

MARION NÖRTERSHÄUSER

**Etablierung eines indirekten Kokultursystems
auf Kompartimentbasis zur Überprüfung der
Biokompatibilität von Knochenersatzmaterialien**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Bibliografische Informationen der Deutschen Bibliothek

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie;
detaillierte bibliografische Daten sind im Internet abrufbar über
<http://dnb.ddb.de>

© 2021 by Verlag:
Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH, Gießen
Printed in Germany

ISBN 978-3-86345-613-9

1. Auflage 2021

Verlag:

DVG Service GmbH
An der Alten Post 2
35390 Gießen
Tel.: 0641 984446-0
info@dvf.de
www.dvf.de

Veterinärklinikum – Klinische Anatomie
Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuerin: Prof. Dr. Sabine Wenisch

**Etablierung eines indirekten Kokultursystems auf
Kompartimentbasis zur Überprüfung der Biokompatibilität von
Knochenersatzmaterialien**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Marion Nörtershäuser

Tierärztin aus Lahnstein



Gefördert durch das Bundesministerium
für Wirtschaft und Energie aufgrund eines
Beschlusses des Deutschen Bundestages



Gießen 2021

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer

1. Gutachterin: Prof. Dr. Sabine Wenisch

2. Gutachterin: Prof. Dr. Janina Burk

Tag der Disputation: 14.09.2021

Meiner Familie

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten 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.

Lahnstein, den 28.01.2021

Marion Nörtershäuser

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	IX
Abbildungsverzeichnis	XIII
Tabellenverzeichnis	XV
1 Einleitung.....	1
2 Literaturübersicht	3
2.1 Kokultursysteme	3
2.2 Osteoblasten, Osteozyten und Knochenoberflächenzellen.....	6
2.3 Osteoklasten.....	10
2.4 Remodellierung.....	12
2.5 Knochenersatzmaterialien.....	14
2.5.1 Gesetzliche Grundlagen zur Testung von Medizinprodukten	15
2.5.2 Anforderungskriterien an Knochenersatzmaterialien.....	18
2.5.3 Einteilung der Knochenersatzmaterialien.....	19
2.5.3.1 Natürliche Knochenersatzmaterialien	19
2.5.3.2 Alloplastische Knochenersatzmaterialien.....	21
2.5.3.3 Komposite.....	28
2.6 Connexine und Pannexine	29
2.6.1 Connexin 43	30
2.6.2 Pannexine.....	30
3 Material und Methoden	33
3.1 Zellkultur	33
3.1.1 Mesenchymale Stromazellen	33
3.1.2 Hämatopoetische Stammzellen	36
3.2 Knochenersatzmaterialien.....	39
3.3 Allgemeines Prinzip des indirekten Kokultursystems.....	40
3.4 Molekularbiologische Untersuchungen.....	41
3.5 Überprüfung der Kultivierungsbedingungen im Kokultursystem: Vorversuche.....	47

3.5.1	Kokultivierung der Zellpopulationen ohne den Einsatz von Differenzierungsfaktoren: Vorversuch 1	47
3.5.2	Osteogene Vordifferenzierung der mesenchymalen Stromazellen vor der Kokultivierung: Vorversuch 2	49
3.5.3	Einsatz der Differenzierungsfaktoren <i>receptor activator of nuclear factor-κB ligand</i> und <i>macrophage colony-stimulating factor-1</i> im Kokultursystem: Vorversuch 3	51
3.6	Überprüfung der Biokompatibilität von Knochenersatzmaterialien im indirekten Kokultursystem: Hauptversuch	52
3.7	Medien und Reagenzien für die Zellkultur	54
3.8	Reagenzien für zytologische Färbungen.....	54
3.9	Reagenzien für molekularbiologische Untersuchungen.....	55
3.10	Verbrauchsmaterialien.....	56
3.11	Geräte.....	58
3.12	Software.....	59
4	Ergebnisse	60
4.1	Überprüfung der Kultivierungsbedingungen im Kokultursystem: Vorversuche.....	60
4.1.1	Kokultivierung der Zellpopulationen ohne den Einsatz von Differenzierungsfaktoren: Vorversuch 1	60
4.1.2	Osteogene Vordifferenzierung der mesenchymalen Stromazellen vor der Kokultivierung: Vorversuch 2	65
4.1.3	Einsatz der Differenzierungsfaktoren <i>receptor activator of nuclear factor-κB ligand</i> und <i>macrophage colony-stimulating factor-1</i> im Kokultursystem: Vorversuch 3	73
4.2	Überprüfung der Biokompatibilität von Knochenersatzmaterialien im indirekten Kokultursystem: Hauptversuch	85
5	Diskussion.....	103
6	Zusammenfassung.....	114
7	Summary.....	116
8	Literaturverzeichnis.....	118
9	Anhang.....	146

9.1 Einsatz der Differenzierungsfaktoren <i>receptor activator of nuclear factor-κB ligand</i> und <i>macrophage colony-stimulating factor-1</i> im Kokultursystem: Vorversuch 3.....	146
9.1.1 Übersicht der p-Werte der relativen Runx2-Genexpressionen der SCs des Vorversuches 3.....	146
9.1.2 Übersicht der p-Werte der relativen Cx43-Genexpressionen der SCs des Vorversuches 3.....	147
9.1.3 Übersicht der p-Werte der relativen Panx1-Genexpressionen der SCs des Vorversuches 3.....	148
9.1.4 Übersicht der p-Werte der relativen Panx2-Genexpressionen der SCs des Vorversuches 3.....	149
9.1.5 Übersicht der p-Werte der relativen Panx3-Genexpressionen der SCs des Vorversuches 3.....	150
9.1.6 Übersicht der p-Werte der relativen TRAP-Genexpressionen der OCVs des Vorversuches 3.....	151
9.1.7 Übersicht der p-Werte der relativen CTSK-Genexpressionen der OCVs des Vorversuches 3.....	152
9.2 Überprüfung der Biokompatibilität von Knochenersatzmaterialien im indirekten Kokultursystem: indirekte Kokultivierung über 9 Tage in Gegenwart der verschiedenen KEMs und leerem Insert 1.....	153
9.2.1 Übersicht der p-Werte der relativen Runx2-Genexpressionen der SCs des Hauptversuches	153
9.2.2 Übersicht der p-Werte der relativen Cx43-Genexpressionen der SCs des Hauptversuches	154
9.2.3 Übersicht der p-Werte der relativen Panx1-Genexpressionen der SCs des Hauptversuches	155
9.2.4 Übersicht der p-Werte der relativen Panx2-Genexpressionen der SCs des Hauptversuches	156
9.2.5 Übersicht der p-Werte der relativen Panx3-Genexpressionen der SCs des Hauptversuches	157
9.2.6 Übersicht der p-Werte der relativen TRAP-Genexpressionen der OCVs des Hauptversuches	158

9.2.7	Übersicht der p-Werte der relativen CTSK-Genexpressionen der OCVs des Hauptversuches	159
10	Danksagung	160

Abkürzungsverzeichnis

2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
ALP	Alkalische Phosphatase
Akt	Proteinkinase B
AML3	<i>acute myelogenous leukemia factor</i>
Apc	<i>adenomatous-polyposis-coli</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BfArM	Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte
BSP	<i>Bone sialoprotein</i>
BM	Basalmedium
BMP	<i>bone morphogenetic protein</i>
BMU	<i>bone multicellular unit</i>
bp	<i>base pairs</i> ; Basenpaare
CaSR	<i>calcium sensing receptor</i> ; calciumsensitiver Rezeptor
CBFA1	<i>core binding factor α</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>copy desoxyribonuclein acid</i>
CFU-F	<i>colony-forming unit fibroblast</i>
CK1	Casein Kinase 1
CN	Calcineurin
Col1	Kollagen Typ 1
CTSK	Cathepsin K
Cx	Connexin
DKK	Dickkopf-1
DMEM lg	Dulbecco's Modified Eagle Medium low glucose
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonuclein acid</i> ; Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
ECM	<i>extracellular matrix</i> ; extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ER	<i>endoplasmic reticulum</i> ; Endoplasmatisches Retikulum
ERK	<i>extracellular-signal regulated kinase</i>

et. al.	<i>Et alii/aliae</i> ; und andere
FDA	<i>Food- and Drug Administration</i>
FBS	Fetales bovines Serum
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
FKRZ	Fremdkörperriesenzellen
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GSK-3 β	Glykogensynthase Kinase-3 β
HA	Hydroxylapatit
HIF	<i>hypoxia-inducible factor</i>
ICIJ	<i>International Consortium of Investigative Journalists</i>
IL	Interleukin
ISCT	<i>International Society for Cellular Therapy</i>
KEM	Knochenersatzmaterial
KK	Kokultur
LOT	<i>liquid overlay</i> -Technik
LPS	Lipopolysaccharide
Lrp	<i>low-density lipoprotein receptor-related protein</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MCP1–4	<i>macrophage chemoattractant protein 1–4</i>
M	M-CSF; <i>macrophage colony-stimulating factor-1</i>
M-CSF	<i>macrophage colony-stimulating factor-1</i>
MIP-1a	<i>macrophage inflammatory protein 1a</i>
MMP	Matrixmetalloproteinasen
MPG	Medizinproduktegesetz
MPKPV	Verordnung über klinische Prüfungen von Medizinprodukten
MPSV	Verordnung über die Erfassung, Bewertung und Abwehr von Risiken bei Medizinprodukten
MSC	<i>mesenchymal stem cell</i> ; mesenchymale Stammzelle
NFATc1	<i>nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 1</i> ; nukleärer Faktor der aktivierten T-Zellen ₁
NTC	<i>no-template control</i>
Ocn	Osteocalcin
OCV	Osteoklastäre Vorläuferzellen
OM	Osteogenes Medium
Opn	Osteopontin
OPG	Osteoprotegerin
Panx	Pannexin

PCK δ	Proteinkinase C Typ δ
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PEBP2 α	<i>polyoma-enhancer-binding protein 2α</i>
PF4	<i>platelet factor 4</i>
PG	Prostaglandine
PGA	Poly(glycolic acid)
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PLGA	Polylactid-co-glycolid
PLLA	<i>poly-L-lactic acid</i> ; Polymilchsäuren
PMMA	Polymethylmethacrylat
PRP	<i>platelet-rich plasma</i>
P/S	Penicillin/Streptomycin
qPCR	<i>quantitative polymerase chain reaction</i> ; quantitative Polymerase-Kettenreaktion
R	RANKL; <i>receptor activator of nuclear factor-κB ligand</i>
RANK	<i>receptor activator of nuclear factor-κB</i>
RANKL	<i>receptor activator of nuclear factor-κB ligand</i>
RANTES	<i>regulated and normal T cell expressed and secreted</i>
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RNA	<i>ribonucleid acid</i> ; Ribonukleinsäure
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
RT	Reverse Transkriptase
Runx	<i>Runt-related transcription factor</i>
RZB	relative Zentrifugalbeschleunigung
SC	Mesenchymale Stromazellen
Sfrp	<i>secreted frizzled related protein</i>
Smad	<i>small mother against decapentaplegic</i> Proteine
Sp7	Osterix
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TBS	<i>tris-buffered saline</i>
TCP	Tricalciumphosphat
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TGF- β	<i>transforming growth factor β</i>
TLR	<i>Toll-like receptors</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAP	<i>tartrat resistant acid phosphatase</i> ; Tartrat-restistente saure Phosphatase

TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
vd	osteogen vordifferenziert
VEGF	<i>vascular endothelial growth factors</i>
Wnt	Akronym von <i>wingless</i> und Int-3
WT	Wildtyp
ZIM	Zentrales Innovationsprogramm Mittelstand
ZLG	Zentralstelle der Länder für Gesundheitsschutz bei Arzneimitteln und Medizinprodukten

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des vorgesehenen Versuchsaufbaus	1
Abbildung 2: Femur, Tibia und Fibula einer Wistar ratte nach Entfernung des anhaftenden Gewebes.....	36
Abbildung 3: Einzelkomponenten des indirekten Kokultursystems	40
Abbildung 4: Schematische Darstellung des indirekten Kokultursystems.....	41
Abbildung 5: Darstellung eines Ergebnisses der Gelelektrophorese	44
Abbildung 6: Insert 1 mit 30 mg des Basis-KEMs	52
Abbildung 7: Native Bildaufnahmen der SCs, die (A), (C) in Kokultur mit OCVs in BM über (A) 9 und (C) 19 Tage bzw. (B), (D) in Monokultur in OM für (B) 9 und (D) 19 Tage kultiviert wurden	60
Abbildung 8: Alizarinfärbung der SCs nach (A) 19 Tagen in Kokultur mit OCVs in BM sowie (B) nach 14 Tagen in Monokultur in BM.....	61
Abbildung 9: Native Bildaufnahmen der OCVs, die (A), (C) in Kokultur mit SCs in BM über (A) 9 und (C) über 19 Tage bzw. (B), (D) in Monokultur in BM unter dem Zusatz der Faktoren RANKL und M-CSF für (B) 9 und (D) 19 Tage kultiviert wurden.....	62
Abbildung 10: TRAP-Färbung der OCVs, die in Monokultur unter Zugabe von RANKL und M-CSF 9 Tage kultiviert wurden	63
Abbildung 11: Phalloidin-gefärbte multinukleäre Osteoklasten-ähnliche Zellen.....	64
Abbildung 12: Native Bildaufnahmen der SCs der (A), (B) 5-tägigen Kokultur in BM nach (A) 14 Tagen und (B) 21 Tagen Vordifferenzierung sowie (C), (D) der 9-tägigen Kokultur in BM nach (C) 14 Tagen und (D) 21 Tagen Vordifferenzierung	65
Abbildung 13: Alizarinfärbung der SCs nach (A) 14 Tagen und (B) 21 Tagen der Vordifferenzierung und einer Kultivierungsdauer von 5 Tagen in der Kokultur sowie nach (C) 14 Tagen und (D) 21 Tagen der Vordifferenzierung und einer Kultivierungsdauer von 9 Tagen in der Kokultur	66
Abbildung 14: Native Bildaufnahmen der OCVs nach (A) 9 Tagen in der Kokultur mit SCs, die 14 Tage osteogen vordifferenziert wurden und nach (B) 9 Tagen in Monokultur unter Zugabe von RANKL und M-CSF in das Medium.....	67
Abbildung 15: TRAP-Färbung der OCVs nach (A) 5 Tagen in der Kokultur mit SCs, die 14 Tage osteogen vordifferenziert wurden und nach (B) 5 Tagen in Monokultur unter Zugabe von RANKL und M-CSF in das Medium.....	68
Abbildung 16: Phalloidin-färbung der OCVs, die (A) 5 und (B) 9 Tage in Monokultur unter der Zugabe von RANKL und M-CSF in das Medium kultiviert wurden.....	69

Abbildung 17: Vorversuch 1 und 2: vergleichende Darstellung der relativen Genexpressionen der SCs: (A) Runx2-Expressionen, (B) Cx43-Expressionen.....	70
Abbildung 18: Vorversuch 1 und 2: vergleichende Darstellung der relativen Genexpressionen der OCVs: (A) TRAP-Expressionen, (B) CTSK-Expressionen.	71
Abbildung 19: Native Bildaufnahmen der SCs, die 9 Tage lang (A), (B) in Kokultur mit OCVs unter (A) BM, (B) BM unter dem Zusatz von RANKL bzw. (C), (D) in Monokultur unter (C) BM, (D) BM unter dem Zusatz von RANKL kultiviert wurden.....	73
Abbildung 20: Vorversuch 3: relative Runx2-Genexpressionen der SCs	74
Abbildung 21: Vorversuch 3: relative Cx43-Genexpressionen der SCs	76
Abbildung 22: Vorversuch 3: relative Panx1-Genexpressionen der SCs.....	77
Abbildung 23: Vorversuch 3: relative Panx2-Genexpressionen der SCs.....	78
Abbildung 24: Vorversuch 3: relative Panx3-Genexpressionen der SCs.....	79
Abbildung 25: Native Bildaufnahme der OCVs nach 9 Tagen in (A), (C), (E) Kokultur mit SCs unter (A) BM, (C) BM unter dem Zusatz von RANKL, (E) BM unter dem Zusatz von RANKL und M-CSF sowie (B), (D), (F) Monokultur unter (B) BM, (D) BM unter dem Zusatz von RANKL und (F) BM unter dem Zusatz von RANKL und M-CSF	80
Abbildung 26: Vorversuch 3: relative TRAP-Genexpressionen der OCVs	82
Abbildung 27: Vorversuch 3: relative CTSK-Genexpressionen der OCVs	83
Abbildung 28: Native Bildaufnahmen der SCs, die 9 Tage im Kokultursystem unter dem Zusatz von RANKL mit OCVs und (A) leerem Insert 1, (B) dem Basis-KEM, (C) SrCl-0,01 und (D) MgHP-0,01 kultiviert wurden.....	85
Abbildung 29: Hauptversuch: relative Runx2-Genexpressionen der SCs.....	87
Abbildung 30: Hauptversuch: relative Cx43-Genexpressionen der SCs.....	89
Abbildung 31: Hauptversuch: relative Panx1-Genexpressionen der SCs	91
Abbildung 32: Hauptversuch: relative Panx2-Genexpressionen der SCs	94
Abbildung 33: Hauptversuch: relative Panx3-Genexpressionen der SCs	95
Abbildung 34: Native Bildaufnahmen der OCVs, die 9 Tage im Kokultursystem unter dem Zusatz von RANKL mit SCs und (A) leerem Insert 1, (B) dem Basis-KEM, (C) SrCl-0,01 und (D) MgHP-0,01 kultiviert wurden.....	96
Abbildung 35: Hauptversuch: relative TRAP-Genexpressionen der OCVs.....	98
Abbildung 36: Hauptversuch: relative CTSK-Genexpressionen der OCVs.....	101

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammensetzung des Wachstumsmediums.....	33
Tabelle 2: Zusammensetzung des Basalmediums	34
Tabelle 3: Zusammensetzung des Einfriermediums	34
Tabelle 4: Zusammensetzung des osteogenen Differenzierungsmediums	35
Tabelle 5: Zusammensetzung der TRAP-Färbelösung.....	38
Tabelle 6: Übersicht der verwendeten Knochenersatzmaterialien.....	39
Tabelle 7: Zusammensetzung des DNase-Mastermix	42
Tabelle 8: Zusammensetzung des Mastermix zur cDNA-Synthese (+RT-Mix).....	42
Tabelle 9: Zusammensetzung des PCR-Mastermix	43
Tabelle 10: Zusammensetzung des qPCR-Mastermix	45
Tabelle 11: Übersicht der verwendeten Primer.....	45
Tabelle 12: Übersicht des Versuchsaufbaus von Vorversuch 1.....	48
Tabelle 13: Übersicht der Kontrollkulturen von Vorversuch 1	48
Tabelle 14: Übersicht des Versuchsaufbaus von Vorversuch 2.....	49
Tabelle 15: Übersicht der Kontrollkulturen von Vorversuch 2	50
Tabelle 16: Übersicht des Versuchsaufbaus von Vorversuch 3.....	51
Tabelle 17: Übersicht der Kontrollkulturen von Vorversuch 3	51
Tabelle 18: Übersicht des Versuchsaufbaus des Hauptversuchs	53

1 Einleitung

Die vorliegenden Untersuchungen wurden im Rahmen "Zentrales Innovationsprogramm Mittelstand (ZIM)"-(Kooperationen, Projektform: Kooperationsprojekt (ZF)) für das Projekt „Entwicklung eines osteoinduktiv wirkenden, den Remodellierungsprozess regulierenden und anforderungsgerecht beschichteten alloplastischen Knochenersatzmaterials (KEM); Methodenentwicklung zum Nachweis der Wirkungsmechanismen und Biokompatibilität von KEMs“ durchgeführt und vom Bundesministerium für Wirtschaft und Energie gefördert.

Zur Überprüfung der Biokompatibilität von Knochenersatzmaterialien *in vitro* existiert bislang kein einheitlicher Standard hinsichtlich der zu verwendenden Kultursysteme. Die Bandbreite reicht aktuell von Monokulturen (Schumacher et al. 2013; Glenske et al. 2014; Kruppke et al. 2016; Schumacher et al. 2016; Wagner et al. 2017a; Rößler et al. 2018; Kruppke et al. 2019b) über direkte (Domaschke et al. 2006; Heinemann et al. 2011; Heinemann et al. 2013; Weber et al. 2018; Heinemann et al. 2019) bis hin zu indirekten Kokultursystemen (Bernhardt et al. 2010; Bernhardt et al. 2019).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein indirektes Kokultursystem auf Kompartimentbasis zur Überprüfung der Biokompatibilität von KEMs zu konzipieren, welches die räumlich getrennte Kultivierung von Osteoblasten bzw. deren Vorläuferzellen und Zellen der Monozyten-Makrophagen-Zelllinie in Gegenwart eines KEMs ermöglicht (Abbildung 1).

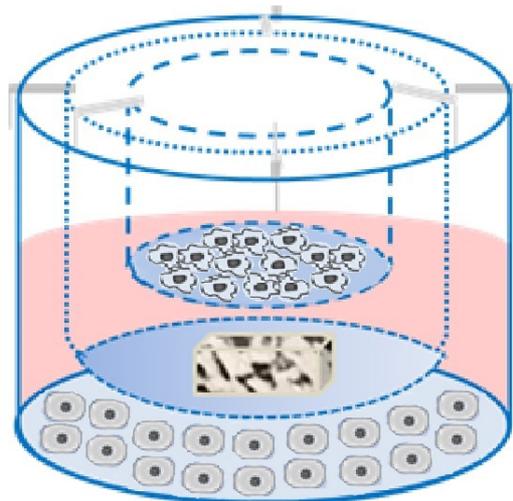


Abbildung 1: Schematische Darstellung des vorgesehenen Versuchsaufbaus (modifiziert in Anlehnung an das entsprechende Schema des Projektantrags). Beispielhaft ist das obere Kompartiment mit Zellen der hämatopoetischen Linie besiedelt, während sich im unteren Kompartiment mesenchymale Stromazellen befinden. Im mittleren Kompartiment ist ein KEM positioniert. Der rötlich tingierte Abschnitt markiert den mit Medium gefüllten Bereich.

Ein derartiger Versuchsaufbau hat den Vorteil, dass die erfassten Zellantworten nicht ausschließlich auf Material-vermittelten Effekten beruhen, die z. B. durch bioaktive Werkstoffe hervorgerufen werden (Zhou et al. 2010; Heinemann et al. 2013; Glenske et al. 2014; Gandolfi et al. 2015; Wagner et al. 2017a; Rößler et al. 2018), sondern dass auch der *crossstalk* auf Ebene humoraler Faktoren zwischen Zellen der mesenchymalen und hämatopoetischen Zelllinie in die Zellantworten einfließt.

Im geplanten indirekten 3-Kompartimente-Assay (3-Kompartimente-Kokultur, Abbildung 1) sollten zwei Zellpopulationen in jeweils eigenen Inserts kultiviert werden. Für weiterführende Untersuchungen der Zellen (z. B. *ribonucleic acid* (RNA)-Extraktion für die quantitative *real-time polymerase chain reaction* (qPCR)) sollten die Inserts entnommen und die Zellpopulationen getrennt voneinander analysiert werden können. Darüber hinaus war geplant, dass die Inserts – jeweils mit der gewünschten Zellpopulation besiedelt – flexibel, in Anpassung an die jeweilige Anforderung, verschieden angeordnet werden können.

Neben der anforderungsgerechten Konzeption des Kokultursystems sollten im Zuge der durch die KEMs vermittelten Differenzierung osteoblastärer und osteklastärer Vorläuferzellen, auch die Pannexin-Expressionsprofile von mesenchymalen Stromazellen (SCs) untersucht werden. Bei Pannexinen handelt es sich um eine Gruppe von Transmembranproteinen, die einen das Plasmalemm-durchspannenden Pannexon-Kanal bilden. Dieser verbindet das intrazelluläre Kompartiment mit dem Extrazellularraum. Der Pannexin-Kanal erlaubt aufgrund seines Durchmessers einer Vielzahl von Molekülen die Passage aus dem Zytosol in das extrazelluläre Milieu oder umgekehrt im Sinne eines parakrinen und/oder autokrinen Signalweges (Penuela et al. 2013; Iwamoto et al. 2013). Die Bedeutung der Pannexine für elementare zelluläre Prozesse steht außer Zweifel (Ishikawa et al. 2011; Ishikawa et al. 2014; Langlois et al. 2014; Dahl 2015; Ishikawa et al. 2016; Pham et al. 2018), dennoch liegen bislang keine Erkenntnisse über die Expressionsmuster und die mögliche Bedeutung von Pannexinen nach Kultivierung von SCs in Kombination mit Calciumphosphat-basierten KEMs vor.

2 Literaturübersicht

2.1 Kokultursysteme

Bereits in den 1980er Jahren wurden Kokultursysteme genutzt, um Erkenntnisse im Bereich der Zell-Zell-Kommunikation zu sammeln. Auch in Forschungsgebieten wie der regenerativen Medizin gewann diese Methode schnell an Interesse, da die gleichzeitige Kultivierung unterschiedlicher Zellpopulationen eine experimentelle Annäherung an die komplexen zellulären Interaktionen der Gewebe und Organe darstellt (Paschos et al. 2015).

Die Kultivierung von zwei oder mehr Zelltypen ist unter dem Begriff Kokultur zusammengefasst. Erfolgt die Kultivierung der Zelltypen in direktem Kontakt, wird von einer direkten Kokultur gesprochen, geschieht sie unter räumlicher Trennung, handelt es sich um eine indirekte Kokultur. Im Rahmen der direkten Kokultur kommunizieren die Zellen im direkten Kontakt und über sezernierte lösliche Faktoren sowie über Zell-Matrix-Interaktionen mit ihrer Umgebung (Paschos et al. 2015). In indirekten Systemen erfolgt die Kommunikation der Zellen ausschließlich mittels löslicher Faktoren, die durchlässige Membranen passieren können (Paschos et al. 2015) oder in einem konditionierten Medium enthalten sind. Hierbei handelt es sich um ein Medium, in welchem ein Zelltyp kultiviert wurde und das die von diesem Zelltyp produzierten löslichen Faktoren enthält. Anschließend dient dieses Medium der Kultivierung eines zweiten Zelltyps. Auch die Nutzung konditionierter extrazellulärer Matrix ist möglich (Grellier et al. 2009).

Die Art der Kultivierung von Zellen unterscheidet sich weiterhin hinsichtlich der räumlichen Anordnung. Bei der zweidimensionalen (2D) Kultivierung werden adhärente Zellen auf einer Plastik- oder Glasunterlage als flacher *single layer* oder Monolayer kultiviert (Ham et al. 2019). Sie ist mit wenig Aufwand durchführbar, berücksichtigt die räumliche Situation eines Gewebes oder Organs jedoch nur unzureichend (Paschos et al. 2015). Die Ergebnisse von 2D-Kultivierungen lassen sich daher nur eingeschränkt auf den lebenden Organismus übertragen (Ham et al. 2019).

Bei dreidimensionalen (3D) Kulturen werden die Zellen in allen drei Raumrichtungen kultiviert – mit oder ohne *scaffold* (Costa et al. 2018). Zu den 3D-Kulturen ohne Gerüst zählen die *liquid overlay*-Technik (LOT), die *hanging drop*-Technik und die *agitation based*-Technik. Unter diesen Methoden ist die LOT die am einfachsten und kostengünstigsten umzusetzende Technik (Costa et al. 2018). Hierbei wird die Adhäsion der Zellen an einer Materialoberfläche unterbunden, sodass sich die Zellen zusammenlagern und sphäroide Formen annehmen (Costa et al. 2014). Zur Kultivierung mittels *hanging drop*-Technik wird ein Tropfen einer

Zellsuspension auf eine Kulturplatte gegeben und diese umgedreht, damit hängende Tröpfchen entstehen. Im Bereich der Oberfläche, die mit der Luft in Kontakt steht, bilden sich spontan Zellsphäroide (Lv et al. 2017). Bei der *agitation based*-Technik wird die Zellsuspension kontinuierlich durchmischt, um eine Adhäsion der Zellen an der Materialoberfläche zu verhindern und die Entstehung von Sphäroiden zu begünstigen (Costa et al. 2018).

Bei der Kultivierung mit Hilfe eines *3D-scaffold* werden zwei verschiedene Prinzipien unterschieden: die Kultivierung auf einer festen 3D-Matrix als Grundgerüst oder mit Hilfe eines Hydrogels, welches einen hohen Wassergehalt aufweist (Rimann und Graf-Hausner 2012; DeVolder und Kong 2012). Bei der Herstellung von Hydrogelen werden natürliche oder synthetische Grundstoffe verwendet. Zu den natürlichen Grundstoffen zählen Bestandteile der extrazellulären Matrix (ECM) wie Kollagen, Fibrinogen oder Alginate. Synthetische Stoffe wie Polyethylenglycol, Polyacrilamid und Poly(N-isopropylacrylamid) werden zur Herstellung von synthetischen Hydrogelen verwendet (DeVolder und Kong 2012). Sie unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Festigkeit, Integrin-Bindungsstellen und Degradation (Rimann und Graf-Hausner 2012). Die Gruppe der *scaffolds* mit fester 3D-Matrix umfasst viele verschiedene Materialien mit unterschiedlichen Eigenschaften, die je nach Fragestellung spezifisch verwendet werden. Zur Wahl stehen verschiedene natürliche (z. B. Chitosan) und synthetische (z. B. Polylactid-co-glycolid (PLGA)) Grundgerüste, die sich hinsichtlich der Porosität, Permeabilität, Oberflächenbeschaffenheit und mechanischer Eigenschaften unterscheiden (Chaicharoenaudomrung et al. 2019; Ham et al. 2019).

Der Einsatz von Osteoblasten und Osteoklasten im Rahmen von Kokulturen

Kokulturen bestehend aus Osteoblasten und Osteoklasten oder deren Vorläuferzellen werden in der Grundlagenforschung (Atkins et al. 2005; Bernhardt et al. 2010; Kang und Zhang 2014; Penolazzi et al. 2016; Schmid et al. 2018; Pagani et al. 2018) sowie zur Testung von Medikamenten und Medizinprodukten wie z. B. bei der Überprüfung der Biokompatibilität von KEMs (Domaschke et al. 2006; Heinemann et al. 2011; Heinemann et al. 2013; Schulze et al. 2017; Heinemann et al. 2019; Bernhardt et al. 2019) genutzt.

Die Kokultivierung der Zellen unterliegt keinen standardisierten Bedingungen (Borciani et al. 2020). Je nach Fragestellung und Zielsetzung werden Standardmedien (Schulze et al. 2017; Jolly et al. 2018) oder Differenzierungsmedien verwendet (Bernhardt et al. 2010). Die Kultivierungsdauer variiert von 24 Stunden über 7 (Kang und Zhang 2014), 14 (Schulze et al. 2017) und 38 (Bernhardt et al. 2010) bis hin zu 42 Tagen (Heinemann et al. 2019), wobei Zellen unterschiedlicher Spezies – vorrangig humane (Atkins et al. 2005; Bernhardt et al. 2010;

Heinemann et al. 2013; Penolazzi et al. 2016; Schulze et al. 2017; Schmid et al. 2018) und murine Zellen (Jimi et al. 1996; Kang und Zhang 2014; Abe et al. 2019; Smieszek et al. 2020) – verwendet werden. Neben Zelllinien wie MC3T3 (Smieszek et al. 2020), ST-2 (Domaschke et al. 2006), 4B12 (Smieszek et al. 2020) oder RAW264 (Abe et al. 2019) werden Primärzellen, allen voran SCs, mesenchymale Stammzellen (MSCs) und osteoklastäre Vorläuferzellen (OCVs) eingesetzt. Werden die mesenchymalen Zellen vorwiegend aus Kalvarien (Kang und Zhang 2014) oder Knochenmarkaspiraten (Domaschke et al. 2006; Heinemann et al. 2013; Kruppke et al. 2016; Schulze et al. 2017; Schmid et al. 2018; Heinemann et al. 2019) isoliert, stammen OCVs der Monozyten-Makrophagen-Linie vorwiegend aus *buffy coats* des peripheren Bluts (Domaschke et al. 2006; Heinemann et al. 2013; Schulze et al. 2017; Schmid et al. 2018; Heinemann et al. 2019; Kruppke et al. 2019b) oder aus dem Knochenmark (Kang und Zhang 2014). Speziell bei der Überprüfung der Biokompatibilität von KEMs finden sowohl direkte Kokulturen (Domaschke et al. 2006; Heinemann et al. 2011; Heinemann et al. 2013; Weber et al. 2018; Heinemann et al. 2019) als auch indirekte Kokulturen (Bernhardt et al. 2010; Bernhardt et al. 2019) Anwendung – so wird ersichtlich, dass trotz rechtlicher Rahmenbedingungen mit Blick auf Medizinprodukte (Kapitel 2.5.1) bislang kein einheitlicher Standard zur *in vitro*-Überprüfung der Biokompatibilität von Biomaterialien existiert.

Dennoch repräsentieren *in vitro*-Modelle eine wichtige Grundlage, um die Zytotoxizität, das osteogene Potenzial eines Werkstoffs, die Adhäsion, das Wachstum und die Differenzierung von Zellen sowie das Risiko einer postoperativen Entzündung abzuschätzen und damit einen Beitrag zur Reduktion von Tierversuchen zu leisten (Przekora 2019). Osteoblasten und Osteoklasten (Bernhardt et al. 2010; Young et al. 2015; Silverwood et al. 2016; Kamleitner et al. 2018; Hammerl et al. 2019), die gemeinsam mit dem zu bewertenden Material kultiviert wurden, dienen der Beurteilung der Zytotoxizität durch mikroskopische Begutachtung. Besonderes Augenmerk wird auf Zelllysen, morphologische Veränderungen, Vakuolenbildung oder Ablösung der Zellen gelegt (Przekora 2019).

Weitere Methoden sind *cell viability assays*, Lebend/Tot-Fluoreszenz-Färbungen, die Raster- (REM) und Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) (Zhang et al. 2017). Durch die Untersuchung von Markern der osteogenen Differenzierung mittels qPCR, *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), Western Blot oder Immunfluoreszenz-Färbungen werden Rückschlüsse auf die osteogene Potenz der Werkstoffe gezogen. Auch die Immunantwort auf Biomaterialien kann *in vitro* getestet werden. Die Bestimmung pro-inflammatorischer Zytokine mittels qPCR, ELISA und *cytokine immunoassays* gibt Rückschlüsse über das Ausmaß der

Aktivierung von Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen (Velard et al. 2015; Waters et al. 2018; Przekora 2019).

Aufgrund ihrer häufigen Verwendung im Rahmen der Biokompatibilitätstestung von KEMs wird im Folgenden auf die Biologie und Funktion der Zellen des Knochens eingegangen.

2.2 Osteoblasten, Osteozyten und Knochenoberflächenzellen

Osteoblasten zählen gemeinsam mit MSCs, Präosteoblasten, Osteozyten und Knochenoberflächenzellen (*bone-lining cells*) zu den *osteoblast lineage cells* (Long 2011). Osteoblasten befinden sich auf der Knochenoberfläche und stellen 4–6 % des Gesamtzellvolumens des Knochens dar (Florencio-Silva et al. 2015). Sie produzieren ECM-Proteine, wie Osteocalcin (Ocn), alkalische Phosphatase (ALP) und auch große Mengen an Kollagen Typ I (Col1) (Long 2011). Zudem regulieren sie die Mineralisation des Knochens (Clarke 2008). Mauern sich Osteoblasten immer weiter in die von ihnen produzierte Matrix ein, bis sie schließlich komplett von ihr umgeben sind, werden sie als Osteozyten bezeichnet (Long 2011; Florencio-Silva et al. 2015). Osteozyten stellen bis zu 95 % des Zellvolumens des Knochens dar und bilden gemeinsam mit den Osteoblasten und Knochenoberflächenzellen ein großes zelluläres Netzwerk innerhalb des Knochens (Long 2011). Sie fungieren als „Regisseure“ (Florencio-Silva et al. 2015) der Knochenremodellierung, indem sie auf Osteoblasten und Osteoklasten regulatorisch einwirken. Dabei sind sie in der Lage, auf mechanische und hormonelle Stimuli zu reagieren (Long 2011). Aus einigen reifen Osteoblasten differenzieren sich Knochenoberflächenzellen. Diese *bone-lining cells* befinden sich an Stellen der Knochenoberfläche, wo weder Resorption noch Formation von Knochen stattfinden. Ihre Funktion ist nicht genau bekannt. Sie stellen jedoch einen wichtigen Bestandteil der *bone multicellular unit* (BMU) dar und besitzen die Fähigkeit zur Sekretion von Osteoprotegerin (OPG) und *receptor activator of nuclear factor- κ B ligand* (RANKL). Damit nehmen sie Einfluss auf die Osteoklastengenese (Florencio-Silva et al. 2015).

Multipotente MSCs sind Präkursoren der Osteoblasten (Caplan 1991; Rastegar et al. 2010), weisen eine Fibroblasten-ähnliche Morphologie auf, sind *in vitro* Plastik-adhärenz und bilden Zellkolonien. Hervorzuheben ist ihr Potenzial, sich in unterschiedliche Zelltypen differenzieren zu können (Uccelli et al. 2008). Friedenstein war Entdecker dieser Zellart und bezeichnet in den 1970er Jahren aus dem Knochenmark isolierte, spindelförmige Zellen als sog. *colony-forming unit fibroblasts* (CFU-Fs), die sich in Adipozyten, Chondroblasten und Osteoblasten differenzieren können (Friedenstein et al. 1974; Owen und Friedenstein 1988; Uccelli et al.

2008). Caplan benannte diese Zellen aufgrund ihrer Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Multidifferenzierung als *mesenchymal stem cells* (Caplan 1991).

Da es lange Zeit Unstimmigkeiten bei der Charakterisierung und einheitlichen Benennung der MSCs gegeben hat, erschien 2005 ein *Position Paper* der *International Society for Cellular Therapy* (ISCT), das anstrebte, Klarheit hinsichtlich der Zellcharakteristika zu schaffen. So sind alle Plastik-adhärenenten, Fibroblasten-ähnlichen Zellen, unabhängig aus welchem Gewebe sie stammen, als SCs zu bezeichnen. MSCs sind dagegen jene Zellen, deren Multipotenz gemäß Stammzellkriterien sowohl *in vitro* wie auch *in vivo* nachgewiesen wurde (Horwitz et al. 2005). In einem weiteren *Position Paper* der ISCT (Dominici et al. 2006) sind Kriterien aufgeführt, die multipotente SCs mindestens erfüllen müssen, um als solche bezeichnet zu werden. Dazu gehören:

- Plastikadhärenz unter Standardkulturbedingungen,
- Expression von spezifischen Oberflächenantigenen: *cluster of differentiation* (CD) 105, CD73, CD90 bei mehr als 95 % der Population,
- keine bzw. in weniger als 2 % der Population nachweisbare Expression von CD45, CD34, CD14 oder CD11b, CD79 α oder CD19, HLA-DR,
- Fähigkeit zur *in vitro*-Differenzierung in Adipozyten, Chondroblasten und Osteoblasten unter Standardkulturbedingungen.

Die Expressionsmuster der Oberflächenantigene, die für humane MSCs und SCs gelten, können je nach Spezies, Gewebe und Kulturbedingungen jedoch variieren (Chamberlain et al. 2007; Uccelli et al. 2008). MSCs und SCs können aus verschiedenen Geweben isoliert werden, z. B. aus Knochenmark, Kalvarien, Fettgewebe, Leber, Muskel, Amnionflüssigkeit, Plazenta, Nabelschnurblut, Pulpa (Arnhold et al. 2007; Salem und Thiemermann 2010; Kang und Zhang 2014), humanem Bohrmehl (Wenisch et al. 2005) und Spongiosa (Wagner et al. 2017a; Wagner et al. 2017b).

Aufgrund ihrer Fähigkeit zur Selbsterneuerung erfahren MSCs und SCs großes Interesse von Seiten der Wissenschaft. Ihre immunmodulatorischen Eigenschaften sind ebenfalls sehr wesentlich, denn über die Sekretion von Wachstumsfaktoren, Chemokinen und Zytokinen sind sie in der Lage, die Immunantwort zu steuern und die Geweberegeneration zu fördern (Bunpetch et al. 2017). SCs sind nicht immunogen, so dass bei einer allogenen Transplantation keine Immunsuppression des Empfängers notwendig ist (Chamberlain et al. 2007). Eine weitere wichtige Eigenschaft von MSCs und SCs ist die Fähigkeit des *homing*. Diese bezieht sich auf die Fähigkeit der Zellen, im Falle einer Entzündung oder Verletzung, von ihrem Ursprungsort in das betroffene Gewebe zu migrieren, sich dort anzusiedeln und ihre funktionellen und

protektiven Eigenschaften *in situ* zu entfalten (Salem und Thiemermann 2010; Sharma et al. 2014). Es wird jedoch auch berichtet, dass MSCs und SCs nach langer Kulturzeit zur Bildung von Tumoren, v. a. Sarkomen, neigen (Chanda et al. 2010; Salem und Thiemermann 2010; Ghiasi et al. 2017).

Im Rahmen der osteogenen Differenzierung differenzieren MSCs über Knochen-Vorläuferzellen zu Präosteoblasten, die konsekutiv zu Osteoblasten reifen. Diese wiederum sind dazu in der Lage, die ECM zu bilden, in die sie sich einbetten – fortan handelt es sich um reife Osteozyten (Xu et al. 2015). Eine Vielzahl von Signalmolekülen und -wegen spielt bei dieser Differenzierung eine Rolle, so z. B. der kanonische Wnt-Signalweg, *transforming growth factor* β (TGF- β), *bone morphogenetic protein* (BMP), Notch, Hedgehog und *fibroblast growth factor* (FGF) (Komori 2009). Viele dieser Wege nehmen dabei Einfluss auf den *Runx-related transcription factor 2* (Runx2) sowie Osterix (Sp7) und damit auf die osteogene Differenzierung (Long 2011).

Runx2, der auch unter den Namen *core-binding factor α* (CBFA1), *polyoma-enhancer-binding protein 2 α* (PEBP2 α A) oder *acute myelogenous leukemia factor* (AML3) bekannt ist, gehört gemeinsam mit Runx1 und Runx3 zur *Runx domain* Familie (Xu et al. 2015). Hinsichtlich seiner Funktion ist er der wichtigste osteogene Transkriptionsfaktor, der v. a. in der frühen Differenzierung der Osteoblasten von Bedeutung ist, und daher auch als Marker der frühen osteogenen Differenzierung gilt (Xu et al. 2015).

Runx2 induziert die Entwicklung der MSCs zu Präosteoblasten, und weiter zu unreifen Osteoblasten (Komori 2009). Während dieser Differenzierungsphasen wird Runx2 vermehrt exprimiert, gleichzeitig steigert er die Expression von Colla1, Colla2, Osteopontin (Opn), *Bone sialoprotein* (BSP) und Ocn (Komori 2009). Im Zuge der fortschreitenden Differenzierung zu reifen Osteoblasten wird Runx2 jedoch herabreguliert, da er sonst die weitere Osteogenese inhibieren würde (Maruyama et al. 2007; Komori 2009; Xu et al. 2015). Dies geschieht nach einer Studie von Lee und Kollegen bei C2C12-Zellen circa an Tag 7 (Lee et al. 1999).

Sp7 ist ein weiterer essenzieller Transkriptionsfaktor der osteogenen Entwicklung. Runx2 ist dazu in der Lage, die Genexpression von Sp7 zu regulieren, indem er an dessen Promoter bindet. Sp7 interagiert daraufhin mit dem nukleären Faktor der aktivierten T-Zellen 1 (NFATc1). Dabei wird ein Komplex gebildet, der den Promoter des α 1(I)-Kollagens kontrolliert (Hofmann et al. 2009).

Als weiterer wichtiger Regulator der Osteogenese gilt die Wnt-Kaskade. Der Name ‚Wnt‘ setzt sich zusammen aus ‚WG‘ für ‚wingless‘ und ‚INT1‘. Wnt-Proteine sind sezernierte

Glykoproteine, die wichtige Funktionen bei der Knochenbildung übernehmen. Dazu gehören die Determination der Osteo- und Chondroprogenitordifferenzierung, die Stimulierung der Osteoblastenfunktion und die Blockierung der Apoptose von Osteoblasten und Osteoklasten (Hofmann et al. 2009).

Der Wnt-Signalweg ist während aller Differenzierungsstadien der Osteoblasten sowie in Knochenoberflächenzellen und Osteozyten aktiv. Deutlich aktiviert wird er während erhöhter mechanischer Belastung und während der Frakturheilung (Hofmann et al. 2009). Auf molekularbiologischer Ebene aktiviert Wnt als Ligand die kanonische Wnt-Signalkaskade, die auch als *β-catenin-dependent canonical signaling pathway* bezeichnet wird (Long 2011; Kobayashi et al. 2018). Bei Abwesenheit des Ligands ist intrazelluläres β-Catenin nur in geringer Menge vorhanden. Ursache dafür ist die Phosphorylierung des vorhandenen β-Catenins durch einen Abbaukomplex, der sich aus Axin, dem Tumorsuppressor-Protein *adenomatous-polyposis-coli* (Apc), der Glykogensynthase Kinase-3β (GSK-3β) und der Casein Kinase 1 (CK1) zusammensetzt. Das phosphorylierte β-Catenin wird daraufhin durch das Ubiquitin-Proteasom-System degradiert. Bindet jedoch Wnt an einen Komplex aus dem *Frizzled*-Rezeptor und dem *low-density lipoprotein receptor-related protein 5* (Lrp5) oder Lrp6, reichert sich β-Catenin in der Zelle an, weil der Abbaukomplex inhibiert wird. Dieses angereicherte β-Catenin induziert im Zellkern die Expression der Zielgene, welche wiederum die Osteoblastendifferenzierung induzieren (Long 2011; Kobayashi et al. 2018).

Der β-Catenin-Signalweg ist in der Lage, gemeinsam mit anderen Faktoren wie TGF-β, BMP oder FGF, die Transkription von Signalmolekülen wie Runx2, *small mother against decapentaplegic* Proteinen (Smad), OPG und Östrogen zu regulieren (Li et al. 2018b). Sklerostin und Dickkopf-1 (Dkk) gelten dagegen als Inhibitoren, da sie Antagonisten zu Lrp5 und Lrp6 darstellen (Einhorn und Gerstenfeld 2014). Auch das *secreted frizzled related protein* (Sfrp) inhibiert diesen Signalweg über die Bindung von Wnt (Kular et al. 2012).

Neben diesen naturgemäß im Hartgewebe ablaufenden Differenzierungskaskaden ist es *in vitro* möglich, die osteogene Differenzierung von SCs zu induzieren. Verwendet werden hierzu v. a. Ascorbinsäure, β-Glycerolphosphat und Dexamethason, welche als Zusätze über zwei bis drei Wochen in das Zellkulturmedium hinzugegeben werden. Die Zellen bilden daraufhin Aggregate bzw. *bone nodules*. Auch ein Anstieg der ALP erfolgt. Ein weiteres Phänomen ist die Calcium-Akkumulation in den *bone nodules*, die durch Alizarinrot- oder von Kossa-Färbungen visualisiert werden kann (Chamberlain et al. 2007). Die oben genannten Supplemente haben dabei unterschiedliche Funktionen, die in einem Übersichtsartikel von Langenbach und Handschel im Detail erläutert werden. So induziert Dexamethason die

Expression von Runx2 über eine Aktivierung des Wnt/ β -Catenin- und des *mitogen-activated protein kinase* (MAPK)-Signalweges. Ascorbinsäure steigert die Sekretion von Coll, während β -Glycerolphosphat als Phosphatquelle dient und die Expression von osteogenen Markern über den *extracellular signal regulated kinases* (ERK)-Signalweg induziert (Langenbach und Handschel 2013).

2.3 Osteoklasten

Osteoklasten sind große, multinukleäre Zellen, die der Monozyten-Makrophagen-Linie entstammen und sich wie Makrophagen (Möst et al. 1997) aus hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks differenzieren (Ono und Nakashima 2018). Sie sind im Hartgewebe für den Knochenabbau verantwortlich und übernehmen so während der Knochenremodellierung wesentliche Aufgaben (Soyas und Alles 2016). Osteoklasten bilden nach Anheftung an der Knochenoberfläche eine apikale Faltenmembran, das sogenannte *ruffled border*, aus (Soyas und Alles 2016). Im Bereich dieser Membran sezerniert der Osteoklast v. a. H^+ - und Cl^- -Ionen, Cathepsin K (CTSK), Tartrat-restistente saure Phosphatasen (TRAP), Matrixmetalloproteinasen (MMP) und entlässt Lysosomen (Väänänen und Laitala-Leinonen 2008; Takahashi et al. 2014; Ono und Nakashima 2018). Durch die im Bereich der Faltenmembran stattfindenden Resorptionsvorgänge entsteht an der Knochenoberfläche die *Howship*-Lakune (Boyle et al. 2003). Hier herrscht ein saures Mikromilieu, das dazu dient, den Hydroxylapatit (HA) aufzulösen und so die mineralisierte Knochenmatrix abzubauen (Kobayashi et al. 2018). Um diese Lakune dicht zu verschließen, bilden Osteoklasten einen Aktinring oder die sogenannte *sealing zone* oder *clear zone*. Sie dient der Adhäsion des Osteoklastens an der Knochenmatrix. Einen weiteren morphofunktionellen Abschnitt repräsentiert die basolaterale Membran (Wenisch et al. 2003a; Soyas und Alles 2016; Kobayashi et al. 2018).

Damit sich die hämatopoetischen Vorläuferzellen zu Osteoklasten differenzieren können, sind v. a. zwei Faktoren wichtig: zum einen *macrophage colony-stimulating factor-1* (M-CSF), ein Polypeptid, das zu den Wachstumsfaktoren zählt, zum anderen RANKL, der zur Familie der Tumornekrosefaktoren (TNF) gehört (Boyle et al. 2003; Ono und Nakashima 2018). M-CSF wird von Osteoblasten und deren Vorläuferzellen in löslicher und membrangebundener Form gebildet. Er vermittelt Proliferation und Überleben der osteoklastären Vorläuferzellen. Bei reifen Osteoklasten reguliert dieser Faktor die Verteilung und Organisation des Zytoskeletts (Teitelbaum und Ross 2003).

RANKL wird, ebenso wie M-CSF, von Osteoblasten und deren Vorläufern membrangebunden und als löslicher Faktor gebildet (Ono und Nakashima 2018). Seinen Rezeptor, *receptor activator of nuclear factor- κ B* (RANK), besitzen Osteoklasten und deren Vorläuferzellen (Sims und Gooi 2008). Die Bindung von RANKL an RANK induziert die Differenzierung der Vorläuferzellen zu Osteoklasten. Reguliert wird dieser Prozess durch OPG, einen löslichen Faktor, der dazu in der Lage ist, RANKL zu binden und somit die Interaktion von RANKL mit RANK zu verhindern. OPG wird von Osteoblasten und deren Vorläuferzellen gebildet (Pivonka et al. 2008).

Zu den Genen, die typischerweise von Osteoklasten exprimiert werden, zählen TRAP, CTSK, Calcitonin Rezeptor sowie β_3 -Integrin (Boyle et al. 2003).

TRAP stellt ein eisenhaltiges Enzym dar, welches von Zellen monozytären Ursprungs und auch von dendritischen Zellen gebildet wird. Sowohl die *messenger*-RNA als auch das dazugehörige Protein sind in vielen verschiedenen Geweben und Organen, z. B. Haut, Thymus, Milz, Leber, Lunge und Gastrointestinaltrakt lokalisiert (Hayman 2008). Es existieren die Isoformen 5a und 5b der TRAP. Sie beruhen auf dem gleichen Genprodukt und unterscheiden sich durch translationale Modifikationen. TRAP 5a wird von Makrophagen und dendritischen Zellen sezerniert, wohingegen TRAP 5b von Osteoklasten gebildet wird (Hayman 2008). Damit gilt die Isoform TRAP 5b als spezifisch für Osteoklasten (Minkin 1982; Halleen et al. 2000; Lamp und Drexler 2000; Azuma et al. 2007). TRAP ist eine Phosphatase und in der Lage, anorganisches Polyphosphat zu degradieren (Halleen et al. 2000). Trotzdem ist die genaue biologische Funktion des Enzyms bislang unklar (Ono und Nakashima 2018). RANKL und OPG regulieren die Synthese der TRAP (Hayman 2008), wobei RANKL die Synthese stimuliert (Wittrant et al. 2003). In einem *in vivo*-Experiment zeigten Hollberg und Kollegen, dass TRAP *knock out* Mäuse (TRAP^{-/-}) zur Ausprägung eines osteopetrotischen Phänotyps neigen, obgleich die Differenzierung von Osteoklasten unverändert abläuft. Jedoch sind einige Osteoklasten dysfunktional und morphologisch verändert (Hollberg et al. 2002). Eine Überexpression der TRAP kann hingegen zu Veränderungen der Knochenhomöostase führen, die Zahl der Osteoklasten ändert sich dabei jedoch nicht signifikant (Angel et al. 2000).

CTSK wird fast ausschließlich von Osteoklasten sezerniert (Drake et al. 1996) und gehört zur Familie der Cysteinproteinasen. Es ist ein essentielles Enzym zur Degradation des Knochens, v. a. von Coll. Unter sauren Bedingungen weist es hohe kollagenolytische Eigenschaften auf (Gamsjäger und Resch 2015). CTSK ist innerhalb von Lysosomen und zytoplasmatischen Vesikeln sowie entlang des *ruffled border* lokalisiert – ebenso wurde es extrazellulär innerhalb der Resorptionslaktone nachgewiesen (Clarke et al. 2017). Aktiviert wird die Expression von

CTSK vom Transkriptionsfaktor NFATc1 und durch den p38-Signalweg. Dementgegen haben Interferon γ , Calcitonin, Östrogen und Coronin1A eine hemmende Wirkung auf die Expression bzw. Sekretion von CTSK (Clarke et al. 2017; Ohmae et al. 2017). Über eine Degradation von Periostin beeinflusst CTSK den kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalweg. Periostin gilt als Stimulator dieses Signalwegs, während CTSK inhibierend auf ihn wirkt (Bonnet et al. 2017).

2.4 Remodellierung

Ein geregeltes und koordiniertes Zusammenspiel von Osteoklasten, Osteoblasten, Osteozyten und Knochenoberflächenzellen ist während des *Remodeling* erforderlich – ein Prozess, der die zeitlebens stattfindenden Ab-, Um-, und Aufbauprozesse des Knochens umfasst (Clarke 2008; Florencio-Silva et al. 2015; Tröltzsch et al. 2016; König und Liebich 2018) und innerhalb der BMU stattfindet. Innerhalb einer BMU entsprechen sich die Raten von Knochenabbau und Knochenaufbau. Kommt es zu Veränderungen dieses Gleichgewichtes, können Erkrankungen wie Osteoporose oder Osteopetrose entstehen (Sims und Gooi 2008). Der Zyklus des *Remodeling* erfolgt fortwährend an unterschiedlichen Stellen des Skeletts und gliedert sich in verschiedene Phasen. Die Initialphase startet mit der Rekrutierung und anschließenden Differenzierung von Osteoklasten und gipfelt in der Resorption der Knochenmatrix. Die Übergangsphase vermittelt den Übergang zwischen Resorption und Formation und wird durch lösliche und membrangebundene Faktoren sowie durch Moleküle, die sich im Knochengewebe befinden, vermittelt. Während die Knochenbildung startet, stoppt die Resorption. Die Knochenformation durch Osteoblasten erfolgt langsam und die Abschlussphase kann sich über Monate hinziehen (Sims und Gooi 2008).

Der komplexe Vorgang des *Remodeling* wird durch verschiedene Kommunikationswege zwischen Osteoblasten und Osteoklasten sowie Osteozyten vermittelt und reguliert. Darüber hinaus beteiligen sich auch Zellen, die nicht zur BMU gehören, wie T-Lymphozyten, B-Zellen und Neurone, an diesem Regulationsmechanismus (Sims und Gooi 2008). Dabei beeinflussen parakrine Faktoren (Zytokine, Wachstumsfaktoren und Prostaglandine) und endokrine Faktoren (Parathormon, Calcitonin, Vitamin D, Glukokortikoide, Sexualhormone, Schilddrüsenhormone) diesen Zyklus (Kenkre und Bassett 2018).

Die Knochenremodellierung ist ebenso für die Frakturheilung des Knochens von Bedeutung und spielt auch für den Erfolg der knöchernen Integration eines KEMs die entscheidende Rolle (Rolvien et al. 2018). So können sich Osteoklasten am Abbau von KEMs beteiligen: z. B. sind sie in der Lage einen Calciumphosphatzement acht Wochen nach der Implantation in den

Tibiakopfddefekt des Schafes mittels Resorption abzubauen (Wenisch et al. 2003a; Wenisch et al. 2003b). Die Implantation eines KEMs kann jedoch auch in einer Fremdkörperreaktion gipfeln, die zur fibrösen Abkapselung und damit zum Funktionsverlust des Implantates führt (Brown und Badylak 2013). Dafür verantwortlich ist eine am Implantationsort durch Makrophagen vermittelte chronische Entzündung (Anderson et al. 2008).

Prinzipiell kommt es bei der Implantation eines KEMs zu Verletzungen des umliegenden Gewebes, sodass Blut in die ‚Implantationswunde‘ eintritt. Dies resultiert in Blut-Material-Kontakt mit konsekutiver Adsorption von Proteinen an der Oberfläche des KEMs. Die darauffolgende Gewebereaktion wird von der Konzentration und der Art der sich anlagernden Proteine wie Albumin, Fibrinogen oder Fibronectin beeinflusst (Anderson et al. 2008).

Durch Aktivierung der extrinsischen und intrinsischen Gerinnungskaskade, des Komplementsystems, des fibrinolytischen Systems, des Kinin-generierenden Systems und der Thrombozyten entstehen Blutkoagel am Ort der Implantation und bilden eine provisorische Matrix. Durch die Freisetzung von Mitogenen, Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren migrieren Makrophagen zum Implantationsort, die dort an der einsetzenden akuten Entzündungsreaktion beteiligt sind. Monozyten und Makrophagen werden im Wesentlichen durch Komplementfaktoren, TGF- β , *platelet-derived growth factor* (PDGF), *platelet factor 4* (PF4), *macrophage chemoattractant protein 1–4* (MCP1–4), *regulated and normal T cell expressed and secreted* (RANTES), *macrophage inflammatory protein 1a* (MIP-1a) und MIP-1b rekrutiert. Sie sind zur direkten Erkennung von Biomaterialien und Biomaterial-assoziierten Proteinen über *Toll-like receptors* (TLR) und *scavenger receptors* in der Lage (Klopffleisch und Jung 2017). Weiterhin dominieren neutrophile Granulozyten die Phase der akuten Entzündung, Mastzellen setzen Histamin, Interleukin (IL)-4, IL-13, und IL-8 frei und rekrutieren weitere Makrophagen, deren Anheftung am Implantat durch adsorbiertes Fibrinogen an der Oberfläche des Materials erleichtert wird (Anderson et al. 2008; Klopffleisch und Jung 2017). Nach circa einer Woche klingt die akute Entzündung ab. In der nun folgenden Phase der chronischen Entzündung dominieren mononukleäre Zellen im Bereich des Implantates. Im Optimalfall ist die chronische Entzündung bei biokompatiblen KEMs von kurzer Dauer und nach circa zwei Wochen beendet (Anderson et al. 2008). Kommt es jedoch zu einer Fremdkörperreaktion, finden sich neben Monozyten und zahlreichen einkernigen Makrophagen auch mehrkernige Riesenzellen an der Implantationsstelle wieder (Anderson et al. 2008). Umfang und Art der ausgelösten Entzündungsreaktion sind somit für die erfolgreiche knöcherne Integration eines KEMs von entscheidender Bedeutung. Insofern gilt es, die Art der Zellen und deren Expressionsprofile bei der Biokompatibilitätsüberprüfung von neuen

Materialien *in vitro* und *in vivo* sicher abzuschätzen (Wang et al. 2016; Korzinskas et al. 2018; Sieger et al. 2019).

Die Rolle der Fremdkörperriesenzellen (FKRZ) wird kontrovers diskutiert (Miron und Bosshardt 2018). Während das Auftreten dieser Zellen am Implantationsort mit einer Abstoßungsreaktion in Verbindung stehen soll, wie Miron und Bosshardt in ihrem Übersichtsartikel darlegen, sind diese Zellen jedoch auch bei erfolgreich implantierten, reaktionslosen Implantaten nachweisbar (Ghanaati et al. 2013; Miron und Bosshardt 2018). FKRZ entstehen durch Fusion von einkernigen Makrophagen, sogenannten *osteomacs* (Miron und Bosshardt 2016). Der Begriff der *frustrated phagocytosis* wird im Zusammenhang mit der Entstehung von FKRZ verwendet. So fusionieren einkernige Makrophagen, für die der zu resorbierende körperfremde Partikel eines KEMs zu groß ist, um diesen Partikel besser phagozytieren zu können (Miron und Bosshardt 2016).

Prinzipiell sind zwei verschiedene Typen von FKRZ-Vorläuferzellen zu unterscheiden: pro-inflammatorische M1- und wundheilungsfördernde M2-Makrophagen. Die Ursachen und Mechanismen der Differenzierung von M1- und M2-Makrophagen sowie die weitere Fusion in FKRZ als Reaktion auf ein Biomaterial sind bislang noch nicht vollständig geklärt (Miron und Bosshardt 2018). M1-Makrophagen, deren Bildung durch Interferon γ oder Lipopolysaccharide (LPS) angeregt wird, sezernieren TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-23, geringe Mengen an IL-10 und hohe Mengen an *reactive oxygen species* (ROS). Sie gehören zu den Antigen-präsentierenden Zellen und induzieren die Bildung von *effector cells* und *inducer cells* im TH1-Signalweg (Brown und Badylak 2013; Chung et al. 2017). Im Gegensatz dazu werden M2-Makrophagen durch IL-4, IL-13, IL-10 und Immunkomplexe aktiviert, produzieren hohe Mengen an IL-10, Ornithin und Polyaminen. Sie exprimieren vermehrt *scavenger receptors*, Mannose- und Galactoserezeptoren und sind in TH2-Reaktionen involviert (Brown und Badylak 2013). Pro-inflammatorische M1-Makrophagen können sich zu wundheilungsfördernden M2-Makrophagen (Italiani et al. 2014) umwandeln und umgekehrt (Yu et al. 2016).

2.5 Knochenersatzmaterialien

Der Einsatz von KEMs ist bei rund 15 % aller Operationen, die am menschlichen Skelett durchgeführt werden, notwendig (Smeets et al. 2018). Zahlen des statistischen Bundesamtes zufolge erfolgte 2006 in Deutschland in 9 939 Fällen die Implantation alloplastischer KEMs (Statistisches Bundesamt 2009). Bis zum Jahr 2017 stieg diese Zahl auf 22 688 Fälle an

(Statistisches Bundesamt 2018). Gemessen an der Gesamtzahl der Operationen beträgt diese Steigerung circa 63 %. Defekte kritischer Größe (Schmitz und Hollinger 1986), die den Einsatz von Knochenersatz erfordern, sind tumorös, infektiös oder traumatisch bedingt (van Heest und Swiontkowski 1999). Die Einsatzgebiete von KEMs umfassen dabei verschiedene medizinische Fachdisziplinen wie die Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie und die Unfallchirurgie. Insbesondere finden sie in der Wirbelsäulenchirurgie Anwendung (Smeets et al. 2014; Smeets et al. 2018)

2.5.1 Gesetzliche Grundlagen zur Testung von Medizinprodukten

Im Jahr 2018 sind Medizinprodukte und deren Testung im Rahmen negativ behafteter Schlagzeilen in den Medien aufgetaucht: fehlerhafte Implantate und andere Medizinprodukte sollen für Todesfälle verantwortlich gewesen sein (NDR; Spiegel Online et al. 2018; Süddeutsche.de GmbH et al. 2018). Grundlage der Schlagzeilen war eine von der Plattform *International Consortium of Investigative Journalists* (ICIJ) veröffentlichte Recherche mit dem Thema „*Implant Files*“ (International Consortium of Investigative Journalists 2018).

Die Bevölkerung ist zunehmend am Thema Implantatsicherheit interessiert (Behrend et al. 2014). Grundlage für diese Sicherheit ist das Gesetz über Medizinprodukte (Medizinproduktegesetz, MPG), welches die Richtlinien 90/358/EWG über aktive implantierbare medizinische Geräte, 92/42/EWG über Medizinprodukte und 98/79/EG über *in vitro*-Diagnostika in nationales Recht umwandelt. Es gliedert sich in mehrere Abschnitte und legt dabei Begriffsbestimmungen, Anforderungen an Medizinprodukte und deren Inbetriebnahme fest. In weiteren Abschnitten geht es um die klinische Prüfung und Leistungsbewertungsprüfungen. Auch der Überwachung und dem Schutz vor Risiken durch Medizinprodukte ist ein Abschnitt gewidmet.

Laut §3 des MPG sind Medizinprodukte jene „Instrumente, Apparate, Vorrichtungen, Software, Stoffe und Zubereitungen aus Stoffen oder andere Gegenstände, die mittels ihrer Funktion dem Zweck a) der Erkennung, Verhütung, Überwachung, Behandlung, Linderung oder Kompensierung von Krankheiten, Verletzungen oder Behinderungen, b) der Untersuchung, der Ersetzung oder der Veränderung des anatomischen Aufbaus oder eines physiologischen Vorgangs oder c) der Empfängnisregelung“ dienen (MPG - Gesetz über Medizinprodukte). Die bestimmungsgemäße Hauptwirkung von Medizinprodukten im oder am menschlichen Körper wird weder durch pharmakologisch oder immunologisch wirkende Mittel noch durch deren Metabolismus erreicht. Die Wirkungsweise kann aber durch solche Mittel unterstützt werden

(MPG - Gesetz über Medizinprodukte). Damit grenzen sich Medizinprodukte von den Arzneimitteln ab.

KEMs zählen zu den Medizinprodukten, und sie dürfen nicht in Verkehr gebracht werden, wenn der Verdacht besteht, dass sie unmittelbar oder mittelbar die Sicherheit und Gesundheit des Patienten gefährden. Um in Verkehr gebracht zu werden, benötigen sie eine CE-Kennzeichnung. Um diese zu erlangen, müssen sie grundlegende Anforderungen des §7 MPG erfüllen sowie ein Konformitätsbewertungsverfahren nach §37 MPG durchlaufen haben. Zuständig dafür sind ‚benannte Stellen‘ im Sinne unabhängiger Prüf- und Zertifizierungsstellen. Von Bedeutung sind hier das Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM) sowie das Paul-Ehrlich-Institut, wobei letzteres ausschließlich im Bereich von *in vitro*-Diagnostika mitwirkt.

Bis auf begründete Ausnahmen ist anhand klinischer Daten eine Bewertung im Rahmen der Konformitätsbewertung vorgesehen, die sowohl unerwünschte Wirkungen sowie das Nutzen-Risiko-Verhältnis berücksichtigt. Sie soll mittels definierter und methodisch einwandfreier Verfahren erfolgen. Um mit einer klinischen Prüfung zu beginnen, muss das Einverständnis der nach §22 Absatz 1 des MPG zuständigen Ethik-Kommission sowie des BfArM vorliegen. Weitere Einzelheiten, v. a. zur Antragsstellung einer klinischen Prüfung, sind in der Verordnung über klinische Prüfungen von Medizinprodukten (MPKPV) festgehalten (MPKPV - Verordnung über klinische Prüfungen von Medizinprodukten). Um eine klinische Prüfung an einer erkrankten Person vorzunehmen, muss allen Erkenntnissen der medizinischen Wissenschaft zufolge von einer Genesung bzw. einer Leidensminderung auszugehen sein. Daten können jedoch auch aus klinischen Prüfungen oder wissenschaftlichen Studien eines ähnlichen Produktes herangezogen werden, wenn die Gleichartigkeit beider Produkte nachgewiesen werden kann. Auch veröffentlichte und unveröffentlichte Berichte über klinische Erfahrungen können zu Rate gezogen werden (MPKPV - Verordnung über klinische Prüfungen von Medizinprodukten).

In der Verordnung über die Erfassung, Bewertung und Abwehr von Risiken bei Medizinprodukten (Medizinprodukte-Sicherheitsplanverordnung, MPSV) werden die Verfahren zur Erfassung, Bewertung und Abwehr von Risiken im Verkehr oder in Betrieb befindlicher Medizinprodukte geregelt (MPSV - Verordnung über die Erfassung, Bewertung und Abwehr von Risiken bei Medizinprodukten).

Für das Inverkehrbringen von Medizinprodukten muss eine Konformitätserklärung vorliegen, die das Aufbringen des CE-Kennzeichens rechtfertigt. Dafür zuständig ist, je nach Risikoklasse des Produkts, entweder der Hersteller des Produktes oder vom Hersteller beauftragte benannte

Stellen. Diese beauftragten Stellen werden von der zuständigen Behörde, der Zentralstelle der Länder für Gesundheitsschutz bei Arzneimitteln und Medizinprodukten (ZLG) benannt (BfArM - Rechtlicher Rahmen). Zu den benannten Stellen der ZLG gehört z. B. der TÜV SÜD Product Service GmbH (ZLG).

Zudem existieren einige DIN-Normen, die im Bereich KEMs Anwendung finden. Sie sind von Bedeutung, da sich benannte Stellen daran orientieren und diesen Normen entsprechende Prüfungen anbieten (ISO 10993-1 Prüfung der Biokompatibilität).

Die Dokumentennummer ISO 13175-3 stellt Anforderungen an Knochenersatz aus monophasischem HA, monophasischen β -Tricalciumphosphat (β -TCP) oder biphasischem HA/ β -TCP in Form von Blöcken und Granulaten (ISO 13175-3:2012 (en)). In der ISO 10993 geht es um die biologische Beurteilung von Medizinprodukten. Sie beinhaltet unter anderem Prüfungen zum Risikomanagement, zur Prüfung auf Genotoxizität und Karzinogenität, Prüfungen auf *in vitro*-Zytotoxizität und lokale Effekte nach der Implantation (DIN EN ISO 10993-1). In der ISO 19090 finden sich Spezifizierungen der Testmethoden zur Prüfung der Zellmigrationsfähigkeit für poröse Körper (ISO 19090:2018-01).

Als Reaktion auf die 2018 geführte Debatte um die Sicherheit von Implantaten und Medizinprodukten (siehe oben) wurde das Gesetz zur Errichtung eines Implantateregisters in Deutschland beschlossen. Laut Bundesgesundheitsministerium soll es für Qualität und Sicherheit für Träger und Produkte sowie schnellere Handlungsmöglichkeiten bei Problemen sorgen. Auch sollen durch eine sichere Datensammlung die Produkte verbessert werden. Gleichzeitig wird die Zulassung neuer Therapien erleichtert (Bundesgesundheitsministerium). §1 des Implantateregistergesetzes ist zu entnehmen, dass das Implantateregister Deutschland der Gewährleistung hoher Qualitäts- und Sicherheitsstandards bei der Gesundheitsversorgung mit Implantaten dient. In dem Gesetz ist definiert, wer zur Datenmeldung verpflichtet ist, wer die Daten sammelt und auswertet. Der Produktverantwortliche wird dazu verpflichtet, das Implantat vor Inverkehrbringen oder vor dem Beginn klinischer Prüfungen im Register aufzuführen. Gegenüber der Registerstelle hat die verantwortliche Gesundheitseinrichtung die Verwendung von Implantaten zu melden, wobei v. a. Informationen zum Implantat abgefragt werden. Werden die Implantate eingesetzt, ist die verantwortliche Gesundheitseinrichtung zur Übermittlung Patienten- und Fall-identifizierender Daten, die unter anderem Krankenversicherungsnummer und das Geburtsdatum erfassen, an die Vertrauensstellen verpflichtet. Weiterhin werden die gesetzlichen Krankenkassen dazu verpflichtet, der Vertrauensstelle fortlaufend Daten über den Vitalstatus oder den Tod von Personen, die ein Implantat haben, zu melden. Die Anonymisierung der pseudonymisierten Daten erfolgt im

Einklang mit §1. Die Liste der Implantattypen, für die dieses Gesetz gilt, umfasst Gelenkendoprothesen, Brustimplantate, Herzklappen und andere kardiale Implantate, implantierbare Defibrillatoren und Herzschrittmacher, Neurostimulatoren, Cochlea-Implantate, Wirbelkörperersatzsysteme und Bandscheibenprothesen sowie Stents (Bundestag).

2.5.2 Anforderungskriterien an Knochenersatzmaterialien

Um eine Defektheilung zu ermöglichen, müssen KEMs bestimmte Kriterien erfüllen (Smeets et al. 2014). Die Begriffe Osteogenese, Osteoinduktion und Osteokonduktivität beschreiben die entsprechenden Eigenschaften. Als **Osteogenese** bezeichnet man die Fähigkeit eines KEMs neuen Knochen zu bilden. Dies wird durch lebende Zellen, die sich auf und in dem Knochenersatz befinden, gewährleistet (Greenwald et al. 2001; Blokhuis und Arts 2011; Smeets et al. 2018).

Osteoinduktion beschreibt die Fähigkeit eines Materials, MSCs zum Ort des Defektes zu rekrutieren, wo sie sich osteoblastär differenzieren und neuen Knochen bilden (Greenwald et al. 2001; Miron und Zhang 2012). Urist war einer der Ersten, der diesen Prozess unter dem Begriff „Autoinduktion“ zusammenfasste (Urist 1965).

Die Fähigkeit als Leitschiene für Osteoprogenitoren zu dienen, beschreibt der Begriff **Osteokonduktivität**. Die Oberfläche des Materials sollte so beschaffen sein, dass sich Osteoprogenitoren ansiedeln, vermehren und zu Osteoblasten differenzieren können, um konsekutiv Knochenmatrix zu bilden. Auch das Einwachsen von Gefäßen, welche für den Aufbau neuen Knochens unerlässlich sind, fällt unter den Begriff der Osteokonduktivität (Blokhuis und Arts 2011; Smeets et al. 2018).

Weiterhin spielt die **Osteointegration** eine entscheidende Rolle – darunter versteht man die Fähigkeit des Materials, eine enge Verbindung zum Lagerknochen herzustellen und so die bindegewebige Abkapselung des implantierten Materials zu verhindern (Albrektsson und Johansson 2001). Oberflächenstruktur (Ratner und Bryant 2004; Roach et al. 2007), Anordnung, Verteilung und Porengröße eines Materials (Porosität) beeinflussen diese Fähigkeit (Smeets et al. 2016).

KEMs sind in der Regel biodegradierbar (Bohner 2010). *In vivo* wird dieser Prozess durch Osteoklasten, ein- und mehrkernige Makrophagen sowie über chemisch-physikalische Prozesse (Hannink und Arts 2011; Miron und Bosshardt 2016; Smeets et al. 2018) durch Auflösung des Materials oder dessen Korrosion vermittelt (Bohner 2010). Ob und auf welche Art ein Knochenersatzmaterial letztlich abgebaut wird, hängt sowohl von den spezifischen

Materialeigenschaften als auch von den biologischen Voraussetzungen im Bereich der Implantationsstelle ab (Hannink und Arts 2011).

Ebenfalls von großer Bedeutung sind die Sterilisierbarkeit und die gute Gewebeverträglichkeit, sprich Biokompatibilität der Materialien. Toxische, mutagene oder infektiöse Effekte sowie immunologische Reaktionen müssen sicher auszuschließen sein. Auch eine lange Lagerbarkeit erweist sich von Vorteil. Als Goldstandard gilt autogener Knochenersatz (Boyce et al. 1999; Schnettler et al. 2003; Sakkas et al. 2017). Ein ideales synthetisches Knochenersatzmaterial, welches biokompatibel, degradierbar, osteokonduktiv, osteoinduktiv, gleichwohl dem natürlichen Knochen in struktureller Hinsicht ähnlich, zudem einfach in der Handhabung und auch kostengünstig ist, ist zur Zeit jedoch noch nicht verfügbar (Kolk et al. 2012; Smeets et al. 2018).

2.5.3 Einteilung der Knochenersatzmaterialien

In der Literatur existieren aufgrund der großen Vielfalt hinsichtlich Herkunft, Vitalität, biologischer Wertigkeit und Zusammensetzung zahlreiche Klassifikationssysteme (Rueger 1998; Bauer 2007; Schieker et al. 2008; Rentsch et al. 2012; Kolk et al. 2012; Rothamel et al. 2015). Schieker und Kollegen definieren KEMs als Materialien, die nach der Implantation strukturelle Elemente des Knochens ersetzen und damit den Knochenheilungsprozess fördern (Schieker et al. 2008).

2.5.3.1 Natürliche Knochenersatzmaterialien

Zu den natürlichen KEMs zählen autogene, allogene und xenogene Materialien (Rueger 1998; Schnettler et al. 2004; Schieker et al. 2008; Kolk et al. 2012; Smeets et al. 2018; Perić Kačarević et al. 2019).

Autogener Knochenersatz

Sind Spender und Empfänger des Knochenersatzes ein Individuum, handelt es sich um autogenen Knochenersatz (Kolk et al. 2012). Dabei wird an einer Stelle des Körpers Knochen entnommen, um diesen an anderer Stelle einzusetzen (Wang und Yeung 2017). Verwendet werden Spongiosa, Kortikalis oder kortikospongiöse Knochentransplantate (Horch und Pautke 2006). Autogener Knochenersatz stellt gegenwärtig aufgrund seiner osteogenen, osteoinduktiven und osteokonduktiven Eigenschaften den Goldstandard dar (Sakkas et al. 2017; Wang und Yeung 2017; Yamada und Egusa 2018). Dennoch gibt es auch Nachteile: zur

Entnahme des autogenen Materials ist ein Zweiteingriff erforderlich, der zu Komplikationen wie Infektionen, Hämatomen und zusätzlichen Schmerzen führen kann. Auch die Menge des zu entnehmenden Materials ist stark beschränkt (Rueger 1998; Wang und Yeung 2017).

Allogener Knochenersatz

Allogener Knochenersatz stammt von einem anderen Individuum der gleichen Art und kann sowohl von toten als auch von lebenden Spendern stammen, wobei sich letzteres auf operativ entnommene Hüft- und Kniegelenke beschränkt (Rothamel et al. 2015). Vorteile des allogenen Knochenersatzes sind sowohl osteoinduktive wie auch osteokonduktive Eigenschaften, wobei keine Osteogenese im Sinne der Übertragung lebender Zellen erfolgt (Kolk et al. 2012). Die fehlende Entnahmemorbidität und kürzere Operationszeiten sind Vorteile gegenüber dem Einsatz von autogenem Knochenersatz (Smeets et al. 2018).

Obwohl die gewonnenen allogenen Transplantate aufwendig mithilfe von Kältekonserverung oder Hitzedesinfektion bearbeitet und gereinigt werden, verbleibt das Risiko der Übertragung von Krankheitserregern. Auch immunologische Reaktionen können bei dem Empfänger auftreten (Mistry und Mikos 2005; Smeets et al. 2018). Allogener Knochenersatz wird in Knochen (Spongiosa oder Kortikalis) sowie demineralisierte Knochenmatrix unterteilt (Rentsch et al. 2012). Eine weitere Einteilung ist hinsichtlich Lagerungs- und Prozessierungsverfahren möglich (Rothamel et al. 2015).

Xenogener Knochenersatz

Stammt der Spender des Ersatzmaterials von einer anderen Art als der Empfänger, handelt es sich um xenogenen Knochenersatz. Dieser kann sowohl tierischen wie auch pflanzlichen Ursprungs sein (Smeets et al. 2018). Die amerikanische *Food- and Drug Administration* (FDA) definiert xenogene Transplantate als lebende Materialien oder Materialien, die vor Implantation Kontakt mit lebenden Materialien hatten (Rentsch et al. 2012). Auf pflanzlicher Seite sind Algen für die Gewinnung von Knochenersatz maßgeblich, auf tierischer Seite v. a. die anorganische Komponente des bovinen Knochens. Xenogener HA gilt als stabil, er besitzt osteokonduktive Eigenschaften und insbesondere bovines Knochenmaterial weist hinsichtlich der Porosität eine große Ähnlichkeit zu humanem Knochen auf (Kolk et al. 2012). Das Risiko einer Krankheitsübertragung ist bei xenogenen Materialien prinzipiell nicht auszuschließen, wobei die Übertragung von z. B. boviner spongioformer Enzephalopathie aufgrund des Herstellungsprozesses jedoch nahezu ausgeschlossen ist (Smeets et al. 2014).

2.5.3.2 Alloplastische Knochenersatzmaterialien

Zu den synthetischen, alloplastischen KEMs zählen Keramiken, Zemente, Polymere und Metalle (Kolk et al. 2012).

Keramiken

Die Keramiken umfassen insbesondere Calciumphosphatkeramiken, Biogläser und Glaskeramiken. Es existieren darüber hinaus auch noch andere Keramiken, wie z. B. Aluminiumkeramiken (García-Gareta et al. 2015).

- **Calciumphosphatkeramiken**

Calciumphosphatkeramiken können aus verschiedenen Grundsubstanzen bestehen, zu denen HA und TCP gehören. Innerhalb der TCPs sind β -TCP und α' - sowie α -TCP zu unterscheiden (Carrodegua und Aza 2011). Auch Kombinationen von HA und TCP sind möglich, diese werden als biphasische Keramiken bezeichnet.

Hergestellt werden Calciumphosphatkeramiken durch Sinterung und Formgebungsverfahren, in denen hoher Druck und Temperaturen von 1000–1500 °C angewendet werden (Smeets et al. 2018). Hauptvorteil dieser Keramiken sind eine ausgezeichnete Biokompatibilität und Osteokonduktivität (Wang und Yeung 2017; Smeets et al. 2018). Sie gelten jedoch als nicht-osteinduktiv, wobei auch hier Studien existieren, die diesem Material eine inerte Osteoinduktion zuweisen (LeGeros 2008). Von Nachteil sind die langsame Degradation dieser Materialien und eine Brüchigkeit durch ihre geringe mechanische Stabilität (Mistry und Mikos 2005). Durch die synthetische Herstellung sind Keramiken theoretisch unbegrenzt verfügbar und eine Krankheitsübertragung ist ebenfalls ausgeschlossen (Schnettler et al. 2004). Als Darreichungsformen von Keramiken existieren Formkörper wie auch Granulate mit unterschiedlicher Porosität. Synthetische HA-Keramiken werden zur Beschichtung von metallischen Implantaten verwendet, da diese eine hohe Oberflächenkonduktivität aufweisen (Smeets et al. 2018). Weder immunogene noch toxische Eigenschaften sind im Hinblick auf HA oder β -TCP bekannt (Kolk et al. 2012).

- **Synthetischer Hydroxylapatit als Bestandteil von Keramiken**

Synthetisch hergestellter HA ist mit dem natürlichen HA chemisch nahezu identisch (Smeets et al. 2014). Abhängig vom pH-Wert kommen jedoch bei 37 °C zwei stabile Formen vor: bei einem pH-Wert unter 4,2 der Brushit ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) und bei pH-Werten

über 4,2 der HA ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). Synthetischer HA weist eine gute Biokompatibilität auf, ist osteokonduktiv, bioaktiv und in der Lage, Proteine und Wachstumsfaktoren zu binden (Rh Owen et al. 2018). Die Abgabe von Calcium- und Phosphationen ist möglich. Im Verlaufe der Heilung kommt es zu einem nicht mehr abgrenzbaren Keramik-Knochen-Verbund, was auch als Verbundosteogenese bezeichnet wird (Smeets et al. 2014). Aufgrund der hohen Verschleißresistenz und der damit verbundenen langen Lebensdauer und dem gleichzeitig niedrigem Gewicht eignet er sich gut als Ersatzmaterial (Smeets et al. 2014; Rh Owen et al. 2018). Die Fähigkeit zur Osteointegration kann durch verschiedene Modifikationen verbessert werden. Dazu gehören Silikat- oder Karbonatsubstituierungen (Smeets et al. 2014) und Zusätze von BMP oder Stammzellen (LeGeros 2008; Liu et al. 2016).

- **Tricalciumphosphat als Bestandteil von Keramiken**

Prinzipiell werden drei Arten von TCPs ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) unterschieden: α -TCP und α' -TCP als *high-temperature*-Formen sowie β -TCP als *low-temperature*-Form (Carrodegua und Aza 2011). α' -TCP ist dabei nur bei einer Temperatur von mehr als 1430 °C stabil und damit als KEM uninteressant, da es bei niedrigeren Temperaturen zu α -TCP umgewandelt wird. β -TCP wirkt osteokonduktiv und wird, einhergehend mit dem Aufbau von neuem Knochen, innerhalb weniger Monate abgebaut (Horch et al. 2006). Obgleich ihm eine gute Biokompatibilität zugestanden wird, kann der Einsatz von β -TCP zu entzündlichen Reaktionen und einem Volumenverlust im Bereich des Defektes aufgrund der schnellen Abbauvorgänge führen (Kolk et al. 2012). Das Calcium-Phosphat-Verhältnis von β -TCP beträgt 1,5, und im Vergleich zu HA besitzt es ein feineres interkonnektierendes Porensystem, welches die Einwanderung von Zellen und Blutgefäßen begünstigt, gleichzeitig aber auch zu einer geringeren mechanischen Stabilität führt (Wang und Yeung 2017). Eingesetzt wird β -TCP – sowohl mono- als auch biphasisch – in Keramiken und Kompositen (Carrodegua und Aza 2011).

- **Biogläser und Glaskeramiken**

Biogläser zählen zu den Keramiken (García-Gareta et al. 2015). Als amorphe Materialien bestehen sie aus sauren (z. B. Phosphorpentoxid, Siliciumdioxid, Aluminiumoxid) und basischen Oxiden (z. B. Calciumoxid, Magnesiumoxid, Zinkoxid). Auch Calciumfluorid kann ein Bestandteil sein (Smeets et al. 2014). Je nach Bioglas werden die verschiedenen Komponenten gemischt und bei 1500 °C geschmolzen. Dabei entsteht

ein 3D-Netzwerk, auf dem sich Metallionen ablagern (Kolk et al. 2012; Smeets et al. 2014). Biogläser weisen ein interkonnektierendes Porensystem auf (Kolk et al. 2012) und ermöglichen aufgrund ihrer Bioaktivität ein Abscheiden von HA auf ihrer Oberfläche. Erhältlich sind Biogläser in kompakter und poröser Form, werden aber aufgrund ihrer geringen mechanischen Festigkeit nur bei wenigen Indikationen verwendet (Smeets et al. 2018). Glaskeramiken bestehen aus auskristallisiertem Material und besitzen im Vergleich zu den amorphen Biogläsern die höhere mechanische Festigkeit bei einer gleichzeitig geringeren Bioaktivität (García-Gareta et al. 2015). Durch die Freisetzung einer Reihe von Ionen stimulieren Biogläser und Glaskeramiken die Osteogenese über eine Einflussnahme auf das Zellverhalten von Osteoprogenitoren und die Blutgefäßneubildung. Auch antimikrobielle bzw. biozide Eigenschaften werden durch die Freisetzung einiger Metallionen (z. B. Silber, Zink, Kupfer) vermittelt (Smeets et al. 2018).

Zemente

- **Calciumphosphatzemente**

Calciumphosphatzemente spielen bereits seit den 1980er Jahren eine Rolle im Rahmen des *Bone Tissue Engineering* (Legeros 1988; Mirtchi et al. 1989; Wang und Yeung 2017). Man unterscheidet Ein- und Zwei-Komponenten-Systeme (Rentsch et al. 2012). Über eine isotherme Reaktion härten die Zemente aus, nachdem sie in die Defekte eingebracht bzw. injiziert wurden. Sie zeichnen sich durch eine hohe Mikroporosität und gute Biokompatibilität aus (Rentsch et al. 2012; Wang und Yeung 2017). Zudem gelten sie als osteokonduktiv und degradierbar (Rentsch et al. 2012). Calciumphosphatzemente werden in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie sowie der Oralchirurgie angewendet und eignen sich besonders für eine Defektfüllung im ersatzstarken Lager (Smeets et al. 2018). Klinischen Einsatz finden sie ebenfalls in der rekonstruktiven Knochenchirurgie (Schnettler et al. 2004), der Kyphoplastie und bei osteoporotisch bedingten Frakturen (Lode et al. 2018).

- **Polymethylmethacrylatzemente**

Als eine der ältesten verwendeten synthetischen Materialien kommen Polymethylmethacrylatzemente (PMMA-Zemente) bereits seit den 1950er Jahren im Rahmen der Prothesenchirurgie zum Einsatz (Smeets et al. 2018). Bei einem PMMA-Zement handelt es sich um ein synthetisches, nicht-resorbierbares, glasartiges Polymer, welches extrem druckfest und hart ist. Bei seiner Aushärtung kommt es jedoch zur

Wärmeentwicklung, die zu thermischen Schäden im umliegenden Gewebe führen kann. PMMA-Zemente sind nicht degradierbar, sodass ein knöcherner Durchbau, der für die Langzeitstabilität notwendig ist, nicht stattfindet. PMMA-Zemente weisen weder osteogene, osteoinduktive noch osteokonduktive Eigenschaften auf. Eingesetzt werden sie zur Verbundosteosynthese oder Vertebroplastie (Rentsch et al. 2012).

Synthetische Polymere

Zu den synthetischen Polymeren, die als KEMs genutzt werden, gehören u. a. Poly- α -Hydroxy-Ester, Polymilchsäuren (poly-L-lactic acid (PLLA)), Poly(glycolic acid) (PGA) und PLGA. Auch Kombinationen verschiedener synthetischer Polymere sowie die Zugabe von Wachstumsfaktoren oder Zellen sind möglich (Mistry und Mikos 2005). Aufgrund der Möglichkeit zur Herstellung von Polymeren verschiedener Porositäten, unterschiedlicher Degradationsraten und Formen weist die Gruppe synthetischer Polymere eine große Heterogenität und Vielseitigkeit auf (García-Gareta et al. 2015). Synthetische Polymere zeichnen sich durch eine gute Biokompatibilität sowie eine geringe lokale Entzündungsreaktion aus (Smeets et al. 2014). Ein Nachteil dieser Gruppe ist jedoch die geringe mechanische Stabilität (García-Gareta et al. 2015).

Metalle

Implantate, die aus Eisen, Kobalt oder Titan bestehen, werden dauerhaft als Füllmaterial oder zur internen Fixation verwendet und sind den alloplastischen KEMs zugeordnet (Kolk et al. 2012). Materialermüdung oder Korrosion können auftreten und ein weiterer Nachteil rein metallischer Ersatzmaterialien ist, dass die mechanische Belastbarkeit größer als die des Knochens ist. Somit ‚absorbieren‘ sie einen Großteil der mechanischen Kraft, die für die Heilung des Knochens essenziell ist. Eine Entfernung des Implantats kann so notwendig werden (Mistry und Mikos 2005).

Anwendung finden Metalle unter anderem als künstliche Hüftgelenke, Zahnersatz sowie Knochenschrauben und -platten (Xiao et al. 2017).

Metalle können zudem als Komponenten eines KEMs verwendet werden. Einige Metallionen sind essenzielle Bestandteile verschiedener Gewebe und beteiligen sich bei wichtigen Prozessen, wie der Proliferation und Differenzierung von Zellen. Da diese Prozesse auch während der Remodellierung, der Frakturheilung und der Degradation von KEMs von Bedeutung sind, erfahren Metallionen und ihre Einsatzmöglichkeiten im Rahmen der Knochenheilung großes Interesse von Seiten der Forschung und klinischen Anwendung, wie es

in einem Übersichtsartikel von Glenske und Kollegen dargelegt ist (Glenske et al. 2018). Im Folgenden werden daher die wichtigsten Metalle bzw. Metallionen genauer beschrieben:

- **Magnesium (Mg^{2+})**

Magnesium ist ein Erdalkalimetall und gehört zur 2. Hauptgruppe des Periodensystems (Jahnen-Dechent und Ketteler 2012). Magnesium ist ein Cofaktor für über 300 enzymatische Reaktionen, es ist für die Synthese von Proteinen und Nukleinsäuren sowie den Transport von Calcium und Kalium unerlässlich und spielt im Energiestoffwechsel sowie der Transphosphorylierung von Adenosintriphosphat (ATP) eine entscheidende Rolle (Saris et al. 2000; Jahnen-Dechent und Ketteler 2012). Im Organismus befindet sich ein Großteil des Magnesiums im Knochen. 50–60 % davon sind an der Oberfläche des mineralischen HA zu finden (Vormann 2003; Jahnen-Dechent und Ketteler 2012). Die Aufnahme von Magnesium erfolgt alimentär (Mineralwasser und grünes Gemüse), wobei der tägliche Bedarf bei ungefähr 310–360 mg für Frauen und 400–420 mg für Männer liegt. Die Resorption von Magnesium erfolgt über den Darm, die Ausscheidung über die Nieren. Über das Blut werden Knochen, Muskeln und andere Gewebe versorgt (Jahnen-Dechent und Ketteler 2012). Bei einem Abfall der Magnesiumkonzentration im Blutplasma ist es dem Körper möglich, Magnesiumionen aus dem Knochen zu mobilisieren (Vormann 2003). Aufgrund der Fähigkeit *in vitro* die Differenzierung von Knochenzellen sowie *in vivo* die Neubildung von Knochen anzuregen, gewinnen Magnesium-basierte KEMs an Bedeutung (Charyeva et al. 2016; Glenske et al. 2018). Magnesium fördert zudem die Proliferation von MSCs, stimuliert die Osteogenese (Díaz-Tocados et al. 2017; Won et al. 2017), steigert die Viabilität von Präosteoblasten (Wong et al. 2016), die Kalzifizierung von Knochen sowie die Bildung von Calciumphosphat (Charyeva et al. 2016).

Glenske und Kollegen beschreiben in einem Übersichtsartikel, dass magnesiumbasierte Materialien bisher kaum in der Praxis vertreten sind, obwohl sie degradierbar sind (Glenske et al. 2018). Magnesiumlegierungen sollen eine gute Biokompatibilität sowie Biosicherheit aufweisen (Ding 2016). Von Nachteil ist jedoch die Entstehung von Gas bei der Degradation von Magnesium zu Magnesiumhydroxid sowie die Verschiebung des pH-Werts ins Alkalische, was nachteilige Effekte auf die Vitalität von Zellen haben kann (Weng und Webster 2013). Bei Magnesium-basierten KEMs kann es zudem zu einer unkontrollierten Degradation einhergehend mit einer akuten toxischen Reaktion kommen (Ding 2016). Hohe extrazelluläre Magnesiumkonzentrationen haben weiterhin einen hemmenden Einfluss auf die Bildung der ECM und die Expression von Coll (Li et al. 2018a).

- **Strontium (Sr²⁺)**

Strontium, das Element mit der Ordnungszahl 38, ist Bestandteil der 2. Hauptgruppe im Periodensystem der Elemente und gehört neben Magnesium und Calcium zu den Erdalkalimetallen. In reiner Form kommt es nicht vor, da es schnell zu dem gelblichen Strontiumoxid oxidiert. Bekannt ist es v. a. in Form der Mineralien Coelestin (SrSO₄) und Strontianit (SrCO₃). Im Organismus ist Strontium ein Spurenelement, es gilt als nicht essenziell. Es kommt im Boden und im Wasser vor. Hauptquellen sind Gemüse und Getreide. Strontium wird gastrointestinal aufgenommen und hauptsächlich über die Nieren ausgeschieden (Pors Nielsen 2004; Pilmane et al. 2017). 99 % des Gesamtstrontiumgehaltes des Körpers befinden sich im Knochen, wo es an die Mineralphase des Knochens bindet (Pilmane et al. 2017). Die Wirkung von Strontium auf den Knochen beruht auf dem *dual effect* (Bonnelye et al. 2008): es ist in der Lage die Knochenneubildung zu stimulieren, während es gleichzeitig die osteoklastäre Resorption von Knochen hemmt (Zhang et al. 2011) bzw. die Osteoklastengenese verzögert (Schumacher et al. 2016).

In vivo erhöht Strontium die Knochenmasse und -dichte, verbessert die mechanischen Eigenschaften des Knochens und reduziert das Auftreten von Wirbel-, Hüft- und anderen Frakturen (Bonnelye et al. 2008; Pilmane et al. 2017). Als Strontiumranelat ist es in mehr als 70 Ländern zur Therapie der Osteoporose zugelassen (Pilmane et al. 2017). In Europa wird es seit 2004 eingesetzt (Glenske et al. 2018). Dennoch werden Strontium auch einige unerwünschte Wirkungen zugeschrieben. So soll die systemische Verabreichung von Strontiumranelat das Risiko von venösen Thrombembolien und Herzinfarkten steigern (Atteritano et al. 2016).

In vitro steigert Strontium die osteogene Differenzierungsfähigkeit von osteoblastären Zellen (Singh et al. 2016), einschließlich der Bildung der ECM durch die Aktivierung des kanonischen Wnt/β-Catenin-Signalweges (Yang et al. 2011). Experimentell wurde an murinen, aus Kalvarien-abgeleiteten Zellen gezeigt, dass die Zahl der *bone nodules* bereits ab einer Konzentration von 0,1 mM Strontium ansteigt und osteoblastäre Marker wie ALP, BSP und Ocn hochreguliert werden (Bonnelye et al. 2008).

Bislang existiert eine große Bandbreite Strontium-haltiger KEMs, die *in vitro* (Schumacher et al. 2016; Lei et al. 2017) und *in vivo* (Ge et al. 2018; Zhao et al. 2020) untersucht wurden. Es handelt sich um Strontium-haltige Biogläser (Kargozar et al. 2019), HA-Polysaccharide (Ehret et al. 2017), Biokeramiken auf Grundlage von HA (Zhao et al. 2020), HA/Chitosan-*scaffolds* (Lei et al. 2017), HA-beschichteten PLLA-*scaffolds* (Ge et al. 2018) oder um Calciumphosphatzemente, die mit Strontium substituiert wurden (Schumacher et al. 2016).

- **Calcium (Ca²⁺)**

Calcium ist das am häufigsten vorkommende Mineral im menschlichen Organismus (Lemann et al. 1979). 99 % des Gesamtgehaltes befinden sich im Knochen und den Zähnen. Im Knochen liegt Calcium als HA vor (Zhu und Prince 2012). Milch und Molkereiprodukte sind reich an Calcium. Dieses wird intestinal resorbiert und kann in den Knochen eingelagert werden. Die Exkretion erfolgt über die Nieren (Zhu und Prince 2012). Intrazelluläres Calcium wirkt als sekundärer Botenstoff und bindet extrazellulär an den calciumsensitiven Rezeptor (*calcium sensing receptor* (CaSR)). Dieser aktiviert intrazelluläre Signalkaskaden, die Einfluss auf die Zellmigration, Proliferation, Differenzierung und Angiogenese nehmen (González-Vázquez et al. 2014). Extrazelluläre Calciumionen beeinflussen dosisabhängig die Differenzierung von Stromazellen und Osteoblasten (Wagner et al. 2017b; Kruppke et al. 2019a). Wagner und Koautoren zeigten, dass steigende extrazelluläre Calcium-Konzentrationen mit einem Anstieg der Connexin (Cx) 43- und BSP-Expressionen und der osteogenen Differenzierung einhergehen. Die Mineralisation der ECM steigt mit steigender Calcium-Konzentration (Wagner et al. 2017b). Ebenfalls werden osteogene Marker wie ALP, Ocn, Opn und Colla durch extrazelluläres Calcium vermehrt exprimiert (Barradas et al. 2012; González-Vázquez et al. 2014). Bei niedrigen extrazellulären Calciumkonzentrationen zeigen Osteoblasten eine reduzierte Vitalität, Proliferation und Differenzierung (Wagner et al. 2017a). Mit Blick auf die knochenabbauenden Osteoklasten wirken sich hohe Calciumkonzentrationen hemmend auf die Osteoklastengnese aus und induzieren vermehrte Apoptosen dieser Zellen. Die durch hohe extrazelluläre Calcium-Konzentrationen vermittelte verminderte Differenzierungskapazität von Osteoklasten steht mit der Expression von Cx43 in Zusammenhang (Glenske et al. 2014).

- **Zink (Zn²⁺)**

Zink, als essenzielles Spurenelement, spielt für das Immunsystem, die Zellteilung und die Entwicklung des Skeletts eine herausragende Rolle (Frassinetti et al. 2006). Zudem steht es in struktureller, katalytischer und regulatorischer Weise mit bestimmten Metalloenzymen wie der ALP in Verbindung (Wang und Yeung 2017). Zink ist in der Lage, die Mineralisation der ECM sowie die Expression von ALP und Opn zu steigern (Zhu et al. 2017). In Hinblick auf die Resorption von Knochen und die Osteoklastengnese wurden supprimierende Effekte festgestellt (Wang und Yeung 2017). Zink als Bestandteil eines

Komposits wirkt antimikrobiell und besitzt eine ausgezeichnete Biokompatibilität (Chen et al. 2016).

- **Kupfer (Cu⁺/Cu²⁺)**

Kupfer gehört zu den essenziellen Mineralien des Körpers und existiert als reduzierte (Cu⁺) und oxidierte (Cu²⁺) Form. Es übernimmt zahlreiche Funktionen im Organismus (Festa und Thiele 2011). Neben der Funktion im Eisenmetabolismus ist es als Cofaktor an vielen weiteren enzymatischen Reaktionen beteiligt. Vor allem die Fähigkeit zur Stimulation der Angiogenese ist von Bedeutung, was im Rahmen der Frakturheilung entscheidend ist (Elrayah et al. 2018; Romero-Sánchez et al. 2018). Zudem regt Kupfer die Knochenbildung an und weist antimikrobielle Eigenschaften auf (Prinz et al. 2017).

- **Silicium (Si⁴⁺)**

Silicium ist das zweithäufigste Element, welches auf der Erde zu finden ist. Anionen, die Silicium enthalten, werden als Silikate bezeichnet. Es ist v. a. im Knochen und im Bindegewebe als Bestandteil von Glycosaminoglycanen und deren Proteinkomplexen zu finden (Wang und Yeung 2017). *In vitro* wurde eine Aktivierung der Osteogenese und vermehrte Bildung der ECM durch SCs nach Kultivierung in Gegenwart von Silikat-basierten KEMs beobachtet (Wagner et al. 2017a). Auf osteoklastärer Seite stimuliert Silikat möglicherweise die Fusion osteoklastärer Vorläuferzellen (Wagner et al. 2019).

2.5.3.3 Komposite

Komposite bestehen aus mindestens zwei Materialien, die grundsätzlich aus jeder der oben genannten Gruppen stammen können. Damit repräsentieren sie eine große und heterogene Gruppe von KEMs, wobei das durch die Kombination von Einzelkomponenten entstehende Kompositmaterial die jeweiligen Vorteile der Einzelkomponenten in sich vereinen soll.

Aufgrund der vielfältigen Kombinationsmöglichkeiten ist eine Einteilung dieser Klasse schwierig, obgleich einige Autoren folgende Unterteilung vornehmen (Smeets et al. 2018):

- Anorganik-Anorganik-Komposite,
- Organik-Organik-Komposite,
- Anorganik-Organik-Komposite,
- Xerogelege.

Um möglichst viele positive Eigenschaften zu verknüpfen, wird angestrebt, ein Kompositmaterial zu entwickeln, welches aus einem osteokonduktiven Leitgerüst besteht und gleichzeitig Proteine oder Faktoren enthält, die osteoinduktiv wirken, um so die Knochenheilung positiv zu beeinflussen (Kolk et al. 2012). Einige Proteine bzw. Faktoren werden bereits präklinisch und klinisch getestet. Dazu gehören: BMP, FGF, *vascular endothelial growth factors* (VEGF), Parathormon und *platelet-rich plasma* (PRP) (Wang und Yeung 2017). Auch die Kombination von Trägermaterialien mit lebenden Zellen ist von Interesse. Dabei werden Zellen, teilweise in Kombination mit Wachstumsfaktoren, auf Träger gebracht. Dies bietet die Möglichkeit, die drei wichtigen Eigenschaften Osteogenese, Osteokonduktivität und Osteointegration miteinander zu vereinen (Kolk et al. 2012).

2.6 Connexine und Pannexine

Bei Vertebraten existieren prinzipiell zwei *gap junction* Proteinfamilien: die Connexine (Cx) und die Pannexine (Panx). Beide regulieren unterschiedliche Funktionen durch den Austausch von kleinen Molekülen wie ATP und Ionen. Dieser Austausch geschieht einerseits zwischen den Zellen und dem Extrazellarraum mittels Halbkanälen (Hemikanäle, *hemichannels*), andererseits zwischen benachbarten Zellen via *gap junctions* im Dienste der Zell-Zell-Kommunikation (Bennett und Verselis 1992; Unger et al. 1999; Bruzzone et al. 2001; Scemes et al. 2007).

Bislang wurden mehr als 20 verschiedene Connexine nachgewiesen und die jeweiligen Funktionen beschrieben (Evans und Martin 2002). Über die Pannexine ist hingegen weit weniger bekannt, und seit ihrer Entdeckung im Jahre 2000 (Panchin et al. 2000) wurden bis heute lediglich 3 Pannexine (Panx 1–3) identifiziert (Panchin et al. 2000; Baranova et al. 2004; D'hondt et al. 2009). Pannexine bilden in der Regel Hemikanäle (Pannexone), sog. *single membrane channels*, vergleichbar mit den Connexin-basierten Hemikanälen (Orellana 2015). Obwohl die Sequenzhomologie von Connexinen und Pannexinen ausgesprochen niedrig ist (unter 16 %), zeigen sie eine auffallende Übereinstimmung hinsichtlich ihrer Proteinstruktur. Beide Proteinfamilien bestehen aus vier Transmembrandomänen, zwei extrazellulären und einem intrazellulären *loop* sowie aus jeweils einem N- und C-terminalen Ende (Penuela et al. 2013).

2.6.1 Connexin 43

Im Knochen kommen verschiedene Connexine, wie Cx43, Cx45, Cx46 Cx37 und Cx40 vor (Stains und Civitelli 2016). Cx43 stellt dabei das bei weitem am häufigsten vorkommende Connexin dar. Synthetisiert wird es nicht nur von Osteoblasten und Osteoprogenitoren, sondern auch von Osteozyten, wodurch ein Synzytium innerhalb des Knochens entsteht (Moorer und Stains 2017). Die Zell-Zell-Kommunikation mittels *gap junctions* zwischen Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten sowie zwischen Synovialzellen und Chondrozyten wird von Cx43 dominiert (Batra et al. 2012; Carpintero-Fernandez et al. 2018). Die *hemichannels* werden von sechs Untereinheiten gebildet (Connexone), deren Permeabilität variiert – je nachdem welche Connexine am Aufbau beteiligt sind (Moorer und Stains 2017). Die *hemichannels*, die von Cx43 in der Zellmembran gebildet werden, interagieren mit dem Extrazellularraum. Der Übersichtsartikel von Plotkin fasst zusammen, in wie weit diese von Cx43 gebildeten *hemichannels* im Knochen auf mechanische und pharmakologische Stimuli reagieren (Plotkin 2014).

Cx43 gilt als ein Marker der osteogenen Differenzierung (Stains und Civitelli 2016; Buo et al. 2017), der bei der Untersuchung von KEMs hinsichtlich der Differenzierungskapazität von SCs (Wagner et al. 2017a; Wagner et al. 2017b) herangezogen wird. Aber auch bei der Biomaterial-assoziierten Differenzierung von Osteoklasten (Glenske et al. 2014) und FKRZ (Herde et al. 2007) spielt Cx43 eine wichtige Rolle. Der Effekt von Cx43 beruht auf verschiedenen nachgeschalteten intrazellulären Signalwegen einschließlich ERK, Proteinkinase C Typ δ (PCK δ), β -catenin und Proteinkinase A. Über ERK und PCK δ reguliert Cx43 die Aktivität der Transkription von Runx2, dem ‚Mastergen‘ der osteogenen Differenzierung. Auch Sp7 wird über ERK und damit über Cx43 beeinflusst. Die Aktivierung der Proteinkinase A resultiert in einer gesteigerten Expression von RANKL, der wiederum die Osteoklastengnese beeinflusst (Moorer und Stains 2017). An Mäusen wurde gezeigt, dass eine Deletion von Cx43 in Osteoblasten und Osteozyten in verminderter Knochenformation und reduzierter Remodellierung resultiert, und dass die mechanische Stabilität des Knochens während der Frakturheilung vermindert ist (Loiselle et al. 2013).

2.6.2 Pannexine

Gemeinsam mit Panx1 und Panx2 gehört Panx3 zur Familie der Pannexine. Hierbei handelt es sich um integrale Membranproteine, meist in Gestalt von Hemikanälen (Penuela et al. 2013),

die an der Ausschüttung von Calciumionen und ATP beteiligt zu sein scheinen (Hainz et al. 2018).

Panx1 wird in zahlreichen Geweben der Säugetiere exprimiert, und auch Panx2, bei dem zuerst angenommen wurde, dass es nur in neuronalem Gewebe vorhanden ist, zeigt eine weitere Verbreitung als ursprünglich angenommen (Bruzzone et al. 2003; Le Vasseur et al. 2014), während sich das Vorkommen von Panx3 auf wenige Gewebe bzw. Zellarten beschränkt (Penuela et al. 2013).

Panx1 gilt als Faktor des purinergen P2X/P2Y-Signalweges und hat damit Anteil an der Freisetzung von ATP (Makarenkova und Shestopalov 2014). Es ist ein Mediator der *find me*-Signale apoptotischer Zellen und der Rekrutierung von Phagozyten und spielt somit eine Rolle beim Entzündungsgeschehen (Chekeni et al. 2010). Die Panx1-mediierte ATP-Freisetzung resultiert in der Chemotaxis von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten, der Freisetzung proinflammatorischer Zytokine und der Aktivierung von T-Zellen (Makarenkova und Shestopalov 2014; Makarenkova et al. 2018). Diese Beteiligung von Panx1 im Rahmen der Inflammation wurde in verschiedenen Organen (Makarenkova et al. 2018) wie der Lunge (Riteau et al. 2010) und im Nervensystem (Bennett et al. 2012) nachgewiesen. Guerrero und Kollegen stellten mit Hilfe eines 3D-Kultursystems zur Testung eines makroporösen Polysaccharid-Gerüsts und unter Verwendung humaner SCs aus dem Knochenmark fest, dass die Expression von Panx1 und Panx3 mit der von Cx43 korreliert, und schlussfolgerten, dass alle drei Proteine in die osteogene Differenzierung involviert sind (Guerrero et al. 2018).

Anfangs wurde vermutet, dass sich die Verbreitung von Panx2 auf das Zentralnervensystem beschränkt (Bruzzone et al. 2003). Neuere Studien verweisen jedoch auf dessen Vorkommen in Organen wie der Niere, Leber, Retina, dem Gastrointestinaltrakt und dem Hoden (Penuela et al. 2013; Makarenkova et al. 2018) sowie in C2C12-Zellen und primären, aus Kalvarien-abgeleiteten Zellen der Maus (Ishikawa et al. 2011). Le Vasseur und Kollegen sprechen sogar von einer ubiquitären Verbreitung von Panx2 (Le Vasseur et al. 2014). Die Funktion von Panx2 könnte im Bereich der intrazellulären Kommunikation liegen (Le Vasseur et al. 2014), die genaue Bedeutung ist jedoch noch unklar (Lohman et al. 2019).

Panx3 wurde bislang in Osteoblasten, Chondrozyten und Fibroblasten nachgewiesen (Penuela et al. 2013) und bildet drei verschiedene Arten von Kanälen: *hemichannels*, *endoplasmic reticulum (ER) Ca²⁺ channels* und *gap junctions* (Ishikawa et al. 2019). Über die Aktivierung von intrazellulären Ca²⁺-Signalwegen moduliert Panx3 die Osteoblasten- und Chondrozytendifferenzierung (Ishikawa und Yamada 2016). Über den Wnt/ β -Catenin- und PKA/CREB-Signalweg inhibiert es zusätzlich die Proliferation von Osteoprogenitoren,

unterstützt via p21 den *cell cycle exit* und leitet gleichzeitig die Differenzierung zu Osteoblasten ein (Ishikawa et al. 2014). *In vivo* resultiert die Deletion von Panx3 bei Mäusen in einer gestörten Funktion hypertrophischer Chondrozyten sowie in einer Verzögerung der Differenzierung und Mineralisation von Osteoblasten (Oh et al. 2015). Die Expression von Panx3 wird von BMP2 gefördert, der einen essenziellen Differenzierungsfaktor im Rahmen der Knochenentwicklung darstellt. Der von Panx3 gebildete *hemichannel* entlässt intrazelluläres ATP in den Extrazellularraum, das dort an purinerge Rezeptoren bindet und den Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Proteinkinase B (Akt)-Signalweg aktiviert, der wiederum den von Panx3 gebildeten *ER Ca²⁺ channel* stimuliert, der daraufhin Calciumionen aus dem Lumen des ER entlässt. Somit steigt der intrazelluläre Calciumgehalt. Bindet Calcium in der Folge an Calmodulin, werden weitere Signalmoleküle, wie die Calmodulin-Kinase II und Calcineurin (CN), aktiviert. CN, gemäß seiner Funktion als Phosphatase, dephosphoryliert und aktiviert damit den Transkriptionsfaktor NFATc1. Dieser begünstigt unter anderem die Expression von Sp7 über einen Anstieg von ALP (Ishikawa und Yamada 2016).

Runx2 ist ebenso in der Lage, an den Panx3-Promoter zu binden und diesen zu aktivieren (Bond et al. 2011). Während der osteogenen Differenzierung kann Panx3 sowohl in Zellen aus der C2C12-Zelllinie als auch in primären, aus Kalvarien-stammenden Zellen gleichzeitig mit osteoblastären Markern wie Runx2, Sp7, ALP und Ocn nachgewiesen werden (Ishikawa et al. 2011). Zudem spielt Panx3 eine Rolle im Entzündungsgeschehen von Pulpazellen und reguliert negativ den NF- κ B-Signalweg (Song et al. 2017).

3 Material und Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Mesenchymale Stromazellen

Zur Isolierung der SCs dienten Kalvarien von Wistar-Ratten ($n = 3$ im 1. Vorversuch, $n = 2$ im Rahmen aller weiteren Versuche) im Alter von 7–9 Wochen. Die Ratten stammten aus dem Institut für Veterinär-Physiologie und Biochemie der Justus-Liebig-Universität Gießen (Herr Prof. Dr. Martin Diener). Für die Verwendung dieser Tiere liegt eine Tierversuchsgenehmigung (administrative Nummer: 577-M) vor. Tierhaltung und Euthanasie der Ratten wurden den deutschen und europäischen Tierschutzgesetzen entsprechend durchgeführt. Nach Euthanasie der Tiere erfolgte die Entnahme der Kalvarien. Anhaftendes Gewebe wurde unter der Sterilbank mithilfe von Skalpell, Schere und Pinzette entfernt. In Anlehnung an ein früheres Protokoll (Wenisch et al. 2005) wurden die Kalvarien in Teilstücke von 3–5 mm Größe zerschnitten. 4–8 dieser Teilstücke wurden jeweils in ein Well einer 6-Well-Platte (VWR International GmbH) platziert, das mit 5 ml Wachstumsmedium befüllt wurde. Die Zusammensetzung des Wachstumsmediums ist Tabelle 1 zu entnehmen. Die Platten wurden in den Brutschrank (37 °C und 5 % CO₂) verbracht. Bei einer Dichte von circa 80–90 % wurden die Primärzellen, die sich nun in Passage 0 befanden, kryokonserviert, um sie bei Bedarf auftauen zu können.

Tabelle 1: Zusammensetzung des Wachstumsmediums

Lösung	Menge/ 100 ml Ansatz (ml)	Hersteller
DMEM lg	79	Gibco® life technologies, Darmstadt, Deutschland
FBS	20	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
P/S	1	Gibco® life technologies, Darmstadt, Deutschland

DMEM lg = Dulbecco's Modified Eagle Medium low glucose, FBS = fetales bovines Serum, P/S = Penicillin/Streptomycin

Ablösen der mesenchymalen Stromazellen

Das Ablösen der adhärennten SCs erfolgte mittels TrypLE™ Express Enzyme (Gibco® life technologies). Die Zellen in den Wells der 6-Well-Zellkulturplatte wurden ein- bis zweimal mit angewärmten Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) gewaschen. Anschließend wurde 1 ml TrypLE™ Express Enzyme in die Wells gegeben, die dann im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ für 5 Minuten inkubiert wurden. Unter optischer Kontrolle hinsichtlich einer erfolgreichen Ablösung wurde die Reaktion mit 2 ml Basalmedium (BM, Tabelle 2) abgestoppt.

Die gesamte Flüssigkeit wurde nun mittels Pipette aufgezogen, zwei- bis dreimal über den Boden gespült und nach Überführung in ein Falconröhrchen zentrifugiert (153 x g für 5 Minuten). Das so entstehende Zellpellet wurde resuspendiert und nach Bedarf ausgesät oder kryokonserviert.

Tabelle 2: Zusammensetzung des Basalmediums

Lösung	Menge/ 100 ml Ansatz (ml)	Hersteller
DMEM lg	89	Gibco® life technologies, Darmstadt, Deutschland
FBS	10	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
P/S	1	Gibco® life technologies, Darmstadt, Deutschland

DMEM lg = Dulbecco's Modified Eagle Medium low glucose, FBS = fetales bovines Serum, P/S = Penicillin/Streptomycin

Kryokonservierung der mesenchymalen Stromazellen

Zur Kryokonservierung wurden die SCs vom Boden der Zellkulturflaschen abgelöst. Nach der Zellzählung mittels C-Chip Neubauer Improved (NanoEnTek Inc.) wurden 5 ml des kalten Einfriermediums (Tabelle 3) auf die Suspension gegeben und zentrifugiert (153 x g für 5 Minuten). Das so entstandene Pellet wurde dann in Einfriermedium (Tabelle 3) resuspendiert und in Kryokonservierungsröhrchen (Carl Roth GmbH + Co. KG) à 1 ml (100 000–2 000 000 Zellen/ml) überführt. Die Röhrchen wurden anschließend in die Einfrierhilfe Mr. Frosty (Nalgene®) verbracht und daraufhin für 24 Stunden bei –80 °C gelagert, um anschließend in flüssigen Stickstoff bei –196 °C aufbewahrt zu werden.

Tabelle 3: Zusammensetzung des Einfriermediums

Lösung	Menge/ 100 ml Ansatz [ml]	Hersteller
DMEM lg	65	Gibco® life technologies, Darmstadt, Deutschland
FBS	30	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
DMSO	5	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland

DMEM lg = Dulbecco's Modified Eagle Medium low glucose, DMSO = Dimethylsulfoxid, FBS = fetales bovines Serum

Auftauen der mesenchymalen Stromazellen

Zum Auftauen der Zellen wurden die Kryokonservierungsröhrchen aus dem Stickstoffbehälter entnommen und im Wasserbad kurz angetaut, um danach bei Raumtemperatur weiter

aufzutauen. Die Zelllösung wurde in Wachstumsmedium verbracht und bei einer relativen Zentrifugalbeschleunigung (RZB) von 98 x g für 5 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet in 1 ml Wachstumsmedium resuspendiert. Die Zellen wurden mit Hilfe des C-Chip Neubauer Improved (NanoEnTek Inc.) gezählt, die dem Bedarf entsprechende Zellzahl wurde in 75 cm²-Flaschen ausgesät und bei 37 °C und 5 % CO₂ für 5–7 Tage im Brutschrank inkubiert. Für die anschließenden Versuche wurden SCs der Passage 3 genutzt.

Osteogene Differenzierung der mesenchymalen Stromazellen

Im 2. Vorversuch wurden die SCs osteogen differenziert. Die Zusammensetzung des dazu verwendeten Mediums, folgend als osteogenes Differenzierungsmedium (OM) bezeichnet, ist der Tabelle 4 zu entnehmen.

Tabelle 4: Zusammensetzung des osteogenen Differenzierungsmediums

Lösung	Menge/Ansatz [ml]	Hersteller
DMEM lg	88	Gibco® life technologies, Darmstadt, Deutschland
FBS	10	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
P/S	1	Gibco® life technologies, Darmstadt, Deutschland
Ascorbinsäure (60 µm)	0,06	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
β-Glycerolphosphat (10 mM)	1	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Dexamethason (100 nM)	0,01	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland

DMEM lg = Dulbecco's Modified Eagle Medium low glucose, FBS = fetales bovines Serum, P/S = Penicillin/Streptomycin

Alizarinfärbung

Zum Nachweis von Calciumablagerungen (Chamberlain et al. 2007) im Rahmen der osteogenen Differenzierung wurden die SCs einer Alizarinfärbung unterzogen.

Fixierte Zellen wurden dreimal für je 3 Minuten mit zweifach destilliertem Wasser gewaschen. Anschließend erfolgte eine 15-minütige Inkubation mit Alizarinrot-S-Lösung (Carl Roth GmbH + Co. KG). Danach wurden die Zellen dreimal für je 10 Minuten mit zweifach destilliertem Wasser gewaschen.

3.1.2 Hämatopoetische Stammzellen

Die Isolierung der hämatopoetischen Zellen aus dem Knochenmark der Wistarratten erfolgte modifiziert nach dem Protokoll von Boraschi-Diaz und Komarova aus dem Jahr 2016 (Boraschi-Diaz und Komarova 2016).

Die zur Isolation der Zellen verwendeten Ratten stammten ebenfalls aus dem Institut für Veterinär-Physiologie und Biochemie der Justus-Liebig-Universität Gießen (Herr Prof. Dr. Martin Diener), für deren Verwendung ebenfalls die Tierversuchsgenehmigung (administrative Nummer: 577-M) vorliegt. Die Haltung der Tiere sowie deren Euthanasie im Rahmen des Experiments wurden den deutschen und europäischen Tierschutzgesetzen entsprechend durchgeführt. Zur Isolierung der hämatopoetischen Zellen wurden nach Euthanasie der Tiere Femora, Tibiae und Fibulae der 6–32 Wochen alten Wistarratten ($n = 2$ für jeden Versuchsansatz) entnommen. Nach grober Entfernung des anhaftenden Gewebes wurden die Knochen unter die Sterilbank verbracht. Dort erfolgten eine Reinigung mit DPBS sowie das Entfernen kleinerer, noch verbliebener Gewebereste. Die so aufbereiteten Knochen (Abbildung 2) wurden mit Hilfe einer Schere in der Mitte der Diaphyse quer in gleich große Hälften zerteilt und in passend zugeschnittene 1 000 μ l-Pipettenspitzen (nerbe Plus GmbH) gesteckt, welche

wiederum in ein Röhrchen (2 ml, Sarstedt AG & Co) verbracht wurden. Das eröffnete Knochenmark zeigte dabei nach unten. In dieser Halterung wurden die Stücke zur Isolation des Knochenmarks bei einer RZB von 13 845 g (3 x 30 Sekunden) zentrifugiert. Die so gewonnenen Zellen verblieben im Röhrchen, während die Pipettenspitze samt Knochen verworfen wurden. Mittels mehrmaligem Pipettieren mit 200 μ l BM wurde das Knochenmark suspendiert, in ein Falconröhrchen (Greiner bio-one) verbracht und auf ein Volumen von 10 ml mit BM aufgefüllt. Es erfolgte eine Zentrifugation für 5 Minuten bei einer RZB von



Abbildung 2: Femur, Tibia und Fibula einer Wistarratte nach Entfernung des anhaftenden Gewebes (Oben: Femur, unten: Tibia und Fibula).

153 x g. Die Überstände wurden verworfen und die Erythrozyten im Pellet in Red Blood Cell Lysis Buffer (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) für 10 Minuten gelöst. Nach Filtration durch einen 70 μ m Filter (Greiner bio-one) wurden die Zellen zweimal bei einer RZB von 153 x g für jeweils 5 Minuten zentrifugiert. Nach Zellzählung wurden je 25 000 000 Zellen/75 cm²-Flasche (Fisher Scientific GmbH) unter Zugabe von rekombinanten M-CSF (25 ng/ml,

PeproTech Germany) in das BM ausgesät und für 24 Stunden in den Brutschrank verbracht. Am nächsten Tag wurde das Medium mit den darin enthaltenden, nicht-adhären Zellen gesammelt und zentrifugiert (151 x g für 5 Minuten). Das Zellpellet wurde in BM resuspendiert, die Zellen wurden gezählt und die entsprechend benötigte Zellzahl (Kapitel 3.3) in Kokultur verbracht.

Im 3. Vorversuch sowie im Hauptversuch wurden die hämatopoetischen Zellen, die im Folgenden als OCVs bezeichnet werden, während der Kokultivierung mittels Zugabe der rekombinanten Faktoren RANKL und/oder M-CSF zur osteoklastären Differenzierung stimuliert. Die Zugabe von RANKL erfolgte in der Konzentration von 50 ng/ml und von M-CSF in der Konzentration von 25 ng/ml.

Fixierung der Zellen

Die SCs und OCVs wurden nach dem Waschen (2 x für je 2–3 Minuten) in DPBS für die weiterführenden Untersuchungen mit 4 % Paraformaldehyd (Carl Roth GmbH + Co. KG) für je 30 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Dazu wurden je 300 µl Fixans in ein 24-Well und je 1 ml in ein 6-Well gegeben. Nach der Fixation wurden die Zellen erneut zwei- bis dreimal mit DPBS gewaschen. Um eine Austrocknung zu vermeiden, verblieb 1 ml DPBS auf den Zellen. Die Zellkulturplatten wurden mit Parafilm (BEMIS Packaging Deutschland GmbH) luftdicht verschlossen und im Kühlschrank aufbewahrt.

TRAP-Enzymhistochemie

Fixierte OCVs wurden zunächst für 5 Minuten in destilliertem Wasser inkubiert, danach für 10 Minuten in Acetatpuffer. Im Anschluss wurde die TRAP-Färbelösung mittels Spritze (Braun) und Spritzenfilter (GE Healthcare GmbH) auf die Zellen gegeben, die dann für 25–60 Minuten in den Brutschrank (37 °C und 5 % CO₂) verbracht wurden. Nach optischer Kontrolle (deutliche Rotfärbung der Zellen) wurden die Zellen ein- bis zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen.

Acetatpuffer und TRAP-Färbelösung wurden selbst hergestellt. Zur Herstellung des Acetatpuffers wurden 4,1 g Natriumacetat p.a. (Merck KGaA, Darmstadt) mit 450 ml destilliertem Wasser aufgefüllt und mittels Rührer und Rührplatte gelöst. Dabei wurde der pH-Wert auf 5,2 mit 25%iger HCl eingestellt. Es erfolgte eine Auffüllung mit destilliertem Wasser auf ein Volumen von 500 ml.

Die TRAP-Färbelösung setzte sich, wie in Tabelle 5 dargelegt, zusammen.

Tabelle 5: Zusammensetzung der TRAP-Färbelösung

Substrat	Menge/25 ml Ansatz	Hersteller
Naphthol-AS-TR-Phosphat	35 mg	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
N-N-Dimethylfomamid	125 µl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Na-Acetatpuffer (0,1 M, pH 5,2)	25 ml	Eigene Ansetzung
Natrium-Tartrat	57,5 mg	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Echtrotsalz	35 mg	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland

Phalloidinfärbung

Um das Aktinzytoskelett der OCVs darzustellen, wurden diese mit dem Farbstoff Phalloidin gefärbt. Phalloidin ist ein Toxin aus dem grünen Knollenblätterpilz (*Amanita phalloides*). Es bindet an polymere Aktinfilamente der Zellen. Um dieses mittels Fluoreszenzmikroskopie sichtbar zu machen, wird Fluoreszenz-markiertes Phalloidin verwendet (Sigma-Aldrich Produktinformation).

Die Phalloidinfärbung erfolgte bei Raumtemperatur. Nach Fixation der Zellkulturen wurden diese für 10 Minuten mit 1 % Triton X in 1 x Tris-gepufferter Salzlösung (TBS) inkubiert. Danach erfolgten je 3 Waschungen für jeweils 3 Minuten mit DPBS. Anschließend wurde für 30 Minuten 1 % FBS in DPBS hinzugegeben. Nach dessen Entfernung wurde das Phalloidin-Fluorescence-Isothiocyanat (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) für 30 Minuten bei Raumtemperatur in Dunkelheit auf die Zellkulturen gegeben. Danach erfolgten erneut Waschungen mit DPBS (3 x für je 3 Minuten). Um die Zellkerne darzustellen, wurden die Zellen anschließend mit einem Hoechstfarbstoff (bisBenzimide H33258, Sigma-Aldrich Chemie GmbH) gefärbt. Dieser wurde für 5 Minuten bei Dunkelheit inkubiert. Nach erneuter Waschung (2 x für je 3 Minuten, DPBS) wurden die Zellen, die sich auf Glasplättchen befanden, auf einen Objektträger verbracht und dort mittels einem Tropfen ProLong™ Gold Antifade Mountant (Invitrogen) eingedeckt. Die Objektträger wurden bis zur weiteren Untersuchung in Objektträgermappen vor Licht geschützt im Kühlschrank gelagert.

3.2 Knochenersatzmaterialien

Die im Kokultursystem eingesetzten Strontium- und Magnesium-basierten KEMs (Tabelle 6) wurden von biotrics bioimplants AG (Deutschland) zur Verfügung gestellt. Aus den Komponenten Magnesiumchloridhexahydrat ($\text{MgCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$, Alfa Aesar), Magnesiumhydrogenphosphat (MgHPO_4 , Sigma-Aldrich Chemie GmbH), Strontiumchloridhexahydrat ($\text{SrCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$, Alfa Aesar) und Strontiumhydrogenphosphat (SrHPO_4 , Sigma-Aldrich Chemie GmbH) wurden Salzlösungen unterschiedlicher Konzentrationen hergestellt. Die KEM-Basiskomponente (Basis-KEM, Maxresorb[®] (botiss biomaterials GmbH), bestehend aus 60 % HA und 40 % β -TCP) wurde jeweils mit diesen Salzlösungen in unterschiedlicher Konzentration (Tabelle 6) kombiniert. Für die Herstellung des KEMs mit der Bezeichnung PLGA-MgSrCl-0,05 wurden die entsprechenden Salze zunächst in einer PLGA-Lösung gelöst. In Tabelle 6 sind die verwendeten Knochenersatzmaterialien zusammengefasst. Im Folgenden werden die Materialien im Sinne einer Kurzbezeichnung entsprechend des zugesetzten Salzes und dessen Konzentration (Angabe in mol/L) benannt.

Tabelle 6: Übersicht der verwendeten Knochenersatzmaterialien

Knochenersatzmaterial	Konzentration der Salzkomponente [mol/L]	Kurzbezeichnung
Basis-KEM	–	w/o
Basis-KEM + MgCl_2	0,1	MgCl-0,1
Basis-KEM + SrCl_2	0,1 / 0,01	SrCl-0,1 / SrCl-0,01
Basis-KEM + MgHPO_4	0,01	MgHP-0,01
Basis-KEM + SrHPO_4	0,01	SrHP-0,01
Basis-KEM + MgCl_2 + SrCl_2	0,05	MgSrCl-0,05
Basis-KEM + MgHPO_4 + SrHPO_4	0,005	MgSrHP-0,005
Basis-KEM + PLGA + MgCl_2 + SrCl_2	0,05	PLGA-MgSrCl-0,05

Basis-KEM = Maxresorb[®] (botiss biomaterials GmbH) bestehend aus 60 % HA und 40 % β -TCP (β -TCP = β -Tricalciumphosphat, HA = Hydroxylapatit, KEM = Knochenersatzmaterial, PLGA = Polylactid-co-glycolid)

3.3 Allgemeines Prinzip des indirekten Kokultursystems

Das hier konzipierte Kokultursystem sollte aus drei Kompartimenten bestehen (Abbildung 3). In das untere Kompartiment, welches dem Boden der 6-Well-Zellkulturplatte (Fisher Scientific GmbH) entsprach, in dem die Inserts geliefert wurden, wurden die SCs ausgesät. Die Fläche eines dieser Wells betrug 9,6 cm². Darin befanden sich zwei Inserts (Fisher Scientific GmbH) unterschiedlicher Größe, die ineinander gestellt waren und deren Böden aus einer Membran mit Poren der Größe 0,4 µm bestanden. Die Membran ermöglichte somit einen Austausch löslicher Faktoren bzw. Substanzen zwischen den verschiedenen Kompartimenten. Das mittlere Kompartiment mit einer Fläche von 4,1 cm², folgend

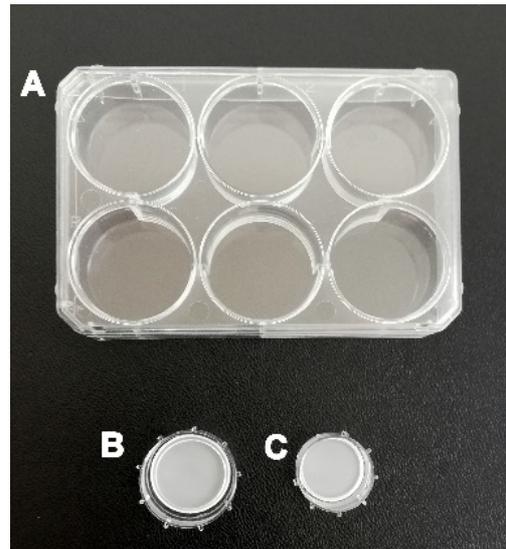


Abbildung 3: Einzelkomponenten des indirekten Kokultursystems. (A) 6-Well-Zellkulturplatte als Bodenkompartiment, (B) Insert 1, (C) Insert 2.

als Insert 1 bezeichnet, bot Raum für die Testung verschiedener KEMs. Im oberen Kompartiment, folgend bezeichnet als Insert 2 (Fläche: 3,14 cm²), wurden die OCVs ausgesät. Um später die Morphologie beurteilen zu können, erfolgte das Hereinlegen eines Glasplättchens mit einem Durchmesser von 13 mm in das Insert 2. Über das Medium standen die verschiedenen Kompartimente zwar in Verbindung, ein direkter Kontakt zwischen den SCs und den OCVs sowie zu den zu testenden KEMs bestand jedoch nicht. Nach Versuchsabschluss konnte jede Zellpopulation für sich für weiterführende Untersuchungen geerntet werden.

Indirekte Kokultur der mesenchymalen Stromazellen mit osteoklastären Vorläuferzellen

Nach Ablösung der SCs wurden diese in das untere Kompartiment der Kokultur mit einer Zellzahl von 100 000 Zellen pro Bodenkompartiment ausgesät. Nach 24 Stunden waren die Zellen adhärent und die Population der OCVs wurde dem Kokultursystem hinzugefügt. Dazu wurde Insert 1, je nach Versuchsaufbau unterschiedlich bestückt, mithilfe einer Pinzette auf den adhären Zellenrasen der SCs platziert. In dieses hinein wurde Insert 2, ebenfalls mithilfe einer Pinzette, gesetzt. Auf den Boden des Insert 2 wurde ein rundes Glasplättchen (Durchmesser: 13 mm) gelegt, um die dort befindlichen Zellen später zur weiteren Untersuchung zu entnehmen. In Insert 2 wurden 250 000 Zellen der OCVs ausgesät. Das Well der Kokultur wurde mit 5 ml Medium befüllt, sodass alle Kompartimente über das Medium in Verbindung standen. Ein Schema des indirekten Kokultursystems ist in Abbildung 4 dargestellt.

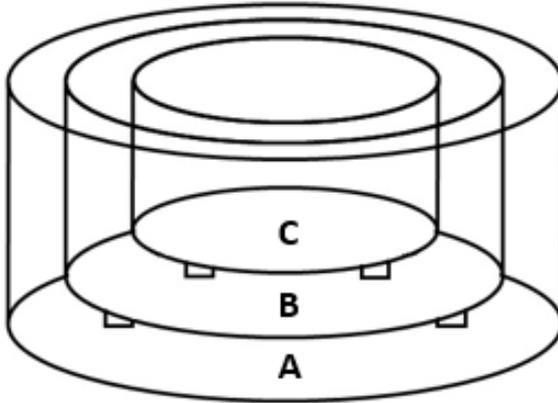


Abbildung 4: Schematische Darstellung des indirekten Kokultursystems. In das Bodenkompartment (A), in welchem SCs kultiviert wurden, wurde Insert 1 (B), entweder leer oder mit KEMs befüllt, platziert. In Insert 1 wurde Insert 2 (C) platziert, in dem sich die OCVs befanden.

Die Kokultur wurde anschließend in den Brutschrank (37 °C und 5 % CO₂) verbracht. Die jeweilige Inkubationsdauer ist den einzelnen Versuchen zu entnehmen (Kapitel 3.5, 3.6). Zusätzlich wurden für jeden Versuch (Kapitel 3.5, 3.6) Monokulturen der SCs und OCVs zur Kontrolle angelegt. Dazu wurden die SCs und die OCVs je nach Versuch in BM, BM unter der Zugabe von RANKL oder BM unter der Zugabe von RANKL und M-CSF kultiviert. Die SCs wurden zudem in Monokultur osteogen differenziert.

3.4 Molekularbiologische Untersuchungen

Herstellung von Zelllysaten für die spätere RNA-Extraktion

Die SCs und OCVs wurden mittels innuPREP RNA Mini Kit (Analytik Jena GmbH) lysiert. Zur Lyse der OCVs wurden die entsprechenden Glasplättchen aus Insert 2 entnommen und in Wells einer 24-Well-Zellkulturplatte gelegt. Die SCs wurden in ihrem Kompartiment lysiert.

Extraktion der total RNA

Die Extraktion der total RNA erfolgte nach Herstellerangaben mithilfe des innuPREP RNA Mini Kit (Analytik Jena GmbH). Die RNA-Gehalte wurden nach Ende der Behandlung photometrisch überprüft. Neben der Konzentration der RNA wurde auch die Reinheit jeder Probe mittels BioPhotometer bestimmt, welche zwischen 1,5 und 2,0 liegen sollte. Bis zur weiteren Untersuchung wurde die RNA im Gefrierschrank bei -20 °C aufbewahrt.

Verdünnung der RNA-Konzentration

Damit möglichst gleiche RNA-Konzentrationen vorlagen, wurden die zu untersuchenden Proben auf 100 µg/ml mit RNase-freiem Wasser verdünnt. Falls die Konzentration der vorliegenden Probe geringer war, wurde diese unverdünnt verwendet.

DNase-Behandlung

Um eventuell vorhandene Verunreinigungen der Proben mit genomischer Desoxyribonukleinsäure (DNA) auszuschließen, wurde eine DNase-Behandlung durchgeführt. Der dazu verwendete Mastermix setzte sich wie folgt zusammen:

Tabelle 7: Zusammensetzung des DNase-Mastermix

Substrat	Menge/ Probe [μ l]	Hersteller
MgCl ₂	1,2	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
DNase I recombinant Incubation Buffer	1,2	Roche Deutschland Holding GmbH, Grenzach-Wyhlen, Deutschland
DNase I recombinant (10 U/ μ l)	1,2	Roche Deutschland Holding GmbH, Grenzach-Wyhlen, Deutschland
Ambion™ RNase Inhibitor (40 U/ μ l)	0,3	Invitrogen, Eugene, Oregon, USA

Zu 3,9 μ l des DNase-Mastermix wurden 8,1 μ l, gegebenenfalls verdünnte, RNA der zu untersuchenden Probe pipettiert. Die Proben kamen daraufhin in den Thermocycler und wurden gemäß folgendem Programm inkubiert:

1. 35 Minuten bei 37 °C
2. 10 Minuten bei 75 °C
3. Abkühlen auf 4 °C

Um die Stabilität der RNA zu gewährleisten, wurde diese innerhalb von 30 Minuten weiterverarbeitet.

Synthetisierung der complementary DNA

Mithilfe des Enzyms Reverse Transkriptase (RT) wurde die zuvor gewonnene RNA in komplementäre DNS (*complementary DNA* (cDNA)) umgeschrieben (Tabelle 8).

Tabelle 8: Zusammensetzung des Mastermix zur cDNA-Synthese (+RT-Mix)

Substrat	Menge/ Probe [μ l]	Hersteller
MgCl ₂	12	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Gene Amp10X PCR Gold Puffer	6	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Applied Biosystems™ GeneAmp™ dNTP	24	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Random Hexamers	3	Invitrogen, Eugene, Oregon, USA
RNase Inhibitor (20 U/ μ l)	3	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
MultiScribe™ Reverse Transkriptase	3	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland

Von den umzuschreibenden Proben wurden je 60 µl Gesamtvolumen angesetzt, bestehend aus 51 µl des Mastermix zur cDNA-Synthese sowie 9 µl RNA. Um das Ergebnis der vorangegangenen DNase-Behandlung zu überprüfen, wurde parallel ein Mastermix angesetzt, der RNase-freies Wasser (QIAGEN GmbH) anstatt der RT enthielt (-RT-Mix). Je Probe wurden 1,5 µl RNA zu 8,5 µl des -RT-Mix gegeben. Die Gesamtheit der Proben wurde in den Thermocycler verbracht und folgendes Programm gestartet:

1. 8 Minuten bei 21 °C
2. 15 Minuten bei 42 °C
3. 5 Minuten bei 99 °C
4. 5 Minuten bei 5 °C
5. Abkühlen auf 4 °C

Qualitative Polymerase-Kettenreaktion

Um die erfolgreiche Synthetisierung der cDNA zu bewerten, wurde anschließend eine qualitative Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) mit dem Zielgen Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (GAPDH) durchgeführt, die anschließend per Gelelektrophorese ausgewertet wurde. Tabelle 9 zeigt die Zusammensetzung des dazu verwendeten Mastermix.

Tabelle 9: Zusammensetzung des PCR-Mastermix

Substrat	Menge/ Probe [µl]	Hersteller
MgCl ₂	0,5	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Gene Amp10X PCR Gold Puffer	1	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Primer GAPDH forward	0,25	Microsynth AG, Balgach, Schweiz
Primer GAPDH reverse	0,25	Microsynth AG, Balgach, Schweiz
RNase freies H ₂ O	7,93	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
AmpliTaq GOLD	0,0625	Roche Deutschland Holding GmbH, Grenzach-Wyhlen, Deutschland

Der Ansatz wurde aus 10 µl PCR-Mix und 2,5 µl cDNA hergestellt, so dass sich ein Probenvolumen von 12,5 µl je Probe ergab. Zusätzlich wurden Negativkontrollen erstellt, die statt cDNA RNase-freies Wasser enthielten (NTC, *no template control*). Im Thermocycler lief anschließend folgendes Protokoll:

1. 5 Minuten bei 95 °C
 2. 30 Sekunden bei 94 °C
 3. 30 Sekunden bei 60 °C
 4. 30 Sekunden bei 72 °C
 5. 1 Minute bei 72 °C
 6. Abkühlen auf 4 °C
- } Wiederholung für 35 Zyklen

Gelelektrophorese

Die erfolgreiche Amplifizierung der Genprodukte der qualitativen GAPDH-PCR wurde mittels Gelelektrophorese überprüft. Für die Herstellung des Gels wurde 1 g Agarosepulver (Bioline GmbH) in 50 ml des 1 x TRIS-Acetat-EDTA (TAE)-Puffers gelöst und in der Mikrowelle aufgeköcht bis eine klare, homogene Lösung entstand. Nach kurzer Zeit zur Abkühlung wurden 4 µl Gel Green™ nucleic acid stain (Biotium) hinzugegeben und das Gefäß bis zur vollständigen Homogenisierung geschwenkt. Das noch warme, flüssige Gel wurde dann in den vorbereiteten Schlitten samt Kämmen gegossen. Es wurde darauf geachtet, dass im Gel keine Luftblasen vorhanden und alle Kämmen gleichmäßig von Gel umgeben waren. Nach Aushärtung des Gels wurde dieses in die Gelelektrophoreselaufkammer verbracht. Zu jeder der zu untersuchenden Proben wurden 2 µl TAE-Puffer zugefügt. Zusätzlich zu den Proben wurde ein 50-Basenpaar (bp) Marker aufgetragen (2,5 µl/Geltasche). Von der jeweiligen Probe wurden 7 µl pro Tasche pipettiert. In der Kammer, die mit TAE-Puffer gefüllt war, wurde eine elektrische Spannung von 180 V bei einem elektrischen Strom von 400 mA für 20 Minuten angelegt. Der TAE-Puffer setzte sich aus 145,2 g Tris (Carl Roth), 11,1 g EDTA (Carl Roth) und 3 l zweifach destilliertem Wasser zusammen. Der pH von 8 wurde mit Essigsäure (Merck) eingestellt. Nach Ablauf der Zeit wurde das Gel entnommen und im Transilluminator UVsolo (Biometra GmbH) fotografiert. Danach wurden die Banden (Abbildung 5) beurteilt.

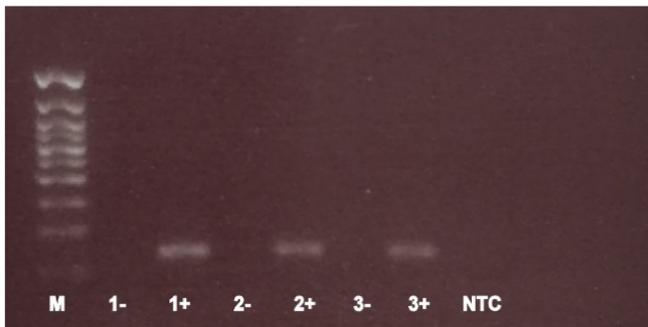


Abbildung 5: Darstellung eines Ergebnisses der Gelelektrophorese. 1-, 2-, 3- = Proben des -RT-Ansatzes, 1+, 2+, 3+ = Proben des +RT-Ansatzes, M = 50 bp-Marker, NTC = Negativkontrolle

Sowohl in den –RT-Proben wie auch in der NTC durften keine Signale zu detektieren sein, da dies bedeutete, dass eine Verunreinigung mit genomischer DNA vorlag oder die DNase-Behandlung ineffizient war. In diesem Fall muss die DNase-Behandlung erneut durchgeführt werden. Wurde nur in den +RT-Proben ein Signal gemessen, wurde die überprüfte cDNA verwendet.

Quantitative *real-time polymerase chain reaction*

Um Aufschlüsse darüber zu erhalten, welche Gene in welcher relativen Menge vorliegen, wurde eine qPCR durchgeführt. Dieses System basiert auf der Detektion von Fluoreszenzsignalen. Der Farbstoff SYBR Green I, der dem Mastermix (Tabelle 10) hinzugefügt war, lagert sich in den entstehenden DNA-Doppelstrang ein und wird durch Licht angeregt. Die Messung des so entstehenden Fluoreszenzsignals erfolgt nach jedem abgeschlossenen Zyklus. Von besonderem Interesse waren dabei auf Seite der SCs folgende Gene: Runx2, Cx43, Panx1, Panx2 und Panx3. Bei den OCVs waren folgende Differenzierungsmarker von Interesse: TRAP und CTSK. Zusätzlich wurde die Expression von GAPDH als Referenzgen untersucht.

Tabelle 10: Zusammensetzung des qPCR-Mastermix

Substrat	Menge/Probe [µl]	Hersteller
QuantiFast SYBR Green PCR Master Mix	10	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
Quanti Tect Primer Assay	2	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
RNase freies H ₂ O	6	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland

Die verwendeten Primer (Quanti Tect Primer Assay, Tabelle 11) sind kommerziell erhältlich, vom Hersteller (QIAGEN GmbH) designt und getestet.

Tabelle 11: Übersicht der verwendeten Primer (Quanti Tect Primer Assay, QIAGEN GmbH)

Primer	Gensymbol	Referenzsequenz	Katalognummer	Länge des Amplikon [bp]
Cathepsin K (CTSK)	CTSK	NM_031560	QT00375599	80
Connexin43 (Cx43)	Gja1	NM_012567	QT00177737	141
Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)	GAPDH	NM_017008	QT00199633	149

Tabelle 11 (Fortsetzung): Übersicht der verwendeten Primer (Quanti Tect Primer Assay, QIAGEN GmbH)

Primer	Gensymbol	Referenzsequenz	Katalognummer	Länge des Amplikon [bp]
Pannexin 1 (Panx1)	Panx1	NM_199397	QT01595454	105
Pannexin 2 (Panx2)	Panx2	NM_199409	QT02333443	133
Pannexin 3 (Panx3)	Panx3	NM_199398	QT01620906	105
Runt-related transcription factor 2 (Runx2)	Runx2	NM_053470	QT01620647	84
Tartrat-resistente saure Phosphatase (TRAP)	Acp5	NM_019144	QT00374346	89

In ein Well wurden 18 µl des Mastermix und 2 µl cDNA der zu untersuchenden Probe pipettiert. Je Probe wurde ein Triplet pipettiert (entspricht 3 Wells) und je Ansatz erfolgte eine NTC, die statt cDNA RNase-freies Wasser enthielt, um die Reinheit des angesetzten Mix zu überprüfen. Die fertige Platte wurde mit Folie abgedeckt und in den Thermocycler verbracht. Dort lief folgendes Programm:

1. 5 Minuten bei 95 °C
 2. 10 Sekunden bei 95 °C
 3. 30 Sekunden bei 60 °C
 4. Schmelzkurve: 60 °C bis 95 °C, schrittweise Erhöhung der Temperatur um 0,5 °C für jeweils 5 Sekunden
- } Wiederholung für 39 Zyklen

Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit GraphPad. Für die Analyse der Genexpressionen wurde eine einfaktorische Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt, ein Tukey-Test wurde als post-hoc-Test angeschlossen. Um die relative Quantifizierung bestimmen zu können, wurde in jeder Probe die Expression des Gens GAPDH als Referenzgen analysiert und der ΔCq bestimmt. Dieser wurde für jede Probe gegen die Kontrollprobe entsprechend des Versuchsaufbaus normiert ($\Delta\Delta Cq$). Die Ergebnisse der qPCR sind als Mittelwerte der errechneten $2^{-\Delta\Delta Cq}$ mit Standardabweichung der jeweiligen Probe dargestellt und der aufgetragene Graph entspricht damit der x-fachen Expression des Gens im Vergleich zu der jeweiligen Kontrollprobe.

3.5 Überprüfung der Kultivierungsbedingungen im Kokultursystem: Vorversuche

Das folgende Kapitel erläutert drei Vorversuche. Die Vorversuche wurden durchgeführt, um optimale Kokulturbedingungen für die SCs und die OCVs zu etablieren, während im Hauptversuch (Kapitel 3.6) die beiden Zellpopulationen in Kombination mit verschiedenen KEMs kokultiviert wurden, um die anforderungsgerechte Konzeption des Kokultursystems und die Biokompatibilität der KEMs zu überprüfen.

3.5.1 Kokultivierung der Zellpopulationen ohne den Einsatz von Differenzierungsfaktoren: Vorversuch 1

Im Rahmen von Vorversuch 1 wurde das indirekte Kokultursystem mit drei Kompartimenten aufgebaut. Es erfolgte keine Zugabe von KEMs. Vielmehr wurde die optimale Inkubationszeit für beide Zellpopulationen überprüft. Gewählt wurden Zeiten von 5, 9, 14 und 19 Tagen. Das BM wurde ohne die Zugabe von Supplementen verwendet. Eine Übersicht des Versuchsaufbaus ist in Tabelle 12 zu sehen. Im Bodenkompartment wurden SCs ausgesät (100 000 Zellen/Bodenkompartiment). Insert 1 wurde ohne Bestückung mit einem KEM in das Bodenkompartment platziert. Nach 24 Stunden wurden in Insert 2 OCVs gesät (250 000 Zellen/Insert 2).

Um die Kennzeichnung der Proben im Rahmen der Versuche zu gewährleisten, wurden sie hinsichtlich des (Vor-) Versuchs, der verwendeten Zellart, der Kultivierungsart (Kokultur oder Monokultur), der Art des verwendeten Mediums und der Versuchsdauer benannt. Dafür wurden Abkürzungen verwendet: so werden z. B. im Rahmen des Vorversuchs 1 (V1) eingesetzte SCs, die in der Kokultur (KK) in BM über 5 Tage (5d) kultiviert wurden, als V1-SCs-KK-BM-5d bezeichnet. Entsprechend wird die Population der OCVs dieser Kokultur als V1-OCVs-KK-BM-5d bezeichnet. Tabelle 12 gibt einen Überblick über den Versuchsaufbau des Vorversuchs 1.

Als Kontrollen wurden in 24-Well-Zellkulturplatten ausgesäte SCs und OCVs in Monokultur mit einer Inkubationsdauer von 5, 9, 14 und 19 Tagen verwendet. Zwei verschiedene Medien wurden für die Kultivierung der SCs verwendet: BM sowie OM. Das BM der OCVs wurde mit den Faktoren RANKL (50 ng/ml) und M-CSF (25 ng/ml) supplementiert. Eine Übersicht über die verwendeten Kontrollproben gibt Tabelle 13.

Tabelle 12: Übersicht des Versuchsaufbaus von Vorversuch 1

Kulturform	Bodenkompartiment mit SCs - Proben	Insert 1	Insert 2 mit OCVs - Proben	Kulturdauer [d]
Kokultur	V1-SCs-KK-BM-5d	leer	V1-OCVs-KK-BM-5d	5
Kokultur	V1-SCs-KK-BM-9d	leer	V1-OCVs-KK-BM-9d	9
Kokultur	V1-SCs-KK-BM-14d	leer	V1-OCVs-KK-BM-14d	14
Kokultur	V1-SCs-KK-BM-19d	leer	V1-OCVs-KK-BM-19d	19

BM = Basalmedium, d = Tage, KK = Kokultur, OCVs = osteoklastäre Vorläuferzellen, SCs = mesenchymale Stromazellen, V1 = Vorversuch 1

Tabelle 13: Übersicht der Kontrollkulturen von Vorversuch 1

Kulturform	Proben	Medium	Kulturdauer [d]
Monokultur	V1-SCs-MK-BM-5d	BM	5
Monokultur	V1-SCs-MK-BM-9d	BM	9
Monokultur	V1-SCs-MK-BM-14d	BM	14
Monokultur	V1-SCs-MK-BM-19	BM	19
Monokultur	V1-SCs-MK-OM-5d	OM	5
Monokultur	V1-SCs-MK-OM-9d	OM	9
Monokultur	V1-SCs-MK-OM-14d	OM	14
Monokultur	V1-SCs-MK-OM-19d	OM	19
Monokultur	V1-OCVs-MK-BM-9d	BM	9
Monokultur	V1-OCVs-MK-BM-14d	BM	14
Monokultur	V1-OCVs-MK-BM-19d	BM	19
Monokultur	V1-OCVs-MK-BM-R-M-5	BM + R + M	5
Monokultur	V1-OCVs-MK-BM-R-M-9d	BM + R + M	9
Monokultur	V1-OCVs-MK-BM-R-M-14d	BM + R + M	14
Monokultur	V1-OCVs-MK-BM-R-M-19d	BM + R + M	19

BM = Basalmedium, d = Tage, M = M-CSF, MK = Monokultur, OCVs = osteoklastäre Vorläuferzellen, OM = osteogenes Differenzierungsmedium, R = RANKL, SCs = mesenchymale Stromazellen, V1 = Vorversuch 1

Die SCs des Vorversuchs 1 wurden zunächst morphologisch bewertet. Dabei wurde vor allem auf die Form der Zellen, deren Anordnung und Adhärenz geachtet. Um Aufschlüsse über die osteogene Differenzierungskapazität der SCs zu erhalten, wurden die Kulturen mit Alizarin angefärbt und ein Teil der Proben mittels qPCR analysiert, wobei der quantitative Nachweis von Runx2 und Cx43 erfolgte. Mittels qPCR wurden die Proben der SCs, die 19 Tage lang in Monokultur (V1-SCs-MK-BM-19d) oder Kokultur (V1-SCs-KK-BM-19d) kultiviert wurden, untersucht.

Die OCVs des Vorversuchs 1 wurden hinsichtlich ihrer Adhärenz, Form und Größe sowie dem Vorhandensein mehrerer Zellkerne bewertet. Die weitere Auswertung umfasste den enzymhistochemischen Nachweis der TRAP und die Phalloidininfärbung. Um Informationen über die relativen TRAP- und CTSK-Expressionen der OCVs zu erhalten, wurden die OCVs, die 19 Tage in Kokultur (V1-OCVs-KK-BM-19d) kultiviert wurden, mittels qPCR untersucht.

3.5.2 Osteogene Vordifferenzierung der mesenchymalen Stromazellen vor der Kokultivierung: Vorversuch 2

Bei diesem Versuchsaufbau wurden die SCs im Bodenkompartment (100 000 Zellen /Bodenkompartiment) der Kokultur mittels OM über Zeiträume von 14 und 21 Tagen vordifferenziert, um einerseits die osteogene Differenzierung der Zellen zu beschleunigen und andererseits im Rahmen der Differenzierung der SCs zu Osteoblasten die Osteoklastengnese der kokultivierten OCVs anzuregen. Insert 1 blieb leer. Da erst im Anschluss an die Phasen der Vordifferenzierung die OCVs in Insert 2 ausgesät wurden (250 000 Zellen/Insert 2), startete die eigentliche Versuchsdauer erst im Anschluss an die Vordifferenzierung mit Beginn der Kokultivierung beider Zellpopulationen und betrug 5 und 9 Tage (Tabelle 14). Monokulturen der SCs kultiviert in BM und OM sowie OCVs unter der Zugabe von RANKL (50 ng/ml) und M-CSF (25 ng/ml) in das BM dienten als Kontrollen. Die Übersicht des Versuchsaufbaus ist Tabelle 15 zu entnehmen.

Tabelle 14: Übersicht des Versuchsaufbaus von Vorversuch 2

Kulturform	Bodenkompartiment mit SCs - Proben	vd [d]	Insert 1	Insert 2 mit OCVs - Proben	Kulturdauer [d]
Kokultur	V2-SCs-14d-vd-KK-BM-5d	14	leer	V2-OCVs[SCs-14d-vd]-KK-BM-5d	5
Kokultur	V2-SCs-21d-vd-KK-BM-5d	21	leer	V2-OCVs[SCs-21d-vd]-KK-BM-5d	5
Kokultur	V2-SCs-14d-vd-KK-BM-9d	14	leer	V2-OCVs[SCs-14d-vd]-KK-BM-9d	9
Kokultur	V2-SCs-21d-vd-KK-BM-9d	21	leer	V2-OCVs[SCs-21d-vd]-KK-BM-9d	9

BM = Basalmedium, d = Tage, KK = Kokultur, OCVs = osteoklastäre Vorläuferzellen, SCs = mesenchymale Stromazellen, vd = osteogen vordifferenziert, V2 = Vorversuch 2

Tabelle 15: Übersicht der Kontrollkulturen von Vorversuch 2

Kulturform	Proben	Medium	Kultur-dauer [d]
Monokultur	SCs ¹	BM	14
Monokultur	SCs ¹	BM	21
Monokultur	SCs ¹	OM	14
Monokultur	SCs ¹	OM	21
Monokultur	V2-OCVs-MK-BM-R-M-5d	BM + R + M	5
Monokultur	V2-OCVs-MK-BM-R-M-9d	BM + R + M	9

BM = Basalmedium, d = Tage, M = M-CSF, MK = Monokultur, OCVs = osteoklastäre Vorläuferzellen, OM = osteogenes Differenzierungsmedium, R = RANKL, SCs = mesenchymale Stromazellen, V2 = Vorversuch 2

Die SCs dieses Vorversuchs wurden wie bei Vorversuch 1 morphologisch bewertet. Eine Alizarinfärbung zum Nachweis mineralisierter Matrix wurde ebenso durchgeführt. Zur Bestimmung der relativen Genexpressionen von Runx2 und Cx43 wurden die SCs, die entweder 14 Tage (V2-SCs-14d-vd-KK-BM-9d) oder 21 Tage (V2-SCs-21d-vd-KK-BM-9d) osteogen vordifferenziert wurden, mittels qPCR untersucht. Der Normierung dienten die SCs, die 19 Tage in Monokultur mit BM kultiviert wurden (V1-SCs-MK-BM-19d). Diese Expression entsprach somit der einfachen Expression des jeweiligen Gens.

Die OCVs dieses 2. Vorversuchs wurden ebenfalls morphologisch ausgewertet sowie einem enzymhistochemischen Nachweis der TRAP und der Phalloidin färbung unterzogen. Geachtet wurde dabei vor allem auf die Form, Größe, Anordnung und Adhärenz der Zellen sowie das Vorhandensein von multinukleären Zellen. Um Informationen über die relativen TRAP- und CTSK-Expressionen der OCVs zu erhalten, wurden die Zellen nach 9 Tagen in Kokultur mit 14 oder 21 Tagen osteogen vordifferenzierten SCs in BM (V2-OCVs[SCs-14d-vd]-KK-BM-9d, V2-OCVs[SCs-21d-vd]-KK-BM-9d) mittels qPCR untersucht.

Zur Normierung wurden OCVs, die 9 Tage lang in Monokultur in BM (V2-OCVs-MK-BM-9d) kultiviert wurden, verwendet. Die Genexpression dieser OCVs (V2-OCVs-MK-BM-9d) entsprach somit der einfachen Expression des jeweiligen Gens.

¹ Proben aufgrund von Kontamination nicht auswertbar.

3.5.3 Einsatz der Differenzierungsfaktoren *receptor activator of nuclear factor- κ B ligand* und *macrophage colony-stimulating factor-1* im Kokultursystem: Vorversuch 3

Bei diesem Vorversuch wurden RANKL und M-CSF dem BM der Kokulturen zugesetzt, um die Differenzierung der OCVs zu stimulieren. Dabei wurden drei verschiedene Varianten des Mediums verwendet, um die beste Zusammensetzung des Mediums zu überprüfen: BM, BM unter der Zugabe von RANKL (50 ng/ml) und BM unter der Zugabe von RANKL (50 ng/ml) und M-CSF (25 ng/ml). In das Bodenkompartment der Kokulturen wurden SCs ausgesät (100 000 Zellen/Bodenkompartiment). Nach 24 Stunden wurde das leere Insert 1 hinzugefügt, in Insert 2 wurden die OCVs gesät (250 000 Zellen/Insert 2). Die Versuchsdauer erstreckte sich über 9 Tage. Der Versuchsaufbau ist Tabelle 16 zu entnehmen. Als Kontrollen dienten SCs und OCVs in Monokultur. Beide Zellpopulationen wurden ebenfalls 9 Tage in BM, in BM unter der Zugabe von RANKL (50 ng/ml) und in BM unter der Zugabe von RANKL (50 ng/ml) und M-CSF (25 ng/ml) kultiviert (Tabelle 17).

Tabelle 16: Übersicht des Versuchsaufbaus von Vorversuch 3

Kulturform	Bodenkompartiment mit SCs - Proben	Insert 1	Insert 2 mit OCVs - Proben	Medium
Kokultur	V3-SCs-KK-BM-9d	leer	V3-OCVs-KK-BM-9d	BM
Kokultur	V3-SCs-KK-BM-R-9d	leer	V3-OCVs-KK-BM-R-9d	BM + R
Kokultur	V3-SCs-KK-BM-R-M-9d	leer	V3-OCVs-KK-BM-R-M-9d	BM + R + M

BM = Basalmedium, d = Tage, KK = Kokultur, M = M-CSF, OCVs = osteoklastäre Vorläuferzellen, R = RANKL, SCs = mesenchymale Stromazellen, V3 = Vorversuch 3

Tabelle 17: Übersicht der Kontrollkulturen von Vorversuch 3

Kulturform	Proben	Medium
Monokultur	V3-SCs-MK-BM-9d	BM
Monokultur	V3-SCs-MK-BM-R-9d	BM + R
Monokultur	V3-SCs-MK-BM-R-M-9d	BM + R + M
Monokultur	V3-OCVs-MK-BM-9d	BM
Monokultur	V3-OCVs-MK-BM-R-9d	BM + R
Monokultur	V3-OCVs-MK-BM-R-M-9d	BM + R + M

BM = Basalmedium, d = Tage, M = M-CSF, MK = Monokultur, OCVs = osteoklastäre Vorläuferzellen, R = RANKL, SCs = mesenchymale Stromazellen, V3 = Vorversuch 3

Die SCs wurden hinsichtlich Form, Anordnung und Adhärenz beurteilt sowie die relativen Genexpressionen von Runx2, Cx43, Panx1, Panx2 und Panx3 mittels qPCR ermittelt. Verwendet wurden hierzu die Kulturen der SCs, die in Kokultur mit BM (V3-SCs-KK-BM-9d), BM mit RANKL (V3-SCs-KK-BM-R-9d) und BM mit RANKL und M-CSF (V3-SCs-KK-BM-R-M-9d) kultiviert wurden. Zur Kontrolle wurden SCs in diesen Medien monokultiviert (V3-SCs-MK-BM-9d, V3-SCs-MK-BM-R-9d, V3-SCs-MK-BM-R-M-9d). Als Referenz, gegen die normiert wurde, dienten SCs, die in Monokultur mit BM (V3-SCs-MK-BM-9d) inkubiert wurden. Die OCVs dieses Vorversuchs wurden morphologisch unter Berücksichtigung von Form, Größe, Anordnung, Adhärenz und dem Vorhandensein von multinukleären Zellen charakterisiert. Um Informationen über die relativen TRAP- und CTSK-Expressionen zu erhalten, wurden die OCVs der Ko- und Monokulturen mittels qPCR untersucht (V3-OCVs-KK-BM-9d, V3-OCVs-KK-BM-R-9d, V3-OCVs-KK-BM-R-M-9d, V3-OCVs-MK-BM-9d, V3-OCVs-MK-BM-R-9d, V3-OCVs-MK-BM-R-M-9d). Als Referenz, gegen die normiert wurde, dienten die OCVs, die für 9 Tage in Monokultur in BM (V3-OCVs-MK-BM-9d) kultiviert wurden. Die Genexpression dieser OCVs (V3-OCVs-MK-BM-9d) entsprach somit der einfachen Expression des jeweiligen Gens.

3.6 Überprüfung der Biokompatibilität von Knochenersatzmaterialien im indirekten Kokultursystem: Hauptversuch

Zur Untersuchung der Effekte von KEMs auf SCs und OCVs diente das auf Basis der Vorversuche konzipierte indirekte Kokultursystem. Verwendet wurde BM unter der Zugabe von RANKL (50 ng/ml). Die Versuchsdauer betrug 9 Tage.

In das Bodenkompartiment wurden SCs ausgesät (100 000 Zellen/Bodenkompartiment). Nach einer Dauer von 24 Stunden wurde Insert 1, welches mit 30 mg des jeweiligen KEMs befüllt wurde, hinzugefügt. In Insert 2 wurden OCVs (250 000 Zellen/Insert 2) gesät. Abbildung 6 zeigt ein Insert 1 mit 30 mg des Basis-KEMs. Der Versuchsaufbau ist in Tabelle 18 dargestellt.



Abbildung 6: Insert 1 mit 30 mg des Basis-KEMs.

Tabelle 18: Übersicht des Versuchsaufbaus des Hauptversuchs. Die KEMs sind in Tabelle 6, Kapitel 3.2 zusammengefasst

Kultur -form	Bodenkompartiment mit SCs - Proben	Insert 1 mit KEMs	Insert 2 mit OCVs - Proben
Kokultur	SCs-KK-leer	leeres Insert 1	OCVs-KK-leer
Kokultur	SCs-KK-w/o	w/o	OCVs-KK-w/o
Kokultur	SCs-KK-MgCl-0,1	MgCl-0,1	OCVs-KK-MgCl-0,1
Kokultur	SCs-KK-SrCl-0,1	SrCl-0,1	OCVs-KK-SrCl-0,1
Kokultur	SCs-KK-SrCl-0,01	SrCl-0,01	OCVs-KK-SrCl-0,01
Kokultur	SCs-KK-MgHP-0,01	MgHP-0,01	OCVs-KK-MgHP-0,01
Kokultur	SCs-KK-SrHP-0,01	SrHP-0,01	OCVs-KK-SrHP-0,01
Kokultur	SCs-KK-MgSrCl-0,05	MgSrCl-0,05	OCVs-KK-MgSrCl-0,05
Kokultur	SCs-KK-MgSrHP-0,005	MgSrHP-0,005	OCVs-KK-MgSrHP-0,005
Kokultur	SCs-KK-PLGA-MgSrCl-0,05	PLGA-MgSrCl-0,05	OCVs-KK-PLGA-MgSrCl-0,05

d = Tage, KEMs = Knochensatzmaterialien, KK = Kokultur, SCs = mesenchymale Stromazellen, OCVs = osteoklastäre Vorläuferzellen, PLGA = Polylactid-co-glycolid

Zellen, die mit leerem Insert 1 kultiviert wurden, stellten die Negativkontrolle dar, während Zellen, die gemeinsam mit dem Basis-KEM (w/o) kultiviert wurden, als Positivkontrolle dienten.

Die SCs wurden hinsichtlich Form, Anordnung und Adhärenz beurteilt. Zur Ermittlung der relativen Genexpressionen von Runx2, Cx43, Panx1, Panx2 und Panx3 der SCs in Gegenwart der KEMs wurden die SCs der Kokulturen mittels qPCR untersucht. Als Referenz, gegen die normiert wurde, dienten SCs, die 9 Tage in Kokultur unter der Zugabe von RANKL mit leerem Insert 1 (SCs-KK-leer) kultiviert wurden. Die Genexpression dieser SCs (SCs-KK-leer) entsprach somit der einfachen Expression des jeweilig untersuchten Gens. Die OCVs des Hauptversuchs wurden hinsichtlich ihrer Morphologie beurteilt. Folgende Kriterien wurden herangezogen: Form, Größe, Anordnung, Adhärenz sowie das Auftreten von multinukleären Zellen. Der quantitative Nachweis der relativen Genexpressionen von TRAP und CTSK der in Gegenwart der KEMs inkubierten OCVs erfolgte mittels qPCR. OCVs, die mit leerem Insert 1 (OCVs-KK-leer) kultiviert wurden, dienten als Referenz zur Normierung.

3.7 Medien und Reagenzien für die Zellkultur

Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
β-Glycerolphosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Dexamethason	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Dulbecco's Modified Eagle Medium low glucose (DMEM lg)	Gibco® life technologies, Darmstadt, Deutschland
Fetales bovines Serum (FBS)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS)	Gibco® life technologies, Darmstadt, Deutschland
Penicillin/Streptomycin (P/S)	Gibco® life technologies, Darmstadt, Deutschland
Recombinant Rat M-CSF (M-CSF)	PeproTech Germany, Hamburg, Deutschland
Recombinant Rat sRANK Ligand (RANKL)	PeproTech Germany, Hamburg, Deutschland
Red Blood Cell Lysis Buffer	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
TrypLE™ Express Enzyme	Gibco® life technologies, Darmstadt, Deutschland

3.8 Reagenzien für zytologische Färbungen

Alizarin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Echtrotsalz (Fast Red TR Salt)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Hoechstfarbstoff (bisBenzimide H33258)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Naphthol-AS-TR-Phosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland

N-N-Dimethylformamid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Na-Tartrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumacetat p.a.	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Paraformaldehyd	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Phalloidin-Fluorescence-Isothiocyanat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
ProLong™ Gold Antifade Mountant	Invitrogen, Eugene, Oregon, USA
Triton X	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

3.9 Reagenzien für molekularbiologische Untersuchungen

5 x DNA Loading Buffer	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Agarose	Bioline GmbH, Luckenwald, Deutschland
Ambion™ RNase Inhibitor (40 U/μl)	Invitrogen, Eugene, Oregon, USA
AmpliTaq GOLD	Roche Deutschland Holding GmbH, Grenzach-Wyhlen, Deutschland
Applied Biosystems™ GeneAmp™ dNTP	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
DNase I recombinant (10 U/μl)	Roche Deutschland Holding GmbH, Grenzach-Wyhlen, Deutschland
DNase I recombinant Incubation Buffer	Roche Deutschland Holding GmbH, Grenzach-Wyhlen, Deutschland
EDTA	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Essigsäure	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Gel Green™ nucleic acid stain	Biotium, Darmstadt, Deutschland

Material und Methoden

Gene Amp10X PCR Gold Puffer	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
innuPREP RNA Mini Kit	Analytik Jena GmbH, Jena, Deutschland
MgCl ₂	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
MultiScribe™ Reverse Transkriptase	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Primer GAPDH forward	Microsynth AG, Balgach, Schweiz
Primer GAPDH reverse	Microsynth AG, Balgach, Schweiz
Random Hexamers	Invitrogen, Eugene, Oregon, USA
RNase-freies Wasser	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
RNase Inhibitor (20 U/μl)	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Tris	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
QuantiFast SYBR Green PCR Master Mix	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
Quantitas DNA Marker (50bp)	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Quanti Tect Primer Assay	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland

3.10 Verbrauchsmaterialien

C-Chip Neubauer Improved	NanoEnTek Inc., Seoul, Korea
Deckgläser (13 mm)	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Falconröhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Filter EasyStrainer™ (70 μm)	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Hard-Shell® PCR Plates (96-Well)	Bio-Rad, München, Deutschland
Kanüle (21G)	Braun, Melsungen, Deutschland

Material und Methoden

Kryoröhrchen (1,5 ml)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Minisart [®] plus Spritzenvorsatzfilter	Satorius, Göttingen, Deutschland
Microseal [®] B Film PCR Sealer	Bio-Rad, München, Deutschland
Multiwell-Zellkulturplatten (6-Well, 24-Well)	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Objektträger	R. Langenbrick, Emmendingen, Deutschland
Parafilm [®] M Film	BEMIS Packaging Deutschland GmbH, Rheinbach, Deutschland
Pipetten Cellstar (5 ml, 10 ml, 20 ml, 50 ml)	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Pipettenspitzen (10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl, 1250 µl)	nerbe Plus GmbH, Winsen/Luhe, Deutschland
Röhrchen (1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Skalpellschneiden carbon steel	Swann-Morton Limited, Sheffield, England
Spritzen (1 ml, 5 ml)	Braun, Melsungen, Deutschland
Spritzenfilter (Whatman [®])	GE Healthcare GmbH, Solingen, Deutschland
Thermo Scientific [™] Nunc [™] EasYFlask [™] Zellkulturflaschen (75 cm ²)	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Thermo Scientific [™] Nunc [™] Polycarbonat-Membraneinsätze in Multischalen (Porengröße: 0,4 µm, Fläche: 3,14 cm ²)	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Thermo Scientific [™] Nunc [™] Polycarbonat-Membraneinsätze in Multischalen (Porengröße: 0,4 µm, Fläche: 4,1 cm ²)	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland

3.11 Geräte

BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
CFX96™ Real-Time System C1000Touch™ Thermal Cycler	Bio-Rad, München, Deutschland
Cryo-Einfriergerät Mr. Frosty	Nalgene® über Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
DNA Engine Peltier Thermal Cycler	Bio-Rad, München, Deutschland
Eismaschine SPR 80 L	NordCap GmbH & Co. KG, Bremen, Deutschland
Eppendorf® Zentrifuge 5702	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Eppendorf™ Research™ Pipetten (0,1–2,5 µl, 0,5–10 µl, 1–20 µl, 10–100 µl, 10–200 µl, 100–1000 µl)	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Feinwaage Discovery	Ohaus, Nänikon, Schweiz
Finnpipetten F2 (0,1–2,5 µl, 0,5–10 µl, 2–20 µl, 10–100 µl, 20–200 µl, 100–1000 µl)	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Gefrierschrank (–20 °C)	Miele & Cie. KG, Gütersloh, Deutschland
Gefrierschrank HERAfreeze™ (–86 °C)	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Gelelektrophoresekammer	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
HERAcell150i CO ₂ Incubator	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Kühlschrank	Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach an der Riß, Deutschland
Mikroskop Primovert	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Mikroskop Immunfluoreszenz Observer Z1	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Mikrowelle Privileg 8520	Bauknecht Hausgeräte GmbH, Stuttgart, Deutschland
PIPETGIRL Pipettierhilfe	INTEGRA Biosciences GmbH, Biebertal, Deutschland

PowerPac™ Basic Power Supply	Bio-Rad, München, Deutschland
Sterilwerkbank Clean Air NSF 49	Clean Air, Deutschland
Stickstofftank LOCATOR JR PLUS	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Thermocycler „DNA-Engine“	Bio-Rad, München, Deutschland
Transilluminator UVsolo	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Waage PB3002-S Delta Range®	Mettler-Toledo, Gießen, Deutschland
Wasserbad memmert	Gesellschaft für Laborgeräte, Burgwedel, Deutschland
Zentrifuge Mikro 20	Hettich, Tuttlingen, Deutschland

3.12 Software

Axiovision image analysis	Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland
Citavi 6	Swiss Academic Software GmbH, Schweiz
GraphPad Prism 5, 9	Graphpad Software, Inc., USA
Microsoft Office Excel 2016	Microsoft Corporation, USA
Microsoft Office Word 2016	Microsoft Corporation, USA
Paint	Microsoft Corporation, USA
Photoshop	Adobe Inc., USA
Picasa 3	Google Inc., USA
Zeiss-ZEN	Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland

4 Ergebnisse

4.1 Überprüfung der Kultivierungsbedingungen im Kokultursystem: Vorversuche

4.1.1 Kokultivierung der Zellpopulationen ohne den Einsatz von Differenzierungsfaktoren: Vorversuch 1

Morphologie der mesenchymalen Stromazellen

SCs der Kokulturen in BM bildeten zu keinem der untersuchten Zeitpunkte (5, 9, 14 und 19 Tage) Aggregate im Sinne von sogenannten *bone nodules*. Nach 5 (V1-SCs-KK-BM-5d) sowie 9 Tagen (V1-SCs-KK-BM-9d, Abbildung 7 A) waren mehrheitlich adhärenente, spindelförmig bis polygonale, vitale Zellen zu erkennen.

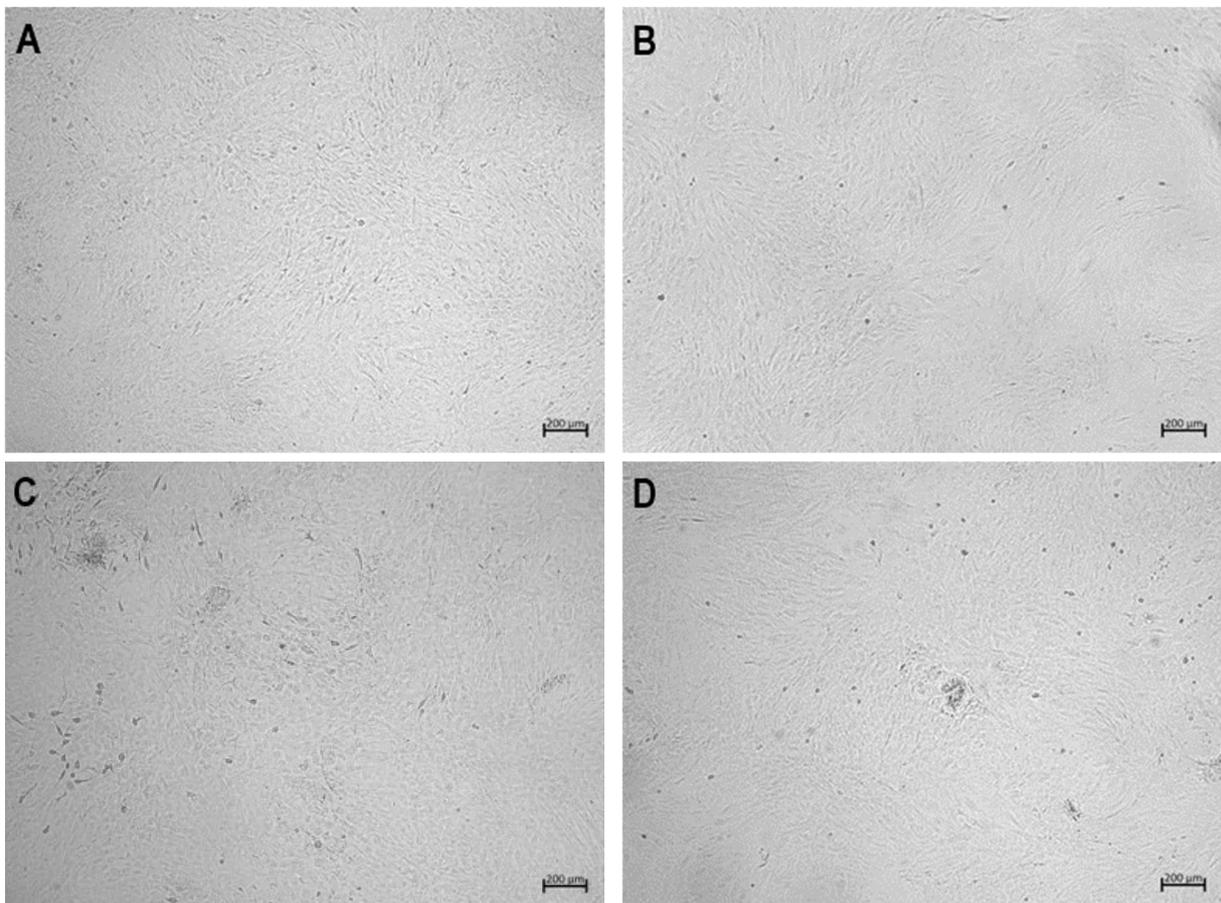


Abbildung 7: Native Bildaufnahmen der SCs, die (A), (C) in Kokultur mit OCVs in BM über (A) 9 und (C) 19 Tage bzw. (B), (D) in Monokultur in OM für (B) 9 und (D) 19 Tage kultiviert wurden. In allen Versuchsaufbauten zeigten sich vitale, adhärenente Zellen mit spindelförmiger Morphologie. Nach 19 Tagen in Monokultur fielen vereinzelt Zellanhäufungen auf (D).

Nur vereinzelt kamen abgerundete Zellen vor. Bis zum 19. Tag änderte sich dieses Zellbild nur unwesentlich. Lediglich die Zelldichte nahm zu und am 19. Tag (V1-SCs-KK-BM-19d,

Abbildung 7 C) waren Bereiche abgrenzbar, in denen sich die Zellen vom Boden gelöst hatten und dementsprechend eine abgerundete Morphologie aufwiesen.

Die als Kontrolle dienenden Monokulturen der SCs kultiviert in BM bestanden nach 5 (V1-SCs-MK-BM-5d), 9 (V1-SCs-MK-BM-9d) und 14 Tagen (V1-SCs-MK-BM-14d) aus vitalen, adhären, spindelförmigen bis polygonalen Zellen. Nach 19 Tagen (V1-SCs-MK-BM-19d) fielen ebenfalls vereinzelt abgerundete Zellen auf. Die in OM kultivierten Zellen (V1-SCs-MK-OM-5d, V1-SCs-MK-OM-9d (Abbildung 7 B), V1-SCs-MK-OM-14d) zeigten im Laufe der Kultivierungszeit bis zum 14. Tag und auch im Vergleich zu den Zellen in BM keine morphologischen Unterschiede. Lediglich nach 19 Tagen (V1-SCs-MK-OM-19d, Abbildung 7 D) waren einzelne Zellanhäufungen der Zellen im OM zu identifizieren. Prinzipiell waren zu allen Zeitpunkten vitale, adhären, spindelförmige bis polygonale Zellen vorhanden.

Alizarinfärbung der mesenchymalen Stromazellen

In keiner der mittels Alizarin gefärbten Kokulturen (V1-SCs-KK-BM-5d, V1-SCs-KK-BM-9d, V1-SCs-KK-BM-14d, V1-SCs-KK-BM-19d (Abbildung 8 A)) waren Calciumnachweise sichtbar. Die in BM inkubierten Monokulturen (V1-SCs-MK-BM-5d, V1-SCs-MK-BM-9d, V1-SCs-MK-BM-14d, V1-SCs-MK-BM-19d) zeigten ebenfalls keine typischen Alizarin-Rotfärbungen.

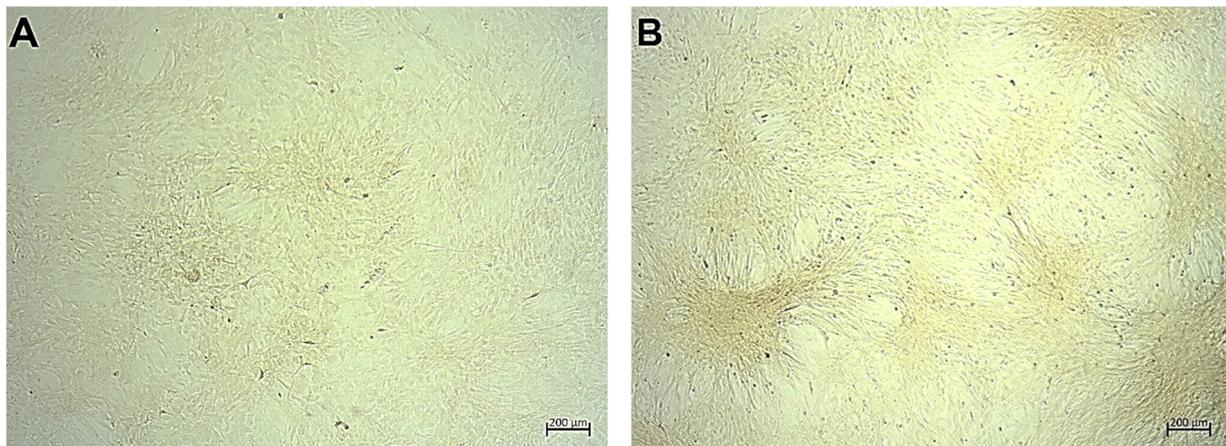


Abbildung 8: Alizarinfärbung der SCs nach (A) 19 Tagen in Kokultur mit OCVs in BM sowie (B) nach 14 Tagen in Monokultur in BM. Weder in der Kokultur noch in der Monokultur waren *bone nodules* oder Calciumablagerungen nachzuweisen.

Abbildung 8 A zeigt das negative Ergebnis der Alizarinfärbung der SCs-Kokultur nach 19 Tagen in BM. SCs der Monokulturen, die in OM kultiviert wurden, zeigten weder nach 5 (V1-SCs-MK-OM-5d), 9 (V1-SCs-MK-OM-9d) noch nach 14 Tagen (V1-SCs-MK-OM-14d) Calciumablagerungen mittels Alizarinfärbung (Abbildung 8 B). Erst nach 19 Tagen

(V1-SCs-MK-OM-19d) der osteogenen Differenzierung wiesen diese Monokulturen vereinzelte rot angefärbte Bereiche auf.

Morphologie der osteoklastären Vorläuferzellen

Bei der Beurteilung der OCVs, die 5 (V1-OCVs-KK-BM-5d) und 9 Tage (V1-OCVs-KK-BM-9d, Abbildung 9 A) in der Kokultur in BM kultiviert wurden, ergaben sich hinsichtlich der Morphologie kaum Unterschiede. Insgesamt zeigte sich ein Bild aus adhären, runden Zellen, zwischen denen vereinzelt spindelförmige Zellen zu finden waren.

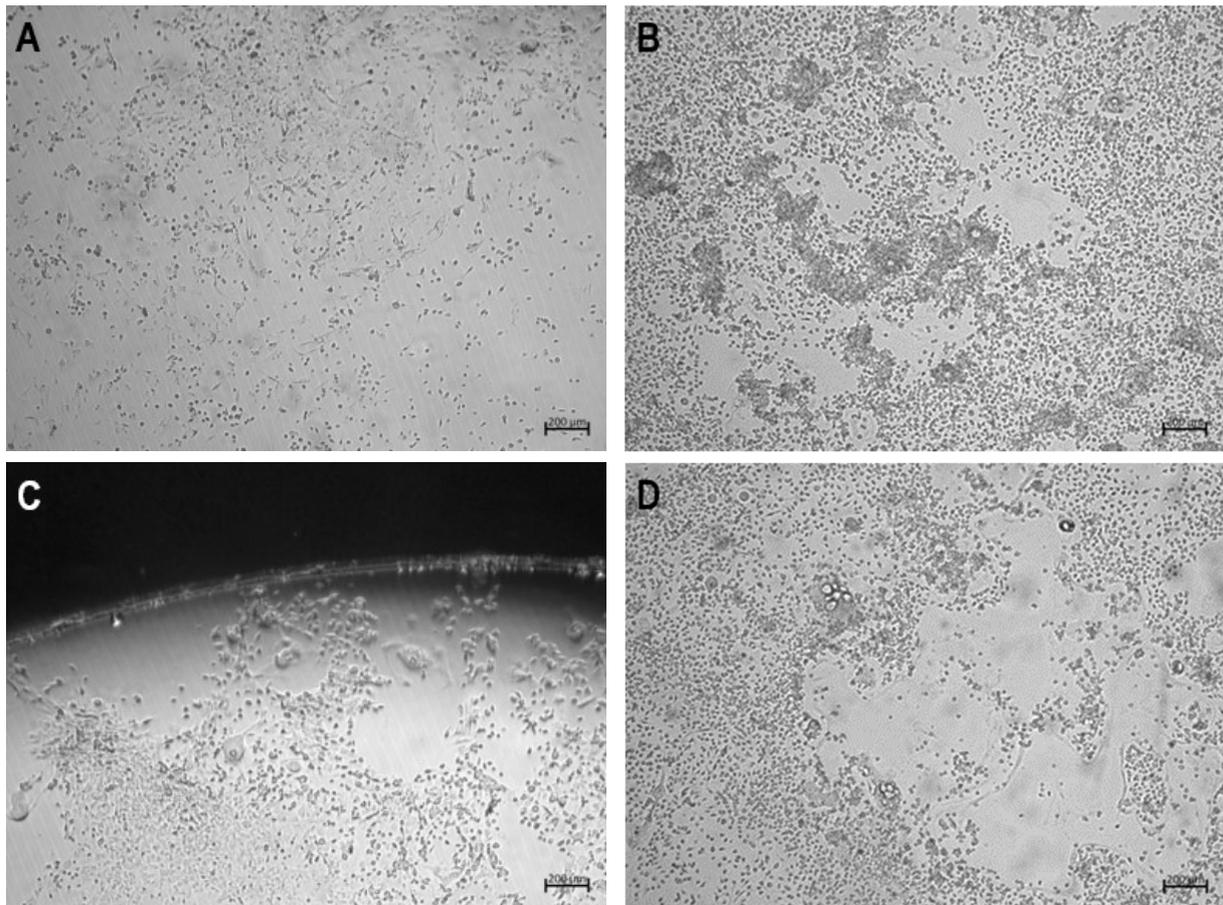


Abbildung 9: Native Bildaufnahmen der OCVs, die (A), (C) in Kokultur mit SCs in BM über (A) 9 und (C) über 19 Tage bzw. (B), (D) in Monokultur in BM unter dem Zusatz der Faktoren RANKL und M-CSF für (B) 9 und (D) 19 Tage kultiviert wurden. Nach 9 Tagen in Kokultur zeigten sich keine Zellen mit typischer Osteoklasten-ähnlicher Morphologie (A), wohingegen in Monokultur unter dem Zusatz der Faktoren RANKL und M-CSF zahlreiche Osteoklasten-ähnliche Zellen zu erkennen waren (B). In Kokultur zeigten sich erstmals nach 19 Tagen vereinzelte Zellen mit Osteoklasten-typischer Morphologie (C), unter dem Zusatz von RANKL und M-CSF zeigten sich zu diesem Zeitpunkt in Monokultur bereits zahlreiche Osteoklasten-ähnliche Zellen (D).

Lediglich nach 9 Tagen in Kokultur in BM (V1-OCVs-KK-BM-9d, Abbildung 9 A) waren vereinzelt polygonale Zellen zu erkennen. Nach 14 Tagen in Kokultur (V1-OCVs-KK-BM-14d) waren spindelförmige, adhärenente Zellen zu identifizieren. Runde, vitale Zellen ordneten sich stellenweise kreisförmig an. Zellen mit typischer Osteoklasten-ähnlicher Morphologie im Sinne großer, rundlich-ovaler Zellen unterschiedlichen Durchmessers waren erstmals nach 19-tägiger Kultivierungsdauer (V1-OCVs-KK-BM-19d, Abbildung 9 C) erkennbar.

In den OCVs der Monokulturen, die unter der Zugabe von RANKL und M-CSF kultiviert wurden, zeigten sich nach 5 Tagen (V1-OCVs-MK-BM-R-M-5d) noch keine Osteoklasten-ähnlichen Zellen. Nach 9, 14 und 19 Tagen (V1-OCVs-MK-BM-R-M-9d (Abbildung 9 B), V1-OCVs-MK-BM-R-M-14d, V1-OCVs-MK-BM-R-M-19d (Abbildung 9 D)) dominierten zwar immer noch adhärenente, runde bis spindelförmige Zellen, aber es waren auch vereinzelt Zellen mit Osteoklasten-ähnlicher Morphologie zu sehen. Stellenweise lagen die Zellen in dichter, kreisförmiger Anordnung vor. Monokulturen in BM ohne Zusatz der Faktoren RANKL und M-CSF (V1-OCVs-MK-BM-9d, V1-OCVs-MK-BM-14d, V1-OCVs-MK-BM-19d) setzten sich unabhängig von der Kultivierungsdauer jeweils aus adhärenenten, einkernigen runden bis spindelförmig-polygonalen Zellen zusammen.

TRAP-Färbung der osteoklastären Vorläuferzellen

OCVs der Kokulturen, inkubiert in BM, wiesen nach 5 (V1-OCVs-KK-BM-5d) und 9 Tagen (V1-OCVs-KK-BM-9d) keine TRAP-Aktivität auf. Erstmals nach 14 Tagen (V1-OCVs-KK-BM-14d) und in der Folge nach 19 Tagen (V1-OCVs-KK-BM-19d) wiesen vereinzelte Zellen mit Osteoklasten-ähnlicher Morphologie eine Färbung auf.

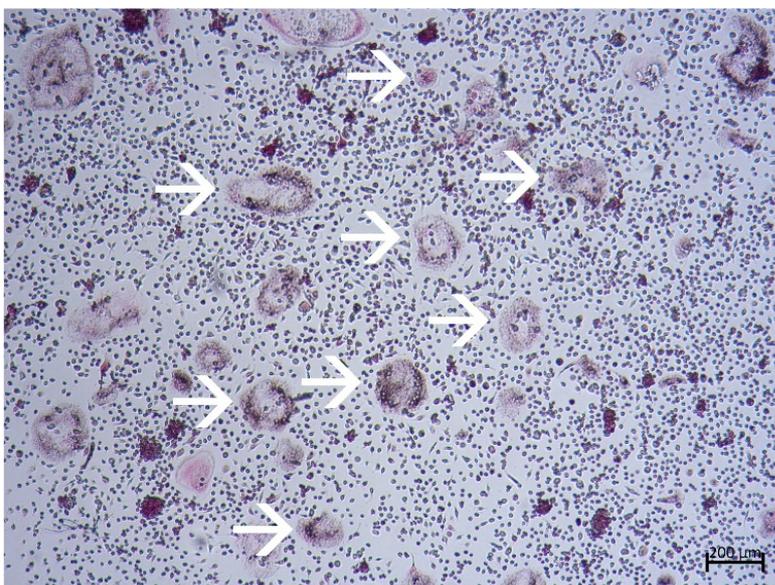


Abbildung 10: TRAP-Färbung der OCVs, die in Monokultur unter Zugabe von RANKL und M-CSF 9 Tage kultiviert wurden. Neben zahlreichen einkernigen Zellen sind mehrkernige Zellen mit Osteoklasten-ähnlicher Morphologie, die eine TRAP-Aktivität aufweisen (weiße Pfeile) zu erkennen.

Dagegen zeigten OCVs der Monokultur inkubiert in BM unter Zugabe von RANKL und M-CSF bereits nach 9 Tagen (V1-OCVs-MK-BM-R-M-9d) zahlreiche TRAP-positive Zellen (Abbildung 10). Auch nach 14 (V1-OCVs-MK-BM-R-M-14d) und 19 Tagen (V1-OCVs-MK-BM-R-M-19d) waren zahlreiche TRAP-positive Zellen mit Osteoklasten-ähnlicher Morphologie nachweisbar.

Kontrollkulturen der OCVs, die in Monokultur in BM kultiviert wurden (V1-OCVs-MK-BM-9d, V1-OCVs-MK-BM-14d, V1-OCVs-MK-BM-19d), zeigten zu keinem Zeitpunkt TRAP-positive Osteoklasten-ähnliche Zellen. Lediglich einkernige, runde und spindelförmige TRAP-positive OCVs waren vorhanden.

Phalloidin-färbung der osteoklastären Vorläuferzellen

Mehr kernige Zellen der Kokulturen wiesen erstmals nach 19 Tagen (V1-OCVs-KK-BM-19d) einen in der Zellperipherie lokalisierten Aktinring auf. Diese Zellen enthielten 3 oder mehr, durch DAPI blau angefärbte, zentral lokalisierte runde Zellkerne. Die Mehrzahl der Zellen war jedoch einkernig, mit gleichmäßig verteiltem Zytoskelett. In den OCVs der Monokulturen inkubiert in BM unter Zugabe von RANKL und M-CSF (V1-OCVs-MK-BM-R-M-9d, V1-OCVs-MK-BM-R-M-14d, V1-OCVs-MK-BM-R-M-19d) waren dagegen ab dem 9. Tag zahlreiche Zellen mit typischer Osteoklasten-ähnlicher Morphologie und Verteilung des Zytoskeletts zu sehen (Abbildung 11). In den Monokulturen der OCVs, inkubiert in BM ohne Zugabe der Faktoren RANKL und M-CSF (V1-OCVs-MK-BM-9d, V1-OCVs-MK-BM-14d, V1-OCVs-MK-BM-19d), waren zu keinem der Untersuchungszeitpunkte (9, 14 und 19 Tage) multinukleäre Zellen mit Osteoklasten-typischer Anfärbung des Zytoskeletts zu identifizieren.

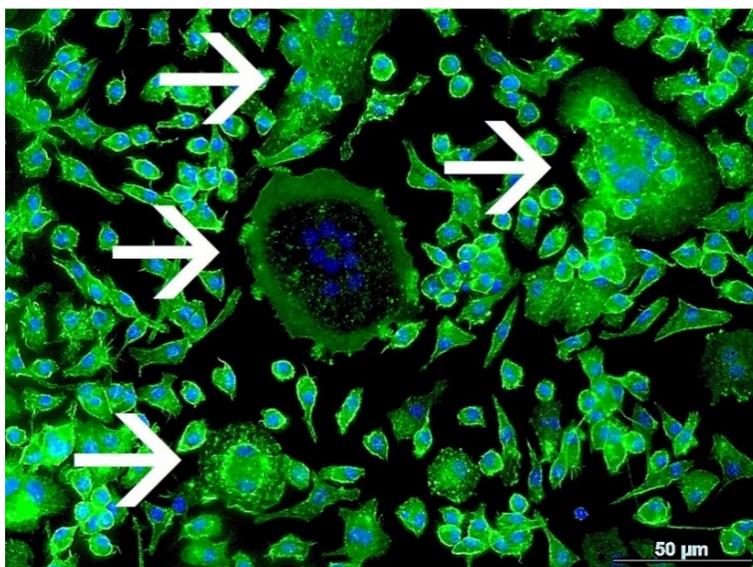


Abbildung 11: Phalloidin-gefärbte multinukleäre Osteoklasten-ähnliche Zellen. Der Aktinring (Phalloidin, grün) befindet sich bei der zentral im Bildausschnitt lokalisierten Zelle in der Zellperipherie. Zentral sind mehrere runde Zellkerne (DAPI, blau) zu erkennen. Zahlreiche einkernige OCVs mit gleichmäßig angefärbtem Zytoskelett umgeben die multinukleären Osteoklasten-ähnlichen Zellen (weiße Pfeile). Grün: Phalloidin (Zytoskelett), Blau: DAPI (Zellkern).

4.1.2 Osteogene Vordifferenzierung der mesenchymalen Stromazellen vor der Kokultivierung: Vorversuch 2

Morphologie der mesenchymalen Stromazellen

Nach 5 Tagen waren in den Kokulturen der SCs, inkubiert in BM (V2-SCs-14d-vd-KK-BM-5d (Abbildung 12 A), V2-SCs-21d-vd-KK-BM-5d (Abbildung 12 B)), nach 14- und 21-tägiger Vordifferenzierung adhärente, spindelförmige Zellen zu beobachten. Hinsichtlich der Bildung von Aggregaten überwog die Häufigkeit jedoch in jenen Kulturen, die 21 Tage vordifferenziert wurden (V2-SCs-21d-vd-KK-BM-5d, Abbildung 12 B). Auch nach 9 Tagen in der Kokultur (Abbildung 12 C–D) dominierten die Aggregate in den über 21 Tage osteogen vordifferenzierten Kulturen (V2-SCs-21d-vd-KK-BM-9d, Abbildung 12 D).

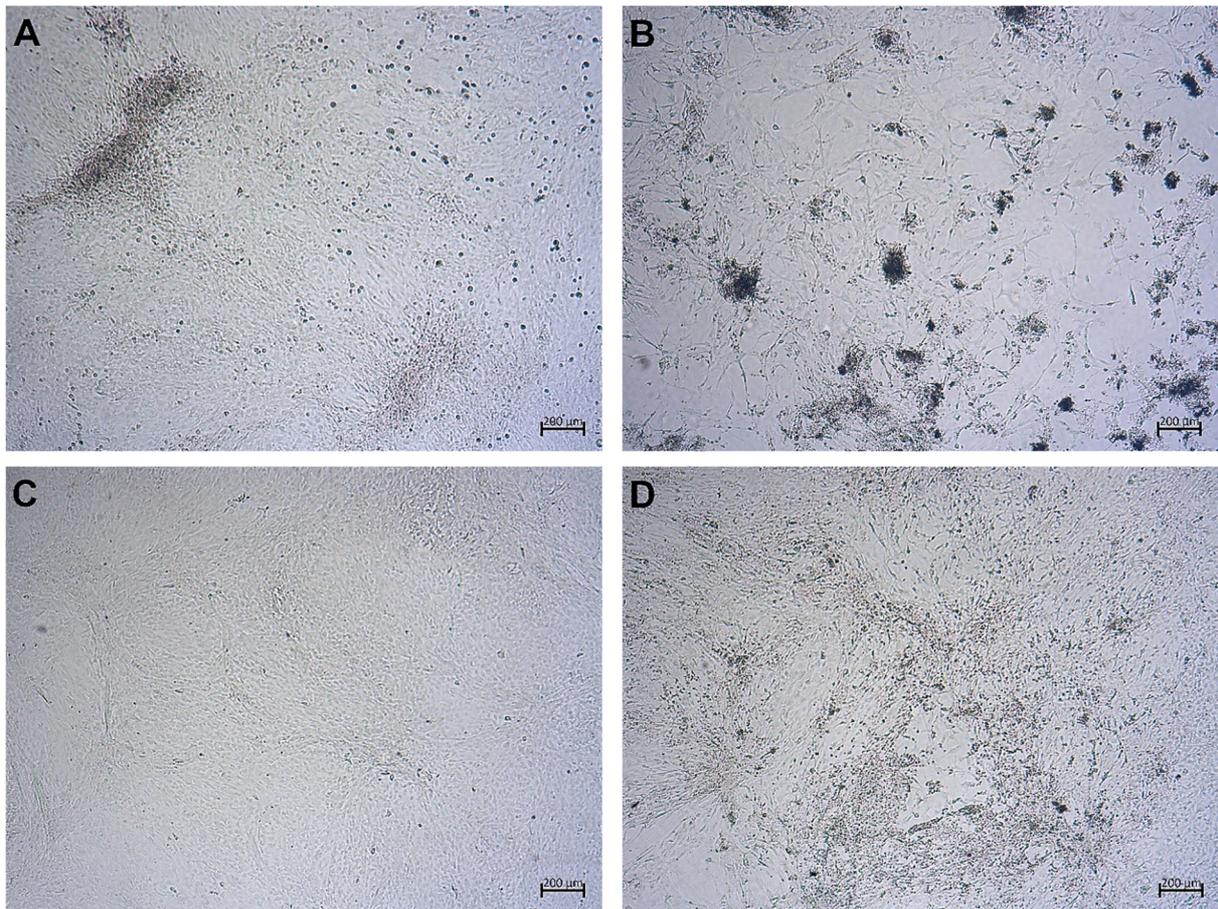


Abbildung 12: Native Bildaufnahmen der SCs der (A), (B) 5-tägigen Kokultur in BM nach (A) 14 Tagen und (B) 21 Tagen Vordifferenzierung sowie (C), (D) der 9-tägigen Kokultur in BM nach (C) 14 Tagen und (D) 21 Tagen Vordifferenzierung. Mit steigender Dauer der Vordifferenzierung formten sich vermehrt Zellanhäufungen. Prinzipiell führte die längere Kultivierungsdauer von 9 Tagen jedoch zu einer Abnahme der Zellaggregate.

Mit steigender Kultivierungsdauer waren sowohl nach 14- und 21-tägigen Vordifferenzierungsphasen weniger Zellaggregate zu beobachten (V2-SCs-14d-vd-KK-BM-5d vs. V2-SCs-14d-vd-KK-BM-9d (Abbildung 12 A vs. C); V2-SCs-21d-vd-KK-BM-5d vs. V2-SCs-21d-vd-KK-BM-9d (Abbildung 12 B vs. D)).

Alizarinfärbung der SCs

Entsprechend der unterschiedlichen Vordifferenzierungsphasen (14 und 21 Tage) und Kultivierungsphasen (5 und 9 Tage) wiesen die Kulturen (V2-SCs-14d-vd-KK-BM-5d, V2-SCs-21d-vd-KK-BM-5d, V2-SCs-14d-vd-KK-BM-9d, V2-SCs-21d-vd-KK-BM-9d) unterschiedliche Farbintensitäten im Rahmen der Alizarinfärbung auf (Abbildung 13 A-D).

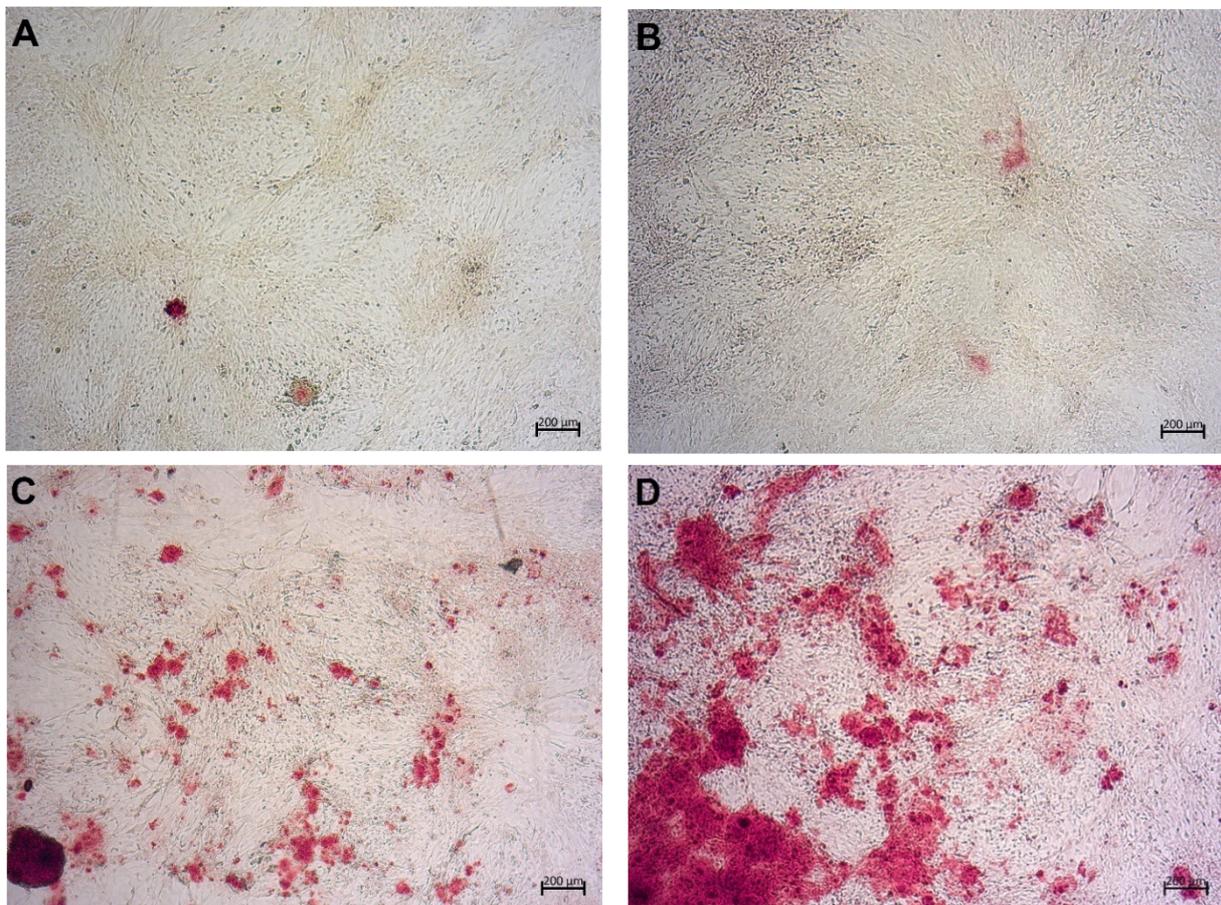


Abbildung 13: Alizarinfärbung der SCs nach (A) 14 Tagen und (B) 21 Tagen der Vordifferenzierung und einer Kultivierungsdauer von 5 Tagen in der Kokultur sowie nach (C) 14 Tagen und (D) 21 Tagen der Vordifferenzierung und einer Kultivierungsdauer von 9 Tagen in der Kokultur. Mit zunehmender Dauer der Vordifferenzierung und Kokultivierung nahmen Intensität und Umfang der durch Alizarin angefärbten Areale zu.

Kulturen, die 14 Tage vordifferenziert und 5 Tage in der Kokultur in BM (V2-SCs-14d-vd-KK-BM-5d) kultiviert wurden, wiesen nur sehr wenige angefärbte Bereiche auf (Abbildung 13 A), während sich die entsprechende 21-tägige Vordifferenzierung (V2-SCs-21d-vd-KK-BM-5d) in umfangreicheren Anfärbungen widerspiegelte (Abbildung 13 B). Dies war ebenfalls bei den SCs, die 9 Tage in der Kokultur kultiviert wurden, zu sehen (V2-SCs-14d-vd-KK-BM-9d vs. V2-SCs-21d-vd-KK-BM-9d, Abbildung 13 C–D). Prinzipiell nahmen die Calciumablagerungen und damit die Intensität der Alizarinfärbung vom 5. bis 9. Tag der Kultivierung deutlich zu.

Morphologie der osteoklastären Vorläuferzellen

Hinsichtlich der Zellmorphologie zeigten die OCVs, die mit den osteogen vordifferenzierten SCs kokultiviert wurden, keine Unterschiede. In allen Kulturen (V2-OCVs[SCs-14d-vd]-KK-BM-5d, V2-OCVs[SCs-21d-vd]-KK-BM-5d, V2-OCVs[SCs-14d-vd]-KK-BM-9d (Abbildung 14 A), V2-OCVs[SCs-21d-vd]-KK-BM-9d) waren nur wenige adhärente Zellen vorhanden. Osteoklasten-ähnliche Zellen waren nicht zu erkennen. Dagegen befanden sich in den entsprechenden Monokulturen, die mit RANKL und M-CSF (V2-OCVs-MK-BM-R-M-5d, V2-OCVs-MK-BM-R-M-9d (Abbildung 14 B)) behandelt wurden, zahlreiche adhärente Zellen. Einige davon zeigten Osteoklasten-ähnliche Morphologien.

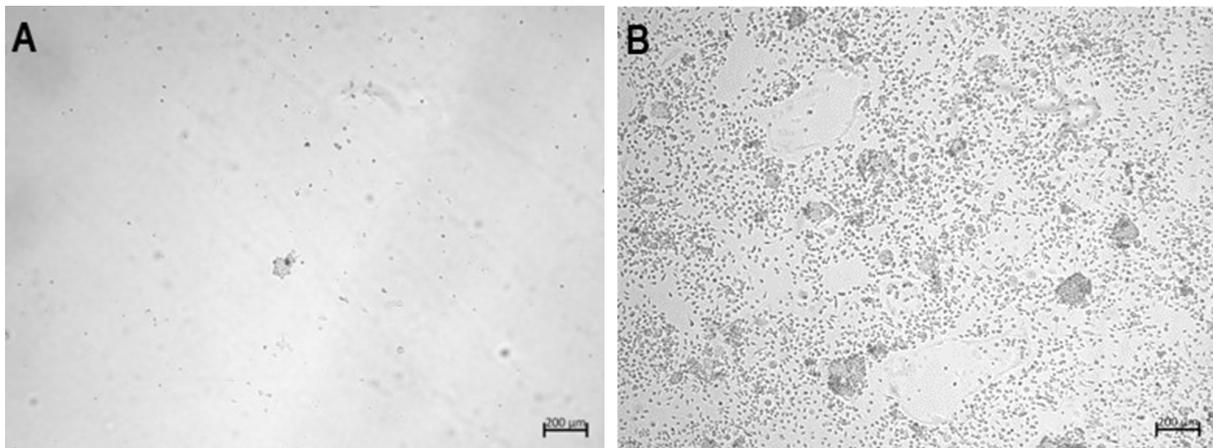


Abbildung 14: Native Bildaufnahmen der OCVs nach (A) 9 Tagen in der Kokultur mit SCs, die 14 Tage osteogen vordifferenziert wurden und nach (B) 9 Tagen in Monokultur unter Zugabe von RANKL und M-CSF in das Medium. In der Kokultur waren nach 9 Tagen nur wenige adhärente Zellen zu sehen (A). In der zur Kontrolle angelegten Monokultur waren dagegen adhärente Zellen mit Osteoklasten-ähnlicher Morphologie zu finden (B).

TRAP-Färbung der osteoklastären Vorläuferzellen

Die OCVs der Kokulturen (V2-OCVs[SCs-14d-vd]-KK-BM-5d, V2-OCVs[SCs-21d-vd]-KK-BM-5d, V2-OCVs[SCs-14d-vd]-KK-BM-9d, V2-OCVs[SCs-21d-vd]-KK-BM-9d) wiesen unabhängig von der Dauer der Vordifferenzierung der SCs keine TRAP-Aktivität auf (Abbildung 15 A).

In den OCVs der Monokulturen, die mit RANKL und M-CSF (V2-OCVs-MK-BM-R-M-5d, V2-OCVs-MK-BM-R-M-9d) kultiviert wurden, waren dagegen TRAP-positive, Osteoklasten-ähnliche Zellen erkennbar (Abbildung 15 B).

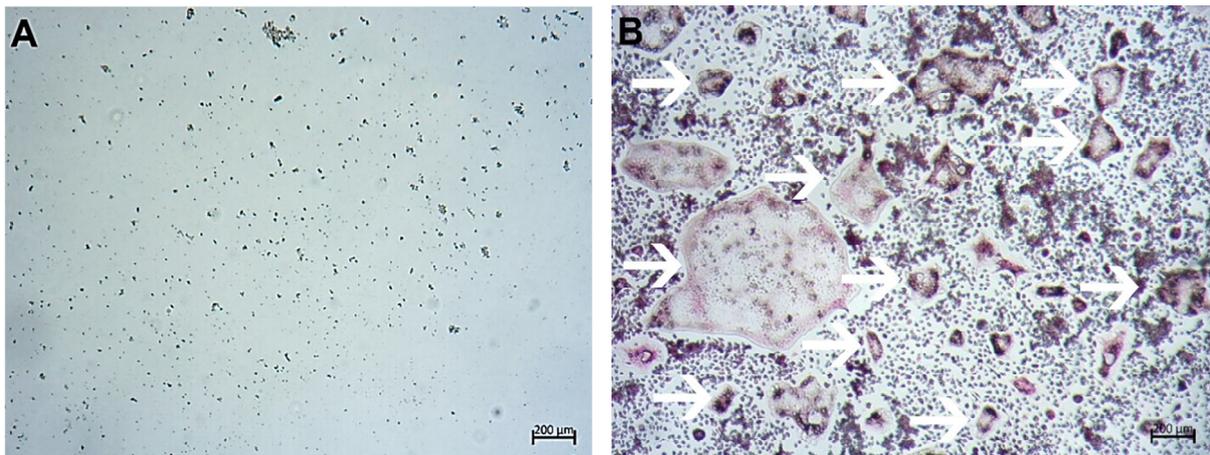


Abbildung 15: TRAP-Färbung der OCVs nach (A) 5 Tagen in der Kokultur mit SCs, die 14 Tage osteogen vordifferenziert wurden und nach (B) 5 Tagen in Monokultur unter Zugabe von RANKL und M-CSF in das Medium. In der Kokultur sind nach 5 Tagen nur wenige adhärenente Zellen zu sehen (A). In der angelegten Monokultur sind dagegen zahlreiche adhärenente TRAP-positive Zellen vorhanden. Einige dieser Zellen weisen eine Osteoklasten-ähnliche Morphologie auf (B, weiße Pfeile).

Phalloidin-färbung der osteoklastären Vorläuferzellen

In den Monokulturen der OCVs, die unter der Zugabe von RANKL und M-CSF kultiviert wurden (V2-OCVs-MK-BM-R-M-5d (Abbildung 16 A), V2-OCVs-MK-BM-R-M-9d (Abbildung 16 B)), waren multinukleäre Zellen mit Osteoklasten-ähnlicher Morphologie vorhanden, die einen Aktinring in der Zellperipherie aufwiesen.

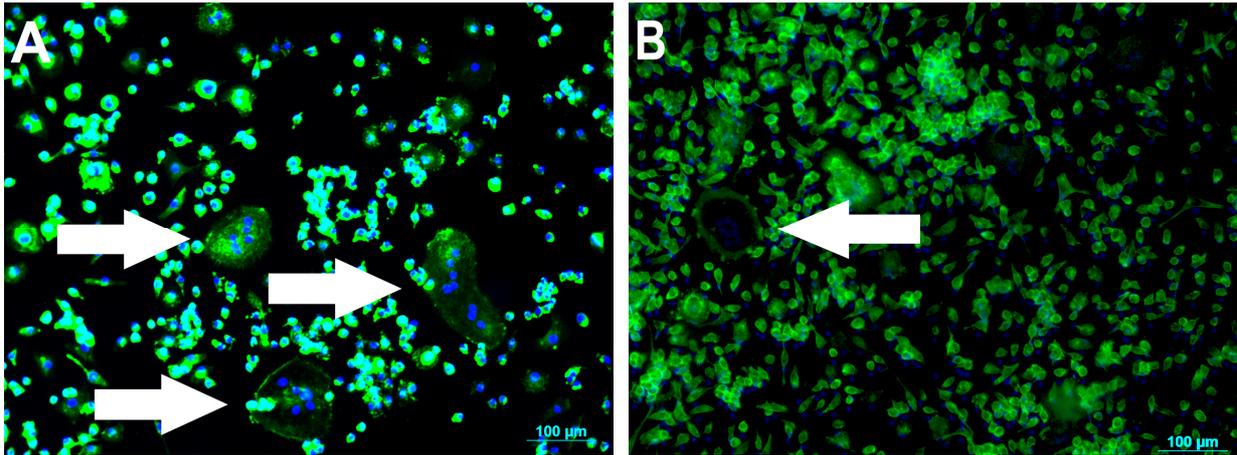


Abbildung 16: Phalloidininfärbung der OCVs, die (A) 5 und (B) 9 Tage in Monokultur unter der Zugabe von RANKL und M-CSF in das Medium kultiviert wurden. Es waren multinukleäre Zellen mit der Osteokasten-typischen Anfärbung des Zytoskeletts zu sehen (weiße Pfeile).

Vergleichende Auswertung der Runx2- und Cx43-Expressionsmuster der SCs

Die relative Expression von **Runx2** (Abbildung 17 A) war bei den SCs der Monokultur, die im Rahmen von Vorversuch 1 19 Tage in BM kultiviert wurden (V1-SCs-MK-BM-19d), höchst signifikant höher ($p \leq 0,001$) gegenüber den relativen Runx2-Expressionen der SCs der Kokultur aus Vorversuch 1 (V1-SCs-KK-BM-19d) und Vorversuch 2, unabhängig von der Kultur- und Vordifferenzierungsdauer (V2-SCs-14d-vd-KK-BM-9d, V2-SCs-21d-vd-KK-BM-9d). Die **Runx2**-Expressionsprofile der Kokulturen unterschieden sich kaum (V1-SCs-KK-BM-19d vs. V2-SCs-14d-vd-KK-BM-9d vs. V2-SCs-21d-vd-KK-BM-9d). Abbildung 17 zeigt die Ergebnisse der qPCR. Diese sind als Mittelwerte der $2^{-\Delta\Delta C_q}$ -Werte mit Standardabweichung dargestellt. Ein entsprechendes Ergebnis betraf auch die relativen **Cx43**-Expressionen (Abbildung 17 B). SCs, die 19 Tage in Monokultur in BM (V1-SCs-MK-BM-19d) kultiviert wurden, wiesen eine höchst signifikant höhere Expression ($p \leq 0,001$) auf als SCs der Kokulturen (V1-SCs-KK-BM-19d, V2-SCs-14d-vd-KK-BM-9d, V2-SCs-21d-vd-KK-BM-9d), während sich Expressionsprofile der Kokulturen kaum unterschieden (V1-SCs-KK-BM-19d vs. V2-SCs-14d-vd-KK-BM-9d vs. V2-SCs-21d-vd-KK-BM-9d).

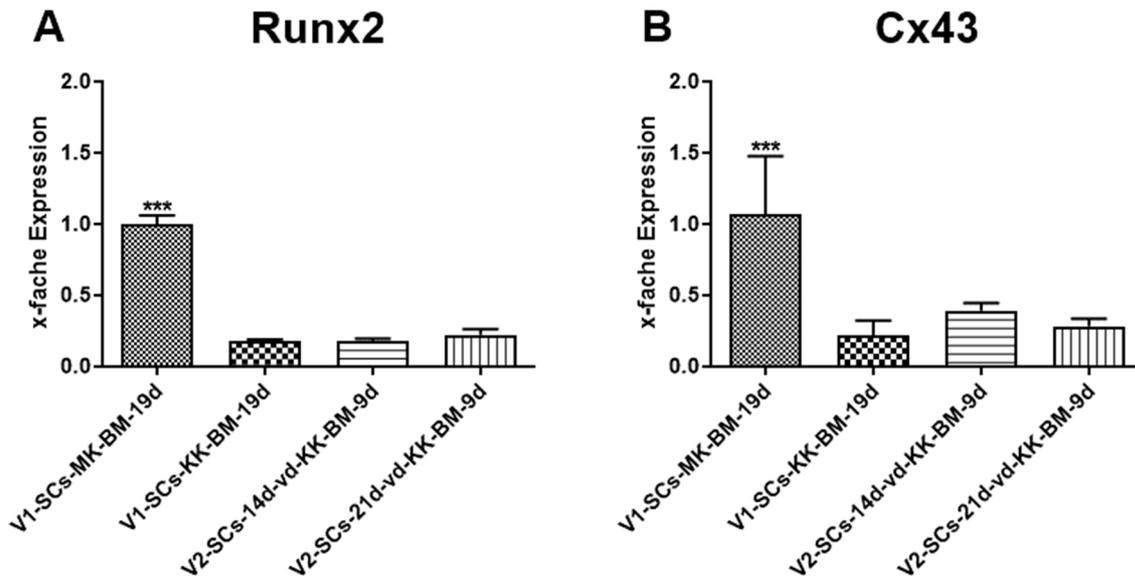


Abbildung 17: Vorversuch 1 und 2: vergleichende Darstellung der relativen Genexpressionen der SCs: (A) Runx2-Expressionen, (B) Cx43-Expressionen. Dargestellt als Mittelwerte der $2^{-\Delta\Delta Cq}$ -Werte mit Standardabweichung. Die relative Expression von Runx2 (A) und Cx43 (B) war bei den SCs der Monokultur (V1-SCs-MK-BM-19d) höchst signifikant höher ($p \leq 0,001$) im Vergleich zu den Kokulturen (V1-SCs-KK-BM-19d, V2-SCs-14d-vd-KK-BM-9d, V2-SCs-21d-vd-KK-BM-9d; *** = $p \leq 0,001$, BM = Basalmedium, Cx43 = Connexin 43, d = Tage, KK = Kokultur, MK = Monokultur, OCVs = osteoklastäre Vorläuferzellen, Runx2 = *Runt-related transcription factor 2*, SCs = mesenchymale Stromazellen, vd = osteogen vordifferenziert, V1 = Vorversuch 1, V2 = Vorversuch 2).

TRAP- und CTSK-Expressionsmuster der osteoklastären Vorläuferzellen

OCVs, die 9 Tage in Monokultur in BM (V1-OCVs-MK-BM-9d) kultiviert wurden, zeigten eine signifikant niedrigere ($p \leq 0,05$) **TRAP**-Expression als OCVs, die über den gleichen Zeitraum mit SCs kokultiviert wurden, die zuvor 21 Tage osteogen vordifferenziert wurden (V2-OCVs[SCs-21d-vd]-KK-BM-9d, Abbildung 18 A). OCVs, die 19 Tage in Kokultur mit BM kultiviert wurden (V1-OCVs-KK-BM-19d), wiesen signifikant bis hoch signifikant niedrigere **TRAP**-Expressionen auf als die OCVs, die mit vordifferenzierten SCs kokultiviert wurden, unabhängig davon, wie lange diese Vordifferenzierungsphasen andauerten.

Abbildung 18 A zeigt die relativen **TRAP**-Expressionen der Kulturen aus Vorversuch 1 (V1-OCVs-MK-BM-9d, V1-OCVs-KK-BM-19d) und Vorversuch 2 (V2-OCVs[SCs-14d-vd]-KK-BM-9d, V2-OCVs[SCs-21d-vd]-KK-BM-9d), die als Mittelwerte der $2^{-\Delta\Delta Cq}$ -Werte mit Standardabweichung dargestellt sind.

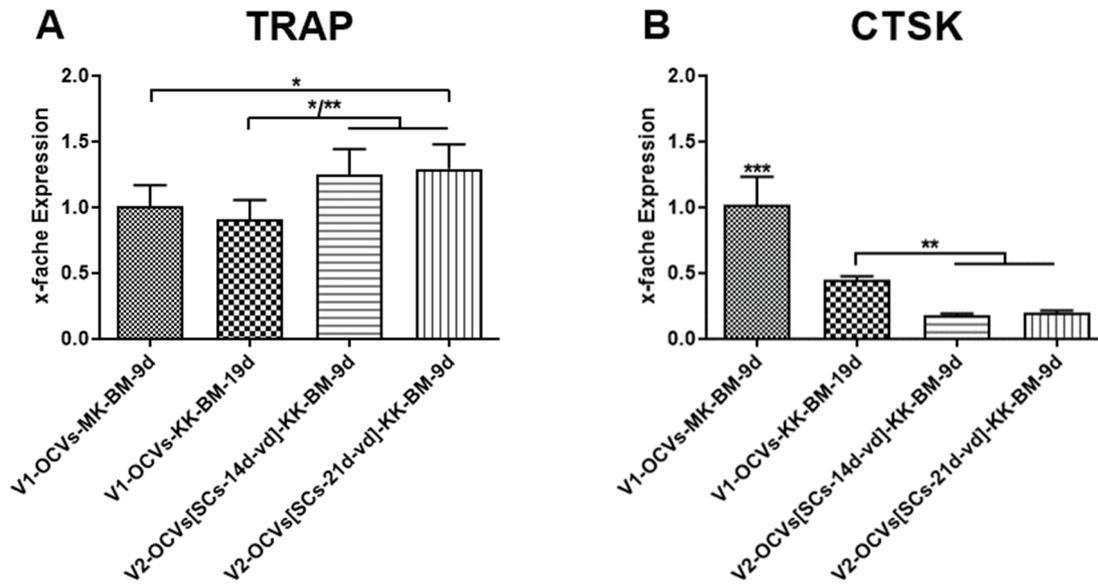


Abbildung 18: Vorversuch 1 und 2: vergleichende Darstellung der relativen Genexpressionen der OCVs: (A) TRAP-Expressionen, (B) CTSK-Expressionen. Dargestellt als Mittelwerte der $2^{-\Delta\Delta Cq}$ -Werte mit Standardabweichung. (A) OCVs, die mit vordifferenzierten SCs kokultiviert wurden (V2-OCVs[SCs-14d-vd]-KK-BM-9d, V2-OCVs[SCs-21d-vd]-KK-BM-9d), wiesen signifikant bis hoch signifikant höhere TRAP-Expressionen auf als OCVs der Kokultur, bei der keine Vordifferenzierung der SCs erfolgte (V1-OCVs-KK-BM-19d). (B) Die relative CTSK-Expression der OCVs der Monokultur (V1-OCVs-MK-BM-9d) war höchst signifikant höher als bei den Kokulturen (V1-OCVs-KK-BM-19d, V2-OCVs[SCs-14d-vd]-KK-BM-9d, V2-OCVs[SCs-21d-vd]-KK-BM-9d; *** = $p \leq 0,001$, ** = $p \leq 0,01$, * = $p \leq 0,05$, / = oder, BM = Basalmedium, CTSK = Cathepsin K, d = Tage, KK = Kokultur, MK = Monokultur, OCVs = osteoklastäre Vorläuferzellen, SCs = mesenchymale Stromazellen, TRAP = Tartrat-resistente saure Phosphatase, vd = osteogen vordifferenziert, V1 = Vorversuch 1, V2 = Vorversuch 2).

Die relative **CTSK**-Expression der OCVs-Monokultur, die 9 Tage mit BM kultiviert wurde (V1-OCVs-MK-BM-9d), war gegenüber den OCVs der Kokulturen (V1-OCVs-KK-BM-19d, V2-OCVs[SCs-14d-vd]-KK-BM-9d, V2-OCVs[SCs-21d-vd]-KK-BM-9d) höchst signifikant höher ($p \leq 0,001$), unabhängig von der Dauer der Vordifferenzierungsphasen von 14 und 21 Tagen (Vorversuch 2) sowie der Kultivierungszeit (Abbildung 18 B).

Die vergleichende Untersuchung der Kokulturen verdeutlichte bei den OCVs, die 19 Tage mit BM (V1-OCVs-KK-BM-19d) kultiviert wurden, eine hoch signifikant höhere ($p \leq 0,01$) Expression gegenüber den OCVs, die mit osteogen vordifferenzierten SCs (V2-OCVs[SCs-14d-vd]-KK-BM-9d, V2-OCVs[SCs-21d-vd]-KK-BM-9d) kokultiviert wurden. Die unterschiedlich lange andauernde osteogene Vordifferenzierung hatte keinen Einfluss auf dieses Ergebnis.

Wichtigste Ergebnisse der Vorversuche 1 und 2

Im Rahmen von Vorversuch 1 bildeten die SCs der Kokultur nach Kultivierungsphasen von 5, 9, 14 und 19 Tagen keine mineralisierte Matrix. Die Runx2-Expressionen der SCs der Kokulturen waren niedriger als die in der Monokultur festgestellten Expressionsmuster. Die OCVs der Kokulturen zeigten jedoch keine ausreichenden Anzeichen einer stattfindenden Osteoklastengnese – weder auf morphologischer noch auf molekularbiologischer Ebene. Mit dem Ziel, sowohl die Osteogenese als auch die Osteoklastengnese zu stimulieren, wurden die SCs daher im Verlauf von Vorversuch 2 über 14 und 21 Tage osteogen vordifferenziert. Die SCs bildeten daraufhin nach einer Kultivierungszeit von 5 und 9 Tagen mineralisierte Matrix. Die Runx2- und Cx43-Expressionen der vordifferenzierten SCs der Kokulturen waren niedriger als die festgestellten Level der SCs der Monokulturen. Die OCVs zeigten jedoch auch durch die Vordifferenzierung der kokultivierten SCs keine zufriedenstellende Osteoklastengnese. Daher wurde für die Etablierung der Kultivierungsbedingungen auf eine Vordifferenzierung der SCs in der Folge verzichtet.

4.1.3 Einsatz der Differenzierungsfaktoren *receptor activator of nuclear factor- κ B ligand* und *macrophage colony-stimulating factor-1* im Kokultursystem: Vorversuch 3

Im 3. Vorversuch wurde durch die Zugabe der Faktoren RANKL und M-CSF angestrebt, die Osteoklastengnese zu stimulieren. Die Versuchslaufzeit wurde entsprechend der Ergebnisse aus den Vorversuchen 1 und 2 auf 9 Tage festgesetzt.

Morphologie der mesenchymalen Stromazellen

SCs, die 9 Tage in Kokultur in BM (V3-SCs-KK-BM-9d (Abbildung 19 A)), in BM unter der Zugabe von RANKL (V3-SCs-KK-BM-R-9d (Abbildung 19 B)) sowie in BM unter der Zugabe von RANKL und M-CSF (V3-SCs-KK-BM-R-M-9d) kultiviert wurden, wiesen keine morphologischen Unterschiede auf.

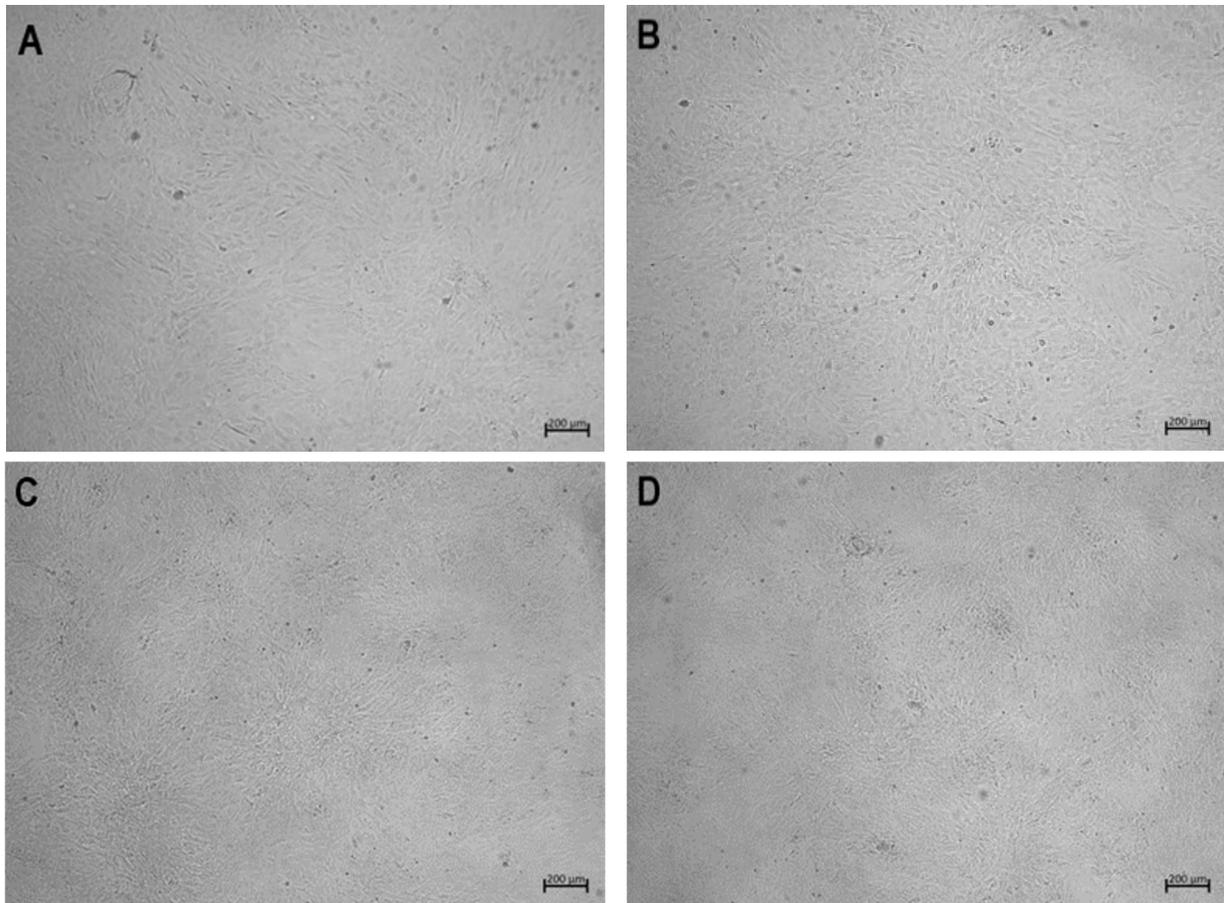


Abbildung 19: Native Bildaufnahmen der SCs, die 9 Tage lang (A), (B) in Kokultur mit OCVs unter (A) BM, (B) BM unter dem Zusatz von RANKL bzw. (C), (D) in Monokultur unter (C) BM, (D) BM unter dem Zusatz von RANKL kultiviert wurden. In allen Versuchsaufbauten zeigte sich ein dichter Rasen adhärenter Zellen mit spindelförmiger Morphologie.

Prinzipiell waren in allen Kulturen (V3-SCs-KK-BM-9d (Abbildung 19 A), V3-SCs-KK-BM-R-9d (Abbildung 19 B), V3-SCs-KK-BM-R-M-9d) dichte Zellrasen von adhärenenten, spindelförmigen bis polygonalen Zellen zu beobachten. In den entsprechenden Monokulturen der SCs (V3-SCs-MK-BM-9d (Abbildung 19 C), V3-SCs-MK-BM-R-9d (Abbildung 19 D), V3-SCs-MK-BM-R-M-9d) dominierten ebenfalls adhärenente, spindelförmige bis polygonale Zellen – unabhängig von der unterschiedlichen Zusammensetzung der Medien.

Runx2-, Cx43- und Panx1–3-Expressionsmuster der mesenchymalen Stromazellen

Die Ergebnisse der qPCR der SCs sind in den Abbildungen 21–25 zusammengefasst. Sie sind dargestellt als Mittelwerte der $2^{-\Delta\Delta C_q}$ -Werte mit Standardabweichung. Die p-Werte sind dem Anhang (siehe 9.1.1–9.1.5) zu entnehmen. Normiert wurde gegen SCs der Monokultur nach 9 Tagen in BM (V3-SCs-MK-BM-9d) im Sinne der einfachen Genexpression.

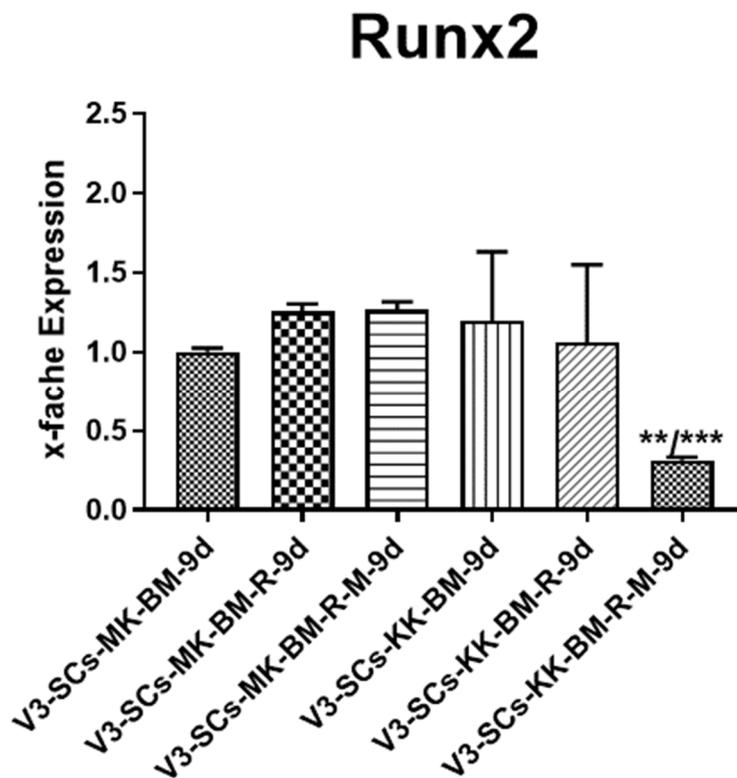


Abbildung 20: Vorversuch 3: relative Runx2-Genexpressionen der SCs. Dargestellt als Mittelwerte der $2^{-\Delta\Delta C_q}$ -Werte mit Standardabweichung. Die relative Runx2-Expression der SCs, die in Kokultur unter der Zugabe von RANKL und M-CSF kultiviert wurden, war gegenüber den anderen Kulturen (V3-SCs-MK-BM-9d, V3-SCs-MK-BM-R-9d, V3-SCs-MK-BM-R-M-9d, V3-SCs-KK-BM-9d, V3-SCs-KK-BM-R-9d) hoch bis höchst signifikant vermindert (** = $p \leq 0,01$, / = oder, BM = Basalmedium, d = Tage, KK = Kokultur, M = M-CSF = *macrophage colony-stimulating factor-1*, MK = Monokultur, R = RANKL = *receptor activator of nuclear factor- κ B ligand*, Runx2 = *Runt-related transcription factor 2*, SCs = mesenchymale Stromazellen, V3 = Vorversuch 3).

Die relative Expression von **Runx2** (Abbildung 20) war in den SCs der Kokultur, die in BM unter Zugabe von RANKL und M-CSF (V3-SCs-KK-BM-R-M-9d) kultiviert wurden, hoch bis höchst signifikant niedriger gegenüber den SCs, die in BM (V3-SCs-KK-BM-9d), in BM mit RANKL (V3-SCs-KK-BM-R-9d) und für 9 Tage in der Monokultur in BM (V3-SCs-MK-BM-9d), in BM mit RANKL (V3-SCs-MK-BM-R-9d) sowie mit RANKL und M-CSF (V3-SCs-MK-BM-R-M-9d) kultiviert wurden. Keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der relativen Runx2-Expressionen ergaben sich zwischen den SCs der Mono- oder Kokulturen, die jeweils 9 Tage unter dem Einfluss von RANKL kultiviert wurden (V3-SCs-MK-BM-R-9d vs. V3-SCs-KK-BM-R-9d).

Auch die relative **Cx43**-Expression (Abbildung 21) der SCs, die 9 Tage in Kokultur in BM unter der Zugabe von RANKL und M-CSF (V3-SCs-KK-BM-R-M-9d) kultiviert wurden, war signifikant niedriger als bei SCs, die für den gleichen Zeitraum in BM (V3-SCs-KK-BM-9d) sowie in BM unter der Zugabe von RANKL (V3-SCs-KK-BM-R-9d) kultiviert wurden. Im Vergleich zu den SCs der Monokulturen in BM (V3-SCs-MK-BM-9d), BM unter der Zugabe von RANKL (V3-SCs-MK-BM-R-9d) und BM unter der Zugabe von RANKL und M-CSF (V3-SCs-MK-BM-R-M-9d) war die Expression der Zellen in Kokultur unter der Zugabe von RANKL und M-CSF (V3-SCs-KK-BM-R-M-9d) höchst signifikant vermindert.

Signifikant bis höchst signifikant höhere relative **Cx43**-Expressionen waren nach Kultivierung der SCs in den Monokulturen (V3-SCs-MK-BM-9d, V3-SCs-MK-BM-R-9d, V3-SCs-MK-BM-R-M-9d) gegenüber den in den Kokulturen inkubierten Zellen (V3-SCs-KK-BM-9d, V3-SCs-KK-BM-R-9d, V3-SCs-KK-BM-R-M-9d) zu verzeichnen (Abbildung 21). Die jeweiligen p-Werte sind im Anhang (siehe 9.1.2) zu finden.

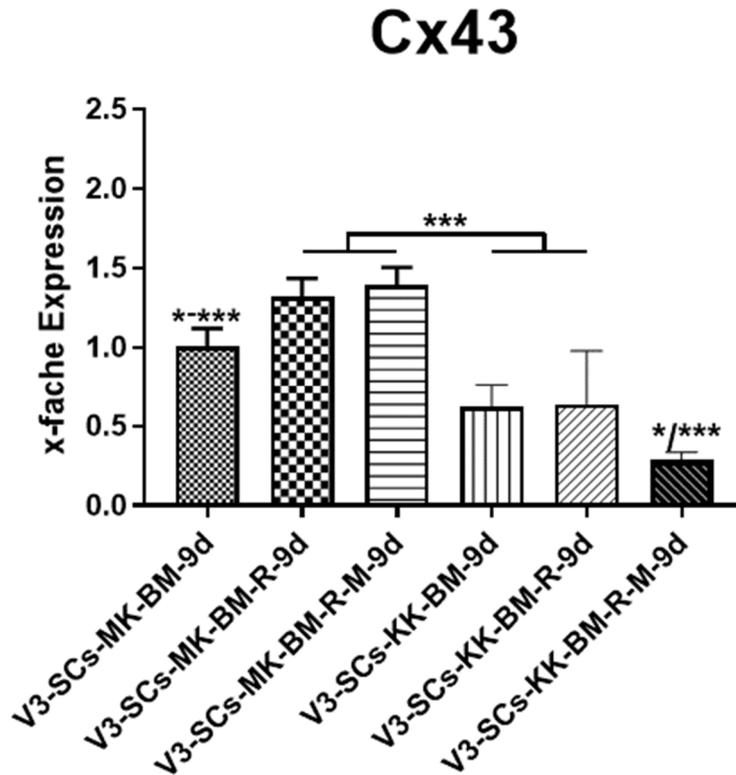


Abbildung 21: Vorversuch 3: relative Cx43-Genexpressionen der SCs. Dargestellt als Mittelwerte der $2^{-\Delta\Delta Cq}$ -Werte mit Standardabweichung. SCs der Kokulturen (V3-SCs-KK-BM-9d, V3-SCs-KK-BM-R-9d, V3-SCs-KK-BM-R-M-9d) wiesen höchst signifikant niedrigere relative Cx43-Expressionen als SCs der Monokulturen (V3-SCs-MK-BM-9d, V3-SCs-MK-BM-R-9d, V3-SCs-MK-BM-R-M-9d) auf und zeigten nach Kultivierung in BM unter der Zugabe von RANKL und M-CSF (V3-SCs-KK-BM-R-M-9d) eine signifikant niedrigere relative Cx43-Expression gegenüber den anderen Kokulturen (V3-SCs-KK-BM-9d, V3-SCs-KK-BM-R-9d; *** = $p \leq 0,001$, * = $p \leq 0,05$, / = oder, - = bis, BM = Basalmedium, Cx43 = Connexin 43, d = Tage, KK = Kokultur, M = M-CSF = *macrophage colony-stimulating factor-1*, MK = Monokultur, R = RANKL = *receptor activator of nuclear factor- κ B ligand*, SCs = mesenchymale Stromazellen, V3 = Vorversuch 3).

In Anlehnung an die festgestellten **Runx2**- und **Cx43**-Expressionsmuster waren ebenfalls hoch bis höchst signifikant niedrigere relative Expressionsmuster von **Panx1** (Abbildung 22, p-Werte: Anhang 9.1.3) bei den SCs der Kokultur zu beobachten, die 9 Tage in BM unter Zugabe von RANKL und M-CSF (V3-SCs-KK-BM-R-M-9d) kultiviert wurden – im Unterschied zu SCs der Kokulturen, entsprechend in BM (V3-SCs-KK-BM-9d) und in BM unter Zusatz von RANKL (V3-SCs-KK-BM-R-9d) kultiviert. Signifikant bis höchst signifikant höhere Genexpressionen von **Panx1** zeigten die SCs der Monokulturen (V3-SCs-MK-BM-9d, V3-SCs-MK-BM-R-9d, V3-SCs-MK-BM-R-M-9d) im Unterschied zu den SCs der Kokulturen (V3-SCs-KK-BM-9d, V3-SCs-KK-BM-R-9d, V3-SCs-KK-BM-R-M-9d).

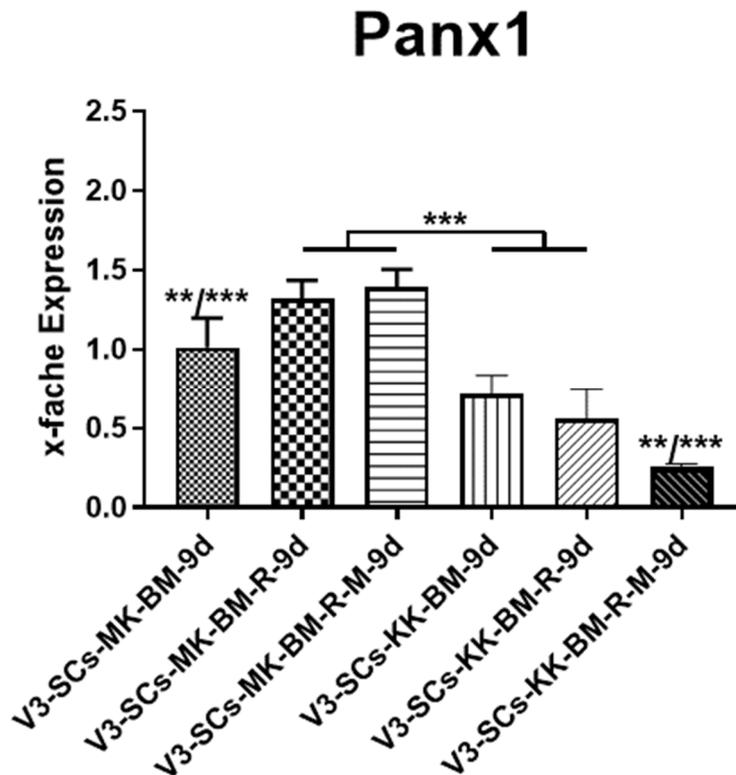


Abbildung 22: Vorversuch 3: relative Panx1-Genexpressionen der SCs. Dargestellt als Mittelwerte der $2^{-\Delta\Delta Cq}$ -Werte mit Standardabweichung. SCs der Kokulturen (V3-SCs-KK-BM-9d, V3-SCs-KK-BM-R-9d, V3-SCs-KK-BM-R-M-9d) zeigten hoch bis höchst signifikant niedrigere Panx1-Expressionen als die SCs der Monokulturen (V3-SCs-MK-BM-9d, V3-SCs-MK-BM-R-9d, V3-SCs-MK-BM-R-M-9d). Beim Vergleich der Kokulturen untereinander wiesen die SCs unter der Zugabe von RANKL und M-CSF (V3-SCs-KK-BM-R-M) hoch bis höchst signifikant niedrigere relative Panx1-Expressionen auf (***) = $p \leq 0,001$, ** = $p \leq 0,01$, / = oder, BM = Basalmedium, d = Tage, KK = Kokultur, M = M-CSF = *macrophage colony-stimulating factor-1*, MK = Monokultur, Panx1 = Pannexin 1, R = RANKL = *receptor activator of nuclear factor- κ B ligand*, SCs = mesenchymale Stromazellen, V3 = Vorversuch 3).

Dagegen war die relative **Panx2**-Expression (Abbildung 23) der SCs der Kokultur, die für 9 Tage in BM unter der Zugabe der Faktoren RANKL und M-CSF (V3-SCs-KK-BM-R-M-9d) kultiviert wurden, signifikant niedriger als bei den SCs der entsprechenden Monokultur (V3-SCs-MK-BM-R-M-9d). Im Anhang 9.1.4 ist eine Übersicht über die p-Werte dargestellt.

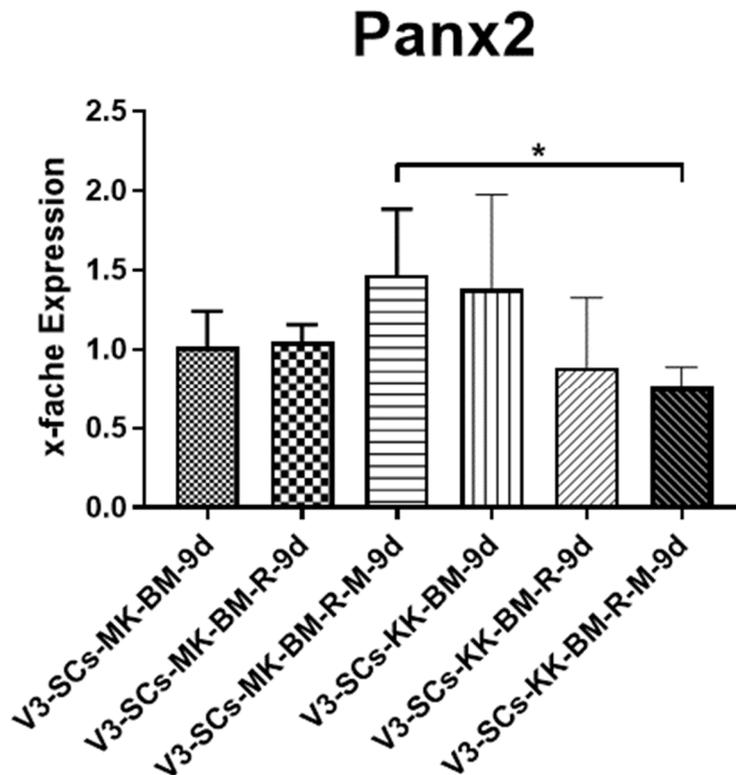


Abbildung 23: Vorversuch 3: relative Panx2-Genexpressionen der SCs. Dargestellt als Mittelwerte der $2^{-\Delta\Delta Cq}$ -Werte mit Standardabweichung. Die Panx2-Expression von SCs der Kokultur (V3-SCs-KK-BM-R-M-9d) war nach Kultivierung in BM unter der Zugabe von RANKL und M-CSF signifikant höher als bei der entsprechenden Monokultur (V3-SCs-MK-BM-R-M-9d; * = $p \leq 0,05$, BM = Basalmedium, d = Tage, KK = Kokultur, M = M-CSF = *macrophage colony-stimulating factor-1*, MK = Monokultur, Panx2 = Pannexin 2, R = RANKL = *receptor activator of nuclear factor- κ B ligand*, SCs = mesenchymale Stromazellen, V3 = Vorversuch 3).

Die relativen **Panx3**-Expressionen (Abbildung 24, p-Werte: Anhang 9.1.5) waren hingegen bei den SCs der Kokulturen (V3-SCs-KK-BM-9d, V3-SCs-KK-BM-R-9d, V3-SCs-KK-BM-R-M-9d) hoch bis höchst signifikant vermindert im Vergleich zu den Mustern der Monokulturen (V3-SCs-MK-BM-9d, V3-SCs-MK-BM-R-9d, V3-SCs-MK-BM-R-M-9d). Keine signifikanten Unterschiede ergaben sich trotz unterschiedlicher Medienzusammensetzung – weder beim Vergleich der Expressionsmuster der Kokulturen (V3-SCs-KK-BM-9d, V3-SCs-KK-BM-R-9d, V3-SCs-KK-BM-R-M-9d) noch bei dem der Monokulturen (V3-SCs-MK-BM-9d, V3-SCs-MK-BM-R-9d, V3-SCs-MK-BM-R-M-9d).

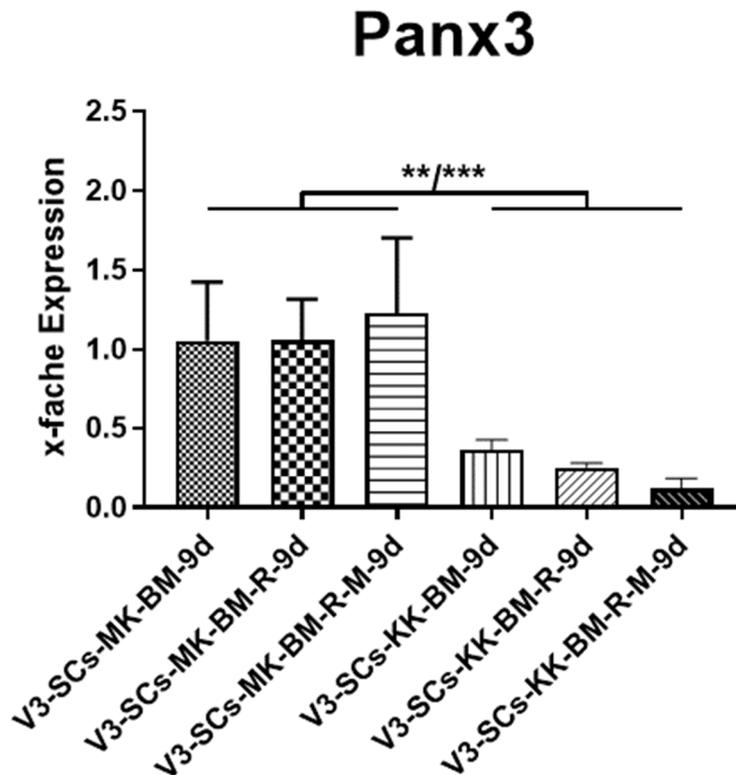


Abbildung 24: Vorversuch 3: relative Panx3-Genexpressionen der SCs. Dargestellt als Mittelwerte der $2^{-\Delta\Delta C_q}$ -Werte mit Standardabweichung. Unabhängig von der Zusammensetzung der Medien zeigten die SCs der Kokultur (V3-SCs-KK-BM-9d, V3-SCs-KK-BM-R-9d, V3-SCs-KK-BM-R-M-9d) höchst signifikant niedrigere relative Panx3-Expressionen als die Monokulturen (V3-SCs-MK-BM-9d, V3-SCs-MK-BM-R-9d, V3-SCs-MK-BM-R-M-9d; *** = $p \leq 0,001$, BM = Basalmedium, d = Tage, KK = Kokultur, M = M-CSF = *macrophage colony-stimulating factor-1*, MK = Monokultur, Panx3 = Pannexin 3, R = RANKL = *receptor activator of nuclear factor- κ B ligand*, SCs = mesenchymale Stromazellen, V3 = Vorversuch 3).

Morphologie der osteoklastären Vorläuferzellen

OCVs der Kokultur, die 9 Tage in BM (V3-OCVs-KK-BM-9d, Abbildung 25 A) kultiviert wurden, waren von runder bis spindelförmiger Gestalt. Vereinzelt formten diese Zellen dichte Zellansammlungen. Osteoklasten-ähnliche Zellen waren nur vereinzelt zu erkennen. Zellen, die unter der Zugabe von RANKL über den gleichen Zeitraum kultiviert wurden (V3-OCVs-KK-BM-R-9d, Abbildung 25 C), waren prinzipiell von gleicher Gestalt, lagerten sich jedoch vermehrt in Zellclustern zusammen. Auch Zellen mit Osteoklasten-ähnlicher Morphologie waren häufiger zu beobachten. Eine Vielzahl von Zellclustern und Zellen großen Durchmessers waren jedoch in den Kulturen sichtbar, die 9 Tage unter der Zugabe von RANKL und M-CSF kultiviert wurden (V3-OCVs-KK-BM-R-M-9d, Abbildung 25 E).

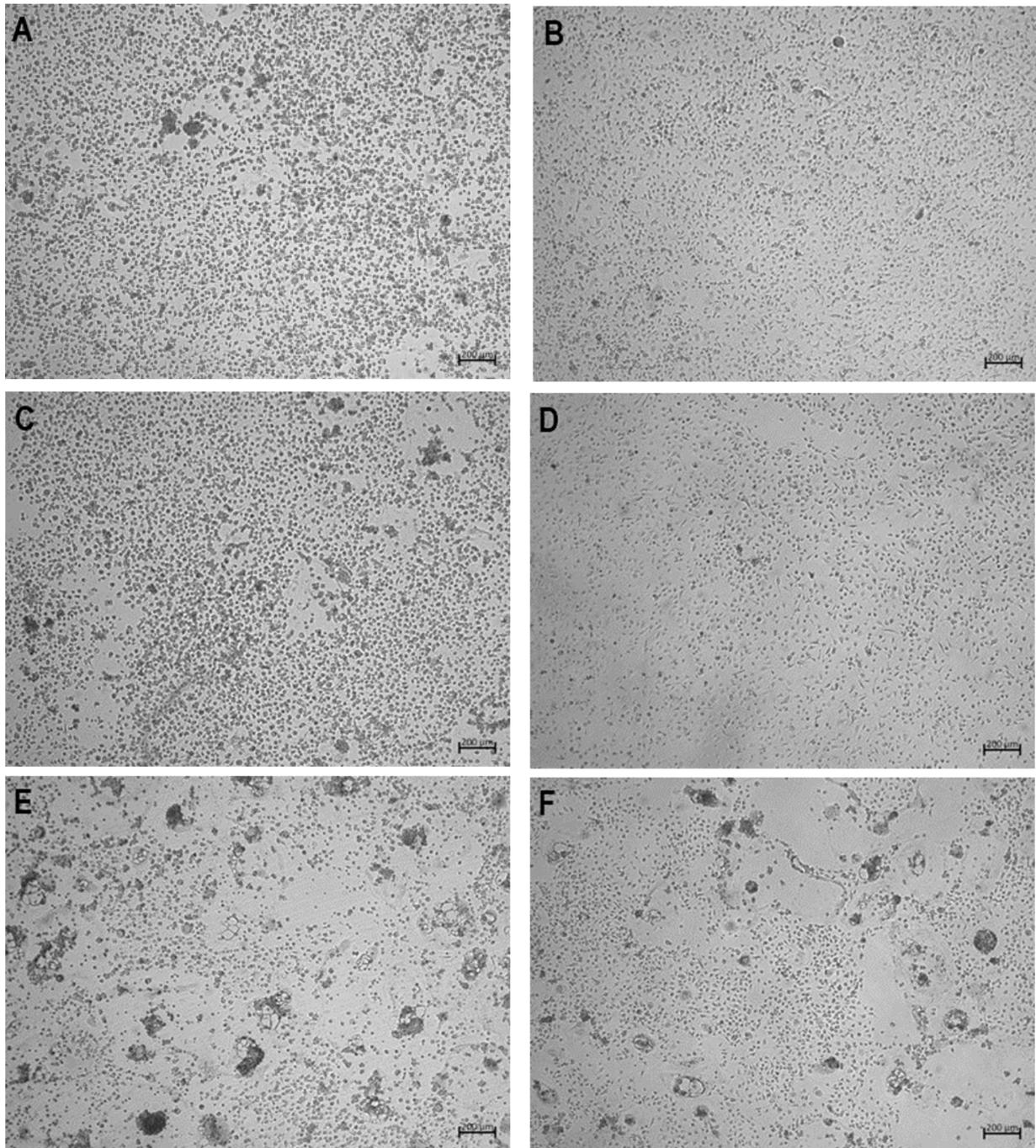


Abbildung 25: Native Bildaufnahme der OCVs nach 9 Tagen in (A), (C), (E) Kokkultur mit SCs unter (A) BM, (C) BM unter dem Zusatz von RANKL, (E) BM unter dem Zusatz von RANKL und M-CSF sowie (B), (D), (F) Monokultur unter (B) BM, (D) BM unter dem Zusatz von RANKL und (F) BM unter dem Zusatz von RANKL und M-CSF. Es zeigten sich Unterschiede in Bezug auf das verwendete Kultursystem sowie das verwendete Medium. Im Kokultursystem war die höchste Anzahl Osteoklasten-ähnlicher Zellen unter Verwendung des BM unter dem Zusatz von RANKL und M-CSF nachzuweisen (E). In Monokultur zeigten sich im BM keine Osteoklasten-ähnlichen Zellen (B), während unter dem Zusatz von RANKL und M-CSF die höchste Anzahl zu finden war (F).

Bei den entsprechenden Monokulturen waren ebenfalls in Abhängigkeit der Medienzusammensetzung Unterschiede hinsichtlich der Morphologie feststellbar. So dominierten in reinem BM (V3-OCVs-MK-BM-9d, Abbildung 25 B) spindelförmige bis polygonale Zellen, während unter dem Einfluss von RANKL (V3-OCVs-MK-BM-R-9d, Abbildung 25 D) bereits vereinzelte Zellen mit Osteoklasten-ähnlicher Morphologie auftraten. Augenfällig war ihr häufiges Auftreten nach Zugabe von RANKL und M-CSF (V3-OCVs-MK-BM-R-M-9d, Abbildung 25 E). Des Weiteren waren runde bis spindelförmige Zellen zu sehen, die teils in Zellaggregaten organisiert waren.

TRAP- und CTSK-Expressionsmuster der osteoklastären Vorläuferzellen

Die Ergebnisse der qPCR der OCVs sind in den Abbildungen 27–28 zusammengefasst. Sie sind dargestellt als Mittelwerte der $2^{-\Delta\Delta Cq}$ -Werte mit Standardabweichung. Normiert wurde gegen OCVs der Monokultur nach 9 Tagen in BM (V3-OCVs-MK-BM-9d) im Sinne der einfachen Genexpression. Die p-Werte sind dem Anhang (siehe 9.1.6–9.1.7) zu entnehmen.

Hinsichtlich der relativen **TRAP**-Expressionen (Abbildung 26) ergaben sich signifikante Unterschiede mit Blick auf die Kultivierungsbedingungen. OCVs der Kokultur, die in BM (V3-OCVs-KK-BM-9d) kultiviert wurden, zeigten gegenüber der Kokultur, der zusätzlich RANKL und M-CSF über das Medium zugeführt wurde (V3-OCVs-KK-BM-R-M-9d), hoch signifikant niedrigere Expressionslevel.

Diese in der Kokultur (V3-OCVs-KK-BM-9d) festgestellten Level waren ebenfalls hoch bis höchst signifikant erniedrigt im Vergleich zu den in den Monokulturen festgestellten Expressionsprofilen der OCVs, die mit RANKL (V3-OCVs-MK-BM-R-9d) sowie mit RANKL und M-CSF (V3-OCVs-MK-BM-R-M-9d) kultiviert wurden. Die jeweiligen p-Werte sind im Anhang 9.1.6 dargestellt.

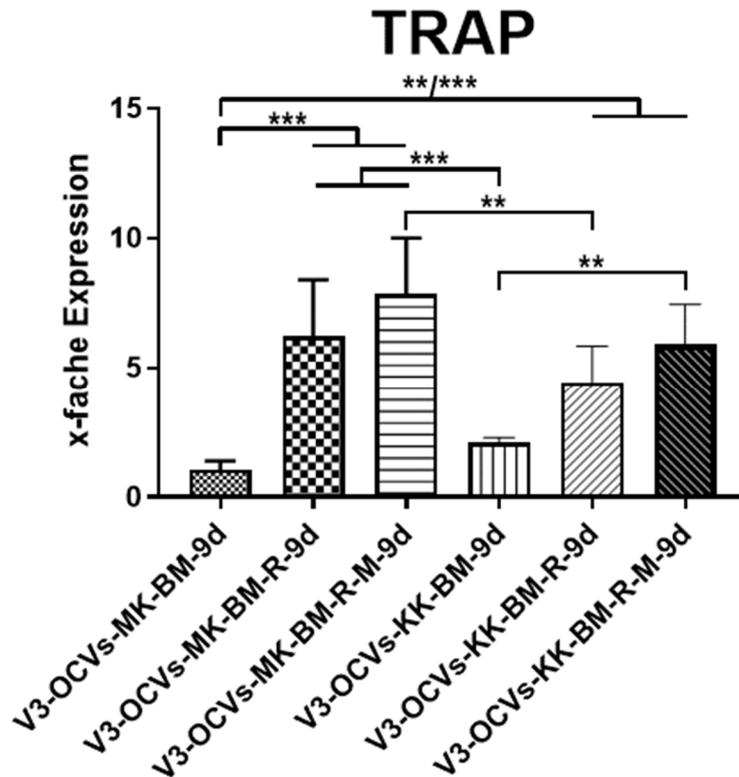


Abbildung 26: Vorversuch 3: relative TRAP-Genexpressionen der OCVs. Dargestellt als Mittelwerte der $2^{-\Delta\Delta C_q}$ -Werte mit Standardabweichung. OCVs der Kokultur, die in BM kultiviert wurden, wiesen eine hoch bis höchst signifikant niedrigere relative TRAP-Expression auf als die entsprechend in BM unter der Zugabe von RANKL und M-CSF kultivierten OCVs (V3-OCVs-KK-BM-R-M-9d) sowie den im Rahmen von Monokulturen kultivierten OCVs unter der Zugabe von RANKL (V3-OCVs-MK-BM-R-9d) oder RANKL und M-CSF (V3-OCVs-MK-BM-R-M-9d; *** = $p \leq 0,001$, ** = $p \leq 0,01$, * = $p \leq 0,05$, / = oder, BM = Basalmedium, d = Tage, KK = Kokultur, M = M-CSF = *macrophage colony-stimulating factor-1*, MK = Monokultur, OCVs = osteoklastäre Vorläuferzellen, R = RANKL = *receptor activator of nuclear factor- κ B ligand*, TRAP = Tartrat-resistente saure Phosphatase, V3 = Vorversuch 3).

OCVs der Kokultur, die RANKL und M-CSF (V3-OCVs-KK-BM-R-M-9d) erhielten, wiesen höchst signifikant höhere relative **CTSK**-Expressionslevel auf (Abbildung 27, Übersicht p-Werte: Anhang 9.1.7) als Kokulturen, die nur in BM (V3-OCVs-KK-BM-9d) sowie in RANKL-enthaltendem BM (V3-OCVs-KK-BM-R-9d) kultiviert wurden. Sie zeigten ebenfalls zu den OCVs der Monokultur, die in BM mit RANKL (V3-OCVs-MK-BM-R-9d) kultiviert wurden, eine höchst signifikant höhere relative CTSK-Expression.

Im Gegensatz dazu wiesen sie (V3-OCVs-KK-BM-R-M-9d) jedoch höchst signifikant niedrigere Expressionslevel auf als die Zellen, die in Monokultur mit dem entsprechenden Medium (V3-OCVs-MK-BM-R-M-9d) kultiviert wurden.

Prinzipiell besaßen OCVs der Monokultur, die unter Zugabe von RANKL und M-CSF (V3-OCVs-MK-BM-R-M-9d) inkubiert wurden, höchst signifikant höhere relative CTSK-Expressionen gegenüber allen anderen im Rahmen von Vorversuch 3 verwendeten Kultur- und Medienansätzen (V3-OCVs-KK-BM-9d, V3-OCVs-KK-BM-R-9d, V3-OCVs-KK-BM-R-M-9d, V3-OCVs-MK-BM-R-9d). Die niedrigste TRAP-Expression zeigten die OCVs, die in Monokultur unter BM kultiviert wurden (V3-OCVs-MK-BM-9d).

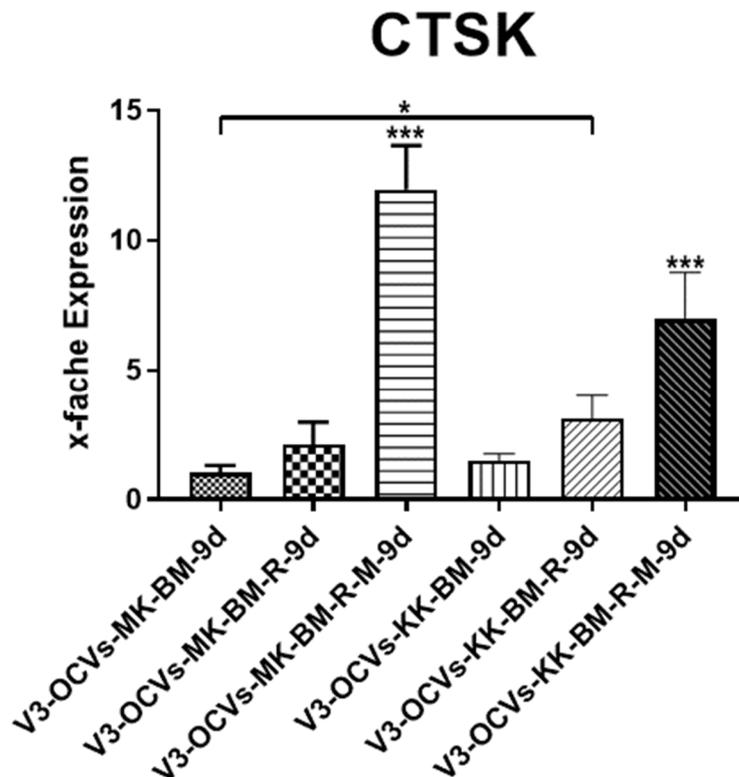


Abbildung 27: Vorversuch 3: relative CTSK-Genexpressionen der OCVs. Dargestellt als Mittelwerte der $2^{-\Delta\Delta C_q}$ -Werte mit Standardabweichung. OCVs der Monokultur, die unter Zugabe von RANKL und M-CSF kultiviert wurden, besaßen höchst signifikant höhere relative CTSK-Expressionen als alle anderen untersuchten Kulturen (V3-OCVs-KK-BM-9d, V3-OCVs-KK-BM-R-9d, V3-KK-BM-R-M-9d, V3-OCVs-MK-BM-R-9d). Zudem war die Expression der OCVs der Kokultur nach Zugabe von RANKL und M-CSF (V3-OCVs-KK-BM-R-M-9d) höchst signifikant höher als bei den in BM kokultivierten OCVs (V3-OCVs-KK-BM-9d) sowie bei den unter Zugabe von RANKL inkubierten Ko- und Monokulturen (V3-OCVs-KK-BM-R-9d, V3-OCVs-MK-BM-R-9d; BM = Basalmedium, CTSK = Cathepsin K, d = Tage, KK = Kokultur, M = M-CSF = *macrophage colony-stimulating factor-1*, MK = Monokultur, OCVs = osteoklastäre Vorläuferzellen, R = RANKL = *receptor activator of nuclear factor- κ B ligand*, V3 = Vorversuch 3).

Wichtigste Ergebnisse des 3. Vorversuchs und Fazit

In den OCVs der Kokulturen konnte durch die Verwendung von RANKL die Osteoklastengnese zufriedenstellend stimuliert werden. Keines der verwendeten Medien führte zu Veränderungen der SCs-Morphologie. Um die Supplementierung des Mediums für die zu etablierende Kokultur auf ein Mindestmaß zu reduzieren, wurde als Standardmedium BM unter Zugabe von RANKL für die folgenden Untersuchungen ausgewählt. Die Kultivierungsdauer für den Hauptversuch wurde auf 9 Tage festgelegt.

4.2 Überprüfung der Biokompatibilität von Knochenersatzmaterialien im indirekten Kokultursystem: Hauptversuch

Morphologie der mesenchymalen Stromazellen

SCs der Kokulturen, die in Kombination mit den KEMs kultiviert wurden, zeigten in ihrer Morphologie keine Unterschiede. In allen Kulturen (SCs-KK-leer (Abbildung 28 A), SCs-KK-w/o (Abbildung 28 B), SCs-KK-MgCl-0,1, SCs-KK-SrCl-0,1, SCs-KK-SrCl-0,01 (Abbildung 28 C), SCs-KK-MgHP-0,01 (Abbildung 28 D), SCs-KK-SrHP-0,01, SCs-KK-MgSrCl-0,05, SCs-KK-MgSrHP-0,005, SCs-KK-PLGA-MgSrCl-0,05) waren dichte Rasen adhärenter, spindelförmiger bis polygonaler Zellen und einzelne abgerundete Zellen zu erkennen.

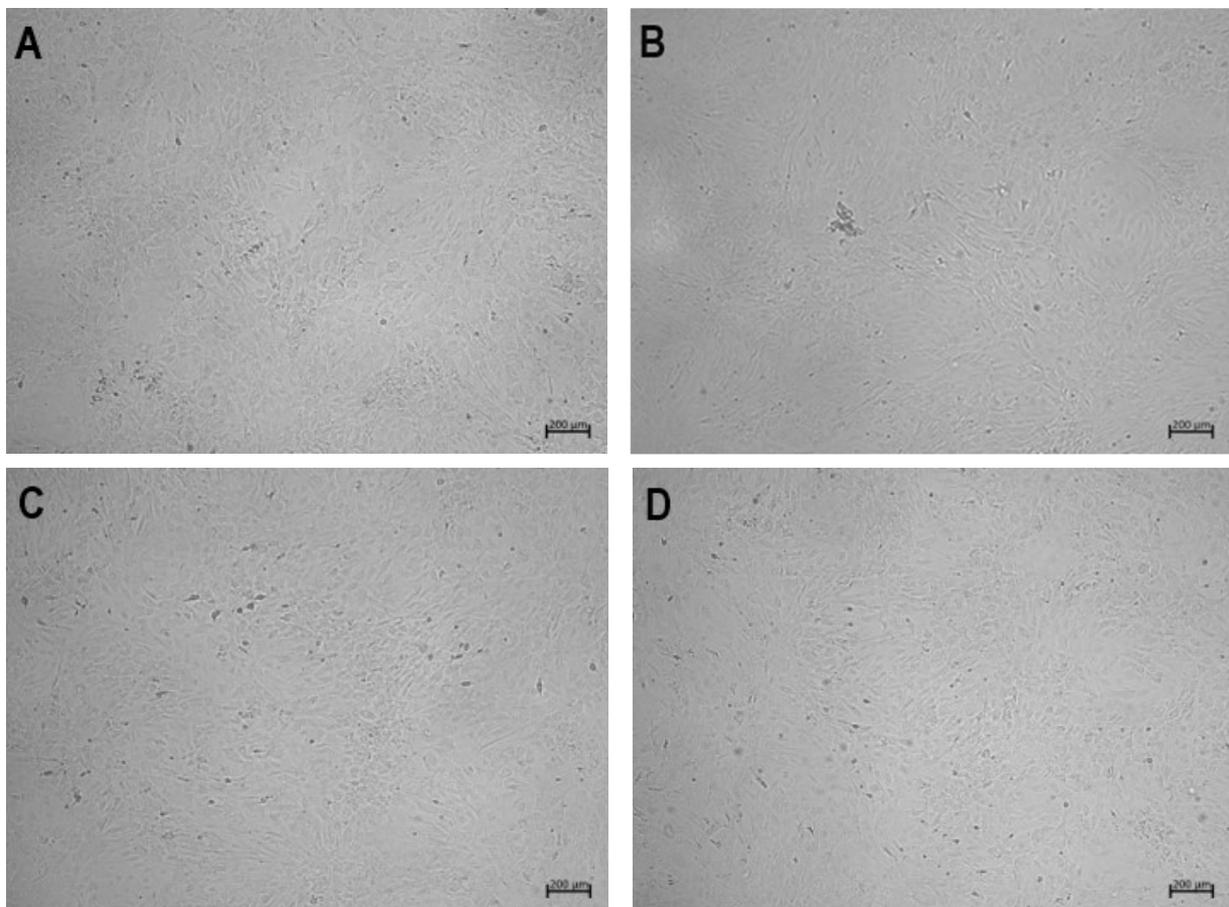


Abbildung 28: Native Bildaufnahmen der SCs, die 9 Tage im Kokultursystem unter dem Zusatz von RANKL mit OCVs und (A) leerem Insert 1, (B) dem Basis-KEM, (C) SrCl-0,01 und (D) MgHP-0,01 kultiviert wurden. In allen Versuchsaufbauten waren morphologisch keine Unterschiede wahrnehmbar. Es zeigte sich ein dichter Zellrasen adhärenter Zellen mit spindelförmiger Morphologie.

Ergebnisse der quantitativen *real-time polymerase chain reaction* der mesenchymalen Stromazellen

Die Zellantworten der SCs hinsichtlich ihrer relativen **Runx2**-, **Cx43**- und **Panx1**-Expressionen (Abbildung 29–32) waren nach Inkubation mit den KEMs nahezu deckungsgleich. So waren die Expressionsmuster dieser Gene in Gegenwart von **MgHP-0,01** (SCs-KK-MgHP-0,01), **SrHP-0,01** (SCs-KK-SrHP-0,01) und **MgSrHP-0,005** (SCs-KK-MgSrHP-0,005) annähernd auf dem Niveau der Negativ- (SCs-KK-leer) und Positivkontrolle (SCs-KK-w/o). Dementgegen waren die Expressionslevel bei SCs, die mit **SrCl-0,1** (SCs-KK-SrCl-0,1), **SrCl-0,01** (SCs-KK-SrCl-0,01) und **PLGA-MgSrCl-0,05** (SCs-KK-PLGA-MgSrCl-0,05) kultiviert wurden, stets am niedrigsten. Die **Panx2**-Expressionen (Abbildung 32) folgten, bis auf Ausnahme der SCs, die mit dem KEM **MgCl-0,1** (SCs-KK-MgCl-0,1) kokultiviert wurden, ebenfalls diesem Muster. Eine Ausnahme stellte das Expressionsprofil von **Panx3** (Abbildung 33) dar, das sich in Gegenwart **aller KEMs** hoch bis höchst signifikant unterhalb der einfachen Expression der SCs befand, die im Sinne der Negativkontrolle mit **leerem Insert 1** (SCs-KK-leer) kokultiviert wurden.

Die Abbildungen 30–34 zeigen die Ergebnisse der qPCR nach Kokultivierung der SCs in Gegenwart der KEMs. Sie sind als Mittelwerte der $2^{-\Delta\Delta C_q}$ -Werte mit Standardabweichung dargestellt. Die jeweiligen p-Werte sind dem Anhang (siehe 9.2.1–9.2.5) zu entnehmen. Nachfolgend werden die Genexpressionen und errechnete p-Werte im Detail erläutert.

Relative Runx2-Expressionen der mesenchymalen Stromazellen

Abbildung 29 fasst die relativen **Runx2**-Expressionen mit p-Werten der SCs zusammen. Die jeweiligen p-Werte sind im Anhang (siehe 9.1.1) zu finden.

SCs, die mit **leerem Insert 1** im Sinne der **Negativkontrolle** in indirekter Kokultur mit OCVs kultiviert wurden (SCs-KK-leer), zeigten hoch bis höchst signifikant höhere relative Runx2-Expressionen im Vergleich zu den SCs, die mit MgCl-0,1 (SCs-KK-MgCl-0,1), SrCl-0,1 (SCs-KK-SrCl-0,1), SrCl-0,01 (SCs-KK-SrCl-0,01), MgSrCl-0,05 (SCs-KK-MgSrCl-0,05) und PLGA-MgSrCl-0,05 (SCs-KK-PLGA-MgSrCl-0,05) kultiviert wurden. Im Vergleich zu den als Positivkontrolle dienenden SCs, die mit dem Basis-KEM (SCs-KK-w/o) kultiviert wurden, zeigte sich kein signifikanter Unterschied.

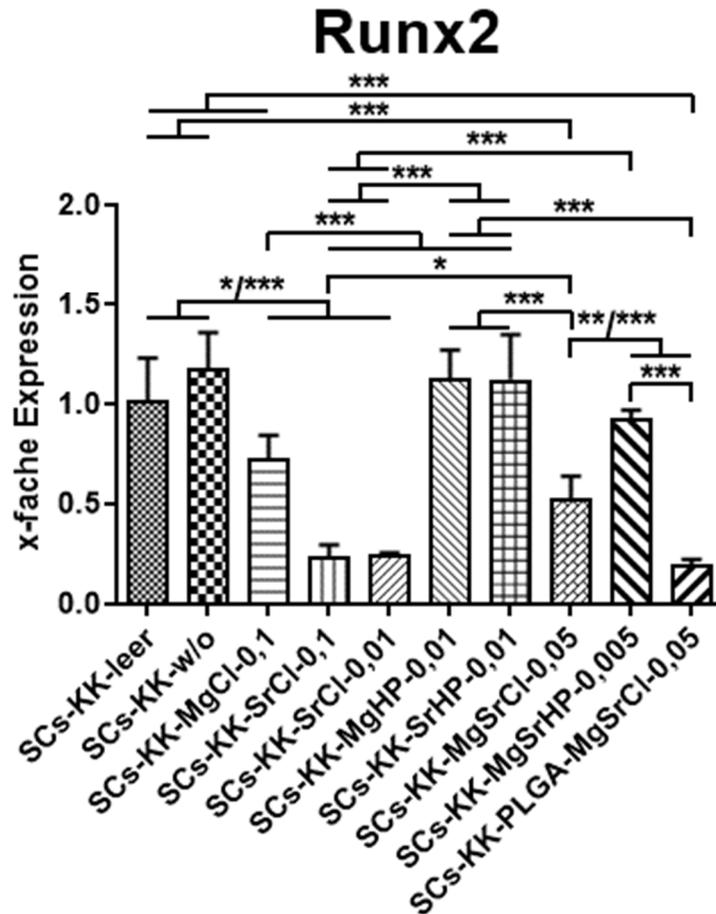


Abbildung 29: Hauptversuch: relative Runx2-Genexpressionen der SCs. Dargestellt als Mittelwerte der $2^{-\Delta\Delta C_q}$ -Werte mit Standardabweichung. Die Kultivierung der SCs erfolgte in indirekter Kokultur mit OCVs und leerem Insert 1 oder KEMs über 9 Tage. Auffällig waren vor allem die niedrigen relativen Runx2-Expressionen der SCs, die in Gegenwart von SrCl-0,1 (SCs-KK-SrCl-0,1), SrCl-0,01 (SCs-KK-SrCl-0,01) und PLGA-MgSrCl-0,05 (SCs-KK-PLGA-MgSrCl-0,05) kultiviert wurden. SCs, die in Gegenwart des Basis-KEMs (SCs-KK-w/o, Positivkontrolle), von MgHP-0,01 (SCs-KK-MgHP-0,01), SrHP-0,01 (SCs-KK-SrHP-0,01) und MgSrHP-0,005 (SCs-KK-MgSrHP-0,005) kultiviert wurden, zeigten im Vergleich zur Negativkontrolle (SCs-KK-leer) keine signifikant unterschiedlichen relativen Runx2-Expressionen (***) = $p \leq 0,001$, ** = $p \leq 0,01$, * = $p \leq 0,01$, / = oder, KEMs = Knochenersatzmaterialien, KK = Kokultur, OCVs = osteoklastäre Vorläuferzellen, PLGA = Polylactid-co-glycolid, Runx2 = *Runt-related transcription factor 2*, SCs = mesenchymale Stromazellen).

Das Expressionsprofil der SCs in Gegenwart des **Basis-KEMs** (SCs-KK-w/o) als Positivkontrolle war höchst signifikant höher gegenüber den Profilen, die nach Inkubation der SCs mit den KEMs MgCl-0,1 (SCs-KK-MgCl-0,1), SrCl-0,1 (SCs-KK-SrCl-0,1), SrCl-0,01 (SCs-KK-SrCl-0,01), MgSrCl-0,05 (SCs-KK-MgSrCl-0,05) und PLGA-MgSrCl-0,05

(SCs-KK-PLGA-MgSrCl-0,05) festgestellt wurden. **PLGA-MgSrCl-0,05** (SCs-KK-PLGA-MgSrCl-0,05), **SrCl-0,1** (SCs-KK-SrCl-0,1) und **SrCl-0,01** (SCs-KK-SrCl-0,01) induzierten hoch bis höchst signifikante Verminderungen der relativen Runx2-Expressionen gegenüber der Negativ- (SCs-KK-leer) und Positivkontrolle (SCs-KK-w/o) sowie den KEMs MgCl-0,1 (SCs-KK-MgCl-0,1), MgHP-0,01 (SCs-KK-MgHP-0,01), SrHP-0,01 (SCs-KK-SrHP-0,01) und MgSrHP-0,005 (SCs-KK-MgSrHP-0,005).

Die Kultivierung mit **MgCl-0,1** (SCs-KK-MgCl-0,1) resultierte in einer höchst signifikant höheren Expression im Unterschied zu einer Kokultivierung der SCs in Gegenwart von SrCl-0,1 (SCs-KK-SrCl-0,1), SrCl-0,01 (SCs-KK-SrCl-0,01) und PLGA-MgSrCl-0,05 (SCs-KK-PLGA-MgSrCl-0,05). Eine signifikant bis höchst signifikant niedrigere Expression zeigte sich jedoch im Unterschied zu den SCs, die mit leerem Insert 1 (SCs-KK-leer, Negativkontrolle), dem Basis-KEM (SCs-KK-w/o, Positivkontrolle), MgHP-0,01 (SCs-KK-MgHP-0,01) und SrHP-0,01 (SCs-KK-SrHP-0,01) kokultiviert wurden. **MgHP-0,01** (SCs-KK-MgHP-0,01) und **SrHP-0,01** (SCs-KK-SrHP-0,01) vermittelten im Unterschied zu MgCl-0,1 (SCs-KK-MgCl-0,1), SrCl-0,1 (SCs-KK-SrCl-0,1), SrCl-0,01 (SCs-KK-SrCl-0,01), MgSrCl-0,05 (SCs-KK-MgSrCl-0,05) und PLGA-MgSrCl-0,05 (SCs-KK-PLGA-MgSrCl-0,05) höchst signifikante Erhöhungen der Expressionen. Eine höchst signifikant niedrigere Expression war dagegen nach Kultivierung mit **MgSrCl-0,05** (SCs-KK-MgSrCl-0,05) zu beobachten – im Unterschied zu den Expressionsleveln, die in Gegenwart des leeren Insert 1 (SCs-KK-leer, Negativkontrolle), dem Basis-KEM (SCs-KK-w/o, Positivkontrolle), MgHP-0,01 (SCs-KK-MgHP-0,01), SrHP-0,01 (SCs-KK-SrHP-0,01) und MgSrHP-0,005 (SCs-KK-MgSrHP-0,005) ermittelt wurden. Im Gegensatz dazu war die Expression höchst signifikant erhöht gegenüber SrCl-0,1 (SCs-KK-SrCl-0,1) und PLGA-MgSrCl-0,05 (SCs-KK-PLGA-MgSrCl-0,05). Eine ebenfalls höchst signifikant höhere Expression erzeugte die Kultivierung mit **MgSrHP-0,005** (SCs-KK-MgSrHP-0,005) im Vergleich zu SrCl-0,1 (SCs-KK-SrCl-0,1), SrCl-0,01 (SCs-KK-SrCl-0,01), MgSrCl-0,05 (SCs-KK-MgSrCl-0,05) und PLGA-MgSrCl-0,05 (SCs-KK-PLGA-MgSrCl-0,05).

Relative Cx43-Expressionen der mesenchymalen Stromazellen

Abbildung 30 fasst die relativen **Cx43**-Expressionen mit p-Werten der SCs zusammen. Die einzelnen p-Werte sind dem Anhang (siehe 9.2.2) zu entnehmen. Das **Cx43**-Expressionsprofil der SCs der **Negativkontrolle** (SCs-KK-leer) war hoch bis höchst signifikant höher im Vergleich zu den Expressionsprofilen der SCs, die mit MgCl-0,1 (SCs-KK-MgCl-0,1), SrCl-0,1 (SCs-KK-SrCl-0,1), SrCl-0,01 (SCs-KK-SrCl-0,01) und PLGA-MgSrCl-0,05 (SCs-KK-

PLGA-MgSrCl-0,05) kultiviert wurden. Kein signifikanter Unterschied zeigte sich im Vergleich zu den SCs, die mit dem Basis-KEM (SCs-KK-w/o, Positivkontrolle) kultiviert wurden.

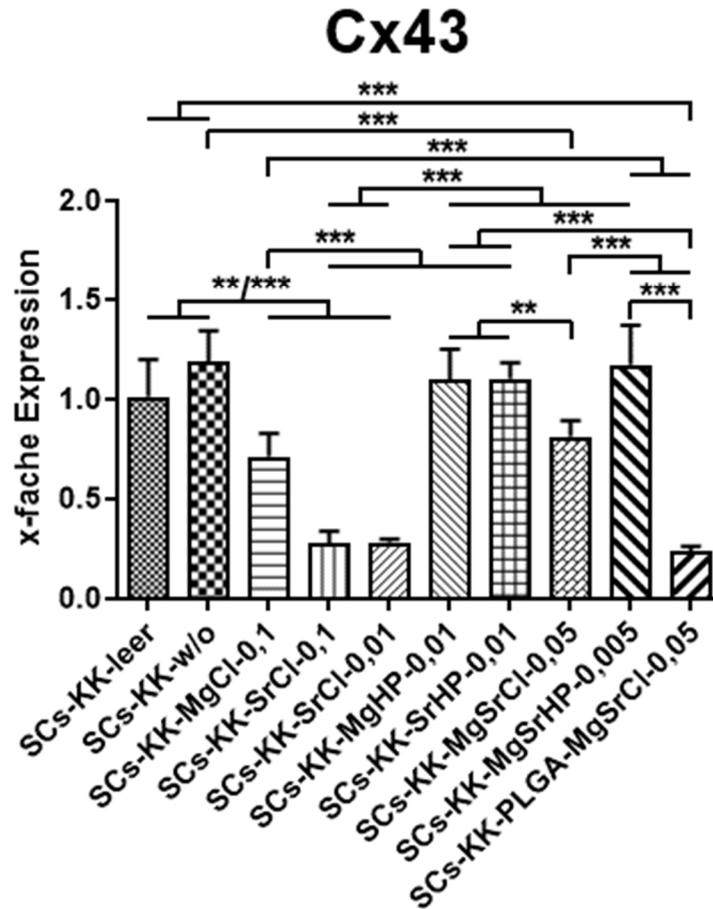


Abbildung 30: Hauptversuch: relative Cx43-Genexpressionen der SCs. Dargestellt als Mittelwerte der $2^{-\Delta\Delta C_q}$ -Werte mit Standardabweichung. Die Kultivierung der SCs erfolgte in indirekter Kokultur mit OCVs und leerem Insert 1 oder KEMs über 9 Tage. Zwischen Negativkontrolle (SCs-KK-leer) und Positivkontrolle (SCs-KK-w/o) bestand kein signifikanter Unterschied. SCs, die mit MgHP-0,01 (SCs-KK-MgHP-0,01), SrHP-0,01 (SCs-KK-SrHP-0,01) und MgSrHP-0,005 (SCs-KK-MgSrHP-0,005) kultiviert wurden, zeigten keine signifikanten Unterschiede zu diesen Kontrollkulturen. Dagegen besaßen SCs, die in Gegenwart von SrCl-0,1 (SCs-KK-SrCl-0,1), SrCl-0,01 (SCs-KK-SrCl-0,01) und PLGA-MgSrCl-0,005 (SCs-KK-PLGA-MgSrCl-0,005) kultiviert wurden, die vergleichsweise niedrigsten Expressionen mit höchst signifikanten Verminderungen (*** = $p \leq 0,001$, ** = $p \leq 0,01$, / = oder, Cx43 = Connexin 43, KEMs = Knochenersatzmaterialien, KK = Kokultur, OCVs = osteoklastäre Vorläuferzellen, PLGA = Polylactid-co-glycolid, SCs = mesenchymale Stromazellen).

Die Kultivierung mit dem **Basis-KEM** (SCs-KK-w/o, Positivkontrolle) resultierte in einer höchst signifikant höheren Expression als nach Kultivierung mit MgCl-0,1

(SCs-KK-MgCl-0,1), SrCl-0,1 (SCs-KK-SrCl-0,1), SrCl-0,01 (SCs-KK-SrCl-0,01), MgSrCl-0,05 (SCs-KK-MgSrCl-0,05) und PLGA-MgSrCl-0,05 (SCs-KK-PLGA-MgSrCl-0,05).

Das **Cx43**-Expressionsprofil der SCs der **Negativkontrolle** (SCs-KK-leer) war hoch bis höchst signifikant höher im Vergleich zu den Expressionsprofilen der SCs, die mit MgCl-0,1 (SCs-KK-MgCl-0,1), SrCl-0,1 (SCs-KK-SrCl-0,1), SrCl-0,01 (SCs-KK-SrCl-0,01) und PLGA-MgSrCl-0,05 (SCs-KK-PLGA-MgSrCl-0,05) kultiviert wurden. Kein signifikanter Unterschied zeigte sich im Vergleich zu den SCs, die mit dem Basis-KEM (SCs-KK-w/o, Positivkontrolle) kultiviert wurden. Die Kultivierung mit dem **Basis-KEM** (SCs-KK-w/o, Positivkontrolle) resultierte in einer höchst signifikant höheren Expression als nach Kultivierung mit MgCl-0,1 (SCs-KK-MgCl-0,1), SrCl-0,1 (SCs-KK-SrCl-0,1), SrCl-0,01 (SCs-KK-SrCl-0,01), MgSrCl-0,05 (SCs-KK-MgSrCl-0,05) und PLGA-MgSrCl-0,05 (SCs-KK-PLGA-MgSrCl-0,05).

Die Genexpressionen der SCs, die mit **SrCl-0,1** (SCs-KK-SrCl-0,1), **SrCl-0,01** (SCs-KK-SrCl-0,01) und **PLGA-MgSrCl-0,05** (SCs-KK-PLGA-MgSrCl-0,05) kultiviert wurden, waren höchst signifikant vermindert im Vergleich zu den Werten aller anderen Kulturen (SCs-KK-leer, SCs-KK-w/o, SCs-KK-MgCl-0,1, SCs-KK-MgHP-0,01, SCs-KK-SrHP-0,01, SCs-KK-MgSrCl-0,05, SCs-KK-MgSrHP-0,005). **MgCl-0,1** (SCs-KK-MgCl-0,1) induzierte eine höchst signifikant höhere Expression im Gegensatz zu SrCl-0,1 (SCs-KK-SrCl-0,1), SrCl-0,01 (SCs-KK-SrCl-0,01) und PLGA-MgSrCl-0,05 (SCs-KK-PLGA-MgSrCl-0,05) sowie eine hoch bis höchst signifikante Verminderung im Unterschied zu den SCs kultiviert mit leerem Insert 1 (SCs-KK-leer, Negativkontrolle), dem Basis-KEM (SCs-KK-w/o, Positivkontrolle), MgHP-0,01 (SCs-KK-MgHP-0,01), SrHP-0,01 (SCs-KK-SrHP-0,01) und MgSrHP-0,005 (SCs-KK-MgSrHP-0,005).

Die Kultivierung mit **MgHP-0,01** (SCs-KK-MgHP-0,01) und **SrHP-0,01** (SCs-KK-SrHP-0,01) resultierte im Vergleich zu MgCl-0,1 (SCs-KK-MgCl-0,1), SrCl-0,1 (SCs-KK-SrCl-0,1), SrCl-0,01 (SCs-KK-SrCl-0,01), MgSrCl-0,05 (SCs-KK-MgSrCl-0,05) und PLGA-MgSrCl-0,05 (SCs-KK-PLGA-MgSrCl-0,05) in hoch bis höchst signifikanten Erhöhungen der Genexpressionen. **MgSrCl-0,05** (SCs-KK-MgSrCl-0,05) vermittelte eine höchst signifikante Erhöhung der Cx43-Genexpression im Vergleich zu den KEMs SrCl-0,1 (SCs-KK-SrCl-0,1), SrCl-0,01 (SCs-KK-SrCl-0,01) und PLGA-MgSrCl-0,05 (SCs-KK-PLGA-MgSrCl-0,05), während eine hoch bis höchst signifikante Verminderung im Vergleich zu dem Basis-KEM (SCs-KK-w/o, Positivkontrolle), MgHP-0,01 (SCs-KK-MgHP-0,01), SrHP-0,01 (SCs-KK-SrHP-0,01) und MgSrHP-0,005 (SCs-KK-MgSrHP-0,005)

festzustellen war. Auch **MgSrHP-0,005** (SCs-KK-MgSrHP-0,005) erhöhte die **Cx43**-Expression höchst signifikant im Unterschied zu MgCl-0,1 (SCs-KK-MgCl-0,1), SrCl-0,1 (SCs-KK-SrCl-0,1), SrCl-0,01 (SCs-KK-SrCl-0,01), MgSrCl-0,05 (SCs-KK-MgSrCl-0,05) und PLGA-MgSrCl-0,05 (SCs-KK-PLGA-MgSrCl-0,05).

Relative Panx1-Expressionen der mesenchymalen Stromazellen

Abbildung 31 fasst die relativen **Panx1**-Expressionen mit p-Werten der SCs zusammen. Die einzelnen p-Werte sind dem Anhang (siehe 9.2.3) zu entnehmen.

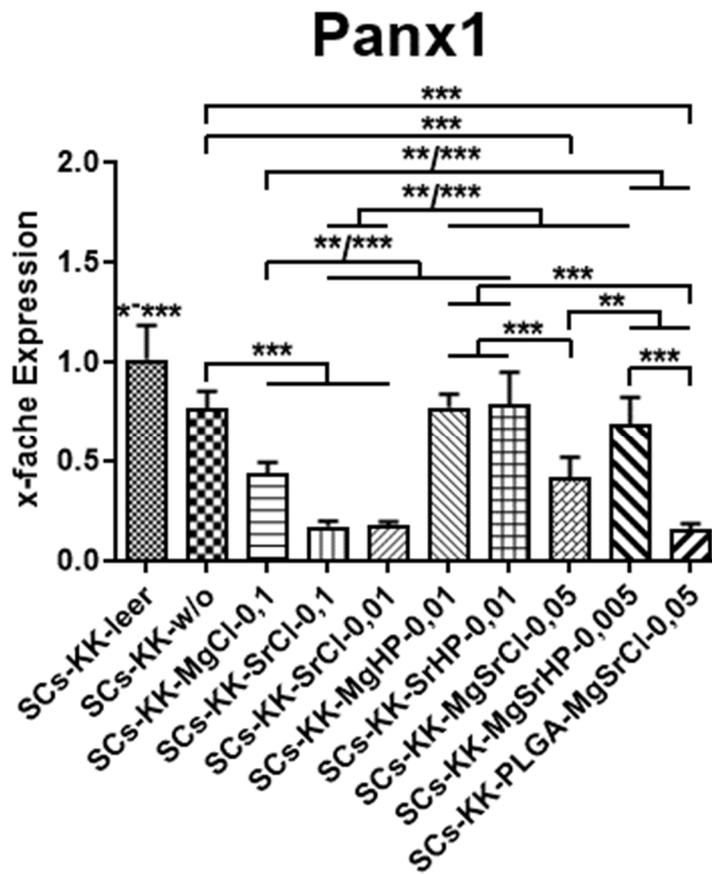


Abbildung 31: Hauptversuch: relative Panx1-Genexpressionen der SCs. Dargestellt als Mittelwerte der $2^{-\Delta\Delta C_q}$ -Werte mit Standardabweichung. Die Kultivierung der SCs erfolgte in indirekter Kokultur mit OCVs und leerem Insert 1 oder KEMs über 9 Tage. Die relative Panx1-Expression der SCs, die ohne Zugabe eines KEMs (SCs-KK-leer, Negativkontrolle) kultiviert wurden, war gegenüber allen anderen Kulturen signifikant bis höchst signifikant höher. Die niedrigsten Expressionen zeigten SCs, die in Gegenwart von SrCl-0,1 (SCs-KK-SrCl-0,1), SrCl-0,01 (SCs-KK-SrCl-0,01) oder PLGA-MgSrCl-0,05 (SCs-KK-PLGA-MgSrCl-0,05) kultiviert wurden (***) = $p \leq 0,001$, ** = $p \leq 0,01$, * = $p \leq 0,05$, – = bis, / = oder, KEMs = Knochenersatzmaterialien, KK = Kokultur, OCVs = osteoklastäre Vorläuferzellen, Panx1 = Pannexin 1, PLGA = Polylactid-co-glycolid, SCs = mesenchymale Stromazellen).

Die relative **Panx1**-Expression der **Negativkontrolle** (SCs-KK-leer) war im Vergleich zu allen anderen Kulturen (SCs-KK-w/o, SCs-KK-MgCl-0,1, SCs-KK-SrCl-0,1, SCs-KK-SrCl-0,01, SCs-KK-MgHP-0,01, SCs-KK-SrHP-0,01, SCs-KK-MgSrCl-0,05, SCs-KK-MgSrHP-0,005, SCs-KK-PLGA-MgSrCl-0,05) signifikant bis höchst signifikant höher. Die Kultivierung mit dem **Basis-KEM** (SCs-KK-w/o, Positivkontrolle) resultierte in einer höchst signifikant höheren **Panx1**-Expression im Vergleich zu einer Kultivierung mit MgCl-0,1 (SCs-KK-MgCl-0,1), SrCl-0,1 (SCs-KK-SrCl-0,1), SrCl-0,01 (SCs-KK-SrCl-0,01), MgSrCl-0,05 (SCs-KK-MgSrCl-0,05) und PLGA-MgSrCl-0,05 (SCs-KK-PLGA-MgSrCl-0,05). Durch den Einfluss von **SrCl-0,1** (SCs-KK-SrCl-0,1), **SrCl-0,01** (SCs-KK-SrCl-0,01) und **PLGA-MgSrCl-0,05** (SCs-KK-PLGA-MgSrCl-0,05) waren im Unterschied zu allen anderen Kulturen (SCs-KK-leer, SCs-KK-w/o, SCs-KK-MgCl-0,1, SCs-KK-MgHP-0,01, SCs-KK-SrHP-0,01, SCs-KK-MgSrCl-0,05, SCs-KK-MgSrHP-0,005) hoch bis höchst signifikante Verminderungen der relativen **Panx1**-Expressionen zu verzeichnen. In ähnlicher Weise war nach Inkubation mit **MgCl-0,1** (SCs-KK-MgCl-0,1) eine höchst signifikante Verminderung der Expression im Unterschied zu den Kulturen der Negativ- (SCs-KK-leer) und Positivkontrolle (SCs-KK-w/o) sowie den KEMs MgHP-0,01 (SCs-KK-MgHP-0,01), SrHP-0,01 (SCs-KK-SrHP-0,01) und MgSrHP-0,005 (SCs-KK-MgSrHP-0,005) festzustellen. Ebenso führte die Kultivierung mit diesem KEM (SCs-KK-MgCl-0,1) zu einer hoch bis höchst signifikanten Erhöhung gegenüber SrCl-0,1 (SCs-KK-SrCl-0,1), SrCl-0,01 (SCs-KK-SrCl-0,01) und PLGA-MgSrCl-0,05 (SCs-KK-PLGA-MgSrCl-0,05).

Die Kokultivierung mit **MgHP-0,01** (SCs-KK-MgHP-0,01) und **SrHP-0,01** (SCs-KK-SrHP-0,01) resultierte dagegen in höchst signifikanten Erhöhungen der Expression gegenüber MgCl-0,1 (SCs-KK-MgCl-0,1), SrCl-0,1 (SCs-KK-SrCl-0,1), SrCl-0,01 (SCs-KK-SrCl-0,01), MgSrCl-0,05 (SCs-KK-MgSrCl-0,05) und PLGA-MgSrCl-0,05 (SCs-KK-PLGA-MgSrCl-0,05) sowie der Negativkontrolle (SCs-KK-leer). Eine hoch bis höchst signifikant verminderte Expression war in Gegenwart von **MgSrCl-0,05** (SCs-KK-MgSrCl-0,05) festzustellen im Unterschied zu den Genexpressionsleveln von SCs, die mit leerem Insert 1 (SCs-KK-leer, Negativkontrolle), dem Basis-KEM (SCs-KK-w/o, Positivkontrolle), MgHP-0,01 (SCs-KK-MgHP-0,01), SrHP-0,01 (SCs-KK-SrHP-0,01) und MgSrHP-0,005 (SCs-KK-MgSrHP-0,005) inkubiert wurden, während sich im Vergleich mit SrCl-0,1 (SCs-KK-SrCl-0,1), SrCl-0,01 (SCs-KK-SrCl-0,01) und PLGA-MgSrCl-0,05 (SCs-KK-PLGA-MgSrCl-0,05) hoch bis höchst signifikant höhere Expressionen von Panx1 manifestierten. Erfolgte die Inkubation der SCs mit **MgSrHP-0,005** (SCs-KK-MgSrHP-0,005), war die Genexpression hoch bis höchst signifikant erhöht im Vergleich zu MgCl-0,1

(SCs-KK-MgCl-0,1), SrCl-0,1 (SCs-KK-SrCl-0,1), SrCl-0,01 (SCs-KK-SrCl-0,01), MgSrCl-0,05 (SCs-KK-MgSrCl-0,05) und PLGA-MgSrCl-0,05 (SCs-KK-PLGA-MgSrCl-0,05), während sie im Unterscheid zur Negativkontrolle (SCs-KK-leer) höchst signifikant vermindert war. Eine Übersicht über die beschriebenen p-Werte ist dem Anhang (siehe 9.2.3) zu entnehmen.

Relative Panx2-Expressionen der mesenchymalen Stromazellen

Die relativen **Panx2**-Expressionen der SCs sind in Abbildung 32 zusammengefasst. Die jeweiligen p-Werte sind dem Anhang (siehe 9.2.4) zu entnehmen.

Die Panx2-Expression der **Negativkontrolle** (SCs-KK-leer) befand sich ungefähr auf dem Niveau der SCs, die mit dem Basis-KEM (SCs-KK-w/o, Positivkontrolle) kultiviert wurden, zwischen beiden Expressionen war kein signifikanter Unterschied festzustellen. SCs, die mit dem **Basis-KEM** (SCs-KK-w/o, Positivkontrolle), in Gegenwart der **Negativkontrolle** (SCs-KK-leer) und mit **MgCl-0,1** (SCs-KK-MgCl-0,1) kultiviert wurden, zeigten im Vergleich zu den Kulturen in Verbindung mit den KEMs SrCl-0,1 (SCs-KK-SrCl-0,1), SrCl-0,01 (SCs-KK-SrCl-0,01) und PLGA-MgSrCl-0,05 (SCs-KK-PLGA-MgSrCl-0,05) hoch bis höchst signifikante Erhöhungen der Expressionen. Die Inkubation mit **SrCl-0,1** (SCs-KK-SrCl-0,1), **SrCl-0,01** (SCs-KK-SrCl-0,01) und **PLGA-MgSrCl-0,05** (SCs-KK-PLGA-MgSrCl-0,05) induzierte gegenüber fast allen anderen Kulturen (SCs-KK-leer, SCs-KK-w/o, SCs-KK-MgCl-0,1, SCs-KK-MgHP-0,01, SCs-KK-SrHP-0,01, SCs-KK-MgSrHP-0,005), hoch bis höchst signifikante Verminderungen der Panx2-Expressionen.

MgHP-0,01 (SCs-KK-MgHP-0,01) und **SrHP-0,01** (SCs-KK-SrHP-0,01) vermittelten höchst signifikante Erhöhungen im Vergleich zu der Kultivierung mit SrCl-0,1 (SCs-KK-SrCl-0,1), SrCl-0,01 (SCs-KK-SrCl-0,01) und PLGA-MgSrCl-0,05 (SCs-KK-PLGA-MgSrCl-0,05). Eine hoch signifikante Erhöhung war ebenfalls bei **SrHP-0,01** (SCs-KK-SrHP-0,01) im Vergleich zu MgSrCl-0,05 (SCs-KK-MgSrCl-0,05) zu erkennen. **MgSrCl-0,05** (SCs-KK-MgSrCl-0,05) führte im Unterschied zu SrCl-0,01 (SCs-KK-SrCl-0,01) zur hoch signifikanten Erhöhung der Expression bzw. zur signifikant bis hoch signifikanten Verminderung mit Blick auf MgHP-0,01 (SCs-KK-MgHP-0,01) und SrHP-0,01 (SCs-KK-SrHP-0,01). In Gegenwart von **MgSrHP-0,005** (SCs-KK-MgSrHP-0,005) war die Panx2-Expression hoch bis höchst signifikant erhöht im Vergleich zu SrCl-0,1 (SCs-KK-SrCl-0,1), SrCl-0,01 (SCs-KK-SrCl-0,01) und PLGA-MgSrCl-0,05 (SCs-KK-PLGA-MgSrCl-0,05). Dagegen war die Kultivierung mit **PLGA-MgSrCl-0,05** (SCs-KK-PLGA-MgSrCl-0,05) im Vergleich zu einer Kultivierung der SCs mit leerem Insert 1 (SCs-KK-leer, Negativkontrolle), dem Basis-KEM (SCs-KK-w/o,

Positivkontrolle), MgCl-0,1 (SCs-KK-MgCl-0,1), MgHP-0,01 (SCs-KK-MgHP-0,01), SrHP-0,01 (SCs-KK-SrHP-0,01) und MgSrHP-0,005 (SCs-KK-MgSrHP-0,005) mit einer hoch bis höchst signifikanten Verminderung der Panx2-Expression verknüpft.

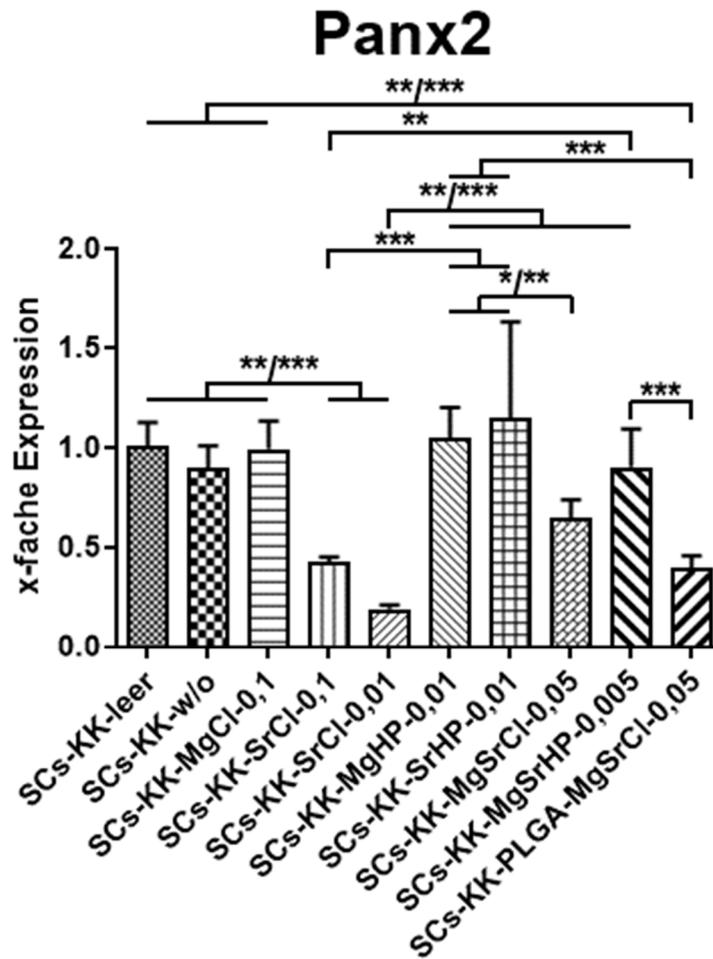


Abbildung 32: Hauptversuch: relative Panx2-Genexpressionen der SCs. Dargestellt als Mittelwerte der $2^{-\Delta\Delta C_q}$ -Werte mit Standardabweichung. Die Kultivierung der SCs erfolgte in indirekter Kokultur mit OCVs und leerem Insert 1 oder KEMs über 9 Tage. SCs, die mit leerem Insert 1 (SCs-KK-leer, Negativkontrolle) kultiviert wurden, zeigten keine signifikanten Unterschiede gegenüber Zellen, die mit dem Basis-KEM (SCs-KK-w/o, Positivkontrolle), MgCl-0,1 (SCs-KK-MgCl-0,1), MgHP-0,01 (SCs-KK-MgHP-0,01), SrHP-0,01 (SCs-KK-SrHP-0,01) oder MgSrHP-0,005 (SCs-KK-MgSrHP-0,005) kultiviert wurden. Dagegen resultiert die Kultivierung mit SrCl-0,1 (SCs-KK-SrCl-0,1), SrCl-0,01 (SCs-KK-SrCl-0,01) und PLGA-MgSrCl-0,05 (SCs-KK-PLGA-MgSrCl-0,05) im Vergleich zu der Negativkontrolle (SCs-KK-leer) sowie Positivkontrolle (SCs-KK-w/o) in hoch bis höchst signifikanten Reduzierungen der relativen Panx2-Expressionen (***) = $p \leq 0,001$, ** = $p \leq 0,01$, * = $p \leq 0,05$, / = oder, KEMs = Knochenersatzmaterialien, KK = Kokultur, OCVs = osteoklastäre Vorläuferzellen, Panx2 = Pannexin 2, PLGA = Polylactid-co-glycolid, SCs = mesenchymale Stromazellen).

Relative Panx3-Expressionen der mesenchymalen Stromazellen

Abbildung 33 fasst die relativen **Panx3**-Expressionen mit p-Werten der SCs zusammen. Die jeweiligen p-Werte sind dem Anhang (siehe 9.2.5) zu entnehmen. Die **Panx3**-Expression der SCs, die mit **leerem Insert 1** (SCs-KK-leer, Negativkontrolle) kultiviert wurden, war gegenüber allen anderen Kulturen (SCs-KK-w/o, SCs-KK-MgCl-0,1, SCs-KK-SrCl-0,1, SCs-KK-SrCl-0,01, SCs-KK-MgHP-0,01, SCs-KK-SrHP-0,01, SCs-KK-MgSrCl-0,05, SCs-KK-MgSrHP-0,005, SCs-KK-PLGA-MgSrCl-0,05), die sich kaum in ihren Expressionsmustern unterschieden, hoch bis höchst signifikant erhöht.

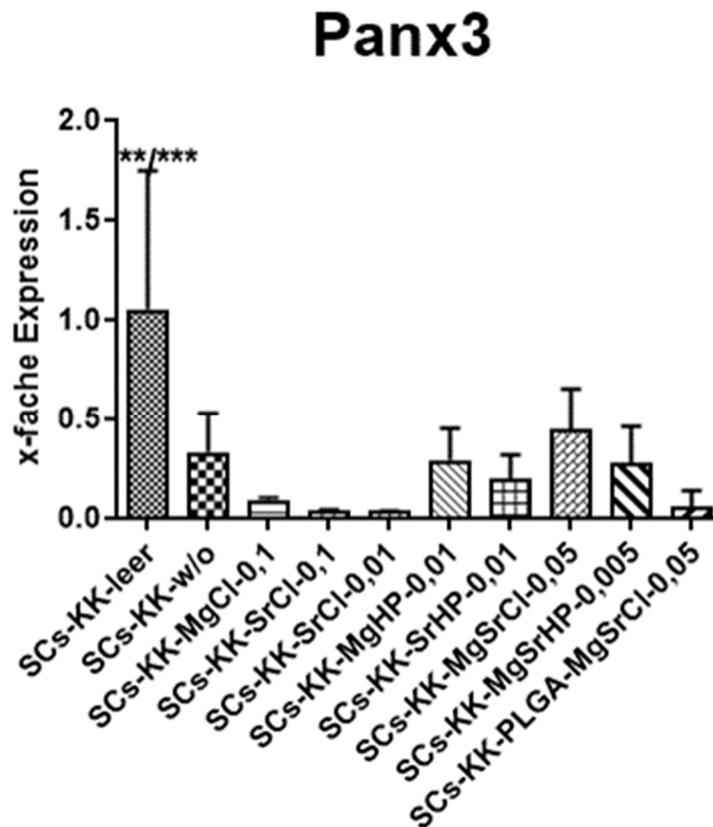


Abbildung 33: Hauptversuch: relative Panx3-Genexpressionen der SCs. Dargestellt als Mittelwerte der $2^{-\Delta\Delta Cq}$ -Werte mit Standardabweichung. Die Kultivierung der SCs erfolgte in indirekter Kokultur mit OCVs und leerem Insert 1 oder KEMs über 9 Tage. Die relative Panx3-Expression der SCs der Negativkontrolle (SCs-KK-leer, Negativkontrolle) kultiviert wurden, war gegenüber allen anderen untersuchten Kulturen hoch bis höchst signifikant erhöht (** = $p \leq 0,01$, *** = $p \leq 0,001$, / = oder, KEMs = Knochenersatzmaterialien, KK = Kokultur, OCVs = osteoklastäre Vorläuferzellen, Panx3 = Pannexin 3, PLGA = Polylactid-co-glycolid, SCs = mesenchymale Stromazellen).

Zusammenfassend ist festzustellen, dass **SrCl-0,1**, **SrCl-0,01** und **PLGA-MgSrCl-0,05** die Aktivität der untersuchten Gene durchweg reduzierten. Demgegenüber entsprachen die Genexpressionen der SCs bei **MgHP-0,01**, **SrHP-0,01** und **MgSrHP-0,005** annähernd dem

Niveau der Kontrollen. Eine Ausnahme stellten die Panx3-Expressionen dar, die in Gegenwart aller KEMs im Vergleich zur Negativkontrolle signifikant reduziert waren. Die Expressionen von Runx2, Cx43, Panx1 und Panx2 unterschieden sich in Abhängigkeit der verwendeten Salze: so waren die Expressionen der SCs, die mit **SrCl-0,01** kultiviert wurden, stets höchst signifikant vermindert im Vergleich zu **SrHP-0,01**. In abgeschwächter Form war diese Tendenz auch beim Vergleich von **MgCl-0,1** mit **MgHP-0,01** zu beobachten.

Vergleichende Morphologie der osteoklastären Vorläuferzellen

OCVs, die in indirekter Kokultur mit SCs und unterschiedlichen KEMs kultiviert wurden, wiesen nach Versuchsende keine nennenswerten morphologischen Unterschiede auf.

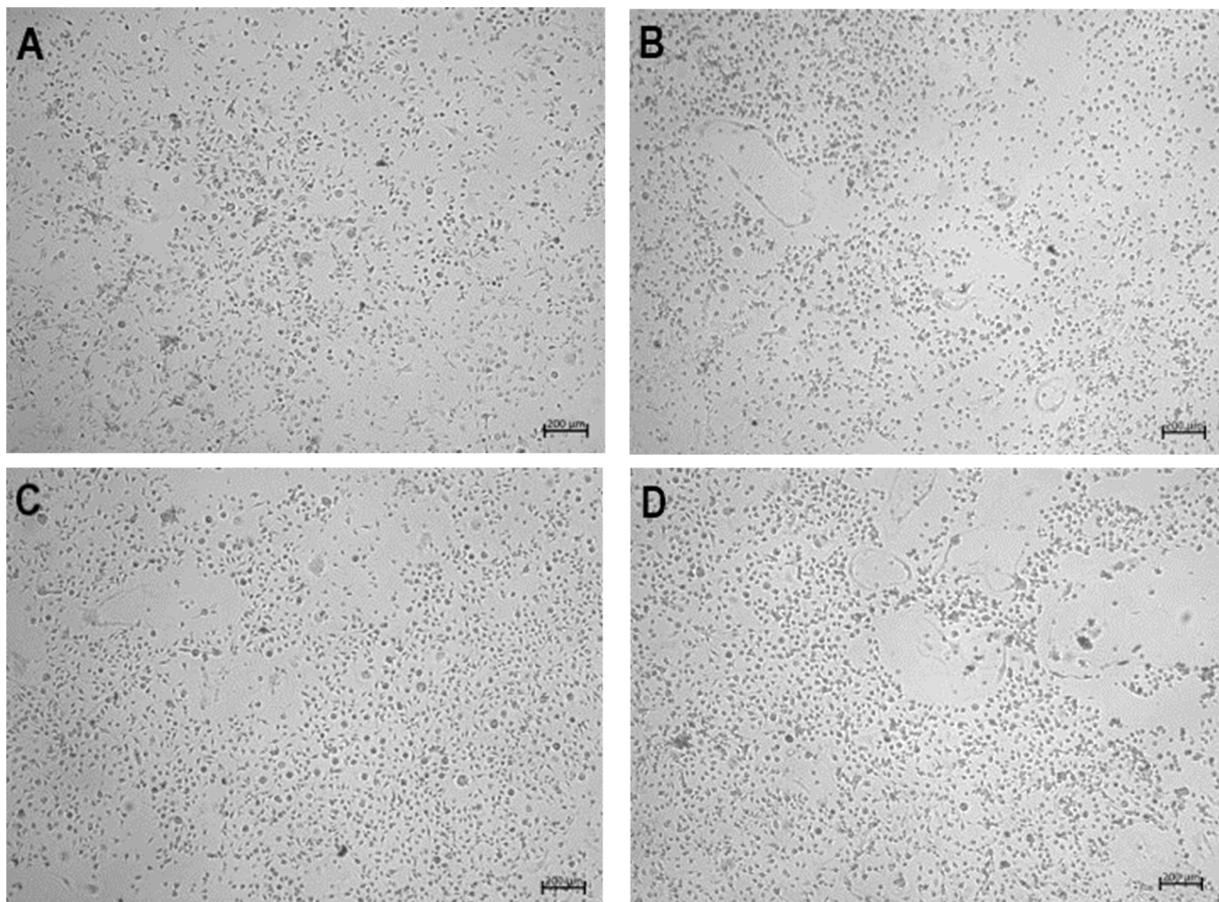


Abbildung 34: Native Bildaufnahmen der OCVs, die 9 Tage im Kokultursystem unter dem Zusatz von RANKL mit SCs und (A) leerem Insert 1, (B) dem Basis-KEM, (C) SrCl-0,01 und (D) MgHP-0,01 kultiviert wurden. In allen Versuchsaufbauten zeigten sich morphologisch keine Unterschiede. Neben mononukleären Zellen waren auch Zellen größeren Zelldurchmessers mit Osteoklasten-ähnlicher Morphologie zu sehen.

In allen Kulturen (OCVs-KK-w/o (Abbildung 34 B), OCVs-KK-MgCl-0,1, OCVs-KK-SrCl-0,1, OCVs-KK-SrCl-0,01 (Abbildung 34 C), OCVs-KK-MgHP-0,01 (Abbildung 34 D), OCVs-KK-SrHP-0,01, OCVs-KK-MgSrCl-0,05,

OCVs-KK-MgSrHP-0,005, OCVs-KK-PLGA-MgSrCl-0,05), einschließlich der Negativkontrolle (OCVs-KK-leer, Abbildung 34 A), waren mehrkernige Zellen mit Osteoklasten-ähnlicher Morphologie zu identifizieren.

Ergebnisse der quantitativen *real-time polymerase chain reaction* der osteoklastären Vorläuferzellen

Die Ergebnisse der qPCR sind als Mittelwerte der $2^{-\Delta\Delta C_q}$ -Werte mit Standardabweichung und p-Werten den Abbildungen 36–37 und dem Anhang (siehe 9.2.6–9.2.7) zu entnehmen. Die festgestellten TRAP- und CTSK-Expressionsprofile (Abbildung 35–Abbildung 36) der OCVs waren nach Kokultivierung mit den KEMs nahezu übereinstimmend. OCVs, die mit **SrHP-0,01** (OCVs-KK-SrHP-0,01) und **MgSrHP-0,005** (OCVs-KK-MgSrHP-0,005) kultiviert wurden, wiesen annähernd die gleichen Expressionslevel der TRAP und von CTSK auf wie die Kontrollen (OCVs-KK-leer, OCVs-KK-w/o). Die niedrigsten Expressionen zeigten OCVs, die mit **MgCl-0,1** (OCVs-KK-MgCl-0,1), **SrCl-0,1** (OCVs-KK-SrCl-0,1), **SrCl-0,01** (OCVs-KK-SrCl-0,01) und **PLGA-MgSrCl-0,05** (OCVs-KK-PLGA-MgSrCl-0,05) kultiviert wurden. Die nächsten Abschnitte erläutern die relativen Genexpressionen mit Blick auf die p-Werte.

Relative TRAP-Expressionen der osteoklastären Vorläuferzellen

Abbildung 35 fasst die relativen **TRAP**-Expressionen der OCVs zusammen. Die jeweiligen p-Werte sind dem Anhang (siehe 9.2.6) zu entnehmen. Die **Negativkontrolle** (OCVs-KK-leer) zeigte eine signifikante bis höchst signifikante Erhöhung der relativen TRAP-Expression gegenüber den KEMs MgCl-0,1 (OCVs-KK-MgCl-0,1), SrCl-0,1 (OCVs-KK-SrCl-0,1), SrCl-0,01 (OCVs-KK-SrCl-0,01), MgHP-0,01 (OCVs-KK-MgHP-0,01), MgSrCl-0,05 (OCVs-KK-MgSrCl-0,05), MgSrHP-0,005 (OCVs-KK-MgSrHP-0,005) und PLGA-MgSrCl-0,05 (OCVs-KK-PLGA-MgSrCl-0,05). Zwischen der Expression der Negativkontrolle (OCVs-KK-leer) und der Positivkontrolle (OCVs-KK-w/o) ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

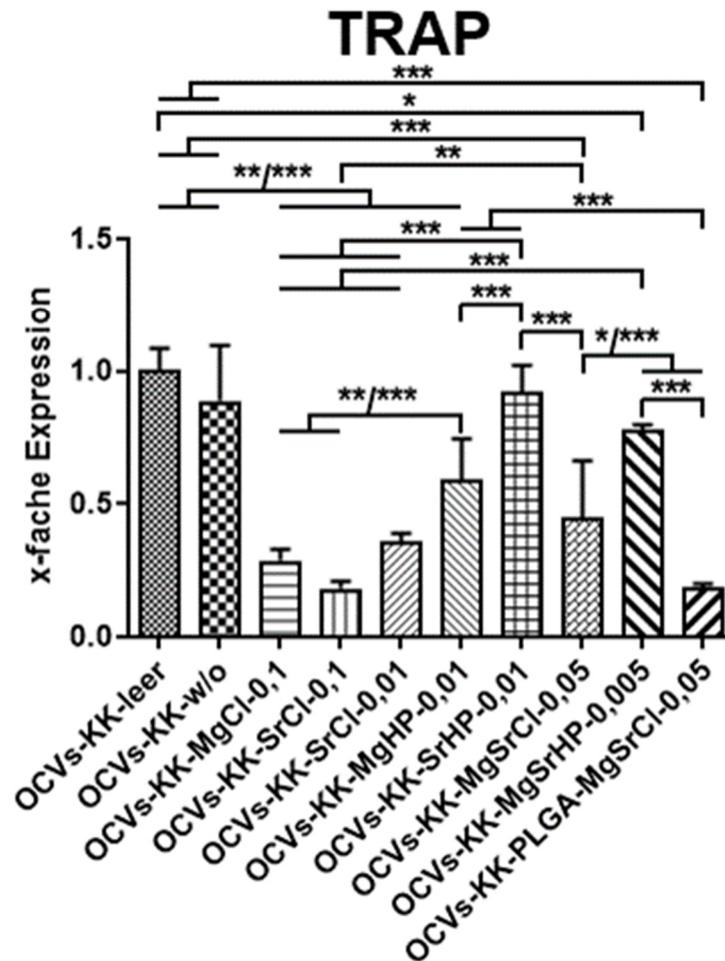


Abbildung 35: Hauptversuch: relative TRAP-Genexpressionen der OCVs. Dargestellt als Mittelwerte der $2^{-\Delta\Delta C_q}$ -Werte mit Standardabweichung. Die Kultivierung der OCVs erfolgte in indirekter Kokultur mit SCs und leerem Insert 1 oder KEMs über 9 Tage. Zwischen Negativkontrolle (OCVs-KK-leer) und Positivkontrolle (OCVs-KK-w/o) bestand kein signifikanter Unterschied. Beide Kulturen zeigten wie OCVs in Gegenwart von SrHP-0,01 (OCVs-KK-SrHP-0,01) annähernd gleich hohe Expressionslevel. Die niedrigsten relativen TRAP-Expressionen der OCVs ergaben sich nach Kultivierung mit MgCl-0,1 (OCVs-KK-MgCl-0,1), SrCl-0,1 (OCVs-KK-SrCl-0,1), SrCl-0,01 (OCVs-KK-SrCl-0,01) und PLGA-MgSrCl-0,05 (OCVs-PLGA-MgSrCl-0,05; *** = $p \leq 0,001$, ** = $p \leq 0,01$, * = $p \leq 0,05$, / = oder, KEMs = Knochenersatzmaterialien, KK = Kokultur, OCVs = osteoklastäre Vorläuferzellen, PLGA = Polylactid-co-glycolid, SCs = mesenchymale Stromazellen, TRAP = Tartrat-resistente saure Phosphatase).

Das **Basis-KEM** (OCVs-KK-w/o, Positivkontrolle) führte zur hoch bis höchst signifikanten Erhöhung der Expression gegenüber den KEMs MgCl-0,1 (OCVs-KK-MgCl-0,1), SrCl-0,1 (OCVs-KK-SrCl-0,1), SrCl-0,01 (OCVs-KK-SrCl-0,01), MgHP-0,01 (OCVs-KK-MgHP-0,01), MgSrCl-0,05 (OCVs-KK-MgSrCl-0,05) und PLGA-MgSrCl-0,05 (OCVs-KK-PLGA-MgSrCl-0,05). Die Kultivierung mit **MgCl-0,1** (OCVs-KK-MgCl-0,1) resultierte im Unterschied zur Negativ- (OCVs-KK-leer) und Positivkontrolle (OCVs-KK-w/o) sowie MgHP-0,01 (OCVs-KK-MgHP-0,01), SrHP-0,01 (OCVs-KK-SrHP-0,01) und MgSrHP-0,005 (OCVs-KK-MgSrHP-0,005) in einer hoch bis höchst signifikanten Verminderung der TRAP-Expression.

Hingegen war die TRAP-Expression der OCVs, die mit **SrCl-0,1** (OCVs-KK-SrCl-0,1) inkubiert wurden, hoch bis höchst signifikant erniedrigt im Vergleich zu den OCVs der Negativ- (OCVs-KK-leer) und Positivkontrolle (OCVs-KK-w/o) sowie den Kulturen angelegt in Gegenwart von MgHP-0,01 (OCVs-KK-MgHP-0,01), SrHP-0,01 (OCVs-KK-SrHP-0,01), MgSrCl-0,05 (OCVs-KK-MgSrCl-0,05) und MgSrHP-0,005 (OCVs-KK-MgSrHP-0,005).

SrCl-0,01 (OCVs-KK-SrCl-0,01) führte zur höchst signifikanten Verminderung der **TRAP**-Expression im Unterschied zur Negativ- (OCVs-KK-leer) und Positivkontrolle (OCVs-KK-w/o), SrHP-0,01 (OCVs-KK-SrHP-0,01) sowie MgSrHP-0,005 (OCVs-KK-MgSrHP-0,005).

Ebenfalls hoch bis höchst signifikant vermindert war die Expression der OCVs, die mit **MgHP-0,01** (OCVs-KK-MgHP-0,01) kultiviert wurden, im Vergleich zu Kulturen in Kombination mit leerem Insert 1 (OCVs-KK-leer, Negativkontrolle), dem Basis-KEM (OCVs-KK-w/o, Positivkontrolle) und SrHP-0,01 (OCVs-KK-SrHP-0,01). Dagegen zeigte diese Kultur (OCVs-KK-MgHP-0,01) im Vergleich zu den Zellen, die mit MgCl-0,1 (OCVs-KK-MgCl-0,1), SrCl-0,1 (OCVs-KK-SrCl-0,1) und PLGA-MgSrCl-0,05 (OCVs-KK-PLGA-MgSrCl-0,05) kokultiviert wurden, eine hoch bis höchst signifikant höhere TRAP-Expression. Die Inkubation der OCVs mit **SrHP-0,01** (OCVs-KK-SrHP-0,01) hatte im Vergleich zu einer Inkubation mit MgCl-0,1 (OCVs-KK-MgCl-0,1), SrCl-0,1 (OCVs-KK-SrCl-0,1), SrCl-0,01 (OCVs-KK-SrCl-0,01), MgHP-0,01 (OCVs-KK-MgHP-0,01), MgSrCl-0,05 (OCVs-KK-MgSrCl-0,05) und PLGA-MgSrCl-0,05 (OCVs-KK-PLGA-MgSrCl-0,05) eine höchst signifikant höhere TRAP-Expression zur Folge. Die Expressionen der OCVs, die mit **MgSrCl-0,05** (OCVs-KK-MgSrCl-0,05) kultiviert wurden, waren im Vergleich zu einem Teil der Proben (OCVs-KK-SrCl-0,1 und OCVs-KK-PLGA-MgSrCl-0,05) signifikant bis hoch signifikant erhöht, gegenüber anderen (OCVs-KK-SrHP-0,01 und OCVs-KK-MgSrHP-0,005) einschließlich der Negativ-

(OCVs-KK-leer) und Positivkontrolle (OCVs-KK-w/o), höchst signifikant vermindert. Signifikant vermindert war die Expression der OCVs in Gegenwart von **MgSrHP-0,005** (OCVs-KK-MgSrHP-0,005) im Unterschied zu Kulturen, die mit leerem Insert 1 (OCVs-KK-leer, Negativkontrolle) kultiviert wurden, während die Expression gegenüber MgCl-0,1 (OCVs-KK-MgCl-0,1), SrCl-0,1 (OCVs-KK-SrCl-0,1), SrCl-0,01 (OCVs-KK-SrCl-0,01), MgSrCl-0,05 (OCVs-KK-MgSrCl-0,05) und PLGA-MgSrCl-0,05 (OCVs-KK-PLGA-MgSrCl-0,05) höchst signifikant höher war.

Relative CTSK-Expressionen der osteoklastären Vorläuferzellen

Abbildung 36 fasst die relativen **CTSK**-Expressionen der OCVs zusammen. Die jeweiligen p-Werte sind dem Anhang (siehe 9.2.7) zu entnehmen.

Die relative CTSK-Expression der **Negativkontrolle** (OCVs-KK-leer) zeigte sich gegenüber den Expressionen der OCVs, die mit MgCl-0,1 (OCVs-KK-MgCl-0,1), SrCl-0,1 (OCVs-KK-SrCl-0,1), SrCl-0,01 (OCVs-KK-SrCl-0,01), MgHP-0,01 (OCVs-KK-MgHP-0,01), MgSrCl-0,05 (OCVs-KK-MgSrCl-0,05) und PLGA-MgSrCl-0,05 (OCVs-KK-PLGA-MgSrCl-0,05) kultiviert wurden, höchst signifikant höher. Nur die Expression der OCVs, die mit MgSrHP-0,005 (OCVs-KK-MgSrHP-0,005) kultiviert wurden, zeigte sich auf dem gleichen Niveau wie die Negativkontrolle (OCVs-KK-leer). Der Vergleich zur Kultivierung mit dem Basis-KEM (OCVs-KK-w/o, Positivkontrolle) und SrHP-0,01 (OCVs-KK-SrHP-0,01) zeigte keinen signifikanten Unterschied.

OCVs, die mit dem **Basis-KEM** (OCVs-KK-w/o, Positivkontrolle) kultiviert wurden, zeigten im Vergleich zu den OCVs, die mit MgCl-0,1 (OCVs-KK-MgCl-0,1), SrCl-0,1 (OCVs-KK-SrCl-0,1), SrCl-0,01 (OCVs-KK-SrCl-0,01), MgSrCl-0,05 (OCVs-KK-MgSrCl-0,05) und PLGA-MgSrCl-0,05 (OCVs-KK-PLGA-MgSrCl-0,05) kultiviert wurden, eine signifikant bis höchst signifikant höhere Expression.

Bei **MgCl-0,1** (OCVs-KK-MgCl-0,1) war eine signifikante bis höchst signifikante Verminderung, bei **SrCl-0,1** (OCVs-KK-SrCl-0,1) und **SrCl-0,01** (OCVs-KK-SrCl-0,01) hoch bis höchst signifikant verminderte Expressionen gegenüber den OCVs, die mit leerem Insert 1 (OCVs-KK-leer, Negativkontrolle), dem Basis-KEM (OCVs-KK-w/o, Positivkontrolle), SrHP-0,01 (OCVs-KK-SrHP-0,01) und MgSrHP-0,005 (OCVs-KK-MgSrHP-0,005) inkubiert wurden, zu verzeichnen. **MgHP-0,01** (OCVs-KK-MgHP-0,01) führte im Vergleich zu OCVs, die mit leerem Insert 1 (OCVs-KK-leer, Negativkontrolle) sowie MgSrHP-0,005 (OCVs-KK-MgSrHP-0,005) kultiviert wurden, zu einer hoch bis höchst signifikanten Verminderung der CTSK-Expression. Im Gegensatz dazu war eine signifikante bis höchst

signifikante Erhöhung der Expression bei **SrHP-0,01** (OCVs-KK-SrHP-0,01) im Vergleich zu MgCl-0,1 (OCVs-KK-MgCl-0,1), SrCl-0,1 (OCVs-KK-SrCl-0,1), SrCl-0,01 (OCVs-KK-SrCl-0,01) und PLGA-MgSrCl-0,05 (OCVs-KK-PLGA-MgSrCl-0,05) festzustellen.

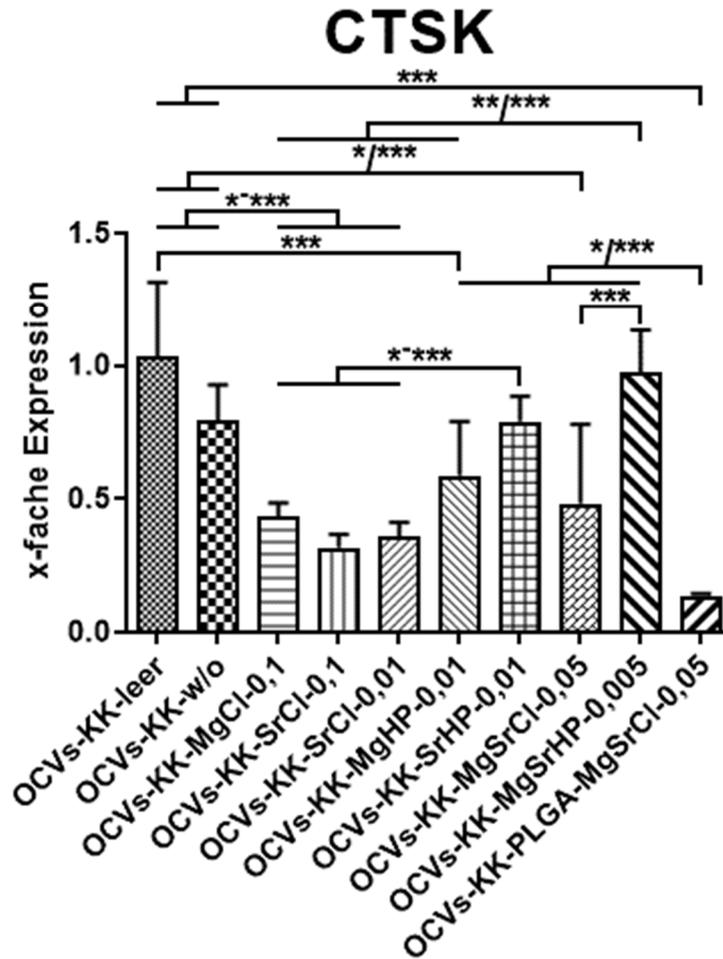


Abbildung 36: Hauptversuch: relative CTSK-Genexpressionen der OCVs. Dargestellt als Mittelwerte der $2^{-\Delta\Delta C_q}$ -Werte mit Standardabweichung. Die Kultivierung der OCVs erfolgte in indirekter Kokultur mit leerem Insert 1 oder KEMs über 9 Tage. Die Kultivierung mit leerem Insert 1 (OCVs-KK-leer, Negativkontrolle) und dem Basis-KEM (OCVs-KK-w/o, Positivkontrolle) führte zu relativ hohen, nicht signifikant unterschiedlichen Expressionen, die hinsichtlich der Expressionshöhe noch bei der Kultur in Gegenwart von MgSrHP-0,005 (OCVs-KK-MgSrHP-0,005) zu beobachten waren. Die niedrigsten relativen TRAP-Expressionen ergaben sich nach Kultivierung mit SrCl-0,1 (OCVs-KK-SrCl-0,1), SrCl-0,01 (OCVs-KK-SrCl-0,01) und PLGA-MgSrCl-0,05 (OCVs-KK-PLGA-MgSrCl-0,05; *** = $p \leq 0,001$, ** = $p \leq 0,01$, * = $p \leq 0,05$, - = bis, / = oder, CTSK = Cathepsin K, KEMs = Knochenersatzmaterialien, KK = Kokultur, OCVs = osteoklastäre Vorläuferzellen, PLGA = Polylactid-co-glycolid, SCs = mesenchymale Stromazellen).

Die Kultivierung mit **MgSrCl-0,05** (OCVs-KK-MgSrCl-0,05) resultierte im Unterschied zu OCVs der Negativ- (OCVs-KK-leer) und Positivkontrolle (OCVs-KK-w/o) sowie bei Kulturen inkubiert mit MgSrHP-0,005 (OCVs-KK-MgSrHP-0,005) in einer signifikant bis höchst signifikant verminderten bzw. einer signifikant erhöhten Expression im Falle von PLGA-MgSrCl-0,05 (OCVs-KK-PLGA-MgSrCl-0,05).

MgSrHP-0,005 (OCVs-KK-MgSrHP-0,005) wies in annähernder Übereinstimmung mit den Kulturen der Positivkontrolle (OCVs-KK-w/o) das höchste Expressionsprofil auf und induzierte eine hoch bis höchst signifikant höhere CTSK-Expression im Vergleich zu MgCl-0,1 (OCVs-KK-MgCl-0,1), SrCl-0,1 (OCVs-KK-SrCl-0,1), SrCl-0,01 (OCVs-KK-SrCl-0,01), MgHP-0,01 (OCVs-KK-MgHP-0,01), MgSrCl-0,05 (OCVs-KK-MgSrCl-0,05) und PLGA-MgSrCl-0,05 (OCVs-KK-PLGA-MgSrCl-0,05). Wurden die OCVs mit **PLGA-MgSrCl-0,05** (OCVs-KK-PLGA-MgSrCl-0,05) kultiviert, war die Expression im Vergleich zu den Kulturen, die mit leerem Insert 1 (OCVs-KK-leer, Negativkontrolle), dem Basis-KEM (OCVs-KK-w/o, Positivkontrolle), MgHP-0,01 (OCVs-KK-MgHP-0,01), SrHP-0,01 (OCVs-KK-SrHP-0,01), MgSrCl-0,05 (OCVs-KK-MgSrCl-0,05) und MgSrHP-0,005 (OCVs-KK-MgSrHP-0,005) inkubiert wurden, signifikant bis höchst signifikant vermindert.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass in Gegenwart aller untersuchten KEMs die Expressionsprofile von TRAP und CTSK prinzipiell sehr ähnlich waren: **MgCl-0,1**, **SrCl-0,1**, **SrCl-0,01**, **MgHP-0,01**, **MgSrCl-0,05** sowie **PLGA-MgSrCl-0,05** reduzierten signifikant bis höchst signifikant die TRAP- und CTSK-Expressionen gegenüber den Kontrollen. Lediglich **SrHP-0,01** und **MgSrHP-0,005** beeinflussten die Expressionen beider Gene kaum und blieben annähernd auf dem Niveau der Kontrollen.

Auch bei den OCVs zeigten sich Unterschiede in Abhängigkeit der Salzkomponente: **SrCl-0,1** führte im Gegensatz zu **MgCl-0,1** zu einer stärkeren Reduktion der relativen TRAP- und CTSK-Expressionen. Im Unterschied dazu zeigte sich bei der Verwendung der Phosphatsalze eine stärkere Reduktion im Falle von **MgHP-0,01** im Unterschied zu **SrHP-0,01**.

5 Diskussion

Die *in vitro*-Testung von KEMs gewinnt zusehends an Bedeutung und bislang existiert eine Reihe von heterogenen Zellkultursystemen, um die Effekte der Materialien auf die Zellen zu überprüfen. Neben Monokulturen (Glenske et al. 2014; Schumacher et al. 2016) werden direkte und indirekte Kokultursysteme (Bernhardt et al. 2010; Heinemann et al. 2013; Schulze et al. 2017; Heinemann et al. 2019) verwendet.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde in mehreren methodischen Ansätzen ein indirekter Versuchsaufbau etabliert, in dem Vorläuferzellen der Osteoblasten und Zellen der Monozyten-Makrophagen-Linie – die Vorläuferzellen der Osteoklasten – adäquat unter Zellkulturbedingungen in verschiedenen Kompartimenten unter dem Einfluss eines KEMs differenzieren.

Im Rahmen des 1. Vorversuchs gab es keine morphologischen Hinweise auf die Entstehung von reifen Osteoblasten in den Mono- und Kokulturen. Dennoch spiegelte die Untersuchung der relativen Genexpressionen der SCs im Hinblick auf die untersuchten osteoblastären Marker Runx2 und Cx43 signifikante Unterschiede zwischen den SCs der Mono- und Kokulturen wider. So wiesen die monokultivierten SCs höchst signifikant höhere relative Runx2- und Cx43-Expressionen auf als die entsprechend in den Kokulturen gewachsenen SCs (Abbildung 17). Xu und Kollegen verweisen bei Zellen der C2C12-Linie auf eine hohe Runx2-Expression während der frühen osteogenen Differenzierung, die im weiteren Verlauf zu reifen Osteoblasten jedoch signifikant abnimmt (Xu et al. 2015). Lee und Kollegen, die ebenfalls C2C12-Zellen in ihrer Studie verwendeten, fanden heraus, dass diese Herabregulierung an Tag 7 stattfindet (Lee et al. 1999). Vor dem Hintergrund dieser Ergebnisse ist anzunehmen, dass die SCs der Kokultur am 19. Tag die Phase der frühen osteogenen Differenzierung bereits überschritten haben könnten. Dafür spricht das ebenfalls sehr niedrige Expressionsprofil von Cx43 am 19. Tag der Kokultivierung. Runx2 und Cx43 sind auf funktioneller Ebene eng miteinander verknüpft, indem Cx43 die Aktivität von Runx2 über Regulation der ERK- und PKC δ -Signalwege beeinflusst. Runx2 wird als Resultat dieser Signalwege phosphoryliert, wodurch seine transkriptionelle Aktivität ansteigt (Buo und Stains 2014). Cx43 gilt somit als Marker der osteogenen Differenzierung (Buo et al. 2017) und wird zur Beurteilung der osteogenen Differenzierungsfähigkeit von SCs *in vitro* in Gegenwart von KEMs herangezogen (Wagner et al. 2017a; Wagner et al. 2017b).

In vivo sind vor allem die Faktoren RANKL und M-CSF an der Differenzierung von OCVs beteiligt (Boyle et al. 2003). Prinzipiell werden zur *in vitro*-Generierung von Osteoklasten zwei

Verfahren unterschieden: zum einen über die Zugabe der rekombinanten Faktoren RANKL und M-CSF in das Medium, wie von Wagner und Kollegen bei der Untersuchung von KEMs in der Monokultur genutzt (Wagner et al. 2019). Zum anderen durch Kokultivierung der OCVs mit einer zweiten Zellpopulation wie Osteoblasten, MSCs oder aktivierten T-Zellen (Suda et al. 1999; Quinn und Gillespie 2005; Young et al. 2015).

Dass MSCs *in vitro* prinzipiell zur Induktion der Osteoklastengnese in der Lage sind, zeigt die Studie von Young und Kollegen (Young et al. 2015), die ein direktes Kokultursystem entwickelten, in dem sich nach 21 Tagen Kultivierungszeit ohne die Zugabe von Supplementen die Differenzierung von Osteoblasten und Osteoklasten aus den jeweiligen Vorläuferzellen vollzog (Young et al. 2015). Im Rahmen des 1. Vorversuchs dieser Arbeit wurde ebenfalls eine Kokultivierung ohne den Zusatz von Supplementen angestrebt, um die Differenzierung von OCVs zu stimulieren – jedoch im Unterschied zu Young und Kollegen (Young et al. 2015) auf Basis der indirekten Kokultur. Es zeigte sich jedoch, dass nach 19 Tagen der Kokultivierung keine ausreichende Differenzierung der OCVs stattgefunden hatte (Kapitel 4.1.1). Dagegen waren in den entsprechenden Monokulturen, die unter dem Zusatz der Faktoren RANKL und M-CSF kultiviert wurden, eine große Anzahl von TRAP-positiven Osteoklasten-ähnlichen Zellen zu identifizieren (Abbildung 10). Dieses Ergebnis stimmt mit den Befunden einer Studie von Schulze und Kollegen überein (Schulze et al. 2017). Sie verglichen die direkte und indirekte Kokultivierung humaner MSCs und OCVs. Die OCVs der indirekten Kokultur waren innerhalb von 14 Tagen nicht in der Lage zu Osteoklasten zu differenzieren, während sich die Osteoklastengnese in der direkten Kokultur ohne die Zugabe von stimulierenden Supplementen vollzog (Schulze et al. 2017). Einen ähnlichen Ansatz nutzten auch Heinemann und Kollegen unter Verwendung humaner MSCs und OCVs in einem direkten Kokultursystem zur Biokompatibilitätsüberprüfung von KEMs. Vor der Kokultivierung wurde die osteogene Differenzierung der MSCs 13 Tage durch die Zugabe von Dexamethason, β -Glycerolphosphat, Vitamin D3 und Ascorbinsäure stimuliert. Nach Aussaat der OCVs in die Kokultur wurde Ascorbinsäure für 4 Wochen dem Medium hinzugefügt (Heinemann et al. 2019).

Da es im Rahmen des 1. Vorversuchs nicht gelungen war, eine ausreichende Zahl von OCVs zur Differenzierung durch die kokultivierten SCs anzuregen, wurde im nächsten Methodenschritt, dem 2. Vorversuch, angestrebt, durch Stimulation der osteogenen Differenzierung die SC-abhängige RANKL- und M-CSF-Produktion zu verstärken, um so die Osteoklastengnese anzuregen. In vorliegender Arbeit lagerten sich die SCs nach 21 Tagen

osteogener Vordifferenzierung und anschließender Kokultivierung für 5 (Abbildung 12 B) und 9 (Abbildung 12 D) Tage zu Zellaggregaten zusammen. Wie sich mittels der Alizarinfärbung nachweisen ließ, produzierten die Zellen eine mineralisierte Matrix (Abbildung 13 C und D). Die relativen Expressionslevel von Runx2 und Cx43 dieser Zellen waren höchst signifikant niedriger als die entsprechenden Zellen der Monokultur. In Anbetracht der mit fortschreitender Differenzierung der Zellen assoziierten Herabregulation der Runx2-Expression (Lee et al. 1999; Xu et al. 2015) und der engen Verknüpfung von Runx2 und Cx43 (Buo und Stains 2014) auf funktioneller Ebene, könnten diese Ergebnisse für eine fortgeschrittene Osteogenese der SCs in der indirekten Kokultur sprechen. Die osteoklastären Vorläuferzellen zeigten im Verlauf der Kokultivierung jedoch keine Differenzierungsanzeichen, unabhängig davon über welchen Zeitraum die SCs vordifferenziert wurden. Somit waren die osteogen differenzierten SCs offensichtlich nicht dazu in der Lage, die Osteoklastengnese zu stimulieren. Im Unterschied zu der Arbeit von Heinemann und Kollegen (Heinemann et al. 2019), die die Zellen über 4 Wochen kokultivierten, war die Dauer der Kokultivierung in vorliegender Arbeit auf maximal 19 Tage im 1. Vorversuch und 9 Tage im 2. Vorversuch beschränkt und damit deutlich kürzer. Zudem wurde in vorliegender Arbeit auf den Zusatz von Ascorbinsäure im Kokultursystem verzichtet. Der Versuchsansatz der Vordifferenzierung wurde in der vorliegenden Arbeit aufgrund der ausbleibenden osteoklastären Differenzierung nicht weiter verfolgt – auch aufgrund der Tatsache, dass Supplemente des osteogenen Differenzierungsmedium, wie Dexamethason, einen inhibierenden Einfluss auf die Differenzierung von OCVs haben können (Zhu et al. 2018).

Schulze und Kollegen (Schulze et al. 2017) verglichen die osteoklastäre Differenzierung von humanen mononukleären Zellen des peripheren Bluts in der direkten und indirekten Kokultur mit humanen SCs, ohne Zugabe von Supplementen zur Stimulation der osteogenen oder osteoklastären Differenzierung. Sie zeigten, dass nur im direkten Kokultursystem die Differenzierung der OCVs erfolgreich war – vergleichbar mit der Differenzierung von OCVs der RANKL-stimulierten Kontrollen (Schulze et al. 2017). Die sowohl im Rahmen des 1. als auch 2. Vorversuchs ausbleibende Osteoklastendifferenzierung könnte daher auf die mangelnde Verfügbarkeit von RANKL zurückzuführen sein. Es existieren 2 Isoformen von RANKL: membrangebundenes (mRANKL) und gelöstes RANKL (sRANKL). Nakashima und Kollegen zeigten, dass mRANKL im Hinblick auf die Osteoklastengnese die größere Effektivität besitzt (Nakashima et al. 2000). Es ist daher anzunehmen, dass mRANKL zwar in ausreichender Menge durch die osteogen vordifferenzierten MSCs produziert wurde, dieses aber aufgrund der

indirekten Kultivierung nicht an den Rezeptor RANK binden konnte. Das gebildete sRANKL könnte in zu geringer Konzentration vorgelegen haben, um eine erfolgreiche Osteoklastengnese zu stimulieren. Dafür sprechen die Ergebnisse von Abe und Kollegen, die murine Balb/c MSCs aus dem Knochenmark mit OCVs der RAW264-Zelllinie in einem indirekten Kokultursystem unter der Zugabe von sRANKL kultivierten (Abe et al. 2019). Darüber hinaus stellten Gori und Kollegen fest, dass humane SCs zur Induktion der Osteoklastengnese in der Lage sind, diese Fähigkeit aber während der Differenzierung zu Osteoblasten einbüßen (Gori et al. 2000). Auch hohe OPG-Level könnten die Osteoklastengnese unterdrückt haben. Als *decoy receptor* bindet OPG an RANKL und hebt damit dessen Wirkung auf (Gori et al. 2000; Walsh und Choi 2014).

Daher hatte der 3. Vorversuch zum Ziel, durch Zugabe von rekombinanten RANKL und/oder M-CSF die Osteoklastengnese zu stimulieren. Die Ergebnisse der vergleichenden Morphologie der osteoklastären Vorläuferzellen spiegelten im Kokultursystem sowohl nach Zugabe von RANKL als auch nach Zugabe von RANKL und M-CSF eine ausreichende Zahl von Osteoklasten-ähnlichen Zellen wider. Die Zellen waren mehrkernig und wiesen TRAP-Aktivität auf (Kapitel 4.1.3). Zudem zeigten sie nach Phalloidin-färbung einen peripheren Aktinring, der typisch für Osteoklasten ist (Burgess et al. 1999). Er entspricht dem filamentösen Aktin der *sealing zone* und ermöglicht dem Osteoklast das Anheften an die Knochenoberfläche und die Migration (Soysa und Alles 2016).

OCVs, die unter der Zugabe von RANKL und M-CSF in Gegenwart der SCs kokultiviert wurden, besaßen teils höchst signifikant niedrigere relative TRAP- und CTSK-Expressionen gegenüber den OCVs, die in Monokultur mit RANKL und M-CSF kultiviert wurden (Abbildung 26–27). In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen dokumentierten Oshita und Kollegen in einer Studie, in der sie humane MSCs und periphere Monozyten aus dem Blut verwendeten, dass die Osteoklastengnese unter dem Einfluss von sRANKL und M-CSF im Beisein von MSCs weniger stark stimuliert wurde als in OCVs-Monokulturen. Sie führten diese Ergebnisse hauptsächlich auf die Produktion von OPG durch die MSCs zurück (Oshita et al. 2011). Die mit RANKL und M-CSF kokultivierten SCs wiesen in Bezug auf Runx2 höchst signifikant niedrigere Expressionslevel auf als die entsprechenden Monokulturen dieses 3. Vorversuchs (Abbildung 20). Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass beide Faktoren die osteogene Differenzierung von SCs nur unter Kokulturbedingungen stimulierten.

Nach Etablierung der optimalen Kulturbedingungen der Zellen für die Kokultur wurde die Tauglichkeit und Sensitivität des Systems überprüft, indem die Zellen mit verschiedenen KEMs kokultiviert und anschließend die jeweiligen Zellantworten untersucht wurden.

Die Basiskomponente des in dieser Arbeit verwendeten KEMs ist biphasisches Calciumphosphat. Es wird synthetisch hergestellt und besteht zu 60 % aus HA, welcher langsam abgebaut wird und zu 40 % aus β -TCP, welches eine hohe Löslichkeit besitzt, vergleichsweise einem schnellen Abbau unterliegt und damit Raum für einwachsende Blutgefäße schafft (Kolk et al. 2012). Eine Studie von Rothamel und Kollegen weist diesem Basis-KEM eine gute Biokompatibilität zu (Rothamel et al. 2008). Um Einfluss auf die remodellierenden Eigenschaften des KEMs zu nehmen, wurde dieses Basis-KEM mit Strontium und/oder Magnesium in verschiedenen Konzentrationen und chemischen Modifikationen versetzt.

Mit Blick auf die Ergebnisse der qPCR fiel auf, dass Zellen, die mit den KEMs SrCl-0,1, SrCl-0,01 und PLGA-MgSrCl-0,05 kultiviert wurden, annähernd übereinstimmende Muster der untersuchten Gene aufwiesen. Um die osteogene Differenzierung der SCs zu beurteilen, wurden die relativen Expressionen von Runx2, Cx43 und Panx3 bewertet, deren Expressionen bei SCs, die mit den KEMs SrCl-0,1, SrCl-0,01 und PLGA-MgSrCl-0,05 kokultiviert wurden, signifikant, in der Mehrzahl sogar höchst signifikant, niedriger waren als die relativen Expressionen der SCs, die mit allen anderen KEMs kokultiviert wurden (Abbildung 29–Abbildung 30, Abbildung 33, Anhang 9.2.1–9.2.2, Anhang 9.2.5). In Übereinstimmung mit den bislang bekannten osteogenen Effekten von Strontium auf knochenbildende Zellen (Zhang et al. 2011; Glenske et al. 2018; Krupke et al. 2019a), verweisen die vorliegenden Ergebnisse auf einen durch Strontium stimulierten, fortgeschrittenen Prozess der osteogenen Differenzierung, der im Rahmen des etablierten Kokultursystems deutlich erfasst werden konnte. Dass dabei die RNA-Level von Runx2 niedriger waren als die der SCs der Negativ- und Positivkontrolle, also Zellen, die mit leerem Insert 1 bzw. mit dem Basis-KEM kultiviert wurden, kann dem dynamischen Verlauf der Expression dieses Markers geschuldet sein. So sind hohe Runx2-Expressionslevel nur während der frühen Differenzierung von C2C12-Zellen der Maus nachweisbar, die mit Fortschreiten der Osteogenese signifikant abnehmen (Xu et al. 2015), wobei der maßgebliche Abfall der Runx2-Expression bei C2C12-Zellen an Tag 7 der Kultivierung stattfindet (Lee et al. 1999). Auch andere Autoren berichten über diese Runx2-Absenkung im Laufe der fortschreitenden Osteogenese sowohl bei Zelllinien (C2C12, C3H10T1/2) und Kalvarien-abgeleiteten Primärzellen der Maus (Maruyama et al. 2007).

Die in vorliegender Arbeit festgestellten relativen Cx43-Expressionen sind mit der differenzierungsabhängigen Abnahme der Runx2-Expression in Einklang zu bringen, denn Cx43 beeinflusst über Aktivierung der ERK und PKC δ die Runx2-Aktivität (Buo und Stains 2014). Runx2 ist darüber hinaus zur Regulation von Panx3 durch Bindung an den Panx3-Promoter befähigt (Bond et al. 2011). Im Knochen bildet Panx3 drei Arten von Kanälen: *hemichannels*, *gap junctions* und *ER Ca²⁺ channels* (Ishikawa und Yamada 2016). Der Panx3-*hemichannel* setzt intrazelluläres ATP in den Extrazellularraum frei, dieses bindet an P2-Rezeptoren. Über PI3K wird Akt aktiviert, der wiederum den *ER Ca²⁺ channel* zur Freisetzung von Ca²⁺ aus dem ER stimuliert (Ishikawa et al. 2019). Der Panx3-*hemichannel* ist zudem am *cell cycle exit* über die Regulierung von Wnt/ β -Catenin und p21-Signalen beteiligt und moduliert somit den Übergang von Proliferation zur Differenzierung (Ishikawa et al. 2014). Ishikawa und Kollegen stellten in ihrer Studie an C2C12-Zellen und primären Kalvarien-abgeleiteten Zellen der Maus annähernd übereinstimmende Expressionsmuster von Runx2 und Panx3 fest (Ishikawa et al. 2011). In der vorliegenden Arbeit wiesen SCs, die mit SrCl-0,1, SrCl-0,01 und PLGA-MgSrCl-0,05 kultiviert wurden, jeweils die niedrigsten Runx2- und Panx3-Expressionen auf. Diese Ergebnisse könnten daher in Übereinstimmung mit den Befunden von Ishikawa und Kollegen (Ishikawa et al. 2011) sowie von Liu und Lee (Liu und Lee 2013) für eine funktionelle Rolle von Panx3 im Rahmen der frühen Differenzierung der primären Kalvarien-abgeleiteten Zellen der Ratte sprechen.

Ishikawa und Kollegen untersuchten in einer weiteren Studie aus dem Jahr 2016 den funktionellen Zusammenhang zwischen Panx3 und Cx43 während der skelettalen Entwicklung. Sie verglichen Wildtyp-Mäuse (WT) mit Mäusen, die kein Panx3 (Panx3^{-/-}) oder kein Cx43 (Cx43^{-/-}) bzw. keines der beiden Gene (Panx3^{-/-};Cx43^{-/-}) exprimierten. Phänotypisch zeigten die neugeborenen Panx3^{-/-}-Tiere eine verminderte Knochendichte und einen ausgeprägten Kleinwuchs. Die Erscheinung der Panx3^{-/-};Cx43^{-/-}-Mäuse ähnelte diesem Bild. Cx43^{-/-}-Tiere hingegen zeigten phänotypisch keine Unterschiede zum WT, wiesen aber eine verminderte Mineralisierung des Schädels auf (Ishikawa et al. 2016). Ishikawa und Kollegen stellten ebenfalls die Zeitverläufe der Panx3- und Cx43-Expressionen im WT und den Cx43^{-/-}-Mäusen dar. Dazu nutzten sie primäre Kalvarienzellen, die nach Isolation aus den jeweiligen Schädelknochen für 24 Tage in osteoinduktivem Medium kultiviert wurden. Panx3 ließ sich bereits während der frühen Differenzierung in den aus dem WT isolierten Zellen nachweisen, und zeigte die höchste Expression an Tag 15. Danach sank die Expression signifikant ab. Die Cx43-Expression stieg erst gegen Ende der Kultivierungsdauer, zeitgleich mit der Absenkung

der Panx3-Expression, signifikant an. Die höchste Expression trat an Tag 24, dem letzten Tag der Untersuchung, auf. Der Verlauf der Panx3-Expressionen in Cx43^{-/-}-Mäusen war jenen des WT ähnlich. Die Autoren nehmen an, dass Panx3 sowohl die frühe wie auch die späte osteogene Differenzierung stimuliert, während Cx43 hauptsächlich für die späte osteogene Differenzierung von Bedeutung sei. Sie schlussfolgern, dass Panx3 *upstream* von Cx43 lokalisiert ist, dessen Expression teilweise über Osx reguliert wird (Ishikawa et al. 2016). Ishikawa und Kollegen nutzten im Unterschied zur vorliegenden Arbeit zum einen jedoch Zellen aus der Maus, zum anderen ein osteoinduktives Medium zur Kultivierung der Kalvarien-Zellen. Dennoch stimmen die in der vorliegenden Arbeit festgestellten Expressionsprofile von Panx3 und Cx43 tendenziell mit denen von Ishikawa und Kollegen (Ishikawa et al. 2016) beschriebenen, zeitlich gegenläufigen Expressionsmustern beider Gene überein: die in Gegenwart aller untersuchter KEMs extrem niedrigen Panx3-Level standen jeweils deutlich höheren Leveln von Cx43 gegenüber. Dies könnte in Anlehnung an die Vermutung von Ishikawa und Kollegen (Ishikawa et al. 2016) bedeuten, dass mit Absenkung der Panx3-Expression die Erhöhung der Cx43-Expression einhergegangen war. Um die Bedeutung von Panx3 in humanen SCs aus dem Knochenmark noch detaillierter zu untersuchen, verwendeten Guerrero und Kollegen siRNA zur Unterdrückung der Panx3-Expression. Es zeigte sich, dass dies in einer verminderten Expression von Ocn resultierte. Auf Grundlage dieses Ergebnisses schlussfolgerten die Autoren, dass die Bedeutung von Panx3 mit der späten osteogenen Differenzierung verknüpft ist (Guerrero et al. 2018).

Betrachtet man die in der vorliegenden Untersuchung festgestellten Panx2-Expressionsmuster der SCs, die im Rahmen des Hauptversuchs mit den verschiedenen KEMs kokultiviert wurden, so ist ein annähernd übereinstimmendes Muster mit den Genexpressionsleveln von Runx2, Cx43 und Panx1 festzustellen. Dies legt die Vermutung nahe, dass auch Panx2 an der osteogenen Differenzierung der SCs beteiligt ist. Die Funktion von Panx2 ist bislang noch nicht geklärt (Lohman et al. 2019) – betrifft aber vermutlich die intrazelluläre Kommunikation (Le Vasseur et al. 2014). Darüber hinaus wurde die Beteiligung von Panx2 an der neuronalen Differenzierung nachgewiesen (Swayne et al. 2010).

Panx1 spielt dagegen bei vielen zellulären Prozessen wie der Freisetzung von ATP, der Calciumwellenausbreitung und der Apoptose eine Rolle (Chekeni et al. 2010; Penuela et al. 2013). Guerrero und Kollegen (Guerrero et al. 2018) untersuchten die osteogene Differenzierung humaner SCs aus dem Knochenmark im 2D-Kultursystem im Vergleich zum

3D-System auf Grundlage eines makroporösen Polysaccharid-Gerüsts. Dazu kultivierten sie die Zellen über einen Zeitraum von 4 Tagen. Die Probenentnahme erfolgte am 1. und 4. Tag. Sie beurteilten die Expressionen von Runx2, Cx43, Panx1, Panx3, ALP und Ocn. Dabei stellten sie fest, dass die unterschiedliche Kultivierungsart (2D vs. 3D) Einfluss auf die Expression der Marker hat. Nach 4 Tagen der Kultivierung waren die Expressionen von Panx1, Panx3 und Cx43 der Zellen, die mittels des 3D-Gerüsts kultiviert wurden, signifikant höher als diejenigen der 2D-Kultur (Guerrero et al. 2018). In vorliegender Arbeit wurde die Kultivierung der Zellen in 2D durchgeführt, womit die Genexpressionen möglicherweise grundsätzlich geringer sind als in 3D-Kulturen.

Guerrero und Kollegen nutzten weiterhin zwei spezifische Panx1-Inhibitoren, Probenecid, ein pharmakologischer Inhibitor und das mimetische Peptid 10panx1, um die funktionelle Bedeutung von Panx1 in den humanen SCs zu untersuchen. Dabei zeigten sich nach Zugabe beider Inhibitoren interessante Effekte an Tag 4 der 2D-Kultivierung: die Expression von ALP sank signifikant, während die anderen Gene (CaSR, Runx2, Ocn) keine Beeinflussung zeigten. Dies verweist auf einen funktionellen Zusammenhang zwischen ALP und Panx1 als Markergene der frühen osteogenen Differenzierung (Guerrero et al. 2018). Das im Rahmen des vorliegenden Hauptversuchs festgestellte Expressionsprofil von Panx1 entsprach dem der beiden frühen osteogenen Marker, Runx2 und Cx43 (Abbildung 29–31) was in Übereinstimmung mit Guerrero und Kollegen, die mittels Immunolabeling Panx1 vor allem in Bereichen von Zellaggregaten nachweisen konnten (Guerrero et al. 2018), für eine funktionelle Rolle von Panx1 im Rahmen der frühen osteogenen Differenzierung spricht.

Ein wichtiger funktioneller Aspekt von Panx1 betrifft auch das Inflammationsgeschehen (Makarenkova et al. 2018). Im Zusammenhang mit P2X-Rezeptoren wurde Panx1 als *upstream* Regulator von Inflammasomen sowie von Casp1 und Casp11 identifiziert (Makarenkova et al. 2018). Inflammasome sind Multiproteinkomplexe, die die proteolytische Reifung von Casp1, Casp11, IL-1 β und IL18 vermitteln (Makarenkova et al. 2018). Pro-inflammatorische Zytokine wie IL-1 β beeinflussen wiederum die Aktivität, die Resorptionsaktivität und auch die Anzahl von Osteoklasten (Mundy 2007). Im Hinblick auf die funktionelle Rolle von Panx1 im Rahmen einer Entzündung könnten die vergleichsweise hoch bis höchst signifikant niedrigeren Panx1-Expressionen der SCs, die mit den KEMs SrCl-0,1, SrCl-0,01 und PLGA-MgSrCl-0,05 kokultiviert wurden (Abbildung 31), auf ein geringes Entzündungs-vermittelndes Potenzial dieser Zellen bzw. auf ein geringes Potenzial der entsprechenden KEMs zur Induktion einer Inflammation hindeuten. Die höchst signifikant reduzierte Expression von Panx1 der SCs könnte auf funktioneller Ebene mit einer Suppression der osteoklastären Aktivität verknüpft

sein, denn die osteoklastären Zellen des Kokultursystems besaßen entsprechend höchst signifikant bzw. hoch signifikant verminderte RNA-Level von TRAP und CTSK (Abbildung 35–36, Anhang 9.2.6–9.2.7). Vor diesem Hintergrund könnten, vermittelt durch einen zellulären *crossstalk*, niedrige Panx1-Level der SCs niedrige Degradationskapazitäten der kokultivierten osteoklastären Zellen zur Folge gehabt haben. In diesem Falle würde Panx1 nicht autokrin wirken, sondern wie für die Aktivierung von T-Zellen und die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten und Makrophagen (Adamson und Leitinger 2014) beschrieben, das Verhalten einer anderen Zellpopulation parakrin beeinflussen.

Mit Hilfe des etablierten Kokultursystems konnte weiterhin der *dual effect* (Bonnelye et al. 2008) von Strontium nachvollzogen werden. Dieser Effekt beschreibt die Stimulation der osteogenen Differenzierung bei gleichzeitiger Hemmung der osteoklastären Differenzierung (Bonnelye et al. 2008), und offenbarte sich in den relativen Expressionen beider Zellpopulationen, die mit den KEMs SrCl-0,1, SrCl-0,01 und PLGA-MgSrCl-0,05 kultiviert wurden. In Gegenwart dieser Materialien waren die relativen TRAP- und CTSK-Expressionen der OCVs als Zeichen der Suppression der Osteoklastengenese am niedrigsten (Abbildung 35–36), während sich die fortgeschrittene osteogene Differenzierung der SCs in den niedrigen Runx2- und Cx43-Expressionen (Abbildung 29–30) widerspiegelte.

Das etablierte Kultursystem offenbarte jedoch auch weitere differenzielle Zellantworten mit Blick auf die unterschiedliche Zusammensetzung der KEMs: In Gegenwart von SrCl-0,01 und SrHP-0,01 zeigten sich höchst signifikante Unterschiede bezüglich der relativen Runx2-, Cx43-, Panx1- und Panx2-Genexpressionen der SCs (Abbildung 29–32) sowie der relativen TRAP- und CTSK-Genexpressionen der OCVs (Abbildung 35–67). Aus diesen Ergebnissen ist die Schlussfolgerung abzuleiten, dass Chlorid und Hydrogenphosphat die Wirkung von Strontium auf die Zellen des Knochens unterschiedlich modulieren. Eine mögliche Ursache könnte die unterschiedliche Löslichkeit sein. Laut der GESTIS-Stoffdatenbank liegt die Wasserlöslichkeit von Strontiumchlorid bei 1062 g/l (0 °C) bzw. 2058 g/l (40 °C) (GESTIS-Stoffdatenbank), die Wasserlöslichkeit von Strontiumhydrogenphosphat bei 62,1 mg/l (20 °C) (GESTIS-Stoffdatenbank). Die Genexpressionen der Zellen nach Kultivierung in Gegenwart der KEMs SrCl-0,1 und SrCl-0,01 zeigten dagegen keine signifikant unterschiedlichen Effekte. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass der zehnfache Konzentrationsunterschied dieser beiden Formulierungen keinen Einfluss auf die Strontium-vermittelten Effekte hatte.

Magnesium stimuliert die Differenzierung von SCs sowie die Knochenformation *in vivo* und *in vitro* (Yoshizawa et al. 2014; Galli et al. 2015). Yoshizawa und Kollegen untersuchten in einer Studie humane SCs in Monokultur hinsichtlich der Expressionen verschiedener Gene (*hypoxia-inducible factor* (HIF)-1 α , HIF2 α , Col10A1, *18s ribosomal RNA*) in Zusammenhang mit Magnesium. Dabei stellten sie eine durch Magnesium vermittelte Stimulation der osteogenen Differenzierung fest (Yoshizawa et al. 2014). Diese Wirkung konnte in der hier vorliegenden Arbeit teilweise nachvollzogen werden. Hinsichtlich der relativen Expressionen von Runx2 und Cx43 der SCs (Abbildung 29–30), die mit dem Knochenersatzmaterial MgCl-0,1 und jenen, die in Gegenwart des Basis-KEMs als Positivkontrolle kultiviert wurden, zeigten sich höchst signifikant niedrigere Expressionen der Zellen in Gegenwart von MgCl-0,1. Somit kann von einer fortgeschrittenen osteogenen Differenzierung ausgegangen werden. Dagegen war kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der relativen Runx2- und Cx43-Expressionen zwischen den mit dem KEM MgHP-0,01 kultivierten SCs und den in Kombination mit dem Basis-KEM kultivierten Zellen feststellbar. Hierbei ist zu beachten, dass sich sowohl die chemische Zusammensetzung von MgHP-0,01 und MgCl-0,1 als auch die Konzentration des Magnesiums beider KEMs unterschieden. So liegt die Wasserlöslichkeit von Magnesiumchlorid bei 542 g/l (20 °C) (GESTIS-Stoffdatenbank), die von Magnesiumhydrogenphosphat bei 0,578 g/l (20 °C) (GESTIS-Stoffdatenbank). Auch könnte die Konzentration von MgHP-0,01 mit 0,01 mol/L zu gering sein, um die Zellen zu beeinflussen.

Zhai und Kollegen versetzten Kulturmedium mit Magnesium, um den Effekt auf Osteoklasten zu untersuchen. Dabei stellten sie eine Hemmung der Osteoklastenformation, -polarisation und -resorption fest. Ursächlich dafür mag eine Inhibierung der Aktivierung des NF- κ B-Signalweges sein (Zhai et al. 2014). Dieser inhibierende Effekt auf die Osteoklastenformation konnte in vorliegender Arbeit insofern nachvollzogen werden, als dass OCVs, die mit MgCl-0,1 und MgHP-0,01 kultiviert wurden, hinsichtlich der relativen TRAP-Expressionen hoch bis höchst signifikant niedrigere Expressionen aufwiesen im Unterschied zu den OCVs, die mit dem Basis-KEM kultiviert wurden (Abbildung 35, Anhang 9.2.6).

OCVs, die mit den KEMs MgSrCl-0,05 und PLGA-MgSrCl-0,05 kokultiviert wurden, zeigten hinsichtlich der Expressionsmuster der TRAP und CTSK ebenfalls signifikante Unterschiede. So waren die TRAP- und CTSK-Expressionen der Zellen, die mit PLGA-MgSrCl-0,05 kokultiviert wurden, stets niedriger als bei den Zellen, die in Gegenwart von MgSrCl-0,05 kokultiviert wurden (Abbildung 35–36). Verantwortlich hierfür mag der Zusatz von PLGA sein, da die Konzentration der zugefügten Salze gleich war ($c = 0,05$ mol/L). PLGA ist ein Copolymer aus den Monomeren Lactid und Glycolid (D’Avila Carvalho Erbeta 2012), und

wird im Rahmen des *Bone Tissue Engineering* eingesetzt (Gentile et al. 2014). Lai und Kollegen untersuchten die Eigenschaften eines *scaffold*, welcher sich aus PLGA, β -TCP und Magnesium zusammensetzte, und wiesen in einem *in vivo*-Modell des Kaninchens eine die Knochenformation stimulierende Wirkung des Materials nach (Lai et al. 2019).

Die Diskussion mit Blick auf die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen hat gezeigt, dass das konzipierte indirekte Kokultursystem auf Kompartimentbasis differentielle Zellantworten in Gegenwart unterschiedlicher KEMs auf molekularbiologischer Ebene deutlich abbildet. Der Versuchsaufbau hat den Vorteil, dass die erfassten Zellantworten nicht auf ausschließlich KEM-vermittelten Effekten beruhen, sondern den interzellulären *crosstalk* auf Grundlage humoraler Faktoren miteinbezieht.

6 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung eines indirekten Kokultursystems zur Überprüfung der Biokompatibilität und Materialeigenschaften von Knochenersatzmaterialien (KEMs). Dazu wurden im Rahmen von drei Vorversuchen zunächst optimale Kultivierungsbedingungen für die aus Kalvarien von Wistarratten abgeleiteten mesenchymalen Stromazellen (SCs) und für osteoklastäre Vorläuferzellen (OCVs) – isoliert aus Femora und Tibiae von Wistarratten – etabliert. Im Anschluss wurde das indirekte Kokultursystem im Rahmen des Hauptversuchs hinsichtlich seiner Tauglichkeit überprüft, indem die Zellantworten nach Kokultivierung der Zellen mit KEMs unterschiedlicher chemischer Zusammensetzungen auf morphologischer und molekularbiologischer Ebene überprüft wurden. Auf Grundlage der in den Vorversuchen ermittelten Kultivierungsbedingungen wurden die Zellen während des Hauptversuchs über 9 Tage gemeinsam mit den KEMs in Basalmedium (BM, Dulbecco's Modified Eagle Medium low glucose (DMEM lg), 1 % Penicillin/Streptomycin (P/S), 10 % fetales bovines Serum (FBS)) unter dem Zusatz von *recombinant rat receptor activator of nuclear factor- κ B ligand* (RANKL, 50 ng/ml) kultiviert.

Das konzipierte indirekte Kokultursystem auf Kompartimentbasis bestand aus drei räumlich getrennten Kompartimenten, die über das Medium in Verbindung standen, um den Austausch löslicher Faktoren zu ermöglichen. Das Bodenkompartment der Kokultur entsprach dem Boden eines Wells einer 6-Well-Zellkulturplatte (9,6 cm²), in welches 2 Inserts (Insert1: 4,1 cm², Insert 2: 3,14 cm²), deren Böden aus einer Porenmembran (Porengröße 0,4 μ m) bestanden, platziert wurden. Im Bodenkompartment wurden die SCs in einer Dichte von 100 000 Zellen pro Bodenkompartment, in Insert 2 die OCVs in einer Dichte von 250 000 Zellen pro Insert 2 ausgesät. Insert 1 diente der Platzierung eines KEMs.

Hinsichtlich der osteogenen Differenzierungskapazität der SCs wurden im Anschluss an die Kokultivierung mittels quantitativer *real-time polymerase chain reaction* (qPCR) die Genexpressionen von *Runt-related transcription factor 2* (Runx2) und Connexin 43 (Cx43) ermittelt. Darüber hinaus wurden die Expressionen der Pannexine 1–3 (Panx1–3) untersucht. Bei den OCVs dienten die Expressionen der Tartrat-resistenten sauren Phosphatase (TRAP) und von Cathepsin K (CTSK) als Indikatoren der osteoklastären Aktivität. Die Berechnung der statistischen Signifikanz erfolgte mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) mit anschließendem Tukey-Test als post-hoc-Test.

Morphologisch zeigten sich in Gegenwart aller KEMs vitale Zellen in den Kulturen. Die relativen Genexpressionen von Runx2, Cx43 sowie von Panx1-3 der SCs sowie der TRAP und von CTSK der OCVs unterschieden sich signifikant im Hinblick auf die chemisch

unterschiedlich zusammengesetzten KEMs. So wiesen insbesondere Zellen, die in Gegenwart von Strontium-basierten KEMs kultiviert wurden, vergleichsweise hoch bis höchst signifikant niedrigere Expressionen aller untersuchten Gene auf. Mit Blick auf die Expression von Runx2 und Cx43 war dies vermutlich der fortgeschrittenen osteogenen Differenzierung der SCs geschuldet, während die TRAP- und CTSK-Expressionsmuster mit der supprimierten osteoklastären Aktivität einhergingen. Die festgestellten Profile von Panx1–3 der SCs legen eine funktionelle Bedeutung dieser Gene im Rahmen der osteogenen Differenzierung nahe.

7 Summary

The aim of the present study was to establish an indirect co-culture system to investigate biocompatibility and material characteristics of bone substitutes.

Three different preliminary experiments were undertaken to evaluate optimal culture conditions for simultaneous cultivation of mesenchymal stromal cells (SCs) – isolated from rat-calvaria – and osteoclast-progenitor-cells (OCVs) – isolated from rat-femora and -tibiae. Subsequently, the applicability of the established indirect co-culture system was investigated by using different chemically-modified bone substitutes. Due to the conditions established in the course of the pre-experiments, cells were co-cultured for 9 days in combination with the bone substitutes by using the following medium: Dulbecco's Modified Eagle Medium low glucose (DMEM lg), 1 % Penicillin/Streptomycin (P/S), 10 % fetal bovine serum (FBS) and 50 ng/ml recombinant rat receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL). Relevant cell responses to the materials were evaluated morphologically and by means of molecular-biological methods.

The indirect co-culture system consisted of three different, spatially separated compartments, whereby the medium allowed the exchange of soluble factors, and the change between the compartments. A single well of a 6-well-cell culture plate was used in terms of the ground compartment (9.6 cm²) in which two inserts of different size were placed in (Insert 1: 4.1 cm², Insert 2: 3.14 cm²). The bottom of the inserts consisted of a porous membrane (0.4 μ m) which allowed the exchange of soluble factors. SCs were seeded in the bottom compartment (100 000 cells per ground compartment), whereas OCVs were seeded into Insert 2 (250 000 cells per Insert 2). Insert 1 offered the ability to store bone substitutes.

Osteogenic differentiation capacity of SCs in response to different bone substitutes was determined by quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) with special regard to the gene expression of Runt-related transcription factor 2 (Runx2) and Connexin 43 (Cx43). In addition, gene expression of Pannexin 1–3 (Panx 1–3) was investigated. For assessment of osteoclastic activity, gene expression of Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) and Cathepsin K (CTSK) was analysed. Significances were calculated by one-way variance analysis (ANOVA) and Tukey-test as post-hoc test.

Morphologically vital cells could be observed in presence of all bone substitutes used presently. Gene expression of Runx2, Cx43, Panx 1–3, TRAP and CTSK differed significantly due to the chemically different composition of the materials. Especially, cells cultured in combination with strontium-containing bone substitutes showed highly reduced gene expressions of all the investigated genes. The decrease of Runx2- and Cx43-expressions indicated an advanced

osteogenic differentiation state of the SCs, whereas reduced expression patterns of TRAP and CTSK referred to suppressed osteoclast activity. Gene expression patterns of Panx1-3 suggest a functional role of these genes in the course of osteogenic differentiation of SCs.

8 Literaturverzeichnis

Abe, T.; Sumi, K.; Kunimatsu, R.; Oki, N.; Tsuka, Y.; Nakajima, K. et al. (2019): The effect of mesenchymal stem cells on osteoclast precursor cell differentiation. In: *Journal of oral science* 61 (1), S. 30–35. DOI: 10.2334/josnusd.17-0315.

Adamson, S.E.; Leitinger, N. (2014): The role of pannexin1 in the induction and resolution of inflammation. In: *FEBS Letters* 588 (8), S. 1416–1422. DOI: 10.1016/j.febslet.2014.03.009.

Albrektsson, T.; Johansson, C. (2001): Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. In: *European spine journal* 10 (2), S96-S101.

Anderson, J.M.; Rodriguez, A.; Chang, D.T. (2008): Foreign body reaction to biomaterials. In: *Seminars in Immunology* 20 (2), S. 86–100. DOI: 10.1016/j.smim.2007.11.004.

Angel, N.Z.; Walsh, N.; Forwood, M.R.; Ostrowski, M.C.; Cassady, A.I.; Hume, D.A. (2000): Transgenic Mice Overexpressing Tartrate-Resistant Acid Phosphatase Exhibit an Increased Rate of Bone Turnover. In: *J Bone Miner Res* 15 (1), S. 103–110. DOI: 10.1359/jbmr.2000.15.1.103.

Arnhold, S.J.; Goletz, I.; Klein, H.; Stumpf, G.; Beluche, L.A.; Rohde, C. et al. (2007): Isolation and characterization of bone marrow-derived equine mesenchymal stem cells. In: *American journal of veterinary research* 68 (10), S. 1095–1105. DOI: 10.2460/ajvr.68.10.1095.

Atkins, G.J.; Kostakis, P.; Welldon, K.J.; Vincent, C.; Findlay, D.M.; Zannettino, A.C.W. (2005): Human trabecular bone-derived osteoblasts support human osteoclast formation in vitro in a defined, serum-free medium. In: *J Cell Physiol* 203 (3), S. 573–582. DOI: 10.1002/jcp.20255.

Atteritano, M.; Catalano, A.; Santoro, D.; Lasco, A.; Benvenga, S. (2016): Effects of strontium ranelate on markers of cardiovascular risk in postmenopausal osteoporotic women. In: *Endocrine* 53 (1), S. 305–312. DOI: 10.1007/s12020-015-0721-8.

Azuma, K.; Kobayashi, M.; Nakamura, M.; Suzuki, N.; Yashima, S.; Iwamuro, S. et al. (2007): Two osteoclastic markers expressed in multinucleate osteoclasts of goldfish scales. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 362 (3), S. 594–600. DOI: 10.1016/j.bbrc.2007.08.010.

Baranova, A.; Ivanov, D.; Petrash, N.; Pestova, A.; Skoblov, M.; Kelmanson, I. et al. (2004): The mammalian pannexin family is homologous to the invertebrate innexin gap junction proteins. In: *Genomics* 83 (4), S. 706–716. DOI: 10.1016/j.ygeno.2003.09.025.

Barradas, A.M.C.; Fernandes, H.A.M.; Groen, N.; Chai, Y.C.; Schrooten, J.; van de Peppel, J. et al. (2012): A calcium-induced signaling cascade leading to osteogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. In: *Biomaterials* 33 (11), S. 3205–3215. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2012.01.020.

Batra, N.; Kar, R.; Jiang, J.X. (2012): Gap junctions and hemichannels in signal transmission, function and development of bone. In: *Biochimica et biophysica acta* 1818 (8), S. 1909–1918. DOI: 10.1016/j.bbamem.2011.09.018.

Bauer, T.W. (2007): Bone graft substitutes. In: *Skeletal Radiology* 36 (12), S. 1105–1107. DOI: 10.1007/s00256-007-0377-4.

Behrend, D.; Warkentin, M.; Klüß, D.; Bader, R.; Kopp, S.; Frank, M.; Mittelmeier, W. (2014): Schadensanalyse als Basis für Qualitätssicherungsstrategien in der Implantattechnologie. In: *Der Orthopäde* 43 (6), S. 555–560. DOI: 10.1007/s00132-014-2301-7.

Bennett, M.V.; Verselis, V.K. (1992): Biophysics of gap junctions. In: *Seminars in cell biology* 3 (1), S. 29–47. DOI: 10.1016/s1043-4682(10)80006-6.

Bennett, M.V.L.; Garré, J.M.; Orellana, J.A.; Bukauskas, F.F.; Nedergaard, M.; Sáez, J.C. (2012): Connexin and pannexin hemichannels in inflammatory responses of glia and neurons. In: *Brain research* 1487, S. 3–15. DOI: 10.1016/j.brainres.2012.08.042.

Bernhardt, A.; Österreich, V.; Gelinsky, M. (2019): Three-Dimensional Co-culture of Primary Human Osteocytes and Mature Human Osteoclasts in Collagen Gels. In: *Tissue engineering. Part A*. DOI: 10.1089/ten.TEA.2019.0085.

Bernhardt, A.; Thieme, S.; Domaschke, H.; Springer, A.; Rösen-Wolff, A.; Gelinsky, M. (2010): Crosstalk of osteoblast and osteoclast precursors on mineralized collagen—towards an in vitro model for bone remodeling. In: *J. Biomed. Mater. Res.* 95A (3), S. 848–856. DOI: 10.1002/jbm.a.32856.

BfArM - Rechtlicher Rahmen. Online verfügbar unter https://www.bfarm.de/DE/Medizinprodukte/RechtlicherRahmen/_node.html, zuletzt geprüft am 19.11.2020.

Blokhuis, T.J.; Arts, J.J.C. (2011): Bioactive and osteoinductive bone graft substitutes: definitions, facts and myths. In: *Injury* 42 Suppl 2, S26-9. DOI: 10.1016/j.injury.2011.06.010.

Bohner, M. (2010): Resorbable biomaterials as bone graft substitutes. In: *Materials Today* 13 (1), S. 24–30. DOI: 10.1016/S1369-7021(10)70014-6.

Bond, S.R.; Lau, A.; Penuela, S.; Sampaio, A.V.; Underhill, T.M.; Laird, D.W.; Naus, C.C. (2011): Pannexin 3 is a novel target for Runx2, expressed by osteoblasts and mature growth plate chondrocytes. In: *J Bone Miner Res* 26 (12), S. 2911–2922. DOI: 10.1002/jbmr.509.

Bonnelye, E.; Chabadel, A.; Saltel, F.; Jurdic, P. (2008): Dual effect of strontium ranelate: stimulation of osteoblast differentiation and inhibition of osteoclast formation and resorption in vitro. In: *Bone* 42 (1), S. 129–138. DOI: 10.1016/j.bone.2007.08.043.

Bonnet, N.; Brun, J.; Rousseau, J.-C.; Le Duong, T.; Ferrari, S.L. (2017): Cathepsin K Controls Cortical Bone Formation by Degrading Periostin. In: *J Bone Miner Res* 32 (7), S. 1432–1441. DOI: 10.1002/jbmr.3136.

Boraschi-Diaz, I.; Komarova, S.V. (2016): The protocol for the isolation and cryopreservation of osteoclast precursors from mouse bone marrow and spleen. In: *Cytotechnology* 68 (1), S. 105–114. DOI: 10.1007/s10616-014-9759-3.

Borciani, G.; Montalbano, G.; Baldini, N.; Cerqueni, G.; Vitale-Brovarone, C.; Ciapetti, G. (2020): Co-culture systems of osteoblasts and osteoclasts: Simulating in vitro bone remodeling in regenerative approaches. In: *Acta Biomaterialia* 108, S. 22–45. DOI: 10.1016/j.actbio.2020.03.043.

Boyce, T.; Edwards, J.; Scarborough, N. (1999): ALLOGRAFT BONE: The Influence of Processing on Safety and Performance. In: *Orthopedic Clinics of North America* 30 (4), S. 571–581. DOI: 10.1016/S0030-5898(05)70110-3.

Boyle, W.J.; Simonet, W.S.; Lacey, D.L. (2003): Osteoclast differentiation and activation. In: *Nature* 423, 337 EP -.

Brown, B.N.; Badylak, S.F. (2013): Expanded applications, shifting paradigms and an improved understanding of host-biomaterial interactions. In: *Acta Biomaterialia* 9 (2), S. 4948–4955. DOI: 10.1016/j.actbio.2012.10.025.

Bruzzo, R.; Hormuzdi, S.G.; Barbe, M.T.; Herb, A.; Monyer, H. (2003): Pannexins, a family of gap junction proteins expressed in brain. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (23), S. 13644–13649. DOI: 10.1073/pnas.2233464100.

Bruzzo, S.; Guida, L.; Zocchi, E.; Franco, L.; Flora, A. de (2001): Connexin 43 hemi channels mediate Ca²⁺-regulated transmembrane NAD⁺ fluxes in intact cells. In: *The FASEB Journal* 15 (1), S. 10–12. DOI: 10.1096/fj.00-0566fje.

Bundesgesundheitsministerium: Implantateregister-Errichtungsgesetz. Online verfügbar unter <https://www.bundesgesundheitsministerium.de/implantateregister-errichtungsgesetz.html>, zuletzt geprüft am 19.11.2020.

Bundestag: Gesetz zur Errichtung des Implantateregisters Deutschland und zu weiteren Änderungen des Fünften Buches Sozialgesetzbuch. Implantateregister-Errichtungsgesetz - EIRD. In: *Bundesgesetzblatt* 2019 Teil I (48), S. 2494–2509. Online verfügbar unter [https://www.bgbl.de/xaver/bgbl/start.xav?startbk=Bundesanzeiger_BGBl&start=//*\[@attr_id=%27bgbl119s2494.pdf%27\]#__bgbl__%2F%2F*%5B%40attr_id%3D%27bgbl119s2494.pdf%27%5D__1586588417304](https://www.bgbl.de/xaver/bgbl/start.xav?startbk=Bundesanzeiger_BGBl&start=//*[@attr_id=%27bgbl119s2494.pdf%27]#__bgbl__%2F%2F*%5B%40attr_id%3D%27bgbl119s2494.pdf%27%5D__1586588417304), zuletzt geprüft am 19.11.2020.

Bunpetch, V.; Zhang, Z.-Y.; Zhang, X.; Han, S.; Zongyou, P.; Wu, H.; Hongwei, O. (2017): Strategies for MSC expansion and MSC-based microtissue for bone regeneration. In: *Biomaterials*. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2017.11.023.

Buo, A.M.; Stains, J.P. (2014): Gap junctional regulation of signal transduction in bone cells. In: *FEBS Letters* 588 (8), S. 1315–1321. DOI: 10.1016/j.febslet.2014.01.025.

Buo, A.M.; Tomlinson, R.E.; Eidelman, E.R.; Chason, M.; Stains, J.P. (2017): Connexin43 and Runx2 Interact to Affect Cortical Bone Geometry, Skeletal Development, and Osteoblast and Osteoclast Function. In: *J Bone Miner Res* 32 (8), S. 1727–1738. DOI: 10.1002/jbmr.3152.

Burgess, T.L.; Qian, Y.; Kaufman, S.; Ring, B.D.; Van, G.; Capparelli, C. et al. (1999): The ligand for osteoprotegerin (OPGL) directly activates mature osteoclasts. In: *The Journal of Cell Biology* 145 (3), S. 527–538. DOI: 10.1083/jcb.145.3.527.

Caplan, A.I. (1991): Mesenchymal stem cells. In: *J. Orthop. Res.* 9 (5), S. 641–650. DOI: 10.1002/jor.1100090504.

Carpintero-Fernandez, P.; Gago-Fuentes, R.; Wang, H.Z.; Fonseca, E.; Caeiro, J.R.; Valiunas, V. et al. (2018): Intercellular communication via gap junction channels between chondrocytes and bone cells. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1860 (12), S. 2499–2505. DOI: 10.1016/j.bbamem.2018.09.009.

Carrodeguas, R.G.; Aza, S. de (2011): α -Tricalcium phosphate: synthesis, properties and biomedical applications. In: *Acta Biomaterialia* 7 (10), S. 3536–3546. DOI: 10.1016/j.actbio.2011.06.019.

Chaicharoenaudomrung, N.; Kunhorm, P.; Noisa, P. (2019): Three-dimensional cell culture systems as an in vitro platform for cancer and stem cell modeling. In: *World J Stem Cells* 11 (12), S. 1065–1083. DOI: 10.4252/wjsc.v11.i12.1065.

- Chamberlain, G.; Fox, J.; Ashton, B.; Middleton, J. (2007): Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: Their Phenotype, Differentiation Capacity, Immunological Features, and Potential for Homing. In: *STEM CELLS* 25 (11), S. 2739–2749. DOI: 10.1634/stemcells.2007-0197.
- Chanda, D.; Kumar, S.; Ponnazhagan, S. (2010): Therapeutic potential of adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells in diseases of the skeleton. In: *J. Cell. Biochem.* 111 (2), S. 249–257. DOI: 10.1002/jcb.22701.
- Charyeva, O.; Dakischew, O.; Sommer, U.; Heiss, C.; Schnettler, R.; Lips, K.S. (2016): Biocompatibility of magnesium implants in primary human reaming debris-derived cells stem cells in vitro. In: *Journal of Orthopaedics and Traumatology : Official Journal of the Italian Society of Orthopaedics and Traumatology* 17 (1), S. 63–73. DOI: 10.1007/s10195-015-0364-9.
- Chekeni, F.B.; Elliott, M.R.; Sandilos, J.K.; Walk, S.F.; Kinchen, J.M.; Lazarowski, E.R. et al. (2010): Pannexin 1 channels mediate 'find-me' signal release and membrane permeability during apoptosis. In: *Nature* 467 (7317), S. 863–867. DOI: 10.1038/nature09413.
- Chen, J.; Zhang, X.; Cai, H.; Chen, Z.; Wang, T.; Jia, L. et al. (2016): Osteogenic activity and antibacterial effect of zinc oxide/carboxylated graphene oxide nanocomposites: Preparation and in vitro evaluation. In: *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces* 147, S. 397–407. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2016.08.023.
- Chung, L.; Maestas, D.R., JR; Housseau, F.; Elisseeff, J.H. (2017): Key players in the immune response to biomaterial scaffolds for regenerative medicine. In: *Advanced drug delivery reviews* 114, S. 184–192. DOI: 10.1016/j.addr.2017.07.006.
- Clarke, B. (2008): Normal bone anatomy and physiology. In: *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN* 3 Suppl 3, S131-9. DOI: 10.2215/CJN.04151206.
- Clarke, B.L.; Drake, M.T.; Oursler, M.J.; Khosla, S. (2017): Cathepsin K Inhibitors for Osteoporosis: Biology, Potential Clinical Utility, and Lessons Learned. In: *edrv* 38 (4), S. 325–350. DOI: 10.1210/er.2015-1114.
- Costa, E.C.; Gaspar, V.M.; Coutinho, P.; Correia, I.J. (2014): Optimization of liquid overlay technique to formulate heterogenic 3D co-cultures models. In: *Biotechnology and bioengineering* 111 (8), S. 1672–1685. DOI: 10.1002/bit.25210.
- Costa, E.C.; Melo-Diogo, D. de; Moreira, A.F.; Carvalho, M.P.; Correia, I.J. (2018): Spheroids Formation on Non-Adhesive Surfaces by Liquid Overlay Technique: Considerations and Practical Approaches. In: *Biotechnology journal* 13 (1). DOI: 10.1002/biot.201700417.

- D'Avila Carvalho Erbetta, C. (2012): Synthesis and Characterization of Poly(D,L-Lactide-co-Glycolide) Copolymer. In: *JBNB* 03 (02), S. 208–225. DOI: 10.4236/jbnb.2012.32027.
- Dahl, G. (2015): ATP release through pannexon channels. In: *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 370 (1672). DOI: 10.1098/rstb.2014.0191.
- DeVolder, R.; Kong, H.-J. (2012): Hydrogels for in vivo-like three-dimensional cellular studies. In: *WIREs Syst Biol Med* 4 (4), S. 351–365. DOI: 10.1002/wsbm.1174.
- D'hondt, C.; Ponsaerts, R.; Smedt, H. de; Bultynck, G.; Himpens, B. (2009): Pannexins, distant relatives of the connexin family with specific cellular functions? In: *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 31 (9), S. 953–974. DOI: 10.1002/bies.200800236.
- Díaz-Tocados, J.M.; Herencia, C.; Martínez-Moreno, J.M.; Montes de Oca, A.; Rodríguez-Ortiz, M.E.; Vergara, N. et al. (2017): Magnesium Chloride promotes Osteogenesis through Notch signaling activation and expansion of Mesenchymal Stem Cells. In: *Scientific Reports* 7 (1), S. 7839. DOI: 10.1038/s41598-017-08379-y.
- DIN EN ISO 10993-1. Online verfügbar unter <https://www.beuth.de/de/norm-entwurf/din-iso-10993-1/267686461>, zuletzt geprüft am 19.11.2020.
- Ding, W. (2016): Opportunities and challenges for the biodegradable magnesium alloys as next-generation biomaterials. In: *Regen Biomater* 3 (2), S. 79–86. DOI: 10.1093/rb/rbw003.
- Domaschke, H.; Gelinsky, M.; Burmeister, B.; Fleig, R.; Hanke, T.; Reinstorf, A. et al. (2006): In vitro ossification and remodeling of mineralized collagen I scaffolds. In: *Tissue engineering* 12 (4), S. 949–958. DOI: 10.1089/ten.2006.12.949.
- Dominici, M.; Le Blanc, K.; Mueller, I.; Slaper-Cortenbach, I.; Marini, F.; Krause, D. et al. (2006): Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. In: *Cytotherapy* 8 (4), S. 315–317. DOI: 10.1080/14653240600855905.
- Drake, F.H.; Dodds, R.A.; James, I.E.; Connor, J.R.; Debouck, C.; Richardson, S. et al. (1996): Cathepsin K, but Not Cathepsins B, L, or S, Is Abundantly Expressed in Human Osteoclasts. In: *Journal of Biological Chemistry* 271 (21), S. 12511–12516. DOI: 10.1074/jbc.271.21.12511.

- Ehret, C.; Aid-Launais, R.; Sagardoy, T.; Siadous, R.; Bareille, R.; Rey, S. et al. (2017): Strontium-doped hydroxyapatite polysaccharide materials effect on ectopic bone formation. In: *PLOS ONE* 12 (9), e0184663. DOI: 10.1371/journal.pone.0184663.
- Einhorn, T.A.; Gerstenfeld, L.C. (2014): Fracture healing: mechanisms and interventions. In: *Nature Reviews Rheumatology* 11, 45 EP -. DOI: 10.1038/nrrheum.2014.164.
- Elrayah, A.; Zhi, W.; Feng, S.; Al-Ezzi, S.; Lei, H.; Weng, J. (2018): Preparation of Micro/Nano-Structure Copper-Substituted Hydroxyapatite Scaffolds with Improved Angiogenesis Capacity for Bone Regeneration. In: *Materials (Basel, Switzerland)* 11 (9). DOI: 10.3390/ma11091516.
- Evans, W.H.; Martin, P.E.M. (2002): Gap junctions: structure and function (Review). In: *Molecular membrane biology* 19 (2), S. 121–136. DOI: 10.1080/09687680210139839.
- Festa, R.A.; Thiele, D.J. (2011): Copper: an essential metal in biology. In: *Current biology : CB* 21 (21), R877-83. DOI: 10.1016/j.cub.2011.09.040.
- Florencio-Silva, R.; Sasso, Gisela Rodrigues da Silva; Sasso-Cerri, E.; Simões, M.J.; Cerri, P.S. (2015): Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. In: *BioMed Research International* 2015. DOI: 10.1155/2015/421746.
- Frassinetti, S.; Bronzetti, G.; Caltavuturo, L.; Cini, M.; Della Croce, C. (2006): The role of zinc in life: a review. In: *Journal of environmental pathology, toxicology and oncology : official organ of the International Society for Environmental Toxicology and Cancer* 25 (3), S. 597–610. DOI: 10.1615/jenvironpatholtoxicoloncol.v25.i3.40.
- Friedenstein, A.J.; Chailakhyan, R.K.; Latsinik, N.V.; Panasyuk, A.F.; Keiliss-Borok, I.V. (1974): STROMAL CELLS RESPONSIBLE FOR TRANSFERRING THE MICROENVIRONMENT OF THE HEMOPOIETIC TISSUES: Cloning In Vitro and Retransplantation In Vivo. In: *Transplantation* 17 (4), S. 331–340. Online verfügbar unter https://journals.lww.com/transplantjournal/Fulltext/1974/04000/STROMAL_CELLS_RESPONSIBLE_FOR_TRANSFERRING_THE.1.aspx.
- Galli, S.; Naito, Y.; Karlsson, J.; He, W.; Andersson, M.; Wennerberg, A.; Jimbo, R. (2015): Osteoconductive Potential of Mesoporous Titania Implant Surfaces Loaded with Magnesium: An Experimental Study in the Rabbit. In: *Clinical Implant Dentistry and Related Research* 17 (6), S. 1048–1059. DOI: 10.1111/cid.12211.
- Gamsjäger, M.; Resch, H. (2015): Cathepsin K-Inhibitoren: präklinische und klinische Daten. In: *Wiener Medizinische Wochenschrift* 165 (3), S. 65–70. DOI: 10.1007/s10354-014-0336-3.

- Gandolfi, M.G.; Siboni, F.; Botero, T.; Bossù, M.; Riccitiello, F.; Prati, C. (2015): Calcium silicate and calcium hydroxide materials for pulp capping: biointeractivity, porosity, solubility and bioactivity of current formulations. In: *Journal of applied biomaterials & functional materials* 13 (1), S. 43–60. DOI: 10.5301/jabfm.5000201.
- García-Gareta, E.; Coathup, M.J.; Blunn, G.W. (2015): Osteoinduction of bone grafting materials for bone repair and regeneration. In: *Epigenetic Mechanisms Regulating Bone Biology and Pathology* 81, S. 112–121. DOI: 10.1016/j.bone.2015.07.007.
- Ge, M.; Ge, K.; Gao, F.; Yan, W.; Liu, H.; Xue, L. et al. (2018): Biomimetic mineralized strontium-doped hydroxyapatite on porous poly(l-lactic acid) scaffolds for bone defect repair. In: *International journal of nanomedicine* 13, S. 1707–1721. DOI: 10.2147/IJN.S154605.
- Gentile, P.; Chiono, V.; Carmagnola, I.; Hatton, P.V. (2014): An overview of poly(lactic-co-glycolic) acid (PLGA)-based biomaterials for bone tissue engineering. In: *International journal of molecular sciences* 15 (3), S. 3640–3659. DOI: 10.3390/ijms15033640.
- GESTIS-Stoffdatenbank. Suchbegriff: Magnesiumchlorid. Online verfügbar unter <https://gestis.dguv.de/data?name=003450>, zuletzt geprüft am 08.12.2020.
- GESTIS-Stoffdatenbank. Suchbegriff: Magnesiumhydrogenphosphat. Online verfügbar unter <https://www.gestis.dguv.de/data?name=122617>, zuletzt geprüft am 08.12.2020.
- GESTIS-Stoffdatenbank. Suchbegriff: Strontiumchlorid. Online verfügbar unter <https://gestis.dguv.de/data?name=491485>, zuletzt geprüft am 08.12.2020.
- GESTIS-Stoffdatenbank. Suchbegriff: Strontiumhydrogenphosphat. Online verfügbar unter <https://www.gestis.dguv.de/data?name=126487>, zuletzt geprüft am 08.12.2020.
- Ghanaati, S.; Barbeck, M.; Lorenz, J.; Stuebinger, S.; Seitz, O.; Landes, C. et al. (2013): Synthetic bone substitute material comparable with xenogeneic material for bone tissue regeneration in oral cancer patients: First and preliminary histological, histomorphometrical and clinical results. In: *Ann Maxillofac Surg* 3 (2), S. 126–138. DOI: 10.4103/2231-0746.119221.
- Ghiasi, M.S.; Chen, J.; Vaziri, A.; Rodriguez, E.K.; Nazarian, A. (2017): Bone fracture healing in mechanobiological modeling: A review of principles and methods. In: *Bone Reports* 6, S. 87–100. DOI: 10.1016/j.bonr.2017.03.002.

- Glenske, K.; Donkiewicz, P.; Kowitsch, A.; Milosevic-Oljaca, N.; Rider, P.; Rofall, S. et al. (2018): Applications of Metals for Bone Regeneration. In: *International journal of molecular sciences* 19 (3). DOI: 10.3390/ijms19030826.
- Glenske, K.; Wagner, A.-S.; Hanke, T.; Cavalcanti-Adam, E.A.; Heinemann, S.; Heinemann, C. et al. (2014): Bioactivity of xerogels as modulators of osteoclastogenesis mediated by connexin 43. In: *Biomaterials* 35 (5), S. 1487–1495. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2013.11.002.
- González-Vázquez, A.; Planell, J.A.; Engel, E. (2014): Extracellular calcium and CaSR drive osteoinduction in mesenchymal stromal cells. In: *Acta Biomaterialia* 10 (6), S. 2824–2833. DOI: 10.1016/j.actbio.2014.02.004.
- Gori, F.; Hofbauer, L.C.; Dunstan, C.R.; Spelsberg, T.C.; Khosla, S.; Riggs, B.L. (2000): The Expression of Osteoprotegerin and RANK Ligand and the Support of Osteoclast Formation by Stromal-Osteoblast Lineage Cells Is Developmentally Regulated**This work was supported by Grant AG-04875 from the National Institute on Aging. In: *endo* 141 (12), S. 4768–4776. DOI: 10.1210/endo.141.12.7840.
- Greenwald, A.S.; Boden, S.D.; Goldberg, V.M.; Khan, Y.; Laurencin, C.T.; Rosier, R.N. (2001): Bone-graft substitutes: facts, fictions, and applications. In: *The Journal of bone and joint surgery. American volume* 83-A Suppl 2 Pt 2, S. 98–103.
- Grellier, M.; Bordenave, L.; Amédée, J. (2009): Cell-to-cell communication between osteogenic and endothelial lineages: implications for tissue engineering. In: *Trends in Biotechnology* 27 (10), S. 562–571. DOI: 10.1016/j.tibtech.2009.07.001.
- Guerrero, J.; Oliveira, H.; Aid, R.; Bareille, R.; Siadous, R.; Letourneur, D. et al. (2018): Influence of the three-dimensional culture of human bone marrow mesenchymal stromal cells within a macroporous polysaccharides scaffold on Pannexin 1 and Pannexin 3. In: *J Tissue Eng Regen Med* 12 (4), e1936-e1949. DOI: 10.1002/term.2625.
- Hainz, N.; Beckmann, A.; Schubert, M.; Haase, A.; Martin, U.; Tschernig, T.; Meier, C. (2018): Human stem cells express pannexins. In: *BMC research notes* 11 (1), S. 54. DOI: 10.1186/s13104-018-3125-z.
- Halleen, J.M.; Alatalo, S.L.; Suominen, H.; Cheng, S.; Janckila, A.J.; Väänänen, H.K. (2000): Tartrate-Resistant Acid Phosphatase 5b: A Novel Serum Marker of Bone Resorption. In: *J Bone Miner Res* 15 (7), S. 1337–1345. DOI: 10.1359/jbmr.2000.15.7.1337.
- Ham, J.; Lever, L.; Fox, M.; Reagan, M.R. (2019): In Vitro 3D Cultures to Reproduce the Bone Marrow Niche. In: *JBMR Plus* 3 (10), e10228-e10228. DOI: 10.1002/jbm4.10228.

- Hammerl, A.; Diaz Cano, C.E.; De-Juan-Pardo, E.M.; van Griensven, M.; Poh, P.S.P. (2019): A Growth Factor-Free Co-Culture System of Osteoblasts and Peripheral Blood Mononuclear Cells for the Evaluation of the Osteogenesis Potential of Melt-Electrowritten Polycaprolactone Scaffolds. In: *International journal of molecular sciences* 20 (5). DOI: 10.3390/ijms20051068.
- Hannink, G.; Arts, J.C. (2011): Bioresorbability, porosity and mechanical strength of bone substitutes: What is optimal for bone regeneration? In: *Injury* 42, S22-S25. DOI: 10.1016/j.injury.2011.06.008.
- Hayman, A.R. (2008): Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) and the osteoclast/immune cell dichotomy. In: *Autoimmunity* 41 (3), S. 218–223. DOI: 10.1080/08916930701694667.
- Heinemann, C.; Heinemann, S.; Rößler, S.; Kruppke, B.; Wiesmann, H.-P.; Hanke, T. (2019): Organically modified hydroxyapatite (ormoHAP) nanospheres stimulate the differentiation of osteoblast and osteoclast precursors: a co-culture study. In: *Biomedical materials (Bristol, England)* 14 (3), S. 35015. DOI: 10.1088/1748-605X/ab0fad.
- Heinemann, C.; Heinemann, S.; Worch, H.; Hanke, T. (2011): Development of an osteoblast/osteoclast co-culture derived by human bone marrow stromal cells and human monocytes for biomaterials testing. In: *European cells & materials* 21, S. 80–93. DOI: 10.22203/ecm.v021a07.
- Heinemann, S.; Heinemann, C.; Wenisch, S.; Alt, V.; Worch, H.; Hanke, T. (2013): Calcium phosphate phases integrated in silica/collagen nanocomposite xerogels enhance the bioactivity and ultimately manipulate the osteoblast/osteoclast ratio in a human co-culture model. In: *Acta Biomaterialia* 9 (1), S. 4878–4888. DOI: 10.1016/j.actbio.2012.10.010.
- Herde, K.; Hartmann, S.; Brehm, R.; Kilian, O.; Heiss, C.; Hild, A. et al. (2007): Connexin 43 expression of foreign body giant cells after implantation of nanoparticulate hydroxyapatite. In: *Biomaterials* 28 (33), S. 4912–4921. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2007.07.027.
- Hofmann, A.; Mattyasovszky, S.G.; Brüning, C.; Ritz, U.; Mehling, I.; Meurer, A.; Rommens, P.M. (2009): Osteoblasten. In: *Der Orthopäde* 38 (11), S. 1009. DOI: 10.1007/s00132-009-1488-5.
- Hollberg, K.; Hultenby, K.; Hayman, A.R.; Cox, T.M.; Andersson, G. (2002): Osteoclasts from Mice Deficient in Tartrate-Resistant Acid Phosphatase Have Altered Ruffled Borders and Disturbed Intracellular Vesicular Transport. In: *Experimental Cell Research* 279 (2), S. 227–238. DOI: 10.1006/excr.2002.5612.

- Horch, H.-H.; Pautke, C. (2006): Regeneration instead of reparation: a critical review of the autogenous bone transplant as "golden standard" of reconstructive oral surgery. In: *Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie : MKG* 10 (4), S. 213–220. DOI: 10.1007/s10006-006-0004-x.
- Horch, H.-H.; Sader, R.; Pautke, C.; Neff, A.; Deppe, H.; Kolk, A. (2006): Synthetic, pure-phase beta-tricalcium phosphate ceramic granules (Cerasorb®) for bone regeneration in the reconstructive surgery of the jaws. In: *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 35 (8), S. 708–713. DOI: 10.1016/j.ijom.2006.03.017.
- Horwitz, E.M.; Le Blanc, K.; Dominici, M.; Mueller, I.; Slaper-Cortenbach, I.; Marini, F.C. et al. (2005): Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. In: *Cytotherapy* 7 (5), S. 393–395. DOI: 10.1080/14653240500319234.
- International Consortium of Investigative Journalists (2018): The Implant Files: a global investigation into medical devices - ICIJ. International Consortium of Investigative Journalists. Online verfügbar unter <https://www.icij.org/investigations/implant-files/>, zuletzt geprüft am 19.11.2020.
- Ishikawa, M.; Iwamoto, T.; Fukumoto, S.; Yamada, Y. (2014): Pannexin 3 inhibits proliferation of osteoprogenitor cells by regulating Wnt and p21 signaling. In: *The Journal of biological chemistry* 289 (5), S. 2839–2851. DOI: 10.1074/jbc.M113.523241.
- Ishikawa, M.; Iwamoto, T.; Nakamura, T.; Doyle, A.; Fukumoto, S.; Yamada, Y. (2011): Pannexin 3 functions as an ER Ca²⁺ channel, hemichannel, and gap junction to promote osteoblast differentiation. In: *The Journal of Cell Biology* 193 (7), S. 1257–1274. DOI: 10.1083/jcb.201101050.
- Ishikawa, M.; Williams, G.; Forcinito, P.; Ishikawa, M.; Petrie, R.J.; Saito, K. et al. (2019): Pannexin 3 ER Ca(2+) channel gating is regulated by phosphorylation at the Serine 68 residue in osteoblast differentiation. In: *Scientific Reports* 9 (1), S. 18759. DOI: 10.1038/s41598-019-55371-9.
- Ishikawa, M.; Williams, G.L.; Ikeuchi, T.; Sakai, K.; Fukumoto, S.; Yamada, Y. (2016): Pannexin 3 and connexin 43 modulate skeletal development through their distinct functions and expression patterns. In: *Journal of cell science* 129 (5), S. 1018–1030. DOI: 10.1242/jcs.176883.
- Ishikawa, M.; Yamada, Y. (2016): The Role of Pannexin 3 in Bone Biology. In: *J Dent Res* 96 (4), S. 372–379. DOI: 10.1177/0022034516678203.

ISO 10993-1 Prüfung der Biokompatibilität. Online verfügbar unter https://www.tuev-sued.de/produktpruefung/branchen/medizinprodukte/pruefung-bewertung/pruefungen-fuer-nichtaktive-medizinprodukte/iso-10993-1-pruefung-der-biokompatibilitaet#tab_1413452401395430022096, zuletzt geprüft am 19.11.2020.

ISO 13175-3:2012 (en): Implants for surgery — Calcium phosphates — Part 3: Hydroxyapatite and beta-tricalcium phosphate bone substitutes. Online verfügbar unter <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:13175:-3:ed-1:v1:en>, zuletzt geprüft am 19.11.2020.

ISO 19090:2018-01. Online verfügbar unter <https://www.beuth.de/de/norm/iso-19090/285437346>, zuletzt geprüft am 19.11.2020.

Italiani, P.; Mazza, E.M.C.; Lucchesi, D.; Cifola, I.; Gemelli, C.; Grande, A. et al. (2014): Transcriptomic profiling of the development of the inflammatory response in human monocytes in vitro. In: *PLOS ONE* 9 (2), e87680. DOI: 10.1371/journal.pone.0087680.

Iwamoto, T.; Ishikawa, M.; Ono, M.; Nakamura, T.; Fukumoto, S.; Yamada, Y. (2013): Biological roles of gap junction proteins in cartilage and bone development. In: *Journal of Oral Biosciences* 55 (1), S. 29–33. DOI: 10.1016/j.job.2012.12.001.

Jahnen-Dechent, W.; Ketteler, M. (2012): Magnesium basics. In: *Clinical kidney journal* 5 (Suppl 1), i3-i14. DOI: 10.1093/ndtplus/sfr163.

Jimi, E.; Nakamura, I.; Amano, H.; Taguchi, Y.; Tsurukai, T.; Tamura, M. et al. (1996): Osteoclast function is activated by osteoblastic cells through a mechanism involving cell-to-cell contact. In: *endo* 137 (8), S. 2187–2190. DOI: 10.1210/endo.137.8.8754795.

Jolly, J.J.; Chin, K.-Y.; Farhana, M.F.N.; Alias, E.; Chua, K.H.; Hasan, W.N.W.; Ima-Nirwana, S. (2018): Optimization of the Static Human Osteoblast/Osteoclast Co-culture System. In: *Iranian journal of medical sciences* 43 (2), S. 208–213.

Kamleitner, C.; Obi, J.; Vassilev, N.; Epstein, M.M.; Hoffmann, O. (2018): Biological Compatibility Profile on Biomaterials for Bone Regeneration. In: *Journal of visualized experiments : JoVE* (141). DOI: 10.3791/58077.

Kang, Y.K.; Zhang, M.C. (2014): IL-23 promotes osteoclastogenesis in osteoblast-osteoclast co-culture system. In: *Genet Mol Res* 13 (2), S. 4673–4679. DOI: 10.4238/2014.june.18.10.

Kargozar, S.; Montazerian, M.; Fiume, E.; Baino, F. (2019): Multiple and Promising Applications of Strontium (Sr)-Containing Bioactive Glasses in Bone Tissue Engineering. In: *Front Bioeng Biotechnol* 7, S. 161. DOI: 10.3389/fbioe.2019.00161.

Kenkre, J.S.; Bassett, J. (2018): The bone remodelling cycle. In: *Annals of clinical biochemistry* 55 (3), S. 308–327. DOI: 10.1177/0004563218759371.

Klopfleisch, R.; Jung, F. (2017): The pathology of the foreign body reaction against biomaterials. In: *J. Biomed. Mater. Res.* 105 (3), S. 927–940. DOI: 10.1002/jbm.a.35958.

Kobayashi, Y.; Uehara, S.; Udagawa, N. (2018): Roles of non-canonical Wnt signaling pathways in bone resorption. In: *Journal of Oral Biosciences* 60 (2), S. 31–35. DOI: 10.1016/j.job.2018.03.001.

Kolk, A.; Handschel, J.; Drescher, W.; Rothamel, D.; Kloss, F.; Blessmann, M. et al. (2012): Current trends and future perspectives of bone substitute materials - from space holders to innovative biomaterials. In: *Journal of cranio-maxillo-facial surgery : official publication of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery* 40 (8), S. 706–718. DOI: 10.1016/j.jcms.2012.01.002.

Komori, T. (2009): Regulation of bone development and extracellular matrix protein genes by RUNX2. In: *Cell and Tissue Research* 339 (1), S. 189. DOI: 10.1007/s00441-009-0832-8.

König, Horst Erich; Liebich, Hans-Georg (Hg.) (2018): Anatomie der Haustiere. Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis. 7., aktualisierte und erweiterte Auflage. Stuttgart: Thieme.

Korzinskas, T.; Jung, O.; Smeets, R.; Stojanovic, S.; Najman, S.; Glenske, K. et al. (2018): In Vivo Analysis of the Biocompatibility and Macrophage Response of a Non-Resorbable PTFE Membrane for Guided Bone Regeneration. In: *International journal of molecular sciences* 19 (10). DOI: 10.3390/ijms19102952.

Kruppke, B.; Farack, J.; Wagner, A.-S.; Beckmann, S.; Heinemann, C.; Glenske, K. et al. (2016): Gelatine modified monetite as a bone substitute material: An in vitro assessment of bone biocompatibility. In: *Acta Biomaterialia* 32, S. 275–285. DOI: 10.1016/j.actbio.2015.12.035.

Kruppke, B.; Heinemann, C.; Wagner, A.-S.; Farack, J.; Wenisch, S.; Wiesmann, H.-P.; Hanke, T. (2019a): Strontium ions promote in vitro human bone marrow stromal cell proliferation and differentiation in calcium-lacking media. In: *Develop. Growth Differ.* 61 (2), S. 166–175. DOI: 10.1111/dgd.12588.

Kruppke, B.; Wagner, A.-S.; Rohnke, M.; Heinemann, C.; Kreschel, C.; Gebert, A. et al. (2019b): Biomaterial based treatment of osteoclastic/osteoblastic cell imbalance - Gelatin-modified calcium/strontium phosphates. In: *Materials Science and Engineering: C* 104, S. 109933. DOI: 10.1016/j.msec.2019.109933.

- Kular, J.; Tickner, J.; Chim, S.M.; Xu, J. (2012): An overview of the regulation of bone remodelling at the cellular level. In: *Clinical Biochemistry* 45 (12), S. 863–873. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2012.03.021.
- Lai, Y.; Li, Y.; Cao, H.; Long, J.; Wang, X.; Li, L. et al. (2019): Osteogenic magnesium incorporated into PLGA/TCP porous scaffold by 3D printing for repairing challenging bone defect. In: *Biomaterials* 197, S. 207–219. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2019.01.013.
- Lamp, E.C.; Drexler, H.G. (2000): Biology of Tartrate-Resistant Acid Phosphatase. In: *Leukemia & Lymphoma* 39 (5-6), S. 477–484. DOI: 10.3109/10428190009113378.
- Langenbach, F.; Handschel, J. (2013): Effects of dexamethasone, ascorbic acid and β -glycerophosphate on the osteogenic differentiation of stem cells in vitro. In: *Stem Cell Research & Therapy* 4 (5), S. 117. DOI: 10.1186/scrt328.
- Langlois, S.; Xiang, X.; Young, K.; Cowan, B.J.; Penuela, S.; Cowan, K.N. (2014): Pannexin 1 and pannexin 3 channels regulate skeletal muscle myoblast proliferation and differentiation. In: *The Journal of biological chemistry* 289 (44), S. 30717–30731. DOI: 10.1074/jbc.M114.572131.
- Le Vasseur, M.; Lelowski, J.; Bechberger, J.F.; Sin, W.-C.; Naus, C.C. (2014): Pannexin 2 protein expression is not restricted to the CNS. In: *Frontiers in Cellular Neuroscience* 8, S. 392. DOI: 10.3389/fncel.2014.00392.
- Lee, M.H.; Javed, A.; Kim, H.J.; Shin, H.I.; Gutierrez, S.; Choi, J.Y. et al. (1999): Transient upregulation of CBFA1 in response to bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor beta1 in C2C12 myogenic cells coincides with suppression of the myogenic phenotype but is not sufficient for osteoblast differentiation. In: *Journal of cellular biochemistry* 73 (1), S. 114–125.
- Legeros, R.Z. (1988): Calcium Phosphate Materials in Restorative Dentistry: a Review. In: *Advances in Dental Research* 2 (1), S. 164–180. DOI: 10.1177/08959374880020011101.
- LeGeros, R.Z. (2008): Calcium phosphate-based osteoinductive materials. In: *Chemical reviews* 108 (11), S. 4742–4753. DOI: 10.1021/cr800427g.
- Lei, Y.; Xu, Z.; Ke, Q.; Yin, W.; Chen, Y.; Zhang, C.; Guo, Y. (2017): Strontium hydroxyapatite/chitosan nanohybrid scaffolds with enhanced osteoinductivity for bone tissue engineering. In: *Materials Science and Engineering: C* 72, S. 134–142. DOI: 10.1016/j.msec.2016.11.063.

- Lemann, J.; Adams, N.D.; Gray, R.W. (1979): Urinary Calcium Excretion in Human Beings. In: *New England Journal of Medicine* 301 (10), S. 535–541. DOI: 10.1056/NEJM197909063011008.
- Li, Y.; Wang, J.; Yue, J.; Wang, Y.; Yang, C.; Cui, Q. (2018a): High magnesium prevents matrix vesicle-mediated mineralization in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells via mitochondrial pathway and autophagy. In: *Cell biology international* 42 (2), S. 205–215. DOI: 10.1002/cbin.10888.
- Li, Z.; Xu, Z.; Duan, C.; Liu, W.; Sun, J.; Han, B. (2018b): Role of TCF/LEF Transcription Factors in Bone Development and Osteogenesis. In: *International journal of medical sciences* 15 (12), S. 1415–1422. DOI: 10.7150/ijms.26741.
- Liu, T.M.; Lee, E.H. (2013): Transcriptional regulatory cascades in Runx2-dependent bone development. In: *Tissue engineering. Part B, Reviews* 19 (3), S. 254–263. DOI: 10.1089/ten.TEB.2012.0527.
- Liu, Z.; Yin, X.; Ye, Q.; He, W.; Ge, M.; Zhou, X. et al. (2016): Periodontal regeneration with stem cells-seeded collagen-hydroxyapatite scaffold. In: *Journal of biomaterials applications* 31 (1), S. 121–131. DOI: 10.1177/0885328216637978.
- Lode, A.; Heiss, C.; Knapp, G.; Thomas, J.; Nies, B.; Gelinsky, M.; Schumacher, M. (2018): Strontium-modified premixed calcium phosphate cements for the therapy of osteoporotic bone defects. In: *Acta Biomaterialia* 65, S. 475–485. DOI: 10.1016/j.actbio.2017.10.036.
- Lohman, A.W.; Weiling, N.L.; Santos, S.M.F.; Bialecki, J.; Werner, A.C.; Anderson, C.L.; Thompson, R.J. (2019): Regulation of pannexin channels in the central nervous system by Src family kinases. In: *Neuroscience Letters* 695, S. 65–70. DOI: 10.1016/j.neulet.2017.09.019.
- Loiselle, A.E.; Paul, E.M.; Lewis, G.S.; Donahue, H.J. (2013): Osteoblast and osteocyte-specific loss of Connexin43 results in delayed bone formation and healing during murine fracture healing. In: *J. Orthop. Res.* 31 (1), S. 147–154. DOI: 10.1002/jor.22178.
- Long, F. (2011): Building strong bones: molecular regulation of the osteoblast lineage. In: *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 13, 27 EP -. DOI: 10.1038/nrm3254.
- Lv, D.; Hu, Z.; Lu, L.; Lu, H.; Xu, X. (2017): Three-dimensional cell culture: A powerful tool in tumor research and drug discovery. In: *Oncology letters* 14 (6), S. 6999–7010. DOI: 10.3892/ol.2017.7134.

- Makarenkova, H.P.; Shah, S.B.; Shestopalov, V.I. (2018): The two faces of pannexins: new roles in inflammation and repair. In: *Journal of inflammation research* 11, S. 273–288. DOI: 10.2147/JIR.S128401.
- Makarenkova, H.P.; Shestopalov, V.I. (2014): The role of pannexin hemichannels in inflammation and regeneration. In: *Front Physiol* 5, S. 63. DOI: 10.3389/fphys.2014.00063.
- Maruyama, Z.; Yoshida, C.A.; Furuichi, T.; Amizuka, N.; Ito, M.; Fukuyama, R. et al. (2007): Runx2 determines bone maturity and turnover rate in postnatal bone development and is involved in bone loss in estrogen deficiency. In: *Developmental Dynamics* 236 (7), S. 1876–1890. DOI: 10.1002/dvdy.21187.
- Matsuo, K.; Irie, N. (2008): Osteoclast–osteoblast communication. In: *Archives of Biochemistry and Biophysics* 473 (2), S. 201–209. DOI: 10.1016/j.abb.2008.03.027.
- Minkin, C. (1982): Bone acid phosphatase: Tartrate-resistant acid phosphatase as a marker of osteoclast function. In: *Calcified Tissue International* 34 (1), S. 285–290. DOI: 10.1007/BF02411252.
- Miron, R.J.; Bosshardt, D.D. (2016): OsteoMacs: Key players around bone biomaterials. In: *Biomaterials* 82, S. 1–19. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2015.12.017.
- Miron, R.J.; Bosshardt, D.D. (2018): Multinucleated Giant Cells: Good Guys or Bad Guys? In: *Tissue engineering. Part B, Reviews* 24 (1), S. 53–65. DOI: 10.1089/ten.TEB.2017.0242.
- Miron, R.J.; Zhang, Y.F. (2012): Osteoinduction: A Review of Old Concepts with New Standards. In: *J Dent Res* 91 (8), S. 736–744. DOI: 10.1177/0022034511435260.
- Mirtchi, A.A.; Lemaître, J.; Terao, N. (1989): Calcium phosphate cements: study of the beta-tricalcium phosphate--monocalcium phosphate system. In: *Biomaterials* 10 (7), S. 475–480.
- Mistry, A.S.; Mikos, A.G. (2005): Tissue Engineering Strategies for Bone Regeneration. In: Ioannis V. Yannas (Hg.): *Regenerative Medicine II: Clinical and Preclinical Applications*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, S. 1–22.
- Moorer, M.C.; Stains, J.P. (2017): Connexin43 and the Intercellular Signaling Network Regulating Skeletal Remodeling. In: *Current Osteoporosis Reports* 15 (1), S. 24–31. DOI: 10.1007/s11914-017-0345-4.
- Möst, J.; Spötl, L.; Mayr, G.; Gasser, A.; Sarti, A.; Dierich, M.P. (1997): Formation of multinucleated giant cells in vitro is dependent on the stage of monocyte to macrophage maturation. In: *Blood* 89 (2), S. 662–671.

MPG - Gesetz über Medizinprodukte. Medizinproduktegesetz in der Fassung der Bekanntmachung vom 7. August 2002 (BGBl. I S. 3146), das zuletzt durch Artikel 7 des Gesetzes vom 18. Juli 2017 (BGBl. I S. 2757) geändert worden ist. Online verfügbar unter <https://www.gesetze-im-internet.de/mpg/BJNR196300994.html#BJNR196300994BJNG000202377>, zuletzt geprüft am 19.11.2020.

MPKPV - Verordnung über klinische Prüfungen von Medizinprodukten. Verordnung über klinische Prüfungen von Medizinprodukten vom 10. Mai 2010 (BGBl. I S. 555), die durch Artikel 3 der Verordnung vom 25. Juli 2014 (BGBl. I S. 1227) geändert worden ist. Online verfügbar unter <https://www.gesetze-im-internet.de/mpkp/BJNR055510010.html>, zuletzt geprüft am 19.11.2020.

MPSV - Verordnung über die Erfassung, Bewertung und Abwehr von Risiken bei Medizinprodukten. Medizinprodukte-Sicherheitsplanverordnung vom 24. Juni 2002 (BGBl. I S. 2131), die zuletzt durch Artikel 7 der Verordnung vom 29. November 2018 (BGBl. I S. 2034) geändert worden ist. Online verfügbar unter <http://www.gesetze-im-internet.de/mpsv/BJNR213110002.html>, zuletzt geprüft am 19.11.2020.

Mundy, G.R. (2007): Osteoporosis and Inflammation. In: *Nutr Rev* 65 (suppl_3), S147–S151. DOI: 10.1111/j.1753-4887.2007.tb00353.x.

Nakashima, T.; Kobayashi, Y.; Yamasaki, S.; Kawakami, A.; Eguchi, K.; Sasaki, H.; Sakai, H. (2000): Protein Expression and Functional Difference of Membrane-Bound and Soluble Receptor Activator of NF- κ B Ligand: Modulation of the Expression by Osteotropic Factors and Cytokines. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 275 (3), S. 768–775. DOI: 10.1006/bbrc.2000.3379.

NDR: Dossier: "The Implant Files". Online verfügbar unter <https://www.ndr.de/nachrichten/investigation/Dossier-The-Implant-Files,implantfiles102.html>, zuletzt geprüft am 19.11.2020.

Oh, S.-K.; Shin, J.-O.; Baek, J.-I.; Lee, J.; Bae, J.W.; Ankamerddy, H. et al. (2015): Pannexin 3 is required for normal progression of skeletal development in vertebrates. In: *The FASEB Journal* 29 (11), S. 4473–4484. DOI: 10.1096/fj.15-273722.

Ohmae, S.; Noma, N.; Toyomoto, M.; Shinohara, M.; Takeiri, M.; Fuji, H. et al. (2017): Actin-binding protein coronin 1A controls osteoclastic bone resorption by regulating lysosomal secretion of cathepsin K. In: *Scientific Reports* 7, 41710 EP -. DOI: 10.1038/srep41710.

- Ono, T.; Nakashima, T. (2018): Recent advances in osteoclast biology. In: *Histochemistry and Cell Biology* 149 (4), S. 325–341. DOI: 10.1007/s00418-018-1636-2.
- Orellana, J.A. (2015): Editorial: Single membrane channels formed by connexins or pannexins: focus on the nervous system. In: *Frontiers in Cellular Neuroscience* 9, S. 402. DOI: 10.3389/fncel.2015.00402.
- Oshita, K.; Yamaoka, K.; Udagawa, N.; Fukuyo, S.; Sonomoto, K.; Maeshima, K. et al. (2011): Human mesenchymal stem cells inhibit osteoclastogenesis through osteoprotegerin production. In: *Arthritis & Rheumatism* 63 (6), S. 1658–1667. DOI: 10.1002/art.30309.
- Owen, M.; Friedenstein, A.J. (1988): Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. In: *Ciba Foundation symposium* 136, S. 42–60.
- Pagani, S.; Torricelli, P.; Veronesi, F.; Salamanna, F.; Cepollaro, S.; Fini, M. (2018): An advanced tri-culture model to evaluate the dynamic interplay among osteoblasts, osteoclasts, and endothelial cells. In: *J Cell Physiol* 233 (1), S. 291–301. DOI: 10.1002/jcp.25875.
- Panchin, Y.; Kelmanson, I.; Matz, M.; Lukyanov, K.; Usman, N.; Lukyanov, S. (2000): A ubiquitous family of putative gap junction molecules. In: *Current biology : CB* 10 (13), R473-4. DOI: 10.1016/s0960-9822(00)00576-5.
- Paschos, N.K.; Brown, W.E.; Eswaramoorthy, R.; Hu, J.C.; Athanasiou, K.A. (2015): Advances in tissue engineering through stem cell-based co-culture. In: *J Tissue Eng Regen Med* 9 (5), S. 488–503. DOI: 10.1002/term.1870.
- Penolazzi, L.; Lolli, A.; Sardelli, L.; Angelozzi, M.; Lambertini, E.; Trombelli, L. et al. (2016): Establishment of a 3D-dynamic osteoblasts–osteoclasts co-culture model to simulate the jawbone microenvironment in vitro. In: *Life Sciences* 152, S. 82–93. DOI: 10.1016/j.lfs.2016.03.035.
- Penuela, S.; Gehi, R.; Laird, D.W. (2013): The biochemistry and function of pannexin channels. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1828 (1), S. 15–22. DOI: 10.1016/j.bbamem.2012.01.017.
- Perić Kačarević, Ž.; Rider, P.; Alkildani, S.; Retnasingh, S.; Pejakić, M.; Schnettler, R. et al. (2019): An introduction to bone tissue engineering. In: *The International Journal of Artificial Organs* 43 (2), S. 69–86. DOI: 10.1177/0391398819876286.
- Pham, T.L.; St-Pierre, M.-E.; Ravel-Chapuis, A.; Parks, T.E.C.; Langlois, S.; Penuela, S. et al. (2018): Expression of Pannexin 1 and Pannexin 3 during skeletal muscle development,

regeneration, and Duchenne muscular dystrophy. In: *J Cell Physiol* 233 (10), S. 7057–7070. DOI: 10.1002/jcp.26629.

Pilmane, M.; Salma-Ancane, K.; Loca, D.; Locs, J.; Berzina-Cimdina, L. (2017): Strontium and strontium ranelate: Historical review of some of their functions. In: *Materials Science and Engineering: C* 78, S. 1222–1230. DOI: 10.1016/j.msec.2017.05.042.

Pivonka, P.; Zimak, J.; Smith, D.W.; Gardiner, B.S.; Dunstan, C.R.; Sims, N.A. et al. (2008): Model structure and control of bone remodeling: A theoretical study. In: *Epigenetic Mechanisms Regulating Bone Biology and Pathology* 43 (2), S. 249–263. DOI: 10.1016/j.bone.2008.03.025.

Plotkin, L.I. (2014): Connexin 43 hemichannels and intracellular signaling in bone cells. In: *Front Physiol* 5, S. 131. DOI: 10.3389/fphys.2014.00131.

Pors Nielsen, S. (2004): The biological role of strontium. In: *Bone* 35 (3), S. 583–588. DOI: 10.1016/j.bone.2004.04.026.

Prinz, C.; Elhensheri, M.; Rychly, J.; Neumann, H.-G. (2017): Antimicrobial and bone-forming activity of a copper coated implant in a rabbit model. In: *Journal of biomaterials applications* 32 (2), S. 139–149. DOI: 10.1177/0885328217713356.

Przekora, A. (2019): The summary of the most important cell-biomaterial interactions that need to be considered during in vitro biocompatibility testing of bone scaffolds for tissue engineering applications. In: *Materials Science and Engineering: C* 97, S. 1036–1051. DOI: 10.1016/j.msec.2019.01.061.

Quinn, J.M.W.; Gillespie, M.T. (2005): Modulation of osteoclast formation. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 328 (3), S. 739–745. DOI: 10.1016/j.bbrc.2004.11.076.

Rastegar, F.; Shenaq, D.; Huang, J.; Zhang, W.; Zhang, B.-Q.; He, B.-C. et al. (2010): Mesenchymal stem cells: Molecular characteristics and clinical applications. In: *World journal of stem cells* 2 (4), S. 67–80. DOI: 10.4252/wjsc.v2.i4.67.

Ratner, B.D.; Bryant, S.J. (2004): Biomaterials: where we have been and where we are going. In: *Annual review of biomedical engineering* 6, S. 41–75. DOI: 10.1146/annurev.bioeng.6.040803.140027.

Rentsch, C.; Rentsch, B.; Scharnweber, D.; Zwipp, H.; Rammelt, S. (2012): Knochenersatz. In: *Der Unfallchirurg* 115 (10), S. 938–949. DOI: 10.1007/s00113-012-2238-4.

- Rh Owen, G.; Dard, M.; Larjava, H. (2018): Hydroxyapatite/beta-tricalcium phosphate biphasic ceramics as regenerative material for the repair of complex bone defects. In: *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials* 106 (6), S. 2493–2512. DOI: 10.1002/jbm.b.34049.
- Rimann, M.; Graf-Hausner, U. (2012): Synthetic 3D multicellular systems for drug development. In: *Current opinion in biotechnology* 23 (5), S. 803–809. DOI: 10.1016/j.copbio.2012.01.011.
- Riteau, N.; Gasse, P.; Fauconnier, L.; Gombault, A.; Couegnat, M.; Fick, L. et al. (2010): Extracellular ATP is a danger signal activating P2X7 receptor in lung inflammation and fibrosis. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 182 (6), S. 774–783. DOI: 10.1164/rccm.201003-0359OC.
- Roach, P.; Eglin, D.; Rohde, K.; Perry, C.C. (2007): Modern biomaterials: a review—bulk properties and implications of surface modifications. In: *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 18 (7), S. 1263–1277. DOI: 10.1007/s10856-006-0064-3.
- Rolvien, T.; Barbeck, M.; Wenisch, S.; Amling, M.; Krause, M. (2018): Cellular Mechanisms Responsible for Success and Failure of Bone Substitute Materials (International Journal of Molecular Sciences, 19).
- Romero-Sánchez, L.B.; Marí-Beffa, M.; Carrillo, P.; Medina, M.Á.; Díaz-Cuenca, A. (2018): Copper-containing mesoporous bioactive glass promotes angiogenesis in an in vivo zebrafish model. In: *Acta Biomaterialia* 68, S. 272–285. DOI: 10.1016/j.actbio.2017.12.032.
- Rößler, S.; Heinemann, C.; Kruppke, B.; Wagner, A.S.; Wenisch, S.; Wiesmann, H.P.; Hanke, T. (2018): Manipulation of osteoclastogenesis: Bioactive multiphasic silica/collagen composites and their effects of surface and degradation products. In: *Materials Science and Engineering: C* 93, S. 265–276. DOI: 10.1016/j.msec.2018.07.049.
- Rothamel, D.; Fienitz, T.; Kielhorn, J.; Jelusic, D.; Schlee, M.; Smeets, R. et al. (2015): Neue augmentative Möglichkeiten durch allogene Knochenersatzmaterialien—Chance oder Risiko. In: *Quintessenz* 66 (10), S. 1167–1177.
- Rothamel, D.; Neugebauer, J.; Scheer, M.; Ritter, L.; Dreiseidler, T.; Lingohr, T. et al. (2008): Surface Morphology, Biocompatibility and Osseous Organization of a New Biphasic Bone Substitute (Maxresorb®). A Combined In-Vitro. In: *Vivo Analysis; Department of Oral and Maxillofacial Surgery, University Hospital of Cologne: North Rhine-Westphalia, Germany* 22, S. 50931.

- Rueger, J.M. (1998): Bone replacement materials – state of the art and the way ahead. In: *Der Orthopäde* 27 (2), S. 72–79. DOI: 10.1007/PL00003481.
- Sakkas, A.; Wilde, F.; Heufelder, M.; Winter, K.; Schramm, A. (2017): Autogenous bone grafts in oral implantology-is it still a "gold standard"? A consecutive review of 279 patients with 456 clinical procedures. In: *International journal of implant dentistry* 3 (1), S. 23. DOI: 10.1186/s40729-017-0084-4.
- Salem, H.K.; Thiemermann, C. (2010): Mesenchymal Stromal Cells: Current Understanding and Clinical Status. In: *STEM CELLS* 28 (3), S. 585–596. DOI: 10.1002/stem.269.
- Saris, N.E.; Mervaala, E.; Karppanen, H.; Khawaja, J.A.; Lewenstam, A. (2000): Magnesium. An update on physiological, clinical and analytical aspects. In: *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 294 (1-2), S. 1–26. DOI: 10.1016/s0009-8981(99)00258-2.
- Scemes, E.; Suadicani, S.O.; Dahl, G.; Spray, D.C. (2007): Connexin and pannexin mediated cell-cell communication. In: *Neuron glia biology* 3 (3), S. 199–208. DOI: 10.1017/S1740925X08000069.
- Schieker, M.; Heiss, C.; Mutschler, W. (2008): Knochenersatzmaterialien. In: *Der Unfallchirurg* 111 (8), S. 613–620. DOI: 10.1007/s00113-008-1489-6.
- Schmid, V.F.; Kleinhans, C.; Schmid, F.F.; Kluger, J.P. (2018): Osteoclast Formation within a Human Co-Culture System on Bone Material as an In Vitro Model for Bone Remodeling Processes (Journal of Functional Morphology and Kinesiology, 3).
- Schmitz, J.P.; Hollinger, J.O. (1986): The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. In: *Clin Orthop Relat Res* (205), S. 299–308.
- Schnettler, R.; Alt, V.; Dingeldein, E.; Pfefferle, H.-J.; Kilian, O.; Meyer, C. et al. (2003): Bone ingrowth in bFGF-coated hydroxyapatite ceramic implants. In: *Biomaterials* 24 (25), S. 4603–4608. DOI: 10.1016/s0142-9612(03)00354-5.
- Schnettler, R.; Stahl, J.P.; Alt, V.; Pavlidis, T.; Dingeldein, E.; Wenisch, S. (2004): Calcium Phosphate-Based Bone Substitutes. In: *European Journal of Trauma* 30 (4), S. 219–229. DOI: 10.1007/s00068-004-1393-x.
- Schulze, S.; Wehrum, D.; Dieter, P.; Hempel, U. (2017): A supplement-free osteoclast–osteoblast co-culture for pre-clinical application. In: *J Cell Physiol* 233 (6), S. 4391–4400. DOI: 10.1002/jcp.26076.

Schumacher, M.; Lode, A.; Helth, A.; Gelinsky, M. (2013): A novel strontium(II)-modified calcium phosphate bone cement stimulates human-bone-marrow-derived mesenchymal stem cell proliferation and osteogenic differentiation in vitro. In: *Acta Biomaterialia* 9 (12), S. 9547–9557. DOI: 10.1016/j.actbio.2013.07.027.

Schumacher, M.; Wagner, A.-S.; Kokesch-Himmelreich, J.; Bernhardt, A.; Rohnke, M.; Wenisch, S.; Gelinsky, M. (2016): Strontium substitution in apatitic CaP cements effectively attenuates osteoclastic resorption but does not inhibit osteoclastogenesis. In: *Acta Biomaterialia* 37, S. 184–194. DOI: 10.1016/j.actbio.2016.04.016.

Sharma, R.R.; Pollock, K.; Hubel, A.; McKenna, D. (2014): Mesenchymal stem or stromal cells: a review of clinical applications and manufacturing practices. In: *Transfusion* 54 (5), S. 1418–1437. DOI: 10.1111/trf.12421.

Sieger, D.; Korzinskas, T.; Jung, O.; Stojanovic, S.; Wenisch, S.; Smeets, R. et al. (2019): The Addition of High Doses of Hyaluronic Acid to a Biphasic Bone Substitute Decreases the Proinflammatory Tissue Response. In: *International journal of molecular sciences* 20 (8). DOI: 10.3390/ijms20081969.

Sigma-Aldrich Produktinformation: Product Information. Phalloidin from *Amanita phalloides* and Phalloidin Conjugates (Coumarin, FITC, and TRITC). Online verfügbar unter https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/p5282?lang=de®ion=DE&cm_sp=I nsite_-_caContent_prodMerch_raiOtherymlCtr_-_prodMerch10-5.

Silverwood, R.K.; Fairhurst, P.G.; Sjostrom, T.; Welsh, F.; Sun, Y.; Li, G. et al. (2016): Analysis of Osteoclastogenesis/Osteoblastogenesis on Nanotopographical Titania Surfaces. In: *Advanced healthcare materials* 5 (8), S. 947–955. DOI: 10.1002/adhm.201500664.

Sims, N.A.; Gooi, J.H. (2008): Bone remodeling: Multiple cellular interactions required for coupling of bone formation and resorption. In: *Seminars in Cell & Developmental Biology* 19 (5), S. 444–451. DOI: 10.1016/j.semcdb.2008.07.016.

Singh, S.S.; Roy, A.; Lee, B.; Parekh, S.; Kumta, P.N. (2016): Murine osteoblastic and osteoclastic differentiation on strontium releasing hydroxyapatite forming cements. In: *Materials Science and Engineering: C* 63, S. 429–438. DOI: 10.1016/j.msec.2016.02.059.

Smeets, R.; Arnhold, S.; Henningsen, A.; Jung, O.; Barbeck, M.; Schnettler, R.; Wenisch, S. (2018): Knochenersatzmaterialien. In: *wissen kompakt* 12 (2), S. 55–64. DOI: 10.1007/s11838-018-0062-6.

Smeets, R.; Hanken, H.; Beck-Broichsitter, B.; Gröbe, A.; Precht, C.; Heiland, M.; Jung, O. (2016): Knochenersatzmaterialien. In: *Der MKG-Chirurg* 9 (1), S. 2–11.

Smeets, R.; Hanken, H.; Jung, O.; Rothamel, D.; Handschel, J.; Al-Dam, A. et al. (2014): Knochenersatzmaterialien. In: *Der Freie Zahnarzt* 58 (10), S. 78–88. DOI: 10.1007/s12614-014-1989-4.

Smieszek, A.; Marcinkowska, K.; Pielok, A.; Sikora, M.; Valihrach, L.; Marycz, K. (2020): The Role of miR-21 in Osteoblasts-Osteoclasts Coupling In Vitro. In: *Cells* 9 (2). DOI: 10.3390/cells9020479.

Song, F.; Sun, H.; Wang, Y.; Yang, H.; Huang, L.; Fu, D. et al. (2017): Pannexin3 inhibits TNF- α -induced inflammatory response by suppressing NF- κ B signalling pathway in human dental pulp cells. In: *J. Cell. Mol. Med.* 21 (3), S. 444–455. DOI: 10.1111/jcmm.12988.

Soysa, N.S.; 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.

Spiegel Online; Hamburg; Germany (2018): "Implant Files": Gefährlicher Informationsmangel bei Implantaten - SPIEGEL ONLINE - Gesundheit. Online verfügbar unter <http://www.spiegel.de/gesundheit/diagnose/implant-files-dokumentieren-informationsmangel-a-1240344.html>, zuletzt aktualisiert am 25.11.2018, zuletzt geprüft am 19.11.2020.

Stains, J.P.; Civitelli, R. (2016): Connexins in the skeleton. In: *Seminars in Cell & Developmental Biology* 50, S. 31–39. DOI: 10.1016/j.semcdb.2015.12.017.

Statistisches Bundesamt (2009): Fallpauschalenbezogene Krankenhausstatistik (DRG-Statistik) Operationen und Prozeduren der vollstationären Patientinnen und Patienten in Krankenhäusern - Ausführliche Darstellung - 2006, zuletzt geprüft am 16.07.2020.

Statistisches Bundesamt (2018): Fallpauschalenbezogene Krankenhausstatistik (DRG-Statistik) Operationen und Prozeduren der vollstationären Patientinnen und Patienten in Krankenhäusern (4-Steller) - 2017, zuletzt geprüft am 16.07.2020.

Suda, T.; Takahashi, N.; Udagawa, N.; Jimi, E.; Gillespie, M.T.; Martin, T.J. (1999): Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. In: *edrv* 20 (3), S. 345–357. DOI: 10.1210/edrv.20.3.0367.

Süddeutsche.de GmbH; Munich; Germany (2018): Implant Files decken Missstände bei Medizinprodukten auf. Online verfügbar unter

<https://projekte.sueddeutsche.de/implantfiles/politik/implant-files-sueddeutsche-de-e952128/>,
zuletzt aktualisiert am 30.11.2018, zuletzt geprüft am 19.11.2020.

Swayne, L.A.; Sorbara, C.D.; Bennett, S.A.L. (2010): Pannexin 2 is expressed by postnatal hippocampal neural progenitors and modulates neuronal commitment. In: *The Journal of biological chemistry* 285 (32), S. 24977–24986. DOI: 10.1074/jbc.M110.130054.

Takahashi, N.; Udagawa, N.; Suda, T. (2014): Vitamin D endocrine system and osteoclasts. In: *Bonekey Rep* 3, S. 495. DOI: 10.1038/bonekey.2013.229.

Teitelbaum, S.L.; Ross, F.P. (2003): Genetic regulation of osteoclast development and function. In: *Nature Reviews Genetics* 4, 638 EP -.

Tröltzsch, M.; Kriegelstein, S.; Hanf, U.; Tröltzsch, M. (2016): Knochen und Skelettsystem– von der Embryologie bis zur Osteoporose. In: *Quintessenz* 67 (3), S. 323–330.

Uccelli, A.; Moretta, L.; Pistoia, V. (2008): Mesenchymal stem cells in health and disease. In: *Nature Reviews Immunology* 8, 726 EP -. DOI: 10.1038/nri2395.

Unger, V.M.; Kumar, N.M.; Gilula, N.B.; Yeager, M. (1999): Three-dimensional structure of a recombinant gap junction membrane channel. In: *Science (New York, N.Y.)* 283 (5405), S. 1176–1180. DOI: 10.1126/science.283.5405.1176.

Urist, M.R. (1965): Bone: formation by autoinduction. In: *Science (New York, N.Y.)* 150 (3698), S. 893–899.

Väänänen, H.K.; Laitala-Leinonen, T. (2008): Osteoclast lineage and function. In: *Archives of Biochemistry and Biophysics* 473 (2), S. 132–138. DOI: 10.1016/j.abb.2008.03.037.

van Heest, A.; Swiontkowski, M. (1999): Bone-graft substitutes. In: *The Lancet* 353, S28-S29. DOI: 10.1016/S0140-6736(99)90228-3.

Velard, F.; Schlaubitz, S.; Fricain, J.-C.; Guillaume, C.; Laurent-Maquin, D.; Möller-Siegert, J. et al. (2015): In vitro and in vivo evaluation of the inflammatory potential of various nanoporous hydroxyapatite biomaterials. In: *Nanomedicine* 10 (5), S. 785–802. DOI: 10.2217/nmm.15.12.

Vormann, J. (2003): Magnesium: nutrition and metabolism. In: *Molecular Aspects of Medicine* 24 (1-3), S. 27–37. DOI: 10.1016/S0098-2997(02)00089-4.

Wagner, A.-S.; Glenske, K.; Henss, A.; Kruppke, B.; Rossler, S.; Hanke, T. et al. (2017a): Cell behavior of human mesenchymal stromal cells in response to silica/collagen based xerogels and calcium deficient culture conditions. In: *Biomedical materials (Bristol, England)* 12 (4), S. 45003. DOI: 10.1088/1748-605X/aa6e29.

- Wagner, A.-S.; Glenske, K.; Wolf, V.; Fietz, D.; Mazurek, S.; Hanke, T. et al. (2017b): Osteogenic differentiation capacity of human mesenchymal stromal cells in response to extracellular calcium with special regard to connexin 43. In: *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger* 209, S. 18–24. DOI: 10.1016/j.aanat.2016.09.005.
- Wagner, A.-S.; Schumacher, M.; Rohnke, M.; Glenske, K.; Gelinsky, M.; Arnhold, S. et al. (2019): Incorporation of silicon into strontium modified calcium phosphate bone cements promotes osteoclastogenesis of human peripheral mononuclear blood cells. In: *Biomedical materials (Bristol, England)* 14 (2), S. 25004. DOI: 10.1088/1748-605X/aaf701.
- Walsh, M.C.; Choi, Y. (2014): Biology of the RANKL-RANK-OPG System in Immunity, Bone, and Beyond. In: *Frontiers in Immunology* 5, S. 511. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00511.
- Wang, P.; Liu, P.; Peng, H.; Luo, X.; Yuan, H.; Zhang, J.; Yan, Y. (2016): Biocompatibility evaluation of dicalcium phosphate/calcium sulfate/poly (amino acid) composite for orthopedic tissue engineering in vitro and in vivo. In: *Journal of biomaterials science. Polymer edition* 27 (11), S. 1170–1186. DOI: 10.1080/09205063.2016.1184123.
- Wang, W.; Yeung, K.W.K. (2017): Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review. In: *Bioactive materials* 2 (4), S. 224–247. DOI: 10.1016/j.bioactmat.2017.05.007.
- Waters, M.; VandeVord, P.; van Dyke, M. (2018): Keratin biomaterials augment anti-inflammatory macrophage phenotype in vitro. In: *Acta Biomaterialia* 66, S. 213–223. DOI: 10.1016/j.actbio.2017.10.042.
- Weber, D.; Knaak, S.; Hettrich, K.; Andrulis, M.; Momburg, F.; Quade, M. et al. (2018): Influence of Regioselectively Sulfated Cellulose on in Vitro Vascularization of Biomimetic Bone Matrices. In: *Biomacromolecules* 19 (11), S. 4228–4238. DOI: 10.1021/acs.biomac.8b01004.
- Weng, L.; Webster, T.J. (2013): Nanostructured magnesium has fewer detrimental effects on osteoblast function. In: *International journal of nanomedicine* 8, S. 1773–1781. DOI: 10.2147/IJN.S39031.
- Wenisch, S.; Stahl, J.-P.; Horas, U.; Heiss, C.; Kilian, O.; Trinkaus, K. et al. (2003a): In vivo mechanisms of hydroxyapatite ceramic degradation by osteoclasts: fine structural microscopy. In: *J. Biomed. Mater. Res.* 67 (3), S. 713–718. DOI: 10.1002/jbm.a.10091.

Wenisch, S.; Stahl, J.-P.; Horas, U.; Kilian, O.; Heiss, C.; Schnettler, R. (2003b): Ultrastructural examination of cell-mediated degradation of a calcium phosphate ceramic. In: *Der Unfallchirurg* 106 (5), S. 387–391. DOI: 10.1007/s00113-003-0578-9.

Wenisch, S.; Trinkaus, K.; Hild, A.; Hose, D.; Herde, K.; Heiss, C. et al. (2005): Human reaming debris: a source of multipotent stem cells. In: *Epigenetic Mechanisms Regulating Bone Biology and Pathology* 36 (1), S. 74–83. DOI: 10.1016/j.bone.2004.09.019.

Wittrant, Y.; Theoleyre, S.; Couillaud, S.; Dunstan, C.; Heymann, D.; Rédini, F. (2003): Regulation of osteoclast protease expression by RANKL. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 310 (3), S. 774–778. DOI: 10.1016/j.bbrc.2003.09.084.

Won, S.; Huh, Y.-H.; Cho, L.-R.; Lee, H.-S.; Byon, E.-S.; Park, C.-J. (2017): Cellular Response of Human Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells to Titanium Surfaces Implanted with Calcium and Magnesium Ions. In: *Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 14 (2), S. 123–131. DOI: 10.1007/s13770-017-0028-3.

Wong, H.M.; Chu, P.K.; Leung, F.K.L.; Cheung, K.M.C.; Luk, K.D.K.; Yeung, K.W.K. (2016): Engineered magnesium-based resorbable porous scaffold for bone tissue engineering.

Xiao, M.; Chen, Y.M.; Biao, M.N.; Zhang, X.D.; Yang, B.C. (2017): Bio-functionalization of biomedical metals. In: *Materials Science and Engineering: C* 70, S. 1057–1070. DOI: 10.1016/j.msec.2016.06.067.

Xu, J.; Li, Z.; Hou, Y.; Fang, W. (2015): Potential mechanisms underlying the Runx2 induced osteogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells. In: *American journal of translational research* 7 (12), S. 2527–2535.

Yamada, M.; Egusa, H. (2018): Current bone substitutes for implant dentistry. In: *Journal of prosthodontic research* 62 (2), S. 152–161. DOI: 10.1016/j.jpor.2017.08.010.

Yang, F.; Yang, D.; Tu, J.; Zheng, Q.; Cai, L.; Wang, L. (2011): Strontium Enhances Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells and In Vivo Bone Formation by Activating Wnt/Catenin Signaling. In: *STEM CELLS* 29 (6), S. 981–991. DOI: 10.1002/stem.646.

Yoshizawa, S.; Brown, A.; Barchowsky, A.; Sfeir, C. (2014): Magnesium ion stimulation of bone marrow stromal cells enhances osteogenic activity, simulating the effect of magnesium alloy degradation. In: *Acta Biomaterialia* 10 (6), S. 2834–2842. DOI: 10.1016/j.actbio.2014.02.002.

- Young, P.S.; Tsimbouri, P.M.; Gadegaard, N.; Meek, R.M.D.; Dalby, M.J. (2015): Osteoclastogenesis/osteoblastogenesis using human bone marrow-derived cocultures on nanotopographical polymer surfaces. In: *Nanomedicine* 10 (6), S. 949–957. DOI: 10.2217/nmm.14.146.
- Yu, T.; Zhao, L.; Huang, X.; Ma, C.; Wang, Y.; Zhang, J.; Xuan, D. (2016): Enhanced Activity of the Macrophage M1/M2 Phenotypes and Phenotypic Switch to M1 in Periodontal Infection. In: *Journal of periodontology* 87 (9), S. 1092–1102. DOI: 10.1902/jop.2016.160081.
- Zhai, Z.; Qu, X.; Li, H.; Yang, K.; Wan, P.; Tan, L. et al. (2014): The effect of metallic magnesium degradation products on osteoclast-induced osteolysis and attenuation of NF- κ B and NFATc1 signaling. In: *Biomaterials* 35 (24), S. 6299–6310. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2014.04.044.
- Zhang, H.; Qing, F.; Zhao, H.; Fan, H.; Liu, M.; Zhang, X. (2017): Cellular internalization of rod-like nano hydroxyapatite particles and their size and dose-dependent effects on pre-osteoblasts. In: *Journal of Materials Chemistry B* 5 (6), S. 1205–1217.
- Zhang, W.; Shen, Y.; Pan, H.; Lin, K.; Liu, X.; Darvell, B.W. et al. (2011): Effects of strontium in modified biomaterials. In: *Acta Biomaterialia* 7 (2), S. 800–808. DOI: 10.1016/j.actbio.2010.08.031.
- Zhao, R.; Chen, S.; Zhao, W.; Yang, L.; Yuan, B.; Ioan, V.S. et al. (2020): A bioceramic scaffold composed of strontium-doped three-dimensional hydroxyapatite whiskers for enhanced bone regeneration in osteoporotic defects. In: *Theranostics* 10 (4), S. 1572–1589. DOI: 10.7150/thno.40103.
- Zhou, H.; Wei, J.; Wu, X.; Shi, J.; Liu, C.; Jia, J. et al. (2010): The bio-functional role of calcium in mesoporous silica xerogels on the responses of osteoblasts in vitro. In: *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 21 (7), S. 2175–2185. DOI: 10.1007/s10856-010-4083-8.
- Zhu, D.; Su, Y.; Young, M.L.; Ma, J.; Zheng, Y.; Tang, L. (2017): Biological Responses and Mechanisms of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells to Zn and Mg Biomaterials. In: *ACS applied materials & interfaces* 9 (33), S. 27453–27461. DOI: 10.1021/acsami.7b06654.
- Zhu, K.; Prince, R.L. (2012): Calcium and bone. In: *Clinical Biochemistry* 45 (12), S. 936–942. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2012.05.006.
- Zhu, S.; Ehnert, S.; Rouß, M.; Häussling, V.; Aspera-Werz, R.H.; Chen, T.; Nussler, A.K. (2018): From the Clinical Problem to the Basic Research—Co-Culture Models of Osteoblasts

and Osteoclasts. In: *International journal of molecular sciences* 19 (8), S. 2284. DOI: 10.3390/ijms19082284.

ZLG: Benannte Stellen - 93/42/EWG. Online verfügbar unter <https://www.zlg.de/medizinprodukte/dokumente/stellenlaboratorien/benannte-stellen-9342ewg/>, zuletzt geprüft am 19.11.2020.

9 Anhang

9.1 Einsatz der Differenzierungsfaktoren *receptor activator of nuclear factor- κ B ligand* und *macrophage colony-stimulating factor-1* im Kokultursystem: Vorversuch 3

9.1.1 Übersicht der p-Werte der relativen Runx2-Genexpressionen der SCs des Vorversuches 3

Runx2	V3-SCs-MK-BM-9d	V3-SCs-MK-BM-R-9d	V3-SCs-MK-BM-R-M-9d
V3-SCs-MK-BM-9d vs.		ns	ns
V3-SCs-MK-BM-R-9d vs.	ns		ns
V3-SCs-MK-BM-R-M-9d vs.	ns	ns	
V3-SCs-KK-BM-9d vs.	ns	ns	ns
V3-SCs-KK-BM-R-9d vs.	ns	ns	ns
V3-SCs-KK-BM-R-M-9d vs.	** ↓	*** ↓	*** ↓
Runx2	V3-SCs-KK-BM-9d	V3-SCs-KK-BM-R-9d	V3-SCs-KK-BM-R-M-9d
V3-SCs-MK-BM-9d vs.	ns	ns	** ↑
V3-SCs-MK-BM-R-9d vs.	ns	ns	*** ↑
V3-SCs-MK-BM-R-M-9d vs.	ns	ns	*** ↑
V3-SCs-KK-BM-9d vs.		ns	*** ↑
V3-SCs-KK-BM-R-9d vs.	ns		*** ↑
V3-SCs-KK-BM-R-M-9d vs.	*** ↓	*** ↓	

*** = $p \leq 0,001$, ** = $p \leq 0,01$, ↓ = niedriger, ↑ = höher, BM = Basalmedium, d = Tage, KK = Kokultur, M = M-CSF = *macrophage colony-stimulating factor-1*, MK = Monokultur, R = RANKL = *receptor activator of nuclear factor- κ B ligand*, Runx2 = *Runt-related transcription factor 2*, SCs = mesenchymale Stromazellen, V3 = Vorversuch, vs. = versus

9.1.2 Übersicht der p-Werte der relativen Cx43-Genexpressionen der SCs des Vorversuches 3

Cx43	V3-SCs-MK-BM-9d	V3-SCs-MK-BM-R-9d	V3-SCs-MK-BM-R-M-9d
V3-SCs-MK-BM-9d vs.		* ↓	** ↓
V3-SCs-MK-BM-R-9d vs.	* ↑		ns
V3-SCs-MK-BM-R-M-9d vs.	** ↑	ns	
V3-SCs-KK-BM-9d vs.	** ↓	*** ↓	*** ↓
V3-SCs-KK-BM-R-9d vs.	* ↓	*** ↓	*** ↓
V3-SCs-KK-BM-R-M-9d vs.	*** ↓	*** ↓	*** ↓
Cx43	V3-SCs-KK-BM-9d	V3-SCs-KK-BM-R-9d	V3-SCs-KK-BM-R-M-9d
V3-SCs-MK-BM-9d vs.	** ↑	* ↑	*** ↑
V3-SCs-MK-BM-R-9d vs.	*** ↑	*** ↑	*** ↑
V3-SCs-MK-BM-R-M-9d vs.	*** ↑	*** ↑	*** ↑
V3-SCs-KK-BM-9d vs.		ns	* ↑
V3-SCs-KK-BM-R-9d vs.	ns		* ↑
V3-SCs-KK-BM-R-M-9d vs.	* ↓	* ↓	

*** = $p \leq 0,001$, ** = $p \leq 0,01$, * = $p \leq 0,05$, ↓ = niedriger, ↑ = höher, BM = Basalmedium, Cx43 = Connexin 43, d = Tage, KK = Kokultur, M = M-CSF = *macrophage colony-stimulating factor-1*, MK = Monokultur, R = RANKL = *receptor activator of nuclear factor- κ B ligand*, SCs = mesenchymale Stromazellen, V3 = Vorversuch, vs. = versus

9.1.3 Übersicht der p-Werte der relativen Panx1-Genexpressionen der SCs des Vorversuches 3

Panx1	V3-SCs-MK-BM-9d	V3-SCs-MK-BM-R-9d	V3-SCs-MK-BM-R-M-9d
V3-SCs-MK-BM-9d vs.		** ↓	*** ↓
V3-SCs-MK-BM-R-9d vs.	** ↑		ns
V3-SCs-MK-BM-R-M-9d vs.	*** ↑	ns	
V3-SCs-KK-BM-9d vs.	** ↓	*** ↓	*** ↓
V3-SCs-KK-BM-R-9d vs.	*** ↓	*** ↓	*** ↓
V3-SCs-KK-BM-R-M-9d vs.	*** ↓	*** ↓	*** ↓
Panx1	V3-SCs-KK-BM-9d	V3-SCs-KK-BM-R-9d	V3-SCs-KK-BM-R-M-9d
V3-SCs-MK-BM-9d vs.	** ↑	*** ↑	*** ↑
V3-SCs-MK-BM-R-9d vs.	*** ↑	*** ↑	*** ↑
V3-SCs-MK-BM-R-M-9d vs.	*** ↑	*** ↑	*** ↑
V3-SCs-KK-BM-9d vs.		ns	*** ↑
V3-SCs-KK-BM-R-9d vs.	ns		** ↑
V3-SCs-KK-BM-R-M-9d vs.	*** ↓	** ↓	

*** = $p \leq 0,001$, ** = $p \leq 0,01$, ↓ = niedriger, ↑ = höher, BM = Basalmedium, d = Tage, KK = Kokultur, M = M-CSF = *macrophage colony-stimulating factor-1*, MK = Monokultur, Panx1 = Pannexin 1, R = RANKL = *receptor activator of nuclear factor- κ B ligand*, SCs = mesenchymale Stromazellen, V3 = Vorversuch, vs. = versus

9.1.4 Übersicht der p-Werte der relativen Panx2-Genexpressionen der SCs des Vorversuches 3

Panx2	V3-SCs-MK-BM-9d	V3-SCs-MK-BM-R-9d	V3-SCs-MK-BM-R-M-9d
V3-SCs-MK-BM-9d vs.		ns	ns
V3-SCs-MK-BM-R-9d vs.	ns		ns
V3-SCs-MK-BM-R-M-9d vs.	ns	ns	
V3-SCs-KK-BM-9d vs.	ns	ns	ns
V3-SCs-KK-BM-R-9d vs.	ns	ns	ns
V3-SCs-KK-BM-R-M-9d vs.	ns	ns	* ↓
Panx2	V3-SCs-KK-BM-9d	V3-SCs-KK-BM-R-9d	V3-SCs-KK-BM-R-M-9d
V3-SCs-MK-BM-9d vs.	ns	ns	ns
V3-SCs-MK-BM-R-9d vs.	ns	ns	ns
V3-SCs-MK-BM-R-M-9d vs.	ns	ns	* ↑
V3-SCs-KK-BM-9d vs.		ns	ns
V3-SCs-KK-BM-R-9d vs.	ns		ns
V3-SCs-KK-BM-R-M-9d vs.	ns	ns	

* = $p \leq 0,05$, ↓ = niedriger, ↑ = höher, BM = Basalmedium, d = Tage, KK = Kokultur, M = M-CSF = *macrophage colony-stimulating factor-1*, MK = Monokultur, Panx2 = Pannexin 2, R = RANKL = *receptor activator of nuclear factor- κ B ligand*, SCs = mesenchymale Stromazellen, V3 = Vorversuch, vs. = versus

9.1.5 Übersicht der p-Werte der relativen Panx3-Genexpressionen der SCs des Vorversuches 3

Panx3	V3-SCs-MK-BM-9d	V3-SCs-MK-BM-R-9d	V3-SCs-MK-BM-R-M-9d
V3-SCs-MK-BM-9d vs.		ns	ns
V3-SCs-MK-BM-R-9d vs.	ns		ns
V3-SCs-MK-BM-R-M-9d vs.	ns	ns	
V3-SCs-KK-BM-9d vs.	** ↓	** ↓	*** ↓
V3-SCs-KK-BM-R-9d vs.	*** ↓	*** ↓	*** ↓
V3-SCs-KK-BM-R-M-9d vs.	*** ↓	*** ↓	*** ↓
Panx3	V3-SCs-KK-BM-9d	V3-SCs-KK-BM-R-9d	V3-SCs-KK-BM-R-M-9d
V3-SCs-MK-BM-9d vs.	** ↑	*** ↑	*** ↑
V3-SCs-MK-BM-R-9d vs.	** ↑	*** ↑	*** ↑
V3-SCs-MK-BM-R-M-9d vs.	*** ↑	*** ↑	*** ↑
V3-SCs-KK-BM-9d vs.		ns	ns
V3-SCs-KK-BM-R-9d vs.	ns		ns
V3-SCs-KK-BM-R-M-9d vs.	ns	ns	

*** = $p \leq 0,001$, ** = $p \leq 0,01$, ↓ = niedriger, ↑ = höher, BM = Basalmedium, d = Tage, KK = Kokultur, M = M-CSF = *macrophage colony-stimulating factor-1*, MK = Monokultur, Panx3 = Pannexin 3, R = RANKL = *receptor activator of nuclear factor- κ B ligand*, SCs = mesenchymale Stromazellen, V3 = Vorversuch, vs. = versus

9.1.6 Übersicht der p-Werte der relativen TRAP-Genexpressionen der OCVs des Vorversuches 3

TRAP	V3-OCVs-MK-BM-9d	V3-OCVs-MK-BM-R-9d	V3-OCVs-MK-BM-R-M-9d
V3-OCVs-MK-BM-9d vs.		*** ↓	*** ↓
V3-OCVs-MK-BM-R-9d vs.	*** ↑		ns
V3-OCVs-MK-BM-R-M-9d vs.	*** ↑	ns	
V3-OCVs-KK-BM-9d vs.	ns	*** ↓	*** ↓
V3-OCVs-KK-BM-R-9d vs.	** ↑	ns	** ↓
V3-OCVs-KK-BM-R-M-9d vs.	*** ↑	ns	ns
TRAP	V3-OCVs-KK-BM-9d	V3-OCVs-KK-BM-R-9d	V3-OCVs-KK-BM-R-M-9d
V3-SCs-MK-BM-9d vs.	ns	** ↓	*** ↓
V3-SCs-MK-BM-R-9d vs.	*** ↑	ns	ns
V3-SCs-MK-BM-R-M-9d vs.	*** ↑	** ↑	ns
V3-SCs-KK-BM-9d vs.		ns	** ↓
V3-SCs-KK-BM-R-9d vs.	ns		ns
V3-SCs-KK-BM-R-M-9d vs.	** ↑	ns	

*** = $p \leq 0,001$, ** = $p \leq 0,01$, * = $p \leq 0,05$, / = oder, BM = Basalmedium, d = Tage, KK = Kokultur, M = M-CSF = *macrophage colony-stimulating factor-1*, MK = Monokultur, OCVs = osteoklastäre Vorläuferzellen, R = RANKL = *receptor activator of nuclear factor- κ B ligand*, TRAP = Tartrat-resistente saure Phosphatase, V3 = Vorversuch 3

9.1.7 Übersicht der p-Werte der relativen CTSK-Genexpressionen der OCVs des Vorversuches 3

CTSK	V3-OCVs-MK-BM-9d	V3-OCVs-MK-BM-R-9d	V3-OCVs-MK-BM-R-M-9d
V3-OCVs-MK-BM-9d vs.		ns	*** ↓
V3-OCVs-MK-BM-R-9d vs.	ns		*** ↓
V3-OCVs-MK-BM-R-M-9d vs.	*** ↑	*** ↑	
V3-OCVs-KK-BM-9d vs.	ns	ns	*** ↓
V3-OCVs-KK-BM-R-9d vs.	* ↑	ns	*** ↓
V3-OCVs-KK-BM-R-M-9d vs.	*** ↑	*** ↑	*** ↓
CTSK	V3-OCVs-KK-BM-9d	V3-OCVs-KK-BM-R-9d	V3-OCVs-KK-BM-R-M-9d
V3-SCs-MK-BM-9d vs.	ns	* ↓	*** ↓
V3-SCs-MK-BM-R-9d vs.	ns	ns	*** ↓
V3-SCs-MK-BM-R-M-9d vs.	*** ↑	*** ↑	*** ↑
V3-SCs-KK-BM-9d vs.		ns	*** ↓
V3-SCs-KK-BM-R-9d vs.	ns		*** ↓
V3-SCs-KK-BM-R-M-9d vs.	*** ↑	*** ↑	

*** = $p \leq 0,001$, * = $p \leq 0,05$, / = oder, BM = Basalmedium, CTSK = Cathepsin K, d = Tage, KK = Kokultur, M = M CSF = *macrophage colony-stimulating factor-1*, MK = Monokultur, OCVs = osteoklastäre Vorläuferzellen, R = RANKL = *receptor activator of nuclear factor- κ B ligand*, V3 = Vorversuch 3

9.2 Überprüfung der Biokompatibilität von Knochenersatzmaterialien im indirekten Kokultursystem: indirekte Kokultivierung über 9 Tage in Gegenwart der verschiedenen KEMs und leerem Insert 1

9.2.1 Übersicht der p-Werte der relativen Runx2-Genexpressionen der SCs des Hauptversuches

Runx2	SCs-KK-leer	SCs-KK-w/o	SCs-KK-MgCl-0,1	SCs-KK-SrCl-0,1	SCs-KK-SrCl-0,01
SCs-KK-leer vs.		ns	* ↑	*** ↑	*** ↑
SCs-KK-w/o vs.	ns		*** ↑	*** ↑	*** ↑
SCs-KK-MgCl-0,1 vs.	* ↓	*** ↓		*** ↑	*** ↑
SCs-KK-SrCl-0,1 vs.	*** ↓	*** ↓	*** ↓		ns
SCs-KK-SrCl-0,01 vs.	*** ↓	*** ↓	*** ↓	ns	
SCs-KK-MgHP-0,01 vs.	ns	ns	*** ↑	*** ↑	*** ↑
SCs-KK-SrHP-0,01 vs.	ns	ns	*** ↑	*** ↑	*** ↑
SCs-KK-MgSrCl-0,05 vs.	*** ↓	*** ↓	ns	* ↑	ns
SCs-KK-MgSrHP-0,005 vs.	ns	ns	ns	*** ↑	*** ↑
SCs-KK-PLGA-MgSrCl-0,05 vs.	*** ↓	*** ↓	*** ↓	ns	ns
Runx2	SCs-KK-MgHP-0,01	SCs-KK-SrHP-0,01	SCs-KK-MgSrCl-0,05	SCs-KK-MgSrHP-0,005	SCs-KK-PLGA-MgSrCl-0,05
SCs-KK-leer vs.	ns	ns	*** ↑	ns	*** ↑
SCs-KK-w/o vs.	ns	ns	*** ↑	ns	*** ↑
SCs-KK-MgCl-0,1 vs.	*** ↓	*** ↓	ns	ns	*** ↑
SCs-KK-SrCl-0,1 vs.	*** ↓	*** ↓	* ↓	*** ↓	ns
SCs-KK-SrCl-0,01 vs.	*** ↓	*** ↓	ns	*** ↓	ns
SCs-KK-MgHP-0,01 vs.		ns	*** ↑	ns	*** ↑
SCs-KK-SrHP-0,01 vs.	ns		*** ↑	ns	*** ↑
SCs-KK-MgSrCl-0,05 vs.	*** ↓	*** ↓		*** ↓	** ↑
SCs-KK-MgSrHP-0,005 vs.	ns	ns	*** ↑		*** ↑
SCs-KK-PLGA-MgSrCl-0,05 vs.	*** ↓	*** ↓	** ↓	*** ↓	

*** = $p \leq 0,001$, ** = $p \leq 0,01$, * = $p \leq 0,05$, ↓ = niedriger, ↑ = höher, KEMs = Knochenersatzmaterialien, KK = Kokultur, ns = nicht signifikant, OCVs = osteoklastäre Vorläuferzellen, PLGA = Polylactid-co-glycolid, SCs = mesenchymale Stromazellen, vs. = versus

9.2.2 Übersicht der p-Werte der relativen Cx43-Genexpressionen der SCs des Hauptversuches

Cx43	SCs-KK-leer	SCs-KK-w/o	SCs-KK-MgCl-0,1	SCs-KK-SrCl-0,1	SCs-KK-SrCl-0,01
SCs-KK-leer vs.		ns	** ↑	*** ↑	*** ↑
SCs-KK-w/o vs.	ns		*** ↑	*** ↑	*** ↑
SCs-KK-MgCl-0,1 vs.	** ↓	*** ↓		*** ↑	*** ↑
SCs-KK-SrCl-0,1 vs.	*** ↓	*** ↓	*** ↓		ns
SCs-KK-SrCl-0,01 vs.	*** ↓	*** ↓	*** ↓	ns	
SCs-KK-MgHP-0,01 vs.	ns	ns	*** ↑	*** ↑	*** ↑
SCs-KK-SrHP-0,01 vs.	ns	ns	*** ↑	*** ↑	*** ↑
SCs-KK-MgSrCl-0,05 vs.	ns	*** ↓	ns	*** ↑	*** ↑
SCs-KK-MgSrHP-0,005 vs.	ns	ns	*** ↑	*** ↑	*** ↑
SCs-KK-PLGA-MgSrCl-0,05 vs.	*** ↓	*** ↓	*** ↓	ns	ns
Cx43	SCs-KK-MgHP-0,01	SCs-KK-SrHP-0,01	SCs-KK-MgSrCl-0,05	SCs-KK-MgSrHP-0,005	SCs-KK-PLGA-MgSrCl-0,05
SCs-KK-leer vs.	ns	ns	ns	ns	*** ↑
SCs-KK-w/o vs.	ns	ns	*** ↑	ns	*** ↑
SCs-KK-MgCl-0,1 vs.	*** ↓	*** ↓	ns	*** ↓	*** ↑
SCs-KK-SrCl-0,1 vs.	*** ↓	*** ↓	*** ↓	*** ↓	ns
SCs-KK-SrCl-0,01 vs.	*** ↓	*** ↓	*** ↓	*** ↓	ns
SCs-KK-MgHP-0,01 vs.		ns	** ↑	ns	*** ↑
SCs-KK-SrHP-0,01 vs.	ns		** ↑	ns	*** ↑
SCs-KK-MgSrCl-0,05 vs.	** ↓	** ↓		*** ↓	*** ↑
SCs-KK-MgSrHP-0,005 vs.	ns	ns	*** ↑		*** ↑
SCs-KK-PLGA-MgSrCl-0,05 vs.	*** ↓	*** ↓	*** ↓	*** ↓	

*** = $p \leq 0,001$, ** = $p \leq 0,01$, ↓ = niedriger, ↑ = höher, Cx43 = Connexin 43, KEMs = Knochenersatzmaterialien, KK = Kokultur, ns = nicht signifikant, OCVs = osteoklastäre Vorläuferzellen, PLGA = Polylactid-co-glycolid, SCs = mesenchymale Stromazellen, vs. = versus

9.2.3 Übersicht der p-Werte der relativen **Panx1**-Genexpressionen der SCs des Hauptversuches

Panx1	SCs-KK-leer	SCs-KK-w/o	SCs-KK-MgCl-0,1	SCs-KK-SrCl-0,1	SCs-KK-SrCl-0,01
SCs-KK-leer vs.		** ↑	*** ↑	*** ↑	*** ↑
SCs-KK-w/o vs.	** ↓		*** ↑	*** ↑	*** ↑
SCs-KK-MgCl-0,1 vs.	*** ↓	*** ↓		** ↑	** ↑
SCs-KK-SrCl-0,1 vs.	*** ↓	*** ↓	** ↓		ns
SCs-KK-SrCl-0,01 vs.	*** ↓	*** ↓	** ↓	ns	
SCs-KK-MgHP-0,01 vs.	** ↓	ns	*** ↑	*** ↑	*** ↑
SCs-KK-SrHP-0,01 vs.	* ↓	ns	*** ↑	*** ↑	*** ↑
SCs-KK-MgSrCl-0,05 vs.	*** ↓	*** ↓	ns	** ↑	** ↑
SCs-KK-MgSrHP-0,005 vs.	*** ↓	ns	** ↑	*** ↑	*** ↑
SCs-KK-PLGA-MgSrCl-0,05 vs.	*** ↓	*** ↓	*** ↓	ns	ns
Panx1	SCs-KK-MgHP-0,01	SCs-KK-SrHP-0,01	SCs-KK-MgSrCl-0,05	SCs-KK-MgSrHP-0,005	SCs-KK-PLGA-MgSrCl-0,05
SCs-KK-leer vs.	** ↑	* ↑	*** ↑	*** ↑	*** ↑
SCs-KK-w/o vs.	ns	ns	*** ↑	ns	*** ↑
SCs-KK-MgCl-0,1 vs.	*** ↓	*** ↓	ns	** ↓	*** ↑
SCs-KK-SrCl-0,1 vs.	*** ↓	*** ↓	** ↓	*** ↓	ns
SCs-KK-SrCl-0,01 vs.	*** ↓	*** ↓	** ↓	*** ↓	ns
SCs-KK-MgHP-0,01 vs.		ns	*** ↑	ns	*** ↑
SCs-KK-SrHP-0,01 vs.	ns		*** ↑	ns	*** ↑
SCs-KK-MgSrCl-0,05 vs.	*** ↓	*** ↓		** ↓	** ↑
SCs-KK-MgSrHP-0,005 vs.	ns	ns	** ↑		*** ↑
SCs-KK-PLGA-MgSrCl-0,05 vs.	*** ↓	*** ↓	** ↓	*** ↓	

*** = $p \leq 0,001$, ** = $p \leq 0,01$, * = $p \leq 0,05$, ↓ = niedriger, ↑ = höher, KEMs = Knochenersatzmaterialien, KK = Kokultur, ns = nicht signifikant, OCVs = osteoklastäre Vorläuferzellen, Panx1 = Pannexin 1, PLGA = Polylactid-co-glycolid, SCs = mesenchymale Stromazellen, vs. = versus

9.2.4 Übersicht der p-Werte der relativen **Panx2**-Genexpressionen der SCs des Hauptversuches

Panx2	SCs-KK-leer	SCs-KK-w/o	SCs-KK-MgCl-0,1	SCs-KK-SrCl-0,1	SCs-KK-SrCl-0,01
SCs-KK-leer vs.		ns	ns	*** ↑	*** ↑
SCs-KK-w/o vs.	ns		ns	** ↑	*** ↑
SCs-KK-MgCl-0,1 vs.	ns	ns		*** ↑	*** ↑
SCs-KK-SrCl-0,1 vs.	*** ↓	** ↓	*** ↓		ns
SCs-KK-SrCl-0,01 vs.	*** ↓	*** ↓	*** ↓	ns	
SCs-KK-MgHP-0,01 vs.	ns	ns	ns	*** ↑	*** ↑
SCs-KK-SrHP-0,01 vs.	ns	ns	ns	*** ↑	*** ↑
SCs-KK-MgSrCl-0,05 vs.	ns	ns	ns	ns	** ↑
SCs-KK-MgSrHP-0,005 vs.	ns	ns	ns	** ↑	*** ↑
SCs-KK-PLGA-MgSrCl-0,05 vs.	*** ↓	** ↓	*** ↓	ns	ns
Panx2	SCs-KK-MgHP-0,01	SCs-KK-SrHP-0,01	SCs-KK-MgSrCl-0,05	SCs-KK-MgSrHP-0,005	SCs-KK-PLGA-MgSrCl-0,05
SCs-KK-leer vs.	ns	ns	ns	ns	*** ↑
SCs-KK-w/o vs.	ns	ns	ns	ns	** ↑
SCs-KK-MgCl-0,1 vs.	ns	ns	ns	ns	*** ↑
SCs-KK-SrCl-0,1 vs.	*** ↓	*** ↓	ns	** ↓	ns
SCs-KK-SrCl-0,01 vs.	*** ↓	*** ↓	** ↓	*** ↓	ns
SCs-KK-MgHP-0,01 vs.		ns	* ↑	ns	*** ↑
SCs-KK-SrHP-0,01 vs.	ns		** ↑	ns	*** ↑
SCs-KK-MgSrCl-0,05 vs.	* ↓	** ↓		ns	ns
SCs-KK-MgSrHP-0,005 vs.	ns	ns	ns		*** ↑
SCs-KK-PLGA-MgSrCl-0,05 vs.	*** ↓	*** ↓	ns	*** ↓	

*** = $p \leq 0,001$, ** = $p \leq 0,01$, * = $p \leq 0,05$, ↓ = niedriger, ↑ = höher, KEMs = Knochenersatzmaterialien, KK = Kokultur, ns = nicht signifikant, OCVs = osteoklastäre Vorläuferzellen, Panx2 = Pannexin 2, PLGA = Polylactid-co-glycolid, SCs = mesenchymale Stromazellen, vs. = versus

9.2.5 Übersicht der p-Werte der relativen Panx3-Genexpressionen der SCs des Hauptversuches

Panx3	SCs-KK-leer	SCs-KK-w/o	SCs-KK-MgCl-0,1	SCs-KK-SrCl-0,1	SCs-KK-SrCl-0,01
SCs-KK-leer vs.		*** ↑	*** ↑	*** ↑	*** ↑
SCs-KK-w/o vs.	*** ↓		ns	ns	ns
SCs-KK-MgCl-0,1 vs.	*** ↓	ns		ns	ns
SCs-KK-SrCl-0,1 vs.	*** ↓	ns	ns		ns
SCs-KK-SrCl-0,01 vs.	*** ↓	ns	ns	ns	
SCs-KK-MgHP-0,01 vs.	*** ↓	ns	ns	ns	ns
SCs-KK-SrHP-0,01 vs.	*** ↓	ns	ns	ns	ns
SCs-KK-MgSrCl-0,05 vs.	** ↓	ns	ns	ns	ns
SCs-KK-MgSrHP-0,005 vs.	*** ↓	ns	ns	ns	ns
SCs-KK-PLGA-MgSrCl-0,05 vs.	*** ↓	ns	ns	ns	ns
Panx3	SCs-KK-MgHP-0,01	SCs-KK-SrHP-0,01	SCs-KK-MgSrCl-0,05	SCs-KK-MgSrHP-0,005	SCs-KK-PLGA-MgSrCl-0,05
SCs-KK-leer vs.	*** ↑	*** ↑	** ↑	*** ↑	*** ↑
SCs-KK-w/o vs.	ns	ns	ns	ns	ns
SCs-KK-MgCl-0,1 vs.	ns	ns	ns	ns	ns
SCs-KK-SrCl-0,1 vs.	ns	ns	ns	ns	ns
SCs-KK-SrCl-0,01 vs.	ns	ns	ns	ns	ns
SCs-KK-MgHP-0,01 vs.		ns	ns	ns	ns
SCs-KK-SrHP-0,01 vs.	ns		ns	ns	ns
SCs-KK-MgSrCl-0,05 vs.	ns	ns		ns	ns
SCs-KK-MgSrHP-0,005 vs.	ns	ns	ns		ns
SCs-KK-PLGA-MgSrCl-0,05 vs.	ns	ns	ns	ns	

*** = $p \leq 0,001$, ** = $p \leq 0,01$, ↓ = niedriger, ↑ = höher, KEMs = Knochenersatzmaterialien, KK = Kokultur, ns = nicht signifikant, OCVs = osteoklastäre Vorläuferzellen, Panx3 = Pannexin 3, PLGA = Polylactid-co-glycolid, SCs = mesenchymale Stromazellen, vs. = versus

9.2.6 Übersicht der p-Werte der relativen TRAP-Genexpressionen der OCVs des Hauptversuches

TRAP	OCVs-KK-leer	OCVs-KK-w/o	OCVs-KK-MgCl-0,1	OCVs-KK-SrCl-0,1	OCVs-KK-SrCl-0,01
OCVs-KK-leer vs.		ns	*** ↑	*** ↑	*** ↑
OCVs-KK-w/o vs.	ns		*** ↑	*** ↑	*** ↑
OCVs-KK-MgCl-0,1 vs.	*** ↓	*** ↓		ns	ns
OCVs-KK-SrCl-0,1 vs.	*** ↓	*** ↓	ns		ns
OCVs-KK-SrCl-0,01 vs.	*** ↓	*** ↓	ns	ns	
OCVs-KK-MgHP-0,01 vs.	*** ↓	** ↓	** ↑	*** ↑	ns
OCVs-KK-SrHP-0,01 vs.	ns	ns	*** ↑	*** ↑	*** ↑
OCVs-KK-MgSrCl-0,05 vs.	*** ↓	*** ↓	ns	** ↑	ns
OCVs-KK-MgSrHP-0,005 vs.	* ↓	ns	*** ↑	*** ↑	*** ↑
OCVs-KK-PLGA-MgSrCl-0,05 vs.	*** ↓	*** ↓	ns	ns	ns
TRAP	OCVs-KK-MgHP-0,01	OCVs-KK-SrHP-0,01	OCVs-KK-MgSrCl-0,05	OCVs-KK-MgSrHP-0,005	OCVs-KK-PLGA-MgSrCl-0,05
OCVs-KK-leer vs.	*** ↑	ns	*** ↑	* ↑	*** ↑
OCVs-KK-w/o vs.	** ↑	ns	*** ↑	ns	*** ↑
OCVs-KK-MgCl-0,1 vs.	** ↓	*** ↓	ns	*** ↓	ns
OCVs-KK-SrCl-0,1 vs.	*** ↓	*** ↓	** ↓	*** ↓	ns
OCVs-KK-SrCl-0,01 vs.	ns	*** ↓	ns	*** ↓	ns
OCVs-KK-MgHP-0,01 vs.		*** ↓	ns	ns	*** ↑
OCVs-KK-SrHP-0,01 vs.	*** ↑		*** ↑	ns	*** ↑
OCVs-KK-MgSrCl-0,05 vs.	ns	*** ↓		*** ↓	* ↑
OCVs-KK-MgSrHP-0,005 vs.	ns	ns	*** ↑		*** ↑
OCVs-KK-PLGA-MgSrCl-0,05 vs.	*** ↓	*** ↓	* ↓	*** ↓	

*** = $p \leq 0,001$, ** = $p \leq 0,01$, * = $p \leq 0,05$, ↓ = niedriger, ↑ = höher, KEMs = Knochenersatzmaterialien, KK = Kokultur, ns = nicht signifikant, OCVs = osteoklastäre Vorläuferzellen, PLGA = Polylactid-co-glycolid, SCs = mesenchymale Stromazellen, TRAP = Tartrat-resistente saure Phosphatase, vs. = versus

9.2.7 Übersicht der p-Werte der relativen CTSK-Genexpressionen der OCVs des Hauptversuches

CTSK	OCVs-KK-leer	OCVs-KK-w/o	OCVs-KK-MgCl-0,1	OCVs-KK-SrCl-0,1	OCVs-KK-SrCl-0,01
OCVs-KK-leer vs.		ns	*** ↑	*** ↑	*** ↑
OCVs-KK-w/o vs.	ns		* ↑	*** ↑	** ↑
OCVs-KK-MgCl-0,1 vs.	*** ↓	* ↓		ns	ns
OCVs-KK-SrCl-0,1 vs.	*** ↓	*** ↓	ns		ns
OCVs-KK-SrCl-0,01 vs.	*** ↓	** ↓	ns	ns	
OCVs-KK-MgHP-0,01 vs.	*** ↓	ns	ns	ns	ns
OCVs-KK-SrHP-0,01 vs.	ns	ns	* ↑	*** ↑	** ↑
OCVs-KK-MgSrCl-0,05 vs.	*** ↓	* ↓	ns	ns	ns
OCVs-KK-MgSrHP-0,005 vs.	ns	ns	*** ↑	*** ↑	*** ↑
OCVs-KK-PLGA-MgSrCl-0,05 vs.	*** ↓	*** ↓	ns	ns	ns
CTSK	OCVs-KK-MgHP-0,01	OCVs-KK-SrHP-0,01	OCVs-KK-MgSrCl-0,05	OCVs-KK-MgSrHP-0,005	OCVs-KK-PLGA-MgSrCl-0,05
OCVs-KK-leer vs.	*** ↑	ns	*** ↑	ns	*** ↑
OCVs-KK-w/o vs.	ns	ns	* ↑	ns	*** ↑
OCVs-KK-MgCl-0,1 vs.	ns	* ↓	ns	*** ↓	ns
OCVs-KK-SrCl-0,1 vs.	ns	*** ↓	ns	*** ↓	ns
OCVs-KK-SrCl-0,01 vs.	ns	** ↓	ns	*** ↓	ns
OCVs-KK-MgHP-0,01 vs.		ns	ns	** ↓	*** ↑
OCVs-KK-SrHP-0,01 vs.	ns		ns	ns	*** ↑
OCVs-KK-MgSrCl-0,05 vs.	ns	ns		*** ↓	* ↑
OCVs-KK-MgSrHP-0,005 vs.	** ↑	ns	*** ↑		*** ↑
OCVs-KK-PLGA-MgSrCl-0,05 vs.	*** ↓	*** ↓	* ↓	*** ↓	

*** = $p \leq 0,001$, ** = $p \leq 0,01$, * = $p \leq 0,05$, ↓ = niedriger, ↑ = höher, KEMs = Knochensatzmaterialien, CTSK = Cathepsin K, KK = Kokultur, ns = nicht signifikant, OCVs = osteoklastäre Vorläuferzellen, PLGA = Polylactid-co-glycolid, SCs = mesenchymale Stromazellen, vs. = versus

10 Danksagung

Ein herzliches Dankeschön an alle, die mich bei der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt haben. Ganz besonders bedanke ich mich bei:

Frau Prof. Dr. Wenisch, für ihre Betreuung und Unterstützung, die konstruktive Kritik und die aufmunternden Worte.

Dem Bundesministerium für Wirtschaft und Energie (BMWi) sowie dem Projektträger des BMWi, ZIM Kooperationsprojekte AiF Projekt GmbH, für die Bereitstellung der Mittel zur Finanzierung meiner Stelle und der Sachmittel zur Durchführung der Untersuchungen im Rahmen meiner Dissertation.

Dem Kooperationspartner biotrics bioimplants AG (Deutschland) für den regen fachlichen Austausch und die zur Verfügungstellung der mit Strontium und Magnesium kombinierten Knochenersatzmaterialien sowie botiss biomaterials GmbH (Deutschland) für die Bereitstellung des Knochenersatzmaterials Maxresorb®.

Herrn Prof. Dr. Martin Diener, Institut für Veterinär-Physiologie und -Biochemie, für die Zuverfügungstellung der Versuchstiere.

Frau Dr. Kristina Glenske und Frau Dr. Nada Miloseciv-Oljaca für die kompetente und unkomplizierte Hilfe bei allen Fragen rund ums Labor und für die Geduld bei jeder Nachfrage.

Frau Iris Schütz, Frau Martina Fink, Frau Anne Hild und Frau Dr. Alena-Svenja Alsen für die fachkundige und kompetente Unterstützung.

Dem gesamten Team des Institutes für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie für die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Fabi und Laura für die schöne Zeit während Studium und Promotion und die Freundschaft darüber hinaus.

Meiner Familie, vor allen meinen Eltern, die mich auf jede erdenkliche Weise unterstützen und denen ich so viel zu verdanken habe.

Philipp. Vielen Dank für deine Zuversicht, deinen Rückhalt und die vielfältige Unterstützung in jeder Lebenslage.

ISBN: 978-3-86345-613-9



Verlag der DVG Service GmbH

An der Alten Post 2 • 35390 Gießen

Tel.: 0641 984446-0 • Fax: 0641 984446-25

E-Mail: info@dvg.de • Web: www.dvg.de