



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Austestung von Komponenten aus Biomaterialien auf
Osteoklasten- und Osteoblastendifferenzierung“

verfasst von

Melanie Kleiner

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2015

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Diplomstudium Pharmazie

Betreut von:

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

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.
Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Wien, 2015

Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei Prof. Dr. Oskar Hoffmann dafür bedanken, dass ich während der spannenden Zeit in seinem Labor einen Einblick in Forschung und Wissenschaft gewinnen durfte und dass er für alle meine Anliegen jederzeit ein offenes Ohr hatte.

Ich möchte mich ebenso bei Barbara Berger, die mich mit vielen hilfreichen Ratschlägen im Laboralltag unterstützt hat, und bei Peter Höflich, der mir mit seiner Herzlichkeit die Arbeit erleichtert hat, bedanken.

Ein großes Dankeschön geht an Dr. Tristan Fowler, denn er hat mit zahllosen produktiven Diskussionen und Tipps und besonders mit seiner immer positiven Einstellung einen wertvollen Beitrag zu dieser Diplomarbeit geleistet.

Bei Mag. pharm. Carina Kamleitner möchte ich mich herzlich für ihre große Hilfsbereitschaft und viele gemeinsame Laborstunden bedanken.

Meiner Familie - ganz besonders meinen Eltern - danke ich von Herzen dafür, dass sie mir dieses Studium ermöglicht und mich über die Jahre hinweg begleitet und unterstützt hat.

Ich möchte mich zuletzt bei Raphael bedanken, der in allen Belangen meine stärkste Stütze ist.

Liste verwendeter Abkürzungen und Bezeichnungen

1,25(OH) ₂ D ₃	1 α ,25-Dihydroxycholecalciferol; Calcitriol
α -MEM	α -Modification of Minimum Essential Medium
ANOVA	Analysis of Variance; Varianzanalyse
B	Gelatine Typ B
β -GP	β -Glycerophosphat
β -TCP	Tricalciumphosphat
B/H	Gelatine Typ B + Gelatine Typ A, 300 Bloom 1:1
B/L	Gelatine Typ B + Gelatine Typ A, 90-110 Bloom 1:1
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BSA	bovines Serum-Albumin
cDNA	komplementäre DNA
Col1a1	Kollagen Typ I α 1
Ct	Cycle Threshold
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DBM	demineralisierte Knochenmatrix
DG	Kontrollgruppe; unbeschichtetes Deckglas
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS (hi)	fötales Kälberserum (hitzeinaktiviert)
FSD	Functional Secretory Domain
GA	Glutaraldehyd
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
H	Gelatine Typ A, 300 Bloom (high gel strength)
HA	Hydroxylapatit
H/L	Gelatine Typ A, 300 Bl. + Gelatine Typ A, 90-110 Bl. 1:1
IEP	isoelektrischer Punkt
IL-1	Interleukin-1
L	Gelatine Typ A, 90-110 Bloom (low gel strength)
LAF	Laminar Air Flow; Sterilwerkbank
M-CSF	Monozytenkolonie-stimulierender Faktor

MSC	mesenchymale Stammzellen
N	Gelatine per analysi
NF- κ B	Nuclear Factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NGS	Normal Goat Serum; Ziegenserum
OB	Osteoblast(en)
OK	Osteoklast(en)
OPG	Osteoprotegerin
PBS	Phosphate-Buffered Saline; phosphatgepufferte Salzlösung
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
P/S	Penicillin/Streptomycin
PTH	Parathormon
qRT-PCR	quantitative Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion
RANK	Receptor Activator of NF- κ B
RANKL	RANK-Ligand
RB	Ruffled Border
RGD	RGD-Sequenz: Arg - Gly - Asp
rm	rekombinant murin
Runx2	Runt-Related Transcription Factor 2
SC	Suspension Culture; Suspensionskultur
SZ	Sealing Zone
TC	Tissue Culture; Gewebekultur
TGF- β	Transforming Growth Factor β
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor α
TRAP	Tartrate-Resistant Acid Phosphatase

Inhaltsverzeichnis

Liste verwendeter Abkürzungen und Bezeichnungen.....	6
Zielsetzung	12
1 Einleitung	13
1.1 Knochen	13
1.1.1 Bestandteile des Knochengewebes.....	13
1.1.2 Ossifikation	14
1.1.3 kortikaler und trabekulärer Knochen	15
1.2 Osteoblasten	15
1.2.1 Osteocyten	19
1.2.2 Saumzellen – Bone Lining Cells	20
1.3 Osteoklasten	21
1.4 Knochenimplantate	25
1.4.1 Anforderungen an Knochenimplantate.....	26
1.4.2 Arten von Knochenimplantaten	27
1.5 Knochenersatzmaterialien	29
1.5.1 Polymere.....	30
1.5.2 Keramiken.....	31
1.5.3 Kompositmaterialien	32
1.6 Gelatine.....	33
1.6.1 Quervernetzung von Gelatine.....	35
2 Material und Methoden.....	36
2.1 Instrumente, Materialien und Reagenzien	36
2.2 Versuchsaufbau	41
2.3 Pufferlösungen	42
2.3.1 phosphatgepufferte Salzlösung für Zellkultur (PBS/TC)	42

2.3.2	phosphatgepufferte Salzlösung mit Calcium und Magnesium (PBS+Ca ²⁺ /Mg ²⁺)	42
2.4	Nährmedien	42
2.4.1	Hitzeinaktivierung von FCS	42
2.4.2	Nährmedium für Osteoblastenkulturen	43
2.4.3	Nährmedium für Osteoklastenkulturen	43
2.5	Zellen	43
2.5.1	primäre Maus-Osteoblasten	43
2.5.2	Osteoklasten aus Maus-Kokultur	44
2.6	Sterilisation der Deckgläser	44
2.7	Herstellung der Beschichtungen	44
2.7.1	Gelatinebeschichtungen	45
2.7.2	BSA-Beschichtung	46
2.8	Fixierung der Zellen	46
2.9	Fluoreszenzmarkierung	47
2.10	TRAP-Färbung	47
2.11	quantitative Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion	48
2.11.1	Zell-Lyse	48
2.11.2	RNA-Isolation und -Quantifizierung	49
2.11.3	cDNA-Synthese	49
2.11.4	qRT-PCR	49
2.11.5	Analyse und Berechnung	51
2.12	statistische Auswertung der Daten	52
3	Resultate	53
3.1	Charakterisierung von Osteoklasten	53
3.1.1	TRAP-Färbung	53
3.1.2	Fluoreszenzmarkierung	54

3.2	Einfluss von Gelatinebeschichtungen auf die Anzahl und Morphologie von Osteoklasten	55
3.3	Einfluss von quervernetzten Gelatinebeschichtungen auf die Anzahl und Morphologie von Osteoklasten	60
3.4	quantitative Real-Time-PCR: Einfluss von quervernetzten Gelatinebeschichtungen auf die Expression von M-CSF und RANKL in Osteoblasten	65
3.4.1	Amplifikationskurven und Schmelzkurvenauswertung.....	65
3.4.2	M-CSF- und RANKL-Expression in Osteoblasten auf quervernetzten Gelatinen	67
3.5	quantitative Real-Time-PCR: Einfluss von quervernetzten Gelatinebeschichtungen auf die Expression von Col1a1 und Runx2 in Osteoblasten	69
3.5.1	Amplifikationskurven und Schmelzkurvenauswertung.....	70
3.5.2	Bilddokumentation von Tag 21 der Kultur	71
3.5.3	Col1a1- und Runx2-Expression in Osteoblasten auf quervernetzten Gelatinen	72
4	Diskussion	83
4.1	Osteoklasten im Maus-Kokultur-Modell auf Gelatine, nicht-quervernetzt.....	83
4.1	Osteoklasten im Maus-Kokultur-Modell auf Gelatine, quervernetzt .	85
4.2	Expression von M-CSF und RANKL in Osteoblasten	86
4.3	Expression von Runx2 und Col1a1 in Osteoblasten.....	87
4.4	Gelatine-basierte Biomaterialien	89
4.5	Zukunftsaussichten	90
4.5.1	vertiefende Experimente zu Differenzierung und Aktivität der Osteoblasten und Osteoklasten	90
4.5.2	Konsequenzen aus dieser Arbeit.....	90
	Zusammenfassung	92
	Abstract.....	94

Tabellenverzeichnis.....	96
Abbildungsverzeichnis	97
Literaturverzeichnis	100
Lebenslauf	107

Zielsetzung

Die Entwicklung neuer Knochenersatzmaterialien ist von großer Bedeutung, da die Inzidenz von therapiebedürftigen Knochendefekten im Steigen begriffen, die Verfügbarkeit von Knochentransplantaten jedoch nicht ausreichend ist. Wenn Knochendefekte, die durch Osteoporose, Tumore, Unfälle oder Infektionen verursacht sein können, eine gewisse Größe überschreiten, werden Implantate eingesetzt, die eine Heilung unterstützen und beschleunigen sollen.

Knochenersatzmaterialien werden aus mineralischen Bestandteilen und synthetischen oder natürlichen Polymeren wie Gelatine erzeugt. Im Allgemeinen ist das Ziel ein Material mit Eigenschaften, die jenen von natürlichem Knochen möglichst ähneln sollen. Dies ist ein Grund, warum sich Gelatine als ein von Kollagen abgeleitetes Polymer für diesen Zweck anbietet. Darüber hinaus sind das geringe immunologische Potential und die jahrelangen klinischen Erfahrungen aus anderen Bereichen der Medizin nennenswerte Vorteile von Gelatine.

Diese Arbeit soll einen Beitrag zur Charakterisierung der Eigenschaften verschiedener Gelatinetypen leisten, die sich in Bezug auf das Ausgangsmaterial, die Extraktionsmethode und die Gelfestigkeit unterscheiden. Es wurden dazu die Expressionsniveaus relevanter Gene in Maus-Osteoblasten und die Anzahl und Morphologie von Maus-Osteoklasten auf Gelatineoberflächen ermittelt.

Das Wissen über die verschiedenen Effekte der Gelatinesorten kann dazu verwendet werden, Biomaterialien herzustellen, deren Eigenschaften auf die jeweiligen Einsatzgebiete abgestimmt sind.

1 Einleitung

1.1 Knochen

Das Skelett ermöglicht Bewegung, Stabilität und Unterstützung unseres Organismus. Darüber hinaus erfüllt es noch weitere Funktionen. Die Knochen in Schädel und Rumpf schützen unsere inneren Organe, das Knochenmark ist unser wichtigstes Organ zur Blutbildung, die Knochen stellen ein riesiges Reservoir für Calcium dar und, zu guter Letzt, scheint das Skelett auch in endokrinologische Prozesse involviert zu sein (Lee et al., 2007). Um all diese Aufgaben erfüllen zu können, ist eine ausgesprochen gute Organisation des Knochens und seiner Zellen notwendig, daher ist das Skelett über die gesamte Lebensdauer hinweg einem ständigen Umbau- und Erneuerungsprozess unterworfen, dem sogenannten Bone Remodeling.

1.1.1 Bestandteile des Knochengewebes

Knochen besteht aus organischen und anorganischen Bestandteilen, die hierarchisch angeordnete Strukturen formen.

Den organischen Anteil bilden Proteine, aus ihnen besteht das Grundgerüst des Knochens, die Knochenmatrix. Den Hauptanteil der Matrixproteine stellt Kollagen Typ I mit etwa 90 %, die übrigen 10 % machen nicht-kollagenöse Proteine wie z. B. Proteoglykane (Heparinsulfat, Hyaluronsäure), Glykoproteine (alkalische Phosphatase, Fibronectin, Vitronectin), Osteopontin, Bone-Sialoprotein, Osteocalcin und Osteonectin aus (Burr und Akkus, 2013).

Das Protein Kollagen Typ I ist eine Tripelhelix, die von je zwei α 1- und einer α 2-Helix aufgebaut wird. Aufgrund des überdurchschnittlich häufigen Vorkommens von Prolin und Hydroxyprolin wird die Kollagen-Tripelhelix über Wasserstoffbrücken in ihrem Inneren besonders gut stabilisiert.

Die Hauptaufgaben der nicht-kollagenösen Proteine liegen vor allem in der Regulation der Kollagen- und Mineralbildung über Vermittlung von Signalen

im Zell-Signaling, in der Zellanhaftung und der Speicherung von Wasser (Burr und Akkus, 2013).

Der anorganische Anteil, der Knochenapatit („Mineral“), wird in zwei Phasen aufgebaut. Während der primären Mineralisation wird amorphes Calciumphosphat mit einem beträchtlichen Anteil an Calciumcarbonat zwischen den Kollagenmolekülen abgelegt. Dieser Prozess ist nach etwa drei Wochen abgeschlossen und bringt 65-70 % der endgültigen Mineralmenge hervor. Die sekundäre Mineralisation ist ein länger dauernder Vorgang, währenddessen der Carbonatanteil reduziert wird und die Mineralstruktur kristallin wird. (Burr und Akkus, 2013)

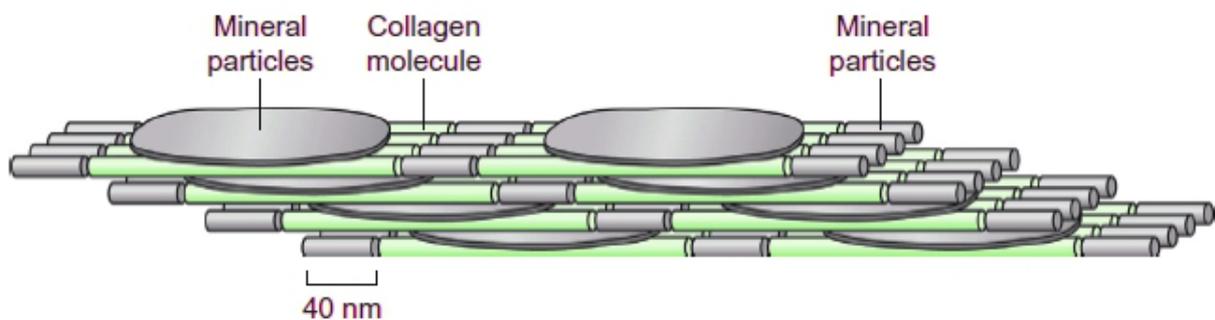


Abbildung 1: aus Burr und Akkus, 2013; die Mikrostruktur von Knochenmaterial, bestehend aus organischen Kollagenmolekülen und anorganischen Mineralablagerungen

Abbildung 1 zeigt die aus Kollagen und Mineral bestehende Mikrostruktur von Knochen. Die Kollagenmoleküle vermitteln Biegsamkeit und Elastizität, wobei das eingelagerte Mineral für Festigkeit sorgt.

1.1.2 Ossifikation

Es gibt zwei verschiedene Wege der Ossifikation (Knochenbildung).

Die indirekte oder chondrale Ossifikation zeichnet sich dadurch aus, dass zu Beginn der Embryonalentwicklung eine Art Vorlage aus Knorpelgewebe überall dort gebildet wird, wo später Knochen entstehen sollen. Dieses Knorpelgewebe wird von Chondroklasten wieder abgebaut und Osteoblasten vollziehen die Bildung von neuem Knochenmaterial. (Allen und Burr, 2013)

Bei direkter oder desmaler Ossifikation wird die Knochenmatrix von Anfang an durch Osteoblasten gebildet und mineralisiert. So werden u. a. das Schädeldach, der Gesichtsschädel und das Schlüsselbein gebildet. (Allen und Burr, 2013)

Im Falle des Bone Remodeling, das den kontinuierlichen Umbau des Knochens bezeichnet, wird das schadhafte oder mechanisch beanspruchte Knochenmaterial an kleinen, begrenzten Stellen von Osteoklasten abgebaut und darauffolgend von Osteoblasten wieder aufgebaut.

1.1.3 **kortikaler und trabekulärer Knochen**

Man kann zwischen zwei Qualitäten von Knochen unterscheiden. Kortikaler Knochen (Substantia compacta) ist sehr dicht, hat einen hohen Mineralisationsgrad und große Festigkeit, weshalb er vor allem die äußeren Schichten von Knochen bildet.

Trabekulärer Knochen (Substantia spongiosa) hingegen besitzt größere Porosität und ist durch seinen speziellen Aufbau flexibel und elastisch, weshalb er bei geringem Gewicht gut dazu geeignet ist, Stöße abzdämpfen. Trabekulärer Knochen ist rund um die Markhöhlen zu finden und zu großem Anteil z. B. in Handwurzelknochen, Oberschenkelhalsknochen und in Wirbelkörpern, die besonders stark durch Kompressionskräfte beansprucht werden, enthalten. (Seeman, 2008)

1.2 **Osteoblasten**

Osteoblasten sind jene Zellen im Skelett, die für den Aufbau von Knochen verantwortlich sind. Sie gehen aus mesenchymalen Vorläuferzellen hervor, differenzieren in der Folge zu unreifen Präosteoblasten und produzieren Matrixproteine. Nach weiterer Differenzierung wird diese Knochenmatrix von den reifen Osteoblasten mineralisiert. (Aubin, 2008)

Mesenchymale Stammzellen (MSC) können sich außer zu Osteoblasten in Richtung von Chondroblasten, Adipocysten und Myoblasten differenzieren.

Eine Vielzahl an Wachstums- und Transkriptionsfaktoren bestimmt die Linie, zu der sich die Zellen entwickeln.

Es lässt sich vereinfacht sagen, dass der Peroxisomen-Proliferator-aktivierte Rezeptor γ (PPAR γ) und Proteine der C/EBP-Familie die Differenzierung zu Adipocyten stimulieren, der Myogene Faktor 3 (MyoD) und Myf-5-Helix-Loop-Helix-Transkriptionsfaktoren die Entwicklung zu Myoblasten ermöglichen, und Sox9 die Chondroblastenbildung fördert (Aubin, 2008). Selbstverständlich sind für die vollständige Differenzierung zu funktionellen Zellen weitaus mehr Einflüsse als die genannten Faktoren notwendig, jedoch nehmen diese gewisse Schlüsselrollen in der Differenzierung zur jeweiligen Zellart ein. Ebendiese Schlüsselrolle hat im Falle der Osteoblasten Runx2, der Runt-related transcription factor 2, inne (Ducy et al., 1997).

Die mesenchymale Osteoblastenlinie lässt sich in verschiedene Entwicklungsstadien unterteilen: Osteoblasten-Vorläuferzellen, Präosteoblasten, reife Osteoblasten und Osteocyten. Die Unterscheidung dieser Differenzierungsstufen erfolgt anhand der Expressionslevel ihrer jeweiligen Markergene. MSC haben die Oberflächenproteine CD105, CD73 und CD90 in ihren Zellmembranen, was sie von Zellen anderen als mesenchymalen Ursprungs abgrenzt. Runx2 wird von allen mesenchymalen Entwicklungsstufen der Osteoblastenlinie exprimiert und ist der früheste Marker der Osteoblastendifferenzierung (Aubin, 2008). Präosteoblasten zeichnen sich durch Expression von Kollagen Typ I $\alpha 1$ (Col1a1), Osteopontin (OPN) und alkalischer Phosphatase (ALP) aus (Fakhry et al., 2013). In reifen Osteoblasten hingegen werden Osteocalcin (OCN), Bone Sialoprotein (BSP) und noch größere Mengen von Col1a1 exprimiert (Nakashima et al., 2002). Die terminale Differenzierungsstufe der Osteoblastenlinie sind die Osteocyten, deren Markergene Sclerostin und das Dentin Matrix Protein-1 (DMP-1) sind (Fakhry et al., 2013).

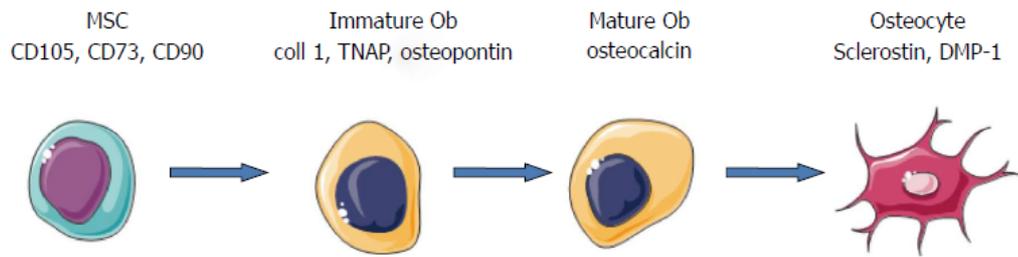


Abbildung 2: aus Fakhry et al., 2013; Entwicklungsstufen der Osteoblastenlinie innerhalb der mesenchymalen Zellen mit den jeweiligen Markergenen

Der schon genannte Transkriptionsfaktor Runx2 greift in die Expression von Genen ein, die den Knochenaufbau beeinflussen. So kann er beispielsweise in mesenchymalen Vorläuferzellen die Expression von Osteoblasten-spezifischen Genen wie z. B. Osteocalcin auslösen (Geoffroy et al., 1995). In Mäusen, in denen die Runx2-Expression ausgeschaltet wurde, gibt es keine reifen Osteoblasten, die zur Mineralisation befähigt sind, und infolgedessen auch keine Knochen – sowohl die direkte, als auch die indirekte Ossifikation kann ohne Runx2 nicht stattfinden (Komori et al., 1997).

Die Expression von Runx2 wird von verschiedenen Bone Morphogenetic Proteins (BMP) und anderen knochenanabolen Faktoren upreguliert (Yamaguchi et al., 2000). Im Gegensatz dazu inhibieren die beiden Transkriptionsfaktoren Twist 1 und 2 die Runx2-Expression (Bialek et al., 2004). Die Wirkungen von Runx2 und den beiden SMAD-Proteinen 2 und 5 ergänzen sich synergistisch (Aubin, 2008).

Runx2 nachgeschaltet ist ein weiterer Transkriptionsfaktor, und zwar das für die vollständige Osteoblastendifferenzierung ebenfalls unerlässliche Zinkfingerprotein Osterix (Osx). Auch das Ausschalten des Osterix-Gens führt zu einer aus Knorpel bestehenden Skelettstruktur ohne Matrix-sezernierende Osteoblasten oder Knochen (Nakashima et al., 2002). Seine Expression wird durch Runx2 stimuliert, während der Tumorsuppressor p53 die Osterix-Expression inhibiert (Wang et al., 2006).

Seit vielen Jahren ist bekannt, dass die Bone Morphogenetic Proteine (BMP) starken Einfluss auf Knochenbildung und Knochenmetabolismus haben.

Die BMP aus der TGF- β -Superfamilie sind, wie TGF- β (Transforming Growth Factor β) selbst, Wachstumsfaktoren, deren Signale vor allem über SMAD-

Proteine übertragen werden, aber auch über den MAP-Kinase weg laufen können. (Chen et al., 2012; Fakhry et al., 2013)

BMP sind dazu in der Lage, ektopische Knochenbildung, z. B. subkutan oder intramuskulär, auszulösen (Karsenty et al., 2009; Takaoka et al., 1988).

Man geht davon aus, dass BMP vor allem in der Phase vor der eigentlichen Knochenbildung von Bedeutung sind, in der es darum geht, die mesenchymalen Vorläuferzellen an den richtigen Positionen zu versammeln und zur Proliferation anzuregen (Karsenty et al., 2009).

BMP2 und BMP7 sind die beiden einzigen BMP, die zur humanmedizinischen Anwendung zugelassen sind. Bei Frakturen der Röhrenknochen mit intermedullärer Fixierung bewirkt ihre Verwendung eine gesenkte Rate von Folgeoperationen (Fakhry et al., 2013).

Ein für den Knochenmetabolismus äußerst bedeutendes Hormon ist das Parathormon (PTH) aus den Nebenschilddrüsen. Eine seiner Hauptaufgaben besteht in der Regulation der Plasmakonzentration von Calcium- und Phosphationen.

Die Effekte von PTH auf Osteoblasten sind abhängig vom Differenzierungsstatus und der aktuellen Zellzyklus-Phase der Zellen. Allerdings ist auch die Dauer der PTH-Einwirkung entscheidend – intermittierende Gaben haben eine Zunahme der Knochenmasse zur Folge, dauerhafte Gaben haben katabole Wirkung. (Kousteni und Bilezikian, 2008)

Da sich im Knochen die Rezeptoren für PTH auf Osteoblasten bzw. mesenchymalen Zellen befinden, jedoch nicht auf Osteoklasten (Kousteni und Bilezikian, 2008), kommt der Osteoklasten-aktivierende Effekt bei dauerhafter Gabe indirekt über die Bindung an Osteoblasten zustande. Diese regulieren durch die Freisetzung von Osteoprotegerin (OPG) und Receptor Activator of NF- κ B-Ligand (RANKL) die Osteoklastenfunktion (Suda et al., 1999). Osteoprotegerin ist ein löslicher Rezeptor, der gelösten RANKL „einfängt“ und davon abhält, an RANK zu binden – OPG verhindert also die Wirkung von RANKL an seinem Rezeptor auf Osteoklasten (Suda et al., 1999).

Insbesondere im letzten Jahrzehnt haben sich viele Arbeitsgruppen mit den Einflüssen rund um Wnt-Signalwege beschäftigt. Die Signalproteine der Wnt-

Familie können u. a. an einen Rezeptorkomplex binden, der über Zwischenstufen bewirkt, dass β -Catenin nicht abgebaut wird, sondern im Cytoplasma akkumuliert (Aubin, 2008). β -Catenin aktiviert im Komplex mit anderen Faktoren die Expression bestimmter Zielgene. Die Wirkung des Wnt-Signalwegs liegt in der Differenzierung von Vorläuferzellen in Richtung der Osteoblasten anstatt zu anderen mesenchymalen Zellarten hin (Bennett et al., 2005; Day et al., 2005). Der Wnt-Signalweg wird vom Dickkopf-related Protein 1 (DKK1) inhibiert, das Protein Indian Hedgehog (Ihh) hingegen ist notwendig für funktionierendes Wnt-Signaling (Aubin, 2008).

Es soll nicht unerwähnt bleiben, dass außer den beschriebenen Proteinen noch eine Vielzahl an Substanzen Osteoblasten in ihrer Proliferation, Differenzierung und ihrem Überleben beeinflusst, allen vorangestellt seien verschiedene Steroidhormone wie z. B. Sexualhormone, Glucocorticoide und Vitamin D.

Der Osteoblast ist ein wichtiger Akteur im Prozess des Bone Remodeling. Durch die Interaktion mit anderen Zellen sind Osteoblasten dazu imstande, die Aktivierung und das Überleben von Osteoklasten direkt zu regulieren. Dazu exprimieren Osteoblasten den Monocytenkolonie-stimulierenden Faktor M-CSF, RANKL und OPG. Eine genauere Beschreibung der Wirkung dieser Cytokine befindet sich im Kapitel 1.3 über Osteoklasten.

1.2.1 **Osteocyten**

Während des Aufbauprozesses von Knochen wird ein großer Anteil der Osteoblasten in das neu gebildete Knochengewebe eingebettet und differenziert dort zu Osteocyten. Osteocyten sind die am häufigsten in Knochen vorkommenden Zelltypen und äußerst langlebig: Einmal von Knochenmaterial umgeben, können Osteocyten bis zu mehrere Jahre oder gar Jahrzehnte an Ort und Stelle überleben, bis der Knochen an dieser Stelle wieder umgebaut wird. (Manolagas und Parfitt, 2013)

Neue Studien haben gezeigt, dass Osteocyten eine herausragende Rolle in der Osteoklastenaktivierung spielen, da sie, wie auch Osteoblasten, RANKL in löslicher Form sezernieren und in membrangebundener Form präsentieren können. Es sind nicht die von Osteoblasten, sondern die von Osteocyten produzierten RANKL-Mengen, die für eine effiziente Osteoklastenaktivierung maßgeblich sind (Manolagas und Parfitt, 2013). Überdies gibt es Hinweise, dass der Effekt des membrangebundenen RANKL stärker ist, als jener des löslichen RANKL (Calori et al., 2011; Honma et al., 2013; Nakashima et al., 2000).

Osteocyten liegen in Lakunen und haben dendritische Fortsätze, durch die sie ein sternförmiges Erscheinungsbild aufweisen. Die Fortsätze verlaufen in sogenannten Canaliculi. Über diese Membranausläufer stehen Osteocyten miteinander und mit anderen Zellen des Knochens in Kontakt, vor allem aber ist ihre Interaktion mit den Zellen in der Markhöhle von großer Bedeutung: RANKL-Moleküle in den Fortsätzen können hämatopoetische Vorläuferzellen aus dem Knochenmark aktivieren, die daraufhin zu Osteoklasten reifen und Knochen resorbieren. (Honma et al., 2013)

Eine weitere Aufgabe von Osteocyten besteht in ihrer Funktion als Mechanosensoren im Knochen. Über ihr durch die Fortsätze weitläufiges Cytoskelett nehmen Osteocyten bei mechanischer Beanspruchung des Skeletts Reize auf, die vermutlich über Integrin-Signaling letztlich ihr Überleben fördern (Plotkin et al., 2005). Entfallen diese mechanischen Reize, kommt es zu verstärkter Osteocyten-Apoptose, im Zuge derer spezifische Stoffe freigesetzt werden, die insgesamt zu einer weniger stabilen Knochenstruktur führen (Plotkin et al., 2005).

1.2.2 **Saumzellen – Bone Lining Cells**

Im Zuge der Knochenbildung oder der Reparatur von Defekten wird nach dem Erreichen des Zielniveaus ein Teil der mineralisierenden Osteoblasten zu Saumzellen (Bone Lining Cells). Diese mesenchymalen Zellen sind flach und liegen direkt auf der Knochenoberfläche. Über Gap Junctions stehen die Saumzellen sowohl mit Osteocyten, als auch mit noch aktiv mineralisierenden Osteoblasten in Verbindung. (Bellido et al., 2013)

Auf ihrer Oberfläche haben sie Rezeptoren für PTH. Die Ligandenbindung scheint zu einer Aktivierung von Osteoklasten zu führen, sodass die Saumzellen offenbar über diese Achse an der Steuerung der Calcium-Homöostase beteiligt sind (Talmage und Talmage, 2006).

1.3 Osteoklasten

Osteoklasten sind die einzigen Zellen im menschlichen Organismus, die dazu in der Lage sind, Knochenmaterial vollständig abzubauen – sie sind somit die unabdingbaren Partner von Osteoblasten im Prozess des Bone Remodeling. Sowohl der anorganische Mineralanteil als auch organische Komponenten des Knochens werden durch Osteoklasten angegriffen und entfernt. Die Differenzierung und Aktivierung von Osteoklasten unterliegen streng regulierten Prozessen, die sicherstellen sollen, dass kein unkontrollierter Knochenabbau stattfindet.

Osteoklasten gehen aus hämatopoetischen Stammzellen hervor, die vor allem im Knochenmark, aber auch in peripherem Blut enthalten sind. Osteoklasten sind terminal differenziert und nicht dazu in der Lage, zu proliferieren oder wieder zu dedifferenzieren (Nakamura et al., 2012; Väänänen und Laitala-Leinonen, 2008). Ihre Entwicklung zu reifen Osteoklasten wird durch Cytokine ausgelöst, unter denen M-CSF und RANKL eine besondere Schlüsselrolle einnehmen.

Der Monocytenkolonie-stimulierende Faktor M-CSF (auch: CSF-1) ist ein Cytokin, das von Stromazellen im Allgemeinen und Osteoblasten im Speziellen exprimiert und freigesetzt wird. M-CSF bindet an seinen Rezeptor c-fms, der sich an der Membran von Monocyten befindet (Weir et al., 1993). Durch ein Zusammenspiel von M-CSF und anderen Cytokinen werden die Differenzierung und Fusion von Osteoklasten-Vorläufern ermöglicht, sowie die Resorptionsfähigkeit und das Überleben der reifen Osteoklasten gefördert (Fuller et al., 1993).

Das Cytokin Receptor Activator of NF- κ B-Ligand (RANKL; auch: TRANCE, ODF, OPGL) wird, ebenso wie M-CSF, von mesenchymalen Zellen wie Osteoblasten und Osteocyten exprimiert. RANKL existiert einerseits in membrangebundener, andererseits aber auch in löslicher Form, wobei die lösliche Form durch Metalloproteasen vom membrangebundenen Protein abgespalten wird (Nakashima et al., 2000). Es hat sich herausgestellt, dass membrangebundener RANKL den größeren Anteil zur RANKL-Wirkung beisteuert (Honma et al., 2013; Jilka et al., 2013; Nakashima et al., 2000). Durch die RANK-RANKL-Bindung kommt es zur Aktivierung von Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor-assoziierten Faktoren (TRAF), die z. B. im Signalweg des Transkriptionsfaktor NF- κ B eine wichtige Rolle spielen (Blair et al., 2007).

Monocytaire Osteoklasten-Vorläuferzellen differenzieren unter dem Einfluss von M-CSF (Fuller et al., 1993; Jimi et al., 1995), RANKL (Lacey et al., 1998) und Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF- α ; Kobayashi et al., 2000) zu mononukleären Präosteoklasten, die wiederum zu multinukleären Osteoklasten fusionieren. Durch die Anwesenheit von Interleukin-1 (IL-1; Jimi et al., 1995), aber vor allem von RANKL (Lacey et al., 1998; Tsukii et al., 1998), können die mehrkernigen Zellen nun zu resorbierenden Osteoklasten aktiviert werden. Das Überleben der reifen Osteoklasten, die Knochen abbauen, wird besonders durch M-CSF gefördert, da es auf resorbierende Zellen einen anti-apoptotischen Effekt ausübt (Fuller et al., 1993).

Bevor ein Osteoklast Knochenresorption betreiben kann, muss er fest am Knochen adhärirt sein. Dies wird insbesondere durch Bindung von Knochenmatrix-Proteinen an die verschiedenen Integrine in der Osteoklastenmembran erreicht.

Integrine sind heterodimere Rezeptoren, die unter ihren Aufgaben sowohl die Verankerung des Osteoklasten auf dem Knochen, wie auch Zell-Signaling haben (Teitelbaum, 2011). Sie bestehen aus je einer α - und β -Untereinheit, von beiden gibt es mehrere verschiedene Subtypen. An die extrazellulären Domänen der Integrine binden Matrixproteine mit ihren RGD-Sequenzen. (Zou und Teitelbaum, 2010)

Der Integrin- $\alpha\beta 3$ -Rezeptor ist im Osteoklasten von größter Bedeutung und ist im nicht-resorbierenden Osteoklasten gemeinsam mit dem Aktinring lokalisiert, nach der vollständigen Ausbildung der Sealing Zone und der damit einhergehenden Reorganisation des Cytoskeletts jedoch nicht mehr (Mulari et al., 2003). Der Rezeptor bindet vor allem Vitronektin, Bone-Sialoprotein und Osteopontin (Duong et al., 2000). Im Zellinneren wird durch diese Bindung eine Signalkaskade über die Tyrosinkinase c-Src ausgelöst, die in der Bildung von Aktinringen, also einer Neuordnung des Cytoskeletts, gipfelt, und somit den Startschuss für den Knochenresorptionsprozess gibt (Teitelbaum, 2011).

Der reife Osteoklast bildet auf Knochen die dicht abschließende „Sealing Zone“ (SZ) und eine Region namens „Ruffled Border“ (RB) aus, beide sind Voraussetzung für erfolgreiche Knochenresorption (van Tran et al., 1985). Für die Ausbildung dieser Strukturen ist die Integrin-vermittelte grundlegende Umorganisation des Cytoskeletts erforderlich. Im Zuge dieser auch als Polarisation bezeichneten Vorgänge kommt es außerdem zur Bildung einer „Functional Secretory Domain“ (FSD) auf der basolateralen Seite des Osteoklasten, der Ruffled Border gegenüberliegend (Salo et al., 1997). Durch den Abbau von Knochen entsteht die sogenannte Lakune - eine Art Grube - unter der Ruffled Border. Da Osteoklasten zur amöboiden Fortbewegung befähigt sind, können diese Lakunen auch länglich sein, dann wird an ihnen die Spur des resorbierenden Osteoklasten sichtbar.

Die Sealing Zone wird vor allem aus F-Aktin-Mikrofilamenten aufgebaut und sie siegelt den Bereich zwischen Zelle und Knochen dicht ab. Die Neuordnung dieser Mikrofilamente wird zu Beginn durch Integrin-Signaling gesteuert. Welche Proteine an der Fertigstellung des Prozesses genau beteiligt sind, ist noch nicht endgültig geklärt, aber wahrscheinlich spielt hier der CD44-Rezeptor eine entscheidende Rolle. (Chabadel et al., 2007)

Innerhalb der Sealing Zone liegt die Ruffled Border – dies ist das Zellorganell, das die Resorption des Knochens ermöglicht. Der Name ergibt sich aus der lamellenartigen Zellmembran-Struktur, die eine starke Oberflächenvergrößerung bewirkt.

Um den anorganischen Hydroxylapatit (HA) abzubauen, wird der pH-Wert innerhalb der Sealing Zone gesenkt (Baron et al., 1985). Dies geschieht zum einen durch Freisetzung von Säure-enthaltenden Vesikeln, und zum anderen durch die kontinuierliche Sekretion von Protonen in die Resorptionslakune (Väänänen und Laitala-Leinonen, 2008). Eine V-Typ-ATPase pumpt Protonen ihrem Konzentrationsgradienten entgegen, Chlorid-Ionen zum Ladungsausgleich werden vom Chloridkanal ClC-7 in die Resorptionszone gepumpt (Schlesinger et al., 1997). Um H^+ zu erzeugen, katalysiert die Carboanhydrase II die Reaktion von Wasser und Kohlendioxid zu Kohlensäure, bei der Dissoziation letzterer entstehen Bicarbonat und Protonen (Wu et al., 2008). Durch das hierbei anfallende Bicarbonat würde das Milieu im Cytoplasma des Osteoklasten immer stärker alkalisiert werden, daher sind Anionenaustauscher notwendig, um basolateral Bicarbonat gegen Chlorid zu tauschen (Wu et al., 2008).

Nachdem der anorganische Knochenanteil durch die Säuresekretion gelöst worden ist, kann das nun freiliegende organische Grundgerüst aus Matrixproteinen angegriffen werden. Für diesen Zweck wird in Vesikel verpacktes Cathepsin K in die Resorptionslakune freigesetzt. Cathepsin K ist eine Protease, die eine Schlüsselrolle im Bone Remodeling einnimmt. Einerseits hat Cathepsin K bei saurem pH, der innerhalb der Sealing Zone vorherrscht, eine hohe enzymatische Aktivität, was die Protease dazu befähigt, Proteine der Knochenmatrix, v.a. Kollagen, abzubauen (Bossard et al., 1996). Andererseits bewirkt Cathepsin K die Aktivierung weiterer Enzyme, die zum Knochenabbau notwendig sind, z. B. TRAP (Ljusberg et al., 2005). Aufgrund der hohen Wichtigkeit von Cathepsin K im Knochenabbau bietet es sich als Ziel für neuartige antiresorptive Pharmakotherapien an (Zerbini und McClung, 2013).

Gemeinsam mit Cathepsin K wird auch die Tartrat-resistente saure Phosphatase TRAP in Vesikeln sezerniert. Sie wird häufig als Marker für die Differenzierung und Aktivität von Osteoklasten in Zellkulturexperimenten herangezogen, die genauen Funktionen von TRAP im Knochen sind jedoch nicht vollständig bekannt. Neben ihrer Funktion als Phosphatase ist TRAP aufgrund des Fe^{2+} -Ions im aktiven Zentrum des Enzyms zur Bildung von

reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) befähigt, die eventuell im Kollagenabbau involviert sind (Halleen et al., 2003).

Während des Resorptionsprozesses fallen in der Lakune große Mengen an Knochen-Abbauprodukten an, die entfernt werden müssen, um die Resorption effizient weiterführen zu können. Die anorganischen wie organischen Komponenten werden per Endocytose wieder in den Osteoklasten aufgenommen und über die FSD auf der basolateralen Seite sezerniert und so aus der Zelle transportiert (Salo et al., 1997).

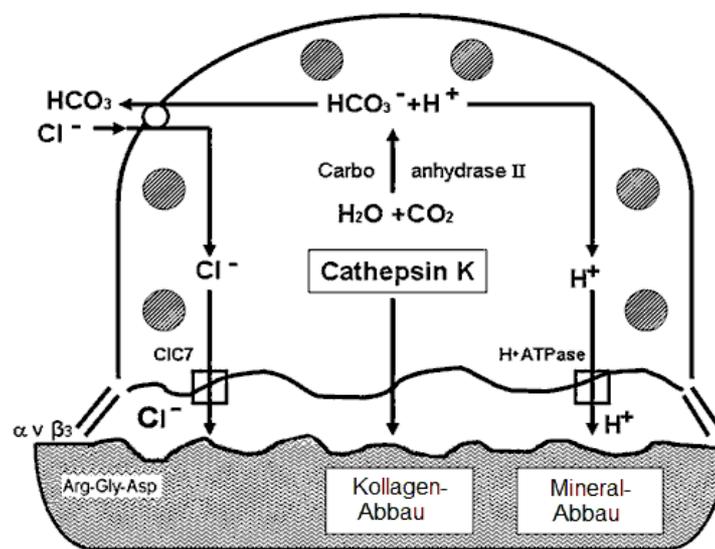


Abbildung 3: aus Athanasou, 2011; ins Deutsche übersetzt

Ein reifer Osteoklast hat eine relativ kurze Lebensdauer von einigen wenigen Tagen. Wenn die anti-apoptotischen Signale durch M-CSF ausbleiben, wird die Apoptose eingeleitet und der Osteoklast geht zugrunde. (Fuller et al., 1993)

1.4 Knochenimplantate

Defekte in Knochen bedingt durch Verletzungen, Tumore, Osteoporose oder andere Erkrankungen machen in einigen Fällen den Einsatz von Knochenimplantaten sinnvoll. Wenn ein Defekt eine gewisse Größe überschreitet, ist eine Heilung in angemessener Zeit nicht möglich, man spricht dann von einem „Critical Size Defect“ (Calori et al., 2011). Um die

mechanische Stabilität und sonstige Funktion dieser Knochen wiederzuerlangen, kann man sich in diesen Fällen mit Knochenimplantaten behelfen. Sie sollen die Region stabilisieren und eine Art Gerüst oder Vorlage für den neu zu bildenden Knochen darstellen.

1.4.1 **Anforderungen an Knochenimplantate**

Neben den Anforderungen, die für alle Arten von medizinischen Implantaten gelten – das Material und seine Abbauprodukte sollen weder Entzündungsreaktionen, Allergien, toxische Effekte oder immunologische Reaktionen hervorrufen, noch dürfen sie Pathogene übertragen – werden an Materialien zur Anwendung als Knochenimplantate zusätzliche Ansprüche gestellt: Ein ideales Knochenimplantat soll Osteokonduktivität, Osteoinduktivität und Osteogenität vermitteln, resorbierbar sein und seine mechanischen Eigenschaften sollen jenen der angrenzenden Knochen möglichst ähneln (Brown et al., 2012).

Osteokonduktivität bezeichnet eine Materialbeschaffenheit, die die Adhäsion, das Überleben und die Migration der Knochenzellen zulässt (Carulli et al., 2013; Kneser et al., 2002).

Von Osteoinduktivität spricht man bei Materialien, die eine Differenzierung von Vorläuferzellen in Richtung der mesenchymalen Osteoblastenlinie erlauben und fördern. Es gibt hierzu zwei Hypothesen zum Zustandekommen der Osteoinduktivität: Die erste Hypothese geht davon aus, dass Calcium- und Phosphationen aus den meist Calciumphosphat-hältigen Materialien freigesetzt werden und diese dann die Differenzierung zu Osteoblasten fördern. Die zweite Hypothese besagt, dass für die Differenzierung benötigte Faktoren an den Materialien adsorbieren und dort den Osteoblastenvorläuferzellen präsentiert werden. (Barradas et al., 2011)

Der Begriff Osteogenität bezieht sich schließlich auf die Bildung von neuem Knochen. Wenn Osteoblasten sich auf dem Material ansiedeln können und in weiterer Folge Mineralisation stattfindet, ist das Material osteogen (Carulli et al., 2013; Kneser et al., 2002).

1.4.2 **Arten von Knochenimplantaten**

Im Falle von Knochenschäden, die ein solches Ausmaß haben, dass die Implantation eines Materials zur Heilung des Defekts erforderlich wird, stehen verschiedene Arten von Knochenimplantaten zur Verfügung: „Autografts“ (Autotransplantate) und „Allografts“ (Allotransplantate), die aus Knochen gewonnen werden, und Knochenersatzmaterialien (Einteilung in Anlehnung an Brown et al., 2012).

1.4.2.1 **Autograft**

Beim Autograft ist der Knochenmaterial-Spender gleich dem Empfänger. Vor allem in der Kieferchirurgie findet dieses Verfahren im Zuge des Kieferaufbaus breite Anwendung. Es werden hierzu kleine Knochensegmente, meist aus anderen Kieferbereichen oder aus dem Beckenkamm, entnommen, und in atrophische Regionen des Kieferknochens eingesetzt (Rawashdeh und Telfah, 2008). Aber auch für das Auffüllen von Defekten an anderen Knochen werden autogene Implantate, ebenfalls meist aus dem Beckenkamm, verwendet.

Bei der Auswahl der Entnahmestelle sollte berücksichtigt werden, ob das transplantierte Knochengewebe kortikal oder trabekulär ist, da der Volumszuwachs an der Implantationsstelle davon abhängt (Rawashdeh und Telfah, 2008).

Autografts haben offensichtliche Vorteile, aufgrund derer sie nach wie vor als der Goldstandard für Knochenimplantate gelten: Sie bestehen – besonders bei passender Auswahl der Entnahmestelle – aus dem perfekten Material und sie rufen keine Immunreaktionen hervor. Darüber hinaus enthalten Autografts lebende Knochenzellen und sind daher per se osteogen. Neben der eingeschränkten Menge an vorhandenem Material sind beträchtliche Komplikationen wie Entzündungen, Nekrosen und schmerzhaftes Heilungsprozesse an der Entnahmestelle die Nachteile von Autografts. (Amini et al., 2012; Brown et al., 2012)

Diese unerwünschten Komplikationen von Autograft-Implantationen sind neben den hohen Kosten der Eingriffe der Hauptgrund für die Suche nach Knochenersatzmaterialien.

1.4.2.2 ***Allograft***

Allografts bezeichnen Implantate, die zwar aus derselben Spezies, aber aus einem anderen Individuum als dem Empfänger, meist von Verstorbenen, stammen. Die Knochen werden lyophilisiert und bestrahlt, um das Infektionsrisiko zu vermindern. Das hat jedoch einerseits zur Folge, dass die Knochenzellen abgetötet werden, des Weiteren bewirkt die Lyophilisation eine Veränderung der physikalisch-mechanischen Eigenschaften des Knochens. Diese Allografts sind daher weniger osteokonduktiv und osteoinduktiv, sie haben jedoch den großen Vorteil, dass am Empfängerorganismus kein zusätzliches Operationsgebiet eröffnet wird. (Laurencin et al., 2006)

Durch den Ursprung des implantierten Knochengewebes in einem anderen Individuum kann es zu Immunreaktionen kommen, die eine Immunsuppression erforderlich machen (Paskert et al., 1987).

Allografts können durch Demineralisation noch tiefgreifender modifiziert werden, dabei entsteht demineralisierte Knochenmatrix (DBM), die auch als Allograft-basiertes Knochenersatzmaterial bezeichnet wird. Zur Herstellung wird Spender-Knochenmaterial sterilisiert und demineralisiert, sodass lediglich ein Gerüst aus Matrixproteinen (kollagenöse und nicht-kollagenöse Proteine) bestehen bleibt (Gazdag et al., 1995). Entweder wird dieses Gerüst in bestimmte Formen geschnitten und implantiert, oder zerkleinert und mit Glycerin, Hyaluronsäure oder anderen Stoffen versetzt zu einem injizierbaren Gel verarbeitet (Brown et al., 2012).

Es gibt einige DBM-Produkte, die zur Behandlung von Knochendefekten zugelassen sind. Als Vorteil dieser Implantate ist die gute Osteoinduktivität anzusehen, die vermutlich durch die Freilegung von differenzierungsfördernden Faktoren im Zuge der Demineralisation zustande kommt. Die Nachteile von DBM bestehen in der fehlenden Osteogenität, der

geringen mechanischen Belastbarkeit und der je nach Herstellungsverfahren verminderten Osteokonduktivität. (Brown et al., 2012; Gazdag et al., 1995)

1.4.2.3 **Knochenersatzmaterialien**

Im Gegensatz zu Autografts und Allografts sind Knochenersatzmaterialien Stoffe, deren Ursprung nicht in menschlichen Knochen liegt. Siehe dazu Kapitel 1.5.

1.5 Knochenersatzmaterialien

Knochenersatzmaterialien können anhand ihrer chemischen Zusammensetzung eingeteilt werden. Man unterscheidet vor allem zwischen Polymeren und Keramiken.

Aus beiden Arten von Ausgangsmaterialien können Feststoffe hergestellt werden, wobei diese entweder regelmäßig porös sind oder, im Falle der Polymere, eine fest vorgegebene räumliche Struktur mit Hohlräumen aufweisen können, was z. B. durch 3D-Druck-Verfahren, Elektrosponnen oder 2-Photonen-Polymerisation erreicht werden kann. Keramische Partikel und Polymere können auch zur Herstellung von injizierbaren Gelen herangezogen werden.

Einige Studien belegen, dass nicht nur die chemische Struktur des Materials, sondern vor allem auch die Mikroarchitektur der Implantate („Scaffolds“), die sich je nach Herstellungsverfahren unterscheidet, für den Erfolg des Materials *in vivo* bedeutend ist (Li et al., 2008; Yuan et al., 2002).

So kommt es, dass der Porosität von Knochenersatzmaterialien eine herausragende Bedeutung zuteilwird. Zum einen ist die Größe der Poren entscheidend, zum anderen ihre Interkonnektivität. Beide Kriterien bestimmen gemeinsam, ob sich Zellen über das gesamte Implantatvolumen hinweg ausbreiten und ansiedeln können. Eine gute Interkonnektivität, also der Verbindungsgrad der Poren, erlaubt sowohl die Versorgung aller Regionen des Implantats mit Sauerstoff, Nährstoffen und löslichen Faktoren, die für die Zellproliferation und -differenzierung vonnöten sind, als auch die Migration

der Zellen selbst. In fortgeschrittenen Stadien des Knochenaufbaus wird durch ausreichend große Poren auch die Vaskularisation ermöglicht. (Brown et al., 2012)

Porosität wird durch Verfahren wie Porogen- oder Salz-Leaching, Gefriertrocknung, Sintern oder Aufschäumen mit Gasen erzeugt. All diese Methoden sind derart kontrollier- und steuerbar, dass Scaffolds mit reproduzierbaren mechanischen Kennwerten, Porengrößen und Interkonnektivität dabei entstehen (Amini et al., 2012).

1.5.1 **Polymere**

Polymere bergen ein großes Potential zur Herstellung von Knochenimplantaten, da sie vermutlich die flexibelsten Ausgangsmaterialien sind. Viele von ihnen sind der Verarbeitung mit modernen Verfahren zugänglich, um Scaffolds mit geeigneter Mikroarchitektur fertigen zu können. Primär gilt es, ein passendes Polymer auszuwählen. Überdies können die Polymerisations- oder Quervernetzungsmechanismen variiert werden, damit sind oft auch Veränderungen im formgebenden Herstellungsverfahren verknüpft.

Zwischen den so erzeugten verschiedenen Produkten bestehen mitunter große Unterschiede im Verhalten in vitro oder in vivo.

1.5.1.1 **natürliche Polymere**

Wenn es darum geht, natürliche Polymere zur Verwendung in Knochen zu verwenden, ist zuallererst die Wahl von Kollagen naheliegend, da es den Hauptbestandteil der Knochenmatrix ausmacht und somit den körpereigenen Strukturen am ähnlichsten ist. Es befinden sich verschiedene Produkte auf dem Markt, die Kollagen enthalten, entweder mit rekombinantem human-BMP-2/7 oder im Verbund mit mineralischen Bestandteilen. Am häufigsten wird hierfür β -Tricalciumphosphat (β -TCP) verwendet, die mechanische Stabilität der resultierenden Scaffolds ist trotzdem eher gering. (Brown et al., 2012)

Kollagen-basierte Knochenersatzmaterialien werden meist aus Rinder- oder Schweinekollagen hergestellt und sind in mehreren Applikationsformen erhältlich, z. B. als knetbare oder injizierbare Masse, zuschneidbare Streifen oder in vorgefertigten Formen. In der Regel werden diese Materialien vor der Implantation in Knochenmark-Aspirat eingelegt oder damit vermischt, sodass von Beginn an Osteoblastenvorläuferzellen im Material enthalten sind. (AAOS. Summary of typical bone-graft substitutes that are commercially available, 2010)

Ein von tierischem Kollagen abgeleitetes Polymer ist die Gelatine, mit der sich Kapitel 1.6 näher auseinandersetzt. Neben Kollagen und Gelatine sind auch natürliche Polymere wie Chitosan, Fibrin und Alginat Gegenstand aktueller Forschung.

1.5.1.2 ***synthetische Polymere***

Synthetische Polymere bieten aufgrund der großen strukturellen Variationsmöglichkeiten ideale Ausgangsstoffe, um Knochenersatzmaterialien den jeweiligen Anforderungen entsprechend designen zu können. Die genaue chemische Zusammensetzung des Materials bestimmt über Oberflächeneigenschaften und Abbauverhalten der Scaffolds.

Von der FDA sind einige synthetische Polymere zur Verwendung im Menschen zugelassen, darunter Polylactid, Polycaprolacton und Polyglycolid. Die Materialien bieten den Vorteil, dass sich daraus beliebig geformte Scaffolds mit einer definierten Mikroarchitektur erzeugen lassen. Dazu werden relativ junge Verfahren wie etwa das Lasersintern, Stereolithographie oder 2-Photonen-Polymerisation verwendet. (Brown et al., 2012)

Ein weiterer Vorteil der synthetischen Polymere ist, dass sie nicht biologischen Ursprungs sind und somit keine Pathogene übertragen.

1.5.2 **Keramiken**

Als Keramiken bezeichnet man Materialien, die aus anorganischen Verbindungen hergestellt werden. Am häufigsten eingesetzt werden die

Calciumphosphate β -Tricalciumphosphat und Hydroxylapatit $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$, sowie Calciumsulfat und verschiedene Siliciumverbindungen (bioaktives Glas). All diese Stoffe haben gemeinsam, dass sie bei relativ guter mechanischer Stabilität vollständig resorbiert und durch neuen Knochen ersetzt werden können. Die bioaktiven Gläser ragen in dieser Gruppe besonders heraus, da sie die größte Festigkeit aufweisen, die mit jener von trabekulärem Knochen vergleichbar ist. (Brown et al., 2012)

Wie schon zuvor erwähnt, wird die für ein Knochenersatzmaterial notwendige Porosität durch unterschiedlichste Verfahren erreicht, wobei das Sintern und verschiedene Leaching-Methoden die wohl am häufigsten genutzten sind.

1.5.3 **Kompositmaterialien**

Durch Kombination der soeben beschriebenen Materialien entweder untereinander oder mit Zellen oder Wachstumsfaktoren können Kompositmaterialien erzeugt werden, die im Idealfall die Vorzüge ihrer Einzelkomponenten vereinen (Brown et al., 2012).

Ein derartiges Kompositmaterial könnte z. B. ein Polymergerüst mit passender Porosität sein, das von anorganischem Mineral ummantelt ist und so die Struktur des Knochens imitiert.

Ebenso realisierbar sind z. B. poröse Keramik-Scaffolds, die vor der Implantation mit Zellen der Osteoblastenlinie aus dem Knochenmark des Empfängers versehen werden, um ein osteogenes Implantat zu erhalten.

Eine weitere Möglichkeit wäre ein Gel aus einem Polymer, das z. B. mit BMP-2 versehen ist und in Knochenregionen injiziert wird, an denen Knochenwachstum erwünscht ist.

Dies sollen nur einige wenige Beispiele sein. Durch die vielen Kombinationsmöglichkeiten ergibt sich ein weit gefächertes Feld an Anwendungsarten.

1.6 Gelatine

Gelatine ist ein wasserlösliches Protein, das durch Hydrolyse aus tierischem Kollagen gewonnen wird. Dafür werden in der Regel Schlachtabfälle wie Häute, Knochen und andere Kollagen-haltige Bindegewebsanteile von Schweinen oder Rindern verwendet. Gerade in den vergangenen beiden Jahrzehnten haben sich jedoch auch viele Forschungsgruppen mit den Eigenschaften von Gelatine beschäftigt, die aus verschiedenen Fischarten extrahiert wird. Diese Gelatine weisen wiederum andere, eventuell für gewisse Anwendungen vorteilhafte, Eigenschaften auf, als jene aus Säugetieren (siehe Review von Boran und Regenstein, 2010).

Man differenziert zwischen Typ A (acid, sauer) und Typ B (basisch) Gelatine, abhängig davon, ob die Behandlung des Tiermaterials zur Gelatineextraktion unter sauren oder alkalischen Bedingungen stattfindet.

Für Typ A Gelatine werden meist enthaarte und entfettete Schweinehäute verwendet. Man lässt sie einige Stunden in Salz- oder Schwefelsäure quellen. (GMIA. Gelatin Handbook, 2012)

Der Vorbehandlungsprozess von Typ B Gelatine ist wesentlich zeitaufwändiger. Hierfür ist die Verwendung v.a. von Knochen, aber auch Häuten üblich. Knochen müssen vor der Extraktion mithilfe von Säure demineralisiert werden, das verbleibende Material besteht vor allem aus Protein und wird Ossein genannt. Im nächsten Schritt werden die Häute oder das Ossein der basischen Hydrolyse in Kalkmilch über meist zwei bis drei Monate unterzogen. (GMIA. Gelatin Handbook, 2012)

Nach diesen unterschiedlichen Vorbehandlungen sind die weiteren Schritte für saures und basisches Verfahren dieselben: nach einigen Waschschritten mit kaltem Wasser erfolgt die Extraktion der Gelatine mit etwa 50-60°C heißem Wasser. Im ersten Extraktionsschritt wird die qualitativ hochwertigste Gelatinefraktion gewonnen. Die weiteren Extraktionsschritte erfolgen mit jeweils erhöhter Temperatur, was zu Verlusten im Molekulargewicht, der Gelierkraft und der Viskosität des Produktes führt. In der Folge werden die einzelnen Gelatinefraktionen in mehreren Schritten geklärt und aufgereinigt. (GMIA. Gelatin Handbook, 2012)

Aus der Anwendung entweder der sauren oder der basischen Extraktionsmethode ergibt sich der isoelektrische Punkt (IEP) des Produkts. Durch die basische Behandlung werden Asparagin und Glutamin zu Asparaginsäure und Glutaminsäure desaminiert (Young et al., 2005). Der IEP von Typ A Gelatine liegt in einem Bereich von pH=7-9 und für die durch Asp- und Glu-Reste negativ geladene Typ B Gelatine im sauren Milieu um etwa pH=5 herum (Gorgieva und Kokol, 2011). Die Löslichkeit des Proteins ist bei einem pH-Wert, der dem IEP entspricht, am geringsten, woraus sich u. a. für pharmazeutische Drug-Delivery-Systeme wichtige Eigenschaften ergeben (Young et al., 2005).

Die Aminosäurezusammensetzung von Gelatine weist im Vergleich mit anderen Proteinen einige Besonderheiten auf, wobei die meisten Säugetiergelatinen einander relativ ähnlich sind. Typischerweise sind etwa 33 % Glycin, 21 % Prolin und Hydroxyprolin und 10 % Alanin in Gelatine enthalten, zudem fehlt Tryptophan in Gelatine, wie auch schon in Kollagen (Djabourov et al., 1988). Gelatinen von Walen und Fischen haben davon etwas abweichende Zusammensetzungen (Eastoe, 1955).

Ihren physikalischen Eigenschaften verdankt die Gelatine ihre breite Anwendung in der Lebensmitteltechnologie und in der pharmazeutischen Technologie. Gelatine quillt in kaltem Wasser und löst sich ab Temperaturen von etwa 35 bis 40°C. Durch erneutes Abkühlen verfestigt sich die wässrige Gelatinelösung zu einem homogenen Hydrogel, dieser Vorgang ist thermoreversibel (Djabourov et al., 1988). Die Gelstärke wird mit der Methode nach Bloom bestimmt und gibt Auskunft darüber, welchem Druck ein Gelatine-Hydrogel unter definierten Bedingungen standhält. Je höher der Bloom-Wert, desto größer ist die Gelfestigkeit (GMIA. Gelatin Handbook, 2012). Der Geliervorgang und die Gelstärke werden insbesondere durch die Temperatur und die Gelatinekonzentration beeinflusst, jedoch spielen auch der pH-Wert und die Salzkonzentration der Lösung eine Rolle (Gelita AG. Viskoelastische Eigenschaften von Gelatine, 2013).

1.6.1 Quervernetzung von Gelatine

Für Anwendungen, bei denen größere Stabilität der Hydrogele erforderlich ist, und auch bei Temperaturen über 35°C, stehen verschiedene Methoden zur Quervernetzung (Crosslinking) zur Verfügung. Bei der Vernetzung werden intramolekular zwischen den Gelatinemolekülen kovalente Bindungen eingeführt.

Der bekannteste und industriell wichtigste chemische Vernetzer ist Glutaraldehyd (GA), es vernetzt Lysin- und Argininreste hocheffektiv. Ein Problem bei der Verwendung von Glutaraldehyd liegt in seiner Cytotoxizität, daher müssen GA-vernetzte Produkte ausgiebig gewaschen werden, um GA-Rückstände zu minimieren. (Bigi et al., 2001)

Weitere chemische Crosslinker sind z. B. EDC (Staroszczyk et al., 2014) und Genipin (Gomes et al., 2013), eine weniger cytotoxische Substanz pflanzlichen Ursprungs. Auch das enzymatische Crosslinking mit Transglutaminase, Tyrosinase oder anderen Enzymen führt zu guten Ergebnissen (Moreira Teixeira et al., 2012).

In den vergangenen Jahren hat das UV-Crosslinking mithilfe von photoaktiven Substanzen an Bedeutung gewonnen. Dabei werden dem Gel Photoinitiatoren zugesetzt, bei deren Bestrahlung mit UV-Licht Radikale entstehen, die sodann zur Quervernetzung des gelbildenden Polymers führen. Auch hier besteht ein gewisses Potential für cytotoxische Rückstände im Produkt. (Carroll et al., 2006)

Darüber hinaus ist es auch möglich, Proteine ohne Zugabe von Reagenzien zu vernetzen, indem man die Materialien hochenergetischer γ -Strahlung aussetzt (Moreira Teixeira et al., 2012).

2 Material und Methoden

2.1 Instrumente, Materialien und Reagenzien

Tabelle 1: verwendete Instrumente

	<i>Hersteller</i>
Analysenwaage	MC 210 P, Sartorius, Deutschland
Autoklav	TOMY SX-300E, USA
CASY Zellzähler	Schärfe Systems, Deutschland
Digitalkamera für Mikroskope	D 5100, Nikon, Japan
Eismaschine	AF103, Scotsman Ice Systems, USA
Fluoreszenzmikroskop	BX 51, Olympus, Japan
Inkubator	HERA cell 240, Kendro, Deutschland
Lampe für Fluoreszenzmikroskop	X-Cite Series, 120 PC, Exfo, Kanada
Lichtmikroskope	TMS, Nikon, Japan Diaphot 300, Nikon, Japan
Magnetrührer	Ikamag RCT, Janke & Kunkel, Deutschland
pH-Meter	713 Metrohm, Schweiz
Pipettierhilfe	Pipetboy, Integra Biosciences, Deutschland
Schüttelinkubator	GFL 3032, Heraeus Instruments, Deutschland
Sterilwerkbank (Laminar Air Flow)	Ehret Labor- und Pharmatechnik, Deutschland
Tischzentrifuge	Mini Centrifuge C-1200, National Labnet, USA
Trockenschrank (zur Hitzesterilisation)	WTB, Binder, Deutschland
Ultraschallbad	Transsonic 570, Elma, Deutschland
Vortex	AG Vortex Genie, Bender, Schweiz REAX 2000, Heidolph, Deutschland
Wasserfiltrationsanlage	Milli-Q UF Plus mit Q-Pak 1, Millipore, USA
Wasserbad	GFL 1086, Deutschland
Zentrifugen	5415C, Eppendorf, Deutschland Z323 K, Hermle, Deutschland Z233 M, Hermle, Deutschland RT-H250, Sorvall, USA

Tabelle 2: verwendete Materialien

	<i>Hersteller</i>
24-Well-Kulturplatten, Cell + Suspension Culture	Greiner Bio-One International AG, Österreich
Deckgläser rund, Ø 12 mm	VWR International, USA
Reaktionsgefäße „Eppendorf“ 1,5+2 ml	Eppendorf AG, Deutschland
Kryoröhrchen	Greiner Bio-One International AG, Österreich
Messpipetten Glas	Brand, Deutschland
Mikropipetten	Eppendorf, Deutschland Labsystems FinnpiPETTE, Finnland
Mr. Frosty Freezing Container	Thermo Fisher Scientific, USA
Objektträger	VWR International, USA
Parafilm M	American National Can Company
PCR-Gefäße 0,2ml	Greiner Bio-One International AG, Österreich
Petrischalen 100mm und 60mm	Sterilin, Bibby Sterilin Ltd., UK
Pipettenspitzen	VWR International, Österreich Greiner Bio-One International AG, Österreich
Sterilfilter 0,22µm	GE Walter & Process, USA
Zentrifugenröhrchen, 15+50 ml	Greiner Bio-One International AG, Österreich

Tabelle 3: verwendete Substanzen

<i>Substanzname</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Chargennummer</i>
1 α ,25-Dihydroxycholecalciferol	Hoffmann LaRoche	
4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid	Sigma-Aldrich	3267 Lot#59A3960
Aceton, p.a.	Fluka	00570 Lot#43200
Albumin bovine, Fraction V; 96 – 99 %	Sigma-Aldrich	A-4503 Lot#28F-0982
Alexa Fluor® 633 Phalloidin	Molecular Probes	A22284 Lot#34E1-2
Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Mouse IgG Antikörper	Molecular Probes	A-11001 Lot#99C1-1
Alexa Fluor® 546 Goat Anti-Rabbit IgG Antikörper	Molecular Probes	A-11010 Lot#94C1-1
Ascorbinsäure	Merck	841 Lot#F971227

Calciumchlorid-Anhydrid, approx. 97 %	Sigma-Aldrich	C-4901 Lot#53H0617
CASYton	Roche Diagnostics	05651808001 Lot#11686500
Cathepsin K mouse anti-human monoklonaler Antikörper	Merck Millipore	MAB3324 Lot#2070806
Collagenase from Clostridium histolyticum, Typ 1	Sigma-Aldrich	9001-12-1 Lot#95H6843
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich	D-8879 Lot#99H3655
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat, p.a.	Merck	1.06580.1000 Lot#K33351980429
Dispase, Typ II	Sigma-Aldrich	165859 Lot#85568720-73
Ethanol absolut, 99,9 %, p.a.	AustrAlco	AAAH-5020-07025- 010711
Ethylendiamintetraessigsäure- Anhydrid, appr. 99 %	Sigma-Aldrich	E-6758 Lot#50K01315
Fast Red Violet LB Salt	Sigma-Aldrich	F-3381 Lot#MKBH6351V
FastStart Essential DNA Green Master	Roche Diagnostics	06402712001 Lot#14613000
Fetal Calf Serum 10270	Gibco Life Technologies	Lot#41Q403K Lot#41Q4297P
Flüssiger Stickstoff	TU Wien, Österreich	
Formaldehyd-Lösung 37 %, Ph. Eur	Roth	CP10.1 Lot#460103407
Gelatin from bovine skin, Type B;	Sigma-Aldrich	G9382 Lot#051M0012V
Gelatin from porcine skin, gel strength 300 g Bloom, Type A	Sigma-Aldrich	G2500 Lot#SLBB0914V
Gelatin from porcine skin, gel strength 90 - 110 g Bloom, Type A	Sigma-Aldrich	G6144 Lot#BCBF3362V
Gelatin per analysi, bovine, Typ B, granular	ACROS organics	410875000 Lot#A0313412
Glutardialdehyd, 25 % in Wasser	Fluka	49633 Lot#75600

β-Glycerophosphat	Sigma-Aldrich	G5422 Lot#SLBB5458V
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems	4368814 Lot#1304185
Integrin beta 3 rabbit anti-mouse/human polyklonaler Antikörper	abcam	ab47584 Lot#GR84252-2
Kaliumdihydrogenphosphat, p.a.	Merck	1.04873.1000 Lot#A531473438
Kaliumchlorid, p.a.	Merck	1.04936.1000 Lot#K33076636428
Macrophage Colony Stimulating Factor, recombinant mouse (E.coli derived)	R&D Systems	416-ML Lot#ME093121
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Sigma-Aldrich	M-0250 Lot#57H1053
MEM Alpha Medium, + Ribonucleosides + Deoxyribonucleosides	Life Technologies	11900-073 Lot#1097450
2-Mercaptoethanol	Carl Roth	4227.3 Lot#189104048
Methanol p.a.	Merck	1.06009 Lot#K20478409
N,N-Dimethylformamid	Sigma-Aldrich	D-4254 Lot#67H0764
Naphthol AS-MX Phosphat	Sigma-Aldrich	N4875 Lot#061M5303V
Natriumacetat-Trihydrat	Sigma-Aldrich	S-8625 Lot#67H0568
Natriumazid	Sigma-Aldrich	S-8032 Lot#94H2685
Natriumhydroxid, in Plätzchen, p.a.	Merck	1.06498 Lot#B244798825
Natriumtartrat-Dihydrat	Sigma-Aldrich	S-8640 Lot#82H06941
Normal Goat Serum	Life Sciences	
Penicillin/Streptomycin-Lösung, 10000 µg/ml	Biochrom	A 2213 Lot#330 FF
Prostin E ₂ Konzentrat, 5 mg/0,5 ml	Pfizer	5Q9817 Lot#P09610

Receptor Activator of NF- κ B Ligand, recombinant mouse (E.coli derived)	R&D Systems	462-TEC Lot#CWA124121
RNase AWAY	Sigma-Aldrich	83931 Lot#BCBJ1413V
RNase-free DNase Set	QIAGEN	79254 Lot#145029318
RNeasy Mini Kit	QIAGEN	74106 Lot#142341579
RT ² qPCR Primer Assay Col1a1	QIAGEN	PPM03845F-200
RT ² qPCR Primer Assay GAPDH	QIAGEN	PPM02946E-200
RT ² qPCR Primer Assay M-CSF	QIAGEN	PPM03116C-200
RT ² qPCR Primer Assay RANKL	QIAGEN	PPM03047F-200
RT ² qPCR Primer Assay Runx2	QIAGEN	PPM04449C-200
Salzsäure rauchend, 37 %	Merck	Lot# 52700 54305C02
Tissue-Tek O.C.T. Compound	Sakura Finetek	0708810014 Lot#2009-04
Tricalciumphosphat, reinst, Ph. Eur.	AppliChem	A0779,0500 Lot#1J002688
Triton X-100	Sigma-Aldrich	X100 Lot#106H0619
Trypsin (1:250)	Life Technologies	27250-018 Lot#1038644

2.2 Versuchsaufbau

Mithilfe geeigneter Methoden wurde der Einfluss verschiedener Beschichtungen aus Gelatine auf die Differenzierung von Osteoklasten und Osteoblasten getestet.

Die Immunfluoreszenzmarkierung in Verbindung mit einer Aktin/Zellkern-Färbung diente der morphologischen Charakterisierung von Osteoklasten aus Maus-Kokulturen, die auf Deckgläsern kultiviert worden waren.

Für die Untersuchung der Osteoklastendifferenzierung wurde ein Maus-Kokultur-System auf Beschichtungen aus den zu testenden Gelatinetypen durchgeführt. Nach Beendigung der Kokultur wurden die entstandenen Osteoklasten einer TRAP-Färbung unterzogen und die TRAP-positiv gefärbten Zellen mit mindestens drei Zellkernen als reife Osteoklasten gewertet.

Im Fall der Experimente mit nicht-quervernetzter Gelatine wurden Fotos von den Kulturplatten angefertigt, da aufgrund variierender Ergebnisse und unterschiedlichen Versuchsaufbaus keine Vergleichbarkeit gegeben war.

Zur Quantifizierung der Expression von Genen in Osteoblasten, die für die Osteoklastogenese erforderlich sind, wurden primäre Maus-Osteoblasten für 24 und 48h unter Kokultur-Bedingungen mit Calcitriol ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) und Prostaglandin E_2 (PGE_2) kultiviert und die Proben für qRT-PCR aufbereitet.

Die Differenzierung von Osteoblasten wurde untersucht, indem primäre Maus-Osteoblasten auf den Gelatinebeschichtungen in Mineralisationsmedium mit Ascorbinsäure und β -Glycerophosphat (β -GP) kultiviert wurden. Zu vier Zeitpunkten wurden die Proben für qRT-PCR aufbereitet und im Anschluss die Expression von Genen analysiert, die spezifisch für die Differenzierung von Osteoblasten sind.

Die Experimente wurden so entworfen, dass jede Gruppe im Triplikate oder zumindest Duplikate untersucht werden konnte. Als Kontrollgruppen dienten vor allem unbeschichtete Deckgläser, in einigen Experimenten wurden

zusätzlich auch mit bovinem Serumalbumin (BSA) beschichtete Deckgläser verwendet.

2.3 Pufferlösungen

2.3.1 phosphatgepufferte Salzlösung für Zellkultur (PBS/TC)

Zum Waschen von Zellen und für andere Anwendungen wurde eine phosphatgepufferte Salzlösung benutzt, die in 1000 ml zweifach destilliertem Wasser 0,20 g Kaliumchlorid, 0,20 g Kaliumdihydrogenphosphat, 8,00 g Natriumchlorid und 2,71 g Dinatriumhydrogenphosphatdihydrat enthielt. Die Lösung wurde nach der Sterilfiltration bei 4 °C aufbewahrt.

2.3.2 phosphatgepufferte Salzlösung mit Calcium und Magnesium (PBS+Ca²⁺/Mg²⁺)

In 1000 ml zweifach destilliertem Wasser wurden 0,20 g Kaliumchlorid, 0,20 g Kaliumdihydrogenphosphat, 0,10 g Magnesiumchlorid-hexahydrat, 8,00 g Natriumchlorid und 1,43 g Dinatriumhydrogenphosphat-dihydrat gelöst. Diese Lösung wurde auf pH 2-3 angesäuert, 0,10 g Calciumchlorid anhyd. wurden darin gelöst, im Anschluss wurde die Lösung mit Natronlauge auf einen pH von 7,2 eingestellt.

2.4 Nährmedien

2.4.1 Hitzeinaktivierung von FCS

Zur Kultivierung von Osteoblasten wurde ausschließlich hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum verwendet. Dazu wurde das Serum für 30 min in einem auf 56 °C temperiertem Wasserbad belassen und anschließend bei 4 °C bis zur Verwendung aufbewahrt.

2.4.2 **Nährmedium für Osteoblastenkulturen**

Das Medium für Osteoblasten bestand aus α -Modification of Minimum Essential Medium (α -MEM) mit 10 % fötalem Kälberserum, hitzeinaktiviert (FCS, hi) und 1 % Penicillin/Streptomycin (P/S).

2.4.2.1 ***Mineralisationsmedium***

Das Medium zur Anregung von Osteoblasten zur Mineralisation bestand aus dem bereits beschriebenen Osteoblasten-Medium, versetzt mit 50 μ g/ml Ascorbinsäure und 5 mM β -Glycerophosphat.

2.4.3 **Nährmedium für Osteoklastenkulturen**

Osteoklasten wurden in einem Medium basierend auf α -MEM mit 10 % FCS (nicht hitzeinaktiviert) und 1 % P/S kultiviert, dem 10 nM $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und 1 μ M PGE_2 zugesetzt worden waren.

2.5 **Zellen**

2.5.1 **primäre Maus-Osteoblasten**

Osteoblasten wurden in Anlehnung an die Bone Research Protocols (Osteoblast Isolation from Murine Calvaria and Long Bones, Bakker und Klein-Nulend, 2012) aus den Kalvarien von neugeborenen Mäusen isoliert. Dazu wurden die Kalvarienknochen in einer Lösung aus Collagenase und Dispase wiederholt verdaut und die so gewonnenen Zellfraktionen vereinigt. Durch Zentrifugation wurde die Enzymlösung von den isolierten Zellen abgetrennt und nach Resuspendieren in Medium für Osteoblasten in Petrischalen ausgesät. 24 h nach der Isolierung erfolgte ein Mediumtausch, um nicht adhärente Zellen zu entfernen. Nach zweimaligem Splitten und kontrolliertem Einfrieren mithilfe eines Mr. Frosty-Behälters wurden die Zellen bis zur Verwendung in Flüssigstickstoff aufbewahrt.

2.5.2 Osteoklasten aus Maus-Kokultur

Zur Gewinnung von Osteoklasten wurde den Bone Research Protocols entsprechend (Osteoclast Formation in Mouse Co-cultures, Itzstein und van't Hof, 2012) eine Kokultur von Maus-Osteoblasten mit Zellen aus dem Knochenmark von Mäusen durchgeführt. Die Osteoblasten ermöglichen durch die Freisetzung von M-CSF und RANKL die Differenzierung und Fusion von hämatopoetischen Stammzellen aus dem Knochenmark zu vielkernigen Osteoklasten. Auch das Überleben der Osteoklasten wird durch die Cytokine verlängert (Fuller et al., 1993).

Die Expression von M-CSF und RANKL in Osteoblasten wird durch den Zusatz von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und PGE_2 zum Nährmedium induziert. Des Weiteren fördert PGE_2 die Expression von RANK in Osteoklasten (Nakashima et al., 2000).

Zu Beginn von Kokultur-Experimenten wurden primäre Maus-Osteoblasten ausgesät. 24 h später (als Tag 0 bezeichnet) wurde Maus-Knochenmark mit darin enthaltenen Osteoklasten-Vorläuferzellen isoliert. Das Knochenmark wurde mithilfe einer mit Medium für Osteoklasten gefüllten Spritze und Nadel aus den Markhöhlen von Femur und Tibia gespült. Nach Zentrifugation und Resuspendieren im Nährmedium mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und PGE_2 wurde die Zellsuspension auf die Osteoblasten aufgebracht. An den Tagen 2 und 4 der Kokultur erfolgte jeweils ein Mediumtausch, die Fixierung der Zellen wurde stets an Tag 5 der Kokultur vorgenommen.

2.6 Sterilisation der Deckgläser

Die Deckgläser wurden für 24 h in 70 % Ethanol eingelegt und danach in einer verschließbaren Metallbox im Hitzeschrank bei 180 °C für 3 h hitzesterilisiert.

2.7 Herstellung der Beschichtungen

Die Methoden zur Herstellung der Beschichtungen wurden von Fr. Mag. Kimla (Kimla, 2013) übernommen.

2.7.1 **Gelatinebeschichtungen**

2.7.1.1 **Gelatinelösungen**

Es wurden 5 % Lösungen der vier verschiedenen Gelatinetypen in Wasser hergestellt. Zu diesem Zwecke wurde die entsprechende Menge Gelatine in eine kleine Glasflasche mit Schraubverschluss gewogen und die erforderliche Menge Milli-Q-Wasser hinzugefügt. Im Anschluss daran wurde diese Mischung ohne vorheriges Auflösen o.ä. bei 121 °C autoklaviert, bis zur Verwendung wurden die Lösungen bei 4 °C aufbewahrt.

2.7.1.2 **Glutaraldehydlösung**

Eine Lösung von 1 % Glutaraldehyd in Milli-Q-Wasser wurde hergestellt und sterilfiltriert. Bis zum Gebrauch erfolgte die Aufbewahrung bei 4 °C.

2.7.1.3 **Herstellung von Gelatine-beschichteten Deckgläsern**

Die Gelatinelösungen wurden bei 40 °C im Schüttelinkubator geschmolzen. Die Mischung aus zwei Gelatinetypen wurde durch Pipettieren in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen hergestellt und kurz auf dem Vortex-Gerät gemischt.

Unter dem Laminar Air Flow (LAF) wurden auf jedes runde 12 mm-Deckglas 40 µl der Gelatinelösung aufgetragen. Mit der Pipettenspitze wurde die Gelatinelösung so auf dem sterilen Deckglas verteilt, dass die gesamte Fläche bedeckt war. Die berechnete Gelatinemenge pro Fläche betrug etwa 1,6 mg/cm².

Die Deckgläser wurden bis zum vollständigen Trocknen der Beschichtungen im LAF belassen, dann in die Kulturgefäße transferiert und bis zum Gebrauch bei Raumtemperatur gelagert.

2.7.1.4 **Quervernetzen von Gelatine-beschichteten Deckgläsern**

Zur Quervernetzung der Gelatinebeschichtungen wurden 200 µl der Glutaraldehydlösung auf jedes beschichtete Deckglas aufgetragen und dort für 24 h belassen. Nach dieser Zeitspanne wurden die Deckgläser mit einer

Pinzette gefasst und je dreimal in PBS/TC und Milli-Q-Wasser geschwenkt, um überschüssiges Glutaraldehyd zu entfernen.

2.7.2 **BSA-Beschichtung**

2.7.2.1 **BSA-Lösung**

Zur Herstellung einer BSA-Lösung wurde die entsprechende Menge BSA in PBS/TC unter vorsichtigem Schütteln gelöst, um eine Konzentration von 5 mg/ml zu erhalten. Die Lösung wurde anschließend sterilfiltriert und bis zur Verwendung bei 4 °C aufbewahrt.

2.7.2.2 **Herstellung der BSA-Beschichtung**

Die BSA-Lösung wurde in die zu beschichtenden Wells mit Deckgläsern pipettiert. Die Kulturplatten wurden daraufhin für 2 h im Inkubator bei 37 °C belassen, dann wurde die Lösung abgesaugt und die Wells mit PBS/TC gewaschen.

2.8 **Fixierung der Zellen**

Das Fixieren der Zellen erfolgte nach einmaligem Waschen mit PBS+Ca²⁺/Mg²⁺ in einer 3,7 % Lösung von Formaldehyd in PBS+Ca²⁺/Mg²⁺ für 3 min und 10 min, danach wurde drei Mal mit PBS+Ca²⁺/Mg²⁺ gewaschen. Von jenen Deckgläsern, die zur Anfertigung einer Fluoreszenzfärbung verwendet werden sollten, wurde vor der Fixierung die relativ lose anhaftende Osteoblastenschicht von den Deckgläsern gespült. Dies wurde bewerkstelligt, indem auf 37 °C temperiertes PBS+Ca²⁺/Mg²⁺ mit einer Mikropipette immer wieder schwungvoll an der Wand der Wells entlang zum Boden gespült wurde. Die Osteoblasten konnten so als Schicht abgelöst und vor dem Auftragen der Fixierlösung mit der Pufferlösung abgesaugt werden. Zur Aufbewahrung für spätere Färbungen wurde den fixierten Zellen PBS+Ca²⁺/Mg²⁺ mit 0,2 mg/ml Natriumazid zugegeben.

2.9 Fluoreszenzmarkierung

Zur Durchführung einer Fluoreszenzfärbung wurden fixierte und in PBS+Ca²⁺/Mg²⁺ mit Natriumazid-Zusatz gelagerte Deckgläser mit Osteoklasten aus muriner Kokultur verwendet. Zur Permeabilisation der Zellmembranen wurden die Deckgläser 10 min in einer Lösung aus Triton X-100 inkubiert. Im Anschluss daran erfolgte ein Blocking-Schritt in einer Lösung aus Normal Goat Serum (NGS) und BSA für 30 min, um unspezifische Antikörperbindung zu verhindern.

Die für die multiple Antikörperfärbung benötigten primären Antikörper waren in unterschiedlichen Spezies (Kaninchen und Maus) erzeugt worden und wurden gemeinsam auf die Deckgläser aufgetragen. Die Inkubation mit den primären Antikörpern erfolgte über Nacht bei 4 °C.

Am nächsten Tag wurde dreimal je 5 min unter Schütteln mit PBS+Ca²⁺/Mg²⁺ gewaschen, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Es wurde wieder ein Blocking-Schritt durchgeführt, um unspezifische Bindungsstellen abzudecken. Die Mischung der Alexa Fluor®-gekoppelten sekundären Antikörper (Ziege, anti-Kaninchen 546 und anti-Maus 488) wurde gemeinsam mit Alexa Fluor®633-gekoppeltem Phalloidin für 1 h unter Lichtschutz inkubiert.

Nach dreimaligem Waschen wurden die Deckgläser 10 min mit einer DAPI-Lösung inkubiert. Im Anschluss daran erfolgten wieder drei Waschschriffe zu je 5 min unter Schütteln, um ungebundene Antikörper und DAPI restlos zu entfernen.

Die fertig gefärbten Deckgläser wurden in Tissue-Tek-Medium eingebettet. Nach dem vollständigen Trocknen wurden die Ränder der Deckgläser mit klarem Nagellack versiegelt und waren bereit für die Analyse.

2.10 TRAP-Färbung

Die fixierten Zellen wurden mit PBS+Ca²⁺/Mg²⁺ gewaschen und für 30 min bei 37 °C in sogenanntem TRAP-Puffer, bestehend aus Natriumacetat und Natriumtartrat gelöst in zweifach destilliertem Wasser, inkubiert.

Nach Entfernen der Lösung wurde eine 1:1 Mischung von Aceton und absolutem Ethanol aufgetragen und nach wenigen Sekunden Einwirkzeit erfolgte eine kurze Trocknung der Zellen an der Luft.

Als nächstes wurde die Färbelösung, bestehend aus Naphthol AS-MX Phosphat, N,N-Dimethylformamid und Fast Red Violet LB in TRAP-Puffer gelöst, aufgetragen und für etwa 10 min auf den Zellen belassen. Während des Färbeprozesses wurden die Kulturgefäße bei 37 °C inkubiert. Die Intensität der Färbung wurde anhand des mikroskopischen Bildes überwacht und der Färbeprozess bei Erreichen eines befriedigenden Ergebnisses durch Waschen mit zweifach destilliertem Wasser gestoppt.

Die Lagerung der Zellen erfolgte in PBS+Ca²⁺/Mg²⁺ mit dem Zusatz von 0,2 mg/ml Natriumazid.

2.11 quantitative Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion

Beide PCR-Experimente wurden mit zwei biologischen Replikaten pro untersuchter Gruppe und Zeitpunkt durchgeführt (zwei Wells in Zellkultur).

2.11.1 Zell-Lyse

Vor Beginn der Probenaufbereitung wurden der Arbeitsbereich und alle Pipetten und sonstigen verwendeten Utensilien mit RNase-Away abgewischt, um eine Kontamination der Proben mit RNase von außerhalb zu verhindern.

Die Lysierung der Zellen an den jeweiligen Zeitpunkten erfolgte mit Buffer RLT aus dem RNeasy Mini Kit von QIAGEN. Die Lösung wurde vor der Verwendung mit 10 µl/ml Mercaptoethanol versetzt, um die in den Proben enthaltene RNase effektiv zu inaktivieren und so einen Abbau der Proben-RNA zu verhindern.

Nach gründlichem Auf- und Abpipettieren und mikroskopischer Kontrolle wurden die Lysate aus den Wells auf QIAshredder pipettiert und für 2 min bei Maximalgeschwindigkeit der Mikroliterzentrifuge zentrifugiert. Die Proben wurden daraufhin unverzüglich eingefroren und bei -80 °C bis zur RNA-Isolation aufbewahrt.

2.11.2 **RNA-Isolation und -Quantifizierung**

Zur Isolation und Aufreinigung der RNA wurde das RNeasy Mini Kit nach Vorschrift benutzt. Um sicherzustellen, dass keine genomische DNA aus den Zellen oder als Kontamination die Proben verunreinigt, wurde ein DNA-Verdau unter Verwendung des Enzyms DNase durchgeführt. Am Ende des Aufreinigungsprozesses wurde die RNA mit RNase-freiem Wasser von den RNeasy Mini Spin Columns eluiert.

Zur Quantifizierung der isolierten RNA wurde eine spektrophotometrische Messung mit einem Nanodrop-Gerät durchgeführt. Die Ausbeuten waren teils gering, was vermutlich an einer niedrigen Zellzahl in den relativ kleinen Wells der 24-Well-Kulturplatte liegt.

Die RNA-Proben wurden bis zur Synthese der komplementären DNA (cDNA) bei -80 °C gelagert.

2.11.3 **cDNA-Synthese**

Zur cDNA-Synthese wurden von jeder Probe 250 ng RNA als Ausgangsmaterial verwendet. Durch den Mastermix, der u. a. das Enzym Reverse Transkriptase, Random Oligonukleotid-Primer und Desoxyribonukleosidtriphosphate enthält, wurde die RNA im Thermocycler in cDNA umgeschrieben.

Nach einer 10-minütigen Präinkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben für 2 h auf 37 °C gehalten, um anschließend für 5 min auf 85 °C erhitzt zu werden.

Nach dem Abschluss der Synthese wurden die Proben sofort wieder im -80 °C Tiefkühlschrank aufbewahrt.

2.11.4 **qRT-PCR**

Bei Durchführung einer absoluten Quantifizierung zieht auch die geringste Ungenauigkeit während der RNA-Quantifizierung oder beim Pipettieren von RNA oder cDNA große Abweichungen der Endergebnisse nach sich. Daher wird für Anwendungen wie die hier beschriebene prinzipiell eine relative

Quantifizierung durchgeführt. Durch Verwendung dieser Methode werden außerdem unterschiedliche Raten der Genexpression in den Zellen kompensiert.

In beiden PCR-Experimenten gab es für jede Probe zwei Gene von Interesse. Um die relative Quantifizierung durchführen zu können, wurde noch ein drittes Gen, das sogenannte Haushaltsgen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), benötigt. Als Haushaltsgene werden Gene verwendet, deren Expressionslevel normalerweise konstant bleiben. Die Expression von GAPDH in jeder Probe wurde mit der Expression der beiden Gene von Interesse in Beziehung gesetzt.

Zur Minimierung von Unregelmäßigkeiten beim Pipettieren wurden, sowohl von den cDNA-Proben, als auch von den Primern, 1:5 Verdünnungen angefertigt, sodass größere Volumina pipettiert werden konnten.

Der Mastermix enthielt u. a. das thermostabile Enzym Taq-DNA-Polymerase, den Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I und für die Amplifikation benötigte Desoxyribonukleotide. SYBR Green I ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der an doppelsträngige DNA bindet. Dies wird in der zweiten Phase eines jeden Amplifikationszyklus ausgenutzt, wenn die Amplifikationsprodukte bei 60 °C als Doppelstrang vorliegen, SYBR Green I binden kann und die Fluoreszenzintensität detektiert wird.

Nachdem der Mastermix, die Proben und die Primer in alle Wells pipettiert worden waren, konnte die eigentliche qRT-PCR durchgeführt werden. Das PCR-Programm bestand aus einer Präinkubationsphase bei 95 °C für 10 min, auf diese folgten 34 Amplifikationszyklen, die jeweils aus zwei Schritten (95 °C für 15 sek und 60 °C für 1 min) bestanden, gefolgt von der Schmelzphase (95 °C für 10 sek, 55 °C für 1 min und 97 °C für 1 sek) zur Erstellung der Schmelzkurven. Die Messung der Fluoreszenz von SYBR Green I erfolgte am Ende eines jeden Amplifikationszyklus und kontinuierlich während des Aufheizens auf 97 °C in der Schmelzphase.

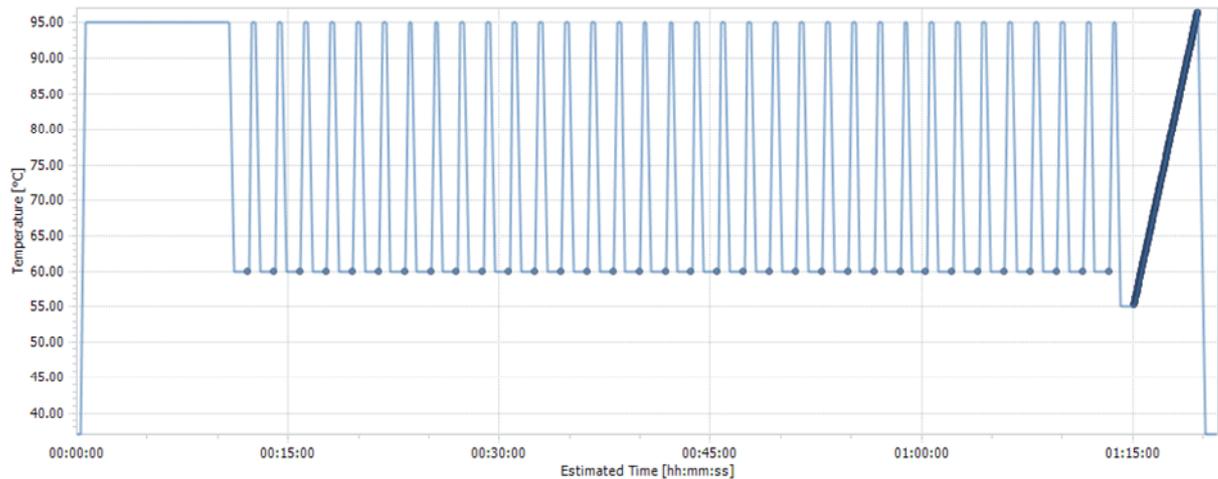


Abbildung 4: verwendetes PCR-Programm; Temperatur (y-Achse) im Verlauf über die Zeit (x-Achse), Fluoreszenzmessungen sind fett eingezeichnet

Die Anzahl der Amplifikationsprodukte, und damit einhergehend auch die Fluoreszenzintensität, nimmt einen sigmoidalen Verlauf. Bei der qRT-PCR wird die Anzahl an Amplifikationszyklen bestimmt, die nötig ist, damit die Fluoreszenz von SYBR Green I einen festgelegten Grenzwert übersteigt. Der erhaltene Wert wird als Ct-Wert (cycle threshold) bezeichnet und zeigt die Zyklanzahl an, bei der die Fluoreszenzintensität durch SYBR Green I, das an doppelsträngige Amplifikationsprodukte gebunden ist, die Hintergrundfluoreszenz übersteigt.

2.11.5 Analyse und Berechnung

Die Analyse der durch die qRT-PCR erhaltenen Werte erfolgte unter Verwendung der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode (Livak und Schmittgen, 2001). Wie der Name schon vermuten lässt, basiert die Methode auf der Berechnung von Differenzen. Einerseits wird für jede Probe die Differenz des Ct-Wertes des Haushaltgens und des Ct-Wertes des Gens von Interesse (z. B. Gen A) gebildet. Dieser erste Schritt stellt also eine Normierung zum Haushaltgen dar. Andererseits werden aus den so erhaltenen ΔCt -Werten wieder Differenzen gebildet, z. B. die Differenz aus dem ΔCt -Wert für Gen A von Probe 1 und aus dem ΔCt -Wert für Gen A von Probe 2. Auf diese Weise lassen sich Unterschiede in der Expression desselben Gens in zwei

verschiedenen Proben berechnen, z. B. zwischen einer Gelatinegruppe und der unbehandelten Kontrollgruppe. Diese $\Delta\Delta Ct$ -Werte werden für verbesserte Übersichtlichkeit in Fold Change (im Deutschen am ehesten entsprechend: x-fache Änderung) umgerechnet.

$$\Delta Ct = Ct_{\text{Gen von Interesse}} - Ct_{\text{Haushaltsgen}}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{Probe 1}} - \Delta Ct_{\text{Probe 2}}$$

$$\text{Fold Change} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Die Graphen im Resultate-Teil dieser Arbeit basieren auf den so berechneten Fold Change-Werten.

2.12 statistische Auswertung der Daten

Die Osteoklasten-Zählung wurde mit verschiedenen Programmen ausgewertet: Mittelwerte und Standardabweichungen wurden in Microsoft Excel berechnet, eine einfaktorische ANOVA ebendieser Werte mit Tukey-Test im Anschluss wurde in GraphPad Prism durchgeführt. Auch für die grafische Darstellung wurde Prism herangezogen.

Die Auswertung der quantitativen Real-Time-PCR gestaltete sich schwierig, da die Anzahl der biologischen Replikate zu gering für eine ANOVA war ($n=2$). Zur Berechnung der p-Werte wurde daher in Excel ein zweiseitiger Student-t-Test mit ungleicher Varianz (heteroskedastisch) durchgeführt, um p-Werte zu berechnen. Auch die Graphen wurden in Excel erstellt.

3 Resultate

3.1 Charakterisierung von Osteoklasten

Zum Zwecke des Erlernens der Kokultur-Methoden wurden Experimente mit murinen Osteoblasten und Osteoklasten durchgeführt. Die dabei entstandenen Osteoklasten wurden für Experimente zur Charakterisierung von Maus-Osteoklasten genutzt.

3.1.1 TRAP-Färbung

Nach der Fixierung der Zellen wurde eine TRAP-Färbung durchgeführt, um die Präsenz von TRAP-positiven Osteoklasten zu sichern und um die Zellen durch den so erhöhten Kontrast besser erkennbar zu machen.

Es zeigen sich viele TRAP-positive, multinukleäre Zellen und ihre Größe beträgt oft mehr als 500 μm . Ihre Zellkerne sind meist in kleinen Gruppen in der Mitte der Zelle oder entlang der Zellmembran in Reihen angeordnet.

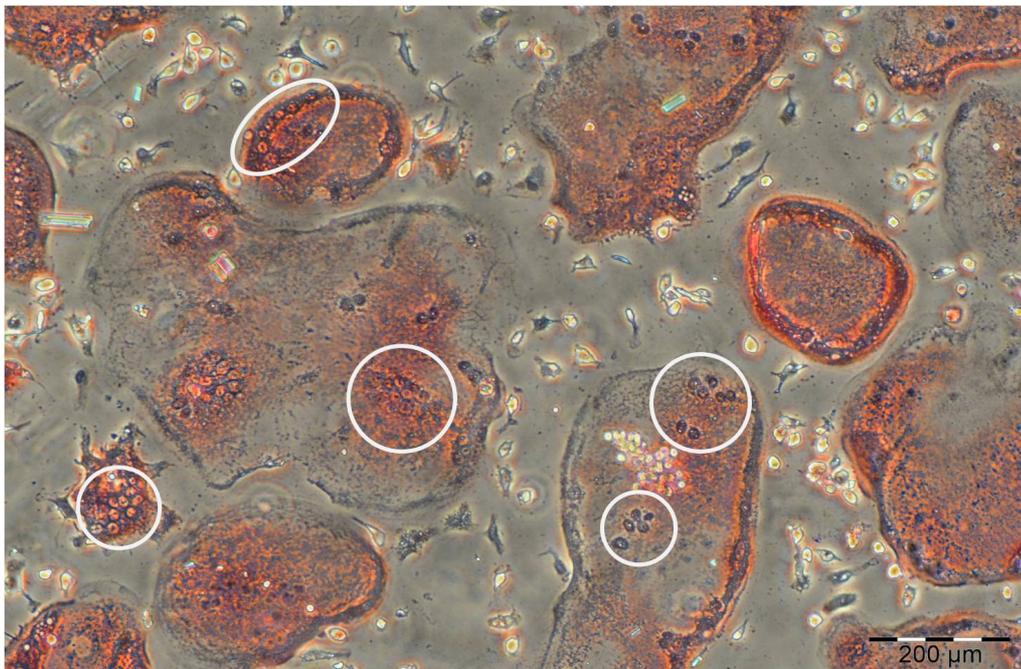


Abbildung 5: Osteoklasten aus Maus-Kokultur nach TRAP-Färbung; deutlich sichtbar sind die Zellkerne, entweder in Grüppchen (Kreise) oder entlang der Membran angeordnet (Ellipse)

3.1.2 Fluoreszenzmarkierung

Mit fixierten Zellen aus demselben Experiment wurde außerdem eine Immunfluoreszenzfärbung von Integrin $\beta 3$ und Cathepsin K in Verbindung mit einer Phalloidin-/DAPI-Färbung durchgeführt. Anhand der Fluoreszenzmikroskop-Aufnahmen lässt sich die zelluläre Lokalisation von Integrin $\beta 3$ und Cathepsin K in murinen Osteoklasten erkennen, die Phalloidin-/DAPI-Färbung zeigt Aktinringe und Zellkerne.

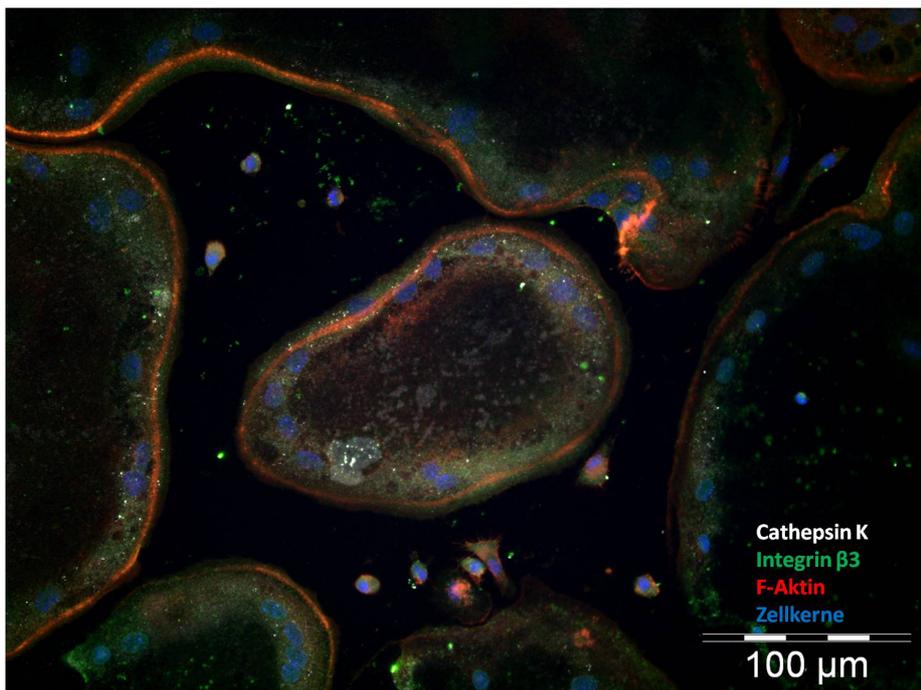


Abbildung 6: Fluoreszenzfärbung muriner Osteoklasten, 20x Objektiv

In Abbildung 6 ist ein eher kleiner Osteoklast mit 14 Zellkernen (blau) zu sehen, einige größere Osteoklasten umgeben ihn. Abbildung 7 zeigt dieselbe Zelle, in stärkerer Vergrößerung aufgenommen.

Deutlich erkennbar sind feine Aktinringe (rot) am äußeren Rand aller Osteoklasten. Integrin $\beta 3$ (grün) ist in nächster Umgebung der Aktinringe in besonderer Dichte lokalisiert.

Cathepsin K (weiß) ist, bevor es in die Resorptionslakune freigesetzt wird, in Vesikeln gespeichert, was das punktierte Bild der Cathepsin K-Färbung erklärt.

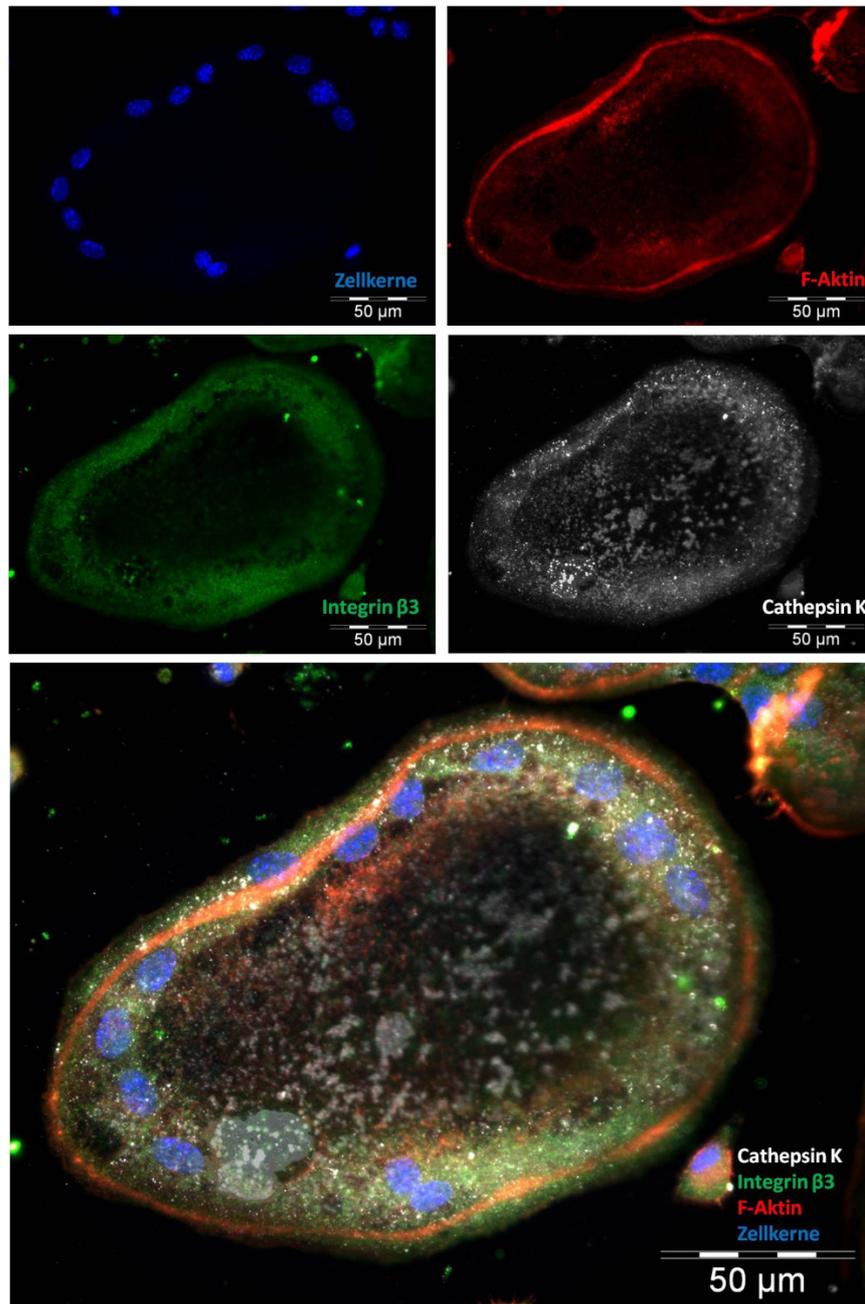


Abbildung 7: Fluoreszenzfärbung muriner Osteoklasten, 40x Objektiv; Einzelbilder und Overlay (unten)

3.2 Einfluss von Gelatinebeschichtungen auf die Anzahl und Morphologie von Osteoklasten

Die aus vorhergehenden Experimenten der Arbeitsgruppe vorliegenden Resultate haben gezeigt, dass die Osteoklastenbildung auf einigen der Gelatinebeschichtungen verhindert wird (siehe Abbildung 8).

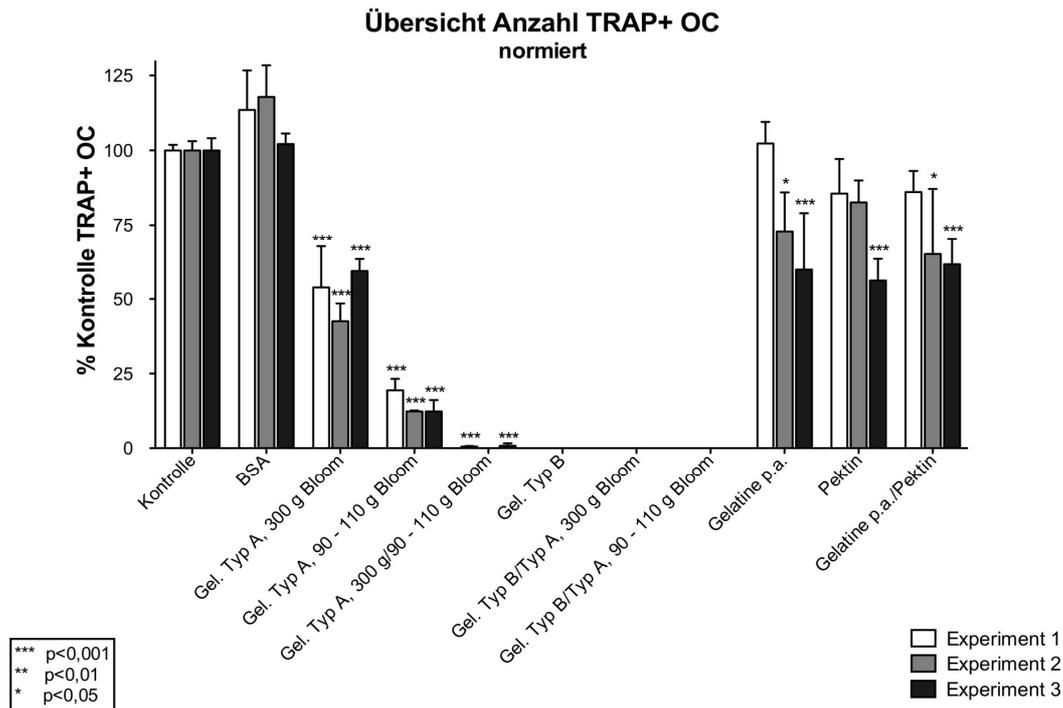


Abbildung 8: Kimla, 2013; Anzahl TRAP-positiver Zellen mit mind. 3 Zellkernen auf Gelatinebeschichtungen

Um die Ursache hierfür zu finden, wurde ein Experiment entwickelt, in welchem dem Nährmedium die für die Osteoklastogenese notwendigen Cytokine M-CSF und RANKL hinzugefügt werden sollten. Für den Fall, dass die Gelatinebeschichtungen die Osteoblasten in ihrer Funktion beeinträchtigen und in Folge dessen die Expression oder Freisetzung der Cytokine verringern sollten, müsste dieser Effekt durch den Cytokinzusatz aufgehoben werden können.

Tatsächlich hat sich gezeigt, dass nach dem Zusatz von rmM-CSF (100 ng/ml an Tag 0 zugesetzt, 30 ng/ml von Tag 2-5 der Kokultur) und rmRANKL (50 ng/ml von Tag 2-5) in jeder der Gelatinearten etwa gleich viele Osteoklasten entstanden waren. Allerdings ergaben darauffolgende Experimente, dass auch ohne den Zusatz von M-CSF und RANKL die verschiedenen Gelatinegruppen etwa gleich viele TRAP-positive multinukleäre Zellen hatten – auch jene, die in den Experimenten aus Abbildung 8 keine Osteoklasten gehabt hatten. Andeutungsweise war zu erkennen, dass mit Zusatz der Cytokine eher mehr TRAP-positive Zellen in den Kulturgefäßen waren.

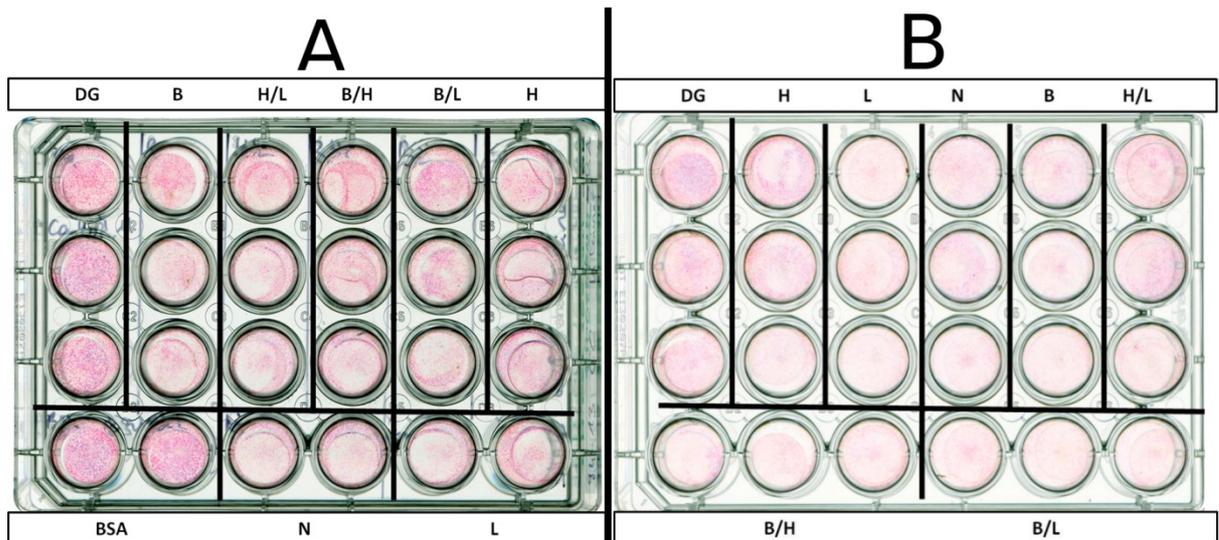


Abbildung 9: TRAP-Färbung von Maus-Kokultur auf Gelatine; mit Zusatz von M-CSF und RANKL (A) und ohne Zusatz der Cytokine (B); Abkürzungen:

DG ... Kontrolle, unbeschichtetes Deckglas

BSA ... BSA-beschichtetes Deckglas

H ... Gelatine Typ A, 300 Bloom

L ... Gelatine Typ A, 90-110 Bloom

B ... Gelatine Typ B

N ... Gelatine p.a.

B/H, B/L, H/L ... 1:1 Mischungen der jeweiligen Gelatinetypen

Ein weiterer Effekt, der im Zuge dieser Experimente beobachtet werden konnte, war die Auswirkung der verwendeten Kulturplatten auf die Menge der Osteoklasten auf den gelatinebeschichteten Deckgläsern. Die Kulturplatten aus Abbildung 9 sind für adhärenzte Zellkultur geeignet („tissue culture treated“, TC), sie sind also mit einer durch physikalische Verfahren hydrophilisierten Oberfläche versehen, um die Zellanheftung an den Polystyrolplatten zu verbessern (Greiner Bio-One GmbH. FAQ Zell-/Gewebekultur, 2013). Zwecks Vergleichbarkeit mit den schon durchgeführten Experimenten wurden auch für die nachfolgenden Versuche ebensolche Kulturplatten verwendet. In einem Experiment jedoch wurden beide Kulturplattenarten parallel verwendet, eine für adhärenzte Zellkultur und eine für Suspensionskultur. Im Vergleich beider war festzustellen, dass sich die Ergebnisse deutlich unterscheiden. Die TC-Oberfläche erleichtert die Adhäsion der Zellen, sodass die gesamte Fläche der Wells bewachsen wurde und tendenziell mehr Osteoklasten auf der behandelten Plastikoberfläche zu

finden waren als auf den Gelatine-Deckgläsern. In der Suspensionskulturplatte bewirkt die unbeschichtete Plastikoberfläche, dass sich keine Zellen auf ihr anheften können – deutlich zu sehen waren die Ringe rund um die Deckgläser, auf denen sich keinerlei TRAP-positive Zellen befanden – alle Osteoklasten waren auf den (beschichteten) Deckgläsern. Auf der Suspensionskulturplatte war praktisch kein Unterschied zwischen den Gelatinegruppen und der Kontrollgruppe auszumachen.

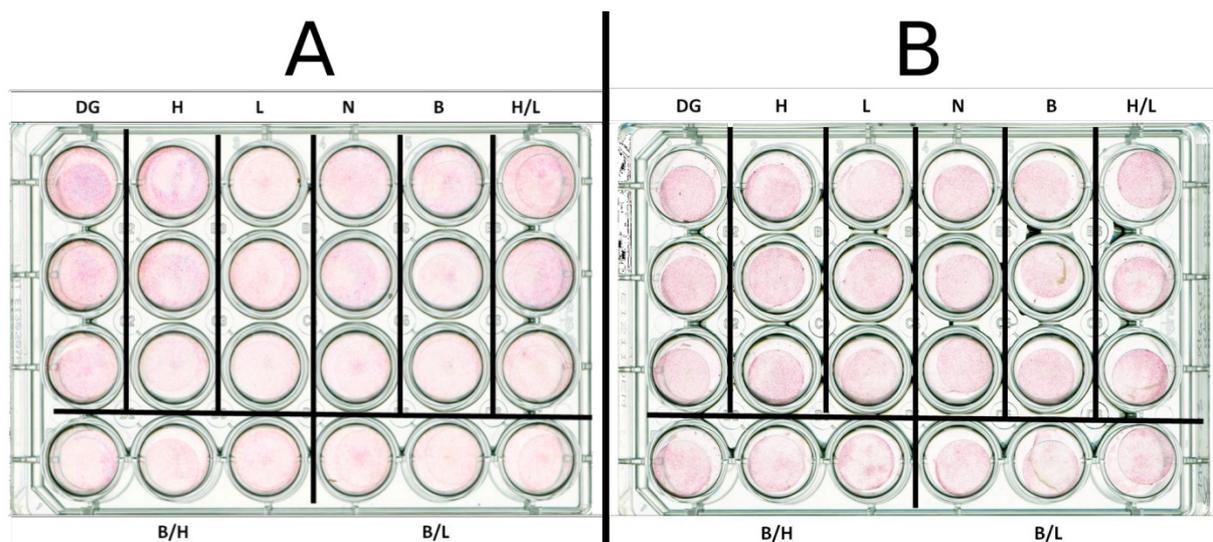


Abbildung 10: TRAP-Färbung von Maus-Kokkultur auf Gelatine; auf Kulturplatte für adhärenzte Zellkultur (A) und für Suspensionskultur (B); Abkürzungen:

DG ... Kontrolle, unbeschichtetes Deckglas

BSA ... BSA-beschichtetes Deckglas

H ... Gelatine Typ A, 300 Bloom

L ... Gelatine Typ A, 90-110 Bloom

B ... Gelatine Typ B

N ... Gelatine p.a.

B/H, B/L, H/L ... 1:1 Mischungen der jeweiligen Gelatinetypen

Um Hinweise auf die Morphologie der Zellen zu erhalten, wurden Fotos von zufällig ausgewählten Stellen auf den Deckgläsern gemacht und einander gegenübergestellt (siehe Abbildung 11).

Zwischen den verschiedenen Gelatinetypen waren keine Unterschiede ersichtlich, die Zellen waren von sehr ähnlicher Gestalt und Größe.

Die Zellen der Gelatinegruppen in der Kulturplatte mit Cytokinzusatz sahen im Vergleich zur Kontrollgruppe auf derselben Platte etwas kleiner und

verzweigter aus, sie schienen auch tendenziell weniger Zellkerne zu besitzen. Dies könnte ein Hinweis auf verschlechterte Osteoklastenadhäsion in der Gegenwart von Gelatine sein.

Die Gruppen in der Platte ohne Cytokinzusatz sahen – bei dieser Betrachtungsweise – gleich aus, es gab keine gravierenden Unterschiede zwischen den Gelatinen und der Kontrolle.

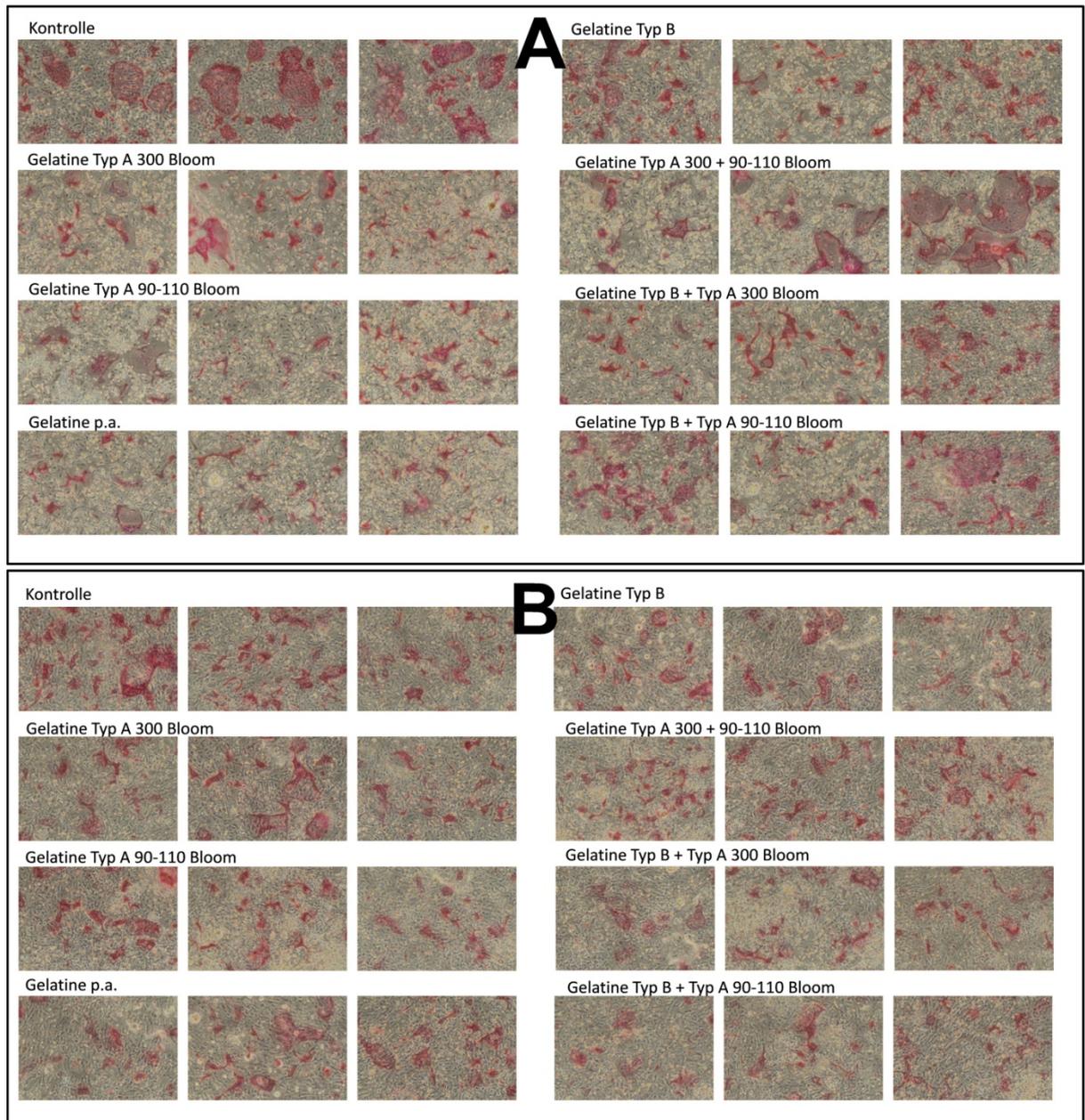


Abbildung 11: Vergleich der Morphologie von Zellen auf Gelatine mit Zusatz von M-CSF und RANKL (A) und Zellen ohne Cytokin-Zusatz (B); alle Fotos mit 20x Objektiv aufgenommen

3.3 Einfluss von quervernetzten Gelatinebeschichtungen auf die Anzahl und Morphologie von Osteoklasten

Für frühere Experimente wurden Kompositbeschichtungen aus Gelatine und β -TCP hergestellt. Da sich Gelatine während der Kultivierung bei 37 °C verflüssigt und infolgedessen der mineralische Anteil ins Medium freigesetzt wird, war es notwendig, die Gelatine mit Glutaraldehyd zu quervernetzen.

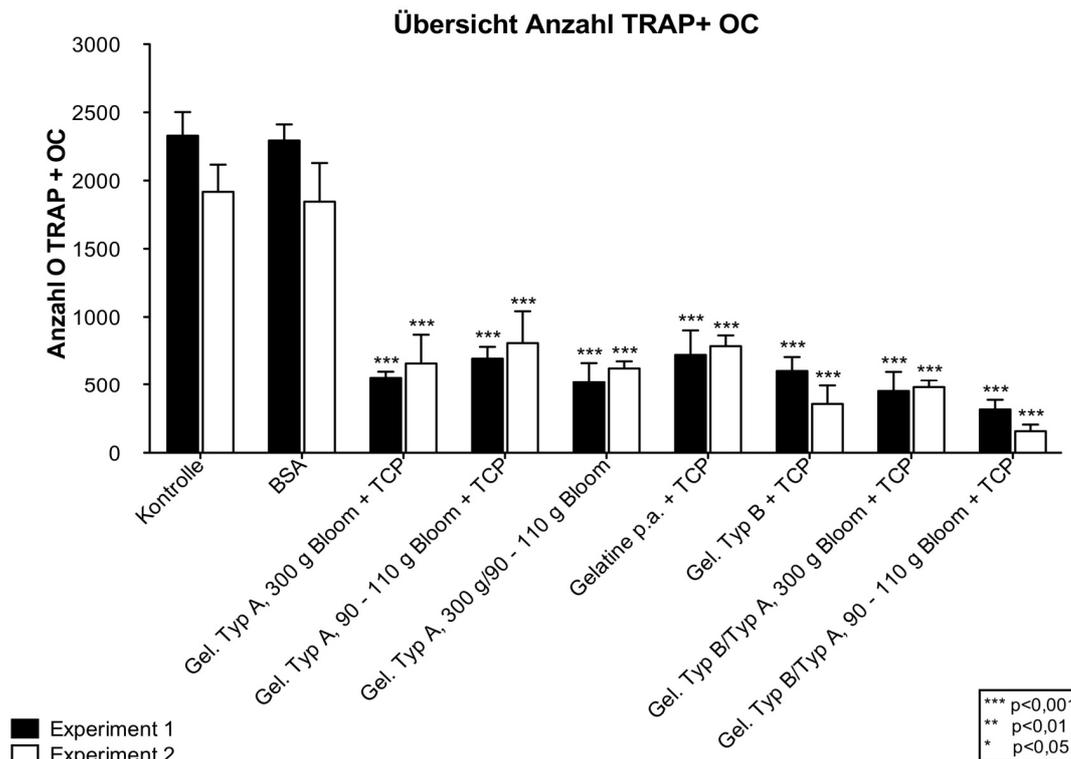


Abbildung 12: Kimla, 2013; Anzahl TRAP-positiver Zellen mit mind. 3 Zellkernen auf quervernetzten Gelatine-TCP-Beschichtungen

Im Gegensatz zu den Experimenten mit Gelatine ohne TCP und Glutaraldehyd konnte hier beobachtet werden, dass die Beschichtungen aus Gelatine Typ B und allen Gelatinemischungen nun ähnlich viele Osteoklasten wie die übrigen Gelatinegruppen hatten (Kimla, 2013). Allerdings war nicht klar, ob die Ursache dafür die Mineralbeimengung oder das Quervernetzen der Gelatine war. Aus diesem Grund wurden in den vorliegenden Experimenten mit Glutaraldehyd quervernetzte Gelatinebeschichtungen ohne TCP-Zusatz getestet.

Mit jeder Gruppe wurde der Versuch mindestens zweimal durchgeführt. Für die vier Gelatinetypen und die Kontrollgruppe wurde noch ein drittes Experiment gemacht, um zu einer besseren Aussage über die teils sehr unterschiedlichen Ergebnisse innerhalb der Gruppen gelangen zu können.

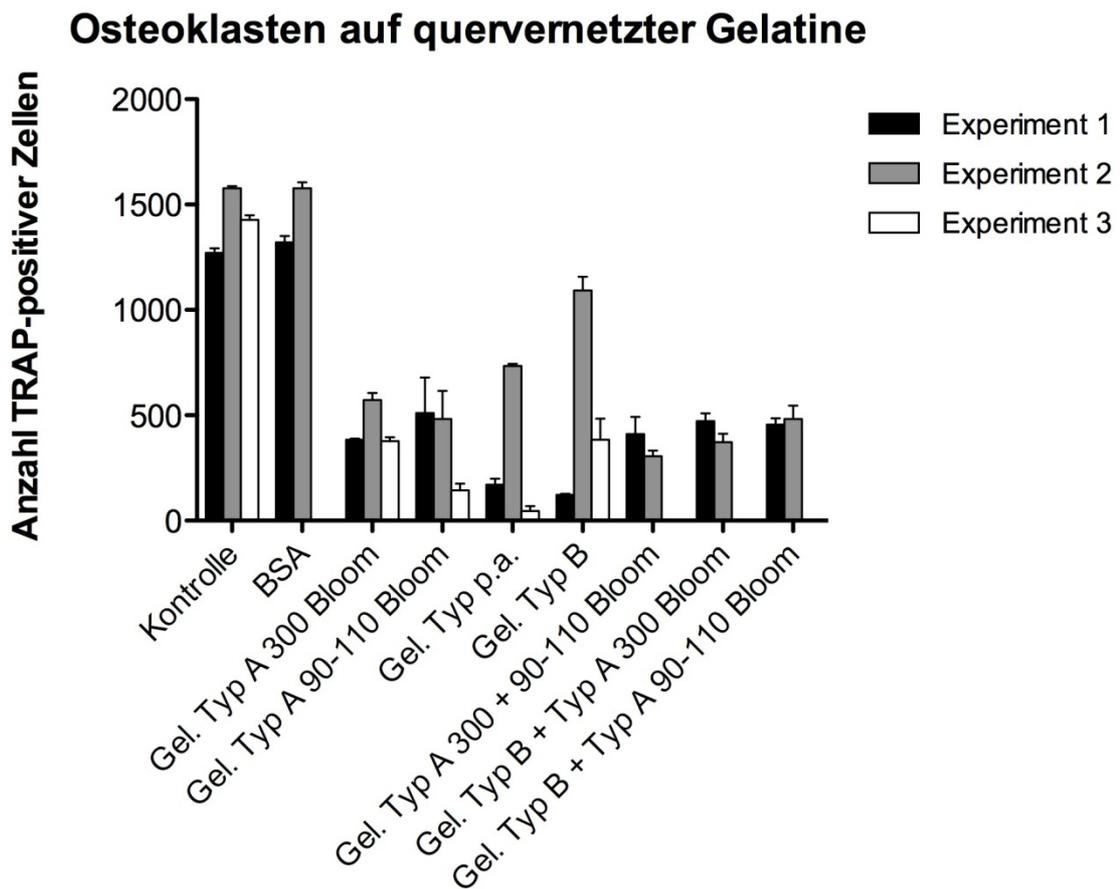


Abbildung 13: Anzahl TRAP-positiver Zellen mit mind. 3 Zellkernen auf quervernetzten Gelatine-Beschichtungen

Anhand dieser Resultate lässt sich sagen, dass die Produkte des Quervernetzungsprozesses offenbar von sehr inhomogener Qualität sind. Obwohl bei jedem der 3 Experimente nach demselben Protokoll gearbeitet worden war, kamen teils höchst unterschiedliche Ergebnisse zustande. Auch die Standardabweichung (siehe Fehlerindikator-Balken) war in manchen Gelatinegruppen deutlich größer als in der Kontroll- und der BSA-Gruppe.

Eine weitere statistische Auswertung der Daten erfolgte nur für die Kontrollgruppe und die reinen Gelatintypen, da für die BSA-Gruppe und die Gelatinemischungen nicht ausreichend viele Experimente durchgeführt worden waren.

Nach einer einfaktoriellen ANOVA mit dem Tukey-Test im Anschluss wurde erkennbar, dass sich jede der Gelatinegruppen signifikant von der Kontrollgruppe unterscheidet ($p < 0,05$), für Gelatine p.a. war der Unterschied hochsignifikant ($p < 0,01$). Zwischen den Gelatinen untereinander waren keine signifikanten Unterschiede vorhanden.

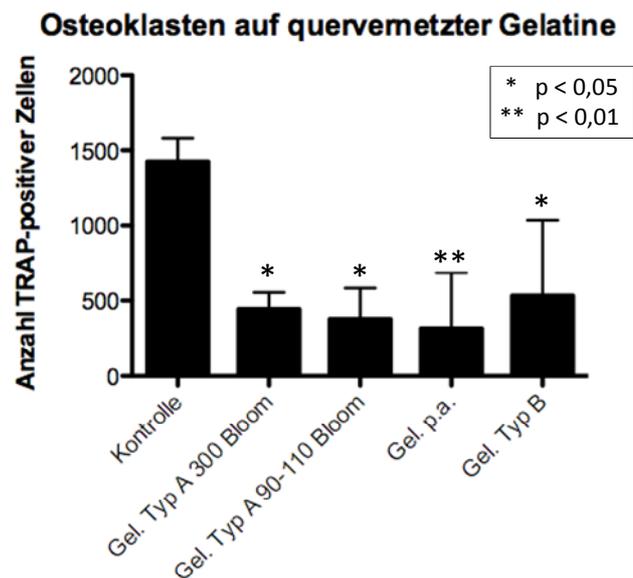


Abbildung 14: Anzahl TRAP-positiver Zellen mit mind. 3 Zellkernen auf ausgewählten quervernetzten Gelatine-Beschichtungen; nach der einfaktoriellen ANOVA mit Tukey-post-hoc-Test zeigt jeder Gelatintyp im Vergleich zur unbeschichteten Kontrolle signifikante Unterschiede ($p < 0,05$ oder $p < 0,01$), zwischen den verschiedenen Gelatintypen untereinander konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden

Sehr auffällig an den Osteoklasten auf Glutaraldehyd-quervernetzter Gelatine war ihre Zellmorphologie. Die Zellen waren, verglichen mit der unbehandelten Kontrollgruppe, deutlich kleiner, eher länglich als rund und hatten nur eine geringe Anzahl an Zellkernen, meist etwa drei bis fünf Stück pro Zelle.

An dieser Stelle wurde untersucht, ob die Expression oder Freisetzung von M-CSF und/oder RANKL durch die Osteoblasten von der quervernetzten Gelatine beeinträchtigt wird. Zu diesem Zwecke wurde wieder eine Kulturplatte mit rmM-CSF (100 ng/ml an Tag 0 zugesetzt, 30 ng/ml von Tag 2-5 der Kokultur) und rmRANKL (50 ng/ml von Tag 2-5) im Medium kultiviert und die andere ohne den Cytokinzusatz.

Auf den quervernetzten Gelatinebeschichtungen kam es bei diesem Experiment ebenfalls zu keiner wesentlichen Veränderung in der Morphologie, die Zellen sahen sowohl mit als auch ohne M-CSF- und RANKL-Zusatz sehr ähnlich aus (siehe Abbildung 15). Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass die veränderte Anzahl und Morphologie der Osteoklasten aus Kokultur auf quervernetzter Gelatine nicht von einer Beeinträchtigung der Osteoblasten verursacht wird, sondern dass die Osteoklasten selbst in ihrer Differenzierung, Fusion oder Adhäsion gestört sind.

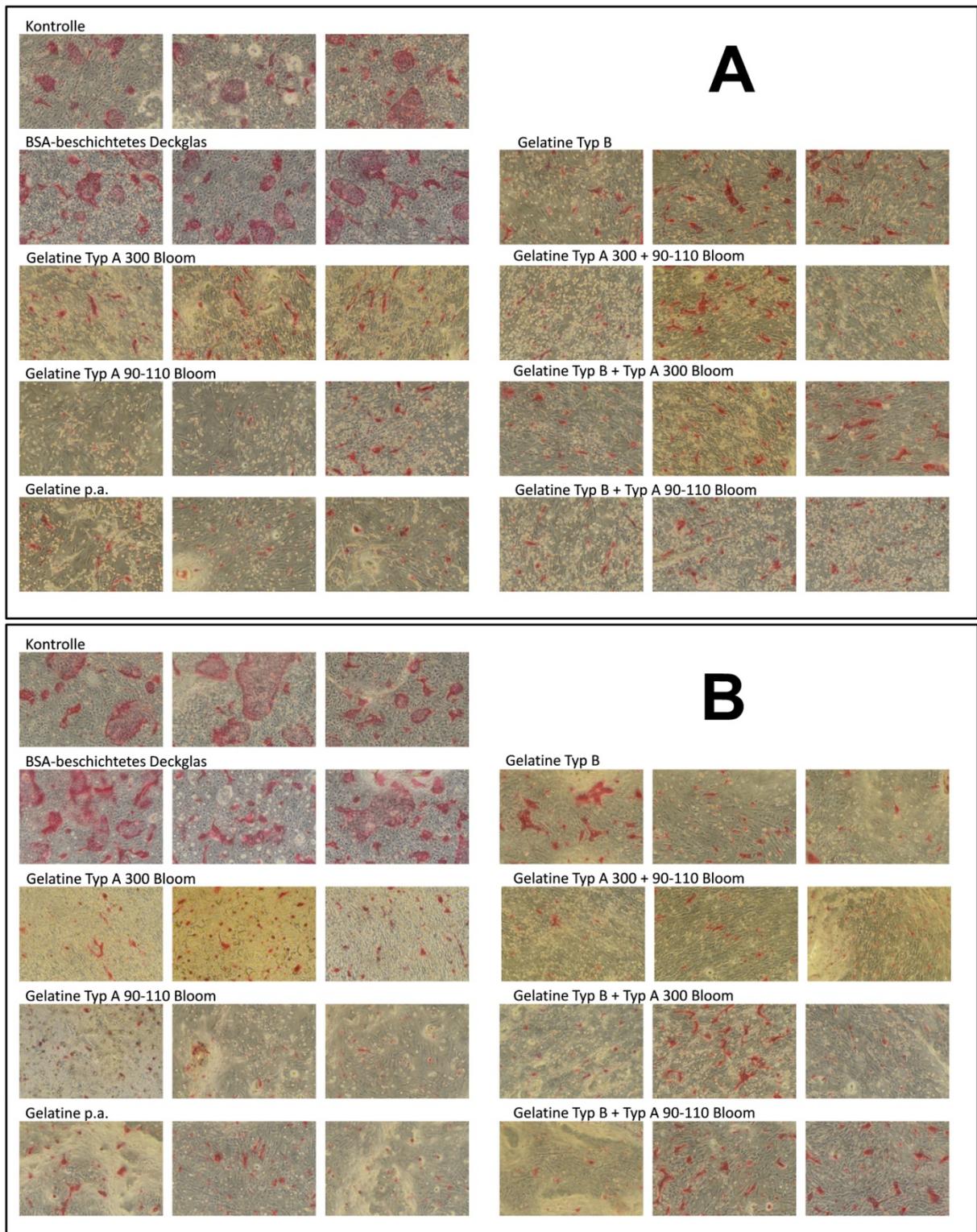


Abbildung 15: Vergleich der Morphologie von Zellen auf quervernetzter Gelatine mit Zusatz von M-CSF und RANKL (A) und Zellen ohne Cytokin-Zusatz (B); alle Fotos mit 20x Objektiv aufgenommen

3.4 quantitative Real-Time-PCR: Einfluss von quervernetzten Gelatinebeschichtungen auf die Expression von M-CSF und RANKL in Osteoblasten

Um den Einfluss der quervernetzten Gelatinebeschichtungen auf die Osteoklastogenese noch genauer zu analysieren, wurde ein Experiment mit primären Maus-Osteoblasten durchgeführt, mithilfe dessen die Expression von M-CSF und RANKL in Osteoblasten unter Kokultur-Bedingungen quantifiziert wurde.

Die eine Hälfte der Proben wurde 24 h nach der Aussaat für den ersten Zeitpunkt der Analyse lysiert („Tag 0“; Namensgebung an Kokulturbedingungen angelehnt, die Knochenmarksaussaat bestimmt Tag 0 der Kokultur), der anderen Hälfte wurde zu diesem Zeitpunkt PGE_2 und $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ hinzugefügt und die Probenaufbereitung erfolgte erst nach weiteren 24 h („Tag 1“).

Die Proben wurden wie schon unter Material und Methoden beschrieben aufbereitet und mit quantitativer RT-PCR analysiert. Es wurden Primer für murinen M-CSF und murinen RANKL verwendet, als Haushaltsgen fungierte GAPDH.

3.4.1 Amplifikationskurven und Schmelzkurvenauswertung

Am Ende eines jeden Amplifikationszyklus wird die Fluoreszenzintensität von SYBR-Green detektiert und aus diesen Messwerten über die Zeit eine Kurve erstellt. Abbildung 16 zeigt die Amplifikationskurven für die verschiedenen Primer.

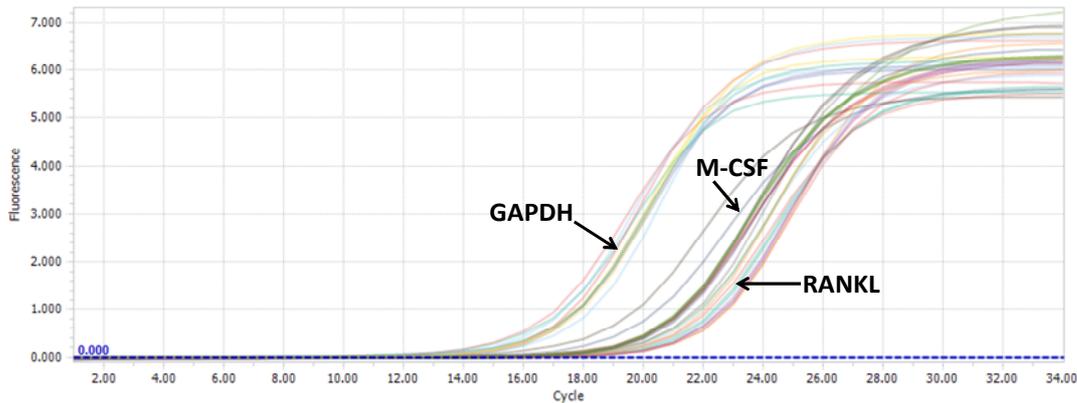


Abbildung 16: Amplifikationskurven für die verwendeten Primer; repräsentative Auswahl

Am Ende der Amplifikationsphasen erfolgt die Schmelzphase, um die Reinheit des amplifizierten Produktes sicherzustellen. Hierzu wird die Temperatur kontinuierlich gesteigert und dabei die Fluoreszenzintensität von SYBR-Green gemessen. Für das PCR-Produkt eines jeden Primers ist die Temperatur bekannt, bei der das Intensitätsmaximum vorliegt. Bei spezifischer Amplifikation erscheint in der Schmelzkurve nur ein einziger Peak, etwa bei der vom Primer-Hersteller angegebenen Temperatur. In Abbildung 17 sind die Schmelzkurven der PCR-Produkte zu sehen.

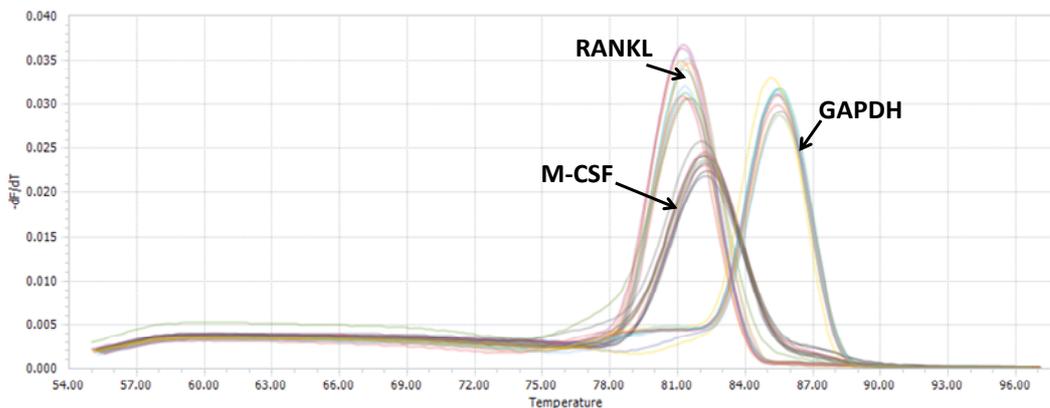


Abbildung 17: Schmelzkurven der PCR-Produkte für die verwendeten Primer; Herstellerangaben für Schmelztemperaturen: RANKL etwa 81 °C, M-CSF etwa 80 °C und GAPDH etwa 84 °C; repräsentative Auswahl

3.4.2 M-CSF- und RANKL-Expression in Osteoblasten auf quervernetzten Gelatinen

3.4.2.1 *Im Vergleich mit unbeschichteter Kontrollgruppe*

Die Proben von Tag 0, dem ersten analysierten Zeitpunkt, repräsentieren die Basiswerte der Expression von M-CSF und RANKL (Abbildung 18).

Die M-CSF-Expressionslevel liegen in allen Gelatinegruppen unter den Werten in der Kontroll- und BSA-Gruppe. Eine signifikante Reduktion der M-CSF-Expression um etwa die Hälfte liegt bei beiden Gelatinen vom Typ A (300 und 90-110 Bloom), bei Gelatine p.a. und der Mischung aus Gelatine Typ B mit Gelatine Typ A (90-110 Bloom) vor.

Die RANKL-Expression in den Gelatinegruppen unterscheidet sich nicht signifikant von der Kontrollgruppe.

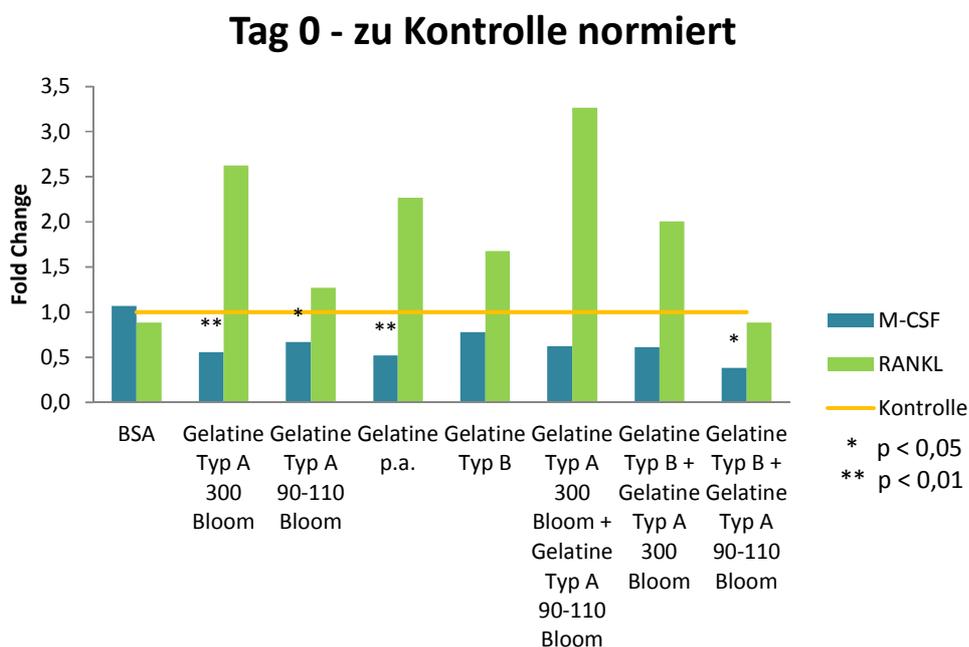


Abbildung 18: Expression von M-CSF und RANKL zum Zeitpunkt Tag 0; die Werte sind zur unbeschichteten Kontrollgruppe normiert, die in der Grafik durch die horizontale Linie bei Fold Change = 1 repräsentiert wird

An Tag 1 wird der Einfluss von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und PGE_2 , die 24 h vor der Probenaufbereitung dem Nährmedium zugesetzt worden sind, auf die Zellen

erkennbar (Abbildung 19). Die Expression von M-CSF ist nun in den Gelatinegruppen ähnlich wie in der Kontrolle.

Auch die Expressionslevel von RANKL unterscheiden sich, wie schon an Tag 0, in den Gelatinegruppen nicht signifikant von der Kontrolle.

Der anfangs zu beobachtende hemmende Effekt der Gelatinebeschichtungen auf die M-CSF-Expression in den Osteoblasten ist 24 h nach Zugabe von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und PGE_2 nicht mehr vorhanden.

Tag 1 - zu Kontrolle normiert

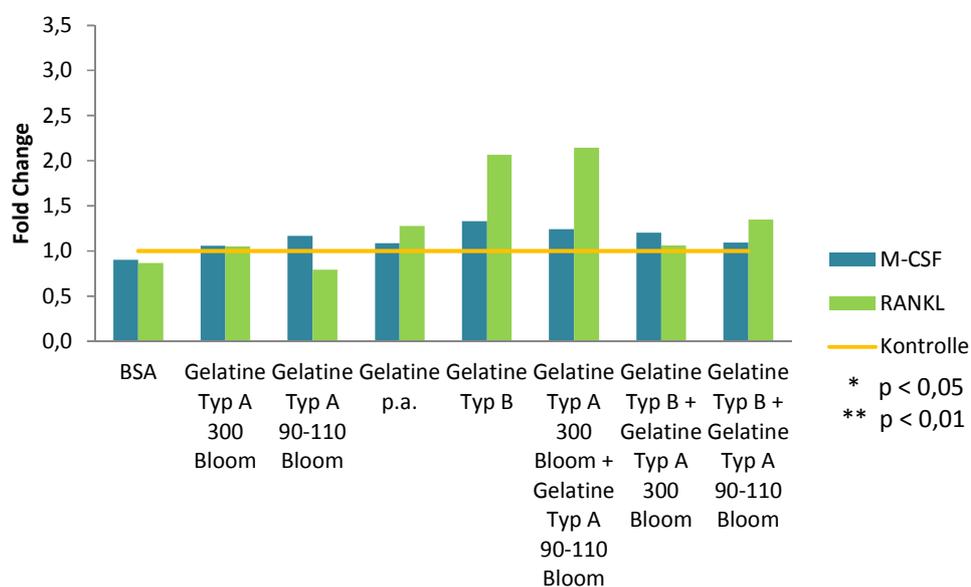


Abbildung 19: Expression von M-CSF und RANKL zum Zeitpunkt Tag 1; die Werte sind zur unbeschichteten Kontrollgruppe normiert, die in der Grafik durch die horizontale Linie bei Fold Change = 1 repräsentiert wird

3.4.2.1 *Im Zeitverlauf*

Die Werte von Tag 1 aller Gruppen wurden nicht nur auf die Kontrolle normiert (Abbildung 18 und Abbildung 19), sondern auch auf die Werte von Tag 0 aus der jeweils gleichen Gruppe. Der Graph in Abbildung 20 gibt also Auskunft über die Veränderung der Genexpression von Tag 0 auf Tag 1.

Die M-CSF-Expression verändert sich über die Zeit in keiner der Gruppen signifikant.

In der RANKL-Expression jedoch liegen signifikante Anstiege bei Gelatine Typ A (90-110 Bloom) und in der Mischung selbiger mit Gelatine Typ B vor (für beide $p < 0,01$). Auch in Gelatine Typ B und der BSA-Gruppe ist ein signifikanter Expressionsanstieg zu messen.

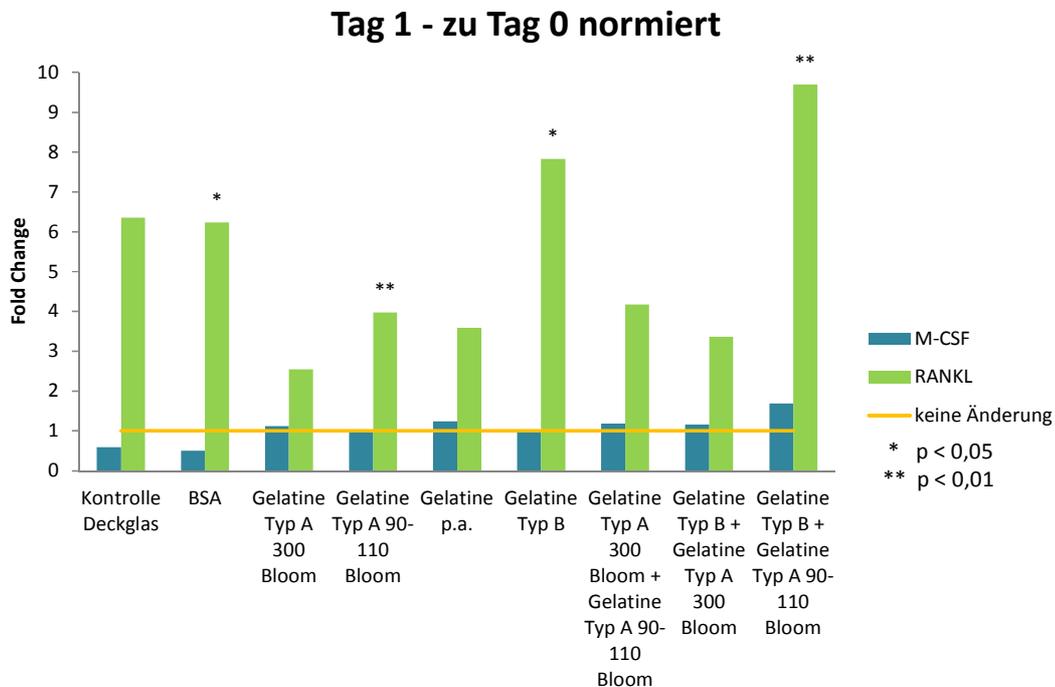


Abbildung 20: Veränderung der Expression von M-CSF und RANKL von Tag 0 auf Tag 1; die Werte der Gruppen von Tag 1 sind auf die jeweiligen Werte von Tag 0 normiert, die in der Grafik durch die horizontale Linie bei Fold Change = 1 repräsentiert werden

3.5 quantitative Real-Time-PCR: Einfluss von quervernetzten Gelatinebeschichtungen auf die Expression von Col1a1 und Runx2 in Osteoblasten

Auch der Einfluss von quervernetzten Gelatinebeschichtungen auf die Differenzierung von primären Maus-Osteoblasten wurde mit qRT-PCR analysiert. In diesem Fall wurde die Expression der Osteoblasten-spezifischen Gene Col1a1 und Runx2 quantifiziert.

Die Zellen auf den Gelatinebeschichtungen und in der Kontrollgruppe wurden ab Konfluenz mit Mineralisationsmedium (mit 50 $\mu\text{g/ml}$ Ascorbinsäure und 5 mM β -Glycerophosphat) kultiviert.

Die Proben wurden an vier Zeitpunkten (Tag 0, 7, 14, 21) wie schon unter Material und Methoden beschrieben aufbereitet und mit quantitativer RT-PCR analysiert. Es wurden Primer für murines Col1a1 und murines Runx2 verwendet, als Haushaltsgen fungierte wieder GAPDH.

3.5.1 Amplifikationskurven und Schmelzkurvenauswertung

Repräsentative Amplifikationskurven für den Col1a1-, Runx2- und GAPDH-Primer sind in Abbildung 21 abgebildet.

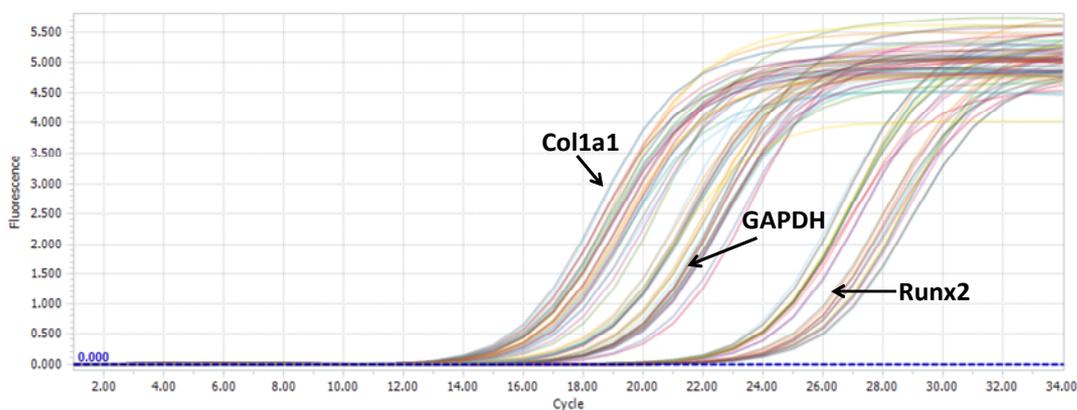


Abbildung 21: Amplifikationskurven für die verwendeten Primer; repräsentative Auswahl

Abbildung 22 zeigt repräsentative Schmelzkurven der PCR-Produkte der verwendeten Primer für Col1a1, Runx2 und GAPDH.

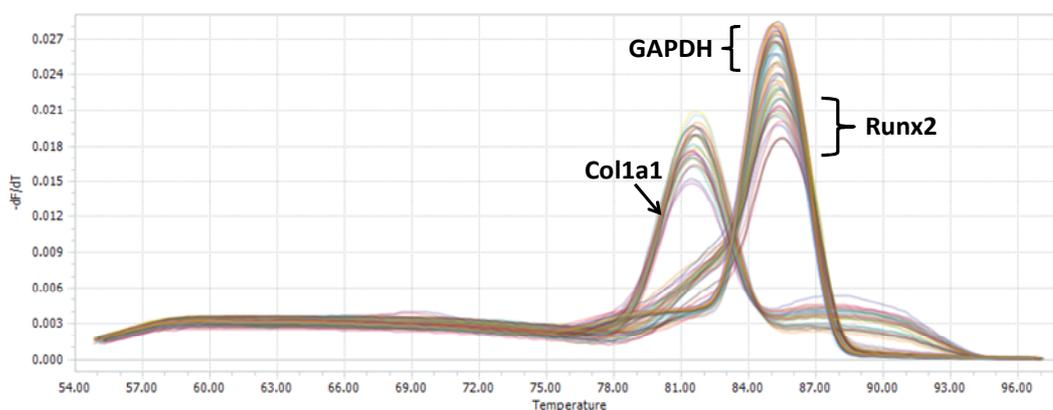


Abbildung 22: Schmelzkurven der PCR-Produkte für die verwendeten Primer; Herstellerangaben für Schmelztemperaturen: Col1a1 etwa 81 °C, Runx2 und GAPDH etwa 84 °C; repräsentative Auswahl

3.5.2 Bilddokumentation von Tag 21 der Kultur

Direkt vor Beginn der Probenaufbereitung für Tag 21 der qRT-PCR wurden Fotos der kultivierten Zellen aufgenommen.

In der Kontrollgruppe und auf dem BSA-beschichteten Deckglas sind kleine „bone nodules“ als dunkle Stellen erkennbar, in den Gelatinegruppen hingegen fehlen derartige Strukturen. Es sind lediglich in manchen Wells hellbraune Aggregate sichtbar, möglicherweise handelt es sich hierbei um beginnende Mineralisation.

Zum Zeitpunkt Tag 7 war in keiner der Gruppen Mineralisation zu sehen. Das Bild an Tag 14 war dem von Tag 21 sehr ähnlich.

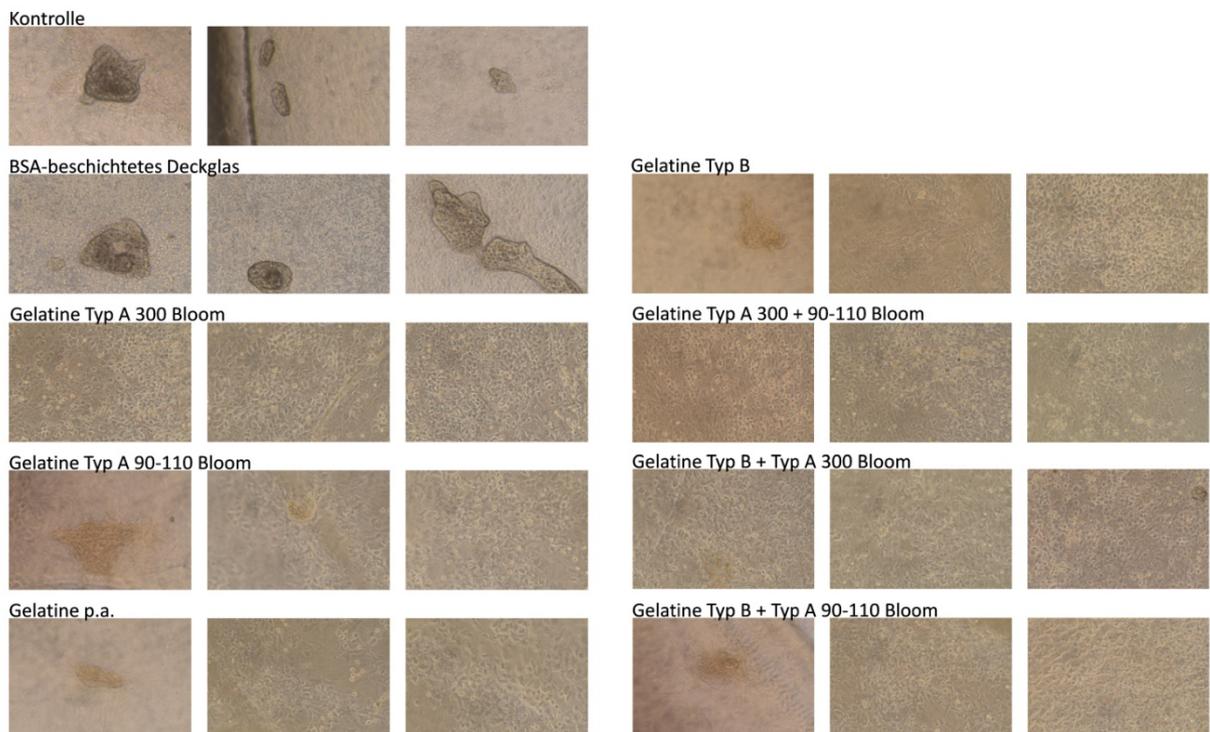


Abbildung 23: Fotos der Kontroll- und Gelatinegruppen an Tag 21, direkt vor der Zelllyse; alle Fotos mit 20x Objektiv aufgenommen

3.5.3 Col1a1- und Runx2-Expression in Osteoblasten auf quervernetzten Gelatinen

3.5.3.1 *Im Vergleich mit unbeschichteter Kontrollgruppe*

Die Genexpression an Tag 0 (= Konfluenz) stellt wieder die Basislinie dar, da die für die Probenaufbereitung verwendeten Zellen noch ohne Zusatz von Mineralisationsmedium kultiviert worden sind.

Alle Gruppen zeigen im Vergleich zur unbeschichteten Kontrolle eine reduzierte Expression von Col1a1. In Gelatine Typ A (90-110 Bloom), Gelatine Typ B und allen drei Mischungen aus Gelatine Typ A und Typ B ist die Reduktion signifikant. Die Col1a1-Expression ist in Gelatine Typ A (90-110 Bloom) signifikant auf ein Sechstel der Kontrolle reduziert, in Gelatine Typ B beträgt die Expression sogar nur ein Sechzehntel des Wertes in der Kontrolle.

Die Runx2-Expression ist tendenziell in den meisten Gruppen etwas höher als in der Kontrolle, jedoch nicht signifikant.

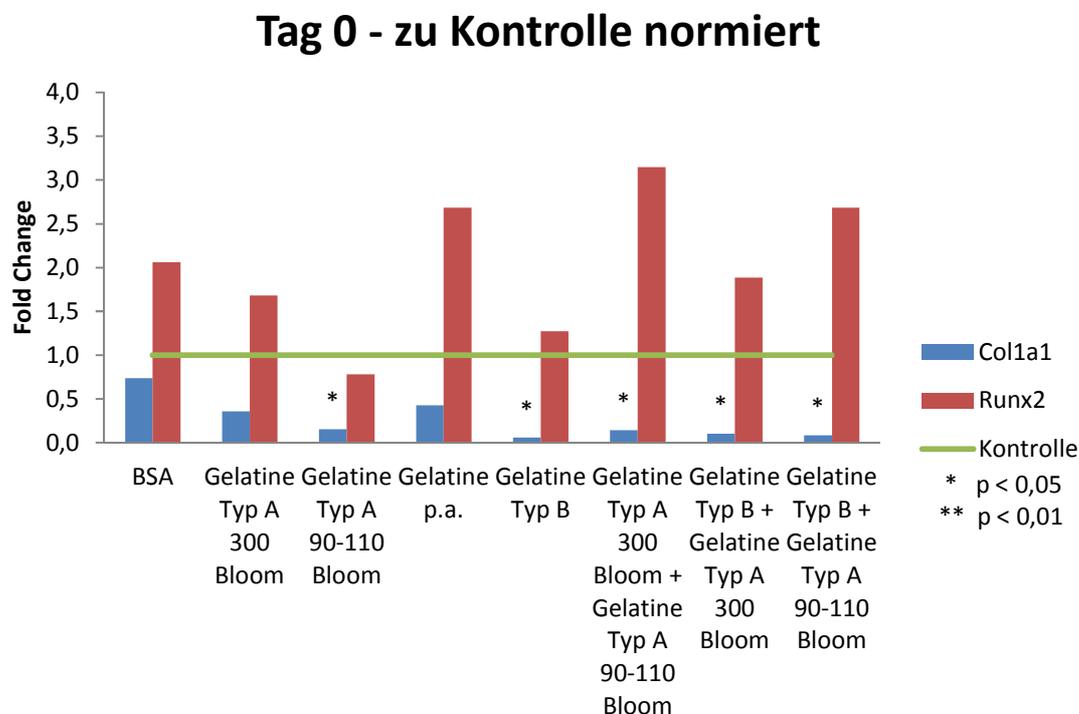


Abbildung 24: Expression von Col1a1 und Runx2 zum Zeitpunkt Tag 0; die Werte sind zur unbeschichteten Kontrollgruppe normiert, die in der Grafik durch die horizontale Linie bei Fold Change = 1 repräsentiert wird

Der Einfluss des Mineralisationsmediums auf die Zellen fließt ab dem Analysezeitpunkt Tag 7 in die Genexpression mit ein.

In den Gelatinegruppen ist das Niveau der Col1a1-Expression gegenüber der Kontrolle um etwa 2,5 Fold Change erhöht, signifikant für Gelatine Typ A (90-110 Bloom), Gelatine Typ B und die Mischung aus Gelatine Typ B und Typ A (300 Bloom).

Auch die Werte für Runx2 in den verschiedenen Gelatinegruppen ähneln einander. Mit Ausnahme von Gelatine Typ B sind die Runx2-Expressionslevel in allen Gelatinesamples gegenüber der Kontrolle vier- bis sechsfach signifikant erhöht.

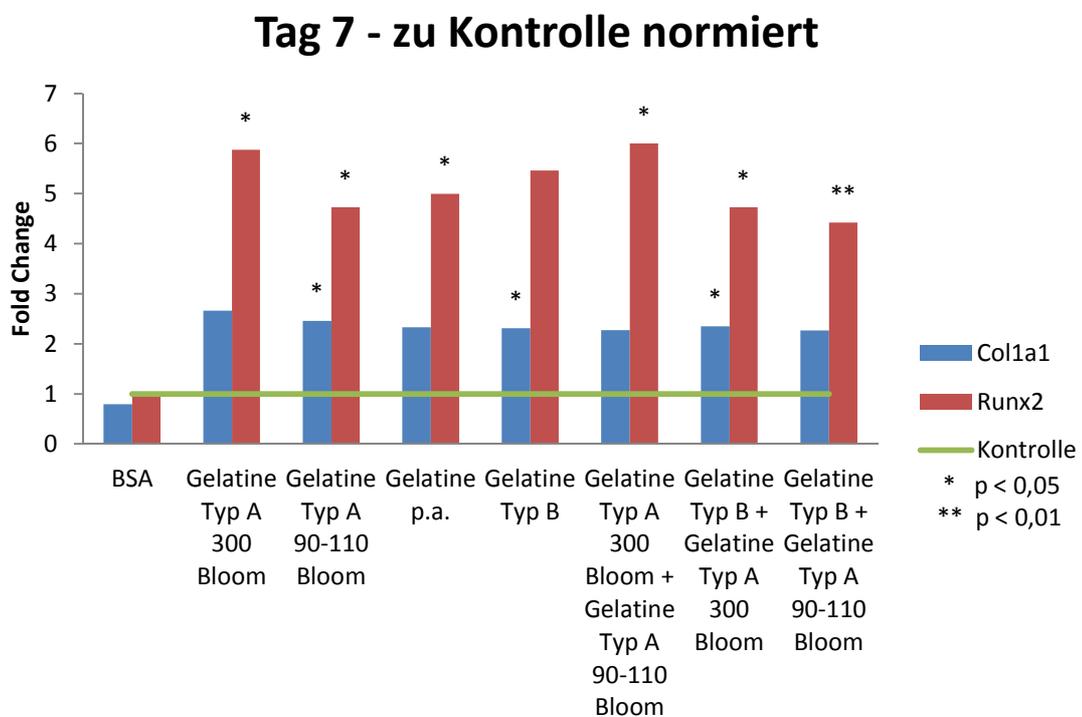


Abbildung 25: Expression von Col1a1 und Runx2 zum Zeitpunkt Tag 7; die Werte sind zur unbeschichteten Kontrollgruppe normiert, die in der Grafik durch die horizontale Linie bei Fold Change = 1 repräsentiert wird

Tag 14 zeigt weiterhin relativ ähnliche Werte zwischen den Gelatinegruppen für die Col1a1-Expression. In Gelatine Typ A (90-110 Bloom) kommt es zur signifikanten Steigerung um Fold Change 3,5 der Expression von Col1a1. Etwas geringer, aber dennoch signifikant, ist die Erhöhung in Gelatine p.a.,

Gelatine Typ A (300 Bloom) und auch in den beiden Mischungen dieser Gelatine.

An Tag 14 zeigt sich, dass die Expression von Runx2 in Gelatine Typ A (90-110 Bloom) und Gelatine p.a. auf dem höchsten Niveau liegt, ebenfalls hohe Expressionsraten finden sich in Gelatine Typ A (300 Bloom) und auch hier in den beiden Mischungen mit Gelatine Typ A (300 Bloom).

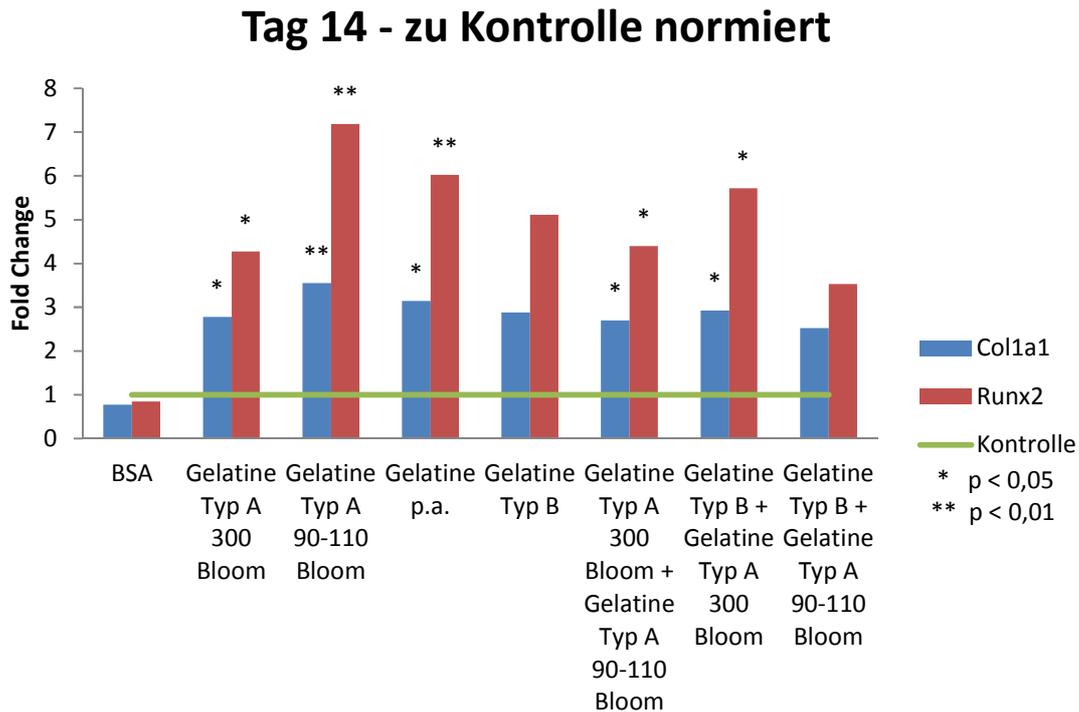


Abbildung 26: Expression von Col1a1 und Runx2 zum Zeitpunkt Tag 14; die Werte sind zur unbeschichteten Kontrollgruppe normiert, die in der Grafik durch die horizontale Linie bei Fold Change = 1 repräsentiert wird

An Tag 21 sind die höchsten Expressionslevel von Col1a1 und Runx2 in Gelatine Typ B zu finden. Die Mischung aus beiden Gelatinen Typ A zeigt an Tag 21 die niedrigsten Werte für Col1a1 und Runx2.

Signifikante Veränderungen sind hier nicht auszumachen, da die Varianzen der Ergebnisse zu groß sind. Tendenziell scheinen sich die Runx2-Level gegenüber Tag 14 nicht mehr stark zu verändern, während Col1a1 in dieser Zeitspanne noch zu steigen scheint.

Tag 21 - zu Kontrolle normiert

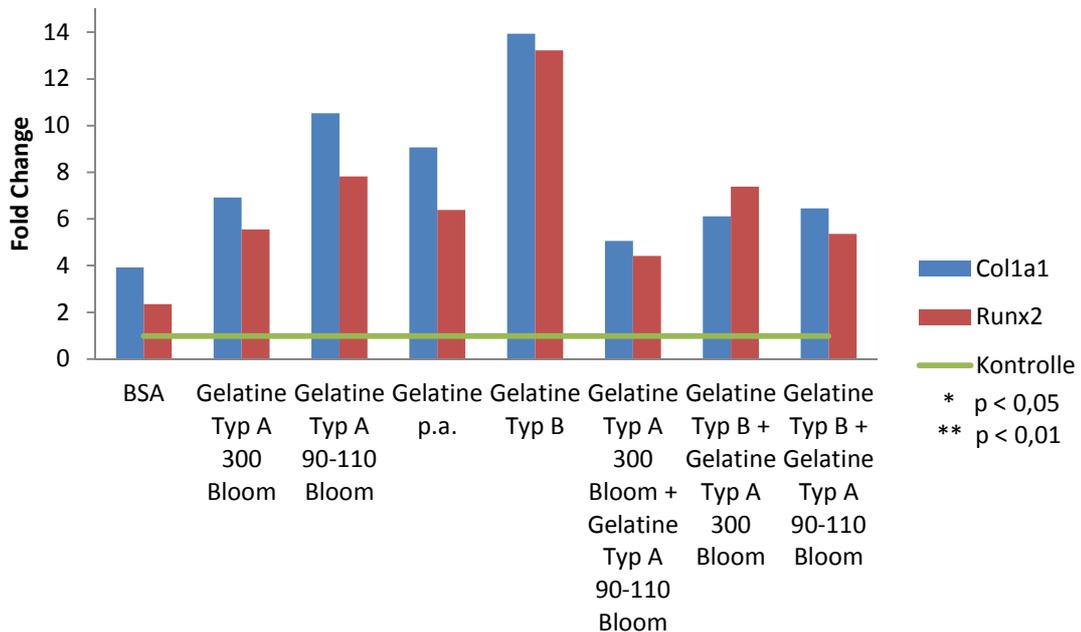


Abbildung 27: Expression von Col1a1 und Runx2 zum Zeitpunkt Tag 21; die Werte sind zur unbeschichteten Kontrollgruppe normiert, die in der Grafik durch die horizontale Linie bei Fold Change = 1 repräsentiert wird

3.5.3.2 ***Im Zeitverlauf***

a. Kontrolle, unbeschichtetes Deckglas

Der Graph zeigt den zeitlichen Verlauf der Expression von Col1a1 und Runx2 in der Kontrollgruppe. Anders als man erwarten würde, sinken in der unbehandelten Kontrolle mit der Zeit beide Expressionslevel deutlich ab. Überraschenderweise waren dennoch in der Kontrollgruppe kleine „bone nodules“, also Ablagerungen von Kollagen und anderen sezernierten Proteinen, im Mikroskop erkennbar.

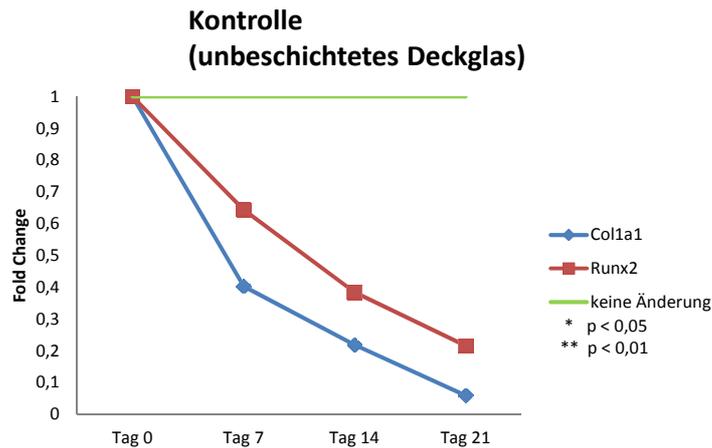


Abbildung 28: Kontrollgruppe, unbeschichtetes Deckglas; zeitlicher Verlauf der Expression von Col1a1 und Runx2

b. BSA-beschichtetes Deckglas

Die Gruppe mit BSA-Beschichtung ähnelt nicht nur in der Genexpression im zeitlichen Verlauf stark der Kontrollgruppe, denn auch hier waren in den Wells deutlich „bone nodules“ erkennbar.

An Tag 7 kommt es zu einer signifikanten Reduktion der Expression von Runx2.

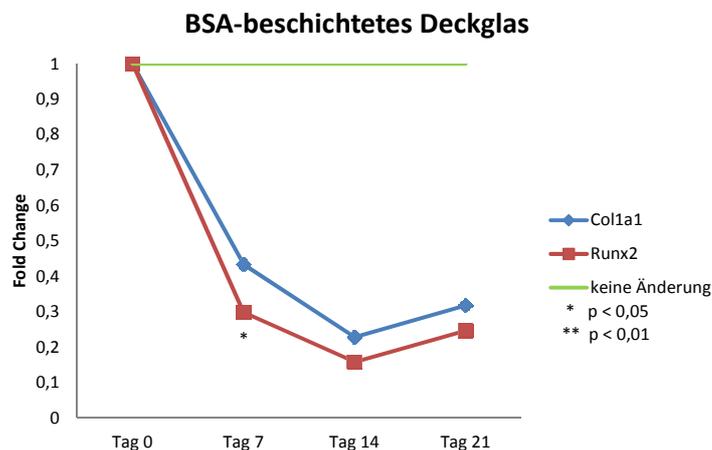


Abbildung 29: BSA-beschichtetes Deckglas; zeitlicher Verlauf der Expression von Col1a1 und Runx2

c. Gelatine Typ A, 300 Bloom

Gelatine Typ A mit hoher Gelstärke zeigt über die Zeit nur geringe Veränderungen in der Expression von Col1a1 und Runx2. An Tag 7 erreicht

die Expression von Col1a1 mit einem Fold Change von ca. 3 den höchsten Wert in dieser Gruppe.

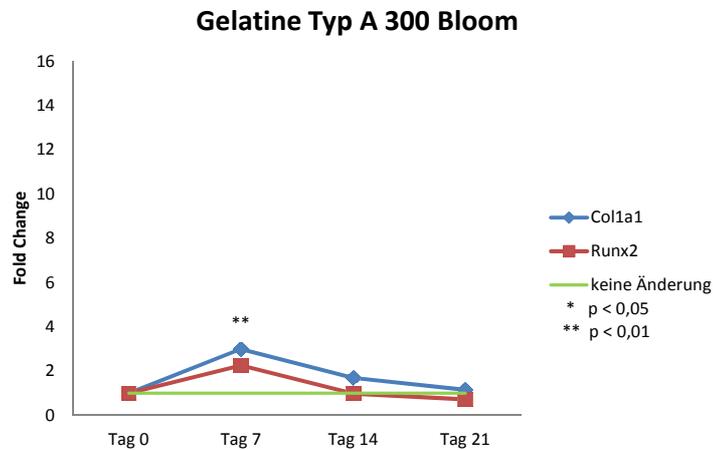


Abbildung 30: Gelatine Typ A, 300 Bloom; zeitlicher Verlauf der Expression von Col1a1 und Runx2

d. Gelatine Typ A, 90-110 Bloom

Gelatine Typ A mit niedriger Gelstärke zeigt ab Tag 7 einen Anstieg in der Expression von Col1a1 und Runx2, wobei der Col1a1-Anstieg zu jedem Zeitpunkt signifikant ist und sein Maximum an Tag 7 erreicht.

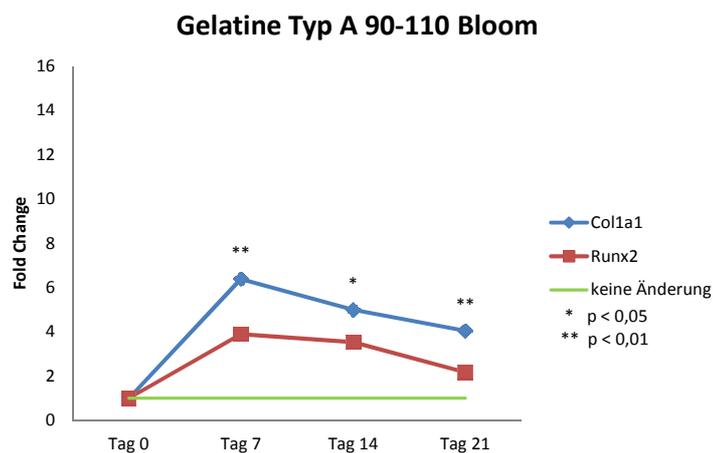


Abbildung 31: Gelatine Typ A, 90-110 Bloom; zeitlicher Verlauf der Expression von Col1a1 und Runx2

e. Gelatine per analysi

In Gelatine p.a. gibt es über den zeitlichen Verlauf hinweg keine signifikanten Veränderungen in der Genexpression.

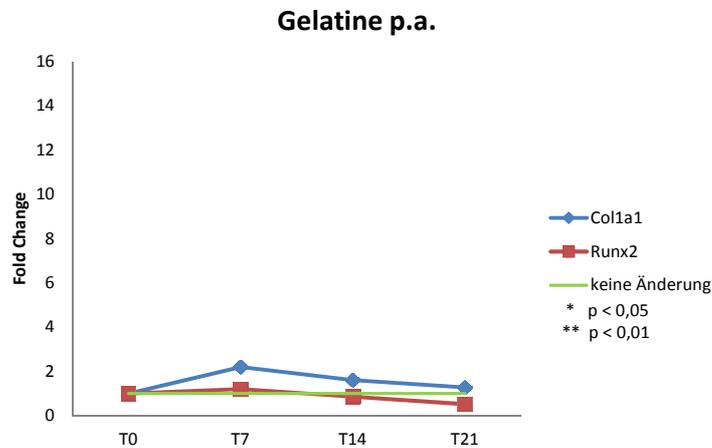


Abbildung 32: Gelatine p.a.; zeitlicher Verlauf der Expression von Col1a1 und Runx2

f. Gelatine Typ B

Gelatine Typ B zeigt an Tag 7 den stärksten Anstieg der Col1a1-Expression um Fold Change von 16. Auch an Tag 14 ist der Anstieg gegenüber Tag 0 signifikant.

Die Expression von Runx2 hingegen bewegt sich zwischen 1,5-3 Fold Change, diese Werte sind jedoch nicht signifikant.

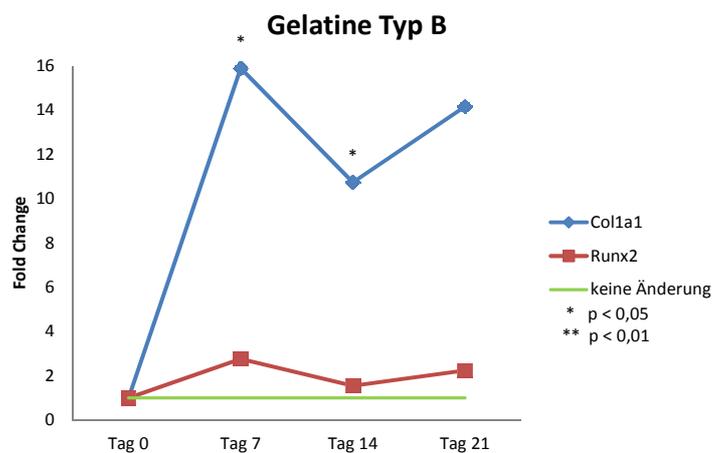


Abbildung 33: Gelatine Typ B; zeitlicher Verlauf der Expression von Col1a1 und Runx2

g. Gelatine Typ A, 300 Bloom + Gelatine Typ A, 90-110 Bloom

In der Mischung der beiden Gelatinen Typ A mit hoher und niedriger Gelstärke ist an Tag 7 der stärkste Anstieg in der Col1a1-Expression sichtbar. An Tag 14 ist die Col1a1-Expression etwas niedriger als an Tag 7. Die Runx2-Expression sinkt an Tag 14 signifikant unter den Wert von Tag 0.

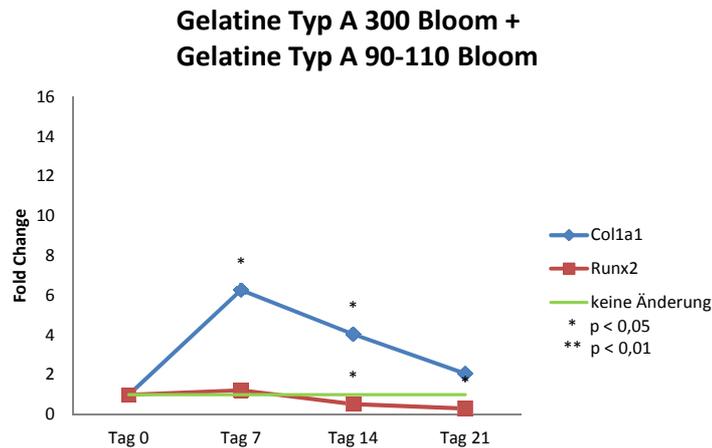


Abbildung 34: Gelatine Typ A, 300 Bloom + Gelatine Typ A, 90-110 Bloom; zeitlicher Verlauf der Expression von Col1a1 und Runx2

h. Gelatine Typ B + Gelatine Typ A, 300 Bloom

Die Mischung aus Gelatine Typ B und Gelatine Typ A mit hoher Gelstärke zeigt den höchsten Wert der Col1a1-Expression an Tag 7, auch der Wert an Tag 14 ist gegenüber Tag 0 signifikant erhöht.

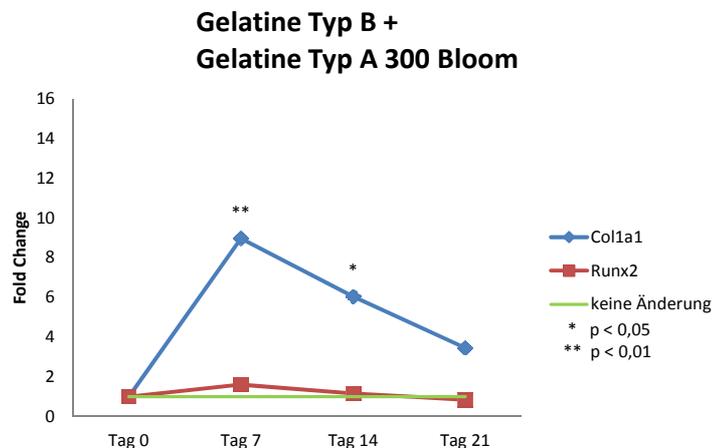


Abbildung 35: Gelatine Typ B + Gelatine Typ A, 300 Bloom; zeitlicher Verlauf der Expression von Col1a1 und Runx2

i. Gelatine Typ B + Gelatine Typ A, 90-110 Bloom

Auch die Mischung aus Gelatine Typ B und Gelatine Typ A mit niedriger Gelstärke zeigt den höchsten Wert der Col1a1-Expression an Tag 7 (Fold Change ca. 10), an Tag 14 und 21 ist die Expression gegenüber Tag 0 ebenfalls signifikant erhöht.

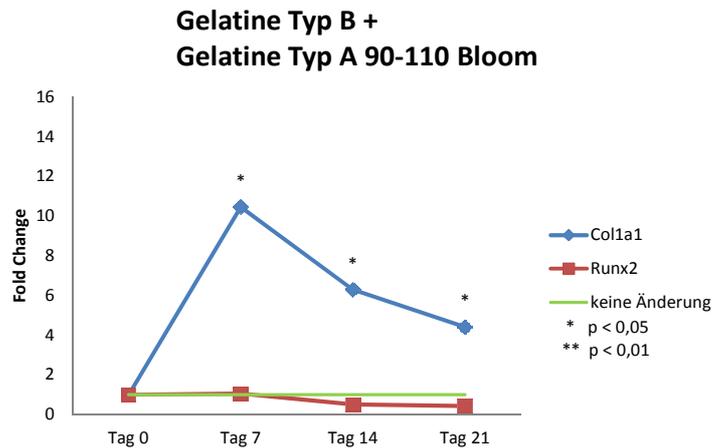


Abbildung 36: Gelatine Typ B + Gelatine Typ A, 90-110 Bloom; zeitlicher Verlauf der Expression von Col1a1 und Runx2

3.5.3.3 ***Gene von Interesse im Zeitverlauf***

Das Diagramm in Abbildung 37 zeigt die Expression von Col1a1 zu allen Zeitpunkten in der Kontrolle und den Samples, jeweils normiert auf dieselbe Gruppe an Tag 0 – es repräsentiert also die zeitliche Veränderung in der Genexpression von Col1a1. Hier ist bemerkenswert, dass die Expressionslevel für Col1a1 in der Kontrolle und BSA-Gruppe - also ohne Gelatinebeschichtungen - an den Zeitpunkten Tag 7-21 unter den Wert von Tag 0 absinken. Anhand des mikroskopischen Bildes mit „bone nodules“ würde man von einem Anstieg der Kollagen-Expression mit der Zeit ausgehen.

Die Gelatinegruppen erreichen an Tag 7 die höchsten Level der Col1a1-Expression, die im weiteren Verlauf wieder etwas sinken. Die größte Steigerung in der Expression verglichen mit Tag 0 ist in Gelatine Typ B zu finden, es kommt zu einem Fold Change von 16 an Tag 7.

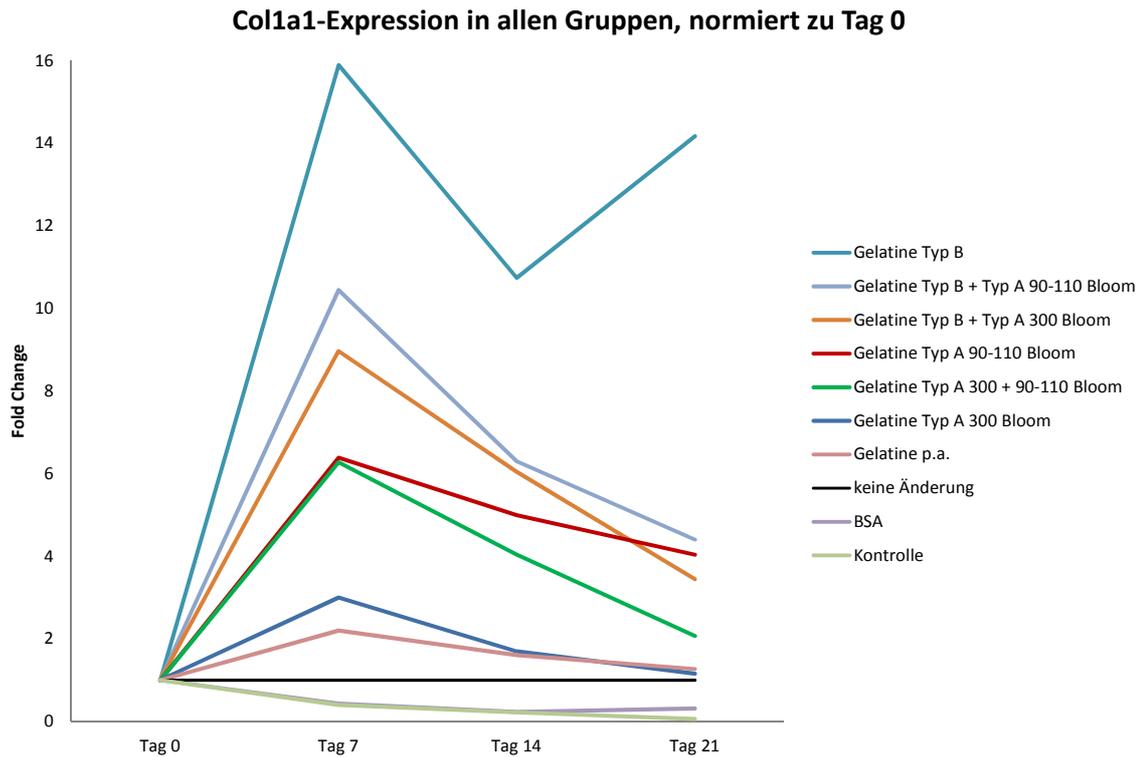


Abbildung 37: Col1a1-Expression in allen Gruppen, im zeitlichen Verlauf

In Abbildung 38 ist die Expression von Runx2 zu allen Zeitpunkten in der Kontrolle und den Samples, jeweils normiert auf dieselbe Gruppe an Tag 0 zu sehen – es gibt die zeitliche Veränderung in der Genexpression von Runx2 wieder.

Für Runx2 ist ein ähnliches Bild sichtbar wie für Col1a1: in der Kontrolle- und BSA-Gruppe sinken die Expressionslevel unter den Wert von Tag 0 – in der BSA-Gruppe kommt es an Tag 7 zu einer signifikanten Reduktion um ein Drittel gegenüber der Kontrolle (Fold Change 0,3). Generell lässt sich sagen, dass die Veränderungen der Runx2-Expression auf Gelatinebeschichtungen über die Zeit eher nicht signifikant sind.

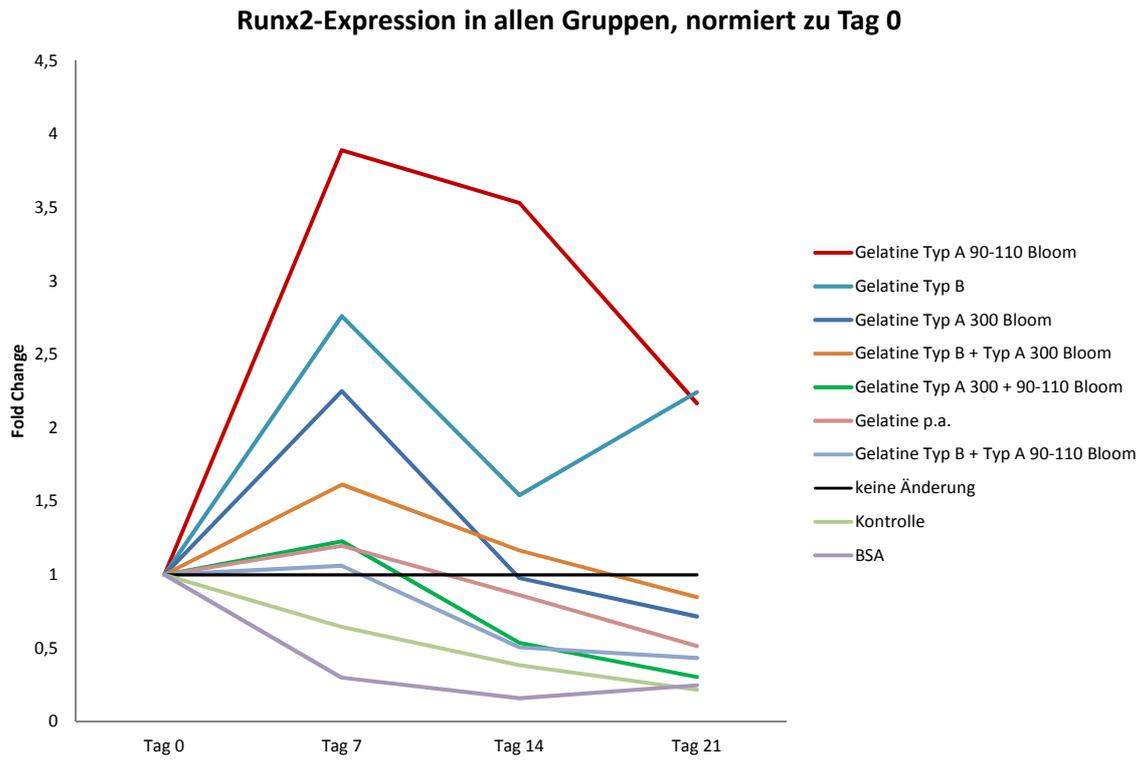


Abbildung 38: Runx2-Expression in allen Gruppen, im zeitlichen Verlauf

4 Diskussion

Den in dieser Arbeit beschriebenen Experimenten sind Versuche auf nicht-quervernetzter Gelatine und auf quervernetzter Gelatine mit dem Zusatz einer mineralischen Komponente (β -TCP) vorausgegangen.

Um die Effekte des Calciumphosphats von jenen der Glutaraldehyd-quervernetzten Gelatine abzugrenzen, wurden Versuche mit quervernetzter Gelatine ohne β -TCP durchgeführt. Zusätzlich sollte auch noch untersucht werden, warum auf bestimmten Typen der nicht-quervernetzten Gelatine keine Osteoklasten detektiert werden konnten.

4.1 Osteoklasten im Maus-Kokultur-Modell auf Gelatine, nicht-quervernetzt

Wie Abbildung 8 anschaulich darstellt, waren in bisherigen Experimenten in vier der Gelatinegruppen keine Osteoklasten nachweisbar. Mein Versuch sollte einen Hinweis auf die Ursache hierfür erbringen, es wurde daher erneut eine Kokultur auf den verschiedenen Gelatinen durchgeführt, wobei eine der beiden ansonsten identen Kulturplatten mit M-CSF und RANKL-Zusatz kultiviert wurde. Viele Studien haben in der Vergangenheit belegen können, dass die von Osteoblasten gebildeten Cytokine M-CSF und RANKL für die Differenzierung und Fusion von Osteoklasten-Vorläuferzellen zu Osteoklasten unerlässlich sind (Fuller et al., 1993; Suda et al., 1999). Eine Regeneration der Osteoklastenbildung hätte bedeutet, dass die Produktion oder die Freisetzung der Cytokine in den Osteoblasten auf den Gelatinen beeinträchtigt war.

Auf jenen Gelatinetypen, wo zuvor keine Osteoklasten gebildet worden waren, waren im neuen Versuch etwa gleich viele Osteoklasten wie in den übrigen Gelatinegruppen – unabhängig davon, ob das Nährmedium M-CSF und RANKL enthalten hatte oder nicht (Abbildung 9). Die auf Gelatinebeschichtungen gebildeten Osteoklasten waren tendenziell etwas kleiner als jene in der unbeschichteten Kontrollgruppe, auch die Anzahl schien etwas geringer. Es war deutlich mit freiem Auge erkennbar, dass alle Gelatinebeschichtungen im Großen und Ganzen denselben Effekt auf die

Osteoklastenanzahl und -verteilung hatten, daher wurde auch auf eine genaue Zählung der Osteoklasten verzichtet.

Die Versuche mit nicht-quervernetzter Gelatine sind schwierig zu interpretieren. Es ist nach wie vor unklar, warum in den vorhergehenden Experimenten in Gelatine Typ B und den Gelatine-Mischungen die Osteoklastenbildung gehemmt war. Da dieser Effekt nicht reproduzierbar war, konnte die Hypothese der mangelhaften Cytokin-Freisetzung durch die neuen Experimente weder bestätigt, noch widerlegt werden.

Grundsätzlich soll angemerkt werden, dass der Einsatz von nicht-quervernetzten Gelatinebeschichtungen in der Zellkultur problematisch ist. Da die meisten Gelatinesorten bei 35-40°C vom Gel in den Sol-Zustand übergehen, muss man davon ausgehen, dass auch während der Inkubation bei 37°C ein Großteil der Beschichtung in Lösung geht. Des Weiteren ist denkbar, dass durch im Medium gelöste Gelatine die Zelladhäsion beeinträchtigt wird. Es war zu beobachten, dass die Zellmorphologie auf den Gelatinen etwas anders als in den unbeschichteten Kontrollgruppen war. Die Zellen waren kleiner, eher verzweigt und hatten tendenziell weniger Zellkerne wenn sie auf Gelatine kultiviert worden waren. Gelatine ist natürlichem Kollagen sehr ähnlich, daher sollten Osteoblasten und ihre Vorläuferzellen eine hohe Affinität zu Gelatineoberflächen aufweisen. Wenn nun Osteoblasten auf eine feste Gelatineoberfläche ausgesät werden, adhärieren sie an selbiger. Bei einer Temperaturerhöhung jedoch ist es wahrscheinlich, dass sich die Gelatine auflöst und womöglich auch die Osteoblasten eher in Lösung bleiben, anstatt an eine feste Oberfläche zu adhärieren.

Um den Effekt von nicht-quervernetzter Gelatine auf Zellen zu untersuchen, wäre es daher vermutlich zielführend und einfacher als die Herstellung von Beschichtungen, dem Nährmedium flüssige Gelatine hinzuzufügen. Die Gelatine könnte einige Stunden nach der Zellaussaat und bei jedem weiteren Mediumtausch zugegeben werden.

Zur Untersuchung von Gelatine-Oberflächen oder gar Scaffolds aus Gelatine muss das Material daher vor der Inkubation bei 37°C quervernetzt werden, um eine über die Dauer des Experiments konstante Schichtdicke und

Materialoberfläche zu gewährleisten und ein Auflösen der Beschichtung zu verhindern (Ovsianikov, 2013).

4.1 Osteoklasten im Maus-Kokultur-Modell auf Gelatine, quervernetzt

Abbildung 12 aus vorangegangenen Versuchen (Kimla, 2013) zeigt, dass mit dem Zusatz von β -TCP zur quervernetzten Gelatine in allen Gelatinegruppen etwa gleich viele Osteoklasten nachweisbar waren – ganz im Gegensatz zu den Experimenten mit nicht-quervernetzter Gelatine. Bei der alleinigen Betrachtung dieser beiden Resultate war nicht klar, ob diese Veränderung der Osteoklastenanzahl auf die Mineralkomponente oder die quervernetzte Gelatineoberfläche zurückzuführen ist. An dieser Stelle sollte bemerkt werden, dass zum Zeitpunkt der Experimentplanung die Ergebnisse auf nicht-quervernetzter Gelatine und damit die mangelhafte Reproduzierbarkeit noch nicht bekannt waren.

Das Ergebnis meiner Experimente ist in Abbildung 13 veranschaulicht. Auch ohne den Zusatz von β -TCP waren in jeder der getesteten quervernetzten Gelatinegruppen Osteoklasten nachweisbar. Daraus kann man folgern, dass vermutlich nicht alleine der Zusatz von β -TCP die höhere Osteoklastenanzahl bewirkt hat, sondern dass vor allem die quervernetzte und damit beständigere Gelatineoberfläche einen Effekt hatte.

Nichtsdestotrotz war die zu beobachtende Zellmorphologie auf den quervernetzten Beschichtungen gegenüber den Kontrollgruppen deutlich verändert, wie auch Abbildung 15 zeigt. Die Osteoklasten waren sehr klein und hatten meist nur 3-5 Zellkerne. Eine mögliche Erklärung könnte in der Verwendung von Glutaraldehyd zum Crosslinking liegen. Die Substanz hat cytotoxische Eigenschaften und es ist nicht auszuschließen, dass zum Zeitpunkt der Zellaussaat noch gewisse Rückstände in den Beschichtungen zu finden waren (Bigi et al., 2001).

Es ist außerdem erwähnenswert, dass in einigen Gelatinegruppen bei den Wiederholungen des Experiments sehr unterschiedliche Werte resultierten, wobei die unbeschichtete Kontrollgruppe immer sehr ähnliche Resultate

lieferte. Der Grund hierfür könnte in der Beschaffenheit der Beschichtungen zu suchen sein. Eventuell sind manche Gelatinesorten besonders anfällig auf leichte Unregelmäßigkeiten im Vorgang des Beschichtens oder während des Crosslinking-Prozesses. Durch die Art und Weise der Beschichtungsmethode ist vorstellbar, dass die Dicke der Gelatineschicht in der Mitte des Deckglases größer ist als auf dem Rand. Man könnte dies eventuell vermeiden, indem auf das Deckglas mit der noch flüssigen Gelatinelösung ein flexibles Plättchen derselben Größe gelegt wird, sodass die Flüssigkeit durch Adhäsionskräfte eine Schicht mit homogener Dicke bildet (Ovsianikov, 2013). Nach dem Erstarren der Gelatine könnte das Plättchen abgezogen und die entstandene Gelatineschicht quervernetzt werden.

Es besteht die Möglichkeit, dass der Crosslinking-Vorgang unregelmäßig ist, besonders bei ungleichen Schichtdicken ist dies denkbar. Dies hätte zur Folge, dass sich unzureichend quervernetzte Gelatineregionen vorzeitig aus der Beschichtung lösen könnten. Deshalb sollten die Gelatinebeschichtungen hinsichtlich ihrer Schichtdicke und insbesondere auch ihres Crosslinking-Grades charakterisiert werden.

Ferner könnte angedacht werden, ein anderes Crosslinking-Verfahren, eventuell über UV-Aktivierung von photoaktiven Substanzen, auf potentiell bessere Eignung für die gegebenen Rahmenbedingungen und Zielsetzungen zu testen (Carroll et al., 2006).

4.2 Expression von M-CSF und RANKL in Osteoblasten

Die Untersuchung der M-CSF und RANKL-Expression in Osteoblasten basierte ebenfalls auf den schon vorhandenen Ergebnissen zur Osteoklasten auf nicht-quervernetzter Gelatine. Der Versuch sollte unter Umständen verminderte Expressionsraten der beiden Cytokine aufzeigen.

Nach 24h Inkubation der Zellen auf den quervernetzten Gelatineoberflächen zeigte sich in den beiden Gelatinen Typ A und der Gelatine p.a. eine signifikante Reduktion der M-CSF-Expression, dieser Effekt war nach weiteren 24h nicht mehr messbar, die Expressionsraten hatten sich zu diesem Zeitpunkt an jene der Kontrollgruppe angeglichen. Dies deutet darauf hin, dass auf den GA-quervernetzten Gelatinen die Expression bestimmter Gene

möglicherweise verzögert abläuft. Die Bedeutung hiervon für die Kokultur von Osteoblasten mit monocytären Vorläuferzellen aus dem Knochenmark wäre groß, da gerade zu Beginn der Kultur das Vorhandensein von M-CSF für eine erfolgreiche Differenzierung zu Osteoklasten erforderlich ist (Arai et al., 1999).

Bei Betrachtung von Abbildung 20, die die Zunahme der Expression zwischen den beiden untersuchten Zeitpunkten darstellt, wird erkennbar, dass sich das Niveau der M-CSF-Expression in keiner Gruppe verändert, aber das Niveau der RANKL-Expression in einigen Gruppen signifikant ansteigt.

Die größte Schwierigkeit bei diesem Experiment war die geringe Sampleanzahl pro zu testender Gruppe. Aufgrund des hohen Materialverbrauchs und Aufwands sind pro Gruppe nur zwei bis drei Samples untersucht worden, was aber ein Problem für die statistische Auswertung darstellt. Aufgrund von zu großen Varianzen zwischen zwei Samples ergab der angewandte t-Test oft relativ hohe p-Werte, sodass keine signifikante Veränderungen, sondern lediglich Tendenzen gezeigt werden konnte. Daher kann keine klare Relation zu den Experimenten mit Maus-Kokultur auf nicht-quervernetzter Gelatine hergestellt werden.

Es soll noch darauf hingewiesen werden, dass für dieses Experiment nur Osteoblasten mit Kokultur-Nährmedium, jedoch ohne den Zusatz von Knochenmarkszellen kultiviert worden waren – durch direkte Zell-Zell-Interaktionen ausgelöste Veränderungen der Genexpression wurden somit nicht durch diesen Versuch erfasst.

Zusätzlich zu einer erhöhten Samplegröße wäre auch noch ein zusätzlicher Zeitpunkt interessant, z. B. vier oder fünf Tage nach der Aussaat des Knochenmarks, wenn die ersten Osteoklasten erkennbar werden sollten.

4.3 Expression von Runx2 und Col1a1 in Osteoblasten

Ein weiteres qRT-PCR-Experiment wurde entwickelt, um die Expression der Osteoblasten-spezifischen Gene Runx2 und Col1a1 in einer mit Ascorbinsäure und β -Glycerophosphat supplementierten Osteoblastenkultur zu untersuchen.

Das Ziel des Experiments war die Anregung von Matrixbildung und Mineralisation durch das differenzierungsfördernde Medium.

Zum ersten Zeitpunkt Tag 0 zeigte sich gegenüber der Kontrollgruppe eine signifikante Verminderung der Col1a1-Expression in den Gelatinegruppen, die sehr stark ausgeprägt war. Der zweite Zeitpunkt an Tag 7 hingegen zeigte gegenüber der Kontrollgruppe eine eher erhöhte Col1a1-Expression, die jedoch nicht in allen Gelatinegruppen signifikant war. Die RANKL-Expression war in fast allen Gelatinen gegenüber der Kontrolle signifikant erhöht. Tag 14 zeigt ein sehr ähnliches Bild mit meist signifikant erhöhten Expressionsniveaus von Runx2 und Col1a1. An Tag 21 hingegen liegen keine signifikanten Werte vor, obwohl die Tendenz ähnlich wie an Tag 7 und 14 aussieht.

Die Situation dieses Versuchs ist der im zuvor beschriebenen qRT-PCR-Experiment recht ähnlich. Durch die zu geringe Samplegröße lassen sich oft lediglich Tendenzen und keine signifikanten Werte ermitteln.

Erstaunlich waren die Expressionsmuster von Col1a1 und Runx2 in der unbeschichteten Kontrolle und der BSA-Gruppe. Für beide Gene ist die Expression über die Experimentendauer von 21 Tagen hinweg kontinuierlich gesunken, obwohl man zumindest für Col1a1 einen mit der fortschreitenden Differenzierung der Osteoblasten einhergehenden Anstieg erwartet hätte (Fakhry et al., 2013). Diese veränderte Genexpression könnte eine Erklärung für die wenigen, nur eher kleinen, sichtbaren „bone nodules“ sein. Interessanterweise waren jedoch in keiner der Gelatinegruppen „bone nodules“ zu erkennen, obwohl die Expressionslevel der untersuchten Gene weitaus höher waren als jene der Kontrollgruppe. Die Expressionsprofile von Col1a1 mit meist signifikanten Maximalwerten an Tag 7 und Tag 14 waren eher den Erwartungen entsprechend als jene der Kontrollgruppen.

Es wäre möglich, dass das Col1a1-Gen zwar ordnungsgemäß exprimiert wurde, aber das Protein in der Folge nicht sezerniert werden konnte. Auch eine Störung der für die stabile Vernetzung der Kollagenmoleküle notwendigen Schritte der aufwändigen posttranslationalen Modifikationen wäre denkbar. Um diese Fragestellungen zu klären, könnten Western Blots jeweils mit dem Zelllysat und dem überstehenden Nährmedium durchgeführt werden. Es ist allerdings bei der Analyse zu berücksichtigen, dass die

Osteoblasten auf Gelatine kultiviert werden, die von Kollagen abgeleitet ist. Daher müsste entweder ein Lysepuffer benutzt werden, der die unter den Zellen liegende Schicht Gelatine nicht ebenfalls lysiert, oder man könnte versuchen, den Zuwachs an kollagenösem Protein durch das Mineralisationsmedium im Vergleich zu einer Gelatinebeschichtung ohne Zellen zu quantifizieren.

4.4 Gelatine-basierte Biomaterialien

Die Verwendung von Gelatine als Komponente von Biomaterialien ist aus mehreren Gründen ansprechend. Aus technologischer Sichtweise ist von Bedeutung, dass Gelatine leicht verfügbar und der Herstellungsprozess zu einem gewissen Grad variierbar ist, so dass das Produkt an die jeweiligen Umstände und Bedürfnisse angepasst werden kann. Es stehen einige quervernetzende Verfahren und Reagenzien zur Verfügung, um die Eignung von Gelatine zur Implantation in den Körper zu verbessern.

Aus pharmakologischer Sicht ist hervorzuheben, dass Gelatine dem körpereigenen Kollagen im Knochen strukturell sehr ähnlich und daher bioabbaubar ist. Überdies ist das immunogene Potential von Gelatine gering (Gorgieva und Kokol, 2011). Es gibt jahrelange Erfahrungen mit der Verwendung von Gelatineprodukten in der Medizin, beispielsweise als Plasmaexpander zur Volumenersatztherapie, außerdem bei HNO- oder zahnärztlichen Eingriffen in Form blutstillender Tamponaden.

In der Tat beschäftigen sich auch einige andere Arbeitsgruppen mit Gelatine als Komponente von Biomaterialien, sehr häufig als Kompositmaterial mit Hydroxylapatit (Gorgieva et al., 2014; Liu et al., 2009; Panzavolta et al., 2013; Rungsiyanont et al., 2012). Üblicherweise wird jedoch nicht versucht, jene Gelatine mit den für die Anwendung passendsten Eigenschaften zu ermitteln. Stattdessen arbeiten die allermeisten Forschungsgruppen von Anfang an mit nur einer Gelatinesorte. Durch diese Einschränkung bleiben womöglich die Vorteile anderer Gelatinetypen ungenutzt, demzufolge ist es von Bedeutung, genau definierte Gelatinen für die Herstellung von Biomaterialien zu charakterisieren.

Der tierische Ursprung von Gelatine geht mit mancherlei Besonderheiten einher. Da die Möglichkeit besteht, mit dem Material Krankheiten zu übertragen, muss ein besonderes Augenmerk auf der Sicherheit und der Freiheit von Pathogenen liegen. Ein weiterer Punkt von Interesse sind religiöse Vorschriften zum Konsum von Rinder- oder Schweineprodukten, da die am häufigsten verwendeten Gelatinearten aus Schlachtabfällen ebendieser Tiere gewonnen werden – dies könnte jedoch durch die Verwendung von Fischgelatine umgangen werden. An dieser Stelle sei abschließend auch die ethische Problematik der Verwendung von Tierprodukten im Allgemeinen erwähnt.

4.5 Zukunftsaussichten

4.5.1 vertiefende Experimente zu Differenzierung und Aktivität der Osteoblasten und Osteoklasten

Zur weiterführenden Erforschung der Osteoblastendifferenzierung auf Gelatinen wäre zusätzlich zu den schon durchgeführten Experimenten auch eine Quantifizierung der Osteocalcin-Expression von Interesse. Dies würde Auskunft darüber geben, ob auch das Differenzierungsstadium der reifen, mineralisierenden Osteoblasten erreicht wird (Fakhry et al., 2013).

Neue Erkenntnisse über die Resorptionsaktivität der auf Gelatine gebildeten Osteoklasten könnten durch die Quantifizierung von Cathepsin K gewonnen werden. Das Protein ist für eine funktionierende Knochen- und auch Biomaterialresorption unentbehrlich (Bossard et al., 1996).

4.5.2 Konsequenzen aus dieser Arbeit

Für die weitere Erforschung der Gelatinewirkungen auf Knochenzellen sollte in Betracht gezogen werden, die in die Untersuchungen inkludierten Gelatinegruppen an die neugewonnenen Erkenntnisse anzupassen. Es ist sinnvoll, sich vor allem auf definierte Produkte mit Informationen über das Herstellungsverfahren und Eigenschaften wie z. B. der Gelstärke zu

konzentrieren, damit die Ergebnisse dieser Versuche für die später folgende Herstellung eines Biomaterials von Nutzen sein können. Außerdem wäre das Hinzufügen einer Fischgelatine aufgrund der zuvor genannten Vorteile empfehlenswert.

Die Analyse der drei Gelatinemischungen wäre - in diesem Stadium der Untersuchungen - eher nicht zielführend, die Herstellung von Mischungen könnte jedoch zur Feinabstimmung der Eigenschaften des Materials genutzt werden. Um dies effizient bewerkstelligen zu können, müssen zuerst die Einzelkomponenten hinsichtlich ihrer Einflüsse auf Zellen ausreichend charakterisiert sein.

Zur Quervernetzung der Gelatinen lässt sich sagen, dass der Crosslinking-Prozess noch weiter optimiert werden kann, um die Reproduzierbarkeit und Homogenität der Gelatinebeschichtungen zu steigern.

Die BSA-beschichteten Deckgläser unterschieden sich in den Expressionsraten der PCR-Versuche und auch bei TRAP-gefärbten Maus-Kokulturen praktisch nicht von den unbeschichteten Kontrollgruppen. Hierfür sind zwei Ursachen vorstellbar: Einerseits wäre möglich, dass BSA-beschichtete Oberflächen im Vergleich mit TC-Kulturplatten gleich attraktiv für Osteoblasten und Osteoklasten sind, andererseits könnte auch sein, dass mit dieser Beschichtungsmethode keine nennenswerten Mengen an BSA auf den Deckgläsern zurückbleiben. Zumindest die zweite Behauptung könnte sich leicht mit einem Proteinnachweis der fertig beschichteten Deckgläser überprüfen lassen.

Zusammenfassung

Diese Diplomarbeit beschäftigt sich mit den Einflüssen von Gelatine als Bestandteil von Biomaterialien auf die Zellen des Knochens. Gelatine eignet sich sowohl aufgrund ihrer chemisch-physikalischen Eigenschaften, als auch durch ihre hohe Biokompatibilität gut als eine Grundkomponente von potentiellen Biomaterialien. Gemeinsam mit anderen Polymeren oder mineralischen Bestandteilen lassen sich aus Gelatine poröse Kompositmaterialien herstellen, die zur Implantation in Knochen genutzt werden können.

Es wurden mehrere verschiedene Gelatintypen und ihre Mischungen diversen Versuchen unterzogen, um die Materialien hinsichtlich ihrer Wirkungen auf Maus-Osteoblasten und -Osteoklasten zu charakterisieren.

Maus-Kokultur-Experimente mit Osteoblasten und Osteoklasten auf quervernetzter und nicht-quervernetzter Gelatine wurden durchgeführt. Das Ziel war es, die Anzahl und Morphologie der auf den Gelatinen gebildeten reifen Osteoklasten nach selektiver Färbung zu ermitteln.

Die Anzahl der auf den nicht-quervernetzten Gelatinebeschichtungen gebildeten Osteoklasten war in allen Gruppen nur wenig geringer als in der unbeschichteten Kontrollgruppe. Auf quervernetzten Gelatinebeschichtungen hingegen war die Reduktion der Osteoklastenzahl deutlicher ausgeprägt, möglicherweise aufgrund von cytotoxischen Effekten des Crosslinkers Glutaraldehyd. Auch war die Zellmorphologie, besonders die Größe der Zellen und Anzahl der Zellkerne, gegenüber der Kontrollgruppe stark verändert.

Zur Untersuchung der Genexpression mithilfe von quantitativer Real Time-PCR in primären Maus-Osteoblasten auf Glutaraldehyd-quervernetzten Gelatinen wurden zwei Versuche mit unterschiedlicher Zielsetzung durchgeführt.

In einem Experiment wurden die Zellen mit differenzierungsförderndem Medium kultiviert und die Expression der Osteoblasten-Markergene Runx2 und Col1a1 zu vier Zeitpunkten quantifiziert. So konnten die Differenzierung

und die Matrixproduktion der Zellen über drei Wochen hinweg dokumentiert werden. Es zeigte sich, dass die Expressionsniveaus von Col1a1 in den Gelatinegruppen gegenüber der Kontrollgruppe anfangs deutlich vermindert und zu den weiteren Zeitpunkten erhöht waren. Auch die Werte für Runx2 waren im Vergleich mit der Kontrollgruppe erhöht.

Ein weiteres Experiment diente dazu, die Expression der Cytokine M-CSF und RANKL zu untersuchen, die beide für die Bildung und Aktivierung von Osteoklasten notwendig sind. Zum ersten der beiden Zeitpunkte, 24 Stunden nach Beginn der Kultur, zeigte sich eine deutliche Verminderung der M-CSF-Expression in den Gelatinegruppen, zum zweiten untersuchten Zeitpunkt nach 48 Stunden jedoch unterschied sich die M-CSF-Expression nicht mehr signifikant von jener in der Kontrollgruppe. Die RANKL-Expression zeigte in einigen Gelatinegruppen einen signifikanten Anstieg vom ersten zum zweiten Zeitpunkt.

Im Laufe dieser Arbeit konnten gewisse Veränderungen der Zellmorphologie und Genexpression in Osteoklasten und Osteoblasten durch Gelatinematerialien festgestellt werden.

Bei Verwendung von quervernetzter Gelatine wurden eine veränderte Osteoklastenmorphologie und -anzahl beobachtet.

Die Kultur von Osteoblasten auf Gelatinebeschichtungen scheint vor allem zu frühen Zeitpunkten der Zellkultur einen bedeutenden Einfluss auf die Genexpression und Zelldifferenzierung zu haben.

Zwischen den verschiedenen Gelatinetypen konnten keine signifikanten Unterschiede aufgezeigt werden.

Weitere Forschung auf diesem Gebiet kann die Mechanismen hinter den beobachteten Effekten von unterschiedlichen Gelatinearten auf Knochenzellen aufklären und somit zur Entwicklung von neuen Gelatine-basierten Knochenersatzmaterialien führen.

Abstract

Gelatin is a natural polymer that can be obtained from various animal sources and extraction methods. The chemical, physical and compatibility properties of gelatin make it an ideal compound for the incorporation into composite materials used in bone implants, however little is known about the direct effect if altered gelatin on bone cells. The aim of this thesis is to examine multiple parameters of bone biology in response to the various compositions and modifications of gelatin. We hypothesize that these alterations endow different gelatins with properties more or less suitable for bone regeneration.

In order to examine the impact of the gelatin coatings on osteoclast adhesion and formation, mouse osteoblasts were co-cultured with bone marrow containing osteoclast precursors. The cells were cultured on gelatin coatings consisting of either pure gelatin or gelatin cross-linked with glutaraldehyde. The number of mature osteoclasts and their morphology was analyzed with the aid of a selective osteoclast staining method.

On the non-cross-linked gelatin surfaces, the number and morphology of osteoclasts were similar to the uncoated control group. However, the cross-linked gelatin coatings exhibited significantly decreased numbers of mature osteoclasts and irregular cell morphology.

Changes in the expression levels of marker genes for osteoblast and osteoclast differentiation on cross-linked gelatin coatings were examined with quantitative real-time PCR. For osteoblast differentiation, *col1a1* and *runx2* were determined as genes of interest, whereas M-CSF and RANKL were used as marker genes for osteoclast differentiation.

For *col1a1* and *runx2* expression analysis, primary mouse osteoblasts were cultured with mineralization medium over a period of three weeks, with the first RNA isolation when cell growth had reached confluence and at three other time points 7, 14 and 21 days after the first RNA isolation. Compared to the control group, the levels of *col1a1* expression were significantly decreased in most of the gelatin groups, however, both *col1a1* and *runx2* expression levels were increased at all other time points. Remarkably, mineralization occurred only in the control group.

Osteoblasts were generated to probe for M-CSF and RANKL expression over a period of two days in the presence of PGE2 and 1,25-dihydroxyvitamin D3. After 24 hours, M-CSF expression in the gelatin groups was significantly decreased in comparison to the control group. After 48 hours, there were no significant differences in the expression of M-CSF and RANKL between gelatins and control cultures.

The observed effects were similar for all gelatins tested. Collectively, the results from this thesis suggest that cross-linked gelatin coatings can influence cellular attachment and morphology, however the expression changes of genes assayed did not elucidate any clear mechanism by which gelatins affect bone cells.

The observed effects were similar for all gelatins tested. Collectively, the results from this thesis suggest that cross-linked gelatin coatings can influence cellular attachment and morphology. The most significant changes in gene expression parameters for osteoblasts and osteoclasts were observed in the earlier stages of culture, suggesting that this early attachment and expression profile is mandatory for mature cell development in the presence of the gelatins tested. Further modifications and plating methods will allow for a better understanding of the mechanisms by which gelatins affect bone cells and will contribute to the advancement of gelatin incorporation in biomedical bone implants.

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: verwendete Instrumente	36
Tabelle 2: verwendete Materialien	37
Tabelle 3: verwendete Substanzen	37

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: aus Burr und Akkus, 2013; die Mikrostruktur von Knochenmaterial, bestehend aus organischen Kollagenmolekülen und anorganischen Mineralablagerungen	14
Abbildung 2: aus Fakhry et al., 2013; Entwicklungsstufen der Osteoblastenlinie innerhalb der mesenchymalen Zellen mit den jeweiligen Markergenen	17
Abbildung 3: aus Athanasou, 2011; ins Deutsche übersetzt.....	25
Abbildung 4: verwendetes PCR-Programm; Temperatur (y-Achse) im Verlauf über die Zeit (x-Achse), Fluoreszenzmessungen sind fett eingezeichnet.....	51
Abbildung 5: Osteoklasten aus Maus-Kokultur nach TRAP-Färbung; deutlich sichtbar sind die Zellkerne, entweder in Grüppchen (Kreise) oder entlang der Membran angeordnet (Ellipse)	53
Abbildung 6: Fluoreszenzfärbung muriner Osteoklasten, 20x Objektiv.....	54
Abbildung 7: Fluoreszenzfärbung muriner Osteoklasten, 40x Objektiv; Einzelbilder und Overlay (unten)	55
Abbildung 8: Kimla, 2013; Anzahl TRAP-positiver Zellen mit mind. 3 Zellkernen auf Gelatinebeschichtungen	56
Abbildung 9: TRAP-Färbung von Maus-Kokultur auf Gelatine; mit Zusatz von M-CSF und RANKL (A) und ohne Zusatz der Cytokine (B)	57
Abbildung 10: TRAP-Färbung von Maus-Kokultur auf Gelatine; auf Kulturplatte für adhärente Zellkultur (A) und für Suspensionskultur (B).....	58
Abbildung 11: Vergleich der Morphologie von Zellen auf Gelatine mit Zusatz von M-CSF und RANKL (A) und Zellen ohne Cytokin-Zusatz (B); alle Fotos mit 20x Objektiv aufgenommen	59
Abbildung 12: Kimla, 2013; Anzahl TRAP-positiver Zellen mit mind. 3 Zellkernen auf quervernetzten Gelatine-TCP-Beschichtungen	60
Abbildung 13: Anzahl TRAP-positiver Zellen mit mind. 3 Zellkernen auf quervernetzten Gelatine-Beschichtungen.....	61
Abbildung 14: Anzahl TRAP-positiver Zellen mit mind. 3 Zellkernen auf ausgewählten quervernetzten Gelatine-Beschichtungen; nach der einfaktoriellen ANOVA mit Tukey-post-hoc-Test zeigt jeder Gelatinetyp im Vergleich zur unbeschichteten Kontrolle signifikante Unterschiede ($p < 0,05$ oder $p < 0,01$), zwischen den verschiedenen Gelatinetypen untereinander konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden	62

Abbildung 15: Vergleich der Morphologie von Zellen auf quervernetzter Gelatine mit Zusatz von M-CSF und RANKL (A) und Zellen ohne Cytokin-Zusatz (B); alle Fotos mit 20x Objektiv aufgenommen.....	64
Abbildung 16: Amplifikationskurven für die verwendeten Primer; repräsentative Auswahl	66
Abbildung 17: Schmelzkurven der PCR-Produkte für die verwendeten Primer; Herstellerangaben für Schmelztemperaturen: RANKL etwa 81 °C, M-CSF etwa 80 °C und GAPDH etwa 84 °C; repräsentative Auswahl	66
Abbildung 18: Expression von M-CSF und RANKL zum Zeitpunkt Tag 0; die Werte sind zur unbeschichteten Kontrollgruppe normiert, die in der Grafik durch die horizontale Linie bei Fold Change = 1 repräsentiert wird	67
Abbildung 19: Expression von M-CSF und RANKL zum Zeitpunkt Tag 1; die Werte sind zur unbeschichteten Kontrollgruppe normiert, die in der Grafik durch die horizontale Linie bei Fold Change = 1 repräsentiert wird	68
Abbildung 20: Veränderung der Expression von M-CSF und RANKL von Tag 0 auf Tag 1; die Werte der Gruppen von Tag 1 sind auf die jeweiligen Werte von Tag 0 normiert, die in der Grafik durch die horizontale Linie bei Fold Change = 1 repräsentiert werden	69
Abbildung 21: Amplifikationskurven für die verwendeten Primer; repräsentative Auswahl	70
Abbildung 22: Schmelzkurven der PCR-Produkte für die verwendeten Primer; Herstellerangaben für Schmelztemperaturen: Col1a1 etwa 81 °C, Runx2 und GAPDH etwa 84 °C; repräsentative Auswahl	70
Abbildung 23: Fotos der Kontroll- und Gelatinegruppen an Tag 21, direkt vor der Zelllyse; alle Fotos mit 20x Objektiv aufgenommen	71
Abbildung 24: Expression von Col1a1 und Runx2 zum Zeitpunkt Tag 0; die Werte sind zur unbeschichteten Kontrollgruppe normiert, die in der Grafik durch die horizontale Linie bei Fold Change = 1 repräsentiert wird	72
Abbildung 25: Expression von Col1a1 und Runx2 zum Zeitpunkt Tag 7; die Werte sind zur unbeschichteten Kontrollgruppe normiert, die in der Grafik durch die horizontale Linie bei Fold Change = 1 repräsentiert wird	73
Abbildung 26: Expression von Col1a1 und Runx2 zum Zeitpunkt Tag 14; die Werte sind zur unbeschichteten Kontrollgruppe normiert, die in der Grafik durch die horizontale Linie bei Fold Change = 1 repräsentiert wird	74

Abbildung 27: Expression von Col1a1 und Runx2 zum Zeitpunkt Tag 21; die Werte sind zur unbeschichteten Kontrollgruppe normiert, die in der Grafik durch die horizontale Linie bei Fold Change = 1 repräsentiert wird	75
Abbildung 28: Kontrollgruppe, unbeschichtetes Deckglas; zeitlicher Verlauf der Expression von Col1a1 und Runx2.....	76
Abbildung 29: BSA-beschichtetes Deckglas; zeitlicher Verlauf der Expression von Col1a1 und Runx2	76
Abbildung 30: Gelatine Typ A, 300 Bloom; zeitlicher Verlauf der Expression von Col1a1 und Runx2	77
Abbildung 31: Gelatine Typ A, 90-110 Bloom; zeitlicher Verlauf der Expression von Col1a1 und Runx2.....	77
Abbildung 32: Gelatine p.a.; zeitlicher Verlauf der Expression von Col1a1 und Runx2	78
Abbildung 33: Gelatine Typ B; zeitlicher Verlauf der Expression von Col1a1 und Runx2.....	78
Abbildung 34: Gelatine Typ A, 300 Bloom + Gelatine Typ A, 90-110 Bloom; zeitlicher Verlauf der Expression von Col1a1 und Runx2	79
Abbildung 35: Gelatine Typ B + Gelatine Typ A, 300 Bloom; zeitlicher Verlauf der Expression von Col1a1 und Runx2.....	79
Abbildung 36: Gelatine Typ B + Gelatine Typ A, 90-110 Bloom; zeitlicher Verlauf der Expression von Col1a1 und Runx2.....	80
Abbildung 37: Col1a1-Expression in allen Gruppen, im zeitlichen Verlauf.....	81
Abbildung 38: Runx2-Expression in allen Gruppen, im zeitlichen Verlauf	82

Literaturverzeichnis

- AAOS. Summary of typical bone-graft substitutes that are commercially available [Internet]: American Academy of Orthopaedic Surgeons. Available from: <http://www.aatb.org/aatb/files/ccLibraryFiles/Filename/00000000323/BoneGraftSubstituteTable2010.pdf>.
- Allen und Burr. Bone Modeling and Remodeling. In: Burr, DB, Allen, M. Basic and Applied Bone Biology: Elsevier; 2013. ISBN: 978-0-12-416015-6.
- Amini AR, Laurencin CT, Nukavarapu SP. Bone Tissue Engineering: Recent Advances and Challenges. *Crit Rev Biomed Eng*, 2012;40(5):363–408.
- Arai F, Miyamoto T, Ohneda O, Inada T, Sudo T, Brasel K, Miyata T, Anderson DM, Suda T. Commitment and differentiation of osteoclast precursor cells by the sequential expression of c-Fms and receptor activator of nuclear factor kappaB (RANK) receptors. *J. Exp. Med.*, 1999;190(12):1741–54.
- Athanasou NA. The osteoclast—what’s new? *Skeletal Radiol*, 2011;40(9):1137–40.
- Aubin. Mesenchymal Stem Cells and Osteoblast Differentiation. In: Bilezikian, JP, Raisz, LG, Martin, TJ. Principles of Bone Biology. Amsterdam, London: Elsevier; 2008. p. 85–107. ISBN: 978-0-12-373884-4.
- Bakker und Klein-Nulend. Osteoblast Isolation from Murine Calvaria and Long Bones. In: Helfrich, MH, Ralston, SH. Bone Research Protocols: Springer New York; 2012. ISBN: 978-1-61779-414-8.
- Baron R, Neff L, Louvard D, Courtoy P. Cell-mediated Extracellular Acidification and Bone Resorption: Evidence for a Low pH in Resorbing Lacunae and Localization of a 100-kD Lysosomal Membrane Protein at the Osteoclast Ruffled Border. *The Journal of Cell Biology*, 1985;101:2210–22.
- Barradas A, Yuan H, van Blitterswijk CA, Habibovic P. Osteoinductive Biomaterials: Current Knowledge of Properties, Experimental Models and Biological Mechanisms. *European Cells and Materials*, 2011;21:407–29.
- Bellido et al. Bone Cells. In: Burr, DB, Allen, M. Basic and Applied Bone Biology: Elsevier; 2013. p. 27–45. ISBN: 978-0-12-416015-6.
- Bennett CN, Longo KA, Wright WS, Suva LJ, Lane TF, Hankenson KD, MacDougald OA. Regulation of Osteoblastogenesis and Bone Mass by Wnt10b. *PNAS*, 2005;102(9):3324–9.
- Bialek P, Kern B, Yang X, Schrock M, Susic D, Hong N, Wu H, Yu K, Ornitz DM, Olson EN, Justice MJ, Karsenty G. A twist code determines the onset of osteoblast differentiation. *Dev. Cell*, 2004;6(3):423–35.
- Bigi A, Cojazzi G, Panzavolta S, Rubini K, Roveri N. Mechanical and thermal properties of gelatin films at different degrees of glutaraldehyde crosslinking. *Biomaterials*, 2001;22(8):763–8.
- Blair J, Zheng Y, Dunstan C. RANK ligand. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2007;39(6):1077–81.
- Boran und Regenstein. Chapter 5 - Fish Gelatin. In: Steve L. Taylor. Advances in Food and Nutrition Research: Academic Press; 2010. p. 119–43. ISBN: 1043-4526.
- Bossard MJ, Tomaszek TA, Thompson SK, Amegadzie BY, Hanning CR, Jones C, Kurdyla JT, McNulty DE, Drake FH, Gowen M, Levy MA. Proteolytic Activity of Human Osteoclast Cathepsin K. *Journal of Biological Chemistry*, 1996;271(21):12517–24.

- Brown et al. Bone Tissue Engineering. In: Ratner, BD. Biomaterials Science, An Introduction to Materials in Medicine. Amsterdam, Heidelberg [u.a.]: Elsevier, Academic Pr.; 2012. p. 1194–214. ISBN: 978-0-12-374626-9.
- Burr und Akkus. Bone Morphology and Organization. In: Burr, DB, Allen, M. Basic and Applied Bone Biology: Elsevier; 2013. p. 3–25. ISBN: 978-0-12-416015-6.
- Calori GM, Mazza E, Colombo M, Ripamonti C. The use of bone-graft substitutes in large bone defects: Any specific needs? *Injury*, 2011;42:S56–S63.
- Carroll GT, Sojka ME, Lei X, Turro NJ, Koberstein JT. Photoactive Additives for Cross-Linking Polymer Films: Inhibition of Dewetting in Thin Polymer Films. *Langmuir*, 2006;22(18):7748–54.
- Carulli C, Matassi F, Civinini R, Innocenti M. Tissue engineering applications in the management of bone loss. *CCMBM*, 2013;10(1):22–5.
- Chabadel A, Banon-Rodriguez I, Cluet D, Rudkin BB, Wehrle-Haller B, Genot E, Jurdic P, Anton IM, Saltel F. CD44 and beta3 Integrin Organize Two Functionally Distinct Actin-based Domains in Osteoclasts. *Molecular Biology of the Cell*, 2007;18:4899–910.
- Chen G, Deng C, Li Y. TGF- β and BMP Signaling in Osteoblast Differentiation and Bone Formation. *Int. J. Biol. Sci.*, 2012:272–88.
- Day T, Guo X, Garrett-Beal L, Yang Y. Wnt/ β -Catenin Signaling in Mesenchymal Progenitors Controls Osteoblast and Chondrocyte Differentiation during Vertebrate Skeletogenesis. *Developmental Cell*, 2005;8(5):739–50.
- Djabourov M, Leblond J, Papon P. Gelation of aqueous gelatin solutions. I. Structural investigation. *J. Phys. France*, 1988;49(2):319–32.
- Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell*, 1997;89(5):747–54.
- Duong L, Lakkakorpi P, Nakamura I, Rodan GA. Integrins and Signaling in Osteoclast Function. *Matrix Biologie*, 2000;19:97–105.
- Eastoe JE. The Amino Acid Composition of Mammalian Collagen and Gelatin. *Biomedical Journal*, 1955;6i(589-600).
- Fakhry M, Hamade E, Badran B, Buchet R, Magne D. Molecular mechanisms of mesenchymal stem cell differentiation towards osteoblasts. *WJSC*, 2013;5(4):136.
- Fuller K, Owens JM, Jagger CJ, Wilson A, Moss R, Chambers T. Macrophage Colony-stimulating Factor Stimulates Survival and Chemotactic Behavior in Isolated Osteoclasts. *J. Exp. Med.*, 1993;178:1733–44.
- Gazdag AR, Lane JM, Glaser D, Forster RA. Alternatives to Autogenous Bone Graft: Efficacy and Indications. *J Am Acad Orthop Surg*, 1995;3(1):1–8.
- Gelita AG. Viskoelastische Eigenschaften von Gelatine [Internet]. Available from: <http://www.gelita.com/de/loesungen-und-produkte/viskoelastische-eigenschaften>.
- Geoffroy V, Ducy P, Karsenty G. A PEBP2alpha/AML-1-related Factor Increases Osteocalcin Promoter Activity through Its Binding to an Osteoblast-specific cis-Acting Element. *Journal of Biological Chemistry*, 1995;270(52):30973–9.
- GMIA. Gelatin Handbook [Internet]: Gelatin Manufacturers Institute of America. Available from: http://www.gelatin-gmia.com/images/GMIA_Gelatin_Manual_2012.pdf.

- Gomes SR, Rodrigues G, Martins GG, Henriques C, Silva JC. In vitro evaluation of crosslinked electrospun fish gelatin scaffolds. *Materials Science and Engineering: C*, 2013;33(3):1219–27.
- Gorgieva und Kokol. Collagen- vs. Gelatine-Based Biomaterials and Their Biocompatibility, Review and Perspectives. In: Pignatello, R. *Biomaterials Applications for Nanomedicine*. Rijeka: InTech; 2011. ISBN: 978-953-307-661-4.
- Gorgieva S, Štrancar J, Kokol V. Evaluation of surface/interface-related physicochemical and microstructural properties of gelatin 3D scaffolds, and their influence on fibroblast growth and morphology. *J. Biomed. Mater. Res.*, 2014:n/a.
- Greiner Bio-One GmbH. FAQ Zell-/Gewebekultur [Internet]. Available from: <http://faq.greinerbioone.com/de/site/category/414/item/88/>.
- Halleen JM, Räsänen S, Alatalo SL, Väänänen HK. Potential Function for the ROS-Generating Activity of TRACP. *J Bone Miner Res*, 2003;18(10):1908–11.
- Honma M, Ikebuchi Y, Kariya Y, Hayashi M, Hayashi N, Aoki S, Suzuki H. RANKL subcellular trafficking and regulatory mechanisms in osteocytes. *J Bone Miner Res*, 2013;28(9):1936–49.
- Itzstein und van't Hof. Osteoclast Formation in Mouse Co-cultures. In: Helfrich, MH, Ralston, SH. *Bone Research Protocols*: Springer New York; 2012. ISBN: 978-1-61779-414-8.
- Jilka RL, Noble B, Weinstein RS. Osteocyte apoptosis. *Bone*, 2013;54(2):264–71.
- Jimi E, Shuto T, Koga T. Macrophage colony-stimulating factor and interleukin-1 alpha maintain the survival of osteoclast-like cells. *Endocrinology*, 1995;136(2):808–11.
- Karsenty G, Kronenberg HM, Settembre C. Genetic Control of Bone Formation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 2009;25(1):629–48.
- Kimla. *Austestung von Biomaterialien auf Osteoklasten [Diplomarbeit]*: Universität Wien; 2013.
- Kneser U, Schaefer DJ, Munder B, Klemm C, Andree C, Stark GB. Tissue engineering of bone. *Minim Invasive Ther Allied Technol*, 2002;11(3):107–16.
- Kobayashi K, Takahashi N, Jimi E, Udagawa N, Takami M, Kotake S, Nakagawa N, Kinoshita M, Yamaguchi K, Shima N, Yasuda H, Morinaga T, Higashio K, Martin TJ, Suda T. Tumor Necrosis Factor alpha Stimulates Osteoclast Differentiation by a Mechanism Independent of the ODF/RANKL–RANK Interaction. *J. Exp. Med.*, 2000;191(2):275–85.
- Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, Shimizu Y, Bronson RT, Gao Y, Inada M, Sato M, Okamoto R, Kitamura Y, Yoshiki S, Kishimoto T. Targeted Disruption of Cbfa1 Results in a Complete Lack of Bone Formation owing to Maturational Arrest of Osteoblasts. *Cell*, 1997;89(5):755–64.
- Kousteni und Bilezikian. Cellular Actions of Parathyroid Hormone. In: Bilezikian, JP, Raisz, LG, Martin, TJ. *Principles of Bone Biology*. Amsterdam, London: Elsevier; 2008. p. 639–56. ISBN: 978-0-12-373884-4.
- Lacey D, Timms E, Tan H, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S, Hsu H, Sullivan J, Hawkins N, Davy E, Capparelli C, Eli A, Qian Y, Kaufman S, Sarosi I, Shalhoub V, Senaldi G, Guo J, Delaney J, Boyle WJ. Osteoprotegerin Ligand Is a Cytokine that Regulates Osteoclast Differentiation and Activation. *Cell*, 1998;93:165–76.

- Laurencin C, Khan Y, El-Amin SF. Bone graft substitutes. *Expert Rev Med Dev*, 2006;3(1):49–57.
- Lee NK, Sowa H, Hinoi E, Ferron M, Ahn JD, Confavreux C, Dacquin R, Mee PJ, McKee MD, Jung DY, Zhang Z, Kim JK, Mauvais-Jarvis F, Ducy P, Karsenty G. Endocrine Regulation of Energy Metabolism by the Skeleton. *Cell*, 2007;130(3):456–69.
- Li X, van Blitterswijk, Clemens A., Feng Q, Cui F, Watari F. The effect of calcium phosphate microstructure on bone-related cells in vitro. *Biomaterials*, 2008;29(23):3306–16.
- Liu X, Smith LA, Hu J, Ma PX. Biomimetic nanofibrous gelatin/apatite composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 2009;30(12):2252–8.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods*, 2001;25(4):402–8.
- Ljusberg J, Wang Y, Lang P, Norgard M, Dodds R, Hultenby K, Ek-Ryklander B, Andersson G. Proteolytic Excision of a Repressive Loop Domain in Tartrate-resistant Acid Phosphatase by Cathepsin K in Osteoclasts. *Journal of Biological Chemistry*, 2005;280(31):28370–81.
- Manolagas SC, Parfitt AM. For whom the bell tolls: Distress signals from long-lived osteocytes and the pathogenesis of metabolic bone diseases. *Bone*, 2013;54(2):272–8.
- Moreira Teixeira LS, Feijen J, van Blitterswijk CA, Dijkstra PJ, Karperien M. Enzyme-catalyzed crosslinkable hydrogels: Emerging strategies for tissue engineering. *Biomaterials*, 2012;33(5):1281–90.
- Mulari M, Vääräniemi J, Väänänen HK. Intracellular membrane trafficking in bone resorbing osteoclasts. *Microsc. Res. Tech.*, 2003;61(6):496–503.
- Nakamura I, Takahashi N, Jimi E, Udagawa N, Suda T. Regulation of osteoclast function. *Mod Rheumatol*, 2012;22(2):167–77.
- Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, Crombrughe B de. The Novel Zinc Finger-Containing Transcription Factor Osterix Is Required for Osteoblast Differentiation and Bone Formation. *Cell*, 2002;108(1):17–29.
- Nakashima T, Kobayashi Y, Yamasaki S, Kawakami A, Eguchi K, Sasaki H, Sakai H. Protein Expression and Functional Difference of Membrane-Bound and Soluble Receptor Activator of NF- κ B Ligand: Modulation of the Expression by Osteotropic Factors and Cytokines. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2000;275(3):768–75.
- Ovsianikov A. Tipps zur Herstellung von homogenen Gelatinebeschichtungen auf Deckgläsern mit Hilfe von abziehbaren Teflonplättchen. Diskussion während eines Meetings. 2013 Oct 29.
- Panzavolta S, Torricelli P, Amadori S, Parrilli A, Rubini K, Della Bella E, Fini M, Bigi A. 3D interconnected porous biomimetic scaffolds: In vitro cell response. *J. Biomed. Mater. Res.*, 2013;101(12):3560–70.
- Paskert JP, Yaremchuk MJ, Randolph MA, Weiland AJ. Prolonging survival in vascularized bone allograft transplantation: developing specific immune unresponsiveness. *J Reconstr Microsurg*, 1987;3(3):253–63.
- Plotkin LI, Mathov I, Aguirre JI, Parfitt AM, Manolagas SC, Bellido T. Mechanical stimulation prevents osteocyte apoptosis: requirement of integrins, Src kinases, and ERKs. *AJP: Cell Physiology*, 2005;289(3):C633–C643.

- Rawashdeh MA, Telfah H. Secondary Alveolar Bone Grafting: the Dilemma of Donor Site Selection and Morbidity. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 2008;46(8):665–70.
- Rungsiyanont S, Dhanesuan N, Swasdison S, Kasugai S. Evaluation of biomimetic scaffold of gelatin-hydroxyapatite crosslink as a novel scaffold for tissue engineering: Biocompatibility evaluation with human PDL fibroblasts, human mesenchymal stromal cells, and primary bone cells. *Journal of Biomaterials Applications*, 2012;27(1):47–54.
- Salo J, Lehenkari P, Mulari M, Metsikkö K, Väänänen HK. Removal of Osteoclast Bone Resorption Products by Transcytosis. *Science*, 1997;276(5310):270–3.
- Schlesinger PH, Blair HC, Teitelbaum SL, Edwards JC. Characterization of the Osteoclast Ruffled Border Chloride Channel and Its Role in Bone Resorption. *Journal of Biological Chemistry*, 1997;272(30):18636–43.
- Seeman. Modeling and Remodeling. In: Bilezikian, JP, Raisz, LG, Martin, TJ. *Principles of Bone Biology*. Amsterdam, London: Elsevier; 2008. p. 1–28. ISBN: 978-0-12-373884-4.
- Staroszczyk H, Sztuka K, Wolska J, Wojtasz-Pajak A, Kołodziejska I. Interactions of fish gelatin and chitosan in uncrosslinked and crosslinked with EDC films: FT-IR study. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2014;117:707–12.
- Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT, Martin TJ. Modulation of Osteoclast Differentiation and Function by the New Members of the Tumor Necrosis Factor Receptor and Ligand Families. *Endocrine Reviews*, 1999;20(3):345–57.
- Takaoka K, Nakahara H, Yoshikawa H, Masuhara K, Tsuda T, Ono K. Ectopic bone induction on and in porous hydroxyapatite combined with collagen and bone morphogenetic protein. *Clin Orthop Relat Res*, 1988;234:250–4.
- Talmage RV, Talmage DW. Calcium homeostasis: Solving the solubility problem. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 2006;6(4):402–7.
- Teitelbaum SL. The osteoclast and its unique cytoskeleton. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2011;1240(1):14–7.
- Tsukii K, Shima N, Mochizuki S, Yamaguchi K, Kinoshita. Osteoclast Differentiation Factor Mediates an Essential Signal for Bone Resorption Induced by 1,25-Dihydroxyvitamin D₃, Prostaglandin E₂, or Parathyroid Hormone in the Microenvironment of Bone. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1998;246(2):337–41.
- Väänänen HK, Laitala-Leinonen T. Osteoclast lineage and function. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2008;473(2):132–8.
- van Tran P, Dryll A, Lansaman J, Naveau B, Treve R, Miravet L, Ryckewaert A. Osteoclast abnormalities in idiopathic osteopetrosis, Reference to the ultrastructural histochemistry study. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol.*, 1985;408(2-3):269–80.
- Wang X, Kua H, Hu Y, Guo K, Zeng Q, Wu Q, Ng H, Karsenty G, Crombrughe B de, Yeh J, Li B. p53 functions as a negative regulator of osteoblastogenesis, osteoblast-dependent osteoclastogenesis, and bone remodeling. *J. Cell Biol.*, 2006;172(1):115–25.
- Weir E, Horowitz M, Baron R, Centrella M, Kacinski B, Insogna K. Macrophage colony-stimulating factor release and receptor expression in bone cells. *J Bone Miner Res*, 1993;8(12).

- Wu J, Glimcher L, Aliprantis A. HCO₃⁽⁻⁾/Cl⁽⁻⁾ anion exchanger SLC4A2 is required for proper osteoclast differentiation and function. *PNAS*, 2008;105(44):16934–9.
- Yamaguchi A, Komori T, Suda T. Regulation of Osteoblast Differentiation Mediated by Bone Morphogenetic Proteins, Hedgehogs and Cbfa1. *Endocrine Reviews*, 2000;21(4):393–411.
- Young S, Wong M, Tabata Y, Mikos AG. Gelatin as a delivery vehicle for the controlled release of bioactive molecules. *Journal of Controlled Release*, 2005;109(1-3):256–74.
- Yuan H, Van Den Doel, M, Li S, van Blitterswijk CA, Groot K de, Bruijn JD de. A comparison of the osteoinductive potential of two calcium phosphate ceramics implanted intramuscularly in goats. *J Mater Sci Mater Med*, 2002;13(12):1271–5.
- Zerbini C, McClung M. Olanacatib in postmenopausal women with low bone mineral density: a review of current clinical evidence. *Ther Adv Musculoskel Dis*, 2013;5(4):199–209.
- Zou W, Teitelbaum SL. Integrins, growth factors, and the osteoclast cytoskeleton. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2010;1192(1):27–31.

Lebenslauf

Name

Melanie Kleiner

Geburtsdatum

24. März 1988

Studium

10/2006 - 03/2015

Diplomstudium Pharmazie, Universität Wien

Schulische Bildung

09/1993 – 06/1998

Volksschule Maria Enzersdorf Schulplatz

09/1998 – 06/2006

BG & BRG Mödling Keimgasse

20. Juni 2006

Reifeprüfung

Arbeitserfahrung

04/2007-02/2013

Central-Apotheke Wiener Neudorf