



universität
wien

DIPLOMARBEIT / DIPLOMA THESIS

Titel der Diplomarbeit / Title of the Diploma Thesis

„Evaluierung neuartiger Biokeramiken auf die
Osteoklastogenese *in vitro*“

verfasst von / submitted by

Vanessa Kiene

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of

Magistra der Pharmazie (Mag. pharm.)

Wien, 2018 / Vienna, 2018

Studienkennzahl lt. Studienblatt /
degree programme code as it appears on
the student record sheet:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt /
degree programme as it appears on
the student record sheet:

Diplomstudium Pharmazie

Betreut von / Supervisor:

Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Oskar Hoffmann

Danksagung

Ich danke Ao. Univ.- Prof. Mag. Dr. Oskar Hoffmann für die Möglichkeit im Rahmen der Diplomarbeit einen interessanten Einblick in die Welt der Forschung erlangt zu haben.

Ein ganz besonderer Dank gilt Frau Mag. Carina Kamleitner, die mir unentwegt als Ansprechpartnerin zur Verfügung stand und immer ein offenes Ohr für all meine Belange hatte. Ihre Informationsbereitschaft und Antworten auf meine Fragen haben mich stets motiviert.

Außerdem möchte ich mich bei Frau Barbara Berger bedanken, durch deren Hilfe und großes Praxiswissen die Durchführung der Experimente erst ermöglicht wurde. Auch Herrn Peter Höflich bin ich zu Dank verpflichtet, der immer ein nettes Wort für mich hatte und eine nette Arbeitsatmosphäre geboten hat.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, die mir stets Rückhalt gaben und in jeder Hinsicht unterstützend zur Seite gestanden sind.

Liste der verwendeten Abkürzungen und Bezeichnungen

α -MEM	α -minimum essential Medium nach Eagle
AK	Antikörper
ANOVA	Varianzanalyse
APS	Ammoniumpersulfat
B1	Kontrollgruppe Knochenplättchen mit M-CSF + RANKL
B2	Kontrollgruppe Knochenplättchen mit M-CSF
BCP	Biphasisches Calciumphosphat
BMP	Knochenmorphogenetisches Protein
BSA	Rinderserumalbumin
BTE	Bone Tissue Engineering
C3a	Complement component 3a
CaCl ₂	Calciumchlorid
CTHRC1	Collagen triple helix repeat containing 1
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DiFMU	6, 8-Difluoro-4-Methylumbelliferyl
DiFMUP	6, 8-Difluoro-4-Methylumbelliferylphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
EfnB2	EphrinB2
EtOH	Ethanol
FCS	fötales Kälberserum
HA	Hydroxylapatit
HCO ₃ ⁻	Hydrogencarbonat
HCl	Salzsäure
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KM	Knochenmark
LAF	Reinraumwerkbank („Laminar Air Flow“)
M-CSF	Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O	Dinatriumhydrogenphosphatdihydrat

NaCl	Natriumchlorid
NaN ₃	Natriumazid
NaOH	Natriumhydroxid
NF- κ B.....	Nuklear Faktor ' κ -Leichtketten Verstärker' von aktivierten B-Zellen
OPG	Osteoprotegerin
P/S	Penicillin/Streptomycin
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
RANK	Rezeptor Aktivator von NF- κ B
RANKL	Rezeptor Aktivator von NF- κ B Ligand
RT	Raumtemperatur
RUNX2	Runt Transkriptionsfaktor 2
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
SEM	Standardfehler
SDS.....	Natriumdodecylsulfat
Sema4D	Semaphorin4D
TC1	Gewebekultur mit M-CSF und RANKL
TC2	Gewebekultur mit M-CSF
β -TCP.....	β -Tricalciumphosphat
TEMED.....	N, N, N, N-Tetramethylethyldiamin
TGF- β	Transformierender Wachstumsfaktor- β
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
TRAP.....	Tartrat-resistente saure Phosphatase
TRAP+ MNCs.....	TRAP Positive Mehrkernige Zellen
Tris	Tris-(hydroxyethyl-)aminoethan
Tween20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	3
Liste der verwendeten Abkürzungen und Bezeichnungen	5
Inhaltsverzeichnis	7
Zielsetzung	9
1 Einleitung	10
2 Material und Methoden	22
2.1 Versuchsaufbau	22
2.2 Biokeramiken	23
2.2.1 Einteilung	23
2.3 Knochenplättchen	24
2.3.1 Verwendete Geräte, Materialien und Reagenzien	24
2.3.2 Durchführung	24
2.4 Zellkultur	25
2.4.1 Verwendete Geräte, Materialien und Reagenzien	25
2.5 Fixieren der Zellen	29
2.5.1 Verwendete Geräte, Materialien und Reagenzien	29
2.5.2 Durchführung	29
2.6 TRAP-Färbung	29
2.6.1 Verwendete Geräte, Materialien und Reagenzien	30
2.6.2 Durchführung	31
2.7 TRAP+ MNCs Zählung	31
2.7.1 Verwendete Geräte, Materialien und Reagenzien	31
2.7.2 Durchführung	32
2.8 TRAP-Aktivität	32
2.8.1 Verwendete Geräte, Materialien und Reagenzien	32
2.8.2 Durchführung	33
2.9 Proteinbestimmung	34
2.9.1 Verwendete Geräte, Materialien und Reagenzien	34
2.9.2 Durchführung	35
2.10 Gelelektrophorese und Western Blot	35
2.10.1 Probenvorbereitung und Elektrophorese	35
2.10.2 Transfer	38
2.10.3 Immundetektion	39
2.11 Statistische Auswertung der Daten	43

3	Ergebnisse	44
3.1	Evaluierung der RANKL-induzierten Osteoklastogenese aus KM-Zellen	44
3.1.1	Ermittlung der Kulturdauer für KM-Kultur mittels TRAP-Färbung	44
3.1.2	Evaluierung des Resorptionsverhaltens von Osteoklasten aus KM-Kultur	45
3.2	Evaluierung des Kulturverhaltens von Osteoklasten auf Biokeramiken	46
3.2.1	Differenzierungs- und Resorptionsverhalten von Osteoklasten aus KM-Kultur auf Biokeramiken	46
3.3	Effekt von Biokeramiken auf die Osteoklastogenese	49
3.3.1	Morphologie TRAP+ Osteoklasten auf Biokeramiken	49
3.3.2	Quantifizierung von TRAP+ Osteoklasten auf Biokeramiken	51
3.3.3	Differenzierungsverlauf von Osteoklasten auf Biokeramiken	52
3.3.4	Resorptionsfähigkeit der Osteoklasten auf Biokeramiken	54
3.3.5	Korrelation der Ergebnisse	56
4	Diskussion und Conclusio	57
5	Zusammenfassung	62
6	Abstract	63
7	Literaturverzeichnis	64
8	Abbildungsverzeichnis	71
9	Tabellenverzeichnis	73
10	Anhang	74

Zielsetzung

Der enorme Anstieg von Knochentransplantationen in den letzten Jahrzehnten und die begrenzte Verfügbarkeit von Knochentransplantaten führte zur Entwicklung einer Vielzahl neuer synthetischer Knochenersatzmaterialien.

Vor allem Calciumphosphat-Keramiken spielen eine große Rolle. Eine wichtige Voraussetzung für eine vollständige Integration eines Ersatzmaterials in den Knochen ist die Fähigkeit des Materials, die Knochenneubildung durch Osteoblasten zu unterstützen. Zusätzlich sollte auch die biologische Abbaubarkeit durch Osteoklasten gegeben sein. Die Aufgabe von Osteoklasten ist aber nicht nur auf die Resorption beschränkt. Die zelluläre Kommunikation von Osteoklasten sezernierten Faktoren, spielt eine wichtige Rolle in der Rekrutierung, Differenzierung und Aktivität von Osteoblasten. Ob, und wie dieser Prozess erfolgt und noch dazu in Verbindung mit Biomaterialien, ist noch nicht vollständig geklärt.

Teil dieser Thematik war es zuerst herauszufinden, ob man Osteoklasten auf den Biomaterialien kultivieren kann. Da die Interaktion zwischen Zellen und Biomaterial eine wichtige Voraussetzung darstellt, sollte die Differenzierungsfähigkeit und das anschließende Resorptionsverhalten von Osteoklasten überprüft werden. Somit war das Ziel dieser Arbeit, die Osteoklastogenese auf verschiedenen neuartigen Biokeramiken *in vitro* zu testen.

1 Einleitung

Der Knochen ist ein hochspezialisiertes Organ, das sich durch seine hohe Festigkeit und Härte als stützendes Gerüst des Körpers auszeichnet. Weitere wichtige Funktionen des Knochens sind der Schutz der inneren Organe, die Blutbildung durch das Knochenmark und die Speicherung von Fett. Außerdem dient er als Depot für Calcium, Wachstumsfaktoren und Zytokine und ist in der Lage diese auch freizusetzen. Das Knochengewebe besteht vor allem aus einer mineralisierten extrazellulären Matrix, welche sich aus einer organischen (30 %) und anorganischen (70 %) Phase zusammensetzt. Die organische Phase besteht hauptsächlich aus Kollagen Typ I, den Knochenzellen sowie nicht-kollagenösen Proteinen einschließlich Osteocalcin, Osteonectin, Osteopontin, Fibronectin, knochenmorphogenetischen Proteinen (BMPs) und Wachstumsfaktoren (Florencio-Silva et al., 2015). Die anorganische Knochenmasse besteht zum Großteil aus Hydroxylapatit, $(\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2)$ (Clarke, 2008).

Das Knochengewebe muss ständig neu gebildet, geformt und repariert werden, um die Knochenstruktur und -funktion im gesunden Körper aufrecht zu halten (Boyle et al., 2003). Diese Vorgänge beruhen auf der korrekten Funktion der zwei wichtigsten Zelltypen des Knochengewebes: Osteoklasten und Osteoblasten, welche die Knochenmatrix ab- und wieder aufbauen. Von den Osteoblasten stammen des Weiteren Osteozyten ab. Ein bedeutender Zelltyp der rund 95 % der Gesamtmenge an Knochenzellen ausmacht und den Knochenumbau reguliert. Sie sind in der gesamten Knochenmatrix eingebettet und können biologische und mechanische Signale registrieren (Capulli et al., 2014).

Osteoblasten entwickeln sich aus pluripotenten mesenchymalen Stammzellen, welche im Knochenmark lokalisiert sind. Diese Zellen haben das Potenzial, sich in Anwesenheit von regulatorischen Transkriptionsfaktoren in Adipozyten, Myozyten, Chondrozyten oder Osteoblasten zu differenzieren. Die Differenzierung wird durch Hormone und Zytokine (transformierender Wachstumsfaktor (TGF- β), knochenmorphogenetisches Protein-2 (BMP-2), BMP-4, BMP-7) und auf Transkriptionsebene, durch RUNX2 (Runt Transkriptionsfaktor 2) gesteuert (Ballanti et al., 1997). Die Hauptaufgaben der Osteoblasten sind die Aktivierung von Osteoklasten, die Produktion von Knochenmatrixproteinen und die Knochenmineralisierung. Osteoblasten umfassen eine vielfältige Population von Zellen. Die Stadien der Osteoblastendifferenzierung beeinflussen auch den funktionellen Beitrag dieser Zellen zum Knochenumbau. Eine Studie von Raggatt (2010) legt nahe, dass unreife Osteoblasten die Osteoklastogenese steuern, während reife Osteoblasten die Matrixproduktion und die Mineralisierungsfunktionen ausführen (Raggatt und Partridge, 2010).

Die „Gegenspieler“ der Osteoblasten sind die aus hämatopoetischen Stammzellen hervorgehenden Osteoklasten. Sie wurden 1873 zum ersten Mal erwähnt und sind als einzige in der Lage, Knochen zu resorbieren (Kölliker, 1873). Bei der Entwicklung und Differenzierung benötigen diese mehrkernigen Zellen vor allem die Zytokine M-CSF und RANKL, welche von Osteoblasten sezerniert werden (Raggatt und Partridge, 2010).

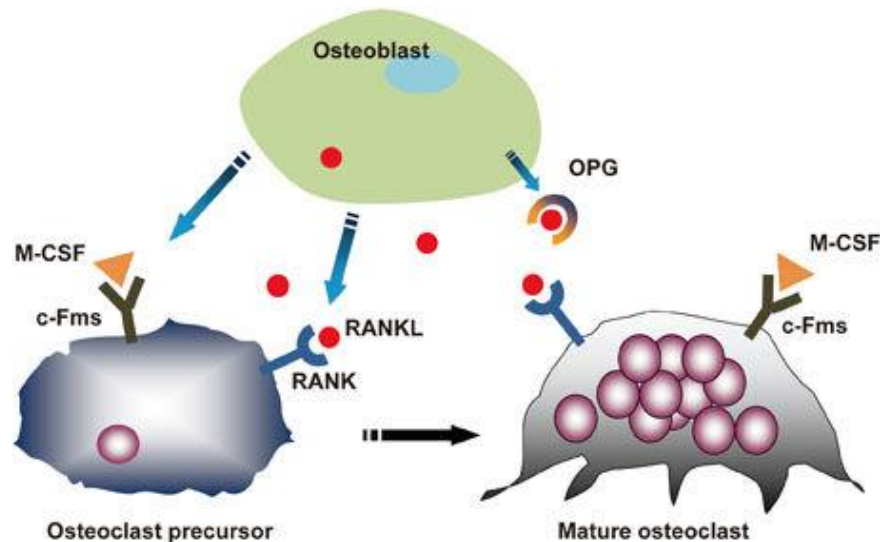


Abbildung 1 Regulation der Osteoklastendifferenzierung, (Lee, 2010)

Der Regulationsmechanismus der Osteoklastogenese besteht aus dem RANKL/RANK/OPG-System (**Abbildung 1**). Alle Rezeptoren und Liganden gehören der TNF-Rezeptor-Superfamilie an. Der Rezeptoraktivator von $\text{NF}\kappa\text{B}$ (RANK), wird unter anderem von osteoklastischen Vorläufern und reifen Osteoklasten exprimiert (Anderson et al., 1997, Khosla, 2001). Osteoblasten synthetisieren RANKL, welcher an RANK bindet und die Differenzierung der Vorläuferzellen zu reifen Osteoklasten stimuliert (Wong et al., 1997). Im Gegensatz dazu bindet Osteoprotegerin (OPG), ein von Osteoblasten freigesetzter löslicher Scheinrezeptor, kompetitiv an RANKL. Ohne weitere Signaltransduktion wird dadurch die Osteoklastendifferenzierung inhibiert (Simonet et al., 1997). Sobald die Osteoklasten aktiviert sind, synthetisieren sie ein für ihre Funktion wichtiges Protein, die Tartrat-resistente saure Phosphatase (TRAP). TRAP wird aufgrund des hohen Expressionslevels und der hohen zellulären Aktivität als ein primärer histochemischer Marker für Osteoklasten angesehen. Die Intensität ist beim gesunden Knochen niedrig und bei bestimmten Erkrankungen, die durch eine vorherrschende Osteoklastenaktivität gekennzeichnet sind, erhöht (Logar et al., 2007).

Die Hauptaufgabe der Osteoklasten ist die Resorption der Knochensubstanz (**Abbildung 2**). Dieser Vorgang findet in einer „sealing zone“ statt. Das Zytoskelett der Osteoklasten ist durch die Bildung von Aktin-Ringen in der Lage, einen engen Kontakt zwischen der Zelle und der Knochenoberfläche herzustellen. Die Verbindung zum Knochen wird durch spezialisierte Adhäsionsstrukturen vom Integrin-Typ, in diesem Fall vom $\alpha_v\beta_3$ -Integrin, gesteuert. Während der Resorption bildet die von den Aktin-Ringen abgedichtete Zellmembran über der Knochenoberfläche einen Faltensaum aus, unter der sich eine Extravakuole aufbaut (Stenbeck, 2002). In diese Extravakuole werden Protonen transportiert. Das Cl^- , welches im Austausch gegen HCO_3^- in die Extravakuole gepumpt wird, erzeugt mit den Protonen HCl . Es entsteht ein saures Milieu, wodurch das Knochenmineral aufgelöst wird. Die organische Phase des Knochens wird freigesetzt und durch Cathepsin K (Ctsk) abgebaut (Teitelbaum, 2000).

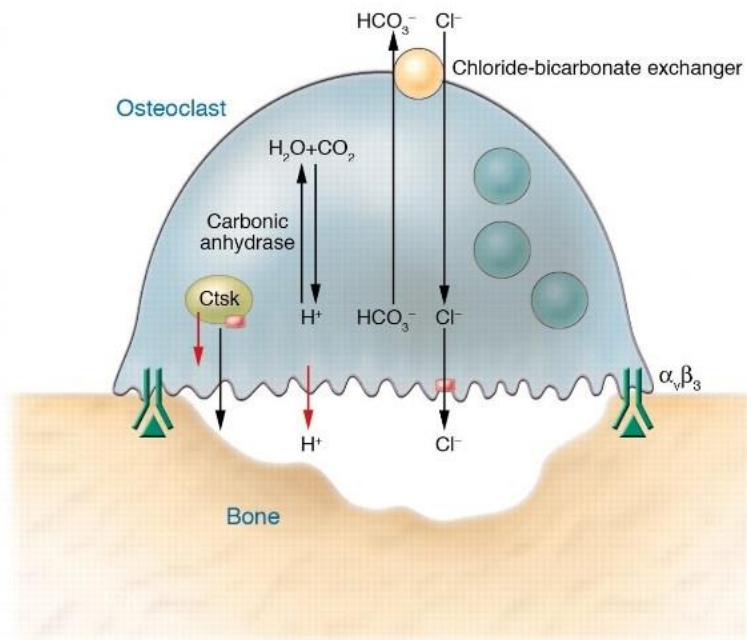


Abbildung 2 Mechanismus der Knochenresorption, (Ross und Christiano, 2006)

Um eine konstante Knochenmasse zu erhalten, ist es notwendig, dass ein Gleichgewicht zwischen Knochenaufbau und -abbau besteht (Rucci, 2008). Dieser Knochenumbau, auch „bone remodelling“ genannt, wird durch die Kommunikation zwischen Osteoblasten und Osteoklasten gelenkt. 1964 wurde zum ersten Mal berichtet, dass zwischen der Knochenbildung und -resorption ein Kopplungsmechanismus bestehen könnte (Frost und Straatsma, 1964). Es gibt viele unterschiedliche Zelltypen und Kontrollmechanismen, die zur dieser Kopplung beitragen. Diese sind unter anderem:

- von der Matrix freigesetzte Wachstumsfaktoren
- lösliche und membrangebundene Produkte von Osteoklasten
- Signale von Osteozyten und Immunzellen
- Signalübertragungen innerhalb der Osteoblasten-Linie.

Die genauen molekularen Mechanismen dieses Vorgangs sind jedoch noch nicht vollständig geklärt. Es ist aber mittlerweile bekannt, dass die Osteoklasten nicht nur Knochen resorbieren können. Sie besitzen auch die Fähigkeit, mit Osteoblasten zu kommunizieren und die Knochenbildung zu beeinflussen. Durch die Sekretion von Zytokinen (Clastokine), können Osteoklasten die lokale Rekrutierung, Differenzierung und Aktivität von Osteoblasten fördern oder inhibieren (Sims und Martin, 2014). In den letzten Jahren wurden einige dieser Clastokine identifiziert und näher beschrieben. Dazu gehören: S1P (Sphingosin-1-Phosphat) (Ryu et al., 2006, Shiwaku et al., 2015), BMP-6 (Knochenmorphogenetisches Protein-6) (Pederson et al., 2008), Wnt10b (Pederson et al., 2008), CTHRC1 (Collagen Triple Helix Repeat Containing 1) (Takeshita et al., 2013), C3a (Complement 3a) (Matsuoka et al., 2014) und das inhibierende Sema4D (Semaphorin 4D) (Negishi-Koga et al., 2011). Des Weiteren können EphrinB2-Liganden von Osteoklasten an EphB4-Rezeptoren von Osteoblasten koppeln und so zu einer beschleunigten Osteoblastendifferenzierung führen (Zhao et al., 2006).

Diese Kopplung zwischen Osteoblasten und Osteoklasten bezieht sich auf den Vorgang in sogenannten multizellulären Grundeinheiten, in denen die Menge an neu gebildetem Knochen im Verhältnis zum abgebauten Knochen immer gleichbleibt. Der sogenannte Knochenumbauzyklus besteht aus vier aufeinanderfolgenden Phasen, die unterschiedlich lange dauern (**Abbildung 3**):

- Resorptionsphase
- Umkehrungsphase
- Bildungsphase
- Ruhephase

Die 2-wöchige Resorptionsphase beginnt mit der Migration einkerniger Prä-Osteoklasten zur Knochenoberfläche, wo sie zu mehrkernigen Osteoklasten fusionieren. Nach Abschluss der Resorption kommt es zu einer bis zu 5 Wochen dauernden Umkehrphase, bei der einkernige Zellen auf der Knochenoberfläche erscheinen. Diese Zellen bereiten die Oberfläche für neue Osteoblasten vor, indem sie Signale für die Osteoblastendifferenzierung und -migration freisetzen und damit die Knochenbildung einleiten. Die Knochenneubildungsphase erfolgt durch Osteoblasten, die solange Knochenmatrix produzieren und danach mineralisieren bis

der resorbierte Knochen vollständig durch neue Knochenstruktureinheiten ersetzt worden ist. Diese Phase kann bis zu 4 Monate dauern. Aus den Osteoblasten bilden sich anschließend Belegzellen, welche die Oberfläche abdecken und die Ruheperiode einleiten. Diese dauert an bis ein neuer Umbauzyklus beginnt (Hadjidakis und Androulakis, 2006).

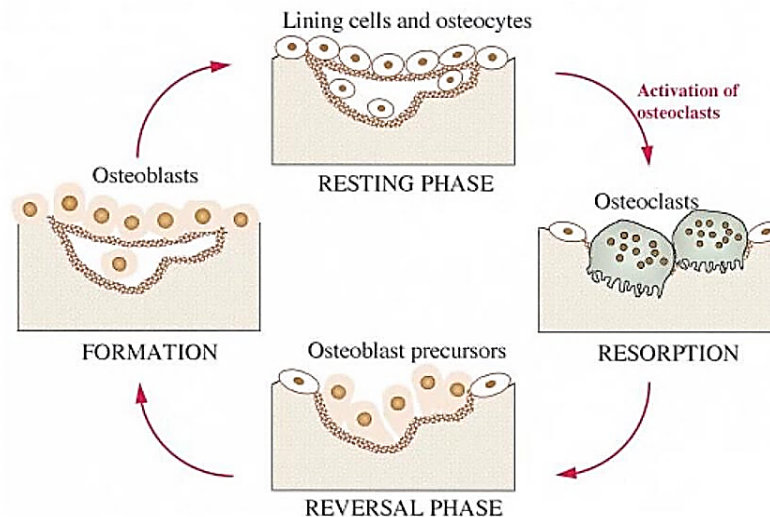


Abbildung 3 Phasen des Knochenumbaus, (Verbruggen, 2013)

Der Knochenumbau ist somit ein fein abgestimmter Prozess, der sämtliche Zellen sowie intra- und extrazelluläre Signalwege beinhaltet und ständig bestrebt ist, Knochen zu reparieren und die Knochenfunktion aufrecht zu halten (Dimitriou et al., 2005). Wenn aber das Gleichgewicht des Knochenumbaus gestört wird, kann es zu verschiedenen Erkrankungen wie zum Beispiel der Osteoporose kommen (Kular et al., 2012). Sie ist gekennzeichnet durch eine erhöhte Aktivität von Osteoklasten und einer verringerten Knochendichte, welche das Risiko für Knochenfrakturen erhöht. Auch bei Gewalteinwirkungen kann eine Fraktur entstehen und der Knochen dadurch seine anatomische und mechanische Stabilität verlieren. Das Knochengewebe hat aber als einziges Gewebe im menschlichen Körper die Fähigkeit, sich narbenlos selbst zu heilen (Li und Stocum, 2014). Die Frakturheilung ist ein komplexer und mehrstufiger Prozess, der eng mit der Knochenbildung und dem Remodelling verbunden ist. Es wird unterschieden zwischen der primären und der sekundären Frakturheilung. Bei der ersteren bleiben die Fraktarenden in Kontakt und der Knochen heilt ohne Kallusbildung. Weitaus häufiger tritt die sekundäre Frakturheilung auf (Dimitriou et al., 2005). Dieser Prozess läuft unter Bildung eines Kallus in mehreren Phasen ab (**Abbildung 4**):

1. Entzündungsphase (inflammatorische Phase)
2. Granulationsphase
3. Phase der Kallushärtung
4. Phase des Umbaus (Knochenremodelling)

In der ersten Phase der Frakturheilung tritt Blut aus der Bruchfläche aus und es bildet sich ein Hämatom. Makrophagen, Leukozyten und andere Entzündungszellen kommen an den Ort der Fraktur und lösen eine Entzündungskaskade aus. Es werden Stammzellen rekrutiert und damit die Bildung von neuem Skelett- und Gefäßgewebe eingeleitet (Li und Stocum, 2014).

Die Zellen, die während des Entzündungsstadiums stimuliert und sensibilisiert werden, beginnen in der Granulationsphase mit der Produktion neuer Gefäße, Fibroblasten und Stützzellen. Durch Chondrozyten (Knorpelzellen) wird das Hämatom durch ein fibrinreiches Granulationsgewebe ersetzt. Es entsteht ein Faserknorpel (weicher Kallus) der die Knochenenden stabilisiert. Mit fortschreitender Proliferation der Chondrozyten werden sie hypertroph und die extrazelluläre Matrix des weichen Kallus wird durch Osteoblasten mineralisiert. Eine Ossifikation des Knorpels führt zur Bildung eines harten Kallusgewebes (Einhorn und Gerstenfeld, 2015).

Obwohl der harte Kallus eine gewisse Stabilität bietet, stellt er die biomechanischen Eigenschaften von normalem Knochen nicht vollständig wieder her. Die sekundäre Knochenbildung wird deshalb in der letzten Phase der Frakturheilung eingeleitet. Der Kallus wird remodelliert, indem er schrittweise durch lamellaren Knochen ersetzt wird, was zu einer vollständig regenerierten Knochenstruktur führt (Marsell und Einhorn, 2011).

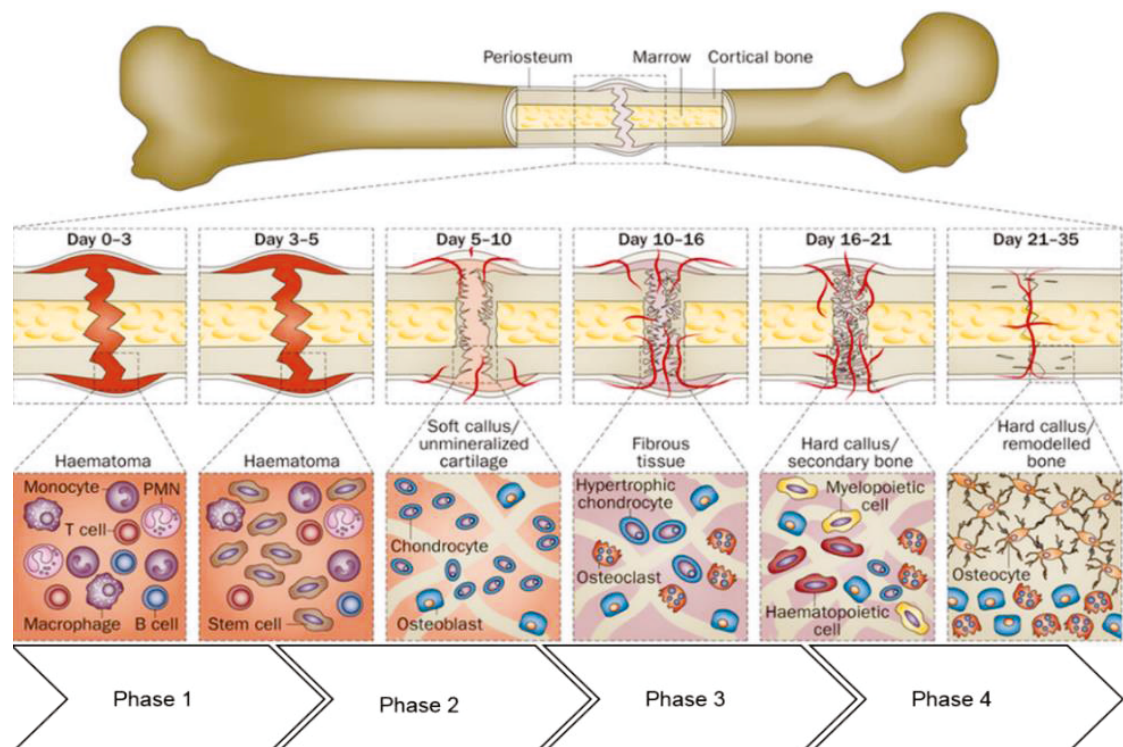


Abbildung 4 Phasen der Fraktur Heilung, modifiziert nach Einhorn und Gerstenfeld, 2014

Obwohl das Knochengewebe die einzigartige Eigenschaft besitzt, sich selbst zu heilen, kann eine erfolgreiche Regeneration unter bestimmten Bedingungen ausbleiben. Wenn zum Beispiel Frakturen eine kritische Größe überschreiten, Knochentumore entfernt werden, Wirbelsäulen- oder Gelenksversteifungen auftreten. Des Weiteren führen auch Stoffwechselerkrankungen, Pseudoarthrosen, Infektionen und Implantationsmisserfolge dazu, dass weltweit mehr als 2,2 Millionen Knochentransplantationen pro Jahr durchgeführt werden und bei vielen der Einsatz von geeigneten Ersatzmaterialien notwendig ist. (Calori et al., 2011, Kraus und Kirker-Head, 1996, Stanovici et al., 2016)

Der Goldstandard für Knochentransplantationen ist die Transplantation von autologem Knochen. Bei dieser Transplantationstechnik werden dem Patienten Knochenteile, hauptsächlich vom Beckenkamm, entnommen und am Ort des Defektes wiedereingesetzt. Der autologe Knochen besitzt osteokonduktive Fähigkeiten, da er als Gerüststruktur (Scaffold) das Einwachsen von neuem Knochengewebe erleichtert (Daculsi et al., 2013, Vaccaro, 2002). Zudem ist er osteoinduktiv und kann daher die Knochenneubildung anregen. Dies geschieht durch Wachstumsfaktoren, welche die Differenzierung mesenchymaler Vorläuferzellen zu Prä-Osteoblasten einleiten. Des Weiteren kann der autologe Knochen durch osteogene Eigenschaften, die Bildung von neuem Knochengewebe ermöglichen. Allerdings ist die Menge des Knochens, der transplantiert werden kann, begrenzt. Darüber hinaus sind bei dieser kostenintensiven Methode zwei Eingriffsstellen nötig. Es kann zu postoperativen Komplikationen kommen und dadurch zu einer erhöhten Morbiditätsrate.

Eine Alternative sind allogene Transplantationen, bei denen laut Definition Spenderknochen von einem anderen Individuum derselben Spezies verwendet werden. Aufgrund der dreidimensionalen Struktur und der Anwesenheit von Kollagen Typ I bringen Allotransplantate optimale osteokonduktive und biomechanische Eigenschaften mit (Calori et al., 2011). Nachteile dieser Methode sind eine Verringerung der Osteoinduktion und das erhöhte Risiko der Abstoßung und der Übertragung von bakteriellen und viralen Krankheitserregern (Zamborsky et al., 2016).

Um den unbefriedigenden Ergebnissen und Nachteilen der autologen und allogenen Transplantationen entgegenzusteuern kam es vor über 50 Jahren im Bereich des Tissue Engineerings und der regenerativen Medizin zur Entwicklung industriell gefertigter synthetischer Materialien, auch Biomaterialien genannt (Black et al., 2015). Das Konzept eines Biomaterials wurde von Williams definiert als "eine Substanz, die so konstruiert wird, dass sie eine Form annimmt, die dazu dient, durch die Kontrolle von Wechselwirkungen mit

Komponenten lebender Systeme den Verlauf eines jeden therapeutischen oder diagnostischen Verfahrens zu lenken“ (Williams, 2014).

Das BTE (Bone Tissue Engineering) setzt sich aus drei Hauptkomponenten zusammen (**Abbildung 5**): den Stammzellen, den Scaffolds und den biologischen Faktoren. Im BTE wird ein Biomaterial als temporäres azelluläres Scaffold eingesetzt. Alternativ kann ein Scaffold mit verschiedenen Arten von Zellen kombiniert werden, die in der Lage sind, die Knochenbildung *in vivo* entweder durch Differenzierung in Richtung der osteogenen Linie oder durch Freisetzung spezifischer löslicher Moleküle zu fördern. Diese Zellen können *ex vivo* vor der Operation auf dem Scaffold platziert werden. Die am häufigsten verwendeten Zellen sind adulte Stammzellen (Stammzellen aus Knochenmark, Fettgewebe, Zahn oder peripherem Blut), embryonale Stammzellen und genetisch veränderte Zellen (Roseti et al., 2017). Auch die Vaskularisation nach der Implantation, die durch Zugabe von Wachstumsfaktoren beschleunigt werden kann, ist von entscheidender Bedeutung für die Integration und Funktionalität des Scaffolds (Fröhlich et al., 2008). Für ein erfolgreiches Tissue Engineering sind nicht nur die drei Hauptkomponenten isoliert betrachtet wichtig, sondern auch die Kombination aller ihrer Interaktionen (Murphy et al., 2013).

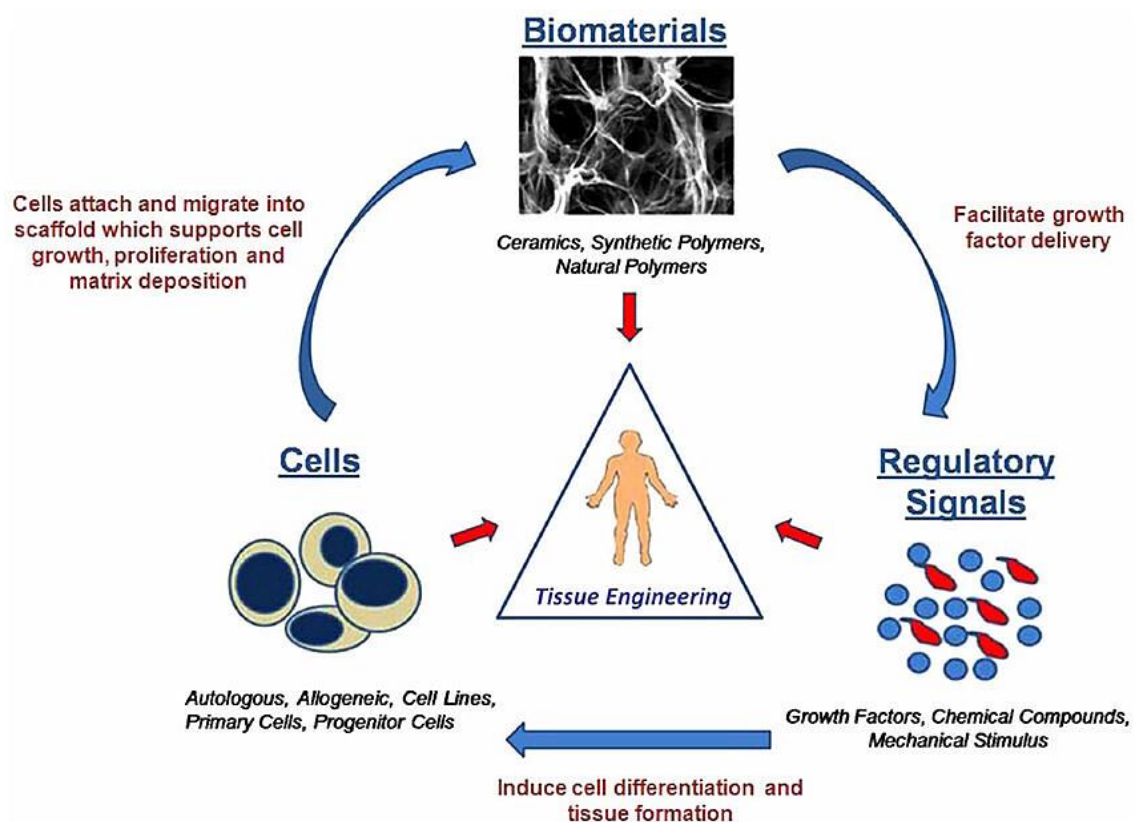


Abbildung 5 Hauptkomponenten des BTE, (Murphy et al., 2013)

Um eine völlige *Restitutio ad integrum* zu erhalten, legt das BTE Kriterien fest, die für die Entwicklung eines Biomaterials erforderlich sind. Ein Biomaterial sollte die strukturellen Aspekte eines erkrankten Gewebes ersetzen und die Prozesse der Geweberegeneration auslösen können. Daher sind geeignete mechanische Stabilität und biologische Fähigkeiten wichtige Voraussetzungen (Ratner et al., 2013). Ein grundlegendes Merkmal für die Eignung eines Biomaterials stellt die Biokompatibilität mit dem System dar. Das Implantat darf die biologische Umgebung nicht beeinträchtigen. Die Zellen sollten ihre Morphologie und Funktionen beibehalten, sich vermehren und die Oberfläche des Scaffolds besiedeln können (Roseti et al., 2017). Das Material sollte zudem auch osteoinduktiv wirken, um die Knochenbildung auf einem Scaffold induzieren zu können. Dies stellt jedoch eine der größten Herausforderungen im BTE dar, da das Verständnis der biologischen Mechanismen zwischen Material und Zellen noch nicht geklärt ist (Barradas et al., 2010).

Außerdem ist die Osteokonduktivität der Materialien von entscheidender Bedeutung. Die Architektur des Scaffolds sollte der Knochenstruktur ähnlich sein, eine zusammenhängende Porenstruktur und eine hohe Porosität aufweisen. Somit wird eine zelluläre Penetration sichergestellt und die Diffusion von Nährstoffen zu den Zellen innerhalb des Scaffolds ermöglicht (O'Brien, 2011). Es sollte sich in seinen Eigenschaften, der Resorption durch Osteoklasten und der Knochensynthese durch Osteoblasten, in den natürlichen Prozess des Knochenumbaus integrieren können (Detsch et al., 2008). Bei der Entwicklung neuer Biomaterialien ist zusätzlich die Toxikologie der Materialien zu überprüfen. Das Biomaterial sollte zudem biologisch abbaubar sein und nur eine minimale Entzündungsreaktion auslösen. Auch die mechanischen und physikalischen Aspekte müssen überprüft und berücksichtigt werden (Calori et al., 2011).

Giannoudis et al. (2015) erwähnten, dass das ideale Biomaterial keine Größenbeschränkung und eine lange Haltbarkeit aufweisen soll. Für Chirurgen sollte es einfach zu verwenden sein, die Patientenmorbidity verringern und vor allem kosteneffektiv eingesetzt werden können (Giannoudis et al., 2005). Das Konzept des BTE besteht also darin, das Gebiet der Biomaterialien und der Zellbiologie so zu kombinieren, dass im Idealfall robuste, reproduzierbare neue Materialien entstehen, die die meisten oder alle der zuvor genannten Eigenschaften mit sich bringen (Fröhlich et al., 2008).

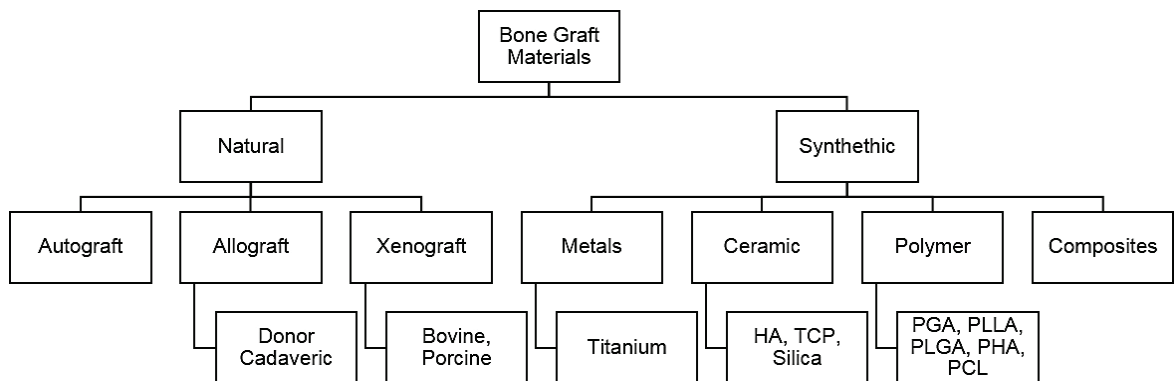


Abbildung 6 Einteilung Knochenersatzmaterialien modifiziert nach Sharif et al., 2016

Durch die Fortschritte im BTE sind mittlerweile eine Vielzahl von Knochenersatzmaterialien erhältlich, welche durch verschiedene Zusammensetzungen und Eigenschaften geprägt sind. Die am häufigsten eingesetzten synthetischen Materialien sind unter anderem Metalle, Keramiken und Polymere. Verbundwerkstoffe (Composite) sind eine Kombination aus zwei oder mehr Materialien (**Abbildung 6**).

Vor allem die Biokeramiken, die als azelluläre Scaffolds verwendet werden, haben einen hohen Stellenwert unter den Biomaterialien im BTE (Giannoudis et al., 2005). Sie machen rund 60 % der eingesetzten Knochenersatzmaterialien aus und werden seit mehr als 30 Jahren eingesetzt (Hing, 2005, Wu et al., 2013). Der klinische Einsatz bezieht sich auf ihre spezifischen strukturellen, biologischen und biomechanischen Eigenschaften.

Derzeitige Anwendungsformen im klinischen Einsatz sind unter anderem ganze Implantate (zum Beispiel zur Rekonstruktion von Mittelohrknöchelchen oder als lasttragende Komponenten von Gelenkprothesen), Pulver und Granulate zur Knochenfüllung, Beschichtungen auf Metallgelenkprothesen, injizierbare Formulierungen (Knochenzement) und poröse Gerüste (Hench, 2013). Durch ihre Zusammensetzung sind Biokeramiken dem Mineralgehalt des menschlichen Knochens sehr ähnlich und können nach ihrer Gewebereaktion unterteilt werden in:

- Bioinert: Aluminiumoxid, Zirkoniumoxid
- Resorbierbar: β -Tricalciumphosphat (β -TCP)
- Bioaktiv: Hydroxylapatit (HA), bioaktive Gläser und Glaskeramiken (Hench, 1998)

Calciumphosphat-Keramiken, welche aus HA und/oder β -TCP bestehen, werden durch thermisches Sintern hergestellt. Es entstehen poröse, feste Materialien deren strukturelle Eigenschaften, wie zum Beispiel die Größe der Poren, die Porosität, die mechanische Stabilität und die Abbaubarkeit durch den Sintervorgang gezielt verändert werden können.

Basierend auf ihren Strukturen bieten HA- und β -TCP-Keramiken geeignete Lösungen, um das Einwachsen von neuem Knochen zu erleichtern. Die optimale Porengröße für das Einwachsen neuer Knochen liegt zwischen 150 – 500 μm (Makroporosität). Für die Diffusion von Nährstoffen und um die besten bioresorbierbaren Fähigkeiten zu erlangen, ist eine Mikroporosität (Porengröße von $<5\text{ }\mu\text{m}$) von Vorteil (Fuchs und Kossler, 2009) (**Abbildung 7**).

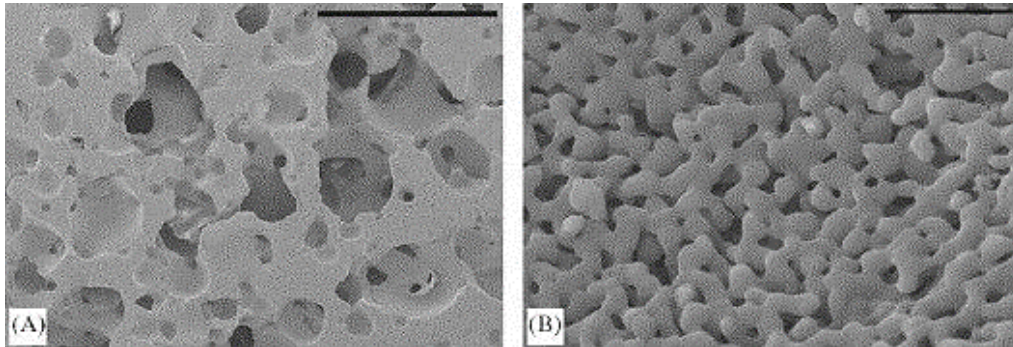


Abbildung 7 Makro- und Mikrostruktur von β -TCP (OSferion®), Makroporen von 100 – 500 μm (A), Mikroporen $<5\text{ }\mu\text{m}$, Skala 1 mm (A), 10 μm (B), (Kondo et al., 2006)

Synthetisch hergestellte Keramiken alleine besitzen keine beziehungsweise kaum osteogene oder osteoinduktive Eigenschaften. Wenn sie aber in Kontakt mit Knochen kommen, wirken sie osteokonduktiv. Die Oberflächenstruktur dieser Keramiken bietet eine geeignete Umgebung für Knochenzellen und Knochen morphogenetische Proteine, welche die Resorption und Knochenneubildung stimulieren. Dadurch unterstützen sie das Knochenwachstum und fördern die Bildung von Osteoid auf ihrer Oberfläche. Dieses mineralisiert und der neu gebildete Knochen wird allmählich in den Umbauprozess integriert.

Während der Bildung von neuem Knochen muss das Material entweder durch Osteoklasten resorbiert werden oder sich in seine chemischen Bestandteile auflösen. Um Entzündungsreaktionen zu vermeiden, dürfen die durch Dissoziation entstehenden Partikel nicht zu klein sein. Die biokompatiblen β -TCP- und HA-Keramiken unterscheiden sich in der biologischen Abbaubarkeit. β -TCP-Keramiken besitzen eine höhere Löslichkeit und können im Körper schneller abgebaut werden als die schwer löslichen und nicht resorbierbaren HA-Keramiken. Im Idealfall sollte ein Ersatzmaterial erst dann gänzlich resorbiert worden sein, wenn seine Aufgabe als Gerüstsubstanz erfüllt ist und sich der neue Knochen gebildet hat (Calori et al., 2011, Hench, 1998). Eine Kombination aus beiden Keramiken führt dazu, dass die Resorptionsrate auf die Regenerationsrate des Gewebes abgestimmt werden kann. Die Abbaurate dieser daraus entstehenden biphasischen Calciumphosphat-Keramiken (BCP-Keramiken) kann leicht adaptiert werden, indem das Verhältnis von stabilem HA und leicht

löslichem β -TCP geändert wird (Giannoudis et al., 2005). Während des Abbaus kommt es zum Verlust der mechanischen Festigkeit, weshalb Calciumphosphate im Allgemeinen nur begrenzte biomechanische Unterstützung zeigen. Die Leichtigkeit der Anpassung ihrer Chemie, Größe und Form machen sie aber zu einer vielseitigen Matrix. Bei der Anwendung ist es deshalb wesentlich, solche Parameter zu kennen und daraus das richtige Material zu wählen (Lobo und Livingston Arinze, 2010).

2 Material und Methoden

2.1 Versuchsaufbau

Es wurde zu Beginn versucht ein solides experimentelles Design aufzustellen, um an den richtigen Tagen die optimalen Ergebnisse zu bekommen. Für die Bestimmung der Osteoklastenzahl wurde die TRAP-Färbung gewählt. Das Differenzierungsverhalten konnte durch TRAP-Aktivitätsmessung in den Zellkulturüberständen gemessen werden. Die Resorptionsfähigkeit der Osteoklasten wurde Anhand der Expression von Cathepsin K in den Zellkulturüberständen überprüft und mit der Western Blot-Technik nachgewiesen. Nach einigen Pilotversuchen wurde das Design wie folgt aufgestellt:

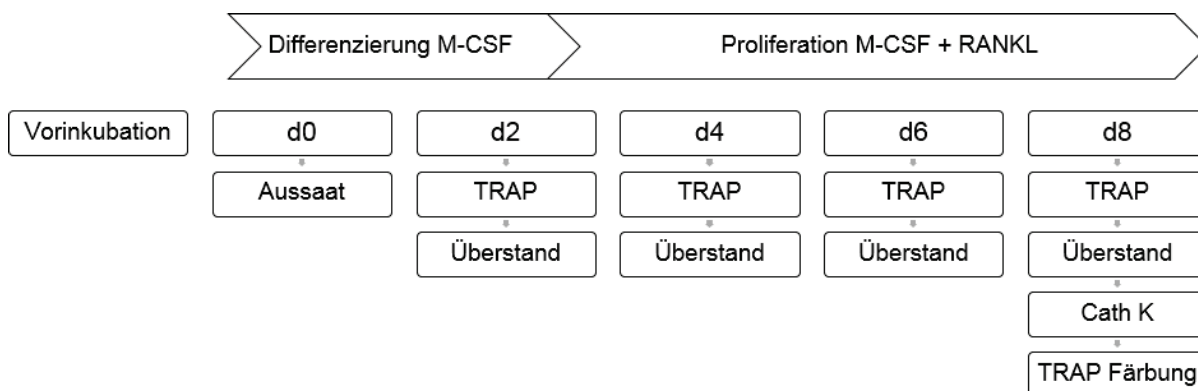


Abbildung 8 Design des Experiments

Zuerst wurden die Biokeramik-Disks und die Knochenplättchen für 24 Stunden in Kulturmedium vorinkubiert (5% CO₂, 37 °C). Am darauffolgenden Tag wurden die Knochenmarkszellen isoliert und ausgesät. Die Osteoklastogenese wurde induziert, indem man die isolierten Knochenmarkszellen mit M-CSF und RANKL behandelte. Eine TRAP-Färbung wurde an Tag 8 gemacht. Währenddessen wurden die Zellkulturüberstände von Tag 2, 4, 6 und 8 gesammelt und eingefroren. In diesen Zellkulturüberständen wurde die TRAP-Aktivität bestimmt. Zuletzt wurde noch Cathepsin K in den Zellkulturüberständen von Tag 8 detektiert.

2.2 Biokeramiken

2.2.1 Einteilung

Die verwendeten Biokeramik-Disks wurden im Rahmen einer Kooperation mit dem französischen *Institute nationale de la santé et de la recherche médicale* (Inserm) UMR_1238 zur Verfügung gestellt. Diese waren durch γ -Bestrahlung sterilisiert worden, weswegen man keine weiteren Vorbereitungen mehr treffen musste. Es gab sowohl Disks aus reinem HA, reinem β -TCP als auch BCP (Biphasische Calciumphosphat-Disks mit unterschiedlichen Verhältnissen von HA und β -TCP). Die BCP-Disks mit einem Mischungsverhältnis von 20 % HA und 80 % β -TCP wurden 20/80 genannt. Die BCP-Disks mit einem Anteil von 60 % HA und 40 % β -TCP nannten wir 60/40. Sie hatten alle einen Durchmesser von 15 mm und waren 1 mm dick.

Tabelle 1 Überblick über die verwendeten Disks

Bezeichnung	%-Anteil HA	%-Anteil β-TCP	Disk $\varnothing$ in mm	Disk Dicke in mm
HA	100	0	15	1
TCP	0	100	15	1
20/80	20	80	15	1
60/40	60	40	15	1

2.3 Knochenplättchen

2.3.1 Verwendete Geräte, Materialien und Reagenzien

Geräte:

Isomet low speed saw	Firma Buehler, GER
Laminar Air Flow	Firma Ehret, GER
Sägeblatt/Diamanttrennscheibe	Firma Buehler, GER
Ultraschallbad Transsonic 570	Firma Elma, GER

Materialien:

24-Wellplatte	Firma Greiner Bio-One, AUT
---------------	----------------------------

Reagenzien:

EtOH 70%	Firma AustrAlco, AUT
EtOH 99,9%	Firma AustrAlco, AUT

2.3.2 Durchführung

Als Kontrollgruppe wurden Knochenplättchen aus Rinderröhrenknochen verwendet. Mit der Knochensäge wurden 300-400 µm dicke Scheiben geschnitten. Mit einem Messer wurden ca. 1 cm² große Vierecke geformt. Die so entstandenen Knochenplättchen wurden zuerst in Wasser für 3 x 5 Minuten und anschließend in EtOH 70 % für 1 x 5 Minuten im Ultraschallbad gereinigt. Zur Desinfektion wurden die Plättchen unter dem LAF auf jeder Seite für 15 Minuten mit UV-Licht bestrahlt. Im Anschluss daran wurden sie in einer 24-Wellplatte platziert und für den späteren Gebrauch aufbewahrt.

2.4 Zellkultur

2.4.1 Verwendete Geräte, Materialien und Reagenzien

Geräte:

Autoklav SX-300E	Firma Tomy Digital Biology, JPN
CASY TT Cell counter & Analyzer	Firma OLS OMNI Life Science, GER
Digitalkamera für Lichtmikroskop ProGres	Firma Jenoptik, GER
Eismaschine AF103	Firma Scotsman Ice Systems, USA
Inkubator Hera Cell 240	Firma Thermo, USA
Laminar Air Flow	Firma Ehret, GER
Lichtmikroskop H550S	Firma Nikon TMS, JPN
Mikropipetten	Firma VWR International, AUT
Pipetten	Firma Gilson, FRA
Trockenschrank	Firma Binder WTB, GER
Vortex-Genie 2	Firma Bender & Hobein, GER
Wasserbad 1083	Firma GFL, GER
Zentrifuge	Firma Eppendorf, GER

Materialien:

24-Wellplatte Gewebe-, Suspensionskultur	Firma Greiner Bio-One, AUT
CASY Cup	Firma Roche Diagnostics, GER
Einwegnadeln 27G x ¾ in.	Firma BD, IRL
Einwegspritzen 1 ml	Firma Henke Sass-Wolf, GER
Glaspipetten	Firma Brand, GER
Petrischalen quadratisch, rund	Firma Greiner Bio-One, AUT
Pipettenspitzen	Firma VWR International, AUT
Skalpell	Firma Bard-Parker, USA
Zellsieb Falcon 70 µM	Firma Corning, USA
Zentrifugenröhrchen 15 ml, 50 ml	Firma Greiner Bio-One, AUT

Reagenzien:

BSA	Firma Roth, GER	# EG2923225
CaCl ₂	Firma Sigma-Aldrich, AUT	# 97H0981
HCl	Firma Chem-Labs, BEL	# 2202004061000
CASYton	Firma Roche Diagnostics, GER	# 11689200
EtOH 99,99%	Firma AustrAlco, AUT	
FCS BM	Firma Sigma-Aldrich, USA	# 084M3250
KCl	Firma Merck, GER	# K33076636428
KH ₂ PO ₄	Firma Merck, GER	# 851A386673
Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O	Firma Merck, GER	# K33351980429
NaCl	Firma Sigma-Aldrich, GER	# 236241234
NaHCO ₃	Firma Sigma-Aldrich, GER	# 035K0074
NaOH	Firma Chem-Labs, BEL	# 2129930051000
P/S 10,000 µg/ml	Firma Biochrom, GER	# 15240-062
RBC Lysis Buffer	Firma Roche, GER	# 1074900
Recomb. Murine M-CSF	Firma R&D System, USA	# ME095051
Recomb. Murine RANKL	Firma R&D System, USA	# CWA181512
α-MEM	Firma Gibco LifeTechnologies, AUT	# 22571-020

Herstellung von:

- **Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)**

2 g KCl, 2 g KH₂PO₄, 80 g NaCl und 27,07 g Na₂HPO₄*2H₂O wurden in 1000 ml dH₂O gelöst. Anschließend wurde es mit dH₂O noch auf 10 l verdünnt und steril filtriert abgefüllt.

- **PBS mit Ca²⁺/Mg²⁺**

2 g KCl, 2 g KH₂PO₄, 80 g NaCl, 14,34 g Na₂HPO₄*2H₂O und 1 g MgCl₂*6H₂O wurden in 1000 ml dH₂O gelöst. Der pH-Wert wurde mit einer 5 M HCl auf einen Wert von 2-3 eingestellt. Anschließend wurde 1 g CaCl₂ hinzugefügt. Diese Lösung wurde dann mit dH₂O auf 10 l verdünnt und zum Schluss mit einer 5 N NaOH auf pH 7,2 eingestellt.

- **0,1 % Rinderserumalbumin (BSA) in PBS mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$**
0,01 g BSA wurde eingewogen und in 10 ml PBS mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ gelöst und anschließend steril filtriert abgefüllt.
- **RANKL Stocklösung (R&D System)**
Der lyophilisierte RANKL wurde zentrifugiert und in 0,1 % BSA in PBS mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ auf eine Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ verdünnt. Die Lösung wurde in Eppendorf Gefäße abgefüllt und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.
- **M-CSF Stocklösung**
Das lyophilisierte M-CSF wurde zentrifugiert und in 0,1 % BSA in PBS mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ auf eine Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ verdünnt. Die Lösung wurde in Eppendorf Gefäße abgefüllt und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.
- **1X Lysis Puffer**
0,5 ml 10X RBC Lysis Puffer Lösung wurden mit 4,5 ml MiliQ Wasser auf 1X verdünnt.
- **Kulturmedium, α -MEM + 10 % FCS**
 α -MEM wurde mit 10 % FCS BM und 1 % Penicillin-/Streptomycinlösung versetzt und in sterilen Glasflaschen bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Vor Gebrauch wurde es im Wasserbad auf $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ erwärmt.
- **Waschmedium, α -MEM + 2 % FCS**
 α -MEM wurde mit 2 % FCS BM und 1 % Penicillin-/Streptomycinlösung versetzt. Das Waschmedium wurde in Glasflaschen abgefüllt.

2.4.1.1 Osteoklasten aus Knochenmarkkultur

Da Osteoklasten nur in sehr geringen Mengen im Knochen beziehungsweise im Knochenmark vorhanden sind, ist die Wahl der richtigen Methode zur Osteoklastengewinnung von grundlegender Bedeutung (Murrills et al., 1998). Es ist bekannt, dass Osteoklasten von hämatopoetischen Vorläufern abstammen und durch Fusion monozytischer Zellen, die entweder in der Zirkulation oder im Knochenmark lokalisiert sind, gebildet werden (Osdoby et al., 2002). So wurden durch Isolierung von Monozyten aus Knochenmarkszellen und deren Behandlung mit M-CSF und RANKL die Fusion zu mehrkernigen Osteoklasten induziert (**Abbildung 9**).

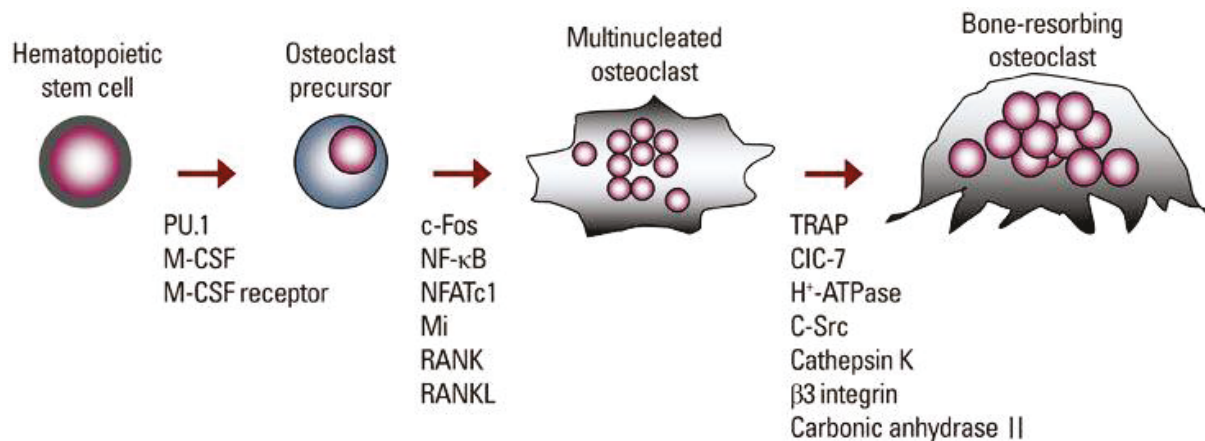


Abbildung 9 Stammzellendifferenzierung, (Lee, 2010)

Es wurde anhand der Methode „RANKL-Based Osteoclastogenic Assays from Murine Bone Marrow Cells“ aus „Skeletal Development and Repair: Methods and Protocols“ durchgeführt (Xing und Boyce 2014). Laut dieser Methode benutzt man pures BM und behandelt es mit hohen Konzentrationen von M-CSF und RANKL.

Alle Zellkulturexperimente wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt, um bakterielle Kontaminationen auszuschließen. Deshalb wurden die Arbeiten in einer sterilen Werkbank (LAF) erledigt. Knochenmarkszellen aus einer erwachsenen Maus (8-9 Wochen alt) wurden isoliert. Femur und Tibia wurden vom Körper getrennt und das Knochenmark mit einer Einwegspritze aus den Knochen mit Waschmedium in eine Petrischale herausgespült. Die Zellsuspension wurde für 5 Minuten bei RT und 1000 U zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in Lysis Puffer resuspendiert. Lysis Puffer wurde verwendet, um die roten Blutkörperchen aufzubrechen. Anschließend wurde nochmals zentrifugiert und filtriert. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit dem CASY Cell Counter + Analyzer System Model TT. Anschließend wurde die Zellsuspension für 5 Minuten bei RT und 1000 U zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in Kulturmedium (α -MEM + 10 %FCS) resuspendiert. Zum Schluss versetzte man das Kulturmedium noch mit M-CSF (30 ng/ml). Die Zellen wurden zusammen mit dem Kulturmedium mit einer Dichte von $3,04 \cdot 10^5/\text{cm}^2$ auf 24-Wellplatten ausgesät. Nach der Aussaat wurden die Platten unter dem Mikroskop kontrolliert und anschließend bei 5 % CO₂ und 37 °C im Inkubator inkubiert.

2.4.1.2 Mediumwechsel

An den Tagen 2, 4 und 6 erfolgte jeweils ein Mediumwechsel. Das Medium wurde nach Zugabe von aufgetautem M-CSF (30 ng/ml) und RANKL (10 ng/ml) im Wasserbad erwärmt. Nach Erreichen der richtigen Temperatur wurden die Zellen mit frischem Medium versetzt.

2.4.1.3 Sammeln der Zellkulturüberstände

Die Zellkulturüberstände der einzelnen Gruppen wurden in Eppendorf Gefäßen gesammelt und bis zum weiteren Gebrauch bei -20 °C gelagert.

2.5 Fixieren der Zellen

2.5.1 Verwendete Geräte, Materialien und Reagenzien

Geräte:

Pipetboy Pipettierhilfe

Firma Integra Bioscience, GER

Materialien:

Glaspipetten

Firma Brand, GER

Reagenzien:

PBS mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$	selbst hergestellt	# 052017
PBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$	selbst hergestellt	# 052017
Formalin 10 %	Firma Sigma-Aldrich, USA	# SLBH1382V

2.5.2 Durchführung

Die Zellkulturexperimente wurden am 8. Tag durch fixieren der Zellen beendet. Die Zellkulturüberstände wurden in Eppendorf Gefäßen gesammelt und bei -20 °C aufbewahrt. Die Zellen wurden dann mit PBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ bei Raumtemperatur (RT) einmal gewaschen. Im Anschluss daran wurden sie mit 10 %-iger Formalinlösung für 10 Minuten fixiert. Die Fixierung wurde beendet, indem man die Zellen drei Mal mit PBS mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (RT) gewaschen hatte. Bis zur Färbung konnten die Platten im Kühlschrank bei 4 °C gelagert werden.

2.6 TRAP-Färbung

TRAP ist ein charakteristisches Enzym welches von differenzierten Osteoklasten gebildet wird. Deshalb wurde zur Visualisierung reifer Osteoklasten auf den unterschiedlichen Materialien eine sogenannte TRAP-Färbung durchgeführt.

2.6.1 Verwendete Geräte, Materialien und Reagenzien

Geräte:

Analysenwaage MC 210 P	Firma Sartorius, GER
Digitalkamera für Lichtmikroskop ProGres	Firma Jenoptik, GER
Inkubator Hera Cell 240	Firma Thermo, USA
Lichtmikroskop H550S	Firma Nikon TMS, JPN
Mikropipetten	Firma VWR International, AUT
Pipetboy Pipettierhilfe	Firma Integra Bioscience, GER
Ultraschallbad Transsonic 570	Firma Elma, GER
Vortex-Genie 2	Firma Bender & Hobein, GER

Materialien:

Glaspipetten	Firma Brand, GER
Eppendorf Gefäße	Firma Eppendorf, AUT
Pipettenspitzen	Firma VWR International, AUT

Reagenzien:

Aceton	Firma Roth, GER	# 121164098
EtOH 99,9 %	Firma AustroAlco, AUT	
Fast Red Violet LB Salt	Firma Sigma-Aldrich, USA	# MKBH6351V
HCl	Firma Chem-Labs, BEL	# 2202004061000
N, N-dimethylformamid	Firma Sigma-Aldrich, USA	# 5HBC5480V
Naphthol AS Phosphat	Firma Sigma-Aldrich, USA	# 061M5303V
Natriumacetat	Firma Sigma-Aldrich, AUT	# 93H0417
Natriumcitrat	Firma Sigma-Aldrich, AUT	# STBF1932V
Natriumtartrat	Firma Sigma-Aldrich, AUT	# 82H06941

Herstellung von:

- **TRAP-Puffer**

Für 100 ml TRAP-Puffer wurden 0,5444 g Natriumacetat in dH₂O gelöst. Der pH wurde mit 1 M HCl auf 5,0 eingestellt. Anschließend wurden 0,2302 g Natriumtartrat hinzugefügt.

- **Ethanol/Aceton Lösung**

Aceton und EtOH wurden zu gleichen Teilen gemischt und in einem geschlossenen Gefäß aufbewahrt.

- **TRAP-Färbelösung**

Eine frische Färbelösung wurde für jede Färbung hergestellt. Naphtol AS Phosphat und Fast Red Violet Salt wurden eingewogen. 5 mg Naphthol AS Phosphat wurde mit 500 µl N, N-Dimethylformamid in einem Eppendorf Gefäß versetzt und mit dem Vortex gemischt bis es gelöst war. Daraus wurden 100 µl entnommen und mit 10 ml TRAP-Puffer versetzt. Zum Schluss wurde noch das eingewogene Salz hinzugefügt und alles für 15 Minuten im Ultraschallbad beschallt. Die Lösung wurde lichtgeschützt gelagert.

2.6.2 Durchführung

Die fixierten Platten wurden mit dem TRAP-Puffer versetzt und für 30 Minuten im Inkubator bei 5 % CO₂ und 37 °C inkubiert. Nach entfernen des TRAP-Puffers wurde die EtOH/Aceton Lösung für 30 Sekunden auf die Zellen gegeben. Danach wurden die Platten für 2 Minuten getrocknet. Die Färbelösung wurde hinzugegeben und für 10 Minuten im Inkubator bei 5 % CO₂ und 37 °C inkubiert. Gestoppt wurde die Färbung mit MiliQ Wasser. Die Platten wurden bis zur Quantifizierung auf 4 °C gelagert.

2.7 TRAP+ MNCs Zählung

2.7.1 Verwendete Geräte, Materialien und Reagenzien

Geräte:

Lichtmikroskop H550S

Firma Nikon TMS, JPN

Kamera Speed XT Core 5

Firma Jenoptik, GER

2.7.2 Durchführung

Zur quantitativen Auswertung wurden die gefärbten Zellen gezählt. Es wurden nur TRAP+ gefärbte Osteoklasten mit 3 oder mehr Kernen beachtet. Für eine mikroskopische Betrachtung der Zellen wurden Aufnahmen mit einer Mikroskop-Kamera und dem Programm ProgRes gemacht.

2.8 TRAP-Aktivität

Die TRAP-Enzymaktivität wurde mit Hilfe des EnzChek™ Phosphatase Kit von Thermo Scientific gemessen. DiFMUP (6, 8-Difluoro-4-Methylumbelliferyl Phosphat) wurde in einer Fluoreszenzmessung bestimmt. Während einer Inkubation der Zellkulturüberstände mit 200 µM DiFMUP begann eine enzymatische Dephosphorylierung des Produktes. Dies führte zu einem Fluoreszenzprodukt, DIFMU (6, 8-Difluoro-7-Hydroxy-4-Methylcoumarin), welches bei 388/455 nm detektiert werden konnte. Die erhaltenen DIFMU Werte wurden anschließend mit einer Standardkurve verglichen. Die TRAP-Aktivität wurde in den gesammelten Zellkulturüberständen von Tag 2, 4, 6, und 8 gemessen.

2.8.1 Verwendete Geräte, Materialien und Reagenzien

Geräte:

Mikrotiterplattenlesegerät Infinite 200	Firma Tecan, CH
Mikropipetten	Firma VWR International, AUT

Materialien:

Pipettenspitzen	Firma VWR International, AUT
96-Mikrotiterplatte, schwarz	Firma Greiner Bio-One, AUT
EnzChek™ Phosphatase Kit	Firma Thermo Scientific, AUT

Reagenzien:

5X Reaktion Puffer	selbst hergestellt	# 052017
Kulturmedium	selbst hergestellt	# 062017

Herstellung von:

- **1X Reaktion Puffer**
1,1 ml 5X Reaktion Puffer wurde 1:5 mit MiliQ Wasser verdünnt.
- **DiFMUP-Lösung (200 μM)**
3,4 ml 1X Reaktion Puffer wurden mit 70 μl DiFMUP (10 mM) versetzt.
- **Medium + Buffer**
1,5 ml Kulturmedium wurden mit 1,5 ml 1X Reaktion Puffer gemischt.
- **Standardlösung**
Die Standards wurden wie in der **Tabelle 2** hergestellt. Man begann mit der höchsten Konzentration und entnahm dann jeweils immer ein Aliquot für die nächst niedrigere Verdünnungsstufe.

Tabelle 2 Pipettierschema Standard

Konzentration (μM)	DiFMU	Kulturmedium + 1X Puffer
0	-	-
0.5	0,15 ml von 1 μM	0,15 ml
1	0,225 ml von 2 μM	0,225 ml
2	0,220 ml von 5 μM	0,330 ml
5	0,275 ml von 10 μM	0,275 ml
10	0,120 ml von 50 μM	0,480 ml
50	0,225 ml von 100 μM	0,225 ml
100	0,250 ml von 200 μM	0,250 ml
200	10 μl DiFMU (10 mM)	0,490 ml

2.8.2 Durchführung

Die Reagenzien und Zellkulturüberstände wurden aufgetaut und eine schwarze Wellplatte bereitgestellt. DiFMUP und DiFMU wurden lichtgeschützt aufbewahrt. Je 100 μl der Standards wurden in die vorgesehenen Wells pipettiert. Anschließend wurden noch je 50 μl Zellkulturüberstand und 50 μl DiFMUP pro Well zugesetzt. Nach einer 15-minütigen Inkubation bei RT wurde vermessen. (ex= 358, em= 455)

2.9 Proteinbestimmung

Der Proteingehalt der gesammelten Zellkulturüberstände wurde mit dem Proteinassay der Firma Biorad bestimmt. Da diese Quantifizierung auf einer Proteinbestimmung nach Lowry basierte, konnte die Sensitivität im $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Bereich gemessen werden. Es kam zu einer blauvioletten Komplexbildung zwischen Peptidbindungen und Kupferionen und anschließender Reduktion des Folin-Reagens. Dadurch entstand eine Blaufärbung die mit einem ELISA Reader auf Basis des Lambert-Beerschen Gesetzes bei 690 nm gemessen wurde. Um im linearen Bereich des Standards zu liegen mussten die Proben immer 1:2 verdünnt werden.

2.9.1 Verwendete Geräte, Materialien und Reagenzien

Geräte:

Mikrotiterplattenlesegerät Infinite 200	Firma Tecan, CH
Zentrifuge	Firma Eppendorf, GER

Materialien:

96-Mikrotiterplatte	Firma Greiner Bio-One, AUT
---------------------	----------------------------

Reagenzien:

Reagens A	Firma Bio-Rad, GER	# 500-0013
Reagens B	Firma Bio-Rad, GER	# 500-0114
Reagens S	Firma Bio-Rad, GER	# 500-0115
BSA	Firma Roth, GER	# EG2923225

Herstellung von:

- **Reagens A'**
40 μl Reagens S wurden mit 2000 μl Reagens A gemischt
- **Standardreihe**
BSA wurde mit MilliQ Wasser gemischt, sodass 8 verschiedenen Konzentrationen entstanden (0 $\mu\text{l}/\text{ml}$, 0,25 $\mu\text{l}/\text{ml}$, 0,5 $\mu\text{l}/\text{ml}$, 0,75 $\mu\text{l}/\text{ml}$, 1 $\mu\text{l}/\text{ml}$, 1,5 $\mu\text{l}/\text{ml}$, 2 $\mu\text{l}/\text{ml}$ und 2,5 $\mu\text{l}/\text{ml}$). Lagerung bei -20 °C.

2.9.2 Durchführung

Die aufgetauten Zellkulturüberstände wurden für 20 Minuten bei 4 °C und 13500 U zentrifugiert, um unnötige Zellbestandteile abzutrennen. Danach wurden die verdünnten Proben und die Standards (je 5 µl) in die vorhergesehenen Wells pipettiert. Anschließend fügte man noch Reagens A' (25 µl) und Reagens B (200 µl) hinzu. Man ließ die Platte bei RT für 15 Minuten inkubieren. Zum Schluss vermaß man die Platte im Tecan Reader bei 690 nm. Es wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Über die BSA-Standardreihe konnte eine Eichgerade ermittelt werden und so die Proteinkonzentrationen errechnet werden.

2.10 Gelelektrophorese und Western Blot

Zur Cathepsin K-Identifizierung wurden die Proteingemische in den Zellkulturüberständen mittels SDS Page (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese) nach ihrer Größe aufgetrennt und das gesuchte Enzym mit Hilfe von Western Blot detektiert.

2.10.1 Probenvorbereitung und Elektrophorese

2.10.1.1 Verwendete Geräte, Materialien und Reagenzien

Geräte:

Elektrophoresekammer	Firma Bio-Rad, GER
Gelgießstand	Firma Bio-Rad, GER
Hitzeblock	Firma Eppendorf, AUT
Mini Protean II Apparatur	Firma Bio-Rad, GER
Quick-Zentrifuge	Firma Labnet, USA
Spannungsgeber, Power Pac 200	Firma Bio-Rad, GER

Materialien:

10-Wellkamm	Firma Bio-Rad, GER
Filterpapier	Firma Schleicher & Schuell, AUT
Glasplatten	Firma Bio-Rad, GER

Reagenzien:

Acrylamid	Firma Sigma-Aldrich, AUT	# 79061
APS	Firma Sigma-Aldrich, AUT	# 7727540

Bromphenolblau	Firma Sigma Aldrich, AUT	# 115393
EDTA	Firma Sigma Aldrich, AUT	# 60004
EtOH 70 %	Firma AustroAlco, AUT	
Glycerin	Firma Sigma Aldrich, AUT	# 7098808
Glycin	Firma Sigma Aldrich, AUT	# 56406
HCl	Firma Chem-Labs, BEL	# 2202004061000
Molekulargewichtsmarker	Firma Thermo Scientific, USA	# 26616
SDS ultra-pure	Firma Roth, GER	# 151-21-3
TEMED	Firma Bio-Rad, AUT	# 161-0800
Tris Base	Firma Sigma Aldrich, AUT	# 77861

Herstellung von:

- **„Lower“ Tris, pH 8,8**
18,7 g Tris Base wurde in 70 ml dH₂O gelöst und auf pH 8,8 (mit 32 % HCl) eingestellt. Anschließend wurde 4 ml 10 % SDS Lösung hinzugesetzt und mit dH₂O auf 100 ml aufgefüllt. Lagerung bei 4 °C.
- **„Upper“ Tris, pH 6,8**
6,06 g Tris Base wurde in 70 ml dH₂O gelöst und auf pH 6,8 (mit 32 % HCl) eingestellt. Anschließend wurde 4 ml 10 % SDS Lösung hinzugesetzt und mit dH₂O auf 100 ml aufgefüllt. Lagerung bei 4 °C.
- **10X Laufpuffer, pH 8.9**
60,5 g Tris Base wurde in dH₂O gelöst und anschließend 285,5 g Glycin und 40,0 g SDS hinzugefügt. Der pH wurde auf 8,9 eingestellt. Zum Schluss wurde mit dH₂O auf 2 l aufgefüllt. Die Lösung wurde vor Gebrauch 1:10 verdünnt.
- **4X Probenpuffer**
1,52 g Tris Base, 9,45 g Glycin und 0,116 g EDTA wurden in 40 ml dH₂O gelöst und auf pH 6,9 (mit HCl) eingestellt. Anschließend wurden 6 g SDS und 0,2 g Bromphenolblau hinzugegeben und mit dH₂O auf 50 ml aufgefüllt. Zum Schluss wurden noch 50 µl β-Mercaptoethanol zugefügt. Der Puffer wurde in Eppendorf-Gefäßen abgefüllt und konnte bei -20 °C gelagert werden.

- **1X Probenpuffer**

Für den 1X Sample Puffer wurde der 4X Probenpuffer mit der entsprechenden Menge dH₂O verdünnt und ebenfalls in Eppendorf Gefäßen abgefüllt und bei -20 °C aufbewahrt.

- **10 % APS**

0,1 g Ammoniumpersulfat wurden eingewogen und in 1 ml dH₂O gelöst. Die Lösung wurde in Eppendorf-Gefäßen abgefüllt und konnte bei -20 °C gelagert werden.

- **10 % SDS Lösung**

10 g SDS ultra pur wurden eingewogen und mit dH₂O gelöst und auf 100 ml aufgefüllt. Die Lagerung erfolgte bei RT.

Für die Elektrophorese waren 2 verschiedene 10 %-ige Polyacrylamidgele notwendig. Das erste Gel, „Ladegel“, diente zur Konzentrierung der Proteine bis zur Front des zweiten Gels, das sogenannte „Trenngel“. Dieses benötigte man um die Proteine möglichst optimal auftrennen zu können. Sie wurden nacheinander wie in **Tabelle 3** hergestellt. Zuerst wurden die Bestandteile des Trenngels in ein Becherglas pipettiert. APS wurde zum Schluss hinzugefügt, um die Polymerisation einzuleiten. Die Mischung wurde zügig in die Gelgießkammer gegossen, mit Wasser bedeckt und für 45 Minuten erstarren gelassen. Nach entfernen des Wassers wurde das Ladegel auf dieselbe Art auf das Trenngel gegossen. Ein Kamm wurde aufgesetzt, um Taschen für das Auftragen der Proben zu formen. Nach 45 Minuten war das Gel bereit beladen zu werden.

Tabelle 3 Pipettierschema für die Gele

Bestandteile	Ladegel	Trenngel
MiliQ Wasser	945 µl	1430 µl
Lower Tris	-	880 µl
Upper Tris	375 µl	-
Acrylamid	195 µl	1170 µl
TEMED	2,4 µl	1,05 µl
APS (10 %)	15 µl	175 µl

Die gesammelten Zellkulturüberstände wurden auf Eis aufgetaut und die Proben wie in **Tabelle 4** hergestellt. Anschließend wurden die Proben für 5 Minuten in einem Hitzeblock bei 95 °C erhitzt und zentrifugiert. So konnten das im Sample Puffer enthaltene β -Mercaptoethanol die Disulfidbrücken in den Proteingemischen trennen und sich das SDS besser an die Seitenketten anlagern und die Proteine mit einer negativen Ladung überziehen.

Tabelle 4 Pipettierschema der Proben

Bestandteil	Volumen
Überstand	50 μ g Proteingemisch
4X Probenpuffer	1/3 des Gesamtvolumens
1X Probenpuffer	Auffüllen auf Gesamtvolumen
Gesamtvolumen	18 μ l

2.10.1.2 Durchführung

Die Gele wurden mit den Proben und einem Molekulargewichtsmarker beladen und in einer Elektrophoresekammer bei 200 Volt konstant in 1X Laufpuffer platziert bis der Molekulargewichtsmarker aufgetrennt war.

2.10.2 Transfer

In diesem Schritt erfolgte das eigentliche Western Blotting. Die durch die Elektrophorese aufgetrennten Proteine wurden nun vom Gel auf eine Nitrozellulosemembran transferiert indem man sie einem Spannungsfeld aussetzte.

2.10.2.1 Verwendete Geräte, Materialien und Reagenzien

Geräte:

Elektrophoresekammer, Protean 3 cell	Firma Bio-Rad, GER
Magnetrührer	Firma Heito, FRA
Mini-Trans-Blot elektrophoretische Transferzelle	Firma Bio-Rad, GER

Materialien:

Blotting Papier	Firma Schleicher und Schuell, GER
Nitrocellulosemembran	Firma Schleicher und Schuell, GER

Reagenzien:

Methanol	Firma Merck, GER	# 1.06009
Ponceau	Firma Sigma Aldrich, AUT	# 7170
Trichloressigsäure	Firma Roth, AUT	# 200-927-2
Glycin	Firma Sigma Aldrich, AUT	# 56406
Tris Base	Firma Sigma Aldrich, AUT	# 77861

Herstellung von:

- **Transfer Puffer**
18 g Glycin und 3,7 g Tris Base wurden eingewogen und mit dH₂O auf 2l aufgefüllt. Der pH-Wert wurde gemessen und sollte bei 8,3-8,4 liegen. Wenn er in diesem Bereich war wurden noch 500 ml Methanol hinzugefügt. Konnte bei 4 °C gelagert werden
- **Ponceau-Färbelösung 0,2 %**
0,2 g Ponceau und 3 g Trichloressigsäure wurden eingewogen und mit dH₂O auf 100 ml aufgefüllt. Konnte bei RT gelagert werden.

2.10.2.2 Durchführung

Die Transferkassette wurde aufgebaut und mit einem kleinen Trog mit Eis in die Transferrammer gestellt. Der Proteintransfer wurde für 60 Minuten bei variablen 350 mA und konstanten 100 V bei 4 °C durchgeführt. Eine gleichmäßige Proteinbeladung wurde mit einer Ponceau-Färbung überprüft.

2.10.3 Immundetektion

Bei der Immundetektion wurden die gesuchten Enzyme mit spezifischen Antikörper gekoppelt und anschließend durch eine Chemolumineszenz Reaktion auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht.

2.10.3.1 Verwendete Geräte, Materialien und ReagenzienGeräte:

Analysenwaage MC 210 P	Firma Sartorius, GER
Filmtrockenschrank	Firma Kindermann, GER
Magnetrührer RCT	Firma Janke & Kunkel, GER

Röntgenkassette	Firma Kodak, USA
Schüttelplatte	Firma Bühler, GER

Materialien:

Parafilm	Firma Sigma Aldrich, AUT
Plastikfolie	Firma Bene, AUT
Röntgenfilm	Firma Kodak, USA
Glasplatte	
Wasserwaage	

Reagenzien:

Anti-Maus IgG Antikörper	Firma Sigma Aldrich, AUT	# M4280
BSA	Firma Roth, GER	# EG2923225
BSA-Antikörper	Firma Santa Cruz, USA	# 57504
Cathepsin K Antikörper	Firma Santa Cruz, USA	# 48353
DMSO	Firma Sigma Aldrich, AUT	# BCBJ4366V
Entwicklerlösung	Firma AGFA, BEL	# G354
Fixierlösung	Firma AGFA, BEL	# G334
H ₂ O ₂	Firma Merck, AUT	# 822287
Luminolsalz	Firma Sigma Aldrich, AUT	# SHBF3159V
Magermilchpulver	Firma Maresi, AUT	
NaCl	Firma Sigma Aldrich, AUT	# 236241234
NaN ₃	Firma Sigma Aldrich, AUT	# 26628228
p-Hydroxycumarinsäure	Firma Sigma Aldrich, AUT	# 501984
Tris Base	Firma Sigma Aldrich, AUT	# 77861
Tris HCl	Firma Roth, GER	# 279105574
Tween 20	Firma Sigma Aldrich, AUT	# SZBE2460V

Herstellung von:

- **10X TBS Puffer**
12,1 g Tris Base und 40 g NaCl wurden eingewogen und mit dH₂O auf 500 ml aufgefüllt. Der pH-Wert wurde mit 32 % HCl auf 7,4 eingestellt. Lagerung bei 4 °C.
- **1X TBS Puffer**
100 ml 10X TBS Puffer wurden eingewogen und mit dH₂O auf 1.000 ml aufgefüllt. Lagerung bei 4 °C.
- **500X NaN₃-Lösung**
0,1 g Natriumazid wurde in 1 ml dH₂O gelöst. Lagerung bei 4 °C.
- **TBST 0,1 %**
1 ml Tween 20 wurde in 1.000 ml 1X TBS gelöst. Konnte bei 4 °C gelagert werden.
- **Tris HCl (Lösung A)**
4,8 mg Luminolsalz wurden eingewogen und in 200 ml 0,1 M Tris HCl pH 8,6 gelöst. Aufbewahrung unter Lichtschutz.
- **Lösung B**
5,8 mg para-Hydroxycumarinsäure wurden in 5,27 mg DMSO gelöst. Lagerung bei 4 °C.
- **ECL-Reagens**
2 ml Solution A, 0,6 µl H₂O₂ und 200 µl Solution B wurden in einem Plastikröhrchen miteinander vermengt.
- **Blocking Puffer**
1,25 g Magermilchpulver wurden eingewogen und auf dem Magnetrührer bei 80 °C in 25 ml TBST 0,1 % gelöst.
- **Primäre Antikörperlösung**
0,2 g BSA wurden eingewogen und in 5 ml TBST 0,1 % auf dem Magnetrührer gelöst. Davon wurden 4 ml entnommen und mit 8 µl NaN₃-Lösung, zur Haltbarmachung, versetzt. Anschließend pipettierte man noch 40 µl primären Antikörper dazu. Lagerung bei 4 °C.
- **Ladekontrolle BSA Antikörperlösung**
0,5 g Magermilchpulver wurden eingewogen und auf dem Magnetrührer bei 80 °C in 10 ml TBST 0,1 % gelöst. Davon wurden 8 ml entnommen und mit 4 µl sekundärem Antikörper versetzt. Diese Lösung wurde frisch zubereitet.

- **Sekundäre Antikörperlösung**

- 0,5 g Magermilchpulver wurden eingewogen und auf dem Magnetrührer bei 80 °C in 5 ml TBST 0,1 % gelöst. Davon wurden 4 ml entnommen und mit 4 µl sekundärem Antikörper versetzt. Diese Lösung wurde frisch zubereitet.

- **Fixierlösung**

Die Fixierlösung wurde im Verhältnis 1:3 mit Wasser verdünnt und im Dunkeln gelagert.

- **Entwicklerlösung**

Die Entwicklerlösung wurde im Verhältnis 1:3 mit Wasser verdünnt und im Dunkeln gelagert.

Tabelle 5 Verwendete primäre Antikörper

Antikörper	MG (kDa)	Isotyp	Verdünnung
Cathepsin K	29	Maus IgG ₃	1:100
BSA	67	Maus IgG ₁	1:1000

Tabelle 6 Verwendeter sekundärer Antikörper

Antikörper	Quelle	Verdünnung
Anti-Maus IgG, HRP Konjugat	Ziege	1:2000

2.10.3.2 Antikörperdetektion

Zuerst wurde die Membran für eine Stunde in dem frisch zubereiteten Blocking Puffer auf der Schüttelplatte inkubiert. Danach wurde die Membran 3 x für 5 Minuten mit TBST 0,1 % gewaschen. Die Membran wurde über Nacht mit dem primären AK inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran für 3 x für 5 Minuten mit TBST 0,1 % gewaschen. Der frisch zubereitete sekundäre AK wurde anschließend für eine Stunde bei RT und unter Lichtschutz inkubiert. Die Verdünnungen der Antikörper sind in **Tabelle 5** und **Tabelle 6** zu sehen. Nach der Inkubation wurde die Membran 3 x mit TBST 0,1 % und 2 x mit TBS für je 5 Minuten auf der Schüttelplatte gewaschen. In der Zwischenzeit wurde die ECL-Lösung hergestellt. Die Blots konnten in TBS gelagert werden und die Detektion wurde anschließend in der Dunkelkammer durchgeführt. Um die richtige Beladung des Gels mit dem Protein zu überprüfen wurde die zuvor verwendete Membran 2 x 10 Minuten mit TBS gewaschen und anschließend mit einer BSA Ladekontrolle anstatt des primären AK und nochmals mit dem sekundären AK inkubiert und detektiert. Für die Quantifizierung der Banden bei den Western Blots wurde das Programm „ImageJ“ verwendet.

2.11 Statistische Auswertung der Daten

Statistische Unterschiede wurden mit einer Varianzanalyse (ANOVA = one-way analysis of variance) unter Verwendung des Tukey's post-hoc Tests ermittelt. Als Bezugsgruppe wurde der Knochen gewählt. Um statistisch relevante Aussagen über die gesammelten Daten treffen zu können wurde mit einer Probenanzahl von $n = 6$ gearbeitet. Die Werte der Zellzählung, der TRAP-Aktivität und des Western Blots wurden normiert. Verwendet wurde das Programm GraphPad Prism 5.0.

3 Ergebnisse

3.1 Evaluierung der RANKL-induzierten Osteoklastogenese aus KM-Zellen

3.1.1 Ermittlung der Kulturdauer für KM-Kultur mittels TRAP-Färbung

Um die Osteoklastogenese auf den verschiedenen Biokeramiken zu testen, musste zuerst die optimale Kulturdauer anhand einer TRAP-Färbung ermittelt werden. Es wurden zunächst KM-Kulturen auf Knochenplättchen (B = Bone), Gewebekulturplatten (TC = Tissue Culture) und Glas (CS = Cover Slip) unter Zugabe von 30 ng/ml M-CSF und 10 ng/ml RANKL inkubiert und ihr Verhalten beobachtet. Durch die Behandlung mit M-CSF und RANKL proliferierten und differenzierten die Knochenmarkszellen zu runden, vielkernigen Osteoklasten. An Tag 5, 6, 8 und 10 wurden TRAP-Färbungen durchgeführt.

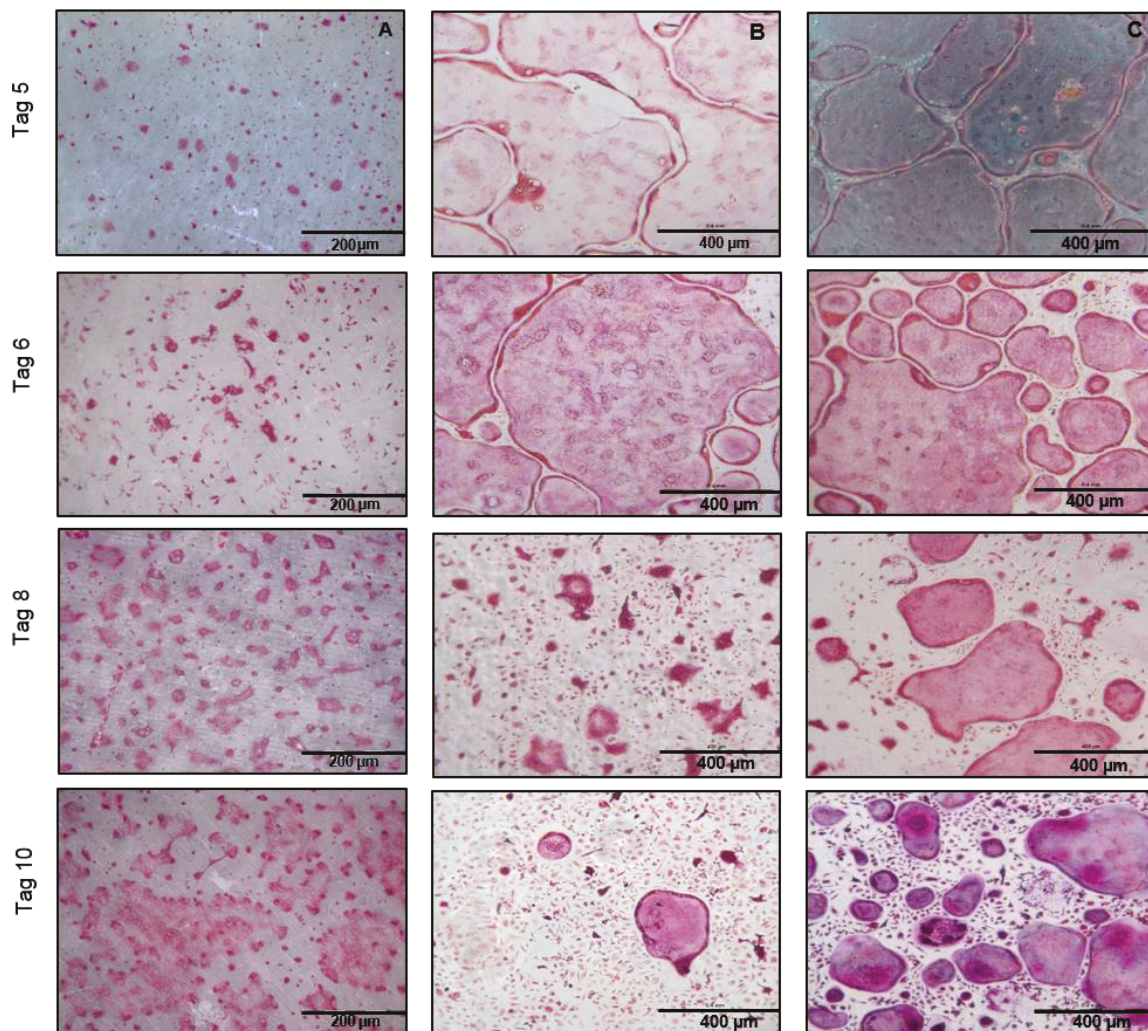


Abbildung 10 Tartrat-resistente saure Phosphatase (TRAP) Färbung der Osteoklasten in einer KM-Kultur behandelt mit 30 ng/ml M-CSF und 10 ng/ml RANKL, nach 5, 6, 8 und 10 Tagen der Kultivierung, Spalte A (links): Knochen, B (mitte): Gewebekulturplatte, C (rechts): Glas, Maßstab: 200 µm beziehungsweise 400 µm

Die **Abbildung 10** zeigt, wie Osteoklasten in den einzelnen Gruppen unter dem Einfluss von M-CSF und RANKL unterschiedlich differenzierten. In allen Gruppen konnten TRAP+ Osteoklasten visualisiert werden. Auf dem Knochen konnte man die Entstehung von kleinen, runden Osteoklasten bis zum Tag 10 erkennen. Die Osteoklasten verhielten sich auf den beiden anderen Materialien (TC und CS) anders als auf dem Knochen. Hier waren an Tag 5 und 6 sehr große runde Osteoklasten zu erkennen bei denen sich aber das Cytoskelett zum 8. Tag hin wieder auflöste. Auf TC waren am 10. Tag kaum mehr Osteoklasten zu finden. Jedoch gab es auf CS am 10. Tag wieder mehr TRAP+ Zellen. Als negative Kontrollen wurden B, TC und CS nur mit 30 ng/ml M-CSF alleine behandelt. Die RANKL Zugabe wurde bewusst unterlassen, da es ein Stimulans für die Differenzierung ist. In den negativen Kontrollen konnte keine Differenzierung der KM-Zellen zu Osteoklasten beobachtet werden (Daten werden nicht gezeigt).

3.1.2 Evaluierung des Resorptionsverhaltens von Osteoklasten aus KM-Kultur

Um die Resorptionsfähigkeit der Osteoklasten zu untersuchen, wurde die Cathepsin K-Expression durch Gelelektrophorese und Western Blot gemessen (**Abbildung 11**). Die Zellkulturüberstände von B, TC und CS der Tage 2, 4, 5, 8 und 10 wurden miteinander verglichen.

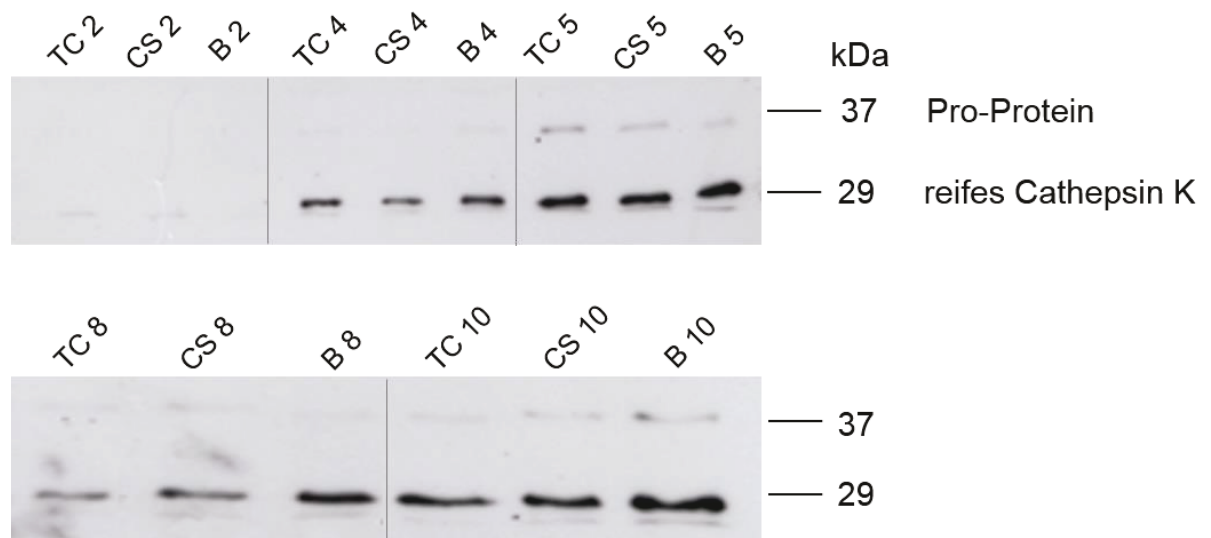


Abbildung 11 Western Blot mit Zellkulturüberständen der KM-Kultur von Tag 2, 4, 5, 8 & 10, 50 µg Protein/Tasche, 1. Antikörper: Anti-Cathepsin K 1:100, 2. Antikörper: Anti-mouse IgG HRP conj. 1:2000, TC: Gewebekulturplatte, CS: Glas, B: Knochen

Cathepsin K aus den Zellkulturüberständen bewirkte eindeutige Banden bei 29 kDA, das Pro-Protein bei 37 kDA. An Tag 2 waren noch keine Banden ersichtlich. Cathepsin K konnte ab dem 4. Tag nachgewiesen werden. Die Banden der Knochen-Gruppe waren an Tag 5, 8 und 10 stärker als in den anderen Gruppen. An Tag 5 waren die Banden in allen Gruppen deutlich zu erkennen. Am 8. Tag waren die Banden bei TC und CS schwächer als zuvor und schwächer als in der Knochen-Gruppe. An Tag 10 waren die stärksten Banden bei allen ersichtlich. Eine Resorptionsaktivität von reifen Osteoklasten konnte somit bestätigt werden

3.2 Evaluierung des Kulturverhaltens von Osteoklasten auf Biokeramiken

3.2.1 Differenzierungs- und Resorptionsverhalten von Osteoklasten aus KM-Kultur auf Biokeramiken

In diesem Pilotversuch zur Bestimmung der optimalen Kulturdauer wurden B, TC und CS als Kontrollgruppen zum ersten Mal mit den Biokeramiken getestet. Um das Kulturverhalten von Osteoklasten aus KM-Kulturen auf den verschiedenen Biokeramiken zu untersuchen versuchte man das Differenzierungsverhalten von Vorläuferzellen der Osteoklasten und die Resorptionsaktivität von reifen Osteoklasten auf den Biokeramiken zu evaluieren. Die Differenzierung wurde durch Messung der TRAP-Enzymaktivität mit Hilfe des EnzChek™ Kits gemessen. Die Evaluierung der Resorptionsaktivität der Osteoklasten auf den Biokeramiken wurde durch Detektion der Endoprotease Cathepsin K durchgeführt.

Für die Bestimmung des Differenzierungsverhalten wurden die gesammelten Zellkulturüberstände der Tage 2, 4, 6, 8 und 10 verglichen. Die **Abbildung 12** zeigt den Verlauf der TRAP-Aktivitäten in den jeweiligen Gruppen. In den Zellkulturüberständen der reinen HA-Disks konnte keine Aktivität gemessen werden. Es stellte sich weiters heraus, dass in keiner Gruppe an Tag 2 eine Aktivität beziehungsweise Differenzierung nachweisbar war. An Tag 4 begann die TRAP-Aktivität zu steigen, wobei die stärkste TRAP-Aktivität auf Knochen ersichtlich war. Neben HA war der schwächste Verlauf der TRAP-Aktivität in der TC-Gruppe zu verzeichnen. Die Differenzierung stieg in allen Gruppen von Tag 4 auf 6 an und zeigte die höchsten Werte in der Knochen-Gruppe. In der 20/80-Gruppe gab es die höchste TRAP-Aktivität an Tag 6. Die TRAP-Aktivität erreichte den höchsten Wert in der 60/40-Gruppe an Tag 8, sie war aber geringer als in der Knochen-Gruppe. An Tag 8 erzielten auch die Zellen auf β -TCP und Knochen die höchsten TRAP-Aktivitäten. Die Differenzierung der Zellen war in allen Gruppen an Tag 10 schwächer als an Tag 8. Zusammenfassend betrachtet, konnten die stärksten TRAP-Aktivitäten an Tag 6 und 8 beobachtet werden.

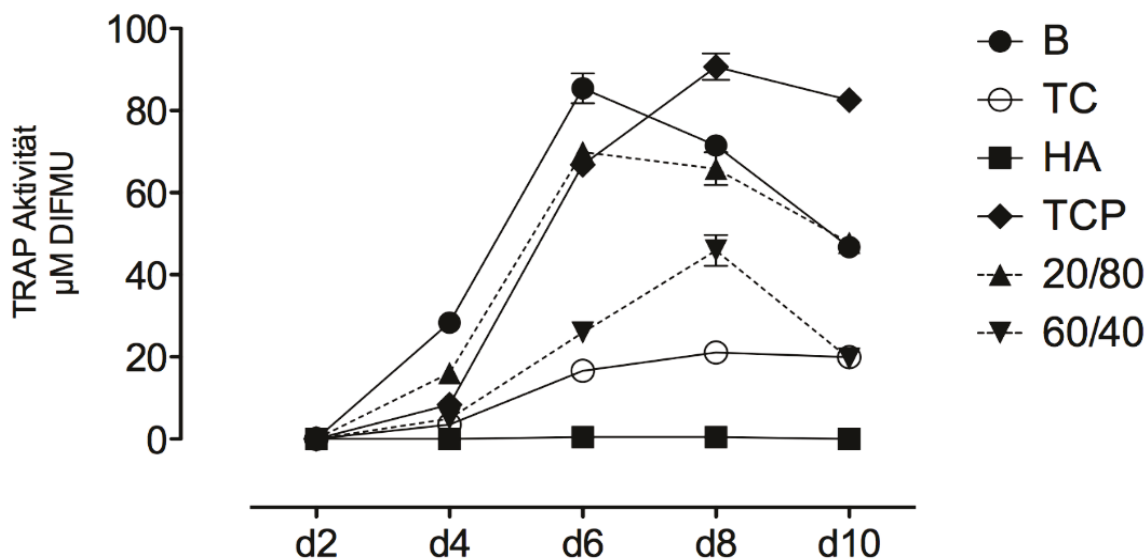


Abbildung 12 Tartrat-resistente saure Phosphatase (TRAP) Aktivität der Osteoklasten einer KM-Kultur auf den Biokeramiken im Vergleich zu Kontrollgruppen, Bestimmung der Aktivität in den Zellkulturüberständen von Tag 2, 4, 6, 8 und 10, (pro μM DIFMU, Mittelwert $\pm$ SEM, $n=6$), TC: Gewebekulturplatte, B: Knochen, TCP: β -Tricalciumphosphat, HA: Hydroxylapatit, 60/40: 60 % HA & 40 % β -TCP, 20/80: 20 % HA & 80 % β -TCP

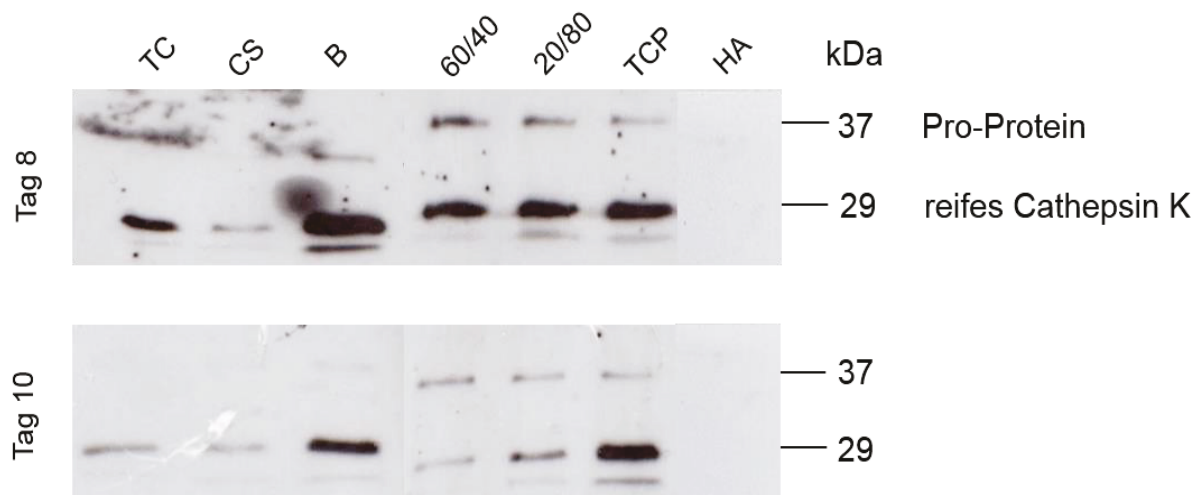


Abbildung 13 Western Blot mit Zellkulturüberständen der KM-Kultur von Tag 8 & 10 auf Biokeramiken und Kontrollgruppen, 50 μg Protein/Tasche, 1. Antikörper: Anti-Cathepsin K 1:100, 2. Antikörper: Anti-mouse IgG HRP conj. 1:2000, TC: Gewebekulturplatte, CS: Glas, B: Knochen, TCP: β -Tricalciumphosphat, HA: Hydroxylapatit, 60/40: 60 % HA & 40 % β -TCP, 20/80: 20 % HA & 80 % β -TCP

Da in den Zellkulturüberständen der Probeläufe vor allem am Tag 8 starke Banden von Cathepsin K in den Gruppen B, TC und CS und somit eine Resorption durch reife Osteoklasten nachgewiesen werden konnte wurden die Zellkulturüberstände von Tag 8 und 10 gesammelt und Cathepsin K detektiert. Cathepsin K-Expression wurde auch in den Zellkulturüberständen der Biokeramiken mit Ausnahme der HA-Gruppe, gefunden und bewirkte sichtbare Banden bei 29 kDA, das Pro-Protein bei 37 kDA (**Abbildung 13**). Eindeutig war zu erkennen, dass die Expression auf den Biokeramiken an Tag 8 stärker als an Tag 10 war. In der Kontrollgruppe CS waren an beiden Tagen nur schwache Banden detektiert worden. Die TC-Kontrolle ergab an Tag 8 eine stärkere Bande als an Tag 10. An beiden Tagen waren starke Banden vor allem in der Knochen- und β -TCP-Gruppe ersichtlich. Die Expression in den beiden BCP-Gruppen war an Tag 10 ungefähr gleich intensiv aber schwächer als in der Knochen-Gruppe.

Durch die Ergebnisse der Evaluierungen konnte auf den optimalen Zeitpunkt zur Testung der Osteoklastogenese auf den verschiedenen Biokeramiken geschlossen werden. Für die RANKL induzierte Osteoklastogenese aus Knochenmarkszellen versuchte man nun, die Zellen für 8 Tage zu kultivieren, da an diesem Tag eindeutig differenzierte Osteoklasten und eine Resorptionsaktivität nachgewiesen werden konnte. Die TRAP-Färbung und Aktivitätsmessung zur Überprüfung des Differenzierungsverhalten und der Cathepsin K-Nachweis zur Bestimmung der Resorptionsaktivität wurden im Anschluss durchgeführt. Da die Aktivität in der CS-Gruppe sehr schwach war, wurde sie für die weiteren Experimente nicht mehr verwendet.

3.3 Effekt von Biokeramiken auf die Osteoklastogenese

3.3.1 Morphologie TRAP+ Osteoklasten auf Biokeramiken

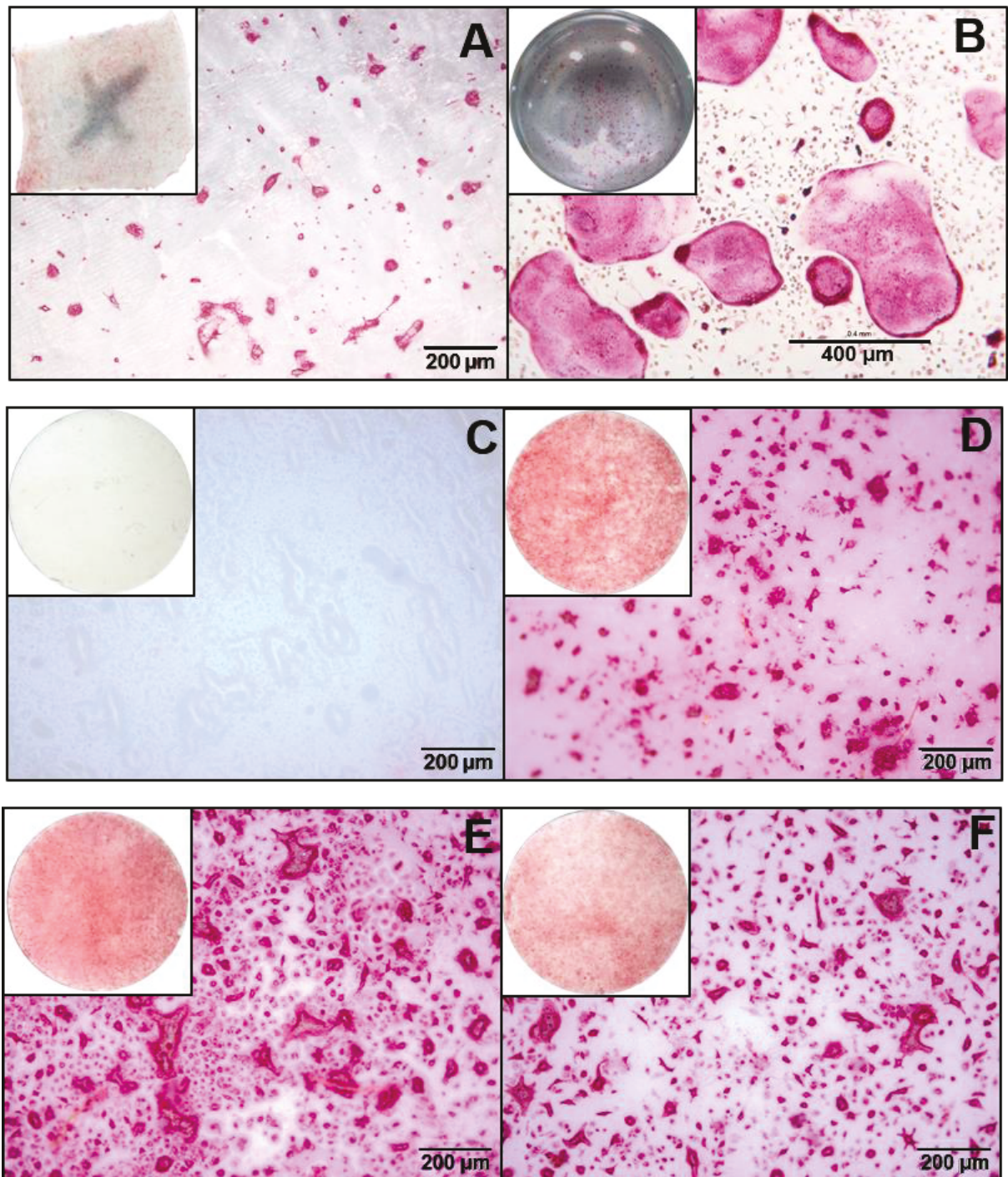


Abbildung 14 Tartrat-resistente saure Phosphatase (TRAP) Färbung der Osteoklasten in einer KM-Kultur auf den jeweiligen Biokeramiken beziehungsweise Kontrollgruppen an Tag 8, Behandlung mit 30 ng/ml M-CSF und 10 ng/ml RANKL, Tag 8, Bild A: Knochen, B: Gewebekulturplatte, C: HA-Hydroxylapatit, D: β -TCP-Tricalciumphosphat, E: 20/80 20 % HA & 80 % β -TCP, F: 60/40 60 % HA & 40 % β -TCP, Maßstab: 200 beziehungsweise 400 μ m

Es konnten TRAP+ Osteoklasten in allen Gruppen, mit Ausnahme der HA-Gruppe, nachgewiesen werden. **Abbildung 14** zeigt die verschiedenen Aufnahmen auf mikroskopischer Ebene und eine Großaufnahme der gesamten Fläche.

Makroskopisch betrachtet konnte eine gleichmäßige und intensive Färbung der Zellen beobachtet werden. Zu erkennen war auch, dass auf den Knochen sowie in der TC-Gruppe weniger gefärbte Zellen vorhanden waren als auf den Biokeramiken. Jedoch waren im Vergleich zur Knochen-Gruppe und den Biokeramiken, sehr große Zellen in der TC-Gruppe ersichtlich. Viele kleine Zellen in dichter Besiedlung waren auf den anderen Biokeramiken zu erkennen. Die β -TCP-Disks ergaben im Vergleich zu den BCP-Disks (20/80 und 60/40) eine etwas intensivere Färbung. Zwischen den BCP-Disks konnten optisch kaum Unterschiede festgestellt werden.

Auf dem Knochen konnte man auf mikroskopischer Ebene nur wenige Zellen mit mehreren Zellkernen erkennen. Sie waren von ihrer Form her den Osteoklasten in der TC-Gruppe ähnlich, jedoch sehr viel kleiner. Einige mehrkernige Zellen hatten zusätzlich zu ihrer rundlichen Gestalt auch mehrere Ausläufer gebildet. Die Zellen auf den β -TCP-Disks waren ähnlich groß wie jene auf den Knochen. Allerdings waren auf den β -TCP-Keramiken Zellverbände mit mehreren Zellkernen und unregelmäßiger Erscheinungsform ersichtlich. Auch die Zellen auf den 20/80-Disks waren in ihrer Form und Größe denen auf den β -TCP sehr ähnlich. Viele gefärbte Zellen waren auf den 60/40-Disks zu sehen, jedoch hatten sie eine abweichende Form zu den Osteoklasten auf den β -TCP- und 20/80-Disks, denn gab es so gut wie keine Zellverbände mehr. Es gab einige größere Zellen mit mehreren Zellkernen und weiters viele kleinere Zellen mit mehreren Zellkernen. Sie erschienen rundlich und hatten vereinzelt Ausläufer wie die Zellen auf den Knochen. Durch das unterschiedliche Aussehen der Zellen konnte ein Einfluss der Biokeramiken auf die Morphologie von Osteoklasten durch diese Färbung gezeigt werden.

3.3.2 Quantifizierung von TRAP+ Osteoklasten auf Biokeramiken

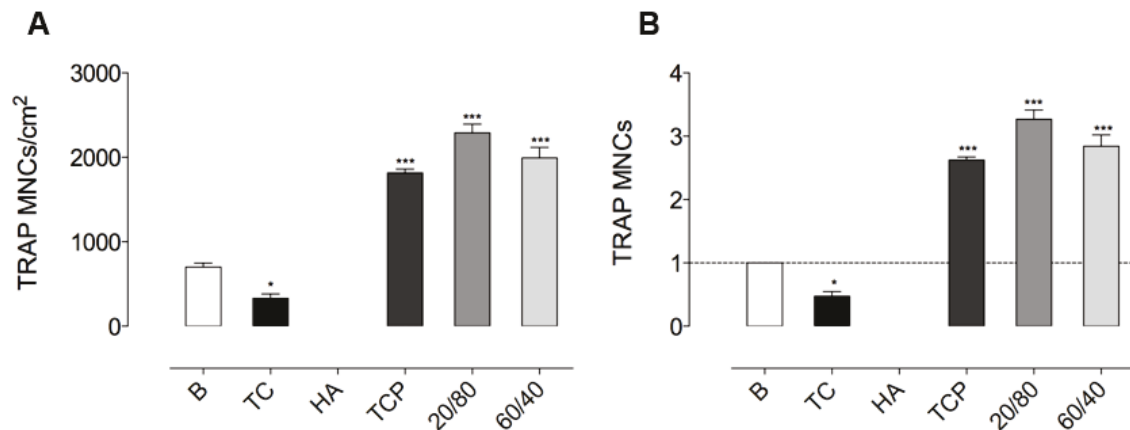


Abbildung 15 Quantifizierung TRAP+ Osteoklasten aus KM-Kultur (Zellkerne ≥ 3). **A:** Absolute Zellzahlen/cm², **B:** TRAP+ Zellen normalisiert, (Mittelwert $\pm$ SEM, n = 6), TC: Gewebekulturplatte, B: Knochen, TCP: β -Tricalciumphosphat, HA: Hydroxylapatit, 60/40: 60 % HA & 40 % β -TCP, 20/80: 20 % HA & 80 % β -TCP, *p < 0,05, *** p < 0,001 vs. Knochen basierend auf „one way ANOVA mit post Tukey's Test“

Tabelle 7 Links: Absolute Zellzahlen TRAP+ MNCs/cm² $\pm$ SEM, **Rechts:** Mittelwerte der korrelierten TRAP+ MNCs $\pm$ SEM nach Bezug auf Knochen, n=6

	<i>absolute Mittelwerte $\pm$ SEM</i>	<i>normierte Werte $\pm$ SEM</i>
B	701 $\pm$ 47,12	1 $\pm$ 0
TC	331 $\pm$ 52,07	0,47 $\pm$ 0,07
HA	0	0
TCP	1815 $\pm$ 45,44	2,59 $\pm$ 0,05
20/80	2291 $\pm$ 101,3	3,27 $\pm$ 0,14
60/40	1993 $\pm$ 124,4	2,84 $\pm$ 0,18

Zur Quantifizierung TRAP+ Osteoklasten auf den Biokeramiken, erfolgte eine Auszählung von allen Osteoklasten, die mehr als 3 Zellkerne enthielten. Die **Abbildung 15** zeigt die absoluten Zellzahlen der verschiedenen Gruppen, beziehungsweise die Korrelation der Zellzahlen zur Knochen-Gruppe. Wie schon bei den Aufnahmen der TRAP-Färbung ersichtlich, ergab die Zählung weniger Zellen in den beiden Kontrollgruppen als auf den Biokeramiken. Es zeigte sich auch, dass es in der TC-Gruppe weniger Zellen als auf den Knochen gab. Es konnten keine TRAP+ MNCs auf den reinen HA-Disks nachgewiesen werden. Weiters war es auffallend, dass die Anzahl der Zellen auf den β -TCP-, 20/80- und 60/40-Disks einen hochsignifikanten Unterschied (p < 0,001) zum Knochen ergaben. Ähnliche Ergebnisse ergab auch der Vergleich zwischen der TC-Gruppe mit den Biokeramiken. Die höchste Zellzahl war auf den 20/80-Disks zu finden. Unterschiede im Vergleich von β -TCP-Disks zu den 20/80-Disks waren leicht signifikant (p < 0,05), im Vergleich zu den 60/40-Disks war kein signifikanter

Unterschied zu erkennen. Auch der Vergleich der BCP-Keramiken ergab keinen signifikanten Unterschied. Sämtliche Kombinationen der Gruppen und deren signifikante Unterschiede sind im Anhang aufgeführt.

3.3.3 Differenzierungsverlauf von Osteoklasten auf Biokeramiken

Um den Differenzierungsverlauf von Vorläuferzellen der Osteoklasten aus KM auf den Biokeramiken zu evaluieren, wurde die TRAP-Enzymaktivität mit Hilfe des EnzChek™ Kits gemessen. Es wurden die gesammelten Zellkulturüberstände der Tage 2, 4, 6 und 8 verglichen.

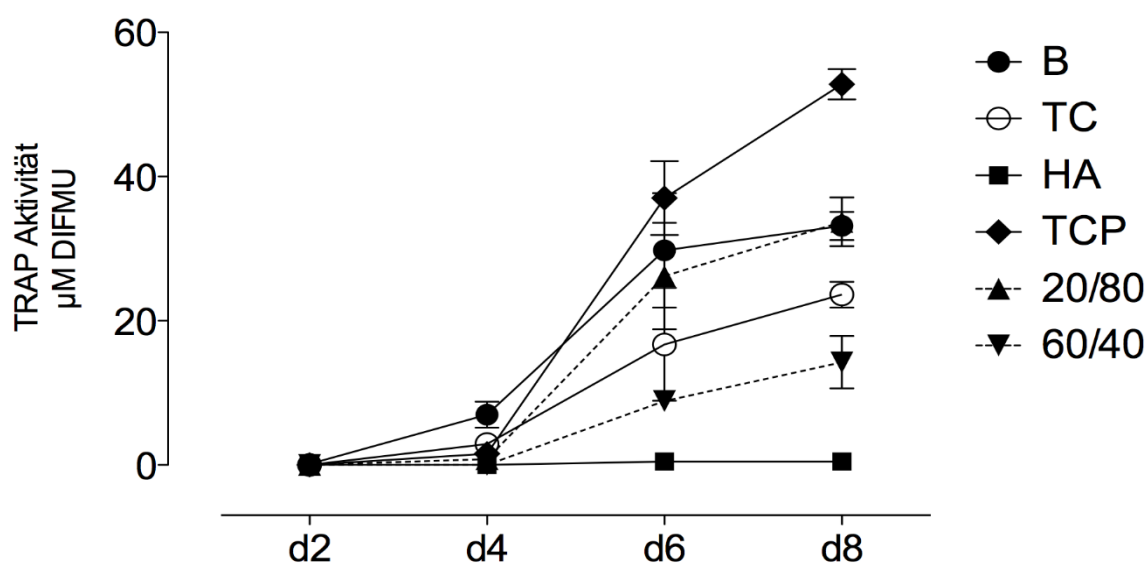


Abbildung 16 Tartrat-resistente saure Phosphatase (TRAP) Aktivität der Osteoklasten einer KM-Kultur auf Biokeramiken im Vergleich zu Kontrollgruppen, Bestimmung der Aktivität in den Zellkulturüberständen von Tag 2, 4, 6 und 8, (pro μM DIFMU, Mittelwert $\pm$ SEM, $n=6$), TC: Gewebekulturplatte, B: Knochen, TCP: β -Tricalciumphosphat, HA: Hydroxylapatit, 60/40: 60 % HA & 40 % β -TCP, 20/80: 20 % HA & 80 % β -TCP

In allen Gruppen, ausgenommen der HA-Gruppe, war zu erkennen, dass es einen stetigen Anstieg der TRAP-Aktivität bis zum Endpunkt am Tag 8 gab. Der Differenzierungsverlauf hatte in allen Gruppen am 8. Tag den Höhepunkt erreicht. Knochen und die TC wurden als Kontrolle verwendet. In keiner Gruppe konnte an Tag 2 eine TRAP-Aktivität beziehungsweise Differenzierung nachgewiesen werden. An Tag 4 begannen die TRAP-Aktivitäten zu steigen, wobei die stärkste TRAP-Aktivität der Zellen auf Knochen ersichtlich war. Ab dem 6. Tag zeigten die Zellen auf den β -TCP-Disks eine höhere TRAP-Aktivität als die auf den Knochen an. Die TRAP-Aktivität in den BCP-Gruppen war schwächer als in den Zellkulturüberständen der Knochen. Die **Abbildung 17** zeigt einen Überblick über die TRAP-Aktivitäten an den einzelnen Tagen 4, 6 und 8. Die TRAP-Aktivitäten in den verschiedenen Gruppen verhielten

sich bis zu Tag 4 noch ähnlich. Es waren keine signifikanten Unterschiede zu erkennen. Von Tag 4 auf Tag 6 änderte sich die Menge der TRAP-Aktivität in allen Gruppen stark, jedoch waren die TRAP-Aktivitäten untereinander noch vergleichbar und es gab keine signifikanten Unterschiede. Von Tag 6 auf Tag 8 änderte sich die TRAP-Aktivität vor allem in der β -TCP- und 60/40-Gruppe, welches zu einem signifikanten Unterschied im Vergleich zu den Knochen führte. Des Weiteren konnten die TRAP-Aktivitäten der einzelnen Tage zwischen 20/80 und den Knochen stets als gleich und ohne signifikanten Unterschiede gesehen werden. Die TRAP-Aktivität in den Zellkulturüberständen von 60/40-Keramiken war schwächer als in den Kontrollgruppen.

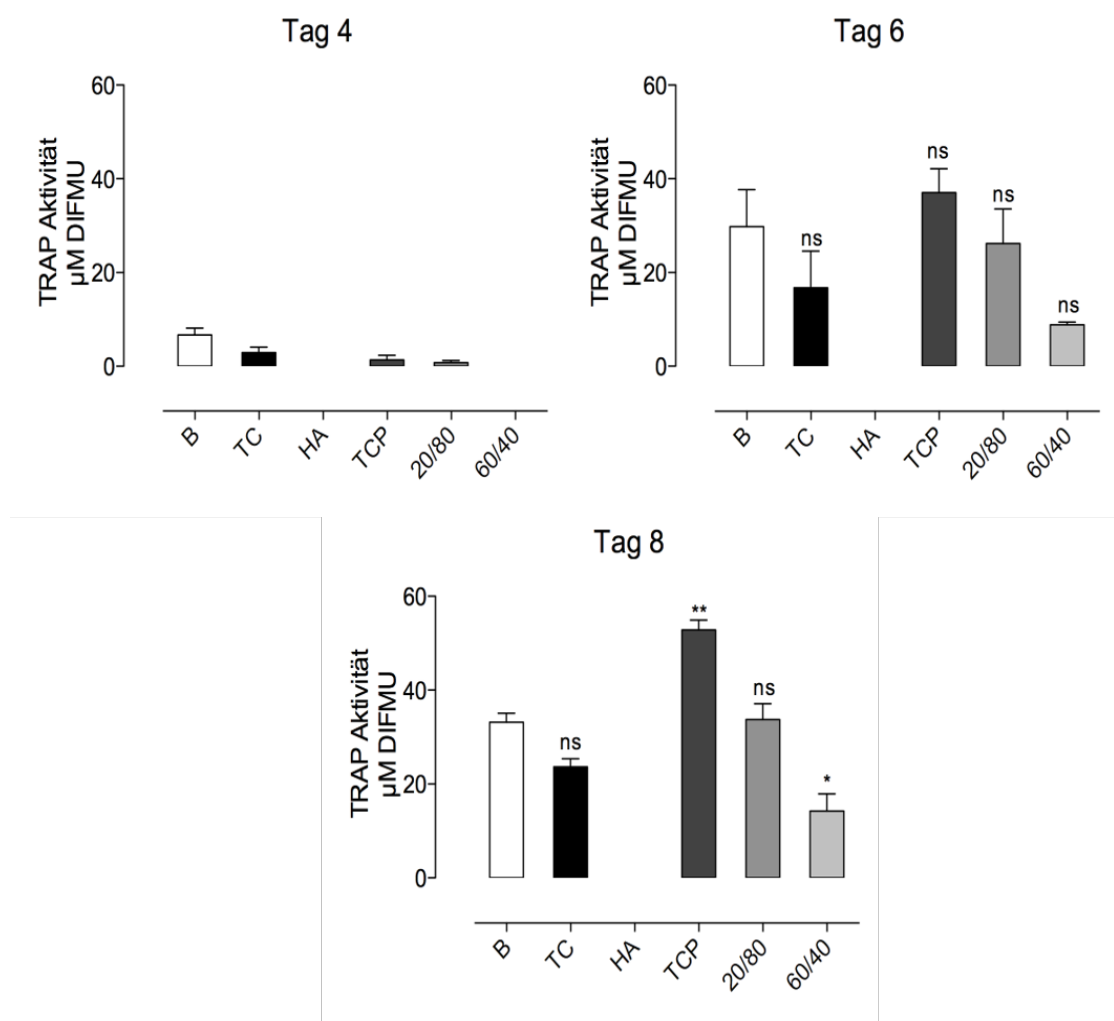


Abbildung 17 Tartrat-resistente saure Phosphatase (TRAP) Aktivität der Osteoklasten einer KM-Kultur auf den jeweiligen Biokeramiken im Vergleich zu Kontrollgruppen, Vergleich der Aktivität in den Zellkulturüberständen von Tag 4, 6 und 8, (pro µM DIFMU, Mittelwerte $\pm$ SEM, n=6), * $p < 0.05$ und ** $p < 0.01$, ns = nicht signifikant vs. Knochen basierend auf „one way ANOVA mit post Tukey’s Test“

3.3.4 Resorptionsfähigkeit der Osteoklasten auf Biokeramiken

Die Resorptionsfähigkeit von reifen Osteoklasten wurde in den Zellkulturüberständen vom 8. Tag mittels Gelelektrophorese und Western Blot durch den Nachweis der Endoprotease Cathepsin K untersucht. Zu den beiden positiven Kontrollgruppen (Behandlung von Knochenplättchen „B1“ und Gewebekulturplatten „TC1“ mit M-CSF und RANKL) wurden zusätzlich noch zwei negative Kontrollgruppen (Behandlung von Knochenplättchen „B2“ und Gewebekulturplatten „TC2“ nur mit M-CSF) hinzugefügt, um zu überprüfen ob die Expression der Protease wirklich nur von den Zellen selber kommt. Um nachzuweisen, ob die Gele gleichmäßig beladen wurden, wurde BSA als Ladekontrolle verwendet. Cathepsin K aus den Zellkulturüberständen bewirkte eindeutige Banden bei 29 kDa, das Pro-Protein bei 37 kDa. Wie **Abbildung 18** zeigt, gab es bei den beiden negativen Kontrollen (TC2 und B2) und HA keine Banden. Bei den beiden positiven Kontrollen (B1 und TC1) waren ungefähr gleich starke Banden sichtbar. Optisch betrachtet gab es die stärkste Bande in den Zellkulturüberständen der β -TCP-Keramiken. Die Expression auf den beiden BCP-Gruppen war im Vergleich gleich intensiv aber schwächer als in der B1- und β -TCP-Gruppe.

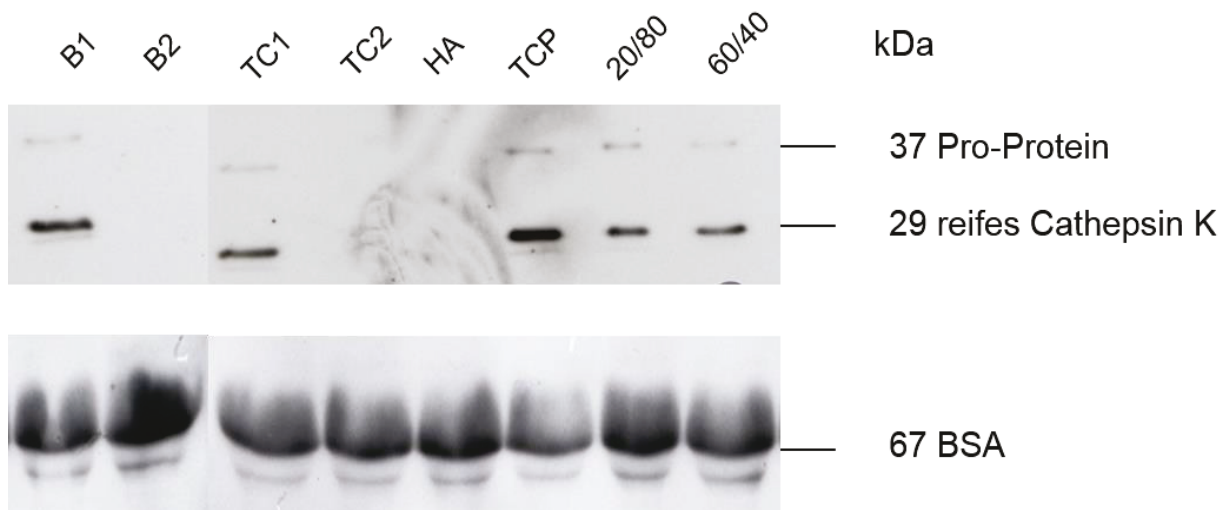


Abbildung 18 Western Blot mit Zellkulturüberständen der KM-Kultur von Tag 8, 50 µg Protein/Tasche, 1. Antikörper: Anti-Cathepsin K 1:100, 2. Antikörper: Anti-mouse IgG HRP conj. 1:2000, Ladekontrolle: BSA 1:1000, TC: Gewebekulturplatte, B: Knochen, TCP: β -Tricalciumphosphat, HA: Hydroxylapatit, 60/40: 60 % HA & 40 % β -TCP, 20/80: 20 % HA & 80 % β -TCP

Eine quantitative Aussage über die Intensität der Banden zeigt **Abbildung 19**. Der relative Prozentanteil der Fläche der Knochen-Gruppe war intensiver als in der TC-Gruppe. In der β -TCP-Gruppe konnte wie optisch beurteilt die größte Fläche gefunden werden. Die BCP-Disks ergaben vergleichbare und deutlich niedrigere Werte als die β -TCP-Gruppe. Zu erkennen war auch, dass die 20/80-Gruppe geringere Werte im Vergleich zur Knochen-Gruppe zeigte.

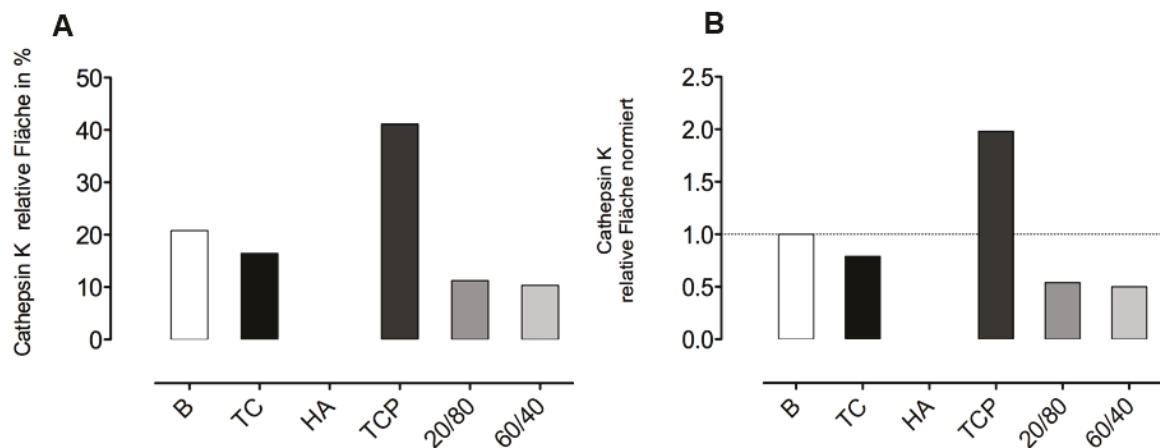


Abbildung 19 Cathepsin K in Zellkulturüberständen von Tag 8, **A:** Vergleich der Flächen aus einem Blot. **B:** relative Flächen normiert, TC: Gewebekulturplatte, B: Knochen, TCP: β -Tricalciumphosphat, HA: Hydroxylapatit, 60/40: 60 % HA & 40 % β -TCP, 20/80: 20 % HA & 80 % β -TCP

Tabelle 8 Repräsentative Daten der Ergebnisse aus einem Blot, Flächen wurden normiert und auf Knochen bezogen, TC: Gewebekulturplatte, B: Knochen, TCP: β -Tricalciumphosphat, HA: Hydroxylapatit, 60/40: 60 % HA & 40 % β -TCP, 20/80: 20 % HA & 80 % β -TCP

	<i>Relative Flächen in %</i>	<i>Normiert</i>
B	20.78	1.00
TC	16,43	0.79
HA	0	0
TCP	41.17	1.98
20/80	11.26	0.54
60/40	10.35	0.50

3.3.5 Korrelation der Ergebnisse

Eine Übersicht über die einzelnen Ergebnisse zeigt **Tabelle 9**. Die Kontrollgruppe TC schnitt schlechter ab als die Kontrollgruppe Knochen. Keine Differenzierung beziehungsweise Resorption konnte auf den reinen HA-Keramiken nachgewiesen werden. Zu erkennen war auch, dass die reinen β -TCP-Keramiken bessere Ergebnisse lieferten als die Knochen-Gruppe. Das Differenzierungsverhalten der Osteoklasten auf den 20/80-Keramiken war stärker, beziehungsweise ähnlich gut wie in der Knochen-Gruppe, jedoch war das Resorptionsverhalten deutlich geringer. In der 60/40-Gruppe war sowohl die Differenzierung als auch die Resorption der Osteoklasten geringer als in der Knochen-Gruppe.

Zusammenfassend konnte man darauf schließen, dass die Biokeramiken einen Einfluss auf die Osteoklastogenese bewirkt haben. HA scheint einen negativen Einfluss auf die Osteoklastogenese zu haben, denn in keiner Testung konnten Zellen beziehungsweise eine Differenzierung oder Resorption von Osteoklasten nachgewiesen werden.

Tabelle 9 Überblick der Ergebnisse der einzelnen Testungen, bezogen auf Knochen als Kontrollgruppe, + gleich wie Kontrolle, ++ besser als Kontrolle, +++ Signifikant besser als Kontrolle, - schlechter als Kontrolle, negativ keine Ergebnisse, TC: Gewebekulturplatte, B: Knochen, TCP: β -Tricalciumphosphat, HA: Hydroxylapatit, 60/40: 60 % HA & 40 % β -TCP, 20/80: 20 % HA & 80 % β -TCP

	<i>TRAP Färbung</i>	<i>TRAP Zählung</i>	<i>TRAP Aktivität</i>	<i>Western Blot</i>
B	+	+	+	+
TC	+	-	-	-
HA	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ
TCP	+++	+++	+++	+++
20/80	+++	+++	+	-
60/40	++	+++	-	-

4 Diskussion und Conclusio

Der Knochenumbau und auch die Integration von Ersatzmaterialien erfordert eine koordinierte Regulierung zwischen der Resorption und Formation von Knochengewebe. Neben vielen Einflussfaktoren, die diesen Prozess steuern, spielt vor allem die Kommunikation zwischen Osteoblasten und Osteoklasten eine wichtige Rolle. Es ist mittlerweile bekannt, dass Osteoklasten nicht nur Knochen resorbieren. Sie können auch die Osteoblastenfunktion und deren Rekrutierung und die Knochenbildungsaktivität steuern (Charles und Aliprantis, 2014). Wie diese Kommunikation genau funktioniert und ob dieser Prozess auch stattfindet, wenn Osteoklasten an Ersatzmaterialien haften, ist noch nicht ganz geklärt.

Im Zuge dieser Arbeit wurde somit die grundlegende Frage untersucht, ob eine Osteoklastendifferenzierung und eine Resorptionsaktivität, auf neuartigen Biokeramiken *in vitro*, stattfinden kann und ob deren chemische Zusammensetzung Einfluss darauf hat.

Die Ergebnisse der Zellzählung zeigten, dass die Zahl an Osteoklasten auf den Biokeramiken signifikant höher als in der Kontrollgruppe Knochen war. Die Zahl der Osteoklasten war in den BCP-Gruppen am höchsten. Eine hohe Anzahl an Osteoklasten deutet aber nicht zwingend auf eine gute Interaktion der Zellen mit dem Biomaterial hin. Denn die Interaktion, auch Biokompatibilität genannt, zwischen Zellen und Biomaterial setzt einen Interaktionsmechanismus voraus (einschließlich spezifischer Adhäsionsproteine und Zellrezeptoren, Signaltransduktion, Zelldifferenzierung, Gewebeentwicklung, um nur einige Prozesse zu nennen) (Gonçalves et al., 2015). Diese Einflüsse sollten überprüft werden, um Zell-Biomaterial-Interaktionen besser zu charakterisieren und kontrollieren zu können. Da keine Zellen in der HA-Gruppe gefunden wurden, konnte man eine Toxizität vermuten. Wie schon Sun et al. (1999) erwähnten, deutet eine niedrige Zellzahl auf einen toxischen Effekt dieses Substrates auf die Zelldifferenzierung und -proliferation hin (Sun et al., 1999).

Mit dem Lichtmikroskop war deutlich zu erkennen, dass sich das Aussehen der Zellen auf den Keramiken von denen auf den Knochen unterschied. Die Osteoklasten auf den Keramiken waren viel kleiner und hatten eine unregelmäßigere Form als die Osteoklasten auf den Knochen. Laut Nakamura et al. (2013) ist der wichtigste Faktor, um eine Differenzierung von Prä-Osteoklasten in reife resorbierende Osteoklasten zu überprüfen, die Morphologie des Aktin-Rings. Dieser Ring dient als eine Art Abdichtung zwischen Osteoklasten und der Knochenoberfläche und unterstützt die Resorption (Nakamura et al., 2013). Durch eine spezielle Färbemethode des Aktin-Rings kann man dessen Morphologie sichtbar machen und von der Größe und Form auf die Resorptionsfähigkeit der Zellen rückschließen. Jedoch war so eine Färbemethode nicht Teil dieser Arbeit und wir versuchten die Morphologie der Zellen

ausschließlich durch mikroskopische Aufnahmen der TRAP-Färbung zu untersuchen. Des Weiteren konnten Zellverbände auf den Keramiken festgestellt werden die Hinweise auf eine andere Interaktion der Zellen mit dem Material im Vergleich zu der Knochenoberfläche zeigten. Wie schon Arkett (1992) feststellte, kann man die resorptive Fähigkeit der Osteoklasten über die Morphologie beurteilen. Er beobachtete, dass kompaktere Osteoklasten Biomaterialien besser resorbierten als „ausgebreitete“ Osteoklasten (Arkett et al., 1992).

Die Osteoklastogenese der Zellen auf den Biokeramiken wurden durch die Faktoren Mehrkernigkeit (Baron et al., 1986), TRAP (Ballanti et al., 1997) und Cathepsin K (Troen, 2004) überprüft. Um die Ergebnisse der TRAP-Färbung und TRAP-Aktivitätsmessung zu bestätigen, wurde die Analyse auf die Expression von Cathepsin K erweitert.

Die TRAP-Aktivitätsmessung in den Zellkulturüberständen, welches während der Knochenresorption von Osteoklasten freigesetzt wird, diente zur Bestimmung des Differenzierungsverhalten dieser Zellen. Die Messungen der β -TCP-Keramiken zeigten, dass die Zellen auf den Keramiken besser differenzierten als auf den Knochen. Die Bestimmung von Cathepsin K in den Zellkulturüberständen, welches dazu beiträgt die kollagene Knochenmatrix abzubauen, wurde zur Kontrolle der Resorptionsfähigkeit der Osteoklasten eingesetzt. Auch hier wurde die höchste Expression in der β -TCP-Gruppe gefunden (Aydin und Pişkin, 2009). Dadurch, dass auf den reinen HA-Keramiken gar keine Resorption stattfand und auf den Keramiken mit mehr HA-Anteil (60/40) deutlich schlechtere Ergebnisse im Vergleich zum Knochen gefunden worden sind, konnte man die Vermutung aufstellen, dass HA einen negativen Einfluss auf die Osteoklastogenese hat. Shiwaku et al. (2015) testete ebenfalls die Osteoklastendifferenzierung auf Biokeramiken mit denselben chemischen Zusammensetzungen und kam bei der TRAP- und Cathepsin K-Messung, jedoch mittels PCR Technik, auf ähnliche Ergebnisse, die zeigten, dass mehr TRAP und Cathepsin K in den Gruppen vorhanden war, die auch mehr β -TCP enthielten. Auch sie bemerkten einen negativen Einfluss von HA auf die Osteoklastendifferenzierung und Resorptionsfähigkeit (Shiwaku et al., 2015).

Zahlreiche Studien belegen die Fähigkeit von Osteoklasten, auf Biokeramiken zu differenzieren und das Material zu resorbieren. Die Resorption hängt dabei von vielen Faktoren ab. Einerseits von der Art und Zusammensetzung des Materials, so testeten schon Yamada (1997) und Detsch (2008) die Resorption durch Osteoklasten auf verschiedenen Calciumphosphat-Keramiken aus (Detsch et al., 2008, Yamada et al., 1997). Andererseits haben die Herkunft der verwendeten Zellen, das Herstellungsverfahren und die

Oberflächenbeschaffenheit der Biomaterialien einen Einfluss auf die Aktivität von Osteoklasten.

An dieser Stelle sollte noch erwähnt werden, dass der Abbau beziehungsweise der Ersatz eines Knochenersatzmaterials nicht allein durch die zellvermittelte Resorption stattfindet. Zum einen kann das Material durch eine Desintegration in einzelne Partikel abgebaut werden, indem es von Makrophagen phagozytiert wird. Zum anderen kann ein Implantat, umgeben von biologischen Flüssigkeiten, durch chemische Dissoziation in seine Bestandteile aufgelöst werden (Langstaff et al., 2001, Sheikh et al., 2015). Wenn wenige Zellen und eine geringe TRAP-Aktivität gefunden werden, kann man davon ausgehen, dass die Resorption durch Osteoklasten eine geringere Rolle spielt und das Biomaterial hauptsächlich durch chemische Dissoziation abgebaut wird (Ghanaati et al., 2010)

Diese Löslichkeit ist auch Grund für die unterschiedliche Resorption der verschiedenen Calciumphosphat-Keramiken. Die quantitative und qualitative Charakterisierung des Abbaus dieser Keramiken war zwar kein Ziel dieser Arbeit, jedoch haben andere Arbeitsgruppen gezeigt, dass reines β -TCP die schnellste Abbaurate im Vergleich zu reinem HA und BCP hat (Klein et al., 1983, Shimazaki und Mooney, 1985). Obwohl β -TCP am löslichsten ist, konnten Yamada et al. (1997) die höchste Resorptionsrate durch Osteoklasten aus Kaninchen Knochenzellen bei einer Zusammensetzung von HA/ β -TCP in einem Verhältnis von 25/75 finden. Es zeigte sich, dass hohe Konzentrationen von Calcium die Aktivität von Osteoklasten hemmt. Da vor allem die Auflösung des leicht löslichen β -TCP, zu hohen intrazellulären Calciumspiegeln führte, kam es bei diesen Keramiken zur Reduktion der Resorption (Yamada et al., 1997). Diese Hypothese konnte aber im Zuge dieser Arbeit nicht bestätigt werden, denn die Ergebnisse zeigten eine deutlich höhere Resorptionsaktivität auf den β -TCP-Disks. Somit kann behauptet werden, dass über die Löslichkeit alleine keine Aussage über die Resorptionsaktivität getroffen werden kann. Es muss andere Einflussfaktoren in der Beschaffenheit der Biokeramiken gegeben haben, die die hohe Resorptionsrate beeinflussten.

Keine Differenzierung und Resorption durch Osteoklasten konnte auf den reinen HA-Keramiken gefunden werden. Laut Yamada et al. (1997) und Monchau et al. (2002) ist die Resorption von HA im Gegensatz zu β -TCP und BCP mit niedrigem HA/ β -TCP-Verhältnis begrenzt. Da sie tiefere und besser abgegrenzte Resorptionslakunen bei β -TCP und BCP gefunden haben als bei HA (Monchau et al., 2002, Yamada et al., 1997). In einigen Studien wurde gezeigt, dass Osteoklasten HA resorbieren können, während in anderen Studien auch keine Resorption durch Osteoklasten von reinem HA stattgefunden hat (de Bruijn et al., 1994,

Gomi et al., 1993, Takeshita et al., 1992, Yamada et al., 1997). Die gegensätzlichen Ergebnisse können durch viele verschiedene Einflüsse entstanden sein, die schon zuvor erwähnt wurden. So hatten Monchau et al. (2002) gezeigt, dass humane Osteoklasten andere Resorptionslakunen bildeten als Osteoklasten von Ratten (Monchau et al., 2002). Auch die experimentellen Bedingungen führten zu verschiedenen Aussagen. Einige Arbeitsgruppen kultivierten Osteoklasten in einer Experiment Dauer von 2 Tagen und fanden keine Osteoklasten auf den jeweiligen HA-Keramiken (Yamada et al., 1997), während andere erst nach 14 Tagen der Kultivierung eine Osteoklastogenese feststellen konnten (Detsch et al., 2008).

Um wieder einen Vergleich für die Löslichkeit im Hinblick auf die Bioresorption zu bekommen sollte erwähnt werden, dass Doi und Co. (1998) beobachtet haben, dass das Lösungsverhalten von synthetisch hergestelltem HA in einem schwach sauren Medium viel ungünstiger war als von echtem Knochenapatit. Auch wir konnten feststellen, dass sich das Kulturmedium der HA-Keramiken, während der Vorinkubation, von den anderen unterschied. Die Farbe des pH-Indikators deutete auf einen niedrigeren pH-Wert in der Gruppe der HA-Keramiken hin (Daten werden nicht gezeigt). Das saure Milieu könnte auch ein Grund für das Ausbleiben der Osteoklastogenese auf reinem HA gewesen sein.

Weiters konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass die Mikroporosität der Oberfläche einen Einfluss auf die Resorption hat. Je höher die Sintertemperatur bei der Herstellung der Keramiken war, desto geringer war die Mikroporosität und desto besser war die Resorption (Zimmer et al., 2012). Während dieser Diplomarbeit lagen keine Informationen über den Herstellungsprozess und die Oberflächeneigenschaften der Materialien vor. Man könnte davon ausgehen, dass die Oberflächenstruktur der HA-Keramiken durch die Herstellungsart zu porös war und die Zellen sich nicht gut ansiedeln konnten.

Nachdem in dieser Arbeit nur mit Osteoklasten gearbeitet wurde, sollte weiterführend neben der Resorption auch die Knochenformation auf den Biokeramiken getestet werden. Viele Studien mit BCP-Keramiken wurden schon darüber veröffentlicht. So testeten Arinze et al. (2004) die Knochenformation auf Keramiken mit denselben Zusammensetzungen wie in dieser Diplomarbeit aus. Es wurde zwar zusätzlich mit humanen Stammzellen gearbeitet, jedoch kam man zu dem Ergebnis, dass die deutlichste Knochenformation auf den Keramiken mit einem HA/ β -TCP-Verhältnis von 20/80 stattgefunden hat (Arinze et al., 2005). Da in dieser Diplomarbeit im Verhältnis die BCP-Gruppe 20/80 gute Resorptionsaktivitäten mit vergleichbaren Aktivitäten wie die Knochen-Gruppe zeigte, konnte man darauf schließen, dass dieses Material günstige Voraussetzungen für den Knochenumbau mit sich bringt.

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit, dass Osteoklasten auf den verschiedenen neuartigen Biokeramiken zur Differenzierung und Resorption *in vitro* befähigt waren. Die Ergebnisse der Resorptionsaktivität waren in allen Gruppen in unterschiedlichem Ausmaß vorhanden. Es konnte keine Osteoklastogenese auf reinem HA gefunden werden. Je geringer der Prozentsatz an HA in den biphasischen Calciumphosphat-Keramiken war, desto besser war die Fähigkeit von Osteoklasten-Vorläufern zu reifen Osteoklasten zu differenzieren und die Biokeramiken zu resorbieren. Das Ziel dieser Arbeit, die Kultivierung von Osteoklasten auf den Biokeramiken, konnte durch das erfolgreiche Gestalten des experimentellen Designs, erreicht werden. Weitere Schritte zur Überprüfung der osteoanabolischen Aktivität ausgewählter Clastokine auf diesen synthetischen Calciumphosphat-Keramiken können somit durchgeführt werden und zum Verständnis der Knochenregeneration in Kombination mit Biomaterialien beitragen.

5 Zusammenfassung

Bei Knochendefekten werden für gewöhnlich autogene Knochentransplantationen durchgeführt. Immer mehr an Bedeutung gewinnen jedoch die Transplantationen von Knochenersatzmaterialien. Infolgedessen kam es in den letzten Jahrzehnten zur Entwicklung einer großen Anzahl verschiedenster Knochenersatzstoffe.

Eine noch ungelöste Frage stellt sich im Verständnis der Knochenregeneration. Osteoklasten können neben der Resorption von Knochen auch eine Rolle beim Knochenaufbau spielen, indem sie die Osteoblastenfunktion durch Produktion von sogenannten „Clastokinen“ regulieren. Bei der Frage, wie diese Kommunikation im Knochenumbau genau funktioniert und speziell in Kombination mit Biomaterialien, ist noch nicht aufgeklärt. Um die osteoanabolische Aktivität ausgewählter Clastokine auf synthetischen Calciumphosphat-Keramiken zu untersuchen, sollte zuerst untersucht werden, ob Osteoklasten auf diesen Biokeramiken kultivierbar sind.

So wurde die Osteoklastogenese auf Biokeramiken mit unterschiedlicher chemischer Zusammensetzung *in vitro* getestet. Die verschiedenen Biokeramiken bestanden aus reinem Hydroxylapatit (HA), reinem β -Tricalciumphosphat (β -TCP) und Mischungen der zwei Komponenten im Verhältnis 20/80 HA/ β -TCP und 60/40 HA/ β -TCP. Eine Differenzierung von Knochenmarkszellen zu resorbierenden Osteoklasten auf den Biokeramiken wurde mit M-CSF und RANKL eingeleitet. Als Kontrollgruppe dienten Knochenplättchen, die aus Rinderknochen hergestellt wurden. Um die Osteoklastogenese der Zellen auf den Biokeramiken nachzuweisen, wurden mehrere Faktoren angewendet. Das Differenzierungsverhalten wurde durch eine TRAP-Färbung der Zellen und einer TRAP-Aktivitätsmessung im Zellkulturüberstand nachgewiesen. Die Resorptionsaktivität wurde durch Detektion des Enzyms Cathepsin K mittels Western Blot und anschließender Immundetektion bestimmt.

Zusammenfassend deuten die Befunde dieser Arbeit darauf hin, dass Osteoklasten auf diesen verschiedenen Biokeramiken zur Differenzierung und Resorption *in vitro* befähigt waren. Einen negativen Einfluss auf die Osteoklastogenese scheint HA zu haben, denn es hat keine, beziehungsweise eine schlechtere Differenzierung und Resorption von Osteoklasten auf den Keramiken mit HA stattgefunden. Je niedriger der Anteil an HA war, desto größer war die Fähigkeit von Osteoklasten-Vorläufern zu reifen Osteoklasten zu differenzieren und die Biokeramiken zu resorbieren.

6 Abstract

Bone defects are frequently treated with autogenous bone grafting. However, the transplantation of bone substitute materials is becoming increasingly important. Consequently, many different bone substitutes have been developed in recent decades.

A question came up in the understanding of bone regeneration. It was reported that osteoclasts, in addition to resorbing bone, can potentially contribute to bone formation by stimulating osteoblast function through the production of clastokines. The question how this communication system exactly works in bone remodeling and in combination with biomaterials is still unclear. To investigate the osteoanabolic activity of selected clastokines on synthetic calcium phosphate ceramics, I first investigated whether osteoclasts can be cultivated on these bioceramics.

Therefore, osteoclastogenesis was tested on bioceramics with different chemical composition *in vitro*. The various bioceramic discs consisted of hydroxyapatite (HA), β -tricalcium phosphate (β -TCP) and mixtures of the two components in the ratio 20/80 HA/ β -TCP and 60/40 HA/ β -TCP. The differentiation of bone marrow cells into resorbing osteoclasts on bioceramics surfaces was initiated with M-CSF and RANKL. Bovine bone was used as a comparison. Several factors have been used to prove osteoclast differentiation on the bioceramics. The differentiation behavior was detected by TRAP-staining and a TRAP-activity measurement in the cell culture supernatants. The resorption activity was determined by detection of the enzyme cathepsin K using Western blotting and immunodetection.

In summary, the findings suggest that osteoclasts were capable to differentiate and show resorptive activity on these various bioceramics tested *in vitro*. HA alone seemed to have a negative impact on osteoclastogenesis as no differentiation or resorption of osteoclasts has occurred. The lower the amount of HA in the bioceramic, the higher was the ability of osteoclast precursors to differentiate into mature osteoclasts and to resorb the bioceramics.

7 Literaturverzeichnis

- Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL, Dougall WC, Tometsko ME, Roux ER, Teepe MC, DuBose RF, Cosman D, Galibert L. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature*. 1997;390(6656):175-9.
- Arinzech TL, Tran T, McAlary J, Daculsi G. A comparative study of biphasic calcium phosphate ceramics for human mesenchymal stem-cell-induced bone formation. *Biomaterials*. 2005;26(17):3631-8.
- Arkett SA, Dixon SJ, Sims SM. Substrate influences rat osteoclast morphology and expression of potassium conductances. *The Journal of physiology*. 1992;458:633-53.
- Aydin HM, Pişkin E. Cathepsin K/TRAP: Can they be used to induce osteogenesis? *Medical hypotheses*. 2009;72(4):464-5.
- Ballanti P, Minisola S, Pacitti MT, Scarnecchia L, Rosso R, Mazzuoli GF, Bonucci E. Tartrate-resistant acid phosphate activity as osteoclastic marker. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*. 1997;7(1):39-43.
- Baron R, Neff L, Tran Van P, Nefussi JR, Vignery A. Kinetic and cytochemical identification of osteoclast precursors and their differentiation into multinucleated osteoclasts. *The American Journal of Pathology*. 1986;122(2):363-78.
- Barradas AM, Yuan H, van Blitterswijk C, Habibovic P. Osteoinductive biomaterials: current knowledge of properties, experimental models and biological mechanisms. *European cells & materials*. 2010;21:407-29.
- Black CRM, Goriainov V, Gibbs D, Kanczler J, Tare RS, Oreffo ROC. Bone Tissue Engineering. *Current Molecular Biology Reports*. 2015;1(3):132-40.
- Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*. 2003;423(6937):337-42.
- Calori GM, Mazza E, Colombo M, Ripamonti C. The use of bone-graft substitutes in large bone defects: Any specific needs? *Injury*. 2011;42:56-63.
- Capulli M, Paone R, Rucci N. Osteoblast and osteocyte: Games without frontiers. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2014;561:3-12.
- Charles JF, Aliprantis AO. Osteoclasts: more than 'bone eaters'. *Trends in molecular medicine*. 2014;20(8):449-59.

- Clarke B. Normal Bone Anatomy and Physiology. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology : CJASN*. 2008;3(3):131-9.
- Daculsi G, Fellah BH, Miramond T, Durand M. Osteoconduction, Osteogenicity, Osteoinduction, what are the fundamental properties for a smart bone substitutes. *IRBM*. 2013;34(4):346-8.
- de Bruijn JD, Bovell YP, Davies JE, van Blitterswijk CA. Osteoclastic resorption of calcium phosphates is potentiated in postosteogenic culture conditions. *J Biomed Mater Res*. 1994;28(1):105-12.
- Detsch R, Mayr H, Ziegler G. Formation of osteoclast-like cells on HA and TCP ceramics. *Acta Biomaterialia*. 2008;4(1):139-48.
- Dimitriou R, Tsiridis E, Giannoudis PV. Current concepts of molecular aspects of bone healing. *Injury*. 2005;36(12):1392-404.
- Einhorn TA, Gerstenfeld LC. Fracture healing: mechanisms and interventions. *Nature Reviews Rheumatology*. 2015;11(1):45.
- Florencio-Silva R, Sasso GRdS, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *BioMed Research International*. 2015;2015:421746.
- Fröhlich M, Grayson WL, Wan LQ, Marolt D, Drobnic M, Vunjak-Novakovic G. Tissue Engineered Bone Grafts: Biological Requirements, Tissue Culture and Clinical Relevance. *Current stem cell research & therapy*. 2008;3(4):254-64.
- Frost HM, Straatsma C. Bone remodelling dynamics. LWW; 1964.
- Fuchs J, Kossler W. *Bioceramics : Properties, Preparation and Applications* New York: Nova Science Publishers, Inc. 2009.
- Ghanaati S, Barbeck M, Orth C, Willershausen I, Thimm BW, Hoffmann C, Rasic A, Sader RA, Unger RE, Peters F, Kirkpatrick CJ. Influence of beta-tricalcium phosphate granule size and morphology on tissue reaction in vivo. *Acta Biomater*. 2010;6(12):4476-87.
- Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E. Bone substitutes: An update. *Injury*. 2005;36(3):20-7.
- Gomi K, Lowenberg B, Shapiro G, Davies JE. Resorption of sintered synthetic hydroxyapatite by osteoclasts in vitro. *Biomaterials*. 1993;14(2):91-6.
- Gonçalves S, Dourado F, Rodrigues LR. Overview on Cell-Biomaterial Interactions. In: Puoci F, editor. *Advanced Polymers in Medicine*. Cham: Springer International Publishing; 2015; p. 91-128.

- Hadjidakis DJ, Androulakis II. Bone Remodeling. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2006;1092(1):385-96.
- Hench LL. Bioceramics. *Journal of the American Ceramic Society*. 1998;81(7):1705-28.
- Hench LL. An introduction to bioceramics: World Scientific Publishing Company. 2013.
- Hing KA. Bioceramic Bone Graft Substitutes: Influence of Porosity and Chemistry. *International Journal of Applied Ceramic Technology*. 2005:184.
- Khosla S. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology*. 2001;142(12):5050-5.
- Klein C, Driessen A, De Groot K, Van Den Hooff A. Biodegradation behavior of various calcium phosphate materials in bone tissue. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 1983;17(5):769-84.
- Kölliker A. Die normale Resorption des Knochengewebes und ihre Bedeutung für die Entstehung der typischen Knochenformen: Vogel. 1873.
- Kondo N, Ogose A, Tokunaga K, Umezue H, Arai K, Kudo N, Hoshino M, Inoue H, Irie H, Kuroda K, Mera H, Endo N. Osteoinduction with highly purified β -tricalcium phosphate in dog dorsal muscles and the proliferation of osteoclasts before heterotopic bone formation. *Biomaterials*. 2006;27(25):4419-27.
- Kraus KH, Kirker-Head C. Mesenchymal Stem Cells and Bone Regeneration. Malden, USA 1996; p. 232.
- Kular J, Tickner J, Chim SM, Xu J. An overview of the regulation of bone remodelling at the cellular level. *Clinical Biochemistry*. 2012;45(12):863-73.
- Langstaff S, Sayer M, Smith TJ, Pugh SM. Resorbable bioceramics based on stabilized calcium phosphates. Part II: evaluation of biological response. *Biomaterials*. 2001;22(2):135-50.
- Lee NK. Molecular Understanding of Osteoclast Differentiation and Physiology. *Endocrinol Metab*. 2010;25(4):264-9.
- Li J, Stocum DL. Chapter 10 - Fracture Healing A2 - Burr, David B. In: Allen MR, editor. *Basic and Applied Bone Biology*. San Diego: Academic Press; 2014; p. 205-23.
- Lobo SE, Livingston Arinzeh T. Biphasic Calcium Phosphate Ceramics for Bone Regeneration and Tissue Engineering Applications. *Materials*. 2010;3(2):815.

- Logar DB, Komadina R, Preželj J, Ostanek B, Trošt Z, Marc J. Expression of bone resorption genes in osteoarthritis and in osteoporosis. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*. 2007;25(4):219-25.
- Marsell R, Einhorn TA. The Biology of Fracture Healing. *Injury*. 2011;42(6):551-5.
- Matsuoka K, Park KA, Ito M, Ikeda K, Takeshita S. Osteoclast-derived complement component 3a stimulates osteoblast differentiation. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2014;29(7):1522-30.
- Monchau F, Lefevre A, Descamps M, Belquin-myrdycz A, Laffargue P, Hildebrand HF. In vitro studies of human and rat osteoclast activity on hydroxyapatite, beta-tricalcium phosphate, calcium carbonate. *Biomolecular engineering*. 2002;19(2-6):143-52.
- Murphy C, O'Brien F, Little D, Schindeler A. Cell-scaffold interactions in the bone tissue engineering triad. 2013.
- Murrills RJ, Dempster DW, Arnett TR. Isolation and culture of osteoclasts and osteoclast resorption assays. In: Arnett TR, Henderson B, editors. *Methods in Bone Biology*. Boston, MA: Springer US; 1998; p. 64-105.
- Nakamura M, Hentunen T, Salonen J, Nagai A, Yamashita K. Characterization of bone mineral-resembling biomaterials for optimizing human osteoclast differentiation and resorption. *Journal of biomedical materials research Part A*. 2013;101(11):3141-51.
- Negishi-Koga T, Shinohara M, Komatsu N, Bito H, Kodama T, Friedel RH, Takayanagi H. Suppression of bone formation by osteoclastic expression of semaphorin 4D. *Nature medicine*. 2011;17(11):1473-80.
- O'Brien FJ. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials Today*. 2011;14(3):88-95.
- Osdoby P, Anderson F, Maloney W, Collin-Osdoby P. Isolation and cultivation of osteoclasts and osteoclast-like cells. *Human cell culture: Springer*; 2002; p. 147-69.
- Pederson L, Ruan M, Westendorf JJ, Khosla S, Oursler MJ. Regulation of bone formation by osteoclasts involves Wnt/BMP signaling and the chemokine sphingosine-1-phosphate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105(52):20764-9.
- Raggatt LJ, Partridge NC. Cellular and Molecular Mechanisms of Bone Remodeling. *The Journal of Biological Chemistry*. 2010;285(33):25103-8.

- Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE. Introduction - Biomaterials Science: An Evolving, Multidisciplinary Endeavor. Biomaterials Science: An Introduction to Materials: Third Edition, 1 January 2013,. 2013:225.
- Roseti L, Parisi V, Petretta M, Cavallo C, Desando G, Bartolotti I, Grigolo B. Scaffolds for Bone Tissue Engineering: State of the art and new perspectives. Materials Science and Engineering: C. 2017;78:1246-62.
- Ross FP, Christiano AM. Nothing but skin and bone. The Journal of Clinical Investigation. 2006;116(5):1140-9.
- Rucci N. Molecular biology of bone remodelling. Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism. 2008;5(1):49-56.
- Ryu J, Kim HJ, Chang EJ, Huang H, Banno Y, Kim HH. Sphingosine 1-phosphate as a regulator of osteoclast differentiation and osteoclast-osteoblast coupling. The EMBO journal. 2006;25(24):5840-51.
- Sheikh Z, Abdallah M-N, Hanafi AA, Misbahuddin S, Rashid H, Glogauer M. Mechanisms of in Vivo Degradation and Resorption of Calcium Phosphate Based Biomaterials. Materials. 2015;8(11):7913-25.
- Shimazaki K, Mooney V. Comparative study of porous hydroxyapatite and tricalcium phosphate as bone substitute. Journal of orthopaedic research. 1985;3(3):301-10.
- Shiwaku Y, Neff L, Nagano K, Takeyama K-I, de Bruijn J, Dard M, Gori F, Baron R. The Crosstalk between Osteoclasts and Osteoblasts Is Dependent upon the Composition and Structure of Biphasic Calcium Phosphates. Plos One. 2015;10(7):132.
- Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Sander S, Van G, Tarpley J, Derby P, Lee R, Boyle WJ. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. Cell. 1997;89(2):309-19.
- Sims NA, Martin TJ. Coupling the activities of bone formation and resorption: a multitude of signals within the basic multicellular unit. Bonekey Rep. 2014;3:481.
- Stanovici J, Le Nail LR, Brennan MA, Vidal L, Trichet V, Rosset P, Layrolle P. Bone regeneration strategies with bone marrow stromal cells in orthopaedic surgery. Current Research in Translational Medicine. 2016;64(2):83-90.
- Stenbeck G. Formation and function of the ruffled border in osteoclasts. Seminars in Cell & Developmental Biology. 2002;13(4):285-92.

- Sun JS, Lin FH, Hung TY, Tsuang YH, Chang WHS, Liu HC. The influence of hydroxyapatite particles on osteoclast cell activities. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1999;45(4):311-21.
- Takeshita N, Akagi T, Yamasaki M, Ozeki T, Nojima T, Hiramatsu Y, Nagai N. Osteoclastic features of multinucleated giant cells responding to synthetic hydroxyapatite implanted in rat jaw bone. *Journal of electron microscopy*. 1992;41(3):141-6.
- Takeshita S, Fumoto T, Matsuoka K, Park KA, Aburatani H, Kato S, Ito M, Ikeda K. Osteoclast-secreted CTHRC1 in the coupling of bone resorption to formation. *J Clin Invest*. 2013;123(9):3914-24.
- Teitelbaum SL. Bone Resorption by Osteoclasts. *Science*. 2000;289:1504.
- Troen BR. The role of cathepsin K in normal bone resorption. *Drug news & perspectives*. 2004;17(1):19-28.
- Vaccaro AR. The role of the osteoconductive scaffold in synthetic bone graft. *Orthopedics*. 2002;25(5):571-8.
- Verbruggen S. *Mechanobiological Origins of Osteoporosis*. 2013.
- Williams DF. There is no such thing as a biocompatible material. *Biomaterials*. 2014;35(38):10009-14.
- Wong BR, Josien R, Lee SY, Sauter B, Li HL, Steinman RM, Choi Y. TRANCE (tumor necrosis factor [TNF]-related activation-induced cytokine), a new TNF family member predominantly expressed in T cells, is a dendritic cell-specific survival factor. *The Journal of experimental medicine*. 1997;186(12):2075-80.
- Wu C, Chang J, Xiao Y. *Advanced bioactive inorganic materials for bone regeneration and drug delivery*: CRC Press. 2013.
- Yamada S, Heymann D, Bouler JM, Daculsi G. Osteoclastic resorption of calcium phosphate ceramics with different hydroxyapatite/ β -tricalcium phosphate ratios. *Biomaterials*. 1997;18(15):1037-41.
- Zamborsky R, Svec A, Bohac M, Kilian M, Kokavec M. *Infection in Bone Allograft Transplants*. 2016.
- Zhao C, Irie N, Takada Y, Shimoda K, Miyamoto T, Nishiwaki T, Suda T, Matsuo K. Bidirectional ephrinB2-EphB4 signaling controls bone homeostasis. *Cell metabolism*. 2006;4(2):111-21.

Zimmer G, Rohrhofer A, Hoffmann O. The surface porosity of ceramic biomaterials predefines the activity and resorption capacity of osteoclasts. Osteoporosis International: Springer London LTD; 2012; p. 369.

8 Abbildungsverzeichnis

Ich habe mich bemüht, sämtliche Inhaber der Bildrechte ausfindig zu machen und ihre Zustimmung zur Verwendung der Bilder in dieser Arbeit eingeholt. Sollte dennoch eine Urheberrechtsverletzung bekannt werden, ersuche ich um Meldung bei mir.

Abbildung 1 Regulation der Osteoklastendifferenzierung, (Lee, 2010).....	11
Abbildung 2 Mechanismus der Knochenresorption, (Ross und Christiano, 2006)	12
Abbildung 3 Phasen des Knochenumbaus, (Verbruggen, 2013).....	14
Abbildung 4 Phasen der Fraktur Heilung, modifiziert nach Einhorn und Gerstenfeld, 2014	15
Abbildung 5 Hauptkomponenten des BTE, (Murphy et al., 2013).....	17
Abbildung 6 Einteilung Knochenersatzmaterialien modifiziert nach Sharif et al., 2016.....	19
Abbildung 7 Makro- und Mikrostruktur von β -TCP (OSferion®), Makroporen von 100 – 500 μ m (A), Mikroporen <5 μ m, Skala 1 mm (A), 10 μ m (B), (Kondo et al., 2006).....	20
Abbildung 8 Design des Experiments	22
Abbildung 9 Stammzellendifferenzierung, (Lee, 2010).....	28
Abbildung 10 Tartrat-resistente saure Phosphatase (TRAP) Färbung der Osteoklasten in einer KM-Kultur behandelt mit 30 ng/ml M-CSF und 10 ng/ml RANKL, nach 5, 6, 8 und 10 Tagen der Kultivierung, Spalte A (links): Knochen, B (mitte): Gewebekulturplatte, C (rechts): Glas, Maßstab: 200 μ m beziehungsweise 400 μ m	44
Abbildung 11 Western Blot mit Zellkulturüberständen der KM-Kultur von Tag 2, 4, 5, 8 & 10, 50 μ g Protein/Tasche, 1. Antikörper: Anti-Cathepsin K 1:100, 2. Antikörper: Anti-mouse IgG HRP conj. 1:2000, TC: Gewebekulturplatte, CS: Glas, B: Knochen.....	45
Abbildung 12 Tartrat-resistente saure Phosphatase (TRAP) Aktivität der Osteoklasten einer KM-Kultur auf den Biokeramiken im Vergleich zu Kontrollgruppen, Bestimmung der Aktivität in den Zellkulturüberständen von Tag 2, 4, 6, 8 und 10, (pro μ M DIFMU, Mittelwert $\pm$ SEM, n=6), TC: Gewebekulturplatte, B: Knochen, TCP: β -Tricalciumphosphat, HA: Hydroxylapatit, 60/40: 60 % HA & 40 % β -TCP, 20/80: 20 % HA & 80 % β -TCP	47
Abbildung 13 Western Blot mit Zellkulturüberständen der KM-Kultur von Tag 8 & 10 auf Biokeramiken und Kontrollgruppen, 50 μ g Protein/Tasche, 1. Antikörper: Anti-Cathepsin K 1:100, 2. Antikörper: Anti-mouse IgG HRP conj. 1:2000, TC: Gewebekulturplatte, CS: Glas, B: Knochen, TCP: β -Tricalciumphosphat, HA: Hydroxylapatit, 60/40: 60 % HA & 40 % β -TCP, 20/80: 20 % HA & 80 % β -TCP	47
Abbildung 14 Tartrat-resistente saure Phosphatase (TRAP) Färbung der Osteoklasten in einer KM-Kultur auf den jeweiligen Biokeramiken beziehungsweise Kontrollgruppen an Tag 8, Behandlung mit 30 ng/ml M-CSF und 10 ng/ml RANKL, Tag 8, Bild A: Knochen, B:	

Gewebekulturplatte, C: HA-Hydroxylapatit, D: β -TCP-Tricalciumphosphat, E: 20/80 20 % HA & 80 % β -TCP, F: 60/40 60 % HA & 40 % β -TCP, Maßstab: 200 beziehungsweise 400 μ m

Abbildung 15 Quantifizierung TRAP+ Osteoklasten aus KM-Kultur (Zellkerne ≥ 3). **A:** Absolute Zellzahlen/cm², **B:** TRAP+ Zellen normalisiert, (Mittelwert $\pm$ SEM, n = 6), TC: Gewebekulturplatte, B: Knochen, TCP: β -Tricalciumphosphat, HA: Hydroxylapatit, 60/40: 60 % HA & 40 % β -TCP, 20/80: 20 % HA & 80 % β -TCP, *p< 0.05, *** p<0.001 vs. Knochen basierend auf „one way ANOVA mit post Tukey’s Test“ 51

Abbildung 16 Tartrat-resistente saure Phosphatase (TRAP) Aktivität der Osteoklasten einer KM-Kultur auf Biokeramiken im Vergleich zu Kontrollgruppen, Bestimmung der Aktivität in den Zellkulturüberständen von Tag 2, 4, 6 und 8, (pro μ m DIFMU, Mittelwert $\pm$ SEM, n=6), TC: Gewebekulturplatte, B: Knochen, TCP: β -Tricalciumphosphat, HA: Hydroxylapatit, 60/40: 60 % HA & 40 % β -TCP, 20/80: 20 % HA & 80 % β -TCP 52

Abbildung 17 Tartrat-resistente saure Phosphatase (TRAP) Aktivität der Osteoklasten einer KM-Kultur auf den jeweiligen Biokeramiken im Vergleich zu Kontrollgruppen, Vergleich der Aktivität in den Zellkulturüberständen von Tag 4, 6 und 8, (pro μ M DIFMU, Mittelwerte $\pm$ SEM, n=6), *p< 0.05 und **p<0,01, ns = nicht signifikant vs. Knochen basierend auf „one way ANOVA mit post Tukey’s Test“ 53

Abbildung 18 Western Blot mit Zellkulturüberständen der KM-Kultur von Tag 8, 50 μ g Protein/Tasche, 1. Antikörper: Anti-Cathepsin K 1:100, 2. Antikörper: Anti-mouse IgG HRP conj. 1:2000, Ladekontrolle: BSA 1:1000, TC: Gewebekulturplatte, B: Knochen, TCP: β -Tricalciumphosphat, HA: Hydroxylapatit, 60/40: 60 % HA & 40 % β -TCP, 20/80: 20 % HA & 80 % β -TCP..... 54

Abbildung 19 Cathepsin K in Zellkulturüberständen von Tag 8, **A:** Vergleich der Flächen aus einem Blot. **B:** relative Flächen normiert, TC: Gewebekulturplatte, B: Knochen, TCP: β -Tricalciumphosphat, HA: Hydroxylapatit, 60/40: 60 % HA & 40 % β -TCP, 20/80: 20 % HA & 80 % β -TCP..... 55

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Überblick über die verwendeten Disks	23
Tabelle 2 Pipettierschema Standard	33
Tabelle 3 Pipettierschema für die Gele	37
Tabelle 4 Pipettierschema der Proben	38
Tabelle 5 Verwendete primäre Antikörper	42
Tabelle 6 Verwendeter sekundärer Antikörper	42
Tabelle 7 Links: Absolute Zellzahlen TRAP+ MNCs/cm ² ± SEM, Rechts: Mittelwerte der korrelierten TRAP+ MNCs ± SEM nach Bezug auf Knochen, n=6	51
Tabelle 8 Repräsentative Daten der Ergebnisse aus einem Blot, Flächen wurden normiert und auf Knochen bezogen, TC: Gewebekulturplatte, B: Knochen, TCP: β-Tricalciumphosphat, HA: Hydroxylapatit, 60/40: 60 % HA & 40 % β-TCP, 20/80: 20 % HA & 80 % β-TCP	55
Tabelle 9 Überblick der Ergebnisse der einzelnen Testungen, bezogen auf Knochen als Kontrollgruppe, + gleich wie Kontrolle, ++ besser als Kontrolle, +++ Signifikant besser als Kontrolle, - schlechter als Kontrolle, negativ keine Ergebnisse, TC: Gewebekulturplatte, B: Knochen, TCP: β-Tricalciumphosphat, HA: Hydroxylapatit, 60/40: 60 % HA & 40 % β-TCP, 20/80: 20 % HA & 80 % β-TCP	56
Tabelle 10 one way ANOVA Test, Signifikanz= <0,05, *= p Wert <0,01, **= p Wert <0,001, ***= p Wert <0,001, ****= p Wert <0,0001, ns= nicht signifikant, TC: Gewebekulturplatte, B: Knochen, TCP: β-Tricalciumphosphat, HA: Hydroxylapatit, 60/40: 60 % HA & 40 % β-TCP, 20/80: 20 % HA & 80 % β-TCP	74

10 Anhang

“Tukey's multiple comparisons test”	Signifikant	Ergebnis
B vs. TC	Ja	*
B vs. HA	Ja	***
B vs. β -TCP	Ja	****
B vs. 20/80	Ja	****
B vs. 60/40	Ja	****
TC vs. HA	Ja	*
TC vs. β -TCP	Ja	****
TC vs. 20/80	Ja	****
TC vs. 60/40	Ja	****
HA vs. β -TCP	Ja	****
HA vs. 20/80	Ja	****
HA vs. 60/40	Ja	****
β -TCP vs. 20/80	Ja	**
β -TCP vs. 60/40	Nein	ns
20/80 vs. 60/40	Nein	ns

Tabelle 10 one way ANOVA Test, Signifikanz= <0,05, *= p Wert <0,01, **= p Wert <0,001, ***= p Wert <0,001, ****= p Wert <0,0001, ns= nicht signifikant, TC: Gewebekulturplatte, B: Knochen, TCP: β -Tricalciumphosphat, HA: Hydroxylapatit, 60/40: 60 % HA & 40 % β -TCP, 20/80: 20 % HA & 80 % β -TCP