

Aus der Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik  
Klinik für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie an der  
Universität Tübingen

**Entwicklung eines dreidimensionalen in vitro Co-Kultur  
Modells des humanen Knochenstoffwechsels**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Humanwissenschaften**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von**

**Häussling, Victor Maximilian Ernst Reinhold**

**2022**

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. A. Nüssler

2. Berichterstatter: Professor Dr. Dr. P. Ruth

Tag der Disputation: 21.03.2022

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>6</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>7</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>8</b>
<b>Einheitenverzeichnis .....</b>	<b>9</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>10</b>
<b>1.1 Allgemeiner Aufbau des Knochens .....</b>	<b>10</b>
<b>1.2 Einflussfaktoren auf das Skelett .....</b>	<b>12</b>
1.2.1 Beispiel für einen gestörten Knochenstoffwechsel.....	12
1.2.2 Umweltfaktoren und ihr Einfluss auf den Knochenstoffwechsel.....	13
1.2.3 Diabetes und die Folgen für den Knochen.....	14
<b>1.3 Stand der Forschung .....</b>	<b>16</b>
1.3.1 <i>In Vivo</i> Modelle.....	16
1.3.2 <i>In Vitro</i> Modelle .....	18
1.3.3 Einfluss und Anforderungen einer 3D Umgebung.....	21
<b>1.4 Zielsetzung der Arbeit .....</b>	<b>23</b>
<b>2. Material &amp; Methoden .....</b>	<b>25</b>
<b>2.1 Material .....</b>	<b>25</b>
2.1.1 Chemikalien .....	25
2.1.2 Material und Verbrauchsgüter.....	27
2.1.3 Geräte .....	28
2.1.4 Enzyme und Primer.....	30
2.1.5 Puffer & Lösungen .....	31
<b>2.2 Methoden zur Herstellung &amp; Charakterisierung einer 3D Matrix.....</b>	<b>32</b>
2.2.1 Herstellung Scaffolds .....	32
2.2.2 Herstellung humanes Plasmalysat.....	33
2.2.3 Porenstruktur.....	33
2.2.4 Rasterelektronenmikroskopie.....	33
2.2.5 Porosität und Schwellrate .....	34
2.2.6 Permeabilität .....	34
2.2.7 Grad der Mineralisierung der 3D Matrix .....	35
2.2.8 Steifigkeit der 3D Matrix .....	35
2.2.9 Wasserkapazität.....	36

<b>2.3 Zellkultur</b> .....	<b>36</b>
2.3.1 Zelllinien .....	36
2.3.2 Zellzählung .....	36
2.3.3 Zellaussaat .....	37
2.3.4 Osteoklastäre & Osteogene Differenzierung .....	39
2.3.5 Integrierung der diabetischen Bedingungen in vitro .....	40
2.3.6 Auswahl geeigneter Zellen .....	40
<b>2.4 Messmethoden</b> .....	<b>41</b>
2.4.1 Mitochondriale Aktivität .....	41
2.4.2 Tartrate-resistente saure Phosphatase .....	41
2.4.3 Alkalische Phosphatase Aktivität (ALP) .....	42
2.4.4 Carbonic Anhydrase II Aktivität (CAII) .....	42
2.4.5 DNA – Isolierung .....	43
2.4.6 Höchst & Calcein AM Färbung .....	44
2.4.7 Matrix - Alizarin Rot .....	44
2.4.8 Glucose-Messung .....	45
2.4.9 Transfektion von Fluoreszenzproteinen .....	45
2.4.10 RNA Isolierung .....	47
2.4.11 c-DNA Synthese .....	48
2.4.12 PCR & Gelelektrophorese .....	48
2.4.13 qPCR .....	49
2.4.14 Statistik .....	50
2.4.15 Ethikvotum .....	50
<b>3. Ergebnisse</b> .....	<b>51</b>
<b>3.1 Scaffold - technische Entwicklung</b> .....	<b>51</b>
3.1.1 Verhältnis pHEMA und BAA .....	51
3.1.2 Autofluoreszenz .....	52
3.1.3 Matriceigenschaften und ihrer Einflussgrößen .....	53
3.1.4 Kein Einfluss bei einer Inkubation zwischen der Zugabe von APS - TEMED .....	54
3.1.5 Hydroxylapatit .....	55
3.1.6 Vergleich der Proteinquellen RGD, PRP, Coll, CM .....	56
3.1.7 Abschließende Matrix-Zusammensetzung .....	58
3.1.8 Effekt der Inkubation der Scaffolds vor der Zellaussaat .....	59
<b>3.2 Co-Kultur – Entwicklung</b> .....	<b>60</b>
3.2.1 Auswahl geeigneter Zellen .....	60
3.2.2 Zell-Zell-Verhältnisse .....	62
3.2.3 Mediumshöhe & Hypoxie .....	64
3.2.4 Einfluss des FCS-Gehalts .....	66
3.2.5 Co-Kultur unter diabetischen Bedingungen in 2D .....	67

3.2.6 Normalisierung/ Quantifizierung .....	68
<b>3.3 Etablierung einer Co-Kultur .....</b>	<b>70</b>
3.3.1 Bisphosphonate .....	70
3.3.2 Metformin .....	75
3.3.3 Diabetes + Metformin 2D vs. 3D .....	79
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>87</b>
4.1 Scaffold - technische Entwicklung .....	87
4.2 Co-Kultur – Entwicklung .....	93
<b>4.3 Etablierung einer Co-Kultur .....</b>	<b>100</b>
4.3.1 Bisphosphonate .....	100
4.3.2 Metformin .....	102
4.3.3 Diabetes + Metformin 2D vs. 3D .....	104
<b>Schlussfolgerung .....</b>	<b>107</b>
<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>108</b>
<b>6. Ausblick .....</b>	<b>110</b>
<b>Liste der Veröffentlichungen .....</b>	<b>112</b>
<b>Quellenverzeichnis .....</b>	<b>114</b>
<b>Erklärungen zum Eigenanteil .....</b>	<b>128</b>
<b>Danksagung .....</b>	<b>129</b>

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Erwartetes Wachstum der Weltbevölkerung und der Anzahl an Diabetes Mellitus weltweit erkrankten Menschen [2,3] .	14
Abbildung 2. Cryo-Gele - Entwicklung einer knochenähnlichen Matrix	23
Abbildung 3. Schema zur Verwendung von SaOS-2 Konditioniertem Medium in THP-1 Mono-Kultur	38
Abbildung 4. Auswirkungen unterschiedlicher pHEMA: BAA Verhältnisse auf die Steifigkeit der Cryogel Matrix.	51
Abbildung 5. Auswirkungen der Glutaraldehydkonzentration auf die Autofluoreszenz und Steifigkeit der Scaffolds.	52
Abbildung 6. Verlauf der Kerntemperatur während der Polymerisation der Scaffold-Masse, bei -18 °C.	54
Abbildung 7. Fotografie zweier Scaffolds bestehend aus PRP und Hydroxylapatit.	55
Abbildung 8. Vergleich von Cryogelen ohne und mit Hydroxylapatit, sowie ex. Kristallisation.	56
Abbildung 9. Veränderung der Oberflächenbeschaffenheit durch Austausch von Kollagen & Gelatine gegen Plasmalysat.	57
Abbildung 10. Vergleich von rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen von Cryogelen mit unterschiedlichen Proteinzusammensetzungen.	57
Abbildung 11. Vergleich der charakteristischen Eigenschaften von Cryogelen mit unterschiedlichen Proteinzusammensetzungen.	58
Abbildung 12. Vergleich der Genexpression zwischen osteogenen Zelllinien und primären humanen Osteoblasten.	61
Abbildung 13. Vergleich unterschiedlicher Zell-Zell-Verhältnisse in 2D Co-Kultur, zwischen den zu Osteoklasten differenzierenden THP-1 Zellen und den osteoblastären SaOS-2 Zellen.	63
Abbildung 14. Alizarin Rot-Färbung der mineralisierten Matrix zur Ermittlung eines geeigneten Zell-Zell-Verhältnisses	64
Abbildung 15. Einfluss von Hypoxie auf die Differenzierung einer Co-Kultur, aus SaOS-2 und THP-1 Zellen, in 2D.	65
Abbildung 16. Vergleich des Einflusses von unterschiedlicher FCS Konzentrationen auf die Differenzierung einer Co-Kultur, aus SaOS-2 und THP-1 Zellen.	66
Abbildung 17. Mikroskopische Aufnahmen der Alizarin Rot Färbung von der Co-Kultur mineralisierten Matrix unter Einfluss unterschiedlicher FCS-Konzentrationen	67
Abbildung 18. Untersuchung des Einflusses von Bisphosphonaten auf die Aktivität des Co-Kultur Modells.	71
Abbildung 19. Einfluss der Bisphosphonate Alendronat sowie Zoledronat auf das Zell-Zell-Verhältnis und den Glukoseverbrauch während der Differenzierung des Co-Kultur Modells, über 14 Tage.	72
Abbildung 20. Konzentrationsverlauf von Knochenspezifischen Zytokinen und Proteinen Im Zellkulturüberstand.	73
Abbildung 21. Einfluss der Bisphosphonate auf die Differenzierung der Zellen in Mono-Kultur.	74

Abbildung 22. Einfluss unterschiedlicher Metformin Konzentrationen auf die Viabilität und das Zell-Zell-Verhältnis zwischen angehenden Osteoblasten und Osteoklasten in Co-Kultur. ....	76
Abbildung 23. Einfluss unterschiedlicher Metformin Konzentrationen auf die Differenzierung und den Zellspezifischen Metabolismus in der Co-Kultur. ....	77
Abbildung 24. Konzentrationsverlauf von Knochenspezifischen Zytokinen und Proteinen Im Zellkulturüberstand. ....	78
Abbildung 25. Einfluss unterschiedlicher Metformin Konzentrationen auf die Differenzierung und den Zellspezifischen Metabolismus in mono-Kulturen von SaOS-2 und THP-1 Zellen. ....	79
Abbildung 26. Auswirkungen von diabetischen Bedingungen auf die Viabilität und das Zell-Zell-Verhältnis unter 2D & 3D in vitro Bedingungen. ....	81
Abbildung 27. Auswirkungen von diabetischen Bedingungen auf die Differenzierung der Zellen in Co-Kultur unter 2D & 3D in vitro Bedingungen. ....	82
Abbildung 28. Auswirkungen der diabetischen Bedingungen in Bezug auf Mineralisierung und Steifigkeit in 2D & 3D. ....	83
Abbildung 29. Konzentrationsverlauf der in das Medium sezernierten Zytokine sRANKL & OPG. ....	85
Abbildung 30. Konzentrationsverlauf von PINP und NTX im Co-Kultur Modell unter diabetischen Bedingungen in 2D & 3D. ....	86
Abbildung 31. Cryo-Gele - Übersicht über Einflussfaktoren und ihrer Zusammenhänge zueinander. .	89

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Vor und Nachteile von primären Zellen und Zelllinien [68] .....	20
Tabelle 2. Vor und Nachteile der experimentellen Tier- bzw. in vitro-Modellen.....	21
Tabelle 3. Grundzusammensetzung der Cryogele für knochenähnlich Scaffolds .....	51
Tabelle 4. Charakteristische Eigenschaften und Anforderungen der entwickelten 3D Matrix .....	59

## Abkürzungsverzeichnis

2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
ALP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BAA	Bisacrylamid
BSA	Bovines Serumalbumin
CM	Konditioniertes Medium
Coll	Kollagen
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Eppie	Kunststoff-Reaktionsgefäß
FCS	Fötale Kälberserum
HA	Hydroxylapatit
hOSÜ	primären humanen Osteoblasten
IDF	Internationalen Diabetes Föderation
M	mol/L
M-CSF	Monozytenkolonien-stimulierender Faktor
OPG	Osteoprotegerin
PBS	Phosphatgepufferte Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pHEMA	Polyhydroxyethylmethacrylate
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PRP	Plasmalysat
RANK	receptor activator of nuclear factor B
RANKL	receptor activator of nuclear factor B ligand
RGD	Arginin-Glycin-Asparaginsäure Peptidkette
Res	Resazurin
RT	Raumtemperatur
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TRAP	Tartrate-resistente saure Phosphatase
u. a.	unter anderem

WHO World Health Organization  
z. B. zum Beispiel

## Einheitenverzeichnis

°C	Grad Celsius
cm	Zentimeter
g	g-Kraft
g	Gramm
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
h	Stunde
L	Liter
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
min	Minute
mM	Millimol
µM	Mikromol
nm	Nanometer
nM	Nanomol
s	Sekunden

# 1. Einleitung

Das menschliche Skelett besteht bei einem erwachsenen Menschen aus etwa 200 einzelnen Knochen, die das Stützgerüst des Körpers bilden [5]. Der Zustand der Knochen ist entscheidend für unsere Körperhaltung und Fortbewegung. Eine mangelhafte Knochenstruktur kann sich u.a. negativ auf die Körperhaltung auswirken, sowie mit einem erhöhten Frakturrisiko auch bei inadäquatem Trauma und einer reduzierten Knochenheilung einhergehen. Der Zustand der Knochen wird wesentlich über den Knochenstoffwechsel beeinflusst. Dabei unterliegt dieser einer Reihe von Einflussfaktoren, u.a. Hormone und körperliche Belastung. Für einen gesunden Knochenstoffwechsel ist eine Balance der den Knochenstoffwechsel-beeinflussenden Hormone sowie weiterer Umwelteinflüsse erforderlich. Ein Ungleichgewicht dieser aber auch verschiedener anderen Krankheiten können einen negativen Einfluss auf den Knochenstoffwechsel haben. Um diese Einflussfaktoren und ihre Wirkmechanismen zu identifizieren und analysieren, bedarf es eines experimentellen Modells, welches den Knochenstoffwechsel widerspiegelt. Ein solches Modell kann nicht nur zur Analyse von o.g. Faktoren, sondern auch zur Untersuchung von Erkrankungen mit Einfluss auf den Knochenstoffwechsel sowie deren Therapie genutzt werden.

## 1.1 Allgemeiner Aufbau des Knochens

Der menschliche Knochen setzt sich aus organischem und anorganischem Material zusammen und besteht im Wesentlichen aus in Kollagen (primär Typ-1-Kollagen) eingelagertem Hydroxylapatit [6].

90 % der im Knochen enthaltenden Proteine sind Kollagen. Die übrigen Proteine setzen sich aus Osteokalzin, Osteonektin, Sialoproteinen und Proteoglykanen zusammen. Der mineralische Anteil besteht vorwiegend aus Kalziumverbindungen wie z. B. Hydroxylapatit ( $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ ), Brushit ( $[\text{CaHPO}_4(\text{H}_2\text{O})_2]$ ), Osteokalziumphosphat ( $[\text{Ca}_2(\text{PO}_4)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ ) und Komplexen mit Anionen ( $\text{F}^-$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ ) und Kationen ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) [7].

Der Knochen selbst wird in zwei Hauptsegmente unterteilt, die Substantia compacta, welche die äußere kompakte und stabile Knochenschicht (sog. Corticales) bildet, und der Substantia spongiosa, einem schwammartig, fein strukturierten Gewebe im Inneren des Knochens. Das Gewebe der Substantia spongiosa ist lammellenartig aufgebaut. Durch Ausrichtung und Dichte der Trabekel (Bälkchenknochen), vor allem an den

Enden von Röhrenknochen (Epiphysen), erhält der Knochen mit einem Minimum an Material seine maximale Festigkeit. Belastungen und Biegebeanspruchungen formen Druck- und Zugtrabekel. Ein feines, engmaschiges Blutgefäßsystem versorgt die Zellen mit Nährstoffen und erlaubt den Abtransport Stoffwechselendprodukten. Der Stoffaustausch erfolgt ausschließlich durch Diffusion. Bei denen am Knochenstoffwechsel beteiligten Zellen handelt es sich in erster Linie um Osteozyten, Osteoblasten und Osteoklasten [5,7].

Osteoblasten, die durch die Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen entstehen, sind für den Aufbau der Knochenmatrix verantwortlich [8,9]. Osteoblasten bilden Proteine, wie zum Beispiel Kollagen und Proteoglykane, in welche anorganische Kalziumverbindungen eingelagert werden, was zur Mineralisierung des Knochens führt.

Bei Osteoklasten handelt es sich um makrophagenähnliche Zellen, welche defekte, alte und defiziente Knochenmatrix abbauen. Der Prozess des Abbaus erfolgt über Proteasen und über die Sezernierung von Säuren, die zur Auflösung der mineralischen Knochenanteile dienen. Im Rahmen der Differenzierung verschmelzen mehrere Vorläuferzellen zu einem Osteoklasten; dies führt zu ihrem markanten Merkmal mehrkerniger Zellen [9-11]. Gemeinsam sorgen Osteoblasten und Osteoklasten für eine stabile und gesunde Knochenstruktur, wofür ein ausgewogenes Gleichgewicht zwischen beiden Zelltypen erforderlich ist.

Das Zusammenspiel zwischen Osteoklasten und Osteoblasten erfolgt primär über eine gegenseitige Regulierung der Zellen durch Zytokine. Dabei sind die bedeutendsten Zytokine RANKL (rezeptor activator of nuclear factor B ligand) und das Peptidhormon M-CSF (colony-stimulating-factor), welche unter anderem von Osteoblasten sezerniert werden und die Differenzierung der Osteoklasten regulieren. M-CSF regt osteoklastäre Vorläuferzellen zur Proliferation an und hindert sie vor der Apoptose. RANKL, ein zentraler Regulator, der sowohl von Osteoblasten sezerniert wird als auch membrangebunden vorkommt, regt durch die Bindung an RANK-Rezeptoren die osteoklastären Vorläuferzellen zur Fusion an. Durch RANKL wird ebenso auch die Abbau-Aktivität der Osteoklasten wesentlich beeinflusst. Eine natürliche Regulation erfolgt über Osteoprotegerin (OPG), ein Antagonist von RANKL, der ebenfalls von Osteoblasten sezerniert wird. OPG bindet RANKL und verhindert so eine Bindung an die RANK-Rezeptoren [7,12,13]. Die Expression von OPG ist in der Regel bei einer erhöhten Expression an RANKL reduziert [14].

Eine weitere Form der Regulierung des Knochenstoffwechsels erfolgt unter anderem über Hormone. Besonders Parathormon (Knochenabbau) sowie Calcitriol (Knochenaufbau) spielen hierbei eine entscheidende Rolle. Ebenfalls entscheidend für einen gesunden Knochenstoffwechsel ist der Östrogen-Spiegel bei der Frau sowie der Testosteron-Spiegel bei Männern [7,15]. Dabei führt ein Mangel an Östrogen zu einem reduzierten Knochenaufbau, mit der Folge einer Reduktion der Knochendichte und einer erhöhten Frakturgefahr. Beispielsweise ist dieser Mangel an Östrogen eine Erklärung für die reduzierte Knochendichte bei Frauen nach der Menopause [7].

Dieses hier geschilderte Wechselspiel aus verschiedenen endogenen sowie exogenen Faktoren ist hoch komplex. Die Entwicklung eines Modells, das all diese Wechselwirkungen und Einflüsse widerspiegelt, stellt somit eine große Herausforderung dar.

## **1.2 Einflussfaktoren auf das Skelett**

Der menschliche Bewegungsapparat und insbesondere das Skelett ist im Alltag einer ständigen Belastung ausgesetzt, durch körperliche Anstrengungen, Sport aber auch durch Umwelteinflüsse (z. B. Sonneneinstrahlung, Ernährung, Alkohol, Rauchen, sowie durch Medikamente). Die Folge ist ein kontinuierlicher Umbau aller Knochen. Schätzungsweise werden ca. 10 % des gesamten Skeletts jährlich erneuert [6]. Entscheidend dabei ist ein gesunder Knochenstoffwechsel, der unter anderem aus einem ausgewogenen Gleichgewicht zwischen knochenaufbauenden Zellen, Osteoblasten, und -knochenabbauenden Zellen, Osteoklasten, besteht. Störungen dieses Gleichgewichts gehen oft mit einer reduzierten Knochenstabilität einher. Ein typisches Beispiel dafür ist Osteoporose.

### **1.2.1 Beispiel für einen gestörten Knochenstoffwechsel**

Die Inzidenz von Osteoporose liegt alleine in Deutschland jährlich bei ca. 885.000 Neuerkrankungen. Jede vierte Frau und jeder siebzehnte Mann über 50 Jahre leidet an Osteoporose. Bei 50 % der Betroffenen kommt es innerhalb der ersten 4 Jahren zu mindestens einer Fraktur [16], bei deren Behandlung meist erst die Diagnose Osteoporose gestellt wird. Grund hierfür ist, dass Osteoporose bis zum Frakturereignis meist symptomlos verläuft. Auch aus gesundheitsökonomischer Sicht stellt Osteoporose eine deutliche Belastung für das Gesundheitssystem dar, mit Kosten von

jährlich 37 Mrd. €. Dabei wird mit einem Anstieg der Kosten bis zum Jahr 2025 von +25 % gerechnet [17].

Die Osteoporose selbst wird in zwei Formen unterteilt (primäre u. sekundäre Osteoporose). Die primäre Osteoporose, welche wesentlich durch natürliche Alterungsprozesse bedingt ist, mit einem Verlust der mineralischen Knochendichte und eine Veränderung der Knochenstruktur, stellt die häufigste Form dar. Von dieser Form sind v. a. Frauen betroffen, bedingt durch den mit der Menopause einhergehenden Östrogenmangel. Nach Beginn der Menopause, kommt es über einen Zeitraum von 4-5 Jahren insbesondere zu einem deutlichen Rückgang des spongiösen Knochengewebes [18]. Bei Kindern und Jugendlichen tritt die primäre Form der Osteoporose, die sogenannte Idiopathische juvenile Osteoporose, nur selten auf [19]. Als Therapieoptionen stehen hier lediglich Physiotherapie und eine ausreichende Vitamin-D-Substitution zur Verfügung.

Bei der sekundären Form der Osteoporose handelt es sich um eine seltenere Form der Osteoporose und wird u.a. bei Patienten diagnostiziert, die eine Fraktur erlitten aufgrund zu geringer Knochenstabilität, diese aber keine Risikofaktoren für eine Osteoporose aufweisen. Dabei handelt es sich in 30 % der Fälle um postmenopausale Frauen und in 50 % um Männer [20]. Ursachen für die sekundäre Form der Osteoporose sind häufig multifaktoriell, beispielsweise Erkrankungen wie Morbus Paget, Rachitis/Osteomalazie, sowie die diabetische Osteopathie.

### **1.2.2 Umweltfaktoren und ihr Einfluss auf den Knochenstoffwechsel**

Bereits über siebzig Erkrankungen und Funktionsstörungen mit negativem Einfluss auf den Knochenstoffwechsel und reduzierter Knochendichte wurden bereits beschrieben. Aber auch Umwelteinflüsse wie Bewegungsmangel, unausgewogene Ernährung, Medikamente, Alkohol und Rauchen tragen zur Entstehung einer sekundären Osteoporose bei [21-23]. Mangelernährung bzw. einseitige Ernährung mit reduzierter Kalziumaufnahme und einem Mangel an Vitamin D führt zu einer reduzierten Knochensubstanz. Eine prospektive Befragung unfallchirurgischer Patienten in Deutschland ergab ein 22,3-prozentiges Risiko für eine Mangelernährung ( $\text{NRS} \geq 3$ ) [24], dass mit einem erhöhten postoperativen Komplikationsrisiko einhergeht. Bei Patienten mit einem  $\text{NRS} \geq 3$  ist das Risiko für Komplikationen 34,9 % höher gegenüber Patienten mit einem  $\text{NRS} < 3$  und damit signifikant erhöht [25]. Zudem konnte bei Patienten mit einem  $\text{NSR} \geq 3$  ein erhöhtes Frakturrisiko beobachtet werden, insbesondere für Frakturen, die typischerweise ältere Patienten mit einer reduziertem

Knochendichte betrifft (z. B. LWK-Fraktur und prox. Beckenfraktur 47,4 %, Oberschenkelhalsfraktur 36,4 %, prox. Humerusfraktur) [24]. Ebenso steht Rauchen in einem direkten Zusammenhang mit einer reduzierte Knochendichte, einem erhöhten Frakturrisiko, einer eingeschränkten Wundheilung und einem erhöhten post-operativen Komplikationsrisiko [26,27].

Eine weitere Ursache kann ebenso die Einnahme von bestimmten Medikamenten sein. Die langfristige Einnahme von Kortikosteroiden begünstigt sog. „Fragility Fractures“ und die Entwicklung einer sekundären Osteoporose. Nebenwirkungen der nichtsteroidale Antirheumatika (NSARs) wie z. B. Ibuprofen, oder auch oraler Kontrazeptiva sind eine reduzierte Knochenheilung nach Frakturen. Weitere bekannte Medikamente mit Einfluss auf den Knochenstoffwechsel sind u. a. Antiepileptika, Antidepressiva, Protonenpumpenhemmer und Antikoagulanzen wie z. B. Heparin [20,22]. Eine Befragung von 1641 Patienten der BG-Unfallklinik Tübingen ergab, dass vier von fünf Patienten (80,5 %) dauerhaft Medikamente einnehmen. Die durchschnittliche Anzahl der eingenommenen Medikamente lag bei 4,3 pro Patient [21].

### 1.2.3 Diabetes und die Folgen für den Knochen

Neben den bereits genannten Risikofaktoren können auch Vorerkrankungen die Entstehung einer Osteoporose begünstigen. Eine der wichtigsten und weitverbreitetsten Krankheitsbilder, die mit einem erhöhten Osteoporoserisikos einhergehen, ist Diabetes mellitus Typ II (DM Typ II) [28].

Diabetes mellitus (DM) zählt zu den sog. „Volkskrankheiten“ mit einer weltweit stetig steigenden Prävalenz mit Schwerpunkt in den Industrienationen. Nach Schätzungen der WHO stieg die Zahl der Erkrankten innerhalb von 20 Jahren von 108 Mio. (1980) auf 150 Mio. (2000). Aufgrund dessen mussten Prognosen in den letzten Jahren regelmäßig nach oben korrigiert werden. Die Internationale Diabetes Föderation (IDF) erwartet für 2030 eine Prävalenz von 578 Mio. Erkrankten weltweit. Für 2045 beläuft sich die Prognose bereits auf 700 Mio. Menschen die an DM erkrankt sind. Verglichen zu 2019 entspricht dies einem Zuwachs von 33,9 % [29]. Prinzipiell betrifft DM

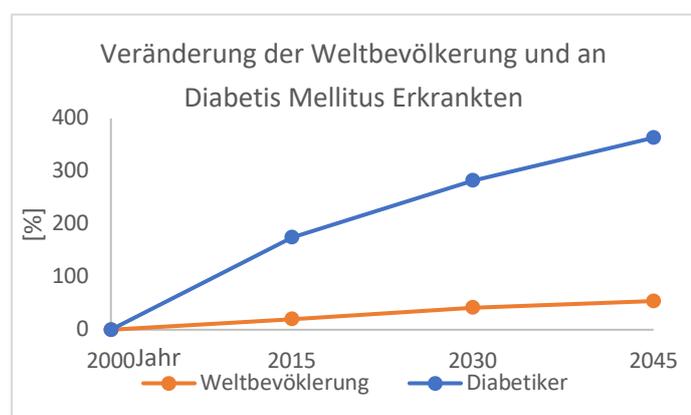


Abbildung 1. Erwartetes Wachstum der Weltbevölkerung und der Anzahl an Diabetes Mellitus weltweit erkrankten Menschen [2,3].

Menschen sämtlicher Altersgruppen. Die Prävalenz steigt jedoch mit zunehmendem Alter an. Bereits heute ist weltweit jeder Fünfte im Alter von > 65 Jahren von DM betroffen [30].

Diese Entwicklung spiegelt sich auch im klinischen Alltag der Unfallchirurgie wider. In den Bereichen Endoprothetik, septische Unfallchirurgie und Traumatologie an einem überregionalem deutschen Trauma Zentrum waren in einem Beobachtungszeitraum von 2012 - 2015 bereits 10,3 % der Patienten Diabetiker [31]. DM geht mit Veränderungen des Knochenstoffwechsels, gefolgt von einer beeinträchtigten Knochenmikroarchitektur und einem erhöhten Knochenfrakturrisiko einher [32]. Im Vergleich zu Gesunden besitzen Frauen mit DM Typ I ein zwölfmal erhöhtes Risiko für hüftgelenksnahe Frakturen, Frauen mit DM Typ II haben ein um das 1,7 höheres Risiko [33].

Bei DM Typ I handelt es sich um eine Autoimmunerkrankung, die mit einem absoluten Insulinmangel durch den Verlust der im Pankreas befindlichen Beta-Zelleneinher geht. Bei DM Typ II weisen Patienten neben einer gestörten Insulinsekretion auch eine gewisse periphere Insulinresistenz auf [34]. Diese wird zunächst durch eine erhöhte Insulinsekretion kompensiert, die im Verlauf der Erkrankung aber nicht mehr ausreicht bzw. zu einer Erschöpfung der Beta-Zellen führt. Dies hat somit langfristig einen absoluten Insulinmangel wie beim DM Typ I zur Folge. Daraus resultiert eine chronische Hyperglykämie, die bei lang andauernder Erkrankung u. a. zu Neuropathie sowie Vaskulopathien führt. Im klinischen Alltag spielt primär DM Typ II (90 % aller Diabetiker) die dominierende Rolle. Langzeitfolgen von DM Typ II sind Störungen der Mikro- und Makrozirkulation, welche zu Endorganschäden (z. B. diabetische Nephropathie, Retinopathie) und Herz-Kreislaufkrankungen (z. B. akutem Myokardinfarkt und Apoplex) führen können. Damit einher geht auch eine verlängerte stationäre Liegedauer bei Patienten mit DM. Im Vergleich zu Nicht-Diabetikern verlängert sich die Liegedauer um 3,6 Tage bei unter 60-jährigen Diabetikern und bei über 60-jährigen um 1,5 Tage, insbesondere durch Wundheilungsstörungen oder weiteren Komplikationen in der Traumatologie [31,35]. So hat auch DM einen Einfluss auf den Knochenstoffwechsel, der mit einem verminderten Knochenumbau und erhöhten Frakturrisiko einhergeht [28,36]. Während beim DM Typ I der Knochen eine geringe mineralische Dichte aufweist, zeigt sich beim DM Typ II eine normale bzw. leicht erhöhte Knochendichte, die jedoch eine verminderte Stabilität aufweist und somit trotz unauffälliger Knochendichte zu einem erhöhten Frakturrisiko führt [28]. Die beim

DM Typ II anhaltende Hyperglykämie führt neben erhöhtem oxidativem Stress zu einer vermehrten Glykierung von Proteinen, Lipiden und Nukleinsäuren und somit zu einer Anreicherung von „Advanced Glycation Endproducts“ (AGE), wie beispielsweise dem HbA<sub>1c</sub>. AGEs gelten als Auslöser für mikro- und makrovaskuläre Durchblutungsstörungen, aber auch für erhöhten oxidativen Stress. Zudem stehen AGEs in Zusammenhang mit einer verminderten Bildung sowie einer vermehrten Apoptose von Osteoblasten. Deren Aktivität wiederum wird durch Hemmung des Wnt-Signalweges, ausgelöst durch oxidativen Stress, reduziert [28,37]. Zusammen führt dies zu dem beschriebenen reduzierten Knochenumbau und somit einem erhöhten Knochenbruchrisiko.

Die beschriebenen Beispiele für Umwelteinflüsse, Medikamente und Krankheiten zeigen die unterschiedlichen Einflüsse auf den menschlichen Knochen und seinen Stoffwechsel auf. Zudem wird deutlich, dass ein hoher Anteil der Bevölkerung solchen Risiken ausgesetzt bzw. anfällig für Störungen des Knochenstoffwechsels ist. Um Risiken und ihre Ursachen früher zu erkennen und entsprechend möglichen Folgen vorbeugen zu können, bedarf es geeigneter Modelle, die es erlauben, diese verschiedenen Risikofaktoren unter annähernd physiologischen Bedingungen zu untersuchen und entsprechende Maßnahmen zu ergreifen.

## **1.3 Stand der Forschung**

### **1.3.1 *In Vivo* Modelle**

*In vivo* Tiermodelle erlauben Untersuchungen in möglichst physiologischen Bedingungen. Hier sind sowohl physiologische Zell-Zell-Kontakte gegeben, die natürliche 3D Umgebung sowie eine Beeinflussung des Stoffwechsels u. a. durch eine definierte Nährstoffversorgung möglich. Es werden Kleintier- (z. B. Maus), mittlere (z. B. Hasen, Schafe) oder Großtiermodelle (z. B. Kühe) unterschieden. Hierbei bietet v. a. das Kleintiermodell durch seine relativ einfache Handhabung und die Möglichkeit spezifische genetische Merkmale zu analysieren Vorteile. Durch genetische Modifikationen (z. B. Knock-out spezifischer Gene) kann der Einfluss einer bestimmten Mutation auf den Knochenstoffwechsel untersucht werden. Daneben bietet es den Vorteil einer kurzen Reproduktionszeit, einer Vielfalt möglicher Mutationen und etablierter Messmethoden in Verbindungen mit einer geringen ökonomischen Belastung [38-40].

Ein weiterer Vorteil ist die Möglichkeit, Knochen relative definiert am Modell zu brechen und somit eine hohe Reproduzierbarkeit im Frakturtyp zu erreichen [41]. Um z. B. eine Hypoxie, wie sie u. a. bei Rauchern, Diabetikern oder älteren Menschen auftritt zu untersuchen, besteht die Möglichkeit die Blutversorgung des Knochens selektiv im Mausmodell zu unterbinden [41]. Neben Frakturen können auch durch selektive Knochenbohrungen Wundheilung und Stoffwechselforgänge untersucht und analysiert werden. Dies bietet den Vorteil, dass eine Fixierung des Knochens nicht erforderlich ist.

Im Vergleich zum Mausmodell bieten Untersuchungen an größeren Tieren (z. B. Schweine, Schafe) eine bessere anatomische Ähnlichkeit zum Menschen. Diese Form findet oftmals Anwendung in der orthopädisch/ unfallchirurgischen Forschung, bei der Erprobung von Implantaten und Knochenersatzmaterialien. Durch gezielten Östrogenmangel (z. B. durch Ovariectomie) kann darüber hinaus eine primäre Osteoporose induziert bzw. simuliert werden [41].

Neben den o. g. Vorteilen sind auch die Limitierungen der *in vivo* Tiermodelle zu beachten. Hier sind u. a. hohe Spezies abhängige Unterschiede im Knochenmetabolismus [42], sowie durch die Züchtung fehlende Variabilität zu nennen. Auch stellt der Vierfüßlergang der Tiere im Vergleich zum aufrechten Gang des Menschen eine entscheidend abweichende Belastung des muskuloskelettalen Systems dar, was die Übertragbarkeit auf den Menschen limitiert. Ebenso unterliegen Tiere nicht den gleichen Umwelteinflüssen wie Menschen, aufgrund der kontrollierten Halungsweise. Auch sind die Kosten – insbesondere für Mittel- und Großtiermodelle – zu beachten.

Gegenüber den Möglichkeiten von *in vivo* Modellen besteht natürlich auch die Untersuchung des Knochenstoffwechsels unter *ex vivo* Bedingungen im Rahmen von Zellkulturen. Diese können sowohl tierischen als auch menschlichen Ursprungs sein, beispielsweise von Biopsien [43,44]. Je nach Versuchsaufbau und Versuchsziel werden ganze Knochen oder Teile eines Knochens verwendet, wie beispielsweise der Femurkopf, Teile der Schädelkalotte bzw. des spongiösen Gewebes [45-49]. Diese Form der Untersuchungen bieten unter anderem den Vorteil, dass mit dem vorhandenen Gewebe eines Tiers meist mehrere Tests bzw. unterschiedliche Bedingungen getestet werden können. Dies reduziert einerseits die Zahl der Tierversuche, aber vor allem das Leid der Tiere.

Für die Untersuchung des Knochenwachstums ist das am häufigsten genutzte *ex vivo* Modell die Kultivierung langer ganzer Knochen von Mäusen, Ratten und auch von Hühnern [47]. Das zweithäufigste genutzte *ex vivo* Modell ist die Kultivierung des Femur-Kopfes bzw. Teilen der Schädelkalotte. Neben dem Knochenwachstum kann an diesen Modellen auch der Knochen- und Knorpelmetabolismus wie auch der Prozess der Knochenheilung untersucht werden [50].

Wird das Gewebe zu Beginn in mehrere Fragmente zerteilt (Zerteilung), geht einerseits der natürliche Aufbau verloren und Zellverhältnisse verändern sich, andererseits können so mehrere Versuche durchgeführt und damit die Zahl der Spendertiere reduziert werden [51-54]. Für humanes Gewebe aus Biopsien bietet diese Form der Kultivierung ebenfalls einen geeigneten Rahmen für Untersuchungen.

Eine weitere Modell-Art zur Erforschung des Knochenmetabolismus und dessen Biokompatibilität ist die Verwendung von spongiösem Gewebe aus dem Trabekelkern. Hierzu kann auch mittels Biopsie eine Probe aus dem menschlichen Knochen verwendet werden, um so molekulare Mechanismen metabolischer Knochenerkrankungen zu untersuchen [55,56].

Bei entsprechender Größe ist es möglich mechanische Kräfte auf die Proben wirken zu lassen [57-59]. So können punktuelle Belastung simuliert werden, wie sie z. B. bei einer Bewegung oder einem Trauma auf den Knochen einwirken.

Wie *in vivo* Tiermodelle weist auch die *ex vivo* Kultivierung Limitierungen auf. So ist ein direkter Vergleich von Rind, Schaf und humanem spongiösem Gewebe aufgrund von Spezies spezifischen Unterschieden nicht möglich. Die Kultivierung von Knochen außerhalb des Organismus und der damit fehlenden Durchblutung geht mit einer fehlenden Hämatombildung des Knochenbruchmodells einher, welche wichtig für die Knochenbruchheilung ist [41,60]. Der Einfluss von Hormonen und Zytokinen kann mit solchen Modellen nur näherungsweise dargestellt werden. Dies zeigt einmal mehr die Notwendigkeit eines ständig verfügbaren *in vitro* Modells, das den humanen Knochenstoffwechsel und dessen Durchblutung widerspiegelt und gleichzeitig eine Option des „up-scales“ ermöglicht.

### **1.3.2 In Vitro Modelle**

Neben der reduzierten Zahl an Tierversuchen ist auch die Reproduzierbarkeit und Wirtschaftlichkeit der *in vitro* Modelle hervorzuheben. Bei den bekannten *in vitro* Modellen des Knochens handelt es sich vorwiegend um Modelle, die für eine

spezifische Fragestellung entwickelt wurden, die jedoch nicht allgemein den Knochenstoffwechsel widerzuspiegeln.

Entscheidend für ein Modell, das diese Bedingung erfüllen soll, ist das es den knochenaufbauenden wie auch -abbauenden Prozess durch Osteoblasten und Osteoklasten wiedergibt, sowie deren gegenseitige Interaktion [10,61].

In einem Mono-Kultur Modell kann diese Interaktion über Zugabe von Zytokinen bzw. der Verwendung von konditioniertem Medium nur bedingt wiedergegeben werden. Co-Kultur-Modelle bieten hingegen den Vorteil, dass sie auch die Interaktion zwischen verschiedenen Zellarten ermöglichen [10].

In Bezug auf die technische Arbeitsweise erfordert dies eine gemeinsame Kultivierung von Zellen in direktem Kontakt zueinander, sodass eine Interaktion der Zellen über membrangebundene Proteine wie z. B. über „Receptor Activator NF- $\kappa$ B Ligand“ (mRANKL), möglich ist [10]. Spezielle Zellkulturplatten mit Membranen bzw. hängende Einsätze „Cellculture-Hanging-Inserts“ ermöglichen zwar einen Stoffaustausch zwischen den einzelnen Kulturen, jedoch keinen direkten Zell-Zell-Kontakt.

Weitere Einflussfaktoren sind die gewählten Kultivierungsbedingungen, z. B. 2-Dimensionale (2D) oder 3-Dimensionale (3D) Kultivierung. Aber auch die Oberflächenbeschaffenheit der Zellkulturschale hat einen Einfluss auf den Erfolg. Es gibt Hinweise, dass es für die Differenzierung von Osteoklasten eine knochenähnliche mineralisierte Matrix bedarf [62]. Die Osteoblastendifferenzierung hingegen ist von der Steifigkeit der Oberfläche abhängig [63,64].

Bei der Entscheidung welche Art von Zellen im Modell genutzt werden, sind in erster Linie primäre humane Zellen zu bevorzugen. Sie bilden den sogenannten „Goldstandard“, stammen direkt vom Menschen ab, weisen in der Regel keine Kanzerogenität bzw. Transformation auf und sind spenderspezifisch [65]. Die Verfügbarkeit dieser Zellen ist allerdings limitiert. Bis zum Erreichen der benötigten Zellzahl bedarf es bei den Osteoblasten einer langen Expansionszeit über mehrere Wochen bis Monate. Im Anschluss für die Isolierung von Monozyten als Osteoklastäre Vorläuferzellen, vom selben Spender Blut zu erhalten, ist nicht zwingend gesichert, die Suche nach geeigneten alternativen Spendern komplex. Eine Alternative zu den primären humanen Osteoblasten könnten humane mesenchymale Stammzellen bzw. Fettzellen als Osteoprogenitorzellen sein. Unter spezifischen Voraussetzungen wäre eine Differenzierung der Zellen zu Osteoblasten möglich, aber ebenfalls sehr Zeit intensiv [66].

Gegenüber primären Zellen bieten Zelllinien den Vorteil der ständigen Verfügbarkeit. Zelllinien weisen zwar meist einen kanzerogenen Ursprung auf und können genetisch verändert sein, sie ermöglichen jedoch neben der ständigen Verfügbarkeit eine rasche Kultivierung einer großen Zellzahl in kurzer Zeit [61,67]. Zwar weisen Zelllinien keine Spenderspezifität auf, dass aber in diesem Fall von Vorteil sein kann da somit der Grundzustand des Modells unabhängig vom Zeitpunkt des Versuchsbeginns immer gleich und parallel eine Kontrolle des Modells selbst ist. Aus diesem und den weiteren genannten Gründen ist entschieden worden, für das Modell immortalisierte Zelllinien zu verwenden.

Tabelle 1. Vor und Nachteile von primären Zellen und Zelllinien [68].

Primäre Osteoblasten & Monozyten	Osteogene & immortalisierte Zelllinie
<ul style="list-style-type: none"> <li>+ Gold Standard</li> <li>+ Nicht kanzerogen / transformiert</li> <li>+ Spenderspezifisch</li> <li>- Vergleichbarkeit von Ergebnissen*</li> <li>- Begrenzte Verfügbarkeit der Zellen</li> <li>- Kultivierung sehr zeitintensiv</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>+ Einfache &amp; schnelle Kultivierung</li> <li>+ Hohe Verfügbarkeit</li> <li>+ Vergleichbar</li> <li>- Nicht Spender spezifisch</li> <li>- Meist kanzerogenem Ursprung</li> <li>- Genetisch verändert</li> </ul>

Trotz des Verzichts auf die Verwendung primärer Zellen, kann eine Individualisierung des Modells durch Austausch von FCS gegen spenderspezifisches Blutplasma erzielt werden. Somit können Veränderungen im Modell auf mögliche spenderspezifische Faktoren zurückgeführt werden [69]. Für die Nachbildung des humanen Knochenstoffwechsels mit Knochen auf- und abbauenden Prozessen sollten idealerweise Zellen humanen Ursprungs gewählt werden. In den vereinzelt *in vitro* Modellen des Knochens werden verschiedenste Zellen verwendet, die meist der Gruppe der Osteosarkome angehören. Trotz des humanen Ursprungs zeigen diese Zellen einen unterschiedlichen Metabolismus, was zu berücksichtigen gilt [67,70-72]. Ebenso wichtig wie die osteogenen Eigenschaften ist die Gewährleistung der Interaktion zwischen den Zellarten im Co-Kultur Modell. Die Expression von u. a. RANKL und M-CSF durch die osteogenen Zelllinie muss gewährleistet sein, sodass auf Zugabe von Parakrinen verzichtet werden kann. Gleiches gilt für die Wahl einer geeigneten monozytären Zelllinie, die im Modell zu Osteoklasten heranreift.

Tabelle 2. Vor und Nachteile der experimentellen Tier- bzw. *in vitro*-Modellen.

Experimentelles Tier - Modell	Experimentelles <i>in vitro</i> - Modell
<ul style="list-style-type: none"> <li>+ <i>in vivo</i> - Gegebenheiten</li> <li>+ gegenseitige Beeinflussung der Organe</li> <li>+ hohe Probanden Variabilität, inkl. Krankheiten (Gen-Knock out)</li> <li>- Metabolismus Tier <math>\neq</math> Mensch</li> <li>- Bewegungsablauf Tier <math>\neq</math> Menschen</li> <li>- Ethische Aspekt</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>+ zügige Versuchsdurchführung</li> <li>+ Kosten &amp; Ethik</li> <li>+ hohe reproduzierbare Versuchswiederholungen</li> <li>- Fehlenden <i>in vivo</i> Eigenschaften</li> <li>- Geringe Spendervariabilität</li> <li>- ggf. genetische Veränderungen</li> </ul>

### 1.3.3 Einfluss und Anforderungen einer 3D Umgebung

Eine Differenzierung von Zellen in einer bestimmten 3D Umgebung fördert nicht nur die Reifung der Zellen, sondern unterstützt auch den spezifischen Stoffwechsel [73,74]. Damit steigert die Kultivierung in 3D die Aussagekraft der gewonnenen Daten [75,76]. In Bezug auf den Knochen sind bei der Auswahl bzw. der Entwicklung einer 3D Matrix auf Eigenschaften zu achten wie Oberflächenbeschaffenheit, Steifigkeit, Permeabilität, Porosität und die Architektur, mit entsprechender Porenweiten, Porenform und Wandstärke. Neben den Eigenschaften der Matrix, die gegenüber den *in vivo* Eigenschaften vergleichbar sein sollten, ist zwingend auch die Anwendbarkeit *in vitro* in Bezug auf Biokompatibilität, Nährstoffversorgung, Adhärenz zu berücksichtigen, sowie eine gleichmäßige Zellaussaat, Probennahme und Verfügbarkeit geeigneter Messmethoden. Zu beachten ist auch, dass sich die o. g. Eigenschaften gegenseitig beeinflussen. Verändert sich beispielsweise die Porenweite bei gleichem Gesamtvolumen, so führt dies auch zu Veränderungen in der Permeabilität, Porosität und folglich auch in der Steifigkeit. Verändert sich die Nährstoffversorgung kann dies die Zellaussaat und die Zelldifferenzierung stören [1,63,64,77-81].

In den vergangenen Jahren hat es wesentliche Fortschritte in der Entwicklung von 3D Matrizes für verschiedene Arten von Gewebe und Organen gegeben [77-79]. Matrizes in Bezug auf den Knochen ähneln vorwiegend dem spongiösen Gewebe, da es hierbei um das stoffwechselaktivere Gewebe handelt [47]. Unterschiede zwischen den Matrizes zeigen sich durch eine unterschiedliche Zusammensetzung und unterschiedliche Herstellungsprozesse [82]. Matrizes, die in der Medizin als

Knochenersatzstoff Anwendung finden, basieren meist auf Kalziumphosphate wie Hydroxylapatit und gleichen Keramik. Diese Art der Scaffolds werden häufig über einen Sinterprozess hergestellt und zeichnen sich durch eine hohe Steifigkeit und sowie hohen Mineralgehalt aus. Diese Arten von Scaffolds werden vor dem Einsatz *in vivo* bzw. *in vitro* meist noch vorbehandelt. Dazu werden Scaffolds u. a. mit autologem Plasma oder Kollagen vorbehandelt, um die Adhärenz der Zellen und das Einwachsen in das natürliche Gewebe zu verbessern [83,84].

Eine Alternative hierzu bilden Scaffolds, die auf Kollagen und Gelatine bzw. mineralischen Emulsionen in Kombinationen mit Proteinen basieren und in der Forschung verwendet werden. Die so von Beginn enthaltenden Proteine erfordern meist keine Vorbehandlung der Scaffolds. Das Herstellungsverfahren ist i. d. R. eine Polymerisation [85]. Durch eine feinperlige Begasung bzw. Kryotechnik (Kältetechnik) oder chemischen Reaktionen mit Gasbildung während der Polymerisation, werden die Poren und damit die Porosität im Scaffold erreicht. Elektrosinning und Webtechniken mit z. B. Polyglucosamin-Fasern [86] sind weitere Verfahren zur Herstellung von Matrices/ Scaffolds. Entsprechend der Ausgangstoffe und der unterschiedlichen Herstellungsverfahren ist es somit möglich verschiedene Produkte herzustellen, die alle gemeinsam als Oberfläche dem Knochenstoffwechsel dienen sollen, jedoch deutliche Unterschiede aufweisen.

Aus den bisher entwickelten Modellen kann geschlossen werden, dass eine Reihe verschiedener Parameter erfüllt sein müssen, um die Voraussetzungen für die Entwicklung einer 3D Kultur zu ermöglichen. In Bezug auf das angestrebte 3D Co-Kultur Modell erweisen sich Cryogele als am geeignetsten. Unter anderem durch die Polymerisation mit Crosslinkern können unterschiedliche Proteine und Inhaltsstoffe integriert und eine Matrix entwickelt werden, die dem humanen spongiösem Gewebe ähnelt [1,79,82,87,88].

Bei Cryo-Gelen erfolgt die Polymerisation parallel zu einem Einfrierprozess. Beim Einfrieren bilden sich aus dem enthaltenen Wasser Eiskristalle, die die Räume der späteren Poren bilden. So entsteht eine poröse Gewebeform, die dem humanen spongiösen Gewebe ähnelt. Die Porengröße und Form, die die Architektur und Steifigkeit der Matrix beeinflussen, werden über die Inhaltsstoffe sowie der Gefrieretemperatur und der davon abhängigen Polymerisationskinetik bestimmt. Je schneller der Gefrierprozess und je niedriger die Temperaturen, desto kleiner sind die Eiskristalle und folglich die späteren Poren [88,89]. Eine Vielzahl von kleinen Poren führt

zu einer höheren Steifigkeit bei gleichzeitig geringerer Porosität und ggf. geringerer Permeabilität. Hingegen führen große Poren zu einer höheren Porosität mit höherer Permeabilität bei gleichzeitig geringerer Steifigkeit. Somit muss der Gefrierprozess an die Geschwindigkeit der Polymerisation und an die angestrebte Größe der Poren und der gewünschten Charakteristika der Matrix angepasst werden [88]. Als Grundlage für ein Cryogel eignet sich 2-Hydroxyethylmethacrylat (HEMA), das als Polymer (Poly(2-hydroxyethylmethacrylate) – pHEMA) in Gegenwart von Wasser Hydrogele bildet. In Kombination mit N,N'-Methylenbisacrylamid (BAA), als Vernetzter, gibt es bereits erste Erfahrungen und Anwendungen als *in vitro* Scaffold in der Zellkultur und im Bereich der Analytik und Medizintechnik [88,90]. Durch Verwendung von Ammoniumpersulfat (APS) und Tetramethylethyldiamin (TEMED) erfolgt die radikalische Polymerisation. Dabei fungiert APS als Radikalstarter und TEMED als Katalysator. Durch Zugabe des Quervernetzers Glutaraldehyd ist es möglich Proteine unterschiedlichster Art kovalent an die Oberfläche der Matrix zu binden, um z. B. mittels Plasmalysat, Kollagen I, oder RGD-Peptiden die Adhärenz der Zellen zu verbessern [1,91]. Die von HEMA, BAA, APS und TEMED bekannten gesundheitlichen Gefahren sind in polymerisierter Form nicht mehr gegeben [92,93].

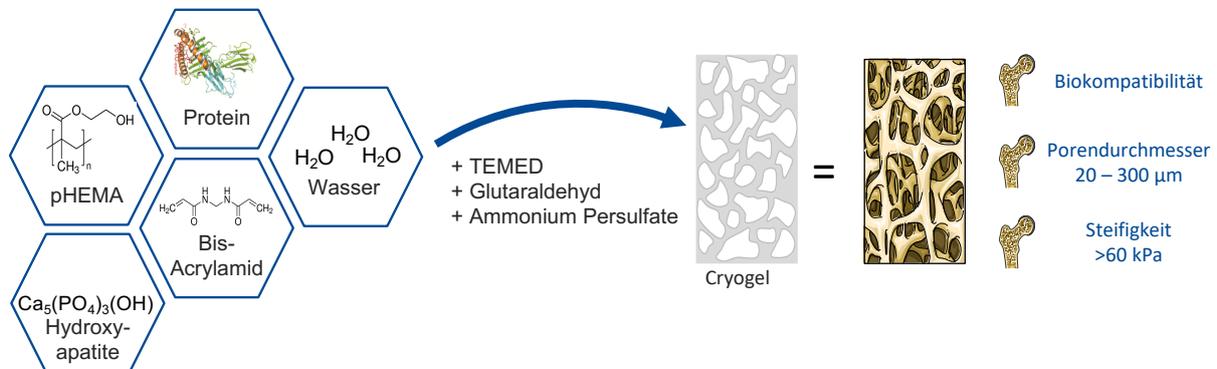


Abbildung 2. Cryo-Gele - Entwicklung einer knochenähnlichen Matrix.  
Verwendete Piktogramme entstammen dem Service von [smart.servier.com](http://smart.servier.com)

## 1.4 Zielsetzung der Arbeit

Für die Erforschung von Krankheiten und Stoffwechselstörungen, die sich auf den Knochenstoffwechsel auswirken, sowie der Erprobung neuer Therapieansätzen werden meist *in vivo* & *ex vivo* Tiermodelle verwendet. Ein entscheidender Grund dafür ist, dass bisher keine *in vitro* Modelle zur Verfügung stehen, die die gewünschten Voraussetzungen erfüllen.

Daher ist es das Ziel dieser Arbeit, ein *in vitro* Modell zu entwickeln, das den Stoffwechsel des humanen Knochens größtenteils widerspiegelt, es ermöglicht den

Einfluss durch Umwelteinflüsse, Krankheiten und Medikamente auf den Knochenstoffwechsel zu erforschen, sowie eine Alternative zu Tierversuchen bietet und somit den Bedarf an Tiermodellen reduziert. Neben den knochenaufbauenden bzw. knochenabbauenden Stoffwechselfvorgängen durch Osteoblasten und Osteoklasten soll auch die Zell-Zell-Interaktion gewährleistet werden, sodass auf die Zugabe von Botenstoffen wie Zytokinen verzichtet werden kann. Um die *in vitro* Bedingungen den *in vivo* Gegebenheiten weiter anzugleichen, soll der Einfluss einer 3D Matrix geprüft werden.

Für die Entwicklung und Herstellung einer 3D Matrix bieten Cryo-Gele eine Reihe von Vorteilen, weshalb angestrebt wird diese Technik zu verwenden. Dabei ist das Ziel, dass die Matrix einerseits dem spongiösen Gewebe ähnelt und biokompatibel ist sowie eine Angleichung des *in vitro* Modells an den *in vivo* Stoffwechsel unterstützt.

Zu Beginn der Arbeit erfolgt einerseits die Entwicklung einer geeigneten 3D Matrix sowie parallel die Auswahl möglicher Zellen für ein Co-Kultur Modell. Entsprechend der Wahl an geeigneten Zellen erfolgt eine Optimierung der Kultivierungsbedingungen und Messmethoden für in 2D sowie die stetige Weiterentwicklung der 3D Matrix.

Für eine erste Evaluierung des Modells wird Einfluss von Bisphosphonaten getestet und die angestrebte Zell-Zell-Interaktion überprüft. Zur Evaluation inwieweit das Modell Krankheiten bzw. die Auswirkungen von humanen Stoffwechselstörungen auf den Knochenstoffwechsel widerspiegelt, soll das Modell unter diabetischen Bedingungen, mit Fokus auf Diabetes Mellitus Typ II, getestet werden. Der Grund für DM Typ II ist die stetig wachsende Prävalenz und den damit steigenden Folgen für die Unfallchirurgie. In einem vorangestellten Versuch wird zunächst der Einfluss von Metformin auf das Co-Kultur Modell überprüft, da ebenfalls die Bedingung eines therapierten DM Typ II Patienten getestet werden soll.

Für die Untersuchung des Einflusses der diabetischen Bedingungen soll das Co-Kultur Modell auf die entwickelte 3D Matrix transferiert werden, um die *in vitro* Gegebenheiten den *in vivo* Bedingungen näher anzugleichen. Für eine Beurteilung der Auswirkungen durch die 3D Matrix ist es das Ziel diesen Versuch parallel in 2D wie auch in 3D durchzuführen. Ein weiteres Ziel meiner Arbeit ist es soweit wie möglich tierische Produkte für die Versuchsdurchführung zu meiden, um nicht nur die Anzahl der Tierversuche selbst, aber auch die Zahl der Tiere, die zur Materialgewinnung (z.B. FCS, Kollagen, etc.) für *in vitro* Versuche benötigt werden, zu reduzieren.

## 2. Material & Methoden

### 2.1 Material

Nachfolgend sind alle Materialien, Geräte, Chemikalien, Enzyme usw. aufgelistet, die bei dieser Arbeit verwendet wurden. Spezielle Geräte oder Chemikalien, die ausschließlich bei besonderen Methoden benötigt wurden, sind in Kapitel 3 jeweils im entsprechenden Abschnitt genannt. Chemikalien und weitere Bestandteile eines Kits sind nicht aufgezählt.

#### 2.1.1 Chemikalien

• Ammoniumperoxodisulfat	Carl Roth	//:9592.2
• Alizarin Rot S	Carl Roth	//:0348.2
• L-Ascorbinsäure-2-Phosphat	Merck	//:A8960-5G
• L-Agarose	Genaxxon	//:M3044.1000
• Bis-Acrylamid-Lösung 2 %	Carl Roth	//:3039.1
• Bis-Benzimide H 33342 trihydrochloride	Merck	//:14533-100MG
• Borsäure (99,8 %)	Carl Roth	//:6943.1
• Bovine Serum Albumin	Carl Roth	//:8076.4
• Bromphenolblau	Carl Roth	//:A512.1
• Calcein -acetoxymethylester	Merck	//:17783
• Calcein blue acetoxymethylester	ATT Bioquest	//:168482-84-6
• Calciumchlorid	AppliChem	//:A1428
• Cetylpyridiumchlorid monohydrate	Carl Roth	//:CN27.1
• Cholecalciferol	Merck	//:95230
• CuSO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O	Carl Roth	//:P024.1
• Diethylpyrocarbonat	Carls Roth	//:K028.3
• Dimethylsulfoxid	Carl Roth	//:4720.2
• Dulbecco´s phosphate buffered saline	Sigma	//:D8537
• Ethylendiamintetraacetat	Carl Roth	//:8043.2
• Essigsäure 100 %	VWR Prolab	//:20104.298
• Ethanol vergilbt	SAV-Liquid	//:ETO-5000-99-1
• Ethanol >99,5 %rein	Applichem	//:A1613
• Ethidiumbromidlösung, 1 % in H <sub>2</sub> O	Carls Roth	//:2218.1
• Fötale-Kälberserum-Albumin	GIBCO	//:10270-106

• D-(+)-Glucose	Sigma	//:G7021
• Glutaraldehyd (25 %)	Carl Roth	//:3778.1
• G418	Invitrogen	/:108321-42-2
• $\beta$ -Glycerolphosphat	Merck	//:G9422-10
• Glycine	Carl Roth	//:3908.2
• Hydroxylapatit	Sigma Aldrich	//:21223
• HyperLadder II	Bioline	//:BIO-33054
• ddH <sub>2</sub> O	Carl Roth	//:3175.1
• HEPES	Carl Roth	//:HN78.2
• Humanes Insulin	Novo Nordisk	//:Actrapid FlexP
• Isopropanol	VWR Prolab	//:20842.330
• Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Carl Roth	//:KK36.2
• Natriumacetat	Carl Roth	//:X891.2
• Natriumtartrat Dihydrat	Carl Roth	//:0254.1
• Natriumlaurylsulfat (SDS)	Carl Roth	//:CN30.2
• Natronlauge 2 M	Carl Roth	//:T135.1
• Na-K-Tatrate	Sigma	//:S2377
• NEB Buffer 3.1 (10x)	N. E. Biolabs	//:B7203S
• 4-Nitrophenol Lösung 10 mM (pNP)	Merck	//:N7660
• para-Nitrophenyl Phosphat diNatrium Hexahydrat	Carl Roth	//:4165.1
• Nuclear Red™ LCS 1	ATT Bioquest	//:ABD-17542
• PCR-Mastermix Biozym Red HS	Biozym	//:331126XL
• Penicillin/Streptomycin	Sigma	//:P0781
• pHEMA 97 %	Sigma	//:128635
• Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	Merck	//:16561-29-8
• Resazurin Natriumsalz	Merck	//:199303-1G
• Salzsäure 2 M	Carl Roth	//:T134.1
• Sulforhodamin B Mononatriumsalz	Sigma	//:1402-1G
• Tetramethylethylenediamin (99 %)	Carl Roth	//:2367.3
• Tris Base	Sigma	//:T1503-1KG
• Trypanblau (0,05 %)	Carl Roth	//:CN76.1
• TRIS hydrochloride	Sigma	//:RES3098T

## 2.1.2 Material und Verbrauchsgüter

- Parafilm Merck //:P7793-1EA
- Pipettenspitzen 0,1 – 10 µl Starlab //:S-1111-3000-B
- Pipettenspitzen 2 – 200 µl Starlab //:S-1113-1006-C
- Pipettenspitzen 100 – 1000 µl Starlab //:S-1111-6001-C
- Reaktionsgefäße 1,5 ml Carl Roth //:4182.1
- Serumpipetten 5 ml Corning //:20612013
- Serumpipetten 10 ml Corning //:21512025
- Serumpipetten 25 ml Corning //:17712012
- Serumpipetten 50 ml Croning //:4501
- 15 ml Zentrifugenröhrchen Greiner Bio-One //:188271
- 50 ml Zentrifugenröhrchen Greiner Bio-One //:227261
- Monovette 9ml K3E 1,6 mg EDTA/ml Sarsted //:02.1066.001
- MILLEX GP 0,22 µm Merck Millipore //:SLGP033RS  
Fast Flow & Low binding Millipore

### T-Flask

- T25 CELLSTAR Greiner Bio-One //:690175  
Cell Culture Flasks, 25 cm<sup>2</sup>, 50 ml PS, red filter cap, sterile
- T75 CELLSTAR Greiner Bio-One //:658940  
Cell Culture Flasks, 25 cm<sup>2</sup>, 250 ml PS, red filter cap, sterile
- T175 CELLSTAR Greiner Bio-One //:660175  
Cell Culture Flasks, 175 cm<sup>2</sup>, 550 ml PS, red filter cap, sterile

### Platten

- 24 Well Zellkulturplatten Greiner Bio-One //:662160
- 48 Well Zellkulturp., F-Botten, Suspension Greiner Bio-One //:677102
- 96 Well Zellkulturplatten, F-Botten, PS Greiner Bio-One //: 655180

### Sterilspritzen

- 2 ml Injekt B Braun, Melsungen
- 10 ml Injekt B Braun, Melsungen
- 20 ml Injekt B Braun, Melsungen
- 50 ml Injectomat Fresenius Kabi, Bad Homburg

### Fertiglösungen für PCR

- GreenMasterMix (2x) High ROX™ (500nM) Genaxxon //:M3052
- pUC 19 ready to use Lademarker Carl Roth //:X901.1
- Biozym Red HS Mastermix Biozym //: 331126XL

### Kits

- First Strand cDNA Synthesis Kit ThermoScientific //:K1612
- FuGene®HD Transfection Reagenz Promega //:E231A
- ViaFect™ Transfection Reagenz Promega //:E498A
- GenaxxonFect-plus Genaxxon //:M3055.0002
- Lipofectamin™ 2000 ThermoFisher //:11668027
- Lipofectamin™ 3000 ThermoFisher //:L3000001
- Viromer® red Lipocallyx //:VR-01LB-00
- Viromer® yellow Lipocallyx //:VY-01LB-00

### Medien

- RPMI1640 Sigma //:R8758
- Opti-MEM-Medium Thermo //:31985070
- Kulturmedium  
RPMI 1640  
5 % FCS
- Differenzierungsmedium  
RPMI 1640  
2 % FCS  
200 µM L-Ascorbinsäure 2-Phosphat  
5 mM β-Glycerolphosphat  
25 mM HEPES  
1,5 mM Calciumchlorid  
20 ng/ml Cholecaliferol

### **2.1.3 Geräte**

- Multimode Microplate Reader FLUOstra Omega BMG Labtech
- LVis-Platte BMG Labtech
- SE Vortex Mixer Corning
- Glukometer Accu-Check Performa Roche//:05894972190

- UV-Kammer  
Dokumentationssystem P93DW

Intas Science Imaging  
Instruments

#### Elektrophorese

- PowerPac™ HC High-Current Power Supply
- PowerPac™ 200 Power Supply

Bio RAD, München  
Bio RAD, München

#### Feinpipetten

- 0,1-2,5 µl Research Pipette Lambda plus
- 0,5-10 µl Research Pipette Lambda plus
- 10-100 µl Research Pipette Lambda plus
- 50-200 µl Research Pipette Lambda plus
- 100-1000 µl Research Pipette Lambda plus

Corning, New York  
Corning, New York  
Corning, New York  
Corning, New York  
Corning, New York

#### Inkubator

- CO<sub>2</sub>-Inkubator C 150 9040-0078

Binder, Tuttlingen

#### Kühlagermöglichkeiten

- +4 °C/-20 °C Liebherr Comfort
- -80 °C Forma 900 Series
- -80 °C TSX60086V TSX-Series

Liebherr, Bulle - Medline  
Thermo Scientific, Waltham  
Thermo Scientific, Waltham

#### Sterilarbeitsbank

- Safe 2020, Class II, EN 12469

Thermo Scientific, Waltham

#### Mikroskope

- Primo Vert, 12V DC, 30W
- EVOS fl 91-AF-4301

Carl Zeiss Microscopy,  
Oberkoch  
Advanced Microscopy Group,  
Carlsbad

#### PCR Cycler

- Arktik Thermal Cycler
- Veriti 96 Well Thermal Cycler
- qPCR StepOnePlus

Thermo Scientific, Waltham  
Applied Biosystems, Carlsbad  
Applied Biosystems, Carlsbad

#### Schwenktisch

- Shaker DRS-12, Sky Line
- Rollmischer i Roll RnR 10
- Thermoshaker TS-100
- Wippschüttler DRS 12

Elmi, Lativa  
Neuation Technologies  
Peqlab Biosysteme  
LTF Labortechnik

## Waagen

- Feinwaage: Kern ABJ 120-4M Kern & Sohn, Balingen D
- Laborwaage: Kern PCB 250-3 Kern & Sohn, Balingen D

## Wasserbad

- AQUAline AL 25 Lauda, Lauda Königshofen

## Zentrifugen

- Heraeus Megafuge 40R Thermo Scientific, Waltham USA
- Heraeus Fresco 17 Thermo Scientific, Waltham USA
- Plate Fuge Benchmark, Sayreville USA

## **2.1.4 Enzyme und Primer**

### Enzyme

- Restriktionsenzym Sall New England Biolabs //:R0138T
- Restriktionsenzym NcoI New England Biolabs //:R0193S
- Restriktionsenzym XhoI New England Biolabs //:ER0691
- Restriktionsenzyme EcoRI New England Biolabs //:IVGN0116
- Trypsin/EDTA Sigma //:T3924

### Primer

- hGapdH TA: 56 °C Produktgröße: 420 bp  
F: GTC AGT GGT GGA CCT GAC CT  
R: AGG GGT CTA CAT GGC AAC TG
- hALP TA: 53 °C Produktgröße: 476 bp  
F: ACGTGGCTAAGAATGT CATC  
R: CTGGTAGGCGATGTCC TTA
- hColl TA: 56 °C Produktgröße: 84 bp  
F: CAGCCGCTTCACCTAC AGC  
R: TTTTGTATTCAATCACT GTCTTGCC
- hOPN TA: 60 °C Produktgröße: 257 bp  
F: CTCCATTGACTCGAAC GACTC  
R: CGTCTGTAGCATCAGG G TACTG
- hOsterix TA: 62 °C Produktgröße: 175 bp  
F: CCCAGGCAACACTCCT ACTC  
R: GGCTGGATTAAGGGGA GCAAA
- hSOST TA: 62 °C Produktgröße: 268 bp

- F: CAGCTGCCGCGAGCT GCACT  
R: GCACTTGCACGAGGCC ACCA
- hFib TA: 60 °C Produktgröße: 203 bp  
F: CCCCATTCAGGACAC TTCTG  
R: GCCCACGGTAACAACC TCTT
  - hDCN TA: 63 °C Produktgröße: 326 bp  
F: CCAGTGTGCCCTTCC GCTG  
R: GCGGTGTTGGCCAGA GAGCC
  - hOC TA: 65 °C Produktgröße: 236 bp  
F: CCAGCGGTGCAGAGT CCAGC  
R: GACACCCTAGACCGGG CCGT
  - hVCan TA: 64 °C Produktgröße: 306 bp  
F: AATGCCGTCTGCAGGG TGCC  
R: GGCCGCAAGCGACTGT TCCT
  - hUGT1A6 TA: 60 °C Produktgröße: 209 bp  
F: TGGTGCCTGAAGTTAATTTGCT  
R: GCTCTGGCAGTTGATGAAGTA
  - hSRY TA: 60 °C Produktgröße: 137 bp  
F: TGGCGATTAAGTCAAATTCGC  
R: CCCCTAGTACCCTGACAATGTATT

### 2.1.5 Puffer & Lösungen

Sofern nicht weiter erwähnt, wurden alle Lösungen mit ddH<sub>2</sub>O Wasser hergestellt und anschließend mit 0,22 µm Filtern filtert. Die Volumenangabe hinter dem Puffernamen bezeichnet das Endvolumen.

<u>Name</u>	<u>Inhaltstoffe</u>	<u>Herstellung</u>
1 M TRIS Puffer (pH = 8,0)	12,1 g TRIS c <sub>final</sub> : 1 M	Auf 60 ml mit ddH <sub>2</sub> O aufgefüllt, pH auf 8,0 mit NaOH eingestellt, anschließend auf 100 ml aufgefüllt mit ddH <sub>2</sub> O. Lagerung bei RT °C
DEPC H <sub>2</sub> O	1 ml DEPC	Auf 1 L mit ddH <sub>2</sub> O aufgefüllt, anschließend autoklaviert. Lagerung bei RT °C

## 2.2 Methoden zur Herstellung & Charakterisierung einer 3D Matrix

### 2.2.1 Herstellung Scaffolds

Scaffolds wurden mit der sogenannten Cryogel-Technik hergestellt. Bei dieser Technik polymerisieren Monomere bei Temperaturen unter dem Gefrierpunkt. Durch das in der Lösung enthaltene Wasser entstehen Eiskristalle, die Hohlräume in der polymerisierten Matrix bilden. Die Größe und Form der Hohlräume ist abhängig von der Kinetik der Polymerisation, der Gefriertemperatur und Gefriereschwindigkeit [88,90,94].

Für die Herstellung eines PRPexK-Scaffolds wurden in einem ersten Schritt 16 % pHEMA, 0,3 % Bisacrylamid, 24,4 % ddH<sub>2</sub>O und 0,25 g/l Plasmalysat gemischt und auf Eis auf 1-2 °C heruntergekühlt. Es folgte die Zugabe von 0,3 M di-Natriumhydrogenphosphat, 0,2 % Ammoniumperoxodisulfat, 0,2 % Tetramethylethyldiamin und 0,1 % Glutaraldehyd in exakter Reihenfolge und ohne zeitliche Verzögerungen. Anschließend folgt eine Vermischung aller Bestandteile durch vortexen. 2 ml der Lösung wurden anschließend zügig in je 2,5 ml in Gussform gefüllt und für mindestens 17 h bei -18 °C gelagert. Die verwendete Gussform aus pyrogenem Styrol besitzt bei einer Wandstärke von 1 mm einen Innendurchmesser von 6 mm. Um eine konstante Qualität zu gewährleisten wurden lediglich 8 ml der Lösung je Gussdurchlauf angesetzt.

Zum Schneiden der Scaffolds in 3 mm dicke Schnitte wurden diese zunächst über eine Stunde auf -80 °C herunter gekühlt, um eine entsprechende Rigidität zu erhalten, die ein Schneiden der Matrix ermöglicht. Die jeweiligen Endstücke wurden verworfen. Die Schnitte wurden umgehend in einer 1 M CaCl<sub>2</sub> Lösung über 24 h inkubiert. Dabei reagiert das im Scaffold enthaltene Phosphat mit dem in der Lösung enthaltene Kalzium zu Hydroxylapatit [1].

Verbleibendes CaCl<sub>2</sub> und ungebundene Kristalle wurden mit einmaligem Waschen mittels PBS entfernt. Zur Sterilisation der Schnitte wurden diese zunächst in ein Tuch gebettet. Durch Zentrifugieren bei 600 rpm über 10 min bei RT wurde das verbleibende PBS abgetrennt. Mittels 70 % reinem Ethanol (nicht-vergilteter) erfolgte, unter Bewegung auf einem Rotierer, die Sterilisation für min. 12 h bei RT. Beim Ansetzen der 70 % Ethanol-Lösung ist das Volumen der Summe aller Scaffolds als Wasseranteil definiert worden, da die Scaffolds selbst weiter Wasser enthalten und anderenfalls es zu einer Verdünnung von unter 70 % kommen würde [4,79].

### **2.2.2 Herstellung humanes Plasmalysat**

Für die Herstellung von humanem Plasma Lysat (PRP) wurden EDTA Blutproben (Monovette 9 ml K3E 1,6 mg EDTA/ml Sarstedt: 02.1066.001) bei 1000 g für 10 min bei +4 °C zentrifugiert, um Erythrozyten und Leukozyten vom Plasma zu trennen. Das Plasma, inkl. der in der weißen Trennschicht enthaltenen Thrombozyten, wurde steril abgenommen und zur Lyse bei -80 °C eingefroren, welche durch wiederholte Auftau-Einfrier-Schritte erfolgte. Das verwendete Plasmalysat bestand aus einem Gemisch fünf unterschiedlicher Plasmaspender [95,96].

### **2.2.3 Porenstruktur**

Die Struktur und Größe einer Pore im Scaffold wurde durch fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen bestimmt. Hierzu wurden die Scaffolds für 30 min bei RT, lichtgeschützt auf einem Horizontalschüttler mit 0,08 % Sulforhodamin-B (SRB) (gelöst in 1 % Essigsäure) bedeckt. Dabei wurden alle enthaltenen organischen Komponenten durch SRB angefärbt. Die SRB-Lösung wurde entfernt und ungebundenes SRB mit 1 % Essigsäure ausgewaschen. Somit ist im Wellenbereich von AFP (Ex 531/40; EM 593/40) das gebundene rot fluoreszierende SRB die Matrix im Detail sichtbar gemacht worden. Dazu wurde ein Fluoreszenzmikroskop (Evos FI, Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Deutschland), mit der Möglichkeit der Fotografie verwendet. Unter Zuhilfenahme der „open source“ Software ImageJ (NIH, Bethesda, USA) und der Option „polygon selction“ sind die Form und der Durchmesser einer Pore manuell bestimmt worden. Hierfür wurden 10 repräsentative Poren von jeder Aufnahme ausgemessen. Aus jedem Durchlauf wurden drei Scaffolds angefärbt und jeweils drei mikroskopischen Aufnahmen für die Auswertung angefertigt [1,87,97].

### **2.2.4 Rasterelektronenmikroskopie**

Die Oberflächeneigenschaften der Scaffolds wurde mittels Rasterelektronenmikroskopie (Zeiss DSM 962, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) untersucht. Dazu wurden die Scaffolds zunächst gefriergetrocknet und anschließend in Fragmente geschnitten. Fixiert auf Aluminiumstümpfen, mit doppelseitig Kohlenstoffklebeband, wurden die Proben vor der Untersuchung in einem „sputter-coating“-Verfahren (t = 3 min, 16 mA) mit Gold beschichtet [1].

### 2.2.5 Porosität und Schwellrate

Mittels des Feucht- und Trockengewichts kann auf Basis der von Shimizu *et al.* 2005 entwickelten Formel und einer spezifischen Anpassung die Porosität und die Schwellrate der Scaffolds bestimmt werden [78,98]. Das Trocken- und Feuchtgewicht wurde mit einer Analysenwaage bestimmt. Zur Bestimmung des Feuchtgewichts wurden die Scaffolds zunächst über eine Stunde mit Wasser bei RT inkubiert.

$$\text{Porosität [\%]} = \frac{(\text{Feuchtgewicht [g]} - \text{Trockengewicht [g]})}{\text{Feuchtgewicht [g]}} * 100$$

$$\text{Schwellrate [1]} = \frac{(\text{Feuchtgewicht [g]} - \text{Trockengewicht [g]})}{\text{Trockengewicht [g]}}$$

### 2.2.6 Permeabilität

Die Permeabilität der Scaffolds wurde mithilfe eines spezifischen Versuchsaufbaus errechnet. Dazu wurde das Scaffold passgenau am Ende eines Zylinders fixiert und eine konstante hydrostatische Wassersäule über der Matrix angelegt. Die Masse an Wasser, die pro Minute durch das Scaffold drang, wurde anschließend gesammelt. Mittels *Darcy's law* konnte nun die Permeabilität berechnet werden.

$$\text{Permeabilität [cm}^2\text{]} = \frac{\eta_{H_2O} * \frac{V_{H_2O}^\beta}{s}}{A_{Scaffold} * \Delta p} \cdot H_{Scaffold}$$

Die Permeabilität [cm<sup>2</sup>] ergibt sich aus dem Verhältnis der durchgeflossenen Wassermenge zu den Abmessungen des Scaffolds und der anliegenden Druckdifferenz. Dabei entspricht  $\eta_{H_2O}$  der Viskosität von Wasser [Pa \* s], die bei Raumtemperatur mit  $9,5 \cdot 10^{-4}$  Pa\*s angenommen wird.  $V_{H_2O}^\beta$  entspricht der Menge [g] an Wasser, die durch die Matrix geflossen ist,  $s$  [s] der Zeit,  $A$  der Fläche der Probe,  $H$  der Höhe der Probe und  $\Delta p$  [Pa] der Druckdifferenz.

Die Druckdifferenz selbst errechnet sich aus der Dichte  $d$  [g/cm<sup>3</sup>] von Wasser, dem Volumen  $V_{Scaffold}$  [cm<sup>3</sup>] der Matrix und der spezifischen Erdbeschleunigung  $a$  [m/s<sup>2</sup>].

$$\Delta P = \frac{d * V_{Scaffold}}{a}$$

Dabei wird bei Raumtemperatur eine spezifische Dichte von Wasser mit  $0,997 \text{ g/cm}^3$  und die spezifische Erdanziehungskraft mit  $9,81 \text{ m/s}^2$  angenommen. Pro Durchgang mit je drei Wiederholungen wurde die Masse in 5 min Intervallen bestimmt und umgerechnet [78,99].

### 2.2.7 Grad der Mineralisierung der 3D Matrix

Zur Bestimmung der Zu- bzw. Abnahme der Mineralisierung im Scaffold wurden Proben mittels Quantitativer-Computertomografie (CT) gescannt. Hierfür ist ein klinischer *high-end 128-slice* Computertomograf (Somatom Definition Edge, Siemens Healthineers, Erlangen, Deutschland) verwendet. Die Bildgebung ist mittels einer Röhrenspannung von 80 kV und einem festen effektiven Röhrenstrom von 500 mAs durchgeführt worden. Die Primärakquisition wurde mit  $16 \times 0,3 \text{ mm}$  und einem Pitch von 0,4 bei einer Rotationszeit von 1,0 s durchgeführt, die rekonstruierte Schichtdicke betrug 0,4 mm. In einem quadratischen Sichtfeld von 50 mm und einer Auflösung von  $512 \times 512$  Pixeln wurden die Bilder rekonstruiert. Die Bildrekonstruktion erfolgte unter Verwendung einer sinogrammbestätigten iterativen Rekonstruktion (SAFIRE, Siemens Healthineers, Erlangen, Deutschland) auf Stufe 5 mit einem scharfen kantenverstärkenden Rekonstruktionskern (v80U); die Bilder wurden im Knochenfenster angezeigt. Die erhaltenen Daten, (Format: DICOM) wurden mit dem „open source“ Programm *ImageJ*, und dem Tool *DICOM sort* analysiert. Dabei wurde über einen definierten Block das Niveau des Grautons gemessen und mit einem Referenzblock verglichen (Phantom EFP-06-96). Dies ermöglicht die Bestimmung der Mineralisierung der Matrix [4].

### 2.2.8 Steifigkeit der 3D Matrix

Durch Bestimmung des E-Moduls wurde die spezifische Steifigkeit unabhängig der Probengröße festgestellt. Mithilfe einer ZwickLine Z 25TN (ZwickRoell GmbH & Co. KG, Ulm, Deutschland) wurden die Scaffolds in vier hintereinander folgenden Messungen um 10 % ihrer Höhe komprimiert und die dazugehörige Kraft-Weg-Strecke mittels einer Xforce HP 5 N Messdose von ZwickRoell aufgezeichnet. Die Messungen wurden nach Erreichen einer Vorkraft von 0,1 N mit einer Geschwindigkeit von 5 mm/min gefahren. Die erhaltene Kraft-Deformations-Kurve wurde in ein Spannungs-

Dehnungs-Diagramm übersetzt. Im linearen Bereich der elastischen Deformation ist mit der nachfolgenden Formel das E-Modul [MPa] berechnet worden [78,100].

$$E - Modul = \frac{F * H}{A * \Delta H}$$

Dabei entspricht  $F$  der angelegten Kraft [N],  $H$  der Höhe [mm] der Probe und  $A$  der Fläche [mm<sup>2</sup>] die im Kontakt mit dem Geräteaufbau steht.

### **2.2.9 Wasserkapazität**

Über die Differenz des Feucht- und Trockengewichtes wurde die Wasserkapazität eines jeden Scaffolds bestimmt. Dazu wurden die Scaffolds bei RT für 1 h in PBS eingelegt und anschließend das Feuchtgewicht mittels Analysewaage bestimmt. Um eine Übersättigung der Probe zu vermeiden, wurde überschüssige Lösung abgestreift. Das Trockengewicht wurde nach dem Trocknen der Probe im Exsikkator bestimmt [78].

## **2.3 Zellkultur**

### **2.3.1 Zelllinien**

Bei THP-1 Zellen (DSMZ), die im Modell zu Osteoklasten differenziert werden, handelt es sich um monozytäre Suspensionszellen. Diese wurden von einem 1-jährigem männlichen Kind, das an akuter Monozytenleukämie litt, isoliert [101]. Zur Expansion wurden die Zellen in RPMI 1640 Medium mit 5 % FCS bei +37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und in gesättigter Luftfeuchtigkeit in Kultur gehalten [68].

Bei den als Osteoblasten verwendeten Zellen handelt es sich um SaOS-2 Zellen (DSMZ). Diese Osteosarkom-Zellen stammen von einem 11-jährigen Mädchen [102]. Zur Expansion wurden die Zellen in RPMI 1640 Medium mit 5 % FCS, bei +37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und gesättigter Luftfeuchtigkeit kultiviert [68].

### **2.3.2 Zellzählung**

Mittels einer Neubauerzählkammer (Hämozytometer) wurde die Zellzahl je Volumeneinheit bestimmt. Die Zählkammer enthält vier Großquadrate mit einer Fläche von je 1 mm<sup>2</sup> und einem Abstand von 0,1 mm zwischen Objektträger und Deckgläschen. Daraus resultiert ein definiertes Volumen jedes Großquadrates von 0,1 µl (1\*10<sup>4</sup> ml).

Durch Verdünnung der Probe mit einer 125 % Trypanblau-Lösung (Trypan Blau in DPBS ohne Ca & Mg) konnten tote bzw. verletzte Zellen angefärbt werden und so von den zu zählenden, vitalen Zellen unterschieden werden. Je Großquadrat wurden Zellen, die auf zwei Randlinien lagen, mitgezählt. Der Mittelwert der vier Großquartrate multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor und dem Kammervolumen ergibt die Zelldichte je ml. Diese wurden anschließend mit dem Gesamtvolumen multipliziert und somit die Gesamtzellzahl bestimmt. Je nach gezählter Zellart erhält man die Gesamtzellzahl bzw. Lebendzellzahl.

Die Vitalität errechnete sich aus Lebendzellzahl dividiert durch Gesamtzellzahl, multipliziert mit 100.

$$\text{Lebendzellzahl} = n * D_f * V * 10^4$$

$$\text{Gesamtzellzahl} = m * D_f * V * 10^4$$

$$\text{Viabilität[\%]} = \frac{m}{n} * 100$$

n: Mittelwert Lebendzellzahl

m: Mittelwert Gesamtzellzahl

D<sub>f</sub>: Verdünnungsfaktor

V: Volumen Zellsuspension

10<sup>4</sup>: Hemozytometerfaktor

### 2.3.3 Zellaussaat

Die THP-1 Zellen wurden in einem ersten Schritt bei 600 rpm 10 min bei RT zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Zellpellet wurde anschließend für einen Waschschrift in PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert. Anschließend wurde dieses in einem geringen Volumen an RPMI 1640 Medium mit 5 % FCS resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Die entsprechende Gesamtzellzahl wurde mit weiterem Wachstumsmedium auf die entsprechende Konzentration verdünnt. Kurz vor der Aussaat erfolgte die Zugabe von Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) auf 200 nM.

Von den adhärennten SaOS-2 Zellen wurde in einem ersten Schritt der Überstand abgenommen und die Zellen in der Kulturflasche für 5 min mit PBS gewaschen. Mittels 0,5 g/L Trypsin & 0,2 g/L EDTA-4Na erfolgte die Ablösung der Zellen von der Zellkulturflasche. Dazu wurden die Zellen bei +37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> für 5 – 10 min inkubiert. Der enzymatische Prozess wurde durch Zugabe von Wachstumsmedium gestoppt und die Zellen mittels Zentrifugation und PBS einmal gewaschen. Das Zellpellet wurde nach dem Waschen in geringem Volumen resuspendiert und die

Zellzahl bestimmt. Entsprechend der nachfolgenden Versuche wurden die Zellen weiter mit Wachstumsmedium auf die entsprechende Konzentration verdünnt. Wurden die Zellen weiter mit Differenzierungsmedium verwendet, wurden diese zunächst erneut zentrifugiert und anschließend in Differenzierungsmedium resuspendiert [68]. Bei der 2D Kultivierung der Co-Kultur in 96-Well sind  $10^4$  SaOS-2 und  $2 \times 10^4$  THP-1 Zellen in 100  $\mu$ l/Well ausgesät worden. In den jeweiligen Mono-Kulturen wurden die gleichen Zellzahlen wie in der Co-Kultur ausgesät. Für die Kultivierung der THP-1 Mono-Kultur wurde ein Gemisch aus frischem Differenzierungsmedium und konditioniertem Medium von SaOS-2 Zellen verwendet. Beide Medien wurden in einem Verhältnis von 1:1 gemischt, dabei enthielten beide Medien die entsprechenden Inhaltsstoffe gemäß der zu untersuchenden Bedingung.

Zur Herstellung des konditionierten Mediums wurden  $10^4$  SaOS-2 Zellen in 2D 96- Wells ausgesät und unter den gleichen Bedingungen wie die THP-1 Zellen in Mono-Kultur differenziert. Die Differenzierung der SaOS-2 Zellen für konditioniertes Medium wurde zwei Tage im Voraus begonnen und parallel zum Versuch fortgesetzt, sodass das konditionierte Medium auch die Inhaltsstoffe in entsprechender Konzentration enthielt. Die für die Herstellung verwendeten SaOS-2 Zellen wurden unter den gleichen Bedingungen kultiviert wie die THP-1 später kultiviert wurden. Dies entspricht dem Niveau der differenzierten SaOS-2 Zellen, die theoretisch parallel zu den THP-1 Zellen ebenfalls in Mono-Kultur kultiviert werden (siehe Abbildung 3).

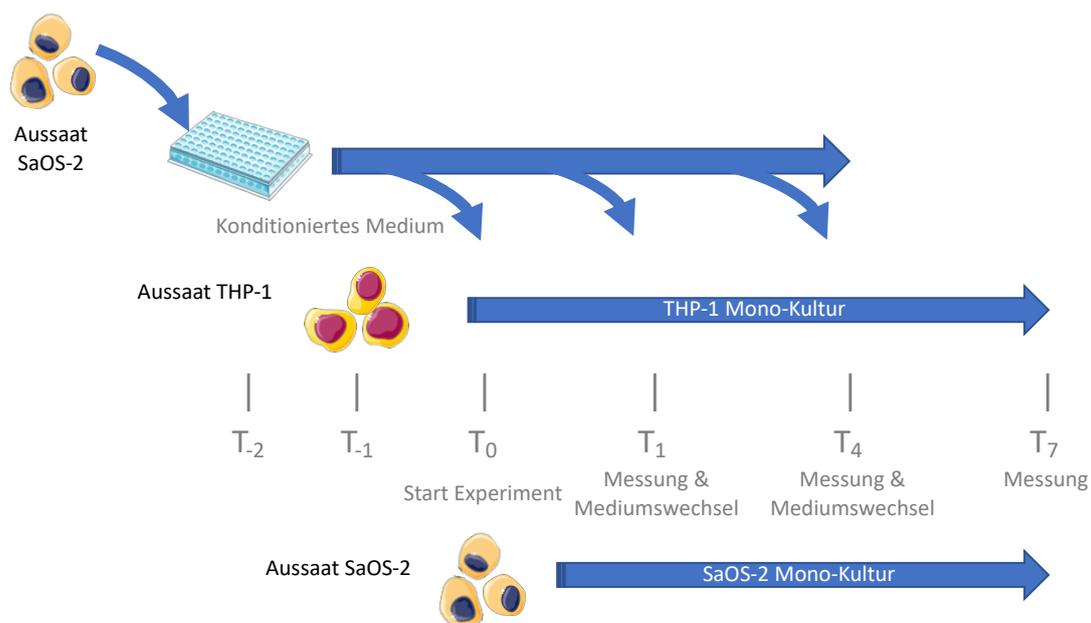


Abbildung 3. Schema zur Verwendung von SaOS-2 Konditioniertem Medium in THP-1 Mono-Kultur. Verwendete Piktogramme entstammen dem Service von [smart.servier.com](http://smart.servier.com)

Für die Kultivierung in 3D wurden  $12 \times 10^4$  THP-1 Zellen und  $6 \times 10^4$  SaOS-2 Zellen ausgesät. Zur Aussaat der Zellen in 3D folgte in einem ersten Schritt die Inkubation

der Scaffolds in 48 Well-Platten mit Wachstumsmedium für 3 Tage bei +37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Inkubator. Vor der Aussaat wurde das Medium im Well abgenommen sowie durch leichtes Drücken des Scaffolds gegen die Well-Wand und gleichzeitiges Saugen das verbleibende Medium aus dem Scaffold abgesaugt. Das sich schwammartig verhaltende Scaffold wurde mittig im Well platziert, so dass kein Kontakt zur Well-Wand bestand. Dies verhindert ein unkontrolliertes Herunterfließen der Zellsuspension bei der Aussaat, durch das anderenfalls die Gefahr des Verlusts der Oberflächenspannung bei Kontakt mit der Wellwand besteht. Die abgesaugten Scaffolds im Well wurden bis zur Aussaat im Inkubator bei +37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> gelagert. Bei der Aussaat ist die Gesamtzellzahl/Scaffold in 15 µl mittig auf das Scaffold durch einen Tropfen platziert worden. Anschließend folgte eine Inkubation für 4 h im Inkubator bei +37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. Im Anschluss wurde das Well über den Rand mit 505 µl Medium aufgefüllt, so dass das Gesamtvolumen des Mediums 520 µl entspricht.

Im Fall der Co-Kultur wurden zunächst die THP-1 Zellen in einem Wachstumsmedium mit 200 nM PMA ausgesät. Nach 24 h wurde der Überstand entfernt und das Well mit dem Scaffold und den THP-1 einmal mit PBS gewaschen. Das Scaffold wurden erneut mittig platziert und die SaOS-2 Zellen in 15 µl von oben auf das Scaffold pipettiert. Nach 4 h Inkubation bei +37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> erfolgte erneut die Zugabe von 505 µl Differenzierungsmedium [4].

#### **2.3.4 Osteoklastäre & Osteogene Differenzierung**

Zur Differenzierung der Co-Kultur wurde das Wachstumsmedium gegen ein Differenzierungsmedium (RPMI 1640 Medium, 2 % FCS, 200 µM L-Ascorbinsäure-2-Phosphat, 5 mM β-Glycerolphosphat, 25 mM HEPES, 1.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 µM Cholecalciferol) ausgetauscht und die Bedingungen entsprechend des Versuchsaufbau angepasst [69].

Bei der THP-1 Mono-Kultur erfolgte die Differenzierung durch konditioniertes Medium, dessen Herstellung entsprechend der Erklärungen aus 2.3.3 „Zellaussat“ erfolgte. Durch die um zwei Tage versetzte Kultivierung konnte der Einfluss durch die spezifische Bedingung auf möglichst gleicherweise wie *in vivo* auf die THP-1 Zellen wirken, da der Einfluss der Bedingung auf die Osteoblasten berücksichtigt wird, dass nämlich eine Veränderung der Sezernierung der Botenstoffe und Zytokine ggf. zur Folge haben könnte. An den Tagen des Mediumwechsels wurde der Überstand der SaOS-2 Zellen gesammelt und bei 600 x g und +4 °C für 10 min zentrifugiert. Dies

erlaubt z. B. das Abtrennen von Zelltrümmern. Es erfolgte eine Mischung von Konditionierungs- und Differenzierungsmedium im Verhältnis 1:1 und die Einstellung der entsprechenden Bedingung. Anschließend wurde das Medium der zur differenzierenden THP-1 Mono-Kulturen mit der Mischung aus Konditionierungs-/Differenzierungsmedium ausgetauscht. Die SaOS-2 Zellen in Mono-Kultur erhielten frisches Differenzierungsmedium, dass auf die aktuellen Bedingungen eingestellt worden ist [79].

### **2.3.5 Integrierung der diabetischen Bedingungen in vitro**

Die unterschiedlichen humanen diabetischen Bedingungen wurden *in vitro* durch die Zugabe von Insulin und Glucose simuliert. Dabei dienten als Grundlage die von Freude *et al.* 2012 beschriebenen Methoden [103]. Durch eine Erhöhung der Glukosekonzentration auf 25 mM wurde im Modell eine Hyperglykämie (HG-I) simuliert. Die Bedingungen, wie sie bei Typ 2 Diabetiker vorliegen (Hyperglykämie & Hyperinsulinämie → HG+I), wurden durch die zusätzliche Gabe von Insulin erreicht. Unter Verwendung einer 0,5 M Glukoselösung wurde die Glukosekonzentration im Differenzierungs-medium angepasst (Bsp. 10 ml Diff.-Medium + 280 µl 0,5 M Glukoselösung). Um eine Verzerrung durch den gestiegenen osmotischen Druck, welcher durch die erhöhte Glukosekonzentration entsteht, zu vermeiden, wurde parallel der osmotische Druck in der Kontrollgruppe (NG-I) ebenfalls erhöht. Dazu wurde dem Medium für die Kontrollgruppe ein entsprechendes Volumen an 0,5 M Mannitol zugegeben, so dass in Summe das Medium den gleichen osmotischen Druck aufweist. Eine Hyperinsulinämie wurde durch Zugabe von ±160 I.E./l humanem Insulin eingestellt. Sämtliche Lösungen wurden entsprechend des Tagesbedarfs immer frisch angesetzt.

### **2.3.6 Auswahl geeigneter Zellen**

Für die Auswahl geeigneter Osteoblasten sind die Zelllinien MG-63, SCP-1, Cal-72 und SaOS-2, auf Basis ihrer Expressionseigenschaften mit primären humanen Osteoblasten (hOSÜ) verglichen worden. Dabei handelt es sich bei MG-63, Cal-72 und SaOS-2 um Zellen, die den Osteosarkomen abgeleitet wurden, bei SCP-1 um eine Zelllinie, die von humanen mesenchymalen Stammzellen abstammt.

Vor der Isolierung der mRNA wurden die Zellen 2 Tage differenziert und anschließend über cDNA-Synthese mit Hilfe von PCR verglichen. Die für den Vergleich genutzten

hOSÜ Proben stammen von vier willkürlichen gewählten Spendern, die Proben der Zelllinien stammen von 4 unabhängigen Chargen [21].

## **2.4 Messmethoden**

### **2.4.1 Mitochondriale Aktivität**

Zur Bestimmung der Viabilität der Zellen wurde der Umsatz von Resazurin zu Resorurfin durch die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenase bestimmt. Der Umsatz findet in den Mitochondrien statt. Durch die Normalisierung kann dies als Maß für das Stressniveau der Zellen genutzt werden [104,105].

#### **2D:**

In RPMI 1640 ohne FCS ist die Resazurinstammlösung (0,00227 % Resazurin gelöst in DPBS) 1:11 verdünnt und Lichtgeschützt auf +37 °C vortemperiert worden. Der Überstand wurde entfernt und die Zellen mit DPBS gewaschen (100 µl DPBS pro Welle einer 96-Welle-Platte). 100 µl Resazurinlösung wurden je Well pipettiert und die Platte bei +37 °C inkubiert. Mittels Fluoreszenz (ex. 544 nm; em. 590-10 nm) wurde nach 60 & 120 min das Signal von Resorurfin gemessen.

#### **3D:**

Das Messprinzip und die verwendeten Lösungen entsprachen denen bei 2D. Aufgrund der Matrix weicht die Handhabung allerdings etwas ab. Mithilfe einer Pinzette wird seitlich das Scaffold aufgenommen und in ein frisches Well (48-Well-Platte) überführt. Zum Waschen wird das Scaffold bei der Überführung kurz durch ein mit DPBS gefülltes Becken gezogen. 520 µl Resazurinlösung wurden im neuen Well vorgelegt. Nach Inkubation über 120 min bei +37 °C und kurzer Durchmischung der Lösung wurden 100 µl der Probe abgenommen und in ein Well einer 96-Well-Platte zur Messung im Omega Plate Reader überführt. Als Blank wurden Scaffolds ohne Zellen verwendet. Blank-Scaffolds wurden parallel in den Platten über die gesamte Versuchsdauer bis zum entsprechenden Messtag „mit“ kultiviert.

### **2.4.2 Tartrate-resistente saure Phosphatase**

Das für die Knochenresorption von Osteoklasten sezernierte Enzym Tartrate-resistente saure Phosphatase ist Osteoklasten-spezifisch. Deren Aktivität ist ein Maß für die Präsenz differenzierter Osteoklasten und deren Aktivität. Durch die enzymatische Umsetzung von para-Nitrophenyl-Phosphate zu 4-Nitrophenol kann ihre Aktivität bestimmt werden. Dazu wurden 30 µl Überstand (2D wie auch in 3D) in ein

frisches Well einer 96-Well-Platte überführt und 90 µl Substratlösung (5 mM para-Nitrophenyl-Phosphate, 100 mM N-Acetate, 50 mM Na<sub>2</sub>-Tartrate \*2 H<sub>2</sub>O, pH = 5,5) hinzugefügt. Nach Inkubation über 6 h bei +37 °C wurde die enzymatische Reaktion durch Zugabe von 90 µl 1 M NaOH gestoppt und der Umsatz mittels Absorption bei 405 nm bestimmt [106,107].

#### **2.4.3 Alkalische Phosphatase Aktivität (ALP)**

Für die Bestimmung der Osteoblasten-spezifischen Alkalische Phosphatase (ALP) Aktivität ist der enzymatische Umsatz von para-Nitrophenyl-Phosphate zu 4-Nitrophenol über die Zeit bestimmt worden. Der Wert ermöglicht es den Status der Differenzierung von Osteoblasten einzuschätzen [108].

In 2D wurde der Überstand von den Zellen abgenommen und die Zellen zunächst mit DPBS gewaschen (100 µl DPBS je Welle einer 96-Welle-Platte). Nach der Zugabe von 100 µl der ALP-Substratlösung (3,5 mM para-Nitrophenyl-Phosphate, 50 mM Glycin, 100 mM Tris-Base, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, pH = 10,5) in jedes Well wurde direkt im Anschluss der Umsatz mittels Absorption-Messung bei 405 nm, +37 °C über 15 min im Abstand von 1 min mit einem Omega Plate Readers bestimmt. Zur Bestimmung der Kinetik wurde der lineare Bereich genutzt.

Für die Bestimmung der ALP in 3D wurde, ähnlich zu der 3D-Viabilitäts-Messung, mit einer Pinzette das Scaffold seitlich gegriffen und in ein neues Well (48-Well-Platte) überführt. Zum Waschen wurde das Scaffold bei der Überführung kurz durch ein Becken mit DPBS gezogen, bevor es in das frische Well mit 520 µl vorgelegter ALP-Substratlösung gelegt wurde. Im Anschluss an eine Inkubationsphase von 5 min bei +37 °C wurde der Überstand dreimal auf und ab pipettiert, bevor 100 µl Probe zur Messung in ein frisches 96-Well überführt wurden. Die quantitative Bestimmung erfolgte durch Absorption bei 405 nm mittels Omega Plate Reader. Als Blank wurden Scaffolds ohne Zellen verwendet. Blank-Scaffolds wurden parallel über die gesamte Versuchsdauer in den Platten bis zum entsprechenden Messtag „mit“ kultiviert worden, [109].

#### **2.4.4 Carbonic Anhydrase II Aktivität (CAII)**

Ein ebenfalls Osteoklasten-spezifischer Aktivitätsmarker ist die Carbonic Anhydrase II (CAII), deren Aktivität durch den Umsatz von 4-Nitrophenolacetate zu 4-Nitrophenol bestimmt wurde.

Zur Bestimmung der Aktivität in 2D wurde der Überstand von den Zellen abgenommen und die Zellen mit DPBS gewaschen (100 µl DPBS je Welle einer 96-Welle-Platte). 100 µl der CAlI-Substratlösung (2 mM 4-Nitrophenolacetate, 12,5 mM TRIS, 75 mM NaCl, pH = 7,5) wurden in jedes Well pipettiert. Aufgrund natürlichen Zerfalls der Substratlösung wurde diese erst kurz vor der Messung angesetzt. Der Umsatz wurde direkt im Anschluss photometrisch bei 405 nm, +37 °C über 15 min in einem Omega Plate Readers bestimmt [110]. Messungen erfolgten im Abstand von 1 min. Analog zu ALP wurde ist die Kinetik im linearen Bereich bestimmt. In 3D geschah die Messung auf die gleiche Weise wie bei ALP. Nach einer Inkubationszeit von 15 min erfolgte die Probennahme mit anschließender photometrischer Messung bei 405 nm.

#### **2.4.5 DNA – Isolierung**

Die Isolierung der DNA ist ein wichtiger Schritt für die Normalisierung der Versuchsergebnisse und damit eine Möglichkeit, die Messergebnisse besser interpretieren zu können. Zur Isolierung von DNA in 2D wurde zunächst der Überstand von den Zellen abgenommen. 50 µl einer +98 °C heißen 50 mM NaOH Lösung wurden in jedes Well gegeben. Für 5 min inkubierten die Well-Platten auf einer Wärmeisoliertem Oberflächen, um ein rasches Abkühlen der heißen NaOH zu verhindern. Im Anschluss wurde (mithilfe einer Pipette) die Lösung im Well durchmischt und mit der Pipettenspitze an der Oberfläche gekratzt. Die Lösung wurde in ein 1,5 Reaktionsgefäß überführt und bei -20 °C eingefroren.

Für die Weiterbearbeitung wurde die Probe aufgetaut und für weitere 30 min bei +98 °C, mit 250 rpm, inkubiert. Zur Neutralisierung wurden je 50 µl DNA-NaOH Probe 50 µl ddH<sub>2</sub>O und 5 µl 1<sup>o</sup>M Tris hinzugegeben. Zur Trennung von Feststoffen, die die spätere Messung stören, wurden die Proben bei 14000 g für 10 min bei RT zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Isolierung der DNA in 3D erfolgt nach dem gleichen Prinzip wie in 2D. Der Überstand wurde abgenommen und die Scaffolds in einem Zellsieb bei 600 g, für 10 min bei RT zentrifugiert, um den Flüssigkeitsanteil im Scaffold zu reduzieren. Anschließend wurde das Scaffold in ein neues Well platziert, in das im Anschluss 250 µl, +98 °C heiße 50 mM NaOH hinzugegeben wurden. An diesem Punkt folgte ein Einfrier-Auftau-Schritt bei -20 °C, gefolgt von einer Inkubation von 30 min bei +60 °C. Zur Neutralisierung wurden zu je 250 µl DNA-NaOH Probe 250 µl ddH<sub>2</sub>O und 25 µl 1 M Tris hinzugegeben. Zur Trennung von Feststoffen wurden die Proben bei 14.000 g

über 10 min bei RT zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -20 °C [105].

#### **2.4.6 Höchst & Calcein AM Färbung**

Zur Visualisierung der Zellen, Zelldichte und Verteilung der vitalen Zellen wurden die Zellen in Kultur mit Hilfe von Calcein AM und Höchst 33342 angefärbt. Dabei handelt es sich bei beiden Farbstoffen um zellmembranpermeable Farbstoffe. Die Abspaltung von Acetatgruppen durch eine Esterase im Zytoplasma führt zu grün fluoreszierenden Calcein (ex. 485 nm; em. 530 nm), das somit viable Zellen farblich visualisiert. Höchst 33342 (ex 355 nm; em. 460 nm) interkaliert mit der DNA im Nukleus, das zu einem blau fluoreszierenden Signal führt. Damit ist eine Kenntlichmachung der Zellkerne und freier DNA möglich. Frei leuchtende DNA in Form eines Zellkerns ohne ein grün fluoreszierendes Calceinsignal, wurde als Indiz für eine tote Zelle gewertet. Medien und Lösungen wurden vor der Verwendung auf +37 °C vortemperiert.

Für die Färbung der Zellen wurde in einem ersten Schritt der Überstand abgenommen und die Zellen mit 100 µl PBS im 96 Well gewaschen. Für 3D wurden 520 µl PBS im 48 verwendet. Es folgte die Zugabe von Färbelösung mit 2 µM Calcein AM, 2 ng/µl Höchst 33342 verdünnt in reinem RPMI 1640 Medium. Die Volumina entsprachen denen im Waschschrift. Nach einer lichtgeschützten Inkubation von 15-20 min bei +37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> erfolgte die Abnahme der Färbelösung und eine Wiederholung des Waschschrifts mit PBS. Das zum Waschen aufgetragene PBS wurde gegen frisches PBS getauscht. Die Proben wurden mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie analysiert [111].

#### **2.4.7 Matrix - Alizarin Rot**

Zur Bestimmung des Niveaus der mineralisierten Matrix wurde diese mit Alizarin Rot angefärbt. Dabei geht der Farbstoff mit Kalzium eine Komplexbildung ein, die quantitativ bestimmt werden kann.

Nachdem der Überstand im Well abgenommen wurde, folgte eine Fixierung der Matrix sowie der Zellen im Well durch reines eisgekühltes Ethanol. Für eine verbesserte Fixierung erfolgte zunächst eine Inkubation von min. 1 h bei -20 °C. Vor der Färbung wurden die Proben dreimal mit Leitungswasser gewaschen und leicht trocken geklopft. Anschließend ist die Oberfläche der Probe mit 50 µl 0,5 % w/v Alizarin Red S (C.I.58005) Lösung, pH = 4,0 bedeckt und für 30 min auf einem Horizontalschüttler bei

RT inkubiert worden. Im Anschluss wurden die Proben drei weitere Male mit Leitungswasser gewaschen und anschließend an der Luft getrocknet.

Zur Dokumentation wurde die angefärbte Matrix lichtmikroskopisch erfasst, bevor der Farbstoff durch Zugabe von 100 µl 10 % w/v Cetylpyridiumchlorid-Monohydrat-Lösung wieder gelöst wurde. Die quantitative Bestimmung des gelösten Farbstoffes erfolgte mittels eines Omega-Platten-Readers, der die Menge zuvor gebundenen Farbstoffs photometrisch bei 562 nm erfasste [109].

#### **2.4.8 Glucose-Messung**

Durch Messung der Glukosekonzentration im Zell-Medium wurde über eine definierte Zeit der Glukoseverbrauch bestimmt. Der Verbrauch von Glucose kann in Verbindung mit weiteren zellspezifischen Merkmalen Auskunft über den Zustand und den Entwicklungsstand der Zellen geben. Ein beschleunigter Abbau von Glucose ist ein Hinweis für Zellwachstum, wohingegen ein reduzierter Glucose-Verbrauch ein Hinweis für eine Mangelversorgung sein kann. Im Fall von eukaryotischen Zellen ist bei einer Abnahme des Glukoseverbrauchs auch ein Wechsel der primären Energiequelle möglich, wie zum Beispiel von Glukose zu Milchsäure [112].

Für eine Messung wurden auf Parafilm 5 µl Überstand in 10 µl ddH<sub>2</sub>O verdünnt und für 5 min ruhen gelassen, damit die Probe Raumtemperatur annimmt. Mit Hilfe eines Glukometer (Accu-Check Performa, Roche), mit einem Messbereich von 10 – 600 mg/dL (0,6 – 33,3 mmol/L) wurde die Glukosekonzentration bestimmt [113]. Der Verbrauch ergab sich aus der Differenz von frischem Differenzierungsmedium (Null-Wert) und dem gemessenen Werten im Überstand der Zellen nach einer spezifischen Inkubationszeit.

#### **2.4.9 Transfektion von Fluoreszenzproteinen**

##### **Plasmid Isolierung**

Zur Isolierung der Plasmide aus Bakterienkulturen wurde einerseits das DNA-Aufreinigungs-Kit der Firma Promega (Wizard®Plus SV Minipreps DNA Purification Systems) verwendet. Andererseits wurde eine alkalische Lyse durchgeführt. Die Isolierung mit dem Miniprep System von Promega ist entsprechend der Angaben des Herstellers durchgeführt worden. Bei der Isolierung der Plasmide durch eine alkalische Lyse wurden folgende Schritte durchgeführt: 1,5 ml der Bakterienkultur wurden in einem 2 ml Reaktionsgefäß für 30 s bei 10.000 g, RT zentrifugiert. Vorsichtig wurde der Überstand entfernt und das Zellpellet mit 100 µl eisgekühlter Tris-HCl (25 mM Tris-

HCl, 50 mM Glukose, 10 mM EDTA, pH 8,0) für 2 min mittels vortexen resuspendiert. Es folgte die Zugabe von 200 µl einer NaOH-SDS-Lösung (0,2 M NaOH, 1 % SDS) und ein leichtes Vermischen der Lösungen durch 5-maliges Kippen. Über 5 min inkubierte die Lösung auf Eis, gefolgt von der Zugabe von 150 µl Kaliumacetat-Eisessig-Lösung (120 ml 5 M Kaliumacetat, 23 ml Eisessig, 57 ml ddH<sub>2</sub>O). Durch mehrmaliges Kippen erfolgte eine Durchmischung, bevor die Suspension für weiter 5 min auf Eis inkubierte. Anschließend folgte eine Zentrifugation für 5 min bei 12.000 g und +4 °C. Der Überstand, der die Plasmide enthält, wurde vorsichtig in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und 350 µl Isopropanol hinzugefügt. Die Lösung wurde über 1 h bei -20 °C gelagert und anschließend bei 14.000 g für 10 min bei +4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Plasmid-Pellet mit 1 ml 70 % eisgekühltes Ethanol gewaschen. Nach zwei weiteren Waschschritten wurde das Pellet final für kurze Zeit an der Luft getrocknet. Im Anschluss wurde das Plasmid-Pellet in 25-50 µl DEPC Wasser resuspendiert und bei - 80 °C gelagert [114].

### **Restriktionsverdau Plasmide**

Zur Überprüfung der Plasmid-Proben wurde ein Restriktionsverdau mit anschließender Größensortierung durch eine Gelelektrophorese durchgeführt. Dafür wurde 1 µg Plasmid-DNA, 1 µl Enzym, 5 µl NEB Puffer 3.1 (10x) zusammen pipettiert und auf ein Volumen von 50 µl mit DEPC aufgefüllt. Für 1 h bei +37 °C inkubierten die Proben auf einem Thermal-Cycler. Nach Zugabe von 6 µl 5x Ladepuffer und Durchmischen der Lösungen wurden 10 µl einer Probe in einem 1 % Agarosegel mit 0,00007 % Ethidiumbromid aufgetragen. Die Proben wurden für 30 min bei 80 V aufgetrennt und anschließend durch eine Intas-Science-Imaging Fotokabine visualisiert und digital erfasst. Als Größenmarker wurden 3 µl des pUC 19 ready-to-use 5 µg/500 µl Markers der Firma Carl Roth GmbH + Co. KG genutzt.

### **Transfektion**

Für die Transfektion der Plasmide mit den Fluoreszenzproteinen in die Zellen wurde die Form der biochemischen Transfektion gewählt. Dazu wurden die Produkte FuGene®HD (Promega, USA), ViaFect™ (Promega, USA), Lipofectamine™ 2000 (ThermoFisher, USA), Lipofectamine™ 3000 (ThermoFisher, USA), GennaxxonFect-plus (Genaxxon, Deutschland), Viromer® red (Biozym, Österreich) und Viromer® yellow (Biozym, Österreich) genutzt. Entsprechend der Herstellerangaben wurden unterschiedliche Transfektionsbedingungen getestet. In der Regel wurden 15.000

SaOS-2 Zellen bzw. 40.000 THP-1 Zellen in 96-Well entsprechend der Herstellangaben für 24 h bei +37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

Als Selektionsmarker wurde das Antibiotikum Geneticin G418 in einer Konzentration von 250 µg/ml bei SaOS-2 Zellen und bis zu 290 µg/ml bei THP-1 Zellen verwendet. Die Zugabe von G418 erfolgte 24 h nach Beginn der Transfektion.

Allgemein erfolgte eine erste Analyse der Transfektionsergebnisse 24 h nach Beginn der Transfektion, sowie nach 72 h und 6 Tagen durch eine Fluoreszenzmikroskops Evos fl AMG (ThermoFisher). Dabei wurde die Effizienz anhand der positiv transfizierten Zellen bestimmt sowie deren Morphologie und die Viabilität als Maß für die Toxizität der Transfektionsreagenzien analysiert.

#### **2.4.10 RNA Isolierung**

Die Isolierung der RNA erfolgte auf Basis einer Phenol-Chloroform-Extraktion, bei der die Zellbestandteile durch Zentrifugation in 3 Phasen aufgetrennt werden. Dazu wurde der Überstand von den Zellen abgenommen und 250 µl / 25 cm<sup>2</sup> der Isolationslösung (0,8 M Guanidinthiocyanat, 0,4 M Ammoniumthiocyanat, 0,1 M Natriumacetat, 5 % Glycerin, 38 % Phenol, mit ddH<sub>2</sub>O auf 100 ml aufgefüllt) auf die Zellen gegeben. Nach dem Abkratzen der Zellen, wurde die Suspension in ein frisches steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß übertragen und für weitere 5 min bei RT inkubiert.

Bei Proben mit hohem Feststoffanteil oder viel Matrix ist eine Vor-Zentrifugation optional bei 12.000 g für 10 min bei +4 °C, durchgeführt und der Überstand anschließend in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt worden. 50 µl Chloroform / 250 µl Isolationslösung wurden zur Suspension hinzugegeben und durch Kippen vorsichtig gemischt. Nach einer Inkubation von 5 – 10 min bei RT erfolgte die Trennung der Bestandteile durch das Zentrifugieren bei 14.000 g, 10 min und +4 °C. Bei der Zentrifugation bildeten sich drei Phasen, die wässrige, organische und mittlere Phase. Die wässrige Phase beinhaltet RNA, die organische Phase enthält Proteine und die mittlere Phase DNA-Bestandteile. Die wässrige Phase mit der RNA wurde in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß übertragen, in das 250 µl 100 % Isopropanol (eisgekühlt) vorgelegt wurden. Beide Lösungen wurden vorsichtig vermischt und für 1 bis 24 h bei -20 °C inkubiert.

Zur weiteren Bearbeitung wurden die Proben zunächst 5 – 10 min auf Eis inkubiert und im nächsten Schritt für 10 min bei 14.000 g und +4 °C zentrifugiert. Es bildete sich im Reaktionsgefäß ein Pellet, das die RNA enthält. Um das RNA-Pellet zu waschen, wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und 1 ml 70 % Ethanol hinzugegeben.

Erneut wurde die Probe bei 14.000 g, 10 min bei +4 °C zentrifugiert und anschließend der Waschschrift ein weiteres Mal wiederholt worden. Zum Abschluss wurde der Überstand abgenommen und das Reaktionsgefäß für einige Minuten geöffnet und auf Eis ruhen gelassen, sodass der restliche Ethanolgehalt in die Gasphase übergehen kann. Das RNA-Pellet ist in 10 – 15 µl DEPC gelöst und der RNA-Gehalt wurde mit Hilfe eines Omega-Plate-Reader bestimmt [68,115,116].

#### **2.4.11 c-DNA Synthese**

Die Herstellung der cDNA erfolgte unter Zuhilfenahme des cDNA Synthesis Kit „First Strand cDNA Synthesis Kit“ (ThermoScientific, Waltham, USA). Die Durchführung der Synthese erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers. Zusammengefasst ist es möglich je Probe und Durchlauf bis zu 2.500 ng RNA in cDNA umzuschreiben. Die Limitierung liegt unter anderem im maximal verwendbaren Volumen. Nach Zugabe der *Primer oligo dT* und *Primer random hexamer* erfolgte eine Inkubation über 5 min bei +65 °C im PCR-Cycler. Anschließend wurde der fünffach konzentrierte Reaktionspuffer *RiboLock Rnase Inhibitor* (20 U/µl), 10 mM dNTP Mix und der *M-MULV Reverse Transcriptase* (20 U/µl) hinzugegeben. Es folgten weitere Inkubationen von 5 min +25 °C, 60 min +37 °C und 5 min +70 °C. Im Anschluss wurde die cDNA-Konzentration mittels Absorption und der LVIS-Platte des Omega Plate Reader bestimmt und auf die gewünschte Endkonzentration mit DEPC verdünnt.

#### **2.4.12 PCR & Gelelektrophorese**

Mit Hilfe von PCR wurde die Untersuchung der cDNA Proben und die Entwicklung der Normalisierung vorgenommen. Generell wurden 2 µl Probe mit 0,75 µl Primer Forward und 0,75 µl Primer Reverse sowie 7,5 µl Biozym Red HS Mastermix verwendet. Beim Biozym Red HS Mastermix handelt es sich um eine gebrauchsfertige, gepufferte Lösung, die dNTPs, Loadingdye und die Polymerase enthält. Somit können die Proben direkt nach der PCR auf ein Gel aufgetragen werden. Mittels DEPC H<sub>2</sub>O ist das Gesamtprobenvolumen auf 15 µl aufgefüllt worden. Die Durchführung der PCR erfolgte gemäß den Angaben des Biozym Red HS Mastermix Herstellers (Denaturierung: 95 °C, 2 min; Zyklus: 95 °C, 2 min → X °C, 15 sec → 72 °C, 30 sec; Polymerisation: 72 °C, 10 min, Ende: 4 °C), die Anzahl an Zyklen sowie die Annealing-Temperatur richtete sich an die entsprechend verwendeten Primer.

Für die Gelelektrophorese ist ein 1,7 % Agerosegel mit einem TBE-Puffer und 0,00007 % Ethidiumbromid hergestellt worden. Je Probe wurden 7 µl Probevolumen

in eine Geltasche gegeben. Die Auftrennung erfolgte bei 80 V über 30 bis 40 min. Anschließend sind mit Hilfe einer Intas-Science-Imaging Fotokabine die Banden visualisiert und fotografiert worden. Als Größenmarker wurden 3 µl des pUC 19 ready-to-use 5 µg/500 µl Markers der Firma Carl Roth GmbH + Co. KG aufgetragen. Die Analyse der Proben erfolgte mit der „Open Source“ Software ImageJ [68].

#### 2.4.13 qPCR

Für die Normalisierung der gewonnenen Versuchsdaten wurde mittels qPCR, basierend auf *SYBER-green* und der isolierten DNA-Proben, das Zell-Zell-Verhältnis sowie die Gesamt-DNA-Konzentration bestimmt. Dazu wurde zur Unterscheidung beider Zellenarten der Unterschied im Geschlecht genutzt. Bei THP-1 Zellen handelt es sich um männliche Zellen, bei SaOS-2 um weibliche Zellen. Für die Bestimmung der männlichen Zellen ist der primer *hSRY* (sex-determining region Y), der am Y-Chromosom bindet und für die weiblichen SaOS-2 Zellen der primer *hUGT1A6* (uridine diphosphate glucuronosyl transferase 1A6), welcher am Chromosom 2 bindet, verwendet worden [105,117]. Die Annealing-Temperatur betrug für beide Primer +60 °C. Das amplifizierte Produkt von *hSRY* betrug 137 bp und für *hUGT1A6* 209 bp.

Für die Messung einer Probe wurden 1 µl Primer-Forward, 1 µl Primer-Reverse, 10 µl GreenMasterMix (2x), 7 µl DEPC und 1 µl DNA-Probe genutzt. Ein Standard von THP-1 DNA und SaOS-2 DNA in den Abstufungen 200000 Z, 100000 Z, 50000 Z, 12500 Z und 6250 Z, ist zu jeder Messung mit getestet worden, um mögliche systematische Fehler zu berücksichtigen. Des Weiteren erfolgte die Messung einer Probe bzw. des Standards immer in Duplikaten. Der ermittelte CT-Wert wurde mittels der Standardgerade in die entsprechende DNA-Konzentration umgerechnet. Dabei entspricht der errechnete Wert von *hUGT1A6* der Gesamt-DNA-Konzentration, der Wert von *hSRY* den der THP-1-DNA. Trotz der ähnlichen Effizienz von *hUGT1A6* gegenüber der DNA von THP-1 Zellen und der von SaOS-2 Zellen ist für die Auswertung der Mittelwert der Steigung und des Achsenabschnitts verwendet worden. Durch Abziehen der errechneten THP-1-DNA-Konzentration von der Gesamt-DNA-Konzentration wurde der Anteil an SaOS-2-DNA bestimmt [21].

#### **2.4.14 Statistik**

Die vorliegende statistische Auswertung wurde nach Rücksprache mit PD Dr. Sabrina Ehnert durchgeführt. Die Ergebnisse werden als Median in Linien- bzw. Balkendiagramme (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung des Mittelwerts) dargestellt. Experimente wurden mindestens dreimal durchgeführt ( $N = 3$ ), mit jeweils mindestens drei Wiederholungen ( $n \geq 3$ ). Die Anzahl der biologischen und technischen Replikate ist in den Legenden der Abbildungen angegeben. Die statistischen Analysen wurden mit der Software GraphPad Prism Version 8 (GraphPad, El Camino Real, USA) vorgenommen. Die Gruppen wurden mit dem Kruskal-Wallis H-Test und dem anschließenden Dunn's Multiple Comparison Test verglichen. Veränderungen in der zellspezifischen DNA wurden mittels nichtparametrischer Zwei-Wege-ANOVA und anschließendem Tukey-Mehrfachvergleichstest analysiert. Ein p-Wert unter 0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen.

#### **2.4.15 Ethikvotum**

Die hier beschriebenen Versuche erfolgten im Rahmen des Projektes „Mechanismen der Knochenregeneration. Entwicklung von Knochen-ähnlichen 3D Zellkulturen für *in vitro* Untersuchungen (Tissue Engineering).“, welches unter der Projekt-Nummer 539/2016BO2 im Jahr 2016 von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Eberhard Karls Universität zu Tübingen angenommen wurde.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Scaffold - technische Entwicklung

Am Institut durchgeführte Vorversuche zeigten, dass ein Cryogel basierend auf Polyhydroxyethylmethacrylate (pHEMA) und Bisacrylamid (BAA), versetzt mit Rattenschwanzkollagen, Gelatine und Hydroxylapatit die meisten Kriterien, wie z. B. Biokompatibilität, Struktur und Architektur, Möglichkeiten in der Justierung der Steifigkeit und Oberflächenbeschaffenheit, sowie in der Verfügbarkeit und dem Aufwand der Herstellung aufwies, um ein spongiöses humanes Knochengewebe *in vitro* nachzubilden. Durch Zugabe von Ammoniumperoxodisulfat (APS) und Tetramethylethylendiamin (TEMED) erfolgte eine

Tabelle 3. Grundzusammensetzung der Cryogele für knochenähnlich Scaffolds.

pHEMA (97 %)	16,00 %
Bisacrylamid (2 %)	8,00 %
Hydroxylapatid (25 %)	20,00 %
Kollagen (2.5 g/l)	0,10
Gelatine (30 %)	2,50 %
H <sub>2</sub> O	38,80 %
Glutaraldehyd (25 %)	2,50 %
APS (10 %)	2,00 %
TEMED (99 %)	0,20 %

radikalische Polymerisation [88]. Oberflächenbeschaffenheiten, wie z. B. die Fixierung von Proteinen auf der Oberfläche ist mithilfe von Glutaraldehyd erreicht worden. Auf Grundlage der in Tabelle 3 aufgelisteten Zusammensetzung erfolgte die Weiterentwicklung der Matrix zu einem Gewebe, das dem humanen möglichst gleicht.

##### 3.1.1 Verhältnis pHEMA und BAA

In einem ersten Schritt wurde das Verhältnis von pHEMA gegenüber BAA weiter untersucht. Wie von uns in der Publikation „*Impact of Four Protein Additives in Cryogels on Osteogenic Differentiation of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells*“ [1] beschrieben, führte eine Verdopplung des BAA Anteils (2:1) zu einer Reduktion der Steifigkeiten (E-Modul) auf 27,3 kPa. Dahingegen führt eine Gleichsetzung von pHEMA & BAA (1:1) zu einer leichten Erhöhung der Steifigkeit, im Durchschnitt

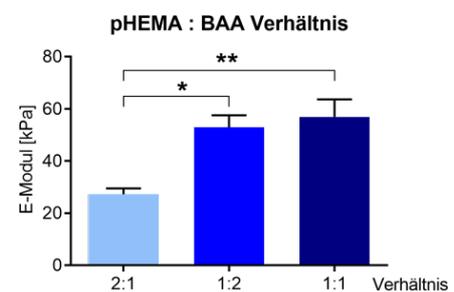


Abbildung 4. Auswirkungen unterschiedlicher pHEMA: BAA Verhältnisse auf die Steifigkeit der Cryogel Matrix. N=2, n≥3 \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ . Publiziert in Häussling et al. 2019 [1]

auf 56,9 kPa (Abbildung 4). Aufgrund des Bedarfs einer hohen Steifigkeit, ist für das weitere Vorgehen das Verhältnis 1:1 genutzt worden.

### 3.1.2 Autofluoreszenz

Mikroskopische Untersuchungen der Matrix zur Charakterisierung sowie zur Färbung lebender Zellen auf der Matrix ergaben eine extrem hohe Autofluoreszenz (Abbildung 5A). In sämtlichen Farbbereichen, wie zum Beispiel GFP (Ex 470/22; Em 525/50), RFP (Ex 531/40; EM 593/40), TexasRed (Ex 585/29; Em 628/32), war eine qualitative Untersuchung nicht möglich.

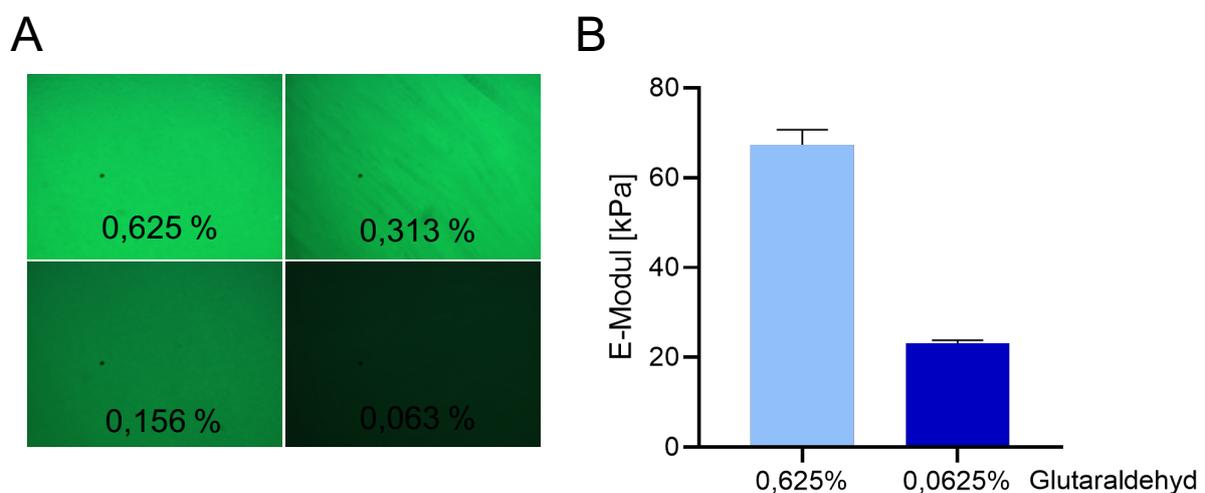


Abbildung 5. Auswirkungen der Glutaraldehydkonzentration auf die Autofluoreszenz und Steifigkeit der Scaffolds. In Abhängigkeit der Glutaraldehyd-Konzentration zeigt A) Abstufungen der Autofluoreszenz und B) den Einfluss auf die Steifigkeit N>10, n>2.

Tests der einzelnen Matrix-Komponenten auf Autofluoreszenz verliefen negative. Berichte aus der Histologie beschrieben vergleichbare Herausforderungen bei Verwendung von Glutaraldehyd, das als Vernetzter/ Crosslinker verwendet wird. Glutaraldehyd besitzt die Eigenschaft, mit Amingruppen zu reagieren und mit ihnen eine Bindung einzugehen. Dabei tritt eine Strukturveränderung ein, die die beschriebene Autofluoreszenz zur Folge hat [118,119]. Die Matrixbestandteile BAA, TEMET, APS sowie die zugegebenen Proteine weisen alle Amingruppen auf. Versuche mit 0,625 %, 0,313 %, 0,156 % und 0,0625 % Glutaraldehyd bestätigten, dass mit Reduktion des Glutaraldehyds die Intensität der Autofluoreszenz abnahm (Abbildung 4A). Es ergab sich eine notwendige Reduktion von Glutaraldehyd auf 0,0625 % des Gesamtanteils.

Da Glutaraldehyd als Vernetzter agiert, beeinflusst es auch die Steifigkeit der Matrix. Durch die Reduktion an Glutaraldehyd reduzierte sich die Steifigkeit um rund 65 % auf 23,07 kPa (Abbildung 5B).

### **3.1.3 Matriceigenschaften und ihrer Einflussgrößen**

Neben den Inhaltsstoffen und deren Konzentration beeinflusst die Architektur der Matrix entscheiden die Charakteristik des Scaffolds. Reguliert wird dieser Faktor unter anderem durch die Konzentration der Inhaltstoffe, der Polymerisation-Kinetik und der Gefriertemperatur. Für eine homogene Produktqualität ist der standardisierte Herstellungsprozess bedeutend.

Aus diesen Gründen sind Gussformen aus unterschiedlichen Materialien mit einem spezifischen Wärmeleitfähigkeitskoeffizienten, wie zum Bsp. Edelstahl, Kupfer und Polypropylen getestet worden. Trotz seiner guten spezifischen Wärmeleitfähigkeit stellte sich Kupfer als ungeeignet heraus. In der gegebenen Konstellation führte Kupfer zur Bildung von Grünspan. Trotz ihrer geringen Wärmeleitfähigkeit erwiesen sich Kunststoffrohre aus Polystyrol unter Berücksichtigung der gegebenen Bedingungen am besten geeignet.

Zur besseren Kontrolle der Einfriertemperatur wurde die Verwendung von Gefrierbädern geprüft. Die Gefrierbäder wurden mit 70 % Ethanol bzw. 25 %  $\text{CaCl}_2$ -Lösung gefüllt und die Gussformen in das vortemperierte Bad hineingehängt. Der Vergleich zeigte, dass die 25 %  $\text{CaCl}_2$ -Lösung langsamer abkühlt und damit längere Zeit im Bereich von  $-5\text{ °C}$  bis  $-12\text{ °C}$  verbleibt, im Gegensatz zu 70 % Ethanol. Ein langsames Herunterkühlen ist wichtig, da in einem negativen Temperaturbereich kurz unter  $0\text{ °C}$  sich wenige Eiskristalle bilden, die zu großen Kristallen heranwachsen und wiederum zu großen Poren führen [88]. Eine homogenere Produktqualität konnte durch  $\text{CaCl}_2$ -Bäder erreicht werden.

Eine parallele Überwachung der Kerntemperatur (Abbildung 6) während der Erprobung der Bäder zeigte einen spontanen sprunghaften Anstieg der Kerntemperatur auf mit anschließendem zügigem Abkühlen. Die sogenannte Kristallisationswärme als weitere Einflussgröße beeinflusst somit den Herstellungsprozess zusätzlich. Durch die nahezu geschlossene Gussform wird die Energie beim Wechsel des Aggregatzustandes in Form von Wärme frei. In der Regel betrug das  $\Delta T$  über  $5\text{ °C}$ , dennoch überschritt der Peak nie die Grenze von  $0\text{ °C}$ . Durch die Verwendung von Gussformen aus Polystyrol und deren geringe Wärmeleitfähigkeit

verläuft der Prozess des wieder Abkühlens unter einer verlangsamten Kinetik, somit verbleibt mehr Zeit für das Wachstum der Eiskristalle.

Durch das Weglassen der Gefrierbäder, einem konsequenten verschließen der Gefriertruhe für mindestens 17 h und der Vermeidung jeglicher Erschütterungen, konnte die Kinetik des wieder Abkühlens weiter verlangsamt und eine relative homogene Produktqualität gewährleistet werden.

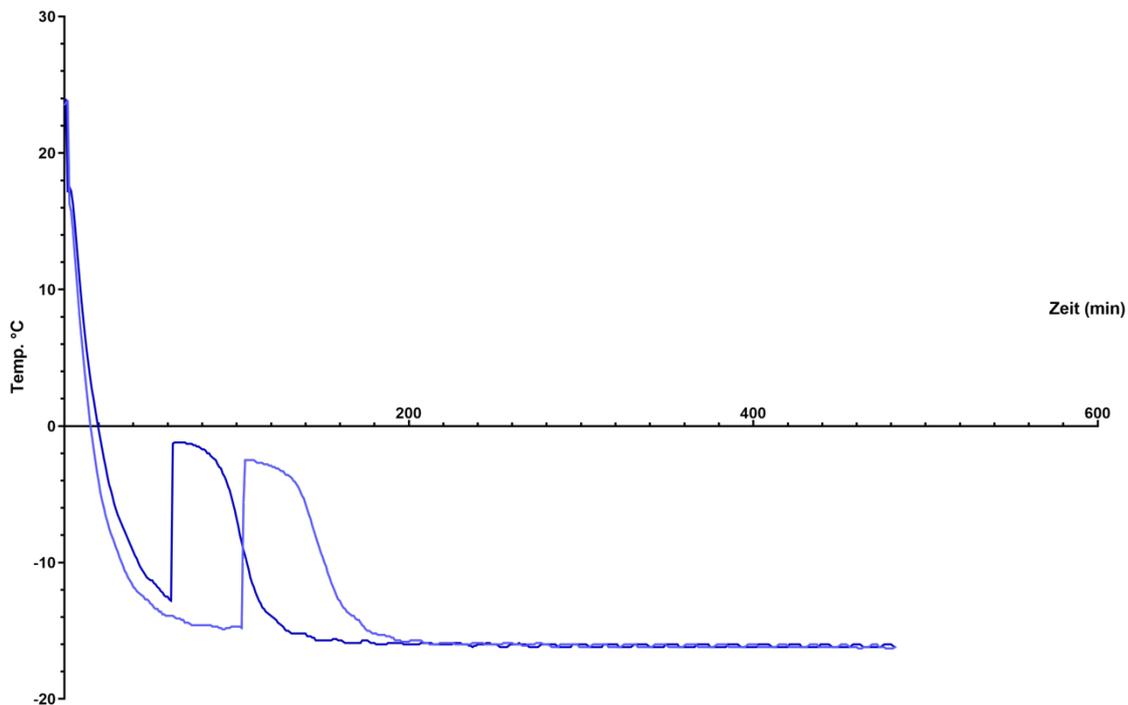


Abbildung 6. Verlauf der Kerntemperatur während der Polymerisation der Scaffold-Masse, bei  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 3.1.4 Kein Einfluss bei einer Inkubation zwischen der Zugabe von APS - TEMED

Für die Herstellung von Cryogelen ist in der Literatur unter anderem eine Methode beschrieben, die nach Zugabe von APS und vor der Zugabe von TEMED eine Inkubation der Lösung von 2 - 3 min vorsah [90,120]. Bei Tests führte die getrennte Zugaben und die zusätzliche Inkubation allerdings zu keinen erwähnenswerten positiven Effekten, weder in der Architektur der Poren noch in der Steifigkeit.

Bei der Verwendung von APS ist zu beachten, dass APS bei Temperaturen von RT und höher instabile ist [121]. Aus diesem Grund ist APS in Form von „single use“ Aliquotes genutzt und während der Herstellung der Scaffold fortwährend auf Eis gelagert worden. Anderenfalls würde es zu einer Verschiebung der Kinetik kommen und somit zu unterschiedlichen Produkten.

### 3.1.5 Hydroxylapatit

Die gezielte verlangsamte Polymerisationskinetik hatte zur Folge, dass das Hydroxylapatit begann zu sedimentieren. Wie in der Publikation „*Impact of Four Protein Additives in Cryogels on Osteogenic Differentiation of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells*“ [1] beschrieben, wurde die Hydroxylapatitkonzentration auf 12,5 % erhöht, um der beobachteten Sedimentation entgegenzuwirken. Durch die erhöhte Salzkonzentration stützen die Kristalle sich gegenseitig und der Prozess der Sedimentation verlangsamte sich (Abbildung 7). In

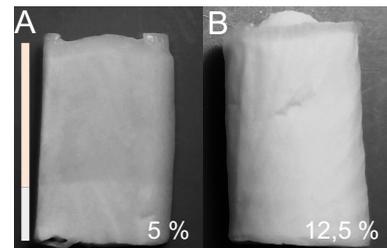


Abbildung 7. Fotografie zweier Scaffolds bestehend aus PRP und Hydroxylapatit.

(A) 5 % Hydroxylapatit, das zu 2 Phasen führt. (B) 12,5 % Hydroxylapatit, das zu einer relativen homogenen Verteilung führt. Publiziert in Häussling et al. 2019 [1]

Bezug auf die Steifigkeit erwies sich dies zudem als positive, die Steifigkeit erhöhte sich um 40,85 % auf 71 kPa.

Um eine gleichmäßigere Verteilung von Hydroxylapatit zu gewährleisten, ist die direkte Zugabe von Hydroxylapatit gegen ein Verfahren der externen Kristallisation ausgetauscht worden. Durch Zugabe von Dinatriumhydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) anstelle der Emulsion aus PBS und Hydroxylapatit sowie der Inkubation der polymerisierten Scaffolds in 1 M Calciumchlorid ( $\text{CaCl}_2$ ) Lösung entsteht durch Reaktion des Phosphats mit Kalzium Hydroxylapatit auf der Matrixoberfläche. Versuche mit Natriumdihydrogenphosphat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ), als alternative Phosphatquelle, verhinderten die Polymerisation der Scaffolds.

Ein weiterer Grund zur Testung der Alternative war die Sorge, dass eine hohe Hydroxylapatitkonzentration die SaOS-2 Zellen möglicherweise zu einer sehr schnellen Differenzierung zu Osteozyten führen könnte und damit die für das Modell interessante Phase der Osteoblasten überspringen würde. Die höhere Konzentration gelöster Salze in der zu polymerisierenden Lösung erhöhte durch Anwendung der externen Kristallisation zudem den Gefrierpunkt. Dies führte wiederum zu leicht vergrößerten Poren und einer höheren Steifigkeit (Abbildung 8B, C).

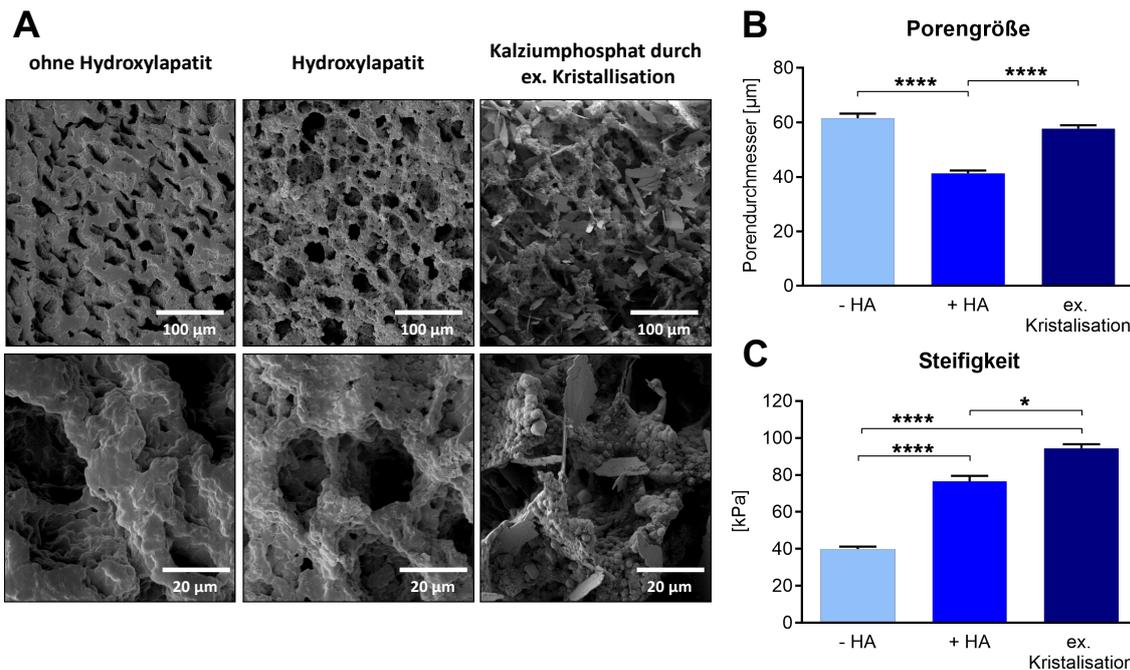


Abbildung 8. Vergleich von Cryogelen ohne und mit Hydroxylapatit, sowie ex. Kristallisation. (A) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen, sowie charakteristische Merkmale wie (B) die Porengröße und (C) die Steifigkeit von Cryogelen,  $N \geq 3$ ,  $n = 3$ , \*  $p < 0.05$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$  publiziert in Häussling et al. 2019 [1,3].

### 3.1.6 Vergleich der Proteinquellen RGD, PRP, Coll, CM

Ziel dieser Arbeit ist mitunter die Entwicklung einer 3D Matrix ohne tierische Bestandteile. Aus diesem Grund ist bereits zu Beginn das enthaltende Kollagen- und Gelatine-Gemisch gegen humanes PRP ausgetauscht worden, wie in der Publikation „Impact of Four Protein Additives in Cryogels on Osteogenic Differentiation of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells“ [1] beschrieben. Grund für die Wahl von PRP ist, dass PRP die osteogene Differenzierung von Ad-MSCs verbessert [122]. Zudem ist es so möglich weitere menschliche Faktoren in das Modell zu integrieren.

Verglichen zu PRP enthielt das Kollagen-Gelatine-Gemisch  $\pm 25\%$  weniger Protein. Daher ist das Volumen an PRP entsprechend um 25 % reduziert und im Gegenzug der Anteil an  $ddH_2O$  um 25 % erhöht worden.

In erster Linie machte sich der Wechsel bei den Oberflächenbeschaffenheiten bemerkbar. Die PRP enthaltenden Scaffolds wiesen sowohl innen als auch außen eine deutlich rauere Oberfläche auf, während die Oberfläche der Kollagen-Gelatine Scaffolds eine verhältnismäßig glatt war (Abbildung 9).

Um den Einfluss des Plasmalysats auf die Herstellung der 3D Matrix besser beurteilen zu können, wurden Scaffolds mit konditioniertem THP-1 Kultur-medium (CM), RGD Peptidlösung (RGD), sowie erneut mit Kollagen (Coll) hergestellt.

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen (Abbildung 10) zeigten Ähnlichkeiten in Porengröße und Dichte der Kalziumphosphatkristallen bei Coll und PRP, während CM und RGD eine deutlich höhere Dichte an Kristallen aufwiesen. Beim Vergleich der Oberflächenbeschaffenheiten wiesen PRP, CM und RGD eine deutlich rauere Oberfläche als Coll auf, welches zu einer glatten Oberfläche führt. Die Porengröße der RGD-Scaffolds wirkt zudem deutlich kleiner, was durch Ausmessung der Poren bestätigt wurde (Abbildung 11A). RGD-Scaffolds wiesen mit einer durchschnittlich Porengröße 42,46  $\mu\text{m}$  signifikant ( $p < 0,0001$ ) die kleinsten Poren auf. Die Steifigkeit erhöhte sich durch Verwendung von PRP um 48,8 % gegenüber Coll auf 82,29 kPa, im Vergleich zu CM erhöht sich die Steifigkeit um 80,64 %. RGD Scaffolds wiesen die geringste Steifigkeit mit 32,76 kPa auf (Abbildung 11B). Die Wasseraufnahmekapazität unter Coll war im Vergleich zu den anderen Proteinquellen erhöht, allerdings ohne einen signifikanten Unterschied. Bei der Porosität wiesen alle vier Arten gleiche Eigenschaften auf.

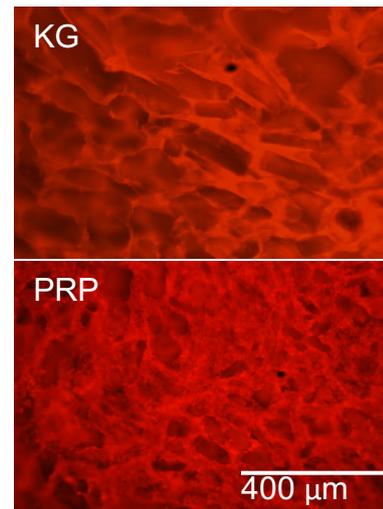


Abbildung 10. Veränderung der Oberflächenbeschaffenheit durch Austausch von Kollagen & Gelatine gegen Plasmalysat.

Mikroskopische Aufnahmen der, mit SRB angefärbten, 3D Matrix bestehend aus (KG) Kollagen & Gelatine, sowie (PRP) Plasmalysat.

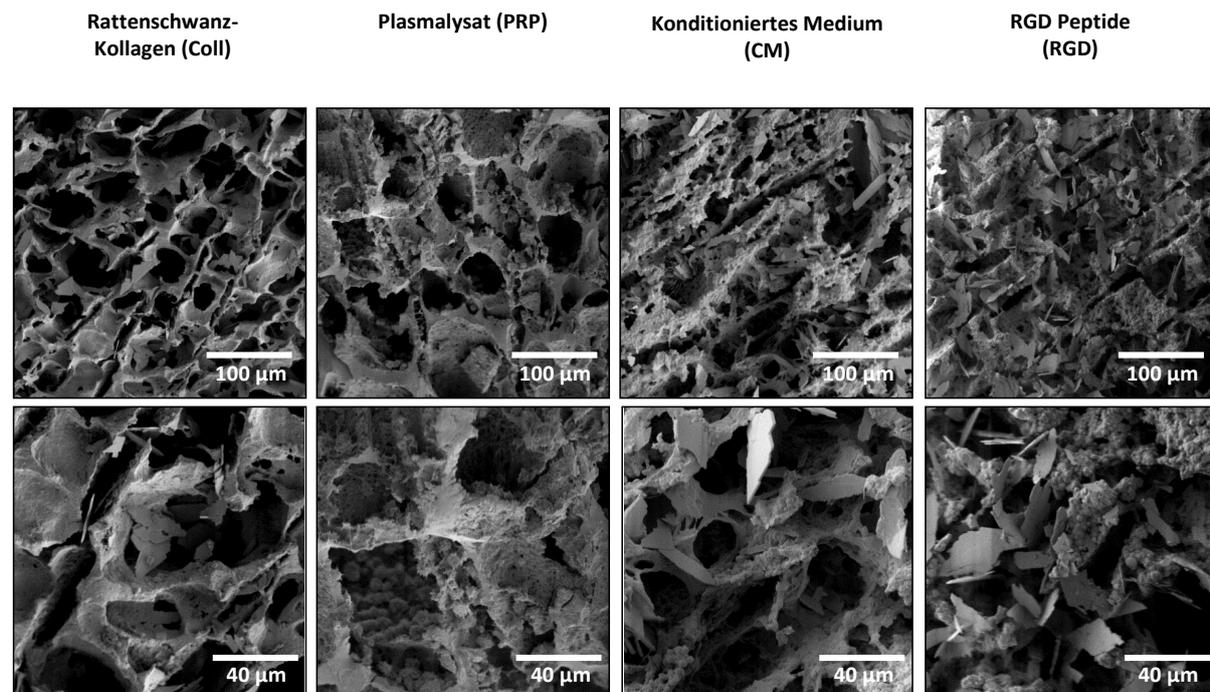


Abbildung 9. Vergleich von rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen von Cryogelen mit unterschiedlichen Proteinzusammensetzungen. Publiziert in Häussling et al. [1]

Bei der weiteren Charakterisierung der PRP-Scaffolds ergaben sich eine mineralische Dichte von  $47,23 \text{ mg/cm}^3$  mittels CT-Analysen, sowie eine Permeabilität von  $0,03 \text{ cm}^2$ . Die Porenform erreichte einen Mittelwert von 0,83, dabei entspricht ein Wert von 1 einer Kugel (Tabelle 4). Zusammenfassend wiesen PRP- und Coll-Scaffolds ähnliche Eigenschaften auf und konnten in Hinblick auf vergleichbare *in vivo* Gewebeeigenschaften weiterentwickelt werden.

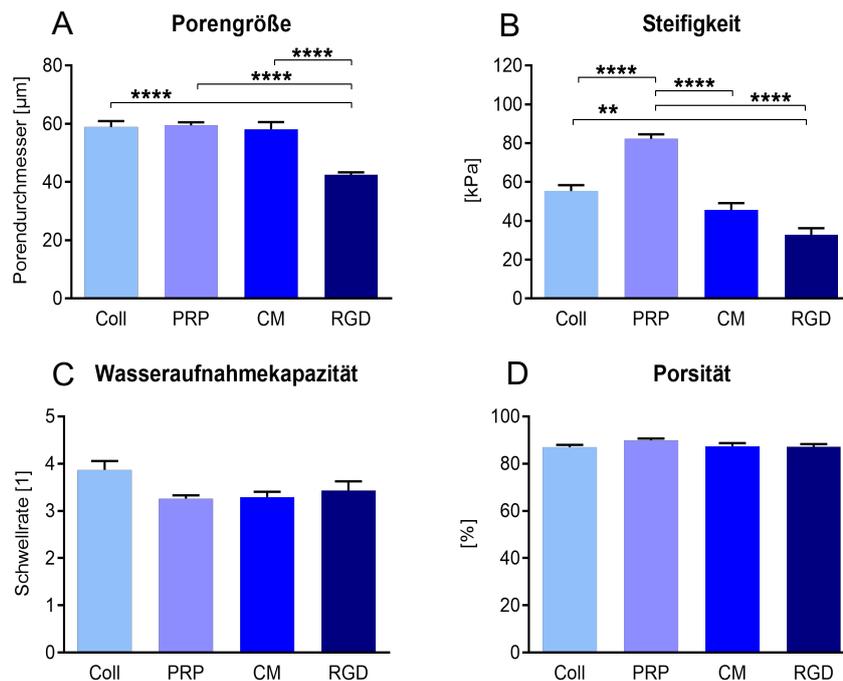


Abbildung 11. Vergleich der charakteristischen Eigenschaften von Cryogelen mit unterschiedlichen Proteinzusammensetzungen. N=5, n=4\*  $p < 0.05$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ ,

Publiziert in Häussling *et al.* 2019 [1]

### 3.1.7 Abschließende Matrix-Zusammensetzung

Die Weiterentwicklung der 3D Matrix führte final zu einer Zusammensetzung der zu polymerisierenden Lösung von 16 % pHEMA, 0,3 % Bisacrylamid, 24,4 % ddH<sub>2</sub>O, 0,25 g/l Plasmalysat, 0,3 M di-Natriumhydrogenphosphat und 0,1 % Glutaraldehyd sowie 0,2 % Ammoniumperoxodisulfat mit 0,2 % Tetramethylethyldiamin. Mit anschließender Inkubation in 1 M CaCl<sub>2</sub> [1].

Tabelle 4. Charakteristische Eigenschaften und Anforderungen der entwickelten 3D Matrix.

Charakteristika 3D Matrix	Anforderungen
🔑 Biokompatibilität	🔑 Biokompatibilität ✓
🔑 Porendurchmesser $102,6 \pm 24,4 \mu\text{m}$	🔑 Porendurchmesser 100 - 300 $\mu\text{m}$ ✓
🔑 Steifigkeit $76,8 \pm 19,2 \text{ kPa}$	🔑 Steifigkeit $>60 \text{ kPa}$ ✓
🔑 Mineralische Dichte $47,2 \pm 6,8 \text{ mg/cm}^3$	🔑 technisch einfache Herstellung ✓
🔑 Permeabilität $3,5 \pm 1$	
🔑 Porosität $76,5 \pm 6,5 \%$	
🔑 Zirkularität der Poren 0,83	

### 3.1.8 Effekt der Inkubation der Scaffolds vor der Zellaussaat

Gemäß den Beobachtungen von Rouß *et al.* 2020, erwies es sich als positiv Scaffolds 48 h vor der Aussaat der Zellen in Kultivierungsmedium mit 5 % FCS bei 37 °C zu inkubieren [123]. Dies führt im Vergleich zu einer Zellaussaat ohne vorherige Inkubation zu einer höheren Adhärenz der Zellen auf der Matrix sowie zu einer verbesserten Viabilität der Zellen. Bei Zellaussaaten ohne eine vorherige Inkubation der Matrix fanden sich 24 h nach der Zellaussaat Zellen im Well, die nicht nur auf der Matrix, sondern primär am Wellboden adhärirt sind, mit einer veränderten Morphologie. Nach einer vorherigen 48-stündige Inkubation wurde eine höhere Adhärenz auf der Matrix und Viabilität visuell beobachtet. Zellen, die nicht auf der Matrix, sondern auf dem Wellboden adhärirt sind, erschienen in ihrer Morphologie unauffällig.

## 3.2 Co-Kultur – Entwicklung

### 3.2.1 Auswahl geeigneter Zellen

Bei der Auswahl potentiell geeigneter Zellen für das Co-Kultur Modell ist es zwingend erforderlich sicherzustellen, dass die Zellen eine Reihe von Voraussetzungen erfüllen, wie zum Bsp. die Interaktion zwischen beiden Zellarten, die Vergleichbarkeit gegenüber den *in vivo* Prozessen, aber auch dass die Zellen in der gleichen Umgebung mit demselben Medium kultiviert werden können.

Die Auswahl der Zellen für das Co-Kultur Modell erfolgte nach den in Material/Methoden beschriebenen Kriterien. Es wurden MG-63, SCP-1, Cal-72 und SaOS-2 Zellen untersucht.

SaOS-2 Zellen zeigten eine fast zehnmal höhere ALP-Expression als hOSÜ auf. Auch SCP-1 und MG-63 Zellen zeigten eine geringe ALP-Expression. Noch geringer zeigte sich die ALP-Expression von Cal-72 Zellen (79 % geringer als hOSÜ). Die Osterix Expression (= Transkriptionsfaktor Sp7) jedoch war für hOSÜ und Cal-72 Zellen vergleichbar. SCP-1 und MG-63 Zellen zeigten eine geringe durchschnittlicher Osterix-Erhöhung, wohingegen SaOS-2 Zellen eine signifikant ( $p < 0,01$ ) höhere Osterix-Expression gegenüber hOSÜ aufwiesen (+ 441 %) (Abbildung 12B).

Bei der Expression von Osteopontin, welches an der Knochenbildung beteiligt ist, zeigten die SCP-1, MG-63 und SaOS-2 Zellen wiederum deutlich geringere Niveaus, während die Cal-72 um nahezu das Dreifache des Niveaus der hOSÜ übertrafen (Abbildung 12C). In Bezug auf Sclerostin wurden hohe Schwankungen bei den SCP-1 Zellen festgestellt, die jedoch durchschnittlich über dem Mittelwert der hOSÜ lagen. Die Zellen MG-63, SaOS-2 und Cal-72 zeigten hingegen ein ca. 80 % geringeres Expressionsniveau (Abbildung 12 D).

Im Fall von Osteocalcin, Kollagen I, Decorin, Versican und Fibronectin lag das Expressionsniveau der Zelllinien unter dem der hOSÜ. Zwischen den Zelllinien selbst zeigten sich außer für Versican keine wesentlichen Unterschiede (Abbildung 12E, F, G, H). Dabei zeigten im Vergleich zu MG-63 SaOS-2 Zellen signifikant ( $p < 0,001$ ) sowie Cal-72 und SCP-1 eine höhere Versican-Expression auf (Abbildung 12 H). Parallel dazu wurden am Institut Untersuchungen mit Fokus auf die Expression von Vitamin-D-Rezeptoren (VitDR), RunX2, CCL2, M-CSF, sRANKL und OPG durchgeführte [68]. Die Expression von VitDR ist unter allen vier Zelllinien ähnlich hoch wie die von hOSÜ. Dahingegen zeigten sich Unterschiede in den Niveaus an RunX2. Bei MG-63 Zellen war die Expression gegenüber hOSÜ um weit mehr als das

Zehnfache signifikant reduziert. Deutlich weniger stark, aber auch reduziert, war das Niveau bei SCP-1 Zellen gewesen. SaOS-2 Zellen wiesen eine gleich hohe Expression wie hOSÜ auf, gefolgt von Cal-72 Zellen. Gleiches galt für die Expression von CCL2, hier war auch das Niveau bei SaOS-2 gleich dem von hOSÜ, gefolgt von SCP-1, MG-63 und Cal-72. Die für die Differenzierung von Osteoklasten essenzielle wichtigen Proteine sRANKL und M-CSF sind beide ebenfalls von SaOS-2 vergleichbar stark exprimiert worden wie von hOSÜ. Im Fall von M-CSF überstieg die Expression leicht den Durchschnitt von hOSÜ, leicht darunter der Mittelwert von Cal-72, gefolgt von MG-63 und SCP-1. Im Fall von sRANKL folgte nach den SaOS-2 Zellen, die SCP-1 Zellen. Um etwas mehr als den Faktor 10 war die Expression bei MG-63 reduziert. Nahezu keine Expression ist bei Cal-72 festgestellt worden. Bei der Expression OPG, dem Antagonisten von sRANKL, der ebenfalls von Osteoblasten exprimiert wird, zeigte sich bei MG-63 und SaOS-2 Zellen ein vergleichbares Niveau wie bei hOSÜ, gefolgt von SCP-1. Um das acht- bis neunfache unter dem Niveau der hOSÜ lag bei einer hohen

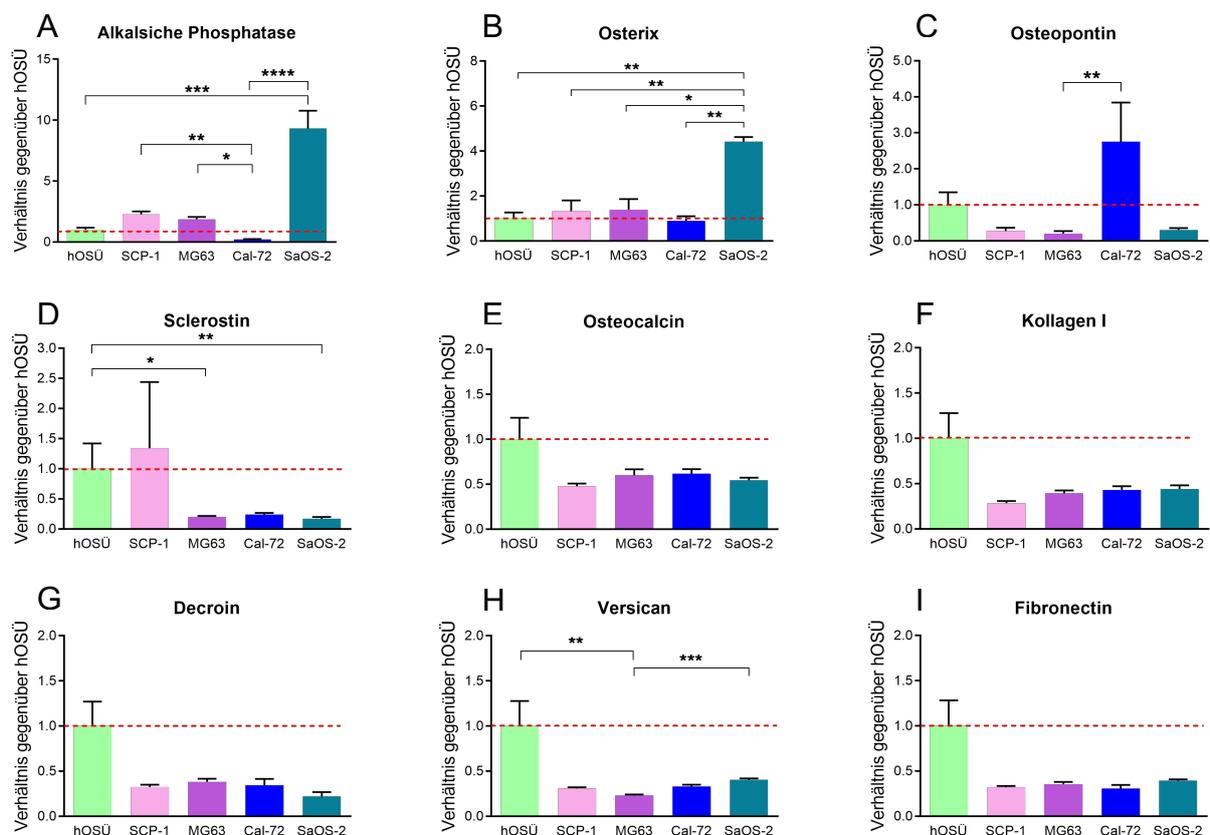


Abbildung 12. Vergleich der Genexpression zwischen osteogenen Zelllinien und primären humanen Osteoblasten. Die Expression der einzelnen Marker ist zwischen den einzelnen Zelllinien und gegenüber primären humanen Osteoblasten verglichen worden. Die gewonnenen Messwerte wurden mit dem „housekeeping“-Gen, zur Korrektur verrechnet und mit dem Messwert der hOSÜ ins Verhältnis gesetzt. N=4, n=2. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$

Streuung der Mittelwert der Cal-72 Zellen [68]. Damit einher ergab sich ebenfalls eine Eignung von SaOS-2 Zellen für das Modell.

Parallel am Institut durchgeführte Untersuchungen zur Auswahl einer geeigneten Vorläuferzelle zur Osteoklastogenese wurden die myeolytischen Suspensionszellen THP-1 und HL-60 miteinander verglichen [68]. Neben dem humanen Ursprung wurde die Expression von VitDR, CCR1 und RANK sowie Intensität des Transkriptionsfaktor NFATc1 untersucht. Eine Verwendung der Zelllinien RAW264.7 und J774 wurde nicht weiterverfolgt, da diese von Mäusen abstammen. In Bezug auf die Signalintensität für VitDR zeigten die Proben der HL-60 Zellen eine höhere Streuung, der Mittelwert war jedoch mit dem der THP-1 Zellen vergleichbar. Die Höhe der CCR1 Expression bei den HL-60 Zellen unterlag signifikant dem Niveau der THP-1 Zellen. Bezüglich der RANK Expression zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Zellarten. Gleiches galt auch in Bezug auf NFATc1, dass von THP-1 und HL-60 Zellen relativ gleich stark exprimiert wurde [68].

Die relative vergleichbare Expression bei SaOS-2 Zellen gegenüber hOSÜ, sowie die Expression an notwendigen Rezeptoren und Transkriptionsfaktoren bei den THP-1 Zellen zur Osteoklastogenese, sind wesentliche Bausteine für die Entwicklung des Co-Kulturmodells und zeigen eindeutig die Eignung beider Zellen für das Co-Kultur Modell. Der humane Ursprung von SaOS-2 und THP-1 Zellen sowie die Verwendung des gleichen Mediums sind weitere Vorteile bei der Kombination beider Zellen und der Entwicklung eines humanes *in vitro* Knochenstoffwechselmodells [4].

### **3.2.2 Zell-Zell-Verhältnisse**

Ein abgestimmtes Zell-Zell-Verhältnis zwischen den verwendeten Zellen ist entscheidend für ein ausgewogenes Co-Kultur Modell. Einerseits beeinflusst das Verhältnis den Fortgang der Differenzierung, andererseits die Stabilität des Modells über die Zeit.

Da bei der Differenzierung von Osteoklasten mehrere Vorläuferzellen zu einem Osteoklasten fusionieren, wurde die Zellzahl der THP-1 Zellen bereits zu Beginn der Versuche entsprechend angepasst. Zur Ermittlung eines geeigneten Zell-Zell-Verhältnis, sind die Verhältnisse 2:1, 2,67:1 und 4:1 mit jeweils  $2 \times 10^4$  THP-1 und den entsprechenden SaOS-2 Zellen in 2D 96-Well, über 21 Tage differenziert worden. Als Kontrolle wurden parallel weitere  $2 \times 10^4$  THP-1 Zellen in Mono-Kultur, in konditionierten SaOS-2 Medium, differenziert. An den Tagen 4, 7, 10, 14 und 21 erfolgten Messungen zur Bestimmung der Viabilität, mit Hilfe von Resazurin, der ALP-Aktivität, TRAP-

Aktivität und dem Niveau an mineralisierter Matrix wie auch Lebend-Färbungen. In der mitochondrialen Aktivität sowie im Verlauf von ALP- und TRAP-Aktivität zeigten sich keine Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Zell-Zell-Verhältnissen (Abbildung 13A, B, C). Im Vergleich der mineralisierten Matrix zeigte sich jedoch an Tag 4 ein höheres Niveau unter dem Verhältnis 2:1. An Tag 7 zog das Verhältnis 2,67:1 nach, welches in Summe über die 21 Tage dieselbe Höhe an mineralisierter Matrix bildete, wie auch das Verhältnis 2:1 (Abbildung 13D). Beim Vergleich der mikroskopischen Aufnahmen, der durch Alizarin Rot angefärbten, mineralisierten Matrix an Tag 14 wird allerdings eine intensivere Mineralisierung unter 2:1 im Well erkennbar (Abbildung 14). Dies lässt darauf schließen, dass eine höhere Zelldichte nicht nachteilhaft für das Modell ist.

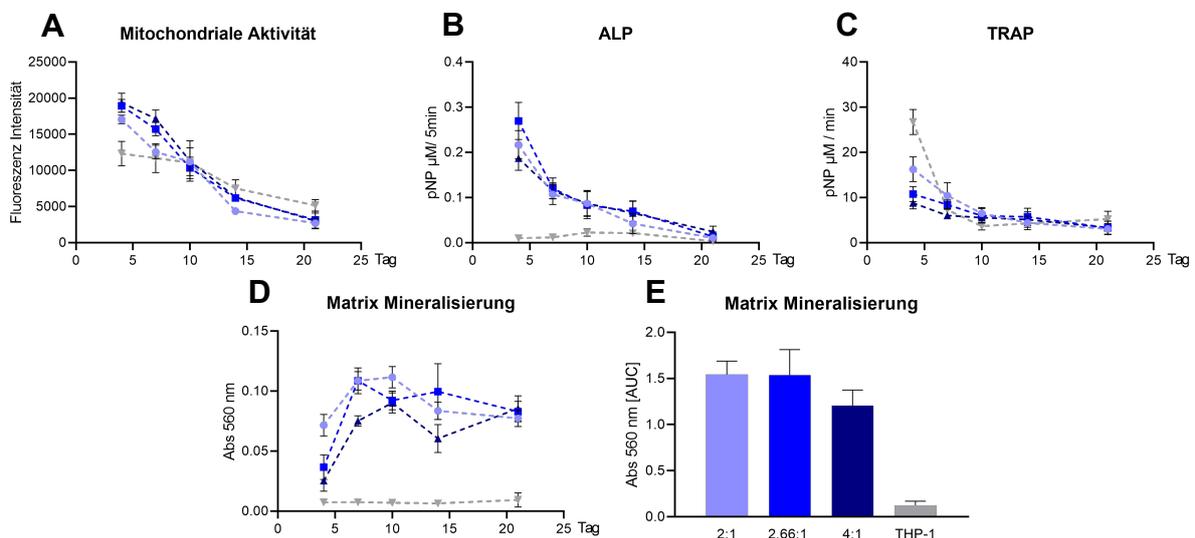


Abbildung 13. Vergleich unterschiedlicher Zell-Zell-Verhältnisse in 2D Co-Kultur, zwischen den zu Osteoklasten differenzierenden THP-1 Zellen und den osteoblastären SaOS-2 Zellen.

Die Zell-Zell-Verhältnisse von 2:1 (● hellblau), 2,67:1 (■ blau) und 4:1 (▲ dunkel blau) sind über 21 Tage kultiviert worden. An den Tagen 4, 7, 10, 14 und 21 erfolgten Messungen zur Bestimmung der (A) Mitochondrialen Aktivität, (B) Alkalischen Phosphatase Aktivität (ALP), (C) Tartrate-resistente saure Phosphatase Aktivität (TRAP) und (D) Matrix Mineralisierung (Alizarin Rot) über die Zeit, sowie in Summe (E). Für eine verbesserte Einschätzung des Effekts durch die direkte Co-Kultur und der gegenseitigen Beeinflussung beider Zeller, sind THP-1 Zellen (▼ grau) parallel in Mono-Kultur gehalten worden. N=3, n≥2, Mittelwert ± SEM

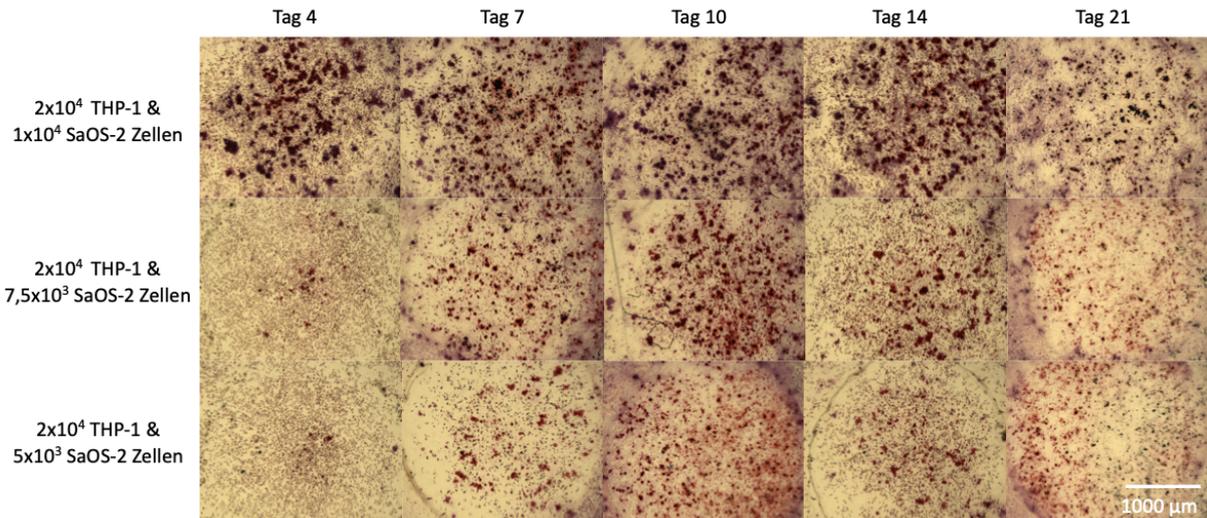


Abbildung 14. Alizarin Rot-Färbung der mineralisierten Matrix zur Ermittlung eines geeigneten Zell-Zell-Verhältnisses.

Lebend-Färbungen mit Calcein AM und Höchst 33342 zeigten an Tag 10 eine höhere Zell-Viabilität unter 2:1 gegenüber den anderen Verhältnissen an und gleichzeitig aber auch eine Limitierung des Modells bis Tag 7. Aufgrund der verlängerten Stabilität des Co-Kultur Modells, der gleichmäßigeren Matrix Mineralisierung sowie keinen erkennbaren Nebenwirkungen bei der Differenzierung der Co-Kultur ist für das Zell-Zell-Verhältnis 2:1 gewählt wurden.

### 3.2.3 Mediumshöhe & Hypoxie

Im Rahmen von Knochenbrüchen kommt es auch zu Verletzungen von Blutgefäßen und somit zu einer Hämatombildung. Dies kann über eine verminderte Blut- und somit Sauerstoffzufuhr bei gleichzeitig gesteigertem Sauerstoffbedarf der Zellen zu einer Ischämie bzw. Hypoxie führen. Der somit bestehende Sauerstoffmangel hat in der Regel eine Reduktion der ATP-Konzentration der Zellen zur Folge und löst eine Vielzahl an Reaktionen auf Zell- bzw. Gewebeebene aus [124]. Daher soll der Effekt der Hypoxie im Rahmen von Frakturen ebenfalls im Co-Kultur-Modell untersucht werden.

Zur Ermittlung möglicher Auswirkungen der unterschiedlichen Medienhöhen und somit einer unterschiedlichen Sauerstoff-Konzentration wurden THP-1 und SaOS-2 Zellen in einem Verhältnis von 2:1 für 11 Tage in Co-Kultur bei Mediumshöhen von 100 µl (3,1 mm, normoxic), 137 µl (4,3 mm; 10 mmHg) und 172 µl (5,4 mm; 6,2 mmHg) im 96-Well differenziert und untersucht. An den Tagen 4, 7 und 11 erfolgten Messungen

zur Bestimmung der Viabilität, mit Hilfe von Resazurin, der ALP-Aktivität, TRAP-Aktivität und dem Niveau an mineralisierter Matrix.

Wie erwartet hat die mitochondriale Aktivität über die Zeit abgenommen. Während die mitochondriale Aktivität zwischen den Bedingungen mit 100  $\mu\text{l}$  und 137  $\mu\text{l}$  über 11 Tage sich gleich verhielt, so ist die Aktivität unter 172,8  $\mu\text{l}$  bereits an Tag 4 deutlich reduziert. Zu Tag 7 vergrößerte sich die Differenz zwischen der Bedingung mit 172,8  $\mu\text{l}$  gegenüber 100  $\mu\text{l}$  sowie 137  $\mu\text{l}$  und verblieb, bis einschließlich Tag 11, auf einem konstant niedrigen Niveau (Abbildung 15A). Ebenfalls zeigte sich durch Hypoxie eine deutlich reduziert Osteoklasten spezifische TRAP-Aktivität. An Tag 7 wurde eine TRAP-Aktivität unter 172,8  $\mu\text{l}$  bestimmt die 49 % niedriger gegenüber der Normalbedingung mit 100  $\mu\text{l}$ , sowie an Tag 11 45,22 % niedriger im Vergleich zu 100  $\mu\text{l}$  und 54,68 % gegenüber 137  $\mu\text{l}$  (Abbildung 15C). Eine Beeinflussung der Matrix-Mineralisierung war ebenfalls zu erkennen. So ist der Verlauf unter allen drei Bedingungen ähnlich, jedoch das Niveau mit steigendem Volumen reduziert. Die Höhe an mineralisierter Matrix ist in Summe unter 172,8  $\mu\text{l}$  im Vergleich zu 100  $\mu\text{l}$  um 20,8 % niedriger (Abbildung 15E). Da kein positiver Unterschied zwischen 100  $\mu\text{l}$  und 137  $\mu\text{l}$  Medium festgestellt werden konnte, wurden 100  $\mu\text{l}$  Medium in 96-Well für die weiteren Untersuchungen gewählt.

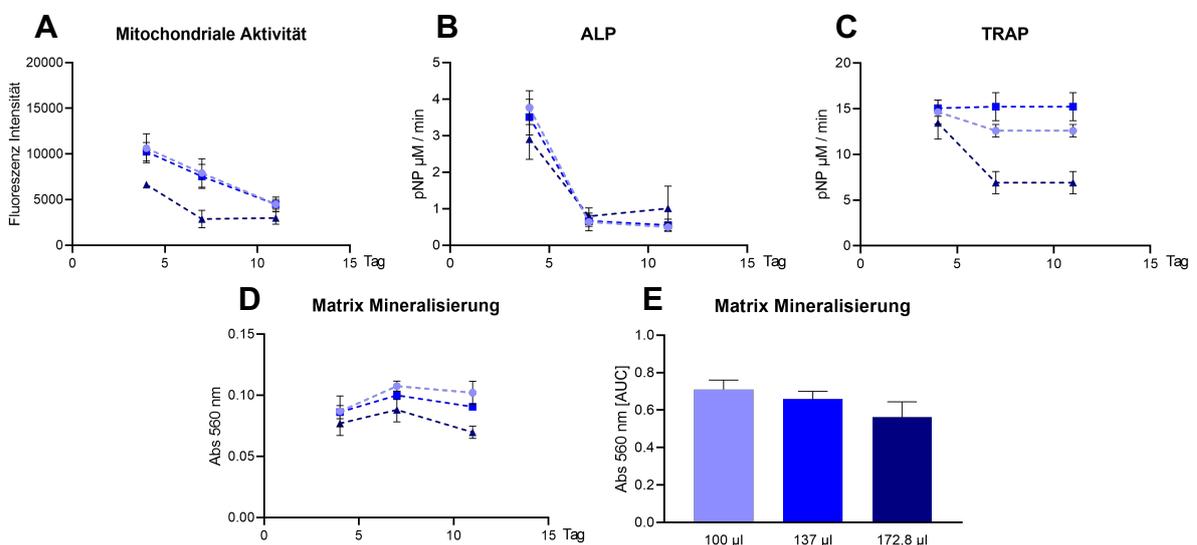


Abbildung 15. Einfluss von Hypoxie auf die Differenzierung einer Co-Kultur, aus SaOS-2 und THP-1 Zellen, in 2D. Durch Kultivierung der Co-Kultur in unterschiedlichen Volumina an Differenzierungsmedium sind Abstufungen der gelösten Sauerstoffkonzentration eingestellt worden. In 96-Well wird eine Normalsättigung von 21 mmHg durch 100  $\mu\text{l}$  (● hellblau), Sauerstoffreduzierte mit 137  $\mu\text{l}$  (■ blau) und Hypoxie mit 6,2 mmHg durch 172,8  $\mu\text{l}$  (▲ dunkelblau) eingestellt. An den Tagen 4, 7 und 11 erfolgten Messungen zur Bestimmung der (A) Mitochondrialen Aktivität, (B) Alkalischen Phosphatase Aktivität (ALP), (C) Tartrate-resistente saure Phosphatase Aktivität (TRAP) und (D) Matrix Mineralisierung (Alizarin Rot) über die Zeit, sowie in Summe (E). N=3, n $\geq$ 2, Mittelwert  $\pm$  SEM

### 3.2.4 Einfluss des FCS-Gehalts

Für die Kultivierung der Zelllinien THP-1 und SaOS-2 erwies sich das RPMI 1640 Medium sowohl zur Kultivierung als auch zur Differenzierung (zzgl. Zusatzstoffe) als geeignet. Das zur Differenzierung der Co-Kultur verwendete Medium basiert auf einem Differenzierungsmedium mit einem Gehalt von 1 % FCS, das zur Differenzierung von primären Osteoblasten verwendet wurde [103]. Um eine nachteilige Beeinflussung der Kultur durch eine zu geringe FCS-Konzentration auszuschließen ist der Einfluss von 1 %, 2 % und 3 % FCS am Co-Kultur Modell untersucht worden.

In einem Verhältnis von 2:1 sind THP-1 und SaOS-2 Zellen über 11 Tage in Co-Kultur, unter den FCS Konzentrationen 1 %, 2 % und 3 % FCS, differenziert worden. An den Tagen 4, 7 und 11 erfolgten Messungen zur Bestimmung der Viabilität, durch Resazurin, ALP-Aktivität, TRAP-Aktivität und dem Niveau an mineralisierter Matrix.

Eine Erhöhung der FCS-Konzentration zeigte keinen Einfluss auf die Mitochondriale Aktivität (Abbildung 16A), aber sowohl auf die ALP als auch TRAP-Aktivität. So ist die ALP-Aktivität unter 2 % FCS um 110,4 % und unter 3 % FCS um 96,1 % höher gegenüber der Aktivität bei 1 % FCS, an Tag 4. Zwar gleichen sich die ALP-Aktivitäten von 2 % und 3 % FCS zu Tag 7 und Tag 11 an, so sind sie beide dennoch höher im Vergleich zu 1 % FCS (Abbildung. 16B). Die TRAP-Aktivität ist ebenfalls über die

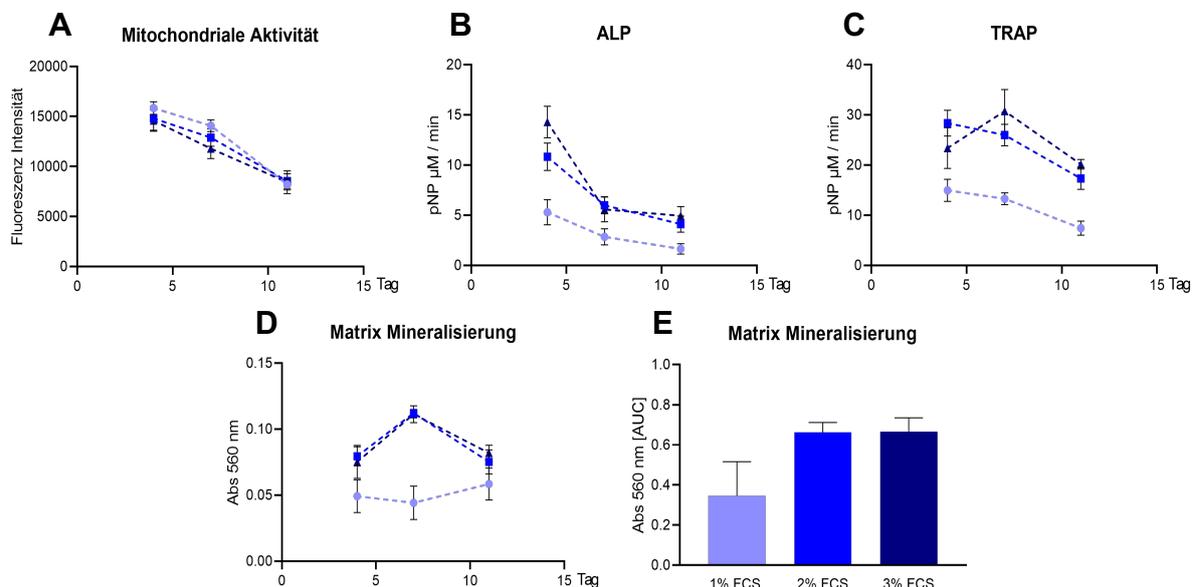


Abbildung 16. Vergleich des Einflusses von unterschiedlicher FCS Konzentrationen auf die Differenzierung einer Co-Kultur, aus SaOS-2 und THP-1 Zellen.

FCS Konzentrationen von 1 % (● hellblau), 2 % (■ blau) und 3 % (▲ dunkel blau) sind am Modell getestet worden. An den Tagen 4, 7 und 11 erfolgten Messungen zur Bestimmung der (A) Mitochondrialen Aktivität, (B) Alkalischen Phosphatase Aktivität (ALP), (C) Tartrate-resistente saure Phosphatase Aktivität (TRAP) und (D) Matrix Mineralisierung (Alizarin Rot) über die Zeit, sowie in Summe (E). N=3, n≥2, Mittelwert ± SEM

gesamte Versuchsdauer unter 2 % und 3 % FCS höher, wie im Fall von 1 % FCS. An Tag 11 ist die Aktivität unter 2 % FCS um 132,99 % und 3 % FCS um 171,13 % größer als unter den Kontrollbedingungen mit 1 % FCS (Abbildung 16C). Auch bezüglich der mineralisierten Matrix zeigte sich eine Steigerung, so wurden unter 2 % und 3 % FCS  $\pm 91,8$  % mehr Matrix mineralisiert als unter 1 % FCS, im gleichen Zeitraum (Abbildung 16E, 17).

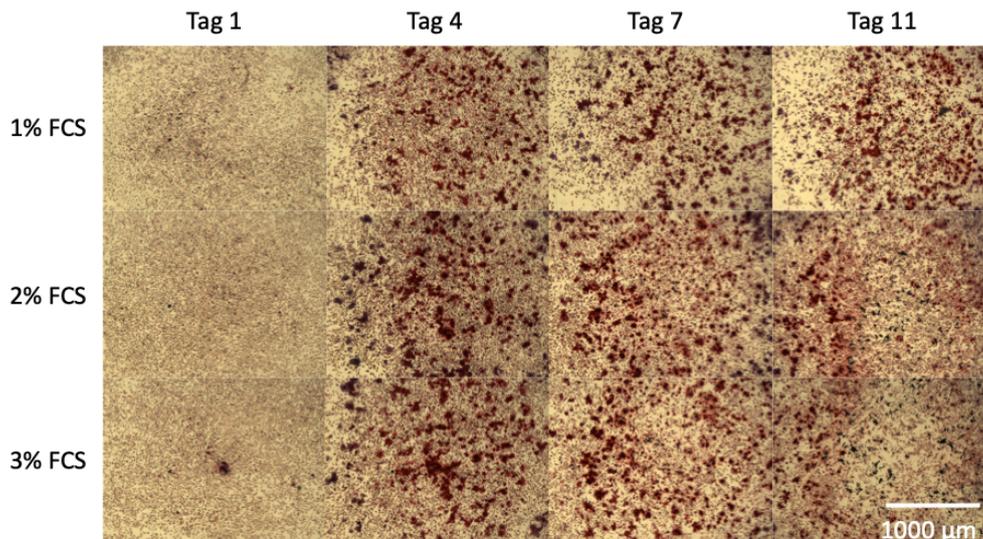


Abbildung 17. Mikroskopische Aufnahmen der Alizarin Rot Färbung von der Co-Kultur mineralisierten Matrix unter Einfluss unterschiedlicher FCS-Konzentrationen

### 3.2.5 Co-Kultur unter diabetischen Bedingungen in 2D

Nach Entwicklung der Co-Kultur und Anpassung der Kulturbedingungen wurde das Modell erstmals unter den angestrebten diabetischen Bedingungen getestet. Dazu ist das Modell in 2D 96-Wellen über 7 Tage unter hyperglykämischen Bedingungen mit und ohne Kombination einer Hyperinsulinämie (HG-I / HG+I) *in vitro* untersucht worden. Um mögliche Effekte durch den erhöhten osmotischen Druck bzw. die Auswirkungen der Hyperinsulinämie einschätzen zu können, wurde die Co-Kultur parallel unter „Normal-Glukose“ mit und ohne Kombination einer Hyperinsulinämie (NG-I / NG+I) ebenfalls evaluiert. Beide Zellarten sind zusätzlich jeweils unter den gleichen Bedingungen in Mono-Kultur untersucht worden, um die möglichen Effekte in der Co-Kultur ggf. einer der Zellarten zuzuordnen bzw. den möglichen Ursprung des Effekts identifizieren zu können. Bei den durchgeführten Versuchen zeigten sich Hinweise auf einen Einfluss der diabetischen Bedingungen, jedoch konnten auf Grund hohen Standardabweichungen und fehlender Signifikanzen keine Rückschlüsse gezogen werden, welche Zell-Art inwieweit von der jeweiligen Bedingung beeinflusst wird. Bei

den mittels *Platereader* gemessenen Daten handelt es sich um Daten, die nicht reflektieren wie viele Zellen für jenes gemessene Signal verantwortlich sind. In Bezug auf die Co-Kultur und die gegenseitige Interaktion der Zellen ist es elementar, das Messergebnis quantitativ auf die entsprechende Zell-Art zurückzuführen zu können, um den Effekt im Co-Kultur Modell richtig zu interpretieren. Aus diesem Grund ist zunächst eine Quantifizierung der jeweiligen Zell-Art im Co-Kultur Modell mittels Normalisierung erforderlich.

### **3.2.6 Normalisierung/ Quantifizierung**

Die durch die Differenzierung sich ändernden zellspezifischen Aktivitäten sowie die gegenseitige Beeinflussung der Zellen kann Einfluss auf die Zell-Verhältnisse wie auch auf die Kulturdauer haben. Um die in den Experimenten gewonnenen Daten richtig interpretieren zu können, bedarf es Kenntnisse über die Zellzahl und das Verhältnis der beiden Zelltypen.

Eine Normalisierung über den Umsatz eines spezifischen Stoffes, wie zum Beispiel Resazurin, ist bei einer Co-Kultur nicht geeignet, da jede der beiden verwendeten Zelltypen einen unterschiedlich hohen Umsatz besitzt und dieser vom Status der Differenzierung variiert und abhängig ist. Des Weiteren beeinflussen die *in vitro* Bedingungen ebenfalls den Resazurin-Umsatz. So zeigten sich auch Unterschiede im Umsatz beim Vergleich der mitochondrialen Aktivität zwischen 2D und 3D Kultivierung. Eine qualifizierte Unterscheidung beider Zelltypen und Erkenntnisse über das Zell-Zell-Verhältnis können so nicht gewonnen werden. Daher bedurfte es der Etablierung einer Methode, die eine zellspezifische Normalisierung der Daten erlaubt.

Auf Basis farblicher Kennzeichnung und unter Zuhilfenahme der Fluoreszenzmikroskopie ist zunächst eine Methode zur Unterscheidung entwickelt worden. Zell-Tracker-Farbstoffe erwiesen sich allerdings aufgrund ihrer zu geringen Haltbarkeit von <14 Tage als ungeeignet. Als weiterer Ansatz wurde über Transfektion versucht Plasmide mit fluoreszierenden Proteinen (EBPF2-N1 – blau fluoreszierendes Protein, tdTomato-N1 – rot fluoreszierendes Protein, sf-GFP-N1 – grün fluoreszierendes Protein) in die Zellen einzuschleusen und mittels Selektionsantibiotikum G418 die kontinuierliche Expression des fluoreszierenden Proteins anzuregen. Nach erfolgreicher Isolation der Plasmide durch alkalische Lyse wurden die Proben mittels Restriktionsverdau (Sall, NcoI, XhoI, EcoRI) auf ihre Reinheit und Richtigkeit kontrolliert. Nach positiven Ergebnissen ist mit der Einschleusung der Fremd-DNA in die Zellen begonnen worden.

Bei Transfektionsversuchen mit SaOS-2 Zellen zeigte sich die größte Effizienz bei der Verwendung von FuGENE®HD mit 8 – 11 %, GennaxxonFect-plus mit 4,2 – 5,7 % und unter der zweiten Bedingung von ViaFect mit 5,3 %. Allerdings kam es dabei auch zu Apoptosen. So lag die Mortalität, nach 24 h, bei GenaxxonFect-plus zwischen 36,1 – 53,3 %, FuGENE®HD zwischen 24,1 – 27,6 % und bei ViaFect™ zwischen 4,4 – 8,5 %. Im Fall der weiteren getesteten Transfektionsreagenzien lag bei den SaOS-2 Zellen die Effizienz deutlich tiefer bzw. zeigte sich eine hohe Mortalität. Die mit FuGENE®HD erfolgreich modifizierten SaOS-2 Zellen sind in Gefrierreaktionsgefäßen für 4 Tage in flüssigem Stickstoff eingefroren und nach erfolgreichem Auftauen elf weitere Tage in Kultur gehalten worden. Dies diente der Kontrolle der Signalstabilität, die auch nach dem Einfrierschritt weitere 11 Tage gleichbleibend gegeben war. Versuche die THP-1 Zellen zu transfizieren blieben mit einer Effizienz von unter 1 %, erfolglos. Um gegebenenfalls modifizierte SaOS-2 Zellen mit nicht modifizierbaren THP-1 Zellen dennoch in Co-Kultur differenzieren zu können, ist die Notwendigkeit des Selektionsdrucks durch G418 überprüft worden. Es zeigte sich, dass die SaOS-2 Zellen ein gleichbleibendes Fluoreszenzsignal über 11 Tage auch ohne G418 im Medium erzeugten.

Versuche mit THP-1 wie auch SaOS-2 Zellen mittels replikationsdefekter adenoviraler Vektoren zu modifizieren, erwies sich bei SaOS-2 Zellen erneut positiv, bei den THP-1 Zellen hingegen wieder als negativ. Bei Co-Kultur Versuchen mit transfizierten bzw. transduzierten SaOS-2 Zellen und unbehandelten THP-1 Zellen war eine Unterscheidung der Zellen in den ersten Tagen gut möglich. So konnten auch an Tag 11 transfizierte SaOS-2-RFP Zellen gut von THP-1 Zellen unterschieden werden. Hierzu wurden unter anderem Lebendfarbstoffen wie z. B. Calcein AM verwendet, sowie zur Anfärbung der Zellkerne Höchst 33342. Beim Vergleich der Zelldichte zwischen den einzelnen Bedingungen je Well schien die Effizienz der Aussaat im Fall der transduzierten SaOS-2 Zellen gegenüber den Kontrollen reduziert zu sein. Es konnten nur vereinzelt fluoreszierende Zellen bestimmt werden. Am elften Tag konnte kein Signal von transduzierten SaOS-2 Zellen mehr bestimmt werden. Die dazu parallel gemessenen Zellparameter wiesen erste Hinweise zu Veränderungen in den Co-Kulturen mit transfizierten bzw. transduzierten Zellen gegenüber der Kontrolle auf. Bei der Übertragung der Co-Kultur von 2D auf 3D entstanden weitere Hürden zur Normalisierung. Die Zusammensetzung der Matrix führte zu einer sehr geringen Lichtdurchlässigkeit (Transluzenz), wodurch bereits etwas tiefer liegenden Zellen nicht

visualisiert werden konnten. Aufgrund der sehr geringen Transluzenz, Hinweisen auf einen veränderten Stoffwechsel der Zellen und fehlender langfristiger Stabilität der eingesetzten Marker ist entschieden worden, eine Normalisierung auf Basis genetischer Merkmale zu entwickeln.

Eine in der Literatur beschriebene Zelllinie zur Erforschung von Osteoklasten ist die Zelllinie J774 [125]. Dabei handelt es sich um eine monozytäre Makrophage, die der Maus abstammt. Der Vorteil dieser Zelllinie in Bezug auf das Co-Kultur Modell ist ihr genetisches Merkmal, das die Zellart der Maus abstammt und so eine Differenzierung zwischen humanen SaOS2-Zellen mittels PCR einfach realisierbar ist. Experimentelle Vergleiche zwischen THP-1 und J774 Zellen in Mono- und Co-Kultur zeigten ein ähnliches Verhalten beider Zellen. Der Resazurinumsatz allgemein wie auch die ALP-Aktivität der SaOS-2 Zellen war in beiden Co-Kultur Modellen gleich. Die CaII-Aktivität der OC ist in Betrachtung auf die Gesamtleistung über eine Dauer von 7 Tagen ähnlich. Allerdings begannen die J774 Zellen ihrer Adhärenz ab Tag vier zu verlieren. Der Wechsel von einem rein humanen zu einem Mensch-Maus-Modell und besonders die reduzierte Stabilität des Modells von nur vier Tagen führten zu der Entscheidung, das Co-Kultur Modell weiter mit THP-1 Zellen zu entwickeln.

Ein entscheidender Unterschied zwischen SaOS-2 und THP-1 Zellen ist ihr Geschlecht. Bei den SaOS-2 Zellen handelt es sich um weibliche und bei THP-1 Zellen um männliche Zellen. Auf Basis des Nachweises von geschlechtsspezifischer DNA-Sequenzen ist es dann erfolgreich gelungen zwischen beiden Zellen zu unterscheiden. Es ist möglich geworden, die Gesamtmenge an DNA entsprechend beider Zellarten aufzuteilen und das Verhältnis mittels PCR zu bestimmen. Auf Grundlage dessen ist ab sofort die DNA bei den Experimenten isoliert und unter Verwendung der quantitativen Echtzeit-PCR die Normalisierung durchgeführt worden [4,21].

### **3.3 Etablierung einer Co-Kultur**

#### **3.3.1 Bisphosphonate**

Um das Modell auf seine Funktionalität und die gegenseitige Beeinflussung beider Zellarten zu testen, ist der Einfluss von Bisphosphonaten am Co-Kulturmodell untersucht worden. Bisphosphonate hemmen die Aktivität der Osteoklasten und werden aus diesem Grund in der Behandlung von Osteoporose verwendet [126].

In unseren Versuchen wurden die Zellen sowohl in Co-Kultur als auch jeweils in Mono-Kultur mit 0,05 µM Alendronat bzw. Zoledronat, über 14 Tage, in 2D kultiviert. An den

Tagen 1, 4, 7, 10 und 14 erfolgten unterschiedliche Messungen zur Beurteilung der Co-Kultur.

Sowohl Alendronat wie auch Zoledronat zeigten Einfluss auf die Co-Kultur. So reduzierte sich in den ersten 7 Tagen die mitochondriale Aktivität, allerdings ist der erwartete Rückgang signifikant ( $p < 0,05$ ) geringer ausgefallen als unter Kontrollbedingungen. Anschließend erhöhte sich die mitochondriale Aktivität abermals, bevor sie aber von Tag 10 bis Tag 14 wieder auf das Niveau von Tag 7 herabfällt. In Summe ist die mitochondriale Aktivität unter beiden Bisphosphonaten deutlich höher als unter Kontrollbedingungen (Abbildung 18A).

Ebenfalls höher gegenüber der Kontrollbedingung ist das Niveau mineralisierter Matrix unter beiden Bisphosphonaten gewesen. In den ersten 10 Tage zeigte sich zunächst kein Unterschied zwischen den einzelnen Bedingungen. Ab Tag 14 zeigte sich jedoch eine signifikante Zunahme der mineralisierten Matrix sowohl unter Einfluss von Alendronat (+ 54,37 %,  $p < 0,0001$ ) als auch Zoledronat (+ 64,99 %,  $p < 0,0001$ ) jeweils im Vergleich zur Kontrollbedingung (Abbildung 18B). Unter Zoledronat zeigte sich an Tag 14 eine 23,35 % höhere Matrix-Mineralisierung als unter Zugabe von Alendronat.

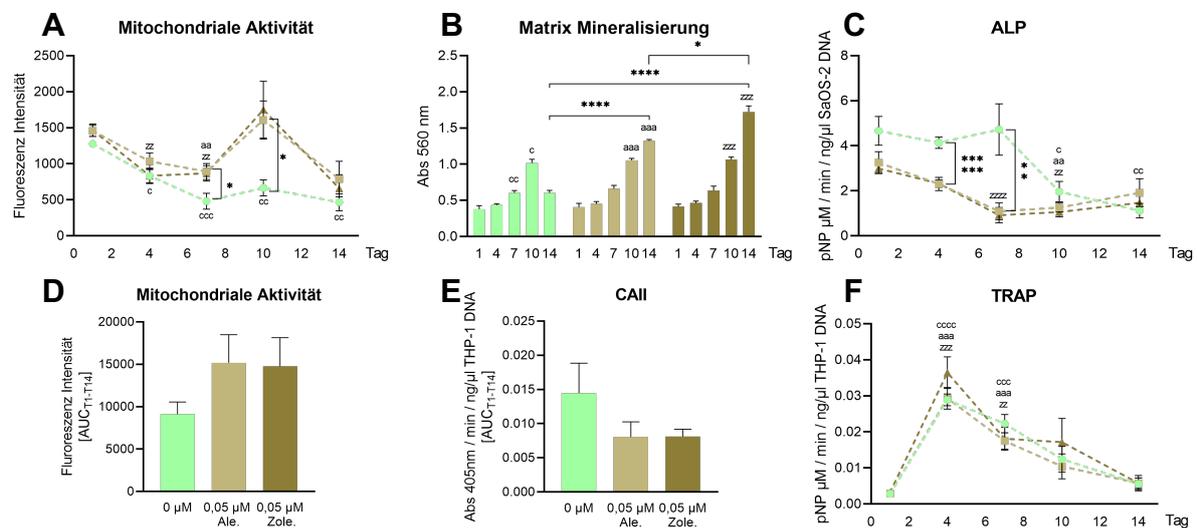


Abbildung 18. Untersuchung des Einflusses von Bisphosphonaten auf die Aktivität des Co-Kultur Modells.

Die Bisphosphonate Alendronat (■ hellbraun) und Zoledronat (▲ dunkelbraun) sind jeweils zu 0,05  $\mu\text{M}$  dem Differenzierungsmedium hinzugefügt worden. Zur Kontrolle sind parallel die Zellen ebenfalls, aber ohne Zugabe eines Bisphosphonates, differenziert worden (● hellgrün). An den Tagen 1, 4, 7, 10 und 14 wurden Zellparameter bestimmt, unter anderem die Viabilität über die (A) Mitochondrialen Aktivität, (B) Menge an mineralisierter Matrix, (C) Alkalischen Phosphatase Aktivität (ALP), (D) Summe an Mitochondrialen Aktivität über 14 Tage, (E) Carbonic Anydrase II Aktivität und (F) Tartrate-resistente saure Phosphatase Aktivität (TRAP).  $N=3$ ,  $n=3$ , Mittelwert  $\pm$  SEM, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ; c, a, z stellvertretend für \* in Bezug auf T0

Ebenfalls zeigten sich Einflüsse auf die ALP-Aktivität sowie die CAII-Aktivität unter Einfluss der Bisphosphonate.

Während die ALP-Aktivität unter Kontrollbedingungen in den ersten 7 Tage einen Umsatz von über 4 pNP  $\mu\text{M}/\text{min}$  aufwies, so zeigten die SaOS-2 Zellen bereits nach den ersten 24 h einen Umsatz unter 4 pNP  $\mu\text{M}/\text{min}$ , der im Verlauf bis Tag 7 auf knapp unter 1 pNP  $\mu\text{M}/\text{min}$  abnahm (Abbildung 18C). Die CAII-Aktivität zeigte sich unter Einfluss von Bisphosphonaten ebenfalls deutlich reduziert. Die TRAP-Aktivität wurde durch die Bisphosphonate nicht beeinflusst (Abbildung 18F).

Die Höhe der detektierten DNA im Well, die die Menge an vitalen Zellen im Well widerspiegelt, verhielt sich trotz der Bisphosphonate ähnlich wie unter Kontrollbedingung. Nach einem zunächst konstanten Verlauf in der gemessenen DNA-Konzentration ist ab Tag 7 eine Reduktion festgestellt worden. Das Verhältnis zwischen THP-1 und SaOS-2 Zellen ist unabhängig dessen konstant (Abbildung 19A). Unterschiede zeigten sich allerdings in Bezug auf den Glukoseverbrauch. Zwar stieg der Verbrauch in den ersten 7 Tagen an, nahm aber analog der Kontrolle unter Zugabe von Bisphosphonaten ab, jedoch zeigte sich allgemein ein niedrigerer Verbrauch unter Alendronat und Zoledronat als gegenüber der Kontrolle (Abbildung 19B).

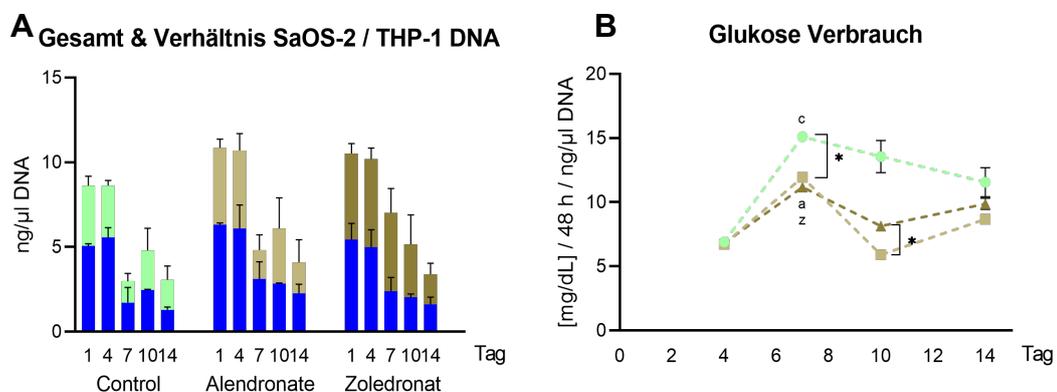


Abbildung 19. Einfluss der Bisphosphonate Alendronat sowie Zoledronat auf das Zell-Zell-Verhältnis und den Glukoseverbrauch während der Differenzierung des Co-Kultur Modells, über 14 Tage.

Alendronat (■ hellbraun) bzw. Zoledronat (▲ dunkelbraun) sind jeweils zu 0,05  $\mu\text{M}$  dem Differenzierungsmedium hinzugefügt worden. Zur Kontrolle sind parallel die Zellen ebenfalls, aber ohne Zugabe eines Bisphosphonates, differenziert worden (● hellgrün). An den Tagen 1, 4, 7, 10 und 14 wurden Zellparameter bestimmt. In Graphik (A) angezeigte DNA Konzentration zeigt einerseits die detektierte Gesamtkonzentration sowie den entsprechenden Anteil an SaOS-2 DNA (hell grün, hell braun, dunkel braun) wie auch den Anteil an THP-1 DNA (blau). N=3, n=3, Mittelwert  $\pm$  SEM, \* p < 0.05

Beim Vergleich der von Osteoblasten sezernierten gemessenen Konzentration an sRANKL und OPG, zeigte sich eine schrittweise Zunahme an sRANKL unter der Kontrollbedingung wie auch unter Einfluss von Alendronat. Die Kultivierung unter

Zoledronat führte hingegen zu einer Art Seitwärtsbewegung. In Bezug auf die gemessenen Konzentrationen ist der Unterschied zwischen allen drei Bedingungen aber gering. Mit Fokus auf die gemessenen Konzentrationen an OPG ist mit Ausnahme einer deutlich erhöhten OPG-Konzentration an Tag 10 unter Alendronat, ein gleichbleibendes Niveau über die gesamte Versuchsdauer unter allen drei Bedingungen beobachtet worden. Mit Ausnahme eines Ausreißers an Tag 10 unter Alendronat überstiegen die gemessenen Werte die Schwelle von 50 pg/ml nicht (Abbildung 20B). Der Vergleich der Konzentrationen an sRANKL und OPG zeigt zu Tag 7 einen erhöhten Anteil an sRANKL, der aber unter beiden Bisphosphonaten abermals in den folgenden Tagen abnimmt und der Anteil an OPG wieder überwiegt (Abbildung 20C). Bei dem mit Knochenaufbau assoziierte Marker PINP ist ein leicht ansteigender Trend trotz hoher Schwankungen festgestellt worden (Abbildung 20D). Ebenfalls wurde eine Zunahme der NTX-Konzentration bestimmt (Abbildung 20E). Zwar sind zu Beginn und dem Ende die gleichen Konzentrationen bestimmt worden, sowohl unter der Kontroll- wie auch den beiden Bisphosphonate Bedingungen, dennoch waren die NTX-Konzentrationen in der Zeit von Tag 4 bis 10 höher im Vergleich zur Kontrolle.

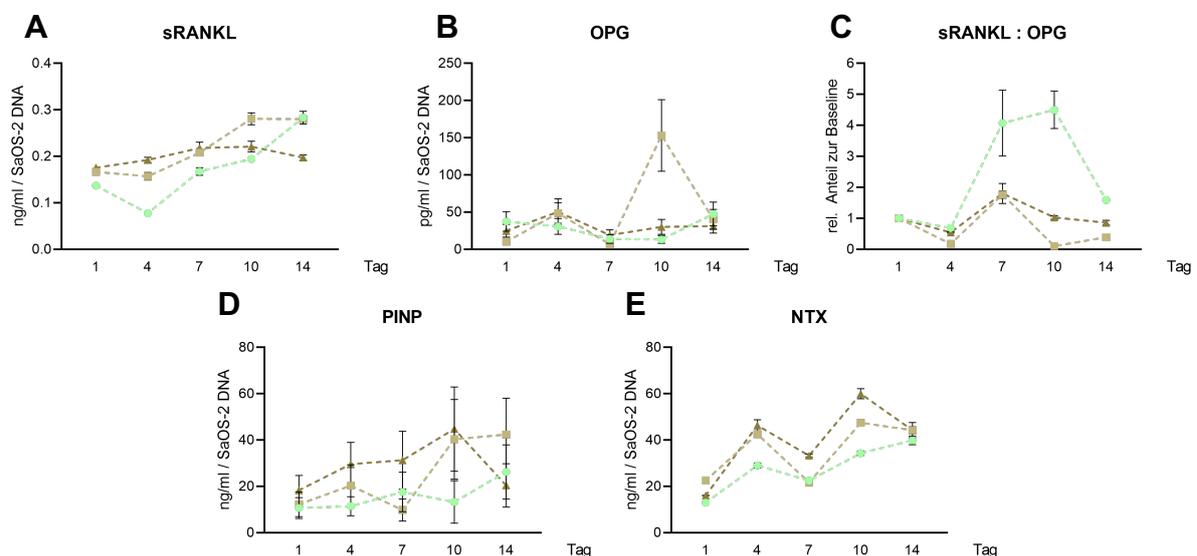


Abbildung 20. Konzentrationsverlauf von Knochenspezifischen Zytokinen und Proteinen im Zellkulturüberstand. Bestimmung von Knochenspezifische Marker im Zellkulturüberstand der Co-Kultur unter dem Einfluss der Bisphosphonate Alendronat (■ hellbraun) und Zoledronat (▲ rot) und einer Kontrolle (● hellgrün). Die Differenzierung der Zellen erfolgte über 14 Tage. Die Probenahme erfolgte an den Tagen 1, 4, 7, 10 und 14. Dabei sind die Konzentrationen der Zytokine (A) sRANKL und (B) OPG für die Differenzierung von Osteoklasten, (C) das Verhältnis von sRANKL:OPG, sowie die Konzentrationen von (D) PINP und (E) NTX untersucht worden. N≥3, n=3, Mittelwert ± SEM

In den Mono-Kulturen zeigten sich eine nur geringe bzw. nur unwesentlich Beeinflussung der Zellen durch Alendronat bzw. Zoledronat. Die mitochondriale Aktivität ist bei den SaOS-2 Zellen in Mono-Kultur, zu Tag 1 erhöht, aber bereits zu Tag 4 wieder auf gleichem Niveau wie unter den Kontrollbedingungen (Abbildung 21A). Die THP-1 Zellen zeigten keinerlei Veränderungen in der mitochondrialen Aktivität durch Alendronat oder Zoledronat, in Mono-Kultur (Abbildung 21B). Die ALP-Aktivität der SaOS-2 Zellen ist unabhängig der Bisphosphonate deutlich höher in Mono-Kultur als in der Co-Kultur. Die Zugabe von Bisphosphonaten führte zu Beginn zu einer kurzen reduzierten ALP-Aktivität an Tag 1, allerdings war das Aktivitätsniveau unter allen drei Bedingungen an Tag 4 wieder gleich (Abbildung 21C). Eine eindeutige Veränderung der CAII-Aktivität durch die Bisphosphonate konnte bei den THP-1 Zellen in Mono-Kultur hingegen nicht festgestellt werden. Gleiches gilt für das Maß an mineralisierter Matrix bei der SaOS-2 Mono-Kultur.

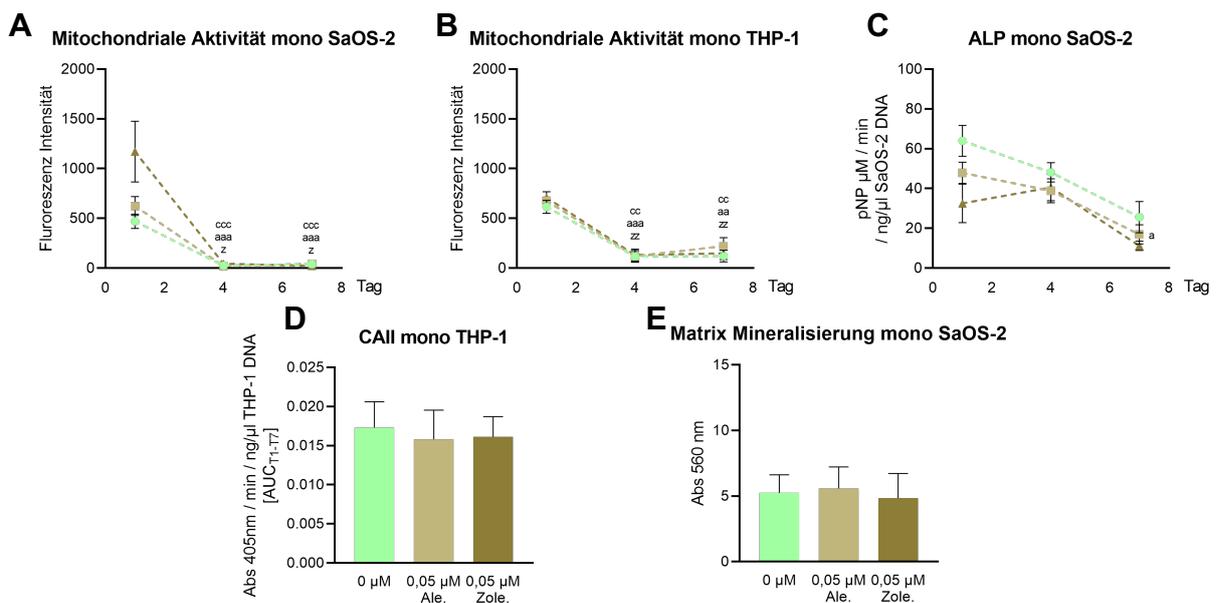


Abbildung 21. Einfluss der Bisphosphonate auf die Differenzierung der Zellen in Mono-Kultur.

Alendronat (■ hellbraun) bzw. Zoledronat (▲ dunkelbraun) sind jeweils zu 0,05 µM dem Differenzierungsmedium hinzugefügt worden und die Zellen in Mono-Kultur für 7 Tage differenziert. Zur Kontrolle sind parallel die Zellen ebenfalls, aber ohne Zugabe eines Bisphosphonates, differenziert worden (● hellgrün). An den Tagen 1, 4, und 7 wurden die Zellparameter bestimmt. In den Graphiken wird (A) die Mitochondriale Aktivität der SaOS-2 Zellen in Mono-Kultur, (B) die Mitochondriale Aktivität der THP-1 Zellen in Mono-Kultur, (C) die ALP-Aktivität der SaOS-2 Zellen, (D) die CAII-Aktivität der THP-1 Zellen und in (E) die Höhe der innerhalb von 7 Tagen mineralisierten Matrix, durch die SaOS-2 Zellen gezeigt. N=3, n=3, Mittelwert ± SEM, \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\*p < 0.001, \*\*\*\* p < 0.0001, c, a, z stellvertretend für \* in Bezug auf T0

### 3.3.2 Metformin

Für die finale Beurteilung der Co-Kultur soll das Modell unter diabetischen Bedingungen sowie unter Zugabe von Metformin, um eine typische Therapie des DM Typ II zu simulieren, untersucht werden.

Zur Ermittlung einer für das Modell nicht-toxischen Metformin-Konzentration wurden zunächst Metformin-Konzentration von 1, 5 und 10 µg/ml am 2D Co-Kultur-Modell getestet. Parallel zu den 2D Co-Kultur Versuchen wurde zusätzlich jede der beiden Zellarten in Mono-Kultur über 7 Tage kultiviert. An Tag 1, 4, 7, 10 und 14 erfolgten Messungen an den Kulturen.

Im Verlauf der mitochondrialen Aktivität zeigte sich zwischen den einzelnen Metformin-Konzentrationen kein Unterschied, jedoch in der Höhe an Aktivität (Abbildung 22A). Die gemessene Fluoreszenz-Intensität unter den Bedingungen 5 µg/ml und 10 µg/ml Metformin lagen an den jeweiligen Messtagen mehr als 36 % über den Umsätzen der Kontrolle sowie der 1 µg/ml Metformin Bedingung. Der Vergleich der AUC ergab, dass die mitochondriale Aktivität der 5 µg/ml Metformin Bedingung (35433 [Intensität]) um nahezu 1/3 höher gegenüber der Kontrolle (24218,3 [Intensität]) gewesen ist (Abbildung 22C). Eine steigende Metformin-Konzentration ging zudem mit einer höheren Gesamt-DNA-Konzentration (gemessen als AUC) einher. So überstieg die gemessene Gesamt-DNA-Konzentration unter 5 µg/ml Metformin um 51,42 % und unter 10 µg/ml Metformin um 70,90 % die Gesamt-DNA-Konzentration der Kontrolle. Vergleicht man die an den einzelnen Tagen gemessenen DNA-Konzentrationen, zeigte sich eine tendenzielle Abnahme der Gesamtkonzentration über die Zeit, wobei unter der Kontrollbedingung sowie der Bedingung mit 1 µg/ml Metformin eine stärkere Abnahme der DNA-Gesamtkonzentration festgestellt worden ist als unter 5 µg/ml und 10 µg/ml Metformin (Abbildung 22D). Auffällig dabei ist die Abnahme des THP-1 DNA-Anteils in der Co-Kultur. In allen vier Bedingungen reduzierte sich der gemessene THP-1 DNA-Gehalt gleichermaßen, wodurch sich das Verhältnis zwischen THP-1 Zellen und SaOS-2 Zellen unter Kontrollbedingungen zu 86 % und unter von 10 µg/ml Metformin sogar zu 152,8 % zugunsten der SaOS-2 Zellen verschob (Abbildung 22B).

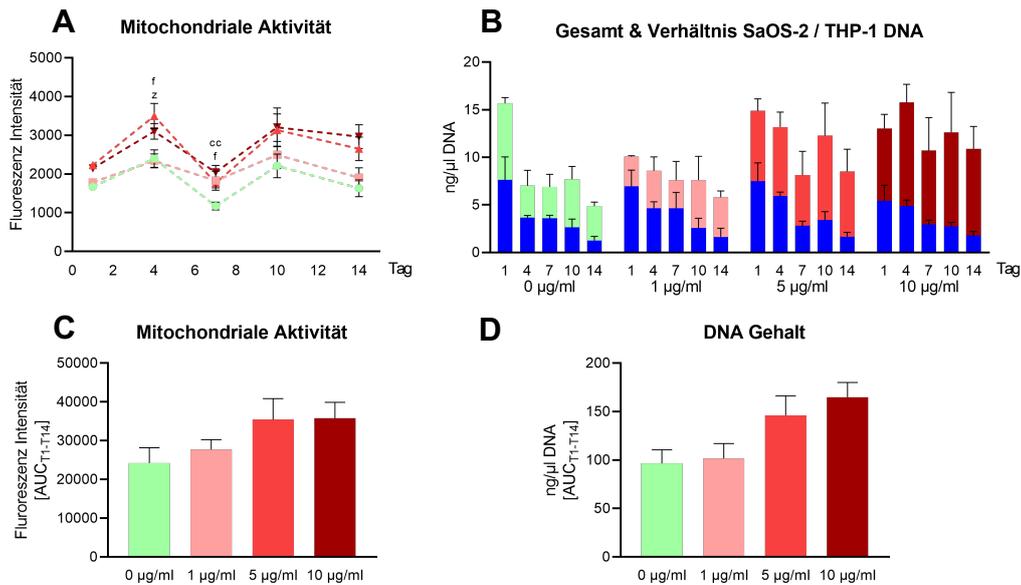


Abbildung 22. Einfluss unterschiedlicher Metformin Konzentrationen auf die Viabilität und das Zell-Zell-Verhältnis zwischen angehenden Osteoblasten und Osteoklasten in Co-Kultur.

Konzentrationen von 1 µg/ml (■ hellrot), 5 µg/ml (▲ rot) und 10 µg/ml (▼ dunkelrot) Metformin sind am Modell getestet worden. Zur Kontrolle ist parallel die Co-Kultur mit 0 µg/ml (● hellgrün) Metformin differenziert worden. An den Tagen 1, 4, 7, 10 und 14 erfolgten Messungen zur Bestimmung der (A) Mitochondrialen Aktivität, sowie die Bestimmung des (B) DNA-Gehalts und das Verhältnis zwischen SaOS-2 und THP-1 DNA. Die blau gefärbten Balken zeigen den jeweiligen Anteil an THP-1 DNA, der darüber liegende den Anteil an SaOS-2 DNA. (C) die Summe an mitochondrialer Aktivität als „Area under the Curve“ (AUC), sowie (D) den Gesamten DNA-Gehalt als AUC, jeweils über die 14 Tage der Differenzierung. N≥3, n=3, Mittelwert ± SEM

Die Metformin-Konzentrationen 5 µg/ml und 10 µg/ml führten zudem zu einer deutlichen Reduktion der ALP-Aktivität (Abbildung 23A, B). Während unter 0 µg/ml bzw. 1 µg/ml Metformin die ALP-Aktivität zunächst ansteigt oder erhöht ist, so ist sowohl unter 5 µg/ml wie auch 10 µg/ml Metformin die ALP-Aktivität bereits zu Beginn der Differenzierung niedrig und verringert sich an den folgenden Tagen weiter bis auf ein Grundniveau von ca. 0,55 pNP µM/min an Tag 10, das ebenfalls signifikant niedriger ist als das Niveau der Kontroll- und 1 µg/ml Metformin Bedingungen. Unterschiede zwischen den Bedingungen in der Höhe an mineralisierter Matrix sind über die gesamte Messdauer keine festgestellt worden (Abbildung 23C). In Bezug auf die Osteoklasten spezifische CAII-Aktivität ist zwischen Tag 7 und Tag 10 ein Anstieg der Aktivität, sowohl unter Kontroll- wie auch der 1 µg/ml Metformin Bedingung, festgestellt worden, während unter 5 µg/ml und 10 µg/ml Metformin die Aktivität gleichgeblieben niedrig geblieben ist (Abbildung 23D).

Ab der zweiten Hälfte der Kultivierungsdauer beginnt zudem der Glucoseverbrauch unter 5 µg/ml und 10 µg/ml Metformin leicht zu sinken. Der Verbrauch verbleibt auf einem niedrigen Niveau bis einschließlich Tag 14. Zwar sinkt unter 1 µg/ml Metformin

ebenfalls der Glucose Verbrauch, jedoch liegt er weiterhin oberhalb des Verbrauchs der beiden höheren Metformin-Konzentrationen. Der Verbrauch unter Kontrollbedingungen ist gleichbleibend gegenüber Tag 4, wodurch sich eine Differenz von 50,8 % gegenüber 5 µg/ml & 10 µg/ml Metformin zeigt (Abbildung 23E).

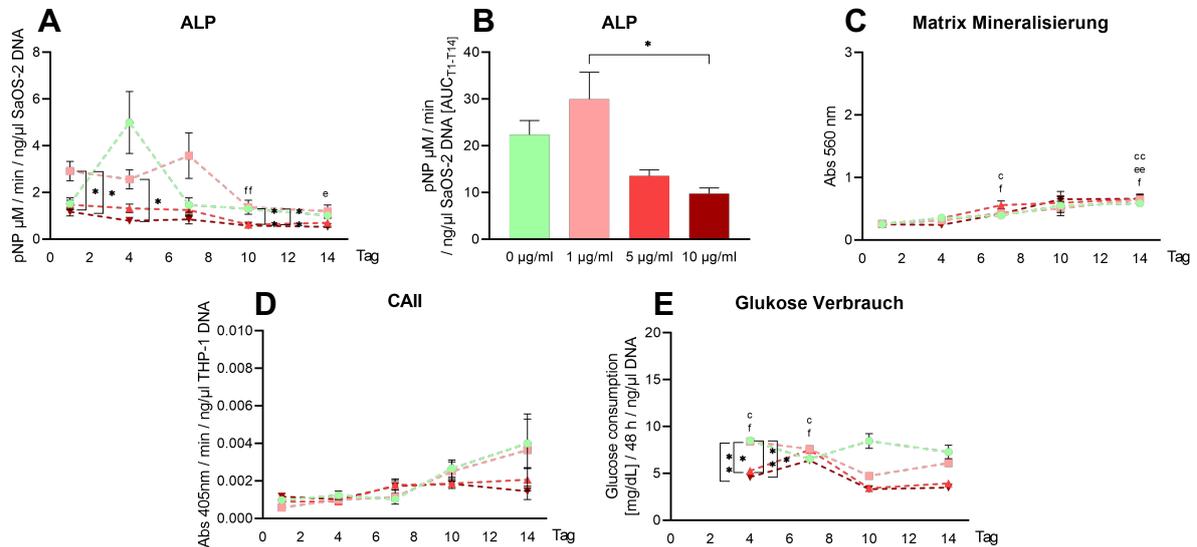


Abbildung 23. Einfluss unterschiedlicher Metformin Konzentrationen auf die Differenzierung und den Zellspezifischen Metabolismus in der Co-Kultur.

Konzentrationen von 1 µg/ml (■ hellrot), 5 µg/ml (▲ rot) und 10 µg/ml (▼ dunkelrot) Metformin sind am Modell getestet worden. Parallel zur Kontrolle ist die Co-Kultur unter 0 µg/ml (● hellgrün) Metformin differenziert worden. An den Tagen 1, 4, 7, 10 und 14 erfolgten Messungen zur Bestimmung der (A) Alkalischen Phosphatase Aktivität (ALP), (B) ALP über 14 Tage als AUC, (C) Menge an mineralisierter Matrix, (D) Carbonic Anhydrase II Aktivität und (E) Glucose Verbrauch. N≥3, n=3, Mittelwert ± SEM, \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, c, e, f stellvertretend für \* in Bezug auf T0

Metformin hat keinen wesentlichen Einfluss auf die Sezernierung der Zytokine sRANKL und OPG. Zwar sind leichte Konzentrationsunterschiede in beiden Fällen messbar gewesen, der Verlauf ist aber unabhängig der Metformin-Konzentration. Allgemein steigt die Konzentration an sRANKL mäßig (Abbildung 24A) und die von OPG beständig weiter an (Abbildung 24B). Hierdurch ergibt sich beim Vergleich der Konzentration von sRANKL und OPG ein Verhältnis, das stetig weiter abnimmt (Abbildung 24C).

Bei dem für den Knochenaufbau assoziierten Protein PINP (Abbildung 24D), wie auch mit dem für Knochenabbau in Verbindung stehende Protein NTX (Abbildung 24E) ist ebenso ein Anstieg über die Zeit beobachtet worden. Signifikante Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Metformin-Konzentrationen zeigten sich weder für PINP noch für NTX (Abbildung 24D, E).

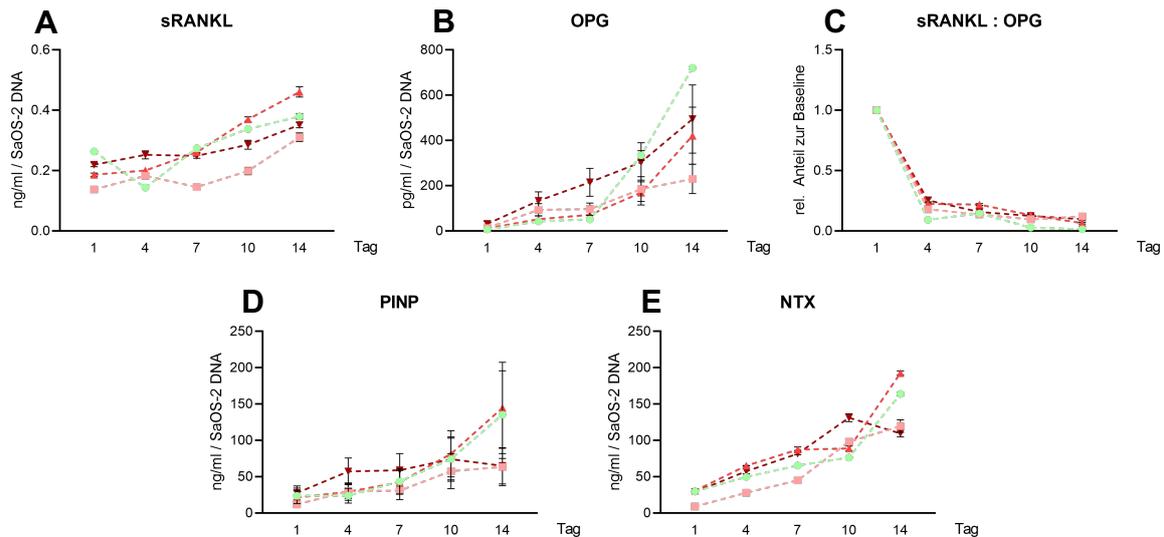


Abbildung 24. Konzentrationsverlauf von Knochenspezifischen Zytokinen und Proteinen im Zellkulturüberstand. Bestimmung von Knochenspezifischen Markern im Zellkulturüberstand der Co-Kultur unter dem Einfluss von 1 µg/ml (■ hellrot), 5 µg/ml (▲ rot) und 10 µg/ml (▼ dunkelrot) Metformin und einer Kontrolle mit 0 µg/ml (● hellgrün). Die Differenzierung der Zellen erfolgte über 14 Tage. Die Probenahme erfolgte an den Tagen 1, 4, 7, 10 und 14. Dabei wurden untersucht die Konzentrationen der Zytokine (A) sRANKL und (B) OPG für die Differenzierung von Osteoklasten, (C) das Verhältnis von sRANKL:OPG, sowie die Konzentrationen von (D) PINP und (E) NTX. N≥3, n=3, Mittelwert ± SEM

SaOS-2 Zellen wie auch THP-1 Zellen in Mono-Kultur zeigten unabhängig der unterschiedlichen Metformin-Konzentration keine signifikante Veränderung im Resazurinumsatz und damit in der Viabilität gegenüber der Kontrolle (Abbildung 25A, B). Veränderungen fanden sich in der ALP- und CAll-Aktivität. Die ALP-Aktivität der SaOS-2 Zellen nahm mit steigender Metformin-Konzentration ab, ebenso die CAll-Aktivität der THP-1 Zellen. Im Fall der ALP-Aktivität der SaOS-2 Zellen in Mono-Kultur ist unter Kontrollbedingungen eine Aktivität von 10,6 pNP µM/ min/ (ng/µl SaOS-2-DNA) und unter 10 µg/ml Metformin eine Aktivität von 5,52 pNP µM/ min/ (ng/µl SaOS-2-DNA) als AUC festgestellt worden (Abbildung 25C). Die CAll-Aktivität der THP-1 Zellen belief sich als AUC in Mono-Kultur auf 0,0028 Abs 405 nm/ min/ (ng/µl SaOS-2-DNA) in der Kontrolle und auf 0,0012 nm/ min/ (ng/µl SaOS-2-DNA) unter 10 µg/ml Metformin (Abbildung 25F). Signifikante Unterschiede in Bezug auf die mineralisierte Matrix konnten in der SaOS-2 Mono-Kultur bei unterschiedlichen Metformin-Konzentrationen nicht festgestellt werden. Das Niveau der mineralisierten Matrix betrug unter Kontrollbedingungen 5,36 [Abs 560 nm] und unter 10 µg/ml 4,85 [Abs 560 nm] (Abbildung 25D).

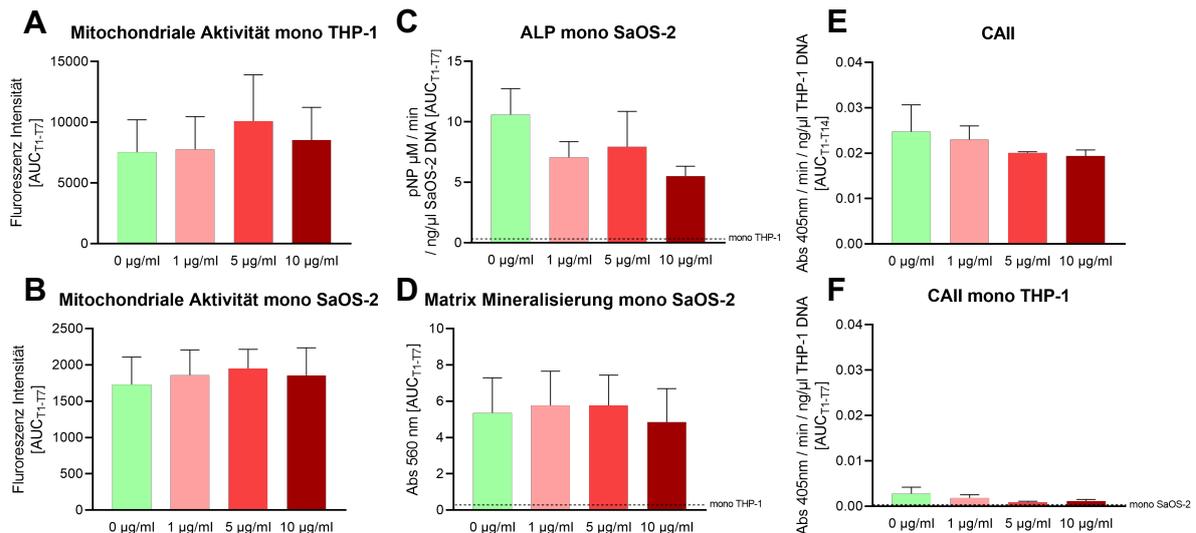


Abbildung 25. Einfluss unterschiedlicher Metformin Konzentrationen auf die Differenzierung und den Zellspezifischen Metabolismus in mono-Kulturen von SaOS-2 und THP-1 Zellen.

Graphische Darstellung der (A) Mitochondrialen Aktivität von mono-THP-1, (B) Mitochondrialen Aktivität von mono-SaOS-2, (C) Alkalischen Phosphatase Aktivität (ALP), (D) Menge an mineralisierter Matrix, (E) Carbonic Anhydrase II Aktivität (CAII) in Co-Kultur sowie (F) CAII in mono-THP-1.  $n \geq 3$ ,  $n = 3$ , Mittelwert  $\pm$  SEM

### 3.3.3 Diabetes + Metformin 2D vs. 3D

Wie in der Publikation „3D Environment Is Required In Vitro to Demonstrate Altered Bone Metabolism Characteristic for Type 2 Diabetics“ [4] ist mit Fokus auf den Einfluss von Metformin in Kombination mit Diabetes ist das Co-Kultur Modell erneut unter den diabetischen Bedingungen geprüft worden. In einer weiteren Bedingung ist durch die Kombination der hyperglykämischen Bedingung mit Hyperinsulinämie und 5 µg/ml Metformin die Situation eines DM Typ II unter Metformin-Therapie simuliert worden. Die Kultivierung der Zellen erfolgte sowohl in 2D als auch in 3D mit dem Ziel, den Einfluss einer 3D Matrix, die in ihren Eigenschaften den *in vivo* Bedingungen des Knochens ähnelt, auf die Zellen zu untersuchen.

Ein direkter Vergleich der Messergebnisse zwischen 2D und 3D ist aufgrund der unterschiedlichen Zellzahlen, Volumina und Messmethoden nicht möglich. Auf Grundlage der Messdatenverläufe und Tendenzen ist aber eine Beurteilung der Daten und ein tendenzieller Vergleich zwischen 2D und 3D möglich.

Über die Zeit zeigte sich allgemein unter den 2D Bedingungen ein kontinuierlicher Rückgang des Gesamt-DNA-Gehaltes. Während unter NG-I und HG-I bereits von Tag 1 an die DNA-Konzentration sank, so war unter den drei Bedingungen mit Insulin (NG+I, HG+I, HG+I+M) erst eine Abnahme ab Tag 7 zu erkennen (Abbildung 26A). Unter der Kontrollbedingung NG-I sank innerhalb von vierzehn Tagen die DNA-

Konzentration von 25,34 ng/μl auf bis zu 6,36 ng/μl, dahingegen sank die DNA-Konzentration bei diabetischen Bedingungen in 2D nicht unter 9,07 ng/μl. Des Weiteren zeigte sich bereits vom ersten Tag an unter allen Bedingungen in 2D ein überwiegend hoher Anteil an THP-1 DNA. Allgemein verschob sich das Verhältnis der THP-1 Zellen und SaOS-2 Zellen weiter zugunsten der THP-1 Zellen auf bis zu ±97 % THP-1 DNA im Co-Kultur Modell an Tag 14 (Abbildung 26A). Dem gegenüber zeigten sich unter 3D Bedingungen bereits von Tag 1 ein höherer Anteil an SaOS-2 DNA, gemessen unter den vier diabetischen Bedingungen HG-I, NG+I, HG+I und HG+I+M (Abbildung 26B). Unter NG+I und HG+I verschob sich das Zell-Zell-Verhältnis auf ein Verhältnis von bis zu 1:1. Zudem wiesen beide Bedingungen eine tendenziell höhere Gesamt-DNA Konzentration auf. Unter Einwirken von Metformin (HG+I+M) milderten diese Beobachtungen hingegen ab und bildeten ein Mittelmaß gegenüber den Bedingungen ohne Insulin (NG-I, HG-I).

Während unter den 2D Bedingungen die mitochondriale Aktivität über die Zeit abnahm, erhöhte sich die Aktivität schrittweise unter allen fünf Bedingungen in 3D (Abbildung 26C, D). Beide *in vitro* Bedingungen 2D & 3D haben gemeinsam, dass die Kontrollbedingung NG-I im Vergleich zu den vier weiteren diabetischen Bedingungen eine geringere mitochondriale Aktivität aufwies, was sowohl in der Auftragung der einzelnen Messtage (Abbildung 26C, D) wie auch der AUC zu erkennen ist (Abbildung 26E, F). Unter 2D Bedingungen erhöhte sich die mitochondriale Aktivität unter NG+I um 15,71 %, HG+I um 33,11 % und unter HG+I+M um 38,55 % gegenüber der Kontrolle NG-I.

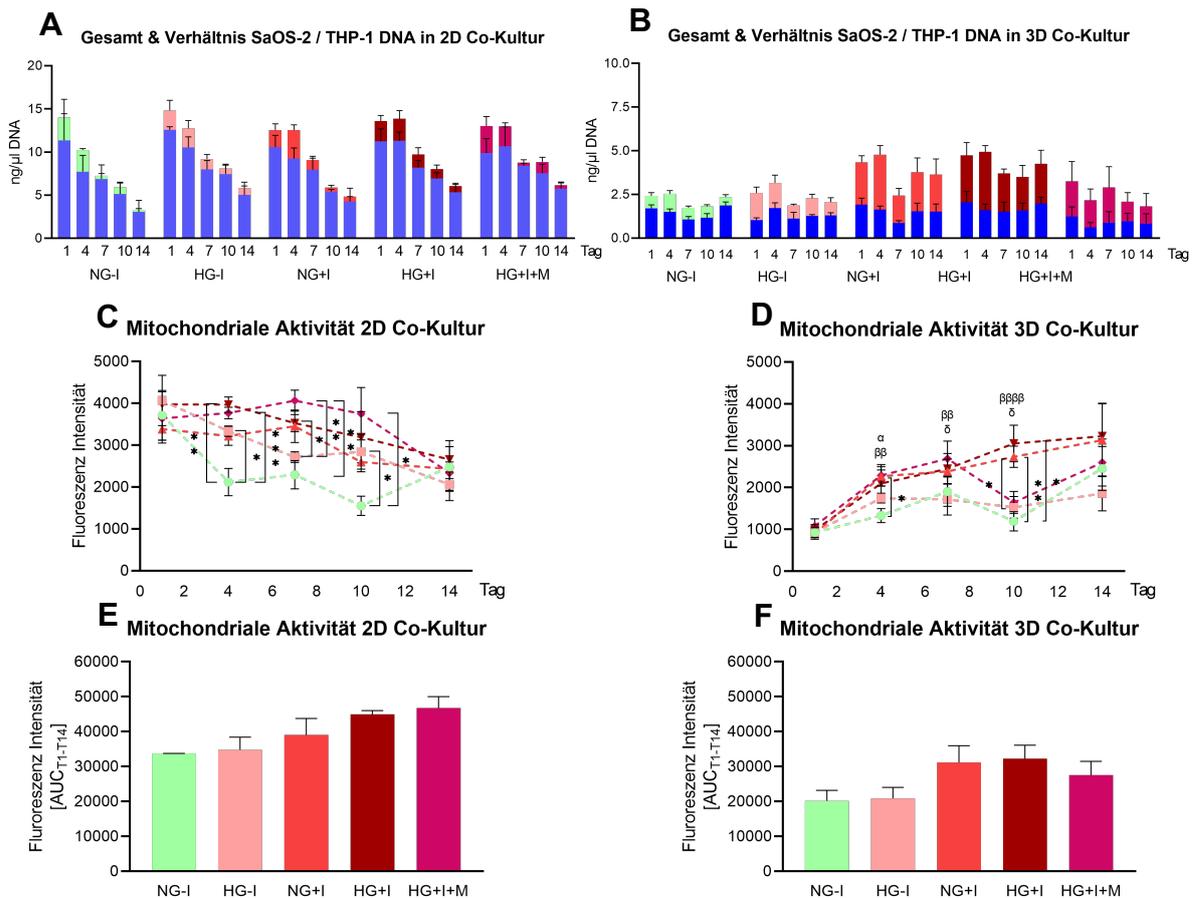


Abbildung 26. Auswirkungen von diabetischen Bedingungen auf die Viabilität und das Zell-Zell-Verhältnis unter 2D & 3D *in vitro* Bedingungen.

Die Summe der übereinander gelagerten Balken an einem Tag, in Abbildung A und B, entsprechen dem gesamten DNA Gehalt der jeweiligen Bedingung. Blau gefärbten Balken zeigen den jeweiligen Anteil an THP-1 DNA, der darüber liegende, den Anteil an SaOS-2 DNA. Abbildung (C) & (D) zeigen die Viabilität der Zellen unter normoglykämischen (NG-I, ● hellgrün), hyperglykämischen (HG-I, ■ hellrot), normoglykämischen + hyperinsulinämischen (NG+I, ▲ rot), hyperglykämischen + hyperinsulinämischen (HG+I, ▼ dunkelrot) sowie hyperglykämischen + hyperinsulinämischen Bedingungen in Kombination mit Metformin (HG+I+M, ◆ rosa), Abbildung (C) für die Werte unter 2D, (D) für 3D. (E) und (F) die Summe der Mitochondrialen Aktivität als AUC über die gesamte Versuchsdauer.  $N \geq 3$ ,  $n = 3$ , Mittelwert  $\pm$  SEM, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  stellvertretend für \* in Bezug auf T0. Teile der Daten publiziert in Häussling et al. 2021 [4]

Während unter 2D lediglich NG-I eine erhöhte ALP-Aktivität in den ersten Tagen in Kultur zeigte, ist die ALP-Aktivität in 3D von NG-I, HG-I und HG+I+M an Tag 1 signifikant höher gegenüber von NG+I und HG+I (Abbildung 27A, D). Sowohl unter den 2D wie auch 3D Bedingungen ist mit Ausnahme von HG+I ein Rückgang der ALP-Aktivität bis Tag 4, gefolgt von einem Anstieg an Tag 7, mit anschließend einem erneuten Rückgang festgestellt worden. Hingegen unter HG+I ist durchgehend eine Reduktion der bereits von Tag 1 sehr niedrigen ALP-Aktivität festgestellt worden (Abbildung 27A, D).

Die OC spezifische CAII-Aktivität unter 2D Bedingungen steigt schrittweise über die Zeit an sodass zu Tag 14 ein signifikanter Anstieg gegenüber T1 unter HG-I ( $p < 0,01$ ), HG+I ( $p < 0,001$ ) und HG+I+M ( $p < 0,0001$ ) festgestellt worden ist. Allerdings ist ebenfalls zu erkennen gewesen, dass der Aktivitätsanstieg durch eine Hyperglykämie reduziert ist. So ist an Tag 14 eine signifikante Differenz ( $p < 0,01$ ) zwischen der Kontrolle NG-I und HG+I+M festgestellt worden. Während unter NG-I die CAII-Aktivität um 297,3 % anstieg, ist die Aktivität unter HG+I+M um 86,8 % innerhalb von 14 Tagen angestiegen. Bereits ab Tag 7 ist unter HG-I wie auch HG+I eine reduziertere CAII-Aktivität gegenüber NG-I und NG+I gemessen worden (Abbildung 27B). Die Zugabe von Metformin (HG+I+M) konnte diesen Effekt nicht kompensieren. Im Gegensatz zu der zunehmenden CAII-Aktivität in 2D ist unter 3D Bedingungen eine gleichbleibende Aktivität über die Dauer von 14 Tagen unter allen Bedingungen mit Ausnahmen von HG+I+M festgestellt worden. Diese Aktivität unter 3D übersteigt allgemein das Niveau der 2D Bedingungen um das dreihundert-fache. Unter HG+I+M in 3D, ist ein steiler Anstieg der Aktivität innerhalb der ersten vier Tage gemessen worden, der in den weiteren Tagen stufenweise auf das Niveau der anderen Bedingungen wieder herabfällt.

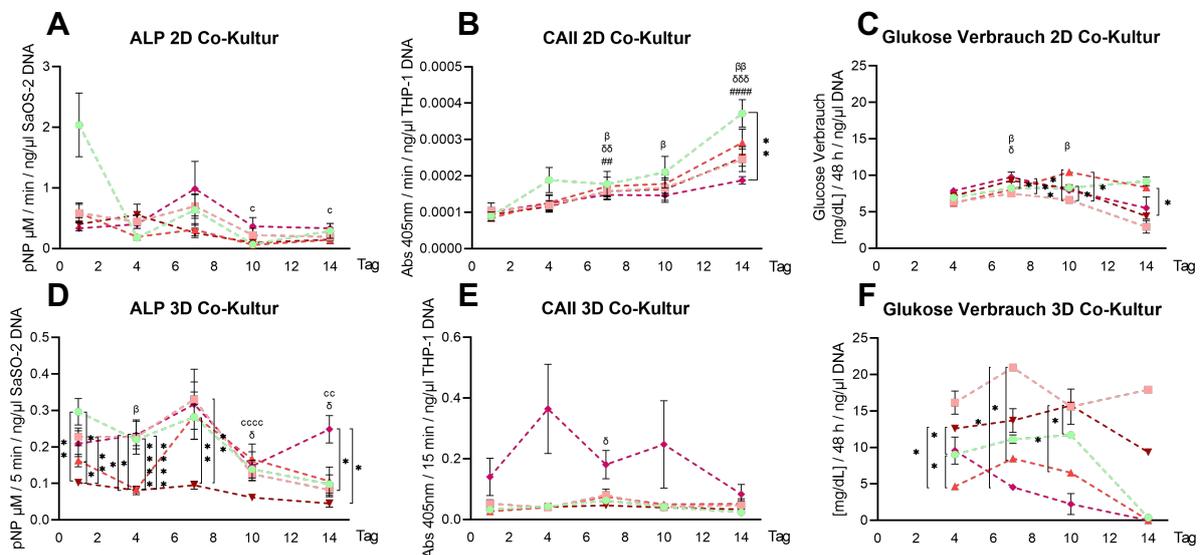


Abbildung 27. Auswirkungen von diabetischen Bedingungen auf die Differenzierung der Zellen in Co-Kultur unter 2D & 3D *in vitro* Bedingungen.

Unter den diabetischen Bedingungen, Normoglykämie (NG-I, ● hellgrün), Hyperglykämie (HG-I, ■ hellrot), Normoglykämie + Hyperinsulinämie (NG+I, ▲ rot), Hyperglykämie + Hyperinsulinämie (HG+I, ▼ dunkelrot) sowie Hyperglykämie + Hyperinsulinämie in Kombination mit Metformin (HG+I+M, ◆ rosa) sind die Zellen in Co-Kultur differenziert worden. An den Tagen 1, 4, 7, 10 und 14 erfolgten Messungen zur Bestimmung der (A) (D) Alkalischen Phosphatase Aktivität (ALP), (B) (E) Carbonic Anhydrase II Aktivität und (C) (F) des Glukose Verbrauch. N=3, n=3, Mittelwert  $\pm$  SEM, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , c,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  stellvertretend für \* in Bezug auf T0. Teile der Daten publiziert in Häussling et al. 2021 [4]

In Bezug auf den Glukoseverbrauch unter 2D Bedingungen zeigte sich nach einem moderaten Anstieg bis Tag 7 ein Rückgang des Verbrauchs verstärkt unter den hyperglykämischen Bedingungen mit signifikanten unterschieden zwischen HG-I und NG-I ( $p < 0,05$ ) sowie gegenüber NG+I ( $p < 0,05$ ) an Tag 10 und zwischen HG+I und NG+I ( $p < 0,05$ ) an Tag 14 (Abbildung 27C). Allgemein wiesen die Bedingungen NG-I und NG+I an Tag 14 einen höheren Glukoseverbrauch auf als HG-I, HG+I und HG+I+M.

Die an Tag 14 gemessene Steifigkeit der 3D Matrix ergab eine leicht verringerte Steifigkeit der Scaffolds unter den vier diabetischen Bedingungen HG-I, NG+I, HG+I und HG+I+M gegenüber der Kontrolle NG-I (Abbildung 28B). Dabei ist der „höchste“ Rückgang unter HG-I mit einer Reduktion von 13,75 % gegenüber der Steifigkeit von NG-I, mit 68,36 kPa, bestimmt worden. Gleichzeitig ist jedoch ein signifikanter Anstieg ( $p < 0,0001$ ) der Mineralisierung unter HG-I festgestellt worden, so stieg der Mineralisierungsgehalt um 58,275 mg/cm<sup>3</sup> gegenüber NG-I, von 104,46 mg/cm<sup>3</sup> auf 162,73 mg/cm<sup>3</sup> an. Unter dem Einfluss von Insulin erhöhte sich ebenfalls das Niveau der Mineralisierung auf rund 133,8 mg/cm<sup>3</sup> unter NG+I, HG+I (132,97 mg/cm<sup>3</sup>) sowie auch HG+I+M (134,11 mg/cm<sup>3</sup>). Das entspricht einer durchschnittlichen Zunahme von + 28,09 % (Abbildung 28C).

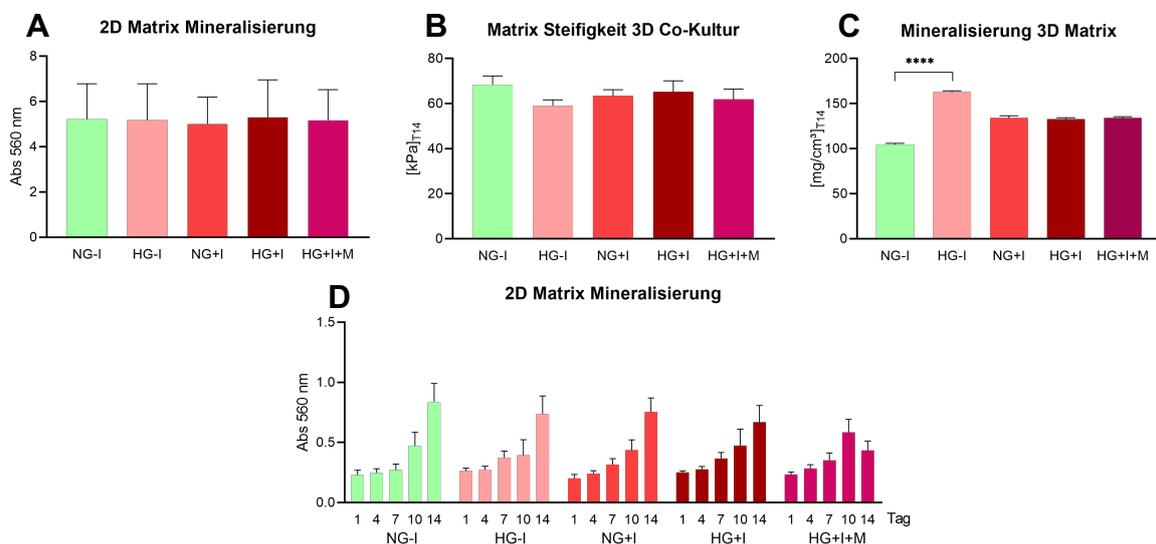


Abbildung 28. Auswirkungen der diabetischen Bedingungen in Bezug auf Mineralisierung und Steifigkeit in 2D & 3D. (A) Die Gesamthöhe an mineralisierter Matrix in 2D, (B) Veränderungen der Steifigkeit und Mineralisierung (C) der 3D Matrix nach 14 Tagen, (D) sowie das Niveau der mineralisierten Matrix an den entsprechenden Messtagen in 2D. N=3, n=3, Mittelwert  $\pm$  SEM, \*\*\*\* $p < 0,0001$ . Teile der Daten publiziert in Häussling et al. 2021 [4]

Beim Vergleich der von Osteoblasten sezernierten Zytokinen unter den diabetischen Bedingungen zeigten sich bei sRANKL unter 2D zwar Konzentrationsschwankungen

zwischen den einzelnen Versuchstagen, jedoch in Summe kein Unterschied zwischen den Bedingungen (Abbildung 29A). In Bezug auf die Höhe an sezerniertem OPG erhöht sich in den ersten vier Tagen die Konzentration deutlich, nahm aber in den folgenden Tagen kontinuierlich wieder ab. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Bedingungen ist nicht festgestellt worden (Abbildung 29B).

Unter 3D Bedingungen erfolgte die Sezernierung von sRANKL gleichbleibend konstant über die Zeit, jedoch in unterschiedlichen Konzentrationsbereichen je nach Bedingung. So ist in Bezug auf die SaOS-2 DNA unter Kontrollbedingungen (NG-I) sRANKL in einem Konzentrationsbereich von unter 0,2 ng/ml sezerniert worden. In einem Bereich um 03 ng/ml erfolgte die Sezernierung unter HG-I und NG+I. Die Kombination aus Hyperglykämie und Hyperinsulinämie führte zu einem leicht, aber nicht signifikanten, erhöhten Konzentrationsbereich, wohingegen die zusätzliche Gabe an Metformin zu einer näherungsweise Verdreifachung der Werte in den Bereich um 0,6 ng/ml führte (Abbildung 29D). Parallel kommt es zu einer nahezu Vervierfachung der im Überstand gemessenen OPG-Konzentration zu Tag 4 unter HG+I+M, gegenüber der Kontrolle NG-I. Wie unter 2D folgte in den kommenden Tagen aber wieder eine schrittweise Reduktion. Gleiches gilt auch für HG-I, NG+I und HG+I, nach einer Plateaubildung in den ersten 4-7 Tagen (Abbildung 29E). Setzt man die gemessenen Konzentrationen in Relation zueinander, überwiegt unter den 2D Bedingungen der Anteil an OPG. Während das Verhältnis von NG-I (2D) nahe 0 ist und damit der Anteil an OPG durchgehend deutlich überwiegt, nimmt der Anteil an sRANKL unter HG-I, HG+I und HG+I+M schrittweise wieder zu. Zwar überwiegt der Anteil an OPG auch an Tag 14, so sank aber dessen Anteil soweit, dass zu Tag 14 das Verhältnis unter HG-I näherungsweise 1:2 und unter HG+I und HG+I+M näherungsweise wieder 1 war (Abbildung 29C). Betrachtet man die Situation unter dem Einfluss der 3D Umgebung, so führten HG-I, HG+I, HG+I+M zu einem erhöhten Verhältnis an OPG. Bei den normoglykämischen Bedingungen NG-I und NG+I betrug in den ersten 7 Tagen das Verhältnis näherungsweise 1:1, ab Tag 10 erhöhte sich der Anteil an sRANKL deutlich, sodass an Tag 14 unter NG-I ein Verhältnis von näherungsweise 3:1 und unter NG+I sogar 7:1 bestimmt werden konnte (Abbildung 29F).

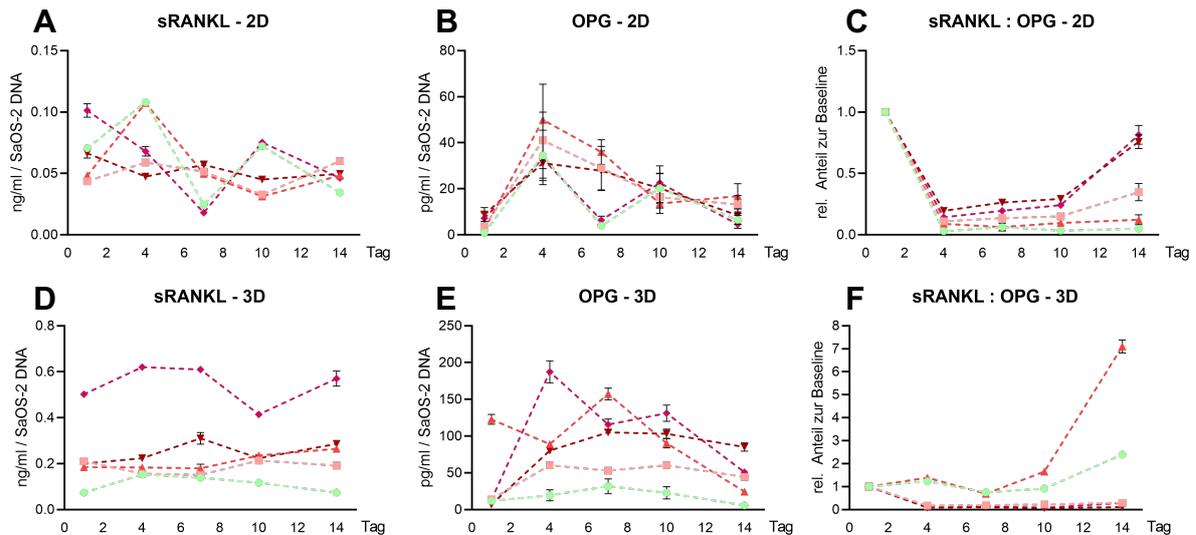


Abbildung 29. Konzentrationsverlauf der in das Medium sezernierten Zytokine sRANKL & OPG.

Verlauf der gemessenen Konzentration an sRANKL und OPG unter den diabetischen Versuchsbedingungen Normoglykämie (NG-I, ● hellgrün), Hyperglykämie (HG-I, ■ hellrot), Normoglykämie + Hyperinsulinämie (NG+I, ▲ rot), Hyperglykämie + Hyperinsulinämie (HG+I, ▼ dunkelrot) sowie Hyperglykämie + Hyperinsulinämie in Kombination mit Metformin (HG+I+M, ◆ rosa). An den Tagen 1, 4, 7, 10 und 14 erfolgten die Probennahme für die Messungen, sowie die Isolierung der DNA für zur Bestimmung des Zell-Zell-Verhältnisses. Die in (A-C) dargestellten Daten wurden unter 2D und die in (D-F) unter 3D Bedingungen erhoben. N=3, n=3, Mittelwert ± SEM. Teile der Daten publiziert in Häussling et al. 2021 [4]

In Bezug auf den im Überstand detektierbaren Marker für Knochenaufbau, PINP, zeigte sich unter der Bedingungen HG+I eine höhere Konzentration an PINP als unter NG-I (-26,27 %) und HG-I (-26,61 %). Allgemein zeigten die Bedingungen mit Insulin eine etwas höhere Konzentration als die ohne Insulin (Abbildung 30A). Parallel hierzu wurden bei normoglykämischen Bedingungen NG-I und NG+I gleich hohe NTX Konzentrationen bestimmt, während unter hyperglykämischen Bedingungen die Konzentrationen geringer ausfielen. So ist bei HG-I und HG+I+M näherungsweise 30 % weniger NTX bestimmt worden als unter NG-I und NG+I. Dem gegenüber ist im Vergleich von HG+I+M und NG-I unter 3D Bedingungen eine nahezu signifikant ( $p < 0,05$ ) dreimal höhere Konzentration an NTX gemessen worden. Ebenso in Bezug auf PINP, wo die Konzentration unter HG+I+M 3D Bedingungen (636,97 ng/ ml/ SaOS-2 DNA) nahezu dreimal höher gewesen ist als wie unter NG-I (237,67 ng/ ml/ SaOS-2 DNA).

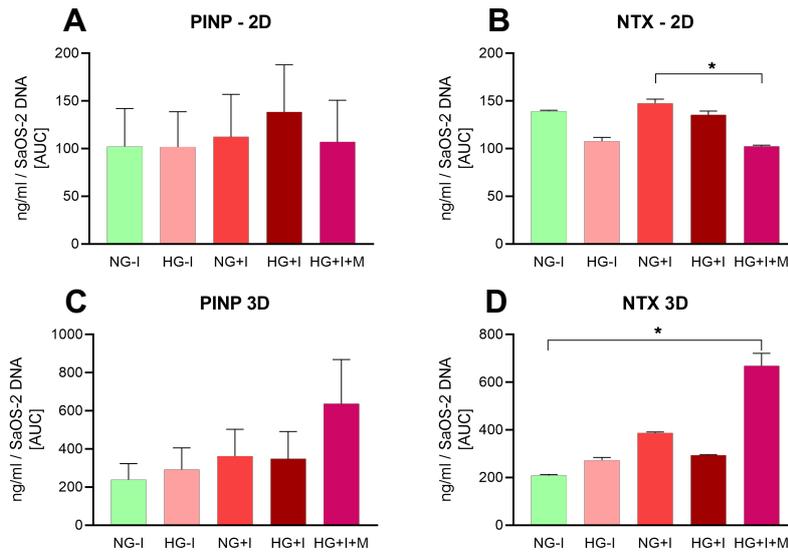


Abbildung 30. Konzentrationsverlauf von PINP und NTX im Co-Kultur Modell unter diabetischen Bedingungen in 2D & 3D.

Im Zellkulturmedium von 2D (A) und 3D (C) ist einerseits das für den Knochenaufbau repräsentative PINP bestimmt worden, wie auch NTX in 2D (B) und 3D (D), das ein Diagnostischer Marker für den Knochenabbau ist. N=3, n=3, Mittelwert  $\pm$  SEM, \*  $p < 0.05$ . Teile der Daten publiziert in Häussling et al. 2021 [4]

## 4. Diskussion

### 4.1 Scaffold - technische Entwicklung

*In vitro* Versuche stellen eine Möglichkeit dar, Zusammenhänge, Einflüsse und Auswirkungen von verschiedenen Stoffen/ Substanzen auf den Stoffwechsel einer Zelle bzw. eines Organs zu untersuchen. Allerdings können in klassischen *in vitro* Modellen nicht sämtliche Interaktionen und Einflussfaktoren wie sie *in vivo* auftreten nachgebildet werden. Somit können Ergebnisse aus *in vitro* Untersuchungen nicht eins zu eins auf die Situation *in vivo* übertragen werden. *In vivo* Modelle zeichnen sich dadurch aus, dass sie Wechselwirkungen zwischen Zellen, Geweben und Organen widerspiegeln können. Oftmals werden für *in vivo* Untersuchungen Tiermodelle genutzt. Dies geht mit einem hohen Kostenfaktor einher und erlaubt aufgrund unterschiedlicher Stoffwechselprozesse keine direkte Übertragung auf den Menschen. Auch in Hinblick auf das Tierwohl sind ethische Aspekte bei Tierversuchen zu bedenken.

Um diese Problematik zu umgehen, aber gleichzeitig möglichst physiologische Bedingungen für das Forschungsmodell zu schaffen, wurden sogenannte *ex vivo* Modelle entwickelt, die die Untersuchungen menschlichen Gewebes experimentell erlauben [21,47].

*Ex vivo* Modelle erlauben die Untersuchung von Zellen in einer annähernd natürlichen Umgebung im dreidimensionalen Raum. Zellen sind in ihrer Differenzierung und ihrem Stoffwechsel maßgeblich von ihrer Umgebung abhängig. In den vergangenen Jahren hat sich so mehr die Bedeutung dieser 3D Umgebung für Zellen und deren Stoffwechsel erwiesen [78].

Um den Bedarf an Tieren für *in vivo* und *ex vivo* Modelle weiter zu reduzieren, bedarf es der weiteren Entwicklung an 3D Matrix Modellen [127]. Auf diese können Zellen transferiert und somit Interaktionen zwischen verschiedenen Zellen in einer annähernd natürlichen Umgebung untersucht werden. So kann die Aussagekraft von *in vitro* Modellen erhöht werden.

Zur Untersuchung von Knochengewebe wurden verschiedene 3D Matrizes entwickelt, die meist mittels Sinterverfahren, Gefriertrocknung oder Polymerisation unter spezifischen Bedingungen hergestellt werden [128-131]. Entscheidend für die Nutzbarkeit eines solchen Modells ist, dass das allogene Gewebe die charakteristischen Eigenschaften des menschlichen Knochengewebes widerspiegelt,

sowie eine Versorgung und Migration der Zellen gewährleistet, wie auch deren Differenzierung und Aufnahme spezifischer Stoffwechselprozesse erlaubt [73]. Auf Basis von pHEMA und BAA ist zur Durchführung der hier beschriebenen Entwicklung ein Cryogel weiterentwickelt worden, das den humanen *in vivo* Eigenschaften des spongiösen Knochengewebes ähnelt und zusammen mit einer entwickelten Co-Kultur den menschlichen Knochenstoffwechsel widerspiegelt [4].

Bei Knochenersatzgewebe, welches in der Medizin Anwendung findet, handelt es sich meist um keramische Matrices, die über einen Sinterprozess hergestellt werden. Sie bieten eine hohe Steifigkeit und meist gute Porosität, die eine Migration der autologen Zellen ermöglicht. Durch ihre Zusammensetzung weisen sie einen hohen mineralischen, anorganischen Anteil auf. Untersuchungen haben ergeben, dass eine vorherige Behandlung der Matrices mit humanem Plasmalysat zu einer verbesserten Adhärenz der Zellen führt [132,133]. Dies zeigt, die Bedeutung der Oberflächeneigenschaften und der Notwendigkeit eines gewissen organischen Anteils auf. Der Herstellungsprozess, bei dem viel Energie in Form von Hitze benötigt wird und somit kostenintensiv ist, ermöglicht keine Zugabe von organischen Bestandteilen. Dies erfordert einen weiteren Bearbeitungsschritt [134]. Bei denen durch einen Gefrierprozess hergestellten pHEMA-BAA Scaffolds handelt es sich um Cryogele, deren Herstellungsprozess in der Regel einfach sowie kostengünstig ist und ermöglicht neben der Verwendung eines hohen anorganischen Anteils auch die Zugabe von organischen Bestandteilen wie Proteinen [1,123]. Der technisch einfachere Herstellungsprozess und die vielfältigen Möglichkeiten in der Variation der Zusammensetzung, haben zu der Entscheidung geführt, pHEMA Cryogele für die Entwicklung einer 3D Matrix zu nutzen, um damit ein *in vitro* 3D Co-Kultur Modell des Knochenstoffwechsels zu entwickeln.

Eine Toxizität der Matrix aufgrund ihrer Inhaltsstoffe besteht nach aktuellem Wissensstand nicht, da in der polymerisierten Form keine Gefahr von den einzelnen Inhaltsstoffen ausgeht [87,135]. Durch Sterilisation und anschließende Inkubation der 3D Matrix in einem Nähr-Medium werden mögliche Reste der einzelnen Bestandteile, die während der Polymerisation nicht gebunden wurden bzw. reagiert haben, ausgewaschen.

Die Architektur, Porenform und Porosität von Cryogelen wird durch die Zusammensetzung und den Herstellungsprozess maßgeblich bestimmt. Dabei beeinflussen die Zusammensetzung bzw. der Herstellungsprozess sich gegenseitig.



des Polymers bildet. Durch die weitere Optimierung des Herstellungsprozesses ist die Steifigkeit aber wiederum erhöht worden. Wesentliche Faktoren neben der Zusammensetzung der Lösungen ist das Reaktionsvolumen, die Gussform und damit die Geschwindigkeit des Gefrierens. So ist einerseits die Gefriertemperatur entscheidend, andererseits aber auch die Wärmeleitfähigkeit der Gussform [88]. Während mit einem Gemisch aus Polyacrylamid und Glutaraldehyd Porendurchmesser von 30-60  $\mu\text{m}$  bei  $-5\text{ }^\circ\text{C}$  erreicht werden konnten, reduzierte sich der Porendurchmesser auf 10-20  $\mu\text{m}$  bei einer Polymerisation bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  [138]. Gleich verhielt es sich bei Polyacrylamid Cryogelen mit Acrylamid und Bisacrylamid, wo bei  $-18\text{ }^\circ\text{C}$  die größten Porendurchmesser von  $\pm 60\text{ }^\circ\text{C}$  erreicht werden konnten und bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  wiederum nur noch 32  $\mu\text{m}$  bzw. bei  $-22\text{ }^\circ\text{C}$  nur noch Durchmesser von 22  $\mu\text{m}$  [139]. Cryogele aus Fibroin zeigten ein ähnliches Verhalten [88]. Eine zu milde Gefriertemperatur kann allerdings auch ungeeignet sein, da die Polymerisation abgeschlossen ist, bevor sich die entsprechenden Eiskristalle gebildet haben. Neben der Gefriertemperatur ist auch die Kinetik des Herunterkühlens entscheiden für die Struktur. Kühlt die polymerisierende Lösung rasch ab, bilden sich kleine Poren, wohingegen bei gleicher Temperatur die Geschwindigkeit des Herunterkühlens verlangsamt ist, bilden sich größere Poren. Durch das verlangsamte Herunterkühlen verbleibt den Eiskristallen mehr Zeit zu wachsen und damit erhöht sich der Porendurchmesser. So zeigten sich in unseren Versuchen ebenfalls Unterschiede in der Porengröße, wenn die Cryogele einerseits bei unterschiedlichen Temperaturen eingefroren, aber auch wenn die Proben in Gefrierbäder eingehängt worden sind, wie beispielsweise in 70 % Ethanol bzw. 1 M  $\text{CaCl}_2$  oder frei in der Luft hingen. Im Vergleich kühlte die zu polymerisierende Lösung in einem Bad von 1 M  $\text{CaCl}_2$  langsamer herunter als in einem Bad mit 70 % Ethanol bzw. in der Luft. Zusätzlich konnte durch Vortemperierung der Bäder auf beispielsweise  $+4\text{ }^\circ\text{C}$  oder  $-5\text{ }^\circ\text{C}$ , die Geschwindigkeit des Herunterkühlens und damit die Porengröße beeinflusst werden. Entscheidend hierbei sind die Volumina der Bäder und die Wärmeleitfähigkeit des Mediums. Ebenso entscheidend ist aber auch die spezifische Wärmeleitfähigkeit der Gussform und damit das Material, aus dem diese besteht. Ist die spezifische Wärmeleitfähigkeit gering, wird der Prozess des Herunterkühlens weiter verlangsamt [140]. Es wurden Gussformen aus Edelstahl, Kupfer, Aluminium und Polypropylen (mit unterschiedlichen Schichtdicken) miteinander verglichen. Final zeigte sich, dass unter der gewählten Zusammensetzung der zu polymerisierenden Lösung ein Volumen von

2 ml in einer Gussform aus nicht pyrogenem Polystyrol mit einem Innendurchmesser von 6 mm und einer Wandstärke von 1 mm, bei -18 °C über 17 h umgeben von Luft, die angestrebten Parameter näherungsweise erreicht wurden. Somit ist dieser Prozess für die weitere Versuchsreihe genutzt worden. Zum Vergleich nutzten Alkan *et al.* eine Temperatur von -16 °C über 24 h, um 5 ml pHEMA Cryogele in klassischen Plastikspritzen herzustellen und erreichten damit Porendurchmessern von 10 - 200 µm [141]. Nilay Bereli *et al.* verwendete bei einer leicht abgeänderten Zusammensetzung eine Temperatur von -12 °C, über 24 h, um ebenfalls pHEMA Cryogele mit einer Porenweite von 10 - 100 µm, mit 5 ml Reaktionslösung in einer klassischen Plastik Spritzen herzustellen [142]. Für ein ebenfalls auf pHEMA und BAA basierendes Cryogel das mittels APS und TEMED polymerisiert wird, nutzten Akande *et al.* einen Glaszylinder und gefror 4 ml Lösung über 18 h bei -12 °C. Die Porendurchmesser betragen zwischen 10-120 µm, abhängig des pHEMA:BAA Verhältnisses unterschieden sich die Cryogele zudem in ihrer Steifigkeit [143].

Die Porengröße im spongiösen Knochen des Menschen beträgt  $389,3 \pm 134,9$  µm [64]. In der Literatur wird für osteogene Modelle eine Porengröße von 20 – 300 µm [128,144] empfohlen bzw. ein minimaler Durchmesser von 100 µm für eine erfolgreiche Besiedlung und Migration der Zellen in das Gewebe [79,145,146]. Durch die verwendete Technik ist eine durchschnittliche Porenweite von  $102,6 \pm 24,4$  µm erreicht worden und somit das Ziel einer Porenweite von  $\geq 100$  µm.

Neben der Porengröße ist auch die Steifigkeit der Matrix einer der entscheidenden Faktoren der 3D-Matrix. Die Steifigkeit der Matrix wird dabei u.a. von der Porengröße beeinflusst [88]. Neben der Porengröße bestimmen auch Inhaltsstoffe der Matrix und die sich hieraus ergebende Steifigkeit die Effektivität, mit der es zu einer Adhäsion der Zellen kommt, sowie deren Stoffwechselaktivität.

Der testweise Austausch von Gelatine und Kollagen gegen PRP führte zu dem positiven Effekt der vermehrten Steifigkeit. Ebenso führte die Zugabe von Hydroxylapatit, eines der Hauptbestandteile des Knochens, zu einer vermehrten Steifigkeit bei reduzierter Porengröße. Hydroxylapatit steht in Zusammenhang mit einer verbesserten Zell-Adhärenz, Proliferation und osteogene Differenzierung [128,147]. Allerdings kam es bei einem Anteil von 5 % Hydroxylapatit zu einem Gradienten innerhalb der Matrix aufgrund von Sedimentation während des Polymerisationsprozesses. Durch eine Erhöhung der Konzentration auf 12,5 % konnte

dieser Effekt reduziert werden, dennoch konnte eine weitere Gradientenbildung nicht vollständig ausgeschlossen werden.

Neben Hydroxylapatit wurde die Kalzium-Phosphat-Kristallisation untersucht. Dabei wurde Hydroxylapatit gegen eine Natriumdihydrogenphosphat-Lösung ausgewechselt und die polymerisierten Scaffolds nach Gefrieren und Schneiden in 1 M  $\text{CaCl}_2$  Lösung inkubiert. Dieser Schritt führte zu größeren Poren und einer gesteigerten Steifigkeit der Matrix. Grund für die Vergrößerung der Poren könnte die Zugabe des Natriumdiphosphatpuffers sein. Die dadurch erhöhte Salzkonzentration führt zu einer Erniedrigung des Gefrierpunktes der Lösung und somit zu einer Verlängerung des Gefrierprozesses mit einem vermehrten Eiskristall-Wachstum. Die damit erreichte Steifigkeit von  $76,8 \pm 19,2$  kPa unterstützt die Expression von osteogenen Transkriptionsfaktoren, die wiederum eine osteogene Differenzierung fördern. So ist bekannt dass osteogene Transkriptionsfaktoren ab einer Steifigkeit von  $>60$  kPa vermehrt exprimiert werden [63,137]. Die Kalzium-Phosphat-Kristallisation führte ebenfalls zu einer Veränderung der Matrix-Oberfläche. Diese zeigte eine rauer und mit Kristallen belegte Oberfläche. Dies wiederum soll ebenfalls eine osteogene Differenzierung von MSC induzieren [148,149]

Der teilweise Austausch von Gelatine & Kollagen gegen PRP führte bereits zu einer höheren Steifigkeit der Matrix. Hintergrund dieses Austausches war das Ziel, eine Matrix zu entwickeln, die eine gute Adhärenz aufweist, aber frei von tierischen Produkten ist. Mit PRP konnte bereits eine verbesserte osteogene Differenzierung bei Ad-MSCs gezeigt werden. Zudem wurde durch die Verwendung von PRP eine weitere humane Komponente in das Modell integriert. Neben PRP erwiesen sich auch RGD-Peptide als vorteilhaft für die Steigerung der Adhärenz, als auch fördernd in der osteogenen Differenzierung [150,151].

Um den Einfluss von Proteinen auf die Matrix zu untersuchen, wurden zum Vergleich Scaffolds mit jeweils PRP und RGD hergestellt. Parallel hierzu wurden Scaffolds mit CM gegossen, da die osteogene Differenzierung von Ad-MSC unter CM sich ebenfalls als positiv erwies [152,153]. Es wird vermutet, dass dieser Effekt auf einer Sekretion von Chemokine sowie Wachstumsfaktoren der zuvor kultivierten Zellen beruht. Als Kontrolle hierzu wurden Scaffolds mit Kollagen hergestellt.

Der Vergleich ergab, dass mit Ausnahme von RGD, die Porengröße durch die unterschiedlichen Proteine nicht wesentlich beeinflusst wird. Unter RGD reduziert sich die Porengröße signifikant um bis zu 27 %. Entscheidende Veränderungen ergaben

sich in Bezug auf die Steifigkeit, die durch PRP erhöht wurde, aber unter CM und RGD im Vergleich zu Coll verringert worden ist. Unter dem Elektronenmikroskop zeigte sich erneut wie durch die Verwendung von PRP, aber auch bei CM und RGD, die Oberfläche der Matrix im Vergleich unter Coll wesentlich rauer ausfällt.

Aufgrund der leicht erhöhten Porenweite, der höheren Steifigkeit und den fördernden Eigenschaften der Osteogenese wurden sämtliche weitere Versuche unter Verwendung von PRP durchgeführt [1].

## **4.2 Co-Kultur – Entwicklung**

### **4.2.1 Auswahl geeigneter Zellearten für das Modell**

Für das angestrebte Co-Kultur Modell werden Zellen benötigt, die den Knochenstoffwechsel inkl. Auf- und Abbau der Knochenmatrix widerspiegeln. Aufgrund der Verfügbarkeit und Reproduzierbarkeit des Grundmodells ist, neben den weiteren in der Einleitung genannten Gründen, entschieden worden für das Co-Kultur Modell Zelllinien zu verwenden. Bei der Auswahl von geeigneten Zellarten ist besonders auf eine Zell-Zell-Interaktion zwischen beiden Zellarten und den humanen Ursprung geachtet worden [8,154,155]. Für die Verwendung als Osteoblasten wurden verschiedene Zelllinien untersucht. Vorarbeiten am Institut zeigten beim Vergleich der vier Zelllinien MG-63, SaOS-2, Cal-72 und SCP-1 eine relativ ähnlich hohe Expression an VitDR, zwischen den Zellen, aber auch gegenüber hOSÜ. VitDR ist entscheidend für die Differenzierung der Zellen und somit eine entscheidende Grundvoraussetzung [68]. In Bezug auf die Eignung einer Zelllinie für das Modell ist die metabolische Ähnlichkeit zu humanen Zellen entscheidend. Beim Vergleich der Zelllinien MG-63, SaOS-2, Cal-72 und SCP-1 mit der hOSÜ zeigten sich die meisten Ähnlichkeiten mit hOSÜ für SCP-1 und SaOS-2 Zellen. Im Vergleich dieser beiden Zelllinien fand sich bei SaOS-2 Zellen eine signifikant höhere Expression an Osterix (Abbildung 12). Dabei handelt es sich bei Osterix um den Transkriptionsfaktor Sp7, der mitverantwortlich ist für die Differenzierung zu Osteoblasten und eine Differenzierung zu Chondrozyten verhindert [156,157]. Die ebenfalls deutlich erhöhte Expression von ALP bestätigt dies. Beides gemeinsam ist ein klares Indiz, dass SaOS-2 Zellen in ihrer Differenzierung Osteoblasten näher sind als SCP-1 Zellen. Gestützt wird dies durch die Beobachtungen von Ehnert *et al.* 2020. Hier zeigten SaOS-2 Zellen gegenüber SCP-1 Zellen eine höhere RunX2 Expression auf, ähnlich zu hOSÜ [68]. Damit geht eine

verkürzte Differenzierungsdauer einher, welche für die klinische Anwendung des Modells vorteilhaft ist.

Im Vergleich der Zelllinien ist zudem entscheidend, dass die Zellen die Fähigkeiten einer gegenseitigen Interaktion aufweisen. Entscheidend für die Differenzierung von Osteoklasten sind hierbei unter anderem sRANKL und MCS-F, sezerniert von Osteoblasten, sodass eine Supplementierung mit rekombinantem sRANKL bzw. MCS-F nicht erforderlich ist. So konnte in der Arbeit von Ehnert *et al.* 2020 ebenfalls gezeigt werden, dass Cal-72 Zellen als geeignete Zelle ausschied, da sie keinen sRANKL exprimieren, wohingegen die SaOS-2 und SCP-1 Zellen sich erneut als geeignet erwiesen. Während die Expression von sRANKL und MCS-F bei den SaOS-2 relative gleich stark wie bei hOSÜ ist, so ist bei den SCP-1 Zellen die Expression von sRANKL leicht und die Expression von MCS-F deutlich reduzierter [68]. Somit eignete sich die SaOS-2 Zelllinie am ehesten für das Modell.

In Bezug auf eine geeignete Zelllinie, die die Differenzierung und die Aktivität humaner Osteoklasten widerspiegelt, werden meist für *in vitro* Modelle RAW264.7 bzw. J774 Zelllinien beschrieben. Beide Zellen weisen unterschiedliche Vorteile auf, stammen aber beide von der Maus ab [11,125,158,159].

In einer Co-Kultur, in der beide Zellarten unterschiedlichem Ursprung sind (z. B. Mensch und Maus), bietet dies den klaren Vorteil einer einfacheren Normalisierung der Messdaten, da eine Unterscheidung zwischen beiden Zellarten einfach realisierbar ist [105]. Mit Fokus auf ein humanes Knochenmodell ist deshalb das Augenmerk auf die weniger bekannten humanen monozytären Zelllinien THP-1, HL-60 gelegt worden. In der Arbeit von Ehnert *et al.* 2020 sind unter anderem beide Zellen auf wichtige Expressionsmerkmale, wie auch das Verhalten der Zellen in einer ersten Form von Co-Kultur mit SCP-1 bzw. SaOS-2 Zellen untersucht worden. In Bezug auf die Expression von VitDR und RANK zeigen beide Zellarten ähnliche Eigenschaften, nicht aber in der Expression von CCR1. So ist eine signifikant höhere Expression bei THP-1 Zellen festgestellt worden. Eine reduzierte Expression von CCR1 steht in Zusammenhang mit einer Behinderung der Osteoklastogenese, wodurch hier ein Vorteil bei den THP-1 Zellen gesehen wird. Ebenfalls ähnelt sich das Expressionsniveau, in Bezug auf den Transkriptionsfaktor NFATc1, zwischen beiden Zellen [68].

In Betrachtung der gemeinsamen Kultivierung mit SCP-1 und SaOS-2 Zellen ist es im Fall der Kombination der THP-1 & SaOS-2 Zellen bzw. HL-60 & SaOS-2 Zellen praktikabel, dass für alle drei Zellarten das Medium RPMI 1640 verwendend werden kann. SCP-1 Zellen werden hingegen in MEM $\alpha$  Medium kultiviert. Einen Austausch von MEM $\alpha$  gegen RPMI 1640 überleben die SCP-1 Zellen nicht. Versuche zeigten, dass eine Kombination von 1:1 RPMI 1640 und MEM $\alpha$  die höchste Viabilität ergab. Dabei ist aber ungeklärt, inwieweit die Zusammensetzung des Mediums den zellspezifischen Metabolismus hemmt [68]

Im Vergleich der vier Co-Kultur-Kombinationen zeigte sich ein geringerer Gesamtproteingehalt als auch reduzierte mitochondriale Aktivität, ALP-Aktivität, sowie in der Höhe der mineralisierten Matrix bei den Kombinationen HL-60 & SaOS-2 und HL-60 & SCP-1, gegenüber den Kombinationen mit THP-1 Zellen. Bezogen auf den Vergleich von SCP-1 und SaOS-2 Zellen, zeigten die Kombinationen mit SaOS-2 Zellen eine höhere ALP-Aktivität sowie Matrix Mineralisierung. Der für Osteoklasten spezifischen Aktivitätsmarker TRAP5b erreichte unter SaOS-2 Zellen zwar geringere Werte als unter Verwendung von SCP-1 Zellen, insgesamt zeigte sich jedoch eine höhere Gesamtaktivität der Kombinationen mit SaOS-2 Zellen als mit SCP-1 Zellen. Dies wurde in der Kombination von THP-1 und SaOS-2 Zellen im Vergleich zu einer Kombination von THP-1 und HL-60 Zellen ebenfalls bestätigt [68].

Aus den gesamten ermittelten Parametern und Untersuchungen zeigt die Kombination aus THP-1 und SaOS-2 Zellen die vielversprechendsten Ergebnisse für die Entwicklung des angestrebten Co-Kultur-Modells des Knochens.

#### **4.2.2 Zell-Zell-Verhältnisse**

Um ein Co-Kultur Modell weiter zu optimieren, muss ein geeignetes Zell-Zell-Verhältnis etabliert werden. Ein Ungleichgewicht im Verhältnis beider Zellarten zueinander würde zu reduzierten Zellaktivitäten, einer reduzierten Differenzierung und somit zu einer Instabilität des Modells führen. In Bezug auf den Knochen zeigt sich ein Verhältnis von Osteoblasten zu Osteoklasten von 95:5 zugunsten der Osteoblasten/Osteozyten [9]. So ist in der Literatur ein 2D Co-Kultur Modell mit hMCs und hOBs beschrieben worden, dass ein Verhältnis von 1:3 hMCs:hOBs nutzt [160]. Insgesamt ist hierbei aber nicht berücksichtigt worden, dass Osteoklasten durch die Fusion mehrere Vorläuferzellen entstehen, wofür eine entsprechende Zelldichte erforderlich ist [11]. Die Entscheidung zunächst eine höhere Zellzahl an THP-1 Zellen anstelle von SaOS-2 Zellen zu verwenden, erwies sich als positiv. Beim Vergleich unterschiedlicher Zell-

Verhältnisse zeigten sich keine größeren Unterschiede im Verlauf von ALP, TRAP und der mitochondrialen Aktivität zwischen den getesteten Kombinationen, allerdings zeigte die Matrix-Mineralisierung, dass ein Verhältnis von 2:1 bzw. 2,67:1 von THP-1 zu SaOS-2 Zellen gut miteinander interagiert, während bei einem Verhältnis von 4:1 die Matrix Mineralisierung zeitlich verzögert begann und in Summe nicht die Werte von 2:1 und 2,67:1 erreichte (Abbildung 13). Eine erhöhte Osteoklasten-Aktivität bei dem Verhältnis von 4:1, die eine reduzierte Summe an Matrix erklären könnte, kann aufgrund der fehlenden TRAP5b Aktivität ausgeschlossen werden. Der visuelle Vergleich zwischen 2:1 und 2,67:1 mittels Lebendfärbung zeigte an Tag 10 eine höhere Viabilität unter 2:1 und folglich längere Stabilität des Modells, weshalb für das weitere Vorgehen die 2:1 Kombination die besten Eigenschaften aufweist.

#### **4.2.3 Mediumshöhe & Hypoxie**

Ein weiterer Faktor, der die Aktivität von Zellen maßgeblich beeinflusst, ist die Mediumshöhe im Well und dem der damit verbundenen Partialdruck, der die gelöste Sauerstoffkonzentration wesentlich bestimmt [161,162]. Ein Mangel an Sauerstoff führt unter anderem zu einem Engpass in der Verfügbarkeit von ATP und löst eine Vielzahl systemischer zell- und gewebespezifischer Reaktionen aus [124,163].

Bei einem Knochenbruch führt die einwirkende Kraft oftmals auch zu einer Verletzung bzw. Abreißen der Blutgefäße, was wiederum zu einem Frakturhämatom führt. Die infolge verminderte Blutzufuhr, sowie des erhöhten Sauerstoffverbrauchs der Zellen hat in der Regel eine lokale Ischämie und somit verminderte Sauerstoffkonzentration (Hypoxie) zur Folge. Neben negativen Effekten sind aber auch Beobachtungen gemacht worden, in denen eine Hypoxie das Wachstum und die Entwicklung der Zellen positiv beeinflusst [164,165]. Somit ist es von Bedeutung den Einfluss einer Hypoxie auf das Co-Kultur Modell zu untersuchen. In Bezug auf den Knochen und Osteoblasten wird jedoch ein tendenziell stimulierender Einfluss durch Hypoxie vermutet. RNA-Untersuchungen von Zellen aus Frakturhämatomen zeigten eine Induktion der Osteogenese auf [166]. So zeigen Ergebnisse von Tuncay *et al.*, dass Osteoblasten eine erhöhte Proliferation bei gleichzeitig reduzierter ALP-Aktivität und Kollagen Synthese unter Hypoxie aufweisen. Entgegengesetzt hierzu wurde bei einer normalen Sauerstoffsättigung eine erhöhte ALP-Aktivität und Kollagensynthese, bei gleichzeitig reduzierter Proliferation festgestellt [167]. Diese Beobachtungen decken sich näherungsweise mit den Beobachtungen am Co-Kultur Modell.

Mit sinkender gelöster Sauerstoffkonzentration reduzierte sich die Stoffwechselaktivität der Co-Kultur mit einer reduzierten ALP-Aktivität sowie Matrix-Mineralisierung. Zudem zeigte sich eine niedrigere Mitochondrien- und TRAP5b-Aktivität (Abbildung 15). Eine geringe Reduktion des Sauerstoffpartialdrucks hat keinen negativen Effekt auf den Zellstoffwechsel, jedoch sollten 6,2 mmHg nicht unterschritten werden, da sich hier ein deutlicher Rückgang der metabolischen Aktivität zeigt.

#### **4.2.4 Medium + FCS-Gehalt**

Der FCS-Gehalt im Medium ist ebenfalls eine entscheidende Einflussgröße zur Optimierung der Zellkultivierung. Eine zu hohe bzw. zu niedrige Konzentration hemmt den Stoffwechsel und kann die Zell-Viabilität negativ beeinflussen [168]. Institutionen wie die *American Type Culture Collection (ATCC)* bzw. die *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ)* des Leibniz Instituts geben entsprechende Empfehlungen für die Kultivierung der Zellen aus. In Bezug auf die THP-1 Zellen wird ein Gehalt von 10-20 % FCS sowie für die SaOS-2 Zellen ein Gehalt von 15 % empfohlen. In der Literatur werden hingegen primär Konzentrationen von 10 % FCS für sowohl THP-1 Zellen wie auch für SaOS-2 Zellen mit teils weiteren Zellen in Co-Kultur beschrieben [10,169-172]. So verwendet Beşkardeş *et al.* für ein perfundiertes Co-Kultur Modell aus hMSCs und THP-1 Zellen 10 % FCS [170]. Für die Erforschung des Übergangs von Osteoblasten zu Osteozyten nutzten Prideaux *et al.* SaOS-2 Zellen, die ebenfalls mit 10 % FCS differenziert werden [85]. Weitere in der Literatur beschriebene Co-Kultur Modelle, mit Bezug auf den Knochen, verwenden ebenfalls 10 % FCS [173]. Allerdings wird in der Literatur kein Bezug auf die Hintergründe für die gewählte FCS-Konzentration genommen. Aus der Biotechnologie ist bekannt, dass die Stoffwechsel-Phasen der Zellen, z. B. Lag-Phase oder Log-Phase, über die Nährstoffversorgung gesteuert werden können [112]. Da eine spätere Personalisierung des Modells mit z. B. Blutplasma Ziel des Modells ist, und um eine Proliferation zu hemmen und die Differenzierung zu fördern, wurden FCS Konzentrationen von 1-3 % FCS am Modell getestet. Hierbei zeigte sich, dass eine geringe FCS Konzentration von 1 % zu einer Hemmung der Osteoblasten führt, was sich in einer niedrigeren ALP-Aktivität sowie verzögerten Matrixmineralisierung zeigt (Abbildung 16). Ebenso fiel die TRAP5b Aktivität der Osteoklasten, unter 1 % FCS, niedrig aus. Wobei nicht bestimmt werden konnte, ob dies aufgrund der verzögerten Differenzierung der SaOS-2 Zellen und der damit mangelnden Sezernierung von

sRANKL bzw. MCS-F, zu begründen ist, oder der niedrige FCS Gehalt direkt Einfluss auf die THP-1 und die Osteoklasten Differenzierung nimmt. Dabei ist am ehesten von einer Kombination aus beidem auszugehen. Aufgrund der besseren TRAP-Aktivität, der deutlich höheren ALP-Aktivität mit anschließender gewünschter Abnahme, wie auch höheren Matrix Mineralisierung ist eine Erhöhung der FCS-Konzentration zu empfehlen. Da eine Verstärkung des Effektes durch Verwendung von 3 % gegenüber 2 % FCS wie zwischen 1 % und 2 % FCS nicht nachgewiesen werden konnte, wurde für weitere Untersuchungen die Verwendung von 2 % FCS gewählt.

#### **4.2.5 Bedeutung der Normalisierung**

Die vorangegangenen Versuche und Daten verdeutlichen die Bedeutung einer genaueren Zuordnung der Ergebnisse und damit die Notwendigkeit einer Methode für eine qualitative Normalisierung. Bei klassischen *in vitro* Mono-Kulturen kann dies meist über Bestimmung der Gesamt-DNA-Konzentration, der Höhe an angefärbten Proteinen mittels SRB oder über die mitochondriale Aktivität erreicht werden [105]. Alle drei Methoden haben aber gemein, dass bei einer Co-Kultur nicht unterschieden werden kann, welche Signalstärke von welchem Zelltyp ausgeht. Die Wahl eines zellspezifischen Aktivitätsmarkers ist zwar möglich, allerdings muss dieser unabhängig vom Differenzierungsstatus gleichbleibend konstant sein und sich nur über die Anzahl an vitalen Zellen ändern. Eine Normalisierung, beispielsweise mittels einer Durchflusszytometrie (FACS), ist bei diesem angestrebten Modell leider ebenfalls nicht möglich. Einerseits, da die Zellen später in 3D kultiviert werden sollen und eine Isolierung der Zellen aus der 3D Matrix qualitative nicht gewährleistet werden kann. Andererseits beginnen die SaOS-2 Zellen mit fortschreitender Differenzierung sich in eine Art Knochenmatrix „einzukapseln“, sodass hier eine Isolierung der vitalen Zellen ebenfalls nicht gewährleistet werden kann.

Versuche über Cell-Tracking-Farbstoffe erwiesen sich aufgrund der zu geringen Haltbarkeit als ungeeignet. Nur wenige Farbstoffe besaßen eine Haltbarkeit über mehrere Tage, weitestgehend jedoch nicht über die gesamte Versuchsdauer von 14 Tage. Ebenso wäre mit jeder Zellteilung der Farbstoff aufgeteilt worden, dass zunächst gut gewesen ist, aber durch die Reduktion an Farbstoff je Zelle reduziere sich auch die Signalintensität. Ein weiterer Punkt war das Bestreben, eine markierte Zelllinie zu entwickeln, sodass nicht vor jedem Versuch ein Färbeprozess vorgeschaltet werden muss. Zudem ist eine gleichbleibende Qualität der Färbung fraglich, da nicht sichergestellt werden kann, dass immer alle Zellen markiert werden.

Über die Transfektion von Plasmiden mit fluoreszierenden DNA-Sequenzen wurde versucht, eine dauerhafte Unterscheidung der Zellen zu ermöglichen, indem jede Zellart mit unterschiedlichen Farbstoff-Sequenzen transfiziert werden sollte. Dies erwies sich jedoch ebenfalls als nicht erfolgreich. Trotz der Verwendung unterschiedlichster Transfektionsreagenzien und der weiteren Optimierungsversuche über Zellzahl, DNA-Konzentration oder verlängerten Inkubationszeiten konnte im Fall der SaOS-2 Zellen lediglich unter der Verwendung von FuGENE®HD ein Transfektionserfolg von bis zu 11 % erreicht werden. In Bezug auf die THP-1 Zellen konnte kein dauerhaft positives Ergebnis erzielt werden. Von einer mangelnden Funktionsfähigkeit der Plasmide ist nicht auszugehen, da bei vereinzelt Zellen kurzzeitig ein Signal ermittelt werden konnte. Vielmehr muss von einem aktiven Verdau der Fremd-DNA durch THP-1 Zellen, die von Monozyten abstammen, ausgegangen werden.

Allgemein ist der Erfolg einer Transfektion von der Methode selbst, der Viabilität der Zellen, Passagennummer sowie der Höhe der Konfluenz wie auch der Qualität und Quantität der DNA abhängig [174]. Im Fall der THP-1 Zellen wäre ein Wechsel der Methode erforderlich. So beschreibt Maeß *et al.* eine erfolgreiche Methode durch Verwendung der Nukleofektion [175].

Neben den Herausforderungen der Transfektion bzw. der Zellmarkierung zeigten sich in Mono- und Co-Kultur Versuchen Hinweise, die auf eine Veränderung des Zellmetabolismus hindeuten. So wurden leicht erhöhte bzw. reduzierte Resazurinumsätze gegenüber den jeweiligen Kontrollen beobachtet. Im Fall der RFP-transfizierte SaOS-2 Zellen mit leicht erhöhte Resazurin-Messsignale kann diskutiert werden, dass ein erhöhtes Signal von Interferenzen durch das RFP-Signals ausgeht, da Resazurin im roten Spektralbereich von 590-610 nm fluorometrisch gemessen wird [104,105]. Dies erklärt aber nicht Veränderungen bei mit Adenoviral infizierte GFP-SaOS Zellen. Ebenso wurden Veränderungen in der ALP-Aktivität und der Matrix Mineralisierung festgestellt. Auch konnten Abweichungen in der TRAP-Aktivität festgestellt werden, sodass eine Einflussnahme auf die Differenzierung der Osteoklasten durch die Transfektion der Osteoblasten nicht ausgeschlossen werden kann.

Allerdings wird auch bei einer erfolgreichen Transfektion und nachvollziehbaren Veränderungen des Co-Kultur-Stoffwechsels, eine Markierung der Zellen über ein Fluoreszenzsignal bzw. Cell-Tracking- System nur temporär möglich sein, da bei

Zellenmigration in eine 3D Matrix, eine Detektion der Zellen schwer sein wird. Grund hierfür ist das lichtundurchlässige Material, weshalb nach weiteren Optionen gesucht wurde.

Ein markantes Merkmal, das unabhängig der Kultivierungsbedingungen in beiden Zellarten vorkommt und damit gleichbleibend bestimmt werden kann, ist ihr geschlechtsspezifischer Chromosomensatz [101,102]. Durch die Isolierung der DNA und der Bestimmung der geschlechtsspezifischen Chromosomen mittels PCR ist es möglich, Rückschlüsse auf die Verhältnisse der beiden Zellarten schließen zu können. Rouß *et al.* beschrieben erstmals diese Methode [105].

Die Sensitivität einer PCR kommt Methoden wie die des CyQuan-Assay und weiteren konventionellen Absorptionsmethoden gleich. Dennoch ist bei einer PCR entscheidend, dass geschlechtsspezifische Primer verwendet werden und somit zwischen den Zellen unterschieden werden kann. Dies ist mit den klassischen Fluoreszenz- bzw. Absorption-Detektionsmethoden nicht möglich [21,105].

Herausforderungen wie die Isolierung der Zellen aus einer 3D Umgebung bzw. der mineralischen Einkapselung der differenzierten SaOS-2 Zellen konnten durch eine Isolierung mittels einer alkalischen Lyse mit +98 °C heißem NaOH gelöst werden. Durch diese Form der Isolation wird die DNA nicht beschädigt [21]. Allerdings stößt diese Methode auch an Ihre Grenzen sollte eine Isolierung der DNA qualitative nicht möglich sein bzw. die Messung durch DNA von toten Zellen verfälscht werden. Um dem vorzubeugen, kann ein Waschschrift zwischengeschaltet werden.

Diese Methode könnte theoretisch um weitere Zellarten erweitert werden, sofern die zusätzlichen Zellen ein genetisches Alleinstellungsmerkmal besitzen, beispielsweise durch eine tierische bzw. spezifisch genetische manipulierte Zelle.

### **4.3 Etablierung einer Co-Kultur**

Im Anschluss an die Suche nach geeigneten Zelltypen und der Optimierung der Kulturbedingungen sowie der Etablierung der Normalisierung erfolgte im nächsten Schritt eine Kontrolle der Funktionalität der Co-Kultur.

#### **4.3.1 Bisphosphonate**

Bisphosphonate gehören zu einer Gruppe von Wirkstoffen, die eine Resorption des Knochens verhindern und seit über drei Jahrzehnte u. a. für die Behandlung von Osteoporose klinisch verwendet werden. Die wachsende Zahl an DM Typ II und

Osteoporose erkrankten verdeutlicht immer mehr einen möglichen Zusammenhang zwischen diesen beiden Volkskrankheiten [17,30].

Zu der Gruppe der Bisphosphonate zählen die Wirkstoffe Alendronat und Zoledronat, die u. a. zu einer Hemmung der Osteoklasten-Aktivität führen [176]. Um die gewünschten Wechselwirkungen im Co-Kultur Modell zwischen beiden Zellarten zu überprüfen, wurde das Modell zusammen mit diesen beiden Bisphosphonaten kultiviert. Einerseits ist bekannt, dass Bisphosphonate die Rekrutierung, Differenzierung und auch Fusion von Osteoklasten-Vorläuferzellen und reifen Osteoklasten verhindern, aber auch, dass sie einen Einfluss auf den Stoffwechsel von Osteoblasten haben. Auf welche Weise die Wirkstoffe auf Osteoblasten wirken, ist bis jetzt ungeklärt. Sahni *et al.* zeigte aber, dass die Knochenresorption von Osteoklasten gehemmt ist, bei einer Kultivierung der Zellen in konditionierten Medium von Osteoblasten, die zuvor mit Bisphosphonaten behandelt wurden [177]. Mackie *et al.* beobachteten bei der *in vitro* Kultivierung von Osteosarkomen bei Ratten eine herunterregulierte Expression von RANKL durch Bisphosphonate, bei gleichzeitig weitestgehend normaler Expression von ALP, Kollagen und OPG. Damit scheinen Bisphosphonate nicht nur auf den allgemeinen Stoffwechsel von Osteoblasten Einfluss zu haben, sondern auch durch Veränderung der Expression von osteoklasten-regulierenden Stoffen, die Differenzierung und Aktivität der Osteoklasten zu hemmen [178]. Sollte somit eine Interaktion zwischen beiden Zellarten in dem hier getesteten Modell existieren, muss eine reduzierte Osteoklasten-Aktivität unter beiden Bisphosphonaten nachgewiesen werden.

So zeigten das Modell sowohl unter Alendronat wie auch Zoledronat eine deutliche Reduktion in der CAII-Aktivität, wie auch eine signifikante Zunahme an mineralisierter Matrix (Abbildung 18). In beiden Fällen überstieg zu Tag 14, das Niveau an mineralisierter Matrix die Werte der Kontrolle um mehr als das Doppelte. Eine zelltoxische Wirkung gegenüber den THP-1 Zellen konnte durch die vergleichbaren detektierten DNA-Konzentrationen gegenüber der Kontrollbedingung ausgeschlossen werden. Dass die getesteten Stoffe die Zellen nicht weiter beeinflussen, konnte bei einer steigenden mitochondrialen Aktivität nicht ausgeschlossen werden, da sich ein 50-prozentiger Anstieg gegenüber der Kontrolle zeigte. Dabei ist unklar, ob das gesteigerte Signal von THP-1 oder SaOS-2 stammt.

Wie in der Literatur beschrieben, zeigte sich auch im Co-Kultur Modell eine Beeinflussung der Osteoblasten durch Alendronat und Zoledronat anhand einer reduzierten ALP-Aktivität [177,178].

Vergleicht man die Werte der Co-Kultur mit den parallel durchgeführten Mono-Kultur-Versuchen, wird vor allem erkennbar, dass die Werte und die Verläufe sich nicht gleichen. Während in der Co-Kultur die mitochondriale Aktivität unter beiden Wirkstoffen ansteigt, sind die Verläufe der beiden Bisphosphonate gleich der Kontrolle, sowohl bei den Mono-SaOS-2 wie auch Mono-THP-1 Zellen (Abbildung 18, Abbildung 21). Gleiches gilt auch in Bezug auf die Aktivität von ALP und CAII. Zwar könnte hier über die Versuchsdauer der Mono-Kultur gegenüber der Dauer der Co-Kultur diskutiert werden, aber dennoch müssten Effekte mindestens bei der mitochondrialen Aktivität wie auch ALP und CAII zu erkennen sein (Abbildung 18).

Damit bestätigt dieser Versuchsaufbau die gewünschte Wechselwirkung beider Zellarten untereinander. Aber vor allem weist dieser Versuch die Bedeutung eines Co-Kultur-Modells für zukünftige Untersuchungen auf, da hier gezeigt werden konnte, dass Mono-Kultur-Modelle die *in vivo* Bedingungen nicht im gleichen Maße widerspiegeln können, wie es für Co-Kultur-Modell näherungsweise der Fall ist.

#### **4.3.2 Metformin**

Nach Identifizierung geeigneter Zellen und einer bestätigten Wechselwirkung zwischen diesen wurde in einem nächsten Schritt der Einfluss von Metformin auf das Modell geprüft. Einerseits sollen Hinweise für eine Beeinflussung des Knochenstoffwechsels durch Metformin überprüft werden, zum anderen gilt es, die Hauptfragestellung des Einflusses von DM Typ II in Kombination mit Metformin auf den Knochenstoffwechsel zu untersuchen und die Ergebnisse mit Daten aus klinischen Studien zu vergleichen.

Untersuchungen über den Einfluss von Metformin auf Knochenzellen, u. a. mit periodontalen Ligament-Stammzellen sowie Knochenstammzellen haben gezeigt, dass Metformin einerseits die Proliferation wie auch die Differenzierung hinzu Osteoblasten anregt [179,180]. So führt die orale Einnahme zu Metformin-Konzentrationen im Blut von 1 - 10 µg/ml bei Diabetikern [181-184]. Daher ist dieser Konzentrationsbereich am Modell überprüft worden.

Zwar gibt es Hinweise, dass Metformin in höheren Konzentrationen toxisch ist und die Sensitivität von Osteosarkomen gegenüber einer Chemotherapie deutlich erhöhen kann [185], aber in den hier verwendeten Konzentrationen konnte keine Zelltoxizität

festgestellt werden. Vielmehr zeigte sich bei Konzentrationen von 5 bzw. 10 µg/ml eine stabilisierte Viabilität bzw. leichte Proliferation. Hierfür spricht die über 14 Tage annähernd konstante mitochondriale Aktivität sowie die zunehmende DNA-Konzentration. Dabei ist in Bezug auf die Zelltoxizität zu berücksichtigen, dass die im humanen Blut und auch in diesen Versuchen verwendeten Konzentration 1:2.000 bzw. 1:200 niedriger sind als jene Metformin-Konzentrationen, die eine erhöhte Sensitivität der Osteosarkomen gegenüber einer Chemotherapie *in vitro* herbei führen soll [185]. Einen Einfluss von Metformin in den hier verwendeten Konzentrationen auf den Stoffwechsel lässt sich an einer gesteigerten mitochondrialen Aktivität und höheren DNA-Konzentration gegenüber der Kontrolle erkennen (Abbildung 22). In Bezug auf die gemessene DNA-Konzentration ist hervorzuheben, dass der erwartete Rückgang der DNA-Konzentration mit steigender Metformin-Konzentration abgemildert wird. Während unter Kontrollbedingungen die DNA-Konzentration um nahezu das dreifache zurückging, ist bei einer Metformindosis von 10 µg/ml die DNA-Konzentration weit weniger als ein Drittel zurückgegangen und überstieg nach 14 Tagen die Gesamtkonzentration der Kontrolle um 70,9 %. Diese Beobachtung wird von bisher publizierten Daten bestätigt, die zeigen, dass Metformin die Proliferation von Zellen anregt [180].

Diese Beobachtungen spiegeln sich aber im Zell-Zell-Verhältnis nicht wider. Unabhängig von der Metformin-Konzentration reduzierte sich schrittweise die THP-1 DNA-Konzentration. Dies wiederum bedeutet, dass sowohl bei einer Metformin-Konzentration von 5 als auch bei 10 µg/ml eine Proliferation der SaOS-2 Zellen stattfinden muss (Abbildung 22). Diese Beobachtung wird von Ergebnissen vorangegangener Untersuchungen unterstützt, die ebenfalls einen Osteoklasten-hemmenden bzw. Osteoblasten-förderndem Effekt von Metformin beobachtet haben. Hintergründe hierfür können eine reduzierte Expression an RANKL und erhöhte Expression OPG sein, dass eine Hemmung der Osteoklasten-Aktivität wie auch eine Hemmung der Differenzierung mit sich bringt [186]. Diese deckt sich mit der ansteigenden CAII-Aktivität der THP-1 Zellen unter 0 und 1 µg/ml, die aber unter 5 und 10 µg/ml Metformin ausbleibt. Allerdings zeigen die in den Versuchen gemessenen sRANKL und OPG Werte einen tendenziellen ähnlichen Verlauf, weshalb es hier weitere Untersuchungen benötigt (Abbildung 24).

So deuten diese Daten ebenso wie die reduzierter ALP-Aktivität bei 5 bzw. 10 µg/ml Metformin auf eine teilweise Hemmung der osteogenen Differenzierung sowie eine

gesteigerte Proliferation der SaOS-2 Zellen hin. Hier gegen spricht allerdings wiederum die unverändert hohe Matrix-Mineralisierung, die konstant blieb. Um dies genauer beurteilen zu können, braucht es weitere Untersuchungen in Bezug auf das Expressionsniveau von RunX2 und OPN, der Aktivierung von AMPK, wie auch der Konzentration an M-CSF. *In vitro* Versuche an BMPCs und *in vivo* Experimente an diabetischen und nicht-diabetischen Ratten zeigten eine gesteigerte Expression an RunX2 und eine zeitabhängige Aktivierung von AMPK, wie auch verbesserte Heilung von Knochenläsionen durch Metformin [187].

In Bezug auf den Vergleich des Einflusses eines Wirkstoffes auf Zellen in Mono-Kultur gegenüber Zellen in Co-Kultur zeigten die Versuche mit Metformin deutliche Aktivitätsunterschiede. Unter anderem im Fall der SaOS-2 Zellen an der unterschiedlichen ALP-Aktivität wie auch bei den THP-1 Zellen an der deutlich veränderten CAII-Aktivität (Abbildung 22, Abbildung 23, Abbildung 25). Dies zeigt erneut, dass Mono-Kultur-Modelle die *in vivo* Bedingungen nicht im gleichen Maße widerspiegeln können, wie es für Co-Kultur-Modell näherungsweise der Fall ist.

#### **4.3.3 Diabetes + Metformin 2D vs. 3D**

Final ist am Co-Kultur Modell das Krankheitsbild DM Typ II getestet worden mit dem Ziel, den Einfluss auf den Knochenstoffwechsel zu untersuchen und das Modell weiter zu evaluieren. Dabei erfolgte die Kultivierung der Zellen sowohl in 2D als auch in 3D, auf der in dieser Arbeit entwickelten Matrix. Aufgrund der unterschiedlichen Randbedingungen, wie zum Beispiel verschiedene Messmethoden, Zellzahlen und Volumina an Medium, ist ein direkter Vergleich der Messdaten aus der 2D und der 3D Kultivierung nicht möglich. Allerdings kann durch die parallele Versuchsdurchführung der 3D Effekt auf die Zellen näherungsweise eingeschätzt werden.

So zeigten sich bereits im Vergleich der Mitochondrialen-Aktivität von 2D und 3D Unterschiede. Wie in den vorangegangenen Versuchen reduzierte sich unter 2D Bedingungen die Mitochondrialen-Aktivität über die Zeit, nicht jedoch unter den 3D Bedingungen, hier stieg die Mitochondriale-Aktivität über die Zeit an (Abbildung 26). Gleiches gilt in Bezug auf den DNA-Gehalt einer jeden diabetischen 2D Bedingung, die mit Fortgang der Zeit immer weiter abnimmt, während unter den 3D Bedingungen der Gehalt an DNA konstant über die Zeit verlief (Abbildung 26). Am Beispiel der Kontrollbedingungen NG-I sank die Mitochondriale-Aktivität in 2D und auch reduzierte sich der DNA-Gehalt, der um nahezu 2/3 zurückging. Parallel hierzu verdoppelte sich

die mitochondriale Aktivität unter 3D und der DNA-Gehalt an Tag 14 entsprach näherungsweise demselben Wert wie zu Beginn der Experimente. Das Zell-Zell-Verhältnis verschob sich unter 2D zugunsten der Osteoklasten, während dieses unter 3D annähernd konstant blieb. Diese Beobachtungen treffen in verwandter Weise auch auf die Bedingungen mit Hyperglykämie und Hyperinsulinämie zu, sodass ein positiver Einfluss der 3D Matrix in Bezug auf Viabilität und Stabilität ermittelt werden konnte und folglich eine 3D Matrix den Metabolismus der Zellen maßgeblich beeinflussen kann. Zu ähnliche Erkenntnis kam Payr *et al.* die signifikant höhere Genexpressionswerte bei primäre humane Osteoblasten von älteren Spendern in einer 3D Matrix gegenüber Zellen in 2D feststellte [75]. Zu einem gesammelten positiven Ergebnis für die Kultivierung in 3D kommen Jensen & Teng *et al.* beim Vergleich der in der Wissenschaft geschilderten Beobachtungen von 2D gegenüber 3D [76]. Die oben beschriebene Einflussgröße der Oberflächenrauigkeit spielt auch in dem hier beschriebenen Versuchsaufbau eine Rolle. Diese beeinflusst sowohl die Differenzierung von Osteoklasten als auch der Osteoblasten [188]. So ist auch der verzögerte Rückgang der ALP-Aktivität in 3D unter NG-I, HG-I und HG+I+M nicht zwingend auf die diabetischen Bedingungen zurückzuführen, sondern auf die Oberflächenbeschaffenheit der 3D Matrix, da eine raue Oberfläche die ALP-Aktivität anregt [79,172].

In Bezug auf Diabetes zeigte sich von Beginn an sowohl unter prädiabetischen als auch diabetischen Bedingungen in 2D und 3D, eine reduzierte ALP-Aktivität (Abbildung 27). Im Vergleich zu vorangegangenen Untersuchungen ist diese Reduzierung auf den Einfluss von Hyperglykämie sowie Hyperinsulinämie zurückzuführen und ein Hinweis für eine verzögerte osteogene Differenzierung der Osteoblasten und ihrer Vorläuferzellen [69,103,189]. Gestützt wird dies Vermutung mit dem deutlich verzögerten Rückgang an mitochondrialer-Aktivität unter Hyperinsulinämie gegenüber der Kontrolle und einer noch stärkeren Verzögerung unter der hyperglykämischen 2D Bedingung mit Hyperinsulinämie, dass die Situation eines DM Typ II Erkrankten widerspiegelt.

Eine durch die verzögerte Differenzierung eingeleitete Proliferation zeigte sich nicht. So reduzierte sich zwar der DNA-Gehalt unter den drei Bedingungen mit Hyperinsulinämie weniger in den ersten 7 Tagen als unter Hyperglykämie (HG-I) und der Kontrolle (NG-I), aber eine Zunahme der Zellzahl konnte nicht festgestellt werden

(Abbildung 26). Gleiches trifft auf die Bedingungen unter 3D zu, bei denen ebenfalls keine Proliferation, aber eine relative gleichbleibende DNA-Konzentration über die Zeit festgestellt werden konnte. Hervorzuheben ist hierbei aber der bedeutend höhere Anteil an SaOS-2 Zellen unter der 3D Hyperinsulinämie Bedingung NG+I und der diabetischen 3D Bedingung HG+I mit Hyperglykämie und Hyperinsulinämie. Während unter allen fünf Bedingungen in 3D die THP-1 DNA-Konzentration relativ gleichbleibend war und auch der SaOS-2 DNA-Gehalt auf einem vergleichbaren Niveau unter NG-I und HG-I blieb, so zeigte sich unter den Hyperinsulinämie Bedingungen NG+I und HG+I ein deutlich höherer SaOS-2 DNA-Gehalt (Abbildung 26). Diese Beobachtung ist auf die Konstellation der 3D Matrix und Insulin zurückzuführen. So zeigte sich unter den gleichen Bedingungen in 2D zwar auch eine erhöhte metabolische Aktivität, jedoch kein deutlich erhöhter Anteil an SaOS-2 DNA wie es unter 3D der Fall ist. Bedeutend hierbei ist aber auch der Einfluss von Metformin. Während unter 3D HG+I eine erhöhte SaOS-2 DNA-Konzentration bestimmt wurde und auch die mitochondriale-Aktivität höher war, so scheint Metformin diesen Effekt abzumildern. Der SaOS-2 DNA-Gehalt als auch die mitochondriale Aktivität war näherungsweise nur halb so hoch wie unter HG+I und NG+I. Diese Messergebnisse decken sich mit den Beobachtungen, dass die durch erhöhte Glukose-Konzentration gestiegenen AEG-Konzentration sowie ROS-Bildung und deren negativen Einfluss auf die Osteoblasten mit einer verzögerten Differenzierung und reduzierte ALP-Aktivität durch Metformin umgekehrt wird [190]. In der Arbeit von Jia *et al.* konnte nachgewiesen werden, dass Metformin bei periodontalen Ligamenten-Stammzellen den Akt-Signalweg aktiviert und Nrf2 herunter reguliert, das als wichtiger Transkriptionsfaktor die Expression von Antioxidantien-Proteinen reguliert [191]. So beschreibt auch Tolosa *et al.* eine Umkehrung von negativen Effekten von Diabetes auf die Osteogenese und den Knochenumbau bei insulindefizienten, diabetischen Ratten unter Medikation mit Metformin [192]. Im Co-Kultur Modell wird dies durch die deutlich höhere ALP-Aktivität unter 3D HG+I+M gegenüber 3D HG+I ohne Metformin bestätigt.

Diesen entgegensehenden Effekt durch Metformin ist in seiner Ausprägung allerdings unter den 2D Gegebenheiten nicht so deutlich zu beobachten wie unter 3D (Bsp. CAII-Aktivität 2D, Abbildung 27.E), was erneut den positiven Einfluss durch eine 3D Matrix und ihre Bedeutung für das Modell hervorhebt. Gestützt wird dies durch die hohen Werte für sRANKL, OPG, PINP sowie NTX (Abbildung 29, Abbildung 30).

In Bezug auf den Einfluss einer Hyperinsulinämie auf das Modell zeigte sich eine tendenzielle Hemmung der Osteogenese. Dies ist in 2D als auch 3D an der erhöhten mitochondrialen Aktivität, bei gleichzeitig nicht erhöhter ALP- und CAII-Aktivität zu erkennen. Damit deckt sich dies nicht mit der Literatur, in der angenommen wird, dass Insulin die Osteoblastogenese fördere und die Knochenbildung erhöhe [193,194]. Gleiches wird von Thrailkill *et al.* beschrieben, deren Ergebnisse sowohl *in vivo* als auch *in vitro* Studien darauf hindeuten, dass Insulin die Knochenbildung über proosteoblastische Mechanismen verbessert. Ebenfalls wird die Beobachtung beschrieben, dass ein Insulinmangel in Tiermodellen zu Anomalien der Knochenmikroarchitektur führen kann, die durch einen Insulinersatz jedoch verhindert werden können. Parallel wird aber auch der Effekt der Hyperglykämie wie beim DM Typ II geschildert und dem Fortbestand der Frakturrisikos, was darauf hinweist, dass eine zu hohe Insulinkonzentration wiederum zu Nachteilen für den Knochenstoffwechsel führt [195]. Dies deckt sich ebenfalls mit den Beobachtungen in diesem Co-Kultur Modell. In der Gesamtbetrachtung der Auswirkung einer Hyperglykämie ist aber auch der Einfluss auf die verzögerte Differenzierung der Osteoklasten zu berücksichtigen. Dabei kommt es zu einer Hemmung der Osteoklastenfusion [196].

## **Schlussfolgerung**

Durch die Verwendung der humanen Zelllinien SaOS-2 und den THP-1 Zellen ist es gelungen ein *in vitro* Co-Kultur zu entwickeln, welches den Knochenstoffwechsel und die Interaktionen zwischen Osteoblasten und Osteoklasten näherungsweise widerspiegelt. Die humanen Zelllinien ermöglichen eine ständige Verfügbarkeit des Modells, mit dem es möglich ist Knochenstoffwechselerkrankungen bzw. den Einfluss durch Umweltfaktoren bzw. Medikamenten auf den Knochen zu weiter zu erforschen. Es ist nach aktuellem Wissen das erste *in vitro* Modell, das den reduzierten Stoffwechsel und die erhöhter mineralischer Knochendicht bei gleichzeitiger verringerter Knochensteifigkeit, wie es beim DM Typ II Patienten beobachtet wurde, näherungsweise widerspiegelt [197,198]. Während *in vitro* Modelle der untersuchten Zellen in Mono-Kultur lediglich 7-10 Tage stabile gewesen sind, so führte die direkte Co-Kultur zu einer Modell-Stabilität von mindestens 14 Tagen. Mitentscheidend hierbei ist neben der direkten Co-Kultur aber auch der Einfluss einer 3D-Matrix, die merklich den Stoffwechsel der Zellen mitbeeinflusst.

## 5. Zusammenfassung

In einer alternden Gesellschaft mit zunehmenden negativen Einflüssen auf den Knochenstoffwechsel wächst die Bedeutung eines ständig verfügbaren, sowie ethisch vertretbaren Knochenstoffwechselmodells. Aus diesem Grund war es Ziel dieser Arbeit ein *in vitro* Modell zu entwickeln, das den menschlichen Knochenstoffwechsel mit Osteoblasten und Osteoklasten sowie deren Interaktion widerspiegelt. Experimentelle Vorversuche und Versuche zur Expression spezifischer Proteine zeigten die Eignung der humanen Zelllinien SaOS-2 und THP-1. Die Entwicklung der Co-Kultur ergab ein optimales Zell-Zell-Verhältnis von 2:1 - THP-1 Zellen: SaOS-2 Zellen. Die Differenzierung unter 2 % FCS führte zu einer verbesserten Stoffwechselaktivität und einer Stabilität des Modells von bis zu 14 Tagen. Erste Untersuchungen wiesen die Notwendigkeit einer Zell-Normalisierung zur Evaluation der Messdaten auf. Versuche die beiden Zellarten separat voneinander mittels Zellfärbung bzw. Transfektion mit spezifischen Markern zu quantifizieren, erwiesen sich als ungeeignet. Über geschlechtsspezifische Chromosomen konnten mittels PCR die Zellarten separat quantifiziert werden. Zur Überprüfung der Zell-Zell-Interaktion wurde der Einfluss von Bisphosphonaten (Alendronat, Zoledronat) untersucht. Es bestätigte sich die erwartete Hemmung der Osteoklasten, sowie die angestrebte Interaktion von SaOS-2 und THP-1 Zellen. Jedoch zeigte sich auch eine Beeinflussung der SaOS-2 Zellen durch die Bisphosphonate. Die Beobachtungen werden von Ergebnissen der Literatur unterstützt [177,178]. Parallel durchgeführte Versuche mit SaOS-2 und THP-1 Zellen in Mono-Kultur zeigten abweichende Ergebnisse. Dies hob die Bedeutung des Co-Kultur-Modells für zukünftige Untersuchungen hervor. Untersuchungen über den Einfluss von Metformin auf das Co-Kultur Modell zeigten keine Toxizität von Metformin, sondern eine vermehrte Proliferation der SaOS-2 Zellen sowie Hinweise auf eine Hemmung der osteogenen Differenzierung trotz konstanter Matrixmineralisierung. THP-1 Zellen wiesen bei höheren Metformin-Konzentrationen eine reduzierte osteoklastäre Aktivität auf. Um die *in vitro* Kultivierungsbedingungen den *in vivo* Gegebenheiten weiter anzugleichen, wurde die in 2D kultivierte Co-Kultur auf eine 3D-Matrix transferiert. Auch die 3D-Matrix sollte möglichst kostengünstig und einfach herzustellen und ständig verfügbar sein. Die Vielfalt möglicher Inhaltsstoffe, Flexibilität der Parameter und ein einfacher Herstellungsprozess unterstützten die Entwicklung einer 3D-Matrix auf Basis von Cryo-Gelen. Eine Anpassung des Verhältnisses von pHEMA und BAA steigerte die Steifigkeit der Matrix. Eine

Optimierung des Herstellungsprozesses vergrößerte die Porenweite, erhöhte somit die Steifigkeit, Permeabilität und Reproduzierbarkeit der Matrix. Die Zugabe von humanen Plasmalysat steigerte die Zell-Adhärenz und durch externe Kristallisation mit Kalziumchlorid und einem Phosphatpuffer statt direkter Zugabe von Hydroxylapatit optimierte Porendurchmesser und Steifigkeit weiter. Als abschließender Schritt wurde die Co-Kultur auf die entwickelte 3D-Matrix transferiert und der Einfluss diabetischer Bedingungen (mit/ohne Metformin) untersucht. Die Wahl fiel auf DM Typ II, da Patienten mit DM Typ II oftmals Wund- und Knochenheilungsstörungen aufweisen [31]. Mit einer stetig steigenden Inzidenz von DM Typ II gewinnt dies an Relevanz für die Unfallchirurgie. DM Typ II-Patienten weisen trotz erhöhter Knochendichte eine verringerte Knochensteifigkeit und somit ein erhöhtes Frakturrisiko auf [197,198]. Dieser Effekt konnte bisher in 2D Mono-Kultur Versuchen nicht nachgewiesen werden. Osteoblasten und Osteoklasten zeigten unter 2D Hyperglykämie und Hyperinsulinämie und deren Kombination eine reduzierte spezifische Aktivität auf. So konnte trotz Verwendung einer Co-Kultur eine erhöhte Knochendichte bei DM Typ II im Modell nicht nachgewiesen werden. Dies weist auf komplexere Zusammenhänge jenseits der einfachen Zell-Zell-Interaktion hin. Diese sollen mit Hilfe einer 3D-Umgebung, die realistischer die Knochenstruktur abbildet, weiter untersucht werden. Die Co-Kultur wurde parallel unter den gleichen Bedingungen in 2D und 3D differenziert. Dabei zeigten sich Unterschiede in der mitochondrialen-Aktivität (2D: erhöht, 3D: reduziert) und DNA-Gehalt (2D: rückläufig, 3D: konstant). Das Zell-Zell-Verhältnis verschob sich unter 2D zugunsten der Osteoklasten, blieb jedoch in 3D konstant. Somit zeigte sich ein positiver Einfluss der 3D Matrix auf Viabilität und Stabilität, wie auch eine Beeinflussung des Zell-Metabolismus, das sich mit der aktuellen Literatur deckt [75,76]. Der Einfluss diabetischer Bedingungen unter 3D führte zu Veränderungen der Osteoblasten- und Osteoklastenaktivität, die mit vermehrter Matrix-Mineralisierung bei reduzierter Steifigkeit einhergehen. Somit konnte im 3D Co-Kultur Modell der Einfluss von DM Typ II auf den Knochen *in vitro* nachgebildet werden. Auch zeigten sich Hinweise, dass Metformin dem Einfluss von Hyperglykämie und Hyperinsulinämie entgegenwirkt, was sich im 3D Modell ausgeprägter zeigte. Die Ergebnisse dieser Arbeit verdeutlichen die Notwendigkeit einer direkten Co-Kultur und Bedeutung einer 3D-Umgebung. Das hier entwickelte Modell eröffnet die Grundlage Knochenpathologien sowie den Einfluss von Umwelteinflüssen und Medikamenten auf den Knochenstoffwechsel sowie neue Therapieansätze *in vitro* zu erforschen [21].

## 6. Ausblick

Eine Einflussgröße, die das entwickelte Modell nicht berücksichtigt, ist die Verfettung des Knochenmarks, welche zunehmend bei DM Typ II beobachtet wird [199]. Die Ergänzung bzw. der Austausch von SaOS-2 Zellen gegen Zellen, die sich in einem früheren Differenzierungsstadium befinden (z. B. SCP-1 Zellen), würde es ermöglichen, diesen Einfluss auf die Zelldifferenzierung zu berücksichtigen. Einen weiteren Vorteil bei der Verwendung von SCP-1 Zellen bieten erste Erfahrungen zur Kompatibilität und Kultivierung einer Co-Kultur mit den hier verwendeten THP-1 Zellen [68]. Auch könnte so der Einfluss auf die Verfettung des Knochenmarks als Einflussgröße weiter untersucht werden, da Metformin in der Behandlung von DM Typ II nicht nur die osteogene Zelldifferenzierung fördert, sondern gleichzeitig zu einer Hemmung der Adipogenese führt [200].

Weitere Einflussgrößen, die die Qualität des Modelles erhöhen könnten, wären die Etablierung einer dynamischen Belastung der Matrix oder eine Perfusion der Co-Kultur. Damit könnte die Belastung des menschlichen Knochens, welcher dieser z. B. durch Bewegung ausgesetzt ist, simuliert werden. Eine gerichtete Perfusion des Modells würde eine Nähr- und Sauerstoffversorgung der Zellen gewährleisten, sowie den Abtransport von Stoffwechselprodukten. Dies wiederum würde eine tiefere Migration der Zellen in die Matrix ermöglichen. Bei ungerichteter Perfusion konnte in ersten Laborversuchen nur eine Diffusion im äußeren Randbereich der Scaffolds beobachtet werden. Eine tiefe Migration der Zellen erscheint somit bei ungerichteter Perfusion unwahrscheinlich. Eine weitere Einflussgröße, die durch Perfusion und die Wahl einer entsprechenden Pumpe integriert werden könnte, ist die Nachahmung des Pulses und die damit verbundenen Scherkräfte und Druckschwankungen.

Weitere Punkte, die bei der Weiterentwicklung des Modells berücksichtigt werden sollten, sind einerseits die Gewährleistung der Sterilität (sowohl in Bezug auf das perfundierte System, aber auch in Bezug auf den Energieeintrag für dynamische Bewegung), der Methodik des Zellseedings und der Analytik, da durch Perfusion die Konzentration der entsprechenden Messgrößen beeinflusst werden kann. Auch in Bezug auf die klinische Forschung mit Fokus auf Knochenheilung bei Patienten mit DM Typ II ermöglicht dieses 3D Co-Kultur Modell, wenn auch limitiert, den Einfluss von Chemokinen, welche regulierend auf Zelldifferenzierung, -migration und Zytokinproduktion wirken, auf den Knochenstoffwechsel bzw. -heilungsprozess und mögliche neue Therapieansätze zu untersuchen.

Zur weiteren Prüfung des Co-Kultur Modells im Sinne eines „proof of concepts“, sollten Alternativen zu Metformin wie zum Beispiel Antidiabetika der Gruppe der Thiazolidindione getestet werden. So verbessern Thiazolidindione die Insulinsensitivität der Zellen, zeigen gleichzeitig aber einen negativen Einfluss auf den Knochenstoffwechsel und führen zu einem erhöhten Risiko für Knochenfrakturen [201]. Des Weiteren ist der Frage nachzugehen, warum Metformin eine Wirkung im 3D Modell entwickelt, die mit der Fachliteratur nachvollziehbar ist, aber der Effekt im 2D Modell nicht nachgewiesen werden konnte.

Eine mögliche weitere Fragestellung stellt den Austausch von FCS gegen humanes Blutplasma dar [69]. Dies würde es nicht nur erlauben dieses *in vitro* Modell ohne Verwendung tierischer Produkte zu etablieren, sondern auch eine Personalisierung des Modells erlauben. Durch ein patientenspezifisches Modell können nicht nur Erkrankungen des Knochens, aber auch individuelle Therapieansätze untersucht werden. Dies stellt insbesondere mit dem Aspekt der zunehmend personalisierten Medizin einen interessanten Ansatz dar.

## Liste der Veröffentlichungen

Teile der vorliegenden Dissertationsschrift wurden bereits in den folgenden Publikationen veröffentlicht:

- 2018 Zhu, S.; Ehnert, S.; Rouss, M.; **Haussling, V.**; Aspera-Werz, R.H.; Chen, T.; Nussler, A.K. From the Clinical Problem to the Basic Research-Co-Culture Models of Osteoblasts and Osteoclasts. *Int J Mol Sci* 2018, 19, doi:10.3390/ijms19082284.
- 2018 Ruoss, M.; **Haussling, V.**; Schugner, F.; Olde Damink, L.H.H.; Lee, S.M.L.; Ge, L.; Ehnert, S.; Nussler, A.K. A Standardized Collagen-Based Scaffold Improves Human Hepatocyte Shipment and Allows Metabolic Studies over 10 Days. *Bioengineering (Basel)* 2018, 5, doi:10.3390/bioengineering5040086.
- 2019 Ruoss, M.; Kieber, V.; Rebholz, S.; Linnemann, C.; Rinderknecht, H.; **Haussling, V.**; Hacker, M.; Olde Damink, L.H.H.; Ehnert, S.; Nussler, A.K. Cell-Type-Specific Quantification of a Scaffold-Based 3D Liver Co-Culture. *Methods Protoc* 2019, 3, doi:10.3390/mps3010001.
- 2019 **Haussling, V.**; Deninger, S.; Vidoni, L.; Rinderknecht, H.; Ruoss, M.; Arnscheidt, C.; Athanasopulu, K.; Kemkemer, R.; Nussler, A.K.; Ehnert, S. Impact of Four Protein Additives in Cryogels on Osteogenic Differentiation of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Bioengineering (Basel)* 2019, 6, doi:10.3390/bioengineering6030067.
- 2020 Ehnert, S.; Rinderknecht, H.; Aspera-Werz, R.H.; **Haussling, V.**; Nussler, A.K. Use of in vitro bone models to screen for altered bone metabolism, osteopathies, and fracture healing: challenges of complex models. *Arch Toxicol* 2020, 10.1007/s00204-020-02906-z, doi:10.1007/s00204-020-02906-z.
- 2020 Ehnert, S.; Linnemann, C.; Aspera-Werz, R.H.; **Haussling, V.**; Braun, B.; Weng, W.; Zhu, S.; Ngamsri, K.C.; Nussler, A.K. Feasibility of Cell Lines for In Vitro Co-Cultures Models for Bone Metabolism. *SciMedicine Journal* 2020, 2, doi:10.28991/SciMedJ-2020-0203-6.
- 2020 Reumann, M.K.; Schaefer, J.; Titz, B.; Aspera-Werz, R.H.; Wong, E.T.; Szostak, J.; **Haussling, V.**; Ehnert, S.; Leroy, P.; Tan, W.T., et al. E-vapor aerosols do not compromise bone integrity relative to cigarette smoke after 6-month inhalation in an ApoE(-/-) mouse model. *Arch Toxicol* 2020, 94, 2163-2177, doi:10.1007/s00204-020-02769-4.
- 2020 Weng, W.; **Haussling, V.**; Aspera-Werz, R.H.; Springer, F.; Rinderknecht, H.; Braun, B.; Kuper, M.A.; Nussler, A.K.; Ehnert, S. Material-Dependent Formation and Degradation of Bone Matrix-Comparison of Two Cryogels. *Bioengineering (Basel)* 2020, 7, doi:10.3390/bioengineering7020052.
- 2020 Zhu, S.; **Haussling, V.**; Aspera-Werz, R.H.; Chen, T.; Braun, B.; Weng, W.; Histing, T.; Nussler, A.K. Bisphosphonates Reduce Smoking-Induced

Osteoporotic-Like Alterations by Regulating RANKL/OPG in an Osteoblast and Osteoclast Co-Culture Model. *Int J Mol Sci* 2020, 22, doi:10.3390/ijms22010053.

2021 **Hausling, V.**; Aspera-Werz, R.H.; Rinderknecht, H.; Springer, F.; Arnscheidt, C.; Menger, M.M.; Histing, T.; Nussler, A.K.; Ehnert, S. 3D Environment Is Required In Vitro to Demonstrate Altered Bone Metabolism Characteristic for Type 2 Diabetics. *Int J Mol Sci* 2021, 22, doi:10.3390/ijms22062925.

## Quellenverzeichnis

1. Haussling, V.; Deninger, S.; Vidoni, L.; Rinderknecht, H.; Ruoss, M.; Arnscheidt, C.; Athanasopulu, K.; Kemkemer, R.; Nussler, A.K.; Ehnert, S. Impact of Four Protein Additives in Cryogels on Osteogenic Differentiation of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Bioengineering (Basel)* **2019**, *6*, doi:10.3390/bioengineering6030067.
2. Saeedi, P.; Petersohn, I.; Salpea, P.; Malanda, B.; Karuranga, S.; Unwin, N.; Colagiuri, S.; Guariguata, L.; Motala, A.A.; Ogurtsova, K., et al. Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9(th) edition. *Diabetes Res Clin Pract* **2019**, *157*, 107843, doi:10.1016/j.diabres.2019.107843.
3. Nations, U.; Department of Economic and Social Affairs, P.D. World Population Prospects: The 2015 Revision. **2015**, II.
4. Haussling, V.; Aspera-Werz, R.H.; Rinderknecht, H.; Springer, F.; Arnscheidt, C.; Menger, M.M.; Histing, T.; Nussler, A.K.; Ehnert, S. 3D Environment Is Required In Vitro to Demonstrate Altered Bone Metabolism Characteristic for Type 2 Diabetics. *Int J Mol Sci* **2021**, *22*, doi:10.3390/ijms22062925.
5. Faller, A.; Schünke, M. *Der Körper des Menschen*; Georg Thieme Verlag: Stuttgart, 2008; Vol. 15.
6. Scharthl, M.; Gessler, M.; von Eckardstein, A. *Biochemie und Molekularbiologie des Menschen*; Elsevier GmbH: München, 2009; Vol. 1.
7. Lang, F.; Murer, H. Kalzium-, Magnesium- und Phosphathaushalt. In *Physiologie des Menschen*, Schmidt, R.F., Lang, F., Heckmann, M., Eds. Springer Medizin Verlag: Heidelberg, 2010; Vol. 31, pp. 688-689.
8. Heinemann, C.; Heinemann, S.; Worch, H.; Hanke, T. Development of an osteoblast/osteoclast co-culture derived by human bone marrow stromal cells and human monocytes for biomaterials testing. *Eur Cell Mater* **2011**, *21*, 80-93, doi:10.22203/ecm.v021a07.
9. Florencio-Silva, R.; Sasso, G.R.; Sasso-Cerri, E.; Simoes, M.J.; Cerri, P.S. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *Biomed Res Int* **2015**, *2015*, 421746, doi:10.1155/2015/421746.
10. Schulze, S.; Wehrum, D.; Dieter, P.; Hempel, U. A supplement-free osteoclast-osteoblast co-culture for pre-clinical application. *J Cell Physiol* **2018**, *233*, 4391-4400, doi:10.1002/jcp.26076.
11. Amano, S.; Sekine, K.; Bonewald, L.F.; Ohmori, Y. A novel osteoclast precursor cell line, 4B12, recapitulates the features of primary osteoclast differentiation and function: enhanced transfection efficiency before and after differentiation. *J Cell Physiol* **2009**, *221*, 40-53, doi:10.1002/jcp.21827.
12. G., W. Extrazelluläre Matrix und Zellkontakte. In *Biochemie und Molekularbiologie des Menschen* 1ed.; M., S., M., G., A., v.E., G., W., Eds. Elsevier GmbH: München, 2009; p. 591.
13. A., F.; M., S.; G., S. Gewebe. In *Der Körper des Menschen* 15 ed.; A., F., M., S., G., S., Eds. Georg Thieme Verlag: Stuttgart, 2008; pp. 93 - 99.
14. Boyce, B.F.; Xing, L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch Biochem Biophys* **2008**, *473*, 139-146, doi:10.1016/j.abb.2008.03.018.
15. Mohamad, N.V.; Soelaiman, I.N.; Chin, K.Y. A concise review of testosterone and bone health. *Clin Interv Aging* **2016**, *11*, 1317-1324, doi:10.2147/CIA.S115472.

16. Peyman Hadji, S.K., Holger Gothe, Bertram Häussler, Thomas Kless, Torsten Schmidt, Thomas Steinle, Frank Verheyen, Roland Linder. Epidemiologie der Osteoporose - Bone Evaluation Study. *Deutsches Ärzteblatt* 2013, pp 52-57.
17. Hernlund, E.; Svedbom, A.; Ivergard, M.; Compston, J.; Cooper, C.; Stenmark, J.; McCloskey, E.V.; Jonsson, B.; Kanis, J.A. Osteoporosis in the European Union: medical management, epidemiology and economic burden. A report prepared in collaboration with the International Osteoporosis Foundation (IOF) and the European Federation of Pharmaceutical Industry Associations (EFPIA). *Arch Osteoporos* **2013**, *8*, 136, doi:10.1007/s11657-013-0136-1.
18. Riggs, B.L.; Khosla, S.; Melton, L.J., 3rd. Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton. *Endocr Rev* **2002**, *23*, 279-302, doi:10.1210/edrv.23.3.0465.
19. Tan, L.O.; Lim, S.Y.; Vasanwala, R.F. Primary osteoporosis in children. *BMJ Case Rep* **2017**, *2017*, doi:10.1136/bcr-2017-220700.
20. Sheu, A.; Diamond, T. Secondary osteoporosis. *Aust Prescr* **2016**, *39*, 85-87, doi:10.18773/austprescr.2016.038.
21. Ehnert, S.; Rinderknecht, H.; Aspera-Werz, R.H.; Haussling, V.; Nussler, A.K. Use of in vitro bone models to screen for altered bone metabolism, osteopathies, and fracture healing: challenges of complex models. *Arch Toxicol* **2020**, 10.1007/s00204-020-02906-z, doi:10.1007/s00204-020-02906-z.
22. Hernandez, R.K.; Do, T.P.; Critchlow, C.W.; Dent, R.E.; Jick, S.S. Patient-related risk factors for fracture-healing complications in the United Kingdom General Practice Research Database. *Acta Orthop* **2012**, *83*, 653-660, doi:10.3109/17453674.2012.747054.
23. Stein, E.; Shane, E. Secondary osteoporosis. *Endocrinol Metab Clin North Am* **2003**, *32*, 115-134, vii, doi:10.1016/s0889-8529(02)00062-2.
24. Ihle, C.; Freude, T.; Bahrs, C.; Zehendner, E.; Braunsberger, J.; Biesalski, H.K.; Lambert, C.; Stockle, U.; Wintermeyer, E.; Grunwald, J., et al. Malnutrition - An underestimated factor in the inpatient treatment of traumatology and orthopedic patients: A prospective evaluation of 1055 patients. *Injury* **2017**, *48*, 628-636, doi:10.1016/j.injury.2017.01.036.
25. Wintermeyer, E.; Ihle, C.; Ehnert, S.; Schreiner, A.J.; Stollhof, L.; Stockle, U.; Nussler, A.; Fritsche, A.; Pscherer, S. Assessment of the Influence of Diabetes mellitus and Malnutrition on the Postoperative Complication Rate and Quality of Life of Patients in a Clinic Focused on Trauma Surgery. *Z Orthop Unfall* **2019**, *157*, 173-182, doi:10.1055/a-0654-5504.
26. Abate, M.; Vanni, D.; Pantalone, A.; Salini, V. Cigarette smoking and musculoskeletal disorders. *Muscles Ligaments Tendons J* **2013**, *3*, 63-69, doi:10.11138/mltj/2013.3.2.063.
27. Kanis, J.A.; Johnell, O.; Oden, A.; Johansson, H.; De Laet, C.; Eisman, J.A.; Fujiwara, S.; Kroger, H.; McCloskey, E.V.; Mellstrom, D., et al. Smoking and fracture risk: a meta-analysis. *Osteoporos Int* **2005**, *16*, 155-162, doi:10.1007/s00198-004-1640-3.
28. Fassbender, W.J.; Willmann, B. Diabetes und Osteoporose: Verzweigtes Zusammenwirken. *Deutsches Ärzteblatt* **2016**, *113*, doi:10.3238/PersDia.2016.10.28.05.
29. Karuranga, S.; Malanda, B.; Saeedi, P.; Salpea, P. *IDF Diabetes Atlas Ninth edition 2019*; 2019.
30. Federation, I.D. *IDF Diabetes Atlas Global Fact sheet*. 9 ed.; 2019.

31. Pscherer, S.; Nüssler, A.; Bahrs, C.; Reumann, M.; Ihle, C.; Stöckle, U.; Ehnert, S.; Freude, T.; Ochs, B.G.; Flesch, I., et al. Retrospektive Analyse von Diabetikern im Hinblick auf Behandlungsdauer und Behandlungskosten in einem überregionalen Traumazentrum. *Zeitschrift für Orthopädie und Unfallchirurgie* **2017**, 10.1055/s-0042-116328, 72-76, doi:10.1055/s-0042-116328.
32. Murray, C.E.; Coleman, C.M. Impact of Diabetes Mellitus on Bone Health. *Int J Mol Sci* **2019**, 20, doi:10.3390/ijms20194873.
33. Dobnig, H. Diabetes und Knochen. *Österreichische Ärztezeitung* **2014**, 8, 20-28.
34. Ostenson, C.G. The pathophysiology of type 2 diabetes mellitus: an overview. *Acta Physiol Scand* **2001**, 171, 241-247, doi:10.1046/j.1365-201x.2001.00826.x.
35. Selvin, E.; Steffes, M.W.; Zhu, H.; Matsushita, K.; Wagenknecht, L.; Pankow, J.; Coresh, J.; Brancati, F.L. Glycated hemoglobin, diabetes, and cardiovascular risk in nondiabetic adults. *N Engl J Med* **2010**, 362, 800-811, doi:10.1056/NEJMoa0908359.
36. Jiao, H.; Xiao, E.; Graves, D.T. Diabetes and Its Effect on Bone and Fracture Healing. *Curr Osteoporos Rep* **2015**, 13, 327-335, doi:10.1007/s11914-015-0286-8.
37. Starup-Linde, J. Diabetes, biochemical markers of bone turnover, diabetes control, and bone. *Front Endocrinol (Lausanne)* **2013**, 4, 21, doi:10.3389/fendo.2013.00021.
38. Hickman, D.L.; Johnson, J.; Vemulapalli, T.H.; Crisler, J.R.; R., S. Commonly Used Animal Models. In *Principles of Animal Research for Graduate and Undergraduate Students*, Suckow, M., Stewart, K., Eds. Elsevier Inc.: 2017; 10.1016/B978-0-12-802151-4.00007-4pp. 117–175.
39. King, A.J. The use of animal models in diabetes research. *Br J Pharmacol* **2012**, 166, 877-894, doi:10.1111/j.1476-5381.2012.01911.x.
40. Ribitsch, I.; Baptista, P.M.; Lange-Consiglio, A.; Melotti, L.; Patrino, M.; Jenner, F.; Schnabl-Feichter, E.; Dutton, L.C.; Connolly, D.J.; van Steenbeek, F.G., et al. Large Animal Models in Regenerative Medicine and Tissue Engineering: To Do or Not to Do. *Front Bioeng Biotechnol* **2020**, 8, 972, doi:10.3389/fbioe.2020.00972.
41. Haffner-Luntzer, M.; Hankenson, K.D.; Ignatius, A.; Pfeifer, R.; Khader, B.A.; Hildebrand, F.; van Griensven, M.; Pape, H.C.; Lehmicke, M. Review of Animal Models of Comorbidities in Fracture-Healing Research. *J Orthop Res* **2019**, 37, 2491-2498, doi:10.1002/jor.24454.
42. Aerssens, J.; Boonen, S.; Lowet, G.; Dequeker, J. Interspecies differences in bone composition, density, and quality: potential implications for in vivo bone research. *Endocrinology* **1998**, 139, 663-670, doi:10.1210/endo.139.2.5751.
43. Lessmollmann, U.; Hinz, N.; Neubert, D. In vitro system for toxicological studies on the development of mammalian limb buds in a chemically defined medium. *Arch Toxicol* **1976**, 36, 169-176, doi:10.1007/BF00351978.
44. Barrach, H.J.; Neubert, D. Significance of organ culture techniques for evaluation of prenatal toxicity. *Arch Toxicol* **1980**, 45, 161-187, doi:10.1007/BF02418996.
45. Proffit, W.R.; Ackerman, J.L. Fluoride: Its Effects on 2 Parameters of Bone Growth in Organ Culture. *Science* **1964**, 145, 932-934, doi:10.1126/science.145.3635.932.
46. Abubakar, A.A.; Ibrahim, S.M.; Ali, A.K.; Handool, K.O.; Khan, M.S.; Noordin Mustapha, M.; Azmi Ibrahim, T.; Kaka, U.; Mohamad Yusof, L. Postnatal ex vivo rat model for longitudinal bone growth investigations. *Animal Model Exp Med* **2019**, 2, 34-43, doi:10.1002/ame2.12051.
47. Abubakar, A.A.; Noordin, M.M.; Azmi, T.I.; Kaka, U.; Loqman, M.Y. The use of rats and mice as animal models in ex vivo bone growth and development studies. *Bone Joint Res* **2016**, 5, 610-618, doi:10.1302/2046-3758.512.BJR-2016-0102.R2.

48. Madsen, S.H.; Goettrup, A.S.; Thomsen, G.; Christensen, S.T.; Schultz, N.; Henriksen, K.; Bay-Jensen, A.C.; Karsdal, M.A. Characterization of an Ex vivo Femoral Head Model Assessed by Markers of Bone and Cartilage Turnover. *Cartilage* **2011**, *2*, 265-278, doi:10.1177/1947603510383855.
49. Sathi, G.A.; Kenmizaki, K.; Yamaguchi, S.; Nagatsuka, H.; Yoshida, Y.; Matsugaki, A.; Ishimoto, T.; Imazato, S.; Nakano, T.; Matsumoto, T. Early initiation of endochondral ossification of mouse femur cultured in hydrogel with different mechanical stiffness. *Tissue Eng Part C Methods* **2015**, *21*, 567-575, doi:10.1089/ten.TEC.2014.0475.
50. Sloan, A.J.; Taylor, S.Y.; Smith, E.L.; Roberts, J.L.; Chen, L.; Wei, X.Q.; Waddington, R.J. A novel ex vivo culture model for inflammatory bone destruction. *J Dent Res* **2013**, *92*, 728-734, doi:10.1177/0022034513495240.
51. Srinivasaiah, S.; Musumeci, G.; Mohan, T.; Castrogiovanni, P.; Absenger-Novak, M.; Zefferer, U.; Mostofi, S.; Bonyadi Rad, E.; Grun, N.G.; Weinberg, A.M., et al. A 300 µm Organotypic Bone Slice Culture Model for Temporal Investigation of Endochondral Osteogenesis. *Tissue Eng Part C Methods* **2019**, *25*, 197-212, doi:10.1089/ten.TEC.2018.0368.
52. Birbrair, A.; Frenette, P.S. Niche heterogeneity in the bone marrow. *Ann N Y Acad Sci* **2016**, *1370*, 82-96, doi:10.1111/nyas.13016.
53. Morrison, S.J.; Scadden, D.T. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature* **2014**, *505*, 327-334, doi:10.1038/nature12984.
54. Pinho, S.; Frenette, P.S. Haematopoietic stem cell activity and interactions with the niche. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2019**, *20*, 303-320, doi:10.1038/s41580-019-0103-9.
55. Bellido, T.; Delgado-Calle, J. Ex Vivo Organ Cultures as Models to Study Bone Biology. *JBMR Plus* **2020**, *4*, doi:10.1002/jbm4.10345.
56. Owen, R.; Reilly, G.C. In vitro Models of Bone Remodelling and Associated Disorders. *Front Bioeng Biotechnol* **2018**, *6*, 134, doi:10.3389/fbioe.2018.00134.
57. Knothe Tate, M.L.; Knothe, U. An ex vivo model to study transport processes and fluid flow in loaded bone. *J Biomech* **2000**, *33*, 247-254, doi:10.1016/s0021-9290(99)00143-8.
58. David, V.; Guignandon, A.; Martin, A.; Malaval, L.; Lafage-Proust, M.H.; Rattner, A.; Mann, V.; Noble, B.; Jones, D.B.; Vico, L. Ex Vivo bone formation in bovine trabecular bone cultured in a dynamic 3D bioreactor is enhanced by compressive mechanical strain. *Tissue Eng Part A* **2008**, *14*, 117-126, doi:10.1089/ten.a.2007.0051.
59. Davies, C.M.; Jones, D.B.; Stoddart, M.J.; Koller, K.; Smith, E.; Archer, C.W.; Richards, R.G. Mechanically loaded ex vivo bone culture system 'Zetos': systems and culture preparation. *Eur Cell Mater* **2006**, *11*, 57-75; discussion 75, doi:10.22203/ecm.v011a07.
60. Kolar, P.; Schmidt-Bleek, K.; Schell, H.; Gaber, T.; Toben, D.; Schmidmaier, G.; Perka, C.; Buttgerit, F.; Duda, G.N. The early fracture hematoma and its potential role in fracture healing. *Tissue Eng Part B Rev* **2010**, *16*, 427-434, doi:10.1089/ten.TEB.2009.0687.
61. Zhu, S.; Ehnert, S.; Rouss, M.; Haussling, V.; Aspera-Werz, R.H.; Chen, T.; Nussler, A.K. From the Clinical Problem to the Basic Research-Co-Culture Models of Osteoblasts and Osteoclasts. *Int J Mol Sci* **2018**, *19*, doi:10.3390/ijms19082284.
62. Itoh, K.; Udagawa, N.; Matsuzaki, K.; Takami, M.; Amano, H.; Shinki, T.; Ueno, Y.; Takahashi, N.; Suda, T. Importance of membrane- or matrix-associated forms of M-CSF and RANKL/ODF in osteoclastogenesis supported by SaOS-4/3 cells expressing recombinant PTH/PTHrP receptors. *J Bone Miner Res* **2000**, *15*, 1766-1775, doi:10.1359/jbmr.2000.15.9.1766.

63. Engler, A.J.; Sen, S.; Sweeney, H.L.; Discher, D.E. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell* **2006**, *126*, 677-689, doi:10.1016/j.cell.2006.06.044.
64. Chen, G.; Dong, C.; Yang, L.; Lv, Y. 3D Scaffolds with Different Stiffness but the Same Microstructure for Bone Tissue Engineering. *ACS Appl Mater Interfaces* **2015**, *7*, 15790-15802, doi:10.1021/acsami.5b02662.
65. Knasmüller, S.; Misík, M.; Parzefall, W.; Wagner, K.-H. *Krebs und Ernährung*; Georg Thieme Verlag: Stuttgart, 2014; Vol. 1.
66. Reumann, M.K.; Linnemann, C.; Aspera-Werz, R.H.; Arnold, S.; Held, M.; Seeliger, C.; Nussler, A.K.; Ehnert, S. Donor Site Location Is Critical for Proliferation, Stem Cell Capacity, and Osteogenic Differentiation of Adipose Mesenchymal Stem/Stromal Cells: Implications for Bone Tissue Engineering. *Int J Mol Sci* **2018**, *19*, doi:10.3390/ijms19071868.
67. Pautke, C.; Schieker, M.; Tischer, T.; Kolk, A.; Neth, P.; Mutschler, W.; Milz, S. Characterization of osteosarcoma cell lines MG-63, Saos-2 and U-2 OS in comparison to human osteoblasts. *Anticancer Res* **2004**, *24*, 3743-3748.
68. Ehnert, S.; Linnemann, C.; Aspera-Werz, R.H.; Häussling, V.; Braun, B.; Weng, W.; Zhu, S.; Ngamsri, K.C.; A., N. Feasibility of Cell Lines for In Vitro Co-Cultures Models for Bone Metabolism. *SciMedicine Journal* **2020**, *2*, doi:10.28991/SciMedJ-2020-0203-6.
69. Ehnert, S.; Freude, T.; Ihle, C.; Mayer, L.; Braun, B.; Graeser, J.; Flesch, I.; Stockle, U.; Nussler, A.K.; Pscherer, S. Factors circulating in the blood of type 2 diabetes mellitus patients affect osteoblast maturation - description of a novel in vitro model. *Exp Cell Res* **2015**, *332*, 247-258, doi:10.1016/j.yexcr.2014.12.011.
70. Rochet, N.; Leroy, P.; Far, D.F.; Ollier, L.; Loubat, A.; Rossi, B. CAL72: a human osteosarcoma cell line with unique effects on hematopoietic cells. *Eur J Haematol* **2003**, *70*, 43-52, doi:10.1034/j.1600-0609.2003.02766.x.
71. Trojani, C.; Weiss, P.; Michiels, J.F.; Vinatier, C.; Guicheux, J.; Daculsi, G.; Gaudray, P.; Carle, G.F.; Rochet, N. Three-dimensional culture and differentiation of human osteogenic cells in an injectable hydroxypropylmethylcellulose hydrogel. *Biomaterials* **2005**, *26*, 5509-5517, doi:10.1016/j.biomaterials.2005.02.001.
72. Lucero, C.M.; Vega, O.A.; Osorio, M.M.; Tapia, J.C.; Antonelli, M.; Stein, G.S.; van Wijnen, A.J.; Galindo, M.A. The cancer-related transcription factor Runx2 modulates cell proliferation in human osteosarcoma cell lines. *J Cell Physiol* **2013**, *228*, 714-723, doi:10.1002/jcp.24218.
73. Griffith, L.G.; Swartz, M.A. Capturing complex 3D tissue physiology in vitro. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2006**, *7*, 211-224, doi:10.1038/nrm1858.
74. Bulnheim, U.; Muller, P.; Neumann, H.G.; Peters, K.; Unger, R.E.; Kirkpatrick, C.J.; Rychly, J. Endothelial cells stimulate osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells on calcium phosphate scaffolds. *J Tissue Eng Regen Med* **2014**, *8*, 831-840, doi:10.1002/term.1590.
75. Payr, S.; Rosado-Balmayor, E.; Tiefenboeck, T.; Schuseil, T.; Unger, M.; Seeliger, C.; van Griensven, M. Direct comparison of 3D and 2D cultivation reveals higher osteogenic capacity of elderly osteoblasts in 3D. *J Orthop Surg Res* **2021**, *16*, 13, doi:10.1186/s13018-020-02153-z.
76. Jensen, C.; Teng, Y. Is It Time to Start Transitioning From 2D to 3D Cell Culture? *Front Mol Biosci* **2020**, *7*, 33, doi:10.3389/fmolb.2020.00033.
77. Lee, J.; Cuddihy, M.J.; Kotov, N.A. Three-dimensional cell culture matrices: state of the art. *Tissue Eng Part B Rev* **2008**, *14*, 61-86, doi:10.1089/teb.2007.0150.

78. Ruoss, M.; Haussling, V.; Schugner, F.; Olde Damink, L.H.H.; Lee, S.M.L.; Ge, L.; Ehnert, S.; Nussler, A.K. A Standardized Collagen-Based Scaffold Improves Human Hepatocyte Shipment and Allows Metabolic Studies over 10 Days. *Bioengineering (Basel)* **2018**, *5*, doi:10.3390/bioengineering5040086.
79. Weng, W.; Haussling, V.; Aspera-Werz, R.H.; Springer, F.; Rinderknecht, H.; Braun, B.; Kuper, M.A.; Nussler, A.K.; Ehnert, S. Material-Dependent Formation and Degradation of Bone Matrix-Comparison of Two Cryogels. *Bioengineering (Basel)* **2020**, *7*, doi:10.3390/bioengineering7020052.
80. Nishimura, I.; Hisanaga, R.; Sato, T.; Arano, T.; Nomoto, S.; Ikada, Y.; Yoshinari, M. Effect of osteogenic differentiation medium on proliferation and differentiation of human mesenchymal stem cells in three-dimensional culture with radial flow bioreactor. *Regen Ther* **2015**, *2*, 24-31, doi:10.1016/j.reth.2015.09.001.
81. Grayson, W.L.; Bhumiratana, S.; Cannizzaro, C.; Chao, P.H.; Lennon, D.P.; Caplan, A.I.; Vunjak-Novakovic, G. Effects of initial seeding density and fluid perfusion rate on formation of tissue-engineered bone. *Tissue Eng Part A* **2008**, *14*, 1809-1820, doi:10.1089/ten.tea.2007.0255.
82. Loh, Q.L.; Choong, C. Three-dimensional scaffolds for tissue engineering applications: role of porosity and pore size. *Tissue Eng Part B Rev* **2013**, *19*, 485-502, doi:10.1089/ten.TEB.2012.0437.
83. Giudice, G.; Cutrignelli, D.A.; Leuzzi, S.; Robusto, F.; Sportelli, P.; Nacchiero, E. Autologous bone grafting with platelet-rich plasma for alveolar cleft repair in patient with cleft and palate. *Ann Ital Chir* **2016**, *87*, 5-12.
84. Souza GMO; Borges CL; Ratis RNRS; VKL, P. Use of Platelet-Rich Plasma in Autogenous Bone Graft in Implantology. *International Journal of Oral and Dental Health* **2019**, *5*, doi:10.23937/2469-5734/1510096.
85. Prideaux, M.; Wijenayaka, A.R.; Kumarasinghe, D.D.; Ormsby, R.T.; Evdokiou, A.; Findlay, D.M.; Atkins, G.J. SaOS2 Osteosarcoma Cells as an In Vitro Model for Studying the Transition of Human Osteoblasts to Osteocytes. *Calcified Tissue International* **2014**, *95*, 183-193, doi:10.1007/s00223-014-9879-y.
86. Heinemann, C.; Heinemann, S.; Bernhardt, A.; Lode, A.; Worch, H.; Hanke, T. In vitro osteoclastogenesis on textile chitosan scaffold. *Eur Cell Mater* **2010**, *19*, 96-106, doi:10.22203/ecm.v019a10.
87. Kumari, J.; Karande, A.A.; Kumar, A. Combined Effect of Cryogel Matrix and Temperature-Reversible Soluble-Insoluble Polymer for the Development of in Vitro Human Liver Tissue. *ACS Appl Mater Interfaces* **2016**, *8*, 264-277, doi:10.1021/acsami.5b08607.
88. Okay, O.; Lozinsky, V.I. Synthesis and Structure–Property Relationships of Cryogels. In *Polymeric Cryogels*, Springer International Publishing Switzerland, 2014; 10.1007/978-3-319-05846-7\_33.
89. Savina, I.N.; Ingavle, G.C.; Cundy, A.B.; Mikhalovsky, S.V. A simple method for the production of large volume 3D macroporous hydrogels for advanced biotechnological, medical and environmental applications. *Sci Rep* **2016**, *6*, 21154, doi:10.1038/srep21154.
90. Özgür, E.; Bereli, N.; Türkmen, D.; Ünal, S.; Denizli, A. PHEMA cryogel for in-vitro removal of anti-dsDNA antibodies from SLE plasma. *Materials Science and Engineering C* **2011**, 915-920.
91. Memic, A.; Colombani, T.; Eggermont, L.J.; Rezaeeyazdi, M.; Steingold, J.; Rogers, Z.J.; Navare, K.J.; Mohammed, H.S.; Bencherif, S.A. Latest Advances in Cryogel Technology

- for Biomedical Applications. *Advanced Therapeutics* **2019**, *2*, doi:10.1002/adtp.201800114.
92. Crotti, T.N.; O'Sullivan, R.P.; Shen, Z.; Flannery, M.R.; Fajardo, R.J.; Ross, F.P.; Goldring, S.R.; McHugh, K.P. Bone matrix regulates osteoclast differentiation and annexin A8 gene expression. *J Cell Physiol* **2011**, *226*, 3413-3421, doi:10.1002/jcp.22699.
  93. Ofner, C.M., 3rd; Bubnis, W.A. Chemical and swelling evaluations of amino group crosslinking in gelatin and modified gelatin matrices. *Pharm Res* **1996**, *13*, 1821-1827, doi:10.1023/a:1016029023910.
  94. Kimura, S.H.; Tsuruga, H.; Yabuta, N.; Endo, Y.; Nojima, H. Structure, expression, and chromosomal localization of human GAK. *Genomics* **1997**, *44*, 179-187, doi:10.1006/geno.1997.4873.
  95. Dagur, P.K.; McCoy, J.P., Jr. Collection, Storage, and Preparation of Human Blood Cells. *Curr Protoc Cytom* **2015**, *73*, 5 1 1-5 1 16, doi:10.1002/0471142956.cy0501s73.
  96. Dhurat, R.; Sukesh, M. Principles and Methods of Preparation of Platelet-Rich Plasma: A Review and Author's Perspective. *J Cutan Aesthet Surg* **2014**, *7*, 189-197, doi:10.4103/0974-2077.150734.
  97. Doube, M.; Klosowski, M.M.; Arganda-Carreras, I.; Cordelieres, F.P.; Dougherty, R.P.; Jackson, J.S.; Schmid, B.; Hutchinson, J.R.; Shefelbine, S.J. BoneJ: Free and extensible bone image analysis in ImageJ. *Bone* **2010**, *47*, 1076-1079, doi:10.1016/j.bone.2010.08.023.
  98. Shimizu, K.; Ito, A.; Honda, H. Enhanced cell-seeding into 3D porous scaffolds by use of magnetite nanoparticles. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* **2006**, *77*, 265-272, doi:10.1002/jbm.b.30443.
  99. Fan, J.; Jia, X.; Huang, Y.; Fu, B.M.; Fan, Y. Greater scaffold permeability promotes growth of osteoblastic cells in a perfused bioreactor. *J Tissue Eng Regen Med* **2015**, *9*, E210-218, doi:10.1002/term.1701.
  100. Tamjid, E.; Simchi, A.; Dunlop, J.W.; Fratzl, P.; Bagheri, R.; Vossoughi, M. Tissue growth into three-dimensional composite scaffolds with controlled micro-features and nanotopographical surfaces. *J Biomed Mater Res A* **2013**, *101*, 2796-2807, doi:10.1002/jbm.a.34584.
  101. Tsuchiya, S.; Yamabe, M.; Yamaguchi, Y.; Kobayashi, Y.; Konno, T.; Tada, K. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer* **1980**, *26*, 171-176, doi:10.1002/ijc.2910260208.
  102. Fogh, J.; Fogh, J.M.; Orfeo, T. One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J Natl Cancer Inst* **1977**, *59*, 221-226, doi:10.1093/jnci/59.1.221.
  103. Freude, T.; Braun, K.F.; Haug, A.; Pscherer, S.; Stockle, U.; Nussler, A.K.; Ehnert, S. Hyperinsulinemia reduces osteoblast activity in vitro via upregulation of TGF-beta. *J Mol Med (Berl)* **2012**, *90*, 1257-1266, doi:10.1007/s00109-012-0948-2.
  104. McMillian, M.K.; Li, L.; Parker, J.B.; Patel, L.; Zhong, Z.; Gunnett, J.W.; Powers, W.J.; Johnson, M.D. An improved resazurin-based cytotoxicity assay for hepatic cells. *Cell Biol Toxicol* **2002**, *18*, 157-173, doi:10.1023/a:1015559603643.
  105. Ruoss, M.; Kieber, V.; Rebholz, S.; Linnemann, C.; Rinderknecht, H.; Haussling, V.; Hacker, M.; Olde Damink, L.H.H.; Ehnert, S.; Nussler, A.K. Cell-Type-Specific Quantification of a Scaffold-Based 3D Liver Co-Culture. *Methods Protoc* **2019**, *3*, doi:10.3390/mps3010001.
  106. Burstone, M.S. Histochemical demonstration of acid phosphatase activity in osteoclasts. *J Histochem Cytochem* **1959**, *7*, 39-41, doi:10.1177/7.1.39.

107. Kirstein, B.; Chambers, T.J.; Fuller, K. Secretion of tartrate-resistant acid phosphatase by osteoclasts correlates with resorptive behavior. *J Cell Biochem* **2006**, *98*, 1085-1094, doi:10.1002/jcb.20835.
108. Ehnert, S.; Falldorf, K.; Fentz, A.K.; Ziegler, P.; Schroter, S.; Freude, T.; Ochs, B.G.; Stacke, C.; Ronniger, M.; Sachtleben, J., et al. Primary human osteoblasts with reduced alkaline phosphatase and matrix mineralization baseline capacity are responsive to extremely low frequency pulsed electromagnetic field exposure - Clinical implication possible. *Bone Rep* **2015**, *3*, 48-56, doi:10.1016/j.bonr.2015.08.002.
109. Ehnert, S.; Baur, J.; Schmitt, A.; Neumaier, M.; Lucke, M.; Dooley, S.; Vester, H.; Wildemann, B.; Stockle, U.; Nussler, A.K. TGF-beta1 as possible link between loss of bone mineral density and chronic inflammation. *PLoS One* **2010**, *5*, e14073, doi:10.1371/journal.pone.0014073.
110. Bernhardt, A.; Koperski, K.; Schumacher, M.; Gelinsky, M. Relevance of osteoclast-specific enzyme activities in cell-based in vitro resorption assays. *Eur Cell Mater* **2017**, *33*, 28-42, doi:10.22203/eCM.v033a03.
111. Tenopoulou, M.; Kurz, T.; Doulias, P.T.; Galaris, D.; Brunk, U.T. Does the calcein-AM method assay the total cellular 'labile iron pool' or only a fraction of it? *Biochem J* **2007**, *403*, 261-266, doi:10.1042/BJ20061840.
112. Storhas, W. *Bioverfahrensentwicklung*; Wiley-VCH: Weinheim, 2013.
113. Cruz-Bermudez, A.; Laza-Briviesca, R.; Vicente-Blanco, R.J.; Garcia-Grande, A.; Coronado, M.J.; Laine-Menendez, S.; Palacios-Zambrano, S.; Moreno-Villa, M.R.; Ruiz-Valdepenas, A.M.; Lendinez, C., et al. Cisplatin resistance involves a metabolic reprogramming through ROS and PGC-1alpha in NSCLC which can be overcome by OXPHOS inhibition. *Free Radic Biol Med* **2019**, *135*, 167-181, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2019.03.009.
114. Cornel, M. *Der Experimentator Molekularbiologie/Genomics*; Springer-Verlag Berlin Heidelberg: Heidelberg, 2013; Vol. 7.
115. Erlangen, V.I.G.L.S.C.C. Datenplatt 30-20xx\_peqGOLD TriFast\_v0815. Available online: <https://de.vwr.com/store/product/15155296/peqgold-trifasttm-und-trifasttm-fl> (accessed on 29.08.2021).
116. Rodriguez-Ezpeleta, N.; Teijeiro, S.; Forget, L.; Burger, G.; Lang, B.F. Construction of cDNA libraries: focus on protists and fungi. *Methods Mol Biol* **2009**, *533*, 33-47, doi:10.1007/978-1-60327-136-3\_3.
117. Kastelic, V.; Budowle, B.; Drobnic, K. Validation of SRY marker for forensic casework analysis. *J Forensic Sci* **2009**, *54*, 551-555, doi:10.1111/j.1556-4029.2009.01007.x.
118. Lee, K.; Choi, S.; Yang, C.; Wu, H.C.; Yu, J. Autofluorescence generation and elimination: a lesson from glutaraldehyde. *Chem Commun (Camb)* **2013**, *49*, 3028-3030, doi:10.1039/c3cc40799c.
119. Callis, G. Glutaraldehyde-induced autofluorescence. *Biotech Histochem* **2010**, *85*, 269, doi:10.3109/10520290903472415.
120. Hüseyin, A.; Nilay, B.; Zübeyde, B.; Adil, D. Selective removal of the autoantibodies from rheumatoid arthritis patient plasma using protein A carrying affinity cryogels. *Biochemical Engineering Journal* **2010**, 10.1016/j.bej.2010.06.010, 153-159, doi:10.1016/j.bej.2010.06.010.
121. GESTIS", I.f.a.d.D.G.U.I.A.B.G.-. IFA GESTIS-Stoffdatenbank Ammoniumperoxodisulfat 20.08.2021 ed.; Deutsche Gesetzliche Unfallversicherung e.V. (DGUV): Berlin, 2021; p 17.

122. Niemeyer, P.; Fechner, K.; Milz, S.; Richter, W.; Suedkamp, N.P.; Mehlhorn, A.T.; Pearce, S.; Kasten, P. Comparison of mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue for bone regeneration in a critical size defect of the sheep tibia and the influence of platelet-rich plasma. *Biomaterials* **2010**, *31*, 3572-3579, doi:10.1016/j.biomaterials.2010.01.085.
123. Ruoss, M.; Rebholz, S.; Weimer, M.; Grom-Baumgarten, C.; Athanasopulu, K.; Kemkemer, R.; Kass, H.; Ehnert, S.; Nussler, A.K. Development of Scaffolds with Adjusted Stiffness for Mimicking Disease-Related Alterations of Liver Rigidity. *J Funct Biomater* **2020**, *11*, doi:10.3390/jfb11010017.
124. Ducsay, C.A.; Goyal, R.; Pearce, W.J.; Wilson, S.; Hu, X.Q.; Zhang, L. Gestational Hypoxia and Developmental Plasticity. *Physiol Rev* **2018**, *98*, 1241-1334, doi:10.1152/physrev.00043.2017.
125. Murillo, A.; Guerrero, C.A.; Acosta, O.; Cardozo, C.A. Bone resorptive activity of osteoclast-like cells generated in vitro by PEG-induced macrophage fusion. *Biol Res* **2010**, *43*, 205-224, doi:/S0716-97602010000200009.
126. Lewiecki, E.M. Bisphosphonates for the treatment of osteoporosis: insights for clinicians. *Ther Adv Chronic Dis* **2010**, *1*, 115-128, doi:10.1177/2040622310374783.
127. Bedard, P.; Gauvin, S.; Ferland, K.; Caneparo, C.; Pellerin, E.; Chabaud, S.; Bolduc, S. Innovative Human Three-Dimensional Tissue-Engineered Models as an Alternative to Animal Testing. *Bioengineering (Basel)* **2020**, *7*, doi:10.3390/bioengineering7030115.
128. Jain, K.G.; Mohanty, S.; Ray, A.R.; Malhotra, R.; Airan, B. Culture & differentiation of mesenchymal stem cell into osteoblast on degradable biomedical composite scaffold: In vitro study. *Indian J Med Res* **2015**, *142*, 747-758, doi:10.4103/0971-5916.174568.
129. Mayr-Wohlfart, U.; Fiedler, J.; Gunther, K.P.; Puhl, W.; Kessler, S. Proliferation and differentiation rates of a human osteoblast-like cell line (SaOS-2) in contact with different bone substitute materials. *J Biomed Mater Res* **2001**, *57*, 132-139, doi:10.1002/1097-4636(200110)57:1<132::aid-jbm1152>3.0.co;2-k.
130. Ayobian-Markazi, N.; Fouroutan, T.; Kharazifar, M.J. Comparison of cell viability and morphology of a human osteoblast-like cell line (SaOS-2) seeded on various bone substitute materials: An in vitro study. *Dent Res J (Isfahan)* **2012**, *9*, 86-92, doi:10.4103/1735-3327.92959.
131. George, J.; Kuboki, Y.; Miyata, T. Differentiation of mesenchymal stem cells into osteoblasts on honeycomb collagen scaffolds. *Biotechnol Bioeng* **2006**, *95*, 404-411, doi:10.1002/bit.20939.
132. Rohman, G.; Langueh, C.; Ramtani, S.; Lataillade, J.J.; Lutomski, D.; Senni, K.; Changotade, S. The Use of Platelet-Rich Plasma to Promote Cell Recruitment into Low-Molecular-Weight Fucoidan-Functionalized Poly(Ester-Urea-Urethane) Scaffolds for Soft-Tissue Engineering. *Polymers (Basel)* **2019**, *11*, doi:10.3390/polym11061016.
133. Fernandes, G.; Yang, S. Application of platelet-rich plasma with stem cells in bone and periodontal tissue engineering. *Bone Res* **2016**, *4*, 16036, doi:10.1038/boneres.2016.36.
134. Li, J.; Yuan, H.; Chandrakar, A.; Moroni, L.; Habibovic, P. 3D porous Ti6Al4V-beta-tricalcium phosphate scaffolds directly fabricated by additive manufacturing. *Acta Biomater* **2021**, *126*, 496-510, doi:10.1016/j.actbio.2021.03.021.
135. Backer, A.; Goppert, B.; Sturm, S.; Abaffy, P.; Sollich, T.; Gruhl, F.J. Impact of adjustable cryogel properties on the performance of prostate cancer cells in 3D. *Springerplus* **2016**, *5*, 902, doi:10.1186/s40064-016-2629-z.

136. Deville, S. Freeze-Casting of Porous Ceramics: A Review of Current Achievements and Issues. *Advanced Engineering Materials* **2008**, *10*, 14, doi:10.1002/adem.200700270.
137. Sun, M.; Chi, G.; Xu, J.; Tan, Y.; Xu, J.; Lv, S.; Xu, Z.; Xia, Y.; Li, L.; Li, Y. Extracellular matrix stiffness controls osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells mediated by integrin alpha5. *Stem Cell Res Ther* **2018**, *9*, 52, doi:10.1186/s13287-018-0798-0.
138. Ivanov, R.V.; Lozinsky, V.I.; Noh, S.K.; Han, S.S.; Lyoo, W.S. Preparation and characterization of polyacrylamide cryogels produced from a high - molecular - weight precursor. I. Influence of the reaction temperature and concentration of the crosslinking agent. *Journal of Applied Polymer Science* **2007**, *106*, 1470-1475, doi:10.1002/app.26559.
139. Dinu, M.V.; Ozmen, M.M.; Dragan, E.S.; Okay, O. Freezing as a path to build macroporous structures: Superfast responsive polyacrylamide hydrogels. *Polymer, Elsevier Ltd.* **2007**, *48*, 195-204, doi:10.1016/j.polymer.2006.11.022.
140. V.I., L.; O., O. Basic Principles of Cryotropic Gelation. In *Polymeric Cryogels*, O., O., Ed. Springer, Cham: Switzerland, 2014; Vol. 263.
141. Alkana, H.; Berelib, N.; Baysala, Z.; Denizli, A. Selective removal of the autoantibodies from rheumatoid arthritis patient plasma using protein A carrying affinity cryogels. *Biochemical Engineering Journal* **2010**, *51* 153–159.
142. Nilay Berelia, N.; Andaç, M.; Baydemira, G.; Sayb, R.; Galaevc, I.Y.; Denizli, A. Protein recognition via ion-coordinated molecularly imprinted supermacroporous cryogels. *Journal of Chromatography A* **2008**, *1190*, 18–26, doi:10.1016/j.chroma.2008.02.110.
143. Akande, W.; Mikhalovska, L.; James, S.; Mikhalovsky, S. Poly (2-Hydroxyethyl Methacrylate) Macroporous Cryogel for Extracorporeal Medical Devices. *International Journal of Biomedical Materials Research* **2015**, *3*, 46-55, doi:10.11648/j.ijbmr.20150304.12.
144. Di Luca, A.; Ostrowska, B.; Lorenzo-Moldero, I.; Lepedda, A.; Swieszkowski, W.; Van Blitterswijk, C.; Moroni, L. Gradients in pore size enhance the osteogenic differentiation of human mesenchymal stromal cells in three-dimensional scaffolds. *Sci Rep* **2016**, *6*, 22898, doi:10.1038/srep22898.
145. Murphy, C.M.; O'Brien, F.J. Understanding the effect of mean pore size on cell activity in collagen-glycosaminoglycan scaffolds. *Cell Adh Migr* **2010**, *4*, 377-381, doi:10.4161/cam.4.3.11747.
146. Daculsi, G.; Passuti, N. Effect of the macroporosity for osseous substitution of calcium phosphate ceramics. *Biomaterials* **1990**, *11*, 86-87.
147. Thein-Han, W.W.; Misra, R.D. Biomimetic chitosan-nanohydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. *Acta Biomater* **2009**, *5*, 1182-1197, doi:10.1016/j.actbio.2008.11.025.
148. Faia-Torres, A.B.; Guimond-Lischer, S.; Rottmar, M.; Charnley, M.; Goren, T.; Maniura-Weber, K.; Spencer, N.D.; Reis, R.L.; Textor, M.; Neves, N.M. Differential regulation of osteogenic differentiation of stem cells on surface roughness gradients. *Biomaterials* **2014**, *35*, 9023-9032, doi:10.1016/j.biomaterials.2014.07.015.
149. Faia-Torres, A.B.; Charnley, M.; Goren, T.; Guimond-Lischer, S.; Rottmar, M.; Maniura-Weber, K.; Spencer, N.D.; Reis, R.L.; Textor, M.; Neves, N.M. Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in the absence of osteogenic supplements: A surface-roughness gradient study. *Acta Biomater* **2015**, *28*, 64-75, doi:10.1016/j.actbio.2015.09.028.
150. Bilem, I.; Chevallier, P.; Plawinski, L.; Sone, E.D.; Durrieu, M.C.; Laroche, G. RGD and BMP-2 mimetic peptide crosstalk enhances osteogenic commitment of human bone

- marrow stem cells. *Acta Biomater* **2016**, *36*, 132-142, doi:10.1016/j.actbio.2016.03.032.
151. Bellis, S.L. Advantages of RGD peptides for directing cell association with biomaterials. *Biomaterials* **2011**, *32*, 4205-4210, doi:10.1016/j.biomaterials.2011.02.029.
  152. Ehnert, S.; van Griensven, M.; Unger, M.; Scheffler, H.; Falldorf, K.; Fentz, A.K.; Seeliger, C.; Schroter, S.; Nussler, A.K.; Balmayor, E.R. Co-Culture with Human Osteoblasts and Exposure to Extremely Low Frequency Pulsed Electromagnetic Fields Improve Osteogenic Differentiation of Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Int J Mol Sci* **2018**, *19*, doi:10.3390/ijms19040994.
  153. Zhang, J.; Neoh, K.G.; Kang, E.T. Electrical stimulation of adipose-derived mesenchymal stem cells and endothelial cells co-cultured in a conductive scaffold for potential orthopaedic applications. *J Tissue Eng Regen Med* **2018**, *12*, 878-889, doi:10.1002/term.2441.
  154. Chen, X.; Wang, Z.; Duan, N.; Zhu, G.; Schwarz, E.M.; Xie, C. Osteoblast-osteoclast interactions. *Connect Tissue Res* **2018**, *59*, 99-107, doi:10.1080/03008207.2017.1290085.
  155. Heinemann, S.; Heinemann, C.; Wensch, S.; Alt, V.; Worch, H.; Hanke, T. 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. *Acta Biomater* **2013**, *9*, 4878-4888, doi:10.1016/j.actbio.2012.10.010.
  156. Martin, T.J.; Sims, N.A.; Quinn, J.M.W. 8 - Interactions Among Osteoblasts, Osteoclasts, and Other Cells in Bone. *Osteoimmunology, Academic Press* **2011**, 10.1016/B978-0-12-375670-1.10008-1., 227-267, doi:10.1016/B978-0-12-375670-1.10008-1.
  157. Sher, R.B.; Cox, G.A.; Ackert-Bicknell, C. Development and Disease of Mouse Muscular and Skeletal Systems. *The Laboratory Mouse, Academic Press* **2012**, *2*, 209-239, doi:10.1016/B978-0-12-382008-2.00010-6.
  158. Marino, S.; Logan, J.G.; Mellis, D.; Capulli, M. Generation and culture of osteoclasts. *Bonekey Rep* **2014**, *3*, 570, doi:10.1038/bonekey.2014.65.
  159. Kong, L.; Smith, W.; Hao, D. Overview of RAW264.7 for osteoclastogenesis study: Phenotype and stimuli. *J Cell Mol Med* **2019**, *23*, 3077-3087, doi:10.1111/jcmm.14277.
  160. Penolazzi, L.; Lolli, A.; Sardelli, L.; Angelozzi, M.; Lambertini, E.; Trombelli, L.; Ciarpella, F.; Vecchiatini, R.; Piva, R. Establishment of a 3D-dynamic osteoblasts-osteoclasts co-culture model to simulate the jawbone microenvironment in vitro. *Life Sci* **2016**, *152*, 82-93, doi:10.1016/j.lfs.2016.03.035.
  161. Yoshimura, Y.; Kikuri, T.; Hasegawa, T.; Matsuno, M.; Minamikawa, H.; Deyama, Y.; Suzuki, K. How much medium do you use for cell culture? Medium volume influences mineralization and osteoclastogenesis in vitro. *Mol Med Rep* **2017**, *16*, 429-434, doi:10.3892/mmr.2017.6611.
  162. Place, T.L.; Domann, F.E.; Case, A.J. Limitations of oxygen delivery to cells in culture: An underappreciated problem in basic and translational research. *Free Radic Biol Med* **2017**, *113*, 311-322, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2017.10.003.
  163. Wang, G.L.; Jiang, B.H.; Rue, E.A.; Semenza, G.L. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1995**, *92*, 5510-5514, doi:10.1073/pnas.92.12.5510.
  164. Harris, A.L. Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer* **2002**, *2*, 38-47, doi:10.1038/nrc704.

165. Walters, G.; Pountos, I.; Giannoudis, P.V. The cytokines and micro-environment of fracture haematoma: Current evidence. *J Tissue Eng Regen Med* **2018**, *12*, e1662-e1677, doi:10.1002/term.2593.
166. Kolar, P.; Gaber, T.; Perka, C.; Duda, G.N.; Buttgerit, F. Human early fracture hematoma is characterized by inflammation and hypoxia. *Clin Orthop Relat Res* **2011**, *469*, 3118-3126, doi:10.1007/s11999-011-1865-3.
167. Tuncay, O.C.; Ho, D.; Barker, M.K. Oxygen tension regulates osteoblast function. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* **1994**, *105*, 457-463, doi:10.1016/S0889-5406(94)70006-0.
168. Sohi, S.S.; Smith, C. Effect of fetal bovine serum on the growth and survival of insect cell cultures. *Can J Zool* **1970**, *48*, 427-432, doi:10.1139/z70-074.
169. Delpino, M.V.; Fossati, C.A.; Baldi, P.C. Proinflammatory response of human osteoblastic cell lines and osteoblast-monocyte interaction upon infection with *Brucella* spp. *Infect Immun* **2009**, *77*, 984-995, doi:10.1128/IAI.01259-08.
170. Beşkardeş, I.G.; Hayden, R.S.; Glettig, D.L.; Kaplan, D.L.; Gümüşderelioğlu, M. Bone tissue engineering with scaffold-supported perfusion co-cultures of human stem cell-derived osteoblasts and cell line-derived osteoclasts. *Process Biochemistry* **2017**, *59*, 303-311, doi:<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.05.008>.
171. Alcaide, M.; Serrano, M.C.; Pagani, R.; Sanchez-Salcedo, S.; Vallet-Regi, M.; Portoles, M.T. Biocompatibility markers for the study of interactions between osteoblasts and composite biomaterials. *Biomaterials* **2009**, *30*, 45-51, doi:10.1016/j.biomaterials.2008.09.012.
172. Shapira, L.; Halabi, A. Behavior of two osteoblast-like cell lines cultured on machined or rough titanium surfaces. *Clin Oral Implants Res* **2009**, *20*, 50-55, doi:10.1111/j.1600-0501.2008.01594.x.
173. Schmid, F.V.; Kleinhans, C.; Schmid, F.F.; Kluger, P.J. Osteoclast Formation within a Human Co-Culture System on Bone Material as an In Vitro Model for Bone Remodeling Processes. *J. Funct. Morphol. Kinesiol.* **2018**, *3*, 17.
174. Scientific, T. Factors Influencing Transfection Efficiency. Available online: <https://www.thermofisher.com/de/de/home/references/gibco-cell-culture-basics/transfection-basics/factors-influencing-transfection-efficiency.html> (accessed on 10.07).
175. Maess, M.B.; Wittig, B.; Lorkowski, S. Highly efficient transfection of human THP-1 macrophages by nucleofection. *J Vis Exp* **2014**, 10.3791/51960, e51960, doi:10.3791/51960.
176. Naidu, A.; Dechow, P.C.; Spears, R.; Wright, J.M.; Kessler, H.P.; Opperman, L.A. The effects of bisphosphonates on osteoblasts in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **2008**, *106*, 5-13, doi:10.1016/j.tripleo.2008.03.036.
177. Sahni, M.; Guenther, H.L.; Fleisch, H.; Collin, P.; Martin, T.J. Bisphosphonates act on rat bone resorption through the mediation of osteoblasts. *J Clin Invest* **1993**, *91*, 2004-2011, doi:10.1172/JCI116422.
178. Mackie, P.S.; Fisher, J.L.; Zhou, H.; Choong, P.F. Bisphosphonates regulate cell growth and gene expression in the UMR 106-01 clonal rat osteosarcoma cell line. *Br J Cancer* **2001**, *84*, 951-958, doi:10.1054/bjoc.2000.1679.
179. Zhang, R.; Liang, Q.; Kang, W.; Ge, S. Metformin facilitates the proliferation, migration, and osteogenic differentiation of periodontal ligament stem cells in vitro. *Cell Biol Int* **2019**, 10.1002/cbin.11202, doi:10.1002/cbin.11202.
180. Jiang, L.L.; Liu, L. Effect of metformin on stem cells: Molecular mechanism and clinical prospect. *World J Stem Cells* **2020**, *12*, 1455-1473, doi:10.4252/wjsc.v12.i12.1455.

181. Frid, A.; Sterner, G.N.; Löndahl, M.; Wiklander, C.; Cato, A.; Vinge, E.; Andersson, A. Novel Assay of Metformin Levels in Patients With Type 2 Diabetes and Varying Levels of Renal Function. *Diabetes Care* **2010**, *33*, 1291, doi:10.2337/dc09-1284.
182. Hess, C.; Unger, M.; Madea, B.; Stratmann, B.; Tschoepe, D. Range of therapeutic metformin concentrations in clinical blood samples and comparison to a forensic case with death due to lactic acidosis. *Forensic Science International* **2018**, *286*, 106-112, doi:<https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2018.03.003>.
183. Salai, M.; Somjen, D.; Gigi, R.; Yakobson, O.; Katzburg, S.; Dolkart, O. Effects of commonly used medications on bone tissue mineralisation in SaOS-2 human bone cell line. *The Bone & Joint Journal* **2013**, *95-B*, 1575-1580, doi:10.1302/0301-620X.95B11.31158.
184. Rena, G.; Hardie, D.G.; Pearson, E.R. The mechanisms of action of metformin. *Diabetologia* **2017**, *60*, 1577-1585, doi:10.1007/s00125-017-4342-z.
185. Shang, D.; Wu, J.; Guo, L.; Xu, Y.; Liu, L.; Lu, J. Metformin increases sensitivity of osteosarcoma stem cells to cisplatin by inhibiting expression of PKM2. *Int J Oncol* **2017**, *50*, 1848-1856, doi:10.3892/ijo.2017.3950.
186. Mai, Q.G.; Zhang, Z.M.; Xu, S.; Lu, M.; Zhou, R.P.; Zhao, L.; Jia, C.H.; Wen, Z.H.; Jin, D.D.; Bai, X.C. Metformin stimulates osteoprotegerin and reduces RANKL expression in osteoblasts and ovariectomized rats. *J Cell Biochem* **2011**, *112*, 2902-2909, doi:10.1002/jcb.23206.
187. Molinuevo, M.S.; Schurman, L.; McCarthy, A.D.; Cortizo, A.M.; Tolosa, M.J.; Gangoiti, M.V.; Arnol, V.; Sedlinsky, C. Effect of metformin on bone marrow progenitor cell differentiation: in vivo and in vitro studies. *J Bone Miner Res* **2010**, *25*, 211-221, doi:10.1359/jbmr.090732.
188. Zhang, Y.; Chen, S.E.; Shao, J.; van den Beucken, J. Combinatorial Surface Roughness Effects on Osteoclastogenesis and Osteogenesis. *ACS Appl Mater Interfaces* **2018**, *10*, 36652-36663, doi:10.1021/acsami.8b10992.
189. Rinker, T.E.; Hammoudi, T.M.; Kemp, M.L.; Lu, H.; Temenoff, J.S. Interactions between mesenchymal stem cells, adipocytes, and osteoblasts in a 3D tri-culture model of hyperglycemic conditions in the bone marrow microenvironment. *Integr Biol (Camb)* **2014**, *6*, 324-337, doi:10.1039/c3ib40194d.
190. Bahrambeigi, S.; Yousefi, B.; Rahimi, M.; Shafiei-Irannejad, V. Metformin; an old antidiabetic drug with new potentials in bone disorders. *Biomed Pharmacother* **2019**, *109*, 1593-1601, doi:10.1016/j.biopha.2018.11.032.
191. Jia, L.; Xiong, Y.; Zhang, W.; Ma, X.; Xu, X. Metformin promotes osteogenic differentiation and protects against oxidative stress-induced damage in periodontal ligament stem cells via activation of the Akt/Nrf2 signaling pathway. *Exp Cell Res* **2020**, *386*, 111717, doi:10.1016/j.yexcr.2019.111717.
192. Tolosa, M.J.; Chuguransky, S.R.; Sedlinsky, C.; Schurman, L.; McCarthy, A.D.; Molinuevo, M.S.; Cortizo, A.M. Insulin-deficient diabetes-induced bone microarchitecture alterations are associated with a decrease in the osteogenic potential of bone marrow progenitor cells: preventive effects of metformin. *Diabetes Res Clin Pract* **2013**, *101*, 177-186, doi:10.1016/j.diabres.2013.05.016.
193. Reid, I.R. Relationships among body mass, its components, and bone. *Bone* **2002**, *31*, 547-555, doi:10.1016/s8756-3282(02)00864-5.
194. Reid, I.R.; Evans, M.C.; Cooper, G.J.; Ames, R.W.; Stapleton, J. Circulating insulin levels are related to bone density in normal postmenopausal women. *Am J Physiol* **1993**, *265*, E655-659, doi:10.1152/ajpendo.1993.265.4.E655.

195. Thrailkill, K.M.; Lumpkin, C.K., Jr.; Bunn, R.C.; Kemp, S.F.; Fowlkes, J.L. Is insulin an anabolic agent in bone? Dissecting the diabetic bone for clues. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **2005**, *289*, E735-745, doi:10.1152/ajpendo.00159.2005.
196. Xu, J.; Yue, F.; Wang, J.; Chen, L.; Qi, W. High glucose inhibits receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand-induced osteoclast differentiation via downregulation of vATPase V0 subunit d2 and dendritic cell-specific transmembrane protein. *Mol Med Rep* **2015**, *11*, 865-870, doi:10.3892/mmr.2014.2807.
197. Vestergaard, P. Discrepancies in bone mineral density and fracture risk in patients with type 1 and type 2 diabetes--a meta-analysis. *Osteoporos Int* **2007**, *18*, 427-444, doi:10.1007/s00198-006-0253-4.
198. Picke, A.K.; Campbell, G.; Napoli, N.; Hofbauer, L.C.; Rauner, M. Update on the impact of type 2 diabetes mellitus on bone metabolism and material properties. *Endocr Connect* **2019**, *8*, R55-R70, doi:10.1530/EC-18-0456.
199. Costantini, S.; Conte, C. Bone health in diabetes and prediabetes. *World J Diabetes* **2019**, *10*, 421-445, doi:10.4239/wjd.v10.i8.421.
200. Zhou, G.; Myers, R.; Li, Y.; Chen, Y.; Shen, X.; Fenyk-Melody, J.; Wu, M.; Ventre, J.; Doebber, T.; Fujii, N., et al. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest* **2001**, *108*, 1167-1174, doi:10.1172/JCI13505.
201. Marin, C.; Luyten, F.P.; Van der Schueren, B.; Kerckhofs, G.; Vandamme, K. The Impact of Type 2 Diabetes on Bone Fracture Healing. *Front Endocrinol (Lausanne)* **2018**, *9*, 6, doi:10.3389/fendo.2018.00006.

## Erklärungen zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde am Lehrstuhl für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie in der Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik Tübingen, am Siegfried Weller Institut für Unfallmedizinische Forschung unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Andreas K. Nüssler und Frau PD Dr. sc. hum. Sabrina Ehnert durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. rer. nat. Andreas K. Nüssler und Frau PD Dr. sc. hum. Sabrina Ehnert.

Sämtliche Versuche wurden (nach Einarbeitung durch Labormitglieder Dr. Marc Ruoff, Caren Linnemann, Dr. Romina Aspera-Werz, Helen Rinderknecht und Bianca Braun) von mir selbstständig durchgeführt. Der Abschnitt „Vergleich der Proteinquellen RGD, PRP, Coll, CM“ in der Weiterentwicklung einer 3D Matrix erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Sebastian Denninger.

Bei den im Abschnitt „Auswahl geeigneter Zellen“ aufgelisteten Daten handelt es sich zum Teil um Daten aus der Publikation Feasibility of Cell Lines for In Vitro Co-Cultures Models for Bone Metabolism von Ehnert et al. 2020. Dabei erfolgte die Erhebung der Daten zu den Merkmalen VitDR, RunX2, CCL2, M-CSF, sRANKL und OPG sowie die Untersuchung der Eignung von THP-1 und HL-60 Zellen durch PD Dr. Sabrina Ehnert und Caren Linnemann.

Die statistische Auswertung erfolgte durch mich, nach vorheriger Einarbeitung durch Frau PD Dr. Sabrina Ehnert.

Ich versichere, das Manuskript selbstständig (nach Anleitung durch Herrn Prof. Dr. rer. nat. Andreas K. Nüssler) verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den

## Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Professor Andreas Nüssler für die Möglichkeit bedanken, diese Arbeit an seinem Institut durchführen und schreiben zu können. Zudem danke ich ihm herzlich für das mir entgegengebrachte Vertrauen, seine fortwährende Unterstützung sowie sein Wissen und seine Erfahrung, die er mit mir teilte.

Mein weiterer besonderer Dank gilt Frau PD Dr. Sabrina Ehnert, für die Betreuung und Unterstützung während der Arbeit an diesem Projekt, welche wesentlich zur Umsetzung dieser Arbeit beitrug.

Ebenfalls gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Fabian Springer und Frau Kiriaki Athanasopulu für die Unterstützung im Bereich Radiologie und Elektronenmikroskopie.

Mein großer Dank gilt auch den Mitarbeitern des Sigfried Weller Institutes, der Berufsgenossenschaftliche Unfallklinik Tübingen. Hierbei sind besonders zu nennen: Dr. Marc Ruoff, Caren Linemann, Helen Rinderkencht, Dr. Romina Aspera-Werz, Dr. Marie Reumann, Bianca Braun, Svetlana Gasimova und Hanna Schäffler.

Ein besonderer Dank gilt auch meiner Familie für ihre immerwährende Unterstützung auf meinem bisherigen Weg. Zudem darf hier noch besonders Herr Prof. Dr. Stephen Meyer genannt werden, der mich bereits seit der Schulzeit begleitet und dessen Rat, nicht nur in akademischen Fragen, ich immer zu schätzen weiß.