



universität
wien

DIPLOMARBEIT / DIPLOMA THESIS

Titel der Diplomarbeit / Title of the Diploma Thesis

„Wirkung von Silizium und Strontium dotierten
Hydroxylapatitnanopartikel auf Mauszellen *in vitro*“

verfasst von / submitted by

Nina Lackner

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree
of

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2018 / Vienna, 2018

Studienkennzahl lt. Studienblatt /
degree programme code as it appears on
the student record sheet:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt /
degree programme as it appears on
the student record sheet:

Diplomstudium Pharmazie

Betreut von / Supervisor

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

Eidesstattliche Erklärung

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

Die Arbeit wurde bisher in gleicher oder ähnlicher Form keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und auch noch nicht veröffentlicht.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all jenen Menschen danken, die durch ihre fachliche und persönliche Unterstützung zum Gelingen dieser Diplomarbeit beigetragen haben.

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Univ. Prof. Mag. Dr. Oskar Hoffmann für die Möglichkeit in seinem Labor arbeiten zu dürfen sowie für die Bereitstellung des Themas meiner Diplomarbeit als auch für die Aufwendung der für meine Arbeit benötigten Mitteln und Materialien bedanken. Weiterhin gilt ein großer Dank Frau Mag. Carina Kamleitner, die mich während meiner praktischen Arbeit angeleitet und unterstützt hat und sich die Mühe machte jede meiner Fragen – ob fachlich oder organisatorisch – zu beantworten. Auch Frau Barbara Berger und Herr Peter Höflich haben maßgeblich daran mitgewirkt, dass diese Diplomarbeit nun in dieser Form vorliegt. Vielen Dank, für die hervorragende Einschulung und die tatkräftige Unterstützung im weiteren Verlauf meiner praktischen Arbeit.

Daneben gilt mein Dank meiner Großmutter Dr. Grete Kloyber, die diese Diplomarbeit Korrektur gelesen hat. Sie konnte als fachfremde Person immer wieder aufzeigen, wo noch Erklärungsbedarf bestand. Nicht zuletzt gebührt meinen Eltern Dank, ohne die vorliegende Arbeit schon im Vorhinein niemals zustande gekommen wäre.

Abkürzungen

β-GP	β-Glycerophosphat
ALP	alkalische Phosphatase
ANOVA	analysis of variance, Varianzanalyse
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat
BMP	bone morphogenic protein, knochenmorphogenetisches Protein
BSP-II	Knochen-Sialoprotein II
Ca ²⁺	Kalzium
CaSR	calcium sensing receptor
cDNA	copy Desoxyribonukleinsäure, komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Col1A1	Typ 1A1 Kollagen
d3	day 3, Tag 3
d7	day 7, Tag 7
d14	day 14, Tag 14
DIFMU	6,8-Difluoro-4-Methylumbelliferyl
DIFMUP	6,8-Difluoro-4-Methylumbelliferyl-Phospat
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
et al.	et alii, et aliae, und andere
FADH	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FMNH	Flavin-Mononukleotid
FCS HI	hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
Gly	Glycin
HA	Hydroxylapatit
IGF	insulin-like growth factors, Insulinähnliche Wachstumsfaktoren
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KM	Kulturmedium
M-CSF	macrophage colony-stimulating factor, Monozytenkolonien-stimulierender Faktor
MEM	Minimal Essential Medium Eagle
Mg ²⁺	Mineralisationsmedium
MM	Mineralisationsmedium
MMix	Mastermix
MSC	Mesenchymale Stammzelle

Na-Citrat... Natriumcitrat, Natriumzitat
 NaCl Natriumchlorid
 NAD⁺ Nicotinamidadenindinukleotid, oxidierte Form
 NADH Nicotinamidadenindinukleotid, reduzierte Form
 NADPH.... Nicotinamidadenindinukleotidphosphat, reduzierte Form
 Na₂HPO₄ .. Dinatriumhydrogenphosphat
 NBT Nitroblau Tetrazolium
 NF-κB nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
 NP Nanopartikel
 OB Osteoblasten
 OC Osteoclasten
 OCN Osteocalcin
 OPG Osteoprotegerin
 Osx Osterix
 PBS phosphatgepufferte Salzlösung ohne Kalzium und Magnesium
 PCL Polycaprolakton
 PGL Polyglykolsäure
 PLA Polylakid
 P/S Penicillin/Streptomycin
 qRT-PCR.. quantitative Real-Time polymerase chain reaction
 RANK receptor activator of nuclear factor κB
 RANKL receptor activator of nuclear factor κB ligand
 RGD Arginin-Glycin-Asparaginsäure
 RNA Ribonukleinsäure
 RNase Ribonuklease
 Runx2 Runt-related transcription factor 2
 siHA-NP ... Silizium dotierte Hydroxylapatitnanopartikel
 srHA-NP ... Strontium dotierte Hydroxylapatitnanopartikel
 siRNA small interfering ribonucleic acid, kleine eingreifende Ribonukleinsäure
 SYBR Synergy Brands
 TGFβ transforming growth factor-β
 TRAP tartrate-resistant acid phosphate
 Tween 20.. Polysorbat 20
 Vit. C Vitamin C, Ascorbinsäure
 Wnt wingless Int 1
 Wt % weight percent, Gewichtsprozent

Inhaltsverzeichnis

Eidesstattliche Erklärung	3
Danksagung	4
Abkürzungen	5
Inhaltsverzeichnis	7
Zielsetzung	10
1 Einleitung	11
1.1 Anatomie und Funktion des Knochens	11
1.1.1 Makroskopischer Knochenaufbau	11
1.1.2 Mikroskopischer Knochenaufbau	11
1.1.3 Knochenaufbau auf der Nanometerdimension	12
1.2 Knochenumbau	13
1.3 Knochenzellen	15
1.3.1 Osteoklasten	15
1.3.2 Osteoblasten	16
1.3.3 Osteozyten und Saumzellen	17
1.4 Knochen-Tissue Engineering	18
1.4.1 "Scaffold"-basiertes Knochen-Tissue Engineering	19
1.4.2 Biomaterialien im Knochen-Tissue Engineering	20
1.4.3 Nanotechnologie im Knochen-Tissue Engineering	22
1.4.4 Hydroxylapatitnanopartikel	24
1.4.5 Die Rolle von Silizium und Strontium in der Knochenregeneration	26
2 Materialien und Reagenzien	28
2.1 Geräte	28
2.2 Materialien	29
2.3 Substanzen	30
2.4 Reagenzienherstellung	32
2.4.1 β -Glycerophosphat-Stammlösung (100x β -GP)	32
2.4.2 Ascorbinsäure-Stammlösung (100x Vit.C)	32
2.4.3 BCIP/NBT-Farbreagens	32
2.4.4 CyQuant Färbelösung (10x)	32
2.4.5 CyQuant Zellyse Puffer (1x)	32
2.4.6 CyQuant Zellyse Puffer/ALP Puffer (1:2)	32
2.4.7 DiFMUP Lösung (200 μ M)	33
2.4.8 DNase Inkubationsmix	33
2.4.9 DNase Stammlösung	33
2.4.10 70% Ethanolösung (RNase-frei)	33
2.4.11 3,7% Formaldehydlösung	33
2.4.12 Kahle Lösung	33
2.4.13 Mastermix (MMix)	34
2.4.14 2% Natriumzitatrlösung	34
2.4.15 Phosphatgepufferte Salzlösung ohne Kalzium und Magnesium	34

2.4.16	RLT-Puffer/Mercaptoethanol-Lösung	34
2.4.17	Waschpuffer	35
2.5	Medienbereitung	35
2.5.1	Kulturmedium	35
2.5.2	Mineralisationsmedium	35
3	Methoden.....	36
3.1	Isolierung und Kultivierung primärer Osteoblasten	36
3.2	Getestete Nanopartikel	36
3.2.1	Vorbehandlung der Nanopartikel	36
3.3	Presto Blue Bestimmung	38
3.4	Untersuchung der Osteoblastendifferenzierung.....	39
3.4.1	Färbung der alkalischen Phosphatase	39
3.4.2	Quantifizierung der alkalischen Phosphatase.....	40
3.4.2.1	Bestimmung der Zellzahl mittels CyQuant Proliferation Assay Kit.....	41
3.5	Sirius Red/Fast Green Färbung	43
3.6	qRT-PCR.....	44
3.6.1.1	Zelllyse.....	44
3.6.1.2	Extraktion und Aufreinigung der RNA.....	44
3.6.1.3	Umschreiben der RNA in cDNA	45
3.6.1.4	Vermessung und Auswertung	46
3.6.1.5	Prinzip der qRT-PCR	47
3.6.2	Statistische Auswertung	49
4	Resultate	50
4.1	Kurzzeiteffekte der Nanopartikel unter Zusatz von Mineralisationsmedium	50
4.1.1	Versuchsaufbau	50
4.1.2	Einfluss der Silizium dotierten Hydroxylapatitnanopartikel auf die Zellviabilität.....	52
4.1.3	Einfluss der Strontium dotierten Hydroxylapatitnanopartikel auf die Zellviabilität..	53
4.1.4	Einfluss der Silizium dotierten Hydroxylapatitnanopartikel auf die Osteoblastendifferenzierung.....	54
4.1.5	Einfluss der Strontium dotierten Hydroxylapatitnanopartikel auf die Osteoblastendifferenzierung.....	55
4.1.6	Einfluss der Silizium dotierte Hydroxylapatitnanopartikel auf die Mineralisation der Osteoblasten.....	57
4.1.7	Einfluss der Strontium dotierte Hydroxylapatitnanopartikel auf die Mineralisation der Osteoblasten.....	58
4.1.8	Einfluss der Nanopartikel auf die Genexpression der Osteoblasten.....	59
4.1.8.1	Einfluss der Nanopartikel auf die Runx-2-Expression	59
4.1.8.2	Einfluss der Nanopartikel auf die Kollagen-1A1-Expression.....	60
4.1.8.3	Einfluss der Nanopartikel auf die ALP-Expression.....	61
4.1.8.4	Einfluss der Nanopartikel auf die OCN-Expression.....	61
4.2	Langzeiteffekte der Nanopartikel ohne Zusatz von Mineralisationsmedium.....	62
4.2.1	Einfluss der Nanopartikel auf die Osteoblastendifferenzierung	63
5	Diskussion.....	64

6	Zusammenfassung	69
7	Abstract.....	70
8	Literaturverzeichnis.....	71
9	Abbildungsverzeichnis.....	74
10	Tabellenverzeichnis.....	75

Zielsetzung

Die Therapie von Knochendefekten stellt die Medizin vor große Probleme, da die derzeit üblichen Implantationsmethoden eine Reihe von Nachteilen aufweisen. Einerseits bestehen Herausforderungen hinsichtlich der Verfügbarkeit von Implantaten, andererseits birgt jede Transplantation ein hohes Risiko für Abstoßungsreaktionen.

Synthetisch hergestelltes Hydroxylapatit ist dem natürlichen Knochenmineral sehr ähnlich und besitzt osteoinduktive sowie osteokonduktive Eigenschaften. Daher kann Hydroxylapatit als Biomaterial im Knochen-Tissue Engineering eingesetzt werden. Ziel des Knochen-Tissue Engineering ist die Entwicklung von Knochenersatzmaterialien, die die Reparatur und Regeneration von Knochendefekten ermöglichen sollen. Durch die Erzeugung von Strukturen auf der Nanometerdimension oder das Einbringen bioaktiver Nanopartikel können die osteoinduktiven und osteokonduktiven Eigenschaften eines Biomaterials verbessert werden und damit auch die Integration eines Biomaterials im Knochendefekt. Grundvoraussetzung für die Anwendbarkeit eines Biomaterials im Knochen-Tissue Engineering sind fördernde Effekte auf die Proliferation, Differenzierung und Aktivität der knochenbauenden Osteoblasten.

Die vorliegende Arbeit soll die Wirkung von Silizium und Strontium dotierten Hydroxylapatitnanopartikel auf Osteoblasten *in vitro* untersuchen. Es wurden vier unterschiedliche Konzentrationen der beiden Nanopartikelsorten getestet. Die Effekte der Nanopartikel auf die Viabilität, Differenzierung und Aktivität der Osteoblasten wurden überprüft. Zudem war geplant die Veränderungen in der Expression wichtiger Differenzierungsmarker der Zellen zu untersuchen.

1 Einleitung

1.1 Anatomie und Funktion des Knochens

Das Knochengewebe kann als spezialisiertes Bindegewebe, dessen extrazelluläre Matrix mineralisiert vorliegt, angesehen werden. Durch seine extrazelluläre Kalzifikation wird dem Knochen seine besonders hohe Stabilität und Festigkeit verliehen, die es ihm ermöglicht seine Funktionen im Organismus zu erfüllen. So dient das Skelett als strukturelle Stütze des Körpers und als Schutz der inneren Organe vor mechanischer Einwirkung. Außerdem kann über die Anheftung des Muskelgewebes an den Knochen die Fortbewegung des Körpers bewerkstelligt werden. Durch den Aufbau und Abbau des Knochengewebes kann zudem die Regulation des Mineralstoffwechsels, sowie des Säure- und Basen-Haushaltes bewirkt werden. Das Skelett beherbergt außerdem das Knochenmark, das eine zentrale Rolle in der Hämatopoese einnimmt (Florencio-Silva et al., 2015).

1.1.1 Makroskopischer Knochenaufbau

Das Knochengewebe des erwachsenen, menschlichen Skeletts kann makroskopisch in kortikales und trabekuläres Gewebe unterteilt werden. Der kortikale Knochen macht in etwa 80% der gesamten Knochenmasse aus und zeichnet sich durch seine hohe Dichte und seinen hohen Mineralisationsgrad aus. Daher weist er eine hohe Resistenz gegenüber mechanischer Beanspruchung auf und trägt wesentlich zur mechanischen Stabilität sowie zur Schutzfunktion des Skelettes bei. Das trabekuläre Knochengewebe hat einen relativen Anteil von 20% an der Skelettmasse. Es ist weniger kompakt, aber elastischer und weist eine höhere Knochenumsatzrate auf. Folglich hat es metabolische Funktion und stellt die Kalziumversorgung sicher, sobald ein akutes Defizit vorliegt (Hadjidakis und Androulakis, 2006).

1.1.2 Mikroskopischer Knochenaufbau

Mikroskopisch betrachtet sind sowohl das kortikale als auch das trabekuläre Knochengewebe aus immer gleich strukturierten, sich wiederholenden Einheiten aufgebaut. Eine solche Einheit wird als Osteon bezeichnet. Im Zentrum eines kortikalen Osteons befindet sich der sogenannte Haver'sche Kanal, der Blutgefäße sowie Nervenstränge beherbergt. Rund um diesen Kanal sind Knochenlamellen in Form von konzentrischen Kreisen angeordnet. Innerhalb dieser Lamellen befinden sich Hohlräume, sogenannte Lakunen, von denen kleine Knochenkanäle (Canaliculi)

ausgehen, die mit Knochenkanälen anderer Osteone zusammentreffen, sodass sich ein Netzwerk von Hohlräumen innerhalb des Knochens ausbildet. Die Lakunen, sowie Knochenkanäle werden von Osteozyten gebildet (Fuchs et al., 2009).

Während das kortikale Osteon eine zylindrische Form besitzt, ist das trabekuläre Osteon halbmondförmig (Clarke, 2008). Diese Form entsteht, da die Knochenlamellen im trabekulären Osteon nicht konzentrisch um einen Kanal angeordnet sind, sondern parallel zueinander verlaufen (Hadjidakis und Androulakis, 2006).

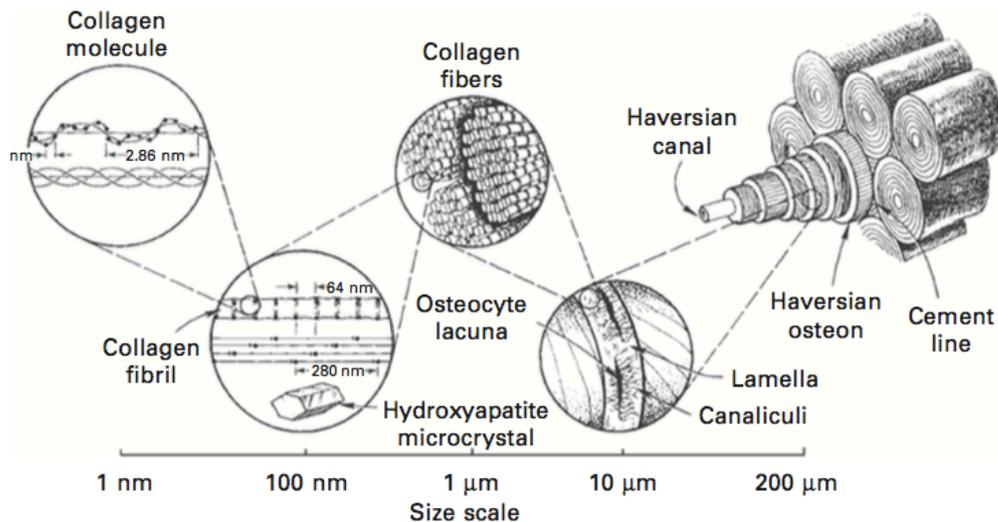


Abb. 1: mikroskopischer Aufbau des Knochengewebes (Fuchs et al., 2009)

Ein Osteon besteht aus Knochenlamellen, in denen sich Canaliculi befinden. Knochenlamellen bestehen aus Kollagenfasern, die durch eine Zusammenlagerung von Kollagenfibrillen gebildet werden. Zwischen den Kollagenfibrillen lagern sich Apatitkristalle ein. Ein Osteon wird durch eine Zementlinie von anderen Osteonen abgegrenzt. In der Mitte eines Osteons befindet sich der Haver'sche Kanal durch den Blutgefäße und Nervenbahnen verlaufen (Fuchs et al., 2009).

1.1.3 Knochenaufbau auf der Nanometerdimension

Neben der makroskopischen und mikroskopischen Struktur ist die Zusammensetzung des Knochens auf der Nanometerdimension interessant, da auf dieser Ebene Zellen und Moleküle mit ihrer biologischen Umgebung interagieren. Die extrazelluläre Matrix, die den umgebenden Zellen als strukturelle und biochemische Stütze dient, weist eine streng hierarchische Anordnung auf, die von der Nanometerdimension bis in den Zentimeterbereich reicht (Wang et al., 2016).

Auf der Nanometerdimension besteht die extrazelluläre Matrix des Knochens zu 10-30% aus organischen Komponenten, also aus streng hierarchisch angeordneten Typ 1 Kollagenfibrillen, sowie aus nicht-kollagenösen Proteinen, wie etwa Osteocalcin und Osteopontin. Zu 70-90% besteht der Knochen aus anorganischem Apatitmineral. Infolge seiner Zusammensetzung kann das Knochengewebe auch als Nanoverbundmaterial, bestehend aus einem organischen und einem anorganischen Anteil, angesehen werden.

Während die organische Matrix dem Knochen vor allem hohe Belastbarkeit verleiht, sind die nanokristallinen, mineralischen Komponenten für die hohe Festigkeit und Steifheit des Knochens verantwortlich (Ren et al., 2015)

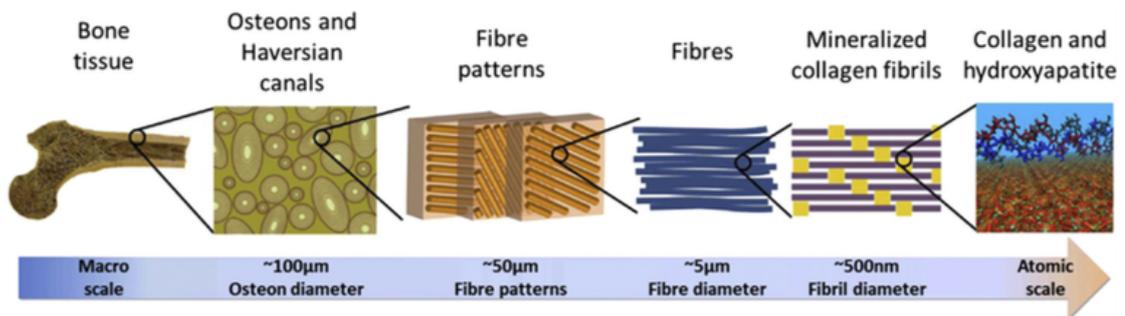


Abb. 2: hierarchischer Aufbau des Knochengewebes vom makroskopischen Knochengewebe bis zu Kollagenmolekülen und Hydroxylapatit auf der Nanometerdimension (Wang und Yeung, 2017)

1.2 Knochenumbau

Das Knochengewebe zeichnet sich durch seine hohe Stabilität und Festigkeit aus. Nichtsdestotrotz ist es auch ein sehr dynamisches Gewebe. Die Dynamik des Knochens zeigt sich vor allem während der Knochenneubildung, der Knochenmodellierung sowie des Knochenumbaus. Diese Prozesse dienen dazu, während des Körperwachstums Knochen aufzubauen, die Stabilität des Knochens an bestehende Belastungen anzupassen, das vorhandene Knochengewebe zu erhalten, sowie den Mineralhaushalt des Körpers aufrecht zu erhalten (Rucci, 2008).

Bei dem Auftreten von Mikrofrakturen oder bei hoher mechanischer Belastung setzt im gesunden Skelett der Knochenumbau ein. Der Knochenumbau ist ein Prozess, bei dem kontinuierlich einzelne Areale an altem Knochen abgebaut werden und durch eine neu synthetisierte Osteoidmatrix, die anschließend kalzifiziert wird, ersetzt wird. Dieser Prozess läuft in vier aufeinanderfolgende Phasen ab, die als Aktivierungs-, Resorptions-, Umkehr- und Anbauphase bezeichnet werden (Clarke, 2008).

Der Knochenumbau startet mit der Aktivierungsphase, in der es zur Differenzierung und Aktivierung von knochenresorbierenden Osteoklasten (OC) kommt. Die Signale, die diese Aktivierungsphase einleiten, können hormoneller Art sein, wie etwa Östrogen oder Parathormon. Andererseits können starke mechanische Belastungen, die über biochemische Signale von Osteozyten wahrgenommen werden, Auslöser für die Aktivierungsphase sein (Katsimbri, 2017).

In der darauffolgenden Resorptionsphase lagern sich die mehrkernigen, reifen OC über Integrine an die Knochenmatrix an (Hadjidakis und Androulakis, 2006). Bei Integrinen handelt es sich um Anheftungsproteine, die die sogenannte RGD-Sequenz von Matrixproteinen als potentielle Anheftungsstelle erkennen. Die RGD-Sequenz ist eine

Aminosäureabfolge aus Arginin, Glycin und Asparagin (Clarke, 2008). Auf die Anheftung an die Knochenmatrix folgt die Polarisierung der OC. Durch eine Neuordnung ihres Zytoskeletts bilden diese Zellen eine apikale und eine basolaterale Seite aus. Dabei steht die apikale Seite in direktem Kontakt zur Knochenmatrix. An dieser Seite wird der sogenannte Bürstensaum ausgebildet. Dieser stellt das resorbierende Organ der OC dar. Dagegen steht die basolaterale Seite der OC nicht in direktem Kontakt mit der Knochenmatrix. Sobald die OC polarisiert vorliegen, beginnen sie mit dem Abbau des Knochens. Dabei setzen sie Salzsäure frei, die den pH-Wert innerhalb des Aktinrings herabsetzt, wodurch die anorganische Phase der Knochenmatrix mobilisiert wird. Gleichzeitig werden auch lysosomale Enzyme wie TRAP, Matrixmetalloproteinase-9 und Cathepsin K über den Bürstensaum in die entstehende Resorptionslücke sezerniert. Diese bauen die organische Matrix des Knochengewebes ab. Die bei diesen Prozessen freiwerdenden Abbauprodukte werden über Endozytose in die OC aufgenommen und an die basolaterale Seite transportiert. Am Ende der Resorptionsphase findet sich anstelle des alten Knochengewebes eine Resorptionslücke und die OC werden in die Apoptose geschickt (Florencio-Silva et al., 2015).

Auf die Resorptionsphase folgt eine Umschaltphase, in der die Knochenresorption abgebrochen wird und gleichzeitig Osteoblasten (OB) für die nachfolgende Knochenneubildung rekrutiert werden. In dieser Phase bereiten monozytäre Zellen die Knochenoberfläche innerhalb der Resorptionslücke für die anschließende Anbauphase vor. Gleichzeitig setzen diese Zellen Signalproteine frei, die die Osteoblastendifferenzierung und -migration einleiten (Hadjidakis und Androulakis, 2006). Die Anbauphase des Knochenbaus dient dazu, die Resorptionslücke mit neuer Knochensubstanz aufzufüllen. Zu diesem Zweck produzieren OB große Mengen an Kollagenen, allen voran Kollagen vom Typ 1, sowie nicht-kollagenöse Proteine wie Osteocalcin, Osteopontin, Osteonectin, BSP II. Diese Proteine lagern sich in der Resorptionslücke ab und bilden dadurch die organische Grundsubstanz des Knochengewebes, das sogenannte Osteoid (Rucci, 2008). In weiterer Folge findet die Mineralisation (Kalzifikation) der organischen Grundsubstanz statt. Diese verleiht dem Osteoidgewebe die für den Knochen notwendige Festigkeit und Stabilität. Dabei werden Apatitkristalle im Osteoidgewebe eingelagert. Dieser Prozess wird ebenfalls von OB reguliert, indem sie kleine, membrangebundene Vesikel freisetzen, innerhalb derer Kalzium- sowie Phosphationen konzentriert vorliegen. Gleichzeitig sezernieren sie Enzyme, die diverse Inhibitoren der Mineralisation, allem voran Proteoglykane und Pyrophosphat, abbauen (Clarke, 2008).

Nach erfolgter Knochenneubildung wird ein Großteil der OB in die Apoptose geschickt. Ein weiterer Anteil dieser Zellen lagert sich an der Oberfläche der neu synthetisierten

Knochenmatrix ab und differenziert zu Saumzellen. Dagegen werden manche OB schon während der Anbauphase in die gerade entstehende Matrix eingebettet und differenzieren dort zu Osteozyten (Robling et al., 2006).

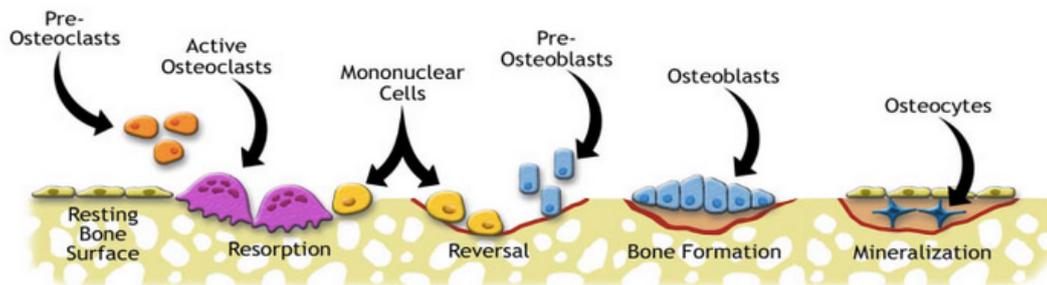


Abb. 3: schematische Darstellung des Knochenumbaus

Nach Auftreten einer Mikrofraktur startet der Knochenumbau mit der Resorptionsphase, in der OC das alte Knochengewebe abbauen. In der darauffolgenden Umkehrphase bereiten monozytäre Zellen die entstandene Resorptionslücke auf die Knochenneubildung vor. Zeitgleich werden auch OB rekrutiert. In der Anbauphase bilden und sezernieren die OB zunächst die organische Matrix des Knochens. Zum Schluss erfolgt eine Mineralisation des Osteoidgewebes (Rucci, 2008).

1.3 Knochenzellen

1.3.1 Osteoklasten

Bei Osteoklasten (OC) handelt es sich um knochenresorbierende, mehrkernige Riesenzellen, die sich unter dem Einfluss verschiedener Faktoren aus hämatopoetischen Stammzellen entwickeln. Zu Beginn der Osteoklastogenese werden aus den hämatopoetischen Stammzellen, die aus dem Knochenmark und der Milz stammen, einkernige Präosteoklasten gebildet. Dies geschieht unter dem Einfluss des Wachstumsfaktors M-CSF, der von Osteozyten, Osteoblasten sowie deren Vorstufen, synthetisiert wird. Über den Blutkreislauf gelangen Präosteoklasten in die Nähe eines Knochenareals, das resorbiert werden soll und fusionieren dort zu mehrkernigen, reifen OC. Dieser Differenzierungsschritt erfordert unter anderem die Anwesenheit von M-CSF sowie die Expression des RANK-Liganden an der Oberfläche von OB, deren Vorstufen oder Bindegewebszellen. Der reife OC produziert unter anderem TRAP, ein Enzym das am Knochenabbau beteiligt ist und das einen frühen Marker der Osteoklastendifferenzierung darstellt. In einem letzten Schritt kommt es ausgelöst durch eine Interaktion der OC mit der Knochenmatrix zur Aktivierung der OC (Robling et al., 2006).

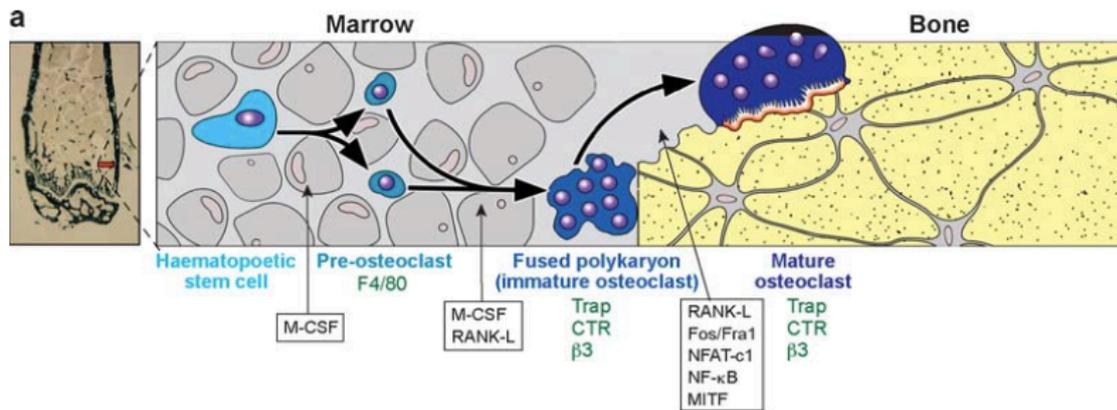


Abb. 4: Osteoklastendifferenzierung (Robling et al., 2006)
 Zunächst entstehen einkernige Präosteoblasten aus hämatopoetischen Stammzellen in Anwesenheit von molekularer Signalstoffe, vor allem M-CSF. Unter dem Einfluss von Faktoren wie RANKL, fusionieren Präosteoklasten zu reifen, mehrkernigen OC. Zuletzt findet eine Aktivierung der OC statt (Robling et al., 2006).

Die Interaktion des RANK-Liganden mit dem RANK-Rezeptor der OC ist für deren Differenzierung entscheidend. OB sowie Bindegewebszellen sind in der Lage, die Osteoklastendifferenzierung über diesen Faktor zu steuern. Dabei können sie einerseits die Expression des RANK-Liganden an ihrer Oberfläche variieren, andererseits können sie über die Freisetzung von Osteoprotegerin die Bindung des RANK-Liganden an seinen Rezeptor beeinflussen. Osteoprotegerin fungiert als löslicher Rezeptor des RANK-Liganden und bindet diesen, sodass seine Bindungsstelle nicht mehr für die Interaktion mit dem RANK-Rezeptor der Osteoklastenvorstufen zur Verfügung steht. In der Folge nimmt die Knochenresorption ab (Rucci, 2008)

1.3.2 Osteoblasten

Osteoblasten (OB) sind knochenaufbauende, einkernige Zellen, die sich aus mesenchymalen Stammzellen (MSC) entwickeln. Die Osteoblastogenese startet mit der Proliferation der MSC in der Knocheninnenhaut sowie im Knochenmark. In diesem Stadium können neben OB auch Myozyten, Adipozyten oder Chondrozyten entstehen. Erst durch die Expression von Transkriptionsfaktoren wie etwa Runx-2 wird festgelegt, dass die Differenzierung in Richtung Osteoblastenlinie fortschreiten soll. Dabei bilden sich sogenannte Präosteoblasten aus. Zur Bildung des reifen OB ist die Anwesenheit von Runx-2, Osterix sowie verschiedenen Faktoren des Wnt-Signalweges erforderlich (Robling et al., 2006). Der reife OB zeichnet sich durch sein kubisches Erscheinungsbild aus. Dieses sowie das Vorhandensein zahlreicher endoplasmatischer Retikuli macht klar, dass seine Hauptaufgabe in der Synthese und Sekretion von Proteinen besteht (Florencio-Silva et al., 2015). Diese Zellen stellen unter anderem Kollagen Typ I, Osteocalcin und

das Enzym alkalische Phosphatase her. Diese Proteine können als Marker der Osteoblastendifferenzierung und –aktivität verwendet werden (Robling et al., 2006).

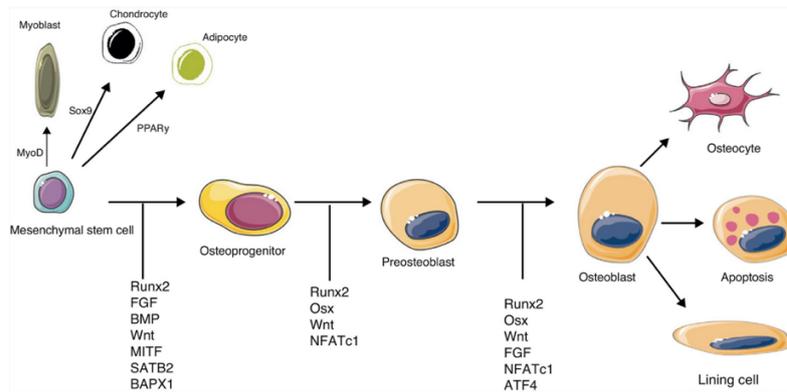


Abb. 5: Osteoblastendifferenzierung (Arboleya und Castaneda, 2013)

MSC differenzieren unter dem Einfluss von Signalstoffen wie Runx-2 zu Präosteoblasten. Die Expression von Runx-2, Osterix sowie Faktoren des Wnt-Signalwegs lassen die Differenzierung zum reifen OB fortschreiten. Während oder nach dem Knochenumbau gehen die OB entweder in die Apoptose oder sie differenzieren zu Osteozyten oder Saumzellen (Robling et al., 2006).

1.3.3 Osteozyten und Saumzellen

Osteozyten sind langlebige Zellen und differenzieren aus OB, die während der Anbauphase in der Resorptionslücke zurückbleiben und von neuer Knochenmatrix umgeben werden. Sie haben im Vergleich zu den OB ein geringeres Zellvolumen sowie eine geringere Proteinsynthesekapazität. Zudem besitzen sie eine verzweigte Form und bilden Canaliculi aus, die das gesamte Knochengewebe durchziehen. Über diese Knochenkanäle können sie mit anderen Osteozyten sowie mit Saumzellen kommunizieren. Außerdem fungiert das Netzwerk aus Canaliculi als eine Art Mechanosensor. Belastungen, die auf den Knochen wirken, werden wahrgenommen und in entsprechende biochemische Signale umgewandelt, die den Knochenumbau begünstigen. So kann eine Adaption des Knochens an unterschiedliche Belastungen erfolgen. Außerdem wurde festgestellt, dass die Apoptose von Osteozyten als chemotaktisches Signal für die Knochenresorption durch OC dient (Florencio-Silva et al., 2015).

Ein weiterer Teil der OB lagert sich an der Oberfläche des neu gebildeten Knochens in Form von Saumzellen ab. Bei Saumzellen handelt es sich um abgeflachte, ruhende OB (Clarke, 2008). Sie verhindern einen direkten Kontakt zwischen OC und der Knochenmatrix und verhindern so die Knochenresorption überall dort, wo sie nicht stattfinden soll (Florencio-Silva et al., 2015).

1.4 Knochen-Tissue Engineering

Obwohl Knochengewebe in der Lage ist, Schäden ohne Narbenbildung ausheilen zu lassen, kann es vorkommen, dass eine vollständige Überbrückung eines Knochenbruchs nicht mehr möglich ist. Ob ein Defekt selbst verheilen kann oder nicht, ist abhängig vom Regenerierungspotenzial des jeweiligen Gewebes, der Stoffwechsellage innerhalb des Gewebes sowie der Defektgröße. So kann der Knochen aufgrund der Entfernung eines Tumors, eines schweren Traumas oder einer Infektion derart geschädigt sein, dass ein Ersatz des beschädigten oder fehlenden Knochengewebes notwendig wird (Holzapfel et al., 2017). Dies kann durch die Transplantation von Knochengewebe bewerkstelligt werden. Die autologe Knochentransplantation, bei der dem Patienten an einer Stelle gesundes Knochengewebe entnommen wird und dieses anschließend am Ort des Knochendefektes eingesetzt wird, wird derzeit als Goldstandard in der Therapie von schweren Knochendefekten betrachtet. Diese Methode weist allerdings eine Handvoll Nachteile auf. So können nicht unbegrenzt viele und nicht übermäßig große Knochenstücke mit dieser Methode gewonnen werden. Zudem muss der Patient an zwei Stellen gleichzeitig operiert werden, womit die Morbidität sowie das Risiko für postoperative Komplikationen erhöht ist. Alternativ wurde die allogene Knochentransplantation entwickelt. Bei diesem Vorgehen bezieht man den Spenderknochen von Leichen. Häufig wird diese Art der Transplantation bei größeren Knochendefekten angewendet. Problematisch dabei ist das hohe Risiko für Immun- oder Abstoßungsreaktionen, sowie ein hohes Potenzial für die Übertragung von Krankheitserregern, der man durch Vorbehandlung des Knochenmaterials vorbeugen will. Außerdem besteht die Möglichkeit einer xenogenen Knochentransplantation, bei der das Knochengewebe aus Tieren bezogen wird. Da bei dieser Methodik die Gefahr für die Übertragung von infektiösen Erregern und für das Auftreten von Abstoßungsreaktionen am größten ist, wird sie in der Praxis nicht angewandt (Ramesh et al., 2017).

Insbesondere die begrenzte Verfügbarkeit an Spenderknochen und die erhöhte Morbidität limitieren den Einsatz von autologen Knochentransplantaten. Zudem steigt das durchschnittliche Lebensalter der Menschen und damit auch die Anzahl der im skelettalen Bereich auftretenden Defekten. Aus diesen Gründen kann ein stetig wachsender, medizinischer Bedarf am sogenannten Knochen-Tissue Engineering verzeichnet werden (Holzapfel et al., 2017).

1.4.1 „Scaffold“-basiertes Knochen-Tissue Engineering

Beim Tissue Engineering handelt es sich um „ein fächerübergreifendes Wissenschaftsfeld, welches das Wissen aus den Fachbereichen der Biologie, Ingenieurwissenschaften und Medizin nutzt, um Biomaterialien zu entwickeln, die ein Gewebe oder eine Organfunktion ersetzen, wiederherstellen, beibehalten oder erhöhen sollen“ (Shi et al., 2010). Im Wesentlichen werden beim Tissue Engineering dreidimensionale Matrices, sogenannte Scaffolds, verwendet, die ein vorübergehendes Gerüst für Zellen und einwachsendes Gewebe darstellen sollen. Zusätzlich können Zellen isoliert, *in vitro* expandiert und anschließend auf dem Scaffold ausgesät werden. Gleichzeitig sollte der Scaffold so beschaffen, dass das Einwandern und Anheften von knochenbildenden Zellen gefördert wird. Die Zellen sollen anschließend innerhalb des Körpers nach einer Proliferations- und Differenzierungsphase neues Knochengewebe bilden. Auch das Beladen des Scaffolds mit biologischen Substanzen, wie etwa Wachstumsfaktoren, ist für die Zelldifferenzierung und Gewebeneubildung von Vorteil. Außerdem muss eine ausreichende Gefäßneubildung innerhalb des Scaffolds erfolgen, damit die notwendige Sauerstoff- und Nährstoffversorgung der Zellen gewährleistet ist (Saiz et al., 2013).

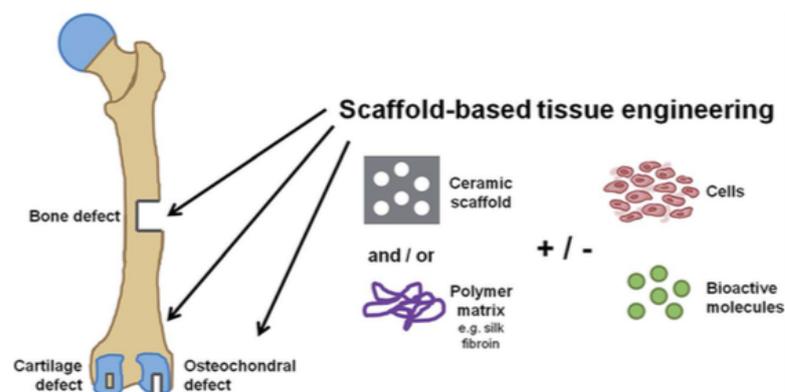


Abb. 6: Prinzip des „Scaffold“-basierten Knochen-Tissue Engineering (Li et al., 2014)

Die Basis eines Scaffolds bildet die dreidimensionale Matrix, die aus Keramikmaterialien, Polymeren oder einer Kombination dieser Materialien besteht. Osteogene Zellen werden aus dem Patienten gewonnen, *in vitro* expandiert und auf den Scaffold ausgesät und kultiviert. Zusätzlich werden bioaktive Moleküle in den Scaffold integriert, um die Knochenneubildung zu fördern. Zuletzt wird der Scaffold zusammen mit den Zellen und den bioaktiven Molekülen in den Knochendefekt implantiert (Saiz et al., 2013).

Bei der Herstellung und dem Design von Scaffolds müssen verschiedene Kriterien erfüllt werden, damit die Implantation und die Regeneration des Knochengewebes erfolgreich sind. Primär sollte das Material biokompatibel sein, das heißt das Material selbst, wie auch seine Abbauprodukte, sollte keine Abstoßungsreaktionen im Körper hervorrufen und nicht toxisch sein. Die Oberfläche des Materials sollte eine Zelladhäsion, -proliferation und -differenzierung zulassen und bestenfalls sogar fördern. Zudem ist eine ausreichende

Porosität des Materials erforderlich. Dabei müssen sowohl makroskopische als auch mikroskopische Poren vorhanden sein, die innerhalb des Scaffolds miteinander verbunden sein sollen. Dies ermöglicht eine Einwanderung von Zellen, die Bildung einer extrazellulären Matrix, sowie eine Gefäßneubildung, die die Sauerstoff- und Nährstoffversorgung der Zellen gewährleisten. Andererseits sollte das Material trotz der hohen Porosität eine gewisse mechanische Stabilität aufweisen. Ist die Stabilität zu gering, so geht die stützende Funktion des Implantats verloren. Ist die Stabilität zu hoch, so kann es durch die hohe Druckbelastung des Materials auf das umliegende Gewebe zu einer vermehrten Knochenresorption in der Umgebung des Implantats führen. In der Regel sollten Scaffolds zudem bioabbaubar sein. Dabei sollte die Degeneration des Materials derart erfolgen, dass in gleicher Weise neues natives Knochenmaterial gebildet wird wie das Scaffold abgebaut wird (Matassi et al., 2011).

1.4.2 Biomaterialien im Knochen-Tissue Engineering

Zur Herstellung von Scaffolds können bestimmte Biomaterialien verwendet werden. Unter Biomaterialien versteht man „jegliches Material, das verwendet wird, um einen Teil oder eine Funktion des Körpers auf sichere, verlässliche, ökonomische und physiologisch mögliche Weise zu ersetzen“ (Ramesh et al., 2017). Biomaterialien die als Knochengewebeersatz oder zur Knochenregeneration verwendet werden, sollten osteoinduktive und osteokonduktive Eigenschaften aufweisen. Die Osteoinduktion ist jene Eigenschaft, die es einem Material ermöglicht, die Differenzierung von Vorläuferzellen in Richtung Osteoblastenlinie zu fördern. Osteokonduktivität ist jene Eigenschaft, die das Material in die Lage versetzt, das Knochenwachstum sowie das Einwachsen von umgebenden Knochengewebe in das Material zu unterstützen. Außerdem ist das Vorhandensein von osteogenen Zellen notwendig. Osteogene Zellen sind Zellen, die in der Lage sind, neues Knochengewebe zu bilden (Griffin et al., 2016).

Biomaterialien, die in der Therapie von Knochendefekten zum Einsatz kommen können, lassen sich in die Kategorien Keramikmaterialien, Metalle, Polymere sowie Komposita unterteilen (Matassi et al., 2011).

Keramikmaterialien bestehen zumeist aus Hydroxylapatit, β -Tricalciumphosphat oder aus einer Mischung dieser Substanzen, die als biphasisches Calciumphosphat bezeichnet wird. Diese Materialien weisen eine hohe Biokompatibilität auf, da sie sowohl chemisch als auch strukturell der extrazellulären Matrix im Knochengewebe ähnlich sind und auch an diese binden können. Durch die Bindung an das umliegende Knochengewebe kann die Integration des Implantates sowie das Einwachsen des umliegenden Gewebes positiv beeinflusst werden. Ein weiterer Vorteil ist die einfache Herstellung von porösen Scaffolds.

Probleme können ihre hohe Brüchigkeit bereiten, da Keramikimplantate unter stärkerer Belastung versagen können. Zudem sind sie meist schlecht bioabbaubar, wodurch nach erfolgter Knochenneubildung Teile des Scaffolds im Körper zurückbleiben können (Matassi et al., 2011). Bioaktives Glas besitzt eine gute Bindungsaffinität zum Knochen und ist dem Hydroxylapatit in seinen Eigenschaften ähnlich. Im Gegensatz zu den meisten anderen Keramikmaterialien, besitzt es außerdem eine kontrollierbare Abbaurrate im Körper (Lee et al., 2014).

Dagegen können Metalle im Körper nicht kontrolliert abgebaut werden. Sie besitzen gute mechanische Eigenschaften und können daher auch an Stellen im Körper transplantiert werden, wo es zum Auftreten starker Belastungen kommt. Die Anwendung von Metallen kann problematisch sein, denn sie neigen zur Korrosion und können auslaugen. Titan oder Tantal sind am besten als metallische Biomaterialien geeignet, da sie sehr resistent gegenüber Korrosion sind und außerdem biokompatibel sind. Da sie jedoch inert sind und eine höhere Steifheit als das native, umliegende Knochengewebe besitzen, gelingt oft keine gute Osseointegration, was zur Implantatlockerung führen kann. Außerdem sind diese Metalle nicht abbaubar und verbleiben daher im Körper (Matassi et al., 2011).

Sehr häufig werden Polymere als Biomaterialien im Knochen-Tissue Engineering eingesetzt. Man kann entweder natürliche Polymere wie Kollagen, Fibrin, Chitosan, Alginat oder Seide verwenden, oder man erzeugt synthetische Polymere, wie Polylaktid (PLA), Polyglykolsäure (PGL), Polycaprolakton (PCL). Eine weitere Möglichkeit besteht in der Herstellung von Co-Polymeren aus natürlichen und synthetischen Polymeren. Polymere haben den Vorteil, dass sie über einfache chemische Modifikationen gut angepasst werden können. So kann man ihre Abbaurrate variieren, ihre mechanischen Eigenschaften verbessern oder ihre Biokompatibilität steigern. Generell können synthetische Polymere einfacher modifiziert werden als natürliche Polymere und besitzen eine sehr hohe Flexibilität hinsichtlich ihrer Eigenschaften, was sie zu guten Kandidaten für die Herstellung von Scaffolds macht (Matassi et al., 2011).

Außerdem kann man verschiedene Klassen von Biomaterialien vereinen, um die Nachteile der einzelnen Bestandteile zu kompensieren. Solche kombinierten Biomaterialien werden als Komposita oder Verbundstoffe bezeichnet (Lee et al., 2014). So kann man beispielsweise Keramikmaterialien mit Polymeren vereinigen. Die Polymere können die hohe Brüchigkeit und die schlechte Abbaurrate der Keramikmaterialien verbessern. Andererseits können die Keramikmaterialien die Biokompatibilität und die mechanische Stabilität der Polymere erhöhen (Matassi et al., 2011).

1.4.3 Nanotechnologie im Knochen-Tissue Engineering

Trotz der Fortschritte, die durch die Entwicklung von Biomaterialien bereits gemacht wurden, kann eine klinische Anwendung dieser Produkte nicht oder nur sehr eingeschränkt erfolgen. Ein Grund dafür ist, dass die Integration dieser Materialien im umliegenden nativen Gewebe oft nicht erfolgreich ist. Außerdem sind die mechanischen Eigenschaften oft unzureichend und es ist schwierig vorherzusagen, welche Resultate im menschlichen Körper mit diesen Materialien wirklich erzielt werden können (Saiz et al., 2013).

Um die mechanischen Eigenschaften von Biomaterialien zu verbessern und Abstoßungsreaktionen zu verhindern, stieg in den letzten Jahren das Interesse an neuen Scaffolds, die der extrazellulären Matrix des Knochengewebes ähnlicher sein sollen (Griffin et al., 2016). Die neuesten Entwicklungen in der Nanotechnologie ermöglichen es, Scaffolds zu entwickeln, die besonders hinsichtlich ihrer Nanoarchitektur dem nativen Knochengewebe ähnlicher sind als konventionelle Scaffolds (Shi et al., 2010). Es hat sich gezeigt, dass Nanomaterialien einzigartige chemische als auch physikalische Eigenschaften besitzen und sich daher im Körper anders verhalten als konventionelle Materialien. Sie können aufgrund ihrer geringen Größe einfacher an unterschiedliche Stellen im Körper gelangen. Außerdem interagieren sie aufgrund ihrer Nanostruktur und ihrer großen relativen Oberfläche stärker mit Proteinen, Zellen und Geweben. So können zum Beispiel nanostrukturierte Oberflächen die Zelladhäsion und –proliferation fördern (Wang et al., 2016).

Nanomaterialien, die im Knochen-Tissue Engineering zum Einsatz kommen können, sind dadurch gekennzeichnet, dass sie kleiner als 100 nm sind. Generell können drei Kategorien solcher Nanomaterialien unterschieden werden: Nanopartikel, bei denen alle Dimensionen unter 100 nm sind, Nanofasern, bei denen nur mehr zwei Dimensionen unter 100 nm sind und Nanoverbundmaterialien, bei denen lediglich eine Dimension unter 100 nm ist (Griffin et al., 2016).

Nanofasern bestehen aus synthetischen, natürlichen Polymeren oder aus Co-Polymeren. Sie sollen die Nanofaserstruktur der extrazellulären Matrix des nativen Knochengewebes nachahmen, um dadurch die Anheftung von osteogenen Zellen, sowie deren Migration und Proliferation auf dem Material zu fördern (Griffin et al., 2016). Neben Nanofasern können auch andere nanotopografische Strukturen, wie etwa Gitterstrukturen, Gruben oder Säulen entworfen und hergestellt werden, um die Zelladhäsion zu fördern (Shi et al., 2010).

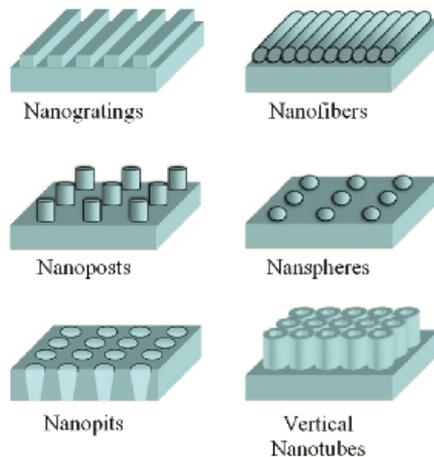


Abb. 7: nanotopografische Strukturen zur Verbesserung der Zelladhäsion (Shi et al., 2010)

In der linken Spalte von oben nach unten: Gitter, Säulen, Gruben

In der rechten Spalte von oben nach unten: Fasern, Sphäre, vertikale Röhren

Ziel der Entwicklung von Nanoverbundmaterialien ist es, ungünstige Eigenschaften eines Stoffes durch die Kombination mit einem anderen Stoff auszugleichen oder zu verbessern. Sehr oft werden dabei Keramikmaterialien wie Hydroxylapatit mit Polymeren kombiniert, um die hohe Brüchigkeit und die langsame Abbaurrate der Keramikmaterialien zu kompensieren. Gleichzeitig erhöht das Vorhandensein von Keramikmaterialien die Biokompatibilität des Nanomaterials. Außerdem werden Nanopartikel im Knochen-Tissue Engineering verwendet, da sie i) die Heilung von Knochenfrakturen unterstützen können, ii) sie wichtige zelluläre Signale für die Ossifikation zur Verfügung stellen können und iii) sie die Integration im umliegenden Gewebe fördern können (Griffin et al., 2016).

Im Bereich des Knochen-Tissue Engineering werden nanobasierte Scaffolds eingesetzt. Durch das Einbringen von Naomaterialien können die mechanischen Eigenschaften von polymerbasierten Scaffolds wesentlich verbessert werden. Zudem kann die Oberflächenstruktur im Inneren des Scaffolds auf der Nanometerebene stark verändert werden. Dies wird von osteogenen Zellen wahrgenommen, wodurch die Zelladhäsion, -migration und -proliferation am Scaffold erhöht werden kann (Saiz et al., 2013). Durch nanotopographische Modifikationen an der äußeren Oberfläche des Scaffolds, können sehr spezifische Interaktionen mit Peptiden und Proteinen im Körper erreicht werden. So kann zusätzlich die Osseointegration des Implantates verbessert werden (Zhou und Lee, 2011). In Scaffolds integrierte Nanopartikel ermöglichen die Freisetzung von Arzneistoffen oder chemischen Signalstoffen. So können über die Freisetzung von Antibiotika innerhalb des Scaffolds bakterielle Infektionen verhindert werden. Werden solche Nanopartikel mit Wachstumsfaktoren beladen, kann die Knochenzellenproliferation und -differenzierung, aber auch die Gefäßneubildung stimuliert werden (Saiz et al., 2013).

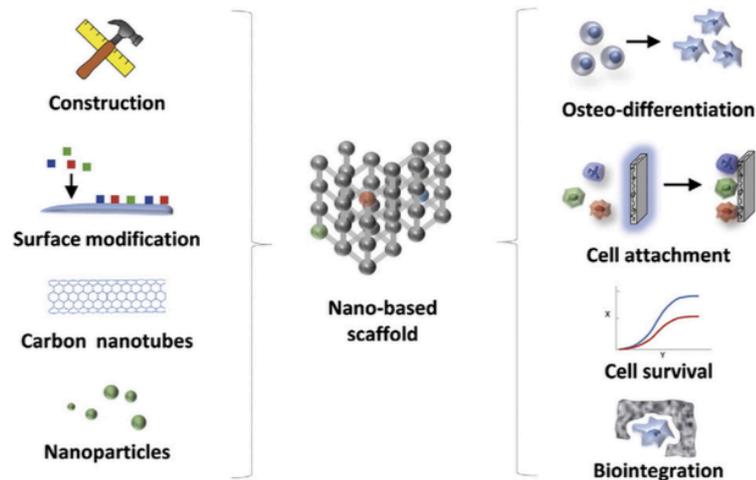


Abb. 8: Herstellung und Modifikation von nanobasierten Scaffolds (Walmsley et al., 2015)

Das zur Herstellung von Scaffolds verwendete Material hat einen großen Einfluss auf wichtige Parameter des Knochen-Tissue Engineering wie etwa i) auf das Überleben der Zellen, ii) auf die Zelladhäsion und -differenzierung sowie iii) auf die Osseointegration. Diese Parameter können auch durch Modifikationen an der Oberfläche des Scaffolds oder durch das Einbringen von Nanopartikeln verbessert werden. (Walmsley et al., 2015).

1.4.4 Hydroxylapatitnanopartikel

Wie bereits im Kapitel 1.1.3 Knochenaufbau auf der Nanometerdimension dargelegt wurde, besteht der anorganische Anteil des Knochens aus nanokristallinem, stäbchenförmigem Apatitmineral. Dieses besitzt eine Länge von etwa 25-50 nm und ist in der organischen Matrix des Knochens in einer bestimmten Anordnung eingebettet. Synthetisch hergestelltes Hydroxylapatit (HA) ist hinsichtlich seiner chemischen Struktur, sowie seinen physikalischen Eigenschaften dem natürlichen Knochenmineral sehr ähnlich. Daher weist es vorteilhafte Eigenschaften für die Verwendung als Knochenersatzmaterial auf. So besitzt Hydroxylapatit eine hohe chemische Bindungsaffinität zum nativen Knochengewebe. Außerdem ist es biokompatibel, bioaktiv und kann im menschlichen Körper mit einer vergleichsweise langsamen Abbaurate zersetzt werden. Zudem kann dieses Material die Differenzierung von osteogenen Zellen sowie das Einwachsen von umliegenden Knochengewebe aufgrund seiner guten osteoinduktiven und osteokonduktiven Eigenschaften fördern. Daher kann Hydroxylapatit als Knochenfüllmaterial oder als Überzugsmaterial für Knochenimplantate eingesetzt werden. Seine schlechten mechanischen Qualitäten verhindern jedoch seine direkte Anwendung als Implantat in Skelett-Bereichen, die hohen Belastungen ausgesetzt sind (Zhou und Lee, 2011, Loo et al., 2010).

Durch neuere Entwicklungen im Bereich der Nanotechnologie stieg in den letzten Jahren das Interesse an der Herstellung von Hydroxylapatitnanopartikeln sowie deren Einsatz in unterschiedlichsten medizinischen Anwendungsbereichen.

Im Knochen-Tissue Engineering können diese Nanopartikel auf drei Arten verwendet werden. Zunächst können sie als Freisetzungssysteme für bioaktive Substanzen eingesetzt werden. Ein weiteres Anwendungsgebiet umfasst die Markierung von Zellen, um diese *in vitro* oder *in vivo* mittels bildgebender Verfahren verfolgen zu können oder um die Zellen zu bestimmten Geweben zu lotsen. Zuletzt können die Hydroxylapatitnanopartikel auch in Scaffolds integriert werden, um die Materialeigenschaften der dreidimensionalen Matrix zu verbessern und gleichzeitig die Knochenneubildung zu fördern (Griffin et al., 2016).

Nanopartikel, die als Freisetzungssysteme für bioaktive Substanzen eingesetzt werden, haben folgende Ziele: die Geweberegeneration fördern, die Integration eines Implantates ins umliegende Gewebe erleichtern oder Infektionen, sowie Entzündungsreaktionen hemmen. Die bioaktiven Substanzen können entweder in die Nanopartikel eingeschlossen werden, oder an ihrer Oberfläche angeheftet werden und so stabilisiert werden. Außerdem können die Nanopartikel das Eintreten der Biomoleküle in Zellen erleichtern und eine kontrollierte Wirkstofffreisetzung an Zielzellen bewerkstelligen. So können schlechte pharmakokinetische Eigenschaften von Biomolekülen kompensiert und unerwünschte Wirkungen der Biomoleküle reduziert werden (Walmsley et al., 2015). Nanopartikel besitzen das Potenzial als nicht virale Vektoren zu fungieren, um die Transformation von Plasmid-DNA oder si-RNA zu erreichen. Dies könnte weitere Fortschritte in der Gentherapie bringen (Loo et al., 2010).

Außerdem können Hydroxylapatitnanopartikel mit magnetischen Ionen dotiert werden und zur Markierung von Stammzellen herangezogen werden. Anschließend können die implantierten Stammzellen mittels Magnetresonanztomographie im Körper sichtbar gemacht werden. Durch die Möglichkeit der Verfolgung von Zellen *in vitro* als auch *in vivo* könnten in weiterer Folge Methoden entwickelt werden, die es ermöglichen, die Wanderung von Zellen zu bestimmten Zielorten zu manipulieren (Griffin et al., 2016, Laranjeira et al., 2016).

Eine wichtige Anwendung von Hydroxylapatitnanopartikel, ist der Einsatz zur Konstruktion oder Strukturmodifikation von Polymer-basierten Scaffolds. Durch das Einbringen von Nanopartikel in das Scaffold kann die notwendige mechanische Festigkeit des Materials generiert werden. Zusätzlich können die Zelladhäsion und –differenzierung gefördert werden sowie die Osseointegration des Scaffolds verbessert werden (Walmsley et al., 2015).

1.4.5 Die Rolle von Silizium und Strontium in der Knochenregeneration

Silizium ist ein essentielles Spurenelement, das heißt, es ist ein Mineralstoff, der in geringen Mengen mit der Nahrung aufgenommen werden muss. Silizium kommt vor allem im Knochen- und Bindegewebe vor (Wang und Yeung, 2017). Früher nahm man an, dass Silizium zwar biokompatibel, aber auch inert sei. Spätere Studien zeigten jedoch, dass eine regelmäßige, nahrungsbedingte Aufnahme dieses Mineralstoffes positive Effekte auf die Knochendichte innerhalb menschlicher Kohorten aufwies (Beck et al., 2012). Außerdem zeigten Studien von Carlisle und Schwarz, dass ein Siliziummangel eine abnormale Knochenbildung zur Folge haben kann. Bei weiteren Untersuchungen des Spurenelements fand man heraus, dass sowohl Knochen- als auch Muskelgewebe direkt an siliziumhältige Keramikmaterialien binden und dass solche Materialien eine erhöhte Bioaktivität aufwiesen. Die erhöhte Bioaktivität zeigte sich *in vitro* in Form einer erhöhten Zelladhäsion, einer verstärkten Expression von Differenzierungsmarkern der OB und einer schnelleren Mineralisation. *In vivo* konnte durch den Einsatz von siliziumhaltigen Implantaten eine bessere Osseointegration sowie eine bessere Heilung von Knochendefekten beobachtet werden (Khan et al., 2014). Die genauen Mechanismen, die zu diesen positiven Ergebnissen führten sind noch nicht ausreichend geklärt. Diese Effekte könnten auf Veränderungen der Materialeigenschaften, der chemischen Zusammensetzung oder der Oberflächenstruktur durch die Dotierung mit Silizium zurückgeführt werden. Andererseits ist es auch möglich, dass lokal freigesetzte Siliziumionen dafür verantwortlich sind (Zou et al., 2009).

Auch bei Strontium handelt es sich um ein Spurenelement (Neves et al., 2017). 98% des Mineralstoffs kommen in der anorganischen Matrix des Knochengewebes vor (Wang und Yeung, 2017). Strontium kann aufgrund seiner Ähnlichkeit zu Kalzium dieses in den Apatitkristallen ersetzen. Andererseits besitzt Strontium sowohl einen anderen Atomradius als auch eine andere Elektronegativität als Kalzium und kann daher die Kristallstruktur und das biologische Verhalten des Hydroxylapatits verändern (Frasnelli et al., 2017). Strontium befindet sich in derselben Periode wie Kalzium im Periodensystem und kann daher in Prozesse des Knochenmetabolismus, die über Kalzium gesteuert werden eingreifen. Dabei kann Strontium den CaS-Rezeptor (calcium sensing receptor) der OB aktivieren. In der Folge produzieren die OB vermehrt Osteoprotegerin, der den RANK-Liganden abfängt und die Knochenresorption vermindert (Wang und Yeung, 2017).

Aufgrund der *in vitro* beobachteten positiven Wirkung von Strontium auf den Knochenmetabolismus wurde der Arzneistoff Strontiumranelat entwickelt, der in klinischen Studien zeigte, dass er die Häufigkeit für das Auftreten von Frakturen bei osteoporotischen Patienten senken konnte und gleichzeitig die Knochenmasse erhöhen konnte. Zudem

ergaben *in-vitro*- Untersuchungen, dass Strontiumranelat eine Erhöhung der Anzahl an OB sowie eine Erniedrigung der Aktivität und Anzahl an knochenresorbierenden OC erreichen konnte (Capuccini et al., 2009). Aufgrund eines möglichen erhöhten kardiovaskulären Risikos gibt es bei der oralen Anwendung von Strontiumranelat Sicherheitsbedenken. So versucht man durch die Entwicklung von strontiumhaltigen Knochenersatzmaterialien die positiven Effekte von Strontium auf den Knochen auszunutzen und gleichzeitig eine sichere Applikationsform zu finden (Neves et al., 2017).

2 Materialien und Reagenzien

2.1 Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Analysewaage MC 210 P	Sartorius, Deutschland
Autoklav SX-300E	Tomy Digital Biology, Japan
CASY TT Cell Counter & Analyzer	OLS OMNI Life Science, Deutschland
Eismaschine AF 103	Scotsman Ice Systems, USA
Gefrierschrank U535 Innova	Eppendorf, Deutschland
Inkubator HERA cell 240	Heraeus, USA
Kühlschrank Mediline LCexv 4010	Liebherr, Deutschland
Lichtmikroskop H550S	Nikon TMS, Japan
Magnetrührer Ikamag RCT	Janke & Kunkel, Deutschland
Mikroliterpipetten	Pipetman, Gilson, Frankreich Finnpipette Digital ACL, Labsystems, Finnland
Mikroskop Kamera, ProgRes Speed XT Core5	Jenoptik, Deutschland
Nanodrop 2000c	Thermo Fischer Scientific, USA
Pipetboy	Integra Biosciences, Deutschland
QuantStudio 5	Thermo Fischer Scientific, USA
Scanner Epson Perfection 1200PHOTO	Epson, Japan
Schüttelwasserbad 1083	GFL, Deutschland
Schüttler Swip	Edmund Bühler, Deutschland
Spektrophotometer Infinite 200 Pro Microplate Reader	Tecan, Schweiz
Sterilwerkbank ET 130 Kl.2	Ehret Labor- und Pharmatechnik, Deutschland
Tischzentrifuge 5415 C	Eppendorf, Deutschland
Ultraschallbad, Transsonic T570	Elma, AIGNER, Wien, Österreich
Vortex Genie 2	Bender & Hobein, Deutschland
Zentrifuge Z323 K	Hermle, Deutschland

Tabelle 1: Liste der verwendeten Geräte

2.2 Materialien

Bezeichnung	Firma
48 Well-Gewebekulturplatten	Techno Plastic Products AG, Schweiz
48 Well-Suspensionsplatte, Cellstar®	Greiner Bio-One, Österreich
96 Well-Mikrotiterplatten	Greiner Bio-One, Österreich
CASYCup 22x65	Roche Diagnostics, Österreich
Collection tubes (1,5ml & 2ml)	Qiagen, Deutschland
cDNA optical tubes	Qiagen, Deutschland
Filterpipettenspitzen, DNase- & RNase frei	Greiner Bio-One, Österreich
Glaspipetten	Brand, Deutschland
Glasröhrchen, steril	Greiner Bio-One, Österreich
Kryoröhrchen	Simport, Kanada
Parafilm "M" Laboratory Film	Bemis, USA
PCR-Titerplatte & Abdeckfolie	Qiagen, Deutschland
PCR Softtubes, RNase frei (0,5ml)	BiozymScientific GmbH, Deutschland
Pasteurpipetten Glas	LLG Labware, Deutschland
Pasteurpipetten Plastik	Alpha Laboratories, England
Pipettenspitzen	VWR International, Österreich Greiner Bio-One, Österreich
QIASchredder Mini Spin Columns	Qiagen, Deutschland
Sterilfilter Millex-LG, 0,20 µm, PTFE Sterilfilter Millex-GV, 0,22 µm, PVDF	Merck Millipore, Deutschland
Transferpipetten, steril	Greiner Bio-One, Österreich
Zentrifugenröhrchen, Cellstar® (15ml & 50 ml)	Greiner Bio-One, Österreich

Tabelle 2: Liste der verwendeten Materialien

2.3 Substanzen

Substanz	Firmenname	Chargennummer
α-MEM (Minimum Essential Medium)	Gibco Lifetechnologies	Lot: 1178507
ALP Buffer (2x)	Invitrogen	Lot: 1676476
CASYton	Roche	Lot: 11689200
Cell-Lysis Buffer (20x)	Invitrogen	Lot: 1676476
CyQUANT® GR dye (400x in DMSO)	Invitrogen	Lot: 1676476
dNTP Mix 100mM	Applied Biosystems, Thermo Fischer	Lot: 1512202
Essigsäure 99,9%	Sigma Chemical	Lot: 38H3418
Ethanol 99,9%	AustrAlco	AAAH-5020-07025-010711
Ethanol 99,9%, RNase frei		
Extraktionspuffer	Chondrex	Lot: 150279
EnzCheck® DiFMUP Substrate	Invitrogen	Lot: 1676476
EnzCheck® DiFMU Substrate	Invitrogen	Lot: 1676476
EnzCheck® N,N-dimethylformamide (DMF)	Invitrogen	Lot: 1676476
EnzCheck® 5x Reaction Buffer	Invitrogen	Lot: 1676476
FastStart SYBR Green Mastermix	Roche	Lot: 10863400
FCS HI	Sigma-Aldrich	Lot. 084M3250
Formaldehydlösung, 37 %	Roth	Ch.Nr.: 460163407
L(+)-Ascorbinsäure-2-phosphat Sesquimagnesiumsalzhydrat	Sigma-Aldrich	Lot: F 971227
Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH	Lot: 399109544
MultiScribe™ Reverse Transcriptase 50 U/ul	Applied Biosystems, Thermo Fischer	Lot: 1512202
Natriumzitrat-Dihydrat	Sigma-Aldrich	Lot: STBF-1932V
Penicillin/Streptomycin-Lösung, 10.000 U/10.000 µg/ml	Biochrom	Lot: 330FF
Presto Blue™ Cell Viability Reagent	Invitrogen	Lot: 1632091A
RDD Buffer	Qiagen	Lot: 151038138

RLT Buffer	Qiagen	Lot: 151038138
RNase AWAY	Thermo Fischer	Lot: BCBP0563V
RNase free DNase Set 50	Qiagen	Lot: 151038138
RNase freies Wasser	Qiagen	Lot: 151039972
RNase Inhibitor	Applied Biosystems, Thermo Fischer	Lot: 1412202
RPE Buffer	Qiagen	Lot: 151038138
RT Buffer	Applied Biosystems, Thermo Fischer	Lot: 1412202
RT-Random Primer	Applied Biosystems, Thermo Fischer	Lot: 1412202
RT ² qPCR Primer Assay ALP	Qiagen	Lot: 20150825029
RT ² qPCR Primer Assay COL1A1	Qiagen	Lot: 20121106013
RT ² qPCR Primer Assay GAPDH	Qiagen	Lot: 2015047026
RT ² qPCR Primer Assay OC	Qiagen	Lot: 20121009032
RT ² qPCR Primer Assay Runx 2	Qiagen	Lot: 20140820013
RW1 Buffer	Qiagen	Lot: 1412202
SigmaFast™ BCIP/NBT	Sigma-Aldrich	Lot: SLBN0689V
Sirius Red/Fast Green Färbelösung	Chondrex	Lot: 150504
Tween 20	Sigma-Aldrich	Lot: 71K0086

Tabelle 3: Liste der verwendeten Substanzen

2.4 Reagenzienherstellung

2.4.1 β -Glycerophosphat-Stammlösung (100x β -GP)

Zur Herstellung von 10 ml einer 100x β -Glycerophosphat-Stammlösung wurden 2,16 g β -Glycerophosphat in 10 ml MilliQ Wasser unter Verwendung eines Magnetrührers gelöst. Danach wurde die Lösung durch einen 0,22 μ m Filter sterilfiltriert. Nach der Portionierung der Stammlösung kann diese bei -20 °C für einen Monat gelagert werden.

2.4.2 Ascorbinsäure-Stammlösung (100x Vit.C)

Für die Herstellung von 10 ml einer 100x Ascorbinsäure - Stammlösung wurden 50 mg der Ascorbinsäure in 10 ml PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} unter Verwendung eines Magnetrührers gelöst. Danach wurde die Lösung durch einen 0,22 μ m Filter sterilfiltriert. Nach der Portionierung der Stammlösung kann diese bei -20 °C für einen Monat aufbewahrt werden.

2.4.3 BCIP/NBT-Farbreagens

Das BCIP/NBT-Farbreagens musste unter Lichtausschluss und unmittelbar vor dessen Gebrauch hergestellt werden. Dazu wurde eine aufgetaute Tablette (BCIP/NBT, SigmaFast™) in 10 ml MilliQ Wasser bis zum vollständigen Auflösen der Tablette gevortext.

2.4.4 CyQuant Färbelösung (10x)

Für die Bereitung von 100 Teilen einer 10x CyQuant Färbelösung wurden 2,5 Teile der 400x CyQuant Färbelösung mit 97,5 Teilen des Zellyse Puffers versetzt. Die Zwischenlagerung erfolgt unter Lichtschutz. Außerdem muss die Lösung innerhalb weniger Stunden verbraucht werden.

2.4.5 CyQuant Zellyse Puffer (1x)

Um 100 Teile eines 1x CyQuant Zellyse Puffers herzustellen, wurden 5 Teile des 20x Lysis-Buffers mit 95 Teilen Nuklease-freiem Wasser verdünnt.

2.4.6 CyQuant Zellyse Puffer/ALP Puffer (1:2)

Eine 1:2 Mischung der beiden Puffer konnte gewonnen werden, indem der 1x CyQuant Zellyse Puffer mit dem 2x ALP-Puffer 1:1 vermischt wurde. Dieses Puffergemisch kann im Kühlschrank bei 4 °C für einige Tage aufbewahrt werden.

2.4.7 DiFMUP Lösung (200 µM)

Zur Herstellung einer 200 µM DiFMUP-Lösung wurde eine 10 000 µM Lösung dieser Substanz im Verhältnis 1:49 mit dem ALP-Puffer verdünnt. Unter Lichtschutz kann die Lösung zwischengelagert werden, wobei sie möglichst schnell zu verbrauchen ist.

2.4.8 DNase Inkubationsmix

Zur Gewinnung von 80 Teilen des DNase Inkubationsmixes wurden 70 Teile RDD-Puffer mit 10 Teilen der DNase Stammlösung vermischt. Danach muss das Gemisch auf Eis zwischengelagert werden.

2.4.9 DNase Stammlösung

Nach Befüllung einer RNase freien Spritze mit 550 µl RNase freiem Wasser, wurde mithilfe einer RNase freien Nadel über das Septum des „RNase free DNase Set 50“ Glasbehälters von Qiagen das RNase freie Wasser zur DNase injiziert und so die DNase Stammlösung gewonnen.

2.4.10 70% Ethanollösung (RNase-frei)

Um eine RNase-freie, 70% Ethanollösung zuzubereiten, wurden 70 Teile des RNase-freien absoluten Ethanol mit 30 Teilen RNase- und DNase-freiem Wasser verdünnt. In einem dicht verschlossenem Zentrifugenröhrchen kann die Lösung bei Raumtemperatur aufbewahrt werden.

2.4.11 3,7% Formaldehydlösung

Durch Verdünnen der 37% Formaldehydlösung mit PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} im Verhältnis 1:10 konnte eine 3,7% Formaldehydlösung gewonnen werden.

2.4.12 Kahle Lösung

Zur Gewinnung von 100 Teilen Kahle Lösung wurden zunächst zu 60 Teilen destilliertem Wasser 28 Teile 96% Ethanollösung zugesetzt. Diese Mischung wurde dann mit 10 Teilen 37% Formaldehydlösung sowie 2 Teilen Essigsäure versetzt.

2.4.13 Mastermix (MMix)

100 Teile des Mastermixes setzen sich aus folgenden Komponenten des „High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits“ zusammen:

Teile	Substanz
8	25 x dNTP Mix (100mM)
10	MultiScribe™ Reverse Transkriptase
10	RNase Inhibitor
20	10x RT Random Primers
20	10x RT Buffer
32	Nuklease freies Wasser

Tabelle 4: Liste der Reagenzien zur Herstellung des Mastermixes

Das Auftauen der einzelnen Substanzen sowie die Herstellung des Mastermixes erfolgte bei 4 °C. Die entsprechenden Bestandteile wurden nach der Reihe miteinander vermischt, wobei nach jeder Zugabe einer Substanz die Mischung durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren durchmischt wurde. Die Zwischenlagerung des MMix erfolgt auf Eis.

2.4.14 2% Natriumzitratlösung

Durch Lösen von 2,00 g Natriumzitat in 98 ml PBS unter Verwendung eines Magnetrührers konnten 100 ml einer 2% Natriumzitratlösung gewonnen werden. Diese Lösung wurde durch einen 0,22 µm Filter sterilfiltriert und kann bei 4 °C gelagert werden.

2.4.15 Phosphatgepufferte Salzlösung ohne Kalzium und Magnesium

Bei der Herstellung von 1000 ml einer 10x PBS-Lösung wurden 2,00g KCl, 2,00g KH₂PO₄, 80,00 g NaCl und 27,07 g Na₂HPO₄•2H₂O eingewogen und in bidestilliertem Wasser, das bis zur 1000 ml Marke aufgefüllt wurde, gelöst und anschließend mit Milli Q Wasser auf 1x verdünnt. Danach erfolgte eine Sterilfiltration durch einen 0,22 µm Filter. Die Lagerung erfolgt bei 4 °C.

2.4.16 RLT-Puffer/Mercaptoethanol-Lösung

Durch Mischen von 100 Volumenteilen RLT-Puffer mit 1 Volumenteil β-Mercaptoethanol in einem RNase-freien Zentrifugenröhrchen wurde die RLT-Puffer/Mercaptoethanol-Lösung bereitet. Die Lagerung erfolgt bei Raumtemperatur für höchstens einen Monat.

2.4.17 Waschpuffer

Der Waschpuffer bestand aus PBS, dem 0,05% Tween 20 zugesetzt wurde.

2.5 Medienbereitung

2.5.1 Kulturmedium

Bei dem verwendeten Kulturmedium handelte es sich um α -MEM. Dieses wurde durch Zusatz von 10% fetalem hitzeinaktiviertem Kälberserum (FCS HI) sowie von 1% Penicillin und Streptomycin (P/S) zum MEM, hergestellt.

2.5.2 Mineralisationsmedium

Das Mineralisationsmedium setzte sich aus dem α -MEM, Ascorbinsäure (50 μ g/ml) und β -Glycerophosphat (10 mM) zusammen. Die beiden letzten Komponenten wurden in Form von Stammlösungen - direkt vor Zugabe des Mineralisationsmediums zur Zellkultur - dem Kulturmedium beigefügt.

Um die entsprechenden Konzentrationen von Vitamin C und β -Glycerophosphat zu erreichen, mussten die Vitamin C - sowie die β -Glycerophosphat-Stammlösung 1:100 mit dem Kulturmedium verdünnt werden.

3 Methoden

3.1 Isolierung und Kultivierung primärer Osteoblasten

Für alle durchgeführten Untersuchungen wurden primäre Mausosteoblasten verwendet. Diese mussten zunächst aus der Calvaria 2-3 Tage alter Mäuse mithilfe einer Lösung, die sich aus 0,1% Kollagenase und 0,2% Dispase zusammensetzt, entsprechend einer modifizierten Methode des „Bone Research Protocols, 2012“, isoliert und in dem Kulturmedium α -MEM mit Zusatz von 10% FCS HI sowie 1% Penicillin/Streptomycin bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert. Nach Erreichen ihrer Konfluenz wurden die Zellen mithilfe einer Trypsinlösung von der Petrischale abgelöst und anschließend bis zu ihrer Verwendung im flüssigen Stickstoff bei –196 °C gelagert.

Für die Austestung der primären OB wurde in 48 Well-Gewebekulturplatten gearbeitet. Die ausgesäte Zelldichte lag bei etwa $5,3 \times 10^5$ Zellen/cm². Nach Erreichen der Zelladhäsion an den Gewebekulturplatten wurde das KM durch MM, das zusätzlich Ascorbinsäure (50 µg/ml) und β -Glycerophosphat (10 mM) enthielt, ersetzt und die zu untersuchenden Nanopartikel wurden zugesetzt.

Bei der Untersuchung der Genexpression der OB wurden anstelle der 48-Well-Gewebekulturplatten 96-Well-Platten verwendet. Die Zelldichte lag bei $5,2 \times 10^5$. Nachdem die Zellen an den Gewebekulturplatten adhäriert waren, wurde das KM durch MM ersetzt und die zu untersuchenden Nanopartikel wurden zugesetzt.

3.2 Getestete Nanopartikel

Die getesteten Nanopartikelpräparationen enthielten Hydroxylapatit mit der chemischen Formel $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Ein Teil der im Hydroxylapatit enthaltenen Kalziumionen (Ca^{2+}) wurde entweder durch Silizium- (Si^{4+}) oder durch Strontiumionen (Sr^{2+}) ersetzt. Während der Substitutionsgrad bei den Silizium dotierten Nanopartikeln bei 2 wt% lag, erfolgte bei den strontiumhaltigen Nanopartikel eine Dotierung im Ausmaß von 6 wt%. Die Nanopartikel wurden als Suspensionen mit PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} verwendet. Zusätzlich enthielten die Nanopartikelpräparationen 2% Natriumzitrat, das die Aggregatbildung der Nanopartikel untereinander hemmen sollte.

3.2.1 Vorbehandlung der Nanopartikel

Die beiden Nanopartikelsorten mussten vor der erstmaligen Verwendung portioniert und autoklaviert, das heißt mit gespanntem Wasserdampf sterilisiert, werden. Zu diesem Zweck mussten die Nanopartikelsuspensionen zunächst 5 min lang ins Ultraschallbad gestellt werden, um aggregierte Nanopartikel zu vereinzeln. Anschließend wurden die

Nanopartikelsuspensionen zu je 0,5 ml (2% Stocklösung) portioniert und bei 121 °C für 15min autoklaviert. Da sich beim Autoklavieren die Volumina der Nanopartikelsuspensionen verringern können und damit die Konzentrationen erhöhen können, mussten die neuen Volumina abgemessen werden und die neuen Konzentrationen der Stocklösungen mit folgender Formel berechnet werden:

$$c_2 = \frac{c_1 \times v_1}{v_2}$$

$$c_1 = \text{Ausgangskonzentration} \left(2\% = 20\,000 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \right)$$

$$v_1 = \text{ursprüngliches Volumen} (0,5\text{ml})$$

$$v_2 = \text{abgemessenes Volumen}$$

$$c_2 = \text{Endkonzentration}$$

Die neuen Konzentrationen der Stocklösungen sind in folgender Tabelle zusammengefasst:

NP-Typ	Volumina nach dem Autoklavieren (v_2)	Endkonzentration der Stocklösungen (c_2)
siHA 1	435 μl	22988 $\mu\text{g/ml}$
siHA 2	430 μl	23256 $\mu\text{g/ml}$
srHA 1	440 μl	22727 $\mu\text{g/ml}$
srHA 2	430 μl	23256 $\mu\text{g/ml}$

Tabelle 5: Liste der Endkonzentrationen der autoklavierten NP-Stocklösungen

Die Stocklösungen können anschließend bei 4 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert werden.

Vor jeder Zugabe der Nanopartikelsuspensionen mussten diese für 5 min ins Ultraschallbad gestellt werden und auf die gewünschten Konzentrationen mit KM verdünnt werden. Die Berechnungen für die entsprechenden Verdünnungen erfolgten mit derselben Formel wie bereits in diesem Kapitel aufgeführt. Dabei wurde diese Formel lediglich so umgeformt, dass eine Berechnung des Ausgangsvolumens (v_1) erfolgt.

3.3 Presto Blue Bestimmung

Die Bestimmung der Zellviabilität ist ein wesentlicher Parameter bei der Untersuchung von biologisch aktiven Substanzen, da jede Substanz, in Abhängigkeit von ihrer Konzentration, die Zellproliferation oder die Morphologie der Zellen negativ oder positiv beeinflussen kann (Xu et al., 2015). Mit Hilfe des Presto Blue Reagenzes von Invitrogen konnte die Zellviabilität der Zellkultur überprüft werden. Dazu wurde die, im Protokoll von invitrogen vorgeschriebene, Vorgangsweise mit Modifikationen übernommen. So wurde das Reagenz nicht, wie im Protokoll vorgesehen, direkt ins verwendete Medium pipettiert, sondern zunächst das alte Kulturmedium entfernt und danach durch frisches α -MEM ersetzt. Dies diente dazu, die Nanopartikel möglichst vollständig zu beseitigen. Danach wurde das Presto Blue Reagenz zugesetzt, die Zellen bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert und anschließend die Fluoreszenz, die direkt proportional zur Menge an metabolisch aktiven Zellen ist, bei einer Anregungswellenlänge von 560 nm und einer Emissionswellenlänge von 590 nm vermessen. Danach konnte die relative Zellviabilität errechnet werden, indem die ermittelten Floreszenzen des ersten Tages gleich 1 gesetzt wurden. Die erhaltenen Werte aller darauffolgenden Tage (Tag 3, 7 und 14) wurden relativ zu jenen des ersten Tages ausgedrückt (Invitrogen, 2010).

$$\text{Zellviabilität (\%)} = \frac{1 \times \text{Absorption (Tag } n)}{\text{Absorption (Tag 1)}}$$

Absorption (Tag n) = die ermittelte Absorption an Tag n (3, 7 oder 14)

Absorption (Tag 1) = ermittelte Absorption an Tag 1

Das Presto Blue Reagenz enthält als Hauptkomponente den dunkelblauen, wasserlöslichen Farbstoff Resazurin (7-Hydroxy-10-Oxidophenoxazin-10-ium-3-on), der als Zellviabilitätsindikator eingesetzt wird. Dieser wird durch Aufnahme von Elektronen aus Kofaktoren wie NADPH, NADH, FADH, FMNH sowie aus Cytochromen zu dem rot-fluoreszierendem Resorufin reduziert. Diese Elektronenübertragung kann nur in Zellen mit intakter mitochondrialer Aktivität, also in lebenden Zellen, stattfinden. Daher kann die Intensität der Fluoreszenz als direkt proportional zu den metabolisch aktiven, lebenden Zellen angesehen werden. (Xu et al., 2015)

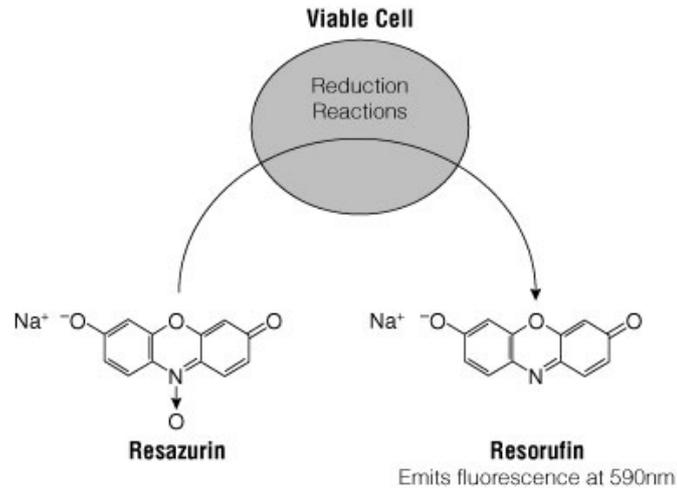


Abb. 9: Reduktion des schwach fluoreszierendem Resazurin zum stark fluoreszierendem Resorufin (Promega, 2018)
Die Reduktion erfolgt durch e^- , die in lebenden Zellen in den Mitochondrien gebildet und durch Co-Faktoren übertragen werden (Xu et al., 2015).

3.4 Untersuchung der Osteoblastendifferenzierung

Bei der alkalischen Phosphatase (ALP) handelt es sich um ein extrazelluläres Metalloenzym, das in der Lage ist, die Hydrolyse von Phosphormonoestern zu katalysieren. In der Folge kommt es zu einer erhöhten Freisetzung von anorganischem Phosphat aus organischem Phosphat. Die ALP-Expression wird über verschiedene Signalwege gesteuert, wobei die genauen Mechanismen noch nicht vollständig geklärt sind. Während der Osteoblastendifferenzierung setzt bereits früh eine hohe Aktivität der alkalischen Phosphatase ein und führt so zur Einleitung der Kalzifikation, während in späteren Stadien der Mineralablagerung nur mehr geringe ALP-Aktivitäten in den Zellen vorhanden sind. Dementsprechend kann die alkalische Phosphatase als Marker der Osteoblastendifferenzierung herangezogen werden (Golub und Boesze-Battaglia, 2007).

3.4.1 Färbung der alkalischen Phosphatase

Um ALP-produzierende OB in den Versuchen sichtbar zu machen, wurde ihre alkalische Phosphatase mit einer BCIP/NBT-Lösung angefärbt. Die Lösung wurde wie im Protokoll des „SIGMAFAST BCIP/NBT tablet Kits“ vorgeschrieben hergestellt. Nach Entfernung des Mediums und Waschen der Zellen mit PBS, konnten diese mit einer 3,7% Formaldehydlösung fixiert werden. Danach wurde die Färbelösung zugesetzt und nach 10 Minuten wieder entfernt werden. Anschließend wurden die Zellen mit Waschpuffer gewaschen und die Intensität der Färbung konnte mit freiem Auge abgeschätzt werden. Zuletzt wurde die 48-well-Zellkulturplatte mit dem Epson Perfection Scanner eingescannt.

Die BCIP/NBT Tabletten enthalten einerseits den Farbstoff Nitroblautetrazolium (NBT) und andererseits das Enzymsubstrat 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-phosphat (BCIP). Bei Zusatz der Lösung zu den Knochenzellen kann die ALP das Enzymsubstrat in eine Indoxy-Zwischenstufe spalten, die anschließend im alkalischen Milieu tautomerisiert. In weiterer Folge kommt es zu einer Dimerisierung der Tautomere unter einer Dehydrierungsreaktion, sodass Wasserstoffatome freigesetzt werden. Diese Wasserstoffatome reduzieren anschließend das lösliche Nitroblautetrazolium-Kation in das unlösliche Diformazan des Salzes, wodurch eine blauviolette Färbung der Zellen erzielt wird. Die Intensität der Färbung lässt Rückschlüsse auf den Differenzierungsgrad der entsprechenden Zellen zu (Sigma-Aldrich, 2008).

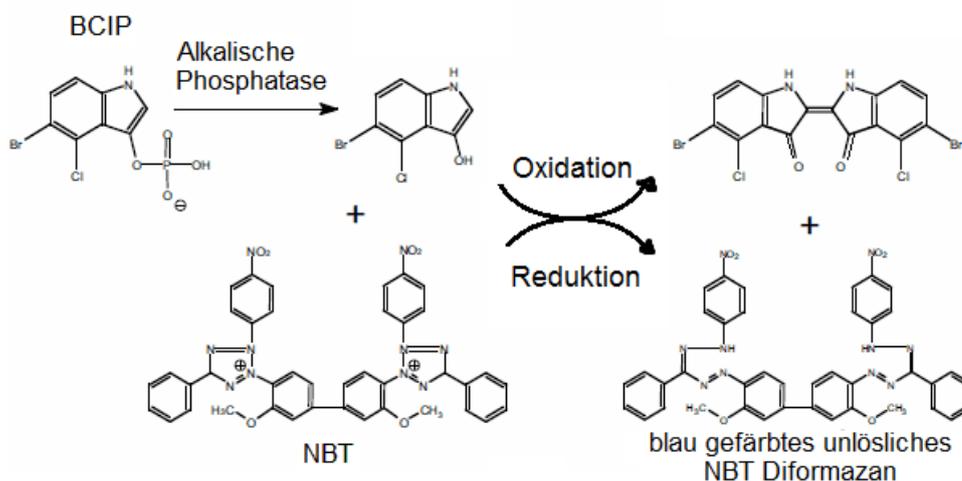


Abb. 10: Umsetzung von BCIP/NBT durch ALP
 Das Substrat BCIP wird von der ALP der differenzierten OB in eine Indoxy-Zwischenstufe umgesetzt, die im alkalischen Milieu tautomerisiert. Die Tautomere bilden Dimere aus und dabei werden Wasserstoffatome freigesetzt, die das lösliche NBT zu einem unlöslichen, blauvioletten Diformazan des Salzes reduzieren (Sigma-Aldrich, 2008).

3.4.2 Quantifizierung der alkalischen Phosphatase

Zur Quantifizierung der ALP-Aktivität wurden die Zellen zunächst, wie im Kapitel 3.1. Versuchsaufbau beschrieben, kultiviert. Sieben Tage nach der Zellaussaat wurden die Zellen mit PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} gewaschen und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ trocken eingefroren. Danach wurde die Zellkulturplatte wieder bei Raumtemperatur aufgetaut. Anschließend wurde den OB der 1x CyQuant Zellyse-Puffer zugesetzt und die Zellen wurden am Schüttelgerät bewegt. Nach erfolgter Zellyse wurden die Lysate auf eine Mikrotiterplatte aufgetragen und mit $200\text{ }\mu\text{M}$ des Enzymsubstrats DiFMUP versetzt. Außerdem musste eine Standardreihe für die Erstellung einer Eichgeraden hergestellt werden. Dabei sollte durch die Standardreihe ein Aktivitätsbereich von $0\text{ }\mu\text{M}$ bis $100\text{ }\mu\text{M}$ an ALP abgedeckt werden, da die durch diese Bestimmung ermittelten ALP-Aktivitäten mit hoher

Wahrscheinlichkeit innerhalb dieses Bereiches liegen würden. Die entsprechenden Lösungen für die Standardreihe setzten sich aus folgenden Komponenten zusammen:

ALP-Aktivität	Menge an 200 µM DiFMU	Menge an 1:2 Zellyse-Puffer/ALP-Puffer Mischung
0 µM	0 µl	300 µl
0,5 µM	600 µl	600 µl
1 µM	800 µl	800 µl
2 µM	720 µl	1080 µl
5 µM	900 µl	900 µl
10 µM	384 µl	1536 µl
50 µM	700 µl	700 µl
100 µM	18 µl	1782 µl

Tabelle 6: Liste zur Herstellung der Standardreihe für die Quantifizierung der ALP-Aktivität

Die Lösungen der Standardreihe wurden ebenfalls auf die Mikrotiterplatte übertragen. Danach wurden die Zellen mitsamt dem beigefügten DiFMUP bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert, damit eine Umsetzung durch die ALP stattfinden konnte. In einem letzten Schritt erfolgte die Vermessung der Fluoreszenzintensitäten bei einer Extinktionswellenlänge von 358 nm und einer Emissionswellenlänge von 455 nm. Aus den erhaltenen Fluoreszenzintensitäten konnten mithilfe der Eichgeraden die entsprechenden ALP-Aktivitäten errechnet werden (Molecular-Probes, 2004).

3.4.2.1 Bestimmung der Zellzahl mittels CyQuant Proliferation Assay Kit

Bei der Durchführung der Zellzahlbestimmung mittels „CyQuant Proliferation Assay Kit“ wurden zunächst ca. 4 Mio. primäre OB aufgetaut und die Anzahl der lebenden Zellen mit dem CASY TT Cell Counter & Analyzer bestimmt. Danach wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für 3 Stunden bei -80 °C eingefroren. Diese Zellen sollten später für die Erstellung einer Eichgeraden dienen. Zu diesem Zweck wurden die Zellsuspensionen wieder aufgetaut und zur Herstellung von Lösungen für eine Standardreihe herangezogen. Die Standardreihe sollte einen Bereich von 10 000 bis 150 000 Zellen abdecken, da die Menge an OB, die es zu untersuchen galt, innerhalb dieser Grenzen liegen würden. Die Lösungen der Standardreihe wurden durch Mischen der Zellsuspension mit dem CyQuant-Zellyse-Puffer in folgenden Mengenverhältnissen gewonnen:

Zellzahl	Menge an Zellsuspension	Menge an Zellyse-Puffer
150 000	100 µl	0 µl
100 000	67 µl	33 µl
80 000	53 µl	47 µl
50 000	33 µl	67 µl
20 000	13 µl	87 µl
10 000	6,7 µl	93,3 µl

Tabelle 7: Liste zur Herstellung der Standardreihe für den CyQuant Proliferation Assay

Danach wurden die zuvor bei der Quantifizierung der alkalischen Phosphatase gewonnenen Lysate und die hergestellten Lösungen der Standardreihe auf eine Mikrotiterplatte aufgetragen und mit „CyQuant dye“ Färbelösung versetzt. Nach Zusatz der Färbelösung konnte die Mikrotiterplatte sofort bei einer Extinktionswellenlänge von 480 nm und einer Emissionswellenlänge von 520 nm vermessen werden. Aus den enthaltenen Fluoreszenzintensitäten konnte mithilfe der Eichgeraden die entsprechende Zellzahl errechnet werden. In einem letzten Schritt wurden die errechneten ALP-Aktivitäten auf eine Zellzahl von 10^4 Zellen normiert (Molecular-Probes, 2006).

Die Ermittlung der Zellzahl mittels „CyQuant Proliferation Assay Kit“ beruht auf Messung der Nukleinsäurekonzentration in den Zellkernen der OB. Diese Methode ermöglicht eine sehr exakte Bestimmung der Zellzahl, da die DNA- und RNA-Mengen innerhalb der Zellen sehr strikt reguliert werden und die Zellzahl bei Verwendung dieser Methode unabhängig von Veränderungen im Metabolismus der Zellen bestimmbar ist. Obwohl es in den einzelnen Zellen immer wieder zu Veränderungen in der Nukleinsäurekonzentration kommt, bleibt die Konzentration an DNA und RNA innerhalb der gesamten Zellkultur konstant. Grund dafür ist, dass Zellen innerhalb eines Zellkulturverbandes asynchron wachsen und arbeiten. Um nun die Nukleinsäurekonzentrationen bestimmen zu können werden zunächst die Nukleinsäuren durch eine Zellyse freigelegt. Die Zellyse kann durch Einfrieren der Zellen und Zugabe eines Zellyse-Puffers erreicht werden. In der Folge wird dem zugesetzten Farbstoff der Zugang zu den Nukleinsäuren ermöglicht Als Farbstoff beim „CyQuant Proliferation Assay Kit“ verwendet man eine Cyaninverbindung, die an die zelluläre DNA und RNA binden kann und dann als grünen Fluoreszenz vermessen werden kann (Jones et al., 2001).

3.5 Sirius Red/Fast Green Färbung

Um den Mineralisationsgrad der OB untersuchen zu können, wurden Kollagene sowie nicht-kollagenöse Proteine angefärbt und anschließend quantifiziert. Bei Kollagenen handelt es sich um Proteine, bei denen die „Gly-X-Y“ Struktur in regelmäßigen Abständen in der Polypeptidkette auftritt. Die „Gly-X-Y“ ist eine Aminosäurekombination aus Glycin (Gly) und 2 weiteren Aminosäuren (Young, 2003). An diese Triplestruktur kann der Sirius Red Farbstoff binden und auf diese Weise das Kollagen hellrot färben (Chondrex, 2017). Alle anderen Proteine der Mineralisationsmatrix werden als nicht-kollagenöse Proteine bezeichnet. Zu diesen zählen in etwa Osteocalcin, Fibronectin oder Osteonectin (Young, 2003). Der Farbstoff Fast Green kann an diesen organischen Komponenten der kalzifizierten Regionen binden und diese somit grün färben. Die Ermittlung der Konzentrationen der nicht-kollagenösen Proteinen durch die Fast Green Färbung wird zur Normalisierung der Kollagenkonzentrationen genutzt (Chondrex, 2017).

Bei den Versuchen wurde die Sirius Red/Fast Green Färbung in einer etwas modifizierten Vorgangsweise entsprechend dem Protokoll der Firma Condrex durchgeführt. Nach 7 beziehungsweise 14 Tagen der Zellkultivierung wurde zuerst das verwendete Medium vorsichtig entfernt. Anschließend wurden die OB mit warmen PBS gewaschen. Nachfolgend wurden die Zellen mit einer Kahle-Lösung fixiert und mit der fertigen Färbelösung der Firma Chondrex versetzt. Die Färbelösung wurde entfernt und die Zellen wurden durch mehrmaliges Waschen mit destilliertem Wasser von ungebundenem Farbstoff befreit. Die Färbung der Kollagene sowie der nicht-kollagenösen Proteine konnte anschließend optisch beurteilt werden, bevor mithilfe eines Extraktionspuffers die gebundenen Farbstoffe wieder in Lösung gebracht wurden. Danach wurden die gelösten Farbstoffe in eine Mikrotiterplatte übergeführt. In einem letzten Schritt wurde die Absorption der Farbstoffe einmal bei 540 nm und einmal bei 605 nm im Spektrophotometer vermessen. Zur Berechnung der Konzentrationen an Kollagen sowie nicht-kollagenöser Proteine wurden folgende Formeln angewendet (Chondrex, 2017):

$$\text{Kollagen } (\mu\text{g}/\text{Abschnitt}) = (OD\ 540 - (OD\ 605 \times 0,291))/0,0378$$

$$\text{nicht - kollagenöse Proteine } (\mu\text{g}/\text{Abschnitt}) = OD\ 605/0.00204$$

OD 540 der bei 540nm vermessene Wert

OD 605 der bei 605nm vermessene Wert

Um die Resultate zu normalisieren und aussagekräftiger zu machen wurde anschließend die Ratio zwischen der Menge an Kollagenen zur Menge an nicht-kollagenösen Proteinen berechnet. Je geringer die errechnete Ratio ausfällt, desto höher ist der Mineralisationsgrad der Zellen.

3.6 qRT-PCR

Die qRT-PCR, englisch „quantitative Real-Time-Polymerase chain reaction“ (qRT-PCR), dient als Quantifizierungsmöglichkeit von Nukleinsäuren, die auf Basis einer üblichen Polymerasekettenreaktion vervielfältigt werden. Dabei erfolgt die Quantifizierung der Nukleinsäuren durch Messung der Fluoreszenz während eines Zyklus der Polymerasekettenreaktion (PCR), wobei die Fluoreszenzintensität proportional zur Produktmenge eines Zyklus ansteigt (Holzapfel und Wickert, 2007).

In den durchgeführten Experimenten wurde die qRT-PCR genutzt, um eine Veränderung in der Genexpression der OB durch die Behandlung mit den Hydroxylapatitnanopartikeln festzustellen. Die Durchführung der qRT-PCR erfolgte in mehreren Schritten. In einem ersten Schritt wurden die Zellen lysiert, um die RNA in einem nächsten Schritt extrahieren zu können. Nach einem Aufreinigungsschritt wurde die RNA in eine komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Diese cDNA wurde in einem letzten Schritt mittels qRT-PCR vervielfältigt und dabei in Echtzeit quantifiziert. Zum Schluss erfolgte die Auswertung der Daten als relative Genexpression mittels der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode.

3.6.1.1 Zellyse

Nach der Zellkultivierung wurden die OB mit PBS gereinigt und anschließend auf Eis mit einer Mischung aus β -Mercaptoethanol und RLT-Puffer aufgeschlossen. Danach wurden die Mischungen durch Zentrifugation in „QIAshredder Columns“, zerkleinert. Zuletzt wurden die einzelnen Zellysate gesammelt und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren.

3.6.1.2 Extraktion und Aufreinigung der RNA

Die Extraktion und Aufreinigung der RNA erfolgte mit Hilfe des „RNeasy® Mini Kits“ und anhand des Protokolls des „RNeasy® Mini Kit Handbuchs“. So erfolgte nach dem Auftauen der Zellysate auf Eis und der Zugabe von RNase-freien Alkohol die Auftragung der Lysate auf Säulen sowie eine Zentrifugation. Dabei sollte die RNA der Zellen an den Säulen haften bleiben, während andere Zellbestandteile durch die Säule hindurchwanderten und verworfen wurden. Auf diese Weise konnte die RNA der Zellen extrahiert werden.

Die anschließende Aufreinigung der RNA erfolgte durch wiederholte Zugabe diverser Puffer des RNeasy® Mini Kits – also RW1-Puffer und RPE-Puffer - und anschließender

Zentrifugation. Zudem wurde vorhandene DNA, die die Ergebnisse der qRT-PCR verfälschen könnte, durch Zugabe eines DNase-Inkubationsmixes und anschließender Zentrifugation, entfernt. Zuletzt wurde die aufgereinigte RNA durch Zentrifugation mit RNase-freiem Wasser aus der Säule eluiert. Um die Reinheit und die Menge der gewonnenen RNA zu bestimmen, wurde die RNA gegen RNase-freies Wasser am NanoDrop vermessen (Qiagen, 2012).

3.6.1.3 Umschreiben der RNA in cDNA

In einem weiteren Schritt sollte die gewonnene RNA in eine komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Dies erfolgte unter Anwendung des „High-Capacity cDNA Reversed Transcription Kits“ und dessen Protokolls. In einem ersten Schritt wurde die gewünschte Ausgangsmenge an RNA mit 300 ng festgelegt. Diese 300 ng an RNA sollten am Ende in 20 µl Gesamtlösung enthalten sein. Zu diesem Zweck wurden für jede Probe die exakten Volumina der RNA-Stammlösung sowie jene an RNase-freiem Wasser, das zum Auffüllen der RNA-Stammlösungen auf 10 µl verwendet wurde, berechnet (appliedbiosystems, 2016).

Probe	RNA-Konzentration in µg/µl vermessen mit Nanodrop	Menge an RNA in µl	Menge an RNase - freiem Wasser in µl
Kontrolle d3	0,0740	4,05	5,95
siHA 50 d3	0,1041	2,88	7,12
srHA 50 d3	0,0783	3,83	6,17
Kontrolle d7	0,0574	5,23	4,77
siHA 50 d7	0,0374	8,02	1,98
srHA 50 d7	0,0611	4,91	5,09
Kontrolle d14	0,0498	6,02	3,98
siHA 50 d14	0,0434	6,91	3,09
srHA 50 d14	0,0622	4,82	5,18

Tabelle 8: Liste zur Herstellung der gewünschten RNA-Konzentrationen

Danach wurde der MMix - wie im Kapitel 2.4.13 Mastermix beschrieben – hergestellt, wobei immer darauf geachtet wurde, alle Komponenten bei 4 °C zu lagern. Nach Zugabe des MMix zu den RNA-Lösungen im Verhältnis 1:1 erfolgte die Umwandlung der RNA in cDNA im QuantStudio 5 unter folgenden Bedingungen:

Schritt	Bedingungen
1. Schritt	25 °C für 10 min
2. Schritt	37 °C für 120 min
3. Schritt	85 °C für 5 min
4. Schritt	4 °C bis zum Ende des Programms

Tabelle 9: Bedingungen für die „reversed Transkription“ der RNA in cDNA

3.6.1.4 Vermessung und Auswertung

In diesem Schritt wurde zunächst die gewonnene cDNA mit dem gewünschten Primer – also entweder dem Primer für Col 1A1, Runx2, die ALP oder OCN – versetzt. Zusätzlich wurde der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I sowie RNase-freies Wasser zugegeben. Anschließend wurden die Mischungen in die PCR-Platten pipettiert. Zusätzlich sollte für jeden Primer eine Blindprobe durchgeführt werden, das heißt es wurden nur der entsprechende Primer mit dem RNase-freiem Wasser vermengt. Außerdem war eine Blindprobe für jede cDNA vorgesehen, das heißt es wurde nur cDNA in RNase-freiem Wasser vermessen. Nach der Befüllung der PCR-Platten wurde die qRT-PCR mit Hilfe des QuantStudio 5 durchgeführt. Dabei wurden folgende Zyklen für die qRT-PCR eingestellt:

Art des Zyklus	Temperatur und Dauer	Temperaturanstieg pro sec
Hold Stage	50 °C für 2 min	2,74 °C/sec
	95 °C für 2 min	2,74 °C/sec
40 PCR-Zyklen	95 °C für 1 sec	2,74 °C/sec
	60 °C für 30 sec	2,12 °C/sec
Schmelzkurve	95 °C für 1 sec	2,74 °C/sec
	60 °C für 20 sec	2,12 °C/sec
	95 °C für 1 sec	0,15 °C/sec

Tabelle 10: Zyklen der qRT-PCR

Die Ergebnisse der qRT-PCR wurden als relative Genexpression mithilfe der $2^{-\delta\delta C_T}$ -Methode berechnet. Die $2^{-\delta\delta C_T}$ -Methode ist eine Berechnungsmethode, mit der eine relative Quantifizierung der Genexpression ermittelt werden kann. Mit dieser Methode können Veränderungen in der Genexpression einer Gruppe oder Unterschiede in der Genexpression zwischen einer Kontroll- und Behandlungsgruppe berechnet werden.

In den durchgeführten Untersuchungen wurde zunächst der δC_T -Wert ermittelt, indem der C_T -Wert des Referenzgens – nämlich der GAPDH – vom C_T -Wert des jeweiligen Zielgens

abgezogen wurde. In einem weiteren Schritt wurde der $\delta\delta C_T$ -Wert ermittelt, indem die Differenz zwischen den δC_T -Werte aller Gruppen an Tag 7 und 14 mit den δC_T -Werten der Gruppen an Tag 3 gebildet wurde. Zuletzt wurde der Fold Change berechnet, indem der negative Wert des $\delta\delta C_T$ -Wertes als Exponent der Zahl 2 berechnet (Kenneth und Schmittgen, 2001).

$$\delta C_T = C_T (\text{Zielgen}) - C_T (\text{Referenzgen})$$

$$\delta\delta C_T = \delta C_T (\text{Tag } n) - \delta C_T (\text{Tag } 3)$$

$$\text{Fold Change} = 2^{-\delta\delta C_T}$$

3.6.1.5 Prinzip der qRT-PCR

Bei der qRT-PCR erfolgt eine Vervielfältigung der cDNA in 3 Schritten, die sich immer wiederholen. Der erste Schritt umfasst die Denaturierung der DNA, das heißt der DNA-Doppelstrang wird zum Einzelstrang aufgebrochen durch Erhöhung der Temperatur auf 90-95 °C. In einem zweiten Schritt findet die Primeranlagerung – auch Primer-Annealing genannt – statt. Dabei lagert sich ein synthetisch hergestellter Primer – also ein kurzkettiges Nukleotid – bei einer Temperatur von 55-60 °C an die komplementäre Sequenz der einzelsträngigen cDNA an. In der letzten Phase der PCR kommt es zur Elongation der cDNA-Stränge mithilfe einer DNA-Polymerase, wobei der Primer als Startsignal für die DNA-Polymerase dient. Diese Schritte werden in der Folge 30 bis 40mal wiederholt, wodurch eine exponentielle Vervielfältigung der cDNA stattfindet (Holzapfel und Wickert, 2007).

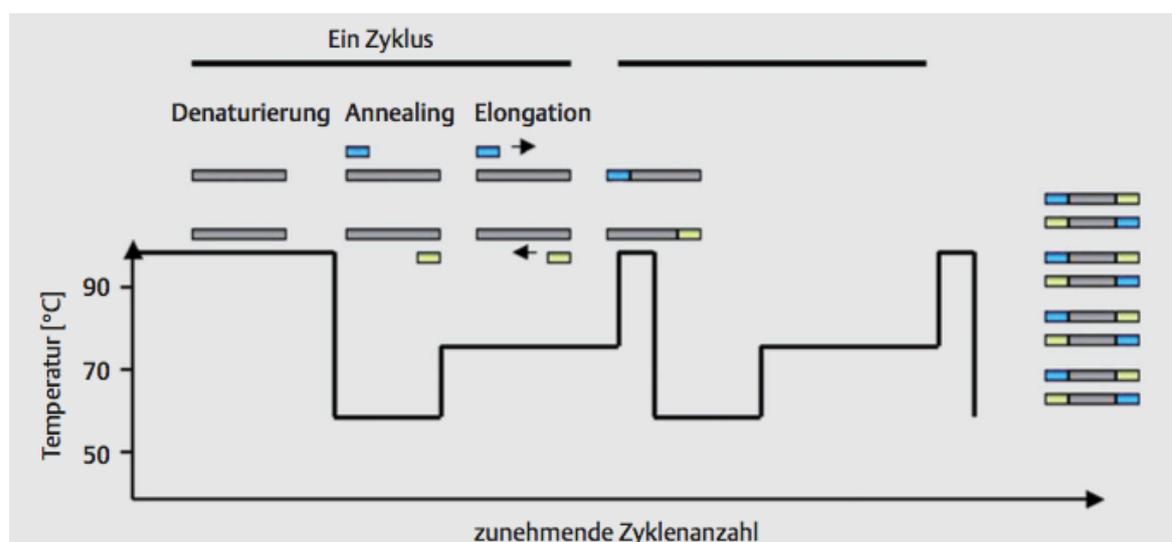


Abb. 11: typisches Temperaturprofil einer Polymerasekettenreaktion (Holzapfel und Wickert, 2007)
Die PCR erfolgt in 3 Schritten – Denaturierung, Annealing, Elongation.
Die Primer sind als blaue bzw. gelbe Kästchen dargestellt.
(Holzapfel und Wickert, 2007)

Die Quantifizierung der cDNA in Echtzeit erfolgt über die Messung der Fluoreszenzintensität bei einer bestimmten Anregungswellenlänge, die proportional zu der bei der PCR entstandenen Produktmenge sein muss. Zu diesem Zweck wird der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I verwendet. Dieser Farbstoff lagert sich in der kleinen Furche der doppelsträngigen cDNA ein, wobei dies nicht nur bei der Zielsequenz erfolgen kann, sondern unter Umständen auch bei Primer-Dimeren oder anderen Beiprodukten. Dies könnte zu falsch positiven Ergebnissen führen. Daher muss am Ende der qRT-PCR eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt werden. Die Schmelzkurve wird von der Gerätesoftware erstellt. Dabei wird am Ende des letzten Zyklus die Temperatur nochmals kontinuierlich erhöht. In der Folge werden Primer-Dimere sowie PCR-Beiprodukte bei wesentlich niedrigeren Temperaturen aufgeschmolzen als die zu quantifizierende cDNA. Dies würde sich in der Schmelzkurve so darstellen, dass neben dem Peak der gewünschten cDNA noch weitere Peaks bei niedrigeren Temperaturen in der Schmelzkurve auftreten würden. Zudem erfolgt die Quantifizierung der cDNA zu Beginn der exponentiellen Phase der PCR, da in dieser Phase Bedingungen vorherrschen, die für eine optimale Verdopplung der cDNA notwendig sind. In der vorhergehenden Startphase kann aufgrund der Bedingungen nur eine begrenzte Produktmenge entstehen, während in der nachfolgenden Plateauphase eine derart große Menge an PCR-Produkten generiert wird, dass diese Produkte miteinander hybridisieren. Daher ist eine Quantifizierung in diesen beiden Phasen nicht sinnvoll (Holzapfel und Wickert, 2007).

Bei der Auswertung der Ergebnisse verwendet man den sogenannten C_T -Wert (Threshold Cycle = „Schwellenwert-Zyklus“) als Ausgangswert. Der C_T -Wert gibt jene Zykluszahl an, bei der die Fluoreszenz zum ersten Mal signifikant höher als die Hintergrundfluoreszenz war (Holzapfel und Wickert, 2007). Ausgehend vom C_T -Wert können interpretierbare Ergebnisse durch Verwendung der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode, die bereits im Kapitel 3.4.1.4 Vermessung und Auswertung beschrieben wurde, gewonnen werden.

3.6.2 Statistische Auswertung

Die Auswertung der in den Versuchen ermittelten Daten erfolgte zunächst mit dem Microsoft Programm Excel. In weiterer Folge wurden die so ermittelten Daten mithilfe des Softwarepaketes Prism von GraphPad statistisch ausgewertet. Es wurde von zwei bis drei durchgeführten in etwa übereinstimmenden Versuchen der aussagekräftigste Versuch herangezogen und ausgewertet (n=3), da bei dem qRT-PCR-Versuch nur insgesamt ein Versuch durchgeführt werden konnte. Die einzelnen Werte einer Gruppe wurden als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts dargestellt. Mithilfe des „one-way ANOVA-Test“ und des „Post-hoc-Tukey-Tests“ des Prism-Programmes konnten signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen oder Tagen errechnet werden. Dabei wurden die statistisch signifikanten Unterschiede wie folgt definiert und angegeben:

p-Wert (Signifikanzwert)	Art der Signifikanz	Darstellung im Graphen
$\leq 0,05$	signifikant	(*)
$\leq 0,01$	sehr signifikant	(**)
$\leq 0,001$	hochsignifikant	(***)

Tabelle 11: Definition und Darstellung der signifikanten Unterschiede

4 Resultate

4.1 Kurzzeiteffekte der Nanopartikel unter Zusatz von Mineralisationsmedium

4.1.1 Versuchsaufbau

Es sollten zwei Sorten von Hydroxyapatitnanopartikel – nämlich Silizium sowie Strontium dotierte Nanopartikel – an primären Mausosteoblasten der Fraktionen II und III ausgetestet werden. Für die Durchführung der Versuche wurden die primären OB in 48-Well Zellkulturplatten ausgesät. Nachdem die Zellen an der Oberfläche der Zellkulturplatten größtenteils adhärirt waren, konnten die Nanopartikel (NP) hinzugefügt werden. Diese wurden in vier verschiedenen Konzentrationen - 250, 100, 50 und 20 µg/ml – zu den Zellen zugesetzt. Die unterschiedlichen Konzentrationen wurden mithilfe einer Verdünnungsreihe durch Zugabe der Stocklösung der Nanopartikelsuspensionen zu dem MM hergestellt. Nach 3 Tagen der Zellkultivierung wurden die NP nicht mehr zugesetzt, aber die OB wurden im MM bis zum 14. Tag weiterkultiviert.

Zu verschiedenen Zeitpunkten der Kultur konnten unterschiedliche Wirkungen der NP auf die Zellen untersucht werden. So wurde zunächst der Einfluss der NP auf die Zellviabilität untersucht. Dafür wurde an den Tagen 1, 3, 7 und 14 nach erfolgter Zellaussaat eine Presto Blue Bestimmung durchgeführt. Die Bestimmung der Zellviabilität an Tag 1 diente als Referenzwert, das heißt alle anderen Werte wurden relativ zu diesen Werten angegeben, um die Schwankungen in der Zellzahl, die bei jeder Zellaussaat zustande kommen, auszugleichen.

Zur Untersuchung des Einflusses der Nanopartikel auf die Differenzierung der OB, wurde die alkalische Phosphatase als Differenzierungsmarker herangezogen. Zunächst erfolgte eine Färbung dieses Enzyms am Tag 7 der Kultur, wobei eine visuelle Untersuchung der Farbintensität Unterschiede im Differenzierungsgrad abschätzen ließ. Um genauere Ergebnisse zu erhalten, musste anschließend eine Quantifizierung der Aktivität der alkalischen Phosphatase erfolgen.

Danach wurde der Mineralisationsgrad der OB untersucht. Aufgrund dessen, dass die Nanopartikel selbst Hydroxylapatit (HA) – und damit auch Kalzium - als Hauptkomponente besaßen, konnte die Kalzifikation der Zellen nicht - wie üblich - durch Bestimmung der abgelagerten Kalziumkonzentration überprüft werden. Dies hätte falsch positive Ergebnisse zur Folge gehabt. Daher konnte ein etwaiger positiver Effekt der NP auf die Mineralisation der Knochenzellkultur nur durch Färben des Kollagens mit dem Farbstoff Sirius Red sowie durch Gegenfärben der nicht-kollagenösen Proteine mit dem Farbstoff Fast Green untersucht werden. Die Färbungen wurden einerseits 7 Tage, andererseits 14

Tage nach der Zellaussaat durchgeführt. Dabei wurde außerdem eine semiquantitative Bestimmung des Kollagens sowie der nicht-kollagenösen Proteine vorgenommen. In der Folge konnte das Verhältnis des Kollagens zu den nicht-kollagenösen Proteinen angegeben werden.

In weiterer Folge konnten die Ergebnisse dieser ersten Untersuchungen auf der Genebene überprüft werden. Zu diesem Zweck wurde eine qRT-PCR durchgeführt, die der Bestimmung der Expression wichtiger Osteoblastenmarker diente. Als Differenzierungsmarker wurden die alkalische Phosphatase (ALP) sowie der Transkriptionsfaktor Runt-related transcription factor 2 (Runx-2) herangezogen. Das Ausmaß der Osteoidbildung konnte anhand der Quantität des Kollagens vom Typ 1A1 (Col1A1) festgestellt werden, während die Mineralisationsphase durch die Osteocalcinexpression (OCN) untersucht werden konnte.

Bei den qRT-PCR-Versuchen wurde aus Kostengründen nur eine Konzentration der NP untersucht, nämlich 50µg/ml an Silizium sowie Strontium dotierten Hydroxylapatitnanopartikel (siHA-NP, srHA-NP).

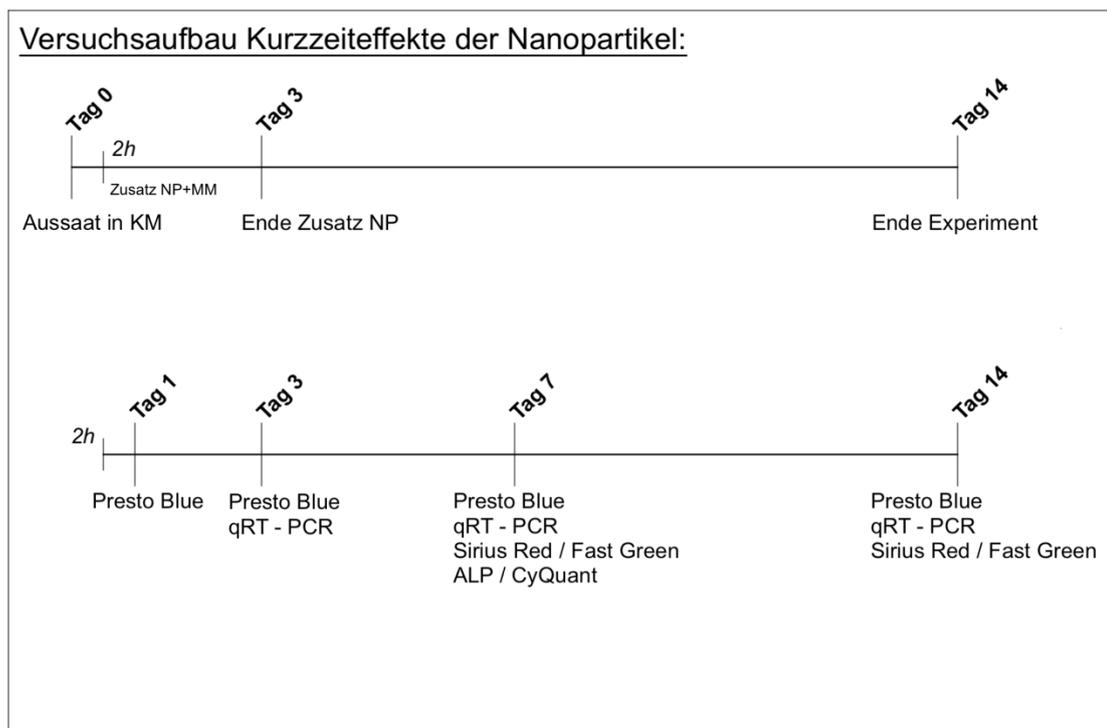


Abb. 12: Kurzzeiteffekte der Nanopartikel

Die Behandlung der Kultur mit den NP erfolgte zwischen zwei Stunden nach der Aussaat und Tag 3. Von Tag 3 bis Tag 14 wurden die Zellen ohne Zusatz NP aber mit Zusatz von MM weitergezüchtet.

Die Zellviabilität wurde mithilfe einer Presto-Blue Bestimmung an Tag 1, 3, 7 und 14 überprüft. Die Zelldifferenzierung wurde durch Färben von ALP und durch Bestimmung der ALP-Aktivität an Tag 7 untersucht. Die Differenzierung der Zellen auf der Genebene wurde mit einer qRT-PCR an Tag 3, 7 und 14 analysiert. An Tag 7 und 14 wurde eine Sirius Red/Fast Green Färbung durchgeführt, um die Mineralisationsfähigkeit der OB zu prüfen.

Als Positivkontrolle bei diesen Versuchen konnten OB, die im MM kultiviert wurden, das mit 250 µg/ml Natriumcitrat – also mit der höchsten verwendeten Nanopartikelkonzentration – versetzt wurde, verwendet werden. Dagegen konnten OB, die im KM mit Natriumzitratzusatz gezüchtet worden waren, als Negativkontrolle herangezogen werden. Da in den Nanopartikelsuspensionen Natriumzitat zur Aggregationshemmung enthalten war, wurde auch den Kontrollgruppen Natriumzitat zugesetzt. Damit sollte ausgeschlossen werden, dass die untersuchten Wirkungen von dem in der Nanopartikelsuspension enthaltenen Natriumzitat erzeugt wurden. Zusätzlich wurden OB ausschließlich im KM beziehungsweise ausschließlich im MM kultiviert, um den allgemeinen Zustand der Kultur während der Versuchsdurchführung überprüfen zu können. Jede Behandlungs- und Kontrollgruppe umfasste immer 3 Wells pro Zellkulturplatte und jeder Versuch wurde mindestens zweimal durchgeführt, um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten.

4.1.2 Einfluss der Silizium dotierten Hydroxylapatitnanopartikel auf die Zellviabilität

Betrachtet man den Verlauf der relativen Zellviabilität über den gesamten Zeitraum der Untersuchung (14 Tage), so stieg die Zellviabilität von Tag 1 bis Tag 7 in allen Gruppen stetig an, während sie zwischen Tag 7 und 14 wieder abnahm. Um die Zellviabilitätswerte unabhängig von Schwankungen in der Zellzahl, die sich bei einer Zellaussaat ergeben, betrachten zu können, wurden die am ersten Tag der Zellkultur erhaltenen Werte als Referenzwerte für alle folgenden Werte herangezogen. Dies konnte erreicht werden, indem die Werte von Tag 1 gleich eins gesetzt und die Werte aller folgenden Tage relativ zu jenen errechnet und dargestellt wurden. Daraus ergab sich ein konstanter Wert von eins am ersten Tag für alle Gruppe, der als Linie im Hintergrund des Diagramms dargestellt wurde. Von Tag 1 bis Tag 3 war der Anstieg der Zellviabilität in allen Behandlungsgruppen nicht signifikant höher als jener der Kontrollgruppe. Von Tag 1 bis Tag 7 erhöhte sich die Zellviabilität in Kontrollgruppe am stärksten. Ein signifikant niedrigerer Anstieg in diesem Zeitraum war nur bei Behandlung der Zellen mit 50 µg/ml der siHA-NP (p-Wert $\leq 0,05$) sowie mit 20 µg/ml der siHA-NP (p-Wert $\leq 0,01$) zu verzeichnen. Zwischen Tag 7 und Tag 14 der Untersuchungen kam es in der Kontrollgruppe zu einem Wachstumsstopp der Zellen, da sich in diesem Zeitraum die Zellviabilität kaum verändert hat. Dagegen verringerte sich die Zellviabilität in allen 4 Behandlungsgruppen. Die relativen Zellviabilitäten an Tag 14 waren in allen 4 Behandlungsgruppen signifikant geringer als jene der Kontrollgruppe: Bei den Behandlungsgruppen siHA 250, siHA 100 sowie siHA 20 war dieser Unterschied sehr signifikant (p-Wert $\leq 0,01$), während er in der Gruppe siHA 50 nur signifikant war (p-

Wert $\leq 0,05$).

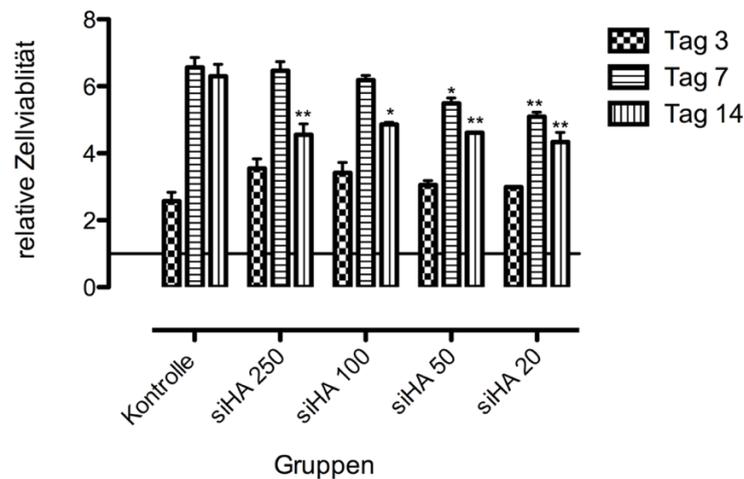


Abb. 13: Einfluss der siHA-NP auf die Zellviabilität der Maus-OB an Tag 3, 7 und 14
Die an den Tagen 3, 7 und 14 ermittelten Werte wurden immer zu jenen von Tag 1 normiert. Die Linie im Diagramm entspricht der normierten Zellviabilität an Tag 1 und entspricht daher genau 1.
Ein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe ist mit * (p -Wert $\leq 0,05$) und ** (p -Wert $\leq 0,01$) gekennzeichnet.

4.1.3 Einfluss der Strontium dotierten Hydroxylapatitnanopartikel auf die Zellviabilität

Bei Untersuchung der srHA-NP zeigten sich ähnliche Ergebnisse. Der Anstieg der Zellviabilität von Tag 1 zu Tag 3 fiel bei allen vier Behandlungsgruppen höher aus als bei der Kontrollgruppe. Signifikant war dieser Unterschied allerdings nur bei der Behandlungsgruppe, bei der ein Zusatz von $100\mu\text{g/ml}$ der srHA-NP erfolgte (p -Wert $\leq 0,01$). Bei Betrachtung der relativen Zellviabilität im Zeitraum von Tag 1 bis Tag 7, war ebenfalls ein Anstieg der Zellviabilität zu verzeichnen. Dieser fiel bei allen vier Behandlungsgruppen geringer aus als bei der Kontrollgruppe. Der geringere Anstieg der Zellviabilität in diesem Zeitraum im Vergleich zur Kontrollgruppe war nur signifikant bei den Behandlungsgruppen srHA 50 sowie srHA 20 (p -Wert $\leq 0,001$). Im Zeitraum von Tag 7 und Tag 14 nahm die Zellviabilität in allen 4 Behandlungsgruppen ab, während sie in der Kontrollgruppe nahezu konstant blieb. Der Unterschied in der relativen Zellviabilität an Tag 14 zwischen der Kontrollgruppe und den Behandlungsgruppen war sehr signifikant in den Gruppen srHA 250, srHA 100 und srHA 20 (p -Wert $\leq 0,01$). Ein hoch signifikanter Unterschied konnte in der Behandlungsgruppe mit $50\mu\text{g/ml}$ der srHA-NP festgestellt werden (p -Wert $\leq 0,001$).

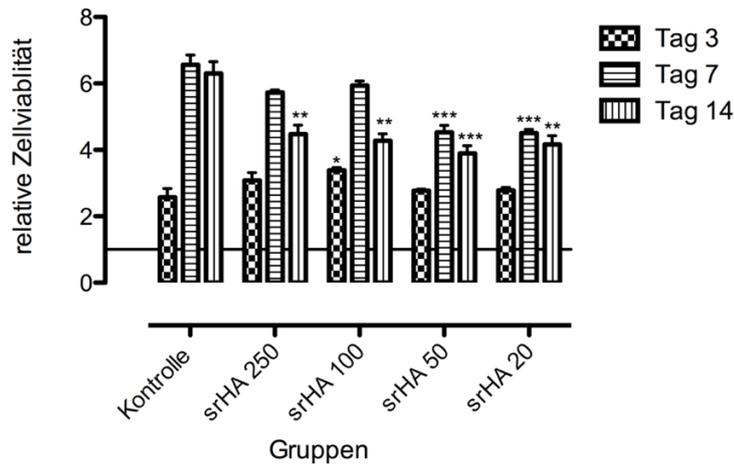


Abb. 14: Einfluss srHA-NP auf die Zellviabilität der Maus-OB an Tag 3, 7 und 14
 Die an den Tagen 3, 7 und 14 ermittelten Werte wurden immer zu jenen von Tag 1 normiert. Die Linie im Diagramm entspricht der normierten Zellviabilität an Tag 1 und entspricht daher genau 1.
 Ein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe ist mit * (p-Wert $\leq 0,05$), ** (p-Wert $\leq 0,01$) und *** (p-Wert $\leq 0,001$) gekennzeichnet.

4.1.4 Einfluss der Silizium dotierten Hydroxylapatitnanopartikel auf die Osteoblastendifferenzierung

Sowohl die Zellen der Kontrollgruppe als auch die Zellen der 4 Behandlungsgruppen (siHA 250, siHA 100, siHA 50 sowie siHA 20) waren ALP-positiv. Zwischen der Kontrollgruppe und den vier Behandlungsgruppen konnte bereits optisch ein Unterschied in der Farbintensität festgestellt werden. Innerhalb der Behandlungsgruppen war jedoch kein Unterschied in der Intensität der Färbung erkennbar.

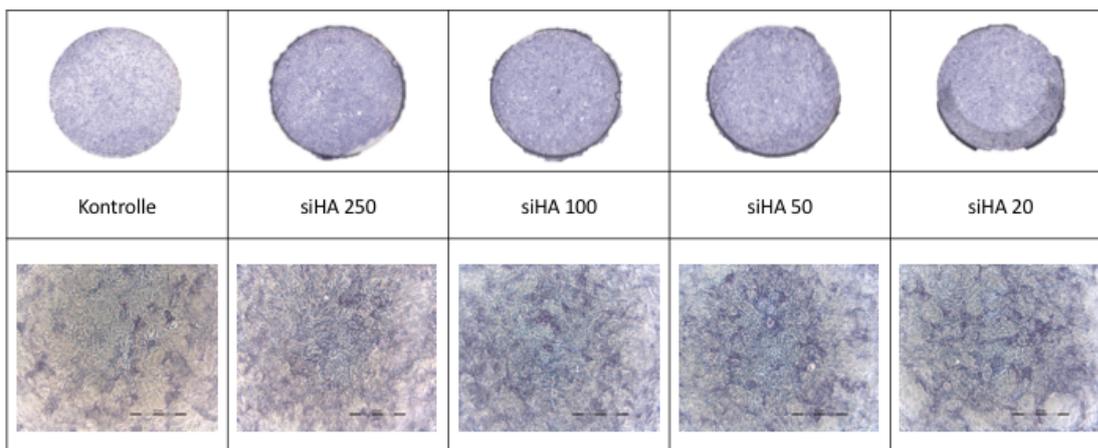


Abb. 15: Einfluss der siHA-NP auf die ALP-Aktivität der Maus-OB Die oberen Bilder zeigen einzelne Wells einer 48-well-Platte mit OB mit angefärbter ALP. Die unteren Bilder zeigen mikroskopische Aufnahmen der Zellen, wobei der Balken einem Maßstab von 0,4mm entspricht.

Um objektivere Ergebnisse zu erhalten wurde außerdem die ALP-Aktivität der OB bestimmt. Dies erfolgte über die Quantifizierung eines von ALP umgesetzten Substrates. Die erhaltenen Konzentrationen dieses Substrates wurden auf eine Zellzahl von 10^4 Zellen normiert. Die ALP-Aktivität war in allen vier Behandlungsgruppen größer als in der Kontrollgruppe. Allerdings waren die Unterschiede in der ALP-Aktivität im Vergleich zur Kontrollgruppe nur bei jenen OB, die in den beiden niedrigeren Konzentrationen an NP (siHA 50 und siHA 20) kultiviert wurden, signifikant (p -Wert $\leq 0,05$). Generell war die Tendenz erkennbar, dass mit sinkender Nanopartikelkonzentration die Menge an ALP stieg. Einzig jene OB, die mit $100\mu\text{g/ml}$ der siHA-NP behandelt wurden, folgten diesem Schema nicht. Diese zeigten eine geringere Konzentration an alkalischer Phosphatase, als man erwarten würde.

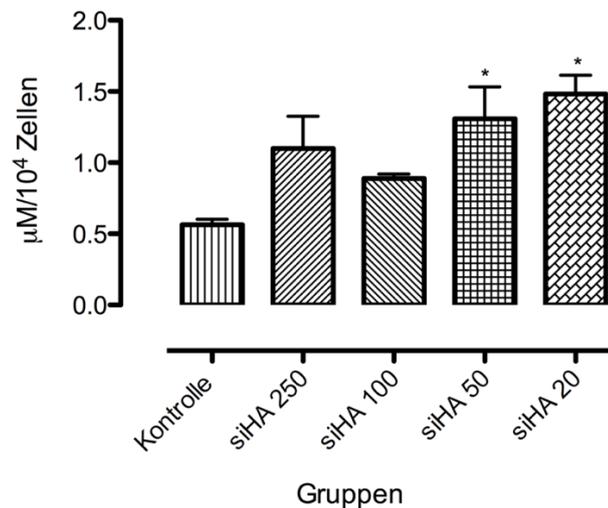


Abb. 16: Einfluss siHA-NP auf die ALP-Aktivität Maus-OB
Die Konzentration an von ALP umgesetzten Substrat wurde auf eine Zellzahl von 10^4 Zellen normalisiert dargestellt. Ein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe ist mit * (p -Wert $\leq 0,05$) gekennzeichnet.

4.1.5 Einfluss der Strontium dotierten Hydroxylapatitnanopartikel auf die Osteoblastendifferenzierung

Auch bei der Untersuchung der srHA-NP waren alle Zellen der Kontrollgruppe sowie der vier Behandlungsgruppen ALP-positiv. Ein Unterschied in der Farbintensität war mit freiem Auge zwischen der Kontrollgruppe und den vier Behandlungsgruppen (srHA 250, srHA 100, srHA 50 sowie srHA 20), nicht aber innerhalb dieser vier Behandlungsgruppen, zu erkennen.

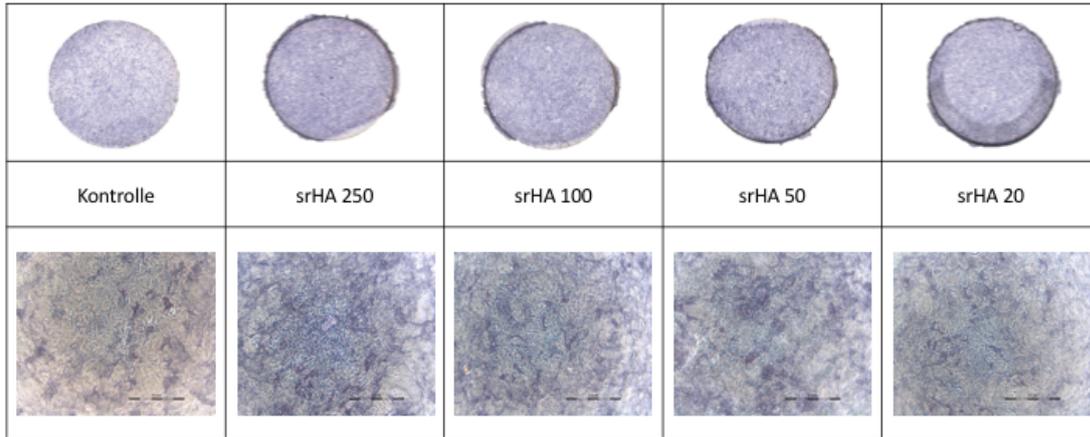


Abb. 17: Einfluss der srHA-NP auf die ALP-Aktivität der Maus-OB Die oberen Bilder zeigen einzelne Wells einer 48-well-Platte mit OB mit angefärbter ALP. Die unteren Bilder zeigen mikroskopische Aufnahmen der Zellen, wobei der Balken einem Maßstab von 0,4mm entspricht.

Die Bestimmung der ALP-Aktivität zeigte auch bei der Untersuchung der srHA-NP, dass alle vier Behandlungsgruppen eine höhere ALP-Aktivität aufwiesen als die Kontrollgruppe. Jedoch waren die Unterschiede in keinem Fall signifikant. Auch bei diesen Behandlungsgruppen fiel besonders die ALP-Konzentration der Gruppe srHA 100 auf, da diese wesentlich geringer war als die der anderen drei Behandlungsgruppen.

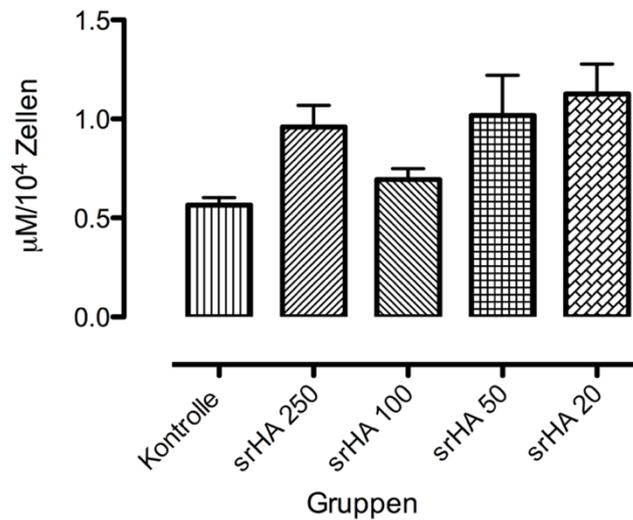


Abb. 18: Einfluss der srHA-NP auf die ALP-Aktivität der Maus-OB Die Konzentration an von ALP umgesetzten Substrat wurde auf eine Zellzahl von 10⁴ Zellen normalisiert dargestellt.

4.1.6 Einfluss der Silizium dotierte Hydroxylapatitnanopartikel auf die Mineralisation der Osteoblasten

Generell zeigten alle untersuchten Zellen nach 14 Tagen der Zellkultivierung eine rote Färbung ihres Kollagens sowie eine grüne Färbung ihrer nicht-kollagenösen Proteine. Alle Zellen der 4 Behandlungsgruppen wiesen schon bei optischer Betrachtung einen höheren Anteil der grün gefärbten, nicht-kollagenösen Proteinen auf als die Kontrollgruppe. Zudem schien sich bei Zusatz höherer Konzentrationen der Nanopartikel auch ein höherer Anteil an nicht-kollagenösen Proteinen zu ergeben.

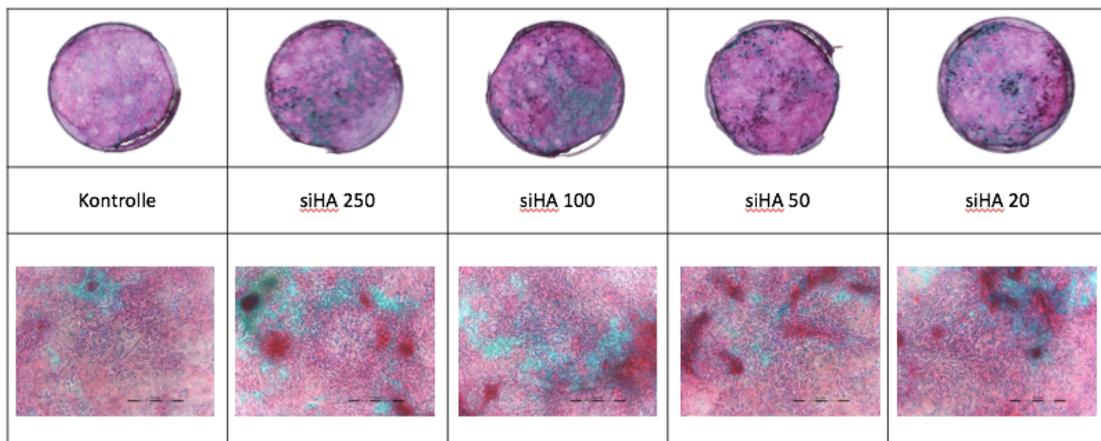


Abb. 19: Einfluss von siHA-NP auf Maus-OB an Tag 14 Die oberen Bilder zeigen einzelne Wells einer 48-well-Platte mit gefärbten OB. Die unteren Bilder zeigen mikroskopische Aufnahmen der Zellen, wobei der Balken einem Maßstab von 0,4mm entspricht.

In weiterer Folge wurden die Mengen an Kollagen und nicht-kollagenösen Proteinen quantifiziert, um objektiv beurteilbare Resultate zu erhalten. Bei Betrachtung der Ergebnisse an Tag 7 ergab die Quantifizierung, dass zwischen keinem der einzelnen Gruppen ein Unterschied hinsichtlich der Ratio von Kollagen zu nicht-kollagenösen Proteinen vorhanden war. Dagegen zeigte die Untersuchungen an Tag 14 starke Unterschiede zwischen der Kontrolle und den vier Behandlungsgruppen, wobei die Ratio bei der Kontrollgruppe wesentlich höher ausfiel als bei den einzelnen Behandlungsgruppen. Dieser Unterschied war sehr signifikant zwischen den OB der Kontrollgruppe und den OB, die in den beiden niedrigeren Nanopartikelkonzentrationen (siHA 50 und siHA 20) kultiviert wurden ($p\text{-Wert} \leq 0,01$). Hochsignifikant war der Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und den OB, die in 250 $\mu\text{g/ml}$ beziehungsweise in 100 $\mu\text{g/ml}$ siHA-NP kultiviert wurden.

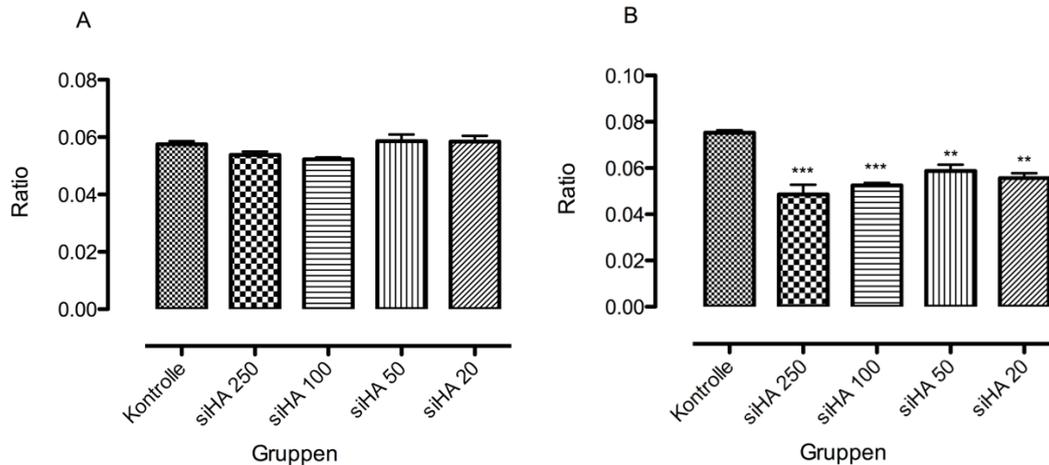


Abb. 20: Einfluss der siHA-NP auf Maus-OB A stellt die Ergebnisse nach 7 Tagen Zellkulturverierung und B die Ergebnisse nach 14 Tagen Zellkulturverierung da. Die ermittelten Werten wurden normiert, indem der Ratio zwischen Kollagen und nicht-kollagenösen Proteinen gebildet wurde. Je geringer dieser Ratio ausfiel, umso höher war der Mineralisationsgrad der Zellen. Ein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe ist mit ** (p-Wert $\leq 0,01$) und *** (p-Wert $\leq 0,001$) gekennzeichnet.

4.1.7 Einfluss der Strontium dotierte Hydroxylapatitnanopartikel auf die Mineralisation der Osteoblasten

Ähnliche Ergebnisse konnten bei Behandlung der primären OB mit srHA-NP beobachtet werden. Alle Gruppen reagierten positiv auf die Färbung mit Sirius Red und auf die Gegenfärbungen mit Fast Green. Alle 4 Behandlungsgruppen wiesen einen höheren Anteil grün gefärbter, nicht-kollagenöser Proteine auf. Bei höheren Nanopartikelkonzentrationen waren nach optischer Beurteilung auch höhere Anteile an nicht-kollagenösen Proteinen vorhanden.

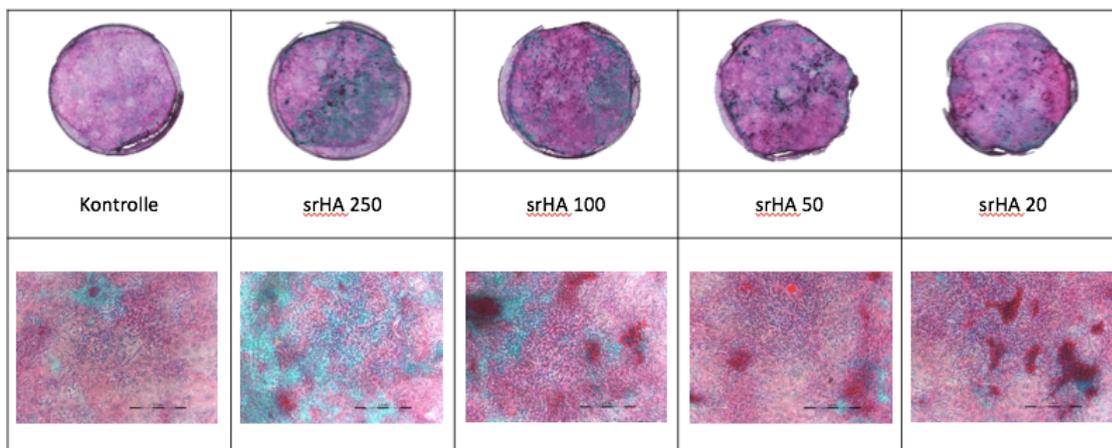


Abb. 21: Einfluss der srHA-NP auf Maus-OB an Tag 14 Die oberen Bilder zeigen einzelne Wells einer 48-well-Platte mit gefärbten OB. Die unteren Bilder zeigen mikroskopische Aufnahmen der Zellen, wobei der Balken einem Maßstab von 0,4mm entspricht.

Bei der Quantifizierung der gefärbten Kollagenen und nicht-kollagenösen Proteinen ergab sich, dass an Tag 7 der Zellkultur kein Unterschied in der Ratio von Kollagen zu nicht-

kollagenösen Proteinen bestand. Dagegen wiesen an Tag 14 alle Behandlungsgruppen eine niedrigere Ratio als die Kontrollgruppe auf. Dieser Unterschied war jedoch in keiner der Behandlungsgruppen signifikant.

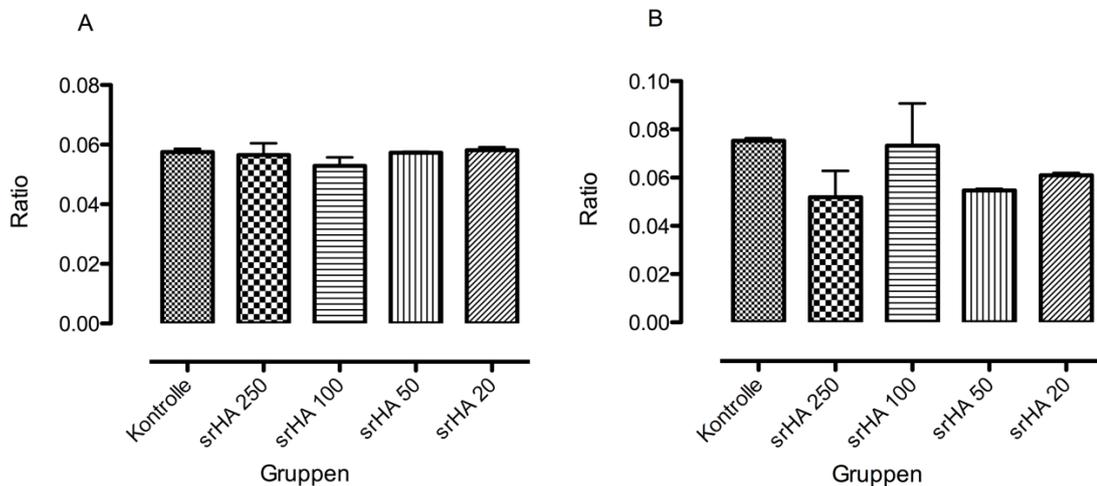


Abb. 22: Einfluss der srHA-NP auf Maus-OB A stellt die Ergebnisse nach 7 Tagen Zellkultivierung und B die Ergebnisse nach 14 Tagen Zellkultivierung dar. Die ermittelten Werten wurden normiert, indem der Ratio zwischen Kollagen und nicht-kollagenösen Proteinen gebildet wurde. Je geringer dieser Ratio ausfällt, umso höher ist der Mineralisationsgrad der Zellen. Ein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe ist mit ** (p -Wert $\leq 0,01$) und *** (p -Wert $\leq 0,001$) gekennzeichnet.

4.1.8 Einfluss der Nanopartikel auf die Genexpression der Osteoblasten

4.1.8.1 Einfluss der Nanopartikel auf die Runx-2-Expression

Die Runx-2-Expression stieg in allen Gruppen von Tag 3 bis Tag 7 an und fiel anschließend von Tag 7 bis Tag 14 ab. Am stärksten ausgeprägt war dieser Anstieg bei der Gruppe, die mit $50\mu\text{g}$ siHA-NP behandelt wurden (von 1,0 auf 1,5). Bei der Kontrollgruppe stieg die Runx-2-Expression in diesem Zeitraum um 0,4 Einheiten an (von 1,0 auf 1,4). Den geringsten Anstieg konnte in der Gruppe, die in $50\mu\text{g}$ srHA-NP kultiviert wurden, verzeichnet werden (von 1,0 auf 1,3). Im Zeitraum von Tag 7 bis Tag 14 ging die Runx-2-Genexpression in allen Gruppen zurück. In der Kontrollgruppe sank die Runx-2-Expression um 0,5 Einheiten (von 1,4 auf 0,9). Bei Betrachtung der beiden Behandlungsgruppen konnte eine stärkere Reduktion der Expression des Runx-2-Gens festgestellt werden. Bei der siHA-Gruppe fiel der Fold Change von 1,5 auf ungefähr 0,9 ab, während bei der srHA-Gruppe eine Reduktion von 1,3 auf 0,5 verzeichnet wurde.

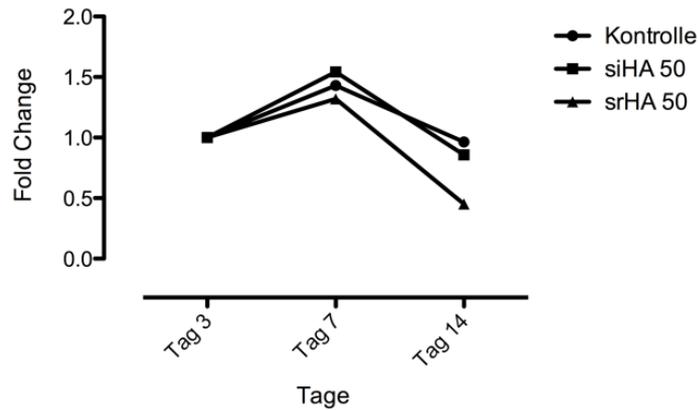


Abb. 23: Einfluss der siHA-NP und der srHA-NP auf die Runx-2-Expression Die Ergebnisse wurden als Fold Change zum Referenzgen (GAPDH) angegeben und auf die Werte von Tag 3 normiert dargestellt.

4.1.8.2 Einfluss der Nanopartikel auf die Kollagen-1A1-Expression

Die Kollagen Typ-1A1-Expression in der siHA-Gruppe nahm von Tag 3 bis Tag 7 zu (von 1,0 auf 1,1). Dagegen nahm in der Kontrollgruppe sowie in der srHA-Gruppe die Kollagen-Genexpression in diesem Zeitraum ab (von 1,0 auf 0,8). Von Tag 7 bis Tag 14 nahm die Kollagen-Genexpression in allen Gruppen ab. Bei der siHA-Gruppe reduzierte sich der Fold Change um ca. 0,4 Einheiten (von 1,1 auf 0,7). Die Kontrollgruppe exprimerte an Tag 14 um etwa 0,3 Einheiten weniger des Gens als an Tag 7 (von 0,8 auf 0,5). Bei der srHA-Gruppe war ein Abfall von 0,6 Einheiten zu beobachten (von 0,8 auf 0,3).

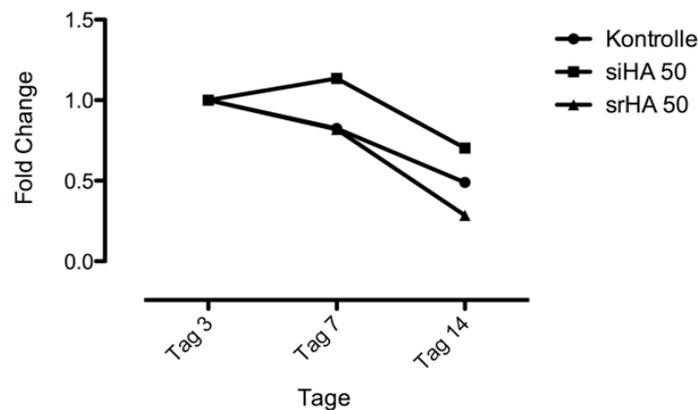


Abb. 24: Einfluss der siHA-NP und der srHA-NP auf die Kollagen Typ 1A1-Expression Die Ergebnisse wurden als Fold Change zum Referenzgen (GAPDH) angegeben und auf die Werte von Tag 3 normiert dargestellt.

4.1.8.3 Einfluss der Nanopartikel auf die ALP-Expression

Die ALP-Expression stieg in allen Gruppen von Tag 3 bis Tag 7 an und fiel anschließend von Tag 7 bis Tag 14 ab. Am meisten ALP wurde von den OB der siHA-Gruppe exprimiert. In dieser Gruppe kam es zu einem massiven Anstieg der ALP-Genexpression von Tag 3 auf Tag 7 (von 1,0 auf 6,9). In der srHA-Gruppe stieg die Expression des ALP-Gens beinahe um das 6-fache an (von 1,0 auf 5,9). In der Kontrollgruppe fiel der Anstieg vergleichsweise gering aus (von 1,0 auf 2,0). Im Zeitraum zwischen Tag 7 und Tag 14 reduzierte sich die ALP-Expression in allen Gruppen auf ungefähr die Hälfte der an Tag 7 ermittelten Werte. So sank in der siHA-Gruppe der Fold Change der ALP-Genexpression von 6,9 auf 3,2, in der srHA-Gruppe von 4,9 auf 1,7 und in der Kontrollgruppe von 2,2 auf 0,8 ab.

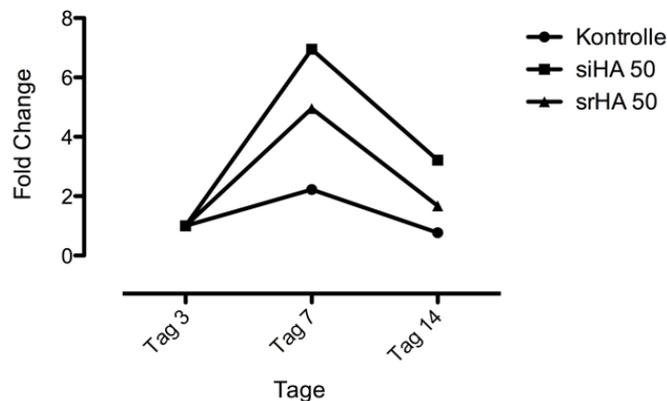


Abb. 25: Einfluss der siHA-NP und der srHA-NP auf die ALP-Expression Die Ergebnisse wurden als Fold Change zum Referenzgen (GAPDH) angegeben und auf die Werte von Tag 3 normiert dargestellt.

4.1.8.4 Einfluss der Nanopartikel auf die OCN-Expression

Die OCN-Expression stieg in allen Gruppen von Tag 3 bis Tag 14 an. Die höchste OCN-Expression erreichten jene OB, die mit srHA-NP behandelt wurden. Der Anstieg in der Genexpression in dieser Gruppe erfolgte nahezu linear. Von Tag 3 auf Tag 7 stieg der Fold Change von 1,0 auf 17,5 und von Tag 7 auf Tag 14 erhöhte sich der Fold Change von 17,5 auf 30,1 an. Bei der Behandlungsgruppe, bei der siHA-Nanopartikel zugesetzt wurden, war die Erhöhung der OCN-Genexpression nahezu gleich wie der der srHA-Gruppe (von 1,0 auf 17,7). Anschließend - also von Tag 7 auf Tag 14 - stieg der Fold Change der siHA-Gruppe wesentlich weniger steil an als bei der srHA-Gruppe (von 17,5 auf 19,9). Bei Betrachtung des zeitlichen Verlaufs der OCN-Genexpression der Kontrollgruppe konnte ebenfalls ein beinahe linearer Anstieg festgestellt werden. Allerdings stieg die OCN-Genexpression in dieser Gruppe wesentlich weniger steil an. Von Tag 3 auf Tag 7 erhöhte sich der Fold Change der OCN-Expression von 1,0 auf 6,4 und von Tag 7 bis Tag 14 stieg der Fold Change von 6,4 auf 10,3 an.

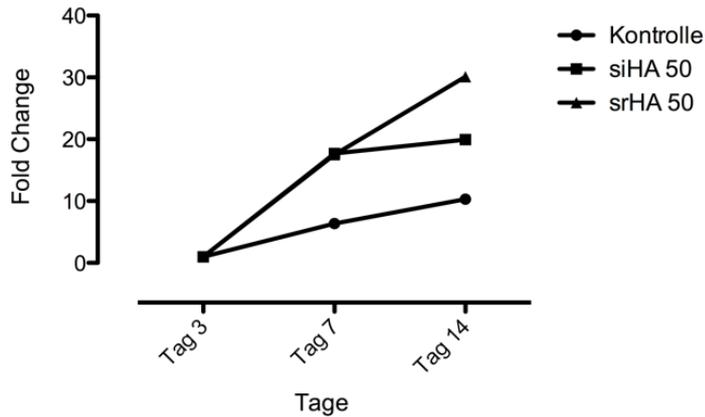


Abb. 26: Einfluss der siHA-NP und der srHA-NP auf die OCN-Expression Die Ergebnisse wurden als Fold Change zum Referenzgen (GAPDH) angegeben und auf die Werte von Tag 3 normiert dargestellt.

4.2 Langzeiteffekte der Nanopartikel ohne Zusatz von Mineralisationsmedium

Mithilfe dieser Versuche sollte festgestellt werden, ob siHA-NP oder srHA-NP in der Lage sind, die Differenzierung der OB ohne Zugabe des entsprechenden Differenzierungsmediums herbeiführen zu können. Hierfür wurden die Zellen für 7 Tage im KM – also α -MEM mit Zusatz von 10 % FCS – gezüchtet. Dem KM wurde jeweils eine Sorte der NP, entweder in der Konzentration 250 $\mu\text{g/ml}$ oder in der Konzentration 50 $\mu\text{g/ml}$, beigefügt. Nach 3 beziehungsweise 7 Tagen der Zellkultivierung wurde die Differenzierung der Zellen durch Färben der alkalischen Phosphatase überprüft. Als Kontrollgruppe wurden OB herangezogen, die im KM mit 250 $\mu\text{g/ml}$ Natriumzitat kultiviert wurden. Somit konnte die Intensität der Färbung bei der Kontrollgruppe und den Behandlungsgruppen verglichen werden. Jede Behandlungs- und Kontrollgruppe umfasste 3 Wells pro Zellkulturplatte und jeder Versuch wurde mindestens zweimal durchgeführt, um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten.

Versuchsaufbau Langzeiteffekte der Nanopartikel:

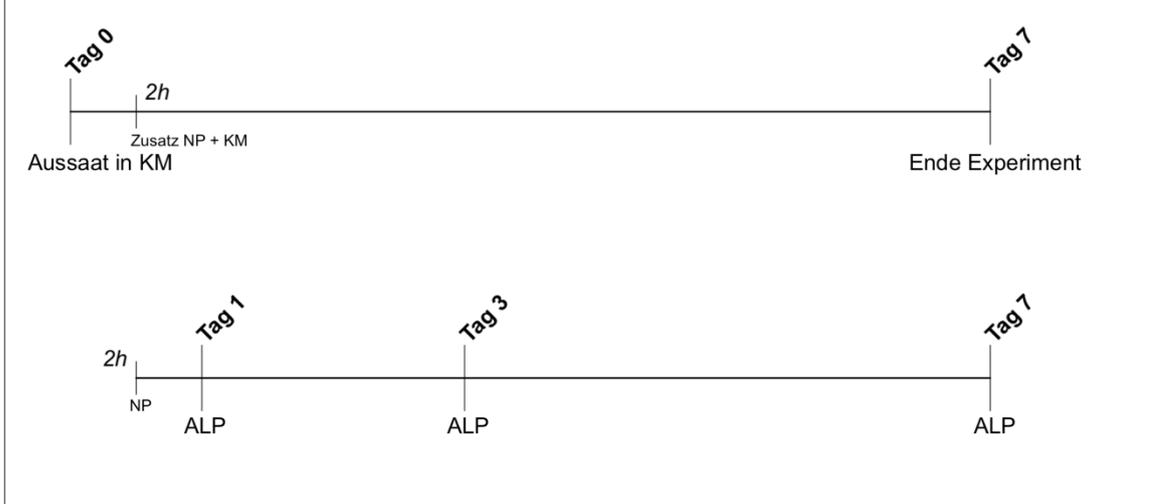


Abb. 27: Langzeiteffekte der Nanopartikel

Die Zellen wurden zwischen 2h nach der Aussaat und dem Ende des Experimentes an Tag 7 mit Nanopartikel behandelt. Dabei erfolgte keine Zugabe von MM, das heißt die Kultivierung erfolgte ausschließlich im KM.

Die Zelldifferenzierung wurde an Tag 3 und Tag 7 durch das Färben der alkalischen ALP überprüft.

4.2.1 Einfluss der Nanopartikel auf die Osteoblastendifferenzierung

Alle Gruppen reagierten positiv auf die ALP-Färbung. Bei visueller Betrachtung der Farbtintensität konnte kein Unterschied zwischen der Kontrolle und den 4 Behandlungsgruppen erkannt werden. Zudem konnte kein signifikanter Unterschied in der Farbtintensität zwischen den Zellen, die mit siHA-NP behandelt wurden und jenen OB, bei denen ein Zusatz von srHA-NP erfolgt war, ausgemacht werden.

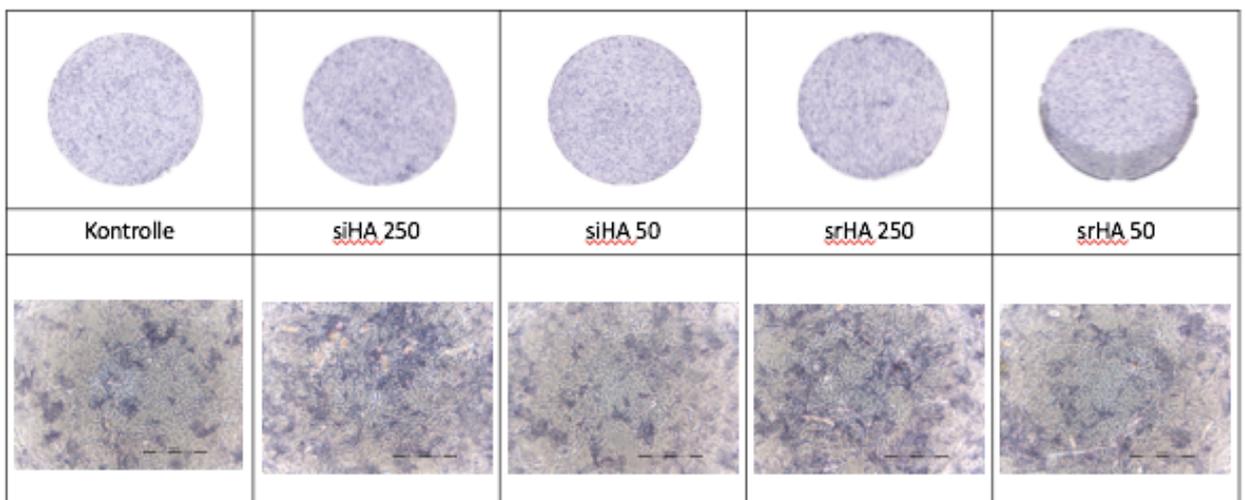


Abb. 28: Einfluss der siHA-NP und srHA-NP auf die ALP-Expression der Maus-OB ohne Zusatz von MM
Die oberen Bilder zeigen einzelne Wells einer 48-well-Platte mit OB mit angefärbter ALP. Die unteren Bilder zeigen mikroskopische Aufnahmen der Zellen, wobei der Balken einem Maßstab von 0,4mm entspricht.

5 Diskussion

Um Nanopartikel im Bereich des Knochen-Tissue Engineerings einsetzen zu können, müssen sie bestimmte Charakteristika aufweisen. Zunächst ist es wichtig, dass die Nanopartikel keine schädigende Wirkung auf knochenaufbauende OB ausüben. Außerdem sollten sie bioaktive Eigenschaften aufweisen, das heißt, sie sollten die Adhäsion, Proliferation und Differenzierung von OB fördern. Andererseits ist eine hemmende Wirkung auf OC wünschenswert (Griffin et al., 2016).

In dieser Diplomarbeit wurde die Wirkung von Silizium und Strontium dotierten Hydroxylapatitnanopartikel auf die Proliferation, Differenzierung und Aktivität von OB der Maus sowie auf eine etwaige hemmende Wirkung auf die Zellviabilität gegenüber OB untersucht. Als Zellkulturmodelle dienten primäre Mausosteoblasten. Die Nanopartikel wurden in vier unterschiedlichen Konzentrationen – nämlich 250 µg/ml, 100 µg/ml, 50 µg/ml und 20 µg/ml – ausgetestet.

Die beiden getesteten Nanopartikelsorten zeigten in keiner der verwendeten Konzentrationen hemmende Effekte auf Zellproliferation, im Gegenteil dazu war die ermittelte Zellviabilität im Zeitraum des Nanopartikelzusatzes sogar leicht erhöht. Die Proliferationsrate der OB wurde bis zum siebten Tag der Zellkultur kaum beeinflusst oder tendenziell erniedrigt. Zu späteren Zeitpunkten der Zellkultur nahm die Proliferation durch den Zusatz der Nanopartikel stark ab. Grund dafür könnte sein, dass in diesem Zeitraum die Differenzierung der OB unter dem Einfluss der Nanopartikel schon stärker fortgeschritten war. Diese Hypothese liegt nahe, da diverse Differenzierungsmarker, wie ALP oder Col1A1 an Tag 7 beziehungsweise OCN an Tag 14, erhöht waren. Außerdem mineralisierten die OB unter dem Einfluss der Nanopartikel stärker.

Andere Ergebnisse ergab eine Studie von Cappuccini et al., bei der Strontium dotierte Hydroxylapatitnanokristalle ausgetestet wurden. Bei diesen Untersuchungen wurde die Zellproliferation zu keinem Zeitpunkt durch die Zugabe der Nanokristalle signifikant beeinflusst. Zudem nahm die Proliferationsrate aller Zellen erst nach 21 Tagen der Zellkultivierung ab und nicht bereits nach 14 Tagen. Ein Grund für diese abweichenden Ergebnisse könnte sein, dass Capuccini et al. für diese Untersuchungen MG-63-Zellen verwendeten. Bei MG-63-Zellen handelt es sich um eine humane Zelllinie, die im Vergleich zu primären OB später zu differenzieren beginnen (Capuccini et al., 2009). Eine Studie von Xue et al., bei der ein strontiumhaltiges Hydroxylapatit-Keramikmaterial an OPC1-Zellen – eine humane Zelllinie aus OB-Vorstufen - ausgetestet wurde, ergab, dass das Biomaterial die Zellproliferation an Tag 3, 7 und 14 der Zellkultur förderte (Xue et al., 2006). Diese Ergebnisse stimmen größtenteils mit den Ergebnissen dieser Diplomarbeit überein.

Einzig eine erhöhte Zellproliferation an Tag 14 konnte in dieser Diplomarbeit nicht festgestellt werden.

Eine Untersuchung von Siliziumionen durch Zou et al. ergab, dass diese Ionen keine toxischen Effekte auf humane primäre OB zeigten. Die metabolische Aktivität und damit die Zellviabilität der Zellen wurde in den ersten Tagen der Zellkultur (Tag 1 bis Tag 7) nicht durch die Siliziumionen beeinflusst. Dies stimmt mit den Untersuchungen der vorliegenden Diplomarbeit überein. Dagegen zeigte sich eine Erhöhung der metabolischen Aktivität am 12. Tag der Zellkultur. Da in der vorliegenden Diplomarbeit der 12. Tag der Zellkultur nicht untersucht wurde, widerspricht das Ergebnis von Zou et al. nicht zwangsläufig den Resultaten dieser Arbeit (Zou et al., 2009).

Die Osteoblastendifferenzierung wurde durch den Zusatz der beiden Nanopartikelpräparationen positiv beeinflusst. Es zeichnete sich ein konzentrationsabhängiger Effekt ab, wobei niedrigere Nanopartikelkonzentrationen die Differenzierung stärker zu fördern schienen. Einzig die Nanopartikel, die in einer Konzentration von 100 µg/ml verwendet wurden, entsprachen nicht dem konzentrationsabhängigen Profil. In dieser Konzentration fiel die fördernde Wirkung auf die Zelldifferenzierung geringer als erwartet aus. Dabei könnte es sich um einen methodischen Fehler handeln, da sich ein ähnlicher Effekt zeigte, als das Experiment ein weiteres Mal durchgeführt wurde. Bei der Untersuchung der Wirkung der beiden Nanopartikelpräparationen auf die Osteoblastendifferenzierung auf RNA-Ebene zeigten sowohl die siHA-NP wie auch die srHA-NP einen fördernden Effekt auf Gene, die an der Differenzierung beteiligt sind, wobei die Silizium dotierten Nanopartikel sowohl eine erhöhte Runx-2- als auch eine erhöhte ALP-Produktion induzierten, während die srHA-NP lediglich einen fördernden Effekt auf die ALP-Genexpression zeigten. Allerdings wurde der qRT-PCR-Versuch nur einmal durchgeführt und es wurde bei diesem Versuch nur mit einer der vier Nanopartikelkonzentrationen – nämlich mit 50 µg/ml – gearbeitet.

Andererseits gibt es bereits Studien, die die fördernde Wirkung von silizium- oder strontiumhaltigen Biomaterialien auf die Differenzierung der OB beschreiben. So untersuchte Beck et al. die Wirkung von siliziumbasierten Nanopartikel auf die Differenzierung von MC3T3-Zellen. Diese Studie zeigte, dass die Nanopartikel die Genexpression von Differenzierungsmarker wie Runx-2, Osterix und BSP nach 7 Tagen der Zellkultur hochregulierten (Beck et al., 2012).

Zudem ergab die Studie von Capuccini et al., dass auch Strontium-dotierte Hydroxylapatitnanokristalle (srHA-NP) in der Lage sind, die Differenzierung von MG-63-Zellen über eine erhöhte Aktivität der ALP nach 7, 14 und 21 Tagen der Zellkultivierung

zu fördern. In dieser Studie war die Erhöhung der ALP-Aktivität abhängig vom Substitutionsgrad der Strontiumionen in den Hydroxylapatitnanokristallen. Je höher der Substitutionsgrad an Strontiumionen war – also 3 wt%, 5 wt% oder 10 wt% - umso stärker wurde die ALP-Aktivität zu allen 3 untersuchten Zeitpunkten – also an Tag 7,14 und 21 – erhöht. (Capuccini et al., 2009)

Sehr klare Ergebnisse lieferte die Untersuchung der Osteoblastenaktivität unter dem Einfluss der siHA-NP beziehungsweise srHA-NP. Die siHA-NP erhöhten massiv die Mineralisationsfähigkeit der Maus-OB an Tag 14, während an Tag 7 nur eine geringe Kalzifizierung stattfand. Der Grund dafür könnte sein, dass die Zellen an Tag 7 mehr proliferierten und differenzierten und aufgrund ihres Differenzierungsstatus noch keine Mineralisationsprozesse zu beobachten waren. Die srHA-NP erhöhten das Ausmaß der Mineralablagerung an Tag 14, allerdings nicht signifikant. Zusätzlich konnte die Osteocalcinproduktion der Zellen durch den Zusatz beider Nanopartikel stark erhöht werden. Da die Untersuchung der OCN-Genexpression mittels qRT-PCR nur ein einziges Mal durchgeführt werden konnte, ist dieses Ergebnis für sich allein nicht aussagekräftig genug. Zusammen mit den Resultaten aus der Untersuchung der Osteoblastenmineralisation, die eine Erhöhung der Mineralablagerung vor allem durch die siHA-NP ergab, ist es jedoch wahrscheinlich, dass diesen Resultaten eine erhöhte OCN-Genexpression zu Grunde lag. Ein weiterer Beweis für eine erhöhte Osteoblastenaktivität ist eine vermehrte Expression von Kollagen Typ 1A1. Die Col1A1-Genexpression wurde ebenfalls mithilfe der qRT-PCR untersucht und ergab, dass die siHA-NP eine erhöhte Kollagenexpression induzierten, während die srHA-NP dies nicht bewirken konnten.

Die Arbeitsgruppe von Cameron et al. erhielt bei der Testung der Wirkung von Silizium dotierten Hydroxylapatit (siHA) auf die Aktivität von humanen Präosteoblasten ähnliche Resultate. Dabei wurde die Mineralisation der humanen Zellen nach 14 sowie 21 Tagen der Zellkultur sowie die Kollagen-Genexpression am 7. Tag der Zellkultur gefördert (Cameron et al., 2013).

Die Studie von Capuccini et al. ergab, dass srHA-NP in der Lage waren, die OCN-Produktion nach 14 beziehungsweise 21 Tagen der Zellkultivierung von MG-63-Zellen zu fördern (Capuccini et al., 2009).

Auf Basis der *in-vitro*-Studien von Cameron et al. wurde in Zuge der praktischen Arbeit zu dieser Diplomarbeit auch eine Untersuchung zu Langzeiteffekten der Nanopartikel auf OB ohne Zugabe von Differenzierungsmedium – also von 50 µg/ml Ascorbinsäure und 10 mM β-Glycerophosphat - zu den OB durchgeführt. Die Studie von Cameron et al. postulierte, dass Silizium substituiertes Hydroxylapatit in der Lage ist, humane mesenchymale

Stammzellen zur Differenzierung anzuregen (Cameron et al., 2013). Daher sollte diese Hypothese auch für die siHA-NP sowie für die srHA-NP überprüft werden. Dabei stellte sich heraus, dass diese beiden Nanopartikel keinen induzierenden Einfluss auf die ALP-Aktivität primärer OB zeigten. Allerdings wurde dieses Ergebnis lediglich durch visuelle Betrachtung der Farbintensität infolge einer ALP-Färbung ermittelt und nicht durch eine Quantifizierung der ALP-Aktivität. Da jedoch *in vivo* sowohl Vitamin C als auch Phosphatquellen stetig für Vorstufen der OB zur Verfügung stehen, ist es fraglich welche Relevanz eine solche Untersuchung für die Entwicklung neuer Knochenersatzmaterialien hat.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass sowohl die siHA-NP als auch die srHA-NP induzierende Effekte auf die Osteoblastendifferenzierung und –aktivität aufweisen. Bei Vergleich der beiden Nanopartikelsorten scheinen die siHA-NP potenter zu sein, und wären daher bessere Kandidaten für die Entwicklung bioaktiver Nanomaterialien. Während die Zellviabilität sowie die Osteoblastenaktivität von beiden Nanopartikelpräparationen positiv beeinflusst wurde, konnte nur bei den siHA-NP eine erhöhte Expression des Differenzierungsmarkers Runx-2 sowie des Kollagens Typ 1A1 beobachtet werden. Zudem wurde nur unter dem Einfluss der siHA-NP die Mineralablagerung signifikant erhöht.

Es ist allerdings zu beachten, dass die Auswahl der richtigen Nanopartikelsorte nicht ausschließlich aufgrund einer fördernden Wirkung auf knochenaufbauende OB erfolgen sollte. Auch die Wirkungen der Nanopartikel auf die Viabilität, Differenzierung und Aktivität von knochenabbauenden OC ist für den Einsatz als Knochenersatzmaterial relevant. Eine Studie von Beck et al. zeigte, dass siHA-NP die Differenzierung von RAW 264.7 Zellen hemmen (Beck et al., 2012). Eine Studie von Capuccini et al. zeigte, dass srHA-NP die Proliferation von OC hemmen können. Für ihre Untersuchungen haben Capuccini et al. Osteoklastenvorstufen aus menschlichem Blut herangezogen. Die Zellproliferation wurde nach 21 Tagen der Zellkultur überprüft (Capuccini et al., 2009). Da in dieser Diplomarbeit die verwendeten Nanopartikel nicht auf ihre Wirkung gegenüber OC getestet wurden, kann kein Vergleich der Nanopartikel in dieser Hinsicht erfolgen. Zudem müssten die Nanopartikel vor einer Anwendung *in vivo* zu einem implantierbaren Biomaterial weiterverarbeitet werden. Da nicht klar ist, ob die positiven Effekte der Nanopartikel auf die Freisetzung der Silizium- beziehungsweise Strontiumionen oder auf die unterschiedliche Veränderung der Kristallstruktur des Hydroxylapatits zurückzuführen ist, könnten Veränderungen in der Struktur durch die Weiterverarbeitung zusätzliche Effekte zur Folge haben. Folglich besitzen beide Nanopartikelpräparationen das Potenzial, zu

einem erfolgsversprechenden Knochenersatzmaterial weiterverarbeitet zu werden. Um eine endgültige Auswahl treffen zu können, sind weitere Untersuchungen zum Wirkmechanismus erforderlich.

6 Zusammenfassung

Beim Knochen-Tissue Engineering werden dreidimensionale Matrices (Scaffolds) zusammen mit osteogenen Zellen und bioaktiven Substanzen entwickelt, die zur Regeneration von Knochendefekten eingesetzt werden sollen. Die im Knochen-Tissue Engineering verwendeten Biomaterialien bestehen meist aus Keramik, Polymeren oder Metallen und sie sollten osteoinduktive und osteokonduktive Eigenschaften besitzen. Um die Osseointegration sowie die knochenaufbauende Wirkung der Biomaterialien zu verbessern, können Hydroxylapatitnanopartikel integriert werden oder als Überzugsmaterial eingesetzt werden.

Bei Nanopartikel handelt es sich um Partikel, die kleiner als 100 nm sind. Sie können aufgrund ihrer hohen Bioaktivität und -affinität oder aufgrund der Bildung nanotopographischer Muster die osteoinduktiven und osteokonduktiven Eigenschaften des Biomaterials verbessern. Außerdem kann durch eine Dotierung der Nanopartikel mit bioaktiven Ionen das Knochenregenerationspotenzial der Biomaterialien weiter gesteigert werden.

Die vorliegende Diplomarbeit untersucht die Effekte von Silizium und Strontium dotierten Hydroxylapatitnanopartikel auf primäre Mausosteoblasten. Zunächst wurde die Wirkung der Nanopartikel auf die Zellviabilität überprüft. Anschließend wurde geprüft, ob sie einen induzierenden Effekt auf die Differenzierung sowie die Aktivität der OB haben. Zuletzt wurden Veränderungen in der Genexpression der Zellen untersucht. Dabei wurden die beiden Nanopartikelsorten in vier unterschiedlichen Konzentrationen - nämlich 250 µg/ml, 100 µg/ml, 50 µg/ml und 20 µg/ml - getestet.

Selbst in der höchsten Konzentration beeinträchtigten die Nanopartikel die Zellviabilität nicht. Im Gegenteil wurde die Zellproliferation durch den Zusatz der Nanopartikel erhöht. Die Zelldifferenzierung wurde durch beide Nanopartikelsorten gefördert. Das Ausmaß der Mineralablagerung und die Expression von Genen, die an der Zelldifferenzierung beteiligt sind wurde durch die siHA-NP stärker erhöht als durch srHA-NP. Folglich besitzen beide Nanopartikelpräparationen das Potenzial zu Knochenersatzmaterialien weiterverarbeitet zu werden. In Bezug auf die Wirkung auf OB zeigten sich die siHA-NP von Vorteil. Da allerdings der Erfolg eines Knochenersatzmaterials nicht nur von einer fördernden Wirkung auf OB, sondern auch von einer hemmenden Wirkung auf knochenabbauende OC abhängt, wären weitere Untersuchungen der Nanopartikel für eine endgültige Bewertung erforderlich.

7 Abstract

Bone-Tissue Engineering is a scientific field that deals with the production of scaffolds in combination with osteogenic cells and bioactive substances for the purpose of regenerating bone defects. Biomaterials used for Bone-Tissue Engineering are made of ceramics, polymers or metals and should possess osteoinductive and osteoconductive properties. Hydroxyapatite nanoparticles can be integrated or used as a bioactive coating in order to enhance osseointegration and bone formation.

Nanoparticles are smaller than 100 nm. The particles' high bioactivity and bioaffinity or their ability to form nanotopographic patterns facilitate the improvement of the osteoinductive and osteoconductive properties of a biomaterial. Moreover, ion doping can be used as a strategy to improve the bone regeneration potential of biomaterials.

This diploma thesis examines the effects of silicon or strontium doped hydroxyapatite nanoparticles on primary mouse osteoblasts. First the particles' effect on cell viability was analyzed. Subsequently, their influence on the differentiation and activity of osteoblasts was tested. Finally, changes in the gene expression of the cells were analyzed. The nanoparticles were tested in four concentrations (250 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$ und 20 $\mu\text{g/ml}$).

Even in the most potent concentration the nanoparticles did not reduce the cell viability. On the contrary, the cell proliferation was promoted. Additionally, both kinds of nanoparticles enhanced the cell differentiation. Under the influence of silicon-doped hydroxyapatite nanoparticles the mineral deposition as well as the expression of proteins which are important for the cell differentiation increased at a higher extend. As a consequence, both of the nanoparticles have the potential to be used as bone replacement material. The silicon doped nanoparticles proved to be more efficient regarding the positive effects on OB.

Nevertheless, a successful bone replacement requires not only a stimulation of bone forming OB, but also an inhibition of bone resorbing OC. Therefore, more studies on nanoparticles are essential for a final assessment.

8 Literaturverzeichnis

Ich habe mich bemüht, sämtliche Inhaber der Bildrechte ausfindig zu machen und ihre Zustimmung zur Verwendung der Bilder in dieser Arbeit eingeholt. Sollte dennoch eine Urheberrechtsverletzung passiert sein, ersuche ich um Meldung bei mir.

1. Florencio-Silva R, Sasso GR, Sasso-Cerri E, Simoes MJ, Cerri PS. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *Biomed Res Int*. 2015;2015:421746.
2. Hadjidakis DJ, Androulakis, II. Bone remodeling. *Ann N Y Acad Sci*. Dec 2006;1092:385-96.
3. Fuchs RK, Warden SJ, Turner CH. Bone anatomy, physiology and adaption to mechanical loading: Woodhead Publishing Ltd; 2009. 44 p.
4. Clarke B. Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol*. Nov 2008;3 Suppl 3:S131-9.
5. Wang J, Wang L, Fan Y. Adverse Biological Effect of TiO₂ and Hydroxyapatite Nanoparticles Used in Bone Repair and Replacement. *Int J Mol Sci*. May 24 2016;17(6). Epub 2016/05/28.
6. Ren L, Yang P, Wang Z, Zhang J, Ding C, Shang P. Biomechanical and biophysical environment of bone from the macroscopic to the pericellular and molecular level. *J Mech Behav Biomed Mater*. Oct 2015;50:104-22. Epub 2015/06/30.
7. Wang W, Yeung KWK. Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review. *Bioactive Materials*. 2017;2(4):224-47.
8. Rucci N. Molecular biology of bone remodelling. *Clin Cases Miner Bone Metab*. Jan 2008;5(1):49-56.
9. Katsimbri P. The biology of normal bone remodelling. *Eur J Cancer Care (Engl)*. Aug 08 2017. Epub 2017/08/09.
10. Robling AG, Castillo AB, Turner CH. Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling. *Annu Rev Biomed Eng*. 2006;8:455-98.
11. Arboleya L, Castaneda S. Osteoimmunology: the study of the relationship between the immune system and bone tissue. *Reumatol Clin*. Sep-Oct 2013;9(5):303-15. Epub 2013/06/04.
12. Holzapfel BM, Rudert M, Hutmacher DW. [Scaffold-based Bone Tissue Engineering]. *Orthopade*. Aug 2017;46(8):701-10. Epub 2017/07/21.
13. Ramesh N, Moratti SC, Dias GJ. Hydroxyapatite-polymer biocomposites for bone regeneration: A review of current trends. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. Jun 26 2017. Epub 2017/06/27.
14. Shi J, Votruba AR, Farokhzad OC, Langer R. Nanotechnology in drug delivery and tissue engineering: from discovery to applications. *Nano Lett*. Sep 08 2010;10(9):3223-30. Epub 2010/08/24.
15. Saiz E, Zimmermann EA, Lee JS, Wegst UG, Tomsia AP. Perspectives on the role of nanotechnology in bone tissue engineering. *Dent Mater*. Jan 2013;29(1):103-15. Epub

2012/08/21.

16. Li JJ, Kaplan DL, Zreiqat H. Scaffold-based regeneration of skeletal tissues to meet clinical challenges. *Journal of Materials Chemistry B*. 2014(42):7272-306.
17. Matassi F, Nistri L, Chicon Paez D, Innocenti M. New biomaterials for bone regeneration. *Clin Cases Miner Bone Metab*. Jan 2011;8(1):21-4. Epub 2011/01/01.
18. Griffin MF, Kalaskar DM, Seifalian A, Butler PE. An update on the Application of Nanotechnology in Bone Tissue Engineering. *Open Orthop J*. 2016;10:836-48. Epub 2017/02/22.
19. Lee EJ, Kasper FK, Mikos AG. Biomaterials for tissue engineering. *Ann Biomed Eng*. Feb 2014;42(2):323-37. Epub 2013/07/04.
20. Zhou H, Lee J. Nanoscale hydroxyapatite particles for bone tissue engineering. *Acta Biomater*. Jul 2011;7(7):2769-81. Epub 2011/03/29.
21. Walmsley GG, McArdle A, Tevlin R, Momeni A, Atashroo D, Hu MS, et al. Nanotechnology in bone tissue engineering. *Nanomedicine*. Jul 2015;11(5):1253-63. Epub 2015/03/21.
22. Loo SC, Moore T, Banik B, Alexis F. Biomedical applications of hydroxyapatite nanoparticles. *Curr Pharm Biotechnol*. Jun 2010;11(4):333-42. Epub 2010/03/05.
23. Laranjeira MS, Moco A, Ferreira J, Coimbra S, Costa E, Santos-Silva A, et al. Different hydroxyapatite magnetic nanoparticles for medical imaging: Its effects on hemostatic, hemolytic activity and cellular cytotoxicity. *Colloids Surf B Biointerfaces*. Oct 01 2016;146:363-74. Epub 2016/07/09.
24. Beck GR, Jr., Ha SW, Camalier CE, Yamaguchi M, Li Y, Lee JK, et al. Bioactive silica-based nanoparticles stimulate bone-forming osteoblasts, suppress bone-resorbing osteoclasts, and enhance bone mineral density in vivo. *Nanomedicine*. Aug 2012;8(6):793-803. Epub 2011/11/22.
25. Khan AF, Saleem M, Afzal A, Ali A, Khan A, Khan AR. Bioactive behavior of silicon substituted calcium phosphate based bioceramics for bone regeneration. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. Feb 01 2014;35:245-52. Epub 2014/01/15.
26. Zou S, Ireland D, Brooks RA, Rushton N, Best S. The effects of silicate ions on human osteoblast adhesion, proliferation, and differentiation. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. Jul 2009;90(1):123-30. Epub 2009/02/06.
27. Neves N, Linhares D, Costa G, Ribeiro CC, Barbosa MA. In vivo and clinical application of strontium-enriched biomaterials for bone regeneration: A systematic review. *Bone Joint Res*. Jun 2017;6(6):366-75. Epub 2017/06/11.
28. Frasnelli M, Cristofaro F, Sglavo VM, Dire S, Callone E, Ceccato R, et al. Synthesis and characterization of strontium-substituted hydroxyapatite nanoparticles for bone regeneration. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. Feb 01 2017;71:653-62. Epub 2016/12/19.
29. Capuccini C, Torricelli P, Boanini E, Gazzano M, Giardino R, Bigi A. Interaction of Sr-doped hydroxyapatite nanocrystals with osteoclast and osteoblast-like cells. *J Biomed Mater Res A*. Jun 2009;89(3):594-600. Epub 2008/04/26.
30. Xu M, McCanna DJ, Sivak JG. Use of the viability reagent PrestoBlue in comparison with alamarBlue and MTT to assess the viability of human corneal epithelial cells. *J Pharmacol Toxicol Methods*. Jan-Feb 2015;71:1-7.
31. Invitrogen. Presto Blue Cell Viability Reagent Protocol.

https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/PrestoBlue_Reagent_PIS_15Oct10.pdf.

32. Promega. Cell Viability. <https://at.promega.com/resources/product-guides-and-selectors/protocols-and-applications-guide/cell-viability/#title1>.
33. Golub EE, Boesze-Battaglia K. The role of alkaline phosphatase in mineralization. *Current Opinion in Orthopaedics*. 2007;444-8.
34. Sigma-Aldrich. Colorimetric Alkaline Phosphatase and Peroxidase Substrate Detection Systems. <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/articles/biofiles/volume3.4a6/Colorimetric-Alkaline-Phosphatase-and-Peroxidase-Substrate-Detection-Systems.pdf>.
35. Molecular-Probes. EnzCheck Phosphatase Assay Kit. <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/mp12020.pdf>.
36. Molecular-Probes. CyQuant Cell Proliferation Assay Kit. <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/mp07026.pdf>.
37. Jones LJ, Gray M, Yue ST, Haugland RP, Singer VL. Sensitive determination of cell number using the CyQUANT cell proliferation assay. *J Immunol Methods*. Aug 1 2001;254(1-2):85-98.
38. Young MF. Bone matrix proteins: their function, regulation, and relationship to osteoporosis. *Osteoporos Int*. 2003;14 Suppl 3:S35-42.
39. Chondrex. Sirius Red/Fast Green Collagen Staining Kit. <https://www.chondrex.com/documents/9046.pdf>.
40. Holzapfel B, Wickert L. Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). *Methoden und Anwendungsgebiete. Biologie in unserer Zeit*. 2007:120-6.
41. Qiagen. RNeasy Mini Handbook. 2012.
42. appliedbiosystems. High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits. 2016.
43. Kenneth JL, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real Time Quantitative PCR and the 2-delta-delta CT Method. *Methods* 25. 2001:402-8.
44. Xue W, Moore JL, Hosick HL, Bose S, Bandyopadhyay A, Lu WW, et al. Osteoprecursor cell response to strontium-containing hydroxyapatite ceramics. *Journal of Biomedical Materials Research*. 2006:804-14.
45. Cameron K, Travers P, Chander C, Buckland T, Campion C, Noble B. Directed osteogenic differentiation of human mesenchymal stem/precursor cells on silicate substituted calcium phosphate. *J Biomed Mater Res A*. Jan 2013;101(1):13-22. Epub 2012/06/27.

9 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: mikroskopischer Aufbau des Knochengewebes.....	12
Abb. 2: hierarchischer Aufbau des Knochengewebes.....	13
Abb. 3: schematische Darstellung des Knochenumbaus.....	15
Abb. 4: Osteoklastendifferenzierung.....	16
Abb. 5: Osteoblastendifferenzierung.....	17
Abb. 6: Prinzip des gerüstbasiertem Knochen-Tissue-Engineering.....	19
Abb. 7: nanotopografische Muster zur Verbesserung der Zelladhäsion.....	23
Abb. 8: Herstellung und Modifikation von nanobasierten Scaffolds.....	24
Abb. 9: Reduktion des schwach fluoreszierendem Resazurin durch die Aktivität lebender Zellen zum stark fluoreszierendem Resorufin.....	39
Abb. 10: Umsetzung von BCIP/NBT durch ALP.....	40
Abb. 11: typisches Temperaturprofil einer Polymerasekettenreaktion.....	47
Abb. 12: Kurzeiteffekte der Nanopartikel.....	51
Abb. 13: Einfluss der siHA-NP auf die Zellviabilität der Maus-OB an Tag 3, 7 und 14.....	53
Abb. 14: Einfluss srHA-NP auf die Zellviabilität der Maus-OB an Tag 3, 7 und 14.....	54
Abb. 15: Einfluss der siHA-NP auf die ALP-Aktivität der Maus-OB.....	54
Abb. 16: Einfluss siHA-NP auf die ALP-Aktivität Maus-OB.....	55
Abb. 17: Einfluss der srHA-NP auf die ALP-Aktivität der Maus-OB.....	56
Abb. 18: Einfluss der srHA-NP auf die ALP-Aktivität der Maus-OB.....	56
Abb. 19: Einfluss von siHA-NP auf Maus-OB an Tag 14.....	57
Abb. 20: Einfluss der siHA-NP auf Maus-OB.....	58
Abb. 21: Einfluss der srHA-NP auf Maus-OB an Tag 14.....	58
Abb. 22: Einfluss der srHA-NP auf Maus-OB.....	59
Abb. 23: Einfluss der siHA-NP und der srHA-NP auf die Runx-2-Expression.....	60
Abb. 24: Einfluss der siHA-NP und der srHA-NP auf die Kollagen Typ 1A1-Expression.....	60
Abb. 25: Einfluss der siHA-NP und der srHA-NP auf die ALP-Expression.....	61
Abb. 26: Einfluss der siHA-NP und der srHA-NP auf die OCN-Expression.....	62
Abb. 27: Langzeiteffekte der Nanopartikel.....	63
Abb. 28: Einfluss der siHA-NP und srHA-NP auf die ALP-Expression der Maus-OB ohne Zusatz von MM ..	63

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Liste der verwendeten Geräte	28
Tabelle 2: Liste der verwendeten Materialien	29
Tabelle 3: Liste der verwendeten Substanzen	31
Tabelle 4: Liste der Reagenzien zur Herstellung des Mastermixes.....	34
Tabelle 5: Liste der Endkonzentrationen der autoklavierten NP-Stocklösungen	37
Tabelle 6: Liste zur Herstellung der Standardreihe für die Quantifizierung der ALP-Aktivität.....	41
Tabelle 7: Liste zur Herstellung der Standardreihe für den CyQuant Proliferation Assay	42
Tabelle 8: Liste zur Herstellung der gewünschten RNA-Konzentrationen	45
Tabelle 9: Bedingungen für die „reversed Transkription“ der RNA in cDNA.....	46
Tabelle 10: Zyklen der qRT-PCR.....	46
Tabelle 12: Definition und Darstellung der signifikanten Unterschiede.....	49