

Aus dem Zentrum für Orthopädie und Unfallchirurgie (ZOU)
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Einfluss des Bone Sialoproteins
auf die Isolierung und Differenzierung von Osteoklasten

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Sarah Knopf
aus Sinsheim

Mainz, 2025

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. Hansjörg Schild

Tag der Promotion: 02. September 2025

Nachnutzungslizenz: InC-1.0

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	X
Tabellenverzeichnis	XI
1 Einleitung	1
2 Literaturdiskussion	2
2.1 Anatomie des Knochens.....	2
2.2 Osteoneogenese	4
2.3 Knochenumbau (<i>Bone Remodeling</i>)	6
2.4 Histologie des Knochens	7
2.4.1 Extrazelluläre Matrix des Knochens	7
2.4.2 Knochenzellen.....	8
2.4.3 Osteoklasten	11
2.5 Bone Sialoprotein	24
2.5.1 Aufbau	24
2.5.2 Funktion.....	25
2.6 Ziel dieser Arbeit.....	26
3 Material und Methoden	27
3.1 Material	27
3.1.1 Verbrauchsmaterialien	27
3.1.2 Kits	29
3.1.3 Instrumente und Geräte	30
3.1.4 Software	32
3.1.5 Primer für qPCR.....	32
3.2 Versuchsaufbau.....	34
3.3 Zusammensetzung der Zellkulturmedien	35
3.4 Isolierung und <i>Priming</i> der PBMCs	35
3.4.1 Isolierung der PBMCs mittels Dichtegradientenzentrifugation	35

3.4.2	Zellkultivierung der PBMCs (<i>Priming</i>)	36
3.4.3	Kryopreservation der Zellen	37
3.4.4	Zellsorting	37
3.5	Analyse der PBMCs	38
3.5.1	Durchflusszytometrische Analyse	38
3.5.2	Lebendzellmikroskopie	39
3.6	Differenzierung der OK-Progenitorzellen zu Osteoklasten	40
3.6.1	Zellkultivierung	40
3.7	Analyse der Osteoklastenformation	41
3.7.1	Lebendzellmikroskopie	41
3.7.2	VNR- und Zellkern-Färbung	41
3.7.3	Genexpressionsanalyse mittels qPCR	42
3.8	Analyse der Osteoklastenfunktion	44
3.8.1	TRAP-Aktivität	44
3.8.2	Calcium-Resorptionsassay	45
3.9	Einfluss des BSP auf Isolierung, Differenzierung und Funktion von Osteoklasten	47
3.9.1	Modifizierte Zellkultivierung zur Untersuchung des BSP-Einflusses ...	47
3.9.2	Einfluss des BSP auf Isolation und Differenzierung der PBMCs	48
3.9.3	Analyse der Osteoklastenformation unter Einfluss von BSP	48
3.9.4	Analyse der Osteoklastenfunktion unter Einfluss von BSP	48
3.10	Statistik	49
4	Ergebnisse	50
4.1	Isolierung und Differenzierung der PBMCs zu Osteoklasten	50
4.1.1	Zellsorting	50
4.1.2	Beurteilung der Morphologie	50
4.1.3	Beurteilung der Reinheit der Zellkultur	52
4.1.4	Analyse und Validierung der Osteoklastenformation	52
4.2	Einfluss des BSP auf die Osteoklastogenese	56

4.2.1	Einfluss auf die Isolierung und Differenzierung der PBMCs.....	56
4.2.2	Analyse der Osteoklastenformation unter Einfluss des BSP.....	58
4.2.3	Schlussfolgerungen.....	68
4.3	Einfluss des BSP auf die Osteoklastenfunktion.....	69
4.3.1	Beurteilung der TRAP-Aktivität.....	69
4.3.2	Beurteilung der resorptiven Aktivität der Osteoklasten	71
5	Diskussion	73
5.1	Etablierung, Optimierung und Validierung der <i>in-vitro</i> -Generierung von Osteoklasten aus PBMCs	73
5.2	Einfluss des BSP auf die Osteoklastogenese	77
5.2.1	Einfluss auf die Isolation und Differenzierung der PBMC.....	77
5.2.2	Einfluss auf die Osteoklastenformation	78
5.3	Einfluss des BSP auf die Funktion der Osteoklasten	82
5.3.1	Einfluss auf die TRAP-Aktivität.....	82
5.3.2	Einfluss auf die Resorptionsfähigkeit	85
5.4	Limitationen	87
5.5	Fazit und Ausblick	91
6	Zusammenfassung	92
7	Literaturverzeichnis.....	93
8	Danksagung.....	IV
9	Tabellarischer Lebenslauf.....	V

Abkürzungsverzeichnis

°	Grad
°C	Grad Celsius
%	Prozent
®	Registrierte Marke
AK	Antikörper
ALP	Alkalische Phosphatase
α-MEM	<i>Alpha Minimum Essential Medium</i>
AP-1	Aktivatorprotein-1
APC	Allophycocyanin
APC-A	integrierte Fluoreszenzintensität im APC-Kanal (FACS-Analyse) <i>APC-Area</i>
BACT	β-Actin
Bcl-xL	<i>B-cell lymphoma-extra large</i>
BMP	<i>Bone Morphogenetic Protein</i>
BMU	<i>Basic Multicellular Unit</i>
BSA	Rinderalbumin <i>bovine serum albumin</i>
BSP	Bone Sialoprotein
BZM	Basis-Zellkulturmedium
Ca ²⁺	Calcium-Ion
CD	Immunphänotypisches Oberflächenmerkmal <i>Cluster of differentiation</i>
CD14 ⁺	CD14-positiv
CD14 ⁻	CD14-negativ

cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure <i>complementary deoxyribonucleic acid</i>
c-Fms	Kolonie-stimulierender Faktor 1-Rezeptor <i>Colony Stimulating Factor 1 Receptor</i>
CFU	Kolonie-bildende Einheit <i>Colony-Forming Unit</i>
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratcentimeter
Cl ⁻	Chlorid-Ion
ClC-7	<i>Chloride Channel 7</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CTR	Calcitonin-Rezeptor
D/d	Tag <i>day</i>
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMP-1	Dentin-Matrixprotein 1
DNA	Desoxyribonukleinsäure <i>deoxyribonucleic acid</i>
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DSPP	Dentin-Sialophosphoprotein
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMP	erythromyeloischer Progenitor
ERK	<i>Extracellular-signal Regulated Kinases</i>

EtOH	Ethanol
EZM	extrazelluläre Matrix
FACS	Technik der Durchflusszytometrie <i>Fluorescence-activated Cell Sorting</i>
FCS	Fetales Kälberserum <i>fetal calf serum</i>
FSC	Vorwärtsstreulicht <i>Forward Scatter</i>
FSC-A	integrierte Lichtstreuintensität im Vorwärtsstreulicht-Kanal <i>FSC-Area</i>
fw	<i>forward</i>
g	Gramm
h	Stunde(n)
H ₂ O	Wasser
HA	Hydroxylapatit
HCO ₃ ⁻	Hydrogencarbonat
HSC	hämatopoetische Stammzelle <i>hematopoietic stem cell</i>
Ig	Immunglobulin
IGF-1	<i>Insulin-like Growth Factor-1</i>
IL	Interleukin
IQR	Interquartilsabstand
JNK	c-Jun-N-terminale Kinase(n)
l	Liter
MACS	Magnetisch aktiviertes Zellsorting

	<i>Magnetic activated cell sorting</i>
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase <i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
(h)M-CSF	(humaner) Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor <i>(human) Macrophage Colony Stimulating Factor</i>
MEPE	<i>Matrix Extracellular Phosphoglycoprotein</i>
mg	Milligramm
min	Minute(n)
MITF	Metall-Response-Element-bindender Transkriptionsfaktor
mL	Milliliter
mM	Millimolar
MMP	Matrix-Metalloproteinase
NCP	nicht-kollagenes Protein
NFATc1	<i>Nuclear Factor of Activated T-cells, cytoplasmatic 1</i>
NF-κB	<i>Nuclear Factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OK	Osteoklast
OKM	Osteoklasten-Medium
OPG	Osteoprotegerin
OPN	Osteopontin
OPZ	Osteoprogenitorzellen
OSX	Osterix
p	p-Wert
PBMC	Mononukleäre Zelle des peripheren Blutes

	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung <i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion <i>polymerase chain reaction</i>
PDGF	<i>Platelet-Derived Growth Factor</i>
PFA	Paraformaldehyd
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKB/Akt	Protein Kinase B
PS	Penicillin/Streptomycin
PTH	Parathormon
PTHrP	Parathormon-verwandtes Peptid <i>Parathyroid hormone-related peptide</i>
qPCR	Quantitative Polymerasekettenreaktion <i>quantitative polymerase chain reaction</i>
RANK	Rezeptor-Aktivator des NF- κ B
RANKL	Rezeptor-Aktivator des NF- κ B-Liganden <i>Receptor Activator for NF-κB-Ligand</i>
RGD	Arginin-Glycin-Aspartat, Aminosäuren
RNA	Ribonukleinsäure <i>ribonucleic acid</i>
RNase	Ribonuklease
RT	Reverse Transkriptase
Runx2	<i>Runt-related transcription factor 2</i>
rv	<i>reverse</i>

s	Sekunde(n)
SD	Standardabweichung
SIBLING	<i>Small Integrin-Binding Ligand N-linked Glycoproteins</i>
SSC	Seitwärtsstreulicht <i>side scatter</i>
(c)-Src	(zelluläre Form der) Tyrosinkinase Src <i>(Cellular) Sarcoma</i>
TNF (- α)	Tumor-Nekrose-Faktor (- α)
TGF- β	Transformierender Wachstumsfaktor- β <i>Transforming Growth Factor-β</i>
™	Schutzmarke <i>trademark</i>
TRAF	TNF-Rezeptor-assoziiertes Faktor
TRAP	Tartrat-resistente saure Phosphatase <i>Tartrate-resistant Acid Phosphatase</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VNR	Vitronectin-Rezeptor (Integrin $\alpha_v\beta_3$)
x g	Relative Zentrifugalkraft als Vielfaches (x) der Erdbeschleunigung (g)
μ g	Mikrogramm
μ L	Mikroliter

In der vorliegenden Arbeit wurden Fremdwörter weitestgehend durch deutsche Fachbegriffe ersetzt. In Fällen, in denen die Verwendung fremdsprachlicher Ausdrücke aus fachlichen Gründen unverzichtbar erschien oder sich die Begriffe im internationalen wissenschaftlichen Diskurs etabliert haben, wurden diese durch Kursivschrift gekennzeichnet. Abkürzungen, die im Duden als allgemein gebräuchlich verzeichnet sind, werden ohne gesonderte Erläuterung verwendet.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Lamellenknochens mit Compacta und Spongiosa.....	4
Abbildung 2: Differenzierung von Osteoklasten.....	12
Abbildung 3: Zentrale Signalwege und Faktoren bei der Osteoklastogenese.....	16
Abbildung 4: Mechanismen der Knochenresorption durch Osteoklasten.....	19
Abbildung 5: Tertiärstruktur des BSP-Moleküls.....	25
Abbildung 6: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus.....	34
Abbildung 7: Dichtegradientenzentrifugation zur Isolierung von PBMCs.....	36
Abbildung 8: Zählkammer.....	40
Abbildung 9: Schematische Darstellung der verschiedenen Subgruppen zur Evaluation des Einflusses von BSP.....	48
Abbildung 10: Lichtmikroskopische Aufnahmen der PBMC-Kulturen unter Einfluss von M-CSF.....	51
Abbildung 11: Ergebnisse der FACS-Analyse zur Bestimmung der CD14-Expression von PBMCs.....	52
Abbildung 12: Lichtmikroskopische Aufnahmen der Zellkulturen unter Einfluss von M-CSF sowie M-CSF und RANKL.....	54
Abbildung 13: Immunfluoreszenzfärbung des VNR und Zellkernfärbung mittels Hoechst.....	55
Abbildung 14: Lichtmikroskopische Aufnahmen der PBMC-Kulturen unter dem Einfluss von BSP allein sowie M-CSF und BSP.....	56
Abbildung 15: Ergebnisse der FACS-Analyse zur Bestimmung der CD14-Expression von PBMCs unter Einfluss von BSP.....	58
Abbildung 16: Lichtmikroskopische Aufnahmen der verschiedenen Zellkulturen im zeitlichen Verlauf.....	61
Abbildung 17: Immunfluoreszenzfärbung des VNR und Zellkernfärbung mittels Hoechst der verschiedenen Subgruppen.....	62
Abbildung 18: Relative Genexpression von NFATc1, Cathepsin K, MMP 9 und TRAP.....	64
Abbildung 19: Relative Genexpression von ITGAV-1, ITGAV-2 und Calcitonin-Rezeptor.....	65
Abbildung 20: Qualitative TRAP-Analyse.....	69
Abbildung 21: Quantitative Analyse der TRAP-Aktivität.....	70
Abbildung 22: Ergebnisse des Calcium-Resorptionsassays.....	72

Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Verbrauchsmaterialien.</i>	27
<i>Tabelle 2: Kits.</i>	29
<i>Tabelle 3: Instrumente und Geräte.</i>	30
<i>Tabelle 4: Software.</i>	32
<i>Tabelle 5: Primer für qPCR.</i>	32
<i>Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Antikörper (AK) und Färbungen sowie deren Konzentration und Funktion.</i>	42

1 Einleitung

Knochengewebe unterliegt einem lebenslangen Umbauprozess (*Bone Remodeling*), der eine Balance zwischen Knochenaufbau durch Osteoblasten und -abbau durch Osteoklasten erfordert. Diese Dynamik ermöglicht eine kontinuierliche Anpassung des Skeletts an mechanische Belastungen, metabolische Anforderungen und Reparaturprozesse (Sorensen et al., 2007).

Osteoklasten sind große, multinukleäre Zellen, die unter dem Einfluss der Schlüsselzytokine M-CSF und RANKL aus myeloischen Vorläuferzellen entstehen (Hsu et al., 1999, Kong et al., 1999, Suda et al., 1999, Boyle et al., 2003, Bar-Shavit, 2007). Während die Rolle dieser Zytokine in der Osteoklastogenese und dem Prozess des *Bone Remodelings* gut charakterisiert ist, rücken zunehmend die Bestandteile der extrazellulären Knochenmatrix neben ihrer strukturellen Stützfunktion als aktive Modulatoren des Knochenumbaus in den Fokus.

In diesem Kontext ist das Bone Sialoprotein (BSP) zu nennen, das über seine charakteristische RGD-Sequenz an Integrin-Rezeptoren bindet und so Zelladhäsion, Differenzierung und Signaltransduktion reguliert (Ross et al., 1993, Fisher and Fedarko, 2003). Während BSP primär für seine zentrale Rolle bei der Initiierung der Knochenmineralisation bekannt ist, deuten einige Studien darüber hinaus auf eine komplexe Beteiligung des BSPs an der Regulation der Osteoklastogenese und Knochenresorption hin (Asagiri and Takayanagi, 2007, Valverde et al., 2008, Jiang et al., 2023). Bislang bleiben die molekularen Mechanismen, zeitlichen Abhängigkeiten und die funktionellen Auswirkungen von BSP auf die Osteoklastogenese aufgrund limitierter Datenlage unzureichend verstanden.

Vor diesem Hintergrund zielte die vorliegende Dissertation darauf ab, die spezifischen Effekte von BSP auf die Differenzierung, Aktivierung und Funktion humaner Osteoklasten systematisch zu untersuchen. Im Fokus stand dabei die Interaktion zwischen BSP und RANKL in verschiedenen Differenzierungsphasen, Effekte des BSPs auf die Expression von osteoklastentypischen Markern und Genen sowie auf die Funktion der aus PBMCs generierten Osteoklasten.

2 Literaturdiskussion

Knochengewebe ist ein hochspezialisiertes, mineralisiertes Bindegewebe, das durch seine außergewöhnliche Stabilität und Festigkeit charakterisiert ist, jedoch nur eine geringe Elastizität aufweist (Welsch, 2014). Es bildet einen wesentlichen Bestandteil des passiven Bewegungsapparates und erfüllt eine Vielzahl essenzieller Funktionen im menschlichen Körper. Zum einen dient es als strukturelle Stütze des Organismus und schützt wichtige Organe wie das ZNS sowie die Organe des Brust- und Beckenraumes. Zum anderen stellt es Ursprung und Ansatzpunkt für Muskeln, Sehnen und Bänder dar und ermöglicht dadurch gezielte aktive Bewegungen (Clarke, 2008). Darüber hinaus übernimmt Knochengewebe eine bedeutende metabolische Rolle als größtes Calciumreservoir des Körpers. Es trägt wesentlich zur Aufrechterhaltung der Calcium-Phosphat-Homöostase bei, die durch ein dynamisches Gleichgewicht von Knochenaufbau und -abbau reguliert wird. Diese Prozesse werden durch eine Vielzahl von Faktoren gesteuert, darunter Zytokine, Hormone wie Calcitonin sowie mechanische Belastungen (Moreira et al., 2000). Das Zusammenspiel dieser regulatorischen Einflüsse gewährleistet nicht nur die strukturelle Integrität des Knochens, sondern auch seine Anpassung an wechselnde Anforderungen. Die vielfältigen Funktionen des Knochens werden durch seinen spezifischen Aufbau ermöglicht. Knochengewebe besteht aus einer organischen Matrix, die hauptsächlich aus Kollagen Typ I besteht, sowie einer anorganischen Komponente, die überwiegend aus Hydroxylapatit-Kristallen zusammengesetzt ist. Zudem spielen verschiedene Zelltypen – darunter Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten – eine zentrale Rolle bei der kontinuierlichen Erneuerung und Anpassung des Knochens durch den Prozess des Knochenumbaus (*Bone Remodeling*).

2.1 Anatomie des Knochens

Es werden vier verschiedene Typen von Knochen unterschieden: Röhrenknochen (*Ossa longa*), kurze Knochen (*Ossa brevia*), platte Knochen (*Ossa plana*) und sogenannte unregelmäßige Knochen (*Ossa irregularia*), die keiner der genannten Formen entsprechen. Zu den kurzen Knochen zählen beispielsweise Hand- und Fußwurzelknochen, zu den platten Scapula und Sternum, während zu den letztgenannten die Wirbelkörper gehören (Clarke, 2008).

Röhrenknochen gliedern sich in einen langen Knochenschaft (Diaphyse), der durch zwei Enden, den Epiphysen begrenzt wird. Diese werden jeweils durch eine Übergangszone (Metaphyse) mit der Diaphyse verbunden, wobei Epiphyse und Metaphyse während des Längenwachstums durch eine hyaline Knorpelschicht, die sogenannte Wachstums- oder Epiphysenfuge, voneinander getrennt werden. Mit Abschluss des Skelettwachstums ossifiziert diese vollständig. Die Diaphyse besteht hauptsächlich aus dichtem kortikalem Knochen und beinhaltet die Markhöhle mit fetthaltigem Knochenmark. Epiphyse und Metaphyse hingegen bestehen überwiegend aus spongiösem Knochen, dessen Trabekel parallel zur größten biomechanischen Beanspruchung ausgerichtet sind. Die äußere Knochenoberfläche wird vom blut-, nerven- und lymphgefäßreichem Periost umhüllt, während das Endost die innere Knochenoberfläche auskleidet. Beide Schichten enthalten osteogene Zellen und sind von relevanter Bedeutung bei der Frakturheilung (Moreira et al., 2000, Clarke, 2008, Welsch, 2014, Schünke et al., 2018).

Das adulte menschliche Skelett ist zu etwa 80 % aus kortikalem und zu 20 % aus spongiösem Knochen aufgebaut. Kortikaler bzw. kompakter Knochen (*Substantia corticalis* bzw. *compacta*) bildet die äußere, schützende Schicht eines Röhrenknochens und ist zu etwa 85 % mineralisiert, was ihm besondere Festigkeit und Stabilität verleiht. Dagegen ist spongiöser bzw. trabekulärer Knochen (*Substantia spongiosa*) netzartig aufgebaut und nur bis zu 25 % mineralisiert (Moreira et al., 2000). Zwischen den Trabekeln findet sich das blutbildende (hämatopoetische) Knochenmark, das für die Blutbildung und Nährstoffversorgung der Zellen zuständig ist. Beide Knochenarten stellen Erscheinungsformen des reifen, adulten Lamellenknochens dar, dessen Kollagenfibrillen entlang biomechanischer Druck- und Zugkräfte ausgerichtet sind. Zusammen mit der verkalkten Knochenmatrix bilden sie die Baueinheiten des Lamellenknochens in Form dicker, miteinander verbundener Knochenlamellen. Linsenförmige Aussparungen zwischen den Lamellen, Lakunen bezeichnet, bieten Platz für Osteozyten und werden durch feine, strahlenförmig angeordnete Kanälchen (*Canaliculi*) untereinander verbunden (Moriishi and Komori, 2022). Im spongiösen Knochen verlaufen die Lamellen parallel zur Trabekeloberfläche, während sie im kortikalen Knochen konzentrisch um sogenannte Havers-Kanäle angeordnet sind, die Blut-, Nerven- und Lymphgefäße enthalten (siehe Abbildung 1). Hierbei bilden sie zylindrische Baueinheiten, die als Osteone bezeichnet werden. Volkmann-Kanäle verbinden die Havers-Kanäle untereinander und

gewährleisten so die Nährstoffversorgung auch der Compacta. Sogenannte Generallamellen grenzen den kortikalen Knochen nach außen und innen durch parallel zur Oberfläche verlaufende Lamellen ab (Welsch, 2014).

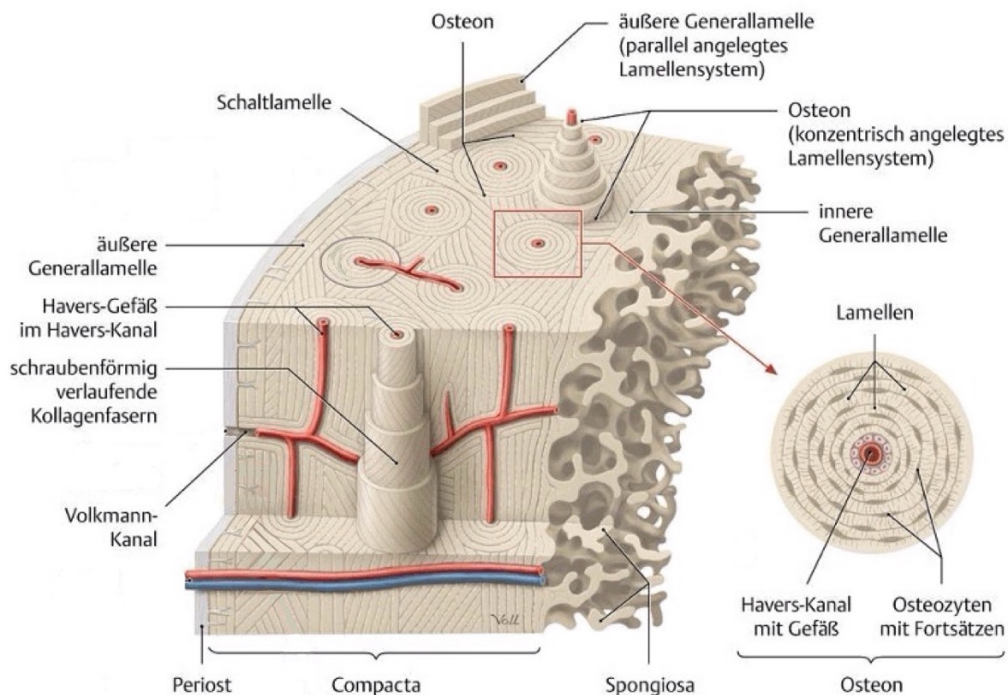


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Lamellenknochens mit Compacta und Spongiosa. Osteone sind Kennzeichen des kompakten Knochens, bestehend aus um den Havers-Kanal konzentrisch angeordneten Lamellen. Abbildung nach Schünke et al. (2018).

2.2 Osteoneogenese

Knochengewebe wird im menschlichen Körper entweder durch desmale oder durch chondrale Ossifikation neugebildet. Beide Prozesse führen zunächst zur Entstehung von unreifem Geflechtknochen, der im weiteren Verlauf sukzessive zu reifem Lamellenknochen umgebaut wird. Im Geflechtknochen liegen die Kollagenfibrillen der Knochenmatrix unstrukturiert vor. Zudem ist die Knochenmatrix weniger mineralisiert, weshalb eine geringere mechanische Festigkeit im Vergleich zum Lamellenknochen resultiert (Clarke, 2008, Weiner et al., 1999).

Die Regulation dieser Prozesse erfolgt über ein komplexes Zusammenspiel von Hormonen, Wachstumsfaktoren und Bestandteilen der extrazellulären Matrix (EZM)

(Clarke, 2008, Mackie et al., 2011). Bei der desmalen Ossifikation, der direkten Knochenbildung, aggregieren mesenchymale Zellen in besonders gut vaskularisierten Regionen des embryonalen Bindegewebes und differenzieren über Osteoprogenitorzellen (OPZ) zu Osteoblasten (Long and Ornitz, 2013, Moreira et al., 2000). Diese synthetisieren das Osteoid, welches anschließend mineralisiert wird. Diese Form der Knochenentstehung ist charakteristisch für Neuro- und Viszerokranium sowie Teilen der Clavicula, und trägt zudem zum subperiostalen Dickenwachstum langer Röhrenknochen bei (Berendsen and Olsen, 2015).

Die chondrale Ossifikation beschreibt hingegen die indirekte Form der Knochenneubildung, bei der zunächst ein hyalines Knorpelmodell entsteht, das später sukzessive durch Knochengewebe ersetzt wird (Mackie et al., 2008). Durch diese Form entsteht der Großteil aller Knochen des menschlichen Skeletts, einschließlich Rumpf, Extremitäten und Schädelbasis. Während der Embryonalentwicklung differenzieren sich mesenchymale Stammzellen zunächst zu Chondroblasten und Chondrozyten, die das sogenannte Primordialskelett formen. Im Verlauf beginnt die Ossifikation mit der Bildung einer perichondralen Knochenmanschette aus OPZ und Chondroblasten um die Diaphyse, gefolgt von Gefäßeinsprossung und Ausbildung eines primären Ossifikationszentrums. Hier differenzieren sich die OPZs zu Osteoblasten, die Osteoid produzieren und mineralisieren, während gleichzeitig das Knorpelgewebe abgebaut wird. Schrittweise expandiert so das primäre Ossifikationszentrum in Richtung der Enden des knorpeligen Modells (Downey and Siegel, 2006, Mackie et al., 2008). Die Ossifikation der Epiphysen erfolgt auf gleiche Weise, ausgehend jeweils von der Bildung eines eigenen, sekundären Ossifikationszentrums. Die Grenze zwischen Epiphyse und Diaphyse bildet die Wachstumsfuge, eine noch verbleibende Knorpelschicht. Diese stellt das Knochenwachstum in Längsrichtung bis zur körperlichen Reife sicher und ossifiziert somit zuletzt, wodurch sich primäre und sekundäre Ossifikationszentren vereinen (Downey and Siegel, 2006).

2.3 Knochenumbau (*Bone Remodeling*)

Um eine kontinuierliche Adaptation des Knochens an wechselnde mechanische Belastungen sicherzustellen, eine Anhäufung von Mikrofrakturen, die durch die Belastungen entstehen, zu verhindern sowie die Calciumhomöostase aufrechtzuerhalten, befindet sich das menschliche Skelett in einem stetigen Auf- und Abbau, dem sogenannten *Bone Remodeling*. Dieser dynamische Prozess findet in abgegrenzten funktionellen Einheiten statt, den sogenannten *Basic Multicellular Units* (BMUs). Eine BMU besteht aus Osteoklasten (OK), Osteoblasten, Osteozyten sowie kapillären Blutgefäßen (Eriksen, 2010). Der Umbauprozess ist streng reguliert, um ein Gleichgewicht zwischen Knochenabbau und -neubildung sicherzustellen, und erfolgt in fünf überlappenden Phasen: Aktivierung, Resorption, Umkehrung, Bildung und Terminierung (Kenkre and Bassett, 2018). Jede Phase ist hierbei durch spezifische zelluläre und molekulare Mechanismen gekennzeichnet.

Die Aktivierungsphase markiert den Beginn des *Remodeling*-Prozesses. Sie wird häufig durch mechanische Belastungen oder Mikroschädigungen der Knochenmatrix ausgelöst. Osteozyten spielen hierbei eine zentrale Rolle als mechanosensitive Zellen (Bonewald, 2011, Nakashima et al., 2011): Infolge von Mikrofrakturen der Knochenmatrix kommt es zur Apoptose von Osteozyten, was zur verstärkten lokalen Rekrutierung von OK- und Osteoblastenvorläuferzellen führt (Tatsumi et al., 2007, Eriksen, 2010, Kenkre and Bassett, 2018). In der Resorptionsphase lösen die OK der BMU das mineralisierte Knochengewebe mittels saurem pH und lysosomalen Enzymen auf (siehe Funktion der Osteoklasten) (Downey and Siegel, 2006). Während sich die OK einer BMU bei kompaktem Knochen tunnelförmig in das Knochengewebe bohren, resorbieren sie spongiösen Knochen entlang der Trabekeloberfläche. Hierzu benötigen sie zwei bis vier Wochen (Eriksen, 2010). Es folgt die vierwöchige Umkehrphase, bei der die Knochenresorption durch Apoptose der OK langsam zum Erliegen kommt und stattdessen in die Phase der Knochenneubildung übergeht. Dies wird durch die Wachstumsfaktoren TGF- β und IGF-1 gesteuert, die durch den Abbau der Knochenmatrix freigesetzt werden und die Differenzierung mesenchymaler Stammzellen zu Osteoblasten fördern (Matsuo and Irie, 2008, Siddiqui and Partridge, 2016). Reife Osteoblasten lagern sich an die Knochenoberfläche an und beginnen mit der Synthese von Osteoid – einer nicht-mineralisierten Kollagenmatrix. Dies stellt die Knochenbildungsphase dar (Kenkre and Bassett, 2018). Die gebildete Matrix wird sukzessive mineralisiert, indem sich Hydroxylapatit-Kristalle einlagern. Nach etwa drei

Monaten ist die Mineralisierung abgeschlossen und die Terminierungsphase setzt ein: die Osteoblasten gehen apoptotisch zugrunde, werden zu Knochensaumzellen oder Osteozyten (Moreira et al., 2000, Segovia-Silvestre et al., 2009). Letztere exprimieren Inhibitoren des Wnt-Signalweges wie Sclerostin, welche die Knochenneubildung hemmen und somit das Ende des *Remodeling*-Zyklus einleiten (Kenkre and Bassett, 2018, Salhotra et al., 2020).

Knochenaufbau und -abbau werden maßgeblich durch mechanische Beanspruchung beeinflusst (Turner et al., 2009). Erhöhter mechanischer Stress führt zu einem verstärkten Aufbau von Knochenmasse durch Aktivierung osteoanaboler Signalwege wie der kanonische Wnt/ β -Catenin-Signalweg (Caetano-Lopes et al., 2007). Dieser Signalweg fördert sowohl die Proliferation als auch die Differenzierung von Osteoblasten und trägt damit entscheidend zur Knochenneubildung bei. Gleichzeitig spielt er eine wichtige Rolle bei der Hemmung der OK-Aktivität, indem er die Synthese von Osteoprotegerin (OPG) stimuliert (siehe Regulation der Osteoklastogenese) (Glass et al., 2005, Baron and Kneissel, 2013). Im Gegensatz dazu resultiert eine verminderte Belastung in einem Überwiegen des Knochenabbaus durch gesteigerte osteoklastäre Aktivität (Ono and Nakashima, 2018). Dieser Mechanismus gewährleistet eine kontinuierliche Anpassung des Skeletts an veränderte physikalische Anforderungen.

2.4 Histologie des Knochens

2.4.1 Extrazelluläre Matrix des Knochens

Die spezifischen Eigenschaften von Knochengewebe beruhen auf der Zusammensetzung der Knochenmatrix, die die Grundsubstanz des Knochens darstellt. Sie setzt sich zu 30 % aus organischen und zu 45 % aus anorganischen Bestandteilen sowie zu 25 % aus Wasser zusammen. Die nicht-mineralisierte Form der Knochenmatrix, die ausschließlich organische Komponenten beinhaltet, wird als Osteoid bezeichnet. Die organische Komponente besteht überwiegend aus Kollagen-Typ-1-Fasern (90 %). Ergänzend hierzu enthält das Osteoid nicht-kollagene Proteine (NCPs), zu denen γ -Carboxyglutamat-haltige Proteine, Proteoglykane, Glykoproteine und SIBLING-Proteine (*Small Integrin-Binding Ligand N-linked Glycoproteins*) zählen (Stanford and Keller, 1991, Florencio-Silva et al., 2015). Ein Großteil dieser Proteine

werden von Osteoblasten synthetisiert, während andere aus dem Blutplasma stammen (Moreira et al., 2000). Obwohl die Funktionen vieler NCPs noch nicht vollständig erforscht sind, ist bekannt, dass sie durch Interaktionen untereinander und mit der Knochenmatrix eine zentrale Rolle bei der Knochenmineralisation und der strukturellen Integrität des Knochens spielen (Young, 2003, Stock, 2015).

Der anorganische Bestandteil der Knochenmatrix wird überwiegend von Hydroxylapatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) gebildet, einem hydroxyliertem Calciumphosphatsalz. Hydroxylapatit (HA) macht ca. 65 % der gesamten Knochenmasse aus, wodurch Knochen als Calcium-Hauptreservoir des menschlichen Körpers dient und eine entscheidende Rolle in der Calcium-Homöostase spielt (Florencio-Silva et al., 2015). Die HA-Kristalle entstehen in Vesikeln, welche sich von Zellfortsätzen der Osteoblasten abschnüren. Während der Knochenmineralisierung lagern sich dann die HA-Kristalle unter dem Einfluss verschiedener Signalmoleküle sowie NCPs longitudinal an die Kollagenfibrillen an (Hunter and Goldberg, 1993, Clarke, 2008, Welsch, 2014).

Während die HA-Kristalle für die hohe Druckfestigkeit verantwortlich sind, verleihen die elastischen Kollagenfasern dem Knochen Zugfestigkeit und eine gewisse Flexibilität (Clarke, 2008, Welsch, 2014).

2.4.2 Knochenzellen

Das Knochengewebe enthält verschiedene Zelltypen, die für den Knochenstoffwechsel essenziell sind: Osteoprogenitorzellen (OPZ), Osteoblasten, Knochenaumzellen (*bone lining cells*) und Osteozyten, welche verschiedene Phasen eines Zelltyps darstellen, sowie Osteoklasten (OK) (Downey and Siegel, 2006).

Osteoprogenitorzellen

OPZ entstammen mesenchymalen Stammzellen und sind Vorläuferzellen von Osteoblasten. Sie sind als schmale Zellen im Endost und Periost zu finden und können im Rahmen von Knochenbildung und -heilung aktiviert werden. Unter Einfluss osteoanaboler Signalwege und Zytokine, zu denen der kanonische Wnt/ β -Catenin-Signalweg und knochenmorphogenetische Proteine (BMPs) sowie Parathormon (PTH) und Vitamin D zählen, differenzieren sie zu Osteoblasten (Capulli et al., 2014).

Osteoblasten

Osteoblasten sind knochenbildende kubische Zellen, welche sich epithelartig auf der Oberfläche der Knochenmatrix anordnen. Sie synthetisieren das Osteoid und sind dementsprechend mit reichlich rauem endoplasmatischem Retikulum, vielen freien Ribosomen und prominentem Golgi-Apparat ausgestattet (Florencio-Silva et al., 2015). Ihre Zellmembran ist reich an Alkalischer Phosphatase (ALP), welche wichtig für die Matrixmineralisierung ist. Neben der ALP sind der Transkriptionsfaktor Runx2 sowie Osterix (OSX) typische Osteoblastenmarker. Diese sind essenziell für die Differenzierung der Progenitorzellen zu Osteoblasten und fördern das Ablesen Osteoblasten-bezogener Gene (Capulli et al., 2014, Salhotra et al., 2020).

Als knochenbildende Zellen sind Osteoblasten von essenzieller Bedeutung für die Knochenhomöostase und stehen in engem Austausch mit Osteoklasten und Osteozyten. So produzieren sie neben den organischen Knochenmatrixbestandteilen auch die Zytokine M-CSF (*Macrophage Colony Stimulating Factor*), RANKL (*Receptor Activator for Nuclear Factor kappa B-Ligand*) und OPG, welche auf unterschiedliche Weise Einfluss auf die Osteoklastogenese nehmen. Auch sezernieren sie parakrin weitere proosteoklastogene Faktoren, nämlich Interleukin (IL)-1 β , IL-6 und Tumornekrose-Faktor- α (TNF- α) (Kobayashi et al., 2000). Auf der Zelloberfläche von Osteoblasten befinden sich zudem Rezeptoren für verschiedene Hormone. So kann beispielsweise PTH nach Rezeptorbindung die Sekretion von RANKL und damit die Knochenresorption durch OK-Stimulation initiieren (Kim et al., 2020). Alternde Osteoblasten entwickeln sich schließlich entweder zu Osteozyten, nehmen einen Ruhezustand in Form von Knochensaumzellen ein oder durchlaufen die Apoptose (Jilka et al., 1998). Mit steigendem Lebensalter des Menschen sinkt der Anteil der Osteoblasten an den Zellen, die die Knochenoberfläche bedecken, stark ab (Welsch, 2014).

Osteozyten

Ein Teil der Osteoblasten wird gegen Ende eines Knochenbildungszyklus in die Knochenmatrix eingebaut. Dieser Prozess bringt morphologische Veränderungen der Zellen mit sich, beispielsweise kommt es zur Ausbildung von Zellfortsätzen sowie zur Abnahme der Zellgröße und der Zellorganellen im Zytoplasma, entsprechend einer verminderten Proteinsynthese und -sekretion (Florencio-Silva et al., 2015). Es entstehen die sogenannten Osteozyten. Außerdem werden verschiedene Osteoblastenmarker herunterreguliert und stattdessen Dentin-Matrixprotein 1 (DMP-

1) und Sclerostin exprimiert, die als Osteozytenmarker dienen (Capulli et al., 2014). Während die Zellkörper in die Lakunen der von ihnen zuvor produzierten Knochenmatrix eingebettet sind, liegen die ausgezogenen Zellfortsätze in den Canaliculi und stellen durch *Gap Junctions* eine Verbindung zu benachbarten Osteozyten, aber auch zu Osteoblasten und Knochensaumzellen her (Rocheft et al., 2010). Dieses so entstandene Netzwerk wird als lakunokanalikuläres System bezeichnet.

Lange galten Osteozyten als inaktive Zellen, durch moderne Forschungsmethodik konnten jedoch zuletzt einige für den Knochenumbau relevante Funktionen festgestellt werden (Bonewald, 2011). So wird angenommen, dass Osteozyten als Mechanosensoren dienen, da durch das lakunokanalikuläre System Druckbelastungen registriert werden können. Hierdurch beeinflussen sie die Anpassung des Knochens an die jeweilige mechanische Beanspruchung (Rocheft et al., 2010): Auf mechanische Entlastung folgt die verstärkte Expression von RANKL, was über die Aktivierung von Osteoklasten zur Knochenresorption führt. Bei Belastung kommt es durch die Verringerung der Expression von *Dickkopf-related Protein 1* (DKK1) und Sclerostin zur Aktivierung des kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalweg in Osteoblasten, was die Knochenbildung fördert (Caetano-Lopes et al., 2007, Salhotra et al., 2020). Die genauen Mechanismen, wie beispielsweise mechanische Reize in biochemische Signale umgewandelt werden, sind jedoch weiterhin Gegenstand aktueller Forschungsarbeiten (Florencio-Silva et al., 2015). Darüber hinaus wurde erkannt, dass die Apoptose von Osteozyten als chemotaktisches Signal für die osteoklastische Knochenresorption wirkt (Aguirre et al., 2006, Bellido, 2014). Gleichzeitig gelten Osteozyten inzwischen als einer der Hauptproduzenten von RANKL (Nakashima et al., 2011, Xiong et al., 2015). Durch eine vermehrte Synthese von Sclerostin können Osteozyten über Blockierung des Wnt/ β -Catenin-Signalweg die Differenzierung von Osteoblasten inhibieren (Capulli et al., 2014). Auf diese Weise nehmen Osteozyten sowohl Einfluss auf Knochenbildung und -resorption als auch auf den Calcium-Phosphat-Haushalt (Capulli et al., 2014).

Knochensaumzellen

Am Ende des Knochenbildungszyklus entstehen aus einer Osteoblasten-Subpopulation neben Osteozyten auch Knochensaumzellen, *bone lining cells*. Sie sind ruhende, abgeflachte Zellen, die den inaktiven Knochen umhüllen. Über Zellfortsätze

stehen sie mittels *Gap Junctions* untereinander sowie mit Osteozyten in Kontakt (Miller et al., 1989). Ihre spezifische Funktion ist noch nicht vollständig bekannt, es konnte aber gezeigt werden, dass Knochensaumzellen wieder reaktiviert werden und durch Synthese und Sekretion von OPG und RANKL Einfluss auf den Knochenstoffwechsel nehmen können (Kim et al., 2012, Florencio-Silva et al., 2015).

Osteoklasten

OK sind verantwortlich für den Knochenabbau. Ihre Bildung und Aktivität werden von verschiedenen Faktoren beeinflusst. Da die Arbeit von der Isolierung und Differenzierung der OK handelt, wird ihnen ein separates Kapitel gewidmet (siehe 2.4.3).

2.4.3 Osteoklasten

Osteoklastogenese

OKs sind große, mehr- bis vielkernige Zellen, deren Hauptfunktion die Resorption von Knochengewebe ist. Schon in den 1970er Jahren wurde entdeckt, dass OKs aus hämatopoetischen Stammzellen (HSCs) entstehen, und in den 1980er Jahren gelang es erstmals, OKs *in vitro* aus HSCs herzustellen (Ash et al., 1980, Scheven et al., 1986). Im Laufe der Zeit konnte das Verständnis der Osteoklastogenese durch neuartige Technologien und Methoden sukzessive vertieft werden. So wurde kürzlich ein weiterer Ursprung von OKs aus erythromyeloischen Progenitorzellen (EMPs) entdeckt. Sowohl HSCs als auch EMPs leiten sich vom hämogenen Endothel ab (Gritz and Hirschi, 2016).

EMPs entstehen früh im Embryonalstadium und können sich zu Monozyten bzw. Makrophagen entwickeln, die für die Bildung von Knochenstrukturen und die Schaffung einer Nische für die Hämatopoese im Knochenmark relevant sind (Yahara et al., 2020, Jacome-Galarza et al., 2019). EMP-abgeleitete OKs spielen eine entscheidende Rolle bei der adäquaten Entwicklung des Skeletts, beim Zahndurchbruch und Knochenumbau (Jacome-Galarza et al., 2019, Jiang et al., 2023). Im Laufe der Entwicklung kommt es zu einem sukzessiven Ersatz der EMP-abgeleiteten Vorläuferzellen durch Monozytenvorläuferzellen, die ihren Ursprung in HSCs haben (Wu and Hirschi, 2020).

HSCs spielen eine zentrale Rolle im adulten hämatopoetischen System, indem sie für die langfristige, lebenslange Generierung aller reifen Blutzelllinien verantwortlich sind

(Jiang et al., 2023). HSCs wandern in die fetale Leber und im weiteren Verlauf in das fetale Knochenmark, wo sie sich ansiedeln und bis zum Erwachsenenalter persistieren (Dzierzak and Speck, 2008, Coşkun et al., 2014, Jiang et al., 2023). Chemotaktische Signale initiieren die Wanderung dieser im Knochenmark ansässigen Monozytenvorläuferzellen in den Blutkreislauf, wo sie als *Peripheral Blood Mononuclear Cells* (PBMCs) bezeichnet werden (Costa-Rodrigues et al., 2011). Zu PBMCs werden jedoch noch weitere Zellen gezählt, darunter Lymphozyten. Anschließend folgen die Monozytenvorläuferzellen einem Sphingosin-1-Phosphat-Gradienten in das Knochengewebe. Hier unterliegen sie dann einer Reihe von Differenzierungsschritten (siehe *Abbildung 2*) und es entstehen letztlich reife, funktionell aktive OKs (Ishii et al., 2009).

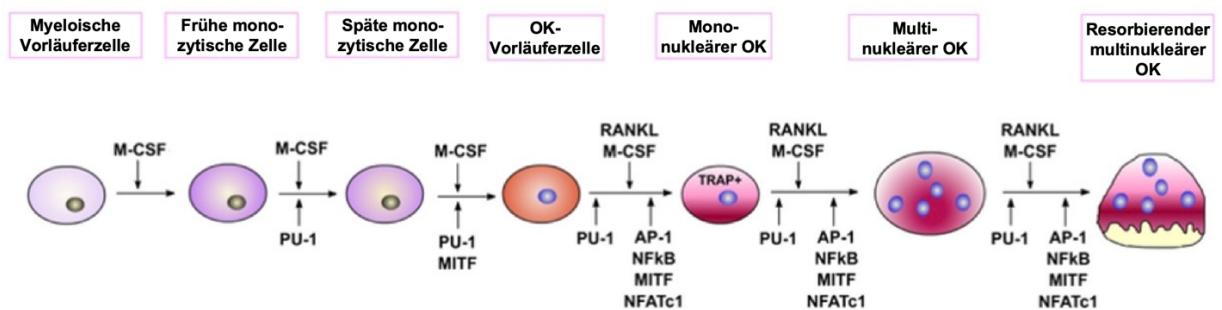


Abbildung 2: Differenzierung von Osteoklasten. Darstellung der Entwicklungsstadien von myeloischen Vorläuferzellen zu resorptiv aktiven, multinukleären Osteoklasten unter Einfluss von M-CSF, RANKL und zentralen Transkriptionsfaktoren wie PU.1 und NFATc1. Abbildung modifiziert nach Soltanoff et al. (2009).

Schlüsselfaktoren und intrazelluläre Signalkaskaden bei der Osteoklastogenese

Die Differenzierung mononukleärer Vorläuferzellen zu reifen, multinukleären OKs sowie deren Aktivität und Überleben sind durch äußerst komplexe und vielfältige Mechanismen reguliert, welche bis dato noch nicht vollständig verstanden sind. Einige der verschiedenen Signalkaskaden, Transkriptionsfaktoren und Zytokine konnten jedoch identifiziert werden (Tong et al., 2022).

Als die beiden Hauptmediatoren für Osteoklastendifferenzierung, -aktivierung und -überleben stellten sich die Wachstumsfaktoren M-CSF und RANKL in verschiedenen Studien der 1990er Jahre heraus (Wiktor-Jedrzejczak et al., 1990, Yoshida et al., 1990, Arai et al., 1999, Dougall et al., 1999, Takayanagi, 2021).

M-CSF wird von verschiedenen Zelltypen wie Osteoblasten, Makrophagen und Stromazellen synthetisiert und bindet an seinen spezifischen Rezeptor c-Fms, der auf der Zellmembran myeloischer Stammzellen exprimiert wird (Soltanoff et al., 2009). Die Aktivierung von c-Fms durch M-CSF führt intrazellulär zur Autophosphorylierung des Rezeptors und zur Rekrutierung von Adapterproteinen sowie zytoplasmatischen Kinasen, einschließlich der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) (Cappellen et al., 2002). Dies wiederum aktiviert verschiedene nachgeschaltete Signalkaskaden und Transkriptionsfaktoren wie beispielsweise PU.1 und c-Fos. Beide Faktoren sind essenziell für die frühen Entwicklungsstadien der myeloischen Stammzellen über PBMCs hin zu OK-Progenitorzellen (Felix et al., 1990, Yoshida et al., 1990, McDonald et al., 2021). So führte die Inaktivierung des PU.1-Gens in Mäusen zu einem Fehlen von Makrophagen und OKs, wodurch es durch fehlende Knochenresorption zur pathologischen Anhäufung von Knochenmatrix und somit dem Krankheitsbild der Osteopetrose kam (McKercher et al., 1996, Tondravi et al., 1997). PU-1 reguliert nicht nur die Expression von c-Fms und RANK, dem Rezeptor von RANKL, sowie weiterer Komponenten des RANK/RANKL/NF- κ B-Signalwegs (Cappellen et al., 2002, Boyle et al., 2003), sondern steuert auch in Zusammenspiel mit c-Fos und NFATc1 (*Nuclear Factor of Activated T-cells, cytoplasmatic 1*) die Transkription wichtiger osteoklastenspezifischer Proteine, darunter Cathepsin K, tartratresistente saure Phosphatase (TRAP) und Integrin $\alpha_v\beta_3$, die essenziell für die Funktion reifer OKs bei der Knochenresorption sind (Tondravi et al., 1997, Matsumoto et al., 2004, Kwon et al., 2005, Zhao et al., 2007).

Darüber hinaus wirkt M-CSF direkt als Überlebensfaktor für osteoklastische Vorläuferzellen, indem es apoptotische Prozesse hemmt. Dies geschieht über die Induktion von Bcl-xL, einem antiapoptotischen Protein, das die Aktivität von Caspase-9 inhibiert und somit den programmierten Zelltod verhindert (Woo et al., 2002).

RANKL ist ein Transmembranprotein, das zur TNF- α -Superfamilie gehört und von Osteozyten, Osteoblasten, Chondroblasten und Stromazellen des Knochenmarks sowie aktivierten T-Zellen synthetisiert und sezerniert wird (Takayanagi, 2007, Nakashima et al., 2011, Lacey et al., 1998). Die Bindung von RANKL an den Rezeptor RANK auf der Oberfläche von OK-Progenitorzellen löst eine komplexe intrazelluläre Signaltransduktion aus (Zhao et al., 2007, Suda et al., 1999). Dabei werden TNF-Rezeptor-assoziierte Faktoren (TRAFs), insbesondere TRAF-6, rekrutiert, welche dann an die zytoplasmatische Domäne von RANK binden (siehe Abbildung 3) (Boyce,

2013). Dies führt zur Aktivierung zahlreicher nachgeschalteter Signalwege, darunter den NF- κ B-Signalweg, die Mitogen-aktivierte Proteinkinase-(MAPK)-Kaskade, den Src-Signalweg sowie die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie c-Fos, NFATc1 und AP-1 (Wong et al., 1998, Boyle et al., 2003, Zhao et al., 2007, Lomaga et al., 1999, Takayanagi, 2021).

Ein zentraler Bestandteil der RANKL-vermittelten Signaltransduktion ist der NF- κ B-Signalweg (siehe Abbildung 3, rosa Signalkaskade). NF- κ B besteht aus dimeren Molekülen aus insgesamt fünf verschiedenen Untereinheiten: NF- κ B1 (p50), NF- κ B2 (p52), RelA, RelB und c-Rel (Jimi and Ghosh, 2005). Insbesondere die Untereinheiten NF- κ B1 und NF- κ B2 haben eine essenzielle Bedeutung für die Osteoklastogenese, wie Studien an Mäusen mit einer Deletion eben dieser beiden Untereinheiten belegen konnten. Die betroffenen Mäuse wiesen einen osteopetrotischen Phänotyp mit vollständigem Fehlen reifer OK auf (Franzoso et al., 1997, Xing et al., 2002). Anderen Untereinheiten konnte bisher noch keine spezifische Funktion im Rahmen der OK-Differenzierung nachgewiesen werden. Im ruhenden Zustand liegt NF- κ B im Zytosol vor, nach Aktivierung migriert es in den Zellkern und dockt an die κ B-Bindungsstellen in Promoterregionen spezifischer Gene an, wie c-Fos und NFATc1, wodurch deren Transkription stimuliert wird (Soltanoff et al., 2009).

Die MAPK-Signalkaskade stellt einen weiteren relevanten Signalweg in der Osteoklastogenese dar (siehe Abbildung 3, grüne Signalkaskaden). Sie induziert die Expression von Proteinen der Jun-Familie (insbesondere c-Jun) sowie der Fos-Familie (vor allem c-Fos) (Ono and Nakashima, 2018). Durch Dimerisierung von c-Jun und c-Fos entsteht das Protein AP-1 (Ikeda et al., 2004, Okamoto et al., 2017). Zusammen mit NF- κ B und weiteren Faktoren formt AP-1 einen Transkriptionsfaktorkomplex, der an die Promoterregion des NFATc1-Gens bindet und dessen Transkription induziert (Asagiri et al., 2005, Matsuo et al., 2004, Ono and Nakashima, 2018). Die Synthese von NFATc1 wird zusätzlich durch einen Autoamplifikationsmechanismus verstärkt, der durch intrazelluläre Calciumoszillationen zur Calcineurin-vermittelten Dephosphorylierung des initial hyperphosphorylierten NFATc1 ausgelöst wird (Takayanagi et al., 2002, Asagiri and Takayanagi, 2007, Zhao et al., 2010).

NFATc1 gilt als Schlüsselfaktor der terminalen Osteoklastendifferenzierung (Takayanagi et al., 2002, Ono and Nakashima, 2018). Dies wurde durch experimentelle Studien belegt: In Abwesenheit von NFATc1 entwickelten sich embryonale Stammzellen trotz RANKL-Stimulation nicht zu OKs. Dagegen bewirkte eine ektopische Expression von NFATc1 eine effiziente OK-Differenzierung, selbst

ohne Zugabe von RANKL (Crabtree and Olson, 2002, Takayanagi et al., 2002). NFATc1 spielt zum einen eine zentrale Rolle bei der Fusion mononukleärer Vorläuferzellen zu reifen, multinukleären OKs. Dieser Prozess wird unter anderem durch das Integrin $\alpha_v\beta_3$ vermittelt, das die Adhäsion der OK-Vorläuferzellen aneinander vor der Membranfusion ermöglicht (Miyamoto et al., 2012, Hobolt-Pedersen et al., 2014, Feng and Teitelbaum, 2013, Jiang et al., 2023, Miyamoto, 2011). Zum anderen aktiviert NFATc1 nach seiner nukleären Translokation in Kooperation mit PU.1, NF- κ B, c-Fos, c-Jun und MITF osteoklastenspezifische Gene wie Cathepsin K, TRAP, den Calcitonin-Rezeptor und $\alpha_v\beta_3$ -Integrin, welche essenziell für die Funktionalität der OKs sind (Oddie et al., 2000, Crabtree and Olson, 2002, Matsumoto et al., 2004, Matsuo et al., 2004, Kim et al., 2005, Kim et al., 2008).

Darüber hinaus führt der RANKL/RANK-Signalweg über die Bildung eines Komplexes aus TRAF-6 und c-Src zur Aktivierung der anti-apoptotischen PKB/Akt-Kinase, die Osteoklasten vor dem programmierten Zelltod schützt (Wong et al., 1999).

Die beschriebenen Signalkaskaden sind schematisch in Abbildung 3 dargestellt und bieten einen Einblick in die komplexen intrazellulären Prozesse, die zur Differenzierung zu funktionsfähigen Osteoklasten erforderlich sind. M-CSF sowie RANKL fungieren hierbei als zentrale Regulatoren der Osteoklastogenese (Nakagawa et al., 1998, Hsu et al., 1999, Udagawa et al., 2021). Dysregulationen innerhalb dieses Systems können zu pathologischen Zuständen wie Osteopetrose oder Osteoporose führen und machen den RANKL/RANK-Signalweg zu einem wichtigen therapeutischen Ziel bei Knochenerkrankungen - so kommt heutzutage beispielsweise der monoklonale RANKL-Antikörper Denosumab zur Antiosteoporosetherapie zum Einsatz (Bekker et al., 2004, Hofbauer and Schoppet, 2004).

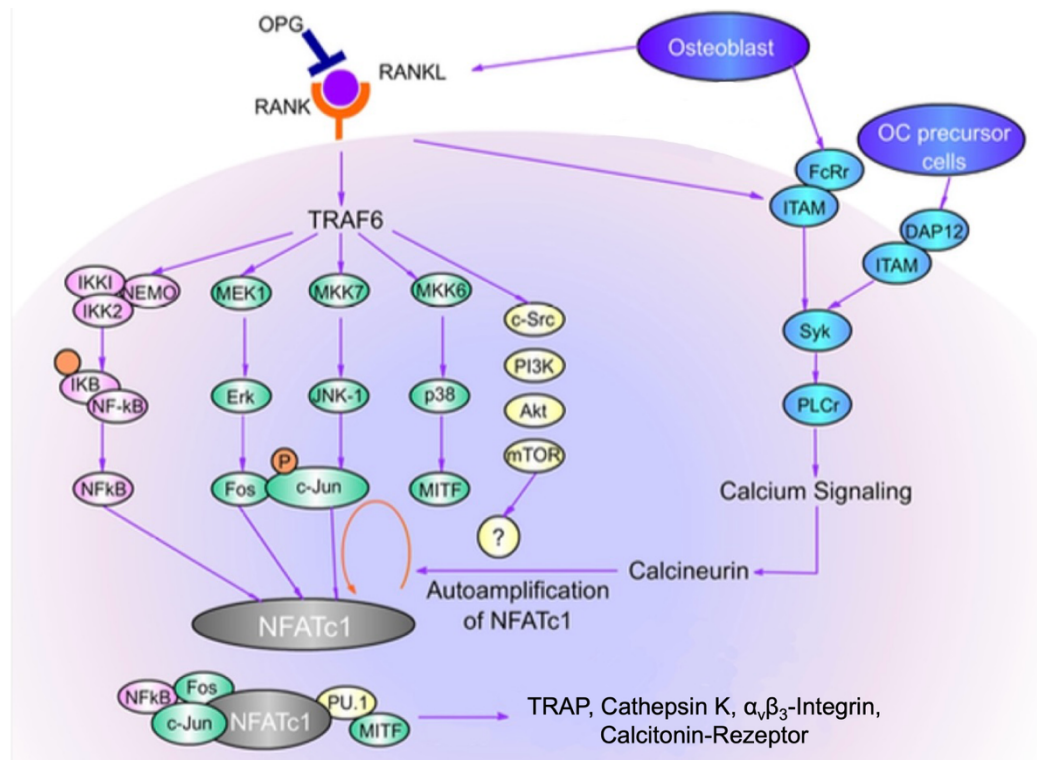


Abbildung 3: Schematische Darstellung der zentralen Signalwege und Faktoren bei der Osteoklastogenese. Die Bindung von RANKL an RANK auf OK-Vorläuferzellen aktiviert über TRAF6 mehrere intrazelluläre Signalkaskaden (rosa: NF-κB, grün: MAPK, gelb: c-Src). Diese führen zur Induktion weiterer Transkriptionsfaktoren wie NF-κB, c-Fos, c-Jun und MITF sowie des Schlüsselregulators NFATc1, die gemeinsam mit PU.1 die Expression osteoklastenspezifischer Gene (z.B. TRAP, Cathepsin K, Integrin $\alpha_v\beta_3$) fördern. Über Steigerung der intrazellulären Calciumkonzentration kommt es durch einen Autoamplifikationsmechanismus zusätzlich zu einer vermehrten Synthese von NFATc1. Abbildung modifiziert nach Zhao et al. (2007).

Regulation der Osteoklastogenese

Neben der Identifikation des RANKL/RANK-Signalweges hat die Entdeckung von OPG zu einem enormen Fortschritt hinsichtlich des Verständnisses der molekularen Regulationsmechanismen der Osteoklastogenese geführt (Boyce and Xing, 2008, Bar-Shavit, 2007). OPG ist ein sogenannter Decoy-Rezeptor, welcher von Osteoblasten und Osteozyten synthetisiert wird (Udagawa et al., 2000, Tong et al., 2022). OPG kann RANKL kompetitiv binden und somit die RANKL/RANK-Interaktion verhindern (Simonet et al., 1997, Yasuda et al., 1998). Dies führt konsekutiv zur Einschränkung der Knochenresorption durch Inhibierung der Osteoklastogenese und somit zu einem

reduzierten Knochenabbau bzw. -umbau (Lacey et al., 1998, Kapasa et al., 2017). Die Expression von OPG wird beispielsweise durch Östrogene, Calcitonin, BMP2, PDGF sowie den Wnt/ β -Catenin-Signalweg gesteigert (Glass et al., 2005, Boyce and Xing, 2008, Takai et al., 1998, Moreira et al., 2000, Florencio-Silva et al., 2015, Baron and Kneissel, 2013). Stattdessen bewirkt ein Ungleichgewicht von RANKL zu OPG zu Gunsten von RANKL eine vermehrte Osteoklastogenese, was in einer schweren Form der Osteoporose resultiert (Bucay et al., 1998). So führen unter anderem 1,25-Dihydroxycholecalciferol bzw. Calcitriol, PTH, das PTH-verwandte Peptid (PTHrP), IL-1, IL-6, TNF und Glukokortikoide zur Steigerung der RANKL-Expression (Hofbauer and Heufelder, 2001, Florencio-Silva et al., 2015, Karsenty and Wagner, 2002, Kitazawa et al., 2003, Kudo et al., 2003). Das RANKL/OPG-Verhältnis ist somit entscheidend in Hinblick auf die Knochenhomöostase.

Funktion der Osteoklasten

Werden reife Osteoklasten durch RANKL aktiviert, so heften sie sich mittels $\alpha_v\beta_3$ -Integrin an Matrixkomponenten des Knochens (siehe Abbildung 4). Anschließend kommt es über Aktivierung der Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase c-Src zur Polarisierung der Zelle durch Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts (Soriano et al., 1991, Izawa et al., 2012). Hierdurch lassen sich vier Membrandomänen unterscheiden: die sogenannte Versiegelungszone (*sealing zone*), der gekräuselte Rand (*ruffled border*, Kräuselmembran) sowie die basolaterale und sekretorische Domäne. Letztere stehen beide nicht in Kontakt mit der Knochenmatrix (Florencio-Silva et al., 2015).

Durch ringförmige Anordnung von Aktinfilamenten und Adhäsion an Matrixkomponenten, insbesondere durch transmembrane $\alpha_v\beta_3$ -Integrine, entsteht die Versiegelungszone. Diese vermittelt die enge Anhaftung der Osteoklasten an die Knochenmatrix. Hierbei binden $\alpha_v\beta_3$ -Integrine an spezifische RGD (Arginin-Glycin-Aspartat, Aminosäuren) – Sequenzen, welche von bestimmten Knochenmatrixproteinen wie Bone Sialoprotein (BSP), Osteopontin (OPN) und Vitronectin exprimiert werden (Saltel et al., 2004, Moreira et al., 2000, Florencio-Silva et al., 2015).

Die Versiegelungszone umgibt den gekräuselten Rand, eine Zellmembrandomäne aus einem Saum zahlreicher, dicht aneinander liegender, dynamischer Zellmembranfalten (Chellaiah et al., 2000, Teitelbaum, 2000, Akisaka and Yoshida, 2016). Hierdurch entsteht ein isolierter Raum zwischen Zelle und Knochen, in welchem die Knochenresorption stattfindet. Dieser Raum wird als subosteoklastisches

Kompartiment oder *Howship*-Resorptionslakune bezeichnet. Durch die Kräuselung der Zellmembran erhöht sich die Effizienz der Knochenresorption durch Vergrößerung der Resorptionsoberfläche. Mithilfe vakuolärer H⁺-ATPasen und Chlorid-Protonen-Antiporter (*Chloride Channel 7*, ClC-7) in der Kräuselmembran wird in diesem Kompartiment durch Entstehung von Salzsäure ein saures Milieu mit einem pH-Wert von etwa 4,5 erzeugt, welches die HA-Kristalle lysiert und die organischen Matrixbestandteile freilegt (Baron et al., 1985, Silver et al., 1988, Kornak et al., 2001). Die Protonen für die H⁺-ATPasen werden hierbei durch Carboanhydrase Typ II aus Kohlensäure katalysiert. Das dabei entstehende HCO₃⁻ wird aus den Osteoklasten über HCO₃⁻/Cl⁻-Antiporter an der basolateralen Oberfläche ausgeschleust und Cl⁻ gelangt in die Zelle, welches im Anschluss in das subosteoklastische Kompartiment sezerniert werden kann (Ono and Nakashima, 2018). Die organischen Matrixbestandteile und somit vor allem Kollagen Typ 1 werden schließlich durch in das subosteoklastische Kompartiment sezernierte lysosomale Enzyme und Proteine degradiert. Hierzu gehören insbesondere Cathepsin K, TRAP und MMP-9 (Yamaza et al., 1998, Garnero et al., 1998, Delaissé et al., 2003, Ljusberg et al., 2005). Die lysierte Knochenmatrix wird vom OK endozytiert und per Transzytose an der funktionellen sekretorischen Membrandomäne in die Blutzirkulation freigesetzt (Teitelbaum, 2000). Anschließend löst sich der OK von der Oberfläche und wandert zu einer neuen Resorptionsstelle am Knochen. Hier beginnt der Funktionszyklus des OK von Neuem.

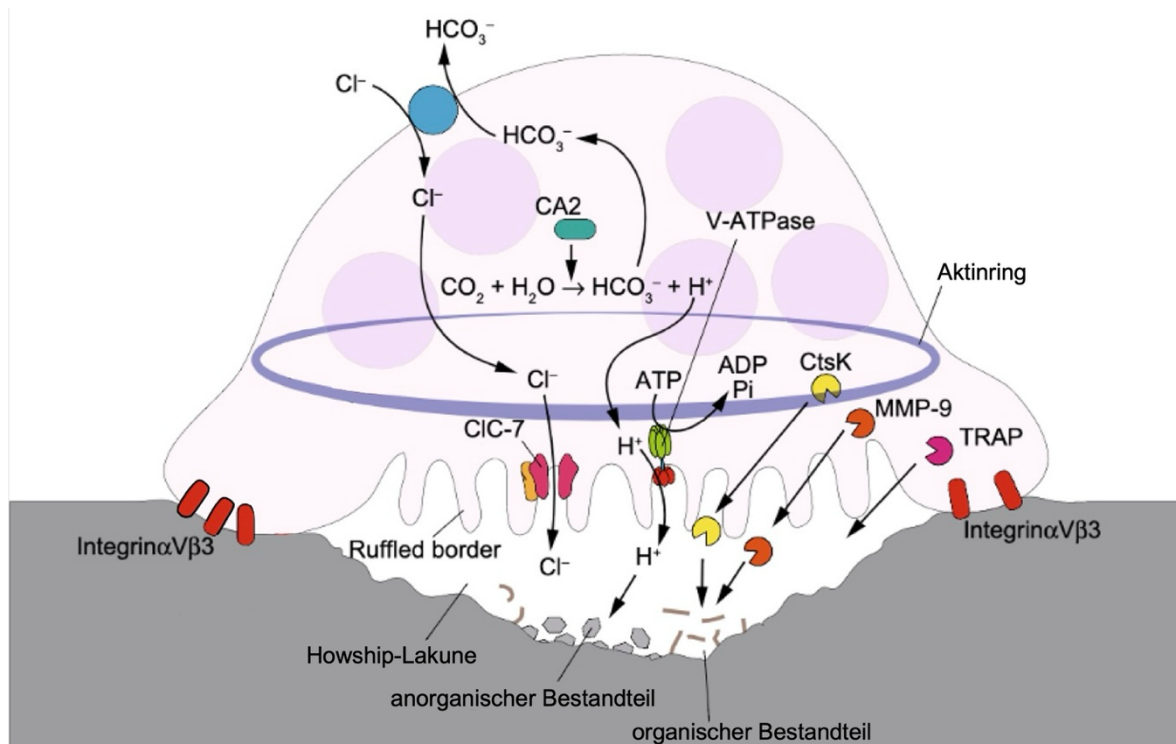


Abbildung 4: Mechanismen der Knochenresorption durch Osteoklasten. Über $\alpha_v\beta_3$ -Integrine an der Zelloberfläche des Osteoklasten erfolgt die Adhäsion an die Knochenmatrix und die Ausbildung der Versiegelungszone (sealing zone). Innerhalb des isolierten Resorptionsraumes (Howship-Lakune) wird durch vakuoläre H^+ -ATPasen und ClC-7-Chloridkanäle in der Kräuselmembran (ruffled border) ein saures Milieu erzeugt. Dieses führt zur Demineralisierung der anorganischen Knochenkomponenten, während die organische Matrix durch sezernierte proteolytische Enzyme wie Cathepsin K (CtsK), Matrix-Metalloproteinase-9 (MMP-9) und Tartrat-resistente saure Phosphatase (TRAP) abgebaut wird. Abbildung modifiziert nach Ono and Nakashima (2018).

Osteoklasten-spezifische Marker

Die Funktion und Aktivität von OKs werden durch eine Vielzahl spezifischer molekularer Marker und Proteine bestimmt. Diese Merkmale sind nicht nur essenziell für die Differenzierung und Funktion reifer OKs, sondern dienen auch als Marker zur Identifizierung von OKs sowie zum Teil als Indikatoren für die osteoklastäre Aktivität (Zhao et al., 2007). Die in dieser Arbeit untersuchten Marker – darunter NFATc1, TRAP, Cathepsin K, MMP-9, $\alpha_v\beta_3$ -Integrin und der Calcitonin-Rezeptor – spielen zentrale Rollen in der Osteoklastogenese und der Knochenresorption. Im Folgenden werden diese Merkmale detailliert erläutert.

NFATc1

NFATc1 ist ein zentraler Transkriptionsfaktor, der als Hauptregulator eine Schlüsselrolle bei der Osteoklastogenese spielt (Ono and Nakashima, 2018). Ursprünglich in T-Zellen identifiziert, gehört NFATc1 zur Familie der NFAT-Transkriptionsfaktoren, die insgesamt fünf Mitglieder umfasst (NFATc1 bis NFATc5) (Zhao et al., 2010). Diese finden sich nicht nur im OK oder Immunsystem, sondern auch in Endothelzellen des Endokards und Skelettmuskelfasern (Jiang et al., 2023). Die Expression von NFATc1 beginnt bereits in frühen Stadien der Osteoklastogenese (Kim and Kim, 2014, Omata et al., 2023). Anschließend fördert NFATc1 die Expression einer Vielzahl osteoklastenspezifischer Gene (wie Cathepsin K, TRAP, Calcitonin-Rezeptor, $\alpha_v\beta_3$ -Integrin), die für Zellfusion, Funktionalität und Knochenresorption essenziell sind (Takayanagi, 2021).

Cathepsin K

Für die Funktions- und damit Resorptionsfähigkeit reifer OKs sind Proteasen zum Abbau der organischen Knochenmatrix erforderlich, darunter Cathepsin K, MMP-9 und TRAP. Cathepsin K ist eine lysosomale Cysteinprotease, die bei niedrigem pH-Wert besonders aktiv ist und essenziell für den Knochenmatrix-Abbau, insbesondere von Kollagen Typ I, ist (Saftig et al., 1998, Zaidi et al., 2001). Dies konnte in humangenetischen Studien belegt werden: Bei Menschen mit Mutationen im Cathepsin K-Gen kommt es zu einer seltenen autosomal-rezessiv vererbten Skeletterkrankung namens Pyknodysostose (Gelb et al., 1996, Johnson et al., 1996). Betroffene Patienten mit Pyknodysostose weisen morphologisch normale OKs auf, die jedoch keine effektive Knochenresorption leisten können (Gowen et al., 1999). Bei spezifischer Deletion von Cathepsin K in der Monozytenlinie in Mäusen entwickelten diese einen osteopetrotischen Phänotyp mit einer erhöhten Anzahl an OKs, die sich jedoch als funktionell defizient erwiesen (Saftig et al., 1998, Lotinun et al., 2013). Tatsächlich zeigte sich darüber hinaus auch eine verlängerte Überlebenszeit der OKs, was auf eine Beteiligung von Cathepsin K an der Steuerung der Seneszenz und Apoptose der OKs schließen lässt (Dai et al., 2020). Die genauen Mechanismen dahinter sind jedoch noch Gegenstand aktueller Forschung (Soltanoff et al., 2009, Ono and Nakashima, 2018). Neben dem Abbau von Kollagen Typ I sorgt Cathepsin K auch für die Freilegung von RGD-Bindungsstellen, die für die Adhäsion von OKs an die Knochenmatrix relevant sind (Garnero et al., 1998, Wilson et al., 2009).

Cathepsin K wird hauptsächlich von OKs exprimiert und ist somit ein osteoklastenspezifisches Protein (Drake et al., 1996). Dies legen Studien mit In-situ-Hybridisierungen und Northern-Blot-Analysen nahe (Inaoka et al., 1995, Tezuka et al., 1994). Gemäß aktueller Forschungserkenntnisse beginnt die Expression in späten Entwicklungsstadien der OK-Progenitorzellen und ist am stärksten in vollständig differenzierten, aktiven OKs (Sorensen et al., 2007).

MMP-9

Die Matrix-Metalloproteinase-9 (MMP-9), auch bekannt als Gelatinase B, gehört zur Familie der Matrix-Metalloproteinasen, welche als proteolytische Enzyme am Abbau der EZM verschiedener Gewebe, einschließlich Knochen, beteiligt sind (Reponen et al., 1994). MMP-9 findet sich vorwiegend in OKs und wird bereits in frühen Entwicklungsstadien von OK-Vorläuferzellen exprimiert (Sorensen et al., 2007, Reponen et al., 1994, Vu et al., 1998). Dies unterscheidet MMP-9 von anderen Markern wie Cathepsin K, die primär in reifen OKs exprimiert werden. Die Expression wird über Aktivierung von NFATc1 induziert, welche über den RANKL/RANK-Signalweg gesteuert wird (Fujisaki et al., 2007). Bereits in frühen Entwicklungsstadien erleichtert MMP-9 durch den Abbau von Kollagenen und anderen EZM-Bestandteilen die Migration der OK-Progenitorzellen zur Knochenoberfläche und somit deren Rekrutierung (Vu et al., 1998, Cappariello et al., 2014). In reifen, aktivierten OKs trägt MMP-9 in Zusammenspiel mit anderen proteolytischen Enzymen wie Cathepsin K zum Abbau der organischen Knochenmatrix bei (Okada et al., 1995). Darüber hinaus bewirkt MMP-9 die Freisetzung der Wachstumsfaktoren TGF- β und VEGF (Engsig et al., 2000), wodurch die für die anschließende Knochenneubildung essenzielle Angiogenese und Rekrutierung mesenchymaler Stammzellen gefördert wird (Colnot et al., 2003). In Studien wiesen MMP-9-defiziente Mäuse während der Embryogenese vorübergehende Defizite bei der Knorpelresorption auf, die jedoch im weiteren Verlauf kompensiert werden konnten. Reife Osteoklasten zeigten keine signifikante Beeinträchtigung der Knochenresorptionsfähigkeit (Vu et al., 1998, Ono and Nakashima, 2018, Sundaram et al., 2007, Colnot et al., 2003, Vaananen et al., 2000, Zhu et al., 2020).

TRAP

Ein typischer molekularer Marker, welcher bereits in OK-Vorläufern kurz vor der Fusion stark exprimiert wird, ist die Tartrate-resistente saure Phosphatase (TRAP) (Ono and Nakashima, 2018). TRAP ist ein lysosomales, eisenhaltiges Enzym, das sich von

anderen sauren Phosphatasen durch seine Resistenz gegenüber einer Inhibition durch L-Tartrat unterscheidet (Oddie et al., 2000). TRAP wird jedoch nicht nur von OKs, sondern auch von Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert (Halleen et al., 2006). In OKs ist TRAP vor allem in Vesikeln lokalisiert, insbesondere im Bereich des Bürstensaums (Vääräniemi et al., 2004). Während des Resorptionsprozesses werden Knochenmatrix-Abbauprodukte zusammen mit Cathepsin K durch Endozytose nach intrazellulär in vesikuläre Strukturen aufgenommen, die mit TRAP-enthaltenden Vesikeln fusionieren und sogenannte Transzytosevesikel bilden (Ljusberg et al., 2005). Diese Vesikel wandern von der apikalen Bürstensaummembran zur basolateralen Zellmembran, wo die Abbauprodukte inklusive TRAP schließlich in die Blutzirkulation abgegeben werden (Halleen et al., 2006).

TRAP übernimmt während des Knochenabbaus mehrere Funktionen. Unter sauren Bedingungen im Bereich der Resorptionslakune agiert TRAP als Phosphatase und dephosphoryliert Knochenmatrixproteine wie OPN und BSP. Diese Modifikation beeinflusst die Adhäsion von OKs an die Knochenmatrix während des Resorptionsprozesses (Ek-Rylander et al., 1994, Nakamura et al., 2021, Halling Linder et al., 2017). Zudem produziert TRAP in den Transzytosevesikeln reaktive Sauerstoffspezies, insbesondere bei neutralem pH im Bereich der basolateralen Membran. Diese führen zur Destruktion der Matrixabbauprodukte, vor allem dem Kollagen (Minkin, 1982, Oddie et al., 2000). Somit findet der Knochenabbau nicht nur extrazellulär in der Resorptionslakune statt, sondern auch intrazellulär innerhalb der Vesikel (Halleen et al., 1999, Halleen et al., 2006, Vaananen et al., 2000). Aufgrund der hohen Expression in aktivierten OKs wird TRAP häufig als molekularer phänotypischer OK-Marker verwendet (Halleen et al., 2000, Cappariello et al., 2014).

$\alpha_v\beta_3$ -Integrin

Integrine stellen heterodimere Rezeptoren dar, die jeweils mit verschiedenen β -Untereinheiten dimerisieren und so entsprechend unterschiedliche Integrinrezeptoren bilden (Duong et al., 2000, Duong and Rodan, 2001, Nakamura et al., 2007). Das $\alpha_v\beta_3$ -Integrin, auch bekannt als VNR, ist ein Adhäsionsmolekül, das zum einen Zell-Zell-Interaktionen ermöglicht, welche entscheidend für die Fusion der mononukleären Progenitorzellen zu reifen, multinukleären OKs sind (Moreira et al., 2000). Zum anderen vermittelt es die Bindung der OKs an die Knochenmatrix, was relevant für deren Resorptionstätigkeit ist (Teitelbaum, 2000, Florencio-Silva et al., 2015). Es erkennt neben Vitronectin weitere Matrixproteine wie OPN und BSP, die jeweils eine

RGD-Domäne aufweisen (Ross et al., 1993, Horton et al., 1991). Durch die Bindung an die Matrixproteine kommt es zur Ausbildung der sogenannten *sealing zone*, die eine Begrenzung der Resorptionslakune darstellt (Rucci and Teti, 2016). Darüber hinaus überträgt $\alpha_v\beta_3$ Signale aus der Knochenmatrix, bei der es unter anderem zur Organisation des OK-Zytoskeletts mit Ausbildung von Podosomen kommt (Teitelbaum and Ross, 2003). Dies geschieht durch Aktivierung von Signalwegen, die Adhäsionskinasen wie c-Src einschließen. Diese Signalwege sind entscheidend für die Migration von OKs sowie für deren Funktionsfähigkeit (Horton et al., 1991, Nakamura et al., 2007, Duong et al., 2000). Mäuse mit fehlendem bzw. blockiertem $\alpha_v\beta_3$ -Integrin entwickelten eine progressive Osteosklerose aufgrund dysfunktionaler OKs mit abnormalen Zytoskeletten und fehlender Migrationsfähigkeit. Dies äußerte sich in erniedrigten Blut-Calciumwerten und einer erhöhten Skelettmasse (Engleman et al., 1997, McHugh et al., 2000, Teitelbaum and Ross, 2003).

Das $\alpha_v\beta_3$ -Integrin wird in besonders hohem Maße von Osteoklasten exprimiert und gilt daher als spezifischer OK-Marker (Rucci and Teti, 2016). Andere Zelltypen wie Makrophagen, Thrombozyten und Endothelzellen zeigen hingegen nur eine schwache Expression (Duong et al., 2000, Nesbitt et al., 1993). Die Expression von $\alpha_v\beta_3$ beginnt während der Differenzierung von OK-Vorläufern zu reifen Zellen. In frühen Stadien exprimieren Vorläuferzellen andere Integrine wie $\alpha_v\beta_5$, das während der Reifung durch $\alpha_v\beta_3$ ersetzt wird (McHugh et al., 2000, Del Fattore et al., 2008, Lane et al., 2005). Die maximale Expression von $\alpha_v\beta_3$ wird in vollständig differenzierten, aktiven OKs erreicht (Sorensen et al., 2007).

Calcitonin-Rezeptor

Der Calcitonin-Rezeptor (CTR) ist ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor mit sieben membrandurchspannenden Domänen, der erstmalig 1991 aus porcinen Nierenepithelzellen kloniert werden konnte (Lin et al., 1991, Goldring et al., 1993). Neben der Expression des CTR in renalen Epithelzellen konnte dieser unter anderem auch im ZNS und in OK nachgewiesen werden (Pondel, 2000). Die Expression des CTR in OK beginnt in späten Entwicklungsstadien der mononukleären Progenitorzellen (Hattersley and Chambers, 1989, Sorensen et al., 2007). Der Ligand des CTR, das Hormon Calcitonin, wird in den parafollikulären C-Zellen der Schilddrüse synthetisiert und bei erhöhtem Calciumspiegel sezerniert. Durch die Bindung von Calcitonin an den Rezeptor wird durch Beeinflussung der OK-Adhäsion, des Aktinzytoskeletts sowie Hemmung der osteoklastogenen Effekte von RANKL die

osteoklastäre Differenzierung, die Motilität sowie die Ausbildung der Kräuselmembran und somit die Knochenresorption gehemmt. Dies konnte sowohl *in vitro* an isolierten OKs als auch *in vivo* gezeigt werden (Samura et al., 2000, Nicholson et al., 1986, Del Fattore et al., 2008). Durch die Wirkung von Calcitonin wird letztlich der Calcium- und Phosphatspiegel gesenkt (Copp and Cheney, 1962, Davey and Findlay, 2013).

2.5 Bone Sialoprotein

2.5.1 Aufbau

Das Glykoprotein Bone Sialoprotein (BSP) ist Bestandteil der EZM und wird insbesondere während der primären Osteogenese unter anderem von reifen Osteoblasten, Osteozyten, Osteoklasten und hypertrophen Chondrozyten exprimiert und zusätzlich durch mechanische Stimulation induziert (Bianco et al., 1991, Bouleffour et al., 2016). Es gehört zur SIBLING-Familie, zu der weitere vier Proteine zählen: OPN, DSPP (Dentin-Sialophosphoprotein), DMP-1 und MEPE (*Matrix Extracellular Phosphoglycoprotein*) (Qin et al., 2004, Staines et al., 2012, Xu et al., 2017). Allen SIBLING-Proteinen ist strukturell ein sogenanntes RGD-Motiv gemeinsam (siehe Abbildung 5), welches aus den drei Aminosäuren Arginin, Glycin und Asparaginsäure besteht (Ruoslahti and Pierschbacher, 1987, Ross et al., 1993, Fisher and Fedarko, 2003). Über dieses Motiv vermitteln die SIBLING-Proteine verschiedene, teils entgegengesetzte Effekte wie Zelladhäsion oder die Aktivierung bestimmter Signalwege (Fisher et al., 2001, Staines et al., 2012, Bouleffour et al., 2016). Die RGD-Sequenz befindet sich beim BSP im C-terminalen Ende der Aminosäuresequenz und kann an $\alpha_v\beta_3$ -Integrine binden, was überwiegend in OKs exprimiert wird (Ross et al., 1993, Ganss et al., 1999, Fisher and Fedarko, 2003). Darüber hinaus weist BSP eine hohe Anzahl an O- und N-Glykosylierungsstellen auf, worüber dessen Aktivität und Zell-Interaktion moduliert werden kann (Oldberg et al., 1988, Fisher et al., 2001, Bouleffour et al., 2016). Im N-Terminus von BSP befindet sich eine spezifische Bindungsstelle für Kollagen Typ I (Tye et al., 2005). Eine strukturelle Darstellung des BSP zeigt die folgende Abbildung 5.

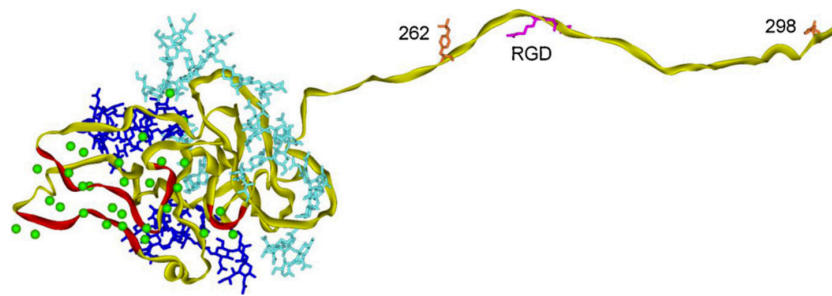


Abbildung 5: Tertiärstruktur des BSP-Moleküls mit Darstellung der funktionell relevanten RGD-Sequenz. Abbildung modifiziert nach Vincent and Durrant (2013).

2.5.2 Funktion

BSP kann aufgrund seiner strukturellen Eigenschaften Einfluss auf die Osteoneogenese sowie den Knochenumbau nehmen. Dennoch sind die genauen Funktionen von BSP weiterhin nicht vollständig verstanden und Gegenstand aktueller Forschung.

In einer wegweisenden *in-vitro*-Studie von Hunter and Goldberg (1993) konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von BSP zu Calciumphosphatlösungen in einem Agarosegel-System die Bildung von HA induziert. Die Ergebnisse legen nahe, dass BSP eine zentrale Funktion bei der Initiierung der Knochenmineralisation übernimmt, indem es als primärer Nukleator für HA-Kristalle wirkt (Raynal et al., 1996, Vincent and Durrant, 2013). Dieser Prozess wird durch Polyglutaminsäuresequenzen des BSP-Proteins gesteuert, die eine hohe Affinität zu Ca^{2+} und Phosphat-Ionen aufweisen und so die Nukleation von HA fördern (Gordon et al., 2007, Marinovich et al., 2016, Harris et al., 2000). Darüber hinaus bindet BSP über die N-terminale kollagenbindende Domäne an Kollagen Typ I in der Knochenmatrix, wobei angenommen wird, dass hierdurch ebenfalls die HA-Bildung verstärkt wird (Bouleftour et al., 2016).

In Studien mit BSP-Null-Mäusen wiesen diese kürzere, hypomineralisierte Knochen mit einer damit verbundenen höheren trabekulären Knochenmasse und einem geringen Knochenumsatz mit defizienter Knochenbildung und -resorption auf (Staines et al., 2012, Malaval et al., 2009, Wade-Gueye et al., 2012, Marinovich et al., 2016, Bouleftour et al., 2014). Es konnte *in vitro* gezeigt werden, dass das Fehlen von BSP zu einer signifikant reduzierten Anzahl an OKs führt, während Kulturen aus transgenen Mäusen, die BSP überexprimierten, eine höhere Anzahl an OKs und teilweise eine höhere Resorptionsaktivität aufweisen (Malaval et al., 2008, Bouleftour et al., 2016,

Boudiffa et al., 2010, Valverde et al., 2008). Hierbei erhöhte BSP in Resorptionsassays dosisabhängig die Anzahl und Tiefe der Resorptionslakunen (Raynal et al., 1996). Dies wird auf die Interaktion der RGD-Sequenz des BSP mit dem $\alpha_v\beta_3$ -Integrin (VNR) auf OK-Progenitorzellen zurückgeführt, wodurch es zur Aktivierung intrazellulärer Signalwege kommt, die essenziell für die Differenzierung, Reifung und Aktivierung der OKs sind (Ross and Teitelbaum, 2005, Sanjay et al., 2001, Miyazaki et al., 2004). Zudem fördert BSP über die VNR-Bindung die OK-Adhäsion, was ebenso die Knochenresorption fördern soll (Ross et al., 1993, Horton et al., 1991, Raynal et al., 1996). BSP spielt somit eine wichtige Rolle bei der Knochenbildung und -mineralisierung, Osteoblasten- und Osteoklastenadhäsion und Induktion der Knochenresorption.

2.6 Ziel dieser Arbeit

Während der Einfluss von BSP auf Osteoblasten und die Knochenmineralisierung bereits in zahlreichen Studien untersucht wurde, bleiben viele seiner Wirkmechanismen, insbesondere in Hinblick auf die Entwicklung und Funktion von OKs, noch unklar. Ziel dieser Arbeit war es daher, den Einfluss von BSP auf die Differenzierung und Aktivität humaner OKs systematisch zu untersuchen. Dazu wurde zunächst ein stabiles *in-vitro*-System zur Isolation und Generierung funktionsfähiger OKs aus PBMCs etabliert und durch die Analyse der Morphologie, typischer Gene sowie der Resorptionsfähigkeit validiert. Aufbauend darauf wurden die spezifischen Effekte von BSP auf die OK-Entwicklung und -funktion sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von RANKL analysiert, um insbesondere mögliche RANKL-unabhängige osteoklastogene Wirkungen von BSP zu identifizieren. Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen dazu beitragen, die Rolle von BSP in der Regulation des Knochenstoffwechsels besser zu verstehen und neue Erkenntnisse für potenzielle therapeutische Ansätze bei Erkrankungen des Knochenstoffwechsels zu liefern.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 1: Verbrauchsmaterialien.

Bezeichnung	Hersteller
8-Well-Streifen mit fixierten, flachen Deckeln	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
96-Well-qPCR-Platte, Semi Skirt	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
96-Well-Zellkulturplatte Costar®, F-bottom, ultra-low attachment	Corning Inc., New York, USA
96-Well-Zellkulturplatte, F-bottom	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
α -MEM (1X) + GlutaMAX™-I	Gibco®, Life Technologies, Grand Island, USA
Alexa Fluor™ 488 goat anti-mouse, A11001	Invitrogen™ Molecular Probes®, Eugene, USA
Aqua ad iniectabilia	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
BSA	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Calciumphosphat-Zement, 2D Cell Culture Well Inserts, Größe XS	InnoTERE GmbH, Radebeul, Deutschland
BSP	Immundiagnostik AG, Bensheim, Deutschland
CD14-APC-Antikörper, human	MACS® Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
CD14 MicroBeads, human	MACS® Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
Cell Tracker™ Green, CMFDA, C7025	Invitrogen™ Molecular Probes®, Eugene, USA
DMSO, HYBRI-MAX®	Sigma-Aldrich®, Steinheim, Deutschland

Material und Methoden

dNTP Mix, 10mM	Bioron GmbH, Ludwigshafen, Deutschland
Dulbecco's <i>Phosphate Buffered Saline</i>	Sigma-Aldrich®, Steinheim, Deutschland
Ethanol 100%	Applichem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Eppendorf Safe-Lock Röhrchen, 0,5mL / 1,5mL / 2,0mL	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
FCS	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Glaspipetten Costar® 5mL / 10mL / 25mL	Corning Inc., New York, USA
HISTOPAQUE®-1077	Sigma-Aldrich®, Steinheim, Deutschland
Hoechst-Färbung, H6024	Sigma-Aldrich®, Steinheim, Deutschland
Maus IgG1-APC-AK	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
Maus Anti-Integrin alpha V beta 3 (VNR-1)	Abcam®, Cambridge, UK
M-CSF, human	MACS® Miltenyi Biotec, GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
MS-MACS-Säule	MACS® Miltenyi Biotec, GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
Nalgene® Cryogenic Vials	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Pasteur-Pipetten, 150mm / 230mm	Carl-Roth® GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Penicillin/Streptomycin, 10 000 U/mL	Gibco®, Life Technologies, Grand Island, USA
Pipettenspitzen ep Dualfilter T.I.P.S.® LoRetention®	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen TipOne® 10µL / 200µL / 1000µL	STARLAB GmbH, Hamburg, Deutschland
PFA	Carl-Roth® GmbH, Karlsruhe, Deutschland
PowerUp™ SYBR® green master mix, 2x	Applied Biosystems, Austin, USA

Material und Methoden

PS Röhrrchen 5mL	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Random primers, 500µg/mL, 20µg	Promega, Madison, WI, USA
Rekombinanter humaner RANKL (0,2 mg/ml)	BioLegend® Way, San Diego, California, USA
Rekombinanter humaner M-CSF	PeptoTech®, Thermo Fisher Scientific, Rocky Hill, New Jersey, USA
RNase-freies Wasser	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Röhrrchen CELLSTAR®, 15mL / 50mL	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Terralin® flüssiges Desinfektionsmittel	Schülke & Mayr, Norderstedt, Deutschland
Trypsin/EDTA Solution 0.25% / 0.02%	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Zählkammer Luna™ <i>cell counting slides</i>	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Zellkulturflaschen CELLSTAR®, 25cm ² / 75cm ²	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Zellschaber, 28cm lang	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland

3.1.2 Kits

Tabelle 2: Kits.

Bezeichnung	Hersteller
BD Accuri™ C6 Flow Cytometer Fluid KIT	BD, Heidelberg, Deutschland
Bacteriostatic concentrate solution	
Cleaning concentrate solution	
Decontamination concentrate solution	
Extended flow cell clean solution	
Calcium Colorimetric Assay	Sigma-Aldrich®, Steinheim, Deutschland
Calcium Assay- Puffer	
Chromogenes Reagenz	

Calcium Standard 500 mM

peqGOLD Total RNA KIT, Safety-Line

PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland

PerfectBind RNA Columns

DNA Removing Columns

Collection Tubes (2 mL)

RNA Lysis-Buffer T

RNA Wash Buffer I

RNA Wash Buffer II

RNase-free DNase Set

Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland

RNase-free DNase I (lyophilized)

Buffer RDD

RNase-free water

TRAP Staining Kit

B-Bridge International Inc., Mountain View, California, USA

Tartrate -containing Buffer

Chromogenic Substrate

3.1.3 Instrumente und Geräte

Tabelle 3: Instrumente und Geräte.

Bezeichnung	Hersteller
Absorbance microplate reader, Tecan Sunrise™ Remote	Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz
Autoclave Systec DX-45	Systec GmbH Labortechnik, Wettenberg, Deutschland
BioPhotometer	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Durchflusszytometer Accuri® C6 Flow cytometer, C.Sampler®	Accuri® Cytometers Inc., Ann Arbor, USA
Eismaschine, 083817	ZIEGRA Eismaschinen GmbH, Isernhagen, Deutschland
EVOS® Digital Inverted Microscope	Life Technologies, Carlsbad, USA

Material und Methoden

Fluid aspiration system, BVC21 NT Vario	Vaccuubrand GmbH, Wertheim, Deutschland
Gefrierbehälter, Mr Frosty™, Cryo 1°C	NUNC International, Rochester, USA
Heizplatte, 13800	Medax Nagel GmbH, Kiel, Deutschland
Inkubator, HERA cell 240	Heraeus Holding, Hanau, Deutschland
Laminar airflow Bank, NuAIRE™ Biological safety cabinets, NU-440-600E, Klasse II	NuAire, Plymouth, USA
Mikro-Cuvette G1.0	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Mikroliter Pipetten 2,5µl / 10µl / 100µl / 1000µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Mikroliter Pipetten 10µl / 100µl / 1000µl	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Mikroskop Leica MZ16A	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland
Mikroskop Kamera, Leica DC480	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland
Mini-Zentrifuge, Spectrafuge, 3-1810	neoLab® Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland
Mini-Zentrifuge, Sprout®, 12V	Heathrow Scientific®, Vernon Hills, USA
Real time PCR system 7300	Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt, Deutschland
Thermal Printer, DPU-414	Seiko Instruments GmbH, Neu-Isenburg, Deutschland
Thermozykler peqSTAR 2X Gradient	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
<i>Ultra low temperature freezer, U570 premium</i>	New Brunswick Scientific, Edison, USA
Vortex Mixer, IKA® MS 3 digital	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Wasserbad LAUDA E100	Lauda, Lauda-Königshofen, Deutschland
Zellzähler, Luna™ <i>automated cell counter</i> , L10001	Logos Biosystems, Annandale, USA

Zentrifuge 5804 R / 5810 R / 5415 C	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Heraeus Fresco 17	Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, USA

3.1.4 Software

Tabelle 4: Software.

Bezeichnung	Hersteller
BD Accuri™ C6 / CSampler™ software, Ink. 1.0.264.21	BD, Heidelberg, Deutschland
EndNote™ 20.5	Calrivate Analytics, Philadelphia, USA
ImageJ, Version 1.48 and 1.50i	NIH (National Institutes of Health), Rockville, USA
Microsoft Office365 ProPlus, Word, Excel, PowerPoint	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Notability Version 14.11.14	Ginger Labs, Inc.
qPCRsoft 3.4	Analytik Jena GmbH+Co. KG, Jena, Deutschland
Sequence detection software, Version 1.4, AB 7300 System	Applied Biosystems, Austin, USA
SPSS, Version 23.0	IBM GmbH, Chicago, USA

3.1.5 Primer für qPCR

Tabelle 5: Primer für qPCR. Alle Primer wurden von Eurofins Genomics, Ebersberg, Deutschland, bezogen.

Gen	Primersequenz
BACT	fw: AACTGGAACGGTGAAGGTG rv: AGAGAAGTGGGGTGGCTTTT
Cathepsin K	fw: GGGGGACATGACCAGTGAAG rv: CAGAGTCTGGGGCTCTACCT
CTR	fw: TTGCTGCCCGCAATTTATGA

	rv: TAGCAGTGGTGGTCAGTTGC
MMP-9	fw: CCTGGGCAGATTCCAAACCT rv: GTACACGCGAGTGAAGGTGA
NFATc1	fw: CCAGTACCAGCGTTTCACCT rv: TAAATGTGCAACACGCCACG
TRAP	fw: AATGGCCAATGCCAAGGAGA rv: GGGAGCGGTCAGAGAATACG
ITGAV-1	fw: GTAGATCACGTCAGCTTATTTTCGG rv: TAGCTTGTGCAGTCCGAGTT
ITGAV-2	fw: AGATGAAACAGGAGCGAGAGC rv: TAAGCTGACGTGATCTACATGG

3.2 Versuchsaufbau

Der Versuchsaufbau dieser Arbeit ist in folgender Abbildung schematisch dargestellt:

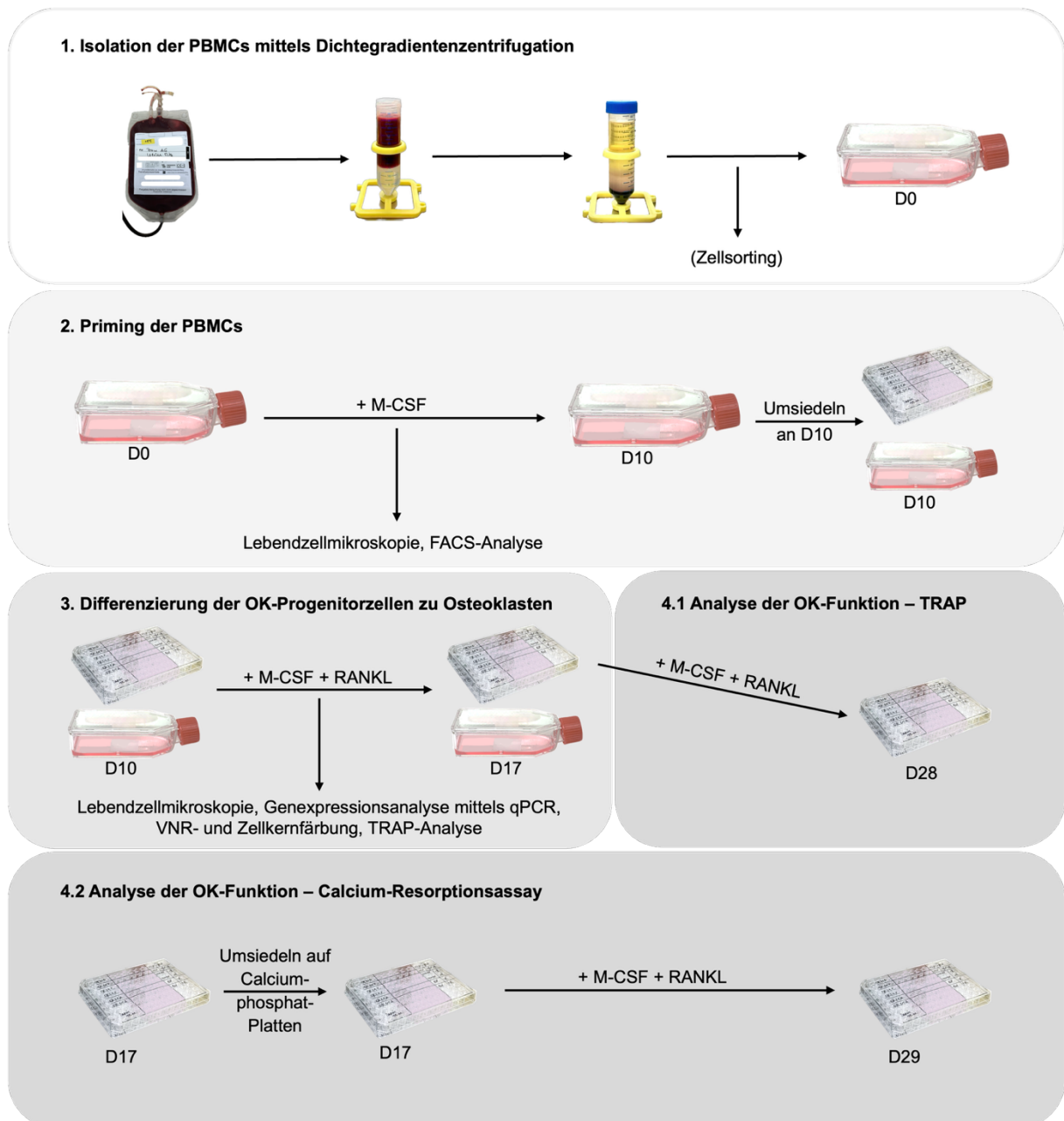


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus. Zunächst erfolgte die Dichtegradientenzentrifugation zur Isolation von PBMCs (1.). Anschließend wurden diese mit M-CSF für 10 Tage inkubiert (2.) und hierbei mittels Lebendzellmikroskopie sowie FACS analysiert. Nach Umsiedeln der Zellen auf kleinere Zellkulturflaschen und 96-Well-Platten erfolgte die Zugabe von RANKL, mit dem die Zellen für weitere 7 Tage kultiviert wurden (3.). Währenddessen erfolgte zur Analyse der Osteoklastenformation die Lebendzellmikroskopie, Färbung des VNR und der Zellkerne sowie die Genexpressionsanalyse mittels qPCR. Zur Untersuchung der Funktionsfähigkeit der

in-vitro-generierten Osteoklasten erfolgte an verschiedenen Kultivierungstagen die TRAP-Analyse (4.1) sowie nach Umsiedeln auf Calciumphosphat-Platten ein Calcium-Resorptionsassay (4.2). Versuchsaufbau angelehnt an Henriksen et al. (2012).

3.3 Zusammensetzung der Zellkulturmedien

Als Nährmedium wurde α -MEM mit 10 % fetalem Kälberserum (FCS) und 0,5 % Penicillin/Streptomycin (PS) verwendet. Dieses wurde jeweils mit entsprechenden Wachstumsfaktoren und Proteinen versetzt. Im Folgenden sind diese aufgeführt:

- i. Basis-Zellkulturmedium (BZM): 500 mL α -MEM, 5 mL FCS, 2,5 mL PS, hM-CSF mit einer Endkonzentration von 20 ng/mL
- ii. OK-Medium (OKM): BZM, RANKL mit einer Endkonzentration von 50 ng/mL (initial 20 ng/mL)
- iii. Bei Versuchen mit BSP: BZM + BSP mit einer Endkonzentration von 5 μ g/mL oder OKM + BSP mit einer Endkonzentration von 5 μ g/mL

3.4 Isolierung und *Priming* der PBMCs

3.4.1 Isolierung der PBMCs mittels Dichtegradientenzentrifugation

Die Isolierung der PBMCs erfolgte in Anlehnung an das etablierte Protokoll von Henriksen et al. (2012). Hierbei werden humane PBMCs aus *Buffy Coats* mittels Dichtegradientenzentrifugation gewonnen. Die in der Studie verwendeten humanen Blutprodukte wurden durch die Transfusionszentrale der Unimedizin Mainz bereitgestellt und stellen Nebenprodukte bei der Verarbeitung humaner Vollblutspenden dar. Der Inhalt eines Blutproduktes wurde gleichmäßig auf drei 50 mL-Zentrifugenröhrchen mit je 25 mL Blut pro Röhrchen verteilt. Anschließend folgte die 1:1 Verdünnung des Blutes mit PBS. In vier neue 50 mL-Zentrifugenröhrchen wurden je 15 mL Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymer-Lösung (Histopaque®) gegeben und darauf vorsichtig jeweils 30 mL des verdünnten Blutes geschichtet, um eine scharfe Phasentrennung zu erreichen (*Abbildung 7 A*). Folgend wurden die Röhrchen bei 800 x g für 20 min ohne Bremsfunktion zentrifugiert, wodurch es zur Ausbildung der in *Abbildung 7 B* gezeigten Schichten.

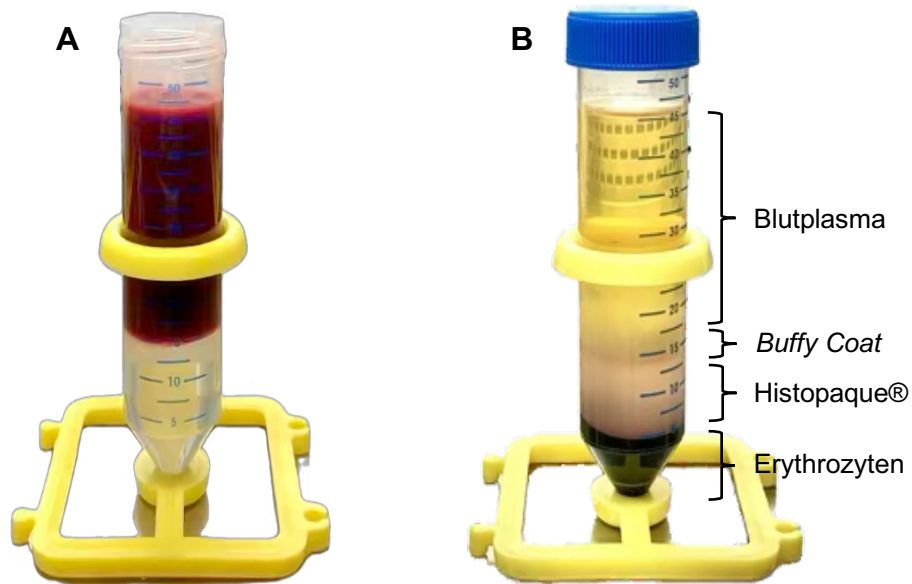


Abbildung 7: Dichtegradientenzentrifugation zur Isolierung von PBMCs aus humanem Blut. (A) Ausgangszustand nach Schichtung des Bluts auf Histopaque®. (B) Nach erfolgter Zentrifugation sind die einzelnen Phasen deutlich erkennbar: Blutplasma, Buffy Coat mit enthaltenen PBMCs, Histopaque® und Erythrozyten.

Der Überstand wurde sorgfältig abgesaugt, der *Buffy Coat* eines Röhrchens vorsichtig abpipettiert und in je zwei neue 50 mL-Röhrchen überführt. Zur Entfernung verbliebener Blutserum- bzw. Histopaque®-Rückständen folgten zwei Waschschriffe mit Zugabe von 45 mL PBS und anschließender Zentrifugation bei 300 x g für 10 min mit aktivierter Bremsfunktion. Nach jedem Waschschriff wurde der Überstand entfernt. Die verbliebenen, gereinigten Zellpellets wurden mittels 30 mL BZM (siehe Zusammensetzung der Zellkulturmedien) in ein gemeinsames Zentrifugenröhrchen resuspendiert und auf drei 75 cm²-Zellkulturflaschen aufgeteilt (10 mL Suspension pro Flasche). Die Zellen wurden bei 37 °C unter 5 % CO₂ -Atmosphäre inkubiert.

3.4.2 Zellkultivierung der PBMCs (*Priming*)

Zweimal wöchentlich erfolgte ein Wechsel des BZM. Hierbei wurde das alte Nährmedium abgenommen und die Zellen mit 5 mL PBS gewaschen, um nicht-adhärente Zellen zu entfernen. Anschließend wurde 10 mL neues BZM zu den Zellen gegeben und nach Beurteilung ihrer Morphologie und Vitalität unter dem Lichtmikroskop zurück in den Inkubator gestellt.

3.4.3 Kryopreservation der Zellen

Einfrieren der Zellen

Um bereits isolierte PBMCs zu einem späteren Zeitpunkt verfügbar zu halten, wurden einige der frisch isolierten Zellpopulationen kryokonserviert. Hierzu wurde ein Einfriermedium bestehend aus 45 % α -MEM, 45 % FCS und 10 % DMSO hergestellt. Die Vorläuferzellen wurden vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst, wie in Kapitel *Ablösen der Zellen* beschrieben. Anschließend erfolgte die Zentrifugation bei 300 x g für 10 min bei Raumtemperatur, gefolgt von der Entfernung des Überstandes. In jedes 15 mL-Röhrchen wurde 3,6 mL des oben genannten Einfriermediums gegeben und das Zellpellet damit resuspendiert. Anschließend wurde der Inhalt jeweils auf 2 Kryoröhrchen aufgeteilt. Die Kryogefäße wurden in eine mit Isopropanol-gefüllte Einfrierbox gestellt und bei -80 °C für mindestens 24 h gelagert. Für die langfristige Aufbewahrung wurden die Zellen in einem Stickstofftank bei -196 °C gelagert.

Auftauen der Zellen

Für weitere Versuche wurden die kryokonservierten PBMCs unter sterilen Bedingungen aufgetaut. Die Kryoröhrchen wurden in ein 37 °C warmes Wasserbad gegeben, bis eine vollständige Verflüssigung des Mediums im Röhrchen erkennbar war. Um Zellschäden durch verbleibendes DMSO zu minimieren, erfolgten alle weiteren Schritte zügig. Die Zellsuspension wurde in ein 15 mL-Röhrchen überführt und mit 10 mL frischem BZM verdünnt. Nach Zentrifugation bei 300 x g für 10 min bei Raumtemperatur wurde der Überstand vorsichtig abgenommen. Das Zellpellet wurde in 10 mL frischem BZM resuspendiert und in eine 75 cm²-Zellkulturflasche transferiert. Hierin wurden die Zellen für 24 h bei 37 °C im Inkubator (5 % CO₂) kultiviert. Im Anschluss waren die PBMCs für nachfolgende Experimente einsatzbereit.

3.4.4 Zellsorting

PBMCs stellen eine heterogene Zellpopulation dar, die als Vorläuferzellen für viele verschiedene Zelltypen dienen (Grage-Griebenow et al., 2001). Um eine reine Zellkultur aus myeloischen Vorläuferzellen mit hohem osteoklastogenen Differenzierungspotenzial aus der heterogenen PBMC-Zellpopulation zu generieren, wurde eine magnetische Zellseparation (*Magnetic Activated Cell Sorting*; MACS) anhand des Zelloberflächenmarkers CD14 nach Protokoll von Henriksen et al. (2012) durchgeführt. CD14 gilt als etablierter Marker monozytärer Vorläuferzellen, die als

Ausgangspopulation für die Osteoklastogenese dienen (Udagawa et al., 1990, Nicholson et al., 2000, Costa-Rodrigues et al., 2011, Zhang and Huang, 2012). Für das Verfahren wurden CD14-MicroBeads von Miltenyi Biotec GmbH verwendet. Hierbei handelt es sich um magnetische Mikropartikel, welche mit monoklonalen Antikörpern (AK) gegen CD14 konjugiert sind. Während des gesamten Prozesses sollte mit gekühlten Lösungen gearbeitet und auf zügige Durchführung der einzelnen Arbeitsschritte geachtet werden.

Unmittelbar nach erfolgter PBMC-Isolation (siehe 3.4.1) wurden 12 mL der Zellsuspension (insgesamt 2×10^6 Zellen) für 10 min bei $300 \times g$ zentrifugiert und der Überstand sorgfältig abgenommen. Das Zellpellet wurde in 80 μ L kaltem MACS-Puffer (PBS mit 2,5 % BSA und 2 mM EDTA) resuspendiert, mit 20 μ L CD14-MicroBeads versetzt und 15 min bei 2 bis 8 °C inkubiert. Nach einem Waschschriff mit 1 mL MACS-Puffer und erneuter Zentrifugation für 10 min bei $300 \times g$ wurde das Zellpellet in 500 μ L MACS-Puffer aufgenommen. Für die magnetische Separation wurde die entsprechend verwendete MS-MACS-Säule in einen Magneten platziert und mit 500 μ L MACS-Puffer äquilibriert. Nach Auftragen der Zellsuspension auf die MACS-Säule folgten drei Waschschriffe mit jeweils 500 μ L MACS-Puffer, um nichtgebundene CD14⁻-Zellen zu entfernen. Anschließend wurde die Säule aus dem Magneten genommen und die gebundenen CD14⁺-Zellen durch Elution mit 1 mL MACS-Puffer in ein neues Sammelröhrchen überführt. Die erfolgreiche Separation wurde mikroskopisch überprüft. Anschließend wurden die isolierten CD14⁺-Zellen in 75 cm²-Zellkulturflaschen (je 0,5 mL Zellsuspension plus 10 mL BZM) ausgesät und gemäß den in Kapitel 3.4.2 beschriebenen Bedingungen kultiviert.

3.5 Analyse der PBMCs

3.5.1 Durchflusszytometrische Analyse

Für die Bestimmung des Anteils an Monozyten- bzw. Osteoklasten (OK)-Vorläuferzellen innerhalb der PBMC-Gesamtpopulation damit der Reinheit der Zellkultur ohne vorangegangenes *Zellsorting* und wurden durchflusszytometrische Analysen (FACS) zu definierten Zeitpunkten nach der Isolation sowie während des M-CSF-*Primings* durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen mit einem fluoreszierenden Anti-CD14-Antikörper markiert.

Nach Ablösung und Zählung der PBMCs (siehe 3.4.1 und 3.6.1) wurden jeweils 1×10^5 Zellen pro Ansatz in ein 15 mL-Zentrifugenröhrchen überführt. Nach zweimaliger Zentrifugation bei $300 \times g$ für 6 min, Abnahme des Überstandes und Aufnahme des Zellpellets in PBS-Puffer (PBS, 2,5 % BSA, 2 mM EDTA) erfolgte die Resuspension in 100 μ L PBS / 1 % BSA pro Pellet. Anschließend wurden die Zellen lichtgeschützt mit einem fluoreszenzmarkierten Anti-CD14-Antikörper (CD14-APC, 1:50) inkubiert. Parallel diente eine mit Maus-anti-human-IgG1-APC (1:50) behandelte Probe als negative Isotyp-Kontrolle, um unspezifische Antikörper-Bindungen zu detektieren. Die Inkubation erfolgte jeweils für 20 min bei 4 °C. Anschließend wurden die Proben mit 1 mL PBS gewaschen, erneut bei $300 \times g$ für 6 min zentrifugiert und die Zellpellets in 250 μ L aufgenommen. Die Proben wurden in gläserne FACS-Röhrchen überführt und mittels BD Accuri™ C6 Durchflusszytometer analysiert.

Die Auswertung der Messungen erfolgte mit der BD Accuri™ C6 Software Version 1.0.264.21. Mittels Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht (FSC/SSC) wurden Zelldetritus und tote Zellen identifiziert und durch *Gating* von der Analyse ausgeschlossen. In das *Gate* R1 wurden somit nur lebende Zellen selektiert. Anhand der negativen Isotyp-Kontrolle konnten CD14⁺-von CD14⁻-Zellen unterschieden und ein weiteres *Gate* gesetzt werden. So konnte der Anteil der lebenden CD14⁺-Zellen innerhalb der PBMC-Population direkt aus den Graphen ermittelt werden konnte.

3.5.2 Lebendzellmikroskopie

Während des M-CSF-*Primings* wurde die morphologische Entwicklung und Vitalität der PBMCs an Tag (D) 3, D7 und D10 nach Isolation anhand der Lebendzellmikroskopie analysiert. Hierzu wurden die Zellkulturflaschen unmittelbar nach erfolgtem Mediumwechsel unter dem EVOS®-Lichtmikroskop (Life Technologies, Carlsbad, USA) betrachtet, wobei mithilfe der integrierten Software repräsentative Bildaufnahmen angefertigt wurden. Die mikroskopischen Befunde dienten der qualitativen Bewertung des Differenzierungsfortschritts der Zellen.

3.6 Differenzierung der OK-Progenitorzellen zu Osteoklasten

3.6.1 Zellkultivierung

Nach zehntägigem M-CSF-*Priming* wurden die OK-Progenitorzellen zur terminalen Differenzierung zu reifen Osteoklasten umgesiedelt.

Ablösen der Zellen

Um die Zellen vom Boden der Zellkulturflaschen abzulösen, folgten zunächst zwei Waschschriffe mit PBS, anschließend Hinzugeben von je 2 mL einer 0,25 %igen Trypsin/0,02 %igen EDTA-Lösung und Inkubation auf einer Heizplatte bei 37 °C für 40 min. Mithilfe eines Zellschabers wurden die Zellen behutsam vom Flaschenboden abgenommen, in jeweils 5 mL frischem Nährmedium resuspendiert und in ein gemeinsames 50 mL-Zentrifugenröhrchen überführt.

Zellzahlbestimmung

Zur Anpassung der Zellkonzentrationen erfolgte die Zellzahlbestimmung aller Ansätze mithilfe des LUNA™ *Automated Cell Counter* (Logos Biosystems). Hierzu wurden je 20 µL der Zellsuspension in eine Zählkammer (*Abbildung 8*) überführt und automatisiert anhand des vorinstallierten PBMC-Programms ausgewertet. Für standardisierte Ausgangsbedingungen der nachfolgenden Experimente wurde die gewünschte Zellkonzentration auf 2×10^5 Zellen/mL festgelegt. Zur Anpassung der Zellkonzentration wurden entsprechende Ansätze zentrifugiert (300 x g für 10 min), der Überstand verworfen und die Pellets in definiertem Volumen Nährmedium resuspendiert, um die Zielkonzentration zu erhalten.

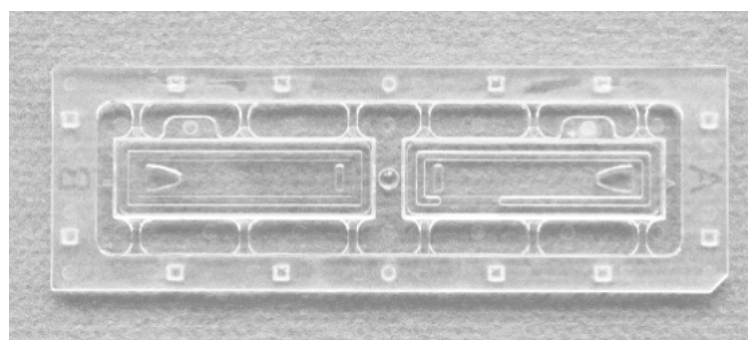


Abbildung 8: Zählkammer des LUNA™ *Automated Cell Counter* (Logos Biosystems).

Zellaussaat

Für die folgenden Versuche wurden die Ansätze auf verschiedene Kultursysteme verteilt. Ein Teil der Zellen wurde auf 96-Well-Mikrotiterplatten ausgesät, wobei jeweils

100 μL in ein *Well* gegeben wurden. Die verbleibende Zellsuspension wurde zu je 4 mL auf 25 cm^2 -Zellkulturflaschen gesät. Im Anschluss erfolgte die Ergänzung der Wachstumsfaktoren M-CSF und RANKL entsprechend der jeweiligen Versuchsgruppe (BZM bzw. OKM). Der Mediumwechsel erfolgte bei allen Ansätzen zweimal wöchentlich.

3.7 Analyse der Osteoklastenformation

3.7.1 Lebendzellmikroskopie

Zur Beurteilung der weiteren Differenzierung wurden die Zellen jeweils nach erfolgtem Mediumwechsel an Tag (D) 14 und D17 nach Isolation (D4 und D7 nach Umsiedlung) unter dem EVOS®-Lichtmikroskop (Life Technologies, Carlsbad, USA) betrachtet. Zur qualitativen Bewertung des Differenzierungsfortschritts wurden repräsentative Bildaufnahmen mithilfe der integrierten Software angefertigt.

3.7.2 VNR- und Zellkern-Färbung

Zur Identifizierung terminal differenzierter Osteoklasten und somit Validierung des verwendeten Protokolls zur *in-vitro*-Generierung von Osteoklasten wurde eine immunzytochemische Detektion des Vitronectin-Rezeptors (VNR) in Kombination mit einer Zellkernfärbung durchgeführt. Der VNR dient als etablierter Marker für reife Osteoklasten und spielt eine essenzielle Rolle bei der Adhäsion der Osteoklasten an die Knochenmatrix (Duong and Rodan, 2001, Rucci and Teti, 2016). Hoechst ist ein Chromosomenfarbstoff, der sich zur Visualisierung und Quantifizierung von Zellkernen bewährt hat (Bainbridge and Macey, 1983). Als Osteoklasten wurden Zellen gewertet, die sowohl den VNR exprimierten als auch mehrkernig (≥ 3 Zellkerne pro Zelle) waren (Kleinhans et al., 2015, Zainal Ariffin et al., 2024). Die Färbungen erfolgten an den auf 96-*Well*-Mikrotiterplatten kultivierten Zellen zu definierten Zeitpunkten der Differenzierung. Tabelle 6 nennt die verwendeten Antikörper und Färbungen.

Das Protokoll umfasste zunächst die Abnahme des Kulturmediums, Fixierung der Zellen mit 3,7 % Paraformaldehyd (PFA) für 10 min, gefolgt von dreimaligem Waschen mit PBS. Es folgte die Inkubation der Präparate mit PBS und 10 % FCS je 100 μL pro *Well* für 30 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurde in alle *Wells* PBS und 5 %

FCS und bei einem Teil der *Wells* zusätzlich der Primär-Antikörper (AK) Anti-VNR-AK (1 µg pro *Well*) hinzugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Alle folgenden Arbeitsschritte wurden fortan lichtgeschützt durchgeführt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS folgte die Inkubation mit PBS, 5 % FCS und einem fluoreszenzmarkierten Sekundär-AK (Alexa Fluor 488, 1:100, grüne Fluoreszenz) für 1 h. Nach erneutem dreimaligem Waschen wurde die Zellkernfärbung durch Inkubation mit PBS und Hoechst-Farbstoff (1:250; blaue Fluoreszenz) für 10 min durchgeführt. Anschließend wurde die Lösung abgenommen und 100 µL PBS pro *Well* zu den Zellen gegeben. Für die Auswertung wurde ein inverses Fluoreszenzmikroskop (EVOS®) verwendet und die Zellen abgedunkelt unter dem GFP- und DAPI-Kanal betrachtet. Es wurde derselbe Bildausschnitt für die VNR- und Hoechst-Fluoreszenz aufgenommen und die beiden Farbkanäle durch die Software ImageJ zusammengeführt. Nach Auswertung wurde die Platte entsorgt.

Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Antikörper (AK) und Färbungen sowie deren Konzentration und Funktion.

Antikörper/Färbung	Menge/Verdünnung pro Well	Funktion
Anti-VNR-AK	1 µg für 2x10 ⁵ Zellen	Primär-AK
Alexa Fluor 488	1:100	Sekundär-AK, Fluoreszenz-Markierung des Primär-AK
Hoechst	1:250	Zellkernfärbung

3.7.3 Genexpressionsanalyse mittels qPCR

Zur Genexpressionsanalyse typischer osteoklastärer Markergene (Cathepsin K, CTR, MMP-9, NFATc1, TRAP, $\alpha_v\beta_3$ -Integrin (bzw. dessen α_v -Untereinheiten ITGAV-1, ITGAV-2) wurde die qPCR angewandt. Hierzu wurde Ribonukleinsäure (RNA) aus den in 25 cm²-Zellkulturflaschen kultivierten Zellen zu den Messzeitpunkten D4 und D7 seit Zellumsiedlung (siehe 3.6) isoliert, aus welcher anschließend komplementäre DNA (cDNA) synthetisiert wurde. Hiernach wurde die qPCR durchgeführt und ausgewertet. Nachfolgend sind die einzelnen Schritte detailliert beschrieben.

RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung erfolgte mit Hilfe des *peqGOLD Total RNA Kit (S-Line)* nach der Anleitung des Herstellers. Verwendet wurden dabei kryokonservierte Zellpellets (siehe Umsiedlung auf Calciumphosphat-Platten). Zusätzlich wurde ein DNase I-Verdau mittels *Quiagen-Kit* durchgeführt und die RNA schließlich mit je 20 µL RNase-freies dH₂O eluiert. Konzentration und Qualität der RNA wurden durch das BioPhotometer 6131 (Eppendorf) anhand des 260/280 nm-Verhältnisses ermittelt. Die RNA-Proben wurden bei -80 °C aufbewahrt oder direkt weiterverwendet.

cDNA-Generierung

Die isolierten RNA-Proben wurden durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Hierzu wurde für jede Probe eine RNA-Menge von 1 µg verwendet und in ein 0,2 mL-Eppendorf-Röhrchen überführt. Hierzu kam pro Eppendorf-Röhrchen ein erster Primer-Ansatz, bestehend aus 2 µL Random Primers, 2 µL Desoxynukleosidtriphosphat (dNTP) und RNase-freiem Wasser, sodass das Gesamtvolumen 15 µL betrug. Anschließend wurden alle Proben im Thermozykler auf 110 °C erhitzt, gefolgt von einer Inkubation bei 65 °C für 5 min. Währenddessen wurde ein zweiter Primer-Ansatz vorbereitet, welcher sich je Probe aus 2 µL M-MuLV Reverse Transkriptase (RT)-Puffer, 2 µL RNase-freiem Wasser und 1 µL M-MuLV RT zusammensetzte. Dieser zweite Ansatz wurde nach Abschluss des zweiten Programmschritts in jedes Eppendorf-Röhrchen hinzugegeben und die Proben erneut in den Thermozykler gestellt. Hier durchliefen die Ansätze folgende Schritte: *Annealing* der Primer für 6 min bei 25 °C, DNA-Polymerisation für 1 h bei 42 °C. Die RT-Aktivität wurde durch Erhitzen auf 65 °C für 20 min gestoppt und die Proben im Anschluss auf 4 °C heruntergekühlt. Die generierten cDNA-Proben wurden entweder unmittelbar zur qPCR verwendet oder bei -20 °C gelagert.

Durchführung und Auswertung der qPCR

Für die qPCR wurden die unter 3.1.5 in Tabelle 5 aufgeführten Primer für die Gene Cathepsin K, CTR, MMP-9, NFATc1, TRAP, ITGAV-1, ITGAV-2 sowie der *PowerUp™ SYBR® Green Master Mix* verwendet. Zunächst wurde jede cDNA-Probe mit RNase-freiem Wasser 1:10 (bei RNA-Gehalt < 1 µg 1:5) verdünnt. Pro *Well* wurde 5 µL der verdünnten cDNA auf einer 96-*Well*-Mikrotiterplatte vorgelegt und je 15 µL qPCR-Mix (4,8 µL RNase-freies Wasser, je 0,1 µL Vorwärts- und Rückwärtsprimer des zu untersuchenden Gens, 10 µL *PowerUp™ SYBR® Green Master Mix*) hinzugegeben. Für jeden Primer wurde eine Leerprobe mitgeführt, die anstelle der cDNA RNase-freies

Wasser enthielt. Außerdem wurde jede Probe in Triplikaten analysiert, um eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse sicherzustellen. Die Mikrotiterplatte wurde in den Thermozykler gestellt, in dem das nachfolgende Programm ablief: Zunächst wurden die Proben auf 95 °C für 2 min erhitzt, gefolgt von 40 Zyklen Denaturierung bei 95 °C für 5 s und kombinierter Primer-Hybridisierung sowie Elongation bei 60 °C für 25 s. Nach Erhalt der Ct-Werte wurde zur Bestimmung der relativen Genexpression der osteoklastären Markergene die $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode nach Livak and Schmittgen (2001) angewandt. Dabei wurden die Zielgene zunächst in Verhältnis zum Referenzgen β -Actin gesetzt und nachfolgend auf die Kontrollgruppe normalisiert (Andersen et al., 2004).

3.8 Analyse der Osteoklastenfunktion

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Evaluation der osteoklastären Funktion und Aktivität die TRAP-Aktivität bestimmt und die Calciumresorptionsfähigkeit untersucht. TRAP gilt als etablierter Marker für die Analyse der OK-Bildung und -Aktivität (Halleen et al., 2006). Die freigesetzte Calciummenge gilt als indirekter Indikator für die osteoklastäre Resorptionsfähigkeit und -aktivität (Maria et al., 2014, Clarke et al., 2017). Im Folgenden sind beide Experimente detailliert erläutert.

3.8.1 TRAP-Aktivität

In der vorliegenden Studie wurde die TRAP-Aktivität der auf 96-Well-Mikrotiterplatten kultivierten Zellen (siehe Kapitel Zellaussaat) zu definierten Zeitpunkten der Differenzierung sowohl qualitativ durch histochemische Färbung als auch quantitativ über die Absorptionsmessung des Zellkulturmediums gemessen (Filgueira, 2004). Hierzu kam das TRAP-*Staining Kit* von B-Bridge International Inc. (Mountain View, California, USA) zum Einsatz. Das Vorgehen erfolgte gemäß Herstellerprotokoll.

Qualitative TRAP-Färbung

Für die direkte Darstellung TRAP-positiver Zellen wurde das Zellkulturmedium abgenommen und für die quantitative TRAP-Aktivitätsmessung verwendet. Jedes Well wurde anschließend einmal mit 100 μ L PBS gewaschen und mit 50 μ L der Fixierungslösung (10 % Formalin, dH₂O) für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit je 250 μ L dH₂O pro Well erfolgte die Zugabe von 50 μ L des chromogenen Substrats (in tartrathaltigem Puffer gelöst) pro Well und die Inkubation

bei 37 °C für 40 min. Die chromogene Reaktion wurde abschließend durch die Zugabe von dH₂O gestoppt und die Zellen unter dem Lichtmikroskop (Leica TCS SP2) bei 40- bis 161-facher Vergrößerung betrachtet. TRAP-positive Zellen bzw. Osteoklasten zeigten eine Multinuklearität sowie rotviolette Zytoplasmafärbung.

Quantitative TRAP-Absorptionsmessung

Parallel zur histochemischen TRAP-Färbung wurde die TRAP-Aktivität im Zellkulturüberstand mittels spektrophotometrischer Absorptionsmessung quantifiziert. Hierzu wurde je 30 µL Zellkulturmedium in ein *Well* einer 96-*Well*-Mikrotiterplatte überführt, mit 170 µL einer Färbelösung (3 mg chromogenes Substrat, 5 mL tartrathaltiger Puffer) versetzt und für 3 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 540 nm (Referenz 650 nm) mittels Spektrophotometer gemessen. Die erhaltenen Werte wurden auf die M-CSF-Kontrollgruppe normiert.

3.8.2 Calcium-Resorptionsassay

Zur Evaluierung der osteoklastären Resorptionsfähigkeit wurden die Zellen nach Ausdifferenzierung zu Osteoklasten (D7 unter RANKL-Substitution) auf Calciumphosphat-Platten umgesiedelt und mit den Mediumüberständen an D2, D4, D7 und D11 ein *Calcium Colorimetric Assay* (Sigma-Aldrich®, Steinheim, Deutschland) durchgeführt. Im Folgenden sind die hierzu erforderlichen Schritte im Detail beschrieben.

Präinkubation der Calciumphosphat-Platten

Bevor die differenzierten Osteoklasten umgesiedelt werden konnten, wurden die Calciumphosphat-Platten ein Tag vor Zellumsiedlung in die Wells einer *ultra-low attachment surface* 96-*Well*-Platte platziert und mit je 100µL Nährmedium bei 37 °C präinkubiert. Die Verwendung nicht-adhärenter Platten minimierte unspezifische Bindungen der Osteoklasten an die Kunststoffoberfläche.

Umsiedlung auf Calciumphosphat-Platten

An D7 (17 Tage nach Zellisolation, 7 Tage unter RANKL-Substitution) wurden die OKs vom Boden der 25 cm²-Zellkulturflaschen durch Waschen mit PBS und anschließende Inkubation mit 1 mL 0,25% Trypsin/ 0,02% EDTA für 60 min auf einer Heizplatte bei 37 °C gelöst. Mithilfe des Zellscrapers wurden alle restlichen noch am Flaschenboden anhaftenden OKs sorgsam abgelöst. Hierbei ist auf eine schonende mechanische Ablösung zu achten, da die OKs großvolumig und somit deutlich empfindlicher sind

(Riedlova et al., 2023). Die abgelösten Zellen wurden in 3 mL Nährmedium aufgenommen und in 15 mL Falcon®-Röhrchen überführt. Nach dem Zählen der Zellen mit LUNA™ *Automated Cell Counter* (siehe Kapitel *Zellzahlbestimmung*) erfolgte die Herstellung der Zielkonzentration von 3×10^5 Zellen/mL. Je 100 μ L der Zellsuspension der entsprechenden Versuchsgruppe wurde sorgfältig auf eine präinkubierte Calciumphosphat-Platte transferiert und das Nährmedium entsprechend der Versuchsgruppen um hM-CSF sowie RANKL (siehe BZM und OKM unter Zusammensetzung der Zellkulturmedien) ergänzt.

Die verbliebenen Zellsuspensionen wurden bei 200 x g für 5 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Pellets einmal mit PBS gewaschen. Die Zellpellets wurden bei -80 °C kryokonserviert (siehe 3.4.3), um sie für nachfolgende qPCR-Analysen osteoklastenspezifischer Gene zu verwenden.

OK-Kultivierung

Die Platten wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Der Mediumwechsel (OKM, BZM) erfolgte an D2, D4, D7 und D11 nach Umsiedlung auf die Calciumphosphat-Platten. Das abgenommene Medium wurde bei -20 °C aufbewahrt, um später hiermit den Calciumresorptionsassay durchzuführen (siehe Kapitel *Quantifizierung der freigesetzten Calciummenge*). Nach D11 (D28 nach Zellisolation) wurden die Zellen entsorgt.

Quantifizierung der freigesetzten Calciummenge

Zur Analyse der osteoklastären Resorptionsfähigkeit und -aktivität wurde die freigesetzte Calciumkonzentration in den bei -20 °C kryokonservierten Mediumüberständen (siehe Kapitel *OK-Kultivierung*) mittels *Calcium Colorimetric Assay Kit* (Sigma-Aldrich®, Steinheim, Deutschland) bestimmt. In ein *Well* einer 96-*Well*-Platte wurden 30 μ L Mediumüberstand mit 20 μ L dH₂O gegeben, wobei jeder Mediumüberstand in Duplikaten angelegt wurde. Als Kontrollgruppe dienten Kulturüberstände von Zellen, die ausschließlich mit M-CSF supplementiert waren. Zusätzlich wurde zur Bestimmung eines Leerwerts lediglich Nährmedium als Probe angelegt. Zur Erstellung einer Standard-Kurve wurde pro Assay eine validierte Calcium-Standardreihe (0-2 μ g/*Well*) unter Verwendung einer Standard-Calciumlösung (0,2 μ g/ μ L) gemäß Herstellerprotokoll angefertigt. Anschließend wurden jedem *Well* 90 μ L chromogenes Reagenz und 60 μ L *Calcium Assay*-Puffer hinzugefügt und die 96-*Well*-Platte lichtgeschützt bei Raumtemperatur für 8 min inkubiert. Hiernach erfolgte die Absorptionsmessung bei 575 nm mittels

Spektrophotometer. Die ermittelten Absorptionswerte wurden mithilfe der Standardkurve in absolute Calciummengen umgerechnet und der Leerwert hiervon subtrahiert. Zur Bestimmung der relativen Calciummenge wurden die Werte der Versuchsgruppen auf die M-CSF-Kontrollgruppe normiert, statistisch signifikante Unterschiede berechnet und in Boxplots visualisiert.

3.9 Einfluss des BSP auf Isolierung, Differenzierung und Funktion von Osteoklasten

3.9.1 Modifizierte Zellkultivierung zur Untersuchung des BSP-Einflusses

Um den Einfluss von Bone Sialoprotein (BSP) auf die Isolierung, Differenzierung und Funktion von Osteoklasten zu untersuchen, wurden sämtliche experimentelle Ansätze unter modifizierten Kulturbedingungen erneut durchgeführt. Im Unterschied zum initialen Protokoll wurde die Zellsuspension nach der Isolation (vgl. Kapitel 3.4) auf sechs 75 cm²-Zellkulturflaschen verteilt, indem jeweils 5 mL der Zell-Nährmedium-Suspension in jede Flasche gegeben wurden. Zum Erreichen eines Endvolumens von 8 mL wurde jede Flasche 3 mL frisches Nährmedium hinzugefügt. Anschließend erfolgte bei vier der 75 cm²-Zellkulturflaschen die Supplementierung von M-CSF in standardisierter Konzentration (siehe BZM) und bei den verbliebenen zwei Zellkulturflaschen die zusätzliche Gabe von BSP mit einer Endkonzentration von 5 µg/mL (siehe *Abbildung 9*). Nach zehntägiger *Priming*-Phase wurden die Kulturen in die in *Abbildung 9* dargestellten Subgruppen weiter unterteilt und RANKL (siehe OKM) und/oder BSP (Endkonzentration 5 µg/mL) bei jedem Mediumwechsel je nach Untergruppe ergänzt. Die Unterteilung in die gezeigten Subgruppen diente der Analyse des Einflusses von BSP auf die Isolation, Differenzierung und Funktion der Osteoklasten und sollte auch einen möglicherweise zeitabhängigen Effekt der BSP-Substitution erkennbar machen.

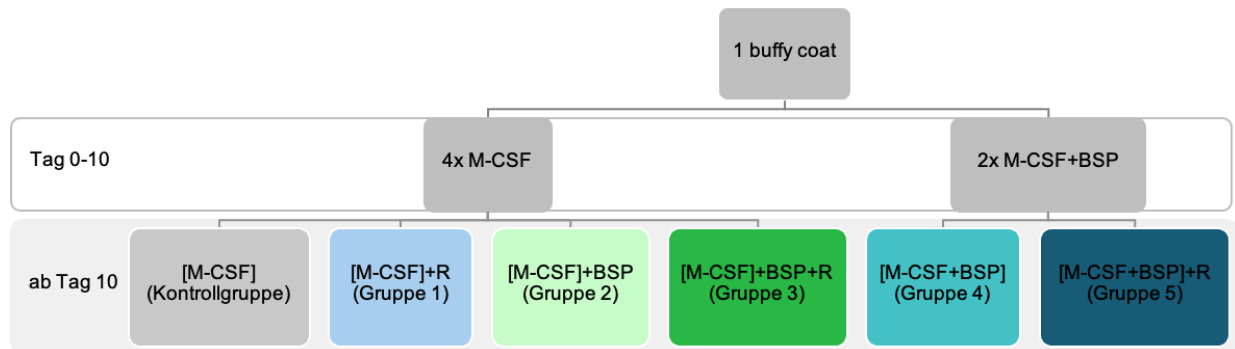


Abbildung 9: Schematische Darstellung der verschiedenen Subgruppen zur Evaluation des Einflusses von BSP auf Isolation, Differenzierung und Funktion der in-vitro-generierten Osteoklasten. Eckige Klammern kennzeichnen die von Beginn der Isolation supplementierten Faktoren, während die außerhalb der Klammern aufgeführten Substanzen ab D10 (d.h. nach Priming) hinzugegeben wurden. M-CSF-Konzentration 20 ng/mL, RANKL-Konzentration 50 ng/mL, BSP-Konzentration 5 µg/mL.

3.9.2 Einfluss des BSP auf Isolation und Differenzierung der PBMCs

Zur Analyse des Effekts von BSP auf Priming und Differenzierung der PBMCs zu OK-Progenitorzellen wurden die beschriebenen Subgruppen (Abbildung 9) hinsichtlich Zellmorphologie und Expression von CD14 untersucht, wie in Kapitel 3.5 beschrieben (siehe auch Abbildung 6).

3.9.3 Analyse der Osteoklastenformation unter Einfluss von BSP

Die Osteoklastenformation wurde in allen Subgruppen (Abbildung 9) gemäß den unter Kapitel 3.7 beschriebenen Methoden analysiert (siehe auch Abbildung 6). Hierbei erfolgte ein Vergleich der Morphologie und Multinuklearität der in den verschiedenen Subgruppen gebildeten Osteoklasten sowie der Nachweis des VNR und die Genexpressionsanalyse mittels qPCR.

3.9.4 Analyse der Osteoklastenfunktion unter Einfluss von BSP

Zur funktionellen Analyse der in-vitro-generierten OKs der jeweiligen Subgruppen (Abbildung 9) wurde sowohl die TRAP-Aktivitätsmessung (siehe 3.8.1) als auch der Calcium-Resorptionsassay (siehe 3.8.2.) durchgeführt (siehe auch Abbildung 6).

3.10 Statistik

Die statistische Datenanalyse erfolgte mithilfe des Programms SPSS 23.0 (IBM, Chicago, USA). Die Normalverteilung der Daten wurde zunächst mittels Shapiro-Wilk-Test überprüft. Anschließend wurden die nicht-parametrischen Tests Kruskal-Wallis und Mann-Whitney-U verwendet, um statistische Signifikanzen zu berechnen. Sobald der Kruskal-Wallis-Test signifikante Unterschiede nachwies, wurden diese zwischen den einzelnen Gruppen berechnet. Bei nicht-signifikantem Kruskal-Wallis-Test wurden keine weiteren statistischen Tests durchgeführt. Ein p-Wert $\leq 0,05$ wurde hierbei als statistisch signifikant gewertet. Bei multiplen Vergleichen erfolgte eine Bonferroni-Korrektur zur Adjustierung der p-Werte.

Die Ergebnisse wurden in Boxplots visualisiert, die die Datenverteilung anhand des Medians (horizontale Linie in der Box) und des Interquartilabstands (IQR; Box repräsentiert das 25.-75. Perzentil) darstellen. Die Whiskers zeigen den Bereich bis zum 1,5-fachen IQR, Ausreißer sind als Einzelpunkte markiert.

Die ermittelten Werte der Genexpressionsanalyse, quantitativen TRAP-Aktivitätsmessung und des Calcium-Resorptionsassays wurden auf die jeweilige Kontrollgruppe normiert, die in den entsprechenden Diagrammen als gepunktete Referenzlinie gekennzeichnet ist. Signifikante Unterschiede zwischen den Subgruppen wurden, sofern nicht anders angegeben, durch Klammern und * für $p \leq 0,05$ gekennzeichnet. Die Grafiken wurden mithilfe SPSS angefertigt und mittels Microsoft Office modifiziert.

4 Ergebnisse

4.1 Isolierung und Differenzierung der PBMCs zu Osteoklasten

Die Isolierung mononukleärer Zellen des peripheren Blutes (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*; PBMCs) aus *Buffy Coats* erfolgte mittels Dichtegradientenzentrifugation gemäß dem unter 3.4.1 beschriebenen Protokoll.

4.1.1 Zellsorting

Zur gezielten Anreicherung myeloischer Vorläuferzellen mit hohem osteoklastogenen Differenzierungspotenzial aus der heterogenen PBMC-Zellpopulation wurde unmittelbar nach PBMC-Isolation eine magnetische Zellseparation (MACS) anhand des Zelloberflächenmarkers CD14 durchgeführt. Trotz sorgfältiger Durchführung aller Arbeitsschritte und Einhaltung aseptischer Bedingungen traten bereits innerhalb der ersten 48 h nach dem *Sorting* wiederholt bakterielle Kontaminationen der Zellkulturen auf, die letztlich zum Absterben der gesamten Kulturen führten. Aufgrund der rezidivierenden Problematik, einer so unmöglichen weiteren Kultivierung sowie der damit verbundenen Kosten wurde auf ein *Zellsorting* im Verlauf der Studie, insbesondere auch in Hinblick auf die unter 4.1.3 erhobenen FACS-Analysen, verzichtet.

4.1.2 Beurteilung der Morphologie

Nach Isolation und Aussäen der PBMCs in die Zellkulturflaschen (siehe 3.4.1) wurden diese unter Zugabe von M-CSF (Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor) an Tag (D) 1, D3, D7 und D10 unter dem Lichtmikroskop analysiert, um die Differenzierung der Monozytenvorläuferzellen zu Osteoklasten-Progenitorzellen zu beurteilen. Hierbei kam es im zeitlichen Verlauf zu charakteristischen morphologischen Veränderungen, die auf eine erfolgreiche Differenzierung der PBMCs zu mononukleären Osteoklastenvorläufern hindeuten (*Abbildung 10*).

Im Laufe des M-CSF-*Primings* ließen sich zusammengefasst vier Entwicklungsstadien beobachten. Unmittelbar nach erfolgter Isolation zeigten sich neben Zelldetritus und Resten des Separationsmediums sehr kleine runde, nicht-adhärierende Zellen mit einem maximalen Durchmesser von etwa 5 μm (*Abbildung 10 A, Stadium 0*). Am dritten Tag der Kultivierung war eine deutliche Adhäsion der PBMCs an den Boden

der Zellkulturflaschen zu beobachten (*Abbildung 10 B, Stadium 1*). Die PBMCs imponierten hier weiterhin überwiegend rundlich-ovalär mit einem Durchmesser von etwa 10 μm , wobei einige Zellen bereits spindelförmige Ausläufer formten und zu Kolonie-bildenden Einheiten (*Colony-Forming Units, CFU*) aggregierten. An D7 (*Abbildung 10 C, Stadium 2*) verteilten sich die nun überwiegend flachen, spindelförmigen Zellen zunehmend gleichmäßig über den Zellkulturboden. Am zehnten Tag dominierten große rundliche, mononukleäre Zellen mit einem Durchmesser von etwa 50 μm (*Abbildung 10 D, Stadium 3*). Es waren keine multinukleären Zellen erkennbar.

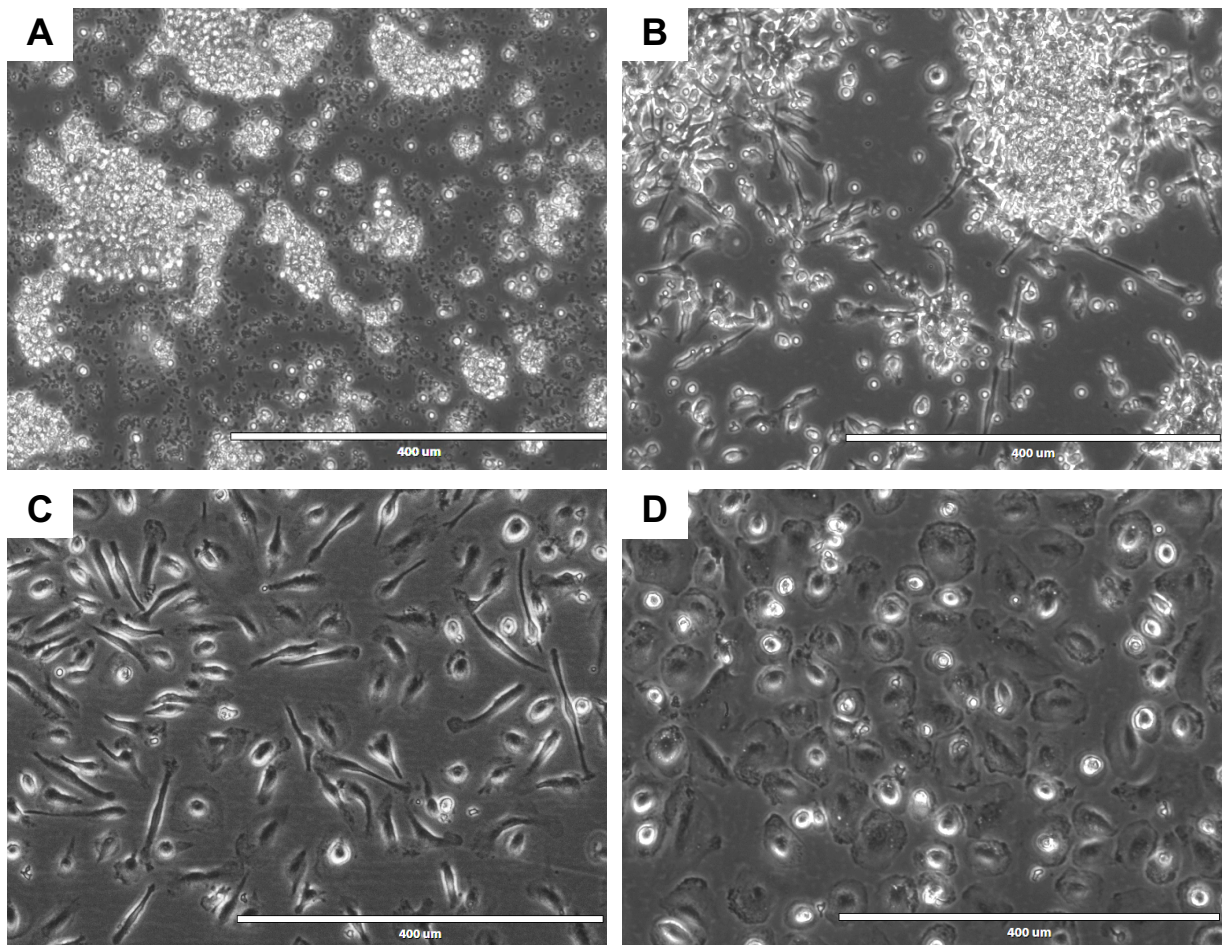


Abbildung 10: Lichtmikroskopische Aufnahmen der PBMC-Kulturen im zeitlichen Verlauf unter Einfluss von M-CSF. (A) D1 der Zellkultivierung. (B) D3 der Zellkultivierung. (C) D7 der Zellkultivierung. (D) D10 der Zellkultivierung. Maßstab: 400 μm .

4.1.3 Beurteilung der Reinheit der Zellkultur

Um den Anteil mononukleärer Zellen mit hohem osteoklastogenem Differenzierungspotenzial und somit OK-Progenitorzellen innerhalb der gesamten Zellpopulation und somit die Reinheit der Zellkultur zu evaluieren, wurde mittels FACS die Expression des etablierten Oberflächenmarkers CD14 analysiert. Die Analyse wurde sowohl unmittelbar nach der Isolierung der PBMCs (D0) als auch 10 Tage nach Kultivierung in Anwesenheit von M-CSF durchgeführt. Mittels *Gating* (R1) wurden tote Zellen und Zelldetritus von der Analyse ausgeschlossen. Die FACS-Analyse unmittelbar nach der Isolierung zeigte, dass 22,4 % aller lebenden PBMCs CD14-positiv waren, während 77,6 % keine CD14-Expression aufwiesen (*Abbildung 11 A*). 8,9 % der Zellen waren vital. Im Laufe der Kultivierung unter Einfluss von M-CSF kam es zu einem deutlichen Anstieg des Anteils CD14-positiver Zellen an der Gesamtzellpopulation. So stieg der Anteil auf 84,1 % nach 10 Tagen Kultivierung, wohingegen 15,9 % der Zellen CD14-negativ waren (*Abbildung 11 B*). Insgesamt zeigten sich hierbei knapp 40 % aller Zellen vital. Anhand dieser Ergebnisse wurde sich für die folgenden Experimente auf ein M-CSF-*Priming* für 10 Tage festgelegt.

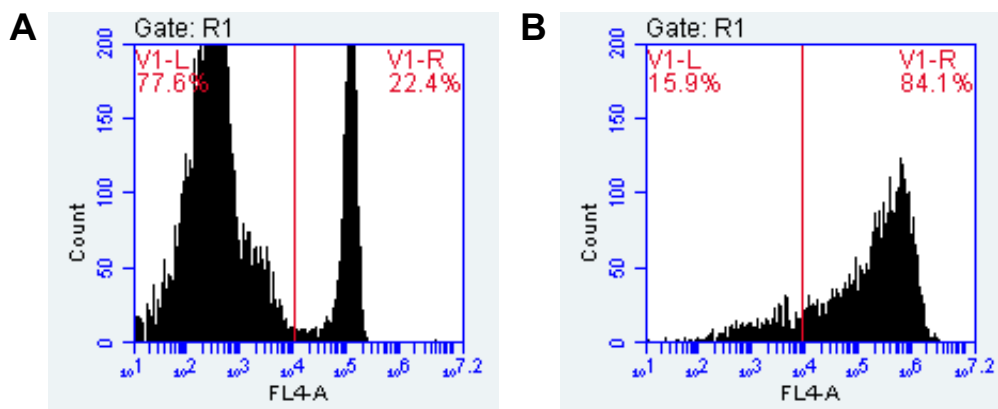


Abbildung 11: Ergebnisse der FACS-Analyse zur Bestimmung der CD14-Expression von PBMCs unmittelbar nach der Isolierung (A) und nach 10 Tagen M-CSF-Priming (B) innerhalb des R1-Gates. V1-L: CD14-negative Zellen. V1-R: CD14-positive Zellen. Count = Zellzahl. FL4-A = gemessene Fluoreszenzintensität. Gate R1 = Ausschluss toter Zellen bzw. Zelldetritus.

4.1.4 Analyse und Validierung der Osteoklastenformation

Nach Ausreifung der OK-Vorläuferzellen 10 Tage nach Isolation erfolgte der Zusatz des Wachstumsfaktors RANKL (Rezeptor-Aktivator des NF- κ B-Liganden), um eine

Ausdifferenzierung zu Osteoklasten (OK) zu erzielen. Um dies zu validieren, erfolgte die Lebendzellbeobachtung mittels Lichtmikroskopie und VNR-Färbung. Als Kontrollgruppe wurden separate Zellkulturen mit alleiniger Zugabe von M-CSF angelegt und analysiert.

Beurteilung der Morphologie mittels Lebendzellmikroskopie

Die Lebendzellmikroskopie erfolgte an D14 und D17 nach Isolierung der PBMCs, wobei die Zellen entweder von Beginn an ausschließlich mit M-CSF (*Abbildung 12 A, B*) oder 10 Tage nach Isolation zusätzlich mit RANKL behandelt wurden (*Abbildung 12 C, D*).

Die Kultivierung der OK-Vorläuferzellen mit ausschließlich M-CSF führte zu einer geringen Vergrößerung der Zellen, ohne dass es zu einer relevanten Formation multinukleärer Osteoklasten kam. Sowohl an D14 als auch an D17 lagen die Zellen mononukleär in überwiegend runder bis ovaler Morphologie vor (*Abbildung 12 A, B*). Die Zugabe von RANKL in der initial verwendeten Konzentration von 20 ng/ml führte ebenso zu keiner bedeutsamen Änderung der Zellmorphologie. Aufgrund dessen erfolgte die Anpassung der RANKL-Konzentration auf 50 ng/ml. Hierunter wiesen die Zellkulturen bereits vier Tage nach Zugabe von RANKL einzelne multinukleäre Zellen mit einer Größe von ca. 100 µm auf (*Abbildung 12 C*). An D17 (*Abbildung 12 D, 7 Tage nach RANKL-Zugabe*) waren zahlreiche, multinukleäre Zellen erkennbar. Diese zeichneten sich durch eine große, flache, polygonale Form mit einem Durchmesser von etwa 200 µm sowie multiplen Zellkernen (3-10) aus. Diese Charakteristika sprechen für eine erfolgreiche Differenzierung der Zellen zu Osteoklasten und markieren das finale Zellentwicklungsstadium 4.

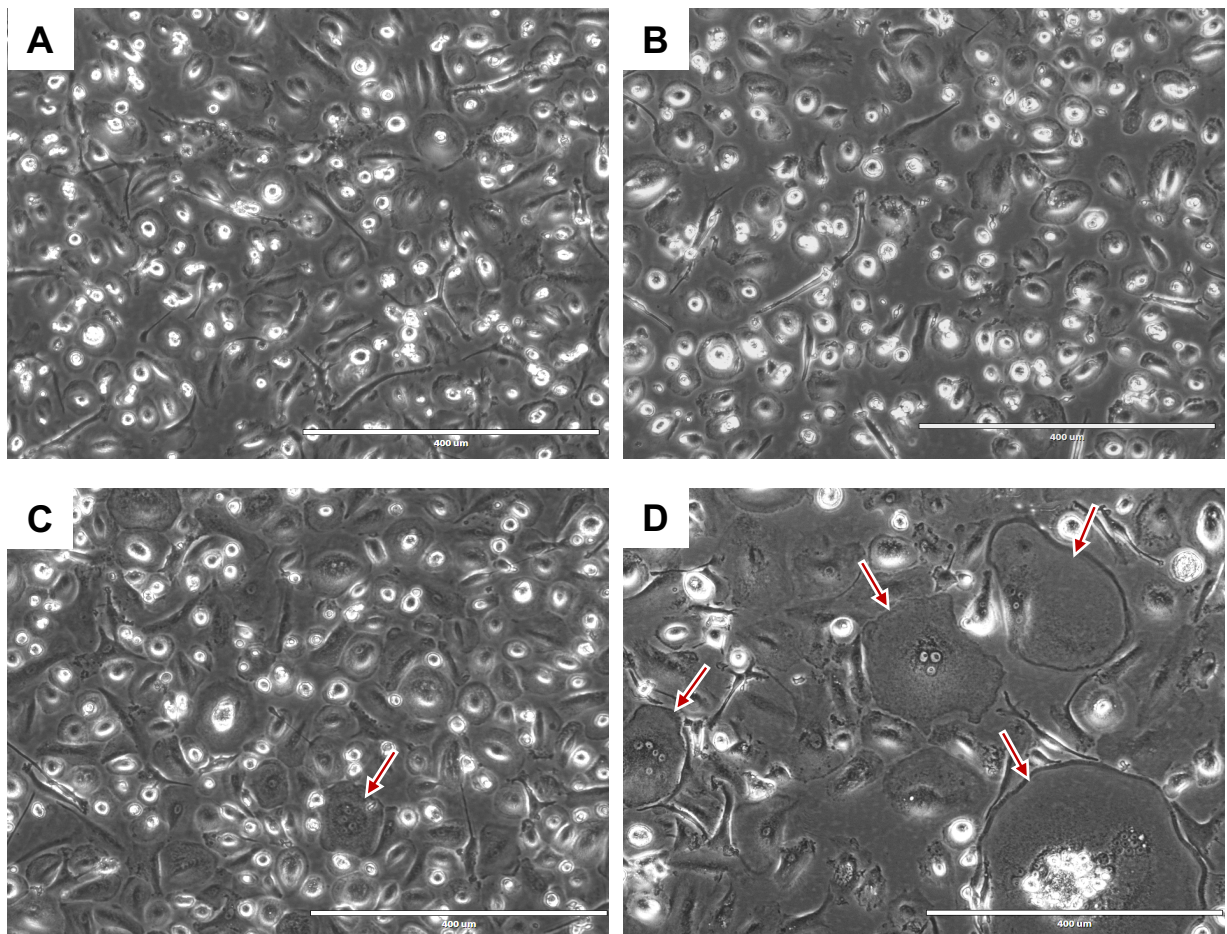


Abbildung 12: Lichtmikroskopische Aufnahmen der Zellkulturen im zeitlichen Verlauf unter Einfluss von M-CSF (A, B) sowie M-CSF und RANKL (C, D). (A), (C) Lebendzellmikroskopie an D14 der Zellkultivierung. (B), (D) Lebendzellmikroskopie an D17 der Zellkultivierung. Die roten Pfeile markieren beispielhaft Zellen im Stadium 4. Maßstab: 400 µm.

Validierung der Osteoklastenformation

Um den Differenzierungsprozess der OK-Vorläuferzellen zu validieren, wurde eine Immunfluoreszenzmarkierung des Vitronectin-Rezeptors (VNR) durchgeführt. Die Färbung erfolgte an D17, wobei eine Zellkultur mit ausschließlicher M-CSF-Substitution als Kontrollgruppe verwendet wurde. Zusätzlich zur VNR-Färbung wurden die Zellkerne mittels Hoechst-Färbung markiert, um sowohl die VNR-Positivität als auch die gleichzeitige Multinuklearität und somit die erfolgreiche Differenzierung zu Osteoklasten nachzuweisen.

In der Kontrollgruppe, die ausschließlich mit M-CSF kultiviert wurde, zeigte die VNR-Färbung ein schwaches, diffuses Fluoreszenzsignal. Die Zellen stellten sich

überwiegend mononukleär mit kleinen, runden bis ovalen Zellkörpern dar. Obwohl vereinzelte Zellen mehrere Zellkerne besaßen, fehlte diesen die VNR-Positivität. Im Gegensatz dazu waren in der Gruppe mit RANKL-Gabe große, multinukleäre Zellen mit intensiver VNR-Fluoreszenz (grün) erkennbar (*Abbildung 13 B*).

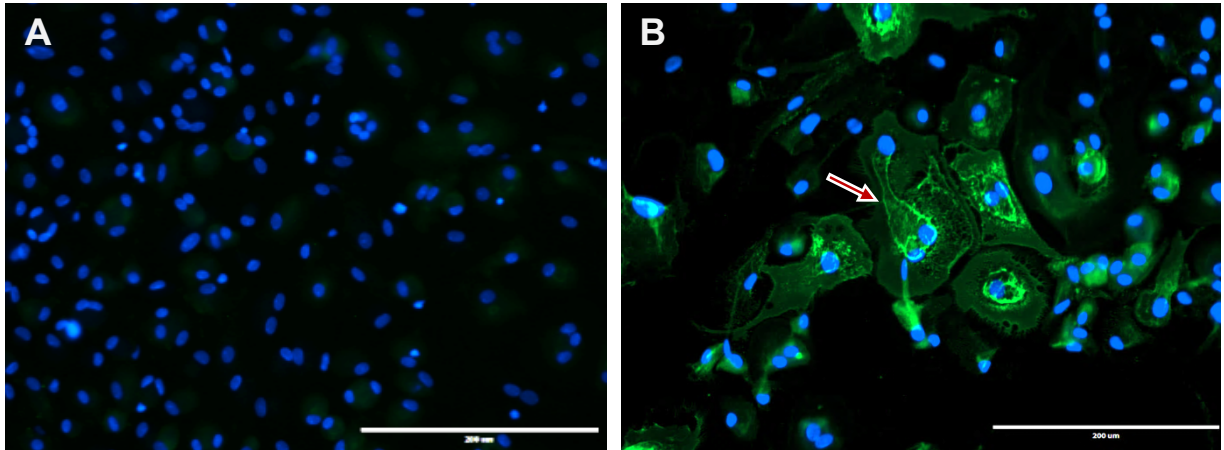


Abbildung 13: Immunfluoreszenzfärbung des VNR (grün) und Zellkernfärbung mittels Hoechst (blau) an D17 der Kultivierung. (A) Kontrollgruppe: Die Kultivierung mit M-CSF führte zu einer schwachen VNR-Positivität mit wenigen multinukleären Zellen. (B) Versuchsgruppe mit M-CSF und RANKL-Substitution: Hier zeigte sich eine intensive VNR-Färbung bei gleichzeitig großen, multinukleären Osteoklasten. Der rote Pfeil markiert beispielhaft einen Osteoklasten im Entwicklungsstadium 4. Maßstab: 200 µm.

Schlussfolgerungen

Zusammenfassend führte die alleinige Behandlung der Zellen mit M-CSF erwartungsgemäß zu keiner signifikanten VNR-Expression oder Multinuklearität. Erst die kombinierte Zugabe von RANKL ermöglichte die vollständige Differenzierung reifer Osteoklasten, erkennbar an der charakteristischen Morphologie, Multinuklearität sowie gleichzeitiger Expression des VNRs. Diese Ergebnisse validierten das verwendete Protokoll zur *in-vitro*-Generierung von Osteoklasten aus PBMCs für die folgenden Experimente.

4.2 Einfluss des BSP auf die Osteoklastogenese

4.2.1 Einfluss auf die Isolierung und Differenzierung der PBMCs

Beurteilung der Morphologie mittels Lebendzellmikroskopie

Zur Beurteilung des Einflusses des BSP auf die Differenzierung der PBMCs während des M-CSF-*Primings* erfolgte die lichtmikroskopische Beurteilung drei verschiedener Gruppen (M-CSF; BSP; M-CSF+BSP) in regelmäßigen Abständen (D3, D7 und D10) zur Detektion möglicher morphologischer Unterschiede.

Hierbei fiel bei den Zellkulturen ausschließlich mit BSP auf, dass die Anzahl der überlebenden Zellen deutlich geringer war als in der Gruppe mit M-CSF und M-CSF+BSP. Auch zeigte sich im Verlauf lediglich eine geringe Zellvergrößerung der wenigen verbliebenen Zellen, während keine Anzeichen für Zellaggregation oder weiter fortschreitende Differenzierung erkennbar waren (*Abbildung 14 A-C*). Aufgrund dessen wurde diese Zellreihe in den anschließenden Versuchen nicht mehr weitergeführt.

Im Gegensatz dazu zeigten sich in den Zellkulturen mit M-CSF+BSP-Zugabe im Vergleich zu jenen mit ausschließlich M-CSF keine deutlichen Unterschiede hinsichtlich der Entwicklungsstadien, wobei die M-CSF+BSP-Gruppe an D10 eine tendenziell höhere Anzahl an Zellen im Stadium 3 aufwies (*Abbildung 14 D-F*).

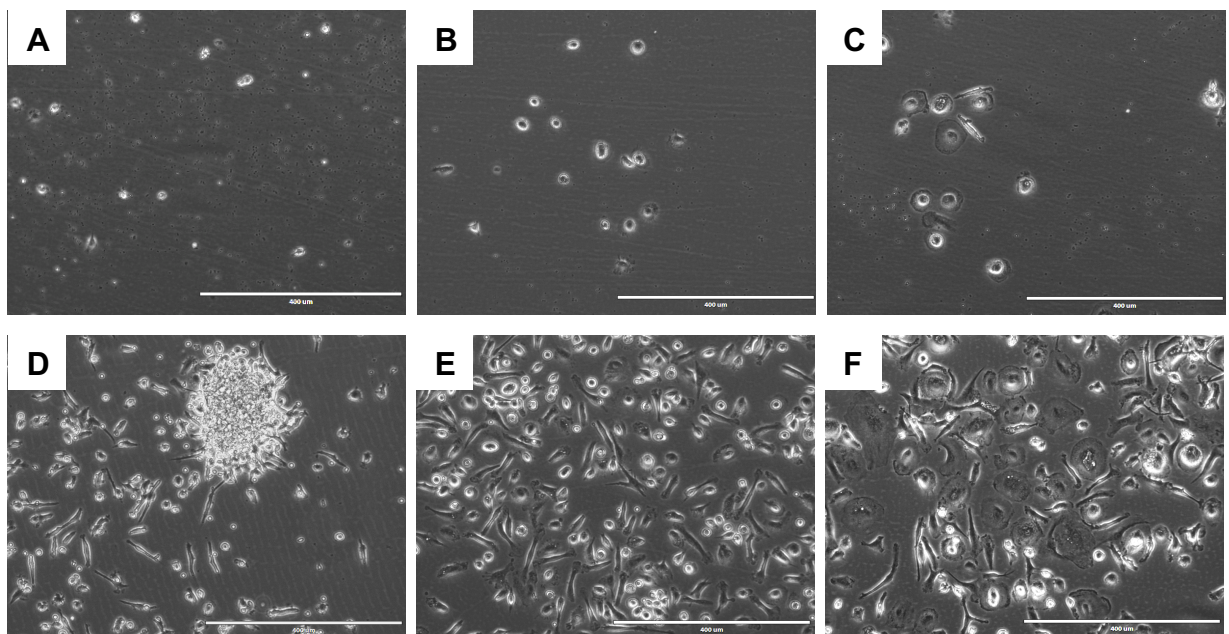


Abbildung 14: Lichtmikroskopische Aufnahmen der PBMC-Kulturen unter dem Einfluss von BSP allein (obere Reihe A-C) sowie M-CSF und BSP (untere Reihe D-F) an

verschiedenen Zeitpunkten während des M-CSF-Primings (A,D: D3; B, E: D7; C, F: D10). Maßstab: 200 μm .

Einfluss auf die Reinheit der Zellkultur

Zur Evaluation des Einflusses von BSP auf die Differenzierung der PBMCs zu OK-Progenitorzellen wurde die CD14-Expression mittels FACS analysiert. Hierzu wurde eine Zellkulturgruppe 13 Tage lang ausschließlich mit M-CSF kultiviert, während die zweite Gruppe zusätzlich mit BSP behandelt wurde.

Die Ergebnisse zeigen deutliche Unterschiede in der CD14-Expression und Zellmorphologie zwischen beiden Gruppen. Unter ausschließlicher Kultivierung mit M-CSF wiesen 80,2 % aller vitalen PBMCs eine CD14-Expression auf. Darüber hinaus überschritten 52,1 % der CD14⁺-Zellen einen Vorwärtsstreulichtwert (FSC) von 10 Millionen (*Abbildung 15 A Q2-UR*), wobei der mittlere FSC-A-Wert 14,4 Millionen betrug. Insgesamt zeigte sich eine relativ gleichmäßige Größenverteilung der Zellkultur mit einem moderaten Anteil an größeren Zellen (*Abbildung 15 A V1-R*). Unter der zusätzlichen Substitution von BSP stieg der Anteil an CD14⁺-Zellen deutlich auf 91,1 % (*Abbildung 15 B V1-R*). Gleichzeitig überschritten etwa 71,4 % der vitalen PBMCs einen FSC-A-Wert von 10 Millionen und der durchschnittliche FSC-A erhöhte sich innerhalb dieser Gruppe auf 15,2 Millionen (*Abbildung 15 B Q2-UR*). Unter dem Einfluss von BSP ließ sich somit eine Zunahme der CD14-Expression sowie der Zellgröße beobachten.

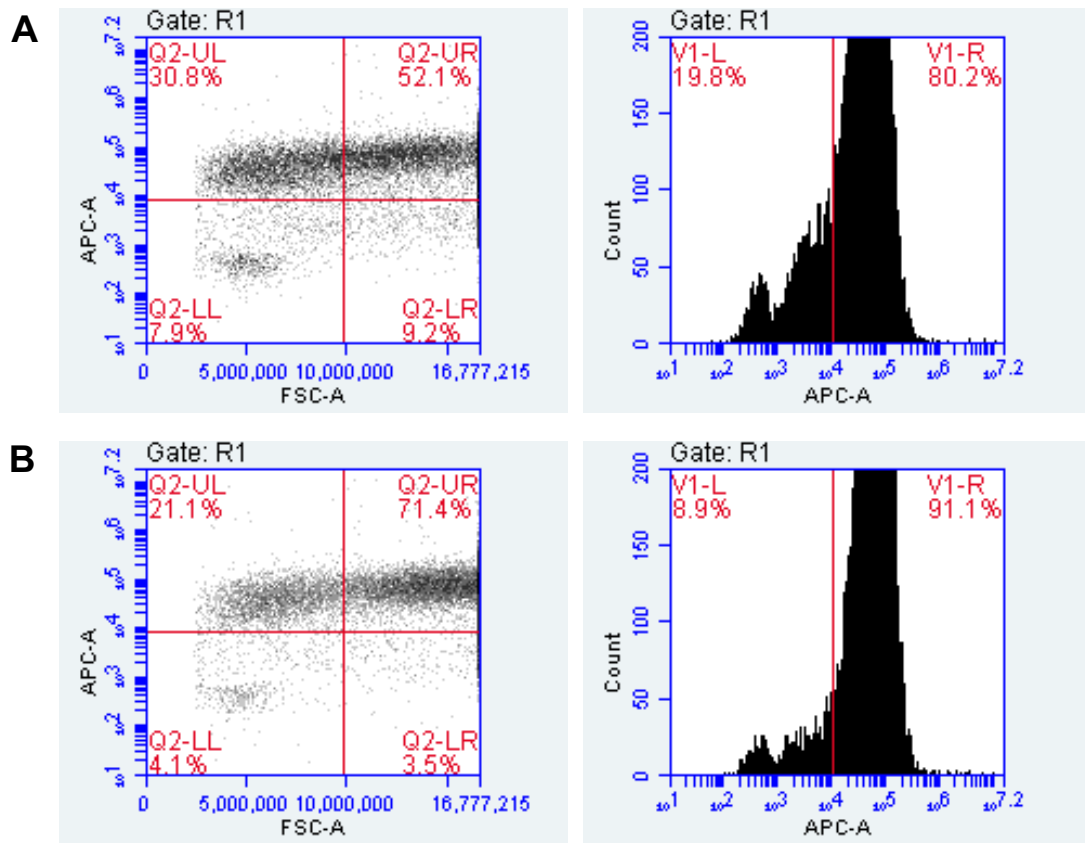


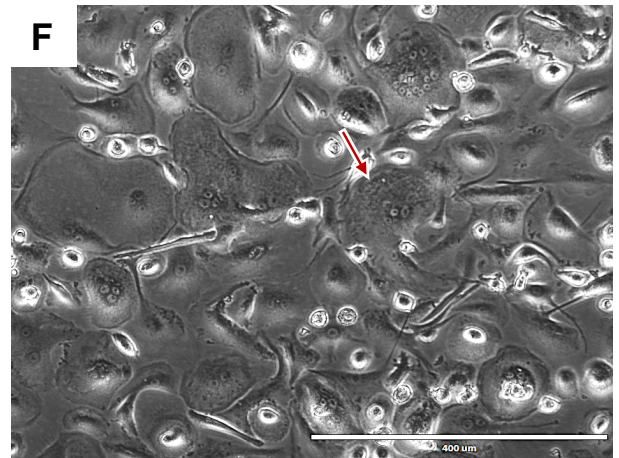
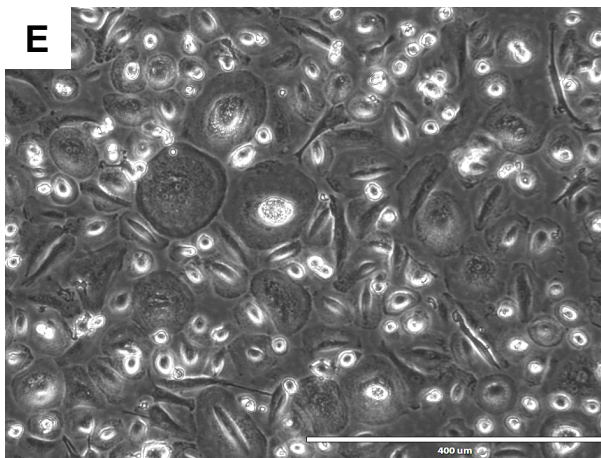
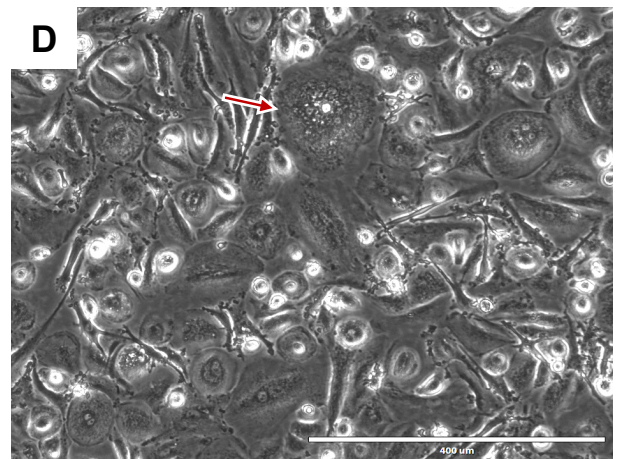
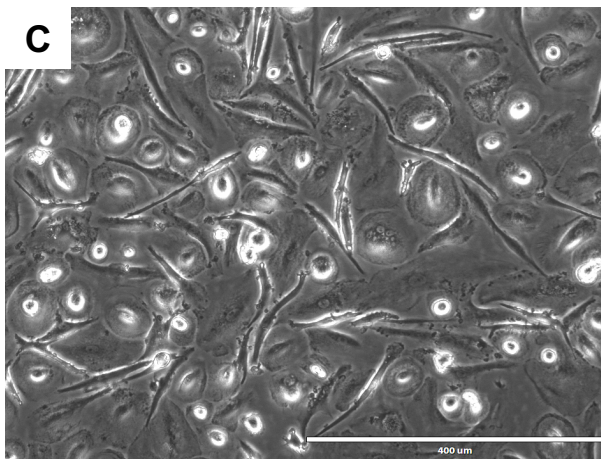
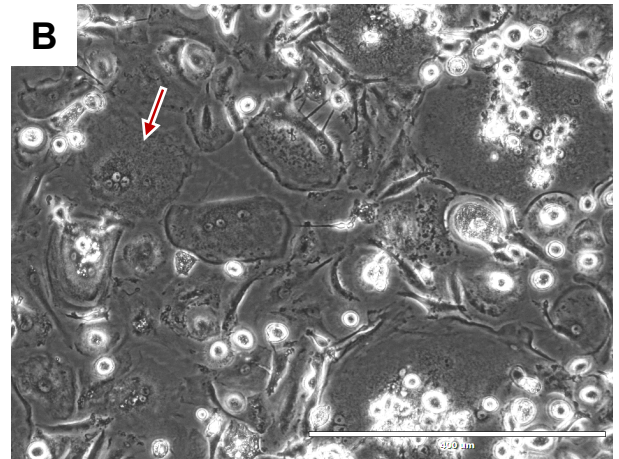
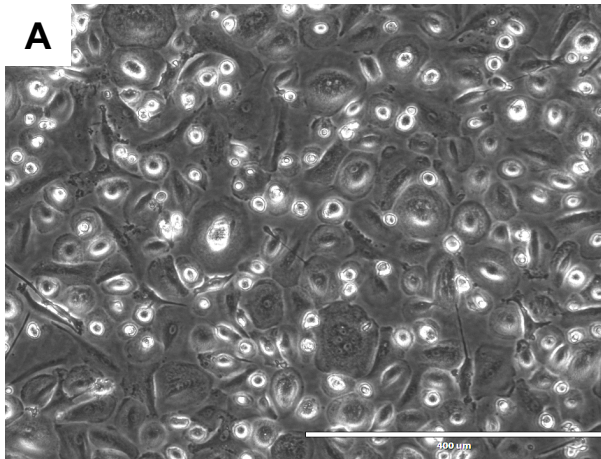
Abbildung 15: Ergebnisse der FACS-Analyse zur Bestimmung der CD14-Expression von PBMCs unter Einfluss von BSP innerhalb des R1-Gates. (A, oben) Kultivierung mit M-CSF. (B, unten) Kultivierung mit M-CSF und BSP. V1-L: CD14-negative Zellen. V1-R: CD14-positive Zellen. FSC-A = integrierte Lichtstreuung im Vorwärtsstreuungskanal. APC-A = integrierte Fluoreszenzintensität im APC-Kanal. Count = Zellzahl. Gate R1 = Ausschluss toter Zellen bzw. Zelldetritus.

4.2.2 Analyse der Osteoklastenformation unter Einfluss des BSP

Beurteilung der Morphologie mittels Lebendzellmikroskopie

Nach 10 Tagen M-CSF-Priming wurden die Osteoklasten-Progenitorzellen umgesiedelt und in den verschiedenen Versuchsgruppen weiter kultiviert, wobei einige Gruppen zusätzlich mit BSP und / oder RANKL substituiert wurden (siehe Kapitel 3.9). Die lichtmikroskopische Beurteilung der Zellen erfolgte an D14 und D17, um den Einfluss der verschiedenen Wachstumsfaktoren auf die Zellmorphologie zu beurteilen. Ziel hierbei war, die Ausdifferenzierung der OK-Vorläuferzellen zu reifen, multinukleären Osteoklasten (Stadium 4) zu beurteilen und mögliche Unterschiede zwischen den Gruppen zu identifizieren.

Die lichtmikroskopischen Aufnahmen in *Abbildung 16* zeigen, dass es bis auf die Kontrollgruppe in allen Subgruppen, einschließlich der Gruppen ohne RANKL-Zugabe, an D17 zur Ausbildung von großen, multinukleären Zellen kam (Stadium 4; *Abbildung 16 B, D, F, H, J*). Neben diesen reifen Osteoklasten fanden sich zudem noch nicht vollständig ausdifferenzierte, mononukleäre Zellen im Stadium 3. Obwohl in allen Subgruppen eine erfolgreiche Differenzierung zu reifen Osteoklasten beobachtet werden konnte, zeigten sich subtile Unterschiede in der Zellmorphologie und -verteilung. So wies Gruppe 1 ([M-CSF]+RANKL; *Abbildung 16 B*) ebenso wie Gruppe 3 ([M-CSF]+BSP+RANKL; *Abbildung 16 F*) an D17 eine hohe Anzahl vollständig differenzierter Osteoklasten mit charakteristischer polygonaler Zellform auf. Im Unterschied zu Gruppe 1 waren in Gruppe 3 an D14 tendenziell vermehrt größere Zellen im Entwicklungsstadium 3 bis 4 zu erkennen (*Abbildung 16 E; A*). Hiervon unterschieden sich die übrigen Gruppen, die eine größere Variabilität in Zellgröße und -morphologie boten.



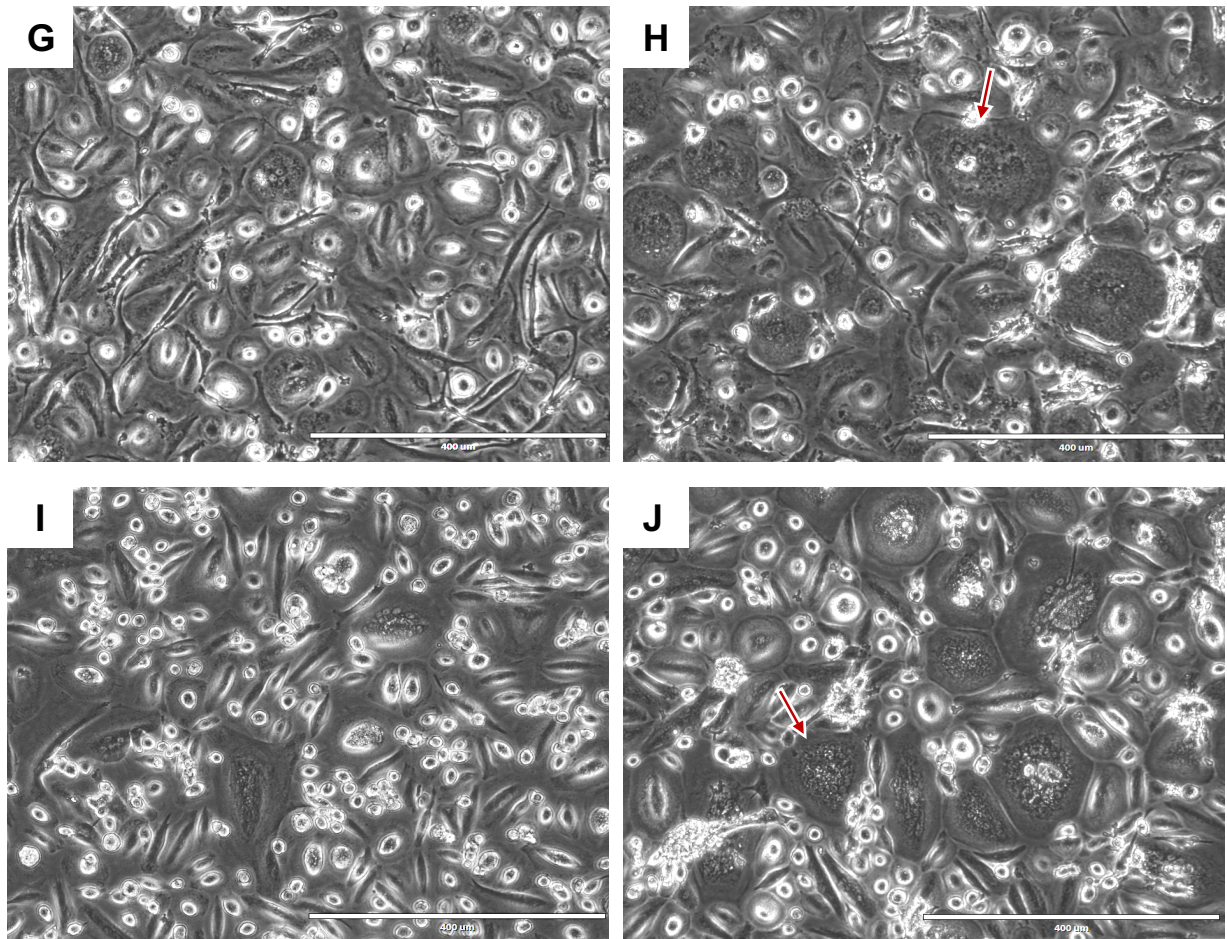


Abbildung 16: Lichtmikroskopische Aufnahmen der verschiedenen Zellkulturen im zeitlichen Verlauf. (A, B) Gruppe 1 ([M-CSF]+RANKL); (C, D) Gruppe 2 ([M-CSF]+BSP); (E, F) Gruppe 3 ([M-CSF]+BSP+RANKL); (G, H) Gruppe 4 ([M-CSF]+BSP); (I, J) Gruppe 5 ([M-CSF]+BSP)+RANKL). Die linke Spalte zeigt die Zellen an D14 nach Isolation (A, C, E, G, I). Rechts sind die Aufnahmen der Lebendzellmikroskopie an D17 dargestellt (B, D, F, H, J). Die roten Pfeile markieren beispielhaft Zellen im Entwicklungsstadium 4. Maßstab: 400 µm.

Analyse der VNR-Expression und Multinuklearität

Um den Einfluss des BSP auf den osteoklastischen Phänotyp zu untersuchen, wurde die VNR-Färbung in Kombination mit der Zellkern-Färbung in den verschiedenen Zellkulturgruppen durchgeführt (Abbildung 17). Hierbei zeigten sich in Gruppe 2 ([M-CSF]+BSP), 3 ([M-CSF]+BSP+RANKL), und 4 ([M-CSF]+BSP) mehr VNR-positive, multinukleäre Osteoklasten als in der Kontrollgruppe sowie Gruppe 1 ([M-CSF]+RANKL). Die Osteoklasten waren in Gruppe 2 und 4 jedoch insgesamt kleiner, während es unter dem zeitgleichen Einfluss von BSP und RANKL (Gruppe 3) zur

Ausbildung besonders großer, polygonaler Osteoklasten mit verstärkter VNR-Expression kam (*Abbildung 17 B*). Bei Gruppe 5 ([M-CSF+BSP]+RANKL) hingegen war die Anzahl der multinukleären Zellen im Vergleich zu allen anderen Subgruppen tendenziell geringer und die Zellen rundlicher, jedoch größer als die der Gruppe 2 und 4 (*Abbildung 17 D; A, C*). Die Ergebnisse zeigen, dass BSP einen positiven Einfluss auf die Expression des VNR und die Differenzierung von PBMCs zu reifen Osteoklasten nimmt. Darüber hinaus scheint die Wirkung von BSP eine zeitabhängige Komponente aufzuweisen.

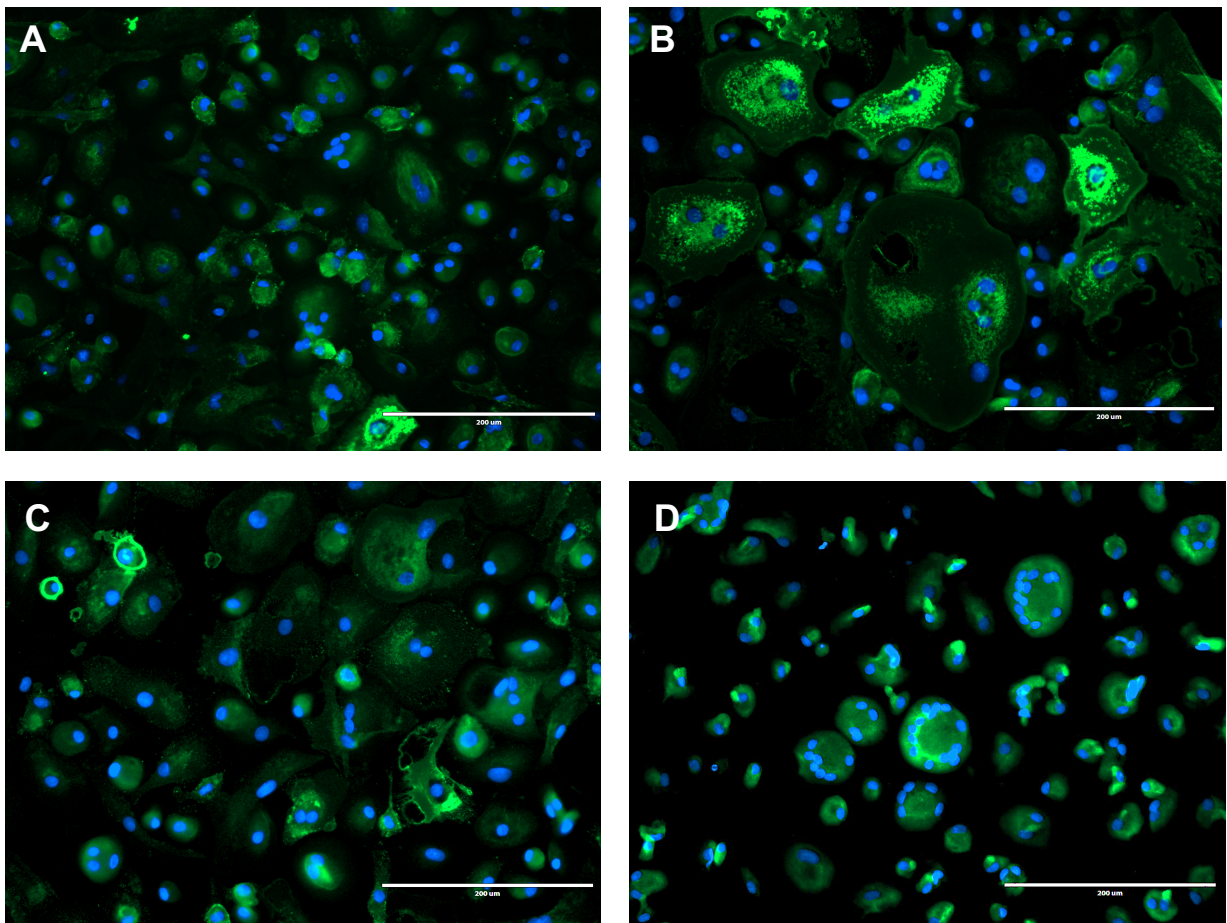


Abbildung 17: Immunfluoreszenzfarbung des VNR (grün) und Zellkernfarbung mittels Hoechst (blau) an D17 der verschiedenen Subgruppen. (A) Gruppe 2 ([M-CSF]+BSP); (B) Gruppe 3 ([M-CSF]+BSP+RANKL); (C) Gruppe 4 ([M-CSF]+BSP); (D) Gruppe 5 ([M-CSF]+BSP+RANKL). Maßstab: 200 µm.

Analyse der Genexpression osteoklastischer Marker

Um den Einfluss des BSP sowie RANKL auch auf Genexpressionsebene zu analysieren, wurden die OK-Vorläuferzellen entsprechend der in der Methodik

gezeigten Subgruppeneinteilung mit M-CSF/BSP/RANKL inkubiert (siehe *Abbildung 9*). Nach 10-tägiger *Priming*-Phase sowie weiteren 4 und 7 Tagen Kultivierung (somit D14 und D17 nach Zellisolation) wurden die Zellen abgelöst, die RNA isoliert, in cDNA transkribiert und die Expressionsraten von NFATc1, Cathepsin K, MMP9, TRAP, $\alpha_v\beta_3$ -Integrin bzw. dessen Untereinheit α_v und CTR mittels qPCR ausgewertet. Die ermittelten Werte wurden jeweils auf die Kontrollgruppe mit M-CSF normiert. Die Ergebnisse sind als Boxplots visualisiert.

Beurteilung der NFATc1-Genexpression

Am vierten Tag der Kultivierung zeigten die Osteoklasten bzw. -vorläuferzellen in allen Subgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe tendenziell eine ähnliche oder geringere relative Genexpression von NFATc1 (*Abbildung 18*). Die Mediane der einzelnen Gruppen unterschieden sich hierbei kaum voneinander. An D7 wurde in allen Versuchsgruppen ein deutlicher Anstieg der NFATc1-Genexpression im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet. Die medianen Genexpressionsraten von Gruppe 1 ([M-CSF]+RANKL), 2 ([M-CSF]+BSP) und 4 ([M-CSF+BSP]) unterschieden sich dabei nur marginal, während Gruppe 3 ([M-CSF + BSP + RANKL]) einen numerisch deutlich höheren Median aufwies. Aufgrund hoher Werteschwankungen innerhalb der Gruppe ergab sich jedoch keine statistische Signifikanz. Überraschenderweise wies Gruppe 5 ([M-CSF+BSP]+RANKL) trotz RANKL-Substitution tendenziell die niedrigsten NFATc1-Expressionswerte auf.

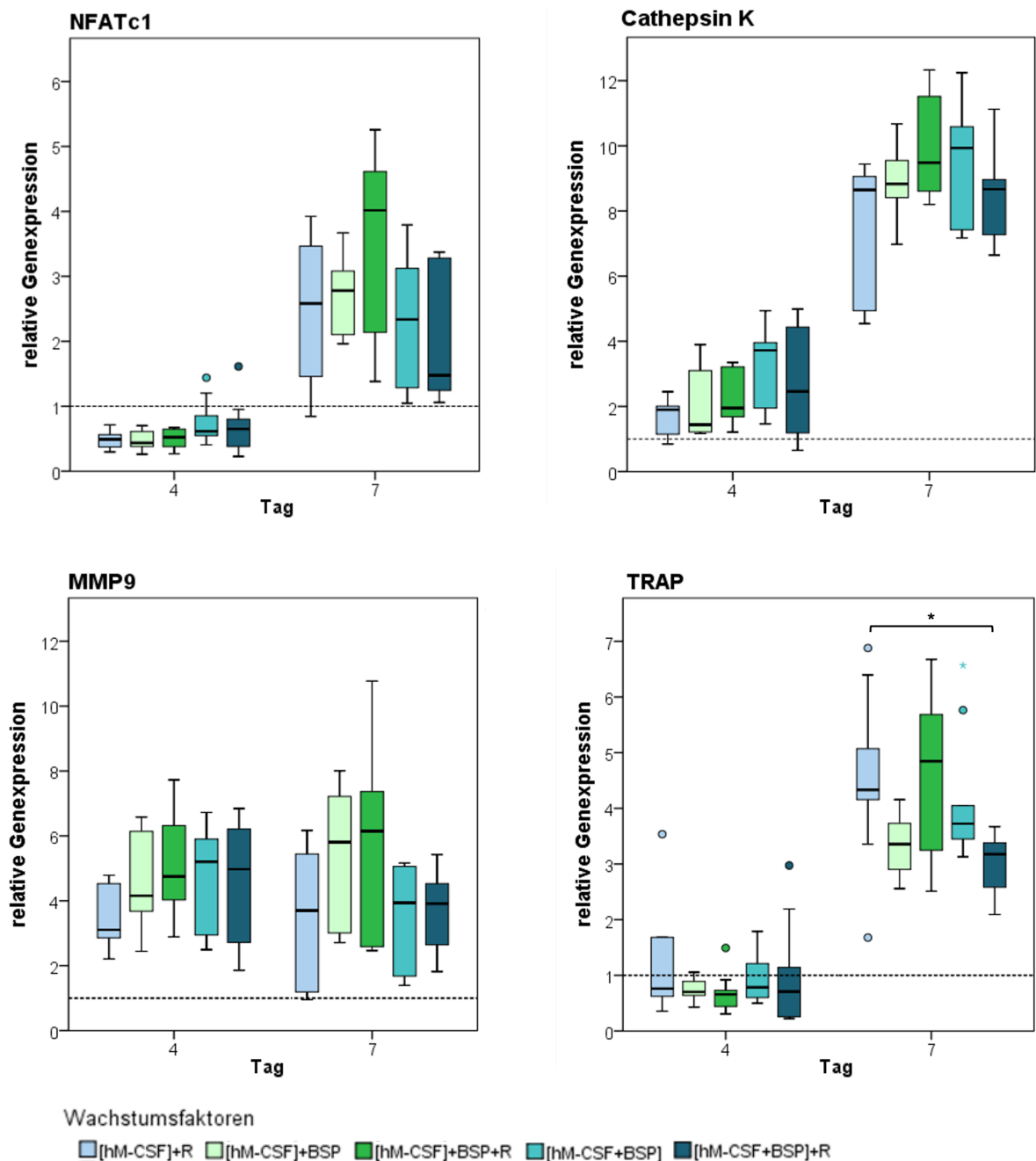


Abbildung 18: Relative Genexpression von NFATc1, Cathepsin K, MMP 9 und TRAP an D4 und D7 der Osteoklastogenese innerhalb der verschiedenen Subgruppen (D14 und D17 seit Isolierung). Die ermittelten Daten sind als Boxplots dargestellt (n=9 pro Subgruppe). Signifikanzen sind mit * gekennzeichnet ($p \leq 0,05$).

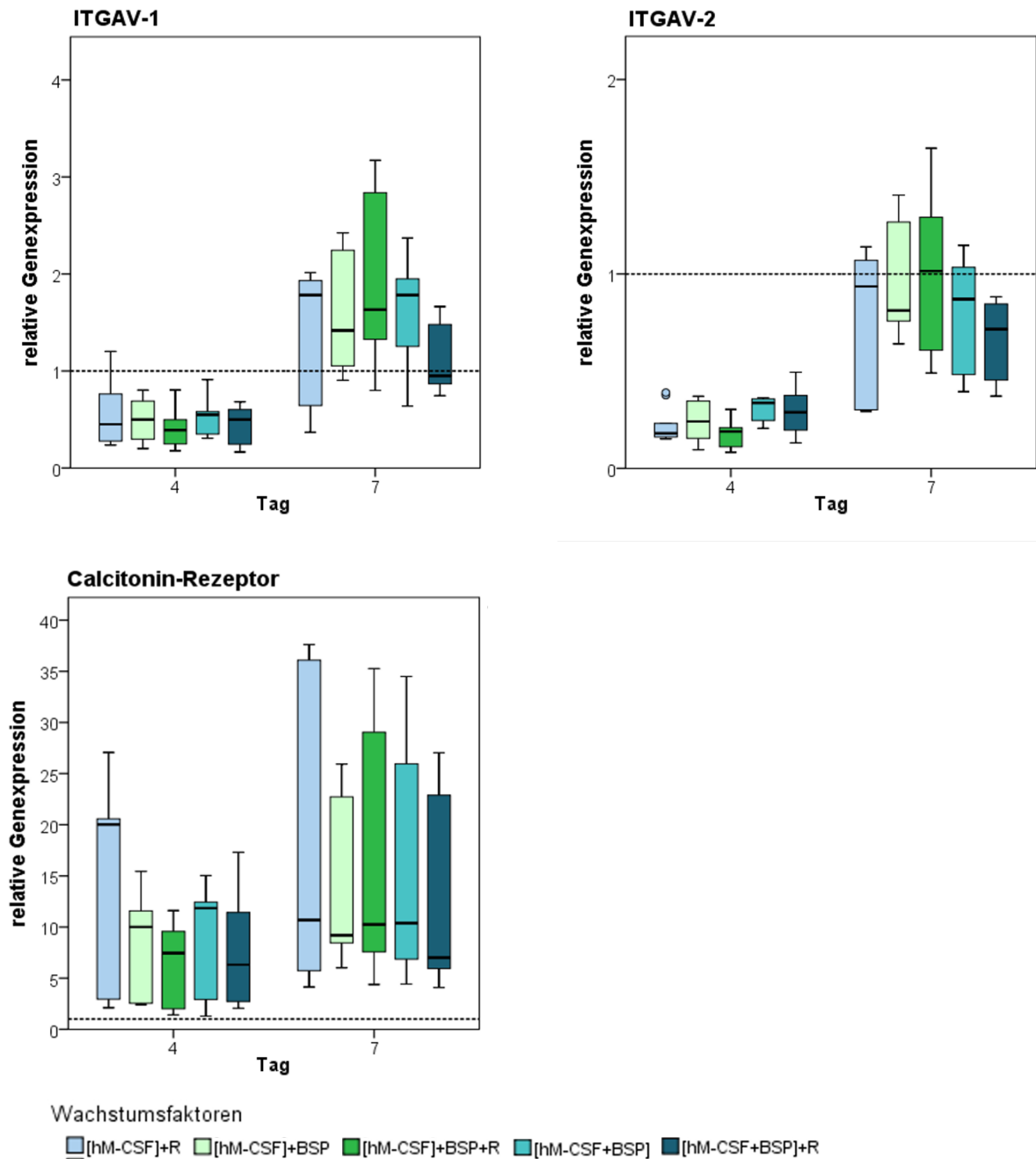


Abbildung 19: Relative Genexpression von ITGAV-1, ITGAV-2 und Calcitonin-Rezeptor an D4 und D7 der Osteoklastogenese innerhalb der verschiedenen Subgruppen (D14 und D17 seit Isolierung). Die ermittelten Daten sind als Boxplots dargestellt (n=9 pro Subgruppe).

Beurteilung der Cathepsin K-Genexpression

Bereits an D4 der Kultivierung zeigten alle Versuchsgruppen deutlich höhere mediane mRNA-Level des lysosomalen Enzyms Cathepsin K im Vergleich zur Kontrollgruppe. Bis D7 kam es in allen Gruppen zu einer weiteren deutlichen Hochregulation der Cathepsin-K-Genexpression, wobei die Werte im Median um das 2- bis 3-fache anstiegen (*Abbildung 18*). Gruppe 3 ([M-CSF]+BSP+RANKL) und 4 ([M-CSF+BSP]) wiesen hierbei sowohl an D4 als auch an D7 tendenziell die höchsten Genexpressionsraten auf, allerdings ergab die statistische Analyse keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Subgruppen.

Beurteilung der MMP-9-Genexpression

Die Analyse der MMP-9-Genexpression ergab analog zur Cathepsin K-Genexpressionsanalyse bereits an D4 in allen Versuchsgruppen höhere mediane Genexpressionsraten als die Kontrollgruppe (*Abbildung 18*). Die niedrigste mediane Expression wies hierbei Gruppe 1 ([M-CSF]+RANKL) auf, während die Zugabe von BSP in den Gruppen 2 ([M-CSF]+BSP), 3 ([M-CSF]+BSP+RANKL), 4 ([M-CSF+BSP]) und 5 ([M-CSF+BSP]+RANKL) zu einer leichten, statistisch jedoch nicht signifikanten Steigerung der Expressionslevel führte. Die Genexpressionslevel blieben nach weiteren 3 Tagen Kultivierung weitgehend auf unverändertem Niveau, wobei in Gruppe 2 und 3 eine numerisch geringfügige Zunahme und in Gruppe 4 und 5 eine geringe Abnahme des Medians zu verzeichnen war. Interessanterweise wiesen die Subgruppen mit identischem Zeitpunkt der BSP-Zugabe (somit Gruppe 2 und 3 sowie Gruppe 4 und 5) somit ein kohärentes Verhalten hinsichtlich der medianen Genexpressionen auf. Insgesamt ließ sich jedoch kein signifikanter Einfluss von BSP auf die MMP-9-Genexpression feststellen.

Beurteilung der TRAP-Genexpression

An D4 der Zellkultur wiesen alle Untergruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe eine ähnliche TRAP-Genexpression auf (*Abbildung 18*). Bis D7 kam es in allen Gruppen (ausgenommen der Kontrollgruppe) zu einer deutlichen Steigerung der TRAP-Genexpression, wobei das Ausmaß der Hochregulation zwischen den Subgruppen variierte. Der deutlichste Unterschied war zwischen Gruppe 5 ([M-CSF+BSP]+RANKL) und Gruppe 1 ([M-CSF]+RANKL) zu beobachten: Gruppe 5 wies hierbei einen signifikant niedrigeren Median im Vergleich zu Gruppe 1 auf ($p < 0,05$), wobei Gruppe 1 den zweithöchsten Median aller Gruppen erreichte. Die TRAP-Genexpression der Gruppe 3 ([M-CSF]+BSP+RANKL) wies numerisch den höchsten Median auf, zeigte

gleichzeitig aber auch die höchsten Werteschwankungen, sodass sich keine statistische Signifikanz feststellen ließ.

Beurteilung der $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Genexpression

Um den Einfluss von BSP und RANKL auf die Expression des VNR ($\alpha_v\beta_3$ -Integrin) während der Osteoklastogenese zu untersuchen, wurde die relative Genexpression der α_v -Untereinheit des Integrins (ITGAV) durch zwei verschiedene ITGAV-Transkripte (ITGAV-1 und ITGAV-2) analysiert.

i. ITGAV-1-Genexpression

Die Analyse der ITGAV-1-Genexpression an D4 ergab in allen Subgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe geringere Werte (*Abbildung 19*). Die Mediane der einzelnen Gruppen unterschieden sich hierbei kaum voneinander. Mit fortschreitender Kulturdauer bis D7 zeigte sich eine Steigerung der ITGAV-1-Expression im Vergleich zu D4. Dabei zeigte Gruppe 1 ([M-CSF]+RANKL) und 4 ([M-CSF+BSP]) die höchsten (1,8-fach) und Gruppe 5 ([M-CSF+BSP]+RANKL) den niedrigsten medianen Genexpressionswert für ITGAV-1, allerdings ohne statistische Signifikanz.

ii. ITGAV-2-Genexpression

Analog zur Analyse von ITGAV-1 ergab die Untersuchung der ITGAV-2-Genexpression an D4 in allen Gruppen eine geringere Expression als die Kontrollgruppe (*Abbildung 19*). Die Mediane der einzelnen Gruppen unterschieden sich auch hier nicht signifikant voneinander. An D7 war im Vergleich zu D4 eine leichte Erhöhung der ITGAV-2-Expression zu verzeichnen, wobei der höchste Median ([M-CSF]+BSP+RANKL) dem Genexpressionswert der Kontrollgruppe entsprach. Gruppe 5 ([M-CSF+BSP]+RANKL) wies den niedrigsten Wert auf und verblieb unter Niveau der Kontrollgruppe. Hierbei waren alle festgestellten Unterschiede jedoch ebenfalls nicht statistisch signifikant.

Beurteilung der CTR-Genexpression

Im Allgemeinen ergaben sich in der Analyse sowohl an D4 als auch an D7 deutliche höhere Genexpressionswerte der Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe (*Abbildung 19*). Dieser Effekt war besonders ausgeprägt unter alleiniger RANKL-Stimulation ohne Einfluss des BSPs und führte zu einer 20-fach höheren medianen Genexpression in Gruppe 1 ([M-CSF]+RANKL) als in der Kontrollgruppe. Numerisch bildete dies den höchsten Median unter allen Untergruppen, aufgrund von Werteschwankungen ergaben sich jedoch keine statistisch signifikanten Unterschiede. Im Laufe der

Kultivierung nahm dieser wieder ab, wobei er weiterhin noch ca. 10-fach höher als der der Kontrollgruppe war. Gleichzeitig gab es in Gruppe 1 die stärksten Werteschwankungen im Vergleich zu den anderen Gruppen. Auch in dieser Genexpressionsanalyse schnitt Gruppe 5 ([M-CSF+BSP]+RANKL) im Vergleich zu den anderen Untergruppen tendenziell am schlechtesten ab mit niedrigstem Median sowohl an D4 als auch an D7, wenn auch nicht statistisch signifikant.

4.2.3 Schlussfolgerungen

Anhand der vorliegenden Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass RANKL die Genexpression osteoklastenspezifischer Marker sowie die VNR-Expression in den isolierten Zellen signifikant hochreguliert. Diese Beobachtung bestätigt die erfolgreiche terminale Differenzierung der PBMCs bzw. OK-Vorläuferzellen zu reifen Osteoklasten. Die analysierten Gene erreichten dabei zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Differenzierungsprozess ihre Expressionsmaxima.

Darüber hinaus demonstrieren die erhobenen Daten, dass BSP sowohl in Kombination mit RANKL als auch RANKL-unabhängig die Expression des VNR und osteoklastenspezifischer Gene stimulierte. Dabei zeigte sich ein zeitabhängiger Aspekt hinsichtlich des Applikationszeitpunkt von BSP und RANKL: So verstärkte die simultane Gabe von BSP und RANKL tendenziell die Expression, während eine zeitversetzte Gabe im Vergleich zur M-CSF/RANKL-Stimulation tendenziell hemmend wirkte.

4.3 Einfluss des BSP auf die Osteoklastenfunktion

4.3.1 Beurteilung der TRAP-Aktivität

Um die TRAP-Aktivität qualitativ und quantitativ zu untersuchen, wurde ein TRAP-*Staining Kit* eingesetzt. Dieses ermöglichte sowohl die direkte intrazelluläre Anfärbung zur morphologischen Beurteilung als auch die indirekte quantitative Messung basierend auf der Fluoreszenzabsorption des Zellkulturmediums. Die Werte wurden dabei auf die M-CSF-Kontrollgruppe normiert und die ermittelten relativen Absorptionswerte der Untergruppen im Anschluss miteinander verglichen.

Die TRAP-Färbung bestätigte die Präsenz TRAP-positiver Zellen in allen Kulturen (*Abbildung 20*). Hierbei konnten sowohl große multinukleäre Zellen mit intensiver TRAP-Färbung als auch kleinere, mononukleäre Zellen mit geringerer TRAP-Aktivität identifiziert werden.

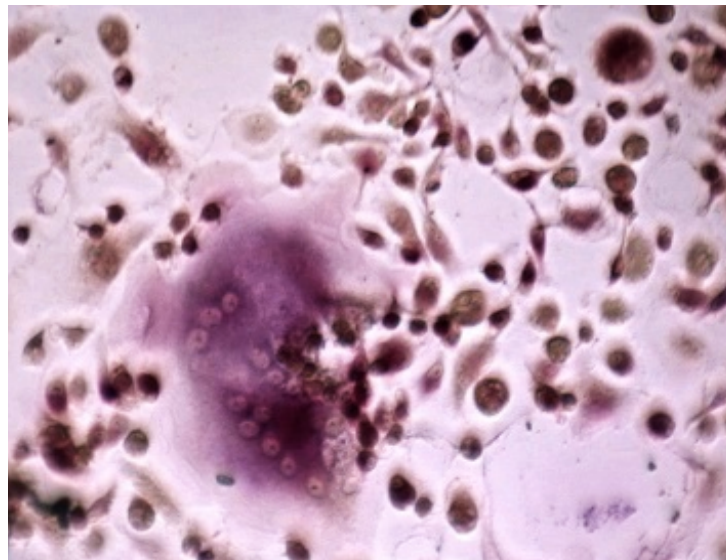


Abbildung 20: Qualitative TRAP-Analyse. Gezeigt ist ein repräsentatives Bild nach TRAP-Färbung an D17 nach Zellisolierung (161-fache Vergrößerung). Neben zwei großen polygonalen und multinukleären Zellen in der Mitte des Bildes sind viele kleinere, multi-, zum Teil auch mononukleäre Zellen dunkellila gefärbt und somit TRAP-positiv.

Die quantitative Analyse der TRAP-Aktivität zeigte signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen über den Kultivierungszeitraum (*Abbildung 21*). An Tag 1 war die TRAP-Aktivität in allen Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe erniedrigt, wobei insbesondere Gruppe 4 ([M-CSF+BSP]) und 5 ([M-CSF+BSP]+RANKL) die niedrigsten Mediane aufwiesen. Diese waren signifikant niedriger als die der Gruppe

1 ([M-CSF]+RANKL) und 3 ([M-CSF]+BSP+RANKL) ($p < 0,05$). Nach 2 Tagen Kultivierung zeigten sich die relativen Absorptionswerte der Gruppen zur Kontrollgruppe weitgehend unverändert, Gruppe 1 erreichte hierbei eine signifikant höhere relative Absorption als Gruppe 4. An D5 war ein kurzfristiger Anstieg der TRAP-Expression erkennbar, wobei Gruppe 4 und 5 etwa auf Niveau der Kontrollgruppe verblieben. Der Median der Gruppe 3 war hierbei numerisch am höchsten und gegenüber dem der Gruppe 5 statistisch signifikant höher. Nach kurzem Peak der TRAP-Expression war die TRAP-Aktivität an D7 kurzfristig rückläufig. Die relative Absorption der ersten Gruppe war dabei signifikant höher als Gruppe 4 und 5. An allen darauffolgenden Tagen ergaben sich keine statistisch relevanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Allgemein war jedoch zu erkennen, dass sich die relativen Absorptionswerte in Gruppe 2 bis 5 sukzessive steigerten und aneinander anglichen, sodass sie letztlich ab D9 tendenziell höher als die der Kontrollgruppe waren. Im Gegensatz dazu war in Gruppe 1 tendenziell eher eine Abnahme der Aktivität auf Niveau der Kontrollgruppe zu verzeichnen.

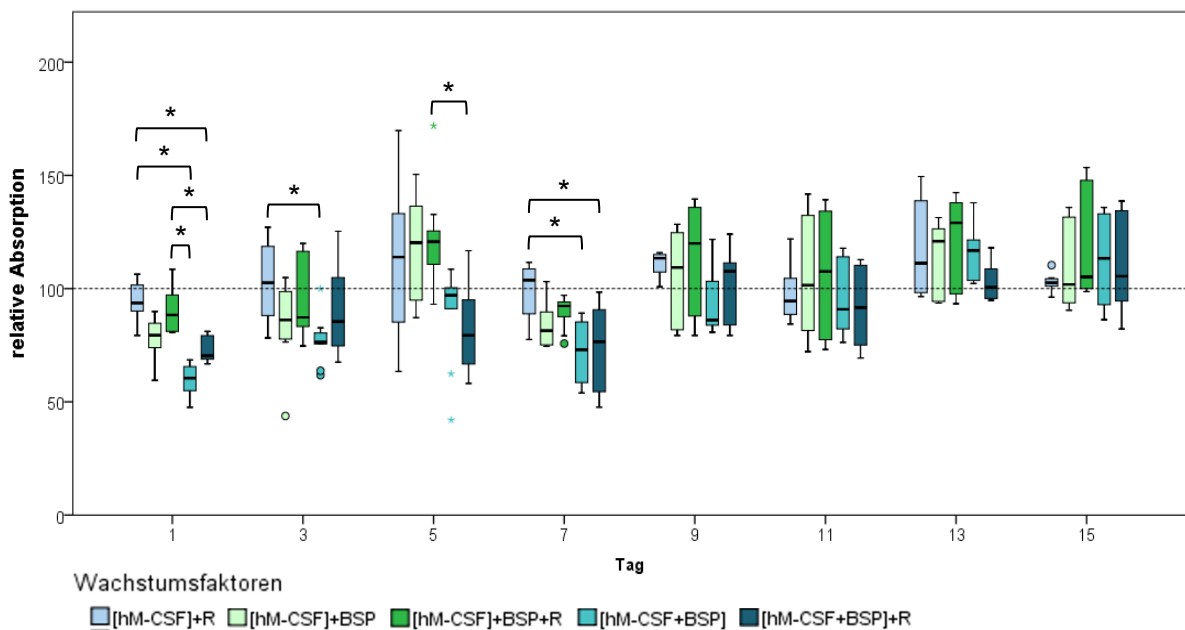


Abbildung 21: Quantitative Analyse der TRAP-Aktivität. Relative Absorptionswerte im Zellkulturüberstand der verschiedenen Subgruppen im Vergleich zur M-CSF-Kontrollgruppe (dargestellt als gestrichelte Referenzlinie) über einen Zeitraum von 15 Tagen, beginnend 10 Tage nach PBMC-Isolation. Die ermittelten Daten sind als Boxplots dargestellt ($n=9$ pro Subgruppe), statistisch signifikante Unterschiede sind mit * markiert ($p \leq 0,05$).

4.3.2 Beurteilung der resorptiven Aktivität der Osteoklasten

Osteoklasten besitzen die einzigartige Fähigkeit, Knochenmatrix abzubauen. Um den Einfluss des BSP auf die Funktionalität der Osteoklasten zu untersuchen, wurde die resorptive Aktivität der Zellen anhand der Calciumfreisetzung quantifiziert. Die Osteoklasten wurden hierfür in den bekannten Subgruppen nach insgesamt 17 Tagen Kultivierung auf Calciumphosphat-Platten umgesiedelt und das freigesetzte Calcium in den Mediumüberständen mittels colorimetrischen Assays an D2, D4, D7 und D11 ab Umsiedelung gemessen. Die ermittelten Werte wurden im Anschluss auf die Kontrollgruppe normiert.

In *Abbildung 22* sind die Unterschiede in der relativen Calciumfreisetzung zwischen den Gruppen und im zeitlichen Verlauf dargestellt. An D2 wiesen alle Gruppen eine deutlich erhöhte relative Calciumfreisetzung im Vergleich zur Kontrollgruppe auf. Dabei gab es innerhalb der Untergruppen keine signifikanten Unterschiede, wobei die Mediane der Gruppe 3 ([M-CSF]+BSP+RANKL) und 5 ([M-CSF+BSP]+RANKL) numerisch am höchsten waren. Mit zunehmender Kulturdauer zeigte sich in allen Gruppen eine sukzessive Abnahme der relativen Calciumfreisetzung. Hierbei war auffällig, dass die mediane relative Calciummenge in Gruppe 5 ([M-CSF+BSP]+RANKL) über die Zeit der Kultivierung weiterhin am höchsten war. Dieser Unterschied war an D7 im Vergleich zu Gruppe 3 ([M-CSF]+BSP+RANKL) sowie an D11 im Vergleich zu allen Untergruppen statistisch signifikant. In den anderen Gruppen zeigte sich ab D4 die relative Calciummenge auf niedrigem Niveau und unterschied sich kaum von der der Kontrollgruppe.

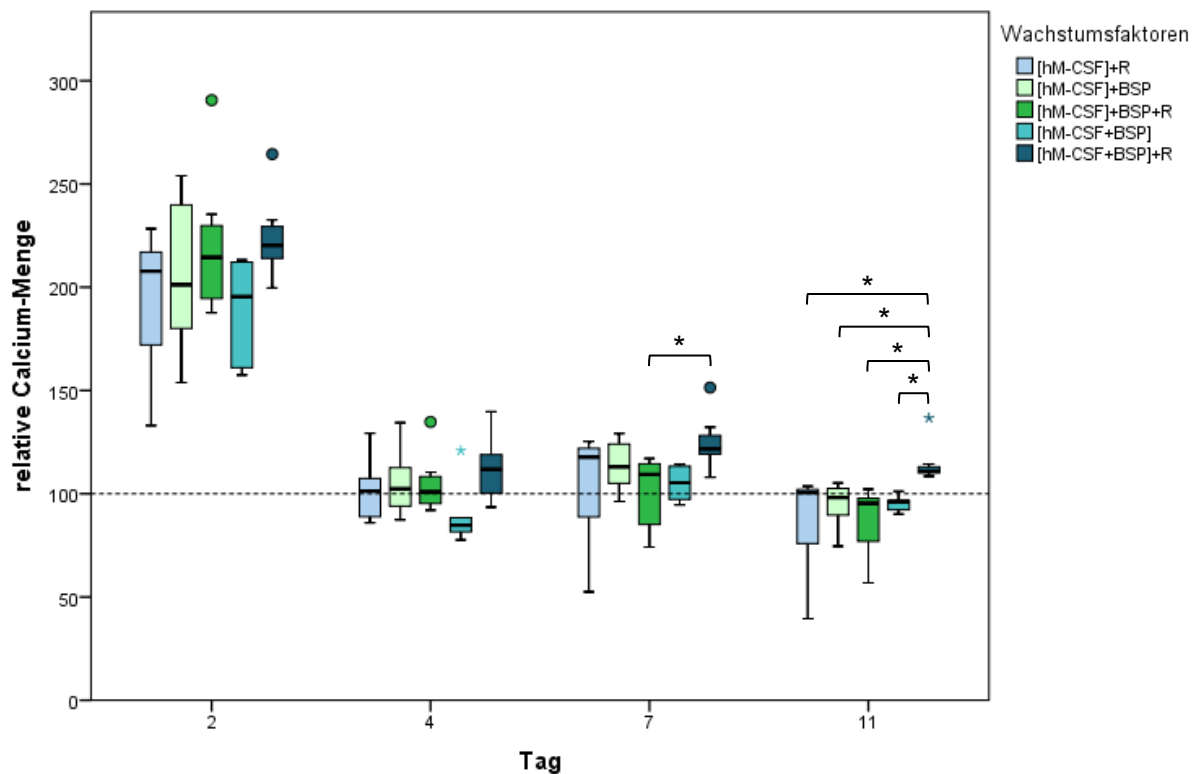


Abbildung 22: Ergebnisse des Calcium-Resorptionsassays. Relative Calcium-Mengen im Zellkulturüberstand der verschiedenen Subgruppen auf Calciumphosphat-Platten im Vergleich zur M-CSF-Kontrollgruppe (dargestellt als gestrichelte Referenzlinie) über einen Zeitraum von 11 Tagen. Die ermittelten Daten sind als Boxplots dargestellt ($n=9$ pro Subgruppe). Signifikanzen sind mit * gekennzeichnet ($p \leq 0,05$).

Zusammenfassende Beurteilung der osteoklastären Funktionalität

In Zusammenschau der Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass RANKL zur erfolgreichen Differenzierung der Osteoklasten führte und die generierten Osteoklasten resorptiv aktiv waren. Darüber hinaus förderte BSP in Kombination mit RANKL, aber auch ohne RANKL ebenso die Entstehung resorptiv aktiver Osteoklasten. Hierbei war besonders auffällig, dass die zeitversetzte Substitution von BSP und RANKL zu einer erhöhten und verlängerten relativen Calciumfreisetzung führte. BSP könnte somit neben einer Steigerung der Resorptionsfähigkeit zusätzlich Einfluss auf die Überlebensfähigkeit der Osteoklasten nehmen.

5 Diskussion

Ziel dieser Studie war die Untersuchung des Einflusses von Bone Sialoprotein (BSP) auf die Differenzierung und Funktion von Osteoklasten (OKs). BSP gehört zur Familie der SIBLING-Proteine und ist Teil der Knochenmatrix. Bisherige Studien konnten zeigen, dass es eine wichtige Rolle als Mineralisations-Initiator der Knochenmatrix spielt und Einfluss auf die Osteoblastendifferenzierung nimmt (Hunter and Goldberg, 1993). Ob und inwiefern BSP mit Osteoklasten interagiert, wurde bislang nur in wenigen Forschungsarbeiten untersucht. In den vorhandenen Studien konnte ein teils synergistischer Effekt von BSP und RANKL in Bezug auf die Osteoklastogenese und Knochenresorption nachgewiesen werden (Miyachi et al., 1991, Ross et al., 1993, Malaval et al., 2008). Auch scheint BSP positiven Einfluss auf die Überlebensrate der Osteoklasten zu nehmen (Valverde et al., 2005). Um detailliertere Einblicke in die Wirkung von BSP auf die Differenzierung und Aktivität von Osteoklasten zu gewinnen, wurde in dieser Arbeit zunächst ein robustes *in-vitro*-Protokoll für Osteoklasten stammend aus PBMCs etabliert. Hierauf basierend erfolgte dann die Analyse des Einflusses von BSP auf die OK-Differenzierung und -Aktivität.

5.1 Etablierung, Optimierung und Validierung der *in-vitro*-Generierung von Osteoklasten aus PBMCs

Maßgeblich für eine erfolgreiche *in-vitro*-Generierung von Osteoklasten aus PBMCs war die Entdeckung der beiden Hauptmediatoren der Osteoklastogenese, M-CSF (Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor) und RANKL (Rezeptor-Aktivator des NF- κ B-Liganden) (Wiktor-Jedrzejczak et al., 1990, Dougall et al., 1999, Ab Kadir et al., 2012). M-CSF ist insbesondere für die frühen Entwicklungsstadien der myeloischen Stammzellen zur Bildung monozytärer und im Verlauf osteoklastärer Vorläuferzellen unverzichtbar (Felix et al., 1990, McDonald et al., 2021). Durch Bindung an seinen Rezeptor c-Fms auf der Zelloberfläche der Vorläuferzellen werden intrazelluläre Signalkaskaden aktiviert, die über weitere Transkriptionsfaktoren wie PU.1 und c-Fos zu einer Hochregulation von RANK, dem Rezeptor von RANKL, führen (Suda et al., 1999, Cappellen et al., 2002, Soltanoff et al., 2009). Daneben ist M-CSF an der Expression osteoklastenspezifischer Gene beteiligt und wirkt als Überlebensfaktor für OK-Progenitorzellen (Woo et al., 2002, Zhao et al., 2007). Basierend auf diesem

Wissen wird in einigen Studien zunächst vor Zugabe von RANKL ein *Priming* der PBMC mit ausschließlich M-CSF empfohlen, um durch die höhere Expression von RANK die RANKL-Sensitivität der Zellen zu steigern und somit die Differenzierung der PBMCs zu Osteoklasten möglichst effizient zu fördern (Riedlova et al., 2023). Hinsichtlich der optimalen Dauer des M-CSF-*Primings* für PBMCs herrscht in der Literatur jedoch Uneinigkeit. Während Riedlova et al. (2023) eine Vorkultivierung von 48 Stunden als ideal beschreiben, um einem möglichen Verlust des osteoklastogenen Potenzials der Vorläuferzellen entgegenzuwirken, weisen andere Studien darauf hin, dass längere Vorinkubationszeiträume keinerlei Einschränkungen des Differenzierungspotenzials bedeuten (Ab Kadir et al., 2012, Prause et al., 2015). So wird in dem von Henriksen et al. (2012) beschriebenen Protokoll eine Vorbehandlung der PBMCs mit M-CSF für 7 Tage mit einer Konzentration von 20 ng/ml empfohlen. Die Diskrepanz lässt sich zum Teil auf Unterschiede der experimentellen Bedingungen zurückführen: So unterscheiden sich Art der verwendeten Zellen, Zelldichte, Mediumzusammensetzung und die Anwesenheit von Knochensubstanz (De Vries et al., 2015). Während der Kultivierung mit M-CSF wurden die PBMCs in der vorliegenden Arbeit hinsichtlich ihrer morphologischen Entwicklung regelmäßig lichtmikroskopisch analysiert. Insgesamt konnten unter dem Einfluss von M-CSF vier Entwicklungsstadien identifiziert werden. Die initial kleinen, runden PBMCs entwickelten sich zu spindelförmigen Zellen mit langen Ausläufern und schließlich zu größeren, rundlichen Zellen mit einem Durchmesser von etwa 50 µm. Diese morphologischen Veränderungen entsprechen dem typischen Erscheinungsbild von OK-Progenitorzellen (Takeshita et al., 2000, Sorensen et al., 2007). In der vorliegenden Studie zeigte sich das dritte Entwicklungsstadium um den 10. Kultivierungstag dominierend, wobei keine multinukleären Zellen zu erkennen waren. Diese Beobachtung steht im Einklang mit den Erkenntnissen der Literatur, die bestätigen, dass M-CSF allein nicht ausreichend für eine vollständige Differenzierung zu multinukleären, aktiven Osteoklasten ist (Nakagawa et al., 1998, Dougall et al., 1999). FACS-Analysen ergaben an Tag 10 des *Primings* mit etwa 84% einen sehr hohen Anteil an CD14⁺-Zellen, wobei CD14 als typischer Marker für monozytäre Vorläuferzellen mit hohem osteoklastogenem Differenzierungspotenzial gilt (Husheem et al., 2005, Nicholson et al., 2000). An Tag 10 zeigte sich somit eine hohe Reinheit der isolierten Zellpopulation. Unmittelbar nach der Isolation der PBMCs hingegen lag der Anteil der CD14⁺-Zellen erwartungsgemäß niedriger bei etwa 22% (Costa-Rodrigues et al., 2011). Somit ergab sich von Tag 0 zu Tag 10 ein signifikanter Anstieg

der CD14⁺-Zellfraktion, gleichzeitig waren anteilig deutlich mehr Zellen vital. Dies unterstreicht die in der Literatur beschriebene Funktion von M-CSF, die Proliferation, Differenzierung und das Überleben monozytärer Vorläuferzellen zu fördern (Woo et al., 2002, Boyle et al., 2003, Arai et al., 1999). In der vorliegenden Studie wurden unter optimierten Zellkulturbedingungen auch nach 10-tägiger M-CSF-Vorbehandlung keine Einschränkungen des Zelldifferenzierungspotenzials beobachtet. Stattdessen wurde die verlängerte M-CSF-Exposition basierend auf den erhobenen Daten als vorteilhaft für die Akkumulation CD14⁺-Vorläuferzellen und somit für den Erhalt einer reineren Zellkultur bei initial heterogener PBMC-Zellpopulation gewertet. Daher wurde sich in dieser Arbeit für eine Vorkultivierungsdauer von 10 Tagen mit ausschließlich M-CSF entschieden. Auf eine Vorsortierung der Zellen hinsichtlich CD14-Positivität, wie in einigen Studien postuliert, wurde verzichtet (s. Kapitel Limitationen).

Nach 10-tägiger *Priming*-Phase mit M-CSF erfolgte die Umsiedelung der Zellen auf kleinere Zellkulturflaschen und die additive Zugabe von RANKL zur Induktion der terminalen OK-Differenzierung: RANKL bindet an seinen Rezeptor RANK auf der Oberfläche der OK-Progenitorzellen und induziert eine komplexe intrazelluläre Signalkaskade, die durch verschiedene TRAF-abhängige Signalwege (z.B. NF- κ B, MAPK) unter anderem zur Aktivierung von NFATc1 führt (Wong et al., 1998, Boyle et al., 2003, Lomaga et al., 1999, Takayanagi, 2021, Nakagawa et al., 1998). NFATc1 initiiert als zentraler Schlüsselfaktor der Osteoklastogenese die Hochregulation typischer osteoklastischer Gene wie von TRAP, Cathepsin K und VNR (Oddie et al., 2000, Crabtree and Olson, 2002, Matsumoto et al., 2004, Matsuo et al., 2004, Kim et al., 2005, Kim et al., 2008, Ono and Nakashima, 2018, Crotti et al., 2006). Zudem ist der RANKL/RANK-Signalweg an der Fusion der mononukleären Vorläuferzellen zu reifen, multinukleären Osteoklasten beteiligt und schützt diese vor Apoptose (Zhao et al., 2007, Suda et al., 1999, Wong et al., 1999).

Das von Henriksen et al. (2012) etablierte Protokoll führte in dieser Studie zunächst nicht zu einer erfolgreichen OK-Differenzierung, was nach Fehleranalyse auf eine unzureichende RANKL-Konzentration von 20 ng/ml zurückgeführt wurde. Basierend auf einer in der Literatur beschriebenen dosisabhängigen Wirkung von RANKL wurde die Konzentration von RANKL auf 50 ng/ml erhöht (Susa et al., 2004, Kleinhans et al., 2015, Ab Kadir et al., 2012, Valverde et al., 2005, Kreja et al., 2007). Hiernach zeigten sich bereits nach vier Tagen unter RANKL-Inkubation vereinzelt mehrkernige Zellen und nach drei weiteren Tagen dominierten große, polygonale, multinukleäre Zellen mit

jeweils mindestens drei Zellkernen die Zellkultur. Dies entspricht dem typischen Erscheinungsbild reifer Osteoklasten (Miyamoto and Suda, 2003, Sorensen et al., 2007).

Zur Validierung des Differenzierungserfolges wurde einerseits eine Immunfluoreszenzfärbung zur Detektion des VNR ($\alpha_v\beta_3$ -Integrin) durchgeführt. Der VNR gilt als etablierter phänotypischer Marker von Osteoklasten und spielt eine wichtige Rolle bei deren Adhäsion an die Knochenmatrix (Duong and Rodan, 2001, Rucci and Teti, 2016). Diese Bindung ist essenziell für den Prozess der Knochenresorption, da hierdurch die Bildung der Versiegelungszone und somit die Entstehung des subosteoklastischen Kompartiments ermöglicht wird (Teitelbaum, 2000, Florencio-Silva et al., 2015), siehe Kapitel Funktion der Osteoklasten. Parallel wurden die Zellkerne mittels Hoechst-Färbung markiert – ein Chromosomenfarbstoff, der sich in zahlreichen Forschungsarbeiten zur Visualisierung und Quantifizierung von Zellkernen bewährt hat (Bainbridge and Macey, 1983). In Einklang mit der Literatur erlaubte die Kombination beider Färbungen die spezifische Identifizierung multinukleärer, reifer Osteoklasten (Kleinhans et al., 2015, Zainal Ariffin et al., 2024). Die Immunfluoreszenzanalyse zeigte eine deutlich stärkere Expression des VNR in den RANKL-stimulierten Gruppen im Vergleich zu den Kontrollgruppen, die ausschließlich mit M-CSF behandelt wurden. Darüber hinaus wiesen die RANKL-exponierten Zellen neben der VNR-Positivität eine deutlich größere Morphologie und gleichzeitige Multinuklearität von mindestens 3 Zellkernen pro Zelle auf. Diese Beobachtungen bestätigten die erfolgreiche Differenzierung der RANKL-stimulierten Zellen zu reifen Osteoklasten, wie in früheren Arbeiten beschrieben (Boyle et al., 2003, Roodman, 1999, Suda et al., 1999). Interessanterweise traten in den M-CSF-Kontrollgruppen vereinzelt ebenfalls multinukleäre Zellen auf, jedoch ohne begleitende VNR-Expression. Die spontane Fusion weniger Vorläuferzellen wurde bereits in vorherigen Studien beobachtet und auf eine minimale Produktion osteoklastogener Faktoren durch noch vorhandene mesenchymale Stromazellen zurückgeführt (Vuoti et al., 2023, Costa-Rodrigues et al., 2011). Die fehlende VNR-Expression belegt jedoch, dass diese endogenen Faktoren nicht ausreichen, um eine terminale Differenzierung der Zellen zu reifen Osteoklasten zu induzieren, sodass ihr Einfluss vernachlässigbar ist.

Zusammenfassend validierten die Ergebnisse das verwendete Protokoll zur Generierung reifer Osteoklasten unter RANKL-Substitution und bildeten die Grundlage

für die nachfolgenden Experimente. Die Gesamtkultivierungsdauer von Isolation der PBMCs bis zur Ausbildung reifer Osteoklasten betrug hierbei insgesamt 17 Tage, zusammengesetzt aus 10 Tagen M-CSF-Vorkultivierung und 7 Tagen additive Zugabe von RANKL. Dies steht in Einklang mit anderen Studien, die für humane PBMCs eine Differenzierungsdauer von etwa 14 bis 21 Tagen bis zu ausgereiften Osteoklasten beschreiben (Costa-Rodrigues et al., 2011, Kleinhans et al., 2015, Susa et al., 2004).

5.2 Einfluss des BSP auf die Osteoklastogenese

Es gibt nur wenige *in-vitro*- und *in-vivo*-Studien, die den Effekt von BSP auf die Osteoklastogenese analysiert haben. Untersuchungen an BSP-defizienten Mäusen konnten zeigen, dass das Fehlen von BSP sowohl die Bildung als auch die Aktivität von Osteoklasten beeinträchtigt. Die Mäuse wiesen kürzere, hypomineralisierte Knochen mit höherer trabekulärer Knochenmasse und vermindertem Knochenumsatz auf (Staines et al., 2012, Malaval et al., 2009, Wade-Gueye et al., 2012, Marinovich et al., 2016, Bouleffour et al., 2014). Umgekehrt führte die Überexpression von BSP zu einer gesteigerten Osteoklastogenese und vertieften Resorptionslakunen (Raynal et al., 1996, Valverde et al., 2008). Trotz dieser Erkenntnisse sind viele Wirkmechanismen, insbesondere auf die OK-Entwicklung und -Funktion noch unklar. In diesem Kontext wurde in dieser Arbeit der Einfluss des BSP auf die Isolation, Differenzierung und Funktion der Osteoklasten detailliert untersucht.

5.2.1 Einfluss auf die Isolation und Differenzierung der PBMC

Unter alleiniger Kultivierung der PBMCs mit BSP zeigte sich eine deutlich reduzierte Zellüberlebensrate. Die verbliebenen Zellen wiesen im weiteren Kultivierungsverlauf keine Zeichen weiter fortschreitender Differenzierung auf. Dies unterstreicht die essenzielle Rolle von M-CSF für das Überleben und die Aktivierung monozytärer Vorläuferzellen (Jiang et al., 2023). Im Gegensatz dazu zeigte sich in den Zellkulturen mit M-CSF und BSP eine tendenziell höhere Anzahl an Zellen im Entwicklungsstadium 3 im Vergleich zu den Kontrollgruppen mit ausschließlich M-CSF. Darüber hinaus führte die Kombination von BSP und M-CSF zu einer deutlichen Steigerung der CD14-Expression (91,1 % vs. 80,2 % unter M-CSF allein) und Zunahme der Zellgröße im Vergleich zur M-CSF-Kontrollgruppe. Die erhobenen Ergebnisse deuten auf einen

synergistischen Effekt von BSP und M-CSF auf die frühe Osteoklastogenese in Bezug auf Überleben und Reifung der Vorläuferzellen hin. Die Datenlage hierzu ist limitiert, so finden sich keine vergleichbaren Studien hinsichtlich spezifischer Effekte von BSP auf die Entwicklung von PBMCs. Die strukturellen Eigenschaften von BSP lassen jedoch vermuten, dass es über die RGD-Sequenz mit den bereits auf den Vorläuferzellen exprimierten Integrinen interagiert, was letztlich zu einer verstärkten Differenzierung der Vorläuferzellen führen könnte (Ganss et al., 1999, Bouleftour et al., 2016, Duong et al., 2000). Die Interaktion von BSP mit Integrinen, insbesondere dem $\alpha_v\beta_3$ -Integrin, ist in zahlreichen Studien bestätigt worden und gilt als Schlüsselmechanismus bei der zellulären Adhäsion, Migration und Aktivierung von OK-Progenitorzellen und reifen Osteoklasten (Bianco et al., 1991, Fisher et al., 2001, Staines et al., 2012).

5.2.2 Einfluss auf die Osteoklastenformation

Einfluss auf den osteoklastischen Phänotyp

Zusammenfassend zeigen die vorliegenden Daten, dass sowohl RANKL als auch BSP in Kombination mit M-CSF die Differenzierung der PBMCs zu reifen Osteoklasten induzierten. Die simultane Gabe von BSP und RANKL nach initialem M-CSF-*Priming* führte hierbei zu einer gesteigerten Differenzierung der Vorläuferzellen im Sinne einer höheren Anzahl großer polygonaler multinukleärer Osteoklasten mit verstärkter VNR-Expression. Diese Beobachtung korreliert mit den in der Literatur beschriebenen synergistischen Effekten von BSP und RANKL. So demonstrierten bereits Valverde et al. (2005) in ihrer *in-vitro*-Studie, dass die Kombination von BSP und RANKL eine stärkere Differenzierung von RAW264.7-Zellen und aus Knochenmark stammenden Monozyten zu Osteoklasten induzierte als RANKL allein. Auch in Zellkulturen transgener Mäuse führte eine BSP-Überexpression zu einer gesteigerten OK-Anzahl und einer teilweise höheren Resorptionsaktivität, während gleichzeitig das Fehlen von BSP in BSP-Knockout-Mäusen zu einer signifikant reduzierten Anzahl an Osteoklasten führte (Malaval et al., 2008, Bouleftour et al., 2016, Boudiffa et al., 2010, Valverde et al., 2008). Bei sequenzieller Gabe von BSP und RANKL war in den Versuchen der vorliegenden Studie dieser synergistische Effekt jedoch abgeschwächt. Die Ergebnisse legen somit einen zeitabhängigen Aspekt der BSP/RANKL-Interaktion nahe, beispielsweise bedingt durch Adaptationsmechanismen mit veränderter Rezeptorsensitivität oder -expression. In der vorhandenen Literatur ist solch ein

zeitabhängiger Effekt der BSP/RANKL-Interaktion in Bezug auf die OK-Differenzierung bislang nicht vorbeschrieben.

Interessanterweise kam es in den mit BSP und M-CSF behandelten Gruppen auch ohne RANKL-Zugabe (Gruppe 2 und 4) zur Ausbildung multinukleärer, VNR-positiver Zellen, die zahlenmäßig tendenziell Gruppe 1 übertrafen, wenngleich die Zellgröße geringer war. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass BSP auch ohne RANKL osteoklasteninduktiv wirken kann. Ähnliche Effekte wurden von Valverde et al. (2005) bei RAW264.7-Zellen beschrieben. In dieser Studie induzierte die alleinige Gabe von M-CSF und BSP dosisabhängig die Bildung TRAP-positiver, mehrkerniger Zellen. RAW 264.7-Zellen entstammen ursprünglich einer murinen Makrophagen-Zelllinie und werden in vielen *in-vitro*-Studien als etabliertes Modellsystem in der Osteoklasten-Forschung eingesetzt. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass sie als transformierte murine Zelllinie nicht alle Aspekte humaner Osteoklasten widerspiegeln. Dies kann zu Spezies-spezifischen Unterschieden führen (Lampiasi et al., 2021, Kong et al., 2019, Cheng et al., 2022).

Auf zellulärer Ebene könnten die beobachteten Effekte auf eine über die RGD-Sequenz des BSPs vermittelte und verstärkte Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden wie dem MAPK-Signalweg und die c-Src-Kinase zurückgeführt werden, welche essenziell für die Differenzierung und Fusion der Vorläuferzellen zu Osteoklasten sind (Ross and Teitelbaum, 2005, Sanjay et al., 2001, Miyazaki et al., 2004).

Einfluss auf den osteoklastischen Genotyp

Anhand der Analyse typischer osteoklastischer Marker mittels qPCR sollte der Einfluss des BSPs auf den OK-Genotyp untersucht werden. Hierfür wurden die Gene von NFATc1, TRAP, Cathepsin K, MMP-9, $\alpha_v\beta_3$ -Integrin und Calcitonin-Rezeptor hinsichtlich ihrer Expressionsstärke in den bekannten Untergruppen untersucht. Die genannten Gene dienen nicht nur als Marker zur Identifizierung von Osteoklasten, sondern spielen zentrale Rollen in der Osteoklastogenese und der osteoklastischen Funktionsfähigkeit (Zhao et al., 2007). Die Analyse der Genexpression osteoklastenspezifischer Marker mittels qPCR lieferte detaillierte Einblicke in den komplexen Differenzierungsprozess von PBMCs bzw. OK-Vorläuferzellen zu Osteoklasten unter dem Einfluss von M-CSF, RANKL und BSP.

Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen somit eine erfolgreiche Osteoklastogenese durch RANKL: So kam es spätestens an Tag 17 unter RANKL-Stimulation zu einer deutlichen Erhöhung der Genexpression der untersuchten Marker im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dies steht im Einklang mit der Literatur, die RANKL als Schlüsselfaktor für die terminale OK-Differenzierung identifiziert (Nakagawa et al., 1998, Takayanagi, 2021, Udagawa et al., 2021).

Hervorzuheben sind zudem die festgestellten Zeitpunkte der Expressionsmaxima der Markergene. Während beispielsweise die relativen Expressionsraten von NFATc1 und TRAP an Tag 4 noch ähnlich zur Kontrollgruppe waren, stiegen diese im weiteren Kultivierungsverlauf unter RANKL-Substitution deutlich an. Diese Beobachtung legt nahe, dass beide Gene bereits in OK-Vorläuferzellen basal und im weiteren Differenzierungsprozess verstärkt exprimiert werden. In anderen Studien wurde dies ebenfalls beschrieben (Sorensen et al., 2007, Omata et al., 2023, Kim et al., 2005, Halleen et al., 2006): So wird die initiale NFATc1-Genexpression in frühen Stadien der Osteoklastogenese über den NF- κ B- und MAPK-Signalweg induziert (Kim and Kim, 2014, Omata et al., 2023, Ono and Nakashima, 2018). Anschließend fördert NFATc1 als Schlüsselregulator die Expression vieler anderer osteoklastenspezifischer Gene, welche relevant für die OK-Reifung und -Aktivität sind (Takayanagi, 2021).

Im Gegensatz dazu unterschieden sich die medianen relativen Genexpressionsraten von Cathepsin K, MMP-9 und CTR in allen Untergruppen bereits an Tag 4 deutlich von der Kontrollgruppe. Besonders ausgeprägt war dieser Effekt beim CTR, dessen Genexpressionsrate unter M-CSF- und RANKL-Stimulation bis zu 20-fach höhere Werte erreichte. Dies unterstreicht die Spezifität insbesondere des CTR-Gens für terminal differenzierte Osteoklasten, was mit den Literaturdaten übereinstimmt (Soltanoff et al., 2009, Zhao et al., 2007, Jiang et al., 2023, Sorensen et al., 2007). Cathepsin K ist eine lysosomale Cysteinprotease, die essenziell für den Abbau der organischen Knochenmatrix ist, ebenso wie die Protease MMP-9 (Saftig et al., 1998, Zaidi et al., 2001, Reponen et al., 1994). Während die Genexpressionsraten von Cathepsin K im Kultivierungsverlauf in allen Gruppen einen weiteren Anstieg verzeichnete, blieben die MMP-9-Genexpressionslevel ab Tag 4 weitgehend konstant. Dieser Aspekt wurde in Studien auf eine insgesamt vorzeitige Expressionskinetik von MMP-9 zurückgeführt, wodurch dessen Maximum im Vergleich zu Cathepsin K bereits zu einem früheren Zeitpunkt im Rahmen der OK-Ausdifferenzierung erreicht wird

(Sorensen et al., 2007, Reponen et al., 1994, Vu et al., 1998, Cappariello et al., 2014, Nakamura et al., 2021).

Die Analyse des Gens der α_v -Integrin-Untereinheit ergab in allen Untergruppen zu beiden Zeitpunkten eine zur Kontrollgruppe ähnliche relative Genexpressionsrate, was auf einen fehlenden spezifischen Einfluss von BSP schließen lässt. Hierbei ist jedoch kritisch anzumerken, dass die α_v -Integrin-Untereinheit im Gegensatz zur β_3 -Untereinheit nicht exklusiv von reifen Osteoklasten exprimiert wird. So exprimieren monozytäre Vorläuferzellen bereits in frühen Entwicklungsstadien andere Integrine wie $\alpha_v\beta_5$, die im Laufe der Ausdifferenzierung zu Osteoklasten sukzessive durch $\alpha_v\beta_3$ ersetzt werden (McHugh et al., 2000, Del Fattore et al., 2008, Lane et al., 2005). Dies erklärt die im Vergleich zur Kontrollgruppe ähnlichen Expressionsraten. Inwiefern BSP Einfluss auf die Genexpression der β_3 -Integrin-Untereinheit nimmt, ist aus den vorhandenen Daten allerdings nicht zu eruieren. Auch in der Literatur gibt es hierzu bislang keine Erkenntnisse. Eine unmittelbare Interpretation der Effekte von BSP hinsichtlich der Genexpression des $\alpha_v\beta_3$ -Integrins fällt somit schwer.

Während RANKL als einer der erforderlichen Hauptmediatoren zur Osteoklastogenese gilt (Dougall et al., 1999, Kong et al., 1999), zeigen die vorliegenden Daten, dass BSP die Genexpression und somit Differenzierung osteoklastärer Vorläuferzellen sowohl in Kombination mit als auch ohne RANKL relevant fördert, wobei die Effekte je nach Gen unterschiedlich stark ausgeprägt waren. Diese Ergebnisse korrelieren mit den *in-vitro*-Daten von Valverde et al. (2005), die in RAW264.7-Zellen eine BSP- sowie synergistische BSP/RANKL-induzierte Hochregulation der mRNA-Expression von NFATc1, TRAP und Cathepsin K beobachteten. Ergänzend dazu zeigten Western-Blot-Analysen unter BSP-Einfluss eine erhöhte NFATc1-Proteinkonzentration im Zellkern, in welchem die Autoamplifikation von NFATc1 nach dessen nukleärer Translokation stattfindet (Takayanagi et al., 2002). Die BSP-Effekte ließen sich auf eine RGD-vermittelte Aktivierung des c-Src-Signalwegs sowie eine gesteigerte Calcineurin-Aktivität und erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration zurückführen (Shankar et al., 1993, Takayanagi et al., 2002). Durch Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration wird die Autoamplifikation von NFATc1 gefördert, was wiederum nachgeschaltete Signalwege vermehrt aktiviert (Crabtree and Olson, 2002, Kim and Kim, 2014). Somit könnte dieser Mechanismus die osteoklasteninduktive Wirkung von BSP erklären. Darüber hinaus ist NFATc1 maßgeblich an der Fusion mononukleärer Vorläuferzellen zu reifen, multinukleären Osteoklasten beteiligt (Kim et al., 2008). Die

in dieser Arbeit beobachtete Zunahme multinukleärer Zellen unter BSP-Einfluss könnte somit zusätzlich auf eine NFATc1-vermittelte Hochregulation fusionsfördernder Proteine bedingt sein. Unterstützt wird diese Beobachtung durch die Studie von Boudiffa et al. (2010), die bei Osteoklasten stammend aus Milzzellen von BSP-Knockout-Mäusen eine geringere Anzahl an Zellkernen pro Zellen feststellten.

Interessanterweise bestätigten die Genexpressionsanalysen den bereits in der VNR-Immunfluoreszenzanalyse beobachteten zeitabhängigen Effekt der BSP- und RANKL-Stimulation (siehe Einfluss auf den osteoklastischen Phänotyp). Obwohl diesbezüglich keine statistischen Signifikanzen festgestellt werden konnten, wies die simultane Gabe von BSP und RANKL nach M-CSF-*Priming* (mit Ausnahme des CTR-Gens) tendenziell die höchsten medianen relativen Genexpressionsraten auf. Besonders ausgeprägt war dieser Trend beim NFATc1-Gen. Im Unterschied hierzu wirkte sich eine zeitversetzte Gabe von BSP und RANKL im unmittelbaren Vergleich dieser Untergruppen tendenziell hemmend auf die Genexpression aus. So fiel in der TRAP-Genexpressionsanalyse eine signifikant reduzierte Genexpressionsrate im Vergleich zur Behandlung mit M-CSF und RANKL auf. Dies könnte darauf hindeuten, dass die initiale BSP-Exposition die Sensitivität der Zellen gegenüber RANKL beeinflusst oder andere Signalwege moduliert. Diesbezüglich fehlen in der Literatur allerdings vergleichbare aussagekräftige Daten.

Zu beachten gilt, dass die qPCR zwar den Nachweis einer erfolgreichen Differenzierung auf mRNA-Ebene ermöglicht, jedoch keine direkten Rückschlüsse auf die tatsächliche Proteinexpression zulässt. Diskrepanzen zwischen Gen- und Proteinexpression können beispielsweise durch posttranslationale Modifikationen oder eine veränderte Proteinstabilität bedingt sein. Umso wichtiger sind ergänzende Analysen wie beispielsweise funktionelle Resorptionsassays.

5.3 Einfluss des BSP auf die Funktion der Osteoklasten

5.3.1 Einfluss auf die TRAP-Aktivität

TRAP spielt eine wesentliche Rolle bei der Degradierung der Knochenmatrix und gilt als typischer Marker im Kontext der Osteoklastogenese (Oddie et al., 2000). In der Literatur besteht jedoch Uneinigkeit hinsichtlich der Exklusivität von TRAP als Marker für reife Osteoklasten. So charakterisieren zahlreiche Studien TRAP als verlässlichen

Indikator terminal differenzierter, funktionsfähiger Osteoklasten (Halleen et al., 2000, Alatalo et al., 2000). Neuere Studien zeigen jedoch, dass TRAP bereits in frühen Differenzierungsstadien exprimiert wird und sowohl von Vorläuferzellen als auch von reifen Osteoklasten sezerniert werden kann (Nakamura et al., 2021, Sorensen et al., 2007). Dies erschwert eine Unterscheidung unreifer TRAP-positiver Zellen von funktionell aktiven Osteoklasten (Kreja et al., 2007). Zudem demonstrierten Halleen et al. (2006) und Riedlova et al. (2023), dass TRAP auch ohne vorangegangene Knochendegradation in das Zellkulturmedium freigesetzt wird. Diese Beobachtung stimmt mit den Resultaten der Studie von Susa et al. (2004) überein, die keine Korrelation zwischen TRAP-Aktivität und Knochenresorptionsaktivität fanden. Dies deutet darauf hin, dass TRAP als alleiniger Indikator für die Osteoklastenaktivität unzureichend ist.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie bestätigen diese Limitation: In der qualitativen TRAP-Analyse zeigten sich sowohl mono- als auch multinukleäre Zellen TRAP-positiv, auch ohne RANKL-Stimulation. Ähnliches wurde zudem in der *in-vitro*-Studie von Cappellen et al. (2002) bei der OK-Differenzierung von murinen Knochenmarksstammzellen beobachtet, in welcher M-CSF allein ebenso TRAP-positive Zellen induzierte, wenn auch in geringerer Ausprägung. Die Beobachtungen könnten zudem die erhobenen relativen Absorptionsraten in der quantitativen Auswertung erklären. In den ersten Kultivierungstagen zeigte sich eine zur Kontrollgruppe ähnliche oder teilweise sogar geringere relative TRAP-Aktivität. Erst im weiteren zeitlichen Verlauf entwickelte sich tendenziell eine höhere relative TRAP-Aktivität im Vergleich zur Kontrollgruppe, wenngleich ohne statistische Signifikanz. In der Literatur ist ein Peak der TRAP-Expression kurz vor Fusion der Vorläuferzellen zu multinukleären Osteoklasten beschrieben (Ono and Nakashima, 2018). Der beobachtete kurzfristige Anstieg der Absorptionsraten um Tag 5 könnte dieses Phänomen widerspiegeln, was gleichzeitig mit den Beobachtungen aus der Lebendzellmikroskopie sowie VNR-Immunfluoreszenz übereinstimmen würde.

Innerhalb der Untergruppen manifestierten sich in der quantitativen Messung signifikante Unterschiede. Besonders auffällig war ein initial inhibierender Effekt von BSP auf die TRAP-Aktivität im Vergleich zur Stimulation mit M-CSF und RANKL. Diese Befunde stehen zunächst in scheinbarem Widerspruch zu den Beobachtungen von Malaval et al. (2008), die in BSP-negativen Zellkulturen aus der Milz eine signifikant reduzierte Anzahl TRAP-positiver Zellen und mehrkerniger Osteoklasten nachwiesen.

Auch Valverde et al. (2005) demonstrierten, dass BSP die Bildung TRAP-positiver multinukleärer Zellen induziert und bei gleichzeitiger Gabe mit RANKL einen synergistischen Effekt erzielt. Die inhibitorische Wirkung von BSP zeigte sich in der vorliegenden Studie jedoch nicht bei simultaner Gabe von BSP und RANKL. So ergaben sich hier an allen Messzeitpunkten annähernd ähnliche Werte wie die der Gruppe unter M-CSF- und RANKL-Stimulation, wobei sich im weiteren zeitlichen Verlauf tendenziell sogar höhere Werte feststellen ließen. Auffällig war zudem, dass die simultane Zugabe von BSP und RANKL an Tag 1 und 5 zu einer signifikant höheren TRAP-Aktivität als die zeitversetzte Zugabe führte. Diese Beobachtung verstärkt die bereits in den Genexpressions- und VNR-Immunfluoreszenzanalysen festgestellten verstärkten synergistischen Effekte durch zeitgleichen Einfluss von BSP und RANKL in Hinblick auf die Osteoklastogenese. Mit fortschreitender Kultivierungsdauer relativierte sich dieser Effekt durch weitgehendes Angleichen der TRAP-Aktivität und es zeigten sich in allen Gruppen unter BSP-Einfluss tendenziell höhere Werte im Vergleich zur Kontrollgruppe, insbesondere bei zeitversetzter Gabe von BSP und RANKL. Die scheinbaren Diskrepanzen könnten somit zudem neben Unterschieden bezüglich der verwendeten Zellstämme auch auf die Zeitpunkte der erhobenen Messwerte zurückzuführen sein. So wurden die Daten in beiden genannten Studien erst zu einem späteren Zeitpunkt erhoben, bei dem die OK-Reifung vermutlich bereits abgeschlossen war und in etwa Tag 9 der vorliegenden Studie entspricht. Zu diesem Zeitpunkt konnten in dieser Arbeit keine signifikant inhibitorischen Effekte durch BSP mehr festgestellt werden, stattdessen ergaben sich hier unter BSP-Einfluss tendenziell höhere TRAP-Aktivitäten.

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse auf eine positive Modulation der TRAP-Aktivität durch BSP hin, insbesondere bei simultaner Applikation mit RANKL und bei bereits ausgereiften Osteoklasten. Dennoch ist die TRAP-Aktivität als alleiniger Parameter zur abschließenden Beurteilung der osteoklastären Funktionalität aufgrund der oben aufgeführten Gründe nicht ausreichend, weshalb es für eine umfassende Bewertung eine ergänzende funktionelle Analyse bedarf (siehe folgendes Kapitel).

5.3.2 Einfluss auf die Resorptionsfähigkeit

Als Goldstandard zur Validierung terminal ausdifferenzierter und funktionsfähiger Osteoklasten gilt der Nachweis ihrer Resorptionsaktivität (Kreja et al., 2007). In der vorliegenden Arbeit wurde mittels Calcium-Assay demonstriert, dass PBMCs nach 17-tägiger Kultivierung mit M-CSF und RANKL zu Osteoklasten differenziert waren, die Calciumphosphat effektiv resorbieren. Diese Ergebnisse stimmen mit vorhandenen Studien überein, die die Funktionalität *in-vitro*-generierter Osteoklasten in Resorptionsassays bestätigten (Prause et al., 2015, Zainal Ariffin et al., 2024, Clarke et al., 2017, Maria et al., 2014). Wie bereits in vorangegangenen Experimenten angedeutet, induzierte BSP sowohl in Kombination mit als auch ohne RANKL Osteoklasten, welche sich als funktionsfähig erwiesen. Dies korreliert mit den Befunden von Valverde et al. (2005), die eine BSP-induzierte Resorptionsaktivität von RAW264.7-abgeleiteten Osteoklasten auch ohne RANKL-Stimulation nachwiesen. Dabei war mit zunehmender BSP-Konzentration ein dosisabhängiger Anstieg der Resorptionsaktivität zu beobachten. Im Gegensatz dazu zeigten in derselben Studie Osteoklasten aus murinen Monozytenvorläuferzellen unter alleiniger BSP-Stimulation allerdings keine signifikante Resorptionstätigkeit. Die Gründe für diese Diskrepanz sind unklar, könnten jedoch auf zelltypspezifischen Unterschieden beruhen. In beiden Zellmodellen führte die Kombination von BSP und RANKL jeweils zu einer signifikant höheren Knochenresorption, was für einen Synergismus beider Faktoren spricht (Valverde et al., 2005). Die synergistische Wirkweise von BSP und RANKL in Bezug auf die Osteoklastenfunktion wurde ebenfalls von anderen Studien bestätigt (Ross et al., 1993, Valverde et al., 2008, Malaval et al., 2008, Malaval et al., 2009). Auch in der vorliegenden Arbeit konnte dieser verstärkende Effekt innerhalb der ersten 48 Stunden beobachtet werden, unabhängig vom Applikationszeitpunkt der beiden Faktoren. Im weiteren Kultivierungsverlauf zeigte sich dieser interessanterweise nur noch bei sequenzieller BSP-RANKL-Substitution im Sinne von signifikant höheren relativen Calciummengen zu allen Messzeitpunkten, insbesondere im Vergleich zur simultanen Gabe, während in allen anderen Gruppen die resorptive Aktivität sukzessive zum Erliegen kam. Diese Beobachtung weist auf eine prolongierte Resorptionsaktivität sowie Überlebensdauer der Osteoklasten unter BSP-Präexposition und anschließender RANKL-Stimulation hin. Der zugrunde liegende molekulare Mechanismus kann durch die Erkenntnisse von Valverde und Mitarbeitende erklärt werden: So wiesen Osteoklasten unter Einfluss von BSP und RANKL eine geringere Caspase-3, -8 und -9-Aktivität, eine geringere Aktivierung des proapoptotischen JNK-

Signalwegs und eine stärkere Aktivierung des antiapoptotischen PKB/Akt-Signalwegs auf als jene unter alleinigem RANKL-Einfluss (Valverde et al., 2005). Im Unterschied zu diesen Beobachtungen manifestierte sich jedoch der beschriebene Effekt in der vorliegenden Arbeit ausschließlich bei sequenzieller Applikation von BSP und RANKL, nicht bei simultaner Gabe. Dieser relevante zeitliche Aspekt der BSP-RANKL-Interaktion wird durch Daten von Raynal et al. (1996) gestützt. Hier konnten die Autoren in einem murinem Ko-Kulturmodell aus OK-Vorläuferzellen und osteoblastischen Zellen auf Elfenbeinschnitten unter BSP-Einfluss einen signifikanten Anstieg der Anzahl und Tiefe der Resorptionslakunen feststellen, insbesondere wenn BSP entweder zu Kulturbeginn oder während der finalen 48 Stunden appliziert wurde. Interessanterweise steht die vorteilhafte Wirkung der sequenziellen Gabe auf die Resorptionsfunktion im vermeintlichen Kontrast zu den vorangegangenen Experimenten, in denen die spätere, simultane BSP/RANKL-Exposition für die terminale Osteoklastogenese optimaler erschien. Diese unterschiedlichen und zeitabhängigen Effekte von BSP auf Differenzierung, Aktivität und Überleben der Osteoklasten könnten auf verschiedene intrazelluläre Signale zurückzuführen sein, die durch eine phasenspezifische Expression von Integrin-Subtypen im Prozess der Osteoklastogenese erklärt werden könnten (Duong et al., 2000). Zu beachten ist jedoch, dass in der Literatur ein Effekt des BSP in Bezug auf die Resorptionsaktivität vor allem innerhalb der ersten 16 bis 24 Stunden der Kultur beschrieben ist – einer Phase, in der die Osteoklasten primär adhärieren und die Resorption aufnehmen (Raynal et al., 1996). Dies ist in der vorliegenden Studie nur unzureichend abgebildet, da die erste Messung nach 48 Stunden beginnt. So könnten frühe signifikante Einflüsse des BSP in Kombination mit RANKL oder auch alleine maskiert sein. Darüber hinaus stellt die Messung der Calciumfreisetzung einen Surrogatparameter der OK-Resorptionsaktivität dar (Clarke et al., 2017), die durch verschiedene Einflüsse modifiziert und somit verfälscht werden kann. Um die Validität der Befunde zu erhöhen, sollten zukünftige Studien ergänzende Methoden integrieren, wie beispielsweise die unmittelbare Analyse der Resorptionslakunen.

Die pathophysiologische Relevanz der identifizierten BSP-vermittelten Effekte wird durch klinische Daten deutlich: Bei Erkrankungen mit pathologisch gesteigerter Knochenresorption – wie Morbus Paget oder Karzinomen mit osteolytischen Knochenmetastasen – wurden signifikant erhöhte BSP-Serumkonzentrationen festgestellt (Valverde et al., 2008, Ogata, 2008, Chen et al., 2023). Diese Beobachtung

unterstreicht die Rolle von BSP als regulatorischen Faktor im Prozess des *Bone Remodelings*.

5.4 Limitationen

Grundlage dieser Arbeit bildete zunächst die Etablierung der Methodik zur *in-vitro*-Generierung von Osteoklasten aus PBMCs angelehnt an das Protokoll von Henriksen et al. (2012). Die in PBMCs enthaltenen Vorläuferzellen wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation aus *Buffy Coats* gewonnen (Fujikawa et al., 1996, Husheem et al., 2005). Es erfolgte ein M-CSF-*Priming* und im Anschluss die Zugabe von RANKL zur Induktion der Osteoklastendifferenzierung. Nach Validierung des verwendeten Protokolls erfolgte die Einteilung in verschiedene Versuchsansätze mit unterschiedlicher Zugabe von M-CSF, BSP und RANKL. Während des Differenzierungsprozesses erfolgte die regelmäßige Lebendzellmikroskopie zur Beurteilung von Vitalität, Morphologie und Wachstum der Zellen. Um nachzuweisen, dass es sich bei den isolierten PBMC vorwiegend um monozytäre und somit osteoklastäre Vorläuferzellen handelt, wurden FACS-Analysen hinsichtlich der CD14-Expression durchgeführt. Nach 10 Tagen Kultivierung erfolgte die Umsiedelung der Zellen zur Ausdifferenzierung zu Osteoklasten unter RANKL-Substitution. Hieran schlossen sich die erneute lichtmikroskopische Beurteilung, Analyse der phänotypischen Expression von VNR und der Multinuklearität mittels Fluoreszenzmarkierung an. Zudem erfolgte die Analyse wichtiger osteoklastentypischer Marker auf Genexpressionsebene mittels qPCR. Im Anschluss wurde die Funktionsfähigkeit der generierten Osteoklasten durch Analyse der TRAP-Sekretion und Resorptionsfähigkeit mittels Calcium-Assay überprüft. Um den Einfluss des BSPs zu untersuchen, wurden die ermittelten Daten stets auf die Kontrollgruppe normiert.

Neben der Gewinnung von Vorläuferzellen aus *Buffy Coats* bzw. PBMCs gibt es noch weitere Verfahren, wie Isolation der Zellen aus tierischen Knochen, Knochenmark, Vollblut oder aus ossären Riesenzelltumoren (Takahashi et al., 2007). Seitdem jedoch rekombinantes RANKL ubiquitär verfügbar ist, wird die *in-vitro*-Generierung von Osteoklasten aus PBMCs weltweit zunehmend verbreitet (Henriksen et al., 2012, Ab Kadir et al., 2012). Gründe hierfür sind neben der Nichtinvasivität auch die leichte

Zugänglichkeit und verhältnismäßig unkomplizierte Gewinnung in ausreichender Zellzahl (Susa et al., 2004). In der Literatur wurde die Methodik bereits mehrfach erfolgreich angewandt (Susa et al., 2004, Ab Kadir et al., 2012, Prause et al., 2015, Abdallah et al., 2018). Die Generierung von Osteoklasten aus PBMCs ist jedoch auch mit Limitationen verbunden, die bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden müssen. Zum einen besteht bei der Verwendung von *Buffy Coats* bzw. PBMCs eine zu beachtende Spendervariabilität beispielsweise in Hinblick auf Alter oder Geschlecht, was zu verschieden starkem osteoklastogenem Potenzial der isolierten Stammzellen führen kann. So belegen Studien geschlechts- und altersabhängige Unterschiede: Männliche Spender zeigen tendenziell eine effizientere OK-Differenzierung, während weibliche Osteoklasten eine stärkere Knochenadhäsion aufweisen. Postmenopausale Frauen weisen zudem eine erhöhte OK-Aktivität auf. Diese Unterschiede basieren vermutlich auf hormonellen Einflüssen und genetischen Faktoren (Jevon et al., 2002, Møller et al., 2020). Möglicherweise erklären die donorspezifischen Heterogenitäten die teilweise großen Werteschwankungen innerhalb der Versuchsgruppen. Diese Variabilität kann jedoch gleichzeitig als methodischer Vorteil interpretiert werden, da die erhobenen Daten hinsichtlich des Einflusses von BSP so generalisierbarer sind.

PBMCs stellen zum anderen eine heterogene Zellpopulation dar, die neben den monozytären Vorläuferzellen auch andere Zelltypen wie Lymphozyten enthält (Zhang and Huang, 2012, Kreja et al., 2007). Die unerwünschten Zelltypen können durch die Sekretion von Differenzierungsfaktoren die Osteoklastogenese modulieren bzw. induzieren, was die Interpretation der Daten erschweren und zu einer Reduktion der Aussagekraft führen kann (Costa-Rodrigues et al., 2011, Quinn and Gillespie, 2005). So können beispielsweise T-Zellen die OK-Differenzierung stimulieren, indem sie eigenständig RANKL sezernieren (D'Amico and Roato, 2012, Riedlova et al., 2023, Kawai et al., 2006). Um das Risiko für eine mögliche Beeinflussung durch die vorhandenen unerwünschten Zellen zu minimieren, wurde in einigen Studien eine spezifische Zellsortierung anhand von immunphänotypischen Oberflächenmerkmale wie den *Cluster of differentiation* (CD) vorgenommen (Ono and Nakashima, 2018). Monozytäre Vorläuferzellen mit hohem osteoklastogenem Differenzierungspotenzial besitzen CD14 als typisches Oberflächenmerkmal (Husheem et al., 2005). Eine Möglichkeit ist die magnetische Zellseparation, bei der CD14⁺-Zellen an magnetische Antikörper gebunden und mithilfe eines Magnets von den unerwünschten Zellen

getrennt werden können (Hemingway et al., 2011, Zhang and Huang, 2012). Auch in der vorliegenden Arbeit wurde eine Vorsortierung der PBMCs durchgeführt. Allerdings führte dies wiederholt zu bakteriellen Kontaminationen und vorzeitiger Apoptose der Zellkulturen. Aufgrund dessen sowie der hohen Kosten wurde auf eine weitere Vorselektion verzichtet. Zudem weisen Literaturdaten auf eine potenzielle Kreuzreaktivität anti-humaner CD14-Antikörper mit mesenchymalen Zellpopulationen hin, die eine unerwünschte Mitanreicherung RANKL-exprimierender Zellen zur Folge haben könnte (Pilz et al., 2011, Ono and Nakashima, 2018). Zur Minimierung potenzieller Einflüsse nicht-monozytärer Zellen wurden in der vorliegenden Studie regelmäßige Waschschrte während der Kultivierungsphase durchgeführt, wodurch nicht-adhärenz Zellpopulationen effizient entfernt werden konnten. Die durchflusszytometrischen Analysen der PBMCs ergaben hierbei im Laufe der Kultivierung einen zufriedenstellend hohen Anteil CD14-positiver monozytärer Vorläuferzellen, was die Eignung des Protokolls für anschließende Untersuchungen zeigte.

Vor diesem Hintergrund ist eines der zentralen Ergebnisse dieser Arbeit, die RANKL-unabhängige osteoklastogene Wirkung von BSP in Kombination mit M-CSF, kritisch zu diskutieren. Dieses Ergebnis steht hierbei im Widerspruch zum etablierten Paradigma, das RANKL als unabdingbaren Faktor der Osteoklastogenese definiert (Lacey et al., 1998, Nakagawa et al., 1998, Kong et al., 1999). Die phänotypischen Analysen der Kontrollgruppen zeigten jedoch, dass die Kulturen unter alleiniger M-CSF-Stimulation zwar vereinzelt multinukleäre Zellen bildeten, jedoch keine VNR-Expression aufwiesen. Zudem bestätigten sowohl die Genexpressions- als auch die Funktionsanalysen, dass unter alleiniger M-CSF-Stimulation keine terminal differenzierten Osteoklasten generiert werden konnten. Diese Befunde reduzieren die Wahrscheinlichkeit einer Kontamination durch endogenes RANKL und validieren die beobachtete BSP-induzierte osteoklastogene Wirkung. Die Induktion reifer und funktionell aktiver Osteoklasten ohne RANKL wirft die Frage auf, ob Signalwege existieren, die eine RANKL-unabhängige Osteoklastogenese ermöglichen. Diese Fragestellung wird heutzutage weiterhin kontrovers diskutiert. Einige aktuelle Forschungsarbeiten konnten mögliche alternative Signalkaskaden identifizieren, die beispielsweise über Zytokine wie TNF- α , TGF- β , IL-6 oder IL-11 vermittelt werden (Tanaka, 2017, Ono and Nakashima, 2018, Sun et al., 2021). Die in dieser Studie beobachtete RANKL-unabhängige Wirkung von BSP könnte auf die RGD-vermittelte

Interaktion mit $\alpha_v\beta_5$ -Integrinen in früheren bzw. $\alpha_v\beta_3$ -Integrinen in späteren Differenzierungsstadien mit Aktivierung des c-Src-Signalwegs, Erhöhung der Calcineurin-Aktivität und der intrazellulären Calciumkonzentration zurückzuführen sein (McHugh et al., 2000, Duong et al., 2000, Byzova et al., 2000). Allerdings bleiben die genauen intrazellulären Mechanismen, die zur terminalen Differenzierung sowie Aktivierung der Osteoklasten führen, weiterhin ungeklärt. Zu kritisieren ist bei den genannten Studien jedoch ähnlich wie bei der vorliegenden Arbeit, dass auch diese letztlich nicht unter strikt RANKL-defizienten Bedingungen durchgeführt wurden (Okamoto et al., 2017). Folglich fehlen nach wie vor definitive Beweise für eine vollständig RANKL-unabhängige Osteoklastogenese. Zukünftige Studien sollten beispielsweise genetisch modifizierte Modelle einsetzen, um die BSP-Wirkung unter RANKL-defizienten Bedingungen zu analysieren (Okamoto et al., 2017, Ono and Nakashima, 2018). Trotz dieser Limitationen konnte in dieser Arbeit durch die konsequente Einbeziehung einer M-CSF-Kontrollgruppe der Einfluss potenzieller Störfaktoren minimiert und die spezifischen Effekte des BSP herausgearbeitet werden.

Ein weiterer methodischer Kritikpunkt dieser Studie ist die fehlende systematische Untersuchung einer möglicherweise dosisabhängigen Wirkung von BSP. In allen Experimenten wurde eine feste Konzentration von 5 $\mu\text{g/ml}$ BSP verwendet. Die Literatur zeigt, dass die Effektivität von BSP in der Osteoklastogenese stark von dessen Konzentration abhängen kann, wobei in den vorliegenden Studien tendenziell niedrigere BSP-Konzentrationen verwendet wurden (Raynal et al., 1996, Valverde et al., 2005). Zudem könnte die optimale BSP-Konzentration je nach Zelltyp und Kulturbedingungen variieren (Pesesse et al., 2014). Weitere Studien sind erforderlich, um zusätzlich einen konzentrationsabhängigen Effekt von BSP zu analysieren.

Abschließend gilt zu beachten, dass die vorliegenden Experimente *in vitro* durchgeführt wurden und die komplexen Wechselwirkungen beim Prozess des *Bone Remodelings in vivo* somit nicht vollständig abbilden können. Anschließende Forschungsarbeiten sollten den Einfluss des BSPs auf Osteoklastogenese und Aktivität der Osteoklasten daher in Ko-Kultur- oder *in-vivo*-Modellen analysieren, um weitere Einblicke in die komplexen Regulationsmechanismen zu gewinnen.

5.5 Fazit und Ausblick

Die vorliegende Arbeit untersuchte den Einfluss von BSP auf die Differenzierung und Aktivität von Osteoklasten. Nach erfolgreicher Etablierung eines Protokolls zur *in-vitro*-Generierung von Osteoklasten aus PBMCs konnte gezeigt werden, dass BSP mehr als ein strukturelles Adhäsionsmolekül der Knochenmatrix darstellt. Die Ergebnisse liefern Einblicke in seinen regulatorischen Einfluss auf die Entwicklung und Resorptionsfähigkeit von Osteoklasten. So konnte gezeigt werden, dass BSP die osteoklastäre Differenzierung und Aktivität sowohl synergistisch mit RANKL als auch unabhängig davon stimuliert. Der synergistische Effekt von BSP und RANKL erwies sich hierbei abhängig vom Applikationszeitpunkt: Durch Zugabe von BSP und RANKL nach erfolgtem M-CSF-*Priming* wurde die Osteoklastenformation hinsichtlich Zellgröße, Multinuklearität, VNR-Expression und Genexpression osteoklastentypischer Marker verstärkt gefördert. Im Gegensatz dazu zeigte sich der synergistische Einfluss auf die Resorptionsaktivität der Osteoklasten besonders bei sequenzieller Zugabe (M-CSF/BSP-*Priming* gefolgt von RANKL) im Sinne einer prolongierten Calciumfreisetzung. Interessanterweise konnte in dieser Arbeit BSP RANKL-unabhängig reife und funktionell aktive Osteoklasten induzieren. Dies steht im Kontrast zum bisher etablierten Konsens einer RANKL-abhängigen Osteoklastogenese, dessen Absolutheit jedoch in aktueller Fachliteratur zunehmend kontrovers diskutiert wird. Bei der Interpretation der Ergebnisse dieser Arbeit müssen allerdings methodische Limitationen berücksichtigt werden. Die Verwendung heterogener PBMC-Populationen birgt das Risiko einer endogenen RANKL-Kontamination, und die *in-vitro*-Bedingungen erlauben keine direkten Rückschlüsse auf die komplexen Regulationsmechanismen *in vivo*. Für zukünftige Studien ergeben sich daher mehrere mögliche Forschungsansätze: Zum einen sollten die intrazellulären Signalkaskaden detailliert analysiert werden, durch die BSP seine Wirkung auf die Osteoklastogenese entfaltet. Zum anderen wäre die Validierung der Ergebnisse in *in-vivo*-Modellen unter strikt RANKL-defizienten Bedingungen essenziell, um die Hypothese einer RANKL-unabhängigen Osteoklastogenese durch BSP zu bestätigen. Dies würde das gegenwärtige Verständnis des Knochenstoffwechsels auf molekularer Ebene substanziell erweitern. Methodisch könnten 3D-Kokultursysteme mit Osteoblasten oder transgene Tiermodelle zum Einsatz kommen.

6 Zusammenfassung

Bone Sialoprotein (BSP) ist ein Glykoprotein der extrazellulären Knochenmatrix, das neben seiner bislang bekannten Rolle bei der Matrixmineralisation zunehmend als Regulator im Prozess des *Bone Remodelings* diskutiert wird (Valverde et al., 2005, Licini et al., 2019, Maalouf et al., 2022). Ziel der vorliegenden Arbeit war es, erstmals den Einfluss von BSP auf die Isolation und Differenzierung humaner Osteoklasten, die aus peripheren mononukleären Zellen (PBMCs) unter definierten kulturellen Bedingungen *in vitro* generiert wurden, systematisch zu untersuchen.

Nach erfolgreicher Etablierung eines *in-vitro*-Protokolls zur Osteoklastengenerierung aus PBMCs zeigte sich, dass BSP einen positiven, jedoch zeit- und differenzierungsabhängigen Einfluss auf die Osteoklastogenese ausübt. In frühen Differenzierungsphasen war dieser Effekt unter simultaner Gabe von BSP und RANKL besonders ausgeprägt, während bei bereits ausgereiften Osteoklasten tendenziell die sequenzielle Gabe von BSP und RANKL zu einer verstärkten Resorptionsfähigkeit führte. Daneben konnte ein RANKL-unabhängiger osteoklasteninduktiver Effekt durch Zugabe von BSP festgestellt werden. Dieser Befund steht im Kontrast zum klassischen Verständnis einer bislang strikt RANKL-abhängigen Osteoklastogenese und reflektiert aktuelle Diskussionen in der Fachliteratur. Zugleich untermauern die Ergebnisse klinische Beobachtungen, wonach bei Erkrankungen mit pathologisch gesteigerter Knochenresorption – wie Morbus Paget oder osteolytischen Knochenmetastasen – erhöhte BSP-Serumspiegel nachweisbar sind (Valverde et al., 2008, Ogata, 2008, Chen et al., 2023).

Die vorliegende Dissertation liefert somit neue Einblicke in die komplexe Regulation der Osteoklastendifferenzierung und -funktion durch Matrixproteine und hebt BSP als wichtigen Modulator im Rahmen des Knochenumbaus hervor. Perspektivisch könnten diese Erkenntnisse dazu beitragen, neue therapeutische Strategien für Erkrankungen mit gestörter Knochenhomöostase zu entwickeln. Zukünftige Studien sollten darauf abzielen, die zugrunde liegenden Signalwege der BSP-vermittelten Effekte weiter aufzuklären und das Potenzial von BSP als Biomarker oder therapeutisches Target umfassend zu evaluieren.

7 Literaturverzeichnis

- Ab Kadir, R., Zainal Ariffin, S. H., Megat Abdul Wahab, R., Kermani, S. & Senafi, S. 2012. Characterization of mononucleated human peripheral blood cells. *ScientificWorldJournal*, 2012, 843843.
- Abdallah, D., Jourdain, M. L., Braux, J., Guillaume, C., Gangloff, S. C., Jacquot, J. & Velard, F. 2018. An Optimized Method to Generate Human Active Osteoclasts From Peripheral Blood Monocytes. *Front Immunol*, 9, 632.
- Aguirre, J. I., Plotkin, L. I., Stewart, S. A., Weinstein, R. S., Parfitt, A. M., Manolagas, S. C. & Bellido, T. 2006. Osteocyte apoptosis is induced by weightlessness in mice and precedes osteoclast recruitment and bone loss. *J Bone Miner Res*, 21, 605-15.
- Akisaka, T. & Yoshida, A. 2016. Ultrastructural analysis of apatite-degrading capability of extended invasive podosomes in resorbing osteoclasts. *Micron*, 88, 37-47.
- Alatalo, S. L., Halleen, J. M., Hentunen, T. A., Mönkkönen, J. & Väänänen, H. K. 2000. Rapid screening method for osteoclast differentiation in vitro that measures tartrate-resistant acid phosphatase 5b activity secreted into the culture medium. *Clin Chem*, 46, 1751-4.
- Andersen, C. L., Jensen, J. L. & Ørntoft, T. F. 2004. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res*, 64, 5245-50.
- Arai, F., Miyamoto, T., Ohneda, O., Inada, T., Sudo, T., Brasel, K., Miyata, T., Anderson, D. M. & Suda, T. 1999. Commitment and Differentiation of Osteoclast Precursor Cells by the Sequential Expression of C-Fms and Receptor Activator of Nuclear Factor kb (Rank) Receptors. *Journal of Experimental Medicine*, 190, 1741-1754.
- Asagiri, M., Sato, K., Usami, T., Ochi, S., Nishina, H., Yoshida, H., Morita, I., Wagner, E. F., Mak, T. W., Serfling, E. & Takayanagi, H. 2005. Autoamplification of NFATc1 expression determines its essential role in bone homeostasis. *J Exp Med*, 202, 1261-1269.
- Asagiri, M. & Takayanagi, H. 2007. The molecular understanding of osteoclast differentiation. *Bone*, 40, 251-264.
- Ash, P., Loutit, J. F. & Townsend, K. M. 1980. Osteoclasts derived from haematopoietic stem cells. *Nature*, 283, 669-70.
- Bainbridge, D. R. & Macey, M. M. 1983. Hoechst 33258: a fluorescent nuclear counterstain suitable for double-labelling immunofluorescence. *J Immunol Methods*, 62, 193-5.
- Bar-Shavit, Z. 2007. The osteoclast: a multinucleated, hematopoietic-origin, bone-resorbing osteoimmune cell. *J Cell Biochem*, 102, 1130-1139.
- Baron, R. & Kneissel, M. 2013. WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments. *Nat Med*, 19, 179-92.
- Baron, R., Neff, L., Louvard, D. & Courtoy, P. J. 1985. Cell-mediated extracellular acidification and bone resorption: evidence for a low pH in resorbing lacunae and localization of a 100-kD lysosomal membrane protein at the osteoclast ruffled border. *J Cell Biol*, 101, 2210-2222.
- Bekker, P. J., Holloway, D. L., Rasmussen, A. S., Murphy, R., Martin, S. W., Leese, P. T., Holmes, G. B., Dunstan, C. R. & Depaoli, A. M. 2004. A single-dose placebo-controlled study of AMG 162, a fully human monoclonal antibody to RANKL, in postmenopausal women. *J Bone Miner Res*, 19, 1059-66.
- Bellido, T. 2014. Osteocyte-Driven Bone Remodeling. *Calcified Tissue International*, 94, 25-34.

- Berendsen, A. D. & Olsen, B. R. 2015. Bone development. *Bone*, 80, 14-18.
- Bianco, P., Fisher, L. W., Young, M. F., Termine, J. D. & Robey, P. G. 1991. Expression of bone sialoprotein (BSP) in developing human tissues. *Calcif Tissue Int*, 49, 421-426.
- Bonewald, L. F. 2011. The amazing osteocyte. *Journal of Bone and Mineral Research*, 26, 229-238.
- Boudiffa, M., Wade-Gueye, N. M., Guignandon, A., Vanden-Bossche, A., Sabido, O., Aubin, J. E., Jurdic, P., Vico, L., Lafage-Proust, M. H. & Malaval, L. 2010. Bone sialoprotein deficiency impairs osteoclastogenesis and mineral resorption in vitro. *J Bone Miner Res*, 25, 2669-2679.
- Bouleffour, W., Boudiffa, M., Wade-Gueye, N. M., Bouët, G., Cardelli, M., Laroche, N., Vanden-Bossche, A., Thomas, M., Bonnelye, E., Aubin, J. E., Vico, L., Lafage-Proust, M. H. & Malaval, L. 2014. Skeletal development of mice lacking bone sialoprotein (BSP)--impairment of long bone growth and progressive establishment of high trabecular bone mass. *PLoS One*, 9, e95144.
- Bouleffour, W., Juignet, L., Bouet, G., Granito, R. N., Vanden-Bossche, A., Laroche, N., Aubin, J. E., Lafage-Proust, M. H., Vico, L. & Malaval, L. 2016. The role of the SIBLING, Bone Sialoprotein in skeletal biology - Contribution of mouse experimental genetics. *Matrix Biol*, 52-54, 60-77.
- Boyce, B. F. 2013. Advances in the regulation of osteoclasts and osteoclast functions. *J Dent Res*, 92, 860-867.
- Boyce, B. F. & Xing, L. 2008. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch Biochem Biophys*, 473, 139-146.
- Boyle, W. J., Simonet, W. S. & Lacey, D. L. 2003. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*, 423, 337-342.
- Bucay, N., Sarosi, I., Dunstan, C. R., Morony, S., Tarpley, J., Capparelli, C., Scully, S., Tan, H. L., Xu, W., Lacey, D. L., Boyle, W. J. & Simonet, W. S. 1998. osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev*, 12, 1260-1268.
- Byzova, T. V., Kim, W., Midura, R. J. & Plow, E. F. 2000. Activation of integrin alpha(V)beta(3) regulates cell adhesion and migration to bone sialoprotein. *Exp Cell Res*, 254, 299-308.
- Caetano-Lopes, J., Canhão, H. & Fonseca, J. E. 2007. Osteoblasts and bone formation. *Acta Reumatol Port*, 32, 103-10.
- Cappariello, A., Maurizi, A., Veeriah, V. & Teti, A. 2014. The Great Beauty of the osteoclast. *Arch Biochem Biophys*, 558, 70-78.
- Cappellen, D., Luong-Nguyen, N. H., Bongiovanni, S., Grenet, O., Wanke, C. & Susa, M. 2002. Transcriptional program of mouse osteoclast differentiation governed by the macrophage colony-stimulating factor and the ligand for the receptor activator of NFkappa B. *J Biol Chem*, 277, 21971-82.
- Capulli, M., Paone, R. & Rucci, N. 2014. Osteoblast and osteocyte: games without frontiers. *Arch Biochem Biophys*, 561, 3-12.
- Chellaiah, M., Kizer, N., Silva, M., Alvarez, U., Kwiatkowski, D. & Hruska, K. A. 2000. Gelsolin deficiency blocks podosome assembly and produces increased bone mass and strength. *J Cell Biol*, 148, 665-78.
- Chen, W. C., Chang, A. C., Tsai, H. C., Liu, P. I., Huang, C. L., Guo, J. H., Liu, C. L., Liu, J. F., Huynh Hoai Thuong, L. & Tang, C. H. 2023. Bone sialoprotein promotes lung cancer osteolytic bone metastasis via MMP14-dependent mechanisms. *Biochem Pharmacol*, 211, 115540.
- Cheng, Y., Liu, H., Li, J., Ma, Y., Song, C., Wang, Y., Li, P., Chen, Y. & Zhang, Z. 2022. Evaluation of culture conditions for osteoclastogenesis in RAW264.7 cells. *PLoS One*, 17, e0277871.

- Clarke, B. 2008. Normal Bone Anatomy and Physiology. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 3, S131-S139.
- Clarke, S. A., Martin, J., Nelson, J., Hornez, J. C., Bohner, M., Dunne, N. & Buchanan, F. 2017. Surrogate Outcome Measures of In Vitro Osteoclast Resorption of β Tricalcium Phosphate. *Adv Healthc Mater*, 6.
- Colnot, C., Thompson, Z., Miclau, T., Werb, Z. & Helms, J. A. 2003. Altered fracture repair in the absence of MMP9. *Development*, 130, 4123-4133.
- Copp, D. H. & Cheney, B. 1962. Calcitonin—a Hormone from the Parathyroid which Lowers the Calcium-level of the Blood. *Nature*, 193, 381-382.
- Coşkun, S., Chao, H., Vasavada, H., Heydari, K., Gonzales, N., Zhou, X., De Crombrughe, B. & Hirschi, K. K. 2014. Development of the fetal bone marrow niche and regulation of HSC quiescence and homing ability by emerging osteolineage cells. *Cell Rep*, 9, 581-90.
- Costa-Rodrigues, J., Fernandes, A. & Fernandes, M. H. 2011. Spontaneous and induced osteoclastogenic behaviour of human peripheral blood mononuclear cells and their CD14(+) and CD14(-) cell fractions. *Cell Prolif*, 44, 410-9.
- Crabtree, G. R. & Olson, E. N. 2002. NFAT Signaling. *Cell*, 109, S67-S79.
- Crotti, T. N., Flannery, M., Walsh, N. C., Fleming, J. D., Goldring, S. R. & Mchugh, K. P. 2006. NFATc1 regulation of the human beta3 integrin promoter in osteoclast differentiation. *Gene*, 372, 92-102.
- D'amico, L. & Roato, I. 2012. Cross-talk between T cells and osteoclasts in bone resorption. *Bonekey Rep*, 1, 82.
- Dai, R., Wu, Z., Chu, H. Y., Lu, J., Lyu, A., Liu, J. & Zhang, G. 2020. Cathepsin K: The Action in and Beyond Bone. *Front Cell Dev Biol*, 8, 433.
- Davey, R. A. & Findlay, D. M. 2013. Calcitonin: Physiology or fantasy? *Journal of Bone and Mineral Research*, 28, 973-979.
- De Vries, T. J., Schoenmaker, T., Aerts, D., Grevers, L. C., Souza, P. P., Nazmi, K., Van De Wiel, M., Ylstra, B., Lent, P. L., Leenen, P. J. & Everts, V. 2015. M-CSF priming of osteoclast precursors can cause osteoclastogenesis-insensitivity, which can be prevented and overcome on bone. *J Cell Physiol*, 230, 210-25.
- Del Fattore, A., Teti, A. & Rucci, N. 2008. Osteoclast receptors and signaling. *Arch Biochem Biophys*, 473, 147-60.
- Delaissé, J. M., Andersen, T. L., Engsig, M. T., Henriksen, K., Troen, T. & Blavier, L. 2003. Matrix metalloproteinases (MMP) and cathepsin K contribute differently to osteoclastic activities. *Microsc Res Tech*, 61, 504-513.
- Dougall, W. C., Glaccum, M., Charrier, K., Rohrbach, K., Brasel, K., De Smedt, T., Daro, E., Smith, J., Tometsko, M. E., Maliszewski, C. R., Armstrong, A., Shen, V., Bain, S., Cosman, D., Anderson, D., Morrissey, P. J., Peschon, J. J. & Schuh, J. 1999. RANK is essential for osteoclast and lymph node development. *Genes Dev*, 13, 2412-2424.
- Downey, P. A. & Siegel, M. I. 2006. Bone biology and the clinical implications for osteoporosis. *Phys Ther*, 86, 77-91.
- Drake, F. H., Dodds, R. A., James, I. E., Connor, J. R., Debouck, C., Richardson, S., Lee-Rykaczewski, E., Coleman, L., Rieman, D., Barthlow, R., Hastings, G. & Gowen, M. 1996. Cathepsin K, but not cathepsins B, L, or S, is abundantly expressed in human osteoclasts. *J Biol Chem*, 271, 12511-12516.
- Duong, L. T., Lakkakorpi, P., Nakamura, I. & Rodan, G. A. 2000. Integrins and signaling in osteoclast function. *Matrix Biol*, 19, 97-105.
- Duong, L. T. & Rodan, G. A. 2001. Regulation of osteoclast formation and function. *Rev Endocr Metab Disord*, 2, 95-104.
- Dzierzak, E. & Speck, N. A. 2008. Of lineage and legacy: the development of mammalian hematopoietic stem cells. *Nat Immunol*, 9, 129-36.

- Ek-Rylander, B., Flores, M., Wendel, M., Heinegard, D. & Andersson, G. 1994. Dephosphorylation of osteopontin and bone sialoprotein by osteoclastic tartrate-resistant acid phosphatase. Modulation of osteoclast adhesion in vitro. *J Biol Chem*, 269, 14853-14856.
- Engleman, V. W., Nickols, G. A., Ross, F. P., Horton, M. A., Griggs, D. W., Settle, S. L., Ruminski, P. G. & Teitelbaum, S. L. 1997. A peptidomimetic antagonist of the $\alpha(v)\beta3$ integrin inhibits bone resorption in vitro and prevents osteoporosis in vivo. *J Clin Invest*, 99, 2284-92.
- Engsig, M. T., Chen, Q. J., Vu, T. H., Pedersen, A. C., Therkidsen, B., Lund, L. R., Henriksen, K., Lenhard, T., Foged, N. T., Werb, Z. & Delaissé, J. M. 2000. Matrix metalloproteinase 9 and vascular endothelial growth factor are essential for osteoclast recruitment into developing long bones. *J Cell Biol*, 151, 879-89.
- Eriksen, E. F. 2010. Cellular mechanisms of bone remodeling. *Rev Endocr Metab Disord*, 11, 219-27.
- Felix, R., Cecchini, M. G., Hofstetter, W., Elford, P. R., Stutzer, A. & Fleisch, H. 1990. Impairment of macrophage colony-stimulating factor production and lack of resident bone marrow macrophages in the osteopetrotic op/op mouse. *J Bone Miner Res*, 5, 781-9.
- Feng, X. & Teitelbaum, S. L. 2013. Osteoclasts: New Insights. *Bone Res*, 1, 11-26.
- Filgueira, L. 2004. Fluorescence-based staining for tartrate-resistant acidic phosphatase (TRAP) in osteoclasts combined with other fluorescent dyes and protocols. *J Histochem Cytochem*, 52, 411-4.
- Fisher, L. W. & Fedarko, N. S. 2003. Six genes expressed in bones and teeth encode the current members of the SIBLING family of proteins. *Connect Tissue Res*, 44 Suppl 1, 33-40.
- Fisher, L. W., Torchia, D. A., Fohr, B., Young, M. F. & Fedarko, N. S. 2001. Flexible structures of SIBLING proteins, bone sialoprotein, and osteopontin. *Biochem Biophys Res Commun*, 280, 460-465.
- Florencio-Silva, R., Sasso, G. R., Sasso-Cerri, E., Simões, M. J. & Cerri, P. S. 2015. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *Biomed Res Int*, 2015, 421746.
- Franzoso, G., Carlson, L., Xing, L., Poljak, L., Shores, E. W., Brown, K. D., Leonardi, A., Tran, T., Boyce, B. F. & Siebenlist, U. 1997. Requirement for NF-kappaB in osteoclast and B-cell development. *Genes Dev*, 11, 3482-96.
- Fujikawa, Y., Quinn, J. M., Sabokbar, A., Mcgee, J. O. & Athanasou, N. A. 1996. The human osteoclast precursor circulates in the monocyte fraction. *Endocrinology*, 137, 4058-4060.
- Fujisaki, K., Tanabe, N., Suzuki, N., Kawato, T., Takeichi, O., Tsuzukibashi, O., Makimura, M., Ito, K. & Maeno, M. 2007. Receptor activator of NF-kappaB ligand induces the expression of carbonic anhydrase II, cathepsin K, and matrix metalloproteinase-9 in osteoclast precursor RAW264.7 cells. *Life Sci*, 80, 1311-8.
- Ganss, B., Kim, R. H. & Sodek, J. 1999. Bone sialoprotein. *Crit Rev Oral Biol Med*, 10, 79-98.
- Garnero, P., Borel, O., Byrjalsen, I., Ferreras, M., Drake, F. H., Mcquaney, M. S., Foged, N. T., Delmas, P. D. & Delaissé, J. M. 1998. The collagenolytic activity of cathepsin K is unique among mammalian proteinases. *J Biol Chem*, 273, 32347-52.
- Gelb, B. D., Shi, G. P., Chapman, H. A. & Desnick, R. J. 1996. Pycnodysostosis, a lysosomal disease caused by cathepsin K deficiency. *Science*, 273, 1236-8.
- Glass, D. A., 2nd, Bialek, P., Ahn, J. D., Starbuck, M., Patel, M. S., Clevers, H., Taketo, M. M., Long, F., McMahon, A. P., Lang, R. A. & Karsenty, G. 2005. Canonical

- Wnt signaling in differentiated osteoblasts controls osteoclast differentiation. *Dev Cell*, 8, 751-64.
- Goldring, S. R., Gorn, A. H., Yamin, M., Krane, S. M. & Wang, J. T. 1993. Characterization of the structural and functional properties of cloned calcitonin receptor cDNAs. *Horm Metab Res*, 25, 477-80.
- Gordon, J. A., Tye, C. E., Sampaio, A. V., Underhill, T. M., Hunter, G. K. & Goldberg, H. A. 2007. Bone sialoprotein expression enhances osteoblast differentiation and matrix mineralization in vitro. *Bone*, 41, 462-73.
- Gowen, M., Lazner, F., Dodds, R., Kapadia, R., Feild, J., Tavaría, M., Bertocello, I., Drake, F., Zavarselk, S., Tellis, I., Hertzog, P., Debouck, C. & Kola, I. 1999. Cathepsin K knockout mice develop osteopetrosis due to a deficit in matrix degradation but not demineralization. *J Bone Miner Res*, 14, 1654-1663.
- Grage-Griebenow, E., Flad, H. D. & Ernst, M. 2001. Heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets. *J Leukoc Biol*, 69, 11-20.
- Gritz, E. & Hirschi, K. K. 2016. Specification and function of hemogenic endothelium during embryogenesis. *Cell Mol Life Sci*, 73, 1547-67.
- Halleen, J. M., Alatalo, S. L., Suominen, H., Cheng, S., Janckila, A. J. & Väänänen, H. K. 2000. Tartrate-resistant acid phosphatase 5b: a novel serum marker of bone resorption. *J Bone Miner Res*, 15, 1337-45.
- Halleen, J. M., Räisänen, S., Salo, J. J., Reddy, S. V., Roodman, G. D., Hentunen, T. A., Lehenkari, P. P., Kaija, H., Vihko, P. & Väänänen, H. K. 1999. Intracellular fragmentation of bone resorption products by reactive oxygen species generated by osteoclastic tartrate-resistant acid phosphatase. *J Biol Chem*, 274, 22907-10.
- Halleen, J. M., Tiitinen, S. L., Ylipahkala, H., Fagerlund, K. M. & Vaananen, H. K. 2006. Tartrate-resistant acid phosphatase 5b (TRACP 5b) as a marker of bone resorption. *Clin Lab*, 52, 499-509.
- Halling Linder, C., Ek-Rylander, B., Krumpel, M., Norgård, M., Narisawa, S., Millán, J. L., Andersson, G. & Magnusson, P. 2017. Bone Alkaline Phosphatase and Tartrate-Resistant Acid Phosphatase: Potential Co-regulators of Bone Mineralization. *Calcif Tissue Int*, 101, 92-101.
- Harris, N. L., Rattray, K. R., Tye, C. E., Underhill, T. M., Somerman, M. J., D'errico, J. A., Chambers, A. F., Hunter, G. K. & Goldberg, H. A. 2000. Functional analysis of bone sialoprotein: identification of the hydroxyapatite-nucleating and cell-binding domains by recombinant peptide expression and site-directed mutagenesis. *Bone*, 27, 795-802.
- Hattersley, G. & Chambers, T. J. 1989. Calcitonin receptors as markers for osteoclastic differentiation: correlation between generation of bone-resorptive cells and cells that express calcitonin receptors in mouse bone marrow cultures. *Endocrinology*, 125, 1606-12.
- Hemingway, F., Cheng, X., Knowles, H. J., Estrada, F. M., Gordon, S. & Athanasou, N. A. 2011. In vitro generation of mature human osteoclasts. *Calcif Tissue Int*, 89, 389-95.
- Henriksen, K., Karsdal, M. A., Taylor, A., Tosh, D. & Coxon, F. P. 2012. Generation of human osteoclasts from peripheral blood. *Methods Mol Biol*, 816, 159-175.
- Hobolt-Pedersen, A. S., Delaissé, J. M. & Søre, K. 2014. Osteoclast fusion is based on heterogeneity between fusion partners. *Calcif Tissue Int*, 95, 73-82.
- Hofbauer, L. C. & Heufelder, A. E. 2001. Role of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin in bone cell biology. *J Mol Med (Berl)*, 79, 243-253.

- Hofbauer, L. C. & Schoppet, M. 2004. Clinical implications of the osteoprotegerin/RANKL/RANK system for bone and vascular diseases. *Jama*, 292, 490-5.
- Horton, M. A., Taylor, M. L., Arnett, T. R. & Helfrich, M. H. 1991. Arg-Gly-Asp (RGD) peptides and the anti-vitronectin receptor antibody 23C6 inhibit dentine resorption and cell spreading by osteoclasts. *Exp Cell Res*, 195, 368-75.
- Hsu, H., Lacey, D. L., Dunstan, C. R., Solovyev, I., Colombero, A., Timms, E., Tan, H. L., Elliott, G., Kelley, M. J., Sarosi, I., Wang, L., Xia, X. Z., Elliott, R., Chiu, L., Black, T., Scully, S., Capparelli, C., Morony, S., Shimamoto, G., Bass, M. B. & Boyle, W. J. 1999. Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 3540-3545.
- Hunter, G. K. & Goldberg, H. A. 1993. Nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 8562-8565.
- Husheem, M., Nyman, J. K., Vääräniemi, J., Vaananen, H. K. & Hentunen, T. A. 2005. Characterization of circulating human osteoclast progenitors: development of in vitro resorption assay. *Calcif Tissue Int*, 76, 222-30.
- Ikeda, F., Nishimura, R., Matsubara, T., Tanaka, S., Inoue, J.-I., Reddy, S. V., Hata, K., Yamashita, K., Hiraga, T., Watanabe, T., Kukita, T., Yoshioka, K., Rao, A. & Yoneda, T. 2004. Critical roles of c-Jun signaling in regulation of NFAT family and RANKL-regulated osteoclast differentiation. 114, 475-484.
- Inaoka, T., Bilbe, G., Ishibashi, O., Tezuka, K., Kumegawa, M. & Kokubo, T. 1995. Molecular cloning of human cDNA for cathepsin K: novel cysteine proteinase predominantly expressed in bone. *Biochem Biophys Res Commun*, 206, 89-96.
- Ishii, M., Egen, J. G., Klauschen, F., Meier-Schellersheim, M., Saeki, Y., Vacher, J., Proia, R. L. & Germain, R. N. 2009. Sphingosine-1-phosphate mobilizes osteoclast precursors and regulates bone homeostasis. *Nature*, 458, 524-8.
- Izawa, T., Zou, W., Chappel, J. C., Ashley, J. W., Feng, X. & Teitelbaum, S. L. 2012. c-Src links a RANK/ $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ integrin complex to the osteoclast cytoskeleton. *Mol Cell Biol*, 32, 2943-53.
- Jacome-Galarza, C. E., Percin, G. I., Muller, J. T., Mass, E., Lazarov, T., Eitler, J., Rauner, M., Yadav, V. K., Crozet, L., Bohm, M., Loyher, P. L., Karsenty, G., Waskow, C. & Geissmann, F. 2019. Developmental origin, functional maintenance and genetic rescue of osteoclasts. *Nature*, 568, 541-545.
- Jevon, M., Sabokbar, A., Fujikawa, Y., Hirayama, T., Neale, S. D., Wass, J. & Athanasou, N. A. 2002. Gender- and age-related differences in osteoclast formation from circulating precursors. *J Endocrinol*, 172, 673-81.
- Jiang, T., Xia, T., Qiao, F., Wang, N., Jiang, Y. & Xin, H. 2023. Role and Regulation of Transcription Factors in Osteoclastogenesis. *Int J Mol Sci*, 24.
- Jilka, R. L., Weinstein, R. S., Bellido, T., Parfitt, A. M. & Manolagas, S. C. 1998. Osteoblast Programmed Cell Death (Apoptosis): Modulation by Growth Factors and Cytokines. *Journal of Bone and Mineral Research*, 13, 793-802.
- Jimi, E. & Ghosh, S. 2005. Role of nuclear factor-kappaB in the immune system and bone. *Immunol Rev*, 208, 80-7.
- Johnson, M. R., Polymeropoulos, M. H., Vos, H. L., Ortiz De Luna, R. I. & Francomano, C. A. 1996. A nonsense mutation in the cathepsin K gene observed in a family with pycnodysostosis. *Genome Res*, 6, 1050-5.
- Kapasa, E. R., Giannoudis, P. V., Jia, X., Hatton, P. V. & Yang, X. B. 2017. The Effect of RANKL/OPG Balance on Reducing Implant Complications. *J Funct Biomater*, 8.
- Karsenty, G. & Wagner, E. F. 2002. Reaching a Genetic and Molecular Understanding of Skeletal Development. *Developmental Cell*, 2, 389-406.

- Kawai, T., Matsuyama, T., Hosokawa, Y., Makihira, S., Seki, M., Karimbux, N. Y., Goncalves, R. B., Valverde, P., Dibart, S., Li, Y. P., Miranda, L. A., Ernst, C. W., Izumi, Y. & Taubman, M. A. 2006. B and T lymphocytes are the primary sources of RANKL in the bone resorptive lesion of periodontal disease. *Am J Pathol*, 169, 987-98.
- Kenkre, J. S. & Bassett, J. 2018. The bone remodelling cycle. *Ann Clin Biochem*, 55, 308-327.
- Kim, J.-M., Lin, C., Stavre, Z., Greenblatt, M. B. & Shim, J.-H. 2020. Osteoblast-Osteoclast Communication and Bone Homeostasis. *Cells*, 9, 2073.
- Kim, J. H. & Kim, N. 2014. Regulation of NFATc1 in Osteoclast Differentiation. *J Bone Metab*, 21, 233-41.
- Kim, K., Kim, J. H., Lee, J., Jin, H. M., Lee, S. H., Fisher, D. E., Kook, H., Kim, K. K., Choi, Y. & Kim, N. 2005. Nuclear factor of activated T cells c1 induces osteoclast-associated receptor gene expression during tumor necrosis factor-related activation-induced cytokine-mediated osteoclastogenesis. *J Biol Chem*, 280, 35209-35216.
- Kim, K., Lee, S. H., Ha Kim, J., Choi, Y. & Kim, N. 2008. NFATc1 induces osteoclast fusion via up-regulation of Atp6v0d2 and the dendritic cell-specific transmembrane protein (DC-STAMP). *Mol Endocrinol*, 22, 176-85.
- Kim, S. W., Pajevic, P. D., Selig, M., Barry, K. J., Yang, J.-Y., Shin, C. S., Baek, W.-Y., Kim, J.-E. & Kronenberg, H. M. 2012. Intermittent parathyroid hormone administration converts quiescent lining cells to active osteoblasts. *Journal of Bone and Mineral Research*, 27, 2075-2084.
- Kitazawa, S., Kajimoto, K., Kondo, T. & Kitazawa, R. 2003. Vitamin D3 supports osteoclastogenesis via functional vitamin D response element of human RANKL gene promoter. *J Cell Biochem*, 89, 771-7.
- Kleinhans, C., Schmid, F. F., Schmid, F. V. & Kluger, P. J. 2015. Comparison of osteoclastogenesis and resorption activity of human osteoclasts on tissue culture polystyrene and on natural extracellular bone matrix in 2D and 3D. *J Biotechnol*, 205, 101-10.
- Kobayashi, K., Takahashi, N., Jimi, E., Udagawa, N., Takami, M., Kotake, S., Nakagawa, N., Kinosaki, M., Yamaguchi, K., Shima, N., Yasuda, H., Morinaga, T., Higashio, K., Martin, T. J. & Suda, T. 2000. Tumor necrosis factor alpha stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL-RANK interaction. *J Exp Med*, 191, 275-286.
- Kong, L., Smith, W. & Hao, D. 2019. Overview of RAW264.7 for osteoclastogenesis study: Phenotype and stimuli. *J Cell Mol Med*, 23, 3077-3087.
- 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., Khoo, W., Wakeham, A., Dunstan, C. R., Lacey, D. L., Mak, T. W., Boyle, W. J. & Penninger, J. M. 1999. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature*, 397, 315-323.
- Kornak, U., Kasper, D., Bösl, M. R., Kaiser, E., Schweizer, M., Schulz, A., Friedrich, W., Delling, G. & Jentsch, T. J. 2001. Loss of the ClC-7 chloride channel leads to osteopetrosis in mice and man. *Cell*, 104, 205-15.
- Kreja, L., Liedert, A., Schmidt, C., Claes, L. & Ignatius, A. 2007. Influence of receptor activator of nuclear factor (NF)-kappaB ligand (RANKL), macrophage-colony stimulating factor (M-CSF) and fetal calf serum on human osteoclast formation and activity. *J Mol Histol*, 38, 341-345.
- Kudo, O., Sabokbar, A., Pocock, A., Itonaga, I., Fujikawa, Y. & Athanasou, N. A. 2003. Interleukin-6 and interleukin-11 support human osteoclast formation by a RANKL-independent mechanism. *Bone*, 32, 1-7.

- Kwon, O. H., Lee, C. K., Lee, Y. I., Paik, S. G. & Lee, H. J. 2005. The hematopoietic transcription factor PU.1 regulates RANK gene expression in myeloid progenitors. *Biochem Biophys Res Commun*, 335, 437-46.
- Lacey, D. L., Timms, E., Tan, H. L., Kelley, M. J., Dunstan, C. R., Burgess, T., Elliott, R., Colombero, A., Elliott, G., Scully, S., Hsu, H., Sullivan, J., Hawkins, N., Davy, E., Capparelli, C., Eli, A., Qian, Y. X., Kaufman, S., Sarosi, I., Shalhoub, V., Senaldi, G., Guo, J., Delaney, J. & Boyle, W. J. 1998. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*, 93, 165-176.
- Lampiasi, N., Russo, R., Kireev, I., Strelkova, O., Zhironkina, O. & Zito, F. 2021. Osteoclasts Differentiation from Murine RAW 264.7 Cells Stimulated by RANKL: Timing and Behavior. *Biology (Basel)*, 10.
- Lane, N. E., Yao, W., Nakamura, M. C., Humphrey, M. B., Kimmel, D., Huang, X., Sheppard, D., Ross, F. P. & Teitelbaum, S. L. 2005. Mice lacking the integrin beta5 subunit have accelerated osteoclast maturation and increased activity in the estrogen-deficient state. *J Bone Miner Res*, 20, 58-66.
- Licini, C., Vitale-Brovarone, C. & Mattioli-Belmonte, M. 2019. Collagen and non-collagenous proteins molecular crosstalk in the pathophysiology of osteoporosis. *Cytokine Growth Factor Rev*, 49, 59-69.
- Lin, H. Y., Harris, T. L., Flannery, M. S., Aruffo, A., Kaji, E. H., Gorn, A., Kolakowski, L. F., Jr., Lodish, H. F. & Goldring, S. R. 1991. Expression cloning of an adenylate cyclase-coupled calcitonin receptor. *Science*, 254, 1022-4.
- Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25, 402-408.
- Ljusberg, J., Wang, Y., Lång, P., Norgård, M., Dodds, R., Hultenby, K., Ek-Rylander, B. & Andersson, G. 2005. Proteolytic Excision of a Repressive Loop Domain in Tartrate-resistant Acid Phosphatase by Cathepsin K in Osteoclasts. *Journal of Biological Chemistry*, 280, 28370-28381.
- Lomaga, M. A., Yeh, W. C., Sarosi, I., Duncan, G. S., Furlonger, C., Ho, A., Morony, S., Capparelli, C., Van, G., Kaufman, S., Van Der Heiden, A., Itie, A., Wakeham, A., Khoo, W., Sasaki, T., Cao, Z., Penninger, J. M., Paige, C. J., Lacey, D. L., Dunstan, C. R., Boyle, W. J., Goeddel, D. V. & Mak, T. W. 1999. TRAF6 deficiency results in osteopetrosis and defective interleukin-1, CD40, and LPS signaling. *Genes Dev*, 13, 1015-24.
- Long, F. & Ornitz, D. M. 2013. Development of the endochondral skeleton. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5, a008334.
- Lotinun, S., Kiviranta, R., Matsubara, T., Alzate, J. A., Neff, L., Lüth, A., Koskivirta, I., Kleuser, B., Vacher, J., Vuorio, E., Horne, W. C. & Baron, R. 2013. Osteoclast-specific cathepsin K deletion stimulates S1P-dependent bone formation. *J Clin Invest*, 123, 666-81.
- Maalouf, M., Çinar, H., Bouleftour, W., Thomas, M., Vanden-Bossche, A., Laroche, N., Linossier, M. T., Peyroche, S., Lafage-Proust, M. H., Vico, L., Guignandon, A. & Malaval, L. 2022. Deletion of osteopontin or bone sialoprotein induces opposite bone responses to mechanical stimulation in mice. *Bone Rep*, 17, 101621.
- Mackie, E. J., Ahmed, Y. A., Tatarczuch, L., Chen, K. S. & Mirams, M. 2008. Endochondral ossification: how cartilage is converted into bone in the developing skeleton. *Int J Biochem Cell Biol*, 40, 46-62.
- Mackie, E. J., Tatarczuch, L. & Mirams, M. 2011. The skeleton: a multi-functional complex organ: the growth plate chondrocyte and endochondral ossification. *J Endocrinol*, 211, 109-21.

- Malaval, L., Monfoulet, L., Fabre, T., Pothuaud, L., Bareille, R., Miraux, S., Thiaudiere, E., Raffard, G., Franconi, J. M., Lafage-Proust, M. H., Aubin, J. E., Vico, L. & Amédée, J. 2009. Absence of bone sialoprotein (BSP) impairs cortical defect repair in mouse long bone. *Bone*, 45, 853-861.
- Malaval, L., Wade-Gueye, N. M., Boudiffa, M., Fei, J., Zirngibl, R., Chen, F., Laroche, N., Roux, J. P., Burt-Pichat, B., Duboeuf, F., Boivin, G., Jurdic, P., Lafage-Proust, M. H., Amedee, J., Vico, L., Rossant, J. & Aubin, J. E. 2008. Bone sialoprotein plays a functional role in bone formation and osteoclastogenesis. *J Exp Med*, 205, 1145-1153.
- Maria, S. M., Prukner, C., Sheikh, Z., Mueller, F., Barralet, J. E. & Komarova, S. V. 2014. Reproducible quantification of osteoclastic activity: characterization of a biomimetic calcium phosphate assay. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 102, 903-12.
- Marinovich, R., Soenjaya, Y., Wallace, G. Q., Zuskov, A., Dunkman, A., Foster, B. L., Ao, M., Bartman, K., Lam, V., Rizkalla, A., Beier, F., Somerman, M. J., Holdsworth, D. W., Soslowsky, L. J., Lagugné-Labarthe, F. & Goldberg, H. A. 2016. The role of bone sialoprotein in the tendon-bone insertion. *Matrix Biol*, 52-54, 325-338.
- Matsumoto, M., Kogawa, M., Wada, S., Takayanagi, H., Tsujimoto, M., Katayama, S., Hisatake, K. & Nogi, Y. 2004. Essential role of p38 mitogen-activated protein kinase in cathepsin K gene expression during osteoclastogenesis through association of NFATc1 and PU.1. *J Biol Chem*, 279, 45969-45979.
- Matsuo, K., Galson, D. L., Zhao, C., Peng, L., Laplace, C., Wang, K. Z., Bachler, M. A., Amano, H., Aburatani, H., Ishikawa, H. & Wagner, E. F. 2004. Nuclear factor of activated T-cells (NFAT) rescues osteoclastogenesis in precursors lacking c-Fos. *J Biol Chem*, 279, 26475-80.
- Matsuo, K. & Irie, N. 2008. Osteoclast-osteoblast communication. *Arch Biochem Biophys*, 473, 201-9.
- Mcdonald, M. M., Kim, A. S., Mulholland, B. S. & Rauner, M. 2021. New Insights Into Osteoclast Biology. *JBMR Plus*, 5, e10539.
- Mchugh, K. P., Hodivala-Dilke, K., Zheng, M. H., Namba, N., Lam, J., Novack, D., Feng, X., Ross, F. P., Hynes, R. O. & Teitelbaum, S. L. 2000. Mice lacking beta3 integrins are osteosclerotic because of dysfunctional osteoclasts. *J Clin Invest*, 105, 433-440.
- Mckercher, S. R., Torbett, B. E., Anderson, K. L., Henkel, G. W., Vestal, D. J., Baribault, H., Klemsz, M., Feeney, A. J., Wu, G. E., Paige, C. J. & Maki, R. A. 1996. Targeted disruption of the PU.1 gene results in multiple hematopoietic abnormalities. *Embo j*, 15, 5647-58.
- Miller, S. C., De Saint-Georges, L., Bowman, B. M. & Jee, W. S. 1989. Bone lining cells: structure and function. *Scanning Microsc*, 3, 953-60; discussion 960-1.
- Minkin, C. 1982. Bone acid phosphatase: tartrate-resistant acid phosphatase as a marker of osteoclast function. *Calcif Tissue Int*, 34, 285-90.
- Miyamoto, H., Suzuki, T., Miyauchi, Y., Iwasaki, R., Kobayashi, T., Sato, Y., Miyamoto, K., Hoshi, H., Hashimoto, K., Yoshida, S., Hao, W., Mori, T., Kanagawa, H., Katsuyama, E., Fujie, A., Morioka, H., Matsumoto, M., Chiba, K., Takeya, M., Toyama, Y. & Miyamoto, T. 2012. Osteoclast stimulatory transmembrane protein and dendritic cell-specific transmembrane protein cooperatively modulate cell-cell fusion to form osteoclasts and foreign body giant cells. *J Bone Miner Res*, 27, 1289-97.
- Miyamoto, T. 2011. Regulators of osteoclast differentiation and cell-cell fusion. *Keio J Med*, 60, 101-105.

- Miyamoto, T. & Suda, T. 2003. Differentiation and function of osteoclasts. *Keio J Med*, 52, 1-7.
- Miyauchi, A., Alvarez, J., Greenfield, E. M., Teti, A., Grano, M., Colucci, S., Zambonin-Zallone, A., Ross, F. P., Teitelbaum, S. L., Cheresh, D. & Et Al. 1991. Recognition of osteopontin and related peptides by an alpha v beta 3 integrin stimulates immediate cell signals in osteoclasts. *J Biol Chem*, 266, 20369-74.
- Miyazaki, T., Sanjay, A., Neff, L., Tanaka, S., Horne, W. C. & Baron, R. 2004. Src kinase activity is essential for osteoclast function. *J Biol Chem*, 279, 17660-17666.
- Møller, A. M. J., Delaissé, J. M., Olesen, J. B., Madsen, J. S., Canto, L. M., Bechmann, T., Rogatto, S. R. & Sørensen, K. 2020. Aging and menopause reprogram osteoclast precursors for aggressive bone resorption. *Bone Res*, 8, 27.
- Moreira, C. A., Dempster, D. W. & Baron, R. 2000. Anatomy and Ultrastructure of Bone – Histogenesis, Growth and Remodeling. In: FEINGOLD, K. R., ANAWALT, B., BOYCE, A., CHROUSOS, G., DE HERDER, W. W., DHATARIYA, K., DUNGAN, K., HERSHMAN, J. M., HOFFLAND, J., KALRA, S., KALTSAS, G., KOCH, C., KOPP, P., KORBONITS, M., KOVACS, C. S., KUOHUNG, W., LAFERRÈRE, B., LEVY, M., MCGEE, E. A., MCLACHLAN, R., MORLEY, J. E., NEW, M., PURNELL, J., SAHAY, R., SINGER, F., SPERLING, M. A., STRATAKIS, C. A., TRENCE, D. L. & WILSON, D. P. (eds.) *Endotext*. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.
- Copyright © 2000-2022, MDText.com, Inc.
- Moriishi, T. & Komori, T. 2022. Osteocytes: Their Lacunocanalicular Structure and Mechanoresponses. *Int J Mol Sci*, 23.
- Nakagawa, N., Kinosaki, M., Yamaguchi, K., Shima, N., Yasuda, H., Yano, K., Morinaga, T. & Higashio, K. 1998. RANK is the essential signaling receptor for osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*, 253, 395-400.
- Nakamura, I., Duong, L. T., Rodan, S. B. & Rodan, G. A. 2007. Involvement of alpha(v)beta3 integrins in osteoclast function. *J Bone Miner Metab*, 25, 337-44.
- Nakamura, M., Aoyama, N., Yamaguchi, S. & Sasano, Y. 2021. Expression of tartrate-resistant acid phosphatase and cathepsin K during osteoclast differentiation in developing mouse mandibles. *Biomedical Research*, 42, 13-21.
- Nakashima, T., Hayashi, M., Fukunaga, T., Kurata, K., Oh-Hora, M., Feng, J. Q., Bonewald, L. F., Kodama, T., Wutz, A., Wagner, E. F., Penninger, J. M. & Takayanagi, H. 2011. Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. *Nature Medicine*, 17, 1231-1234.
- Nesbitt, S., Nesbit, A., Helfrich, M. & Horton, M. 1993. Biochemical characterization of human osteoclast integrins. Osteoclasts express alpha v beta 3, alpha 2 beta 1, and alpha v beta 1 integrins. *J Biol Chem*, 268, 16737-45.
- Nicholson, G. C., Malakellis, M., Collier, F. M., Cameron, P. U., Holloway, W. R., Gough, T. J., Gregorio-King, C., Kirkland, M. A. & Myers, D. E. 2000. Induction of osteoclasts from CD14-positive human peripheral blood mononuclear cells by receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL). *Clin Sci (Lond)*, 99, 133-40.
- Nicholson, G. C., Moseley, J. M., Sexton, P. M., Mendelsohn, F. A. & Martin, T. J. 1986. Abundant calcitonin receptors in isolated rat osteoclasts. Biochemical and autoradiographic characterization. *J Clin Invest*, 78, 355-60.
- Oddie, G. W., Schenk, G., Angel, N. Z., Walsh, N., Guddat, L. W., De Jersey, J., Cassady, A. I., Hamilton, S. E. & Hume, D. A. 2000. Structure, function, and regulation of tartrate-resistant acid phosphatase. *Bone*, 27, 575-584.

- Ogata, Y. 2008. Bone sialoprotein and its transcriptional regulatory mechanism. *J Periodontal Res*, 43, 127-135.
- Okada, Y., Naka, K., Kawamura, K., Matsumoto, T., Nakanishi, I., Fujimoto, N., Sato, H. & Seiki, M. 1995. Localization of matrix metalloproteinase 9 (92-kilodalton gelatinase/type IV collagenase = gelatinase B) in osteoclasts: implications for bone resorption. *Lab Invest*, 72, 311-322.
- Okamoto, K., Nakashima, T., Shinohara, M., Negishi-Koga, T., Komatsu, N., Terashima, A., Sawa, S., Nitta, T. & Takayanagi, H. 2017. Osteoimmunology: The Conceptual Framework Unifying the Immune and Skeletal Systems. *Physiological Reviews*, 97, 1295-1349.
- Oldberg, A., Franzén, A. & Heinegård, D. 1988. The primary structure of a cell-binding bone sialoprotein. *J Biol Chem*, 263, 19430-19432.
- Omata, Y., Tachibana, H., Aizaki, Y., Mimura, T. & Sato, K. 2023. Essentiality of Nfatc1 short isoform in osteoclast differentiation and its self-regulation. *Sci Rep*, 13, 18797.
- Ono, T. & Nakashima, T. 2018. Recent advances in osteoclast biology. *Histochemistry and Cell Biology*, 149, 325-341.
- Pesesse, L., Sanchez, C., Walsh, D. A., Delcour, J. P., Baudouin, C., Msika, P. & Henrotin, Y. 2014. Bone sialoprotein as a potential key factor implicated in the pathophysiology of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*, 22, 547-56.
- Pilz, G. A., Braun, J., Ulrich, C., Felka, T., Warstat, K., Ruh, M., Schewe, B., Abele, H., Larbi, A. & Aicher, W. K. 2011. Human mesenchymal stromal cells express CD14 cross-reactive epitopes. *Cytometry A*, 79, 635-45.
- Pondel, M. 2000. Calcitonin and calcitonin receptors: bone and beyond. *Int J Exp Pathol*, 81, 405-22.
- Prause, M., Seeliger, C., Unger, M., Rosado Balmayor, E., Van Griensven, M. & Haug, A. T. 2015. Pantoprazole decreases cell viability and function of human osteoclasts in vitro. *Mediators Inflamm*, 2015, 413097.
- Qin, C., Baba, O. & Butler, W. T. 2004. Post-translational modifications of sibling proteins and their roles in osteogenesis and dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med*, 15, 126-36.
- Quinn, J. M. & Gillespie, M. T. 2005. Modulation of osteoclast formation. *Biochem Biophys Res Commun*, 328, 739-45.
- Raynal, C., Delmas, P. D. & Chenu, C. 1996. Bone sialoprotein stimulates in vitro bone resorption. *Endocrinology*, 137, 2347-2354.
- Reponen, P., Sahlberg, C., Munaut, C., Thesleff, I. & Tryggvason, K. 1994. High expression of 92-kD type IV collagenase (gelatinase B) in the osteoclast lineage during mouse development. *J Cell Biol*, 124, 1091-1102.
- Riedlova, P., Sood, S., Goodyear, C. S. & Ansalone, C. 2023. Differentiation of Functional Osteoclasts from Human Peripheral Blood CD14+ Monocytes. *J Vis Exp*.
- Rocheffort, G. Y., Pallu, S. & Benhamou, C. L. 2010. Osteocyte: the unrecognized side of bone tissue. *Osteoporosis International*, 21, 1457-1469.
- Roodman, G. D. 1999. Cell biology of the osteoclast. *Exp Hematol*, 27, 1229-1241.
- Ross, F. P., Chappel, J., Alvarez, J. I., Sander, D., Butler, W. T., Farach-Carson, M. C., Mintz, K. A., Robey, P. G., Teitelbaum, S. L. & Cheresch, D. A. 1993. Interactions between the bone matrix proteins osteopontin and bone sialoprotein and the osteoclast integrin alpha v beta 3 potentiate bone resorption. *J Biol Chem*, 268, 9901-9907.
- Ross, F. P. & Teitelbaum, S. L. 2005. alphavbeta3 and macrophage colony-stimulating factor: partners in osteoclast biology. *Immunol Rev*, 208, 88-105.

- Rucci, N. & Teti, A. 2016. The "love-hate" relationship between osteoclasts and bone matrix. *Matrix Biol*, 52-54, 176-190.
- Ruoslahti, E. & Pierschbacher, M. D. 1987. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science*, 238, 491-497.
- Saftig, P., Hunziker, E., Wehmeyer, O., Jones, S., Boyde, A., Rommerskirch, W., Moritz, J. D., Schu, P. & Von Figura, K. 1998. Impaired osteoclastic bone resorption leads to osteopetrosis in cathepsin-K-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 13453-8.
- Salhotra, A., Shah, H. N., Levi, B. & Longaker, M. T. 2020. Mechanisms of bone development and repair. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 21, 696-711.
- Saltel, F., Destaing, O., Bard, F., Eichert, D. & Jurdic, P. 2004. Apatite-mediated Actin Dynamics in Resorbing Osteoclasts. *Molecular Biology of the Cell*, 15, 5231-5241.
- Samura, A., Wada, S., Suda, S., Iitaka, M. & Katayama, S. 2000. Calcitonin receptor regulation and responsiveness to calcitonin in human osteoclast-like cells prepared in vitro using receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and macrophage colony-stimulating factor. *Endocrinology*, 141, 3774-82.
- Sanjay, A., Houghton, A., Neff, L., Didomenico, E., Bardelay, C., Antoine, E., Levy, J., Gailit, J., Bowtell, D., Horne, W. C. & Baron, R. 2001. Cbl associates with Pyk2 and Src to regulate Src kinase activity, alpha(v)beta(3) integrin-mediated signaling, cell adhesion, and osteoclast motility. *J Cell Biol*, 152, 181-195.
- Scheven, B. A., Visser, J. W. & Nijweide, P. J. 1986. In vitro osteoclast generation from different bone marrow fractions, including a highly enriched haematopoietic stem cell population. *Nature*, 321, 79-81.
- Schünke, M., Schulte, E. & Schumacher, U. 2018. *Allgemeine Anatomie und Bewegungssystem*, Stuttgart, Georg Thieme Verlag.
- Segovia-Silvestre, T., Neutzsky-Wulff, A. V., Sorensen, M. G., Christiansen, C., Bollerslev, J., Karsdal, M. A. & Henriksen, K. 2009. Advances in osteoclast biology resulting from the study of osteopetrotic mutations. *Hum Genet*, 124, 561-77.
- Shankar, G., Davison, I., Helfrich, M. H., Mason, W. T. & Horton, M. A. 1993. Integrin receptor-mediated mobilisation of intranuclear calcium in rat osteoclasts. *J Cell Sci*, 105 (Pt 1), 61-68.
- Siddiqui, J. A. & Partridge, N. C. 2016. Physiological Bone Remodeling: Systemic Regulation and Growth Factor Involvement. *Physiology (Bethesda)*, 31, 233-45.
- Silver, I. A., Murrills, R. J. & Etherington, D. J. 1988. Microelectrode studies on the acid microenvironment beneath adherent macrophages and osteoclasts. *Exp Cell Res*, 175, 266-76.
- Simonet, W. S., Lacey, D. L., Dunstan, C. R., Kelley, M., Chang, M. S., Lüthy, R., Nguyen, H. Q., Wooden, S., Bennett, L., Boone, T., Shimamoto, G., Derose, M., Elliott, R., Colombero, A., Tan, H. L., Trail, G., Sullivan, J., Davy, E., Bucay, N., Renshaw-Gegg, L., Hughes, T. M., Hill, D., Pattison, W., Campbell, P., Sander, S., Van, G., Tarpley, J., Derby, P., Lee, R. & Boyle, W. J. 1997. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*, 89, 309-319.
- Soltanoff, C. S., Yang, S., Chen, W. & Li, Y. P. 2009. Signaling networks that control the lineage commitment and differentiation of bone cells. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 19, 1-46.
- Sorensen, M. G., Henriksen, K., Schaller, S., Henriksen, D. B., Nielsen, F. C., Dziegiel, M. H. & Karsdal, M. A. 2007. Characterization of osteoclasts derived from CD14+ monocytes isolated from peripheral blood. *J Bone Miner Metab*, 25, 36-45.

- Soriano, P., Montgomery, C., Geske, R. & Bradley, A. 1991. Targeted disruption of the c-src proto-oncogene leads to osteopetrosis in mice. *Cell*, 64, 693-702.
- Staines, K. A., Macrae, V. E. & Farquharson, C. 2012. The importance of the SIBLING family of proteins on skeletal mineralisation and bone remodelling. *J Endocrinol*, 214, 241-255.
- Stanford, C. M. & Keller, J. C. 1991. The Concept of Osseointegration and Bone Matrix Expression. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 2, 83-101.
- Stock, S. R. 2015. The Mineral–Collagen Interface in Bone. *Calcified Tissue International*, 97, 262-280.
- Suda, T., Takahashi, N., Udagawa, N., Jimi, E., Gillespie, M. T. & Martin, T. J. 1999. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev*, 20, 345-357.
- Sun, Y., Li, J., Xie, X., Gu, F., Sui, Z., Zhang, K. & Yu, T. 2021. Macrophage-Osteoclast Associations: Origin, Polarization, and Subgroups. *Front Immunol*, 12, 778078.
- Sundaram, K., Nishimura, R., Senn, J., Youssef, R. F., London, S. D. & Reddy, S. V. 2007. RANK ligand signaling modulates the matrix metalloproteinase-9 gene expression during osteoclast differentiation. *Exp Cell Res*, 313, 168-178.
- Susa, M., Luong-Nguyen, N. H., Cappellen, D., Zamurovic, N. & Gamse, R. 2004. Human primary osteoclasts: in vitro generation and applications as pharmacological and clinical assay. *J Transl Med*, 2, 6.
- Takahashi, N., Udagawa, N., Kobayashi, Y. & Suda, T. 2007. Generation of osteoclasts in vitro, and assay of osteoclast activity. *Methods Mol Med*, 135, 285-301.
- Takai, H., Kanematsu, M., Yano, K., Tsuda, E., Higashio, K., Ikeda, K., Watanabe, K. & Yamada, Y. 1998. Transforming growth factor-beta stimulates the production of osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor by bone marrow stromal cells. *J Biol Chem*, 273, 27091-6.
- Takayanagi, H. 2007. Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nat Rev Immunol*, 7, 292-304.
- Takayanagi, H. 2021. RANKL as the master regulator of osteoclast differentiation. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, 39, 13-18.
- Takayanagi, H., Kim, S., Koga, T., Nishina, H., Isshiki, M., Yoshida, H., Saiura, A., Isobe, M., Yokochi, T., Inoue, J., Wagner, E. F., Mak, T. W., Kodama, T. & Taniguchi, T. 2002. Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts. *Dev Cell*, 3, 889-901.
- Takeshita, S., Kaji, K. & Kudo, A. 2000. Identification and characterization of the new osteoclast progenitor with macrophage phenotypes being able to differentiate into mature osteoclasts. *J Bone Miner Res*, 15, 1477-1488.
- Tanaka, S. 2017. RANKL-Independent Osteoclastogenesis: A Long-Standing Controversy. *J Bone Miner Res*, 32, 431-433.
- Tatsumi, S., Ishii, K., Amizuka, N., Li, M., Kobayashi, T., Kohno, K., Ito, M., Takeshita, S. & Ikeda, K. 2007. Targeted ablation of osteocytes induces osteoporosis with defective mechanotransduction. *Cell Metab*, 5, 464-75.
- Teitelbaum, S. L. 2000. Bone resorption by osteoclasts. *Science*, 289, 1504-1508.
- Teitelbaum, S. L. & Ross, F. P. 2003. Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat Rev Genet*, 4, 638-649.
- Tezuka, K., Nemoto, K., Tezuka, Y., Sato, T., Ikeda, Y., Kobori, M., Kawashima, H., Eguchi, H., Hakeda, Y. & Kumegawa, M. 1994. Identification of matrix metalloproteinase 9 in rabbit osteoclasts. *J Biol Chem*, 269, 15006-9.

- Tondravi, M. M., Mckercher, S. R., Anderson, K., Erdmann, J. M., Quiroz, M., Maki, R. & Teitelbaum, S. L. 1997. Osteopetrosis in mice lacking haematopoietic transcription factor PU.1. *Nature*, 386, 81-84.
- Tong, X., Yu, G., Fu, X., Song, R., Gu, J. & Liu, Z. 2022. A Review of Signaling Transduction Mechanisms in Osteoclastogenesis Regulation by Autophagy, Inflammation, and Immunity. *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 9846.
- Turner, C. H., Warden, S. J., Bellido, T., Plotkin, L. I., Kumar, N., Jasiuk, I., Danzig, J. & Robling, A. G. 2009. Mechanobiology of the skeleton. *Sci Signal*, 2, pt3.
- Tye, C. E., Hunter, G. K. & Goldberg, H. A. 2005. Identification of the type I collagen-binding domain of bone sialoprotein and characterization of the mechanism of interaction. *J Biol Chem*, 280, 13487-13492.
- Udagawa, N., Koide, M., Nakamura, M., Nakamichi, Y., Yamashita, T., Uehara, S., Kobayashi, Y., Furuya, Y., Yasuda, H., Fukuda, C. & Tsuda, E. 2021. Osteoclast differentiation by RANKL and OPG signaling pathways. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, 39, 19-26.
- Udagawa, N., Takahashi, N., Akatsu, T., Tanaka, H., Sasaki, T., Nishihara, T., Koga, T., Martin, T. J. & Suda, T. 1990. Origin of osteoclasts: mature monocytes and macrophages are capable of differentiating into osteoclasts under a suitable microenvironment prepared by bone marrow-derived stromal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 7260-4.
- Udagawa, N., Takahashi, N., Yasuda, H., Mizuno, A., Itoh, K., Ueno, Y., Shinki, T., Gillespie, M. T., Martin, T. J., Higashio, K. & Suda, T. 2000. Osteoprotegerin produced by osteoblasts is an important regulator in osteoclast development and function. *Endocrinology*, 141, 3478-84.
- Vaananen, H. K., Zhao, H., Mulari, M. & Halleen, J. M. 2000. The cell biology of osteoclast function. *Journal of Cell Science*, 113, 377-381.
- Vääräniemi, J., Halleen, J. M., Kaarlonen, K., Ylipahkala, H., Alatalo, S. L., Andersson, G., Kaija, H., Vihko, P. & Väänänen, H. K. 2004. Intracellular machinery for matrix degradation in bone-resorbing osteoclasts. *J Bone Miner Res*, 19, 1432-40.
- Valverde, P., Tu, Q. & Chen, J. 2005. BSP and RANKL induce osteoclastogenesis and bone resorption synergistically. *J Bone Miner Res*, 20, 1669-1679.
- Valverde, P., Zhang, J., Fix, A., Zhu, J., Ma, W., Tu, Q. & Chen, J. 2008. Overexpression of bone sialoprotein leads to an uncoupling of bone formation and bone resorption in mice. *J Bone Miner Res*, 23, 1775-1788.
- Vincent, K. & Durrant, M. C. 2013. A structural and functional model for human bone sialoprotein. *J Mol Graph Model*, 39, 108-117.
- Vu, T. H., Shipley, J. M., Bergers, G., Berger, J. E., Helms, J. A., Hanahan, D., Shapiro, S. D., Senior, R. M. & Werb, Z. 1998. MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes. *Cell*, 93, 411-22.
- Vuoti, E., Lehenkari, P., Tuukkanen, J., Glumoff, V. & Kylmäoja, E. 2023. Osteoclastogenesis of human peripheral blood, bone marrow, and cord blood monocytes. *Sci Rep*, 13, 3763.
- Wade-Gueye, N. M., Boudiffa, M., Vanden-Bossche, A., Laroche, N., Aubin, J. E., Vico, L., Lafage-Proust, M. H. & Malaval, L. 2012. Absence of bone sialoprotein (BSP) impairs primary bone formation and resorption: the marrow ablation model under PTH challenge. *Bone*, 50, 1064-1073.
- Weiner, S., Traub, W. & Wagner, H. D. 1999. Lamellar bone: structure-function relations. *J Struct Biol*, 126, 241-55.

- Welsch, U. 2014. *Lehrbuch Histologie*, München, Urban & Fischer Verlag, Elsevier GmbH.
- Wiktor-Jedrzejczak, W., Bartocci, A., Ferrante, A. W., Ahmed-Ansari, A., Sell, K. W., Pollard, J. W. & Stanley, E. R. 1990. Total absence of colony-stimulating factor 1 in the macrophage-deficient osteopetrotic (op/op) mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87, 4828-4832.
- Wilson, S. R., Peters, C., Saftig, P. & Brömme, D. 2009. Cathepsin K activity-dependent regulation of osteoclast actin ring formation and bone resorption. *J Biol Chem*, 284, 2584-2592.
- Wong, B. R., Besser, D., Kim, N., Arron, J. R., Vologodskaja, M., Hanafusa, H. & Choi, Y. 1999. TRANCE, a TNF family member, activates Akt/PKB through a signaling complex involving TRAF6 and c-Src. *Mol Cell*, 4, 1041-1049.
- Wong, B. R., Josien, R., Lee, S. Y., Vologodskaja, M., Steinman, R. M. & Choi, Y. 1998. The TRAF Family of Signal Transducers Mediates NF- κ B Activation by the TRANCE Receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 28355-28359.
- Woo, K. M., Kim, H. M. & Ko, J. S. 2002. Macrophage colony-stimulating factor promotes the survival of osteoclast precursors by up-regulating Bcl-X(L). *Exp Mol Med*, 34, 340-6.
- Wu, Y. & Hirschi, K. K. 2020. Tissue-Resident Macrophage Development and Function. *Front Cell Dev Biol*, 8, 617879.
- Xing, L., Bushnell, T. P., Carlson, L., Tai, Z., Tondravi, M., Siebenlist, U., Young, F. & Boyce, B. F. 2002. NF- κ B p50 and p52 Expression Is Not Required for RANK-Expressing Osteoclast Progenitor Formation but Is Essential for RANK- and Cytokine-Mediated Osteoclastogenesis. *Journal of Bone and Mineral Research*, 17, 1200-1210.
- Xiong, J., Piemontese, M., Onal, M., Campbell, J., Goellner, J. J., Dusevich, V., Bonewald, L., Manolagas, S. C. & O'Brien, C. A. 2015. Osteocytes, not Osteoblasts or Lining Cells, are the Main Source of the RANKL Required for Osteoclast Formation in Remodeling Bone. *PLOS ONE*, 10, e0138189.
- Xu, L., Zhang, Z., Sun, X., Wang, J., Xu, W., Shi, L., Lu, J., Tang, J., Liu, J. & Su, X. 2017. Glycosylation status of bone sialoprotein and its role in mineralization. *Exp Cell Res*, 360, 413-420.
- Yahara, Y., Barrientos, T., Tang, Y. J., Puvindran, V., Nadesan, P., Zhang, H., Gibson, J. R., Gregory, S. G., Diao, Y., Xiang, Y., Qadri, Y. J., Souma, T., Shinohara, M. L. & Alman, B. A. 2020. Erythromyeloid progenitors give rise to a population of osteoclasts that contribute to bone homeostasis and repair. *Nat Cell Biol*, 22, 49-59.
- Yamaza, T., Goto, T., Kamiya, T., Kobayashi, Y., Sakai, H. & Tanaka, T. 1998. Study of immunoelectron microscopic localization of cathepsin K in osteoclasts and other bone cells in the mouse femur. *Bone*, 23, 499-509.
- Yasuda, H., Shima, N., Nakagawa, N., Mochizuki, S. I., Yano, K., Fujise, N., Sato, Y., Goto, M., Yamaguchi, K., Kuriyama, M., Kanno, T., Murakami, A., Tsuda, E., Morinaga, T. & Higashio, K. 1998. Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro. *Endocrinology*, 139, 1329-1337.
- Yoshida, H., Hayashi, S.-I., Kunisada, T., Ogawa, M., Nishikawa, S., Okamura, H., Sudo, T., Shultz, L. D. & Nishikawa, S.-I. 1990. The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene. *Nature*, 345, 442-444.
- Young, M. F. 2003. Bone matrix proteins: their function, regulation, and relationship to osteoporosis. *Osteoporos Int*, 14 Suppl 3, S35-42.

- Zaidi, M., Troen, B., Moonga, B. S. & Abe, E. 2001. Cathepsin K, osteoclastic resorption, and osteoporosis therapy. *J Bone Miner Res*, 16, 1747-9.
- Zainal Ariffin, S. H., Megat Abdul Wahab, R., Abdul Razak, M., Yazid, M. D., Shahidan, M. A., Miskon, A. & Zainol Abidin, I. Z. 2024. Evaluation of in vitro osteoblast and osteoclast differentiation from stem cell: a systematic review of morphological assays and staining techniques. *PeerJ*, 12, e17790.
- Zhang, M. & Huang, B. 2012. The multi-differentiation potential of peripheral blood mononuclear cells. *Stem Cell Res Ther*, 3, 48.
- Zhao, Q., Shao, J., Chen, W. & Li, Y. P. 2007. Osteoclast differentiation and gene regulation. *Front Biosci*, 12, 2519-29.
- Zhao, Q., Wang, X., Liu, Y., He, A. & Jia, R. 2010. NFATc1: functions in osteoclasts. *Int J Biochem Cell Biol*, 42, 576-579.
- Zhu, L., Tang, Y., Li, X. Y., Keller, E. T., Yang, J., Cho, J. S., Feinberg, T. Y. & Weiss, S. J. 2020. Osteoclast-mediated bone resorption is controlled by a compensatory network of secreted and membrane-tethered metalloproteinases. *Sci Transl Med*, 12.

8 Danksagung

Mein Dank gilt meiner Doktormutter, die mich während meiner gesamten Promotionszeit mit Engagement, fachlicher Expertise und großem Vertrauen begleitet hat. Ihre konstruktiven Anregungen, ihre Geduld sowie ihre stetige Unterstützung und ihr Vertrauen in meine wissenschaftliche Entwicklung haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Für die Möglichkeit, dieses Promotionsprojekt in Ihrem Labor durchführen zu dürfen, danke ich ihr herzlich.

Darüber hinaus danke ich allen Mitarbeitenden im Labor für die angenehme und produktive Zusammenarbeit, den fachlichen Austausch und die kollegiale Unterstützung, die das wissenschaftliche Arbeiten stets bereichert haben.

Ganz besonders dankbar bin ich meiner Familie und meinen Freunden, die mich auf diesem Weg mit unermüdlichem Zuspruch, Geduld und Zuversicht begleitet haben. Ohne euren kontinuierlichen Rückhalt und euren Glauben an mich hätte ich die Herausforderungen dieser Zeit nicht bewältigen können. Eure Unterstützung ist und bleibt für mich von unschätzbarem Wert.

Nicht zuletzt möchte ich meinem Freund danken, der mich in dieser intensiven Zeit mit außergewöhnlicher Geduld und Verständnis begleitet hat. Danke, dass du mir in allen Höhen und Tiefen stets zur Seite standest, mich in herausfordernden Momenten aufgefangen hast und dabei immer wieder eigene Bedürfnisse zurückgestellt hast. Ohne dich wäre die Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen.

9 Tabellarischer Lebenslauf

Name: Sarah Knopf

Adresse:

Telefon:

Geburtsdatum, -ort:

Staatsangehörigkeit: Deutsch

Familienstand: ledig

Ausbildung

Beruflicher Werdegang

Praktische Erfahrung

Sonstige Kenntnisse