

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

Etablierung einer Co-Kultur aus Osteoblasten und Makrophagen zur Untersuchung des  
Einflusses von Bone Sialoprotein (BSP) und BSP-Antikörpern auf die Differenzierung zu  
Osteoklasten

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

vorgelegt von

Magdalena Steiner  
aus München

Mainz, 2025

© 2025 Magdalena Steiner.

Veröffentlicht unter der Creative Commons Lizenz

CC BY-NC-ND 4.0 International

(<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.de>)

Wissenschaftlicher Vorstand:

Univ.-Prof. Dr. Hansjörg Schild

Tag der Promotion:

11. August 2025

Diese Dissertation ist all den Frauen gewidmet, die in der Forschung ihren Weg gegangen sind – oft gegen Widerstände, häufig unsichtbar und dennoch unbeirrt.

Ihrer Neugier, ihrer Stärke und ihrem Mut verdanken wir Erkenntnisse, Möglichkeiten und Schritte in Richtung Gleichberechtigung.

*„Wissenschaft kennt kein Geschlecht, keine Herkunft, keine Nationalität.“*

- Verfasser unbekannt

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>I</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>II</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>IV</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>2 Literaturdiskussion</b> .....	<b>3</b>
2.1 Allgemeine Knochenlehre .....	3
2.1.1 Bestandteile der Knochenmatrix.....	3
2.1.2 Makroskopische und histologische Knochenstruktur.....	4
2.1.3 Zellen des Knochens, deren Funktion und Interaktion .....	5
2.1.4 Osteogenese und Ossifikation.....	9
2.1.5 Frakturheilung.....	10
2.1.6 Knochenumbau (Bone Remodelling).....	11
2.2 Zellkulturbedingungen: Zellzahl, Nährmedium und Signalstoffe.....	13
2.2.1 Zellzahl und Nährmedium in Co-Kulturen von Osteoblasten und Osteoklasten....	13
2.2.2 Signalstoffe der Testgruppe .....	13
2.3 In-vitro-Co-Kultursysteme als Alternative zur Tiermodellforschung .....	17
<b>3 Ziel der Arbeit</b> .....	<b>19</b>
<b>4 Material und Methoden</b> .....	<b>20</b>
4.1 Zellkulturkomponenten, -reagenzien und -bedarf .....	20
4.1.1 Zellarten und Zellzahl .....	20
4.1.2 Signalstoffe der Testgruppe .....	20
4.1.3 Zellkulturbedarf .....	20
4.2 Studiendesign .....	24
4.3 Zellkultur .....	24
4.3.1 Isolierung von Monozyten aus peripherem Blut .....	24
4.3.2 Isolierung von primären Osteoblasten aus humanen Knochen und Virustransduktion .....	26
4.3.3 Nährmediumstudie .....	28
4.3.4 Monokultur isolierter Monozyten und Osteoblasten .....	29
4.3.5 Anlage der Co-Kultur aus Osteoblasten und Makrophagen .....	30

4.3.6	Nachweis differenzierter Osteoklasten mittels Hoechst-Färbung.....	32
4.3.7	Fluoreszenzmikroskopische Dokumentation differenzierter Osteoklasten .....	32
4.4	Statistische Methoden.....	33
<b>5</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>34</b>
5.1	Höchste Zelldichte und Viabilität unter Verwendung von MEM .....	34
5.2	Wachstum der Monokulturen von hOB und Makrophagen.....	34
5.3	Differenzierte Osteoklasten nach zehntägiger Co-Kultur.....	35
5.3.1	Co-Kultur 9, 10 und 11 - Vergleich von BSP und RANKL .....	36
5.3.2	Co-Kultur 12, 13 und 14 - Vergleich von IDK1 und RANKL .....	37
5.3.3	Co-Kultur 9 und 14 - Vergleich von BSP und IDK1 .....	38
5.4	Statistischer Vergleich wichtiger Gruppen der Co-Kultur.....	38
5.4.1	Test- vs. Kontrollgruppe - Erhöhte Differenzierung von OK in Testgruppe .....	39
5.4.2	BSP vs. RANKL - Gleichwertiger Effekt auf die Osteoklastendifferenzierung.....	43
5.4.3	RANKL vs. IDK1 - Signifikant stärkerer osteoklastogener Effekt von RANKL.....	44
5.4.4	BSP (CK9) vs. IDK1 (CK14) - Höhere Osteoklastendifferenzierung mit BSP .....	44
5.4.5	IDK1 vs. Kontrollgruppe - Vergleichbarer Effekt auf die Differenzierung von OK..	45
5.4.6	RANKL/BSP vs. Kontrollgruppe - Erhöhte Differenzierung durch RANKL/BSP ....	46
5.4.7	0,4µm vs. 8µm Inserts - Gleichwertiger Effekt beider Porengrößen.....	47
5.4.8	MEM vs. Differenzierungs-MEM - Vergleichbarer Effekt beider Nährmedien .....	48
5.4.9	Deskriptive Statistik aller Gruppen .....	49
<b>6</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>50</b>
6.1	Diskussion von Zellkulturkomponenten und -reagenzien .....	50
6.1.1	Aus Buffy Coats isolierte Monozyten.....	50
6.1.2	Zellzahl und Ratio.....	50
6.1.3	Nährmedium und Zusatzsubstanzen.....	51
6.1.4	Inserts.....	53
6.2	Diskussion der Methodik.....	53
6.2.1	Fehlerquellen bei der Isolierung und Kultivierung von Monozyten aus peripherem Blut.....	53
6.2.2	Isolierung und Kultivierung von Osteoblasten aus humanen Knochen .....	55
6.2.3	Vorgehen bei der Anlage der Co-Kulturen .....	56

6.2.4	Vorgehen bei der Analyse der Osteoklastenformation .....	58
6.3	Diskussion der Ergebnisse .....	59
6.3.1	Stärkerer osteoklastogener Effekt in Test- gegenüber Kontrollgruppe.....	60
6.3.2	Erhöhte Osteoklastendifferenzierung durch BSP oder RANKL .....	61
6.3.3	Äquivalenter Effekt von BSP und RANKL .....	61
6.3.4	Hemmung von BSP mittels IDK1-Antikörper .....	62
6.4	Fazit und weitere Forschungsanstöße .....	62
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>65</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>66</b>
<b>9</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>74</b>
<b>10</b>	<b>Tabellarischer Lebenslauf.....</b>	<b>75</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ALP	Alkalische Phosphatase
BMU	Basic Multicellular Unit
BRC	Bone Remodelling Compartment
BSP	Bone Sialoprotein
Bzw.	Beziehungsweise
CK	Co-Kultur
eGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
FBS	Fetal Bovine Serum
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor
hOB	Humane Osteoblasten
HSC	Hämatopoetische Stammzelle
Lsg.	Lösung
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinasen
M-CSF	Macrophage Colony-stimulating Factor
mM	Millimolar
NCP	Nicht-kollagene Proteine
OB	Osteoblasten
OCN	Osteocalcin
OC/OK	Osteoklasten
ON	Osteonectin
OPG	Osteoprotegerin
OPN	Osteopontin
OPZ	Osteoprogenitorzellen
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS	Phosphate Buffered Saline
PTH	Parathormon
RANK	Receptor Activator of NF $\kappa$ B
RANKL	Receptor Activator of NF $\kappa$ B Ligand
RCF	Relative Centrifugal Force (xg)
RPM	Revolutions Per Minute
SOP	Standard Operating Procedure
u.a.	unter anderem
vs.	versus
z.B.	zum Beispiel

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Aufbaus von Lamellenknochen (12).....	5
Abbildung 2: Aus humanem Knochen isolierte Osteoblasten in Monokultur.....	7
Abbildung 3: Durch Hoechst-Färbung und Immunfluoreszenz angefärbte Osteoklasten .....	8
Abbildung 4: Vier Phasen des Bone Remodelling Zyklus (47).....	12
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Osteoklastenentwicklung (52).....	14
Abbildung 6: Auflistung verschiedener 2D-Co-Kultursysteme mit jeweiligen Vor- und Nachteilen (77).....	18
Abbildung 7: Schemazeichnung des Ficoll-Dichtegradienten.....	25
Abbildung 8: Virustransduzierte Osteoblasten unter dem Fluoreszenzmikroskop.....	28
Abbildung 9: Schemazeichnung der Nährmediumstudie .....	29
Abbildung 10: Schematischer Aufbau einer Co-Kultur mit Test- und Kontrollgruppe .....	31
Abbildung 11: Zählschema differenzierter Osteoklasten am Beispiel der Co-Kultur Nr. 13...	33
Abbildung 12: Entwicklung der Osteoblasten in Monokultur über zehn Tage.....	34
Abbildung 13: Entwicklung der Monozyten/Makrophagen in Monokultur über zehn Tage ....	35
Abbildung 14: Linksgipflige Verteilung der Häufigkeit von Einzelergebnissen der Co-Kulturen in Test (M-CSF + BSP/RANKL/IDK1) - und Kontrollgruppe (MEM/Differenzierungs-MEM + M-CSF) mit 0,4µm und 8µm Inserts .....	39
Abbildung 15: Darstellung der Anzahl differenzierter Osteoklasten in Testgruppe (M-CSF + BSP/RANKL/IDK1) und Kontrollgruppe (MEM/Differenzierungs-MEM + M- CSF) mit 0,4µm und 8µm Inserts mittels Balkendiagramm.....	41
Abbildung 16: Grafische Darstellung der Auswertung differenzierter Osteoklasten in Testgruppe (M-CSF + BSP/RANKL/IDK1) und Kontrollgruppe (MEM/Differenzierungs-MEM + M-CSF) mit 0,4µm und 8µm Inserts nach zehn Tagen Co-Kultur durch Boxplots .....	42
Abbildung 17: Grafische Darstellung der logarithmierten Daten in Testgruppe (M-CSF + BSP/RANKL/IDK1) und Kontrollgruppe (MEM/Differenzierungs-MEM + M- CSF) mit 0,4µm und 8µm Inserts nach zehn Tagen Co-Kultur durch Boxplots .....	42
Abbildung 18: Balkendiagramm zur Darstellung der Summe differenzierter Osteoklasten in der RANKL- und BSP-Gruppe der Co-Kulturen 9, 10 und 11 .....	43
Abbildung 19: Balkendiagramm zur Darstellung der Summe differenzierter Osteoklasten in der RANKL- und IDK1-Gruppe der Co-Kulturen 12, 13 und 14 .....	44
Abbildung 20: Balkendiagramm zum Vergleich der BSP-Gruppe (CK9) versus IDK1-Gruppe (CK14).....	45
Abbildung 21: Vergleich der Summe differenzierter Osteoklasten in der IDK1- und Kontrollgruppe (MEM + M-CSF) .....	46

Abbildung 22: Balkendiagramm zum Vergleich der RANKL- und BSP-Gruppe zur Kontroll-Gruppe (MEM/Differenzierungs-MEM + M-CSF) .....	47
Abbildung 23: Balkendiagramm zur Darstellung der Gesamtsumme gezählter Osteoklasten in Wells mit 0,4 oder 8 Mikrometer Inserts .....	48
Abbildung 24: Balkendiagramm zur Unterscheidung der Zellzahlen differenzierter Osteoklasten bei Verwendung von Differenzierungsnährmedium und normalem Nährmedium in der Kontrollgruppe .....	49
Abbildung 25: Schematische Darstellung der Zeitabläufe der neu ausgearbeiteten Anlage von Mono- und Co-Kulturen in dieser Arbeit .....	58

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Verwendete Signalstoffe der Test- und Kontrollgruppe .....	20
Tabelle 2:	Verwendete Materialien in der Zellkultur.....	21
Tabelle 3:	Anzahl differenzierter Osteoklasten der Co-Kulturen 9, 10 und 11 in Test- (MEM + M-CSF + RANKL/BSP) und Kontrollgruppe (MEM/Differenzierungs- MEM + M-CSF) mit 0,4µm und 8µm Inserts .....	37
Tabelle 4:	Anzahl differenzierter Osteoklasten der Co-Kulturen 12, 13 und 14 in Test- (MEM + M-CSF + RANKL/IDK1) und Kontrollgruppe (MEM/Differenzierungs- MEM + M-CSF) mit 0,4µm und 8µm Inserts .....	38
Tabelle 5:	Übersicht der deskriptiven Statistik aller Test- und Kontrollgruppen.....	49
Tabelle 6:	Testung verschiedener Ratios und Zellzahlen.....	51
Tabelle 7:	Modifikation und Optimierung der Co-Kultur-Parameter in den Vorexperimenten (CK1-8) und in den Hauptexperimenten (CK9-14) .....	56

## 1 Einleitung

Der menschliche Knochen ist ein komplexes und hochdynamisches Gewebe, welches sich durch kontinuierlichen Auf- und Abbau regeneriert. Dabei kommt es ein Leben lang zur Entfernung geschädigter oder abgenutzter Knochenmasse und deren Ersatz durch neue Knochensubstanz. Somit wird die Stabilität sowie Funktionalität des Skeletts sichergestellt. Diese Umbauprozesse werden unter dem Begriff „Bone Remodelling“ zusammengefasst und sind ein fein abgestimmtes Zusammenspiel von Knochenzellen und Signalstoffen (1). Hauptakteure der ständig ablaufenden Knochenremodellierung sind zum einen knochenbildende Osteozyten sowie Osteoblasten und zum anderen knochenresorbierende Osteoklasten. Die interzelluläre Kommunikation erfolgt vorwiegend parakrin durch sezernierte Botenstoffe, deren Wirkung und Mechanismen auf Zielzellen bis heute nicht vollständig verstanden sind (2).

Eine zentrale Rolle in dieser Arbeit spielt daher die Regulation der Differenzierung von Osteoklastenvorläuferzellen zu Osteoklasten durch die Signalstoffe Bone Sialoprotein (BSP) sowie Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B Ligand (RANKL) (2). Während die Funktion und Wirkung von RANKL in Bezug auf die Osteoklastogenese sehr gut erforscht ist, sind die Mechanismen, durch die BSP und dessen Antikörper (z.B. IDK1) die Reifung und Aktivität von Osteoklasten beeinflussen, noch nicht abschließend geklärt (3).

Trotz zahlreicher Studien zur Osteoklastogenese bleibt unklar, inwiefern BSP die Differenzierung von Osteoklasten beeinflusst und inwieweit es möglicherweise eine ähnliche Funktion wie RANKL übernehmen kann. Zudem besteht Forschungsbedarf hinsichtlich der Frage, ob BSP-Antikörper, in diesem Fall IDK1, die osteoklastogene Wirkung von BSP gezielt hemmen können. Das zentrale Modell zur Untersuchung dieser Fragestellungen in der vorliegenden Arbeit ist eine Co-Kultur aus Osteoblasten und Makrophagen als Osteoklastenvorläuferzellen. Bereits zahlreiche Studien haben sich mit Osteoblasten-Osteoklasten-Co-Kulturen befasst, jedoch variieren die Methoden zur Zellkultivierung in diesen Untersuchungen teils erheblich.

Ziel dieser Dissertation ist daher die Etablierung einer standardisierten und reproduzierbaren Co-Kultur aus Osteoblasten und Makrophagen, die eine detaillierte Untersuchung der Osteoklastendifferenzierung ermöglicht. Im Mittelpunkt steht die Analyse des Einflusses von BSP, RANKL und dem BSP-Antikörper IDK1 auf die Osteoklastogenese, wobei der potenziell äquivalente Einfluss von RANKL und BSP sowie die Hemmung des BSP-Effektes durch IDK1 von besonderem Interesse sind. Durch diese Experimente sollen neue Erkenntnisse über die Interaktion zwischen Osteoblasten und Osteoklasten gewonnen werden, die nicht nur zur Grundlagenforschung beitragen, sondern auch potenzielle therapeutische Zielstrukturen für metabolische und tumorassoziierte Knochenerkrankungen aufzeigen können.

Um die Forschungsfragen in Bezug auf die Rolle von BSP auf die Osteoklastendifferenzierung und dessen Hemmung durch den BSP-Antikörper IDK1 beantworten zu können, wird eine in-vitro 2D-Co-Kultur aus primären humanen Osteoblasten und Makrophagen etabliert. Dabei werden die Osteoblasten in Inserts verschiedener Porengröße mit den Makrophagen in Wells von 24-Well-Platten kultiviert und dem Einfluss unterschiedlicher Nährmedien und Signalstoffe (BSP, RANKL, IDK1) ausgesetzt. Nach 10-tägiger Co-Kultur wird die Differenzierung zu Osteoklasten mittels Hoechst-Färbung und fluoreszenzmikroskopischer Dokumentation evaluiert. Zusätzlich erfolgt eine statistische Auswertung relevanter Vergleichsgruppen.

Diese Dissertation gibt in der Literatordiskussion (Kapitel 2) zunächst einen umfassenden Überblick über den aktuellen Stand der Forschung, um danach die Zielsetzung der Arbeit genauer zu erläutern (Kapitel 3). Anschließend werden Material und Methoden der Experimente (Kapitel 4) beschrieben, woran sich die Präsentation der Ergebnisse und deren statistische Auswertung (Kapitel 5) anfügt. Kapitel 6 diskutiert die Ergebnisse im Kontext aktueller wissenschaftlicher Erkenntnisse und zieht Schlussfolgerungen für zukünftige Forschungsansätze. In Kapitel 7 werden die zentralen Erkenntnisse der Arbeit zusammengefasst.

## 2 Literaturdiskussion

### 2.1 Allgemeine Knochenlehre

#### 2.1.1 Bestandteile der Knochenmatrix

Der gesunde menschliche Knochen verfügt über eine eindrucksvolle Belastbarkeit und Elastizität bei gleichzeitig relativ niedrigem Gesamtgewicht, was auf die besondere Zusammensetzung und Struktur der extrazellulären Knochenmatrix zurückzuführen ist (4). Die Knochensubstanz besteht zu 30% aus organischem Material, zu 45% aus Hydroxylapatit und zu 25% aus Wasser. 90% des organischen Materials entsprechen Kollagenfasern vom Typ 1, welche einer helikalen Anordnung innerhalb eines Osteons folgen und 10% kleineren Proteinen und Proteoglykanen. Zu den nicht-kollagenen Proteinen (NCP) gehören u.a. Osteonectin, Osteopontin, Osteocalcin und Bone-Sialoprotein, auf deren Funktion bei der Beschreibung der Knochenzellen und Signalstoffe (2.1.3, 2.2.2) eingegangen wird. Die anorganische Fraktion der Knochenmatrix bildet das kristalline Hydroxylapatit mit der Summenformel  $\text{Ca}_5(\text{OH})(\text{PO}_4)_3$ . Dieses verbindet sich im Rahmen des Mineralisierungsprozesses mit den Kollagenfibrillen und verleiht dem Knochen seine Widerstandfähigkeit bei mechanischer Beanspruchung (2, 5).

Der Prozess der Matrixmineralisierung ist noch nicht abschließend geklärt, jedoch gibt es die Theorie der Matrixvesikel. Diese besagt, dass Osteoblasten in der Lage sind, Nanovesikel aus Phospholipiden zu bilden, welche Kalziumphosphat enthalten. Durch Membrantransporter werden  $\text{Ca}^{2+}$  und Phosphat ins Innere der Vesikel geschleust, was zur Größenzunahme der Kalziumphosphatkristalle und zur Bildung von Hydroxylapatit führt. Nachdem die Matrixvesikel vom Osteoblasten in die ECM abgeschnürt wurden, bilden sie sogenannte „mineralized nodules“, also kugelförmige Ansammlungen nadelförmiger Mineralkristalle. In einem zweiten Schritt kommt es anschließend durch Anlagerung der radial angeordneten Hydroxylapatitkristalle an Kollagenfibrillen zur Mineralisierung. Vitamin D (Resorption von Kalzium aus dem Darm) und Parathormon (Resorption von Kalzium aus dem Knochen/aus der Niere) regulieren die Kalziumhomöostase und bestimmen damit die Festigkeit und Härte des Knochens (6-8).

Bei elastischer Verformung von Knochengewebe verteilt sich die Last gleichmäßig auf die mineralisierten Kollagenfibrillen, wobei die Mineralkristalle vorwiegend Spannkraften und Kollagen mehr Dehnungskraften bewältigen können (9). Zudem übernimmt Wasser eine wichtige Rolle bei der Lastaufnahme innerhalb der Kollagenfibrillen: Durch wasservermittelte Wasserstoffbrücken zwischen Hydroxylapatit und Tropokollagen wird die Verbindung dieser Moleküle stabiler und zusätzlich die Übertragung von kinetischer Energie auf den Knochen verbessert. Außerdem fördert intrafibrilläres Wasser die Fähigkeit des Knochengewebes, sich

unter Belastung zu verformen. Mit Hilfe der komplexen Struktur der extrazellulären Matrix, kombiniert mit den ständig ablaufenden Knochenauf- und abbauprozessen, ist der menschliche Knochen in der Lage, sich an einwirkende Belastungen dynamisch anzupassen und im Falle einer Fraktur, neue Knochensubstanz zur Wiederherstellung der Integrität des Knochengewebes zu bilden (10).

### **2.1.2 Makroskopische und histologische Knochenstruktur**

Der menschliche Körper besitzt im mittleren Erwachsenenalter etwa 206 Knochen. Deren Form und Struktur variieren, je nachdem welcher mechanischen Beanspruchung diese in der jeweiligen Skelettregion ausgesetzt sind, stark. Eine Besonderheit bilden dabei die Synostosen, welche zu den unechten Gelenken gehören und eine knöcherne Verschmelzung von Knochen darstellen. Beispiel hierfür ist der Aufbau der langen Röhrenknochen: Diese werden in Epiphyse, Metaphyse und Diaphyse eingeteilt. Im Zuge der Adoleszenz verknöchern die knorpeligen Epiphysenfugen und verbleiben als Epiphysenlinien in der Metaphyse zurück (11, 12).

Makroskopisch gibt es zwei Erscheinungsformen des erwachsenen Lamellenknochens, den kompakten und den spongiösen Knochen (siehe Abbildung 1). Die Substantia compacta (corticalis), auch Kortikalis genannt, bildet den festen und biomechanisch stabilen Schutzmantel des Knochens. Histologisch gesehen, besteht die Kortikalis aus Osteonen, welche wiederum aus Knochenlamellen aufgebaut sind. Im Inneren der Osteone befindet sich jeweils ein Havers-Kanal, der längs verlaufende Venolen und Arteriolen führt und mit Endost ausgekleidet ist. Querverbindungen zwischen den Havers-Gefäßen oder zu extraossären Blutgefäßen erfolgen über gefäßreiche Volkmann-Kanäle. Die Substantia spongiosa (Spongiosa) kleidet als dreidimensionales Geflecht von Knochenbälkchen (Trabekeln) das Innere der Skelettknochen aus. Hier finden dynamische Auf-, Um- und Abbauprozesse des Knochens durch die Interaktion von Osteoblasten, Osteoklasten und Osteoprogenitorzellen statt. Bei Erwachsenen befindet sich zwischen den Trabekeln der Spongiosa von Rippen, Wirbelkörpern, Sternum, Ilium, Humerus und Femur rotes Knochenmark. Dort kann mithilfe verschiedener Wachstumsfaktoren die Differenzierung von multipotenten hämatopoetischen Stammzellen zu Blutzellen erfolgen. Oberflächlich wird der Knochen von einer blut- und lymphgefäßreichen Bindegewebsschicht umgeben, welche zusätzlich zahlreiche Nervenfasern enthält. Das genannte Periost besitzt osteogene Potenz, die bei der Frakturheilung von großer Bedeutung ist (2, 12-14).

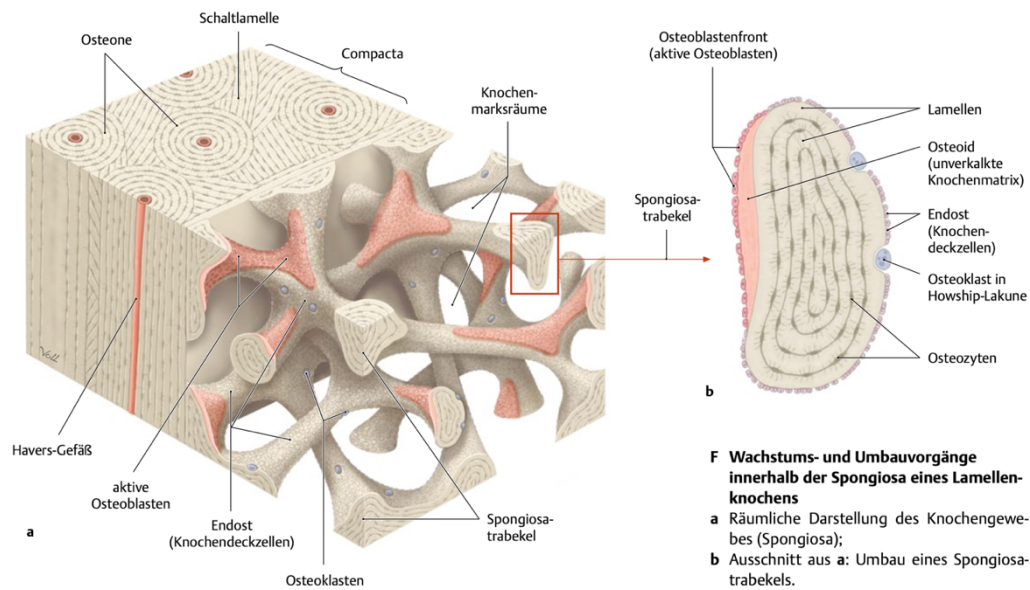


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Aufbaus von Lamellenknochen (12)

### 2.1.3 Zellen des Knochens, deren Funktion und Interaktion

Im Rahmen der pränatalen Skelettentwicklung bringt das mittlere Keimblatt (Mesoderm) embryonales Bindegewebe (Mesenchym) hervor. Aus mesenchymalen Stammzellen entstehen Chondrozyten, welche mit hyalinem Knorpel ein Vorläufermodell des künftigen Skeletts (Primordialskelett) formen (siehe chondrale Osteogenese in 2.1.4). Im Perichondrium, der äußersten Schicht der Knorpelanlage, wird die Bildung von Osteoprogenitorzellen (OPZ) induziert, die in den hypertrophen Knorpel einwandern und Verknöcherungszentren bilden. OPZ sind Vorläuferzellen der Osteoblasten (hOB) und persistieren auch im erwachsenen Knochen im Periost und Endost, was deren osteogene Potenz erklärt (2, 12, 15). Donsante et al. beschreiben in ihrem Review eine Ausprägung unterschiedlicher Untergruppen von OPZ mit speziellen Funktionen, die sich an die jeweiligen Gegebenheiten einer anatomischen Region angepasst haben, um die Knochenhomöostase aufrechtzuerhalten (15). Neben mesenchymalen Stammzellen, Chondrozyten und Osteoprogenitorzellen gibt es weitere wichtige Akteure bei Knochenaufbau- und Umbauprozessen:

#### *Osteoblasten*

Osteoblasten entwickeln sich über mehrere Zwischenstufen aus der Zellreihe multipotenter, mesenchymaler Stammzellen des Knochenmarks. Durch osteogene Transkriptionsfaktoren wie RUNX2 (Runt-Related Transcription Factor 2) kommt es zur Differenzierung der Stammzelle in eine Osteo-Chondroprogenitorzelle, welche sich über das Stadium der Osteoprogenitorzelle erst zu einem unreifen, dann zu einem reifen Osteoblasten entwickelt (16). Die Zellen der verschiedenen Entwicklungsstufen durchlaufen schrittweise Stadien der

Zellproliferation, Sekretion und Reifung der Knochenmatrix und deren Mineralisierung. Die Hauptaufgabe der kubisch geformten Osteoblasten ist die Bildung und Sezernierung von Osteoid, der unmineralisierten Knochenmatrix und die Mineralisierung dieser (siehe 2.1.1). Der reife Osteoblast (siehe Abbildung 2) hat drei Möglichkeiten der Weiterentwicklung:

1. Er entwickelt sich in 5-20% zu einem Osteozyten.
2. Er tritt als endostale Saumzelle (= Knochendeckzelle = „bone lining cells“) in einen Ruhezustand ein.
3. Er geht wie die Mehrzahl der Osteoblasten in Apoptose (2, 17).

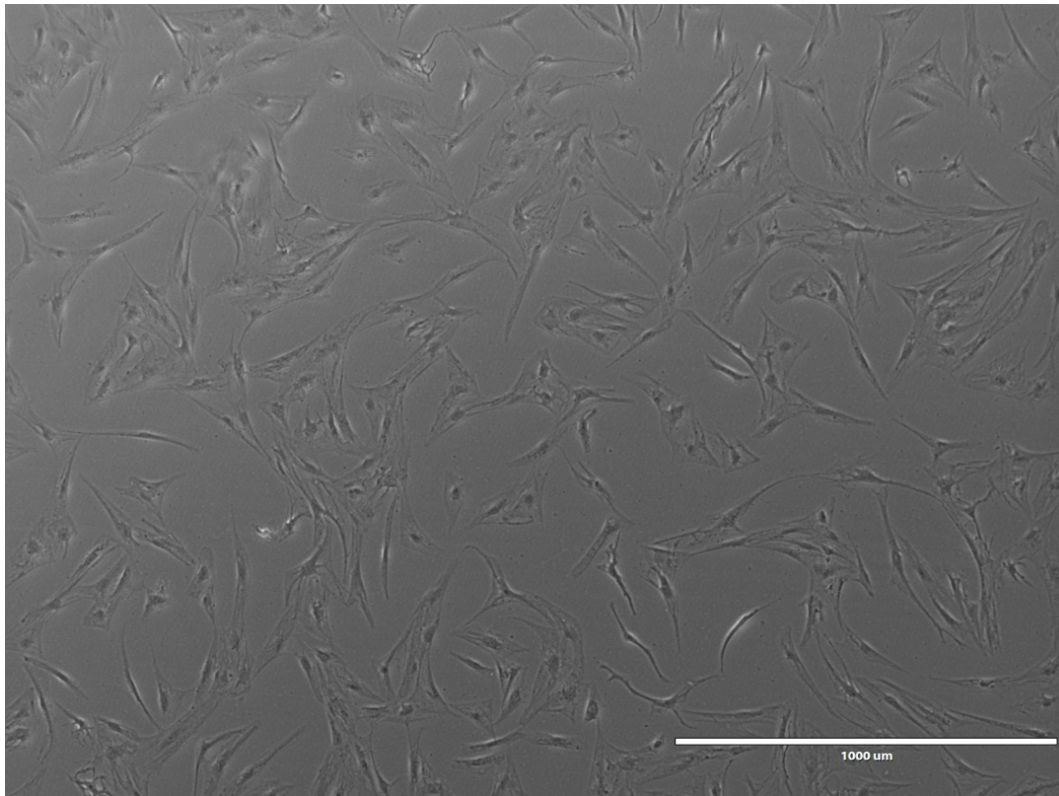
Durch die osteoblastäre Sezernierung verschiedener Botenstoffe und Enzyme wird die Knochenmineralisierung sowie die Kommunikation mit anderen Knochenzellen gewährleistet. Das Enzym alkalische Phosphatase (ALP) wird in Leber, Niere und vor allem im Knochengewebe stark exprimiert und spielt eine Schlüsselrolle in der Kalzifizierung des Knochens. Durch die Hydrolyse von Pyrophosphat erhöht die ALP die lokale Rate an Phosphat, wodurch die Mineralisierung der extrazellulären Matrix gefördert wird (18).

Osteonectin (ON) gehört wie Osteopontin (OPN), Osteocalcin (OCN) und Bone-Sialoprotein (BSP) zu den nicht-kollagenen Proteinen (NCP). ON ist einerseits für die Kollagenbeschaffenheit (z.B. Durchmesser der Fibrillen) und den Einbau von Kollagen in die extrazelluläre Matrix zuständig und andererseits maßgeblich an der Mineralisierung des Osteoids beteiligt, indem es die Kristallisation von Hydroxylapatit (HA) initiiert und die lokale Kalziumionenkonzentration steigert. Außerdem spielt ON eine wichtige Rolle bei der Reifung von Osteoblasten und Osteoklasten (19, 20).

Es wird vermutet, dass Osteopontin mehrere Prozesse der Knochenbildung und des Knochenumbaus, wie z.B. die Kollagenorganisation, im Speziellen auch die Angiogenese und die Modulation der Größe von Knochenkristallen reguliert. Durch die Bildung von stabilen Komplexen aus OPN und Osteocalcin wird die Bildung und Organisation der Knochenmatrix unterstützt (21).

Osteocalcin ist mit etwa 20% das am häufigsten vorkommende nicht-kollagene Matrixprotein des Knochens. Seine Konzentration im Serum korreliert eng mit dem Knochenstoffwechsel und wird klinisch als Marker für die Osteoblastenaktivität zur Bewertung von Knochenerkrankungen, wie z.B. Osteoporose, verwendet. Aufgrund seiner hohen Affinität zu  $\text{Ca}^{2+}$  trägt OCN wesentlich zur Knochenmineralisation bei und spielt eine aktive Rolle in den frühen Phasen der Knochenheilung. Neben der Bindung an Hydroxylapatit ist OCN an der Zellsignalisierung, Rekrutierung und Differenzierung von Osteoklasten und Osteoblasten beteiligt (19, 21, 22).

Unter Punkt 2.2.2 *Signalstoffe der Testgruppe* wird der Aufbau sowie die Funktion von BSP und dessen Wirkung auf Osteoblasten und Osteoklasten erläutert.



*Abbildung 2: Aus humanem Knochen isolierte Osteoblasten in Monokultur*

### *Osteozyten*

Osteozyten stellen vollständig ausdifferenzierte Osteoblasten dar, welche unbeweglich in die mineralisierte Knochenmatrix eingebettet sind. Zahlenmäßig bilden sie mit 90-95% den größten Anteil aller Knochenzellen. Trotz ihrer Unbeweglichkeit sind Osteozyten über Gap Junctions untereinander und mit anderen Zellen, wie Osteoklasten und Osteoblasten verbunden (2, 23). Da Osteozyten eine hohe Dichte an Mechanosensoren aufweisen, können sie sowohl grobe (z.B. Stöße) als auch sehr feine (z.B. alltägliche Bewegungen) mechanische Reize detektieren. Auf diese Stimuli reagieren sie mit der Ausschüttung von Signalmolekülen, welche den Knochenstoffwechsel und -umbau beeinflussen. Hauptakteur ist dabei der mechanosensible Ionenkanal Piezo 1, der auf Osteozyten und Osteoblasten vorkommt und die Knochenbildung anregt (2, 24, 25). Zusätzlich kann Parathormon (PTH) über Rezeptoren an Osteozyten binden, wodurch die intrinsische Bildung des Zytokins RANKL gefördert und somit die lokale Resorption mineralisierter Knochensubstanz durch Osteoklasten veranlasst wird. Ziel dieses Mechanismus ist es, einen zu niedrigen Kalziumspiegel im Blut schnell wieder anzuheben (26).

### *Osteoklasten*

Im Gegensatz zu den bisher vorgestellten Knochenzellen stammen Osteoklasten nicht von mesenchymalen, sondern von hämatopoetischen Stammzellen ab. Sie gehören zur Familie der gewebespezifischen Makrophagen und entwickeln sich durch die Verschmelzung mehrerer Osteoklastenvorläuferzellen zu mehrkernigen Synzytien (=mehrkernige Osteoklasten, siehe Abbildung 3). Der Wachstumsfaktor M-CSF (Macrophage Colony-Stimulating Factor), das Zytokin RANKL und die Interleukine 1 und 6 sind maßgeblich am Reifungsprozess der Vorläuferzelle bis zum vollständig differenzierten Osteoklasten beteiligt. Die bis zu 150  $\mu\text{m}$  großen Zellen befinden sich u.a. an der Oberfläche der spongiösen Knochenbälkchen in sogenannten Howship-Lakunen (2, 27). Hauptaufgabe der Osteoklasten ist das „Bone Remodelling“, also der Knochenumbau, in Interaktion mit Osteoblasten. Dabei findet der Abbau von Knochenmatrix mit Hilfe von freigesetzten  $\text{H}^+$ -Ionen und Enzymen im sogenannten subosteoklastischen Kompartiment am Faltensaum der Osteoklasten statt (2, 28). Das Enzym Tartrat-resistente saure Phosphatase (TRAP) Typ 5b ist spezifisch für Osteoklasten, wird von RANKL aktiviert und spielt durch die Lyse der extrazellulären Matrix eine Schlüsselrolle im Knochenabbau. Da reife Osteoklasten das lytische Enzym TRAP bilden, kann auch dieses zur Analyse der Osteoklastendifferenzierung herangezogen werden (29). Die Aktivierung und Hemmung der Osteoklastenfunktion erfolgt vorwiegend über das RANKL-RANK-OPG-System, was unter 2.2.2 genauer erläutert wird.

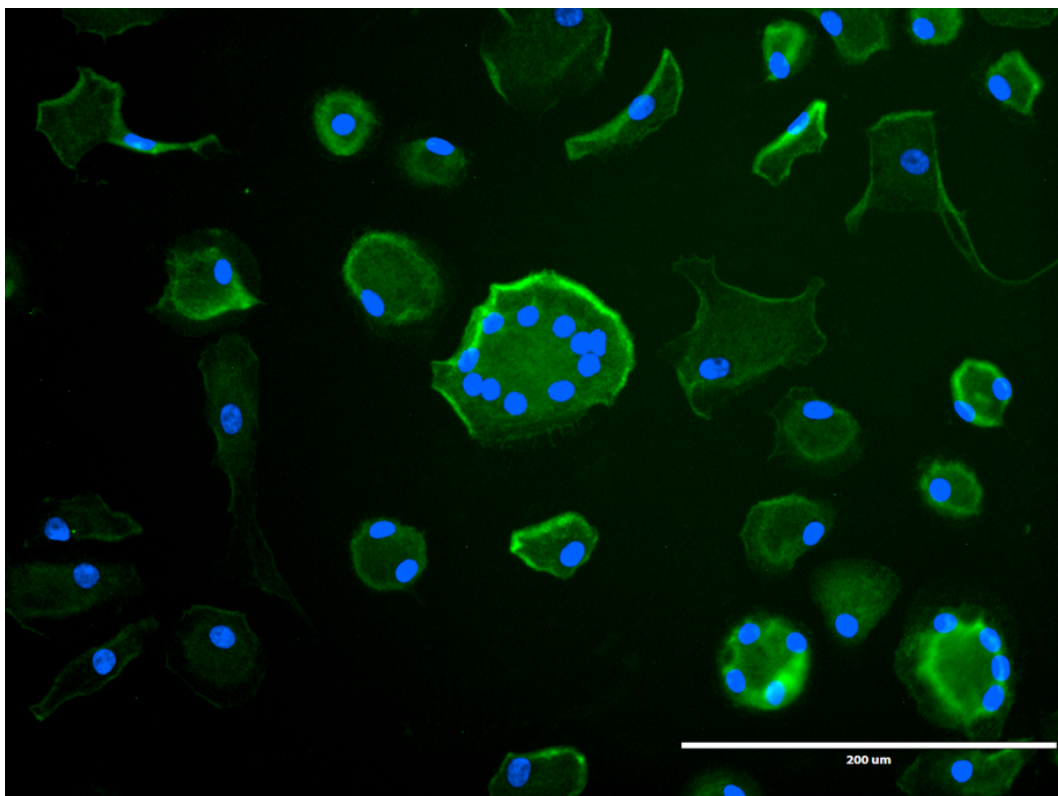


Abbildung 3: Durch Hoechst-Färbung und Immunfluoreszenz angefärbte Osteoklasten

#### 2.1.4 Osteogenese und Ossifikation

Vor der Einführung in die Osteogenese und Ossifikation im menschlichen Körper sollte eine genaue Definition dieser Begriffe erfolgen: Die Osteogenese beschreibt die Bildung eines individuellen Knochens im Rahmen der embryonalen Skelettentwicklung. Die Ossifikation ist als Bildung von Knochengewebe im Wachstum, nach einem Knochenbruch oder bei pathologischen Verknöcherungen definiert (12).

Die Entwicklung humaner Knochen beginnt bereits während der frühen Embryogenese, wobei man verschiedene Abstammungslinien unterscheidet: Kraniofaziale Knochen entwickelt sich aus Neuralleiste und paraaxialem Mesoderm, das Achsenskelett entsteht aus den Somiten und die Extremitäten leiten sich vom Seitenplattenmesoderm ab. Den Anfang dieser Entstehungsmöglichkeiten bilden mesenchymale Vorläuferzellen, welche sich entweder direkt in Osteoblasten (desmale Osteogenese) oder zunächst in Chondrozyten (chondrale Osteogenese) differenzieren (30, 31).

Im Rahmen der chondralen Osteogenese wird der zukünftige Knochen (z.B. Extremitätenknochen) in der Embryonalperiode zunächst als knorpeliges Modell angelegt und bis zum Abschluss des Längenwachstums in Knochengewebe umgewandelt (indirekte Knochenbildung) (2, 12, 30, 31). Hierbei bildet sich im ersten Schritt, der perichondralen Ossifikation, eine Knochenmanschette aus Geflechtknochen im Bereich der Diaphyse des Knorpelmodells. Der Geflechtknochen ist ein Netzwerk aus Knochenbälkchen, in welchem Osteoblasten und Osteoklasten für dynamische Wachstums-, Um- und Abbauprozesse sorgen. Im von der Manschette umgebenen, diaphysären Zentrum der Knorpelanlage proliferieren und hypertrophieren die Chondrozyten zu Blasenzellen, welche die Verkalkung der Matrix initiieren (Bildung von Typ-X-Kollagen) und anschließend in Apoptose gehen. Im zweiten Schritt, der enchondralen Ossifikation, wandern in den Bereich des hypertrophen Knorpels Osteoprogenitorzellen, Osteoklasten, Blutgefäßendothelzellen und hämatopoetischen Zellen aus dem Perichondrium ein. Es entsteht ein primäres Ossifikationszentrum. Dort differenzieren sich OPZ zu Osteoblasten, welche durch die Sezernierung von Osteoid zur Bildung von mineralisierter Knochenmatrix (siehe 2.1.1) beitragen, wobei gleichzeitig die knorpeligen Anteile abgebaut werden (2, 31, 32). Im Gegensatz zum Konzept des Absterbens von Chondrozyten wurde in mehreren Studien belegt, dass ein erheblicher Anteil hypertropher Blasenzellen überlebt, zu Osteoblasten differenziert und Osteoid bildet. In beiden Szenarien entsteht Geflechtknochen, der mit der perichondralen Knochenmanschette verwächst, sich in Richtung beider Epiphysen ausdehnt und die angrenzenden Zonen mit Säulenknorpel verkleinert (Knochen-Knorpel-Grenze). Im Bereich der Epiphysen bilden sich ebenfalls Ossifikationspunkte (sekundäre Ossifikationszentren), die nach dem gleichen Muster wie die Diaphyse ossifizieren. Das primäre und die sekundären Ossifikationszentren vereinigen sich erst nach Abschluss des

Längenwachstums und die Übergangszone zwischen Epi- und Diaphyse, die Metaphyse, verknöchert (2, 32-34).

Bei der desmalen Osteogenese differenzieren sich Osteoblasten direkt aus mesenchymalen OPZ und bilden in flächigen Verbänden angeordnet Osteoid. Ausgangspunkt sind hierbei gut vaskularisierte Ossifikationspunkte, in die mesenchymale Vorläuferzellen einwandern. Diese direkte Knochenbildung findet bei flachen Schädelknochen und der Klavikula statt. Bei beiden Ossifikationsformen, sowohl desmal als auch chondral, wird zunächst Geflechtknochen gebildet, welcher im Verlauf zu stabilerem Lamellenknochen (siehe 2.1.2) umgewandelt wird (2, 35).

### **2.1.5 Frakturheilung**

Knochen gehört zu den wenigen Geweben im menschlichen Körper, die sich nach Verletzung ohne fibröse Narbenbildung vollständig regenerieren (36). Je nach Stellung der Frakturrenden unterscheidet man zwischen primärer und sekundärer Frakturheilung:

Für eine primäre oder direkte Frakturheilung ist es notwendig, dass die Frakturrenden anatomisch korrekt positioniert und unter starrer Fixierung ohne Spaltbildung gehalten werden. Diese Art der Heilung erfolgt üblicherweise nach dem Prinzip der offenen Reposition und internen Fixierung (ORIF) im Rahmen einer operativen Osteosynthese. Wenn der interfragmentäre Spalt weniger als 0,01mm und die interfragmentäre Dehnung weniger als 2% beträgt, ist eine Kontaktheilung möglich. Hierbei erzeugen Osteoklasten, die sich an den Osteonen der Frakturrenden befinden, Längshohlräume. Diese werden später durch Osteoblasten mit neuem Osteoid aufgefüllt und mineralisiert, wobei direkt Lamellenknochen ohne Bildung eines Periostkallus entsteht (intramembranöse Ossifikation). Gleichzeitig wird das zerrissene Harvers'sche System regeneriert, wodurch Osteoprogenitorzellen in den Frakturspalt gelangen können (37, 38).

Häufig liegt nach einem Trauma jedoch ein breiterer Frakturspalt vor, was zur sekundären (indirekten) Frakturheilung führt. Unmittelbar nach der Verletzung wird der Frakturspalt zunächst von einem Frakturhämatom ausgefüllt, welches eine Entzündungsreaktion auslöst. Dabei wandern u.a. Makrophagen, Leukozyten und Fibroblasten in das Areal ein und sezernieren eine Vielzahl proinflammatorischer Zytokine, wie z.B. TNF- $\alpha$  und Interleukine. Dadurch werden weitere Entzündungszellen chemotaktisch rekrutiert und die Angiogenese gefördert. Nach 7 Tagen ist diese Entzündungsreaktion abgeschlossen, der Bluterguss wird durch Granulationsgewebe ersetzt und es entsteht ein sogenannter primitiver Bindegewebskallus. Im nächsten Schritt der Heilung wird dieses kollagenreiche Reparationsgewebe im Sinne einer enchondralen Ossifikation zunächst in Knorpelgewebe und schließlich in Knochen umgewandelt. Zuerst entsteht ein weicher Knorpelkallus, der innerhalb

von 4-6 Wochen zu einem harten Kallus verknöchert. Der anfangs gebildete Geflechtknochen wird in einer abschließenden Phase des Knochenumbaus („bone remodelling“) in Lamellenknochen mit einer zentralen Markhöhle umgebaut. Der Heilungsprozess von der frischen Fraktur bis hin zur vollständigen Regeneration der Knochenstruktur kann je nach Art des Knochens und Alter des Patienten Jahre dauern. Im Gegenteil zur direkten wird die indirekte Frakturheilung durch Mikrobewegungen und dosierte Gewichtsbelastung gefördert. Bei Frakturen, die eine gute Gefäßversorgung, aber eine starke Instabilität aufweisen, kann der gebildete knorpelige Kallus meist nur ungenügend knöchern konsolidieren. Dauert die Frakturheilung länger als 6 Monate spricht man sodann von einer hypertrophen Pseudoarthrose (37-41).

### **2.1.6 Knochenumbau (Bone Remodelling)**

Knochen ist ein sehr dynamisches Gewebe, welches ständigen Auf-, Ab- und Umbauprozessen unterliegt. Diese laufen nicht nur im Rahmen der ossären Embryonalentwicklung und des Knochenwachstums ab, sondern lebenslang auch im ausgewachsenen skelettalen Bewegungsapparat. Jährlich findet beim gesunden Erwachsenen ein Umbau von etwa 10% des Skeletts statt, sodass das gesamte Skelett in einem Zeitraum von rund 10 Jahren vollständig erneuert wird (12, 42). „Bone Remodelling“ beschreibt die Entfernung von alter oder beschädigter Knochenmasse und deren Ersatz mit neuer Knochensubstanz zur Gewährleistung der Stabilität und Qualität des Skeletts (43). Dieser Prozess findet innerhalb eines „Bone Remodelling Compartment“ (BRC) statt, wird durch Osteozyten dirigiert und von Osteoblasten und Osteoklasten, die eine sogenannte „Basic Multicellular Unit“ (BMU) bilden, durchgeführt. Je nachdem, ob trabekulärer oder kortikaler Knochen umgebaut wird, variieren Aufbau und Struktur der BMU: Beim trabekulären Umbau wird Knochengewebe in den oberflächlichen Howship-Lakunen durch Osteoklasten resorbiert und anschließend durch Osteoblasten wieder aufgefüllt. Im Gegensatz dazu erzeugen Osteoklasten beim kortikalen Umbau einen Bohrkanal, der von Osteoblasten mit mineralisierten Matrixlamellen ausgekleidet und so zu einem neuen Osteon aufgebaut wird (42, 44).

Der Knochenumbau verläuft zyklisch und lässt sich je nach Literatur in vier bis fünf überschneidende Schritte unterteilen: Aktivierung, Resorption, Umkehr, Neubildung und Beendigung (siehe Abbildung 4). Diese laufen innerhalb von vier bis sechs Monaten ab. Schädigungen und Verletzungen der Knochenmatrix werden zunächst durch Osteozyten registriert, woraufhin diese Signalstoffe wie RANKL und M-CSF sezernieren. Dadurch kommt es zur Rekrutierung von Osteoklasten- und Osteoblastenvorläuferzellen und deren Aktivierung. In einer etwa zweiwöchigen Phase der Resorption wird der mineralische

Knochenanteil durch  $H^+$ -Ionen und der kollagenreiche Part durch Proteasen (Cathepsin K, Matrixmetalloproteinasen) abgebaut. Die Umkehrphase ist durch den Übergang von der Knochenresorption in die Knochenbildung gekennzeichnet, wobei hier Makrophagen eine Schlüsselrolle in der Beseitigung organischer Abbauprodukte spielen. Die genauen Abläufe in dieser Phase sind noch nicht vollständig geklärt, jedoch wird angenommen, dass Makrophagen zusätzlich die Osteoblasto- und Osteoklastogenese fördern. Im nächsten Schritt, der Neubildungsphase, differenzieren Osteoblastenvorläuferzellen zu Osteoblasten und sezernieren Osteoid, welches in einem zirka viermonatigen Prozess mineralisiert wird. Nach Abschluss der Mineralisierung differenzieren Osteoblasten zu Osteozyten, die Antagonisten der Osteogenese (z.B. Sclerostin) ausschütten und damit das Ende des Umbaus markieren (43-47).

Neben beteiligter Knochenzellen und deren Botenstoffen sind ebenfalls eine Vielzahl von Hormonen, wie Parathormon, Vitamin D, Kalzitinin, Glukokortikoide, Östrogen sowie weitere Schilddrüsen- und Wachstumshormone an der äußerst komplexen Regulation des Knochenumbaus beteiligt (48). Alles in allem entspricht der „Bone Remodelling“-Zyklus einem empfindlichen Gleichgewicht zwischen Schädigung und Reparatur der Knochenmatrix, dessen Ungleichgewicht mit Skeletterkrankungen wie Osteoporose in Verbindung gebracht wird und noch nicht abschließend verstanden ist (49).

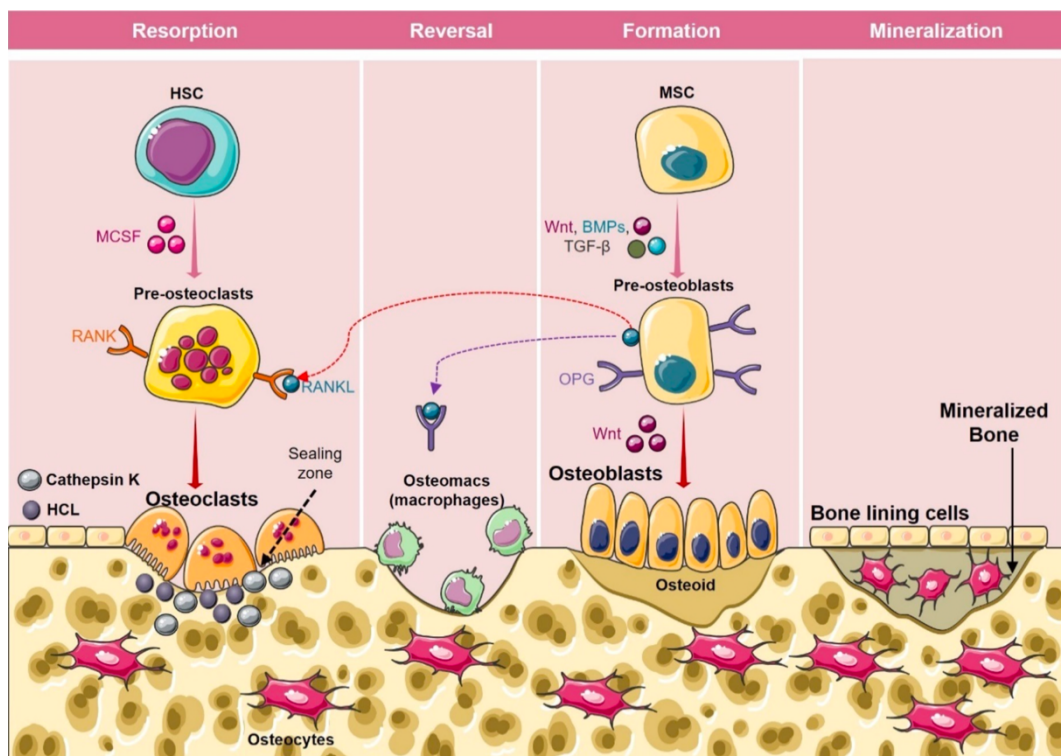


Abbildung 4: Vier Phasen des Bone Remodelling Zyklus (47)

## **2.2 Zellkulturbedingungen: Zellzahl, Nährmedium und Signalstoffe**

### **2.2.1 Zellzahl und Nährmedium in Co-Kulturen von Osteoblasten und Osteoklasten**

In der Literatur variiert die Methodik von 2D-Co-Kultursystemen, wie sie in den beschriebenen Experimenten dieser Arbeit verwendet wurden, stark. Das führt dazu, dass viele, konzeptionell ähnliche Studien existieren, welche sich jedoch aufgrund ihrer methodischen Unterschiede kaum vergleichen lassen. Remmers et al. haben sich diesem Problem angenommen und eine Übersichtsarbeit zu den verschiedenen Parametern einer Co-Kultur publiziert, deren Ergebnisse in Bezug auf Zellzahl und Nährmedium im Folgenden vorgestellt werden.

In insgesamt 39 Studien variierte die Aussaatdichte der Osteoblasten von  $1,9 \times 10^3$  Zellen/cm<sup>2</sup> bis  $60 \times 10^3$  Zellen/cm<sup>2</sup>, wobei im Durchschnitt  $11 \times 10^3$  Zellen/cm<sup>2</sup> ausgesät wurden. Da ein Well einer 24-Well-Platte eine Fläche von 1,9 cm<sup>2</sup> misst, ergibt sich eine Zellzahl von 20.900 Zellen pro Well. Ebenso wurde in 39 Arbeiten die Zellzahl der Osteoklasten in 2D-Co-Kulturen untersucht, welche sich von  $5 \times 10^3$  Zellen/cm<sup>2</sup> bis hin zu  $15 \times 10^6$  Zellen/cm<sup>2</sup> unterschied und durchschnittlich  $190 \times 10^3$  Zellen/cm<sup>2</sup> (= 361.000 Zellen/Well) betrug. Die Ratio OB:OC, also das Verhältnis der Zellzahl der zwei Zellarten zueinander, variierte in den unterschiedlichen Experimenten ebenfalls sehr stark und bewegte sich im Bereich 1:1500 bis 1:1 (50). In der Arbeit von Jolly et al. zur Optimierung der Osteoblasten-Osteoklasten-Co-Kultur wird die Ratio von 1:2 (OC:OB) als sehr vielversprechend beschrieben. (51) Das Wachstum, die Differenzierung und das Überleben der Zellen wird maßgeblich durch das Nährmedium beeinflusst, welches eine möglichst natürliche Umgebung imitieren soll. Als Basismedium fungierte dabei in 80% der 39 Studien  $\alpha$ MEM oder DMEM mit 10% FBS (fetal bovine serum) bzw. FCS (fetales Kälberserum). Als Zusätze für das Differenzierungsmedium wurden im Mittel in 19 Studien 0,18 mM Ascorbinsäure, in 13 Studien  $10^{-8}$  M Dexamethason und in 17 Studien 13 mM  $\beta$ -Glycerophosphat verwendet. In Bezug auf die Zugabe der Zytokine M-CSF und RANKL wurde M-CSF in 11 Studien in einer Konzentration von 10 ng/ml bis 100 ng/ml mit einem Mittelwert von 39,82 ng/ml und RANKL in 14 Studien in einer Konzentration von 10 ng/ml bis 100 ng/ml mit einem Mittelwert von 49 ng/ml in das Nährmedium gegeben (50).

### **2.2.2 Signalstoffe der Testgruppe**

Die Interaktion zwischen Knochenzellen erfolgt vorwiegend durch die parakrine Sekretion von Botenstoffen (2). Im Folgenden werden die wichtigsten Signalstoffe für die Osteoklastogenese und somit die Grundlage einer Osteoblasten-Makrophagen-Co-Kultur vorgestellt.

*M-CSF*

In der Entwicklung zum aktiven Osteoklasten benötigt die hämatopoetische Stammzelle (HSC) den Einfluss vor allem zweier Zytokine: M-CSF und RANKL. Abbildung 5 zeigt die Differenzierung der HSC in Anwesenheit von GM-CSF und M-CSF zum Monozyten und Makrophagen über das Zwischenstadium der Granulozyten-Makrophagen-Progenitorzelle. Das Zytokin M-CSF stimuliert hierbei die Differenzierung und Reifung der CD-14 positiven Monozyten zu CD-68 positiven Makrophagen. Bei einem zusätzlichen Angebot von RANKL, welcher an seinen Rezeptor RANK an der Zelloberfläche bindet, kann sowohl aus der Granulozyten-Makrophagen-Progenitorzelle als auch aus Monozyten und Makrophagen durch die Fusion mehrerer Präosteoklasten ein aktivierter, mehrkerniger Osteoklast entstehen (52-54). M-CSF wird unter anderem von Osteoblasten parakrin sezerniert und bindet an Colony-stimulating-factor-1-Rezeptoren (CSF-1R; c-Fms) in der Zellmembran von Monozyten/Makrophagen und Präosteoklasten. In der Empfängerzelle wird nach Aktivierung des Transmembranrezeptors CSF-1R eine intrazelluläre Signalkaskade ausgelöst, welche das Überleben, die Proliferation und die Differenzierung der Zelle gewährleistet (52, 55). Zudem induziert M-CSF die Synthese von RANK-Rezeptoren im Präosteoklasten, was elementar für die Osteoklastogenese ist (56).

Bereits 1992 wurde im Rahmen eines Experimentes mit CSF1-Gen mutierten Ratten, welche fehlerhaftes M-CSF produzierten, die Rolle des Wachstumsfaktors für die Differenzierung von Osteoklasten besonders deutlich. Unter den mutierten Ratten konnte aufgrund des daraus resultierenden Mangels an Makrophagen und Osteoklasten skelettale Missbildungen wie Osteopetrose und Zahnentwicklungsstörungen beobachtet werden, welche unter M-CSF-Gaben rückläufig waren (57, 58).

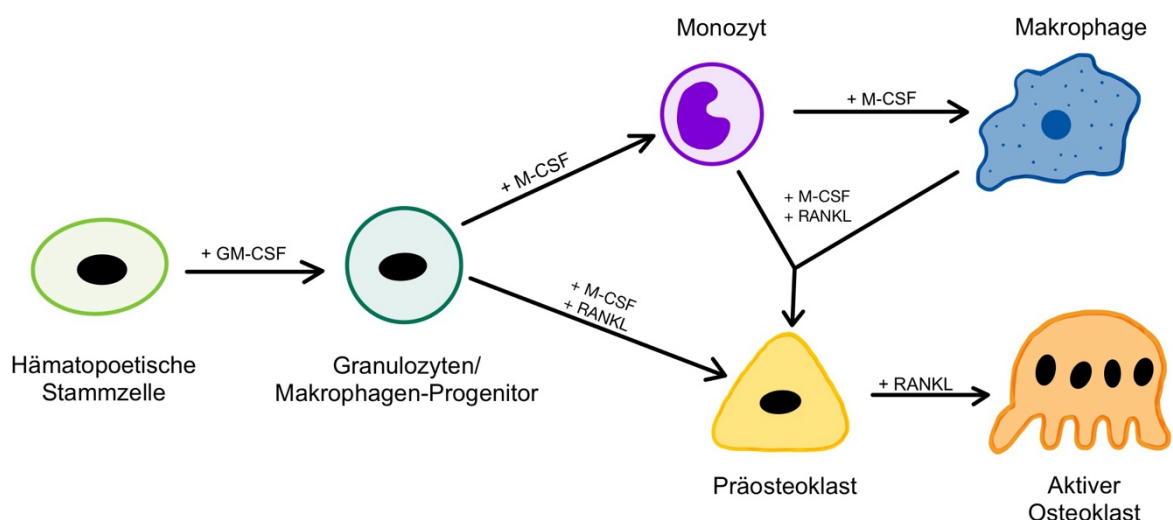


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Osteoklastenentwicklung (52)

### *RANKL*

Das RANKL-RANK-OPG-System wurde in den späten 1990er Jahren entdeckt und ist für die Osteoklastogenese (siehe Abbildung 5), deren Hemmung und den Knochenab- und -umbau entscheidend. RANKL ist Mitglied der Tumornekrosefaktor- $\alpha$ -Superfamilie (TNF $\alpha$ ), wird u.a. von Osteozyten und Osteoblasten sezerniert und bindet an den Signalrezeptor-Aktivator von NF $\kappa$ B (RANK), welcher von Osteoklasten, dendritischen Zellen, T-Zellen, Mammaepithelzellen und medullären Thymusepithelzellen exprimiert wird. Nach der Bindung von RANKL an den Transmembranrezeptor RANK werden im Präosteoklasten oder Osteoklasten nachgeschaltete Signalwege, wie die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B und mitogen-aktivierter Proteinkinasen (MAPK), vermittelt. Diese Signalwege setzen sodann Stoffwechselprozesse in Gang, die die Differenzierung von Osteoklasten fördern, ihre resorptive Funktion unterstützen und das Überleben reifer Osteoklasten gewährleisten (59, 60). Neuere Forschungen haben gezeigt, dass die Bindung von RANKL an RANK neben den bekannten Effekten auf Osteoklasten auch ein „reverse signaling“, also eine umgekehrte Signalwirkung, wie die Förderung der Osteoblastendifferenzierung über den RUNX2-Signalweg und eine Erhöhung der Knochenmasse zur Folge haben kann (59-61).

Osteoprotegerin (OPG) ist ebenfalls Mitglied der TNF-Rezeptor-Familie und fungiert als Decoy-Rezeptor, der sowohl mit membranständigem als auch löslichem RANKL interagiert und die RANK-Aktivierung somit verhindert (27, 59, 62). Die Sekretion von OPG durch Osteoblasten wird durch verschiedene Hormone reguliert, darunter Östrogen. Infolge sinkender Östrogenspiegel in der Menopause der Frau erfolgt eine geringere Expression von OPG bei einer gleichzeitig höheren Produktion von RANKL, was das Risiko einer postmenopausalen Osteopenie oder Osteoporose massiv erhöht. Im Gegensatz dazu konnte bei RANKL-KO-Mäusen eine Osteopetrose ohne Nachweis von Osteoklasten festgestellt werden, was die wichtige Rolle von RANKL bei der Osteoklastenentwicklung deutlich macht. Zusammenfassend kann eine Störung des Gleichgewichts zwischen RANKL und OPG entweder zur Osteoporose oder Osteopetrose führen (60, 63, 64).

Neben den Effekten von RANKL auf den Knochenstoffwechsel spielt das Zytokin zudem eine wichtige Rolle bei der Entwicklung sekundär lymphatischer Organe, der Regulierung von T-Zellen und dendritischen Zellen und der Entstehung sowie Proliferation von Knochenmetastasen und malignen Tumoren. Unter anderem können (metastasierte) Krebszellen vermehrt RANKL oder PTHrP (Parathormon related peptide) bilden, was zur Osteolyse führt. Eine Überexpression von RANKL oder RANK und damit einhergehende Ungleichgewichte im RANKL-RANK-OPG-Signalweg lassen sich vor allem in der Pathogenese des multiplen Myeloms, Mammakarzinoms, Lungenkarzinoms und urologischer Karzinome feststellen. Der humane IgG-Antikörper Denosumab (Anti-RANKL-Antikörper) hemmt wirksam die Knochenresorption und die karzinombedingte Knochenzerstörung, indem

er RANKL konkurrierend bindet und die Differenzierung, Aktivierung und das Überleben von Osteoklasten unterdrückt. (59, 65)

### *BSP*

Bone-Sialoprotein ist Teil einer Gruppe von Proteinen der extrazellulären Matrix, die sich "Small Integrin-Binding Ligand N-linked Glycoproteins" (SIBLING) nennt. Es wird vorwiegend von Osteoblasten, Osteozyten, Osteoklasten und Odontoblasten sezerniert, weshalb es in Knochengewebe und Dentin zu finden ist (21). Das Glykoprotein ist aus 301 Aminosäuren aufgebaut und kann an seinem C-terminalen Ende mit Zellen oder Knochenmatrix und an seinem N-terminalen Ende mit Kollagen interagieren (66).

BSP induziert die Reifung präosteoblastischer Zellen zu Osteoblasten, indem die Expression von Transkriptionsfaktoren wie RUNX2 erhöht wird. Ebenso hat das Protein der SIBLING-Gruppe Einfluss auf Osteoklasten: Es aktiviert Osteoklasten über das Integrin  $\alpha_v\beta_3$ , was zu einer kalziumgetriggerten Steigerung der Resorption von Knochengewebe führt (67). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass BSP und RANKL die osteoklastische Knochenresorption und Osteoklastogenese synergistisch beeinflussen (3).

Die Abwesenheit von BSP in Präosteoklasten- und Osteoklastenkulturen hat nicht nur negative Auswirkungen auf die Differenzierung zu reifen Osteoklasten, sondern auch auf die Zellmigration, Proliferation und Ausbildung des Zytoskeletts von OC (68). Schon zu Beginn der embryonalen Knochenentwicklung kann BSP nachgewiesen werden, da es an der Mineralisierung im Rahmen der primären Osteogenese beteiligt ist (15). Während der Knochenentwicklung ist die BSP-Expression von Osteoblasten im Bereich der Wachstumszone wesentlich höher als im reifen Knochen, was auf eine positive Korrelation von Knochenneubildung und BSP-Ausschüttung hindeutet (69). In diesem Zusammenhang beschreiben Boulefour et al., dass bei BSP-Knockout-Mäusen (BSP  $-/-$ ) der BSP-Mangel zu einer Bildung von kürzeren und hypomineralisierten Knochen führt (67). In einer Studie von Krieger et al. zeigte sich eine verbesserte Knochenregeneration bei kritischen Knochendefekten der Maus unter Verwendung von 3D-biofabriziertem Knochenersatzmaterial bestehend aus PLA und Kollagen Typ I, welches mit BSP versetzt wurde (70).

Bone-Sialoprotein kann darüber hinaus als Tumormarker fungieren, da es vermehrt von malignen Knochtumoren oder Ablegern ossär metastasierender Tumoren (z.B. Brustkrebs) gebildet wird. Eine hohe BSP-Expression korreliert dabei mit einem erhöhten Tumorgrad und demzufolge mit einer schlechteren Prognose für den betroffenen Patienten. Das SIBLING-Protein übernimmt im Tumor wie auch im gesunden Knochengewebe Zellfunktionen wie Proliferation, Apoptose, Adhäsion, Migration, Angiogenese und ECM-Umbau. Die Gabe von Anti-BSP-Antikörpern reduziert in-vitro signifikant die Proliferation, Migration und Klonbildung und im Maus-Modell wird die Knochenmetastasierung gehemmt (71, 72).

### *IDK1*

IDK1 ist ein monoklonaler Ratten-Antikörper gegen tumorassoziiertes Bone-Sialoprotein, welcher an die hypoglykosylierte Zielsequenz TGLAA von BSP bindet. Die Glykosylierung von Proteinen gehört zur posttranslationalen Modifikation und kann bei Abweichung einen Hinweis auf Krankheiten oder Krebs sein. Dabei führt ein verändertes Glykosylierungsmuster häufig zur Proteinfehlfaltung und damit zu einer eingeschränkten Funktion.

In Gewebeproben von Brustkrebspatientinnen konnte ein erhöhter Anteil an hypoglykosyliertem BSP nachgewiesen werden, welcher in Gewebe von Skelettmetastasen deutlich stärker ausgeprägt war als bei den jeweiligen Primärkarzinomen. Erhöhte Serumspiegel von BSP korrelieren mit der Entwicklung von Knochenläsionen und sind mit einer schlechten Prognose von Brustkrebspatientinnen vergesellschaftet.

Im Rahmen von In-vivo-Experimenten mit Ratten wurde u.a. IDK1 in einer Konzentration von 5 mg/kg zwei Wochen nach der Inokulation von Mammakarzinomzellen (MDA-MB-231<sup>GFP/Luc</sup>) verabreicht und zweimal wöchentlich über 6 Wochen fortgesetzt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass IDK1 bei 8 von 10 Ratten eine vollständige Remission und bei einer von 10 Ratten keine Veränderung bzw. ein Fortschreiten der Erkrankung bewirkt. (73-75). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass IDK1 ein Antikörper mit diagnostischen und therapeutischen Anwendungsmöglichkeiten bei Skelettmetastasen von Brustkrebs ist.

## **2.3 In-vitro-Co-Kultursysteme als Alternative zur Tiermodellforschung**

Da die Forschung anhand von Tiermodellen teuer und zeitaufwändig und der Transfer in klinische Studien oft nicht möglich ist, rückt die Verwendung von In-vitro-Zellkulturmodellen immer mehr in den Vordergrund. Zur Untersuchung von Knochenphysiologie, Knochenkrankheiten und therapeutischen Behandlungsmöglichkeiten wurden bereits zahlreiche Studien veröffentlicht, in welchen Osteoblasten-Osteoklasten-Co-Kulturen zum Einsatz kamen. Die Voraussetzung für das Gelingen eines Zellkulturexperiments sind die optimalen Wachstumsbedingungen für die betreffende Zellart. In Co-Kultursystemen besteht die Schwierigkeit, den Anforderungen zweier oder mehrerer Zellarten gerecht zu werden. Wie bereits in 2.2.1 beschrieben, unterscheidet sich die Vorgehensweise der Kultivierung von Zellen in Mono- oder Co-Kultur von Arbeitsgruppe zu Arbeitsgruppe beträchtlich. (50)

Co-Kulturen sind In-vitro-Zellkulturen, also Zellkulturen mit organischen Vorgängen außerhalb eines lebendigen Organismus, bei welchen zwei oder mehrere Zellarten zusammen in einem Kulturbehälter gezüchtet werden (76). Grundsätzlich können Co-Kulturen in 2D- und 3D-Systeme eingeteilt werden. Während in 2D-Kulturen Zellen auf einer flachen Gewebekulturoberfläche kultiviert werden, können die Zellen in 3D-Kulturen mit einer 3D-Matrix (z. B. Hydrogel oder Gerüste), welche die natürliche Umgebung in vivo möglichst genau

simuliert, interagieren. 2D-Kulturen bieten den Vorteil geringerer Kosten und Komplexität in der Durchführung, wohingegen 3D-Kulturen die natürlichen Gegebenheiten besser imitieren und somit pathophysiologische Erkenntnisse besser auf die Situation in vivo übertragen werden können. Da für die erste Etablierung eines In-vitro-Testsystems ein einfaches 2D-Zellkulturmodell mit primären menschlichen Zellen ausreichend ist, wurde ein solches für die Experimente in dieser Arbeit gewählt (77, 78). In Abbildung 6 werden die verschiedenen 2D-Co-Kulturmodelle vorgestellt:

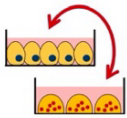
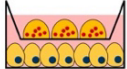


	Figure	Advantages	Disadvantages	Ref.
conditioned medium		<ol style="list-style-type: none"> <li>1. simple setup</li> <li>2. established methods may be used</li> <li>3. easy to quantify metabolic and functional changes of the different cells</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. no direct cell-cell contact</li> <li>2. medium has to be carefully selected</li> </ol>	[51–53]
transwell co-culture		<ol style="list-style-type: none"> <li>1. used to investigate paracrine signaling and response to soluble signaling factors</li> <li>2. cells can be tested separately</li> <li>3. can be used to analyze cell migration</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. no direct cell-cell contact</li> <li>2. medium has to be carefully optimized</li> <li>3. large volumes needed might limit the use of sensitivity-based methods</li> <li>4. large volumes needed might limit the oxygen supply in the bottom wells</li> </ol>	[54–58]
removable permeable divider		<ol style="list-style-type: none"> <li>1. used to investigate paracrine signaling and response to soluble signaling factors</li> <li>2. cells can be tested separately</li> <li>3. requires smaller volumes than in the transwell co-culture (assay sensitivity)</li> <li>4. same medium height (oxygen supply) for both cell types</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. no direct cell-cell contact</li> <li>2. medium has to be carefully selected</li> <li>3. only immature dividers available</li> <li>4. unknown origin of secreted factors</li> </ol>	[49]
direct co-culture		<ol style="list-style-type: none"> <li>1. simple setup</li> <li>2. allows cell-cell contact</li> <li>3. partly mimics the in vivo situation</li> <li>4. requires smaller volumes than in the transwell co-culture (assay sensitivity)</li> <li>5. same medium height (oxygen supply) for both cell types</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. cell ratios have to be optimized</li> <li>2. medium has to be carefully selected</li> <li>3. limited amount of methods available to analyze cells separately</li> <li>4. unknown origin of secreted factors</li> </ol>	[47,48,59,60]

Abbildung 6: Auflistung verschiedener 2D-Co-Kultursysteme mit jeweiligen Vor- und Nachteilen (77)

Neben der Einteilung in 2D und 3D gibt es zudem die Unterscheidung zwischen direkten und indirekten Co-Kulturen. Bei einer direkten Co-Kultur werden zwei Zellarten in ein gemeinsames Kulturresevoir ausgesät, wodurch direkter Zell-Zell-Kontakt entsteht und die Auswirkungen der Interaktion untersucht werden können. Mit Hilfe von indirekten Co-Kultursysteme können Rückschlüsse auf die parakrine Signalübertragung zweier Zelltypen gezogen werden. In diesem Fall fungiert eine permeable Membran als Trennung, welche den direkten Zell-Zell-

Kontakt verhindert oder es kommt einzig zum Austausch des Nährmediums zweier getrennter Zellkulturen (77, 79, 80).

In Kapitel 6.2 *Diskussion der Methodik* werden die Verfahren der Kultivierung von Osteoblasten und Osteoklasten, der Anlage einer Co-Kultur sowie deren Analyse im Kontext der aktuellen Literatur diskutiert.

### **3 Ziel der Arbeit**

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Etablierung einer Osteoblasten-Makrophagen-Co-Kultur an der Universitätsmedizin Mainz, um eine reproduzierbare Grundlage für die Untersuchung von Zell-Zell-Interaktionen zwischen diesen Zelltypen zu schaffen. Ein besonderer Fokus liegt dabei auf der Erforschung des Einflusses verschiedener Testsubstanzen (BSP, RANKL und IDK1) auf die Osteoklastendifferenzierung. In diesem Kontext ist der potenziell äquivalente Einfluss von RANKL und BSP sowie die Hemmung des BSP-Effektes durch den BSP-Antikörper IDK1 von besonderem Interesse. Da die Rolle dieser parakrinen Faktoren in Bezug auf die Knochenhomöostase noch nicht abschließend erforscht ist, kann die Analyse eines Co-Kultursystems mit Osteoblasten und Makrophagen/Osteoklasten dazu beitragen, die Mechanismen der Zellkommunikation sowie deren Einfluss auf das Bone Remodelling besser zu verstehen. Durch die systematische Untersuchung der genannten Testsubstanzen in der entwickelten Co-Kultur sollen sowohl neue Erkenntnisse über die zugrunde liegenden Signalwege gewonnen als auch potenzielle Ansatzpunkte für therapeutische Interventionen identifiziert werden.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Zellkulturkomponenten, -reagenzien und -bedarf

#### 4.1.1 Zellarten und Zellzahl

Diese Dissertation untersucht den Effekt der Zugabe von RANKL, BSP und IDK1 zu Co-Kulturen aus Makrophagen und Osteoblasten auf die Differenzierung der anfänglichen Makrophagen zu Osteoklasten. Der Vorgang der Gewinnung und Anzucht beider Zellarten wird in den Kapiteln 4.3.1 bis 4.3.5 ausführlich erläutert. Auf die Testung verschiedener Ratios der Zellarten zueinander wird im Kapitel 6.1.2 eingegangen.

#### 4.1.2 Signalstoffe der Testgruppe

Die Zugabe verschiedener Signalstoffe zu insgesamt 12 Co-Kulturen und deren Auswirkung auf die Differenzierung von Monozyten zu Osteoklasten war Kernaspekt des experimentellen Teils dieser Arbeit. Die Funktionen der jeweiligen Botenstoffe M-CSF, RANKL, BSP und IDK1 wird unter dem Punkt 2.2.2 genauer beleuchtet. Die Tabelle 1 listet die beschriebenen Stoffe auf.

*Tabelle 1: Verwendete Signalstoffe der Test- und Kontrollgruppe*

---

**Signalstoffe der Testgruppen**

---

<i>Substanz</i>	<i>Hersteller</i>
M-CSF (50µg/ml Puffer)	Peptotech, Cranbury, USA
RANKL (10µg)	Biologend AG, San Diego, USA
BSP (0,42mg/ml)	Immundiagnostik AG, Bensheim, Deutschland
IDK1	Immundiagnostik AG, Bensheim, Deutschland

---

#### 4.1.3 Zellkulturbedarf

Die im Rahmen der Experimente zur Osteoblasten-Makrophagen-Co-Kultur verwendeten Materialien werden in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2: Verwendete Materialien in der Zellkultur

<b>Verbrauchsmaterialien in der Zellkultur</b>	
<i>Material</i>	<i>Hersteller</i>
Cell Culture Flask CELLSTAR®, 75cm <sup>2</sup>	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Falcon® Cell Culture Inserts für 24-Well Platten 0,4µm/3µm/8µm	Corning, Corning, USA
Inserts für 24-Well Platten 0,4µm/3µm/8µm	cellQUART®, SABEU GmbH und Co. KG, Northeim, Deutschland
Kryoröhrchen 2ml	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Kryobox	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
LUNA Cell Counting Slides	Logos Biosystems Inc., Südkorea
Pasteurpipetten 230mm	Duran Wheaton Kimble, Wertheim, Deutschland
Pipettenspitzen TipOne 10/20µl/200µl/1000µl	STARLAB GmbH, Hamburg, Deutschland
Serologische Pipetten COSTAR®, 2ml/5ml/10ml/25ml	Corning Incorporated, Corning, USA
Serologische Pipetten CELLSTAR®, 2ml/5ml/10ml/25ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturplatten 6-Well mit Beschichtung	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturplatten 24-Well mit Beschichtung COSTAR®	Corning Incorporated, Corning, USA
Zellkulturplatten 96-Well mit Beschichtung	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Zentrifugenröhrchen CELLSTAR® Tubes 15ml/50ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
<b>Nährmedien</b>	
<i>Medium</i>	<i>Hersteller</i>
DMEM (Dulbecco's modified Eagle Medium) (1X) + 10% FCS + 1% Penicillin-Streptomycin-Lsg.	Gibco®, Life Technologies, Grand Island, USA
hOB-Nährmedium: DMEM (Dulbecco's modified Eagle Medium/F-12) (1:1) (1X) + GlutaMAX	Gibco®, Life Technologies, Grand Island, USA

+ 10% FCS + 1% Penicillin-Streptomycin-Lsg.	
OK-Nährmedium: MEM (Minimum Essential Medium) Alpha Medium (1X) + GlutaMAX + 10% FCS + 1% Penicillin-Streptomycin-Lsg.	Gibco®, Life Technologies, Grand Island, USA
Differenzierungs-DMEM (Dulbecco's modified Eagle Medium/F-12) (1:1) (1X) + GlutaMAX + 10% FCS + 1% Penicillin-Streptomycin-Lsg. + 250 µl Ascorbinsäure + 5 µl Dexamethason + 175 µl β-Glycerophosphat	Gibco®, Life Technologies, Grand Island, USA
Differenzierungs-MEM (Minimum Essential Medium) Alpha Medium (1X) + GlutaMAX + 10% FCS + 1% Penicillin-Streptomycin-Lsg. + 250 µl Ascorbinsäure + 5 µl Dexamethason + 175 µl β-Glycerophosphat	Gibco®, Life Technologies, Grand Island, USA
Nährmedium für die Osteoblastenisolierung: DMEM HAMS F12 (Medium 199)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Nährmedium für die Virustransduktion: DMEM (Dulbecco's modified Eagle Medium/F-12) (1:1) (1X) + GlutaMAX + 20% FCS + 1% Penicillin-Streptomycin-Lsg. + Protaminsulfat (Verdünnung 1:1000)	Gibco®, Life Technologies, Grand Island, USA

### Flüssigkeiten und Lösungen

<i>Substanz</i>	<i>Hersteller</i>
Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
β-Glycerophosphat	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Dexamethason (D2915)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Einfrierlösung für 2ml Kryoröhrchen: 2 ml FCS	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

## Material und Methoden

---

+ 10% Dimethyl Sulfoxide (DMSO)

---

Ethanol (Einfrieren) Applichem GmbH, Darmstadt, Deutschland

---

Fetales Kälberserum (FCS)  
(= FBS, fetal bovine serum) Biochrom AG, Berlin, Deutschland

---

Histopaque®-1077 Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

---

Hoechst 33342 (1mg/ml) Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

---

Penicillin-Streptomycin-Lösung Gibco®, Life Technologies, Grand Island, USA

---

### Enzyme

---

*Enzym* *Hersteller*

---

Accutase Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

---

Crude Collagenase Typ 1 Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, USA

---

Trypsin-EDTA-Lösung  
(0,05%/0,02% in PBS) PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland

---

### Geräte und Instrumente

---

*Gerät* *Hersteller*

---

Accujet-Elektropipette Brand, Wertheim, Deutschland

---

EVOS digital inverted microscope Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

---

Inkubator Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

---

Gefrierschrank -80°C Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

---

Heizplatte Medax Nagel GmbH, Kiel, Deutschland

---

Pinzette (chirurgisch) Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

---

Pipetten 10µl /20µl/200µl/1000µl Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

---

Sterilbank SAFE2020 Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

---

Stickstofftank Air Liquide S.A., Paris, France

---

Vakuumpipette	Vacuubrand GmbH und Co. KG, Wertheim, Deutschland
Zellzählgerät Luna (Automated Cell Counter)	Logos Biosystems, Annandale, USA
Zentrifuge (5810R)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

## 4.2 Studiendesign

Zu Beginn der Datenerhebung wurden mehrere Co-Kulturvarianten in Bezug auf unterschiedliche Nährmedien, Ratios der Zellarten und Dauer der Anzucht getestet. Nach dieser Phase der Optimierung erfolgte die Durchführung von insgesamt 12 Co-Kulturen mit isolierten Monozyten aus 6 unterschiedlichen Buffy Coats. Genauer betrachtet, wurde jeweils drei Co-Kulturen BSP und drei Co-Kulturen der BSP-Antikörper IDK1, beides im Vergleich zu RANKL, zugegeben. Diese Kulturen stellten die Testgruppen dar. Je Testgruppe wurde zusätzlich eine Kontrollgruppe ohne Zugabe von BSP, RANKL oder IDK1-Antikörper angelegt. Der Wachstumsfaktor M-CSF wurde sowohl den Testgruppen als auch den Kontrollgruppen zugesetzt. Abbildung 10 auf Seite 30 zeigt schematisch den Aufbau der Co-Kulturen.

## 4.3 Zellkultur

Um reines Arbeiten gewährleisten und Kontamination ausschließen zu können, wurden sämtliche Tätigkeiten an einer Sicherheitswerkbank (Sterilbank) ausgeführt. Zwischen den einzelnen Arbeitsschritten erfolgte eine Flächen- und Hilfsmitteldesinfektion. Zur Prävention der Verunreinigung von Zellkulturen wurde regelmäßig eine hygienische Händedesinfektion durchgeführt und ausschließlich mit Latex-Handschuhen gearbeitet.

### 4.3.1 Isolierung von Monozyten aus peripherem Blut

Die literarische Grundlage für die Isolierung von Monozyten aus peripherem Blut findet sich im Artikel „Generation of Human Osteoclasts from Peripheral Blood“ von Henriksen et al. und in einem Protokoll der Firma Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG (81, 82). Dabei wurden Buffy Coats der Transfusionszentrale der Universitätsmedizin Mainz verwendet, welche Nebenprodukte der Herstellung von Erythrozyten- und Thrombozytenkonzentraten darstellen und für Forschungszwecke zur Verfügung gestellt werden. Das Blut stammte von freiwilligen Blutspendern, die vorher über die Verwendung eines Teils des Blutes zu Forschungszwecken aufgeklärt wurden. Erster Schritt der Isolation war die Anlage eines Ficoll-Dichtegradienten zur Aufspaltung des Blutes in seine Zell- und Flüssigkeitsbestandteile. Dabei wurden 25ml der

Buffy Coats mit der gleichen Menge PBS (Phosphate Buffered Saline) in einem 50ml Zentrifugenröhrchen vermischt. Im Anschluss wurden jeweils 30ml des Blut-Puffer-Gemisches vorsichtig auf 15ml Histopaque® gegeben und ohne Bremse zentrifugiert (800 xg, 20min, 20°C). Abbildung 7 zeigt eine Schemazeichnung des Dichtegradienten vor und nach Zentrifugation.

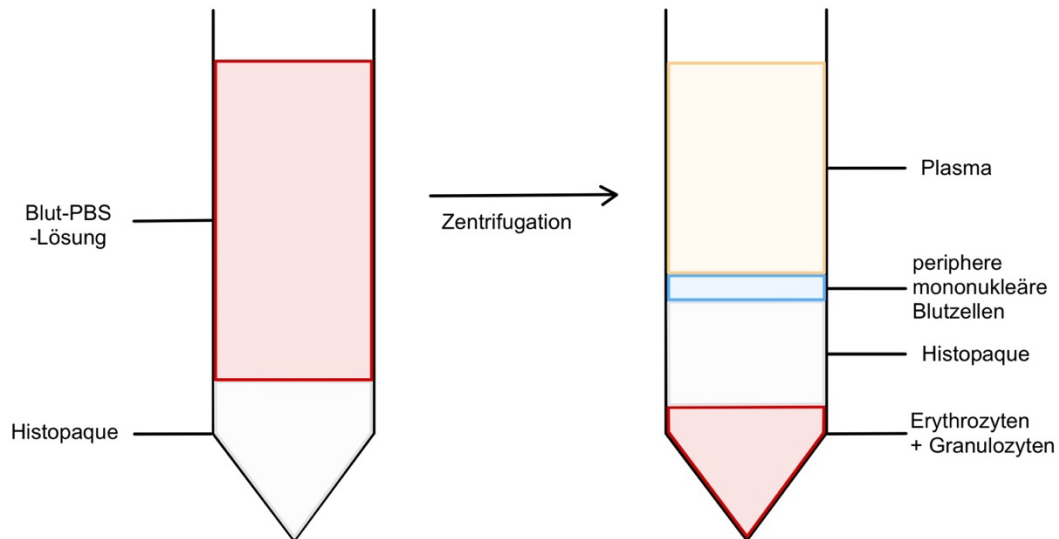


Abbildung 7: Schemazeichnung des Ficoll-Dichtegradienten

Nach der Aufteilung des Blutes in seine Bestandteile und anschließendem Absaugen der Plasmaschicht mit Hilfe einer Vakuumpipette war eine Isolierung der peripheren mononukleären Blutzellen mitsamt Monozyten möglich. Die Mononuklearzellschicht wurde behutsam mit einer Pasteurpipette abpipettiert und in ein neues 50ml Zentrifugenröhrchen gegeben. Anschließend erfolgte die Reinigung der Zellen, indem das Gefäß mit PBS auf 45ml aufgefüllt und bei einer RCF von 300 xg für 10 Minuten zentrifugiert wurde. Nach abgeschlossener Zentrifugation wurde der Flüssigkeitsüberstand bis zum Zellpellet am Boden des Gefäßes abgesaugt, erneut 45ml PBS eingefüllt, das Gemisch resuspendiert und abermals zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde drei bis vier Mal wiederholt, bis sich der Flüssigkeitsüberstand klar zeigte. Dabei gewonnene Zellen konnten nun in Monokultur (Kapitel 4.3.4) gezüchtet und nach 10 Tagen für die Co-Kultur verwendet werden. Die aus den Buffy Coats isolierten Monozyten wurden mit fortlaufender Nomenklatur gekennzeichnet. So wurden zum Beispiel für die erste Co-Kultur „Mono 1“ und „Mono 2“ verwendet.

#### **4.3.2 Isolierung von primären Osteoblasten aus humanen Knochen und Virustransduktion**

Überreste humaner Knochenstücke, welche bei operativen Eingriffen in der Unfallchirurgie und Orthopädie der Universitätsmedizin Mainz anfallen, waren Grundlage für die Isolierung von Osteoblasten. Die Erlaubnis der Knochenspender wurde vor OP-Beginn im Rahmen einer Aufklärung eingeholt und die Verwendung des Knochenmaterials erfolgte nach Zustimmung durch die zuständige Ethikkommission.

Das Vorgehen zur Isolierung von primären Osteoblasten aus humanen Knochenstücken stammt aus einem hausinternen SOP. Dabei wurden zunächst die spongiösen Knochenanteile mit Hilfe einer Luer-Zange von den Knochenstücken abgetrennt, zerkleinert und in einem 50ml Zentrifugenröhrchen mit 25ml PBS gesammelt. Im nächsten Schritt wurden die Spongiosastückchen mindestens 6-mal mit PBS gereinigt, indem die Mischung zirka 30-mal geschüttelt wurde, bis sich klarer Überstand zeigte. Nachdem die feste Phase absedimentiert war, konnte die trübe, flüssige Phase abgesaugt und erneut frisches PBS eingefüllt werden. Anschließend erfolgte der Kollagenaseverdau mit 10ml einer Lösung aus Crude Kollagenase Typ 1 in einer Konzentration von 1 mg/ml in DMEM – HAMS F12 (Medium 199) in einem 37°C warmen Wasserbad für 30-60 Minuten und daraufhin die erneute sechsmalige Reinigung der Spongiosastückchen, wie oben beschrieben. Zur Kultivierung der Osteoblasten wurden im Anschluss auf einer 6-Well-Platte zwei bis drei Stücke pro Well verteilt, 4ml DMEM/F12 + Glutamax mit 20% FCS und 1% Penicillin-Streptomycin-Lösung pro Well hinzugegeben und diese bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 98% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Ein Nährmediumswechsel wurde jeden zweiten Tag durchgeführt.

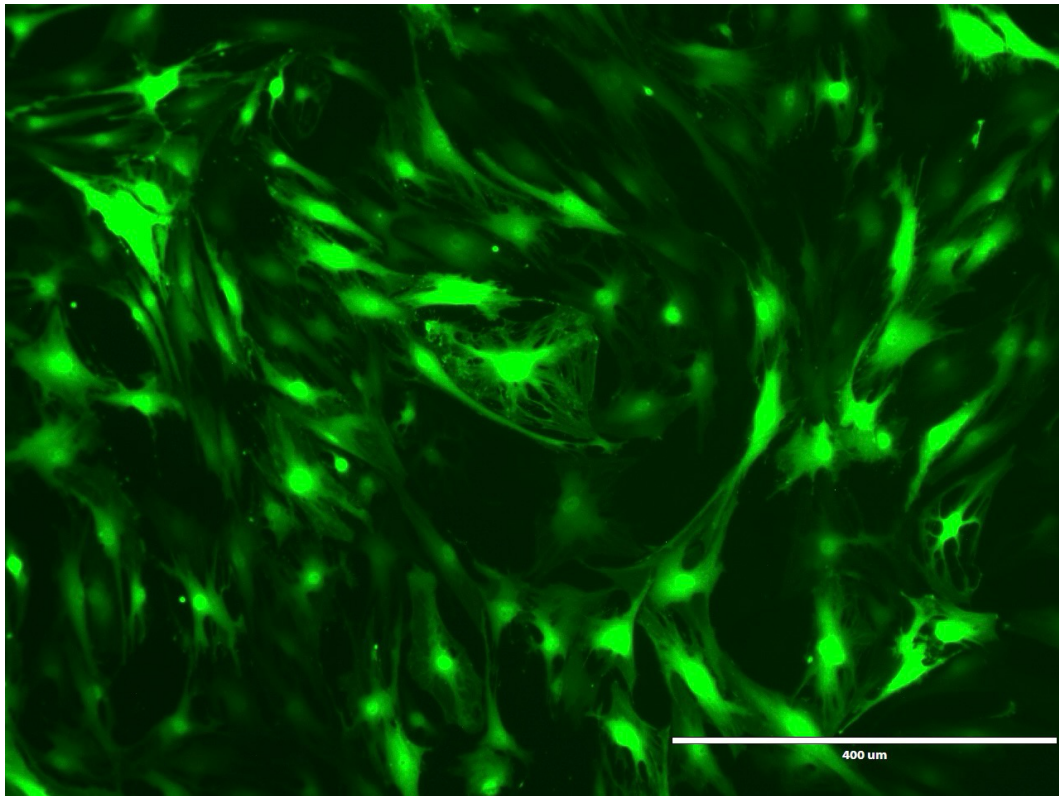
Nach zwei Wochen erfolgte die erste Passage der Osteoblasten von der 6-Well-Platte in eine T<sub>75</sub>-Kulturflasche. Dafür wurde zunächst das Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS abgespült. Zum Ablösen der Zellen wurden 0,5 ml Accutase pro Well zugegeben und 15 Minuten bei 37°C inkubiert, wonach die Zellen mit Nährmedium aufgenommen und in einem 50ml Zentrifugenröhrchen gesammelt werden konnten. Nach der Zentrifugation (1200 xg, 5 min) wurde der Überstand des Nährmediums bis zum Zellpellet am Boden des Gefäßes abgesaugt, anschließend mit 12 ml Nährmedium resuspendiert und auf einer 75cm<sup>2</sup>-Nährmedium ausgesät. Das Nährmedium wurde einmal alle zwei Tage gewechselt.

Weitere zwei Wochen später erfolgte die zweite Passage der Zellen. Hierbei wurden die Osteoblasten, wie oben beschrieben, mittels Accutase vom Nährboden abgelöst, mit Nährmedium abgetragen, in einem 50ml Zentrifugenröhrchen gesammelt und bei 1200 xg 5 min zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet konnte nun, nach Absaugen des Flüssigkeitsüberstandes mit frischem Nährmedium, resuspendiert und die Zellen mittels Zellzählgerät gezählt werden. Einen Tag vor der Virustransduktion der Osteoblasten mussten

diese zur Vorbereitung auf einer 24-Well-Anzuchtplatte mit 20.000 bis 25.000 Zellen pro Well ausgesät werden.

Die Virustransduktion der aus humanem Knochen generierten Osteoblasten erfolgte nach einer hausinternen Standardarbeitsanweisung (SOP), für welche der Virusüberstand von Dr. Stefan Stein aus dem Georg Speyer Haus der Universität Frankfurt zur Verfügung gestellt wurde.

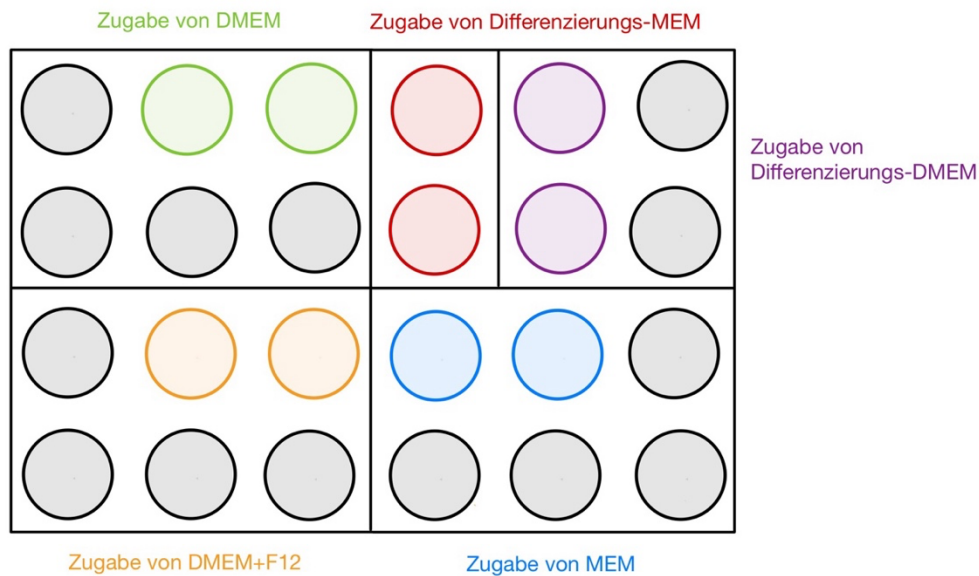
Zur visuellen Darstellung unter dem Fluoreszenzmikroskop wurde die Transduktion von Fluoreszenzgenen auf Osteoblasten mittels Lentiviren gewählt, wodurch das grün fluoreszierende Protein eGFP von den Zellen gebildet werden konnte. Erster Schritt war das Absaugen des alten Nährmediums und Vorbereiten einer Lösung im Verhältnis 1:10 aus Virusüberstand (eingefroren bei  $-80^{\circ}\text{C}$ ) und einem speziell mit Protaminsulfat angesetzten Nährmedium (siehe Materialliste). Pro Well wurden  $50\ \mu\text{l}$  des mit Medium verdünnten Virusüberstandes auf die Zellen gegeben und bei  $37^{\circ}$ , 5%  $\text{CO}_2$  und 98% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nach 6 Stunden wurde das Medium abgesaugt und 1ml frisches Nährmedium (DMEM/F-12 (1:1) (1X) + GlutaMAX + 20% FCS + 1% Penicillin-Streptomycin-Lösung) pro Well eingefüllt und die Zellen erneut inkubiert. Der soeben beschriebene Vorgang der Transduktion wurde nach zwei Tagen wiederholt. Die dabei entstandenen transduzierten hOB (siehe Abbildung 8) wurden entweder direkt zur Anlage einer Co-Kultur verwendet oder gesplittet und eingefroren. Für das Einfrieren der Zellen wurde eine Lösung mit 10% DMSO in FCS verwendet. Nach Ablösen, Zentrifugation und Resuspendierung der Zellen mit der Einfrierlösung wurden eine Million hOB pro 2ml Kryoröhrchen in Stickstoff (ca.  $-187^{\circ}\text{C}$ ) eingefroren. Alle Arbeiten mit den eingesetzten Lentiviren wurden nach den Regelungen des Gentechnikgesetzes durchgeführt und Verbrauchsmaterialien, wie z.B. Pipetten, Medium und die persönliche Schutzausrüstung gesammelt und vor Entsorgung autoklaviert.



*Abbildung 8: Virustransduzierte Osteoblasten unter dem Fluoreszenzmikroskop*

### **4.3.3 Nährmediumstudie**

Die Auswahl des passenden Nährmediums ist für die erfolgreiche Mono- und Co-Kultur entscheidend, um die Nährstoffversorgung der Zellen und deren Wachstum und Teilung zu garantieren. Wie in 2.2.1 beschrieben, finden in der aktuellen Literatur je nach Quelle unterschiedliche Zellkulturmedien Verwendung. Aus diesem Grund wurde zu Anfang der Versuche eine Nährmediumstudie mit fünf verschiedenen Medien anhand von Monozyten-Makrophagen-Monokulturen durchgeführt. Die Isolierung von Monozyten aus peripherem Blut erfolgte wie unter 4.3.1 beschrieben, woraufhin je 50.000 Zellen pro Well auf 24-Well-Platten ausgesät wurden. Abbildung 9 zeigt das Pipettierschema der Nährmediumstudie. Dabei wurde jeweils zwei Wells DMEM, DMEM/F-12, MEM, Differenzierungs-MEM oder Differenzierungs-DMEM zugegeben und mit RANKL und M-CSF versetzt.



Hinweis: Grau hinterlegte Wells wurden nicht belegt. Allen belegten Wells wurde RANKL und M-CSF zugegeben.

Abbildung 9: Schemazeichnung der Nährmediumstudie

#### 4.3.4 Monokultur isolierter Monozyten und Osteoblasten

Nach der Isolierung von Monozyten aus peripherem Blut und Osteoblasten aus Knochen mussten die Zellen vorerst separiert in Monokultur für 10 Tage kultiviert werden, um die Zellteilung und Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen gewährleisten zu können.

Für die Osteoblasten-Monokultur wurden entweder frisch transduzierte oder eingefrorene (ca.  $-187^{\circ}\text{C}$ ) hOB verwendet. Zum Auftauen von Osteoblasten aus dem Stickstofftank wurden diese in 10ml Nährmedium (DMEM/F12 + Glutamax) gegeben und bei 1200xg fünf Minuten lang zentrifugiert. Um zytotoxisches DMSO zu entfernen, wurde der Flüssigkeitsüberstand abgesaugt und das Zellpellet mit 12ml Nährmedium (DMEM/F12 + Glutamax) resuspendiert und auf einem  $75\text{cm}^2$ -Nährboden ausgesät. Pro  $75\text{cm}^2$ -Flasche wurden eine Million Osteoblasten kultiviert. Die Abbildung 12 in Kapitel 5.2 zeigt die Entwicklung der Osteoblasten innerhalb der 10 Tage in Monokultur.

Bei der Monokultur von Monozyten musste zunächst eine Versuchsreihe durchgeführt werden, um die optimale Zellzahl für einen  $75\text{cm}^2$ -Nährboden zu ermitteln. Dabei wurde jeweils eine Kultur mit 1,5, 3 und 6 Millionen Zellen angelegt und über 10 Tage beobachtet. Die optimale Zelldichte erreichte der Ansatz mit 3 Millionen Zellen pro  $75\text{cm}^2$ . Auch hier wurden frisch isolierte oder eingefrorene Monozyten verwendet und wie oben beschrieben aufbereitet. Nach der Zellzählung mit einem automatisierten Zellzählgerät wurden 3 Millionen Monozyten mit 12ml Nährmedium (MEM Alpha Medium (1X) + GlutaMAX) vermischt und auf  $75\text{cm}^2$ -Nährböden ausgesät. Außerdem wurden bei 12ml Nährmedium  $2,4\mu\text{l}$  M-CSF bei einer Stocklösung von  $100\text{ng}/\mu\text{l}$  und einer gewünschten Konzentration im Medium von  $20\text{ng}/\text{ml}$

zugegeben. Abbildung 13 in Kapitel 5.2 zeigt die Entwicklung der kultivierten Monozyten (Tag 4) zu Makrophagen (Tag 10), welche anhand ihrer Zellfortsätze erkennbar sind.

#### **4.3.5 Anlage der Co-Kultur aus Osteoblasten und Makrophagen**

Dieses Kapitel beschreibt das Vorgehen bei der Anlage der Co-Kulturen 9 bis 14 mit jeweils einer Test- und Kontrollgruppe, da diese nach vorausgegangenen Optimierungen dem gleichen Aufbau folgten. Die Co-Kulturen 1 bis 9 werden im Kapitel 6.2.3 behandelt.

Ab Tag 10 der Monozyten-Makrophagen-Monokulturen und Osteoblasten-Monokulturen erfolgte die Anlage der Co-Kulturen. Hierbei wurde ein zweizeitiges Verfahren gewählt, bei welchem zunächst an Tag 10 die Monozyten bzw. Makrophagen vom 75cm<sup>2</sup>-Nährboden abgelöst und auf einer 24-Well-Platte angesät wurden, um ein Absetzen und Anhaften der Zellen sicher zu stellen. Am darauffolgenden Tag 11 fand die Ablösung der Osteoblasten und deren Kultivierung in Inserts statt.

##### Tag 10:

Zum Ablösen der Makrophagen aus der T<sub>75</sub>-Zellkulturflasche wurde das Nährmedium abgesaugt, die Zellen zweimalig mit PBS gereinigt und 1,5 ml Trypsin-EDTA-Lösung zugegeben. Nach 10 Minuten Inkubation auf einer zirka 37°C heißen Heizplatte konnten die Zellen unter Zugabe von 5ml Nährmedium (MEM) abgenommen werden. Aufgrund der starken Anhaftung der Zellen musste dieser Vorgang drei bis vier Mal wiederholt werden. Nach Zentrifugation (1200xg, 5 min), Absaugen des Flüssigkeitsüberstandes und Resuspendieren des Zellpellets mit 25ml Nährmedium (MEM), erfolgte die Zellzählung mittels automatisierten Zellzählgeräts. Je Well wurden 50.000 Makrophagen mit 500µl Nährmedium zugegeben. Außerdem wurde M-CSF (Stocklösung: 100ng/µl) in einer Konzentration von 20ng/ml im Medium und jeweils RANKL (Stocklösung: 10ng/µl) in einer Konzentration von 50ng/ml im Medium, BSP (Stocklösung: 420µg/ml) in einer Konzentration von 5µg/ml im Medium oder IDK1 mit einer Verdünnung von 1:250 eingefüllt. Die Zugabe von M-CSF und RANKL erfolgte nach aktuellem Stand der Literatur (siehe 2.2.1) und die Verwendung von BSP und IDK1 nach hauseigenem SOP, welches Ergebnis einer Optimierung der Stoffkonzentration zurückliegender Vorversuche ist. Es wurden acht Wells je Test- und Kontrollgruppe belegt. In der Testgruppe wurde allen belegten Wells MEM als Nährmedium und M-CSF zugegeben. Der wesentliche Unterschied innerhalb der Gruppe war die Zugabe von RANKL bei der einen Hälfte und von BSP oder IDK1 bei der anderen Hälfte. In beiden Gruppen wurden Inserts mit 0,4µm und 8µm Porengröße getestet. Die Kontrollgruppe hingegen unterschied sich nur hinsichtlich des zugegebenen Nährmediums, wobei einer Hälfte (4 Wells) MEM und der anderen Hälfte MEM-Differenzierungsmedium als Nährmedium diente. Allen Wells wurde M-CSF beigefügt und es wurde ebenfalls in beiden Gruppen Inserts mit 0,4µm und 8µm Porengrößen

verwendet. Anschließend wurden die Co-Kulturen bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 98% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Zum besseren Verständnis visualisiert Abbildung 10 das Pipettierschema von Test- und Kontrollgruppe.

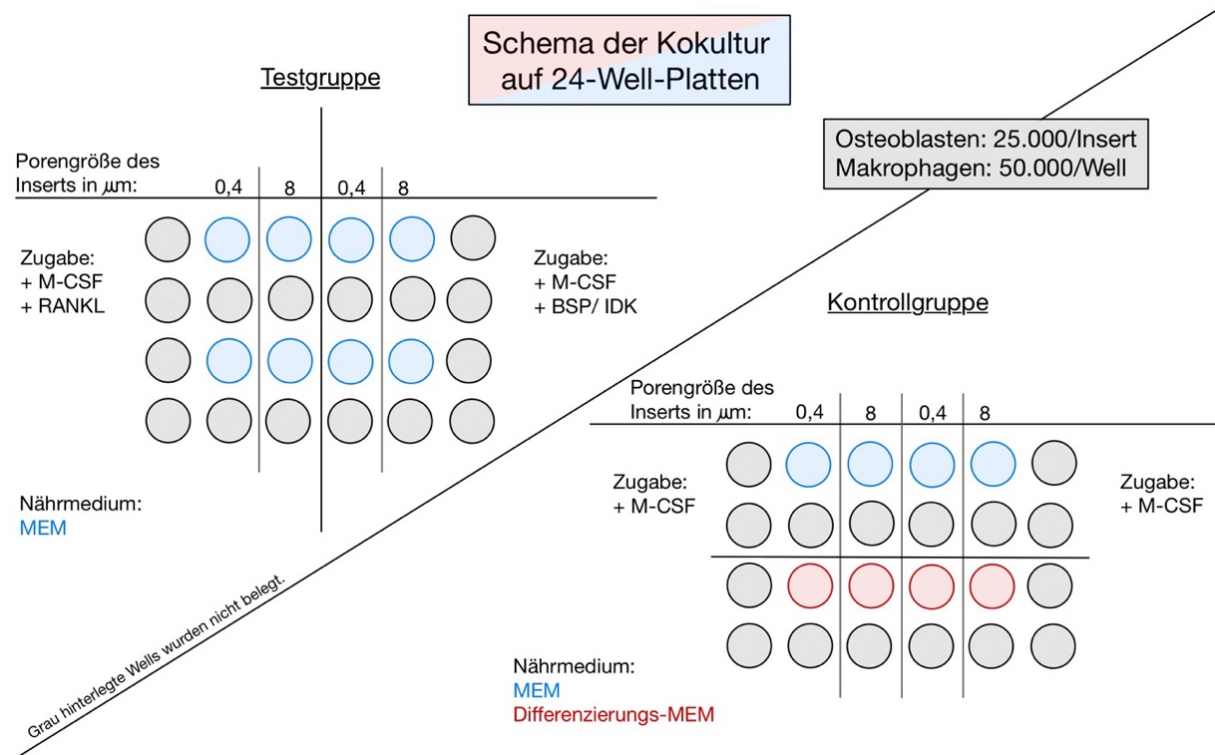


Abbildung 10: Schematischer Aufbau einer Co-Kultur mit Test- und Kontrollgruppe

### Tag 11 / Tag 1 der Co-Kultur:

Nachdem sich die Makrophagen an Tag 10 absetzen und am Nährboden anhaften konnten, wurden die transduzierten Osteoblasten in Inserts an Tag 11 hinzugegeben. Das Ablösen der hOB von der T<sub>75</sub>-Zellkulturflasche erfolgte nach der gleichen Vorgehensweise wie bei den Makrophagen, mit dem Unterschied, dass zum Ablösen der Zellen 1,5ml Accutase verwendet wurde. Das am Vortag eingefüllte Nährmedium wurde zunächst abgesaugt und danach jeweils 25.000 Osteoblasten mit 500µl Nährmedium und entsprechenden Signalstoffen in die Inserts gegeben. Die Zugabe folgte dem Pipettierschema der Abbildung 10. Daraufhin wurden die Co-Kulturen bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 98% Luftfeuchtigkeit inkubiert.

### Tag 3 – 10 der Co-Kultur:

An Tag 3, 5, 7 und 9 wurde ein Nährmediumswechsel nach dem oben beschriebenen Schema durchgeführt. Dabei wurden die Wells erst mit je 500µl PBS gereinigt, dieses wieder abgesaugt und frisches, mit oben genannten Substanzen versetztes Nährmedium eingefüllt. An Tag 10 erfolgte die Auswertung der Co-Kulturen.

#### **4.3.6 Nachweis differenzierter Osteoklasten mittels Hoechst-Färbung**

Nach 10 Tagen in Co-Kultur unter Zugabe von RANKL, BSP oder IDK1 erfolgte die Anfärbung der DNA innerhalb der Zellkerne mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes Hoechst 33342. Aufgrund der Lichtempfindlichkeit des Vitalfarbstoffes wurden alle Arbeiten im Dunkeln durchgeführt. Zuerst wurde das alte Nährmedium abgesaugt, die Inserts mitsamt Osteoblasten in freie Wells auf der Platte verteilt und die verwendeten Wells zweimalig mit 500 $\mu$ l PBS gereinigt. Die Hoechst-Färbelösung wurde in einem Verhältnis von 1:250 mit PBS neu angesetzt und anschließend jeweils 500 $\mu$ l pro Well eingefüllt. Nach 10-minütiger Einwirkzeit bei Raumtemperatur konnte die Lösung abgesaugt, 500 $\mu$ l PBS pro Well zugesetzt und die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden.

#### **4.3.7 Fluoreszenzmikroskopische Dokumentation differenzierter Osteoklasten**

Ziel dieser Dissertation ist es, den Einfluss von RANKL, BSP und IDK1 auf die Osteoklastendifferenzierung im Rahmen von Co-Kulturen aus Osteoblasten und Osteoklasten zu untersuchen. Somit stellte die fluoreszenzmikroskopische Auswertung nach Färbung der Co-Kulturen den entscheidenden Schritt der experimentellen Arbeit dar. Um die Zellen später zählen zu können, wurden sieben Bilder pro Well in vierfacher Vergrößerung und 70% DAPI-Fluoreszenz gemacht, welche nahezu die gesamte Fläche abdeckten (siehe Abbildung 11). Ebenso wurden die hOB mit zwei Bildern pro Insert in vierfacher und zehnfacher Vergrößerung und 60% GFP-Fluoreszenz festgehalten. Nach der Fotodokumentation erfolgte das Auszählen der mehrkernigen Osteoklasten, wobei Zellen mit zwei oder mehr Kernen in die Zählung eingeschlossen wurden.

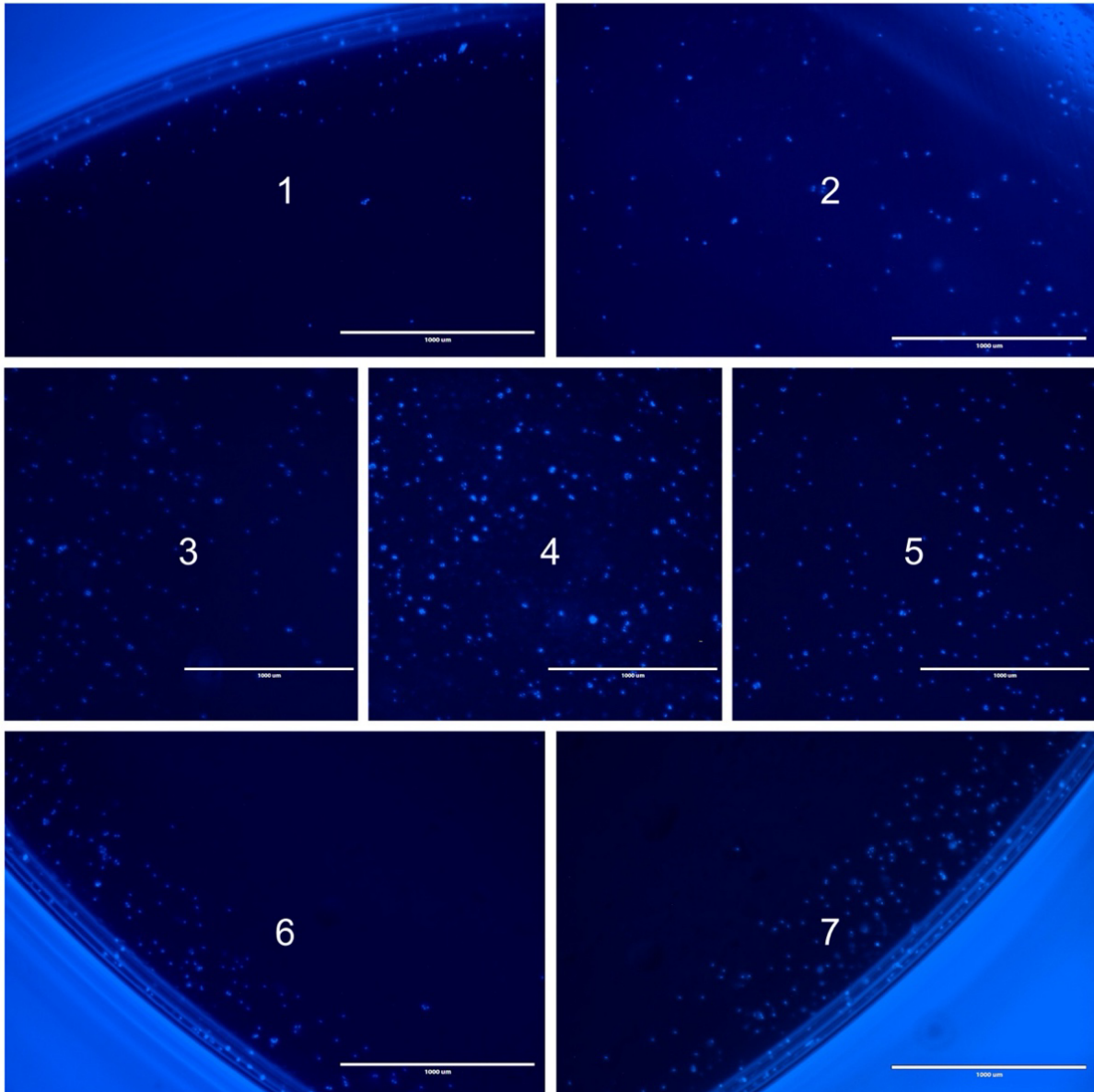


Abbildung 11: Zählschema differenzierter Osteoklasten am Beispiel der Co-Kultur Nr. 13

#### 4.4 Statistische Methoden

Im Anschluss an die Dokumentation der mehrkernigen, differenzierten Osteoklasten erfolgte die statistische Auswertung der Daten mit Hilfe des Statistikprogrammes SPSS 27. Hierbei wurde die Summe der eingeschlossenen Osteoklasten je Co-Kultur in passende Gruppen, wie z. B. „BSP“, „RANKL“, „IDK1“, „kleine Inserts“ und „große Inserts“ eingeteilt. Anhand dieser Einteilung konnten nun Vergleiche der verschiedenen Gruppen angestellt werden. Die Ergebnisse der statistischen Auswertung in Form einer deskriptiven Statistik und grafischen Darstellung mittels Boxplots und Balkendiagrammen werden im Kapitel 5.4 vorgestellt.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Höchste Zelldichte und Viabilität unter Verwendung von MEM

Wie in Kapitel 4.3.3 beschrieben, wurden mehrere Nährmedien an Monozyten-Makrophagen-Monokulturen getestet, um in den Co-Kulturen ein optimales Zellwachstum gewährleisten zu können. Aus der Studie ging hervor, dass Wells, welchen MEM zugesetzt wurde, die größte Zelldichte und -viabilität aufwies. Die Osteoblastenproliferation und -differenzierung zeigte hingegen keine Unterschiede bei Verwendung der Nährmedien MEM und DMEM. Im Rahmen der Studie wurden Zelldichte und -viabilität mikroskopisch und mittels automatisiertem Zellzählgerät gemessen. In den nachfolgenden Experimenten kamen daher MEM und Differenzierungs-MEM als Nährmedium zur Anwendung.

### 5.2 Wachstum der Monokulturen von hOB und Makrophagen

Die Aussaat und Anzucht von Osteoblasten aus humaner Spongiosa in Monokultur über 10 Tage, wie unter Punkt 4.3.4 beschrieben, verlief komplikationslos. Über 10 Tage zeigten die Zellen ein kontinuierliches Wachstum unter Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten. Beim Vergleich der verschiedenen hOB-Chargen konnte ein homogenes Wachstums- und ein einheitliches Differenzierungsmuster anhand der Ausbildung von Zellfortsätzen festgestellt werden. Die Abbildung 12 zeigt die Entwicklung der hOB in Monokultur über zehn Tage.

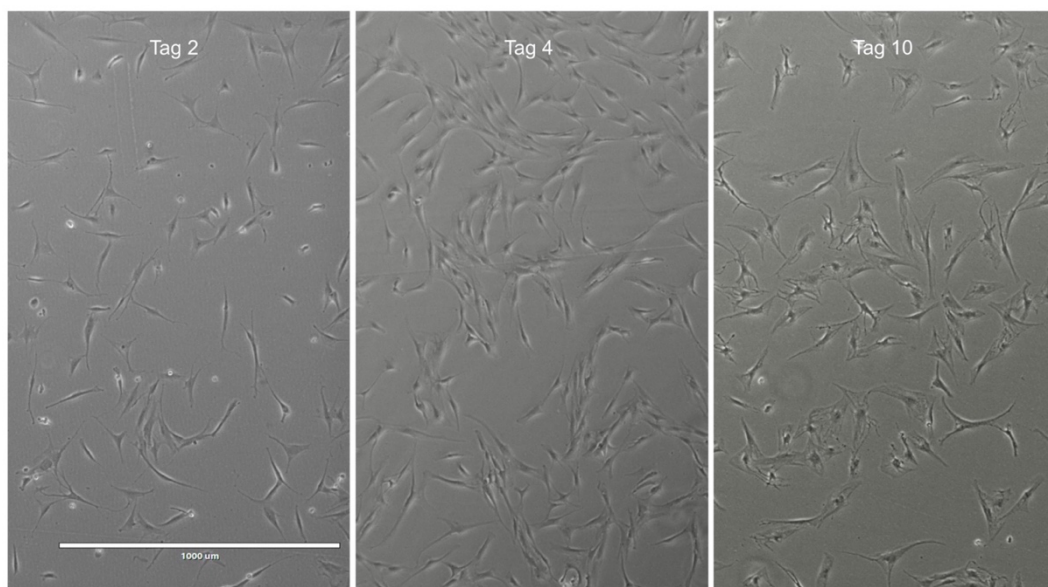


Abbildung 12: Entwicklung der Osteoblasten in Monokultur über zehn Tage

Die Monokultur von Monozyten, später Makrophagen, stellte sich im Gegensatz zur Kultivierung von Osteoblasten deutlich komplizierter dar. Dabei erwiesen sich mehrere Parameter als wichtig: Bereits bei der Isolierung der Monozyten aus peripherem Blut spielten die unterschiedliche Qualität der Buffy Coats, die Zentrifugation und das korrekte Abpipettieren der mononukleären Zellen aus dem Ficoll-Gradienten eine wichtige Rolle. Im Zuge der Aussaat der Zellen war die Wahl des richtigen Nährmediums und der passenden Zelldichte für ein optimales Zellwachstum erforderlich. Diese Punkte werden im Kapitel 6 Diskussion näher erläutert. Abbildung 13 zeigt die ideale Entwicklung einer Monozyten-Makrophagen-Monokultur im Verlauf von 10 Tagen. Während der Phase der Datenerhebung wurden insgesamt 26 Buffy Coats zur Monozytenisolierungen benutzt. Davon wurden „Mono 1“ bis „Mono 19“ zur Optimierung der Co-Kultur und „Mono 20“ bis „Mono 26“ für die sechs letzten Co-Kulturen nach optimiertem Schema verwendet.

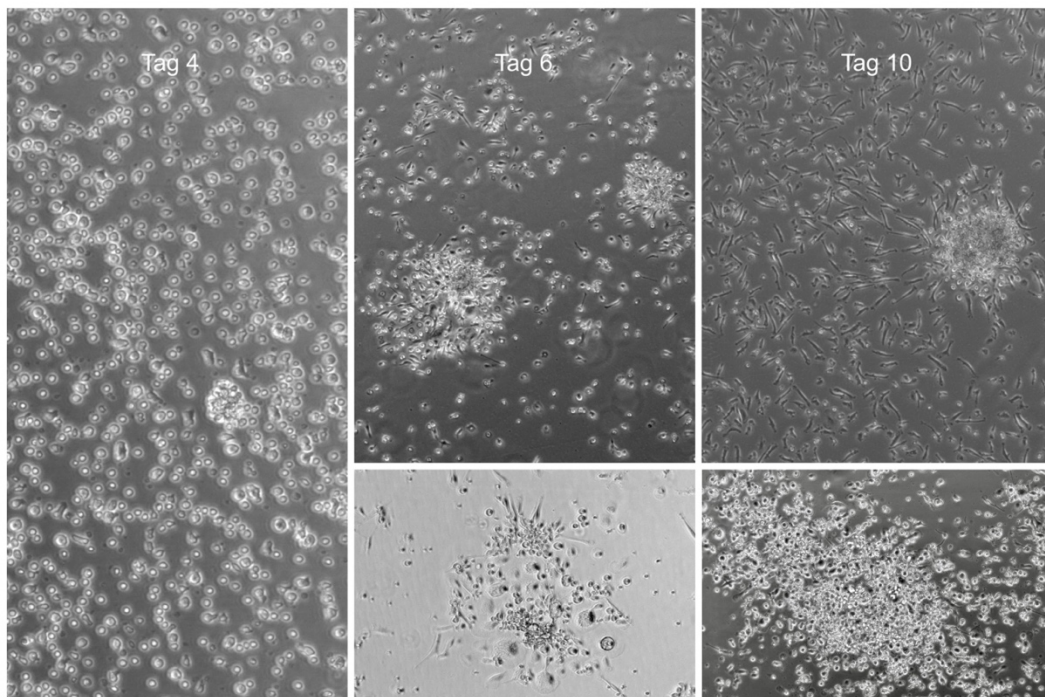


Abbildung 13: Entwicklung der Monozyten/Makrophagen in Monokultur über zehn Tage

### 5.3 Differenzierte Osteoklasten nach zehntägiger Co-Kultur

Mittelpunkt dieser Arbeit ist die Etablierung einer Co-Kultur (CK) von Osteoblasten und Makrophagen unter Einfluss von Signalstoffen (M-CSF, RANKL, BSP, IDK1), verschiedener Inserts (0,4  $\mu\text{m}$  und 8  $\mu\text{m}$ ) und Nährmedien (MEM, Differenzierungs-MEM). Das Ziel der Untersuchungen ist die Quantifizierung der Osteoklastogenese. Hierfür wurde nach 10-tägiger Co-Kultur von Test- und Kontrollgruppe eine Fotodokumentation und Zählung der

mehrkernigen Osteoklasten im Anschluss an die Hoechst-Färbung durchgeführt (Kapitel 4.3.5 bis 4.3.7). Der primäre Endpunkt der Experimente war dabei die Anzahl differenzierter Osteoklasten. Im Folgenden kommt es zu einer tabellarischen Darstellung der ausgezählten Osteoklasten, woraufhin im nachfolgenden Kapitel 5.4 die statistische Auswertung fokussiert wird.

### **5.3.1 Co-Kultur 9, 10 und 11 - Vergleich von BSP und RANKL**

Den Co-Kulturen 9,10 und 11 wurden, wie in der Schemazeichnung in Abbildung 10 beschrieben, in der Testgruppe M-CSF und RANKL oder M-CSF und BSP im Vergleich zugegeben und in der Kontrollgruppe wurde zwischen Nährmedium (MEM) und Differenzierungsnährmedium (= MEM + Dexamethason +  $\beta$ -Glycerophosphat + Ascorbinsäure) unterschieden. Die nachfolgende Tabelle 3 zeigt die Auswertung der gezählten Osteoklasten durch Unterscheidung von Test- und Kontrollgruppe und 0,4 $\mu$ m und 8 $\mu$ m Inserts. Bei der Auswertung der gezählten differenzierten Osteoklasten fiel zunächst auf, dass sich die Summe der Zellen je Co-Kultur sowohl in der Test- als auch in der Kontrollgruppe deutlich voneinander unterschieden. Gründe für diese Variation ergaben sich durch unterschiedliche Parameter, welche die Differenzierung der Makrophagen zu Osteoklasten maßgeblich beeinflussten und zu Wachstumsunterschieden der Zellen innerhalb der Co-Kulturen führten. Diese werden im Kapitel 6.1 und 6.2 diskutiert. Demnach war ein direkter Vergleich zweier Co-Kulturen nicht möglich, jedoch ließ diese Variation eine Analyse der Zahlen einzelner Co-Kulturen und aller Co-Kulturen einer Gruppe (BSP oder IDK1) zu. Im Rahmen der Einzelbetrachtung der BSP-Co-Kulturen 9, 10 und 11 soll Erwähnung finden, dass die CK 10 und CK 11 insgesamt deutlich erniedrigte Zellzahlen aufwiesen gegenüber CK 9, was auf ein vermindertes Wachstum der Zellen zurückzuführen ist. Bei der Auswertung der Daten von Test- und Kontrollgruppe zeigte sich eine deutlich höhere Anzahl von differenzierten Osteoklasten in der Testgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe sowohl in der Einzelbetrachtung der Co-Kulturen als auch in der Zusammenschau. Zudem wurden in allen drei Co-Kulturen mit BSP-Zugabe in der Testgruppe mehr oder gleich viele Osteoklasten in der Gruppe mit 8 $\mu$ m Inserts als in der Gruppe mit 0,4 $\mu$ m Inserts, mit Ausnahme der BSP-Testgruppe der CK 11, gezählt. Innerhalb der Testgruppe zeigten CK 9 und CK 11 erhöhte Zahlen differenzierter Osteoklasten in der BSP-Gruppe verglichen mit der RANKL-Gruppe. Bei Betrachtung der Kontrollgruppe ließen sich in CK 9 und CK 11 erhöhte Werte der mehrkernigen Riesenzellen in der Gruppe mit Differenzierungsnährmedium gegenüber der Gruppe mit normalem Nährmedium feststellen.

Tabelle 3: Anzahl differenzierter Osteoklasten der Co-Kulturen 9, 10 und 11 in Test- (MEM + M-CSF + RANKL/BSP) und Kontrollgruppe (MEM/Differenzierungs-MEM + M-CSF) mit 0,4µm und 8µm Inserts

			0,4µm	8µm
CK 9	Testgruppe	MEM + M-CSF + RANKL	72	72
		MEM + M-CSF + BSP	59	115
	Kontrollgruppe	MEM + M-CSF	5	5
		Diff.-MEM + M-CSF	5	10
			0,4µm	8µm
CK 10	Testgruppe	MEM + M-CSF + RANKL	11	32
		MEM + M-CSF + BSP	12	21
	Kontrollgruppe	MEM + M-CSF	4	8
		Diff.-MEM + M-CSF	3	5
			0,4µm	8µm
CK 11	Testgruppe	MEM + M-CSF + RANKL	9	12
		MEM + M-CSF + BSP	22	16
	Kontrollgruppe	MEM + M-CSF	1	4
		Diff.-MEM + M-CSF	9	20

### 5.3.2 Co-Kultur 12, 13 und 14 - Vergleich von IDK1 und RANKL

Die Co-Kulturen 12, 13 und 14 wurden ebenfalls 10 Tage lang gemäß des Pipettierschemas aus Abbildung 10 kultiviert. Im Unterschied zu den BSP-Co-Kulturen 9, 10 und 11 wurde hier der BSP-Antikörper IDK1 in der Testgruppe verwendet. In der IDK1-Versuchsreihe fiel wie in der BSP-Versuchsreihe, die Anzahl der Zellen der einzelnen Co-Kulturen sehr unterschiedlich aus. Die möglichen Gründe hierfür werden im Kapitel 6 *Diskussion* erläutert. In Tabelle 4 wird die Anzahl der Osteoklasten der Co-Kulturen 12, 13 und 14, eingeteilt in die verschiedenen Versuchsgruppen, dargestellt. Bei Auswertung der Daten zeigte sich in der Testgruppe der CK 13 und CK 14 ein höherer Grad der Differenzierung als in der Kontrollgruppe, die CK 12 hingegen fiel dabei mit höheren Werten in der Kontrollgruppe aus der Reihe. Im Gegensatz zur BSP-Gruppe wiesen die IDK1-Co-Kulturen insgesamt mehr differenzierte Osteoklasten in Wells mit 0,4µm Inserts als in jenen mit 8µm Porendichte auf. Innerhalb der Testgruppe hatte die RANKL-Gruppe in allen drei Co-Kulturen höhere Zellzahlen als in der IDK1-Gruppe zu verzeichnen. Die Kontrollgruppe hingegen stellte sich sehr heterogen dar: Bei Betrachtung der CK 12 zeigten Wells mit Differenzierungsnährmedium mehr und in der CK 13 weniger differenzierte Osteoklasten als Wells mit normalem Nährmedium. In der CK 14 hatten sich in beiden Gruppen gleich viele Osteoklasten entwickelt.

In der statistischen Auswertung der Daten in Kapitel 5.4 werden zusammenfassende Tendenzen einzelner Versuchsgruppen grafisch dargestellt.

Tabelle 4: Anzahl differenzierter Osteoklasten der Co-Kulturen 12, 13 und 14 in Test- (MEM + M-CSF + RANKL/IDK1) und Kontrollgruppe (MEM/Differenzierungs-MEM + M-CSF) mit 0,4µm und 8µm Inserts

			0,4µm	8µm
CK 12	Testgruppe	MEM + M-CSF + RANKL	16	17
		MEM + M-CSF + IDK1	12	3
	Kontrollgruppe	MEM + M-CSF	4	4
		Diff.-MEM + M-CSF	26	33
			0,4µm	8µm
CK 13	Testgruppe	MEM + M-CSF + RANKL	311	442
		MEM + M-CSF + IDK1	207	51
	Kontrollgruppe	MEM + M-CSF	190	164
		Diff.-MEM + M-CSF	140	97
			0,4µm	8µm
CK 14	Testgruppe	MEM + M-CSF + RANKL	84	74
		MEM + M-CSF + IDK1	50	53
	Kontrollgruppe	MEM + M-CSF	30	17
		Diff.-MEM + M-CSF	27	20

### 5.3.3 Co-Kultur 9 und 14 - Vergleich von BSP und IDK1

Die Co-Kulturen 9 und 14 hatten mit 343 Zellen in der CK 9 und 355 Zellen in der CK 14 eine gut vergleichbare Anzahl differenzierter Osteoklasten. Im Vergleich Test- vs. Kontrollgruppe überwog die Zahl der Osteoklasten in den Testgruppen beider Co-Kulturen gegenüber der Kontrollgruppe. Bei Betrachtung der Insert-Gruppen wies die CK 9 höhere Zellzahlen bei Verwendung einer Porengröße von 8µm als bei 0,4µm auf, wohingegen die CK 14 ein gegenteiliges Ergebnis zeigte. In der Testgruppe der CK 9 fiel eine höhere Anzahl differenzierter Osteoklasten in der BSP- verglichen mit der RANKL-Gruppe auf. Im Unterschied dazu ließ sich in der CK 14 eine vermehrte Differenzierung innerhalb der RANKL-Gruppe verglichen mit der IDK1-Gruppe feststellen. Die Kontrollgruppen beider Co-Kulturen zeigten unterschiedliche Tendenzen: Im Differenzierungsnährmedium fanden sich in CK 9 nach 10 Tagen mehr Osteoklasten als im normalen Nährmedium. In CK 14 glichen sich die Zellzahlen beider Medien.

## 5.4 Statistischer Vergleich wichtiger Gruppen der Co-Kultur

In diesem Kapitel werden die zuvor tabellarisch dargestellten Einzeldaten der verschiedenen Co-Kulturen in deskriptiver und grafischer Form statistisch zusammengefasst. Zur Auswertung der Daten wurde SPSS 27 (Version 27.0.1.0) verwendet. Zur Erarbeitung der Resultate der vorliegenden Dissertation wurde die statistische Beratung von Herrn Dr. Markus Schepers vom Institut für medizinische Biometrie, Epidemiologie und Informatik (IMBEI) der

Universitätsmedizin Mainz in Anspruch genommen. Die Anzahl differenzierter Osteoklasten in den Subgruppen RANKL vs. BSP/IDK1, Testgruppe (RANKL/BSP/IDK1) vs. Kontrollgruppe (MEM/Differenzierungs-MEM), Inserts mit  $0,4\mu\text{m}$  versus  $8\mu\text{m}$  Porengröße und Nährmedium versus Differenzierungsmedium wurden mittels Mann-Whitney U-Test verglichen. Dabei wurden die RANKL-Werte auf 100% festgelegt, da der Einfluss von RANKL erwiesenermaßen zur Steigerung der Osteoklastendifferenzierung führt und in der Auswertung als Referenz gelten sollte (siehe 2.2.2). Alle anderen Gruppen wurden prozentual zum jeweiligen RANKL-Wert errechnet. In dieser Arbeit wurde ein Signifikanzniveau von 5 % ( $\alpha = 0,05$ ) festgelegt, sodass Ergebnisse mit einem p-Wert unter 0,05 als statistisch signifikant betrachtet wurden. Den Abschluss der Statistik stellt eine deskriptive Auswertung der Daten dar.

#### 5.4.1 Test- vs. Kontrollgruppe - Erhöhte Differenzierung von OK in Testgruppe

Bei der Auswertung der Anzahl differenzierter Osteoklasten in der Test- und Kontrollgruppe stellten sich die Daten linksgipflig bzw. rechtsschief dar. Die Rohdaten beider Gruppen waren somit nicht mit Tests auswertbar, die eine Normalverteilung voraussetzen, konnten jedoch in ihren Untergruppen (RANKL vs. BSP, RANKL vs. IDK1 etc.) als Prozentwerte mittels Mann-Whitney U-Test verglichen werden. Die Abbildung 14 zeigt Histogramme beider Gruppen, in welchen die Häufigkeit der Einzelergebnisse der Co-Kulturen zur Zellzahl in Test- und Kontrollgruppe aufgetragen ist.

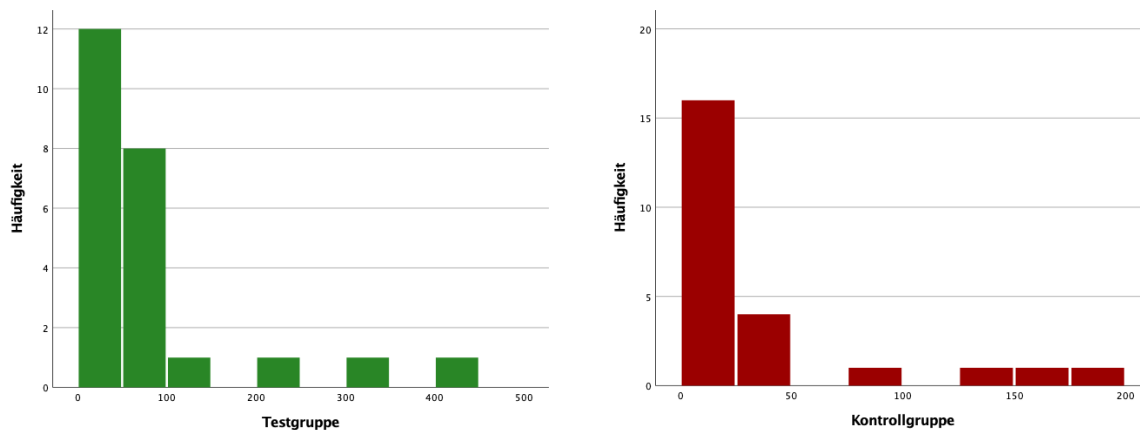


Abbildung 14: Linksgipflige Verteilung der Häufigkeit von Einzelergebnissen der Co-Kulturen in Test (M-CSF + BSP/RANKL/IDK1) - und Kontrollgruppe (MEM/Differenzierungs-MEM + M-CSF) mit  $0,4\mu\text{m}$  und  $8\mu\text{m}$  Inserts

Vor Planung und Durchführung der Datenerhebung ergab sich folgende, zu verifizierende Forschungsfrage:

Hat die Zugabe der verwendeten Substanzen (RANKL, BSP) in der Testgruppe einen stärkeren Einfluss auf die Osteoklastendifferenzierung im Vergleich zur Kontrollgruppe, in der keine Zugabe erfolgte?

Daraus ließen sich die Nullhypothese  $H_0$  und die Alternativhypothese  $H_1$  formulieren:

$H_0$ : Die Anzahl differenzierter Osteoklasten ist mit und ohne Zugabe von BSP und RANKL gleich.

$H_1$ : Die Anzahl differenzierter Osteoklasten bei Zugabe von BSP und RANKL unterscheidet sich von der Zellzahl in Co-Kulturen, welchen keine dieser Substanzen zugegeben wurde.

IDK1 wurde bei der Formulierung der Hypothesen aufgrund des tendenziell hemmenden Einflusses des BSP-Antikörpers auf die Osteoklastendifferenzierung nicht berücksichtigt. Dennoch werden im Folgenden die Summe differenzierter Osteoklasten unter IDK1-Zugabe mit anderen wichtigen Gruppen verglichen (siehe 5.4.2, 5.4.3 und 5.4.4).

Um den Einfluss der Substanzen der Testgruppe zu untersuchen, bot sich bei der nicht parametrischen Verteilung der Daten die grafische Auswertung mittels Balkendiagrammen und Boxplots an. Das Balkendiagramm in Abbildung 15 zeigt eine deutliche Erhöhung der differenzierten Osteoklasten in der Testgruppe verglichen mit der Kontrollgruppe. Nach 10 Tagen Co-Kultur weist die Testgruppe mit 1773 Osteoklasten mehr Differenzierung als die Kontrollgruppe mit 831 Osteoklasten auf. Dabei muss bedacht werden, dass die Testgruppe Daten von Co-Kulturen mit Zugabe differenzierungsfördernden (BSP, RANKL) und differenzierungshemmenden (IDK1) Signalstoffen umfasst.

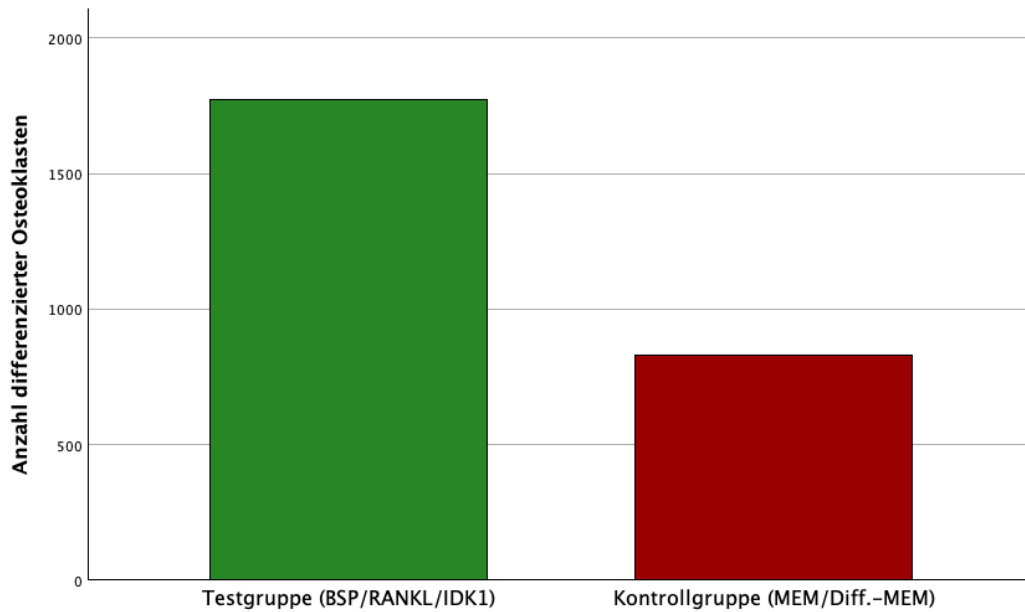


Abbildung 15: Darstellung der Anzahl differenzierter Osteoklasten in Testgruppe (M-CSF + BSP/RANKL/IDK1) und Kontrollgruppe (MEM/Differenzierungs-MEM + M-CSF) mit 0,4 $\mu$ m und 8 $\mu$ m Inserts mittels Balkendiagramm

Zur explorativen Datenanalyse dienen die Boxplots in Abbildung 16. Diese werden in Abbildung 17 zusätzlich mit logarithmierten Werten dargestellt, um eine bessere Übersichtlichkeit zu gewährleisten. Die Daten je Boxplot stammen aus einem Stichprobenumfang von jeweils 24 Zählungen, wobei der Median der Testgruppe bei 41,0 und der Kontrollgruppe bei 9,5 Osteoklasten liegt. Kreise markieren Ausreißer (1,5-facher Interquartilsabstand des 3. Quartils) und extreme Ausreißer (3-facher Interquartilsabstand des 3. Quartils) werden durch Sterne dargestellt. Minimum- und Maximalwerte können anhand der Whiskers abgelesen werden: In der Testgruppe wurden maximal 442 und minimal 3 Zellen gezählt und in der Kontrollgruppe liegt das Maximum bei 190 und das Minimum bei 1.

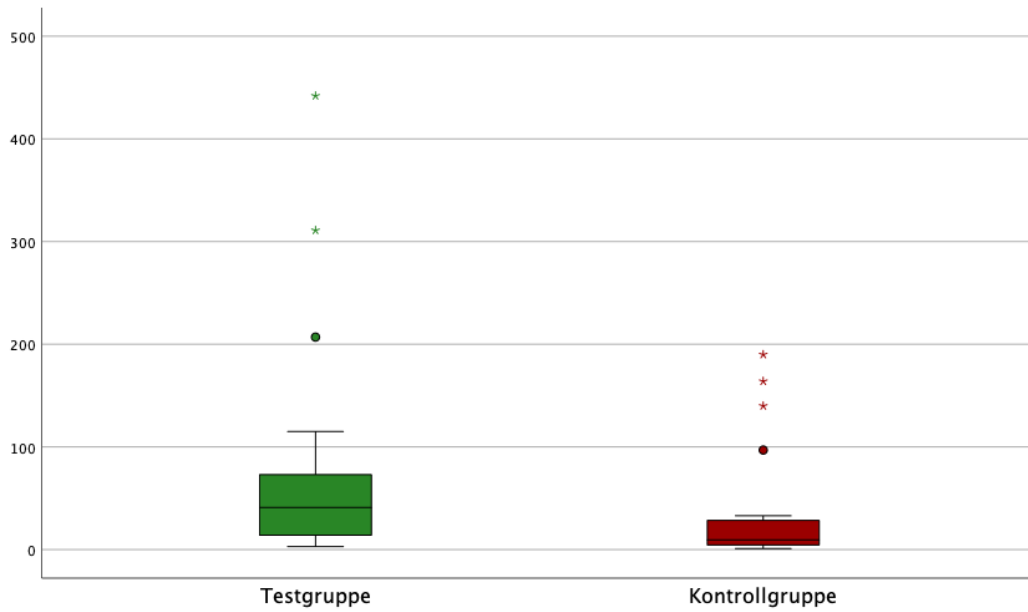


Abbildung 16: Grafische Darstellung der Auswertung differenzierter Osteoklasten in Testgruppe (M-CSF + BSP/RANKL/IDK1) und Kontrollgruppe (MEM/Differenzierungs-MEM + M-CSF) mit 0,4 $\mu$ m und 8 $\mu$ m Inserts nach zehn Tagen Co-Kultur durch Boxplots

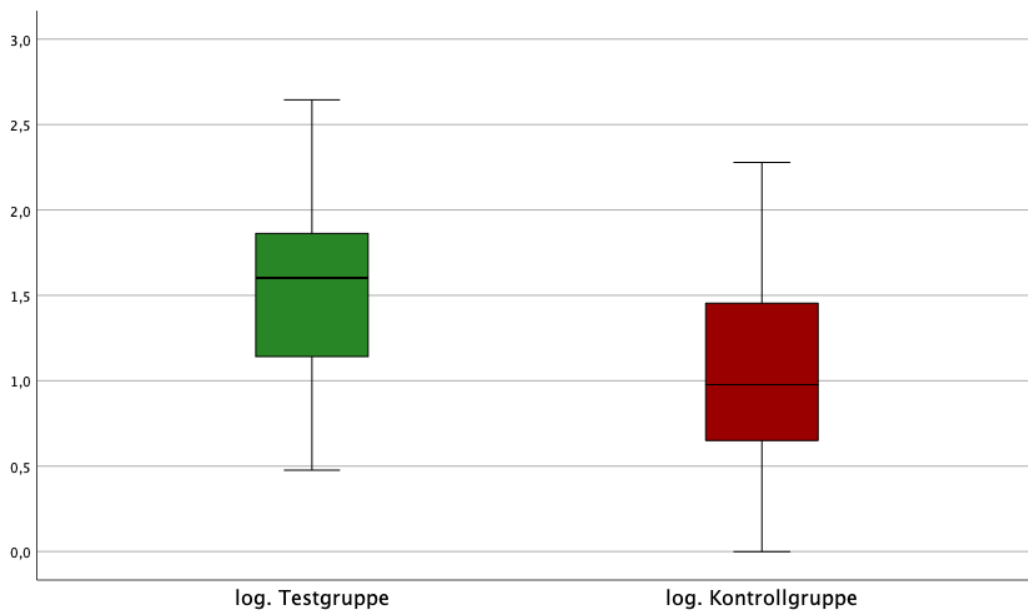


Abbildung 17: Grafische Darstellung der logarithmierten Daten in Testgruppe (M-CSF + BSP/RANKL/IDK1) und Kontrollgruppe (MEM/Differenzierungs-MEM + M-CSF) mit 0,4 $\mu$ m und 8 $\mu$ m Inserts nach zehn Tagen Co-Kultur durch Boxplots

Zusammenfassend zeigte sich, dass Co-Kulturen mit Osteoblasten und Makrophagen tendenziell durch die Zugabe von RANKL, BSP und dem BSP-Antikörper IDK1 in der Summe mehr Osteoklasten hervorbrachten als Co-Kulturen, in denen diese Substanzen nicht

zugesetzt wurden. Jedoch muss diese Darstellung noch durch die Gegenüberstellung von RANKL und BSP bzw. IDK1 ergänzt werden, um eine genaue Aussage darüber treffen zu können, welche Substanzen tatsächlich die Differenzierung begünstigen oder hemmen. Im nächsten Kapitel erfolgt der statistische Vergleich der in der Testgruppe zugesetzten Signalstoffe.

#### 5.4.2 BSP vs. RANKL - Gleichwertiger Effekt auf die Osteoklastendifferenzierung

Um zu entscheiden, ob die Nullhypothese  $H_0$  verworfen werden kann, musste neben dem Vergleich von Test- und Kontrollgruppe eine Auswertung der Testuntergruppen RANKL, BSP und IDK1 erfolgen. Mit Hilfe des Mann-Whitney U-Tests konnte mit einem p-Wert von 0,394 bei einer Gruppengröße von  $n=6$  kein signifikantes Ergebnis bei der Gegenüberstellung von RANKL und BSP erzielt werden. Wie in Abbildung 18 deutlich wird, überwiegt die Summe der gezählten Osteoklasten der BSP-Gruppe (245 Zellen) gegenüber der RANKL-Gruppe (208 Zellen), was tendenziell einen ähnlichen, bis geringfügig stärkeren Effekt von BSP auf die Osteoklastendifferenzierung vermuten lässt.

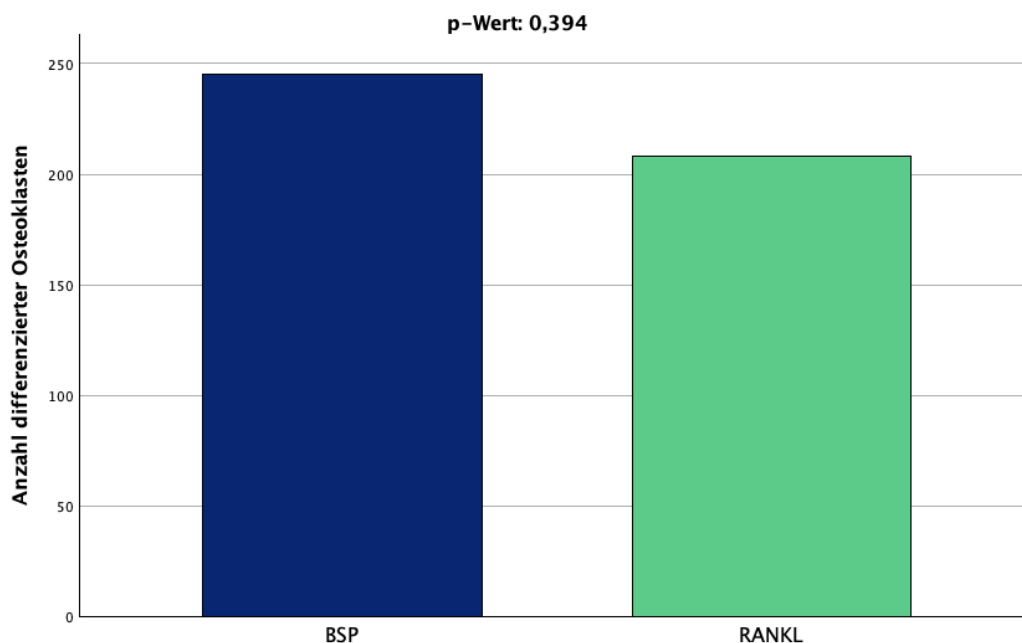


Abbildung 18: Balkendiagramm zur Darstellung der Summe differenzierter Osteoklasten in der RANKL- und BSP-Gruppe der Co-Kulturen 9, 10 und 11

### 5.4.3 RANKL vs. IDK1 - Signifikant stärkerer osteoklastogener Effekt von RANKL

Abbildung 19 zeigt die Gegenüberstellung der RANKL- und IDK1- Gruppe (Zugabe von RANKL oder des BSP-Antikörpers IDK1) in den CK 12, 13 und 14. Insgesamt war diese Versuchsreihe wesentlich zellreicher als die BSP-Gruppe der Co-Kulturen 9, 10 und 11. Dabei fällt auf, dass Wells, welchen RANKL zugegeben wurde erwartungsgemäß deutlich mehr differenzierte Osteoklasten (944 Zellen) aufwies als Wells, deren Nährmedium mit dem BSP-Antikörper IDK1 versetzt wurde (376 Zellen). Bei Durchführung des Mann-Whitney U-Tests ließ sich mit einem p-Wert von 0,02 und einer Fallzahl von n=6 statistisch ein signifikanter Unterschied zwischen der RANKL- und der IDK1-Gruppe der Co-Kulturen 12 bis 14 feststellen. Somit zeigt die Zugabe von RANKL tendenziell einen wachstumssteigernden und IDK1 eher einen hemmenden Effekt bezüglich der Osteoklastogenese.

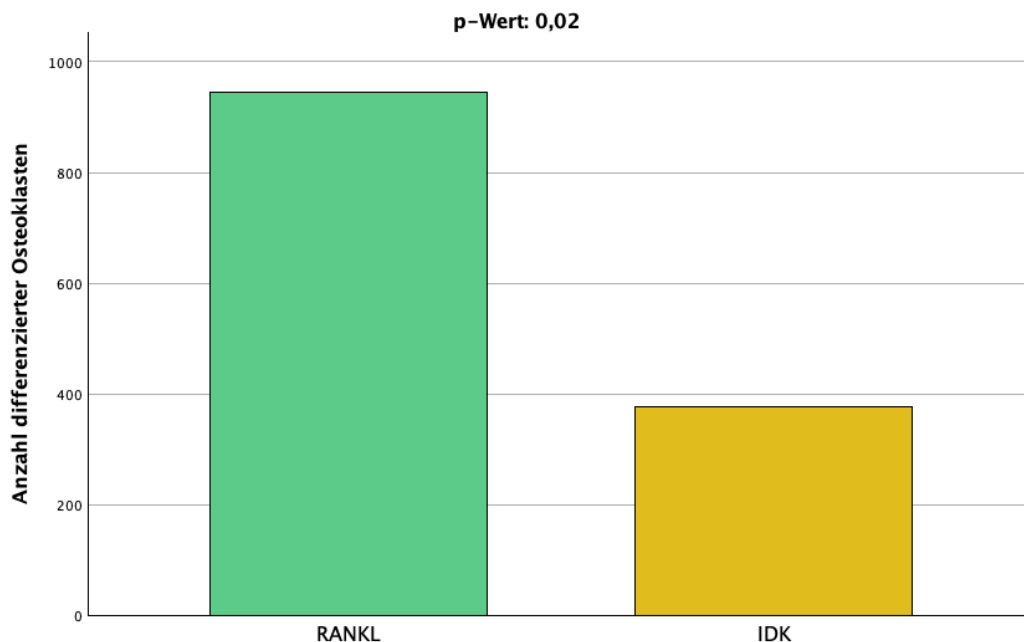


Abbildung 19: Balkendiagramm zur Darstellung der Summe differenzierter Osteoklasten in der RANKL- und IDK1-Gruppe der Co-Kulturen 12, 13 und 14

### 5.4.4 BSP (CK9) vs. IDK1 (CK14) - Höhere Osteoklastendifferenzierung mit BSP

Der direkte Vergleich zwischen der Gesamtheit gezählter Osteoklasten der BSP-Gruppe gegenüber jener der IDK1-Gruppe war aufgrund der stark variierenden Zellzahl je Co-Kultur nicht möglich. Dennoch konnte zwischen den Untergruppen der CK 9 und CK 14 verglichen werden, da diese, wie in 5.3.3 beschrieben, ähnlich hohe Zellzahlen aufwiesen. Die Betrachtung der Ergebnisse mit Hilfe der Balkendiagramme aus Abbildung 20 zeigt, dass die Zugabe von BSP tendenziell einen erwartbar stärkeren Effekt auf die Osteoklastogenese hat

als der BSP-Antikörper IDK1 (174 zu 103 Zellen). Ein Mann-Whitney U-Test konnte in diesem Fall nicht durchgeführt werden.

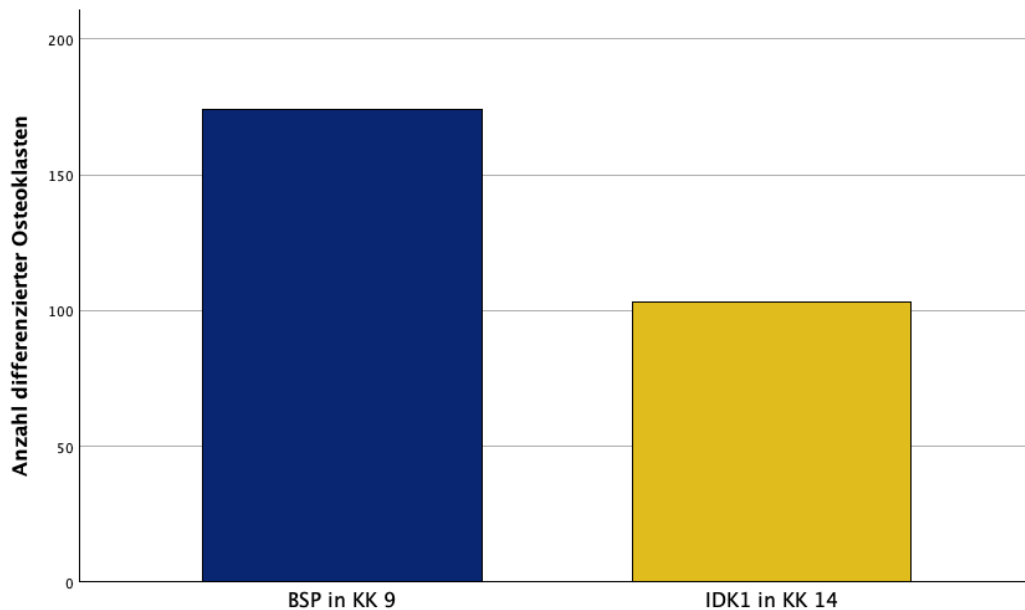


Abbildung 20: Balkendiagramm zum Vergleich der BSP-Gruppe (CK9) versus IDK1-Gruppe (CK14)

#### 5.4.5 IDK1 vs. Kontrollgruppe - Vergleichbarer Effekt auf die Differenzierung von OK

Abbildung 21 zeigt den Vergleich der Summe differenzierter Osteoklasten nach Zugabe des BSP-Antikörpers IDK1 mit der Kontrollgruppe, welcher lediglich MEM mit M-CSF zugegeben wurde. Bei Durchführung des Mann-Whitney U-Tests ergab sich mit  $n=18$  und  $p=0,820$  kein statistisch signifikantes Ergebnis. Die Auswertung des Tests wies darauf hin, dass es tendenziell keinen signifikanten Unterschied der Osteoklastendifferenzierung in der IDK1-Gruppe und der Kontrollgruppe gab.

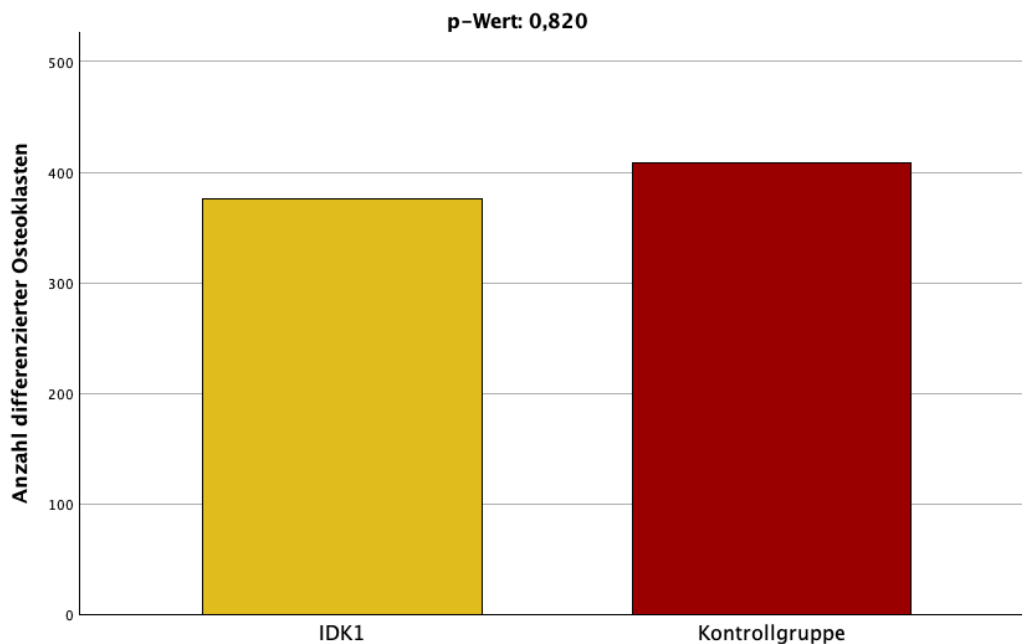


Abbildung 21: Vergleich der Summe differenzierter Osteoklasten in der IDK1- und Kontrollgruppe (MEM + M-CSF)

#### 5.4.6 RANKL/BSP vs. Kontrollgruppe - Erhöhte Differenzierung durch RANKL/BSP

Bei der Auswertung der Ergebnisse der Co-Kulturen war der Vergleich von RANKL bzw. BSP zur Kontrollgruppe für die Entscheidung der Annahme oder Ablehnung der Nullhypothese besonders wichtig. Bereits das Balkendiagramm in Abbildung 22 zeigt den Vergleich der Summen der jeweiligen Gruppen und lässt die Vermutung zu, dass die Zugabe von BSP oder RANKL eine höhere Differenzierungsrate zur Folge hat als die alleinige Zugabe von Nährmedium. Diese Annahme konnte durch den Mann-Whitney U-Test bestätigt werden. Dabei war der Test der RANKL- gegen die Kontrollgruppe mit  $n=18$  und einem p-Wert von 0,01 statistisch signifikant. Ebenso der Vergleich der BSP-Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe ergab bei einem  $n=18$  und  $p=0,005$  ein statistisch signifikantes Ergebnis. Zusammenfassend ließ sich ein signifikanter Unterschied der Testuntergruppen RANKL und BSP zur Kontrollgruppe feststellen.

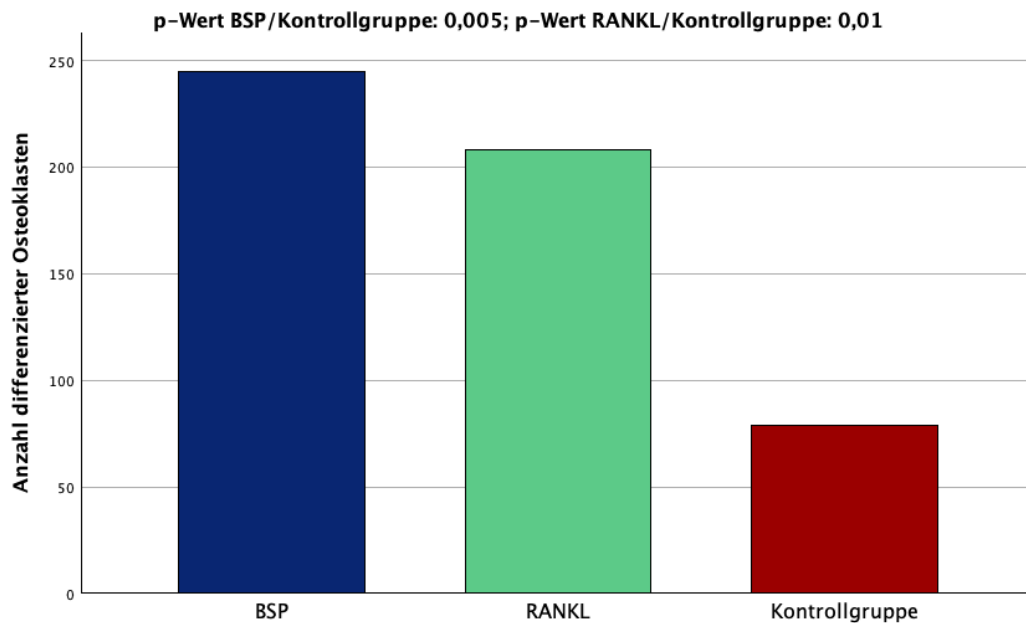


Abbildung 22: Balkendiagramm zum Vergleich der RANKL- und BSP-Gruppe zur Kontroll-Gruppe (MEM/Differenzierungs-MEM + M-CSF)

Nach Analyse der gezählten Osteoklasten, zum einen in den Testuntergruppen mit RANKL und BSP und zum anderen in der Kontrollgruppe, konnte die Nullhypothese  $H_0$  im Rahmen der statistischen Auswertung abgelehnt und die Alternativhypothese  $H_1$  angenommen werden. BSP und RANKL zeigten tendenziell einen höheren Einfluss auf die Entwicklung von Makrophagen zu Osteoklasten als der BSP-Antikörper IDK1, welcher diese eher hemmte. Gleichmaßen konnte in den Gruppen BSP und RANKL ein statistisch signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe verzeichnet werden. Bei Betrachtung der Ergebnisse der Testgruppe, schien die Bindung von BSP an Osteoklasten eine ähnlich starke Wirkung wie RANKL auf deren Differenzierung zu haben.

#### 5.4.7 0,4 $\mu$ m vs. 8 $\mu$ m Inserts - Gleichwertiger Effekt beider Porengrößen

Innerhalb der Test- und Kontrollgruppe wurde neben Zugabe verschiedener Substanzen und Nährmedien zwischen zwei Inserts mit 0,4 $\mu$ m und 8 $\mu$ m Porengröße unterschieden. Im 0,4 $\mu$ m-Insert befindliche Osteoblasten konnten die Poren nicht passieren, wodurch nur Botenstoffe in die Wells zu den Osteoklasten gelangten. Im Insert mit 8 $\mu$ m Poren konnten Osteoblasten durch Abwanderung in die Wells direkten Zell-Zell-Kontakt mit den Osteoklasten eingehen und dadurch Botenstoffe transmittieren. Bereits die Auswertung der zwei Gruppen mittels Balkendiagramm in Abbildung 23 zeigt, dass sich die Summe differenzierter Osteoklasten kaum unterscheidet (1309 Zellen bei 0,4 $\mu$ m versus 1295 Zellen bei 8 $\mu$ m). Im Mann-Whitney

U-Test wurde der Vergleich der Inserts in der BSP-Gruppe (CK 9, 10, 11) und der IDK1-Gruppe (CK 12, 13, 14) getrennt durchgeführt. Weder in der BSP-Gruppe ( $p=0,843$ ;  $n=24$ ) noch in der IDK1-Gruppe ( $p=0,242$ ;  $n=24$ ) konnte eine Signifikanz ermittelt werden. Zusammenfassend lässt das die Vermutung zu, dass sich die zentralen Tendenzen der Zellzahlen von  $0,4\mu\text{m}$ -Inserts und  $8\mu\text{m}$ -Inserts nicht unterscheiden.

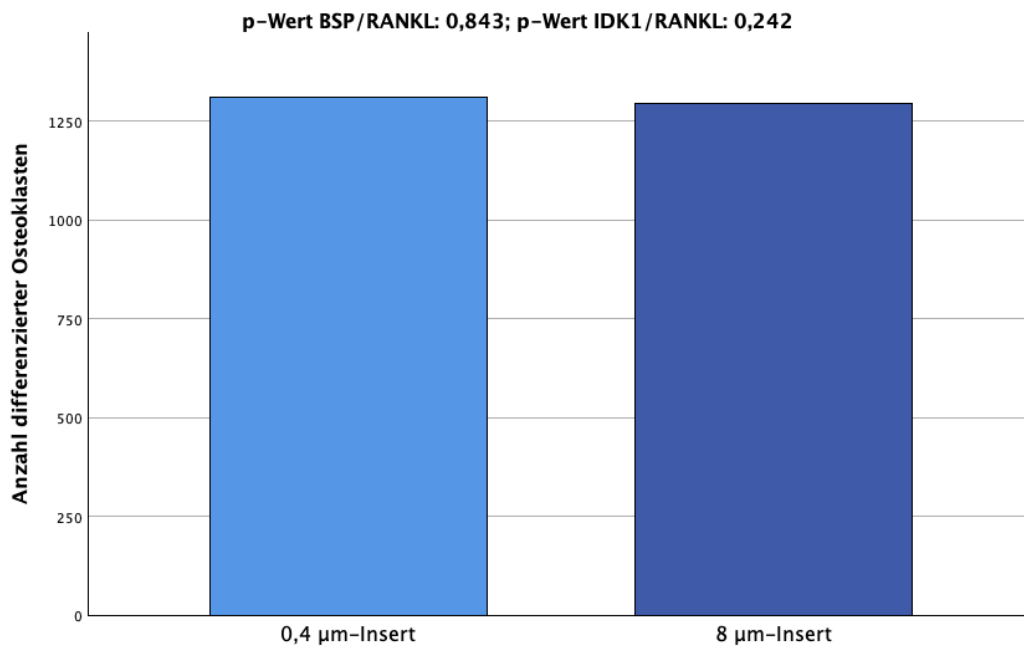


Abbildung 23: Balkendiagramm zur Darstellung der Gesamtsumme gezählter Osteoklasten in Wells mit  $0,4$  oder  $8$  Mikrometer Inserts

#### 5.4.8 MEM vs. Differenzierungs-MEM - Vergleichbarer Effekt beider Nährmedien

In den Kontrollgruppen aller Co-Kulturen wurde zwischen normalem Nährmedium und einem Differenzierungsnährmedium, das die Differenzierung der Osteoblasten begünstigt, unterschieden. Abbildung 24 zeigt die Summe differenzierter Osteoklasten beider Gruppen, wobei 395 Zellen im Differenzierungsmedium und 436 Zellen im normalen Nährmedium gezählt wurden. Die statistische Auswertung erfolgte getrennt in den BSP- (CK 9, 10, 11) und IDK1-Co-Kulturen (12, 13, 14) mittels Mann-Whitney U-Test. In der BSP- als auch in der IDK1-Gruppe war das Ergebnis von Differenzierungsnährmedium gegenüber dem normalen Nährmedium mit  $p=0,485$  und  $n=12$  nicht signifikant. Dies führte zur Annahme, dass sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen ermitteln ließ.



Abbildung 24: Balkendiagramm zur Unterscheidung der Zellzahlen differenzierter Osteoklasten bei Verwendung von Differenzierungsnährmedium und normalem Nährmedium in der Kontrollgruppe

### 5.4.9 Deskriptive Statistik aller Gruppen

Aufgrund mehrerer Faktoren, die das Zellwachstum und die Differenzierung beeinflussen, wiesen die Co-Kulturen 9 bis 14 unterschiedlich hohe Zellzahlen auf. Diese Parameter werden in den Kapiteln 6.1 und 6.2 diskutiert. Tabelle 5 gibt einen Überblick über Maßzahlen der deskriptiven Statistik aller vergleichbarer Gruppen. Dabei ist die Auflistung von Standardabweichung, Varianz und Mittelwerten der erhobenen Daten nicht sinnvoll.

Tabelle 5: Übersicht der deskriptiven Statistik aller Test- und Kontrollgruppen

	Test- gruppe	Kontroll- gruppe	BSP	RANKL (BSP-Gruppe)	IDK1	RANKL (IDK1-Gruppe)	MEM	Diff.-MEM	8µm Inserts	0,4µm Inserts	
Median	41,00	9,50	21,50	22,00	50,50	79,00	5,00	20,00	20,00	19,00	
Minimum	3	1	12	9	3	16	1	3	3	1	
Maximum	442	190	115	72	207	442	190	140	442	311	
Perzentile	25	13,00	4,25	15,00	10,50	9,75	16,75	4,00	6,00	8,50	6,00
	50	41,00	9,50	21,50	22,00	50,50	79,00	5,00	20,00	20,00	19,00
	75	73,50	29,25	73,00	72,00	91,50	343,75	26,75	31,50	67,25	68,75

## **6 Diskussion**

### **6.1 Diskussion von Zellkulturkomponenten und -reagenzien**

#### **6.1.1 Aus Buffy Coats isolierte Monozyten**

Bei der Herstellung von Erythrozyten- und Thrombozytenkonzentraten aus Vollblutspenden werden Leukozyten zur Steigerung der Verträglichkeit und Haltbarkeit des Blutprodukts entfernt. Buffy Coats sind dabei die Nebenprodukte, die im Rahmen der Blutspende anfallen und eine erhöhte Konzentration an Leukozyten enthalten (83). In vielen Arbeiten werden Osteoklasten unter Einsatz von RANKL und M-CSF aus Vorläuferzellen aus Buffy Coats erzeugt, da die Gewinnung von Osteoklasten aus Knochen möglich, aber umständlich und wenig ergiebig ist. Diese einfache Methode der Gewinnung von Osteoklasten für experimentelle Zwecke birgt jedoch den Nachteil der hohen Variabilität der Spendermonozyten (50).

In ihrer Übersichtsarbeit „Pattern of human monocyte subpopulations in health and disease“ gehen Ozanska et al. auf die phänotypisch und funktionell unterschiedlichen Subpopulationen von Monozyten im menschlichen Körper ein. Bei dieser Einteilung in klassisch, intermediär und nicht-klassisch spielen die Expression der Zelloberflächenantigene CD14 und CD16 und die Zytokinproduktion eine entscheidende Rolle. Die anteilige Zusammensetzung der drei Subgruppen im menschlichen Organismus ist je nach Erkrankungen und Alter sehr individuell (84). Zusammenfassend wird in der oben genannten Arbeit ausgeführt, dass die Funktion, die Menge und der Phänotyp von Monozyten abhängig von krankheits- und altersspezifischen Faktoren im Laufe des Lebens sehr unterschiedlich sein können. Aufgrund der Variabilität der Spendermonozyten aus Buffy Coats sind qualitative Unterschiede bezüglich des Zellwachstums und der Differenzierung zu Osteoklasten in den durchgeführten Experimenten anzunehmen.

#### **6.1.2 Zellzahl und Ratio**

Neben der Isolierung und Ansaat der benötigten Zellarten in Monokultur ist die Zellzahl pro Well und somit das Verhältnis (Ratio) der zwei Zellarten zueinander ein wichtiger Parameter für das Gelingen der Co-Kultur. Wie im Kapitel 2.2.1 beschrieben, unterscheiden sich die in der Literatur verwendeten Ratios von Arbeit zu Arbeit stark und reichen von 1:1500 bis 1:1. Aus diesem Grund wurde in Vorexperimenten die optimale Ratio OC:OB ermittelt. Die Tabelle 6 zeigt die vier getesteten Ratios, von welchen sich das Verhältnis von 50.000 Makrophagen pro Well zu 25.000 Osteoblasten pro Insert aufgrund der besten Osteoklastendifferenzierung durchgesetzt hat. In der Arbeit von Jolly et al. zur Optimierung der Osteoblasten-Osteoklasten-Co-Kultur wird die Ratio von 1:2 (OC:OB) ebenfalls als vielversprechend beschrieben (51).

Tabelle 6: Testung verschiedener Ratios und Zellzahlen

Co-Kultur	Ratio	Zellzahl	Outcome
1	1:14	50.000 Osteoblasten/Insert 700.000 Makrophagen/Well	-
2 + 4	1:4	25.000 Osteoblasten/Insert 100.000 Makrophagen/Well	-
3	1:40	25.000 Osteoblasten/Insert 1.000.000 Makrophagen/Well	-
5-14	1:2	25.000 Osteoblasten/Insert 50.000 Makrophagen/Well	+

Ein weiterer wichtiger Punkt in Bezug auf Zellzahl ist die Methodik der Zellzählung. In den oben genannten Experimenten wurde ein automatisiertes Zellzählgerät verwendet. Der Nachteil der automatisierten im Vergleich zur manuellen Zellzählung besteht darin, dass die Zellmorphologie zum Teil durch das Gerät nicht eindeutig identifiziert werden kann, was zu Fehlern in der Zellerkennung führen kann. Trotz einiger Mängel wie z.B. des erhöhten Zeitaufwandes und der fehlenden Wiederholbarkeit gilt die manuelle Zählmethode der Neubauer-Zählkammer nach wie vor als Goldstandard und sollte in nachfolgenden Experimenten als Zellzählmethode erwogen werden (85).

### 6.1.3 Nährmedium und Zusatzsubstanzen

Neben Zellzahl und Zellratio ist die Wahl des Nährmediums entscheidend für das Wachstum, die Differenzierung und das Überleben der Zellen in einer Co-Kultur. Dabei besteht die Schwierigkeit darin, den Anforderungen beider Zellarten gerecht werden zu müssen. Im Rahmen von Vorexperimenten wurde, wie in 4.3.3 beschrieben, eine Nährmediumsstudie durchgeführt, wobei Osteoklasten in MEM die größte Zelldichte und -viabilität erreichten (siehe 5.1). Die literarische Grundlage für die Auswahl von Basismedium und Zusatzstoffen wird in 2.2.1 erläutert.

Die osteogenen Zusätze Dexamethason und  $\beta$ -Glycerophosphat, welche für die Differenzierung von Osteoblasten dem Nährmedium beigefügt werden, hemmen nachweislich die Differenzierung von Monozyten zu Osteoklasten (86). Bei der statistischen Auswertung der Kontrollgruppe konnte in den Experimenten dieser Arbeit kein signifikanter Unterschied der

Summe differenzierter Osteoklasten in normalem Nährmedium und Differenzierungsmedium detektiert werden (siehe 5.4.8).

Die Zugabe von fetalem Kälberserum (FCS, FBS) zum Nährmedium ist stark umstritten, allerdings seit Theodore Pucks Entdeckung 1958 gängige Praxis. FCS wird aus dem Serum ungeborener Kälberfeten von im zweiten und dritten Trimenon trächtigen Schlachtkühen gewonnen. Jährlich werden etwa 800.000 Liter produziert, was 2.000.000 Feten entspricht. Neben ethischen Vorbehalten in Bezug auf das Tierwohl birgt die Verwendung von FCS in der Zellkultur weitere Nachteile: Die genaue Zusammensetzung von FCS ist unbekannt und jede Charge saisonaler und geografischer Variabilität unterworfen. Dies kann zu unbeabsichtigten Wechselwirkungen mit Testsubstanzen und damit zu verfälschten Zellkulturergebnissen führen. Zudem bestehen erhebliche Bedenken in Bezug auf das Infektionsrisiko von Laborpersonal durch Endotoxine, Mykoplasmen, viralen Kontaminanten und Prionproteinen. Derzeit wird der Einsatz serum-, protein- und xenofreier Medien bereits an mehreren Zellarten getestet. Dabei hat sich gezeigt, dass die Umstellung auf FBS-freie Zellkulturen keine negativen Auswirkungen sowohl auf Zellkultursysteme sowie Studienergebnisse hat (87). Da in den Experimenten dieser Arbeit durchgehend dieselbe Charge FCS verwendet wurde, sind Unterschiede in der Zusammensetzung unwahrscheinlich. Jedoch sollte dieser Aspekt bei zukünftigen an diese Studie anknüpfenden Versuchen bedacht werden.

Ein wichtiger nicht zu unterschätzender Parameter in der Zellkultur ist das Volumen an verwendetem Nährmedium. Die Nährstoffversorgung, die Konzentration der Abfallprodukte, der Sauerstoffgehalt, sowie die Konzentration des Zellsekretoms, einschließlich löslicher Faktoren und extrazellulärer Vesikel zur Zellkommunikation sind in hohem Maße von der Menge des hinzugefügten Mediums abhängig. Diese Aspekte beeinflussen wiederum die Proliferation und Differenzierung der Zellen (86). Yoshimura et al. haben im Rahmen einer In-vitro-Studie die Auswirkung des Mediumvolumens auf die Differenzierung von Osteoblasten und Osteoklasten in Co-Kulturen erforscht. Hierbei verhielt sich die Fläche der gemessenen Mineralablagerungen umgekehrt proportional zur Menge an Nährmedium (0,4, 0,6, 0,8, 1,0, 1,5 oder 2,0 ml/Well in einer 24-Well-Platte), obwohl die ALP-Aktivität der Osteoblasten keine Unterschiede aufwies. In diesem Kontext wurde außerdem nachgewiesen, dass die Gesamtzahl der TRAP-positiven, mehrkernigen Osteoklasten mit zunehmenden Mediumvolumina abnahm. Im Gegensatz dazu stieg die Anzahl großer, osteoklastischer, TRAP-positiver Zellen ( $\geq 8$  Kerne) mit Zunahme des Volumens (88). In den Experimenten dieser Arbeit wurde ein Nährmediumvolumen von 500  $\mu$ l gewählt.

#### **6.1.4 Inserts**

Für die Etablierung eines 2D-Co-Kultur-Systems wurde in den oben beschriebenen Experimenten ein „Transwell-System“ ausgewählt, das Inserts mit den Porengrößen 0,4 µm und 8 µm beinhaltet. Die Porengröße von 8 µm ermöglicht die Migration der Osteoblasten im Insert in den Bereich der am Well-Boden befindlichen Makrophagen/Osteoklasten und vice versa und somit den direkten Zell-Zell-Kontakt sowie Stoffaustausch über Gap-Junctions. Bei einer Porengröße von 0,4 µm handelt es sich um zwei getrennte Zellsysteme, in welchen der Austausch parakriner Signalstoffe über das Nährmedium möglich ist (89). Honma et al. führten Ko-Kulturen von Osteozyten und Osteoklastenvorläuferzellen durch, wobei eine feinporige Membran zur physischen Trennung der beiden Zelltypen verwendet wurde. Die Ergebnisse zeigten, dass die Effizienz der Osteoklastenbildung durch den fehlenden Zell-Zell-Kontakt zwischen den Zellpopulationen deutlich reduziert war (59, 90). Aufgrund der Uneinigkeit in der Literatur bezüglich der Verwendung von Inserts in 2D-Co-Kulturen, wurden in dieser Studie zwei unterschiedliche Porengrößen (0,4 µm und 8 µm) verwendet. Bei der statistischen Auswertung ergab der Vergleich beider Insertgruppen keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Summe differenzierter Osteoklasten (siehe 5.4.7).

## **6.2 Diskussion der Methodik**

Die Anlage einer Co-Kultur aus Osteoblasten und Makrophagen/Osteoklasten ist ein komplexer und mehrschrittiger Prozess. Im Rahmen eines solchen Experiments gibt es viele Parameter, wie z.B. die Wahl des Nährmediums, das Verhältnis der Zellarten zueinander oder die Dauer der Kultur bis zur Analyse des Endpunktes von denen das Gelingen abhängig ist. Manche dieser Parameter sind beeinflussbar und können in Vorexperimenten optimiert werden. Andere wie z.B. die Variabilität von Spendermonozyten und Nährmedium sind nur schwer veränderbar und müssen als mögliche Störfaktoren hingenommen werden. Um dennoch das Gelingen und die Reproduzierbarkeit der Co-Kultur gewährleisten zu können, wurde der aktuelle Stand der Forschung mit den Ergebnissen von Vorexperimenten vereint. Die Problematik dabei ist die mangelnde Standardisierung der Methodik in vorausgegangenen Studien zu Osteoblasten-Osteoklasten-Co-Kulturen. Daraus resultieren viele verschiedene Herangehensweisen an funktionell verwandte Experimente (50).

### **6.2.1 Fehlerquellen bei der Isolierung und Kultivierung von Monozyten aus peripherem Blut**

Da die Isolierung und Kultivierung von Monozyten/Makrophagen deutlich komplexer und fehleranfälliger als die der Osteoblasten ist, wird in der Diskussion der Methodik ein

besonderes Augenmerk auf die Monozytenkultur gelegt. Die Isolierung von PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells) aus Buffy Coats erfolgte nach dem in 4.3.1 beschriebenen Schema. Die Grundlage dafür findet sich im Artikel „Generation of Human Osteoclasts from Peripheral Blood“ von Henriksen et al. und in einem Protokoll der Firma Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG (81, 82). Bei der Anlage eines Ficoll-Dichtegradienten kommt es aufgrund der unterschiedlichen Dichte der Blutzellen zur Aufspaltung des Blutes in seine Zell- und Flüssigkeitsbestandteile. Hierbei entsteht folgende Schichtung: Eine Plasma-, PBMC-, Histopaque- und Erythrozyten-Granulozyten-Schicht (siehe Abbildung 7, Seite 25).

Bereits bei der Auflagerung des Blut-Puffer-Gemisches auf das Ficoll-Histopaque-Dichtemedium kann es zur partiellen Vermischung der zwei Phasen kommen, was zur späteren Kontamination der aufgetrennten Schichten mit Erythrozyten, Granulozyten und Thrombozyten führt. Nach Abziehen und drei- bis viermaliger Reinigung der Zellen mit PBS werden die PBMC inklusive verunreinigender Zellen ausgesät. Diese Kontamination kann eine oxidative Stressreaktion und Zellschädigung der Monozyten und somit fehlerhafte Ergebnisse in nachfolgenden Experimenten zur Folge haben. Um Verunreinigungen mit roten Blutkörperchen zukünftig vorzubeugen, gibt es die Möglichkeit der Vorbehandlung des Blutes mit einem Erythrozyten-Lyse-Puffer oder die Durchführung eines zweiten Zentrifugationsdurchgangs (91).

Das Vorgehen bei der Isolierung von Monozyten aus humanem sowie tierischem Vollblut ist in vielen Arbeiten ähnlich bis identisch. Es unterscheiden sich jedoch in Publikationen die relative Zentrifugalbeschleunigung und Zentrifugationszeit des Dichtegradienten im Rahmen der Monozytenisolierung erheblich. Dabei variieren die Werte der Relative Centrifugal Force (RCF) von 400 bis zu 900 xg für 15 bis 30 Minuten (79, 81, 82, 92). In den Experimenten dieser Arbeit wurde mit einer RCF von 800 xg über 20 min zentrifugiert. Wird eine zu hohe Zentrifugalbeschleunigung gewählt, ist eine Schädigung von Zellmembran und -organellen möglich, was zu einer verkürzten Lebenszeit der Zellen führen kann. Eine zu niedrige Zentrifugalbeschleunigung bedingt eine verminderte Sedimentation und Phasenbildung, wodurch es zu Verlust von Zellen im Überstand kommt (93). Da für die oben beschriebenen Experimente eine moderate Zentrifugalbeschleunigung (800 xg über 20 min) gewählt wurde, ist eine erhebliche Zellschädigung eher unwahrscheinlich. Allerdings fehlen klare und einheitliche Empfehlungen zu diesem Aspekt.

Bei der Isolierung von Monozyten aus Buffy Coats mit Hilfe eines Ficoll-Gradienten ist einzig die PBMC-Phase für das weitere Vorgehen von Interesse. Diese Schicht besteht jedoch nur zu 10-30% aus Monozyten und zu 70-90% aus Lymphozyten, welche deren Differenzierung beeinflussen können (94). Chometon et al. haben in ihrer Arbeit „A protocol for rapid monocyte isolation and generation of singular human monocyte derived dendritic cells“ drei verschiedene Methoden zur Reinigung von Monozyten getestet. Dabei setzte sich die magnetische

Separation der Lymphozyten mit Antikörper-beschichteten „Mikro-Beads“ durch, welche eine Viabilität der Monozyten von über 95 % sowie einen signifikanten Lymphozytenrückgang zur Folge hatte (95). Zur Optimierung der Monozytenisolation sollten Reinigungsverfahren der Phase mononuklearer Zellen in Erwägung gezogen werden.

Da die Recherche zur Zelldichte bei Monozyten-Monokulturen vorwiegend Ergebnisse zur Aussaat auf 96-Well-Platten ergab, wurde zu deren Ermittlung eine Studie für 75cm<sup>2</sup>-Nährböden durchgeführt (siehe 4.3.4). Die beste Zelldichte erreichte dabei der Ansatz mit 3 Millionen Zellen pro 75cm<sup>2</sup>.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass das Gelingen der Isolation von Monozyten aus peripherem Blut von verschiedenen Parametern (Verunreinigung, Zentrifugation) abhängig ist und damit mehreren Fehlerquellen unterliegen kann. Trotz des bestehenden Potenzials zur Optimierung dieser Vorgehensweise stellt die Anlage eines Ficoll-Dichtegradienten ein kostengünstiges und zuverlässiges Verfahren der Monozytenisolation dar.

### **6.2.2 Isolierung und Kultivierung von Osteoblasten aus humanen Knochen**

Die bei unfallchirurgischen und orthopädischen, operativen Eingriffen anfallenden (meist femoralen oder humeralen) Knochenreste von Patienten wurden für die Isolation von Osteoblasten verwendet. Die zuständige Ethikkommission stimmte der Verwendung des Knochenmaterials nach Einholen des Einverständnisses der Knochenspender vor der Operation im Rahmen einer umfassenden Aufklärung zu.

Die Extraktion der Knochenzellen erfolgte nach Vorlage eines hauseigenen SOP, welches an das Verfahren im Kapitel „Isolation and Generation of Osteoblasts“ von Perpétuo et al. in „Bone Research Protocols“ angelehnt ist und in 4.3.2 detailliert beschrieben wird (76).

Bei der Isolation von Osteoblasten aus Knochen stehen grundlegend drei verschiedene Prozedere zur Verfügung: Auswuchskulturen aus Knochenbiopsien, enzymatische Isolationen und Auswuchskulturen mit enzymatischer Vorbehandlung (96). Reine Auswuchskulturen haben den Nachteil der Kontamination mit anderen Zelltypen, wohingegen enzymatische Isolationen homogenere Zellpopulationen hervorbringen. Da die enzymatische Isolation sehr komplex ist und oft mit einer hohen Anzahl apoptotischer Zellen einhergeht, sind vorwiegend Auswuchskulturen mit enzymatischer Vorbehandlung das Mittel der Wahl. Diese Vorgehensweise vereint die Vorteile der rein enzymatischen und reinen Auswuchskultur und wurde in dieser Arbeit zur Isolation von Osteoblasten gewählt (97).

Die Aussaat und Monokultur der humanen Osteoblasten auf 75 cm<sup>2</sup> Nährböden erfolgte, wie in 4.3.2 beschrieben, nach hauseigenem SOP mit 13.333 Zellen/cm<sup>2</sup> in DMEM als Nährmedium.

### 6.2.3 Vorgehen bei der Anlage der Co-Kulturen

Die unter 4.3.5 beschriebenen Anlage einer Co-Kultur aus Osteoblasten und Makrophagen wurde aufgrund der inkohärenten Datenlage in vergangenen Arbeiten zu diesem Thema teilweise neu ausgearbeitet. Wie Tabelle 7 zeigt, wurden vor Durchführung der Haupt-Co-Kulturen 9 bis 14 mehrere Vorversuche zur Ausarbeitung und Optimierung getestet. Im Rahmen dieser Vorexperimente konnten verschiedene Parameter variiert und damit ein funktionsfähiges Co-Kulturschema konzipiert werden.

In der ersten Co-Kultur wurden, wie in „Optimization of the Static Human Osteoblast/Osteoclast Co-culture System“ von Jolly et al. beschrieben, die frisch isolierten Monozyten direkt auf einen 24-Well-Nährboden mit Osteoblasten in 0,4 µm und 8 µm Inserts ausgesät (51). Bei der Analyse der Osteoklastenformation an Tag 20 waren die Zellen in schlechtem Zustand und es konnte keine Mehrkernigkeit beobachtet werden. In den darauffolgenden Experimenten wurden Osteoblasten und Monozyten/Makrophagen daher zur verbesserten Proliferation und Differenzierung zunächst in einer Monokultur gezüchtet, bevor an Tag 10-11 mit der Co-Kultur begonnen wurde.

Tabelle 7: Modifikation und Optimierung der Co-Kultur-Parameter in den Vorexperimenten (CK1-8) und in den Hauptexperimenten (CK9-14)

	Co-Kultur	Zeit Monokultur bis Co-Kultur	Dauer Co-Kultur	Ratio OB:OC	OB	OC	Inserts	Nährmedium	Testsubstanzen
Vor-experimente	Co-Kultur 1	0 Tage (direkt CK)	20 Tage	1:14	5x10 <sup>4</sup> /Insert	7x10 <sup>5</sup> /Well	0,4 µm, 8 µm	DMEM, Diff.-DMEM	M-CSF
	Co-Kultur 2	10 Tage	10 Tage	1:4	2,5x10 <sup>4</sup> /Insert	1x10 <sup>5</sup> /Well	3 µm, 8 µm	DMEM, Diff.-DMEM	M-CSF, RANKL
	Co-Kultur 3	10 Tage	10 Tage	1:40	2,5x10 <sup>4</sup> /Insert	1x10 <sup>6</sup> /Well	8 µm	MEM, Diff.-MEM	M-CSF, RANKL
	Co-Kultur 4 (Transwell + direkt)	10 Tage	10 Tage	1:4	2,5x10 <sup>4</sup> /Insert 1x10 <sup>4</sup> /Well direkt	1x10 <sup>5</sup> /Well 5x10 <sup>4</sup> /Well direkt	3 µm	MEM, Diff.-MEM	M-CSF, RANKL, BSP
	Co-Kultur 5-8	10 Tage	10 Tage	1:2	2,5x10 <sup>4</sup> /Insert	5x10 <sup>4</sup> /Well	0,4 µm, 8 µm	MEM, Diff.-MEM	M-CSF, RANKL, BSP
Haupt-experimente	Co-Kultur 9-11	11 Tage	10 Tage	1:2	2,5x10 <sup>4</sup> /Insert	5x10 <sup>4</sup> /Well	0,4 µm, 8 µm	MEM, Diff.-MEM	M-CSF, RANKL, BSP
	Co-Kultur 12-14	11 Tage	10 Tage	1:2	2,5x10 <sup>4</sup> /Insert	5x10 <sup>4</sup> /Well	0,4 µm, 8 µm	MEM, Diff.-MEM	M-CSF, RANKL, IDK1

Die Anzahl von Osteoblasten zu Osteoklasten und deren Ratio wurde, wie in 2.2.1 bzw. 6.1.2 beschrieben, mehrfach abgewandelt, wobei ein Verhältnis von  $2,5 \times 10^4$  Osteoblasten zu  $5 \times 10^4$  Osteoklasten die besten Ergebnisse in der Osteoklastendifferenzierung zeigte.

Im Rahmen der Nährmediumstudie (siehe 4.3.3) wurden aufgrund der uneinheitlichen Datenlage früherer Publikationen (siehe 2.2.1) fünf verschiedene Nährmedien anhand von Monozyten-Makrophagen-Monokulturen getestet. Das beste Zellwachstum konnte hierbei unter Zugabe von MEM erreicht werden.

Bei der Anlage der Co-Kulturen 1 bis 8 (Tag 10) konnte eine Verdrängung der Makrophagen an den Rand der Wells während des Einfüllens der Osteoblasten samt Medium in die Inserts beobachtet werden. Da dies zu einer ungleichen Verteilung und erschwerten Analyse (Tag 20) der Osteoklasten führte, wurden die Makrophagen bereits an Tag 10 in die Wells ausgesät und an Tag 11 mit den Osteoblasten zur Co-Kultur zusammengeführt (CK9-14).

In der Literatur gibt es außerdem stark variierende Zeitspannen von Beginn der Co-Kultur bis zur Analyse der Osteoklastenformation. Hierbei wurden beispielsweise 6, 14 oder 28 Tage je nach Co-Kultur-Modell gewählt (98-100). Munmun et al. führten in ihrem Experiment der Transwell-Co-Kultur aus mesenchymalen Stammzellen und Monozyten eine 9-tägige Co-Kultur durch (101). In dieser Arbeit wurde eine Zeitspanne von 10 Tagen bis zur Färbung und Zählung der Osteoklasten gewählt.

Der Zeitraum der Kultivierung der Co-Kultur bis zur Auswertung der Osteoklastenformation variiert in verschiedenen Arbeiten von 6 bis 28 Tage je nach Co-Kulturmodell (98-100). Abbildung 25 zeigt den Ablauf des endgültigen Co-Kultur-Modells, welches die Grundlage für die Etablierung der Co-Kultur von Makrophagen und Osteoblasten an der Universitätsmedizin Mainz darstellen soll.

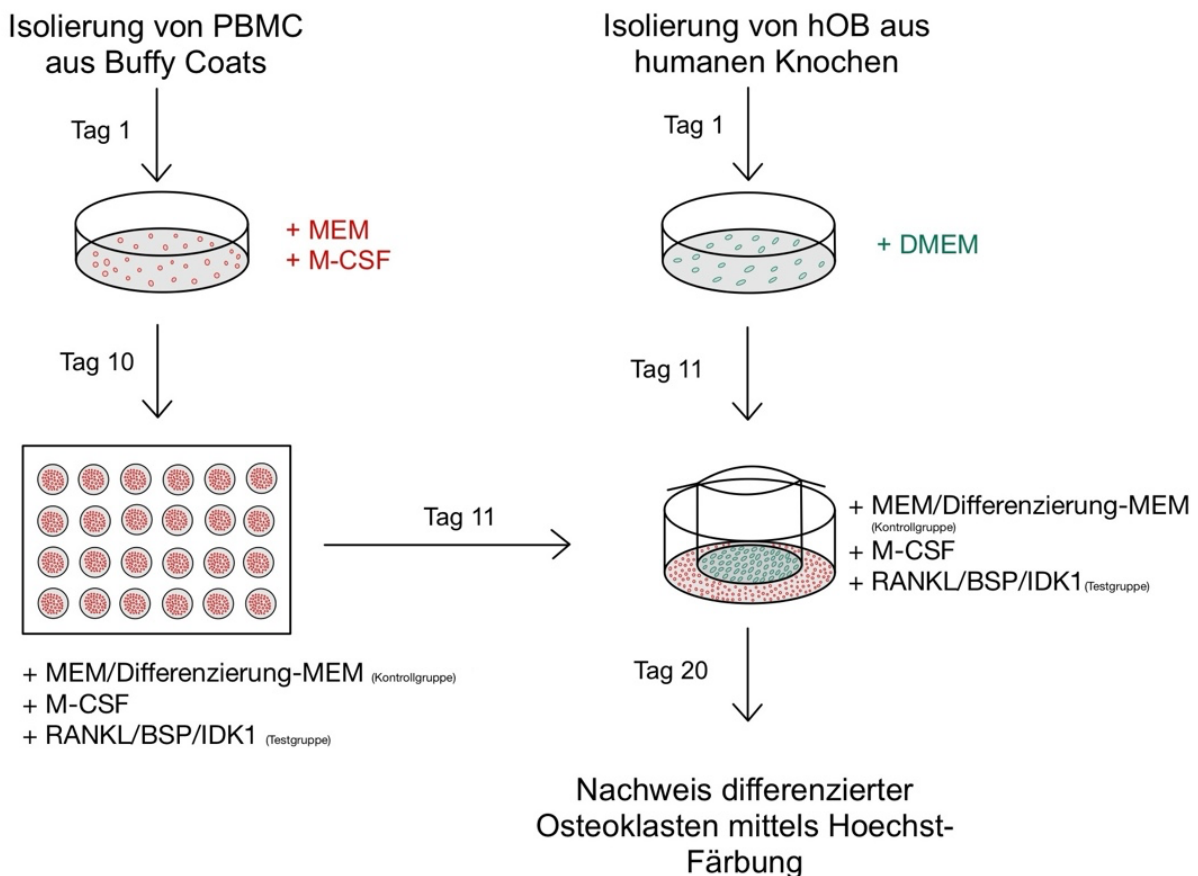


Abbildung 25: Schematische Darstellung der Zeitabläufe der neu ausgearbeiteten Anlage von Mono- und Co-Kulturen in dieser Arbeit

#### 6.2.4 Vorgehen bei der Analyse der Osteoklastenformation

Die Mehrkernigkeit von reifen Osteoklasten basiert auf der Verschmelzung mehrerer Osteoklastenvorläuferzellen zu Synzytien und ist daher ein wichtiges Unterscheidungsmerkmal zu einkernigen Präosteoklasten oder Makrophagen. Zwar geht man davon aus, dass RANKL und BSP beim Prozess der Multinukleation eine entscheidende Rolle spielen, dennoch ist die Fusion äußerst komplex und bis heute nicht vollends verstanden (102). In der Literatur gibt es unterschiedliche Aussagen zur Definition der Mehrkernigkeit bei reifen Osteoklasten: Einige Quellen legen die Anzahl der Zellkerne in reifen Osteoklasten auf  $\geq$  drei fest, wohingegen andere eine Einteilung in kleine ( $\leq$  5-10 Nuclei) und große ( $\geq$  10 Nuclei) Osteoklasten vornehmen (103-106). In Bezug auf die Anzahl der Nuclei weisen große Osteoklasten mit einer hohen Anzahl von Kernen eine höhere Knochenresorptionsaktivität auf als kleinere Osteoklasten (107).

Eine Möglichkeit der Visualisierung und Quantifizierung von Zellkernen ist die Anfärbung der Zellkerne bzw. der DNA mit Hoechst 33342 oder DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol). Die blau

fluoreszierenden Nuclei sind sodann unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar und können ausgezählt werden (108, 109). In den Co-Kultur-Experimenten dieser Arbeit wurden Zellkerne mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes Hoechst 33342 angefärbt und anschließend die Anzahl mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert, wobei Zellen mit mehr als zwei Nuclei als Osteoklasten gewertet wurden (siehe 4.3.6 und 4.3.7).

Darüber hinaus kann die Bildung des lytischen Enzyms Tartrat-resistente saure Phosphatase (TRAP) als Nachweis für die abgeschlossene Differenzierung zum reifen Osteoklasten fungieren und ermöglicht durch dessen Detektion die Analyse der Osteoklastenformation (siehe 2.1.3). Laut Remmers et al. werden meistens pNPP-basierte (Di-Natrium-4-nitrophenylphosphat Hexahydrat) Methoden zur TRAP-Messung angewandt, wobei pNPP durch die Phosphatase zu einer messbaren Verbindung umgesetzt wird. Alternativ können Naphthol-basierte Techniken oder Immunoenzymatische Assays (ELISA), welche eine erhöhte Spezifität für die osteoklastentypische TRAP-Isoform 5b aufweisen, verwendet werden. PNPP-basierte Verfahren zeichnen sich durch ihre einfache Handhabung und geringen Kosten aus, während immunoenzymatische Nachweismethoden eine höhere Empfindlichkeit und Spezifität bieten und nicht auf die intrinsische enzymatische Aktivität von ALP und TRAP angewiesen sind (50).

Zusätzlich kann die Expression osteoklastenspezifischer Proteine wie Cathepsin K, TRAcP und MMP9 durch Western Blotting von Lysaten untersucht werden, um die Osteoklastenaktivität zu bewerten (82). Um die Enzymaktivität der OC in zukünftigen Tests messbar zu machen, sollte neben dem Nachweis der Mehrkernigkeit durch die Hoechst-Färbung auch die TRAP-Analyse in Betracht gezogen werden.

Während in dieser Studie die Analyse der Osteoklasten im Mittelpunkt steht, sollte in zukünftigen Experimenten der Untersuchung der Osteoblasten als Co-Kulturpartner mehr Aufmerksamkeit gewidmet werden. In den beschriebenen Versuchen wurde die Ausprägung der GFP-fluoreszierenden Osteoblasten mittels Fluoreszenzmikroskopie an Tag 20 der Co-Kultur bewertet. Die knochenspezifische Isoform der alkalischen Phosphatase (bALP) gibt direkten Hinweis auf die Osteoblastenaktivität. Diese kann analog zum TRAP-Nachweis durch Umsatz eines kolorimetrisches oder fluorogenen Substrats gemessen werden (50). In diesem Zusammenhang wäre der Vergleich der osteoblastischen ALP-Aktivität bei der Verwendung von normalem Nährmedium und Differenzierungsmedium besonders interessant.

### **6.3 Diskussion der Ergebnisse**

Im Fokus dieser Arbeit steht die Etablierung einer Co-Kultur von Osteoblasten und Makrophagen, die unter dem Einfluss von verschiedenen Signalstoffen, Inserts (0,4 µm und 8 µm) sowie Nährmedien (MEM, Differenzierungs-MEM) durchgeführt wird. Ziel der

Untersuchungen ist es, die Osteoklastogenese quantitativ zu erfassen. Hierzu wurden nach einer 10-tägigen Co-Kultur der Test- und Kontrollgruppen die mehrkernigen Osteoklasten nach Hoechst-Färbung fotografisch dokumentiert und gezählt (vgl. Kapitel 4.3.6 und 4.3.7). Im Mittelpunkt der Arbeit steht vor allem die Analyse der Unterschiede bei der Zugabe osteoklastogener Stoffe wie BSP und RANKL sowie differenzierungshemmender Stoffe wie der BSP-Antikörper IDK1.

Die Grundlage für die Durchführung der Experimente sind dabei folgende Forschungsfrage und -hypothesen, wobei IDK1 bei der Formulierung der Hypothesen aufgrund des tendenziell hemmenden Einflusses des BSP-Antikörpers auf die Osteoklastendifferenzierung nicht berücksichtigt wurde:

Hat die Zugabe der verwendeten Substanzen (RANKL, BSP) in der Testgruppe einen stärkeren Einfluss auf die Osteoklastendifferenzierung im Vergleich zur Kontrollgruppe, in der keine Zugabe erfolgte?

Daraus ließen sich die Nullhypothese  $H_0$  und die Alternativhypothese  $H_1$  formulieren:

$H_0$ : Die Anzahl differenzierter Osteoklasten ist mit und ohne Zugabe von BSP und RANKL gleich.

$H_1$ : Die Anzahl differenzierter Osteoklasten bei Zugabe von BSP und RANKL unterscheidet sich von der Zellzahl in Co-Kulturen, welchen keine dieser Substanzen zugegeben wurde.

### **6.3.1 Stärkerer osteoklastogener Effekt in Test- gegenüber Kontrollgruppe**

Der Vergleich von Test- und Kontrollgruppe in dieser Arbeit dient einerseits dazu, einen Überblick über die Gesamtheit der erhobenen Daten zu gewinnen und andererseits die statistische Verteilung der Osteoklastenzahlen zu demonstrieren (siehe 5.4.1). Bei der reinen Gegenüberstellung der Anzahl gezählter Osteoklasten der beiden Gruppen fällt die klare Überlegenheit der Testgruppe mit 1773 Osteoklasten gegenüber der Kontrollgruppe mit 831 Osteoklasten auf. Dabei muss bedacht werden, dass die Testgruppe Daten von Co-Kulturen mit Zugabe differenzierungsfördernden (BSP, RANKL) und differenzierungshemmenden (IDK1) Signalstoffen umfasst. Trotz des hemmenden Einflusses von IDK1 lässt sich zusammenfassend feststellen, dass die Anzahl differenzierter Osteoklasten in den Co-Kulturen mit BSP, RANKL oder BSP-Antikörpern höher ist als in der Kontrollgruppe, welcher keine dieser Substanzen zugesetzt wurde. Gerade aus diesem Grund ist die Überlegenheit der Testgruppe umso eindrucksvoller. Wegen dieser Heterogenität der Daten der Testgruppe wurden die verschiedenen Untergruppen in den Kapiteln 5.4.2 bis 5.4.6 gezielt miteinander verglichen.

### **6.3.2 Erhöhte Osteoklastendifferenzierung durch BSP oder RANKL**

Durch die Bindung von RANKL an den Transmembranrezeptor RANK wird eine Signalkaskade in Gang gesetzt, welche die Differenzierung von Osteoklasten, die Förderung der resorptiven Funktion und das Überleben reifer Osteoklasten zur Folge hat (siehe 2.2.2). Wie bereits in der Literaturdiskussion (Kapitel 2.2.2) dargelegt, spielt außerdem BSP eine entscheidende Rolle in Bezug auf die Osteoklastogenese: Das Protein der SIBLING-Gruppe hat Einfluss auf die Aktivierung, Zellmigration, Proliferation und Ausbildung des Zytoskeletts von Osteoklasten, wobei es zudem die Osteoblastenreifung induziert. Der Mangel an RANKL oder BSP wurde im Tiermodell anhand von Knockout-Mäusen getestet und führte in beiden Fällen zu einer verschlechterten Knochenqualität (64, 67).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen deutlich den osteoklastogenen Effekt des Zusatzes beider Proteine in der Testgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe, in der sie nicht enthalten waren. Daher konnte nach der statistischen Auswertung der Anzahl differenzierter Osteoklasten in den Testuntergruppen mit RANKL, BSP und der Kontrollgruppe mittels signifikanter Ergebnisse im Mann-Whitney U-Test die Nullhypothese  $H_0$  abgelehnt und die Alternativhypothese  $H_1$  angenommen werden (siehe 5.4.6). Das bedeutet, dass sowohl RANKL als auch BSP in Co-Kulturen aus Osteoblasten und Makrophagen unabhängig voneinander die Osteoklastendifferenzierung stärker fördern als eine Kultivierung ohne diese Signalstoffe.

### **6.3.3 Äquivalenter Effekt von BSP und RANKL**

Beim Vergleich der RANKL- und BSP-Gruppe konnten ähnliche Differenzierungsraten der Osteoklasten beobachtet werden, was einen vergleichbar starken Effekt auf die Osteoklastogenese vermuten lässt (siehe 5.4.2). Außerdem wird diese Tendenz durch das Ergebnis des durchgeführten Mann-Whitney U-Test unterstrichen.

Die Wirkweise und Rolle von RANKL in Bezug auf die Osteoklastenreifung ist bereits sehr gut erforscht. Die Aktivierung des RANK-Rezeptors durch RANKL führt zu einem Anstieg des intrazellulären Kalziums und löst über den Kalzium-Kalzineurin-Signalweg die Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren aus, wodurch die zuvor genannten Effekte auf die Osteoklastenfunktion vermittelt werden. Im Gegensatz dazu ist über die Funktion und Wirkweise des nicht-kollagenen Knochenproteins BSP noch vieles im Unklaren. Es ist jedoch bekannt, dass BSP über seine Arginin-Glycin-Aspartat-Sequenz (RGD) an das Integrin  $\alpha v \beta 3$  in Osteoklasten bindet und diese aktiviert, was u.a. zu einer kalziumgetriggerten Steigerung der Resorption von Knochengewebe führt (3). Das Ergebnis des Effekts von BSP im Vergleich zu RANKL in den Experimenten dieser Arbeit zeigt jedoch einen äquivalenten Einfluss der beiden Signalstoffe auf die Osteoklastendifferenzierung in Co-Kulturen aus Makrophagen und

Osteoblasten. Valverde et al. beschreiben die Wirkung von BSP und RANKL als synergistisch, wobei BSP die Fähigkeit der Induktion der Knochenresorption von RANKL erhöht. Für zukünftige Versuche wäre es daher interessant, die Wirkung beider Proteine im Vergleich zur Zugabe eines einzelnen Proteins zu untersuchen.

#### **6.3.4 Hemmung von BSP mittels IDK1-Antikörper**

IDK1 ist ein monoklonaler Ratten-Antikörper gegen tumorassoziiertes Bone-Sialoprotein, welcher wegen seiner therapeutischen Anwendungsmöglichkeiten bei Skelettmetastasen von Brustkrebs besonders im Fokus steht und im Kapitel 2.2.2 genauer beschrieben wird. Bei der statistischen Gegenüberstellung der Ergebnisse von RANKL- und IDK1-Gruppe zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Osteoklastendifferenzierung, was den fördernden Einfluss von RANKL und den hemmenden Einfluss des BSP-Antikörpers IDK1 unterstreicht. Im Balkendiagramm der Abbildung 20 werden die ausgezählten Osteoklasten der CK 9 unter Zugabe von BSP und die der CK 14 unter Zugabe von IDK1 dargestellt (siehe 5.4.4). Dabei lässt sich eine klare Überlegenheit von BSP gegenüber dem BSP-Antikörper IDK1 bezüglich des primären Endpunktes feststellen.

Der humane, monoklonale Anti-RANKL-Antikörper Denosumab ist unter anderem Bestandteil der Therapie von Osteoporose mit erhöhtem Frakturrisiko und der Therapie von Skelettmetastasen im Rahmen einer Krebserkrankung. Er verhindert durch die Bindung von RANKL dessen Aktivierung des Rezeptors RANK an der (Prä-/) Osteoklastenoberfläche. Daraus erfolgt eine Reduktion der Differenzierung, Funktion und des Überlebens von Osteoklasten und die damit verbundene Knochenresorption (110). In Anlehnung an diesen Mechanismus könnte ein vergleichbarer Effekt bei der Hemmung von BSP durch den BSP-Antikörper IDK1 erwartet werden.

Zusammenfassend kann die Frage, ob IDK1 den Effekt von BSP auf die Osteoklastendifferenzierung hemmen kann, nicht abschließend beantwortet werden und sollte in zukünftigen Experimenten näher erforscht werden.

### **6.4 Fazit und weitere Forschungsanstöße**

Ziel der Versuche dieser Arbeit war es, eine Co-Kultur bestehend aus Osteoblasten und Makrophagen an der Universitätsmedizin Mainz zu etablieren, anhand welcher insbesondere der Einfluss der Signalstoffe BSP, IDK1 und RANKL im Hinblick auf die Osteoklastendifferenzierung untersucht werden konnte. Durch die Zusammenführung der Erkenntnisse aus der Literatur sowie eigener Vorversuche konnte erfolgreich ein funktionierendes und reproduzierbares Co-Kulturmodell entwickelt werden:

Nach Isolierung von Monozyten und Osteoblasten werden diese zunächst jeweils in Monokultur gezüchtet. Am Tag 10 der Monokultur werden die Monozyten auf 24-Well-Platten mit einer Dichte von  $5 \times 10^4$ /Well unter Verwendung von MEM als Nährmedium ausgesät. Außerdem werden die differenzierungsfördernden Signalstoffe M-CSF sowie RANKL oder BSP zugegeben, wobei RANKL und BSP einen äquivalenten Effekt aufweisen (siehe 6.3.3). Am Tag 11 erfolgt die Zugabe von  $2,5 \times 10^4$  Osteoblasten pro Insert in Inserts mit 0,4  $\mu\text{m}$  oder 8  $\mu\text{m}$  Porengröße. Die Co-Kultur wird bis zur Analyse der Osteoklastenformation 10 Tage kultiviert.

Bei Analyse der Daten dieser Arbeit fällt auf, dass die Zugabe von BSP im Vergleich zu RANKL gleichwertige Ergebnisse in der Differenzierung von Osteoklasten erzielt. In der Literatur wurde zudem eine Synergie der Signalstoffe BSP und RANKL und somit ein wechselseitig verstärkender Effekt auf die Knochenresorption durch Osteoklasten beobachtet (3). Um Knochenstoffwechselprozesse besser verstehen zu können, wäre es interessant, diese Synergie in zukünftigen Versuchen im neu etablierten Co-Kulturmodell zu erforschen. Dabei könnte die Zugabe von RANKL- oder BSP-Antikörpern als Kontrollgruppe fungieren, während der Testgruppe RANKL und BSP zugegeben würde.

Ein weiterer zukünftiger Forschungsansatz ist die zielgerichtete Erforschung der Wechselwirkung zwischen BSP und dem BSP-Antikörper IDK1, da die erhobenen Daten der durchgeführten Versuche Tendenzen, jedoch keine eindeutigen Aussagen zulassen. Der Versuchsaufbau könnte hierbei so aussehen, dass BSP zusammen mit IDK1 der Testgruppe und BSP allein der Kontrollgruppe zugegeben werden. Dadurch ließe sich das Ausmaß der Hemmung des BSP-Effektes durch den Antikörper IDK1 untersuchen.

Von besonderem Interesse bei der Grundlagenforschung mit RANKL, BSP und IDK1 ist die Übertragbarkeit der Ergebnisse der Co-Kultur auf die Pathogenese von Knochenerkrankungen wie Osteoporose oder malignen Tumoren mit ossärer Beteiligung. Eine Störung des Gleichgewichts zwischen RANKL und OPG ist erwiesenermaßen ursächlich für das Krankheitsbild der Osteoporose und kann u.a. mit dem Anti-RANKL-Antikörper Denosumab therapiert werden (60, 63, 64). In Anlehnung daran wäre die Erforschung der Hemmung des BSP-Effektes durch BSP-Antikörper in Hinblick auf eine mögliche Therapieoption der Osteoporose erstrebenswert.

Zusätzlich steht eine hohe BSP-Expression bei der ossären Metastasierung maligner Tumore in Korrelation mit einem erhöhten Tumorigrad, wodurch BSP als möglicher Tumormarker dienen kann (71, 72). Da im Rahmen von In-vivo-Experimenten mit Ratten bereits gezeigt werden konnte, dass Tiere mit Mammakarzinom von einer Therapie mit IDK1 profitieren (8 von 10 Ratten), wäre die Erforschung des Effektes von BSP-Antikörpern in Co-Kulturen aus Brustkrebszellen, Osteoblasten und Osteoklasten besonders relevant. Um die Knochenmikroumgebung von Primärtumoren und Metastasen realistischer nachzubilden,

wäre der Einsatz von 3D-Co-Kultursysteme mit Hydrogelen in zukünftigen Experimenten empfehlenswert (80).

## 7 Zusammenfassung

Die vorliegende Dissertation befasst sich mit der Etablierung einer 2D-Co-Kultur aus Osteoblasten und Makrophagen. Besonders im Fokus steht dabei der Einfluss der osteoklastogenen Signalstoffe BSP (Bone Sialoprotein) und RANKL (Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B Ligand) sowie des differenzierungshemmenden BSP-Antikörpers IDK1 auf die Differenzierung von Osteoklastenvorläuferzellen zu Osteoklasten. Ziel der Arbeit ist es, neue Erkenntnisse über die zellulären Interaktionen im Knochenstoffwechsel zu gewinnen und potenzielle therapeutische Ansatzpunkte für die Behandlung von Erkrankungen des Knochenstoffwechsels und Knochenmetastasen zu identifizieren.

Im Rahmen der Versuche konnte ein funktionsfähiges und reproduzierbares Co-Kulturmodell konzipiert werden. Dies sieht nach Isolation von Osteoblasten und Monozyten die zehntägige Monokultur beider Zellarten, gefolgt von der zehntägigen 2D-Transwell-Co-Kultur und anschließender Analyse der Osteoklastenformation mittels Hoechst-Färbung vor. Es wurden insgesamt sechs Co-Kulturen nach identischem Aufbau durchgeführt und ausgewertet.

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten erfolgte mittels Grafiken und Mann-Whitney U-Test, wobei zwischen Test- (Zugabe von RANKL/BSP/IDK1) und Kontrollgruppe (normales und Differenzierungsmedium) sowie den verschiedenen Untergruppen verglichen wurde.

Die experimentellen Ergebnisse zeigen eine signifikante Förderung der Osteoklastendifferenzierung bei Zugabe von BSP oder von RANKL in der Co-Kultur im Vergleich zur Kontrollgruppe. In bisherigen Studien wurde bereits nachgewiesen, dass BSP mit dem Integrin  $\alpha_v\beta_3$  auf der Osteoklastenoberfläche interagiert und deren Differenzierung sowie Aktivität steigert. RANKL aktiviert als Teil des RANKL-RANK-OPG-Systems im Osteoklasten Signalwege und Transkriptionsfaktoren wie z.B.  $\text{NF}\kappa\text{B}$ , welche die Förderung der Differenzierung, der Funktion und des Überlebens reifer Osteoklasten bewirken. Die vorliegenden Daten zeigen außerdem äquivalente osteoklastogene Effekte von BSP und RANKL. Ein weiterer wesentlicher Aspekt dieser Arbeit ist die Untersuchung der Hemmung des BSP-Effektes durch den monoklonalen Antikörper IDK1. Dabei lässt sich ein tendenziell hemmender Effekt des BSP-Antikörpers IDK1 gegenüber BSP bezüglich des primären Endpunktes feststellen.

Zusammenfassend liefert diese Arbeit neue Einblicke in die Rolle von BSP als osteoklastogenen Faktor und dessen Äquivalenz zu RANKL sowie Überlegenheit gegenüber IDK1 bezüglich der Osteoklastendifferenzierung. Die entwickelten Co-Kulturmodelle ermöglichen die Untersuchung der Zell-Zell-Interaktionen im Knochenstoffwechsel und können als Grundlage für zukünftige Studien zur gezielten Hemmung von BSP in metastasierten Tumoren dienen und neue Perspektiven für die Entwicklung therapeutischer Strategien gegen Knochenerkrankungen und knochenmetastasierende Tumore eröffnen.

## 8 Literaturverzeichnis

1. Hart NH NR, Tan J, Rantalainen T, Chivers P, Siafarikas A, Nimphius S. . Biological basis of bone strength: anatomy, physiology and measurement. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2020;1;20(3): S. 347-71.
2. Welsch U, Kummer W, Deller T. *Histologie : Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie : das Lehrbuch.* 6. Auflage ed. München: Elsevier, Urban & Fischer; 2022: S. 136-152.
3. Valverde P, Tu Q, Chen J. BSP and RANKL induce osteoclastogenesis and bone resorption synergistically. *J Bone Miner Res.* 2005;20(9): S. 1669-79.
4. Bartl R, Bartl C. *Klinische Osteologie : Entstehung, Diagnostik, Prävention und Therapie aller Knochenkrankheiten.* 1. Auflage ed. Stuttgart Thieme; 2014: S. 18-35.
5. Florencio-Silva R, Sasso GR, Sasso-Cerri E, Simoes MJ, Cerri PS. *Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells.* *Biomed Res Int.* 2015;2015: S. 17.
6. Hasegawa T, Yamamoto T, Tsuchiya E, Hongo H, Tsuboi K, Kudo A, et al. Ultrastructural and biochemical aspects of matrix vesicle-mediated mineralization. *Jpn Dent Sci Rev.* 2017;53(2): S. 34-45.
7. Hasegawa T, Hongo H, Yamamoto T, Abe M, Yoshino H, Haraguchi-Kitakamae M, et al. Matrix Vesicle-Mediated Mineralization and Osteocytic Regulation of Bone Mineralization. *Int J Mol Sci.* 2022;23(17): S. 15.
8. Murshed M. *Mechanism of Bone Mineralization.* *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2018;8(12).
9. Nair AK, Gautieri A, Buehler MJ. Role of intrafibrillar collagen mineralization in defining the compressive properties of nascent bone. *Biomacromolecules.* 2014;15(7): S. 2494-500.
10. Munoz A, Docaj A, Ugarteburu M, Carriero A. Poor bone matrix quality: What can be done about it? *Current Osteoporosis Reports* 2021;19(5): S. 510-31.
11. Niethard FU, Pfeil J, Biberthaler P. *Orthopädie und Unfallchirurgie.* 9. Auflage ed. Stuttgart: Thieme; 2022: 658 p: S. 146-151.
12. Schünke M, Schulte E, Schumacher U. *Prometheus Lernatlas der Anatomie.* 6. Auflage ed. Stuttgart: Thieme; 2022: 648 p.
13. Hart NH, Newton RU, Tan J, Rantalainen T, Chivers P, Siafarikas A, et al. Biological basis of bone strength: anatomy, physiology and measurement. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2020;20(3): S. 347-71.
14. Chang B, Liu X. Osteon: Structure, Turnover, and Regeneration. *Tissue Eng Part B Rev.* 2022;28(2): S. 261-78.

15. Donsante S, Palmisano B, Serafini M, Robey PG, Corsi A, Riminucci M. From Stem Cells to Bone-Forming Cells. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(8).
16. Ponzetti M, Rucci N. Osteoblast Differentiation and Signaling: Established Concepts and Emerging Topics. *Int J Mol Sci*. 2021;22(13).
17. Amarasekara DS, Kim S, Rho J. Regulation of Osteoblast Differentiation by Cytokine Networks. *Int J Mol Sci*. 2021;22(6).
18. Vimalraj S. Alkaline phosphatase: Structure, expression and its function in bone mineralization. *Gene*. 2020;754: S. 144855.
19. Licini C, Vitale-Brovarone C, Mattioli-Belmonte M. Collagen and non-collagenous proteins molecular crosstalk in the pathophysiology of osteoporosis. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2019;49: S. 59-69.
20. Zhu YS, Mo TT, Jiang C, Zhang JN. Osteonectin bidirectionally regulates osteoblast mineralization. *J Orthop Surg Res*. 2023;18(1): S. 761.
21. Carvalho MS, Cabral JMS, da Silva CL, Vashishth D. Bone Matrix Non-Collagenous Proteins in Tissue Engineering: Creating New Bone by Mimicking the Extracellular Matrix. *Polymers (Basel)*. 2021;13(7).
22. Komori T. Functions of Osteocalcin in Bone, Pancreas, Testis, and Muscle. *Int J Mol Sci*. 2020;21(20).
23. Michigami T. Roles of osteocytes in phosphate metabolism. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022;13: S. 967774.
24. Ding S, Chen Y, Huang C, Song L, Liang Z, Wei B. Perception and response of skeleton to mechanical stress. *Phys Life Rev*. 2024;49: S. 77-94.
25. Wang L, You X, Lotinun S, Zhang L, Wu N, Zou W. Mechanical sensing protein PIEZO1 regulates bone homeostasis via osteoblast-osteoclast crosstalk. *Nat Commun*. 2020;11(1): S. 282.
26. Dedic C, Hung TS, Shipley AM, Maeda A, Gardella T, Miller AL, et al. Calcium fluxes at the bone/plasma interface: Acute effects of parathyroid hormone (PTH) and targeted deletion of PTH/PTH-related peptide (PTHrP) receptor in the osteocytes. *Bone*. 2018;116: S. 135-43.
27. Kim JM, Lin C, Stavre Z, Greenblatt MB, Shim JH. Osteoblast-Osteoclast Communication and Bone Homeostasis. *Cells*. 2020;9(9).
28. McDonald MM, Kim AS, Mulholland BS, Rauner M. New Insights Into Osteoclast Biology. *JBMR Plus*. 2021;5(9): S. e10539.
29. Obermayer-Pietsch B, Schwetz V. Biochemical markers of bone metabolism and their importance. *Z Rheumatol*. 2016;75(5): S. 451-8.
30. Chan WCW, Tan Z, To MKT, Chan D. Regulation and Role of Transcription Factors in Osteogenesis. *Int J Mol Sci*. 2021;22(11).

31. Schott NG, Friend NE, Stegemann JP. Coupling Osteogenesis and Vasculogenesis in Engineered Orthopedic Tissues. *Tissue Eng Part B Rev.* 2021;27(3): S. 199-214.
32. Berendsen AD, Olsen BR. Bone development. *Bone.* 2015;80: S. 14-8.
33. Galea GL, Zein MR, Allen S, Francis-West P. Making and shaping endochondral and intramembranous bones. *Dev Dyn.* 2021;250(3): S. 414-49.
34. Blumer MJF. Bone tissue and histological and molecular events during development of the long bones. *Ann Anat.* 2021;235: S. 151704.
35. Percival CJ, Richtsmeier JT. Angiogenesis and intramembranous osteogenesis. *Dev Dyn.* 2013;242(8): S. 909-22.
36. Ahmad Oryan SM, Amin Bigham-Sadegh Bone Injury and Fracture Healing Biology. *Biomedical and Environmental Sciences.* 2015;28(1): S. 57-71.
37. Marsell R, Einhorn TA. The biology of fracture healing. *Injury.* 2011;42(6): S. 551-5.
38. Bahney CS, Zondervan RL, Allison P, Theologis A, Ashley JW, Ahn J, et al. Cellular biology of fracture healing. *J Orthop Res.* 2019;37(1): S. 35-50.
39. Saul D, Menger MM, Ehnert S, Nussler AK, Histing T, Laschke MW. Bone Healing Gone Wrong: Pathological Fracture Healing and Non-Unions-Overview of Basic and Clinical Aspects and Systematic Review of Risk Factors. *Bioengineering (Basel).* 2023;10(1).
40. Steppe L, Megafu M, Tschaffon-Muller MEA, Ignatius A, Haffner-Luntzer M. Fracture healing research: Recent insights. *Bone Rep.* 2023;19: S. 101686.
41. Gao H, Huang J, Wei Q, He C. Advances in Animal Models for Studying Bone Fracture Healing. *Bioengineering (Basel).* 2023;10(2).
42. Langdahl B, Ferrari S, Dempster DW. Bone modeling and remodeling: potential as therapeutic targets for the treatment of osteoporosis. *Ther Adv Musculoskelet Dis.* 2016;8(6): S. 225-35.
43. Weivoda MM, Bradley EW. Macrophages and Bone Remodeling. *J Bone Miner Res.* 2023;38(3): S. 359-69.
44. Kenkre JS, Bassett J. The bone remodelling cycle. *Ann Clin Biochem.* 2018;55(3): S. 308-27.
45. Tobeiha M, Moghadasian MH, Amin N, Jafarnejad S. RANKL/RANK/OPG Pathway: A Mechanism Involved in Exercise-Induced Bone Remodeling. *Biomed Res Int.* 2020;2020: S. 6910312.
46. Kikyo N. Circadian Regulation of Bone Remodeling. *Int J Mol Sci.* 2024;25(9).
47. Bhardwaj A, Sapra L, Tiwari A, Mishra PK, Sharma S, Srivastava RK. "Osteomicrobiology": The Nexus Between Bone and Bugs. *Front Microbiol.* 2021;12: S. 812466.

48. Wawrzyniak A, Balawender K. Structural and Metabolic Changes in Bone. *Animals (Basel)*. 2022;12(15).
49. Feng X, McDonald JM. Disorders of bone remodeling. *Annu Rev Pathol*. 2011;6: S. 121-45.
50. Remmers SJA, de Wildt BWM, Vis MAM, Spaander ESR, de Vries RBM, Ito K, et al. Osteoblast-osteoclast co-cultures: A systematic review and map of available literature. *PLoS One*. 2021;16(11): S. e0257724.
51. Jolly JJ, Chin K-Y, Farhana MFN, Alias E, Chua KH, Hasan WNW, et al. Optimization of the Static Human Osteoblast/Osteoclast Co-culture System. 2018. Contract No.: 2.
52. Halloran DR, Heubel B, MacMurray C, Root D, Eskander M, McTague SP, et al. Differentiation of Cells Isolated from Human Femoral Heads into Functional Osteoclasts. *J Dev Biol*. 2022;10(1).
53. Ibanez L, Nacher-Juan J, Terencio MC, Ferrandiz ML, Alcaraz MJ. Osteostatin Inhibits M-CSF+RANKL-Induced Human Osteoclast Differentiation by Modulating NFATc1. *Int J Mol Sci*. 2022;23(15).
54. Lacey DC, Achuthan A, Fleetwood AJ, Dinh H, Roiniotis J, Scholz GM, et al. Defining GM-CSF- and macrophage-CSF-dependent macrophage responses by in vitro models. *J Immunol*. 2012;188(11): S. 5752-65.
55. Ushach I, Zlotnik A. Biological role of granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) on cells of the myeloid lineage. *J Leukoc Biol*. 2016;100(3): S. 481-9.
56. Maciel GBM, Maciel RM, Danesi CC. Bone cells and their role in physiological remodeling. *Mol Biol Rep*. 2023;50(3): S. 2857-63.
57. Anwar A, Sapra L, Gupta N, Ojha RP, Verma B, Srivastava RK. Fine-tuning osteoclastogenesis: An insight into the cellular and molecular regulation of osteoclastogenesis. *J Cell Physiol*. 2023;238(7): S. 1431-64.
58. Marks JSC, Wojtowicz A, Szperl M, Urbanowska E, Mackay CA. Administration of Colony Stimulating Factor-1 Corrects Some Macrophage, Dental, and Skeletal Defects in an Osteopetrotic Mutation (Toothless, tl) in the Rat. *Bone*. 1992;13: S. 89-93.
59. De Leon-Oliva D, Barrena-Blazquez S, Jimenez-Alvarez L, Fraile-Martinez O, Garcia-Montero C, Lopez-Gonzalez L, et al. The RANK-RANKL-OPG System: A Multifaceted Regulator of Homeostasis, Immunity, and Cancer. *Medicina (Kaunas)*. 2023;59(10).
60. Yasuda H. Discovery of the RANKL/RANK/OPG system. *J Bone Miner Metab*. 2021;39(1): S. 2-11.

61. Ikebuchi Y, Aoki S, Honma M, Hayashi M, Sugamori Y, Khan M, et al. Coupling of bone resorption and formation by RANKL reverse signalling. *Nature*. 2018;561(7722): S. 195-200.
62. Rashid S, Wilson SG, Zhu K, Walsh JP, Xu J, Mullin BH. Identification of Differentially Expressed Genes and Molecular Pathways Involved in Osteoclastogenesis Using RNA-seq. *Genes (Basel)*. 2023;14(4).
63. Chen X, Wang Z, Duan N, Zhu G, Schwarz EM, Xie C. Osteoblast-osteoclast interactions. *Connect Tissue Res*. 2018;59(2): S. 99-107.
64. Cheng CH, Chen LR, Chen KH. Osteoporosis Due to Hormone Imbalance: An Overview of the Effects of Estrogen Deficiency and Glucocorticoid Overuse on Bone Turnover. *Int J Mol Sci*. 2022;23(3).
65. Casimiro S, Vilhais G, Gomes I, Costa L. The Roadmap of RANKL/RANK Pathway in Cancer. *Cells*. 2021;10(8).
66. Tye CE, Hunter GK, Goldberg HA. Identification of the type I collagen-binding domain of bone sialoprotein and characterization of the mechanism of interaction. *J Biol Chem*. 2005;280(14): S. 13487-92.
67. Bouleffour W, Juignet L, Bouet G, Granito RN, Vanden-Bossche A, Laroche N, et al. The role of the SIBLING, Bone Sialoprotein in skeletal biology - Contribution of mouse experimental genetics. *Matrix Biol*. 2016;52-54: S. 60-77.
68. Boudiffa M, Wade-Gueye NM, Guignandon A, Vanden-Bossche A, Sabido O, Aubin JE, et al. Bone sialoprotein deficiency impairs osteoclastogenesis and mineral resorption in vitro. *J Bone Miner Res*. 2010;25(12): S. 2669-79.
69. Chen JK, Shapiro HS, Wrana JL, Reimers S, Heersche JN, Sodek J. Localization of bone sialoprotein (BSP) expression to sites of mineralized tissue formation in fetal rat tissues by in situ hybridization. *Matrix*. 1991;11(2): S. 133-43.
70. Kriegel A, Schlosser C, Habeck T, Dahmen C, Gotz H, Clauder F, et al. Bone Sialoprotein Immobilized in Collagen Type I Enhances Bone Regeneration In vitro and In vivo. *Int J Bioprint*. 2022;8(3): S. 591.
71. Chai X, Yinwang E, Wang Z, Wang Z, Xue Y, Li B, et al. Predictive and Prognostic Biomarkers for Lung Cancer Bone Metastasis and Their Therapeutic Value. *Front Oncol*. 2021;11: S. 692788.
72. Wang L, Song L, Li J, Wang Y, Yang C, Kou X, et al. Bone sialoprotein- $\alpha$ v $\beta$ 3 integrin axis promotes breast cancer metastasis to the bone. *Cancer Sci*. 2019;110(10): S. 3157-72.
73. Zepp M, Kovacheva M, Altankhuyag M, Westphal G, Berger I, Gather KS, et al. IDK1 is a rat monoclonal antibody against hypoglycosylated bone sialoprotein with application

- as biomarker and therapeutic agent in breast cancer skeletal metastasis. *J Pathol Clin Res.* 2018;4(1): S. 55-68.
74. Tu Q, Zhang J, Fix A, Brewer E, Li YP, Zhang ZY, et al. Targeted overexpression of BSP in osteoclasts promotes bone metastasis of breast cancer cells. *J Cell Physiol.* 2009;218(1): S. 135-45.
75. Keller F, Bruch R, Clauder F, Hafner M, Rudolf R. Extracellular Matrix Components Regulate Bone Sialoprotein Expression in MDA-MB-231 Breast Cancer Cells. *Cells.* 2021;10(6).
76. Perpétuo IP, Bourne LE, Orriss IR, Rucci N, Zallone A, Teti A. *Bone Research Protocols.* 3 ed. New York: Humana New York, NY; 2019: 670 p: S. 3-21, 21-39, 71-99.
77. Zhu S, Ehnert S, Rouss M, Haussling V, Aspera-Werz RH, Chen T, et al. From the Clinical Problem to the Basic Research-Co-Culture Models of Osteoblasts and Osteoclasts. *Int J Mol Sci.* 2018;19(8).
78. Sieberath A, Della Bella E, Ferreira AM, Gentile P, Eglin D, Dalgarno K. A Comparison of Osteoblast and Osteoclast In Vitro Co-Culture Models and Their Translation for Preclinical Drug Testing Applications. *Int J Mol Sci.* 2020;21(3).
79. Borciani G, Montalbano G, Baldini N, Vitale-Brovarone C, Ciapetti G. Protocol of Co-Culture of Human Osteoblasts and Osteoclasts to Test Biomaterials for Bone Tissue Engineering. *Methods Protoc.* 2022;5(1).
80. Borciani G, Montalbano G, Baldini N, Cerqueni G, Vitale-Brovarone C, Ciapetti G. Co-culture systems of osteoblasts and osteoclasts: Simulating in vitro bone remodeling in regenerative approaches. *Acta Biomater.* 2020;108: S. 22-45.
81. Unbekannt. Isolation of mononuclear cells from human peripheral blood by density gradient centrifugation. 2008: [2 p.]. Available from: [https://static.miltenyibiotec.com/asset/150655405641/document\\_octemlbg1d3b395nto9qdj5b48?content-disposition=inline](https://static.miltenyibiotec.com/asset/150655405641/document_octemlbg1d3b395nto9qdj5b48?content-disposition=inline).
82. Henriksen K, Karsdal MA, Taylor A, Tosh D, Coxon FP. Generation of human osteoclasts from peripheral blood. *Bone Research Protocols.* 816. 2011/12/02 ed2012. p. 159-75.
83. Sachs UJH, Bux J. *Transfusionsmedizin und Immunhämatologie: Grundlagen – Therapie – Methodik;* 2010: S. 223–243.
84. Ozanska A, Szymczak D, Rybka J. Pattern of human monocyte subpopulations in health and disease. *Scand J Immunol.* 2020;92(1): S. e12883.
85. Zhang M, Gu L, Zheng P, Chen Z, Dou X, Qin Q, et al. Improvement of cell counting method for Neubauer counting chamber. *J Clin Lab Anal.* 2020;34(1): S. e23024.
86. Vis MAM, Ito K, Hofmann S. Impact of Culture Medium on Cellular Interactions in in vitro Co-culture Systems. *Front Bioeng Biotechnol.* 2020;8: S. 911.

87. van der Valk J, Bieback K, Buta C, Cochrane B, Dirks WG, Fu J, et al. Fetal Bovine Serum (FBS): Past - Present - Future. *ALTEX*. 2018;35(1): S. 99-118.
88. Yoshimura Y, Kikuri T, Hasegawa T, Matsuno M, Minamikawa H, Deyama Y, et al. How much medium do you use for cell culture? Medium volume influences mineralization and osteoclastogenesis in vitro. *Mol Med Rep*. 2017;16(1): S. 429-34.
89. Chung HH, Mireles M, Kwarta BJ, Gaborski TR. Use of porous membranes in tissue barrier and co-culture models. *Lab Chip*. 2018;18(12): S. 1671-89.
90. Honma M, Ikebuchi Y, Kariya Y, Hayashi M, Hayashi N, Aoki S, et al. RANKL subcellular trafficking and regulatory mechanisms in osteocytes. *J Bone Miner Res*. 2013;28(9): S. 1936-49.
91. Fuss IJ, Kanof ME, Smith PD, Zola H. Isolation of whole mononuclear cells from peripheral blood and cord blood. *Curr Protoc Immunol*. 2009;Chapter 7: S. 7.1-7.18.
92. Mitry RR, Hughes RD. *Human Cell Culture Protocols*; 2012: 433 p.
93. Sharifian Gh M, Norouzi F. Guidelines for an optimized differential centrifugation of cells. *Biochem Biophys Rep*. 2023;36: S. 101585.
94. Kleiveland CR. Peripheral Blood Mononuclear Cells. In: Verhoeckx K, Cotter P, Lopez-Exposito I, Kleiveland C, Lea T, Mackie A, et al., editors. *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models*. Cham (CH)2015. p. 161-7.
95. Chometon TQ, Siqueira MDS, Sant Anna JC, Almeida MR, Gandini M, Martins de Almeida Nogueira AC, et al. A protocol for rapid monocyte isolation and generation of singular human monocyte-derived dendritic cells. *PLoS One*. 2020;15(4): S. e0231132.
96. Ansari S, Ito K, Hofmann S. Cell Sources for Human In vitro Bone Models. *Curr Osteoporos Rep*. 2021;19(1): S. 88-100.
97. Zizkova R, Hedvicakova V, Blahnova VH, Sovkova V, Rampichova M, Filova E. The Effect of Osteoblast Isolation Methods from Adult Rats on Osteoclastogenesis in Co-Cultures. *Int J Mol Sci*. 2022;23(14).
98. Schmid F, Kleinhans C, Schmid F, Kluger P. Osteoclast Formation within a Human Co-Culture System on Bone Material as an In Vitro Model for Bone Remodeling Processes. *Journal of Functional Morphology and Kinesiology*. 2018;3(1).
99. Steller D, Scheibert A, Sturmheit T, Hakim SG. Establishment and validation of an in vitro co-culture model for oral cell lines using human PBMC-derived osteoclasts, osteoblasts, fibroblasts and keratinocytes. *Sci Rep*. 2020;10(1): S. 16861.
100. Schulze S, Wehrum D, Dieter P, Hempel U. A supplement-free osteoclast-osteoblast co-culture for pre-clinical application. *J Cell Physiol*. 2018;233(6): S. 4391-400.
101. Munmun F, Witt-Enderby PA. Mesenchymal Stem Cell and Monocyte Co-cultures. *Methods Mol Biol*. 2022;2550: S. 353-64.

102. Kodama J, Kaito T. Osteoclast Multinucleation: Review of Current Literature. *Int J Mol Sci.* 2020;21(16).
103. Diepenhorst NA, Nowell CJ, Rueda P, Henriksen K, Pierce T, Cook AE, et al. High throughput, quantitative analysis of human osteoclast differentiation and activity. *Anal Biochem.* 2017;519: S. 51-6.
104. Hulley PA, Knowles HJ. A New Method to Sort Differentiating Osteoclasts into Defined Homogeneous Subgroups. *Cells.* 2022;11(24).
105. Lees RL, Heersche JN. Differences in regulation of pH(i) in large ( $\geq 10$  nuclei) and small ( $\leq 5$  nuclei) osteoclasts. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2000;279(3): S. C751-61.
106. Manolson MF, Yu H, Chen W, Yao Y, Li K, Lees RL, et al. The  $\alpha 3$  isoform of the 100-kDa V-ATPase subunit is highly but differentially expressed in large ( $\geq 10$  nuclei) and small ( $\leq 5$  nuclei) osteoclasts. *J Biol Chem.* 2003;278(49): S. 49271-8.
107. Takito J, Nakamura M. Heterogeneity and Actin Cytoskeleton in Osteoclast and Macrophage Multinucleation. *Int J Mol Sci.* 2020;21(18).
108. Lemma S, Sboarina M, Porporato PE, Zini N, Sonveaux P, Di Pompo G, et al. Energy metabolism in osteoclast formation and activity. *Int J Biochem Cell Biol.* 2016;79: S. 168-80.
109. Panczel A, Nagy SP, Farkas J, Jakus Z, Gyori DS, Mocsai A. Fluorescence-Based Real-Time Analysis of Osteoclast Development. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9: S. 657935.
110. Hanley DA, Adachi JD, Bell A, Brown V. Denosumab: mechanism of action and clinical outcomes. *Int J Clin Pract.* 2012;66(12): S. 1139-46.

## 9 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin, die mich während dieser Arbeit mit großer fachlicher Expertise, Geduld und wertschätzender Unterstützung begleitet hat. Ihre wissenschaftliche Anleitung, ihr Vertrauen und ihre konstruktiven Impulse waren entscheidend für das Gelingen dieser Dissertation.

Meinem Partner danke ich von Herzen für seine liebevolle Begleitung, seinen unermüdlichen Rückhalt und seine Geduld in allen Phasen dieses Projekts. Seine Unterstützung war für mich eine große Stütze – fachlich wie emotional.

Ein aufrichtiger Dank gilt meinen Eltern, die mir mit ihrer beständigen Zuversicht, ihrer Fürsorge und ihrer Unterstützung den Weg geebnet haben – nicht nur während dieser Arbeit, sondern auf meinem gesamten bisherigen Weg.

Ebenso danke ich meinen Freundinnen und Freunden, die mich durch Gespräche, Aufmunterung und Ablenkung in den richtigen Momenten begleitet haben. Eure Geduld, euer Verständnis und euer Glaube an mich bedeuten mir viel.

## 10 Tabellarischer Lebenslauf

### AUSBILDUNG

10/2020 - 03/2025	<b>Labor des Zentrums für Orthopädie und Traumatologie der Universitätsmedizin Mainz</b> Experimentelle Doktorarbeit (Grundlagenforschung)
04/2018 - 11/2024	<b>Johannes-Gutenberg-Universität Mainz</b> Studium der Humanmedizin
09/2014 - 08/2017	<b>Helios Amper-Klinikum Dachau</b> Ausbildung zur Operationstechnischen Assistentin

### ERFAHRUNG

04/2022 - 04/2023	<b>Radiomed – Gemeinschaftspraxis für Radiologie und Nuklearmedizin</b> Studentische Mitarbeiterin am MRT
10/2020 - 04/2022	<b>Deutsche Stiftung Organtransplantation (DSO)</b> Arbeit als Perfusionistin
10/2020 - 11/2021	<b>Labor des Zentrums für Orthopädie und Unfallchirurgie</b> Wissenschaftliche Hilfskraft (Labor)
09/2017 - 03/2018	<b>Helios Amper-Klinikum Dachau</b> Arbeit als operationstechnische Assistentin

<b>FAMULATUREN</b>	03 - 04/2022	<b>Radiologie und Nuklearmedizin</b> Gemeinschaftspraxis Radiomed in Mainz
	09 - 10/2021	<b>Allgemeinmedizin</b> Praxis Dr. med. Anke Rauhut in Hamburg
	03 - 04/2021	<b>Unfall- und Wiederherstellungschirurgie</b> BG-Unfallklinik Murnau
	08 - 09/2020	<b>Anästhesiologie</b> Universitätsmedizin Mainz

<b>PJ</b>	07/2024 - 10/2024	<b>Innere Medizin</b> Universitätsmedizin Mainz
	03/2024 - 06/2024	<b>Urologie</b> Universitätsmedizin Mainz
	11/2023 - 03/2024	<b>Chirurgie</b> GPR Rüsselsheim

### SCHULISCHER WERDEGANG

2011 - 2013	<b>Graf-Rasso-Gymnasium Fürstfeldbruck</b>
2010 - 2011	<b>Sophie-Scholl-Gymnasium München (Einführungsklasse)</b>
2004 - 2010	<b>Orlando-di-Lasso Realschule Maisach</b>
2001 - 2004	<b>Grundschule Maisach</b>
2000 - 2001	<b>Ährenfeldschule Gröbenzell (Grundschule)</b>

### SPRACHEN

Deutsch	●●●●●●	Englisch	●●●●●●
Spanisch	●●●●●●	Französisch	●●●●●●