

Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg-Essen

Aus der Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie

Untersuchungen zum abriebpartikelinduzierten Zelltod mittels
„live-cell Imaging“ im Kontext
der aseptischen Endoprothesenlockerung

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n
zur
Erlangung des Doktorgrades der Medizin
durch die Medizinische Fakultät
der Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von
Florian Dittrich
aus Düsseldorf
2017

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. J. Buer
1. Gutachter: Herr Prof. Dr. med. S. Landgraeber
2. Gutachter: Herr Univ.-Prof. Dr. rer. nat. M. Gunzer
Tag der mündlichen Prüfung: 20. Dezember 2017

1 Inhaltsverzeichnis

1	Inhaltsverzeichnis	3
2	Einleitung	5
2.1	Klinische Relevanz der aseptischen Endoprothesenlockerung	5
2.2	Grundlagen und Klassifikation der Endoprothesenlockerung	6
2.2.1	<i>Grundlagen der Endoprothesenlockerung</i>	6
2.2.2	<i>Erweiterte Konsensus-Klassifikation der Endoprothesenlockerung</i>	8
2.2.3	<i>Immunologische Mechanismen der aseptischen Endoprothesenlockerung</i>	8
2.3	Zelltod	12
2.3.1	<i>Apoptose</i>	12
2.3.2	<i>Nekrose</i>	15
2.3.3	<i>Nekroptose: Eine programmierte Nekrose</i>	16
2.3.4	<i>Autophagie</i>	16
2.3.5	<i>Pyroptose</i>	17
2.4	Periprotetische Osteolysebildung als Endstadium der aseptischen Endoprothesenlockerung	18
2.5	Fragestellung der Arbeit	20
3	Material und Methoden	21
3.1	Thp-1 Monozyten Zellkultur	21
3.1.1	<i>Auftauen/ Einfrieren der THP-1 Zelllinie</i>	21
3.1.2	<i>Kultivierung der THP-1 Zelllinie</i>	21
3.1.3	<i>Stimulation der THP-1 Zelllinie</i>	21
3.1.4	<i>Bestimmung der Gesamtzellzahl</i>	22
3.2	Abriebpartikel	22
3.3	Generierung und Isolation von Apoptotic Bodies	24
3.4	„live-cell“ Imaging Zeitraffer-Video-Mikroskopie	25
3.4.1	<i>Leica DMI-6000B Settings</i>	25
3.4.2	<i>Zelltoddetektion mittels morphologischer Kriterien und Annexin/ PI- Färbung</i>	26
3.4.3	<i>Statistische Auswertung der Zelltoddetektion</i>	27
3.5	Humaner TNF- α ELISA (Immunassay)	29
3.5.1	<i>Isolation zytokinhaltigen Überstands aus den Coinkubationen</i>	29
3.5.2	<i>Kalkulation der TNF-α Konzentration</i>	30
4	Ergebnisse	31
4.1	Qualitative Auswertung der Coinkubation mit Partikeln	31
4.2	Qualitative Auswertung der Coinkubation mit Apoptotic Bodies	32
4.3	Quantitative Auswertung der Zeitraffer Videos	34
4.3.1	<i>Vitale Zellen</i>	34
4.3.2	<i>Nekrotische Zellen</i>	37
4.3.3	<i>Apoptotische Zellen</i>	38
4.3.4	<i>Partikel und ABs im Vergleich</i>	40
4.4	TNF- α ELISA	41
5	Diskussion	42
5.1	Auswertung	42
5.2	Apoptose: Fluch oder Segen der Evolution?	44
5.3	Zelltoddetektion mittels live-cell Imaging	46
5.4	THP-1 Monozyten Zellkulturmodell – Grenzen des Modells	47

5.5	Humaner TNF- α ELISA.....	49
5.6	Apoptotic Bodies	50
5.7	Zelltod im Wandel: Quo vadis?	52
5.8	Fazit	56
6	Zusammenfassung	60
7	Literatur und Quellenverzeichnis	61
8	Anhang	74
8.1	Tabellenverzeichnis.....	74
8.2	Diagrammverzeichnis.....	74
8.3	Abbildungsverzeichnis.....	75
8.4	Abkürzungsverzeichnis	76
8.5	Material	79
8.5.1	<i>Verbrauchsmaterialien.....</i>	<i>79</i>
8.5.2	<i>Geräte</i>	<i>80</i>
8.5.3	<i>Chemikalien.....</i>	<i>80</i>
8.5.4	<i>Lösungen und Puffer</i>	<i>81</i>
8.5.5	<i>Zellkulturmedien</i>	<i>81</i>
8.6	Versuchsprotokoll humaner TNF- α Quantikine ELISA	82
8.6.1	<i>Material</i>	<i>82</i>
8.6.2	<i>Durchführung.....</i>	<i>83</i>
8.7	Rohdaten live-cell imaging	84
8.7.1	<i>Negativkontrolle und Cokultur mit CoCr-Partikeln.....</i>	<i>84</i>
8.7.2	<i>Negativkontrolle und Cokultur mit Polyethylenpartikeln</i>	<i>86</i>
8.7.3	<i>Negativkontrolle und Cokultur mit ABs.....</i>	<i>88</i>
8.8	Rohdaten TNF- α ELISA	90
8.8.1	<i>Vortest.....</i>	<i>90</i>
8.8.2	<i>ELISA.....</i>	<i>92</i>
9	Danksagung	94
10	Curriculum vitae	95

2 Einleitung

2.1 Klinische Relevanz der aseptischen Endoprothesenlockerung

Eine zentrale und bisher ungelöste Langzeitkomplikation der modernen Orthopädie stellt die begrenzte Standzeit aller im Knochen verankerten Implantate und Prothesen dar. Die Implantation einer Hüftendototalprothese ist mit einer Fallzahl von ca. 700.000 im Jahre 2011 (Wengler et al. 2014) eine der häufigsten Standardoperationen in den USA und in Deutschland. Weltweit liegt die Rate bei über einer Million primär implantierter Hüftarthroplastien (Purdue et al. 2007).

Mit einer durchschnittlichen Implantatstandzeit von über neunzig Prozent nach zehn Jahren erweist sich die totalendoprothetische Versorgung als der Goldstandard in der Therapie der fortgeschrittenen Coxarthrose (Wright et al. 2001).

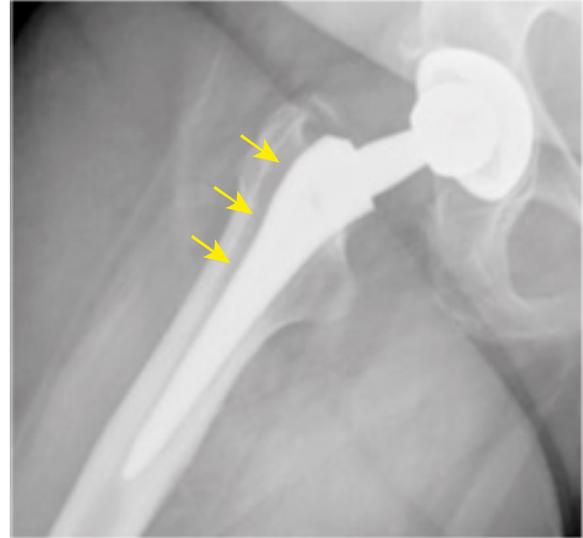


Abbildung 2-1 Röntgenaufnahme einer Hüfte re.
mit periprothetischem Lysesaum (Pfeil) bei aseptischer Endoprothesenlockerung

Studien zeigten, dass mit zunehmender Standzeit die Lockerungsrate drastisch ansteigt. Nach zwölf Jahren weisen bereits 30-50% der Prothesen massive periprothetische Osteolysen auf und müssen durch einen Implantatwechsel therapiert werden (Hallan et al. 2006). Hauptursache dieser mittel- bis langfristigen Komplikation ist die abriebinduzierte aseptische Lockerung bei 55,2% der Hüftprothesen und 29,8% der Knieprothesen (Sadoghi et al. 2013).

Frühere Erstimplantationen von Arthroplastien und eine steigende Anzahl von Primäroperationen, bedingt durch den demographischen Wandel in Deutschland, erhöhen die durch Lockerung bedingten Revisionsoperationen dramatisch (Wengler et al. 2014). Für die USA wird ein Anstieg der Wechseloperationen von 40.000 im Jahr 2005 um 137% bei Hüftprothesen und um 601% bei Knieprothesen in den nächsten 25 Jahren prognostiziert (Kurtz et al. 2007).

Revisionsoperationen führen zu einem progredienten Knochen- und somit Stabilitätsverlust und zu einem Anstieg der Komplikationsrate im Vergleich zur Primärimplantation (Bohl et al. 2016). Neben den durch die Implantatlockerung bedingten physischen und psychischen Beeinträchtigungen des Patienten kommt es zu einer

nicht zu vernachlässigenden ökonomischen Belastung des Gesundheitssystems. Daher ist es essentiell, ein besseres Verständnis über den Pathomechanismus zu erhalten, um die Rate aseptischer Endoprothesenlockerungen deutlich zu senken oder gar ganz zu verhindern.

Durch die stetige Weiterentwicklung chirurgischer Operationstechniken und den Einsatz innovativer Materialien wie Keramik oder quervernetztem ultrahochmolekulargewichtigem Polyethylen (crosslinked UHMWPE), die sich durch hervorragende tribologische Materialeigenschaften auszeichnen, konnte die volumetrische Abriebpartikelentstehung bereits gesenkt werden. Die Verwendung härterer Substanzen führt jedoch zu einer Erhöhung der Anzahl kleiner ($<1\mu\text{m}$) Abriebpartikel, die zusätzlich biologisch aktiver sind (Fisher et al. 2004). Die grundlegende Problematik der abriebgetriggerten periprothetischen Osteolyse bleibt damit bestehen.

2.2 Grundlagen und Klassifikation der Endoprothesenlockerung

2.2.1 Grundlagen der Endoprothesenlockerung

Die Pathogenese der septischen Lockerung ist durch intraoperative Kontamination des Implantats oder des periprothetischen Spalts begründet, die in einer akuten, putriden Infektion, aber auch als „low-grade-Infektion“ apparent werden kann. Neben dieser direkten Kontamination ist auch eine sekundäre Infektion der Prothese durch Bakteriämie, z.B. nach Zahnextraktion oder Bagatellverletzung, möglich (Morawietz et al. 2004).

Demgegenüber steht die aseptische Lockerung, ätiologisch primär auf die initial fehlende Verankerung der Prothese im Knochen - als Voraussetzung zur stabilen Osteointegrität - zurückführbar (Krismer et al. 1996). Sekundär ist die Prothesenlockerung in einer durch Abriebpartikel induzierten periprothetischen Osteolyse begründet, die zu einem Versagen des Implantats führen können. Biomechanische Faktoren wie auf die Prothese einwirkende Scherkräfte, hohe mechanische Belastungen oder Mikrobewegungen des verwindungssteifen Implantats gegenüber den umgebenden marginal elastischen Knochenstrukturen induzieren potenziell direkt den aseptischen Lockerungsprozess, führen jedoch simultan zu einer gesteigerten Produktion von Abriebpartikeln (Landgraeber et al. 2014).

Hauptentstehungsort der Abriebpartikel, die bereits in den 1990er Jahren als zentrale Trigger der periprothetischen Lyse identifiziert wurden (Dumbleton et al. 2002; Willert 1990), ist der mit dem Inlay aus Polyethylen artikulierende künstliche Hüftkopf aus Keramik oder Metall. Aufgrund dieser häufig eingesetzten Gleitpaarung besteht die Mehrheit der in die Synovia abgegebenen Abriebpartikel aus Polyethylen, gefolgt von Metallpartikeln und Polymethylmethacrylat-Knochenzementpartikeln, sofern eine Zementierung durchgeführt wurde.

Diverse Studien diskutierten die Mechanismen der Abriebpartikelmigration aus der Gelenkhöhle an die Knochen-Implantat-Grenze. Als Quintessenz ist festzuhalten, dass Mikrobewegungen des Implantats sowie Druckpeaks der intrakapsulären Synovialflüssigkeit - bis zu 700mmHg bei Belastung (Aspenberg et al. 1998) - oszillierend Gelenkflüssigkeit in das Implantat-Knochen-Interface pressen.

Diese hydrodynamischen Druckwellen führen primär zu einer Dissektion des periprothetischen Interfacebereiches mit folgender Reorganisation zur Synovial-like Interface Membrane (SLIM). Sekundär werden in der Gelenkflüssigkeit gelöste Abriebpartikel an die Implantat-Knochen-Grenze gepumpt. Je kleiner die Partikel, desto weiter penetrieren sie das Gewebe entlang des Implantats (Konttinen et al. 2005).

Die anfallenden Abriebpartikel können zu einem geringen Teil durch perivaskuläre Lymphgefäße abtransportiert werden. Entstehen mehr Abriebpartikel als abtransportiert werden können, dekompensiert das System und es entstehen periprothetische Lysen (Willert 1990).

Diese Osteolysen sind Resultat einer durch zelluläre Phagozytose von Abriebpartikeln initiierten aseptischen Inflammation. Die bei diesem Prozess gebildeten Zytokine führen zu einer gesteigerten Proliferation aktiver Osteoklasten (OC) aus Osteoklasten-Vorläuferzellen (OPC) und zu einer Rekrutierung weiterer immunpotenter Zellen.

2.2.2 Erweiterte Konsensus-Klassifikation der Endoprothesenlockerung

Die erweiterte Konsensus-Klassifikation unterteilt die SLIM in 4 Subtypen anhand definierter histopathologischer Kriterien²:

- Typ I: Neosynovialis vom abriebinduzierten Typ
 - Arthrofibrose abriebinduziert, Implantatallergie
- Typ II: Neosynovialis vom infektiösen Typ
- Typ III: Neosynovialis vom Mischtyp
- Typ IV: Neosynovialis vom Indifferenztyp
 - Arthrofibrose nicht-abriebinduziert

Die weiteren Überlegungen konzentrieren sich aus Übersichtsgründen auf die aseptische Endoprothesenlockerung gemäß Typ I der Neosynovialis.

Pathognomonisch für die Typ I Pseudomembran ist die massive Infiltration von Makrophagen und mehrkernigen Riesenzellen, die Abriebpartikel phagozytiert haben. Vereinzelt sind Lymphozyten detektierbar. Auffällig ist, dass Abriebpartikel oft von nekrotischen Arealen umgeben sind (Krenn et al. 2014).

2.2.3 Immunologische Mechanismen der aseptischen Endoprothesenlockerung

Im Fokus der abriebpartikelinduzierten aseptischen Inflammation stehen Makrophagen. Diese sind traditionell als Phagozyten des angeborenen Immunsystems klassifiziert (Rao et al. 2012).

Die zugrundeliegenden zellulären Mechanismen der Interaktion und Aktivierung von Makrophagen bei der Phagozytose von Abriebpartikeln und die daraus folgende Ausschüttung inflammatorischer Mediatoren sind nicht abschließend geklärt. Der Terminus „Phagozytose“ beschreibt einen internalisierenden Prozess, bei dem Partikel wie Bakterien, Viren oder totes Zellmaterial in die Zelle aufgenommen werden. Durch Bildung des „Phagosoms“, eines membran-gebundenen Vesikels, wird dieser Vorgang prozessiert (Nagata et al. 2010).

Studien zeigten, dass Abriebpartikel als „Danger-associated molecular Pattern Molecules“ (DAMPs) mit Hochregulation intrazellulärer Inflammasome (Caicedo et

² Akzidentell treten Osteonekrosen, Osteomyelitiden im Implantatlager oder Periprothetische Ossifikationen in allen Subtypen auf.

al. 2013) oder als „Pathogen-associated molecular Pattern Molecules“ (PAMPs) über „Pattern-recognition Rezeptoren“ (PRRs) detektiert werden (Lähdeoja et al. 2010).

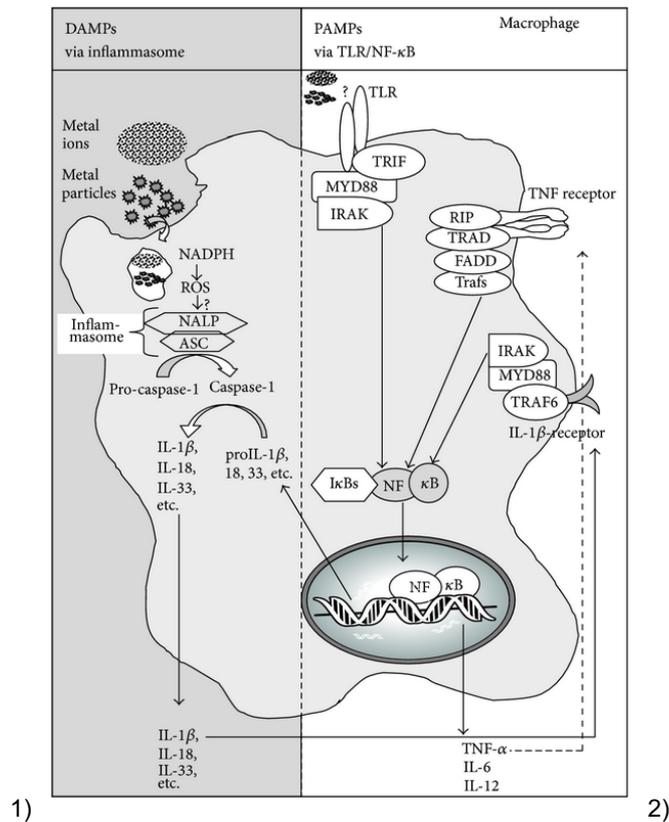


Abbildung-2-2 Schematische Darstellung der intrazellulären Signalkaskaden auf Abriebpartikel im Makrophagen (Signalkaskaden laufen parallel ab und interagieren)

- 1) DAMPS erhöhen die intrazelluläre Konzentration Reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und NADPH durch lysosomale Destabilisierung. „NOD-like Receptors“ (NLRs) wie z.B. NALP3 (NACHT, LRR and PYD Domains containing Protein 3) und ASC (Apoptosis-associated speck-like Protein containing a CARD) reagieren auf diese intrazelluläre Stressreaktion mit der Formierung eines Multiproteinkomplexes, den sogenannten Inflammasomen. Der aktive Inflammasomkomplex spaltet Pro-Caspase 1 zu Caspase 1 (auch „Interleukin-1 converting Enzyme“ genannt). Durch die Bildung von Caspase 1 kommt es zur Freisetzung von IL-1 β und IL-18 (Mariathasan et al. 2007).
 - 2) Die Adapterprotein (MyD88) abhängige, abriebpartikelaktivierte TLR Signalkaskade führt über eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B zu partikelinduzierten Osteolysen und Produktion von Tumornekrosefaktor α (TNF- α), IL-1 β und IL-12 (Beutler 2004).
- (Abb. aus Landgraeber et al. 2014)

PRRs wie „toll-like Rezeptoren“ (TLRs) oder „Scavenger-Rezeptoren“ sind evolutionär konservierte transmembranäre Signalrezeptoren. Sie befinden sich auf den Oberflächen von Zellen des angeborenen Immunsystems und ermöglichen die Detektion und Phagozytose potenziell pathogener, infektiöser Strukturen (Leifer et al. 2016).

DAMPs sind nicht-infektiöse Gefahrensignale und induzieren die intrazelluläre Inflammation-Aktivierung. Neben anorganischen Substanzen wie z.B. Abriebpartikeln können auch intra- bzw. extrazelluläre Proteine oder DNA zur Bildung dieser cytosolischen Inflammationkomplexe führen (Bianchi 2007). Diese heterogene Gruppe organischer DAMPs wird bei mechanischen, strahlenbedingten oder giftassozierten Gewebsschäden freigesetzt.

Konsens besteht darüber, dass es durch die Interaktion von Abriebpartikeln mit Makrophagen zur Ausschüttung der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-11, IL-15, TNF- α (Tumor Necrosis Factor α), TGF- α (Transforming Growth Factor α), GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor), M-CSF (Macrophage Colony Stimulating Factor), PDGF (Platelet-Derived Growth Factor) und EGF (Epidermal Growth Factor) und der Chemokine IL-8, MCP-1 (Monocyte Chemotactic Protein 1), MIP-1 α (Macrophage Inflammatory Protein-1 α) und CCL17/TARC (Thymus and Activation Regulated Cytokine) kommt (Landgraeber et al. 2014). Hervorzuheben ist, dass die zelluläre immunologische Reaktion durch Größe, Form, Inkubationszeit, Oberflächenbeschaffenheit und Anzahl der Partikel stark beeinflusst wird (Purdue et al. 2006). Besonders kleine Partikel sind laut Green et al. (1998) biologisch aktiver und führen in vitro zu einer höheren Zytokinausschüttung bei Makrophagen.

Die Interaktionen dieses Zytokinmilieus sind komplex und Gegenstand aktueller Forschung. Übereinstimmung besteht darin, dass durch dieses pro-inflammatorische Milieu weitere immunpotente Zellen wie Fibroblasten, mehrkernige Riesenzellen, Osteoklasten und Osteoblasten sowohl direkt als auch indirekt aktiviert werden (Abbildung 2-3). Neben Zellen des angeborenen Immunsystems können auch Zellen des adaptiven Immunsystems involviert sein. Besonders der -im Vergleich zu anderen Zellen des adaptiven Immunsystems - in der SLIM dominierende T-Helfer Lymphozyt (TH1) kann eine unkontrollierte aseptische Inflammation durch Rekrutierung und Aktivierung weiterer Makrophagen fördern (Revell 2008).

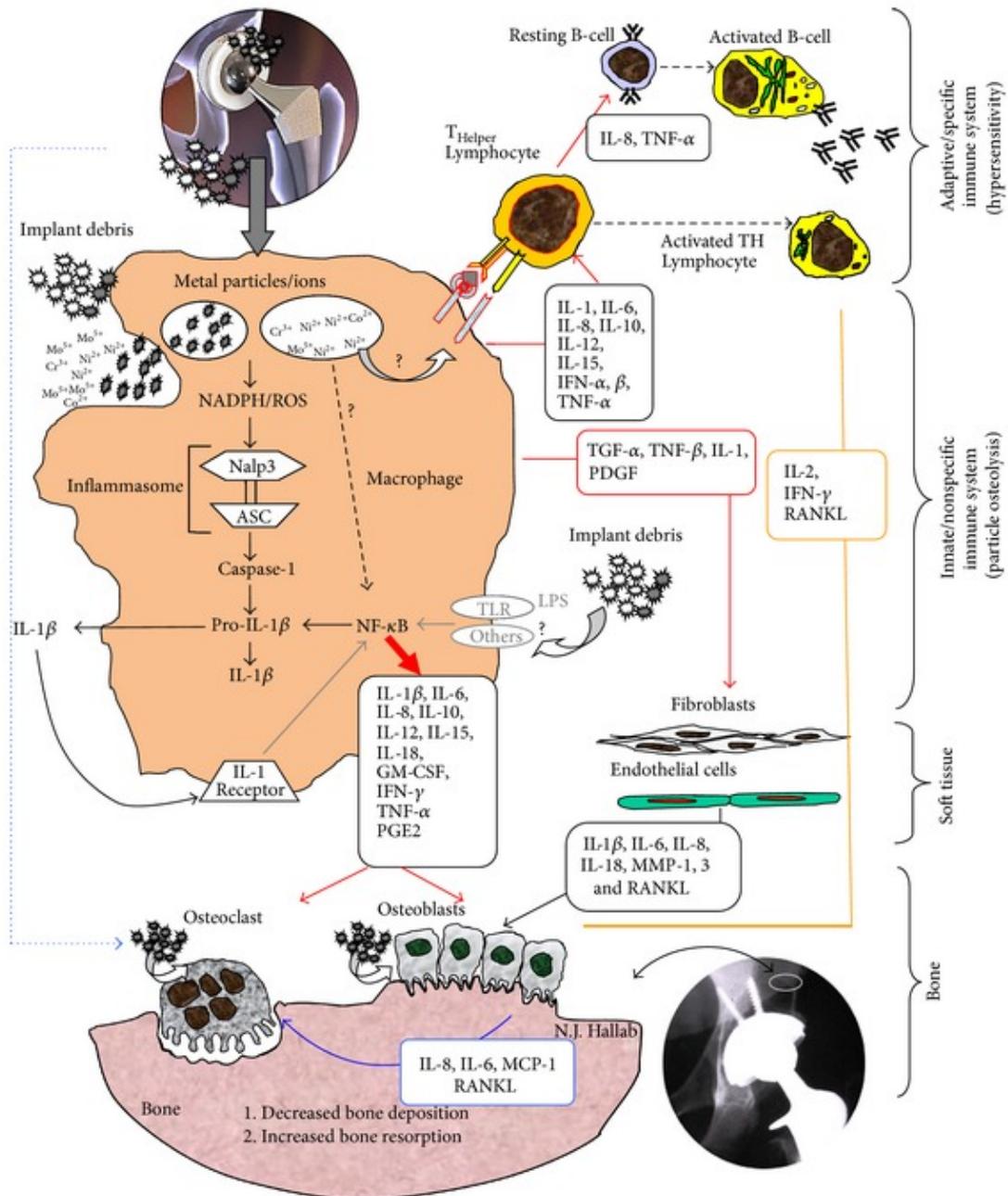


Abbildung 2-3 Schematische Darstellung der intra- und interzellulären Interaktion von Makrophagen nach Abriebpartikelkontakt.

Abriebpartikelaktivierte Makrophagen rekrutieren/ aktivieren durch Zytokine und Chemokine weitere Immunzellen. (Abb. aus Landgraeber et al. 2014)

2.3 Zelltod

Der Begriff des „Zelltods“ ist als irreversibler Plasmamembranintegritätsverlust definiert (Kroemer et al. 2009).

Im Kontext der aseptischen Endoprothesenlockerung zeigen sich neben periprothetischer Osteolyse und einer abriebinduzierten, aseptischen Inflammation auch apoptotische Reaktionen der Abriebpartikel phagozytierenden Makrophagen in vivo (Landgraeber et al. 2006; Olga L. Huk 2001) und in vitro (Catelas et al. 1999). Daher ist es essentiell, das Verständnis über die Mechanismen der Apoptose, die Clearance des anfallenden Zellschrotts wie z.B. Apoptotic Bodies und die mögliche Potenzierung einer abriebinduzierten Inflammation weiter auszubauen.

Die Grundlagen der Apoptose und weiterer Zelltodmechanismen werden im Folgenden genauer erläutert. Aktuelle Zelltodstudien diskutieren eine Plethora an weiteren programmierten und unprogrammierten Zelltodsignalwegen (de Almagro et al. 2015; Fuchs et al. 2015; Lalaoui et al. 2015; Tait et al. 2014).

2.3.1 Apoptose

Die Apoptose stellt die am besten charakterisierte und evolutionär konservierte Form der genetisch programmierten, aktiven Form des Zelltods dar.

Apoptotische Prozesse sind auf die Aktivierung intrazellulärer Signalmediatoren - Caspasen - angewiesen, die durch extrinsische oder intrinsische Stimuli aktiviert werden können. Caspasen (Cystein-dependent Aspartate-specific Proteases) liegen in der Zelle als inaktive Vorstufen (Pro-Caspasen) vor und werden durch proteolytische Spaltung aktiviert. Neben apoptoseinduzierenden Funktionen initiieren Caspasen auch pro-inflammatorische Signalwege (Shalini et al. 2015).

2.3.1.1 Intrinsischer (Bcl-2 regulierter) Signalweg

Der intrinsische Signalweg wird durch intrazellulären Stress wie z.B. irreparable DNA-Schäden, oxidativen Stress, Hitzeschock oder endoplasmatisch-retikulären Stress initiiert. Dies führt zu einer Hochregulation verschiedenster Transkriptionsfaktoren mit Aktivierung von Bax und Bak, die proapoptotische Proteine der apoptoseregulierenden Bcl-2 Familie³ sind (Westphal et al. 2011).

³ Bak (Bcl-2 homologous antagonist/killer); Bax (BCL2 associated X protein); Bcl-2 (B-cell lymphoma 2)

Die Aktivierung von Bax oder Bak stellt den „Point of no Return“ dar, an der die Zelle den apoptotischen Signalweg beschreitet. Bax und Bak bilden Homooligomere, die die äußere Mitochondrienmembran penetrieren und zu einem Verlust des transmembranären Potenzials führen (Czabotar et al. 2014). Daraus folgt der Austritt von apoptoseinduzierenden Proteinen⁴ (Lalaoui et al. 2015) aus dem Intermembranraum. Cytochrom C fusioniert mit Procaspase-9, dem Adapterprotein APAF1 (Apoptotic Protease Activating Factor 1) und dATP zum aktivierten Caspase-9 Holoenzym, dem Apoptosom. Dieses spaltet und aktiviert die Effektor-Caspasen-3 und -7, die zu den typischen apoptotischen und morphologischen (3.4.2) Veränderungen führen (Li et al. 1997).

Die apoptoseinduzierenden Proteine SMAC/DIABLO (Second Mitochondria-derived Activator of Caspases) und HTRA 2 (High Temperature Requirement protein A2) blockieren den genetisch codierten Apoptoseinhibitor IAP (Inhibitors of Apoptosis Proteins), neutralisieren somit dessen anti-apoptotische Aktivität und führen zu weiterer Caspaseaktivität (Chai et al. 2000).

2.3.1.2 Extrinsischer Signalweg

In vielen Zellen, speziell Immunzellen, ist die extrinsische Zelltodinduktion durch die Bindung von Todesliganden an eine Subgruppe der membranständigen TNF-Rezeptor Familie getriggert. Apoptosesignale, z.B. ein irreparabler intrazellulärer Schaden oder der Verlust der Zelladhäsion, können interzellulär weitergeleitet werden (Kiraz et al. 2016). Die am besten charakterisierten Liganden sind der Fas-Ligand (bindet an CD95) und TNF- α (bindet an TNFR1).

Die Todesrezeptoren besitzen eine cytoplasmatische homologe Sequenz, die sogenannte „Death Domain“. Bindet der Ligand an den Rezeptor, kommt es zur Clusterbildung dreier „Death Domains“ mit einem intrazellulären Adaptermolekül zum DISC (Death inducing Signaling Complex). Dieser membranständige Komplex bewirkt die Aktivierung von Procaspase-8 und die Initiation der Apoptose (Lalaoui et al. 2015).

Gemeinsam mit dem intrinsischen Signalweg konvergiert der extrinsische in einer gemeinsamen Endstrecke, der Aktivierung des Schlüsselmediators Pro-Caspase-

⁴ Cytochrom C, Second Mitochondria-derived Activator of Caspases, Apoptosis-Inducing Factor, High Temperature Requirement Protein

3. Caspase-3 führt durch Interaktion mit CAD (Caspase-Activated DNase) zum Abbau von DNA⁵ und der Strukturproteine Laminin und Aktin (Elmore 2007).

2.3.1.3 Clearance apoptotischer Zellen

Die „immunologisch stille“ Elimination apoptotischer Zellen stellt die finale Stufe des programmierten Zelltodes dar. Frühapoptotische Zellen schütten chemotaktische „find-me“ Signale wie Fraktalkin, Lysophosphatidylcholin, Spingosin-1-Phosphat und die Nukleotide ATP und UTP aus, die zur Migration von professionellen Phagozyten an die sterbende Zelle führen (Hochreiter-Hufford et al. 2013). Sogenannte „eat-me“ Signale markieren apoptotische Zellen durch Expression von Calretikulin, Annexin oder des Phospholipids Phosphatidylserin an der Membranaußenseite. Diese Markierung ermöglicht eine effiziente Differenzierung in vitale und apoptotische Zellen. Die Detektion apoptotischer „eat-me“ Signale gelingt über eine Plethora an Rezeptoren auf der Oberfläche von Phagozyten. Während des frühapoptotischen Prozesses wird potenziell inflammatorisch oder immunogen aktiver intrazellulärer Inhalt - DAMPs - (Bianchi 2007) in Form von Apoptotic Bodies verpackt und abgeschnürt (Kinchen et al. 2007).

Apoptotic Bodies sind 1-5µm große exosomale Vesikel, die zelluläre Komponenten wie DNA, RNA, Histone oder ribonukleäre Proteine durch eine Plasmamembran umhüllen (Gyorgy et al. 2011). Makrophagen phagozytieren die Apoptotic Bodies kurz nach ihrer Freisetzung. Da es während des Prozesses zu keinem Austritt von freien zellulären Bestandteilen kommt, wird eine noninflammatorische Elimination der DAMPs ermöglicht.

Die Digestion der Apoptotic Bodies führt physiologisch zu einer Ausschüttung immunsuppressiver Zytokine wie z.B. TGF-β (Transforming Growth Factor β) oder IL-10 (Elliott et al. 2010). Nicht eliminierte spätapoptotische Zellresiduen gehen in einen autolytisch-nekrotischen Prozess über. Da die Plasmamembran nekrotischer Zellen permeabel ist, kommt es durch den Austritt von intrazellulärem Inhalt - DAMPs - zur Initiation einer immunologischen, proinflammatorischen Reaktion. Diese Autolyse wurde von Wyllie et al. (1980) als sekundäre Nekrose bezeichnet. Sowohl eine drastisch erhöhte Apoptoserate als auch eine Störung der apoptotischen Clearance-Funktion kann zu apoptotischen Zellresiduen mit Ausbildung von

⁵ Chromatinkondensation (Pyknosis), Chromatinfragmentation (Karyorrhexis)

Pathologien führen.

2.3.1.4 Apoptotische Prozesse im Kontext der abriebpartikelinduzierten Endoprothesenlockerung

Bisher thematisierten nur wenige Studien die abriebpartikelinduzierte Apoptose⁶ im Rahmen der aseptischen Endoprothesenlockerung.

Erste Hinweise auf eine Beteiligung apoptotischer Aktivität in der periprothetischen Membran aseptisch gelockerter Hüft- oder Knieprothesen lieferte Zhang et al. (1999) durch den immunhistochemischen Nachweis des apoptoseregulierenden Proteins Bax⁷. Abriebpartikel, besonders Metallpartikel, demaskieren sich als die primären Induktoren apoptotischer Prozesse, vorrangig phagozytierender Zellen, in situ (Stea et al. 2000). Weitere Studien wiesen apoptoseassoziierte Marker in periprothetischen Membranen nach und diskutierten die Hemmung der partikelinduzierten Apoptose als potenzieller pharmazeutischer Angriffspunkt (Olga L. Huk 2001; Reno et al. 2003). Landgraeber et al. (2006) gelang der Nachweis der Überexpression p53- bzw. BAK-positiver Makrophagen und Riesenzellen in der Interfacemembran aseptisch gelockerter Prothesen. Wurde die Funktion der Apoptose im Lockerungsprozess von Prothesen bislang als protektiv diskutiert, gingen Landgraeber et al. (2009) erstmalig von einer pathologischen Apoptose aus.

Die selektive Hemmung apoptoseassoziiierter intrazellulärer Signalkaskaden in einem Maus-Osteolyse-Modell hebt die Bedeutung der Apoptose im aseptischen Lockerungsprozess von Implantaten hervor. Die Verwendung eines Pan-Caspase-Inhibitors führte sowohl zu einer Minderung der partikelinduzierten Apoptose als auch der Osteolysen durch Osteoklasten (Landgraeber et al. 2009).

Ein Zusammenhang zwischen periprothetischen Osteolysen und apoptotischen Prozessen liegt somit auf der Hand. Der dahinterstehende Pathomechanismus konnte aber bisher nicht gefunden werden.

2.3.2 Nekrose

Die Nekrose ist definiert als unkontrolliert ablaufender Zelltod mit Absenz apoptotischer oder autophagischer Prozesse als Folge massiver pathologischer Zellschädigungen durch traumatische, infektiöse oder ischämische Ereignisse.

⁶ Pubmed Recherche ergab 35 Treffer auf die Stichworte „apoptosis aseptic loosening“ (Stand: 26.12.2016)

⁷ Bax (BCL-2 Associated X protein) stellt einen Co-Faktor des Tumorsuppressorgens p53 dar und wirkt proapoptotisch

Diese letalen Läsionen führen zu einem Zusammenbruch des Zellmetabolismus mit anschließender Ruptur der Plasmamembran und einem Anschwellen der Zelle. Durch den Verlust der Membranintegrität kommt es zum Austritt freier zellulärer Bestandteile - DAMPs - der toten Zelle, die eine inflammatorische Reaktion des Immunsystems provozieren (Golstein et al. 2007).

Anders als die vollständige Clearance apoptotischer Zellreste können nekrotische Zellen mittels Makropinozytose nur teilweise eliminiert werden (Krysko et al. 2006).

2.3.3 Nekroptose: Eine programmierte Nekrose

Aktuelle Studien terminologisieren eine neue, kontrollierte Form des nekrotischen Zelltods als „Nekroptose“, da sowohl nekrotische als auch apoptotische Charakteristika identifizierbar sind. Die Nekroptose ist als programmierter, Caspase-unabhängiger Zelltod definiert, initiiert durch die Aktivität der Schlüsselmoleküle RIPK-1, -3 (Serine/ Threonine Receptor interacting Protein Kinase) und MLKL (Mixed Lineage Kinase like) (Lalaoui et al. 2015).

Nekroptotische Stimuli werden durch Rezeptoren der TNF-Superfamilie vermittelt, die bei Aktivierung den intrazellulären RIPoptosomkomplex⁸ bilden (Vanden Berghe et al. 2014). RIPK-1 und -3 sind beides Substrate der aktiven Caspase-8. Die Spaltung führt zur Initiation des apoptotischen Signalwegs und simultan zur Hemmung extensiver Nekrose. Ist kein proapoptotisches Caspase-8 vorhanden, formt RIPK-1 und -3 zusammen mit MLKL das Nekrosom (de Almagro et al. 2015). Aktiviertes MLKL durchläuft eine Konformationsänderung und bildet eine Strukturdomäne aus, die die Plasmamembran penetriert. Dies führt zum Verlust der Membranintegrität und zum inflammatorischen Exitus der Zelle (Hildebrand et al. 2014).

2.3.4 Autophagie

Das „Nomenclature Committee on Cell Death“ empfiehlt die Verwendung des Begriffs der „Autophagie“ ausschließlich bei Zelltodprozessen, deren Progress durch pharmakologische oder genetische Hemmung autophagischer Signalwege limitiert werden kann (Galluzzi et al. 2015).

Die Autophagie stellt einen lysosomabhängigen Prozess dar, der die Autodigestion kleinster intrazellulärer Moleküle als auch ganzer Organellen ermöglicht. Durch

⁸ Komplex aus: deubiquiniertem RIPK-1, FADD (Fas-associated protein with Death Domain), Caspase-8 und cFLIP (Cellular FLICE (FADD-like IL-1 β -converting enzyme)-inhibitory protein)

Umhüllung des zu eliminierenden Materials in intrazellulären Vesikeln formt sich das Autophagosom im Cytoplasma. Die Fusion des Autophagosoms mit Lysosomen führt zu einem Abbau des organischen Inhalts (Mizushima 2011).

Eine basale, niedrige Autophagierate existiert in jeder ruhenden Zelle. Die Stimulation autophagischer Prozesse erfolgt als Respons auf Stresssituationen wie Nahrungsmittelkarenz oder zytotoxische Stimuli. Durch exzessive Autophagosomenakkumulation kann die Konzentration reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) zytotoxische Werte erreichen und den Tod der Zelle induzieren (Yu et al. 2006).

2.3.5 Pyroptose

Die Pyroptose ist eine Caspase-abhängige Form des programmierten Zelltods und eo ipso inflammatorisch. Im Unterschied zur ebenfalls Caspase-initiierten Apoptose basiert der pyroptotische Signalweg auf der Aktivität der proinflammatorischen Caspasen-1 und -5 (Tait et al. 2014).

Auslöser des pyroptotischen Zelltods sind verschiedene pathogene Stimuli, besonders aber virale oder bakterielle Infektionen, die über eine Hochregulation intrazellulärer Inflammasome Caspase-1 aktivieren. Neben Unterschieden auf molekularer Ebene lässt sich die Pyroptose auch morphologisch klar von der Apoptose abgrenzen, da die Caspase-1 Aktivität mit osmotischer Lyse und einem Anschwellen der Zelle assoziiert ist. Caspase-1 spielt eine Schlüsselrolle für die Ausschüttung der inflammatorischen Zytokine IL- β und IL-18 und die Zelltodinduktion (Bergsbaken et al. 2009).

2.4 Periprothetische Osteolysebildung als Endstadium der aseptischen Endoprothesenlockerung

Die Knochenstruktur unterliegt physiologisch einem kontinuierlichen Gleichgewicht aus Knochenaufbau und Knochenabbau. Dieses komplexe dynamische System wird durch RANK (Receptor Activator of NF- κ B) und seinen zugehörigen Liganden RANKL reguliert. Osteoprotegerin (OPG) kann als sogenannter Fangrezeptor RANKL antagonisieren. RANKL aktiviert nicht nur nachgeschaltete Signalwege der Osteoklastogenese, sondern moduliert durch Verlinkung mit anderen Signalwegen die Homöostase physiologischer als auch pathologischer ossärer Prozesse (Leibbrandt et al. 2009).

Die Entstehung von Osteolysen sind mit der Aktivität von Osteoklasten als primär knochenresorbierenden Zellen vergesellschaftet. Studien zeigten jedoch, dass auch die mit Osteoklasten ontogenetisch eng verbundenen Makrophagen bzw. multinukleären Riesenzellen nach Abriebpartikelkontakt zu einer low-grade Knochenresorption fähig sind (Athanasou et al. 1992).

Durch die abriebpartikelinduzierte Aktivierung der Makrophagen werden sowohl indirekt, durch ausgeschüttete Zytokine, als auch direkt, durch eine Erhöhung des RANKL/OPG-Quotienten, vermehrt Osteoklasten aus Osteoklasten-Vorläuferzellen (OPCs) rekrutiert (Mandelin et al. 2003). Die Hochregulation der periprothetischen Osteoklastenaktivität führt im Finalstadium zur osteolytischen Aufhebung der stabilen Osteointegrität des Implantats im Knochen und schlussendlich zur Lockerung der Prothese (Landgraeber et al. 2014). Der genaue Mechanismus der Aktivierung und Interaktion von Abriebpartikeln bzw. Zytokinen mit Osteoklasten ist nicht abschließend geklärt.

Osteoblasten halten als Antagonisten der Osteoklasten die Homöostase zwischen Knochenaufbau und -resorption aufrecht. Neben gesteigerten proresorptiven Faktoren endet somit auch eine abriebpartikelinduzierte Störung der knochenbildenden Osteoblasten in der Bildung von Osteolysen (Purdue et al. 2006).

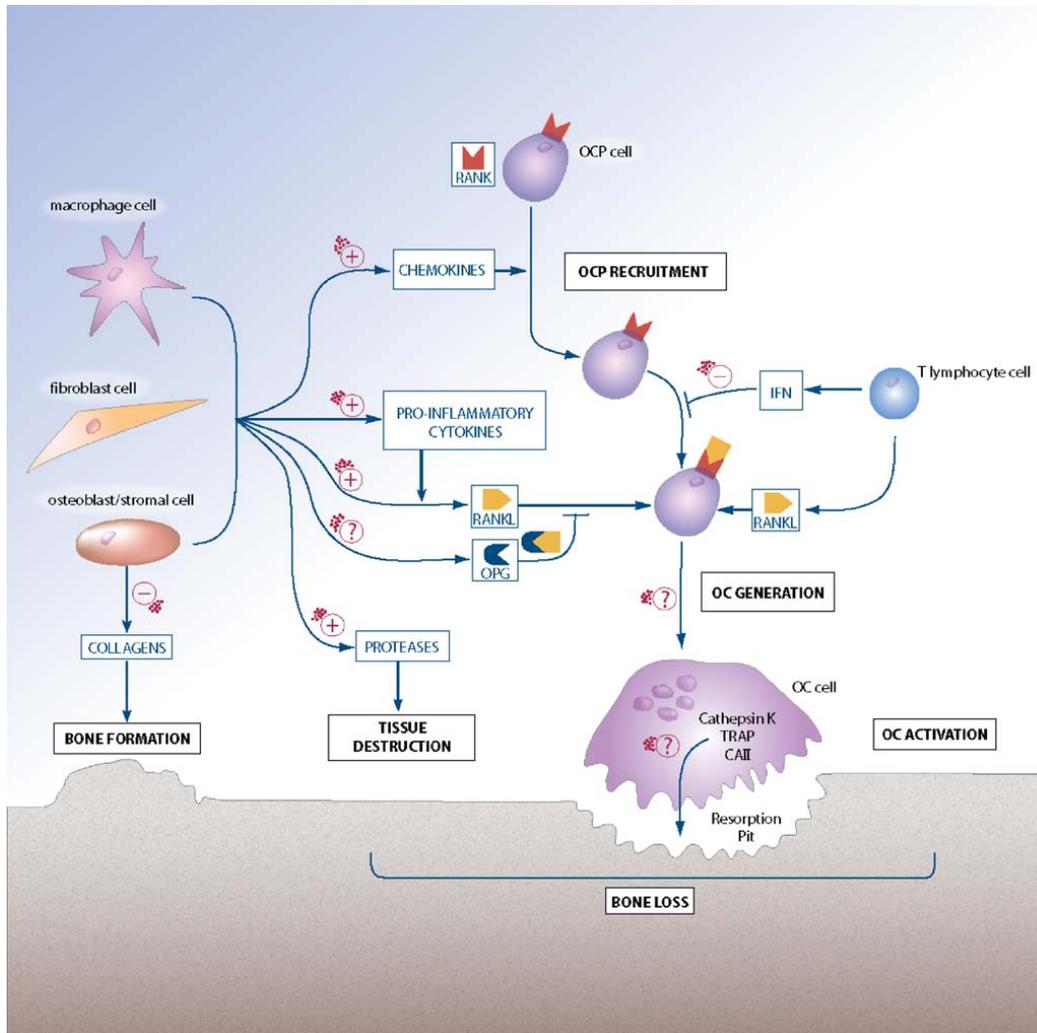


Abbildung 2-4 Schematische Darstellung der Regulation von Osteoklasten durch Abriebpartikel

OPCs immigrieren in den periprothetischen Bereich und reifen unter dem Einfluss von RANKL zu aktiven Osteoklasten aus. Makrophagen, Fibroblasten, Lymphozyten und Osteoblasten können diesen Regelkreislauf durch die Ausschüttung von Chemokinen oder proinflammatorischen Zytokinen beeinflussen. Osteoprotegerin und Interferon- γ hemmen die Osteoklastenausreifung. Abriebpartikel (rot) verstärken (+), hemmen (-) oder beeinflussen potenziell (?) die osteolyseinduzierende Prozesse (Abb. aus Purdue et al. 2006)

2.5 Fragestellung der Arbeit

Im Kontext der aseptischen Endoprothesenlockerung zeigen sich neben periprothetischer Osteolysen und einer abriebinduzierten Inflammation auch apoptotische Reaktionen der abriebpartikelphagozytierenden Makrophagen.

Die Verwendung eines Apoptose-Inhibitors im o.g. Maus-Osteolyse-Modell führte sowohl zu einer Minderung der Apoptose als auch der abriebpartikelinduzierten Osteolysen (Landgraeber et al. 2009). Dies erscheint paradox, da es sich bei der Apoptose, im Gegensatz zur Nekrose, um einen programmierten „protektiven Zelltod“ handelt, der keine weiteren Zellschädigungen oder inflammatorische Reaktionen induziert.

Ziel der vorliegenden Studie ist es, mittels eines Zellkulturmodells mit „live-Imaging“-Technik den abriebpartikelinduzierten Zelltod zytomorphologisch genauer zu qualifizieren und im Vergleich mit Kulturen ohne Abriebpartikelkontakt zu quantifizieren. Inflammatorische Prozesse, induziert durch Partikel oder Apoptotic Bodies, werden anhand eines ELISAs untersucht.

Insbesondere soll evaluiert werden, ob die bei der Phagozytose von Abriebpartikeln entstehenden Zellresiduen, primär die Apoptotic Bodies, weitere Zellschädigungen oder eine Inflammation induzieren.

3 Material und Methoden

3.1 Thp-1 Monozyten Zellkultur

3.1.1 Auftauen/ Einfrieren der THP-1 Zelllinie

Im Auftauprozess wurden die in flüssigem Stickstoff (-196°C) eingefrorenen Zellen zügig in 20ml vorgewärmtem Zellkulturmedium (37°C) resuspendiert und zur Elimination des zytotoxischen Dimethylsulfoxids (DMSO) zehn Minuten bei 300g sedimentiert. Anschließend wurden die Zellen in frischem Medium mit 20% Fetalem Kälberserum (FCS) in Kultur gebracht und nach drei Tagen mit normalem Zellkulturmedium subkultiviert. Für die Kryolagerung der THP-1 Zellen in flüssigem Stickstoff musste das Einfriermedium vorgekühlt, 5×10^6 THP-1 Monozyten in 1ml Einfriermedium resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt werden. Die Röhrchen wurden für 24 Stunden in einer Styroporbox bei -80°C heruntergekühlt und anschließend in den Kryotank überführt.

3.1.2 Kultivierung der THP-1 Zelllinie

Alle Zellkulturarbeiten erfolgten unter sterilen Bedingungen in einer Scanlaf Zellkulturbank. Die in Suspension wachsende THP-1 Zelllinie wurde in 75-T Corning Zellkulturflaschen unter konstanten Bedingungen in einem Inkubator bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und einem atmosphärischen CO₂-Gehalt von 5% kultiviert. Das Zellkulturmedium setzte sich aus RPMI 1640 Medium mit 10% FCS und zur Prophylaxe einer potenziellen bakteriellen Kontamination mit 100U/ml Penicillin und 100µg/ml Streptomycin zusammen. Alle drei Tage wurde das Nährmedium vollständig ersetzt oder die Monozyten auf neue Zellkulturflaschen gesplittet. Nach maximal zwanzig Passagen wurden die THP-1 Zellen verworfen und neue Zellen aus der Kryolagerung aufgetaut.

3.1.3 Stimulation der THP-1 Zelllinie

1×10^5 /ml THP-1 Zellen wurden nach einem etablierten Protokoll (Park et al. 2007) mit 8nM PMA⁹ in DMSO, das zur Differenzierung von Monozyten zu MLCs führt, in 6-well Zellkulturplatten oder 8-well IBIDI-Mikroskopiekammern inkubiert. Nach 48 Stunden differenzierten sich die THP-1 Monozyten zu adhärenen MLCs aus. Nicht-adhärenente Zellen und PMA wurden durch dreimaliges Waschen mit

⁹ Phorbol-12-myristat-13-acetat

Phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) entfernt und die persistierenden adhärenen Zellen nach einem Mediumwechsel unter einem inversen Lichtmikroskop morphologisch kontrolliert.

3.1.4 Bestimmung der Gesamtzellzahl

20µl der Zellsuspension wurden im Verhältnis von 1:1 mit Trypanblau zur Anfärbung und Detektion toter Zellen resuspendiert. Nach Überführung von 20µl dieser Suspension in eine Einmal-Zählkammer (SD100 Slides) konnten die vitalen Zellen mittels Zellzähler (Cellometer Auto T4) automatisch ausgezählt werden. Blaugefärbte und somit tote Zellen wurden von der Zellzahlbestimmung ausgeschlossen.

3.2 Abriebpartikel

Kommerziell erhältliche Polyethylenpartikel (Ceridust® VP 3610) wurden von der Firma Clariant (Gersthofen, Deutschland) für die Durchführung der Experimente bezogen. Laut Herstellerangaben beträgt die elektronenmikroskopisch bestimmte durchschnittliche Partikelgröße $1,75\mu\text{m} \pm 1,43\mu\text{m}$ (Median $1,42\mu\text{m}$), der Anteil der biologisch aktiveren Partikel $<1\mu\text{m}$ 35%. Der Vergleich der biologischen Aktivität von Ceridust Polyethylenpartikeln mit UHMWPE-Abriebpartikeln, generiert aus Hüftsimulatorexperimenten, ergab, dass auch die kommerziell erhältlichen Polyethylenpartikel in vivo potente Osteolyseinduktoren sind (von Knoch et al. 2004). Die Kobalt-Chrompartikel stammen von der Firma BioEngineering Solutions Inc. (USA) und sind laut Hersteller mit einer durchschnittlichen Partikelgröße von $0,9\mu\text{m}$ beziffert.

Die Kobalt-Chrompartikel imponierten morphologisch als kleine, scharfkantige oder runde lichtundurchlässige, schwarze Partikel. Partikel aus Polyethylen waren als blasig geformt bzw. gesprenkelt erkennbar und bildeten wie auch die Kobalt-Chrompartikel Konglomerate.

Zur Vermeidung einer Kontamination der Zellkulturexperimente wurden 5mg Partikel über 48 Stunden in 10ml 70%igem Ethanol sterilisiert und anschließend bei maximaler Geschwindigkeit¹⁰ dreißig Minuten sedimentiert. Dieser Vorgang erfolgte zweimal. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Partikel in sterilem Zellkulturmedium aufgenommen und auf eine Konzentration von approximierten 6×10^7 Partikeln/ml mittels Zellzähler (Cellometer Auto T4) eingestellt, um konstante

¹⁰ 3000g

Inkubationsbedingungen zu erlangen. Zur Gewährleistung keimfreier Inkubationsbedingungen wurden die im mit Antibiotika versetzten Medium aufgenommenen Partikel auf einer LB- und Blutagarplatte ausgestrichen. Im Inkubator erfolgte die Bebrütung über 48 Stunden unter täglicher Kontrolle auf Koloniebildung.

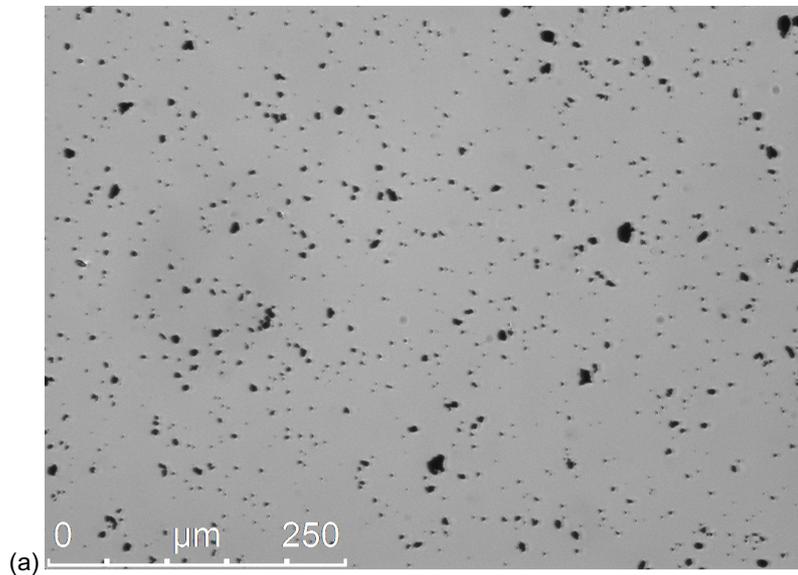


Abbildung 3-1 Kobalt-Chrompartikel (20x)

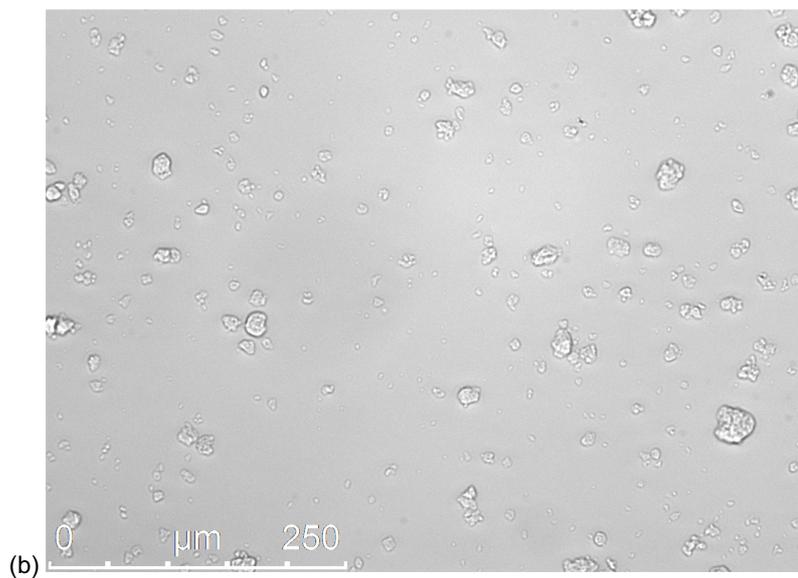


Abbildung 3-2 Polyethylenpartikel
Partikel: Konglomeratbildung (20x)

3.3 Generierung und Isolation von Apoptotic Bodies

1,5x10⁶ THP-1 Zellen wurden pro Well in 3ml Nährmedium in 6-well Zellkulturplatten ausgesät, zu MLCs ausdifferenziert (vgl. 3.1.3) und im Anschluss mit Kobalt-Chrom- und Polyethylenpartikeln im Verhältnis von 10:1 (Partikel/ Zellen) coinkubiert. Nach 48 Stunden Coinkubationszeit erfolgte die Sammlung der Überstände aus der 6-well Platte in einem 50ml Falcon und die folgenden Zentrifugationsschritte, basierend auf einem modifizierten etablierten Protokoll (Crescitelli et al. 2013), zur Isolation der ABs:

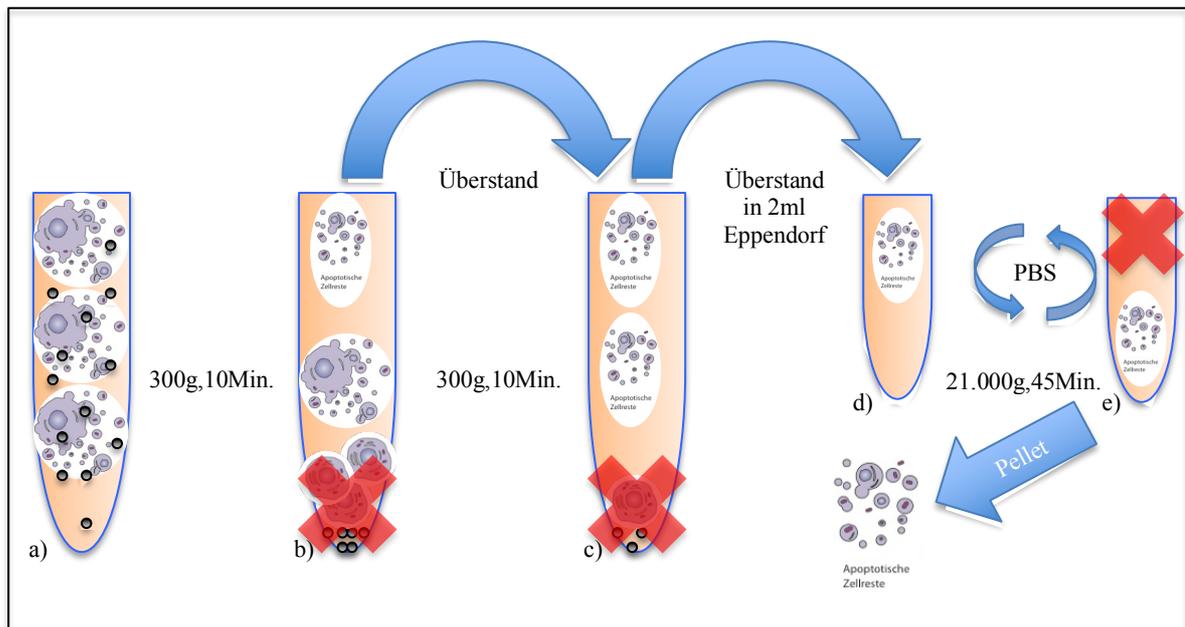


Abbildung 3-3 Übersicht Isolationsprotokoll von Apoptotic Bodies

a) gesammelte Überstände mit Zellbestandteilen, Partikeln, ABs; b/c) Sedimentation größerer Zellbestandteile und Partikel bei 300g für 10 Minuten, Verwerfen des Pellets; d) Aufteilung des ÜS auf mehrere 2ml Eppendorf Reaktionsgefäße; e) Sedimentation der ABs bei 21.000g für 45 Minuten, Aufnahme in 200µl Medium; *optional: Waschen der ABs mit 2ml PBS, erneute Sedimentation der ABs bei 21.000g, 45 Minuten*

Die nach diesem Protokoll von 99,9% der Partikel und grobem Zellschrott aufgereinigten ABs wurden in 200µl Zellkulturmedium bei -20°C gelagert. Es wurde mit immer konstanter THP-1 Aussaatdichte in den 6-well Platten und Partikel-Zell-Ratios gearbeitet, um auch eine konstante ABs-Ratio zu generieren.

Das empirisch bestimmte zelltodinduzierende Arbeitsvolumen aus der Stocklösung mit isolierten ABs für die Experimente zur Evaluation der durch ABs induzierten Zellschädigungen betrug 70µl pro ml Zellkulturmedium. Zum Ausschluss einer

mikrobiellen Kontamination erfolgte auch hier der Ausstrich auf LB- und Blutagarplatten.

3.4 „live-cell“ Imaging Zeitraffer-Video-Mikroskopie

3×10^4 THP-1 Zellen wurden pro Well in 300 μ l Nährmedium in 8-well IBIDI-Mikroskopiekammern ausgesät und zu MLCs ausdifferenziert (s.h. 3.1.3). Im Anschluss erfolgte nach zweifachem Waschen mit PBS die Coinkubation der MLCs in Färbemedium mit ABs oder Abriebpartikeln im zehnfachen Verhältnis von Partikeln zu Zellen.

Zur Validierung des Einflusses der Partikel oder ABs auf die Vitalität der Zellen diente die alleinige Inkubation von MLCs in Färbemedium als Negativkontrolle. Jede Versuchsbedingung wurde doppelt angesetzt und das Experiment mindestens dreimal, an jeweils drei verschiedenen Tagen, wiederholt.

Dem Färbemedium wurden sowohl die Fluoreszenzfarbstoffe Propidiumiodid (PI) und Annexin V gekoppelt an FITC (Fluoresceinisothiocyanat) direkt vor den Experimenten als auch Kalziumchlorid in einer Konzentration von 2nM zugesetzt, da die Bindung des Apoptosefarbstoffs Annexin an Phosphatidylserin kalziumabhängig ist (van Engeland et al. 1998). Zur Minimalisierung zytotoxischer Effekte des Pis und somit Manipulation der Versuchsergebnisse wurde die minimale Färbekonzentration austitriert.

Tabelle 3-1 Färbemedium

	Volumen/ Konzentration	Inhaltsstoffe
IBIDI Mikroskopiekammer (Gesamtvolumen: 300 μ l/well)	290 μ l 2nM <u>Sterilfiltrieren</u>	THP-1 Färbemedium CaCl ₂
Apoptose:	10 μ l	Annexin FITC Propidiumiodid
Nekrose:	2 μ l	

3.4.1 Leica DMI-6000B Settings

Die „live-cell Imaging“ Zeitraffervideos wurden in einem inversen, automatisierten Forschungsmikroskop (Leica DMI-6000B) mit eingebautem Inkubator unter konstanten Bedingungen von 37°C und 5% atmosphärischem CO₂ aufgenommen. Die Bestimmung der Apoptose- bzw. Nekroserate der THP-1 Zellen erfolgte neben der

Beurteilung morphologischer Faktoren mittels Differenzialinterferenzkontrast-Lichtmikroskopie (DIC) auch durch die Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe mit einer Hg-Lichtquelle.

Tabelle 3-2 Anregungs- und Emissionsfilter

	Anregungsfilter	Emissionsfilter
Morphologie: DIC 40x		
Apoptose: Annexin	FITC 490nm±10nm	Green 490nm±10nm
Nekrose: Propidiumiodid	TxRed 555nm±12,5nm	TxRed 605nm±26nm

Die Aufnahme, Verarbeitung und Analyse der Zeitraffervideos erfolgte mit der Software Leica LASF¹¹.

Da MLCs adhären sind und die Abriebpartikel bzw. Abs absinken, wurde in jedem IBIDI-well auf mindestens drei zentrale Positionen am Bodenglas der Mikroskopiekammer fokussiert. Mit der Zuschaltung der adaptiven Fokuskontrolle „AFC“ erfolgte die Sicherstellung eines scharfen Bildes über zwölf Stunden. Jede der markierten Positionen wurde über zwölf Stunden alle fünf Minuten automatisch angefahren und fotografiert. Die Videos setzten sich aus den Einzelbildern der unterschiedlichen Positionen zusammen.

3.4.2 Zelltoddetecktion mittels morphologischer Kriterien und Annexin/ PI-Färbung

Die Apoptosedetecktion mittels Annexin V und einer Gegenfärbung mit dem Danninterkalierenden Farbstoff und Nekrosemarker PI ist eine Methode, bei der mit FITC fluoreszenzmarkiertes Annexin V an Phosphatidylserin (PS) bindet. PS ist ein wichtiger Bestandteil von Zellmembranen und befindet sich ausschließlich an der Innenseite der Plasmamembran einer vitalen Zelle. Apoptotische Zellen verlieren durch Translokation von PS in die Außenschicht, den sogenannten „Phosphatidylserin-flip“, ihre Membran-Asymmetrie. Annexin V bindet an PS und ist daher zur Identifizierung frühapoptotischer Zellen geeignet (Koopman et al. 1994).

Sind Zellen nekrotisch und ihre Membran wird permeabel, bindet initial sowohl PI dann DNA-Fragmente im Zytoplasma der Zelle als auch Annexin V an PS an der Innenseite der Plasmamembran. Neben nekrotischen Zellen können auch

¹¹ Version: [BETA] 3.2.0.8846 [Leica Microsystems]

spätapoptotische Zellen eine Doppelfärbung mit PI-positivem Zellkern und Annexin V positiver Plasmamembran ausbilden.

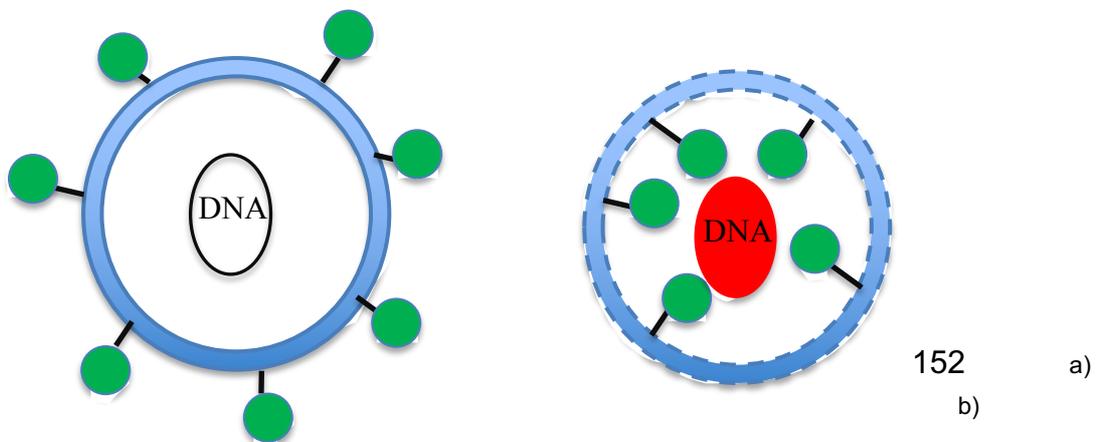


Abbildung 3-4 Schematische Darstellung frühapoptotischer (a) vs. spätapoptotischer (b) Zellen

Fäbecharakteristika: Annexinbindung (grün), PI (rot) positiver Zellkern

Klassisch nekrotische Zellen imponieren morphologisch initial durch die Exvagination von „Bubbles“, gefolgt vom Platzen der Zelle, wohingegen apoptotische Zellen durch das Phänomen des „Membrane-blebbing“, „Cell-rounding“ und „Cell-shrinkaging“ sowie der Karyopyknose und Chromationkondensation charakterisiert sind (Rello et al. 2005).

Die Quantifizierung vitaler Zellen und der Zelltodrate in den Zeitraffervideos erfolgte alle zwei Stunden (0,2,4...10,12 Stunden) über eine manuelle Auszählung unter Beurteilung o.g. morphologischer und fluoreszenzcharakteristischer Eigenschaften.

3.4.3 Statistische Auswertung der Zelltoddetektion

Die statistische Auswertung der Apoptose-, Nekrose- und Vitalitätsrate von MLCs nach Apoptotic Bodies- bzw. Partikelkontakt wurde mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Excel (Version 15.20) und dem Statistikprogramm GraphPad Prism (Version 5.04) durchgeführt. Die absolute Anzahl an Zellen im Sichtfenster des Mikroskops war über zwölf Stunden nicht konstant, da sich die MLCs über den Boden der Mikroskopiekammer fortbewegten. Aus diesem Grund erfolgte zu jedem Zählpunkt die Darstellung der Mittelwerte mit Standardabweichung des Verhältnisses von Apoptose-, Nekrose- und Vitalitätsrate aller im Sichtfenster detektierbaren MLCs in relativen Zahlen.

Zur Ermittlung der partikel- bzw. ABs-induzierten Zelltodrate wurde das arithmetische Mittel der natürlichen Mortalitätsrate der Negativkontrollen, beeinflusst durch

extrinsische Faktoren wie z.B. die Inkubationsbedingungen, von den Zelltodevents der Coinkubation des jeweiligen Zählpunktes subtrahiert.

Die Datensätze zur Zelltoddetektion entsprachen nicht den Kriterien der Gauß'schen Normalverteilung. Die Prüfung auf statistisch signifikante Unterschiedshypothesen zwischen den Kontrollgruppen und den mit Partikeln oder ABs coinkubierten MLCs erfolgte daher mittels des nonparametrischen Mann-Whitney-U-Tests. Als statistisch signifikante Ergebnisse gelten Werte von $p < 0,05$.

Tabelle 3-3 Zellanzahl pro Zählpunkt

Experiment	MW \pm SD Zellzahl pro Zählpunkt	Experimentanzahl
Negativkontrolle	651,3 \pm 15,42 Zellen	n=12
Kobalt-Chrom	534,86 \pm 14,45 Zellen	
Negativkontrolle	445,71 \pm 17,30 Zellen	n=9
Polyethylen	272,57 \pm 17,31 Zellen	
Negativkontrolle	152 \pm 5,13 Zellen	n=9
AB	296,71 \pm 5,99 Zellen	

3.5 Humaner TNF- α ELISA (Immunassay)

Die Durchführung eines ELISAs (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) stellt ein Verfahren zum quantitativen Nachweis spezifischer Stoffe wie Proteine, Enzyme oder Zytokine dar. Die Durchführung des TNF- α Immunassays orientierte sich an dem vom Hersteller beigefügten Protokoll (vgl. 8.6).

Der Boden einer 96-well Mikroplatte ist mit einem monoklonalen Antikörper, spezifisch für TNF- α , gecoated. Das im Überstand enthaltene TNF- α der Positivkontrolle (Medium enthält Lipopolysaccharide (LPS)), des Standards und der Samples bindet an den immobilen Antikörper am Boden der Mikroplatte. Nachdem ungebundene Substanzen durch einen Waschgang entfernt wurden, erfolgt die Addition eines TNF- α spezifischen, Enzym-gebundenen, polyklonalen Antikörpers. Das ungebundene Antikörper-Enzym Reagenz wird entfernt und eine farbige Substratlösung hinzugefügt. Der Farbumschlag erfolgt proportional zur initial gebundenen Menge an TNF- α und kann als Optische Dichte (OD) mittels Mikroplatten-Lesegerät genau detektiert werden. Der Standard, die Positivkontrolle und die Samples werden immer paarig auf TNF- α untersucht. Die Bestimmung der OD erfolgt parallel bei 450nm und 570nm, da zur Wellenlängenkorrektur die ausgelesenen Werte der größeren Wellenlänge subtrahiert werden.

Dieses Verfahren wird als quantitative Sandwich Immunassay Technik bezeichnet. Die minimaldetektierbare Dosis (MDD) an TNF- α in einer Probe beträgt laut Herstellerangaben 1,6pg/ml.

3.5.1 Isolation zytokinhaltigen Überstands aus den Coinkubationen

Zur Gewinnung der im Überstand der Coinkubationen enthaltenen Zytokine wurden $1,5 \times 10^6$ THP-1 Zellen pro Well in 3ml Nährmedium in 6-well Zellkulturplatten ausgesät und zu MLCs ausdifferenziert (s.h. 3.1.3). Im Anschluss erfolgte nach zweifachem Waschen mit PBS die Cokultivierung der MLCs mit ABs und einem 1:1 Gemisch aus Polyethylen- und Kobalt-Chrompartikeln im Verhältnis von 20:1 (Abriebpartikel/ Zellen).

Als Negativkontrolle diente die alleinige Kultivierung der MLCs. Jede der Bedingungen wurde mindestens als $n=5$ angesetzt. Da verschiedene Ansätze mit unterschiedlichen Inkubationsbedingungen gefahren wurden, ist die summierte Anzahl der Experimente (n) nicht in allen Versuchsreihen identisch. Nach zwölf Stunden Cokultivierung wurden die Überstände abgenommen und mögliche

Verunreinigungen durch Partikel oder Zellschrott bei 21.000g 45 Minuten sedimentiert und verworfen. Die Proben wurden direkt ohne Zwischenlagerung und unter Verwendung eines Immunassays auf TNF- α analysiert.

3.5.2 Kalkulation der TNF- α Konzentration

Aus den paarig bestimmten ODs des Standards, der Positivkontrolle und der Samples wurde das Arithmetische Mittel gebildet. Die Kalibrierung des ELISAs mit dem Nullwert erfolgte durch die Subtraktion der durchschnittlichen OD der Negativkontrolle (kein TNF- α) des Standards von allen Messwerten.

Die gemittelten ODs der Standardreihe wurden gegen die bekannten, korrespondierenden TNF- α Konzentrationen aufgetragen und eine Standard-Regressionsgerade konstruiert.

Durch das Einsetzen der bekannten OD-Werte in die Funktionsgleichung der Regressionsgeraden konnte die unbekannte TNF- α Konzentration in den Proben kalkuliert werden (vgl. 8.8).

4 Ergebnisse

4.1 Qualitative Auswertung der Coinkubation mit Partikeln

Die Analyse der zwölf Stunden Zeitraffervideos zeigte, dass die vitalen MLCs sofort mit den Partikeln und ABs interagierten. Vitale THP1-MLCs stellten sich als 30-80µm große, einkernige und an das Bodenglas adhärente Zellen dar.

Funktionell und morphologisch ließen sich zwei Makrophagentypen differenzieren: Große, sessile MLCs bildeten lange Pseudopodien aus, an denen die Kobalt-Chrom- und Polyethylenpartikel adhärten und internalisiert wurden. Kleine, runde MLCs migrierten kontinuierlich amöboid über das Bodenglas der Mikroskopiekammer und phagozytierten oder transportierten Partikel mittels „Cell-dragging“ an der Außenseite der Plasmamembran.

Diese Interaktion von MLCs mit Partikeln führte, im Vergleich zur Negativkontrolle ohne Partikel, zu einer Hochregulation apoptotischer Zelltodevents (s.h. 4.3.3).

Apoptotische Zellen ließen sich in den Zeitrafferaufnahmen morphologisch anhand des Schrumpfens der Zelle, des initialen „Membrane-blebbings“ und der zeitversetzten Grünfärbung mittels Annexin-FITC charakterisieren.

Die MLCs reagierten auf den Partikelkontakt mit einer gesteigerten Abschnürung exosomaler Vesikel bzw. ABs. Spätapoptotische Zellen wiesen nekrotische Charakteristika auf.

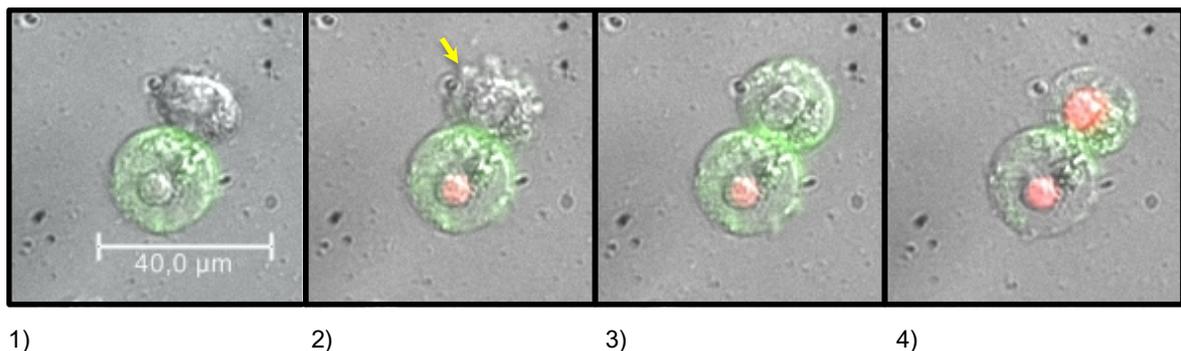
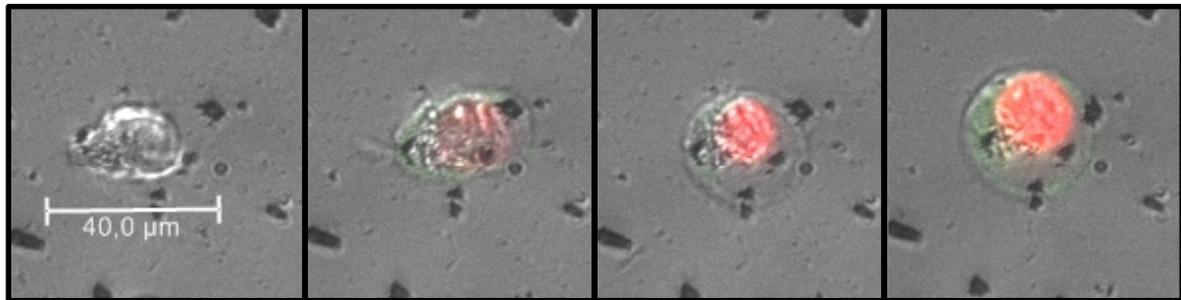


Abbildung 4-1 „klassisch“ apoptotische Zelle

1) THP-1 Zelle vital 2) Membrane-blebbing, Entstehung von ABs (Pfeil) 3) „rounding“, Annexin-FITC einfach-positiv, frühapoptotisch 4) Annexin-Fitc, PI doppelpositiv, spätapoptotisch; Bilder, extrahiert aus den Zeitrafferaufnahmen (Leica DMI6000B Fluoreszenzmikroskop; 40x)

Neben apoptotischen ließ sich auch eine geringe Anzahl an nekrotischen Zelltodevents in allen angesetzten Versuchsbedingungen detektieren. Nekrotische Zellen imponierten über ein Anschwellen bzw. Platzen der Zelle und einer zeitgleichen Anfärbung mit Propidiumiodid.



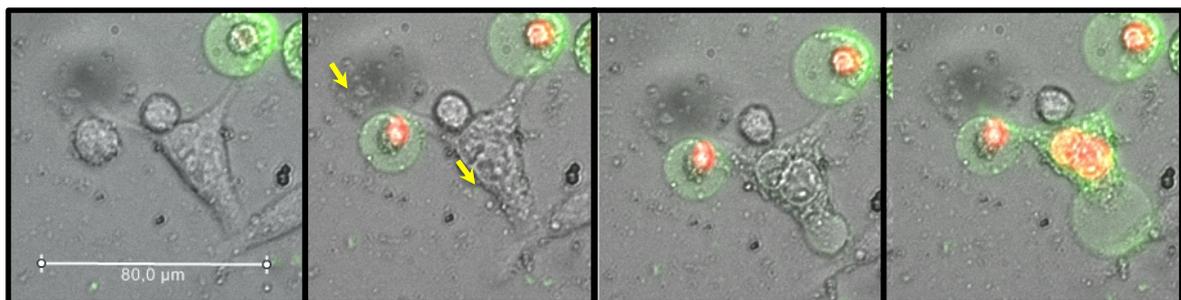
1) 2) 3) 4)

Abbildung 4-2 „klassisch“ nekrotische Zelle

1) THP-1 Zelle vital, prä-Partikel Phagozytose 2) Platzen der Zelle, post-Partikel Phagozytose 3) PI einfach positiv, frühnekrotisch 4) Annexin-Fitc, PI doppelpositiv, spätnekrotisch; Bilder, extrahiert aus den Zeitrafferaufnahmen (Leica DMI6000B Fluoreszenzmikroskop; 40x)

4.2 Qualitative Auswertung der Coinkubation mit Apoptotic Bodies

Die Coinkubation der ABs mit vitalen Makrophagen zeigte einen Anstieg der Zelltodrate, die nicht als eindeutig apoptotischer oder nekrotischer Zelltod zu definieren war. Initial führte der Kontakt von MLCs mit ABs zum „Membrane-blebbing“ und zur Entstehung weiterer ABs. Im Verlauf des Zelluntergangs kam es dann zum Platzen der Plasmamembran mit sofortiger Doppelfärbung durch PI und Annexin-FITC.



1) 2) 3) 4)

Abbildung 4-3 „nicht-apoptotischer“ Zelltod, ABs-induziert

1) THP-1 Zelle vital 2) „Membrane-blebbing“, Entstehung von ABs (Pfeil) 3) marginal Annexin-FITC-positiv, „bubbles“, Platzen der Zelle 4) Annexin-Fitc, PI doppelpositiv; Bilder, extrahiert aus den Zeitrafferaufnahmen (Leica DMI6000B Fluoreszenzmikroskop; 40x)

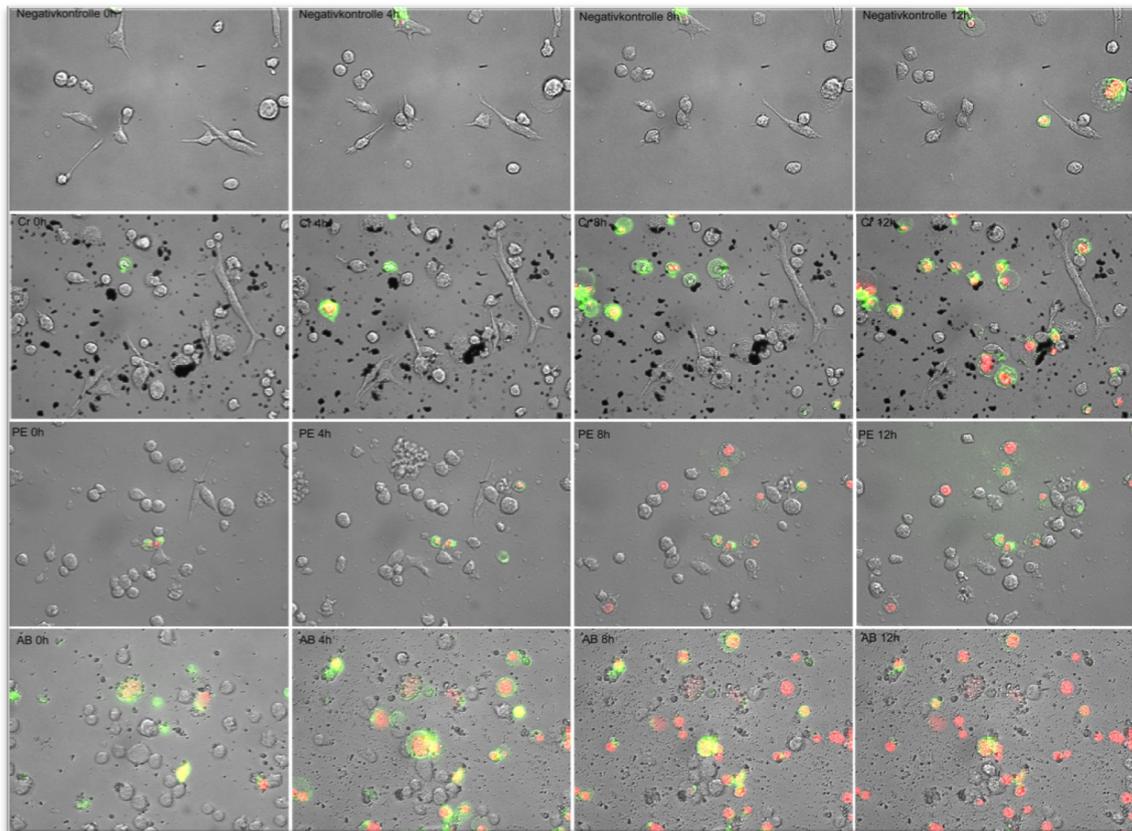


Abbildung 4-4 Momentaufnahmen, extrahiert aus den Zeitraffervideos

Negativkontrolle (1), Coinkubation von Thp-1 mit Kobalt-Chrom- (2), Polyethylenpartikeln (3) und Apoptotic Bodies (4) nach 0h, 4h, 8h, 12h; (Leica DMI6000B Fluoreszenzmikroskop, Annexin (grün) früher Apoptosemarker, Propidiumiodid (rot) Nekrosemarker, Doppelfärbung (rot-grün) später Apoptosemarker/ Nekrose; 40x)

4.3 Quantitative Auswertung der Zeitraffer Videos

Dargestellt sind die relativen Anteile vitaler, nekrotischer oder apoptotischer bzw. „nicht-apoptotisch“ zelltoter MLCs in Prozent (y-Achse: Rate in Prozent; 1=100%) zu jedem Zählpunkt (x-Achse: Zeit in Stunden). Sterne markieren signifikante Unterschiede zwischen der Negativkontrolle (weiß) und den Coinkubationen (schwarz).

*	=	$p \leq 0.05$
**	=	$p \leq 0.01$
***	=	$p \leq 0.001$
****	=	$p \leq 0.0001$

4.3.1 Vitale Zellen

Die Anzahl der vitalen MLCs unterschied sich zwischen der Kontrollgruppe und den mit Kobalt-Chrompartikeln coinkubierten THP-1 Zellen in den ersten zwei Stunden nicht signifikant ($p > 0.05$). Nach vier Stunden wurde ein signifikanter ($p \leq 0.05$), ab acht Stunden ein hochsignifikanter ($p \leq 0.001$) Abbau der Vitalitätsrate der mit Kobalt-Chrom coinkubierten MLCs gegenüber der Negativkontrolle festgestellt.

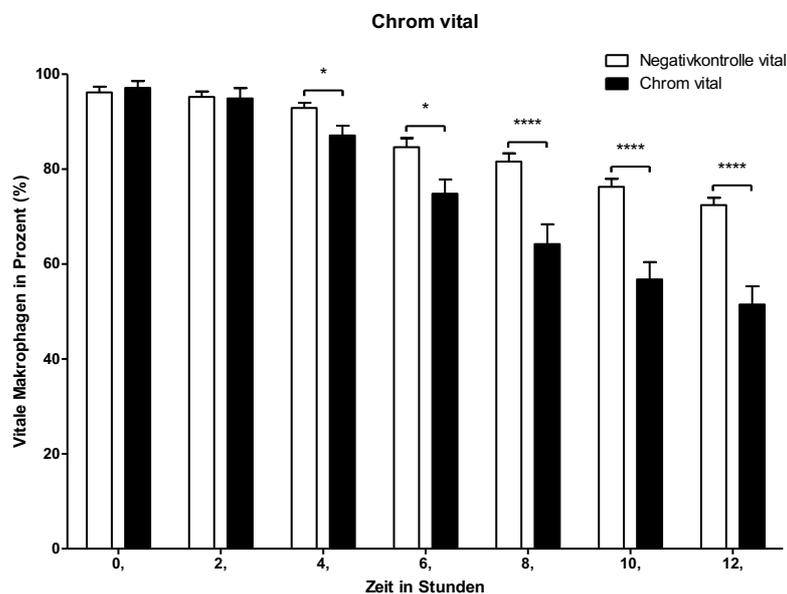


Diagramm 4-1 Vitalitätsrate Kontrollgruppe vs. Kobalt-Chrom coinkubierte MLCs

(Mittelwerte \pm Standardabweichung; p-Wert Coinkubation gegenüber Negativkontrolle, Minimum: 51,45% Kobalt-Chrom, 72,44% Negativkontrolle)

Bei der Coinkubation der MLCs mit Polyethylenpartikeln zeigte sich ein signifikanter Abfall der Vitalitätsrate nach sechs ($p \leq 0.05$) bzw. nach acht Stunden ($p \leq 0.01$) im Vergleich zur Negativkontrolle.

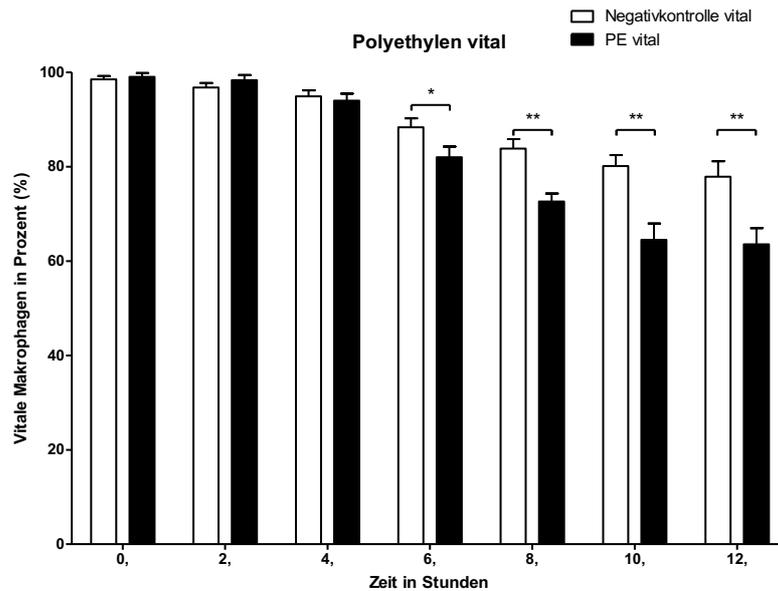


Diagramm 4-2 Vitalitätsrate Kontrollgruppe vs. Polyethylen coinkubierte MLCs

(Mittelwerte \pm Standardabweichung; p-Wert Coinkubation gegenüber Negativkontrolle, Minimum: 63,6% PE, 77,9% Negativkontrolle)

Die Coinkubation der Apoptotic Bodies mit MLCs ergab einen signifikanten Abfall der Vitalitätsrate bereits nach zwei Stunden ($p \leq 0.05$) im Vergleich mit der Negativkontrolle. Nach vier Stunden wurde der Unterschied hochsignifikant ($p \leq 0.001$).

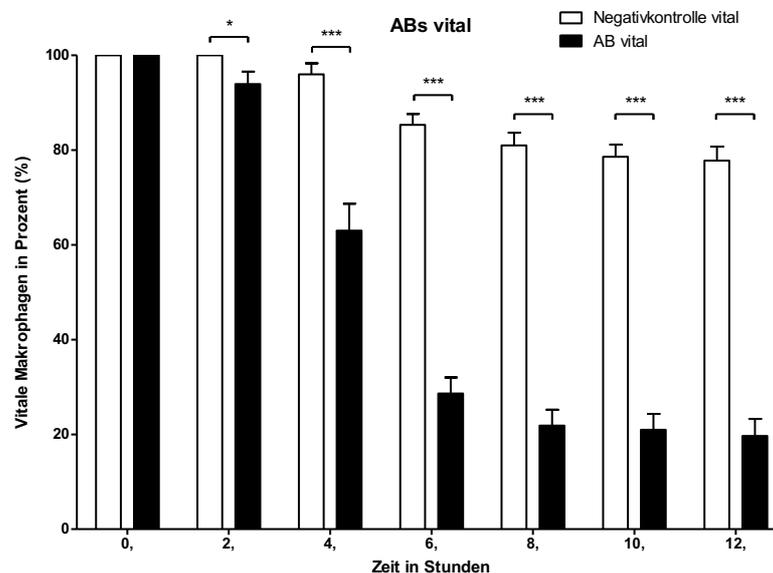


Diagramm 4-3 Vitalitätsrate Kontrollgruppe vs. Apoptotic Bodies coinkubierte MLCs

(Mittelwerte \pm Standardabweichung; p-Wert Coinkubation gegenüber Negativkontrolle, Minimum: 19,68% AB, 77,8% Negativkontrolle)

Zusammenfassend ließ sich zeigen, dass die Coinkubation von Kobalt-Chrom- bzw. Polyethylenpartikeln mit MLCs zu einem signifikanten und tendenziell linear

verlaufenden Abfall der Vitalitätsrate führte. Die ABs induzierten einen approximiert logarithmisch verlaufenden Einbruch der Anzahl vitaler Zellen.

4.3.2 Nekrotische Zellen

Der Vergleich der Nekroseraten zwischen den Negativkontrollen und den mit Kobalt-Chrom- bzw. Polyethylenpartikeln coinkubierten MLCs ergab keinen signifikanten Unterschied.

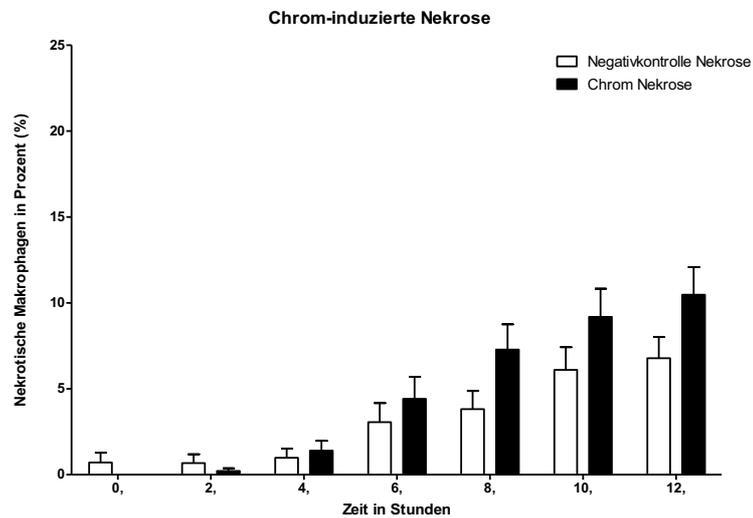


Diagramm 4-4 Nekroserate Kontrollgruppe vs. Kobalt-Chrom coinkubierte MLCs

(Mittelwerte \pm Standardabweichung; p-Wert Coinkubation gegenüber Negativkontrolle, Maximum: 6,78% Kobalt-Chrom, 10,48% Negativkontrolle)

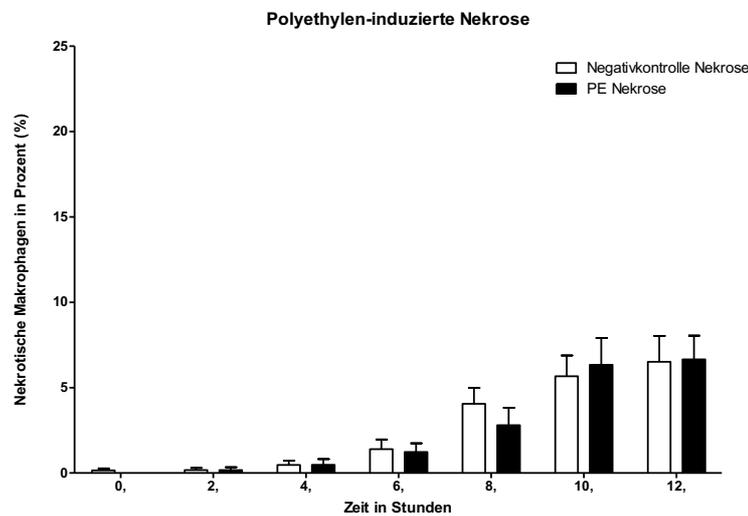


Diagramm 4-5 Nekroserate Kontrollgruppe vs. Polyethylen coinkubierte MLCs

(Mittelwerte \pm Standardabweichung; p-Wert Coinkubation gegenüber Negativkontrolle, Maximum: 6,65% PE, 7,81% Negativkontrolle)

4.3.3

4.3.3 Apoptotische Zellen

Die Apoptoserate der mit Kobalt-Chrompartikeln coinkubierten MLCs war ab vier Stunden signifikant ($p \leq 0.05$), ab sechs Stunden ($p \leq 0.01$) und ab acht Stunden hochsignifikant ($p \leq 0.001$) gegenüber der Negativkontrolle erhöht. Der durch die Kobalt-Chrompartikel induzierte Anstieg der Apoptoserate konnte als linear charakterisiert werden.

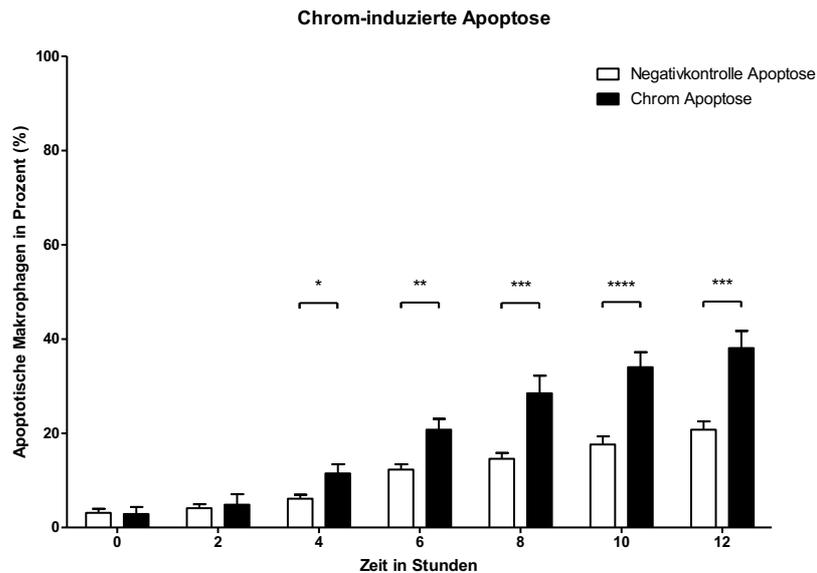


Diagramm 4-6 Apoptoserate Kontrollgruppe vs. Kobalt-Chrom coinkubierte MLCs

(Mittelwerte \pm Standardabweichung; p-Wert Coinkubation gegenüber Negativkontrolle, Maximum: 38,1% Kobalt-Chrom, 20,78% Negativkontrolle)

Polyethylenpartikel erhöhten die Apoptoserate der MLCs linear ab sechs Stunden signifikant ($p \leq 0.05$) und ab acht Stunden hoch signifikant ($p \leq 0.01$).

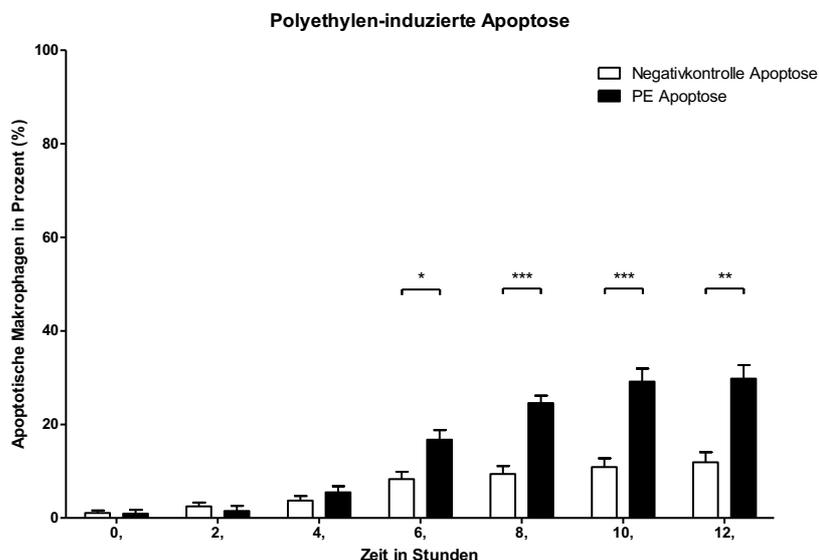


Diagramm 4-7 Apoptoserate Kontrollgruppe vs. Polyethylen coinkubierte MLCs

(Mittelwerte \pm Standardabweichung; p-Wert Coinkubation gegenüber Negativkontrolle, Maximum: 29,8% PE, 14,29% Negativkontrolle)

Die Rate des „nicht-apoptotischen“ Zelltods war bereits nach zwei Stunden bei den mit ABs coinkubierten MLCs signifikant und ab vier Stunden hochsignifikant ($p \leq 0.001$) gegenüber der Apoptoserate der Negativkontrolle erhöht. Dabei erfolgte der Anstieg des „nicht-apoptotischen“ Zelltods logarithmisch.

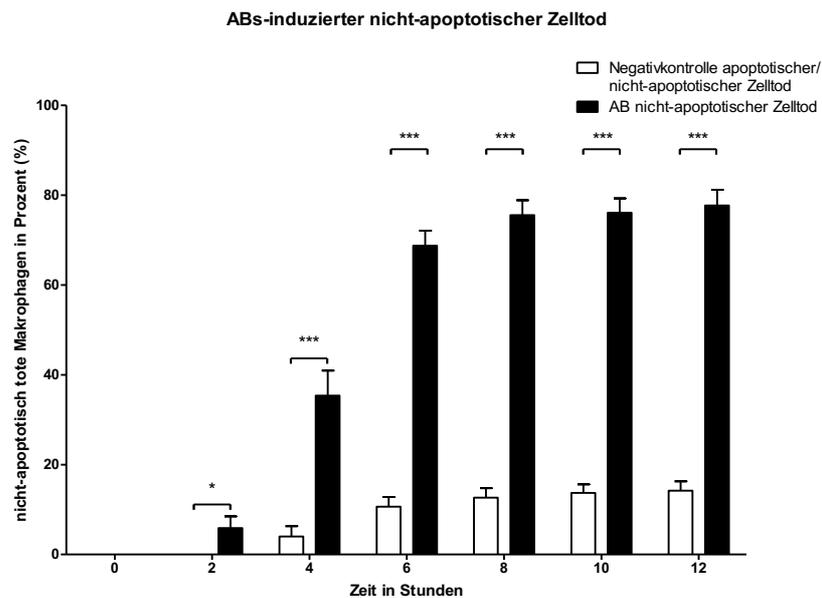


Diagramm 4-8 Rate des „nicht-apoptotischen“ Zelltods Kontrollgruppe vs. Apoptotic Bodies coinkubierte MLCs

(Mittelwerte \pm Standardabweichung; p-Wert Coinkubation gegenüber Negativkontrolle, Maximum: 77,71% AB, 14,22% Negativkontrolle)

4.3.4 Partikel und ABs im Vergleich

Kobalt-Chrompartikel und Polyethylenpartikel erhöhten die Apoptoserate der MLCs signifikant. Es ließ sich jedoch zwischen den Partikeln kein quantitativer Unterschied in der Höhe der Zelltodevents feststellen ($p > 0,05$).

Die Coinkubation der MLCs mit den ABs führte demgegenüber zu einer signifikant erhöhten Zelltodrate im Vergleich mit den Partikel-coinkubierten MLCs. Nach vier Stunden ließ sich ein hochsignifikanter ($p \leq 0.001$) Anstieg der Zelltodevents detektieren.

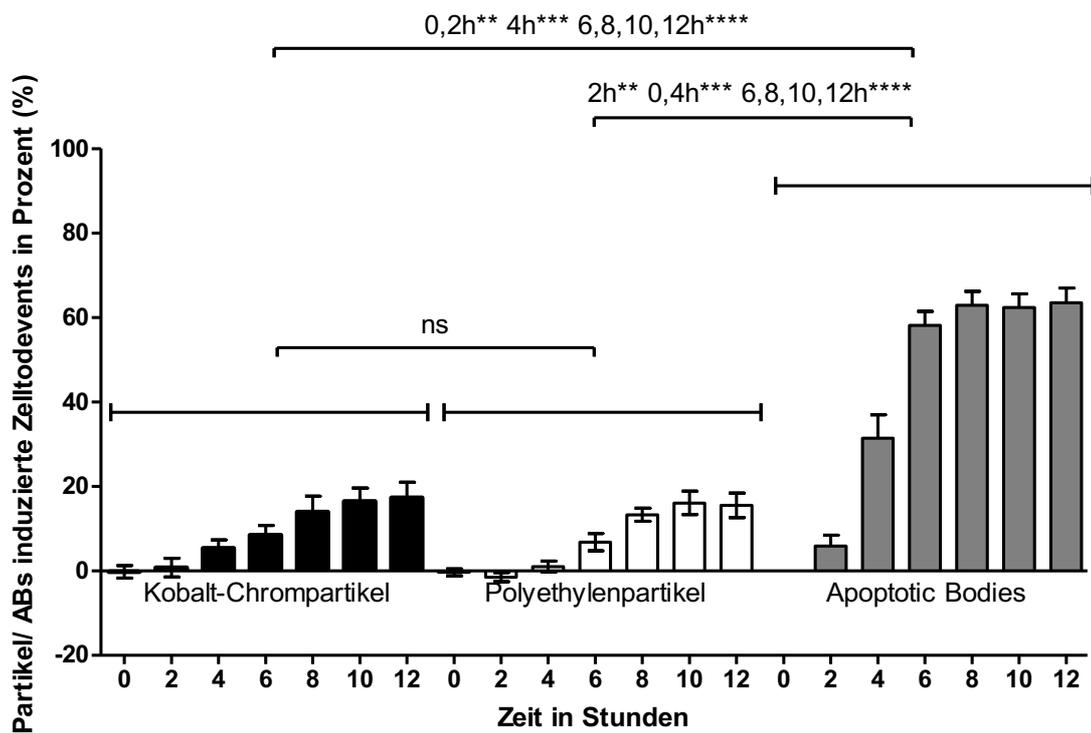


Diagramm 4-9 Apoptoserate/ „nicht-apoptischer“ Zelltod Kobalt-Chrom, PE oder ABs coinkubierte MLCs

(Mittelwerte \pm Standardabweichung; p-Wert Coinkubationen im Vergleich)

4.4 TNF- α ELISA

Die Coinkubation von Polyethylen- und Kobalt-Chrompartikeln bzw. Apoptotic Bodies mit MLCs führte zu einer signifikanten Steigerung der Ausschüttung von TNF- α im Vergleich zur Negativkontrolle.

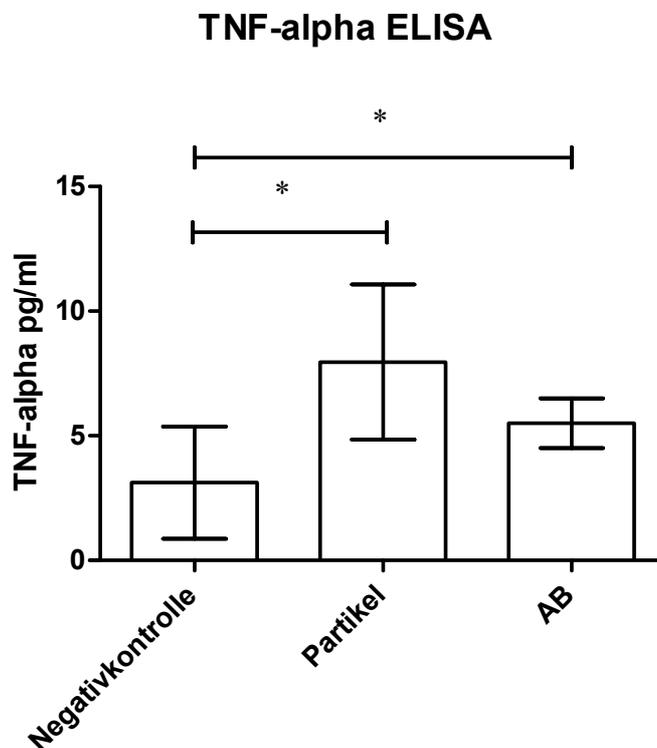


Diagramm 4-10 TNF- α Konzentration Negativkontrolle vs. Coinkubation mit Partikeln oder ABs

(Mittelwerte \pm Standardabweichung; p-Wert Negativkontrolle gegenüber Coinkubation mit Partikeln oder ABs, Mittelwert TNF- α in pg/ml: Negativkontrolle 2,83, Partikel 8,86, ABs 6,42)

5 Diskussion

Die aseptische partikelinduzierte Endoprothesenlockerung stellt aktuell eine ausschließlich mittels Revisionsoperation therapierbare Langzeitkomplikation der modernen orthopädischen Chirurgie dar.

Aktuelle Studien fokussierten nicht nur die partikelinduzierte aseptische Inflammation, sondern diskutierten auch durch Abriebpartikel initiierte apoptotische Prozesse im Kontext der periprothetischen Osteolysenbildung (Huk et al. 2001; Landgraeber et al. 2009; Landgraeber et al. 2014; Landgraeber et al. 2008).

Galt die „Apoptose“ traditionell als eine Form des protektiven, antiinflammatorischen Mechanismus zur Elimination irreparabel geschädigter Zellen, sind die Auswirkungen überschießender, partikelinduzierter apoptotischer Prozesse an der Implantat-Knochen Grenze auf die Ausbildung periprothetischer Osteolysen weitgehend unbekannt.

5.1 Auswertung

In der vorliegenden Studie kann gezeigt werden, dass die Interaktion von Makrophagen sowohl mit Prothesenabriebpartikeln als auch isolierten Apoptotic Bodies zu einer signifikanten Erhöhung der Zelltodrate mit Ausbildung einer lokalen Inflammation führt.

Makrophagen interagieren mit Polyethylen- und Kobalt-Chromabriebpartikeln mittels Phagozytose oder „Cell-dragging“. Diese Reaktion der Phagozyten auf Partikel stellt den desperaten immunologischen Versuch der Elimination des alloplastischen Materials aus dem Gewebe heraus dar. Der Partikelkontakt induziert simultan primär proapoptotische Signalwege und imponiert durch die Entwicklung einer lokalen aseptischen Inflammation mittels Ausschüttung von TNF- α .

Übersteigt die Masse apoptotischer Zellresiduen - vorrangig der Apoptotic Bodies - die Clearance-Kapazität der Makrophagen, führen die Apoptotic Bodies selbst zum immer unkontrollierteren Zelltod der Phagozyten mit Ausbildung einer lokalen Inflammation. Primär apoptotische Zellen werden nicht mehr durch vitale Makrophagen phagozytiert und gehen in einen proinflammatorischen, sekundär nekrotischen Prozess über.

Der durch Apoptotic Bodies induzierte Zelltod der Makrophagen unterscheidet sich in Quantität und Qualität von der durch Partikel induzierten Form. Sowohl morphologisch als auch mittels Apoptose-Nekrose Färbung weisen die Zellen neben

apoptotischen auch Charakteristika des proinflammatorischen, nekrotischen Zelltodes auf.

Isolierte Apoptotic Bodies zeigen im Vergleich mit den Abriebpartikeln in der Interaktion mit Makrophagen quantitativ eine nochmalig erhöhte letale Potenz auf.

5.2 Apoptose: Fluch oder Segen der Evolution?

Warum richtet sich ein evolutionär konservierter und protektiver Mechanismus gegen autologes, vitales Gewebe? Dienen apoptotische Prozesse nicht dem Schutz des Organismus vor irreparabel entarteten oder infizierten Zellen?

Was geschieht mit dem durch apoptotischen Zelltod anfallenden Zellschrott?

Die Antwort auf diese Fragen könnte in verschiedensten fulminanten Krankheitsbildern begründet liegen, deren Pathogenese mit unkontrolliert apoptotischen Prozessen vergesellschaftet ist.

Begünstigt eine beeinträchtigte Apoptose die Entstehung von Tumorerkrankungen, führt die Zerstörung körpereigener Zellen durch überschießende Apoptose zu folgenden Krankheitsbildern (Favaloro et al. 2012):

Multiple Sklerose, Alzheimer'sche Demenz, Creutzfeld-Jakob-Syndrom, BSE, Morbus Parkinson, Zelluntergang nach Schlaganfall oder Herzinfarkt.

Im Rahmen der chronisch inflammatorischen rheumatoiden Arthritis kommt es, ähnlich wie bei der Bildung periprothetischer Osteolysen, zur Destruktion autologen Gewebes durch eine prolongierte Apoptose. Vorrangig die massive Entstehung von Apoptotic Bodies triggert einen etablierten Circulus vitiosus, bestehend aus Apoptose, Inflammation und Osteoklastenaktivität (Distler et al. 2005).

Canbay et al. (2005) zeigte, dass eine toxisch bedingte, überschießende pathologische Apoptoserate in Leberzellen zu einem massiven Untergang von Hepatozyten mit der Ausbildung von sekundären Nekrosen führt. Ist die Clearance-Kapazität phagozytierender Zellen überschritten, kommt es zur Ausschüttung pro-inflammatorischer Substanzen und zur Induktion eines Fibrosierungsprozesses. Gerken resümierte, „[...] dass eine krankhaft gesteigerte Apoptose den Organismus schädigt.“ (Gerken 2006, S. 85).

Sowohl eine drastisch erhöhte Apoptoserate als auch eine Störung der apoptotischen Clearance-Funktion führen zu apoptotischen Zellresiduen mit Ausbildung von Pathologien. Störungen des sensiblen Clearance-Systems prädestinieren für die Entstehung von Gewebedestruktion, Autoimmunerkrankungen oder Inflammation (Elliott et al. 2010). Eine ineffiziente apoptotische Clearance durch Alveolarmakrophagen ist z.B. bei Asthma-Bronchiale, Cystischer Fibrose und COPD beschrieben (Henson et al. 2008).

Als Quintessenz dieser exemplarisch genannten Pathologien ist zu schließen, dass sich auch ein überlebenswichtiger Eliminationsmechanismus entarteter Zellen -wie die Apoptose- gegen körpereigene Strukturen richten kann. Die auslösenden Faktoren sind allerdings nicht immer eruierbar und in ihrer Entität sehr heterogen.

5.3 Zelltoddetektion mittels live-cell Imaging

Die Evaluation apoptotischer Prozesse, induziert durch Abriebpartikel von Prothesen, erforderte die simultane Beurteilung fluoreszenzcharakteristischer und morphologischer Eigenschaften. Im Fokus der Studie stand die Kinetik der Interaktion von Makrophagen mit Abriebpartikeln, die Induktion der Apoptose sowie die Einordnung der Entstehung und des Responses auf Apoptotic Bodies in die Dynamik des abriebpartikelinduzierten apoptotischen Prozesses.

Mittels eines live-cell Imaging Fluoreszenzmikroskops lassen sich neben den morphologischen Apoptosecharakteristika auch die etablierte Apoptose-Nekrose Färbung gegen die Zeit abbilden (Koopman et al. 1994). Dies ermöglichte die Differenzierung zwischen frühapoptotischen, sekundär-nekrotischen und nekrotischen Zellen. Über eine singuläre Momentaufnahme - beispielsweise mittels Durchflusszytometrie (FACS-Analyse) - wäre die Dynamik der abriebpartikelinduzierten Zelltodkinetik nicht nachvollziehbar gewesen.

Abriebpartikel werden sowohl *in vitro* als auch *in vivo* als Induktoren apoptotischer Prozesse gesehen (Catelas et al. 1999; Landgraeber et al. 2006; Olga L. Huk 2001). Die morphologische und fluoreszenzcharakteristische Analyse der abriebpartikel- und ABs-induzierten Zelltodkinetik zeigte jedoch, dass eine eindeutige Differenzierung zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen nicht immer eindeutig möglich war. Dies legt nahe, dass Abriebpartikel, besonders aber Apoptotic Bodies, die Erhöhung der Zelltodrate auch mittels Hochregulation alternativer, nonapoptotischer Zelltodmechanismen bewirken. Additional zeigte sich teilweise ein fließender Übergang primär apoptotischer Zellen in die sekundäre Nekrose, sodass die Festlegung des Cut-offs zwischen Apoptose und Nekrose individuell erfolgte.

Um Manipulationen der abriebpartikel- bzw. ABs-induzierten Zelltodraten durch toxische Effekte der Apoptose-Nekrose Färbung oder die Inkubationsbedingungen im Inkubator des Mikroskops zu eliminieren, wurden die Negativkontrollen unter gleichen Konditionen wie auch die Coinkubationen aufgezeichnet und analysiert (Wallberg et al. 2016). Die Coinkubation der isolierten Apoptotic Bodies erfolgte unter identischen Bedingungen wie die Cokulturen mit den Partikeln.

5.4 THP-1 Monozyten Zellkulturmodell – Grenzen des Modells

Grundlage der Studie ist ein auf die elementaren Mediatoren der aseptischen Lockerung - phagozytierende Zellen und Abriebpartikel - reduziertes Modell. Dieses wird isoliert von den komplexen inflammatorischen Interaktionen verschiedenster humoraler und zellulärer Bestandteile des ossären Milieus untersucht.

Dabei erweisen sich die Stärken des Zellkulturmodells zugleich als seine Schwächen. Lassen sich durch die Elimination o.g. Störfaktoren isoliert Beobachtungen über partikelinduzierte Zelltodmechanismen der phagozytierenden Zellen treffen, bleiben Interaktionen des in situ herrschenden Milieus unbeachtet.

Den zur Phagozytose fähigen Makrophagen wird eine Schlüsselrolle in der Ausbildung partikelinduzierter periprothetischer Osteolysen zugesprochen (Rao et al. 2012). Daher stehen diese im Fokus dieser Arbeit. Aktuelle Studien veränderten jedoch die Sichtweise auf „den Makrophagen“ drastisch, da die klassisch dichotome Einteilung in proinflammatorische M1 und antiinflammatorische M2 Makrophagen relativiert werden musste. Aufgrund der Erkenntnis der stimuliabhängigen, adaptiven Plastizität der Rekrutierung von Makrophagen aus Monozyten resultiert die aktuell gängige Unterteilung in mehrere Makrophagen-Subtypen (Xue et al. 2014). Der Terminus des „Makrophagens“ bezeichnet einen CD-14 positiven Phagozyten, adaptiert und spezialisiert an die Anforderungen des jeweiligen Lokus¹².

Das seit dreißig Jahren extensiv genutzte THP-1 Zellkulturmodell dient der Untersuchung von Signalwegen, Mechanismen und Funktionen von Monozyten bzw. Makrophagen. Die humane THP-1 Monozyten Zelllinie entstammt dem peripheren Blut eines an Akuter Monozytärer Leukämie erkrankten einjährigen männlichen Infanten (Tsuchiya et al. 1980). Per se basieren THP-1 Monozyten somit auf einer Tumorzelllinie und unterliegen daher einem veränderten Zellmetabolismus. Chanput et al. (2014) zeigte jedoch, dass sich durch PMA differenzierte THP-1 MLCs in ihrem Respons auf externe Stimuli und ihrem Rezeptorprofil nur marginal von primären humanen Makrophagen unterscheiden.

Die Studienlage zur Differenzierung von THP-1 Monozyten zu MLCs lässt allerdings keine einheitliche evidenzbasierte Empfehlung zu, da zahlreiche verschiedene Differenzierungsprotokolle existieren. Die in der Literatur beschriebenen

¹² Ein Makrophage in der Lunge sieht sich mit einem anderen immunologischen Spektrum konfrontiert als ein Makrophage auf der Haut, im Knochen etc. und ist daher an die jeweilige Umgebung adaptiert.

Konzentrationen des im Zellkulturmedium eingesetzten PMAs reichen von 5-100nM. Park et al. (2007) empfahl eine PMA Stimulation mit 8nM für 48 Stunden, da aktivierte MLCs, stimuliert mit niedrigen PMA-Konzentrationen (8nM), sensitiver auf schwache Stimulanzen reagieren.

Interleukin-1 α aktivierte THP-1 Monozyten können nicht den in-situ an die Knochen-Implantat-Grenze immigrierenden Makrophagen, im Sinne der o.g. stimuliabhängigen Plastizität, entsprechen. Essentiell ist, dass sowohl im Zellkulturmodell als auch in situ die Phagozytose der Partikel erfolgte und sich eine abriebpartikelinduzierte Hochregulation der Zelltodrate detektieren ließ (Stea et al. 2000). Das zeigt, dass bezüglich der eingangs genannten Fragestellung die THP-1 Zellen in vitro ein dem den Makrophagen in vitro entsprechenden Respons abbilden.

Um möglichst klinisch realistische Bedingungen zu simulieren, wurden die Coinkubationen mit Kobalt-Chrom- und Polyethylenpartikeln durchgeführt. Diese Partikel stellen in situ den Großteil der durch die standardmäßig eingesetzte Metall- UHMWPE Gleitpaarung entstehenden Abriebpartikel dar (Willert 1990). Dennoch kann die Coinkubation von THP-1 MLCs durch die singuläre Bolusgabe von Partikeln oder ABs nur bedingt die klinische Realität widerspiegeln, da die Abriebpartikelentstehung in situ einen schleichenden Prozess darstellt.

Die Coinkubation von Abriebpartikeln mit THP-1 MLCs ist ein etabliertes Verfahren zur Untersuchung abriebpartikelinduzierter inflammatorischer bzw. apoptotischer Reaktionen (Landgraeber et al. 2014). Daher basiert die vorliegende Studie auf diesem Versuchsmodell.

Die Begrenzung des Beobachtungszeitraums der Coinkubationen mit Partikeln oder ABs auf zwölf Stunden wurde anhand von Zeitrafferaufnahmen über einen Zeitraum von 48 Stunden definiert. Nach zwölf Stunden stieg sowohl in den Negativkontrollen als auch den Coinkubationen die Nekroserate überproportional an.

Für die Nutzung eines standardisierten Zellkulturmodells spricht, dass für jedes Experiment identisch generierte MLCs zur Verfügung stehen und somit eine hohe interexperimentelle Reproduzierbarkeit und hohe Zellzahlen gewährleistet werden können. Primäre Zellen, gewonnen aus humanem Serum oder Knochenmark, unterliegen donorabhängigen Faktoren wie z.B. Geschlecht, Alter oder Immunstatus.

5.5 Humaner TNF- α ELISA

Das Verfahren des Sandwich-Immunassays stellt eine etablierte Methode zur Quantifizierung ausgeschütteter Zytokine, speziell TNF- α , dar (Hornbeck 2015).

Bereits Merkel et al. (1999) identifizierte den TNF- α als Schlüsselmediator im Kontext der abriebpartikelinduzierten aseptischen Inflammation. Die Depletion des TNF-Rezeptors p55 im murinen Calvaria-Modell zeigte einen protektiven Effekt auf die Ausbildung PMMA-induzierter Osteolysen auf. Der Einsatz des TNF- α -Inhibitors Etanercept reduzierte die durch Titanpartikel gesteuerte Knochenresorption und Osteoklastogenese drastisch auf das Niveau der Kontrollgruppe (Childs et al. 2001). Die Interaktion von Abriebpartikeln mit Makrophagen führte jedoch nicht nur zu einer Hochregulation von TNF- α , sondern triggert zusätzlich die Ausbildung eines komplexen proinflammatorischen Milieus (Landgraeber et al. 2014).

Im Vergleich mit den ausgeschütteten TNF- α Werten der Positivkontrollen nach Stimulation mit LPS¹³ induzieren sowohl Abriebpartikel als auch Apoptotic Bodies nur einen marginalen, aber signifikanten Anstieg des Zytokins. Das spiegelt das klinische Bild der abriebpartikelinduzierten Inflammation wider, da Abriebpartikel nur eine lokal begrenzte, aseptische Inflammation initiieren. Diese Ergebnisse decken sich mit Resultaten anderer Studien zur abriebpartikelinduzierten Osteolyse (Baumann et al. 2005; Jablonski et al. 2016).

Septische inflammatorische Prozesse, initiiert durch die LPS-Gabe, imponieren durch ein hochakutes klinisches Bild ggf. mit Ausbildung einer putriden oder systemischen Reaktion. Dies korrespondiert daher mit einer höheren TNF- α Ausschüttung in vitro.

Die inflammatorische Potenz der Zellresiduen bzw. Apoptotic Bodies untermauert das Theorem des Circulus vitiosus der partikelinduzierten Apoptosereaktion. Residuale Apoptosekörper sind bereits bei der Destruktion von Knochen- und Knorpelgewebe im Rahmen der rheumatoiden Arthritis beschrieben und ein ähnlicher Circulus vitiosus etabliert (Distler et al. 2005).

¹³ Daten wurden nur als Positivkontrolle angeführt und hier nicht gezeigt.

5.6 Apoptotic Bodies

Der Begriff der „Apoptotic Bodies“ ist terminologisch nicht eindeutig definiert. Konsens besteht darüber, dass während des frühapoptotischen Prozesses intrazellulärer Inhalt in Form von Apoptotic Bodies verpackt und abgeschnürt wird (Kinchen et al. 2007). Dies zeigte sich auch in den Zeitrafferaufnahmen der Cokulturen von MLCs mit Abriebpartikeln. Im weiteren spätapoptotischen bzw. sekundär nekrotischen Verlauf imponierten die MLCs durch einen Verlust der Membranintegrität. Somit gelangten neben Apoptotic Bodies auch freie zelluläre Bestandteile in den Überstand der Cokulturen.

Im Kontext dieser Arbeit ist der Begriff der „Apoptotic Bodies“ daher als im Prozess des abriebpartikelinduzierten Zelltods freigesetzte Mikrovesikel oder kleinste freie zelluläre Mikropartikel zu definieren.

Bei der Isolation der Apoptotic Bodies aus dem Überstand der Zellkultur wurde auf ein etabliertes Protokoll (Crescitelli et al. 2013) zurückgegriffen, welches zur Elimination von grobem Zellschrott und Partikeln modifiziert wurde. Es zeigte sich interexperimentell, dass nicht absolut konstante Mengen an Apoptotic Bodies generiert werden konnten, weil die initial eingesetzten Raten an MLCs und Partikeln bzw. Volumina leicht undulierten. Die in vitro eingesetzte Apoptotic Bodies-Makrophagen-Ratio wurde empirisch bestimmt und bedarf einer Verifizierung in vivo.

Aktuell ist die Bedeutung der Apoptotic Bodies als mögliche Trigger der aseptischen Prothesenlockerung völlig unbekannt, da die in situ anfallende Menge an Apoptotic Bodies bisher nicht quantifiziert wurde. Offen bleibt, wie effektiv das komplexe Apoptose-Phagozytose-System im ossären Milieu arbeitet und welche Faktoren die Homöostase aus abriebpartikelinduzierter Apoptose und Phagozytose der Zellresiduen beeinflussen.

Weitere Erkenntnisse in diesem Zusammenhang könnte ein Re-Transfer der in vitro entstandenen apoptotischen Zellreste in ein murines Calvaria-Modell bringen. Zudem könnte dann mittels intravital-Imaging die Chronologie des partikelinduzierten, apoptotischen Prozesses, mit Übergang in die sekundäre Nekrose und Ausbildung zellulärer Residuen, abgebildet werden. Besonderes Augenmerk läge auf der Interaktion eines physiologischen Clearance-Systems mit den residualen Zellfragmenten, primär den Apoptotic Bodies, und der genauen Definition, welcher Qualität die Zellresiduen sind (DAMPs, PAMPs, „klassische“ Apoptotic Bodies).

Wegweisend wäre die Inkubation isolierter Apoptotic Bodies auf der murinen Calvaria mit anschließender Quantifizierung des potenziellen osteolytischen Potenzials. Abschließend bedürfte die durch Apoptotic Bodies ausgelöste Form des „nicht-apoptischen“ Zelltods einer exakten Definition, mit simultaner Bestimmung des ausgeschütteten Zytokinprofils mittels Western-blot oder Polymerase-Kettenreaktion (PCR).

Die Folgen der Akkumulation monozytärer Mikropartikel sind bereits im Kontext verschiedenster Autoimmunerkrankungen etabliert, der Pathomechanismus jedoch meist unklar (Halim et al. 2016). Distler et al. (2005) identifizierte Mikropartikel im Rahmen der rheumatoiden Arthritis als Induktoren der Matrix-Metalloproteinase-Proteine (MCP-1 und MCP-2) in Synovialzellen. Diese Proteine bewirken die Zerstörung der extrazellulären Matrix und die Ausschüttung der pro-inflammatorischen Zytokine IL-6, IL-8. Persistierende Mikropartikel fördern einen Circulus vitiosus aus Inflammation und Synovitis mit finaler Destruktion von Knorpel und Knochengewebe.

5.7 Zelltod im Wandel: Quo vadis?

Traditionell erfolgte eine dichotome Klassifizierung in programmierte, kontrolliert - apoptotische - oder nicht-programmierte, unkontrolliert ablaufende - nekrotische - Zelltodformen (Kanduc et al. 2002).

Die Apoptose stellt einen überlebenswichtigen und aktiven, physiologischen Mechanismus zur Aufrechterhaltung von Gewebshomöostase, Elimination transformierter, maligner, infizierter oder irreparabel geschädigter Zellen und der Steuerung embryonaler Entwicklung dar. Apoptotische Prozesse, Caspase-reguliert, galten in diesem Kontext als „protektiv“, da sie die noninflammatorische „stille“ Elimination von Zellen ermöglichen (Elliott et al. 2010). Die Konnotation der Apoptose als rein „protektiver“ Zelltodmechanismus zur Elimination von Zellen ist obsolet, da prolongierte apoptotische Prozesse Ursache verschiedenster Krankheiten sind (Canbay et al. 2005). Im Kontext der aseptischen Endoprothesenlockerung konnte dieser Mechanismus bisher nur vermutet werden (Landgraeber et al. 2014).

Unkontrolliert, passiv ablaufende nekrotische Prozesse, induziert durch gravierende Gewebsschäden oder Verletzungen, wurden als proinflammatorisch angesehen (de Almagro et al. 2015). Diese klassisch streng divergente Unterteilung muss durch aktuelle Zelltodforschungen revidiert werden, nachdem neben Apoptose und Nekrose mehrere Zwischen- bzw. Übergangsformen dieser Zelltodqualitäten¹⁴ identifiziert werden konnten.

Da die Analyse der durch Apoptotic Bodies initiierten Zelltodqualität Charakteristika des nekrotischen Zelltods aufweist, ist die Diskussion dieser Übergangsformen im Grenzgebiet zwischen Apoptose und Nekrose obligat.

Humane Zellen sind permanent einem breiten Spektrum potenziell letaler Faktoren ausgesetzt, die zur intrazellulären Aktivierung spezifischer molekularer Signalwege führen. Identische letale Stimuli können zur simultanen Aktivierung präfinaler, molekular unabhängiger Zelltod-Signalkaskaden führen, die über konvergent genutzte Moleküle miteinander kommunizieren. An diesen Regulatormolekülen entscheidet sich, intra- bzw. interzellulär situativ und multifaktoriell beeinflusst, welcher Signalweg den finalen Exitus der Zelle dominiert (Lalaoui et al. 2015).

¹⁴ Spekulativ lässt sich anmerken, dass noch weitaus mehr Zelltodmechanismen existieren könnten, die jedoch aktuell nicht bekannt sind.

Beispiel dieser simultanen Aktivierung intrazellulärer Zelltodmechanismen durch externe Stimuli ist die Interaktion der extrinsischen Apoptose und Nekroptose, deren Signalkaskade parallel durch Mediatoren der TNF-Superfamilie aktiviert wird (Fulda 2014; Vanden Berghe et al. 2014). Ziel des Organismus ist die noninflammatorische Elimination der Zelle ohne Schädigung peripheren Gewebes. Die aktive apoptotische Signalkaskade, initiiert durch Caspasen, blockiert die Schlüsselmoleküle der Nekroptose RIPK-1 und -3 vorrangig mittels katalytischer Spaltung durch Caspase-8 (Kaiser et al. 2013). Kommt es jedoch durch einen letalen Insult zu einer irreparablen zellulären Schädigung - unter Caspasen-Hemmung oder -Defekt - diktiert die Nekroptose den programmierten Exitus der Zelle und fungiert als ein Backup-Mechanismus der Apoptose mit dem Preis einer kontrolliert inflammatorischen Reaktion.

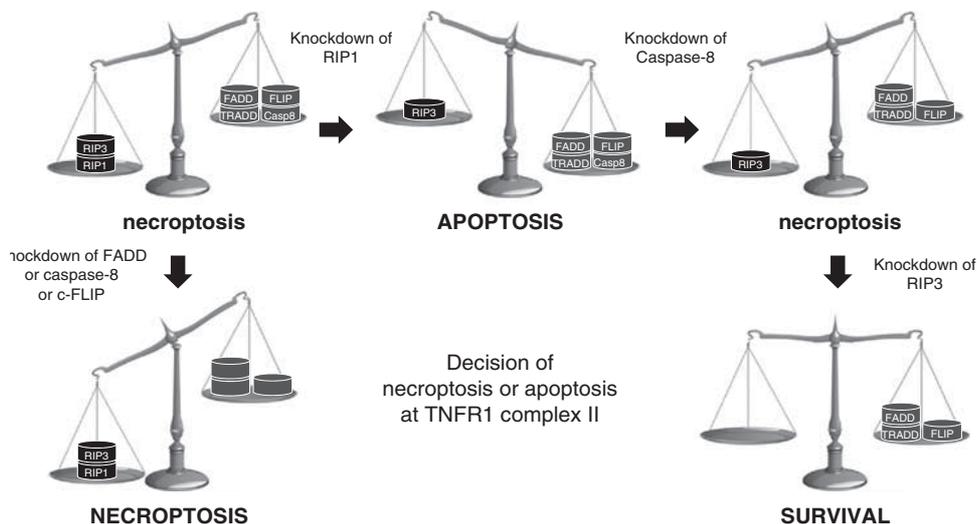


Abbildung 5-1 Regulation der TNF-induzierten Nekroptose und Apoptose mittels TNFR-I und -II Rezeptor (schematische Darstellung (Abb. aus Vanlangenakker et al. 2011))

FADD, Caspase-8 und c-FLIP: pro-apoptotisch und anti-nekroptotisch
 RIP-1: anti-apoptotisch und pro-nekroptotisch, RIP-3: pro-nekroptotisch

Die Interaktion von Autophagie und intrinsischer Apoptose verdeutlicht die hochsensitive Plastizität des humanen Zelltodsystems. Dient die Autophagie als Mechanismus der partiellen Elimination geschädigter Zellkompartimente und ermöglicht somit regenerative Prozesse bei passageren Stresssituationen wie Fastenzuständen, greift die intrinsische-Apoptose bei größerem intrazellulärem Stress und führt zur Elimination der Zelle in toto. Studien an Drosophila-Larven zeigten, dass der Abbau obsoleten Mitteldarm-Gewebes im Rahmen der Metamorphose, bei

Depletion des apoptotischen Signalwegs, auch autophagieabhängig vollzogen wird (Xu et al. 2015).

Massive zelluläre Schäden, die keinen aktiven und programmierten Eliminationsmechanismus zulassen, induzieren den passiven Membranintegritätsverlust im Rahmen einer Nekrose. Dies stellt für den Organismus die Ultima Ratio dar, da durch den Austritt proinflammatorischer Substanzen auch sekundär vitale Zellen destruiert werden (Challa et al. 2010). Die Nekrose führt somit nicht zur selektiven Elimination der irreparabel geschädigten Zellen, sondern tangiert auch peripheres Gewebe bis hin zu einer systemischen Reaktion.

Diese exemplarisch genannten Beispiele kommunizierender Zelltodsignalwege verdeutlichen die Komplexität und Plastizität des Geflechts miteinander interagierender Todesmechanismen. Dieses System ist aktuell allerdings nur rudimentär verstanden.

Im Rahmen der aseptischen Prothesenlockerung stecken Überlegungen zu „neueren“ Zelltodmechanismen noch in den Kinderschuhen¹⁵. Liu et al. (2016) zeigte, dass die Hemmung der abriebpartikelinduzierten Autophagie durch 3-MA (3-Methyladenin) zu einer geringeren TNF- α Ausschüttung durch Makrophagen führt. Parallel dazu bilden sich im murinen Calvaria-Modell nur kleinere Osteolysen durch Hemmung der Autophagie aus. Die intrazelluläre Aufnahme von großen Mengen anorganischer Partikel setzt den Phagozyten unter massiven intrazellulären Stress. Folglich ist die Hochregulation autophagischer Prozesse zur Elimination irreparabel geschädigter Zellkompartimente kausaler Bestandteil des Überlebensprogramms der Makrophagen.

Sieht sich der Organismus mit immunologisch tolerierbaren Mengen anorganischer Partikel konfrontiert, stellt sich eine Homöostase aus Partikelphagozytose, Zelltod durch Apoptose und effizienter Elimination der apoptotischen Zellen ein. Dieser Prozess verläuft „still“.

Persistieren jedoch apoptotische Zellen, da das physiologische Apoptose-System überlastet ist, gehen die primär apoptotischen Zellen in die sekundäre Nekrose über. Die erste Eskalationsstufe ist erreicht.

¹⁵ Studien zu nekroptotischen oder pyroptotischen Zelltodformen ließen sich im Rahmen der aseptischen Prothesenlockerung nicht finden. (Stand Pubmed-Recherche: 26.12.2016)

Die nach der prolongierten Apoptose persistierende Zellmasse, primär die Apoptotic Bodies, bringen das Phagozytose-System über die Induktion eines proinflammatorischen „nicht-apoptotischen“ Zelltods nun vollends zur Dekompensation. Spekulativ dominieren programmierte proinflammatorische Zelltodformen wie die Nekroptose oder die Pyroptose den desperaten Clearance-Versuch der Makrophagen. Obwohl die physiologische Konsequenz und Gemeinsamkeit aller programmierter und nicht-programmierter letaler Mechanismen die Einleitung des Zelltods ist, diktiert der aktive Signalweg den auf den Zelluntergang nachgeschalteten Respons. Der dominante Zelltod-Signalweg hat somit fundamentalen Einfluss auf Entstehung oder Ausbleiben einer Inflammation als Reaktion auf den Zelltod.

5.8 Fazit

Die Beobachtung apoptoseabhängiger, partikelinduzierter Osteolysenbildung im murinen Calvaria-Modell warf die Frage nach der potenziellen Triggerfunktion apoptotischer Prozesse im Pathomechanismus der aseptischen Prothesenlockerung auf.

In dieser Studie kann *in vitro* gezeigt werden, dass die Hochregulation der abriebpartikelinduzierten Apoptose bzw. sekundären Nekrose in Makrophagen zur Entstehung residualer Zellfragmente, primär der Apoptotic Bodies, führt. Diese isolierten Zellresiduen zeigen ein den Abriebpartikeln entsprechendes proinflammatorisches Potenzial. Neben der Induktion eines „nicht-apoptotischen“ Zelltods mit nekrotischer Charakteristik führt die Coinkubation mit Apoptotic Bodies zu einer nochmals massiv gesteigerten quantitativen Zelltodreaktion. Daraus leitet sich ein primär von Abriebpartikeln initiiertes, sekundär jedoch Partikel-autonomes Circulus vitiosus ab.

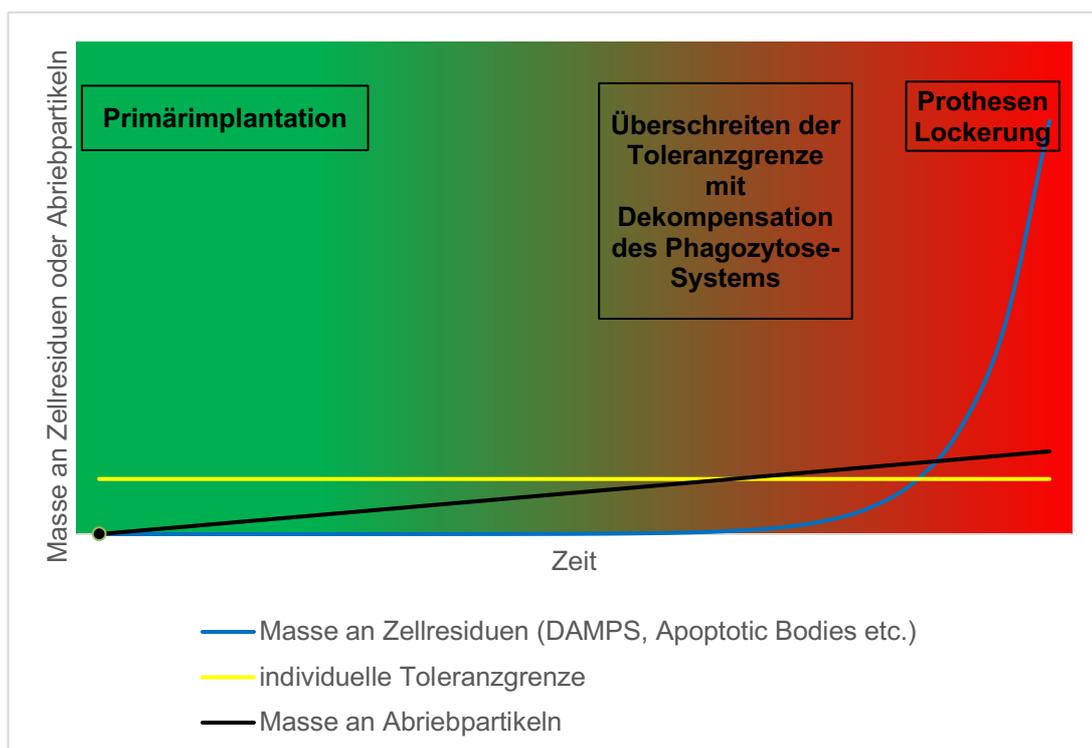


Abbildung 5-1 Zeitabhängige Akkumulation der zu phagozytierenden Masse im Kontext der aseptischen Prothesenlockerung (schematische Darstellung)

Übersteigt die Menge anorganischer Partikel eine individuell unterschiedlich hohe Clearance-Toleranzgrenze, potenziert sich die zu phagozytierende organische Masse durch eine Akkumulation proinflammatorischer Zellresiduen. Das Phagozytose-System dekompensiert und eine aseptische Inflammation exazerbiert. Es zeigt sich ein Übergang vom noninflammatorischen (grün) in ein proinflammatorisches (rot) Milieu.

Dies kann erklären, warum in vorherigen Studien die Hemmung der Apoptose in

vivo durch Pan-Caspase Hemmer geringere Osteolysen ausbildete: Die initiale Hemmung apoptotischer Prozesse resultiert in einer geringeren Abschnürung potenziell proinflammatorischer Zellresiduen wie DAMPs oder Apoptotic Bodies. Das Ausbleiben der konsekutiv inflammatorischen Reaktion hat somit einen präventiven Effekt auf die Ausbildung von Osteolysen durch aktivierte Osteoklasten. Folglich stellt die pharmakologische Hemmung der durch Abriebpartikel induzierten Apoptose einen potenziellen Therapieansatz dar. Aufgrund der aktuell jedoch nicht vollständig absehbaren Langzeitnebenwirkungen einer systemischen antiapoptotischen Therapie ist diese Methode in der vorliegenden Form noch nicht durchführbar. Ein besonderer Fokus muss hier auf das erhöhte kanzerogene Potenzial gelegt werden, da die Apoptose einen Mechanismus zur Elimination irreparabel geschädigter Zellen mit hoher Entartungstendenz darstellt. Diskutabel wäre neben der primären Blockade apoptotischer Prozesse auch die Optimierung des Eliminationsprozesses der Apoptotic Bodies oder der Einsatz immunmodulatorischer Medikamente zur Erhöhung der immunologischen Toleranz der als DAMPs-konnotierten Abriebpartikel. Die topische Applikation antiapoptotischer Substanzen könnte die systemischen Nebenwirkungen einer antiapoptotischen Therapie begrenzen, adäquate Applikationsmethoden fehlen momentan allerdings. Derartige Therapieansätze lassen sich z.B. in der erfolgreichen Therapie der rheumatoiden Arthritis durch den systemischen immunsuppressiven Einsatz von Methotrexat (MTX) oder den neueren Biologicals finden (Smolen et al. 2014). Erfolgsversprechend scheint auch der Einsatz des körpereigenen von den Adipozyten freigesetzten Peptidhormons Adiponektin zu sein. Im Tierversuch führte die systemische Gabe von Adiponektin zu einer signifikant reduzierten abriebpartikelinduzierten Inflammation, geringeren Osteolysen und weniger apoptotischen Zellen. In klinischen Studien sollte die mögliche präventive Wirkung des Adiponektins auf den abriebpartikelinduzierten Lockerungsprozess verifiziert werden (Landgraeber et al. 2014).

Neben potenziell pharmakologischen Therapieansätzen müsste auch der Einsatz von neuen Biomaterialien in der Endoprothetik auf das proapoptotische Potenzial hin untersucht werden. Die etablierten Prothesenwerkstoffe wie Polyethylen oder Kobalt-Chrom weisen ein vergleichbares apoptotisches Potenzial auf. Daher sollten auch neuere Werkstoffe wie z.B. Keramik auf die zelltodinduzierende Wirkung hin untersucht werden.

Unstrittig ist weiterhin, dass dem Prozess der aseptischen Prothesenlockerung eine

multifaktorielle Genese zugrunde liegt. Biomechanische Faktoren, die Immigration von Abriebpartikeln an das Knochen-Implantat-Interface im Zusammenspiel mit einer komplexen Interaktion zellulärer und humoraler Bestandteile des Immunsystems führen zu einem finalen Versagen der Prothese.

Die Etablierung des auf unkontrolliert apoptotischen Prozessen basierenden Circulus vitiosus im Rahmen der aseptischen Prothesenlockerung bildet den frustranen Versuch des Organismus ab, alloplastisches Material mittels Phagozytose zu eliminieren. Die Phagozyten scheitern am Abbau des anorganischen Materials und gehen selbst in die Apoptose über. Die Schlüsselrolle der abriebpartikelinduzierten Apoptose im Rahmen der aseptischen Prothesenlockerung wird durch den nachgeschalteten, postapoptotischen Respons deutlich. Der Verbleib unphagozytierter Apoptotic Bodies initiiert die Auslösung eines „nicht-apoptotischen“ Zelltodes der interagierenden Makrophagen und bildet die Basis für die Exazerbation einer durch Abriebpartikel gebahnten, inflammatorischen Reaktion. Dieses proinflammatorische Milieu fördert die Osteoklastogenese und gipfelt schlussendlich in der Ausbildung periprothetischer Osteolysen.

Die immunologisch „stille“ Apoptose wandelt sich in ein infernales Crescendo.

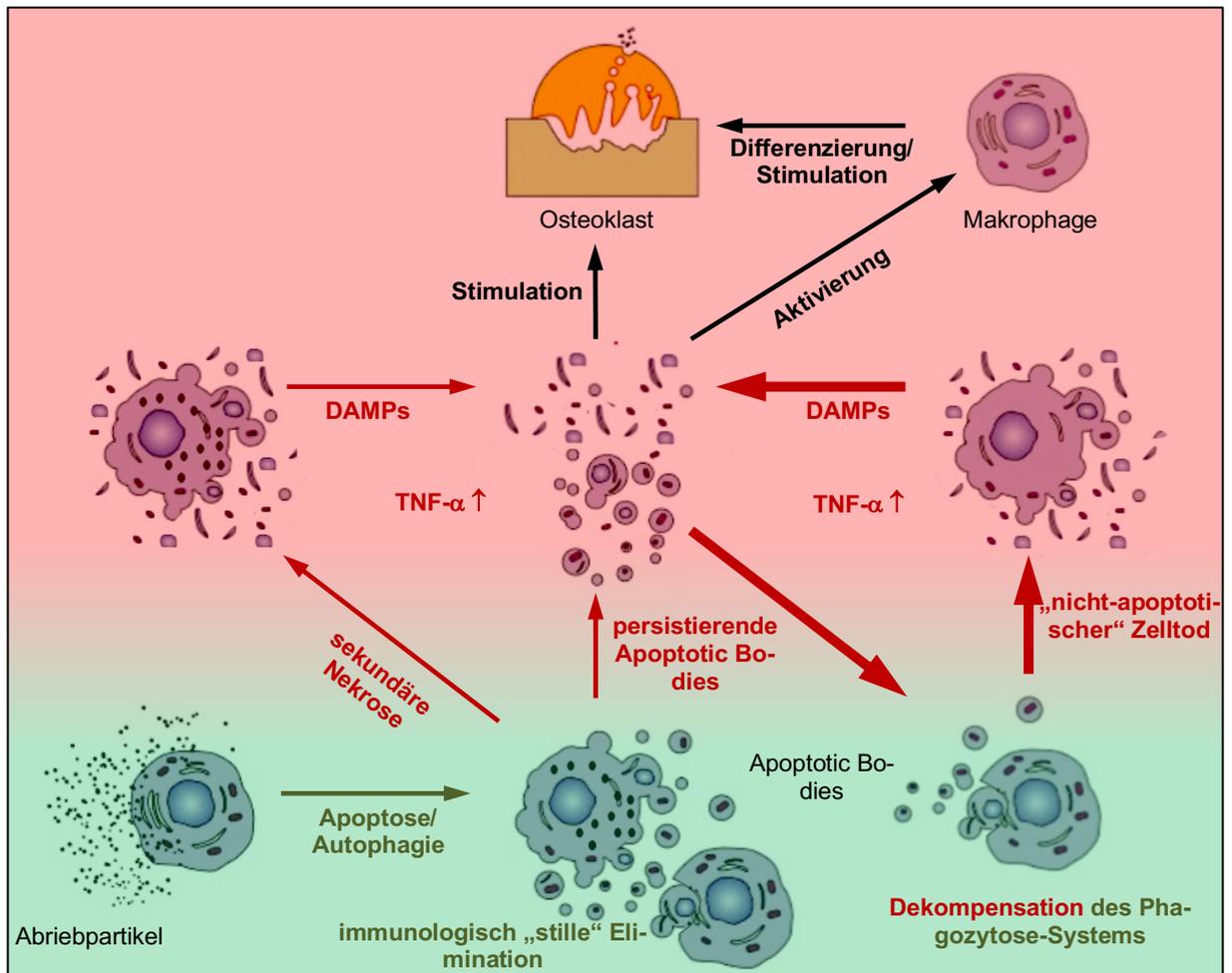


Abbildung 5-2 Circulus vitiosus: Apoptotische Zellreste (Apoptotic Bodies, DAMPs etc.) als zentrale Trigger der abriebpartikelinduzierten Endoprothesenlockerung im Kontext der Zelltoddiversität

Apoptotische Zellreste entstehen durch die abriebpartikelinduzierte Apoptose (ABs) und die sekundäre Nekrose (DAMPs etc.). Überschreitet die Menge anorganischer Zellresiduen die Clearance-Toleranzgrenze des Phagozytose-Systems, erfolgt die Autoinduktion eines „nicht-apoptotischen“ (ggf. nekroptotischen, autophagischen oder pyroptotischen) Zelltods. Diese Zellresiduen aktivieren einen von Partikeln autarken Circulus vitiosus (dicke rote Pfeile) und induzieren ein proinflammatorisches Milieu mit einer gesteigerten Osteoklastogenese.

6 Zusammenfassung

Eine ungelöste Langzeitkomplikation der modernen Orthopädie stellt die aseptische, abriebpartikelinduzierte Endoprothesenlockerung dar. In diesem Kontext zeigen sich ursächlich neben Osteolysen und inflammatorischen Prozessen auch apoptotische Reaktionen der Abriebpartikel phagozytierenden Makrophagen. Die Verwendung eines Pan-Caspase-Inhibitors führte sowohl zu einer Minderung der Apoptose als auch der Osteolysen. Dies erschien paradox, da es sich bei der Apoptose im Gegensatz zur Nekrose um einen programmierten „protektiven“ Zelltod handelt, der keine weiteren Zellschädigungen oder inflammatorischen Reaktionen auslöst. Ziel der vorliegenden Studie war es, den abriebpartikelinduzierten Zelltod zytomorphologisch genauer zu qualifizieren und quantifizieren. Insbesondere sollte evaluiert werden, ob der bei der Phagozytose von Abriebpartikeln entstehende Zellschrott, primär die Apoptotic Bodies (AB), weitere Zellschädigungen induzieren. THP-1 Zellen wurden zu makrophagenähnlichen Zellen (MLC) ausdifferenziert und in einer Cokultur mit Kobalt-Chrom- und Polyethylenabriebpartikeln inkubiert. Mittels cytomorphologischer Auswertung und einer Annexin-PI-Färbung erfolgte unter einem „live-Imaging“ Fluoreszenzmikroskop die Detektion von Apoptose und Nekrose in Zeitraffer-Videos. Aus dem Überstand an apoptotischen Zellresten wurden anschließend die Apoptotic Bodies isoliert und unter gleichen Bedingungen erneut mit zu MLCs ausdifferenzierten THP-1 Zellen coinkubiert. Die Auswertung der Zeitrafferaufnahmen mit Abriebpartikeln zeigte einen signifikanten Anstieg der Zelltodrate durch Apoptose. Die isolierte Coinkubation von THP-1 MLCs mit ABs führte zu einer nochmaligen signifikanten Steigerung der Zelltodrate der phagozytierenden Zellen. Zudem zeigten sich anders als bei dem durch die Abriebpartikel induzierten Zelltod sowohl morphologisch als auch mittels Apoptose-Nekrose Färbung Eigenschaften des unkontrollierten nekrotischen Zelltodes. Die apoptotischen Zellreste, nicht jedoch die Abriebpartikel, lösen somit Übergangsformen der Apoptose und Nekrose aus, wie sie unlängst auch schon im Rahmen anderer Pathomechanismen beschrieben wurden. Die vorliegende Studie untermauert erstmalig die These, dass eine hohe primäre Apoptoserate oder ein fehlender Abbau der apoptotischen Zellreste einen Circulus vitiosus auslösen, der zu einem immer unkontrollierteren Zelltod führt. Dies erklärt, warum eine Hemmung der initialen Apoptose zu einer Verminderung der Osteolysen führt. Daraus lassen sich potenzielle pharmakologische Therapieoptionen wie z.B. die systemische Hemmung der Apoptose, die Optimierung der Clearance-Funktion der ABs (Adiponektin) oder der Einsatz immunmodulatorischer Substanzen (MTX, Biologicals) ableiten. Neben pharmakologischen Interventionen könnten auch Innovationen im Bereich der Materialforschung das zell-todinduzierende Potenzial der Abriebpartikel reduzieren.

7 Literatur und Quellenverzeichnis

1. Aspenberg, P., Van der Vis, H. (1998): Migration, particles, and fluid pressure. A discussion of causes of prosthetic loosening. *Clin Orthop Relat Res*, 75-80.
2. Athanasou, N. A., Quinn, J., Bulstrode, C. J. (1992): Resorption of bone by inflammatory cells derived from the joint capsule of hip arthroplasties. *J Bone Joint Surg Br* 74, 57-62.
3. Baumann, B., Seufert, J., Jakob, F., Noth, U., Rolf, O., Eulert, J., Rader, C. P. (2005): Activation of NF-kappaB signalling and TNFalpha-expression in THP-1 macrophages by TiAlV- and polyethylene-wear particles. *J Orthop Res* 23, 1241-1248.
4. Bergsbaken, T., Fink, S. L., Cookson, B. T. (2009): Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nat Rev Microbiol* 7, 99-109.
5. Beutler, B. (2004): Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature* 430, 257-263.
6. Bianchi, M. E. (2007): DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol* 81, 1-5.
7. Bohl, D. D., Samuel, A. M., Basques, B. A., Della Valle, C. J., Levine, B. R., Grauer, J. N. (2016): How Much Do Adverse Event Rates Differ Between Primary and Revision Total Joint Arthroplasty? *J Arthroplasty* 31, 596-602.
8. Caicedo, M. S., Samelko, L., McAllister, K., Jacobs, J. J., Hallab, N. J. (2013): Increasing both CoCrMo-alloy particle size and surface irregularity induces increased macrophage inflammasome activation in vitro potentially through lysosomal destabilization mechanisms. *J Orthop Res* 31, 1633-1642.

9. Canbay, A., Gieseler, R. K., Gores, G. J., Gerken, G. (2005): The relationship between apoptosis and non-alcoholic fatty liver disease: an evolutionary cornerstone turned pathogenic. *Z Gastroenterol* 43, 211-217.
10. Catelas, I., Petit, A., Zukor, D. J., Marchand, R., Yahia, L., Huk, O. L. (1999): Induction of macrophage apoptosis by ceramic and polyethylene particles in vitro. *Biomaterials* 20, 625-630.
11. Chai, J., Du, C., Wu, J. W., Kyin, S., Wang, X., Shi, Y. (2000): Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature* 406, 855-862.
12. Challa, S., Chan, F. K. (2010): Going up in flames: necrotic cell injury and inflammatory diseases. *Cell Mol Life Sci* 67, 3241-3253.
13. Chanput, W., Mes, J. J., Wichers, H. J. (2014): THP-1 cell line: an in vitro cell model for immune modulation approach. *Int Immunopharmacol* 23, 37-45.
14. Childs, L. M., Goater, J. J., O'Keefe, R. J., Schwarz, E. M. (2001): Efficacy of etanercept for wear debris-induced osteolysis. *J Bone Miner Res* 16, 338-347.
15. Crescitelli, R., Lasser, C., Szabo, T. G., Kittel, A., Eldh, M., Dianzani, I., Buzas, E. I., Lotvall, J. (2013): Distinct RNA profiles in subpopulations of extracellular vesicles: apoptotic bodies, microvesicles and exosomes. *J Extracell Vesicles* 2
16. Czabotar, P. E., Lessene, G., Strasser, A., Adams, J. M. (2014): Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15, 49-63.
17. de Almagro, M. C., Vucic, D. (2015): Necroptosis: Pathway diversity and characteristics. *Semin Cell Dev Biol* 39, 56-62.

18. Distler, J. H. W., Jüngel, A., Huber, L. C., Seemayer, C. A., Reich, C. F., Gay, R. E., Michel, B. A., Fontana, A., Gay, S., Pisetsky, D. S., Distler, O. (2005): The induction of matrix metalloproteinase and cytokine expression in synovial fibroblasts stimulated with immune cell microparticles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 2892-2897.
19. Dumbleton, J. H., Manley, M. T., Edidin, A. A. (2002): A literature review of the association between wear rate and osteolysis in total hip arthroplasty. *J Arthroplasty* 17, 649-661.
20. Elliott, M. R., Ravichandran, K. S. (2010): Clearance of apoptotic cells: implications in health and disease. *J Cell Biol* 189, 1059-1070.
21. Elmore, S. (2007): Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 35, 495-516.
22. Favaloro, B., Allocati, N., Graziano, V., Di Ilio, C., De Laurenzi, V. (2012): Role of apoptosis in disease. *Aging (Albany NY)* 4, 330-349.
23. Fisher, J., McEwen, H. M., Tipper, J. L., Galvin, A. L., Ingram, J., Kamali, A., Stone, M. H., Ingham, E. (2004): Wear, debris, and biologic activity of cross-linked polyethylene in the knee: benefits and potential concerns. *Clin Orthop Relat Res*, 114-119.
24. Fuchs, Y., Steller, H. (2015): Live to die another way: modes of programmed cell death and the signals emanating from dying cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 16, 329-344.
25. Fulda, S. (2014): Tumor-necrosis-factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *Adv Exp Med Biol* 818, 167-180.
26. Galluzzi, L., Bravo-San Pedro, J. M., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., Alnemri, E. S., Altucci, L., Andrews, D., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Baehrecke, E. H., Bazan, N. G., Bertrand, M. J., Bianchi, K.,

- Blagosklonny, M. V., Blomgren, K., Borner, C., Bredesen, D. E., Brenner, C., Campanella, M., Candi, E., Cecconi, F., Chan, F. K., Chandel, N. S., Cheng, E. H., Chipuk, J. E., Cidlowski, J. A., Ciechanover, A., Dawson, T. M., Dawson, V. L., De Laurenzi, V., De Maria, R., Debatin, K. M., Di Daniele, N., Dixit, V. M., Dynlacht, B. D., El-Deiry, W. S., Fimia, G. M., Flavell, R. A., Fulda, S., Garrido, C., Gougeon, M. L., Green, D. R., Gronemeyer, H., Hajnoczky, G., Hardwick, J. M., Hengartner, M. O., Ichijo, H., Joseph, B., Jost, P. J., Kaufmann, T., Kepp, O., Klionsky, D. J., Knight, R. A., Kumar, S., Lemasters, J. J., Levine, B., Linkermann, A., Lipton, S. A., Lockshin, R. A., Lopez-Otin, C., Lugli, E., Madeo, F., Malorni, W., Marine, J. C., Martin, S. J., Martinou, J. C., Medema, J. P., Meier, P., Melino, S., Mizushima, N., Moll, U., Munoz-Pinedo, C., Nunez, G., Oberst, A., Panaretakis, T., Penninger, J. M., Peter, M. E., Piacentini, M., Pinton, P., Prehn, J. H., Puthalakath, H., Rabinovich, G. A., Ravichandran, K. S., Rizzuto, R., Rodrigues, C. M., Rubinsztein, D. C., Rudel, T., Shi, Y., Simon, H. U., Stockwell, B. R., Szabadkai, G., Tait, S. W., Tang, H. L., Tavernarakis, N., Tsujimoto, Y., Vanden Berghe, T., Vandenabeele, P., Villunger, A., Wagner, E. F., Walczak, H., White, E., Wood, W. G., Yuan, J., Zakeri, Z., Zhivotovsky, B., Kroemer, G. (2015): Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. *Cell Death Differ* 22, 58-73.
27. Gerken, G. C., A. (2006): Sterbende Leberzellen: Die Bedeutung des Zelltodes bei Lebererkrankungen. *Essener Unikate* 27, 82-89.
28. Golstein, P., Kroemer, G. (2007): Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem Sci* 32, 37-43.
29. Green, T. R., Fisher, J., Stone, M., Wroblewski, B. M., Ingham, E. (1998): Polyethylene particles of a 'critical size' are necessary for the induction of cytokines by macrophages in vitro. *Biomaterials* 19, 2297-2302.
30. Gyorgy, B., Szabo, T. G., Pasztoi, M., Pal, Z., Misjak, P., Aradi, B., Laszlo, V., Pallinger, E., Pap, E., Kittel, A., Nagy, G., Falus, A., Buzas, E. I. (2011):

- Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci* 68, 2667-2688.
31. Halim, A. T., Ariffin, N. A., Azlan, M. (2016): Review: the Multiple Roles of Monocytic Microparticles. *Inflammation* 39, 1277-1284.
32. Hallan, G., Lie, S. A., Havelin, L. I. (2006): High wear rates and extensive osteolysis in 3 types of uncemented total hip arthroplasty: a review of the PCA, the Harris Galante and the Profile/Tri-Lock Plus arthroplasties with a minimum of 12 years median follow-up in 96 hips. *Acta Orthop* 77, 575-584.
33. Henson, P. M., Tuder, R. M. (2008): Apoptosis in the lung: induction, clearance and detection. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 294, L601-611.
34. Hildebrand, J. M., Tanzer, M. C., Lucet, I. S., Young, S. N., Spall, S. K., Sharma, P., Pierotti, C., Garnier, J. M., Dobson, R. C., Webb, A. I., Tripaydonis, A., Babon, J. J., Mulcair, M. D., Scanlon, M. J., Alexander, W. S., Wilks, A. F., Czabotar, P. E., Lessene, G., Murphy, J. M., Silke, J. (2014): Activation of the pseudokinase MLKL unleashes the four-helix bundle domain to induce membrane localization and necroptotic cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 15072-15077.
35. Hochreiter-Hufford, A., Ravichandran, K. S. (2013): Clearing the dead: apoptotic cell sensing, recognition, engulfment, and digestion. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5, a008748.
36. Hornbeck, P. V. (2015): Enzyme-Linked Immunosorbent Assays. *Curr Protoc Immunol* 110, 2.1.1-23.
37. Huk, O. L., Zukor, D. J., Ralston, W., Lisbona, A., Petit, A. (2001): Apoptosis in interface membranes of aseptically loose total hip arthroplasty. *J Mater Sci Mater Med* 12, 653-658.

38. Jablonski, H., Rekasi, H., Jager, M. (2016): The influence of calcitonin gene-related peptide on markers of bone metabolism in MG-63 osteoblast-like cells co-cultured with THP-1 macrophage-like cells under virtually osteolytic conditions. *BMC Musculoskelet Disord* 17, 199.
39. Kaiser, W. J., Sridharan, H., Huang, C., Mandal, P., Upton, J. W., Gough, P. J., Sehon, C. A., Marquis, R. W., Bertin, J., Mocarski, E. S. (2013): Toll-like receptor 3-mediated necrosis via TRIF, RIP3, and MLKL. *J Biol Chem* 288, 31268-31279.
40. Kanduc, D., Mittelman, A., Serpico, R., Sinigaglia, E., Sinha, A. A., Natale, C., Santacroce, R., Di Corcia, M. G., Lucchese, A., Dini, L., Pani, P., Santacroce, S., Simone, S., Bucci, R., Farber, E. (2002): Cell death: apoptosis versus necrosis (review). *Int J Oncol* 21, 165-170.
41. Kinchen, J. M., Ravichandran, K. S. (2007): Journey to the grave: signaling events regulating removal of apoptotic cells. *J Cell Sci* 120, 2143-2149.
42. Kiraz, Y., Adan, A., Kartal Yandim, M., Baran, Y. (2016): Major apoptotic mechanisms and genes involved in apoptosis. *Tumour Biol*
43. Konttinen, Y. T., Zhao, D., Beklen, A., Ma, G., Takagi, M., Kivel??-Rajam??ki, M., Ashammakhi, N., Santavirta, S. (2005): The Microenvironment around Total Hip Replacement Prostheses. *Clinical Orthopaedics and Related Research* &NA, 28-38.
44. Koopman, G., Reutelingsperger, C. P., Kuijten, G. A., Keehnen, R. M., Pals, S. T., van Oers, M. H. (1994): Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* 84, 1415-1420.
45. Krenn, V., Morawietz, L., Perino, G., Kienapfel, H., Ascherl, R., Hassenpflug, G. J., Thomsen, M., Thomas, P., Huber, M., Kendoff, D., Baumhoer, D., Krukemeyer, M. G., Natu, S., Boettner, F., Zustin, J., Kolbel, B., Ruther, W.,

- Kretzer, J. P., Tiemann, A., Trampuz, A., Frommelt, L., Tichilow, R., Soder, S., Muller, S., Parvizi, J., Illgner, U., Gehrke, T. (2014): Revised histopathological consensus classification of joint implant related pathology. *Pathol Res Pract* 210, 779-786.
46. Krismer, M., Stockl, B., Fischer, M., Bauer, R., Mayrhofer, P., Ogon, M. (1996): Early migration predicts late aseptic failure of hip sockets. *J Bone Joint Surg Br* 78, 422-426.
47. Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., Blagosklonny, M. V., El-Deiry, W. S., Golstein, P., Green, D. R., Hengartner, M., Knight, R. A., Kumar, S., Lipton, S. A., Malorni, W., Nunez, G., Peter, M. E., Tschopp, J., Yuan, J., Piacentini, M., Zhivotovskiy, B., Melino, G. (2009): Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ* 16, 3-11.
48. Krysko, D. V., Denecker, G., Festjens, N., Gabriels, S., Parthoens, E., D'Herde, K., Vandenabeele, P. (2006): Macrophages use different internalization mechanisms to clear apoptotic and necrotic cells. *Cell Death Differ* 13, 2011-2022.
49. Kurtz, S., Ong, K., Lau, E., Mowat, F., Halpern, M. (2007): Projections of primary and revision hip and knee arthroplasty in the United States from 2005 to 2030. *J Bone Joint Surg Am* 89, 780-785.
50. Lähdeoja, T., Pajarinen, J., Kouri, V. P., Sillat, T., Salo, J., Konttinen, Y. T. (2010): Toll-like receptors and aseptic loosening of hip endoprosthesis—a potential to respond against danger signals? *J Orthop Res* 28, 184-190.
51. Lalaoui, N., Lindqvist, L. M., Sandow, J. J., Ekert, P. G. (2015): The molecular relationships between apoptosis, autophagy and necroptosis. *Semin Cell Dev Biol* 39, 63-69.

52. Landgraeber, S., Jaeckel, S., Loer, F., Wedemeyer, C., Hilken, G., Canbay, A., Totsch, M., von Knoch, M. (2009): Pan-caspase inhibition suppresses polyethylene particle-induced osteolysis. *Apoptosis* 14, 173-181.
53. Landgraeber, S., Jäger, M., Jacobs, J. J., Hallab, N. J. (2014): The pathology of orthopedic implant failure is mediated by innate immune system cytokines. *Mediators Inflamm* 2014, 185150.
54. Landgraeber, S., Putz, S., Schlattjan, M., Bechmann, L. P., Totsch, M., Grabellus, F., Hilken, G., Jager, M., Canbay, A. (2014): Adiponectin attenuates osteolysis in aseptic loosening of total hip replacements. *Acta Biomater* 10, 384-393.
55. Landgraeber, S., Toetsch, M., Wedemeyer, C., Saxler, G., Tsokos, M., von Knoch, F., Neuhauser, M., Loer, F., von Knoch, M. (2006): Over-expression of p53/BAK in aseptic loosening after total hip replacement. *Biomaterials* 27, 3010-3020.
56. Landgraeber, S., von Knoch, M., Loer, F., Wegner, A., Tsokos, M., Hussmann, B., Totsch, M. (2008): Extrinsic and intrinsic pathways of apoptosis in aseptic loosening after total hip replacement. *Biomaterials* 29, 3444-3450.
57. Leibbrandt, A., Penninger, J. M. (2009): RANKL/RANK as key factors for osteoclast development and bone loss in arthropathies. *Adv Exp Med Biol* 649, 100-113.
58. Leifer, C. A., Medvedev, A. E. (2016): Molecular mechanisms of regulation of Toll-like receptor signaling. *J Leukoc Biol* 100, 927-941.
59. Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E. S., Wang, X. (1997): Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91, 479-489.

60. Liu, N., Meng, J., Wang, Z., Zhou, G., Shi, T., Zhao, J. (2016): Autophagy mediated TiAl6V4 particle-induced peri-implant osteolysis by promoting expression of TNF-alpha. *Biochem Biophys Res Commun* 473, 133-139.
61. Mandelin, J., Li, T. F., Liljestrom, M., Kroon, M. E., Hanemaaijer, R., Santavirta, S., Konttinen, Y. T. (2003): Imbalance of RANKL/RANK/OPG system in interface tissue in loosening of total hip replacement. *J Bone Joint Surg Br* 85, 1196-1201.
62. Mariathasan, S., Monack, D. M. (2007): Inflammasome adaptors and sensors: intracellular regulators of infection and inflammation. *Nat Rev Immunol* 7, 31-40.
63. Merkel, K. D., Erdmann, J. M., McHugh, K. P., Abu-Amer, Y., Ross, F. P., Teitelbaum, S. L. (1999): Tumor necrosis factor-alpha mediates orthopedic implant osteolysis. *Am J Pathol* 154, 203-210.
64. Mizushima, N. (2011): Autophagy in protein and organelle turnover. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 76, 397-402.
65. Morawietz, L., Gehrke, T., Claßen, R. A., Barden, B., Otto, M., Hansen, T., Aigner, T., Stiehl, P., Neidel, J., Schröder, J. H., Frommelt, L., Schubert, T., Meyer-Scholten, C., König, A., Ströbel, P., Rader, C. P., Kirschner, S., Lintner, F., Räther, W., Skwara, A., Bos, I., Kriegsmann, J., Krenn, V. (2004): Vorschlag für eine Konsensus-Klassifikation der periprothetischen Membran gelockerter Hüft- und Knieendoprothesen. *Der Pathologe* 25
66. Nagata, S., Hanayama, R., Kawane, K. (2010): Autoimmunity and the clearance of dead cells. *Cell* 140, 619-630.
67. Olga L. Huk, D. J. Z., Whitney Ralston, Allan Lisbona, Alain Petit. (2001): Apoptosis in interface membranes of aseptically loose total hip arthroplasty. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 12, 653-658.

68. Park, E. K., Jung, H. S., Yang, H. I., Yoo, M. C., Kim, C., Kim, K. S. (2007): Optimized THP-1 differentiation is required for the detection of responses to weak stimuli. *Inflamm Res* 56, 45-50.
69. Purdue, P. E., Koulouvaris, P., Nestor, B. J., Sculco, T. P. (2006): The central role of wear debris in periprosthetic osteolysis. *HSS J* 2, 102-113.
70. Purdue, P. E., Koulouvaris, P., Potter, H. G., Nestor, B. J., Sculco, T. P. (2007): The cellular and molecular biology of periprosthetic osteolysis. *Clin Orthop Relat Res* 454, 251-261.
71. Rao, A. J., Gibon, E., Ma, T., Yao, Z., Smith, R. L., Goodman, S. B. (2012): Revision joint replacement, wear particles, and macrophage polarization. *Acta Biomater* 8, 2815-2823.
72. Rello, S., Stockert, J. C., Moreno, V., Gamez, A., Pacheco, M., Juarranz, A., Canete, M., Villanueva, A. (2005): Morphological criteria to distinguish cell death induced by apoptotic and necrotic treatments. *Apoptosis* 10, 201-208.
73. Reno, F., Sabbatini, M., Masse, A., Bosetti, M., Cannas, M. (2003): Fibroblast apoptosis and caspase-8 activation in aseptic loosening. *Biomaterials* 24, 3941-3946.
74. Revell, P. A. (2008): The combined role of wear particles, macrophages and lymphocytes in the loosening of total joint prostheses. *J R Soc Interface* 5, 1263-1278.
75. Sadoghi, P., Liebensteiner, M., Agreiter, M., Leithner, A., Bohler, N., Labek, G. (2013): Revision surgery after total joint arthroplasty: a complication-based analysis using worldwide arthroplasty registers. *J Arthroplasty* 28, 1329-1332.
76. Shalini, S., Dorstyn, L., Dawar, S., Kumar, S. (2015): Old, new and emerging functions of caspases. *Cell Death Differ* 22, 526-539.

77. Smolen, J. S., Landewe, R., Breedveld, F. C., Buch, M., Burmester, G., Dougados, M., Emery, P., Gaujoux-Viala, C., Gossec, L., Nam, J., Ramiro, S., Winthrop, K., de Wit, M., Aletaha, D., Betteridge, N., Bijlsma, J. W., Boers, M., Buttgereit, F., Combe, B., Cutolo, M., Damjanov, N., Hazes, J. M., Kouloumas, M., Kvien, T. K., Mariette, X., Pavelka, K., van Riel, P. L., Rubbert-Roth, A., Scholte-Voshaar, M., Scott, D. L., Sokka-Isler, T., Wong, J. B., van der Heijde, D. (2014): EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2013 update. *Ann Rheum Dis* 73, 492-509.
78. Stea, S., Visentin, M., Granchi, D., Cenni, E., Ciapetti, G., Sudanese, A., Toni, A. (2000): Apoptosis in peri-implant tissue. *Biomaterials* 21, 1393-1398.
79. Tait, S. W., Ichim, G., Green, D. R. (2014): Die another way--non-apoptotic mechanisms of cell death. *J Cell Sci* 127, 2135-2144.
80. Tsuchiya, S., Yamabe, M., Yamaguchi, Y., Kobayashi, Y., Konno, T., Tada, K. (1980): Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer* 26, 171-176.
81. van Engeland, M., Nieland, L. J., Ramaekers, F. C., Schutte, B., Reutelingsperger, C. P. (1998): Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry* 31, 1-9.
82. Vanden Berghe, T., Linkermann, A., Jouan-Lanhouet, S., Walczak, H., Vandenabeele, P. (2014): Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15, 135-147.
83. Vanlangenakker, N., Bertrand, M. J., Bogaert, P., Vandenabeele, P., Vanden Berghe, T. (2011): TNF-induced necroptosis in L929 cells is tightly regulated by multiple TNFR1 complex I and II members. *Cell Death Dis* 2, e230.

84. von Knoch, M., Jewison, D. E., Sibonga, J. D., Sprecher, C., Morrey, B. F., Loer, F., Berry, D. J., Scully, S. P. (2004): The effectiveness of polyethylene versus titanium particles in inducing osteolysis in vivo. *J Orthop Res* 22, 237-243.
85. Wallberg, F., Tenev, T., Meier, P. (2016): Time-Lapse Imaging of Cell Death. *Cold Spring Harb Protoc* 2016, pdb.prot087395.
86. Wengler, A., Nimptsch, U., Mansky, T. (2014): Hip and knee replacement in Germany and the USA: analysis of individual inpatient data from German and US hospitals for the years 2005 to 2011. *Dtsch Arztebl Int* 111, 407-416.
87. Westphal, D., Dewson, G., Czabotar, P. E., Kluck, R. M. (2011): Molecular biology of Bax and Bak activation and action. *Biochim Biophys Acta* 1813, 521-531.
88. Willert, H. G. B., H.; Buchhorn, G. H. (1990): Osteolysis in alloarthroplasty of the hip: the role of ultra-high molecular weight polyethylene wear particles. *Clin Orthop Relat Res.* 258, 95-107.
89. Wright, T. M., Goodman, S. B., Surgeons, A. A. o. O. (2001): Implant Wear in Total Joint Replacement: Clinical and Biologic Issues, Material and Design Considerations : Symposium, Oakbrook, Illinois, October 2000: American Academy of Orthopaedic Surgeons.
90. Wyllie, A. H., Kerr, J. F., Currie, A. R. (1980): Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 68, 251-306.
91. Xu, T., Nicolson, S., Denton, D., Kumar, S. (2015): Distinct requirements of Autophagy-related genes in programmed cell death. *Cell Death Differ* 22, 1792-1802.

92. Xue, J., Schmidt, S. V., Sander, J., Draffehn, A., Krebs, W., Quester, I., De Nardo, D., Gohel, T. D., Emde, M., Schmidleithner, L., Ganesan, H., Nino-Castro, A., Mallmann, M. R., Labzin, L., Theis, H., Kraut, M., Beyer, M., Latz, E., Freeman, T. C., Ulas, T.,Schultze, J. L. (2014): Transcriptome-based network analysis reveals a spectrum model of human macrophage activation. *Immunity* 40, 274-288.
93. Yu, L., Wan, F., Dutta, S., Welsh, S., Liu, Z. H., Freundt, E., Baehrecke, E. H.,Lenardo, M. (2006): Autophagic programmed cell death by selective catalase degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 4952-4957.
94. Zhang, X. S.,Revell, P. A. (1999): In situ localization of apoptotic changes in the interface membrane of aseptically loosened orthopaedic implants. *J Mater Sci Mater Med* 10, 879-883.

8 Anhang

8.1 Tabellenverzeichnis

Tabelle 3-1 Färbemedium.....	25
Tabelle 3-2 Anregungs- und Emissionsfilter.....	26
Tabelle 3-3 Zellanzahl pro Zählpunkt.....	28
Tabelle 8-1 Verwendete Verbrauchsmaterialien mit Herstellerangaben	79
Tabelle 8-2 Verwendete Geräte mit Herstellerangaben	80
Tabelle 8-3 Verwendete Chemikalien, Zellen, Kits mit Herstellerangaben.....	80
Tabelle 8-4 Verwendete Lösungen und Puffer.....	81
Tabelle 8-5 Verwendete Zellkulturmedien.....	81

8.2 Diagrammverzeichnis

Diagramm 4-1 Vitalitätsrate Kontrollgruppe vs. Kobalt-Chrom coinkubierte MLCs	34
Diagramm 4-2 Vitalitätsrate Kontrollgruppe vs. Polyethylen coinkubierte MLCs...	35
Diagramm 4-3 Vitalitätsrate Kontrollgruppe vs. Apoptotic Bodies coinkubierte MLCs	35
Diagramm 4-4 Nekroserate Kontrollgruppe vs. Kobalt-Chrom coinkubierte MLCs	37
Diagramm 4-5 Nekroserate Kontrollgruppe vs. Polyethylen coinkubierte MLCs...	37
Diagramm 4-6 Apoptoserate Kontrollgruppe vs. Kobalt-Chrom coinkubierte MLCs	43
Diagramm 4-7 Apoptoserate Kontrollgruppe vs. Polyethylen coinkubierte MLCs .	39
Diagramm 4-8 Rate des „nicht-apoptotischen“ Zelltods Kontrollgruppe vs. Apoptotic Bodies coinkubierte MLCs	39
Diagramm 4-9 Apoptoserate/ „nicht-apoptotischer“ Zelltod Kobalt-Chrom, PE oder ABs coinkubierte MLCs.....	40
Diagramm 4-10 TNF- α Konzentration Negativkontrolle vs. Coinkubation mit Partikeln oder ABs	41

8.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2-1 Röntgenaufnahme einer Hüfte re. mit periprothetischem Lyseaum (Pfeil) bei aseptischer Endoprothesenlockerung	5
Abbildung 2-2 Schematische Darstellung der intrazellulären Signalkaskaden auf Abriebpartikel im Makrophagen (Signalkaskaden laufen parallel ab und interagieren).....	9
Abbildung 2-3 Schematische Darstellung der intra- und interzellulären Interaktion von Makrophagen nach Abriebpartikelkontakt.	11
Abbildung 2-4 Schematische Darstellung der Regulation von Osteoklasten durch Abriebpartikel.....	19
Abbildung 3-1 Kobalt-Chrompartikel (20x)	23
Abbildung 3-2 Polyethylenpartikel.....	23
Abbildung 3-3 Übersicht Isolationsprotokoll von Apoptotic Bodies.....	24
Abbildung 3-4 Schematische Darstellung frühapoptotischer (a) vs. spätapoptotischer (b) Zellen.....	27
Abbildung 4-1 „klassisch“ apoptotische Zelle	31
Abbildung 4-2 „klassisch“ nekrotische Zelle	32
Abbildung 4-3 „nicht-apoptotischer“ Zelltod, ABs-induziert	32
Abbildung 4-4 Momentaufnahmen, extrahiert aus den Zeitraffervideos.....	33
Abbildung 5-1 Zeitabhängige Akkumulation der zu phagozytierenden Masse im Kontext der aseptischen Prothesenlockerung (schematische Darstellung)	56
Abbildung 5-2 Circulus vitiosus: Apoptotische Zellreste (Apoptotic Bodies, DAMPS etc.) als zentrale Trigger der abriebpartikelinduzierten Endoprothesenlockerung im Kontext der Zelltoddiversität.....	59
Abbildung 8-1 Standardverdünnungsreihe (Produktdatenblatt Human TNF-alpha Quantikine ELISA Kit)	83

8.4 Abkürzungsverzeichnis

AB	-	„Apoptotische Zellreste“ (engl. Apoptotic Bodies)
APAF1	-	engl. Apoptotic Protease Activating Factor 1
ASC	-	engl. Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD
ATP	-	Adenosintriphosphat
Bak	-	engl. Bcl-2 homologous antagonist/killer
Bax	-	engl. Bcl2 associated X protein
Bcl-2	-	engl. B-cell lymphoma 2
CAD	-	engl. Caspase-Activated DNase
CARD	-	Caspase Rekrutierungs-Domäne (engl. Caspase Recruitment Domain)
Caspasen	-	Aspartat-spezifische Cysteinproteasen (engl. cysteine-dependent aspartate-specific proteases)
CCL17/ TARC	-	engl. Thymus- and Activation-Regulated Chemokine
CCL22/ MCP-1	-	engl. CC-chemokine Ligand 22/Monocyte Chemotactic Protein 1
COPD	-	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung (engl. Chronic Obstructive Pulmonary Disease)
DAMP	-	Gefahr-assoziierte molekulare Muster (engl. Danger-Associated Molecular Pattern molecules)
dATP	-	Desoxyadenosintriphosphat
DIC	-	Differenzialinterferenzkontrast
DISC	-	engl. Death Inducing Signaling Complex
DMSO	-	Dimethylsulfoxid
DNA	-	Desoxyribonukleinsäure (engl. Deoxyribonucleic Acid)
EGF	-	engl. Epidermal Growth Factor
ELISA	-	engl. Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FACS	-	engl. Fluorescence-Activated Cell Sorting
Fas-L	-	Fas-Ligand
Fas-R/	-	Fas-Rezeptor/ engl. Cluster of Differentiation 95

CD95		
FCS	-	Fetales Kälberserum (engl. Fetal Calf Serum)
FITC	-	Fluoresceinisothiocyanat
GM-CSF	-	engl. Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor
HTRA 2	-	engl. High Temperature Requirement protein A2
IAP	-	engl. Inhibitors of Apoptosis Proteins
IL	-	Interleukin
IL-10	-	Interleukin 10
IL-11	-	Interleukin 11
IL-15	-	Interleukin 15
IL-1 α	-	Interleukin 1 α
IL-1 β	-	Interleukin 1 β
IL-6	-	Interleukin 6
IL-8	-	Interleukin 8
LB-Medium	-	engl. Lysogeny Broth
LPS	-	Lipopolysaccharide
M-CSF	-	engl. Macrophage Colony Stimulating Factor
MDD	-	Minimaldetektierbare Dosis
MIP-1 α	-	engl. Macrophage Inflammatory Protein 1 α
MLC	-	Makrophagen-ähnliche Zelle (engl. Macrophage-Like Cells)
MLKL	-	engl. Mixed Lineage Kinase Like
MTX	-	Methotrexat
MyD88	-	engl. Myeloid Differentiation primary response gene 88
NADPH	-	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NALP3	-	engl. NACHT, LRR and PYD domains containing protein 3
NF- κ B	-	engl. Nuclear Factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NLRs	-	engl. Nucleotide-binding oligomerization domain-Like Receptors
OB	-	Osteoblast
OC	-	Osteoklast (engl. Osteoclast)
OCP	-	Osteoklasten-Vorläuferzelle (engl. Osteoclast-Precursor Cell)
OD	-	Optische Dichte

OPG	-	Osteoprotegerin
PAMP	-	Pathogen-assoziierte molekulare Muster (engl. Pathogen-Associated Molecular Pattern molecules)
PBS	-	Phosphatgepufferte Salzlösung (engl. Phosphate Buffered Saline)
PDGF	-	engl. Platelet-Derived Growth Factor
PI	-	Propidiumiodid
PMA	-	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PRR	-	Muster-Erkennungs Rezeptoren (engl. pattern-recognition receptors)
PS	-	Phosphatidylserin
RANK	-	engl. Receptor Activator of NF- κ B
RANKL	-	engl. Receptor Activator of NF- κ B Ligand
RIPK	-	engl. Receptor-Interacting serine/threonine-Protein Kinase
RNA	-	Ribonukleinsäure (engl. Ribonucleic Acid)
ROS	-	Reaktive Sauerstoffspezies (engl. Reactive Oxygen Species)
SLIM	-	Synovia-ähnliche Zwischenspalt Membran (engl. Synovial-Like Interface Membrane)
SMAC/ DIABLO	-	engl. Second Mitochondria-derived Activator of Caspases
TGF- α	-	Transforming Growth Factor α
TGF- β	-	Transforming Growth Factor β
TLR	-	Toll-ähnliche Rezeptoren (engl. Toll-Like Receptors)
TNF- α	-	Tumornekrosefaktor α
UHMWPE	-	Ultrahochmolekulargewichtiges Polyethylen (engl. Ultrahigh-molecular-Weight Polyethylene)
UTP	-	Uridintriphosphat
3-MA	-	3-Methyladenin

8.5 Material

8.5.1 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 8-1 Verwendete Verbrauchsmaterialien mit Herstellerangaben

Bezeichnung	Hersteller	Bestell-Nr.
Einmal-Zählkammern (SD100 Slides)	Nexcelom Bioscience	91-CMCCP-01
Kunststoffröhrchen, konisch mit Schraubdeckel, 15 ml	Falcon BD	352096
Kunststoffröhrchen, konisch mit Schraubdeckel, 50 ml	Greiner Bio-One	227 261
Mikroskopiekammern (μ -Slide 8 well)	Ibidi	80826
Mikrotiterplatte (96 Nöpfchen)	TPP	92097
Pipettenspitzen, 100-5000 μ l	Eppendorf	0030 000.978
Pipettenspitzen, 50-1000 μ l	Eppendorf	0030 000.919
Pipettenspitzen, 2-200 μ l	Eppendorf	0030 000.870
Pipettenspitzen, 0,1-10 μ l	Eppendorf	0030 000.811
Reaktionsgefäße, 2,0 ml	Eppendorf	0030 120.094
Reaktionsgefäße, 1,5 ml	Eppendorf	0030 108.116
Reaktionsgefäße, 0,5 ml	Eppendorf	0030 108.094
Spritzen, 5 ml	Terumo	SST05ES1
Sterilfilter, 500 ml (0,22 μ l Porengröße)	Corning	430049
Zellkultur-Einwegpipetten 25 ml	Corning	4489
Zellkultur-Einwegpipetten 10 ml	Corning	4488
Zellkultur-Einwegpipetten 5 ml	Corning	4487
Zellkulturflasche		
Zellkulturplatten, 24 Kammern	TPP	92024
Zellkulturplatten, 6 Kammern	TPP	92006
Zellsiebe, 100 μ m Porendurchmesser	Falcon BD	352360
Zellsiebe, 40 μ m Porendurchmesser	Falcon BD	352340
Zellsiebe, 30 μ m Porendurchmesser	Partec	04-0042-2316
Zellsiebe, 10 μ m Porendurchmesser	Partec	04-0042-2314

8.5.2 Geräte

Tabelle 8-2 Verwendete Geräte mit Herstellerangaben

Gerät	Typ	Hersteller
Inkubator (Zellkultur)	Heracell 150i CO ₂ -Inkubator	Thermo Scientific
Inverses Fluoreszenzmikroskop	DMI6000 B	Leica
Inverses Labormikroskop	DM IL LED	Leica
Multi-Mode Reader	SpectraMax M5	Molecular Devices
Pipettierhilfe	Pipetus	Hirschmann
Schüttelgerät	Vortex Genie 2	Scientific Industries
Vakuumpumpe	AA 02	Ditabis
Waage	TR64	Sartorius
Wasserbad	TW12	Julabo
Werkbank	Mars Safety Class 2	Scanlaf
Zellzähler	Cellometer Auto T4	Nexcelom Bioscience
Zentrifuge	5424R	Eppendorf
Zentrifuge	5810R	Eppendorf

8.5.3 Chemikalien

Tabelle 8-3 Verwendete Chemikalien, Zellen, Kits mit Herstellerangaben

Bezeichnung	Hersteller	Bestell-Nr.
Annexin V (FITC)	BioLegend	640906
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Sigma	223506
Cobalt-Chrom Abriebpartikel		
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fluka	41641
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Carl Roth	4984.1
Ethanol, 70 %		
Fötales Kälberserum (FCS), deaktiviert	Biochrom	Lot 0378A
Human TNF-alpha Quantikine ELISA Kit	Rndsystems	DTA00C
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma	P9541
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Sigma	P5655
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth	9357.1
Phorbol 12-Myristat 13-Acetat (PMA)	Sigma	P8139-5MG
Polyethylen (PE) Abriebpartikel	Clariant	Ceridust VP 3610
Penicillin/ Streptomycin	Biochrom	A 2210
Propidiumiodid	BioLegend	421301

RPMI 1640	Biochrom	FG1215
StemPro Accutase	Gibco/Life Technologies	A11105-01
Stickstoff Chemikalienlager Universität Essen		
Titan (Ti) Abriebpartikel	Continuum Blue Technology, UK	
Trypanblau Lösung (0,4 %)	Sigma	T8154
Zelllinie THP-1	ATCC	TIB-202
	DSMZ	ACC16

8.5.4 Lösungen und Puffer

Tabelle 8-4 Verwendete Lösungen und Puffer

Lösung/ Puffer	Volumen/ Gewicht	Inhaltsstoffe
PBS	80g	NaCl
	2g	KCl
	14,3g	Na ₂ HPO ₄
	2g	KH ₂ PO ₄
Bemerkung	Mit destilliertem H ₂ O auf 1000ml auffüllen, pH 7,4 einstellen und sterilfiltrieren.	

8.5.5 Zellkulturmedien

Tabelle 8-5 Verwendete Zellkulturmedien

Medium	Volumen/ Gewicht	Inhaltsstoffe
THP-1 Zellkulturmedium	445ml	RPMI-1640
	50ml	FBS 0378A
	100IE/ml	Penicillin/
	100µg/ml	Streptomycin
THP-1 Färbemedium	445ml	RPMI-1640
	50ml	FBS 0378A
	100IE/ml	Penicillin/
	100µg/ml	Streptomycin
Bemerkung	2nM Zweifaches sterilfiltrieren.	CaCl ₂
THP-1 Einfriermedium	10%	DMSO
	20%	FCS
	70%	RPMI 1640

8.6 Versuchsprotokoll humaner TNF- α Quantikine ELISA

Die Durchführung des Protokolls orientierte sich an dem vom Hersteller beigefügten Produktdatenblatts¹⁶.

8.6.1 Material

- Waschpuffer: 20ml Wash Buffer Concentrate mit 500ml destilliertem Wasser verdünnen
- Verdünnungsmedium für den Standard: Calibrator Diluent RD6-35 (1X)
- Substratlösung: Color Reagents A und B vermischen im Verhältnis von 1:1
- TNF- α Standard: Lösen des TNF- α Standards in 1ml destilliertem Wasser (10.000pg/ml)

(alle Reagenzien, Standards und Samples müssen auf Raumtemperatur aufgewärmt werden)

¹⁶ Human TNF-alpha Quantikine ELISA Kit, Rndsystems, DTA00C

8.6.2 Durchführung

1. Herstellung einer Standardverdünnungsreihe

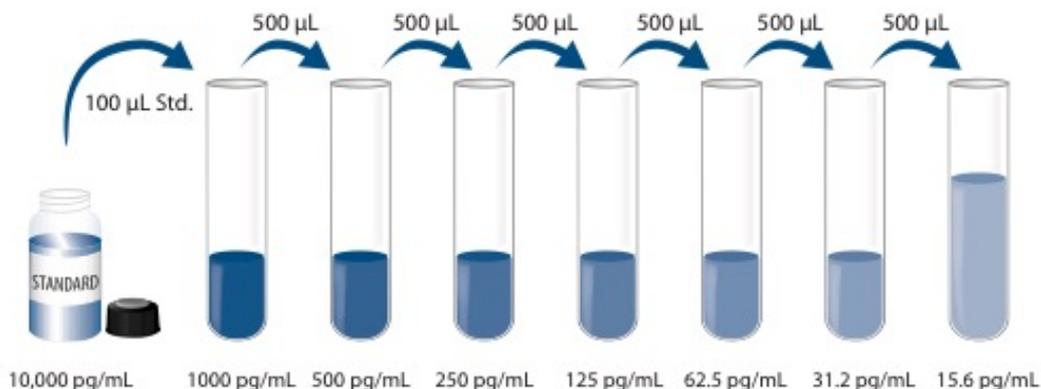


Abbildung 8-1 Standardverdünnungsreihe (Produktdatenblatt Human TNF-alpha Quantikine ELISA Kit)

2. Addition von 50µl Assay Diluent RD1F in jedes well.
3. Addition von 200µl Standard, Sample oder Kontrolle pro well und Inkubation als Duplikat über 2 Stunden bei Raumtemperatur.
4. Viermaliges Waschen mit jeweils 400µl Waschpuffer
5. Addition von 200µl TNF- α Conjugate pro well und Inkubation über 1 Stunde bei Raumtemperatur.
6. Viermaliges Waschen mit jeweils 400µl Waschpuffer
7. Addition von 200µl Substrate Solution und lichtgeschützte Inkubation bei Raumtemperatur über 20 Minuten.
8. Addition von 50µl Stop Solution.
9. Bestimmung der optischen Dichte innerhalb von 30 Minuten.

8.7 Rohdaten live-cell imaging

8.7.1 Negativkontrolle und Cokultur mit CoCr-Partikeln

Name ohne Abriepartikel	A0h	N0h	L0h	A2h	N2h	L2h	A4h	N4h	L4h	A6h	N6h	L6h	A8h	N8h	L8h	A10h	N10h	L10h	A12h	N12h	L12h
050620014 1001	2	1	50	3	1	44	6	1	52	12	3	40	12	4	33	11	5	35	16	7	42
050620014 2002	1	0	99	4	0	83	5	1	89	14	1	71	19	4	70	17	10	71	16	11	69
050620014 3003	1	1	105	1	1	100	7	2	112	12	6	96	14	12	95	12	15	84	14	15	83
050620014 5005	0	0	57	1	0	55	3	0	54	7	1	53	6	4	47	7	5	48	7	5	52
050620014 7007	2	0	45	4	0	43	4	2	42	9	3	48	6	6	46	5	7	43	7	7	44
Start- realen wert	6	2	356	13	2	325	25	6	349	54	14	308	57	30	291	52	42	281	60	45	290
Gesamt Zellzahl			364			332			372			368			374			367			387
Prozent	0,02	0,0	0,9	0,0	0,0	0,9	0,0	0,0	0,9	0,1	0,0	0,8	0,1	0,0	0,7	0,13	0,11	0,77	0,14	0,11	0,75
Name ohne Abriepartikel	A0h	N0h	L0h	A2h	N2h	L2h	A4h	N4h	L4h	A6h	N6h	L6h	A8h	N8h	L8h	A10h	N10h	L10h	A12h	N12h	L12h
02082014Caspase_2_Chr Negativkontrolle 1	0	0	8	0	0	8	0	0	8	1	0	7	1	0	7	2	0	6	3	0	7
02082014Caspase_2_Chr Negativkontrolle 2	1	1	8	1	1	9	1	1	9	2	2	8	2	1	8	2	2	7	2	2	7
02082014Caspase_2_Chr Negativkontrolle 3	1	0	8	1	0	8	1	0	7	1	1	6	1	1	6	1	1	6	1	1	6
Start- realen wert	2	1	24	2	1	25	2	1	24	4	3	21	4	2	21	5	3	19	6	3	20
Gesamt Zellzahl			27			25			24			25			26			24			26
Prozent	0,07	0,0	0,8	0,0	0,0	0,9	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0	0,8	0,0	0,1	0,8	0,13	0,08	0,79	0,15	0,08	0,77
Name ohne Abriepartikel	A0h	N0h	L0h	A2h	N2h	L2h	A4h	N4h	L4h	A6h	N6h	L6h	A8h	N8h	L8h	A10h	N10h	L10h	A12h	N12h	L12h
31072014Caspase_1_Chr Negativkontrolle 1	1	0	29	2	0	28	3	0	27	5	1	24	5	1	24	5	1	24	8	1	24
31072014Caspase_1_Chr Negativkontrolle 2	0	0	28	0	0	28	0	0	28	4	0	24	5	0	22	5	0	22	7	0	17
31072014Caspase_1_Chr Negativkontrolle 3	1	0	23	1	0	25	2	0	24	4	1	20	5	1	19	5	1	18	6	1	19
Start- realen wert	2	0	80	3	0	81	5	0	79	13	2	68	15	2	65	15	2	64	21	2	60
Gesamt Zellzahl			82			82			82			81			80			79			81
Prozent	0,02	0,0	0,9	0,0	0,0	0,9	0,0	0,0	0,9	0,1	0,0	0,8	0,1	0,0	0,8	0,16	0,03	0,81	0,23	0,02	0,74
Name ohne Abriepartikel	A0h	N0h	L0h	A2h	N2h	L2h	A4h	N4h	L4h	A6h	N6h	L6h	A8h	N8h	L8h	A10h	N10h	L10h	A12h	N12h	L12h
31072014Caspase_4_Chr Negativkontrolle 1	0	0	51	0	0	51	3	0	46	5	0	44	6	0	43	12	0	37	13	1	35
31072014Caspase_4_Chr Negativkontrolle 2	0	0	39	1	0	38	3	0	36	5	0	31	7	0	31	9	1	26	10	2	25
31072014Caspase_4_Chr Negativkontrolle 3	0	0	28	0	0	28	1	0	26	1	0	26	3	0	23	3	1	23	5	1	20
31072014Caspase_4_Chr Negativkontrolle 5	0	0	18	0	0	18	0	0	18	1	0	17	2	0	16	4	1	14	4	1	14
31072014Caspase_4_Chr Negativkontrolle 6	1	0	17	1	0	15	1	0	14	1	0	14	1	0	14	1	0	13	3	0	12
31072014Caspase_4_Chr Negativkontrolle 7	1	0	17	1	0	17	1	0	17	1	0	18	1	0	18	2	1	16	2	1	16
31072014Caspase_4_Chr Negativkontrolle 8	1	0	14	1	0	14	1	0	14	2	0	14	3	0	11	5	0	9	5	1	8
Start- realen wert	3	0	184	4	0	181	10	0	171	16	0	164	23	0	156	36	4	138	42	7	130
Gesamt Zellzahl			187			182			178			177			176			175			176
Prozent	0,02	0,0	0,9	0,0	0,0	0,9	0,0	0,0	0,9	0,0	0,0	0,9	0,1	0,0	0,8	0,19	0,02	0,79	0,22	0,04	0,74

Name Cr	A0h	N0h	L0h	A2h	N2h	L2h	A4h	N4h	L4h	A6h	N6h	L6h	A8h	N8h	L8h	A10h	N10h	L10h	A12h	N12h	L12h
050620014 9009	0	0	84	0	0	72	5	2	67	12	8	58	14	9	58	14	9	57	16	11	53
050620014 10010	0	0	64	1	0	60	5	2	47	11	6	42	10	8	37	12	6	32	22	7	33
050620014 11011	2	0	49	3	0	53	4	1	51	12	3	38	13	7	36	13	7	37	15	9	27
050620014 14014	0	0	88	1	1	86	5	1	79	19	3	54	21	5	69	22	8	54	23	9	59
050620014 15015	3	0	99	3	0	97	14	3	90	18	6	70	21	9	64	29	10	53	28	10	61
	5	0	384	8	1	368	33	9	334	72	26	262	79	38	264	90	40	233	104	46	233
Start- realen wert	5	0	384	3	1	368	28	9	334	67	26	262	74	38	264	85	40	233	99	46	233
Gesamt Zellzahl	389			372			371			355			376			358			378		
Prozent	0,01	0,00	0,99	0,01	0,00	0,99	0,08	0,02	0,90	0,19	0,07	0,74	0,20	0,10	0,70	0,24	0,11	0,65	0,26	0,12	0,62
Name Cr	A0h	N0h	L0h	A2h	N2h	L2h	A4h	N4h	L4h	A6h	N6h	L6h	A8h	N8h	L8h	A10h	N10h	L10h	A12h	N12h	L12h
02082014Caspase_2_Chr 1	0	0	6	0	0	6	1	0	5	2	1	3	3	1	1	3	1	1	4	1	1
02082014Caspase_2_Chr 2	1	0	5	2	0	4	2	0	4	2	0	4	2	0	4	2	0	4	2	1	3
02082014Caspase_2_Chr 3	2	0	8	2	0	8	2	0	7	3	1	5	5	1	3	5	1	3	6	1	2
02082014Caspase_2_Chr 4	0	0	11	0	0	11	1	0	10	2	0	9	2	0	9	2	0	9	2	0	9
	3	0	30	4	0	29	6	0	26	9	2	21	12	2	17	12	2	17	14	3	15
Start- realen wert	3	0	30	1	0	29	3	0	26	6	2	21	9	2	17	9	2	17	11	3	15
Gesamt Zellzahl	33			30			29			29			28			28			29		
Prozent	0,09	0,00	0,91	0,03	0,00	0,97	0,10	0,00	0,90	0,21	0,07	0,72	0,32	0,07	0,61	0,32	0,07	0,61	0,38	0,10	0,52
Name Cr	A0h	N0h	L0h	A2h	N2h	L2h	A4h	N4h	L4h	A6h	N6h	L6h	A8h	N8h	L8h	A10h	N10h	L10h	A12h	N12h	L12h
31072014Caspase_1_Chr 1	0	0	12	0	0	12	2	0	10	4	0	8	7	0	5	7	0	5	7	0	5
31072014Caspase_1_Chr 2	0	0	4	0	0	4	0	0	4	1	0	3	2	0	3	2	0	3	2	0	3
31072014Caspase_1_Chr 3	0	0	11	0	0	11	2	1	8	3	1	8	2	1	5	2	1	5	2	1	5
31072014Caspase_1_Chr 4	0	0	10	0	0	10	1	0	9	2	0	9	2	1	8	3	2	6	3	2	6
	0	0	37	0	0	37	5	1	31	10	1	28	13	2	21	14	3	19	14	3	19
Start- realen wert	0	0	37	0	0	37	5	1	31	10	1	28	13	2	21	14	3	19	14	3	19
Gesamt Zellzahl	37			37			37			39			36			36			36		
Prozent	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	1,00	0,14	0,03	0,84	0,26	0,03	0,72	0,36	0,06	0,58	0,39	0,08	0,53	0,39	0,08	0,53
Name Cr	A0h	N0h	L0h	A2h	N2h	L2h	A4h	N4h	L4h	A6h	N6h	L6h	A8h	N8h	L8h	A10h	N10h	L10h	A12h	N12h	L12h
31072014Caspase_4_Chr 1	1	0	17	2	0	17	2	0	16	2	0	15	3	1	14	7	3	8	9	3	7
31072014Caspase_4_Chr 2	0	0	18	0	0	18	1	0	17	1	0	17	3	0	13	5	0	11	8	0	8
31072014Caspase_4_Chr 4	0	0	39	0	1	38	1	1	37	1	1	37	6	3	27	13	5	20	14	6	18
31072014Caspase_4_Chr 6	0	0	26	2	0	24	2	0	24	3	0	21	5	1	18	8	2	13	9	2	12
	1	0	100	4	1	97	6	1	94	7	1	90	17	5	72	33	10	52	40	11	45
Start- realen wert	1	0	100	3	1	97	5	1	94	6	1	90	16	5	72	32	10	52	39	11	45
Gesamt Zellzahl	101			101			100			97			93			94			95		
Prozent	0,01	0,00	0,99	0,03	0,01	0,96	0,05	0,01	0,94	0,06	0,01	0,93	0,17	0,05	0,77	0,34	0,11	0,55	0,41	0,12	0,47

8.7.2 Negativkontrolle und Cokultur mit Polyethylenpartikeln

Name ohne Abriebpartikel	A0h	N0h	L0h	A2h	N2h	L2h	A4h	N4h	L4h	A6h	N6h	L6h	A8h	N8h	L8h	A10h	N10h	L10h	A12h	N12h	L12h
050620014 1001	2	1	50	3	1	44	6	1	52	12	3	40	12	4	33	11	5	35	16	7	42
050620014 2002	1	0	99	4	0	83	5	1	89	14	1	71	19	4	70	17	10	71	16	11	69
050620014 3003	1	1	105	1	1	100	7	2	112	12	6	96	14	12	95	12	15	84	14	15	83
050620014 5005	0	0	57	1	0	55	3	0	54	7	1	53	6	4	47	7	5	48	7	5	52
050620014 7007	2	0	45	4	0	43	4	2	42	9	3	48	6	6	46	5	7	43	7	7	44
	6	2	356	13	2	325	25	6	349	54	14	308	57	30	291	52	42	281	60	45	290
Start- realen wert	6	2	356	7	0	325	19	4	349	48	12	308	51	32	291	46	40	281	54	43	290

Gesamt Zellzahl	364			332			372			368			374			367			387		
Prozent	0,02	0,01	0,98	0,02	0,00	0,98	0,05	0,01	0,94	0,13	0,03	0,84	0,14	0,09	0,78	0,13	0,11	0,77	0,14	0,11	0,75
Name ohne Abriebpartikel	A0h	N0h	L0h	A2h	N2h	L2h	A4h	N4h	L4h	A6h	N6h	L6h	A8h	N8h	L8h	A10h	N10h	L10h	A12h	N12h	L12h
15082014 1001	3	0	30	3	0	30	4	0	28	5	0	29	6	0	25	7	1	21	7	2	21
15082014 3003	0	0	17	0	0	17	0	0	17	0	0	17	2	0	16	2	0	16	2	0	16
15082014 5005	0	0	18	0	0	18	0	0	19	1	0	18	2	1	17	2	2	16	2	2	16
15082014 6006	0	0	13	0	0	13	1	0	13	1	0	13	1	1	12	2	1	11	2	1	11
	3	0	78	3	0	78	5	0	77	7	0	77	11	2	70	13	4	64	13	5	64
Start- realen wert	3	0	78	0	0	78	2	0	77	4	0	77	8	2	70	10	4	64	10	5	64

Gesamt Zellzahl	81			78			79			81			80			78			79		
Prozent	0,04	0,00	0,96	0,00	0,00	1,00	0,03	0,00	0,97	0,05	0,00	0,95	0,10	0,03	0,88	0,13	0,05	0,82	0,13	0,06	0,81
Name ohne Abriebpartikel	A0h	N0h	L0h	A2h	N2h	L2h	A4h	N4h	L4h	A6h	N6h	L6h	A8h	N8h	L8h	A10h	N10h	L10h	A12h	N12h	L12h
28082014 1001	0	0	12	0	0	13	0	0	14	1	1	13	1	1	11	3	2	11	4	3	6
28082014 2002	0	0	18	1	0	16	1	0	19	2	0	15	2	0	15	4	0	15	4	0	15
28082014 3003	0	0	21	0	0	21	0	0	19	1	0	18	1	0	18	1	0	20	1	0	19
28082014 4004	0	0	14	1	0	12	1	0	12	2	0	12	2	1	13	2	1	11	2	1	11
28082014 5005	0	0	10	0	0	10	0	0	10	0	0	10	0	0	10	0	0	10	0	0	10
28082014 6006	0	0	11	0	0	11	0	0	11	1	0	10	1	1	12	1	1	12	1	1	11
	0	0	86	2	0	83	2	0	85	7	1	78	7	3	79	11	4	79	12	5	72
Start- realen wert	0	0	86	2	0	83	2	0	85	7	1	78	7	3	79	11	4	79	12	5	72

Gesamt Zellzahl	86			85			87			86			89			94			89		
Prozent	0,00	0,00	1,00	0,02	0,00	0,98	0,02	0,00	0,98	0,08	0,01	0,91	0,08	0,03	0,89	0,12	0,04	0,84	0,13	0,06	0,81

Name PE	A0h	N0h	L0h	A2h	N2h	L2h	A4h	N4h	L4h	A6h	N6h	L6h	A8h	N8h	L8h	A10h	N10h	L10h	A12h	N12h	L12h
050620014 20020	0	0	47	0	0	48	1	0	42	6	1	28	10	1	25	11	2	20	11	2	21
050620014 21021	1	0	105	2	0	104	9	3	94	24	3	67	30	5	66	31	7	54	31	7	54
050620014 22022	0	0	66	1	1	64	4	1	62	8	1	49	15	2	47	17	3	46	17	3	39
050620014 25025	0	0	32	0	0	32	2	0	34	4	0	25	5	0	21	5	0	22	5	1	25
	1	0	250	3	1	248	16	4	232	42	5	169	60	8	159	64	12	142	64	13	139

Start- realen wert 1 0 250 2 1 248 15 4 232 41 5 169 59 8 159 63 12 142 63 13 139

Gesamt Zellzahl 251 251 251 215 226 217 215

Prozent 0,00 0,00 1,00 0,01 0,00 0,99 0,06 0,02 0,92 0,19 0,02 0,79 0,26 0,04 0,70 0,29 0,06 0,65 0,29 0,06 0,65

Name PE	A0h	N0h	L0h	A2h	N2h	L2h	A4h	N4h	L4h	A6h	N6h	L6h	A8h	N8h	L8h	A10h	N10h	L10h	A12h	N12h	L12h
15082014 11011	0	0	12	0	0	12	0	0	12	1	0	12	3	0	10	5	2	6	5	2	6
15082014 12012	0	0	15	0	0	15	1	0	14	2	0	13	4	0	10	6	0	9	6	0	9
15082014 13013	0	0	14	0	0	10	0	0	14	2	0	11	2	1	10	2	1	10	2	1	10
	0	0	41	0	0	37	1	0	40	5	0	36	9	1	30	13	3	25	13	3	25

Start- realen wert 0 0 41 0 0 37 1 0 40 5 0 36 9 1 30 13 3 25 13 3 25

Gesamt Zellzahl 41 37 41 41 40 41 41

Prozent 0,00 0,00 1,00 0,00 0,00 1,00 0,02 0,00 0,98 0,12 0,00 0,88 0,23 0,03 0,75 0,32 0,07 0,61 0,32 0,07 0,61

Name PE	A0h	N0h	L0h	A2h	N2h	L2h	A4h	N4h	L4h	A6h	N6h	L6h	A8h	N8h	L8h	A10h	N10h	L10h	A12h	N12h	L12h
28082014 9009	0	0	10	0	0	10	1	0	9	3	0	8	3	0	8	3	1	7	4	1	7
28082014 13013	2	0	25	3	0	27	3	0	26	5	1	24	8	2	20	9	2	19	9	2	19
	2	0	35	3	0	37	4	0	35	8	1	32	11	2	28	12	3	26	13	3	26

Start- realen wert 2 0 35 1 0 37 2 0 35 6 1 32 9 2 28 10 3 26 11 3 26

Gesamt Zellzahl 37 38 37 39 39 39 40

Prozent 0,05 0,00 0,95 0,03 0,00 0,97 0,05 0,00 0,95 0,15 0,03 0,82 0,23 0,05 0,72 0,26 0,08 0,67 0,28 0,08 0,65

8.7.3 Negativkontrolle und Cokultur mit ABs

Name ohne Abriebpartikel	A0h	N0h	L0h	A2h	N2h	L2h	A4h	N4h	L4h	A6h	N6h	L6h	A8h	N8h	L8h	A10h	N10h	L10h	A12h	N12h	L12h
14092014 13013	0	0	15	0	0	15	0	0	16	2	0	15	2	0	12	2	0	15	2	0	15
14092014 14014	0	0	18	0	0	18	0	0	19	2	2	18	3	2	15	3	2	15	3	2	15
	0	0	33	0	0	33	0	0	35	4	2	33	5	2	27	5	2	30	5	2	30

Start- realen wert 0 0 33 0 0 33 0 0 35 4 2 33 5 2 27 5 2 30 5 2 30

Gesamt Zellzahl 33 33 35 39 34 37 37

Prozent 0,00 0,00 1,00 0,00 0,00 1,00 0,00 0,00 1,00 0,10 0,05 0,85 0,15 0,06 0,79 0,14 0,05 0,81 0,14 0,05 0,81

Name ohne Abriebpartikel	A0h	N0h	L0h	A2h	N2h	L2h	A4h	N4h	L4h	A6h	N6h	L6h	A8h	N8h	L8h	A10h	N10h	L10h	A12h	N12h	L12h
15092014 1001	0	0	20	0	0	24	2	0	19	3	0	20	3	0	18	3	0	17	3	0	19
15092014 2002	0	0	18	0	0	18	1	0	20	3	1	17	3	1	15	3	1	15	3	1	14
15092014 3003	0	0	13	0	0	13	0	0	13	2	1	9	2	2	9	2	2	9	2	2	8
	0	0	51	0	0	55	3	0	52	8	2	46	8	3	42	8	3	41	8	3	41

Start- realen wert 0 0 51 0 0 55 3 0 52 8 2 46 8 3 42 8 3 41 8 3 41

Gesamt Zellzahl 51 55 55 56 53 52 52

Prozent 0,00 0,00 1,00 0,00 0,00 1,00 0,05 0,00 0,95 0,14 0,04 0,82 0,15 0,06 0,79 0,15 0,06 0,79 0,15 0,06 0,79

Name ohne Abriebpartikel	A0h	N0h	L0h	A2h	N2h	L2h	A4h	N4h	L4h	A6h	N6h	L6h	A8h	N8h	L8h	A10h	N10h	L10h	A12h	N12h	L12h
18092014 2002	0	0	31	0	0	31	0	0	29	1	0	26	2	1	23	2	3	18	3	4	23
18092014 3003	0	0	20	0	0	20	0	0	21	0	2	18	0	2	18	1	2	17	1	2	17
18092014 4004	0	0	14	0	0	14	3	0	14	3	0	15	3	1	12	3	1	9	3	1	8
	0	0	65	0	0	65	3	0	64	4	2	59	5	4	53	6	6	44	7	7	48

Start- realen wert 0 0 65 0 0 65 3 0 64 4 2 59 5 4 53 6 6 44 7 7 48

Gesamt Zellzahl 65 65 67 65 62 56 62

Prozent 0,00 0,00 1,00 0,00 0,00 1,00 0,04 0,00 0,96 0,06 0,03 0,91 0,08 0,06 0,85 0,11 0,11 0,79 0,11 0,11 0,77

Name AB	A0h	N0h	L0h	A2h	N2h	L2h	A4h	N4h	L4h	A6h	N6h	L6h	A8h	N8h	L8h	A10h	N10h	L10h	A12h	N12h	L12h
14092014 1001	0	0	31	0	0	31	1	0	29	13	1	8	18	1	5	18	1	5	18	1	5
14092014 7007	0	0	28	0	0	28	4	0	24	15	0	8	18	0	5	18	1	5	20	0	3
14092014 8008	0	0	24	1	0	23	2	1	17	12	1	7	16	1	3	16	1	3	17	1	2
14092014 11011	0	0	24	0	0	24	4	0	20	15	0	10	17	0	8	18	0	7	19	0	6
	0	0	107	1	0	106	11	1	90	55	2	33	69	2	21	70	3	20	74	2	16

Start- realen wert 0 0 107 1 0 106 11 1 90 55 2 33 69 2 21 70 3 20 74 2 16

Gesamt Zellzahl 107 107 102 90 92 93 92

Prozent 0,00 0,00 1,00 0,01 0,00 0,99 0,11 0,01 0,88 0,61 0,02 0,37 0,75 0,02 0,23 0,75 0,03 0,22 0,80 0,02 0,17

Name AB	A0h	N0h	L0h	A2h	N2h	L2h	A4h	N4h	L4h	A6h	N6h	L6h	A8h	N8h	L8h	A10h	N10h	L10h	A12h	N12h	L12h
15092014 6006	0	0	12	5	0	13	9	0	6	9	0	6	9	0	6	9	0	7	9	0	8
15092014 7007	0	0	33	2	1	32	16	2	19	23	3	13	24	3	12	25	3	11	25	3	11
15092014 12012	0	0	15	1	0	17	7	0	10	12	0	5	12	0	5	12	0	5	12	0	5
15092014 14014	0	0	14	4	0	10	9	0	4	10	1	3	10	1	3	10	1	2	10	1	2
15092014 15015	0	0	21	1	0	20	11	0	7	15	0	3	15	0	3	15	0	3	15	0	2
	0	0	95	13	1	92	52	2	46	69	4	30	70	4	29	71	4	28	71	4	28

Start- realen wert 0 0 95 13 1 92 52 2 46 69 4 30 70 4 29 71 4 28 71 4 28

Gesamt Zellzahl 95 106 100 103 103 103 103

Prozent 0,00 0,00 1,00 0,12 0,01 0,87 0,52 0,02 0,46 0,67 0,04 0,29 0,68 0,04 0,28 0,69 0,04 0,27 0,69 0,04 0,27

Name AB	A0h	N0h	L0h	A2h	N2h	L2h	A4h	N4h	L4h	A6h	N6h	L6h	A8h	N8h	L8h	A10h	N10h	L10h	A12h	N12h	L12h
18092014 5005	0	0	23	0	0	23	9	0	14	20	0	3	22	0	1	22	0	1	22	0	1
18092014 6006	0	0	18	0	0	18	6	0	12	16	0	2	17	0	1	17	0	1	17	0	1
18092014 7007	0	0	15	0	0	15	6	1	8	12	1	2	13	1	1	13	1	1	13	1	1
18092014 9009	0	0	18	1	0	17	9	1	8	13	1	4	15	1	3	15	1	3	15	1	3
18092014 11011	0	0	22	0	0	22	3	0	19	11	0	13	13	0	11	13	0	10	13	0	10
	0	0	96	1	0	95	33	2	61	72	2	24	80	2	17	80	2	16	80	2	16

Start- realen wert 0 0 96 1 0 95 33 2 61 72 2 24 80 2 17 80 2 16 80 2 16

Gesamt Zellzahl 96 96 96 98 99 98 98

Prozent 0,00 0,00 1,00 0,01 0,00 0,99 0,34 0,02 0,64 0,73 0,02 0,24 0,81 0,02 0,17 0,82 0,02 0,16 0,82 0,02 0,16

8.8 Rohdaten TNF- α ELISA

8.8.1 Vortest

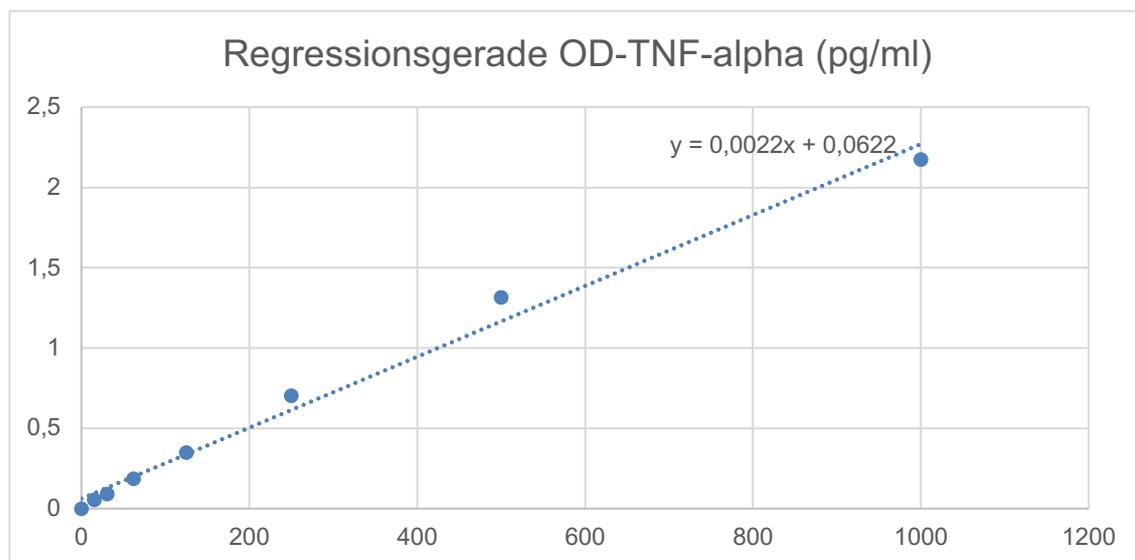
Mikroplattenbelegung TNF-alpha ELISA, Vortest:

Standard	Standard	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ
Standard	Standard	Negativ	Positiv	Positiv	Positiv
Standard	Standard	Partikel 1:1	Partikel 1:1	Partikel 1:10	Partikel 1:10
Standard	Standard	Partikel 1:10	Partikel 1:20	Partikel 1:20	Partikel 1:20
Standard	Standard	Zellschrott	Zellschrott	Zellschrott	Zellschrott
Standard	Standard	Zellschrott	Zellschrott	Zellschrott	Zellschrott
Standard	Standard	AB 1:10	AB 1:10	AB 1:10	AB 1:10
Standard	Standard	AB 1:20	AB 1:20	AB 1:20	AB 1:20

OD:						
450nm	2,4671	2,1210	0,1036	0,1018	0,0950	0,1028
	1,4011	1,4335	0,0981	1,9240	1,8497	1,8969
	0,8173	0,7869	0,0998	0,1439	0,1238	0,1421
	0,4487	0,4547	0,1006	0,1114	0,1187	0,1293
	0,2865	0,2802	0,0996	0,1124	0,0961	0,1126
	0,1899	0,1876	0,1126	0,1095	0,1137	0,1550
	0,1580	0,1453	0,1010	0,1027	0,0988	0,1099
	0,0956	0,0928	0,1048	0,1084	0,1080	0,1212
OD:						
570nm	0,0654	0,0825	0,0569	0,0512	0,0492	0,0532
	0,0549	0,0567	0,0499	0,1037	0,0613	0,0784
	0,0512	0,0538	0,0498	0,0875	0,0713	0,0864
	0,0579	0,0560	0,0461	0,0563	0,0605	0,0703
	0,0507	0,0509	0,0483	0,0506	0,0458	0,0524
	0,0499	0,0472	0,0479	0,0533	0,0480	0,0795
	0,0498	0,0479	0,0487	0,0485	0,0478	0,0561
	0,0472	0,0486	0,0472	0,0492	0,0467	0,0600
OD:						
Korrigiert	2,4017	2,0385	0,0467	0,0506	0,0458	0,0496
	1,3462	1,3768	0,0482	1,8203	1,7884	1,8185
	0,7661	0,7331	0,0500	0,0564	0,0525	0,0557
	0,3908	0,3987	0,0545	0,0551	0,0582	0,0590
	0,2358	0,2293	0,0513	0,0618	0,0503	0,0602
	0,1400	0,1404	0,0647	0,0562	0,0657	0,0755
	0,1082	0,0974	0,0523	0,0542	0,0510	0,0538
	0,0484	0,0442	0,0576	0,0592	0,0613	0,0612
TNF						
pg/ml	OD	OD-Nullpunkt				
1000,00	2,1738	0,0004	0,0043	-0,0005	0,0033	
500,00	1,3152	0,0019	1,7740	1,7421	1,7722	
250,00	0,7033	0,0037	0,0101	0,0062	0,0094	
125,00	0,3485	0,0082	0,0088	0,0119	0,0127	
62,50	0,1863	0,0050	0,0155	0,0040	0,0139	
31,20	0,0939	0,0184	0,0099	0,0194	0,0292	
15,60	0,0565	0,0060	0,0079	0,0047	0,0075	
0,00	0,0000	0,0113	0,0129	0,0150	0,0149	

**TNF-alpha
pg/ml**

0,1196	1,8923	-0,2895	1,4378
0,8014	806,3014	791,8014	805,4832
1,6196	4,5287	2,7560	4,2105
3,6651	3,9378	5,3469	5,7105
2,2105	6,9833	1,7560	6,2560
8,3014	4,4378	8,7560	13,2105
2,6651	3,5287	2,0742	3,3469
5,0742	5,8014	6,7560	6,7105



8.8.2 ELISA

Mikroplattenbelegung TNF-alpha ELISA

Standard	Standard	Negativ	QVD	Partikel	AB
Standard	Standard	Negativ	QVD	Partikel	AB
Standard	Standard	Negativ	QVD	Partikel	AB
Standard	Standard	Negativ	QVD	Partikel	AB
Standard	Standard	Negativ	QVD	Partikel	AB
Standard	Standard	Negativ	QVD	Partikel	AB
Standard	Standard	QVD	Partikel	AB	X
Standard	Standard	QVD	Partikel	AB	X

OD: 450nm	0,6405	0,6112	0,0977	0,1134	0,1171	0,1108
	0,3594	0,3342	0,0862	0,0976	0,1062	0,1042
	0,2257	0,2152	0,1027	0,104	0,1059	0,1039
	0,1671	0,156	0,1054	0,1036	0,11	0,1051
	0,1318	0,1288	0,098	0,1111	0,1129	0,1004
	0,114	0,1249	0,0949	0,1104	0,1122	0,11
	0,1084	0,0992	0,0999	0,1068	0,1104	0,1053
	0,1033	0,0877	0,0957	0,1121	0,1242	0,0951

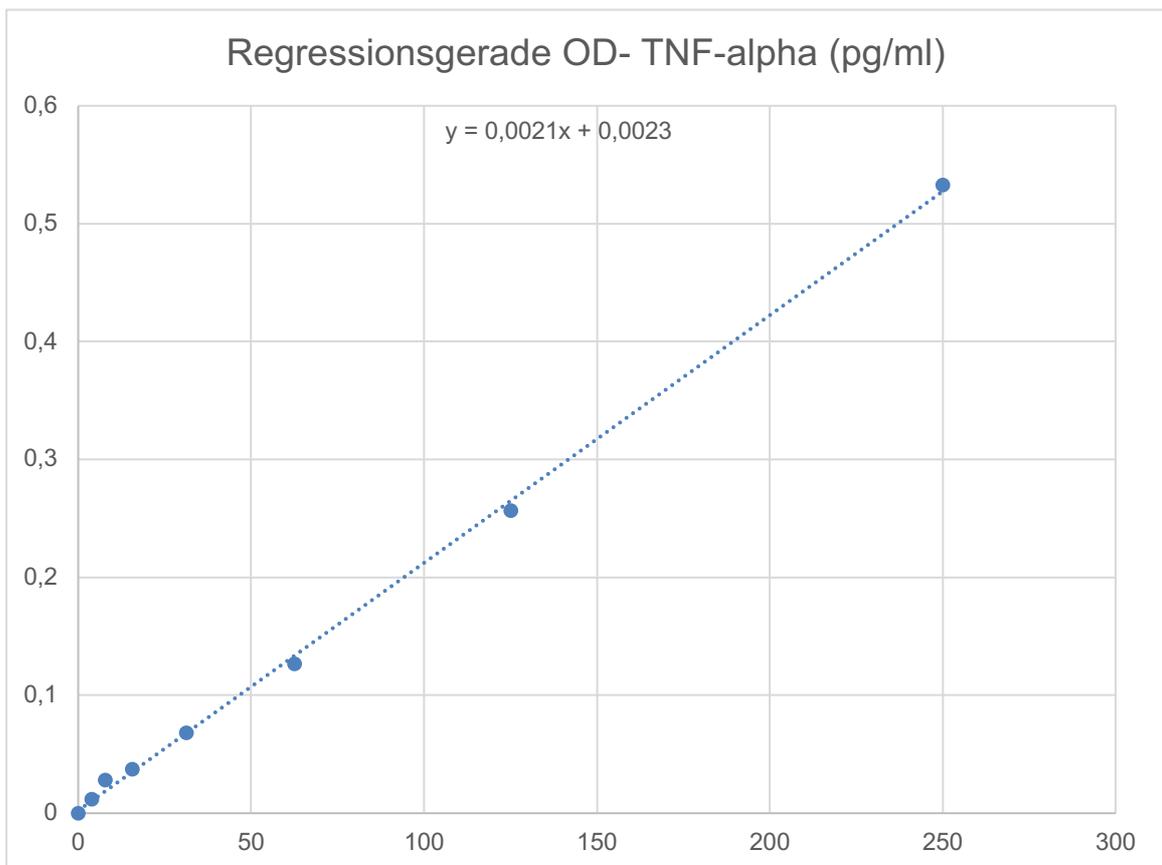
OD: 570nm	0,0514	0,0471	0,0487	0,0541	0,054	0,0555
	0,0506	0,0425	0,0375	0,0411	0,0451	0,0498
	0,048	0,053	0,0468	0,0425	0,0448	0,0496
	0,0493	0,0503	0,0512	0,0417	0,049	0,0523
	0,0487	0,0507	0,0444	0,0489	0,0471	0,0494
	0,0475	0,048	0,0412	0,0457	0,0475	0,0561
	0,0485	0,0486	0,0449	0,0431	0,0434	0,0474
	0,0606	0,043	0,0394	0,0449	0,0519	0,0393

OD: Korrigiert	0,59	0,5641	0,049	0,0593	0,0631	0,0553
	0,3088	0,2917	0,0487	0,0565	0,0611	0,0544
	0,1777	0,1622	0,0559	0,0615	0,0611	0,0543
	0,1178	0,1057	0,0542	0,0619	0,061	0,0528
	0,0831	0,0781	0,0536	0,0622	0,0658	0,051
	0,0665	0,0769	0,0537	0,0647	0,0647	0,0539
	0,0599	0,0506	0,055	0,0637	0,067	0,0579
	0,0427	0,0447	0,0563	0,0672	0,0723	0,0558

TNF pg/ml	OD	OD-Nullpunkt			
250	0,5329	0,0053	0,0156	0,0194	0,0116
125	0,25655	0,005	0,0128	0,0174	0,0107
62,5	0,12625	0,0122	0,0178	0,0174	0,0106
31,25	0,06805	0,0105	0,0182	0,0173	0,0091
15,625	0,0369	0,0099	0,0185	0,0221	0,0073
7,8125	0,028	0,01	0,021	0,021	0,0102
3,90625	0,01155	0,0113	0,02	0,0233	0,0142
0	0	0,0126	0,0235	0,0286	0,0121

**TNF-alpha
pg/ml**

2,5215	7,4263	9,2358	5,5215
2,3787	6,0929	8,2834	5,0929
5,8072	8,4739	8,2834	5,0453
4,9977	8,6644	8,2358	4,3310
4,7120	8,8072	10,5215	3,4739
4,7596	9,9977	9,9977	4,8548
5,3787	9,5215	11,0929	6,7596
5,9977	11,1882	13,6167	5,7596



9 Danksagung

Als erstes möchte ich Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Marcus Jäger für die Möglichkeit der Promotion in seiner Abteilung, dem damit verbundenen organisatorischen Aufwand und für die Überlassung des Themas danken.

Ein großer Dank gilt Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Stefan Landgraeber für die ausgezeichnete Betreuung und die vielen motivierenden und produktiven Gespräche. Herrn Dr. rer. nat. Mike Hasenberg danke ich für die hervorragende Anleitung im Labor und seinem immer offenen Ohr für Probleme bei der praktischen Durchführung der Experimente.

Ich danke Herrn Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Matthias Gunzer für die Möglichkeit der Nutzung des Labors und der Mikroskope des Instituts für Experimentelle Immunologie und Bildgebung.

Ein herzlicher Dank geht an Prof. Dr. med. Alexander T. Wild und Familie für die Unterstützung mit Rat und Tat zu jeder Zeit.

Ein Dank von Herzen an meine Eltern und meinen Bruder, die mich immer unterstützen und motiviert haben. Euch verdanke ich alles!

Frau Kira Kattenbeck danke ich für die zahllosen Korrekturen und die sprachliche Durchsicht dieser Arbeit.

Vielen Dank an Andreas Kraus, Lea Bornemann, Sarah Lask und der gesamten AG Gunzer für die praktischen Hilfestellungen bei der Durchführung der Experimente.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei all denjenigen bedanken, die hier nicht namentlich genannt sind, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen und mich unterstützt haben.

10 Curriculum vitae

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

