

Aus der Klinik und Poliklinik für Orthopädie, Physikalische Medizin und Rehabilitation

Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Dipl. Ing. Volkmar Jansson

Einfluss der Nanofunktionalisierung eines Anti-RANKL-Antikörpers auf die Osteoklastogenese

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

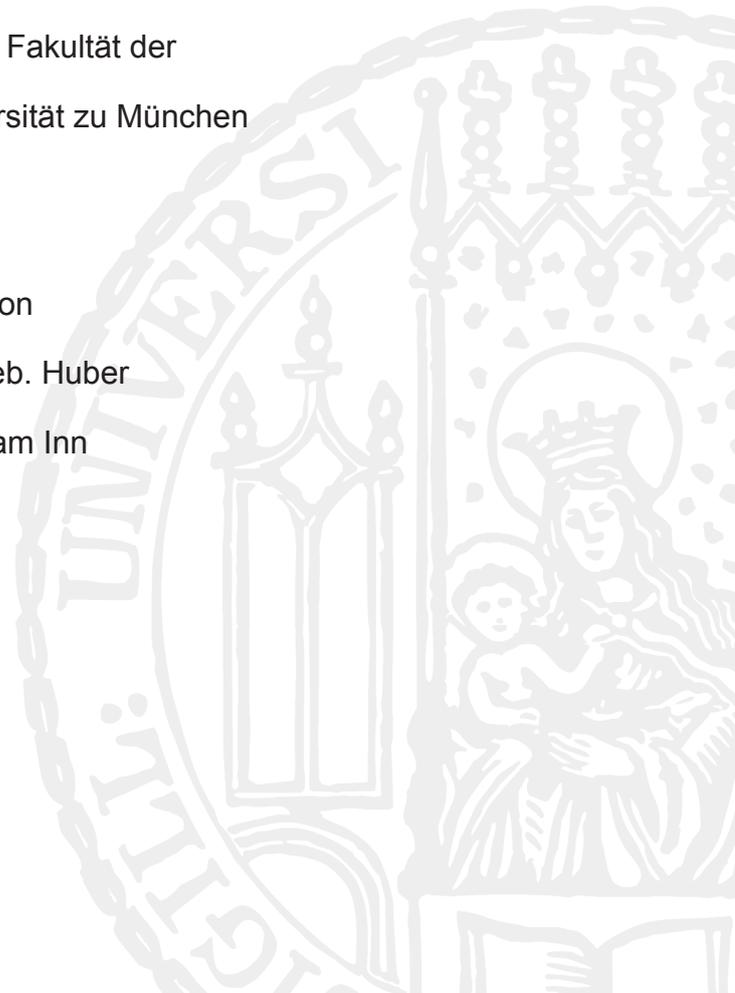
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Felicitas Beck, geb. Huber

aus Mühldorf am Inn

2019



Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatterin: Prof. Dr. med. Susanne Mayer

Mitberichterstatter: PD Dr. Sebastian Baumbach
PD Dr. Florian Haasters
Prof. Dr. Andreas Krödel

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard HICKEL

Tag der mündlichen Prüfung: 21.03.2019

Eidesstattliche Versicherung

Beck, Felicitas

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Einfluss der Nanofunktionalisierung eines Anti-RANKL-Antikörpers auf die Osteoklastogenese

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München den 01.07.2018

Ort, Datum

Felicitas Beck

Unterschrift Doktorand

Inhaltsverzeichnis

1	Einführung	1
1.1	Osteoklastogenese	1
1.1.1	Osteoklastendifferenzierung und –aktivierung	1
1.1.2	OPG-RANKL-RANK-Achse	3
1.1.3	Rolle der Tartrat-resistenten sauren Phosphatase	3
1.1.4	Anti-RANKL-Antikörper Denosumab	5
1.2	Aseptische Endoprothesenlockerung	7
1.2.1	Pathogenese	7
1.2.2	Behandlungskonzepte	7
1.3	Nanofunktionalisierung	10
1.4	Hypothese und Zielsetzung der Arbeit	11
2	Material und Methoden	12
2.1	Verwendete Materialien	12
2.1.1	Laborgeräte	12
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	13
2.1.3	Farben, Chemikalien und Reagenzien	13
2.1.4	Zellkultur	14
2.1.5	Kits	15
2.1.6	Software	15
2.2	Angewandte Methoden	16
2.2.1	Gewinnung von Peripheral Blood Mononuclear Cells	16
2.2.2	Zellkultur, Osteoklasten-Differenzierung und Testung von löslichem Denosumab	16
2.2.3	TRAP-, ELF- und Toluidinblau-Färbung	18
2.2.4	TRAP5b Proteinbestimmung	19
2.2.5	Nanofunktionalisierung der Titanprobekörper mit Denosumab	19

2.2.6	IgG2 ELISA zur Quantifizierung von Denosumab	20
2.2.7	Rasterelektronenmikroskopie	20
2.2.8	Statistische Auswertung	21
2.2.9	Versuchsübersicht	21
3	Ergebnisse	24
3.1	Bestätigung des Nanofunktionalisierungserfolgs von Denosumab	24
3.2	Validierung der Kontrollgruppen und Bestätigung der Hemmung der Osteoklastogenese in vitro durch lösliches Denosumab	25
3.2.1	Histochemischer Nachweis der Osteoklasten-typischen TRAP	25
3.2.2	Detektion von Resorptionslakunen reifer Osteoklasten auf Dentin	26
3.2.3	Schlussfolgerung aus den Validierungsversuchen	27
3.3	Hemmung der Osteoklastogenese in vitro durch nanofunktionalisiertes Denosumab	28
3.3.1	Hemmung der Osteoklasten-spezifischen TRAP5b-Freisetzung	29
3.3.2	Reduktion der endogenen Phosphatasenaktivität in Osteoklasten	29
3.3.3	Inhibition der terminalen Osteoklastendifferenzierung	30
4	Diskussion	32
4.1	Osteoklastendifferenzierung aus humanen PBMCs	33
4.2	RANKL-Inhibition zur Verhinderung aseptischer Lockerung	35
4.3	Immobilisierung von Denosumab	38
5	Zusammenfassung	41
6	Publikationen	43
7	Literaturverzeichnis	44
8	Danksagung	53

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
α -MEM	Minimal Essential Medium Eagle – Alpha Modification
BMP2	Bone Morphogenic Protein 2
CD	Cluster of Differentiation
DMAB	Denosumab
cDMAB	conjugated Denosumab
sDMAB	soluble Denosumab
DSS	Disuccinimidyl-Suberat
ELF	Enzyme-Linked-Fluorescence
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FREEDOM	Fracture Reduction Evaluation of Denosumab in Osteoporosis Every 6 Months
IL	Interleukin
NFATc1	Nuclear Factor of Activated T-cells, cytoplasmic 1
M-CSF	Macrophage Colony Stimulating Factor
NF κ B	Nuclear Factor kappaB
OPG	Osteoprotegerin
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PGE2	Prostaglandin E2
PTH	Parathormon
PTHrP	Parathyroid-related Protein
RANK	Receptor activator of NF κ B
RANKL	Receptor activator of NF κ B Ligand
TNF	Tumor Necrosis Factor
TNFR	Tumor Necrosis Factor Receptor
TRAF6	Tumor Necrosis Factor Receptor Associated Factor 6
TRAP	Tartrate-Resistant Acid Phosphatase

1. Einführung

1.1 Osteoklastogenese

Osteoklasten sind große, mehrkernige Zellen, die maßgeblich den Knochenstoffwechsel und die Kalziumhomöostase beeinflussen. Sie besitzen die einzigartige Fähigkeit, Knochenmatrix degradieren zu können. Dies ermöglicht den physiologischen Knochenumbau. Im Falle einer dysregulierten Überaktivität kann es jedoch zur Osteolyse kommen, mit deren Vorbeugung im Kontext aseptischer Endoprothesenlockerung sich diese Arbeit beschäftigt.

1.1.1 Osteoklastendifferenzierung und -aktivierung

Osteoklasten stammen von Monozyten-/Makrophagen-Vorläuferzellen der hämatopoietischen Zellreihe ab [1, 2] (Abb. 1). Diese Vorläuferzellen bilden eine Fraktion der Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) [3, 4], die chemotaktisch über einen Sphingosin-1-Phosphat Gradienten angelockt ins Knochengewebe migrieren [5] und dort zu Osteoklasten differenzieren können [6].

Als Hauptmediatoren des Differenzierungsprozesses fungieren der Wachstumsfaktor Macrophage-Colony-Stimulating Factor (M-CSF, auch als CSF-1 bekannt) und das Zytokin Receptor-Activator of NFκB Ligand (RANKL, auch als TNFSF11 bezeichnet), das der TNF-Familie zuzuordnen ist [7-9].

M-CSF wird von Makrophagen, Fibroblasten, aktivierten T-Zellen, Osteoblasten und Endothelzellen gebildet [10]. Durch die Bindung an den Rezeptor c-Fms verhindert M-CSF die Apoptose der Osteoklastenvorläuferzellen [11]. M-CSF induziert zudem die Expression des Receptor-Activator of NFκB (RANK) auf den Osteoklastenvorläuferzellen [12]. RANK dient als Rezeptor für RANKL, das die weitere Osteoklastendifferenzierung initiiert.

RANKL, auch Osteoklastendifferenzierungs-Faktor genannt, ist ein homotrimeres Transmembranprotein, das unter anderem durch Osteoblasten und Fibroblasten synthetisiert wird und an zwei verschiedene Rezeptoren binden kann [13]. Ein Rezeptor für RANKL ist RANK auf der Oberfläche der Osteoklastenvorläuferzellen. Der andere Rezeptor ist der lösliche decoy receptor Osteoprotegerin (OPG), der RANKL sequestriert und so an der Bindung an RANK hindert. Die Bindung von RANKL an RANK induziert die Expression von etwa 70 Zielgenen [12] und triggert dabei über die TRAF6 und c-Fos Signalwege NFATc1,

den Schlüsseltranskriptionsfaktor der terminalen Osteoklastendifferenzierung [14]. Dabei kommt es, wie in Abbildung 1 dargestellt, zur Fusion der Vorläuferzellen zu multinukleären Osteoklasten [15, 16] und zur Expression Osteoklasten-typischer Enzyme, zu denen unter anderem Cathepsin K und die Tartrat-resistente saure Phosphatase (TRAP) gehören [17]. Um den Knochenumbau einzuleiten, werden die reifen Osteoklasten durch RANKL rekrutiert und aktiviert. Die Zellen adhären auf der Knochenoberfläche (Abb. 1) und es kommt zu strukturellen Veränderungen, wie der Umorganisation des Aktin-Zytoskeletts und der Ausbildung eines Kompartiments zwischen Basalmembran und Knochenoberfläche [18]. Dieses Kompartiment wird vom extrazellulären Milieu durch eine „Sealing zone“ abgegrenzt und durch den Osteoklasten angesäuert, um darin die Knochenbestandteile zu mobilisieren und zur Resorption vorzubereiten [19]. Cathepsin K wird zur Degradation der Knochenmatrix in das Kompartiment sezerniert und die zersetzten Knochenbestandteile werden anschließend in den Osteoklasten aufgenommen, mittels TRAP weiter abgebaut und in die Blutzirkulation abgegeben [17, 18]. Durch diese Resorption an der Oberfläche

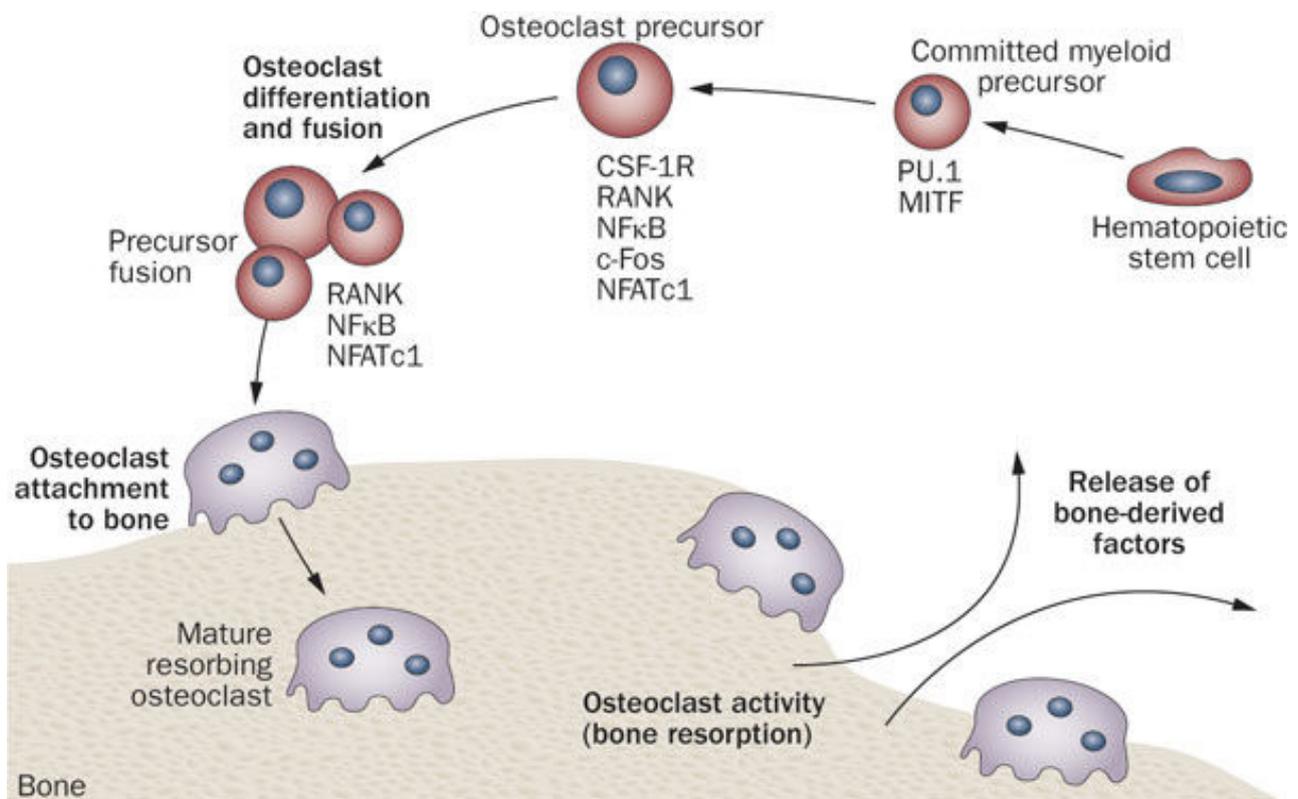


Abb. 1: Osteoklastenbildung aus einer hämatopoietischen Stammzelle (modifiziert nach Edwards et al., Nature Reviews Rheumatology, 2011 [20]). Die monozytären Vorläuferzellen durchlaufen einen durch M-CSF und RANKL mediierten Differenzierungsprozess und fusionieren zu multinukleären Osteoklasten.

der spongiösen Knochen trabekel entstehen so genannte Resorptionslakunen.

1.1.2 OPG-RANKL-RANK-Achse

Zum Verständnis der Regulation der Osteoklastogenese hat neben der Entdeckung des erwähnten Zusammenspiels von RANKL und RANK die Identifikation der Rolle von OPG wesentlich beigetragen. OPG, RANKL und RANK bilden gemeinsam ein System zur Aufrechterhaltung der Knochenhomöostase.

OPG ist ein lösliches Protein, das zur TNF Rezeptor (TNFR) Superfamilie zählt und durch Osteoblasten gebildet wird [21] (Abb. 2). Während die meisten TNFR Mitglieder membrangebunden auf Zelloberflächen exprimiert werden, existiert OPG ausschließlich als sezerniertes Molekül. Bei der Entdeckung des Wirkmechanismus von OPG 1997 konnte erstmals gezeigt werden, dass rekombinantes OPG die Osteoklastendifferenzierung in vitro hemmt [22]. OPG agiert als decoy receptor für RANKL und bindet den Liganden kompetitiv [7, 8]. Wie in Abbildung 2 demonstriert, verhindert es dadurch die RANKL-RANK-Bindung und inhibiert den konsekutiven Differenzierungs- und Aktivierungsprozess der Osteoklastenvorläuferzellen [8].

Ein RANKL/OPG Ungleichgewicht zu Gunsten von RANKL führt zu einer Steigerung der Osteoklastogenese, während ein Überschuss an OPG mit einem reduzierten Knochenumbau einhergeht [23]. Die Steigerung der RANKL Expression und damit der Knochenresorption wird durch zahlreiche Mediatoren, wie Zytokine und Hormone, vermittelt. Dazu gehören unter anderem 1,25(OH)₂ Vitamin D₃, PTH, PTHrP, PGE₂, IL-1, IL-6, TNF und Glukokortikoide [24-30]. Eine gesteigerte OPG Expression und damit verminderte Knochenresorption wird unter anderem durch Östrogene, Calcitonin, BMP 2 und PDGF induziert [25, 31-34].

1.1.3 Rolle der Tartrat-resistenten sauren Phosphatase

Die TRAP ist ein Metalloenzym, das sich von anderen sauren Phosphatasen durch die Resistenz gegen eine Inhibition durch L-Tartrat abgrenzen lässt [17]. TRAP wird von verschiedenen Zellen exprimiert, zu denen unter anderem Osteoklasten, Alveolarmakrophagen und dendritische Zellen zählen [36-39]. Durch die besonders hohe Expression in aktivierten Osteoklasten und deren spezifischen Isoform 5b wird TRAP häufig als Osteoklastenmarker verwendet [40].

Die genaue Funktion der durch Osteoklasten sezernierten TRAP ist noch Gegenstand der Forschung. Intrazellulär wurde TRAP in Vesikeln, insbesondere im Bereich des osteoklastären Bürstensaumes, nachgewiesen [41]. Der Bürstensaum von adhärenenten Osteoklasten ist der Knochenoberfläche zugewandt und dient als Aufnahme­fläche für Knochenmatrix, die in der darunter liegenden Resorptions­laku­ne durch Säure und proteolytische Enzyme wie Cathepsin K abgetragen abgebaut wird. Es wird vermutet, dass die Knochenabbauprodukte zusammen mit Cathepsin K durch Endozytose in Vesikel in den Osteoklasten aufgenommen werden [42]. Diese Vesikel fusionieren mit TRAP­enthaltenenden Vesikeln. Dadurch entstehen Transzytosevesikel, die ausgehend vom Bürstensaum die Zelle nach basolateral durchwandern [42]. In den Transzytosevesikeln generiert Cathepsin K aus TRAP die Isoform 5b [43]. Unter sauren Bedingungen, die im Bereich des Bürstensaums vorherrschen, ist TRAP5b als Phosphatase aktiv und degradiert Knochenmatrixproteine, wie z.B. Osteopontin [44]. Bei neutralem pH, weiter in Richtung basolaterale Membran, generiert TRAP5b reaktive Sauerstoffspezies [45, 46]. Es wird angenommen, dass die reaktive Sauerstoffspezies an der finalen Knochendegradation beteiligt sind [37]. Über die basolaterale Membran werden die abgebaute Knochenmatrix

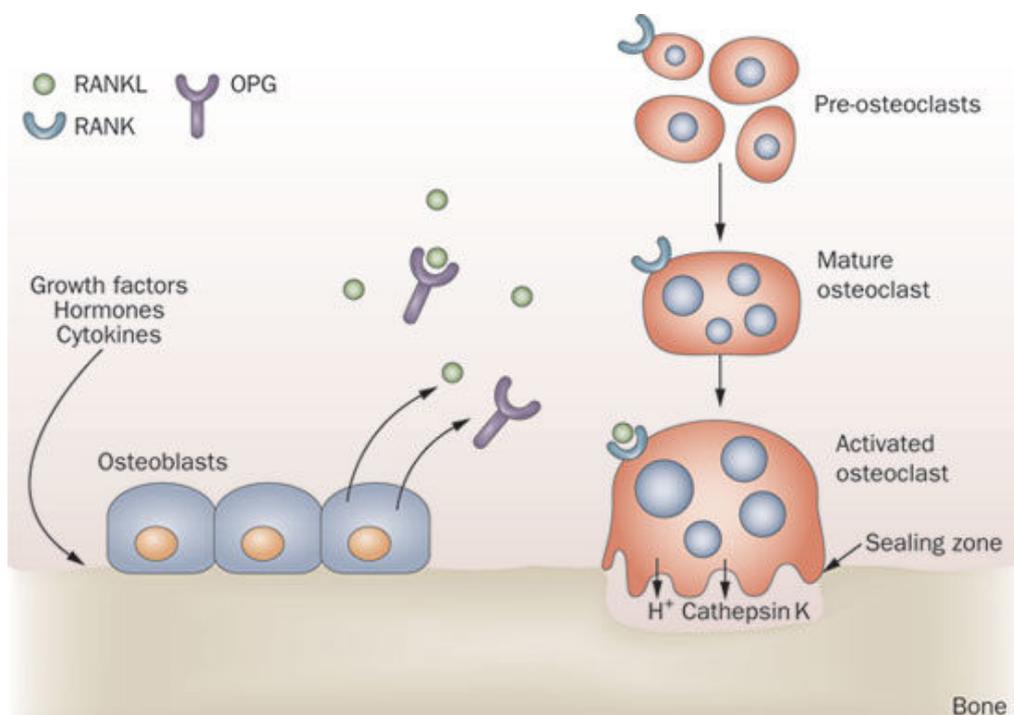


Abb. 2: Regulation der Osteoklastogenese durch OPG (modifiziert nach Lewiecki et al., Nature Reviews Rheumatology, 2011 [35]). OPG fängt als decoy receptor lösliches RANKL ab, um dessen Bindung an RANK und die konsekutive Osteoklastendifferenzierung zu verhindern.

und TRAP5b in die Blutzirkulation abgegeben [42]. Es konnte gezeigt werden, dass das im Serum gemessene TRAP5b direkt mit der Knochenresorption korreliert [40]. Im klinischen Setting wird TRAP5b daher zum Monitoring der Osteoklastenaktivität, z.B. während einer antiresorptiven Therapie, verwendet. In vitro wurde auch ohne vorangegangene Knochendegradation eine TRAP5b Freisetzung ins Medium beobachtet, die mit der Anzahl der reifen Osteoklasten korreliert und daher als Osteoklastenmarker verwendet wird [42, 47, 48].

1.1.4 Anti-RANKL-Antikörper Denosumab

Durch die Entdeckung der OPG-RANKL-RANK Achse rückte RANKL als Angriffspunkt in den Focus, um eine pathologische Osteoklastenüberaktivität zu verhindern. Zahlreiche RANKL-Inhibitoren, die OPG nachahmen sollten, wurden in den 1990er Jahren entwickelt [49]. Nach mehreren präklinischen Versionen von einem PEGylierten OPG Monomer bis hin zu einem klinisch getesteten OPG-Fc-Fusionsprotein, fiel die Entscheidung auf die Entwicklung eines Antikörpers, der die Vorteile einer längeren Halbwertszeit und höheren Spezifität für RANKL im Vergleich zu OPG bieten sollte (Abb. 3) [49]. Das Ergebnis war Denosumab, ein humaner monoklonaler IgG2 Anti-RANKL Antikörper.

Denosumab bindet membrangebundenes und lösliches RANKL, ohne mit anderen TNF-Liganden zu interagieren [50, 51]. Durch die Verhinderung der Bindung von RANKL an dessen Rezeptor RANK reduziert Denosumab die Osteoklastendifferenzierung, -aktivierung und deren Überlebensfähigkeit [52].

Denosumab wird zur Prävention und Therapie von ungewollter Knochenresorption eingesetzt. Dazu gehören die Prävention von skelettbezogenen Komplikationen bei Knochenmetastasen solider Tumore und die Therapie von nicht resezierbaren Riesenzelltumoren des Knochens [53, 54]. Zudem wird Denosumab zur Behandlung der Osteoporose bei postmenopausalen Frauen und bei Männern mit erhöhtem Frakturrisiko, sowie zur Therapie von Knochenschwund bei hormonablativer Therapie von Prostatakrebs eingesetzt [55, 56].

In zahlreichen klinischen Studien, zu denen unter anderem die FREEDOM Studie gehört [55], wurde das Wirkungs- und Sicherheitsprofil von Denosumab evaluiert. Dabei konnte nach dem Einsatz von Denosumab eine erhöhte kortikale und trabekuläre Knochenmasse, sowie eine Reduktion von Frakturrisiko und Osteolysen gezeigt werden [52, 55-61]. Als

Nebenwirkung wurde, wie auch bei anderen anti-resorptiven Medikamenten, teilweise eine Hypokalzämie beobachtet, weshalb die Substitution von Kalzium und Vitamin D unter Denosumab empfohlen wird [62, 63]. Beim Einsatz von Denosumab bei Männern mit hormonablativer Therapie bei Prostatakarzinom wurden tendenziell mehr Katarakte diagnostiziert [56]. Die schwerwiegende Nebenwirkung der Kieferosteonekrose wurde mit zwischen den Studien variierender Inzidenz beobachtet, mit selten bis gehäuft klassifiziert und wird immer noch evaluiert [55, 64-67]. Zudem wurden teilweise Ekzeme als Folge der subkutanen Applikation von Denosumab beschrieben [55].

In Zusammenschau der Literatur kann festgestellt werden, dass Denosumab in hoher Dosierung, nach einem längeren Behandlungszeitraum und als systemische Applikationsform potentiell schwerwiegende Nebenwirkungen haben kann. Gleichzeitig hat sich Denosumab als sehr potentes Medikament zur Hemmung von Osteoklastenüberaktivität erwiesen, das in geringer Dosierung und lokaler Applikation die Möglichkeit einer zielgerichteten effektiven Osteoklastenhemmung ohne Risiko von Nebenwirkungen bietet.

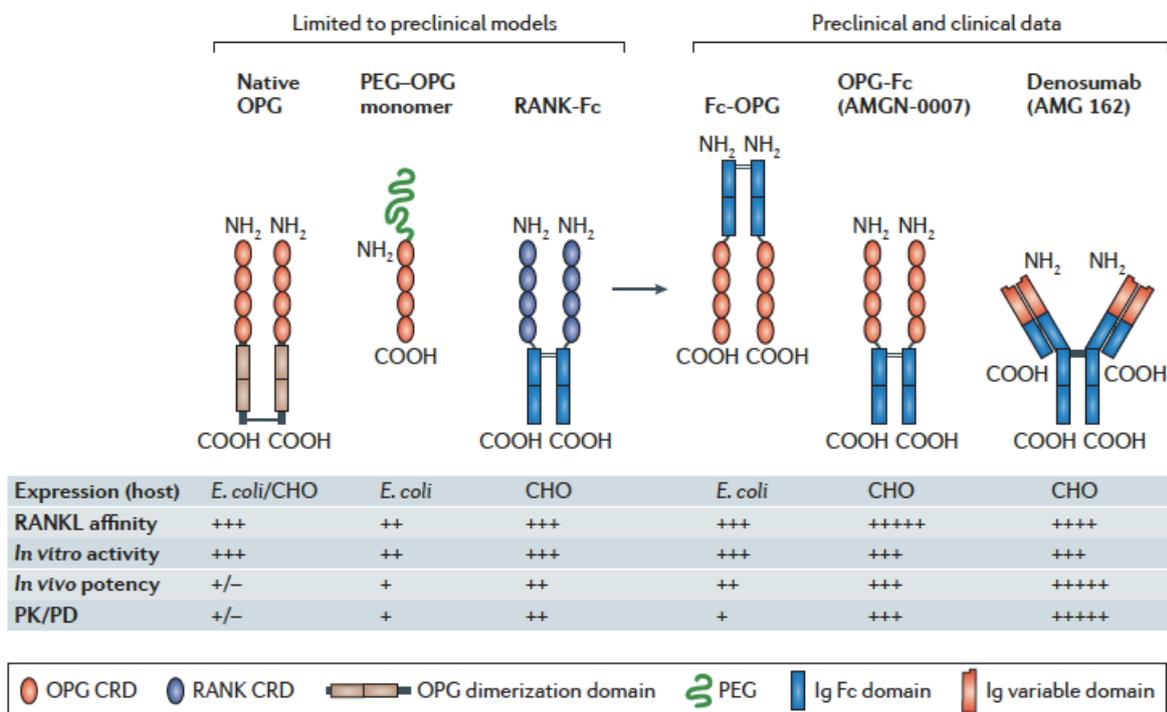


Abb. 3: Entwicklung von Denosumab (modifiziert nach Lacey et al., Nature Reviews Drug Discovery, 2012 [49]). Vergleich pharmakologischer Eigenschaften der Entwicklungsstufen auf der Suche nach einem effektiven RANKL-Inhibitor. (CHO, Chinese hamster ovary cell; *E. coli*, Escherichia coli; PEG, polyethylene glycol; PK/PD, pharmacokinetics/pharmacodynamics)

1.2 Aseptische Endoprothesenlockerung

Die erste aseptische Endoprothesenlockerung wurde bereits 1976 durch Harris et al. beschrieben [68]. Während das Risiko anderer postoperativer Komplikationen, wie z.B. Infektionen, durch präventive Maßnahmen deutlich reduziert werden konnte, stellt die aseptische Lockerung aktuell die häufigste Komplikation nach endoprothetischen Eingriffen und die entscheidende Limitation der Endoprothesenstandzeit dar [69, 70].

1.2.1 Pathogenese

Die genaue Ätiologie der aseptischen Lockerung wird noch erforscht. Vermutet wird eine multifaktorielle Genese, in deren Zentrum eine Entzündungsreaktion auf Abriebteilchen des Endoprothesenmaterials steht, die wiederum zu periprothetischen Osteolysen führen kann [71, 72]. Weitere Faktoren, die neben bekannten mechanischen Faktoren als Auslöser der aseptischen Lockerung vermutet werden, sind unter anderem ein gesteigerter Gelenkflüssigkeitsdruck [73] und genetisch oder immunologisch prädisponierende Faktoren [74].

Initial kommt es zu einer lokalisierten Entzündungsreaktion und zur Ausbildung eines Periimplantatgewebes, in dem zahlreiche Makrophagen zu finden sind. Abriebpartikel, die bei Bewegung des Gelenks entstehen, können abhängig von ihrer Größe von den Makrophagen phagozytiert, jedoch nicht prozessiert werden [75]. Dies führt zu einer Stimulation der Makrophagen, die zusammen mit anderen aktivierten Zellen, wie periprothetische Fibroblasten, verschiedene Zytokine und Wachstumsfaktoren, wie TNF- α , Interleukine, M-CSF und RANKL, sowie Matrixmetalloproteinasen freisetzen (Abb. 4) [76-79]. Die Zytokine locken Monozyten und weitere Makrophagen an, deren Differenzierung zu Osteoklasten durch die Expression von M-CSF und RANKL durch aktivierte Zellen des Periimplantatgewebes induziert wird [80]. Im Periimplantatgewebe konnte eine gesteigerte RANKL/OPG Ratio festgestellt werden, die zur dieser übermäßigen Differenzierung und Aktivierung der Osteoklasten führt [80, 81].

1.2.2 Behandlungskonzepte

Es gibt zahlreiche Ansätze, aseptische Endoprothesenlockerung zu verhindern. Ein

klinischer Goldstandard hat sich bisher nicht etabliert. Bei zementfreien Endoprothesen zählen abgesehen von biomechanischen Implantatmodifikationen diverse medikamentöse Herangehensweisen und Oberflächen-Modifikationen der Endoprothesen zu den häufig verwendeten Verfahren, um die langfristige Implantatstabilität zu verbessern.

Zur Verbesserung der Integration des Implantats in das umliegende Gewebe wurden diverse Endoprothesen-Oberflächenmodifikationen entwickelt. Dazu wurden vor allem Methoden eingesetzt, die die Oberflächenrauheit erhöhen, da diese eine bessere Adhärenz von knochenbildenden Zellen ermöglicht [83-85]. Mit dem gleichen Zweck wurde Titan mit Calciumphosphat beschichtet [86] und verschiedene osteogene Faktoren auf Titan immobilisiert [87, 88]. Diese Methoden konnten eine verbesserte Zell-Adhärenz erreichen,

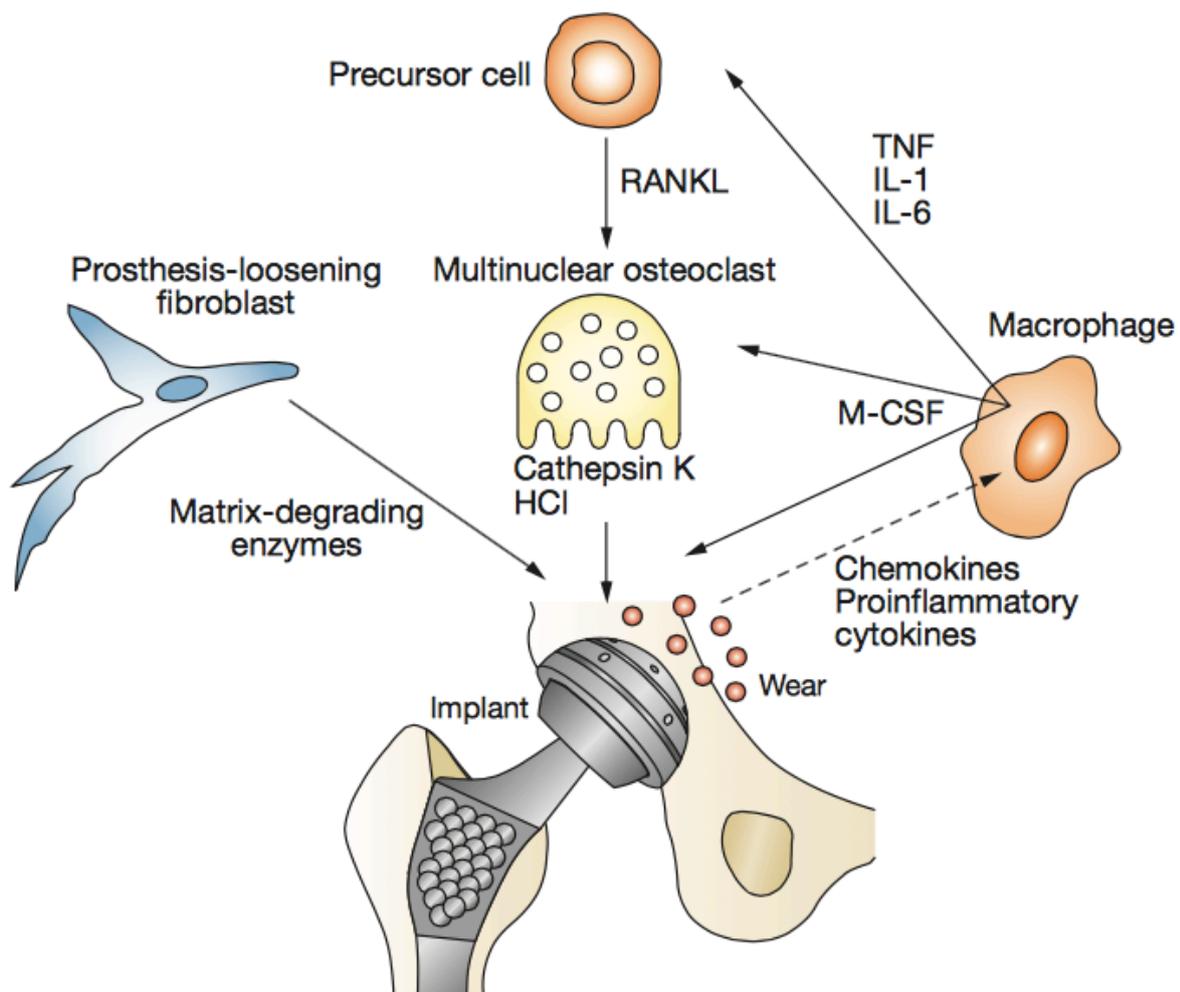


Abb. 4: Aseptische Endoprothesenlockerung (modifiziert nach Drees et al., Nature Reviews Rheumatology, 2007 [82]). Abriebinduzierte Partikel führen zu einer Stimulation der Zellen im Periimplantatgewebe, die die Freisetzung verschiedener Zytokine, die Einwanderung von Osteoklastenvorläuferzellen und deren Differenzierung zur Folge hat.

jedoch nicht die durch Osteoklasten verursachten Osteolysen verhindern.

Um die Osteoklastenaktivität zu beeinflussen, wurde neben Doxycyclin zur Inhibition der Osteoklasten-typischen Enzymgruppe der Matrixmetalloproteinasen [89] unter anderem TNF α getestet, das für die Induktion einer Signalkaskade zur Initiierung der Partikel-assoziierten Inflammation verantwortlich gemacht wird. Dazu führte man den Gentransfer eines TNF α Inhibitors in ein Mausmodell durch, wodurch die Osteoklastogenese allerdings nicht gehemmt werden konnte [90]. Zudem testete man Bisphosphonate, die bereits klinisch in der Osteoporosetherapie zur Reduktion der Osteoklastenaktivität eingesetzt werden [91]. Während sie in der Osteoporosetherapie als Standardtherapeutikum gelten, ist ihre Effektivität zur Verhinderung des Progress von Inflammations-assoziiierter Knochenresorption umstritten [92, 93]. Ein weiterer Angriffspunkt ist RANKL, das im Zentrum der Differenzierung und Aktivierung von Osteoklastenvorläuferzellen steht. Um RANKL zur Verhinderung aseptischer Lockerung zu antagonisieren, wurde ein Gentransfer durch einen OPG exprimierenden rekombinanten adeno-assoziierten viralen Vektor in ein Mausmodell [94], sowie der Einsatz eines OPG-Fc Fusionsproteins im Rattenmodell [95] untersucht. Durch beide Ansätze konnte eine Reduktion der Osteoklastendifferenzierung erzielt werden. Diese Beobachtung wurde auch nach der Immobilisation von OPG-Fc auf Titanoberflächen durch Alkoxysilan als Haftvermittler gemacht [96]. Ebenso mit RANKL als Zielstruktur wurde Denosumab entwickelt, das OPG und OPG-Fc durch eine signifikant längere Halbwertszeit überlegen ist [49]. Der für viele Indikationen bereits zugelassene Antikörper wird aktuell als systemische Applikation zur Reduktion periprothetischer Osteolysen getestet [97].

1.3 Nanofunktionalisierung

Die Immobilisation von bioaktiven Molekülen auf Titan hat der Endoprothetik ein neues Feld therapeutischer Möglichkeiten geschaffen. Derzeit gibt es zahlreiche Methoden, die zur Immobilisierung angewendet werden. Dazu gehören unter anderem die Adsorption, die kovalente Immobilisation und elektrochemische Methoden. Für diese Arbeit wurde die so genannte Nanofunktionalisierung als Kombination mehrerer Techniken gewählt, durch die bioaktive Moleküle mittels elektrochemischer Verankerung von Nucleinsäuren auf Titanoberflächen immobilisiert werden [88, 98, 99].

Das Prinzip der Nanofunktionalisierung umfasst drei wesentliche Schritte [88]. Der erste Schritt ist die Fixierung der Nucleinsäure-Ankerstränge auf dem Titan. Diese werden auf dem Titan adsorbiert und durch anodische Polarisation in der Oxidschicht des Titans fixiert. In einem nächsten Schritt wird das bioaktive Molekül durch Disuccinimidyl-Suberat (DSS) als Verbindungsmolekül an Oligonucleotidstränge konjugiert, die komplementär zu den immobilisierten Ankersträngen sind. Im letzten Schritt werden die synthetisierten

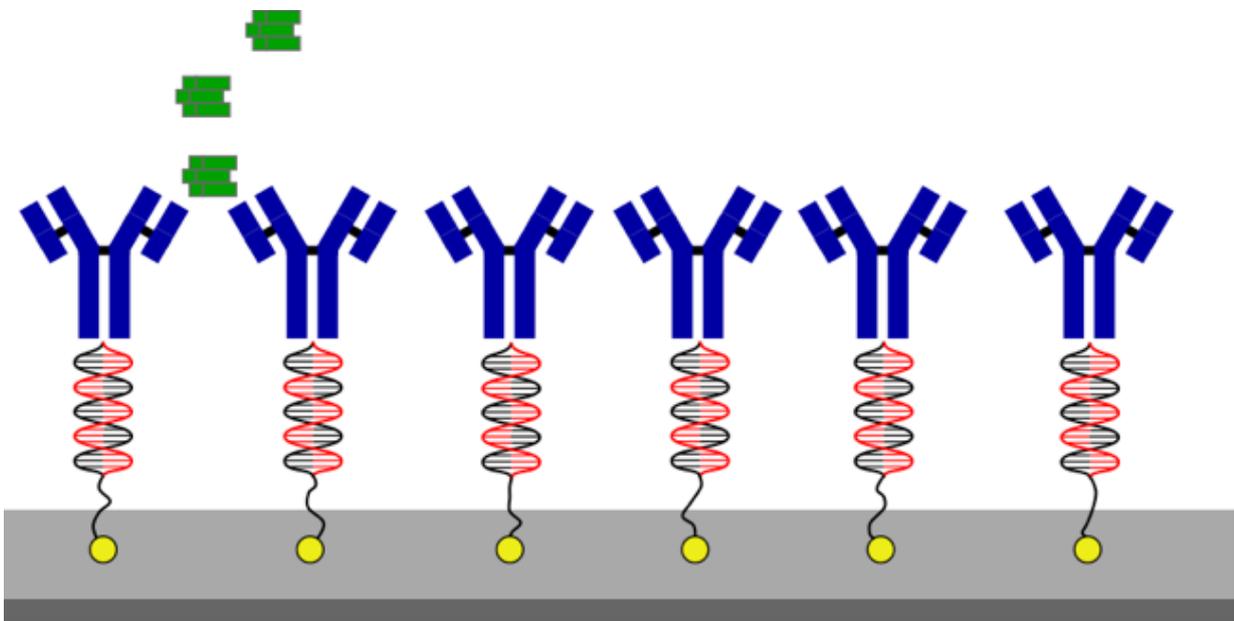


Abb. 5: Prinzip der Nanofunktionalisierung. Die Phosphatenden (gelb) der Nucleinsäure-Ankerstränge (schwarz) werden elektrochemisch auf Titanoberflächen immobilisiert. Komplementäre Oligonucleotidstränge (rot), an denen bioaktive Moleküle konjugiert sind, in diesem Fall Denosumab (blau), werden an die Ankerstränge hybridisiert, um dann wieder freigesetzt werden zu können (modifiziert nach L. Schliack).

Oligonukleotid-Konjugate mit den Ankersträngen hybridisiert. Die detaillierte Methodik wird im Teil „Material und Methoden“ besprochen. Diese Methode wurde bereits erfolgreich unter anderem zur Immobilisation der Zell-Adhäsions-vermittelnden Aminosäuresequenz RGD [88], sowie der Wachstumsfaktoren Bone Morphogenic Proteins (BMPs) auf Titanprobekörpern eingesetzt [87].

Die Nanofunktionalisierung ist im Vergleich zu einigen anderen Immobilisationstechniken toxikologisch unbedenklich, da im Herstellungsprozess keine potentiell giftigen Substanzen, wie z.B. Glutardialdehyd bei der kovalenten Kopplung, verwendet werden. Zudem erlaubt sie, nach der Immobilisation der Ankerstränge die Titanprobekörper einem Sterilisationsprozess zu unterziehen, was die klinische Implementation erleichtert. Des Weiteren bietet diese Methode die Möglichkeit zur kontinuierlichen Freisetzung der immobilisierten bioaktiven Moleküle, deren Geschwindigkeit durch die Anpassung der Hybridlänge und –zusammensetzung modifiziert werden kann.

1.4 Hypothese und Zielsetzung der Arbeit

Die Hypothese dieser Arbeit ist, dass Titan, welches mit Denosumab nanofunktionalisiert wurde, die periprothetische Osteoklastenbildung reduziert.

Durch diese neue Option könnte die osteolytisch bedingte aseptische Lockerung von Endoprothesen verringert und damit die Standzeit von Endoprothesen verlängert werden. Ziel dieser Arbeit war die in vitro Testung dieser Hypothese. Dazu wurden zunächst Kontrollgruppen etabliert und lösliches Denosumab im 28-Tagesversuch getestet. Daraufhin wurden Titanprobekörper mit Denosumab nanofunktionalisiert und der Immobilisationserfolg evaluiert. Schließlich wurden Zellen auf den nanofunktionalisierten Titanprobekörpern differenziert und der Effekt des immobilisierten Denosumabs auf die Osteoklastendifferenzierung und –aktivierung untersucht.

2. Material und Methoden

2.1 Verwendete Materialien

2.1.1 Laborgeräte

Analysewaage	Sartorius (Deutschland)
Autoclav	H+P Labortechnik (Deutschland)
Becherglas	Schott Duran (Deutschland)
Brutschrank (37°C, 5% CO ₂)	Binder (Deutschland)
ELISA plate reader	Synergy HT, Biotek (USA)
Fluoreszenz-Mikroskop BZ9000	Keyence (Japan)
Gefrierschränke -20°C	Liebherr (Deutschland)
Gefrierschränke -80°C	Heraeus (Deutschland)
Kamerasystem Axio Cam ICm1 Vert.A1	Zeiss (Deutschland)
Kamerasystem Axio Cam MRc 5	Zeiss (Deutschland)
Kritisch-Punkt-Trockner (CPD030)	Bal-Tec (Liechtenstein)
Kühlschränke +4°C	Liebherr (Schweiz)
Kühlzentrifuge Multifuge 1L-R	Heraeus (Deutschland)
Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf (Deutschland)
Küvetten 200 ml	Carl Roth (Deutschland)
Lichtmikroskop, Axiovert 40	Zeiss (Deutschland)
Mehrkanalpipette 20-200 µl	Brand (Deutschland)
Mikroskop Axiovert 40 CFL	Zeiss (Deutschland)
Nanodrop	Thermo Fisher Scientific (USA)
Neubauer Zählkammer	Karl Hecht Assistent (Schweiz)
Pipettierhilfe elektrisch, accu-jet-pro	Brand (Deutschland)
Pipettierhilfe Pipetman Neo., 0,2-2µl, 1-10µl, 2-20µl, 20-100µl, 50-200µl, 100-1000µl	Gilson (USA)
Rasterelektronenmikroskop Typ LEO 1455VP	Zeiss (Deutschland)
Sputter Coater S 150 B	Edwards (England)
Sterilwerkbank, Modell Hera safe	Heraeus (Deutschland)
Trockenschrank	Binder (Deutschland)
Vortexer	BioSan (Lettland)
Wasserbad	Heraeus (Deutschland)
Zentrifuge Multifuge 1L-R	Eppendorf (Deutschland)

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Bacillol AF	Bode Chemie (Deutschland)
Einmalpinzette steril, anatomisch	Seidel Medizin (Deutschland)
Gigasept R AF	Schülke & Mayr (Deutschland)
Microlance Kanüle 25G	BD (USA)
Nitrilhandschuhe , puderfrei S	Semper (Deutschland)
Petrischalen, steril, 92mm	Nunc (Dänemark)
pH-Fix 0-14	Carl Roth (Deutschland)
Pipettenspitzen (0,2-2µl, 1-10µl, 2-20µl, 20-100µl, 50-200µl, 100-1000µl)	Gilson (USA)
Pipettenspitzen (steril) (0,2-2µl, 1-10µl, 2-20µl, 20-100µl, 50-200µl, 100-1000µl)	Gilson (USA)
Pipettenspitzen mit Filter (Premium Tips)	Biozym (Deutschland)
Pipettenspitzen silikonisiert	Sigma-Aldrich (Deutschland)
Reaktionsgefäße 1,5ml	Eppendorf (Deutschland)
Reaktionsgefäße silikonisiert 1,5 ml	Biozym (Deutschland)
Serumpipetten (2ml, 5ml, 10ml)	Corning incorporated (USA)
Pipetten 25 ml	Greiner Bio-One (Deutschland)
Spritzen 10ml	BD (USA)
Spritzenfilter 0,22 µm	TPP (Schweiz)
Wägebapier	Macherey-Nagel (Deutschland)
Zellfilter 100µm	BD (USA)
Zellkulturplatten (24 Well, 96 Well)	Nunc (Dänemark)
Zellkulturplatten (24 Well, Suspension)	Sarstedt (Deutschland)
Zentrifugenröhrchen 15 ml	TPP (Schweiz)
Zentrifugenröhrchen 50 ml	BD (USA)

2.1.3 Färbungen, Chemikalien und Reagenzien

Aceton	Merck (Deutschland)
Aqua ad iniectabilia	B Braun (Deutschland)
Bovine Serum Albumin	Sigma-Aldrich (Deutschland)
Dinatriumhydrogenphosphat	Sigma-Aldrich (Deutschland)
EDTA Dinatriumsalz-Dihydrat	AppliChem (Deutschland)

Ethanol 30%, 50%, 70%, 80%, 96% (je in Aqua dest.) und 99,)% unvergällt	Apotheke der Universität München (Deutschland)
Glutaraldehyd	Sigma-Aldrich (Deutschland)
Hoechst 33342	Invitrogen (USA)
Kaliumdihydrogenphosphat	Sigma-Aldrich (Deutschland)
Levamisol (5mM, pH 8.0)	MP Biomedicals (USA)
Natriumacetat	Sigma-Aldrich (Deutschland)
di-Natriumtartrat-Dihydrat	Merck (Deutschland)
4-Nitrophenyl phosphate disodium salt hexahydrate (para-Nitrophenylphosphat)	Sigma-Aldrich (Deutschland)
4-Nitrophenol solution	Sigma-Aldrich (Deutschland)
Natriumcacodylat-Trihydrat	Sigma-Aldrich (Deutschland)
Natriumchlorid	AppliChem (Deutschland)
Natriumhypochlorit	Merck (Deutschland)
Natriumhydroxid Tabletten	Merck (Deutschland)
Phosphat-gepufferte-Salzlösung (PBS)	Biochrom-Seromed (Deutschland)
Phosphorsäure (H ₃ PO ₄)	Sigma-Aldrich (Deutschland)
Salzsäure	Merck (Deutschland)
Toluidinblau	Waldeck GmbH (Deutschland)
Trypan Blau	Biochrom (Deutschland)
Tween 20	Merck (Deutschland)

2.1.4 Zellkultur

α -MEM	Biochrom/Seromed (Deutschland)
Amphotericin B Lösung 250 μ g/ml	Sigma-Aldrich (Deutschland)
Biocoll Separating Solution	Biochrom (Deutschland)
Elfenbeinblöcke	Vom Bundesamt für Naturschutz Forschungszwecken zur Verfügung gestellt
L-Glutamin 200 mM	Biochrom (Deutschland)
Penicillin/Streptomycin 10000 IU/ml/10000 μ g/ml	Biochrom (Deutschland)
Rekombinanter humaner sRANK Ligand	Peprotech (USA)
Rekombinantes humanes M-CSF	R&D Systems, Inc. (USA)
Xgeva (Denosumab), Injektionslösung	Amgen (USA)

2.1.5 Kits

ELF® 97 Endogenous Phosphatase Detection Kit	Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific (USA)
Human IgG2 Ready-SET-Go!	eBioScience, Affymetrix (Österreich)
TRACP5b ELISA kit	BlueGene Biotech (Deutschland)
Leukocyte Acid Phosphatase (TRAP) Kit	Sigma-Aldrich (USA)

2.1.6 Software

AxioVision, Rel. 4.5
EndNote X7.6
Microsoft Office mac 2015 (Excel, Word)
SAS
GraphPad Prism 5.0

2.2 Angewandte Methoden

2.2.1 Gewinnung von Peripheral Blood Mononuclear Cells

Für alle Versuchsgruppen wurden humane Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) verwendet, die aus so genannten „Buffy Coats“ isoliert wurden. Die Buffy Coats stellen die konzentrierte Leukozyten-Fraktion einer Vollblutspende dar und wurden von männlichen Spendern im Bayerischen Roten Kreuz Blutspendezentrum Ulm (Deutschland) gewonnen. Zur PBMC-Isolation wurden je 25 ml des Buffy-Coat-Präparats in einem Zentrifugenröhrchen mit sterilem PBS auf 50 ml aufgefüllt. Anschließend wurden je 30 ml der Blut-PBS-Suspension auf je 15 ml Biocoll Separationslösung geschichtet und die Phasentrennung durch 30 Minuten Zentrifugation (2000 rpm, Raumtemperatur, Bremseneinstellung „1“, Zentrifuge Multifuge 1L-R, Eppendorf, Deutschland) erwirkt. Das Serum wurde für die Erstellung des PBMC-Mediums aufbewahrt. Die Interphase zwischen Serum und Separationslösung, die die PBMCs enthält, wurde in ein neues Röhrchen überführt und durch vier Waschkvorgänge aufgereinigt. Dazu wurden die PBMCs in PBS resuspendiert und bei 1500 rpm, Raumtemperatur und der Bremseneinstellung „3“ für je 10 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand zur Hälfte verworfen und das verbliebene Zellpellet erneut in PBS resuspendiert. Im Anschluss an die Waschkvorgänge wurden die Zellen in einer PBS-Suspension gezählt, wonach erneut zentrifugiert und der gesamte Überstand verworfen wurde.

Die Zellzahlbestimmung erfolgte anhand einer Neubauer Zählkammer. Zur Darstellung der Viabilität wurden 10 µl der Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau verdünnt. Während Trypanblau die Membran von toten Zellen durchdringt, bleibt diese bei vitalen Zellen hell. Dadurch können die vitalen Zellen als helle Objekte auf dem blauen Hintergrund der Zählkammer erkannt und gezählt werden. Die Zellzahl wurde anhand folgender Formel ermittelt:

$$\text{Zellen/ml Zellsuspension} = Q_{\text{Mittelwert}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

2.2.2 Zellkultur, Osteoklasten-Differenzierung und Testung von löslichem Denosumab

Die Kultivierung der PBMCs erfolgte in 1,9 cm² großen Wells von 24-Well-Platten und auf Dentinchips und Titanprobekörpern, die in 24-Well-Suspensionsplatten platziert wurden.

Die Dentinchips wurden in einer Größe von 10 x 10 x 0,7 mm mit einer Bandsäge aus Elfenbeinblöcken geschnitten. Die Chips wurden für 2 Stunden in 70% Ethanol eingelegt und anschließend unter der Werkbank getrocknet. Anschließend wurde mit einer sterilen Pinzette je ein Dentinchip pro Well überführt.

Bei den Titanprobekörpern handelt es sich um sandgestrahlte, säurebehandelte Plättchen aus TiAl6V4 mit einem Durchmesser von 14,7 mm und einer Tiefe von 1,9 mm. Ein Teil der Plättchen wurde nanofunktionalisiert, wie in 2.2.5 näher erläutert. Es wurde je ein Titanprobekörper pro Well überführt.

Die PBMCs wurden nach ihrer Isolierung und Zellzahlbestimmung (siehe 2.2.1) in einem PBMC-Medium (s.u.) resuspendiert, zu 6 Millionen Zellen pro Well auf den 24-Well-Platten ausgesät und mit 500 µl PBMC-Medium pro Well bedeckt. Der Aussaat auf Dentin und den Titanprobekörpern folgte ein 2-stündiger Inkubationsschritt im Brutschrank bei 37°C, um eine ausreichende Adhärenz der Zellen zu erreichen, bevor 500 µl des PBMC-Mediums pro Well zugegeben wurden. Unabhängig von der Kultivierungs-Plattform wurden die Zellen während des gesamten Versuchszeitraums im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂-Atmosphäre in Raumluft und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert.

Das PBMC-Medium setzte sich aus 500 ml αMEM, 10% FCS, 2 mM L-Glutamin, 60 IU/ml Penicillin, 60 µg/ml Streptomycin und 0,025 µg/ml Amphotericin B zusammen.

Zur Kultivierung einer Positivkontrolle wurden dem PBMC-Medium einer Versuchsgruppe osteoklastäre Differenzierungsfaktoren zugegeben. Am ersten und vierten Versuchstag wurden 25 ng M-CSF/ml Medium zugefügt. Am sechsten Versuchstag wurde pro Well jeweils die Hälfte des Mediums entnommen und mit PBMC-Medium aufgefüllt, das mit 20 ng RANKL/ml angereichert war. Danach wurde drei Mal wöchentlich das Medium komplett gewechselt und jeweils 20 ng RANKL/ml PBMC-Medium zugegeben (Protokoll nach Unger, Univ.-Prof. Dr. Dr. Martijn van Griensven [48]).

Zur Testung des Effekts von löslichem Denosumab auf die Osteoklastendifferenzierung wurde nach Empfehlung des Erstbeschreibers der anti-RANKL-Antikörper-Wirkung, Paul Kostenuik (unpublished correspondence), die klinisch zugelassene und käufliche Injektionslösung Xgeva® (Amgen) verwendet und mittels sterilem Aqua ad iniectabilia auf 2 nM verdünnt und dem Medium der Behandlungsgruppe vor jedem Mediumwechsel neu zugegeben. Die Behandlungsgruppe bestand ebenso aus humanen PBMCs und wurde

wie die Positivkontrolle wie bereits beschrieben mit M-CSF (25 ng/ml) und RANKL (20 ng/ml) zur Osteoklastendifferenzierung stimuliert.

Alle Arbeiten zur Kultivierung der PBMCs wurden an einer Sterilwerkbank (Klasse 2) umgesetzt. Medium und Medienzusätze wurden im Wasserbad auf 37°C erwärmt und mit 70%igem Alkohol desinfiziert, bevor sie an der Sterilwerkbank verwendet wurden.

Der Medienwechsel erfolgte für alle Gruppen über die gesamte Kultivierungsdauer von 28 Tagen hinweg dreimal pro Woche. Am letzten Versuchstag wurden die TRAP-Färbung auf den Well-Platten und die Toluidinblau-Färbung der Resorptionslakunen auf den Dentinchips, sowie die Fluoreszenz-Färbung auf den Titanprobekörpern durchgeführt. Ein Teil der Titanprobekörper wurde für die Rasterelektronenmikroskopie fixiert. TRAP5b Protein wurde im Zellkultur-Überstand gemessen.

2.2.3 TRAP-, ELF[®] und Toluidinblau-Färbung

Die Aktivität der Tartrat-resistenten sauren Phosphatase (TRAP) wurde auf Well-Platten durch die Anfärbung mittels Leukocyte Acid Phosphatase (TRAP) Kit (Sigma-Aldrich, USA) detektiert. Die Auswertung erfolgte unterm Lichtmikroskop (Axiovert 40, Zeiss, Deutschland). Zur Darstellung endogener Phosphatasen auf den Titanprobekörpern wurden die Zellen analog zur TRAP-Färbung mittels einer Citrat- und Acetonlösung fixiert und nach 20-minütiger Lufttrocknung das ELF[®] 97 Endogenous Phosphatase Detection Kit (Molecular Probes, Invitrogen GmbH, Deutschland) gemäß Herstellerangaben angewendet. Die Ergebnisse wurden in der Fluoreszenzmikroskopie (Mikroskop Axiovert 40 CFL, Zeiss, Deutschland) ermittelt.

Die Toluidinblau-Färbung ermöglicht eine Darstellung von Resorptionslakunen auf Dentin. Dazu wurden die Zellen von den Dentinchips durch die Zugabe von Natriumhypochlorit, durch kräftiges Abreiben mit einem Papiertuch und anschließender Spülung mit Leitungswasser entfernt. Nach einer kurzen Fixierung in 80 % Ethanol wurde eine 1 % Toluidinblaulösung für 10 Sekunden auf die Dentinchips pipettiert. Nach der erneuten Reinigung der Chips durch Leitungswasser wurden die Resorptionslakunen unterm Fluoreszenzmikroskop (BZ9000, Keyence, Japan) detektiert.

2.2.4 TRAP5b Proteinbestimmung

Zur Bestimmung der Osteoklasten-spezifischen TRAP Protein-Isoform 5b wurde das TRAP5b ELISA kit (BlueGene Biotech, Deutschland) gemäß den Herstellerangaben angewendet. TRAP5b wurde photometrisch (ELISA plate reader, Synergy HT, Biotek, USA) bei 450 nm in den Zellkultur-Überständen gemessen und die Proteinkonzentration anhand einer Standardkurve ermittelt.

2.2.5 Nanofunktionalisierung der Titanprobekörper mit Denosumab

Plättchen einer Titanlegierung (14,7 mm x 1,9 mm) wurden aus TiAl6V4 hergestellt und mit SiC Papier P600 (26 µm) geschliffen (Aesculap, Tuttlingen, Deutschland).

Die Immobilisierung der Ankerstränge auf den Titanprobekörpern und die Konjugation von Denosumab an komplementäre Oligonukleotidstränge wurde durch das Max-Bergmann-Zentrum für Biomaterialien (TU Dresden) durchgeführt. Zur Immobilisierung der Ankerstränge wurden die sandgestrahlten, säurebehandelten TiAl6V4 Titanprobekörper am Boden einer speziell entwickelten elektrochemischen Zelle mit einer Dreielektrodenanordnung angebracht. Zur initialen Adsorption der Ankerstränge (8 pmol/cm²) wurde die Zelle mit einer Elektrolytlösung befüllt, die die 60mer Oligonukleotidstränge (Thermo Fisher Scientific GmbH, Ulm, Deutschland) enthielt. Der Adsorption folgte eine anodische Polarisierung, um die Ankerstränge in der Oxidschicht des Titans zu fixieren. Anschließend wurden die Probekörper gewaschen und luftgetrocknet. Zur Konjugation von Denosumab an die zu den Ankersträngen komplementären 31mer Oligonukleotidsträngen (Biomers GmbH, Ulm, Deutschland) wurde DSS als Verbindungsmolekül verwendet. Die Oligonukleotidstränge wurden zunächst mit DSS in 1 mM Acetatpuffer bei einem pH von 4,0 aktiviert und anschließend mit Denosumab (in PBS mit 2 M Natriumchlorid, pH 7,4) gemischt. Es folgte eine 18-stündige Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur.

Die Hybridisierung der Denosumab-Oligonukleotid-Konjugate an die immobilisierten Ankerstränge wurde im Rahmen dieser Arbeit direkt vor der Zell-Besiedelung der Titanprobekörper durchgeführt. Die verwendeten Materialien wurden durch das Max-Bergmann-Zentrum für Biomaterialien (TU Dresden) zur Verfügung gestellt. Pro

Titanprobekörper wurden für 550 nM Denosumab-Konjugat 50 µl Hybridisierungslösung aus 5 µl 10xPBS, 1,1 µl Konjugat-Lösung und 43,9 µl sterilem Reinstwasser hergestellt. Die sterilisierten mit Oligonukleotid-Ankersträngen immobilisierten Titanprobekörper wurden mit der Hybridisierungslösung vollständig benetzt und im Dunkeln bei Raumtemperatur eine Stunde lang inkubiert. Anschließend wurden die Proben viermal in PBS-Puffer (18 g Natriumchlorid, 1,78 g Dinatriumhydrogenphosphat x 2 H₂O und 0,462 g Kaliumdihydrogenphosphat ad 200 ml entionisiertem Wasser mit Gesamt-pH 6,85) gewaschen. Die letzte Spülung erfolgte mit sterilem Reinstwasser. Um die Menge an gebundenem Denosumab-Konjugat zu evaluieren, wurde die weggewaschene Menge mittels IgG2-ELISA gemessen (siehe 2.2.6).

2.2.6 IgG2 ELISA zur Quantifizierung von Denosumab

Als IgG2-Antikörper konnte Denosumab durch das Ready-SET-Go! IgG2 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (eBioScience, Affymetrix, Österreich) quantifiziert werden. Die Absorption der IgG2 wurde mittels ELISA Reader bei 405 nm gemessen und die Konzentration anhand einer Standardkurve ermittelt.

Zur Einschätzung der Hybridisierungseffizienz wurde Denosumab in den Waschvorgängen (siehe 2.2.5) gemessen und vom Ausgangswert subtrahiert. Zur Bestimmung der Freisetzung wurde Denosumab zu sieben Versuchszeitpunkten im Zeitraum von 18 Tagen gemessen und mit der Ausgangskonzentration korreliert.

2.2.7 Rasterelektronenmikroskopie

Zur zellmorphologischen Untersuchung wurden die Titanprobekörper am Versuchsende für die Rasterelektronenmikroskopie vorbereitet. Dazu wurden die Zellen auf den Titanprobekörpern mittels FIX II Lösung (456 ml destilliertes Wasser, 43,5 ml Glutaraldehyd (25%), 0,75 ml Salzsäure (1N), 5,65 g Natriumcacodylat-Trihydrat) fixiert und bei 4°C für 24 Stunden inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen mittels aufsteigender Alkoholreihe (30%, 50%, 70%, 96% Ethanol) mit einer Inkubationszeit von je 10 Minuten bei Raumtemperatur entwässert, der sich eine sofortige Kritisch-Punkt-Trocknung und eine Goldbeschichtung mittels Sputter Coater (Sputter Coater S 150 B, Edwards, England) anschloss.

Daraufhin konnten die Titanprobekörper im Rasterelektronenmikroskop (Zeiss, Deutschland)

mit einer Kathodenspannung von 10 kV beurteilt werden.

2.2.8 Statistische Auswertung

Inferenzstatistische Vergleiche der fünf Gruppen erfolgten anhand einfaktorieller Varianzanalysen mit der Prozedur GLM des Statistical Analysis System SAS 9.4 für Windows (SAS Institute, Cary, NC, USA). Sämtliche Werte, die in diese Analysen eingingen, sind Mittelwerte aus mindestens zwei Wiederholungsmessungen. Als Globaltest erfolgte zunächst ein F-Test auf dem Alphaniveau von 5%. Bei einem signifikanten Ausfall erfolgten post hoc paarweise, zweiseitige Gruppenvergleiche mit Sidak-Korrektur. Korrigierte p-Werte unter 5% wurden als signifikant gewertet.

2.2.9 Versuchsübersicht

Um den Effekt von nanofunktionalisiertem Denosumab auf die Osteoklastendifferenzierung zu testen, wurden drei Versuchsgruppen auf Titanprobekörper mit darauf verankerten Oligonukleotid-Einzelsträngen evaluiert. Dazu gehörten neben der Behandlungsgruppe

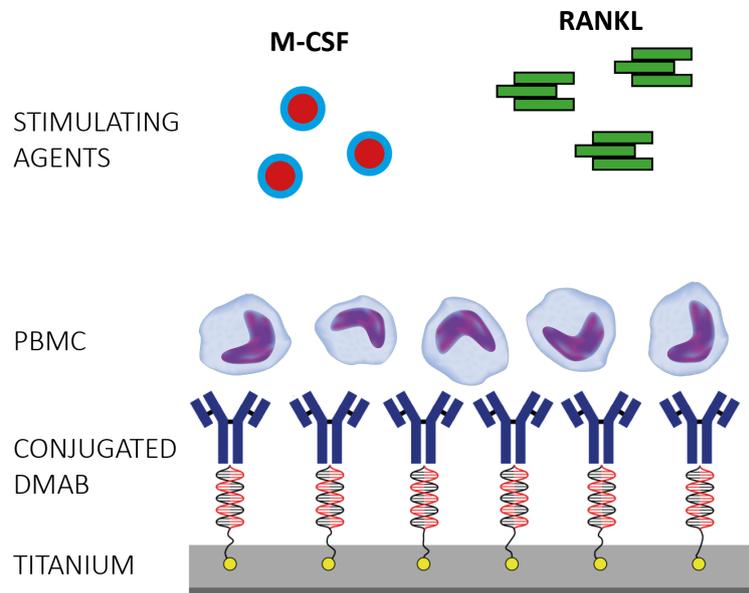


Abb. 6: Nanofunktionalisierung von Titan mit Denosumab. Oligonukleotid-Einzelstränge (schwarz) wurden mit ihrem Phosphatende (gelb) in der oberen Titanschicht fixiert. Der Anti-RANKL-Antikörper Denosumab (blau) wurde an einen komplementären Oligonukleotid-Einzelstrang (rot) konjugiert und dieser an den verankerten Oligonukleotid-Einzelstrang hybridisiert. Um den Hemmeffekt durch Denosumab zu testen, wurden humane PBMCs auf dem nanofunktionalisierten Titan kultiviert und durch M-CSF und RANKL zur Osteoklastendifferenzierung stimuliert (modifiziert nach L. Schliack).

(cDMAB) eine Negativkontrolle (-CTRL) und eine Positivkontrolle (+CTRL), die nach einem Versuchszeitraum von 28 Tagen auf Osteoklasten-typische Eigenschaften untersucht wurden.

Als -CTRL wurden PBMCs verwendet, die ohne Zugabe von Differenzierungsfaktoren oder Denosumab auf den Titanprobekörpern kultiviert wurden. Da im Zellpool der PBMCs Monozyten und Makrophagen zu finden sind und diese zu Osteoklasten differenzieren können [1], wurden damit undifferenzierte potentielle Osteoklastenvorläuferzellen als Negativkontrolle eingesetzt. Die als +CTRL verwendeten PBMCs wurden wie in 2.2.1 beschrieben durch M-CSF und RANKL über 28 Tage hinweg zur Osteoklastenbildung stimuliert. Dieser Zeitraum wird als physiologischer Differenzierungszeitraum zu reifen Osteoklasten vermutet. Die dritte Gruppe stellte die Behandlungsgruppe dar und bestand ebenso aus zur Osteoklastendifferenzierung stimulierten PBMCs. Diese wurden auf den nanofunktionalisierten Titanprobekörpern kultiviert. Auf diesen waren, wie bei den Kontrollgruppen, Oligonukleotid-Einzelstränge verankert, an die in dieser Gruppe zusätzlich Denosumab gekoppelt worden war (Abb. 6). Um die Voraussetzungen für die Testung dieser drei Versuchsgruppen zu überprüfen, wurden Validierungsversuche durchgeführt.

Diese beinhalteten zum einen die Untersuchung des Nanofunktionalisierungserfolgs und des Freisetzungsverhaltens von auf dem Titan verankerten Denosumab.

Zum anderen wurden die beschriebenen Kontrollgruppen auf anderen Plattformen mittels Methoden validiert, die eine sichere Aussage zur erfolgten Osteoklastendifferenzierung zuließen. Dabei wurde auch der Effekt von löslichem Denosumab getestet, um eine Wirkung des Medikaments auf Osteoklasten in vitro unabhängig von der Applikationsform der Nanofunktionalisierung zu bestätigen. Hierfür wurden ebenso zur Osteoklastogenese stimulierte PBMCs verwendet, denen bei jedem Mediumwechsel 2 nM lösliches Denosumab zugegeben wurde.

Zusammengefasst wurden folgende Gruppen über 28 Tage getestet:

Validierungsversuche (auf 24-Well-Platten, Dentinchips):

-CTRL: -M-CSF/-RANKL, - Denosumab

+CTRL: +M-CSF/+RANKL, - Denosumab

sDMAB: +M-CSF/+RANKL, + lösliches Denosumab

Hauptversuch (auf Titanplättchen):

-CTRL: -M-CSF/-RANKL, - Denosumab

+CTRL: +M-CSF/+RANKL, - Denosumab

cDMAB: +M-CSF/+RANKL, + konjugiertes Denosumab

3. Ergebnisse

3.1 Bestätigung des Nanofunktionalisierungserfolgs von Denosumab

Die erfolgreiche Nanofunktionalisierung von bioaktiven Molekülen wurde in der Literatur bereits mehrmals gezeigt [87, 100]. Um Titan mit bioaktiven Molekülen zu nanofunktionalisieren, wurden zunächst Oligonukleotid-Einzelstränge elektrochemisch in der Oxidschicht des Titans fixiert. Die bioaktiven Moleküle wurden an weitere Oligonukleotid-Einzelstränge konjugiert, die komplementär zu den verankerten Oligonukleotid-Einzelsträngen sind und dadurch mit diesen hybridisiert werden können. Zur Hybridisierung wurden die Konjugate aus Oligonukleotid-Einzelsträngen und bioaktiven Molekülen auf den Titanprobekörpern mit den verankerten Oligonukleotid-Einzelsträngen inkubiert. Ungebundene Konjugate wurden im Anschluss an die Hybridisierung durch mehrere Spülungen der Titanprobekörper entfernt.

In dieser Studie wurde zum ersten Mal die Nanofunktionalisierung von Titan mit Denosumab gezeigt. Dass dies möglich ist und nicht z.B. durch sterische Hinderung der großen Denosumab-Moleküle unterbunden wird, wurde in einem Validierungsversuch überprüft. Dazu wurde Denosumab im Überstand der Spülungen nach der Hybridisierung bestimmt und mit der Ausgangskonzentration korreliert. Es konnte festgestellt werden, dass 83 % der Oligonukleotid-Denosumab-Konjugate mit den verankerten Oligonukleotid-Einzelsträngen hybridisierten. Nach der erfolgreichen Hybridisierung wurde in einem weiteren Versuch die Freisetzung von Denosumab im Verlauf bestimmt. Dabei wurde nachgewiesen, dass mindestens 88% des hybridisierten Denosumabs innerhalb von 18 Tagen wieder freigesetzt wurde.

Die Ergebnisse dieser Versuche zeigen, dass die Hybridisierung und damit die Nanofunktionalisierung von Titan mit Denosumab erfolgreich war. Darüber hinaus konnte ermittelt werden, dass ein Großteil des verankerten Denosumabs im Verlauf wieder freigesetzt wurde.

3.2 Validierung der Kontrollgruppen und Bestätigung der Hemmung der Osteoklastogenese in vitro durch lösliches Denosumab

Um eine erfolgte bzw. nicht erfolgte Osteoklastogenese aus humanen PBMCs zu untersuchen, wurden die +CTRL und die –CTRL neben den Titanprobekörpern zusätzlich auf Well-Platten und auf Dentin kultiviert. Dadurch wurde der Nachweis von Osteoklasten-typischer Aktivität mittels TRAP-Färbung und die Darstellung von osteoklastären Resorptionslakunen ermöglicht.

In diesen Validierungsversuchen wurde zudem lösliches Denosumab (sDMAB) getestet. Dieses wurde der Behandlungsgruppe der Validierungsversuche in Anlehnung an die Literatur mit 2 nM zugegeben [50]. In dem in der Literatur beschriebenen Modell wurden murine RAW264.7 Zellen anstatt von den in dieser Arbeit verwendeten humanen PBMCs als Osteoklastenvorläuferzellen verwendet. Zudem bezog sich die Untersuchung auf 5 Tage anstatt des hier getesteten 28-tägigen Zeitraums. Daher wurde in unserer Studie das bisher unerprobte Modell aus in vitro Osteoklastendifferenzierung aus humanen PBMCs und deren Hemmung durch Denosumab im 28-Tagesversuch zunächst in 8 unabhängigen Versuchen validiert, bevor es auf die nanofunktionalisierten Titanprobekörper übertragen wurde.

3.2.1 Histochemischer Nachweis der Osteoklasten-typischen TRAP

Die TRAP ist ein Enzym der Osteoklasten, das an der Knochenzersetzung beteiligt ist [17]. Da nicht alle Isoformen der TRAP spezifisch für Osteoklasten sind, wird die rötlich-violette Anfärbung der TRAP als Screening für die enzymatische Aktivität differenzierter Osteoklasten verwendet. Die Färbung zur Darstellung der TRAP-Aktivität bietet zudem die Möglichkeit, die Zellmorphologie zu beurteilen. Da Osteoklasten durch Fusion der Vorläuferzellen entstehen, zeichnen sie sich durch wesentlich größere Zellkörper und eine unregelmäßige Form im Vergleich zu ihren kleinen, eher kugeligen Vorläuferzellen aus [19, 101].

Die Zellen der –CTRL wiesen nach 28-tägiger Kultivierung eine inhomogene Morphologie auf (Abb. 7 A). Bei unterschiedlichen Zellgrößen waren größtenteils TRAP-negative Zellen und ein geringer Anteil TRAP-positiver Zellen zu sehen. In allen Versuchen differenzierten

sich die Zellen der +CTRL nach 28 Tagen zu TRAP-positiven Zellen (Abb. 7 B). Diese präsentierten sich als unregelmäßig geformte Riesenzellen mit kräftig rötlich-violetter cytoplasmatischer Anfärbung. Mit 50-100 µm waren diese Zellen zumeist deutlich größer als die der -CTRL und durch einen wesentlich höheren Anteil TRAP-positiver Zellen gekennzeichnet. Die Zellen der sDMAB Gruppe waren als kleine, kugelige Zellen mit dunkler, rötlicher Anfärbung zu erkennen (Abb. 7 C). Ihre Größe ähnelte den Zellen der -CTRL, von denen sie sich jedoch durch die dunkle Färbung unterschieden. Diese Ergebnisse legen nahe, dass in der +CTRL im Gegensatz zur -CTRL eine Osteoklastenbildung erfolgt ist. Zudem hat sich gezeigt, dass das lösliche Denosumab in vitro den Differenzierungsprozess bei einer 28-tägigen Stimulation der Zellen beeinträchtigt hat.

3.2.2 Detektion von Resorptionslakunen reifer Osteoklasten auf Dentin

Osteoklasten besitzen die einzigartige Fähigkeit, Knochenmatrix resorbieren zu können. Das knochenähnlich aufgebaute Dentin bietet mit seiner glatten Oberfläche eine Möglichkeit, diese Resorptionsfähigkeit in vitro zu detektieren. Die Darstellung von Resorptionslakunen auf Dentin gilt als Beweis für die Aktivität reifer Osteoklasten und wurde hier zur Ergänzung der TRAP-Färbung durchgeführt (Abb. 8).

Dazu wurden die Kontrollgruppen und die sDMAB Gruppe auf Dentinchips kultiviert. Nach 28 Tagen wurden die Zellen entfernt und die Resorptionslakunen durch Toluidinblau angefärbt. Die unstimulierten PBMCs der -CTRL hinterließen keine Fressspuren auf Dentin (Abb. 8 A). Die Dentinchips der zur Osteoklastendifferenzierung stimulierten +CTRL waren am Versuchsende durch zahlreiche Resorptionslakunen gekennzeichnet (Abb. 8

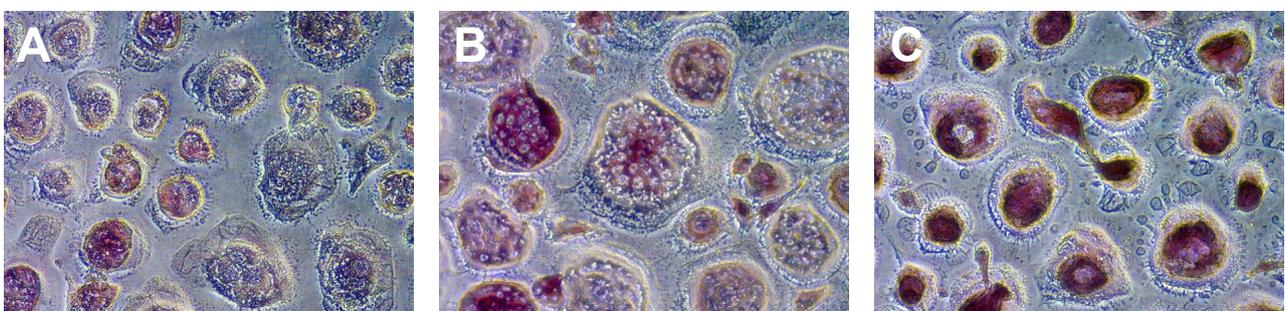


Abb. 7: TRAP-Färbung mit je einem repräsentativen Bild pro Gruppe aus 8 unabhängigen Versuchen (32-fache Vergrößerung). Zu sehen sind die Kontrollgruppen -CTRL (A) und +CTRL (B), sowie die sDMAB Gruppe (C) nach 28-tägiger Kultivierung auf Well-Platten.

B). Diese waren sowohl als einzelne Lakunen vorzufinden, als auch in Gruppierungen und konfluierenden Straßen. Letztere charakterisieren die Migration von Osteoklasten während des Resorptionsprozesses. Auf den Dentinchips der sDMAB Gruppe waren keine Resorptionslakunen zu detektieren (Abb. 8 C).

Diese Ergebnisse weisen eine erfolgte Differenzierung zu knochenresorbierenden Zellen in der +CTRL nach und belegen, dass in der –CTRL keine Differenzierung zu reifen Osteoklasten stattgefunden hat. Darüber hinaus zeigen die Ergebnisse, dass das lösliche Denosumab die Osteoklastendifferenzierung und/oder Aktivierung im 28-tägigen Versuchszeitraum gehemmt hat.

3.2.3 Schlussfolgerung aus den Validierungsversuchen

Durch den Nachweis von TRAP-positiven Riesenzellen und Resorptionslakunen in der +CTRL wurde das verwendete Versuchsprotokoll zur Generierung von Osteoklastentypischen Zellen und somit einer verwendbaren Positivkontrolle bestätigt. Die größtenteils TRAP-negativen Zellen und die Abwesenheit der Resorptionslakunen in der –CTRL validierte diese als Vergleichsgruppe zu den osteoklastär differenzierten Zellen. Lösliches Denosumab konnte im 28-tägigen Versuch die Osteoklastendifferenzierung hemmen, sodass die kultivierten Zellen keine Resorptionsfähigkeit ausbilden konnten. Damit wurde zum ersten Mal die Wirksamkeit von Denosumab auf die 28-tägige Osteoklastendifferenzierung aus humanen PBMCs in vitro gezeigt. Diese Ergebnisse boten die Basis für die Untersuchung des Effekts des nanofunktionalisierten Denosumabs.

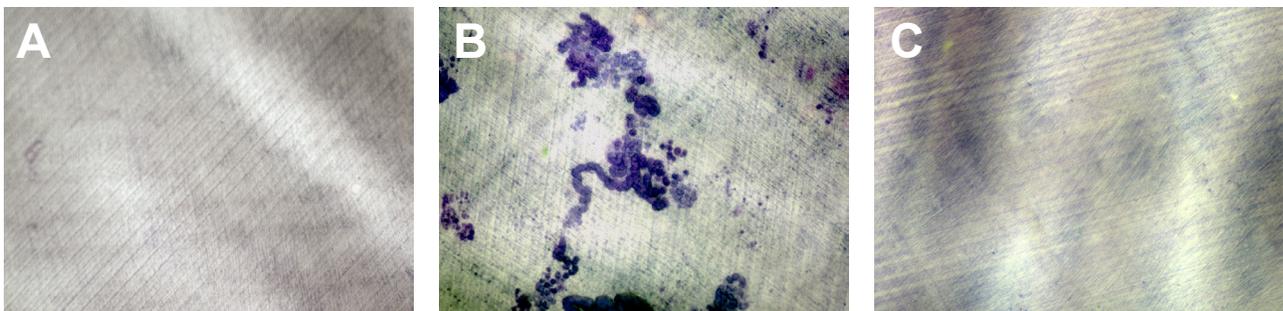


Abb. 8: Toluidinblau gefärbte Resorptionslakunen auf Dentin mit je einem repräsentativen Bild pro Gruppe aus 8 unabhängigen Versuchen (10-fache Vergrößerung). Zu sehen sind die -CTRL (A), die +CTRL (B) und die sDMAB Gruppe (C) nach 28-tägiger Kultivierung auf Dentinchips.

3.3 Hemmung der Osteoklastogenese in vitro durch nanofunktionalisiertes Denosumab

Nach der Validierung der Kontrollgruppen wurden diese auf Titanprobekörpern mit verankerten Oligonukleotid-Einzelsträngen kultiviert und als Vergleichsgruppen zur Behandlungsgruppe cDMAB verwendet. Wie bereits beschrieben bestand die cDMAB Gruppe aus zur Osteoklastendifferenzierung stimulierten PBMCs, die nun auf mit Denosumab nanofunktionalisiertem Titan kultiviert wurden.

Während in den Validierungsversuchen Denosumab in löslicher Form appliziert wurde, wurde mit der Versuchsgruppe cDMAB eine völlig neue Applikationsform getestet. Diese bestand in der bereits beschriebenen Verankerung von Oligonukleotid-Einzelsträngen auf Titan, der Konjugation von Denosumab an einen dazu komplementären Oligonukleotid-Einzelstrang und deren Hybridisierung. Die Freisetzung des Denosumabs erfolgt durch dessen Dissoziation von den verankerten Oligonukleotidsträngen.

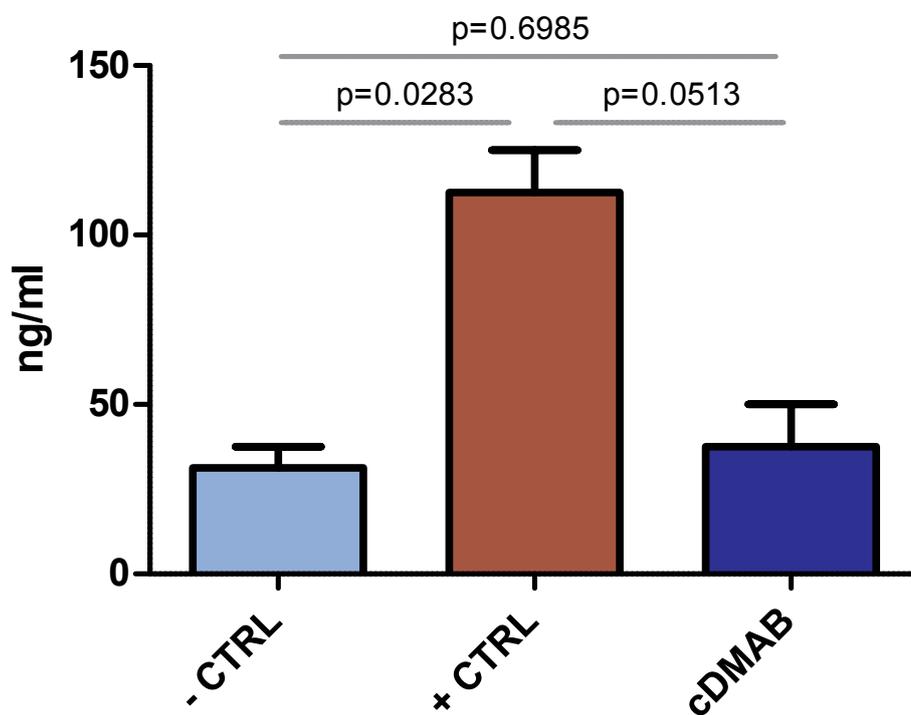


Abb. 9: TRAP5b im Zellkulturüberstand der Versuchsgruppen nach 28 Tagen Kultivierung. Dargestellt sind die Kontrollgruppen (-CTRL, +CTRL) auf Titan mit verankerten Oligonukleotid-Einzelsträngen und die stimulierten PBMCs auf mit Denosumab nanofunktionalisiertem Titan (cDMAB).

3.3.1 Hemmung der Osteoklasten-spezifischen TRAP5b-Freisetzung

In dieser Studie wurde die Messung des freigesetzten TRAP5b durchgeführt, um den Einfluss von cDMAB auf die Osteoklastendifferenzierung und –aktivierung zu evaluieren (Abb. 9).

TRAP5b war im Überstand der +CTRL im Vergleich zur –CTRL signifikant erhöht messbar. Die cDMAB Gruppe zeigte eine drastische Reduktion der TRAP5b Sekretion im Verhältnis zur +CTRL und erreichte fast das Level der –CTRL. Dies steht im Einklang mit der Wirkung des löslichen Denosumabs in den Validierungsversuchen und zeigt, dass durch die zielgerichtete Applikation mittels Nanofunktionalisierung bereits sehr niedrige Konzentrationen ausreicht, um die Osteoklastendifferenzierung und –aktivierung effektiv zu hemmen.

3.3.2 Reduktion der endogenen Phosphatasenaktivität in Osteoklasten

In Osteoklasten besteht eine hohe Aktivität endogener Phosphatasen, zu denen auch die bereits erwähnte TRAP gehört. Die intrazelluläre Phosphatasenaktivität kann neben der TRAP-Färbung auch durch eine Fluoreszenz-Färbung dargestellt werden [47, 102]. Diese ermöglicht es, Phosphatasenaktivität auf Titanprobekörper zu detektieren und wurde in dieser Studie zur weiteren Beurteilung der Osteoklastenaktivität herangezogen (Abb. 10). Die +CTRL wies im Vergleich zur –CTRL eine deutlich höhere Phosphatasenaktivität auf (Abb. 10 A und B). In der cDMAB Gruppe gruppierten sich die Zellen, die Phosphatasenaktivität

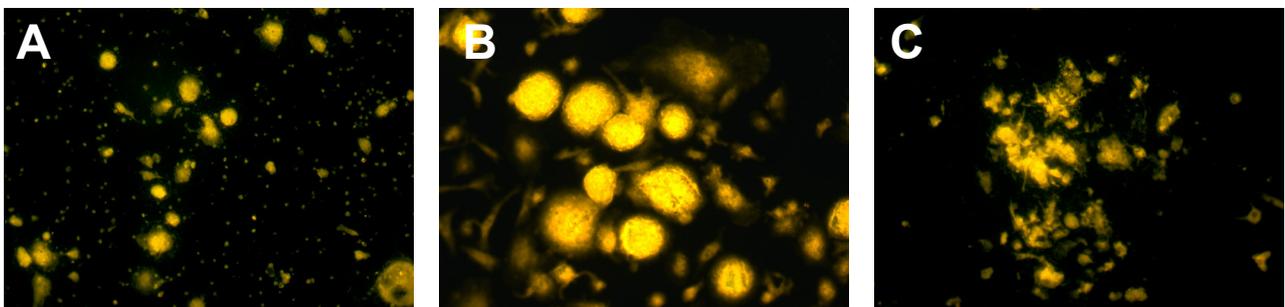


Abb. 10: Enzyme-linked-Fluorescence Färbung zur Darstellung endogener Phosphatasenaktivität (10-fache Vergrößerung). Zu sehen sind die –CTRL (A), die +CTRL (B), sowie die stimulierten PB-MCs auf mit Denosumab nanofunktionalisiertem Titan (C) nach 28-tägiger Kultivierung.

war wesentlich reduziert im Vergleich zur +CTRL (Abb. 10 C). Diese Ergebnisse bieten einen weiteren Hinweis darauf, dass nanofunktionalisiertes Denosumab die Osteoklastenaktivität deutlich beeinträchtigt.

3.3.3 Inhibition der terminalen Osteoklastendifferenzierung

Nach 28 Tagen Kultivierung wurde die Zellmorphologie der Versuchsgruppen mittels Rasterelektronenmikroskopie verglichen (Abb. 11). Die Zellen der –CTRL zeigten ein auffallend helles kugeliges Erscheinungsbild und bildeten Cluster ohne zu multinukleären Zellen zu fusionieren (Abb. 11 A). Mit ca. 5 µm Durchmesser waren die Cluster um ein Vielfaches kleiner als die anderen beiden Versuchsgruppen. Zudem war die Adhärenz der Zellen der –CTRL im Vergleich zu den anderen Gruppen auf der Titanoberfläche herabgesetzt. Die zur Osteoklastogenese stimulierte +CTRL ließ große Zellkörper mit einzelnen Ausläufern erkennen (Abb. 11 B). Die Zellgrenzen waren klar zu identifizieren und erschienen aufgehellt. Die Zelloberfläche war unregelmäßig gewölbt und zeigte sich dunkel verdichtet. Die cDMAB Gruppe formte große Zellagglomerate (Abb. 11 C). Im Vergleich zur +CTRL waren eine weitaus weniger dichte, aufgehellte Zelloberfläche und keine Zellausläufer zu sehen. Diese Ergebnisse zeigen, dass in der +CTRL im Vergleich zur –CTRL eine Osteoklastendifferenzierung stattgefunden hat. Die Zellmorphologie der cDMAB Gruppe ähnelt der der +CTRL in Größe und Ausdehnung. Die cDMAB Gruppe war jedoch durch fehlende Zellausläufer und flachere, hellere Zellkörper von der +CTRL

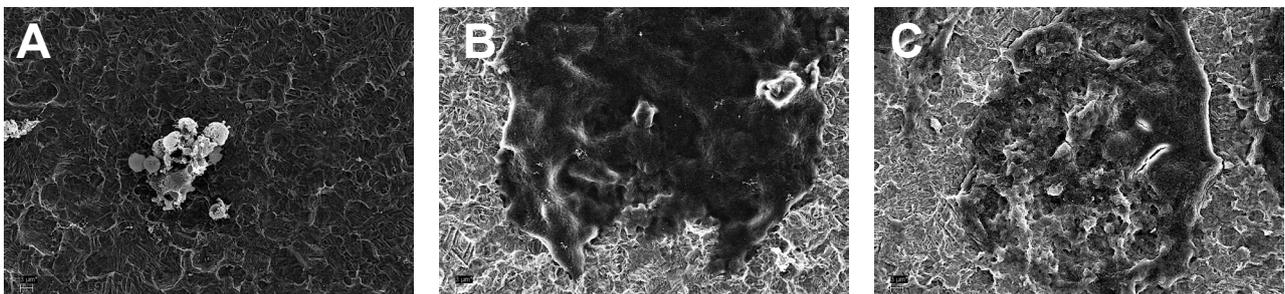


Abb. 11: Rasterelektronenmikroskopische Betrachtung der –CTRL (A), der +CTRL (B) und der cDMAB Gruppe (C) auf Titan mit verankerten Oligonukleotid-Einzelsträngen nach 28 Tagen Kultivierung (10.000-fache Vergrößerung, 10kV, Rasterelektronenmikroskop Typ LEO 1455VP, Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie, Klinikum der Universität München, LMU).

zu unterscheiden. In Zusammenschau mit der beobachteten Hemmung der TRAP5b Freisetzung und der reduzierten Enzymaktivität der Osteoklasten in der cDMAB Gruppe legen die Ergebnisse der rasterelektronenmikroskopischen Betrachtung nahe, dass cDMAB die Osteoklastendifferenzierung teilweise zulässt, die terminale Differenzierung und damit die Osteoklastenaktivität jedoch hemmt.

4. Diskussion

Endoprothesenimplantationen werden weltweit millionenfach zur Therapie von degenerativen oder inflammatorischen Gelenkerkrankungen durchgeführt und gehen zumeist mit einer schnellen Verbesserung der Lebensqualität der Patienten einher. Die Anzahl an Erstimplantationen steigt jährlich, jedoch auch die Anzahl an Revisionsoperationen [103]. Denn während die Gefahr von postoperativen Komplikationen wie Sepsis oder Thrombose durch präventive Maßnahmen begrenzt werden konnte, stellt die langfristige Gefahr der aseptischen Lockerung der Endoprothese noch eine große Herausforderung dar.

Im Zentrum der Pathogenese der aseptischen Lockerung steht die periprothetische Bildung von Osteoklasten. Verschiedene Zellarten im Gewebe um die Prothese werden durch Abriebteilchen aktiviert und setzen daraufhin Faktoren frei, die die Osteoklastenvorläuferzellen zur Differenzierung stimulieren [104]. Zu diesen freigesetzten Molekülen zählen M-CSF und RANKL, die sowohl die Osteoklastenbildung, als auch –aktivierung induzieren [105]. Die aktiven Osteoklasten resorbieren den periprothetischen Knochen, wodurch sich die Prothese mit der Zeit lockert. In diesem Prozess spielen viele Faktoren eine Rolle, weshalb das Spektrum an Angriffspunkten zur Lösung des Problems groß ist.

Endoprothetische Oberflächenmodifikationen stellen eine Option dar, das periprothetische Gewebe gezielt zu beeinflussen. Insbesondere die Immobilisation von bioaktiven Molekülen bietet die effektive Möglichkeit, auf bestimmte Zellen und Prozesse im Bereich um die Prothese abzielen, ohne dabei systemische Nebenwirkungen zu riskieren.

In der vorliegenden Studie wurde die Methode der Nanofunktionalisierung angewendet, um das häufig gebrauchte Implantatmaterial TiAl6V4 medikamentös zu beschichten. Durch diese Methode können bioaktive Moleküle nicht nur auf der Prothese verankert, sondern auch kontinuierlich freigesetzt werden. In der vorliegenden Arbeit wurden Titanprobekörper mit dem Anti-RANKL-Antikörper Denosumab nanofunktionalisiert, um damit eine potentielle Möglichkeit zur gezielten Hemmung der periprothetischen Osteoklastenbildung zu evaluieren. Denosumab wird zum Zweck der Verhinderung einer aseptischen Endoprothesenlockerung bereits in systemischer Form getestet [97]. Diese Arbeit beschäftigt sich mit der neuen lokalen Applikationsform der Nanofunktionalisierung,

um das Risiko schwerwiegender systemischer Nebenwirkungen zu vermeiden. Der Effekt des immobilisierten Denosumabs wurde an humanen Osteoklasten getestet, die in vitro aus PBMCs differenziert wurden. Bevor diese auf den Titanprobekörpern kultiviert wurden, wurden zunächst deren Differenzierung validiert und deren Beeinflussung durch lösliches Denosumab untersucht, da es zum Effekt von Denosumab auf humane Osteoklasten in vitro noch keine Studien über den physiologischen Differenzierungszeitraum von 28 Tagen gibt. Anschließend wurden die Titanprobekörper mit Denosumab nanofunktionalisiert und dessen Effekt auf die 28-tägige Osteoklastogenese analysiert. Sowohl in den Validierungsversuchen, als auch im Hauptversuch mit den Titanprobekörpern lag ein besonderes Augenmerk auf der Untersuchung der osteoklastären Enzymaktivität, anhand derer in anderen Arbeiten bereits der Effekt verschiedener Substanzen auf die Osteoklastendifferenzierung aus humanen PBMCs beurteilt wurde [48, 106].

4.1 Osteoklastendifferenzierung aus humanen PBMCs

Um humane Osteoklasten-typische Zellen zu generieren, wurden PBMCs aus Vollblutspenden isoliert, da die monozytären Vorläuferzellen der Osteoklasten im Zellpool der PBMCs zu finden sind [1, 101]. Die isolierten PBMCs wurden anschließend durch die Differenzierungsfaktoren M-CSF und RANKL zur Osteoklastenbildung stimuliert. Diese Methode, aus PBMCs Osteoklasten zu differenzieren, wurde in der Literatur bereits mehrfach erfolgreich angewendet [6, 48, 107]. Dennoch ist zu bedenken, dass PBMCs nicht nur Osteoklastenvorläuferzellen, sondern zahlreiche weitere Subpopulationen enthalten, die anhand von immunphänotypischen Oberflächenmerkmalen unterschieden werden können. Gruppen dieser Oberflächenmerkmale werden als „Cluster of differentiation“ (abgekürzt CD) bezeichnet. Zu den Gruppen, die im Zellpool der PBMCs zu finden sind, gehören die CD14⁺, CD11b⁺, CD61⁺, CD15⁺ und CD169⁺ Zellen, von denen insbesondere die CD14⁺ Zellen das Potential zur Osteoklastendifferenzierung haben [101]. Es wurde festgestellt, dass die PBMCs als Gesamtheit, möglicherweise durch gegenseitige Stimulation, eine geringe Tendenz zur spontanen Osteoklastenbildung ohne Zugabe von Differenzierungsfaktoren aufweisen [3].

Den Erfolg der Osteoklastendifferenzierung kann man anhand verschiedener Osteoklasten-typischer Eigenschaften untersuchen. Die Fähigkeit zur Resorption von Knochenmatrix ist einzigartig für Osteoklasten und damit ein spezifischer Nachweis für Osteoklasten-typische

Aktivität. Diese Resorptionsaktivität kann in vitro durch die Kultivierung der Zellen auf der Knochen-ähnlichen Substanz Dentin detektiert werden. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass humane PBMCs, die zur Osteoklastendifferenzierung stimuliert wurden, nach 28 Tagen Kultivierung Resorptionslakunen auf Dentin ausbildeten (Abb. 8). Diese Beobachtung deckt sich mit anderen Arbeiten, in denen Osteoklasten aus PBMCs generiert und deren Differenzierung durch die Kultivierung auf Dentin bestätigt wurde [48, 106]. Unterstützt wurde dieses Ergebnis durch die Darstellung der TRAP. Die TRAP ist ein Osteoklastentypisches Enzym, dessen intrazelluläre Aktivität durch eine Färbung detektiert und zum Nachweis einer erfolgten Osteoklastendifferenzierung verwendet werden kann [47]. Auch in dieser Arbeit konnte ein Großteil an TRAP-positiv gefärbten Zellen einen weiteren Hinweis auf die stattgefundene Osteoklastenbildung liefern (Abb. 7).

Zur Evaluation der Negativkontrolle wurden ebenso Resorptions- und TRAP-Aktivität beurteilt. Auf den Dentinplättchen der Negativkontrolle waren keine Resorptionslakunen nachzuweisen (Abb. 8). Dies lieferte den Beweis, dass ohne Zugabe der Differenzierungsfaktoren keine aktiven Osteoklasten generiert wurden. Die TRAP-Färbung zeigte hauptsächlich TRAP-negative Zellen (Abb. 7). Teilweise waren TRAP-positive Zellen zu erkennen, die jedoch deutlich kleiner als die Osteoklasten-typisch differenzierten PBMCs waren. Dies deckt sich mit der Beobachtung in der Literatur, dass unstimulierte PBMCs geringfügig TRAP-Aktivität ausbilden können [3]. Da die unstimulierten PBMCs jedoch in einer Reihe von unabhängigen Versuchen keine Resorptionsaktivität aufwiesen und damit nicht bzw. zumindest nicht vollständig differenziert waren, wurden sie im Weiteren als Negativkontrolle verwendet.

Auch bei der Kultivierung der Kontrollgruppen auf den Titanplättchen konnten ähnliche Beobachtungen gemacht werden. Obwohl die TRAP vorwiegend als Osteoklastenmarker verwendet wird, kommt sie prinzipiell auch in anderen Zellarten vor [36, 38, 108]. Sie wird daher vor allem als Screening-Methode der in vitro Osteoklastendifferenzierung verwendet. Die Isoform TRAP5b ist hingegen spezifischer für Osteoklasten und wird von diesen sezerniert [40, 109]. Daher ist die Messung von TRAP5b im Serum bzw. in vitro im Zellkulturüberstand eine Möglichkeit, Osteoklastenaktivität abzuschätzen. Dies wurde in der Literatur auch bereits anhand von Osteoklasten gezeigt, die in vitro aus humanen PBMCs generiert wurden [106]. Die vorliegende Arbeit zeigt ähnliche Ergebnisse bei PBMCs, die auf Titanprobekörpern kultiviert wurden (Abb. 9). Auch hier war eine signifikant

höhere TRAP5b Freisetzung der zur Differenzierung stimulierten PBMCs im Vergleich zur Negativkontrolle festzustellen. Unterstützt wurde die Beobachtung durch die Fluoreszenz-mikroskopische Darstellung der endogenen Phosphatasenaktivität, wobei die zur Differenzierung stimulierten PBMCs im Vergleich zu den unstimulierten PBMCs eine deutlich stärkere Aktivität aufwies (Abb. 10). Diese Fluoreszenzfärbung kann zur Detektion der intrazellulären TRAP verwendet werden [47]. Im Gegensatz zur histochemischen TRAP-Färbung in den Validierungsversuchen ist diese Fluoreszenzfärbung unspezifischer, jedoch für die Anwendung auf Titan geeignet. In Kombination mit der TRAP5b Messung unterstützen die Ergebnisse die Annahme, dass in der +CTRL in allen Versuchen eine erfolgreiche Osteoklastenbildung stattgefunden hat.

Osteoklasten entstehen durch die Fusion ihrer monozytären Vorläuferzellen und unterscheiden sich daher durch ein deutlich größeres Zellvolumen, eine hohe Anzahl an Zellkernen und verschiedene Charakteristika, wie z.B. Zellausläufer, die sie zur Anheftung an Oberflächen oder zur Knochenresorption befähigen. Der zellmorphologische Unterschied zwischen Positiv- und Negativkontrolle konnte in dieser Arbeit in rasterelektronenmikroskopischen Betrachtungen gezeigt werden und deckt sich mit Ergebnissen in der Literatur [110]. Die differenzierten PBMCs waren im Vergleich zu den undifferenzierten als wesentlich größere, adhärente Zellen mit weiten Ausläufern zu erkennen (Abb. 11).

4.2 RANKL-Inhibition zur Verhinderung aseptischer Lockerung

Es gibt verschiedene Theorien zur Pathogenese der aseptischen Endoprothesenlockerung und während einige molekularbiologische Prozesse bereits identifiziert sind, sind ihre Zusammenhänge und die beteiligten Zellen noch Gegenstand der Forschung. Konsens ist, dass es im Bereich um die Prothese zur übermäßigen Differenzierung und Aktivierung von Osteoklasten kommen kann. Dies birgt die Gefahr von Osteolysen, durch die die Prothese ihren Halt im Knochen verliert.

Im Gewebe zwischen Implantat und Knochen wurden sowohl Osteoklastenvorläuferzellen gefunden, als auch Zellen, die Faktoren exprimieren, die Osteoklastenvorläuferzellen zur Differenzierung stimulieren [82]. Die Expression dieser Faktoren wird wiederum durch Abriebpartikel der Endoprothese und ihrem unzureichenden Abbau getriggert

[105]. In Zellen, die aus periprothetischem Gewebe isoliert wurden, konnte eine erhöhte RANKL/OPG Ratio nachgewiesen werden [111]. RANKL ist durch die Bindung an RANK auf Osteoklastenvorläuferzellen sowohl zu deren Differenzierung als auch zu deren Aktivierung notwendig [19]. Während dies zur physiologischen Knochenhomöostase erwünscht ist, kann ein pathologischer Überschuss an RANKL zu einer unkontrollierten Osteoklastenaktivität und damit zu Osteolysen führen.

Auf Basis dieser Erkenntnisse testeten diverse Arbeitsgruppen die Inhibition von RANKL mit dem Ziel, periprothetischer Knochenresorption vorzubeugen. Aspenberg et al. nutzten ein Modell periprothetischer Osteolysen in Ratten, denen eine Titanplatte auf die Tibiaoberfläche implantiert wurde [95]. Den Ratten wurde subkutan der RANKL-Antagonist OPG als OPG-Fc Fusionsprotein injiziert und festgestellt, dass dieses die Knochenresorption verhindern und die Osteoklastenzahl und das gemessene Serum TRAP5b reduzieren konnte. OPG-Fc wurde zudem durch eine Alkoxysilan-Verbindung auf Titanoberflächen immobilisiert, um die Osteoklastendifferenzierung aus RAW264.7 Zellen zu inhibieren [96]. Ergebnis dieser Studie war eine Hemmung der RANKL-induzierten Osteoklastenbildung durch das immobilisierte OPG-Fc über den 8-tägigen Versuchszeitraum. Das OPG-Fc war 2 Tage lang auf der Titanoberfläche aktiv. Eine Reduktion der Osteoklastendifferenzierung aus RAW 264.7 Zellen wurde auch durch den Anti-RANKL-Antikörper Denosumab gezeigt [50]. Die Fähigkeit von Denosumab, übermäßige Osteoklastenaktivität zu verhindern, wurde bereits in zahlreichen präklinischen und klinischen Studien demonstriert [52]. Kostenuik et al. zeigten anhand von zur Osteoklastogenese stimulierten RAW 264.7 Zellen, dass in vitro bereits 2 nM ausreichen, um nach 5 Tagen die TRAP5b Aktivität signifikant zu hemmen [50]. In derselben Studie wurde Denosumab anhand eines knock-in Mausmodells mit der Fähigkeit zur Expression von humanem RANKL getestet. Dies ist essentiell zur Testung von Denosumab im Tiermodell, da Denosumab humanes RANKL mit einer hohen Affinität, murines RANKL jedoch gar nicht binden kann [50]. Im etablierten Mausmodell wurde eine deutliche Verringerung des Serum TRAP5b durch Denosumab erreicht. Nachdem Denosumab bereits klinisch jahrelang eingesetzt und für mehrere Indikationen zugelassen worden ist, wird es nun erstmals klinisch auch zur Reduktion von periprothetischen Osteolysen getestet [97]. In einer randomisierten doppelblinden Placebo-kontrollierten Studie werden 110 Patienten halbjährlich 60 mg Denosumab subkutan injiziert. In die Studie eingeschlossen sind Patienten, bei denen bereits eine periprothetische osteolytische Läsion nachgewiesen wurde. Der Effekt von

Denosumab wird evaluiert, indem potentielle Veränderungen der osteolytischen Läsion durch eine dreidimensionale Computertomographie nach den drei Versuchsjahren, sowie die Knochendichte und serologische Marker des Knochenumbaus beurteilt werden. Eine weitere Studie testete systemisch appliziertes Denosumab, um periprothetischen Osteolysen um zementlose Hüft-Totalendoprothesen entgegenzuwirken und konnte in der röntgenologischen Evaluation nach einem Jahr einen positiven Effekt auf die Knochendichte nachweisen [112].

Die vorliegende Arbeit greift den Ansatz, Denosumab zur Reduktion der periprothetischen Osteoklastendifferenzierung einzusetzen, auf und verwendet eine Applikationsart, die durch die lokale Anwendung von geringen Dosen die Nachteile und potentiellen Risiken einer systemischen Denosumab-Gabe umgeht.

In dieser Studie wurde erstmals der Einfluss von Denosumab auf Osteoklasten-typische Zellen untersucht, die durch die 28-tägige Stimulation von humanen PBMCs generiert wurden. Über diesen im Vergleich zu den bisherigen Studien langen Versuchszeitraum wurde zunächst lösliches Denosumab in der in der Literatur bereits erprobten geringen Konzentration von 2 nM zugegeben. Diese reichte aus, um die Resorptionsaktivität auf Dentin zu verhindern (Abb. 8). Auch in der TRAP-Färbung unterschieden sich die behandelten Zellen deutlich von den unbehandelten differenzierten Zellen (Abb. 7). Diese Ergebnisse konnten erstmals zeigen, dass Denosumab die in vitro Osteoklastendifferenzierung aus humanen PBMCs in geringer Dosierung über 28 Tage hemmt. Diese Erkenntnis hat für die Immobilisation von Denosumab zur Verhinderung aseptischer Lockerung große Bedeutung, da die Konzentration, die auf der Endoprothese maximal immobilisiert werden kann, begrenzt ist.

Zur Nanofunktionalisierung von Titanprobekörpern mit Denosumab wurde die entsprechende maximale Konzentration gewählt, mit der BMP-2 bereits erfolgreich nanofunktionalisiert werden konnte [87]. Die Nanofunktionalisierung sieht vor, bioaktive Moleküle an Oligonukleotidstränge zu konjugieren, die an Ankerstränge auf der Titanoberfläche hybridisiert werden. Mit der eingesetzten Menge an konjugiertem Denosumab wurde gewährleistet, dass für die Hybridisierung mehr Oligonukleotid-Denosumab-Konjugate als Ankerstränge vorlagen. Dadurch sollte eine maximale Beschichtung der Titanoberfläche durch das Denosumab erreicht werden.

Durch das immobilisierte Denosumab zeichnete sich ebenso wie durch das lösliche Denosumab ein deutlicher Trend zur Reduktion der Osteoklastenaktivität ab. Dies wurde

durch eine drastisch reduzierte TRAP5b Freisetzung gezeigt (Abb. 9). Unterstützt wurde dieses Ergebnis durch die fluoreszenzmikroskopisch dargestellte stark verringerte endogene Phosphatasenaktivität (Abb. 10). Sowohl in der TRAP5b Messung, als auch der Darstellung der Phosphatasenaktivität erreichte die Behandlungsgruppe fast das Level der Negativkontrolle. Somit war eine deutliche, jedoch keine vollständige Hemmung der Osteoklastendifferenzierung wahrscheinlich. Diese Erkenntnis wurde durch die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung unterstützt (Abb. 11). Dabei ließ sich in der durch das immobilisierte Denosumab behandelten Gruppe eine gewisse Differenzierung der Zellen erkennen. Sie unterschieden sich in der Größe deutlich von den undifferenzierten PBMCs und bildeten Zellagglomerate aus. Sie unterschieden sie jedoch auch von den zu Osteoklasten differenzierten PBMCs, da sie wesentlich flacher waren und keine Zellausläufer ausbildeten. In Zusammenschau mit der deutlich reduzierten TRAP5b Freisetzung und Phosphatasenaktivität ist es wahrscheinlich, dass das immobilisierte Denosumab die Osteoklastendifferenzierung nicht vollständig hemmen, die Osteoklastenaktivität jedoch entscheidend reduzieren konnte.

4.3 Immobilisierung von bioaktiven Molekülen

Durch eine immer älter werdende Bevölkerung mit einer immer längeren Lebenserwartung wird in den nächsten Jahren und Jahrzehnten sowohl die Anzahl der endoprothetischen Ersteingriffe, als auch die der Revisionsoperationen rasant steigen [103, 113]. Da Revisionsoperationen insbesondere für ältere Patienten ein Risiko darstellen, wird die Verlängerung der Endoprothesenstandzeit immer bedeutender. Zur Verbesserung der Implantateigenschaften wurden bereits zahlreiche Oberflächenmodifikationen getestet. Die Immobilisierung von bioaktiven Molekülen auf Titanoberflächen macht es der Endoprothetik möglich, dem implantierten Material Eigenschaften hinzuzufügen, die die Integration der Prothese in das umliegende Gewebe begünstigen und damit potentiell ihre Standzeit verbessern.

Die Nanofunktionalisierung von Titanoberflächen ist eine von zahlreichen Immobilisierungsmethoden, die derzeit angewendet werden. Die Methoden unterscheiden sich durch ein variierendes Maß an Komplexität der Durchführung, in der Toxizität der jeweils verwendeten Substanzen und in der Stabilität der Bindung der Stoffe an die Oberflächen. Die Methode der Adsorption zum Beispiel bietet den Vorteil, Stoffe schnell

und einfach zu immobilisieren [114]. Allerdings kommt es dabei zu einer instabilen Bindung des Stoffes an die Titanoberfläche und einer konsekutiven schnellen Freisetzung, was für viele Anwendungen einen Nachteil bietet. Kovalente Immobilisierungsmethoden führen zu einer sehr ausgeprägten, mitunter irreversiblen Bindung [115]. Dies ist ebenso nicht für alle Indikationen erwünscht und dazu kommt der nachteilige Effekt, dass oft der Einsatz potentiell toxischer Stoffe in einer komplexen Prozedur notwendig ist. Elektrochemische Methoden, die einen kathodischen oder anodischen Polarisationsprozess nutzen, können einfach und ohne Verwendung toxischer Substanzen angewendet werden, ermöglichen allerdings wenig Kontrolle über das Freisetzungsverhalten der immobilisierten Moleküle [99]. Die Nanofunktionalisierung kombiniert die elektrochemische Immobilisationsmethode mit dem Einsatz von Nukleinsäuren, wodurch eine Steuerung der Freisetzungsgeschwindigkeit möglich wird. Nukleinsäuren besitzen ein so genanntes Selbstorganisations-Potential [99]. Das bedeutet, dass komplementäre Stränge sich autonom einander anlagern und wieder dissoziieren. Wie stark diese aneinanderbinden und wie schnell sie dementsprechend freigesetzt werden, kann jedoch durch die Modifikation der Hybridstabilität beeinflusst werden. Dazu gibt es mehrere Angriffspunkte, wie z.B. die Hybridlänge und der G-C Gehalt der Oligonukleotidstränge. Dadurch wird es ermöglicht, das Freisetzungsverhalten der bioaktiven Moleküle durch das Design der Oligonukleotidstränge zu steuern.

Für unsere Studie wurde diese Methodik ausgewählt, da zur Verhinderung periprothetischer Osteoklastendifferenzierung eine Freisetzung des verwendeten Hemmstoffes über einen gewissen Zeitraum notwendig ist. Zudem muss für den potentiellen Einsatz am Patienten eine toxikologisch unbedenkliche Methode angewandt werden, die auch einem Sterilisationsprozess vor Implantation unterzogen werden kann. Mit Denosumab haben wir uns für ein großes zu immobilisierendes Molekül entschieden, dessen Funktionalität durch den Immobilisierungsprozess nicht beeinträchtigt werden durfte. In unserer Studie konnten wir zeigen, dass die Hybridisierung von an Oligonukleotidstränge gekoppeltem Denosumab funktioniert und ein Großteil (83%) effektiv gebunden hat. Trotz der stabilen Bindung der Oligonukleotidstränge konnte auch ein Großteil (88%) des Denosumabs im gemessenen Versuchsverlauf freigesetzt werden. Damit wurde gezeigt, dass Denosumab durch die Methode der Nanofunktionalisierung nicht nur effizient binden, sondern auch im Zeitverlauf wieder freigesetzt werden kann. Der Versuch zum Freisetzungsverhalten von Denosumab umfasste 18 Tage. Ein Großteil des immobilisierten Denosumabs wurde also in den ersten Wochen freigesetzt. Eine noch schnellere Freisetzung wurde

bei der Nanofunktionalisierung von Titanoberflächen mit BMP2 beobachtet [87]. Eine weiter verzögerte Freisetzung wäre für die Anwendung zur Verhinderung der aseptischen Lockerung wünschenswert, da es sich dabei um einen langsam fortschreitenden Prozess handelt. Für weitere Studien wäre daher eine Verlangsamung der Freisetzung, wie bereits angesprochen z.B. durch die Änderung der Hybridlänge und des G-C Gehalts der Oligonukleotidstränge, sinnvoll.

Damit würde in vivo eine lokale von der Endoprothese ausgehende Freisetzung von Denosumab ermöglicht, ohne eine systemische Applikation zu benötigen. Dies beugt zum einen systemischen Nebenwirkungen vor und macht durch die geringe Konzentration auch lokale Nebenwirkungen unwahrscheinlich. Die Nanofunktionalisierung würde zur attraktiven Präventionsmöglichkeit aseptischer Endoprothesenlockerung.

Bisher wurde die Nanofunktionalisierung hauptsächlich auf Ti6Al7Nb getestet [99]. Da TiAl6V4 aufgrund des geringeren Elastizitätsmoduls in der klinischen Endoprothetik häufiger zum Einsatz kommt, ist diese Studie mit der Verwendung von TiAl6V4 Titanprobekörpern ein wichtiger Schritt in der Testung und Anpassung der Methodik an klinische Bedürfnisse. Die in dieser Studie verwendeten TiAl6V4 Probekörper konnten erfolgreich zur Immobilisation von Denosumab verwendet werden. Um eine vergleichbare Effektivität der Nanofunktionalisierung gegenüber der systemischen Applikation zu bestätigen, ist schließlich eine klinische Testung notwendig.

5. Zusammenfassung

Die Standzeit von Endoprothesen wird maßgeblich durch die so genannte aseptische Lockerung limitiert. Diese Form der Implantat-Lockerung ist multifaktorieller Genese und geht mit periprothetischen Osteolysen einher, die durch aktivierte Osteoklasten verursacht werden. Das bedeutet, dass im Bereich um die Prothese Osteoklastenvorläuferzellen rekrutiert, zur Differenzierung stimuliert und aktiviert werden, woraus eine übermäßige Knochenresorption um die Prothese und deren konsekutive Lockerung und Instabilität resultiert. Zur Lösung dieses Problems gibt es bereits zahlreiche Ansätze, von denen sich jedoch keiner klinisch durchgesetzt hat. Die Implantatinstabilität kann eine Revisionsoperation notwendig machen, die für Patienten ein Risiko darstellt. Daher ist die Verhinderung aseptischer Lockerungen zur Verbesserung der Endoprothesenstandzeit ein wichtiges Ziel der Biomaterial-Forschung.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit einer Methode zur medikamentösen Beschichtung von Endoprothesenoberflächen, wodurch die Aktivität osteoklastärer Zellen im periprothetischen Gewebe gezielt beeinflusst werden kann. Ziel dieser in vitro Arbeit war es, den antiresorptiven Anti-RANKL-Antikörper Denosumab auf dem Endoprothesenmaterial Titan zu immobilisieren und durch die kontinuierliche Freisetzung die lokale Osteoklastenbildung und –aktivierung zu hemmen. Als Immobilisationsmethode wurde die so genannte Nanofunktionalisierung gewählt, durch die Nukleinsäuren elektrochemisch im Titan fixiert werden. Die fixierten Nukleinsäuren werden anschließend mit komplementären Nukleinsäuren hybridisiert, an die zuvor bioaktive Moleküle konjugiert werden können. Diese können zeitversetzt durch die Dissoziation der Nukleinsäurestränge freigesetzt werden. Als bioaktives Molekül wurde Denosumab eingesetzt. Denosumab bindet den Osteoklastendifferenzierungsfaktor RANKL und verhindert dadurch sowohl die Bildung, als auch die Aktivierung von Osteoklasten. Denosumab wird derzeit klinisch zur Verhinderung der aseptischen Lockerung getestet. Bei systemischer Gabe sind allerdings potentiell schwerwiegende Nebenwirkungen auf Denosumab möglich. Deshalb wurde in dieser Arbeit die Nanofunktionalisierung als lokale Applikationsform untersucht.

Um den Einfluss des immobilisierten Denosumabs auf die Osteoklastenbildung und –aktivität beurteilen zu können, wurden humane Osteoklastenvorläuferzellen aus Spenderblut

isoliert, auf den mit Denosumab nanofunktionalisierten Titanprobekörpern zu Osteoklasten differenziert und nach 28 Tagen auf Osteoklasten-typische Eigenschaften untersucht.

Da es bisher keine in vitro Studien zum 28-tägigen Einsatz von Denosumab gibt, wurde dessen Effekt zunächst in löslicher Form ohne Titanprobekörper validiert. Dazu wurden Osteoklastenvorläuferzellen auf Well-Platten und Dentin für 28 Tage differenziert, mit löslichem Denosumab mehrfach behandelt und im Anschluss durch die Anfärbung des Osteoklasten-typischen Enzyms TRAP und der Resorptionsaktivität auf Dentin untersucht. Diese Validierungsversuche zeigten eine erfolgte Osteoklastenbildung aus isolierten Vorläuferzellen des Spenderblutes und deren Hemmung durch lösliches Denosumab im 28-Tagesversuch.

Daraufhin wurden die Titanprobekörper mit Denosumab nanofunktionalisiert und der Erfolg evaluiert. Es konnte festgestellt werden, dass ein Großteil des konjugierten Denosumabs hybridisiert hat und im Versuchsverlauf freigesetzt wurde.

Der Bestätigung des Nanofunktionalisierungserfolgs schloss sich die Kultivierung und Differenzierung der Osteoklastenvorläuferzellen auf den beschichteten Titanprobekörpern an. Ob das immobilisierte Denosumab die Differenzierung beeinflussen konnte, wurde anhand der Sekretion des Osteoklasten-spezifischen Enzyms TRAP5b, anhand der Fluoreszenz-Färbung endogener Phosphatasenaktivität und anhand der Zellmorphologie in der Rasterelektronenmikroskopie beurteilt. Das immobilisierte Denosumab konnte die Freisetzung des Osteoklastenenzym TRAP5b, sowie die Aktivität endogener Phosphatasen deutlich reduzieren. Die rasterelektronenmikroskopische Betrachtung zeigte eine teilweise erfolgte Differenzierung auf, jedoch mit deutlichem Unterschied zu den unbehandelten differenzierten Zellen. Diese Ergebnisse zeigen, dass die endoprothetische Immobilisierung von Denosumab durch Nanofunktionalisierung möglich ist und die Osteoklastendifferenzierung und -aktivität reduziert.

Weitere Studien sind notwendig, um die Methode weiter zu optimieren und die klinische Implementation zu testen.

6. Publikationen

Hartmann, E.S., Köhler, M.I., Huber, F., Redeker, J.I., Schmitt, B., Summer, B., Fottner, A., Jansson, V., Mayer-Wagner, S., Factors Regulating Bone Remodeling Processes in Asep-tic Implant Loosening. *Journal of Orthopaedic Research*, 2016. DOI: 10.1002/jor.23274

Beck, F., Hartmann, E.S., Koehler, M.I., Redeker, J.I., Schluessel, S., Schmitt, B., Fottner, A., Unger, M., van Griensven, M., Michael, J., Summer, B., Kunzelmann, K.H., Beutner, R., Scharnweber, D., Kostenuik, P.J., Mayer-Wagner, S., Immobilization of Denosumab on Titanium Affects Osteoclastogenesis of Human Peripheral Blood Monocytes. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019. DOI: 10.3390/ijms20051002

7. Literaturverzeichnis

1. Fujikawa, Y., et al., The human osteoclast precursor circulates in the monocyte fraction. *Endocrinology*, 1996. 137(9): p. 4058-4060.
2. Pereira, M., et al., Common signalling pathways in macrophage and osteoclast multinucleation. *J Cell Sci*, 2018. 131(11).
3. Costa-Rodrigues, J., A. Fernandes, and M. Fernandes, Spontaneous and induced osteoclastogenic behaviour of human peripheral blood mononuclear cells and their CD14+ and CD14- cell fractions. *Cell proliferation*, 2011. 44(5): p. 410-419.
4. Kylmäoja, E., et al., Gap junctional communication is involved in differentiation of osteoclasts from bone marrow and peripheral blood monocytes. *Heliyon*, 2018. 4(5): p. e00621.
5. Ishii, M., et al., Sphingosine-1-phosphate mobilizes osteoclast precursors and regulates bone homeostasis. *Nature*, 2009. 458(7237): p. 524.
6. Ab Kadir, R., et al., Characterization of mononucleated human peripheral blood cells. *The Scientific World Journal*, 2012. 2012.
7. Lacey, D., et al., Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *cell*, 1998. 93(2): p. 165-176.
8. Yasuda, H., et al., Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1998. 95(7): p. 3597-3602.
9. Amarasekara, D.S., et al., Regulation of Osteoclast Differentiation by Cytokine Networks. *Immune Netw*, 2018. 18(1): p. e8.
10. Koeffler, H.P., et al., Recombinant human TNF alpha stimulates production of granulocyte colony-stimulating factor. *Blood*, 1987. 70(1): p. 55-59.
11. Yavropoulou, M. and J. Yovos, Osteoclastogenesis--current knowledge and future perspectives. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 2008. 8(3): p. 204-216.
12. Cappellen, D., et al., Transcriptional program of mouse osteoclast differentiation governed by the macrophage colony-stimulating factor and the ligand for the receptor activator of NFκB. *Journal of Biological Chemistry*, 2002. 277(24): p. 21971-21982.
13. Nagy, V. and J.M. Penninger, The RANKL-RANK Story. *Gerontology*, 2015. 61(6): p. 534-542.

14. Takayanagi, H., et al., Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts. *Developmental cell*, 2002. 3(6): p. 889-901.
15. Hsu, H., et al., Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1999. 96(7): p. 3540-3545.
16. Nakagawa, N., et al., RANK is the essential signaling receptor for osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis. *Biochemical and biophysical research communications*, 1998. 253(2): p. 395-400.
17. Oddie, G., et al., Structure, function, and regulation of tartrate-resistant acid phosphatase. *Bone*, 2000. 27(5): p. 575-584.
18. Burgess, T.L., et al., The ligand for osteoprotegerin (OPGL) directly activates mature osteoclasts. *The Journal of cell biology*, 1999. 145(3): p. 527-538.
19. Teitelbaum, S.L. and F.P. Ross, Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nature reviews. Genetics*, 2003. 4(8): p. 638.
20. Edwards, J.R. and G.R. Mundy, Advances in osteoclast biology: old findings and new insights from mouse models. *Nature Reviews Rheumatology*, 2011. 7(4): p. 235-243.
21. Udagawa, N., et al., Osteoprotegerin produced by osteoblasts is an important regulator in osteoclast development and function. *Endocrinology*, 2000. 141(9): p. 3478-3484.
22. Simonet, W., et al., Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*, 1997. 89(2): p. 309-319.
23. Kapasa, E.R., et al., The Effect of RANKL/OPG Balance on Reducing Implant Complications. *J Funct Biomater*, 2017. 8(4).
24. Hofbauer, L., et al., Interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α , but not interleukin-6, stimulate osteoprotegerin ligand gene expression in human osteoblastic cells. *Bone*, 1999. 25(3): p. 255-259.
25. Takai, H., et al., Transforming growth factor- β stimulates the production of osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor by bone marrow stromal cells. *Journal of Biological Chemistry*, 1998. 273(42): p. 27091-27096.
26. Lee, S.-K. and J.A. Lorenzo, Parathyroid hormone stimulates TRANCE and inhibits osteoprotegerin messenger ribonucleic acid expression in murine bone marrow cultures: correlation with osteoclast-like cell formation. *Endocrinology*, 1999. 140(8): p. 3552-3561.
27. Kitazawa, S., et al., Vitamin D3 supports osteoclastogenesis via functional vitamin D

- response element of human RANKL gene promoter. *Journal of cellular biochemistry*, 2003. 89(4): p. 771-777.
28. Kudo, O., et al., Interleukin-6 and interleukin-11 support human osteoclast formation by a RANKL-independent mechanism. *Bone*, 2003. 32(1): p. 1-7.
29. Kobayashi, A., F. Hirano, and I. Makino, The inhibitory effect of bisphosphonates on glucocorticoid-induced RANKL expression in human cells. *Scandinavian journal of rheumatology*, 2005. 34(6): p. 480-484.
30. Palmqvist, P., et al., IL-6, leukemia inhibitory factor, and oncostatin M stimulate bone resorption and regulate the expression of receptor activator of NF- κ B ligand, osteoprotegerin, and receptor activator of NF- κ B in mouse calvariae. *The Journal of Immunology*, 2002. 169(6): p. 3353-3362.
31. Nicholson, G., et al., Abundant calcitonin receptors in isolated rat osteoclasts. Biochemical and autoradiographic characterization. *Journal of Clinical Investigation*, 1986. 78(2): p. 355.
32. Hofbauer, L.C., et al., Osteoprotegerin production by human osteoblast lineage cells is stimulated by vitamin D, bone morphogenetic protein-2, and cytokines. *Biochemical and biophysical research communications*, 1998. 250(3): p. 776-781.
33. Hofbauer, L.C., et al., Estrogen stimulates gene expression and protein production of osteoprotegerin in human osteoblastic cells. *Endocrinology*, 1999. 140(9): p. 4367-4370.
34. Zhang, J., et al., PDGF induces osteoprotegerin expression in vascular smooth muscle cells by multiple signal pathways. *FEBS letters*, 2002. 521(1-3): p. 180-184.
35. Lewiecki, E.M., New targets for intervention in the treatment of postmenopausal osteoporosis. *Nature reviews rheumatology*, 2011. 7(11): p. 631-638.
36. Andersson, G. and B. Ek-Rylander, The tartrate-resistant purple acid phosphatase of bone osteoclasts—a protein phosphatase with multivalent substrate specificity and regulation. *Acta Orthopaedica Scandinavica*, 1995. 66(sup266): p. 189-194.
37. Halleen, J.M., et al., Intracellular fragmentation of bone resorption products by reactive oxygen species generated by osteoclastic tartrate-resistant acid phosphatase. *Journal of Biological Chemistry*, 1999. 274(33): p. 22907-22910.
38. Efstratiadis, T. and D.W. Moss, Tartrate-resistant acid phosphatase of human lung: apparent identity with osteoclastic acid phosphatase. *Enzyme*, 1985. 33: p. 34-40.
39. Vohora, D. and B. Parveen, Tartrate-Resistant Acid Phosphatase as a Biomarker of Bone Remodeling, in *Biomarkers in Bone Disease*, V.B. Patel and V.R. Preedy, Editors.

2017, Springer Netherlands: Dordrecht. p. 421-442.

40. Halleen, J.M., et al., Tartrate-resistant acid phosphatase 5b: a novel serum marker of bone resorption. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2000. 15(7): p. 1337-1345.
41. Vääräniemi, J., et al., Intracellular machinery for matrix degradation in bone-resorbing osteoclasts. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2004. 19(9): p. 1432-1440.
42. Halleen, J.M., et al., Tartrate-resistant acid phosphatase 5b (TRACP 5b) as a marker of bone resorption. *Clinical laboratory*, 2006. 52(9-10): p. 499-510.
43. Ljusberg, J., et al., Proteolytic excision of a repressive loop domain in tartrate-resistant acid phosphatase by cathepsin K in osteoclasts. *Journal of Biological Chemistry*, 2005. 280(31): p. 28370-28381.
44. Halling Linder, C., et al., Bone Alkaline Phosphatase and Tartrate-Resistant Acid Phosphatase: Potential Co-regulators of Bone Mineralization. *Calcified Tissue International*, 2017. 101(1): p. 92-101.
45. Ek-Rylander, B., et al., Dephosphorylation of osteopontin and bone sialoprotein by osteoclastic tartrate-resistant acid phosphatase. Modulation of osteoclast adhesion in vitro. *Journal of Biological Chemistry*, 1994. 269(21): p. 14853-14856.
46. Kaija, H., et al., Phosphatase and oxygen radical-generating activities of mammalian purple acid phosphatase are functionally independent. *Biochemical and biophysical research communications*, 2002. 292(1): p. 128-132.
47. Figueira, L., Fluorescence-based staining for tartrate-resistant acidic phosphatase (TRAP) in osteoclasts combined with other fluorescent dyes and protocols. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 2004. 52(3): p. 411-414.
48. Prause, M., et al., Pantoprazole Decreases Cell Viability and Function of Human Osteoclasts In Vitro. *Mediators of Inflammation*, 2015. 2015: p. 8.
49. Lacey, D.L., et al., Bench to bedside: elucidation of the OPG-RANK-RANKL pathway and the development of denosumab. *Nat Rev Drug Discov*, 2012. 11(5): p. 401-19.
50. Kostenuik, P.J., et al., Denosumab, a fully human monoclonal antibody to RANKL, inhibits bone resorption and increases BMD in knock-in mice that express chimeric (murine/human) RANKL. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2009. 24(2): p. 182-195.
51. Tsourdi, E., et al., Denosumab for bone diseases: translating bone biology into targeted therapy. *European journal of endocrinology*, 2011. 165(6): p. 833-840.
52. Dempster, D.W., et al., Role of RANK ligand and denosumab, a targeted RANK ligand inhibitor, in bone health and osteoporosis: a review of preclinical and clinical data.

Clinical therapeutics, 2012. 34(3): p. 521-536.

53. Branstetter, D.G., et al., Denosumab induces tumor reduction and bone formation in patients with giant-cell tumor of bone. *Clinical Cancer Research*, 2012. 18(16): p. 4415-4424.
54. Brown-Glaberman, U. and A.T. Stopeck, Role of denosumab in the management of skeletal complications in patients with bone metastases from solid tumors. *Biologics: targets & therapy*, 2012. 6: p. 89.
55. Cummings, S.R., et al., Denosumab for prevention of fractures in postmenopausal women with osteoporosis. *New England Journal of Medicine*, 2009. 361(8): p. 756-765.
56. Smith, M.R., et al., Denosumab in men receiving androgen-deprivation therapy for prostate cancer. *New England Journal of Medicine*, 2009. 361(8): p. 745-755.
57. Narayan, P., Denosumab: A compressive review. *South Asia J Cancer*, 2013. 2: p. 272-7.
58. McClung, M.R., et al., Denosumab in postmenopausal women with low bone mineral density. *New England Journal of Medicine*, 2006. 354(8): p. 821-831.
59. Brown, J.P., et al., Comparison of the effect of denosumab and alendronate on BMD and biochemical markers of bone turnover in postmenopausal women with low bone mass: a randomized, blinded, phase 3 trial. *Journal of bone and mineral research*, 2009. 24(1): p. 153-161.
60. Faienza, M.F., et al., Monoclonal antibodies for treating osteoporosis. *Expert Opin Biol Ther*, 2018. 18(2): p. 149-157.
61. Slopian, R., et al., Denosumab - a new medication in the treatment of postmenopausal osteoporosis. *Prz Menopauzalny*, 2017. 16(3): p. 75-78.
62. Okada, N., et al., Identification of the risk factors associated with hypocalcemia induced by denosumab. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2013. 36(10): p. 1622-1626.
63. Pavone, V., et al., Pharmacological Therapy of Osteoporosis: A Systematic Current Review of Literature. *Frontiers in Pharmacology*, 2017. 8: p. 803.
64. Saad, F., et al., Incidence, risk factors, and outcomes of osteonecrosis of the jaw: integrated analysis from three blinded active-controlled phase III trials in cancer patients with bone metastases. *Annals of Oncology*, 2011. 23(5): p. 1341-1347.
65. Taylor, K., L. Middlefell, and K. Mizen, Osteonecrosis of the jaws induced by anti-RANK ligand therapy. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 2010. 48(3): p. 221-223.

66. Bone, H.G., et al., 10 years of denosumab treatment in postmenopausal women with osteoporosis: results from the phase 3 randomised FREEDOM trial and open-label extension. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*, 2017. 5(7): p. 513-523.
67. Larsson Wexell, C., A. Kjellman, and O. Akre, [Osteonecrosis of the jaws (ONJ) associated to antiresorptive treatment]. *Lakartidningen*, 2018. 115.
68. Harris, W., et al., Extensive localized bone resorption in the femur following total hip replacement. *JBJS*, 1976. 58(5): p. 612-618.
69. Lenzen-Schulte, M., Orthopädenkongress: Wenn die Prothese nicht mehr hält. *Dtsch Arztebl*, 2017. 114(48): p. A-2281 / B-1911 / C-1865.
70. Haijje, L., et al., Implant Survival and Complication Profiles of Endoprostheses for Treating Tumor Around the Knee in Adults: A Systematic Review of the Literature Over the Past 30 Years. *J Arthroplasty*, 2018. 33(4): p. 1275-1287.e3.
71. Harris, W.H., Osteolysis and particle disease in hip replacement: a review. *Acta Orthopaedica Scandinavica*, 1994. 65(1): p. 113-123.
72. Amirhosseini, M., et al., Mechanical instability and titanium particles induce similar transcriptomic changes in a rat model for periprosthetic osteolysis and aseptic loosening. *Bone Reports*, 2017. 7: p. 17-25.
73. Aspenberg, P. and H. van der Vis, Fluid pressure may cause periprosthetic osteolysis: Particles are not the only thing. *Acta Orthopaedica Scandinavica*, 1998. 69(1): p. 1-4.
74. Jacobi-Gresser, E., K. Huesker, and S. Schütt, Genetic and immunological markers predict titanium implant failure: a retrospective study. *International journal of oral and maxillofacial surgery*, 2013. 42(4): p. 537-543.
75. González, O., R.L. Smith, and S.B. Goodman, Effect of size, concentration, surface area, and volume of polymethylmethacrylate particles on human macrophages in vitro. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 1996. 30(4): p. 463-473.
76. Takagi, M., et al., Extracellular matrix metalloproteinases around loose total hip prostheses. *Acta Orthopaedica Scandinavica*, 1994. 65(3): p. 281-286.
77. Eemeli, J., et al., Characterization of macrophage polarizing cytokines in the aseptic loosening of total hip replacements. *Journal of Orthopaedic Research*, 2014. 32(9): p. 1241-1246.
78. Dapunt, U., et al., Osteoclast Generation and Cytokine Profile at Prosthetic Interfaces: A Study on Tissue of Patients with Aseptic Loosening or Implant-Associated Infections. *European Journal of Inflammation*, 2014. 12(1): p. 147-159.

79. Hallab, N.J. and J.J. Jacobs, Chemokines Associated with Pathologic Responses to Orthopedic Implant Debris. *Frontiers in Endocrinology*, 2017. 8(5).
80. Haynes, D., et al., The osteoclastogenic molecules RANKL and RANK are associated with periprosthetic osteolysis. *Bone & Joint Journal*, 2001. 83(6): p. 902-911.
81. Kapasa, E.R., et al., The Effect of RANKL/OPG Balance on Reducing Implant Complications. *Journal of functional biomaterials*, 2017. 8(4): p. 42.
82. Drees, P., et al., Mechanisms of disease: Molecular insights into aseptic loosening of orthopedic implants. *Nature Reviews. Rheumatology*, 2007. 3(3): p. 165.
83. Ong, J.L., D.L. Carnes, and K. Bessho, Evaluation of titanium plasma-sprayed and plasma-sprayed hydroxyapatite implants in vivo. *Biomaterials*, 2004. 25(19): p. 4601-4606.
84. Ivanoff, C.J., et al., Histologic evaluation of the bone integration of TiO₂ blasted and turned titanium microimplants in humans. *Clinical oral implants research*, 2001. 12(2): p. 128-134.
85. Wong, M., et al., Effect of surface topology on the osseointegration of implant materials in trabecular bone. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 1995. 29(12): p. 1567-1575.
86. LeGeros, R.Z., Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. *Clinical orthopaedics and related research*, 2002. 395: p. 81-98.
87. Schliephake, H., et al., Effect of immobilized bone morphogenic protein 2 coating of titanium implants on peri-implant bone formation. *Clinical Oral Implants Research*, 2005. 16(5).
88. Michael, J., et al., Surface modification of titanium-based alloys with bioactive molecules using electrochemically fixed nucleic acids. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 2007. 80(1): p. 146-155.
89. Ong, S. and G. Taylor, Doxycycline inhibits bone resorption by human interface membrane cells from aseptically loose hip replacements. *Bone & Joint Journal*, 2003. 85(3): p. 456-461.
90. Childs, L.M., et al., Effect of Anti-Tumor Necrosis Factor- α Gene Therapy on Wear Debris-Induced Osteolysis. *JBJS*, 2001. 83(12): p. 1789-1797.
91. Millett, P.J., M.J. Allen, and M.P. Bostrom, Effects of alendronate on particle-induced osteolysis in a rat model. *JBJS*, 2002. 84(2): p. 236-249.
92. Tsutsumi, R., et al., Differential effects of biologic versus bisphosphonate inhibition of wear debris-induced osteolysis assessed by longitudinal micro-CT. *Journal of Orthopaedic*

dic Research, 2008. 26(10): p. 1340-1346.

93. Bhandari, M., et al., Effect of bisphosphonates on periprosthetic bone mineral density after total joint arthroplasty: a meta-analysis. *JBJS*, 2005. 87(2): p. 293-301.

94. Ulrich-Vinther, M., et al., Recombinant adeno-associated virus-mediated osteoprotegerin gene therapy inhibits wear debris-induced osteolysis. *JBJS*, 2002. 84(8): p. 1405-1412.

95. Aspenberg, P., et al., Targeting RANKL for reduction of bone loss around unstable implants: OPG-Fc compared to alendronate in a model for mechanically induced loosening. *Bone*, 2011. 48(2): p. 225-230.

96. Makihira, S., et al., Immobilized-OPG-Fc on a titanium surface inhibits RANKL-dependent osteoclast differentiation in vitro. *J Mater Sci Mater Med*, 2010. 21(2): p. 647-53.

97. Sköldenberg, O., et al., Denosumab for treating periprosthetic osteolysis; study protocol for a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *BMC musculoskeletal disorders*, 2016. 17(1): p. 174.

98. Beutner, R., et al., Immobilization of oligonucleotides on titanium based materials by partial incorporation in anodic oxide layers. *Biomaterials*, 2009. 30(14): p. 2774-2781.

99. Beutner, R., et al., Biological nano-functionalization of titanium-based biomaterial surfaces: a flexible toolbox. *J R Soc Interface*, 2010. 7 Suppl 1: p. S93-s105.

100. Michael, J., et al., Oligonucleotide– RGD Peptide Conjugates for Surface Modification of Titanium Implants and Improvement of Osteoblast Adhesion. *Bioconjugate chemistry*, 2009. 20(4): p. 710-718.

101. Husheem, M., et al., Characterization of circulating human osteoclast progenitors: development of in vitro resorption assay. *Calcified tissue international*, 2005. 76(3): p. 222-230.

102. Cadosch, D., et al., Titanium IV ions induced human osteoclast differentiation and enhanced bone resorption in vitro. *Journal of biomedical materials research Part A*, 2009. 91(1): p. 29-36.

103. Kurtz, S., et al., Projections of Primary and Revision Hip and Knee Arthroplasty in the United States from 2005 to 2030. *The Journal of Bone & Joint Surgery*, 2007. 89(4): p. 780-785.

104. Abu-Amer, Y., I. Darwech, and J.C. Clohisy, Aseptic loosening of total joint replacements: mechanisms underlying osteolysis and potential therapies. *Arthritis research & therapy*, 2007. 9(1): p. S6.

105. Sundfeldt, M., et al., Aseptic loosening, not only a question of wear: a review of different theories. *Acta Orthop*, 2006. 77(2): p. 177-97.
106. Von Metzler, I., et al., Bortezomib inhibits human osteoclastogenesis. *Leukemia* (08876924), 2007. 21(9).
107. Granchi, D., et al., Molecular basis of osteoclastogenesis induced by osteoblasts exposed to wear particles. *Biomaterials*, 2005. 26(15): p. 2371-2379.
108. Ketcham, C., et al., Molecular cloning of the type 5, iron-containing, tartrate-resistant acid phosphatase from human placenta. *Journal of Biological Chemistry*, 1989. 264(1): p. 557-563.
109. Diepenhorst, N.A., et al., High throughput, quantitative analysis of human osteoclast differentiation and activity. *Analytical Biochemistry*, 2017. 519: p. 51-56.
110. Perez-Amodio, S., W. Beertsen, and V. Everts, (Pre-) Osteoclasts Induce Retraction of Osteoblasts Before Their Fusion to Osteoclasts. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2004. 19(10): p. 1722-1731.
111. Hartmann, E.S., et al., Factors regulating bone remodeling processes in aseptic implant loosening. *Journal of Orthopaedic Research*, 2016: p. n/a-n/a.
112. Nagoya, S., et al., Restoration of proximal periprosthetic bone loss by denosumab in cementless total hip arthroplasty. *Eur J Orthop Surg Traumatol*, 2018.
113. Wengler, A., U. Nimptsch, and T. Mansky, Hüft- und Kniegelenkersatz in Deutschland und den USA. *Dtsch Arztebl*, 2014. 111: p. 407-416.
114. Schliephake, H., et al., Effect of modifications of dual acid-etched implant surfaces on peri-implant bone formation. Part I: organic coatings. *Clinical oral implants research*, 2009. 20(1): p. 31-37.
115. Porté-Durrieu, M.-C., et al., Cyclo-(DfKRG) peptide grafting onto Ti-6Al-4V: physical characterization and interest towards human osteoprogenitor cells adhesion. *Biomaterials*, 2004. 25(19): p. 4837-4846.

8. Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei meiner Doktormutter und Betreuerin Frau Prof. Dr. med. Susanne Mayer für die Themenvergabe, die FöFoLe-Doktorandenstelle in ihrer Arbeitsgruppe, die lehrreiche Zeit in ihrem Labor und besonders für ihre herzliche Betreuung bedanken.

Vielen Dank auch Bärbel Schmitt, Julia Redeker, Miriam Köhler und Eliza Hartmann für die tolle Unterstützung und Lehre der Methodik. Danke auch unseren Kooperationspartnern Dr. rer. nat. Jan Michael und Judith Reichert für die wunderbare Zusammenarbeit, danke an Marina Unger, Gisela Dachs und Lars Schliack für die methodische Unterstützung.

Allerherzlichst möchte ich mich schließlich bei meiner Familie bedanken. Bei meinen Eltern, meinem Ehemann Alexander und meinen Brüdern Dominikus und Tobias für ihre unbegrenzte, bedingungslose Unterstützung, Motivation, ihr immerwährendes begeistertes Interesse und ihre liebevolle Begleitung meines Lebenswegs.