

# **Der Einfluss von Bioglas auf die Osteoklastogenese und Osteoklasten**

**- Eine in vitro Untersuchung -**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Humanmedizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Hanna Marion Baitinger

aus Böblingen

Gießen 2025

Aus der experimentellen Unfallchirurgie,  
Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie  
Des Fachbereichs Medizin  
Der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Katrin Susanne Lips

Gutachter: Prof. Dr. Katrin Susanne Lips

Gutachter: Prof. Dr. Markus Rickert

Tag der Disputation: 21.01.2025

# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung .....	1
1.1. Knochengewebe .....	1
1.2. Osteoklasten .....	4
1.2.1. Knochenresorption .....	5
1.3. Osteoklastogenese .....	7
1.3.1. Effekt von M-CSF auf die Osteoklastogenese .....	9
1.3.2. Effekt von RANKL auf die Osteoklastogenese .....	10
1.3.3. Kostimulatorische Signale.....	15
1.4. Bioglas.....	20
1.5. Fragestellung und Zielsetzung .....	21
2. Material und Methoden .....	23
2.1. Bioglas.....	23
2.2. Zellkultur .....	23
2.2.1. Zellkulturmedium.....	23
2.2.2. Isolation von PBMCs .....	24
2.2.3. Zellernte .....	27
2.3. Lebendzellbeobachtung.....	28
2.4. pH-Wert Messung .....	28
2.5. RNA-Isolation .....	28
2.6. cDNA-Synthese.....	29
2.7. Real-time Reverse-Transkriptase Polymerase-Ketten-Reaktion.....	30
2.8. Kapillarelektrophorese .....	34
2.9. Funktionelle Assays .....	34
2.10. Rasterelektronenmikroskopie (REM) .....	36
2.11. Immunfluoreszenzmikroskopie .....	38
2.12. Statistische Auswertung .....	39
2.13. Schematische Abbildungen .....	39
3. Ergebnisse .....	40
3.1. Morphologische Auswertung der Lebendzellbeobachtung.....	40
3.2. pH-Wert Messung .....	43
3.3. Real-time Reverse-Transkriptase Polymerase-Ketten-Reaktion.....	45
3.3.1. Referenzgen.....	45
3.3.2. CD14 .....	47
3.3.3. CBFB.....	48

3.3.4	Mannose Rezeptor C Typ 1 .....	50
3.3.5	Cathepsin K .....	51
3.3.6	Calcitonin Rezeptor .....	53
3.3.7	OSCAR.....	54
3.4.	Kapillarelektrophorese .....	56
3.5.	Funktionelle Assays .....	57
3.5.1.	Carboanhydrase II .....	57
3.5.2.	TRAP 5b.....	58
3.6.	Immunfluoreszenzmikroskopie .....	60
3.7.	Rasterelektronenmikroskopie (REM) .....	63
4.	Diskussion .....	68
4.1.	Methodendiskussion .....	68
4.1.1.	Zellkultur .....	69
4.1.2.	pH-Wert Messung .....	73
4.1.3.	Bildmorphologische Verfahren .....	74
4.1.4.	Genetische Untersuchungen .....	75
4.1.5.	Funktionelle Assays .....	79
4.1.6.	Molekularbiologischer Einfluss von Bioglas .....	80
4.1.7.	Einfluss von Bioglas auf die Osteoklastenaktivität.....	83
4.2.	Biokompatibilität.....	84
4.3.	Vergleich der einzelnen Biogläser .....	86
4.4.	Limitation der Studie.....	86
4.5.	Fazit und Ausblick .....	88
5.	Zusammenfassung .....	90
6.	Summary .....	91
7.	Abkürzungsverzeichnis .....	92
8.	Abbildungsverzeichnis .....	98
9.	Tabellenverzeichnis.....	99
10.	Literaturverzeichnis.....	100
11.	Ehrenwörtliche Erklärung .....	119
12.	Danksagung .....	120

# 1. Einleitung

## 1.1. Knochengewebe

Knochengewebe bildet die Grundlage des Skeletts und spielt als Ansatzpunkt für Sehnen und Muskeln eine entscheidende Rolle in der Ausführung von Bewegungen. Gleichzeitig schützt es empfindliche innere Organe, das Gehirn oder das Rückenmark vor äußeren Einflüssen und bildet einen Raum für das Knochenmark. Zudem dient es als Speicher für verschiedene Mineralstoffe und nimmt am Säure-Base-Haushalt teil (Sommerfeldt und Rubin 2001; Grabowski 2009; Hart et al. 2020). Knochen setzt sich aus 70 % anorganischen Mineralien, 25 % organischer Matrix und 5 % Wasser zusammen. Er gliedert sich in eine anorganische und eine organische extrazelluläre Matrix, die durch das Zusammenspiel verschiedener Zellen moduliert wird. Der anorganische Anteil besteht hauptsächlich aus Calcium und Phosphat, welche sich zu Hydroxylapatitkristallen ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) zusammenlagern. Er ist für das Maß an Knochenfestigkeit verantwortlich. Hydroxylapatit lagert sich in den Kollagenfibrillen der organischen Matrix ab. Diese ist bei der Energieabsorption von Bedeutung und besteht aus kollagenen und nicht-kollagenen Proteinen (Buckwalter und Cooper 1987; Sommerfeldt und Rubin 2001; Florencio-Silva et al. 2015; Alcorta-Sevillano et al. 2020). Ihr Hauptbestandteil ist Kollagen Typ I, welches ungefähr 85 % der organischen Matrix ausmacht. Es setzt sich aus drei Helices zusammen und wird zunächst als Vorläuferprotein sezerniert. Erst durch posttranslationale Modifikation wird es in seine endgültige Form überführt (Baht et al. 2008; Licini et al. 2019). Neben den Kollagenen werden nicht-kollagene Proteine sezerniert. Es handelt sich hierbei um eine heterogene Gruppe von ungefähr 200 verschiedenen Proteinen. Diese beteiligen sich an Signaltransduktionswegen, beeinflussen die mechanische Stabilität des Knochens und enthalten Wachstumsfaktoren. Das am häufigsten vorkommende nicht-kollagene Protein im Knochen ist Osteocalcin. Es wird von Osteoblasten sezerniert und ist in der Lage, die Hydroxylapatitkristalle parallel zu den Kollagenfibrillen auszurichten (Komori 2020; Manolagas 2020; Moriishi et al. 2020). Weitere Vertreter der nicht-kollagenen Proteine sind unter anderem das Knochensialoprotein (BSP), Decorin oder Osteonektin. Das BSP wird im Rahmen der Knochenbildung von Osteoblasten sezerniert und hat verschiedene Bindungsstellen für Kollagen I, Hydroxylapatit und zelluläre Bestandteile. Es gilt als einer der wichtigsten Kristallisationsfaktoren von Hydroxylapatit. Gleichzeitig konnte in verschiedenen Spezies die Aminosäuresequenz Arginin – Glycin – Asparaginsäure (RGD-Sequenz) nachgewiesen werden, welche über das  $\alpha\beta_3$  Integrin die Bindung von Osteoklasten an die Knochenoberfläche vermittelt (Baht et al. 2008; Vincent und Durrant 2013; Licini et al. 2019).

Decorin wird überall exprimiert, wo auch Kollagen I vorkommt, und spielt eine Rolle in der Bildung und Anordnung der einzelnen Kollagenfibrillen (Mochida et al. 2009; Licini et al. 2019). Osteonektin ist ein nicht-kollagenes Protein das stark mit dem Vorhandensein von Kollagen I korreliert. Es ist in der Lage sowohl Kollagen I als auch Hydroxylapatit zu binden und dadurch die Knochenmineralisierung zu fördern (Termine et al. 1981; Rosset und Bradshaw 2016).

Bei makroskopischer Betrachtung des Knochens kann ein kompakter Anteil von einem trabekelartigen Anteil unterschieden werden. Der kompakte kortikale Knochen macht mit ungefähr 80 % den deutlich größeren Teil aus. Er findet sich vor allem in der Diaphyse langer Röhrenknochen und bildet eine Höhle für das Knochenmark und den trabekulären Knochen. Der kortikale Knochen ist kompakt gebaut mit geringer Oberfläche. Diese wird von einer membranartigen Schicht, dem Periost, überzogen. Das Periost gliedert sich in eine äußere faserreiche und eine innere zellreiche Schicht. Die äußere Schicht besteht hauptsächlich aus kollagenen und elastischen Fasern sowie aus Gefäßen und Nerven. Sie überträgt mechanische Kräfte auf den Knochen und initiiert dadurch Anpassungsvorgänge. In ihr enden die Ansätze von Sehnen. Die innere periostale Schicht besteht hauptsächlich aus Zellen mit osteogenem Potential (Buckwalter und Cooper 1987; Neagu et al. 2016; Ott 2018; Zhang et al. 2022). Der trabekuläre Knochen befindet sich im Knochenmarkraum und zeichnet sich durch seine große Oberfläche aus. Im Gegensatz zur Kompakta ist er aufgrund seiner Struktur deutlich poröser, weist aber auch ein deutlich höheres Maß an Umbau auf und kann daher besser auf wechselnde Belastungen reagieren. Ähnlich wie der kortikale Knochen wird auch der trabekuläre Knochen von einer membranartigen Schicht umgeben. Hierbei handelt es sich um das Endost, welches mit dem umgebenden Knochenmark und Fettgewebe in Verbindung steht. Das Endost überzieht alle knöchernen Strukturen im Inneren der Knochenmarkshöhle. Es besteht aus kollagenen Fasern und osteogenen Zellen (Chappard et al. 2008; Clarke 2008; Kivell 2016; Ott 2018; Nahian und Chauhan 2023).

Bei mikroskopischer Betrachtung von Knochen kann Geflechtknochen von Lamellenknochen unterschieden werden. Im Rahmen der Embryonalentwicklung muss in kurzer Zeit viel Knochen gebildet werden. Es entsteht zunächst der Geflechtknochen, der durch große und viele Zellen in unregelmäßig angeordneten Kollagenfasern gekennzeichnet ist. Dieser unregelmäßige Knochen kann zwar schnell gebildet werden, hat allerdings Defizite hinsichtlich seiner Stabilität. Er wird mit der Zeit in Lamellenknochen umgebaut. Im erwachsenen Skelett findet sich Geflechtknochen nur noch im Rahmen der Frakturheilung oder nach extremen Belastungen

(Sommerfeldt und Rubin 2001; Hernandez et al. 2004; Hart et al. 2020). Lamellenknochen ist durch seine geordnete Struktur und parallele Ausrichtung der Fasern gekennzeichnet. Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen haben gezeigt, dass sich jeweils kollagenarme- und kollagenreiche Fasern abwechselnd aneinanderlagern (Marotti et al. 1994; Weiner et al. 1999; Hart et al. 2020).

Das Skelett eines erwachsenen Menschen besteht aus ungefähr 200 einzelnen Knochen. Diese unterliegen ständiger Veränderung durch Anpassung an die vorherrschenden Anforderungen. Eine Zunahme der Belastung führt zu einer vermehrten lokalen Knochenbildung, während Inaktivität in Knochenverlust resultiert (Frost 1994; Clarke 2008). Dieser Umbau wird von den verschiedenen Knochenzellen reguliert. Hierzu gehören Osteoprogenitorzellen, Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten (Buckwalter und Cooper 1987; Thompson et al. 2012; Alcorta-Sevillano et al. 2020).

### 1.1.1 Osteoblasten

Osteoblasten entwickeln sich unter dem Einfluss verschiedener Transkriptionsfaktoren wie dem Runt verwandten Transkriptionsfaktor 2 (RUNX2) und Osterix aus mesenchymalen Stammzellen (MSC). Sie sind als knochenbildende Zellen auf der Knochenoberfläche lokalisiert und imponieren als kubische, einkernige Zellen. Als proteinsynthetisierende Zellen sind sie reich an endoplasmatischem Retikulum, Golgi-Apparat, Mitochondrien und zytoplasmatischen Vesikeln (Gay et al. 2000; Roeder et al. 2016; Blair et al. 2017). Diese Vesikel enthalten unter anderem Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ), welches über die apikale, dem Knochen anliegende, Membran freigesetzt wird und an die negativ geladenen Proteoglykane der Knochenoberfläche bindet. Zusätzlich wird Phosphat über eine membranständige alkalische Phosphatase bereitgestellt. Durch Zusammenschluss dieser Ionen bilden sich die Hydroxylapatitkristalle. Neben Hydroxylapatit sind Osteoblasten für die Bereitstellung der organischen Matrix verantwortlich. Sie sezernieren Kollagen I und verschiedene nicht-kollagene Proteine (Florencio-Silva et al. 2015; Blair et al. 2017; van Scoy et al. 2017). In Abhängigkeit des erforderlichen Knochenumbaus können Osteoblasten zwei verschiedene Zustandsformen annehmen. Im nicht-knochenbildenden Stadium verbleiben sie als flache und wenige Organellen enthaltende Zellen, auf der Knochenoberfläche liegen. Sie werden dann als Saumzellen bezeichnet. Sie sind weiterhin in der Lage, ihre knochenbildende Funktion durch Größenzunahme auszuführen. Wenn jedoch eine große Menge an neuem Knochen benötigt

wird, mauern sie sich mit der Zeit in die von ihnen produzierte Knochenmatrix ein und werden dann als Osteozyten bezeichnet. Sie stehen über ihre Zellfortsätze über kleine Knochenkanälchen weiterhin mit den auf der Oberfläche befindlichen aktiven Osteoblasten in Kontakt (Miller et al. 1989; Gay et al. 2000; Florencio-Silva et al. 2015; Blair et al. 2017). Über die Freisetzung von Rezeptor Aktivator von NF $\kappa$ B Ligand (RANKL) und Osteoprotegerin (OPG) sind sie in der Lage, Osteoklasten zu beeinflussen (Sommerfeldt und Rubin 2001; Caetano-Lopes et al. 2007).

### 1.1.2 Osteozyten

Osteozyten machen mit ungefähr 90 % den größten Anteil aller Knochenzellen aus. Sie gehören mit einer Lebensspanne von circa (ca.) 25 Jahren zu den langlebigsten Zellen. Es handelt sich um ehemalige Osteoblasten, die sich durch die Produktion der Knochenmatrix selbst eingemauert haben. Im Gegensatz zu Ihren Vorläufern besitzen sie nur eine sehr reduzierte Menge an Zellorganellen. Sie kennzeichnen sich jedoch durch ihre große Anzahl an Zellfortsätzen, mit denen sie sowohl untereinander als auch mit den Saumzellen der Knochenoberfläche in Verbindung stehen (Sommerfeldt und Rubin 2001; Florencio-Silva et al. 2015). Lange Zeit herrschte die Annahme, dass es sich bei Osteozyten um gealterte Osteoblasten ohne relevante Funktion handelt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass Osteozyten eine bedeutende Rolle in der Regulation des Knochenbaus spielen. Die Zellfortsätze von Osteozyten werden in ihren Knochenkanälchen von einer Flüssigkeit umgeben. Durch die auf den Knochen einwirkenden Kräfte wird diese Flüssigkeit in Bewegung gesetzt. Osteozyten sind in der Lage, die dadurch entstehenden Schwingungen und Scherkräfte zu detektieren und in biochemische Signale für Osteoblasten und Osteoklasten zu übersetzen. Dieser Prozess wird als Mechanotransduktion bezeichnet (Bonewald 2006; Thompson et al. 2012; Humphrey et al. 2014; Hart et al. 2020)

### 1.2. Osteoklasten

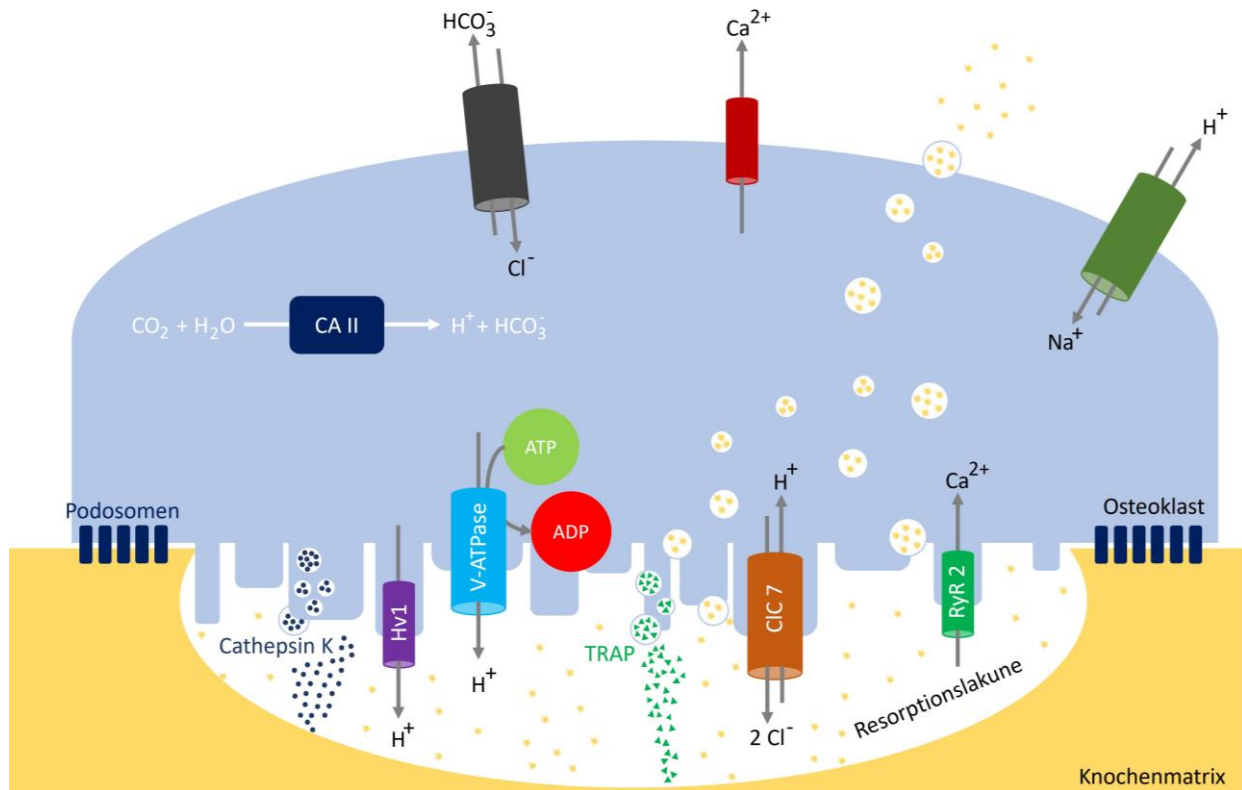
Osteoklasten sind mehrkernige Riesenzellen der Monozyten-Makrophagen-Linie. Sie sind die einzigen Zellen des Knochens, die ihren Ursprung in einer hämatopoetischen Stammzelle haben. Ihre Differenzierung wird durch Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor (M-CSF) und RANKL induziert und endet in der Fusion mononukleärer Vorläuferzellen. Ihre Lebensdauer beträgt durchschnittlich 2 – 4 Wochen. Osteoklasten sind einzigartig in ihrer

Funktion, Knochen abzubauen und spielen daher eine bedeutende Rolle im Rahmen der Knochenhomöostase (Lerner 2000; Sommerfeldt und Rubin 2001; Bar-Shavit 2007; Athanasou 2011; Del Fattore et al. 2012).

### 1.2.1. Knochenresorption

Osteoklasten sind auf der Knochenoberfläche lokalisiert. Um Knochen resorbieren zu können, müssen sie sich jedoch zunächst fest an die Oberfläche anhaften. Dies erfordert eine zytoskelettale Umstrukturierung. Diese wird durch die Bindung des  $\alpha\beta3$  Integrins in der Osteoklastenmembran an eine Arginin – Glycin – Asparaginsäure Aminosäuresequenz (RGD-Sequenz) der Knochenmatrixproteine initiiert. Zu den RGD reichen Matrixproteinen gehört unter anderem (u. a.) Osteopontin und das BSP. Diese Bindung führt zu einer Umstrukturierung des Aktinzytoskeletts mit Bildung einer festen Anhaftungszone (Sealing zone) der Osteoklastenmembran am Knochen. Diese Anhaftungszone teilt die Osteoklastenmembran in eine dem Knochen zugewandte apikale und eine dem Knochen ferne basolaterale Membran. Dieser Prozess der zytoskelettalen Umstrukturierung wird als Polarisation bezeichnet und ist charakteristisch für Osteoklasten (Väänänen et al. 1988; Zaidi et al. 2003; Ahn et al. 2012; Soysa und Alles 2016). Die Versiegelungszone ist ein zellorganellenfreier Bereich und wird daher in der Literatur auch als Clear zone beschrieben. Dieser wird durch Podosomen gebildet. Es handelt sich hierbei um Strukturen, die in der Lage sind, sich an den Knochen anzuhaften. Sie bestehen u. a. aus Aktin, Vinculin, Paxillin und Tensin. Der genaue Mechanismus, der für die Umstrukturierung verantwortlich ist, ist bislang nicht vollständig geklärt. Die Versiegelungszone grenzt den in Resorption befindlichen Knochen von der Umgebung ab (Florencio-Silva et al. 2015; Takito et al. 2018; Portes et al. 2022). Die apikale Membran kennzeichnet sich durch ihre von Mikrovilli gebildete, gekräuselte Oberfläche (Ruffled membrane). Sie beinhaltet eine Vielzahl an Kanälen und Transportern für die Knochenresorption (Baron 1989; Florencio-Silva et al. 2015). Zu Beginn muss der pH-Wert in der Resorptionslakune (Howship Lakune) deutlich reduziert werden. Hierzu werden Protonen ( $H^+$ ) über die Osteoklastenmembran transportiert. Es stehen drei verschiedene Transporter zur Verfügung, wobei der vakuolären  $H^+$ -Adenosintriphosphatase (V-ATPase) die größte Bedeutung zukommt. Sie transportiert  $H^+$  aktiv unter Hydrolyse von Adenosintriphosphat (ATP) in die Resorptionslakune (Nordström et al. 1995; Rousselle und Heymann 2002; Marcoline et al. 2016; Ribet et al. 2021). Intrazellulär wird  $H^+$  durch die Carboanhydrase II zur Verfügung gestellt. Das Enzym katalysiert die Reaktion von Kohlenstoffdioxid ( $CO_2$ ) und

Wasser ( $\text{H}_2\text{O}$ ) zu Protonen ( $\text{H}^+$ ) und Bikarbonat ( $\text{HCO}_3^-$ ). Das intrazelluläre Bikarbonat ist dabei in der Lage den pH-relevanten Effekt von  $\text{H}^+$  initial abzuf puffern (Rousselle und Heymann 2002; Marcoline et al. 2016). Neben der V-ATPase gelangen Protonen passiv über den spannungsgesteuerten Protonenkanal  $\text{Hv1}$  in die Resorptionslakune. Dieser Transport erfolgt jedoch deutlich langsamer. Ab einem pH-Wert unter 5,5 wird zusätzlich ein säureinduzierter  $\text{H}^+$  Fluss gefördert. Diese pH abhängige Aktivierung dient dem Schutz des umliegenden Knochens (Marcoline et al. 2016; Kuno 2018). Durch den starken Transport von positiv geladenen Protonen über die Plasmamembran entsteht ein Membranpotential. Um dieses auszugleichen, werden parallel negativ geladene Chlorid-Ionen ( $\text{Cl}^-$ ) in die Resorptionslakune transportiert. Hierfür steht der spannungsgesteuerte Chlorid Kanal 7 ( $\text{ClC7}$ ) zur Verfügung. Dieser Antiporter befördert 2  $\text{Cl}^-$  Ionen im Austausch gegen ein  $\text{H}^+$  in die Resorptionslakune (Bastani et al. 1996; Henriksen et al. 2009; Ribet et al. 2021; Xue et al. 2022; Zifarelli 2022). Die  $\text{Cl}^-$  Ionen werden durch den in der basolateralen Membran lokalisierten  $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$  Antiporter zur Verfügung gestellt. Er nutzt das durch die Carboanhydrase II gebildete Bikarbonat als Substrat. Gleichzeitig verhindert er durch den Transport von Bikarbonat in das extrazelluläre Kompartiment eine Alkalisierung des Zytoplasmas. In dieser Aufgabe wird er durch den ebenfalls basolateral lokalisierten  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiporter (NHE) unterstützt, der  $\text{H}^+$  im Austausch gegen ein Natrium-Ion ( $\text{Na}^+$ ) in das extrazelluläre Kompartiment transportiert (Rousselle und Heymann 2002; Marcoline et al. 2016). Durch diese Ionenverschiebungen kommt es insgesamt zu einer starken Übersäuerung der Resorptionslakune bis zu einem pH-Wert von ungefähr 2 – 4. Dieser induziert die Auflösung der Hydroxylapatitkristalle. Um die organische Knochenmatrix abzubauen, sezernieren Osteoklasten hydrolytische Enzyme wie Cathepsin K, Tartratresistente-saure-Phosphatase (TRAP) oder Matrix-Metalloproteinase-9 (MMP9). Diese Enzyme werden erst durch den sauren pH-Wert in der Resorptionslakune aktiviert (Sommerfeldt und Rubin 2001; Goto et al. 2003; Troen 2004; Ahn et al. 2012; Gruber 2015; Marcoline et al. 2016). Durch den Abbau der Knochenmatrix fallen eine große Menge an Abbauprodukten an. Diese werden über Transzytose zur basolateralen Membran transportiert und dort in den extrazellulären Raum sezerniert. Gleichzeitig besitzen Osteoklasten in ihrer apikalen Membran den Ryanoidin-Rezeptor-2 (RyR2) zum Transport von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen. Diese werden dann an der basolateralen Membran über die ATP-abhängige Transporter ATP2B1 und ATP2B4 freigesetzt (Abb. 1) (Nesbitt und Horton 1997; Salo et al. 1997; Robinson et al. 2010; Ribet et al. 2021).



**Abb. 1: Knochenresorption**

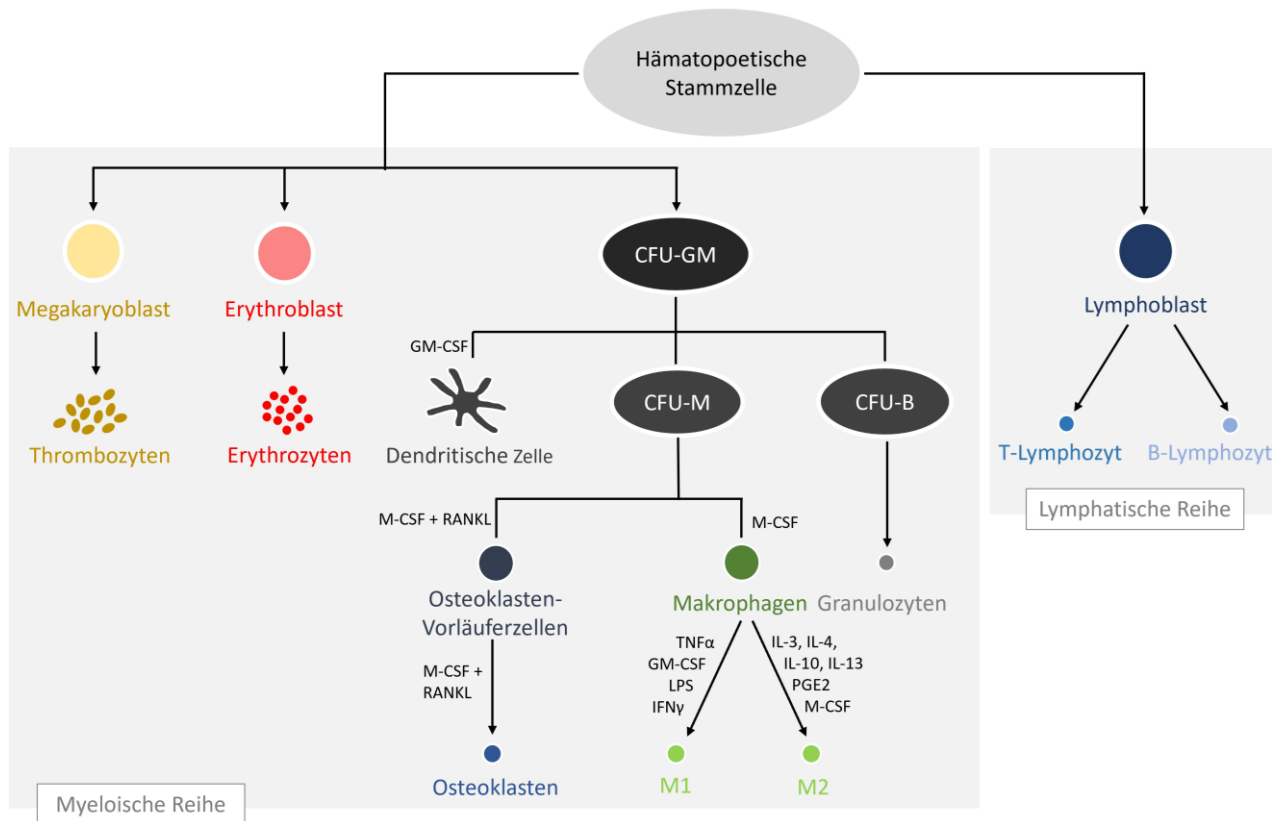
Während der Knochenresorption bilden Osteoklasten eine Resorptionslücke. Diese wird durch Podosomen (dunkelblau) vom umgebenden Knochengewebe getrennt. Durch Protonen findet eine starke Übersäuerung statt, was zum Abbau von Hydroxylapatit führt. Durch enzymatische Aktivität wird die organische Matrix abgebaut. Der abgebaute Knochen (gelbe Partikel) wird durch Transzytose in das extrazelluläre Kompartiment transportiert. ADP = Adenosindiphosphat, ATP = Adenosintriphosphat,  $\text{Ca}^{2+}$  = Calcium, CA II = Carboanhydrase II,  $\text{Cl}^-$  = Chlorid Ion, ClC7 = Chlorid-Kanal 7,  $\text{CO}_2$  = Kohlenstoffdioxid,  $\text{H}^+$  = Proton,  $\text{H}_2\text{O}$  = Wasser,  $\text{HCO}_3^-$  = Bikarbonat, Hv1 = Spannungsgesteuerter Protonenkanal,  $\text{Na}^+$  = Natrium, RyR2 = Ryanodin Rezeptor 2, TRAP = Tartratresistente saure Phosphatase, V-ATPase = vakuoläre  $\text{H}^+$  ATPase. Modifiziert nach Marcoline et al. 2016 und Ribet et al. 2021.

### 1.3. Osteoklastogenese

Osteoklastogenese bezeichnet den Prozess der Bildung von reifen Osteoklasten aus Vorläuferzellen. Der früheste identifizierbare Vorläufer ist dabei die Granulozyten-Makrophagen-Kolonie bildende Einheit (CFU-GM). Es handelt sich dabei um multipotente Zellen, die sich in Granulozyten, Makrophagen und Osteoklasten differenzieren können (Menaar et al. 2000; Roodman 2006; Ruef et al. 2017). Hämatopoetische Stammzellen im Knochenmark können proliferieren und sich zu Monozyten weiterentwickeln. Monozyten sind mononukleäre Zellen, die anhand ihrer Oberflächenmarker Unterscheidungsgruppe 14 (Cluster of Differentiation = CD14) und Unterscheidungsgruppe 16 (Cluster of Differentiation = CD16) in klassische, intermediäre und nicht-klassische Monozyten eingeteilt werden können. Für die

Bildung von Osteoklasten sind vor allem (v. a.) CD14 positive Monozyten von Bedeutung (Swirski et al. 2014; Nielsen et al. 2020). In Abhängigkeit der vorherrschenden stimulierenden Faktoren können sich diese zu dendritischen Zellen oder Makrophagen weiterentwickeln. Bei Vorhandensein von Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierendem Faktor (GM-CSF) und Interleukin-4 (IL-4) können CD14 positiven Monozyten zu dendritischen Zellen werden. Diese zeichnen sich durch ihre sternförmige Morphologie aus und spielen eine wichtige Rolle im Rahmen der erworbenen Immunantwort. Sie sind an der Bildung eines immunologischen Gedächtnisses beteiligt und dienen als antigenpräsentierende Zellen für T-Zellen (Geissmann et al. 2010; Puhr et al. 2015). Neben dendritischen Zellen können sich aus Monozyten auch Makrophagen entwickeln. Makrophagen sind Zellen des angeborenen Immunsystems und sind ubiquitär vorhanden. Ihre Funktion richtet sich nach ihrer Umgebung, wobei ihre Hauptaufgabe in der Phagozytose besteht. Sie besitzen ein hohes Maß an Plastizität und können sich je nach vorherrschenden Faktoren in verschiedenen polarisierte Zellen differenzieren. Allgemein unterscheidet man M1 polarisierte, von M2 polarisierten Zellen, wobei diese Form der Klassifizierung eine starke Vereinfachung und Zusammenfassung zahlreicher Subtypen darstellt. M1 polarisierte Makrophagen entstehen unter dem Einfluss von GM-CSF, Tumor-Nekrose-Faktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), Lipopolysaccharid (LPS) und Interferon- $\gamma$  (INF $\gamma$ ). Sie setzen v. a. proinflammatorische Faktoren wie z. B. TNF $\alpha$ , Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) oder Interleukin-6 (IL-6) frei und unterhalten so die Entzündungsreaktion. Zusätzlich sind sie in der Lage reaktive Sauerstoffspezies (ROS) zu bilden, wodurch Krankheitserreger abgetötet werden können. Unter dem Einfluss von M-CSF, IL-4, Interleukin-13 (IL-13) und Prostaglandin E2 (PGE2) werden hingegen M2 polarisierte Makrophagen gebildet. Im Gegensatz zu M1 polarisierte Makrophagen, sezernieren diese v. a. antiinflammatorische Faktoren wie z. B. IL-4, Interleukin-10 (IL-10) oder transformierender Wachstumsfaktor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ). Aufgrund ihrer entzündungshemmenden Wirkung werden sie auch als wundheilungsaktivierende Makrophagen bezeichnet (Shapouri-Moghaddam et al. 2018; Locati et al. 2020; Nielsen et al. 2020; Peng et al. 2023). Wenn neben M-CSF auch RANKL vorhanden ist, wird der Proliferationsprozess in Richtung Osteoklastogenese geleitet. Während M-CSF v. a. für die Proliferation und das Überleben der Vorläuferzellen relevant ist, ist RANKL unerlässlich für die Differenzierung und Aktivierung von Osteoklasten (Abb. 2). Neben M-CSF und RANKL spielen verschiedene kostimulatorische Faktoren bei der Initiierung der Osteoklastogenese eine Rolle. Hierzu gehören die Immunrezeptor-Tyrosin-basierten Aktivierungsmotive (ITAM). OPG konkurriert mit RANKL um die Bindungsstelle an dem Rezeptor Aktivator von NF $\kappa$ B

(RANK), sodass die Bildung von Osteoklasten durch OPG gehemmt wird (Nemeth et al. 2011; Barrow et al. 2011; Maciel et al. 2023; Kawai et al. 2023).



**Abb. 2: Die hämatopoetische Reihe**

Ausgehend von der multipotenten hämatopoetischen Stammzellen können Zellen der lymphatischen und der myeloischen Reihe entstehen. CFU-B = Basophilen-Kolonie bildende Einheit, CFU-M = Monozyten-Kolonie bildende Einheit, CFU-GM = Granulozyten-Makrophagen-Kolonie bildende Einheit, GM-CSF = Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierendem Faktor, IL-3 = Interleukin-3, IL-4 = Interleukin-4, IL-10 = Interleukin-10, IL-13 = Interleukin-13, INF $\gamma$  = Interferon- $\gamma$ , LPS = Lipopolysaccharid, M-CSF = Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor, PGE2 = Prostaglandin E2, RANKL = Rezeptor Aktivator von NF $\kappa$ B Ligand, TNF $\alpha$  = Tumor-Nekrose-Faktor  $\alpha$ . Modifizierte Darstellung nach Yavropoulou und Yovos 2008; Miyamoto 2011; Ruef et al. 2017; Shapouri-Moghaddam et al. 2018 und Peng et al. 2023.

### 1.3.1. Effekt von M-CSF auf die Osteoklastogenese

M-CSF wird von Osteoblasten und Stromazellen gebildet und bindet an den koloniestimulierenden Faktor 1 Rezeptor (c-Fms) auf der Oberfläche von Osteoklastenvorläuferzellen. Bei c-Fms handelt es sich um eine Transmembran-Rezeptor-Tyrosinkinase. Durch Bindung kommt es zur Dimerisierung des Rezeptors mit nachfolgender Autophosphorylierung ausgewählter Tyrosinreste im zytoplasmatischen Anteil (Zou et al. 2008; Kim et al. 2010; Otero et al. 2014; Kong et al. 2020). Durch die Autophosphorylierung werden Proteinbindungsstellen an der zytoplasmatischen Domäne von c-Fms freigelegt. Hier

kann die Tyrosinkinase c-Src binden, welche dann die Phosphoinositid 3 Kinase (PI3K) rekrutiert. PI3K aktiviert die Serin-Threonin-Proteinkinase Akt, die an der Bildung der zytoskelettalen Aktinfilamente beteiligt ist. Der M-CSF/ PI3K/ Akt Signalweg ermöglicht der Zelle Motilität und fördert dadurch die resorptive Funktion von Osteoklasten (Bourette et al. 1997; Franke et al. 1997; Grey et al. 2000; Lee et al. 2002b; Golden und Insogna 2004; Sakai et al. 2006). Neben c-Src wird auch das Wachstumsfaktor Rezeptorgebundenes Protein 2 (Grb2) an den aktivierten c-Fms Rezeptor rekrutiert. Dieser ist in der Lage, einen Komplex mit der extrazellulär signalregulierten Kinase (ERK) zu bilden. ERK wird ubiquitär exprimiert und ist Teil der Mitogen aktivierten Protein Kinase (MAPK) Familie. Sie vermittelt Proliferation und Differenzierung (Mancini et al. 1997; Hodge et al. 2011; Saulnier et al. 2012; Kim und Kim 2016). Durch die Kopplung von M-CSF an den Rezeptor c-Fms wird zusätzlich die Expression von RANK auf myeloischen Vorläuferzellen erhöht (Abb. 3) (Park-Min 2018; Zhu et al. 2021). Obwohl bereits seit Langem bekannt ist, dass sowohl M-CSF als auch RANKL einen entscheidenden Faktor im Rahmen der Osteoklastogenese spielen, sind die genauen Signaltransduktionswege, die durch M-CSF ausgelöst werden, noch Gegenstand aktueller Forschungen (Kim und Kim 2016; Zhu et al. 2021).

### 1.3.2. Effekt von RANKL auf die Osteoklastogenese

RANKL ist der Hauptmediator der Osteoklastogenese und wird von Osteoblasten, Osteozyten und Stromazellen des Knochenmarks exprimiert. Es wird entweder als Transmembranprotein in die Plasmamembran integriert, oder in den extrazellulären Raum sezerniert. RANKL bindet an den RANK auf der Oberfläche von Osteoklastenvorläuferzellen. RANK ist Teil der Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor (TNFR) Familie und spielt sowohl in der Entwicklung von Osteoklasten als auch bei der Bildung von Lymphknoten eine Rolle. Seine Expression in Osteoklastenvorläuferzellen wird durch M-CSF stimuliert (Mizukami et al. 2002; Takayanagi 2021). Da RANK selbst keine enzymatische Aktivität besitzt, rekrutiert er verschiedene TNFR assoziierte Faktoren (TRAF) zur Signaltransduktion. Das wichtigste Adapterprotein im Rahmen der Osteoklastogenese ist TRAF6. Es konnte zwar auch eine Interaktion zwischen RANK und den Faktoren TRAF1, TRAF2, TRAF3, und TRAF5 nachgewiesen werden, allerdings zeigten Untersuchungen an Knockout Mäusen, dass lediglich der Verlust von TRAF6 zu einem schweren osteopetrotischen Phänotyp führt (Darnay et al. 1998; Lomaga et al. 1999; Naito et al. 1999; Tomomura et al. 2012; Kim et al. 2019). TRAF6 ist nicht nur in der Lage, das RANKL/RANK induzierte Signal weiterzuleiten, sondern dient auch als Adapterprotein für

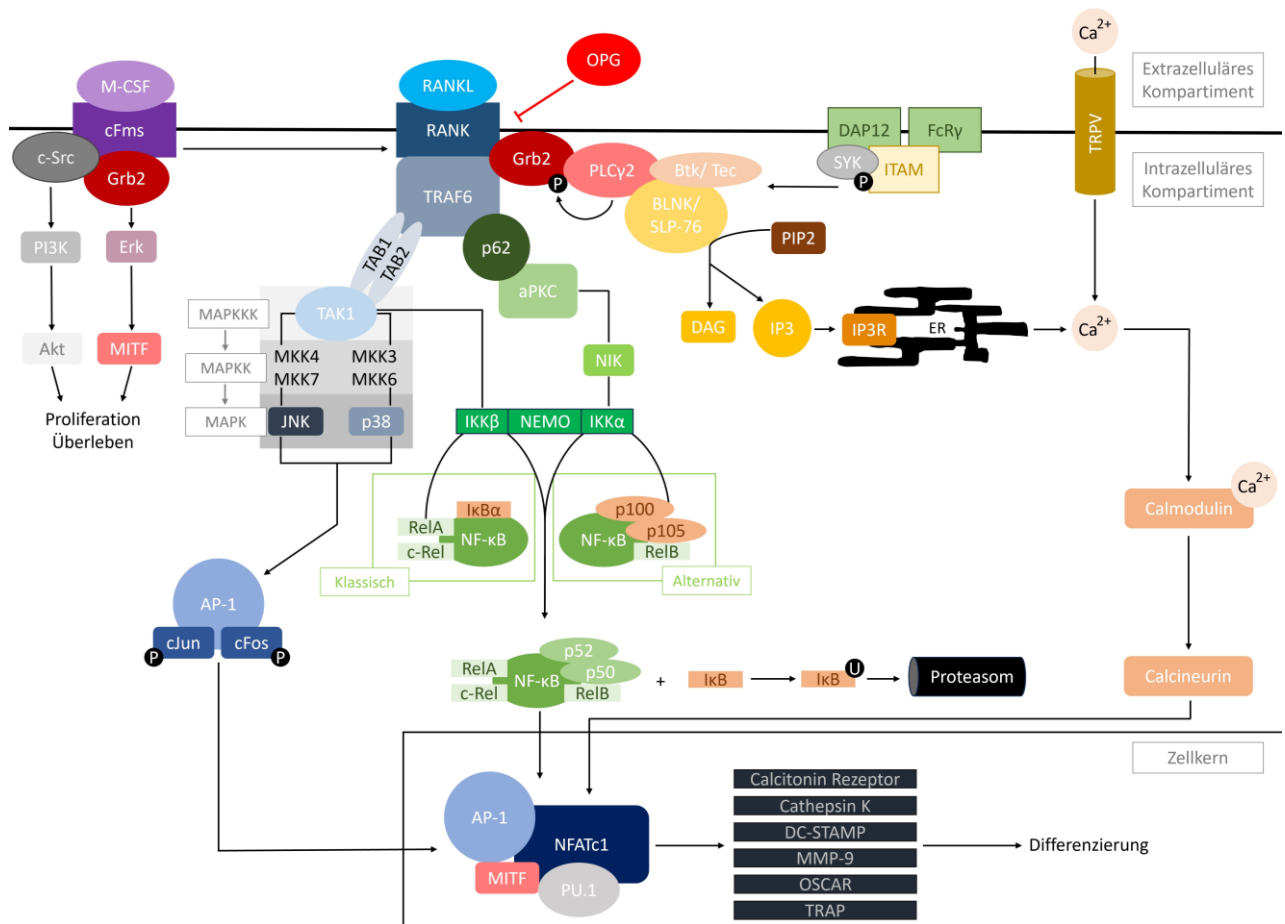
Unterscheidungsgruppe 40 (Cluster of Differentiation = CD40), Interleukin-1 (IL-1) und LPS. Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass nur RANK zur Initiierung der Osteoklastogenese in der Lage ist (Lomaga et al. 1999; Kadono et al. 2005). TRAF6 ist über verschiedene Mechanismen an der Aktivierung von ERK, PI3K, Aktivator-Protein-1 (AP-1) und Kernfaktor  $\kappa$  aktivierter B-Zellen (NF- $\kappa$ B) beteiligt (Lee et al. 2002a; Walsh et al. 2008; Son et al. 2012). Hierzu rekrutiert TRAF6 die transformierende Wachstumsfaktor  $\beta$ -aktivierte Kinase 1 (TAK1). Diese Bindung wird über die beiden Adapterproteine TAK1 bindendes Protein 1 (TAB1) und 2 (TAB2) vermittelt (Walsh et al. 2008; Park-Min 2018). TAK1 ist eine Mitogen aktivierte Proteinkinase Kinase Kinase (MAP3K/ MAPKKK). Sie aktiviert über den MAP-Kinase-Weg AP-1. Zusätzlich aktiviert die MAP3K über die Inhibitor von NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B)-Kinase (IKK) den NF- $\kappa$ B (Lee et al. 2002a; Mizukami et al. 2002; Lamothe et al. 2013). Der MAP-Kinase Weg vermittelt Proliferation, Differenzierung und Zelltod in Abhängigkeit von den vorherrschenden Umweltbedingungen. Er besteht aus einer dreistufigen Reaktion. Zu Beginn aktiviert eine MAP3-Kinase eine MAP Kinase Kinase (MAP2K/ MAPKK), die wiederum eine MAP Kinase (MAPK) aktiviert. Im Rahmen der Osteoklastogenese aktiviert TAK1 als MAP3K die Enzyme MAP Kinase Kinase 3 (MKK3), MAP Kinase Kinase 4 (MKK4), MAP Kinase Kinase 6 (MKK6) und MAP Kinase Kinase 7 (MKK7). Im letzten Schritt werden dann die MAPK c-Jun terminale Kinase (JNK) und p38 aktiviert. JNK wird von MKK4 und MKK7 stimuliert, während MKK3 und MKK6 einen positiven Effekt auf p38 haben (Davis 2000; David et al. 2002; Huang et al. 2006; Chiou et al. 2010; Landström 2010; Lamothe et al. 2013). JNK und p38 induzieren AP-1 durch Phosphorylierung von c-Jun und c-Fos. Der Transkriptionsfaktor AP-1 ist eine Verbindung aus verschiedenen Fos-, Aktivierenden Transkriptionsfaktor (ATF)- und Jun-Proteinen. Der MAPK Signalweg kann die Transkriptionsleistung von AP-1 positiv beeinflussen (Davis 2000; Matsumoto et al. 2000; David et al. 2002; Tanos et al. 2005). Neben seiner Bedeutung im MAPK Weg, phosphoryliert der TRAF6/ TAB1/ TAB2/ TAK1 Komplex die I $\kappa$ B-Kinase (IKK). Die IKK ist ein Komplex aus zwei katalytischen und einer regulatorischen Untereinheit. Die beiden katalytischen Untereinheiten IKK $\alpha$  und IKK $\beta$  vermitteln die Phosphorylierung von I $\kappa$ B-Proteinen. Ihre enzymatische Aktivität wird durch die regulatorische Untereinheit NF- $\kappa$ B essenzieller Modulator (NEMO/ IKK $\gamma$ ) kontrolliert (Rothwarf und Karin 1999; Ruocco et al. 2005; Taniguchi et al. 2014). IKK $\beta$  wird dabei vor allem über den MAPK Weg aktiviert, während IKK $\alpha$  hauptsächlich durch die atypische Proteinkinase C (aPKC) phosphoryliert wird. Hierfür bildet diese einen Komplex mit TRAF6, der über das Gerüstprotein p62 vermittelt wird (Kobayashi et al. 2001; Durán et al. 2004; Feng 2005; Park-Min 2018). Die NF- $\kappa$ B induzierende Kinase (NIK) ist in nicht aktivierten

Osteoklastenvorläuferzellen ein sehr instabiles Protein, das schnell durch Ubiquitinierung im Proteasom abgebaut wird. Durch Bindung von RANKL kommt es zur Stabilisierung der NIK, sodass diese in der Lage ist, IKK $\alpha$  zu aktivieren (Novack et al. 2003; Yang et al. 2010). Der IKK-Komplex vermittelt die Aktivierung von NF- $\kappa$ B über einen klassischen/ kanonischen und einen alternativen/ nicht-kanonischen Weg. Der klassische Weg wird vor allem durch IKK $\beta$  vermittelt und dient der Sicherstellung des Überlebens der Osteoklastenvorläuferzellen. Der alternative Weg wird durch IKK $\alpha$  vermittelt und initiiert die Transkription osteoklastenspezifischer Gene (Maruyama et al. 2010; Yang et al. 2010). NF- $\kappa$ B ist einer der wichtigsten Transkriptionsfaktoren der Osteoklastogenese. In nicht aktivierten Vorläuferzellen liegt er an I $\kappa$ B Proteine im Zytoplasma gebunden vor. Um seine Wirkung entfalten zu können, muss er in den Zellkern transloziert werden. Hierfür werden die I $\kappa$ B Proteine nach Aktivierung durch die IKK phosphoryliert, ubiquitiniert und im Proteasom abgebaut (Rothwarf und Karin 1999; Häcker und Karin 2006; Maruyama et al. 2010). NF- $\kappa$ B ist ein aus fünf Untereinheiten bestehender Proteinkomplex. Hierzu gehören die reifen Proteine RelA, RelB und c-Rel, sowie die Transkriptionsfaktoren p50 und p52. IKK $\beta$  katalysiert über den klassischen Weg die Abspaltung des I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteins von NF- $\kappa$ B und überführt dadurch RelA und c-Rel in ihren aktiven Zustand. IKK $\alpha$  vermittelt die Phosphorylierung des als I $\kappa$ B-wirkenden Proteins p100 über den alternativen NF- $\kappa$ B aktivierenden Weg. Die Reaktion führt zur Abspaltung des C-terminalen Endes und bringt das aktive p52 Protein hervor. Gleichzeitig läuft die Umwandlung von p105 in p50 in gleicher Weise ab. Die beiden Vorläuferfaktoren p100 und p105 agieren als I $\kappa$ B-Protein und halten dadurch NF- $\kappa$ B im Zytosol gebunden. Die beiden Transkriptionsfaktoren p52 und p50 formen einen Komplex mit RelB und ermöglichen NF- $\kappa$ B dadurch die Translokation vom Zytosol in den Zellkern (Aya et al. 2005; Otero et al. 2008; Vaira et al. 2008; Novack et al. 2003; Taniguchi et al. 2014). Neben AP-1 und NF- $\kappa$ B wird zusätzlich Ca<sup>2+</sup> für die Induktion des zytoplasmatischen nukleären Faktors aktivierter T-Zellen 1 (NFATc1) benötigt.

Durch die Bindung von RANKL an RANK wird die Phospholipase C $\gamma$  2 (PLC $\gamma$ 2) phosphoryliert. Gleichzeitig erfolgt eine Aktivierung durch ITAM-vermittelte c-Src/Milztyrosinkinase (SYK) abhängige Phosphorylierung (Kajiya 2012; Kim et al. 2019). Die PLC $\gamma$ 2 wird v. a. auf hämatopoetischen Vorläuferzellen exprimiert und initiiert im aktivierten Zustand die Rekrutierung von Grb-2 assoziiertem Binder 2 (GAB2) an RANK. Dieser Komplex aus RANK, GAB2 und PLC $\gamma$ 2 aktiviert AP-1 und NF- $\kappa$ B zusätzlich (Wada et al. 2005; Mao et al. 2006). Sowohl über eine RANKL- als auch über eine ITAM-induzierte Syk-abhängige Signalübertragung können zudem PLC $\gamma$ 2 und die Bruton-Tyrosinkinase (Btk)/Tec Protein

Tyrosinkinase (Tec) aktiviert werden. Durch Bildung eines Komplexes aus PLC $\gamma$ 2, Btk/ Tec und B-Zell Verbindungsprotein (BLNK)/ SH2-Domäne enthaltendes Leukozytenprotein von 76 kDa (SLP-76) wird die Spaltung von Phosphatidyl-Inositol-4,5-Bisphosphonat (PIP2) in Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-Triphosphat (IP3) katalysiert (Koga et al. 2004; Mao et al. 2006; Shinohara et al. 2008; Park-Min 2018). DAG aktiviert die membranständige Proteinkinase C (PKC). IP3 bindet an seinen Rezeptor Inositol-1,4,5-Triphosphat Rezeptor (IP3R) am endoplasmatischen Retikulum und induziert dadurch die Ca<sup>2+</sup> Freisetzung aus intrazellulären Speichern. Ca<sup>2+</sup> bindet an Calmodulin und aktiviert Calcineurin. Diese Proteinphosphatase dephosphoryliert Mitglieder der NFAT Familie und überträgt so die Ca<sup>2+</sup> vermittelten Signale. Durch die Dephosphorylierung kann NFATc1 in den Zellkern transloziert werden und dort die Transkription osteoklastenspezifischer Gene initiieren (Sun et al. 2007; Park-Min 2018; Kajiya 2012; Kang et al. 2020b). Diese Form der Ca<sup>2+</sup> Bereitstellung spielt vor allem in der frühen Phase der Osteoklastogenese eine Rolle. Sie nimmt mit zunehmender Differenzierung ab und wird sukzessive durch den Einstrom von Ca<sup>2+</sup> über transmembranäre Kanäle ersetzt. Hierzu gehört der speichergesteuerte Calcium Eingang (SOCE) sowie die transienten Rezeptorpotential Vanilloidkanäle (TRPV). SOCE ist ein Kanal in der Plasmamembran, der aufgrund von schwankenden Ca<sup>2+</sup> Konzentrationen einen Ca<sup>2+</sup>-Strom nach intrazellulär verursacht. Die TRPV-Familie besteht aus mehreren Kanälen, die verschiedene Funktionen erfüllen und in unterschiedlichen Differenzierungsstadien relevant sind. Neben der Induktion der PLC $\gamma$ 2 vermittelt RANKL die Bildung von TRPV2 in Präosteoklasten. TRPV4 stellt in den finalen Stadien der Osteoklastogenese die Bereitstellung von Ca<sup>2+</sup> sicher. In resorbierenden Osteoklasten findet sich TRPV4 und TRPV5 im Bereich der Ruffled Border (Masuyama et al. 2008; Chamoux et al. 2010; Kajiya et al. 2010; Huang et al. 2020; Kang et al. 2020b).

Durch das Zusammenspiel von AP-1, NF $\kappa$ B und Ca<sup>2+</sup> wird NFATc1 schließlich induziert. Es ist in die Lage, die Faktoren PU.1, Mikrophthalmie assoziierter Transkriptionsfaktor (MITF) und AP-1 zu rekrutieren, welche gemeinsam einen Transkriptionskomplex formen, um die Transkription osteoklastenspezifischer Gene zu initiieren. Hierzu gehören der Osteoklasten-assoziierte Rezeptor (OSCAR), TRAP, Cathepsin K, Calcitonin Rezeptor, MMP9 und das dendritische zellspezifische Transmembranprotein (DC-STAMP) (Abb. 3) (Feng 2005; Granfar et al. 2005; Asagiri und Takayanagi 2007; Sørensen et al. 2007; Nemeth et al. 2011; Barrow et al. 2011; Nedeva et al. 2021).



**Abb. 3: Osteoklastogenese**

AP-1 = Aktivator-Protein-1, aPKC = atypische Proteinkinase C, BLNK = B-Zell Verbindungsprotein, Btk = Bruton-Tyrosinkinase,  $Ca^{2+}$  = Calcium, c-Fms = Koloniestimulierender Faktor 1 Rezeptor, c-Src = Akronym cellular sarcoma, DAG = Diacylglycerol, DAP12 = DNAX aktivierendes Protein von 12 kDa, DC-STAMP = Dendritisches Zellspezifisches Transmembranprotein, ER = Endoplasmatisches Retikulum, Erk = Extrazelluläre Signalregulierte Kinase, FcR $\gamma$  = FcR $\gamma$ -Kette, I $\kappa$ B = Inhibitor von NF- $\kappa$ B, IKK = I $\kappa$ B-Kinase, IP3 = Inositol-1,4,5-Triphosphat, IP3R = Inositol-1,4,5-Triphosphat Rezeptor, ITAM = Immunrezeptor Tyrosinbasiertes Aktivierungsmotiv, JNK = c-Jun terminale Kinase, Grb2 = Wachstumsfaktor Rezeptorgebundes Protein 2, MAPK = Mitogen aktivierte Proteinkinase, MAPKK = Mitogen aktivierte Proteinkinase Kinase, MAPKKK = Mitogen aktivierte Proteinkinase Kinase Kinase, M-CSF = Makrophagen-Kolonie-stimulierendem Faktor, MITF = Mikrophthalmie assoziierter Transkriptionsfaktor, MKK = MAP Kinase Kinase, MMP-9 = Matrix-Metalloproteinase-9, NEMO = NF- $\kappa$ B essenzieller Modulator, NFATc1 = Zytoplasmatischer nukleärer Faktor aktivierter T-Zellen 1, NF- $\kappa$ B = Kernfaktor  $\kappa$  aktivierter B-Zellen, NIK = NF- $\kappa$ B induzierende Kinase, OSCAR = Osteoklastenassoziiertes Rezeptor, PI3K = Phosphoinositid 3 Kinase, PIP2 = Phosphatidyl-Inositol-4,5-Bisphosphonat, PLC $\gamma$ 2 = Phospholipase C $\gamma$ 2, RANK = Rezeptor Aktivator von NF $\kappa$ B, RANKL = Rezeptor Aktivator von NF $\kappa$ B Ligand, SLP-76 = SH2-Domäne enthaltendes Leukozytenprotein von 76 kDa, SYK = Milztyrosinkinase, TAB1 = TAK1 bindendes Protein 1, TAB2 = TAK1 bindendes Protein 2, TAK1 = Transformierende Wachstumsfaktor- $\beta$ -aktivierte Kinase 1, Tec = Tec Protein Tyrosinkinase, TRAF6 = TNF Rezeptor assoziierter Faktor 6, TRAP = Tartratresistente-saure-Phosphatase, TRPV = Transienter Rezeptorpotential Vanilloidkanal. Modifizierte Darstellung nach Frank et al. 1997; Davis 2000; Yavropoulou und Yovos 2008; Kajiya 2012; Taniguchi et al. 2014; Kim und Kim 2016; Park-Min 2018; Kong et al. 2020; Kang et al. 2020a; Nedeva et al. 2021.

### 1.3.3. Kostimulatorische Signale

Neben M-CSF und RANKL spielen kostimulatorische Signale der ITAMs eine Rolle. Diese sind sowohl an der Osteoklastogenese, als auch an der Knochenresorption durch reife Osteoklasten beteiligt. ITAMs sind Bestandteil vieler Immunrezeptoren und bestehen aus einer evolutionär hochkonservierten Sequenz. Sie werden in myeloischen Zellen exprimiert. Es handelt sich um sehr kleine Proteine, die im Zytoplasma lokalisiert sind. Sie besitzen keine extrazelluläre Domäne, sodass sie Adapterproteine benötigen, um Signale von außen verarbeiten zu können. Im Rahmen der Osteoklastogenese sind die beiden Transmembran-Adapterproteine DNAX aktivierendes Protein von 12 kDa (DAP12) und die Fc-Rezeptor- $\gamma$ -Kette (FcR $\gamma$ ) von Bedeutung (van Beek et al. 2009; Hamerman et al. 2009; Zou et al. 2010; Humphrey und Nakamura 2016). DAP12 und FcR $\gamma$  haben ihrerseits nur minimale extrazelluläre Domänen und sind daher im transmembranären Bereich über unterschiedlich geladene Aminosäuren an verschiedene Rezeptoren gekoppelt (Otero et al. 2009; Kameda et al. 2013). DAP12 ist ein Bindeglied zwischen Transmembranrezeptoren und ITAM. Es wird in vielen Zellen des angeborenen Immunsystems, wie natürlichen Killerzellen, Lymphozyten und myeloischen Zellen, wie den Osteoklastenvorläuferzellen exprimiert (Lanier und Bakker 2000; Zou et al. 2008; Hamerman et al. 2009; Humphrey und Nakamura 2016). Es ist mit einer Vielzahl an Rezeptoren, wie dem Triggerrezeptor auf myeloischen Zellen 2 (TREM2), dem myeloischen DAP12 assoziierten Lektin 1 (MDL-1), dem Signalregulationsprotein  $\beta$ 1 (SIRP $\beta$ 1) und dem Sialinsäurebindenden immunglobulinähnlichen Lektin 15 (Siglec-15) assoziiert (Zou et al. 2010; Ishida-Kitagawa et al. 2012; Zou und Teitelbaum 2015; Park-Min 2018). Welche Liganden für die Aktivierung der Rezeptoren verantwortlich sind, ist noch Gegenstand aktueller Forschungen. TREM2 ist ein DAP12 assoziierter Rezeptor und kommt sowohl in myeloischen Zellen wie Makrophagen und Osteoklastenvorläuferzellen als auch in neuronalen Mikroglia-Zellen vor. In Anwesenheit von RANKL wird er verstärkt exprimiert und hat einen positiven Effekt auf die Osteoklastogenese und die Multinukleation. Als Liganden konnten bislang verschiedene Bakterien, Dextransulfat und das Hitzeschockprotein-60 (HSP-60) identifiziert werden (Daws et al. 2003; Ishikawa et al. 2004; Colonna et al. 2007; Stefano et al. 2009; Humphrey und Nakamura 2016). MDL-1 ist ein Typ II Transmembranrezeptor, der in myeloischen Zellen wie Makrophagen und Monozyten vorkommt. Aufgrund seiner sehr kleinen intrazellulären Domäne, benötigt er für die weitere Signaltransduktion DAP12 als Adapterprotein. Bislang ist ausschließlich das Dengue-Virus als Ligand bekannt (Watson und O'Callaghan 2010; Humphrey und Nakamura 2016). SIRP $\beta$ 1 ist ein Glykoprotein, das auf der Zellmembran von Monozyten und dendritischen Zellen lokalisiert

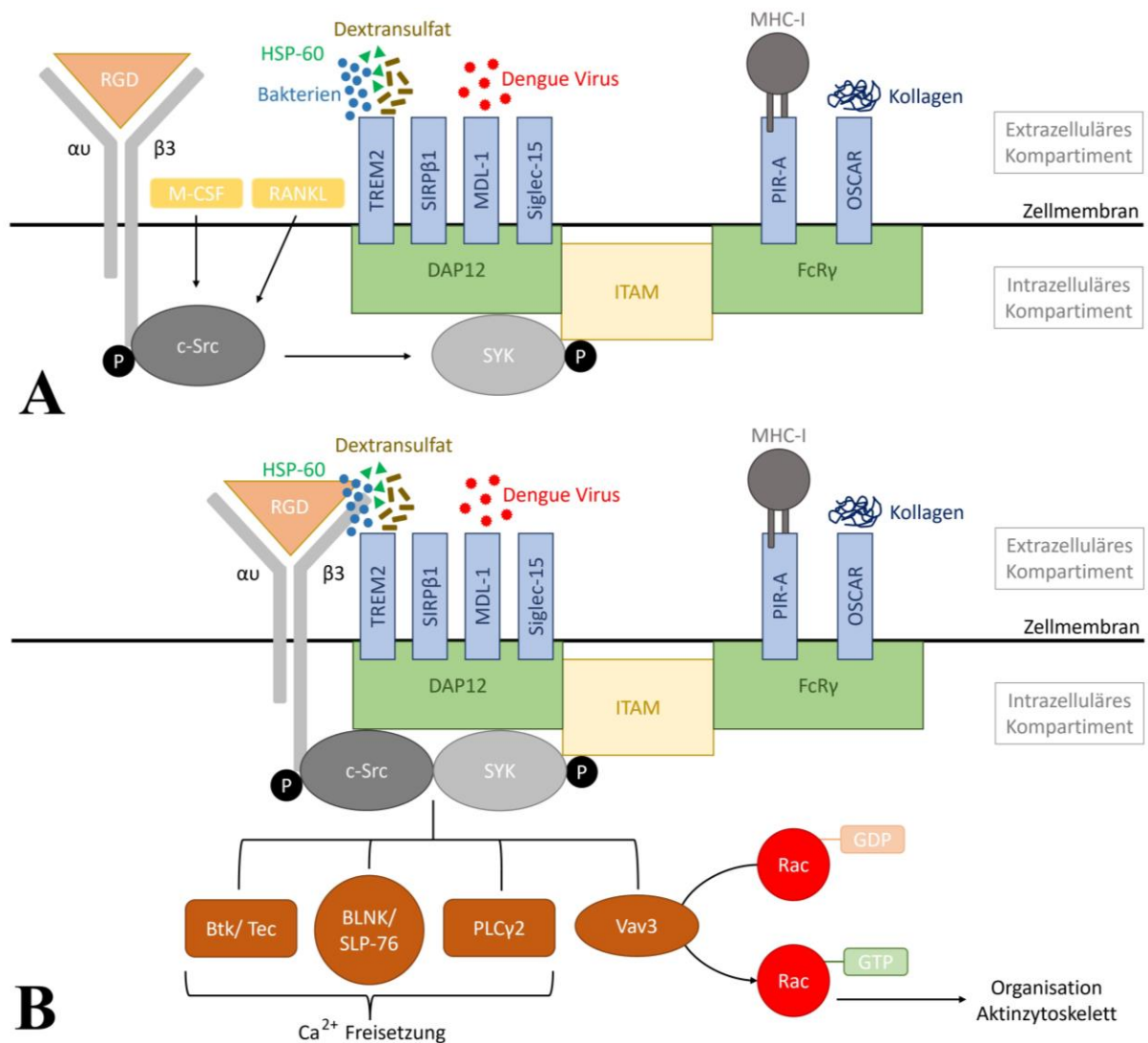
ist. Es hat ähnlich wie MDL-1 nur einen sehr kleinen zytoplasmatischen Anteil, sodass es für die weiteren Signaltransduktion DAP12 als Adapterprotein benötigt. Bislang gibt es keine Informationen hinsichtlich eines natürlichen Liganden. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass das Masernvirus Nukleokapsidprotein an SRIP $\beta$ 1 bindet, RANKL-unabhängig die Osteoklastogenese fördert und dadurch zu einem Morbus Paget führen kann (Dietrich et al. 2000; Sundaram et al. 2017). Siglec-15 ist ein hochkonservierter Typ I Transmembranrezeptor der Siglec-Familie, der auf Makrophagen und dendritischen Zellen zu finden ist. Er bindet endständige sialylierte Glykane und hat dadurch einen positiven Effekt auf die Osteoklastogenese. Studien haben zudem eine deutlich erhöhte Expression von Siglec-15 in Riesenzelltumoren gezeigt (Hiruma et al. 2011; Kang et al. 2020a; Rashid et al. 2022; Huang et al. 2023). Neben DAP12 dient auch FcR $\gamma$  als Adapterprotein für ITAM. Auch FcR $\gamma$  fehlt die extrazelluläre Domäne, sodass er sich mit ligandenbindenden Rezeptoren zusammenschließen muss, um die extrazellulären Signale weiterleiten zu können. FcR $\gamma$  kommt in fast allen Zellen des angeborenen Immunsystems, sowie in Monozyten und Makrophagen vor. Er ist mit dem OSCAR und dem gepaarten Ig-ähnlichen Rezeptor A (PIR-A) assoziiert. Bislang ist nur wenig über den Wirkmechanismus von FcR $\gamma$  bekannt, es konnte jedoch gezeigt werden, dass mit seiner Aktivierung eine verstärkte Osteoklastogenese einhergeht (Ishikawa et al. 2004; Negishi-Koga et al. 2015; Humphrey und Nakamura 2016). Die Expression von OSCAR wird im Rahmen der Osteoklastogenese durch einen Transkriptionskomplex aus NFATc1, MITF, AP1 und PU.1 initiiert. Durch die Vermittlung der Signaltransduktion an FcR $\gamma$  führt OSCAR zu einer Verstärkung der Osteoklastogenese und seiner eigenen Transkription über NFATc1. Als Ligand bindet er verschiedene Kollagene wie Kollagen I, II und III sowie die extrazelluläre Matrix. Auch wenn OSCAR im Laufe der Entwicklung von Osteoklasten vermehrt exprimiert wird, ist er nicht spezifisch für Osteoklasten, sondern ist auch auf Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen zu finden. Er ist als Teil der Leukozyten-Rezeptor-Komplex (LRC) kodierenden Familie auch an der angeborenen und erworbenen Immunantwort beteiligt (Kim et al. 2002; Sørensen et al. 2007; Nemeth et al. 2011; Haywood et al. 2016). PIR-A wurde als FcR $\gamma$ -assoziiertes Rezeptor in murinen Osteoklasten nachgewiesen. Bislang ist allerdings noch unklar, ob er auch in humanen Osteoklasten exprimiert wird. In Mäusen wird er durch Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) Klasse I Moleküle stimuliert (Abb. 4A) (Humphrey und Nakamura 2016). Untersuchungen an Knockout-Mäusen haben gezeigt, dass sowohl der Verlust einer der Rezeptoren als auch das Fehlen von DAP12 und FcR $\gamma$  selbst, zu einem schweren osteopetrotischen Phänotyp führt. Die Osteopetrose ist aber nicht auf eine fehlregulierte Differenzierung, sondern hauptsächlich auf eine gestörte Knochenresorption

zurückzuführen. Die Zellen sind dann nicht mehr in der Lage, Resorptionszonen mithilfe des Zytoskeletts einzurichten. Wenn nur eines der beiden Transmembran-Adapterproteine fehlt, zeigt sich ein unauffälliges klinisches Bild, sodass der Verlust eines Adapters durch den anderen kompensiert werden kann (Zou et al. 2007; Zou et al. 2010; Zou und Teitelbaum 2015).

Sobald ein Ligand an einen DAP 12 oder FcR $\gamma$  assoziierten Rezeptor bindet, wird das ITAM durch Phosphorylierung aktiviert. Es dient dann als Bindungsstelle für die SYK (Lanier und Bakker 2000; Zou et al. 2007; Hamerman et al. 2009; Otero et al. 2009). SYK ist eine Nicht-Rezeptor-Tyrosin-Kinase, die hauptsächlich in hämatopoetischen Zellen exprimiert wird. Neben ihrer Funktion im Rahmen der Osteoklastogenese, spielt SYK auch bei verschiedenen Immunreaktionen eine Rolle. Die Aktivierung von SYK erfolgt durch c-Src-vermittelte Phosphorylierung (Mócsai et al. 2004; Kong et al. 2020; Xie et al. 2021). Phosphoryliertes SYK bildet einen Komplex mit c-Src und dem  $\alpha\beta 3$ -Integrin. Dieser Komplex ist ein Bindeglied zwischen der ITAM- und der M-CSF-/ RANKL-vermittelten Signaltransduktion. Das  $\alpha\beta 3$ -Integrin ist das am häufigsten vorkommende Integrin in Osteoklasten und wird durch Kontakt zu einer Arginin-Glycin-Asparaginsäure-Sequenz (RGD)-haltigen extrazellulären Matrix an den Knochen gebunden (Ross und Teitelbaum 2005; Chamoux et al. 2010; Xiang et al. 2019). C-Src ist eine Tyrosinkinase, die ubiquitär in einer Vielzahl an Geweben exprimiert wird. Im Rahmen der Osteoklastogenese ist seine Transkription und Aktivität durch M-CSF und RANKL Stimulation erhöht. Es katalysiert gemeinsam mit dem  $\alpha\beta 3$ -Integrin die Phosphorylierung von SYK (Schwartzberg et al. 1997; Yeon et al. 2014; Kong et al. 2020; Matsubara et al. 2022). Der Komplex aus  $\alpha\beta 3$ -Integrin, c-Src und SYK ist in der Lage verschiedene nachgeschaltete Mediatoren zu aktivieren. Hierzu gehört der Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor Vav3, PLC $\gamma 2$ , der Btk/Tec Protein Tyrosinkinase Komplex und der BLNK/ SLP-76 Komplex (Zou et al. 2007; Park-Min 2018). Vav3 überführt die Rho-GTPase Rac vom inaktiven GDP-gebundenen Zustand in den aktiven GTP-gebundenen Zustand. Aktiviertes Rac ist in der Lage, das Aktinzytoskelett zu organisieren. In Untersuchungen, die den Verlust des  $\alpha\beta 3$ -Integrin/ c-Src/ SYK Komplexes oder von Vav3 simuliert haben, zeigte sich eine reduzierte Knochenresorption. Die Zellen konnten sich zwar zu reifen Osteoklasten differenzieren, zeichneten sich allerdings durch eine deutlich eingeschränkte Mobilität aus. Sie waren nicht mehr in der Lage, ihr Zytoskelett zu einer knochenanhaftende Resorptionszone zu organisieren (Faccio et al. 2005; Zou et al. 2007; Croke et al. 2011; Goldberg et al. 2012). Der Komplex aus PLC $\gamma$ , Btk/Tec Protein Tyrosinkinase und BLNK/ SLP-76 verbindet ebenfalls die RANKL- und die ITAM-induzierten Signalwege. Er spielt eine wichtige Rolle in der

Bereitstellung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus intrazellulären Speichern (Abb. 4B) (Kajiya 2012; Park-Min 2018; Kim et al. 2019).

Zusammenfassend spielen die kostimulatorischen ITAM-vermittelten Signale eine wichtige Rolle in der  $\text{Ca}^{2+}$  Bereitstellung und der Organisation des Aktinzytoskeletts. Es bestehen mehrere Verbindungen zur M-CSF- und RANKL- induzierten Signalkaskade.



**Abb. 4: ITAM vermittelte Signaltransduktion**

Neben der M-CSF und RANKL-induzierten Osteoklastogenese gibt es zahlreiche kostimulatorische Signalkaskaden. (A) Das intrazellulär lokalisierte ITAM ist an die Adapterproteine (grün) DAP12 und FcRγ gebunden. Diese sind im transmembranären Bereich mit verschiedenen Rezeptoren (blau) assoziiert. M-CSF und RANKL (gelb) sind an der Aktivierung von c-Src und αβ3-Integrin beteiligt. c-Src phosphoryliert (schwarz) an DAP12 gebundenes SYK. (B) Der αβ3-Integrin/ c-Src/ SYK Komplex aktiviert (braun) den Btk/Tec Komplex, den BLNK/ SLP-76 Komplex, die PLCγ2 und Vav3. Btk/Tec, BLNK/ SLP-76 und PLCγ2 sind an der Ca<sup>2+</sup> Freisetzung beteiligt. Vav3 überführt die GTPase Rac (rot) in ihren aktiven GTP-gebundenen Zustand. Diese ist an der Organisation des Aktinzytoskeletts beteiligt. BLNK = B-Zell Verbindungsprotein, Btk = Bruton-Tyrosinkinase, c-Src = Akronym cellular sarcoma, DAP12 = DNAX aktivierendes Protein von 12 kDa, FcRγ = FcRγ -Kette, HSP-60 = Hitzeschockprotein-60, ITAM = Immunrezeptor Tyrosinbasiertes Aktivierungsmotiv, M-CSF = Makrophagen-Koloniestimulierendem Faktor, MDL-1 = Myeloisches DAP12 assoziiertes Lektin 1, MHC-I = Haupthistokompatibilitätskomplex, OSCAR = Osteoklastenassoziierter Rezeptor, PIR-A = Gepaarter Ig-ähnlicher Rezeptor A, PLCγ2 = Phospholipase Cγ2, RANKL = Rezeptor Aktivator von NFκB Ligand, RGD = Arginin-Glycin-Asparaginsäure-Sequenz, Siglec-15 = Sialinsäurebindenden immunglobulinähnlichen Lektin 15, SIRPβ1 = Signalregulationsprotein β1, SLP-76 = SH2-Domäne enthaltendes Leukozytenprotein von 76 kDa, SYK = Milztyrosinkinase, Tec = Tec Protein Tyrosinkinase, TREM2 = Triggerrezeptor auf myeloischen Zellen 2, Vav3 = Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor Vav3. Modifizierte Darstellung nach Zou et al. 2007; Humphrey und Nakamura 2016 und Park-Min 2018.

## 1.4. Bioglas

Bioglas beschreibt eine heterogene Gruppe an Knochenersatzmaterialien, die auf das 1971 von Larry Hench entwickelte Bioglas 45S5 zurückzuführen sind (Hench 2013). Bioglas 45S5 setzt sich aus 45 % Kieselsäure ( $\text{SiO}_2$ ), 24,5 % Calciumoxid ( $\text{CaO}$ ), 24,5 % Natriumoxid ( $\text{Na}_2\text{O}$ ) und 6 % Phosphorpentoxid ( $\text{P}_2\text{O}_5$ ) zusammen. Die Zusammensetzung und Konzentration der einzelnen Komponenten ähneln stark dem Knochen (Krishnan und Lakshmi 2013). Im Laufe der Zeit konnten weitere Biogläser entwickelt werden, die sich hinsichtlich ihrer Zusammensetzung oder ihrer Herstellung von Bioglas 45S5 unterscheiden (Kargozar et al. 2019). Bei Kontakt mit lebendem Gewebe kommt es zu einer starken Oberflächenreaktion mit Freisetzung der einzelnen Bestandteile. Diese sind in der Lage, die Knochenbildung zu initiieren (Jones 2013; Cannio et al. 2021).

Zahlreiche Studien berichten von einem hohen Maß an Biokompatibilität. Untersuchungen an Bioglas 45S5 und Bioglas 1393 haben gezeigt, dass eine große Menge osteoblastischer Gene, die mit der Mineralisation in Verbindung stehen, hochreguliert werden (Matsuda und Davies 1987; Xynos et al. 2000a; Silver et al. 2001; Brown et al. 2008; Ferraz et al. 2017; Ferreira et al. 2021).

Auch wenn der osteogene Effekt von Bioglas immer wieder hervorgehoben wird, gibt es bislang kaum Informationen bezüglich der Wirkung von Bioglas auf Osteoklasten. Detsch et al. konnten in einer *in vitro* Untersuchung an murinen RAW 264.7 Zellen eine Lebensfähigkeit von 100 % sowie eine vermehrte Expression von Cathepsin K feststellen. Insgesamt ist der Effekt jedoch abhängig von der verwendeten Menge an Bioglas (Detsch et al. 2016).

Diba et al. konnten im Rahmen einer *in vitro* Untersuchung an murinen RAW 246.7 Zellen mit Kontakt zu Bioglas 45S5 einen anti-osteoklastogenen Effekt feststellen. Allerdings wurde das Bioglas 45S5 in dieser Untersuchung mit Alendronat hybridisiert, welches ebenfalls hemmend auf Osteoklasten wirkt. Es kann also nicht sicher gesagt werden, wovon die hemmende Wirkung ausgeht (Diba et al. 2019).

Dennoch konnte Bosetti et al. bei Untersuchungen an 77S Bioglas eine signifikant geringere Menge TRAP positiver Zellen feststellen (Bosetti und Cannas 2005).

Derzeit sind ungefähr 25 verschiedene Biogläser für den medizinischen Gebrauch zugelassen. Sie finden Anwendung als Knochenersatzmaterial, im Rahmen der Wundheilung, in

zahnmedizinischen Behandlungen und als Träger von Medikamenten zur lokalen Applikation (Cannio et al. 2021; Shearer et al. 2023).

### 1.5. Fragestellung und Zielsetzung

Bioglas ist ein vielversprechendes Knochenersatzmaterial, dessen osteoinduktive Wirkung bereits in zahlreichen Studien hervorgehoben wurde. Es konnte gezeigt werden, dass Bioglas Osteoprogenitorzellen zur Differenzierung anregt und die Expression osteoblastischer Gene, die mit der Mineralisation in Verbindung stehen, hochreguliert. Trotz der zahlreichen in vitro und in vivo Untersuchungen mit Bioglas, gibt es kaum Erkenntnis über den Effekt auf Osteoklasten. Untersuchungen an murinen Osteoklasten mit Kontakt zu Bioglas 45S5 konnten zeigen, dass eine Differenzierung möglich ist. Es gibt jedoch auch Hinweise darauf, dass diese in ihrer Aktivität eingeschränkt sein könnten. Insgesamt gibt es noch keine Untersuchung an humanen Osteoklasten. Zudem liegt der Schwerpunkt vieler Untersuchungen auf Bioglas 45S5, sodass es nur wenige Informationen zu anderen Biogläsern gibt.

Das Ziel dieser Untersuchung ist es, erste Informationen hinsichtlich des Effekts von Bioglas auf humane Osteoklasten zu erhalten. Neben dem seit Langem bekannten und häufig als Referenz verwendeten Bioglas 45S5, sollen weitere Bioglas-Varianten untersucht werden. In dieser Untersuchung werden hierfür Bioglas 1393, Bioglas 1393 BS und eine gesinterte Variante von Bioglas 1393 (1393 ges) einander gegenübergestellt. Konkret sollen dabei folgende Fragen untersucht werden:

1. Welchen Effekt haben die hier untersuchten Biogläser auf die Differenzierung von humanen Osteoklasten?
2. Welchen Effekt haben die hier untersuchten Biogläser auf die Aktivität von humanen Osteoklasten?
3. Gibt es ein Bioglas, das besonders positiv oder negativ hervorsteht?
4. Sind die hier verwendeten Methoden geeignet, um Bioglas exponierte Osteoklasten zu untersuchen?

Als Grundlage dieser Untersuchung dient die Isolation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs = Peripheral blood mononuclear cells). Diese sollen unter Stimulation von M-CSF und RANKL in einer Zellkultur zu Osteoklasten differenziert werden. Dabei werden sie jeweils mit einer Art von Bioglas kultiviert. Um den Erfolg des

Differenzierungsprozesses überprüfen zu können, soll die Expression verschiedener Gene untersucht werden. Bildmorphologische Untersuchungen wie die Lebendzellbeobachtung und die immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchung liefern einen Hinweis darauf, wie weit die Zellen in ihrer Entwicklung vorangeschritten sind. Mithilfe von funktionellen Assays und einer rasterelektronenmikroskopischen Analyse soll die Aktivität der Zellen erfasst werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Bioglas

Die verwendeten Biogläser wurden von Qaisar Nawaz aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Aldo R. Boccaccini des Lehrstuhls für Werkstoffwissenschaften (Biomaterialien) der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg zur Verfügung gestellt. Insgesamt wurden vier verschiedene Biogläser untersucht. Neben dem bereits in zahlreichen Studien untersuchten Bioglas 45S5 wurde zusätzlich Bioglas 1393 mit Borosilikat (1393 BS) sowie Bioglas 1393 und eine gesinterte Variante von Bioglas 1393 (1393 ges) analysiert. Die Biogläser haben einen Durchmesser von 0,5 cm bei einem Gewicht von 100 mg. Die chemische Zusammensetzung ist Tabelle 1 (Tab. 1) zu entnehmen.

**Tab. 1: Chemische Zusammensetzung der Biogläser**

Zusammensetzung [wt. %]	Na <sub>2</sub> O	K <sub>2</sub> O	MgO	CaO	B <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	SiO <sub>2</sub>
<b>45S5</b>	24.5	0	0	24.5	0	6	45
<b>1393</b>	6	12	5	20	0	4	53
<b>1393 BS (0106-B2)</b>	5.9	12	5.5	22.6	25	4	25

B<sub>2</sub>O<sub>3</sub> = Bortrioxid, CaO = Calciumoxid, K<sub>2</sub>O = Kaliumoxid, MgO = Magnesiumoxid, Na<sub>2</sub>O = Natriumoxid, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> = Phosphorpentoxid, SiO<sub>2</sub> = Siliciumdioxid/ Kieselsäure, wt. % = Massenanteil

### 2.2. Zellkultur

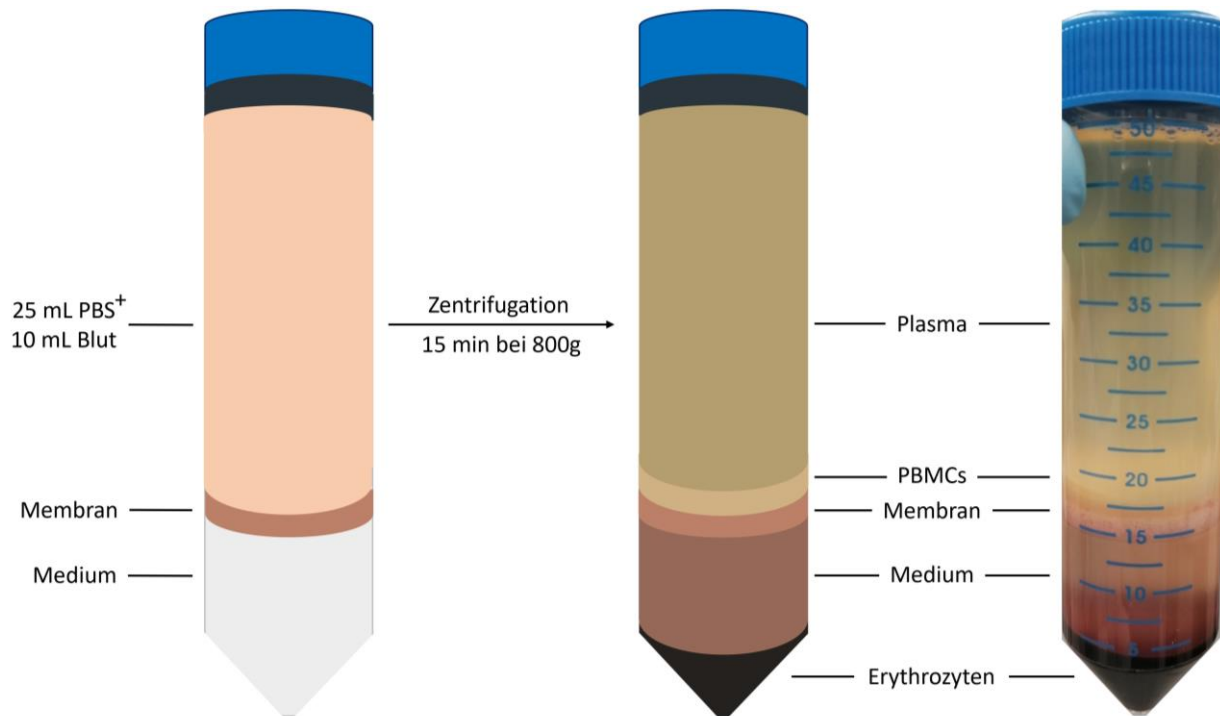
#### 2.2.1. Zellkulturmedium

Das Zellkulturmedium setzt sich zu 89,8 % aus Minimum Essential Medium –  $\alpha$  Modifikation ( $\alpha$ MEM, Gibco, Life Science Technologies, Grand Island, New York, USA), 10 % hitzeinaktiviertem fetalem Kälberserum (hi-FBS, Biochrom, Berlin, Deutschland) und 0,2 % Gentamicin/ Amphotericin (Gibco, Life Science Technologies) zusammen. Dieses Grundmedium wurde zusätzlich mit 0,005 % RANKL (Santa Cruz Biotechnologies Inc., Dallas, Texas, USA) und 0,005 % M-CSF (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) versetzt.

### 2.2.2. Isolation von PBMCs

Für die Zellkultur wurden PBMCs aus humanem Vollblut von 6 Spendern ( $n = 6$ ) isoliert. Diese wurde in Form eines Buffy Coats durch das Blutspendezentrum des Instituts für klinische Immunologie und Transfusionsmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen (Gießen, Deutschland) anonymisiert zur Verfügung gestellt. Die Ethikkommission der medizinischen Fakultät hat der Nutzung der Blutprodukte zugestimmt (05/2000).

Zunächst wurde eine mit Zusätzen versehene phosphatgepufferte Salzlösung (PBS, Gibco, Life Science Technologies) hergestellt. Diese setzt sich aus 98 % PBS, 2 % hi-FBS (Biochrom) und 1 Millimol (mM) Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) zusammen. Diese mit Zusätzen versehene Lösung wird im Folgenden vereinfacht als PBS<sup>+</sup> bezeichnet. Zunächst wurden 25 mL PBS<sup>+</sup> auf eine Temperatur von 4 °C gekühlt und mit 10 mL Blut gemischt. Diese Lösung wurde in einem Leucosep-Röhrchen (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) 15 min lang bei 800 g ohne Bremse einer Dichtegradientenzentrifugation unterzogen. Hierdurch werden die verschiedenen Zellen voneinander entsprechend ihrer Dichte aufgetrennt. Die PBMCs sind dann als dünne hellgelbliche Schicht unter dem überstehenden Plasma zu finden (Abb. 5).



**Abb. 5: Dichtegradientenzentrifugation**

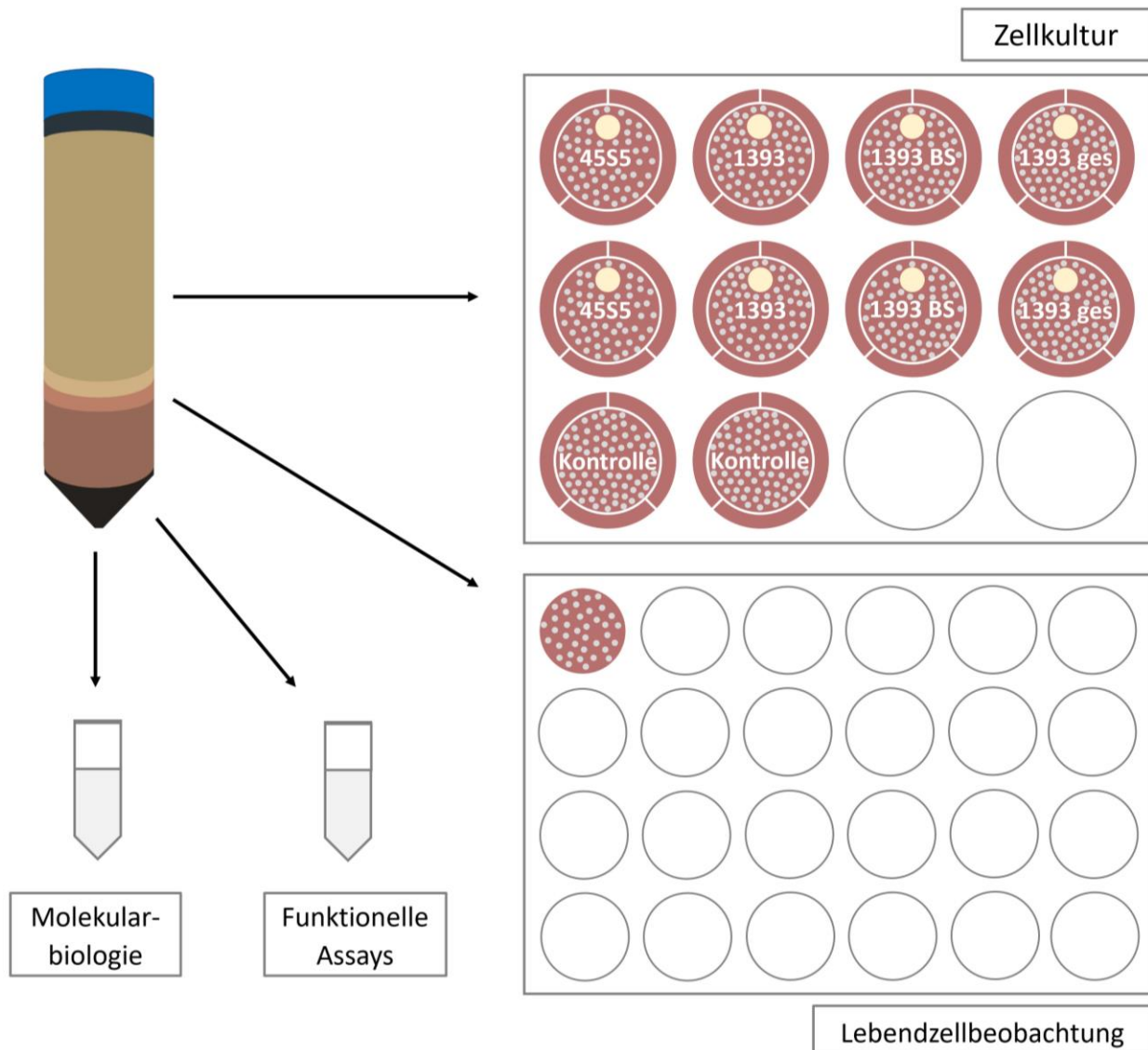
Dichtegradientenzentrifugation des Leucosep™ Röhrens nach Zugabe von 25 mL PBS<sup>+</sup> und 10 mL Blut. Diese werden durch eine poröse Membran vom Separationsmedium abgetrennt. Foto rechts vom 24.06.2020. Modifizierte Darstellung nach Collon et al. 2023; Matt und Bergemann 2019.

Nachdem das Plasma abpipettiert wurde, konnten die darunterliegenden PBMCs in ein neues Röhren transferiert und mit 50 mL PBS<sup>+</sup> aufgefüllt werden. Die Lösung wurde für 5 min bei 450 g ohne Bremse zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wurde das Zellpellet zweimal in 30 mL PBS<sup>+</sup> resuspendiert und für 10 min bei 120 g ohne Bremse zentrifugiert. Nun folgte die Zellzählung mithilfe des Casy Zellzählers Modell TTC (Omni Life Science GmbH & Co. KG, Bremen, Deutschland). Insgesamt wurde  $5 \times 10^7$  Zellen mit PBS<sup>+</sup> auf 2 mL in einem Polystyrene Röhren (Sarstedt, Nürnberg, Deutschland) aufgefüllt und mit 100 µL EasySep™ humane Monozyten Anreicherungsset (STEMCELL Technologies Inc., Vancouver, Kanada) versetzt. Diese Lösung wurde für 10 min bei 2 – 8 °C gelagert. Im Anschluss wurden 100 µL EasySep™ magnetische Partikel für humane Monozyten (STEMCELL Technologies Inc.) hinzugefügt. Diese sind in der Lage nicht-monozytäre Zellen, entsprechend dem Prinzip der negativen Selektion, mit einem magnetischen Antikörper zu binden. Nach 5 min wurde das Röhren in den EasySep™ Magneten gestellt (STEMCELL Technologies Inc.). Dadurch werden alle nicht-monozytären Zellen mit magnetischem Antikörper an den Magneten gebunden. Nach weiteren 2,5 min konnten dann die monozytären, nicht an den Magneten gebundenen Zellen in ein neues Röhren gekippt und für 5 min bei 450 g ohne Bremse

zentrifugiert werden. Die Zellen wurden erneut in 1 mL PBS<sup>+</sup> resuspendiert, sodass eine erneute Bestimmung der Anzahl der vitalen Zellen mittels Casy Zellzähler durchgeführt werden konnte.

Zur Aussaat der Zellen wurde eine 12-Well Multiwell Platte (Greiner Bio One) mit TC-Inserts (Sarstedt) mit jeweils 2 mL Zellkulturmedium vorbereitet. Es wurden jeweils 600.000 Zellen in die TC-Inserts ausgesät und mit weiteren 2 mL Zellkulturmedium bedeckt. Es wurden jeweils 2 Wells pro Bioglas sowie 2 Wells ohne Fremdmaterial angesetzt. In einer weiteren 24-Well Multiwell Platte (Greiner Bio One) wurden 600.000 Zellen in 1 mL Zellkulturmedium ausgesät. Diese Platte diente der Lebendzellbeobachtung. Beide Multiwell Platten wurde für 8 Tage bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in einem Brutschrank inkubiert (Abb. 6). An Tag 2, 4 und 6 erfolgte jeweils ein Mediumwechsel mit Lebendzellbeobachtung und pH-Wert Messung des Zellkulturmediums.

Aus den verbleibenden Zellen wurden in zwei Reaktionsgefäßen je 600.000 Zellen gesammelt und für 5 min bei 450 g zentrifugiert (Abb. 6). Nach einer Resuspension in 500 µL PBS (Gibco, Life Science Technologies) erfolgte eine erneute Zentrifugation bei 450 g für 5 min. Das daraus entstehende Zellpellet des ersten Reaktionsgefäßes wurde in 600 µL Puffer RLT (QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland) resuspendiert und für spätere molekularbiologische Untersuchungen bei – 80 °C gelagert. Das Zellpellet des zweiten Reaktionsgefäßes wurde in 300 µL 1 % Triton X-100 (Sigma-Aldrich) resuspendiert und ebenfalls bei – 80 °C für funktionelle Assays gelagert.



**Abb. 6: Verwendung der isolierten Zellen**

Schematische Darstellung der weiteren Verwendung der Zellen (hellgraue Punkte). In einer 12 Well Multiwell Platte wurden je 600.000 Zellen in TC-Inserts ausgesät (weiße Kreise innerhalb der Wells). Die Biogläser sind hier als gelbe Kreise dargestellt. In einer 24 Well Multiwell Platte wurden 600.000 Zellen in einem Well zur Lebendzellbeobachtung ausgesät. Zudem wurden in zwei Reaktionsgefäßen je 600.000 Zellen für spätere molekularbiologische Untersuchungen sowie funktionelle Assays isoliert.

### 2.2.3. Zellernte

Nach 8 Tagen der Inkubation wurde das Zellkulturmedium abgenommen und der pH-Wert daraus bestimmt. Die einzelnen Wells wurden einmal mit PBS (Gibco, Life Science Technologies) gewaschen. Wie oben beschrieben gab es pro Bioglas je zwei Wells mit Zellen. Die Zellen des einen Wells wurde in 600  $\mu$ L Puffer RLT (QIAGEN GmbH) lysiert und für nachfolgende molekularbiologische Untersuchungen bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Zellen des

anderen Wells wurden in 300  $\mu\text{L}$  1 % Triton X-100 (Sigma-Aldrich) resuspendiert und für spätere funktionelle Assays bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 2.3. Lebendzellbeobachtung

Die Lebendzellbeobachtung wurde direkt nach der Isolation der Zellen sowie nach 2, 4, 6 und 8 Tagen Zellkultur zur Beobachtung der Entwicklung der Zellen anhand der Morphologie durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen in der 24-Well Platte mit einem inversen Lichtmikroskop Axiovert 10 (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) untersucht und mit einer Stingray F-145 Kamera (Allied Vision Technologies GmbH, Stadtroda, Deutschland) fotografiert. Die Fotos wurde mithilfe des Programms ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) bearbeitet. Aufgrund der Verwendung von TC-Inserts war eine Beobachtung der Zellen der 12-Well Platte nicht möglich.

### 2.4. pH-Wert Messung

Die pH-Wert Messung diente der Beobachtung der Zelldifferenzierung und erfolgte nach 2, 4, 6 und 8 Tagen in der Zellkultur. Bioglas ist in der Lage, durch seine Zerfallsprodukte den pH-Wert zu erhöhen, wohingegen Osteoklasten mit zunehmendem Differenzierungsstadium eine Ansäuerung ihrer Umgebung bewirken. Hierzu wurde das Zellkulturmedium in 2 mL Reaktionsgefäßen für 20 min bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  und 5 %  $\text{CO}_2$  re-inkubiert und in den Zellkulturplatten durch frisches Medium ersetzt. Nach weiteren 30 min bei Raumtemperatur erfolgte die pH-Wert Messung in den Reaktionsgefäßen mithilfe des CG820 pH-Meters (Schott Instrumente GmbH, Mainz, Deutschland).

### 2.5. RNA-Isolation

Die RNA-Isolation erfolgte unter Verwendung des RNeasy Mini Kits (QIAGEN GmbH) gemäß den Herstellerangaben. Die Untersuchung wurde mit den Zellen, welche in 600  $\mu\text{L}$  Puffer RLT (QIAGEN GmbH; herstellereigene, unbekannte Abkürzung) lysiert worden sind, durchgeführt. Die Proben wurden zunächst in einer QIAshredder Mini Spin Column (QIAGEN GmbH) für 2 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der dabei entstandene Durchfluss durch 600  $\mu\text{L}$  70 % Ethanol (Sigma-Aldrich) ergänzt und in einer RNeasy Mini Spin Column

(QIAGEN GmbH) für 30 s bei 8000 g zentrifugiert. Die nachfolgenden Schritte dienten der weiteren Aufreinigung der isolierten RNA. Hierzu wurden zunächst 700 µL RW1-Puffer (QIAGEN GmbH; herstellereigene, unbekannte Abkürzung) auf die Säule gegeben und nach 5-minütiger Inkubation für 30 s bei 8000 g zentrifugiert. Der entstandene Durchfluss wurde verworfen. Anschließend wurden 500 µL RPE Waschpuffer (QIAGEN GmbH; herstellereigene, unbekannte Abkürzung) zur Säule hinzugegeben und zweimal, zunächst für 30 s, dann für 2 min, bei 8000 g zentrifugiert. Um nun mögliche Rückstände der Waschpuffer zu entfernen, folgte eine 1-minütige Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit. Im Anschluss wurde die Säule in ein neues 1,5 mL Röhrchen überführt und 30 µL RNase freies Wasser (QIAGEN GmbH) hinzugefügt. Nach 5-minütiger Inkubation folgte eine erneute Zentrifugation für 1 min bei 8000 g, um die RNA von der Säule zu trennen. Der RNA-Gehalt wurde photometrisch mithilfe des ND-1000 Spektrophotometers (NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, Delaware, USA) bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Bis zur weiteren Verarbeitung wurde die isolierte RNA bei – 80 °C gelagert.

### 2.6. cDNA-Synthese

Die Herstellung komplementärer DNA (cDNA) erfolgte mittels Reverser Transkription der isolierten RNA unter Verwendung des Quantitect Reverse Transcription Kit (QIAGEN GmbH) gemäß den Herstellerangaben. Für die Durchführung der reversen Transkription, war es zunächst erforderlich zwei Reaktionsgemische je reverser Transkriptase (RT+ und RT-) vorzubereiten. Ein Reaktionsmix setzt sich dabei aus einer reversen Transkriptase (RT+ bzw. RT-), einem Puffer, Nukleotiden sowie einem RNA-Template zusammen. Je zu transkribierender Probe wurden zur Herstellung des RT+ Reaktionsgemisches 1 µL Quantiscript Reverse Transkriptase (QIAGEN GmbH), 4 µL Quantiscript RT Puffer (5x) (QIAGEN GmbH) und 1 µL RT Primer Mix (QIAGEN GmbH) miteinander vermischt. Zur Herstellung des RT- Reaktionsgemisches wurden je Probe 2 µL Quantiscript RT Puffer (5x) (QIAGEN GmbH), 0,5 µL RT Primer Mix (QIAGEN GmbH) und 0,5 µL RNase freies Wasser (QIAGEN GmbH) miteinander vermischt.

Zur Elimination kontaminierender genomischer DNA (gDNA) wurden 375 ng der isolierten RNA mit 3 µL gDNA Wipeout Puffer (QIAGEN GmbH) vermischt und durch RNase freies Wasser auf ein Gesamtvolumen von 21 µL aufgefüllt. Die Proben wurden für 5 min bei 42 °C im Bio-Rad i-Cycler (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) inkubiert. Im

Anschluss wurden hiervon je 7  $\mu\text{L}$  in ein Röhrchen mit 3  $\mu\text{L}$  des RT- Reaktionsmixes überführt. Den übrigen Proben wurden je 6  $\mu\text{L}$  RT+ Reaktionsmix hinzugefügt. Anschließend wurden alle Proben für 30 min bei 42 °C im Bio-Rad i-Cycler (Bio-Rad Laboratories GmbH) inkubiert. Zur Inaktivierung der reversen Transkriptase folgte dann eine 3-minütige Erhitzung des Systems auf 95 °C. Die Proben mit der gewonnenen cDNA wurden auf ein Verhältnis von 1:4 mit RNase freiem Wasser (QIAGEN GmbH) verdünnt und bis zur weiteren Untersuchung bei -20 °C gelagert.

### 2.7. Real-time Reverse-Transkriptase Polymerase-Ketten-Reaktion

Die real-time Reverse-Transkriptase Polymerase-Ketten-Reaktion (Real-time PCR) diente der Bestimmung der Expression einer Auswahl an Genen und erfolgte unter Verwendung des QuantiFast SYBR Green PCR Kits (QIAGEN GmbH) gemäß den Herstellerangaben. Hierzu musste zunächst ein Reaktionsgemisch hergestellt werden. Pro zu untersuchender Probe wurden 0,1  $\mu\text{L}$  20  $\mu\text{M}$  Primer, 5  $\mu\text{L}$  QuantiFast Mastermix (QIAGEN GmbH) und 3,9  $\mu\text{L}$  RNase freies Wasser (QIAGEN GmbH) miteinander vermischt. Als Primer wurden in dieser Untersuchung 14-3-3 Protein  $\zeta$  (YWHAZ, Eurofins Genomics, Ebersberg, Deutschland) als Referenzgen, sowie Cathepsin K (CtsK, Eurofins Genomics), Mannose Rezeptor 1 (Mrc1/CD206, Eurofins Genomics), Calcitonin Rezeptor (CALCR, Eurofins Genomics), CD14, Kernbindungsfaktor Untereinheit Beta (Core-binding subunit beta, CBF $\beta$ , Eurofins Genomics) sowie der Osteoklasten assoziierte Rezeptor (OSCAR, Eurofins Genomics) verwendet (Tab. 2). Mithilfe der Software NormFinder (Department of molecular Medicine Aarhus University Hospital and Aarhus University, Aarhus, Dänemark) wurde das für diese Untersuchung am besten geeignete Referenzgen ermittelt. Hierzu wurden neben YWHAZ auch  $\beta$ 2-Mikroglobulin (B2M, Eurofins Genomics), Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1 (HPRT1, Eurofins Genomics) und Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH, Eurofins Genomics) untersucht.

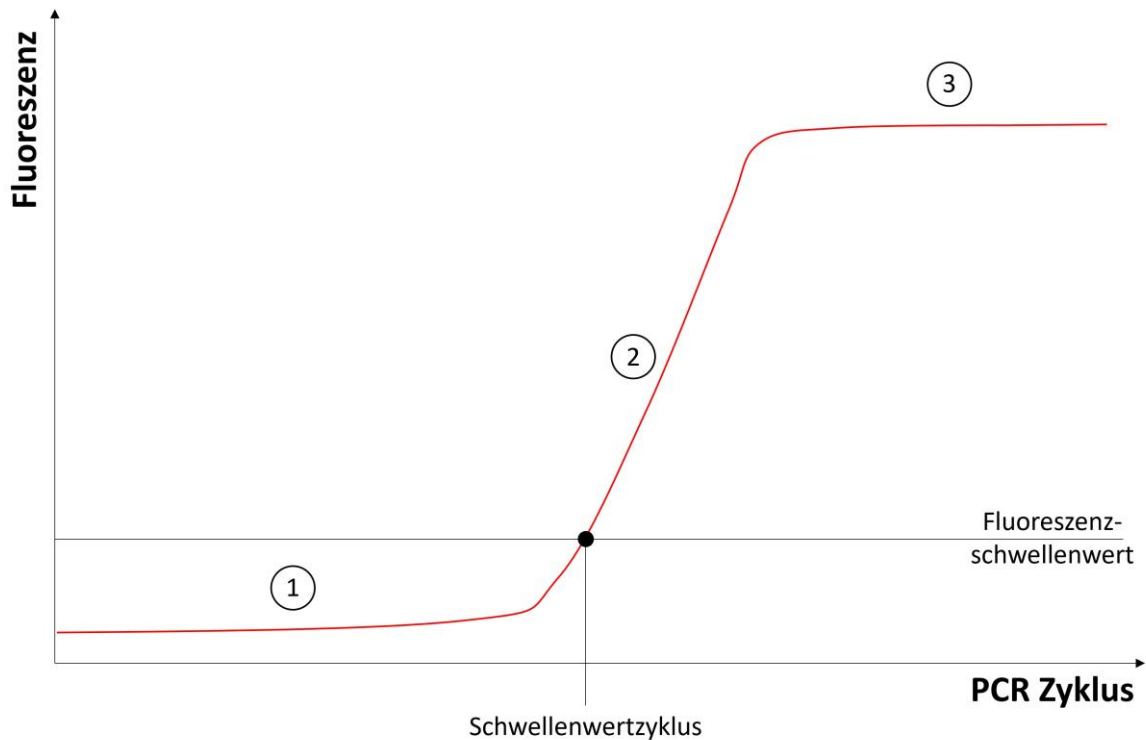
**Tab. 2: Primer der real-time PCR**

Primer	Sequenz	Länge	Accession No.
YWHAZ	for: 5'-AAT ACA GAG AGA AAA TTG AGA CGG-3' rev: 5'-CAG CCA AGT AAC GGT AGT AAT CTC-3'	150 bp	NM_001135701
B2M	for: 5'-TGC CTG CCG TGT GAA CCA TGT-3' rev: 5'- TGC GGC ATC TTC AAA CCT CCA TGA-3'	104 bp	NM_004048
HPRT1	for: 5'-AGG GGA CAT AAA AGT AAT TGG TGG-3' rev: 5'-TGC GAC CTT GAC CAT CTT TG-3'	151 bp	NM_000194.3
GAPDH	for: 5'-CAG GGC TGC TTT TAA CTC TGG-3' rev: 5'-TGG GTG GAA TCA TAT TGG AAC-3'	102 bp	NR_152150.2
CtsK	for: 5'-AGG AGA TAC TGG ACA CCC AC-3' rev: 5'-CCC AAA TTA AAC GCC GAG AG-3'	96 bp	NM_000396.4
Mrc1	for: 5'-GGA TGG ATG ATA CCT GCG AC-3' rev: 5'-TGG AGG ATT AGT CAA GGA AGG G-3'	77 bp	NM_002438.4
CALCR	for: 5'-TGA GTG TGG AAA CCC ATT TGC-3' rev: 5'-ATT TTG GTC ACA AGC ACC CG-3'	109 bp	NM_001164737
CD14	for: 5'-GGT CTC AAC CTA GAG CCG TT-3' rev: 5'-CGG AGA GCC TTG ACC GTG-3'	83 bp	NM_000591.4
CBFB	for: 5'-CGT GCC CGA CCA GAG AA-3' rev: 5'-TAA TCT CAC ACT CGC GGC TCA-3'	71 bp	NM_001755.3
OSCAR	for: 5'-CCC AGC TTC ATA CCA CCC T-3' rev: 5'-CCA GGC TTG AAA AGT CCA AA-3'	129 bp	NM_206818.4

Auflistung der in dieser Untersuchung verwendeten Primer. bp = Basenpaare/ Länge des PCR-Produkts, for = forward Sequenz, rev = reverse Sequenz

Für die Real-time PCR wurden je 9 µL Reaktionsgemisch mit 1 µL der bereits im Voraus auf ein Verhältnis von 1:4 verdünnten cDNA in 20 µL LightCycler Kapillaren (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) für 1 min bei 400 g zentrifugiert. Die Real-time PCR erfolgte mithilfe des Roche LightCycler 2.0 (Roche Diagnostics GmbH). Hierbei wurden die Proben zur Denaturierung zunächst auf eine Temperatur von 95 °C für 5 min erhitzt. Im Anschluss folgten 40 Zyklen aus je einer 10-sekündigen Denaturierungsphase bei 95 °C mit einer 30-sekündigen Amplifikationsphase bei 60 °C. Die Untersuchung erfolgte in einer Doppelbestimmung. Die Reinheit der Proben wurde mittels Schmelzkurve sichergestellt.

Die Auswertung erfolgt mithilfe des CT-Werts (Cycle threshold, Schwellenzyklus). Dieser Wert gibt die Anzahl an Amplifikationszyklen an, die notwendig ist, um einen definierten Fluoreszenz-Schwellenwert zu überschreiten. Je höher der CT-Wert, desto geringer ist also die Genexpression in der untersuchten Probe. Die Amplifikationsreaktion kann in verschiedene Phasen eingeteilt werden, welche einen sigmoidalen Kurvenverlauf ergeben (Abb. 7). In der anfänglichen exponentiellen Phase ist die tatsächlich emittierte Fluoreszenz nur schwer von der Hintergrundfluoreszenz zu unterscheiden. Diese entsteht durch freien, nicht gebundenen Fluoreszenzfarbstoff oder durch Farbstoff, der nicht an den Primer gebunden hat. In der zweiten, linearen Phase übersteigt die vom Reaktionsprodukt emittierte Fluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz. Am Ende kommt es zu einer Plateauphase, in der die Reaktion annähernd zum Erliegen kommt, und kaum noch Reaktionsprodukt gebildet wird. Der CT-Wert entspricht dem Kreuzungspunkt dieser Kurve mit dem Fluoreszenz-Schwellenwert. Dieser kann willkürlich festgelegt oder automatisch mit verschiedenen Algorithmen ermittelt werden (Tichopad et al. 2003; Larionov et al. 2005).



**Abb. 7: Real-time PCR Standardkurve**

Reaktionsverlauf einer Real-time PCR unter Betrachtung der gemessenen Fluoreszenz (y-Achse) in Relation zum PCR-Zyklus (x-Achse). Der Reaktionsverlauf kann in verschiedene Phasen eingeteilt werden: (1) Exponentielle Phase, (2) Lineare Phase, (3) Plateauphase. Der Fluoreszenzschwellenwert kann willkürlich festgelegt, oder durch Algorithmen bestimmt werden. Der Schwellenwertzyklus entspricht dem Kreuzungspunkt zwischen der Standardkurve und dem Fluoreszenzschwellenwert. Hier übersteigt die emittierte Fluoreszenz des Reaktionsprodukts die Hintergrundfluoreszenz. Modifizierte Darstellung nach Tichopad et al. 2003 und Larionov et al. 2005.

Die Auswertung und Interpretation der CT-Werte (Cycle threshold, Schwellenzyklus) erfolgte mithilfe der  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Methode zur Quantifizierung der relativen Expression eines bestimmten Gens in Relation zu YWHAZ als Referenzgen, wie im Folgenden dargestellt.

$$(1) \Delta CT = CT (\text{Zielgen}) - CT (\text{Referenzgen})$$

$$(2) \Delta\Delta CT = \Delta CT (\text{Zielprobe}) - \Delta CT (\text{Referenzprobe})$$

$$(3) \text{Relative Expression} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

Im ersten Schritt wird die der  $\Delta CT$ -Wert ermittelt. Der  $\Delta CT$ -Wert ist die Differenz des Schwellenwertzyklus ( $\Delta CT$ ) von Ziel- und Referenzgen. Im zweiten Schritt wird der  $\Delta\Delta CT$ -

Wert bestimmt. Dieser ist die Differenz zwischen den  $\Delta$ CT-Werten von Ziel- und Referenzprobe. Die relative Expression gibt die x-fache Expression des Zielgens der Zielprobe im Vergleich zur Referenzprobe an (Tichopad et al. 2003; Rao et al. 2013).

## 2.8. Kapillarelektrophorese

Die Kapillarelektrophorese diente der Bestimmung der spezifischen Länge der untersuchten Primer. Hierzu wurde je eine Probe stellvertretend für jeden verwendeten Primer untersucht, sowie die Proben, die in der Real-time PCR nicht nachgewiesen werden konnten. Hierzu wurden die Proben aus den unter 2.7 erwähnten 20  $\mu$ L LightCycler Kapillaren (Roche Diagnostics GmbH) verwendet. Die Kapillaren wurden umgedreht in Reaktionsgefäße gestellt und für 1 min bei 1600 g zentrifugiert, sodass sich die Proben in den Röhrchen sammelten und weiteren Untersuchungen zugänglich waren. Hiervon wurden 5  $\mu$ L Probe mit 10  $\mu$ L QX DNA Dilution Puffer (QIAGEN GmbH) in einem PCR-Röhrchen vermischt und mit einem Tropfen QX Öl (QIAGEN GmbH) beschichtet. Um für die Auswertung einen Größenstandard zu haben, wurde gleichzeitig ein PCR-Röhrchen mit 12  $\mu$ L QX DNA Dilution Puffer (QIAGEN GmbH), 3  $\mu$ L QX Größenmarker 100 bp – 2.5 kb (QIAGEN GmbH) und einem Tropfen QX Öl (QIAGEN GmbH) vorbereitet. Die Kapillarelektrophorese erfolgte mithilfe des QIAxcel Advanced Systems (QIAGEN GmbH).

## 2.9. Funktionelle Assays

Zur Bestimmung der Aktivität der Osteoklasten wurde ein Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) für Carboanhydrase II und Tartratresistente saure Phosphatase Typ 5b (TRAP 5b) durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen, welche in 300  $\mu$ L 1 % Triton X-100 (Sigma-Aldrich) bei – 80 °C gelagert wurden, verwendet.

### 2.9.1. Carboanhydrase II

Die Carboanhydrase II ist ein Enzym, welches im Rahmen der Knochenresorption die Umwandlung von Kohlenstoffdioxid ( $\text{CO}_2$ ) und Wasser ( $\text{H}_2\text{O}$ ) zu Bikarbonat ( $\text{HCO}_3^-$ ) und Wasserstoff ( $\text{H}^+$ ) katalysiert. Sie ist v. a. im Rahmen des Abbaus der anorganischen Matrix von Bedeutung.

Um eine Vergleichsgröße zu etablieren, wurde zunächst eine Verdünnungsreihe mit 20 mM 4-Nitrophenyl-Acetat (Sigma-Aldrich) in Ethanol (Stockmeier Chemie, Bielefeld, Deutschland) für neun verschiedene Konzentrationen in einer 96-Well Platte (Greiner Bio One) als Standard hergestellt. Die Wells mit den 50 µL Standard wurden mit je 50 µL des 1 % Triton X-100 Lyse-Puffers (Sigma-Aldrich) aufgefüllt.

Für die übrigen Wells wurden pro Well 50 µL Substrat hergestellt, welches sich zu 10 % aus 20 mM 4-Nitrophenyl-Acetat (Sigma-Aldrich) und zu 90 % aus Assay-Puffer zusammensetzt. Der Assay-Puffer wurde aus 66 % 20 mM Tris (Carl Roth GmbH), 24 % Aqua (B Braun, Melsungen, Deutschland) und aus 10 % 0,75 M NaCl (Carl Roth GmbH) hergestellt.

Im Folgenden wurde die 96-Well Platte mit je 50 µL Probe, 50 µL Triton X-100 (Sigma-Aldrich), welcher als Lyse-Puffer verwendet wurde oder 50 µL humaner Carboanhydrase II (Sigma-Aldrich) jeweils in Doppelbestimmung vorbereitet. Diese Wells wurden mit je 50 µL des zuvor vorbereiteten Substrats aufgefüllt. Die ELISA-Reaktion erfolgte mithilfe des Bio Tek Synergy HAT Plattenreaders (BioTek Instruments Inc., Winooski, Vermont, USA), wobei die Extinktion bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen wurde. Anhand der Absorption der Standards konnte eine Standardkurve ermittelt werden, woraus nachfolgend die Enzymaktivität in den einzelnen Proben bestimmt werden konnte.

### 2.9.2. TRAP 5b

Die TRAP 5b spielt ebenfalls eine bedeutende Rolle im Rahmen der Knochenresorption und ist spezifisch für Osteoklasten. Sie ist v. a. beim Abbau der organischen Matrix von Bedeutung. Der TRAP 5b Assay wurde mithilfe des MicroVue Bone ELISA Kit (Quidel Corporation, Athens, Ohio, USA) gemäß den Herstellerangaben durchgeführt.

In einem ersten Schritt wurden die Standards A-E (Quidel Corporation) sowie die Kontrolle low und high (Quidel Corporation) in 300 µL Aqua (B Braun) aufgelöst. Während einer 10-minütigen Inkubationszeit wurde in jedes Well einer 96-Well Platte (Greiner Bio One) 100 µL TRAP 5b Probendiluent (Quidel Corporation) gegeben. Das Probendiluent besteht aus zwei Antikörpern. Antikörper 1 bindet aktives TRAP 5b am Boden der Platte, wohingegen Antikörper 2 inaktives TRAP 5b bindet und im Folgenden ausgewaschen wird. Anschließend wurden die Wells entweder mit 50 µL Standard A – E bzw. Kontrolle low/ high oder mit 10 µL Probe und 40 µL Triton X-100 (Sigma-Aldrich) auf ein Gesamtvolumen von 150 µL aufgefüllt. Die Platte wurde mit einer Klebefolie abgedeckt und für 1 h bei Raumtemperatur auf einer

Rüttelplatte mit 300 U/min inkubiert. In dieser Zeit bindet der primäre Antikörper aktives TRAP 5b und verankert es am Boden der Platte. Nach 1 h wurde die Platte dreimal mit TRAP 5b Waschpuffer (Quidel Corporation) gewaschen, um inaktives, an den sekundären Antikörper gebundenes TRAP 5b auszuwaschen. Anschließend wurden die Wells mit je 100 µL TRAP 5b Dekonstitution Puffer (Quidel Corporation) aufgefüllt. Es folgte eine erneute Inkubation der Platte für 1 h bei 37 °C. Durch die Zugabe des Substrats färbte sich die Lösung gelb. Nach 1 h wurde die enzymatische Reaktion durch Zugabe von 50 µL TRAP 5b Stopplösung (Quidel Corporation) beendet. Die Extinktion wurde bei einer Wellenlänge von 405 nm mithilfe des Bio Tek Synergy HAT Plattenreaders (BioTek Instruments Inc.) bestimmt. Anhand der Absorption der Standards konnte eine Standardkurve ermittelt werden, woraus nachfolgend die Enzymaktivität in den einzelnen Proben bestimmt werden konnte.

### 2.10. Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Mithilfe der Rasterelektronenmikroskopie (REM) sollte untersucht werden, ob und wie die Oberfläche der Biogläser durch die Besiedelung mit Osteoklasten verändert wird. Hierzu wurden sowohl native Biogläser untersucht als auch Biogläser, die jeweils 8 bzw. 14 Tage in einer Zellkultur inkubiert worden sind.

#### 2.10.1. Fixierung der REM-Proben

Nach 8 bzw. 14 Tagen in einer Zellkultur wurden die Zellen mit 1 mL Puffer RLT (QIAGEN GmbH) lysiert. Für das Fixieren der Biogläser ist eine Fixierlösung erforderlich. Hierfür musste zunächst 0,2 M Natrium-Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 7,2 – 7,4 hergestellt werden. Dieser besteht als Puffer aus einer Säure und einer Base. Hier wurden neben 27,6 g Natriumhydrogenphosphat-Monohydrat (Merck, München, Deutschland) als saure Komponente, 35,6 g Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Merck) als alkalische Komponente in je 1 L Aqua bidest (B Braun) gelöst. Um nun einen 0,2 M Natrium-Phosphatpuffer zu erhalten, wurden 23 % des sauren Natriumhydrogenphosphat-Monohydrat (Merck) mit 77 % Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Merck) bis zum Erreichen des Ziel-pH-Wertes von 7,2 – 7,4 miteinander vermischt. Der pH-Wert wurde mithilfe des CG820 pH-Meters (Schott Instrumente GmbH) kontrolliert. Nun wurde der 0,2 M Natrium-Phosphatpuffer durch Verwendung derselben Menge Aqua bidest (B Braun) zu einem 0,1 M Natrium-Phosphatpuffer verdünnt. In einem letzten Schritt wurde die Fixierlösung, bestehend aus 90 %

0,1 M Natrium-Phosphatpuffer und 10 % Glutardialdehydlösung (2,5 %) (Carl Roth GmbH), durch Hinzufügen von 1 % Saccharose (Carl Roth GmbH) des Volumens, hergestellt. Alle Biogläser wurden in dieser Lösung für 24 h bei 4 – 8 °C fixiert. Anschließend wurden die Biogläser sechsmal mit 0,1 M Natrium-Phosphatpuffer gewaschen. Die Materialien wurden für weitere 24 h bei 4 – 8 °C in 0,1 M Natrium-Phosphatpuffer gelagert.

### 2.10.2. Dehydratation der REM-Proben

Um eine Untersuchung mit dem Rasterelektronenmikroskop zu ermöglichen, müssen die Proben einer ausführlichen Dehydratation unterzogen werden. Andernfalls bestünde die Gefahr eines Verdampfens der Wassermoleküle im Vakuum, wodurch die Proben beschädigt werden können. Hierzu wurden die Proben zunächst in Ethanol mit jeweils zunehmender Konzentration für 15 min bei 4 – 8 °C inkubiert. Es wurde Ethanol (Sigma-Aldrich) mit den Konzentrationen 50 %, 70 %, 80 %, 96 % und 100 % verwendet. Die finale Trocknung der Proben erfolgte mithilfe des Leica EM CPD 300 Critical Point Dryers (Leica Mikrosysteme GmbH, Wetzlar, Deutschland). Hierbei erfolgt zunächst eine Kühlung des Systems auf 12 °C. Bei dieser Temperatur wird flüssiger Kohlenstoffdioxid (CO<sub>2</sub>) in die Kammer geleitet, welches sich mit dem Ethanol vermischt. Anschließend wird die Temperatur auf 40 °C erhöht, sodass das CO<sub>2</sub> verdampft und die getrocknete Probe zurückbleibt.

### 2.10.3. Beschichtung der REM-Proben

Um die Biogläser im Rasterelektronenmikroskop untersuchen zu können, müssen sie in einem letzten Schritt mit einem Edelmetall beschichtet werden, um eine elektrostatische Aufladung zu verhindern. Diese würde zu Artefakten bei der Betrachtung führen. In dieser Untersuchung wurde Argon (Praxair, Mississauga, Ontario, USA) als inertes Gas verwendet. Die Biogläser wurden hierzu mit einer beidseitig klebenden Folie (Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland) auf dem Stiftprobenteller (Plano GmbH) fixiert und mithilfe des Polaron SC7640 Sputter Coaters (Polaron, Quorum Technologies LTD, Ashford, Großbritannien) mit Argon beschichtet.

### 2.10.4. Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Nach der ausführlichen Probenvorbereitung konnte die eigentliche Betrachtung der Biogläser mithilfe des LEO 1530 Rasterelektronenmikroskops (LEO Elektronenmikroskope GmbH,

Oberkochen, Deutschland) durchgeführt werden. Dieses Mikroskop besteht aus insgesamt drei Detektoren. Bei zwei Detektoren handelt es sich um Everhard-Thornley-Detektoren, die in der Lage sind, sekundäre Elektronen zu erkennen, die von der obersten Schicht der Oberfläche stammen. Der dritte Detektor ist ein Backscattered Electron Detektor (Rückstreuelektronen-Detektor), der Primärelektronen erkennt und dadurch einen Kontrast ermöglicht. Es wurde die gesamte Oberfläche jedes einzelnen Bioglasses in fünf verschiedenen Vergrößerungen untersucht: 100x, 250x, 500x, 1.000x und 2.500x.

### 2.11. Immunfluoreszenzmikroskopie

Mithilfe der Immunfluoreszenzmikroskopie sollte untersucht werden, ob und in welchem Ausmaß sich die Zellen direkt auf der Materialoberfläche entwickeln. Hierzu wurden, wie unter 2.2 beschrieben, Monozyten isoliert und in einer Zellkultur zu Osteoklasten differenziert. Nach 8 Tagen wurde das Zellkulturmedium durch 4 % Paraformaldehyd (PFA, Carl Roth GmbH) ausgetauscht. Zur Herstellung des 4 % PFAs wurde 1 g PFA in 25 mL 1 % PBS (Gibco, Life Science Technologies) aufgelöst. Es folgte eine 10-minütige Inkubation der Platte auf Eis im Dunkeln. Anschließend wurden die Proben mehrmals mit 1 % PBS gewaschen, um Kontamination durch das PFA zu vermeiden. Dann wurden die Biogläser in eine 96-Well Cycloolefin Platte mit einem 190 µm dicken klaren Boden (Greiner Bio One) überführt und mit 200 µL Phalloidin Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) (Sigma-Aldrich) für 40 min lichtgeschützt inkubiert. Es handelt sich hierbei um einen fluoreszierenden Stoff, der sich an Aktinfasern des Zytoskeletts anlagert und diese grün aufleuchten lässt. Anschließend wurden die Wells sechsmal mit 1 % PBS gewaschen und für weitere 15 min mit 200 µL Hoechst BisBenzimide H33258 (Sigma-Aldrich) lichtgeschützt inkubiert. Hierbei handelt es sich um einen Fluoreszenz-Farbstoff, der durch Interkalation in die DNA-Stränge die Nuclei blau erscheinen lässt. Anschließend wurden die Wells erneut sechsmal mit 1 % PBS gewaschen.

Die Immunfluoreszenzmikroskopie erfolgte mithilfe des THUNDER Imaging Systems (Leica Microsystems GmbH). Hierzu wurde zunächst durch Mikroskopie beider Seiten sichergestellt, dass sich die Biogläser während der Präparationsschritte nicht gedreht hatten. Anschließend wurde das PBS durch ProLong<sup>TM</sup> Gold Antifade Reagenz (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Eugene, Oregon, USA) ersetzt. Die Platte konnte bei 4 °C für weitere Untersuchungen gelagert werden.

## 2.12. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe des Programms Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) Version 26.0 (IBM, SPSS Statistics, Armonk, New York, USA). Zunächst erfolgte die Überprüfung auf Normalverteilung der Daten mithilfe des Kolmogorov-Smirnov-Tests. Bei Vorliegen einer Normalverteilung wurde auf Signifikanzen mittels ANOVA als parametrischem Test untersucht. Lag jedoch keine Normalverteilung der Daten vor, folgte eine weitere Auswertung mittels nicht-parametrischen Tests. Für verbundene Stichproben wurde hierbei eine Friedman-Analyse, für nicht-verbundene Stichproben ein Kruskal-Wallis- und beim Vorliegen von zwei Gruppen ein Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde mit  $p \leq 0,05$  festgelegt. Die Ergebnisse wurden mithilfe von Box-Whisker-Plots graphisch veranschaulicht (SPSS, Version 26.0).

## 2.13. Schematische Abbildungen

Die in dieser Untersuchung entstandenen Graphiken wurden, wenn es sich nicht um Darstellung der statistischen Analysen handelt oder ausdrücklich anders angegeben ist, mithilfe von Microsoft PowerPoint Version 2311 (Microsoft Deutschland GmbH, München, Deutschland) erstellt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Morphologische Auswertung der Lebendzellbeobachtung

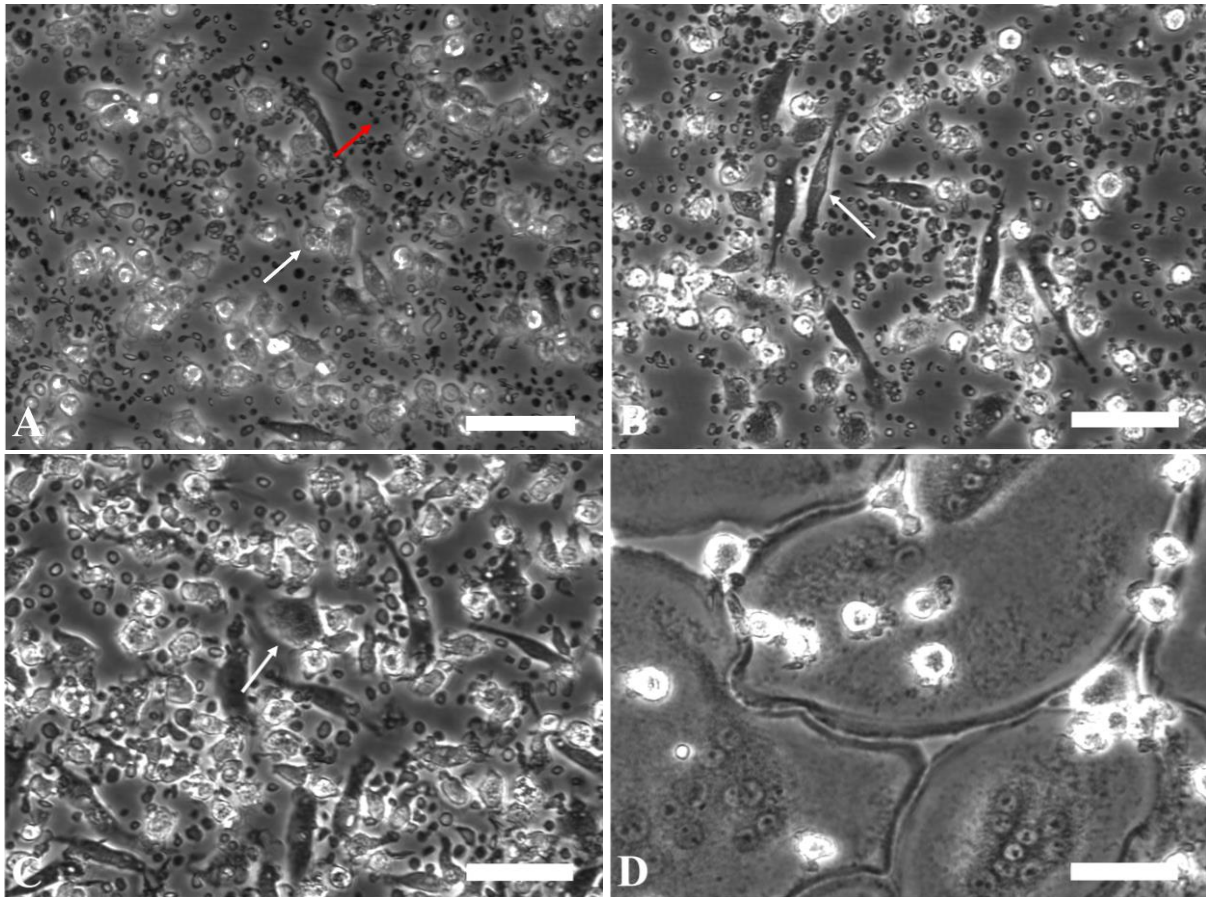
Die lichtmikroskopische Lebendzellbeobachtung diente der Erfolgskontrolle der Zellkultur. Da die Anzucht der Zellen mit Bioglas in Zellkultureinsätzen innerhalb der Multiwellplatten erfolgte, konnte keine direkte Beobachtung der Zellen mit Kontakt zum Fremdmaterial erfolgen. Es wurde eine separate Kontroll-Kultur ohne Zellkultureinsätze gezüchtet und stellvertretend analysiert.

Zur Beurteilung des Wachstumsverlaufs wurden vier Entwicklungsstadien definiert (Abb. 7). Stadium 1 liegt direkt nach dem Isolationsprozess vor. Das Zellbild wird von kleinen, rund-ovalen Zellen mit einem Durchmesser von ca. 5  $\mu\text{m}$  dominiert. Daneben finden sich Überreste des Separationsmediums, die im Verlauf ausgewaschen werden. In Stadium 2 zeigen sich spindelförmige, mononukleäre Zellen mit einer Länge von ca. 60  $\mu\text{m}$  und einer maximalen Breite von ca. 10  $\mu\text{m}$ . In Stadium 3 liegen ca. 50  $\mu\text{m}$  durchmessende große runde mononukleäre Zellen vor. Im finalen Stadium 4 zeigen sich ca. 60–200  $\mu\text{m}$  große Zellen mit ca. 5–10 Zellkernen.

Die Lebendzellbeobachtung erfolgt nach 2, 4, 6 und 8 Inkubationstagen. Bereits ab Tag 2 lagen Zellen in Stadium 2 und ab Tag 4 in Stadium 3 und 4 vor (Abb. 8). Es zeigte sich durchgehend eine homogene Verteilung der Zellen auf dem Boden der Zellkulturplatten mit ausgewogener Zelldichte. Im Verlauf der Entwicklung lagen Zellen aller Entwicklungsstadien, inklusive sich nicht differenzierender Zellen, vor.

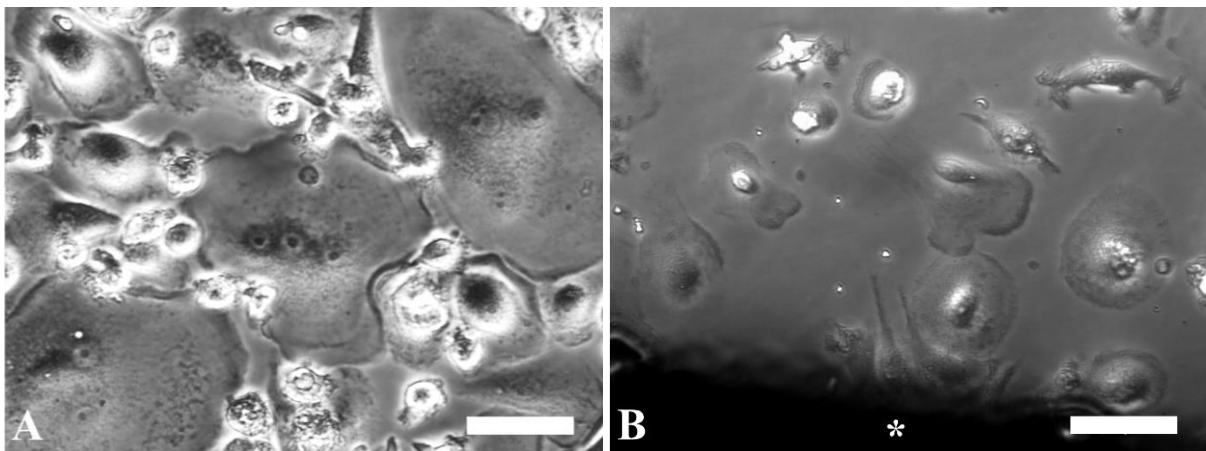
Zusätzlich zu der Positivkontrolle der Differenzierung konnten im Rahmen von Vorversuchen lichtmikroskopische Beobachtungen ohne Zellkultureinsätze in den Multiwellplatten durchgeführt werden. Diese ermöglichten eine direkte Lebendzellbeobachtung von Zellen mit Kontakt zu Bioglas. Es zeigte sich, dass sich die Zellen auch bei direktem Kontakt zum Material differenzierten, allerdings langsamer als Zellen, die weiter vom Material entfernt lagen oder Zellen, die ohne Bioglas kultiviert wurden (Abb. 9-13).

Durch die hier dargestellten Positivkontrollen konnte nachgewiesen werden, dass jede der verwendeten PBMC-Kulturen sich in lichtmikroskopisch intakte, mehrkernige Zellen differenzierten.



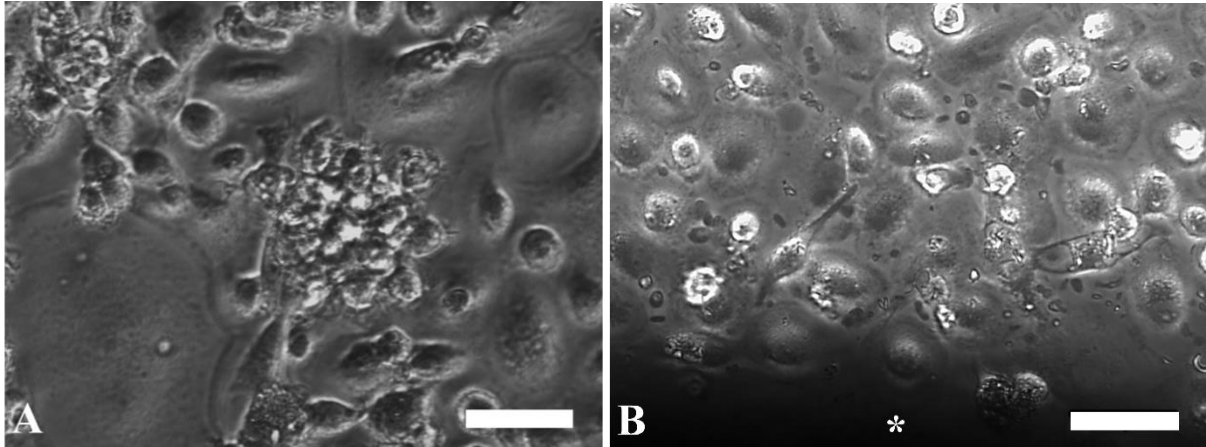
**Abb. 8: Morphologische Stadieneinteilung der Lebendzellbeobachtung**

(A) Lebendzellbeobachtung an Tag 2. Der weiße Pfeil zeigt eine Zelle in Stadium 1. Der rote Pfeil zeigt Überreste des Separationsmediums. (B) Lebendzellbeobachtung an Tag 2. Der weiße Pfeil zeigt eine Zelle in Stadium 2. (C) Lebendzellbeobachtung an Tag 4. Der weiße Pfeil zeigt eine Zelle in Stadium 3. (D) Lebendzellbeobachtung an Tag 8. Mehrere multinukleäre Zellen des Stadiums 4 sind zu beobachten. Maßstab: 50 µm



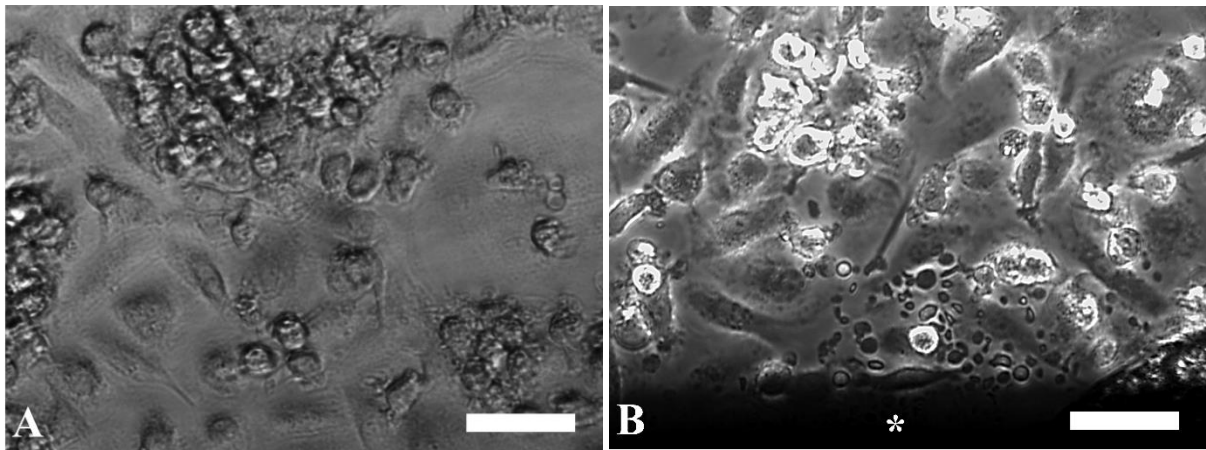
**Abb. 9: Zelldifferenzierung bei Kontakt mit Bioglas 45S5**

Lebendzellbeobachtung nach 6 Tagen Inkubation. (A) Lebendzellbeobachtung im peripheren Bereich im Well mit Bioglas 45S5. Es zeigen sich Zellen bis Stadium 4. (B) Lebendzellbeobachtung von Zellen mit Kontakt zu Bioglas 45S5 (\*) im selben Well. Es zeigen sich Zellen bis Stadium 3. Maßstab: 50 µm.



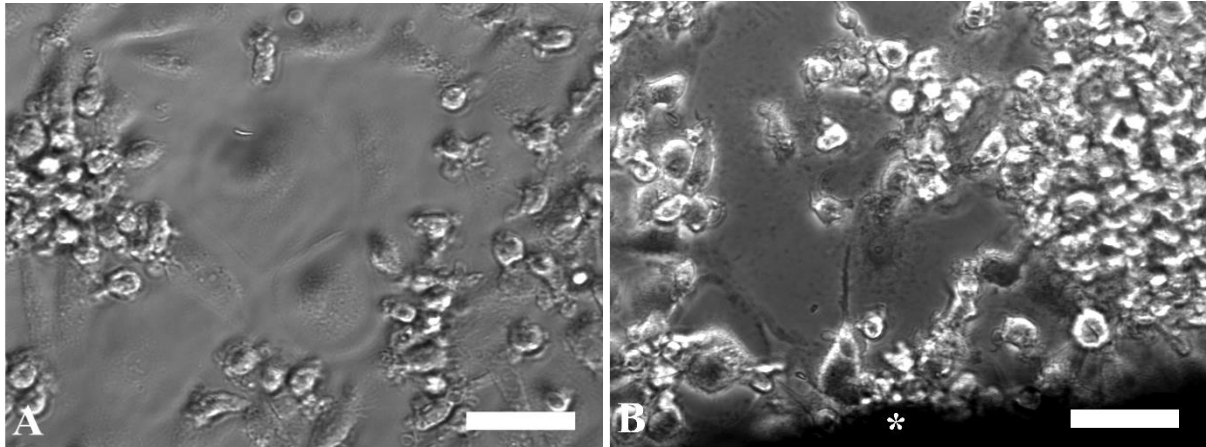
**Abb. 10: Zelldifferenzierung bei Kontakt mit Bioglas 1393**

Lebendzellbeobachtung nach 6 Tagen Inkubation. (A) Lebendzellbeobachtung im peripheren Bereich im Well mit Bioglas 1393. Es zeigen sich Zellen bis Stadium 4. (B) Lebendzellbeobachtung von Zellen mit Kontakt zu Bioglas 1393 (\*) im selben Well. Es zeigen sich Zellen bis Stadium 3. Maßstab: 50  $\mu$ m.



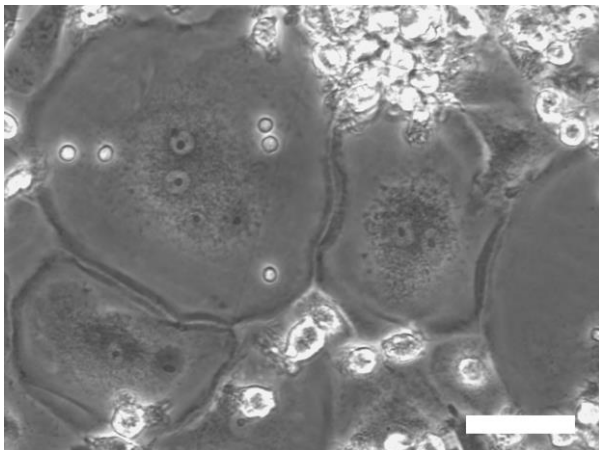
**Abb. 11: Zelldifferenzierung bei Kontakt mit Bioglas 1393 BS**

Lebendzellbeobachtung nach 6 Tagen Inkubation. (A) Lebendzellbeobachtung im peripheren Bereich im Well mit Bioglas 1393 BS. Es zeigen sich Zellen bis Stadium 4. (B) Lebendzellbeobachtung von Zellen mit Kontakt zu Bioglas 1393 BS (\*) im selben Well. Es zeigen sich Zellen bis Stadium 3. Maßstab: 50  $\mu$ m.



**Abb. 12: Zelldifferenzierung bei Kontakt mit Bioglas 1393 ges**

Lebendzellbeobachtung nach 6 Tagen Inkubation. (A) Lebendzellbeobachtung im peripheren Bereich im Well mit Bioglas 1393 ges. Es zeigen sich Zellen bis Stadium 4. (B) Lebendzellbeobachtung von Zellen mit Kontakt zu Bioglas 1393 ges (\*) im selben Well. Es zeigen sich Zellen bis Stadium 3. Maßstab: 50  $\mu$ m.



**Abb. 13: Zelldifferenzierung ohne Kontakt zu Bioglas**

Lebendzellbeobachtung von Zellen desselben Spenders in einem Well ohne Fremdmaterial. Es zeigen sich Zellen im Stadium 4. Maßstab: 50  $\mu$ m.

### 3.2. pH-Wert Messung

Die pH-Wert Messung erfolgt nach 2, 4, 6 und 8 Tagen der Inkubation aus dem abgenommenen Medium. Durch die Freisetzung von Ionen durch das Bioglas und die Bildung funktionsfähiger Osteoklasten kommt es zu pH-Schwankungen, die durch die Messung dokumentiert wurden.

Nach 2 Tagen Inkubation waren die pH-Werte von Bioglas 45S5 mit  $\text{pH } 7,85 \pm 0,04$  ( $p = 0,018$ ) sowie von Bioglas 1393 mit  $\text{pH } 7,85 \pm 0,05$  ( $p = 0,014$ ) signifikant höher als der pH-Wert des Ansatzes ohne Fremdmaterial mit  $\text{pH } 7,64 \pm 0,08$ . Für Bioglas 1393 BS und Bioglas 1393 ges

konnten nach 2 Tagen Inkubation keine signifikanten pH-Unterschiede festgestellt werden (Abb. 14).

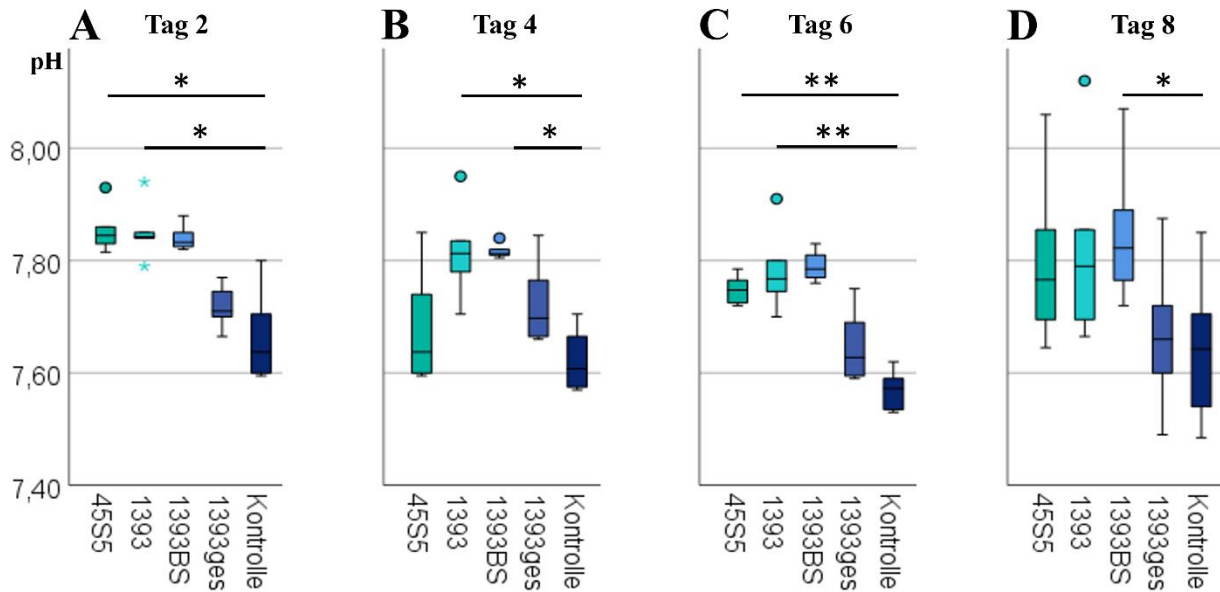
An Tag 4 waren die pH-Werte von Bioglas 1393 mit  $\text{pH } 7,81 \pm 0,05$  ( $p = 0,041$ ) und Bioglas 1393 BS mit  $\text{pH } 7,85 \pm 0,05$  ( $p = 0,019$ ) signifikant höher als der Ansatz ohne Fremdmaterial mit,  $\text{pH } 7,62 \pm 0,06$ . Für Bioglas 45S5 und Bioglas 1393 ges konnten nach 4 Tagen Inkubation keine signifikanten pH-Unterschiede festgestellt werden (Abb. 14).

Es zeigte sich zudem an Tag 6, dass Bioglas 45S5 mit  $\text{pH } 7,75 \pm 0,02$  ( $p = 0,001$ ) sowie Bioglas 1393 mit  $\text{pH } 7,78 \pm 0,07$  ( $p = 0,004$ ) signifikant höhere pH-Werte aufwies als die Kultur ohne Fremdmaterial mit  $\text{pH } 7,57 \pm 0,03$ . Für Bioglas 1393 BS und Bioglas 1393 ges konnten nach 6 Tagen Inkubation keine signifikanten pH-Unterschiede festgestellt werden (Abb. 14).

Nach 8 Tagen konnte nur noch bei Bioglas 1393 BS mit  $\text{pH } 7,85 \pm 0,12$  ( $p = 0,024$ ) eine signifikante Abweichung von der Kontrollgruppe mit  $\text{pH } 7,64 \pm 0,13$  nachgewiesen werden. Für Bioglas 45S5, Bioglas 1393 und Bioglas 1393 ges konnten nach 8 Tagen Inkubation keine signifikanten pH-Unterschiede festgestellt werden (Abb. 14).

Zusammenfassend zeigten die Messungen des pH-Wertes, dass Bioglas 1393 ges zu keinem Beobachtungszeitpunkt signifikante pH-Unterschiede im Vergleich zur Kultur ohne Fremdmaterial aufweist. Weiterhin konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den pH-Werten der Kontroll-Gruppe und dem Ansatz für die lichtmikroskopische Lebendzellbeobachtung festgestellt werden (Tag 2 mit  $p = 1,03$ ; Tag 4 mit  $p = 3,96$ ; Tag 6 mit  $p = 5,30$ ; Tag 8 mit  $p = 4,39$ ; nicht graphisch dargestellt).

Die statistische Auswertung erfolgt mit dem Kolmogorov-Smirnov Test auf Normalverteilung, dem Kruskal-Wallis Test für unabhängige Stichproben sowie der zweifachen Varianzanalyse für Ränge nach Friedman für verbundene Stichproben.



**Abb. 14: Ergebnis der pH-Wert Messung zu den verschiedenen Inkubationszeitpunkten**  
 Box-Whisker-Plots der pH-Werte zu den verschiedenen Inkubationszeitpunkten Tag 2 (A), Tag 4 (B), Tag 6 (C) und Tag 8 (D) für die verschiedenen Biogläser sowie die Kontrolle. Bei der Kontrolle handelt es sich um die PBMCs (PBMCs = Peripheral blood mononuclear cells), die ohne Fremdmaterial inkubiert worden sind.  $p \leq 0,05$  ist mit \* markiert,  $p \leq 0,01$  mit \*\*. Neben den dargestellten Signifikanzen konnten keine weiteren signifikanten Unterschiede in der statistischen Auswertung festgestellt werden. Überprüfung auf signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen mithilfe der Friedman-Analyse für verbundene Stichproben. Bei den mit \* oder ° markierten Werten handelt es sich um Ausreißer. Werte, welche mit ° dargestellt werden, stellen einfache Ausreißer dar und liegen unterhalb des 0,25 Quartils  $- 1,5 * \text{IQR}$  oder oberhalb des 0,75 Quartils  $+ 1,5 * \text{IQR}$ . Werte, welche mit \* dargestellt werden, stellen extreme Ausreißer dar und liegen entweder zwischen dem 0,25 Quartil  $- 1,5 * \text{IQR}$  und 0,25 Quartil  $- 3 * \text{IQR}$  oder dem 0,75 Quartil  $+ 1,5 * \text{IQR}$  und 0,75 Quartil  $+ 3 * \text{IQR}$ .

### 3.3. Real-time Reverse-Transkriptase Polymerase-Ketten-Reaktion

Mittels Real-time PCR wurden Gene untersucht, die zum Untersuchungszeitpunkt für die Proteinbiosynthese transkribiert wurden. Es wurden insbesondere Gene, die einen Hinweis auf die Zelldifferenzierung liefern, sowie osteoklastenspezifische Gene untersucht. Zur Auswertung wurde YWHAZ als Referenzgen verwendet.

#### 3.3.1 Referenzgen

Die Suche nach einem geeigneten Referenzgen erfolgte mithilfe der Software NormFinder (Department of molecular Medicine Aarhus University Hospital and Aarhus University, Aarhus, Dänemark). Untersucht wurden die Gene B2M, HPRT1, YWHAZ und GAPDH. Die

Gene mit den niedrigsten Stabilitätswerten, mit jeweils 0,019 (Tab. 3) sind HPRT1 und YWHAZ. Sie weisen zusätzlich die niedrigste Intra- und Intergruppenvarianz auf (Tab. 4 und Tab. 5).

**Tab. 3: Stabilitätswerte für die untersuchten Referenzgene**

Gen	Stabilitätswert
B2M	0,046
HPRT1	0,019
YWHAZ	0,019
GAPDH	0,046

Stabilitätswerte für die untersuchten Gene B2M, HPRT1, YWHAZ und GAPDH. Die Berechnung erfolgte mithilfe der Software NormFinder. B2M =  $\beta$ 2-Mikroglobulin, HPRT1 = Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1, YWHAZ = 14-3-3 Protein  $\zeta$ , GAPDH = Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase

**Tab. 4: Intragruppenvariation**

Gen	PBMCs	OK	OK + BG 45S5	OK + BG 1393	OK + BG 1393BS	OK + BG 1393ges
B2M	0,000	0,000	0,000	0,167	0,000	0,000
HPRT1	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
YWHAZ	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
GAPDH	0,000	0,000	0,000	0,000	0,167	0,000

OK = Osteoklasten, PBMCs = Peripheral blood mononuclear cells, B2M =  $\beta$ 2-Mikroglobulin, HPRT1 = Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1, YWHAZ = 14-3-3 Protein  $\zeta$ , GAPDH = Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase

**Tab. 5: Intergruppenvariation**

Gen	PBMCs	OK	OK + BG 45S5	OK + BG 1393	OK + BG 1393BS	OK + BG 1393ges
B2M	0,014	0,014	0,014	- 0,111	0,056	0,014
HPRT1	- 0,014	- 0,014	- 0,014	0,028	0,028	- 0,014
YWHAZ	- 0,014	- 0,014	- 0,014	0,028	0,028	- 0,014
GAPDH	0,014	0,014	0,014	0,056	- 0,111	0,014

OK = Osteoklasten, PBMCs = Peripheral blood mononuclear cells, B2M =  $\beta$ 2-Mikroglobulin, HPRT1 = Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1, YWHAZ = 14-3-3 Protein  $\zeta$ , GAPDH = Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase

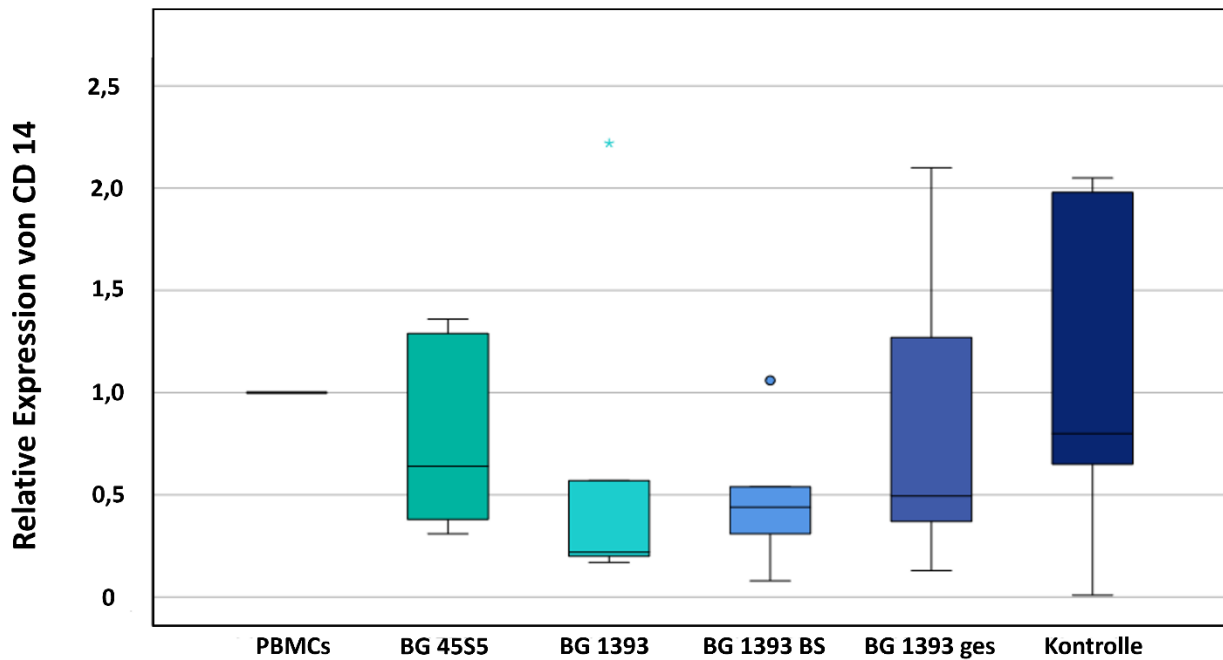
## 3.3.2 CD14

Das auf Monozyten und Makrophagen lokalisierte Oberflächenprotein CD14 zeigte in der statistischen Auswertung keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen ( $p = 0,426$ ; Kruskal-Wallis-Test) in Bezug auf die relative Expression (Tab. 6 und Abb. 15). Dieses Ergebnis ist mit den bildmorphologischen Befunden, dass einigen Zellen nicht in den Differenzierungsprozess eingetreten sind bzw. sich zum Untersuchungszeitpunkt noch in frühen Entwicklungsstadien befanden, in Einklang zu bringen. Mit zunehmender Differenzierung wäre hierbei eine Abnahme der Expression zu erwarten gewesen.

Tab. 6: Relative Expression von CD14

Zellreihe	Relative Expression mit PBMCs als Bezugspunkt					
	PBMCs	OK Kontrolle	OK + BG 45S5	OK + BG 1393	OK + BG 1393BS	OK + BG 1393ges
ZK 01	1,00	0,65	0,31	0,22	0,08	0,37
ZK 02	1,00	1,98	1,29	0,57	0,54	1,27
ZK 03	1,00	0,01	0,50	0,20	0,31	0,49
ZK 04	1,00	0,88	0,38	0,17	NA	0,50
ZK 05	1,00	2,05	1,36	2,22	1,06	2,10
ZK 06	1,00	0,72	0,78	NA	0,44	0,13
Mittelwert	1,00	1,05	0,77	0,68	0,49	0,81
Median	1,00	0,80	0,64	0,22	0,44	0,50
Standardfehler	0,00	0,33	0,19	0,39	0,16	0,30
Standardabweichung	0,00	0,81	0,46	0,88	0,36	0,74
p-Wert	0,426					

Relative Expression von CD 14 in Osteoklasten mit Kontakt zu Bioglas, im Vergleich zu PBMCs ohne Kontakt zu Bioglas vom selben Spender. OK = Osteoklasten, PBMCs = Peripheral blood mononuclear cells, NA = unterhalb der Nachweisgrenze. Überprüfung auf signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen mithilfe des Kruskal-Wallis-Tests für nicht-verbundene Stichproben ( $p = 0,426$ ).



**Abb. 15: Relative Expression von CD14**

Box-Whisker-Plots der relativen Expression von CD14 in Bezug auf die Expression in PBMCs für die verschiedenen Biogläser sowie die Kontrolle. Bei den mit \* oder ° markierten Werten handelt es sich um Ausreißer. Werte, welche mit ° dargestellt werden, stellen einfache Ausreißer dar und liegen unterhalb des 0,25 Quartils  $- 1,5 * IQR$  oder oberhalb des 0,75 Quartils  $+ 1,5 * IQR$ . Werte, welche mit \* dargestellt werden, stellen extreme Ausreißer dar und liegen entweder zwischen dem 0,25 Quartil  $- 1,5 * IQR$  und  $0,25 \text{ Quartil} - 3 * IQR$  oder dem 0,75 Quartil  $+ 1,5 * IQR$  und  $0,75 \text{ Quartil} + 3 * IQR$ . PBMCs = Peripheral blood mononuclear cells.

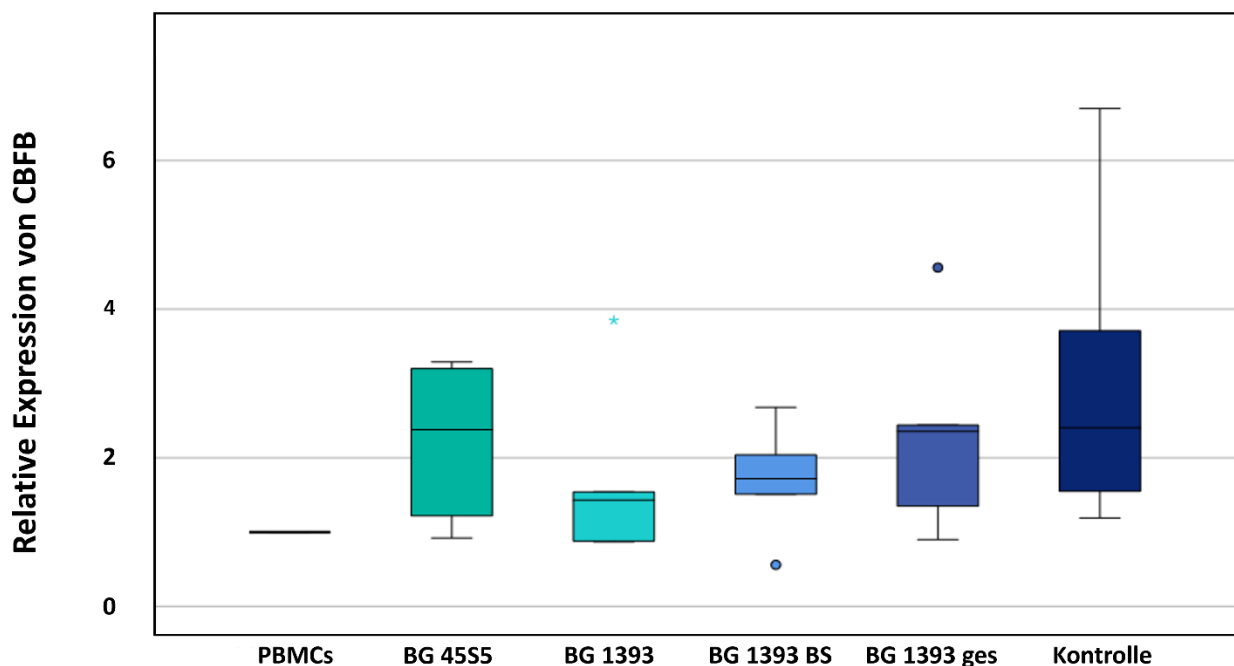
### 3.3.3 CBFb

Das für die Entwicklung von dendritischen Zellen relevante CBFb zeigte in der statistischen Auswertung keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen ( $p = 0,097$ ; Kruskal-Wallis-Test) in Bezug auf die relative Expression, sodass nicht davon auszugehen ist, dass im Rahmen der Differenzierung, dendritische Zellen entstanden sind (Tab. 7 und Abb. 16).

**Tab. 7: Relative Expression von CFBF**

Zellreihe	Relative Expression mit PBMCs als Bezugspunkt					
	PBMCs	OK Kontrolle	OK + BG 45S5	OK + BG 1393	OK + BG 1393BS	OK + BG 1393ges
ZK 01	1,00	1,55	0,92	0,87	0,56	1,35
ZK 02	1,00	3,71	2,86	1,43	1,72	2,44
ZK 03	1,00	2,60	1,90	1,54	2,04	2,42
ZK 04	1,00	1,19	1,22	0,88	NA	2,29
ZK 05	1,00	6,70	3,29	3,85	2,68	4,56
ZK 06	1,00	2,21	3,20	NA	1,51	0,90
Mittelwert	1,00	2,99	2,23	1,71	1,70	2,33
Median	1,00	2,99	2,38	1,43	1,72	2,36
Standardfehler	0,00	0,82	0,42	0,55	0,35	0,52
Standard- abweichung	0,00	2,02	1,03	1,23	0,78	1,26
p-Wert	0,097					

Relative Expression von CFBF in Osteoklasten mit Kontakt zu Bioglas, im Vergleich zu PBMCs ohne Kontakt zu Bioglas vom selben Spender. OK = Osteoklasten, PBMCs = Peripheral blood mononuclear cells, NA = unterhalb der Nachweisgrenze, CFBF = Core-binding factor subunit beta. Überprüfung auf signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen mithilfe des Kruskal-Wallis-Tests für nicht-verbundene Stichproben ( $p = 0,097$ ).

**Abb. 16: Relative Expression von CFBF**

Box-Whisker-Plots der relativen Expression von CFBF in Bezug auf die Expression in PBMCs für die verschiedenen Biogläser sowie die Kontrolle. Bei den mit \* oder ° markierten Werten handelt es sich um Ausreißer. Werte, welche mit ° dargestellt werden, stellen einfache Ausreißer dar und liegen unterhalb  $0,25 \text{ Quartils} - 1,5 * \text{IQR}$  oder oberhalb des  $0,75 \text{ Quartils} + 1,5 * \text{IQR}$ . Werte, welche mit \* dargestellt werden, stellen extreme Ausreißer dar und liegen entweder zwischen dem  $0,25 \text{ Quartil} - 1,5 * \text{IQR}$  und  $0,25 \text{ Quartil} - 3 * \text{IQR}$  oder dem  $0,75 \text{ Quartil} + 1,5 * \text{IQR}$  und  $0,75 \text{ Quartil} + 3 * \text{IQR}$ . CFBF = Core-binding factor subunit beta, PBMCs = Peripheral blood mononuclear cells.

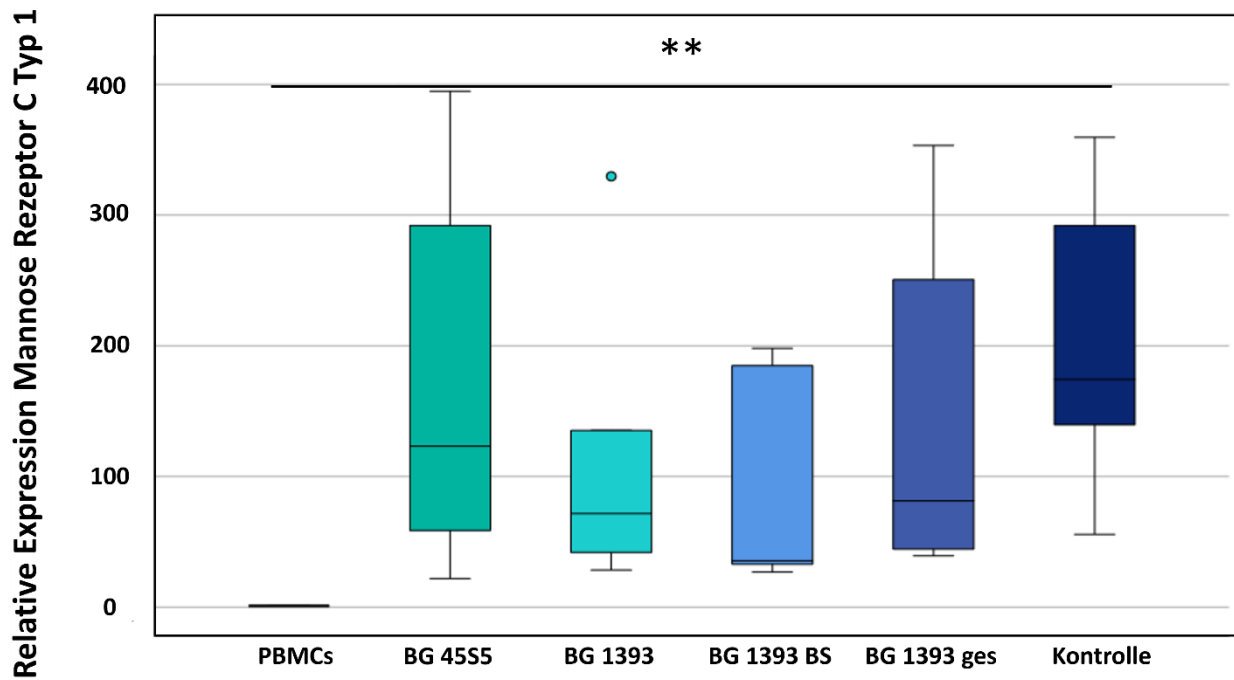
### 3.3.4 Mannose Rezeptor C Typ 1

Der für die Differenzierung in multinukleäre Zellen fungierende Mannose Rezeptor C Typ 1 (Mrc1/ CD206) zeigte in der Kultur ohne Fremdmaterial ( $199,26 \pm 109,53$ ) eine signifikant höhere Konzentration als die PBMCs ( $1,00 \pm 0,00$ ) ( $p = 0,014$ ; Friedmann-Analyse). Hierdurch konnte eine erfolgreiche Bildung multinukleärer Zellen aus PBMCs nachgewiesen werden. Für die Ansätze mit Bioglas konnte weder unter den Biogläsern untereinander noch zu den PBMCs oder dem Ansatz ohne Fremdmaterial signifikante Unterschiede ermittelt werden. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Bildung multinukleärer Zellen nicht oder nur in reduziertem Ausmaß unter dem Einfluss von Bioglas stattgefunden hat, ohne Fremdmaterial jedoch multinukleäre Zellen gebildet werden konnten (Tab. 8 und Abb. 17).

**Tab. 8: Relative Expression von Mannose Rezeptor Typ 1**

Zellreihe	Relative Expression mit PBMCs als Bezugspunkt					
	PBMCs	OK Kontrolle	OK + BG 45S5	OK + BG 1393	OK + BG 1393BS	OK + BG 1393ges
ZK 01	1,00	139,58	66,03	71,75	26,91	113,77
ZK 02	1,00	359,54	394,81	329,70	198,09	353,36
ZK 03	1,00	186,11	180,39	135,30	184,82	250,73
ZK 04	1,00	162,58	58,69	28,44	NA	48,84
ZK 05	1,00	55,72	22,01	41,93	33,01	39,40
ZK 06	1,00	247,28	292,04	NA	34,54	44,48
Mittelwert	1,00	199,26	169,00	121,42	95,67	141,76
Median	1,00	174,35	123,21	71,75	35,54	81,31
Standardfehler	0,00	44,71	60,73	55,23	39,18	53,54
Standardabweichung	0,00	109,53	148,75	123,50	87,62	131,15
p-Wert		0,01	1,00	1,06	2,42	0,92

Relative Expression von Mannose Rezeptor Typ 1 in Osteoklasten mit Kontakt zu Bioglas, im Vergleich zu PBMCs ohne Kontakt zu Bioglas vom selben Spender. OK = Osteoklasten, PBMCs = Peripheral blood mononuclear cells, NA = unterhalb der Nachweisgrenze. Überprüfung auf signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen mithilfe der Friedmann-Analyse für verbundene Stichproben.



**Abb. 17: Relative Expression des Mannose Rezeptor C Typ 1**

Box-Whisker-Plots der relativen Expression des Mannose Rezeptor C Typ 1 in Bezug auf die Expression in PBMCs für die verschiedenen Biogläser sowie die Kontrolle. \*\* entspricht  $p = 0,014$ . Bei den mit  $\circ$  markierten Werten handelt es sich um einfache Ausreißer, welche unterhalb des  $0,25$  Quartils  $- 1,5 * IQR$  oder oberhalb des  $0,75$  Quartils  $+ 1,5 * IQR$  liegen. PBMCs = Peripheral blood mononuclear cells.

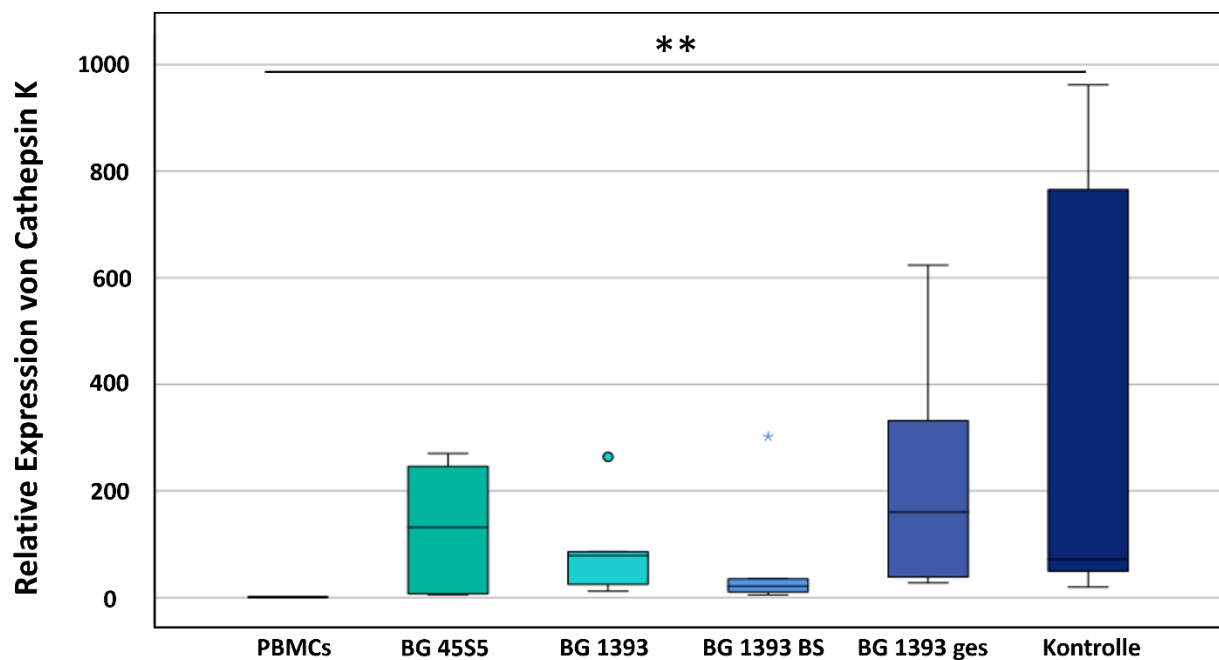
### 3.3.5 Cathepsin K

Für das lysosomale Enzym Cathepsin K konnten signifikant höhere Konzentrationen in der Osteoklasten-Kultur ohne Fremdmaterial ( $373,76 \pm 453,02$ ) als in den isolierten PBMCs ( $1,00 \pm 0,00$ ) festgestellt werden ( $p = 0,003$ ; Friedmann-Analyse), wodurch demonstriert wurde, dass die Osteoklastogenese in diesen Proben erfolgreich war. Durch die Zugabe der Biogläser zu den PBMCs konnte im Verlauf der Inkubationszeit kein signifikanter Anstieg der Cathepsin K Expression gemessen werden, wodurch eine mangelhafte Osteoklastogenese aufgezeigt wurde (Tab. 9 und Abb. 18).

**Tab. 9: Relative Expression von Cathepsin K im Vergleich zu PBMCs**

Zellreihe	Relative Expression mit PBMCs als Bezugspunkt					
	PBMCs	OK Kontrolle	OK + BG 45S5	OK + BG 1393	OK + BG 1393BS	OK + BG 1393ges
ZK 01	1,00	72,00	29,55	12,17	10,63	44,94
ZK 02	1,00	765,36	270,60	79,07	21,41	331,99
ZK 03	1,00	962,07	246,42	264,11	302,33	276,28
ZK 04	1,00	19,84	233,94	86,22	NA	623,83
ZK 05	1,00	49,52	7,24	24,85	5,31	27,86
ZK 06	1,00	NA	5,60	NA	35,26	38,59
Mittelwert	1,00	373,76	132,23	93,28	74,99	223,92
Median	1,00	72,00	131,75	79,07	21,41	160,61
Standardfehler	0,00	202,60	53,14	45,11	57,07	96,47
Standardabweichung	0,00	453,02	130,18	100,87	127,60	236,29
p-Wert		0,003	1,33	1,42	2,42	0,10

Relative Expression von Cathepsin K in Osteoklasten mit Kontakt zu Bioglas, im Vergleich zu PBMCs ohne Kontakt zu Bioglas vom selben Spender. OK = Osteoklasten, PBMCs = Peripheral blood mononuclear cells, NA = unterhalb der Nachweisgrenze. Überprüfung auf signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen mithilfe der Friedmann-Analyse für verbundene Stichproben.

**Abb. 18: Relative Expression von Cathepsin K**

Box-Whisker-Plots der relativen Expression von Cathepsin K in Bezug auf die Expression in PBMCs für die verschiedenen Biogläser sowie die Kontrolle. \*\* entspricht  $p = 0,003$ . Bei den mit \* oder ° markierten Werten handelt es sich um Ausreißer. Werte, welche mit ° dargestellt werden, stellen einfache Ausreißer dar und liegen unterhalb des  $0,25$  Quartils  $- 1,5 * IQR$  oder oberhalb des  $0,75$  Quartils  $+ 1,5 * IQR$ . Werte, welche mit \* dargestellt werden, stellen extreme Ausreißer dar und liegen entweder zwischen dem  $0,25$  Quartil  $- 1,5 * IQR$  und  $0,25$  Quartil  $- 3 * IQR$  oder dem  $0,75$  Quartil  $+ 1,5 * IQR$  und  $0,75$  Quartil  $+ 3 * IQR$ . PBMCs = Peripheral blood mononuclear cells.

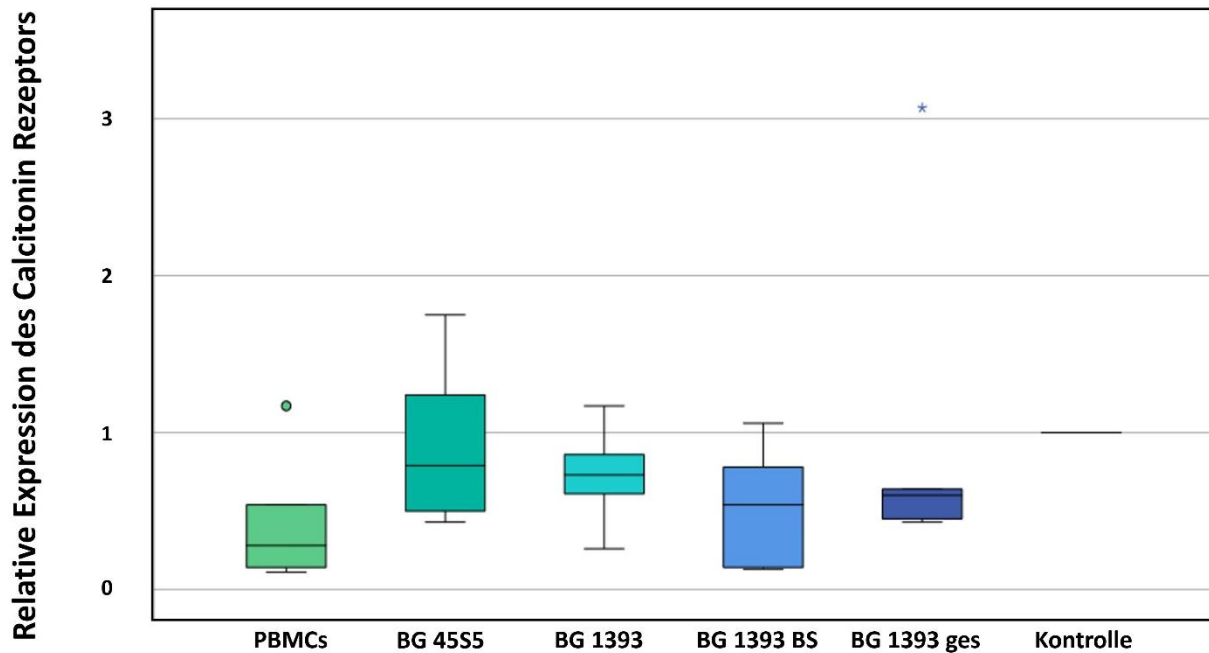
### 3.3.6 Calcitonin Rezeptor

Der Calcitonin-Rezeptor gehört zu den osteoklastenspezifischen Markern, welcher im Rahmen der Osteoklastogenese hochreguliert wird. Für den Calcitonin-Rezeptor lagen die Werte für PBMCs unterhalb der Nachweisgrenze, sodass keine Werte für die relative Expression ermittelt werden konnten, da der Bezugspunkt fehlt. Es kann also von einer erfolgreichen Induktion der Osteoklastogenese ausgegangen werden. Daher wurde für die Auswertung der Ergebnisse für den Calcitonin-Rezeptor, anstatt den PBMCs als Bezugspunkt, die Zellen ohne Kontakt zu Bioglas herangezogen. Bei dieser Form der Auswertung kommt es zu einer Änderung der absoluten Werte der Differenzen, nicht jedoch zu einer Änderung der relativen Expressionen und daher auch nicht zu einer Änderung der statistischen Signifikanzen. Hier konnten keine signifikanten Unterschiede ( $p = 0,21$ ; Kruskal-Wallis-Test) zwischen den Zellen mit Kontakt zu Bioglas untereinander, noch im Vergleich zu Zellen ohne Kontakt zu Bioglas nachgewiesen werden, sodass hier von einem gleichmäßigen, Bioglas-unabhängigen Expressionsprofil auszugehen ist (Tab. 10 und Abb. 19).

**Tab. 10: Relative Expression des Calcitonin Rezeptors**

Zellreihe	Relative Expression mit PBMCs als Bezugspunkt					
	PBMCs	OK Kontrolle	OK + BG 45S5	OK + BG 1393	OK + BG 1393BS	OK + BG 1393ges
ZK 01	1,17	1,00	0,96	0,73	0,78	0,64
ZK 02	0,19	1,00	0,62	0,26	0,14	0,58
ZK 03	0,11	1,00	0,43	0,61	0,54	0,45
ZK 04	0,54	1,00	1,75	1,17	NA	3,07
ZK 05	0,14	1,00	0,50	0,86	0,13	0,43
ZK 06	0,37	1,00	1,24	NA	1,06	0,62
Mittelwert	0,42	1,00	0,92	0,73	0,53	0,97
Median	0,28	1,00	0,79	0,73	0,54	0,60
Standardfehler	0,16	0,00	0,21	0,15	0,18	0,42
Standardabweichung	0,40	0,00	0,51	0,33	0,40	1,03
p-Wert	0,21					

Relative Expression des Calcitonin Rezeptors in Osteoklasten mit Kontakt zu Bioglas, im Vergleich zu Osteoklasten ohne Kontakt zu Bioglas vom selben Spender. OK = Osteoklasten, PBMCs = Peripheral blood mononuclear cells, NA = unterhalb der Nachweisgrenze. Überprüfung auf signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen mithilfe des Kruskal-Wallis-Tests für nicht-verbundene Stichproben ( $p = 0,21$ ).



**Abb. 19: Relative Expression des Calcitonin Rezeptors**

Box-Whisker-Plots der relativen Expression des Calcitonin Rezeptors in Bezug auf die Expression in Osteoklasten ohne Kontakt zu Fremdmaterial für die verschiedenen Biogläser. Bei den mit \* oder ° markierten Werten handelt es sich um Ausreißer. Werte, welche mit ° dargestellt werden, stellen einfache Ausreißer dar und liegen unterhalb des  $0,25 \text{ Quartils} - 1,5 * \text{IQR}$  oder oberhalb des  $0,75 \text{ Quartils} + 1,5 * \text{IQR}$ . Werte, welche mit \* dargestellt werden, stellen extreme Ausreißer dar und liegen entweder zwischen dem  $0,25 \text{ Quartil} - 1,5 * \text{IQR}$  und  $0,25 \text{ Quartil} - 3 * \text{IQR}$  oder dem  $0,75 \text{ Quartil} + 1,5 * \text{IQR}$  und  $0,75 \text{ Quartil} + 3 * \text{IQR}$ . PBMCs = Peripheral blood mononuclear cells.

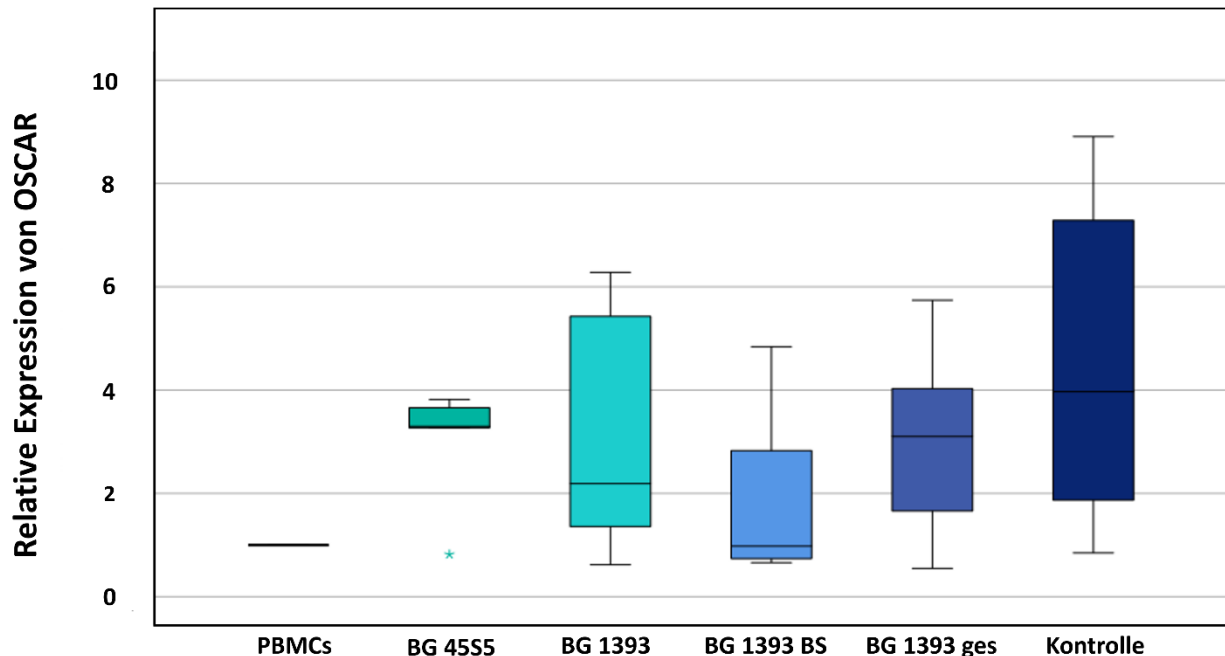
### 3.3.7 OSCAR

Der osteoklastenassoziierte Rezeptor OSCAR zeigte in der statistischen Auswertung keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen ( $p = 0,222$ ; Kruskal-Wallis-Test) in Bezug auf die relative Expression (Tab. 11 und Abb. 20). OSCAR wird v. a. während der Osteoklastogenese vermehrt exprimiert. Aus einer Normalverteilung kann nicht klar geschlussfolgert werden, wie die Verteilung der Zellen in ihrer Entwicklung in den einzelnen Gruppen zum Untersuchungszeitpunkt ist.

**Tab. 11: Relative Expression von OSCAR**

Zellreihe	Relative Expression mit PBMCs als Bezugspunkt					
	PBMCs	OK Kontrolle	OK + BG 45S5	OK + BG 1393	OK + BG 1393BS	OK + BG 1393ges
ZK 01	1,00	0,85	0,82	0,62	0,66	0,55
ZK 02	1,00	5,26	3,28	1,36	0,74	3,05
ZK 03	1,00	8,91	3,82	5,43	4,84	4,03
ZK 04	1,00	1,87	3,27	2,19	NA	5,74
ZK 05	1,00	7,29	3,66	6,28	0,98	3,16
ZK 06	1,00	2,68	3,32	NA	2,83	1,66
Mittelwert	1,00	4,48	3,03	3,18	2,01	3,03
Median	1,00	3,97	3,30	2,19	0,98	3,11
Standardfehler	0,00	1,31	0,45	1,13	0,81	0,74
Standardabweichung	0,00	3,20	1,11	2,53	1,82	1,81
p-Wert	0,222					

Relative Expression von OSCAR in Osteoklasten mit Kontakt zu Bioglas, im Vergleich zu PBMCs ohne Kontakt zu Bioglas vom selben Spender. OK = Osteoklasten, PBMCs = Peripheral blood mononuclear cells, NA = unterhalb der Nachweisgrenze, OSCAR = Osteoclast-associated immunoglobulin-like receptor. Überprüfung auf signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen mithilfe des Kruskal-Wallis-Tests für nicht-verbundene Stichproben ( $p = 0,222$ ).

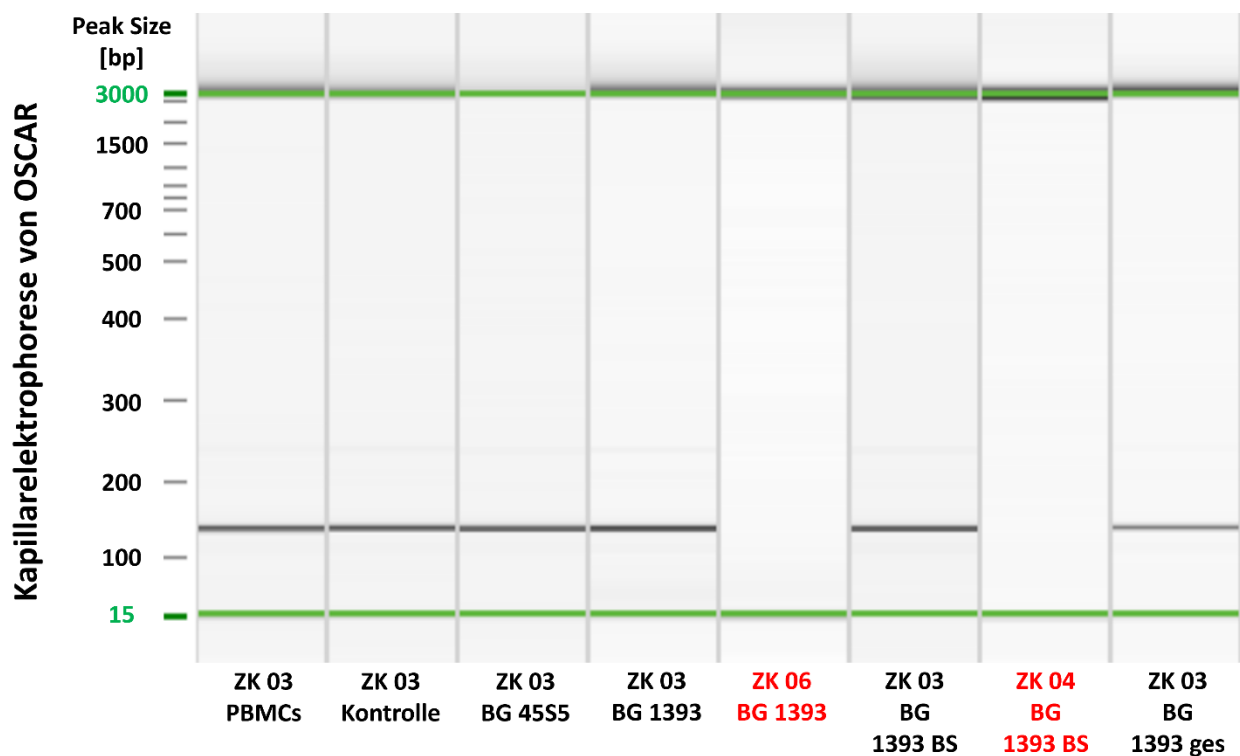
**Abb. 20: Relative Expression von OSCAR**

Box-Whisker-Plots der relativen Expression von OSCAR in Bezug auf die Expression in PBMCs für die verschiedenen Biogläser sowie die Kontrolle. Bei den mit \* markierten Werten handelt es sich um extreme Ausreißer, welche entweder zwischen dem 0,25 Quartil –  $1,5 * IQR$  und 0,25 Quartil –  $3 * IQR$  oder dem 0,75 Quartil +  $1,5 * IQR$  und 0,75 Quartil +  $3 * IQR$  liegen. OSCAR = Osteoclast-associated immunoglobulin-like receptor, PBMCs = Peripheral blood mononuclear cells.

### 3.4. Kapillarelektrophorese

Die Kapillarelektrophorese wurde für alle Proben durchgeführt, deren CT-Wert unterhalb der Nachweisgrenze in der Real-time PCR lagen, um auch Proben mit niedrigerer Konzentration zu detektieren.

Keine der Proben, die in der Real-time PCR unterhalb der Nachweisgrenze lagen, konnten in der Kapillarelektrophorese nachgewiesen werden. Dies wird hier exemplarisch für OSCAR (Abb. 21) dargestellt. Dieses Beispiel verdeutlicht, dass bei den entsprechenden Proben keine OSCAR-Expression für die Biogläser BG 1393 und BG 1393 BS vorlag.



#### Abb. 21: Exemplarische Darstellung der Kapillarelektrophorese für OSCAR

Kapillarelektrophorese der PCR-Produkte von OSCAR. Exemplarisch wurden alle Proben aus ZK 03 ermittelt. Für OSCAR konnten in der Real-time PCR keine CT-Werte für BG 1393 in ZK 06 sowie BG 1393 BS in ZK 04 (rot markiert) ermittelt werden. Die schwarzen Banden stellen das nachgewiesene PCR-Produkt dar, welches bereits in der Real-time PCR ermittelt werden konnte. ZK = Zellkultur, BG = Bioglas, bp = Basenpaar, OSCAR = Osteoclast-associated immunoglobulin-like receptor, PBMCs = Peripheral blood mononuclear cells

### 3.5. Funktionelle Assays

Funktionelle Assays liefern Aussagen über die Aktivität von Osteoklasten. Hierzu wurden die für Osteoklasten spezifischen Enzyme Carboanhydrase II und TRAP 5b untersucht. Beide Enzyme spielen eine entscheidende Rolle im Rahmen der Knochenresorption.

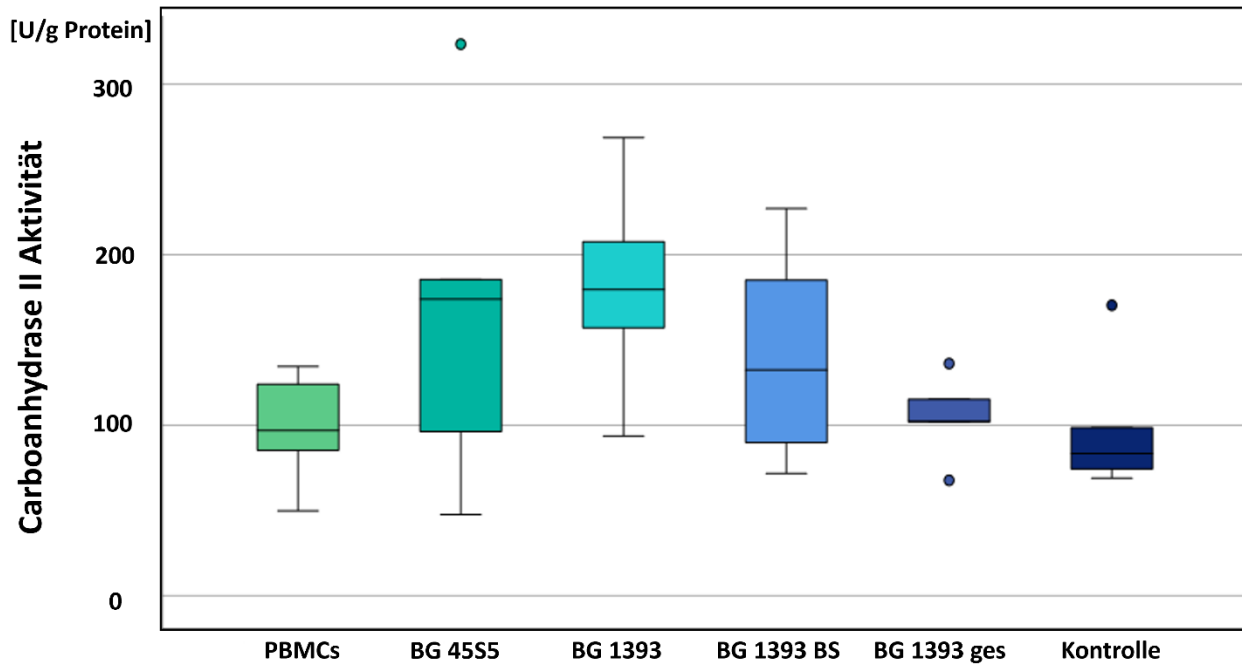
#### 3.5.1. Carboanhydrase II

Es war ein Nachweis einer Carboanhydrase II Aktivität in allen Proben möglich. Es zeigte sich eine Varianz hinsichtlich der Ergebnisse, wobei die Aktivität bei Zellen mit Kontakt zu Bioglas 1393 die höchsten Werte zeigte. In der statistischen Auswertung für Carboanhydrase II zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen ( $p = 0,107$ ; Kruskal-Wallis-Test). Es waren weder signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Biogläsern noch zwischen den Biogläsern und den PBMCs oder der Kultur ohne Fremdmaterial ermittelbar (Tab. 12 und Abb. 22).

**Tab. 12: Carboanhydrase II Aktivität [U/g Protein]**

Zellreihe	Carboanhydrase II Aktivität [U/g Protein]					
	PBMCs	OK Kontrolle	OK + BG 45S5	OK + BG 1393	OK + BG 1393BS	OK + BG 1393ges
ZK 01	85,31	98,65	168,24	93,68	89,89	136,22
ZK 02	97,02	85,17	185,55	194,20	154,20	67,73
ZK 03	NA	68,98	47,71	164,86	110,65	NA
ZK 04	124,05	74,38	179,70	207,69	185,17	102,13
ZK 05	49,86	81,83	96,36	268,73	227,16	102,23
ZK 06	134,51	170,40	323,54	71,71	115,28	115,28
Mittelwert	98,15	96,57	166,85	181,10	139,80	104,72
Median	97,02	83,50	173,97	179,64	132,43	102,23
Standardfehler	14,98	15,34	38,40	23,83	24,41	11,15
Standardabweichung	33,51	37,57	94,05	58,38	59,79	24,92
p-Wert	0,107					

OK = Osteoklasten, PBMCs = Peripheral blood mononuclear cells, ZK = Zellkultur, NA = unterhalb der Nachweisgrenze. Überprüfung auf signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen mithilfe des Kruskal-Wallis-Tests für nicht-verbundene Stichproben ( $p = 0,107$ ).



**Abb. 22: Carboanhydrase II Aktivität**

Box-Whisker-Plots der Carboanhydrase II Aktivität für die verschiedenen Biogläser sowie die Kontrolle. Bei den  $\circ$  markierten Werten handelt es sich um einfache Ausreißer, welche unterhalb des 0,25 Quartils  $- 1,5 * IQR$  oder oberhalb des 0,75 Quartils  $+ 1,5 * IQR$  liegen. BG = Bioglas, PBMCs = Peripheral blood mononuclear cells.

### 3.5.2. TRAP 5b

In der statistischen Auswertung konnte eine statistisch signifikant stärkere Aktivität von TRAP 5b für Zellen ohne Kontakt zu Bioglas ( $16,79 \pm 10,77$ ) im Vergleich zu PBMCs ( $4,49 \pm 4,57$ ) ( $p = 0,032$ ; Mann-Whitney-U-Test) festgestellt werden. Dieses Ergebnis zeigt, dass ohne Bioglas funktionell aktive Osteoklasten im Rahmen der Osteoklastogenese entstanden sind. Zusätzlich konnte festgestellt werden, dass Zellen mit Kontakt zu Bioglas 1393 ges ( $6,71 \pm 3,09$ ) eine signifikant geringere TRAP 5b Aktivität im Vergleich zu Zellen ohne Kontakt zu Bioglas ( $16,79 \pm 10,77$ ) ( $p = 0,032$ ; Mann-Whitney-U-Test) aufweisen, sodass ohne Bioglas 1393 ges mehr funktionell aktive Osteoklasten entstanden sein müssen (Tab. 13 und Abb. 23).

Tab. 13: TRAP 5b Aktivität [U/g Protein]

Zellreihe	TRAP 5b Aktivität [U/g Protein]					
	PBMCs	OK Kontrolle	OK + BG 45S5	OK + BG 1393	OK + BG 1393BS	OK + BG 1393ges
ZK 02	9,26	14,14	8,63	9,59	5,20	8,46
ZK 03	9,13	16,02	7,13	5,10	2,31	5,41
ZK 04	3,90	12,95	9,14	15,65	3,96	11,27
ZK 05	0,00	6,02	2,12	6,72	10,95	4,33
ZK 06	0,17	34,83	9,52	10,11	1,58	4,08
Mittelwert	4,49	16,79	7,31	9,43	4,80	6,71
Median	3,90	14,14	8,63	9,59	3,96	5,41
Standardfehler	2,04	4,82	1,36	1,81	1,66	1,38
Standard- abweichung	4,57	10,77	3,04	4,04	3,72	3,09
p-Wert		0,032				0,032

BG = Bioglas, OK = Osteoklasten, PBMCs = Peripheral blood mononuclear cells, TRAP 5b = Tartratresistente saure Phosphatase Typ 5b, ZK = Zellkultur. Überprüfung auf signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests für nicht-verbundene Stichproben

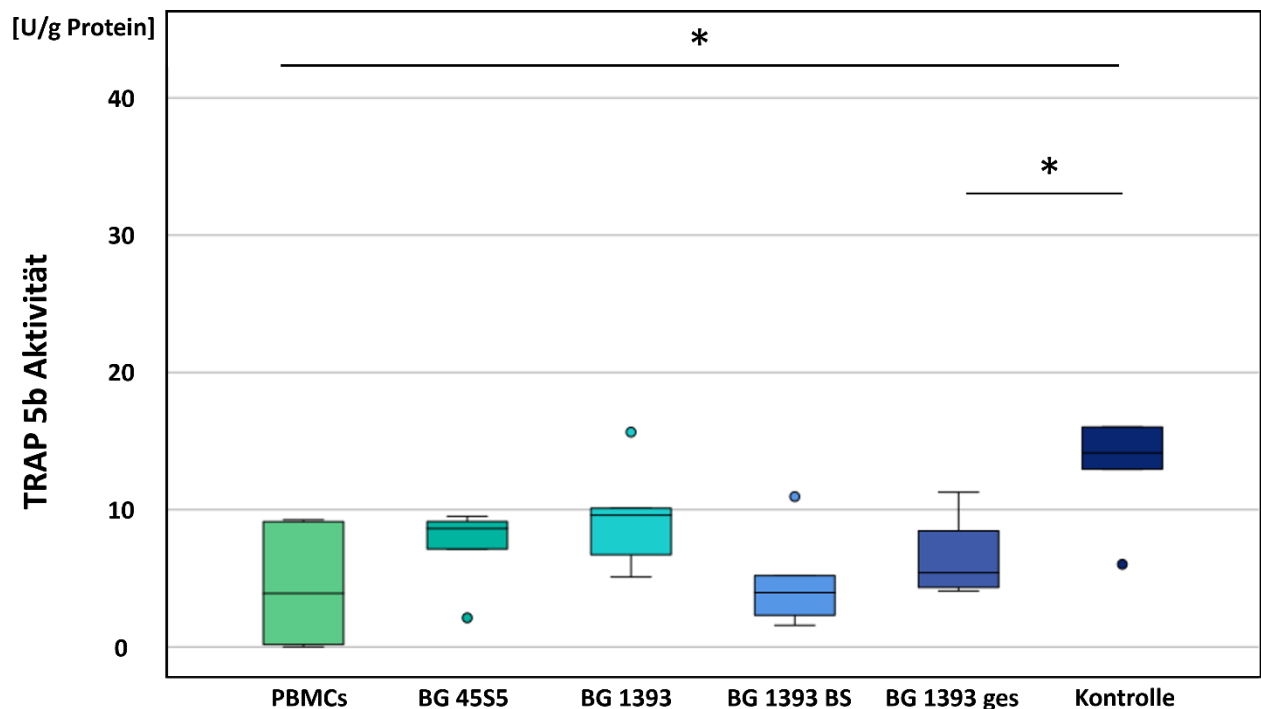


Abb. 23: TRAP 5b Aktivität

Box-Whisker-Plots der TRAP 5b Aktivität für die verschiedenen Biogläser sowie die Kontrolle. \* entsprechen je  $p = 0,032$ . Bei den mit \* oder ° markierten Werten handelt es sich um Ausreißer. Werte, welche mit ° dargestellt werden, stellen einfache Ausreißer dar und liegen unterhalb des 0,25 Quartils  $- 1,5 * IQR$  oder oberhalb des 0,75 Quartils  $+ 1,5 * IQR$ . Werte, welche mit \* dargestellt werden, stellen extreme Ausreißer dar und liegen entweder zwischen dem 0,25 Quartil  $- 1,5 * IQR$  und  $0,25 \text{ Quartil} - 3 * IQR$  oder dem  $0,75 \text{ Quartil} + 1,5 * IQR$  und  $0,75 \text{ Quartil} + 3 * IQR$ . TRAP 5b = Tartratresistente saure Phosphatase Typ 5b, PBMCs = Peripheral blood mononuclear cells.

### 3.6. Immunfluoreszenzmikroskopie

Mittels immunfluoreszenzmikroskopischer Untersuchung sollte geklärt werden, ob die Zellen auch auf dem Material adhäreren und sich entwickeln können. Hierzu wurden in einer separat angelegten Untersuchung (n = 1), jeweils zwei Biogläser jeder Art nach 8 Tagen Inkubation betrachtet. Im Rahmen der Immunhistochemie wurden Aktinfasern des Zytoskeletts (FITC) und die DNA zur Darstellung der Zellkerne (Hoechst BisBenzimide H33258) markiert.

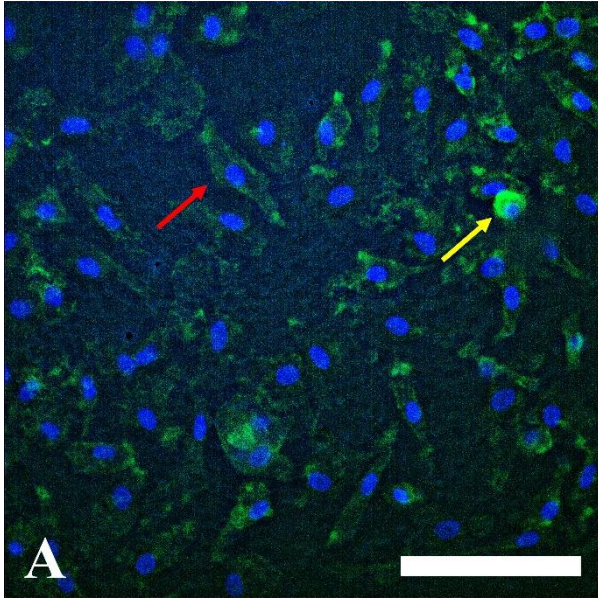
Bei der Untersuchung von Bioglas 45S5 zeigte das Material eine starke Eigenfluoreszenz, sodass nur in niedrigen Vergrößerungen Zellen nachgewiesen werden konnten. Hierbei präsentierte sich ein dichtes Netz aus Zellen, wobei Osteoklasten im Entwicklungsstadium 2 dominierten. Vereinzelt waren Zellen bis Stadium 3 zu sehen (Abb. 24). Insgesamt konnten jedoch keine multinukleären Osteoklasten nachgewiesen werden.

Auf Bioglas 1393 zeigte sich ein dichtes Netz aus Zellen aller Entwicklungsstadien, wobei hauptsächlich frühe Stadien zu finden waren (Abb. 25).

Bei der Betrachtung von Bioglas 1393 BS zeigten sich einzelne Zellnestern aus überwiegend Zellen im Stadium 1. Daneben konnten vereinzelt Osteoklasten im Stadium 2, jedoch keine multinukleären Osteoklasten, beobachtet werden (Abb. 26).

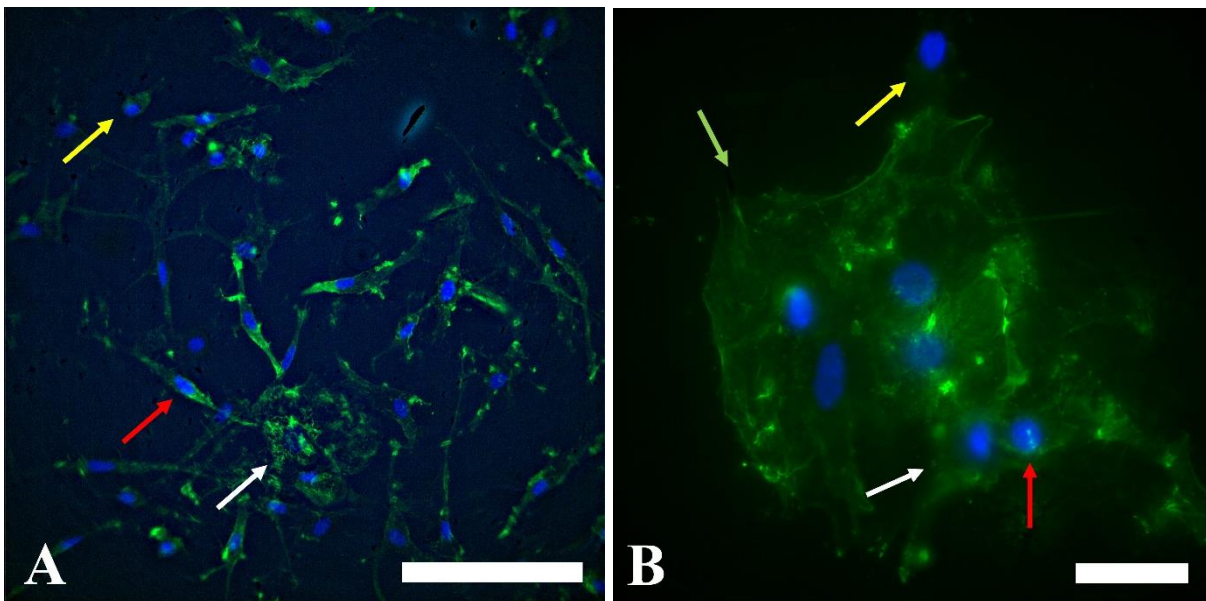
Bioglas 1393 ges zeigte von allen untersuchten Materialien am wenigsten Eigenfluoreszenz. Hier präsentierten sich Zellen aller Entwicklungsstadien, wobei frühe Stufen vorherrschend waren (Abb. 27).

Die morphologische Lebendzellbeobachtung einer parallelen Kultur ohne Fremdmaterial mit Zellen desselben Spenders, zeigte nach 8 Tagen Inkubation ein dichtes Zellnetz aus großen multinukleären Zellen gemäß Entwicklungsstadium 4, sodass die Osteoklastogenese hier erfolgreich war. Insgesamt wurde direkt auf der Materialoberfläche eine reduzierte Zelldichte mit einer langsamer ablaufenden Differenzierung als bei Zellen ohne Kontakt zu Bioglas beobachtet. Bei Bioglas 1393 sowie Bioglas 1393 ges zeigten sich am meisten multinukleäre Zellen.



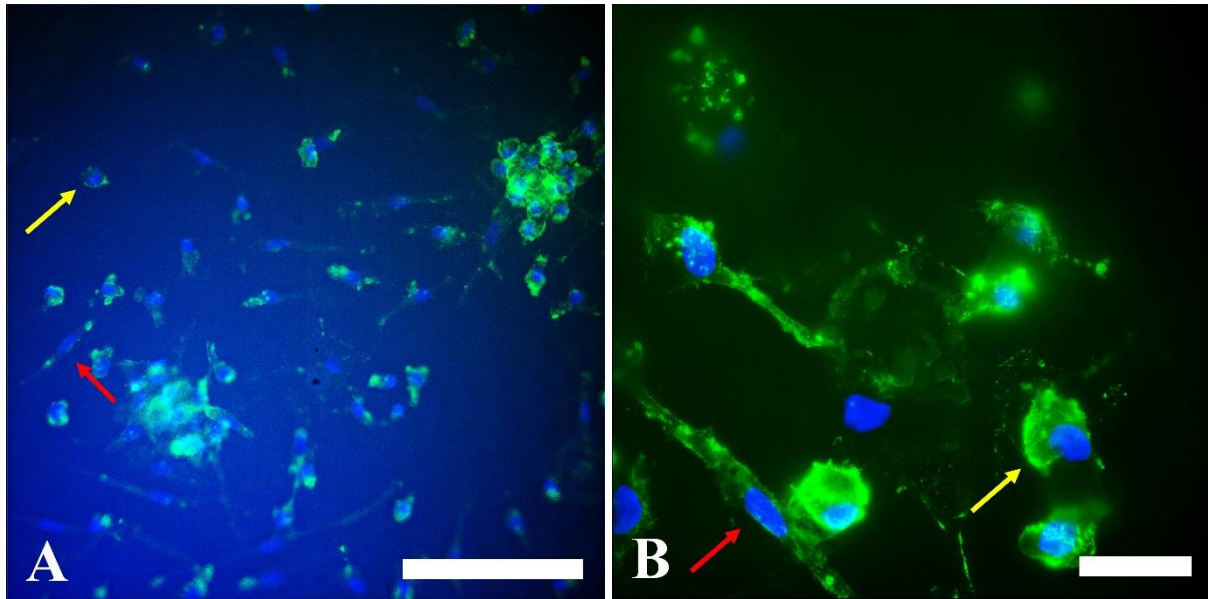
**Abb. 24: Immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchung von Bioglas 45S5**

(A) Übersichtsaufnahme von Bioglas 45S5 mit vorwiegend Zellen in Stadium 1 sowie Stadium 2. Aufgrund der starken Eigenfluoreszenz von Bioglas 45S5 konnte keine geeignete Detailaufnahme angefertigt werden. Grün: Aktinfilamente, Blau: Zellkerne, Gelber Pfeil: Entwicklungsstadium 1, Roter Pfeil: Entwicklungsstadium 2. (A) Maßstab 100  $\mu\text{m}$ .



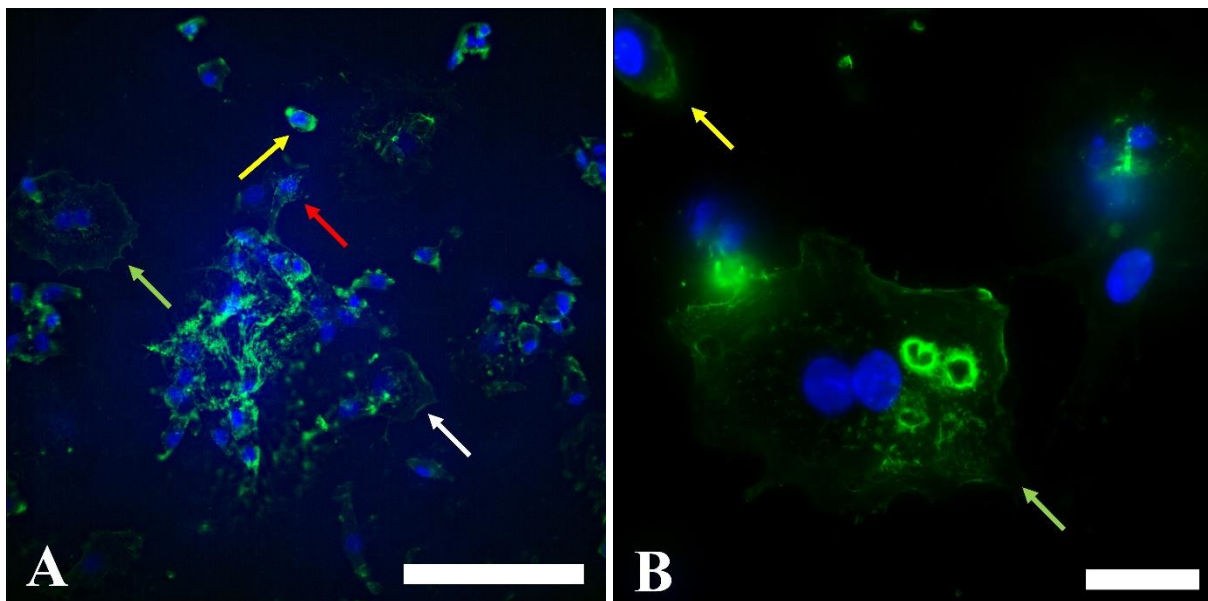
**Abb. 25: Immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchung von Bioglas 1393**

(A) Übersichtsaufnahme von Bioglas 1393 mit wenigen Zellen in Entwicklungsstadium 1, zahlreichen Zellen in Entwicklungsstadium 2 sowie vereinzelt weiterentwickelten Zellen, z. B. Entwicklungsstadium 3. (B) Detailaufnahme von Bioglas 1393, mit allen Entwicklungsstadien in sich teils überlagernder Darstellung. Grün: Aktinfilamente, Blau: Zellkerne, Gelber Pfeil: Entwicklungsstadium 1, Roter Pfeil: Entwicklungsstadium 2, Weißer Pfeil: Entwicklungsstadium 3, Grüner Pfeil: Entwicklungsstadium 4. (A) Maßstab 100  $\mu\text{m}$ , (B) Maßstab 50  $\mu\text{m}$ .



**Abb. 26: Immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchung von Bioglas 1393 BS**

(A) Übersichtsaufnahme von Bioglas 1393 BS mit vorwiegend Zellen in Entwicklungsstadium 1 und Entwicklungsstadium 2. (B) Detailaufnahme von Bioglas 1393 BS mit vergrößerter Darstellung der Zellen in Entwicklungsstadium 1 und 2. Weiter differenzierte Zellen wurden nicht gesehen. Grün: Aktinfilamente, Blau: Zellkerne, Gelber Pfeil: Entwicklungsstadium 1, Roter Pfeil: Entwicklungsstadium 2. (A) Maßstab 100  $\mu\text{m}$ , (B) Maßstab 50  $\mu\text{m}$ .



**Abb. 27: Immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchung von Bioglas 1393 ges**

(A) Übersichtsaufnahme von Bioglas 1393 ges mit Darstellung von Zellen aller Entwicklungsstadien, (B) Detailaufnahme von Bioglas 1393 ges mit exemplarischer Darstellung von Zellen in Entwicklungsstadium 1 und 4. Grün: Aktinfilamente, Blau: Zellkerne, Gelber Pfeil: Entwicklungsstadium 1, Roter Pfeil: Entwicklungsstadium 2, Weißer Pfeil: Entwicklungsstadium 3, Grüner Pfeil: Entwicklungsstadium 4. (A) Maßstab 100  $\mu\text{m}$ , (B) Maßstab 50  $\mu\text{m}$ .

### 3.7. Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Mithilfe der Rasterelektronenmikroskopie (REM) wurde die Oberfläche der verschiedenen Biogläser in einer repräsentativen Untersuchung betrachtet. Der Fokus lag auf der Suche nach von Osteoklasten verursachten Veränderungen wie Resorptionslakunen. Hierzu wurden die Biogläser zunächst unkultiviert im nativen Zustand untersucht. Im Anschluss wurde jedes Bioglas einmal für 8 Tage und einmal für 14 Tage mit Osteoklasten kultiviert und im Anschluss im Rasterelektronenmikroskop untersucht. Zur Beurteilung der Oberflächenbeschaffenheit bzw. -veränderung, wurden die Zellen entfernt. Es erfolgte keine Betrachtung mit Zellen.

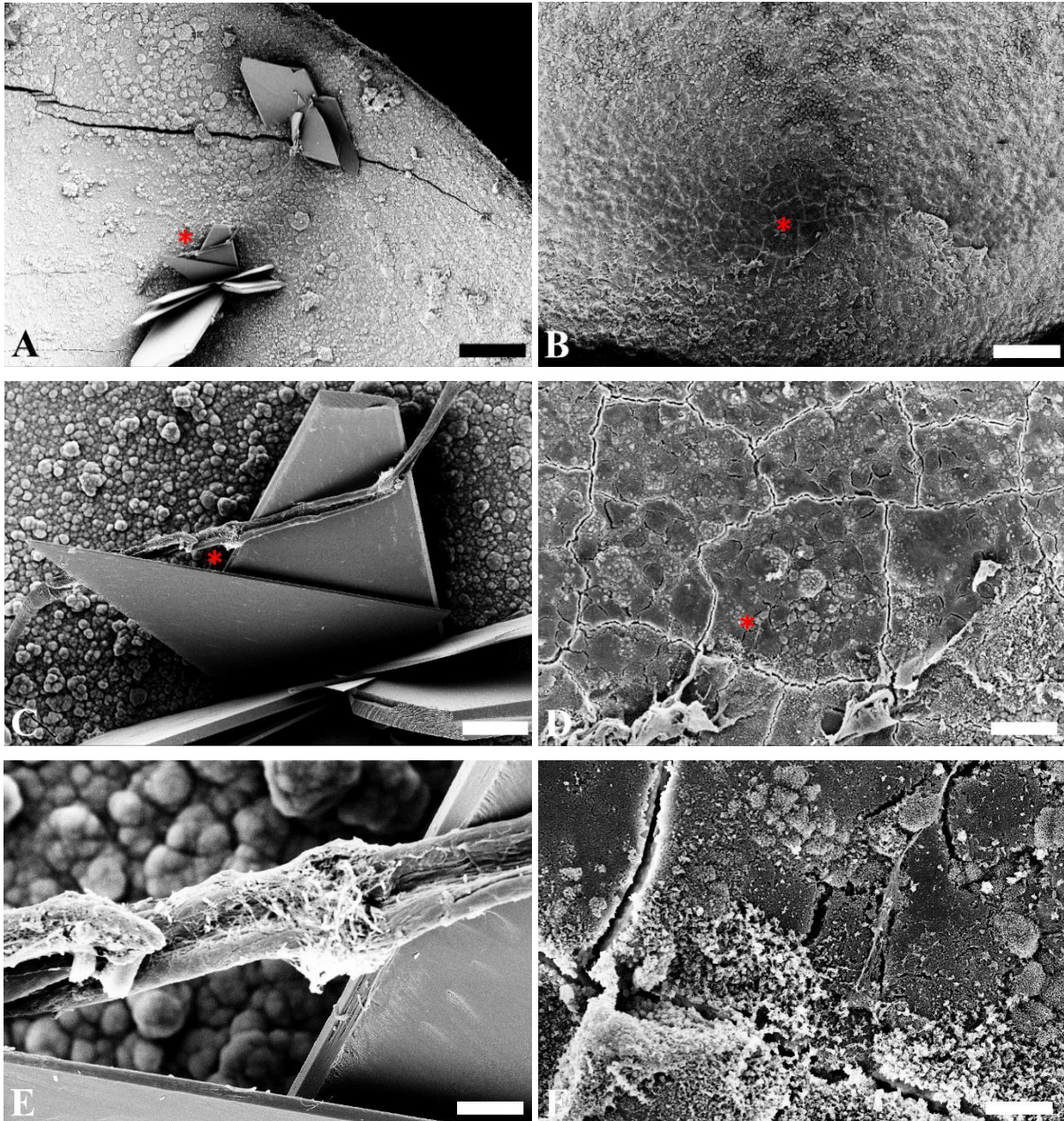
Unverändertes Bioglas 45S5 zeigte eine vielfältige Oberflächenstruktur mit kugel- und pyramidenförmigen Erhebungen, kristallartigen Strukturen und fadenartigen Gebilden. In kultivierten Proben zeigte sich die Oberfläche mit scholliger Grundstruktur und zusätzlich faden- und netzartigen Strukturen (Abb. 28). Es zeigte sich jedoch kein Hinweis auf die Entstehung von für Osteoklasten charakteristische Resorptionslakunen.

Bioglas 1393 zeigt natürlicherweise eine kugelige Oberfläche mit stellenweise fadenartig konfigurierten Stellen. Auch nach Kontakt mit Osteoklasten dominiert die Oberfläche mit einer kugel- und kristalloiden Grundstruktur. Es waren keine Resorptionslakunen zu beobachten. Es konnten keine Unterschiede zwischen der unkultivierten und der besiedelten Oberfläche festgestellt werden (Abb. 29). Zusätzlich zeigte sich eine spindelförmige Struktur (Abb. 29B), welche auf den ersten Blick wie eine Zelle in Entwicklungsstadium 2 erscheint. Bei Vergleich der durchschnittlichen Größe einer Zelle in diesem Entwicklungsstadium (ca. 50  $\mu\text{m}$ ) sowie der Größe dieser Struktur (ca. 1000  $\mu\text{m}$ ) muss es sich hierbei um die natürliche Oberfläche des Bioglasses handeln. Zusätzlich wurden im Rahmen der Präparationsschritte alle Zellen entfernt.

Die Oberfläche von nativem Bioglas 1393 BS präsentiert sich mit einem feingranulierten, teils scholligen Muster. Daneben finden sich fadenförmige Strukturen sowie flache, teils kugelige Objekte. Nachdem das Material in der Zellkultur war, dominiert die Oberfläche kugelig, mit zusätzlich fadenartigen Gebilden. Auch hier konnten keine Resorptionslakunen detektiert werden. Es liegen keine eindeutigen Unterschiede von Bioglas 1393 BS vor bzw. nach der Besiedelung vor (Abb. 30).

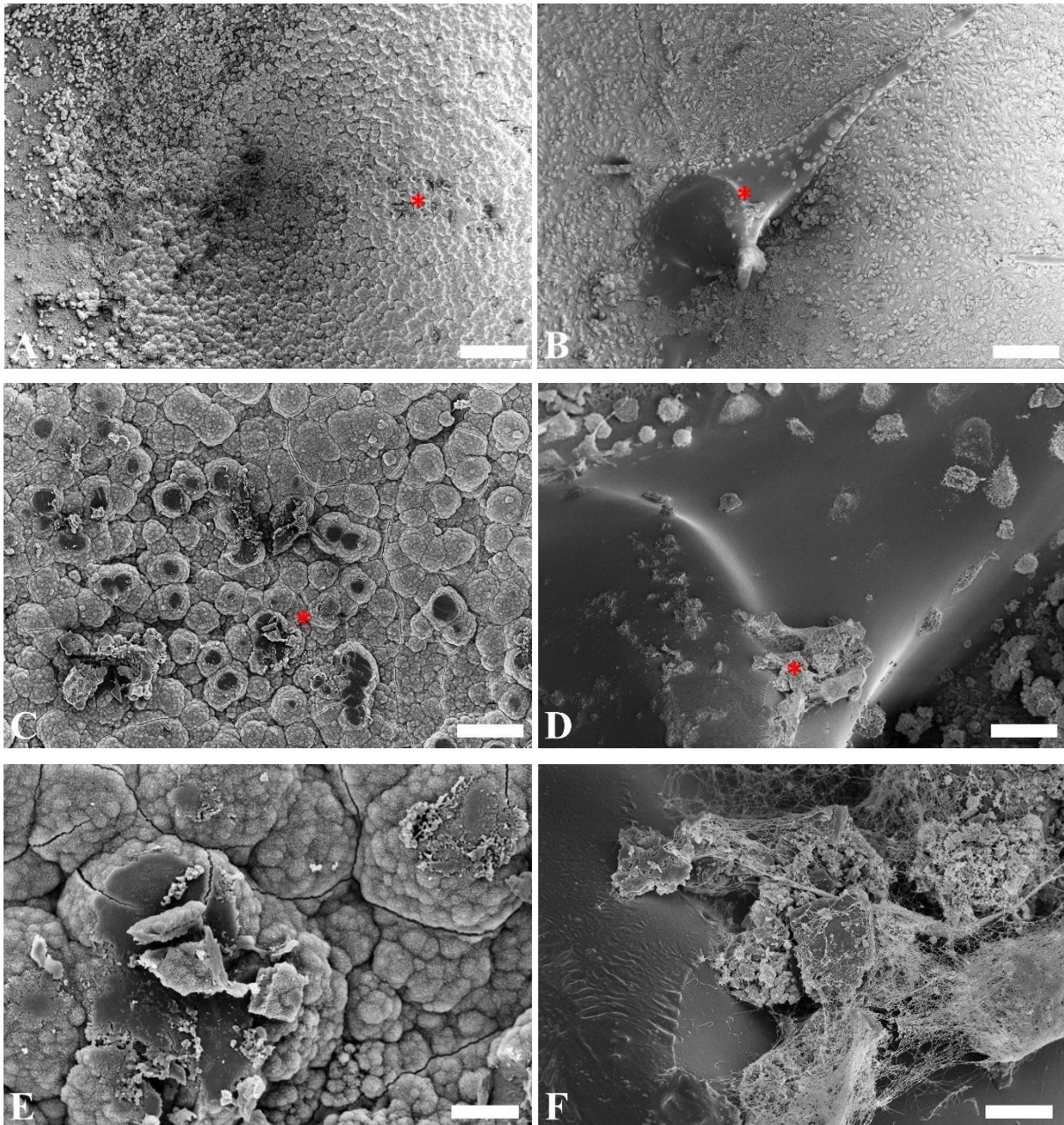
Bioglas 1393 ges hat von Natur aus eine plane Oberfläche mit kleinen stäbchenförmigen und ungeformten flachen Auflagerungen. Auch hier zeigen sich fadenförmige Gebilde. Nach Besiedelung mit Osteoklasten ist die Oberfläche von kleinen runden bis längsovalen Strukturen mit stellenweise scholligen Auflagerungen und fadenförmigen Strukturen durchsetzt.

Vereinzelt zeigen sich dunkle, ebene Flächen. Auch hier ergab sich kein Hinweis auf Resorptionslakunen oder einen Unterschied zwischen fehlendem oder bestehendem Kontakt mit Zellen (Abb. 31).



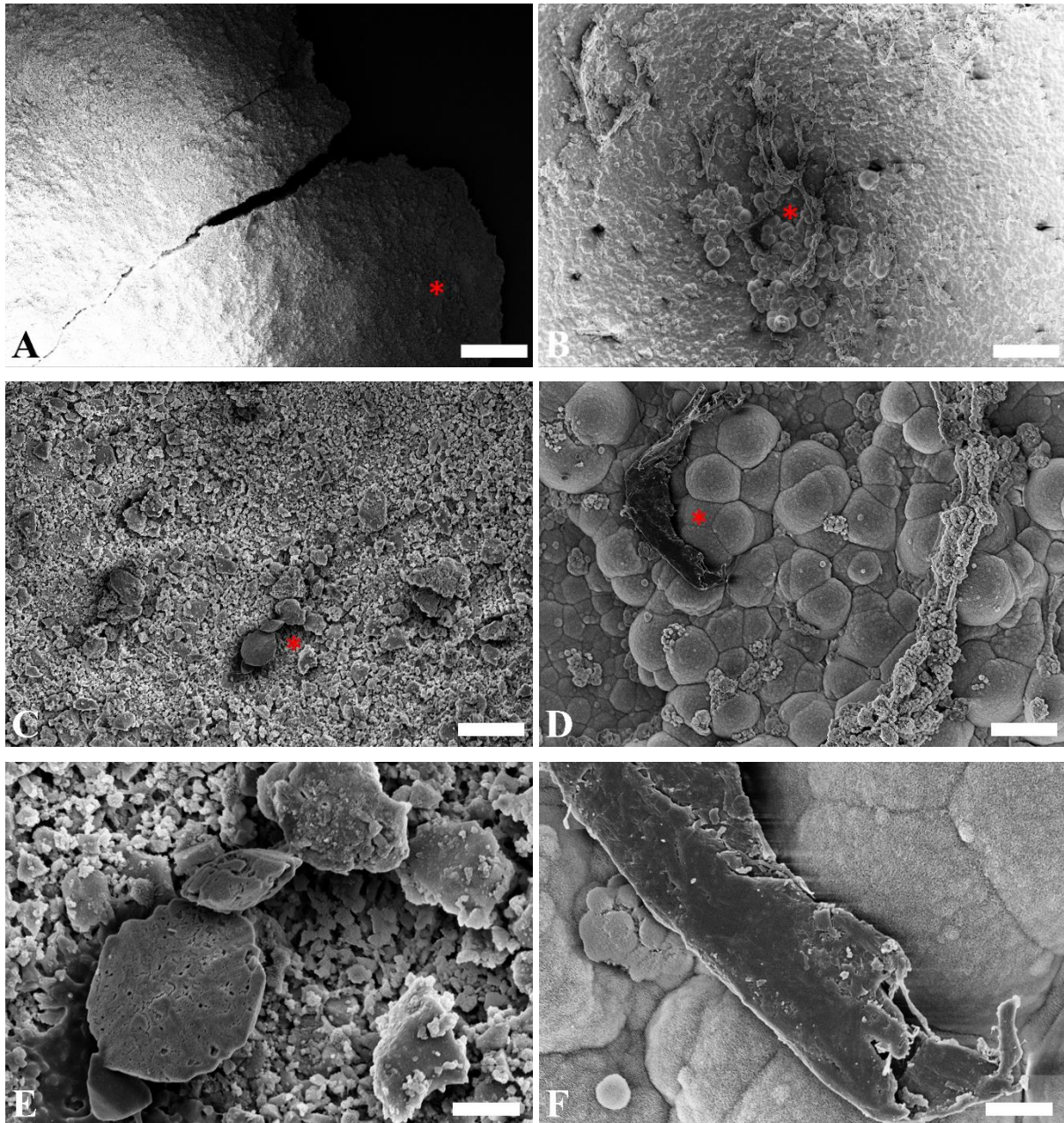
**Abb. 28: Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung von Bioglas 45S5**

Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung von Bioglas 45S5. Links (A, C, E) zeigt sich beispielhaft die Oberflächenstruktur von nativem Bioglas 45S5. Rechts (B, D, F) ist repräsentativ die Oberfläche von Bioglas 45S5 nach 8 Tagen Kontakt mit Osteoklasten dargestellt. Der mit \* markierte Bereich wird jeweils vergrößert dargestellt. (A, B) Maßstab: 250  $\mu\text{m}$ . (C, D) Maßstab: 50  $\mu\text{m}$ . (E, F) Maßstab: 10  $\mu\text{m}$ .



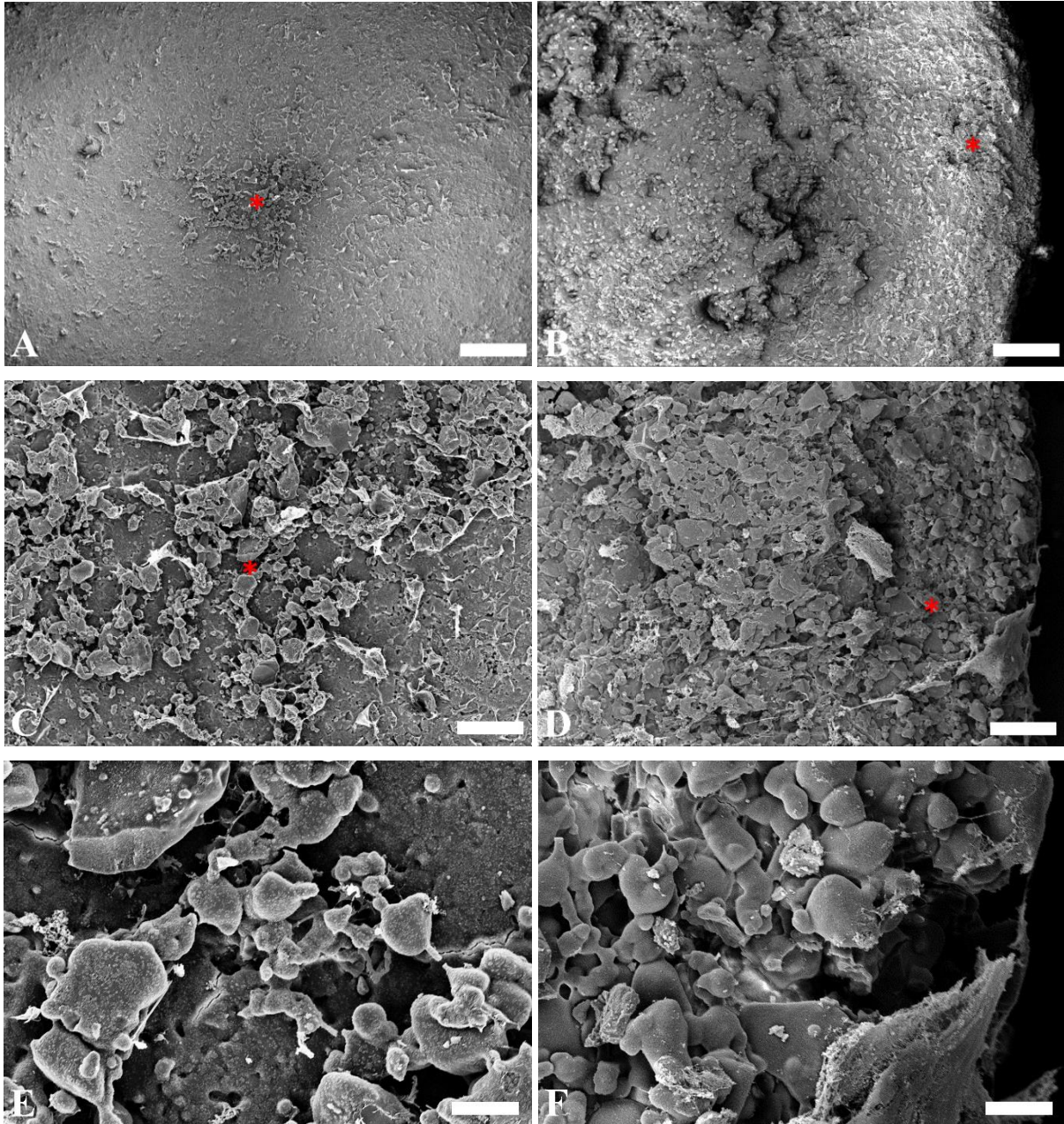
**Abb. 29: Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung von Bioglas 1393**

Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung von Bioglas 1393. Links (A, C, E) zeigt sich beispielhaft die Oberflächenstruktur von nativem Bioglas 1393. Rechts (B, D, F) ist repräsentativ die Oberfläche von Bioglas 1393 nach 8 Tagen Kontakt mit Osteoklasten dargestellt. Der mit \* markierte Bereich wird jeweils vergrößert dargestellt. (A, B) Maßstab: 250  $\mu\text{m}$ . (C, D) Maßstab: 50  $\mu\text{m}$ . (E, F) Maßstab: 10  $\mu\text{m}$ .



**Abb. 30: Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung von Bioglas 1393BS**

Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung von Bioglas 1393. Links (A, C, E) zeigt sich beispielhaft die Oberflächenstruktur von nativem Bioglas 1393. Rechts (B, D, F) ist repräsentativ die Oberfläche von Bioglas 1393 nach 8 Tagen Kontakt mit Osteoklasten dargestellt. Der mit \* markierte Bereich wird jeweils vergrößert dargestellt. (A, B) Maßstab: 250  $\mu\text{m}$ . (C, D) Maßstab: 50  $\mu\text{m}$ . (E, F) Maßstab: 10  $\mu\text{m}$ .



**Abb. 31: Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung von Bioglas 1393ges**

Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung von Bioglas 1393ges. Links (A, C, E) zeigt sich beispielhaft die Oberflächenstruktur von nativem Bioglas 1393ges. Rechts (B, D, F) ist repräsentativ die Oberfläche von Bioglas 1393ges nach 8 Tagen Kontakt mit Osteoklasten dargestellt. (A, B) Übersicht in 100-facher Vergrößerung. Der mit \* markierte Bereich wird jeweils vergrößert dargestellt. (A, B) Maßstab: 250  $\mu\text{m}$ . (C, D) Maßstab: 50 $\mu\text{m}$ . (E, F) Maßstab: 10  $\mu\text{m}$ .

## 4. Diskussion

Ziel dieser Studie war die Untersuchung des Einflusses verschiedener Biogläser auf die Osteoklastogenese sowie die Aktivität reifer Osteoklasten. Bioglas 45S5 gehört zu den am besten untersuchten Biogläsern, wobei der Fokus bislang auf den osteoinduktiven Eigenschaften liegt. So konnte gezeigt werden, dass Bioglas 45S5 die Expression einer Vielzahl an Genen steigert, und so seine osteogenen Eigenschaften entfaltet (Xynos et al. 2001; Ferraz et al. 2017). Auch für Bioglas 1393 konnte an murinen MC3T3-E1 Osteoblasten eine Steigerung der Expression osteoblastischer Gene sowie eine ausgeprägte Adhärenz auf der Oberfläche sowie in den Poren des Bioglasses nachgewiesen werden (Brown et al. 2008).

Bisherige Studien zu Osteoklasten konnten einen positiven, konzentrationsabhängigen Effekt auf die Differenzierung und Vitalität von murinen RAW 264.7 Zellen (Makrophagen) unter dem Einfluss von Bioglas 45S5 nachweisen (Detsch et al. 2016).

In der Literaturrecherche zeigte sich ein großes Defizit hinsichtlich der Untersuchung des Einflusses von Bioglas auf humane Osteoklasten. Obwohl bereits zahlreiche Untersuchungen an Bioglas 45S5 und teilweise an Bioglas 1393 sowohl in vitro, als auch in vivo an Tieren und teilweise auch am Menschen durchgeführt worden sind, gibt es bislang nur wenige Informationen zu den Biogläsern 1393 BS und 1393 ges (Detsch et al. 2016; Diba et al. 2019). Der Fokus dieser Studie lag also darauf, sowohl erste Erkenntnisse über die Interaktion zwischen Bioglas und humanen Osteoklasten zu erhalten als auch bislang weniger bekannte Biogläser näher zu untersuchen und mit den bislang bekannteren Vertretern zu vergleichen.

Neben den bislang fehlenden Studien zum Einfluss von Bioglas auf Osteoklasten gibt es zudem keine Informationen dazu, welche Methoden sich gut für die Untersuchung von Bioglas exponierten Osteoklasten eignen (Sirkiä et al. 2021).

### 4.1. Methodendiskussion

Grundlage dieser Untersuchung bildet die Isolation von Monozyten aus humanen PBMCs. Unter dem Einfluss von RANKL und M-CSF wurde deren Entwicklung zu Osteoklasten induziert. Dabei wurden den einzelnen Versuchsansätzen Bioglas 45S5, Bioglas 1393, Bioglas 1393 BS und Bioglas 1393 ges als Fremdmaterial beigelegt. Ein Ansatz pro Versuchsreihe blieb als Kontrolle jeweils ohne Fremdmaterial.

Während des Differenzierungsprozesses erfolgte eine regelmäßige pH-Wert Kontrolle am Kulturmedium sowie eine repräsentative Lebendzellbeobachtung am Ansatz ohne Fremdmaterial. Nach 8 Tagen in der Zellkultur erfolgte die Zellernte.

Zur Untersuchung der genetischen Ausstattung der gezüchteten Zellen wurde mRNA isoliert, zu cDNA transkribiert und mittels Real-time PCR analysiert. Dabei erfolgte die quantitative Bestimmung von CD14, Mannose Rezeptor C Typ 1, CFBF, Cathepsin K, Calcitonin Rezeptor und OSCAR. Nicht nachweisbare Proben wurden zum sicheren Ausschluss zusätzlich mittels Kapillarelektrophorese kontrolliert.

Um eine Aussage hinsichtlich der Aktivität der gezüchteten Zellen treffen zu können, wurden TRAP 5b und Carboanhydrase II Assays durchgeführt.

Zur Beurteilung der Adhärenz von Osteoklasten auf dem Fremdmaterial wurde die Immunfluoreszenzmikroskopie durchgeführt. In der Rasterelektronenmikroskopie wurde das Bioglas auf charakteristische Resorptionslakunen untersucht, um feststellen zu können, ob die gezüchteten Zellen in der Lage sind, das Bioglas zu resorbieren.

### 4.1.1. Zellkultur

Die Grundlage dieser Arbeit bildet die Differenzierung von Osteoklasten aus humanen hämatopoetischen Stammzellen unter dem Einfluss von RANKL und M-CSF (Hemingway et al. 2011; Marino et al. 2014). In dieser Untersuchung wurden die mononukleären Zellen dabei aus peripherem Blut (PBMCs) gewonnen. Neben PBMCs steht die Isolation von Zellen aus neonatalen Tierknochen, Knochenmark sowie Vollblut als Quelle für hämatopoetische Stammzellen zur Verfügung (Schilling et al. 2004; Marino et al. 2014).

Vor der Erfindung der *in vitro* Kultivierung von Osteoklasten, war die Zellgewinnung durch Fragmentierung neonataler Tierknochen die einzige Methode zur Gewinnung von Osteoklastenvorläuferzellen (Chambers et al. 1984; Marino et al. 2014). Seit der Entdeckung des Einflusses von M-CSF und RANKL auf die Osteoklastogenese und der erfolgreichen *in vitro* Kultivierung ohne Co-Kultivierung mit Osteoblasten, ist diese Methode in den Hintergrund geraten (Susa et al. 2004). Inzwischen gibt es etablierte Verfahren zur Differenzierung von Osteoklasten aus hämatopoetischen Stammzellen, sodass die Methode mittels Gewinnung von Zellen durch Fragmentierung neonataler Tierknochen heute sowohl aus Tierschutzgründen als auch aufgrund des sehr aufwendigen Procederes kritisch zu bewerten ist.

Zudem liegt aufgrund der zunehmenden Translation von Bioglas in die Klinik der besondere Fokus dieser Studie auf der Untersuchung humaner Osteoklasten, sodass tierische Zellen hier nicht geeignet sind.

Bei der Isolation von Stammzellen aus dem Knochenmark gibt es kontroverse Ansichten, ob durch dieses Verfahren, mehr oder weniger Zellen isoliert werden können, im Vergleich zu Zellen aus peripherem Blut. In einigen Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass Zellen aus peripherem Blut mehr multinukleäre Zellen mit einer höheren Anzahl an Kernen hervorbringen können. Die Knochenmarkpunktion bietet zudem den Nachteil, dass sie einen sehr aufwendigen und für den Patienten unangenehmen Eingriff darstellt (Schilling et al. 2004; Ansari et al. 2021).

In dieser Untersuchung wurden PBMCs aus einem Buffy Coat isoliert. Der Buffy Coat entsteht als Nebenprodukt bei der Verarbeitung von Blutspendeprodukten. Alternativ kommt Vollblut als Quelle in Betracht. Bei der Isolation von PBMCs aus einem Buffy Coat können gleich viele bis geringfügig weniger Zellen gewonnen werden. In Bezug auf die Reinheit und Lebensfähigkeit der isolierten Zellen konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Allerdings waren diese Parameter bei verzögerter Verarbeitung reduziert (Jia et al. 2018; Marini et al. 2020). Die Verwendung eines Buffy Coats erfordert den Zugriff auf eine Blutbank mit entsprechenden Verarbeitungsverfahren. Wenn diese Voraussetzung allerdings erfüllt ist, können eine Vielzahl an Proben ohne einen zusätzlichen Eingriff in die körperliche Unversehrtheit des Patienten gewonnen werden.

PBMCs können sowohl durch Apherese als auch durch Ficoll-Paque Dichtegradientenzentrifugation gewonnen werden. Die Apherese findet vor allem im klinischen Alltag Anwendung. Bei der Ficoll-Paque Dichtegradientenzentrifugation kann entweder Ficoll-Paque Zentrifugationsmedium oder vorgefertigte Zellpräparationsröhrchen mit Ficoll-Paque verwendet werden. Durch Zellpräparationsröhrchen konnten im Vergleich zu Ficoll-Paque Zentrifugationsmedium 70 % mehr Zellen isoliert werden. Auch wenn die vorgefertigten Zellpräparationsröhrchen höhere Anschaffungskosten aufweisen, bieten sie Vorteile, die diesen Nachteil ausgleichen. In den Röhrchen wird das Ficoll-Paque durch ein Gel vom restlichen Lumen getrennt, sodass eine Vermischung zwischen Ficoll-Paque und Blutbestandteilen erst während der Zentrifugation entsteht. Zudem konnte eine geringere Variabilität zwischen verschiedenen Versuchsreihen und Anwendern festgestellt werden (Grievink und Luisman 2016; Puleo et al. 2017; Chen et al. 2020). Die Dichtegradientenzentrifugation erfolgt aus

heparinisierem peripherem Vollblut und wurde auch in dieser Untersuchung als Methode verwendet. PBMCs können sich in eine Vielzahl an Zelltypen, wie Blutzellen, Hepatozyten, Muskelzellen oder Epithelzellen differenzieren. Der Isolationsprozess kann in zwei Abschnitte gegliedert werden. Zunächst erfolgt eine Ficoll-Paque Dichtegradientenzentrifugation zur Isolation der PBMCs. Nach einigen Waschschrinen kann dann nach der Zellzählung eine Aussaat der Zellen erfolgen (Susa et al. 2004). Um einen höheren Reinheitsgrad zu erlangen, können die einzelnen Vorläuferzellen anhand ihrer spezifischen Oberflächenantigene in einem zweiten Schritt mithilfe der magnetischen Zellseparation gezielt getrennt werden. Zur Differenzierung von Osteoklasten wurden CD14 positive Monozyten via Negativselektion isoliert. Hierfür wurden die nicht-monozytären Zellen an magnetische Antikörper gebunden, sodass die CD14 positiven Zellen in ein neues Röhrchen abgegossen werden können. Neben der Negativselektion können Monozyten auch mittels Positivselektion oder Plastikadhäsion isoliert werden. Eine vergleichende Untersuchung hat gezeigt, dass die höchste Zellausbeute sowie der höchste Reinheitsgrad mithilfe der Positivselektion, dicht gefolgt von der Negativselektion, erzielt werden konnte. Das Verfahren der Plastikadhäsion schnitt in der Untersuchung mit großem Abstand am schlechtesten ab (Hemingway et al. 2011; Zhang und Huang 2012; Nielsen et al. 2020).

Zur Initiierung der Differenzierung der CD14 positiven Zellen in Osteoklasten stehen verschiedene Faktoren zur Verfügung. In dieser Studie wurden M-CSF, RANKL und Gentamicin/ Amphotericin verwendet. Die Erstellung eines in-vitro Protokolls zur Isolation und Kultivierung humaner Osteoklasten war wesentlich von der Entdeckung von M-CSF und RANKL als relevante stimulierende Faktoren abhängig (Nicholson et al. 2000; Väänänen 2005; Fujisaki et al. 2007; Bradley und Oursler 2008). So konnte gezeigt werden, dass M-CSF dosisabhängig sowohl die Differenzierung von Osteoklasten als auch deren Überleben erheblich steigert. Zudem fördert M-CSF die Resorption von Knochen und kann dabei die Anzahl an Resorptionslakunen erhöhen. Die Anzahl an Osteoklasten bleibt dabei konstant, sodass anzunehmen ist, dass M-CSF für die Aktivierung von Osteoklasten von Bedeutung ist (Sarma und Flanagan 1996; Fujikawa et al. 2001; Hodge et al. 2011). Neben M-CSF konnte RANKL aus der Tumornekrosefaktor Familie als notwendiger Mediator für eine erfolgreiche Osteoklastogenese und -aktivität identifiziert werden. RANKL wird physiologischerweise von Osteoblasten sezerniert und spielt eine entscheidende Rolle in der Initiierung der Differenzierung von Osteoklasten. Es konnte eine positive direkte Wirkung auf die Resorptionsaktivität von Osteoklasten nachgewiesen werden (Kudo et al. 2002; Fujisaki et al.

2007; Kobayashi et al. 2009). In einigen Protokollen wird neben M-CSF und RANKL zusätzlich die Gabe von TGF- $\beta$ 1 diskutiert. Bei Zugabe von TGF- $\beta$ 1 konnte bei in vitro Untersuchungen humaner Osteoklasten gezeigt werden, dass hier vor allem ein positiver Einfluss auf die Osteoklastenaktivität, weniger jedoch auf die Osteoklastogenese existiert (Susa et al. 2004). Die Wirkung auf die Differenzierung von Osteoklasten ist abhängig von der verwendeten Konzentration, sodass nur bei niedrigen Konzentrationen ein stimulierender Effekt beobachtet wurde. TGF- $\beta$ 1 vermittelt seine Wirkung über die Regulation der Expression von M-CSF und RANKL, was in dieser Untersuchung durch deren exogene Bereitstellung unerheblich ist. Viele der erhobenen Daten stammen zudem aus Ko-Kulturen mit Osteoblasten. In reinen Osteoklasten-Kulturen unter RANKL Einfluss konnte jedoch ebenfalls eine deutliche Steigerung der Osteoklastogenese festgestellt werden, sodass neben der indirekt vermittelten Wirkung, auch ein direkter Effekt auf hämatopoetische Vorläuferzellen anzunehmen ist (Sells Galvin et al. 1999; Quinn et al. 2001; Karst et al. 2004). Unter dem Einfluss von TGF- $\beta$ 1 konnte keine erhöhte Knochenresorption festgestellt werden (Sarma und Flanagan 1996).

In der Literatur werden verschiedene Angaben zur Kultivierungszeit von Osteoklasten gemacht, wobei Zeiträume zwischen 8 und 21 Tagen genannt werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Osteoklastogenese bereits nach 8 bis 12 Tagen abgeschlossen ist und die Zellen zu diesem Zeitpunkt osteoklastenspezifische Moleküle wie den Calcitonin Rezeptor, RANK, TRAP oder Cathepsin K exprimieren. Der darauffolgende Zeitraum dient vor allem der Reifung und Aktivierung der Zellen. Die Daten stammen aus einem Protokoll, in dem auf die magnetische Zellseparation anhand von Oberflächenantigenen verzichtet wurde, sodass neben den gewünschten CD14 positiven Zellen, weitere andere Zellen ausgesät wurden. Zweimal pro Woche wurde jeweils die Hälfte des Kulturmediums ausgetauscht (Susa et al. 2004). Die Zellen erhalten dadurch seltener wachstumsfördernde Faktoren und sind potenziell schädlichen Zellabfallprodukten für einen längeren Zeitraum ausgesetzt. In dieser Studie wurden ausschließlich CD14 positive Zellen ausgesät. Dieses Vorgehen erfordert einen aufwändigeren Isolationsprozess, reduziert aber störende Einflüsse durch Ko-Kultivierung unerwünschter Zellen. Zudem wird ausschließlich bei den gewünschten Zellen ein Differenzierungsprozess ausgelöst. Das Medium wurde alle 2 Tage vollständig ausgetauscht. In vorbereitenden Untersuchungen mit 18 bis 21 Tagen Kultivierung waren die Zellen bereits abgestorben, sodass keine weiteren Untersuchungen mehr möglich waren. Bereits nach 4 Tagen konnten mehrkernige Zellen in der Lebendzellbeobachtung nachgewiesen werden. Aufgrund dieser

Ergebnisse wurde ein Zeitraum von 8 Tagen bei dem verwendeten Protokoll als ausreichend definiert.

### 4.1.2. pH-Wert Messung

Bereits in vorangegangenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass bioaktive Gläser durch die Freisetzung von Ionen das Medium alkalisieren (Ciraldo et al. 2018). Da diese pH-Wert Schwankungen zytotoxische Folgen haben können, ist es relevant, diese möglichst gering zu halten (Pryce und Hench 2003). Durch die Vorbehandlung von Bioglas 45S5 mit Minimum-Essential-Medium  $\alpha$  ( $\alpha$ -MEM) konnte gezeigt werden, dass die pH-Wert Schwankungen reduziert werden können (Ciraldo et al. 2018). Daher wurden die Biogläser während der Isolation der PBMCs bereits im Medium kultiviert. Alternativ kann zur Vorbehandlung Tris(hydroxymethyl)aminomethan-Puffer (TRIS) mit simulierter Körperflüssigkeit (SBF) verwendet werden. Allerdings haben Studien gezeigt, dass TRIS-Puffer mit dem Gerüst der Biogläser interagiert und dieses auflöst, sodass dieser nicht für Biokompatibilitätsuntersuchungen geeignet ist (Rohanová et al. 2011). Untersuchungen von SBF zeigten, dass auch hier Interaktionen mit Bioglas 45S5 auftreten, die auch nicht durch verschiedene Zusätze reduziert werden konnten (Horkavcová et al. 2021).

In Vorversuchen wurden die einzelnen Konzentrationen des Kulturmediums, die Menge an Bioglas sowie die Menge an ausgesäten Zellen so modelliert, dass der pH-Wert möglichst wenigen Schwankungen unterliegt. Daraus ergab sich, dass ein hohes Volumen an Kulturmedium erforderlich ist, sodass eine Wellplatte mit entsprechend großen Wells gewählt werden musste. Da der Durchmesser der einzelnen Biogläser jedoch deutlich geringer war, wurden die Zellen in Zellkultureinsätzen innerhalb der einzelnen Wells kultiviert, um in der unmittelbaren Umgebung des Bioglasses, eine möglichst hohe Konzentration an Zellen zu erreichen.

Insgesamt hat sich diese Methode durch den entgegengesetzten Einfluss von Bioglas und Osteoklasten auf den pH-Wert als sehr wichtiger Indikator zur Kontrolle einer erfolgreichen Differenzierung herausgestellt, sodass die pH-Wert Messung für die Untersuchung des Einflusses von Bioglas auf die Osteoklastogenese und Osteoklasten einen wichtigen Stellenwert einnimmt. Es konnte bestätigt werden, dass Biogläser eine Alkalisierung der Umgebung verursachen, wobei diese bei Bioglas 1393 ges am geringsten ausgeprägt ist.

### 4.1.3. Bildmorphologische Verfahren

In der Entwicklungsphase kann der Erfolg der Zellkultur mittels Lebendzellbeobachtung via Lichtmikroskopie kontrolliert werden. In dieser Untersuchung war dies jedoch aufgrund der Verwendung von undurchsichtigen Zellkultureinsätzen nicht möglich. Daher wurde ein separates Well ohne Einsatz zur repräsentativen Beobachtung kultiviert. In Vorversuchen konnte zwar gezeigt werden, dass eine repräsentative Darstellung in diesem separaten Versuchsansatz möglich ist, dennoch ist eine direkte Beobachtung zu bevorzugen.

Mithilfe der Immunfluoreszenzmikroskopie können Zellen nachgewiesen und lokalisiert werden. In dieser Untersuchung diente diese Methode der Fragestellung, ob sich die Zellen auf dem Fremdmaterial ansiedeln. Die Vorbereitung der Proben erfolgt dabei in zwei Schritten. Nach der Fixierung der Zellen erfolgt die Markierung der gewünschten Strukturen mit einem fluoreszierenden Antikörper. Die Fixierung dient vor allem dem Erhalt der originalen Zellarchitektur und Unterbindung der Autolyse. Die Wahl des Fixiermediums und -protokolls ist dabei abhängig von dem zu markierenden Antigen und Probentyp. In dieser Untersuchung wurden Aktinfilamente mit Phalloidin und Zellkerne mit Höchst 33258 markiert, welche sich bereits in vorangegangenen Studien mit Osteoklasten etabliert haben (Fu et al. 2013; Im et al. 2019). Es gibt eine Vielzahl an Fluoreszenzsonden für F-Aktin, wobei sich Phalloidin als Standardreagenz etabliert hat. Es stammt aus dem Giftpilz *Amanita phalloides* und entfaltet durch Inhibition der Depolymerisation der Aktinfilamente seine toxische Wirkung. Aus der Toxizität resultiert die Verwendung ausschließlich bei fixierten Zellen, sodass keine Lebendzellbeobachtung möglich ist (Pospich et al. 2020; Mazloom-Farsibaf et al. 2021). Höchst 33258 als Chromosomenfarbstoff dient der Anfärbung von Zellkernen. Die kombinierte Verwendung von Höchst 33258 und Phalloidin hat sich durch die jahrelange Verwendung zu einem gut untersuchten Verfahren entwickelt. In dieser Untersuchung bietet sie den Vorteil, die Zellen durch Beurteilung von Zellform und -größe sowie der Anzahl der Zellkerne analog zur Lebendzellbeobachtung in ihr Entwicklungsstadium einzuteilen (Bainbridge und Macey 1983). Bei der Auswertung muss jedoch berücksichtigt werden, dass Zellen durch Präparationsschritte vom Material abgewaschen worden sein könnten, wodurch eine Verzerrung des Ergebnisses möglich ist.

Die Rasterelektronenmikroskopie ermöglicht die Darstellung von Strukturen mit hoher Auflösung. In dieser Untersuchung diente sie der Fragestellung, ob die gezüchteten Zellen in der Lage sind, Resorptionslakunen auf dem Bioglas zu bilden. Die Rasterelektronenmikroskopie erfordert eine aufwendige Probenvorbereitung. Diese gliedert sich in

drei Teilschritte: Stabilisierung, Dehydrierung und Beschichtung. Die Fixierung der Probe kann mit 2,5 % Glutardialdehyd, Aceton und Ethanol erfolgen. Neben dieser Standardmethode gibt es weitere, für spezielle Strukturen etablierte Fixierprotokolle. Die Dehydrierung ist ein essenzieller Schritt in der Probenpräparation und verhindert die Ablenkung von Elektronen in der finalen Betrachtung. Zur Dehydrierung steht die kritische Punkt Trocknung sowie eine chemische Trocknung mittels Hexamethyldisilazan (HMDS) oder Tetramethylsilan (TMS) zur Verfügung. Auch wenn die Kritische-Punkt-Trocknung ein hochetabliertes Verfahren darstellt, ist sie äußerst zeit- und kostenintensiv und setzt das Vorhandensein eines entsprechenden Gerätes voraus. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Methoden festgestellt werden. Mithilfe einer Beschichtung der Proben kann die Leitfähigkeit im Rasterelektronenmikroskop sichergestellt werden. Es gibt bislang jedoch keine Methode, die eine erfolgreiche Bildgebung garantiert. Zudem besteht durch die intensiven Bearbeitungsprozesse die Gefahr der Artefaktbildung. Neben den technisch verursachten Veränderungen sind in diesem Versuchsaufbau Rückstände des Kulturmediums zu bedenken. Eine Verbesserung der Auflösung kann durch Optimierung der Probenkonservierung oder durch hochwertige Untersuchungsgeräte erzielt werden (Fischer et al. 2012; Lee und Chow 2012). Bioglas 45S5 zeigte bereits in anderen Studien in der Rasterelektronenmikroskopie eine vielgestaltige, uneinheitliche Oberfläche. Es präsentierte sich mit zufälligen Formen, scharfen Kanten, aber auch planen Flächen, wie sie auch in dieser Untersuchung nachgewiesen werden konnten. Es hat sich jedoch auch gezeigt, dass die Oberflächenstruktur abhängig von der makroskopischen Geometrie der Biogläser ist (Borden et al. 2022). Um Aufschluss über die Resorptionsaktivität der Osteoklasten zu bekommen, wäre alternativ auch ein Pit-Formation Assay infrage gekommen. Allerdings ließ sich auch unter Verwendung verschiedener Protokolle kein funktionsfähiger Versuchsaufbau für einen Pit Formation Assay etablieren, sodass sich für diese Fragestellung die Rasterelektronenmikroskopie als besser geeignet zeigte.

#### 4.1.4. Genetische Untersuchungen

Die Untersuchung der genetischen Ausstattung der isolierten Zellen erfolgte mittels Real-time PCR. Bei dieser Methode handelt es sich um die aktuell präziseste und am häufigsten verwendete Methode zur Bestimmung der Genexpression (Bustin 2002; Larionov et al. 2005). Bei der PCR kommt es zur Amplifikation von Nukleinsäuren. Bei der Real-time PCR kann parallel die Menge des gebildeten Produkts mittels sequenzspezifischen fluoreszierenden Farbstoffen beobachtet werden (Kubista et al. 2006; Ruijter et al. 2021). Bei allen Proben wurde

zur Vermeidung von Messfehlern eine Doppelbestimmung durchgeführt. Die Analyse der Ergebnisse kann mittels absoluter oder relativer Quantifizierung erfolgen. Bei der absoluten Quantifizierung wird hierbei die Anzahl der vorhandenen Gen-Kopien mithilfe der Standardkurve ermittelt. Dieses Verfahren findet beispielsweise in der Mikrobiologie zur Bestimmung von Verunreinigungen Anwendung. Bei der relativen Quantifizierung wird das Real-time PCR-Ergebnis zunächst in Beziehung zu einem Referenzgen gesetzt und nachfolgend zwischen Interventions- und Kontrollgruppe verglichen, sodass es sich daher vor allem zur vergleichenden Untersuchung der Genexpression eignet (Livak und Schmittgen 2001; Mazza und Mazzette 2014; Harshitha und Arunraj 2021). In dieser Untersuchung erfolgte die Auswertung mittels relativer Quantifizierung. Bei der Interventionsgruppe handelt es sich hier um die Zellen, die für 8 Tage in der Zellkultur zu Osteoklasten differenziert wurden, während die Kontrollgruppe durch die isolierten PBMCs des jeweils selben Spenders gebildet wird. Als Bezugspunkt wurde anstatt den isolierten PBMCs auch die Osteoklasten ohne Kontakt zu Bioglas sowie die Zellen mit Kontakt zu Bioglas 45S5 diskutiert. Im Ergebnis verändert sich aber lediglich der absolute Wert der relativen Expression, nicht aber das Verhältnis der Veränderung, sodass eine Auswertung exemplarisch ausreichend ist.

Die  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Methode hat sich als Standardmethode zur Bestimmung der relativen Expression etabliert. Die Berechnung erfolgt unter der Annahme einer Amplifikationseffizienz von 100 %, welche jedoch nur unter optimalen Bedingungen erreicht werden kann. Diese Annahme macht die Berechnung leicht durchführbar. Tatsächlich ist die Effizienz jedoch abhängig von verschiedenen Faktoren, wie der RNA-Isolierung, den verwendeten Primern und Enzymen, der zu amplifizierenden Sequenz und der Probe selbst. Tatsächlich schwankt die Effizienz der Amplifikation je nach Quelle zwischen 60 % und 100 %. Diese Faktoren haben nicht nur einen Einfluss auf die Amplifikationseffizienz, sondern führen auch zu Schwankungen der Effizienz. Zudem wird die Hintergrundfluoreszenz automatisch von den Programmen subtrahiert, obwohl ihr tatsächlicher Wert unbekannt ist. Diese Schätzung kann zu einer Verzerrung des Ergebnisses führen. Es gibt verschiedene Modelle zur effizienzkorrigierten Berechnung der relativen Expression. Allerdings konnte sich bislang keines als neues Standardverfahren durchsetzen, sodass die Berechnung mithilfe der  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Methode zwar nicht fehlerfrei ist, aber eine gute Vergleichbarkeit der Ergebnisse ermöglicht (Tichopad et al. 2003; Rao et al. 2013; Ruijter et al. 2021).

Referenzgene sind Gene, die auch unter Behandlung eine stabile Expression aufweisen. Dies ist von Bedeutung, da eine schwankende Expression das Ergebnis der Real-time PCR

beeinflussen kann. Referenzgene zeichnen sich durch stabile CT-Werte in der Real-time PCR aus. Eine in vivo Untersuchung von langen Rattenknochen zeigte ein geschlechtsunabhängiges, stabiles Expressionsniveau, für die Gene YWHAZ und GAPDH (Han et al. 2020). Eine in vitro Untersuchung von murinen Knochenzellen ergab, dass in Osteoklasten v. a. die Gene Hydroxymethylbilan-Synthase (HMBS) und B2M ein stabiles Expressionsniveau aufweisen. Für Untersuchungen an Osteoblasten eignen sich v. a.  $\beta$ -Aktin (ACTB), HMBS und HPRT1. Diese Studie zeigte zudem, dass GAPDH die größte Variabilität in ihrer Expression in allen Knochenzellen aufweisen (Stephens et al. 2011). Eine Genexpressionsanalyse an menschlichen Knochen zeigte, dass sich vor allem die Gene TATA-bindendes Protein (TBP), YWHAZ und Phosphoglycerat Kinase 1 (PGK1) als Referenzgene eignen (Cepollaro et al. 2018). Diese Untersuchungen bestätigen, dass es kein universell einsetzbares Referenzgen gibt, da das Expressionsniveau von verschiedenen Faktoren wie dem Zell- und Gewebetyp, der Behandlung und dem Versuchsaufbau abhängig ist. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit im Voraus ein Referenzgen-Screening durchgeführt, um das Gen mit der für den geplanten Versuchsaufbau stabilsten Expression identifizieren zu können. Hierfür muss zunächst eine Auswahl an infrage kommenden Genen getroffen werden. Auf Grundlage der oben genannten Erkenntnisse wurden in dieser Untersuchung vier verschiedene Gene in das Screening eingeschlossen: B2M, HPRT1, YWHAZ und GAPDH. Diese Gene wurden mithilfe der Software NormFinder (Department of molecular Medicine Aarhus University Hospital and Aarhus University, Aarhus, Dänemark) auf ihre Expressionsstabilität untersucht. Das Programm basiert auf einem mathematischen Modell, welches neben der Expressionsstabilität auch die Variation innerhalb einer untersuchten Gruppe sowie zwischen den einzelnen Untergruppen berücksichtigt. Dabei ist eine möglichst kleine Intra- und Intergruppenvariation anzustreben (Andersen et al. 2004; Han et al. 2020). Für den vorliegenden Versuchsaufbau zeigte sich hier YWHAZ als am besten geeignet.

Als Referenzprobe kommen verschiedene Proben in Frage, wie beispielsweise aus verschiedenen Geweben oder von verschiedenen Zeitpunkten. Hier wurden die unbehandelten PBMCs als Referenzprobe verwendet (Rao et al. 2013).

Die Wahl der Zielgene erfolgt in Abhängigkeit der Fragestellung. In dieser Untersuchung sollte herausgefunden werden, welchen Einfluss Bioglas auf die Osteoklastogenese und reife Osteoklasten hat. Um dieser Frage nachzugehen, wurden charakteristische Gene von den verschiedenen Zellen ausgewählt, die im Rahmen dieses Differenzierungsprozesses auftauchen können. Ausgangspunkt des Experiments bilden die isolierten CD14 positiven Monozyten. Für die erfolgreiche Isolation von Osteoklasten sind CD14 positive Monozyten essenziell. Es

konnte gezeigt werden, dass in CD14 negativen Populationen, auch unter Stimulation mit M-CSF und RANKL keine Osteoklasten gebildet werden können. In Osteoklasten konnte eine mit zunehmendem Differenzierungsgrad abnehmende CD14 Expression nachgewiesen werden (Massey und Flanagan 1999; Sørensen et al. 2007). Mit dem Nachweis von CD14 soll in diesem Experiment überprüft werden, ob die Isolation CD14 positiver Zellen als Grundlage dieser Untersuchung erfolgreich war und wie sich die Expression im Laufe der Differenzierung entwickelt. CD14 positive Zellen können sich in Abhängigkeit der Stimulation in dendritische Zellen oder Makrophagen differenzieren. Die Suche nach einem charakteristischen Marker für dendritische Zellen zum Ausschluss einer Differenzierung in diese Richtung stellte sich als äußerst schwierig heraus. Dendritische Zellen exprimieren CD33 und CD11b als charakteristische Marker. Allerdings konnte CD11b auch in Monozyten und Osteoklasten nachgewiesen werden (Massey und Flanagan 1999; Puhr et al. 2015). In Studien mit CFBF Knockout-Genen konnte gezeigt werden, dass die Bildung aller Untergruppen an dendritischen Zellen essenziell vom Vorhandensein von CFBF abhängt. Neben der fehlenden Bildung von dendritischen Zellen kommt es aber auch zu einem Mangel an hämatopoetischen Stammzellen (Miller et al. 2002; Satpathy et al. 2014). CFBF konnte zudem als wichtiger Faktor im Rahmen der Knochenheilung identifiziert werden. Er kommt in mesenchymalen Stammzellen vor und spielt eine wichtige Rolle bei der Differenzierung von Osteoblasten (Wu et al. 2014; Guo et al. 2021). Da es keinen Hinweis auf eine Expression von CFBF in Osteoklasten und Makrophagen gibt, wurde CFBF als Marker zum Ausschluss einer Differenzierung in dendritische Zellen ausgewählt. Ein charakteristischer Marker für M2 polarisierte Makrophagen ist der Mrc1. Dieser Rezeptor enthält endständige Oligosaccharide mit einem hohen Mannose-Gehalt. Diese Art von Rezeptor ist in Säugetieren sehr selten zu finden. Der hohe Mannose-Anteil ist aber essenziell für die Zell-Zell-Fusion und somit ein sehr wichtiger Faktor für die Bildung multinukleärer Zellen (Morishima et al. 2003; Al-Maawi et al. 2021). Neben Mrc1 spielt DC-STAMP eine große Rolle in der Zell-Zell-Fusion von Osteoklastenvorläufern und wäre somit ein geeigneter alternativer Marker gewesen (Miyamoto 2006; Chiu et al. 2017). Neben den Markern für die verschiedenen Zellen, die im Rahmen des Differenzierungsprozesses aus Monozyten entstehen konnten, wurden für Osteoklasten spezifische Marker verwendet. Im Rahmen der Osteoklastogenese werden verschiedene Gene unter dem Einfluss von RANKL hochreguliert. Hierzu gehören u. a. die Tartratresistente-saure-Phosphatase (TRAP), Cathepsin K (CtsK), der Calcitonin Rezeptor (CALCR) sowie der Osteoklastenassoziierte Rezeptor (OSCAR) (Granfar R. et al. 2005; Nedeva et al. 2021). Cathepsin K ist eine lysosomale Cysteinproteinase und spielt eine zentrale Rolle in der Resorption der organischen

Knochenmatrix. Es wird neben der Matrix-Metalloproteinase-9 und TRAP in exozytotischen Vesikeln gespeichert (Dodds et al. 2001; Nakamura et al. 2021; Nedeva et al. 2021). Der Calcitonin-Rezeptor (CALCR) ist ein G-Protein gekoppelter Rezeptor, der durch die RANKL-induzierte NFATc1 Stimulation exprimiert wird. Physiologischerweise bindet von C-Zellen produziertes Calcitonin an den Rezeptor und hemmt dadurch die Knochenresorption. Der Calcitonin-Rezeptor wird in verschiedenen Geweben exprimiert. So kommt er zusätzlich in Gehirn-, Nieren- oder Plazentazellen vor. Im Knochen sind Osteoklasten aber die einzigen Zellen, die den Calcitonin-Rezeptor exprimieren können. In CD14 positiven Monozyten und Makrophagen konnte er nicht nachgewiesen werden, sodass er als einer der osteoklastenspezifischsten Marker gilt. Ein Nachweis ist mit Aufnahme der Knochenresorption, ungefähr gleichzeitig mit dem TRAP-Nachweis möglich (Taylor et al. 1989; Takahashi et al. 1995; Shen et al. 2007). Der Osteoklasten assoziierte Rezeptor (OSCAR) ist Teil der LRC Familie und wird neben Osteoklasten auch in Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert. Seine Expression wird insbesondere während der Osteoklastogenese hochreguliert. Als Ligand dienen verschiedene Kollagene auf der Knochenoberfläche. Im Rahmen eines positiven Feedbackmechanismus verstärkt er die RANKL-induzierte Osteoklastogenese (Nemeth et al. 2011; Zhou et al. 2016; Haywood et al. 2016). OSCAR wird zwar nicht nur von Osteoklasten exprimiert, zeigt aber eine verstärkte Expression während der Osteoklastogenese. Da sich diese Untersuchung verstärkt mit der Bildung von Osteoklasten beschäftigt, ist OSCAR hier als Marker geeignet.

Als Zielproben wurden die kultivierten Untersuchungsansätze gewählt.

Die Ergebnisse der Real-time PCR ermöglichen eine Aussage hinsichtlich der genetischen Ausstattung einer untersuchten Probe. Es gibt jedoch Belege dafür, dass es nur eine unzureichende Korrelation zwischen mRNA- und Proteingehalt gibt. Ein hohe Gen-Expression ist nicht mit einer hohen Proteinexpression gleichzusetzen (Gygi et al. 1999). Diese Methode eignet sich daher gut, um eine erfolgreiche Differenzierung der Zellen nachzuweisen, jedoch nicht um eine Aussage hinsichtlich ihrer Funktionalität zu treffen.

### 4.1.5. Funktionelle Assays

Die Real-time PCR-Untersuchung bietet den Nachteil, keine Aussage hinsichtlich der tatsächlichen Transkriptionsleistung der Zelle zuzulassen. Um hierüber eine Aussage treffen zu

können wurden funktionelle Assays durchgeführt. Hier wurde die Enzymaktivität der Carboanhydrase II (CA II) und der TRAP 5b untersucht.

Carboanhydrasen kommen in vielen verschiedenen Zellen vor und werden als zytoplasmatische und membrangebundene Form exprimiert. Im Menschen sind derzeit 16 verschiedene Isoformen bekannt, wobei die zytoplasmatische Carboanhydrase II spezifisch für Osteoklasten ist. Sie katalysiert die Umwandlung von Kohlenstoffdioxid ( $\text{CO}_2$ ) und Wasser ( $\text{H}_2\text{O}$ ) in Bikarbonat ( $\text{HCO}_3^-$ ) und Protonen ( $\text{H}^+$ ). In Osteoklasten werden die Protonen über die  $\text{H}^+$ -ATPase in die Resorptionslakune transportiert und sind dort an der Knochenresorption beteiligt (Riihonen et al. 2007; Marcoline et al. 2016; Alkhayal et al. 2023; O'Herin et al. 2023).

Die TRAP wird in vielen Zellen exprimiert. Sie wird jedoch erst durch posttranslationale Modifikationen in die osteoklastenspezifische Form TRAP 5b überführt. Die nachgewiesene Enzymaktivität korreliert stark mit der Anzahl an Osteoklasten sowie dem Ausmaß der Knochenresorption (Halleen et al. 2006; Guañabens et al. 2019; Mira-Pascual et al. 2020). In dieser Untersuchung konnte eine ubiquitäre Erhöhung der TRAP5b Aktivität gezeigt werden, wobei diese nur bei der Kontrollgruppe signifikant war. Hierbei waren die Zellen unter dem Einfluss von Bioglas 1393 ges signifikant weniger aktiv als in der Kontrollgruppe. Dieses Ergebnis kann zum einen auf eine verzögerte Entwicklung zurückgeführt werden, es gibt jedoch auch Hinweise darauf, dass Bioglas die Entwicklung TRAP-positiver Zellen unterbindet (Bosetti und Cannas 2005).

Es gibt zahlreiche Untersuchungen, die belegen, dass Immunassays eine geeignete Methode zum Nachweis spezifischer Substrate und deren Aktivität sind. Dennoch konnte gezeigt werden, dass die Aktivität bestimmter osteoklastenspezifischer Enzyme sowohl vom verwendeten Fremdmaterial als auch vom pH-Wert abhängt (Alatalo et al. 2000; Bernhardt et al. 2017).

### 4.1.6. Molekularbiologischer Einfluss von Bioglas

Als Grundlage dieser Untersuchung dient die Isolation CD14 positiver Monozyten. In der Real-time PCR konnte CD14 in allen Proben nachgewiesen werden, sodass der Isolationsprozess als erfolgreich anzusehen ist. Frühere Untersuchungen an Ratten haben gezeigt, dass CD14 auch von Osteoklasten exprimiert wird, die Expression jedoch mit zunehmendem Differenzierungsstadium abnimmt (Massey und Flanagan 1999). Die statistische Auswertung zeigte für CD14 keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen. Dies ist

damit zu erklären, dass sich nicht alle Zellen durch die Stimulation zu Osteoklasten differenzieren, sondern im monozytären Stadium verbleiben und damit ein hohes Maß an CD14 Expression aufweisen. Gleichzeitig wird CD14 auch noch von frühen Entwicklungsstadien der Osteoklastogenese gebildet und nimmt erst mit Beginn der Resorptionsaktivität stark ab.

Zum Ausschluss einer Differenzierung in dendritische Zellen wurde die Expression von CBFB gemessen. Auch hier zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen. Dies ist damit zu erklären, dass CBFB zwar für die Differenzierung zu dendritischen Zellen essenziell ist, aber auch in deren Vorläuferzellen exprimiert wird (Miller et al. 2002; Satpathy et al. 2014). Da aber keine signifikant höhere Expression im Vergleich zu den isolierten Monozyten aufgetreten ist, ist davon auszugehen, dass keine Entwicklung in diese Richtung entstanden ist. Diese Annahme wird von den bildmorphologisch nachgewiesenen runden und teils mehrkernigen Zellen gestützt, die nicht mit dem für dendritische Zellen charakteristischem sternförmigem Aussehen in Einklang zu bringen sind. Zudem wäre für die Differenzierung von Monozyten zu dendritischen Zellen Faktoren wie GM-CSF und IL-4 notwendig (Puhr et al. 2015). Da es sich bei der Zellkultur aber um ein in sich geschlossenes System handelt, dem diese Faktoren nicht zugeführt worden sind, ist es sehr unwahrscheinlich, dass in diesem Versuch dendritische Zellen entstanden sind.

Mit Hilfe von Mrc1 als charakteristischem Marker für M2 polarisierte Zellen, soll sichergestellt werden, dass sich die isolierten Zellen in die gewünschte Richtung differenzieren. Mrc1 ist ein Membranrezeptor mit hohem Mannose-Gehalt, der für die Zell-Zell-Fusion von Bedeutung ist. Er wird dabei nicht nur in Makrophagen, sondern auch im Rahmen der Osteoklastogenese exprimiert und findet sein Maximum während des Fusionsprozesses (Morishima et al. 2003; Al-Maawi et al. 2021). In dieser Untersuchung zeigten die isolierten Zellen, die ohne Bioglas kultiviert worden sind, eine signifikant höhere Expression von Mrc1, im Vergleich zu den isolierten PBMCs. Daraus kann geschlossen werden, dass im Rahmen der Zellkultur mehrkernige Zellen entstanden sind. Die Expression von Mrc1 in den Ansätzen mit Fremdmaterial war zwar höher als in den PBMCs, jedoch zeigten sich weder signifikante Unterschiede zu den PBMCs, noch zu den Zellen ohne Bioglas. Dies wäre damit zu erklären, dass die Expression von Mrc1 zwar auch in den Zellen mit Bioglas durch die Stimulation mit M-CSF und RANKL hochreguliert worden ist, aber nicht in einem vergleichbar hohen Maß wie in den Zellen ohne Kontakt zu Bioglas. Das bedeutet, dass der Prozess der Osteoklastogenese auch in Zellen initiiert wird, die in Kontakt zu Bioglas stehen, jedoch langsamer erfolgt als in Zellen ohne Bioglas-Exposition.

Bei der Untersuchung der osteoklastenspezifischen Marker zeigte sich eine signifikant höhere Expression von Cathepsin K in Zellen ohne Kontakt zu Bioglas im Vergleich zu den isolierten PBMCs. Auch hier zeigte sich eine höhere Expression in den Zellen, die mit Bioglas kultiviert worden sind, jedoch ohne signifikante Unterschiede zu PBMCs und Zellen ohne Exposition. Dadurch konnte gezeigt werden, dass die Osteoklastogenese erfolgreich stattgefunden hat, jedoch bei Kontakt zu Bioglas einer zeitlichen Verzögerung unterliegt. In Untersuchungen an murinen Osteoklasten mit Bioglas 45S5 konnte ebenfalls eine verstärkte Expression von Cathepsin K beobachtet werden (Detsch et al. 2016). Der Calcitonin-Rezeptor war in keiner der isolierten PBMCs nachweisbar, was sich mit bisherigen Erkenntnissen deckt, dass dieser nicht von Monozyten exprimiert wird (Takahashi et al. 1995). Im Gegensatz dazu, gelang in beinahe allen zur Differenzierung angeregten Zellen mit und ohne Kontakt zu Bioglas ein entsprechender Nachweis, sodass dadurch eine erfolgreiche Differenzierung nachgewiesen ist. Diese Erkenntnis deckt sich damit, dass der Nachweis des Calcitonin-Rezeptors mit Beginn der Resorption gleichzeitig mit dem Nachweis von TRAP 5b möglich ist (Taylor et al. 1989; Takahashi et al. 1995; Shen et al. 2007). Da für die statistische Auswertung aber die isolierten PBMCs als Referenzprobe ausgewählt worden sind, war es zur Bestimmung einer relativen Expression erforderlich, hier die Auswertung mit Zellen ohne Kontakt zu Bioglas als Referenzprobe durchzuführen. Hierbei konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass eine erfolgreiche Differenzierung in Osteoklasten stattgefunden hat, da in keiner anderen Zellart der Nachweis von Calcitonin-Rezeptor möglich gewesen wäre. Es zeigte sich aber auch, dass es keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Biogläsern oder dem Kontakt zu Bioglas im Allgemeinen gibt. Bei der Untersuchung des Expressionsmusters des Osteoklasten assoziierten Rezeptors (OSCAR) war die relative Expression in allen Proben stärker als in den isolierten PBMCs, jedoch ohne signifikante Unterschiede. OSCAR gilt zwar als hochspezifisch für Präosteoklasten und wird während der Osteoklastogenese stark hochreguliert, dennoch wird er neben Osteoklasten auch u. a. in Monozyten exprimiert (Haywood et al. 2016; Barrow et al. 2011). Die verstärkte Expression deutet auf eine erfolgreich induzierte Osteoklastogenese hin. Da OSCAR auch in Monozyten exprimiert wird, ist der Unterschied der Expression zwischen PBMCs und den kultivierten Zellen geringer, sodass es weniger wahrscheinlich ist, signifikante Unterschiede in der relativen Expression zu erzielen.

Die Real-time PCR-Ergebnisse, insbesondere die signifikant höhere Expression von *Mrc1* und Cathepsin K in der Kontrollgruppe, sowie der Nachweis des Calcitonin Rezeptors in allen zur

Differenzierung angeregten Proben stützen die Annahme, einer erfolgreichen Initiierung der Osteoklastogenese und Bildung von Osteoklasten. Gleichzeitig zeigen die Ergebnisse aber auch, dass die Osteoklastogenese bei Zellen mit Kontakt zu Bioglas zwar erfolgreich, jedoch langsamer abläuft als ohne Fremdmaterial. Aus molekularbiologischer Sicht gibt es kein Bioglas, das besonders positiv oder negativ im Vergleich zu den anderen untersuchten Fremdmaterialien hervorsticht. Bisher gibt es kaum vergleichbare Untersuchungen anhand derer diese Ergebnisse eingeordnet werden können.

### 4.1.7. Einfluss von Bioglas auf die Osteoklastenaktivität

Um die Aktivität der Zellen zu untersuchen, wurden verschiedene Methoden eingesetzt. Die Immunassays geben Aufschluss über die enzymatische Aktivität. Es konnte eine signifikant höhere TRAP 5b Aktivität in der Kontrollgruppe nachgewiesen werden, wodurch gezeigt werden kann, dass die Osteoklastogenese erfolgreich abgelaufen und zusätzlich funktionell aktive Osteoklasten entstanden sind. Auch für die Zellen, welche mit Bioglas differenziert wurden, zeigten sich erhöhte Werte für sowohl Carboanhydrase II als auch TRAP 5b, wobei die Zellen unter dem Einfluss von Bioglas 1393 ges eine signifikant geringere TRAP 5b Aktivität aufwiesen als die Kontrollgruppe. Dies stützt die Ergebnisse der Real-time PCR einer erfolgreichen, jedoch langsamer ablaufenden Osteoklastogenese bei Kontakt zu Bioglas.

Bei Untersuchungen an murinen Bioglas 45S5 exponierten Osteoklasten wurden zwar osteoklastenspezifische Gene wie Cathepsin K verstärkt exprimiert, es bildeten sich aber keine TRAP positiven mehrkernigen Zellen (Detsch et al. 2016). In Untersuchungen an anderen bioaktiven Gläsern konnte sogar eine Hemmung der Anzahl TRAP-positiver Zellen nachgewiesen werden (Bosetti und Cannas 2005). Es gibt Studien, die belegen, dass die Aktivität bestimmter Enzyme abhängig vom eingesetzten Fremdmaterial ist, sodass angenommen werden könnte, dass CAII und TRAP 5b keine geeigneten Zielsubstrate für diese Fragestellung sind (Bernhardt et al. 2017). Physiologischerweise wird TRAP 5b in der Resorptionslücke durch die Ansäuerung der Umgebung auf pH 2 – 4 aktiviert (Sommerfeldt und Rubin 2001). Möglicherweise war eine Aktivierung von TRAP5b aufgrund des deutlich höheren vorherrschenden, teils sogar signifikant höheren im Vergleich zur Kontrollgruppe vorliegenden pH-Wertes der Umgebung nicht möglich. Zusätzlich konnten jedoch auch in der Rasterelektronenmikroskopie keine eindeutigen Resorptionslücken identifiziert werden. Dies stützt die Annahme, dass die Zellen nicht in der Lage gewesen sind, resorptive Aufgaben auszuführen. Die Auswertung wurde durch die vielgestaltige Oberfläche erschwert, welche

bereits Borden et al. bei der rasterelektronenmikroskopischen Untersuchung von Bioglas 45S5 nachweisen konnte. Dementgegen stehen die Ergebnisse von Sirkiä et al., die eine flache Oberfläche vorfanden (Sirkiä et al. 2021). Allerdings kam das Bioglas in dieser Untersuchung weder mit Zellkulturmedium noch mit Zellen in Kontakt, sodass die Vermutung nahe liegt, dass es sich bei den zahlreichen Strukturen um Rückstände von Kulturmedium handelt. Diese Annahme wird von den Ergebnissen verschiedener Studien gestützt, die nachgewiesen haben, dass unterschiedlichen Anteile von Zellkulturmedien, wie Dulbeccos modifiziertes Eagle-Medium (DMEM) oder simulierte Körperflüssigkeit (SBF) mit Tris-(hydroxymethyl)aminomethan- (TRIS-) Puffer, unterschiedliche stark mit der Oberfläche von Bioglas interagieren diese verändern und deren Auflösung fördern. Dies hängt jedoch neben dem verwendeten Zellkulturmedium auch von der Verarbeitung des Bioglases selbst ab (Sepulveda et al. 2002; Rohanová et al. 2011; Thavornyutikarn et al. 2019). Das in dieser Untersuchung verwendete Zellkulturmedium enthielt zwar keines der Reagenzien, für die bereits eine starke Beeinflussung der Oberfläche von Bioglas nachgewiesen wurde, die Ergebnisse deuten allerdings darauf hin, dass auch die hier verwendeten Komponenten, wie  $\alpha$ MEM und FBS, einen starken Einfluss auf die Oberfläche der Biogläser haben und Ablagerungen verursachen. Auch in der Immunfluoreszenzmikroskopie dominieren hauptsächlich wenig weit differenzierte Zellen. Dies lässt den Schluss zu, dass zwar Zellen gezüchtet werden konnten, diese allerdings bei Kontakt mit Bioglas eine verlangsamte Entwicklung aufweisen und aufgrund dessen zum untersuchten Beobachtungszeitpunkt noch nicht resorptionsfähig gewesen sind. Dennoch belegen die Ergebnisse des TRAP 5b Assays eine Funktionalität der Kontrollgruppe, sodass unter Berücksichtigung der Ergebnisse der Immunfluoreszenzmikroskopie, davon auszugehen ist, dass es nur wenige funktionell aktive Osteoklasten unmittelbar auf der Materialoberfläche gibt, da die Differenzierung verzögert abläuft, dennoch aber funktionell aktive Osteoklasten in der unmittelbaren Umgebung des Fremdmaterials entstanden sind, sodass auf der Oberfläche zum Untersuchungszeitpunkt der Rasterelektronenmikroskopie noch keine Resorptionslakunen nachweisbar gewesen sein können.

### 4.2. Biokompatibilität

Die Biokompatibilität beschreibt den Effekt eines untersuchten Fremdmaterials auf den Körper. Bisherige Untersuchungen zur Biokompatibilität von Bioglas haben gezeigt, dass diese sowohl von der Zusammensetzung als auch von der Verarbeitung abhängt. Biogläser bestehen unter

anderem aus Calcium und Phosphat. Die Zusammensetzung entspricht ungefähr der Konzentration im Knochen und erhöht dadurch die Biokompatibilität (Ali et al. 2014; Zor et al. 2019; Cannio et al. 2021). Untersuchungen an Osteoblasten haben gezeigt, dass die Freisetzung von Bioglaspartikeln, wie Kieselsäure, Calcium und Phosphor, eine Alkalisierung der Umgebung hervorruft. Dies konnte auch in dieser Untersuchung nachgewiesen werden. Diese Veränderungen in der Umgebung der Zellen wird für die osteoinduktiven Prozesse verantwortlich gemacht. So konnte sowohl eine Induktion der Osteoblastendifferenzierung als auch der Mineralisierung der extrazellulären Matrix in verschiedenen Untersuchungen zu Osteoblasten verschiedener Spezies nachgewiesen werden (Matsuda und Davies 1987; Xynos et al. 2000b; Silver et al. 2001; Ferraz et al. 2017; Ferreira et al. 2021). Der in zahlreichen Studien belegte osteoinduktive Effekt von Bioglas wurde bislang hauptsächlich auf die Induktion der Osteoblastendifferenzierung sowie der verstärkten Mineralisierung zurückgeführt. In dieser Untersuchung zeigte sich jedoch, dass die Osteoklastogenese langsamer abläuft als ohne Kontakt zu Bioglas. Sowohl in der Lebendzellbeobachtung als auch in der immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchung, war eine reduzierte Zelldichte bei direktem Kontakt mit dem Bioglas aufgefallen. Zusätzlich dominierten wenig weit differenzierte Zellen, vorwiegend in Stadium 2 oder 3. Dennoch konnten im TRAP 5b Assay funktionell aktive Osteoklasten in der Kontrollgruppe nachgewiesen werden. In der Zusammenschau dieser Erkenntnisse mit den nicht nachweisbaren Resorptionslakunen in der Rasterelektronenmikroskopie ist davon auszugehen, dass unmittelbar auf der Materialoberfläche nach 8 Tagen nur sehr wenige funktionell aktive Osteoklasten entstanden sind. In der unmittelbaren Materialumgebung bzw. ohne Kontakt zu Bioglas scheint die Differenzierung schneller abgelaufen zu sein, sodass hier bereits funktionell aktive TRAP 5b positive, Cathepsin K exprimierende, multinukleäre Zellen entstanden sind. Grund hierfür könnten die signifikant höheren pH-Werte bei Zellen mit Kontakt zu Bioglas im Vergleich zur Kontrollgruppe sein. Diese Ergebnisse deuten auf eine reduzierte Biokompatibilität hinsichtlich der Osteoklastogenese hin. Die hemmende Wirkung auf Osteoklasten stellt einen weiteren Aspekt des osteogenen Effekts von Bioglas dar. Durch Hemmung von Osteoklasten und Förderung von Osteoblasten wird die Knochenhomöostase in unmittelbarer Umgebung von Bioglas zugunsten der Knochenbildung verschoben. Dies kann im Rahmen der Knochenheilung von Vorteil sein und dem Knochen Zeit geben, den Schaden zu beheben, ohne jedoch das regulierende Eingreifen von Seiten der Osteoklasten völlig auszuschalten.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass Bioglas einen hemmenden Effekt auf die Osteoklastogenese in der unmittelbaren Materialumgebung hat, was im Rahmen der Knochenheilung einen positiven Effekt hat. Dieser Einfluss ist dabei bei Bioglas 1393 ges am geringsten ausgeprägt.

### 4.3. Vergleich der einzelnen Biogläser

Als Grund für die langsamer ablaufende Osteoklastogenese bei Kontakt mit Bioglas kann die Alkalisierung der Umgebung herangezogen werden. Hierbei zeigen sich bei allen Biogläsern, außer bei Bioglas 1393 ges signifikant höhere pH-Werte im Vergleich zur Kontrollgruppe. Bioglas 1393 ges scheint also die geringste Interaktion mit der Umgebung hervorzurufen, wodurch seine Biokompatibilität erhöht wird. Bei der Untersuchung der Expression verschiedener Gene zeigte keines der untersuchten Materialien signifikante Ergebnisse, sodass die Biogläser in Bezug auf diesen Aspekt als gleichwertig anzusehen sind. Im Rahmen des TRAP 5b Assays zeigte sich jedoch eine signifikant geringere Aktivität der Osteoklasten bei Bioglas 1393 ges im Vergleich zur Kontrollgruppe, wobei hier auf der Materialoberfläche im Rahmen der Immunfluoreszenzmikroskopie die meisten, bis Entwicklungsstadium 4 differenzierten, multinukleären Zellen nachgewiesen werden konnten. Dieses Ergebnis unterstreicht die Annahme, dass hierbei der geringste hemmende Einfluss auf die Osteoklastogenese vorliegt.

Zusammenfassen können die Biogläser 45S4, 1393 und 1393 BS als gleichwertig in ihrem Einfluss auf die Osteoklastogenese angesehen werden. Bioglas 1393 ges hingegen scheint dagegen nur wenig mit der Umgebung zu interagieren, und daher im Vergleich zu den anderen untersuchten Materialien einen geringeren hemmenden Einfluss auszuüben.

### 4.4. Limitation der Studie

In dieser Untersuchung sollte der Effekt von Bioglas auf humane Osteoklasten untersucht werden. Als Grundlage dieser Arbeit diente eine in-vitro Monozyten-Osteoklasten-Monokultur. Dieses bietet den Vorteil, Osteoklasten in ihrer Differenzierung isoliert betrachten zu können. Allerdings sind Osteoklasten Teil eines komplexen Zusammenspiels im Rahmen der Knochenhomöostase und stehen unter vielfältigem Einfluss, der hier nicht berücksichtigt werden kann. Eine in-vitro Untersuchung stellt daher nur ein sehr eingeschränktes Modell der

Wirklichkeit dar und kann nicht uneingeschränkt auf einen komplexen Organismus übertragen werden.

Insgesamt wurden PBMCs aus dem Buffy Coat von 6 verschiedenen Blutspendern isoliert und untersucht. Da die Buffy Coats anonymisiert wurden, liegen keine Informationen zu den Spendern vor. Es gibt allerdings zahlreiche Untersuchungen, die zeigen, dass es individuelle Faktoren gibt, die einen Einfluss auf die Differenzierung und die Aktivität von Osteoklasten haben. So kommt es mit zunehmendem Alter zu einer verstärkten Knochenresorption durch vermehrte Bildung von Osteoklasten. Dies wird mit hormonellen Veränderungen wie einem abnehmendem Östrogenspiegel in Verbindung gebracht. Auch Erkrankungen des Knochens haben einen Einfluss auf die Zelldifferenzierung. So kommt es sowohl bei der Osteoarthritis, als auch bei einem Morbus Paget zu einer vermehrten Differenzierung von Osteoklasten mit vermehrtem Knochenabbau. Zuletzt gibt es zusätzlich geschlechtsspezifische Unterschiede. So weisen männliche Probanden eine effizientere Osteoklastogenese auf, wohingegen sich weibliche Osteoklasten besser an den Knochen anhaften können (Jevon et al. 2002; Koshihara et al. 2002; Durand et al. 2013; Møller et al. 2020; Wani et al. 2022; Desai et al. 2023). Zusammenfassend können die 6 untersuchten Probanden keinen repräsentativen Querschnitt der Bevölkerung darstellen.

Durch die Verwendung von Zellkultureinsätzen konnte die Differenzierung der Zellen nicht direkt mittels Lebendzellbeobachtung verfolgt werden. Lediglich eine parallele Kultur ohne Zellkultureinsatz sowie die pH-Wert Veränderungen ließen eine Vermutung über den aktuellen Entwicklungsstand zu. In weiteren Untersuchungen könnte ein Versuchsansatz entwickelt werden, in dem die Zellen nicht die Möglichkeit besitzen, sich neben dem Material anzusiedeln, um eine direkte Konfrontation zu erzwingen. Dies würde Klarheit über den Effekt von Bioglas auf die Zellen mit direktem Kontakt bringen. Zusätzlich könnte eine Versuchsreihe mit PBMCs auf dem Boden einer Well-Platte mit Bioglas in einem Zellkultureinsatz durchgeführt werden. Dadurch würden sich die Zellen und das Bioglas zwar im selben Medium befinden, jedoch ohne direkten Kontakt. Dies könnte die Wirkung von Bioglas auf weiter entfernte Zellen klären.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass ein Großteil der Zellen mit Kontakt zu Bioglas noch nicht vollständig zu Osteoklasten differenziert war, sondern sich noch in der Entwicklung befanden, wohingegen bei der Kontrollgruppe bereits eine funktionelle Aktivität nachgewiesen werden konnte. Durch eine längere Inkubationszeit könnten sich die Zellen weiter entwickeln,

sodass eine differenzierte Aussage bezüglich der Genexpression und Aktivität zwischen den einzelnen Biogläsern getroffen werden könnte

### 4.5. Fazit und Ausblick

Die Ergebnisse dieser Untersuchung deuten sowohl molekularbiologisch, bildmorphologisch als auch funktionell auf eine erfolgreiche, aber zeitlich verzögerte Osteoklastogenese bei allen Biogläsern hin. Diese Verzögerung war am geringsten bei Bioglas 1393 ges ausgeprägt. Insgesamt läuft die Differenzierung bei allen Biogläsern langsamer als bei dem Kontrollansatz ohne Fremdmaterial ab. Diese Ergebnisse werden durch die mikroskopischen Untersuchungsergebnisse gestützt. Je näher die Zellen dem Bioglas kommen, desto weniger weit sind sie differenziert.

Der hier verwendete Zellkulturansatz bietet einen guten ersten Überblick über den Effekt von Bioglas auf Osteoklasten. Er bietet jedoch Optimierungspotential, um die Frage zu klären, welche Wirkung Bioglas auf die Zellen auf der Materialoberfläche und welchen Effekt es auf weiter entfernt gelegene Zellen hat. Mithilfe einer längeren Inkubationszeit, könnte zudem überprüft werden, inwieweit tatsächlich eine Verlangsamung der Osteoklastogenese vorliegt. Zudem sollte eine differenzierte Spenderauswahl erfolgen, um individuelle Einflussfaktoren zu vermeiden.

Direkt auf dem Bioglas zeigt sich eine reduzierte Zelldichte mit vorwiegend weniger weit entwickelten Zellen. Hier muss jedoch die Option in Betracht gezogen werden, dass ein Teil der Zellen durch Präparationsschritte vom Material abgewaschen worden ist. Allerdings konnten auch in der rasterelektronenmikroskopischen Untersuchung keine Resorptionslakunen identifiziert werden. In Zusammenschau der Ergebnisse der Immunfluoreszenz und dem fehlenden TRAP 5b Nachweis bei einem Großteil der Biogläser ist davon auszugehen, dass die Zellen in ihrer Entwicklung noch nicht weit genug vorangeschritten sind, um resorbierende Aufgaben zu erfüllen. Allerdings gibt es Hinweise darauf, dass Bioglas die Entwicklung TRAP-positiver Zellen unterbindet (Bosetti und Cannas 2005). Da in dieser Untersuchung bei Bioglas 1393 ges signifikant weniger TRAP-positiven Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden konnten, wäre dies eine Fragestellung, der in zukünftigen Untersuchungen gezielt nachgegangen werden sollte.

In der Rasterelektronenmikroskopie konnten keine Resorptionslakunen nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis ist mit der verzögerten und am ehesten noch nicht vollständig abgeschlossenen Osteoklastogenese in Einklang zu bringen. Im Folgenden sollte diese Untersuchung mit Zellen, welche mehr Zeit für die Differenzierung haben und bei denen ausschließlich ein direkter Kontakt zu Bioglas möglich ist wiederholt werden. Die vielgestaltige Oberflächenstruktur könnte auf eine Interaktion zwischen Zellkulturmedium und Materialoberfläche zurückgeführt werden, sodass es dabei zudem vorteilhaft wäre, ein Zellkulturmedium zu entwickeln, das möglichst wenig mit Bioglas interagiert, um den Effekt der Zellen besser beurteilen zu können.

Insgesamt zeigt diese Untersuchung eine erfolgreiche, aber verzögerte Osteoklastogenese bei Kontakt zu Bioglas. Diese war bei Bioglas 1393 ges am wenigsten eingeschränkt. Als Grund hierfür kommt eine pH-Wert Veränderung im Sinne einer Alkalisierung der Umgebung durch die Biogläser in Betracht, welche bei Bioglas 1393 ges am geringsten ausgeprägt ist.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung stützen die bisherigen Ergebnisse der osteoinduktiven Wirkung von Bioglas. Bisher wurde dieser Effekt allerdings hauptsächlich auf die stimulierende Wirkung auf Osteoblasten zurückgeführt. Diese Ergebnisse deuten an, dass dieser Effekt zusätzlich durch eine leichte Hemmung der Osteoklastogenese zustande kommen könnte, welcher jedoch abhängig vom verwendeten Bioglas ist.

## 5. Zusammenfassung

Bioglas hat aufgrund seiner osteoinduktiven Wirkung als Knochenersatzmaterial zunehmend an Bedeutung gewonnen. Ziel dieser Studie ist es, die Wirkung von Bioglas auf die Entwicklung humaner Osteoklasten zu untersuchen. Hierfür wurde neben dem bekannten Bioglas 45S5, die bislang wenig untersuchten Biogläser 1393, 1393 mit Borsilikat (1393 BS) und eine gesinterte Variante von Bioglas 1393 (1393 ges) einander gegenübergestellt. Dieser Vergleich dient der Suche nach einem möglicherweise noch besser geeigneten Bioglas.

In der Zellkultur wurden mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) im Beisein der Biogläser innerhalb von 8 Tagen unter regelmäßiger pH Kontrolle im Osteoklastendifferenzierungsmedium inkubiert. Es wurden Zellen von sechs verschiedenen Spendern untersucht. Im Anschluss wurden mittels Reverser Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (Real-time PCR) die Zelldifferenzierung und die Expression osteoklastenspezifischer Gene untersucht. Mittels Carboanhydrase II- und TRAP 5b Assay wurden Aktivität der Zellen überprüft. Die morphologische Begutachtung erfolgte mittels Lebendzellbeobachtung sowie immunfluoreszenzmikroskopischen Darstellung der Materialoberfläche. Für einen standardisierten Vergleich wurden vier Entwicklungsstadien definiert. Mittels Rasterelektronenmikroskopie wurde der Effekt auf die Biogläser untersucht.

Die Biogläser 45S5, 1393 und 1393 BS zeigten an Tag 2, 4, 6 und 8 jeweils signifikant höhere pH-Werte als Zellen ohne Fremdmaterial – z. B. ist der pH-Wert von Bioglas 45S5 an Tag 6 mit  $p = 0,001$  signifikant höher als der pH-Wert der Kultur ohne Bioglas. Das lysosomalen Enzyms Cathepsin K ( $p = 0,003$ ) sowie der für Differenzierung multinukleärer Zellen fungierenden Mannose Rezeptor C Typ 1 ( $p = 0,014$ ) wurde nach 8 Tagen Inkubation in Zellen ohne Fremdmaterial signifikant stärker exprimiert. Die Kontrollgruppe ( $p = 0,032$ ) zeigte eine signifikant höhere TRAP 5b Aktivität. Die morphologische Auswertung zeigte, eine Differenzierung in mehrkernige Riesenzellen, welche bei direktem Kontakt zum Material jedoch langsamer erfolgt. Auch in der Immunfluoreszenz zeigte sich auf den Biogläsern eine reduzierte Zelldichte mit weniger differenzierten Zellen.

Insgesamt konnte eine erfolgreiche, jedoch langsamere Osteoklastogenese bei Kontakt mit Bioglas nachgewiesen werden. Dies zeigt sich bei Bioglas 1393 ges am wenigsten stark ausgeprägt, was auf die geringere alkalisierende Wirkung zurückgeführt wird. Die Biokompatibilität von Bioglas 45S5, 1393 und 1393 BS ist dabei als ähnlich einzustufen. Je nach gewünschtem Effekt, können nun verschiedene Biogläser zum Einsatz kommen.

## 6. Summary

Due to its osteoinductive effect, bioglasses are getting more important as bone graft material. The objective of this study is to investigate the effect of bioglass on human osteoclasts. Therefore, the well-known bioglass 45S5, as well as the less established bioglasses 1393, 1393 with borosilicate (1393 BS) and a sintered version of bioglass 1393 (1393 ges) has been compared with each other, with the intention to find a more favourable bioglas.

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) have been differentiated to osteoclasts under the influence of each of the bioglasses 8 days in a cell culture system under frequent pH-measurement. Cells from six different donors have been assessed. Thereafter, real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (real-time PCR) was used to investigate cell differentiation and expression of osteoclast specific genes. Cell function was controlled by performing carbonic anhydrase II and Tartrat resistant acidic Phosphatase type 5b (TRAP 5b) assays. Morphological analysis took place via life cell imaging and immunofluorescence microscopy of the surface of the bioglasses. In order to guarantee a standardized comparison, four differentiation stadiums have been defined. By using the scanning electron microscopy, the osteoclasts effect on bioglasses has been analysed.

Bioglasses 45S5, 1393 and 1393 BS showed significant higher pH values at day 2, 4, 6 and 8 than cells which has been incubated without any bone graft material – e.g. pH value of bioglass 45S5 at day 6 has been significantly higher than pH value of cells without bioglass ( $p = 0,001$ ). The lysosomal enzyme Cathepsin K ( $p = 0,003$ ) as well as mannose receptor C type 1 ( $p = 0,014$ ), which is important for multinucleation, have both shown a more significant expression than PBMCs. The control group ( $p = 0,032$ ) showed significantly higher functional TRAP 5b activity than the PBMCs. A morphological analysis showed a successful multinucleation, even if it has been slower when cells have been in contact with any bioglass. Immunofluorescence microscopy confirmed, that there are less cells on the surface of the bioglasses with especially less differentiated cells.

Overall, successful but slower osteoclastogenesis was demonstrated on contact with Bioglass. This is least pronounced with Bioglass 1393 ges, which is attributed to the lower alkalizing effect. The biocompatibility of Bioglas 45S5, 1393 and 1393 BS can be classified as similar. Depending on the desired effect, different bioglasses can now be used.

## 7. Abkürzungsverzeichnis

1393 BS	Bioglas 1393 mit Borosilikat
Abb.	Abbildung
ACTB	$\beta$ -Aktin
$\alpha$ MEM	Minimum Essential Medium – $\alpha$ Modifikation
AP-1	Aktivator-Protein-1/ Activator Protein 1
aPKC	Atypische Proteinkinase C/ Atypical Protein Kinase C
ATF	Aktivierender Transkriptionsfaktor/ Activating transcription Factor
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
B2M	$\beta$ 2-Mikroglobulin
B <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Bortrioxid
BLNK	B-Zell Verbindungsprotein/ B Cell Linker Protein
BSP	Knochensialoprotein/ Bone Sialoprotein
Btk	Bruton-Tyrosinkinase/ Bruton's Tyrosine Kinase
ca.	circa
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CaO	Calciumoxid
Ca <sub>10</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> (OH) <sub>2</sub>	Hydroxylapatit
CALCR	Calcitonin Rezeptor
CBFB	Kernbindungsfaktor Untereinheit Beta/ Core binding subunit $\beta$
CD14	Unterscheidungsgruppe 14/ Cluster of Differentiation 14
CD16	Unterscheidungsgruppe 16/ Cluster of Differentiation 16
CD40	Unterscheidungsgruppe 40/ Cluster of Differentiation 40
cDNA	komplementäre DNA
c-Fms	Koloniestimulierender Faktor 1 Rezeptor/ Colony Stimulating Factor 1 Receptor
CFU-GM	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie bildende Einheit Colony forming Unit Granulocyte Macrophage Progenitor
Cl <sup>-</sup>	Chlorid
ClC7	Chlorid Kanal 7/ Chlorid Channel 7
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
c-Src	Akronym cellular sarcoma
CtsK	Cathepsin K

CT-Wert	Cycle threshold, Schwellenzyklus
DAG	Diacylglycerol
DAP12	DNAX aktivierendes Protein von 12 kDa/ DNAX Activation Protein of 12 kDa
DC-STAMP	Dendritisches Zellspezifisches Transmembranprotein/ Dendritic Cell-Specific Transmembrane Protein
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ERK	Extrazelluläre Signalregulierte Kinase/ Extracellular-Signal Regulated Kinase
FcR $\gamma$	Fc-Rezeptor- $\gamma$ -Kette/ Fc Receptor Common $\gamma$ -chain
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
GAB2	Grb2-assoziiertes Binder 2/ Grb2 associated Binding Protein 2
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
gDNA	Genomische DNA
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierendem Faktor/ Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor
Grb2	Wachstumsfaktor Rezeptorgebundenen Protein 2/ Growth Factor Receptor bound Protein 2
H <sup>+</sup>	Proton
H <sub>2</sub> O	Wasser
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Bikarbonat
hi-FBS	hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum
HMBS	Hydroxymethylbilan-Synthase
HPRT1	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1
HSP-60	Hitzeschockprotein-60/ Heat Shock Protein 60
Hv1	Spannungsgesteuerter Protonenkanal/ Voltage gated Proton channel
I $\kappa$ B	Inhibitor von NF- $\kappa$ B/ Inhibitor of NF- $\kappa$ B
IKK	I $\kappa$ B-Kinase
IL-1	Interleukin-1
IL-1 $\beta$	Interleukin-1 $\beta$
IL-10	Interleukin-10
IL-13	Interleukin-13
IL-4	Interleukin-4

IL-6	Interleukin-6
INF $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IP3	Inositol-1,4,5-Triphosphat
IP3R	Inositol-1,4,5-Triphosphat Rezeptor
IQR	Interquartilabstand/ Interquartile range
ITAM	Immunrezeptor Tyrosinbasiertes Aktivierungsmotiv/ Immune Receptor Tyrosine-based Activation Motif
JNK	c-Jun terminale Kinase/ c-Jun N-terminal Kinase
K <sub>2</sub> O	Kaliumoxid
LPS	Lipopolysaccharid
LRC	Leukozyten-Rezeptor-Komplex/ Leukocyte Receptor Complex
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase/ Mitogen activated Protein Kinase
MAPKK/ MAP2K	Mitogen aktivierte Proteinkinase Kinase/ Mitogen activated Protein Kinase Kinase
MAPKKK/ MAP3K	Mitogen aktivierte Proteinkinase Kinase Kinase/ Mitogen activated Protein Kinase Kinase Kinase
M-CSF	Makrophagen-Kolonie-stimulierendem Faktor / Macrophage Colony-Stimulating Factor
MDL-1	Myeloisches DAP12 assoziiertes Lektin 1/ Myeloid-associating Lectin (MDL)-1
MgO	Magnesiumoxid
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex/ Major Histocompatibility Complex
MITF	Mikrophthalmie assoziierter Transkriptionsfaktor/ Microphthalmia associated Transcription Factor
MKK	MAP Kinase Kinase
mM	Millimol
MMP-9	Matrix-Metalloproteinase-9/ Matrix Metalloproteinase 9
Mrc1	Mannose Rezeptor C Typ 1/ CD206/ Mannose Receptor C-Type 1
MSC	Mesenchymale Stammzelle
NA	Unterhalb der Nachweisgrenze
Na <sup>+</sup>	Natrium
Na <sub>2</sub> O	Natriumoxid
NEMO/ IKK $\gamma$	NF- $\kappa$ B essenzieller Modulator/ NF- $\kappa$ B essential Modulator

NFATc1	Zytoplasmatischer nukleärer Faktor aktivierter T-Zellen 1 Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 1
NF-κB	Kernfaktor κ aktivierter B-Zellen/ Nuclear Factor κ of activated B-cells
NHE	Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> Antiporter
NIK	NF-κB induzierende Kinase/ NF-κB inducing Kinase
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	Phosphorpentoxid
OPG	Osteoprotegerin
OSCAR	Osteoklastenassoziierter Rezeptor/ Osteoclast associated Receptor
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	Phosphorpentoxid
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PBS+	98 % PBS + 2 % hi-FBS + 1 mM EDTA
PBMCs	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes/ Peripheral blood mononuclear cells
PFA	Paraformaldehyd
PGE2	Prostaglandin E2
PGK1	Phosphoglycerat Kinase 1
PI3K	Phosphoinositid 3 Kinase/ Phosphoinositide 3 Kinase
PIP2	Phosphatidyl-Inositol-4,5-Bisphosphonat/ Phosphatidylinositol 4 5 Bisphosphate 2
PIR-A	Gepaarter Ig-ähnlicher Rezeptor A Paired Immunoglobulin-Like Receptor A
PKC	Proteinkinase C
PLCγ2	Phospholipase Cγ2
RANK	Rezeptor Aktivator von NFκB/ Receptor Activator of NF-κB
RANKL	Rezeptor Aktivator von NFκB Ligand/ Receptor Activator of NF-κB Ligand
Real-time PCR	Real-time Reverse-Transkriptase Polymerase-Ketten-Reaktion
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RGD	Arginin-Glycin-Asparaginsäure-Sequenz
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies/ Reactive Oxygen Species
RT	Reverse Transkriptase
RUNX2	Runt verwandter Transkriptionsfaktor 2/ Runt related transcription factor 2x
RyR2	Ryanoidin-Rezeptor-2

Siglec-15	Sialinsäurebindenden immunglobulinähnlichen Lektin 15/ Sialic Acid-binding Immunoglobulin-Type Lectin 15
SiO <sub>2</sub>	Siliciumdioxid/ Kieselsäure
SIRPβ1	Signalregulationsprotein β1/ Signal Regulatory Protein β1
SLP-76	SH2-Domäne enthaltendes Leukozytenprotein von 76 kDa/ SH2 domain containing leukocyte protein of 76 kDa
SOCE	Speichergesteuerter Calcium Eingang/ Calcium Release Activated Channel
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
SYK	Milztyrosinkinase/ Spleen Tyrosine Kinase
Tab.	Tabelle
TAB1	TAK1 bindendes Protein 1/ TAK1 binding Protein 1
TAB2	TAK1 bindendes Protein 2/ TAK1 binding Protein 2
TAK1	Transformierende Wachstumsfaktor-β-aktivierte Kinase 1/ Transforming Growth Factor β-activated Kinase 1
TBP	TATA-bindendes Protein/ TATA Binding Protein
Tec	Tec Protein Tyrosinkinase/ Tyrosine Protein Kinase Tec
TGF-β	Transformierender Wachstumsfaktor β/ Transforming growth factor β
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor/ Tumor Necrosis Factor
TNFα	Tumor-Nekrose-Faktor α/ Tumor Necrosis Factor-α
TNFR	Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor/ Tumor Necrosis Factor Receptor
TRAF	TNF Rezeptor assoziierter Faktor/ TNF Receptor Associated Factor
TRAP	Tartratresistente-saure-Phosphatase/ Tartrate-resistant Acid Phosphatase
TRAP 5b	Tartratresistente saure Phosphatase Typ 5b
TREM2	Triggerrezeptor auf myeloischen Zellen 2/ Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells 2
TRPV	Transienter Rezeptorpotential Vanilloidkanal/ Transient Receptor Potential Cation Channel
u. a.	unter anderem
v. a.	vor allem
V-ATPase	Vakuoläre H <sup>+</sup> Adenosintriphosphatase (ATPase)
Vav3	Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor Vav3/ Guanine nucleotide exchange factor Vav3

## Abkürzungsverzeichnis

---

wt. %	Massenanteil
YWHAZ	14-3-3 Protein $\zeta$ (Verwendetes Referenzgen)
ZK	Zellkultur

## 8. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Knochenresorption .....	7
Abb. 2: Die hämatopoetische Reihe .....	9
Abb. 3: Osteoklastogenese .....	14
Abb. 4: ITAM vermittelte Signaltransduktion .....	19
Abb. 5: Dichtegradientenzentrifugation .....	25
Abb. 6: Verwendung der isolierten Zellen .....	27
Abb. 7: Real-time PCR Standardkurve .....	33
Abb. 8: Morphologische Stadieneinteilung der Lebendzellbeobachtung .....	41
Abb. 9: Zelldifferenzierung bei Kontakt mit Bioglas 45S5 .....	41
Abb. 10: Zelldifferenzierung bei Kontakt mit Bioglas 1393.....	42
Abb. 11: Zelldifferenzierung bei Kontakt mit Bioglas 1393 BS.....	42
Abb. 12: Zelldifferenzierung bei Kontakt mit Bioglas 1393 ges .....	43
Abb. 13: Zelldifferenzierung ohne Kontakt zu Bioglas .....	43
Abb. 14: Ergebnis der pH-Wert Messung zu den verschiedenen Inkubationszeitpunkten .....	45
Abb. 15: Relative Expression von CD14 .....	48
Abb. 16: Relative Expression von CFBF.....	49
Abb. 17: Relative Expression des Mannose Rezeptor C Typ 1 .....	51
Abb. 18: Relative Expression von Cathepsin K.....	52
Abb. 19: Relative Expression des Calcitonin Rezeptors.....	54
Abb. 20: Relative Expression von OSCAR .....	55
Abb. 21: Exemplarische Darstellung der Kapillarelektrophorese für OSCAR.....	56
Abb. 22: Carboanhydrase II Aktivität .....	58
Abb. 23: TRAP 5b Aktivität .....	59
Abb. 24: Immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchung von Bioglas 45S5.....	61
Abb. 25: Immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchung von Bioglas 1393 .....	61
Abb. 26: Immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchung von Bioglas 1393 BS .....	62
Abb. 27: Immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchung von Bioglas 1393 ges.....	62
Abb. 28: Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung von Bioglas 45S5.....	64
Abb. 29: Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung von Bioglas 1393.....	65
Abb. 30: Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung von Bioglas 1393BS.....	66
Abb. 31: Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung von Bioglas 1393ges .....	67

## 9. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Chemische Zusammensetzung der Biogläser .....	23
Tab. 2: Primer der real-time PCR.....	31
Tab. 3: Stabilitätswerte für die untersuchten Referenzgene.....	46
Tab. 4: Intragruppenvariation.....	46
Tab. 5: Intergruppenvariation.....	46
Tab. 6: Relative Expression von CD14.....	47
Tab. 7: Relative Expression von CBFB .....	49
Tab. 8: Relative Expression von Mannose Rezeptor Typ 1 .....	50
Tab. 9: Relative Expression von Cathepsin K im Vergleich zu PBMCs .....	52
Tab. 10: Relative Expression des Calcitonin Rezeptors .....	53
Tab. 11: Relative Expression von OSCAR .....	55
Tab. 12: Carboanhydrase II Aktivität [U/g Protein].....	57
Tab. 13: TRAP 5b Aktivität [U/g Protein] .....	59

## 10. Literaturverzeichnis

- Ahn, H.;** Kim, J.; Lee, K.; Kim, H.; Jeong, D. (2012): Extracellular acidosis accelerates bone resorption by enhancing osteoclast survival, adhesion, and migration. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 418 (1), S. 144–148. DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.12.149.
- Alatalo, S. L.;** Halleen, J. M.; Hentunen, T. A.; Mönkkönen, J.; Väänänen, H. K. (2000): Rapid screening method for osteoclast differentiation in vitro that measures tartrate-resistant acid phosphatase 5b activity secreted into the culture medium. In: *Clinical Chemistry* 46 (11), S. 1751–1754.
- Alcorta-Sevillano, N.;** Macías, I.; Infante, A.; Rodríguez, C. (2020): Deciphering the Relevance of Bone ECM Signaling. In: *Cells* 9 (12). DOI: 10.3390/cells9122630.
- Ali, S.;** Farooq, I.; Iqbal, K. (2014): A review of the effect of various ions on the properties and the clinical applications of novel bioactive glasses in medicine and dentistry. In: *The Saudi Dental Journal* 26 (1), S. 1–5. DOI: 10.1016/j.sdentj.2013.12.001.
- Alkhalay, Z.;** Shinwari, Z.; Gaafar, A.; Alaiya, A. (2023): Carbonic Anhydrase II Activators in Osteopetrosis Treatment: A Review. In: *Current Issues in Molecular Biology* 45 (2), S. 1373–1386. DOI: 10.3390/cimb45020089.
- Al-Maawi, S.;** Wang, X.; Sader, R.; Götz, W.; Motta, A.; Migliaresi, C.; Kirkpatrick, C.; Ghanaati, S. (2021): Multinucleated Giant Cells Induced by a Silk Fibroin Construct Express Proinflammatory Agents: An Immunohistological Study. In: *Materials* 14 (14). DOI: 10.3390/ma14144038.
- Andersen, C.;** Jensen, J.; Ørntoft, T. (2004): Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. In: *Cancer Research* 64 (15), S. 5245–5250. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-0496.
- Ansari, S.;** Ito, K.; Hofmann, S. (2021): Cell Sources for Human In vitro Bone Models. In: *Current Osteoporosis Reports* 19 (1), S. 88–100. DOI: 10.1007/s11914-020-00648-6.
- Asagiri, M.;** Takayanagi, H. (2007): The molecular understanding of osteoclast differentiation. In: *Bone* 40 (2), S. 251–264. DOI: 10.1016/j.bone.2006.09.023.
- Athanasou, N.** (2011): The osteoclast- what's new? In: *Skeletal Radiology* 40 (9), S. 1137–1140. DOI: 10.1007/s00256-011-1180-9.
- Aya, K.;** Alhawagri, M.; Hagen-Stapleton, A.; Kitaura, H.; Kanagawa, O.; Novack, D. (2005): NF-(kappa)B-inducing kinase controls lymphocyte and osteoclast activities in inflammatory arthritis. In: *The Journal of Clinical Investigation* 115 (7), S. 1848–1854. DOI: 10.1172/JCI23763.
- Baht, G. S.;** Hunter, G.; Goldberg, H. (2008): Bone sialoprotein-collagen interaction promotes hydroxyapatite nucleation. In: *Matrix Biology* 27 (7), S. 600–608. DOI: 10.1016/j.matbio.2008.06.004.
- Bainbridge, D.;** Macey, M. (1983): Hoechst 33258: a fluorescent nuclear counterstain suitable for double-labelling immunofluorescence. In: *Journal of Immunological Methods* 62 (2), S. 193–195. DOI: 10.1016/0022-1759(83)90246-6.
- Baron, R.** (1989): Polarity and membrane transport in osteoclasts. In: *Connective Tissue Research* 20 (1-4), S. 109–120. DOI: 10.3109/03008208909023879.
- Barrow, A.;** Raynal, N.; Andersen, T.; Slatter, D.; Bihan, D.; Pugh, N.; Cella, M.; Kim, T.; Rho, J. (2011): OSCAR is a collagen receptor that costimulates osteoclastogenesis in DAP12-deficient humans and mice. In: *The Journal of Clinical Investigation* 121 (9), S. 3505–3516. DOI: 10.1172/JCI45913.
- Bar-Shavit, Z.** (2007): The osteoclast: a multinucleated, hematopoietic-origin, bone-resorbing osteoimmune cell. In: *Journal of Cellular Biochemistry* 102 (5), S. 1130–1139. DOI: 10.1002/jcb.21553.

- Bastani, B.;** Ross, F. P.; Kopito, R. R.; Gluck, S. L. (1996): Immunocytochemical localization of vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase and Cl<sup>-</sup>-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> anion exchanger (erythrocyte band-3 protein) in avian osteoclasts: effect of calcium-deficient diet on polar expression of the H<sup>+</sup>-ATPase pump. In: *Calcified Tissue International* 58 (5), S. 332–336. DOI: 10.1007/BF02509381.
- Bernhardt, A.;** Koperski, K.; Schumacher, M.; Gelinsky, M. (2017): Relevance of osteoclast-specific enzyme activities in cell-based in vitro resorption assays. In: *European Cells & Materials* 33, S. 28–42. DOI: 10.22203/eCM.v033a03.
- Blair, H.;** Larrouture, Q.; Li, Y.; Lin, H.; Beer-Stoltz, D.; Liu, L.; Tuan, R.; Robinson L.; Schlesinger, P.; Nelson, D (2017): Osteoblast Differentiation and Bone Matrix Formation In Vivo and In Vitro. In: *Tissue Engineering Part B: Reviews* 23 (3), S. 268–280. DOI: 10.1089/ten.TEB.2016.0454.
- Bonewald, L.** (2006): Mechanosensation and Transduction in Osteocytes. In: *BoneKEy-Osteovision* 3 (10), S. 7–15. DOI: 10.1138/20060233.
- Borden, M.;** Westerlund, L.; Lovric, V.; Walsh, W. (2022): Controlling the bone regeneration properties of bioactive glass: Effect of particle shape and size. In: *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 110 (4), S. 910–922. DOI: 10.1002/jbm.b.34971.
- Bosetti, M.;** Cannas, M. (2005): The effect of bioactive glasses on bone marrow stromal cells differentiation. In: *Biomaterials* 26 (18), S. 3873–3879. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2004.09.059.
- Bourette, R.;** Myles, G.; Choi, J.; Rohrschneider, L. (1997): Sequential activation of phosphatidylinositol 3-kinase and phospholipase C-gamma2 by the M-CSF receptor is necessary for differentiation signaling. In: *The EMBO Journal* 16 (19), S. 5880–5893. DOI: 10.1093/emboj/16.19.5880.
- Bradley, E.;** Oursler, M. (2008): Osteoclast culture and resorption assays. In: *Methods in Molecular Biology* 455, S. 19–35. DOI: 10.1007/978-1-59745-104-8\_2.
- Brown, R.;** Day, D.; Day, T.; Jung, S.; Rahaman, M.; Fu, Q. (2008): Growth and differentiation of osteoblastic cells on 13-93 bioactive glass fibers and scaffolds. In: *Acta Biomaterialia* 4 (2), S. 387–396. DOI: 10.1016/j.actbio.2007.07.006.
- Buckwalter, J.;** Cooper, R. (1987): Bone structure and function. In: *Instructional Course Lectures* 36, S. 27–48.
- Bustin, S.** (2002): Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. In: *Journal of Molecular Endocrinology* 29 (1), S. 23–39. DOI: 10.1677/jme.0.0290023.
- Caetano-Lopes, J.;** Canhão, H.; Fonseca, J. (2007): Osteoblasts and bone formation. In: *Acta Reumatologica Portuguesa* 32 (2), S. 103–110.
- Cannio, M.;** Bellucci, D.; Roether, J.; Boccaccini, D.; Cannillo, V. (2021): Bioactive Glass Applications: A Literature Review of Human Clinical Trials. In: *Materials* 14 (18). DOI: 10.3390/ma14185440.
- Cepollaro, S.;** Della Bella, E.; Biase, D. de; Visani, M.; Fini, M. (2018): Evaluation of RNA from human trabecular bone and identification of stable reference genes. In: *Journal of Cellular Physiology* 233 (6), S. 4401–4407. DOI: 10.1002/jcp.26319.
- Chambers, T.;** Revell, P. Fuller, K.; Athanasou, N. (1984): Resorption of bone by isolated rabbit osteoclasts. In: *Journal of Cell Science* 66, S. 383–399. DOI: 10.1242/jcs.66.1.383.
- Chamoux, E.;** Bisson, M.; Payet, M.; Roux, S. (2010): TRPV-5 mediates a receptor activator of NF-kappaB (RANK) ligand-induced increase in cytosolic Ca<sup>2+</sup> in human osteoclasts and down-regulates bone resorption. In: *The Journal of Biological Chemistry* 285 (33), S. 25354–25362. DOI: 10.1074/jbc.M109.075234.

- Chappard, D.;** Baslé, M-F; Legrand, E.; Audran, M. (2008): Trabecular bone microarchitecture: a review. In: *Morphologie : Bulletin de l'Association des Anatomistes* 92 (299), S. 162–170. DOI: 10.1016/j.morpho.2008.10.003.
- Chen, H.;** Schürch, C.; Noble, K.; Kim, K.; Krutzik, P. O.; O'Donnell, E.; Vander Tuig, J.; Nolan, G.; McIlwain, D. (2020): Functional comparison of PBMCs isolated by Cell Preparation Tubes (CPT) vs. Lymphoprep Tubes. In: *BMC Immunology* 21 (1), S. 15. DOI: 10.1186/s12865-020-00345-0.
- Chiou, W.;** Liao, J.; Huang, C.; Chen, C. (2010): 2-Methoxystyrene represses RANKL-mediated osteoclastogenesis by down-regulating formation of TRAF6-TAK1 signalling complexes. In: *British Journal of Pharmacology* 161 (2), S. 321–335. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2010.00823.x.
- Chiu, Y.;** Schwarz, E.; Li, D.; Xu, Y.; Sheu, T.; Li, J.; Mesy Bentley, K. de; Feng, C.; Wang, B.; Wang, J.; Albertorio-Saez, L.; Wood, R.; Kim, M.; Wang, W.; Ritchlin, C. (2017): Dendritic Cell-Specific Transmembrane Protein (DC-STAMP) Regulates Osteoclast Differentiation via the Ca<sup>2+</sup> /NFATc1 Axis. In: *Journal of Cellular Physiology* 232 (9), S. 2538–2549. DOI: 10.1002/jcp.25638.
- Ciraldò, F.;** Boccardi, E.; Melli, V.; Westhauser, F.; Boccaccini, A. (2018): Tackling bioactive glass excessive in vitro bioreactivity: Preconditioning approaches for cell culture tests. In: *Acta Biomaterialia* 75, S. 3–10. DOI: 10.1016/j.actbio.2018.05.019.
- Clarke, B.** (2008): Normal bone anatomy and physiology. In: *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* 3 Suppl 3 (Suppl 3), S131-9. DOI: 10.2215/CJN.04151206.
- Collon, K.;** Bell, J.; Gallo, M.; Chang, S.; Bougioukli, S.; Sugiyama, O.; Tassej, J.; Hollis, R.; Heckmann, N.; Oakes, D.; Longjohn, D.; Evseenko, D.; Kohn, D.; Lieberman, J. (2023): Influence of donor age and comorbidities on transduced human adipose-derived stem cell in vitro osteogenic potential. In: *Gene Therapy* 30 (3-4), S. 369–376. DOI: 10.1038/s41434-022-00367-w.
- Colonna, M.;** Turnbull, I.; Klesney-Tait, J. (2007): The enigmatic function of TREM-2 in osteoclastogenesis. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology* 602, S. 97–105. DOI: 10.1007/978-0-387-72009-8\_13.
- Croke, M.;** Ross, F.; Korhonen, M.; Williams, D.; Zou, W.; Teitelbaum, S. (2011): Rac deletion in osteoclasts causes severe osteopetrosis. In: *Journal of Cell Science* 124 (Pt 22), S. 3811–3821. DOI: 10.1242/jcs.086280.
- Darnay, B.;** Haridas, V.; Ni, J.; Moore, P.; Aggarwal, B. (1998): Characterization of the intracellular domain of receptor activator of NF-kappaB (RANK). Interaction with tumor necrosis factor receptor-associated factors and activation of NF-kappaB and c-Jun N-terminal kinase. In: *The Journal of Biological Chemistry* 273 (32), S. 20551–20555. DOI: 10.1074/jbc.273.32.20551.
- David, J.;** Sabapathy, K.; Hoffmann, O.; Idarraga, M.; Wagner, E. (2002): JNK1 modulates osteoclastogenesis through both c-Jun phosphorylation-dependent and -independent mechanisms. In: *Journal of Cell Science* 115 (Pt 22), S. 4317–4325. DOI: 10.1242/jcs.00082.
- Davis, R.** (2000): Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. In: *Cell* 103 (2), S. 239–252. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)00116-1.
- Daws, M.;** Sullam, P.; Niemi, E.; Chen, T.; Tchao, N.; Seaman, W. (2003): Pattern recognition by TREM-2: binding of anionic ligands. In: *Journal of Immunology* 171 (2), S. 594–599. DOI: 10.4049/jimmunol.171.2.594.
- Del Fattore, A.;** Teti, A.; Rucci, N. (2012): Bone cells and the mechanisms of bone remodelling. In: *Frontiers in Bioscience* 4 (6), S. 2302–2321. DOI: 10.2741/543.
- Desai, S.;** Lång, P.; Näreoja, T.; Windahl, S.; Andersson, G. (2023): RANKL-dependent osteoclast differentiation and gene expression in bone marrow-derived cells from adult mice is sexually dimorphic. In: *Bone Reports* 19, S. 101697. DOI: 10.1016/j.bonr.2023.101697.

- Detsch, R.;** Rübner, M.; Strissel, P.; Mohn, D.; Strasser, E.; Stark, W.; Strick, R.; Boccaccini, A. (2016): Nanoscale bioactive glass activates osteoclastic differentiation of RAW 264.7 cells. In: *Nanomedicine* 11 (9), S. 1093–1105. DOI: 10.2217/nnm.16.20.
- Diba, M.;** Camargo, W.; Zinkevich, T.; Grünewald, A.; Detsch, R.; Kabiri, Y.; Kentgens, A.; Boccaccini, A.; van den Beucken, J.; Leeuwenburgh, S. (2019): Hybrid particles derived from alendronate and bioactive glass for treatment of osteoporotic bone defects. In: *Journal of Materials Chemistry* 7 (5), S. 796–808. DOI: 10.1039/c8tb03062f.
- Dietrich, J.;** Cella, M.; Seiffert, M.; Bühring, H.; Colonna, M. (2000): Cutting edge: signal-regulatory protein beta 1 is a DAP12-associated activating receptor expressed in myeloid cells. In: *Journal of Immunology* 164 (1), S. 9–12. DOI: 10.4049/jimmunol.164.1.9.
- Dodds, R.;** James, I.; Rieman, D.; Ahern, R.; Hwang, S.; Connor, J.; Thompson, S.; Veber, D.; Drake, F.; Holmes, S.; Lark, M.; Gowen, M. (2001): Human osteoclast cathepsin K is processed intracellularly prior to attachment and bone resorption. In: *Journal of Bone and Mineral Research* 16 (3), S. 478–486. DOI: 10.1359/jbmr.2001.16.3.478.
- Durán, A.;** Serrano, M.; Leitges, M.; Flores, J.; Picard, S.; Brown, J.; Moscat, J.; Diaz-Meco, M. (2004): The atypical PKC-interacting protein p62 is an important mediator of RANK-activated osteoclastogenesis. In: *Developmental Cell* 6 (2), S. 303–309. DOI: 10.1016/s1534-5807(03)00403-9.
- Durand, M.;** Komarova, S.; Bhargava, A.; Trebec-Reynolds, D.; Li, K.; Fiorino, C.; Maria, O.; Nabavi, N.; Manolson, M.; Harrison, R.; Dixon, S.; Sims, S.; Mizianty, M.; Kurgan, L.; Haroun, S.; Boire, G.; Fatima Lucena-Fernandes, M. de; Brum-Fernandes, A. de (2013): Monocytes from patients with osteoarthritis display increased osteoclastogenesis and bone resorption: the In Vitro Osteoclast Differentiation in Arthritis study. In: *Arthritis and Rheumatism* 65 (1), S. 148–158. DOI: 10.1002/art.37722.
- Faccio, R.;** Teitelbaum, S.; Fujikawa, K.; Chappel, J.; Zallone, A.; Tybulewicz, V. L.; Ross, F.; Swat, W. (2005): Vav3 regulates osteoclast function and bone mass. In: *Nature Medicine* 11 (3), S. 284–290. DOI: 10.1038/nm1194.
- Feng, X.** (2005): RANKing intracellular signaling in osteoclasts. In: *IUBMB Life* 57 (6), S. 389–395. DOI: 10.1080/15216540500137669.
- Ferraz, E.;** Oliveira, F.; Oliveira, P. de; Crovace, M.; Peitl-Filho, O.; Beloti, M.; Rosa, A. (2017): Bioactive glass-based surfaces induce differential gene expression profiling of osteoblasts. In: *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 105 (2), S. 419–423. DOI: 10.1002/jbm.a.35915.
- Ferreira, S.;** Young, G.; Jones, J.; Rankin, S. (2021): Bioglass/carbonate apatite/collagen composite scaffold dissolution products promote human osteoblast differentiation. In: *Materials Science and Engineering* 118, S. 111393. DOI: 10.1016/j.msec.2020.111393.
- Fischer, E.;** Hansen, B.; Nair, V.; Hoyt, F.; Dorward, D. (2012): Scanning electron microscopy. In: *Current Protocols in Microbiology* Chapter 2, Unit 2B.2. DOI: 10.1002/9780471729259.mc02b02s25.
- Florencio-Silva, R.;** Sasso, G.; Sasso-Cerri, E.; Simões, M.; Cerri, P. (2015): Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. In: *BioMed Research International* 2015, S. 421746. DOI: 10.1155/2015/421746.
- Franke, T.;** Kaplan, D.; Cantley, L. (1997): PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis. In: *Cell* 88 (4), S. 435–437. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)81883-8.
- Frost, H.** (1994): Wolff's Law and bone's structural adaptations to mechanical usage: an overview for clinicians. In: *The Angle Orthodontist* 64 (3), S. 175–188. DOI: 10.1043/0003-3219(1994)064<0175:WLABSA>2.0.CO;2.

- Fu, Y.;** Gu, J.; Zhang, Y.; Tong, X.; Zhao, H.; Yuan, Y. et al. (2013): Influence of osteoprotegerin on differentiation, activation, and apoptosis of Gaoyou duck embryo osteoclasts in vitro. In: *Poultry Science* 92 (6), S. 1613–1620. DOI: 10.3382/ps.2012-02756.
- Fujikawa, Y.;** Sabokbar, A.; Neale, S.; Itonaga, I.; Torisu, T.; Athanasou, N. (2001): The effect of macrophage-colony stimulating factor and other humoral factors (interleukin-1, -3, -6, and -11, tumor necrosis factor- $\alpha$ , and granulocyte macrophage-colony stimulating factor) on human osteoclast formation from circulating cells. In: *Bone* 28 (3), S. 261–267. DOI: 10.1016/S8756-3282(00)00453-1.
- Fujisaki, K.;** Tanabe, N.; Suzuki, N.; Kawato, T.; Takeichi, O.; Tsuzukibashi, O.; Makimura, M.; Ito, K.; Maeno, M. (2007): Receptor activator of NF-kappaB ligand induces the expression of carbonic anhydrase II, cathepsin K, and matrix metalloproteinase-9 in osteoclast precursor RAW264.7 cells. In: *Life Sciences* 80 (14), S. 1311–1318. DOI: 10.1016/j.lfs.2006.12.037.
- Gay, C.;** Gilman, V.; Sugiyama, T. (2000): Perspectives on osteoblast and osteoclast function. In: *Poultry Science* 79 (7), S. 1005–1008. DOI: 10.1093/ps/79.7.1005.
- Geissmann, F.;** Manz, M.; Jung, S.; Sieweke, M.; Merad, M.; Ley, K. (2010): Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. In: *Science* 327 (5966), S. 656–661. DOI: 10.1126/science.1178331.
- Goldberg, S.;** Georgiou, J.; Glogauer, M.; Grynopas, M. (2012): A 3D scanning confocal imaging method measures pit volume and captures the role of Rac in osteoclast function. In: *Bone* 51 (1), S. 145–152. DOI: 10.1016/j.bone.2012.04.018.
- Golden, L.;** Insogna, K. (2004): The expanding role of PI3-kinase in bone. In: *Bone* 34 (1), S. 3–12. DOI: 10.1016/j.bone.2003.09.005.
- Goto, T.;** Yamaza, T.; Tanaka, T. (2003): Cathepsins in the osteoclast. In: *Journal of Electron Microscopy* 52 (6), S. 551–558. DOI: 10.1093/jmicro/52.6.551.
- Grabowski, P.** (2009): Physiology of bone. In: *Endocrine Development* 16, S. 32–48. DOI: 10.1159/000223687.
- Granfar R.;** Day, C.; Kim, M.; Morrison, N. (2005): Optimised real-time quantitative PCR assays for RANKL regulated genes. In: *Molecular and Cellular Probes* 19 (2), S. 119–126. DOI: 10.1016/j.mcp.2004.10.003.
- Grey, A.;** Chen, Y.; Paliwal, I.; Carlberg, K.; Insogna, K. (2000): Evidence for a functional association between phosphatidylinositol 3-kinase and c-src in the spreading response of osteoclasts to colony-stimulating factor-1. In: *Endocrinology* 141 (6), S. 2129–2138. DOI: 10.1210/endo.141.6.7480.
- Grievink, H.;** Luisman, T.; Kluft, C.; Moerland, M.; Malone, K. (2016): Comparison of Three Isolation Techniques for Human Peripheral Blood Mononuclear Cells: Cell Recovery and Viability, Population Composition, and Cell Functionality. In: *Biopreservation and Biobanking* 14 (5), S. 410–415. DOI: 10.1089/bio.2015.0104.
- Gruber, R.** (2015): Molecular and cellular basis of bone resorption. In: *Wiener medizinische Wochenschrift* 165 (3-4), S. 48–53. DOI: 10.1007/s10354-014-0310-0.
- Guañabens, N.;** Filella, X.; Florez, H.; Ruiz-Gaspá, S.; Conesa, A.; Peris, P.; Monegal, A.; Torres, F. (2019): Tartrate-resistant acid phosphatase 5b, but not periostin, is useful for assessing Paget's disease of bone. In: *Bone* 124, S. 132–136. DOI: 10.1016/j.bone.2019.04.023.
- Guo, T.;** Xing, Y.; Chen, Z.; Wang, X.; Zhu, H.; Yang, L.; Yan, Y. (2021): Core-binding factor beta is required for osteoblast differentiation during fibula fracture healing. In: *Journal of Orthopaedic Surgery and Research* 16 (1), S. 313. DOI: 10.1186/s13018-021-02410-9.

- Gygi, S.;** Rochon, Y.; Franza, B.; Aebersold, R. (1999): Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. In: *Molecular and Cellular Biology* 19 (3), S. 1720–1730. DOI: 10.1128/MCB.19.3.1720.
- Häcker, H.;** Karin, M. (2006): Regulation and function of IKK and IKK-related kinases. In: *Science's Signal Transduction Knowledge Environment* 2006 (357), re13. DOI: 10.1126/stke.3572006re13.
- Halleen, J.;** Tiitinen, S.; Ylipahkala, H.; Fagerlund, K.; Väänänen, H. (2006): Tartrate-resistant acid phosphatase 5b (TRACP 5b) as a marker of bone resorption. In: *Clinical Laboratory* 52 (9-10), S. 499–509.
- Hamerman, J.;** Ni, M.; Killebrew, J.; Chu, C.; Lowell, C. (2009): The expanding roles of ITAM adapters FcRgamma and DAP12 in myeloid cells. In: *Immunological Reviews* 232 (1), S. 42–58. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2009.00841.x.
- Han, H.;** Liu, L.; Chen, M.; Liu, Y.; Wang, H.; Chen, L. (2020): The optimal compound reference genes for qRT-PCR analysis in the developing rat long bones under physiological conditions and prenatal dexamethasone exposure model. In: *Reproductive Toxicology* 98, S. 242–251. DOI: 10.1016/j.reprotox.2020.10.008.
- Harshitha, R.;** Arunraj, D. (2021): Real-time quantitative PCR: A tool for absolute and relative quantification. In: *Biochemistry and Molecular Biology Education* 49 (5), S. 800–812. DOI: 10.1002/bmb.21552.
- Hart, N.;** Newton, R.; Tan, J.; Rantalainen, T.; Chivers, P.; Siafarikas, A.; Nimphius, S. (2020): Biological basis of bone strength: anatomy, physiology and measurement. In: *Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interactions* 20 (3), S. 347–371.
- Haywood, J.;** Qi, J.; Chen, C.; Lu, G.; Liu, Y.; Yan, J.; Shi, Y.; Gao, G. (2016): Structural basis of collagen recognition by human osteoclast-associated receptor and design of osteoclastogenesis inhibitors. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113 (4), S. 1038–1043. DOI: 10.1073/pnas.1522572113.
- Hemingway, F.;** Cheng, X.; Knowles, H.; Estrada, F. Martinez; Gordon, S.; Athanasou, N. (2011): In vitro generation of mature human osteoclasts. In: *Calcified Tissue International* 89 (5), S. 389–395. DOI: 10.1007/s00223-011-9530-0.
- Hench, L.** (2013): Chronology of Bioactive Glass Development and Clinical Applications. In: *New Journal of Glass and Ceramics* 03 (02), S. 67–73. DOI: 10.4236/njgc.2013.32011.
- Henriksen, K.;** Gram, J.; Neutzsky-Wulff, A.; Jensen, V.; Dziegiel, M.; Bollerslev, J.; Karsdal, M. (2009): Characterization of acid flux in osteoclasts from patients harboring a G215R mutation in CIC-7. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 378 (4), S. 804–809. DOI: 10.1016/j.bbrc.2008.11.145.
- Hernandez, C.;** Majeska, R.; Schaffler, M. (2004): Osteocyte density in woven bone. In: *Bone* 35 (5), S. 1095–1099. DOI: 10.1016/j.bone.2004.07.002.
- Hiruma, Y.;** Hirai, T.; Tsuda, E. (2011): Siglec-15, a member of the sialic acid-binding lectin, is a novel regulator for osteoclast differentiation. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 409 (3), S. 424–429. DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.05.015.
- Hodge, J.;** Collier, F.; Pavlos, N.; Kirkland, M.; Nicholson, G. (2011): M-CSF potently augments RANKL-induced resorption activation in mature human osteoclasts. In: *PloS One* 6 (6), e21462. DOI: 10.1371/journal.pone.0021462.

- Horkavcová, D.;** Štríbný, A.; Schuhladen, K.; Bezdička, P.; Boccaccini, A.; Rohanová, D. (2021): Effect of buffer in simulated body fluid on morphology and crystallinity of hydroxyapatite precipitated on 45S5 bioactive glass-derived glass–ceramic scaffolds: comparison of Good’s buffer systems and TRIS. In: *Materials Today Chemistry* 21, S. 100527. DOI: 10.1016/j.mtchem.2021.100527.
- Huang, H.;** Ryu, J.; Ha, J.; Chang, E-J; Kim, H.; Kitamura, T.; Lee, Z. (2006): Osteoclast differentiation requires TAK1 and MKK6 for NFATc1 induction and NF-kappaB transactivation by RANKL. In: *Cell Death and Differentiation* 13 (11), S. 1879–1891. DOI: 10.1038/sj.cdd.4401882.
- Huang, R.;** Zheng, J.; Shao, Y.; Zhu, L.; Yang, T. (2023): Siglec-15 as multifunctional molecule involved in osteoclast differentiation, cancer immunity and microbial infection. In: *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 177, S. 34–41. DOI: 10.1016/j.pbiomolbio.2022.10.006.
- Huang, Y.;** Li, Q.; Feng, Z.; Zheng, L. (2020): STIM1 controls calcineurin/Akt/mTOR/NFATC2-mediated osteoclastogenesis induced by RANKL/M-CSF. In: *Experimental and Therapeutic Medicine* 20 (2), S. 736–747. DOI: 10.3892/etm.2020.8774.
- Humphrey, J.;** Dufresne, E.; Schwartz, M. (2014): Mechanotransduction and extracellular matrix homeostasis. In: *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15 (12), S. 802–812. DOI: 10.1038/nrm3896.
- Humphrey, M.;** Nakamura, M. (2016): A Comprehensive Review of Immunoreceptor Regulation of Osteoclasts. In: *Clinical Reviews in Allergy and Immunology* 51 (1), S. 48–58. DOI: 10.1007/s12016-015-8521-8.
- Im, K.;** Mareninov, S.; Diaz, M.; Yong, W. (2019): An Introduction to Performing Immunofluorescence Staining. In: *Methods in Molecular Biology* 1897, S. 299–311. DOI: 10.1007/978-1-4939-8935-5\_26.
- Ishida-Kitagawa, N.;** Tanaka, K.; Bao, X.; Kimura, T.; Miura, T.; Kitaoka, Y.; Hayashi, K.; Sato, M.; Maruoka, M.; Ogawa, T.; Miyoshi, J.; Takeya, T. (2012): Siglec-15 protein regulates formation of functional osteoclasts in concert with DNAX-activating protein of 12 kDa (DAP12). In: *The Journal of Biological Chemistry* 287 (21), S. 17493–17502. DOI: 10.1074/jbc.M111.324194.
- Ishikawa, S.;** Arase, N.; Suenaga, T.; Saita, Y.; Noda, M.; Kuriyama, T.; Arase, H.; Saito, T. (2004): Involvement of FcRgamma in signal transduction of osteoclast-associated receptor (OSCAR). In: *International Immunology* 16 (7), S. 1019–1025. DOI: 10.1093/intimm/dxh103.
- Jevon, M.;** Sabokbar, A.; Fujikawa, Y.; Hirayama, T.; Neale, S. D.; Wass, J.; Athanasou, N. A. (2002): Gender- and age-related differences in osteoclast formation from circulating precursors. In: *The Journal of Endocrinology* 172 (3), S. 673–681. DOI: 10.1677/joe.0.1720673.
- Jia, Y.;** Xu, H.; Li, Y.; Wei, C.; Guo, R.; Wang, F.; Wu, Y.; Liu, J.; Jia, J.; Yan, J.; Qi, X.; Li, Y.; Gao, X. (2018): A Modified Ficoll-Paque Gradient Method for Isolating Mononuclear Cells from the Peripheral and Umbilical Cord Blood of Humans for Biobanks and Clinical Laboratories. In: *Biopreservation and Biobanking* 16 (2), S. 82–91. DOI: 10.1089/bio.2017.0082.
- Jones, J.** (2013): Review of bioactive glass: from Hench to hybrids. In: *Acta Biomaterialia* 9 (1), S. 4457–4486. DOI: 10.1016/j.actbio.2012.08.023.
- Kadono, Y.;** Okada, F.; Perchonock, C.; Jang, H.; Lee, S.; Kim, N.; Choi, Y. (2005): Strength of TRAF6 signalling determines osteoclastogenesis. In: *EMBO Reports* 6 (2), S. 171–176. DOI: 10.1038/sj.embor.7400345.
- Kajiya, H.** (2012): Calcium signaling in osteoclast differentiation and bone resorption. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology* 740, S. 917–932. DOI: 10.1007/978-94-007-2888-2\_41.
- Kajiya, H.;** Okamoto, F.; Nemoto, T.; Kimachi, K.; Toh-Goto, K.; Nakayama, S.; Okabe, K. (2010): RANKL-induced TRPV2 expression regulates osteoclastogenesis via calcium oscillations. In: *Cell Calcium* 48 (5), S. 260–269. DOI: 10.1016/j.ceca.2010.09.010.

- Kameda, Y.;** Takahata, M.; Komatsu, M.; Mikuni, S.; Hatakeyama, S.; Shimizu, T.; Angata, T.; Kinjo, M.; Minami, A.; Iwasaki, N (2013): Siglec-15 regulates osteoclast differentiation by modulating RANKL-induced phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and Erk pathways in association with signaling Adaptor DAP12. In: *Journal of Bone and Mineral Research* 28 (12), S. 2463–2475. DOI: 10.1002/jbmr.1989.
- Kang, F.;** Chen, W.; Wang, L.; Zhang, Y. (2020a): The diverse functions of Siglec-15 in bone remodeling and antitumor responses. In: *Pharmacological Research* 155, S. 104728. DOI: 10.1016/j.phrs.2020.104728.
- Kang, J.;** Kang, N.; Yang, Y.; Hong, J.; Shin, D. (2020b): The Role of Ca<sup>2+</sup>-NFATc1 Signaling and Its Modulation on Osteoclastogenesis. In: *International Journal of Molecular Sciences* 21 (10). DOI: 10.3390/ijms21103646.
- Kargozar, S.;** Montazerian, M.; Fiume, E.; Baino, F. (2019): Multiple and Promising Applications of Strontium (Sr)-Containing Bioactive Glasses in Bone Tissue Engineering. In: *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 7, S. 161. DOI: 10.3389/fbioe.2019.00161.
- Karst, M.;** Gorny, G.; Galvin, R.; Oursler, M. (2004): Roles of stromal cell RANKL, OPG, and M-CSF expression in biphasic TGF-beta regulation of osteoclast differentiation. In: *Journal of Cellular Physiology* 200 (1), S. 99–106. DOI: 10.1002/jcp.20036.
- Kawai, R.;** Sugisaki, R.; Miyamoto, Y.; Yano, F.; Sasa, K.; Minami, E.; Maki, K.; Kamijo, R. (2023): Cathepsin K degrades osteoprotegerin to promote osteoclastogenesis in vitro. In: *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal* 59 (1), S. 10–18. DOI: 10.1007/s11626-023-00747-5.
- Kim, H.;** Zou, W.; Ito, Y.; Kim, S.; Chappel, J.; Ross, F.; Teitelbaum, S. (2010): Src-like adaptor protein regulates osteoclast generation and survival. In: *Journal of Cellular Biochemistry* 110 (1), S. 201–209. DOI: 10.1002/jcb.22527.
- Kim, J.;** Kim, N. (2016): Signaling Pathways in Osteoclast Differentiation. In: *Chonnam Medical Journal* 52 (1), S. 12–17. DOI: 10.4068/cmj.2016.52.1.12.
- Kim, M.;** Kim, B.; Kwon, J.; Song, M.; Jung, S.; Lee, Z.; Kim, H. (2019): ST5 Positively Regulates Osteoclastogenesis via Src/Syk/calcium Signaling Pathways. In: *Molecules and Cells* 42 (11), S. 810–819. DOI: 10.14348/molcells.2019.0189.
- Kim, N.;** Takami, M.; Rho, J.; Josien, R.; Choi, Y. (2002): A novel member of the leukocyte receptor complex regulates osteoclast differentiation. In: *The Journal of Experimental Medicine* 195 (2), S. 201–209. DOI: 10.1084/jem.20011681.
- Kivell, T.** (2016): A review of trabecular bone functional adaptation: what have we learned from trabecular analyses in extant hominoids and what can we apply to fossils? In: *Journal of Anatomy* 228 (4), S. 569–594. DOI: 10.1111/joa.12446.
- Kobayashi, N.;** Kadono, Y.; Naito, A.; Matsumoto, K.; Yamamoto, T.; Tanaka, S.; Inoue, J. (2001): Segregation of TRAF6-mediated signaling pathways clarifies its role in osteoclastogenesis. In: *The EMBO Journal* 20 (6), S. 1271–1280. DOI: 10.1093/emboj/20.6.1271.
- Kobayashi, Y.;** Udagawa, N.; Takahashi, N. (2009): Action of RANKL and OPG for osteoclastogenesis. In: *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression* 19 (1), S. 61–72. DOI: 10.1615/critreveukargeneexpr.v19.i1.30.
- Koga, T.;** Inui, M.; Inoue, K.; Kim, S.; Suematsu, A.; Kobayashi, E.; Iwata, T.; Ohnishi, H.; Matozaki, T.; Kodama, T.; Taniguchi, T.; Takayanagi, H.; Takai, T. (2004): Costimulatory signals mediated by the ITAM motif cooperate with RANKL for bone homeostasis. In: *Nature* 428 (6984), S. 758–763. DOI: 10.1038/nature02444.

- Komori, T.** (2020): What is the function of osteocalcin? In: *Journal of Oral Biosciences* 62 (3), S. 223–227. DOI: 10.1016/j.job.2020.05.004.
- Kong, L.;** Wang, B.; Yang, X.; He, B.; Hao, D.; Yan, L. (2020): Integrin-associated molecules and signalling cross talking in osteoclast cytoskeleton regulation. In: *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 24 (6), S. 3271–3281. DOI: 10.1111/jcmm.15052.
- Koshihara, Y.;** Suematsu, A.; Feng, D.; Okawara, R.; Ishibashi, H.; Yamamoto, S. (2002): Osteoclastogenic potential of bone marrow cells increases with age in elderly women with fracture. In: *Mechanisms of Ageing and Development* 123 (10), S. 1321–1331. DOI: 10.1016/s0047-6374(02)00071-4.
- Krishnan, V.;** Lakshmi, T. (2013): Bioglass: A novel biocompatible innovation. In: *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology and Research* 4 (2), S. 78–83. DOI: 10.4103/2231-4040.111523.
- Kubista, M.;** Andrade, J.; Bengtsson, M.; Forootan, A.; Jonák, J.; Lind, K.; Sindelka, R.; Sjöback, R.; Sjögreen, B.; Strömbom, L.; Ståhlberg, A.; Zoric, N. (2006): The real-time polymerase chain reaction. In: *Molecular Aspects of Medicine* 27 (2-3), S. 95–125. DOI: 10.1016/j.mam.2005.12.007.
- Kudo, O.;** Sabokbar, A.; Pocock, A.; Itonaga, I.; Athanasou, N. (2002): Isolation of human osteoclasts formed in vitro: hormonal effects on the bone-resorbing activity of human osteoclasts. In: *Calcified Tissue International* 71 (6), S. 539–546. DOI: 10.1007/s00223-001-2128-1.
- Kuno, M.** (2018): Cooperative electrogenic proton transport pathways in the plasma membrane of the proton-secreting osteoclast. In: *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 470 (6), S. 851–866. DOI: 10.1007/s00424-018-2137-9.
- Lamothe, B.;** Lai, Y.; Xie, M.; Schneider, M.; Darnay, B. (2013): TAK1 is essential for osteoclast differentiation and is an important modulator of cell death by apoptosis and necroptosis. In: *Molecular and Cellular Biology* 33 (3), S. 582–595. DOI: 10.1128/MCB.01225-12.
- Landström, M.** (2010): The TAK1-TRAF6 signalling pathway. In: *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 42 (5), S. 585–589. DOI: 10.1016/j.biocel.2009.12.023.
- Lanier, L.;** Bakker, A. (2000): The ITAM-bearing transmembrane adaptor DAP12 in lymphoid and myeloid cell function. In: *Immunology Today* 21 (12), S. 611–614. DOI: 10.1016/s0167-5699(00)01745-x.
- Larionov, A.;** Krause, A.; Miller, W. (2005): A standard curve based method for relative real time PCR data processing. In: *BMC Bioinformatics* 6, S. 62. DOI: 10.1186/1471-2105-6-62.
- Lee, J.;** Chow, K. (2012): SEM sample preparation for cells on 3D scaffolds by freeze-drying and HMDS. In: *Scanning* 34 (1), S. 12–25. DOI: 10.1002/sca.20271.
- Lee, S.;** Han, S.; Kim, H.; Lee, Z. (2002a): TAK1-dependent activation of AP-1 and c-Jun N-terminal kinase by receptor activator of NF-kappaB. In: *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 35 (4), S. 371–376. DOI: 10.5483/bmbrep.2002.35.4.371.
- Lee, S.;** Woo, K.; Kim, S.; Kim, H.; Kwack, K.; Lee, Z. (2002b): The phosphatidylinositol 3-kinase, p38, and extracellular signal-regulated kinase pathways are involved in osteoclast differentiation. In: *Bone* 30 (1), S. 71–77. DOI: 10.1016/s8756-3282(01)00657-3.
- Lerner, U.** (2000): Osteoclast formation and resorption. In: *Matrix Biology* 19 (2), S. 107–120. DOI: 10.1016/s0945-053x(00)00052-4.
- Licini, C.;** Vitale-Brovarone, C.; Mattioli-Belmonte, M. (2019): Collagen and non-collagenous proteins molecular crosstalk in the pathophysiology of osteoporosis. In: *Cytokine and Growth Factor Reviews* 49, S. 59–69. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2019.09.001.

- Livak, K.;** Schmittgen, T. (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$  Method. In: *Methods* 25 (4), S. 402–408. DOI: 10.1006/meth.2001.1262.
- Locati, M.;** Curtale, G.; Mantovani, A. (2020): Diversity, Mechanisms, and Significance of Macrophage Plasticity. In: *Annual Review of Pathology* 15, S. 123–147. DOI: 10.1146/annurev-pathmechdis-012418-012718.
- Lomaga, M.;** Yeh, W.; Sarosi, I.; Duncan, G.; Furlonger, C.; Ho, A.; Morony, S.; Capparelli, C.; Van, G.; Kaufman, S.; van der Heiden, A.; Itie, A.; Wakeham, A.; Khoo, W.; Sasaki, T.; Cao, Z.; Penninger, J.; Paige, C.; Lacey, D.; Dunstan, C.; Boyle, W.; Goeddel, D.; Mak, T. (1999): TRAF6 deficiency results in osteopetrosis and defective interleukin-1, CD40, and LPS signaling. In: *Genes and Development* 13 (8), S. 1015–1024. DOI: 10.1101/gad.13.8.1015.
- Maciel, G.;** Maciel, R.; Danesi, C. (2023): Bone cells and their role in physiological remodeling. In: *Molecular Biology Reports* 50 (3), S. 2857–2863. DOI: 10.1007/s11033-022-08190-7.
- Mancini, A.;** Niedenthal, R.; Joos, H.; Koch, A.; Trouliaris, S.; Niemann, H.; Tamura, T. (1997): Identification of a second Grb2 binding site in the v-Fms tyrosine kinase. In: *Oncogene* 15 (13), S. 1565–1572. DOI: 10.1038/sj.onc.1201518.
- Manolagas, S.** (2020): Osteocalcin promotes bone mineralization but is not a hormone. In: *PLoS Genetics* 16 (6), e1008714. DOI: 10.1371/journal.pgen.1008714.
- Mao, D.;** Epple, H.; Uthgenannt, B.; Novack, D.; Faccio, R. (2006): PLCgamma2 regulates osteoclastogenesis via its interaction with ITAM proteins and GAB2. In: *The Journal of Clinical Investigation* 116 (11), S. 2869–2879. DOI: 10.1172/JCI28775.
- Marcoline, F.;** Ishida, Y.; Mindell, J.; Nayak, S.; Grabe, M. (2016): A mathematical model of osteoclast acidification during bone resorption. In: *Bone* 93, S. 167–180. DOI: 10.1016/j.bone.2016.09.007.
- Marini, I.;** Rigoni, F.; Zlamal, J.; Pelzl, L.; Althaus, K.; Nowak-Harnau, S.; Rondina, M.; Bakchoul, T. (2020): Blood donor-derived buffy coat to produce platelets in vitro. In: *Vox Sanguinis* 115 (1), S. 94–102. DOI: 10.1111/vox.12863.
- Marino, S.;** Logan, J.; Mellis, D.; Capulli, M. (2014): Generation and culture of osteoclasts. In: *BoneKey Reports* 3, S. 570. DOI: 10.1038/bonekey.2014.65.
- Marotti, G.;** Muglia, M.; Palumbo, C. (1994): Structure and function of lamellar bone. In: *Clinical Rheumatology* 13 Suppl 1, S. 63–68.
- Maruyama, T.;** Fukushima, H.; Nakao, K.; Shin, M.; Yasuda, H.; Weih, F.; Doi, T.; Aoki, K.; Alles, N.; Ohya, K.; Hosokawa, R.; Jimi, E. (2010): Processing of the NF-kappa B2 precursor p100 to p52 is critical for RANKL-induced osteoclast differentiation. In: *Journal of Bone and Mineral Research* 25 (5), S. 1058–1067. DOI: 10.1359/jbmr.091032.
- Massey, H.;** Flanagan, A. (1999): Human osteoclasts derive from CD14-positive monocytes. In: *British Journal of Haematology* 106 (1), S. 167–170. DOI: 10.1046/j.1365-2141.1999.01491.x.
- Masuyama, R.;** Vriens, J.; Voets, T.; Karashima, Y.; Owsianik, G.; Vennekens, R.; Lieben, L.; Torrekens, S.; Moermans, K.; Vanden Bosch, A.; Bouillon, R.; Nilius, B.; Carmeliet, G. (2008): TRPV4-mediated calcium influx regulates terminal differentiation of osteoclasts. In: *Cell Metabolism* 8 (3), S. 257–265. DOI: 10.1016/j.cmet.2008.08.002.
- Matsubara, T.;** Yasuda, K.; Mizuta, K.; Kawaue, H.; Kokabu, S. (2022): Tyrosine Kinase Src Is a Regulatory Factor of Bone Homeostasis. In: *International Journal of Molecular Sciences* 23 (10). DOI: 10.3390/ijms23105508.
- Matsuda, T.;** Davies, J. (1987): The in vitro response of osteoblasts to bioactive glass. In: *Biomaterials* 8 (4), S. 275–284. DOI: 10.1016/0142-9612(87)90115-3.

- Matsumoto, M.;** Sudo, T.; Saito, T.; Osada, H.; Tsujimoto, M. (2000): Involvement of p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway in osteoclastogenesis mediated by receptor activator of NF-kappa B ligand (RANKL). In: *The Journal of Biological Chemistry* 275 (40), S. 31155–31161. DOI: 10.1074/jbc.M001229200.
- Matt, K.;** Bergemann, J. (2019): Ex vivo analysis of DNA repair capacity of human peripheral blood mononuclear cells by a modified host cell reactivation assay. In: *bio-protocol* 9 (15), e3325. DOI: 10.21769/BioProtoc.3325.
- Mazloom-Farsibaf, H.;** Farzam, F.; Fazel, M.; Wester, M.; Meddens, M.; Lidke, K. (2021): Comparing lifeact and phalloidin for super-resolution imaging of actin in fixed cells. In: *PloS One* 16 (1), e0246138. DOI: 10.1371/journal.pone.0246138.
- Mazza, R.;** Mazzette, R. (2014): Absolute and relative gene expression in *Listeria monocytogenes* using real-time PCR. In: *Methods in Molecular Biology* 1157, S. 213–221. DOI: 10.1007/978-1-4939-0703-8\_18.
- Mena, C.;** Kurihara, N.; Roodman, G. (2000): CFU-GM-derived cells form osteoclasts at a very high efficiency. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 267 (3), S. 943–946. DOI: 10.1006/bbrc.1999.2042.
- Miller, J.;** Horner, A.; Stacy, T.; Lowrey, C.; Lian, J.; Stein, G.; Nuckolls, G.; Speck, N. (2002): The core-binding factor beta subunit is required for bone formation and hematopoietic maturation. In: *Nature Genetics* 32 (4), S. 645–649. DOI: 10.1038/ng1049.
- Miller, S.;** Saint-Georges, L. de; Bowman, B.; Jee, W. (1989): Bone lining cells: structure and function. In: *Scanning Microscopy* 3 (3), 953-60; discussion 960-1.
- Mira-Pascual, L.;** Patlaka, C.; Desai, S.; Paulie, S.; Näreoja, T.; Lång, P.; Andersson, G. (2020): A novel sandwich ELISA for tartrate-Resistant acid phosphatase 5a and 5b protein reveals that both isoforms are secreted by differentiating osteoclasts and correlate to the type I collagen degradation marker CTX-I In vivo and in vitro. In: *Calcified Tissue International* 106 (2), S. 194–207. DOI: 10.1007/s00223-019-00618-w.
- Miyamoto, T.** (2006): The dendritic cell-specific transmembrane protein DC-STAMP is essential for osteoclast fusion and osteoclast bone-resorbing activity. In: *Modern Rheumatology* 16 (6), S. 341–342. DOI: 10.1007/s10165-006-0524-0.
- Mizukami, J.;** Takaesu, G.; Akatsuka, H.; Sakurai, H.; Ninomiya-Tsuji, J.; Matsumoto, K.; Sakurai, N. (2002): Receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL) activates TAK1 mitogen-activated protein kinase kinase kinase through a signaling complex containing RANK, TAB2, and TRAF6. In: *Molecular and Cellular Biology* 22 (4), S. 992–1000. DOI: 10.1128/MCB.22.4.992-1000.2002.
- Mochida, Y.;** Parisuthiman, D.; Pornprasertsuk-Damrongsri, S.; Atsawasuwana, P.; Sricholpech, M.; Boskey, A.; Yamauchi, M. (2009): Decorin modulates collagen matrix assembly and mineralization. In: *Matrix Biology* 28 (1), S. 44–52. DOI: 10.1016/j.matbio.2008.11.003.
- Mócsai, A.;** Humphrey, M.; van Ziffle, J.; Hu, Y.; Burghardt, A.; Spusta, S.; Majumdar, S.; Lanier, L.; Lowell, C.; Nakamura, M. (2004): The immunomodulatory adapter proteins DAP12 and Fc receptor gamma-chain (FcRgamma) regulate development of functional osteoclasts through the Syk tyrosine kinase. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (16), S. 6158–6163. DOI: 10.1073/pnas.0401602101.
- Møller, A.;** Delaissé, J.; Olesen, J.; Madsen, J.; Canto, L.; Bechmann, T.; Rogatto, S.; Søe, K. (2020): Aging and menopause reprogram osteoclast precursors for aggressive bone resorption. In: *Bone Research* 8, S. 27. DOI: 10.1038/s41413-020-0102-7.

- Moriishi, T.;** Ozasa, R.; Ishimoto, T.; Nakano, T.; Hasegawa, T.; Miyazaki, T.; Liu, W.; Fukuyama, R.; Wang, Y.; Komori, H.; Qin, X.; Amizuka, N.; Komori, T. (2020): Osteocalcin is necessary for the alignment of apatite crystallites, but not glucose metabolism, testosterone synthesis, or muscle mass. In: *PLoS Genetics* 16 (5), e1008586. DOI: 10.1371/journal.pgen.1008586.
- Morishima, S.;** Morita, I.; Tokushima, T.; Kawashima, H.; Miyasaka, M.; Omura, K.; Murota, S. (2003): Expression and role of mannose receptor/terminal high-mannose type oligosaccharide on osteoclast precursors during osteoclast formation. In: *The Journal of Endocrinology* 176 (2), S. 285–292. DOI: 10.1677/joe.0.1760285.
- Nahian, A.;** Chauhan, P. (2023): StatPearls. Histology, Periosteum And Endosteum. Treasure Island (FL).
- Naito, A.;** Azuma, S.; Tanaka, S.; Miyazaki, T.; Takaki, S.; Takatsu, K.; Nakao, K.; Nakamura, K.; Katsuki, M.; Yamamoto, T.; Inoue, J. (1999): Severe osteopetrosis, defective interleukin-1 signalling and lymph node organogenesis in TRAF6-deficient mice. In: *Genes to Cells* 4 (6), S. 353–362. DOI: 10.1046/j.1365-2443.1999.00265.x.
- Nakamura, M.;** Aoyama, N.; Yamaguchi, S.; Sasano, Y. (2021): Expression of tartrate-resistant acid phosphatase and cathepsin K during osteoclast differentiation in developing mouse mandibles. In: *Biomedical Research* 42 (1), S. 13–21. DOI: 10.2220/biomedres.42.13.
- Neagu, T.;** Țigliș, M.; Cocoloș, I.; Jecan, C. (2016): The relationship between periosteum and fracture healing. In: *Romanian Journal of Morphology and Embryology* 57 (4), S. 1215–1220.
- Nedeva, I.;** Vitale, M.; Elson, A.; Hoyland, J.; Bella, J. (2021): Role of OSCAR Signaling in Osteoclastogenesis and Bone Disease. In: *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 9, S. 641162. DOI: 10.3389/fcell.2021.641162.
- Negishi-Koga, T.;** Gober, H.; Sumiya, E.; Komatsu, N.; Okamoto, K.; Sawa, S.; Suematsu, A.; Suda, T.; Sato, K.; Takai, T.; Takayanagi, H. (2015): Immune complexes regulate bone metabolism through Fc $\gamma$  signalling. In: *Nature Communications* 6, S. 6637. DOI: 10.1038/ncomms7637.
- Nemeth, K.;** Schoppet, M.; Al-Fakhri, N.; Helas, S.; Jessberger, R.; Hofbauer, L.; Goettsch, C. (2011): The role of osteoclast-associated receptor in osteoimmunology. In: *Journal of Immunology* 186 (1), S. 13–18. DOI: 10.4049/jimmunol.1002483.
- Nesbitt, S.;** Horton, M. (1997): Trafficking of matrix collagens through bone-resorbing osteoclasts. In: *Science* 276 (5310), S. 266–269. DOI: 10.1126/science.276.5310.266.
- Nicholson, G.;** Malakellis, M.; Collier, F.; Cameron, P.; Holloway, W.; Gough, T.; Gregorio-King, C.; Kirkland, M.; Myers, D. (2000): Induction of osteoclasts from CD14-positive human peripheral blood mononuclear cells by receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL). In: *Clinical Science* 99 (2), S. 133–140.
- Nielsen, M.;** Andersen, M.; Møller, H. (2020): Monocyte isolation techniques significantly impact the phenotype of both isolated monocytes and derived macrophages in vitro. In: *Immunology* 159 (1), S. 63–74. DOI: 10.1111/imm.13125.
- Nordström, T.;** Rotstein, O.; Romanek, R.; Asotra, S.; Heersche, J.; Manolson, M.; Brisseau, G.; Grinstein, S. (1995): Regulation of cytoplasmic pH in osteoclasts. Contribution of proton pumps and a proton-selective conductance. In: *The Journal of Biological Chemistry* 270 (5), S. 2203–2212. DOI: 10.1074/jbc.270.5.2203.
- Novack, D.;** Yin, L.; Hagen-Stapleton, A.; Schreiber, R.; Goeddel, D.; Ross, F.; Teitelbaum, S. (2003): The IkappaB function of NF-kappaB2 p100 controls stimulated osteoclastogenesis. In: *The Journal of Experimental Medicine* 198 (5), S. 771–781. DOI: 10.1084/jem.20030116.

- O'Herin, C.;** Moriuchi, Y.; Bemis, T.; Kohlbrand, A.; Burkart, M.; Cohen, S. (2023): Development of Human Carbonic Anhydrase II Heterobifunctional Degraders. In: *Journal of Medicinal Chemistry* 66 (4), S. 2789–2803. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.2c01843.
- Otero, J.;** Dai, S.; Foglia, D.; Alhawagri, M.; Vacher, J.; Pasparakis, M.; Abu-Amer, Y. (2008): Defective osteoclastogenesis by IKKbeta-null precursors is a result of receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL)-induced JNK-dependent apoptosis and impaired differentiation. In: *The Journal of Biological Chemistry* 283 (36), S. 24546–24553. DOI: 10.1074/jbc.M800434200.
- Otero, J.;** Stevens, J.; Malandra, A.; Fredericks, D.; Odgren, P.; Buckwalter, J.; Morcuende, J. (2014): Osteoclast inhibition impairs chondrosarcoma growth and bone destruction. In: *Journal of Orthopaedic Research* 32 (12), S. 1562–1571. DOI: 10.1002/jor.22714.
- Otero, K.;** Turnbull, I.; Poliani, P.; Vermi, W.; Cerutti, E.; Aoshi, T.; Tassi, I.; Takai, T.; Stanley, S.; Miller, M.; Shaw, A.; Colonna, M. (2009): Macrophage colony-stimulating factor induces the proliferation and survival of macrophages via a pathway involving DAP12 and beta-catenin. In: *Nature Immunology* 10 (7), S. 734–743. DOI: 10.1038/ni.1744.
- Ott, S.** (2018): Cortical or trabecular bone: What's the difference? In: *American Journal of Nephrology* 47 (6), S. 373–375. DOI: 10.1159/000489672.
- Park-Min, K.** (2018): Mechanisms involved in normal and pathological osteoclastogenesis. In: *Cellular and Molecular Life Sciences* 75 (14), S. 2519–2528. DOI: 10.1007/s00018-018-2817-9.
- Peng, Y.;** Zhou, M.; Yang, H.; Qu, R.; Qiu, Y.; Hao, J.; Bi, H.; Guo, D. (2023): Regulatory mechanism of M1/M2 macrophage polarization in the development of autoimmune diseases. In: *Mediators of Inflammation* 2023, S. 8821610. DOI: 10.1155/2023/8821610.
- Portes, M.;** Mangeat, T.; Escallier, N.; Dufrancais, O.; Raynaud-Messina, B.; Thibault, C.; Maridonneau-Parini, I.; Vérollet, C.; Poincloux, R. (2022): Nanoscale architecture and coordination of actin cores within the sealing zone of human osteoclasts. In: *eLife* 11. DOI: 10.7554/eLife.75610.
- Pospich, S.;** Merino, F.; Raunser, S. (2020): Structural effects and functional implications of phalloidin and jasplakinolide binding to actin filaments. In: *Structure* 28 (4), 437-449.e5. DOI: 10.1016/j.str.2020.01.014.
- Pryce, R.;** Hench, L. (2003): Dissolution Characteristics of Bioactive Glasses. In: *Key Engineering Materials* 240-242, S. 201–204. DOI: 10.4028/www.scientific.net/KEM.240-242.201.
- Puhr, S.;** Lee, J.; Zvezdova, E.; Zhou, Y.; Liu, K. (2015): Dendritic cell development-History, advances, and open questions. In: *Seminars in Immunology* 27 (6), S. 388–396. DOI: 10.1016/j.smim.2016.03.012.
- Puleo, A.;** Carroll, C.; Maecker, H.; Gupta, R. (2017): Isolation of peripheral blood mononuclear cells using Vacutainer® Cellular Preparation Tubes (CPTTM). In: *bio-protocol* 7 (2), e2103. DOI: 10.21769/BioProtoc.2103.
- Quinn, J.;** Itoh, K.; Udagawa, N.; Hausler, K.; Yasuda, H.; Shima, N.; Mizuno, A.; Higashio, K.; Takahashi, N.; Suda, T.; Martin, T.; Gillespie, M. (2001): Transforming growth factor beta affects osteoclast differentiation via direct and indirect actions. In: *Journal of Bone and Mineral Research* 16 (10), S. 1787–1794. DOI: 10.1359/jbmr.2001.16.10.1787.
- Rao, X.;** Huang, X.; Zhou, Z.; Lin, X. (2013): An improvement of the 2<sup>-delta delta CT</sup> method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. In: *Biostatistics, Bioinformatics and Biomathematics* 3 (3), S. 71–85.
- Rashid, S.;** Song, D.; Yuan, J.; Mullin, B.; Xu, J. (2022): Molecular structure, expression, and the emerging role of Siglec-15 in skeletal biology and cancer. In: *Journal of Cellular Physiology* 237 (3), S. 1711–1719. DOI: 10.1002/jcp.30654.

- Ribet, A.;** Ng, P.; Pavlos, N. (2021): Membrane transport proteins in osteoclasts: The ins and outs. In: *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 9, S. 644986. DOI: 10.3389/fcell.2021.644986.
- Riihonen, R.;** Supuran, C.; Parkkila, S.; Pastorekova, S.; Väänänen, H.; Laitala-Leinonen, T. (2007): Membrane-bound carbonic anhydrases in osteoclasts. In: *Bone* 40 (4), S. 1021–1031. DOI: 10.1016/j.bone.2006.11.028.
- Robinson, L.;** Blair, H.; Barnett, J.; Zaidi, M.; Huang, C. (2010): Regulation of bone turnover by calcium-regulated calcium channels. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 1192, S. 351–357. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2009.05219.x.
- Roeder, E.;** Matthews, B.; Kalajzic, I. (2016): Visual reporters for study of the osteoblast lineage. In: *Bone* 92, S. 189–195. DOI: 10.1016/j.bone.2016.09.004.
- Rohanová, D.;** Boccaccini, A.; Yunos, D.; Horkavcová, D.; Březovská, I.; Helebrant, A. (2011): TRIS buffer in simulated body fluid distorts the assessment of glass-ceramic scaffold bioactivity. In: *Acta Biomaterialia* 7 (6), S. 2623–2630. DOI: 10.1016/j.actbio.2011.02.028.
- Roodman, G.** (2006): Regulation of osteoclast differentiation. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 1068, S. 100–109. DOI: 10.1196/annals.1346.013.
- Ross, F.;** Teitelbaum, S. (2005):  $\alpha$  and macrophage colony-stimulating factor: partners in osteoclast biology. In: *Immunological Reviews* 208, S. 88–105. DOI: 10.1111/j.0105-2896.2005.00331.x.
- Rosset, E.;** Bradshaw, A. (2016): SPARC/osteonectin in mineralized tissue. In: *Matrix Biology* 52-54, S. 78–87. DOI: 10.1016/j.matbio.2016.02.001.
- Rothwarf, D.;** Karin, M. (1999): The NF-kappa B activation pathway: a paradigm in information transfer from membrane to nucleus. In: *Science's Signal Transduction Knowledge Environment* 1999 (5), RE1. DOI: 10.1126/stke.1999.5.re1.
- Rousselle, A.;** Heymann, D. (2002): Osteoclastic acidification pathways during bone resorption. In: *Bone* 30 (4), S. 533–540. DOI: 10.1016/s8756-3282(02)00672-5.
- Ruef, N.;** Dolder, S.; Aeberli, D.; Seitz, M.; Balani, D.; Hofstetter, W. (2017): Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-dependent CD11c-positive cells differentiate into active osteoclasts. In: *Bone* 97, S. 267–277. DOI: 10.1016/j.bone.2017.01.036.
- Ruijter, J.;** Barnewall, R.; Marsh, I.; Szentirmay, A.; Quinn, J.; van Houdt, R.; Gunst, Q.; van den Hoff, M. (2021): Efficiency correction is required for accurate quantitative PCR analysis and reporting. In: *Clinical Chemistry* 67 (6), S. 829–842. DOI: 10.1093/clinchem/hvab052.
- Ruocco, M.;** Maeda, S.; Park, J.; Lawrence, T.; Hsu, L.; Cao, Y.; Schett, G.; Wagner, E.; Karin, M. (2005):  $\beta$  kinase (IKK) $\beta$ , but not IKK $\alpha$ , is a critical mediator of osteoclast survival and is required for inflammation-induced bone loss. In: *The Journal of Experimental Medicine* 201 (10), S. 1677–1687. DOI: 10.1084/jem.20042081.
- Sakai, H.;** Chen, Y.; Itokawa, T.; Yu, K.; Zhu, M.; Insogna, K. (2006): Activated c-Fms recruits Vav and Rac during CSF-1-induced cytoskeletal remodeling and spreading in osteoclasts. In: *Bone* 39 (6), S. 1290–1301. DOI: 10.1016/j.bone.2006.06.012.
- Salo, J.;** Lehenkari, P.; Mulari, M.; Metsikkö, K.; Väänänen, H. (1997): Removal of osteoclast bone resorption products by transcytosis. In: *Science* 276 (5310), S. 270–273. DOI: 10.1126/science.276.5310.270.
- Sarma, U.;** Flanagan, A. (1996): Macrophage colony-stimulating factor induces substantial osteoclast generation and bone resorption in human bone marrow cultures. In: *Blood* 88 (7), S. 2531–2540.

- Satpathy, A.;** Briseño, C.; Cai, X.; Michael, D.; Chou, C.; Hsiung, S.; Bhattacharya, D.; Speck, N.; Egawa, T. (2014): Runx1 and Cbfb regulate the development of Flt3+ dendritic cell progenitors and restrict myeloproliferative disorder. In: *Blood* 123 (19), S. 2968–2977. DOI: 10.1182/blood-2013-11-539643.
- Saulnier, N.;** Guihard, S.; Holy, X.; Decembre, E.; Jurdic, P.; Clay, D.; Feuillet, V.; Pagès, G.; Pouysségur, J.; Porteu, F.; Gaudry, M (2012): ERK1 regulates the hematopoietic stem cell niches. In: *PloS One* 7 (1), e30788. DOI: 10.1371/journal.pone.0030788.
- Schilling, A.;** Linhart, W.; Filke, S.; Gebauer, M.; Schinke, T.; Rueger, J.; Amling, M. (2004): Resorbability of bone substitute biomaterials by human osteoclasts. In: *Biomaterials* 25 (18), S. 3963–3972. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2003.10.079.
- Schwartzberg, P.;** Xing, L.; Hoffmann, O.; Lowell, C.; Garrett, L.; Boyce, B.; Varmus, H. (1997): Rescue of osteoclast function by transgenic expression of kinase-deficient Src in src-/- mutant mice. In: *Genes and Development* 11 (21), S. 2835–2844. DOI: 10.1101/gad.11.21.2835.
- Sells Galvin, R.;** Gatlin, C.; Horn, J.; Fuson, T. (1999): TGF-beta enhances osteoclast differentiation in hematopoietic cell cultures stimulated with RANKL and M-CSF. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 265 (1), S. 233–239. DOI: 10.1006/bbrc.1999.1632.
- Sepulveda, P.;** Jones, J.; Hench, L. (2002): In vitro dissolution of melt-derived 45S5 and sol-gel derived 58S bioactive glasses. In: *Journal of Biomedical Materials Research* 61 (2), S. 301–311. DOI: 10.1002/jbm.10207.
- Shapouri-Moghaddam, A.;** Mohammadian, S.; Vazini, H.; Taghadosi, M.; Esmaeili, S.; Mardani, F.; Seifi, B.; Mohammadian, A.; Afshari, J.; Sahebkar, A. (2018): Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. In: *Journal of Cellular Physiology* 233 (9), S. 6425–6440. DOI: 10.1002/jcp.26429.
- Shearer, A.;** Montazerian, M.; Sly, J.; Hill, R.; Mauro, J. (2023): Trends and perspectives on the commercialization of bioactive glasses. In: *Acta Biomaterialia* 160, S. 14–31. DOI: 10.1016/j.actbio.2023.02.020.
- Shen, Z.;** Crotti, T.; Flannery, M.; Matsuzaki, K.; Goldring, S.; McHugh, K. (2007): A novel promoter regulates calcitonin receptor gene expression in human osteoclasts. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 1769 (11-12), S. 659–667. DOI: 10.1016/j.bbaexp.2007.08.005.
- Shinohara, M.;** Koga, T.; Okamoto, K.; Sakaguchi, S.; Arai, K.; Yasuda, H.; Takai, T.; Kodama, T.; Morio, T.; Geha, R.; Kitamura, D.; Kurosaki, T.; Ellmeier, W.; Takayanagi, H. (2008): Tyrosine kinases Btk and Tec regulate osteoclast differentiation by linking RANK and ITAM signals. In: *Cell* 132 (5), S. 794–806. DOI: 10.1016/j.cell.2007.12.037.
- Silver, I.;** Deas, J.; Erecińska, M. (2001): Interactions of bioactive glasses with osteoblasts in vitro: effects of 45S5 Bioglass, and 58S and 77S bioactive glasses on metabolism, intracellular ion concentrations and cell viability. In: *Biomaterials* 22 (2), S. 175–185. DOI: 10.1016/s0142-9612(00)00173-3.
- Sirkkä, S.;** Nakamura, M.; Qudsiya, S.; Siekkinen, M.; Smått, J.; Peltonen, J.; Heino, T.; Hupa, L.; Vallittu, P. (2021): Structural and elemental characterization of glass and ceramic particles for bone surgery. In: *Dental Materials* 37 (9), S. 1350–1357. DOI: 10.1016/j.dental.2021.06.004.
- Sommerfeldt, D.;** Rubin, C. (2001): Biology of bone and how it orchestrates the form and function of the skeleton. In: *European Spine Journal* 10 Suppl 2 (Suppl 2), S86-95. DOI: 10.1007/s005860100283.
- Son, A.;** Kim, M.; Jo, H.; Byun, H.; Shin, D. (2012): Effects of Inositol 1,4,5-triphosphate on Osteoclast Differentiation in RANKL-induced Osteoclastogenesis. In: *The Korean Journal of Physiology and Pharmacology* 16 (1), S. 31–36. DOI: 10.4196/kjpp.2012.16.1.31.

- Sørensen, M.;** Henriksen, K.; Schaller, S.; Henriksen, D.; Nielsen, F.; Dziegiel, M.; Karsdal, M. (2007): Characterization of osteoclasts derived from CD14<sup>+</sup> monocytes isolated from peripheral blood. In: *Journal of Bone and Mineral Metabolism* 25 (1), S. 36–45. DOI: 10.1007/s00774-006-0725-9.
- Soysa, N.;** Alles, N. (2016): Osteoclast function and bone-resorbing activity: An overview. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 476 (3), S. 115–120. DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.05.019.
- Stefano, L.;** Racchetti, G.; Bianco, F.; Passini, N.; Gupta, R.; Panina Bordignon, P.; Meldolesi, J. (2009): The surface-exposed chaperone, Hsp60, is an agonist of the microglial TREM2 receptor. In: *Journal of Neurochemistry* 110 (1), S. 284–294. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2009.06130.x.
- Stephens, A.;** Stephens, S.; Morrison, N. (2011): Internal control genes for quantitative RT-PCR expression analysis in mouse osteoblasts, osteoclasts and macrophages. In: *BMC Research Notes* 4, S. 410. DOI: 10.1186/1756-0500-4-410.
- Sun, L.;** Peng, Y.; Zaidi, N.; Zhu, L.; Iqbal, J.; Yamoah, K.; Wang, X.; Liu, P.; Abe, E.; Moonga, B.; Epstein, S.; Zaidi, M. (2007): Evidence that calcineurin is required for the genesis of bone-resorbing osteoclasts. In: *American Journal of Physiology* 292 (1), F285-91. DOI: 10.1152/ajprenal.00415.2005.
- Sundaram, K.;** Sambandam, Y.; Shanmugarajan, S.; Rao, D.; Reddy, S. (2017): Measles virus nucleocapsid protein modulates the Signal Regulatory Protein- $\beta$ 1 (SIRP $\beta$ 1) to enhance osteoclast differentiation in Paget's disease of bone. In: *Bone Reports* 7, S. 26–32. DOI: 10.1016/j.bonr.2016.06.002.
- Susa, M.;** Luong-Nguyen, N.; Cappellen, D.; Zamurovic, N.; Gamse, R. (2004): Human primary osteoclasts: in vitro generation and applications as pharmacological and clinical assay. In: *Journal of Translational Medicine* 2 (1), S. 6. DOI: 10.1186/1479-5876-2-6.
- Swirski, F.;** Hilgendorf, I.; Robbins, C. (2014): From proliferation to proliferation: monocyte lineage comes full circle. In: *Seminars in Immunopathology* 36 (2), S. 137–148. DOI: 10.1007/s00281-013-0409-1.
- Takahashi, S.;** Goldring, S.; Katz, M.; Hilsenbeck, S.; Williams, R.; Roodman, G. (1995): Downregulation of calcitonin receptor mRNA expression by calcitonin during human osteoclast-like cell differentiation. In: *The Journal of Clinical Investigation* 95 (1), S. 167–171. DOI: 10.1172/JCI117634.
- Takayanagi, H.** (2021): RANKL as the master regulator of osteoclast differentiation. In: *Journal of Bone and Mineral Metabolism* 39 (1), S. 13–18. DOI: 10.1007/s00774-020-01191-1.
- Takito, J.;** Inoue, S.; Nakamura, M. (2018): The sealing zone in osteoclasts: A self-organized structure on the bone. In: *International Journal of Molecular Sciences* 19 (4). DOI: 10.3390/ijms19040984.
- Taniguchi, R.;** Fukushima, H.; Osawa, K.; Maruyama, T.; Yasuda, H.; Weih, F.; Doi, T.; Maki, K.; Jimi, E. (2014): RelB-induced expression of Cot, an MAP3K family member, rescues RANKL-induced osteoclastogenesis in alymphoplasia mice by promoting NF- $\kappa$ B2 processing by IKK $\alpha$ . In: *The Journal of Biological Chemistry* 289 (11), S. 7349–7361. DOI: 10.1074/jbc.M113.538314.
- Tanos, T.;** Marinissen, M.; Leskow, F.; Hochbaum, D.; Martinetto, H.; Gutkind, J.; Coso, O. (2005): Phosphorylation of c-Fos by members of the p38 MAPK family. Role in the AP-1 response to UV light. In: *The Journal of Biological Chemistry* 280 (19), S. 18842–18852. DOI: 10.1074/jbc.M500620200.
- Taylor, L.;** Tertinegg, I.; Okuda, A.; Heersche, J. (1989): Expression of calcitonin receptors during osteoclast differentiation in mouse metatarsals. In: *Journal of Bone and Mineral Research* 4 (5), S. 751–758. DOI: 10.1002/jbmr.5650040515.

- Termine, J.;** Kleinman, H.; Whitson, S.; Conn, K.; McGarvey, M.; Martin, G. (1981): Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen. In: *Cell* 26 (1 Pt 1), S. 99–105. DOI: 10.1016/0092-8674(81)90037-4.
- Thavornnyutikarn, B.;** Feltis, B.; Wright, P.; Turney, T. (2019): Effect of pre-treatment of crystallized bioactive glass with cell culture media on structure, degradability, and biocompatibility. In: *Materials Science and Engineering* 97, S. 188–197. DOI: 10.1016/j.msec.2018.12.034.
- Thompson, W.;** Rubin, C.; Rubin, J. (2012): Mechanical regulation of signaling pathways in bone. In: *Gene* 503 (2), S. 179–193. DOI: 10.1016/j.gene.2012.04.076.
- Tichopad, A.;** Dilger, M.; Schwarz, G.; Pfaffl, M. (2003): Standardized determination of real-time PCR efficiency from a single reaction set-up. In: *Nucleic Acids Research* 31 (20), e122. DOI: 10.1093/nar/gng122.
- Tomomura, M.;** Hasegawa, H.; Suda, N.; Sakagami, H.; Tomomura, A. (2012): Serum calcium-decreasing factor, caldecrin, inhibits receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (RANKL)-mediated Ca<sup>2+</sup> signaling and actin ring formation in mature osteoclasts via suppression of Src signaling pathway. In: *The Journal of Biological Chemistry* 287 (22), S. 17963–17974. DOI: 10.1074/jbc.M112.358796.
- Troen, B.** (2004): The role of cathepsin K in normal bone resorption. In: *Drug News and Perspectives* 17 (1), S. 19–28. DOI: 10.1358/dnp.2004.17.1.829022.
- Väänänen, H.;** Hentunen, T.; Lakkakorpi, P.; Parvinen, E.; Sundqvist, K.; Tuukkanen, J. (1988): Mechanism of osteoclast mediated bone resorption. In: *Annales Chirurgiae et Gynaecologiae* 77 (5-6), S. 193–196.
- Väänänen, K.** (2005): Mechanism of osteoclast mediated bone resorption--rationale for the design of new therapeutics. In: *Advanced Drug Delivery Reviews* 57 (7), S. 959–971. DOI: 10.1016/j.addr.2004.12.018.
- Vaira, S.;** Alhawagri, M.; Anwisye, I.; Kitaura, H.; Faccio, R.; Novack, D. (2008): RelA/p65 promotes osteoclast differentiation by blocking a RANKL-induced apoptotic JNK pathway in mice. In: *The Journal of Clinical Investigation* 118 (6), S. 2088–2097. DOI: 10.1172/JCI33392.
- van Beek, E.;** Vries, T. de; Mulder, L.; Schoenmaker, T.; Hoeben, K.; Matozaki, T.; Langenbach, G.; Kraal, G.; Everts, V.; van den Berg, T. (2009): Inhibitory regulation of osteoclast bone resorption by signal regulatory protein alpha. In: *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal* 23 (12), S. 4081–4090. DOI: 10.1096/fj.09-131557.
- van Scoy, G.;** George, E.; Opoku Asantewaa, F.; Kerns, L.; Saunders, M.; Prieto-Langarica, A. (2017): A cellular automata model of bone formation. In: *Mathematical Biosciences* 286, S. 58–64. DOI: 10.1016/j.mbs.2017.02.001.
- Vincent, K.;** Durrant, M. (2013): A structural and functional model for human bone sialoprotein. In: *Journal of Molecular Graphics and Modelling* 39, S. 108–117. DOI: 10.1016/j.jmglm.2012.10.007.
- Wada, T.;** Nakashima, T.; Oliveira-dos-Santos, A.; Gasser, J.; Hara, H.; Schett, G.; Penninger, J. (2005): The molecular scaffold Gab2 is a crucial component of RANK signaling and osteoclastogenesis. In: *Nature Medicine* 11 (4), S. 394–399. DOI: 10.1038/nm1203.
- Walsh, M.;** Kim, G.; Maurizio, P.; Molnar, E.; Choi, Y. (2008): TRAF6 autoubiquitination-independent activation of the NF $\kappa$ B and MAPK pathways in response to IL-1 and RANKL. In: *PloS One* 3 (12), e4064. DOI: 10.1371/journal.pone.0004064.
- Wani, S.;** Daroszewska, A.; Salter, D.; van 't Hof, R.; Ralston, S.; Albagha, O. (2022): The Paget's disease of bone risk gene PML is a negative regulator of osteoclast differentiation and bone resorption. In: *Disease Models and Mechanisms* 15 (4). DOI: 10.1242/dmm.049318.

- Watson, A.;** O'Callaghan, C. (2010): Crystallization and X-ray diffraction analysis of human CLEC5A (MDL-1), a dengue virus receptor. In: *Acta Crystallographica Section F* 66 (Pt 1), S. 29–31. DOI: 10.1107/S1744309109047915.
- Weiner, S.;** Traub, W.; Wagner, H. (1999): Lamellar bone: structure-function relations. In: *Journal of Structural Biology* 126 (3), S. 241–255. DOI: 10.1006/jsbi.1999.4107.
- Wu, M.;** Li, C.; Zhu, G.; Wang, Y.; Jules, J.; Lu, Y.; McConnell, M.; Wang, Y.; Shao, J.; Li, Y.; Chen, W. (2014): Deletion of core-binding factor  $\beta$  (Cbf $\beta$ ) in mesenchymal progenitor cells provides new insights into Cbf $\beta$ /Runx2 complex function in cartilage and bone development. In: *Bone* 65, S. 49–59. DOI: 10.1016/j.bone.2014.04.031.
- Xiang, B.;** Liu, Y.; Zhao, W.; Zhao, H.; Yu, H. (2019): Extracellular calcium regulates the adhesion and migration of osteoclasts via integrin  $\alpha$ v  $\beta$  3 /Rho A/Cytoskeleton signaling. In: *Cell Biology International* 43 (10), S. 1125–1136. DOI: 10.1002/cbin.11033.
- Xie, G.;** Liu, W.; Lian, Z.; Xie, D.; Yuan, G.; Ye, J.; Lin, Z.; Wang, W.; Zeng, J.; Shen, H.; Wang, X.; Feng, H.; Cong, W.; Yao, G. (2021): Spleen tyrosine kinase (SYK) inhibitor PRT062607 protects against ovariectomy-induced bone loss and breast cancer-induced bone destruction. In: *Biochemical Pharmacology* 188, S. 114579. DOI: 10.1016/j.bcp.2021.114579.
- Xue, J.;** Grigelioniene, G.; Wang, Z.; Nishimura, G.; Iida, A.; Matsumoto, N.; Tham, E.; Miyake, N.; Ikegawa, S.; Guo, L. (2022): SLC4A2 Deficiency causes a new type of osteopetrosis. In: *Journal of Bone and Mineral Research* 37 (2), S. 226–235. DOI: 10.1002/jbmr.4462.
- Xynos, I.;** Edgar, A.; Buttery, L.; Hench, L.; Polak, J. (2000a): Ionic products of bioactive glass dissolution increase proliferation of human osteoblasts and induce insulin-like growth factor II mRNA expression and protein synthesis. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 276 (2), S. 461–465. DOI: 10.1006/bbrc.2000.3503.
- Xynos, I.;** Hukkanen, M.; Batten, J.; Buttery, L.; Hench, L.; Polak, J. (2000b): Bioglass 45S5 stimulates osteoblast turnover and enhances bone formation In vitro: implications and applications for bone tissue engineering. In: *Calcified Tissue International* 67 (4), S. 321–329. DOI: 10.1007/s002230001134.
- Xynos, I.;** Edgar, A.; Buttery, L.; Hench, L.; Polak, J. (2001): Gene-expression profiling of human osteoblasts following treatment with the ionic products of Bioglass 45S5 dissolution. In: *Journal of Biomedical Materials Research* 55 (2), S. 151–157. DOI: 10.1002/1097-4636(200105)55:2<151::AID-JBM1001>3.0.CO;2-D.
- Yang, C.;** McCoy, K.; Davis, J.; Schmidt-Supprian, M.; Sasaki, Y.; Faccio, R.; Novack, D. (2010): NIK stabilization in osteoclasts results in osteoporosis and enhanced inflammatory osteolysis. In: *PloS One* 5 (11), e15383. DOI: 10.1371/journal.pone.0015383.
- Yeon, J.;** Ryu, B.; Choi, S.; Heo, J.; Kim, K.; Son, Y.; Kim, S. (2014): Natural polyamines inhibit the migration of preosteoclasts by attenuating Ca<sup>2+</sup>-PYK2-Src-NFATc1 signaling pathways. In: *Amino Acids* 46 (11), S. 2605–2614. DOI: 10.1007/s00726-014-1797-9.
- Zaidi, M.;** Blair, H.; Moonga, B.; Abe, E.; Huang, C. (2003): Osteoclastogenesis, bone resorption, and osteoclast-based therapeutics. In: *Journal of Bone and Mineral Research* 18 (4), S. 599–609. DOI: 10.1359/jbmr.2003.18.4.599.
- Zhang, M.;** Huang, B. (2012): The multi-differentiation potential of peripheral blood mononuclear cells. In: *Stem Cell Research and Therapy* 3 (6), S. 48. DOI: 10.1186/scrt139.
- Zhang, W.;** Wang, N.; Yang, M.; Sun, T.; Zhang, J.; Zhao, Y.; Huo, N.; Li, Z. (2022): Periosteum and development of the tissue-engineered periosteum for guided bone regeneration. In: *Journal of Orthopaedic Translation* 33, S. 41–54. DOI: 10.1016/j.jot.2022.01.002.

**Zhou, L.;** Hinerman, J.; Blaszczyk, M.; Miller, J.; Conrady, D.; Barrow, A.; Chirgadze, D.; Bihan, D.; Farndale, R.; Herr, A. (2016): Structural basis for collagen recognition by the immune receptor OSCAR. In: *Blood* 127 (5), S. 529–537. DOI: 10.1182/blood-2015-08-667055.

**Zhu, M.;** Sun, B.; Nevius, E.; Kaplan, J.; Pereira, J.; Insogna, K. (2021): Selective deletion of the receptor for CSF1, c-fms, in osteoclasts results in a high bone mass phenotype, smaller osteoclasts in vivo and an impaired response to an anabolic PTH regimen. In: *PloS One* 16 (2), e0247199. DOI: 10.1371/journal.pone.0247199.

**Zifarelli, G.** (2022): The role of the lysosomal Cl<sup>-</sup>/H<sup>+</sup> antiporter CIC-7 in osteopetrosis and neurodegeneration. In: *Cells* 11 (3). DOI: 10.3390/cells11030366.

**Zor, F.;** Selek, F.; Orlando, G.; Williams, D. (2019): Biocompatibility in regenerative nanomedicine. In: *Nanomedicine* 14 (20), S. 2763–2775. DOI: 10.2217/nmm-2019-0140.

**Zou, W.;** Kitaura, H.; Reeve, J.; Long, F.; Tybulewicz, V.; Shattil, S.; Ginsberg, M.; Ross, F.; Teitelbaum, S. (2007): Syk, c-Src, the  $\alpha$ v $\beta$ 3 integrin, and ITAM immunoreceptors, in concert, regulate osteoclastic bone resorption. In: *The Journal of Cell Biology* 176 (6), S. 877–888. DOI: 10.1083/jcb.200611083.

**Zou, W.;** Reeve, J.; Liu, Y.; Teitelbaum, S.; Ross, F. (2008): DAP12 couples c-Fms activation to the osteoclast cytoskeleton by recruitment of Syk. In: *Molecular Cell* 31 (3), S. 422–431. DOI: 10.1016/j.molcel.2008.06.023.

**Zou, W.;** Teitelbaum, S. (2015): Absence of Dap12 and the  $\alpha$ v $\beta$ 3 integrin causes severe osteopetrosis. In: *The Journal of Cell Biology* 208 (1), S. 125–136. DOI: 10.1083/jcb.201410123.

**Zou, W.;** Zhu, T.; Craft, C.; Broekelmann, T.; Mecham, R.; Teitelbaum, S. (2010): Cytoskeletal dysfunction dominates in DAP12-deficient osteoclasts. In: *Journal of Cell Science* 123 (Pt 17), S. 2955–2963. DOI: 10.1242/jcs.069872.

## 11. Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.

---

Ort, Datum

---

Unterschrift

## 12. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich besonderes Frau Prof. Dr. rer. nat. Katrin S. Lips meinen Dank aussprechen. Zunächst für die Überlassung der Dissertation mit dem Thema „Der Einfluss von Bioglas auf die Osteoklastogenese und Osteoklasten – Eine in vitro Untersuchung“, sowie für die Betreuung während sowohl des experimentellen Teils als auch während der schriftlichen Ausarbeitung. Ihr stetiger Zuspruch war von großer Bedeutung für den erfolgreichen Abschluss dieser Arbeit.

Darüber hinaus möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr.-Ing. habil. Aldo R. Boccaccini sowie Herrn Dr.-Ing. Qaisar Nawaz, M. Sc. des Lehrstuhls für Werkstoffwissenschaften (Biomaterialien) der Friedrich-Alexander-Universität in Erlangen-Nürnberg für die Bereitstellung der Biogläser sowie dem Institut für klinische Immunologie und Transfusionsmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen für die zur Verfügung Stellung der PBMCs bedanken.

Ein besonderer Dank gebührt den Mitarbeiterinnen des Labors für Experimentelle Unfallchirurgie, die mich in die verschiedenen wissenschaftlichen Methoden eingearbeitet haben. An dieser Stelle ist vor allem Frau Ivonne Bergen zu nennen, die mich während der gesamten Zeit der Erhebung der Daten, insbesondere aber in der Zellkultur, der Molekularbiologie sowie den funktionellen Assays betreut hat. Zudem möchte ich mich bei Frau Olga Dakischew für die Betreuung bei der Durchführung der Immunfluoreszenzmikroskopie und statistischen Auswertung sowie bei Frau Dr. med. vet. Ursula Sommer für die geduldige und ausführliche Einarbeitung in die Rasterelektronenmikroskopie bedanken.

Durch meine Arbeit im Labor konnte ich einen ersten Eindruck in das wissenschaftliche Arbeiten erhalten. Diese Zeit wurde durch das gemeinsame Durchführen der Experimente sowie der emotionalen Unterstützung durch meine Mit-Doktorandinnen zu einer besonderen Phase meines Lebens. Hier möchte ich mich besonders bei Frau Miriam Spreda, Frau Verena Hohlbein und Frau Marlena Ruppert bedanken und wünsche Ihnen viel Erfolg für den Abschluss Ihrer Arbeiten.

Zuletzt möchte ich mich bei meinem Freund sowie meiner Familie bedanken, die mich sowohl während meines Studiums als auch während der Dissertation unterstützt und gefördert haben und daher einen sehr großen Teil dazu beigetragen haben, dass ich zu dem Menschen geworden bin, der ich heute bin.