

Aus der Abteilung Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie
(Prof. Dr. med. Dr. med. dent. H. Schliephake)
Im Zentrum Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Auswirkung von Bisphosphonaten auf die Expression
von Osteoprotegerin (OPG) und Receptor activator of
nuclear factor κ B ligand (RANKL) in
Osteoblastenkulturen aus Unterkiefer und Becken
Eine Pilotstudie am Hausschwein

Inaugural – Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
für Zahnheilkunde

der Medizinischen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Niklas Sievers

aus Henstedt-Ulzburg

Göttingen 2012

Dekan: Prof. Dr. med. M.P. Schön

I. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Dr. med. dent. R.M. Gruber

II. Berichterstatter: Prof. Dr. med. D. Raddatz

Tag der mündlichen Prüfung: 14.11.2012

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. <u>Einleitung</u>	7
1.1 <u>Anatomie und Physiologie des Knochengewebes</u>	8
1.2 <u>Regulation des Auf- und Abbaus von Knochen</u>	10
1.3 <u>Knochenerkrankungen und Medikamente</u>	14
1.4 <u>Bisphosphonate und klinische Anwendung</u>	15
1.5 <u>Bisphosphonat-assoziierte Osteonekrose der Kiefer (BP-ONJ)</u>	20
2. <u>Fragestellung</u>	23
3. <u>Material und Methoden</u>	24
3.1 <u>Material</u>	24
3.1.1 <u>Geräte</u>	24
3.1.2 <u>Verbrauchsmaterialien/Einmalartikel</u>	24
3.1.3 <u>Feinchemikalien</u>	25
3.1.4 <u>Enzyme</u>	26
3.1.5 <u>Molekulargewichtsmarker</u>	26
3.1.6 <u>Primer</u>	26
3.2 <u>Methoden</u>	27
3.2.1 <u>Methoden der Zellkultur</u>	27
3.2.1.1 <u>Gewinnung von Knochenmaterial</u>	28
3.2.1.2 <u>Trypsinierung und Passagierung</u>	30
3.2.1.3 <u>Einfrieren und Auftauen von Knochenzellen</u>	31
3.2.1.4 <u>Proliferationsversuch der Prä-Osteoblasten</u>	31
3.2.2 <u>Färbemethoden</u>	32
3.2.2.1 <u>Zytochemische Färbung der alkalischen Phosphatase</u>	32
3.2.2.2 <u>Von-Kossa-Färbung</u>	33
3.2.3 <u>Versuchsprotokoll zum Versetzen der Prä-Osteoblasten mit Zoledronat (Zometa[®], Novartis Pharma): Vorversuch</u>	34
3.2.4 <u>Versuchsprotokoll zum Versetzen der Prä-Osteoblasten mit Zoledronat (Zometa[®], Novartis Pharma): Hauptversuch</u>	34
3.2.5 <u>Molekularbiologische Analysen</u>	36
3.2.5.1 <u>RNA-Isolierung, Quantifizierung und Qualitätskontrolle</u>	36

3.2.5.2	cDNA-Synthese mittels reverser Transkriptase.....	36
3.2.5.3	Primerherstellung.....	36
3.2.5.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	37
3.2.5.5	DNA-Auftrennung im Agarosegel.....	38
3.2.5.6	Housekeeping-Gene.....	38
3.2.5.7	Molekularbiologischer Nachweis des Osteokalzins.....	39
3.2.5.8	Quantitative real-time-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR).....	39
3.2.6	Statistische Auswertung.....	40
4.	Ergebnisse.....	42
4.1	Gewinnung von Prä-Osteoblasten.....	42
4.2	Proliferationsversuch der Prä-Osteoblasten – Vorversuch.....	42
4.3	Proliferationsversuch der Prä-Osteoblasten – Hauptversuch.....	44
4.4	Färbemethoden.....	47
4.4.1	Zytochemische Färbung der alkalischen Phosphatase.....	47
4.4.2	Von-Kossa-Färbung.....	48
4.5	Molekularbiologischer Nachweis des Osteokalzins.....	49
4.6	Molekularbiologische Analysen der Prä-Osteoblasten unter Zoledronat-Therapie: Vorversuch.....	50
4.6.1	Ergebnisse der Expressionsuntersuchung von OPG im Vorversuch.....	50
4.6.2	Ergebnisse der Expressionsuntersuchung von RANKL im Vorversuch.....	53
4.7	Molekularbiologische Analysen der Prä-Osteoblasten unter Zoledronat-Therapie: Hauptversuch.....	55
4.7.1	Einfluss des Entnahmeortes auf die Expression von OPG und RANKL.....	55
4.7.2	Einfluss der Kulturdauer auf die Expression von OPG und RANKL.....	56
4.7.3	Einfluss der Konzentration auf die Expression von OPG und RANKL.....	57
4.7.4	Subgruppenanalyse der Genexpressionsdaten von OPG.....	59

5.	Diskussion.....	61
5.1	Diskussion der untersuchten biochemischen Marker des Knochenstoffwechsels.....	62
5.2	Bewertung des Tiermodells.....	63
5.3	Reaktion von humanen und porcinen Unterkiefer- und Beckenosteoblasten auf eine Bisphosphonatbelastung.....	65
6.	Zusammenfassung.....	70
7.	Anhang.....	72
7.1	Tabellen.....	72
7.2	Abbildungsverzeichnis.....	74
7.3	Tabellenverzeichnis.....	76
7.4	Abkürzungsverzeichnis.....	77
8.	Literaturverzeichnis.....	79

1. Einleitung

Bisphosphonate stellen sowohl bei der Behandlung von Knochenmetastasen bei ossär metastasierenden malignen Erkrankungen als auch bei dem Krankheitsbild der Osteoporose eine wichtige Therapiemaßnahme dar. Im Zusammenhang mit dieser Therapie wird seit 2003 das Auftreten einer Bisphosphonat-assoziierten Knochennekrose der Kiefer beobachtet (engl.: BP-ONJ: Bisphosphonat associated osteonecrosis of the Jaw) (Marx 2003), welche seit ihrer Erstbeschreibung in der Prävalenz stark zugenommen hat (Walter et al. 2007). Definitionsgemäß ist die BP-ONJ ein freiliegender nekrotischer Knochen im Mund-, Kiefer- und Gesichtsbereich, der im Zusammenhang mit einer Bisphosphonattherapie steht und über einen Zeitraum von mindestens 8 Wochen besteht ohne vorausgegangene Bestrahlung der Kiefer (American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons (AAOMS) 2007). Eine Abgrenzung zu einer Osteoradionekrose der Kiefer wäre so nur schwer möglich.

Auffallenderweise treten diese Nekrosen im Kieferbereich und nicht im übrigen Skelettsystem auf (Marx et al. 2005, Ruggiero et al. 2004), wohingegen auch ein Fall einer Knochennekrose im Bereich des Gehörgangs bekannt ist (Polizzotto et al. 2006).

Ebenfalls auffallend ist die Erkenntnis, dass diese Nebenwirkung nach Therapie mit oral verabreichten Bisphosphonaten im Rahmen metabolischer Osteopathien weit weniger häufig auftritt als im Vergleich zu hochdosierten, intravenös verabreichten Bisphosphonaten bei Tumorpatienten (Krauth et al. 2008). Die Inzidenz einer Kiefernekrose bei intravenös verabreichten Bisphosphonaten liegt nach einer Behandlungsdauer von 3 Jahren zwischen 6 und 21 % (Bamias et al. 2005), wohingegen die Inzidenz bei oral verabreichten Bisphosphonaten mit weniger als 1:100000 Patienten pro Kalenderjahr angegeben wird (American Dental Association Council on Scientific Affairs 2006).

Die American Society for Bone and Mineral Research fasste allerdings schon 64 Fälle einer BP-ONJ unter Therapie mit oralen Bisphosphonaten zusammen (Khosla et al. 2007), die durch weitere 30 Fälle von Marx et al. (2007) ergänzt wurden.

Dennoch spielen auch Kofaktoren zur Ausbildung einer Kiefernekrose eine Rolle, wie die eigentliche Grunderkrankung und vor allem dentalchirurgische Eingriffe (Woo et al. 2006).

Neben der Wirkung auf den Knochenmetabolismus scheinen Bisphosphonate auch einen antiangiogenetischen Effekt zu haben (Santini et al. 2003), der eine avaskuläre Knochennekrose auslösen kann (Santini et al. 2002).

Mittlerweile ist gut dokumentiert, dass Bisphosphonate die Fähigkeit besitzen, den Osteoklastenstoffwechsel sowohl in-vitro als auch in-vivo zu hemmen (Russell 2007). Die Wirkung auf die Osteoblasten blieb zunächst weitgehend unklar, wobei einige in-vivo-Studien sogar zeigten, dass Bisphosphonate weder Osteoblasten noch deren Bildungsrate beeinflussen (Chavassieux et al. 1997, Glorieux et al. 1998). Gegensätzlich dazu zeigten aber auch Studien, dass Bisphosphonate sowohl die Osteoblasten als auch die Appositionsrate von Mineralsalzen inhibieren (Tobias et al. 1993, Iwata et al. 2006). Auch Orriss et al. konnten 2009 zeigen, dass das hochpotente Aminobisphosphonat Zoledronat sowohl die Knochenmineralisation als auch die Osteoblastenproliferation und Kollagenproduktion hemmt. Bei höheren Konzentrationen steigt sogar die Apoptoserate der Osteoblasten rapide an, was auch übereinstimmend mit den Ergebnissen von Greiner et al. über humane Osteoblasten aus dem Jahre 2007 einhergeht.

Die Datenlage bezüglich der Wirkung von Bisphosphonaten auf die Osteoblasten ist daher weiterhin widersprüchlich. Eine Vielzahl unterschiedlicher Studiendesigns machen einen Vergleichbarkeit schwierig (Schindeler und Little 2005, Peter et al. 2005).

1.1 [Anatomie und Physiologie des Knochengewebes](#)

Das Knochengewebe gehört zu den Binde- und Stützgeweben und ist neben dem Zahnschmelz und dem Zahnbein das härteste Gewebe des menschlichen Körpers. Durch seinen starken Stoffwechsel besitzt es die Möglichkeit, sich durch ständige Umbauvorgänge an mechanische Belastungen anzupassen, was als biologische Plastizität bezeichnet wird.

Neben seiner Stütz- und Haltefunktion dient der Knochen zusammen mit den beiden Nieren aber auch der Hämatopoese und der Regulation des Kalzium- und Phosphathaushaltes. Zu den wesentlichen Zellen des Knochens zählen Osteoklasten, Osteoblasten sowie die intraossär gelegenen Osteozyten. Während die Osteoklasten den Knochen resorbieren, sind die Osteoblasten für den Knochenaufbau zuständig. Durch das physiologische Gleichgewicht dieser

antagonistisch wirkenden Knochenzellen wird die Integrität des Knochens gewahrt und das Skelettsystem gegenüber biomechanischen Veränderungen anpassungsfähig gemacht.

Der Osteoblast entstammt den Stromazellen des Mesenchyms (Aubin und Liu 1996), welche auch als humane mesenchymale Stromazellen (hMSC) bezeichnet werden. Diese pluripotente Zelllinie stammt aus dem Knochenmark und kann sich unter bestimmten Bedingungen und Einflüssen zu Osteozyten, Chondrozyten und Adipozyten differenzieren (Bruder et al. 1994, Mackay et al. 1998, Pittenger et al. 1999). In Gegenwart von Dexamethason, Ascorbinsäure und β -Glycerophosphat lässt sich in-vitro so eine osteogene Zelllinie etablieren, welche in der Lage ist, eine knochenähnliche Matrix zu produzieren (Jaiswal et al. 1997).

Die hauptsächliche Aufgabe der Osteoblasten ist die Bildung von Osteoid und von Proteinen, die die Mineralisierung des Osteoids ermöglichen. Sobald sie von ihren eigenen Sekretionsprodukten vollständig umschlossen sind, wandeln sie sich in fixe Osteozyten um und sind fest im Knochen eingebettet (Aarden et al. 1994).

Zur Charakterisierung von Osteoblasten wird deren Produktion von alkalischer Phosphatase (Gomez et al. 1995), Osteokalzin (Malaval et al. 1994), Osteopontin und Kollagen nachgewiesen, wobei das Osteokalzin das einzige Protein ist, welches nur in vollständig differenzierten Osteoblasten synthetisiert wird und dadurch deren Funktion beeinflusst (Hauschka et al. 1989, Desbois et al. 1994, Ducy et al. 1996).

Der mehrkernige Osteoklast entwickelt sich aus mononukleären hämatopoetischen Stammzellen, die sich durch Fusion vereinigen und bis zu den letzten Differenzierungsschritten der Granulozyten-Makrophagen-Zellentwicklung gleichen (Prallet et al. 1992). Die Funktion der Osteoklasten besteht in der Aufgabe, mineralisierten Knochen zu resorbieren, womit sie sowohl eine wichtige Rolle in der Kalziumhomöostase als auch in Remodellierungs- und Wachstumsvorgängen spielen. Die Osteoklasten befinden sich in den Howship-Resorptionslakunen (Nijweide et al. 1986). Der Osteoklast besitzt zum einen die der Knochenoberfläche zugewandte *sealing zone*, wodurch eine Resorptionslakune entsteht, die von der extrazellulären Flüssigkeit abgegrenzt ist. Zum anderen ist die *ruffled border* nachweisbar, die durch die schnelle Fusion saurer intrazellulärer Vesikel mit der Zellmembran entsteht. Dabei erscheint die *ruffled border* zentral eher streifig hell mit stark gefalteter Zellmembran (Abbildung 1.1).

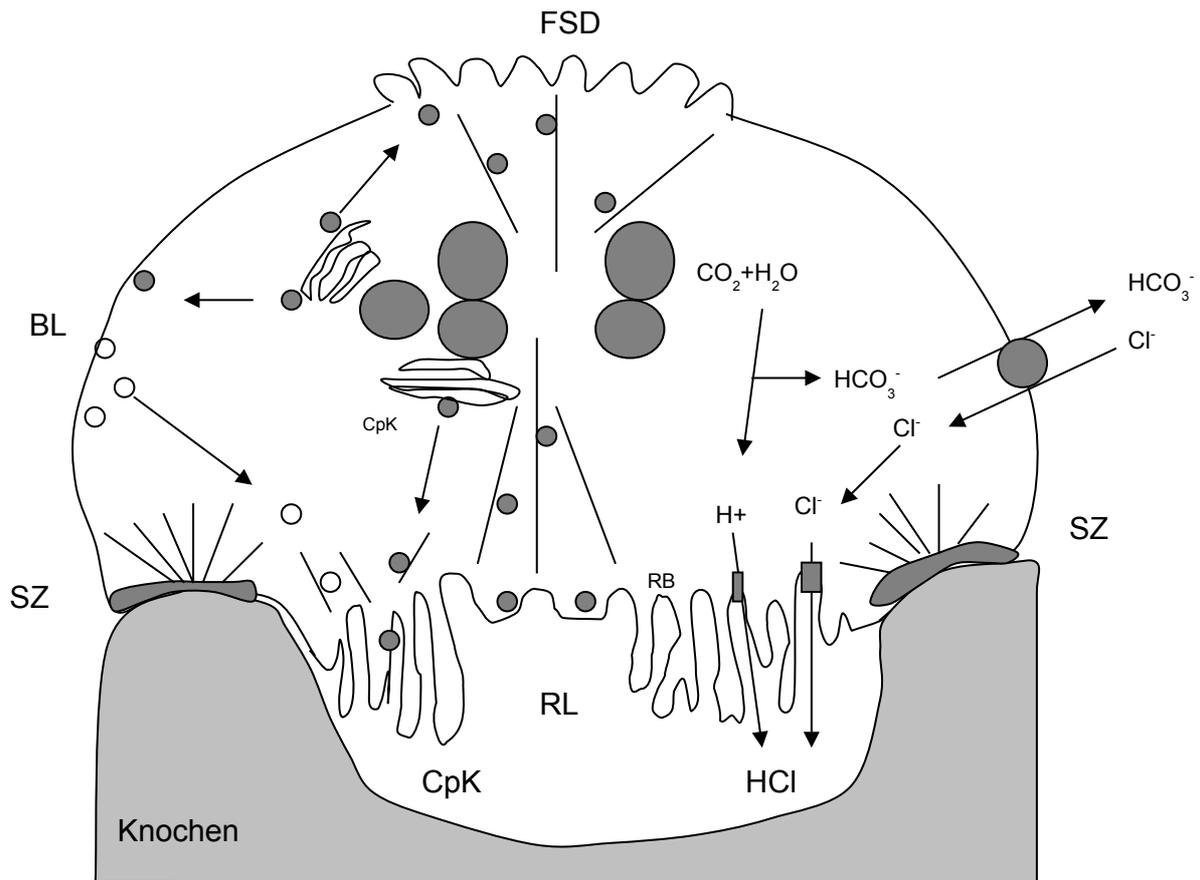


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung eines knochenresorbierenden Osteoklasten

Dargestellt ist die Funktion eines knochenabbauenden Osteoklasten, der über Podosome in der *sealing zone* dem Knochen fest anhaftet und in der Howship-Resorptionslakune den Knochen abbaut. Durch die aktive Sekretion von Wasserstoff und Chlorid entsteht ein saurer pH-Wert, der dem Abbau der Mineralsalze dient. Proteolytische Enzyme wie Cathepsin K dienen dem Abbau der kollagenen Matrix. Die entstehenden Kollagenfragmente werden phagozytiert.

BL (Basolaterale Membran), CpK (Cathepsin K), FSD (*functional secretory domain*), RB (*ruffled border*), RL (Resorptionslakune), SZ (*sealing zone*) (nach Väänänen und Zhao 2002, S.130).

1.2 Regulation des Auf- und Abbaus von Knochen

Der adulte Knochen unterliegt einem ständigen physiologischen Auf- und Abbau, um Mikrofrakturen zu kompensieren und sich an unterschiedliche biomechanische Kräfte anzupassen, was als Knochenremodellierung bezeichnet wird. Außerdem dient dieser ständige Umbau der Einhaltung der Phosphat- und Kalziumhomöostase. Um die Balance zwischen Resorptions- und Formationsrate zu gewährleisten, müssen die Knochen aufbauenden Osteoblasten und die Knochen resorbierenden Osteoklasten in ähnlicher Weise stimuliert werden, was als *coupling* bezeichnet wird.

Schon 1986 konnten McSheehy und Chambers lösliche Faktoren in Überständen von Osteoblastenkulturen nachweisen, die in der Lage waren, Osteoklasten zu aktivieren. Jimi et al. wiederum fanden heraus, dass nur durch direkten Kontakt der Osteoblasten zu den Osteoklasten eine Aktivierung stattfand (Chambers 1982, Jimi et al. 1996). Auch die Differenzierung von osteoklastischen Vorläuferzellen wird durch die Osteoblasten beeinflusst (Burger et al. 1984, Takahashi et al. 1988). Somit war die Abhängigkeit der osteoklastären Entwicklung und Aktivierung von den Osteoblasten deutlich erkennbar.

Weitere in-vitro-Untersuchungen konnten zeigen, dass Osteoblasten die Freisetzung von Osteoklasten aktivierenden Faktoren wie Parathormon (Matsuzaki et al. 1999, Liu et al. 1998), 1,25-Dihydroxyvitamin D (Takeda et al. 1999) und Prostaglandin E₂ (Sakuma et al. 2000) stimulieren.

Der genaue Mechanismus der Osteoklastenaktivierung war jedoch lange unbekannt, sodass man einen „Osteoklasten differenzierenden Faktor“ (ODF) vermutete (Suda et al. 1999).

Die entscheidende Erkenntnis über die Beeinflussung der Osteoklasten erbrachten Ende der 1990er Jahre jedoch zwei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander. So konnte ein Protein aus den Überständen von Fibroblastenkulturen isoliert werden, welches einen hemmenden Einfluss auf die Osteoklastenentwicklung zeigte und *osteoclastogenesis inhibitory factor* (OCIF) genannt wurde (Tsuda et al. 1997).

In weiteren Versuchen konnte gezeigt werden, dass dieser inhibitory factor an ein bestimmtes Membranprotein der Osteoklasten bindet (TNF-like ligand) und diese in ihrer Funktion inhibiert (Yasuda et al. 1998a).

Zufälligerweise entdeckte auch eine weitere Arbeitsgruppe dieses Abhängigkeitsverhältnis zwischen Osteoblasten und Osteoklasten während eines Screenings einer cDNA-Bibliothek auf Homologe der Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor-Superfamilie (Simonet et al. 1997). Simonet et al. nannten es Osteoprotegerin (OPG), welches identisch mit dem *osteoclastogenesis inhibitory factor* (OCIF) ist, da es den Knochen schützen soll und bei Überexpression eine Osteopetrose verursacht.

Kurz darauf wurde ein diesem Protein zugehöriger Ligand (OPG-Ligand, OPGL) identifiziert, der die Osteoklastenaktivierung und -differenzierung förderte (Lacey et al. 1998) und damit die Wirkung von OCIF bzw. OPG antagonisiert. OPGL vermittelt essentielle Signale an Osteoklastenvorläuferzellen, sich in reife Osteoklasten zu differenzieren (Yasuda et al. 1998b).

Dieses OPGL ist sowohl mit ODF (Yasuda et al. 1998a) als auch mit dem entdeckten Zytokin TRANCE (TNF-related activation induced cytokine) bzw. RANKL (receptor activator of nuclear factor κ B ligand) identisch (Yasuda et al. 1998b, Lacey et al. 1998).

Außerdem zeigte sich, dass der zuvor entdeckte Rezeptor RANK (Anderson et al. 1997) mit dem Rezeptor für ODF (ODFR) auf Osteoklastenvorläuferzellen identisch war (Nakagawa et al. 1998, Hsu et al. 1999).

Somit war die molekulare Grundlage mit dem RANKL-RANK-OPG-System (Ligand/Rezeptor/decoy-Rezeptor) für das Verständnis der osteoklastären Aktivierung und Differenzierung durch die Osteoblasten geschaffen (Abbildung 1.2).

Durch die Entdeckung des RANKL-RANK-OPG-Systems sind nun auch die molekularen Grundlagen der Beeinflussung der Knochenzellen untereinander geklärt. Humanes RANKL liegt in drei verschiedenen Isoformen vor (Ikeda et al. 2001), zweimal membrangebunden und einmal in löslicher Form, wobei die membrangebundene Form wirksamer sein soll (Nakashima et al. 2000). Gebildet wird das RANKL durch die Osteoblasten (Takahashi et al. 2002), die durch verschiedene lokale Faktoren wie z.B. durch den Osteoblastendifferenzierungsfaktor Cbfa1 in mineralisierten Geweben zur Expression von RANKL stimuliert werden (Gao et al. 1998).

RANK auf Osteoklastenvorläuferzellen fungiert als Rezeptor für den auf der Osteoblastenoberfläche exprimierten RANK-Liganden. In Zusammenarbeit mit dem Faktor M-CSF, welcher membrangebunden auf den Osteoblasten liegt und an den Rezeptor c-Fms auf den Osteoklastenvorläuferzellen bindet, besitzt RANKL die Fähigkeit, die Differenzierung von reifen Osteoklasten zu induzieren (Arai et al. 1999). RANK hingegen wird vorwiegend in reifen Osteoklasten, Makrophagen, Fibroblasten und Immunzellen gebildet und liegt als einziger Rezeptor für RANKL zur Osteoklastenaktivierung vor (Anderson et al. 1997, Hsu et al. 1999, Nakagawa et al. 1998). Dies wurde deutlich durch einen knockout des RANK-Gens in Mäusen, die durch das völlige Fehlen von Osteoklasten eine schwere Osteopetrose entwickelten (Dougall et al. 1999, Li et al. 2000).

OPG wiederum ist in der Lage, im Sinne einer kompetitiven Hemmung als Antagonist von RANKL auch an den Rezeptor RANK zu binden und damit die Wirkung von RANKL zu inhibieren. Daher besitzen Osteoblasten durch Expression des löslichen Faktors OPG und durch Anlagerung an den Rezeptor RANK die Möglichkeit, diesen

Mechanismus zu unterbinden. Dadurch kann OPG sowohl die Differenzierung von Osteoklastenvorläuferzellen zu reifen Osteoklasten als auch deren spätere Aktivierung hemmen (Hakeda et al. 1998).

Dieses System ermöglicht somit eine sinnvolle Kontrolle des Knochenstoffwechsels. Normalerweise scheint die RANKL-RANK-Bindung zur Aktivierung der Osteoklasten auch in den Osteoblasten via RANKL eine Art Gedächtnis zu hinterlassen, sodass durch jede osteoklastische Knochenresorption ein gleichwertiger, osteoblastischer Knochenaufbau folgen kann. Dieses Abhängigkeitsverhältnis funktioniert unter pathologischen Bedingungen nicht (Suda et al. 1999).

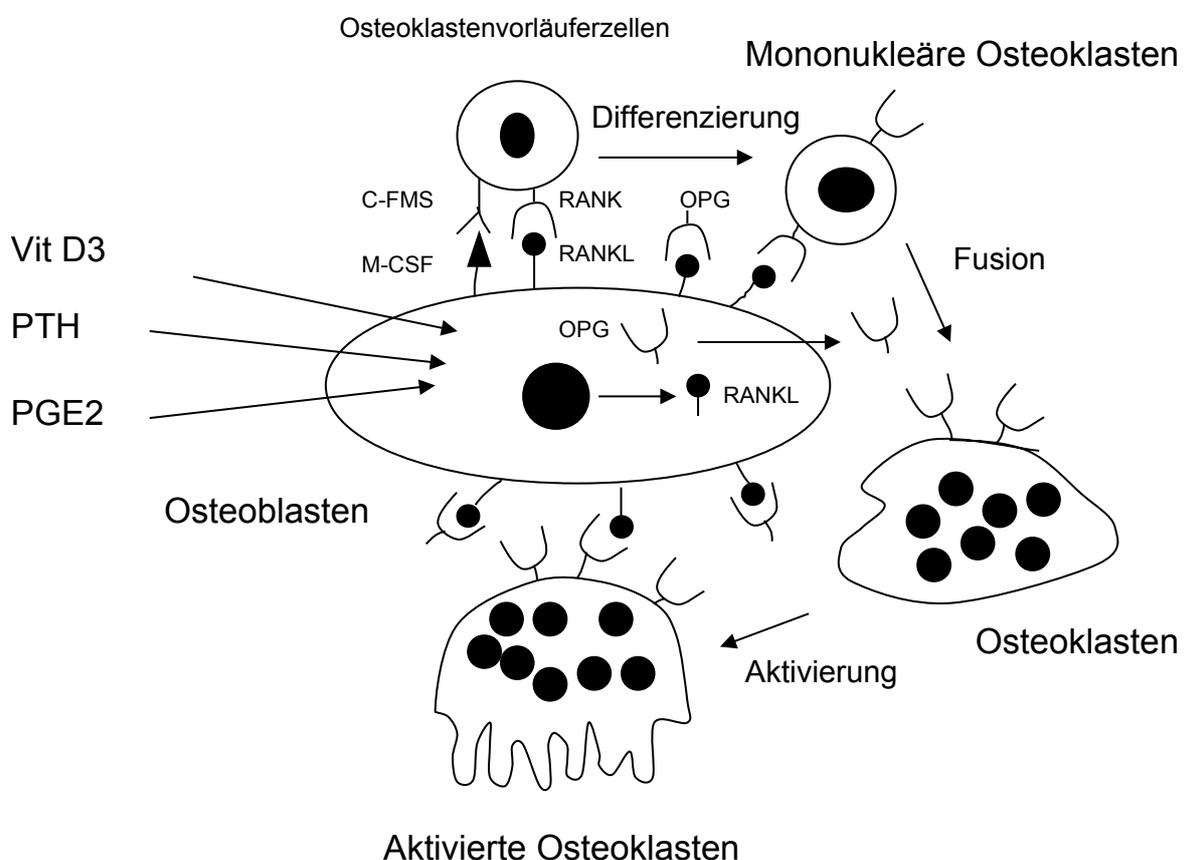


Abbildung 1.2: Schema der Osteoklastendifferenzierung und -aktivierung durch M-CSF und RANKL

RANK wird von reifen Osteoklasten und Osteoklastenvorläuferzellen exprimiert. Membrangebundenes oder lösliches M-CSF und RANKL bewirken die Osteoklastendifferenzierung. Osteotrope Faktoren wie Vitamin D3 (Vit D3), Parathormon (PTH) und Prostaglandin E₂ (PGE₂) stimulieren die Expression von RANKL auf Osteoblasten. Auch die Fusion und Aktivierung von Osteoklasten wird durch RANKL beeinflusst. OPG wird von den Osteoblasten produziert und stellt einen löslichen decoy-Rezeptor für RANKL dar. Die Differenzierung, Fusion und Aktivierung von Osteoklasten durch RANKL wird über die Bindung von OPG an RANKL inhibiert (nach Suda et al. 1999, S.355).

1.3 Knochenerkrankungen und Medikamente

Die meisten Knochenerkrankungen beruhen auf einer gesteigerten Knochenresorption auf Grund einer pathologischen Aktivierung der Osteoklastogenese durch inflammatorische Zytokine. Auch die pathologische RANKL-Bildung durch T-Zellen, wie sie lokal in der Perioprothetik (Sabokbar et al. 2003) und Parodontitis (Zhang et al. 2004) oder systemisch beim Diabetes mellitus (de Amorim et al. 2008) und der rheumatoiden Arthritis (Haynes et al. 2001) vorkommt, spielt eine wichtige Rolle.

Das Krankheitsbild der primären Osteoporose beim weiblichen Geschlecht beginnt nach der Menopause, wenn die Östrogenproduktion abnimmt (Mundy 2007). Weitere Faktoren für die Entstehung primärer Osteoporosen sind eine Hyperthyreose (Murphy et al. 2010), primärer Hyperparathyreodismus (Sitges-Serra et al. 2010) und Diabetes mellitus (Alexopoulou et al. 2006). Seltener sind sekundäre Osteoporosen, denen meistens eine Immobilisation (Takata und Yasui 2001) oder eine chronische Glukokortikoidtherapie zu Grunde liegen (Kim 2010). Ursächlich für diese Erkrankung ist immer ein Missverhältnis zwischen Knochenaufbau und Knochenresorption.

Auch andere Knochenerkrankungen wie der Morbus Paget (Osteitis deformans) (Haslam et al. 1998), das multiple Myelom (Dimopoulos et al. 2000), die Osteomalazie (Basha et al. 2000) und die Osteogenesis imperfecta (Glorieux et al. 2002) sind durch einen vermehrten Knochenumbau gekennzeichnet.

Weitere schwere Erkrankungen, die das Skelettsystem betreffen, sind die tumorbedingte Hyperkalzämie und metastasenbedingte Osteolysen. Der Knochen ist das Organ des Menschen, das am häufigsten von tumorbedingten Metastasen betroffen ist (Coleman 2006). Daraus können schwerwiegende Nebenwirkungen wie Knochenschmerzen, osteolysebedingte pathologische Frakturen, Nervenkompressionssyndrome oder tumorbedingte Hyperkalzämien resultieren (Mundy 2002).

Zur Therapie der Knochenerkrankungen werden verschiedene Medikamente eingesetzt. Gegen die postmenopausale Osteoporose werden beispielsweise Östrogene, Calcitonin und Fluoride eingesetzt (Lindsay 1990), die durch die Hemmung des Knochenabbaus die Frakturhäufigkeit reduzieren sollen.

Weitere Medikamente, die gegen eine Osteoporose oder Osteopenie eingesetzt werden, sind Parathormonfragmente, Kalzium, Vitamin D und Bisphosphonate. Auch Zytokine und Wachstumsfaktoren, wie zum Beispiel das BMP als medikamentöse

Unterstützung bei der Frakturheilung (Deckers et al. 2002) oder die Inhibierung des Knochenbildungs – Hemmers Sclerostin über Antikörper (Sibai et al. 2010), werden möglicherweise in naher Zukunft zur Verfügung stehen.

1.4 **Bisphosphonate und klinische Anwendung**

Bisphosphonate sind metabolisch stabile Analoga des in der Natur vorkommenden Pyrophosphats (P-O-P), wohingegen das zentrale Sauerstoffatom durch ein Kohlenstoffatom ersetzt ist (P-C-P) (Rogers et al. 2000). Genau wie das Pyrophosphat besitzt auch diese Wirkstoffgruppe eine hohe Affinität zum Hydroxylapatit des Knochens (Jung A et al. 1973). Gegensätzlich zum empfindlichen Pyrophosphat ist das Bisphosphonat auf Grund dieser Bindung aber stabil gegenüber enzymatischer Spaltung und saurer Hydrolyse und somit auch chemisch stabil (Sarin et al. 2008, Fleisch 2000). Der Austausch des Zentralatoms ermöglicht außerdem die Aufnahme von zwei verschiedenen Seitenketten R1 und R2 (Shinoda et al. 1983), die sehr variabel sind und dadurch Kohlenstoff-, Sauerstoff-, Halogen-, Schwefel- oder Stickstoffatome tragen können. Anhand dieser Seitenketten entstehen individuelle Bisphosphonate mit unterschiedlichem Wirkspektrum und unterschiedlicher antiresorptiver Potenz. Zudem sind Bisphosphonate in der Lage, zweiwertige Atome wie Kalzium und Magnesium über eine Chelatbindung zu binden, daher dürfen oral verabreichte Bisphosphonate nicht mit Milchprodukten verabreicht werden.

Entscheidend für die Hemmung der osteoklastären Knochenresorption ist die Seitenkette R2. Dieser Rest wurde in den letzten Jahrzehnten mehrfach verändert, sodass es zu verschiedenen Bisphosphonat - Generationen gekommen ist.

Die 1. Generation hat entweder ein Einzelatom oder eine Alkylseitenkette an R2, wie es beim Etidronat der Fall ist. Eine erhöhte Potenz der antiresorptiven Eigenschaften konnte durch die Substitution durch eine Aminoalkyl-Seitenkette in der 2. Generation der Bisphosphonate erreicht werden, wie es beim Pamidronat, Clodronat und Neridronat auch umgesetzt wurde (Schenk et al. 1986). In dieser Generation konnte die Potenz durch eine sekundäre Aminogruppe an R2 wie beim Incandronat und durch eine tertiäre Aminogruppe an R1 wie beim Olpandronat sogar noch gesteigert werden. Die aktuell potenteste Stoffgruppe der Bisphosphonate ist die 3. Generation mit dem Risedronat, Ibandronat und dem Zoledronat, bei denen meist Heterozyklen

mit einem oder mehreren Stickstoffatomen versehen sind (nach Brown und Robbins 1999) (Abbildung 1.3).

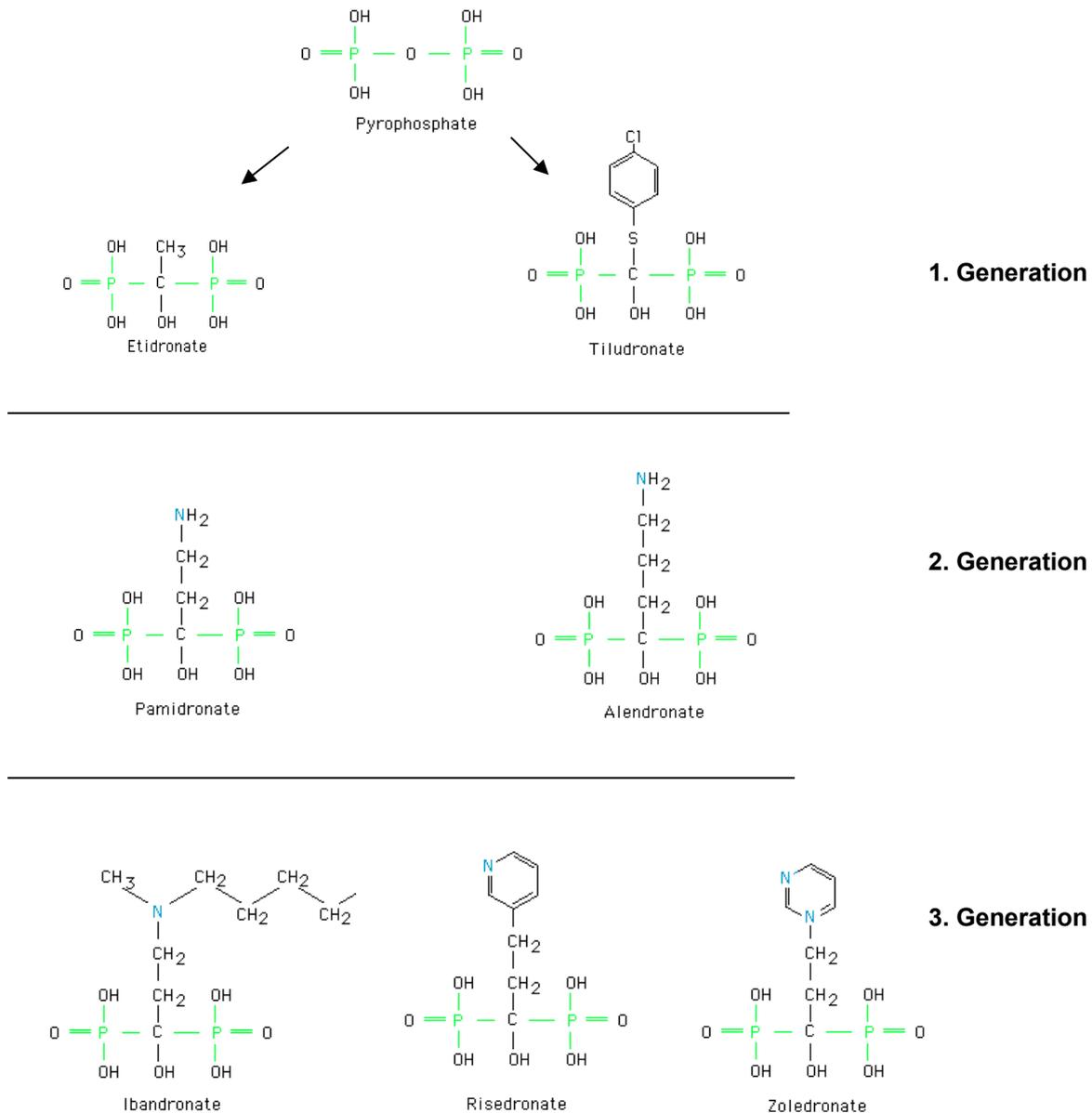


Abbildung 1.3: Die drei Generationen der Bisphosphonate (nach Brown und Robbins 1999, S.652)

Bisphosphonate sind durch ihren molekularen Aufbau sehr lipophil und haben dadurch eine orale Bioverfügbarkeit von nur 2 %. Daher wird die Medikation entsprechend angepasst und zur höheren Bioverfügbarkeit intravenös verabreicht. Nach intravenöser Gabe liegt die Halbwertszeit im Blutplasma bei 30 Minuten bis 2 Stunden, allerdings wurde abweichend bei Etidronat, einem Bisphosphonat der 1. Generation, eine Plasmahalbwertszeit von 6 Stunden ermittelt. Etwa 30 – 60 % der resorbierten Menge werden vom Knochengewebe aufgenommen, wohingegen der Rest über die Nieren ausgeschieden wird (Lin 1996).

Abhängig von der Geschwindigkeit der Knochenresorption ist auch die Elimination der Bisphosphonate nach der Aufnahme in das Knochengewebe. So differieren die Halbwertszeiten im Knochen zwischen 200 Tagen bei Ratten (Lin et al. 1991), 1000 Tagen bei Hunden (Lin et al. 1991) und mindestens 10 Jahren beim Menschen (Gertz et al. 1993). Überraschenderweise akkumulieren die Bisphosphonate auch sehr stark in der Prostata, wohingegen bei anderen Organen wie Lunge, Leber oder Milz nur sehr geringe Konzentrationen messbar waren (Fournier et al. 2002).

Der Wirkungsmechanismus der Bisphosphonate betrifft hauptsächlich die Osteoklasten und die Knochenmineralisation. So akkumulieren die Bisphosphonate durch ihre hohe Affinität zum Hydroxylapatit an der Knochenoberfläche und werden zusammen mit der Knochenmatrix von den Osteoklasten aufgenommen.

Dadurch ändert sich das Zytoskelett der knochenabbauenden Osteoklasten, insbesondere am Bürstensaum, sodass vor allem die *ruffled borders* reduziert werden (Murakami et al. 1995). Dadurch kommt es auch zu einer Reduktion der Anzahl der Resorptionslakunen, die essentiell für einen geregelten Knochenabbau sind, was wiederum für einen Einfluss auf den intrazellulären Wirkmechanismus der Osteoklasten spricht (Lin 1996).

Des Weiteren können die Bisphosphonate die Apoptose der Osteoklasten induzieren (Hughes et al. 1995, Benford et al. 2001). Dabei interagieren die Bisphosphonate mit wichtigen intrazellulären Signaltransduktionswegen, die die Aktivität und Proliferationsbereitschaft der Osteoklasten hemmen. Hierbei sind zwei verschiedene Wege zu unterscheiden (Rogers et al. 1999).

Stickstoffhaltige Aminobisphosphonate wie das Pamidronat, Ibandronat, Alendronat und Zoledronat zeigen einen inhibitorischen Einfluss auf den Mevalonsäurestoffwechsel. Mevalonsäure ist ein Zwischenprodukt in der Cholesterinsynthese (Abbildung 1.4).

Die posttranslationale Modifizierung von Proteinen ist notwendig für die Verankerung verschiedener GTPasen wie Rho, Rac, cdc42 und Rab und wird Prenylierung genannt. An den Zellmembranen ist diese Prenylierung essentiell für die Osteoklastenfunktion.

Für die stickstofffreien Alkylbisphosphonate wie Clodronat, Etidronat und Tiludronat wird ein anderer Wirkmechanismus diskutiert. Auf Grund ihrer engen Verwandtschaft zum Pyrophosphat werden diese Bisphosphonate in Nukleosidanaloga miteingebaut (Frith et al. 1997, Rogers et al. 1994) und sind so nicht mehr hydrolyisierbar und damit

als ATP-Analoga zytotoxisch (Pelorgeas et al. 1992). Auch hierdurch wird die Osteoklastenfunktion beeinträchtigt und die Apoptose induziert. Gleichwohl scheinen auch relativ junge Osteoklasten durch die Bisphosphonate in ihrer Rekrutierung gehemmt zu werden, da mit Bisphosphonaten behandelte Patienten eine sehr geringe Anzahl dieses Zelltyps aufweisen (Löwik et al. 1988).

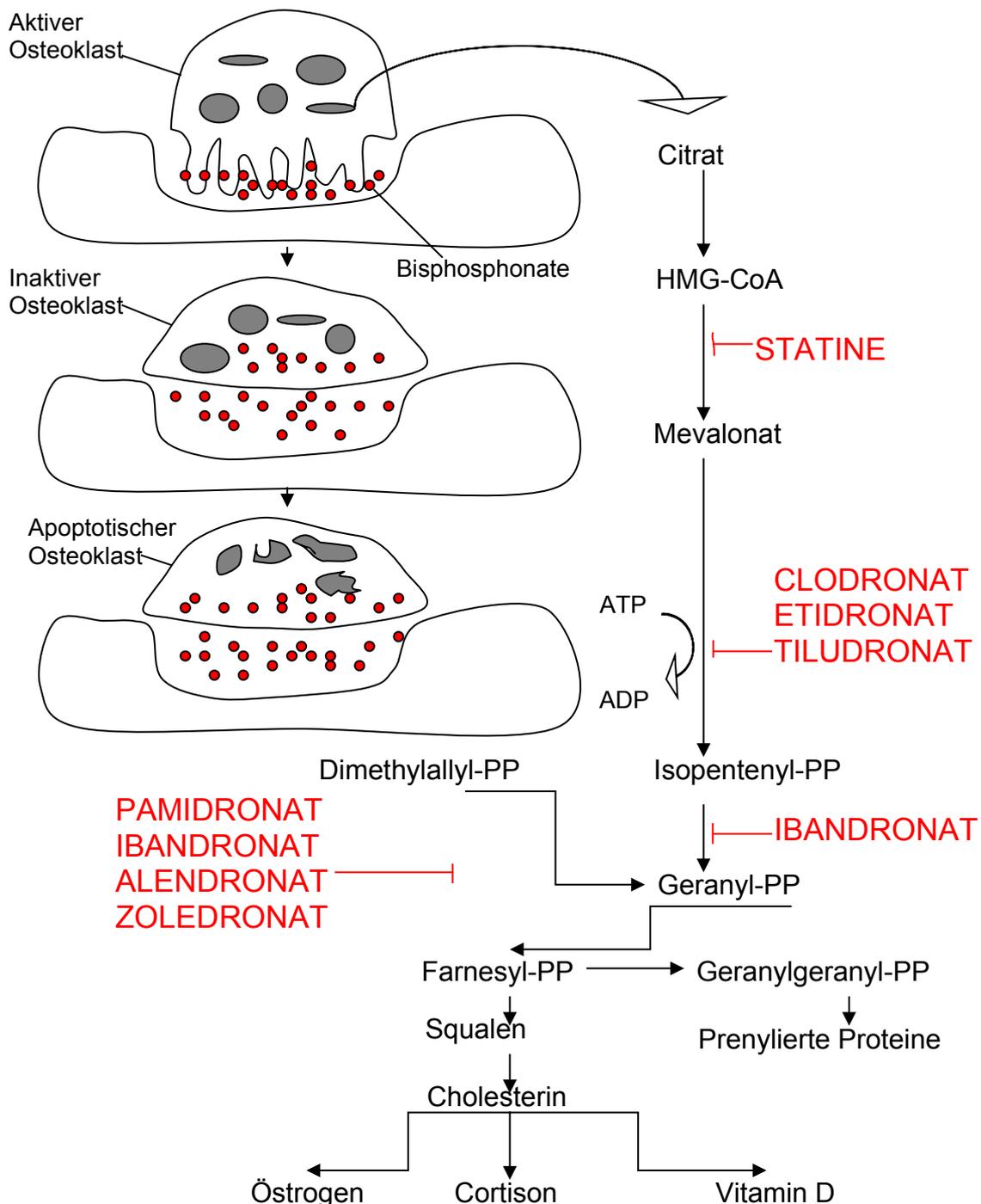


Abbildung 1.4: Zelluläre und biochemische Wirkmechanismen stickstoffhaltiger Bisphosphonate (nach Bartl und Frisch 2001, S.35)

Auch ein direkter Effekt auf die Osteoblasten wird diskutiert. So wird vermutet, dass die Osteoblasten unter Bisphosphonattherapie ein Protein sezernieren, welches wiederum die Osteoklasten hemmt (Vitté et al. 1996). Des Weiteren werden die Osteoblasten direkt zytotoxisch sowohl in ihrem Wachstum als auch in ihrer Funktion und Aktivität durch den Wirkstoff gehemmt. Dadurch wird die Mineralisation der Knochenmatrix selektiv inhibiert (Orriss et al. 2009). Interessanterweise zeigten allerdings Reinholz et al. im Jahre 2000, dass Bisphosphonate wie Pamidronat und Zoledronat sowohl die Aktivierung als auch die Differenzierung von fetalen Osteoblasten steigerten.

Der erste biologische Effekt der Stoffgruppe der Bisphosphonate wurde bereits 1968 entdeckt (Fleisch et al. 1968), sodass sich dieser potente Wirkstoff in den letzten 40 Jahren als Therapeutikum von verschiedenen Knochenerkrankungen durchsetzen konnte (Fleisch 2002). Fleisch et al. konnten bereits 1969 zeigen, dass Bisphosphonate den Stoffwechsel des Knochens hemmen und es somit zu einer positiven Kalziumbilanz kommt. So konnte diese Wirkstoffgruppe schon kurz danach bei ersten Behandlungen von den Knochen betreffenden Erkrankungen wie beim Morbus Paget und bei der Myositis ossificans progressiva therapeutisch eingesetzt werden (Bassett et al. 1969, Smith et al. 1971).

Heutzutage findet diese Wirkstoffgruppe ein breites Anwendungsgebiet und zeigt Erfolg in der Behandlung vieler Knochenerkrankungen. So sind Bisphosphonate bei allen metabolischen Knochenerkrankungen mit gesteigerter resorptiver Aktivität durch die Osteoklasten indiziert. Anfangs wurden vor allem der Morbus Paget (Smith et al. 1971) und die tumorassoziierte Hyperkalzämie mit Bisphosphonaten therapiert (Clines und Guise 2004). Interessanterweise zeigt der Knochen bei Therapie des Morbus Paget wieder eine nahezu regelrechte Lamellenstruktur im Gegensatz zur osteolytischen Struktur des erkrankten Knochens. Doch auch in der Behandlung der postmenopausalen Osteoporose (Blahos 2007) und in der Behandlung von metastasenbedingten Osteolysen im Skelettsystem sind große Erfolge zu verzeichnen (Clines und Guise 2004). Das Krankheitsbild der Osteogenesis imperfecta wird in einigen pädiatrischen Zentren ebenfalls mit Bisphosphonaten behandelt (Glorieux 2007). Aktuell wird die prophylaktische Gabe von Bisphosphonaten zur Vermeidung von tumorassoziierten Skelettmetastasen bei Mamma- (Pavlakis et al. 2008) und Prostatakarzinom (Yuen et al. 2010) diskutiert.

Doch nicht nur der lokale Knochenabbau durch den Tumor wird durch eine Bisphosphonattherapie gehemmt, sondern überraschenderweise auch die Adhäsion und Ausbreitung der Tumorzellen (Magnetto et al. 1999, Boissier et al. 2000).

1.5 Bisphosphonat-assoziierte Osteonekrose der Kiefer (BP-ONJ)

Neben bekannten Nebenwirkungen der Bisphosphonate wie selbstlimitierende Fieberschübe, Hypokalzämie und Nierendysfunktionen (Coleman 2008) wird seit 2003 eine Osteonekrose der Kiefer beobachtet (Marx 2003). Laut Report einer Task Force der American Society for Bone and Mineral Research liegt die Inzidenz der Bisphosphonat-assoziierten Kiefernekrose zwischen 1-10% (Khosla et al. 2007). Klinisch zeichnet sie sich durch nicht heilende Extraktionsalveolen oder freiliegenden Kieferknochen mit der Tendenz zur Sequestrierung aus. Definitionsgemäß besteht eine Bisphosphonat-assoziierte Osteonekrose aus einem seit mehr als acht Wochen freiliegenden Knochenareal ohne Heilungstendenz und steht in Zusammenhang mit einer Bisphosphonattherapie. Der betroffene Kieferbereich wurde dabei definitionsgemäß nicht bestrahlt (American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons (AAOMS) 2007). Dennoch zeigen die betroffenen Patienten nicht immer alle die gleichen Symptome, sodass die Definition der BP-ONJ nicht auf jedes Patientenkollektiv exakt zutrifft (Felsenberg 2006). In der Literatur sind seit 2003 weltweit viele Fallberichte hinzugekommen, wie von Ruggiero et al. aus dem Jahre 2004 mit einem Patientenkollektiv von 63 Patienten, von Abu-Id et al. aus dem Jahre 2006 mit 73 Patienten, von Durie et al. aus dem Jahre 2003 mit 75 Patienten und von Marx et al. aus dem Jahre 2005 mit 119 Patienten, die eine Bisphosphonat-assoziierte Kiefernekrose entwickelt haben. Die Symptome der betroffenen Patienten sind Zahnschmerzen, Zahnlockerung, Foetor ex ore, Mukositis und Mukosaschwellung, rezidivierende und schlecht heilende Zahnfleischulzera, Abszesse mit Fistelbildung, Hyp- und Parästhesien der Unterlippe, ein subjektives Gefühl der Schwerezunahme und eine gefühlte Größenzunahme der Kiefer mit sich einstellender Kieferklemme (Dannemann et al. 2006). Das Leitsymptom ist aber weiterhin der oberflächlich freiliegende Knochen ohne ersichtliche Heilungstendenzen.

Gerade nach der vermehrten Behandlung von Skeletterkrankungen mit den hochpotenten Aminobisphosphonaten wie Pamidronat und Zoledronat sind

zunehmend Fallserien mit freiliegendem Kieferknochen zu verzeichnen (Ruggiero et al. 2004). Zwar werden verschiedene Kofaktoren wie eine manifeste Parodontitis, Zahnextraktionen, oralchirurgische Maßnahmen und das Setzen von Implantaten (Marx et al. 2005) in der Ätiologie der Kiefernekrose diskutiert, allerdings kann dieses Krankheitsbild auch spontan ohne äußere Einwirkung auf den Kieferknochen auftreten. Zum jetzigen Zeitpunkt kann daher keine gesicherte Ursache der Kieferknochennekrose festgestellt werden (Migliorati et al. 2005, Jung TI et al. 2010). Jedes Krankheitsbild und jeder Patient birgt auf Grund von unterschiedlichen Lebensgewohnheiten, verschiedenen Begleiterkrankungen und unterschiedlicher onkologischer Medikation ein individuelles Risiko, an einer Kiefernekrose zu erkranken (Jung TI et al. 2010).

Prädilektionsstellen für eine solche Knochennekrose sind zu 62 % die Mandibula im posterioren Bereich, vor allem in der Nähe des Sulcus glossoalveolaris, und zu 36 % die Maxilla im posterioren Bereich. In nur seltenen Fällen sind beide Kieferknochen betroffen (Gevorgyan und Enepekides 2008). Auch Boonyapakorn et al. ermittelten im Jahre 2008 in einer prospektiven Studie mit 80 Patienten, die Bisphosphonate erhielten, dass sich in 22 % der Fälle eine Knochennekrose einstellte. Zwar entwickelte sich die Nekrose zu 77 % nach einer Zahnextraktion, wohingegen 23 % der Patienten spontan an einer Osteonekrose erkrankten. An diesem Beispiel wird wiederum deutlich, dass weder die genaue Ätiologie der BP-ONJ geklärt ist, noch weshalb nur die Kieferknochen und nicht die übrigen Knochen des Skelettsystems betroffen sind.

Für die Entstehung solcher Kiefernekrosen werden verschiedene Theorien diskutiert. Zum einen wird die dünne Schleimhautabdeckung im Mund für eine leichtere Keiminvasion in den Knochen verantwortlich gemacht, die es in dieser Form im übrigen Skelett nicht gibt. Zum anderen ist die Knochenremodellierung unter einer Bisphosphonattherapie durch die inhibierende Wirkung auf Osteoklasten vermindert. Physiologische Mikrofrakturen der Kieferknochen, die durch die Kaubewegung und durch hohe Kaukräfte auftreten, müssen aber im Rahmen der Remodellierung kompensiert werden, sodass hier ein weiterer Grund für die Entstehung von Nekrosen liegen könnte (Sarin et al. 2008).

Weiterhin werden auch embryologische Faktoren zur Entstehung einer BP-ONJ diskutiert. Im Skelettsystem folgt die Bildung von Knochengewebe entweder einer enchondralen oder desmalen Ossifikation. Bei der desmalen Ossifikation entsteht

das Knochengewebe direkt aus dem embryonalen Mesenchym, wie es beim Schlüsselbein, der Schädelkalotte und beim Viszerokranium der Fall ist. Bei der enchondralen Ossifikation entstehen aus dem Mesenchym zunächst Knorpelzellen, die sich weiter zu knochenbildenden Zellen differenzieren und so Knochengewebe bilden.

Die Kieferknochen wiederum folgen einer intramembranösen, desmalen Knochenbildung, wohingegen Anteile des proximalen Unterkiefers durch enchondrale Knochenbildung entstehen (Oka et al. 2008). Bisher sind nahezu keine Nekrosen in diesem Bereich der Mandibula beschrieben worden. Ferner ist bekannt, dass osteoblastäre Zellen des Viszerokraniums nicht wie im übrigen Körper mesodermalen Ursprungs sind, sondern der kranialen Neuralleiste entstammen (Noden und Trainor 2005). Diese kranialen Neuralleistenzellen wandern in den 1. Pharyngealbogen ein und bilden dort die Anlagen für Anteile des Gesichtsschädels. Aus diesem Grund stellt sich die Frage, ob Osteoblasten des Unterkiefers mit Ursprung in der kranialen Neuralleiste und der Fähigkeit zur intramembranösen Knochenbildung divergent auf eine Bisphosphonatbehandlung reagieren im Vergleich zu Osteoblasten aus anderen Knochen des Skelettsystems, welche mesodermalen Ursprungs sind.

Schon 2008 konnten Stefanik et al. zeigen, dass Knochenmarkstromazellen des Unterkiefers anders auf eine Pamidronatbehandlung reagieren als Knochenmarkstromazellen des Beckens. So zeigten Knochenmarkstromazellen des Unterkiefers im Vergleich zum Becken unter Pamidronatbelastung in-vitro verminderte Zellüberlebensraten, eine verminderte Produktion von alkalischer Phosphatase und in-vivo eine weniger organisierte Knochenstruktur.

Viele andere Arbeitsgruppen befassen sich entweder ausschließlich mit der Reagibilität der Bisphosphonate auf Osteoblasten aus der kranialen Neuralleiste oder auf Osteoblasten, die mesodermalen Ursprungs sind, wohingegen über den Vergleich beider Ursprungsgebiete kaum gesicherte Daten bestehen.

So konnten beispielsweise von Knoch et al. 2005 zeigen, dass Bisphosphonate zwar einen anabolen Effekt auf Osteoblasten und Knochenmarkstromazellen aus dem Beckenknochen haben, wohingegen keine intraindividuellen Wirkungen auf die Osteoblasten der Kieferknochen ermittelt wurden.

2. Fragestellung

Eine der schwerwiegendsten Nebenwirkungen bei der Therapie mit Bisphosphonaten stellt die Bisphosphonat-assoziierte Osteonekrose der Kiefer dar.

Die genaue Ätiopathogenese, die zu einer Bisphosphonat-assoziierten Osteonekrose der Kiefer führt und diese unterhält, ist bis heute noch nicht geklärt.

In einer Studie zur Wirkung von Bisphosphonaten auf porcine Osteoblasten sollen daher folgende Hypothesen getestet werden:

1. Die Kultivierung von porcinen Osteoblasten aus Knochenproben des Beckens und des Unterkieferknochens adulter Hausschweine ist möglich.
2. Das Aminobisphosphonat Zometa® hat sowohl einen Einfluss auf die Expression von OPG und RANKL als auch auf die Proliferation porciner Osteoblasten.
3. Die Auswirkungen von Bisphosphonaten auf die Expression von OPG und RANKL sowie die Proliferation von Osteoblasten sind im Unterkiefer- und Beckenknochen divergent, sodass hier eine mögliche Ursache für die Entstehung Bisphosphonat-assoziiierter Kiefernekrosen liegen könnte.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Art des Gerätes	Hersteller, Firmensitz	Typenbezeichnung
Absaugpumpe	Nalgene, Roskilde, DK	
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies, Waldbronn	
Brutschrank	Sanyo Biomedical, Bad Nenndorf	MCO-20AIC
Casy Cell Counter	Schärfe System, Reutlingen	Model TT
DNA-Abzugshaube	AirClean 600, NC, USA	Model 300
Elektrische Säge	Aesculap, Tuttlingen	ELAN-E
Elektrophoreseapparatur	Elite 300 Plus, Wealtec, NV, USA	
Gel-Dokumentation	BioDocAnalyze, Biometra, Jena	
Mastercycler	Mastercycler gradient, Eppendorf, Hamburg	
Nano-Drop-Spectrophotometer	Peqlab Biotechnologie, Erlangen	
Phasenkontrastmikroskop	Carl Zeiss Vision, Aalen	Axiovert 200 M mit Kamera HAL 100, Carl Zeiss Vision
sterile Werkbank	Biohazard Clean Air, Woerden, NL	EN12469
Thermocycler	iCycler, Bio Rad, München	MyiQ
Tischkühlzentrifuge	Sigma, Osterode	2K15C

Tabelle 3.1: Geräte

3.1.2 Verbrauchsmaterialien/Einmalartikel

Art	Hersteller, Firmensitz	Bezeichnung
Agilent RNA 6000 Nano Kit	Agilent Technologies, Waldbronn	
Agilent RNA 6000 Pico Kit	Agilent Technologies, Waldbronn	
Alkalische Phosphatase Kit	Sigma-Aldrich, München	
Einmalpipetten	Starlab, Ahrensburg	S1122-1830
Eppendorf-Cups 1500 µl	Sarstedt, Nümbrecht	72.690.001
Kulturflaschen 75cm ²	Greiner bio-one, Frickenhausen	Cellstar
Pasteurpipetten	Brand, Wertheim	

RNA-Präparation	Qiagen, Hilden	RNeasy Mini Kit
Zellkulturschalen 100x20mm	Sarstedt, Nümbrecht	83.1802

Tabelle 3.2: Verbrauchsmaterialien/Einmalartikel

3.1.3 Feinchemikalien

Name	Hersteller, Firmensitz
70 %-Ethanol	Merck, Darmstadt
Agarose	Bio Rad, München
Amphotericin B	Pan Biotech, Aidenbach
Ascorbinsäure-2-phosphat	Sigma-Aldrich, München
Blue Juice Gel Loading Buffer	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Dexamethason	Sigma-Aldrich, München
DMSO	Sigma-Aldrich, München
Ethidiumbromid	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
FKS	Biochrom AG, Berlin
β -Glycerophosphat	Sigma-Aldrich, München
iQ Supermix	Bio Rad, München
iQ SYBR Green Supermix	Bio Rad, München
iScript Reaction Mix	Bio Rad, München
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Paraformaldehyd 37 %	Biochrom AG, Berlin
PBS	PAN Biotech, Aidenbach
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim
Vitamin D3 (Cholecalciferol)	Sigma-Aldrich, München
Zoledronat (Zometa [®])	Novartis Pharma, Nürnberg
DMEM High Glucose 4,5 g/l D-Glucose	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
Gentamycin	Biochrom AG, Berlin

Tabelle 3.3: Feinchemikalien

3.1.4 Enzyme

Name	Hersteller, Firmensitz
iScript Reverse Transkriptase	Bio Rad, München
iTaq DNA Polymerase	Bio Rad, München
Trypsin-EDTA-Lösung	Biochrom AG, Berlin

Tabelle 3.4: Enzyme

3.1.5 Molekulargewichtsmarker

Name	Hersteller, Firmensitz
Agilent RNA 6000 Ladder	Agilent Technologies, Waldbronn
100 bp DNA Ladder	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
500 bp DNA Ladder	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

Tabelle 3.5: Molekulargewichtsmarker

3.1.6 Primer

Die Primer wurden von der Firma metabion, Martinsried bezogen und in eigenen Versuchen selbst etabliert.

mRNA	Sequenz (5' → 3')	Länge(bp)	Tm[°C]
OPG [sus] fwd	AAGTCCCGACAGAAGACATCGAGGA	150bp	67° C
OPG [sus] rev	GGTACGTCTTGAGATGCTTCAGGGC	150bp	68° C
RANKL [sus] fwd	ACCTGTATGCCAACATCTGCTTTCG	228bp	66° C
RANKL [sus] rev	TGCTGATTCCTCGCCAGATCGT	228bp	65° C
TBP [sus] fwd	AACAGTTCAGTAGTTATGAGCCAGA	153bp	63° C
TBP [sus] rev	AGATGTTCTCAAACGCTTCG	153bp	56° C
Osteocalcin [sus] fwd	GTGTGTGACCTCAACCCCGACT	210bp	66° C
Osteocalcin [sus] rev	AGCAGCTGGGATGATGGGGACCTT	210bp	69° C

Tabelle 3.6: Primer

3.2 Methoden

3.2.1 Methoden der Zellkultur

Alle Arbeiten mit Zellkulturen sowie das Herstellen von Lösungen wurden unter sterilen Bedingungen unter einer sterilen Werkbank (Biohazard Clean Air, EN12469, Woerden, NL) durchgeführt. Die Dekontamination von Materialien, die unter die Werkbank gestellt wurden wie z.B. Kulturflaschen, erfolgte stets durch eine Wischdesinfektion mit Ethanol (70 %).

Vor jeder Zellfütterung wurden die Zellkulturschalen und Kulturflaschen unter einem Phasenkontrastmikroskop (Carl Zeiss Jena, Axiovert 200 M mit Kamera Typ HAL 100) auf bakterielle Kontamination und Pilzbefall untersucht.

Die Anzucht der Prä-Osteoblasten wurde mit Dulbecco's Modified Eagle Medium mit 4,5 g/L D-Glukose (DMEM High Glucose, Gibco Invitrogen, Karlsruhe) durchgeführt. Dem Medium wurden 2 % Gentamycin und 1 % Amphotericin B als antiinfektive Therapie sowie 15 % FKS (fetales Kälber-Serum) zur Stimulierung der Zellproliferation hinzugefügt.

Das Füttern der Zellen erfolgte dreimal pro Woche im Tagesrhythmus Montag, Mittwoch und Freitag.

Die Kultivierung der Zellen fand unter kontrollierten Bedingungen bei 37° C, 5 % CO₂-Begasung und 95 % Luftfeuchtigkeit in einem Brutschrank (Sanyo Biomedical, MCO-20AIC, Bad Nenndorf) statt.

Zur osteogenen Differenzierung wurden den Zellkulturen des Unterkiefers und des Beckens über einen Zeitraum von 7 Tagen während der 2. Passage osteoinduktive Zusätze wie Dexamethason (Siggelkow et al. 2004), Ascorbinsäure-2-Phosphat (Siggelkow et al. 2004), β-Glycerophosphat (Jaiswal et al. 1997) und Vitamin D₃ (Cholecalciferol) (Siggelkow et al. 1999 b) zugesetzt.

Die Endkonzentrationen der zugesetzten Substanzen lagen für Ascorbinsäure-2-Phosphat bei 10 nM, für β-Glycerophosphat bei 10 mM, für Dexamethason bei 10 nM und für Vitamin D₃ bei 5 x 10⁻⁸ M.

Die Zellen waren insgesamt 28 Tage in Kultur. Die Behandlung mit Vitamin D₃ (Cholecalciferol) ist für den Nachweis von Osteokalzin notwendig, da der Osteokalzinnachweis auf mRNA-Ebene auf das 13-Fache gesteigert werden kann (Siggelkow et al. 1999 b).

3.2.1.1 Gewinnung von Knochenmaterial

Für die Anzucht einer Primärkultur aus Prä-Osteoblasten wurden Knochenproben von zwei Hausschweinen im Vorversuch und insgesamt fünf schlachtreifen, weiblichen Hausschweinen im Hauptversuch aus Becken- (Abbildung 3.2 A) und Unterkieferknochen (Abbildung 3.2 B) entnommen. Die Schlachtung erfolgte bei einem durchschnittlichen Alter von 6-8 Monaten und einem Gewicht von etwa 100 kg in der Fleischerei Sebert, Fäutlingsgasse 2 in 37083 Göttingen.

Der Transport der Knochenfragmente in das Labor der UMG Göttingen erfolgte schnellstmöglich nach Schlachtung in sterilen Plastiktüten und temperaturisolierenden Styroporboxen. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Unterkiefer- und Beckenfragmente eindeutig einem Schwein zugeordnet werden konnten, um einen intraindividuellen Vergleich der Ergebnisse ermöglichen zu können.

Im Labor wurde das Weichgewebe um die Knochen unter aseptischen Bedingungen mit einem Skalpell entfernt, um daraufhin die Knochen mit einer elektrischen Säge (Aesculap, Typ ELAN-E, Tuttlingen) unter NaCl-Kühlung zu durchtrennen (Abbildung 3.2 C).

Danach wurden etwa 6-8 Knochenproben pro Fragment mit einer durchschnittlichen Größe von 1 x 1mm mit einer Hohlmeißelzange nach Luer (Aesculap, Tuttlingen) aus dem Knochenmarkraum entnommen (Abbildung 3.2 D) und in einer 100x20mm Zellkulturschale (Sarstedt, Typ 83.1802, Nümbrecht) auf dem Boden platziert (Jones und Boyde 1977), die zuvor mit 4 ml des bereits hergestellten DMEM-Mediums (DMEM High Glucose, Gibco Invitrogen, Karlsruhe) gefüllt worden war (Abbildung 3.2 D und E).

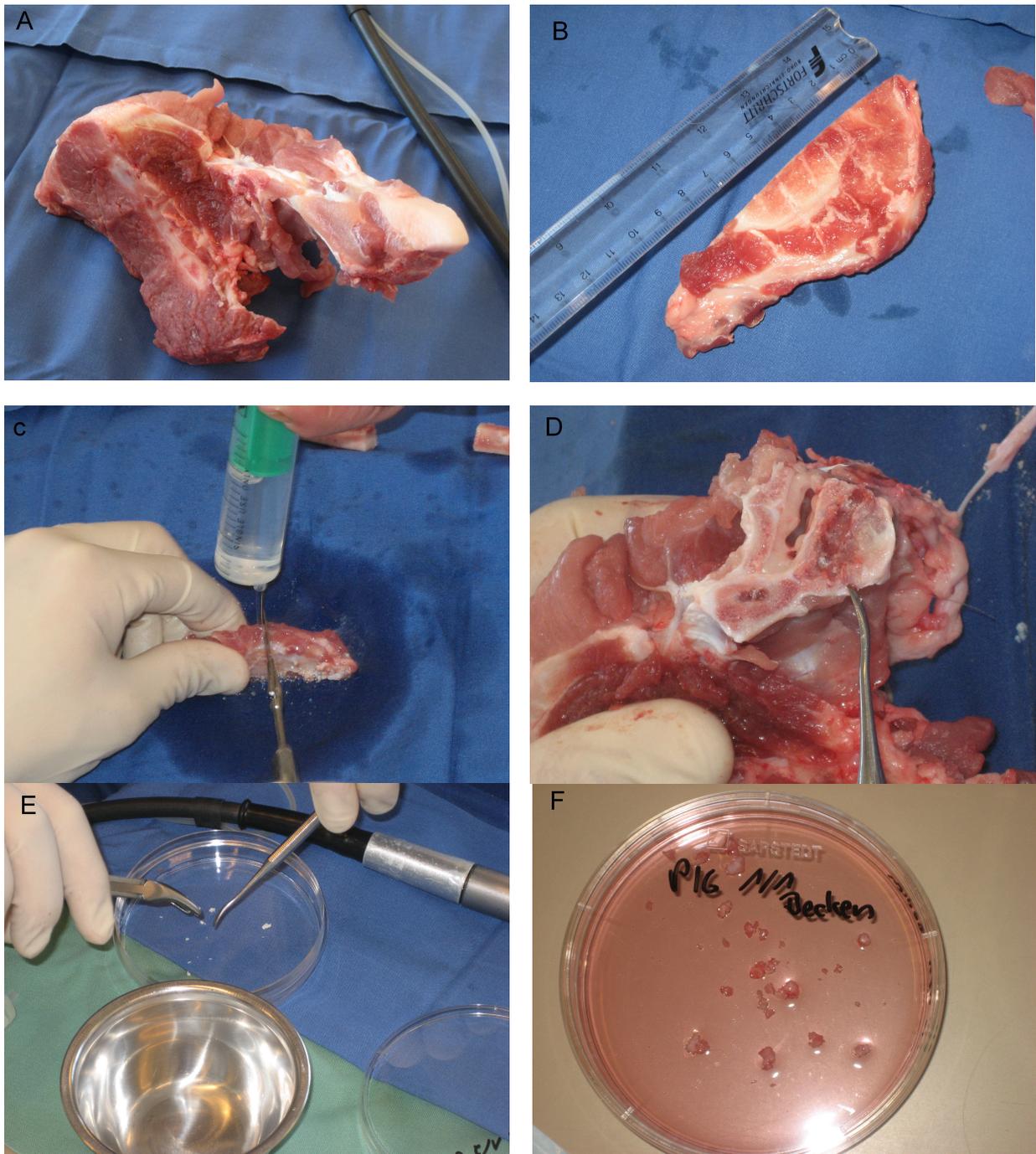


Abbildung 3.1: Präparation der Unterkiefer- und Beckenknochen des Hausschweins

- A:** Beckenknochen mit Weichgewebe
- B:** Stück vom Unterkieferknochen
- C:** Durchtrennen des Knochens mit elektrischer Säge und NaCl-Kühlung
- D:** Gewinnen der Knochenfragmente
- E:** Kultivierung der Knochenfragmente
- F:** Knochenstückchen in Medium in der Zellkulturschale

Von jedem Unterkiefer und Becken wurden so jeweils 2 Primärkulturen angelegt. Bevor die Zellen im Brutschrank kultiviert wurden, erfolgte unter der sterilen Werkbank noch einmal ein Mediumwechsel und zu jeder Zellkulturschale wurden 100 µl Gentamycin hinzugegeben.

Innerhalb von 3 Stunden nach Schlachtung der Hausschweine waren alle Proben entnommen und kultiviert.

Das Füttern der Zellen erfolgte dreimal pro Woche, jeweils Montag, Mittwoch und Freitag, wobei die Menge des zugefügten Mediums so angepasst werden musste, dass die Knochenfragmente adhärent am Boden verweilen konnten.

An Tag 5 wurden die Zellkulturschalen mit PBS (PAN Biotech, Typ P04-53500, Aidenbach) in mehreren Waschsritten gespült, um lysierte Erythrozyten zu entfernen. Die Knochenstückchen wurden am siebten Tag aus der Primärkultur entfernt und in neue Zellkulturschalen umgesetzt, wo teilweise erneutes Zellwachstum beobachtet werden konnte.

Nach Erreichen der Konfluenz nach etwa 3-4 Wochen wurden die Zellen zur Ablösung trypsinisiert und entweder zur Weiterkultivierung passagiert und in 75-cm²-Kulturflaschen (Greiner bio-one, Frickenhausen) umgesetzt oder in flüssigem Stickstoff mit dem Einfriermedium DMSO (Sigma-Aldrich, München) und reinem fetalen Kälberserum bei -196°C gelagert.

[3.2.1.2 Trypsinierung und Passagierung](#)

Unter der sterilen Werkbank (Biohazard Clean Air, EN12469, Woerden, NL) wurde das Medium mit der Vakuum-Absaugpumpe (Nalgene, Roskilde, DK) an einer Seite der Zellkulturschale abgezogen. Nach 2-3 Waschsritten mit jeweils 15 ml PBS wurden 1-2 ml der Trypsin-EDTA-Lösung auf den Zellrasen gegeben und mitsamt der Kulturschale zur Inkubation für 5-10 Minuten in den Kulturschrank gestellt.

Zum Abstoppen wurde ein serumhaltiges Medium in der 4-fachen Menge hinzugegeben, um die Aktivität des Trypsins zu stoppen und das zytotoxische EDTA zu binden. Daraufhin wurde die gesamte Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Von dieser Menge wurden nun zur Quantifizierung der Zellen 100 µl mit einer Eppendorf-Pipette entnommen und in ein Gefäß mit zusätzlich 10 ml Casy spezifischer Messlösung überführt. Die Zellzählung erfolgte stets bei der

Passagierung eines konfluent gewachsenen Zellrasens mit dem Casy Cell Counter (Schärfe System, Model TT, Reutlingen).

Eine Passage wurde als eine bestimmte zeitliche Phase des Wachstums von Zellen bezeichnet, welche durch die Ablösung des Zellrasens vom Boden der Kulturschale durch Trypsinierung beendet wurde. Die Hauptversuche wurden stets mit Erreichen der 2. Passage durchgeführt.

3.2.1.3 Einfrieren und Auftauen von Knochenzellen

Wenn Zellen vorübergehend nicht mehr benötigt werden, besteht die Möglichkeit diese einzufrieren. Hierfür wurden die Zellen abzentrifugiert und in 1 ml reinem FKS (Fetales Kälber-Serum) und 10 % DMSO (Sigma-Aldrich, München) resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde in 1,5-ml-Kryoröhrchen überführt und sofort bei -80°C über Nacht gekühlt. Am nächsten Tag wurde das Röhrchen bis zu seiner weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff (Cryoson, Schöllkrippen) bei -196°C gelagert.

Die eingefrorenen Kryoröhrchen wurden aus dem Stickstoffbehälter entnommen und langsam auf Eis aufgetaut, um anschließend mit der Tischkühlzentrifuge (Sigma, 2K15C, Osterode) zentrifugiert zu werden. Nachdem der Überstand abgesaugt wurde, konnte das Zellpellet in 10 ml vorgewärmtem Medium resuspendiert und die Zellsuspension auf verschiedene Zellkulturflaschen zur Rekultivierung verteilt werden.

3.2.1.4 Proliferationsversuch der Prä-Osteoblasten

Das Ziel dieses Proliferationsversuches war die Objektivierung der Wachstumsrate der porcinen Prä-Osteoblasten des Beckens und des Unterkiefers über einen Zeitraum von zehn Tagen zur Erstellung einer Proliferationskurve.

Die Zellen des Unterkiefers und des Beckens befanden sich zum Zeitpunkt des Versuchs in der 2. Passage und wurden zu je 100000 Zellen pro Well auf 6-Well-Platten (Greiner bio-one, Frickenhausen) verteilt. Zusätzlich wurde in jedes Well 3 ml des DMEM-High-Glukose-Schweinemediums pipettiert.

Des Weiteren erfolgte eine Proliferationsbestimmung der Zellen unter Inkubation mit Konzentrationen des Bisphosphonats Zometa® (Novartis Pharma, Nürnberg) von 10^{-4} M , 10^{-6} M und 10^{-8} M sowie einer Kontrollgruppe ohne Bisphosphonate.

Die 6-Well-Platten wurden im Brutschrank (Sanyo Biomedical, MCO-20AIC, Bad Nenndorf) platziert und die Zellen nach folgenden Tagen trypsiniert und gezählt: nach Tag 0, Tag 1, Tag 4, Tag 7, Tag 10.

Die Zellzählung erfolgte mit dem Casy Cell Counter (Schärfe System, Model TT, Reutlingen).

3.2.2 Färbemethoden

3.2.2.1 Zytochemische Färbung der alkalischen Phosphatase

Die alkalische Phosphatase ist kein spezifischer Marker, sondern vielmehr ein Isoenzym, das die Hydrolyse von Phosphorsäureestern katalysiert und dabei Phosphatgruppen von Molekülen wie Proteinen und Nukleotiden entfernt. Alkalische Phosphatase kommt sowohl membrangebunden in Zellen mit hoher sekretorischer Aktivität als auch als mikrosomales ungebundenes Enzym vor (Anh et al. 1998) (Abbildung 3.2).

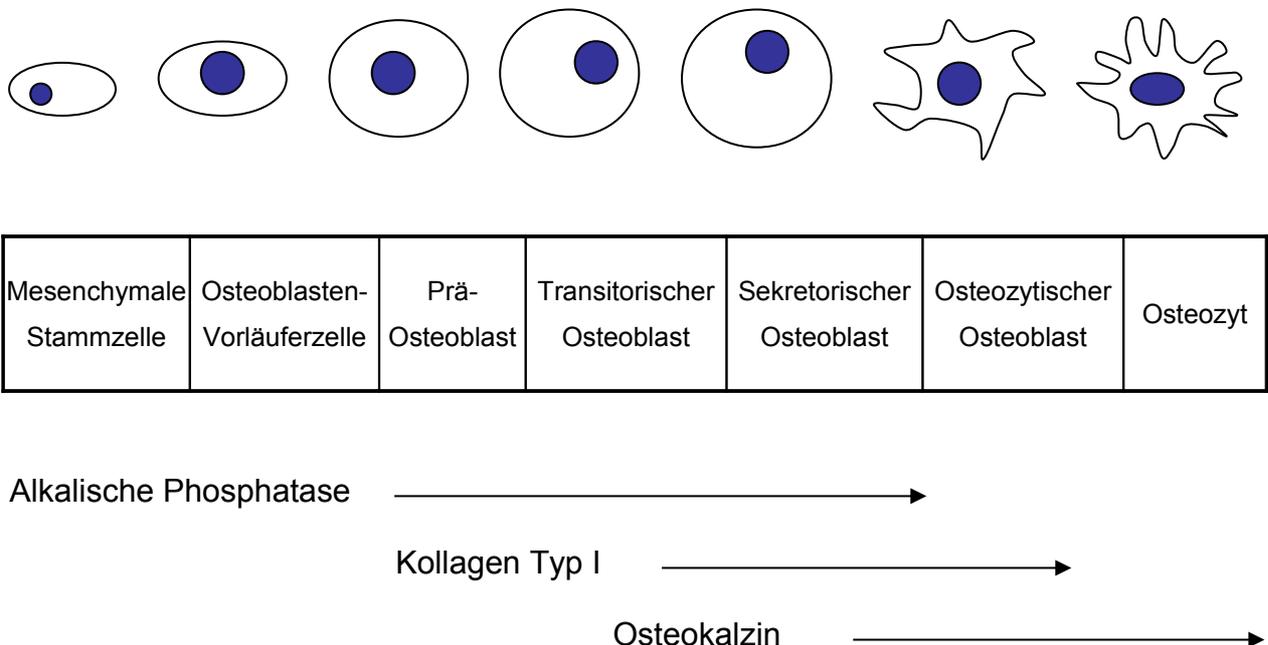


Abbildung 3.2: Differenzierungsstadien der Osteoblastenentwicklung (nach Hemmerling 2007, S.22)

Das Prinzip der Färbemethode der alkalischen Phosphatase ist die Umsetzung eines löslichen Substrates in einen pink-rötlichen unlöslichen Farbstoffkomplex durch die

alkalische Phosphatase. Dieser Farbstoff schlägt sich dort nieder, wo das Enzym aktiv in den Zellen vorhanden ist. Positiv reagierende Prä-Osteoblasten mit aktiver alkalischer Phosphatase erscheinen wässrig-blau mit pink-rötlichen Granula, da das Enzym hier das chromogene Substrat *fast blue* umgesetzt hat.

Die Bestimmung der alkalischen-Phosphatase-Aktivität erfolgte mit dem ALP-Kit von Sigma Aldrich (München).

Zuerst wurde eine Zitrat-Azeton-Formaldehyd Fixierlösung, bestehend aus 25 ml Zitratlösung, 65 ml Azeton (Merck, Darmstadt) und 8 ml Paraformaldehyd (37 %) (Biochrom AG, Berlin) hergestellt. Außerdem musste eine weitere Lösung, bestehend aus 1 ml Natriumnitrit-Lösung und 1 ml Fast blue BB Lösung, hergestellt werden. Diese Lösung wurde wiederum mit 45 ml deionisiertem Wasser und 1 ml einer Naphtholphosphat-Lösung vermischt.

Dann konnte die Zellkulturschale dem Brutschrank (Sanyo Biomedical, MCO-20AIC, Bad Nenndorf) entnommen und das Medium unter einer sterilen Werkbank (Biohazard Clean Air, EN12469, Woerden, NL) abgesaugt werden. Nachdem die Kulturschale in zwei Waschschrritten mit PBS gespült wurde, erfolgte die Fixierung der Zellen mit der Zitrat-Azeton-Formaldehyd Lösung über einen Zeitraum von 30 Sekunden.

Nach weiteren Waschschrritten wurden die Zellen unter strengem Lichtabschluss für 15 Minuten mit der hergestellten Fast blue BB Lösung bei Raumtemperatur inkubiert.

Danach wurden die Zellen mit Neutralrot gegengefärbt und unter dem Phasenkontrastmikroskop betrachtet.

3.2.2.2. Von-Kossa-Färbung

Um die Bildung einer mineralisierten Matrix nachzuweisen, wurde die Färbemethode nach Von Kossa angewendet. Ungelöstes Kalzium, welches in der Matrix von Carbonaten und Phosphaten gebunden ist, wird durch Silberionen ausgetauscht, die zu metallischem Silber reduziert werden. Dadurch lassen sich kalziumhaltige Zonen braun-schwarz färben und lassen so den Grad der Mineralisierung erkennen. Nach Fixierung der Zellen mit Paraformaldehyd (4 %) (Biochrom AG, Berlin) wurde die Kultur über 30 Minuten bei Raumtemperatur und unter Lichtabschluss mit einer Silbernitratlösung (AgNO_3 , 5 %) (Merck, Darmstadt) inkubiert.

Anschließend erfolgte zunächst eine Reduktion der Färbung mit einer Natriumcarbonatlösung (Na_2CO_3) (Merck, Darmstadt), um die Zellen danach mit einer

Natriumthiosulfat-Lösung (5 %) (Merck, Darmstadt) ein weiteres Mal zu fixieren. Zum Schluss wurden die Zellen mit wenig PBS feucht gehalten, bis sie im Phasenkontrastmikroskop untersucht werden konnten.

3.2.3 Versuchsprotokoll zum Versetzen der Prä-Osteoblasten mit Zoledronat (Zometa[®], Novartis Pharma):

Vorversuch

Das Ziel dieses Vorversuches war die Etablierung eines Versuchsprotokolls zur Verifizierung der Hypothese, dass die Auswirkungen von Bisphosphonaten auf porcine Osteoblasten des Beckens und Unterkiefers divergent verlaufen.

Dafür wurden jeweils 100000 Knochenzellen vom Becken und Unterkiefer von zwei Hausschweinen in Doppeltbestimmung auf 6-Well-Platten (Greiner bio-one, Frickenhausen) verteilt und mit dem hochpotenten Aminobisphosphonat Zoledronat (Zometa[®], Novartis Pharma, Nürnberg) in vier unterschiedlichen Konzentrationen sowie einer Kontrollgruppe ohne Zoledronat inkubiert. Die Zellen befanden sich zu dem Zeitpunkt dieses Versuchs in der 2. Passage. Vom Unterkiefer existierten allerdings nur Proben von einem Hausschwein, da die Primärkultur des anderen Schweins nicht ausgewachsen ist. Die Konzentrationen von 10^{-4} M, 10^{-6} M, 10^{-8} M und 10^{-10} M (Viereck et al. 2002) mussten durch geeignete Verdünnungen mit 0,9 % steriler Kochsalzlösung hergestellt werden. Die Inkubation der Zellen wurde über vier Tage fortgeführt. Nach 24 h, 48 h, 72 h und 96 h wurden die Zellen jeweils geerntet und die Zellzahl in Dreifachbestimmung mit dem Casy Cell Counter (Schärfe System, Model TT, Reutlingen) evaluiert.

3.2.4 Versuchsprotokoll zum Versetzen der Prä-Osteoblasten mit Zoledronat (Zometa[®], Novartis Pharma):

Hauptversuch

Beim Hauptversuch wurde die Untersuchung wie oben beschrieben an einer höheren Stichprobenzahl (n=5) sowie unter Verlängerung des Versuchsintervalls auf 10 Tage durchgeführt.

Das Versuchsprotokoll entspricht weitgehend dem des Vorversuches und wurde in folgenden Punkten optimiert.

So wurden im Hauptversuch Kulturen von fünf Hausschweinen, von denen jeweils Prä-Osteoblasten aus dem Unterkiefer und dem Becken aus einer Primärkultur zur Verfügung standen, kultiviert.

Auf die niedrigste Konzentration des Zoledronats von 10^{-10} M konnte verzichtet werden und das Zeitschema wurde hinsichtlich eines verlängerten Inkubationsintervalls verändert. Das Ernten der Zellen erfolgte somit das erste Mal am Tag des Aussäens nach circa sechs Stunden, dann nach einem Tag, nach vier Tagen, nach sieben Tagen und schließlich nach zehn Tagen Inkubation mit dem hochpotenten Aminobisphosphonat sowie jeweils einer Kontrollgruppe ohne Bisphosphonate.

Zu jedem genannten Zeitpunkt wurden die Zellen in Doppelbestimmung mit dem Casy Cell Counter (Schärfe System, Model TT, Reutlingen) gezählt und danach als trockenes Zellpellet bei -80° C eingefroren.

3.2.5 Molekularbiologische Analysen

3.2.5.1 RNA-Isolierung, Quantifizierung und Qualitätskontrolle

Die Isolierung von RNA aus Zellkulturen erfolgte mit Hilfe des RNeasy Mini Kits (Qiagen, Hilden) mit DNase-Verdau nach Herstellerprotokoll. Da die gewonnene RNA bei Raumtemperatur sehr instabil ist, wurden die Versuche während des gesamten Ablaufs stets auf Eis durchgeführt.

Anschließend erfolgte die RNA-Quantifizierung mit dem Nano-Drop-Spectrophotometer, wofür 2 µl der RNA-Probe benötigt wurden. Für die RNA-Qualitätskontrolle wurde der Pico Chip (Messbereich 0,5 – 25 ng/µl) bzw. der Nano Chip (Messbereich 25 – 500 ng/µl) von Agilent (RNA 6000 Nano/ Pico Chip Kit, Agilent Technologies, Waldbronn) nach Herstellerprotokoll verwendet.

3.2.5.2 cDNA-Synthese mittels reverser Transkriptase

Zur weiteren Untersuchung der RNA-Genexpression musste die RNA in komplementäre cDNA (*complementary DNA*) umgeschrieben werden, wofür das iScript cDNA Synthesis Kit von Bio Rad (München) nach Herstellerangaben verwendet wurde. Diese Technik beruht auf der Fähigkeit von selektiven Oligonukleotiden sich an das 3'-PolyA-Ende der mRNA zu binden, um dann mittels der Reversen Transkriptase einzelsträngige cDNA zu synthetisieren. Durch eine DNA-abhängige DNA-Polymerase wird anschließend der komplementäre DNA-Strang zum schon bestehenden cDNA-Einzelstrang hergestellt.

3.2.5.3 Primerherstellung

Da für die molekularbiologische Analyse von RANKL und OPG aus porcinen Prä-Osteoblasten noch keine Primer zur Verfügung standen, mussten diese in eigenen Versuchen entwickelt und etabliert werden. Als Referenz wurde eine unbehandelte Hausschwein c-DNA verwendet, die durch die zuvor beschriebene Methodik aus Unterkiefer- und Beckenknochen isoliert werden konnte.

Zur Entschlüsselung der Gensequenz für OPG, RANKL und Osteokalzin des Hausschweins wurden zunächst mit verschiedenen für das Wildschwein, die Maus,

die Ratte oder das Kaninchen spezifischen Primern Polymerase-Kettenreaktionen durchgeführt. Auch humane Primer wurden eingesetzt, da der Genpool des Hausschweins dem des Menschen ähnlich ist (Glüer et al. 2007).

Dennoch ergaben sich immer wieder Nebenprodukte in der Agarose-Gelelektrophorese, die durch einige Sequenzierungsschritte eliminiert werden mussten.

Die finale Sequenzierung der Hausschweinoligonukleotide bezüglich RANKL, OPG und Osteokalzin erfolgte durch das Göttinger Sequenzierungslabor SeqLab[®], mit deren Hilfe die hausschweinspezifischen Oligonukleotidsequenzen entwickelt werden konnten.

Auf ähnliche Weise wurden auch die Primer für das Housekeeping Gen *TATA-Box-binding-protein* (TBP) etabliert (Nygard et al. 2007), da die üblich verwendeten Housekeeping Gene wie etwa die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (gapdh) im Hausschweinmodell reguliert werden und somit nicht als Vergleich dienen können.

3.2.5.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR (*polymerase chain reaction*) ist ein Verfahren zur selektiven in-vitro-Amplifizierung von cDNA, welche von Kary Mullis erfunden wurde (Saiki et al. 1988) und ihm 1993 zum Nobelpreis für Chemie verhalf.

Für die PCR werden Oligonukleotide (Primer) benötigt, die sich spezifisch auf beiden Einzelsträngen der cDNA anheften, um jeweils den Startpunkt der DNA-Synthese festzulegen, wodurch der zu replizierende Abschnitt von beiden Seiten begrenzt wird. Der Genabschnitt, der zwischen diesen beiden durch die Primer festgelegten Punkte liegt, wird durch eine DNA-Polymerase, wie z.B. durch die thermostabile Taq-Polymerase, repliziert. Der PCR-Prozess besteht im Allgemeinen aus 12-50 Zyklen, welche in einem Thermocycler durchgeführt werden, wobei jeder Zyklus wiederum aus drei Einzelschritten besteht. Meist muss eine PCR auf die spezifische Reaktion hin optimiert werden, das heißt, dass sowohl die Anzahl der Zyklen variiert wird als auch die *Annealing Temperature*.

1. Denaturierung: Die DNA-Doppelstränge werden für 5 Minuten bei 95° C aufgetrennt.

2. *Annealing*: Die Primer haben einen Schmelzpunkt, auf den die *Annealing Temperature* in der Regel mit $T_m - 5^\circ \text{C}$ eingestellt wird. T_m beschreibt hierbei die maximale Temperatur, bei der sich die Nukleotidsequenz noch an den komplementären DNA-Strang binden würde. Dabei findet die Hybridisierung der Oligonukleotide (Primer) an die komplementäre DNA statt.
3. *Elongation*: In dieser Phase findet die eigentliche Polymerisation des DNA-Strangs statt. Die Taq-Polymerase synthetisiert einen komplementären DNA-Einzelstrang in 5'-3'-Richtung mit Hilfe von freien Nukleotiden, wobei der Primer den Anfang des neuen Einzelstrangs darstellt.

Die einfache PCR diente als kostengünstigere Alternative zur Primeretablierung im Vergleich zu der quantitativen real-time-PCR, da in diesem Fall nur die Funktion der Primer überprüft werden sollte und nicht die Quantität der Gentranskripte.

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde im Thermocycler iCycler MyiQ von Bio Rad, München durchgeführt.

3.2.5.5 DNA-Auftrennung im Agarosegel

Die Auftrennung von Nukleinsäureprodukten verschiedener Größe erfolgte durch eine Gelelektrophorese in 1,5 %-Agarosegel (Bio Rad, München).

Das zu analysierende PCR-Produkt (10 μl) wurde mit 2,5 μl blauem Ladungspuffer (Blue Juice Gel Loading Buffer, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) versetzt und direkt in die Taschen des gegossenen Gels gegeben. Zur Größenbestimmung der Fragmente wurden entweder ein 100 bp DNA-Ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) oder bei größeren Produkten ein 500 bp DNA-Ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) als Molekulargewichtsmarker jeweils in die zwei äußeren Taschen pipettiert.

Die Auftrennung der Nukleinsäuren erfolgte bei 200 V, woraufhin die DNA anschließend im Gel durch das interkalierende Ethidiumbromid mit UV-Licht im BioDoc Analyzer (Biometra, Jena) photographisch dokumentiert werden konnte.

3.2.5.6 Housekeeping-Gene

Als Housekeeping-Gene werden solche Gene bezeichnet, die nicht reguliert werden und deren Expression daher unabhängig von Zelltyp oder äußeren Einflüssen ist, da sie mit dem Grundstoffwechsel der Zellen verbunden sind. Die Transkription dieses

Referenzgens wird in jeder Polymerase-Kettenreaktion bestimmt, um durch den Abgleich der Daten Unterschiede aufzuzeigen, die durch methodisch bedingte Fehler eine Fehlregulation der mRNA bedingen könnten.

In diesen Versuchen wurde das *TATA-Box-binding-protein* (TBP) als Housekeeping Gen verwendet (Nygard et al. 2007).

3.2.5.7 Molekularbiologischer Nachweis des Osteokalzins

Zum Nachweis der Osteokalzinproduktion wurden Primärzellen des Beckens und des Unterkiefers von zwei verschiedenen Schweinen kultiviert. Nach 21 Tagen in Kultur wurde die Zelllinie in die 2. Passage überführt und über einen Zeitraum von sieben Tagen mit osteogenem Medium stimuliert. Dem Kultivierungsmedium wurden zugesetzt: Ascorbinsäure-2-Phosphat (10 nM), β -Glycerophosphat (10 mM), Dexamethason (10 nM) und Cholecalciferol (5×10^{-8} M).

Nach der Kultivierung wurde die RNA isoliert, quantifiziert und in cDNA umgeschrieben. Mit dieser cDNA konnte in mehreren Versuchen ein Primer zum Nachweis des Osteokalzins etabliert werden. Anschließend erfolgte eine konventionelle Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion und die Visualisierung des Proteins konnte mittels einer Agarose-Gelelektrophorese realisiert werden.

3.2.5.8 Quantitative real-time-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Die Anwendung der quantitativen Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) zum Nachweis einer spezifischen mRNA ermöglicht zusätzlich zum reinen Nachweis auch die Quantifizierung der amplifizierten Genprodukte. Auch hier besteht der PCR-Prozess aus mehreren Zyklen, die sich wiederum in die drei Einzelschritte Denaturierung, *Annealing* und Elongation gliedern.

Eine einfache Möglichkeit der relativen Quantifizierung der PCR-Produkte ist die Nutzung von interkalierenden fluoreszierenden DNA-Farbstoffen wie z.B. das SYBR Green. Dieser Farbstoff lagert sich in doppelsträngige DNA ein und wird am Ende eines jeden Elongationszyklus freigesetzt und gemessen. Auf diese Weise ist eine korrekte Quantifizierung möglich, da zum Ende eines jeden Zyklus optimale Reaktionsbedingungen vorherrschen. Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der

Menge der PCR-Produkte zu. Im Unterschied zu anderen quantitativen PCR-Methoden, wie z.B. bei der kompetitiven PCR, bei der die Quantifizierung der amplifizierten Gen-Produkte erst nach der Polymerase-Kettenreaktion mit Hilfe der Gelelektrophorese erfolgt, ist die qPCR wesentlich genauer (Pfaffl 2001).

Bei den vorliegenden Versuchen wurde mit der relativen Quantifizierung gearbeitet, bei der die Genexpression des Zielgens auf ein weiter nicht reguliertes Housekeeping Gen bezogen wird (Pfaffl 2004). Die Expressionsergebnisse wurden also auf das *TATA-Box-binding-protein* (TBP) normalisiert. Des Weiteren wurden die Ergebnisse noch weiter optimiert, indem die unterschiedlichen qPCR-Effizienzen der untersuchten Faktoren mit berücksichtigt wurden.

Die PCR-Effizienz kann aus der Steigung einer Standardkurve aus unterschiedlichen Verdünnungsstufen erstellt werden (Rasmussen 2001).

Um die Linearität zu überprüfen und die Effizienz der Amplifikation berechnen zu können, wurde eine Verdünnungsreihe von gepoolter cDNA aus der gesamten Untersuchungsreihe in Triplikaten aufgetragen (Pfaffl et al. 2002).

Die Untersuchung der Quantität der qPCR Daten beruht darauf, dass das gebildete Produkt bei jedem Zyklus der PCR unter optimalen Bedingungen verdoppelt wird. Durch die gebildete Produktmenge, die nach jedem Zyklus anhand des fluoreszierenden Farbstoffes SYBR Green (Bio Rad, München) gemessen wird, lässt sich nach einer gewissen Zyklenzahl C auf die Ausgangsmenge schließen, da die Produktmenge und die Fluoreszenz in direktem linearem Zusammenhang stehen.

Zur statistischen Analyse der qPCR-Daten wurde die relative Expression des zu untersuchenden Gens bestimmt, indem die behandelten experimentellen Proben auf die unbehandelte Kontrolle bezogen wurden.

Dieser Expressionsunterschied (*Ratio*) wurde über die so genannte $\Delta\Delta\text{CT}$ Methode berechnet (Livak und Schmittgen 2001). Basierend auf einem normalverteilungs-unabhängigen Randomisierungstest wurde die statistische Auswertung der Daten durchgeführt.

3.2.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem freien Statistikprogramm R 2.8 (www.r-project.org). Die Werte wurden als Mittelwerte (Mean) +/- Standardabweichungen (SD) angegeben.

Das Expressionslevel von OPG und RANKL wurde durch wiederholte Messungen der Varianz mit den 5 Studientagen (Tag 0, 1, 4, 7, 10), den 4 Konzentrationen (0 M, 10^{-4} M, 10^{-6} M, 10^{-8} M) und den 2 Knochenentnahmeorten (Becken und Unterkiefer) verglichen.

Nachfolgend wurden jeweils paarweise Vergleiche von OPG und RANKL gegen den Starttag 0 auf dieselbe Weise der Varianzmessung durchgeführt.

Allgemein wurde das Signifikanzlevel für die Versuche mit $\alpha=5\%$ definiert und die paarweisen Vergleiche wurden zusätzlich durch die Methode nach Bonferroni-Holm adjustiert.

Des Weiteren wurden die Effekte durch den *log fold change* (fc) beschrieben.

Ein fc-Wert < 0 beschreibt die Herunterregulation des betreffenden Gens, ein fc-Wert > 0 beschreibt die Hochregulation.

4. Ergebnisse

4.1 Gewinnung von Prä-Osteoblasten

Ein wichtiger Schritt zur Erörterung der Fragestellung war die Gewinnung von Prä-Osteoblasten aus Knochenproben des Beckens und des Unterkiefers vom Hausschwein.

Das Auswachsen von Zellen aus den Knochenfragmenten der Hausschweine konnte bei den Knochenproben aus dem Becken nach 5 Tagen und bei den Knochenproben aus dem Unterkiefer nach 7 Tagen beobachtet werden (Abbildung 4.1). Die Konfluenz beider Zellkulturen zeigte sich nach ca. 3 – 4 Wochen, wobei sich die Zellen des Beckens lichtmikroskopisch erkennbar schneller vermehrten als die des Unterkiefers.

Nach erfolgreicher Kultivierung erfolgte anschließend ein Proliferationsversuch der Prä-Osteoblasten.

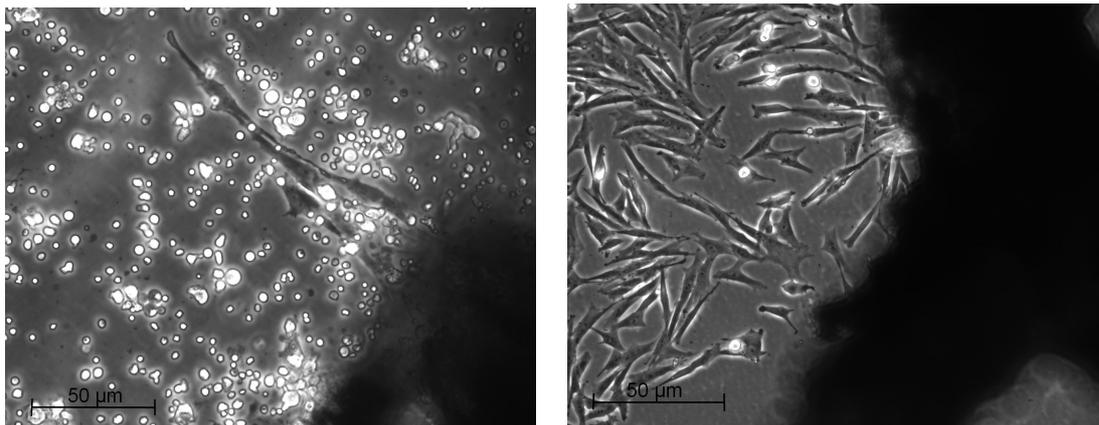


Abbildung 4.1: Zellen wachsen aus Knochenproben aus

4.2 Proliferationsversuch der Prä-Osteoblasten – Vorversuch

Die Proliferationsrate der mit Zoledronat behandelten Prä-Osteoblasten wurde sowohl im Vorversuch als auch im Hauptversuch untersucht. Die Eingangszellzahl von 100000 war sowohl für die Kontrollgruppe als auch für die mit Zoledronat behandelten Zellen in den Konzentrationen von 10^{-4} M, 10^{-6} M, 10^{-8} M und 10^{-10} M identisch. Der Vorversuch umfasste einen Zeitraum von 4 Tagen, an denen die Zellzahl ermittelt wurde, doch für eine genauere Aussage der weiteren Entwicklung war ein größerer Beobachtungszeitraum notwendig. Die Säulendiagramme der Proliferationsrate des Vorversuches zeigen die gemittelten Zellzahlen von Becken- und Unterkieferknochen der zwei untersuchten Schweine (Abbildung 4.2 – 4.3). Aus Übersichtsgründen wurde

auf die Darstellung der Standardabweichung verzichtet. Die Mittelwerte mit Standardabweichung sind tabellarisch im Anhang aufgeführt (Tabelle 7.2).

Proliferationsrate Zometa Vorversuch Becken

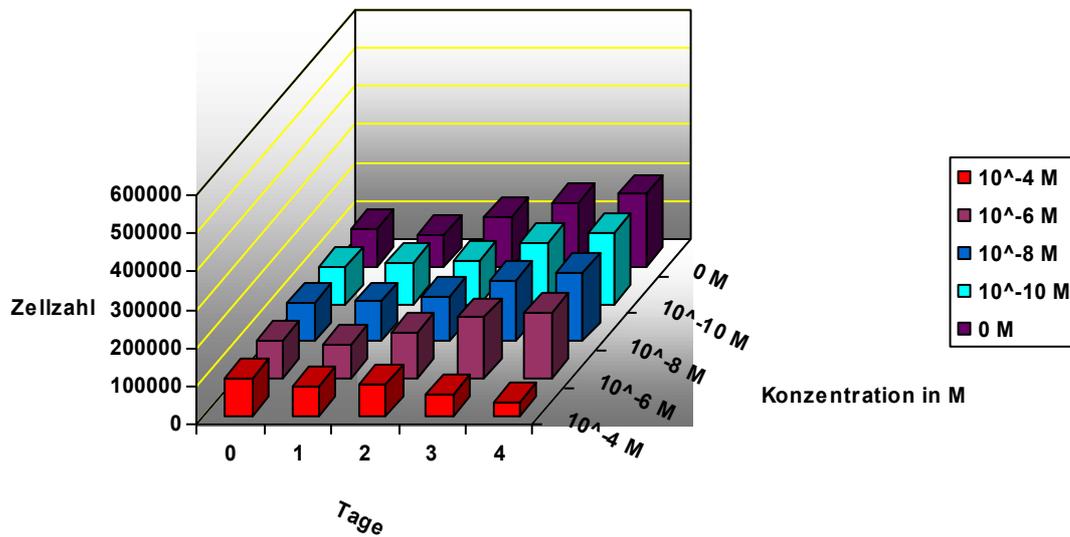


Abbildung 4.2: Proliferationsrate Vorversuch Becken

Proliferationsrate Zometa Vorversuch Unterkiefer

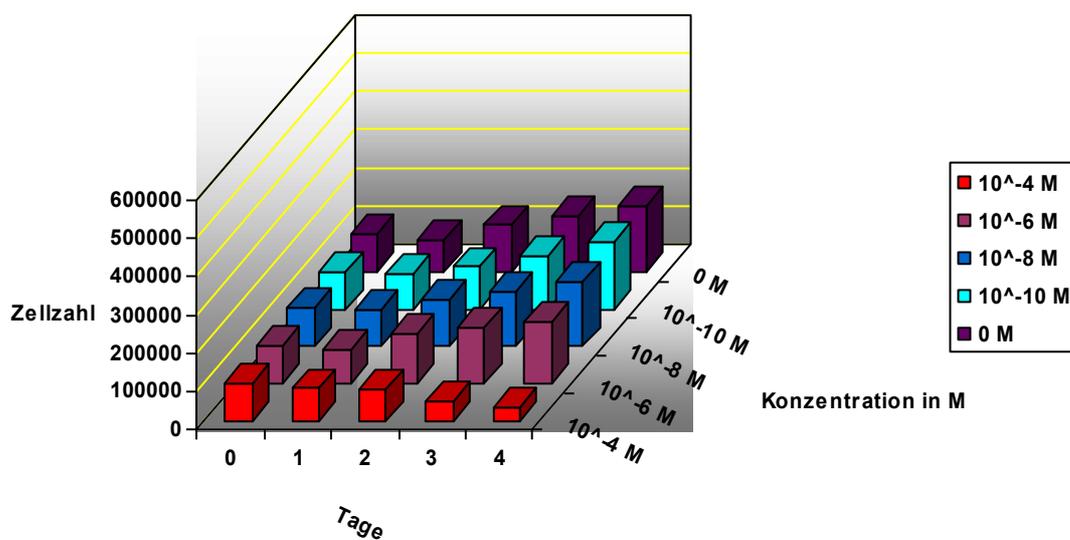


Abbildung 4.3: Proliferationsrate Vorversuch Unterkiefer

Die Beurteilung der Proliferation zeigte eine Steigerung der Zellzahlen in den Konzentrationsstufen 10^{-6} M, 10^{-8} M, 10^{-10} und der Kontrollgruppe jeweils um Faktoren im Bereich zwischen 2,09 und 2,30 für die Prä-Osteoblasten des Beckens und um Faktoren zwischen 1,66 und 1,69 für die Prä-Osteoblasten des Unterkiefers. Für die Zellen der Konzentration 10^{-4} M zeigte sich eine deutliche Verminderung der Zellzahl auf 12,05 % der Ausgangszellzahl für die Prä-Osteoblasten des Beckens und auf 33,8 % für die Prä-Osteoblasten des Unterkiefers.

4.3 Proliferationsversuch der Prä-Osteoblasten – Hauptversuch

Der Hauptversuch umfasste einen Zeitraum von 10 Tagen, an denen wiederum die Proliferationsdaten der Prä-Osteoblasten erhoben wurden. Auf Grund des verlängerten Intervalls wurden auch die Messpunkte im Vergleich zum Vorversuch in der Weise verändert, dass die Zellzählung an Tag 0, Tag 1, Tag 4, Tag 7 und Tag 10 erfolgte. Auf die niedrigste Konzentration des Zoledronats von 10^{-10} M wurde verzichtet, da die Vorversuche keine Auswirkung der geringeren Konzentration erwarten ließen.

Die Abbildungen 4.4 und 4.5 zeigen die gemittelten Proliferationsdaten der Schweine 3-7 im Hauptversuch. Aus Übersichtsgründen wurde auf die Darstellung der Standardabweichung verzichtet. Die Mittelwerte mit Standardabweichung sind tabellarisch im Anhang aufgeführt (Tabelle 7.1).

Proliferationsrate Hauptversuch Becken Schwein 3-7

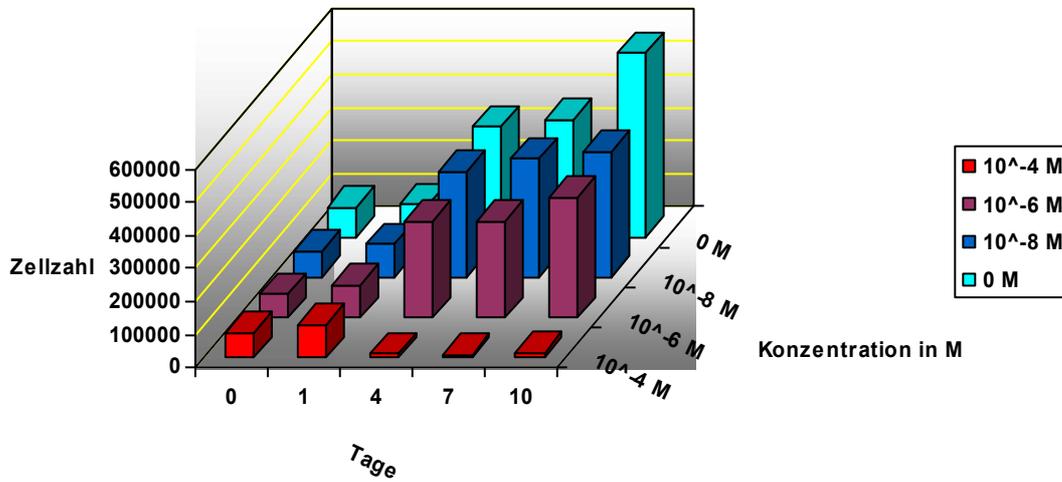


Abbildung 4.4: Proliferationsrate Hauptversuch Becken Schwein 3-7

Proliferationsrate Hauptversuch Unterkiefer Schwein 3-7

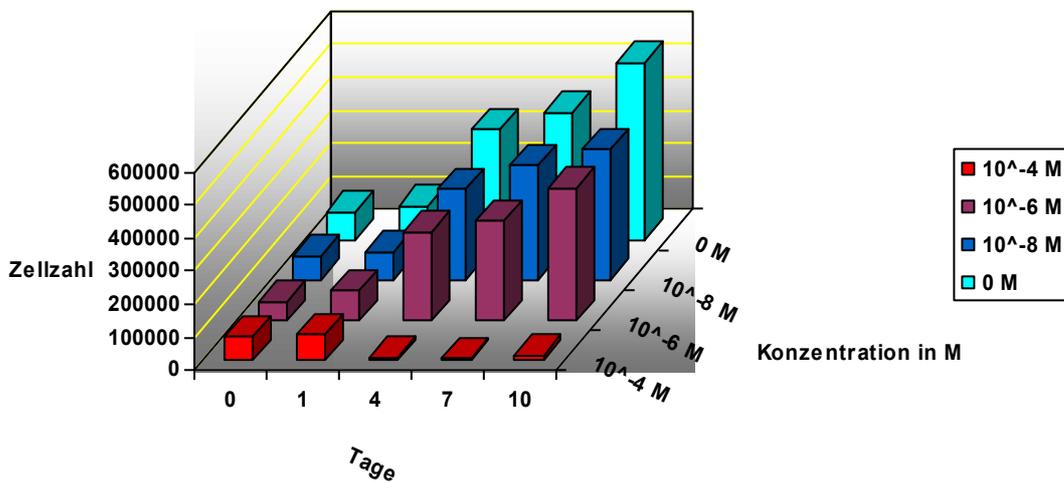


Abbildung 4.5: Proliferationsrate Hauptversuch Unterkiefer Schwein 3-7

Die Beurteilung der Proliferation aller fünf Schweine im Hauptversuch zeigte eine Steigerung der Zellzahlen in den Konzentrationsstufen 10⁻⁶ M, 10⁻⁸ M und der Kontrollgruppe jeweils um Faktoren im Bereich zwischen 3,22 und 8,42 für die Prä-Osteoblasten des Beckens und um Faktoren zwischen 3,89 und 10,03 für die Prä-

Osteoblasten des Unterkiefers. Beim Vergleich der fünf Schweine zeigte die Proliferation der Zellzahlen im Hauptversuch eine Steigerung in den Konzentrationsstufen 10^{-6} M, 10^{-8} M und in der Kontrollgruppe um Faktoren zwischen 4,81 und 6,16 für die Prä-Osteoblasten des Beckens und um Faktoren zwischen 5,42 und 7,27 für die Prä-Osteoblasten des Unterkiefers.

Für die Zellen der Konzentration 10^{-4} M zeigte sich eine deutliche Verminderung der Zellzahl auf 10,68 % bis 19,19 % der Ausgangszellzahl der Prä-Osteoblasten des Beckens und auf 11,39 % bis 44,84 % der Ausgangszellzahl der Prä-Osteoblasten des Unterkiefers. Somit verminderte sich bei dieser Konzentration die Proliferationsrate der Zellen auf durchschnittlich 18,32 % der Ausgangszellzahl der Prä-Osteoblasten des Beckens und auf durchschnittlich 20,15 % der Ausgangszellzahl der Prä-Osteoblasten des Unterkiefers.

4.4 Färbemethoden

4.4.1 Zytochemische Färbung der alkalischen Phosphatase

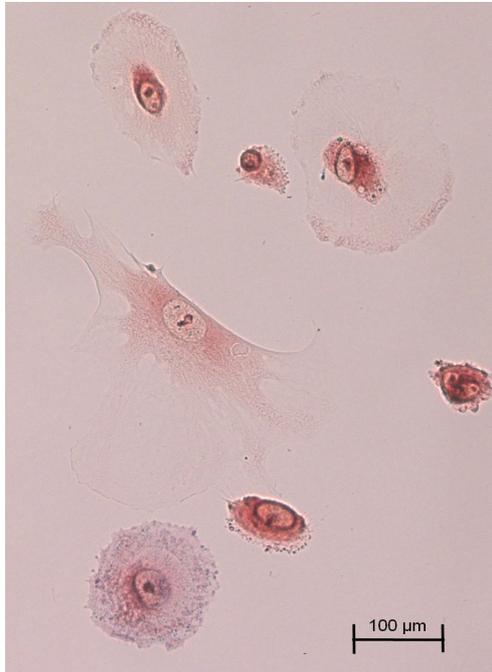


Abbildung 4.6: Beckenzellen AP-positiv

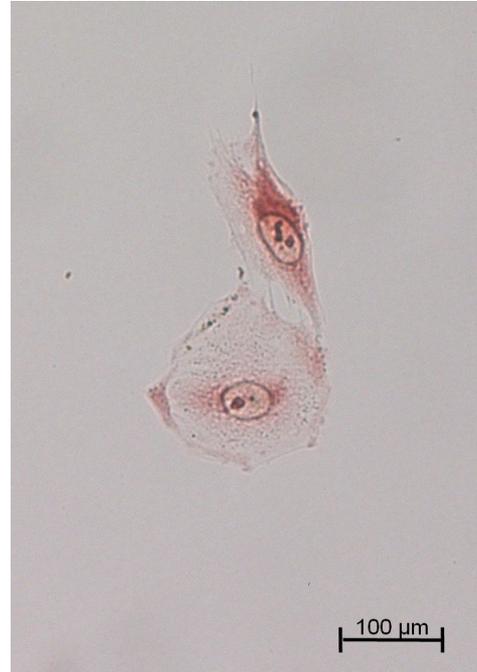


Abbildung 4.7: Unterkieferzellen AP-positiv

Für die Charakterisierung der Prä-Osteoblasten ist der Nachweis der alkalischen Phosphatase von entscheidender Bedeutung.

Die Aktivität des für die Knochenbildung entscheidenden Isoenzyms alkalische Phosphatase konnte sowohl in den Zellkulturen des Beckens (Abbildung 4.6) als auch in den Zellkulturen des Unterkiefers (Abbildung 4.7) nachgewiesen werden. Positiv reagierende Prä-Osteoblasten zeigen ein wässrig-blaues Zytoplasma mit eingeschlossenen pink-rötlichen Granula.

4.4.2 Von-Kossa-Färbung

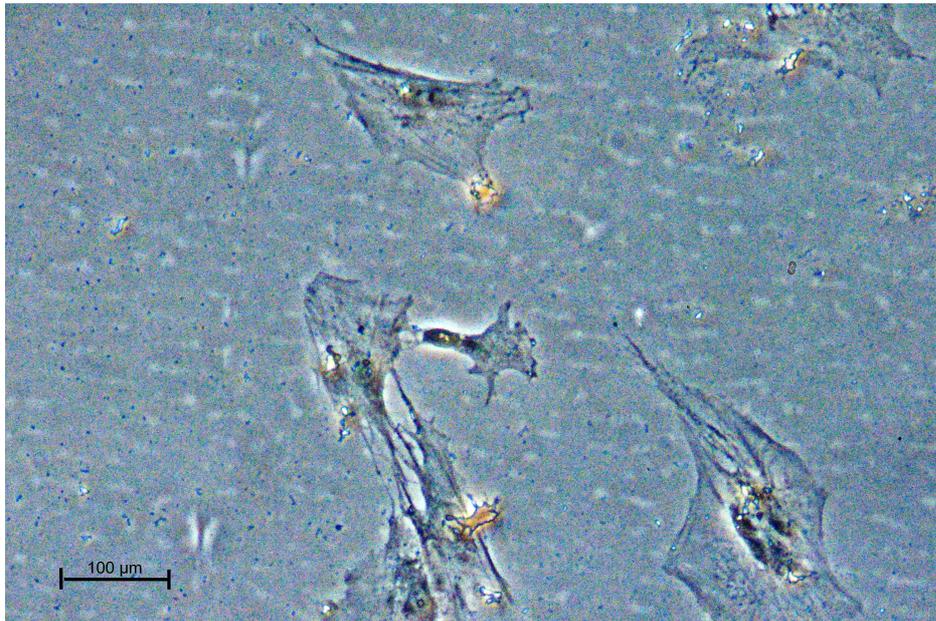


Abbildung 4.8: Beckenzellen Von-Kossa-positiv

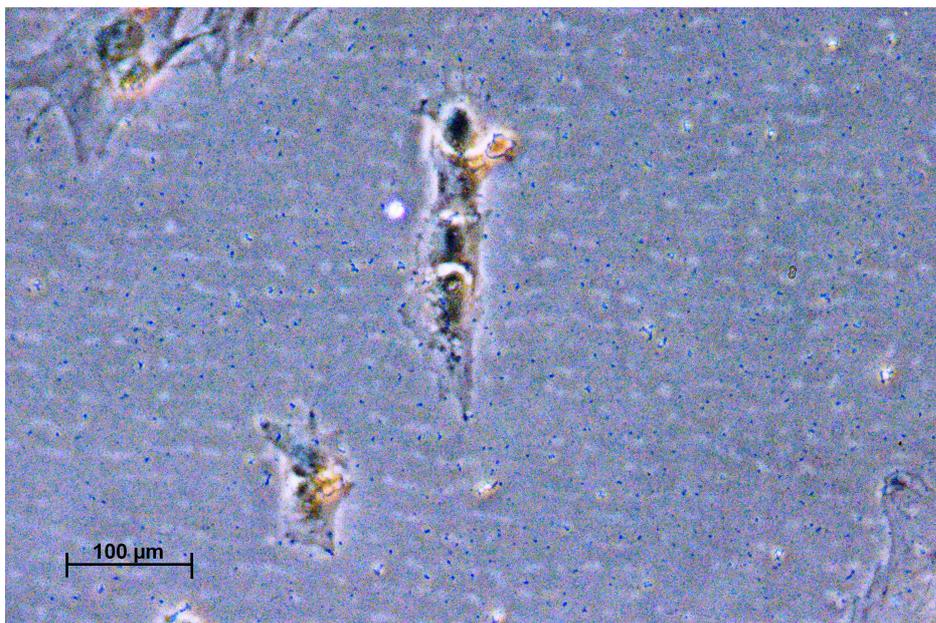


Abbildung 4.9: Unterkieferzellen Von-Kossa-positiv

Die konventionelle Färbemethode nach Von Kossa war sowohl in den Zellkulturen des Beckens (Abbildung 4.8) als auch in den Zellkulturen des Unterkiefers (Abbildung 4.9) positiv. Die Zellen zeigen in der lichtmikroskopischen Beurteilung eine typisch braunschwarze Färbung der kalziumhaltigen Zonen.

Dadurch lässt sich die osteogene Mineralisierung der Zellen nachweisen.

4.5 Molekularbiologischer Nachweis des Osteokalzins

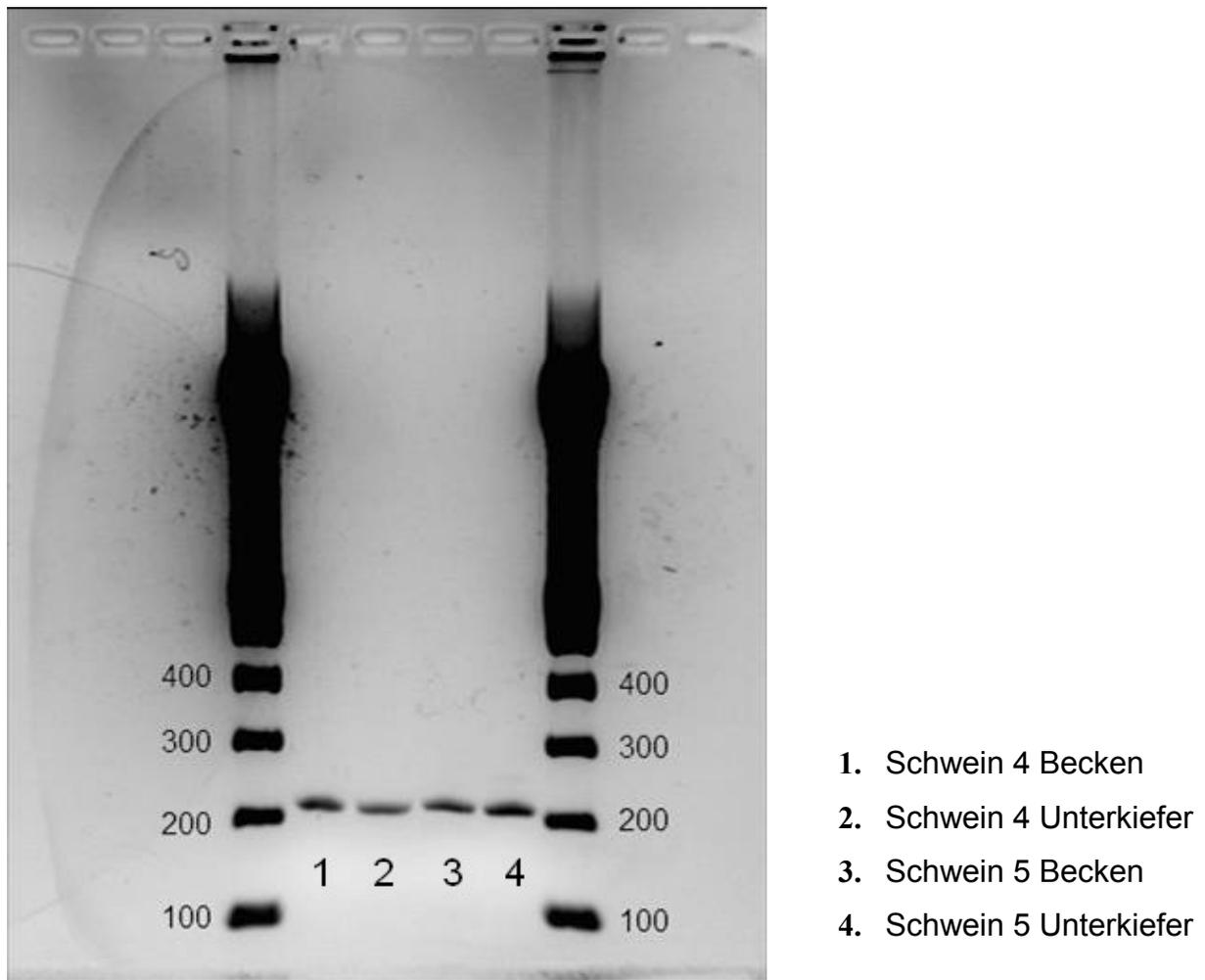


Abbildung 4.10: Osteokalzinnachweis in der Agarose-Gelelektrophorese (210 bp)

Die Primer für das Osteokalzin wurden auf eine Länge von 210 Basenpaaren sequenziert. Abbildung 4.10 zeigt das in der Gelelektrophorese visualisierte Ergebnis. Sowohl auf der linken als auch auf der rechten Seite stehen mit Zahlen markierte Banden, welche als Referenzleiter für die in den Schweineproben zu ermittelnde Länge des Peptidhormons Osteokalzin gilt. In der Mitte zeigen sich die mit den Ziffern 1 - 4 gekennzeichneten Banden des Hausschwein-Genoms, welche alle auf der Höhe von etwa 210 Basenpaaren liegen und somit den Nachweis von Osteokalzin in den porcinen Prä-Osteoblasten von Becken und Unterkiefer zeigen.

Nach der erfolgreichen Charakterisierung der porcinen Prä-Osteoblasten folgten molekularbiologische Untersuchungen zur Expression der Knochenregulationsfaktoren OPG und RANKL.

4.6 Molekularbiologische Analysen der Prä-Osteoblasten unter Zoledronat-Therapie:

Vorversuch

4.6.1 Ergebnisse der Expressionsuntersuchung von OPG im Vorversuch

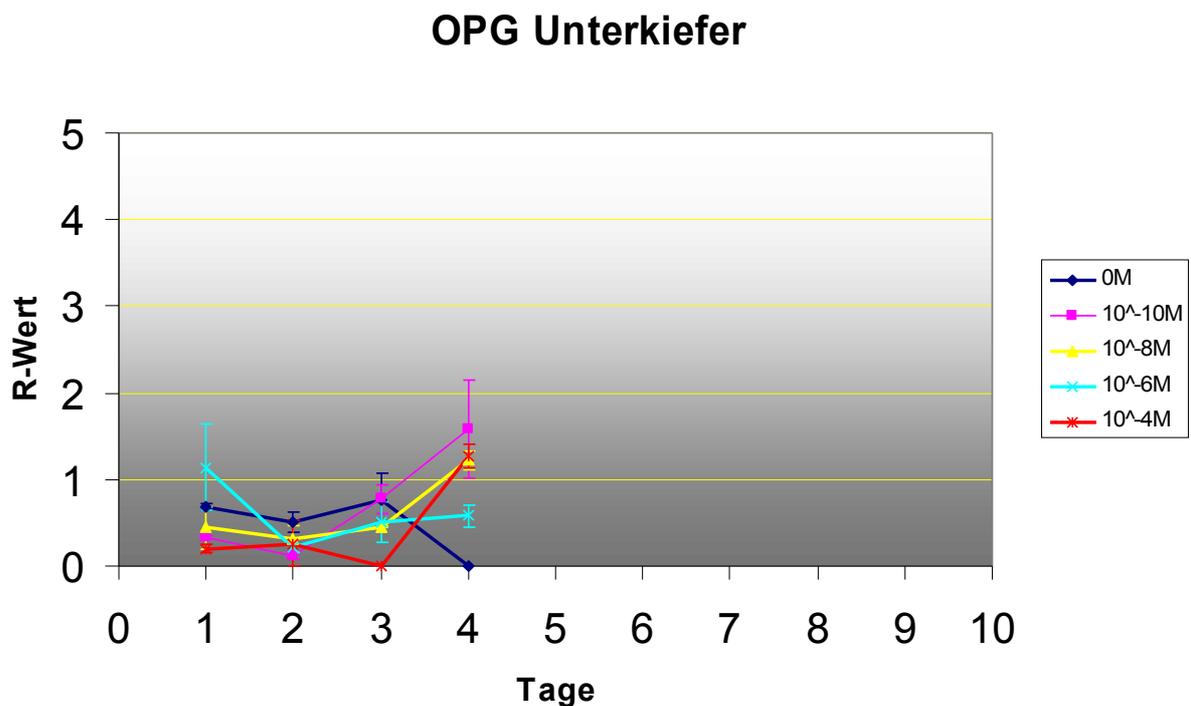


Abbildung 4.11: Expressionsanalyse OPG Unterkiefer Vorversuch

Die Expressionsanalyse für OPG in den Zellkulturen des Unterkiefers ergibt für die Kontrollgruppe während der Tage 1 bis 3 relativ gleich bleibende Werte, wohingegen die Kurve an Tag 4 deutlich abnimmt (Abbildung 4.11).

Bei den verschiedenen Konzentrationsstufen zeigt sich in den Kurvenverläufen ein geringes Absinken der Expression am 2. bzw. 3. Tag und eine Steigung der Werte bis zum 4. Tag.

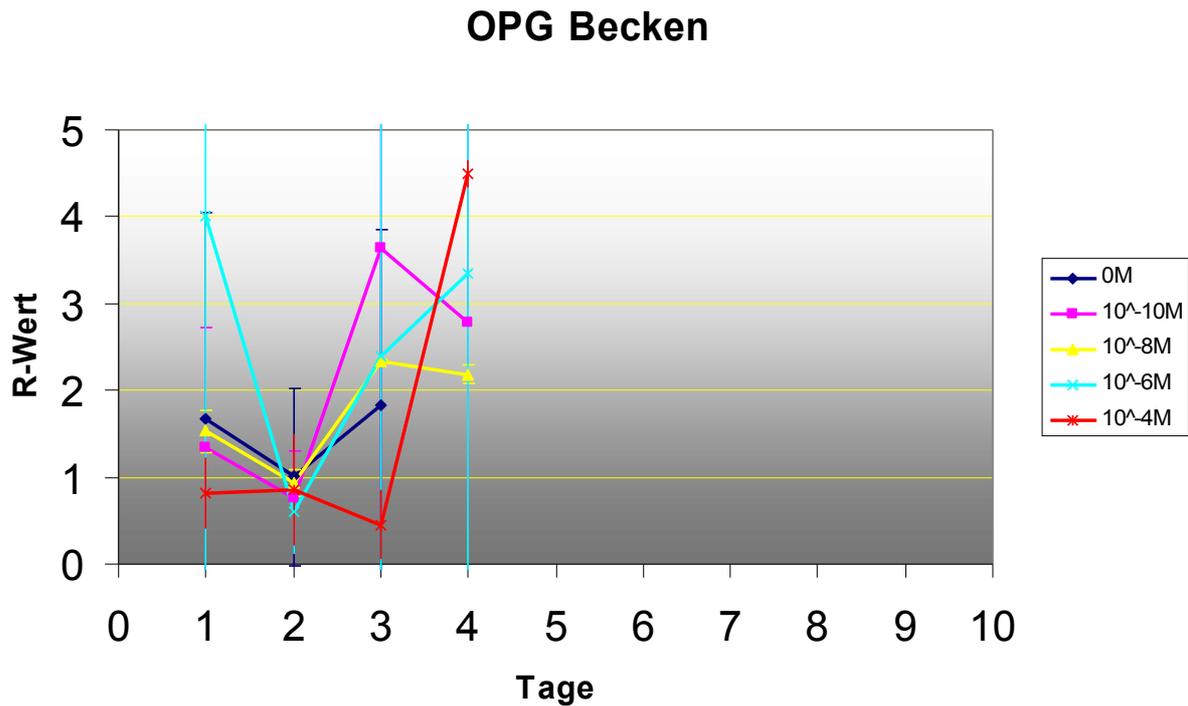


Abbildung 4.12: Expressionsanalyse OPG Becken Vorversuch

Für die Expression von OPG in den Kulturen der Beckenosteoblasten ergeben sich Kurvenverläufe mit deutlich höheren Schwankungen und Extremwerten (Abbildung 4.12). Auffallend ist auch hier das Absinken der Expression zum 2. und 3. Tag, während die Werte an Tag 4 alle auf einem tendenziell höheren Niveau liegen als zum Startzeitpunkt.

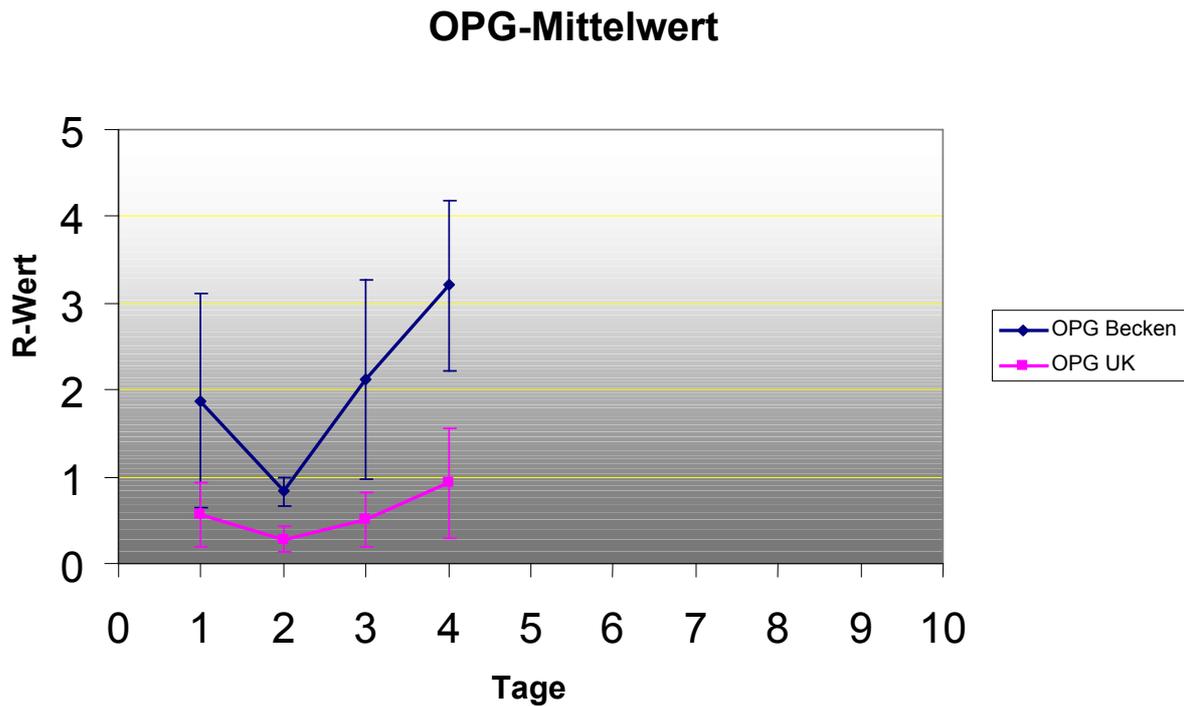


Abbildung 4.13: Expressionsanalyse OPG-Mittelwert

Im Mittel erscheinen die Expressionswerte des Beckens auf einem tendenziell höheren Niveau als die Expressionswerte des Unterkiefers bei vergleichbarer Form des Kurvenverlaufs. Auch hier fallen beide Kurvenverläufe nach dem 1. Tag deutlich ab, woraufhin sich die Werte bis zum 4. Tag erholen und die Kurven dadurch wieder ansteigen (Abbildung 4.13).

Somit zeigen sowohl die gemittelten Werte des Beckens als auch die gemittelten Werte des Unterkiefers über den Zeitraum von 4 Tagen eine zunehmende Tendenz.

4.6.2 Ergebnisse der Expressionsuntersuchung von RANKL im Vorversuch

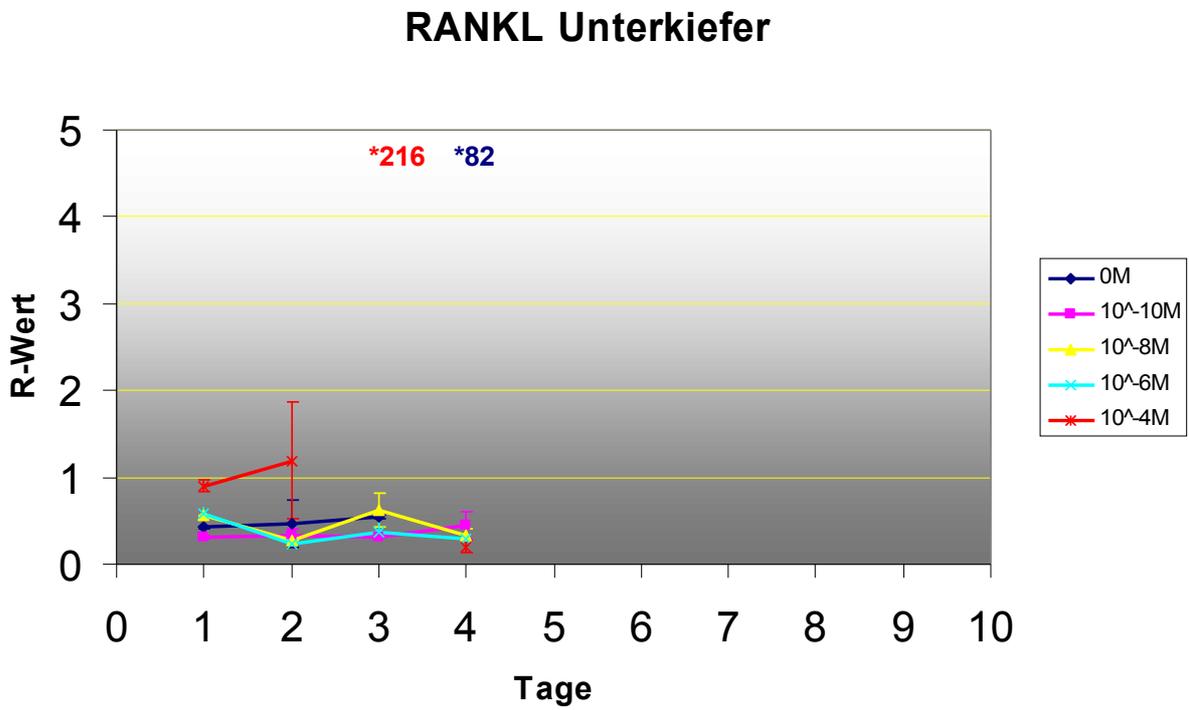


Abbildung 4.14: Expressionsanalyse RANKL Unterkiefer Vorversuch

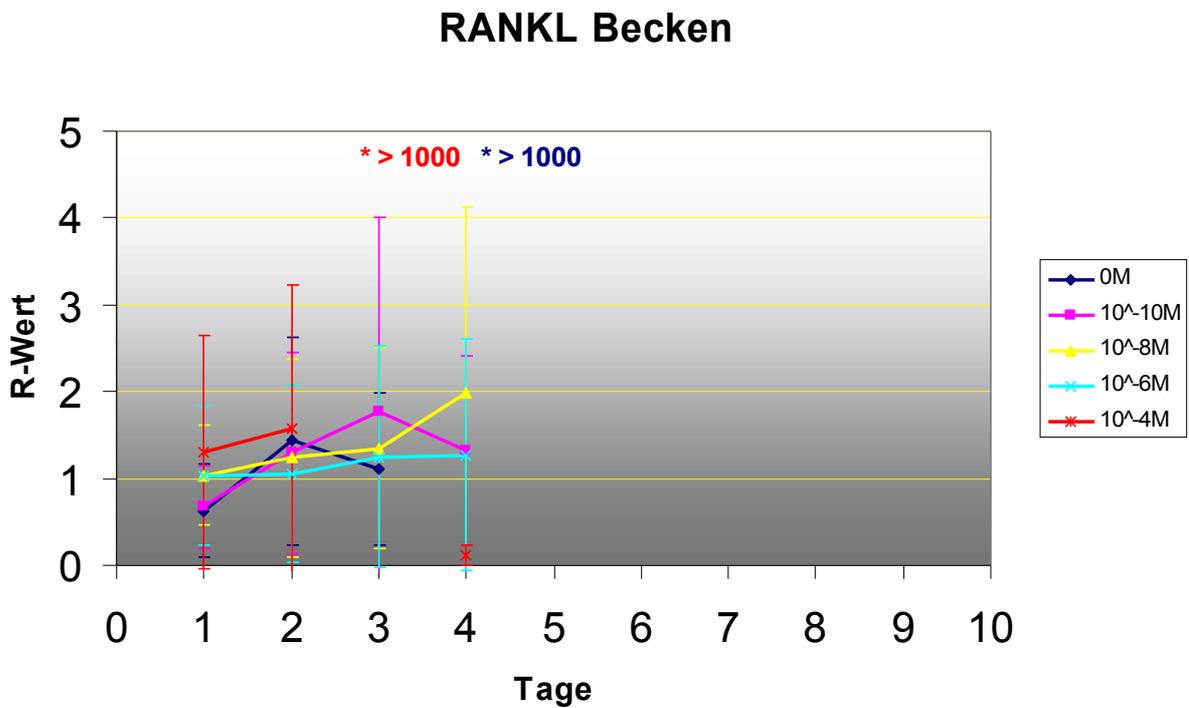


Abbildung 4.15: Expressionsanalyse RANKL Becken Vorversuch

Die Expressionswerte für RANKL bei den Zellen des Unterkiefers zeigen bis auf zwei Ausreißer stabile Kurvenverläufe mit geringen Schwankungen (Abbildung 4.14).

Die Expressionsanalyse von RANKL bei den Zellen des Beckens ergibt im Vergleich zum Unterkiefer höhere Messwerte und zeigt eine größere Schwankungsbreite mit jeweils einem Ausreißer in der höchsten Konzentrationsstufe und einem Ausreißer in der Kontrollgruppe ohne Bisphosphonate (Abbildung 4.15).

RANKL-Mittelwert

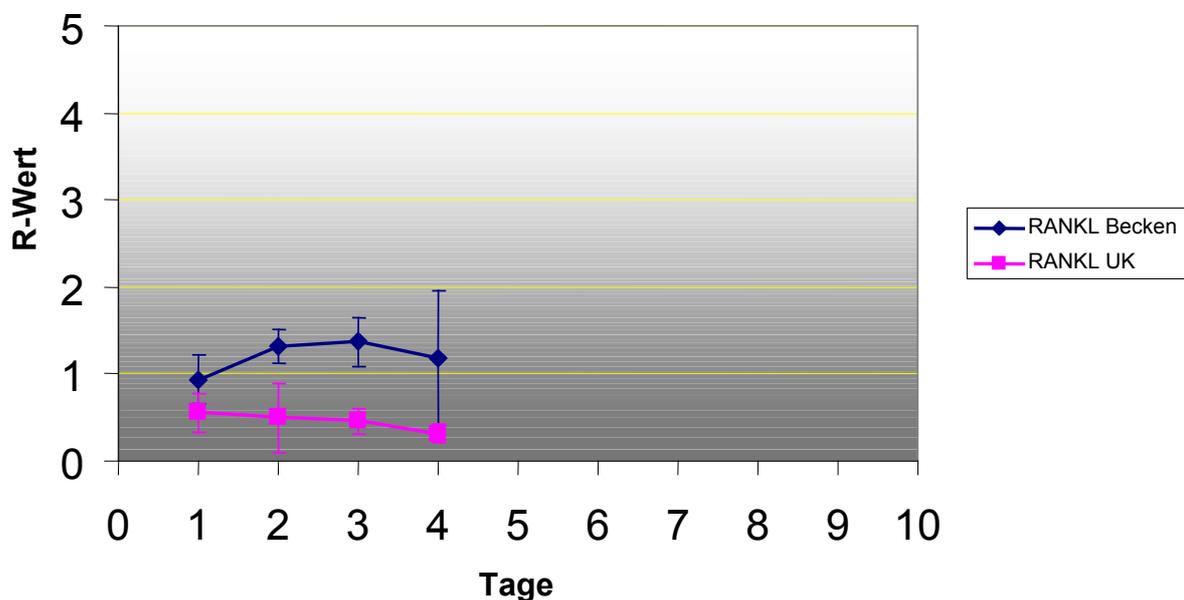


Abbildung 4.16: Expressionsanalyse RANKL-Mittelwert

Beim Vergleich der mittleren Kurvenverläufe werden die geringeren Schwankungen bei den Zellkulturen des Unterkiefers deutlich (Abbildung 4.16).

Auffallend ist weiterhin das tendenziell höhere Expressionsniveau von RANKL in den Zellkulturen des Beckens im Vergleich zu den Zellkulturen des Unterkiefers, was äquivalent zu den Ergebnissen aus der Expressionsanalyse von OPG ist.

In Erweiterung des Vorversuchs wurde im Hauptversuch die Zahl der Hausschweine zur statistischen Auswertbarkeit vergrößert sowie das Behandlungsintervall mit dem Aminobisphosphonat Zoledronat auf 10 Tage ausgedehnt.

Auf die niedrigste Konzentrationsstufe von 10^{-10} M wurde im Hauptversuch verzichtet.

4.7 Molekularbiologische Analysen der Prä-Osteoblasten unter Zoledronat-Therapie:

Hauptversuch

4.7.1 Einfluss des Entnahmeortes auf die Expression von OPG und RANKL

Bei der Varianzanalyse der Entnahmeregion der Knochenproben zeigt sich im Vergleich der Beckenproben mit den Unterkieferproben ein signifikanter Unterschied in der Expression von OPG, ohne Berücksichtigung von Kulturdauer und Konzentration des Bisphosphonats (Tabelle 4.1).

Parameter	Entnahmeort	Mean +/- SD	p
OPG	Becken	-0,30 +/-0,88	< 0,01
	Unterkiefer	-0,74 +/-0,83	
RANKL	Becken	-0,06 +/-0,33	0,95
	Unterkiefer	-0,06 +/-0,50	

Tabelle 4.1: Vergleich der Expressionslevel von OPG und RANKL in Abhängigkeit vom Entnahmeort der Knochenproben

Bei OPG wird deutlich, dass die Expression in den Zellkulturen des Beckens auf einem signifikant höheren Niveau steht als die Expression in den Zellkulturen des Unterkiefers ($p < 0,01$) (Abbildung 4.17).

Die Genexpression von RANKL zeigt keine signifikante Abhängigkeit vom Knochenentnahmeort ($p = 0,95$).

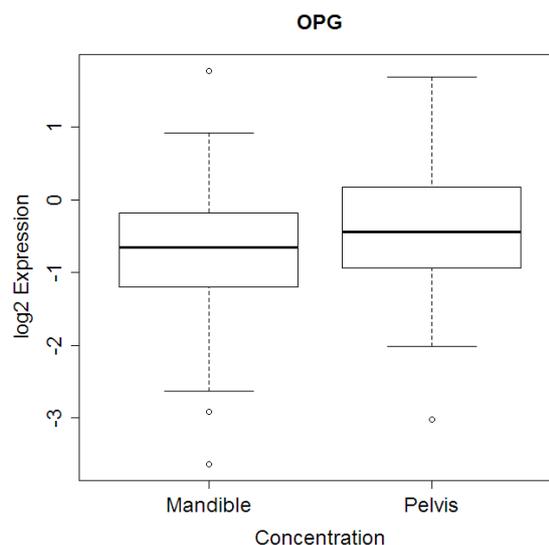


Abbildung 4.17: Genexpression von OPG in Abhängigkeit vom Knochenentnahmeort

4.7.2 Einfluss der Kulturdauer auf die Expression von OPG und RANKL

Bei der Beurteilung des Einflusses der Kulturdauer zeigt sich bei beiden Genen OPG und RANKL in der Varianzanalyse ohne Berücksichtigung von Konzentration und Entnahmeort eine signifikante Abhängigkeit von der Versuchsdauer (Abbildung 4.18).

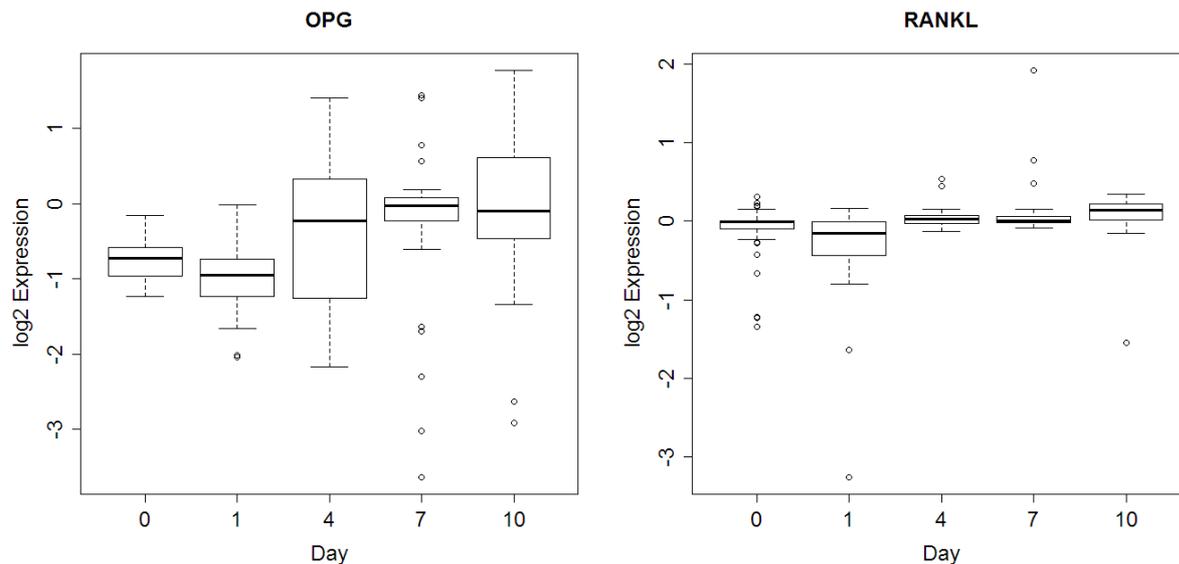


Abbildung 4.18: Genexpression von OPG und RANKL in Abhängigkeit von der Kulturdauer

Beim Vergleich der Expression der einzelnen Versuchstage zeigt sich ein signifikanter Unterschied im Vergleich zum Ausgangstag 0 nach 1, 4, 7 und 10 Tagen für OPG und nach 4, 7 und 10 Tagen für RANKL (Tabelle 4.2).

Gene	Vergleich	Adjustierter p
OPG	Tag 0 mit Tag 1	0,0294
	Tag 0 mit Tag 4	0,0354
	Tag 0 mit Tag 7	0,0354
	Tag 0 mit Tag 10	0,0012
RANKL	Tag 0 mit Tag 1	0,1088
	Tag 0 mit Tag 4	0,0396
	Tag 0 mit Tag 7	0,0312
	Tag 0 mit Tag 10	0,0438

Tabelle 4.2: Vergleich der einzelnen Versuchstage mit dem Startpunkt der Versuchsreihe an Tag 0 für OPG und RANKL

4.7.3 Einfluss der Konzentration auf die Expression von OPG und RANKL

Weiterhin konnte ein Einfluss der Konzentration auf die Expression gefunden werden. In Tabelle 4.3 und der Abbildung 4.19 werden dargestellt, dass OPG in der Kontrollgruppe und den beiden niedrig dosierten Bisphosphonatkonzentrationen nahezu auf einem Level verbleibt, wohingegen die Expression bei der höchsten Zoledronatkonzentration von 10^{-4} M deutlich herunterreguliert wird. Die Varianzanalyse ergab signifikante Unterschiede in der Expression ($p < 0,01$).

Bei dem Gen RANKL zeigten sich geringe Unterschiede in der Expression in Abhängigkeit von der Konzentration zwischen -0,03 und -0,08 (log fold change). Die statistische Analyse ergab keinen signifikanten Einfluss der Konzentration ($p = 0,81$).

Parameter	Konzentration	Mean +/- SD	p
OPG	0	-0,44 +/-0,82	< 0,01
	1×10^{-8}	-0,38 +/-0,94	
	1×10^{-6}	-0,39 +/-0,77	
	1×10^{-4}	-1,27 +/-0,77	
RANKL	0	-0,10 +/-0,53	0,81
	1×10^{-8}	-0,03 +/-0,28	
	1×10^{-6}	-0,03 +/-0,29	
	1×10^{-4}	-0,08 +/-0,62	

Tabelle 4.3: Vergleich der Expressionslevel von OPG und RANKL in Abhängigkeit von der Konzentration

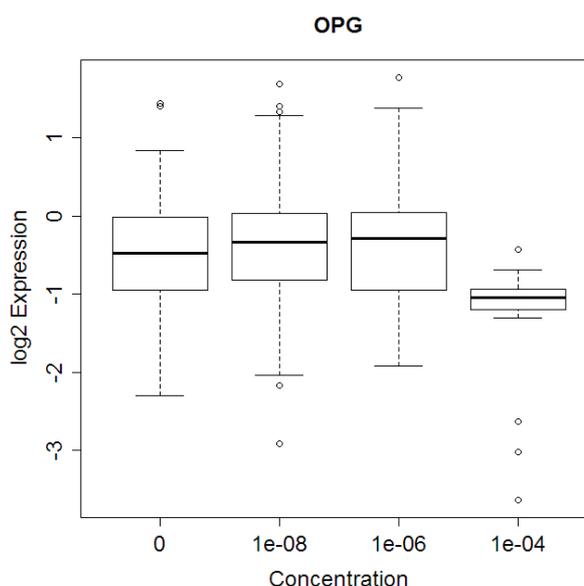


Abbildung 4.19: Genexpression von OPG in Abhängigkeit von der Konzentration

Der paarweise Vergleich bei OPG ergab einen signifikanten Einfluss der höchsten Konzentrationsstufe von 10^{-4} M im Vergleich zur Kontrolle ($p = 0,0003$) (Tabelle 4.4).

Gene	Vergleich	Adjustierter p	log Fold Change
OPG	0 mit 1×10^{-8}	1,0000	0,06
	0 mit 1×10^{-6}	1,0000	0,05
	0 mit 1×10^{-4}	0,0003	-0,83

Tabelle 4.4: Vergleich der Expressionslevel von der Kontrollgruppe ohne Bisphosphonate mit den gewählten Bisphosphonatkonzentrationen

4.7.4 Subgruppenanalyse der Genexpressionsdaten von OPG

Um eine unterschiedliche Beeinflussung der Expression von OPG in Abhängigkeit vom Entnahmeort und von der Konzentration zu evaluieren, wurde eine Subgruppenanalyse für OPG durchgeführt.

Die Analyse ergab keine signifikante Wechselwirkung zwischen Entnahmestelle und zeitlichem Verlauf, so dass hier ein homogener Effekt erkannt werden kann.

Bei der Kontrolle und bei der geringsten Konzentrationsstufe von 10^{-8} M zeigte sich dazu eine signifikant unterschiedliche Expression bei den verschiedenen Entnahmestellen Becken und Unterkiefer.

Trotz der Fallzahl von $n = 5$ konnte bei der höchsten Konzentrationsstufe von 10^{-4} M wegen der zum Teil zu geringen Zellzahlen in 1 von 5 Schweinen keine mRNA-Isolierung durchgeführt werden, sodass hier für die Subgruppenanalyse zu wenig Wertepaare zur Verfügung standen. Daher erstreckt sich die Subgruppenanalyse nur auf die Konzentrationsstufen 10^{-8} M und 10^{-6} M (Tabelle 4.5).

Gen	Konzentration	Effekt	p
OPG	0	Tag	0,31
		Entnahmeregion	0,04
		Interaktion (Tag x Region)	0,63
	1×10^{-8}	Tag	< 0,01
		Entnahmeregion	< 0,01
		Interaktion (Tag x Region)	0,21
	1×10^{-6}	Tag	0,01
		Entnahmeregion	0,15
		Interaktion (Tag x Region)	0,62
	1×10^{-4}	Tag	-
		Entnahmeregion	-
		Interaktion (Tag x Region)	-

Tabelle 4.5: Subgruppenanalyse der einzelnen Konzentrationen in Abhängigkeit von Tag, Entnahmeregion und Interaktion von Tag x Region für OPG

Die Expression bei 10^{-8} M und der Kontrollgruppe liegt im Becken höher als im Unterkiefer (Abbildungen 4.20 a-c). Bei der höheren Expression von 10^{-6} M nähert sich zu den späteren Zeitpunkten die Expression von OPG bei den Osteoblasten des Beckens an die Zellen der Mandibula an.

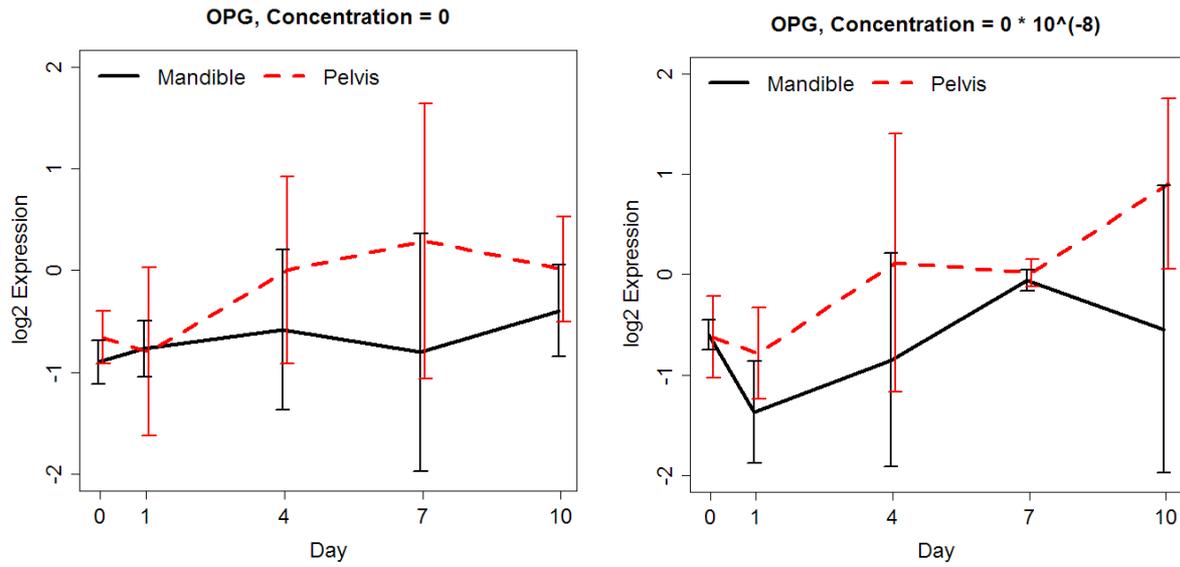


Abbildung 4.20 a und b: Genexpression von OPG (0 M und 10^{-8} M) in Unterkiefer und Becken im zeitlichen Verlauf

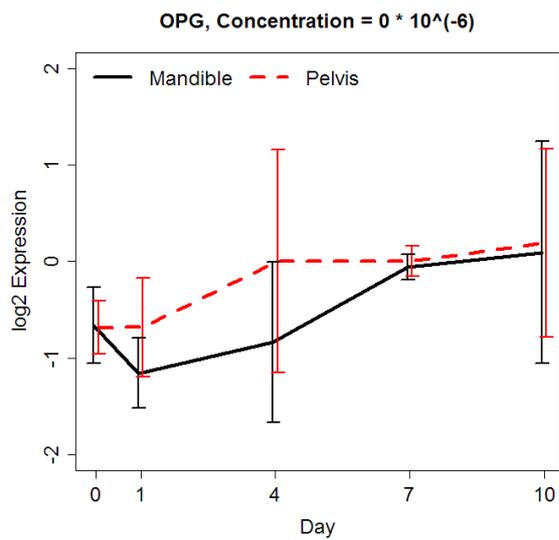


Abbildung 4.20 c: Genexpression von OPG (10^{-6} M) in Unterkiefer und Becken im zeitlichen Verlauf

5. Diskussion

Bisphosphonate gehören zu der Wirkstoffgruppe von Medikamenten, die in der Behandlung verschiedenster Knochenerkrankungen eingesetzt werden.

Zu diesen Erkrankungen zählen verschiedene Osteoporosearten (Lippuner 2003), das multiple Myelom, eine tumorbedingte Hyperkalzämie, der Morbus Paget, das Vorhandensein von Knochenmetastasen (Mundy 2002), die Osteogenesis imperfecta (Glorieux 2007) sowie sekundäre Osteopathien bei der Niereninsuffizienz oder rheumatoiden Arthritis und der ektopischen Kalzifizierung von Weichgewebe (Shinoda et al. 1983).

Aus zahnmedizinischer Sicht ist die Hauptnebenwirkung dieses Medikaments die Bisphosphonat-assoziierte Knochennekrose der Kiefer (Marx 2003, Ruggiero et al. 2004).

Die genau Ätiologie dieser Kiefernekrose ist weiterhin nicht abschließend geklärt, jedoch wird die Beeinflussung verschiedener Zellarten diskutiert, die am Knochenumbau, der vaskulären Versorgung, der Regeneration und der Wundheilung beteiligt sind.

Durch die Kaubewegung und hohe Kaukräfte werden physiologischerweise Mikrofrakturen in der Struktur der Kieferknochen induziert, die durch die Fähigkeit zur Remodellierung ständig repariert werden.

Weiterhin wird die dünne Schleimhautabdeckung für eine leichtere Keiminvansion und Verletzung der Mundschleimhaut verantwortlich gemacht (Sarin et al. 2008).

Die Kieferknochen sind gekennzeichnet durch eine hohe Vaskularität. Daher zeigen die bekannten antiangiogenen Eigenschaften der Bisphosphonate hier möglicherweise eine besonders große Auswirkung (Sarin et al. 2008).

Weiterhin ist bekannt, dass osteoblastäre Zellen des Viszerokraniums nicht wie im übrigen Körper mesodermalen Ursprungs sind, sondern der kranialen Neuralleiste entstammen. Diese kranialen Neuralleistenzellen wandern in den 1. Pharyngealbogen ein und bilden dort Anlagen für Anteile des Gesichtsschädels, wie etwa Knochen, Zähne und Knorpel (Noden und Trainor 2005).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass neben der bekannten Interaktion mit Osteoklasten (Sato et al. 1991), Fibroblasten (Cozin et al. 2011) und Endothelzellen (Santini et al. 2003) auch Osteoblasten direkt von Bisphosphonaten beeinflusst werden. Diese Beeinflussung spiegelt sich in der divergenten Expression

der Regulationsfaktoren RANKL und OPG wider, die zu den wichtigsten Regulatoren der Knochenremodellierung gehören.

Ferner konnte gezeigt werden, dass dieser Einfluss sowohl eine Dosis- als auch eine Zeitabhängigkeit zeigt und Unterschiede in der Expression dieser Regulationsfaktoren zwischen Unterkiefer- und Beckenknochen im porcinen Zellkulturmodell bestehen.

5.1 Diskussion der untersuchten biochemischen Marker des Knochenstoffwechsels

In den in-vitro-Versuchen wurden die alkalische Phosphatase und das Osteokalzin als Nachweis der osteoblastären Differenzierung verwendet sowie OPG und RANKL zur Messung der osteoblastären Aktivität unter Bisphosphonatbelastung.

Osteokalzin wird häufig zur Charakterisierung der Zellen von in-vitro-Untersuchungen verwendet (Viereck et al. 2002), wobei der Grad der Osteokalzin-Synthese mit dem Differenzierungsgrad der Zellen zunimmt (Abbildung 3.2). Siggelkow et al. konnten 2004 zeigen, dass sich sowohl die alkalische Phosphatase als auch das Osteokalzin sehr gut für die Charakterisierung von Osteoblasten in unterschiedlichen Fragestellungen eignen. So verwendeten Siggelkow et al. (1999 b) das Osteokalzin, um die Osteoblastenentwicklung zwischen humanen Osteoblasten und Osteoblasten aus der Schädelkalotte von Ratten vergleichen zu können. Für den möglichen Nachweis des Osteokalzins wurden dem Zellkulturmedium osteogen wirksame Bestandteile zur vollständigen osteogenen Differenzierung zugesetzt. Solche osteoinduktiven Zusätze sind Dexamethason (Siggelkow et al. 2004), Ascorbinsäure-2-Phosphat (Siggelkow et al. 2004), β -Glycerophosphat (Jaiswal et al. 1997) und Vitamin D₃ (Cholecalciferol) (Siggelkow et al. 1999 a).

Des Weiteren gilt auch die alkalische Phosphatase als Marker für die osteoblastäre Differenzierung von in-vitro-Zellkulturen (Viereck et al. 2002). Interessanterweise synthetisieren Prä-Osteoblasten in-vitro erst größere Mengen der knochen-spezifischen alkalischen Phosphatase, wenn sie in der Zellkultur das Stadium der Konfluenz erreicht haben (Calvo et al. 1996), was auch in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden konnte, da vor dem Erreichen des Konfluenzstadiums kaum alkalische-Phosphatase-Aktivität gezeigt werden konnte. Dennoch gilt die alkalische Phosphatase nicht nur als Charakterisierungsmarker, sondern kann auch als Parameter für den Knochenumsatz verwendet werden, wobei erhöhte Werte der

alkalischen Phosphatase für einen vermehrten Knochenumsatz stehen (Lein et al. 2007, Reinholz et al. 2000). Weiterhin wird die Aktivität der alkalischen Phosphatase auch in spezielleren Fragestellungen evaluiert. So zeigten Shoji et al. im Jahr 2010 anhand der alkalischen-Phosphatase-Aktivität, welchen Einfluss Bisphosphonate auf mechanischen Stress im osteoporotischen Knochen haben können.

Weitere Parameter zur Charakterisierung von Osteoblasten sind Osteopontin, Prokollagen I und Osteonektin (Siggelkow et al. 1999 b).

Osteoblasten und Osteoblastenvorläuferzellen synthetisieren sowohl den osteoklastenaktivierenden Faktor RANKL als auch den osteoklasteninhibierenden Faktor OPG (Boyle et al. 2003).

Viele auf den Knochenstoffwechsel Einfluss nehmenden Erkrankungen und Medikamente können über den Einfluss auf die Expression von RANKL und OPG charakterisiert und untersucht werden.

Die molekularbiologische Analyse von OPG und RANKL aus porcinen Prä-Osteoblastenkulturen von Unterkiefer und Becken kann daher als Modell zur Einschätzung des Einflusses von Bisphosphonaten auf die Expression dieser Regulationsfaktoren dienen.

5.2 Bewertung des Tiermodells

Die in-vitro-Untersuchung stellt seit langem eine adäquate Methode dar, um die Beeinflussung pharmakologischer Substanzen auf Zellkulturen zu testen. Für die Erforschung der Knochenphysiologie hat sich die Kultivierung von Osteoblasten bewährt (Maniatopoulos et al. 1988).

Die Kultivierung der Prä-Osteoblasten wurde mit Hilfe der Explanttechnik durchgeführt, die als eine zuverlässige Methode zum Etablieren von Knochenzellen in Kultur beschrieben wurde (Jones und Boyde 1977). Da bisher die Technik der Isolierung als nicht einflussnehmend auf die Differenzierung gilt, wurde keine weitere Zellisolierungsmethode angewandt (Gerber und Gwynn 2001).

In Vorversuchen zu dieser Arbeit wurde ein geeignetes Medium zusammengestellt, da eine spezielle Nährlösung zur Züchtung von porcinen Prä-Osteoblasten bisher nicht kommerziell erhältlich ist. Es wurden die Kulturmedien DMEM mit 1 g/l D-Glukose und DMEM mit 4,5 g/l D-Glukose, die konventionell für Zellkulturmethoden verwendet werden, getestet. Dabei wurde festgestellt, dass das Medium mit der höheren

Glukosekonzentration besser geeignet ist als das schwächer konzentrierte, da hier nur wenig bzw. gar kein Zellwachstum beobachtet werden konnte. Beiden Nährlösungen wurden gewöhnliche, zur in-vitro-Kultivierung von Osteoblasten zu verwendende Zusätze wie Gentamycin, Amphotericin B und FKS hinzugefügt (Rattner et al. 1997). Das Wachstum dieser Prä-Osteoblasten konnte damit zwar gewährleistet werden, jedoch fehlten für die vollständige osteogene Differenzierung noch die schon erwähnten osteogen wirksamen Bestandteile im Kulturmedium.

In Anlehnung an Voruntersuchungen von Viereck et al. aus dem Jahr 2002 wurden die Konzentrationen des Bisphosphonats Zoledronat bewusst gewählt, denn die therapeutische Konzentration von Zoledronat im menschlichen Körper wird nach Herstellerangaben mit etwa 10^{-6} M angegeben.

Auf Grund eines vergleichbaren Stoffwechsels, vergleichbarer mastikatorischer Aktivität und der ähnlichen Physiologie wurde somit diese therapeutische Konzentration von Zoledronat auch auf das Hausschwein übertragen (Glowacki et al. 2004).

Der wesentliche Vorteil des Zellkulturmodells liegt in der Möglichkeit der genauen Applikation einer definierten Konzentration des Bisphosphonats auf eine bestimmte Zellpopulation von osteoblastären Zellen. Im kostenintensiveren Tiermodell hingegen lässt sich die therapeutische Konzentration des Bisphosphonats im Knochen nur abschätzen, da weder im Maus- noch im Hausschweinmodell bekannt ist, in welcher Konzentration Bisphosphonate tatsächlich den Knochen erreichen.

Die limitierende Größe des gewählten Zellkulturmodells ist jedoch die Beeinflussung von verschiedenen Zellarten untereinander. Die Wirkung von Bisphosphonaten auf Osteoblasten kann nur im Zusammenhang mit der schon bekannten Interaktion von Bisphosphonaten mit Osteoklasten (Sato et al. 1991), Endothelzellen (Santini et al. 2003) und Fibroblasten (Cozin et al. 2011) gesehen werden. Daher wird es in nachfolgenden Arbeiten nötig sein, diese Ergebnisse in ein geeignetes Tiermodell zu übertragen.

Hierbei wäre es beispielsweise möglich, die Knochenregulationsfaktoren OPG und RANKL aus Becken- und Unterkieferknochenaspiraten von Hausschweinen unter Bisphosphonatbelastung vergleichend zu untersuchen.

Weitere Modelle zur Erforschung von Bisphosphonateinflüssen auf den Knochenstoffwechsel sind unter anderem die szintigraphischen Untersuchungen des Unterkiefers unter Bisphosphonatbelastung, wie es Van den Wyngaert et al. 2010 an

Patienten mit soliden Tumoren gezeigt haben. Auch in-vivo-Untersuchungen mit unterschiedlichen Dosierungen von Bisphosphonaten am Mausmodell ergeben Einblicke in Veränderungen des Knochenstoffwechsels. Huja et al. konnten 2009 zeigen, dass Zoledronat die Knochenappositionsrate und die Mineralisation des schon gebildeten Osteoids inhibiert, jedoch ohne dabei Knochennekrosen auszulösen.

5.3 Reaktion von humanen und porcinen Unterkiefer- und Beckenosteoblasten auf eine Bisphosphonatbelastung

Für die Ätiologie Bisphosphonat-assoziiertes Kiefernekrosen werden verschiedene Theorien diskutiert. Der Hauptmechanismus der antiresorptiven Eigenschaften der Bisphosphonate besteht in einer verminderten Rekrutierung der Osteoklasten bis hin zu deren Apoptose und daraus folgend in einer Veränderung der Knochenremodellierung (Hughes et al. 1995, Parfitt et al. 1996).

Die statistische Auswertung der Knochenentnahmeregionen hat ergeben, dass die Genexpression von OPG im Becken und im Unterkiefer unterschiedlich verläuft, wohingegen für RANKL kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden konnte.

So zeigt sich für OPG, dass die Expression im Beckenknochen sowohl unter einer niedrigen Bisphosphonatbelastung von 10^{-8} M als auch ohne den Einsatz von Bisphosphonaten auf einem signifikant höheren Niveau verläuft als im Unterkiefer. Dieser Unterschied kann jedoch bei hohen Bisphosphonatkonzentrationen von 10^{-6} M nicht mehr getestet werden, da sich hier die Expression von OPG im Becken und Unterkiefer tendenziell annähert. Somit wird deutlich, dass sich die Wirkung von Bisphosphonaten auf die Expression von OPG mit zunehmender Höhe der Konzentration verändert.

Schon Stefanik et al. haben 2008 humane Knochenmarkstromazellen aus Unterkiefer und Becken von sechs verschiedenen Probanden in vitro mit dem Bisphosphonat Pamidronat inkubiert. Dabei konnte ebenfalls festgestellt werden, dass Pamidronat die osteogenen Eigenschaften von Mandibula und Becken unterschiedlich beeinflusst. Obwohl der Unterkieferknochen nach Pamidronatgabe weniger osteogene Differenzierung als der Beckenkamm zeigt und mehr Zellen absterben, erholt sich dieser in der Kontrollgruppe ohne Bisphosphonatbelastung schneller als der Beckenkamm. Dies könnte mit dem strukturell erhöhten Grundumsatz der

Kieferknochen in Zusammenhang stehen, der durch viel Kaubewegung und durch hohe Kaukräfte ständig Mikrofrakturen durch eine hohe Remodellierungsrate kompensieren muss (Sarin et al. 2008).

Dennoch ist weiterhin nicht geklärt, weshalb Knochenproben aus unterschiedlichen Regionen divergent auf eine Bisphosphonatbelastung reagieren.

In der hier vorgestellten Studie wurde für die Untersuchung des Einflusses von Bisphosphonaten auf den Knochenstoffwechsel von Unterkiefer- und Beckenknochen die Expression von OPG und RANKL über einen definierten Zeitraum unter Bisphosphonatbelastung bestimmt.

Dabei konnte festgestellt werden, dass die Expression von OPG sowohl im Becken als auch im Unterkiefer konzentrationsabhängig unter dem Einfluss von Zoledronat anders verläuft. Die höchste Konzentrationsstufe von 10^{-4} M zeigt im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Bisphosphonate eine signifikante Herunterregulierung von OPG ($p = 0,0003$), wohingegen der paarweise Vergleich mit den Konzentrationen 10^{-6} M und 10^{-8} M eine tendenzielle Hochregulierung des Gens erkennen lässt.

Die direkte Stimulierung der Osteoprotegerinsekretion der Osteoblasten wurde auch schon durch Viereck et al. 2002 und durch Plotkin et al. 1999 evaluiert.

Gegensätzlich dazu verhält sich die Expression von RANKL, das ebenfalls von den Osteoblasten gebildet wird.

Die Expression von RANKL verbleibt durch den Bisphosphonateinsatz über den Zeitraum der zehn Kulturtage nahezu auf einem Level. Dieses Ergebnis beschreibt eine unterschiedliche Regulation von OPG und RANKL durch Bisphosphonate. Wie von Hofbauer et al. 2000 beschrieben wurde, entscheidet das quantitative Verhältnis von Osteoprotegerin zu RANKL darüber, ob eher die knochenaufbauende Funktion des Osteoblasten oder die knochenabbauende Funktion des Osteoklasten überwiegt.

Laut Herstellerangaben wird die höchste Plasmakonzentration des Zoledronats im Menschen auf etwa 10^{-6} M angegeben, wenngleich nicht bekannt ist, welche Menge an Bisphosphonaten tatsächlich im Knochen gespeichert wird.

Die Pamidronatkonzentration im Sternum des Beagles beträgt nach zwei Jahren durchschnittlich 537 ng/mg Knochen, was in etwa 1×10^{-9} mol/mg Knochen entspricht (King et al. 1997). Die maximale Plasmakonzentration des Pamidronats wird ebenso wie für das Zoledronat mit etwa 10^{-6} M angegeben.

In Anbetracht der oben genannten Angaben ist die höchste Konzentration des Zoledronats von 10^{-4} M zwar für den Versuch sehr interessant, jedoch wird sie mit hoher Wahrscheinlichkeit im Körper nicht erreicht.

Anhand des Proliferationsversuchs konnte festgestellt werden, dass die höchste Konzentration des Zoledronats von 10^{-4} M einen zytotoxischen Effekt auf porcine Prä-Osteoblasten zeigt. Die Kontrollgruppe ohne Bisphosphonate sowie niedrige Konzentrationen von 10^{-6} M und 10^{-8} M hingegen zeigen über den Zeitraum der zehn Kulturtage ein tendenziell positives Proliferationsverhalten. Somit wird deutlich, dass die Osteoblastenvorläuferzellen des Beckens und des Unterkiefers im Hinblick auf ihr Proliferationsverhalten stark konzentrationsabhängig reagieren.

Wichtig erscheint in diesem Zusammenhang, dass die Zellproliferation aber auch unter einer Bisphosphonatbelastung weiter möglich ist.

Auch Orriss et al. konnten 2009 zeigen, dass Bisphosphonate einen direkten Einfluss auf die Osteoblasten aus der Schädelkalotte von Ratten haben. So zeigte Zoledronat schon bei Konzentrationen von 10^{-6} M einen zytotoxischen Effekt auf die Rattenosteoblasten und bewirkte eine verminderte Proliferationsrate der Zellen bei Konzentrationen ab 10^{-8} M. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass ab Konzentrationen von mehr als 10^{-8} M auch die Aktivität der alkalischen Phosphatase und bei mehr als 10^{-6} M auch die Kollagenproduktion abnimmt (Orriss et al. 2009).

Dennoch bestehen auch weiterhin widersprüchliche Ansichten über den direkten Effekt der Bisphosphonate auf Osteoblasten. So konnten Reinholz et al. 2000 zwar zeigen, dass fetale humane Osteoblasten auch in ihrer Proliferation durch Bisphosphonate wie Pamidronat gehemmt werden, jedoch die Zelldifferenzierung in der Weise eher positiv beeinflusst wurde, dass eine geregelte Differenzierung von Osteoblastenvorläuferzellen zu reifen Osteoblasten stattfinden konnte. Des Weiteren stieg die Aktivität der alkalischen Phosphatase und des durch die Osteoblasten gebildeten Kollagens I an.

Die Genexpressionsanalyse für OPG ergab keine signifikante Wechselwirkung zwischen Entnahmeort der Knochenproben und dem zeitlichen Verlauf, sodass hier ein homogener Effekt erkannt werden kann. Beim Vergleich der Expression der einzelnen Versuchstage untereinander zeigt sich ein signifikanter Unterschied im Vergleich zum Ausgangstag 0 nach 1, 4, 7 und 10 Tagen für OPG und nach 4, 7 und 10 Tagen für RANKL.

Die Varianzanalyse der Entnahmeregion der Knochenproben ergibt, dass die Expression von OPG in den Zellkulturen des Beckens auf einem signifikant höheren Niveau verläuft als in den Zellkulturen des Unterkiefers ($p < 0,01$). Um eine unterschiedliche Beeinflussung der Expression von OPG in Abhängigkeit von Entnahmeort und Konzentration zu evaluieren, wurde eine Subgruppenanalyse für OPG durchgeführt.

Auch diese erweiterte Analyse der Genexpressionsdaten zeigt, dass die Expression im Becken bei den Konzentrationsstufen 0 M ($p = 0,04$) und 10^{-8} M ($p < 0,01$) auf einem signifikant höheren Niveau liegt als im Unterkiefer.

Bei hohen Bisphosphonatkonzentrationen von 10^{-6} M lässt sich dieser Unterschied jedoch nicht mehr nachweisen, da sich hier die Expression von OPG im Becken und Unterkiefer tendenziell annähert. Diese Änderung der Expression deutet darauf hin, dass sich die Wirkung des Bisphosphonats auf den Knochen mit zunehmender Höhe der Konzentration verändert.

Die Annäherung der Expressionsdaten von OPG in Becken- und Unterkieferknochen bei dieser therapeutisch erreichten Bisphosphonatkonzentration könnte demnach ein entscheidender Hinweis auf die Ätiologie der Bisphosphonat-assoziierten Kiefernekrose sein.

Die Datenlage für den intraindividuellen Vergleich des Einflusses von Bisphosphonaten auf den Knochenstoffwechsel verschiedener Entnahmeregionen ist noch sehr spärlich. Stefanik et al. haben 2008 herausgefunden, dass Bisphosphonate in der Weise unterschiedlich auf den Knochenumsatz des Unterkiefers und des Beckens reagieren, dass die humanen Knochenmarkstromazellen des Unterkiefers stärker beeinflusst werden als die des Beckens.

Dennoch spielen möglicherweise auch Ko-Morbiditäten, Nebenwirkungen von Medikamenten, Chemotherapie und auch Mikrotraumata der Mundschleimhaut und des Zahnhalteapparates eine Rolle in der Entstehung von Bisphosphonat-assoziierten Kiefernekrosen (Migliorati et al. 2006, Woo et al. 2006).

Im Hinblick auf die Fragestellung konnte gezeigt werden, dass die Zellproliferation unter einer Bisphosphonatbelastung weiter möglich ist, dass die Genexpression unter einer Bisphosphonatbelastung konzentrationsabhängig ist und dass die Expression von OPG sowohl in der Kontrollgruppe als auch bei niedrigen Bisphosphonatkonzentrationen im Unterkiefer und Becken divergent verläuft. Im Unterschied dazu nähern sich die Expressionswerte für OPG bei der therapeutisch erreichten

Konzentration von 10^{-6} M an, was auf eine veränderte Wirkung des Bisphosphonats bei hohen Konzentrationen hindeutet.

OPG wird daher bei der therapeutischen Konzentration von 10^{-6} M in den Zellen des Unterkieferknochens während der Versuchsdauer von 10 Tagen vermehrt exprimiert und könnte somit zu einer Verminderung der Resorptions- und Remodellierungsaktivität führen. Im Vergleich dazu reagieren die Zellen des Beckens innerhalb der Versuchsdauer mit einer geringeren Steigerung der OPG-Expression.

6. Zusammenfassung

Bisphosphonate stellen bei der Behandlung von Knochenmetastasen bei ossär metastasierenden malignen Erkrankungen sowie bei der Osteoporose eine wichtige Behandlungsmaßnahme dar. Im Zusammenhang mit dieser Therapie wird seit 2003 das Auftreten einer Bisphosphonat-assoziierten Knochennekrose der Kiefer beobachtet. Auffallenderweise treten diese Nekrosen nur im Kieferbereich und nicht im übrigen Skelettsystem auf.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde die Auswirkung des höchst potenten Bisphosphonats Zoledronat in verschiedenen Dosierungen auf Zellkulturen aus porcinen Prä-Osteoblasten des Beckens und Unterkieferknochens evaluiert. Dabei wurden dosisabhängig die Proliferationsraten der Zellkulturen sowie die Expression von OPG und RANKL auf molekularbiologischer Ebene untersucht.

Nach eigenen Vorversuchen wurden osteoblastäre Zellen aus Knochenproben des Unterkiefers und des Beckens von fünf Hausschweinen im Monolayer kultiviert und immunhistochemisch charakterisiert.

Anschließend erfolgte die Kultivierung der Zellen in Kulturmedien mit einem Zusatz von Zoledronat in den Konzentrationen 10^{-4} M, 10^{-6} M und 10^{-8} M und einer Kontrolle ohne Bisphosphonatbelastung. Zu den Zeiten nach 0, 1, 4, 7 und 10 Tagen wurden jeweils die Zellzahlen bestimmt. Bei allen Zellkulturgruppen wurde nach den eben erwähnten Zeitpunkten die Expression der Knochenregulationsfaktoren OPG und RANKL auf molekularbiologischer Ebene durch eine quantitative real-time-PCR-Analyse evaluiert.

Die statistische Auswertung hat ergeben, dass die Expression von OPG sowohl im Becken als auch im Unterkiefer konzentrationsabhängig unter dem Einfluss von Zoledronat unterschiedlich verläuft. Die höchste Konzentrationsstufe von 10^{-4} M zeigt im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Bisphosphonate eine signifikante Herunterregulierung von OPG ($p = 0,0003$), wohingegen der paarweise Vergleich mit den Konzentrationen 10^{-6} M und 10^{-8} M eine tendenzielle Hochregulierung des Gens erkennen lässt.

Der Proliferationsversuch ergibt bei 10^{-4} M eine Verringerung der Ausgangszellzahl. Niedrige Konzentrationen von 10^{-6} M und 10^{-8} M hingegen zeigen entsprechend der Kontrollgruppe über den Zeitraum der 10 Kulturstage ein tendenziell positives Proliferationsverhalten.

Eine Analyse zur Evaluierung einer Abhängigkeit der Genexpressionsdaten von Entnahmeort und Konzentration zeigt, dass die Expression im Becken bei den Konzentrationsstufen 0 M ($p = 0,04$) und 10^{-8} M ($p < 0,01$) auf einem signifikant höheren Niveau liegt als im Unterkiefer.

Bei hohen Bisphosphonatkonzentrationen von 10^{-6} M lässt sich dieser Unterschied jedoch nicht mehr nachweisen, da sich hier die Expression von OPG im Becken und Unterkiefer tendenziell annähert. Diese Änderung der Expression deutet darauf hin, dass sich die Wirkung des Bisphosphonats auf den Knochen mit zunehmender Höhe der Konzentration verändert.

Die Annäherung der Expression von OPG in Becken- und Unterkieferknochen und die damit divergent zur Kontrolle verlaufende Expression könnte somit bei dieser therapeutisch erreichten Bisphosphonatkonzentration ein entscheidender Hinweis auf die Ätiologie der Bisphosphonat-assoziierten Kiefernekrose sein.

Basierend auf diesen Ergebnissen ist geplant, die Studie auf ein in-vivo-Tiermodell zu übertragen und den Versuchszeitraum auf mehrere Monate auszudehnen.

7. Anhang

7.1 Tabellen

Kulturtage	0	1	4	7	10
Becken 0 M					
Gemittelte Zellzahlen	90529	99639	334540	355683	557580
Standardabweichung	6532	9500	67420	116518	180552
Unterkiefer 0 M					
Gemittelte Zellzahlen	85282	101676	334740	385700	535900
Standardabweichung	20152	28916	77047	66648	110441
Kulturtage	0	1	4	7	10
Becken 10⁻⁴ M					
Gemittelte Zellzahlen	75249	99076	11347	10017	13790
Standardabweichung	13013	26299	5324	6237	7993
Unterkiefer 10⁻⁴ M					
Gemittelte Zellzahlen	73456	77776	9907	5690	14805
Standardabweichung	19753	20400	1871	3910	9828
Kulturtage	0	1	4	7	10
Becken 10⁻⁶ M					
Gemittelte Zellzahlen	71922	99399	290044	291150	362930
Standardabweichung	11726	42187	52647	88491	52517
Unterkiefer 10⁻⁶ M					
Gemittelte Zellzahlen	55146	90134	269200	299380	401000
Standardabweichung	16945	24928	68981	68997	60414
Kulturtage	0	1	4	7	10
Becken 10⁻⁸ M					
Gemittelte Zellzahlen	79634	100929	321120	359450	382480
Standardabweichung	11053	20335	86927	65709	89449
Unterkiefer 10⁻⁸ M					
Gemittelte Zellzahlen	72981	86352	275300	347310	395450
Standardabweichung	10298	23376	67055	31050	31121

Tabelle 7.1.1: Gemittelte Proliferationsraten Zometa® Hauptversuch

Kulturtage	0	1	4	7	10
Becken 0 M					
Gemittelte Zellzahlen	100000	82631	132483	166350	191112
Standardabweichung	0	15397	4350	39639	41104
Unterkiefer 0 M					
Gemittelte Zellzahlen	100000	83896	124083	148383	174633
Standardabweichung	0	28043	2050	19115	2687
Kulturtage	0	1	4	7	10
Becken 10⁻⁴ M					
Gemittelte Zellzahlen	100000	77216	84141	54638	37507
Standardabweichung	0	9595	10389	29616	27959
Unterkiefer 10⁻⁴ M					
Gemittelte Zellzahlen	100000	85528	81046	53555	34558
Standardabweichung	0	2807	2498	2397	968

Kulturtage	0	1	4	7	10
Becken 10⁻⁶ M					
Gemittelte Zellzahlen	100000	88252	120091	160216	173233
Standardabweichung	0	7524	10084	33298	36504
Unterkiefer 10⁻⁶ M					
Gemittelte Zellzahlen	100000	88420	131583	147716	161016
Standardabweichung	0	6401	1673	1154	13694
Kulturtage	0	1	4	7	10
Becken 10⁻⁸ M					
Gemittelte Zellzahlen	100000	104402	115450	157350	180266
Standardabweichung	0	6031	6239	24493	30882
Unterkiefer 10⁻⁸ M					
Gemittelte Zellzahlen	100000	95918	123283	145733	171633
Standardabweichung	0	8704	9923	2027	1791
Kulturtage	0	1	4	7	10
Becken 10⁻¹⁰ M					
Gemittelte Zellzahlen	100000	109687	114834	162691	187883
Standardabweichung	0	12161	13719	43848	43371
Unterkiefer 10⁻¹⁰ M					
Gemittelte Zellzahlen	100000	93731	111781	141216	178816
Standardabweichung	0	1982	14498	2474	10064

Tabelle 7.1.2: Gemittelte Proliferationsraten Zometa® Vorversuch

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1:	Schematische Darstellung eines knochenresorbierenden Osteoklasten.....	10
Abbildung 1.2:	Schema der Osteoklastendifferenzierung und –aktivierung durch M-CSF und RANKL.....	13
Abbildung 1.3:	Die drei Generationen der Bisphosphonate.....	16
Abbildung 1.4:	Zelluläre und biochemische Wirkmechanismen stickstoffhaltiger Bisphosphonate.....	18
Abbildung 3.1:	Präparation der Unterkiefer- und Beckenknochen des Hausschweins.....	29
Abbildung 3.2:	Differenzierungsstadien der Osteoblastenentwicklung.....	32
Abbildung 4.1:	Zellen wachsen aus Knochenproben aus.....	42
Abbildung 4.2:	Proliferationsrate Vorversuch Becken.....	43
Abbildung 4.3:	Proliferationsrate Vorversuch Unterkiefer.....	43
Abbildung 4.4:	Proliferationsrate Hauptversuch Becken Schwein 3-7.....	45
Abbildung 4.5:	Proliferationsrate Hauptversuch Unterkiefer Schwein 3-7.....	45
Abbildung 4.6:	Beckenzellen AP-positiv.....	47
Abbildung 4.7:	Unterkieferzellen AP-positiv.....	47
Abbildung 4.8:	Beckenzellen Von-Kossa-positiv.....	48
Abbildung 4.9:	Unterkieferzellen Von-Kossa-positiv.....	48
Abbildung 4.10:	Osteokalzinnachweis in der Agarose-Gelelektrophorese (210 bp).....	49
Abbildung 4.11:	Expressionsanalyse OPG Unterkiefer Vorversuch.....	50
Abbildung 4.12:	Expressionsanalyse OPG Becken Vorversuch.....	51
Abbildung 4.13:	Expressionsanalyse OPG-Mittelwert.....	52
Abbildung 4.14:	Expressionsanalyse RANKL Unterkiefer Vorversuch.....	53
Abbildung 4.15:	Expressionsanalyse RANKL Becken Vorversuch.....	53
Abbildung 4.16:	Expressionsanalyse RANKL-Mittelwert.....	54
Abbildung 4.17:	Genexpression von OPG in Abhängigkeit vom Knochenentnahmeort... ..	55
Abbildung 4.18:	Genexpression von OPG und RANKL in Abhängigkeit von der Kulturdauer.....	56

Abbildung 4.19: Genexpression von OPG in Abhängigkeit
von der Konzentration..... 57

Abbildung 4.20 a und b:
Genexpression von OPG (0 M und 10^{-8} M) in Unterkiefer
und Becken im zeitlichen Verlauf 60

Abbildung 4.20 c:
Genexpression von OPG (10^{-6} M) in Unterkiefer
und Becken im zeitlichen Verlauf 60

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1: Geräte.....	24
Tabelle 3.2: Verbrauchsmaterialien/Einmalartikel.....	25
Tabelle 3.3: Feinchemikalien.....	25
Tabelle 3.4: Enzyme.....	26
Tabelle 3.5: Molekulargewichtsmarker.....	26
Tabelle 3.6: Primer.....	26
Tabelle 4.1: Vergleich der Expressionslevel von OPG und RANKL in Abhängigkeit vom Entnahmeort der Knochenproben.....	55
Tabelle 4.2: Vergleich der einzelnen Versuchstage mit dem mit dem Startpunkt der Versuchsreihe an Tag 0 für OPG und RANKL.....	56
Tabelle 4.3: Vergleich der Expressionslevel von OPG und RANKL in Abhängigkeit von der Konzentration.....	57
Tabelle 4.4: Vergleich der Expressionslevel von der Kontrollgruppe ohne Bisphosphonate mit den gewählten Bisphosphonatkonzentrationen.....	58
Tabelle 4.5: Subgruppenanalyse der einzelnen Konzentrationen in Abhängigkeit von Tag, Entnahmeregion und Interaktion von Tag x Region für OPG.....	59
Tabelle 7.1.1: Gemittelte Proliferationsraten Zometa® Hauptversuch.....	72
Tabelle 7.1.2: Gemittelte Proliferationsraten Zometa® Vorversuch.....	73

7.4 Abkürzungsverzeichnis

AgNO ₃	Silbernitrat
ALP	alkalische Phosphatase
Aqua dest.	destilliertes Wasser (aqua destillata)
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BMU	Basic Multicellular Unit
BP-ONJ	Bisphosphonat associated osteonecrosis of the jaw
cDNA	complementary Desoxyribonukleinsäure
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FGF	Fibroblast Growth Factor
FKS	Fetales Kälberserum
GTP	Guanosintriphosphat
hMSC	humane mesenchymale Stromazellen
IGF	Insulin-like Growth Factor
Il-1, Il-6	Interleukin (1,6)
Kg	Kilogramm
M	Stoffmengenkonzentration (Molar)
M-CSF	Macrophage colony-stimulating factor
MMP-9	Matrix Metalloproteinase 9
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ CO ₃	Natriumcarbonat
OCIF	Osteoclastogenesis inhibitory factor
ODF	Osteoklasten-differenzierender Faktor
OPG	Osteoprotegerin
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	Platelet-derived Growth Factor
PTHrP	Parathyroid hormone-related protein

qPCR	quantitative real-time-Polymerase-Kettenreaktion
RANK	Receptor activator of nuclear factor κ B
RANKL	Receptor activator of nuclear factor κ B ligand
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
Taq	Thermophilus aquaticus
TBP	TATA-Box-binding-protein
TGF- β	Transforming Growth Factor β
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor α
TRANCE	TNF-related activation induced cytokine
TRAP	Tartrat-resistente saure Phosphatase
U/min	Umdrehungen pro Minute
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

8. Literaturverzeichnis

Aarden EM, Burger EH, Nijweide PJ (1994): Function of osteocytes in bone. *J Cell Biochem* 55(3), 287-299

Abu-Id MH, Açil Y, Gottschalk J, Kreusch T (2006): Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw. *Mund Kiefer GesichtsChir* 10(2), 73-81

Alexopoulou O, Jamart J, Devogelaer JP, Brichard S, de Nayer P, Buyschaert M (2006): Bone density and markers of bone remodeling in type 1 male diabetic patients. *Diabetes Metab* 32(5 Pt 1), 453-458

American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons (2007): American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. *J Oral Maxillofac Surg* 65(3), 369-376

American Dental Association Council on Scientific Affairs (2006): Dental management of patients receiving oral bisphosphonate therapy. Expert panel recommendations. *J Am Dent Assoc* 137(8), 1144-1150

Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL, Dougall WC, Tometsko ME, Roux ER, Teepe MC, DuBose RF, Cosman D, Galibert L (1997): A homologue to the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature* 390(6656), 175-179

Anh DJ, Dimai HP, Hall SL, Farley JR (1998): Skeletal alkaline phosphatase activity is primarily released from human osteoblasts in an insoluble form, and the net release is inhibited by calcium and skeletal growth factors. *Calcif Tissue Int* 62(4), 332-340

Arai F, Miyamoto T, Ohneda O, Inada T, Sudo T, Brasel K, Miyata T, Anderson DM, Suda T (1999): Commitment and differentiation of osteoclast precursor cells by the sequential expression of c-Fms and receptor activator of nuclear factor κ B (RANK) receptors. *J Exp Med* 190(12), 1741-1754

Aubin JE, Liu F: The osteoblast lineage; in: Principles of bone biology, 1 st edition, hrsg. v. Bilezikian J P, Raisz L G, Rodan G A, Academic Press, San Diego 1996, 51-67

Bamias A, Kastritis E, Bamia C, Moulopoulos LA, Melakopoulos I, Bozas G, Koutsoukou V, Gika D, Anagnostopoulos A, Papadimitriou C (2005): Osteonecrosis of the jaw in cancer after treatment with bisphosphonates: Incidence and risk factors. J Clin Oncol 23(34), 8580-8587

Bartl R, Frisch B: Das Bisphosphonat-Manual: Wirkungen – Indikationen – Strategien – Trends; Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin 2001, 27-49

Basha B, Sudhaker Rao D, Han ZH, Parfitt AM (2000): Osteomalacia due to vitamin D depletion: A neglected consequence of intestinal malabsorption. Am J Med 108(4), 296-300

Bassett CAL, Donath A, Macagno F, Preisig R, Fleisch H, Francis MD (1969): Diphosphonates in the treatment of myositis ossificans. Lancet 1969, 2, 845

Benford HL, McGowan NWA, Helfrich MH, Nuttall ME, Rogers MJ (2001): Visualization of bisphosphonate-induced Caspase-3 activity in apoptotic osteoclasts in vitro. Bone 28(5), 465-473

Blahos J (2007): Treatment and prevention of osteoporosis. Wien Med Wochenschr 157(23-24), 589-592

Boissier S, Ferreras M, Peyruchaud O, Magnetto S, Ebetino FH, Colombel M, Delmas P, Delaissé JM, Clézardin P (2000): Bisphosphonates inhibit breast and prostate carcinoma cell invasion, an early event in the formation of bone metastases. Cancer Res 60(11), 2949-2954

Boonyapakorn T, Schirmer I, Reichart PA, Sturm I, Massenkeil G (2008): Bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaws: Prospective study of 80 patients with multiple myeloma and other malignancies. Oral Oncol 44(9), 857-869

Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL (2003): Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 423(6937), 337-342

Brown DL, Robbins R (1999): Developments in the therapeutic applications of bisphosphonates. *J Clin Pharmacol* 39(7), 651-660

Bruder SP, Fink DJ, Caplan AI (1994): Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy. *J Cell Biochem* 56(3), 283-294

Burger EH, Van der Meer JWM, Nijweide PJ (1984): Osteoclast formation from mononuclear phagocytes: Role of bone-forming cells. *J Cell Biol* 99(6), 1901-1906

Calvo MS, Eyre DR, Gundberg CM (1996): Molecular basis and clinical application of biological markers of bone turnover. *Endocr Rev* 17(4), 333-368

Chambers TJ (1982): Osteoblasts release osteoclasts from calcitonin-induced quiescence. *J Cell Sci* 57, 247-260

Chavassieux PM, Arlot ME, Reda C, Wei L, Yates AJ, Meunier PJ (1997): Histomorphometric assessment of the long-term effects of alendronate on bone quality and remodeling in patients with osteoporosis. *J Clin Invest* 100(6), 1475-1480

Clines GA, Guise TA (2004): Mechanisms and treatment for bone metastases. *Clin Adv Hematol Oncol* 2(5), 295-302

Coleman RE (2006): Clinical features of metastatic bone disease and risk of skeletal morbidity. *Clin Cancer Res* 12(20 Pt 2), 6243s-6249s

Coleman RE (2008): Risks and benefits of bisphosphonates. *Br J Cancer* 89(11), 1736-1740

Cozin M, Pinker BM, Solemani K, Zuniga JM, Dadaian SC, Cremers S, Landesberg R, Raghavan S (2011): Novel therapy to reverse the cellular effects of bisphosphonates on primary human oral fibroblasts. *J Oral Maxillofac Surg* 69(10), 2564-2578

Dannemann C, Zwahlen R, Grätz KW (2006): Clinical experiences with bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaws. *Swiss Med Wkly* 136(31-32), 504-509

de Amorim FP, Ornelas SS, Diniz SF, Batista AC, da Silva TA (2008): Imbalance of RANK, RANKL and OPG expression during tibial fracture repair in diabetic rats. *J Mol Histo* 39(4), 401-408

Deckers MML, Van Bezooijen RL, Van der Horst G, Hoogendam J, Van der Bent C, Papapoulos SE, Löwik CWGM (2002): Bone morphogenetic proteins stimulate angiogenesis through osteoblast-derived vascular endothelial growth factor A. *Endocrinology* 143(4), 1545-1553

Delaney MF (2006): Strategies for the prevention and treatment of osteoporosis during early postmenopause. *Am J Obstet Gynecol* 194(2 Suppl), S12-S23

Desbois C, Hogue DA, Karsenty G (1994): The mouse osteocalcin gene cluster contains three genes with two separate spatial and temporal patterns of expression. *J Biol Chem* 269(2), 1183-1190

Dimopoulos MA, Moulopoulos LA, Maniatis A, Alexanian R (2000): Solitary plasmocytoma of bone and asymptomatic multiple myeloma. *Blood* 96(6), 2037-2044

Dobnig H, Hofbauer LC, Viereck V, Obermayer-Pietsch B, Fahrleitner-Pammer A (2006): Changes in the RANK ligand/osteoprotegerin system are correlated to changes in bone mineral density in bisphosphonate-treated osteoporotic patients. *Osteoporos Int* 17(5), 693-703

Dougall WC, Glaccum M, Charrier K, Rohrbach K, Brasel K, De Smedt T, Daro E, Smith J, Tometsko ME, Maliszewski CR (1999): RANK is essential for osteoclast and lymph node development. *Genes Dev* 13(18), 2412-2424

Ducy P, Desbois C, Boyce B, Pinero G, Story B, Dunstan C, Smith E, Bonadio J, Goldstein S, Gundberg C (1996): Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature* 382(6590), 448-452

Durie BGM, Katz M, Crowley J (2003): Osteonecrosis of the jaw and bisphosphonates. *N Engl J Med* 353(1), 99-102

Felsenberg D (2006): Osteonecrosis of the jaw – a potential adverse effect of bisphosphonate treatment. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2(12), 662-663

Fleisch H (1998): Bisphosphonates: Mechanisms of action. *Endocr Rev* 19(1), 80-100

Fleisch H: Bisphosphonates in bone disease: From the laboratory to the patient. 4. Auflage; Academic Press, San Diego 2000

Fleisch H (2002): Development of bisphosphonates. *Breast Cancer Res* 4(1), 30-34

Fleisch H, Russell RGG, Bisaz S, Casey PA, Mühlbauer RC (1968): The influence of pyrophosphate analogues (diphosphonates) on the precipitation and dissolution. *Calcif Tissue Res Suppl* 10-10a

Fleisch H, Russell RGG, Francis MD (1969): Diphosphonates inhibit hydroxyapatite dissolution in vitro and bone resorption in tissue culture and in vivo. *Science* 165(899), 1262-1264

Fournier P, Boissier S, Filleur S, Guglielmi J, Cabon F, Colombel M, Clézardin P (2002): Bisphosphonates inhibit angiogenesis in vitro and testosterone-stimulated vascular regrowth in the ventral prostate in castrated rats. *Cancer Res* 62(22), 6538-6544

Frith JC, Mönkkönen J, Blackburn GM, Russell RGG, Rogers MJ (1997): Clodronate and liposome-encapsulated clodronate are metabolized to a toxic ATP analog, Adenosine 5'-(β , γ -Dichloromethylene) triphosphate, by mammalian cells in vitro. *J Bone Miner Res* 12(9), 1358-1367

Gao YH, Shinki T, Yuasa T, Kataoka-Enomoto H, Komori T, Suda T, Yamaguchi A (1998): Potential role of Cbfa1, an essential transcriptional factor for osteoblast differentiation, in osteoclastogenesis: Regulation of mRNA expression of osteoclast differentiation factor (ODF). *Biochem Biophys Res Commun* 252(3), 697-702

Garnero P, Darte C, Delmas PD (1999): A model to monitor the efficacy of alendronate treatment in women with osteoporosis using a biochemical marker of bone turnover. *Bone* 24(6), 603-609

Gerber I, Gwynn I (2001): Influence of cell isolation, cell culture density, and cell nutrition on differentiation of rat calvarial osteoblast-like cells in vitro. *Eur Cell Mater* 24(2), 10-20

Gertz BJ, Holland SD, Kline WF, Matuszewski BK, Porras AG (1993): Clinical pharmacology of alendronate sodium. *Osteoporosis Int* 3(Suppl 3), S13-S16

Gevorgyan A, Enepekides DJ (2008): Bisphosphonate-induced necrosis of the jaws: A reconstructive nightmare. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 16(4), 325-330

Glorieux FH (2007): Experience with bisphosphonates in osteogenesis imperfecta. *Pediatrics* 119(Suppl 2), S163-S165

Glorieux FH, Bishop NJ, Plotkin H, Chabot G, Lanoue G, Travers R (1998): Cyclic administration of pamidronate in children with severe osteogenesis imperfecta. *N Engl J Med* 339(14), 947-952

Glorieux FH, Ward LM, Rauch F, Lalic L, Roughley PJ, Travers R (2002): Osteogenesis imperfecta type VI: A form of brittle bone disease with a mineralization defect. *J Bone Miner Res* 17(1), 30-38

Glowacki J, Shusterman EM, Troulis M, Holmes R, Perrott D, Kaban LB (2004): Distraction osteogenesis of the porcine mandible: histomorphometric evaluation of bone. *Plast Reconstr Surg* 113(2), 566-573

Glüer CC, Scholz-Ahrens KE, Helfenstein A, Delling G, Timm W, Acil Y, Barkmann R, Hassenpflug J, Stampa B, Bauss F (2007): Ibandronate treatment reverses glucocorticoid-induced loss of bone mineral density and strength in minipigs. *Bone* 40(3), 645-655

Gomez B Jr, Ardakani S, Ju J, Jenkins D, Cerelli MJ, Daniloff GY, Kung VT (1995): Monoclonal antibody assay for measuring bone-specific alkaline phosphatase activity in serum. *Clin Chem* 41(11), 1560-1566

Greiner S, Kadow-Romacker A, Lübberstedt M, Schmidmaier G, Wildemann B (2007): The effect of zoledronic acid incorporated in a poly (D,L-lactide) implant coating on osteoblasts in vitro. *J Biomed Mater Res A* 80(4), 769-775

Hakeda Y, Kobayashi Y, Yamaguchi K, Yasuda H, Tsuda E, Higashio K, Miyata T, Kumegawa M (1998): Osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) directly inhibits bone-resorbing activity of isolated mature osteoclasts. *Biochem Biophys Res Commun* 251(3), 796-801

Haslam SI, Van Hul W, Morales-Piga A, Balemans W, San-Millan JL, Nakatsuka K, Willems P, Haites NE, Ralston SH (1998): Paget's disease of bone: Evidence for a susceptibility locus on chromosome 18q and for genetic heterogeneity. *J Bone Miner Res* 13(6), 911-917

Hauschka PV, Lian JB, Cole DEC, Gundberg CM (1989): Osteocalcin and matrix Gla protein: Vitamin K-dependent proteins in bone. *Physiol Rev* 69(3), 990-1047

Haynes DR, Crotti TN, Loric M, Bain GI, Atkins GJ, Findlay DM (2001): Osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL) regulate osteoclast formation by cells in the human rheumatoid arthritic joint. *Rheumatology* 40(6), 623-630

Hemmerling C: Vergleichende Untersuchungen des Wachstums humaner Osteoblasten und humaner mesenchymaler Stammzellen (MSC's) auf β -Trikalziumphosphat nach Kultivierung im Brutschrank und in der Perfusionskammer. Zahnmedizinische Dissertation. Fachbereich Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie Freiburg 2007

Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Boyle WJ, Riggs BL (2000): The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. *J Bone Miner Res* 15(1), 2-12

Hsu H, Lacey DL, Dunstan CR, Solovyev I, Colombero A, Timms E, Tan HL, Elliott G, Kelley MJ, Sarosi I (1999): Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proc Natl Acad Sci USA* 96(7), 3540-3545

Hüfner M, Siggelkow H (2003): New data on the pathogenesis of steroid-induced osteoporosis: Consequences for therapy and prevention. *Dtsch Med Wochenschr* 128(30), 1602-1608

Hughes DE, Wright KR, Uy HL, Sasaki A, Yoneda T, Roodman GD, Mundy GR, Boyce BF (1995): Bisphosphonates promote apoptosis in murine osteoclasts in vitro and in vivo. *J Bone Miner Res* 10(10), 1478-1487

Huja SS, Fernandez SA, Phillips C, Li Y (2009): Zoledronic Acid decreases bone formation without causing osteocyte death in mice. *Arch Oral Biol* 54(9), 851-856

Ikeda T, Kasai M, Utsuyama M, Hirokawa K (2001): Determination of three isoforms of the receptor activator of nuclear factor κ B ligand and their differential expression in bone and thymus. *Endocrinology* 142(4), 1419-1426

Iwata K, Li J, Follet H, Phipps RJ, Burr DB (2006): Bisphosphonates suppress periosteal osteoblast activity independently of resorption in rat femur and tibia. *Bone* 39(5), 1053-1058

Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI, Bruder SP (1997): Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem* 64(2), 295-312

Jimi E, Nakamura I, Amano H, Taguchi Y, Tsurukai T, Tamura M, Takahashi N, Suda T (1996): Osteoclast Function is activated by osteoblastic cells through a mechanism involving cell-to-cell contact. *Endocrinology* 137(5), 2187-2190

Jones SJ, Boyde A (1977): The migration of osteoblasts. *Cell Tissue Res* 184(2), 179-193

Jung A, Bisaz S, Fleisch H (1973): The binding of pyrophosphate and two diphosphonates by hydroxyapatite crystals. *Calc Tiss Res* 11(4), 269-280

Jung TI, Hoffmann F, Glaeske G, Felsenberg D (2010): Disease-specific risk for an osteonecrosis of the jaw under bisphosphonate therapy. *J Cancer Res Clin Oncol* 136(3), 363-370

Karsenty E, Barillot E, Tosser-Klopp G, Lahbib-Mansais Y, Milan D, Hatey F, Cirera S, Sawera M, Jorgensen CB, Chowdhary B, Fredholm M (2003): The GENETPIG database: a tool for comparative mapping in pig (*Sus Scrofa*). *Nucleic Acids Res* 31(1), 138-141

Khosla S (2001): Minireview: The OPG/RANKL/RANK System. *Endocrinology* 142(12), 5050-5055

Khosla S, Burr D, Cauley J, Dempster D W, Ebeling PR, Felsenberg D, Gagel RF, Gilsanz V, Guise T, Koka S (2007): Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: Report of a task force of the American society for bone and mineral research. *J Bone Miner Res* 22(10), 1479-1491

Kim HJ (2010): New understanding of glucocorticoid action in bone cells. *BMB Rep* 43(8), 524-529

King LE, Grynblas MD, Tomlinson G, Vieth R (1997): Pamidronate Content and Turnover in Sternum, Vertebral Body, and Iliac Bones of Dogs. *Bone* 20(5), 405-411

Krauth MT, Fögl A, Gruber R (2008): Bisphosphonat-associated osteonecrosis of the jaw. *Wien Klin Wochenschr* 120(15-16), 467-476

Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S (1998): Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 93(2), 165-176

Lein M, Wirth M, Miller K, Eickenberg HU, Weissbach L, Schmidt K, Haus U, Stephan C, Meissner S, Loening SA (2007): Serial markers of bone turnover in men with metastatic prostate cancer treated with zoledronic Acid for detection of bone metastases progression. *Eur Urol* 52(5), 1381-1387

Li J, Sarosi I, Yan XQ, Morony S, Capparelli C, Tan HL, McCabe S, Elliott R, Scully S, Van G (2000): RANK is the intrinsic hematopoietic cell surface receptor that controls osteoclastogenesis and regulation of bone mass and calcium metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* 97(4), 1566-1571

Lin JH (1996): Bisphosphonates: A review of their pharmacokinetic properties. *Bone* 18(2), 75-85

Lin JH, Duggan DE, Chen IW, Ellsworth RL (1991): Physiological disposition of alendronate, a potent anti-osteolytic bisphosphonate, in laboratory animals. *Drug Metab Dispos* 19(5), 926-932

Lindsay R (1990): Fluoride and bone – quantity versus quality. *N Engl J Med* 322(12), 845-846

Lippuner K (2003): Medical treatment of vertebral osteoporosis. *Eur Spine J* 12(Suppl 2), S132-S141

Liu BY, Guo J, Lanske B, Divieti P, Kronenberg HM, Bringham FR (1998): Conditionally immortalized murine bone marrow stromal cells mediate parathyroid hormone-dependent osteoclastogenesis in vitro. *Endocrinology* 139(4), 1952-1964

Livak KJ, Schmittgen TD (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

Löwik CWGM, Van der Pluijm G, Van der Wee-Pals LJA, Bloys van Treslong-De Groot H, Bijvoet OLM (1988): Migration and phenotypic transformation of osteoclast precursors into mature osteoclasts: The effect of a bisphosphonate. *J Bone Miner Res* 3(2), 185-192

Mackay AM, Beck SC, Murphy JM, Barry FP, Chichester CO, Pittenger MF (1998): Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. *Tissue Eng* 4(4), 415-428

Magnetto S, Boissier S, Delmas PD, Clezardin P (1999): Additive antitumor activities of taxoids in combination with the bisphosphonate ibandronate against invasion and adhesion of human breast carcinoma cells to bone. *Int J Cancer* 83(2), 263-269

Malaval L, Modrowski D, Gupta AK, Aubin JE (1994): Cellular expression of bone-related proteins during in vitro osteogenesis in rat bone marrow stromal cell cultures. *J Cell Physiol* 158(3), 555-572

Maniatopoulos C, Sodek J, Melcher AH (1988): Bone formation in vitro by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats. *Cell Tissue Res* 254(2), 317-330

Marx RE (2003): Pamidronate (Aredia) and Zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: A growing epidemic. *J Oral Maxillofac Surg* 61(9), 1115-1118

Marx RE, Sawatari Y, Fortin M, Broumand V (2005): Bisphosphonate-induced bone (Osteonecrosis/Osteopetrosis) of the jaws: Risk factors, recognition, prevention, and treatment. *J Oral Maxillofac Surg* 63(11), 1567-1575

Marx RE, Cillo JE, Ulloa JJ (2007): Oral bisphosphonate-induced osteonecrosis: Risk factors, prediction of risk using serum CTX testing, prevention, and treatment. *J Oral Maxillofac Surg* 65(12), 2397-2410

Matsuzaki K, Katayama K, Takahashi Y, Nakamura I, Udagawa N, Tsurukai T, Nishinakamura R, Toyama Y, Yabe Y, Hori M (1999): Human osteoclast-like cells are formed from peripheral blood mononuclear cells in a coculture with SaOS-2 cells transfected with the parathyroid hormone (PTH)/PTH-related protein receptor gene. *Endocrinology* 140(2), 925-932

McSheehy PMJ, Chambers TJ (1986): Osteoblast-like cells in the presence of parathyroid hormone release soluble factor that stimulates osteoclastic bone resorption. *Endocrinology* 119(4), 1654-1659

Migliorati CA, Casiglia J, Epstein J, Jacobsen PL, Siegel MA, Woo SB (2005): Managing the care of patients with bisphosphonate-associated osteonecrosis: An American academy of oral medicine position paper. *J Am Dent Assoc* 136(12), 1658-1668

Migliorati CA, Siegel MA, Elting LS (2006): Bisphosphonate-associated osteonecrosis: a long-term complication of bisphosphonate treatment. *Lancet Oncol* 7(6), 508-514

Mundy GR (2002): Metastasis to bone: Causes, consequences and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer* 2(8), 584-593

Mundy GR (2007): Osteoporosis and inflammation. *Nutr Rev* 65(12 Pt 2), S147-S151

Murakami H, Takahashi N, Sasaki T, Udagawa N, Tanaka S, Nakamura I, Zhang D, Barbier A, Suda T (1995): A possible mechanism of the specific action of bisphosphonates on osteoclasts: Tiludronate preferentially affects polarized osteoclasts having ruffled borders. *Bone* 17(2), 137-144

Murphy E, Glüer CC, Reid DM, Felsenberg D, Roux Christian, Eastell R, Williams GR (2010): Thyroid function within the upper normal range is associated with reduced bone mineral density and increased risk of nonvertebral fractures in healthy euthyroid postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 95(7), 3173-3181

Nakagawa N, Kinosaki M, Yamaguchi K, Shima N, Yasuda H, Yano K, Morinaga T, Higashio K (1998): RANK is the essential signalling receptor for osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 253(2), 395-400

Nakashima T, Kobayashi Y, Yamasaki S, Kawakami A, Eguuchi K, Sasaki H, Sakai H (2000): Protein expression and functional difference of membrane-bound and soluble receptor activator of NF-kappaB ligand: modulation of the expression by osteotropic factors and cytokines. *Biochem Biophys Res Commun* 275(3), 768-775

Nijweide PJ, Burger EH, Feyen JHM (1986): Cells of bone: Proliferation, differentiation, and hormonal regulation. *Physiol Rev* 66(4), 855-886

Ninomiya JT, Tracy RP, Calore JD, Gendreau MA, Kelm RJ, Mann KG (1990): Heterogeneity of human bone. *J Bone Miner Res* 5(9), 933-938

Nishikawa M, Akatsu T, Katayama Y, Yasutomo Y, Kado S, Kugai N, Yamamoto M, Nagata N (1996): Bisphosphonates Act on Osteoblastic Cells and Inhibit Osteoclast Formation in Mouse Marrow Cultures. *Bone* 18(1), 9-14

Noden DM, Trainor PA (2005): Relations and interactions between cranial mesoderm and neural crest populations. *J Anat* 207(5), 575-601

Nygaard AB, Jorgensen CB, Cirera S, Fredholm M (2007): Selection of reference genes for gene expression studies in pig tissues using SYBR green qPCR. *BMC Mol Biol* 15, 8:67

Oka K, Oka S, Hosokawa R, Bringas P Jr, Brockhoff HC 2nd, Nonaka K, Chai Y (2008): TGF-beta mediated Dlx5 signaling plays a crucial role in osteochondroprogenitor cell lineage determination during mandible development. *Dev Biol* 321(2), 303-309

Orriss IR, Key ML, Colston KW, Arnett TR (2009): Inhibition of osteoblast function in vitro by aminobisphosphonates. *J Cell Biochem* 106(1), 109-118

Parfitt AM, Mundy GR, Roddman GD, Hughes DE, Boyce BF (1996): A new model for the regulation of bone resorption, with particular reference to the effects of bisphosphonates. *J Bone Miner Res* 11(2), 150-159

Pavlakakis N, Schmidt RL, Stockler MR (2008): Bisphosphonates for breast cancer. *Cochrane Database Syst Rev* 20(3), CD003474

Pelorgeas S, Martin JB, Satre M (1992): Cytotoxicity of dichloromethane diphosphonate and of 1-hydroxyethane-1,1-diphosphonate in the amoebae of the slime mould *Dictyostelium discoideum*. *Biochem Pharmacol* 44(11), 2157-2163

Peter B, Zambelli PY, Guicheux J, Pioletti DP (2005): The effect of bisphosphonates and titanium particles on osteoblasts. *J Bone Joint Surg Br* 87(8), 1157-1163

Pfaffl MW (2001): A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29(9), e45

Pfaffl MW (2004): Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *Biospektrum* 1, 92-95

Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L (2002): Relative expression software tool (REST[®]) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 30(9), e36

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR (1999): Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284(5411), 143-147

Plotkin LI, Weinstein RS, Parfitt AM, Roberson PK, Manolagas SC, Bellido T (1999): Prevention of osteocyte and osteoblast apoptosis by bisphosphonates and calcitonin. *J Clin Invest* 104(10), 1363-1374

Polizzotto MN, Cousins V, Schwarer AP (2006): Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the auditory canal. *Br J Haematol* 132(1), 114-117

Prallet B, Male P, Neff L, Baron R (1992): Identification of a functional mononuclear precursor of the osteoclast in chicken medullary bone marrow cultures. *J Bone Miner Res* 7(4), 405-414

Rasmussen R: Quantification on the LightCycler; in: Rapid cycle real-time PCR: methods and applications; hrsg. v. Meuer S, Wittwer C, Nakagawara KI; Springer Verlag, Berlin 2001, 21-34

Rattner A, Sabido O, Massoubre C, Rasclé F, Frey J (1997): Characterization of human osteoblastic cells: Influence of the culture conditions. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 33(10), 757-762

Reinholz GG, Getz B, Pederson L, Sanders ES, Subramaniam M, Ingle JN, Spelsberg TC (2000): Bisphosphonates directly regulate cell proliferation, differentiation, and gene expression in human osteoblasts. *Cancer Res* 60(21), 6001-6007

Rogers MJ, Ji X, Russell RGG, Blackburn GM, Williamson MP, Bayless AV, Ebetino FH, Watts DJ (1994): Incorporation of bisphosphonates into adenine nucleotides by amoebae of the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum*. *Biochem J* 303(Pt 1), 303-311

Rogers MJ, Frith JC, Luckman SP, Coxon FP, Benford HL, Mönkkönen J, Auriola S, Chilton KM, Russell RGG (1999): Molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Bone* 24(5 Suppl), 73S-79S

Rogers MJ, Gordon S, Benford HL, Coxon FP, Luckman SP, Monkkonen J, Frith JC (2000): Cellular and molecular mechanisms of action and bisphosphonates. *Cancer* 88(12 Suppl), 2961-2978

Ruggiero SL, Mehrotra B, Rosenberg TJ, Engroff SL (2004): Osteonecrosis of the jaws associated with the use of bisphosphonates: A review of 63 cases. *J Oral Maxillofac Surg* 62(5), 527-534

Russell RG (2007): Bisphosphonates: Mode of action and pharmacology. *Pediatrics* 119 (Suppl 2), S150-S162

Sabokbar A, Kudo O, Athanasou NA (2003): Two distinct cellular mechanisms of osteoclast formation and bone resorption in periprosthetic osteolysis. *J Orthop Res* 21(1), 73-80

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239(4839), 487-491

Sakuma Y, Tanaka K, Suda M, Yasoda A, Natsui K, Tanaka I, Ushikubi F, Narumiya S, Segi E, Sugimoto Y (2000): Crucial involvement of the EP4 subtype of prostaglandin E receptor in osteoclast formation by proinflammatory cytokines and lipopolysaccharide. *J Bone Miner Res* 15(2), 218-227

Santini D, Vincenzi B, Avvisati G, Dicuonzo G, Battistoni F, Gavasci M, Salerno A, Denaro V, Tonini G (2002): Pamidronate induces modifications of circulating angiogenetic factors in cancer patients. *Clin Cancer Res* 8(5), 1080-1084

Santini D, Vespasiani Gentilucci U, Vincenzi B, Picardi A, Vasaturo F, La Cesa A, Onori N, Scarpa S, Tonini G (2003): The antineoplastic role of bisphosphonates: from basic research to clinical evidence. *Ann Oncol* 14(10), 1468-1476

Sarin J, DeRossi SS, Akintoye SO (2008): Updates on bisphosphonates and potential pathobiology of bisphosphonate-induced jaw osteonecrosis. *Oral Dis* 14(3), 277-285

Sato M, Grasser W, Endo N, Akins R, Simmons H, Thompson DD, Golub E, Rodan GA (1991): Bisphosphonate action. Alendronate localization in rat bone and effects on osteoclast ultrastructure. *J Clin Invest* 88(6), 2095-2105

Schenk R, Egli P, Fleisch H, Rosini S (1986): Quantitative morphometric evaluation of the inhibitory activity of new aminobisphosphonates on bone resorption in the rat. *Calcif Tissue Int* 36(6), 342-349

Schindeler A, Little DG (2005): Osteoclasts but not osteoblasts are affected by a calcified surface treated with zoledronic acid in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 338(2), 710-716

Shinoda H, Adamek G, Felix R, Fleisch H, Schenk R, Hagan P (1983): Structure-activity relationships of various bisphosphonates. *Calcif Tissue Int* 35(1), 87-99

Shoji S, Tabuchi M, Miyazawa K, Yabumoto T, Tanaka M, Kadota M, Maeda H, Goto S (2010): Bisphosphonate inhibits bone turnover in OPG (-/-) mice via a depressive effect on both osteoclasts and osteoblasts. *Calcif Tissue Int* 87(2), 181-192

Sibai T, Morgan EF, Einhorn TA (2010): Anabolic Agents and bone quality. *Clin Orthop Relat Res* 469(8), 2215-2224

Siggelkow H, Schulz H, Kaesler S, Benzler K, Atkinson MJ, Hüfner M (1999 a): 1,25 Dihydroxyvitamin-D₃ Attenuates the Confluence-Dependent Differences in the Osteoblast Characteristic Proteins Alkaline Phosphatase, Procollagen I Peptide, and Osteocalcin. *Calcif Tissue Int* 64(5), 414-421

Siggelkow H, Rebenstorff K, Kurre W, Niedhart C, Engel I, Schulz H, Atkinson MJ, Hüfner M (1999 b): Development of the osteoblast phenotype in primary human osteoblasts in culture: Comparison with rat calvarial cells in osteoblast differentiation. *J Cell Biochem* 75(1), 22-35

Siggelkow H, Schmidt E, Hennies B, Hüfner M (2004): Evidence of downregulation of matrix extracellular phosphoglycoprotein during terminal differentiation in human osteoblasts. *Bone* 35(2), 570-576

Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Lüthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T (1997): Osteoprotegerin: A novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 89(2), 309-319

Sitges-Serra A, Garcia L, Prieto R, Pena MJ, Nogues X, Sancho JJ (2010): Effect of parathyroidectomy for primary hyperparathyroidism on bone mineral density in postmenopausal women. *Br J Surg* 97(7), 1013-1019

Smith R, Russell RGG, Bishop M (1971): Diphosphonates and Paget's disease of bone. *Lancet* 1971, 1, 945-947

Stefanik D, Sarin J, Lam T, Levin L, Leboy PS, Akintoye SO (2008): Disparate osteogenic response of mandible and iliac crest bone marrow stromal cells to pamidronate. *Oral Dis* 14(5), 465-471

Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT, John Martin T (1999): Modulation of osteoclast differentiation and function by the members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev* 20(3), 345-357

Takahashi N, Akatsu T, Udagawa N, Sasaki T, Yamaguchi A, Moseley JM, Martin TJ, Suda T (1988): Osteoblastic cells are involved in osteoclast formation. *Endocrinology* 123(5), 2600-2602

Takahashi N, Udagawa N, Takami M, Suda T: Cells of bone: Osteoclast generation; in: Principles of bone biology, Volume 1, 2. edition, hrsg. v. Bilezikian J P, Raisz L G, Martin T J, Academic Press, San Diego 2002, 109-126

Takata S, Yasui N (2001): Disuse osteoporosis. J Med Invest 48(3-4), 147-156

Takeda S, Yoshizawa T, Nagai Y, Yamato H, Fukumoto S, Sekine K, Kato S, Matsumoto T, Fujita T (1999): Stimulation of osteoclast formation by 1,25-dihydroxyvitamin D requires its binding to vitamin D receptor (VDR) in osteoblastic cells: Studies using VDR Knockout mice. Endocrinology 140(2), 1005-1008

Tarassoff P, Csermak K (2003): Avascular necrosis of the jaws: Risk factors in metastatic cancer patients. J Oral Maxillofac Surg 61(10), 1238-1239

Tobias JH, Chow JMW, Chambers TJ (1993): 3-Amino-1-Hydroxypropylidene-1-Bisphosphonate (AHPBP) suppresses not only the induction of new, but also the persistence of existing bone-forming surfaces in rat cancellous bone. Bone 14(4), 619-623

Tsuda E, Goto M, Mochizuki SI, Yano K, Kobayashi F, Morinaga T, Higashio K (1997): Isolation of a novel cytokine from human fibroblasts that specifically inhibits osteoclastogenesis. Biochem Biophys Res Commun 234(1), 137-142

Väänänen K, Zhao H: Osteoclast function; in: Principles of bone biology, Volume 1, 2. edition, hrsg. v. Bilezikian J P, Raisz L G, Martin T J, Academic Press, San Diego 2002, 127-139

Van den Wyngaert T, Huizing MT, Fossion E, Vermorcken JB (2010): Scintigraphic evaluation of mandibular bone turnover in patients with solid tumors receiving zoledronic acid. Oral Oncol 46(3), 214-218

Viereck V, Emons G, Lauck V, Frosch KH, Blaschke S, Gründker C, Hofbauer LC (2002): Bisphosphonates Pamidronate and Zoledronic acid stimulate osteoprotegerin production by primary human osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 291(3), 680-686

Vitté C, Fleisch H, Guenther HL (1996): Bisphosphonates induce osteoblasts to secrete an inhibitor of osteoclast-mediated resorption. *Endocrinology* 137(6), 2324-2333

von Knoch F, Jaquiere C, Kowalsky M, Schaeren S, Alabre C, Martin I, Rubash HE, Shanbhag AS (2005): Effects of bisphosphonates on proliferation and osteoblast differentiation of human bone marrow stromal cells. *Biomaterials* 26(34), 6941-6949

Walter C, Grötz KA, Kunkel M, Al-Nawas B (2007): Prevalence of bisphosphonate associated osteonecrosis of the jaw within the field of osteonecrosis. *Support Care Cancer* 15(2), 197-202

Wang J, Goodger NM, Pogrel MA (2003): Osteonecrosis of the jaws associated with cancer chemotherapy. *J Oral Maxillofac Surg* 61(9), 1104-1107

Woo SB, Hellstein JW, Kalmar JR (2006): Narrative [corrected] review: bisphosphonates and osteonecrosis of the jaws. *Ann Intern Med* 144(10), 753-761

Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Mochizuki SI, Yano K, Fujise N, Sato Y, Goto M, Yamaguchi K, Kuriyama M (1998a): Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): A mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro. *Endocrinology* 139(3), 1329-1337

Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki SI, Tomoyasu A, Yano K, Goto M, Murakami A (1998b): Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(7), 3597-3602

Yuen KK, Shelley M, Sze WM, Wilt TJ, Mason M (2010): Bisphosphonates for advanced prostate cancer. Cochrane Database Syst Rev 18(4), CD006250

Zhang D, Yang YQ, Li XT, Fu MK (2004): The expression of osteoprotegerin and the receptor activator of nuclear factor kappa B ligand in human periodontal ligament cells cultured with and without $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D₃. Arch Oral Biol 49(1), 71-76

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Dr. med. dent. R.M. Gruber, für die wissenschaftliche Idee und die umfassende und engagierte Betreuung. Er war stets bereit, sich mit Problemen und Fragen, die meine Dissertation betrafen, ausführlich auseinanderzusetzen. Ich fühlte mich durch wertvolle Anregungen sowohl in der Versuchsphase als auch in der Phase der Abfassung der Dissertation sehr gut betreut.

Ferner danke ich dem Direktor der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der Universitätsmedizin Göttingen, Herrn Prof. Dr. med. Dr. med. dent. H. Schliephake, für die Möglichkeit, in seiner Klinik eine wissenschaftliche Untersuchung durchführen zu können.

Herrn Dr. med. Dr. med. dent. F. Fialka und Herrn Dr. med. Dr. med. dent. M. Fricke danke ich für ihre unermüdliche Diskussionsbereitschaft im Doktorandenseminar und für ihre Unterstützung während der molekularbiologischen Analysen.

Ferner möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. med. H. Siggelkow für die Anregungen in der Zellkulturphase bedanken.

Gleichfalls zu Dank verpflichtet bin ich den wissenschaftlichen Mitarbeitern des Labors der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, insbesondere Frau Jutta Schulz, die mir während der Experimente mit Rat und Tat zur Seite standen.

Ebenso danke ich Herrn Dr. rer. nat. K. Jung aus der Abteilung für medizinische Statistik der UMG Göttingen für die freundliche Unterstützung während der Anfertigung der statistischen Analysen.

Mein Dank geht auch an die Fleischerei Sebert aus Göttingen, die mir freundlicherweise die Knochenproben der Hausschweine überlassen hat.

Lebenslauf

Niklas Sebastian Sievers

Ich wurde am 18. April 1985 als zweiter von drei Söhnen der Realschullehrerin Christine Sievers, geb. Stange, und des Realschullehrers Volker Sievers in Henstedt-Ulzburg geboren. Von 1991 bis 1995 besuchte ich die Grundschule in Westrhauderfehn und von 1995 bis 1997 die Orientierungsstufe in Rhauderfehn. Die allgemeine Hochschulreife erlangte ich 2004 am Ubbo-Emmius-Gymnasium in Leer.

Nach einer Zivildienstzeit von 10 Monaten auf der Station Innere I des Kreiskrankenhauses Leer begann ich zum Sommersemester 2005 das Studium der Zahnheilkunde an der Georg-August-Universität Göttingen. Mit dem Staatsexamen im Juni 2010 beendete ich das Studium der Zahnheilkunde.

In der Zeit von Juli bis September 2008 unternahm ich eine zahnmedizinische Auslandsfamulatur am Institut d'Odonto-Stomatologie Tropicale de Madagascar (IOSTM) in Mahajanga, Madagascar bei Dr. Emmanuel Rakotoarivony und wurde durch das Stipendium B im Rahmen des Stipendienprogramms für Exzellenz innerhalb „Gö4med“ für Studierende der Universitätsmedizin Göttingen unterstützt.

Ein weiterer zahnärztlicher Auslandsaufenthalt erfolgte von November bis Dezember 2010 mit dem Verein ÄRZTE HELFEN e.V. in einer Klinik des Arbeiter-Samariter-Bundes in Serrekunda, Gambia.

Seit 15. Januar 2011 arbeite ich als Assistenz Zahnarzt in der Zahnarztpraxis Dr. Holger Hasche und Dr. Anja-Katrin Zahl in Wahlstedt, Schleswig-Holstein.