

**Medizinische Fakultät  
der  
Universität Duisburg-Essen**

Aus der Klinik für Orthopädie

**Untersuchungen zur Expression ausgewählter Biomarker  
der periprothetischen Osteolyse an makrophagenähnlichen Zellen  
bei Behandlung mit dem Neuropeptid CGRP**

Inaugural – Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften in der Medizin  
durch die Medizinische Fakultät  
der Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von  
Heidrun Jablonski  
aus Essen

2013

- Dekan:** Herr Univ.-Prof. Dr. med. J. Buer
- 1. Gutachter:** Herr Priv.-Doz. Dr. med. Ch. Wedemeyer
- 2. Gutachter:** Herr Prof. Dr. rer. nat. M. Wiemann
- 3. Gutachter:** Herr Univ.-Prof. Dr. med. H.P. Jennissen

**Tag der mündlichen Prüfung:** 14. Mai 2014

## Publikationen / Kongressbeiträge

- **Jablonski H**, Kauther MD, Bachmann HS, Jäger M, Wedemeyer C:  
Calcitonin Gene-Related Peptide modulates the production of pro-inflammatory cytokines associated with periprosthetic osteolysis by THP-1 macrophage-like cells.  
*Neuroimmunomodulation* (Epub 05/2014).
- **Jablonski H**, Kauther M, Rost S, Schlepper R, Bachmann H, Jäger M, Wedemeyer C:  
Der Einfluss von Calcitonin und CGRP auf die Expression von Biomarkern der Partikel-induzierten Osteolyse – Untersuchungen am Makrophagen-Modell.  
Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie (DKOU), Messe Süd, Berlin, 22.-25. Oktober 2013. Poster.
- **Jablonski H**, Kauther MD, Bachmann HS, Jäger M, Wedemeyer C:  
Calcitonin Gene-Related Peptide moduliert die Expression osteolyseassoziiierter proinflammatorischer Zytokine im Makrophagenmodell.  
12. Forschungstag der Medizinischen Fakultät, Universität Duisburg-Essen, Essen, 22. November 2013. Poster.
- **Jablonski H**, Kauther MD, Bachmann HS, Jäger M, Wedemeyer C:  
Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP) moduliert die Expression Osteolyse-assoziiierter pro-inflammatorischer Zytokine im Makrophagen-Modell.  
180. Jahrestagung der Vereinigung Niederrheinisch-Westfälischer Chirurgen, Heilig Geist-Krankenhaus, Köln, 28.-29. November 2013. Vortrag.
- **Jablonski H**, Kauther MD, Bachmann HS, Jäger M, Wedemeyer C:  
Die pro-inflammatorische Zytokinproduktion in Makrophagen bei periprosthetischer Osteolyse wird im Zellkulturmodell durch das Neuropeptid CGRP reguliert.  
7. Kongress für Endoprothetik, Langenbeck-Virchow-Haus, Berlin, 13.-15. Februar 2014. Poster.
- **Jablonski H**, Kauther MD, Polan C, Bachmann HS, Jäger M, Wedemeyer C:  
Das Neuropeptid CGRP inhibiert die osteolyseassoziierte proinflammatorische Zytokinproduktion in THP-1 makrophagenähnlichen Zellen.  
62. Jahrestagung der Vereinigung Süddeutscher Orthopäden und Unfallchirurgen e.V. (VSOU), Kongresshaus, Baden-Baden, 01.-03. Mai 2014. ePoster.

*Der Zweifel ist der Beginn der Wissenschaft.*

*Wer nichts anzweifelt, prüft nichts.*

*Wer nichts prüft, entdeckt nichts.*

*Wer nichts entdeckt, ist blind und bleibt blind.*

*Teilhard de Chardin (1881 – 1955)*

# Inhaltsverzeichnis

<b>I. <u>EINLEITUNG</u></b> .....	<b>- 9 -</b>
<b>I.1 KNOCHENSTOFFWECHSEL</b> .....	<b>- 9 -</b>
<b>I.2 REGULATION DES KNOCHENSTOFFWECHSELS</b> .....	<b>- 10 -</b>
<b>I.3 „PARTIKELKRANKHEIT“ - DAS PRINZIP DER PERIPROTHETISCHEN OSTEOLYSE</b> .....	<b>- 13 -</b>
<b>I.4 DIE ZENTRALE ROLLE VON GEWEBEMAKROPHAGEN IN DER ASEPTISCHEN PROTHESENLOCKERUNG</b> .....	<b>- 14 -</b>
<b>I.5 ANTIRESORPTIVE THERAPIEANSÄTZE BEI ASEPTISCHER LOCKERUNG</b> .....	<b>- 17 -</b>
<b>I.6 DAS NEUROPEPTID „CALCITONIN GENE-RELATED PEPTIDE“ UND SEINE ROLLE IN DER PERIPROTHETISCHEN OSTEOLYSE</b> .....	<b>- 18 -</b>
<b>I.7 ZIEL DER ARBEIT</b> .....	<b>- 19 -</b>
<b>II. <u>MATERIAL &amp; METHODEN</u></b> .....	<b>- 21 -</b>
<b>II.1 MATERIALIEN</b> .....	<b>- 21 -</b>
II.1.1 GERÄTE.....	- 21 -
II.1.2 SOFTWARE .....	- 23 -
II.1.3 VERBRAUCHSMATERIALIEN .....	- 23 -
II.1.4 CHEMIKALIEN.....	- 25 -
II.1.5 REAGENZIENSYSTEME (KITS).....	- 26 -
II.1.6 ZELLEN .....	- 27 -
II.1.7 PARTIKEL.....	- 27 -
II.1.8 OLIGONUKLEOTIDE.....	- 28 -
II.1.9 ANTIKÖRPER.....	- 29 -
II.1.9.1 Primärantikörper.....	- 29 -
II.1.9.2 Sekundärantikörper.....	- 30 -
II.1.9.3 Fluorochromkonjugierte Antikörper.....	- 30 -
<b>II.2 METHODEN</b> .....	<b>- 31 -</b>
II.2.1 ZELLKULTUR .....	- 31 -
II.2.1.1 Auftauen und Einfrieren von THP-1 Zellen.....	- 31 -
II.2.1.2 Kultivierung von THP-1 Zellen.....	- 32 -
II.2.1.3 Zellzählung und Viabilitätstest.....	- 32 -
II.2.1.4 Differenzierung von THP-1 Monozyten zu makrophagenähnlichen Zellen.....	- 33 -

II.2.1.5	Phagozytostest .....	- 34 -
II.2.1.6	Inkubation von makrophagenähnlichen Zellen mit Partikeln, LPS und CGRP .....	- 34 -
II.2.1.7	Simultane Isolation von RNA und Protein .....	- 35 -
II.2.2	MOLEKULARBIOLOGISCHE STANDARDMETHODEN .....	- 36 -
II.2.2.1	Photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration .....	- 36 -
II.2.2.2	Quantitative RT-Polymerasekettenreaktion .....	- 37 -
II.2.2.2.1	Reverse Transkription (cDNA-Synthese) .....	- 37 -
II.2.2.2.2	Quantitative PCR .....	- 38 -
II.2.3	PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN .....	- 40 -
II.2.3.1	Bestimmung der Proteinkonzentration .....	- 40 -
II.2.3.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese .....	- 41 -
II.2.3.3	Western Blot .....	- 42 -
II.2.3.4	Enzyme-linked Immunosorbent-Assay .....	- 44 -
II.2.3.5	Zytokin-Assay .....	- 45 -
II.2.3.6	Immunfluoreszenzfärbung .....	- 46 -
II.2.4	STATISTISCHE METHODEN .....	- 47 -
<b>III.</b>	<b><u>ERGEBNISSE</u></b> .....	<b>- 49 -</b>
<b>III.1</b>	<b>DIE STIMULATION VON THP-1 MONOZYTEN MIT PHORBOLESTERN FÜHRT ZU IHRER DIFFERENZIERUNG IN MAKROPHAGENÄHNLICHE ZELLEN .....</b>	<b>- 49 -</b>
<b>III.2</b>	<b>THP-1 MAKROPHAGENÄHNLICHE ZELLEN BESITZEN REZEPTOREN FÜR CGRP .....</b>	<b>- 50 -</b>
<b>III.3</b>	<b>UHMWPE-PARTIKEL UND LPS FÖRDERN DIE PRODUKTION VON RANK(L) IN THP-1 MAKROPHAGENÄHNLICHEN ZELLEN NICHT .....</b>	<b>- 53 -</b>
<b>III.4</b>	<b>UHMWPE-PARTIKEL UND LPS INDUZIEREN EINE PROINFLAMMATORISCHE ZYTOKINPRODUKTION DURCH THP-1 MAKROPHAGENÄHNLICHE ZELLEN .....</b>	<b>- 59 -</b>
III.4.1	PARTIKEL- UND LPS-INDUZIERTER <i>TNF-<math>\alpha</math></i> MRNA-EXPRESSION .....	- 59 -
III.4.2	PARTIKEL- UND LPS-INDUZIERTER TNF- $\alpha$ SEKRETION .....	- 59 -
III.4.3	PARTIKEL- UND LPS-INDUZIERTER IL-1 $\beta$ SEKRETION .....	- 61 -
III.4.4	PARTIKEL- UND LPS-INDUZIERTER IL-6 SEKRETION .....	- 63 -
III.4.5	PARTIKEL- UND LPS-INDUZIERTER IL-10 SEKRETION .....	- 63 -
<b>III.5</b>	<b>DAS NEUROPEPTID CGRP MODULIERT DIE PRODUKTION OSTEOLYSEASSOZIIERTER ZYTOKINE IN THP-1 MAKROPHAGENÄHNLICHEN ZELLEN .....</b>	<b>- 64 -</b>
III.5.1	PARTIKEL- UND LPS-INDUZIERTER <i>TNF-<math>\alpha</math></i> EXPRESSION BEI CGRP-BEHANDLUNG .....	- 64 -
III.5.2	PARTIKEL- UND LPS-INDUZIERTER TNF- $\alpha$ SEKRETION BEI CGRP-BEHANDLUNG .....	- 66 -
III.5.3	PARTIKEL- UND LPS-INDUZIERTER IL-1 $\beta$ SEKRETION BEI CGRP-BEHANDLUNG .....	- 67 -
III.5.4	PARTIKEL- UND LPS-INDUZIERTER IL-6 SEKRETION BEI CGRP-BEHANDLUNG .....	- 69 -

<b>IV. <u>DISKUSSION</u></b> .....	<b>- 70 -</b>
<b>IV.1 MÖGLICHKEITEN UND GRENZEN DES THP-1 MAKROPHAGENMODELLS</b> .....	<b>- 70 -</b>
IV.1.1 DIFFERENZIERTER ZELLINIEN IM VERGLEICH ZU GEWEBEMAKROPHAGEN .....	- 70 -
IV.1.2 DIFFERENZIERUNG VON THP-1 MONOZYTEN MIT DEM PHORBOLESTER PMA.....	- 71 -
IV.1.3 ALTERNATIVE <i>IN VITRO</i> UND <i>IN VIVO</i> MODELLE DER PERIPROTHETISCHEN OSTEOLYSE.....	- 72 -
<b>IV.2 RANK(L) IST IN THP-1 MAKROPHAGENÄHNLICHEN ZELLEN OFFENBAR EIN UNGEEIGNETER OSTEOLYSEMARKER</b> .....	<b>- 73 -</b>
IV.2.1 UHMWPE-PARTIKEL UND LPS SIND NICHT IN DER LAGE, DIE <i>RANK(L)</i> MRNA- EXPRESSION IN THP-1 MAKROPHAGENÄHNLICHEN ZELLEN ZU STIMULIEREN .....	- 73 -
IV.2.2 DER SUPPRESSIVE EFFEKT VON UHMWPE-PARTIKELN AUF DIE RELATIVE <i>RANK</i> - EXPRESSION LÄSST SICH DURCH SUBKLINISCHE ENDOTOXINKONTAMINATIONEN ERKLÄREN ...	- 75 -
IV.2.3 RANK-PROTEIN IST IN THP-1 MAKROPHAGENÄHNLICHEN ZELLEN BEI STIMULATION MIT UHMWPE-PARTIKELN UND LPS EBENFALLS NICHT NACHWEISBAR.....	- 76 -
<b>IV.3 UHMWPE-PARTIKEL UND LPS INDUZIEREN IN THP-1 MAKROPHAGEN-ÄHNLICHEN ZELLEN EINE INFLAMMATORISCHE REAKTION</b> .....	<b>- 77 -</b>
IV.3.1 UHMWPE-ABRIEBPARTIKEL UND LPS FÜHREN ZU EINER KONZENTRATIONS- UND ZEITABHÄNGIGEN PRODUKTION PROINFLAMMATORISCHER ZYTOKINE.....	- 77 -
IV.3.2 DIE ERHÖHTE ZYTOKINSEKRETION BEI STIMULATION MIT UHMWPE-PARTIKELN LÄSST SICH EBENFALLS DURCH ENDOTOXINKONTAMINATIONEN ERKLÄREN .....	- 79 -
<b>IV.4 DAS NEUROPEPTID CGRP MODULIERT DIE INFLAMMATORISCHE REAKTION IN THP-1 MAKROPHAGENÄHNLICHEN ZELLEN</b> .....	<b>- 80 -</b>
IV.4.1 CGRP BEEINFLUSST DIE INFLAMMATORISCHE REAKTION THP-1 MAKROPHAGEN- ÄHNLICHER ZELLEN ÜBER SPEZIFISCHE REZEPTOREN.....	- 81 -
IV.4.2 CGRP BESITZT MÖGLICHERWEISE EINEN BIPHASISCHEN EFFEKT AUF DIE PRODUKTION PROINFLAMMATORISCHER ZYTOKINE.....	- 81 -
IV.4.3 CGRP HAT OFFENBAR KEINEN STIMULATORISCHEN EFFEKT AUF DIE SEKRETION ANTIINFLAMMATORISCHER ZYTOKINE .....	- 83 -
IV.4.4 LPS INDUZIERT IN THP-1 MAKROPHAGENÄHNLICHEN ZELLEN MÖGLICHERWEISE DIE INTRAZELLULÄRE PRODUKTION VON CGRP .....	- 84 -
<b>IV.5 AUSBLICK</b> .....	<b>- 85 -</b>
<b>V. <u>ZUSAMMENFASSUNG</u></b> .....	<b>- 88 -</b>
<b>VI. <u>LITERATURVERZEICHNIS</u></b> .....	<b>- 89 -</b>
<b>VII. <u>ANHANG</u></b> .....	<b>- 98 -</b>

<b>VII.1</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>- 98 -</b>
<b>VII.2</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS.....</b>	<b>- 98 -</b>
<b>VII.3</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>- 99 -</b>
<b>VII.4</b>	<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>- 104 -</b>
<b>VII.5</b>	<b>LEBENS LAUF.....</b>	<b>- 106 -</b>



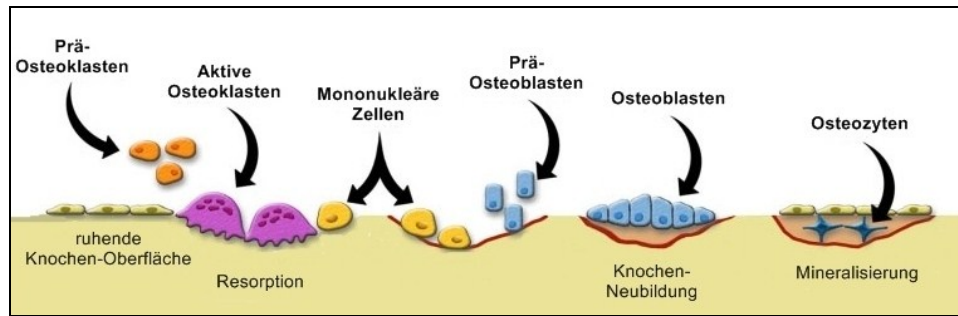
## **I. Einleitung**

Die Entwicklung von Endoprothesen für den vollständigen Gelenkersatz beim Menschen gilt als eine der bedeutendsten Errungenschaften der jüngeren Medizingeschichte. Die Implantation von Hüft- und Kniegelenksendoprothesen als Therapiemethode der Wahl bei medizinischen Indikationen wie Arthrose und Arthritis, Frakturen und Dysplasien führt zu einer deutlichen Verbesserung der Lebensqualität der betroffenen Patienten (Drees et al. 2007). Pro Jahr werden heute weltweit ca. 1,5 Millionen orthopädische Endoprothesen implantiert. Allein in Deutschland werden dabei jährlich etwa 238.000 Hüftgelenke und 172.000 Kniegelenke ersetzt. Mit diesen Zahlen liegt Deutschland in Bezug auf die Einwohnerzahl im internationalen Vergleich an der Weltspitze (OECD 2011). Aktuelle Prognosen prophezeien aufgrund des demografischen Wandels einen weiteren Anstieg des Bedarfs an endoprothetischen Operationen (Kurtz et al. 2011).

Die Standzeit von Totalendoprothesen (TEP) ist aufgrund vorzeitiger Prothesenlockerung oftmals zeitlich limitiert, sodass etwa 10% aller Implantate nach durchschnittlich 15 Jahren gewechselt werden müssen (Sundfeldt et al. 2006). Trotz der Bemühungen um die Entwicklung innovativer, stabiler und verschleißresistenter Implantate unter Verwendung neuartiger Biomaterialien ist und bleibt die vorzeitige Lockerung von Endoprothesen ohne Anzeichen von Infektion oder Trauma, die sogenannte „aseptische Prothesenlockerung“, mit etwa 70% bei Hüftprothesen und etwa 44% bei Knieimplantaten die häufigste Ursache für das TEP-Langzeitversagen (Sundfeldt et al. 2006). Der aseptischen Lockerung liegt eine Störung des Knochenstoffwechsels zugrunde, bei der eine erhöhte periimplantäre Knochenresorption zu der sogenannten „periprothetischen Osteolyse“ führt.

### **I.1 Knochenstoffwechsel**

Aufgrund des kontinuierlich bestehenden Bedarfs nach einer Anpassung des Skeletts an veränderte Belastungen und funktionelle Bedürfnisse befindet sich Knochengewebe in einem ständigen Wechsel zwischen Osteogenese (Knochenaufbau) und Osteolyse (Resorption, Knochenabbau). Diese stetige Remodellierung des Knochens dient einerseits dem Erhalt mechanischer Funktionen, die erlauben, dass der Knochen dem auf ihn einwirkenden Druck standhält, sowie andererseits der Erfüllung metabolischer Funktionen, insbesondere der Calcium-Homöostase (Wright et al. 2009).



**Abb. 1: Knochenremodellierung**

Knochengewebe befindet sich in einem kontinuierlichen Prozess der Remodellierung. Der stetige Wechsel zwischen Resorption (Knochenabbau) und Osteogenese (Knochenneubildung) wird durch zwei Typen von Knochenzellen, die substanzabbauenden Osteoklasten und die substanzaufbauenden Osteoblasten, sowie deren Vorläuferzellen gewährleistet. Die ruhende Knochenoberfläche wird zunächst durch aktive Osteoklasten, die aus spezifischen Vorläuferzellen (Prä-Osteoklasten) heranreifen, resorbiert. Die Ansiedelung mononukleärer Zellen an der Knochenoberfläche leitet den Wechsel in die eigentliche Phase der Knochenneubildung ein. In dieser Phase lagern sich Osteoblasten, die sich aus mesenchymalen Vorläuferzellen (Prä-Osteoblasten) entwickeln, an der Knochenoberfläche an. Diese sind im Rahmen des Prozesses der Mineralisierung für die Produktion der Knochenmatrix (u. a. Collagen, Calciumphosphat und Calciumcarbonat) zuständig. Dabei reifen die Osteoblasten zu nicht mehr teilungsfähigen Osteozyten heran, die in die Knochenmatrix eingeschlossen werden.

(Abbildung verändert nach <http://www.ns.umich.edu/Releases/2005/Feb05/img/bone.jpg>)

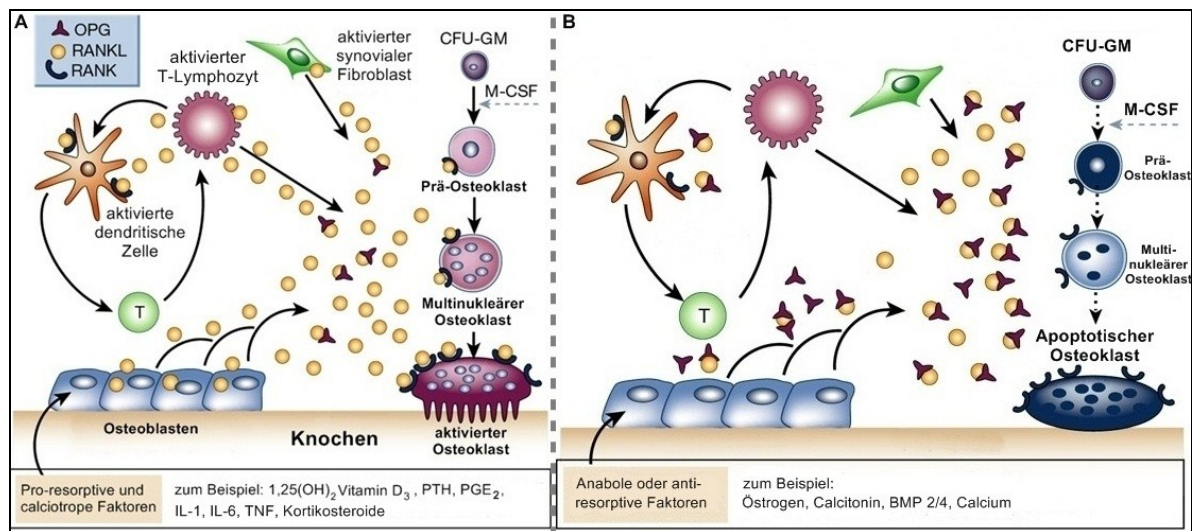
Die Knochenremodellierung wird durch zwei Typen von Knochenzellen, die substanzaufbauenden Osteoblasten und die substanzabbauenden Osteoklasten, gewährleistet. Osteoklasten sind für die Demineralisierung und Resorption alten, ermüdeten Knochens verantwortlich, während Osteoblasten zur Neubildung des Knochens und dessen Mineralisierung beitragen (Hadjidakis & Androulakis 2006; Abb. 1).

Jegliche Abweichungen vom regulären Prozess des Knochenstoffwechsels können zu pathologischen Veränderungen der Knochensubstanz, wie beispielsweise verminderter (Osteoporose) bzw. erhöhter (Osteopetrose) Knochenmasse oder einer abnormen Knochenarchitektur (Morbus Paget) führen.

## **I.2 Regulation des Knochenstoffwechsels**

Der Knochenstoffwechsel unterliegt komplexen regulatorischen Mechanismen. Ein aus drei Schlüsselproteinen – Rezeptoraktivator des Nukleären Faktors  $\kappa$ B (RANK), RANK-Ligand (RANKL) und Osteoprotegerin (OPG) – bestehendes molekulares System spielt eine zentrale Rolle in der Kontrolle der Knochenresorption (Khosla 2001). Die Expression dieser Proteine wurde in verschiedenen Knochenzellen nachgewiesen, wobei RANK auf der Oberfläche von Osteoklasten und deren monozytären Vorläuferzellen zu finden ist, während RANKL und OPG von Osteoblasten und deren mesenchymalen Vorläuferzellen

exprimiert werden. Die Bindung von RANKL an seinen spezifischen Rezeptor, RANK, führt über die Induktion intrazellulärer Signalkaskaden zu einer Differenzierung und Aktivierung von multinukleären Osteoklasten. Dies hat eine erhöhte Knochenresorption zur Folge. Die Bindung von OPG an RANKL hingegen inhibiert die RANK-Signalkaskade und hat einen inhibitorischen Effekt auf die Osteoklastogenese und somit auch auf den Knochenabbau (Khosla 2001; Boyle et al. 2003; Abb. 2).



**Abb. 2: Hormonelle Regulation des Knochenstoffwechsels**

- (A) Proresorptive und calciotrope Faktoren wie beispielsweise Calcitriol ( $1,25(\text{OH})_2$ Vitamin $\text{D}_3$ ), Kortikosteroide, PTH,  $\text{PGE}_2$ , IL-1, IL-6 und TNF- $\alpha$  begünstigen den Prozess der Knochenresorption. Osteoblasten, aktivierte T-Lymphozyten, synoviale Fibroblasten und Knochenmarkstromazellen produzieren RANKL. RANKL bindet nachfolgend an seinen spezifischen, membrangebundenen Rezeptor RANK auf der Oberfläche von Prä-Osteoklasten und multinukleären Osteoklasten. Dies löst eine intrazelluläre Signalkaskade aus, welche die Differenzierung, Aktivierung und Vitalität der Osteoklasten fördert. Aktivierte Osteoklasten führen letztendlich zu einem erhöhten Knochenabbau.
- (B) Antiresorptive Faktoren wie beispielsweise Östrogen, Calcitonin, Calcium und BMP 2/4 induzieren die Produktion von OPG durch Osteoblasten. OPG bindet und neutralisiert RANKL, was über den programmierten Zelltod (Apoptose) von Osteoklasten und eine Blockade der Osteoklastogenese zu einer verminderten Knochenresorption führt. Außerdem werden knochenanabole Mechanismen gefördert.

Abkürzungen: BMP, knochenmorphogenetisches Protein; CFU-GM, kolonienbildende Einheit für Granulozyten und Makrophagen; IL, Interleukin; M-CSF, Makrophagenkolonien-stimulierender Faktor; OPG, Osteoprotegerin; PTH, Parathormon;  $\text{PGE}_2$ , Prostaglandin- $\text{E}_2$ ; RANK, Rezeptoraktivator des Nukleären Faktors  $\kappa\text{B}$ ; RANKL, RANK Ligand; T, T-Zellen; TNF, Tumornekrosefaktor (Abbildung verändert nach Boyle et al. 2003)

Das RANK/RANKL/OPG-System zur Kontrolle des Knochenstoffwechsels unterliegt seinerseits der Kontrolle durch diverse osteotrope Hormone und Zytokine (Abb. 2). So ist bekannt, dass Glukokortikoide, Calcitriol, Parathormon (PTH), Prostaglandin- $\text{E}_2$  ( $\text{PGE}_2$ ) sowie die proinflammatorischen Zytokine Interleukin (IL)-1, IL-6 und Tumornekrosefaktor (TNF)- $\alpha$  das Verhältnis von OPG zu RANKL herabsetzen und somit die Knochenresorption begünstigen. Sie werden daher auch als „proresorptive“ Faktoren bezeichnet.

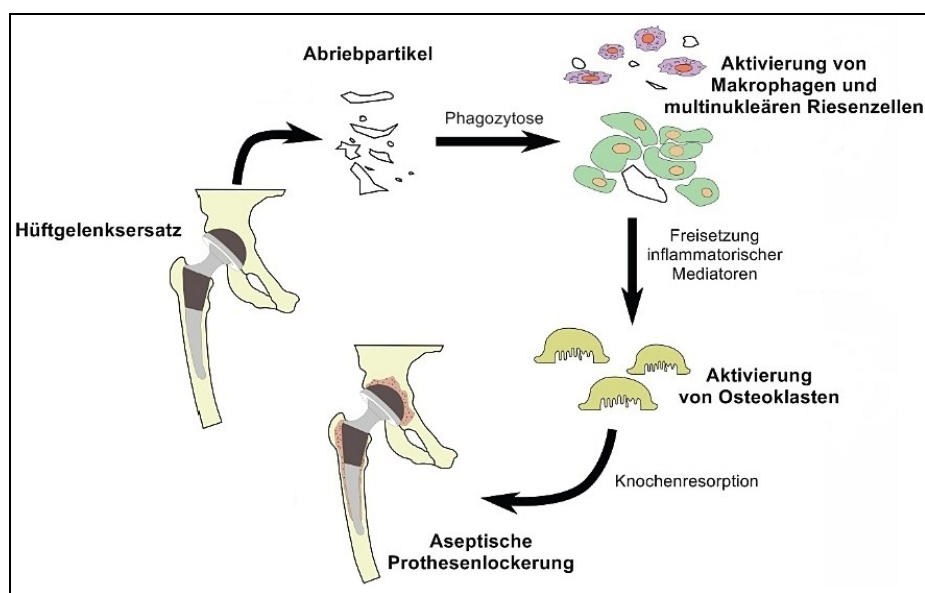
Östrogen, Calcium, Calcitonin und transformierender Wachstumsfaktor (TGF)- $\beta$  fungieren hingegen als sogenannte „antiresorptive“ Faktoren. Sie erhöhen das OPG/RANKL-Verhältnis, inhibieren dadurch den Knochenabbau und fördern somit indirekt auch die Neubildung des Knochens und werden daher auch als „anabole“ Faktoren bezeichnet (Rodan 1998; Boyle et al. 2003).

Interessanterweise bestehen zudem Hinweise auf eine Verbindung zwischen Knochenstoffwechsel und dem Nervensystem (Elefteriou 2005). Bereits Ende der 1960-er Jahre wurde eine starke Innervierung kortikalen Knochens (Cooper 1968) sowie des Knochenmarks (Calvo & Forteza-Vila 1969) entdeckt. Außerdem konnte die Expression funktioneller Rezeptoren für eine Reihe von Signalmolekülen des zentralen Nervensystems, z. B. Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP), Substanz P (SP), Neuropeptid Y (NPY) und vasoaktives intestinales Peptid (VIP), auf der Zelloberfläche von Osteoblasten und Osteoklasten nachgewiesen werden (Togari et al. 1997). In der periprothetischen Membran von Implantaten nach aseptischer Lockerung konnten zudem mit Hilfe immunhistochemischer Methoden sensorische Nervenfasern identifiziert werden, welche Neuropeptide wie beispielsweise CGRP, SP und Neurokinin A (NKA) exprimieren (Ahmed et al. 1998; Saxler et al. 2007). Dies führte zu der Annahme, dass das zentrale Nervensystem ebenfalls an der Kontrolle der Knochenremodellierung bzw. am Prozess der aseptischen Prothesenlockerung beteiligt sein könnte.

In diversen Studien konnte ein tatsächlicher Einfluss verschiedener Neuropeptide auf den Knochenstoffwechsel gezeigt werden. So begünstigt SP im Tiermodell offenbar die Knochenresorption bei periprothetischer Osteolyse (Wedemeyer et al. 2007b). VIP hingegen besitzt einen protektiven Effekt auf den Knochenabbau *in vivo*, der mit einer Inhibition der Produktion proinflammatorischer Zytokine sowie von RANKL einhergeht (Juarranz et al. 2005). Dies lässt darauf schließen, dass Neuropeptide einen direkten oder indirekten Einfluss auf das RANK/RANKL/OPG-System ausüben. Auch Calcitonin und CGRP fungieren offenbar als physiologische Regulatoren des Knochenstoffwechsels und zeigen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* osteoprotektive Eigenschaften. Calcitonin zum Beispiel ist in der Lage, die Bildung von Osteoklasten zu inhibieren (Cornish et al. 2001; Granholm et al. 2007) und somit die periprothetische Osteolyse zu reduzieren (Kauther et al. 2011). CGRP hingegen fungiert als Aktivator der Knochenneubildung (Schinke et al. 2004), indem es sowohl die Proliferation von Osteoblasten fördert (Villa et al. 2000) als auch deren Apoptose verhindert (Mrak et al. 2010).

### I.3 „Partikelkrankheit“ - Das Prinzip der periprothetischen Osteolyse

Eine der Hauptursachen für die aseptische Prothesenlockerung besteht in einer mangelnden Primärstabilität des Implantates, welche sowohl durch das Material und die Form der Prothese selbst sowie durch eine schlechte Verbindung des Implantates mit dem Knochen bedingt sein kann (Drees et al. 2007). Eine unzulängliche Geometrie der Gelenkpartner sowie Mikrobewegungen an der Grenzfläche zwischen Knochen und Implantat können die Produktion von Abriebpartikeln des Prothesenmaterials begünstigen (Karrholm et al. 1994). Auch der intraartikuläre hydrostatische Druck, d. h. der Flüssigkeitsdruck innerhalb des Gelenks, spielt eine mögliche Rolle in der Prothesenlockerung (Aspenberg & van der Vis 1998). Ein erhöhter intraartikulärer Druck kann unter anderem zu der Freisetzung von Synovialflüssigkeit aus subchondralen Zysten führen (Schmalzried et al. 1997), welche wiederum den Transport von Partikeln im periprothetischen Gewebe erleichtert. Da Abriebpartikel des Implantates über die Aktivierung von Makrophagen letztendlich für den Prozess der Prothesenlockerung verantwortlich sind, spricht man bei der periprothetischen Osteolyse auch von der sogenannten „Partikelkrankheit“ (Bauer 2002).



**Abb. 3: Aseptische Prothesenlockerung durch partikelinduzierte Osteolyse**

Nach totalendoprothetischem Hüftgelenksersatz kommt es durch zunehmenden Verschleiß insbesondere der Gleitpaarung des Implantates mit der Zeit zu einer Produktion von Abriebpartikeln. Diese Abriebpartikel werden von Makrophagen in der periprothetischen Membran phagozytiert. Dies führt zu einer Aktivierung der Makrophagen sowie von multinukleären Riesenzellen, wodurch die Freisetzung inflammatorischer Mediatoren (z. B. Zytokine) induziert wird. Diese Substanzen begünstigen wiederum die Aktivierung von knochenresorbierenden Osteoklasten. Der Knochenabbau in der direkten Umgebung des Implantates, die sogenannte „periprothetische Osteolyse“, führt schließlich zu einer Lockerung der Prothese. Im Falle einer Lockerung des Implantates ohne Anzeichen von Infektion oder Trauma spricht man dabei von „aseptischer Prothesenlockerung“. (Abbildung verändert nach Suñer Moreno 2013)

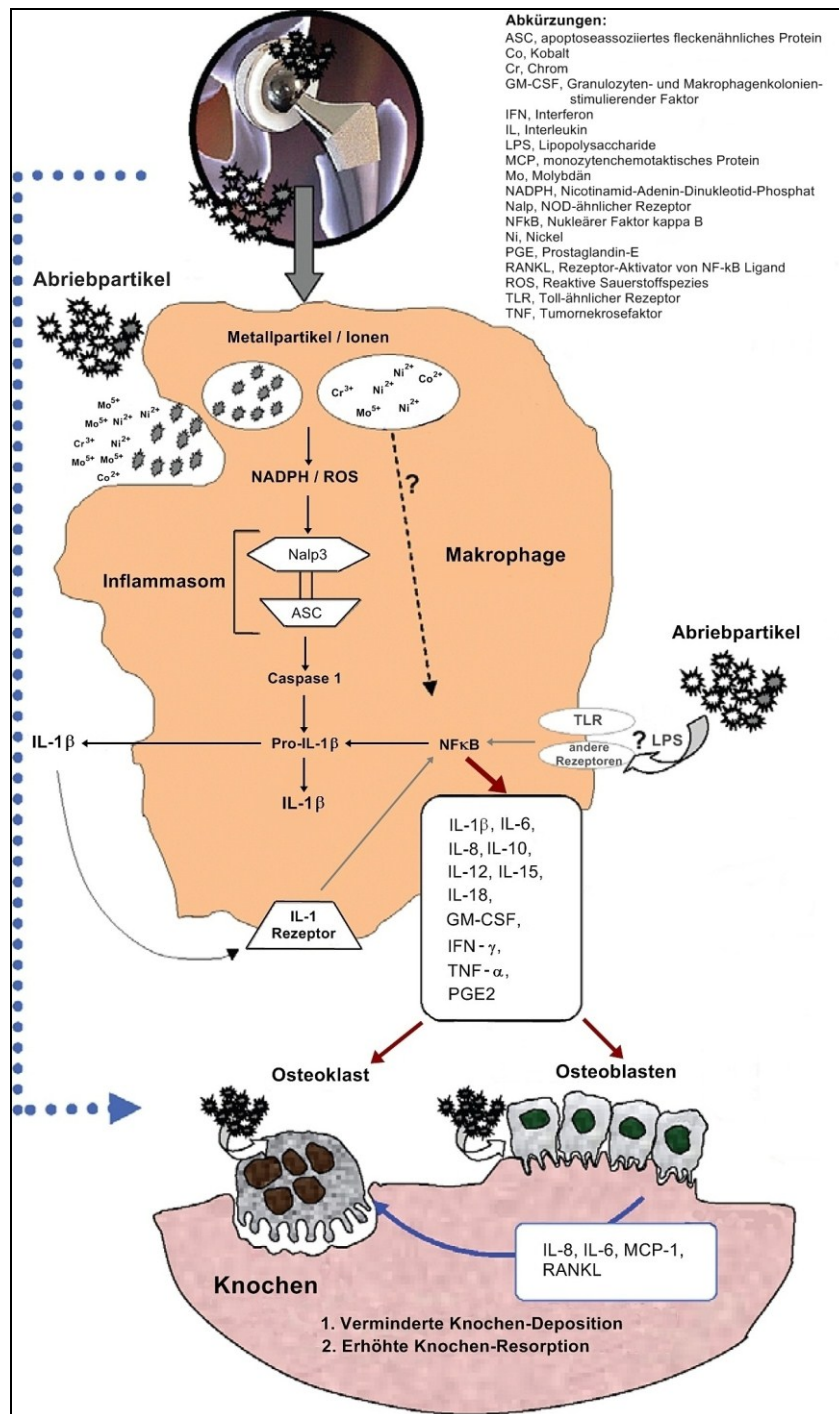
Trotz der Versuche, den Abrieb von Endoprothesen zu minimieren (Charnley 2005), ist bislang kein Implantatsystem frei von Abrieb (Bradford et al. 2004). Die entstehenden Partikel können nach konventionellen Kriterien klassifiziert werden (McKellop et al. 1995): Zusammensetzung, Zahl, Form und Größe können das Ausmaß der Reaktion auf die jeweiligen Abriebpartikel beeinflussen (Shanbhag et al. 1994). Generell können Partikel von sogenannter „kritischer Größe“ (etwa 0,3 - 10 µm) von Makrophagen phagozytiert werden und den Prozess der periprothetischen Osteolyse einleiten (Green et al. 1998). Obwohl prinzipiell die Abriebpartikel aller verwendeten Implantatmaterialien, z. B. Polyethylen, Titan, Zement, Aluminium und Keramik, biologisch aktiv sind, besitzen Polyethylenpartikel in der Größenordnung von 0,21 - 7,2 µm die stärkste osteolytische Potenz (Matthews et al. 2000; Atkins et al. 2011).

In jedem Fall produzieren Abriebpartikel-aktivierte Makrophagen hohe Konzentrationen an proinflammatorischen Zytokinen, welche die Differenzierung von mononukleären Vorläuferzellen in multinukleäre Osteoklasten induzieren. Aktivierte Osteoklasten sezernieren schließlich Säure und das proteolytische Enzym Cathepsin K, wodurch sich Resorptionslakunen an der Knochenoberfläche ausbilden. Die erhöhte periimplantäre Knochenresorption führt letztendlich zu einer Lockerung der Endoprothese (Drees et al. 2007; Abb. 3).

#### **I.4 Die zentrale Rolle von Gewebemakrophagen in der aseptischen Prothesenlockerung**

Die periprothetische Osteolyse ist die Folge von drei miteinander verknüpften Ereignissen: Inflammation, Osteoklastogenese und Knochenresorption. Die beteiligten Zelltypen sind hauptsächlich Makrophagen und Osteoklasten. An der Kontaktfläche zwischen Prothese und Knochen bildet sich eine periprothetische Membran, die charakteristisch für die Prothesenlockerung ist (Goldring et al. 1983).

Die periprothetische Membran kann nach histopathologischen Kriterien klassifiziert werden (Morawietz et al. 2006). Die sogenannte abriebpartikelinduzierte Membran (Typ I) besteht hauptsächlich aus Makrophagen, multinukleären Riesenzellen und prothesenlockerungsspezifischen Fibroblasten (PLF). Diese Zellen sind an der Entstehung der periprothetischen Osteolyse über die Phagozytose von Abriebpartikeln aktiv beteiligt.



**Abb. 4: Makrophagen in der abriebpartikelvermittelten periprotetischen Osteolyse**

Der periprotetischen Osteolyse liegt eine durch Abriebpartikel hervorgerufene Entzündungsreaktion zugrunde, welche hauptsächlich durch Makrophagen gesteuert wird. Dabei phagozytieren Makrophagen zunächst die vom Implantatmaterial stammenden Abriebpartikel. Dies führt zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB und nachfolgend zu der Sekretion einer Reihe proinflammatorischer Zytokine, z. B. IL-1β, IL-6, IL-8, PGE<sub>2</sub>, GM-CSF und TNF-α, welche die Zellen des Knochenstoffwechsels beeinflussen. Osteoblasten werden zu einer erhöhten RANKL-Produktion angeregt. Durch die Bindung von RANKL an seinen Rezeptor, RANK, auf der Zelloberfläche von Osteoklasten und deren mononukleären Vorläuferzellen wird deren Aktivierung bzw. Differenzierung zu multinukleären Osteoklasten eingeleitet. Der reguläre Knochenstoffwechsel wird aus dem Gleichgewicht gebracht. Durch eine erhöhte Knochenresorption ausgehend von den substanzabbauenden Osteoklasten bei verminderter Knochen-deposition durch die substanzaufbauenden Osteoblasten kommt es zu periimplantären Osteolysen und somit zur Prothesenlockerung. (Abbildung verändert nach Hallab & Jacobs 2009)

Multinukleäre Riesenzellen nehmen Partikel mit einer Größe von bis zu 5 µm auf, während Makrophagen Abriebpartikel bis zu einer Größe von 2 µm phagozytieren. Dies löst eine inflammatorische Reaktion aus, welche zentral durch aktivierte Makrophagen gesteuert wird. Über intrazelluläre Signalkaskaden werden diese zu der Produktion proinflammatorischer und proresorptiver Zytokine angeregt (Abb. 4) (Hallab & Jacobs 2009).

Insbesondere IL-1, IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$  und Makrophagenkolonien-stimulierender Faktor (M-CSF) stellen Schlüsselfaktoren in der Regulation von Osteoklastogenese und Knochenresorption dar (Neale et al. 1999; Kobayashi et al. 2000; Tanabe et al. 2005). Einige Studien konnten zeigen, dass sogar die Bindung von Partikeln an spezifische Rezeptoren an der Zelloberfläche ausreicht, um die Freisetzung von TNF- $\alpha$  und IL-1 auszulösen (Ingham & Fisher 2005). Auch die Beteiligung von Endotoxinen an der Initiation einer inflammatorischen Reaktion in periprothetischen Makrophagen wird nicht ausgeschlossen. Adhärente Endotoxine, wie beispielsweise Lipopolysaccharide (LPS), sind auf vielen Implantatmaterialien und deren Abriebpartikeln zu finden und tragen zu vielen biologischen Reaktionen bei (Daniels et al. 2000; Bi et al. 2001; Cho et al. 2002; Hoenders et al. 2008). Allerdings scheinen Abriebpartikel über Phagozytose einerseits und LPS über die Aktivierung spezifischer Rezeptoren andererseits jeweils unterschiedliche molekulare Signalwege in Makrophagen zu aktivieren (Schwab et al. 2006). In Abhängigkeit von der Stärke der bakteriellen Belastung kann dies somit auch zu einem abweichenden Krankheitsbild, der septischen Osteolyse, führen (Schaumburger et al. 2012).

Die von den Makrophagen freigesetzten Zytokine nehmen über Veränderungen des RANKL/OPG-Verhältnisses Einfluss auf das Gleichgewicht zwischen Knochenaufbau und Knochenresorption (Takayanagi 2005). Osteoblasten werden zu einer erhöhten Produktion von RANKL angeregt. Die Bindung von RANKL an den osteoklastenspezifischen Rezeptor RANK führt über die Aktivierung des TNF-rezeptorassoziierten Faktors (TRAF)6 und des nukleären Faktors kappa B (NF $\kappa$ B) zu einer erhöhten Expression eines weiteren Transkriptionsfaktors, zytoplasmatischer nukleärer Faktor aktivierter T-Zellen (NFATc)1. Hierbei handelt es sich um den molekularen Schlüsselregulator der Osteoklastogenese (Crabtree & Olson 2002), welcher die Differenzierung von Osteoklasten aus Vorläuferzellen des mononukleär-phagozytären Systems einleitet. In der Folge kommt es zu einer erhöhten Knochenresorption bei verminderter Knochendeposition und somit zu periimplantären Osteolysen (Hallab & Jacobs 2009) (Abb. 4).



## **I.5 Antiresorptive Therapieansätze bei aseptischer Lockerung**

Bislang gibt es keine anerkannte Therapie, mit der man die periprothetische Osteolyse nicht-invasiv behandeln oder ihr vorbeugen könnte. Allerdings wurden in der jüngeren Vergangenheit einige pharmakologische Substanzen für die potentiell medikamentöse antiresorptive Behandlung der aseptischen Prothesenlockerung entdeckt und sowohl *in vitro* als auch *in vivo* auf ihre Wirksamkeit getestet.

Die Applikation von Simvastatin (von Knoch et al. 2005b), einem potenten Inhibitor der Cholesterinsynthese, ebenso wie der Bisphosphonate Alendronat (Astrand & Aspenberg 2004) und Zoledronat (Wedemeyer et al. 2005) führte im Tiermodell zu einer Reduktion osteolytischer Läsionen und begünstigte teilweise sogar die Knochenneubildung. Die Verabreichung von Pentoxifyllin (Trental<sup>®</sup>), einem wirksamen Inhibitor der Sekretion von TNF- $\alpha$ , kann beim Menschen möglicherweise indirekt die Entwicklung von Osteolysen verhindern (Pollice et al. 2001). Auch der Proteasom-Inhibitor Bortezomib (Velcade<sup>®</sup>) zeigte im Zellkulturmodell einen inhibitorischen Einfluss auf die Produktion verschiedener proinflammatorischer Zytokine, Chemokine und Enzyme und könnte somit die aseptische Prothesenlockerung unterbinden (Mao et al. 2012). Besonders vielversprechend erscheint die Inaktivierung von RANKL durch den Einsatz des humanen monoklonalen Antikörpers AMG162 (Denosumab<sup>®</sup>), welcher die Funktion des physiologischen RANKL-Antagonisten OPG imitiert. Dadurch wird die proresorptive RANK-Signalkaskade inhibiert, was in klinischen Studien zu einer erhöhten Knochendichte und einer verminderten Knochenresorption führte (McClung et al. 2006). Auch der Einsatz eines Antikörpers gegen Sklerostin, einem Protein mit inhibitorischer Wirkung auf die Osteogenese, führte im Tiermodell zu einer effektiven Steigerung der Knochenbildung bei gleichzeitiger Suppression der Knochenresorption (Liu et al. 2012). Des Weiteren hat die lokale Applikation von rekombinanten antiinflammatorischen Zytokinen, z. B. IL-4 und IL-13, *in vivo* einen inhibitorischen Effekt auf die Knochenresorption. Dem liegt offenbar die Suppression der Expression von *RANKL* sowie die Induktion der Produktion von OPG zugrunde (Wang et al. 2013). Daher zeigt auch die Applikation von exogenem OPG *in vivo* suppressive Effekte auf die partikelinduzierte Osteolyse (von Knoch et al. 2005a).

Eine weitere Behandlungsmöglichkeit besteht in der sogenannten Gentherapie. So wurde *in vitro* mit einem rekombinanten adenoassoziierten Virus gearbeitet, um die zelluläre OPG-Produktion künstlich zu erhöhen und dadurch die periprothetische Osteolyse zu verhindern (Ulrich-Vinther et al. 2002). Außerdem wurde *in vivo* ein viraler Gentransfer

von Interleukin-1 Rezeptorantagonist (IL-1Ra) und viralem Interleukin-10 (vIL-10) im Tiermodell durchgeführt, um der Differenzierung von Osteoklasten entgegenzuwirken (Yang et al. 2004). Zudem scheinen pflanzliche Wirkstoffe eine potentielle Bedeutung in der Behandlung der periprothetischen Osteolyse zu gewinnen. So konnten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* antiresorptive bzw. antiinflammatorische Effekte des Sesquiterpen-Lactons Parthenolid (Yip et al. 2004), des Alkaloids Berberin (Zhou et al. 2012), des Flavons Luteolin (Shin et al. 2012), der Polyphenole Salicylsäure, Apigenin und Quercetin (Drummond et al. 2013) sowie von Epigallocatechingallat (Jin et al. 2011), einem Bestandteil von Grünem Tee, nachgewiesen werden.

## **I.6 Das Neuropeptid „Calcitonin Gene-Related Peptide“ und seine Rolle in der periprothetischen Osteolyse**

Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP), auch unter dem Namen  $\alpha$ -CGRP bekannt, ist ein aus 37 Aminosäuren bestehendes Neuropeptid. CGRP wird sowohl im peripheren als auch im zentralen Nervensystem durch gewebespezifisches alternatives Spleißen des *CALCA*-Gens auf Chromosom 11, welches sowohl CGRP als auch Calcitonin codiert, produziert (Rosenfeld et al. 1983). Das Neuropeptid fungiert unter anderem als potenter Vasodilatator und als Regulator der neurogenen Inflammation (Wimalawansa 1997). Außerdem spielt CGRP eine bedeutende Rolle bei der Entstehung von Migräne und anderen kopfschmerzassoziierten Krankheiten (Tepper & Stillman 2008).

Knochengewebe beinhaltet zahlreiche CGRP-immunoreaktive sensorische Nervenfasern, die unter anderem das Periost (Bjurholm et al. 1988), das Knochenmark (Hukkanen et al. 1992) und die Epiphyse von Röhrenknochen (Hara-Irie et al. 1996) innervieren. Die räumliche Nähe dieser Nervenfasern zu Knochenzellen sowie der Nachweis spezifischer Neuropeptidrezeptoren auf der Oberfläche von Osteoblasten und Osteoklasten ließen auf einen direkten regulatorischen Einfluss von CGRP auf den Knochenstoffwechsel schließen (Togari et al. 1997). Tatsächlich besitzt CGRP osteogene Effekte, d. h. es fördert die Knochenbildung. Das Neuropeptid reguliert dabei beispielsweise die Produktion von Zytokinen und Wachstumsfaktoren in Knochenzellen. So inhibiert es unter anderem die Produktion des proinflammatorisch und proresorptiv wirksamen Zytokins TNF- $\alpha$  in Osteoblasten (Millet & Vignery 1997).

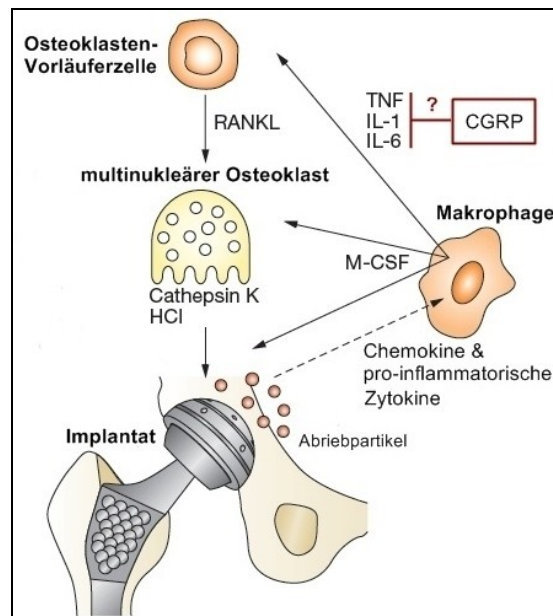
Die Entdeckung von CGRP-reaktiven Nervenfasern in der periprothetischen Membran sowie der Nachweis von CGRP in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit aseptischer Prothesenlockerung brachten das Neuropeptid schließlich mit der Kondition der periprothetischen Osteolyse in Verbindung (Ahmed et al. 1998; Saxler et al. 2007; Qian et al. 2008). Aufgrund des erwiesenen antiresorptiven, knochenanabolen Einflusses von CGRP auf den Knochenmetabolismus (Hoff et al. 2002; Huebner et al. 2008) wurde die potentielle Wirksamkeit von CGRP in der Therapie bzw. Prävention der partikelinduzierten Osteolyse in verschiedenen Studien unserer Arbeitsgruppe näher untersucht. Im Tiermodell trägt CGRP über die Inhibition der partikelinduzierten Osteolyse zu einer verminderten Knochenresorption bei (Wedemeyer et al. 2007a; Kauther et al. 2013). Im Zellkulturmodell wurde der Einfluss von CGRP auf den Knochenstoffwechsel *in vitro* auf molekularer Ebene näher untersucht. Dabei konnte in Osteoblasten ein osteoprotektiver Effekt von CGRP auf die partikelinduzierte Osteolyse nachgewiesen werden, der mit einer Inhibition der zellulären Produktion von RANKL sowie einer Induktion der OPG-Produktion einherging (Kauther et al. 2010; Xu et al. 2010). Demzufolge ist CGRP offenbar in der Lage, über eine Modulation des RANK/RANKL/OPG-Systems dem knochenkatabolen Einfluss von Abriebpartikeln entgegenzuwirken.

## **I.7 Ziel der Arbeit**

Aufgrund der bislang gewonnenen Erkenntnisse bezüglich des regulatorischen Einflusses von CGRP auf den Knochenstoffwechsel wurde der potentiell osteoprotektive Effekt des Neuropeptids auf die periprothetische Osteolyse in makrophagenähnlichen Zellen auf molekularer Ebene genauer untersucht (vgl. Abb. 5).

Makrophagen stellen den zellulären Hauptbestandteil der periprothetischen Membran dar und fungieren somit als Schlüsselmediatoren der aseptischen Prothesenlockerung (Morawietz et al. 2006). Über die Phagozytose von Abriebpartikeln, die mit der Entstehung einer inflammatorischen Reaktion einhergeht, leiten sie den Prozess der partikelinduzierten periprothetischen Osteolyse ein (Hallab & Jacobs 2009). Die Produktion proinflammatorischer Zytokine, wie zum Beispiel IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF- $\alpha$ , durch aktivierte Makrophagen trägt dabei maßgeblich zu einer Differenzierung und Aktivierung von Osteoklasten und somit zu einer erhöhten Knochenresorption bei (Suda et

al. 1999; Boyle et al. 2003; Abb. 5). Außerdem fördert das molekulare Zusammenspiel von RANK und RANKL die Differenzierung von Osteoklastenvorläuferzellen zu aktiven multinukleären Osteoklasten (Khosla 2001), wobei eine direkte Beteiligung von Makrophagen diskutiert wird (Lam et al. 2000; Hou et al. 2013).



**Abb. 5: Der potentielle Einfluss des Neuropeptids CGRP auf die periprothetische Osteolyse**

Die periprothetische Osteolyse ist die häufigste Komplikation in der modernen Endoprothetik und gilt als Hauptursache der aseptischen Prothesenlockerung. Abriebpartikel des Implantatmaterials induzieren eine komplexe Wechselwirkung zwischen Makrophagen in der periprothetischen Membran und multinukleären Osteoklasten sowie deren Vorläuferzellen. Über die Phagozytose von Partikeln ebenso wie über Chemokine und proinflammatorische Zytokine werden Makrophagen aktiviert. Diese wiederum produzieren eine Reihe proinflammatorischer bzw. proresorptiver Mediatoren: RANK, RANKL, TNF, IL-1, IL-6 und M-CSF regulieren die Differenzierung myeloider Osteoklasten-Vorläuferzellen zu multinukleären Osteoklasten, welche das proteolytische Enzym Cathepsin K und Salzsäure (HCl) freisetzen. Dadurch wird die Bildung resorptiver Lakunen an der Knochenoberfläche gefördert. Es kommt zum Knochenabbau durch periimplantäre Osteolyse. Antiresorptive Effekte des Neuropeptids CGRP sind bekannt. Bislang ist jedoch unklar, ob der osteoprotektive Einfluss von CGRP auf die periprothetische Osteolyse auf einer Modulation der Produktion osteolyseassoziiierter Zytokine durch Makrophagen beruht. (Abbildung verändert nach Drees et al. 2007)

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, den Einfluss des Neuropeptids  $\alpha$ -CGRP auf die periprothetische Osteolyse im Makrophagenmodell zu untersuchen. Dabei wurden das RANK/RANKL/OPG-System sowie eine Reihe von Zytokinen als molekulare Osteolysemarker betrachtet. Der potentiell osteoprotektive Einfluss von CGRP wurde mit Hilfe einer quantitativen Analyse der Biomarker RANK, RANKL, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und IL-10 untersucht. Die zentrale Fragestellung nach einem inhibitorischen Effekt von CGRP auf die Produktion proinflammatorischer Zytokine durch makrophagenähnliche Zellen unter osteolytischen Bedingungen stand dabei im Vordergrund (Abb. 5).

## **II. Material & Methoden**

### **II.1 Materialien**

#### **II.1.1 Geräte**

Applied Biosystems AB7500 Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Karlsbad, Kalifornien, USA
Axiostar plus Auflichtmikroskop Objektive: 10x, 20x, 40x, SP100 Oil	Carl Zeiss, Jena
Axiovert 25 Invers-Lichtmikroskop Objektive: 10x, 20x, 32x	Carl Zeiss, Jena
BD FACSCalibur Durchflusszytometer	BD Biosciences, Heidelberg
Biometra Mini-Gel Twin Gelelektrophoresekammer	Biometra, Göttingen
Biometra Whatman Model 250 Power Supply	Biometra, Göttingen
Bio-Plex 200 Luminex-basiertes Suspensionsarray- System für Mikrotiterplatten	Bio-Rad, Herkules, Kalifornien, USA
Bio-Plex Pro II Wash Station automatisiertes Wasch- System für Mikrotiterplatten	Bio-Rad, Herkules, Kalifornien, USA
Bio-Tek ELx808 Absorptions-Reader für Mikrotiterplatten	BioTek Instruments, Winooski, Vermont, USA
Consort EV 265 Power Supply	Consort, Turnhout, Belgien
Easyshaker EAS 2/4 Schüttler für Mikrotiterplatten	SLT Labinstrumente, Grödig, Österreich
Eppendorf Tischzentrifuge 5424	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Easypet Pipettierhilfe	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Research Plus Einkanal-Pipetten Volumen: 0.5 - 10 µl, 10 - 100 µl, 100 - 1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf MiniSpin Tischzentrifuge	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Forma Scientific Bio Freezer -80°C Tiefkühlschrank	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Fusion SL Chemilumineszenz-Detektionssystem	Vilber Lourmat, Marne-la-Vallée, Frankreich

Gelaire Flow Laboratories BSB4A Laminar Flow Sterilwerkbank	Gelaire, Sydney, Australien
Hämazytometer-Deckgläser, 20 x 26 mm	Carl Roth, Karlsruhe
Hämazytometer (Neubauer improved) Zählkammer ohne Federklemmen Kammertiefe: 0.1 mm, Großquadrat: 1 mm <sup>2</sup> , Gruppenquadrat: 0.04 mm <sup>2</sup> , Kleinstquadrat: 0.0025 mm <sup>2</sup>	Carl Roth, Karlsruhe
Heidolph Rotamax 120 rotierender Plattformschüttler	Heidolph, Schwabach
HERAcell 240i CO <sub>2</sub> -Inkubator	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Heraeus Fresco 17 Mikrozentrifuge	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Heraeus Labofuge 400 R Tischzentrifuge	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Heraeus Varifuge 3.0 R Standzentrifuge	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Hettich Rotina 420R Tischzentrifuge	Andreas Hettich, Tuttlingen
HLC Thermomixer B1315	HLC Bio Tech, Bovenden
Hoefer TE22 Mighty Small Transphor Western Blot Mini Transfer-Tank	Hoefer, San Francisco, Kalifornien, USA
IKA Ikamag Reo Magnetührer	IKA Labortechnik, Staufen
IKA MS 2 Minishaker	IKA Labortechnik, Staufen
IKA MS 3 basic Kleinschüttler	IKA Labortechnik, Staufen
IKA MTS 4 Kreisschüttler für Mikrotiterplatten	IKA Labortechnik, Staufen
IKA VF2 Vibro-Fix Minishaker	IKA Labortechnik, Staufen
Julabo TWB12 Wasserbad	Julabo Labortechnik, Seelbach
Leica DM-IL-LED Invers-Lichtmikroskop mit LED- Beleuchtung und DFC290 Mikroskopkamera Objektive: 5x, 10x, 20x	Leica Biosystems, Wetzlar
Liebherr GP1366 Premium Stand-Gefrierschrank	Liebherr, Biberach
Liebherr KT1830 Comfort Stand-Kühlschrank	Liebherr, Biberach
NanoDrop ND-1000 Spektralphotometer	Peqlab, Erlangen
RS Series 750 RS Kryokonservierungssystem	Taylor-Wharton, Theodore, Alabama, USA
Scaltec SBC 61 Präzisionswaage	Denver Instrument, Göttingen

Scotsman AF-10 Flockeneisbereiter	Scotsman, Mailand, Italien
Thermo Finnpipette Multikanal-Pipetten Volumen: 5 - 50 µl, 50 - 300 µl	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Varioklav Dampfsterilisator Tischautoklav	HP Medizintechnik, Oberschleißheim
Zeiss AxioImager.M2 Fluoreszenzmikroskop mit Zeiss AxioCam MRc5 Digitalkamera Objektive: 5x, 10x, 20x, 40x, 63x Oil	Carl Zeiss, Jena

## II.1.2 Software

Bio-Plex Manager 6.0	Bio-Rad, Herkules, Kalifornien, USA
EndNote X6	Thomson Reuters, Karlsbad, Kalifornien, USA
Fusion SL Bildanalyse-Software	Vilber Lourmat, Marne-la-Vallée, Frankreich
Irfan View Version 4.35	Irfan Skiljan, Wien, Österreich
Leica Application Suite LAS V3.3.0	Leica Microsystems, Heerbrugg, Schweiz
Microsoft Office 2003	Microsoft, Redmond, Washington, USA
MikroWin 2000	Mikrotek Laborsysteme, Overath
NanoDrop 1000 V3.7.0	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
PhotoScape V3.6.2	MOOII Tech, Korea
SDS V1.3 für AB7500 Real-Time PCR Series	Applied Biosystems, Karlsbad, Kalifornien, USA
SPSS Statistics Version 21	IBM, Ehningen
Zen Pro 2011 Mikroskop-Software	Carl Zeiss, Jena

## II.1.3 Verbrauchsmaterialien

8 - 16% Precise Tris-Glycine Gels, 12 wells, 10 x 10 cm, 205 - 14 kDa	Pierce Biotechnology, Rockford, Illinois, USA
--	--

BD Falcon Multiwell Zellkulturplatten, Format: 6-well, 96-well	BD Biosciences, Heidelberg
Catrice Cosmetics Quick Dry & High Shine Top Coat klarer Nagellack	Cosnova, Sulzbach
Cellstar Filter Top Suspensionskultur-Flaschen, Volumen: 50 ml, 250 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Cellstar Polypropylen-Röhrchen mit Schraub- Verschluss, konisch, steril Volumen: 15 ml, 50 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Ceridust VP 3610 ultrahochmolekulare Polyethylen- Partikel (UHMWPE-Partikel)	Clariant, Gersthofen
Clean and Clever Kosmetiktücher	Igefa, Ahrensfelde OT Blumberg
Cryo.s Einfrierröhrchen, Volumen: 2 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Dako S3023 Fluorescence Mounting Medium	Dako, Hamburg
dNTP Mix, 10 mM each (dATP, dTTP, dCTP, dGTP)	Fermentas, St. Leon-Rot
Ecotainer Aqua steriles Wasser	B. Braun, Melsungen
Eppendorf Safe-Lock Reaktionsgefäße, Volumen: 1.5 ml, 2.0 ml	VWR International, Darmstadt
Hoechst 33258 Fluoreszenzfarbstoff (Bis-Benzimid), Pentahydrat, 10 mg/ml	Invitrogen, Darmstadt
Incuwater-Clean Desinfektionslösung für CO <sub>2</sub> - Inkubator-Wasser	AppliChem, Darmstadt
Inkubator-Clean Desinfektionslösung für Inkubatoren und Sterilwerkbänke	AppliChem, Darmstadt
Latex Beads, deep blue dyed, durchschnittlicher Durchmesser: 0.80 µm	Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA
Lyreco Prospekthüllen DIN A4, Stärke: 0.08 mm	Lyreco, Barsinghausen
Magermilchpulver	Saliter, Obergünzburg
Menzel Deckgläser 24 x 60 mm (Stärke #1)	Gerhard Menzel, Braunschweig
MicroAmp optische Klebefolien für 96-well optische Mikrotiterplatten	Applied Biosystems, Karlsbad, Kalifornien, USA
µltratip Pipettenspitzen, Volumen: 1 - 100 µl, 1 - 1000 µl	Greiner Bio-One, Frickenhausen
MultiFlex-Kristall-Tips Gelbeladungs-Spitzen, Volumen: 0.5 - 10 µl	Carl Roth, Karlsruhe



Nitrocellulose-Membran 0.45 µm	Bio-Rad, München
Nunc Lab-Tek Permanox Chamber Slides Kammerobjektträger, 4 Kammern Wachstumsfläche: 1.8 cm <sup>2</sup> pro Kammer	Nunc, Rochester, New York, USA
Oligo(dT) <sub>12-18</sub> Primer	Invitrogen, Darmstadt
PageRuler Prestained Protein Ladder, 10 - 170 kDa	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Parafilm „M“ Polymerfilm	American National Can, Chicago, Illinois, USA
Plastibrand Universal-Pipettenspitzen, Volumen: 0.5 - 20 µl, 50 - 1000 µl	Brand, Wertheim
Polypropylen-Gelfärbeschalen midi	Carl Roth, Karlsruhe
Precision Plus Protein Standards Dual Color, 10 - 250 kDa	Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA
Qiagen RNase-freies Wasser	Qiagen, Hilden
RANK (m): 293T Lysat (sc-122962)	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA
RNaseOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor	Invitrogen, Darmstadt
Serologische Pipetten, Volumen: 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
terralin liquid Flächendesinfektion	Schülke & Mayr, Norderstedt
TipOne Pipettenspitzen, Volumen: 1 - 300 µl	Starlab, Hamburg
Thermo-Fast 0.2 ml optische 96-well real-time optische PCR Platten	Thermo Scientific, Dreieich
Transferpipetten, Volumen: 3.5 ml, steril	Sarstedt, Nümbrecht
Transpore Allround Vliespflaster	3 M, Neuss
VWR Filterspitzen, Volumen: 0.1 - 10 µl, 1 - 100 µl, 100 - 1000 µl	VWR International, Darmstadt
Whatman Gel Blot Paper GB003	Whatman, Dassel

#### II.1.4 Chemikalien

Die im Verlauf der vorliegenden Arbeit verwendeten Chemikalien wurden in analytischem Reinheitsgrad sowie gegebenenfalls in für die Zellkultur geeigneter Qualität bei folgenden Firmen bezogen:

Calbiochem	Darmstadt
Carl Roth	Karlsruhe
Fermentas	St. Leon-Rot
Fluka Biochemika	Steinheim
Invitrogen	Darmstadt
J. T. Baker	Griesheim
Lonza	Köln
Merck	Darmstadt
Serva	Heidelberg
Sigma-Aldrich	St. Louis, Missouri, USA
Thermo Fischer Scientific	Dreieich

Kultivierungsmedien und Medienzusätze für die Zellkultur wurden von den Firmen PAA (Pasching, Österreich) und Gibco (Darmstadt) bezogen. Reagenzien und Substanzen für die Anwendung in der Zellkultur wurden in sterilem Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst und ggf. in ebenfalls sterilem *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline* (DPBS) verdünnt. Lösungen und Puffer für molekularbiologische bzw. proteinbiochemische Anwendungen wurden mit voll entsalztem (VE) Wasser angesetzt.

### II.1.5 Reagenziensysteme (Kits)

Bio-Plex Pro Zytokin-Assay für humane Zytokine der Gruppe I: IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$ (Katalog-Nr.: 171-D50001, 171-304070M)	Bio-Rad, Herkules, Kalifornien, USA
Endosafe Gel-Clot Assay LAL Endotoxin Test Sensitivität: 0.25 EU/ml (Katalog-Nr.: R11025)	Charles River Laboratories, Wilmington, Massachusetts, USA
Human TNF- $\alpha$ Elisa Kit, 5 Platten (Katalog-Nr. EH3TNFA5)	Pierce Biotechnology, Rockford, Illinois, USA
Ionic Detergent Compatibility Reagent für Pierce 660 nm Protein Assay (Katalog-Nr. 22663)	Pierce Biotechnology, Rockford, Illinois, USA
NucleoSpin RNA/Protein Isolation, 250 Präparationen (Katalog-Nr. 740933.250)	Macherey-Nagel, Düren

Pierce 660 nm Protein Assay, 450 ml Kit (Katalog-Nr. 22662)	Pierce Biotechnology, Rockford, Illinois, USA
Pierce ECL Plus Western Blotting Substrat (Katalog-Nr. 32132)	Pierce Biotechnology, Rockford, Illinois, USA
QuantiTect Primer Assay, 200 Reaktionen ( <i>TNFSF11</i> & <i>TNFRSF11A</i> ) (Katalog-Nr. QT00215614 & QT00035434)	Qiagen, Hilden
QuantiTect SYBR Green PCR Kit, 200 Reaktionen (Katalog-Nr. 204143)	Qiagen, Hilden
SuperScript II Reverse Transkriptase, 10.000 Units (Katalog-Nr. 18064-014)	Invitrogen, Darmstadt

### II.1.6 Zellen

Humane Monozyten der Linie THP-1 wurden von der Firma CLS Cell Lines Service (Eppelheim) bezogen. Hierbei handelt es sich um eine akute monozytäre Leukämiezelllinie. Monozytäre THP-1 Zellen besitzen die Fähigkeit zur Phagozytose von Latexpartikeln und sensibilisierten Schaferythrozyten (Tsuchiya et al. 1980). Durch Inkubation mit Phorbolestern oder DMSO lassen sich die Monozyten außerdem zu makrophagenähnlichen Zellen differenzieren (Tsuchiya et al. 1982). Aufgrund der funktionellen Ähnlichkeit dieser Zellen zu primären Makrophagen stellen Zellen der Linie THP-1 ein beliebtes Modellsystem für Makrophagen und deren Differenzierung sowie für Untersuchungen zur Phagozytose dar (Auwerx 1991). Außerdem wird diese Zelllinie zur Analyse der regulatorischen Funktion von Monozyten und Makrophagen bei der Reaktion auf verschiedene inflammatorische Mediatoren verwendet (Qin 2012).

Die kryokonservierten THP-1 Suspensionszellen (Katalog-Nr. 300356) wurden bis zu ihrer Verwendung in der Zellkultur in einem Kryokonservierungssystem mit flüssigem Stickstoff bei  $-196^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### II.1.7 Partikel

Ultrahochmolekulare Polyethylenpartikel (UHMWPE-Partikel, Ceridust VP 3610) mit einem durchschnittlichen Partikeldurchmesser von  $1,74 \pm 1,43 \mu\text{m}$  (von Knoch et al. 2004) wurden von der Firma Clariant (Gersthofen) bezogen.

Die Partikel wurden wie in der Literatur beschrieben für die Verwendung in der Zellkultur vorbehandelt (Kauther et al. 2010; Xu et al. 2010). Zur Entfernung von Verunreinigungen mit Endotoxinen wurden die Partikel für 24 h bei Raumtemperatur (RT) in 99% Ethanol gewaschen und anschließend in einem Exsikkator getrocknet.

Die Effizienz der angewandten Dekontaminationsmethode wurde mit Hilfe eines Limulus Amoebocyten-Lysat Tests (LAL Assay; Charles River, Kent, UK) mit einer Sensitivität von 0,25 EU/ml überprüft. Das Ergebnis des nach Herstellerangaben durchgeführten Tests war negativ. Anschließend wurden die Partikel in endotoxinfreiem 10% (v/v) bovinen Serumalbumin in DPBS (BSA; Sigma-Aldrich, Seelze) resuspendiert und durch die Sonifikation in einem Ultraschallbad resuspendiert. Die Anzahl der Partikel pro Flüssigkeitsvolumen wurde mit Hilfe eines Durchflusszytometers (BD FACSCalibur™; BD Biosciences, Heidelberg) bestimmt. Die Partikel wurden bis zu ihrer Verwendung in der Zellkultur steril verpackt bei -20°C gelagert.

### II.1.8 Oligonukleotide

Die in der vorliegenden Arbeit für die quantitative Polymerasekettenreaktion (PCR) genutzten Oligonukleotide zur selektiven Amplifikation von *β-Actin* (Oligonukleotidsequenzen nach Bylski et al. 2009) und *TNF-α* (Oligonukleotidsequenzen nach Heinemann et al. 2011) wurden in salzfrei aufgereinigter Qualität von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) bezogen. Die in lyophilisiertem Zustand gelieferten Oligonukleotide wurden den Herstellerangaben im Oligonukleotidsynthesereport entsprechend mit RNase-freiem Wasser (Qiagen, Hilden) auf eine Ausgangskonzentration von 100 pmol/μl eingestellt. Aus diesen Stammlösungen wurden Arbeitslösungen mit einer Konzentration von 10 pmol/μl hergestellt.

TE-Puffer (pH 8)

10 mM Tris-HCl

1 mM Dinatrium-EDTA

Die Oligonukleotide zur selektiven Amplifikation von *RANK* und *RANKL* wurden als vorgefertigte, bioinformatisch validierte QuantiTect® Primer Assays von der Firma Qiagen (Hilden) bezogen.

Die lyophilisierten Oligonukleotid-Mixe wurden den Herstellerangaben entsprechend in 1,1 ml Tris-EDTA-Puffer (TE-Puffer, pH 8.0; Fluka Biochemika, Steinheim) rekonstituiert, um eine 10x konzentrierte Arbeitslösung zu erhalten. Alle Primer wurden bis zu ihrer Verwendung bei -20°C gelagert.

**Tab. 1: Oligonukleotid-Primer für die quantitative Polymerasekettenreaktion**

Name	Oligonukleotid-Sequenz (5' → 3')	Annealing-Temperatur (°C)	Fragmentgröße Amplifikat (bp)
<i>β-Actin</i> se	TCC CTG GAG AAG AGC TAC GA	60	194
<i>β-Actin</i> as	AGC ACT GTG TTG GCG TAC AG		
<i>RANK</i> se	Hs_TNFRSF11A_1_SG	55	70
<i>RANK</i> as			
<i>RANKL</i> se	Hs_TNFSF11_1_SG	55	91
<i>RANKL</i> as			
<i>TNF-α</i> se	CCC CAG GGA CCT CTC TCT AAT	60	99
<i>TNF-α</i> as	AGG GTT TGC TAC AAC ATG GG		

Die Fragmentgröße der verschiedenen Amplifikate wurde vor Beginn der quantitativen PCR (vgl. II.2.2.2.2) exemplarisch mit Hilfe einer konventionellen, nichtquantitativen PCR und anschließender Agarosegelelektrophorese überprüft. Daten hierzu werden in der vorliegenden Arbeit nicht gezeigt.

## II.1.9 Antikörper

### II.1.9.1 Primärantikörper

**Tab. 2: Primärantikörper für die Anwendung im Western Blot**

Antikörper	Reaktivität	Spezies	Hersteller
<b>RANK</b> , monoklonal (Katalog-Nr. sc-374360)	Mensch	Maus	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA
<b>GAPDH</b> , polyklonal (Katalog-Nr. sc-25778)	Mensch	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA

II.1.9.2 Sekundärantikörper**Tab. 3: Sekundärantikörper für die Anwendung im Western Blot**

Antikörper	Reaktivität	Spezies	Hersteller
<b>anti-Maus IgG-HRP</b> (Katalog-Nr. sc-2005)	Maus	Ziege	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA
<b>anti-Kaninchen IgG-HRP</b> (Katalog-Nr. A0545)	Kaninchen	Ziege	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA

II.1.9.3 Fluorochromkonjugierte Antikörper**Tab. 4: Fluorochromkonjugierte Antikörper für die Immunfluoreszenz**

Antikörper	Reaktivität	Spezies	Hersteller
<b>CD68-Alexa Fluor 647,</b> monoklonal (Katalog-Nr. sc-20060 AF647)	Mensch	Maus	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA
<b>CRLR/CGRPR1-</b> <b>Alexa Fluor 488,</b> polyklonal (Katalog-Nr. bs-1860R-A488)	Mensch	Kaninchen	Bioss, Woburn, Massachusetts, USA

## II.2 Methoden

Die in der vorliegenden Arbeit aufgeführten Methoden und Protokolle orientieren sich an der einschlägigen Laborliteratur (Sambrook & Russell 2001).

### II.2.1 Zellkultur

#### II.2.1.1 Auftauen und Einfrieren von THP-1 Zellen

Kryokonservierte THP-1 Monozyten (CLS Cell Line Service, Eppelheim) wurden einem modifizierten Protokoll des Vertreibers entsprechend in Kultur gebracht. Zur Entfernung des Kryokonservierungsmittels DMSO im Einfriermedium wurden die tiefgefrorenen Zellen zunächst kurz im Wasserbad bei 37°C angetaut, in vorgewärmtes DPBS überführt und bei RT für 10 min bei 1.000 x g pelletiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Zellen in frischem Kulturmedium resuspendiert, welches aus RPMI-1640 Medium, angereichert mit 10% fetalem Kälberserum (FCS), 2 mM L-Glutamin und 1% Penicillin/Streptomycin, bestand. Die Zellsuspension wurde unter dem Lichtmikroskop auf die Dichte, Morphologie und Vitalität der Zellen sowie auf eventuelle mikrobielle Kontaminationen überprüft. Anschließend wurden die Zellen zur Kultivierung in Suspensionskulturflaschen überführt.

<u>Kulturmedium</u>		<u>Einfriermedium</u>	
RPMI-1640		DMSO	10% (v/v)
FCS	10% (v/v)	FCS	90% (v/v)
L-Glutamin	2 mM		
Penicillin	100 U/ml		
Streptomycin	100 µg/ml		

Zur Konservierung des Zellmaterials für spätere Anwendungen wurden die Zellen zunächst systematisch vermehrt und anschließend in definierten Aliquots zu je  $5 \times 10^6$  Zellen eingefroren. Nach Bestimmung der Zellzahl (vgl. II.2.1.3) wurden die Monozyten in einer eiskalten Lösung aus 10% (v/v) DMSO und 90% (v/v) FCS (Einfriermedium) aufgenommen. Die Zellen wurden schließlich stufenweise eingefroren und zur Langzeitlagerung in ein Kryokonservierungssystem mit flüssigem Stickstoff überführt.

### II.2.1.2 Kultivierung von THP-1 Zellen

Kryokonservierte THP-1 Monozyten wurden wie unter II.2.1.1 beschrieben in Kultur gebracht und anschließend in einem CO<sub>2</sub>-Inkubator (HERAcell 240i CO<sub>2</sub>-Inkubator; Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) bei 37°C mit 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt kultiviert. Die monozytären Suspensionskulturen wurden regelmäßig unter dem Lichtmikroskop auf ihre Dichte und Vitalität sowie auf etwaige Kontaminationen überprüft.

Um die vom Vertreiber vorgegebene maximale Zelldichte von 1 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml nicht zu überschreiten und somit optimale Wachstumsbedingungen für die Zellen zu gewährleisten, wurden die Monozyten regelmäßig in neuen Kulturgefäßen subkultiviert. Dazu wurde das Volumen einer ursprünglichen THP-1 Monozyten-Kultur gleichmäßig auf mindestens zwei neue Suspensionskulturflaschen aufgeteilt und mit frischem Kulturmedium aufgefüllt. Das Kulturmedium wurde alle 2-3 Tage erneuert.

### II.2.1.3 Zellzählung und Viabilitätstest

Die Zellzahl sowie die Vitalität der THP-1 Suspensionskulturen wurden regelmäßig mit Hilfe eines Hämazytometers (Carl Roth, Karlsruhe) bestimmt. Dazu wurden die Zellen zunächst für 10 min bei 1.000 x g und RT pelletiert. Anschließend wurde das Pellet in frischem Kulturmedium resuspendiert. Ein Aliquot der Zellsuspension wurde in der Vertiefung einer 96-well Zellkulturplatte in einem Verhältnis von 1:5 mit Trypanblau versetzt, 2 min bei RT inkubiert und in ein Hämazytometer überführt.

Bei Trypanblau handelt es sich um einen sauren Farbstoff, der von vitalen Zellen mit intakter Zellmembran nicht aufgenommen werden kann. Bei lichtmikroskopischer Betrachtung erscheinen vitale Zellen daher gelb bzw. farblos, während abgestorbene Zellen blau gefärbt sind. Mit Hilfe des Hämazytometers lässt sich die Anzahl der vitalen und abgestorbenen Zellen in dem vorhandenen Kulturvolumen quantifizieren. Dazu wird die Anzahl der Zellen in den vier großen Eckquadraten des Hämazytometers ausgezählt. Anschließend lässt sich die Zellzahl pro ml Suspension anhand der folgenden Formel berechnen:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{4} \times 5 \times 10^4 = \frac{\text{Zellen}}{\text{ml}}$$



In der vorliegenden Arbeit wurde die Zellzahl regelmäßig bestimmt, um die THP-1 Zellen in der für die weiteren Experimente benötigten Zelldichte aussäen zu können. Außerdem wurde in einem exemplarischen Versuch der Anteil an vitalen und adhärenen Zellen nach Differenzierung zu makrophagenähnlichen Zellen (vgl. II.2.1.4) sowie deren Inkubation mit unterschiedlichsten Testsubstanzen (vgl. II.2.1.6) hämazytometrisch bestimmt.

#### II.2.1.4 Differenzierung von THP-1 Monozyten zu makrophagenähnlichen Zellen

Durch Inkubation mit Phorbolestern lassen sich Monozyten der Zelllinie THP-1 terminal zu makrophagenähnlichen Zellen differenzieren (Tsuchiya et al. 1982; Auwerx 1991). Dies hat zur Folge, dass die Zellen ihre Fähigkeit zur Proliferation verlieren und adhären werden (Schwende et al. 1996). In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Differenzierung der THP-1 Zellen mit Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) nach dem im Folgenden aufgeführten, an Bylski et al. 2009 orientierten Protokoll.

<u>Kulturmedium</u>		<u>Differenzierungsmedium</u>	
RPMI-1640		Kulturmedium	
FCS	10% (v/v)	PMA	50 nM
L-Glutamin	2 mM		
Penicillin	100 U/ml		
Streptomycin	100 µg/ml		

Monozytäre THP-1 Zellen wurden zunächst mit einer definierten Zelldichte bzw. Zellzahl in neue Kulturgefäße ausgesät. Die Zellsuspension wurde anschließend mit 50 nM PMA in Kulturmedium (Differenzierungsmedium) versetzt. Durch diese Art der Stimulation wurde die Differenzierung zu makrophagenähnlichen Zellen eingeleitet. 48 h nach Aussaat der Zellen wurde das alte durch frisches Differenzierungsmedium ersetzt. Nach weiteren 24 h wurden die über insgesamt 72 h mit PMA stimulierten Zellen einmal mit DPBS gewaschen, bevor sie zum Ausschluss eines verfälschenden Effekts des Phorbolesters auf die Messergebnisse für weitere 48 h in PMA-freiem Medium kultiviert wurden.

Die Identität der so generierten makrophagenähnlichen Zellen wurde anhand ihrer Morphologie sowie anhand der Expression des makrophagenspezifischen Oberflächenmarkers CD68 (vgl. II.2.3.6) überprüft. Außerdem wurde ihre Fähigkeit zur Phagozytose von Latexpartikeln (vgl. II.2.1.5) untersucht.

### II.2.1.5 Phagozytostest

Interessanterweise zeigen THP-1 Monozyten nach PMA-induzierter Differenzierung zu makrophagenähnlichen Zellen eine erhöhte Bereitschaft zur Phagozytose von Latexpartikeln (Schwende et al. 1996). Daher wurde die Phagozytoseaktivität der hier verwendeten makrophagenähnlichen Zellen mit Hilfe eines Phagozytostests gegenüber kommerziell erhältlichen, tiefblau gefärbten Latex Beads mit einem durchschnittlichen Durchmesser von etwa 0,80 µm (Sigma-Aldrich, Seelze) überprüft.

Dazu wurden zunächst THP-1 Monozyten mit einer Zelldichte von ca. 130.000 Zellen/cm<sup>2</sup> (Zellzahl: ca. 1,25 x 10<sup>6</sup> Zellen) in die Vertiefungen einer 6-well Zellkulturplatte ausgesät und in einem Gesamtvolumen von 5 ml zu makrophagenähnlichen Zellen differenziert (vgl. II.2.1.4). Anschließend wurden diese für 30 min mit 1% Latexpartikeln in 3 ml Kulturmedium inkubiert, zweimal mit DPBS gewaschen und schließlich unter Verwendung des DM-IL-LED Invers-Lichtmikroskopes (Leica Biosystems, Wetzlar) analysiert. Die Phagozytose von Latexpartikeln durch die makrophagenähnlichen Zellen wurde mit Hilfe der an das Mikroskop angeschlossenen DFC290 Kamera (Leica Biosystems, Wetzlar) und der Leica Application Suite LAS V3.3.0 Software (Leica Microsystems, Heerbrugg, Schweiz) dokumentiert.

### II.2.1.6 Inkubation von makrophagenähnlichen Zellen mit Partikeln, LPS und CGRP

Zur Analyse des Einflusses von UHMWPE-Partikeln und LPS sowie des Neuropeptids  $\alpha$ -CGRP auf die Expression ausgewählter Biomarker der periprothetischen Osteolyse wurden makrophagenähnliche Zellen über definierte Zeiträume hinweg mit den verschiedenen Testsubstanzen inkubiert (s. Tab. 5). Jedes Experiment wurde dabei in einem 5-fachen Ansatz durchgeführt (n = 5).

Für die Versuche wurden THP-1 makrophagenähnliche Zellen (ca. 1,25 x 10<sup>6</sup> Zellen) in 6-well Zellkulturplatten in einem Gesamtvolumen von 5 ml über definierte Zeiträume von 6, 24 und 48 Stunden zur Simulation osteolyseähnlicher Bedingungen mit LPS aus *Escherichia coli* 055:B6 in einer Endkonzentration von 1 µg/ml (vgl. Baumann et al. 2005) sowie mit zwei verschiedenen Dosen an UHMWPE-Partikeln behandelt, welche Zell-Partikel-Verhältnissen von 1:100 (geringe Partikel-Dosis, 44 µl Partikel) und 1:500 (hohe Partikel-Dosis, 220 µl Partikel) entsprachen. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die weder mit UHMWPE-Partikeln noch mit LPS behandelt wurden.

Zur Untersuchung des Einflusses des potentiell osteoprotektiv wirksamen Neuropeptids CGRP auf die aktivierten makrophagenähnlichen Zellen wurden alle zuvor genannten Zellkulturansätze außerdem mit humanem CGRP in einer Endkonzentration von  $10^{-8}$  M CGRP (vgl. Cornish et al. 2001; Hernanz et al. 2003; Villa et al. 2006) koinkubiert. Als neuropeptidfreie Kontrolle dienten hierbei Zellen, die mit einem entsprechenden Volumen (50  $\mu$ l) an DPBS behandelt wurden (Tab. 5).

**Tab. 5: Experimentelle Behandlung makrophagenähnlicher Zellen**

Die Proben wurden mit einem dreistelligen Zahlencode gekennzeichnet. Die erste Stelle gibt Hinweise auf die Inkubationszeit (1 = 6 h, 2 = 24 h, 3 = 48 h). Die zweite Stelle gibt die Behandlung zur Simulation osteolyseähnlicher Bedingungen an (0 = Kontrolle, 1 = Zell-Partikel-Verhältnis 1:100, 2 = Zell-Partikel-Verhältnis 1:500, 3 = LPS). Die dritte Stelle gibt Aufschluss über die potentiell therapeutische Behandlung der Zellen (0 = Negativkontrolle (DPBS), 1 = CGRP).

Behandlung	Negativkontrolle	Zell-Partikel-Verhältnis 1:100	Zell-Partikel-Verhältnis 1:500	LPS (1 $\mu$ g/ml)	Inkubationszeit
<b>Kontrolle (DPBS)</b>	100	110	120	130	<b>6 h</b>
	200	210	220	230	<b>24 h</b>
	300	310	320	330	<b>48 h</b>
<b><math>10^{-8}</math> M CGRP</b>	101	111	121	131	<b>6 h</b>
	201	211	221	231	<b>24 h</b>
	301	311	321	331	<b>48 h</b>

Für die Analyse der Zytokinsekretion der makrophagenähnlichen Zellen bei Inkubation mit den unterschiedlichen Testsubstanzen wurden am Ende der Inkubationszeiten je 1,5 ml des Zellkulturüberstandes abgenommen und für 5 min bei 500 x g und 4°C abzentrifugiert. Anschließend wurden die Zellkulturüberstände in neue Reaktionsgefäße überführt und bis zu ihrer weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

#### II.2.1.7 Simultane Isolation von RNA und Protein

Zur Gewinnung des Ausgangsmaterials für die weiteren molekularbiologischen und proteinbiochemischen Analysen wurden die makrophagenähnlichen Zellen nach Beendigung der experimentellen Behandlung (vgl. II.2.1.6) mit Hilfe des NucleoSpin<sup>®</sup> RNA/Protein Isolation Kits (Macherey-Nagel, Düren) aufgearbeitet. Die simultane Isolation von RNA und Protein erfolgte nach Herstellerangaben unter Berücksichtigung der Empfehlungen für die Aufbereitung einer Zellzahl von  $1 \times 10^6$  Zellen. Dazu wurden

die Zellen zunächst zweimal mit *Phosphate Buffered Saline* ohne Magnesiumchlorid ( $\text{MgCl}_2$ ) und Calciumchlorid ( $\text{CaCl}_2$ ) (PBS) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für 5 min bei  $37^\circ\text{C}$  in 1 ml Trypsin (0,5 mg/ml) / EDTA (0,2 mg/ml) abgelöst. Nach dem Abstoppen der Trypsinierungsreaktion wurden die Zellen bei  $1.000 \times g$  und  $4^\circ\text{C}$  für 10 min pelletiert. Anschließend wurde das Zellpellet in RP1-Lysepuffer mit  $\beta$ -Mercaptoethanol aufgenommen. Nach einer groben Filtration des Zelllysates mit Hilfe des violetten NucleoSpin<sup>®</sup> Filters wurden RNA und Protein unter Verwendung des blauen NucleoSpin<sup>®</sup> RNA/Protein-Filters säulenchromatographisch getrennt.

Die an die Silicamembran gebundene RNA wurde den Herstellerangaben entsprechend in mehreren aufeinander folgenden Waschschrritten aufgereinigt. Potentielle Kontaminationen der RNA mit genomischer Desoxyribonukleinsäure (DNA) wurden dabei in einem Inkubationsschritt mit dem Enzym rDNase entfernt. Schließlich wurde die hochreine RNA in 40  $\mu\text{l}$  RNase-freiem Wasser eluiert und bis zu ihrer weiteren Verwendung in der quantitativen PCR bei  $-70^\circ\text{C}$  gelagert.

<u>PSB-TCEP Protein-Probenpuffer (pH 6,8)</u>	
BisTris	125 mM
SDS	2% (w/v)
TCEP	50 mM
Glycerol	20% (v/v)
Bromphenolblau	0,01% (w/v)

Das im Zelllysate enthaltene Protein wurde unter denaturierenden Bedingungen präzipitiert, in einem Waschschrritt aufgereinigt und anschließend in 100  $\mu\text{l}$  reduzierendem PSB-TCEP Protein-Probenpuffer bei  $95^\circ\text{C}$  resuspendiert. Unlösliches Material wurde anschließend für 1 min bei  $11.000 \times g$  abzentrifugiert. Der Überstand aus Ansätzen mit gleicher experimenteller Behandlung wurde in neuen Reaktionsgefäßen vereinigt. Die Proben wurden bis zu ihrer weiteren Verwendung in der Proteinquantifizierung bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

## **II.2.2 Molekularbiologische Standardmethoden**

### II.2.2.1 Photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Die spektralphotometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren erfolgt standardgemäß über die optische Dichte (OD) der Lösung bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 260 \text{ nm}$ .

Bei Licht dieser Wellenlänge weisen DNA und RNA ein spezifisches Absorptionsmaximum auf, welchem das aromatische Ringsystem von Purin- bzw. Pyrimidinbasen zugrunde liegt.

Die Konzentration der aus den makrophagenähnlichen Zellen extrahierten RNA (vgl. II.2.1.7) wurde unter Verwendung des NanoDrop® ND-1000 Spektralphotometers (Peqlab, Erlangen) bestimmt. Bei diesem Gerät handelt es sich um ein modernes Spektralphotometer, welches die Quantifizierung von Nukleinsäuren und Proteinen ohne den Einsatz von Küvetten ermöglicht. Nach der Initialisierung des Gerätes wurden jeweils 2 µl der unverdünnten RNA in den Strahlengang pipettiert und unter Verwendung der Option „RNA-40“ des Nukleinsäure-Moduls der NanoDrop® 1000 V3.7.0-Software (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) gegen RNase-freies Wasser als Referenz vermessen. Die innerhalb der Probe gemessene RNA-Konzentration wurde in ng/µl angegeben.

#### II.2.2.2 Quantitative RT-Polymerasekettenreaktion

Die quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR, „*real-time*“ PCR) stellt eine Methode zur Quantifizierung eines spezifischen mRNA-Moleküls dar. Das System basiert auf der Detektion eines fluoreszierenden Reportermoleküls, dessen Signalstärke proportional zum PCR-Produkt zunimmt. Bei der Methode der relativen Quantifizierung wird die Expression des zu untersuchenden Zielgens auf ein konstant reguliertes Haushaltsgen („*housekeeping gene*“, HKG) bezogen.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein zweistufiges qPCR-System angewendet. Dazu wurde zunächst RNA mit Hilfe der reversen Transkription (RT) in einzelsträngige komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben, bevor eine quantitative PCR zur selektiven Amplifikation des gewünschten Fragments durchgeführt wurde. Die PCR-Produkte wurden dabei mit Hilfe des ausschließlich in doppelsträngige DNA (dsDNA) interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes SYBR® Green detektiert.

##### II.2.2.2.1 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Die Synthese von Einzelstrang-cDNA erfolgte unter Verwendung des SuperScript™ II Reverse Transkriptase Kits (Invitrogen, Darmstadt). Jeweils 200 ng Gesamt-RNA aus dem Zellysat makrophagenähnlicher Zellen wurden mit 200 U SuperScript™ II Reverse

Transkriptase nach Herstellerangaben bei 42°C in cDNA umgeschrieben. Die über eine Punktmutation eliminierte RNase H-Funktion des Enzyms verhindert die Degradation der RNA im Verlauf der reversen Transkription. In Kombination mit der Verwendung eines Oligo(dT)<sub>12-18</sub>-Primers ermöglicht dies die selektive Synthese von cDNA ausgehend von polyadenylierter mRNA.

Standard-Reaktionsansatz Reverse Transkription

5x First Strand Buffer	4 µl
0,1 M DTT	2 µl
RNaseOUT™ RNase-Inhibitor (40 U/µl)	1 µl
SuperScript™ II Reverse Transkriptase (200 U/µl)	1 µl
Oligo(dT) <sub>12-18</sub> Primer (0,5 µg/µl)	1 µl
dNTP-Mix (10 mM)	1 µl
200 ng Gesamt-RNA	X µl
RNase-freies Wasser	ad 20 µl

Im Anschluss an die Synthesereaktion wurde die cDNA im Verhältnis 1:5 mit RNase-freiem Wasser verdünnt und bis zu ihrer weiteren Verwendung in der quantitativen PCR bei -20°C gelagert.

#### II.2.2.2.2 Quantitative PCR

Die Amplifikation ausgewählter genetischer Biomarker der periprothetischen Osteolyse erfolgte unter Verwendung des QuantiTect® SYBR® Green PCR Kits (Qiagen, Hilden).

Standard-Reaktionsansatz qPCR

<b>Reaktionsansatz mit <i>Eurofins</i>-Primern</b>		<b>Reaktionsansatz mit <i>Qiagen</i>-Primern</b>	
QuantiTect SYBR Green	12,5 µl	QuantiTect SYBR Green	12,5 µl
RNase-freies Wasser	8 µl	RNase-freies Wasser	7,5 µl
Primer se (10 pmol/µl)	1 µl	QuantiTect Primer Assay (10x)	2,5 µl
Primer as (10 pmol/µl)	1 µl	cDNA-Template (1:5-Verdünnung)	2,5 µl
cDNA-Template (1:5-Verdünnung)	2,5 µl		

Die qPCR-Reaktionen wurden den Herstellerangaben entsprechend durchgeführt. Neben *RANK*, *RANKL* und *TNF-α* als spezifische Zielgene wurde *β-Actin* als internes Referenzgen amplifiziert. Die Amplifikation aller biologischen Proben erfolgte für jedes Gen im Duplikat. Außerdem wurde pro Oligonukleotidpaar eine Negativkontrolle („no

*template control*“, NTC) ohne cDNA-Template sowie eine Kontrollreaktion ohne das Enzym Reverse Transkriptase („*no reverse transcription control*“, NRT) zur Überprüfung von eventuellen Kontaminationen der Template-cDNA mit genomischer DNA mitgeführt. Die PCR-Platte wurde mit einer speziellen optischen Klebefolie verschlossen. Anschließend erfolgte die Amplifikation der Reaktionsansätze unter Verwendung des AB7500 Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems, Karlsbad, Kalifornien, USA). Dabei wurde das folgende Standard-qPCR-Programm mit Primer-spezifischen Annealing-temperaturen (vgl. II.1.8) angewendet:

Standard-qPCR-Programm

Deckeltemperatur:	100°C	konstant
Initiation:	50°C	2 min
	95°C	15 min
Zyklus (45x):	95°C	15 s
	55°C bzw. 60°C	33 s
	72°C	33 s
	Datengewinnung (SYBR Green Fluoreszenz)	
Dissoziation:	95°C - 50°C	je 15 s
	95°C	15 s

Die Schmelzkurvenanalyse (Dissoziation), die im Anschluss an die quantitative PCR durchgeführt wurde, ersetzte die Agarosegelelektrophorese in ihrer Funktion als Qualitätskontrolle und diente somit der Identifikation von eventuell vorhandenen Nebenprodukten, die unter Umständen durch eine unspezifische Amplifikation der cDNA oder die Bildung von sogenannten Primer-Dimeren entstehen.

Der sogenannte „*threshold cycle*“ ( $C_t$ -Wert) ist definiert als die Anzahl der Zyklen, bei der die gemessene Fluoreszenzintensität des Reportermoleküls SYBR<sup>®</sup> Green einen manuell festgelegten Schwellenwert ( $t$ , „*threshold*“) übersteigt. Der *threshold* wurde für alle in der vorliegenden Arbeit durchgeführten qPCR-Experimente auf  $t = 0,05$  festgelegt.

Zur relativen Quantifizierung der Expression der in dieser Arbeit untersuchten Zielgene *RANK*, *RANKL* und *TNF- $\alpha$*  wurde diese auf die Expression des konstant regulierten Referenzgens  *$\beta$ -Actin* bezogen. Dazu wurde für jede untersuchte biologische Probe der  $C_t$ -Wert des Referenzgens  *$\beta$ -Actin* vom  $C_t$ -Wert des Zielgens subtrahiert, um den sogenannten  $\Delta C_t$ -Wert für jede biologische Probe zu ermitteln (Livak & Schmittgen 2001):

$$\Delta C_t = C_t(\text{Ziel} - \text{Gen}) - C_t(\beta - \text{Actin})$$

Da es sich bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten biologischen Proben jeweils um Duplikate handelte, wurden für die Bildung des  $\Delta C_t$ -Wertes die bereits von der SDS V1.3 Software (Applied Biosystems, Karlsbad, Kalifornien, USA) berechneten Mittelwerte für  $C_t$  herangezogen.

$$\text{rel. Transkription} \quad [\%] = \frac{100}{2^{\Delta C_t}} \times 100 \quad (1)$$

$$\Delta \Delta C_t = \Delta C_t(\text{Behandlung}) - \Delta C_t(\text{Kontrolle}) \quad (2)$$

Die  $\Delta C_t$ -Werte wurden schließlich zur Berechnung der relativen Expression der Zielgene im Verhältnis zum Referenzgen  $\beta$ -Actin (relative Transkription, Formel (1)) sowie zur Auswertung des Einflusses der experimentellen Behandlung der makrophagenähnlichen Zellen auf ihre Genexpression nach der  $\Delta \Delta C_t$ -Methode (Formel (2)) verwendet.

## II.2.3 Proteinbiochemische Methoden

### II.2.3.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Der Proteingehalt in den gesammelten Zelllysaten wurde spektralphotometrisch mit Hilfe des Pierce<sup>®</sup> 660 nm Protein Assay (Pierce Biotechnology, Rockford, Illinois, USA) bestimmt. Diese kolorimetrische Methode zur Gesamtproteinbestimmung beruht auf der Verbindung eines rotbraunen Farb-Metall-Komplexes mit Proteinen in saurem Milieu. Der Farbstoff interagiert hauptsächlich mit den Seitenketten basischer Aminosäuren, wie beispielsweise Histidin, Arginin und Lysin. Durch die Proteinbindung kommt es zu einer Deprotonierung des Farbstoffes, wodurch die Farbe des Komplexes nach grün wechselt. Dies ist mit einer Veränderung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes verbunden, welche bei 660 nm gemessen werden kann. Der Proteinnachweis ist aufgrund der hohen Stabilität des Farbstoffes auch in Gegenwart von Detergenzien und reduzierenden Agenzien möglich. Proteine in Probenpuffer mit Sodiumdodecylsulfat (SDS) und Bromphenolblau können durch Zugabe eines optionalen Kompatibilitätsreagenz („*ionic detergent compatibility reagent*“, IDCR) vermessen werden.



Die in den Zellkulturversuchen gesammelten Proteinproben in PSB-TCEP (vgl. II.2.1.7) mit vorangegangener gleicher experimenteller Behandlung ( $n = 5$ ) wurden vor der Bestimmung der Proteinkonzentration vereinigt. Anschließend wurde der Proteingehalt der Proben im Mikrotiterplattenverfahren nach Herstellerangaben quantifiziert. Aufgrund der Anwesenheit von SDS sowie des reduzierenden Agens TCEP im Probenpuffer wurde die Quantifizierung der Proteine unter Zuhilfenahme des IDCR durchgeführt. Um die maximal mit dem Assay-Verfahren kompatiblen Konzentrationen (vgl. Herstellerangaben: Tech Tip #68, „*Protein Assay Compatibility Table*“) an potentiell störenden Substanzen in den Proben nicht zu überschreiten, wurden Aliquots der zu quantifizierenden Proben zunächst im Verhältnis 1:3 mit sterilem Wasser verdünnt. Anschließend wurden die verdünnten Proben neben definierten BSA-Proteinstandards mit Konzentrationen von 50 - 1.500  $\mu\text{g/ml}$  und einem Leerwert (0  $\mu\text{g/ml}$  BSA) in den Vertiefungen einer 96-well Mikrotiterplatte nach Herstellerangaben mit *Protein Assay Reagent* + IDCR versetzt.

Nach einer Inkubationszeit von 5 min bei RT wurde die Proteinkonzentration unter Verwendung des NanoDrop<sup>®</sup> ND-1000 Spektralphotometers (Pheasant, Erlangen) ermittelt. Die Proteinbestimmung erfolgte sowohl für die BSA-Standards als auch für die unbekanntenen Proben im Duplikat. Nach der Initialisierung des Gerätes wurden jeweils 2  $\mu\text{l}$  der BSA-Standards in aufsteigender Reihenfolge in den Strahlengang pipettiert und unter Verwendung des Protein Pierce 660 nm Moduls der NanoDrop<sup>®</sup> 1000 V3.7.0-Software (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) gegen *Protein Assay Reagent* als Referenz vermessen, um eine Standardkurve zu ermitteln. Anschließend wurden je 2  $\mu\text{l}$  der zu quantifizierenden Proben vermessen. Die anhand der Standardkurve ermittelte Proteinkonzentration wurde in  $\mu\text{g/ml}$  angegeben.

### II.2.3.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) ist eine Methode zur Auftrennung von Proteinen nach ihrer molekularen Masse in einem elektrischen Feld. In der vorliegenden Arbeit wurde Gesamtprotein aus den vereinigten Zellysaten makrophagenähnlicher Zellen (vgl. II.2.3.1) mit Hilfe von kommerziell erhältlichen 8-16% Precise™ Tris-Glycin Gelen (Pierce Biotechnology, Rockford, Illinois, USA) aufgetrennt. Neben den zu analysierenden Proben (ca. 10  $\mu\text{g}$  Gesamtprotein pro Geltasche) wurden zwei Größenstandards, Precision Plus Dual Color Protein Standard (10 - 250 kDa; Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA) und PageRuler Prestained Protein

Ladder (10 - 170 kDa; Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), sowie 5 µg des kommerziell erhältlichen RANK(m)-transfizierten HEK 293T Ganzzelllysates (sc-122962; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA) als Positivkontrolle aufgetrennt.

<u>10x Tris-Glycin-SDS Laufpuffer</u>	
Tris Base	29 g
Glycin	144 g
SDS	10 g
VE-Wasser	ad 1 l

Die Gele wurden in einer Minigel Twin Elektrophoresekammer (Biometra, Göttingen) eingespannt und mit 1x Tris-Glycin-SDS-Laufpuffer überschichtet. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte bei RT und konstanten ca. 185 V für etwa 1 h bis zum Auslaufen der Bromphenolblau-Lauffront aus dem Gel.

### II.2.3.3 Western Blot

Der Western Blot ist eine Methode zur irreversiblen Immobilisation von Proteinen. Dabei werden die zu analysierenden Proteine zunächst elektrisch von einem Polyacrylamidgel auf einen Filter, z. B. eine Membran, übertragen. Anschließend können die auf der Membran fixierten Proteine mit Hilfe immunologischer Methoden qualitativ nachgewiesen werden.

<u>10x Towbin-Transferpuffer</u>		<u>1x Towbin-Transferpuffer (pH 8)</u>	
TrisBase	30,3 g	Tris	25 mM
Glycin	144,1 g	Glycin	192 mM
SDS	1% (w/v)	SDS	0,1% (w/v)
VE-Wasser	ad 1 l	Methanol	10% (v/v)
<u>Ponceau-Lösung</u>		<u>Blockpuffer</u>	
Ponceau S	0,1% (w/v)	DPBS	
Essigsäure	5% (v/v)	Milchpulver	5% (w/v)

Zum Nachweis von humanem RANK auf Proteinebene wurden in der vorliegenden Arbeit die mittels SDS-PAGE ihrer Größe nach aufgetrennten Proteine (vgl. II.2.3.2) mit Hilfe des Hoefer TE22 Mighty Small Transphor Mini Transfer Tanks (Hoefer, Holliston, Massachusetts, USA) elektrisch aus dem Polyacrylamidgel auf eine Nitrocellulosemembran mit einer Porengröße von 0,45 µm (Bio-Rad, München) übertragen.

Dabei wurde 1x Tris-Glycin-Transferpuffer nach dem Rezept von Towbin verwendet. Der Proteintransfer erfolgte bei konstanten 250 mA und RT für 45 min und wurde mit Hilfe des reversibel an die positiv geladenen Aminogruppen von Proteinen bindenden Azofarbstoffes Ponceau S überprüft. Nachfolgend wurde die Membran für 1 h bei RT in 5% (w/v) Milchkpulver in DPBS (Blockpuffer) zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen inkubiert. Zum immunologischen Nachweis von humanem RANK-Protein wurde die Membran über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler mit einem monoklonalen anti-RANK Antikörper aus der Maus (sc-374360, 1:200-Verdünnung in Blockpuffer; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA) inkubiert. Der Nachweis von humaner Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) mit Hilfe eines polyklonalen anti-GAPDH Antikörpers aus dem Kaninchen (sc-25778, 1:1.000-Verdünnung in Blockpuffer; Santa Cruz Biotechnology) diente als interne Referenz. Nach der Inkubation mit den Primärantikörpern wurde die Membran bei RT 3 x 10 min in 0,1% Tween-20 in DPBS (DPBS-T) gewaschen. Die spezifisch gebundenen Primärantikörper wurden mit Hilfe peroxidasegekoppelter Sekundärantikörper detektiert. Dabei wurde ein anti-Maus Antikörper aus der Ziege (sc-2005, 1:2.000-Verdünnung in DPBS-T; Santa Cruz Biotechnology) für den Nachweis von RANK sowie ein anti-Kaninchen Antikörper aus der Ziege (A0545, 1:40.000-Verdünnung in DPBS-T; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) für den Nachweis von GAPDH verwendet. Die Inkubation mit den Sekundärantikörpern erfolgte für 1 h bei RT auf einem Schüttler.

Nachdem die Membran zur Entfernung überschüssiger Antikörper bei RT für 3 x 10 min in DPBS-T gewaschen wurde, erfolgte die Visualisierung der Proteinbanden mit Hilfe einer Chemilumineszenzreaktion. Dazu wurde das Pierce ECL Plus Western Blotting Substrat (Pierce Biotechnology, Rockford, Illinois, USA) verwendet. Dabei handelt es sich um ein Substratsystem für das an die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Sekundärantikörper gekoppelte Enzym Meerrettichperoxidase („*horseradish peroxidase*“; HRP). Dieses Enzym katalysiert in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid die Oxidation von Luminol. Dabei entsteht energetisch angeregtes 3-Aminophtalat, welches unter Emission von blauem Licht ( $\lambda = 428 \text{ nm}$ ) in den Normalzustand übergeht. Die Substanzen A und B des Western Blotting Substrates wurden den Herstellerangaben entsprechend im Verhältnis 40:1 in einem Reaktionsgefäß gemischt. Die Nitrocellulosemembran wurde 5 min bei RT mit dem ECL-Substrat inkubiert und in eine Klarsichtfolie eingelegt. Die Chemilumineszenzsignale wurden mit Hilfe des Fusion SL Chemilumineszenz-Detektionssystems (Vilber Lourmat,

Marne-la-Vallée, Frankreich) detektiert und mit Hilfe der Fusion SL Bildanalyse-Software (Vilber Lourmat) dokumentiert.

#### II.2.3.4 Enzyme-linked Immunosorbent-Assay

Der „*Enzyme-linked Immunosorbent-Assay*“ (ELISA) stellt ein standardisiertes immunologisches Verfahren zur Quantifizierung von einzelnen Proteinen in einer Probe dar. Bei einem typischen ELISA im Mikrotiterplattenformat wird das nachzuweisende Protein dabei als Antigen zunächst über einen spezifischen Primärantikörper, den sogenannten „*Capture Antibody*“, an den Boden der Mikrotiterplatte gebunden. Die Zugabe eines biotinylierten Sekundärantikörpers („*Detection Antibody*“), der an einen anderen Bereich desselben Antigens bindet, ermöglicht den selektiven Nachweis des Proteins von Interesse. Über eine Streptavidin-Biotin-Bindung wird der Sekundärantikörper mit dem Reporterenzym HRP gekoppelt, welches schließlich eine Reaktion katalysiert, die dem messbaren Nachweis des Antigens dient. Üblicherweise wird ein chromogenes Nachweisverfahren, beispielsweise die enzymkatalysierte Aktivierung von Tetramethylbenzidin (TMB) durch HRP, verwendet. In diesem Fall entsteht ein blauer Farbstoff, der sich nach Abstoppen der enzymatischen Reaktion durch Zugabe einer schwachen Säure gelb färbt. Die Absorption der Probe kann nachfolgend spektral-photometrisch bei  $\lambda = 450$  nm gemessen werden.

Zur Quantifizierung des von experimentell behandelten makrophagenähnlichen Zellen sezernierten TNF- $\alpha$  im Zellkulturüberstand (vgl. II.2.1.6) wurde in der vorliegenden Arbeit ein humaner TNF- $\alpha$  ELISA (Thermo Scientific, Rockford, Illinois, USA) mit einem Messbereich von 15,6 - 1.000 pg/ml und einer Sensitivität von  $< 2$  pg/ml verwendet. Der Test im Mikrotiterplattenformat wurde den Herstellerangaben entsprechend durchgeführt. Dabei wurden sowohl die TNF- $\alpha$  Standardreihe als auch die Proben im Duplikat vermessen. Die Zellkulturüberstände wurden bei Bedarf in geeignetem Verhältnis mit dem im Kit enthaltenen *Sample Diluent* verdünnt.

Die Absorption der TNF- $\alpha$  Standards sowie der Proben bei  $\lambda = 450$  nm wurde mit Hilfe des Bio-Tek ELx808 Absorptionsreaders für Mikrotiterplatten (BioTek Instruments, Winooski, Vermont, USA) gegen *Sample Diluent* als Referenzwert vermessen. Die Auswertung erfolgte unter Verwendung der MikroWin 2000 Software (Mikrotek Laborsysteme, Overath). Anhand der Standardreihe wurden die TNF- $\alpha$  Konzentrationen in den einzelnen Zellkulturüberständen ermittelt.

Aufgrund der Doppelbestimmung wurden die Werte für die gemessenen TNF- $\alpha$  Konzentrationen der verschiedenen Proben gemittelt. Die Proteinkonzentration wurde in pg/ml angegeben.

#### II.2.3.5 Zytokin-Assay

Zur Quantifizierung der proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$  und IL-6 sowie des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 wurde in der vorliegenden Arbeit ein Bio-Plex Pro™ Zytokin-Assay (Bio-Rad, Herkules, Kalifornien, USA) für humane Zytokine der Gruppe I verwendet. Das Prinzip der Methode entspricht dem Grundprinzip eines ELISA. Die Quantifizierung multipler Proteine in einer einzigen Probe wird durch die Verwendung fluoreszenzmarkierter magnetischer Kugeln, die mit einem „*Capture Antibody*“ gekoppelt sind, ermöglicht. Die Identifizierung der verschiedenen Kugeln („*Beads*“) erfolgt über unterschiedliche interne Konzentrationen des Fluoreszenzfarbstoffes. Diese sogenannten „*Bead Regionen*“ repräsentieren unterschiedliche Proteine von Interesse. Die jeweiligen Antigene werden über ihre spezifischen Antikörper an die *Beads* gebunden. Durch die Zugabe eines biotinylierten „*Detection Antibody*“ wird ein Komplex gebildet. Dieser wird über Streptavidin mit dem Reportermolekül Phycoerythrin (PE) gekoppelt. Schließlich kann die Konzentration der einzelnen Proteine mit Hilfe einer durchflusszytometrischen Messung bestimmt werden. Dabei wird die Fluoreszenz der *Beads* bei  $\lambda = 635$  nm zur Identifikation der einzelnen Antigene gemessen. Die Proteinkonzentration wird für jedes Antigen über die Fluoreszenz des PE-Reporters bei  $\lambda = 532$  nm gemessen.

Die Quantifizierung von IL-1 $\beta$ , IL-6 und IL-10 in den Zellkulturüberständen von experimentell behandelten makrophagenähnlichen Zellen (vgl. II.2.1.6) mit Hilfe des Bio-Plex Pro™ Zytokin-Assay erfolgte im Zentrallabor des Universitätsklinikums Essen. Das speziell auf die Analyse humaner Zytokine der Gruppe I abgestimmte Protokoll zum Nachweis von IL-1 $\beta$ , IL-6 und IL-10 im 96-well Mikrotiterplattenformat wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Vor dem Einsatz im Bio-Plex Pro™ Zytokin-Assay wurden die Zellkulturüberstände bei 1.000 x g und 4°C für 15 min abzentrifugiert und die Überstände zur Zytokinquantifizierung verwendet. Dabei wurden die unverdünnten Proben im Unikat neben einer Standardkurve in Kulturmedium im Duplikat quantifiziert.

Die Messung erfolgte unter Verwendung des Bio-Plex 200 Suspensionsarray-Systems (Bio-Rad, Herkules, Kalifornien, USA). Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Bio-Plex Manager 6.0 Software (Bio-Rad, Herkules, Kalifornien, USA).

Anhand der Standardreihen wurden die Zytokinkonzentrationen in den einzelnen Zellkulturüberständen ermittelt. Die Proteinkonzentration wurde in pg/ml angegeben.

#### II.2.3.6 Immunfluoreszenzfärbung

Zum Nachweis der Expression des makrophagenspezifischen Oberflächenmarkers CD68 und des spezifischen Rezeptors für das Neuropeptid CGRP, CGRP-Rezeptor 1 (CGRPR1 bzw. „*Calcitonin Receptor Like Receptor*“, CRLR), auf der Oberfläche makrophagenähnlicher Zellen wurde eine Immunfluoreszenz (IF)-Färbung durchgeführt. Dabei werden bestimmte Zellbestandteile bzw. Proteine immunologisch mit spezifischen Antikörpern markiert. Diese Antigene werden nachfolgend über an die Antikörper gebundene Fluorochrome sichtbar gemacht.

Für die IF-Versuche wurden zunächst monozytäre THP-1 Zellen mit einer Zelldichte von ca. 130.000 Zellen/cm<sup>2</sup> (Zellzahl: ca. 234.400 Zellen) in einem Gesamtvolumen von 800 µl in den Vertiefungen einer Permanox 4-well *Chamber Slide* (Nunc, Rochester, New York, USA) ausgesät und zu makrophagenähnlichen Zellen differenziert (vgl. II.2.1.4). Die Immunfluoreszenzfärbung wurde in zwei verschiedenen Phasen der Differenzierung durchgeführt. Um die Präsenz der Marker CD68 und CGRPR1 auf der Zelloberfläche zu dem Zeitpunkt zu untersuchen, an welchem die Zellen für die experimentelle Behandlung (vgl. II.2.1.6) eingesetzt wurden, wurden sie nach dem 72-stündigen Differenzierungsprozess und 48-stündiger PMA-Pause gefärbt. Um außerdem die Expression von CD68 und CGRPR1 nach der initialen Phase der PMA-induzierten Differenzierung zu analysieren, wurden die Zellen zudem nach nur 72-stündiger PMA-Stimulation angefärbt.

Für die Färbung wurden die makrophagenähnlichen Zellen zunächst 3 x in DPBS gewaschen und anschließend für 10 min in eiskaltem 100% Methanol auf Eis fixiert und permeabilisiert. Daraufhin wurden die Zellen erneut 3 x 5 min bei RT in DPBS gewaschen. Unspezifische Bindestellen wurden für 30 min bei RT mit 2% (w/v) BSA in DPBS (IF-Blockpuffer) abgesättigt. Nachfolgend wurden die Zellen im Dunkeln für 1,5 h bei RT mit fluorochromkonjugierten Antikörpern inkubiert. Dabei wurde ein monoklonaler Alexa Fluor 647-konjugierter anti-CD68 Antikörper aus der Maus (sc-20060, 1:1.000-Verdünnung in IF-Blockpuffer; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA) neben einem polyklonalen Alexa Fluor 488-konjugierten anti-CRLR/CGRPR1 Antikörper aus dem Kaninchen (bs-1860R-A488, 1:1.400-Verdünnung in IF-Blockpuffer; Bioss, Woburn,

Massachusetts, USA) verwendet. Die Zellkerne wurden mit Hilfe des in die DNA interkalierenden Hoechst 33258 Fluoreszenzfarbstoffes (1:2.000-Verdünnung in IF-Blockpuffer) gegengefärbt. Nach der Inkubation mit den direktkonjugierten Antikörpern wurden die Zellen im Dunkeln bei RT 1 x 5 min in DPBS-T und 3 x 5 min in DPBS gewaschen. Schließlich wurden die Zellen in Dako Fluorescent Mounting Medium (Dako, Hamburg) eingedeckelt und der Analyse am AxioImager.M2 Fluoreszenzmikroskop (Carl Zeiss, Jena) unterzogen. Die Dokumentation der Immunfluoreszenzsignale erfolgte mit Hilfe der angeschlossenen AxioCam MRc5 Digitalkamera (Carl Zeiss, Jena) und der Zen Pro 2011 Mikroskop-Software (Carl Zeiss, Jena).

Humane Endothelzellen aus der Nabelschnurvene („*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*“ (HUVEC), kryokonservierte Zellen von verschiedenen Spendern, Katalog-Nr.: C-12203; PromoCell, Heidelberg) dienen als Positivkontrolle für die Expression von CD68 (Gottfried et al. 2008) und CGRPR1 (Zheng et al. 2010). Die Zellen wurden in „*Endothelial Cell Growth Medium*“ (ECGM + SupplementMix, Katalog-Nr.: C-22010; PromoCell) kultiviert. Für die IF-Färbung wurden die adhären wachsenden HUVEC mit einer Zelldichte von ca. 75.000 Zellen/cm<sup>2</sup> (Zellzahl: ca. 136.000 Zellen) in einem Gesamtvolumen von 800 µl in den Vertiefungen einer Permax 4-well *Chamber Slide* ausgesät und über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Zellen nach dem zuvor beschriebenen Protokoll fixiert, gefärbt und dokumentiert.

#### II.2.4 Statistische Methoden

Die gesammelten Daten bezüglich der Versuchsergebnisse aus den Zellkultur-experimenten, d. h. Daten zur mRNA-Expression und Zytokinsekretion der experimentell behandelten makrophagenähnlichen Zellen (n = 5), wurden unter Verwendung der SPSS Statistics Software (Version 21; IBM, Ehningen) ausgewertet.

Zunächst wurden die Datensätze zur Erstellung deskriptiver Statistiken einer explorativen Datenanalyse unterzogen. Dabei wurden die Daten außerdem mit Hilfe des Shapiro-Wilk Tests auf Normalverteilung getestet. Die Versuchsergebnisse wurden als Mittelwerte ± Standardabweichung (SD) dargestellt. Bei der grafischen und tabellarischen Darstellung der Ergebnisse wurde zwischen (1) der Darstellung der osteolytischen Effekte, hervorgerufen durch die verschiedenen experimentellen Stimuli, und (2) der Darstellung der potentiell therapeutischen Effekte durch Behandlung der Zellen mit dem Neuropeptid CGRP im Vergleich zu unbehandelten Zellen unterschieden.

Um zu analysieren, ob (a) ein Zeit x Gruppen-Interaktionseffekt, (b) ein Zeiteffekt und (c) ein Intergruppeneffekt vorlag, wurde zur Untersuchung sowohl der osteolytischen als auch der therapeutischen Effekte eine univariate zweifaktorielle Varianzanalyse (*Two-way ANOVA*) für alle abhängigen Variablen durchgeführt.

Bei Vorliegen signifikanter *F*-Werte bezüglich der verschiedenen untersuchten Effekte wurden paarweise Vergleiche sowohl zur Analyse der osteolytischen bzw. therapeutischen Effekte zwischen den einzelnen experimentellen Gruppen zu jedem Zeitpunkt als auch zur Analyse des Einflusses der Inkubationszeit auf die einzelnen Gruppen durchgeführt. Dazu wurde für normalverteilte Datensätze der *t*-Test bei unabhängigen Stichproben durchgeführt. Für nichtnormalverteilte Datensätze wurde hingegen der nichtparametrische Wilcoxon-Rangsummentest durchgeführt.

Die Ergebnisse wurden bei einem *p*-Wert von  $p < 0,05$  als statistisch signifikant (\*) betrachtet. Zur Abstufung des Signifikanzniveaus wurden *p*-Werte von  $p < 0,01$  als statistisch hochsignifikant (\*\*) sowie von  $p < 0,001$  als statistisch extrem hochsignifikant (\*\*\*) bewertet.

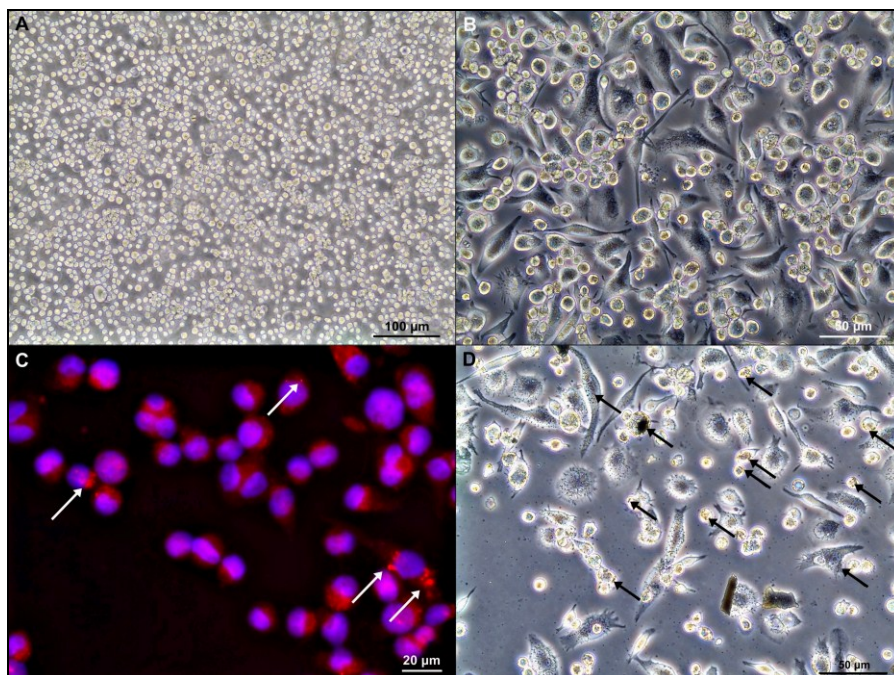


### III. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss des Neuropeptids CGRP auf die Reaktion makrophagenähnlicher Zellen bei Stimulation mit UHMWPE-Partikeln bzw. LPS untersucht. Die Analyse der zellulären Produktion proinflammatorischer Zytokine, welche maßgeblich an der Entstehung periprothetischer Osteolysen beteiligt sind, stand dabei im Vordergrund. Ein potentiell inhibitorischer Einfluss von CGRP auf die osteolyseassoziierte Zytokinsekretion wurde im Zellkulturmodell erforscht.

#### III.1 Die Stimulation von THP-1 Monozyten mit Phorbolestern führt zu ihrer Differenzierung in makrophagenähnliche Zellen

Die Stimulation von Zellen der Linie THP-1 mit dem Phorbolester PMA führte zu einer Differenzierung der Monozyten in makrophagenähnliche Zellen (Abb. 6).



**Abb. 6: Differenzierung von THP-1 Monozyten zu makrophagenähnlichen Zellen**

Die Stimulation von monozytären THP-1 Zellen mit PMA führt zu ihrer Differenzierung in makrophagenähnliche Zellen. (A) Monozytäre Suspensionszellen der Linie THP-1 (ca. 100x Vergrößerung) (B) Adhärente makrophagenähnliche Zellen mit abgeflachter, zum Teil spindelförmiger Morphologie (ca. 200x Vergrößerung) (C) Expression des makrophagenspezifischen Oberflächenmarkers CD68 (rot) in THP-1 makrophagenähnlichen Zellen (s. weiße Pfeile). Die Zellkerne (blau) sind mit Hoechst 33258 gegengefärbt (ca. 200x Vergrößerung) (D) Phagozytose von Latexpartikeln durch THP-1 makrophagenähnliche Zellen (s. schwarze Pfeile) (ca. 200x Vergrößerung)

Die Suspensionszellen (Abb. 6A) verloren dabei ihre Fähigkeit zur Proliferation und wurden adhärenz. Die Morphologie der Zellen veränderte sich im Laufe des Differenzierungsprozesses: die runden THP-1 Monozyten wurden größer, granulärer und entwickelten eine zum Teil abgeflachte Morphologie mit spindelförmigen Zellausläufern (Abb. 6B). Die ausdifferenzierten makrophagenähnlichen Zellen exprimierten den makrophagenspezifischen Oberflächenmarker CD68 in ihrer Zellmembran (Abb. 6C). Außerdem waren sie in der Lage, kommerziell erhältliche Latexpartikel mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 0,80 µm sowie deren Aggregate durch Phagozytose aufzunehmen (Abb. 6D).

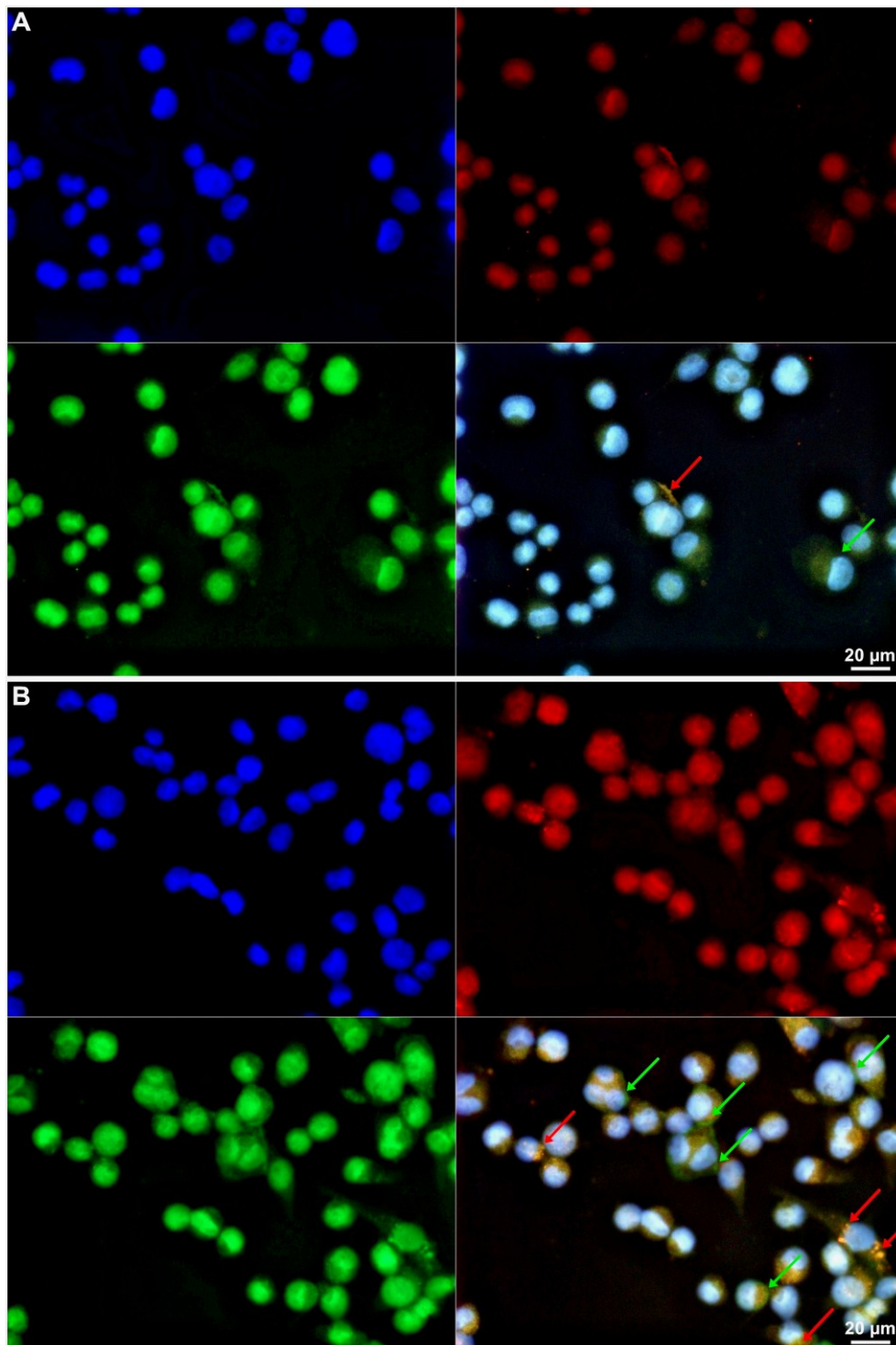
Die Viabilität der makrophagenähnlichen Zellen betrug zu Beginn der Experimente, d. h. im direkten Anschluss an den insgesamt 120-stündigen Differenzierungsprozess, etwa 93%. Bei Behandlung mit UHMWPE-Partikeln, LPS oder CGRP über einen weiteren Zeitraum von bis zu 48 h veränderte sich die Viabilität der Zellen mit Werten zwischen ca. 93-96% kaum. Nur die 48-stündige Stimulation der Zellen mit LPS führte zu einer deutlichen Abnahme der Viabilität auf bis zu 88%.

Die Adhärenz der makrophagenähnlichen Zellen hingegen betrug zum Experimentbeginn etwa 72%. Bei Behandlung mit UHMWPE-Partikeln, LPS oder CGRP nahm die Adhärenz der Zellen mit zunehmender Inkubationszeit ab. Dabei blieb die Adhärenz der Zellen bei Stimulation über 6-24 h mit etwa 70-75% weitgehend unverändert. Bei 48-stündiger Stimulation nahm die Adhärenz der Zellen allerdings deutlich ab. Die Werte wiesen dabei mit etwa 64-71% starke Schwankungen auf. Generell schienen die Zellen bei Partikelstimulation eine höhere Adhärenz aufzuweisen als bei Stimulation mit LPS oder CGRP.

### **III.2 THP-1 makrophagenähnliche Zellen besitzen Rezeptoren für CGRP**

Die Expression des spezifischen Rezeptors für das Neuropeptid  $\alpha$ -CGRP, CGRPR1, sowie des makrophagenspezifischen Oberflächenmarkers CD68 wurde qualitativ mit Hilfe einer immunzytochemischen Färbung nachgewiesen.

Nach 72-stündiger Stimulation der Zellen mit PMA war die Expression von CGRPR1 und CD68 nur schwach erkennbar, was auf eine geringe Expression der Marker hindeutete (Abb. 7A). Die Signaldichte von CGRPR1 erschien dabei dichter zu sein als die von CD68. Die CGRPR1-Signale waren dabei hauptsächlich in der Kernmembran zu finden.



**Abb. 7: Oberflächenmarker THP-1 makrophagenähnlicher Zellen**

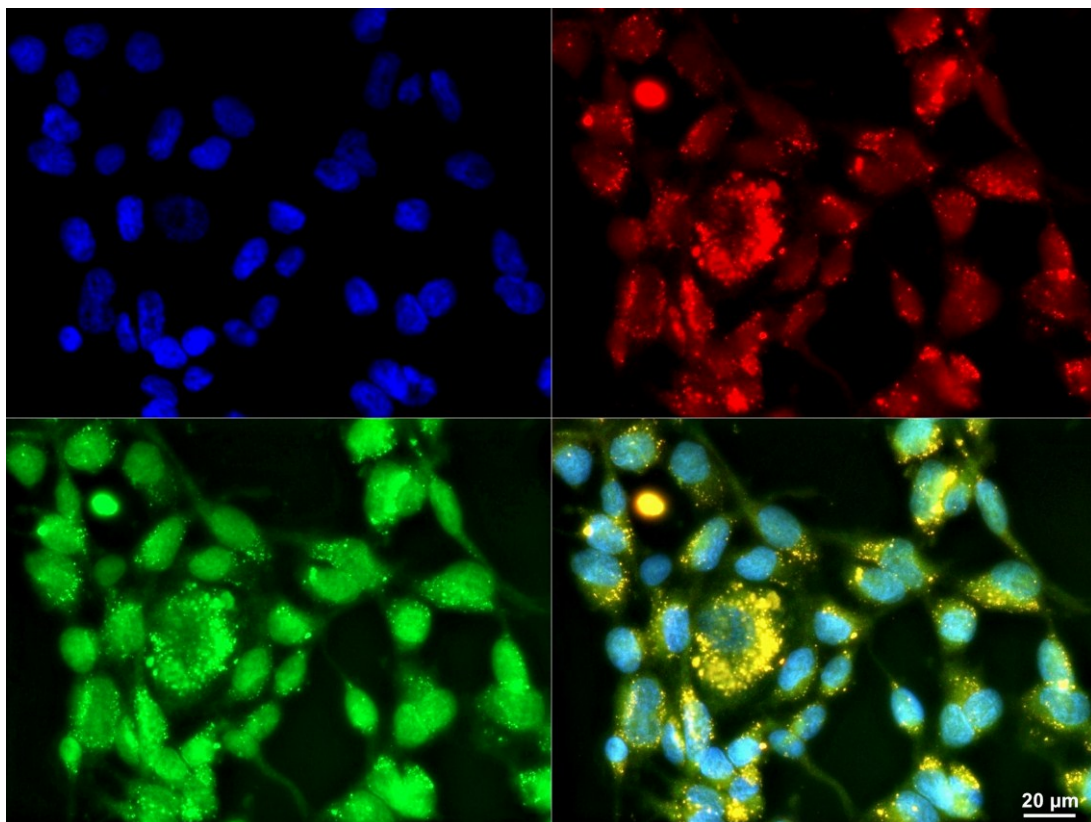
THP-1 makrophagenähnliche Zellen exprimieren sowohl den makrophagenspezifischen Oberflächenmarker CD68 als auch den spezifischen Rezeptor für das Neuropeptid CGRP, CGRP-Rezeptor Typ I (CGRPR1). Dargestellt sind die einzelnen Fluoreszenzkanäle zur Illustration der mit Hoechst 33258 gefärbten Zellkerne (blau, oben links) neben der Expression von CD68 (rot, oben rechts) und CGRPR1 (grün, unten links). In der Überlagerung dieser Kanäle (unten rechts) ist die Expression von CGRPR1 (grüne Pfeile) sowie dessen Kolokalisation mit CD68 (rote Pfeile) hervorgehoben.

(A) THP-1 makrophagenähnliche Zellen nach 72-stündiger PMA-Stimulation (ca. 200x Vergrößerung).

(B) THP-1 makrophagenähnliche Zellen nach abgeschlossener Differenzierung, d. h. nach 72-stündiger PMA-Stimulation mit anschließender 48-stündiger PMA-Pause (ca. 200x Vergrößerung).

Nach 72-stündiger PMA-Stimulation mit anschließender 48-stündiger PMA-Pause waren die Fluoreszenzsignale beider Marker deutlich zu erkennen (Abb. 7B). Somit konnte die Expression der Rezeptoren zu dem Zeitpunkt qualitativ nachgewiesen werden, an welchem die Zellen für die Experimente genutzt wurden. Dabei konnten CD68 und CGRPR1 in der Zellmembran lokalisiert werden. In der Zellmembran befand sich CGRPR1 häufig in der Peripherie sowie in Regionen mit Zell-Zell-Kontakten. Zum Teil konnte CGRPR1 jedoch auch in der Kernmembran nachgewiesen werden. Häufig konnte in der Zellmembran eine Kolokalisation der beiden Fluoreszenzsignale nachgewiesen werden (Abb. 7B).

Die Zellkerne der makrophagenähnlichen Zellen, welche mit dem in die DNA interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33258 gefärbt wurden, zeigten nach insgesamt 120-stündiger Kultivierung teilweise Anzeichen von Kernkondensation und Kernfragmentierung (Daten werden nicht gezeigt). Dies deutete auf vereinzelte beginnende apoptotische Prozesse in den Zellen hin.



**Abb. 8: HUVEC-Positivkontrolle für die Expression von CD68 und CGRPR1**

Humane Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (HUVEC) dienen als Positivkontrolle für die in dieser Arbeit verwendeten fluorchromkonjugierten Antikörper gegen den makrophagenspezifischen Oberflächenmarker CD68 und den CGRPR1-Rezeptor. Dargestellt sind die einzelnen Fluoreszenzkanäle zur Illustration der mit Hoechst 33258 gefärbten Zellkerne (blau, oben links) neben der Expression von CD68 (rot, oben rechts) und CGRPR1 (grün, unten links). In der Überlagerung dieser Kanäle (unten rechts) ist die Kolokalisation von CGRPR1 mit CD68 dargestellt (ca. 200x Vergrößerung).

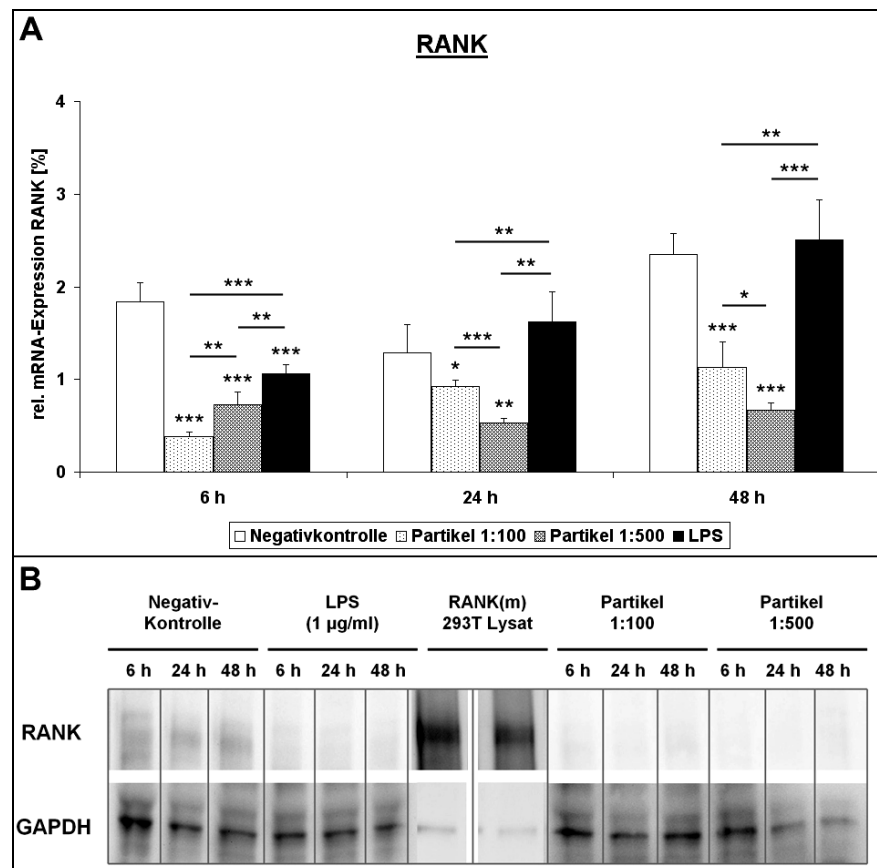
Humane Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (HUVEC) wurden als Positivkontrolle für die Expression von CGRPR1 (Gottfried et al. 2008) und CD68 (Zheng et al. 2010) genutzt (Abb. 8). Die spezifische Bindung der hier verwendeten Antikörper an ihre Zielstrukturen konnte mit Hilfe der Endothelzellen überprüft werden. Die beiden Marker schienen in diesen primären Zellen stärker exprimiert zu werden als in den differenzierten makrophagenähnlichen Zellen.

### **III.3 UHMWPE-Partikel und LPS fördern die Produktion von RANK(L) in THP-1 makrophagenähnlichen Zellen nicht**

Die relative mRNA-Expression von *RANK* war mit Werten von  $1,29 \pm 0,299\%$  bis  $2,35 \pm 0,230\%$  bei unbehandelten Zellen (Negativkontrolle) sehr gering (Tab. 6; Abb. 9A). Auch bei Behandlung der Zellen mit UHMWPE-Partikeln oder LPS zur Simulation der periprothetischen Osteolyse ging die relative *RANK*-Expression nicht über  $2,50 \pm 0,433\%$  hinaus. Bei Behandlung der Zellen mit UHMWPE-Partikeln nahm die relative *RANK*-Expression zu jedem Zeitpunkt ab und erreichte zum Teil nur noch etwa 20-30% der Expression in der Negativkontrolle. Der suppressive Effekt der Partikel auf die relative mRNA-Expression von *RANK* war bei hoher Partikeldosis ( $\leq 0,73 \pm 0,132\%$ ,  $p \leq 0,004$ ) stärker ausgeprägt als bei geringer Partikeldosis ( $\leq 1,13 \pm 0,277\%$ ,  $p \leq 0,049$ ) (Abb. 9A). Bei 6-stündiger Inkubationszeit zeigte auch die Stimulation mit LPS einen inhibitorischen Effekt auf die *RANK*-Expression der makrophagenähnlichen Zellen ( $1,07 \pm 0,099\%$ ,  $p < 0,001$ ). Dieser war mit einer Reduktion der relativen Expression um etwa 40% jedoch weniger stark ausgeprägt als der inhibitorische Effekt der UHMWPE-Partikel, welcher zu einer 70-80%-igen Reduktion der *RANK*-Expression führte. Die 24- und 48-stündige Inkubation der makrophagenähnlichen Zellen mit LPS führte hingegen nicht zu einer signifikanten Veränderung der relativen *RANK*-Expression ( $\leq 2,50 \pm 0,433\%$ ,  $p \geq 0,129$ ) im Vergleich zur Negativkontrolle (Abb. 9A).

Die Ergebnisse der quantitativen Genexpressionsanalyse wurden durch die Analyse der Proteinexpression von RANK im Western Blot bestätigt (Abb. 9B). Eine Quantifizierung der Proteinbanden war jedoch aufgrund der schwachen Proteinbande, die sich kaum von dem Hintergrund abgrenzen ließ, nicht möglich. Die Beurteilung der Proteinexpression erfolgte daher qualitativ im Vergleich zu GAPDH als interner Referenz sowie zu kommerziell erhältlichem RANK-transfiziertem Zelllysats als externer Kontrolle.

RANK konnte lediglich in der Negativkontrolle als schwache Proteinbande nachgewiesen werden. Bei Stimulation der Zellen mit UHMWPE-Partikeln oder LPS war RANK-Protein hingegen nicht nachweisbar. (Abb. 9B). Dies entsprach dem in der Genexpressionsanalyse beobachteten inhibitorischen Effekt von Partikeln und LPS auf die Expression von *RANK* in makrophagenähnlichen Zellen (Abb. 9A).



**Abb. 9: RANK-Expression in THP-1 makrophagenähnlichen Zellen**

**bei Osteolyse-ähnlicher Stimulation mit UHMWPE-Partikeln und bakteriellem LPS**

THP-1 makrophagenähnliche Zellen wurden für 6, 24 und 48 h mit verschiedenen Stimuli (UHMWPE-Partikel in Zell-Partikel-Verhältnissen von 1:100 und 1:500 sowie 1 µg/ml LPS) zur Simulation periprothetischer Osteolysen *in vitro* behandelt.

(A) Relative mRNA-Expression von *RANK* im Verhältnis zum Referenzgen *β-Actin* [%]. Die Veränderungen der relativen Genexpression von *RANK* gegenüber unbehandelten Zellen (Negativkontrolle) wurden mittels quantitativer RT-PCR ermittelt. Signifikanzniveaus:  $p < 0,05$  (statistisch signifikant, \*),  $p < 0,01$  (statistisch hochsignifikant, \*\*),  $p < 0,001$  (statistisch extrem hochsignifikant, \*\*\*)

(B) Proteinexpression von RANK im Vergleich zu kommerziell erhältlichem RANK(m)-transfiziertem 293T Ganzzelllysat als externer Kontrolle und Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (GAPDH) als interner Referenz. Die Veränderungen der Proteinexpression von RANK gegenüber unbehandelten Zellen (Negativkontrolle) wurden an jeweils 10 µg Gesamtprotein mit Hilfe von SDS-Page und anschließendem Western Blot qualitativ untersucht.

Die Expression von *RANKL* war in makrophagenähnlichen Zellen weder quantitativ noch qualitativ nachweisbar ( $RANKL \leq 0,03 \pm 0,005\%$ ;  $C_t > 30$  ähnlich  $C_t$  (NTC/NRT)).

**Tab. 6: Statistische Analyse zu Partikel- und LPS-induzierten Reaktionen im Makrophagenmodell**

Mit Hilfe einer deskriptiven statistischen Analyse wurden Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (SD) für die Expression bzw. Sekretion ausgewählter Biomarker der periprothetischen Osteolyse bei Behandlung von THP-1 makrophagenähnlichen Zellen mit unterschiedlichen Stimuli (Gruppen: Negativkontrolle, Zell-Partikel-Verhältnisse von 1:100 und 1:500, 1  $\mu$ g/ml LPS) zu jeder experimentellen Inkubationszeit (Zeitpunkte: 6 h, 24 h, 48 h) berechnet. Die Ergebnisse repräsentativer Experimente ( $n \leq 5$ ) sind dargestellt. Zur Analyse von Zeit- bzw. Gruppeneffekten auf die Expression bzw. Sekretion der verschiedenen Biomarker wurden paarweise Vergleiche der einzelnen Datensätze durchgeführt. Es wurden drei  $p$ -Werte für die Analyse des Zeiteffektes innerhalb jeder experimentellen Gruppe ermittelt. Dabei wurde der Unterschied zwischen den einzelnen Inkubationszeiten betrachtet (6 h vs. 24 h, 6 h vs. 48 h und 24 h vs. 48 h). Außerdem wurden je drei  $p$ -Werte für den Intergruppeneffekt zu jedem Zeitpunkt ermittelt. Dabei wurde der Unterschied der osteolytischen Effekte der verschiedenen Stimuli zu jedem Zeitpunkt (6 h, 24 h und 48 h Inkubationszeit) betrachtet. Signifikanzniveaus:  $p < 0,05$  (statistisch signifikant, \*),  $p < 0,01$  (statistisch hochsignifikant, \*\*),  $p < 0,001$  (statistisch extrem hochsignifikant, \*\*\*). Mittelwert  $\pm$  SD und Signifikanzniveaus in Klammern: Werte außerhalb des Messbereiches bzw. normierte Werte, die keine verlässliche statistische Analyse zulassen.

Stimulus	Mittelwert $\pm$ SD			$p$ -Wert Zeiteffekte			$p$ -Wert Stimuluseffekte											
	6 h	24 h	48 h	6 h vs. 24 h	6 h vs. 48 h	24 h vs. 48 h	Negativkontrolle			Partikel 1:100			Partikel 1:500			1 $\mu$ g/ml LPS		
							6 h	24 h	48 h	6 h	24 h	48 h	6 h	24 h	48 h	6 h	24 h	48 h
<b>rel. RANK mRNA-Expression [%]</b>																		
<b>Negativkontrolle</b>	1,83 $\pm$ 0,210	1,29 $\pm$ 0,299	2,35 $\pm$ 0,230	* 0,019	* 0,011	*** 0,000	-	-	-	*** 0,000	* 0,049	*** 0,000	*** 0,000	** 0,004	*** 0,000	*** 0,000	0,129	0,503
<b>Partikel 1:100</b>	0,39 $\pm$ 0,053	0,92 $\pm$ 0,067	1,13 $\pm$ 0,277	*** 0,000	* 0,011	0,238	*** 0,000	* 0,049	*** 0,000	-	-	-	** 0,006	*** 0,000	* 0,041	*** 0,000	** 0,007	** 0,002
<b>Partikel 1:500</b>	0,73 $\pm$ 0,132	0,53 $\pm$ 0,050	0,67 $\pm$ 0,081	* 0,013	0,383	* 0,012	*** 0,000	** 0,004	*** 0,000	** 0,006	*** 0,000	* 0,041	-	-	-	** 0,002	** 0,001	*** 0,000
<b>1 <math>\mu</math>g/ml LPS</b>	1,07 $\pm$ 0,099	1,62 $\pm$ 0,319	2,50 $\pm$ 0,433	* 0,015	*** 0,000	* 0,010	*** 0,000	0,129	0,503	*** 0,000	** 0,007	** 0,002	** 0,002	** 0,001	*** 0,000	-	-	-
<b>rel. TNF-<math>\alpha</math> mRNA-Expression [%]</b>																		
<b>Negativkontrolle</b>	0,37 $\pm$ 0,055	0,26 $\pm$ 0,034	0,38 $\pm$ 0,071	** 0,009	0,607	** 0,009	-	-	-	** 0,007	*** 0,000	0,077	* 0,025	** 0,001	** 0,001	*** 0,000	** 0,001	*** 0,000
<b>Partikel 1:100</b>	4,51 $\pm$ 0,617	0,85 $\pm$ 0,063	2,01 $\pm$ 0,838	** 0,009	* 0,014	0,139	** 0,007	*** 0,000	0,077	-	-	-	0,131	** 0,002	0,233	*** 0,000	** 0,001	*** 0,000
<b>Partikel 1:500</b>	6,51 $\pm$ 1,720	2,56 $\pm$ 0,567	2,69 $\pm$ 0,631	** 0,003	** 0,003	0,725	* 0,025	** 0,001	** 0,001	0,131	** 0,002	0,233	-	-	-	*** 0,000	*** 0,000	*** 0,000
<b>1 <math>\mu</math>g/ml LPS</b>	84,37 $\pm$ 10,242	25,45 $\pm$ 5,775	11,38 $\pm$ 1,433	*** 0,000	*** 0,000	** 0,001	*** 0,000	** 0,001	*** 0,000	*** 0,000	** 0,001	*** 0,000	*** 0,000	** 0,001	*** 0,000	-	-	-

Stimulus	Mittelwert ± SD			p-Wert Zeiteffekte			p-Wert Stimuluseffekte											
	6 h	24 h	48 h	6 h vs. 24 h	6 h vs. 48 h	24 h vs. 48 h	Negativkontrolle			Partikel 1:100			Partikel 1:500			1 µg/ml LPS		
							6 h	24 h	48 h	6 h	24 h	48 h	6 h	24 h	48 h	6 h	24 h	48 h
<b><u>TNF-α fold Sekretion (Referenz: Negativkontrolle)</u></b>																		
<b>Partikel 1:100</b>	311,86 ± 10,512	24,66 ± 5,561	85,30 ± 7,104	*** 0,000	*** 0,000	0,124	-	-	-	-	-	-	0,081	*** 0,000	** 0,001	*** 0,000	*** 0,000	** 0,002
<b>Partikel 1:500</b>	279,67 ± 21,582	178,65 ± 20,408	163,83 ± 21,153	** 0,001	** 0,001	0,352	-	-	-	0,081	*** 0,000	** 0,001	-	-	-	*** 0,000	*** 0,000	** 0,009
<b>1 µg/ml LPS</b>	730,23 ± 52,786	1.365,60 ± 31,322	281,08 ± 52,781	*** 0,000	*** 0,000	*** 0,000	-	-	-	*** 0,000	*** 0,000	** 0,002	*** 0,000	*** 0,000	** 0,009	-	-	-
<b><u>IL-1β fold Sekretion (Referenz: Negativkontrolle)</u></b>																		
<b>Partikel 1:100</b>	(1,00) (± 0,000)	(1,00) (± 0,000)	2,49 ± 0,184	-	(**) 0,005	(**) 0,005	-	-	-	-	-	-	(*) 0,010	(*) 0,010	** 0,001	(***) 0,000	(**) 0,001	** 0,001
<b>Partikel 1:500</b>	4,68 ± 0,637	5,62 ± 1,183	6,23 ± 0,880	0,292	0,050	0,464	-	-	-	(*) 0,010	(*) 0,010	** 0,001	-	-	-	** 0,003	*** 0,000	** 0,002
<b>1 µg/ml LPS</b>	7,00 ± 0,661	24,28 ± 2,890	13,01 ± 1,862	** 0,001	** 0,005	** 0,001	-	-	-	(***) 0,000	(**) 0,001	** 0,001	** 0,003	*** 0,000	** 0,002	-	-	-
<b><u>IL-6 fold Sekretion (Referenz: Negativkontrolle)</u></b>																		
<b>Partikel 1:100</b>	11,05 ± 1,602	(1,00) (± 0,000)	5,28 ± 1,488	(**) 0,008	** 0,002	(**) 0,003	-	-	-	-	-	-	0,100	(**) 0,007	*** 0,000	*** 0,000	(***) 0,000	** 0,004
<b>Partikel 1:500</b>	13,84 ± 1,947	53,74 ± 7,437	105,84 ± 13,022	** 0,009	*** 0,000	** 0,001	-	-	-	0,100	(**) 0,007	*** 0,000	-	-	-	** 0,001	*** 0,000	* 0,046
<b>1 µg/ml LPS</b>	164,17 ± 26,793	347,90 ± 39,894	145,03 ± 33,554	*** 0,000	0,407	*** 0,000	-	-	-	*** 0,000	(***) 0,000	** 0,004	** 0,001	*** 0,000	* 0,046	-	-	-



**Tab. 7: Statistische Analyse zur Beeinflussung der Partikel- und LPS-induzierten Reaktionen durch das Neuropeptid CGRP im Makrophagenmodell**

Mit Hilfe einer deskriptiven statistischen Analyse wurden Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (SD) für die Expression bzw. Sekretion ausgewählter Biomarker der periprothetischen Osteolyse bei Behandlung aktivierter THP-1 makrophagenähnlicher Zellen mit dem Neuropeptid CGRP (Gruppen: Kontrolle,  $10^{-8}$  M CGRP) für jeden osteolytischen Stimulus (Negativkontrolle, Zell-Partikel-Verhältnisse 1:100 und 1:500,  $1 \mu\text{g/ml}$  LPS) zu jeder experimentellen Inkubationszeit (Zeitpunkte: 6 h, 24 h, 48 h) berechnet. Die Ergebnisse repräsentativer Experimente ( $n \leq 5$ ) sind dargestellt. Zur Analyse von Zeit- bzw. Gruppeneffekten auf die Expression bzw. Sekretion der verschiedenen Biomarker wurden paarweise Vergleiche der einzelnen Datensätze durchgeführt. Es wurden drei  $p$ -Werte für die Analyse des Zeiteffektes innerhalb jeder experimentellen Gruppe ermittelt. Dabei wurde der Unterschied zwischen den einzelnen Inkubationszeiten betrachtet (6 h vs. 24 h, 6 h vs. 48 h und 24 h vs. 48 h). Außerdem wurden je drei  $p$ -Werte für den Intergruppeneffekt zu jedem Zeitpunkt ermittelt. Dabei wurde der Unterschied der therapeutischen Effekte von CGRP bzw. der Kontrolle zu jedem Zeitpunkt (6 h, 24 h und 48 h Inkubationszeit) betrachtet. Signifikanzniveaus:  $p < 0,05$  (statistisch signifikant, \*),  $p < 0,01$  (statistisch hochsignifikant, \*\*),  $p < 0,001$  (statistisch extrem hochsignifikant, \*\*\*). Mittelwert  $\pm$  SD und Signifikanzniveaus in Klammern: Werte außerhalb des Messbereiches bzw. normierte Werte, die keine verlässliche statistische Analyse zulassen.

Behandlung		Mittelwert $\pm$ SD			$p$ -Wert Zeiteffekte			$p$ -Wert Neuropeptideffekte					
		6 h	24 h	48 h	6 h vs. 24 h	6 h vs. 48 h	24 h vs. 48 h	Kontrolle			$10^{-8}$ M CGRP		
								6 h	24 h	48 h	6 h	24 h	48 h
<b><u>TNF-<math>\alpha</math> fold mRNA-Expression</u> (Referenz: Negativkontrolle)</b>													
Partikel 1:100	Kontrolle	13,115 $\pm$ 3,865	3,326 $\pm$ 0,556	5,364 $\pm$ 1,322	*	*	*	-	-	-	0,451	**	*
	$10^{-8}$ M CGRP	11,023 $\pm$ 3,393	1,935 $\pm$ 0,356	3,153 $\pm$ 0,724	***	**	*	0,451	**	*	-	-	-
Partikel 1:500	Kontrolle	18,291 $\pm$ 6,476	10,095 $\pm$ 3,080	7,577 $\pm$ 3,643	*	0,053	0,175	-	-	-	0,132	0,109	0,175
	$10^{-8}$ M CGRP	33,490 $\pm$ 13,884	6,906 $\pm$ 2,475	5,251 $\pm$ 0,743	*	0,010	0,190	0,132	0,109	0,175	-	-	-
1 $\mu\text{g/ml}$ LPS	Kontrolle	239,103 $\pm$ 42,745	97,549 $\pm$ 13,252	31,449 $\pm$ 10,423	***	***	***	-	-	-	0,091	***	0,073
	$10^{-8}$ M CGRP	352,665 $\pm$ 124,942	6,843 $\pm$ 1,201	20,858 $\pm$ 4,861	***	***	***	0,091	***	0,073	-	-	-
<b><u>TNF-<math>\alpha</math> fold Sekretion</u> (Referenz: Negativkontrolle)</b>													
Partikel 1:100	Kontrolle	311,859 $\pm$ 10,512	24,662 $\pm$ 5,561	85,296 $\pm$ 7,104	***	***	0,124	-	-	-	***	**	**
	$10^{-8}$ M CGRP	154,640 $\pm$ 19,637	50,078 $\pm$ 5,145	147,357 $\pm$ 29,081	***	0,666	**	***	**	**	-	-	-
Partikel 1:500	Kontrolle	279,669 $\pm$ 21,582	178,646 $\pm$ 20,408	163,833 $\pm$ 21,153	**	**	0,352	-	-	-	0,134	***	*
	$10^{-8}$ M CGRP	350,565 $\pm$ 61,812	48,382 $\pm$ 16,476	125,818 $\pm$ 15,915	**	**	**	0,134	***	*	-	-	-

Behandlung		Mittelwert ± SD			p-Wert Zeiteffekte			p-Wert Neuropeptideffekte					
		6 h	24 h	48 h	6 h vs. 24 h	6 h vs. 48 h	24 h vs. 48 h	Kontrolle			10 <sup>-8</sup> M CGRP		
								6 h	24 h	48 h	6 h	24 h	48 h
<b><u>TNF-α fold Sekretion (Referenz: Negativkontrolle)</u></b>													
1 µg/ml LPS	Kontrolle	730,229 ± 52,786	1.365,600 ± 31,322	281,078 ± 52,781	*** 0,000	*** 0,000	*** 0,000	-	-	-	0,105	*** 0,000	* 0,043
	10 <sup>-8</sup> M CGRP	831,268 ± 83,588	301,977 ± 82,044	366,376 ± 41,398	** 0,001	*** 0,000	0,180	0,105	*** 0,000	* 0,043	-	-	-
<b><u>IL-1β fold Sekretion (Referenz: Negativkontrolle)</u></b>													
Partikel 1:100	Kontrolle	(1,000 ± 0,000)	(1,000 ± 0,000)	2,493 ± 0,185	-	(**) 0,005	(**) 0,005	-	-	-	-	(*) 0,022	** 0,001
	10 <sup>-8</sup> M CGRP	(1,000 ± 0,000)	1,562 ± 0,441	4,646 ± 0,595	(*) 0,022	(***) 0,000	*** 0,000	-	(*) 0,022	** 0,001	-	-	-
Partikel 1:500	Kontrolle	4,680 ± 0,637	5,620 ± 1,183	6,233 ± 0,880	0,292	0,050	0,464	-	-	-	0,050	0,059	0,285
	10 <sup>-8</sup> M CGRP	7,607 ± 2,151	8,965 ± 2,111	6,980 ± 0,922	0,289	1,000	0,136	0,050	0,059	0,285	-	-	-
1 µg/ml LPS	Kontrolle	7,002 ± 0,661	24,275 ± 2,890	13,013 ± 1,862	** 0,001	** 0,005	** 0,001	-	-	-	0,242	** 0,002	0,917
	10 <sup>-8</sup> M CGRP	6,460 ± 0,590	10,513 ± 0,302	13,150 ± 1,698	*** 0,000	** 0,002	0,050	0,242	** 0,002	0,917	-	-	-
<b><u>IL-6 fold Sekretion (Referenz: Negativkontrolle)</u></b>													
Partikel 1:100	Kontrolle	11,047 ± 1,602	(1,000 ± 0,000)	5,284 ± 1,488	(**) 0,008	** 0,002	(**) 0,003	-	-	-	0,169	(**) 0,004	** 0,002
	10 <sup>-8</sup> M CGRP	8,845 ± 2,010	3,636 ± 0,993	26,273 ± 4,957	** 0,001	** 0,001	** 0,002	0,169	(**) 0,004	** 0,002	-	-	-
Partikel 1:500	Kontrolle	13,843 ± 1,947	53,740 ± 7,439	105,838 ± 13,022	** 0,009	*** 0,000	** 0,001	-	-	-	** 0,003	*** 0,000	** 0,001
	10 <sup>-8</sup> M CGRP	79,447 ± 24,549	19,550 ± 4,580	61,306 ± 5,674	** 0,001	0,147	*** 0,000	** 0,003	*** 0,000	** 0,001	-	-	-
1 µg/ml LPS	Kontrolle	164,173 ± 26,793	347,900 ± 39,894	145,025 ± 33,554	*** 0,000	0,407	*** 0,000	-	-	-	0,197	*** 0,000	0,754
	10 <sup>-8</sup> M CGRP	133,000 ± 33,548	42,903 ± 13,366	150,540 ± 16,465	** 0,008	0,335	*** 0,000	0,197	*** 0,000	0,754	-	-	-

### **III.4 UHMWPE-Partikel und LPS induzieren eine proinflammatorische Zytokinproduktion durch THP-1 makrophagenähnliche Zellen**

Die experimentelle Stimulation makrophagenähnlicher Zellen mit UHMWPE-Partikeln oder bakteriellem LPS induzierte sowohl die mRNA-Expression als auch die Proteinsekretion verschiedener proinflammatorischer Zytokine (Tab. 6).

#### **III.4.1 Partikel- und LPS-induzierte *TNF- $\alpha$* mRNA-Expression**

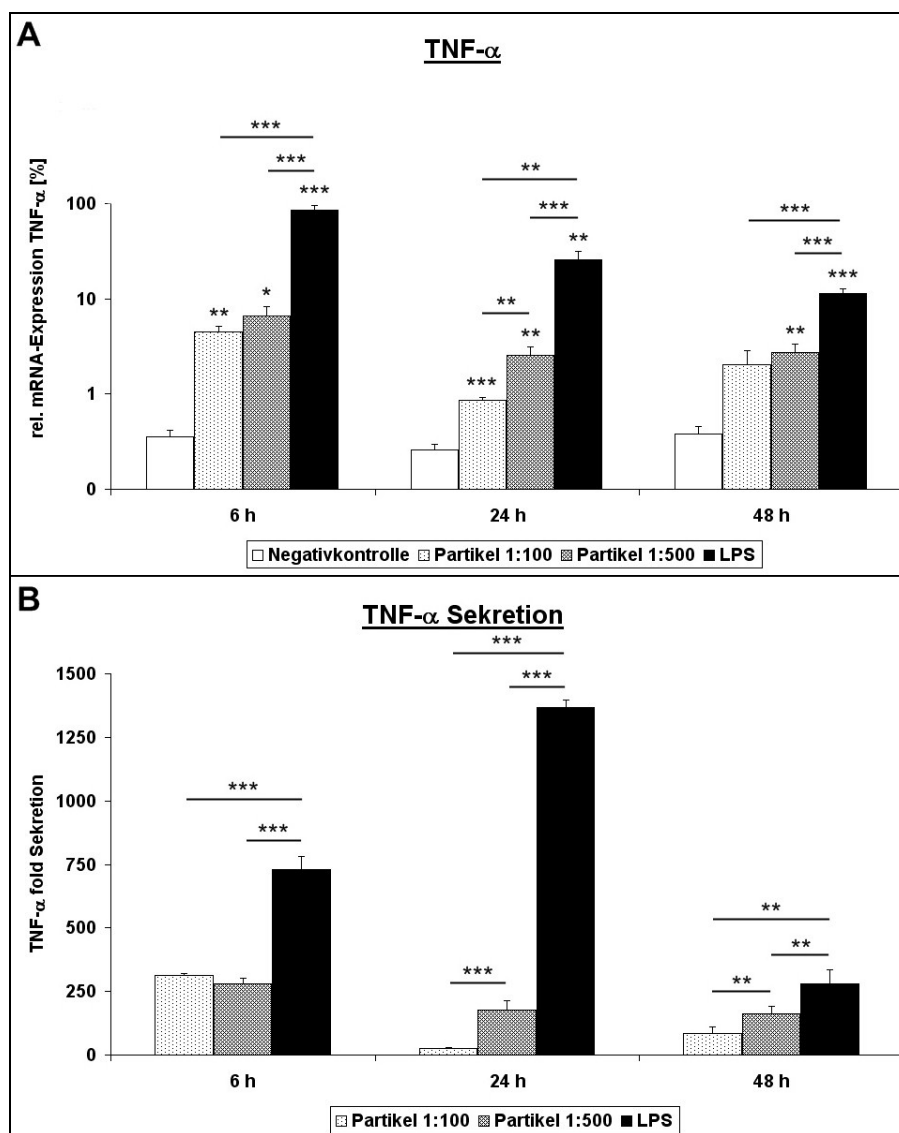
Die relative mRNA-Expression von *TNF- $\alpha$*  war mit Werten zwischen  $0,26 \pm 0,034\%$  und  $0,38 \pm 0,071\%$  in der unbehandelten Negativkontrolle sehr gering. Die relative *TNF- $\alpha$*  Expression war dabei, mit Ausnahme des Wertes für die Inkubationszeit von 24 h, konstant ( $0,37 \pm 0,055\% - 0,38 \pm 0,071\%$ ;  $p = 0,607$ ) (Tab. 6; Abb. 10A).

Die Stimulation der makrophagenähnlichen Zellen mit UHMWPE-Partikeln und LPS führte zu einem Anstieg der relativen *TNF- $\alpha$*  Expression, die in Abhängigkeit von dem entsprechenden Stimulus und der Inkubationszeit eine bis zu ca. 230-fache Expression der Negativkontrolle erreichte (*TNF- $\alpha$* :  $0,85 \pm 0,063\% - 84,37 \pm 10,24\%$ ;  $p \leq 0,025$ ). Dabei erzielte die relative *TNF- $\alpha$*  mRNA-Expression bei einer Inkubationszeit von 6 h jeweils den Maximalwert und nahm anschließend über die Zeit ab ( $p \leq 0,725$ ) (Abb. 10A). Bei Behandlung der Zellen mit UHMWPE-Partikeln erhöhte sich die Expression auf Werte bis zum 18-fachen gegenüber der Negativkontrolle. Die Induktion der *TNF- $\alpha$*  Expression war dabei bei hoher Partikeldosis ( $2,56 \pm 0,567\% - 6,51 \pm 1,720\%$ ;  $p \leq 0,025$ ) stärker ausgeprägt als bei geringer Partikeldosis ( $0,85 \pm 0,063\% - 4,51 \pm 0,617\%$ ;  $p \leq 0,077$ ). Der stärkste Anstieg in der relativen *TNF- $\alpha$*  Expression wurde allerdings durch Stimulation der makrophagenähnlichen Zellen mit LPS erzielt ( $11,38 \pm 1,433\% - 84,37 \pm 10,242\%$ ;  $p \leq 0,001$ ) (Abb. 10A).

#### **III.4.2 Partikel- und LPS-induzierte *TNF- $\alpha$* Sekretion**

Die Zytokinproduktion von *TNF- $\alpha$*  wurde außerdem im Zellkulturüberstand makrophagenähnlicher Zellen auf Proteinebene mit Hilfe eines ELISA quantifiziert. Die Zytokin-konzentrationen in der Negativkontrolle lagen unterhalb des Messbereiches des verwendeten Tests. Daher wurden die entsprechenden Werte auf 1 pg/ml *TNF- $\alpha$*  normiert.

Die Zytokinsekretion der behandelten Zellen wurde anhand der Sekretion in der Negativkontrolle standardisiert und als relative Sekretion dargestellt. Die Ergebnisse bezüglich der Sekretion von TNF- $\alpha$  bestätigten größtenteils die in der Expressionsanalyse gewonnenen Erkenntnisse (Tab 6; Abb. 10).



**Abb. 10: Osteolyseassoziierte TNF- $\alpha$  Produktion in THP-1 makrophagenähnlichen Zellen**

THP-1 makrophagenähnliche Zellen wurden für 6, 24 und 48 h mit verschiedenen Stimuli (UHMWPE-Partikel in Zell-Partikel-Verhältnissen von 1:100 und 1:500 sowie 1  $\mu$ g/ml LPS) zur Simulation periprotetischer Osteolysen *in vitro* behandelt.

(A) Relative mRNA-Expression von *TNF- $\alpha$*  im Verhältnis zum Referenzgen  *$\beta$ -Actin* [%]. Die Veränderungen der relativen Genexpression von *TNF- $\alpha$*  gegenüber unbehandelten Zellen (Negativkontrolle) wurden mittels quantitativer RT-PCR ermittelt.

(B) Relative Zytokinsekretion von TNF- $\alpha$ . Die Zytokinsekretion von TNF- $\alpha$  wurde mit Hilfe eines ELISA quantifiziert und anhand der Sekretion von unbehandelten Zellen (Negativkontrolle, normiert auf 1 pg/ml TNF- $\alpha$ ) standardisiert („fold Sekretion“).

Signifikanzniveaus:  $p < 0,05$  (statistisch signifikant, \*),  $p < 0,01$  (statistisch hochsignifikant, \*\*),  $p < 0,001$  (statistisch extrem hochsignifikant, \*\*\*)

Insgesamt betrachtet war die TNF- $\alpha$  Sekretion bei Aktivierung der Zellen mit LPS ( $281,08 \pm 52,781 - 1.365,60 \pm 31,322$ ) höher als bei Stimulation mit UHMWPE-Partikeln ( $24,66 \pm 5,561 - 311,86 \pm 10,512$ ;  $p \leq 0,009$ ). Dabei zeigten Partikel in hoher Dosis ( $163,83 \pm 21,153 - 279,67 \pm 21,582$ ) einen insgesamt stärkeren proinflammatorischen Effekt als Partikel in niedriger Dosis ( $24,66 \pm 5,561 - 311,86 \pm 10,512$ ) ( $p \leq 0,081$ ) (Abb. 10B).

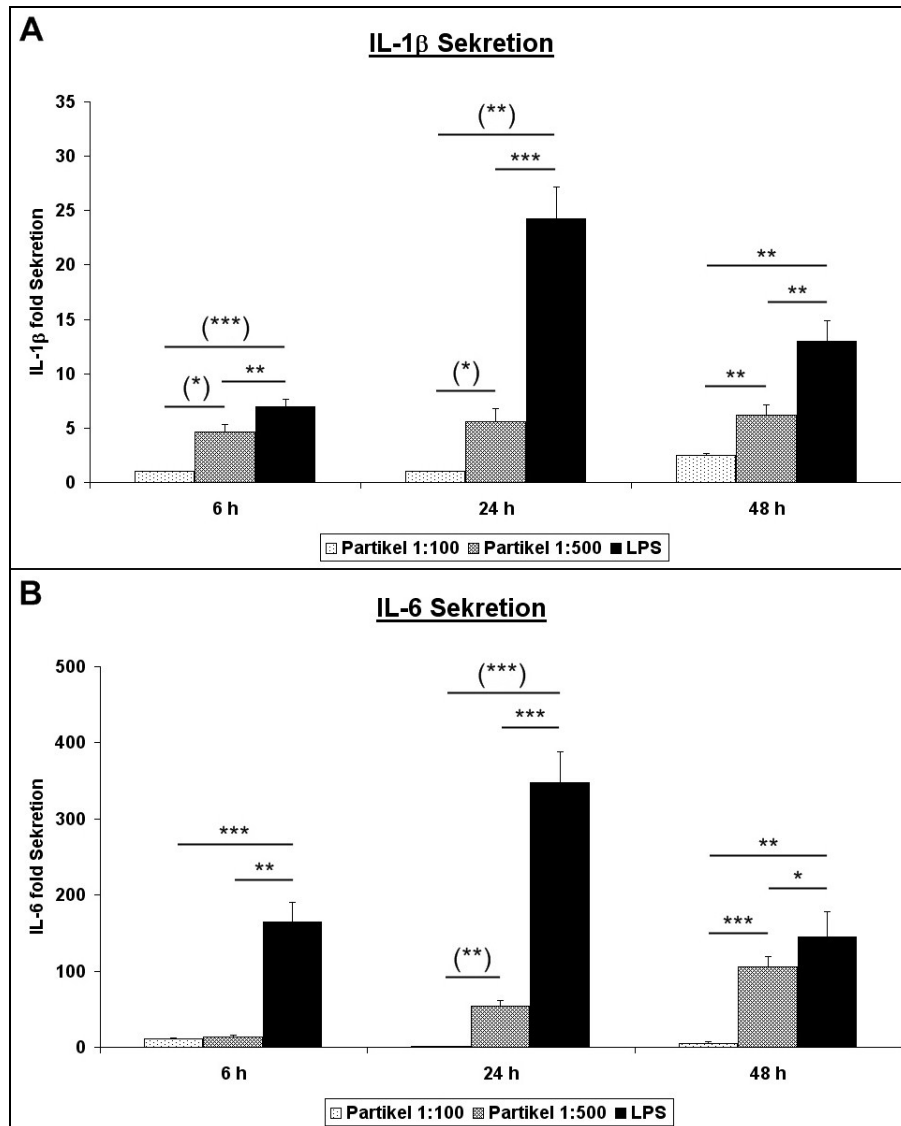
Bei Behandlung der Zellen mit UHMWPE-Partikeln wurde jeweils bei einer Inkubationszeit von 6 h die höchste TNF- $\alpha$  Sekretion gemessen. Bei hoher Partikeldosis nahm die Zytokinsekretion konstant über die Zeit ab ( $p \leq 0,352$ ), während bei geringer Partikeldosis die niedrigste Zytokinsekretion bei 24 h Inkubation beobachtet wurde ( $p < 0,001$ ). Bei Behandlung der Zellen mit LPS hingegen konnte die stärkste Zytokinproduktion bei einer Inkubationszeit von 24 h gemessen werden (Abb. 10B). Diese erreichte eine ca. 55-fache Konzentration im Vergleich zur Stimulation mit UHMWPE-Partikeln in niedriger Dosis ( $p < 0,001$ ).

### III.4.3 Partikel- und LPS-induzierte IL-1 $\beta$ Sekretion

Die Zytokinproduktion von IL-1 $\beta$  wurde ausschließlich auf Proteinebene quantifiziert, wobei die Konzentration im Zellkulturüberstand makrophagenähnlicher Zellen mit Hilfe eines Bio-Plex Assays gemessen wurde. Die Zytokinkonzentrationen in der unbehandelten Negativkontrolle lagen unterhalb des Messbereiches des verwendeten Tests, weshalb die entsprechenden Werte analog zu TNF- $\alpha$  auf 1 pg/ml IL-1 $\beta$  normiert wurden. Die Zytokinsekretion der behandelten Zellen wurde anhand der Sekretion in der Negativkontrolle standardisiert und als relative Sekretion dargestellt (Tab. 6; Abb. 11A).

Die IL-1 $\beta$  Produktion der Zellen ( $2,49 \pm 0,184 - 24,28 \pm 2,890$ ) war im Vergleich zu TNF- $\alpha$  sehr gering. Bei Stimulation mit geringer Partikeldosis lagen die bei Inkubationszeiten von 6 h und 24 h gemessenen IL-1 $\beta$  Konzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze des verwendeten Tests, sodass die auf 1 pg/ml normierten Werte keine zuverlässigen Aussagen zuließen. Bei Stimulation mit hoher Partikeldosis war mit zunehmender Inkubationszeit ein Anstieg der IL-1 $\beta$  Sekretion zu beobachten ( $4,68 \pm 0,637 - 6,23 \pm 0,880$ ), der jedoch nicht signifikant war ( $p \geq 0,050$ ) (Abb. 11A). Die stärkste IL-1 $\beta$  Sekretion konnte bei Stimulation der makrophagenähnlichen Zellen mit LPS gemessen werden ( $7,00 \pm 0,661 - 24,28 \pm 2,890$ ). Dabei wurde die maximale IL-1 $\beta$  Produktion bei einer Inkubationszeit von 24 h erreicht. Sie erreichte etwa die 10-fache Konzentration der niedrigsten detektierbaren IL-1 $\beta$  Menge im Vergleich zur Stimulation mit UHMWPE-

Partikeln ( $p = 0,001$ ). Insgesamt zeigte sich, analog zu TNF- $\alpha$ , dass die Aktivierung der Zellen mit LPS im Vergleich zu Partikelstimulation zu einer höheren Sekretion proinflammatorischer Zytokine führt (Abb. 11A).



**Abb. 11: Osteolyseassoziierte Produktion von IL-1 $\beta$  und IL-6 in THP-1 makrophagenähnlichen Zellen**

THP-1 makrophagenähnliche Zellen wurden für 6, 24 und 48 h mit verschiedenen Stimuli (UHMWPE-Partikel in Zell-Partikel-Verhältnissen von 1:100 und 1:500 sowie 1  $\mu$ g/ml LPS) zur Simulation periprotetischer Osteolysen *in vitro* behandelt. Die Zytokinsekretion von IL-1 $\beta$  und IL-6 wurde mit Hilfe eines Bio-Plex Zytokin-Assay quantifiziert und anhand der Sekretion von unbehandelten Zellen (Negativkontrolle, normiert auf 1 pg/ml Zytokin) standardisiert („fold Sekretion“).

(A) Relative Zytokinsekretion von IL-1 $\beta$ .

(B) Relative Zytokinsekretion von IL-6.

Signifikanzniveaus:  $p < 0,05$  (statistisch signifikant, \*),  $p < 0,01$  (statistisch hochsignifikant, \*\*),  $p < 0,001$  (statistisch extrem hochsignifikant, \*\*\*); Sterne in Klammern deuten auf statistisch nicht verlässliche Angaben bei normierten Werten hin

#### III.4.4 Partikel- und LPS-induzierte IL-6 Sekretion

Auch die Zytokinproduktion von IL-6 wurde ausschließlich auf Proteinebene quantifiziert, wobei die Konzentration im Zellkulturüberstand makrophagenähnlicher Zellen ebenfalls mit Hilfe eines Bio-Plex Assays gemessen wurde. Die Zytokinkonzentrationen in der unbehandelten Negativkontrolle lagen unterhalb des Messbereiches des verwendeten Tests, weshalb die entsprechenden Werte auf 1 pg/ml IL-6 normiert wurden. Die Zytokinsekretion der behandelten Zellen wurde anhand der Sekretion in der Negativkontrolle standardisiert und als relative Sekretion dargestellt (Tab. 6; Abb. 11B).

Die IL-6 Produktion durch makrophagenähnliche Zellen bei osteolyseähnlicher Stimulation ( $5,28 \pm 1,488 - 347,90 \pm 39,894$ ) war im Vergleich zu TNF- $\alpha$  ebenfalls verhältnismäßig gering, fiel im Vergleich zu IL-1 $\beta$  jedoch höher aus. Bei Behandlung der Zellen mit Partikeln in geringer Dosis nahm die IL-6 Sekretion tendenziell mit zunehmender Inkubationszeit ab ( $\leq 11,05 \pm 1,602$ ;  $p \leq 0,008$ ), wobei die Werte bei 24 h Inkubation unterhalb der Nachweisgrenze des Tests lagen. Bei Behandlung der Zellen mit UHMWPE-Partikeln in hoher Dosis hingegen nahm die IL-6 Sekretion über die Inkubationszeit zu ( $13,84 \pm 1,947 - 105,84 \pm 13,022$ ;  $p \leq 0,009$ ) (Abb. 11B). Die stärkste IL-6 Sekretion konnte wiederum bei Stimulation der Zellen mit LPS beobachtet werden ( $145,03 \pm 33,554 - 347,90 \pm 39,894$ ). Diese war beim Vergleich der Werte für 6 h und 48 h Inkubation tendenziell unverändert ( $p = 0,407$ ), erreichte jedoch bei 24 h Inkubation ein Maximum ( $p < 0,001$ ), welches einer etwa 65-fachen Konzentration der niedrigsten detektierbaren Zytokinmenge bei Stimulation mit Partikeln entsprach (Abb. 11B).

#### III.4.5 Partikel- und LPS-induzierte IL-10 Sekretion

Die Konzentrationen des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 befanden sich unterhalb des Messbereiches bzw. an der Nachweisgrenze der verwendeten Quantifizierungsmethode. Mit Hilfe der wenigen extrapolierten Werte, die aus den außerhalb der IL-10 Standardkurve liegenden Messwerten berechnet wurden, ließen sich keine verlässlichen Aussagen treffen. Auf eine Darstellung der Ergebnisse wurde aus diesem Grund verzichtet. Die Sekretion von IL-10 konnte in makrophagenähnlichen Zellen demzufolge weder durch die Stimulation mit UHMWPE-Partikeln oder LPS noch durch die Behandlung mit dem Neuropeptid CGRP angeregt werden.

### **III.5 Das Neuropeptid CGRP moduliert die Produktion osteolyseassoziiertes Zytokine in THP-1 makrophagenähnlichen Zellen**

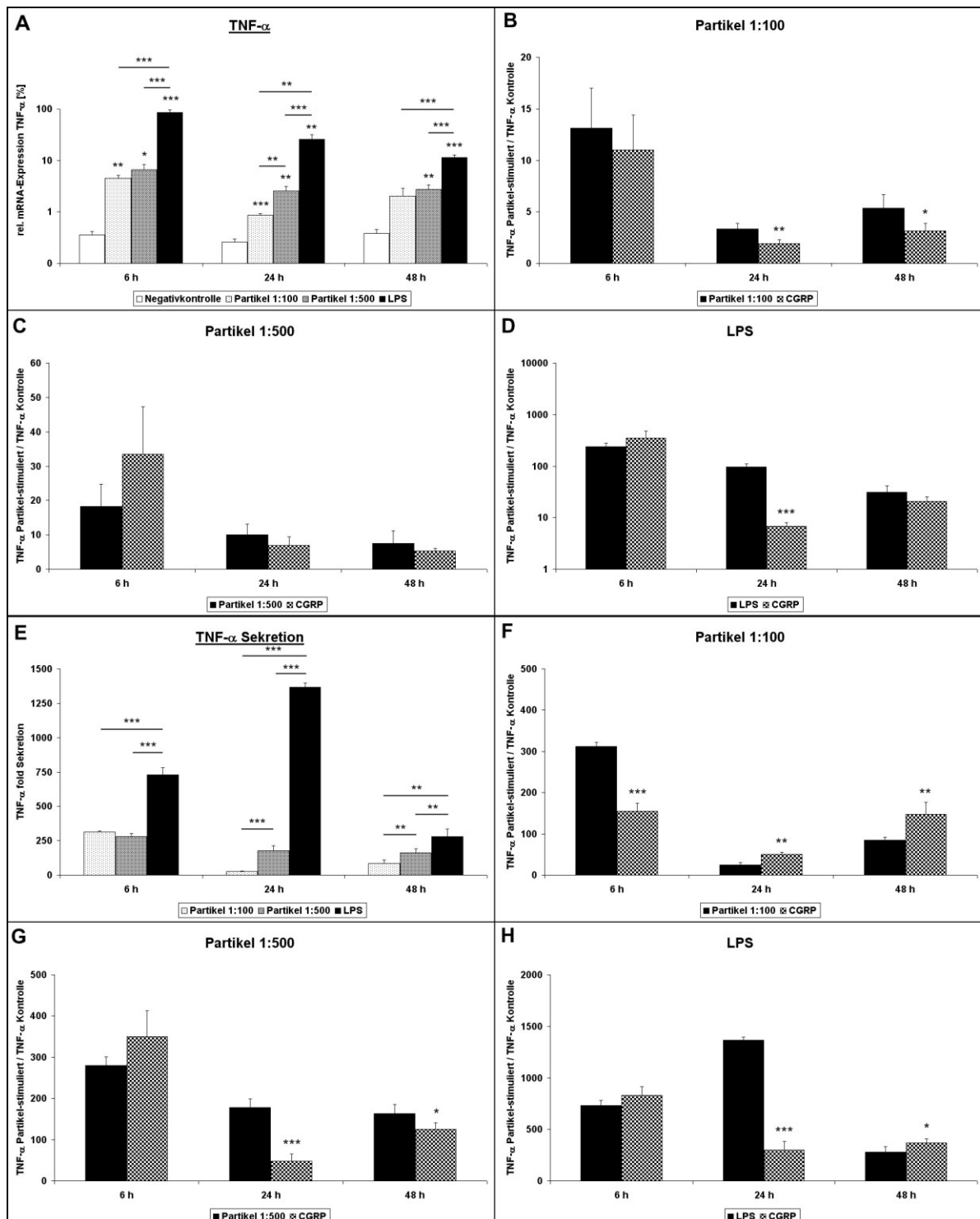
Die Behandlung aktivierter makrophagenähnlicher Zellen mit CGRP führte zu Veränderungen sowohl in der Partikel- und LPS-induzierten mRNA-Expression als auch in der Proteinsekretion verschiedener proinflammatorischer Zytokine. Die relative Expression bzw. Sekretion der analysierten Zytokine bei osteolytischer Stimulation bzw. bei Behandlung mit dem Neuropeptid CGRP wurden relativ zu der entsprechenden unbehandelten Kontrolle angegeben (Tab. 7).

#### **III.5.1 Partikel- und LPS-induzierte *TNF- $\alpha$* Expression bei CGRP-Behandlung**

Die mRNA-Expression von *TNF- $\alpha$*  nahm in Abhängigkeit von der Stärke der osteolytischen Stimuli zu (Zell-Partikel-Verhältnis 1:100 < Zell-Partikel-Verhältnis 1:500 < LPS). Dabei nahm die *TNF- $\alpha$*  Expression mit zunehmender Inkubationszeit ab oder blieb unverändert (vgl. III.4.1) (Abb. 12A). Interessanterweise führte die Behandlung der stimulierten Zellen mit CGRP in Abhängigkeit vom jeweiligen Stimulus zu einer zeitabhängigen Inhibition der relativen *TNF- $\alpha$*  Expression (Tab. 7; Abb. 12B-D).

Bei geringer Partikeldosis führte die Behandlung mit CGRP (*TNF- $\alpha$*   $\leq 11,023 \pm 3,393$ ) dabei zu jeder Inkubationszeit zu einer Inhibition der *TNF- $\alpha$*  Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ( $\leq 13,115 \pm 3,865$ ) auf bis zu 60% der ursprünglichen mRNA-Expression (Abb. 12B). Der inhibitorische Effekt von CGRP war in diesem Fall bei 24 h und 48 h Inkubation signifikant ( $p \leq 0,020$ ). Bei hoher Partikeldosis hingegen blieb die *TNF- $\alpha$*  Expression bei Behandlung mit CGRP ( $\leq 33,490 \pm 13,884$ ) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ( $\leq 18,291 \pm 6,476$ ) unverändert. Es waren lediglich Tendenzen zu erkennen: bei einer Inkubationszeit von 6 h führte die Behandlung mit CGRP zu einer leicht erhöhten *TNF- $\alpha$*  Expression um etwa den Faktor 2, während bei 24 h und 48 h Inkubation die CGRP-Behandlung zu einer tendenziellen Inhibition der mRNA-Expression auf etwa 65% des Ursprungswertes führte ( $p \geq 0,109$ ) (Abb. 12C). Auch bei LPS-Stimulation führte die Behandlung mit CGRP nicht immer zu statistisch signifikanten Effekten auf die *TNF- $\alpha$*  Expression (Abb. 12D). Bei einer Inkubationszeit von 6 h führte die CGRP-Behandlung zu einem etwa 1,5-fachen Anstieg der mRNA-Expression gegenüber der entsprechenden Kontrolle ( $p = 0,091$ ), während es bei 48 h Inkubation zu einer Inhibition der *TNF- $\alpha$*  Expression kam ( $p = 0,073$ ).





**Abb. 12: Modulation der osteolyseassoziierten  $TNF-\alpha$  Produktion in THP-1 makrophagenähnlichen Zellen bei Behandlung mit CGRP**

(A) Relative  $TNF-\alpha$  mRNA-Expression [%] und Einfluss von CGRP (B-D) auf die jeweils auf die Negativkontrolle standardisierte mRNA-Expression von  $TNF-\alpha$  („fold Expression“) bei periprothetischer Osteolyse.

(E) Relative Zytokinsekretion von  $TNF-\alpha$  standardisiert zur Negativkontrolle (normiert auf 1 pg/ml  $TNF-\alpha$ , „fold Sekretion“) und Einfluss von CGRP (F-H) auf die  $TNF-\alpha$  Sekretion bei periprothetischer Osteolyse. Osteolytische Stimuli: Zell:UHMWPE-Partikel-Verhältnisse von 1:100 und 1:500 sowie LPS (1  $\mu$ g/ml) Signifikanzniveaus:  $p < 0,05$  (statistisch signifikant, \*),  $p < 0,01$  (statistisch hochsignifikant, \*\*),  $p < 0,001$  (statistisch extrem hochsignifikant, \*\*\*)

Lediglich bei einer Inkubationszeit von 24 h führte die Behandlung mit CGRP bei LPS-Stimulation zu einer signifikanten Suppression der relativen *TNF- $\alpha$*  Expression ( $6,843 \pm 1,201$ ;  $p < 0,001$ ) auf etwa 7% im Vergleich zu der entsprechenden neuropeptidfreien Kontrolle ( $97,549 \pm 13,252$ ) (Abb. 12D).

### III.5.2 Partikel- und LPS-induzierte *TNF- $\alpha$* Sekretion bei CGRP-Behandlung

Die Zytokinsekretion von *TNF- $\alpha$*  nahm in Abhängigkeit von der Stärke der osteolytischen Stimuli zu. Dabei nahm die *TNF- $\alpha$*  Sekretion bei Partikelstimulation über die Inkubationszeit ab, während sie bei LPS-Stimulation bei 24 h Inkubation ihren Maximalwert erreichte (vgl. III.4.2) (Abb. 12E). Die Behandlung der stimulierten Zellen mit CGRP hingegen führte in Abhängigkeit des Stimulus zu einer zeitabhängigen Inhibition der *TNF- $\alpha$*  Sekretion. Dabei spiegelten sich die in der mRNA-Expression beobachteten Effekte größtenteils auch in der Sekretion von *TNF- $\alpha$*  wider (Tab. 7; Abb. 12F-H).

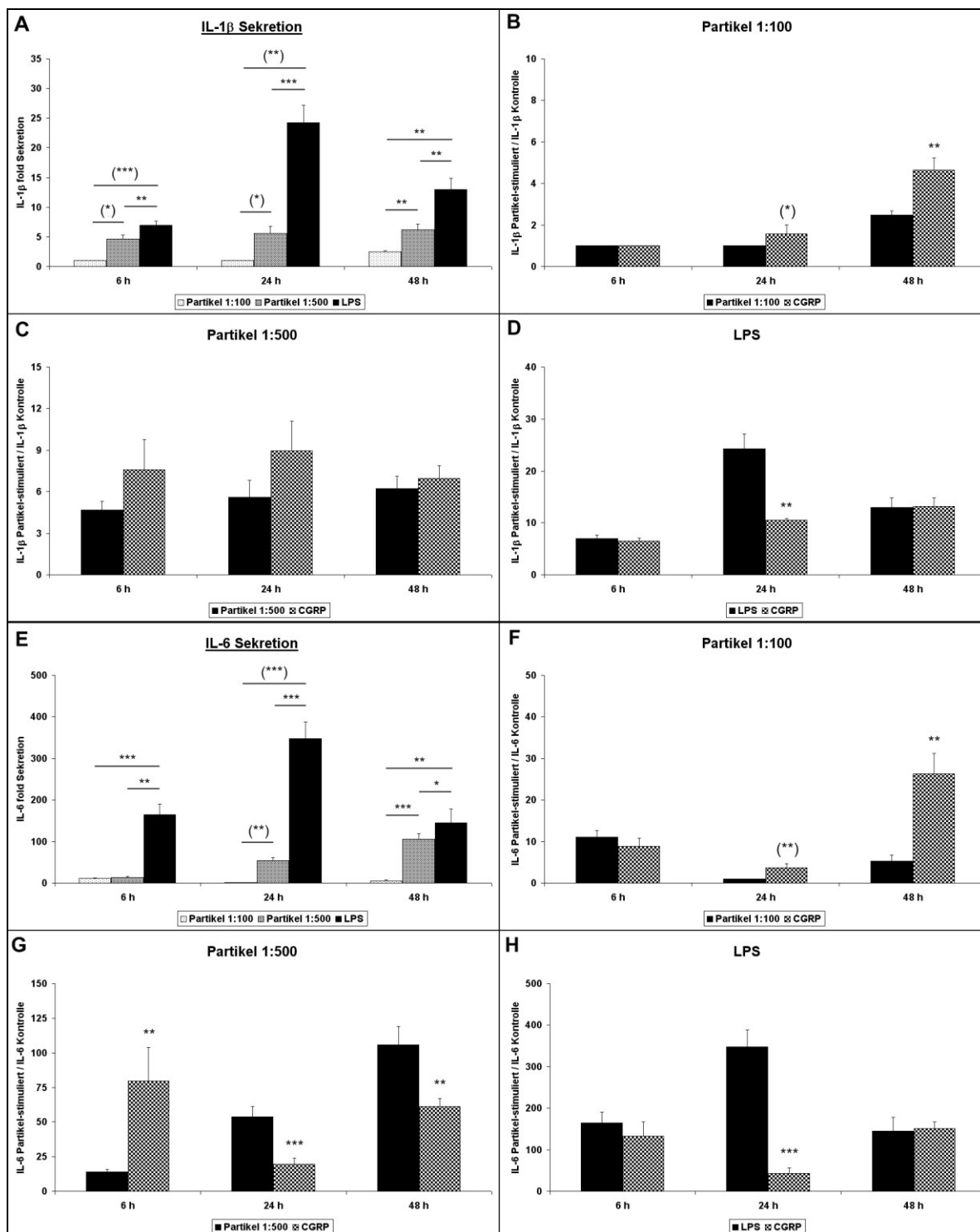
Bei geringer Partikeldosis führte die Behandlung mit CGRP bei 24 h und 48 h Inkubation zu einer etwa 2-fachen Steigerung der *TNF- $\alpha$*  Sekretion ( $\geq 50,078 \pm 5,145$ ;  $p \leq 0,005$ ) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ( $\geq 24,662 \pm 5,561$ ) (Abb. 12F). Dies widersprach dem inhibitorischen Effekt, der bei der relativen *TNF- $\alpha$*  Expression beobachtet werden konnte. Bei einer Inkubationszeit von 6 h führte die CGRP-Behandlung allerdings zu einer Inhibition der *TNF- $\alpha$*  Sekretion ( $154,640 \pm 19,637$ ;  $p < 0,001$ ) um etwa 50% des Ursprungswertes ( $311,859 \pm 10,512$ ) (Abb. 12F), was die inhibitorischen Tendenzen von CGRP in der Expressionsanalyse zum selben Zeitpunkt bestätigte. Bei hoher Partikeldosis verhielten sich die Ergebnisse bei 6 h Inkubation ebenfalls wie bereits in der Expressionsanalyse beobachtet: die Behandlung der Zellen mit CGRP führte zu einer nichtsignifikanten ( $p = 0,134$ ) Steigerung der *TNF- $\alpha$*  Sekretion ( $350,565 \pm 61,812$ ) gegenüber der unbehandelten Kontrolle ( $279,669 \pm 21,582$ ). Bei Inkubationszeiten von 24 h und 48 h hingegen nahm die *TNF- $\alpha$*  Sekretion auf ca. 27% ( $48,382 \pm 16,476$ ;  $p < 0,001$ ) bzw. ca. 77% ( $125,818 \pm 15,915$ ;  $p = 0,028$ ) des jeweiligen Ursprungswertes ( $\leq 178,646 \pm 20,408$ ) ab (Abb. 12G). Dies bestätigte den bereits in der Expressionsanalyse beobachteten tendenziell inhibitorischen Effekt von CGRP. Auch bei Stimulation der Zellen mit LPS wurden die zuvor beschriebenen mRNA-Ergebnisse auf Proteinebene weitgehend bestätigt. Bei 6 h Inkubation führte die Behandlung mit CGRP zu einem leichten Anstieg der *TNF- $\alpha$*  Sekretion ( $831,268 \pm 83,588$ ;  $p = 0,105$ ) im Vergleich zur

unbehandelten Kontrolle ( $730,229 \pm 52,786$ ). Bei 24 h Inkubation kam es ebenfalls zu einer Reduktion der TNF- $\alpha$  Sekretion ( $301,977 \pm 82,044$ ;  $p < 0,001$ ) auf etwa 22% des Ursprungswertes ( $1.365,600 \pm 31,322$ ). Lediglich bei einer Inkubationszeit von 48 h konnte bei CGRP-Behandlung eine leicht gesteigerte TNF- $\alpha$  Sekretion ( $366,376 \pm 41,398$ ;  $p = 0,043$ ) gegenüber der unbehandelten Kontrolle ( $281,078 \pm 52,781$ ) beobachtet werden (Abb. 12H), während hier auf mRNA-Ebene ein inhibitorischer Effekt zu sehen war (Abb. 12D), der allerdings nicht signifikant war.

### III.5.3 Partikel- und LPS-induzierte IL-1 $\beta$ Sekretion bei CGRP-Behandlung

Die Zytokinsekretion von IL-1 $\beta$  war sowohl bei osteolytischer Stimulation als auch bei Behandlung mit CGRP im Vergleich zu TNF- $\alpha$  sehr gering. In Abhängigkeit von der Stärke der osteolytischen Stimuli nahm die IL-1 $\beta$  Sekretion der unbehandelten Zellen leicht zu. Dabei war diese Zunahme bei Partikelstimulation abhängig von der Länge der Inkubationszeit. Bei LPS-Stimulation erreichte die IL-1 $\beta$  Sekretion bei 24 h Inkubation ihren Maximalwert (vgl. III.4.3) (Abb. 13A). Die Behandlung der stimulierten Zellen mit CGRP führte jedoch in Abhängigkeit des Stimulus zu einer zeitabhängigen Inhibition der IL-1 $\beta$  Sekretion (Tab. 7; Abb. 13B-D).

Bei geringer Partikeldosis führte die Behandlung mit CGRP bei 48 h Inkubation zu einem signifikanten Anstieg der IL-1 $\beta$  Sekretion ( $4,646 \pm 0,595$ ;  $p = 0,001$ ) auf etwa den 2-fachen Wert der unbehandelten Kontrolle ( $2,493 \pm 0,185$ ). Bei 24 h Inkubation konnte bei CGRP-Behandlung ( $1,562 \pm 0,441$ ) ein leichter Anstieg der IL-1 $\beta$  Sekretion im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden (Abb. 13B). Bei hoher Partikeldosis führte die Behandlung der Zellen mit CGRP ebenfalls zu einer tendenziell gesteigerten IL-1 $\beta$  Sekretion ( $\geq 6,980 \pm 0,922$ ) gegenüber der unbehandelten Kontrolle ( $\geq 4,680 \pm 0,637$ ) ( $p \geq 0,050$ ) (Abb. 13C). Auch bei LPS-Stimulation waren nur tendenzielle Effekte der Behandlung mit CGRP erkennbar: bei 48 h Inkubation blieb die IL-1 $\beta$  Sekretion bei CGRP-Applikation ( $13,150 \pm 1,698$ ) gegenüber der unbehandelten Kontrolle ( $13,013 \pm 1,862$ ) unverändert ( $p = 0,917$ ), während die Behandlung mit CGRP ( $6,460 \pm 0,590$ ) bei 6 h Inkubation zu einer schwachen Inhibition ( $p = 0,242$ ) der IL-1 $\beta$  Sekretion im Vergleich zu der entsprechenden Kontrolle ( $7,002 \pm 0,661$ ) führte (Abb. 13D). Auch bei 24 h Inkubation war ein inhibitorischer Effekt von CGRP ( $10,513 \pm 0,302$ ) auf die LPS-induzierte IL-1 $\beta$  Sekretion ( $24,275 \pm 2,890$ ) zu beobachten. Die Zytokinsekretion wurde dabei auf etwa 40% des Ursprungswertes reduziert ( $p = 0,002$ ) (Abb. 13D).



**Abb. 13: Modulation der osteolyseassoziierten IL-1 $\beta$  und IL-6 Produktion in THP-1 makrophagenähnlichen Zellen bei Behandlung mit CGRP**

(A) Relative Zytokinsekretion von IL-1 $\beta$  standardisiert zur Negativkontrolle (normiert auf 1 pg/ml IL-1 $\beta$ , „fold Sekretion“) und Einfluss von CGRP (B-D) auf die IL-1 $\beta$  Sekretion bei periprothetischer Osteolyse. (E) Relative Zytokinsekretion von IL-6 standardisiert zur Negativkontrolle (normiert auf 1 pg/ml IL-6, „fold Sekretion“) und Einfluss von CGRP (F-H) auf die IL-6 Sekretion bei periprothetischer Osteolyse. Osteolytische Stimuli: Zell:UHMWPE-Partikel-Verhältnisse von 1:100 und 1:500 sowie LPS (1  $\mu$ g/ml) Signifikanzniveaus:  $p < 0,05$  (statistisch signifikant, \*),  $p < 0,01$  (statistisch hochsignifikant, \*\*),  $p < 0,001$  (statistisch extrem hochsignifikant, \*\*\*); Sterne in Klammern deuten auf statistisch nicht verlässliche Angaben bei normierten Werten hin

### III.5.4 Partikel- und LPS-induzierte IL-6 Sekretion bei CGRP-Behandlung

Die ermittelte Zytokinsekretion von IL-6 war im Vergleich zu TNF- $\alpha$  ebenfalls gering, jedoch höher als von IL-1 $\beta$ . In Abhängigkeit von der Stärke der osteolytischen Stimuli nahm die IL-6 Sekretion deutlich zu. Dabei führten längere Inkubationszeiten bei geringer Partikeldosis tendenziell zu einer Abnahme der IL-6 Sekretion, während diese bei hoher Partikeldosis mit der Inkubationszeit zunahm. Bei LPS-Stimulation hingegen erreichte die IL-6 Sekretion bei 24 h ein Maximum (vgl. III.4.4) (Abb. 13E). Auch hier führte die Behandlung der stimulierten Zellen mit CGRP interessanterweise in Abhängigkeit des osteolytischen Stimulus zu einer zeitabhängigen Inhibition der IL-6 Sekretion (Tab. 7; Abb. 13F-H).

Bei geringer Partikeldosis führte die Behandlung mit CGRP bei 6 h Inkubation ( $8,845 \pm 2,010$ ) zu einer tendenziellen ( $p = 0,169$ ) Inhibition der IL-6 Sekretion im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle ( $11,047 \pm 1,602$ ). Bei 24 h Inkubation konnte ein Anstieg der IL-6 Sekretion ( $3,636 \pm 0,993$ ) bei CGRP-Applikation beobachtet werden, während die Werte in der entsprechenden Kontrolle außerhalb des Messbereiches des verwendeten Tests lagen. Bei 48 h Inkubation nahm die IL-6 Sekretion ebenfalls zu ( $26,273 \pm 4,957$ ;  $p = 0,002$ ) und erreichte etwa den 5-fachen Wert der unbehandelten Kontrolle ( $5,284 \pm 1,488$ ) (Abb. 13F). Bei hoher Partikeldosis führte die CGRP-Behandlung bei 6 h Inkubation zu einem signifikanten Anstieg der IL-6 Sekretion ( $79,447 \pm 24,549$ ;  $p = 0,003$ ) auf etwa das 6-fache Level des Ursprungswertes ( $13,843 \pm 1,947$ ). Bei Inkubationszeiten von 24 h und 48 h hingegen führte die Applikation von CGRP zu einer deutlichen Inhibition der IL-6 Sekretion ( $\leq 61,306 \pm 5,674$ ;  $p \leq 0,001$ ) auf bis zu ca. 35% der unbehandelten Kontrolle ( $\leq 105,838 \pm 13,022$ ) (Abb. 13G). Auch bei LPS-Stimulation führte die Behandlung der Zellen mit CGRP zu einer Inhibition der IL-6 Sekretion (Abb. 13H). Bei einer Inkubationszeit von 6 h ( $133,000 \pm 33,548$ ) war dieser Effekt jedoch nicht signifikant ( $p = 0,197$ ). Bei 24-stündiger Inkubation ( $42,903 \pm 13,366$ ) führte die Applikation von CGRP jedoch zu einer signifikanten Reduktion der IL-6 Sekretion auf etwa 12% des Ursprungswertes ( $347,900 \pm 39,894$ ;  $p < 0,001$ ) (Abb. 13H). Dieser Effekt war interessanterweise auch bei den anderen in der vorliegenden Arbeit analysierten Zytokinen, IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$ , zu beobachten. Bei 48 h Inkubation hingegen kam es durch CGRP-Behandlung zu einem leichten Anstieg der IL-6 Sekretion ( $150,540 \pm 16,465$ ;  $p = 0,754$ ) im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle ( $145,025 \pm 33,554$ ) (Abb. 13H).

## **IV. Diskussion**

### **IV.1 Möglichkeiten und Grenzen des THP-1 Makrophagenmodells**

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression ausgewählter Biomarker der periprothetischen Osteolyse bei Behandlung mit dem Neuropeptid CGRP gegenüber den entsprechenden unbehandelten Kontrollen an humanen makrophagenähnlichen Zellen untersucht. Ein *in vitro* Makrophagenmodell wurde ausgewählt, da Makrophagen den zellulären Hauptbestandteil der abriebpartikelinduzierten periprothetischen Membran darstellen (Morawietz et al. 2006). Als Produzenten verschiedenster proinflammatorischer Zytokine sind sie als Schlüsselmediatoren an der Entstehung der periprothetischen Osteolyse beteiligt (Hallab & Jacobs 2009).

#### **IV.1.1 Differenzierte Zelllinien im Vergleich zu Gewebemakrophagen**

Monozytäre Zellen der Linie THP-1 stellen ein bekanntes und häufig genutztes Modellsystem für Analysen zur Differenzierung und Funktion von Monozyten und Makrophagen sowie durch sie hervorgerufene inflammatorische Reaktionen dar (Tsuchiya et al. 1982; Auwerx 1991). Dabei induziert die Stimulation dieser Zellen mit dem Phorbolster PMA im Vergleich zu 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> einen höheren Differenzierungsgrad, was sich in einer erhöhten Adhärenz der Zellen sowie in der Expression makrophagenspezifischer Oberflächenmarker manifestiert (Schwende et al. 1996). Der Differenzierungsstatus PMA-stimulierter monozytärer Zellen spiegelt jedoch nicht zwangsläufig das Verhalten primärer Makrophagen wider. Die Wahl des Makrophagenmodells kann die experimentellen Ergebnisse beeinflussen: verschiedene Makrophagenpopulationen reagieren so zum Beispiel unterschiedlich auf Abriebpartikel (Glant & Jacobs 1994). Daigneault et al. 2010 konnten allerdings zeigen, dass ein von ihnen entwickeltes Differenzierungsprotokoll makrophagenähnliche Zellen hervorbringt, die eine große Ähnlichkeit zu Gewebemakrophagen aufweisen. So entspricht auch das Zytokinprofil dieser Zellen bei LPS-Stimulation weitestgehend dem von primären Makrophagen. Dennoch weisen andere Studien darauf hin, dass die PMA-Stimulation von Monozyten im Vergleich zu primären Gewebemakrophagen nicht zu vergleichbaren Genexpressionsprofilen führt (Kohro et al. 2004). Außerdem scheinen Phorbolster selbst

einen stimulatorischen Einfluss auf die basale Expression einiger Gene zu besitzen, weshalb es wichtig ist, die Differenzierung der makrophagenähnlichen Zellen unter Verwendung möglichst geringer PMA-Konzentrationen zu induzieren. Eine PMA-Konzentration von 5 ng/ml ist dabei ausreichend (Park et al. 2007).

Dennoch bieten monozytäre Zelllinien im Vergleich zu primären humanen Gewebemakrophagen entscheidende Vorteile: sie sind leicht zu erwerben und lassen sich außerdem leicht kultivieren und vermehren. Die Zellzahlen primärer Makrophagen, die sich nur aus Blutproben oder Gewebebiopsien isolieren lassen, sind hingegen begrenzt. Außerdem weisen diese Zellen aufgrund ihrer spenderabhängigen Herkunft eine sowohl phänotypische als auch genotypische Heterogenität auf (Gordon 2007; Daigneault et al. 2010).

#### **IV.1.2 Differenzierung von THP-1 Monozyten mit dem Phorbolster PMA**

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten makrophagenähnlichen Zellen wurden durch die Differenzierung von monozytären THP-1 Zellen mit 50 nM PMA gewonnen. Der hier angewendete Differenzierungsprozess mit anschließendem PMA-Entzug stellt mittlerweile ein etabliertes Verfahren zur Gewinnung makrophagenähnlicher Zellen dar (Bylski et al. 2009; Daigneault et al. 2010). Dennoch scheint diese Behandlung vor dem eigentlichen Versuchsbeginn Stress bei den Zellen zu induzieren. Dies äußerte sich bei den THP-1 makrophagenähnlichen Zellen insbesondere in einer ungleichmäßig auftretenden Ablösung einzelner adhärenter Zellen über die Gesamtdauer des Experiments. Dies könnte zu der Varianz in den hier gewonnenen quantitativen Ergebnissen beigetragen haben (vgl. III.3, III.4, III.5).

Die Zellen zeigten nach dem 72-stündigen Differenzierungsprozess mit anschließendem 48-stündigem PMA-Entzug hinsichtlich ihrer Morphologie, der Expression spezifischer Oberflächenmarker sowie ihrer Bereitschaft zur Phagozytose zunächst einige Charakteristika nativer Gewebemakrophagen (Schwende et al. 1996; Xing et al. 2002) (vgl. III.1). Die Adhärenz der Zellen war allerdings insbesondere bei längeren Inkubationszeiten unregelmäßig und verhältnismäßig gering (vgl. III.1). Dies ist ein möglicher Hinweis auf eine spontane Dedifferenzierung der makrophagenähnlichen Zellen. Ein solches Phänomen konnte erst kürzlich bei PMA-stimulierten THP-1 Zellen nach PMA-Entzug beobachtet werden (Spano et al. 2013). Zudem konnten in den immunzytochemischen Aufnahmen zum Teil Zellen mit beginnenden Stadien

kondensierter bzw. fragmentierter Zellkerne beobachtet werden (vgl. III.2). Somit zeigten einzelne Zellen teilweise bereits vor Beginn der eigentlichen Experimente erste Anzeichen von Apoptosen (Strasser & Ferrando-May 2008). Die Viabilität der Zellen war jedoch bis auf die 48-stündige Stimulation mit bakteriellem LPS konstant hoch. Dies entspricht den Beobachtungen anderer Studien insofern, dass LPS in einer Konzentration von 1 µg/ml einen ausreichenden Stimulus für die adäquate Aktivierung makrophagenähnlicher Zellen darstellt, welcher gleichzeitig die Viabilität der Zellen nicht beeinträchtigt (Baumann et al. 2005).

Aufgrund der beobachteten Schwankungen in der Adhärenz der Zellen bei relativ gleichmäßiger Viabilität, stellt die Differenzierung monozytärer THP-1 Zellen somit allerdings eine potentielle Fehlerquelle im Experiment dar, welche die zum Teil beobachtete Streuung der in der vorliegenden Arbeit ermittelten quantitativen Ergebnisse erklären könnte. Signifikante Effekte konnten allerdings trotz der zum Teil recht hohen Standardabweichungen identifiziert werden.

#### **IV.1.3 Alternative *in vitro* und *in vivo* Modelle der periprothetischen Osteolyse**

Zur Validierung der in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse bietet sich die Verwendung alternativer Makrophagenmodelle an. Für die Betrachtung humaner Makrophagen könnte dabei auf die Analyse von HL-60 und U937 Zellen zurückgegriffen werden. Diese (pro-)myeloiden Zellen können wie THP-1 Monozyten mit Phorbolestern zu makrophagenähnlichen Zellen differenziert werden. Außerdem könnten primäre humane Makrophagen aus dem Blut von Spendern isoliert werden. Dieses Verfahren wäre allerdings im Gegensatz zu der Verwendung von Zelllinien mit einer genetischen Varianz der entsprechenden Spender verbunden (vgl. IV.1.1). Außerdem böten sich die murinen Zelllinien J774.2, RAW264.7 und IC-21 an.

Insbesondere murine IC-21 Makrophagen scheinen ein vielversprechendes *in vitro* Modell darzustellen, da sie zum Beispiel hinsichtlich ihrer phagozytotischen Aktivität oder der Expression spezifischer Rezeptoren und Antigene charakteristische Eigenschaften nativer peritonealer Makrophagen aufweisen. Außerdem konnte unter Verwendung dieser Zelllinie bei Versuchen mit Abriebpartikeln eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse beobachtet werden (Glant & Jacobs 1994). Dennoch handelt es sich auch bei diesen Zellen nur um ein isoliertes Zellkulturmodell, in welchem die Analyse der periprothetischen Osteolyse bedingt durch den Zelltyp lediglich auf die Betrachtung der inflammatorischen Reaktion



auf Abriebpartikel reduziert wird. Für eine systemische Untersuchung des Phänomens der aseptischen Prothesenlockerung ist die Verwendung von dreidimensionalen Zellkulturen, Gewebekulturen oder Tiermodellen, wie beispielsweise des murinen Kalvariamodells (Merkel et al. 1999), daher nahezu unumgänglich. Die vorgeschlagenen Experimente waren im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit jedoch leider nicht möglich.

#### **IV.2 RANK(L) ist in THP-1 makrophagenähnlichen Zellen offenbar ein ungeeigneter Osteolysemarker**

In dem hier verwendeten Zellkulturmodell wurden UHMWPE-Partikel in zwei verschiedenen Dosen neben bakteriellem LPS als osteolytische Stimuli von unterschiedlicher Stärke verwendet. UHMWPE stellt in der modernen Endoprothetik das am häufigsten verwendete Implantatmaterial dar, wobei es vorwiegend als Artikulationspartner zum Einsatz kommt (Drees et al. 2008). Daher spielen UHMWPE-Partikel eine bedeutende Rolle in der Entstehung der partikelinduzierten periprothetischen Osteolyse. Auch aufgrund ihrer besonderen zellulären Reaktivität (Atkins et al. 2011) waren UHMWPE-Partikel in dieser Arbeit die Abriebpartikel der Wahl. LPS kam als zusätzliche Komponente für die Induktion der periprothetischen Osteolyse im Makrophagenmodell zum Einsatz, da lösliche bzw. an Partikel adsorbierte Endotoxine bekanntlich ebenfalls eine wichtige Rolle in der Prothesenlockerung spielen (Daniels et al. 2000; Bi et al. 2001; Cho et al. 2002). Dabei stellte die gewählte LPS-Konzentration im Vergleich zu den UHMWPE-Partikeln den stärksten Stimulus im Experiment dar.

Keiner der gewählten osteolytischen Stimuli konnte jedoch im Experiment die Produktion der klassischen Osteolysemarker RANK und RANKL in THP-1 makrophagenähnlichen Zellen induzieren (vgl. III.3).

##### **IV.2.1 UHMWPE-Partikel und LPS sind nicht in der Lage, die *RANK(L)* mRNA-Expression in THP-1 makrophagenähnlichen Zellen zu stimulieren**

Die experimentelle osteolytische Stimulation makrophagenähnlicher Zellen mit UHMWPE-Partikeln bzw. LPS führte im Vergleich zu der unbehandelten Negativkontrolle nicht, wie ursprünglich erwartet, zu einer erhöhten Produktion von RANK. Die relative mRNA-Expression von *RANK* war in allen Proben sehr gering (vgl. III.3). Dies liegt

möglicherweise daran, dass in dem hier verwendeten Zellkulturmodell durch Partikel und LPS eine vorwiegend inflammatorische Reaktion der makrophagenähnlichen Zellen induziert wurde. RANK ist nämlich nicht an der primären inflammatorischen Reaktion auf UHMWPE-Partikel beteiligt, ist allerdings essentiell notwendig für die Aktivierung der partikelinduzierten Knochenresorption (Ren et al. 2006).

Bei den hier untersuchten Zellen handelte es sich zudem nicht um knochenabbauende Osteoklasten, welche typischerweise *RANK* exprimieren, sondern um Makrophagen bzw. makrophagenähnliche Zellen. Zwar wird in der Literatur ein direkter Einfluss von  $\text{TNF-}\alpha$  auf die Differenzierung von Makrophagen in aktive Osteoklasten diskutiert (Abu-Amer et al. 1997; Zou et al. 2001), jedoch wird die Auffassung vertreten, dass für den Differenzierungsprozess auch M-CSF und RANKL essentiell notwendig sind (Lam et al. 2000; Zhang et al. 2001). Demzufolge erscheint es äußerst unwahrscheinlich, dass von den makrophagenähnlichen Zellen selbst sezerniertes  $\text{TNF-}\alpha$  allein eine erhöhte *RANK*-Produktion induzieren konnte, welche zu einer weiteren Differenzierung in osteoklastenähnliche Zellen hätte beitragen können.

In anderen *in vitro* Studien konnte *RANK* allerdings auch in THP-1 makrophagenähnlichen Zellen nachgewiesen werden (Baumann et al. 2004; Bylski et al. 2009). Es ist allgemein bekannt, dass *RANK* nicht nur von Osteoklasten, sondern auch von Monozyten und Makrophagen exprimiert wird. Eine basale Expression in der unstimulierten Negativkontrolle war auch in der vorliegenden Arbeit detektierbar. Allerdings wurde die relative mRNA-Expression von *RANK* durch Stimulation mit Partikeln oder LPS nicht wie in anderen Studien in zeitabhängiger Weise hochreguliert. Bei LPS-Stimulation blieb die *RANK*-Expression weitgehend unverändert, während Partikelstimulation sogar zu einem inhibitorischen Effekt auf die Genexpression gegenüber der unbehandelten Kontrolle führte (vgl. III.3). Möglicherweise ist dies durch Unterschiede in der Methodik zu erklären. Bylski et al. 2009 verwendeten zwar dasselbe Differenzierungsprotokoll, welches auch in der vorliegenden Arbeit zum Einsatz kam, untersuchten allerdings den Einfluss von Titan- und Aluminiumpartikeln. Diese lösen möglicherweise andere zelluläre Reaktionen aus als Polyethylenpartikel. Auch Baumann et al. 2004 arbeiteten in ihren Versuchen zu den Auswirkungen von Polyethylenpartikeln auf das RANK/RANKL/OPG-System mit THP-1 makrophagenähnlichen Zellen. Sie differenzierten die Zellen dabei allerdings nicht mit PMA, sondern mit einer Kombination aus 1,25-Dihydroxyvitamin  $\text{D}_3$  und Granulozyten- und Makrophagenkolonien-stimulierendem Faktor (GM-CSF), was im Vergleich zu der hier vorliegenden Arbeit eine osteoklastenähnlichere Differenzierung zur Folge hatte.

Außerdem verwendeten sie mit 18S ribosomaler RNA ein anderes Haushaltsgen für die relative Expressionsanalyse. In der vorliegenden Arbeit wurde *β-Actin* als Referenzgen zur relativen Quantifizierung der mRNA-Expression von *RANK* herangezogen. Dieses weist im Vergleich zu anderen typischen Haushaltsgenen auch während der Differenzierung von THP-1 Monozyten eine stabile Expression auf, weshalb es für die Normalisierung RT-PCR basierter Genexpressionsdaten bei differenzierenden oder differenzierten THP-1 Zellen empfohlen wird (Maess et al. 2010).

Analog zu den zuvor bereits erwähnten Arbeiten von Baumann et al. 2004 und Bylski et al. 2009 war *RANKL* in der vorliegenden Arbeit in THP-1 makrophagenähnlichen Zellen nicht detektierbar. Dies lässt sich dadurch erklären, dass *RANKL* von Osteoblasten und deren Vorläuferzellen, jedoch nicht von monozytären Zellen exprimiert wird (Khosla 2001).

#### **IV.2.2 Der suppressive Effekt von UHMWPE-Partikeln auf die relative *RANK*-Expression lässt sich durch subklinische Endotoxinkontaminationen erklären**

Die in dieser Arbeit beobachtete Inhibition der relativen *RANK*-Expression bei Inkubation der makrophagenähnlichen Zellen mit UHMWPE-Partikeln lässt sich durch eine, eventuell im Experimentverlauf erworbene, geringe Kontamination der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Partikel mit Endotoxinen erklären. In murinen RAW264.7 Zellen konnte etwa vor kurzem beobachtet werden, dass LPS in geringen Konzentrationen die *RANK*-Expression durch die Suppression der Transkriptionsfaktoren PU.1 und MITF inhibiert (Ishii et al. 2008). Zwar waren die in der vorliegenden Arbeit verwendeten UHMWPE-Partikel den Ergebnissen des LAL-Assays zufolge vor Versuchsbeginn nominell endotoxinfrei (vgl. II.1.7), jedoch kann eine LPS-Kontamination offenbar nicht völlig ausgeschlossen werden.

Es ist bekannt, dass sowohl Titan- als auch UHMWPE-Partikel Endotoxine adsorbieren können (Nelson et al. 1997; Daniels et al. 2000). Dabei begünstigen vermutlich insbesondere die extrem hydrophoben Eigenschaften der Polyethylenpartikel die Anlagerung von LPS über deren ebenfalls hydrophoben Lipidanteil. Zudem wird die Effektivität der üblicherweise verwendeten Reinigungsmethoden für die Analyse von zellulären Reaktionen auf Abriebpartikel in der Literatur kontrovers diskutiert. Hitchins & Merritt 1999 konnten zeigen, dass die Reinigung von Partikeln mit 70% Ethanol die inflammatorische Antwort von murinen Makrophagen minimierte, während allgemein

anerkannt ist, dass Ethanol allein nicht ausreicht, um adhärentes LPS zu entfernen (Bi et al. 2001; Cho et al. 2002). Schwab et al. 2006 berichteten, dass die meisten Waschmethoden, unter anderem die Verwendung von 95% Ethanol, zur Dekontamination von Partikeln in der Tat nur begrenzt effektiv sind: erst eine Kombination von Ethanol, Salzsäure, Triton X-100 und trockener Hitze konnte in dieser Studie zu einer signifikanten Reduktion der Endotoxinbelastung der verwendeten Partikel beitragen. Somit ist es möglich, dass auch die in der hier vorliegenden Arbeit verwendeten UHMWPE-Partikel trotz der negativen Ergebnisse des LAL-Assays nicht komplett endotoxinfrei waren.

Dies korreliert allerdings auch mit den realen Bedingungen im periimplantären Gewebe. LPS ist in humanem Gewebe nämlich häufig auch ohne sichtbare Anzeichen bakterieller Infektionen präsent. Die Quellen für Endotoxine im periprothetischen Gewebe sind vielfältig: das Implantat kann bereits während des Herstellungsprozesses oder während der Operation mit Endotoxinen kontaminiert werden, der bakterielle Biofilm auf dem Implantat kann zu einer Produktion bakterieller Endotoxine beitragen, und Abriebpartikel können LPS systemischer Infektionen aus dem Blut oder der Darmflora adsorbieren (Hoenders et al. 2008; Lieder et al. 2013). Insgesamt ist die physiologische Konzentration von Endotoxinen im periimplantären Gewebe wohl zu niedrig, um *per se* eine starke zelluläre Reaktion auszulösen, sie kann jedoch möglicherweise die partikelinduzierten inflammatorischen und proresorptiven Effekte verstärken (Bi et al. 2001; Cho et al. 2002).

#### **IV.2.3 RANK-Protein ist in THP-1 makrophagenähnlichen Zellen bei Stimulation mit UHMWPE-Partikeln und LPS ebenfalls nicht nachweisbar**

Auf Proteinebene konnte ebenfalls keine erhöhte RANK-Produktion bei osteolytischer Stimulation der makrophagenähnlichen Zellen beobachtet werden. RANK-Protein war nur in unstimulierten Zellen detektierbar. Eine Quantifizierung der Proteinexpression war jedoch aufgrund des geringen Kontrastes und der geringen Bandenschärfe von RANK, die selbst in der entsprechenden Positivkontrolle zu sehen war, nicht möglich. Im Vergleich zu RANK war GAPDH als interne Referenz trotz der recht geringen elektrophoretisch aufgetrennten Gesamtproteinmenge von 10 µg als klar abgegrenzte Bande recht gleichmäßig in allen Proben erkennbar (vgl. III.3). Obwohl GAPDH zumindest auf Genexpressionsebene als tendenziell instabile Referenz identifiziert wurde (Maess et al. 2010), kam es in der hier vorliegenden Arbeit erfolgreich als Ladekontrolle zum Einsatz.

Somit konnten die Erkenntnisse aus der Expressionsanalyse im Western Blot weitestgehend erfolgreich bestätigt werden. Bei LPS- ebenso wie bei Partikel-stimulierten Zellen ist ein inhibitorischer Effekt auf die RANK-Produktion zu erkennen.

Der inhibitorische Effekt von LPS, welcher auf mRNA-Ebene nicht beobachtet werden konnte, lässt sich zum einen durch die geringe Proteinmenge und die damit verbundene Reduzierung der Ergebnisse auf qualitative Aussagen erklären. Zum anderen könnte es auf Translationsebene oder im Zuge posttranslationaler Proteinmodifikationen zu Veränderungen am RANK-Protein in LPS-stimulierten Zellen bis hin zur Proteindegradation kommen, welche letztendlich dazu führen, dass RANK zwar auf mRNA-Ebene schwach nachweisbar, als Protein jedoch nicht detektierbar ist.

### **IV.3 UHMWPE-Partikel und LPS induzieren in THP-1 makrophagen-ähnlichen Zellen eine inflammatorische Reaktion**

#### **IV.3.1 UHMWPE-Abriebpartikel und LPS führen zu einer konzentrations- und zeitabhängigen Produktion proinflammatorischer Zytokine**

Im Gegensatz zu RANK konnten TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6 bei osteolytischer Stimulation der makrophagenähnlichen Zellen mit UHMWPE-Partikeln bzw. LPS in dieser Arbeit eindeutig nachgewiesen werden (vgl. III.4.1, III.4.2, III.4.3, III.4.4). Es ist bekannt, dass diese proinflammatorischen Zytokine maßgeblich an der Entstehung periprothetischer Osteolysen beteiligt sind, und somit auch proresorptive Eigenschaften aufweisen (Kuczkowski et al. 2011). Dabei spielt TNF- $\alpha$  offenbar die bedeutendste Rolle, da es nicht nur die Knochenresorption fördert, sondern neuesten Erkenntnissen zufolge auch die Knochenneubildung beeinträchtigt, indem es die Genexpression der osteoblastären Mineralisierungsmarker Collagen, Osteocalcin und Alkaline Phosphatase (ALP) sowie des Transkriptionsfaktors Runx herabreguliert (Lee et al. 2012).

Die experimentellen Ergebnisse zeigten, dass in den unstimulierten Negativkontrollen TNF- $\alpha$  zwar auf mRNA-Ebene, jedoch nicht auf Proteinebene im ELISA nachweisbar ist (vgl. III.4.1, III.4.2). Dies stimmt mit den Beobachtungen von Andersson 2005 überein, dass unstimulierte Monozyten und Makrophagen zwar *TNF- $\alpha$*  mRNA, nicht jedoch das entsprechende Protein produzieren.

Bei osteolytischer Stimulation der makrophagenähnlichen Zellen mit UHMWPE-Partikeln bzw. LPS kam es zu einem zeitabhängigen Anstieg der Expression bzw. Sekretion von TNF- $\alpha$  (vgl. III.4.1, III.4.2). Dabei stimmte der zeitliche Ablauf von Genexpression und Proteinsekretion bei Partikelstimulation weitestgehend überein, während die LPS-stimulierten Zellen deutliche Unterschiede aufwiesen. Die mRNA-Expression von *TNF- $\alpha$*  erreichte den maximal gemessenen Wert bei 6-stündiger Inkubation und nahm mit zunehmender Inkubationszeit ab. Die Proteinsekretion erreichte das Maximum hingegen bei 24-stündiger Inkubation. Dies widerspricht den Beobachtungen von Baumann et al. 2004, die sowohl bei Partikel- als auch bei LPS-Stimulation eine maximale TNF- $\alpha$  Sekretion bei 6-stündiger Inkubationszeit messen konnten.

Auch die Zytokinsekretion von IL-1 $\beta$  und IL-6 nahm bei osteolytischer Stimulation in zeitabhängiger Weise zu (vgl. III.4.3, III.4.4). Allerdings erreichten die Messwerte zu keiner Zeit die Konzentrationen von TNF- $\alpha$ . Dies stimmt mit den Beobachtungen von Rader et al. 1999 überein, die zeigen konnten, dass makrophagenähnliche Zellen bei Stimulation mit Polyethylenpartikeln im Vergleich zu IL-1 $\beta$  mehr TNF- $\alpha$  produzieren. Im Gegensatz zu TNF- $\alpha$ , dessen Sekretion bei Partikelstimulation mit zunehmender Inkubationszeit abnahm, nahm die Sekretion von IL-1 $\beta$  und IL-6 jedoch mit der Zeit zu. Diese zeitlichen Differenzen entsprechen der Beobachtung, dass die Expressions- und Sekretionsprofile von TNF- $\alpha$  und IL-6 in aktivierten Makrophagen generell überlappen, jedoch zeitlich versetzt aufeinander folgen (Kwak et al. 2000). Generell wurde festgestellt, dass die maximale Zytokinproduktion kultivierter Makrophagen in Reaktion auf Partikel nach etwa 15-20-stündiger Inkubation erreicht wird (Voronov et al. 1998). Dies ist mit den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen vereinbar, die insbesondere bei 24-stündiger LPS-Stimulation eine maximale Zytokinsekretion aktivierter THP-1 makrophagenähnlicher Zellen zeigen.

Die Ergebnisse deuten auf eine Regulation der Zytokinsekretion auf subzellulärer Ebene hin. Tatsächlich ist bekannt, dass Makrophagen ein Kompartiment aufweisen, welches die differentielle Sekretion von Zytokinen bei inflammatorischen Reaktionen steuert. Es handelt sich hierbei um das sogenannte „Recycling-Endosom“ (Manderson et al. 2007). Dieses ist an einer Kompartimentierung verschiedener Zytokine vor deren Sekretion und somit an einer Regulation der Immunantwort beteiligt. Die regulatorische Funktion des Recycling-Endosoms erklärt beispielsweise die in dieser Arbeit beobachteten Unterschiede zwischen mRNA-Expression und Proteinsekretion: so wird die *TNF- $\alpha$*  mRNA in LPS-stimulierten Zellen wahrscheinlich zwar umgehend in Protein translatiert, jedoch erst

zeitverzögert von den Zellen sezerniert. Eine differentielle Regulation der Zytokinsekretion bei Partikel- im Vergleich zu LPS-Stimulation erscheint nicht unwahrscheinlich, da bereits Baumann et al. 2004 aufgrund von Unterschieden in der von ihnen beobachteten *RANK*-Expression vermuteten, dass die Pathogenese der Osteolyse bei Induktion durch LPS einerseits und Abriebpartikel andererseits über die Aktivierung unterschiedlicher Signalwege gesteuert wird. Diese Theorie wird auch durch die zuvor erwähnte Arbeit von Schwab et al. 2006 untermauert.

#### **IV.3.2 Die erhöhte Zytokinsekretion bei Stimulation mit UHMWPE-Partikeln lässt sich ebenfalls durch Endotoxinkontaminationen erklären**

Es gibt ältere Studien, die einen direkten Effekt von Abriebpartikeln auf die Zytokinproduktion von Makrophagen oder makrophagenähnlichen Zellen zeigen konnten (Hudspith & Meredith 1997), wobei eine zelluläre Reaktion ab einem Partikel-Zell-Verhältnis von  $\geq 100:1$  beobachtet werden konnte (Green et al. 1998). Allerdings konnten Kaufman et al. 2008 zeigen, dass reine UHMWPE-Partikel in primären humanen Makrophagen keine erhöhte Zytokinsekretion induzieren konnten. Dies entspricht den Beobachtungen zahlreicher anderer Studien, dass LPS-assoziierte Partikel zu einer starken inflammatorischen Reaktion beitragen, während endotoxinfreie Partikel nur minimale Reaktionen in Makrophagen hervorrufen (Daniels et al. 2000; Bi et al. 2001; Cho et al. 2002). Tatsächlich scheinen Abriebpartikel und LPS unterschiedliche Signalwege in Makrophagen zu aktivieren: hohe Partikeldosen induzieren die Freisetzung des Hormons  $\text{PGE}_2$ , während LPS die Produktion von IL-1, IL-6 und TNF- $\alpha$  aktiviert (Harrison et al. 2005; Schwab et al. 2006).

Dies deutet, ebenso wie die Ergebnisse bezüglich *RANK* (vgl. IV.2.2), auf eine zuvor im LAL-Assay nicht nachweisbare Endotoxinkontamination der hier verwendeten UHMWPE-Partikel hin. Schwab et al. 2006 konnten zeigen, dass Makrophagen löslichem LPS gegenüber reaktiver sind als gegenüber partikelgebundenem LPS. Dies spiegelt sich auch in den in der vorliegenden Arbeit ermittelten Ergebnissen wider, in denen bakterielles LPS stets die stärkste inflammatorische Reaktion im Sinne der Sekretion von TNF- $\alpha$  und IL-6 induzierte. Zhou et al. 2012 betrachten subklinische Level an LPS interessanterweise als primären Auslöser der partikelinduzierten Osteolyse. Es wird vermutet, dass Abriebpartikel über die Zeit Endotoxine adsorbieren, bis die LPS-Konzentration hoch genug ist,

um eine inflammatorische Reaktion auszulösen (Schwab et al. 2006). Die in der hier vorliegenden Arbeit verwendeten Partikel waren zu Versuchsbeginn daher möglicherweise tatsächlich endotoxinfrei, obwohl es unter anderem aufgrund von Sensitivitätsgrenzen berechnete Zweifel an der Genauigkeit des LAL-Assays als Quantifizierungsmethode für LPS-Kontaminationen gibt (Hoenders et al. 2008; Maitz et al. 2009).

Da Endotoxine in der Umwelt im Überschuss vorhanden sind (Lieder et al. 2013), kann eine Kontamination der ursprünglich nominell endotoxinfreien Partikel trotz steriler Arbeitsbedingungen durchaus erst im Verlauf des Experiments aufgetreten sein. Dabei könnten Endotoxine aus den verwendeten, möglicherweise nicht 100% endotoxinfreien Zellkulturschalen und -medien adsorbiert worden sein. Um dies ausschließen zu können, müssten in Zukunft eventuell auch alle verwendeten Reagenzien endotoxinfrei sein und gegebenenfalls ebenfalls auf ihren LPS-Gehalt getestet werden. Um die Partikel selbst zu überprüfen, könnte man die für die Bindung von LPS verantwortlichen Rezeptoren, die sogenannten „Toll-like-Rezeptoren“ (TLR; Beutler 2004), selektiv inaktivieren. Dadurch könnte die eventuell vorhandene LPS-Komponente auf der Oberfläche der UHMWPE-Partikel quasi ausgeschlossen werden. Allerdings ist unklar, ob partikelassoziiertes Endotoxin nach Phagozytose der Partikel auch intrazellulär eine spezifische Reaktion auslösen kann.

#### **IV.4 Das Neuropeptid CGRP moduliert die inflammatorische Reaktion in THP-1 makrophagenähnlichen Zellen**

Das Neuropeptid CGRP wurde in dieser Arbeit aufgrund seines potentiell osteoprotektiven Einflusses auf die periprothetische Osteolyse (Hoff et al. 2002; Schinke et al. 2004; Huebner et al. 2008) näher untersucht. Dabei wurden  $10^{-8}$  M CGRP eingesetzt, da sich diese Konzentration bei verschiedenen Zelltypen bereits als effektiv bewährt hat (Cornish et al. 2001; Hernanz et al. 2003; Dallos et al. 2006; Villa et al. 2006; Mrak et al. 2010).

Bislang wurde die Rolle von CGRP im Knochenstoffwechsel bzw. in der periprothetischen Osteolyse nur an Knochenzellen untersucht. In der vorliegenden Arbeit wurde der Fokus hingegen auf einen möglicherweise inhibitorischen Einfluss von CGRP auf die inflammatorische Reaktion makrophagenähnlicher Zellen bei osteolytischer Stimulation mit UHMWPE-Partikeln bzw. LPS gelegt.



#### **IV.4.1 CGRP beeinflusst die inflammatorische Reaktion THP-1 makrophagen-ähnlicher Zellen über spezifische Rezeptoren**

Mit Hilfe immunzytochemischer Methoden konnte in den in der vorliegenden Arbeit verwendeten makrophagenähnlichen Zellen zunächst die Expression des spezifischen CGRP-Rezeptors vom Typ I, CGRPR1, nachgewiesen werden (vgl. III.2). Es ist bekannt, dass primäre murine und humane Makrophagen funktionelle CGRP-Rezeptoren besitzen (Vignery et al. 1991; Owan & Ibaraki 1994). Aufgrund des qualitativen Nachweises von CGRPR1 in der Zellmembran THP-1 makrophagenähnlicher Zellen ist somit davon auszugehen, dass die hier beobachteten Effekte von CGRP über dessen spezifischen Rezeptor vermittelt wurden. Um dies zu überprüfen, könnte der Rezeptorantagonist CGRP<sub>8-37</sub> eingesetzt werden. Sollte bei der Applikation von CGRP<sub>8-37</sub> *in vitro* ein kompetitiver inhibitorischer Effekt auf die Auswirkungen von CGRP zu beobachten sein, so könnte damit auch quantitativ belegt werden, dass die beobachteten anti-inflammatorischen Effekte tatsächlich durch CGRP und seinen spezifischen Rezeptor vermittelt sind.

Eine noch genauere Analyse dieses CGRPR1-vermittelten Signalweges wäre mit Hilfe der Quantifizierung der zellulären Produktion von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) möglich. Das Neuropeptid CGRP induziert nämlich die cAMP-Produktion in monozytären Zellen und Makrophagen, während CGRP<sub>8-37</sub> diesen Effekt revidiert (Owan & Ibaraki 1994). In der intrazellulären Signaltransduktion aktiviert cAMP Proteinkinasen vom Typ A (PKA), welche wiederum die Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren, wie beispielweise „*cAMP response element-binding protein*“ (CREB), induzieren. Diese regulieren letztendlich die Expression weiterer Effektorgene, darunter auch die Transkription von Zytokinen.

#### **IV.4.2 CGRP besitzt möglicherweise einen biphasischen Effekt auf die Produktion proinflammatorischer Zytokine**

Die in der vorliegenden Arbeit beobachteten inhibitorischen Effekte des Neuropeptids CGRP auf die Produktion proinflammatorischer Zytokine in aktivierten makrophagenähnlichen Zellen sind nicht stringent und dabei sowohl abhängig von der Inkubationszeit als auch von dem jeweiligen osteolytischen Stimulus (vgl. III.5). Die inhibitorische

Wirkung tritt oft erst recht spät, d. h. bei 24- bis 48-stündiger Inkubation ein (vgl. III.5). Dies korreliert mit der schon lange bekannten Erkenntnis, dass die neuropeptidvermittelte Signaltransduktion nichtsynaptisch und daher diffus und langsam erfolgt (Kelly 1993). Obwohl in dem hier betrachteten Zellkulturmodell keine Nervenfasern vorhanden sind, die eine diffuse Freisetzung von CGRP vermitteln könnten, so wäre es dennoch möglich, dass die Wirkung des Neuropeptids auch *in vitro* zeitversetzt eintritt.

Auffällig ist, dass CGRP insbesondere bei 6-stündiger Inkubation mit hoher Partikeldosis bzw. LPS die Zytokinproduktion der makrophagenähnlichen Zellen zunächst verstärkte (vgl. III.5). Dies verleiht dem Neuropeptid das bereits in der Literatur beschriebene Attribut eines proinflammatorischen Neurokinins, was den Eigenschaften von Substanz P entspricht (Scott et al. 1994). Tatsächlich sind die immunoregulatorischen Eigenschaften von CGRP oft mit proinflammatorischen Effekten verbunden. So fördert CGRP sowohl bei rheumatoider und Osteo-Arthritis als auch in dentalen Stammzellen die Produktion der proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF- $\alpha$  (Hernanz et al. 2003; Yamaguchi et al. 2004). Auch in Fibroblasten und Makrophagen konnte eine gesteigerte Produktion von IL-6 unter dem Einfluss von CGRP beobachtet werden (Sakuta et al. 1995; Fernandez et al. 2001). Zudem induziert CGRP offenbar bei Vorliegen einer Infektion eine erhöhte Zytokinproduktion (Sehmsdorf 2001; Yaraee et al. 2003). Insbesondere der proinflammatorische Effekt des Neuropeptids auf die LPS-induzierte Produktion von IL-6, der mit einer Steigerung der Zytokinsekretion einhergeht (Tang et al. 1999), ist im Hinblick auf die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit interessant. Die so verstärkte inflammatorische Reaktion verleiht CGRP systemisch betrachtet einen zunächst proresorptiven Charakter.

Allerdings vermuteten Villa et al. 2006 einen biphasischen Effekt von CGRP auf die Aktivierung der Knochenremodellierung. Sie beobachteten einen inhibitorischen Effekt des Neuropeptids auf die OPG-Produktion in humanen Osteoblasten, welcher die Osteoklastogenese begünstigt. Da der hierarchische Prozess des Knochenstoffwechsels zunächst die Aktivierung von Osteoklasten erfordert (Mundy et al. 2003), ein proosteoklastogener Effekt von CGRP jedoch dessen direktem inhibitorischen Einfluss auf die Knochenresorption widerspricht (Akopian et al. 2000; Cornish et al. 2001), scheint das Neuropeptid zu einer Feinsteuerung des Knochenstoffwechsels beizutragen. Dabei moduliert es möglicherweise das Gleichgewicht zwischen Osteoklasten und Osteoblasten, um letztendlich die Knochenneubildung zu fördern (Villa et al. 2006). Diese These wird durch die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse unterstützt: so zeigt sich in der

hier beobachteten erhöhten Zytokinproduktion bei 6-stündiger Inkubation zunächst ein potentiell proresorptiver Effekt von CGRP, welcher die Differenzierung und Aktivität von Osteoklasten begünstigen könnte. Erst bei Inkubationszeiten von 24 und 48 h ist eine antiinflammatorische Wirkung des Neuropeptids erkennbar, welche über die Inhibition der Sekretion proinflammatorischer Zytokine die Aktivierung von Osteoklasten verhindern und somit der periprothetischen Osteolyse entgegenwirken könnte.

Der erwähnte antiresorptive Effekt von CGRP auf den Knochenmetabolismus bzw. die periprothetische Osteolyse scheint offenbar auch mit antiinflammatorischen Eigenschaften einherzugehen. So inhibiert CGRP nicht nur die IL-1 $\beta$  gesteuerte Knochenresorption (Lian et al. 2001), sondern ist auch in der Lage, die Chemokinproduktion von Endothelzellen (Huang et al. 2011) oder die Aktivierung von Mikrogliazellen zu unterbinden (Consonni et al. 2011). Auch systemisch ist CGRP ein effektiver Inhibitor akuter lokaler inflammatorischer Reaktionen (Gomes et al. 2005). Von besonderer Relevanz für die vorliegende Arbeit ist der Effekt von CGRP auf Makrophagen. Bereits recht früh konnte ein inhibitorischer Einfluss von CGRP auf die Aktivierung und Funktion von Makrophagen gezeigt werden (Nong et al. 1989). Außerdem inhibiert CGRP die LPS-induzierte Produktion der proinflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-12 in Makrophagen (Feng et al. 1997; Torii et al. 1997; Liu et al. 2000). Die antiinflammatorische Wirkung von CGRP ist zudem mit einem stimulatorischen Effekt auf die Produktion von IL-10 verbunden (Torii et al. 1997; Holzmann 2013), welches bekannterweise osteoprotektive Eigenschaften besitzt (Carmody et al. 2002; Goodman et al. 2003; Yang et al. 2004).

#### **IV.4.3 CGRP hat offenbar keinen stimulatorischen Effekt auf die Sekretion antiinflammatorischer Zytokine**

In der hier vorliegenden Arbeit konnten allerdings weder die verwendeten osteolytischen Stimuli, noch das Neuropeptid CGRP die Sekretion des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 induzieren. Die gemessenen IL-10 Konzentrationen lagen stets unterhalb bzw. an der Nachweisgrenze des verwendeten Tests (vgl. III.4.5). Dies widerspricht älteren Studien, die zeigen konnten, dass CGRP die IL-10 Produktion in LPS-stimulierten Makrophagen sowie in mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) fördert und somit inflammatorische Reaktionen inhibieren kann (Fox et al. 1997; Torii et al. 1997).

Möglicherweise konnte IL-10 in der vorliegenden Arbeit nicht quantifiziert werden, da mit einer differenzierten monozytären Zelllinie anstelle von primären Zellen gearbeitet wurde. Dabei spielten vermutlich auch die gewählten experimentellen Bedingungen eine Rolle: während die Stimulation mit LPS in undifferenzierten THP-1 Monozyten keine IL-10 Produktion induzieren kann (Schildberger et al. 2013), ist der Nachweis des antiinflammatorischen Zytokins in differenzierten THP-1 makrophagenähnlichen Zellen möglich (Wehrhahn et al. 2010). Da IL-10 bei LPS-Stimulation offenbar prinzipiell auch von PMA-differenzierten THP-1 makrophagenähnlichen Zellen sezerniert wird (Palacio et al. 2011), sind möglicherweise die genauen Versuchsbedingungen wie zum Beispiel die PMA-Konzentration, die Dauer der Differenzierung, die Zeitpunkte der Zytokinquantifizierung und die Verwendung von Antibiotika in der Zellkultur entscheidend für die Nachweisbarkeit von IL-10 in dem hier verwendeten Makrophagenmodell.

#### **IV.4.4 LPS induziert in THP-1 makrophagenähnlichen Zellen möglicherweise die intrazelluläre Produktion von CGRP**

Bei Partikelstimulation sind die inhibitorischen Effekte von CGRP hauptsächlich bei der Produktion von TNF- $\alpha$  zu erkennen (vgl. III.5.1, III.5.2). Dabei ist der antiinflammatorische Effekt vor allem bei hoher Partikeldosis und 24-48-stündiger Inkubation zu erkennen. Dennoch sind die beobachteten Effekte nicht immer signifikant. Offenbar ist der inhibitorische Einfluss von CGRP besonders stark mit der LPS-Stimulation makrophagenähnlicher Zellen assoziiert. Bei TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6 konnte in der vorliegenden Arbeit eine CGRP-induzierte Inhibition der LPS-assoziierten Zytokinproduktion bei einer Inkubationszeit von 24 h beobachtet werden (vgl. III.5). Dies korreliert mit den zuvor beschriebenen inhibitorischen Effekten des Neuropeptids auf die LPS-induzierte Produktion proinflammatorischer Zytokine in Makrophagen (vgl. IV.4.2). Außerdem konnte vor kurzem gezeigt werden, dass Makrophagen bei Stimulation mit LPS selbst CGRP produzieren (Ma et al. 2010). Die Behandlung der murinen Makrophagen-Zelllinie RAW264.7 mit 1  $\mu$ g/ml LPS führte in dieser Studie bei einer Inkubationszeit von 24 h zu einer maximalen Freisetzung des Neuropeptids CGRP.

Geht man davon aus, dass alle monozytären bzw. Makrophagen-Zelllinien zu einer endogenen Produktion von CGRP fähig sind, so kann dies den hier beobachteten ausgeprägten inhibitorischen Effekt auf die LPS-induzierte Zytokinproduktion erklären.

Durch die intrazelluläre CGRP-Produktion würde es zu einem additiven Effekt von endogenem und exogenem CGRP kommen, der somit zu einer effektiven Inhibition der Freisetzung proinflammatorischer Zytokine führen könnte. Bei Partikelstimulation kommt es vermutlich nicht zu einer intrazellulären Produktion des Neuropeptids durch die makrophagenähnlichen Zellen, da dieser Stimulus selbst bei einer zuvor diskutierten potentiellen Endotoxinkontamination wahrscheinlich nicht ausreichend wäre, um endogenes CGRP zu induzieren. Dies würde die vergleichsweise schwache und zeitlich variable Inhibition der Zytokinsekretion bei partikelstimulierten im Vergleich zu LPS-stimulierten Zellen erklären.

Um diese These zu überprüfen, könnte man einen kommerziell erhältlichen CGRP-ELISA anwenden, um das Neuropeptid im Zellkulturüberstand zu quantifizieren. Dabei könnte im Zeitverlauf des Experiments sowohl endogenes als auch exogenes CGRP quantifiziert werden, um abschätzen zu können, ob und inwiefern LPS tatsächlich die Produktion von intrazellulärem CGRP in THP-1 makrophagenähnlichen Zellen stimuliert und welchen Beitrag dieses zu der Gesamtkonzentration des Neuropeptids in der Kultur leistet. Zudem könnte ein sensitiver Nachweis von CGRP möglicherweise Auskunft über die Halbwertszeit des Neuropeptids in Kultur geben.

Der in dieser Arbeit beobachtete ausgeprägte antiinflammatorische Effekt von CGRP bei LPS-stimulierten Zellen zeigt, dass das Neuropeptid nicht nur in der Prävention und Therapie der aseptischen Prothesenlockerung von Bedeutung sein könnte, sondern möglicherweise auch eine Rolle in der Behandlung von bakteriell induzierten Knochenkrankheiten, wie beispielsweise Osteomyelitis oder Periodontitis, spielen könnte. In jeder Hinsicht besitzt CGRP einen antiinflammatorischen und somit potentiell antiresorptiven Effekt auf die osteolyseassoziierten Reaktionen makrophagenähnlicher Zellen, welcher möglicherweise die Standzeit von orthopädischen Endoprothesen erheblich verlängern könnte.

#### **IV.5 Ausblick**

Um die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse näher zu beleuchten, sollte in Zukunft zunächst das vielfach angesprochene Problem der Reaktivität von UHMWPE-Partikeln im Vergleich zu LPS genauer analysiert werden. Um zu überprüfen, ob Partikel allein dazu in der Lage sind, in bestimmten Dosen eine zelluläre Reaktion hervorzurufen

oder ob letztendlich Endotoxinkontaminationen als Auslöser der inflammatorischen Reaktion makrophagenähnlicher Zellen auf UHMWPE-Partikeln dienen, sollten die Experimente nochmals mit alternativ aufgereinigten Partikeln durchgeführt werden. Dabei empfiehlt sich der Einsatz aggressiverer Waschmethoden, beispielsweise unter Verwendung von Salzsäure oder dem nichtionischen Tensid Triton X-100 (Schwab et al. 2006). Eine Hitzeinaktivierung von Endotoxinen bei etwa 160°C ist hingegen nicht sinnvoll, da UHMWPE bei Temperaturen um 135°C vernetzt wird. Außerdem sollten in einem solchen Versuch neben löslichem LPS auch Partikelsuspensionen, substituiert mit definierten Konzentrationen an LPS, als Kontrollen eingesetzt werden.

Darüber hinaus sollten die hier erzielten Ergebnisse aufgrund der zuvor angesprochenen Heterogenität unterschiedlicher Makrophagenpopulationen (Glant & Jacobs 1994) an alternativen Makrophagenmodellen (vgl. IV.1.3) sowie ggf. an primären Spenderzellen validiert werden, um möglicherweise eine allgemeingültige Aussage über den Einfluss von CGRP auf die osteolyseassoziierte inflammatorische Reaktion von Makrophagen treffen zu können. Trotz des bewährten Einsatzes des Neuropeptids in einer effektiven Konzentration von  $10^{-8}$  M CGRP (vgl. IV.4) sollte dabei auf weitere Neuropeptidkonzentrationen zurückgegriffen werden, um eventuelle zellspezifische Reaktionen auszugleichen.

Um die hier erzielten Ergebnisse auf die periprothetische Osteolyse *in vivo* übertragen zu können, ist allerdings die Simulation der komplexen Wechselwirkungen innerhalb des Knochens notwendig. Dazu könnten zunächst Kokulturrexperimente mit konditionierten Überständen und primären oder ausdifferenzierten Knochenzellen durchgeführt werden. Bei Kokulturen aus konditionierten Überständen makrophagenähnlicher Zellen und Osteoblasten könnte man den inhibitorischen Einfluss proinflammatorischer Zytokine auf die Mineralisierung der Osteoblasten untersuchen. Dabei sind Collagen, Osteocalcin und ALP die klassischen Marker. Die Verwendung von Zellkulturüberständen CGRP-behandelter Zellen würde dabei Aufschluss auf einen direkten knochenanabolen Effekt des Neuropeptids geben. Die Osteoblasten für dieses Kokultursystem könnten als primäre humane Zellen käuflich erworben werden oder ggf. in Kooperation mit der experimentellen Orthopädie klinikintern aus mesenchymalen Stammzellen differenziert werden (Jager et al. 2009). Anhand von Kokulturen aus konditionierten Überständen makrophagenähnlicher Zellen und Osteoklasten hingegen könnte man den direkten Einfluss proinflammatorischer Zytokine auf die Knochenresorption analysieren. Dabei könnte man die Aktivität der Osteoklasten über den immunzytochemischen Nachweis der tartratresistenten sauren Phosphatase (TRAP) sowie über die Resorption von

Calciumphosphat-Beschichtungen in Zellkulturschalen darstellen. Der antiresorptive Effekt von CGRP könnte zudem mit Hilfe eines RANKL-ELISA überprüft werden. Dabei könnte quantitativ analysiert werden, ob die in dieser Arbeit beobachtete verringerte Sekretion des proinflammatorischen Zytokins TNF- $\alpha$  bei CGRP-Behandlung zu einer verminderten RANKL-Expression in Osteoblasten führt und somit zu einer Inhibition der Knochenresorption beitragen kann.

Außerdem würde sich die systemische Analyse des Einflusses von CGRP auf die partikelinduzierte Osteolyse im Tiermodell anbieten. Dazu könnte das in unserer Arbeitsgruppe langjährig etablierte murine Kalvariamodell verwendet werden. Dabei wären zunächst Vorversuche zur Halbwertszeit, Konzentration und Applikationshäufigkeit des Neuropeptids *in vivo* erforderlich. Gegebenenfalls könnte man diese Versuche auch an Wildtyp-Mäusen im Vergleich zu Tieren mit selektivem Knock-Out des CGRP-Rezeptors oder des *CALCA*-Gens durchführen (Kauther et al. 2013).

All diese weiteren Experimente würden zu einem detaillierteren Verständnis der Wirkung des Neuropeptids CGRP auf den Knochenmetabolismus und die periprothetische Osteolyse beitragen. Dabei erscheint eine gezielte Analyse des möglicherweise biphasischen Einflusses von CGRP auf den Knochenstoffwechsel (Villa et al. 2006) sinnvoll, um zu klären, ob und wie sich die pro- und antiresorptiven Effekte des Neuropeptids letztendlich auf die Feinsteuerung des Knochenmetabolismus auswirken.

## V. Zusammenfassung

Die periprothetische Osteolyse ist die häufigste Ursache für das Langzeitversagen von endoprothetischen Implantaten. Hierbei werden Abriebpartikel des Prothesenmaterials von Makrophagen phagozytiert. Dies löst eine inflammatorische Reaktion aus, welche über die zytokingesteuerte Rekrutierung von Osteoklasten zu periimplantärer Knochenresorption führt. Ein osteoprotektiver Einfluss des Neuropeptids Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP) auf die periprothetische Osteolyse ist bekannt. In dieser Arbeit wurde der Effekt von CGRP auf den katabolen Einfluss von ultrahochmolekularen Polyethylen (UHMWPE) Partikeln und Lipopolysacchariden (LPS) in humanen Zellen untersucht.

Monozytäre Zellen der Linie THP-1 wurden durch Stimulation mit Phorbol-12-myristat-13-acetat zu makrophagenähnlichen Zellen differenziert. Diese wurden zur Simulation osteolytischer Bedingungen über unterschiedliche Zeiträume (6/24/48 h) mit UHMWPE-Partikeln (Zell-Partikel-Verhältnisse 1:100 und 1:500) bzw. mit LPS (1 µg/ml) inkubiert. Zeitgleich wurde das Neuropeptid CGRP ( $10^{-8}$  M) appliziert. Die mRNA-Expression von Rezeptoraktivator des nukleären Faktors  $\kappa$ B (*RANK*) und Tumornekrosefaktor (*TNF*)- $\alpha$  wurde mittels quantitativer RT-PCR gemessen. Der Proteinnachweis von RANK erfolgte im Western Blot. Die Sekretion von TNF- $\alpha$  sowie der Interleukine (IL)-1 $\beta$ , IL-6 und IL-10 wurde im Zellkulturüberstand mit Hilfe eines humanen TNF- $\alpha$  ELISA bzw. eines humanen Bio-Plex Zytokin-Assays quantifiziert.

Die Expression von *RANK* in makrophagenähnlichen Zellen war sehr gering und nahm bei osteolytischer Stimulation nicht zu. Stimulation der Zellen mit Partikeln bzw. LPS führte in Abhängigkeit von der Stärke des osteolytischen Stimulus und der Inkubationszeit zu einem Anstieg von TNF- $\alpha$  mRNA und Protein sowie von IL-1 $\beta$  und IL-6 ( $p \leq 0,049$ ). CGRP inhibierte in zeitabhängiger Weise die mRNA-Expression von *TNF*- $\alpha$  bei geringer Partikeldosis und LPS-Stimulation ( $p \leq 0,020$ ), die TNF- $\alpha$  Sekretion hingegen bei Partikel- (1:100 und 1:500) und LPS-Stimulation ( $p \leq 0,043$ ). Der ausgeprägte inhibitorische Effekt von CGRP auf die LPS-induzierte Zytokinproduktion bei 24 h Inkubation konnte auch bei IL-1 $\beta$  und IL-6 beobachtet werden ( $p \leq 0,002$ ).

CGRP zeigt einen zeitabhängigen inhibitorischen Effekt auf die osteolyseassoziierte Sekretion von TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6. Dies unterstreicht die bisherigen Erkenntnisse eines potentiell osteoprotektiven Einfluss dieses Neuropeptids in der aseptischen Prothesenlockerung, welcher die Standzeit von Endoprothesen erheblich verlängern könnte.



## VI. Literaturverzeichnis

- [1] Abu-Amer Y., Ross F. P., Edwards J., Teitelbaum S. L. (1997): Lipopolysaccharide-stimulated osteoclastogenesis is mediated by tumor necrosis factor via its P55 receptor. *J Clin Invest* 100(6): 1557-1565.
- [2] Ahmed M., Bergstrom J., Lundblad H., Gillespie W. J., Kreicbergs A. (1998): Sensory nerves in the interface membrane of aseptic loose hip prostheses. *J Bone Joint Surg Br* 80(1): 151-155.
- [3] Akopian A., Demulder A., Ouriaghli F., Corazza F., Fondu P., Bergmann P. (2000): Effects of CGRP on human osteoclast-like cell formation: a possible connection with the bone loss in neurological disorders? *Peptides* 21(4): 559-564.
- [4] Andersson K. (2005): TNF-alpha expression in monocytes/macrophages. Lund: Lund University.
- [5] Aspenberg P., van der Vis H. (1998): Migration, particles, and fluid pressure. A discussion of causes of prosthetic loosening. *Clin Orthop Relat Res*(352): 75-80.
- [6] Astrand J., Aspenberg P. (2004): Topical, single dose bisphosphonate treatment reduced bone resorption in a rat model for prosthetic loosening. *J Orthop Res* 22(2): 244-249.
- [7] Atkins G. J., Haynes D. R., Howie D. W., Findlay D. M. (2011): Role of polyethylene particles in peri-prosthetic osteolysis: A review. *World J Orthop* 2(10): 93-101.
- [8] Auwerx J. (1991): The human leukemia cell line, THP-1: A multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation. *Experientia* 47(1): 22-31.
- [9] Bauer T. W. (2002): Particles and periimplant bone resorption. *Clin Orthop Relat Res*(405): 138-143.
- [10] Baumann B., Rader C. P., Seufert J., Noth U., Rolf O., Eulert J., Jakob F. (2004): Effects of polyethylene and TiAlV wear particles on expression of RANK, RANKL and OPG mRNA. *Acta Orthop Scand* 75(3): 295-302.
- [11] Baumann B., Seufert J., Jakob F., Noth U., Rolf O., Eulert J., Rader C. P. (2005): Activation of NF-kappaB signalling and TNFalpha-expression in THP-1 macrophages by TiAlV- and polyethylene-wear particles. *J Orthop Res* 23(6): 1241-1248.
- [12] Beutler B. (2004): Toll-like receptors and their place in immunology. Where does the immune response to infection begin? *Nat Rev Immunol* 4(7): 498.
- [13] Bi Y., Seabold J. M., Kaar S. G., Ragab A. A., Goldberg V. M., Anderson J. M., Greenfield E. M. (2001): Adherent endotoxin on orthopedic wear particles stimulates cytokine production and osteoclast differentiation. *J Bone Miner Res* 16(11): 2082-2091.
- [14] Bjurholm A., Kreicbergs A., Brodin E., Schultzberg M. (1988): Substance P- and CGRP-immunoreactive nerves in bone. *Peptides* 9(1): 165-171.
- [15] Boyle W. J., Simonet W. S., Lacey D. L. (2003): Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 423(6937): 337-342.
- [16] Bradford L., Baker D. A., Graham J., Chawan A., Ries M. D., Pruitt L. A. (2004): Wear and surface cracking in early retrieved highly cross-linked polyethylene acetabular liners. *J Bone Joint Surg Am* 86-A(6): 1271-1282.
- [17] Bylski D., Wedemeyer C., Xu J., Sterner T., Loer F., von Knoch M. (2009): Alumina ceramic particles, in comparison with titanium particles, hardly affect the expression of RANK-, TNF-alpha-, and OPG-mRNA in the THP-1 human monocytic cell line. *J Biomed Mater Res A* 89(3): 707-716.
- [18] Calvo W., Forteza-Vila J. (1969): On the development of bone marrow innervation in newborn rats as studied with silver impregnation and electron microscopy. *Am J Anat* 126(3): 355-371.
- [19] Carmody E. E., Schwarz E. M., Puzas J. E., Rosier R. N., O'Keefe R. J. (2002): Viral interleukin-10 gene inhibition of inflammation, osteoclastogenesis, and bone resorption in response to titanium particles. *Arthritis Rheum* 46(5): 1298-1308.
- [20] Charnley J. (2005): The long-term results of low-friction arthroplasty of the hip performed as a primary intervention. 1970. *Clin Orthop Relat Res*(430): 3-11; discussion 12.

- [21] Cho D. R., Shanbhag A. S., Hong C. Y., Baran G. R., Goldring S. R. (2002): The role of adsorbed endotoxin in particle-induced stimulation of cytokine release. *J Orthop Res* 20(4): 704-713.
- [22] Consonni A., Morara S., Codazzi F., Grohovaz F., Zacchetti D. (2011): Inhibition of lipopolysaccharide-induced microglia activation by calcitonin gene related peptide and adrenomedullin. *Mol Cell Neurosci* 48(2): 151-160.
- [23] Cooper R. R. (1968): Nerves in cortical bone. *Science* 160(3825): 327-328.
- [24] Cornish J., Callon K. E., Bava U., Kamona S. A., Cooper G. J., Reid I. R. (2001): Effects of calcitonin, amylin, and calcitonin gene-related peptide on osteoclast development. *Bone* 29(2): 162-168.
- [25] Crabtree G. R., Olson E. N. (2002): NFAT signaling: choreographing the social lives of cells. *Cell* 109 Suppl: S67-79.
- [26] Daigneault M., Preston J. A., Marriott H. M., Whyte M. K., Dockrell D. H. (2010): The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. *PLoS One* 5(1): e8668.
- [27] Dallos A., Kiss M., Polyanka H., Dobozy A., Kemeny L., Husz S. (2006): Effects of the neuropeptides substance P, calcitonin gene-related peptide, vasoactive intestinal polypeptide and galanin on the production of nerve growth factor and inflammatory cytokines in cultured human keratinocytes. *Neuropeptides* 40(4): 251-263.
- [28] Daniels A. U., Barnes F. H., Charlebois S. J., Smith R. A. (2000): Macrophage cytokine response to particles and lipopolysaccharide in vitro. *J Biomed Mater Res* 49(4): 469-478.
- [29] Drees P., Eckardt A., Gay R. E., Gay S., Huber L. C. (2007): Mechanisms of disease: Molecular insights into aseptic loosening of orthopedic implants. *Nat Clin Pract Rheumatol* 3(3): 165-171.
- [30] Drees P., Eckardt A., Gay R. E., Gay S., Huber L. C. (2008): [Molecular pathways in aseptic loosening of orthopaedic endoprosthesis]. *Biomed Tech (Berl)* 53(3): 93-103.
- [31] Drummond E. M., Harbourne N., Marete E., Martyn D., Jacquier J., O'Riordan D., Gibney E. R. (2013): Inhibition of proinflammatory biomarkers in THP1 macrophages by polyphenols derived from chamomile, meadowsweet and willow bark. *Phytother Res* 27(4): 588-594.
- [32] Elefteriou F. (2005): Neuronal signaling and the regulation of bone remodeling. *Cell Mol Life Sci* 62(19-20): 2339-2349.
- [33] Feng Y., Tang Y., Guo J., Wang X. (1997): Inhibition of LPS-induced TNF-alpha production by calcitonin gene-related peptide (CGRP) in cultured mouse peritoneal macrophages. *Life Sci* 61(20): PL 281-287.
- [34] Fernandez S., Knopf M. A., Bjork S. K., McGillis J. P. (2001): Bone marrow-derived macrophages express functional CGRP receptors and respond to CGRP by increasing transcription of c-fos and IL-6 mRNA. *Cell Immunol* 209(2): 140-148.
- [35] Fox F. E., Kubin M., Cassin M., Niu Z., Hosoi J., Torii H., Granstein R. D., Trinchieri G., Rook A. H. (1997): Calcitonin gene-related peptide inhibits proliferation and antigen presentation by human peripheral blood mononuclear cells: effects on B7, interleukin 10, and interleukin 12. *J Invest Dermatol* 108(1): 43-48.
- [36] Glant T. T., Jacobs J. J. (1994): Response of three murine macrophage populations to particulate debris: bone resorption in organ cultures. *J Orthop Res* 12(5): 720-731.
- [37] Goldring S. R., Schiller A. L., Roelke M., Rourke C. M., O'Neil D. A., Harris W. H. (1983): The synovial-like membrane at the bone-cement interface in loose total hip replacements and its proposed role in bone lysis. *J Bone Joint Surg Am* 65(5): 575-584.
- [38] Gomes R. N., Castro-Faria-Neto H. C., Bozza P. T., Soares M. B., Shoemaker C. B., David J. R., Bozza M. T. (2005): Calcitonin gene-related peptide inhibits local acute inflammation and protects mice against lethal endotoxemia. *Shock* 24(6): 590-594.
- [39] Goodman S., Trindade M., Ma T., Lee M., Wang N., Ikenou T., Matsuura I., Miyanishi K., Fox N., Regula D., Genovese M., Klein J., Bloch D., Smith R. L. (2003): Modulation of bone ingrowth and tissue differentiation by local infusion of interleukin-10 in the presence of ultra-high molecular weight polyethylene (UHMWPE) wear particles. *J Biomed Mater Res A* 65(1): 43-50.

- [40] Gordon S. (2007): The macrophage: past, present and future. *Eur J Immunol* 37 Suppl 1: S9-17.
- [41] Gottfried E., Kunz-Schughart L. A., Weber A., Rehli M., Peuker A., Muller A., Kastenberger M., Brockhoff G., Andreesen R., Kreutz M. (2008): Expression of CD68 in non-myeloid cell types. *Scand J Immunol* 67(5): 453-463.
- [42] Granholm S., Lundberg P., Lerner U. H. (2007): Calcitonin inhibits osteoclast formation in mouse haematopoietic cells independently of transcriptional regulation by receptor activator of NF- $\kappa$ B and c-Fms. *J Endocrinol* 195(3): 415-427.
- [43] Green T. R., Fisher J., Stone M., Wroblewski B. M., Ingham E. (1998): Polyethylene particles of a 'critical size' are necessary for the induction of cytokines by macrophages in vitro. *Biomaterials* 19(24): 2297-2302.
- [44] Hadjidakis D. J., Androulakis, II (2006): Bone remodeling. *Ann N Y Acad Sci* 1092: 385-396.
- [45] Hallab N. J., Jacobs J. J. (2009): Biologic effects of implant debris. *Bull NYU Hosp Jt Dis* 67(2): 182-188.
- [46] Hara-Irie F., Amizuka N., Ozawa H. (1996): Immunohistochemical and ultrastructural localization of CGRP-positive nerve fibers at the epiphyseal trabecules facing the growth plate of rat femurs. *Bone* 18(1): 29-39.
- [47] Harrison L. M., van den Hoogen C., van Haaften W. C., Tesh V. L. (2005): Chemokine expression in the monocytic cell line THP-1 in response to purified shiga toxin 1 and/or lipopolysaccharides. *Infect Immun* 73(1): 403-412.
- [48] Heinemann A., He Y., Zimina E., Boerries M., Busch H., Chmel N., Kurz T., Bruckner-Tuderman L., Has C. (2011): Induction of phenotype modifying cytokines by FERMT1 mutations. *Hum Mutat* 32(4): 397-406.
- [49] Hernanz A., Medina S., de Miguel E., Martin-Mola E. (2003): Effect of calcitonin gene-related peptide, neuropeptide Y, substance P, and vasoactive intestinal peptide on interleukin-1beta, interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha production by peripheral whole blood cells from rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients. *Regul Pept* 115(1): 19-24.
- [50] Hitchins V. M., Merritt K. (1999): Decontaminating particles exposed to bacterial endotoxin (LPS). *J Biomed Mater Res* 46(3): 434-437.
- [51] Hoenders C. S., Harmsen M. C., van Luyn M. J. (2008): The local inflammatory environment and microorganisms in "aseptic" loosening of hip prostheses. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 86(1): 291-301.
- [52] Hoff A. O., Catala-Lehnen P., Thomas P. M., Priemel M., Rueger J. M., Nasonkin I., Bradley A., Hughes M. R., Ordonez N., Cote G. J., Amling M., Gagel R. F. (2002): Increased bone mass is an unexpected phenotype associated with deletion of the calcitonin gene. *J Clin Invest* 110(12): 1849-1857.
- [53] Holzmann B. (2013): Antiinflammatory Activities of CGRP Modulating Innate Immune Responses in Health and Disease. *Curr Protein Pept Sci*.
- [54] Hou G. Q., Guo C., Song G. H., Fang N., Fan W. J., Chen X. D., Yuan L., Wang Z. Q. (2013): Lipopolysaccharide (LPS) promotes osteoclast differentiation and activation by enhancing the MAPK pathway and COX-2 expression in RAW264.7 cells. *Int J Mol Med*.
- [55] Huang J., Stohl L. L., Zhou X., Ding W., Granstein R. D. (2011): Calcitonin gene-related peptide inhibits chemokine production by human dermal microvascular endothelial cells. *Brain Behav Immun* 25(4): 787-799.
- [56] Hudspith B., Meredith C. (1997): Modulation of cytokine mRNA expression in differentiated human monocytic cell lines following exposure to inorganic particles. *Toxicol In Vitro* 11(5): 549-551.
- [57] Huebner A. K., Keller J., Catala-Lehnen P., Perkovic S., Streichert T., Emeson R. B., Amling M., Schinke T. (2008): The role of calcitonin and alpha-calcitonin gene-related peptide in bone formation. *Arch Biochem Biophys* 473(2): 210-217.
- [58] Hukkanen M., Kontinen Y. T., Rees R. G., Gibson S. J., Santavirta S., Polak J. M. (1992): Innervation of bone from healthy and arthritic rats by substance P and calcitonin gene related peptide containing sensory fibers. *J Rheumatol* 19(8): 1252-1259.

- [59] Ingham E., Fisher J. (2005): The role of macrophages in osteolysis of total joint replacement. *Biomaterials* 26(11): 1271-1286.
- [60] Ishii J., Kitazawa R., Mori K., McHugh K. P., Morii E., Kondo T., Kitazawa S. (2008): Lipopolysaccharide suppresses RANK gene expression in macrophages by down-regulating PU.1 and MITF. *J Cell Biochem* 105(3): 896-904.
- [61] Jager M., Zilkens C., Bittersohl B., Krauspe R. (2009): Cord blood--an alternative source for bone regeneration. *Stem Cell Rev* 5(3): 266-277.
- [62] Jin S., Park J.-Y., Hong J.-M., Kim T.-H., Shin H.-I., Park E. K., Kim S.-Y. (2011): Inhibitory effect of (-)-epigallocatechin gallate on titanium particle-induced TNF- $\alpha$  release and in vivo osteolysis. *Experimental and Molecular Medicine* 43(7): 411.
- [63] Juarranz Y., Abad C., Martinez C., Arranz A., Gutierrez-Canas I., Rosignoli F., Gomariz R. P., Leceta J. (2005): Protective effect of vasoactive intestinal peptide on bone destruction in the collagen-induced arthritis model of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 7(5): R1034-1045.
- [64] Karrholm J., Borssen B., Lowenhielm G., Snorrason F. (1994): Does early micromotion of femoral stem prostheses matter? 4-7-year stereoradiographic follow-up of 84 cemented prostheses. *J Bone Joint Surg Br* 76(6): 912-917.
- [65] Kaufman A. M., Alabre C. I., Rubash H. E., Shanbhag A. S. (2008): Human macrophage response to UHMWPE, TiAlV, CoCr, and alumina particles: analysis of multiple cytokines using protein arrays. *J Biomed Mater Res A* 84(2): 464-474.
- [66] Kauther M. D., Bachmann H. S., Neuerburg L., Broecker-Preuss M., Hilken G., Grabellus F., Koehler G., von Knoch M., Wedemeyer C. (2011): Calcitonin substitution in calcitonin deficiency reduces particle-induced osteolysis. *BMC Musculoskelet Disord* 12: 186.
- [67] Kauther M. D., Neuerburg C., Wefelnberg F., Bachmann H. S., Schlepper R., Hilken G., Broecker-Preuss M., Grabellus F., Schilling A. F., Jager M., Wedemeyer C. (2013): RANKL-associated suppression of particle-induced osteolysis in an aged model of Calcitonin and alpha-CGRP deficiency. *Biomaterials* 34(12): 2911-2919.
- [68] Kauther M. D., Xu J., Wedemeyer C. (2010): Alpha-calcitonin gene-related peptide can reverse the catabolic influence of UHMWPE particles on RANKL expression in primary human osteoblasts. *Int J Biol Sci* 6(6): 525-536.
- [69] Kelly R. B. (1993): Storage and release of neurotransmitters. *Cell* 72 *Suppl*: 43-53.
- [70] Khosla S. (2001): Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology* 142(12): 5050-5055.
- [71] Kobayashi K., Takahashi N., Jimi E., Udagawa N., Takami M., Kotake S., Nakagawa N., Kinoshita M., Yamaguchi K., Shima N., Yasuda H., Morinaga T., Higashio K., Martin T. J., Suda T. (2000): Tumor necrosis factor alpha stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL-RANK interaction. *J Exp Med* 191(2): 275-286.
- [72] Kohro T., Tanaka T., Murakami T., Wada Y., Aburatani H., Hamakubo T., Kodama T. (2004): A comparison of differences in the gene expression profiles of phorbol 12-myristate 13-acetate differentiated THP-1 cells and human monocyte-derived macrophage. *J Atheroscler Thromb* 11(2): 88-97.
- [73] Kuczkowski J., Sakowicz-Burkiewicz M., Izycka-Swieszewska E., Mikaszewski B., Pawelczyk T. (2011): Expression of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1alpha, interleukin-6 and interleukin-10 in chronic otitis media with bone osteolysis. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 73(2): 93-99.
- [74] Kurtz S. M., Ong K. L., Lau E., Widmer M., Maravic M., Gomez-Barrena E., de Pina Mde F., Manno V., Torre M., Walter W. L., de Steiger R., Geesink R. G., Peltola M., Roder C. (2011): International survey of primary and revision total knee replacement. *Int Orthop* 35(12): 1783-1789.
- [75] Kwak D. J., Augustine N. H., Borges W. G., Joyner J. L., Green W. F., Hill H. R. (2000): Intracellular and extracellular cytokine production by human mixed mononuclear cells in response to group B streptococci. *Infect Immun* 68(1): 320-327.

- [76] Lam J., Takeshita S., Barker J. E., Kanagawa O., Ross F. P., Teitelbaum S. L. (2000): TNF-alpha induces osteoclastogenesis by direct stimulation of macrophages exposed to permissive levels of RANK ligand. *J Clin Invest* 106(12): 1481-1488.
- [77] Lee S. S., Sharma A. R., Choi B. S., Jung J. S., Chang J. D., Park S., Salvati E. A., Purdue E. P., Song D. K., Nam J. S. (2012): The effect of TNFalpha secreted from macrophages activated by titanium particles on osteogenic activity regulated by WNT/BMP signaling in osteoprogenitor cells. *Biomaterials* 33(17): 4251-4263.
- [78] Lian K., Du J., Rao Z., Luo H. (2001): The experimental study on the effect calcitonin gene-related peptide on bone resorption mediated by interleukin-1. *J Tongji Med Univ* 21(4): 304-307.
- [79] Lieder R., Petersen P. H., Sigurjonsson O. E. (2013): Endotoxins-the Invisible Companion in Biomaterials Research. *Tissue Eng Part B Rev*.
- [80] Liu J., Chen M., Wang X. (2000): Calcitonin gene-related peptide inhibits lipopolysaccharide-induced interleukin-12 release from mouse peritoneal macrophages, mediated by the cAMP pathway. *Immunology* 101(1): 61-67.
- [81] Liu S., Viridi A. S., Sena K., Sumner D. R. (2012): Sclerostin antibody prevents particle-induced implant loosening by stimulating bone formation and inhibiting bone resorption in a rat model. *Arthritis Rheum* 64(12): 4012-4020.
- [82] Livak K. J., Schmittgen T. D. (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25(4): 402-408.
- [83] Ma W., Dumont Y., Vercauteren F., Quirion R. (2010): Lipopolysaccharide induces calcitonin gene-related peptide in the RAW264.7 macrophage cell line. *Immunology* 130(3): 399-409.
- [84] Maess M. B., Sendelbach S., Lorkowski S. (2010): Selection of reliable reference genes during THP-1 monocyte differentiation into macrophages. *BMC Mol Biol* 11: 90.
- [85] Maitz M. F., Teichmann J., Sperling C., Werner C. (2009): Surface endotoxin contamination and hemocompatibility evaluation of materials. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 90(1): 18-25.
- [86] Manderson A. P., Kay J. G., Hammond L. A., Brown D. L., Stow J. L. (2007): Subcompartments of the macrophage recycling endosome direct the differential secretion of IL-6 and TNFalpha. *J Cell Biol* 178(1): 57-69.
- [87] Mao X., Pan X., Peng X., Cheng T., Zhang X. (2012): Inhibition of titanium particle-induced inflammation by the proteasome inhibitor bortezomib in murine macrophage-like RAW 264.7 cells. *Inflammation* 35(4): 1411-1418.
- [88] Matthews J. B., Besong A. A., Green T. R., Stone M. H., Wroblewski B. M., Fisher J., Ingham E. (2000): Evaluation of the response of primary human peripheral blood mononuclear phagocytes to challenge with in vitro generated clinically relevant UHMWPE particles of known size and dose. *J Biomed Mater Res* 52(2): 296-307.
- [89] McClung M. R., Lewiecki E. M., Cohen S. B., Bolognese M. A., Woodson G. C., Moffett A. H., Peacock M., Miller P. D., Lederman S. N., Chesnut C. H., Lain D., Kivitz A. J., Holloway D. L., Zhang C., Peterson M. C., Bekker P. J. (2006): Denosumab in postmenopausal women with low bone mineral density. *N Engl J Med* 354(8): 821-831.
- [90] McKellop H. A., Campbell P., Park S. H., Schmalzried T. P., Grigoris P., Amstutz H. C., Sarmiento A. (1995): The origin of submicron polyethylene wear debris in total hip arthroplasty. *Clin Orthop Relat Res*(311): 3-20.
- [91] Merkel K. D., Erdmann J. M., McHugh K. P., Abu-Amer Y., Ross F. P., Teitelbaum S. L. (1999): Tumor necrosis factor-alpha mediates orthopedic implant osteolysis. *Am J Pathol* 154(1): 203-210.
- [92] Millet I., Vignery A. (1997): The neuropeptide calcitonin gene-related peptide inhibits TNF-alpha but poorly induces IL-6 production by fetal rat osteoblasts. *Cytokine* 9(12): 999-1007.
- [93] Morawietz L., Classen R. A., Schroder J. H., Dynybil C., Perka C., Skwara A., Neidel J., Gehrke T., Frommelt L., Hansen T., Otto M., Barden B., Aigner T., Stiehl P., Schubert T., Meyer-Scholten C., Konig A., Strobel P., Rader C. P., Kirschner S., Lintner F., Ruther W., Bos I., Hendrich C., Kriegsmann J., Krenn V. (2006): Proposal for a histopathological

- consensus classification of the periprosthetic interface membrane. *J Clin Pathol* 59(6): 591-597.
- [94] Mrak E., Guidobono F., Moro G., Frascini G., Rubinacci A., Villa I. (2010): Calcitonin gene-related peptide (CGRP) inhibits apoptosis in human osteoblasts by beta-catenin stabilization. *J Cell Physiol* 225(3): 701-708.
- [95] Mundy G. R., Chen D., Oyajobi B. O. (2003): Bone remodeling. *In: Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*. Favus M. J., editor. 5 ed. Washington, D.C.: ASBMR. pp 46-58.
- [96] Neale S. D., Sabokbar A., Howie D. W., Murray D. W., Athanasou N. A. (1999): Macrophage colony-stimulating factor and interleukin-6 release by periprosthetic cells stimulates osteoclast formation and bone resorption. *J Orthop Res* 17(5): 686-694.
- [97] Nelson S. K., Knoernschild K. L., Robinson F. G., Schuster G. S. (1997): Lipopolysaccharide affinity for titanium implant biomaterials. *J Prosthet Dent* 77(1): 76-82.
- [98] Nong Y. H., Titus R. G., Ribeiro J. M., Remold H. G. (1989): Peptides encoded by the calcitonin gene inhibit macrophage function. *J Immunol* 143(1): 45-49.
- [99] OECD (2011): Hip And Knee Replacement. *In: Health at a Glance 2011: OECD Indicators*. OECD Publishing.
- [100] Owan I., Ibaraki K. (1994): The role of calcitonin gene-related peptide (CGRP) in macrophages: the presence of functional receptors and effects on proliferation and differentiation into osteoclast-like cells. *Bone Miner* 24(2): 151-164.
- [101] Palacio J. R., Markert U. R., Martinez P. (2011): Anti-inflammatory properties of N-acetylcysteine on lipopolysaccharide-activated macrophages. *Inflamm Res* 60(7): 695-704.
- [102] Park E. K., Jung H. S., Yang H. I., Yoo M. C., Kim C., Kim K. S. (2007): Optimized THP-1 differentiation is required for the detection of responses to weak stimuli. *Inflamm Res* 56(1): 45-50.
- [103] Pollice P. F., Rosier R. N., Looney R. J., Puzas J. E., Schwarz E. M., O'Keefe R. J. (2001): Oral pentoxifylline inhibits release of tumor necrosis factor-alpha from human peripheral blood monocytes : a potential treatment for aseptic loosening of total joint components. *J Bone Joint Surg Am* 83-A(7): 1057-1061.
- [104] Qian Y., Zeng B. F., Zhang X. L., Jiang Y. (2008): High levels of substance P and CGRP in pseudosynovial fluid from patients with aseptic loosening of their hip prosthesis. *Acta Orthop* 79(3): 342-345.
- [105] Qin Z. (2012): The use of THP-1 cells as a model for mimicking the function and regulation of monocytes and macrophages in the vasculature. *Atherosclerosis* 221(1): 2-11.
- [106] Rader C. P., Sterner T., Jakob F., Schutze N., Eulert J. (1999): Cytokine response of human macrophage-like cells after contact with polyethylene and pure titanium particles. *J Arthroplasty* 14(7): 840-848.
- [107] Ren W., Wu B., Peng X., Hua J., Hao H. N., Wooley P. H. (2006): Implant wear induces inflammation, but not osteoclastic bone resorption, in RANK(-/-) mice. *J Orthop Res* 24(8): 1575-1586.
- [108] Rodan G. A. (1998): Control of bone formation and resorption: biological and clinical perspective. *J Cell Biochem Suppl* 30-31: 55-61.
- [109] Rosenfeld M. G., Mermod J. J., Amara S. G., Swanson L. W., Sawchenko P. E., Rivier J., Vale W. W., Evans R. M. (1983): Production of a novel neuropeptide encoded by the calcitonin gene via tissue-specific RNA processing. *Nature* 304(5922): 129-135.
- [110] Sakuta H., Inaba K., Muramatsu S. (1995): Calcitonin gene-related peptide enhances cytokine-induced IL-6 production by fibroblasts. *Cell Immunol* 165(1): 20-25.
- [111] Sambrook J., Russell D. W. (2001): *Molecular cloning : a laboratory manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- [112] Saxler G., Loer F., Skumavc M., Pfortner J., Hanesch U. (2007): Localization of SP- and CGRP-immunopositive nerve fibers in the hip joint of patients with painful osteoarthritis and of patients with painless failed total hip arthroplasties. *Eur J Pain* 11(1): 67-74.
- [113] Schaumburger J., Winkler S., Handel M., Grifka J., Baier C. (2012): [Prosthesis loosening]. *Z Rheumatol* 71(9): 785-797.

- [114] Schildberger A., Rossmann E., Eichhorn T., Strassl K., Weber V. (2013): Monocytes, peripheral blood mononuclear cells, and THP-1 cells exhibit different cytokine expression patterns following stimulation with lipopolysaccharide. *Mediators Inflamm* 2013: 697972.
- [115] Schinke T., Liese S., Priemel M., Haberland M., Schilling A. F., Catala-Lehnen P., Blicharski D., Rueger J. M., Gagel R. F., Emeson R. B., Amling M. (2004): Decreased bone formation and osteopenia in mice lacking alpha-calcitonin gene-related peptide. *J Bone Miner Res* 19(12): 2049-2056.
- [116] Schmalzried T. P., Akizuki K. H., Fedenko A. N., Mirra J. (1997): The role of access of joint fluid to bone in periarticular osteolysis. A report of four cases. *J Bone Joint Surg Am* 79(3): 447-452.
- [117] Schwab L. P., Xing Z., Hasty K. A., Smith R. A. (2006): Titanium particles and surface-bound LPS activate different pathways in IC-21 macrophages. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 79(1): 66-73.
- [118] Schwende H., Fitzke E., Ambs P., Dieter P. (1996): Differences in the state of differentiation of THP-1 cells induced by phorbol ester and 1,25-dihydroxyvitamin D3. *J Leukoc Biol* 59(4): 555-561.
- [119] Scott D. T., Lam F. Y., Ferrell W. R. (1994): Acute joint inflammation--mechanisms and mediators. *Gen Pharmacol* 25(7): 1285-1296.
- [120] Sehmsdorf U.-S. (2001): Einfluss von "Calcitonin Gene-Related Peptide" und "Substance P" auf die mRNA-Expression und Freisetzung von Zytokinen aus zerebralen Endothelzellen bei Kostimulation mit Pneumokokkenzellwänden. Berlin: Medizinische Fakultät - Universitätsklinikum Charité.
- [121] Shanbhag A. S., Jacobs J. J., Black J., Galante J. O., Glant T. T. (1994): Macrophage/particle interactions: effect of size, composition and surface area. *J Biomed Mater Res* 28(1): 81-90.
- [122] Shin D. K., Kim M. H., Lee S. H., Kim T. H., Kim S. Y. (2012): Inhibitory effects of luteolin on titanium particle-induced osteolysis in a mouse model. *Acta Biomater* 8(9): 3524-3531.
- [123] Spano A., Barni S., Sciola L. (2013): PMA withdrawal in PMA-treated monocytic THP-1 cells and subsequent retinoic acid stimulation, modulate induction of apoptosis and appearance of dendritic cells. *Cell Prolif* 46(3): 328-347.
- [124] Strasser C., Ferrando-May E. (2008): Der illustrierte Zelltod: zur Mikroskopie apoptotischer Prozesse. *Biospektrum* 06.08: 597-600.
- [125] Suda T., Takahashi N., Udagawa N., Jimi E., Gillespie M. T., Martin T. J. (1999): Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev* 20(3): 345-357.
- [126] Sundfeldt M., Carlsson L. V., Johansson C. B., Thomsen P., Gretzer C. (2006): Aseptic loosening, not only a question of wear: a review of different theories. *Acta Orthop* 77(2): 177-197.
- [127] Suñer Moreno S. (2013): Carbon Reinforced UHMWPE Composites for Orthopaedic Applications - Characterization and Biological Response to Wear Particles. Luleå: Luleå University of Technology.
- [128] Takayanagi H. (2005): Mechanistic insight into osteoclast differentiation in osteoimmunology. *J Mol Med (Berl)* 83(3): 170-179.
- [129] Tanabe N., Maeno M., Suzuki N., Fujisaki K., Tanaka H., Ogiso B., Ito K. (2005): IL-1 alpha stimulates the formation of osteoclast-like cells by increasing M-CSF and PGE2 production and decreasing OPG production by osteoblasts. *Life Sci* 77(6): 615-626.
- [130] Tang Y., Han C., Wang X. (1999): Role of nitric oxide and prostaglandins in the potentiating effects of calcitonin gene-related peptide on lipopolysaccharide-induced interleukin-6 release from mouse peritoneal macrophages. *Immunology* 96(2): 171-175.
- [131] Tepper S. J., Stillman M. J. (2008): Clinical and preclinical rationale for CGRP-receptor antagonists in the treatment of migraine. *Headache* 48(8): 1259-1268.
- [132] Togari A., Arai M., Mizutani S., Mizutani S., Koshihara Y., Nagatsu T. (1997): Expression of mRNAs for neuropeptide receptors and beta-adrenergic receptors in human osteoblasts and human osteogenic sarcoma cells. *Neurosci Lett* 233(2-3): 125-128.

- [133] Torii H., Hosoi J., Beissert S., Xu S., Fox F. E., Asahina A., Takashima A., Rook A. H., Granstein R. D. (1997): Regulation of cytokine expression in macrophages and the Langerhans cell-like line XS52 by calcitonin gene-related peptide. *J Leukoc Biol* 61(2): 216-223.
- [134] Tsuchiya S., Kobayashi Y., Goto Y., Okumura H., Nakae S., Konno T., Tada K. (1982): Induction of maturation in cultured human monocytic leukemia cells by a phorbol diester. *Cancer Res* 42(4): 1530-1536.
- [135] Tsuchiya S., Yamabe M., Yamaguchi Y., Kobayashi Y., Konno T., Tada K. (1980): Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer* 26(2): 171-176.
- [136] Ulrich-Vinther M., Carmody E. E., Goater J. J., Balle K. S., O'Keefe R. J., Schwarz E. M. (2002): Recombinant adeno-associated virus-mediated osteoprotegerin gene therapy inhibits wear debris-induced osteolysis. *J Bone Joint Surg Am* 84-A(8): 1405-1412.
- [137] Vignery A., Wang F., Ganz M. B. (1991): Macrophages express functional receptors for calcitonin-gene-related peptide. *J Cell Physiol* 149(2): 301-306.
- [138] Villa I., Melzi R., Pagani F., Ravasi F., Rubinacci A., Guidobono F. (2000): Effects of calcitonin gene-related peptide and amylin on human osteoblast-like cells proliferation. *Eur J Pharmacol* 409(3): 273-278.
- [139] Villa I., Mrak E., Rubinacci A., Ravasi F., Guidobono F. (2006): CGRP inhibits osteoprotegerin production in human osteoblast-like cells via cAMP/PKA-dependent pathway. *Am J Physiol Cell Physiol* 291(3): C529-537.
- [140] von Knoch F., Heckelei A., Wedemeyer C., Saxler G., Hilken G., Brankamp J., Sterner T., Landgraeber S., Henschke F., Loer F., von Knoch M. (2005a): Suppression of polyethylene particle-induced osteolysis by exogenous osteoprotegerin. *J Biomed Mater Res A* 75(2): 288-294.
- [141] von Knoch F., Heckelei A., Wedemeyer C., Saxler G., Hilken G., Henschke F., Loer F., von Knoch M. (2005b): The effect of simvastatin on polyethylene particle-induced osteolysis. *Biomaterials* 26(17): 3549-3555.
- [142] von Knoch M., Sprecher C., Barden B., Saxler G., Loer F., Wimmer M. (2004): [Size and shape of commercially available polyethylene particles for in-vitro and in-vivo-experiments]. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 142(3): 366-370.
- [143] Voronov I., Santerre J. P., Hinek A., Callahan J. W., Sandhu J., Boynton E. L. (1998): Macrophage phagocytosis of polyethylene particulate in vitro. *J Biomed Mater Res* 39(1): 40-51.
- [144] Wang Y., Wu N. N., Mou Y. Q., Chen L., Deng Z. L. (2013): Inhibitory effects of recombinant IL-4 and recombinant IL-13 on UHMWPE-induced bone destruction in the murine air pouch model. *J Surg Res* 180(2): e73-81.
- [145] Wedemeyer C., Neuerburg C., Pfeiffer A., Heckelei A., Bylski D., von Knoch F., Schinke T., Hilken G., Gosheger G., von Knoch M., Loer F., Saxler G. (2007a): Polyethylene particle-induced bone resorption in alpha-calcitonin gene-related peptide-deficient mice. *J Bone Miner Res* 22(7): 1011-1019.
- [146] Wedemeyer C., Neuerburg C., Pfeiffer A., Heckelei A., von Knoch F., Hilken G., Brankamp J., Henschke F., von Knoch M., Loer F., Saxler G. (2007b): Polyethylene particle-induced bone resorption in substance P-deficient mice. *Calcif Tissue Int* 80(4): 268-274.
- [147] Wedemeyer C., von Knoch F., Pingsmann A., Hilken G., Sprecher C., Saxler G., Henschke F., Loer F., von Knoch M. (2005): Stimulation of bone formation by zoledronic acid in particle-induced osteolysis. *Biomaterials* 26(17): 3719-3725.
- [148] Wehrhahn J., Kraft R., Harteneck C., Hauschildt S. (2010): Transient receptor potential melastatin 2 is required for lipopolysaccharide-induced cytokine production in human monocytes. *J Immunol* 184(5): 2386-2393.
- [149] Wimalawansa S. J. (1997): Amylin, calcitonin gene-related peptide, calcitonin, and adrenomedullin: a peptide superfamily. *Crit Rev Neurobiol* 11(2-3): 167-239.
- [150] Wright H. L., McCarthy H. S., Middleton J., Marshall M. J. (2009): RANK, RANKL and osteoprotegerin in bone biology and disease. *Curr Rev Musculoskelet Med* 2(1): 56-64.



- [151] Xing S., Waddell J. E., Boynton E. L. (2002): Changes in macrophage morphology and prolonged cell viability following exposure to polyethylene particulate in vitro. *Microsc Res Tech* 57(6): 523-529.
- [152] Xu J., Kautner M. D., Hartl J., Wedemeyer C. (2010): Effects of alpha-calcitonin gene-related peptide on osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand expression in MG-63 osteoblast-like cells exposed to polyethylene particles. *J Orthop Surg Res* 5: 83.
- [153] Yamaguchi M., Kojima T., Kanekawa M., Aihara N., Nogimura A., Kasai K. (2004): Neuropeptides stimulate production of interleukin-1 beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha in human dental pulp cells. *Inflamm Res* 53(5): 199-204.
- [154] Yang S. Y., Wu B., Mayton L., Mukherjee P., Robbins P. D., Evans C. H., Wooley P. H. (2004): Protective effects of IL-1Ra or vIL-10 gene transfer on a murine model of wear debris-induced osteolysis. *Gene Ther* 11(5): 483-491.
- [155] Yaraee R., Ebtekar M., Ahmadiani A., Sabahi F. (2003): Neuropeptides (SP and CGRP) augment pro-inflammatory cytokine production in HSV-infected macrophages. *Int Immunopharmacol* 3(13-14): 1883-1887.
- [156] Yip K. H., Zheng M. H., Feng H. T., Steer J. H., Joyce D. A., Xu J. (2004): Sesquiterpene lactone parthenolide blocks lipopolysaccharide-induced osteolysis through the suppression of NF-kappaB activity. *J Bone Miner Res* 19(11): 1905-1916.
- [157] Zhang Y. H., Heulsmann A., Tondravi M. M., Mukherjee A., Abu-Amer Y. (2001): Tumor necrosis factor-alpha (TNF) stimulates RANKL-induced osteoclastogenesis via coupling of TNF type 1 receptor and RANK signaling pathways. *J Biol Chem* 276(1): 563-568.
- [158] Zheng S., Li W., Xu M., Bai X., Zhou Z., Han J., Shyy J. Y., Wang X. (2010): Calcitonin gene-related peptide promotes angiogenesis via AMP-activated protein kinase. *Am J Physiol Cell Physiol* 299(6): C1485-1492.
- [159] Zhou X., Zhang C., Wang X., An B., Zhang P., Zhu Z. (2012): Berberine inhibits lipopolysaccharide- and polyethylene particle-induced mouse calvarial osteolysis in vivo. *J Surg Res* 173(2): e47-52.
- [160] Zou W., Hakim I., Tschoep K., Endres S., Bar-Shavit Z. (2001): Tumor necrosis factor-alpha mediates RANK ligand stimulation of osteoclast differentiation by an autocrine mechanism. *J Cell Biochem* 83(1): 70-83.

## VII. Anhang

### VII.1 Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1:</b> Knochenremodellierung .....	- 10 -
<b>Abb. 2:</b> Hormonelle Regulation des Knochenstoffwechsels .....	- 11 -
<b>Abb. 3:</b> Aseptische Prothesenlockerung durch partikelinduzierte Osteolyse .....	- 13 -
<b>Abb. 4:</b> Makrophagen in der abriebpartikelvermittelten periprothetischen Osteolyse .....	- 15 -
<b>Abb. 5:</b> Der potentielle Einfluss des Neuropeptids CGRP auf die periprothetische Osteolyse....	- 20 -
<b>Abb. 6:</b> Differenzierung von THP-1 Monozyten zu makrophagenähnlichen Zellen.....	- 49 -
<b>Abb. 7:</b> Oberflächenmarker THP-1 makrophagenähnlicher Zellen.....	- 51 -
<b>Abb. 8:</b> HUVEC-Positivkontrolle für die Expression von CD68 und CGRPR1 .....	- 52 -
<b>Abb. 9:</b> RANK-Expression in THP-1 makrophagenähnlichen Zellen bei Osteolyse-ähnlicher Stimulation mit UHMWPE-Partikeln und bakteriellem LPS .....	- 54 -
<b>Abb. 10:</b> Osteolyseassoziierte TNF- $\alpha$ Produktion in THP-1 makrophagenähnlichen Zellen.....	- 60 -
<b>Abb. 11:</b> Osteolyseassoziierte Produktion von IL-1 $\beta$ und IL-6 in THP-1 makrophagenähnlichen Zellen.....	- 62 -
<b>Abb. 12:</b> Modulation der osteolyseassoziierten TNF- $\alpha$ Produktion in THP-1 makrophagenähnlichen Zellen bei Behandlung mit CGRP .....	- 65 -
<b>Abb. 13:</b> Modulation der osteolyseassoziierten IL-1 $\beta$ und IL-6 Produktion in THP-1 makrophagenähnlichen Zellen bei Behandlung mit CGRP .....	- 68 -

### VII.2 Tabellenverzeichnis

<b>Tab. 1:</b> Oligonukleotid-Primer für die quantitative Polymerasekettenreaktion .....	- 29 -
<b>Tab. 2:</b> Primärantikörper für die Anwendung im Western Blot.....	- 29 -
<b>Tab. 3:</b> Sekundärantikörper für die Anwendung im Western Blot.....	- 30 -
<b>Tab. 4:</b> Fluorochromkonjugierte Antikörper für die Immunfluoreszenz.....	- 30 -
<b>Tab. 5:</b> Experimentelle Behandlung makrophagenähnlicher Zellen .....	- 35 -
<b>Tab. 6:</b> Statistische Analyse zu Partikel- und LPS-induzierten Reaktionen im Makrophagenmodell .....	- 55 -
<b>Tab. 7:</b> Statistische Analyse zur Beeinflussung der Partikel- und LPS-induzierten Reaktionen durch das Neuropeptid CGRP im Makrophagenmodell.....	- 57 -

### VII.3 Abkürzungsverzeichnis

ALP	Alkaline Phosphatase
ANOVA	Varianzanalyse („ <i>analysis of variance</i> “)
as	„ <i>antisense</i> “
ASC	apoptoseassoziiertes fleckenähnliches Protein („ <i>apoptosis-associated speck-like protein</i> “)
BisTris	Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan
BMP	knochenmorphogenetisches Protein („ <i>bone morphogenetic protein</i> “)
bp	Basenpaar
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Celsius
ca.	circa
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CD	Unterscheidungsgruppen („ <i>cluster of differentiation</i> “)
cDNA	komplementäre DNA („ <i>complementary DNA</i> “)
CFU-GM	kolonienbildende Einheit für Granulozyten und Makrophagen („ <i>colony forming unit - granulocytes, macrophages</i> “)
CGRP	„ <i>Calcitonin Gene-Related Peptide</i> “
CGRPR	CGRP-Rezeptor
cm	Zentimeter
CREB	„ <i>cAMP response element-binding protein</i> “
CRLR	„ <i>Calcitonin Receptor Like Receptor</i> “
C <sub>t</sub>	Schwellenwert („ <i>threshold cycle</i> “)
dATP	Desoxy-Adenosintriphosphat
dCTP	Desoxy-Cytosintriphosphat
dGTP	Desoxy-Guanosintriphosphat
d. h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleosidtriphosphat
DPBS	Phosphatpuffer mit MgCl <sub>2</sub> und CaCl <sub>2</sub> („ <i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i> “)
DPBS-T	DPBS + Tween-20

dsDNA	doppelsträngige DNA
dT	Desoxy-Thymidin
dTTP	Desoxy-Thymidintriphosphat
ECGM	Endothelzellmedium („ <i>endothelial cell growth medium</i> “)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	„ <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> “
et al.	und andere („ <i>et alii</i> “)
EU	Endotoxineinheit („ <i>endotoxin unit</i> “)
FCS	fetales Kälberserum
g	Gravitationskonstante
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GM-CSF	Granulozyten- und Makrophagenkolonien-stimulierender Faktor („ <i>granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i> “)
ggf.	gegebenenfalls
h	Stunde(n)
HCl	Salzsäure („ <i>hydrochloric acid</i> “)
HEK	humane embryonale Nierenzellen („ <i>human embryonic kidney cells</i> “)
HKG	Haushaltsgen („ <i>housekeeping gene</i> “)
HRP	Meerrettichperoxidase („ <i>horseradish peroxidase</i> “)
HUVEC	humane Endothelzellen aus der Nabelschnurvene („ <i>human umbilical vein endothelial cells</i> “)
IDCR	„ <i>ionic detergent compatibility reagent</i> “
IF	Immunfluoreszenz
IFN	Interferon
IL	Interleukin
kDa	Kilodalton
LAL	Limulus Amoebozyten-Lysat
LPS	Lipopolysaccharide
m	murin
M	mol pro Liter (molar)
mA	Milliampere
MCP	monozytenchemotaktisches Protein („ <i>monocyte chemotactic protein</i> “)
M-CSF	Makrophagenkolonien-stimulierender Faktor („ <i>macrophage colony-stimulating factor</i> “)
min	Minute(n)

µl	Mikroliter
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	messenger RNA
n	Anzahl der experimentellen Ansätze bzw. Wiederholungen
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (reduzierte Form)
Nalp	NOD-ähnlicher Rezeptor
NFATc	zytoplasmatischer nukleärer Faktor aktivierter T-Zellen ( <i>„nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic“</i> )
NFκB	nukleärer Faktor kappa B ( <i>„nuclear factor κB“</i> )
ng	Nanogramm
NKA	Neurokinin A
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NOD	nukleotidbindende Oligomerisationsdomäne ( <i>„nucleotide-binding oligomerization domain“</i> )
NPY	Neuropeptid Y
NRT	<i>„no reverse transcription“</i> Kontrolle
NTC	Negativkontrolle ( <i>„no template control“</i> )
OD	optische Dichte
OPG	Osteoprotegerin
PBMC	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes ( <i>„peripheral blood mononuclear cells“</i> )
PBS	Phosphatpuffer ohne MgCl <sub>2</sub> und CaCl <sub>2</sub> ( <i>„Phosphate Buffered Saline“</i> )
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
pg	Pikogramm
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin-E <sub>2</sub>
pH-Wert	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenaktivität
PKA	Proteinkinase A
PLF	prothesenlockerungsspezifischer Fibroblast
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
PSB	Proteinpuffer ( <i>„protein solving buffer“</i> )
PTH	Parathormon
qPCR	quantitative Polymerasekettenreaktion
Ra	Rezeptorantagonist

RANK	Rezeptor-Aktivator von NFκB („ <i>receptor activator of NFκB</i> “)
RANKL	RANK-Ligand
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies („ <i>reactive oxygen species</i> “)
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
<i>RT</i>	reverse Transkription
s	Sekunde(n)
s.	siehe
SD	Standardabweichung („ <i>standard deviation</i> “)
SDS	Natriumlaurylsulfat („ <i>sodium dodecyl sulfate</i> “)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
se	„ <i>sense</i> “
SP	Substanz P
t	Schwellenwert („ <i>threshold</i> “)
T	Temperatur
Tab.	Tabelle
TCEP	Tris-(2-Carboxyethyl)-Phosphin
TE	Tris-EDTA
TEP	Totalendoprothese
TGF	transformierender Wachstumsfaktor („ <i>transforming growth factor</i> “)
TLR	Toll-ähnlicher Rezeptor („ <i>toll-like receptor</i> “)
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAF	TNF-Rezeptorassoziierter Faktor („ <i>TNF receptor associated factor</i> “)
TRAP	tartratresistente saure Phosphatase („ <i>tartrate resistant acid phosphatase</i> “)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Einheit der Enzymaktivität („ <i>units</i> “)
u. a.	unter anderem
UHMWPE	ultrahochmolekulares Polyethylen
UKE	Universitätsklinikum Essen
v	viral
V	Volt
V	Volumen

---

VE	vollentsalzt
vgl.	vergleiche
VIP	vasoaktives intestinales Peptid
v/v	Volumenprozent („ <i>volume per volume</i> “)
w/v	Gewichtsprozent („ <i>weight per volume</i> “)
x	vielfach(es), mal
z. B.	zum Beispiel

## **VII.4 Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. Christian Wedemeyer sowie Herrn Dr. med. Max Daniel Kauther für die freundliche Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe, die Überlassung des Promotionsthemas, ihre hervorragende Betreuung in der experimentellen Phase der Arbeit sowie für ihre Unterstützung bei der Veröffentlichung und Präsentation der erzielten Ergebnisse.

Diese Arbeit, eingebunden in das Projekt „Die Rolle von Neuropeptiden und Calcitonin bei der Lockerung von Endoprothesen – Untersuchungen im partikelassoziierten murinen Osteolysemodell, Zellkulturversuche, DNA-Analyse auf Polymorphismen“ erhielt finanzielle Unterstützung durch Fördermittel der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG), eingeworben von Herrn PD Dr. med. Christian Wedemeyer, Herrn Dr. med. Max Daniel Kauther und Herrn PD Dr. med. Hagen Bachmann.

Herrn Prof. Dr. med. Marcus Jäger, Leiter der Kliniken für Orthopädie und Unfallchirurgie, danke ich für die Möglichkeit, meine Dissertation und die damit verbundenen Laborarbeiten in den Räumlichkeiten seines Institutes durchführen zu können.

Ein herzlicher Dank geht an Herrn PD Dr. med. Hagen Bachmann für die Ermöglichung der Durchführung der quantitativen PCR-Analysen in den Laboratorien des Institutes für Pharmakogenetik. Außerdem möchte ich mich an dieser Stelle für die zahlreichen konstruktiven Vorschläge und Diskussionen sowie die hilfreichen kritischen Anmerkungen zum Thema bedanken.

Frau Dr. rer. nat. Martina Bröcker-Preuss und Frau Katrin Rehmann aus dem Zentrallabor des Universitätsklinikums Essen danke ich von Herzen für die Beratung bei der Auswahl geeigneter Assays für die Zytokinquantifizierung sowie für die Durchführung der entsprechenden Bio-Plex-Analysen in ihren Laboratorien.

Dem Institut für Medizinische Mikrobiologie unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Carsten Kirschning danke ich für die Möglichkeit, Western Blots in den Laboratorien des Instituts detektieren zu können.

Ganz besonders möchte ich Frau Dr. rer. nat. Anja Prinz aus der Klinik für Neurochirurgie für ihre intensive Unterstützung bei der Immunzytochemie und die beratende Funktion bei der Erstellung von Präsentationen aller Art danken.



Frau Dr. rer. medic. Carolin Pütter vom Institut für Medizinische Informatik, Biometrie und Epidemiologie (IMIBE) danke ich für die Beratung bei der statistischen Auswertung der experimentellen Daten.

Frau Ursula Jäger vom Promotionsbüro der Medizinischen Fakultät der Universität Duisburg-Essen danke ich für die kompetente Beratung in allen Fragen zur formalen Gestaltung der Dissertation und zum Promotionsverfahren.

Ein ganz besonderes Dankeschön gilt den aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern der experimentellen orthopädischen sowie der experimentellen unfallchirurgischen Forschung für die unkomplizierte Aufnahme in den Laboralltag, die Einführung in neue Methoden sowie diverse Kuchenrunden. Dabei möchte ich Herrn Prof. Dr. rer. nat. Fritz Ulrich Schade und Frau PD Dr. rer. nat. Stefanie Flohé für ihre Anregungen und Denkanstöße zum Thema danken. Frau Dr. rer. nat. Heike Thomas danke ich für das geduldige Zuhören, für die kritische Begutachtung von Posterentwürfen und anderen Schriftstücken sowie die Begleitung auf Kongressreisen. Sara Lask, Dipl.-Chem. Stefanie Pohlmann, Marion Frisch und Marion Heppner-Schefczyk möchte ich für ihre Unterstützung bei der Einarbeitung in neue Methoden sowie die Einweisung in die entsprechenden Geräte danken. Frau cand. med. Katharina Mauel danke ich für die effektive Aufheiterung bei den diversen abendlichen Bench-Sitzungen.

Außerdem möchte ich mich vor allem ganz herzlich bei den Mitarbeitern und Doktoranden der AG Wedemeyer für die entspannte Arbeitsatmosphäre und die unermüdliche Unterstützung bedanken. Frau cand. med. Stefanie Rost möchte ich für ihre Unterstützung bei den Zellkulturarbeiten danken. Frau cand. med. Christina Polan danke ich für die kritische Beurteilung sämtlicher schriftlicher Entwürfe, ein stets offenes Ohr für jegliche Labor- und Alltagsprobleme sowie die kontinuierliche Versorgung mit Süßigkeiten aller Art. Herrn Dr. rer. nat. Rüdiger Schlepper danke ich für die intensive Betreuung, die Unterstützung in sämtlichen organisatorischen Dingen, die perfekten Lorient-Rezitationen, die diversen Büro-Insider und seine beruhigenden Druckorgien.

Für die Durchsicht und die sprachliche Korrektur dieser Arbeit möchte ich mich von Herzen bei Rüdiger Schlepper, Heike Thomas, Anja Prinz, Christina Polan und Michaela Hastrich bedanken.

Tina: you are the cracker!!! ;-) Danke, dass du immer für mich da bist, du verrücktes Huhn.

To my snooker family and friends: thanks for being there and see you all very soon! xxx

Zuletzt möchte ich meinen Eltern danken, die mich während meines gesamten Studiums in jeder Hinsicht unterstützt haben. Vielen Dank!

## **VII.5 Lebenslauf**

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

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

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