



universität
wien

DIPLOMARBEIT

**GRUNDLAGEN FÜR EINE AUTOMATISCHE IMAGEANALYSE VON
OSTEOKLASTEN IN DER ZELLKULTUR**

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag. pharm.)

Verfasser/in:	Ayse Okay
Matrikelnummer:	0348037
Studienrichtung:	Pharmazie (A449)
Begutachter:	Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Walter Jäger

Wien, im April 2011

DANKSAGUNG

Diese Arbeit wurde von März 2010 bis Juli 2010 am Institut für Pathophysiologie und Allergieforschung des Allgemeinen Krankenhauses Wien (Vorstand: Univ. Prof. Erika Jensen Jarolim) im Rahmen des Bridge Projektes P818094 angefertigt.

Ich möchte mich bei Frau Ao. Univ. Prof. Dr. Theresia Thalhammer für die fachliche Betreuung und liebevolle Unterstützung ganz herzlich bedanken.

Herrn Ao. Univ. Prof. Dr. Walter Jäger gilt mein Dank für die Vermittlung des Diplomarbeitsplatzes und für die motivierende Unterstützung bei der Entstehung dieser Arbeit.

Außerdem möchte ich mich beim Herrn Univ. Prof. Dr. Peter Pietschmann herzlichst dafür bedanken, dass er mir das Knochenlabor am Institut für Pathophysiologie und Allergieforschung für die Ausführung des praktischen Teils dieser Arbeit zur Verfügung gestellt hat.

Ein herzliches Dankeschön geht auch an Mag. Caroline Brünner Kubath, Mag. Cihangül Sanlioglu, Mag. Roland Stumberger und Andrea Kapfenberger für das nette Zusammenarbeiten und tolle Arbeitsklima.

Schließlich möchte ich mich bei meiner Familie dafür bedanken, dass sie für mich immer da waren und in schweren Zeiten mir Mut und Kraft gegeben haben.

Daher widme ich diese Diplomarbeit meinen lieben Eltern Ismet Okay und Zeynep Okay, die mich während des Studiums moralisch und finanziell unterstützt haben.

INHALTSVERZEICHNIS

1	PROBLEMSTELLUNG	1
2	EINLEITUNG	3
2.1	Knochenbiologie	3
2.1.1	Die wichtigsten Aufgaben des Knochen	3
2.1.2	Histologischer Aufbau der Knochen	3
2.1.3	Speicherfunktion der Knochen	4
2.2	Knochenzellen	4
2.2.1	Osteoblasten	4
2.2.2	Osteozyten	4
2.2.3	Osteoklasten	5
2.2.4	Differenzierung der Knochenzellen	5
2.3	Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL)	6
2.4	Osteoprotegerin (OPG)	6
2.5	Osteoblasten regulieren die Differenzierung der Osteoklasten	7
2.6	Die Rolle der Hormone im Knochenstoffwechsel	7
2.6.1	Parathormon	7
2.6.2	Vitamin D	8
2.6.3	Calcitonin	8
2.6.3.1	Calcitoninrezeptoren	9
2.6.3.2	Therapeutische Verwendung von Calcitonin	9
2.6.4	Östrogen	9
2.6.5	Testosteron	10
2.7	Osteoklasten-assoziierte Krankheiten	10
2.7.1	Osteoporose	10
2.7.2	Morbus Paget	11
2.7.3	Ewing Sarkom	11
2.7.4	Riesenzelltumore	12
2.7.5	Metastasierende Tumore	12
3	MATERIAL UND METHODEN	14
3.1	Gewinnung von Knochenmarkszellen aus Mäusen	14
3.1.1	Präparation der Tibia und des Femurs	15
3.2	Zellzählung am Coulter Counter	15
3.2.1	Zellzählung	16
3.3	Kultivierung der Osteoklasten	16

3.3.1	Kultivieren der Zellen	16
3.4	Immunfluoreszenzfärbung	17
3.4.1	Prinzip	17
3.4.2	In der Zellkultur verwendete Lösungen	18
3.5	Tartrat-resistente saure Phosphatase (TRAP) – Färbung	19
3.5.1	Durchführung:	20
3.6	Immunfluoreszenzfärbung der Osteoklasten (Parallelfärbung)	20
3.6.1	Fixierung der Zellen	21
3.6.2	Permeabilisieren	21
3.6.3	Blockieren	21
3.6.4	Inkubation der Zellen mit den primären Antikörper	22
3.6.5	Inkubation der Zellen mit dem fluoreszenzgekoppelten sekundären Antikörper	23
3.6.6	Kernfärbung mit DAPI	23
3.6.7	Fixierung der Deckgläser mit Mowiol	24
3.7	Betrachtung und Auswertung der gefärbten Zellen im Fluoreszenzmikroskop	24
3.7.1	Mikroskopie	24
4	ERGEBNISSE	25
4.1	Kultivierung von Osteoklasten	25
4.2	Automatische Identifizierung mehrkerniger Osteoklasten im Tissue Fax® nach indirekte Immunfluoreszenzfärbung von Markerproteinen	25
4.2.1	Nachweis der Osteoklasten in der Zellkultur	27
4.2.1.1	„Klassische“ Osteoklasten	27
4.2.1.2	Riesenosteoklasten	27
4.2.1.3	Osteoklasten mit einer ungewöhnlichen schmalen und länglichen Struktur	27
4.2.1.4	Vorläuferzellen (Präosteoklasten)	27
4.2.2	Doppelfärbungen zur Identifizierung der Osteoklasten in der Kultur	32
4.3	Riesenosteoklasten mit bis zu 50 Zellkernen	34
4.4	Zellkulturen mit sehr kleinen Osteoklasten	36
4.5	Strukturelle Unterschiede der Osteoklasten	37
4.6	Möglicher Zusammenhang zwischen dem Alter der Mäuse und der Bildung und Struktur der Osteoklasten	39
5	DISKUSSION	41
6	ZUSAMMENFASSUNG	43
7	ABSTRACT	44

8	LITERATURVERZEICHNIS.....	45
9	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	48
10	TABELLENVERZEICHNIS.....	49
11	CURRICULUM VITAE	50

1 PROBLEMSTELLUNG

Knochen unterliegen einem ständigen Umbau, wobei ein Gleichgewicht zwischen Knochenresorption durch Osteoklasten und Knochenaufbau durch Osteoblasten besteht. Osteoklasten unterscheiden sich von anderen Zellen durch ihre Multinuklearität. Dies ermöglicht ihre mikroskopische Erkennung und die Unterscheidung von anderen Zellen in einem Gewebe.

Diese Multinuklearität stellt aber für eine automatische Auswertung der Zellzahl am Computer ein komplexes Problem dar. In kommerziell verfügbaren mikroskopischen Auswertesystemen wird der Zellkern als Zellmerkmal angesehen und pro Zellkern wird eine eigene Zelle erkannt. Um mehrkernige Zellen automatisch in einem Imageanalysesystem erkennen zu können, muss bei mehrkernigen Zellen, ein System gefunden werden, wo festgestellt werden kann, wo eine Zelle beginnt und wo sie wieder endet. Dies erfordert die Verwendung von zusätzlichen Marken z.B. Markerproteine an der Zellmembran, die zur Zellabgrenzung heran gezogen werden können. Um diese Studien durchführen zu können, ist es notwendig, Osteoklasten in Zellkulturen anzureichern und zum Nachweis der Osteoklastenzellgrenzen, verschiedene Membranmarker anzufärben.

In dieser Arbeit sollen daher zunächst durch Zugabe von Wachstumsfaktoren eine optimale Menge an Osteoklasten aus ihren Vorläuferzellen gezüchtet werden. Die von den Mäusen gewonnenen Knochenmarkszellen sollen durch Zusatz von Macrophage Colony Stimulating Factor (MCSF), Receptor Activator of NF- κ B Ligand (RANKL) u. Vitamin D in einem Nährmedium eine Woche lang bebrütet werden, um festzustellen, unter welchen Bedingungen und in welchem Milieu gearbeitet werden muss, um eine Vielzahl von reifen, mehrkernigen Osteoklasten aus den Vorläuferzellen zu züchten. Osteoklasten als Zellen mit mehr als drei Zellkernen, werden dann mittels konventioneller TRAP-Färbung weiter detektiert und ihre Zahl wird im Mikroskop quantitativ bestimmt. Sind in einer Präparation genügend mehrkernige Osteoklasten vorhanden, so kann eine Fluoreszenzfärbung zur Darstellung der Zellgrenzen durchgeführt werden. Dabei werden Osteoklastenspezifische Antigene, die sich in der Zellwand der Osteoklasten befinden, angefärbt.

Anhand der gefärbten Zellen können Bildanalysen zur automatischen Zählung der mehrkernigen Zellen mittels Tissue Fax® durchgeführt werden.

Die Etablierung eines automatisierten Systems zur quantitativen Erfassung der Osteoklasten könnte zur Untersuchung von Osteoklasten-assoziierten Krankheiten sehr hilfreich sein. Es könnte für die Untersuchung von verschiedenen Arzneistoffen, die auf diese Knochenzellen wirken, interessant sein.

2 EINLEITUNG

2.1 Knochenbiologie

2.1.1 Die wichtigsten Aufgaben des Knochen

Knochen haben eine wichtige Stütz- und Schutzfunktion im Organismus und bauen das Skelett auf. Das Skelett sorgt für die Aufrechterhaltung des Körpers und schützt die inneren Organe.

Knochen werden ständig umgebaut und besitzen eine Härte und hohe Widerstandskraft gegen Druck- und Zugkräfte. Im Inneren des Knochens ist das Knochenmark, das das wichtigste blutbildende Organ ist. Weiters hat der Knochen wichtige Aufgaben im Mineralstoffwechsel. Er speichert Mineralien, wie Phosphor, und Kalzium. Aus diesem Grund hat das Skelett eine besondere Bedeutung für den Kalziumstoffwechsel in der Konstanthaltung des Kalziumgehaltes im Blut.¹

2.1.2 Histologischer Aufbau der Knochen

Der Knochen ist aus einer mineralisierten extrazellulären Matrix und aus Knochenzellen (Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten) aufgebaut. Sie sind für den Knochenumbau und Knochenneubildung zuständig. Die Osteoblasten bilden die extrazelluläre Matrix, die aus Kollagen, Hydroxylapatit und verschiedenen Proteinen zusammengesetzt ist.

Man unterscheidet zwei verschiedene Arten von Knochengewebe, die unterschiedlich aufgebaut sind. Das spongiöse Gewebe besteht aus Knochenbälkchen (Trabekel). Diese Knochenbälkchen verzweigen sich, binden aneinander und umgeben interzelluläre Räume. Sie geben dem Knochengerüst einen hohen Widerstand und Festigkeit. Da der trabekuläre Knochen mit dem Knochenmark eine Wechselwirkung besitzt, hat er bei der Hämatopoese eine wichtige Bedeutung. Man unterteilt den kompakten Knochen in das Zirkumferenzlamellensystem, das interstitielle Lamellensystem und das Haversche Lamellensystem. Die Knochenlamellen sind im Haverschen System konzentrisch angeordnet. Man findet zwischen den Lamellen die sogenannten Lakunen, in denen Osteozyten liegen. Die parallel angeordneten bänderförmigen Knochenlamellen befinden sich im Zirkumferenzlamellensystem. Im interstitiellen Lamellensystem sind

die Lamellen parallel angeordnet. Es stellt eine Mischform zwischen dem Zirkumferenz- und Haversystem dar.^{2,3}

2.1.3 Speicherfunktion der Knochen

Die Knochenmatrix besteht aus 23 % organischem und 77 % anorganischem Material und wird ständig erneuert. Die organische Knochenmatrix hat auch die Bezeichnung Osteoid und ist aus Kollagen Typ-1 aufgebaut. Sie dient als Speicherort für die Mineralien.

Das anorganische Material der Knochenmatrix ist hauptsächlich aus Kalzium aufgebaut, welches als Hydroxylapatit ($\text{Ca}_5[\text{OH}(\text{PO}_4)_3]$) in die organische Matrix gespeichert wird. Kalzium ist für die hohe Stabilität des Skeletts verantwortlich.⁴

2.2 Knochenzellen

Es wird zwischen 3 Arten von Knochenzellen unterschieden: Osteozyten, Osteoklasten und Osteoblasten.

2.2.1 Osteoblasten

Osteoblasten entstehen aus mesenchymalen Stammzellen und sind für die Knochenneubildung verantwortlich. Die mesenchymalen Zellen differenzieren sich zu Präosteoblasten, die später in Abhängigkeit von Cytokinen und Hormonen sich zu den reifen Osteoblasten entwickeln. Die Osteoblasten haften sich an die Knochen und sezernieren eine Matrix, die als Osteoid genannt wird. Das Osteoid ist hauptsächlich aus Kollagen Typ-1 aufgebaut. Durch die Einlagerung von Kalziumkarbonat und Kalziumphosphat entlang der Kollagenfasern wird die Mineralisierung der organischen Matrix herbeigeführt. Durch diesen Schritt gehen viele Osteoblasten in die Apoptose. Diejenigen Osteoklasten, die von der mineralisierten Matrix umgeben werden, entwickeln sich zu Osteozyten, die sich nicht mehr vermehren. Die Osteozyten mineralisieren und werden mit Kalzium aufgefüllt.⁵

2.2.2 Osteozyten

Die differenzierten Osteozyten besitzen eine sternförmige Struktur. Man nennt sie Nachfahren der Osteoblasten. Diese Knochenzellen befinden sich in den Lakunen und sind über Gap junctions untereinander, aber auch mit anderen Zellen in

Verbindung. Ihre Aufgabe wird noch diskutiert. Ihr Anteil am Knochenumbau ist sehr gering. Die osteoblastischen Osteozyten bilden neue Grundsubstanz, die osteolytischen Osteozyten hingegen bauen die Substanz wieder ab und setzen Kalzium frei. Osteozyten sind nicht mehr teilungsfähig.⁶

2.2.3 Osteoklasten

Die Osteoklasten sind die Gegenspieler der Osteoblasten. Diese Zellen besitzen mindestens 3 Zellkerne und exprimieren tartratresistente saure Phosphatase. Sie sind für die Knochenresorption verantwortlich. Sie sind besonders zahlreich in Knochenregionen, die ständig umgebaut werden. Osteoklasten besitzen eine spezifische Zellmembran (Ruffled border), primäre Lysosomen und viele Mitochondrien. Diese Zellmembran ist vielfach gefaltet und lagert sich an die Knochenoberfläche an. Dadurch wird zwischen dem Osteoklasten und der Knochenoberfläche ein Hohlraum gebildet. Bei der Knochenresorption wird der Hydroxylapatit aufgelöst. Wenn die Knochenmasse nicht durch die Osteoblasten adequat ersetzt wird, wird die Qualität des Knochenmaterials schlechter und dies ist bei Krankheiten wie Osteoporose sichtbar.³⁶

Osteoklasten exprimieren osteoklasten-spezifische Protonenpumpen, verschiedene Rezeptoren, wie z.B. den Calcitoninrezeptor und tartratresistente saure Phosphatase.³⁶

2.2.4 Differenzierung der Knochenzellen

Durch die Osteoblasten- und Osteoklastentätigkeit werden die Knochen ständig auf- und abgebaut. Die knochenresorbierenden Zellen sind die Osteoklasten und die knochenaufbauenden Zellen die Osteoblasten. Makrophagen, Monozyten und Granulozyten entwickeln sich aus den pluripotenten Stammzellen des Knochenmarks. Osteoklasten differenzieren aus Monozyten-Makrophagen-Vorläuferzellen. Monozyten differenzieren mit Hilfe des Gewebefaktors RANKL und dem Makrophagenkolonie-stimulierendem Faktor (M-CSF) zu Osteoklasten.⁷

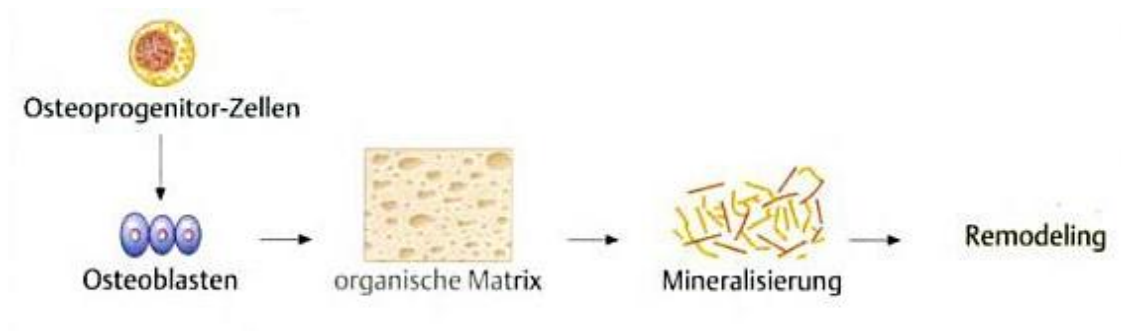


Abb.1: Osteogenese⁸

2.3 Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL)

Synonyme: Tumor necrosis factor ligand superfamily member 11 (TNFSF11), TNF-related activation-induced cytokine (TRANCE), Osteoprotegerin ligand (OPGL), und Osteoclast differentiation factor (ODF).

RANKL ist aus 316 Aminosäuren aufgebaut und wird von aktivierten T-Zellen und reifen Osteoblasten exprimiert. Das Molekül hat einen stimulierenden Effekt auf die Knochenresorption der Osteoklasten. Faktoren, die die Knochenresorption erhöhen, führen zu einer vermehrten Expression von RANKL. Diese Faktoren sind Glucocorticoide, Interleukin-1, Interleukin-11, Interleukin-6, Interleukin-17, Prostaglandin E2, Parathormon, TNF- α und das 1,25 Hydroxyvitamin D3.⁹ RANKL wird zur Familie der Tumor Nekrose Faktoren gezählt. Der Rezeptor RANK wird von Vorläuferzellen der Osteoklasten und Osteoblasten exprimiert.¹⁰ OPGL bindet an seinem Rezeptor und aktiviert RANK. RANKL ist mit verschiedenen TNF assoziierte Faktoren (TRAFs) für die Aktivierung von Stoffwechselkaskaden zuständig. Zu diesen Stoffwechselwegen zählen auch die Stimulierung der nuclear factor-KB sowie der c-jun N-terminal Kinase (JNK).¹¹

2.4 Osteoprotegerin (OPG)

OPG besteht aus 401 Aminosäuren und gehört zur Familie TNF-Rezeptoren.¹² Wenn sich OPG an das OPGL bindet, wird die Stimulierung und Differenzierung der Osteoklasten verhindert. Damit kann RANK nicht stimuliert werden. OPG schickt die Osteoklasten in den Zelltod und verhindert somit die Knochenresorption.

2.5 Osteoblasten regulieren die Differenzierung der Osteoklasten

Das Zusammenspiel von Osteoklasten und Osteoblasten erfolgt in Abhängigkeit von Hormonen, Cytokinen und Wechselwirkungen der Zellen. Osteoklasten bauen den Knochen ab, während auf der anderen Seite die Osteoblasten den Knochen aufbauen. Osteoblasten produzieren M-CSF und RANKL. Diese Cytokine haben in der Osteoklastogenese eine besondere Bedeutung. Somit ist die Osteoklastogenese von den Produkten der Osteoblasten abhängig. Genauso sind die Osteoblasten von den Osteoklasten abhängig.¹³

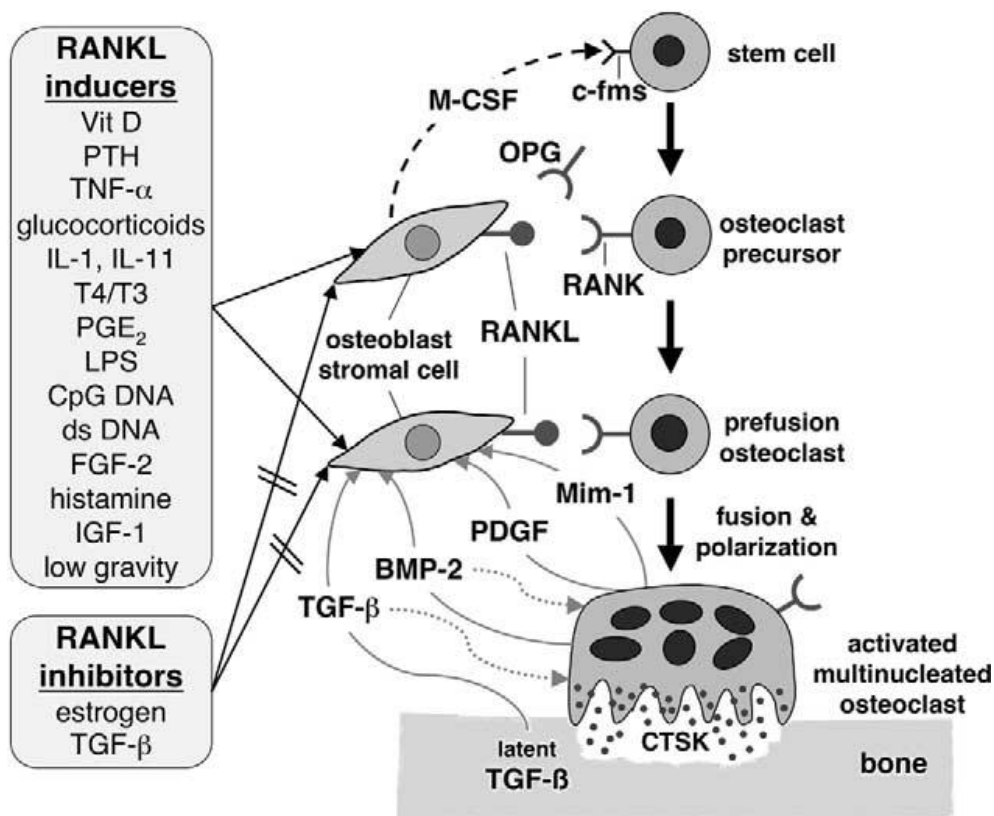


Abb.2: Entstehung und Aktivierung der Osteoklasten ⁵

2.6 Die Rolle der Hormone im Knochenstoffwechsel

Die wichtigsten Hormone, die das Remodelling steuern, sind Parathormon, Calcitonin, Vitamin D, Östrogen und Testosteron.

2.6.1 Parathormon

Das Parathormon (PTH) wird in der Nebenschilddrüse gebildet und reguliert zusammen mit Vitamin D die Kalziumhomöostase. Es stimuliert die

Resorptionsaktivität der Osteoklasten. Die Kalzium-Rezeptoren befinden sich auf der Plasmamembran der Hauptzellen. Sie zählen zur Klasse der 7-Helix-Spannenden Rezeptoren. Wenn der Kalziumspiegel im Blut abfällt, wird die Sekretion des Parathormons erhöht. PTH setzt Kalzium aus den Knochen frei und reduziert die Ausscheidung. Im distalen Tubulus erhöht PTH die Resorption von Ionen. Dieses Hormon hat noch eine wichtige Funktion. Es reguliert zusammen mit Vitamin D und Calcitonin die Menge an Kalzium und Phosphat im Blut ein. Wenn der Parathormonspiegel zu stark erhöht wird, können vermehrt Osteoklasten gebildet werden und Osteolyse verursachen.^{14,15,16}

2.6.2 Vitamin D

Vitamin D ist ein fettlösliches Vitamin und ist für viele biochemische Prozesse wichtig. Es wird entweder mit der Nahrung aufgenommen oder unter Sonneneinstrahlung in der Haut gebildet. Vitamin D ist für eine erhöhte Kalziumaufnahme aus der Nahrung und für eine verminderte Kalziumausscheidung verantwortlich. Auch die Aktivierung der Osteoblasten und der Einbau von Mineralstoffen in das Skelett erfolgt unter dem Einfluss von Vitamin D. Seine Synthese und Aktivierung ist abhängig vom Parathormon. Bei einem Mangel an Vitamin D nimmt die Knochendichte ab. Bei 59 % der Osteoporosepatientinnen liegt ein Vitamin D-Mangel vor.^{17,18}

2.6.3 Calcitonin

Calcitonin (CT) ist ein Peptidhormon, das aus 32 Aminosäuren und einer Disulfidbrücke besteht. Die Bildungsorte sind die Nebenschilddrüse, die C-Zellen der Schilddrüse und der Pankreas. Die Erhöhung des extrazellulären Kalziumspiegels führt zur Freisetzung dieses Hormons. Zuerst wird er als Vorläufermolekül synthetisiert, das aus 136 Aminosäuren besteht.¹⁶ Daraus wird Calcitonin abgespalten und freigesetzt. Calcitonin wirkt auf die Knochen antiosteolytisch. Einerseits fördert es durch die Osteoblasten den Knochenaufbau, andererseits hemmt es durch die Osteoklasten den Knochenabbau. Die Studien haben gezeigt, dass Calcitonin einen starken hemmenden Einfluss auf die Osteoklasten hat. Nach der Freisetzung führt es zu einem schnellen Abfall des Kalziumspiegels im Blut. Außerdem kann das Peptidhormon auch eine analgetische Wirkung ausüben.¹⁶

2.6.3.1 Calcitoninrezeptoren

Der Calcitoninrezeptor gehört zur Familie der G-Protein-gekoppelten Zelloberflächenrezeptoren und besteht aus 7 transmembranären Domänen.¹⁹ Sie werden in Osteoklasten, in der Niere und in neuronalen Zellen exprimiert.²⁰ Durch Untersuchungen hat man festgestellt, dass die Ringstruktur am Aminoterminal von Calcitonin vermutlich mit den membrandurchspannenden Domänen des Calcitoninrezeptors interagiert. Die Affinität des Liganden zum Rezeptor und die Stärke der Bindung hängen sowohl vom α -helikalen Bereich als auch vom Carboxyterminus des Liganden ab.²¹ Diese strukturellen Merkmale könnten auch der Grund sein, warum die Interaktion mit dem humanen Calcitoninrezeptor beim humanen Calcitonin schwächer als beim Lachs-Calcitonin ist.²² Bindet Calcitonin an seinen Rezeptor, so werden verschiedene Signaltransduktionskaskaden ausgelöst, wodurch es letztendlich zur Aktivierung der Adenylatcyclase und der Phospholipase C kommt.²⁰ Es wurden zwei Isoformen dieses Rezeptors gefunden, und zwar CTR1a und CTR1b. Die Osteoklasten exprimieren in ihrer Zellmembran sowohl CTR1a als auch CTR1b.

2.6.3.2 Therapeutische Verwendung von Calcitonin

In der Therapie wird Lachs-Calcitonin verabreicht, da humanes Calcitonin von den Proteasen im Körper sehr leicht abgebaut wird. Zu den häufigsten Nebenwirkungen der Calcitonin-Therapie zählen Erbrechen, Übelkeit und Wärmegefühl. Weil es sich um ein Polypeptid handelt, wird es parenteral verabreicht. Man kann es zwar auch intranasal oder subcutan einnehmen, aber hauptsächlich wird es parenteral verabreicht. Das Peptidhormon wirkt antiosteolytisch und fördert den Einbau von Kalzium in die Knochen. Deshalb wird es zur Behandlung von Osteoporose, Morbus Paget Sudeck und Hyperkalziämie angewendet.²³

2.6.4 Östrogen

Das weibliche Sexualhormon Östrogen übt am Knochen viele Wirkungen aus. Östrogen inhibiert die Osteoklasten und stimuliert die Osteoblasten und die Kollagenherstellung. Ein Defizit an Östrogen führt daher zu einer Abnahme der Knochendichte, was wiederum Knochenkrankheiten wie zum Beispiel Osteoporose verursachen kann. Es fördert die Ausschüttung der Hormone Calcitonin und Parathormon. Die Bildung von M-CSF, RANKL, IL-1, IL-6 und TNF- α durch die

Osteoblasten wird verhindert. Dagegen führt es zu einer vermehrten Produktion des Osteoprotegerins und des Tumor growth factor β (TGF β).¹³

2.6.5 Testosteron

Testosteron ist das männliche Geschlechtshormon und fördert bei Männern und Frauen zum Knochenwachstum. Das Hormon hat eine anabole Wirkung. In der Pubertät ist die Wachstumsgeschwindigkeit der Knochen vom Testosteron abhängig. Um auf die Osteoblasten zu wirken, wird es zuerst in Östradiol umgewandelt. Testosteron hemmt auch die Bildung von Interleukin-1 und Prostaglandin E₂. Die Knochenresorption wird somit unterdrückt. Ein Testosteronmangel kann zu einer Dysregulation des Knochenstoffwechsels führen.²⁴

2.7 Osteoklasten-assoziierte Krankheiten

2.7.1 Osteoporose

Osteoporose ist eine Volkskrankheit, die nicht nur alte Frauen, sondern auch Männer und Jugendliche betreffen kann. Es ist eine systemische Skeletterkrankung. Die Knochendichte nimmt ab und als Folge werden das Frakturrisiko und die Knochenbrüchigkeit erhöht. Der Mikraufbau des Knochengewebes wird zerstört.¹² Bis zum 30. Lebensjahr wird der Knochen aufgebaut. Ab dann beginnt der Mensch Knochenmasse zu verlieren. Trotz des Aufbaus des neuen Knochenmaterials, überwiegt der Abbau. Aber eine systemische Knochenerkrankung mit vermehrtem Knochenabbau kann auch jüngere Menschen betreffen, z.B. kann durch Medikamente oder Hormone, wie z.B. Corticosteroide die Knochenmasse stark reduziert werden. In der Menopause nimmt die Östrogensynthese stark ab. Und dadurch kommt es zu einem starken Verlust an Knochenmasse. Es werden vermehrt Osteoklasten gebildet, die eine hohe Resorptionsfunktion aufweisen.^{1,5}

Risikofaktoren¹:

- Chronischer Bewegungsmangel
- Untergewicht
- Übermäßige sportliche Aktivität
- Zigarettenrauchen
- Alkoholismus

- Fehlernährung
- Hormone
- Medikamente (Kortison und Glucocorticoide)

2.7.2 Morbus Paget

Morbus Paget findet man nur an einzelnen Knochen. Bei dieser Krankheit erfolgt der Knochenumbau zu schnell. Der Knochen wird zu rasch auf- und abgebaut, sodass eine Mineralisierung nicht stattfinden kann. Er wird dadurch instabil und es kann sehr leicht zu einem Knochenbruch kommen. Im Gegensatz zu anderen Krankheiten, an denen Osteoklasten beteiligt sind, ist hier die Zahl der Osteoklasten stark erhöht. Diese besitzen viele Zellkerne und bauen massiv den Knochen ab. Das durch die Osteoblasten neu gebildete Knochenmaterial weist eine schlechte Qualität auf. Die eigentlichen Krankheitsursachen werden noch diskutiert, aber es wird vermutet, dass eine Infektion mit Paramyxoviren die Erkrankung auslösen kann. Der Knochenabbau wird beschleunigt. Eine andere Ursache könnte die genetische Prädisposition sein. Bei Verwandten von Patienten mit Morbus Paget ist das Risiko für das Auftreten dieser Knochenerkrankung relativ erhöht.^{25,26}

Mögliche Symptome²⁷:

- Knochenverformung
- Lokale Schmerzen
- Erhöhte Frakturrisiko
- Kopfschmerzen
- Varikosis
- Hörverlust

2.7.3 Ewing Sarkom

Ewing Sarkom ist einer der wichtigsten Knochentumore, der sich vom Knochenmark ausbreitet. Andere Knochentumore sind Osteosarkom und Chondrosarkom. Diese Krankheit hat einen malignen Verlauf und tritt häufig bei Kindern und Jugendlichen auf.²⁸ Diese Tumorart wächst schnell und hat eine vorzeitige Metastasierung. Außer den Knochen und dem Knochenmark werden auch die Weichteile wie zum Beispiel die Lunge metastasiert. Meistens sind Ewing Sarkome an den langen Röhrenknochen lokalisiert. Die häufigsten Symptome sind Schmerzen und tastbare

oder sichtbare Schwellungen in den betroffenen Regionen. Weitere Beschwerden sind Fieber, Müdigkeit Gewichtsabnahme und Anämie.

Die Chemotherapie führte zu einem deutlichen Anstieg der Überlebensrate. Auch die Prognose wurde verbessert.²⁹

Das Sarkom setzt Tumor-Nekrose-Faktor alpha (TNF- α) frei, welches die Osteoklastogenese in Gang setzt. Dadurch kommt es zu einer vermehrten Bildung von Osteoklasten. Da das Cytokin RANKL im Ewing Sarkomzellen nicht exprimiert wird, erfolgt die Osteoklastendifferenzierung in Abhängigkeit vom Tumor-Nekrose-Faktor alpha.³⁰

2.7.4 Riesenzelltumore

Der Riesenzelltumor ist ein lokal aggressiver, aber meist nicht metastasierender Tumor, der von den Osteoklasten ausgeht und daher auch als Osteoklastom bezeichnet. Das Tumorgewebe besteht aus rundlichen und spindelförmigen Zellen und vielkernigen Riesenzellen, die eine ähnliche Funktion wie die normalen Osteoklasten ausüben.^{31,32,33} Kollagen wird kaum gebildet. Nachdem das Knochenwachstum abgeschlossen, manifestieren sich die Riesenzelltumore bevorzugt in den langen Röhrenknochen.^{35,37} Die Frauen sind mehr von dieser Krankheit betroffen als Männer. Die Symptome sind Schmerzen und Schwellungen in den betroffenen Regionen.³⁴ Der Tumor muss vollständig entfernt werden, damit ein Wiederauftreten verhindert werden kann.

2.7.5 Metastasierende Tumore

Metastasierung ist ein Prozess, wo sich Krebszellen durch Streuung in die Blutbahn im Körper ausbreiten und sich in verschiedenen Stellen festsetzen. Sie bilden dort eine Geschwulst. Je nach Ursprungsort des primären Tumor.

Bei der Entstehung der Knochenmetastasen spielen einige Wachstumsfaktoren, die von den Tumorzellen produziert werden, eine bedeutende Rolle. An Stellen, wo sich Knochenmetastasen ansiedeln, werden Wachstumsfaktoren wie TGF- β , IGF-1, IGF-2, Fibroblast growth factor, PDGF und andere freigesetzt.^{40,41,42} Mit Hilfe dieser Faktoren können die Tumorzellen überleben. Außerdem bilden manche Tumorzellen große Mengen an RANKL, wodurch die Osteoklastendifferenzierung noch mehr gefördert wird.⁴⁰ Man unterscheidet eine osteolytische und osteoblastische Form von

Knochenmetastasen. In beiden Fällen liegt eine Störung der Regulation des normalen Knochenumbaus vor.⁴³ Das Knochenmaterial wird schlechter. Metastasen treten häufig bei Prostatakrebs, Brustkrebs, Nierenkrebs und Lungenkrebs auf.^{38,39} Bei Patienten mit Brustkrebs dominiert die osteolytische Form. Hier ist der Knochenabbau gesteigert. Im Vergleich dazu sind bei Patienten mit Prostatakrebs die osteoblastären Läsionen zu beobachten. In dem Fall wird der Knochenaufbau erhöht. Es können aber auch gemischte Metastasen auftreten.⁴⁴ Die Patienten leiden oft an Knochenschmerzen und pathologischen Frakturen.⁴⁰

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Gewinnung von Knochenmarkszellen aus Mäusen

Tiere

- ❖ Mäuse (OF1/SPF, 4-8 Wochen alt, 15.20 g, weiblich)

Reagentien:

- ❖ Ethanol 70%
- ❖ α -MEM (Minimum essential Medium α ; Fa. Invitrogen, Carlsbad – USA)
- ❖ 10% FCS (fötales Kälberserum, Fa. Promocell, Heidelberg – Deutschland)
- ❖ 100 μ g/ml Streptomycin (Fa. Invitrogen)
- ❖ 100U/ml Penicillin (Fa. Invitrogen)
- ❖ 0,25 μ g/ml Fungizone Amphotericin B (Fa. Invitrogen)
- ❖ Vitamin D₃ (10^{-8} M; Fa. Sigma-Aldrich, St. Louise – USA)
- ❖ 10ml isotone Lösung
- ❖ RANKL (Fa. PEPROTECH, London – England)
- ❖ M-CSF (Fa. R&D Systems, Minneapolis – USA)
- ❖ Aceton

Material:

- ❖ Pinzette
- ❖ Schere
- ❖ CO₂-Kammer
- ❖ Styroporplatte
- ❖ Petrischale
- ❖ Zentrifugenröhrchen 50ml (Fa. TPP, Trasadingen – Schweiz)
- ❖ 10ml Spritze und 0,4mm Nadeln
- ❖ Lamina Air Flow
- ❖ 24 Loch-Testplatten (Fa. TPP)
- ❖ Runde Deckgläser mit 12mm Durchmesser (Fa. Thermo Scientific, Waltham-USA)

Geräte:

- ❖ Wasserbad 37 °C
- ❖ Lamina Air Flow
- ❖ Coulter Counter (Fa. Beckman Coulter, Krefeld – Deutschland)
- ❖ Trockenschrank
- ❖ Heizplatte

3.1.1 Präparation der Tibia und des Femurs

In einer CO₂-Kammer wird eine 4 bis 8 Wochen alte, weibliche Maus narkotisiert und anschließend wird eine zervikale Dislokation durchgeführt. Nun fixiert man die getötete Maus auf eine Styroporplatte und spült das Fell mit Ethanol ab. Danach werden die Beine freigelegt. Damit man aus den hinteren Beinen das Knochenmark leichter entnehmen kann, soll das Muskelgewebe von Femur und Tibia mittels einer Schere abgetrennt werden. Dann werden die Knochen entfernt und in eine Petrischale gelegt. Um steril arbeiten zu können, führt man die weiteren Arbeitsschritte unter dem Lamina Air Flow durch.

Dabei ist zu beachten, dass der Lamina Air Flow 30 Minuten vor der Verwendung eingeschaltet werden muss. Um eine sterile Umgebung zu garantieren, soll die Arbeitsplatte mit UV-Licht bestrahlt werden.

Tibia und die Femur werden getrennt und knapp an ihren Enden aufgeschnitten, damit man aus dem Knochenmarkskanal die Knochenmarkszellen ausspülen kann.

Dafür zieht man 10ml von α -MEM in eine Spritze auf. Mit einer dünnen Nadel sticht man in den Knochenmarkskanal und spült die Knochenmarkszellen mit je 5ml Medium aus den Knochen. Die erhaltene Zellsuspension wird in ein 50ml Zentrifugenröhrchen gegeben.

3.2 Zellzählung am Coulter Counter

Prinzip des Coulter Counters

Mit dem Coulter Counter können Zellen und Teilchen gezählt und ihre Größe bestimmt werden. Dazu wird durch Zugabe von einer isotonen Kochsalzlösung eine verdünnte Suspension der Probe hergestellt und diese wird zur Analyse für den Coulter Counter verwendet. Die Elektroden erzeugen beim Durchströmen der Lösung einen konstant fließenden elektrischen Strom. Die Durchgang der Zellen blockiert zum Teil den leitfähigen Kanal, und dadurch ändert sich kurzzeitig der elektrische Widerstand. Das dabei entstehende Signal wird registriert und aus der Intensität des Signals kann auf die Anzahl der Teilchen in der Suspension geschlossen werden.

3.2.1 Zellzählung

Um die Anzahl der Knochenmarkszellen in der ausgespülten Zellsuspension zu bestimmen, wird zunächst eine Zellzahlbestimmung am Coulter Counter durchgeführt. Um eine ausreichende Menge an Osteoklasten in der Kultur zu erhalten, sollte jedes einzelne Well der Testplatte etwa 2 Millionen Zellen enthalten.

Für die Analyse füllt man 100µl der Suspension und 10ml isotonen Puffer in einem Röhrchen und stellt es in den Coulter Counter. Nachdem drei Zählungen erfolgten, kann die Anzahl der Zellen (Zellzahl/ml) abgelesen werden und der Mittelwert berechnet werden. Indem man diese Zahl mit 10 multipliziert, erhält man die Konzentration der Zellen in der Suspension.

Nach dem Zählvorgang wird der Coulter Counter mit einer Mischung von isotonen Puffer und Reinigungsmittel durchgespült, um eine Verstopfung der Schläuche des Gerätes zu vermeiden. Außerdem muss die Reinigungslösung dauernd in der Maschine bleiben, damit die Elektroden nicht austrocknen.

3.3 Kultivierung der Osteoklasten

Zu Beginn sollte man das α -MEM im Wasserbad auf 37° vorwärmen. Alle weiteren Arbeitsschritte werden unter dem Laminar Air Flow durchgeführt. Dadurch vermeidet man eine Kontamination. Alle 3 Tage wird das Medium gewechselt.

Dem α -MEM werden diverse Wachstumsfaktoren (RANKL, M-CSF) und Vitamin D in unterschiedlichen Konzentrationen zugefügt, um die Bildung der Osteoklasten zu stimulieren.

3.3.1 Kultivieren der Zellen

Die Inkubation der Zellen erfolgt in einem Brutschrank bei 37°C unter Gewebekulturbedingungen und dauert eine Woche. Eine steril verpackte Testplatte wird unter dem Laminar Air Flow beschriftet und in jedem Well wird 1ml Nährmedium pipettiert. 1ml Medium enthält 2 Millionen Zellen. Während der Inkubation kann man die Zellen unter dem Mikroskop kontrollieren um das Wachstum zu beurteilen. Falls eine Kontamination vorliegt, kann die Kultur abgebrochen werden.

3.4 Immunfluoreszenzfärbung

3.4.1 Prinzip

Die Immunfluoreszenzfärbung ist eine effektive Methode, um Proteine innerhalb einer Zelle und an der Zellmembran zu lokalisieren und mikroskopisch sichtbar zu machen. Das Prinzip dieser Methode beruht auf einer Reaktion zwischen einem Antigen und einem Antikörper. Um die Antikörperbindung sichtbar zu machen, benützt man meist fluoreszenzmarkierte Zweitantikörper, die gegen den entsprechenden Erstantikörper, der ein spezifisches Antigen erkennt, gerichtet sind (indirekte Fluoreszenzfärbung, siehe Abb. 4).

Bei der direkten Färbung ist der primäre Antikörper fluoreszenzmarkiert und bindet direkt an das Antigen (dargestellt in Abb.3).

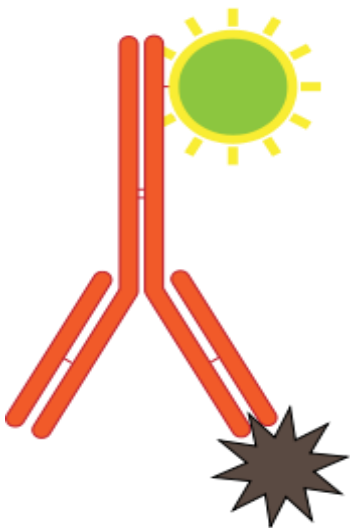


Abb.3: Direkte Methode

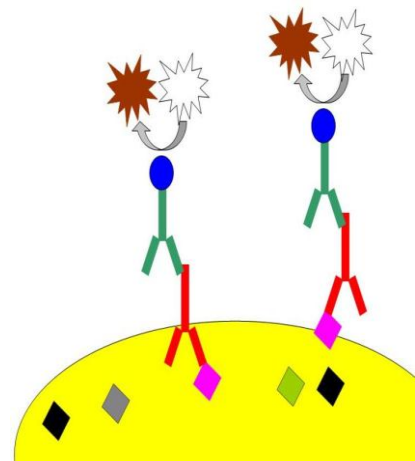


Abb.4: Indirekte Methode

Die indirekte Methode ist flexibler und empfindlicher als die direkte Methode, weil eine Kombination von mehreren primären Antikörpern mit dem zweiten Antikörper möglich ist. Bei der Auswahl des Sekundärantikörpers muss man darauf achten, dass dieser gegen die Immunglobuline der Spezies gerichtet ist, aus dem der Erstantikörper stammt.

Polyklonalen Antikörper werden hergestellt, indem man ein Tier (Ziegen, Hasen und Mäuse) mit dem entsprechenden Antigen impft.

3.4.2 In der Zellkultur verwendete Lösungen

- Phosphat gepufferte Saline (PBS)

In 800ml Aqua bidest. werden 8,01g NaCl, 0,20g KCl, 0,21g KH_2PO_4 und 1,44g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ gelöst. Es entsteht eine klare Lösung, dessen pH-Wert man entweder mit einer Säure (HCl) oder Base (0,1N NaOH) auf 7,4 einstellt. Die Lösung wird dann mit Aqua bidest. auf 1000ml aufgefüllt und es wird die Osmolarität überprüft. Danach wird sie in Glasflaschen abgefüllt und anschließend autoklaviert. Die Lagerung von PBS erfolgt bei 4°C.

- 10% Bovine Serum Albumin (BSA) in PBS

Man sollte von dieser Lösung gleich eine größere Menge herstellen, damit man mit dem mehrere Färbungen durchführen kann. Es wird eine 10%ige Stammlösung hergestellt, indem 5g BSA in 50ml PBS gelöst wird. Dabei sollte man darauf achten, dass das schwer lösliche BSA sich vollständig gelöst hat. Die aliquotierte Stammlösung wird dann bei -20°C im Kühlraum gelagert.

Da man für die Verdünnung der Antikörper, für das Permeabilisieren und das Blockieren verschiedene Konzentrationen von BSA in PBS braucht, stellt man vor jeder Immunfluoreszenzfärbung vom 10%igen Stammlösung die jeweils benötigten Verdünnungen her.

- 4% Paraformaldehyd (PFA) in PBS

Man löst unter Erwärmen und ständigem Rühren 20g PFA in 500ml PBS bis eine klare Lösung entsteht. PFA ist ein schlecht lösliches Pulver, daher kann man beim Auflösen bis ca. 65°C erwärmen. Falls keine klare Lösung entsteht kann man je nach Bedarf NaOH zusetzen. Die Mischung wird dann abgekühlt und durch einen Filter filtriert. Danach wird es in aliquotierten Mengen bei -20°C gelagert. Wegen der Toxizität des Formaldehyds sollte man die Herstellung unter dem Abzug durchführen.

- 50mM Ammoniumchlorid (NH_4Cl) in PBS

Man füllt in einem Becherglas 250ml PBS und gibt dazu 668,5mg NH_4Cl . Nun wird solange gerührt bis sich das ganze NH_4Cl gelöst hat. Danach wird die klare Lösung in eine Glasflasche gefüllt und anschließend autoklaviert. Die Lagerung erfolgt bei 4°C.

- Mowiol

Mowiol besteht chemisch gesehen aus Polyvinylalkohol (PVAL) und wird aus Polyvinylacetat durch Alkoholyse hergestellt. Bei PVAL handelt es sich um wasserlösliche Polymere deren Eigenschaften durch die Anzahl der Acetylgruppen und durch das Molekulargewicht bestimmt werden. Mowiol besitzt eine hohe Klebekraft und wird daher auch als Einbettmittel für die Zellen verwendet.

Herstellung von Mowiol

Man gibt in einem Zentrifugenröhrchen 6g Glycerin und 2,4g Mowiol und lässt diese Mischung bei Raumtemperatur unter ständigem Rühren lösen. Danach wird 6ml destilliertes Wasser hinzugefügt und das Ganze wird am Vortexer ordentlich durchgemischt. Zusätzlich wird dann noch bei Zimmertemperatur 2 Stunden lang geschüttelt. Dann fügt man eine 0,02%ige Na-Azid und 12ml 0,2M Tris-HCl (pH 8,5) hinzu. Der Vorgang wird am Wasserbad (50°C) durchgeführt, wobei die Mischung 3 Stunden lang gerührt wird, um möglichst das ganze Mowiol zu lösen. Falls ungelöste Bestandteile vorliegen, kann man diese durch Zentrifugieren entfernen. 5000g Überstand müsste 15 Minuten lang zentrifugiert werden. Das fertige Mowiol wird zum Schluss steril filtriert, in Eppendorf-Reaktionsgefäße aliquotiert und bei 4°C aufbewahrt.

3.5 Tartrat-resistente saure Phosphatase (TRAP) – Färbung

Reagenzien:

- ❖ TRAP-Färbes-Kit (Fa. Sigma-Aldrich)

Vor einer Immunfluoreszenzfärbung der Osteoklasten ist es sinnvoll eine TRAP-Färbung durchzuführen, um festzustellen, ob sich in der Kultur überhaupt Osteoklasten aus ihren Vorläuferzellen gebildet haben. TRAP (Tartrat-resistente saure Phosphatase) ist ein Enzym, das in mehrkernigen Osteoklasten gebildet wird. Es ist eines der wichtigsten Osteoklasten-Markern.

Die TRAP-Färbung ist eine einfache Methode, die in kurzer Zeit durchzuführen ist. Anhand dieser Färbemethodik kann man die violett-gefärbten Osteoklasten mit >3 Kernen von den TRAP-negativen mehrkernigen Zellen leicht unterscheiden und ihre Zahl durch Auszählen im Durchlichtmikroskop ermitteln.

3.5.1 Durchführung:

In einer Osteoklastenkultur in Wellplatten wird mit einer Absaugpipette das Nährmedium aus dem jeweiligen Wells entfernt. Danach setzt man 250µl Fixierungslösung den Zellen zu. Diese besteht aus Citratpuffer, Aceton und einer 37%igen Formaldehydlösung (25:65:8). Der Citratpuffer setzt sich wieder aus 0,07g NaCl, 0,4g Zitronensäure, 0,265g Natriumzitat und 100ml Aqua bidest. zusammen. Die Inkubationszeit der Zellen mit der Fixierungslösung dauert 10 Minuten und erfolgt bei Raumtemperatur. Dann wird die Flüssigkeit wieder entfernt und die Deckgläser werden zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen. Nun fügt man jedem Well 250µl der Färbelösung zu und lässt die Zellen 20 Minuten unter Lichtausschluss färben. Die Färbelösung wird hergestellt, indem man 400µl Azetat, 200µl Tartrat, 100µl Naphtol und 9ml Aqua bidest. mit 100µl o-Aminoazotoluen und 100µl Nitritlösung mischt. Nach dem Färbeschritt wird der Waschgang wiederholt. Die violett gefärbten Osteoklasten kann man dann unter dem Mikroskop quantitativ bestimmen.

3.6 Immunfluoreszenzfärbung der Osteoklasten (Parallelfärbung)

Reagenzien:

- ❖ PBS
- ❖ 4% PFA in PBS
- ❖ 10% BSA in PBS
- ❖ 50mM NH₄Cl in PBS
- ❖ Triton X-114 (Fa. Sigma-Aldrich)
- ❖ Aqua bidest.
- ❖ DAPI (Fa. Roche, Basel-Schweiz)
- ❖ Mowiol
- ❖ Eis

Material:

- ❖ Eppendorf-Gefäße
- ❖ Pipetten
- ❖ Multipipetten
- ❖ Zentrifugenröhrchen
- ❖ Pinzette
- ❖ Becherglas
- ❖ Kühlbox
- ❖ Filterpapier
- ❖ Nadel

- ❖ Parafilm
- ❖ Lichtundurchlässige Box
- ❖ Objektträger
- ❖ Kleenex Tücher

Geräte:

- ❖ Vortexer
- ❖ Minizentrifuge
- ❖ Schüttler

3.6.1 Fixierung der Zellen

Der erste Schritt bei der Immunfluoreszenzfärbung ist die Fixierung der Osteoklasten. Dazu wird zuerst das Nährmedium von den Zellen in der Testplatte abgesaugt und in jedes Well wird 1ml PBS pipettiert. Das PBS wird wieder gleich entfernt und man versorgt dann jedes Well mit jeweils 1ml einer 4%igen Lösung von PFA in PBS. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten bei Raumtemperatur werden die Zellen mit einer 50mM NH_4Cl – Lösung in PBS 10 Minuten lang gewaschen, um die freien Aldehydgruppen des PFA abzublocken.

3.6.2 Permeabilisieren

Man verdünnt eine 10%ige Stammlösung von BSA mit PBS im Verhältnis 1:10 und gibt 0,5% Triton X dazu. Triton X ist ein nicht ionisches Detergenz, das sich schlecht löst. Deshalb wird die Mischung am Vortexer geschüttelt. Nachdem man die Ammoniumchloridlösung entfernt hat, pipettiert man in jedem Well 1ml der hergestellten Permeabilisierungslösung. Die Zellwände der Osteoklasten werden 20 Minuten lang permeabilisiert, damit die Antikörper später einen Zugang zu intrazellulären Antigenen haben.

3.6.3 Blockieren

Man stellt ein Blockierungspuffer her, der sich aus einer 2%igen Lösung von BSA in PBS und 0,1% Triton X zusammensetzt. Um eine homogene Mischung zu erzielen, wird diese Lösung ebenfalls am Vortexer geschüttelt. Nun saugt man die Permeabilisierungslösung ab und gibt in jedem Well 1ml des hergestellten Puffers. Das Blockieren dauert eine halbe Stunde. Dabei verhindert man unerwünschte Interaktionen zwischen dem Antikörper und intrazellulären Proteinen.

3.6.4 Inkubation der Zellen mit den primären Antikörper

Tab.1: Liste der verwendeten Primärantikörper

Primärantikörper	Immunisiertes Tier	Verdünnung	Firma
F4/80 Antigen, Makrophagen Marker	Ratte	1:100	eBioscience, San Diego - USA
Calcitoninreceptor (N- term, extracell. Dom)	Kaninchen	1:100	Acris Antibodies, Herford – Deutschland
Anti- α -Tubulin Antikörper	Maus	1:100	Sigma-Aldrich
MTR-1A	Kaninchen	1:100	Abbiotec, San Diego – USA

Während die unspezifischen Proteine blockiert werden, stellt man zum Verdünnen der Antikörper eine 1%ige BSA/PBS Lösung her, welches man auch für die Blindproben verwendet. Danach richtet man für die Inkubation einen Feuchtkammer her, indem man eine lichtgeschützte Plastikbox mit Alufolie umwickelt. Der Boden der feuchten Kammer wird mit einem Filterpapier, das mit destilliertem Wasser befeuchtet wurde, zugedeckt. Dabei soll man darauf achten, dass sich keine Falten bilden. Nun beschriftet man entsprechend der Testplatte einen Parafilm und legt es in die Box. Anschließend pipettiert man von der vorbereiteten Antikörperverschüttung je 50 μ l pro Deckglas auf den Parafilm. Da es sich um eine Parallelfärbung handelt, werden die Erstantikörper gleichzeitig zugesetzt. Mit einer sehr dünnen Nadel hebt man die Deckgläser am Rand an, nimmt sie vorsichtig mit einer Pinzette von der Testplatte heraus und tupft den Rand an einem Tuch ab, damit der Puffer abgesaugt wird. Danach legt man die Gläser so auf die getropfte Antikörperlösung, sodass sich die Zellen auf der unteren Seite befinden. Nach einer Stunde Inkubationszeit wird 4 x mit PBS auf einem Schüttler gewaschen und zwar jeweils für 10 Minuten.

3.6.5 Inkubation der Zellen mit dem fluoreszenzgekoppelten sekundären Antikörper

Tab.2: Liste der verwendeten Sekundärantikörper

Die verwendeten Zweitantikörper stammen alle von der Fa. Invitrogen

Sekundärantikörper (Fluoreszenzfarbstoff)	Immunisiertes Tier	Gegen Immunglobuline (IgG), isoliert aus	Verdünnung
Alexa Fluor 568	Ziege	Ratten	1:1000
Alexa Fluor 568	Ziege	Kaninchen	1:1000
Alexa Fluor 647	Ziege	Kaninchen	1:1000
Alexa Fluor 647	Ziege	Maus	1:1000

Es werden die gleichen Arbeitsschritte wie bei der Inkubation mit den primären Antikörpern durchgeführt. Man reinigt mit destilliertem Wasser den Parafilm und tropft wiederum pro Deckglas 50µl der Sekundärantikörper-Verdünnung. Mithilfe einer Pinzette und Nadel werden die Deckgläser aus der Testplatte entnommen. Den Rand der Gläser tupft man an einem saugfähigen Tuch ab, damit man die überschüssige Flüssigkeit entfernt und legt sie auf die Antikörperlösung. Dabei sollte man darauf achten, dass die Zellen wieder auf der unteren Seite sind. Die Inkubation mit den sekundären Antikörpern dauert 30 Minuten. Danach legt man die Deckgläser wieder in die Platte zurück und wäscht sie 2 x mit PBS jeweils 10 Minuten lang. Da die Zweitantikörper an einem Fluoreszenzfarbstoff gebunden sind, sollte man sie vor Licht schützen. Dazu wird die Testplatte beim Waschen mit Alufolie umhüllt.

3.6.6 Kernfärbung mit DAPI

Die Färbung der Zellkerne erfolgt mit 4',6 Diamidino-2-phenylindol (DAPI), ein DNA interkalierendes Fluoreszenzfarbstoff. DAPI lagert sich im Zellkern an die DNA an, ohne dabei das Cytoplasma der Zelle anzufärben. Man löst den Farbstoff in Aqua bidest. und stellt eine 1:10 000 Verdünnung her. Davon wird 200µl pro Well auf die Deckgläser pipettiert und 15 Minuten lang inkubiert. Danach werden die Gläser mit den Zellen 10 Minuten lang mit Aqua bidest. gewaschen. Auch während der Kernfärbung muss man lichtgeschützt arbeiten.

3.6.7 Fixierung der Deckgläser mit Mowiol

Man tropft 4µl Mowiol pro Deckglas auf die Objektträger. Mit einer dünnen Nadel hebt man die Gläser seitlich an und entnimmt sie vorsichtig aus der Testplatte. Mit einem saugfähigen Tuch wird das überschüssige Wasser durch Abtupfen der Kanten entfernt. Danach legt man die Plättchen mit den Zellen auf der unteren Seite auf die Mowioltropfen. Dabei sollte man darauf achten, dass sich keine Luftblasen im Einbettungsmedium bilden. Pro Objektträger werden 2 Deckgläser fixiert. Man lässt die Präparate über die Nacht trocknen und reibt am nächsten Tag mit einem Kleenex-Tuch das überschüssige Mowiol von den Plättchen ab. Die Reinigung der Gläser kann auch mit Alkohol erfolgen.

3.7 Betrachtung und Auswertung der gefärbten Zellen im Fluoreszenzmikroskop

3.7.1 Mikroskopie

Die Betrachtung und Auswertung der Osteoklasten wurde an einem Zeiss-Axio Vision Fluoreszenzmikroskop durchgeführt, welches mit einer AxioCam-Kamera (Fa. Zeiss, Oberkochen – Deutschland) verbunden ist. Für die Aufnahmen wurde das AxioVisio-Programm der Firma Zeiss verwendet.

Als Lichtquelle am Fluoreszenzmikroskop fungiert eine Quecksilberlampe und um Osteoklasten zu betrachten, arbeitet man mit einer 40 fachen Vergrößerung. Je nach dem, mit welchen sekundären Antikörpern man gearbeitet hat, wählt man im Axio-Visio-Programm die gewünschten Reflektoren und Filter aus. Es werden mit verschiedenen Filtern Einzelbilder aufgenommen, die dann im Programm überlagert werden können. Die gespeicherten Bilder können in ein Bildbearbeitungsprogramm importiert werden.

4 ERGEBNISSE

4.1 Kultivierung von Osteoklasten

Um eine Zellkultur mit einer großen Menge an Osteoklasten zu züchten, wurden Knochenmarkszellen aus der Tibia der Maus mit einem Nährmedium unter Zugabe von Differenzierungsstimulatoren eine Woche inkubiert. Die Medienzusätze und ihre Konzentrationen sind in Tabelle 3 angeführt. Das Ziel dabei war, eine große Menge an differenzierten Osteoklasten zu erhalten.

Tab. 3: Medienzusätze

Zusätze	Konzentration
M-CSF	25 ng/ml
RANKL	15 ng/ml
Vit D ₃	10 ⁻⁸ M

Am 4. Tag der Inkubation wurde das Medium gewechselt und es wurden die gleichen Zusätze wieder in den angegebenen Dosen zugefügt. RANKL und M-CSF wurden immer kombiniert zugesetzt, Vitamin D₃ hingegen alleine. Die beste Ausbeute an Osteoklasten konnte man durch die Zugabe einer Kombination beider Cytokine erzielen. Da in früheren Experimenten gezeigt worden war, dass durch Zugabe von 25ng/ml RANKL und 15ng/ml M-CSF eine gute Ausbeute an vielkernigen Riesenosteoklasten erzielt werden konnte, wurden alle Experimente mit diesen Konzentrationen durchgeführt.

Bei einigen Versuchen gelang es, eine große Anzahl neben den üblichen Osteoklasten, die zwischen drei und fünf Kernen hatten, auch Riesenosteoklasten mit sehr vielen Zellkernen (bis zu 50 Kerne) zu züchten.

4.2 Automatische Identifizierung mehrkerniger Osteoklasten im Tissue Fax® nach indirekte Immunfluoreszenzfärbung von Markerproteinen

Osteoklasten sind dadurch definiert, dass sie Tartrat-resistent saure Phosphatase (TRAP) exprimieren und mehr als drei Kerne besitzen. Wenn in einer Präparation, wie mittels eines TRAP-Assays nachgewiesen werden konnte, dass genügend

Osteoklasten gebildet wurden, so wurde die Kultur für die Etablierung der automatischen Erkennung mehrkerniger Zellen im Tissue Fax[®] weiter untersucht.

Da es für die Identifizierung der reifen Osteoklasten keine spezifischen Marker gibt, wurden für den automatischen Nachweis und Charakterisierung der Osteoklasten in der Zellkultur Antigene gesucht, welche von den reifen Osteoklasten exprimiert werden. Diese Antigene sollten nur in reifen Osteoklasten vorkommen und so eine Unterscheidung der Osteoklasten von anderen Zellen in der Kultur ermöglichen.

In dieser Studie wurde der Calcitoninrezeptor als Osteoklasten-spezifisches, Membran-lokalisiertes Antigen ausgewählt und durch Anwendung eines Antikörpers gegen den Calcitoninrezeptor und spezifischer fluoreszierende Zweitantikörper konnten die Zellgrenzen der Osteoklasten bestimmt werden. Da sich in der Struktur der Osteoklasten häufig große Vakuolen finden, ist es oft schwer zu unterscheiden, ob es sich um eine einzige Zelle oder um zwei nicht-fusionierte nebeneinander liegende Zellen handelt, die mehrere Kerne tragen.

Um festzustellen, ob die multiplen Kerne tatsächlich in einer Zelle zu finden sind oder ob sie sich in separaten Zellen befinden, wurden als Marker eine Bestimmung der Mikrotubuli verwendet. Es wurde α -Tubulin als Antigen gewählt und mittels Immunfluoreszenz-Färbung wurde die Verteilung der Mikrotubuli in den Zellen bestimmt.

Ein Antikörper, der ein spezifisches Protein in den Makrophagen erkennt, wurde verwendet, um Osteoklasten von einkernigen Zellen (Monozyten, Makrophagen und Präosteoklasten) zu unterscheiden.

Die verwendeten Zweitantikörper waren mit den Fluoreszenzfarbstoffen Alexa Fluor 568 und Alexa Fluor 647 konjugiert und erlaubten die Detektion des jeweiligen Antigens in separaten Kanälen. Zur Darstellung der Zellkerne wurde der Fluoreszenzfarbstoff DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindol) verwendet, welcher an die DNA bindet und bei einer Aufregung mit UV-Licht blau fluoresziert. Die Emission von DAPI liegt bei 460nm und die Anregung bei 358nm. Da dieser interkalierender Farbstoff sehr leicht in die fixierten Zellen eindringen kann, wird er bei Kernfärbungen in der Immunfluoreszenzmikroskopie am häufigsten verwendet. Die leuchtend blaue

Farbe der Kerne in den großen Osteoklasten ist auch in der Abb. 5 (siehe Seite 28) und Abb. 6 (siehe Seite 39) deutlich zu sehen.

4.2.1 Nachweis der Osteoklasten in der Zellkultur

Es wurde versucht, Osteoklasten, die in der Zellkultur ein sehr unterschiedliches Erscheinungsbild zeigen, zu charakterisieren.

4.2.1.1 „Klassische“ Osteoklasten

Diese Osteoklasten zeigen eine runde bis trapezförmige Form und haben mindestens 3 Zellkerne. Diese sind in der Mitte lokalisiert. Die Kerne selbst weisen auch eine runde bis ovale Form auf.

4.2.1.2 Riesenosteoklasten

Die mikroskopischen Aufnahmen von Riesenosteoklasten zeigen, dass sich die Struktur der knochenresorbierenden Zellen mit der Zunahme der Größe auch ändert. Bei einigen Experimenten konnte man sehr große Osteoklasten mit bis zu 50 Zellkernen erhalten werden. In diesen Riesenosteoklasten sind die Kerne in der Peripherie beliebig lokalisiert. Auch die Tubulinfäden waren im Vergleich zu den üblichen Osteoklasten in den reifen Riesenosteoklasten stark sichtbar. Sie finden sich vor allem rund um die Zellkerne und sie zeigen in die Peripherie.

Etwas kleinere Osteoklasten mit bis zu 10 Zellkernen zeigen eine charakteristische, kreisförmige Anordnung der Kerne an der Zellperipherie. Die Kerne sind durch die Blaufärbung mit DAPI gut sichtbar.

4.2.1.3 Osteoklasten mit einer ungewöhnlichen schmalen und länglichen Struktur

In manchen Zellkulturen finden sich Osteoklasten mit einer länglichen, eher schmalen Form. Das sind neu gebildete Osteoklasten, die durch Fusionierung von Prä-Osteoklasten neu entstanden sind. Die Kerne sind hier nicht in einem Kreis angeordnet, sondern liegen in einer Linie hintereinander gereiht. Einige Zellen zeigen Ausstülpungen, in denen auch Zellkerne sichtbar sind.

4.2.1.4 Vorläuferzellen (Präosteoklasten)

Die Vorläuferzellen der Osteoklasten (Präosteoklasten) besitzen meistens einen, seltener auch zwei Zellkerne und variieren in ihrer Größe. Durch die Färbung mit

dem Antikörper gegen das Makrophagenantigen, wo ein Alexa Fluor 568 markierter Zweitantikörper verwendet wurde, und anschließender Kernfärbung mit DAPI, kann man Vorläuferzellen gut von reifen Osteoklasten, die kein Makrophagenantigen exprimieren, unterscheiden.

Abbildung 5 und 6 zeigen eine Darstellung der Osteoklasten. Die Kerne wurden mittels DAPI-Färbung sichtbar gemacht. Aufnahmen im DAPI-Kanal (b) und die Overlay-Aufnahmen (a) zeigen Osteoklasten und Vorläuferzellen. Mit dem Antikörper gegen den Calcitoninrezeptor und einem Alexa-647 gekoppelten Zweitantikörper werden die Zellgrenzen (weiß) der Osteoklasten aber auch der Vorläuferzellen eindeutig sichtbar. Durch die weiße Färbung von α -Tubulin lässt sich das Zytoskelett der Zellen deutlich erkennen.

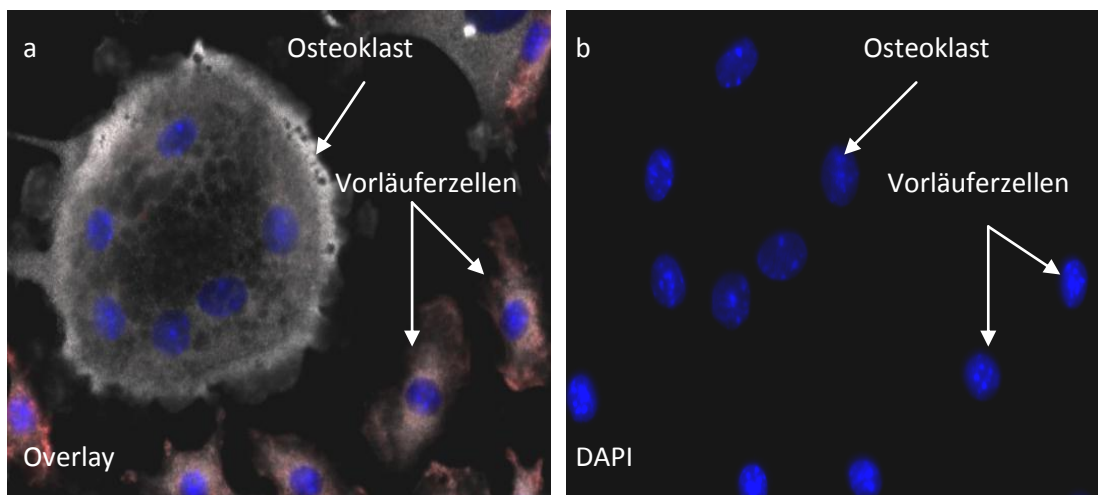


Abb. 5: Vierfachfärbung von Osteoklasten und ihren Vorläuferzellen in einer Knochemarkszellkultur

Es wurden primäre Antikörper gegen Makrophagenantigen (rot), Calcitoninrezeptor (weiß), α -Tubulin (weiß) zur Erkennung der Osteoklasten und DAPI für die Kernfärbung verwendet. Als Zweitantikörper wurde ein Alexa Fluor 568- (Makrophagenantigen) und ein Alexa Fluor 647- (Calcitoninrezeptor und α -Tubulin) markiertes Spezies-spezifisches IgG verwendet.

Bild a: Dreifachfärbung, Der Osteoklast mit sechs Zellkernen ist in Bildmitte deutlich sichtbar. Vorläuferzellen, die durch den Makrophagenantigen-Antikörper rot gefärbt sind erscheinen durch das weiße Tubulin hellrosa.

Bild b: Kernfärbung mit DAPI

Abbildung 6 zeigt einen Osteoklast mit sechs Zellkernen, die mit DAPI blau gefärbt wurden. In diesem reifen Osteoklasten sind die Zellkerne kreisförmig angeordnet. Die Zellgrenzen des Osteoklasten und der Vorläuferzellen sind durch die Färbung des Calcitoninrezeptors, der hauptsächlich in der Zellmembran exprimiert wird, zu

erkennen. Tubulin ist durch die faserigen Strukturen an der Zellperipherie zu erkennen.

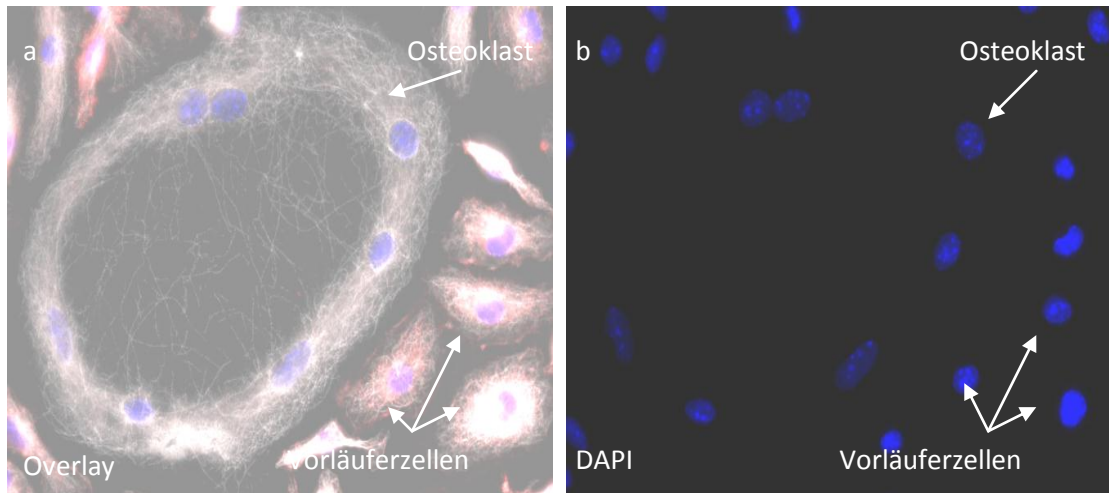


Abb. 6: Vierfachfärbung der Osteoklasten und ihren Vorläuferzellen in einer Knochenmarkszellkultur

Es wurden primäre Antikörper gegen Makrophagenantigen (rot), Calcitoninrezeptor (weiß), α -Tubulin (weiß) zur Erkennung der Osteoklasten und DAPI für die Kernfärbung verwendet. Als Zweitantikörper wurde ein Alexa Fluor 568- (Makrophagenantigen) und ein Alexa Fluor 647- (Calcitoninrezeptor und α -Tubulin) markiertes Spezies-spezifisches IgG verwendet.

Bild a: Dreifachfärbung. Überlappung der rot, weiß und blau gefärbten Strukturen. In dieser Abbildung ist ein Osteoklast mit acht Zellkernen, die in der Peripherie liegen, zu sehen. Die Kerne sind rundherum von Mikrotubuli umgeben und Mikrotubuli sind als dichter Ring in der Peripherie und als loses Netzwerk im Zellinneren zu sehen.

Bild b: Kernfärbung mit DAPI.

In weiteren Experimenten wurden ebenfalls Antikörper gegen den Calcitoninrezeptor, Melatoninrezeptor, α -Tubulin und Makrophagenantigen verwendet, um die reifen Osteoklasten von ihren Vorläuferzellen zu unterscheiden und die Zellen mikroskopisch darzustellen.

Da der Calcitoninrezeptor, durch einen Alexa Fluor 568 markierten Zweitantikörper detektiert wurde, sich auch an Vorläuferzellen befindet, wurde um eine Unterscheidung zwischen Osteoklasten und Makrophagen zu ermöglichen, wurde ein weiterer Antikörper verwendet, der spezifisch das Makrophagenantigen auf den Vorläuferzellen markiert.

Mikrotubuli, die für die Beweglichkeit, Stabilität und intrazellulären Stofftransport wichtig ist, wurde durch die Tubulinfärbung dargestellt.

Für die mikroskopische Aufnahme in Tissue Fax[®] wurde auf dem Deckglas mit den gefärbten Zellen ein Region ausgesucht und in den jeweiligen Kanälen aufgenommen. Diese sind der Cy5-Kanal, Texas-Red-Kanal und der DAPI-Kanal. Im Cy5-Kanal wird der Calcitoninrezeptor aufgenommen, im Texas-Red-Kanal die Makrophagen, und α -Tubulin, und im DAPI-Kanal die Zellkerne. Fallweise wurde auch der Melatoninrezeptor im Texas-Red-Kanal aufgenommen.

Es sollten möglichst solche Regionen ausgesucht werden, wo man die Zellen einzeln gut erkennen kann und, wo sich keine Zellhaufen befinden.

Abbildung 7 und 8 zeigen die Aufnahmen der Osteoklasten und ihren Vorläuferzellen in den jeweiligen Kanälen (a,b und d) und das überlagerte Bild aller Färbungen (c).

In Abbildung 7 sind ein Osteoklast mit 9 Zellkernen und einige einkernige Vorläuferzellen zu sehen. Die Zellgrenzen des Osteoklasten sind durch die Färbung mit dem Calcitoninrezeptor-Antikörper eindeutig zu erkennen (a). Die Vorläuferzellen sind mit dem Makrophagenantikörper rot gefärbt. Allerdings wurde α -Tubulin auch weiß gefärbt, da dessen Zweitantikörper auch mit Alexa Fluor 647 markiert war (b). Mit dem interkalierendem Fluoreszenzfarbstoff DAPI wurden sowohl die Zellkerne der Osteoklasten als auch der Monozyten blau gefärbt (d).

Abbildung 8 zeigt die Aufnahmen eines relativ großen Osteoklasten mit 17 Zellkernen in allen 3 Kanälen (a,b und d) und eine Overlay-Aufnahme (c), wo die Färbungen aller Antigene in den verschiedenen Kanälen überlappen. Im Gegensatz zu anderen Riesenosteoklasten, wo die Zellkerne am Rand in einem Kreis angeordnet sind, befinden sich die Kerne bei diesem Osteoklasten eher in der Mitte. Am Rand sind dagegen fadenförmige Zellskelettstrukturen sichtbar. Monozyten, Makrophagen und Osteoklastenvorläuferzellen können wiederum durch die Färbung mit dem Makrophagenantikörper identifiziert werden.

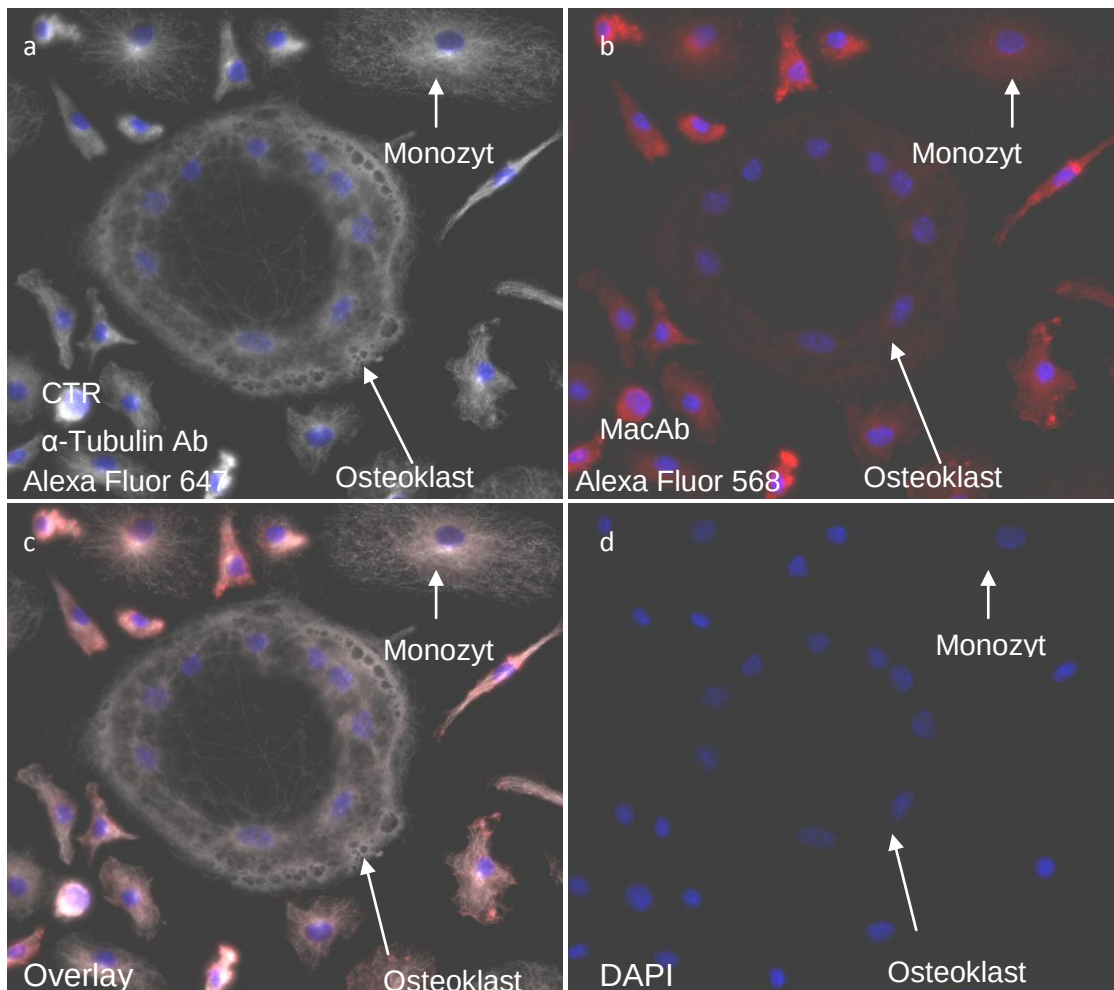


Abb. 7: Vierfachfärbung der Osteoklasten und ihren Vorläuferzellen (Nachweis vom Calcitoninrezeptor, α -Tubulin und Makrophagenantigen).

Es wurden primäre Antikörper gegen Makrophagenantigen (rot), Calcitoninrezeptor (weiß), α -Tubulin (weiß) zur Erkennung der Osteoklasten und DAPI für die Kernfärbung verwendet. Als Zweitantikörper wurde ein Alexa Fluor 568- (Makrophagenantigen), ein Alexa Fluor 647- (Calcitoninrezeptor und α -Tubulin) markiertes Spezies-spezifisches IgG verwendet.

Bild a: Nachweis des Calcitoninrezeptors im Cytoplasma der reifen Osteoklasten, aber auch der Präosteoklasten. Obwohl der Rezeptor auch von den Vorläuferzellen exprimiert wird, ist er in dem Osteoklast besser zu erkennen. Auch die Mikrotubuli sind durch ihre Weißfärbung gut zu sehen.

Bild b: Nachweis des Makrophagenantigens in den Präosteoklasten. Diese sind um den Zellkern intensiv rot gefärbt.

Bild c: Überlappung der Färbungen im roten, weißen und blauen Kanal. Durch die Farbüberlagerung der durch verschiedene Antikörper gefärbten Strukturen kann man die Zellen einfacher identifizieren und zuordnen.

Bild d: Kernfärbung mit DAPI

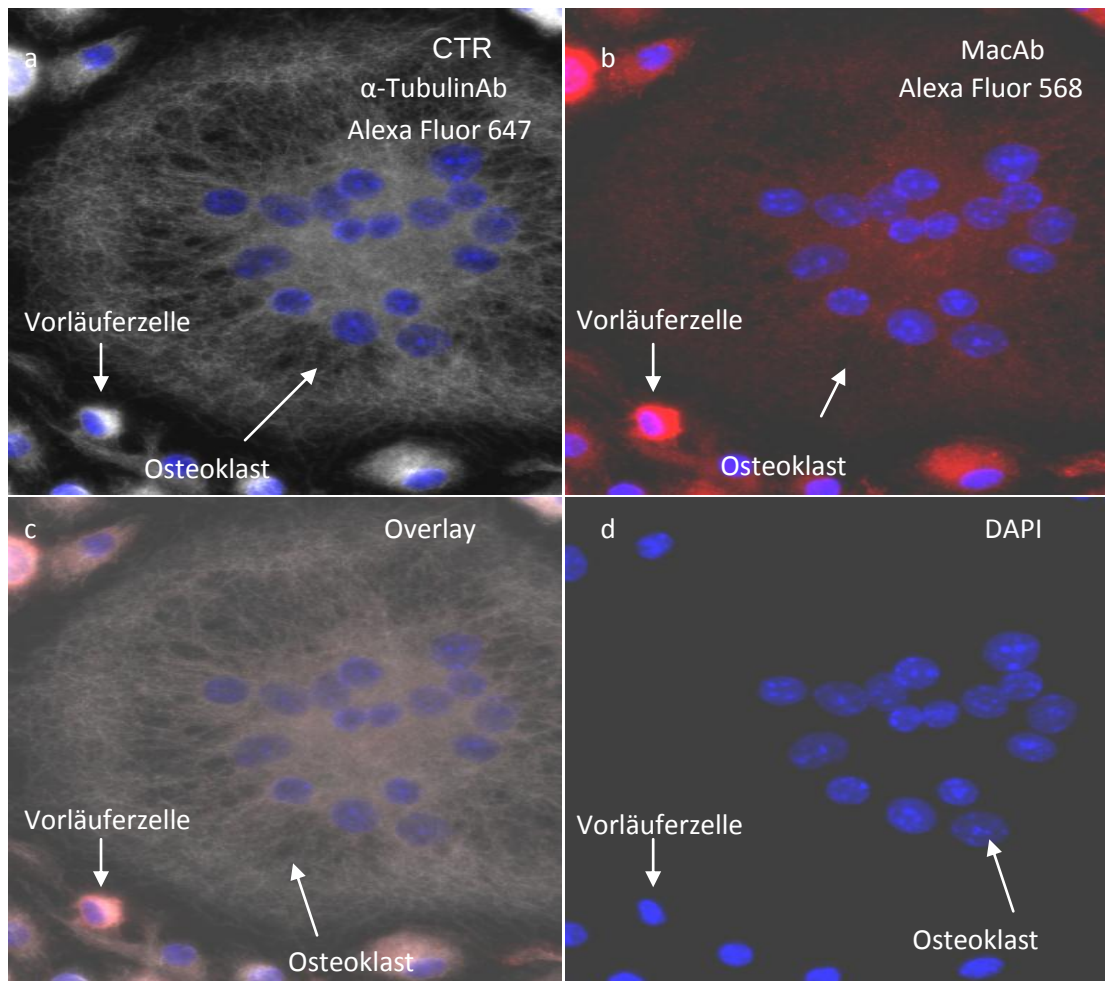


Abb. 8: Vierfachfärbung der Osteoklasten und ihren Vorläuferzellen (Nachweis Calcitoninrezeptor, α -Tubulin und Makrophagenantigen).

Es wurden primäre Antikörper gegen Makrophagenantigen (rot), Calcitoninrezeptor (weiß), α -Tubulin (weiß) zur Erkennung der Osteoklasten und DAPI für die Kernfärbung verwendet. Als Zweitantikörper wurde ein Alexa Fluor 568- (Makrophagenantigen) und ein Alexa Fluor 647- (Calcitoninrezeptor und α -Tubulin) markiertes Spezies-spezifisches IgG verwendet.

Bild a: Dieses Bild zeigt einen großen Osteoklasten mit 16 Zellkernen. Die Kerne sind in der Mitte des Osteoklasten lokalisiert. Die dünnen feinen auseinandergezogenen Tubulinfäden sind auch gut zu erkennen. Der Cytoplasma wurde mit dem Calcitoninrezeptorantikörper weiß gefärbt.

Bild b: Die Makrophagen sind mit einem Primärantikörper und einem Alexa Fluor 568 gekoppelten Sekundärantikörper rot gefärbt.

Bild c: Überlappung der Färbungen im roten, weißen und blauen Kanal. Durch die Überlagerung der roten und weißen Farben entsteht ein hellrosa Expressionsmuster in den Osteoklasten. Die Makrophagen weisen dagegen eine intensivere Rotfärbung auf.

Bild d: Kernfärbung mit DAPI

4.2.2 Doppelfärbungen zur Identifizierung der Osteoklasten in der Kultur

In diesen Versuchen wurden anstatt 3 primäre und sekundäre Antikörper nur 2 eingesetzt. Die verwendeten Antikörper sind Makrophagenantikörper und der

Calcitoninrezeptorantikörper. Die Zellkerne wurden mit dem Kernfarbstoff DAPI blau gefärbt.

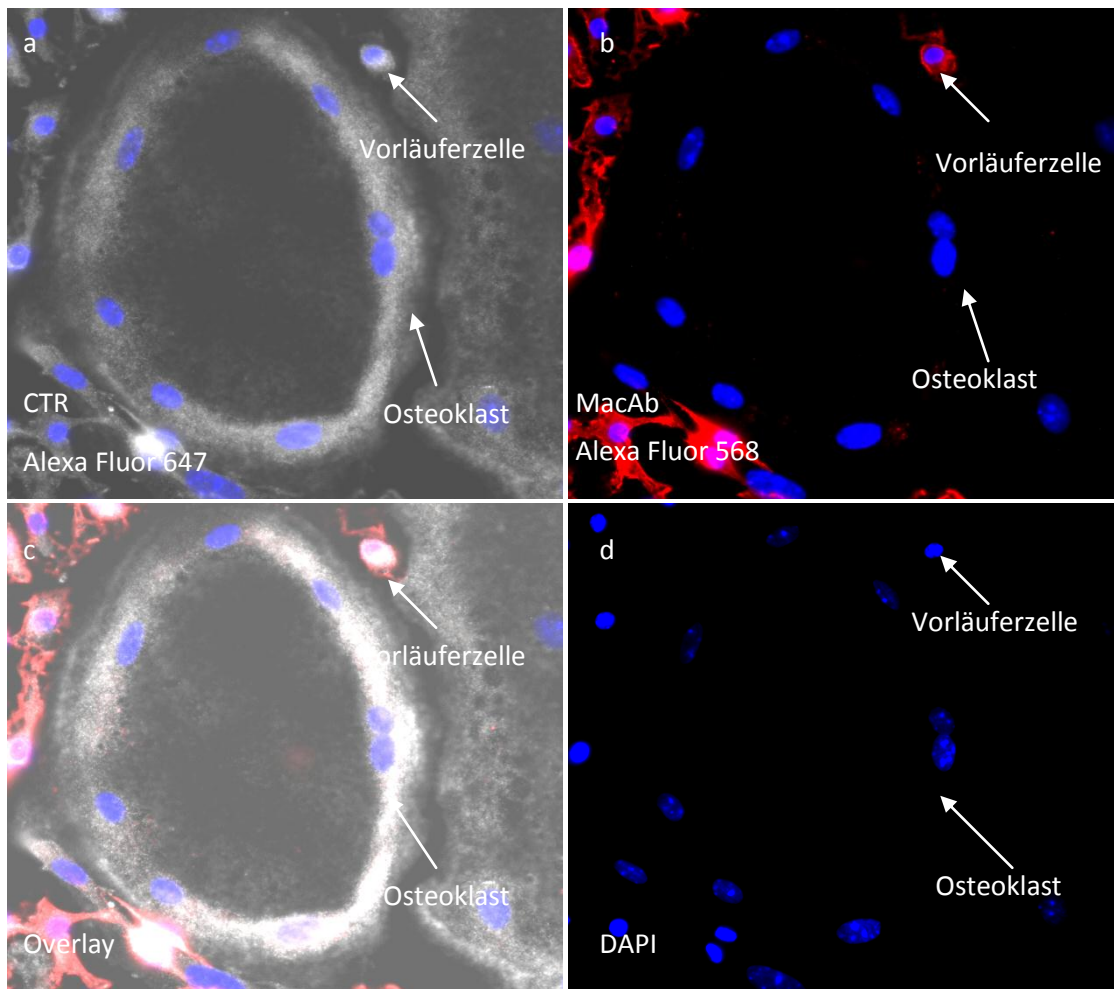


Abb. 9: Doppelfärbung zum Nachweis des Calcitoninrezeptors und des Makrophagenantigens in Osteoklasten

Es wurden primäre Antikörper gegen Makrophagenantigen (rot) und Calcitoninrezeptor (weiß) zur Erkennung der Osteoklasten und DAPI für die Kernfärbung verwendet. Als Zweitantikörper wurde ein Alexa Fluor 568- (Makrophagenantigen) und ein Alexa Fluor 647- (Calcitoninrezeptor) markiertes Spezies-spezifisches IgG verwendet.

Bild a: Nachweis des Calcitoninrezeptors durch Weißfärbung des Cytoplasmas.

Bild b: Nachweis des Makrophagenantigens in den Präosteoklasten durch Rotfärbung der Vorläuferzellen.

Bild c: Überlappung der Färbungen im roten, weißen und blauen Kanal (Overlay-Aufnahme).

Bild d: Kernfärbung mit DAPI. Die Zellkerne sind in einem Kreis angeordnet.

In dieser Abbildung ist eine Osteoklast mit 9 Zellkernen zu sehen. Das Cytoplasma wurde mit dem Calcitoninrezeptorantikörper und einem Sekundärantikörper, welcher an Alexa Fluor 647 gekoppelt war, weiß gefärbt. Außerdem sind auch ein paar

Vorläuferzellen zu erkennen, die mit dem Makrophagenantigen ein rotes Signal ergeben. Dazu wurde ein Zweitantikörper verwendet, der an Alexa Fluor 568 gekoppelt war.

4.3 Riesenosteoklasten mit bis zu 50 Zellkernen

Durch die Behandlung der Mausknochenmarkszellen mit 25ng/ml RANKL und 15ng/ml M-CSF konnte in einigen Versuchsreihen eine sehr gute Ausbeute an Riesenosteoklasten mit bis zu 50 Zellkernen erzielt werden.

Da diese Riesenosteoklasten nicht in einem Gesichtsfeld im Mikroskop betrachtet werden können, sind in den Abbildungen nur Ausschnitte von den Overlay-Aufnahmen der Riesenosteoklasten zu sehen (Abb. 10 bis 12).

Auf diesem Bild (Abb. 10) sieht man zwei benachbarte Riesenosteoklasten. Hier ist es auffällig, dass meist zwei Zellkerne nebeneinander liegen. Das lässt darauf schließen, dass diese Riesenzellen aus zweikernigen Vorläuferzellen durch Fusionierung entstanden sind.

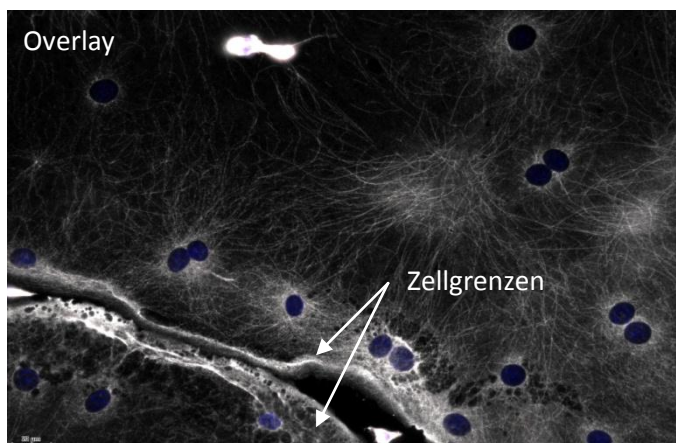


Abb.10: Doppelfärbung der Osteoklasten in Zellkulturen: 2 benachbarte Riesenosteoklasten mit bis zu 50 Zellkernen

Es wurden primäre Antikörper gegen den Calcitoninrezeptor (weiß) und α -Tubulin (weiß) zur Erkennung der Osteoklasten und DAPI für die Kernfärbung verwendet. Als Zweitantikörper wurde ein Alexa Fluor 647-(Calcitoninrezeptor und α -Tubulin) markiertes spezies-spezifisches IgG verwendet.

Die Zellgrenzen sind deutlich sichtbar. Man sieht auch, dass jeweils 2 Kerne eng zusammen liegen.

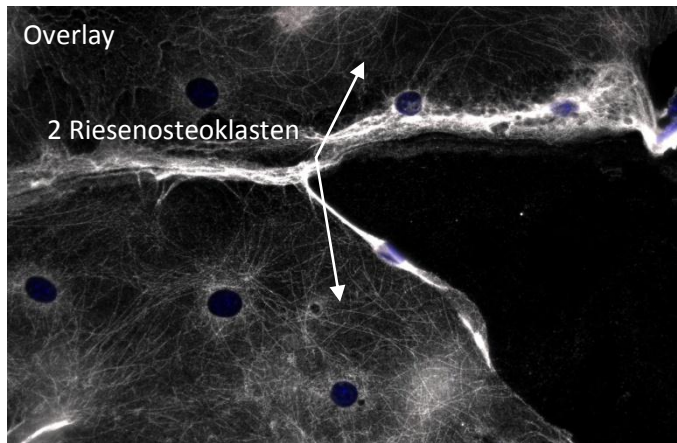


Abb.11: Doppelfärbung der Osteoklasten in Zellkulturen: Zwei aneinander grenzende Riesenosteoklasten

Es wurden primäre Antikörper gegen Calcitoninrezeptor (weiß) und α -Tubulin (weiß) zur Erkennung der Osteoklasten und DAPI für die Kernfärbung verwendet. Als Zweitantikörper wurde ein Alexa Fluor 647-(Calcitoninrezeptor und α -Tubulin) markiertes Spezies-spezifisches IgG verwendet.

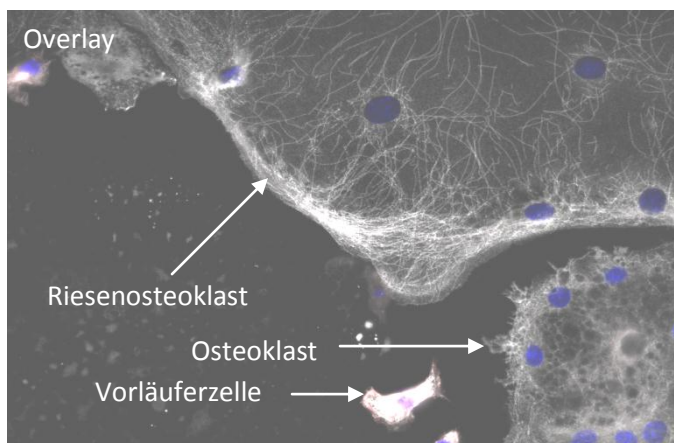


Abb.12: Doppelfärbung der Osteoklasten in Zellkulturen: Ausschnitt aus einem Riesenosteoklasten

Es wurden primäre Antikörper gegen Macrophagenantigen (rot), Calcitoninrezeptor (weiß), α -Tubulin (weiß) zur Erkennung der Osteoklasten und DAPI für die Kernfärbung verwendet. Als Zweitantikörper wurde ein Alexa Fluor 568- (Makrophagenantigen) und ein Alexa Fluor 647- (Calcitoninrezeptor und α -Tubulin) markiertes spezies-spezifisches IgG verwendet.

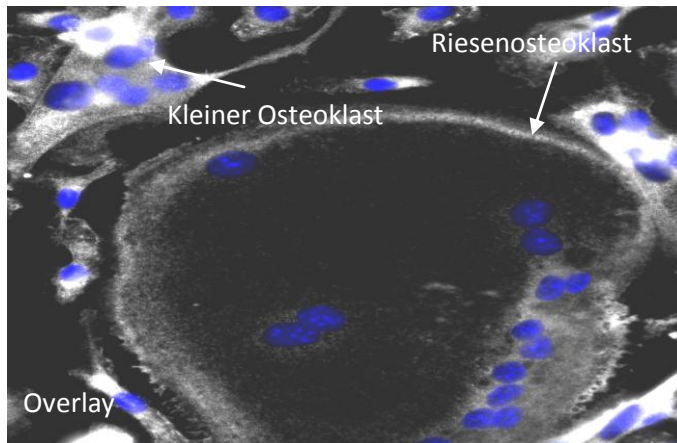


Abb.13: Doppelfärbung der Osteoklasten in Zellkulturen: Riesenosteoklast mit 13 und ein kleiner Osteoklast mit 7 Zellkernen

Es wurden primäre Antikörper gegen Calcitoninrezeptor (weiß) und α -Tubulin (weiß) zur Erkennung der Osteoklasten und DAPI für die Kernfärbung verwendet. Als Zweitantikörper wurde ein Alexa Fluor 647-(Calcitoninrezeptor und α -Tubulin) markiertes Spezies-spezifisches IgG verwendet.

4.4 Zellkulturen mit sehr kleinen Osteoklasten

Nicht immer ist es gelungen, die erwünschte große Ausbeute an Riesenosteoklasten mit sehr vielen Zellkernen zu erzielen. Es gab einige Versuche, wo nur eine niedrige Anzahl an sehr kleinen Osteoklasten mit wenigen Zellkernen in der Kultur gefunden wurde.

In Abbildung 10 sieht man die Overlay-Aufnahmen von sehr kleinen Osteoklasten mit wenigen Zellkernen. Auf den Bildern a,b und d sind die Zellgrenzen eindeutig ersichtlich und die Kerne befinden sich am Rand des Osteoklasten. Bei dem Osteoklasten im Bild c sind die Zellgrenzen wiederum schlecht zu sehen.

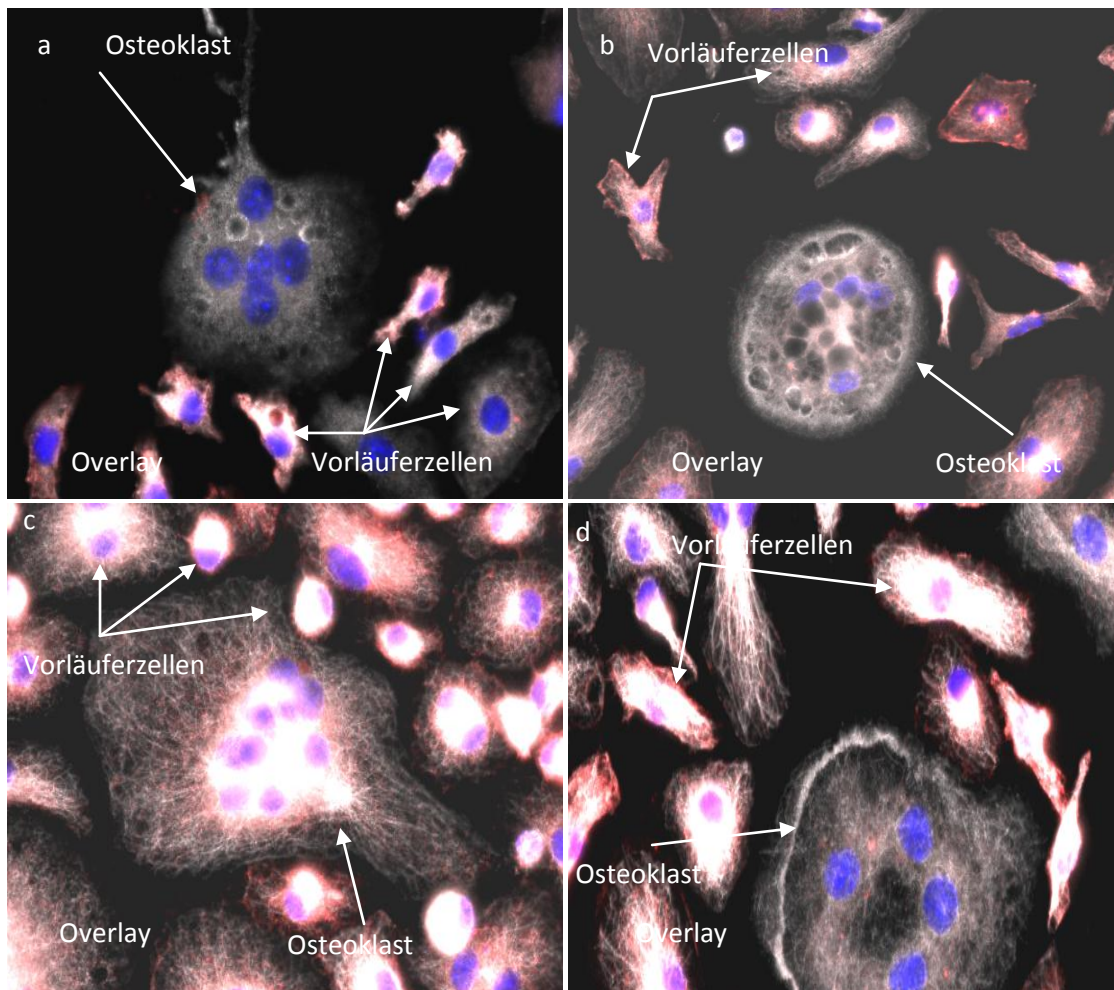


Abb. 14: Parallelfärbung der Osteoklasten in Zellkulturen: Kleine Osteoklasten mit wenigen Zellkernen

Es wurden primäre Antikörper gegen Macrophagenantigen (rot), Calcitoninrezeptor (weiß), α -Tubulin (weiß) zur Erkennung der Osteoklasten und DAPI für die Kernfärbung verwendet. Als Zweitantikörper wurde ein Alexa Fluor 568- (Makrophagenantigen) und ein Alexa Fluor 647- (Calcitoninrezeptor und α -Tubulin) markiertes spezies-spezifisches IgG verwendet.

Im Vergleich zu den Riesenosteoklasten konnte man bei den kleineren Zellen die Zellgrenzen durch die Färbung mit dem Calcitoninrezeptor Antikörper nicht immer deutlich darstellen. Ein möglicher Grund dafür könnte sein, dass die Expressionsrate dieses Rezeptors auch mit der Zunahme der Größe der Osteoklasten steigt.

4.5 Strukturelle Unterschiede der Osteoklasten

Interessanterweise waren bei einigen Versuchen Osteoklasten in der Kultur, die sich durch ihre Struktur von den normalen Osteoklasten unterschieden haben. Ein normaler Osteoklast ist eher rund und hat eine typische kreisförmige Anordnung der Zellkerne am Rand. Diese außerordentlichen Fresszellen hatten im Vergleich zu den üblichen Osteoklasten eher ein länglicheres Aussehen. Einige von ihnen hatten auch eine Ausstülpung an einem Ende. Da die Anzahl der Zellkerne mit dem Resorptionsfunktion der Osteoklasten in einem Zusammenhang steht, könnte die

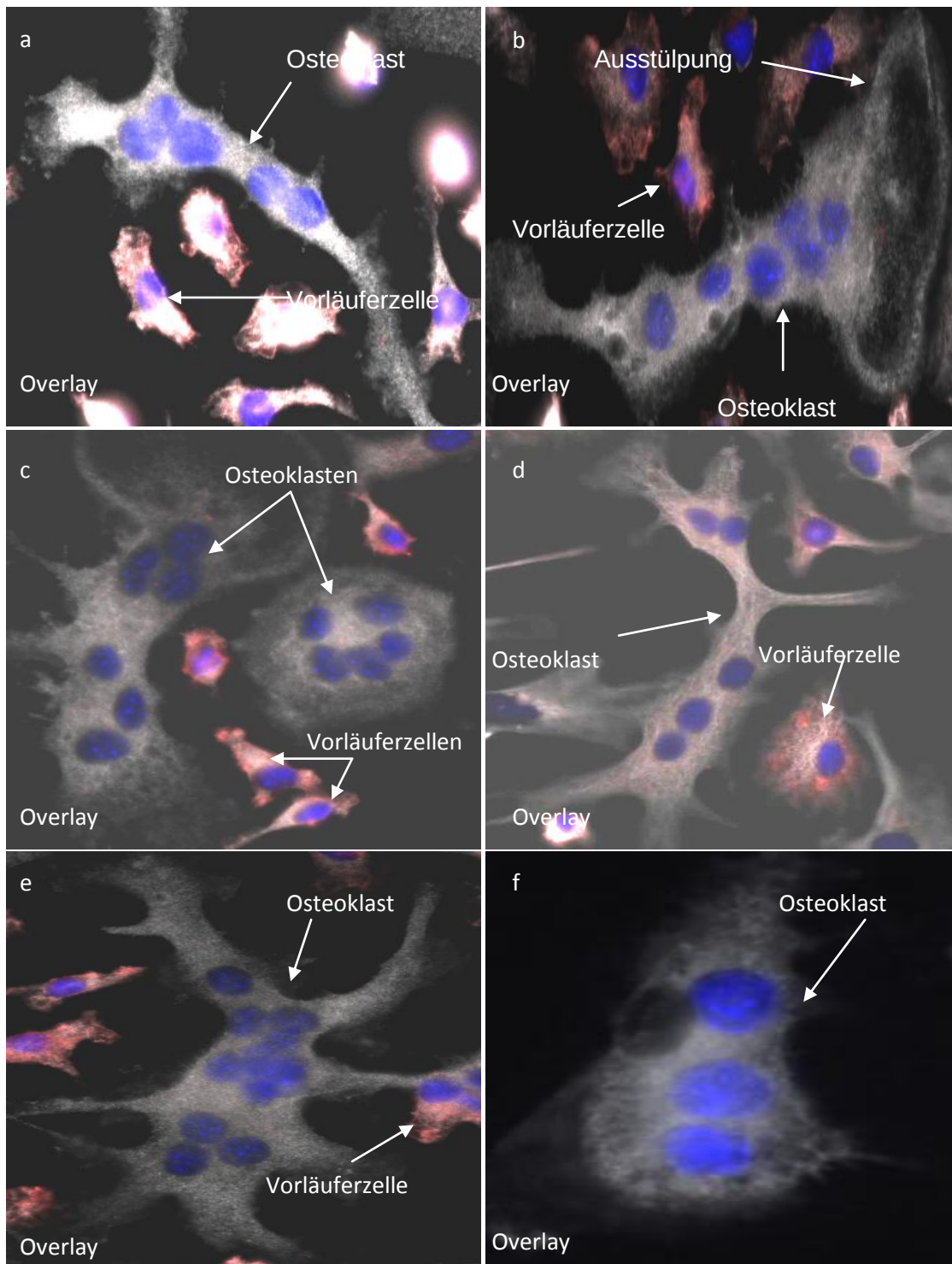


Abb. 15: Parallelfärbung der Osteoklasten in Zellkulturen: Osteoklasten mit einer ungewöhnlichen schmalen und länglichen Struktur

Es wurden primäre Antikörper gegen Macrophagenantigen (rot), Calcitoninrezeptor (weiß), α -Tubulin (weiß) zur Erkennung der Osteoklasten und DAPI für die Kernfärbung verwendet. Als Zweitantikörper wurde ein Alexa Fluor 568- (Makrophagenantigen) und ein Alexa Fluor 647- (Calcitoninrezeptor, MTR-1A und α -Tubulin) markiertes spezie-spezifisches IgG verwendet.

Bilder a-f: Diese Bilder zeigen, wie unterschiedlich die Osteoklasten geformt sein können. Hier sieht man Osteoklasten mit einer schmalen und länglichen Struktur. Auch die Anordnung der Zellkerne unterscheidet sich bei diesen Zellen von den üblichen Osteoklasten.

Ausbildung dieser Formen funktionell von Bedeutung sein. Neben der Multinuklearität könnte die morphologische Struktur dieser Zellen einen Einfluss auf den Knochenabbaufunktion haben. Dies sollte in zukünftigen Studien untersucht werden.

Abbildung 15 zeigt die Overlay –Aufnahmen von den Osteoklasten, die eine längliche Form aufweisen und sich dadurch von den runden Osteoklasten in der Zellkultur unterscheiden.

In dieser Abbildung sind die Overlay-Aufnahmen der Doppelfärbungen mit dem Calcitoninrezeptor-Antikörper (Sekundärantikörper ist mit Alexa Fluor 568 gekoppelt), dem Makrophagenmarker (Sekundärantikörper ist mit Alexa Fluor 647 gekoppelt), dem α -Tubulinantikörper (Sekundärantikörper ist mit Alexa Fluor 568 gekoppelt) und dem Melatoninrezeptor 1A (Zweitantikörper: Alexa Fluor 647-markiert) zu sehen. Die einzelligen Vorläuferzellen kann man wiederum durch ihre rote Färbung mit dem Makrophagenantikörper eindeutig identifizieren. Es ist zu sehen, dass sich auch Osteoklasten in ihrer Größe und Form unterscheiden können. Die Zellkerne kann man durch die Blaufärbung mit DAPI quantitativ detektieren.

4.6 Möglicher Zusammenhang zwischen dem Alter der Mäuse und der Bildung und Struktur der Osteoklasten

Durch die unterschiedliche Struktur und Ausbeute, die in den einzelnen Versuchen zu beobachten war, stellte sich die Frage, ob das Alter der Mäuse für die Bildung von Osteoklasten von Bedeutung ist. Daher wurde das Alter der Mäuse herangezogen, um dies zu untersuchen (Tabelle 4).

Die Tabelle 4 zeigt die Anzahl der Osteoklasten und das Alter der Mäuse, von denen die Knochenmarkszellen aus der Tibia und Femur entnommen wurden. Man kann herauslesen, dass größere Osteoklasten vermehrt bei jüngeren Mäusen gefunden wurde. Trotzdem gab es Schwankungen bezüglich der Osteoklastenanzahl, die man auch anhand dieser Tabelle sehen kann. Es gab auch Experimente, wo überhaupt keine Osteoklasten in der Kultur gebildet wurden, obwohl das Wachstum der anderen Zellen (Makrophagen, Fibroblasten, Osteoklastenvorstufen) in der Kultur nicht

eingeschränkt war. Die Ursache für das Fehlen der Osteoklasten konnte nicht ermittelt werden. Möglicherweise spielen hormonelle Faktoren eine Rolle.

Tab.4: Versuchsreihen

Versuchsreihen	Alter zum Zeitpunkt d. Lieferung	Alter bei Verwendung	Ausbeute
VR1	4-8 Wochen	6-10 Wochen	Viele und sehr große Osteoklasten
VR 7	4-8 Wochen	6-10 Wochen	Größere Osteoklasten
VR 2	4-8 Wochen	7-11 Wochen	Wenige Osteoklasten
VR 8	4-8 Wochen	7-11 Wochen	Größere Osteoklasten
VR 3	4-8 Wochen	8-12 Wochen	Viele und sehr große Osteoklasten
VR 9	4-8 Wochen	8-12 Wochen	Kleine und wenige Osteoklasten
VR 13	4-8 Wochen	8-12 Wochen	Keine Osteoklasten
VR 14	4-8 Wochen	8-12 Wochen	Keine Osteoklasten
VR 4	4-8 Wochen	9-13 Wochen	Wenige Osteoklasten
VR 10	4-8 Wochen	9-13 Wochen	Kleine und wenige Osteoklasten
VR 5	4-8 Wochen	11-15 Wochen	Viele und sehr große Osteoklasten
VR 12	4-8 Wochen	11-15 Wochen	Keine Osteoklasten
VR 6	4-8 Wochen	12-16 Wochen	Wenige Osteoklasten
VR 11	4-8 Wochen	12-18 Wochen	Kleine und wenige Osteoklasten

5 DISKUSSION

Als knochenabbauende Zellen sind Osteoklasten an pathologischen Prozessen bei vielen Knochenkrankheiten maßgeblich beteiligt. Erkrankungen wie Osteoporose, Morbus Paget oder Knochenmetastasen von verschiedenen Tumoren führen zu Knochenabbau und dies geht auch mit einer Überaktivität der Osteoklasten einher.

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurde versucht, eine Osteoklastenkultur zu etablieren und durch die Etablierung von verschiedenen Markern in der Immunfluoreszenz-Mikroskopie Grundlagen für eine automatische Quantifizierung und Charakterisierung von Osteoklasten zu liefern. Durch die Etablierung eines entsprechenden Imageanalysesystems sollte die Rolle dieser Zellen bei verschiedenen Erkrankungen weiter untersucht werden. Dies ist vor allem wichtig, da es sich Krankheiten handelt die eine große Anzahl von Patienten betreffen.

Um die Etablierung der automatischen Erkennung und Quantifizierung von Osteoklasten im Tissue Fax[®]-System gewährleisten zu können, muss das bestehende Tissue Fax[®]-System adaptiert werden. Derzeit beruht das System darauf, dass anhand eines Zellkernes eine Zelle im Image-Analysesystem erkannt wird. Da Osteoklasten mehrkernige Zellen sind, muss an Stelle des Zellkerns als Zellerkennungsmerkmal ein anderer Parameter der Zelle genommen werden. In Frage kommt dafür die Plasmamembran, die die Zellen begrenzt. Um eine entsprechende Immunfluoreszenzfärbung etablieren zu können, müssen Osteoklasten aus Knochenmarkszellen, indem sich Makrophagen und Osteoklasten-Vorläuferzellen befinden, gezüchtet werden. Das Ziel der Osteoklasten-Zellkultur war, eine möglichst hohe Ausbeute an Riesenosteoklasten, das heißt große Osteoklasten mit vielen Zellkernen, zu erhalten. Dies sollte durch Zugabe von entsprechenden Medienzusätzen, wie Vitamin D₃, RANKL und M-CSF gelingen. Die Konzentrationen dieser Zusätze zu den Medien wurde bereits in einer früheren Diplomarbeit getestet.⁴⁶

Die Knochenmarkszellen wurden durch Zugabe von Vitamin D₃ 10⁻⁸ M, 25 ng/ml M-CSF und 15 ng/ml RANKL eine Woche lang bebrütet. Die Cytokine M-CSF und RANKL wurden immer kombiniert eingesetzt, während Vitamin D₃ alleine gegeben wurde. Durch die Behandlung der Zellen mit Vitamin D₃ entstanden kaum Osteoklasten. Durch die Anwendung der Kombination RANKL/M-CSF wurden in

einigen Präparationen sehr großen Osteoklasten mit bis zu 50 Zellkernen gebildet. Daher wurde diese Kombination bei allen weiteren Versuchen in gleicher Konzentration verwendet. Obwohl Präparationstechnik und die Zellkulturbedingungen konstant blieben, war die Anzahl der gebildeten Osteoklasten und auch ihre Größe in den einzelnen Präparaten sehr unterschiedlich. Daher wurde untersucht, ob die Anzahl und Größe der Osteoklasten durch das Alter der Mäuse verändert wird. Allerdings konnte kein Zusammenhang mit dem Alter der Mäuse gefunden werden, sodass die Ursache für diese Inhomogenität weitgehend unbekannt bleibt. Hormonelle Veränderungen könnten jedoch eine Rolle spielen.

Bei den verwendeten Präparationen wurde zuerst mittels einer histochemischen TRAP-Färbung untersucht, ob eine ausreichende Menge an Osteoklasten in der Kultur gebildet wurde. Dann wurden die Osteoklasten durch eine Immunfluoreszenzfärbung mikroskopisch dargestellt und automatisch detektiert. Die Färbungen erfolgten durch Anwendung von fluoreszenzmarkierten Zweitantikörpern, die gegen Erstantikörper gerichtet sind, die den Calcitoninrezeptor, Makrophagenantigen und α -Tubulin in den Zellen erkennen. Die Zellkerne wurden mittels DAPI blau markiert. Der Makrophagenantikörper markierte nur die Osteoklastenvorläuferzellen, da reifen Osteoklasten das Makrophagenantigen fehlt. Dadurch konnte man die Osteoklasten von Osteoklastenvorstufen, Makrophagen, Monozyten und anderen Zellen eindeutig differenzieren. Der Calcitoninrezeptor-Antikörper richtete sich zwar auch nicht spezifisch gegen die reifen Osteoklasten, erlaubte aber eine deutliche Erkennung der Plasmamembran der Zellen. Die Färbung mit dem α -Tubulin wurde durchgeführt, um durch Erkennung der Mikrotubuli unterscheiden zu können, ob es sich um eine Zelle oder getrennte eng nebeneinander liegende Zellen handelt. Mikrotubuli zeigen sich als dünne fadenförmige Strukturen, die meistens rund um die Zellkerne liegen und von dort aus zur Peripherie der Zelle laufen. In den Riesenosteoklasten liegen sie zusammen mit den Kernen an der Zellperipherie.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Osteoblasten entwickeln sich aus den mesenchymalen Stammzellen und üben eine knochenaufbauende Funktion aus. Osteoklasten, die Gegenspieler der Osteoblasten, sind vielkernige Riesenzellen, die in den Einbuchtungen der Knochenoberfläche vorkommen und die Fähigkeit besitzen das Knochenmaterial zu resorbieren. Sie entstehen durch die Fusion von mononukleären Vorläuferzellen. Gewebefaktoren, die bei der Osteoklastogenese eine regulierende Rolle spielen, sind M-CSF und RANKL.

Ziel dieser Diplomarbeit war es, eine Osteoklastenkultur zu etablieren. Durch die Etablierung von verschiedenen Markern sollten Grundlagen für eine automatische Imageanalyse (Tissue Fax®) von Osteoklasten in der Immunfluoreszenz-Mikroskopie geschaffen werden. Durch die Etablierung eines entsprechenden Imageanalysesystems sollte die Rolle dieser Zellen bei verschiedenen Erkrankungen der Knochen (Osteoporose, Knochenmetasten von Tumoren) weiter untersucht werden.

Bemerkenswert war, dass Osteoklasten entsprechend der Zahl der Zellkerne unterschiedliche Strukturen aufweisen. Bei den Riesenosteoklasten sind die Zellkerne eher am Rand in einem Kreis angeordnet. Kleinere Osteoklasten hatten teilweise eine längliche Form mit beliebig verteilten Kernen. Bei einigen dieser Zellen war auffällig, dass sie Ausstülpungen an der Plasmamembran zeigten. Ob diese strukturellen Veränderung für Osteoklasten-assoziierten Krankheiten von Bedeutung sind, muss noch weiter untersucht werden. Dies wäre wichtig, da bekannt ist, dass die resorptive Funktion der knochenabbauenden Zellen mit der steigenden Anzahl der Zellkerne zunimmt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Grundlagen geschaffen wurden, um Osteoklasten in dem Tissue Fax®-Analysesystem automatisch identifizieren und charakterisieren zu können. Es stellt die Grundlagen dar um Wirkungen von Hormonen und Arzneistoffen auf die Osteoklasten besser zu erfassen und bestimmen zu können. Dies sollte es ermöglichen, die Rolle der Osteoklasten bei Knochenkrankheiten besser zu erforschen. Damit wäre es möglich, neue Stoffe zu entwickeln, um diese Erkrankungen besser als bisher möglich therapieren zu können.

7 ABSTRACT

Osteoblasts develop from mesenchymal stem cells and exert a bone building function. Osteoclasts, the opponents of the osteoblasts, are multinucleated cells. They are located in excavations of the bone surface where they reabsorb bone material. Osteoclasts are formed by the fusion of mononuclear osteoclast precursor cells from the macrophage line. Important for osteoclastogenesis, are the tissue factors M-CSF and RANKL.

The aim of this thesis was to establish an osteoclast culture. Through the establishment of different markers should found bases for an automatic image analysis (Tissue Fax ®) of osteoclasts, which are created by immunofluorescence microscopy. The role of these cells in various diseases of the bones (osteoporosis, bone metastases) should be further investigated through the creation of an appropriate image analysis system.

It is noteworthy that osteoclasts have different structures according to their number of cell nuclei. The nuclei of giant osteoclasts are rather arranged in a circle on the edge. A part of smaller osteoclasts had an elongated shape with randomly distributed nuclei. It was striking that some of these cells showed protrusions at the plasma membrane. It must be further investigated whether these structural changes for osteoclast-associated diseases are important. This is essential because it is known that the resorptive function of bone resorbing cells increases with the increasing number of nuclei.

In summary it can be said that mechanisms were created to be able to identify and characterize osteoclasts in the Tissue Fax ® analysis system automatically. It is the basis for a better detection from effects of hormones and drugs on osteoclasts. This should make it possible to explore the role of osteoclasts in bone diseases more easily. So it is possible to develop new substances for the therapy of these diseases.

8 LITERATURVERZEICHNIS

- ¹ Reiner Bartl. Osteoporose: Prävention-Diagnostik-Therapie. 2. Auflage. Georg Thieme Verlag. Stuttgart. 2004. 3-6
- ² Theresa A. Guise, Gregory R. Mundy. Cancer and bone. Endocr Rev 1998;19:18-54
- ³ Mundy, G. R. Bone Remodeling: In Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism. 4.Auflage. 1999. 30-32
- ⁴ Claus-Peter Adler. Knochenkrankheiten: Diagnostik makroskopischer, histologischer und radiologischer Strukturveränderungen des Skeletts. 3. Auflage. 2005. 2-8
- ⁵ Alsina M., Guise T. A., Roodman G. D. Cytokine regulation of bone cell differentiation. Vitam Horm 1996;52:63-98; Aubin, J. E. Bone stem cells. J Cell Biochem Suppl 1998;31:73-82
- ⁶ Daniel Baumhoer, Ingo Steinbrück, Werner Götz. Histologie. 2.Auflage. 2003. 61-62
- ⁷ Detlev Ganten, OE Janssen, Klaus Ruckpaul. Molekularmedizinische Grundlagen von Endokrinopathien. Springer-Verlag. Berlin. 2001. 137-188
- ⁸ Jörg Jerosch, Augustinus Bader, Günther Uhr. Knochen Curasan Taschenatlas spezial. Thieme Verlag. Stuttgart. 2002. 5
- ⁹ Kong, YY, Yoshida H, Sarosi I, Tan HL, Timms E, Caparelli C, Morony S, Oliveira-dos-Santos AJ, Van G, Itie A, Khoo W, Wakeham A, Dunstan CR, Lacey DL, Mak TW, Boyle WY, Penninger JM. OPG is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymphnode organogenesis. Nature 1999;397:315-23
- ¹⁰ Greenfield, EM, Bi Y, Miyauchi A. Regulation of osteocalcin activity. Life sci 1999;65:1087-1102
- ¹¹ Hofbauer, LC, Heufelder AE. Role of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin in bone cell biology. J Mol Med 2001;79:243-253
- ¹² Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT, Martin TJ. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. Endocr Rev 1999;20:345-57
- ¹³ Bruce R. Troen. Molecular mechanism underlying osteoclast formation and activation. Experimental Gerontology 2003;38:605–614
- ¹⁴ Edith Leisten. Osteoporose: Handeln bevor der Knochen bricht. Books on Demand Verlag. 2010. 37
- ¹⁵ G. David Roodman. Cell biology of the osteoclast. Experimental Hematology 1999;27:1229–1241

- 16 F. J. A. De Paula, C. J. Rosen. Back to the Future: Revisiting Parathyroid Hormone and Calcitonin Control of Bone Remodeling. *Horm Metab Res* 2010;42:299-306
- 17 Peter Burckhardt. Vitamin D und Osteoporose.
http://www.medicalforum.ch/pdf/pdf_d/2006/2006-36/2006-36-436.PDF
- 18 Holick MF, Siris ES, Binkley N, Beard MK, Khan A, Katzer JT, et al. Prevalence of vitamin D inadequacy among postmenopausal North American women receiving osteoporosis therapy. *J Clin Endocrinol Metabol* 2005;90:3215–24
- 19 Goldring,S.R., Gorn,A.H., Yamin,M., Krane,S.M., & Wang,J.T. Characterization of the structural and functional properties of cloned calcitonin receptor cDNAs. *Horm.Metab Res* 1993;25:477-480
- 20 Findlay DM, Sexton PM. Calcitonin Growth Factors. 2004;22:217-224
- 21 Stroop,S.D., Nakamuta,H., Kuestner,R.E., Moore,E.E., & Epand,R.M. Determinants for calcitonin analog interaction with the calcitonin receptor N-terminus and transmembraneloop regions. *Endocrinology* 1996;137:4752-4756
- 22 Epand,R.M., Epand,R.F., & Orlowski,R.C. Presence of an amphipathic helical segment and its relationship to biological potency of calcitonin analogs. *Int.J.Pept.Protein Res.* 1985;25:105-111
- 23 Arun Goel. Salmon Calcitonin in the Treatment of Osteoporosis. *Bombay Hospital Journal* 2010;52:362-372
- 24 Peter P. Nawroth, Reinhard Ziegler. *Klinische Endokrinologie und Stoffwechsel.* Springer Verlag. Berlin. 2001. 250-253
- 25 Rebel, A., Malkani, K., Basle, M. Nuclear anomalies in osteoclasts in Paget's bone disease. *Nouvelle Presse Medicale* 1974;3:1299-1301
- 26 Thumb, Bröll, Czurda, Siegmeth, Smolen. *Praktische Rheumatologie.* 4. Auflage. Springer Verlag. Wien. 2001. 393-398
- 27 G. David Roodman, Jolene J. Windle. Paget disease of bone. *J Clin Invest* 2005;115:200–208
- 28 Horowitz ME, Tsokos MG, DeLaney TF. Ewing's sarcoma. *CA Cancer J Clin* 1992;42:300-20
- 29 Jürgen Freyschmidt. *Skeletterkrankungen: Klinisch-radiologische Diagnose und Differentialdiagnose.* 2. Auflage. Springer Verlag. Berlin. 2003. 637-639
- 30 Lau YS, Adamopaulos IE, Sabokbar A, Giele H, Gibbons CL, Athanasou NA. Cellular and humoral mechanisms of osteoclast formation in Ewing's sarcoma. *Br J Cancer* 2007;96:1716-22
- 31 Jaffe JLL,Poartis R. Giant cell tumor of bone – its pathologic appearance, grading, supposed variants and treatment. *Arch Pathol* 1940;30:993–1031

- 32 Horton MA, Lewis D, McNulty K, Pringle JA, Chambers TJ. Monoclonal antibodies to osteoclastomas (giant cell bone tumors): definition of osteoclast-specific cellular antigens. *Cancer Res* 1985;45:5663–5669
- 33 Komiya S., Sasaguri Y., Inoue A., Nakashima M., Yamamoto S., Yanagida I., Morimatsu M. Characterization of cells cultured from human giant-cell tumors of bone. Phenotypic relationship to the monocyte-macrophage and osteoclast. *Clin Orthop* 1990;258:304–309
- 34 Lee MJ, Sallomi DF, Munk PL, Janzen DL, Connell DG, O'Connell JX, Logan PM, Masri BA. Pictorial review: giant cell tumours of bone. *Clin Radiol* 1998;53:481–489
- 35 Delling G. Skelettsystem. In: Remmele W (Hrsg) *Pathologie. Band 5.* Springer Verlag. Berlin. 1997. 263–382
- 36 Steven L. Teitelbaum. Osteoclasts: What do they do and how do they do it? *AJP* 2007;170:427–435
- 37 Carrasco, C.H. and Murray, J.A. Giant cell tumors. *Orthop Clin North Am* 1989;20:395–405
- 38 Mundy GR. Metastasis to bone: causes, consequences and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer* 2002;2:584–93
- 39 Clark PE, Torti FM. Prostate cancer and bone metastases: medical treatment. *Clin Orthop* 2003;415:148–57
- 40 Roodman GD. Mechanisms of bone metastasis. *N Engl J Med* 2004;350:1655–64
- 41 Van der Pluijm G, Sijmons B, Vloedgraven H, Deckers M, Papapoulos S, Lowik C. Monitoring metastatic behavior of human tumor cells in mice with species-specific polymerase chain reaction: elevated expression of angiogenesis and bone resorption stimulators by breast cancer in bone metastases. *J Bone Miner Res* 2001;16:1077–91
- 42 Hans Helge Bartsch, W. Frhr.v. Hornstein. *Interdisziplinäre Schmerztherapie bei Tumorkranken: Strategien der Akut- und Langzeitbehandlung.* 1998. 21–24
- 43 Coleman RE, Seaman JJ. The role of zoledronic acid in cancer: clinical studies in the treatment and prevention of bone metastases. *Semin Oncol* 2001;6:11–6
- 44 Charhon SA, Chapuy MC, Delvin EE, Valentin-Opran A, Edouard CM, Meunier PJ. Histomorphometric analysis of sclerotic bone metastases from prostatic carcinoma special reference to osteomalacia. *Cancer* 1983;51:918–24
- 45 Roland Stumberger. *Entwicklung der Grundlagen für die Identifizierung und Charakterisierung von Osteoklasten mittels neuer Zellerkennungstechnologie.* 2010; Universität Wien

9 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

- Abbildung 1: Osteogenese ⁸
- Abbildung 2: Entstehung und Aktivierung der Osteoklasten ⁵
- Abbildung 3: Direkte Methode der Immunfluoreszenzfärbung
- Abbildung 4: Indirekte Methode der Immunfluoreszenzfärbung
- Abbildung 5: Vierfachfärbung von Osteoklasten und ihren Vorläuferzellen in einer Knochemarkszellkultur
- Abbildung 6: Vierfachfärbung der Osteoklasten und ihren Vorläuferzellen in einer Knochenmarkszellkultur
- Abbildung 7: Vierfachfärbung der Osteoklasten und ihren Vorläuferzellen (Nachweis vom Calcitoninrezeptor, α -Tubulin und Makrophagenantigen)
- Abbildung 8: Vierfachfärbung der Osteoklasten und ihren Vorläuferzellen (Nachweis Calcitoninrezeptor, α -Tubulin und Makrophagenantigen)
- Abbildung 9: Doppelfärbung zum Nachweis des Calcitoninrezeptors und des Makrophagenantigens in Osteoklasten
- Abbildung 10: Doppelfärbung der Osteoklasten in Zellkulturen: 2 benachbarte Riesenosteoklasten mit bis zu 50 Zellkernen
- Abbildung 11: Doppelfärbung der Osteoklasten: Zwei aneinander grenzende Riesenosteoklasten
- Abbildung 12: Doppelfärbung der Osteoklasten in Zellkulturen: Ausschnitt aus einem Riesenosteoklasten
- Abbildung 13: Doppelfärbung der Osteoklasten in Zellkulturen: Riesenosteoklast mit 13 und ein kleiner Osteoklast mit 7 Zellkernen
- Abbildung 14: Parallelfärbung der Osteoklasten in Zellkulturen: Kleine Osteoklasten mit wenigen Zellkernen
- Abbildung 15: Parallelfärbung der Osteoklasten in Zellkulturen: Osteoklasten mit einer ungewöhnlichen schmalen und länglichen Struktur

10 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1:	Liste der verwendeten Primärantikörper
Tabelle 2:	Liste der verwendeten Sekundärantikörper
Tabelle 3:	Medienzusätze
Tabelle 4:	Versuchsreihen

11 CURRICULUM VITAE

Persönliche Daten

Name: Ayse Okay
Adresse: Hildebrandgasse 15/10, 1180 Wien
Geburtsdaten: Wien 19/12/1984
Staatsangehörigkeit: Österreich
Eltern: Ismet und Zeynep Okay
Geschwister: Hüseyin und Veysel Okay

Ausbildung:

1991-1995 Volksschule,
Marktgasse 31-35, 1090 Wien
1995-2003 Erich Fried Bundesrealgymnasium,
Glasergasse 25, 1090 Wien
08.10.2003 Matura
2004-2011 Pharmaziestudium, Universität Wien

Arbeitserfahrungen:

01.09.2003 – 30.09.2005: Verkäuferin, Hühnerparadies KEG
Grundlgasse 5, 1090 Wien
01.03.2006 – 23.05.2006: Angestellte, Anton Schlecker
Gesellschaft m.b.H.
Anton Schlecker Strasse 1, 4055 Pucking
Seit 01.03.2011 : Geringfügig Beschäftigte,
Apotheke zum heiligen Ägidius
Gumpendorferstrasse 105, 1060 Wien