

Aus der Poliklinik für Zahnärztliche Prothetik
(Prof. Dr. med. dent. R. Bürgers)
im Zentrum Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Einfluss von Zoledronat und Denosumab auf humane Zellen der osteoblastären Linie aus dem Kieferknochen anhand osteogener Marker

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
für Zahnmedizin
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Florian Lautenbacher

aus

Starnberg

Göttingen 2022

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

Betreuungsausschuss

Betreuer/in: Prof. Dr. med. N. Miosge

Ko-Betreuer/in: PD Dr. med. Dr. med. dent. P. Kauffmann

Prüfungskommission

Referent/in: Prof. Dr. med. N. Miosge

Ko-Referent/in: PD Dr. med. Dr. med. dent. P. Kauffmann

Drittreferent/in: Prof. Dr. M. Schön

Datum der mündlichen Prüfung: 21.06.2023

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Einfluss von Zoledronat und Denosumab auf humane Zellen der osteoblastären Linie aus dem Kieferknochen anhand osteogener Marker" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den

.....
(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Knochengewebe	1
1.1.1 Überblick	1
1.1.2 Zellen des Knochens und der osteoblastären Linie.....	2
1.1.3 <i>bone-remodelling</i>	4
1.2 MRONJ.....	5
1.2.1 Allgemeines	5
1.2.2 Zoledronat.....	7
1.2.3 Denosumab	8
1.2.4 Pathogenese.....	9
1.3 Proteine.....	10
1.3.1 COL1.....	10
1.3.2 RUNX2.....	11
1.3.3 RANKL	11
1.3.4 SMURF2	11
1.4 Fragestellung	12
2 Material und Methoden	13
2.1 Geräte.....	13
2.2 Verbrauchsmaterial	14
2.3 Chemikalien.....	15
2.4 Probengewinnung.....	16
2.4.1 Zellkultur	17
2.4.2 Medium	17
2.4.3 Ernte und Kultivierung	17
2.4.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	18
2.5 Immunzytochemie	18
2.5.1 Allgemeines zur Immunzytochemie.....	18
2.5.2 Versuchsaufbau.....	19
2.6 Westernblot	21
2.6.1 Allgemeines zu Westernblots	21
2.6.2 Vorbereitung der Proteinproben	21
2.6.3 SDS-PAGE	22
2.6.4 Blotten der Proteine auf die Membran	24
2.6.5 Proteindetektion	25
2.6.6 Strippen der Membranen	27

2.6.7	Statistische Auswertung.....	27
3	Ergebnisse.....	28
3.1	Probengewinnung.....	28
3.2	Proteinlokalisierung.....	29
3.2.1	COL1.....	29
3.2.2	RUNX2.....	32
3.2.3	RANKL.....	35
3.2.4	SMURF2.....	38
3.3	Bestimmung der relativen Proteinlevel.....	40
3.3.1	COL1.....	41
3.3.2	RUNX2.....	41
3.3.3	RANKL.....	41
3.3.4	SMURF2.....	41
3.4	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	46
4	Diskussion.....	47
4.1	Methodik der Probengewinnung der osteoblastären Linie.....	47
4.2	Inkubation der Zellen mit ZOL und DEN.....	48
4.3	Ergebnisse der Immunzytochemie.....	49
4.3.1	COL1.....	49
4.3.2	RUNX2.....	50
4.3.3	RANKL.....	50
4.3.4	SMURF2.....	51
4.4	Ergebnisse der Westernblots.....	51
4.4.1	COL1.....	51
4.4.2	RUNX2.....	52
4.4.3	RANKL.....	53
4.4.4	SMURF2.....	53
4.5	Schlussfolgerung und Ausblick.....	54
5	Zusammenfassung.....	56
6	Literaturverzeichnis.....	57

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Zellen der osteoblastären Linie.....	3
Abbildung 2: Probengewinnung	28
Abbildung 3: ICC, COL1, Patientin 1.....	29
Abbildung 4: ICC, COL1, Patientin 2.....	30
Abbildung 5: ICC, COL1, Patientin 3.....	31
Abbildung 6: ICC, RUNX2, Patientin 1	32
Abbildung 7: ICC, RUNX2, Patientin 2.....	33
Abbildung 8: ICC, RUNX2, Patientin 3.....	34
Abbildung 9: ICC, RANKL, Patientin 1.....	35
Abbildung 10: ICC, RANKL, Patientin 2	36
Abbildung 11: ICC, RANKL, Patientin 3	37
Abbildung 12: ICC, SMURF2, Patientin 1	38
Abbildung 13: ICC, SMURF2, Patientin 2.....	39
Abbildung 14: ICC, SMURF2, Patientin 3.....	40
Abbildung 15: Westernblots, COL1	42
Abbildung 16: Westernblots, RUNX2.....	43
Abbildung 17: Westernblots, RANKL.....	44
Abbildung 18: Westernblots, SMURF2	45
Abbildung 19: Übersicht der relativen Proteinlevel.....	46

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte.....	13
Tabelle 2: Verbrauchsmaterial	14
Tabelle 3: Chemikalien.....	15
Tabelle 4: Standardmedium.....	17
Tabelle 5: Arbeitsmedien.....	17
Tabelle 6: Protokoll Immunzytochemie	20
Tabelle 7: primäre Antikörper Immunzytochemie.....	20
Tabelle 8: sekundäre Antikörper Immunzytochemie.....	20
Tabelle 9 SDS-Probenpuffer	22
Tabelle 10: 1x Laufpuffer	23
Tabelle 11: Trenn- und Sammelgelpuffer	23
Tabelle 12: Zusammensetzung Sammelgel (5%).....	23
Tabelle 13: Zusammensetzung Trenngel (10%).....	23
Tabelle 14: Transferpuffer.....	24
Tabelle 15: Lösungen Coomassie-Färbung	25
Tabelle 16: primäre Antikörper WB	26
Tabelle 17: sekundäre Antikörper WB.....	26
Tabelle 18: Stripping-Puffer.....	27

Abkürzungsverzeichnis

BMSCs	<i>bone marrow stem cells</i>
BMP	<i>bone morphogenetic protein</i>
BMU	<i>basic multicellular unit</i>
BSA	bovines Serumalbumin
BP	Bisphosphonate
COL1	Kollagen 1
DEN	Denosumab
DG	Deckgläschen
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECL	<i>enhanced chemoluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycoltetraacetat
EZM	extrazelluläre Matrix
FCS	<i>fetal calf serum</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
ICC	<i>immunocytochemistry</i>
MRONJ	<i>medication related osteonecrosis of the jaw</i>
OPG	Osteoprotegerin
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PFA	Paraformaldehyd
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RANK	<i>receptor activator of nuclear factor kappa B</i>
RANKL	RANK Ligand
RUNX2	<i>runt related transcription factor 2</i>
SDS-PAGE	<i>sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoreses</i>
SSC	<i>skeletal stem cells</i>
SMURF2	<i>Smad ubiquitin regulatory factor 2</i>
TBS-T	<i>tris-buffered saline and tween 20</i>
ZOL	Zoledronat

1 Einleitung

PatientInnen mit malignen onkologischen Erkrankungen oder Osteoporose erhalten zur Behandlung ihrer Leiden häufig antiresorptive Medikamente wie Bisphosphonate (BP) oder Denosumab (DEN). Als Komplikation dieser Therapie kann eine sogenannte medikamentenassoziierte Kiefernekrose oder auch *medication related osteonecrosis of the jaw* (MRONJ) entstehen. Im Vergleich zu einer 15 % Wahrscheinlichkeit zur Entwicklung einer Kiefernekrose bei malignen Erkrankungen treten diese bei Osteoporose PatientInnen mit 0,01 % vergleichsweise selten auf (Mücke et al. 2016). Aber nicht nur aufgrund der bloßen Häufigkeit der Nekrosen, sondern vor allem wegen der schwierigen und komplexen Therapie, ist es enorm wichtig die pathophysiologischen Vorgänge weiter zu erforschen, um neue Therapieansätze zu etablieren (Voss et al. 2017). Ziel dieser Arbeit war es, diese Vorgänge anhand humaner Zellen aus dem Kieferknochen tiefergehend zu untersuchen und potenziell neue pathophysiologische Erkenntnisse zu erlangen.

1.1 Knochengewebe

1.1.1 Überblick

Insgesamt 213 Knochen stellen im menschlichen Körper einen Großteil Teil des Binde- & Stützgewebes dar. Diese lassen sich in lange, kurze, platte, pneumatisierte und irreguläre Knochen einteilen. Innerhalb des Gesamtorganismus übernimmt der Knochen verschiedenste Funktionen. Durch seine enorme Stabilität werden lebenswichtige Strukturen und Organe geschützt und an ihm ansetzende Muskeln setzen komplexeste Bewegungen um. Auch der Mineralstoffwechsel wird durch den Knochen und den in ihm enthaltenen Mineralien beeinflusst, indem in ständigen Umbauprozessen Mineralien gespeichert oder freigesetzt werden und damit lebenswichtige Stoffwechselprozesse aufrechterhalten werden (Clarke 2008). Darüber hinaus stellt der Knochen das Ursprungsgewebe des Blutes dar, wobei das Knochenmark die zentralen hämatopoetischen Funktionen übernimmt, vor allem die Bildung der zellulären Hauptbestandteile des Blutes, wie Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten (Taichman 2005).

65 % des Knochenvolumens umfassen mineralische Komponenten wie Hydroxylapatit und verleihen dem Knochen seine mechanische Stabilität. Die restlichen 15 % sind Wasser und Lipide (Buck und Dumanian 2012). Lange Zeit wurde vermutet die Mineralisation des Knochens wäre ein passiver Prozess, bis klar wurde, dass dies aktiv geschieht, indem Zellen zunächst ein Kollagenrundgerüst in Form einer extrazellulären Matrix (EZM) bilden, in das nach und nach die mineralischen Komponenten wie Calcium und Phosphat, in unterschiedlichen Verbindungen eingelagert werden. Diese Mineralisation ist eng verknüpft

mit der vorher beschriebenen Mineralstoffwechselhomöostase und den ständigen Umbauprozessen des Knochens (Burr 2002; Murshed 2018).

Kompakter Knochen, in der Terminologie auch *substantia compacta* genannt, bildet die stabile äußere Hülle eines jeden Knochens und hat seinen größten Anteil innerhalb der zentralen Skelettanteile, wie den Wirbeln oder den Schädelknochen. Vor allem in der Diaphyse der Röhrenknochen wird das Innere wiederum durch den trabekulären Knochen, die *substantia spongiosa* gebildet. Bis zu 75 % des Volumens der Spongiosa umfassen organisches Gewebe in Form des Knochenmarkes und Fett (Monier-Faugere et al. 1998).

Um seine endgültige Stabilität zu erlangen, durchläuft das Knochengewebe einen Reifeprozess, wobei man zwei verschiedene Knochenarten unterscheiden kann. Der optisch ungeordnete Geflechtknochen entsteht primär bei der Embryogenese und wird später in den reifen stärker strukturierten Lamellenknochen mit seiner charakteristischen Osteonstruktur umgewandelt (Buckwalter et al. 1995).

Die in dieser Arbeit untersuchten Zellen entstammen dem Kieferknochen. Dieser unterscheidet sich vor allem hinsichtlich seiner embryonalen Herkunft von den Knochen des Rumpfs oder der Extremitäten. In den ersten Entwicklungswochen des Embryos bilden sich in der späteren Gesichtsregion fünf sogenannte Kiemenbögen aus Ektoderm, Mesoderm und Entoderm. Aus den ektodermalen Neuralleistenzellen des ersten Kiemenbogens entsteht das mesenchymale Grundgerüst des Ober- und Unterkiefers, welches sich später über direkte, desmale Ossifikation zu Knochen entwickelt (Zohrabian et al. 2015).

1.1.2 Zellen des Knochens und der osteoblastären Linie

Innerhalb des Knochens lassen sich zwei Typen von Zellen unterscheiden. Zum einen Osteoklasten, die knochenabbauenden makrophagenähnlichen Riesenzellen und zum anderen die knochenaufbauenden Osteoblasten, die in ihrer inaktiven Form Osteozyten genannt werden (Rodan 1992). Nach Entdeckung der Osteoklasten wurde lange vermutet sie entstammen der gleichen Zelllinie wie Osteoblastenvorläuferzellen (Hall 1975), bis es nach und nach mehr Hinweise auf einen hämatopoetischen Ursprung gab. Im Blut zirkulierende Osteoklastenvorläuferzellen und deren Entdeckung im Knochenmark wiesen darauf hin, dass die Zellen ihre Entwicklung nicht wie Osteoblasten ortsständig durchlaufen, sondern deren Vorläuferzellen aus anderen Regionen einwandern (Nijweide et al. 1986). Genauere molekularbiologische Untersuchungen konnten schließlich eindeutig den monozytären hämatopoetischen Ursprung der Zelllinie zeigen (Boyle et al. 2003).

Die Vorläuferzellen lagern sich, aktiviert durch das *receptor activator of nuclear factor kappa B* (RANK)/ RANK Ligand (RANKL) System an der abzubauenen Knochenoberfläche an und fusionieren zu aktiven mehrkernigen Riesenzellen (Martin und Sims 2015). Um die Oberfläche für die Resorptionsvorgänge zu erhöhen, bildet sich die sogenannte *ruffled border*, die den basalen Pol der Zelle darstellt und über aktiven Transport und Exozytose

Protonen (H^+) und proteolytische Enzyme in die Howshipschen Resorptionslakunen entlassen (Blair et al. 1989; Everts et al. 2002; Delaissé et al. 2003).

Osteoblasten sind die für den Knochenaufbau verantwortlichen Zellen und entstammen einer den Knochenmarkstammzellen oder *bone marrow stem cells* (BMSCs) abzweigenden Zelllinie. Diese Zellen werden nach dem durch sie gebildeten Gewebe skelettale Stammzellen oder *skeletal stem cells* (SSC) genannt (Robey und Riminucci 2020). Für die weitere Differenzierung sind drei Transkriptionsfaktoren maßgeblich verantwortlich. Der *SRY-box transcription factor 9* (SOX9) für die chondrogene, *runt related transcription factor 2* (RUNX2) für die osteoblastäre und der *peroxisome proliferator activated receptor- γ* (PPAR γ) für die adipogene Differenzierung (Bi et al. 1999; Komori 2002; Muruganandan et al. 2009).

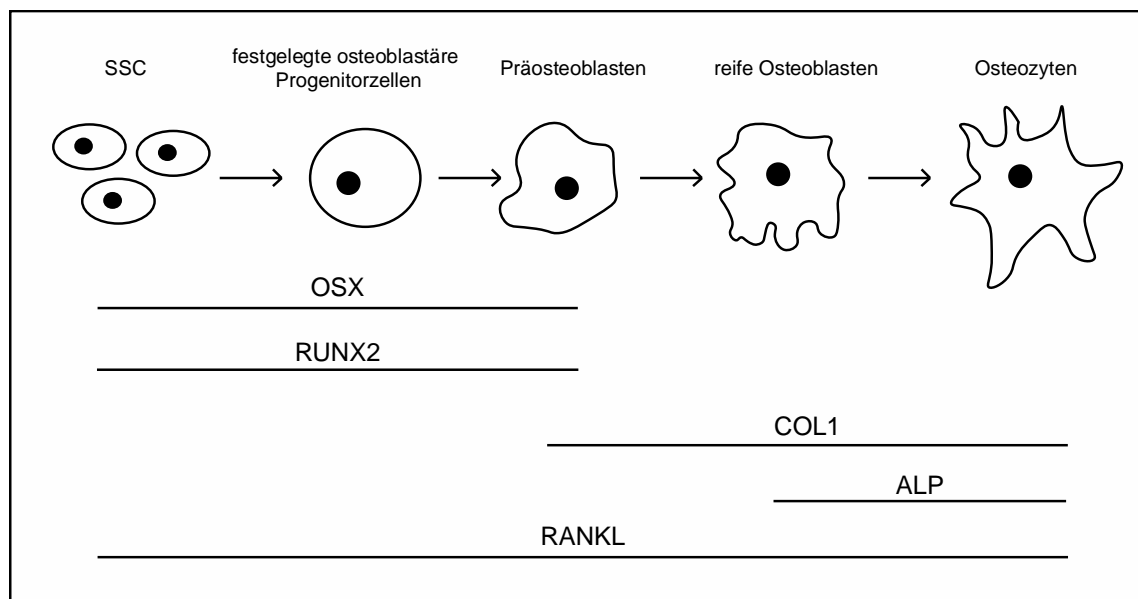


Abbildung 1: Zellen der osteoblastären Linie. Gezeigt werden die Differenzierungsstadien der osteoblastären Linie von den skelettalen Stammzellen (SSC) bis zum eingemauerten Osteozyten. Während der Differenzierung können für die verschiedenen Stadien Markerproteine nachgewiesen werden. Osterix (OSX), *runt related transcription factor 2* (RUNX2), Kollagen 1 (COL1), alkalische Phosphatase (ALP), *receptor activator of nuclear factor kappa B* (RANKL). Der Zeitpunkt verstärkter Expression wird durch die Querbalken dargestellt.

In dieser Arbeit stand klar die osteoblastäre Differenzierung im Mittelpunkt. Die osteoblastäre Linie umfasst alle Entwicklungsstadien der Osteoblasten von der SSC bis zum reifen EZM produzierenden Osteoblasten. RUNX2 und Osterix (OSX) sind die entscheidenden Transkriptionsfaktoren für die damit festgelegte Differenzierung zu Präosteoblasten und dienen als Markerproteine für die Identifikation dieser Zelllinie. (Nakashima et al. 2002). Die alkalische Phosphatase (ALP) ist ein weiteres knochenspezifisches Markerprotein, das allerdings nur bei reifen Osteoblasten und Osteozyten vorkommt (Christenson 1997). Um Knochengewebe zu bilden, produzieren die reifen Osteoblasten eine zu 90 % COL1 enthaltende organische EZM, die vor der abschließenden Mineralisation als Osteoid bezeichnet wird und je nach Anordnung der Kollagenfibrillen, die oben erwähnte laminäre oder geflechtartige Knochenstruktur vorgibt.

Von Präosteoblasten werden im Vergleich zu reifen Osteoblasten hingegen eher geringe Mengen an COL1 gebildet. (Giraud-Guille 1988; Fratzl et al. 2004)

Sobald die gebildete EZM mineralisiert wurde sind die Osteoblasten ringsherum von reifem Knochen umgeben und werden als Osteozyten bezeichnet. Da die von Osteoblasten besiedelte Knochenoberfläche nur einen geringen Teil des Knochenvolumens ausmacht, umfassen die Osteozyten bis zu 95 % aller Knochenzellen (Franz-Odendaal et al. 2006). Über *gap junctions* in ihren Zellausläufern ist es den Osteozyten möglich in einem komplexen Netzwerk zu kommunizieren und Signale an die der Knochenoberfläche aufliegenden *lining cells* weiterzugeben, worüber zum Beispiel neue Osteoblasten rekrutiert werden können (Schaffler et al. 2014).

Die letzte Zellart innerhalb des Knochengewebes sind die eben genannten *bone lining cells*. Sie liegen den Resorptionslakunen nach dem Knochenabbau als flache Zellen auf und werden mit dem sogenannten *coupling*, also der Kopplung zwischen knochenaufbauenden und knochenabbauenden Phasen, in Verbindung gebracht (Everts et al. 2002; Andersen et al. 2009).

1.1.3 *bone-remodelling*

Wie in den vorherigen Kapiteln beschrieben, unterliegt der Knochen ständigen Umbauprozessen. Während der Kindheit steht der Knochenaufbau im Mittelpunkt. Im Erwachsenenalter übernimmt dann das *bone-remodelling* den Erhaltungsprozess (Kobayashi et al. 2003). Zum einen geschieht dies durch immer wieder benötigte Anpassungsmechanismen an äußere Umstände von normalen mechanischen Belastungen bis zur Heilung von Knochenbrüchen (Einhorn und Gerstenfeld 2015), zum anderen um den initial ungeordnet gebildeten Geflechtknochen in geordneten laminären Knochen umzuwandeln (Crockett et al. 2011). Darüber hinaus ist das *bone-remodelling* entscheidend an pathophysiologischen Vorgängen beteiligt und teilweise der zentrale Kern von Knochenerkrankungen wie Osteoporose (Armas und Becker 2012).

Für das *bone-remodelling* konnten fünf Phasen charakterisiert werden, die mit der Aktivierung des *remodellings* beginnen. Auf die Phase der Resorption folgt die Umkehrungsphase, die die nun beginnende Aufbauphase einleitet. Zuletzt geht das *remodelling* in eine terminierende Ruhephase über bevor der Zyklus von vorne beginnt (Katsimbri 2017). Dabei agieren die Knochenzellen als ineinandergreifende Einheit und werden gemeinsam mit den sie umgebenden spezifischen anatomischen Strukturen als *basic multicellular unit* (BMU) bezeichnet. Die für das *bone-remodelling* verantwortliche BMU besteht somit aus Osteoklasten, Osteoblasten, umgebendem Gewebe und einer gesicherten Gefäßversorgung. (Jilka 2003)

Die Aktivierungsphase wird durch Osteozyten, die mechanische Reize registrieren oder über hormonelle Regulationsmechanismen eingeleitet (Bonewald 2007). Beispielhaft hierfür ist die Steuerung des Kalziumstoffwechsels durch das Parathormon (PTH) (Jüppner et al. 1991)

oder der inhibierende Einfluss des Sexualhormons Östrogen auf die Knochenresorption (Krum et al. 2008).

Für etwa zwei bis vier Wochen dominiert die Resorptionsphase der Osteoklasten das *bone-remodelling*. Nachdem der auf Osteoblasten vorkommende Ligand RANKL an den passenden Rezeptor RANK der monzytären Osteoklastenvorläufern bindet, differenzieren sich diese Vorläufer zu polarisierten reifen Osteoklasten (Tolar et al. 2004). Über die am basalen Pool gebildete *ruffled border* wird durch eine H⁺-ATPase ein demineralisierender pH-Wert zwischen 4 und 5 erzeugt (Silver et al. 1988). Matrix Metalloproteinasen und Cathepsin K lösen die organische Kollagenmatrix auf (Delaissé et al. 2003). Die Resorptionsphase wird durch Apoptose der Osteoklasten beendet (Xing und Boyce 2005).

Der Übergang zur Aufbauphase ist noch nicht völlig verstanden. Vermutet wird eine Vorbereitung der Knochenoberfläche durch osteoblastäre Zellen, die eine erste nicht kollagenisierte Matrixschicht erzeugen und das Auflagern von reifen Osteoblasten erleichtert (Kenkre und Bassett 2018). Das *coupling* zwischen Knochenab- und -aufbau wird unter anderem durch TGF- β gesteuert (Bonewald und Mundy 1990).

In der vier- bis sechsmonatigen Knochenaufbauphase werden die entstandenen Resorptionslakunen durch die rekrutierten Osteoblasten mit größtenteils COL1 enthaltendem Osteoid aufgefüllt. Auch an der anschließenden Mineralisierung der Osteoidmatrix sind die Osteoblasten maßgeblich beteiligt (Atkins und Findlay 2012). Etwa 50-70 % der Osteoblasten werden apoptotisch, der Rest wird als Osteozyten eingemauert oder liegt als *bone lining cells* der Knochenmatrix auf. Die *bone lining cells* können allerdings durch bestimmte Signale wieder osteoblastäre Funktionen übernehmen (Katsimbri 2017).

Terminal geht das *bone-remodelling* in eine Ruhephase über, in der von Osteozyten antagonistische Signalmoleküle zur Osteogenese ausgeschüttet werden (Bonewald 2011).

1.2 MRONJ

1.2.1 Allgemeines

Osteoporose ist eine der häufigsten, die Dichte und Mikroarchitektur des Knochens beeinflussenden Erkrankungen des Menschen (Rachner et al. 2011). Etwa 5 % der deutschen Bevölkerung über 18 ist betroffen, wobei Frauen weit häufiger an Osteoporose leiden als Männer. Die aktuelle demographische Entwicklung wird diesen Anteil weiter nach oben treiben, da vor allem Frauen im postmenopausalen Alter erkranken (Hadjji et al. 2020). Charakteristisch ist ein Verlust der Knochendichte und ein daraus resultierendes hohes Frakturrisiko. Diese Frakturen stellen vor allem für ältere PatientInnen ein erhebliches gesundheitliches Risiko dar, da bei typischen Sturzfrakturen des Hüftknochens oder des Femurs lebensbedrohliche Blutungen einsetzen können (Black und Rosen 2016). Um die Reduktion der Knochendichte aufzuhalten und folgenschwere Komplikationen zu

verhindern, wird eine Reihe von antiresorptiven Medikamenten eingesetzt. BP, wie das in dieser Arbeit untersuchte Zoledronat (ZOL) sind die am häufigsten verabreichten, aber auch neuere medikamentöse Therapeutika wie der monoklonale Antikörper DEN gewinnen immer stärker an Bedeutung (Khosla und Hofbauer 2017).

Obwohl unterschiedliche pathophysiologische Vorgänge zugrunde liegen, werden auch bei Knochenmetastasen maligner Tumore BP oder DEN eingesetzt, um deren Wachstum einzudämmen und Folgekomplikationen wie Knochenmarkaplasien, chronische Schmerzen oder Hyperkalzämien zu verhindern (Sousa und Clézardin 2018). Multiple Myelome, Brust- und Prostatakarzinome sind mit einer über 60 % Wahrscheinlichkeit besonders prädestiniert Knochenmetastasen zu bilden und damit die mechanischen Eigenschaften des Knochens erheblich zu beeinträchtigen (D'Oronzo et al. 2019). Andere häufige Karzinome wie die der Lunge, der Niere oder Blase bilden weit weniger häufig Knochenmetastasen (Macedo et al. 2017).

Trotz des hohen therapeutischen Nutzens gibt es wie bei vielen Medikamenten auch bei Antiresorptiva die Gefahr seltener aber schwerwiegender Nebenwirkungen, die von atypischen Frakturen, gastrointestinalen Komplikationen bis hin zu den hier im Mittelpunkt stehenden MRONJ reichen (Skjødt et al. 2019).

Ein möglicher Zusammenhang zwischen antiresorptiven Therapien mit intravenös verabreichten Bisphosphonaten und dem Auftreten von Kieferosteonekrosen wurde zum ersten Mal im Jahr 2003 von Marx beschrieben. Er konnte bei 36 PatientInnen, die zuvor mit Pamidronat und ZOL behandelt wurden, avaskuläre Kiefernekrosen feststellen (Marx 2003). Diese Assoziation wurde nach und nach von weiteren Autoren beschrieben und erlangte immer mehr klinische Relevanz (Ruggiero et al. 2004; Khosla et al. 2007; Ruggiero 2009). Da, mit der Entwicklung neuer den Knochenstoffwechsel beeinflussenden Medikamente, avaskuläre Kiefernekrosen auch bei anderen antiresorptiven (DEN) und antiangiogenetischen Medikationen (Bevacizumab, Sunitinib, Sorafenib) diagnostiziert wurden, tagte 2014 die *American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons* (AAOMS) und befasste sich mit der ursprünglichen Definition und der damit einhergehenden Bezeichnung *bisphosphonate related osteonecrosis of the jaw* (BRONJ). Um den neuen Umfang zu erfassen, wurde die Bezeichnung *medication related osteonecrosis of the jaw* MRONJ eingeführt und etabliert (Ruggiero et al. 2014).

Klinisch präsentiert sich eine MRONJ durch meist schmerzhaft freiliegenden, nicht mehr von gesunder Mundschleimhaut bedeckten Kieferknochen, wobei sich dieser Zustand auch asymptomatisch entwickeln kann. Radiologisch sind zusätzlich Veränderungen der Knochenstruktur zu erkennen. Eine klare Diagnose ergibt sich, wenn der Knochen für mindestens 8 Wochen freiliegt, eine laufende oder vergangene Therapie mit antiresorptiven oder antiangiogenetischen Medikamenten nachzuweisen ist und vorherige Radiotherapien oder Knochenmetastasen im Kiefer ausgeschlossen werden können (Migliorati et al. 2019; Ruggiero 2015). Um schnell und strukturiert eine Therapie einleiten zu können, wurde im

Positionspapier der AAOMS von 2014 ein *staging* etabliert, das von nicht freiliegendem Knochen mit intakter Mukosa aber radiologischen Veränderungen (*stage 0*) bis hin zu großausgedehnten, mit der Kieferhöhle kommunizierenden Nekrosen mit hohem pathologischen Frakturrisiko reicht (*stage 3*) (Ruggiero et al. 2014). Insgesamt zeigt sich außerdem ein weitaus häufigeres Auftreten der MRONJ im Unterkiefer als im Oberkiefer (Aljohani et al. 2018).

Zusätzlich zur Einnahme antiresorptiver Medikamente und deren Dosierung gibt es eine Reihe von Risikofaktoren, die die Entwicklung einer MRONJ begünstigen. Dazu gehören invasive oralchirurgische Eingriffe wie beispielsweise Zahnextraktionen (Dodson 2015), schlechte Mundhygiene und parodontale Erkrankungen (Aghaloo et al. 2011; Nicolatou-Galitis et al. 2015), sowie das Alter, da es bisher keine Hinweise auf MRONJ bei pädiatrischen PatientInnen gibt (Nasomyont et al. 2019).

Wie im ersten Abschnitt der Einleitung erwähnt, besteht ein klarer Unterschied zwischen der Art der Vorerkrankung und der Wahrscheinlichkeit eine Kiefernekrose unter antiresorptiver Therapie zu entwickeln. 15 % der PatientInnen mit malignen Erkrankungen leiden an dieser Therapiekomplication, im Vergleich zu 0,01 % der OsteoporosepatientInnen (Mücke et al. 2016)

Bisher liegt der Fokus der Behandlung, je nach *staging* der PatientInnen, auf antiinfektöser Prophylaxe, Schmerztherapie, Antibiosen und chirurgischer Sanierung (Voss et al. 2017).

1.2.2 Zoledronat

Als Derivat des Pyrophosphats (P–O–P) wurden BP (P–C–P) bereits vor über 200 Jahren industriell synthetisiert (Russell 2011), allerdings erst in den 60er Jahren für medizinische Zwecke genutzt, nachdem ein Zusammenhang zwischen der Gabe von BP und einer reduzierten extrazellulären Ablagerung von Kalzium festgestellt wurde (Bassett et al. 1969; Francis et al. 1969). Fleisch untersuchte in den 70er Jahren zudem deren Wirkung auf das *bone-remodelling* und bestätigte die Vermutung einer positiven Kalziumbilanz aus dem vorherigen Jahrzehnt (Fleisch et al. 1977).

Durch das zentrale Kohlenstoffatom der BP (P–C–P) und die Möglichkeit dessen Wasserstoffatome durch aliphatische Seitenketten zu ersetzen, ergaben sich zahlreiche neue Kombinationsmöglichkeiten. Die in medizinischer Anwendung befindlichen Wirkstoffe lassen sich somit in drei Gruppen einteilen. BP ohne Stickstoffatom (Etidronat, Clodronat, Tiludronat), Aminobisphosphonate (Pamidronat, Alendronat, Neridronat) und am Stickstoffatom zusätzlich substituierte Präparate (Olpadronat, Ibandronat, Risedronat, Zoledronat). Mit der großen Vielfalt der Präparate unterscheiden sich auch pharmakologische Eigenschaften wie die Plasmaeiweißbindung, Halbwertszeiten und relative Potenzen. BP werden bei oraler Gabe nur zu 1 % im Gastrointestinaltrakt resorbiert, anschließend über die Blutbahn verteilt und rektal fast vollständig wieder ausgeschieden, da die P–C–P Struktur chemisch sehr stabil ist und nicht durch hydrolytische Prozesse abgebaut

werden kann. Bei intravenöser Gabe ergibt sich mit bis zu 70 % eine deutlich erhöhte Bioverfügbarkeit im Knochen und die Ausscheidung verlagert sich auf die Nieren (Bartl et al. 2006). Trotz einiger bekannter aber dennoch seltener Nebenwirkungen wie den ONJ, gehören BP seit langem zu den am besten untersuchten und sichersten *first-line* Medikamenten bei der Therapie von Osteoporose und Knochenmetastasen (Pazianas und Abrahamsen 2011).

Anfänglich wurde die Inhibition der Knochenresorption der hohen Affinität zu Hydroxylapatit (HAP) zugeschrieben, wobei das hochpotente ZOL im Vergleich die größte Affinität zu HAP aufweist (Green et al. 1994) Die kristalline Struktur des HAP wird durch die BP stabilisiert und ein Auflösen der Kristallstruktur verhindert. Inzwischen ist allerdings auch ein eindeutiger zellulärer Einfluss bekannt (Nancollas et al. 2006). Die auf der Knochenoberfläche aufgelagerten BP hemmen zum einen die Adhäsion von Osteoklasten, zum anderen werden weniger Makrophagen rekrutiert, die zu Osteoklasten fusionieren können (Bartl et al. 2006). Zunächst an HAP gebunden werden BP bei der Knochenresorption gelöst und akkumulieren in den Howshipschen Lakunen. Durch Endozytose aufgenommen, entfalten sie anschließend intrazellulär ihren biochemischen Einfluss und führen zur Apoptose der Osteoklasten (Thompson et al. 2006). In vitro und in vivo wurden auch Effekte auf Osteozyten und -blasten nachgewiesen, die eher zellprotektiv wirken und vor Apoptose schützen, womit häufig das verminderte Frakturrisiko trotz gleichbleibender Knochendichte erklärt wird (Bartl et al. 2006). Eine BP induzierte Beeinflussung der Osteoklastenaktivität durch osteoblastäre Mediatoren wird ebenso diskutiert wie der Einfluss auf die osteoblastäre Proliferationsfähigkeit und Differenzierung aus Vorläuferzellen (Vitté et al. 1996; Rogers 2003; Bellido und Plotkin 2011)

Das intravenös verabreichte ZOL ist eines der potentesten und langwirksamsten BP in klinischer Anwendung. An R₂-Position enthält es einen Imidazolring und repräsentiert damit eine neue Gruppe der Aminobisphosphonate (Reid et al. 2020). Auf molekularer Ebene greift es in den Mevalonatstoffwechsel der Osteoklasten ein, der zur Synthese von Cholesterol und Isoprenoiden führt, welche als Bestandteil der Zellmembran die Zellintegrität aufrechterhalten. Zoledronat hemmt innerhalb dieses Signalweges die Farnesylpyrophosphat-Synthase (FPPS) und die Geranylgeranylpyrophosphat-Synthase (GGPPS), die für die Prenylierung GTP-bindender Proteine wie Rap, Rho und Rac verantwortlich sind. Ohne deren adäquate Funktion wird die Apoptose eingeleitet. (Luckman et al. 1998; Russell et al. 2008; Rogers et al. 2020)

1.2.3 Denosumab

Rodan und Martin vermuteten schon in den 80er Jahren einen Zusammenhang zwischen Osteoblasten und der Steuerung der Knochenresorption (Rodan und Martin 1981). Diese Hypothese wurde in den 90er Jahren mit der Entdeckung des RANK/RANKL/Osteoprotegerin (OPG) Systems untermauert und rückte in den Fokus

der Pharmakologie, um Medikamente zu entwickeln, die den Knochenabbau bei bestimmten Krankheiten limitieren können (Boyce und Xing 2007).

DEN ist ein monoklonaler Antikörper, der die Wirkung von OPG imitiert, an den von Osteoblasten und Osteozyten sezernierten Mediator RANKL andockt und somit dessen Interaktion mit RANK auf den Osteoklastenvorläuferzellen verhindert. Therapeutisch wird DEN ebenso wie die BP bei Osteoporose, Knochenmetastasen solider Tumore und Riesenzelltumoren des Knochens eingesetzt. Dazu werden im Abstand von sechs Monaten jeweils 60 mg des Wirkstoffs subkutan verabreicht (Cummings et al. 2009; Thomas 2012). Der große Vorteil von DEN ist die einfache Applikation und das damit einhergehende vereinfachte Monitoring der Therapie. Im Vergleich zu BP wird es deutlich schneller vollständig ausgeschieden, da es nicht direkt an den Knochen bindet (Tella und Gallagher 2014). Das Retikuloendotheliale-System metabolisiert DEN innerhalb etwa eines Monats, wohingegen die Ausscheidung der BP über die Niere bis zu mehrere Jahre dauern kann und somit ein ständiges Monitoring der Nieren erfordert (Baron et al. 2011).

In randomisierten Vergleichsstudien von OsteoporosepatientInnen konnte ein ähnlicher osteoprotektiver Effekt mit DEN wie mit BP festgestellt werden und auch das Risiko zur Entwicklung einer MRONJ war nicht erhöht (Choi et al. 2017). Skelett bezogene Komplikationen von Knochenmetastasen konnten mit DEN im Vergleich zu BP hingegen länger hinausgezögert werden (Stopeck et al. 2010; Fizazi et al. 2011)

1.2.4 Pathogenese

Wie eingangs erwähnt ist Pathogenese der Kiefernekrosen noch nicht vollumfänglich verstanden und es herrscht Uneinigkeit welche pathophysiologischen Mechanismen die Nekrosen initial auslösen.

Einig ist man sich in Bezug auf die Sonderstellung des Kieferknochens. Kein anderer Knochen des Körpers hat eine so enge Verbindung zu potenziell infektiösen Umgebungen. Über die Alveolarfächer und das Parodontium besteht eine direkte Eintrittspforte für Mikroorganismen und die ständige Deformation des Knochens durch Kaubelastungen führt zu einer etwa zehnfach erhöhten *turn-over-Rate* (Lombard et al. 2016). Ein weiteres wichtiges Merkmal ist die in vorherigen Kapiteln besprochene embryonale Entwicklung des Kieferknochens. Anders als beispielsweise lange Röhrenknochen aus dem Mesoderm entstammen die Kiefer den ektodermalen Neuralleistenzellen (vgl. 1.1.1) (Zohrabian et al. 2015). Der Unterkiefer ist darüber hinaus etwa doppelt so häufig von MRONJ betroffen wie der Oberkiefer (Fliefel et al. 2015).

Zwei grundlegende Theorien werden aktuell diskutiert. Die sogenannte *inside-outside*-Theorie geht davon aus, dass der Kieferknochen durch starke Kaubelastung ständigen Mikroverletzungen unterliegt (Hoefert et al. 2010). Kombiniert mit einer Antiresorptiva induzierten Reduktion des *bone-remodellings* und deren zusätzlichem immunmodulierenden Einfluss ist der Knochen anfälliger für pathogene Mikroorganismen und stirbt lokal ab.

Wichtig ist hierbei, dass der Knochen zunächst asymptomatisch nekrotisch wird bevor er nicht mehr von Mukosa bedeckt und in der Mundhöhle exponiert ist (Lesclous et al. 2009).

Bei der *outside-inside*-Theorie wird die Ursache in der hoch infektiösen Mundhöhle gesehen. Mukosaverletzungen oder Infektionskrankheiten wie die Karies führen zum Eindringen von pathogenen Keimen in den Kieferknochen (Lombard et al. 2016). Die auch bei der ersten Theorie beschriebene Immunmodulation und das herabgesetzte *bone-remodelling* verhindern eine adäquate Abwehrleistung des Knochens. Die Nekrose setzt ein und der Knochen wird exponiert. Die zusätzliche Besiedlung des freiliegenden Knochens mit einem pathogenen Biofilm erschwert die anschließende Therapie (Sedghizadeh et al. 2008).

Zusammenfassend lässt sich somit sagen, dass die MRONJ unabhängig von der Reihenfolge der Ereignisse ein multifaktorielles Geschehen darstellt, das vor allem auf die reduzierte *bone-remodelling* Fähigkeit des Kieferknochens in Kombination mit exogenen Faktoren zurückzuführen ist.

1.3 Proteine

1.3.1 COL1

90 % der organischen EZM des Knochens bestehen aus COL1 und bildet damit als Strukturprotein das Grundgerüst für die weitere Mineralisierung (Wang et al. 2001). Drei linksgewundene Polypeptidketten, zwei α 1-Ketten und eine α 2-Kette mit einer Gly-X-Y Aminosäuresequenz bilden gemeinsam eine rechtsgewundene Triplehelix (Rossert und de Crombrugge 2002). Die X und Y-Position wird meistens von Prolin oder Hydroxyprolin eingenommen, wobei dies auch jede andere beliebige Aminosäure sein kann (Ramshaw et al. 1998). Nach der Translation liegen die einzelnen Ketten zunächst als Prokollagene vor, die posttranslational im endoplasmatischen Retikulum mit Lysin modifiziert werden (Yamauchi und Sricholpech 2012). Die Ketten lagern sich anschließend aneinander und bilden das fertige Prokollagen als Triplehelix. Nach der Sekretion in die EZM werden die Propeptide am N- und C-terminalen Ende enzymatisch abgespalten, um die Moleküle für die extrazelluläre Assemblierung zu Kollagenfibrillen vorzubereiten. Innerhalb der Fibrillen überlappen sich die 300 nm langen Triplehelixes um 67 nm und gehen kovalente Verbindungen ein (Shoulders und Raines 2009). Die lamelläre und wellförmige Ausrichtung der Kollagenfibrillen ermöglicht die strukturelle Anpassung des Knochens an mechanische Belastungen und in die fibrillären Zwischenräume können mineralische Bestandteile der EZM eingelagert werden (Viguet-Carrin et al. 2006)

1.3.2 RUNX2

Der Transkriptionsfaktor RUNX2 auch als *core-binding factor subunit alpha-1* (CBFA1) bekannt, ist gemeinsam mit OSX und dem Wnt-Signalweg für die Osteoblastendifferenzierung verantwortlich. Er gehört neben RUNX1 und RUNX3 der RUNX-Familie an, die alle eine DNA bindende *runt*-Domäne enthalten (Komori 2006; Komori 2020). Die Expression von RUNX2 ist in mesenchymalen Stammzellen gering, nimmt zum festgelegten osteoblastären Vorläufer hin zu und wird im reifen Osteoblasten wieder geringer (Long 2012). Da RUNX2-*knockout*-Mäuse kein OSX mehr exprimieren, OSX-*knockout*-Mäuse aber weiterhin RUNX2 ist eine direkte Abhängigkeit dieser beiden Transkriptionsfaktoren klar und erklärt auch die spätere Expression von OSX innerhalb der osteoblastären Linie (Nakashima et al. 2002). Die Bedeutung für die Osteogenese lässt sich auch bei PatientInnen mit cleidokranialer Dysplasie beobachten, die eine Punktmutation an dem für RUNX2 kodierenden Gens aufweisen und bei RUNX2-*knockout*-Mäusen führt eben dieser *knockout* zu einer Nichtanlage skelettaler Strukturen (Komori et al. 1997; Mundlos et al. 1997).

1.3.3 RANKL

Wie im Denosumab Kapitel bereits erwähnt, konnten in den 90er Jahren die einzelnen Bestandteile des RANK/RANKL/OPG-Systems und deren Interaktion von unterschiedlichen Arbeitsgruppen nachgewiesen werden (Yasuda 2021). Innerhalb des *bone-remodellings* werden OPG und RANKL von Osteoblasten und Osteozyten sezerniert, wobei RANKL dabei als Ligand für den membranständigen Rezeptor RANK fungiert, der sich auf monozytären Vorläuferzellen der Osteoklasten befindet und deren Differenzierung aktiviert. OPG kann RANKL im extrazellulären Raum abfangen und neutralisieren, wodurch eine Osteoklastenaktivierung verhindert wird (Boyce und Xing 2007). Bei RANKL handelt es sich um ein Typ II Membranprotein dessen löslicher Bestandteil enzymatisch vom *tumor necrosis factor- α -converting enzyme* (TACE) abgespalten wird und somit extrazellulär wirksam werden kann (Lee et al. 2011). Der Ligand lässt sich in allen Zellen der osteoblastären Linie bis zum reifen Osteozyten nachweisen (vgl. Abbildung 1) (Atkins et al. 2003; Nakashima et al. 2011; Kim et al. 2020).

1.3.4 SMURF2

Smad ubiquitin regulatory factor 1/2 (SMURF1 und SMURF2) sind Ubiquitin-Protein-Ligasen, welche SMAD-Proteine ubiquitinieren und im Zuge dessen regulierend auf das *bone morphogenetic protein* (BMP) und den *transforming growth factor* β (TGF- β) wirken. Bei SMURF1 wird eine Interaktion mit RUNX2 und darüber ein Einfluss auf die Osteoblastendifferenzierung vermutet (Zhao et al. 2004). Schminke et al. konnten in chondrogenen Progenitorzellen auch bei einer Überexpression von SMURF2 eine verringerte Expression von RUNX2 nachweisen (Schminke et al. 2015). Eine kürzlich erschienene Studie, bei der SMURF2-*knockout*-Mäuse unter BMP-Gabe eine höhere

Knochendichte und mehr Osteoblasten aufweisen konnten als Wildtypmäuse, deutet darauf hin, dass SMURF2 außerdem negativ regulierend auf den BMP-Signalweg einwirkt (Kushioka et al. 2020).

1.4 Fragestellung

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand die Auswertung potenzieller Einflüsse von Zoledronat und Denosumab auf Zellen der osteoblastären Linie. Da die genauen pathologischen Prozesse der MRONJ auf zellulärer Ebene noch nicht abschließend geklärt sind, war es wichtig weitere Erkenntnisse zu gewinnen (vgl. 1.2). In bisherigen Arbeiten wurde die Wirkung von Zoledronat und Denosumab auf Zellen der osteoblastären Linie in vitro vor allem in Form von Zellviabilitäts- und Apoptose-*assays* und der Einfluss der Präparate auf die mRNA-Expression untersucht. Um möglichst realitätsnahe Bedingungen zu erzeugen, bestand das erste Ziel darin humane Zellen aus dem Kieferknochen zu isolieren. Um nun Rückschlüsse auf zelluläre Interaktionen, das *bone remodelling* und das potenzielle Differenzierungsverhalten der Zellen zu erlangen, sollten anschließend die oben beschriebenen Proteine COL1, RUNX2, RANKL und SMURF2 untersucht werden. Ziel war es die Proteine zunächst immunzytochemisch nachzuweisen, deren Lokalisation innerhalb der Zelle zu untersuchen und das relative Proteinlevel im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollgruppe mit Westernblots zu bestimmen.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte

Tabelle 1: Geräte

Gerät	Bezeichnung, Hersteller, Ort, Land
Blot-Scanner	# 9000F Mark II, Canon, Krefeld, D
Blot-Transferkammer	PerfectBlue, peqLab, Erlangen, D
Elektrophoresekammer	Nachbau, wissenschaftliches Labor UMG, Göttingen, D
Fluoreszenz Mikroskop Keyence BZ-X710	# BD410013, Keyence, Japan
Herafreeze, -86 °C	Herasafe™ KS12, Thermo Fisher, Waltham, USA
Inkubator	C200 # 13946, Labotect Labor-Technik-Göttingen GmbH, Rosdorf, D
Kamera Nikon D90	D90, Nikon, Düsseldorf, D
Lumineszenz-Scanner	C-DiGit, LI-COR, Bad Homburg, D
Mikroskop (für Objektträger)	# 415500-0004-000, Carl Zeiss, Jena, D
Mikroskop (für Zellkultur)	Axiovert 40 CFL, Carl Zeiss, Jena, D
Software: Lumineszenz-Scanner	ImageJ Studio Digits
Software Gel-Scanner	Canon Scan IJ
Software Statistik	Prism 9
Software Zellometer	Cellometer Auto
Wasserbad	# TW12 GB, Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach, D
Wippe	Duomax 1030 # 543-32205-00-3, Heidolph instruments, Schwabach, D
Zellometer	Cellometer Auto T4, Nexcelom, Lawrence MA, USA
Zentrifuge	# 58100011535, Eppendorf, Hamburg, D
Zentrifuge	# 54260015772, Eppendorf AG, Hamburg, D

2.2 Verbrauchsmaterial

Tabelle 2: Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Bezeichnung, Hersteller, Ort, Land
24-Well Platte	CytoOne # CC7672-7596, Starlab, Hamburg, D
6-Well-Platte	# 83.3920.300, Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, D
Cryoröhrchen	# 5000-1012, Thermo Fisher Scientific, Bremen, D
Deckgläser	Deckgläser 12mm # P231.1, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Einmal-Skalpell	# 11.000.00.724 No. 22, Dahlhausen & Co. GmbH, Köln, D
<i>Falcon Tube</i> 15 ml	# 62.554.502, Sarstedt, Nümbrecht, D
<i>Falcon Tube</i> 50 ml	# 62.547.254, Sarstedt, Nümbrecht, D
Flasche (25 cm ²)	# 83.3910.002, Sarstedt, Nümbrecht, D
Flasche (75 cm ²)	# 83.3911.000, Sarstedt, Nümbrecht, D
Lühr-Knochenzange	# FO472, Aesculap, Tuttlingen, D
Mowiol	# 4-88, Hoechst, Frankfurt-Höchst, D
Nylonsieb	# 11587522, Thermo Fisher Scientific, Bremen, D
Objektträger	# 7695002, Labsolute Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, D
Parafilm	# 9170002, Labsolute Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, D
PVDF-Membran	Immobilon-P # IPVH00010, Merck KGaA Millipore, Darmstadt, D
<i>Safe-Lock Tube</i>	# 0030 121.589, Eppendorf AG, Hamburg, D
Zellkulturschale	# 0690.1, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D

2.3 Chemikalien

Tabelle 3: Chemikalien

Chemikalien	Bezeichnung, Hersteller, Ort, Land
β -Mercaptoethanol	# 4227.3, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Blockingreagenz	# 120-000-442, MACS Miltenyi Biotec, Berg. Gladbach, D
Bovines Serumalbumin (BSA)	# A9647-50g, Sigma Aldrich, Steinheim, D
Collagenase 1	# 17018029, Gibco, Paisley, UK
DAPI	# 71-03-00, KPL, Gaithersburg, USA
Denosumab	XGEVA 70 mg/ml, AMGEN, München, D
Dimethylsulfoxid (DMSO)	# D2650-100ML, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Dispase	# 17105041, Gibco, Paisley, UK
Ethanol	# 2212.5000, Chemsolute, Renningen, D
Fetales Rinderserum (FCS)	# 10270-106, Gibco, Paisley, UK
Gentamycin	# HN09.1, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Methanol	# 4627.5, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Mowiol	# 4-88, Hoechst, Frankfurt-Höchst, D
Paraformaldehyd	# 0335.3, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Protein-Größenstandard (Western Blot)	PageRuler Prestained Protein Ladder, Thermo Fisher, Bremen, D
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)	Phosphate Buffered Saline # P4417, Sigma Aldrich, Steinheim, D
TRIS-Puffer	# 5429.3, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Triton	# 9002-93-1, Sigma Aldrich, Steinheim, D
Trypsin	PAN Biotech, Aidenbach, D
WesternBright Chemilumineszenz Substrat Sirius	# 541021, Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf, D
WesternBright ChemiePen	# P/N 926-91000, LI-CORE, Lincoln NE, USA
Zolendronat	# 10355023 4 mg/ 5 ml, Accord, München, D

2.4 Probengewinnung

Kortikale Knochenproben aus dem Ober-, oder Unterkiefer wurden bei drei weiblichen Patientinnen im Zuge eines medizinisch notwendigen Eingriffs entnommen. Die chirurgischen Eingriffe fanden in der Abteilung für Mund-, Kiefer und Gesichtschirurgie der Universitätsmedizin Göttingen (UMG) statt. Bei keiner der Patientinnen lagen eine *medication related osteonecrosis of the jaw* (MRONJ) oder andere Knochenpathologien vor. Bis zur weiteren Aufarbeitung wurden die Proben in *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) gelagert. Dem Medium waren 10 % *fetal calf serum* (FCS) und Gentamycin 1 μ l/ml beigemischt. Anschließend wurden die Zellen der osteoblastären Linie, einem laboreigenen Protokoll folgend, aus dem Kieferknochen isoliert.

Der Probenentnahme stimmten vor dem Eingriff alle Patientinnen schriftlich zu. Die Gewebeentnahme für Versuche in diesem Labor wird durch den Ethikantrag vom 16/06/09 geregelt.

Collagenase 1 und Dispase wurden in einer Konzentration von 0,5 mg/ml (Dispase) und 0,8 mg/ml (Collagenase 1) dem Zellkulturmedium DMEM (10 % FCS, Gentamycin 1 μ l/ml) beigemischt und die Lösung anschließend steril filtriert. Die Knochenproben wurden in einer Zellkulturschale mit einem Skalpell grob zerkleinert, alle umliegenden Gewebereste (Parodontales Ligament, Knochenmark) entfernt und immer wieder mit *phosphate-buffered saline* (PBS) gewaschen. Die weitere Zerkleinerung erfolgte mit einer Lühr-Knochenzange in ca. 1 – 2 mm große Stücke. Um die Zellen aus dem Gewebe zu lösen, wurden die Knochenstücke in eine 25 ml Zellkulturflasche überführt und mit 20 ml des oben beschriebenen Mediums bedeckt. Über Nacht wurden die Knochenproben für (24 h) bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit, unter ständigem Rühren durch einen Magnetrührer inkubiert. Ziel war es die mineralischen Knochenbestandteile aufzulösen und die Zellen zu isolieren.

Am folgenden Tag erfolgte eine Filtration des Flascheninhaltes durch ein 40 μ m Nygonsieb. Die Suspension wurde für 10 min bei 1200 *revolutions per minute*, bzw. Umdrehungen pro Minute (rpm) zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach Resuspension in 2 ml DMEM (10 % FCS, Gentamycin 1 μ l/ml) wurde die Anzahl lebender Zellen statistisch mithilfe eines Zellometers ermittelt. Die Zellen-, Knochensuspension wurde nun auf eine 6-Well-Platte verteilt und jedes Well mit 3 ml DMEM aufgefüllt. 24 h später wurde das Medium abgenommen. Der Wellinhalt wurde dreimal mit PBS gewaschen, um kleinere verbliebene Knochenbestandteile zu entfernen und folgend erneut mit Medium bedeckt. Dieser Vorgang wurde nun alle zwei bis drei Tage wiederholt, bis der Wellboden unter optischer, mikroskopischer Kontrolle sichtbar mit Zellen der osteoblastären Linie bewachsen war. Daraufhin erfolgte das Ernten der Zellen (vgl. 2.4.3). Die Kultivierung wurde bis Passage 3 fortgesetzt. Ab Passage 3 waren die Zellen bereit für die weiterführenden Versuche.

2.4.1 Zellkultur

Die Zellen der osteoblastären Linie wurden unter sterilen Bedingungen an einer Zellbank, bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Mit 70 % Ethanol wurden alle Oberflächen sowohl vor als auch nach der Arbeit an der Zellbank gereinigt. Die Kultur fand in 75 cm² Flaschen mit 10 ml Zellkulturmedium statt.

2.4.2 Medium

Als Standardmedium für die Zellkultur wurde DMEM genutzt. Diesem wurden 0,1 % Gentamycin zur Vorbeugung einer bakteriellen Kontamination sowie 10 % FCS zur Ergänzung von Proteinen und Wachstumsfaktoren hinzugefügt.

Für eine andauernde und ausreichende Versorgung mit Nährstoffen wurde das Medium alle 2-3 Tage gewechselt. Dem Standardmedium wurden für die Hauptversuche das Bisphosphonat Zoledronat und der monoklonale Antikörper DEN (vgl. Tabelle 3) hinzugefügt. Die Medikamentenkonzentrationen im Arbeitsmedium betragen bei ZOL 1 µM (0,3667 µl/ml) und bei DEN 1 µM (4,2 µl/ml). Sie wurden anhand in der Literatur beschriebener Versuche ausgewählt, bei deren Durchführung trotz nachweislicher Wirkung der Medikamente eine ausreichende Zellviabilität beschrieben wurde (Huang et al. 2015; Mosch et al. 2019).

Tabelle 4: Standardmedium

Basismedium	Zusatz
DMEM	0,1 % Gentamycin 10 % FCS

Tabelle 5: Arbeitsmedien

Basismedium	Zusatz
DMEM	0,1 % Gentamycin 10 % FCS 1 µM Zoledronat oder 1 µM Denosumab

2.4.3 Ernte und Kultivierung

Um ein Entarten der Zellen zu verhindern, wurden die Zellen bei Erreichen einer 80 % Konfluenz geerntet und geteilt. Die Zelldichte wurde täglich unter dem Mikroskop kontrolliert.

Zunächst wurde das alte Medium verworfen und die Flaschen 2× mit 5-10 ml PBS gewaschen. Um die Zellen von der Flasche zu lösen, wurden pro Flasche 2 ml Trypsin hinzugegeben und für 3-5 Minuten in den Inkubator gestellt. Leichtes Klopfen gegen die Flaschen erleichterte das Ablösen und ein vollständiges Ablösen der Zellen wurde mikroskopisch kontrolliert.

Die Wirkung des Trypsins wurde anschließend mit einer äquivalenten Menge DMEM abgestoppt und die Zellsuspension in ein 50 ml Röhrchen überführt. 2-3-maliges erneutes Spülen der Flaschen mit DMEM garantierte ein nahezu vollständiges Überführen aller Zellen.

Der Inhalt der Röhrchen wurde für 10 Minuten bei 1200 rpm abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das verbleibende Zellpellet wurde je nach Zellmenge mit 1 oder 2 ml PBS resuspendiert. 20 µl der Suspension wurden in eine Zählkammer pipettiert und die Gesamtzellmenge mittels Zellometer optisch statistisch ermittelt.

Für die Fortsetzung der Kultur in der nächsthöheren Passage wurden pro Flasche 4×10^5 Zellen ausgesät. Dies ermöglichte ein Passagieren der Zellen etwa alle sieben Tage.

2.4.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Um Zellen für spätere Versuche zurückzuhalten und zu häufiges Passagieren zu vermeiden, wurden die Zellen mittels eines speziellen Einfriermediums (70 % DMEM, 20 % FCS, 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO)) bei -196 °C in flüssigem Stickstoff eingefroren. Je 1×10^6 Zellen wurden direkt in Anschluss an die Zellernte in 1 ml Einfriermedium resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Zuvor wurde eine Einfrierbox mit 100 % Isopropanol vorbereitet. Diese gewährleistet über einen Zeitraum von 24 h ein langsames Herunterkühlen der Zellen um $1\text{ °C}/1\text{ min}$ im Gefrierschrank bei -82 °C , bevor sie in flüssigen Stickstoff überführt werden.

Aufgetaut wurden die Zellen im Wasserbad bei 37 °C . Danach wurde der gesamte Inhalt des Kryoröhrchens in einer Zellkulturflasche mit DMEM auf 10 ml aufgefüllt. Nach 24 h wurde das Medium erneut gewechselt, um Einfriermediumreste und Zelltrümmer zu entfernen.

2.5 Immunzytochemie

2.5.1 Allgemeines zur Immunzytochemie

Bei der Immunzytochemie oder *immunocytochemistry* (ICC) handelt es sich um eine Immunfluoreszenzmethode, die es ermöglicht membranständige Proteine in fixierten und strukturell intakten Zellen nachzuweisen. Bei der hier angewandten indirekten Methode geschieht dies mithilfe eines primären und sekundären Antikörpers. Der Primäre bindet direkt an das gesuchte Protein. An diesen kann dann ein sekundärer Antikörper andocken,

der wiederum mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist. Dieser Farbstoff kann mit einem Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen werden. Dabei wird der Farbstoff mit Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt, wodurch das gesuchte Protein optisch sichtbar gemacht wird.

2.5.2 Versuchsaufbau

Für den hier geschilderten Versuch wurden pro Patientin je eine 24-Well-Platte benötigt. Für jeden der zu untersuchenden Antikörper wurden drei Wells vorbereitet. Eines für die Behandlung mit Zoledronat, eines für die Behandlung mit Denosumab und eines für die unbehandelte Kontrolle. Außerdem ein Well zur Negativkontrolle des sekundären Antikörpers.

Nach der wie oben beschriebenen Zellernte wurden pro Well 1×10^3 Zellen der osteoblastären Linie ausgesät und mit 3 ml Standardmedium bedeckt. Das Standardmedium wurde am darauffolgenden Tag durch 3 ml des entweder Zoledronat oder Denosumab enthaltenden Arbeitsmediums ersetzt und für 5 weitere Tage inkubiert. Am dritten Tag erfolgte ein Wechsel des Arbeitsmediums.

Die zu untersuchenden Zellen mussten am Ende der Inkubationszeit mittels Paraformaldehyd (PFA) fixiert werden. Zusätzlich war genaue Kenntnis über die Lage des Proteins innerhalb der Zelle wichtig. Denn bei Proteinen, die kein Bestandteil der äußeren Zellmembran sind, dagegen intrazellulär liegen, musste die Zellmembran mit TritonX-100 permeabilisiert werden. Dadurch konnten auch Proteine mit intrazellulärer Lage von den Antikörpern erreicht werden.

Damit keine unspezifische Bindung mit anderen Molekülen stattfindet, mussten diese vor Zugabe des primären Antikörpers mit bovinem Serumalbumin (BSA) geblockt werden.

Bis zum Blocken wurden alle Schritte innerhalb der Wells durchgeführt. Danach wurden die Deckgläschen auf eine mit Parafilm überzogene und äquivalent zu den 24-Well-Platten beschriftete Box gelegt. Hier erfolgten alle weiteren Schritte bis zum Eindeckeln. Die Antikörperinkubation fand in einer feuchten Kammer bei 37 °C statt. Genauere Beschreibung der Antikörper und deren Konzentration sind den Tabellen zu entnehmen (vgl. Tabelle 7, Tabelle 8).

Um die fertig behandelten Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachten zu können, wurden die Deckgläschen (DG) einseitig mit Mowiol bedeckt und langsam auf einem Objektträger abgelegt. Zum Aushärten des Mowiol, wurden die Objektträger für ca. 1 h im Kühlschrank gelagert. Die fertigen Objektträger konnten nun unter dem Fluoreszenzmikroskop verwendet oder für einige Tage weiter im Kühlschrank aufbewahrt werden. Es wurden Aufnahmen mit 20×, 40× und 60× Vergrößerung gemacht. Das exakte Protokoll ist nachfolgend beschrieben (vgl. Tabelle 6).

Tabelle 6: Protokoll Immunzytochemie

Arbeitsschritt	Material	Zeit
Fixierung	2 % PFA (300 μ l/Well)	15 min
2x Waschen	PBS (300 μ l/Well)	je 1 min
Permeabilisierung	0,25 % TritonX-100 in PBS (300 μ l/Well)	10 min
2-3x Waschen	PBS (300 μ l/Well)	je 1 min
Blocken	1 % BSA in PBS (100 μ l/DG)	15 min
1. AK	AK mit 1 % BSA in PBS (25-50 μ l/DG)	60 min
2x Waschen	PBS (100 μ l/DG)	je 1 min
2. AK	AK mit 1 % BSA in PBS (25-50 μ l/DG) + DAPI (1:1000)	30-60 min
2x Waschen	PBS (100 μ l/DG)	je 1 min
Eindeckeln	Mowiol (5-10 μ l/DG)	30 min
Fotografieren	Fluoreszenzmikroskop Keyence	/

Tabelle 7: primäre Antikörper Immunzytochemie

AK	Verdünnung	Ursprung	Hersteller, Bestellnr.
COL1	1:50	<i>rabbit</i>	Origene, # R1038X
RANKL	1:50	<i>rabbit</i>	Proteintech, # 23408-1-AP
Runx2	1:50	<i>rabbit</i>	Santa Cruz, # sc-10758
Smurf2	1:50	<i>rabbit</i>	Santa Cruz, # sc-130878

Tabelle 8: sekundäre Antikörper Immunzytochemie

AK	Verdünnung	Ursprung	Hersteller, Bestellnr.
anti-rabbit IgG H&L Alexa Fluor 555	1:1000	<i>donkey</i>	abcam, # ab150074

2.6 Westernblot

2.6.1 Allgemeines zu Westernblots

Das Ziel eines Westernblots, auch Immunoblot genannt, ist es spezifische Proteine innerhalb eines Proteingemisches nachzuweisen und deren Mengen semiquantitativ zu bestimmen. Zunächst muss das Proteingemisch mittels Gelelektrophorese nach Größe und molekularer Masse aufgetrennt werden. Die Trennung erfolgt innerhalb eines Polyacrylamid-Gels, indem ein elektrisches Feld erzeugt wird. Durch die negative Ladung wandern die Proteine entlang des elektrischen Feldes hin zur Anode. Aufgrund ihrer unterschiedlichen molekularen Masse und Struktur bewegen sich die Proteine durch Lücken im Gitternetz des Gels, mit voneinander abweichenden Geschwindigkeiten, woraus sich ein charakteristisches Bandenmuster ergibt. Der eigentliche Blotvorgang folgt erst im nächsten Schritt. Die Proteine werden, durch ein diesmal senkrecht zum Gel verlaufendes elektrisches Feld, vom Polyacrylamid-Gel auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF-Membran) übertragen. Die geblotteten Proteinbanden können nun durch Anfärben sichtbar gemacht werden.

Um gesuchte Proteine zu detektieren, werden Antikörper genutzt, die an antigene Epitope der Proteine andocken. An den primären Antikörper bindet wiederum ein sekundärer Antikörper. Durch ein an diesen sekundären Antikörper gebundenes Enzym wird ein chemilumineszentes Substrat gespalten, dessen Reaktion mithilfe eines Lumineszenzscanners optisch festgehalten werden kann. Über unterschiedliche Intensitäten des Signals erfolgt die semiquantitative Auswertung.

2.6.2 Vorbereitung der Proteinproben

Die Proteinproben wurden ebenfalls aus Zellen, der im Abschnitt Probengewinnung beschriebenen osteoblastären Linie, gewonnen (vgl. 2.4).

In Passage 4 wurden pro Flasche 1×10^5 Zellen ausgesät und mit 10 ml Standardmedium bedeckt. Erreichten die Zellen 60 % Konfluenz, wurde bei 2/3 der Flaschen das Standardmedium durch die Arbeitsmedien ersetzt und für 5 Tage kultiviert. Für jede Patientin gab es somit Flaschen, die entweder Arbeitsmedium mit Zoledronat oder Denosumab enthielten oder Flaschen mit Standardmedium. Nach 3 Tagen wurde das Medium erneuert. Am fünften Tag wurden die Zellen, wie im bereits geschilderten Protokoll geerntet (vgl. 2.4.3). Nachdem die Zellzahl am Zellometer ermittelt wurde, konnten Zellpellets von je $5,5 \times 10^5$ Zellen pro *Safe-Lock Tube* bei -82°C eingefroren werden. Hierbei war kein Einfriermedium notwendig, da bei Westernblots ausschließlich Proteine und keine lebenden Zellen betrachtet werden.

Proben für die mit Standardmedium behandelten Zellen wurden nach dem gleichen Protokoll gewonnen und bildeten die Kontrollgruppe. Zellen der Kontrollgruppe wurden bis zur Passage 6 verwendet. Für die Durchführung der Westernblots wurden die Zellpellets

bei Raumtemperatur für 10 min aufgetaut. Neun Teile des 3-fach konzentrierten SDS-Probenpuffers wurden mit einem Teil β -Mercaptoethanol vermischt. 10 μ l dieser Lösung wurden pro 1×10^5 Zellen auf das Zellpellet pipettiert, resuspendiert und bei 95 °C für 5 min in einem Heizblock vorbereitet. Dies führte zur Auflösung der molekularen Wechselwirkungen der Peptidketten, wodurch die Proteine in ihrer Primärstruktur vorlagen. Das ist essenziell für die folgenden Schritte.

Tabelle 9: SDS-Probenpuffer

SDS-Probenpuffer	Inhalt	Menge
3fach konzentriert	0,3 M Tris-Puffer in H ₂ O	3,6 g
	9 % SDS	9 g
	22,5 % Glycerin	22,5 g
	Bromphenolblau	Spatelspitze
Mit Aqua dest. auf 100 ml auffüllen und pH mit HCL auf 6,7 einstellen		

2.6.3 SDS-PAGE

Die diskontinuierliche *sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoreses* (SDS-PAGE) diente der anfänglichen Auftrennung des Proteingemisches.

Zunächst wurden die Polyacrylamidgele hergestellt. Die Zusammensetzung ist den Tabellen zu entnehmen (vgl. Tabelle 11, Tabelle 12, Tabelle 13). Zwei gereinigte Glasplatten wurden mit einem Dichtungsgummi versehen, aufeinandergelegt und mit Klemmen fixiert. Zwischen diese konnte zunächst das Trenngel (10 %) appliziert werden. Die Höhe des Gels wurde durch eine 6 cm vom Unterrand der Glasplatten entfernte Markierung festgelegt. Nach Aushärten des Trenngels wurde der obere Teil mit dem Sammelgelansatz aufgefüllt und mit einem Kamm die Taschen für die spätere Probenapplikation geformt. Die fertigen Gelplatten wurden ohne Blasenbildung in eine mit $1 \times$ Laufpuffer (vgl. Tabelle 10) befüllte Elektrophoresekammer gestellt. In die Taschen wurden 25 μ l der Proben pipettiert. Zusätzlich wurden 4 μ l eines Protein-Größenmarkers in eine Tasche pipettiert. Im Sammelgel wurden die Proteine durch einen Strom von 15 mA an der Trenngelkante konzentriert. Mit 25 mA pro Gel erfolgte die Auftrennung der Proteine innerhalb des Trenngels. Durch das in den Gelen vorhandene Molekülgerüst des Polyacrylamids wanderten die Proteine je nach Struktur und molekularer Größe in unterschiedlicher Geschwindigkeit von der Kathode zu Anode.

Tabelle 10: 1x Laufpuffer

Puffer	Inhalt	pH
1x Laufpuffer	0,4 M TRIS-Puffer 0,125 % SDS 0,725 M Glycin in Aqua dest.	

Tabelle 11: Trenn- und Sammelgelpuffer

Puffer	Inhalt	pH
Trenngelpuffer	1,5 M Tris-Puffer in Aqua. dest.	8,9
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris-Puffer in Aqua. dest.	6,8

Tabelle 12: Zusammensetzung Sammelgel (5%)

Substanz	Menge
Puffer (s.o)	1,25 ml
10 % SDS	50 μ l
TEMED	5 μ l
Acrylamid	0,8 ml
H ₂ O	2,7 ml
10 % APS	0,2 ml

APS wurde als letzter Bestandteil hinzugefügt

Tabelle 13: Zusammensetzung Trenngel (10%)

Substanz	Menge
Puffer (s.o)	1,4 ml
10 % SDS	55 μ l
TEMED	5 μ l
Acrylamid	1,85 ml
H ₂ O	2,0 ml
10 % APS	0,25 ml

APS wurde als letzter Bestandteil hinzugefügt

2.6.4 Blotten der Proteine auf die Membran

Um die Proteine nachweisen zu können, folgte der namensgebende Teil der Methode. Beim Blotten werden die im Gel enthaltenen Proteine auf eine PVDF-Membran zur weiteren Analyse übertragen.

Der Aufbau des hierfür benötigten Wet-Blot-Sandwiches stellt sich wie folgt dar. 15 min vor Zusammenbau des Sandwiches wurden zwei Schwämme, sechs Filterpapiere (9 cm × 6 cm) und die PVDF-Membran (9 cm × 6 cm) in Transferpuffer (vgl. Tabelle 14) eingelegt. Dann wurden in einer bereits mit benutzten Transferpuffer gefüllten Box drei Filterpapiere vorgelegt. Darauf wurde die vorher für 10 s in 100 % Methanol aktivierte PVDF-Membran platziert. Das Proteingel wurde nun blasenfrei auf die PVDF-Membran gelegt und wurde mit drei weiteren Filterpapieren bedeckt. Die Blot-Kassette wurde daraufhin geschlossen und mit zwei Gummibändern fixiert.

Die fertigen Kassetten wurden in eine mit frischem, gekühltem Transferpuffer gefüllte Blot-Transferkammer gestellt. Das Gel zeigte dabei zur Kathode und die PVDF-Membran zur Anode. Ein Strom von 350 mA wurde senkrecht zur Kassette für 90 min angelegt. Die Proteine wanderten dadurch von der Kathode zur Anode, also vom Gel zur PVDF-Membran und blieben aufgrund von hydrophoben Wechselwirkungen an dieser haften.

Tabelle 14: Transferpuffer

Puffer	Inhalt	pH
Transferpuffer	25 mM TRIS-Puffer 192 mM Glycin 20 % Methanol in Aqua dest.	8,3

Um einen erfolgreichen Blot nachzuweisen, wurden die Membranen anschließend mit einer Coomassie-Blau-Lösung (vgl. Tabelle 15) für 2-10 min angefärbt. Die Banden wurden darauf durch mehrfaches Spülen mit einer Endfärbelösung (vgl. Tabelle 15) auf der Membran sichtbar gemacht, da die Coomassie-Blau-Lösung an den proteinbehafteten Bereichen stärker adhärert als an den Bereichen ohne Protein. Die Membranen wurden zuletzt eingescannt und dokumentiert.

Tabelle 15: Lösungen Coomassie-Färbung

Lösung	Inhalt
Coomassie-Blau-Lösung	0,1 % Brilliant-Blau R 250 50 % Methanol 7 % Essigsäure in Aqua dest.
Endfärbelösung	50 % Methanol 7 % Essigsäure mit Aqua dest. auf 100 ml aufgefüllt

2.6.5 Proteindetektion

Der letzte Teil umfasste alle Schritte des Proteinnachweises. Zunächst wurde ein primärer spezifischer Antikörper benötigt, der direkt an das nachzuweisende Protein koppelt. Dann wurde ein sekundärer Antikörper hinzugegeben, der generalisiert an die Ursprungsspezies des primären Antikörpers bindet (*mouse, rabbit*). Der Nachweis erfolgt dann über eine Chemilumineszenzreaktion. Das an den sekundären Antikörper gekoppelte Enzym *horseradish*-Peroxidase (HRP) spaltet das am Ende hinzugefügte Substrat (WesternBright Sirius) und verursachte eine optisch nachweisbare Reaktion. Die Stärke dieser Reaktion wurde mit einem Lumineszenz-Scanner gemessen und dokumentiert.

Folgendes Protokoll wurde hierfür angewandt. Zu Beginn mussten alle unspezifischen Proteine für 1 h mit einer Blocking-Lösung geblockt werden. Dazu diente 5 % Milchpulver in *tris-buffered saline and tween 20* (TBS-T). Die primären Antikörper wurden für 24 h bei 4 °C auf einer Wippe inkubiert. Außer den in dieser Arbeit untersuchten Proteinen wurden sogenannte *housekeeping*-Proteine detektiert. α -Tubulin und Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) sind ubiquitär vorkommende Strukturproteine und eignen sich daher zur Normalisierung der Ergebnisse. Die Antikörper wurden in Milch oder BSA enthaltenden Blocking-Lösungen in TBS-T verdünnt. Genauere Informationen zu den Antikörpern und deren Verdünnung sind den Tabellen zu entnehmen (vgl. Tabelle 16, Tabelle 17). Nach der Inkubation mussten alle nicht gebundenen Antikörper durch 5maliges Waschen mit TBS-T für je 5 min entfernt werden. Anschließend konnte für 1 h die Inkubation mit den sekundären Antikörpern bei Raumtemperatur erfolgen. Die Auswahl des sekundären Antikörpers wurde an die Spezies des primären Antikörpers angepasst. Erneutes 5maliges Waschen mit TBS-T entfernte auch hier die nicht gebundenen Antikörper.

Vor der Chemilumineszenzreaktion wurden die Banden des Protein-Größenstandards mit dem WesternBright ChemiPen markiert. Die rot markierte 70 kDa Bande wurde zur

Orientierung hervorgehoben. Nun war es möglich anhand dieser Markierungen die Proteine mit den Größenangaben der Hersteller und zusätzlicher Literatur zu vergleichen.

Das WesternBright Chemilumineszenz Substrat Sirius wurde aus seinen beiden Komponenten im Verhältnis 1:1 zusammengemischt, auf die vorbehandelte Membran gegeben und für 5 min unter Lichtausschluss inkubiert. Nun konnte die HRP Enzymreaktion des sekundären Antikörpers und des Substrats ablaufen. Diese Chemilumineszenzreaktion wurde mit einem Lumineszenz-Scanner erfasst und die Intensität der Lichtreaktion mit der Software ImageJ ausgewertet. Durch den Vergleich der Zielproteine mit den *housekeeping*-Proteinen war es möglich die Werte zu normalisieren. Dazu wurde der Quotient Zielprotein/*housekeeping*-Protein gebildet. Diese normalisierten Werte der behandelten Zellen und der Kontrollgruppe konnten somit ins Verhältnis gesetzt und relative Proteinmengen bestimmt werden.

Tabelle 16: primäre Antikörper WB

AK	Verdünnung	Ursprung	Größe	Hersteller, Bestellnr.
COL1	1:500 (1 % Milch)	<i>rabbit</i>	150 kDa	Origene, # R1038X
RANKL	1:750 (1 % Milch)	<i>rabbit</i>	37 kDa	Proteintech, # 23408-1-AP
Runx2	1:1000 (1 % Milch)	<i>rabbit</i>	60 kDa	Cell-Signaling, # 8486
Smurf2	1:750 (1 % BSA)	<i>mouse</i>	86 kDa	Santaa Cruz, # sc-393848
α -Tubulin	1:5000 (1 % BSA)	<i>mouse</i>	50 kDa	Sigma Aldrich, # T6074-200UL

Tabelle 17: sekundäre Antikörper WB

AK	Verdünnung	Ursprung	Größe	Hersteller, Bestellnr.
Anti- <i>Mouse</i>	1:40000 (1 % BSA)	<i>goat</i>	150 kDa	Origene, # R1038X
Anti- <i>Rabbit</i>	1:100000 (1 % BSA)	<i>goat</i>	37 kDa	Proteintech, # 23408-1-AP

2.6.6 Strippen der Membranen

Um auf der gleichen Membran oder der gleichen *Line* einer Membran erneut Proteine detektieren zu können, die gleiche oder ähnliche Größen hatten, wurden die Antikörper von der Membran entfernt. Bei 60 °C wurden die Membranen 15 min in einen Stripping-Puffer (vgl. Tabelle 18) gelegt. Um den Stripping-Puffer wieder zu entfernen, folgten zwei Waschschriffe für je 10 min mit TBS-T. Für eine erneute Verwendung wurden die Membranen für 15 s mit 100 % Methanol gewaschen und anschließend 15 min getrocknet. Danach wurden sie bei -20 °C eingefroren.

Tabelle 18: Stripping-Puffer

Puffer	Inhalt	pH
Stripping-Puffer	40 mM Tris-HCl 2 % SDS 150 mM 2-Mercaptoethanol in Aqua dest.	6,7

2.6.7 Statistische Auswertung

Pro Protein wurden Zellen der osteoblastären Linie von drei Patientinnen untersucht wodurch sich pro Protein drei biologische Replikate (n=3) ergaben. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Statistikprogramms Prism 9. Das Signifikanzniveau wurde mit einem *Students T-Test* ermittelt und die Ergebnisse bei einem p-Wert < 0,05 als signifikant erachtet.

3 Ergebnisse

3.1 Probengewinnung

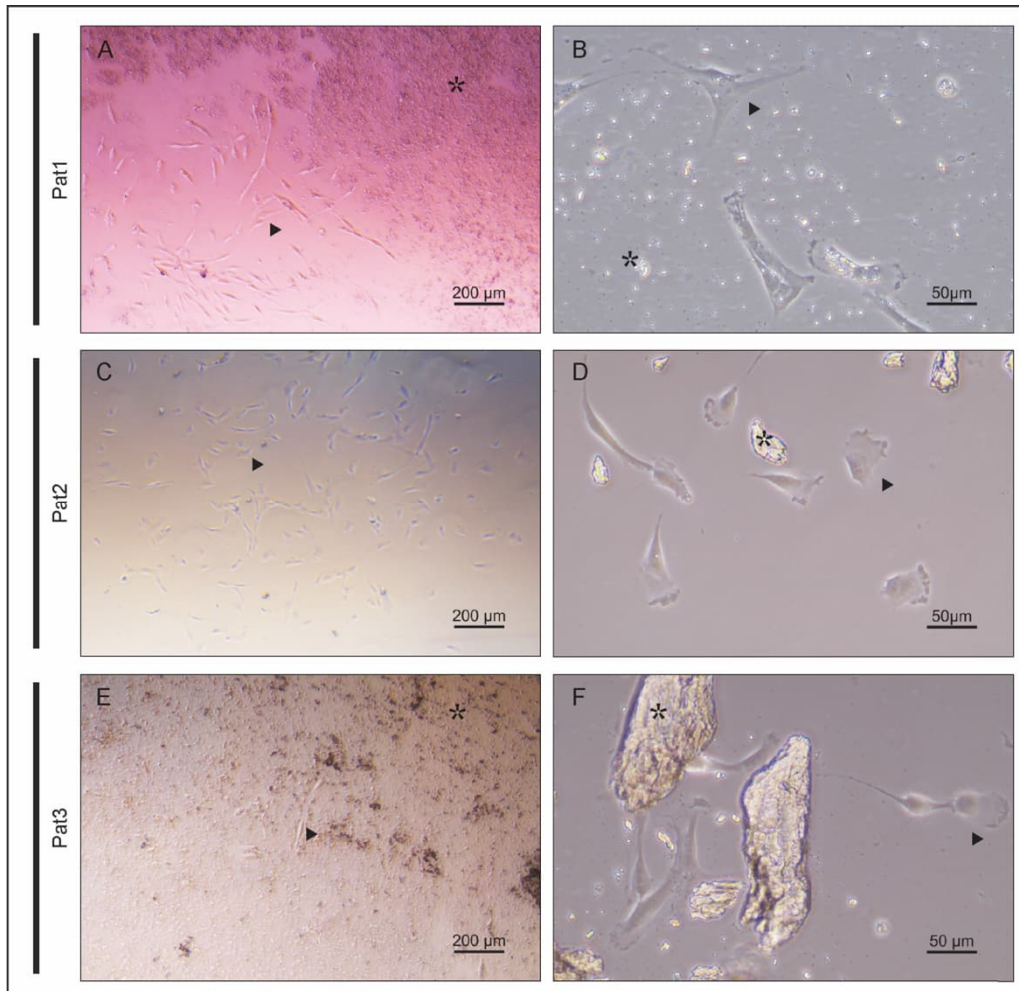


Abbildung 2: Probengewinnung. Links sind Aufnahmen mit dem Mikroskop Axiovert 40 CFL unter 5-facher und rechts unter 20-facher Vergrößerung gezeigt. Die Pfeile markieren jeweils die Zellen. Die Sterne markieren die mineralischen Knochenbestandteile. Die Balken entsprechen links einer Strecke von 200 µm und rechts von 50 µm A: Patientin 1: 7 d nach Aussäen in 6-Well-Platten. B: Patientin 1: 1 d nach erstmaligen Passagieren. C: Patientin 2: 10 d nach Aussäen in 6-Well-Platten. D: Patientin 2: 4 d nach Aussäen in 6-Well-Platten. E: Patientin 3: 3 d nach Aussäen in 6-Well-Platten. F: Patientin 3: 3 d nach Aussäen in 6-Well-Platten.

Zellen der osteoblastären Linie wurden mithilfe eines mit Collagenase 1 und Dispase versetzten Mediums (DMEM) aus den mineralischen Bestandteilen der Knochenproben isoliert und in 6-Well-Platten initial kultiviert (vgl. 2.4). Es war zu beobachten, wie die Zellen aus den mineralischen Knochenbestandteilen auswuchsen. Nach 10 d wurde ein erstes Mal passagiert, nachdem ein Großteil der mineralischen Knochenbestandteile entfernt und der Well-Boden dicht mit Zellen bewachsen war. Da die Knochenproben initial gründlich von allen anderen Geweben befreit wurden, waren die Zellen auch ohne vorherige Zugabe eines Differenzierungsmediums der osteoblastären Linie zuzuordnen. Morphologisch war eine Mischpopulation aus den verschiedenen Stadien der osteoblastären Linie zu beobachten.

3.2 Proteinlokalisierung

Um die in dieser Arbeit untersuchten Proteine schließlich nachzuweisen und um mögliche Unterschiede der Proteinlokalisierung oder der Fluoreszenzintensität darzustellen, wurden sie mit einer immunzytochemischen Fluoreszenzreaktion sichtbar gemacht (vgl. 2.5). Für die hier durchgeführte Immunzytochemie wurden die Zellen jeder Patientin für 5 d entweder mit ZOL, DEN oder einem Kontrollmedium inkubiert.

3.2.1 COL1

Bei COL1 handelt es sich um einen der organischen Hauptbestandteile der EZM des Knochengewebes. Die Translation dieses Strukturproteins findet im Zytosol statt, weshalb es sich dort immunzytochemisch nachweisen lässt (vgl. 1.3.1).

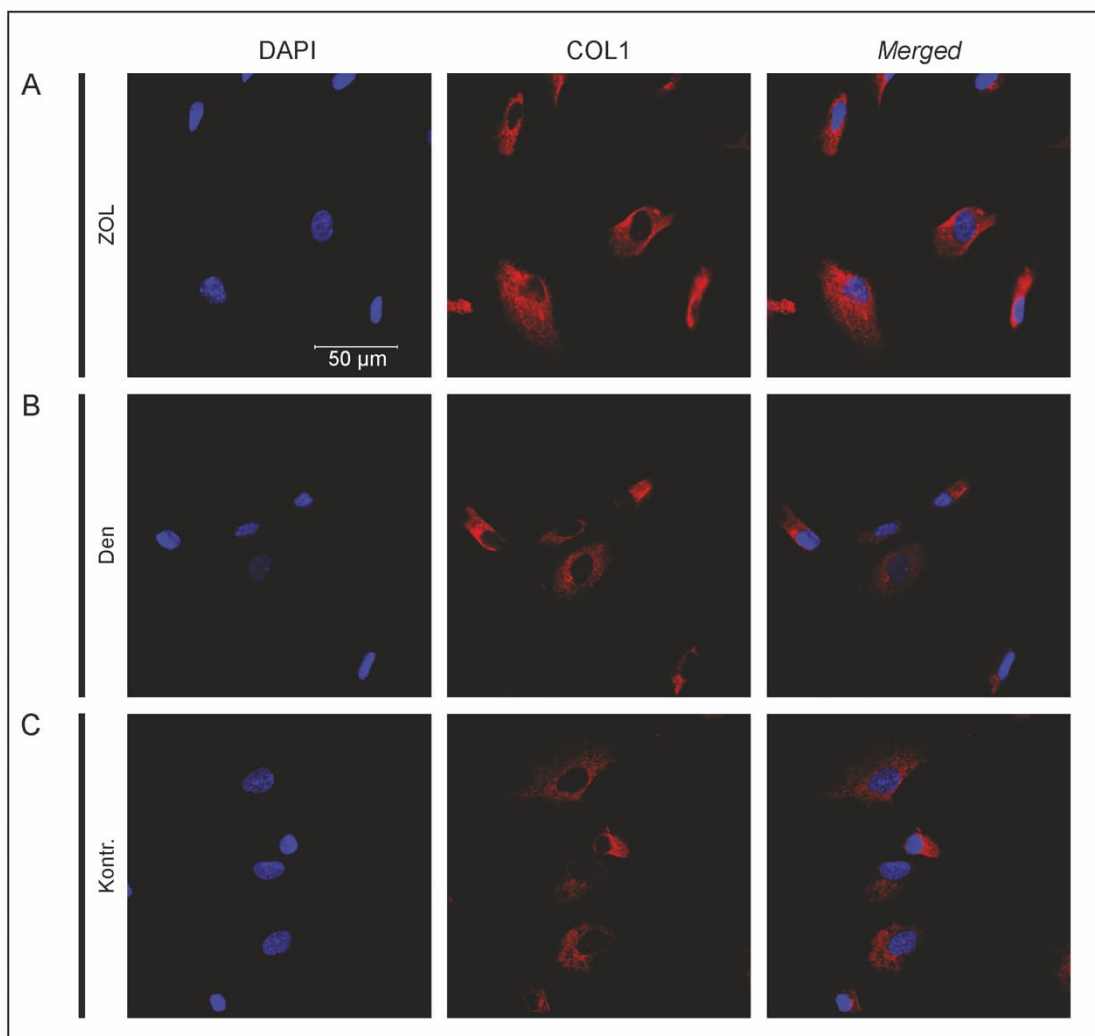


Abbildung 3: ICC, COL1, Patientin 1. Die linke Spalte zeigt die Zellkerne mit einer DAPI-Färbung. In der Mitte ist die AK-Fluoreszenzreaktion von COL1 gezeigt. Rechts wurden beide Aufnahmen zusammengeführt. Die Aufnahmen wurden mit 60-facher Vergrößerung durchgeführt. Der weiße Balken entspricht einer Länge von 50 µm. A: Zellen wurden mit ZOL behandelt. B: Zellen wurden mit DEN behandelt. C: Kontrollgruppe ohne Behandlung.

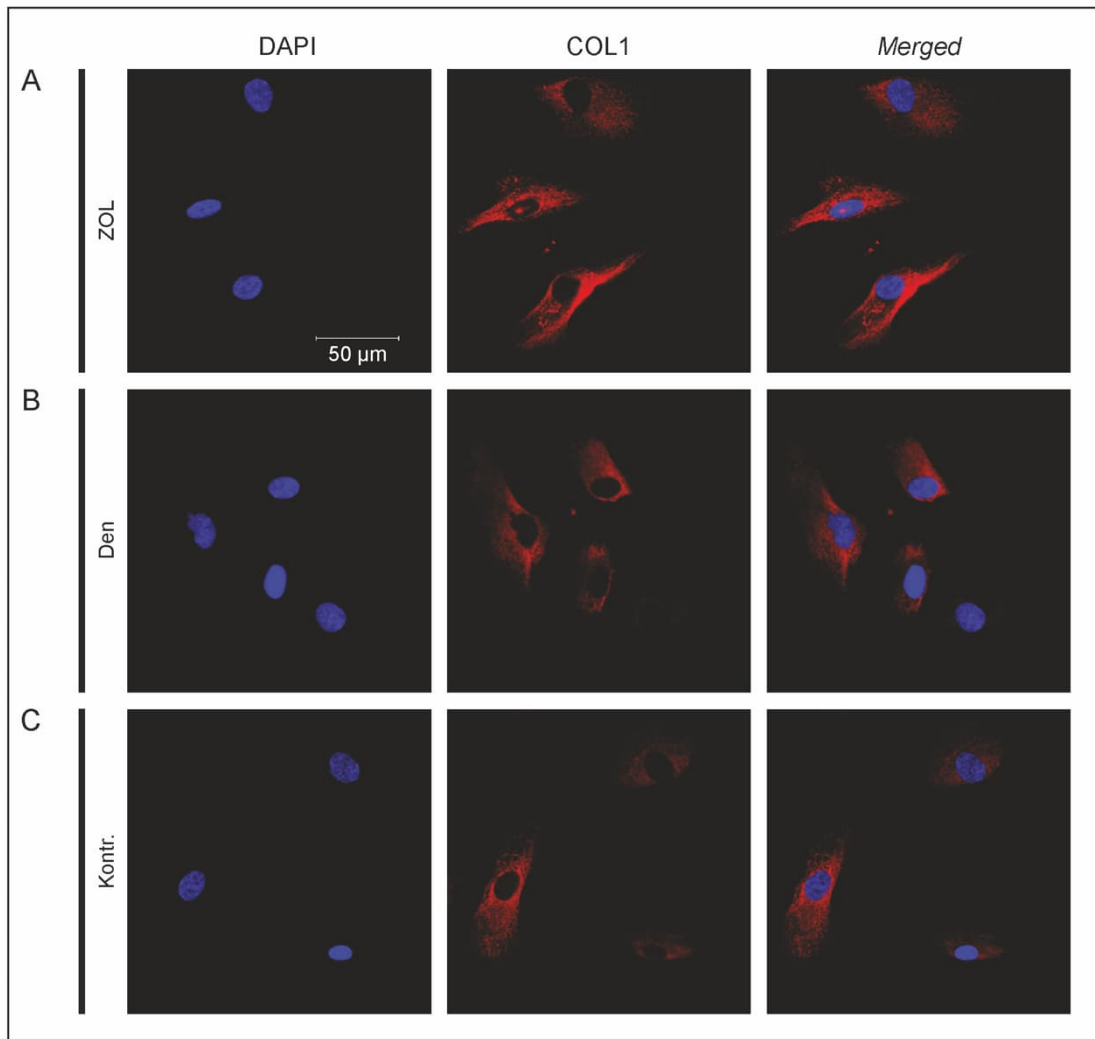


Abbildung 4: ICC, COL1, Patientin 2. Die linke Spalte zeigt die Zellkerne mit einer DAPI-Färbung. In der Mitte ist die AK-Fluoreszenzreaktion von COL1 gezeigt. Rechts wurden beide Aufnahmen zusammengeführt. Die Aufnahmen wurden mit 60-facher Vergrößerung durchgeführt. Der weiße Balken entspricht einer Länge von 50 μm . A: Zellen wurden mit ZOL behandelt. B: Zellen wurden mit DEN behandelt. C: Kontrollgruppe ohne Behandlung.

Bei Patientin 1 zeigte sich bei allen drei Gruppen die zu erwartende Antikörperreaktion mit COL1 im Zytoplasma. Bei den mit ZOL behandelten Zellen war die Fluoreszenzintensität etwas stärker als bei den mit DEN behandelten und in der Kontrollgruppe. Es waren keine Unterschiede hinsichtlich der Position des Proteins innerhalb der Zelle zu beobachten (vgl. Abbildung 3).

Auch bei Patientin 2 zeigte sich bei allen drei Gruppen eine Antikörperreaktion mit COL1 im Zytoplasma. Bei den mit ZOL behandelten Zellen war die Fluoreszenzintensität wie bei Patientin 1 optisch etwas stärker als bei den mit DEN behandelten und in der Kontrollgruppe. Es waren ebenfalls keine Unterschiede hinsichtlich der Position des Proteins innerhalb der Zelle zu beobachten (vgl. Abbildung 4).

Die Antikörperreaktion mit COL1 trat auch bei Patientin 3 wie erwartet im Zytoplasma ein. Die Fluoreszenzintensität war optisch bei allen Versuchsreihen gleich und es zeigten sich wieder keine Unterschiede in der Proteinlokalisierung (vgl. Abbildung 5).

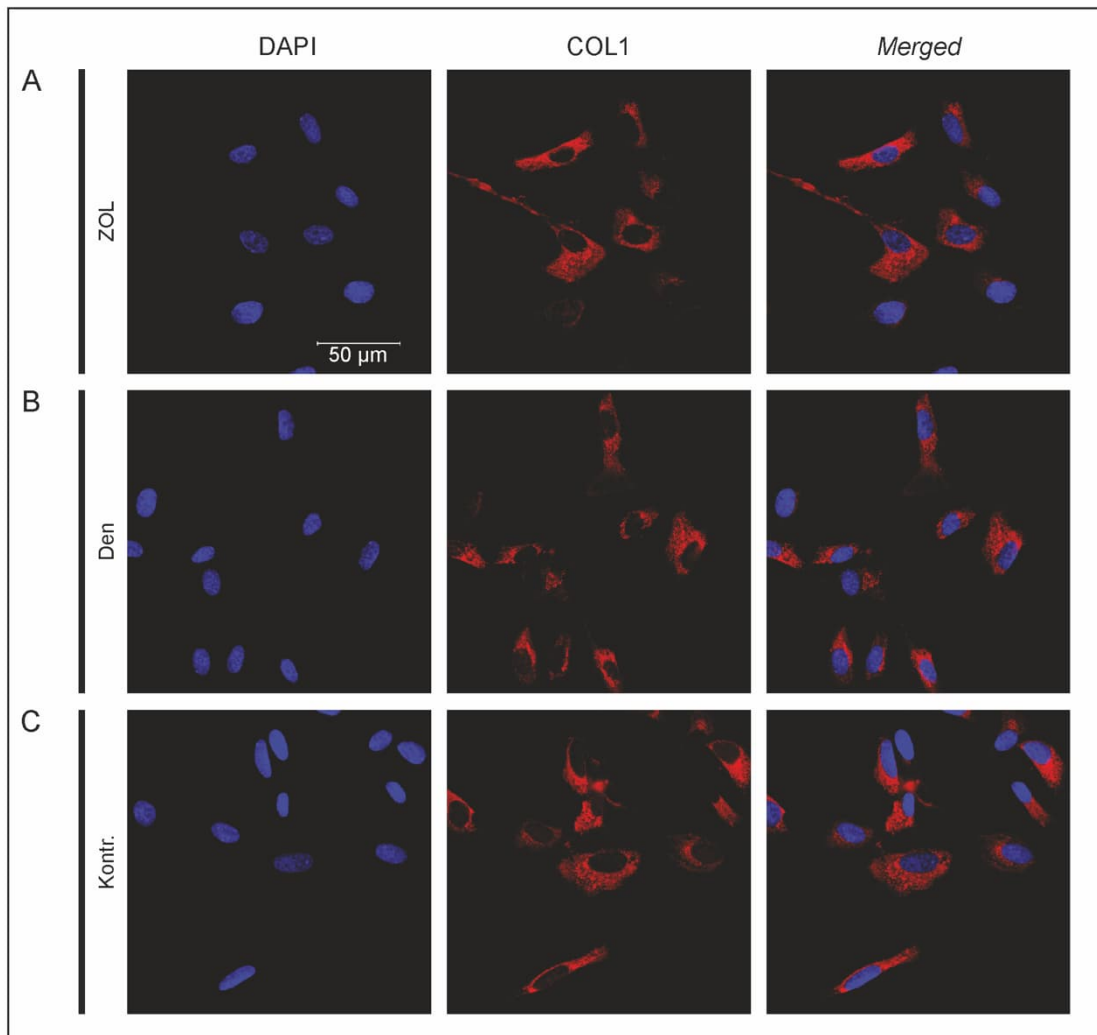


Abbildung 5: ICC, COL1, Patientin 3. Die linke Spalte zeigt die Zellkerne mit einer DAPI-Färbung. In der Mitte ist die AK-Fluoreszenzreaktion von COL1 gezeigt. Rechts wurden beide Aufnahmen zusammengeführt. Die Aufnahmen wurden mit 60-facher Vergrößerung durchgeführt. Der weiße Balken entspricht einer Länge von 50 μm . A: Zellen wurden mit ZOL behandelt. B: Zellen wurden mit DEN behandelt. C: Kontrollgruppe ohne Behandlung.

3.2.2 RUNX2

RUNX2 ist ein entscheidender Transkriptionsfaktor innerhalb der Differenzierung zu reifen Osteoblasten und befindet sich der Lokalisation der Transkription folgend im Zellkern (vgl. 1.3.2).

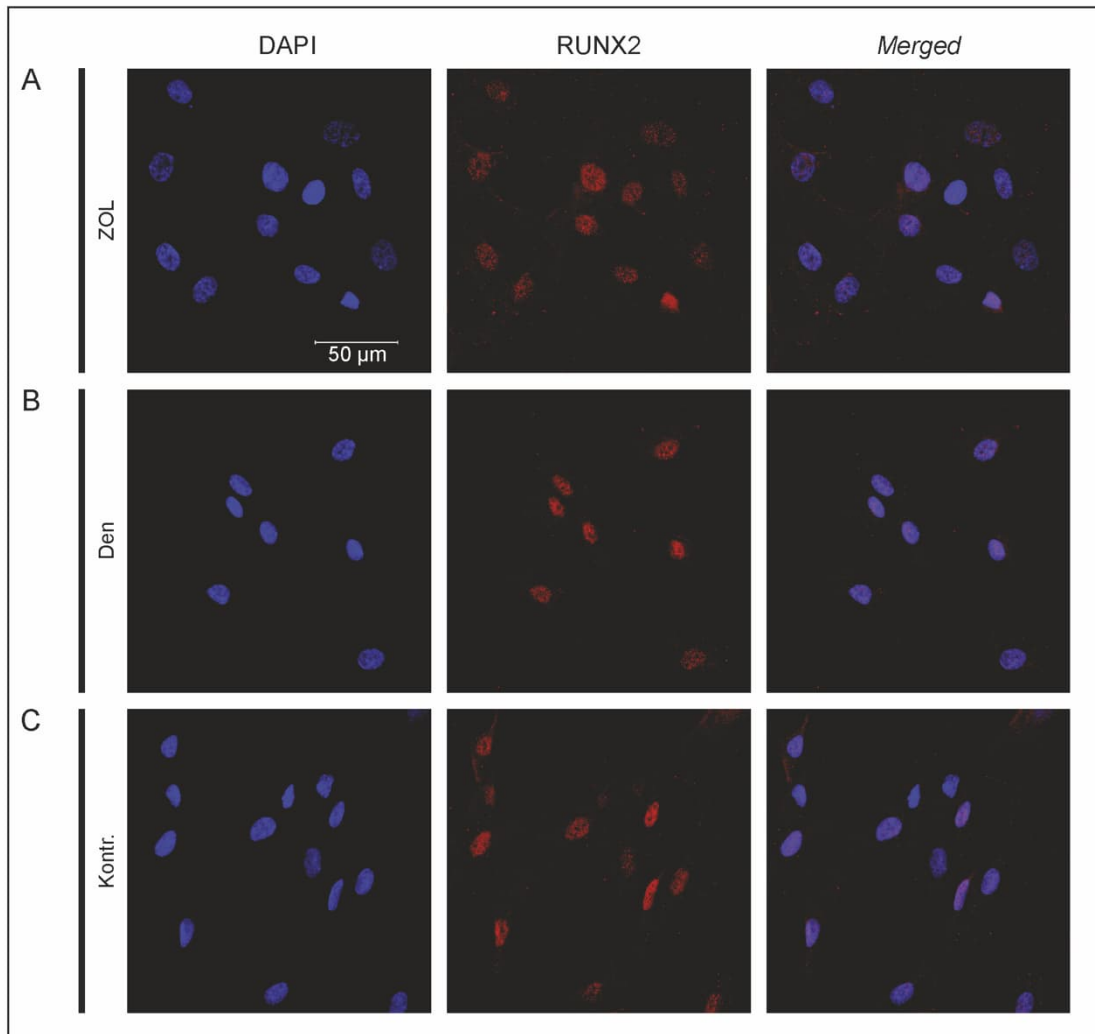


Abbildung 6: ICC, RUNX2, Patientin 1. Die linke Spalte zeigt die Zellkerne mit einer DAPI-Färbung. In der Mitte ist die AK-Fluoreszenzreaktion von RUNX2 gezeigt. Rechts wurden beide Aufnahmen zusammengeführt. Die Aufnahmen wurden mit 60-facher Vergrößerung durchgeführt. Der weiße Balken entspricht einer Länge von 50 μm . A: Zellen wurden mit ZOL behandelt. B: Zellen wurden mit DEN behandelt C: Kontrollgruppe ohne Behandlung.

Bei Patientin 1 zeigte sich die Antikörperreaktion mit dem Transkriptionsfaktor RUNX2 wie erwartet im Zellkern. Keine der Behandlungsgruppen zeigte Unterschiede in der Proteinlokalisierung. Die Fluoreszenzintensität war bei den mit ZOL behandelten Zellen optisch etwas schwächer als bei den mit DEN behandelten und der Kontrollgruppe (vgl. Abbildung 5).

Die Antikörperreaktionen mit RUNX2 unterschieden sich bei Patientin 2 von denen bei Patientin 1 und Patientin 3. Entgegen der eigentlichen Erwartung waren bei den mit ZOL

und DEN behandelten Zellen zusätzliche Fluoreszenzreaktionen im Zytoplasma zu beobachten. Da für jedes Protein alle Aufnahmen mit den gleichen Belichtungseinstellungen vorgenommen wurden, war diese Beobachtung nicht auf die Eigenfluoreszenz der Zellen zurückzuführen. In der Kontrollgruppe war dieses Phänomen nur schwach ausgebildet und die Fluoreszenzreaktion begrenzte sich auf den Zellkern (vgl. Abbildung 7).

Bei Patientin 3 entsprach die Antikörperreaktion wieder den Erwartungen und begrenzte sich größtenteils auf den Zellkern. Es gab also keine auffälligen Abweichungen in der Proteinlokalisierung wie bei Patientin 2. Die Fluoreszenzintensität war bei allen drei Behandlungsgruppen in etwa gleich (vgl. Abbildung 8).

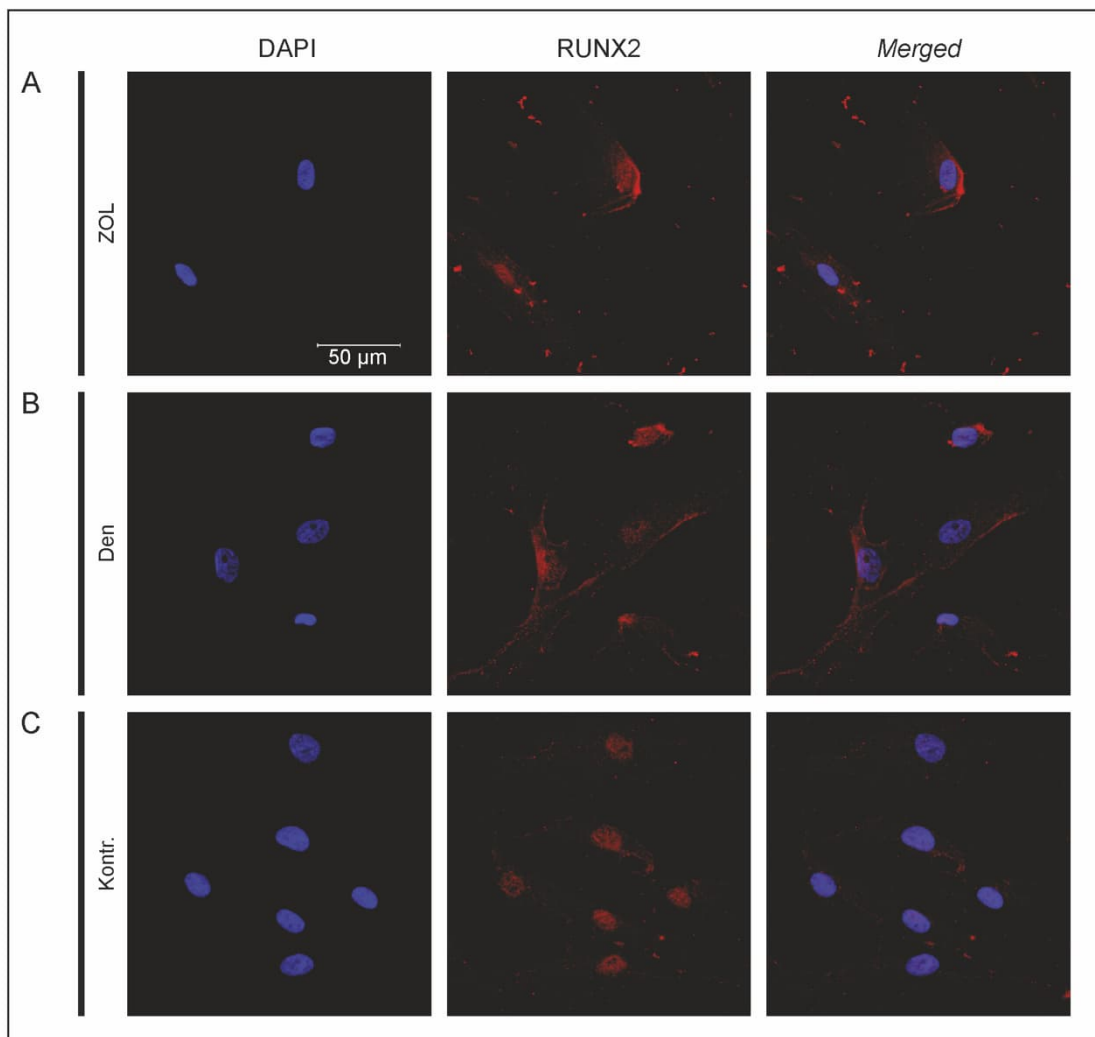


Abbildung 7: ICC, RUNX2, Patientin 2. Die linke Spalte zeigt die Zellkerne mit einer DAPI-Färbung. In der Mitte ist die AK-Fluoreszenzreaktion von RUNX2 gezeigt. Rechts wurden beide Aufnahmen zusammengeführt. Die Aufnahmen wurden mit 60-facher Vergrößerung durchgeführt. Der weiße Balken entspricht einer Länge von 50 µm. A: Zellen wurden mit ZOL behandelt. B: Zellen wurden mit DEN behandelt C: Kontrollgruppe ohne Behandlung.

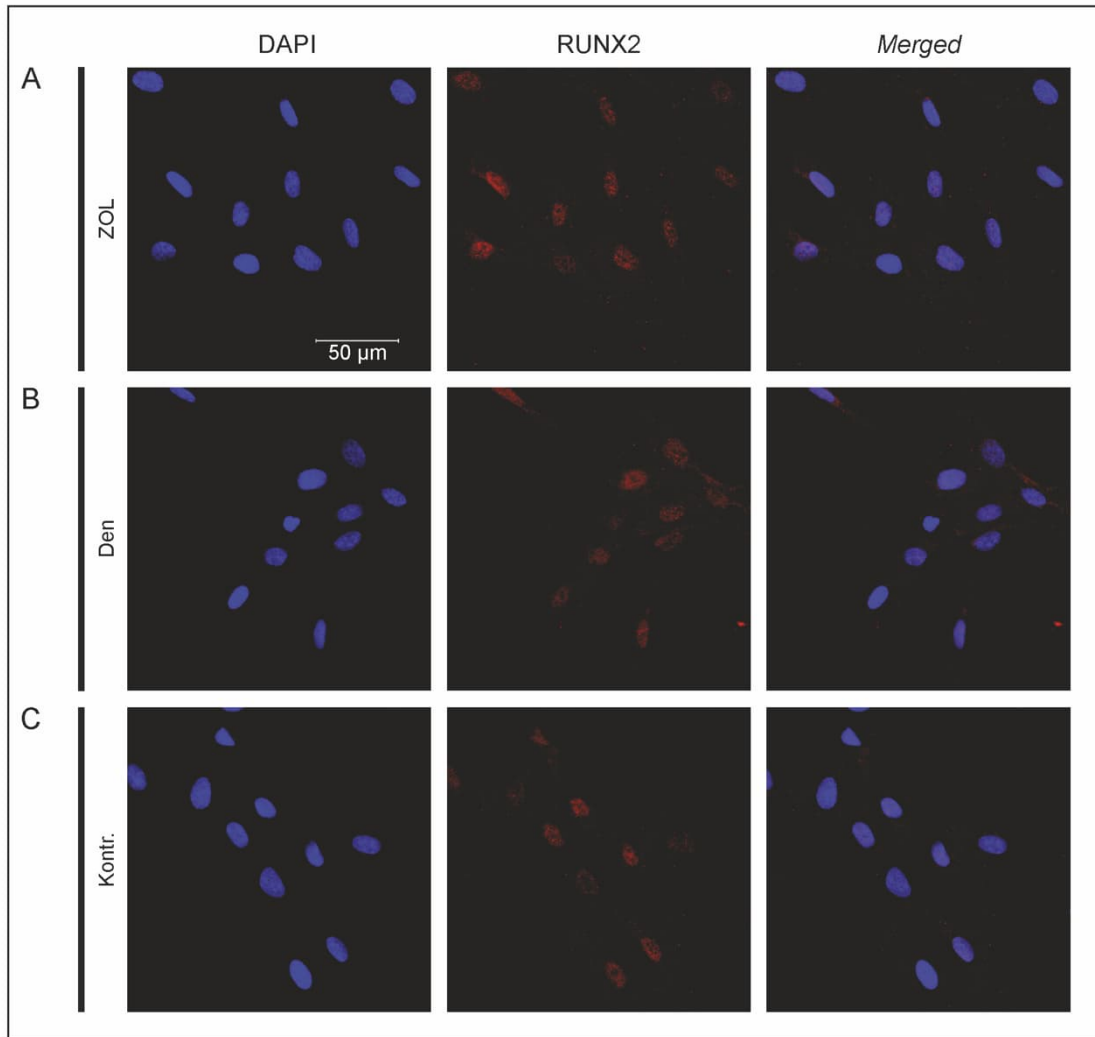


Abbildung 8: ICC, RUNX2, Patientin 3. Die linke Spalte zeigt die Zellkerne mit einer DAPI-Färbung. In der Mitte ist die AK-Fluoreszenzreaktion von RUNX2 gezeigt. Rechts wurden beide Aufnahmen zusammengeführt. Die Aufnahmen wurden mit 60-facher Vergrößerung durchgeführt. Der weiße Balken entspricht einer Länge von 50 μm . A: Zellen wurden mit ZOL behandelt. B: Zellen wurden mit DEN behandelt C: Kontrollgruppe ohne Behandlung.

3.2.3 RANKL

Als Ligand interagiert RANKL mit dem auf Osteoklastenvorläuferzellen befindlichen Rezeptor RANK und aktiviert damit die weitere Differenzierung zu reifen Osteoklasten. Nach der Transkription befindet sich dieses Protein sowohl im Zytosol als auch seiner Funktion als Ligand folgend membranständig auf der Oberfläche der Zellen (vgl. 1.3.3).

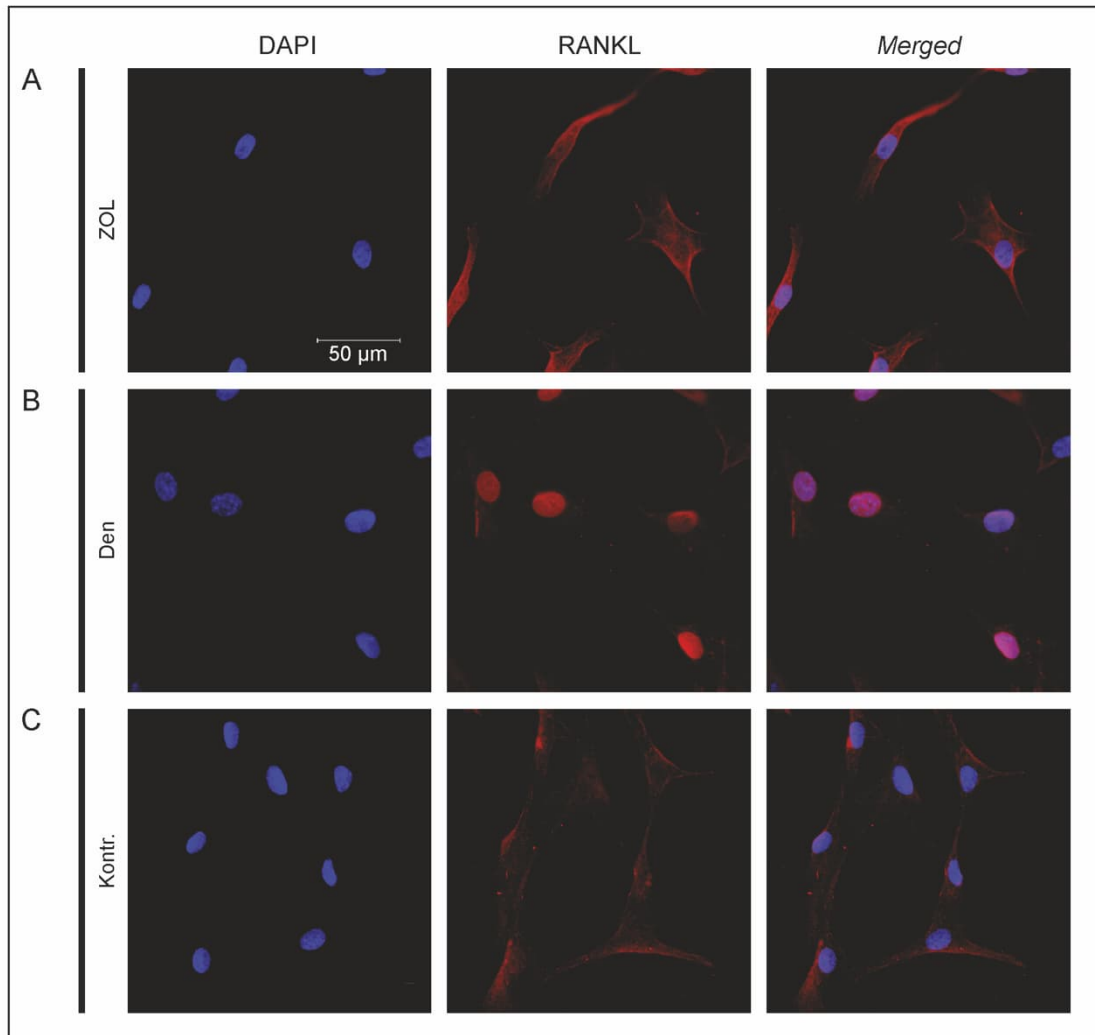


Abbildung 9: ICC, RANKL, Patientin 1. Die linke Spalte zeigt die Zellkerne mit einer DAPI-Färbung. In der Mitte ist die AK-Fluoreszenzreaktion von RANKL gezeigt. Rechts wurden beide Aufnahmen zusammengeführt. Die Aufnahmen wurden mit 60-facher Vergrößerung durchgeführt. Der weiße Balken entspricht einer Länge von 50 μm . A: Zellen wurden mit ZOL behandelt. B: Zellen wurden mit DEN behandelt. C: Kontrollgruppe ohne Behandlung.

Bei Patientin 1 entspricht die Kontrollgruppe und die mit ZOL behandelten Zellen den Erwartungen. Der Fluoreszenznachweis erfolgte eindeutig innerhalb des Zytosols und vermehrt membranständig, wobei die mit ZOL behandelten Zellen optisch eine etwas stärkere Fluoreszenzreaktion zeigten. Die Fluoreszenzreaktion bei den mit DEN behandelten Zellen wich stark von der zu erwartenden Reaktion ab. Neben einer minimal erkennbaren Fluoreszenz im Zytoplasma, zeigte sie sich vor allem im Zellkern (vgl. Abbildung 9). Auch bei Patientin 2 war das eben beschriebene Phänomen zu

beobachtend. Diesmal in der Kontrollgruppe. Die Zellen zeigten eine starke Fluoreszenzreaktion am Zellkern. Die Fluoreszenzreaktionen der mit ZOL und DEN behandelten Zellen zeigten dagegen die typische Lokalisation von RANKL im Zytosol und an der Zellmembran (vgl. Abbildung 10).

Bei Patientin 3 stellte sich bei allen drei Behandlungsgruppen eine typische Fluoreszenz innerhalb des Zytosols und an der äußeren Zellmembran dar. Zusätzlich war aber auch hier wieder eine Fluoreszenzreaktion am Zellkern zu beobachten, diesmal bei der Kontrollgruppe. Die Fluoreszenzintensität war optisch bei allen drei Behandlungsgruppen gleich (vgl. Abbildung 11).

Bei allen drei Patientinnen zeigte sich bei einer Behandlung mit DEN eine geringere Fluoreszenz an der Zellmembran.

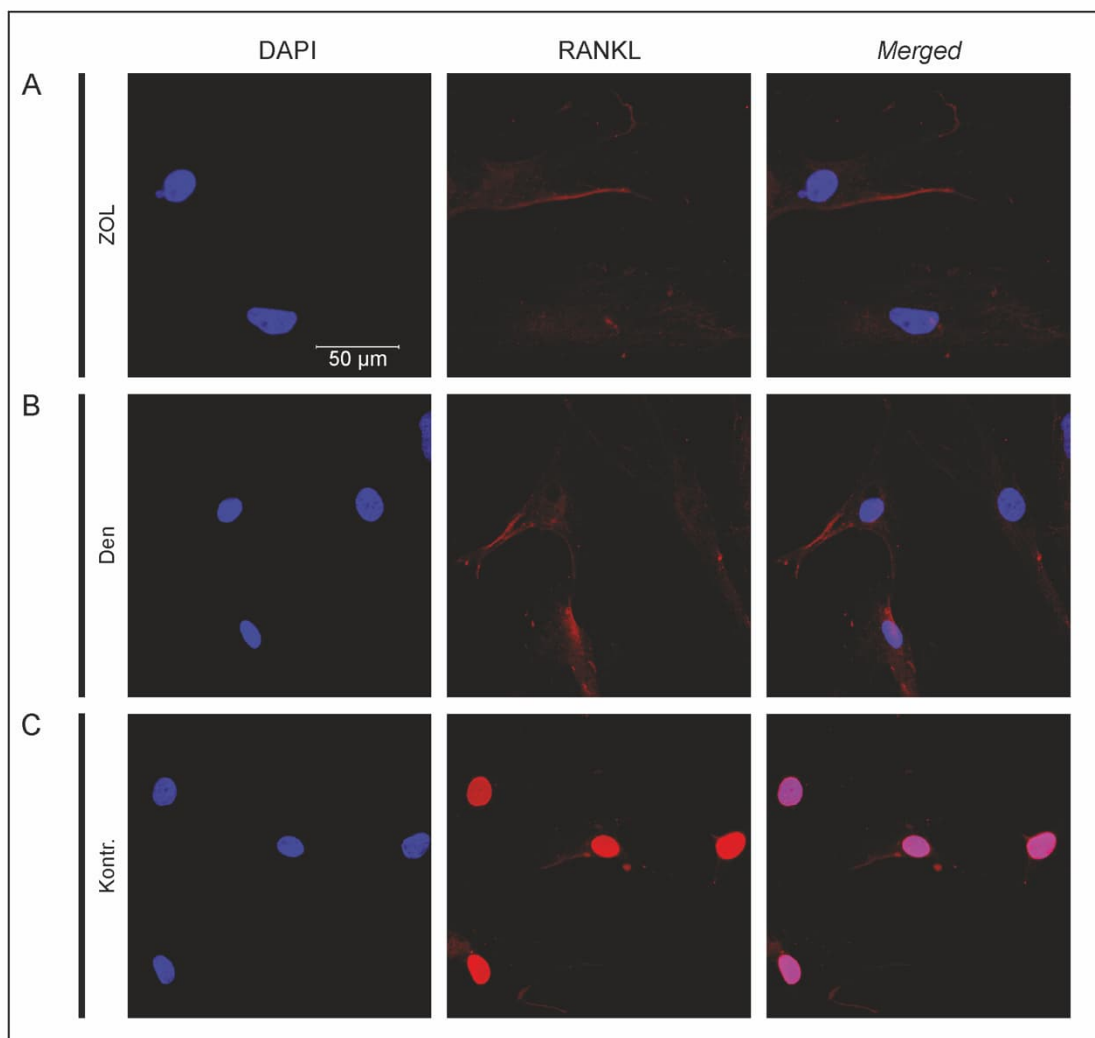


Abbildung 10: ICC, RANKL, Patientin 2. Die linke Spalte zeigt die Zellkerne mit einer DAPI-Färbung. In der Mitte ist die AK-Fluoreszenzreaktion von RANKL gezeigt. Rechts wurden beide Aufnahmen zusammengeführt. Die Aufnahmen wurden mit 60-facher Vergrößerung durchgeführt. Der weiße Balken entspricht einer Länge von 50 µm. A: Zellen wurden mit ZOL behandelt. B: Zellen wurden mit DEN behandelt C: Kontrollgruppe ohne Behandlung.

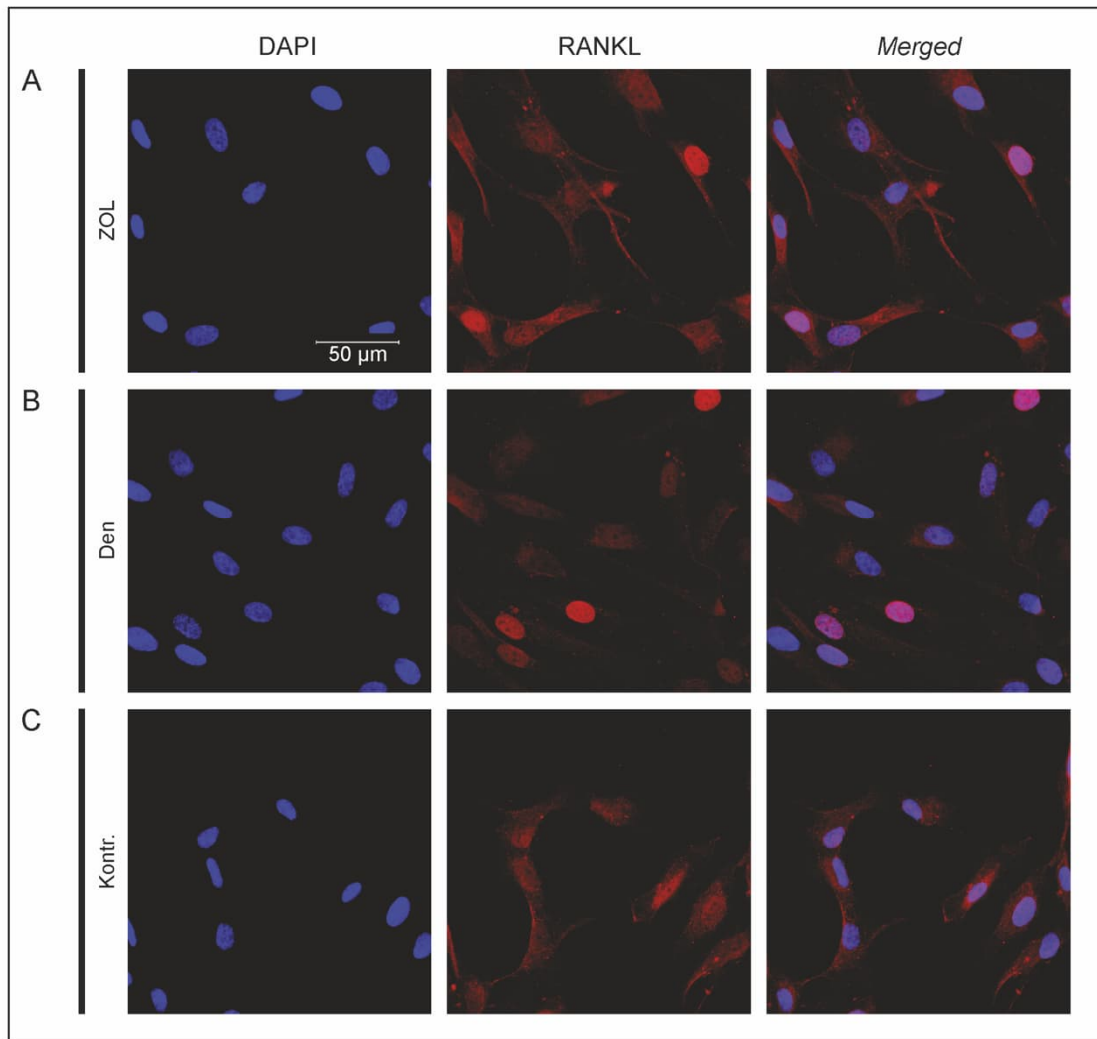


Abbildung 11: ICC, RANKL, Patientin 3. Die linke Spalte zeigt die Zellkerne mit einer DAPI-Färbung. In der Mitte ist die AK-Fluoreszenzreaktion von RANKL gezeigt. Rechts wurden beide Aufnahmen zusammengeführt. Die Aufnahmen wurden mit 60-facher Vergrößerung durchgeführt. Der weiße Balken entspricht einer Länge von 50 μm . A: Zellen wurden mit ZOL behandelt. B: Zellen wurden mit DEN behandelt C: Kontrollgruppe ohne Behandlung.

3.2.4 SMURF2

Die Ubiquitin-Protein Ligase SMURF2 ubiquitiniert SMAD-Proteine und wirkt im Zuge dessen regulierend auf BMP. Entsprechend ihrer Funktion befindet sich SMURF2 sowohl im Zytosol, als auch im Zellkern (vgl. 1.3.4).

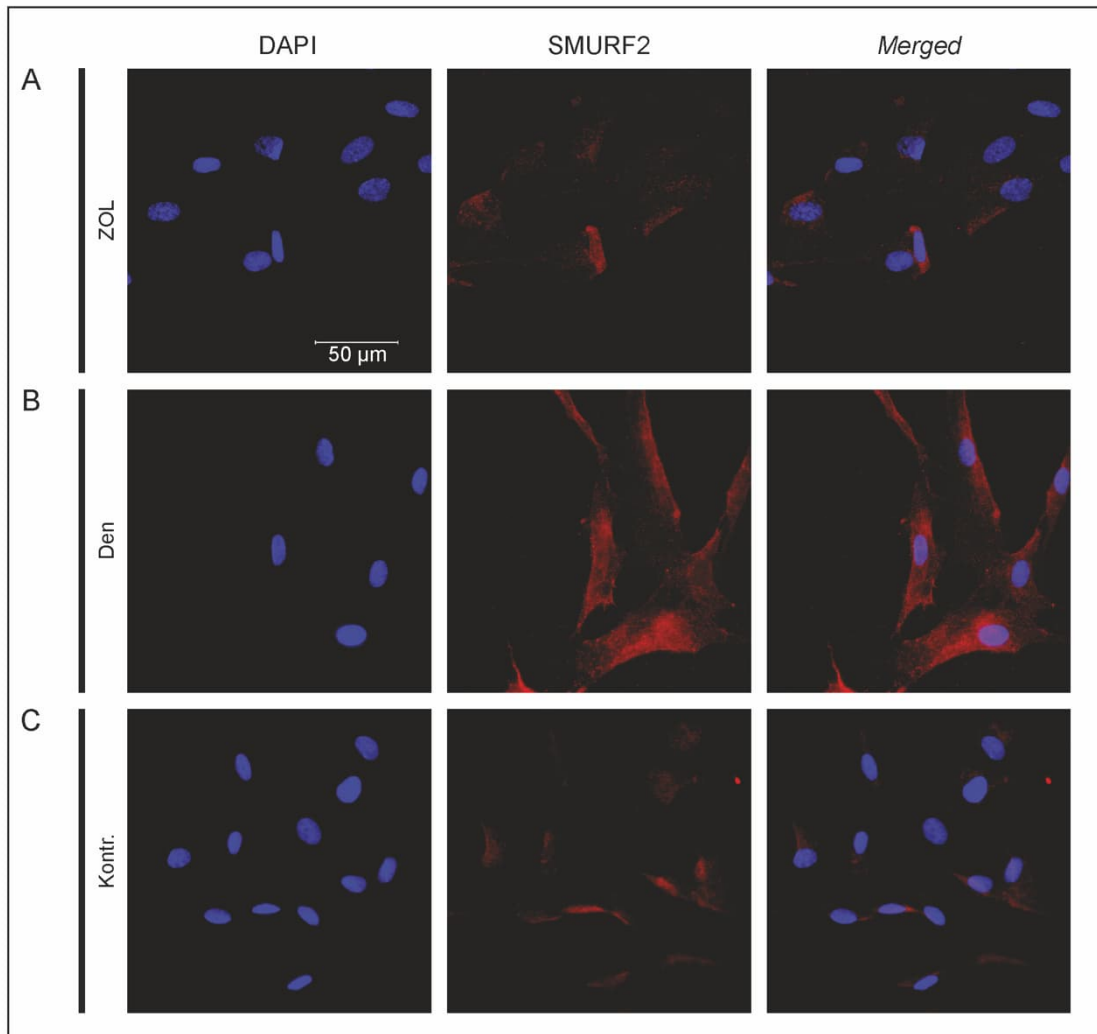


Abbildung 12: ICC, SMURF2, Patientin 1. Die linke Spalte zeigt die Zellkerne mit einer DAPI-Färbung. In der Mitte ist die AK-Fluoreszenzreaktion von SMURF2 gezeigt. Rechts wurden beide Aufnahmen zusammengeführt. Die Aufnahmen wurden mit 60-facher Vergrößerung durchgeführt. Der weiße Balken entspricht einer Länge von 50 µm. A: Zellen wurden mit ZOL behandelt. B: Zellen wurden mit DEN behandelt C: Kontrollgruppe ohne Behandlung.

Die Zellen von Patientin 1 zeigten bei allen drei Behandlungsgruppen Fluoreszenzreaktionen. Die Fluoreszenz war sowohl im Zytosol als auch im Zellkern zu beobachten. Auffällig war die deutlich stärkere Fluoreszenzintensität bei den mit DEN behandelten Zellen. Dort zeigten sich auch stärkere Reaktionen in der Zellkernregion. Bis auf die eben genannte Intensitätsvariation bei der mit DEN behandelten Gruppe, waren die Fluoreszenzreaktionen auch so zu erwarten (vgl. Abbildung 12).

Alle Behandlungsgruppen von Patientin 2 zeigten ähnliche Fluoreszenzreaktionen. Wie bei Patientin 1 war das Protein sowohl im Zytosol als auch im Zellkern lokalisiert. Die Fluoreszenzintensitäten waren optisch als gleich zu bewerten (vgl. Abbildung 13)

Auch bei Patientin 3 war das Protein bei allen drei Behandlungsgruppen wie erwartet im Zytosol und im Zellkern zu finden. Die Fluoreszenzintensität der Kontrollgruppe von Patientin 3 war optisch geringer als bei den mit ZOL und DEN behandelten Zellen. (vgl. Abbildung 14)

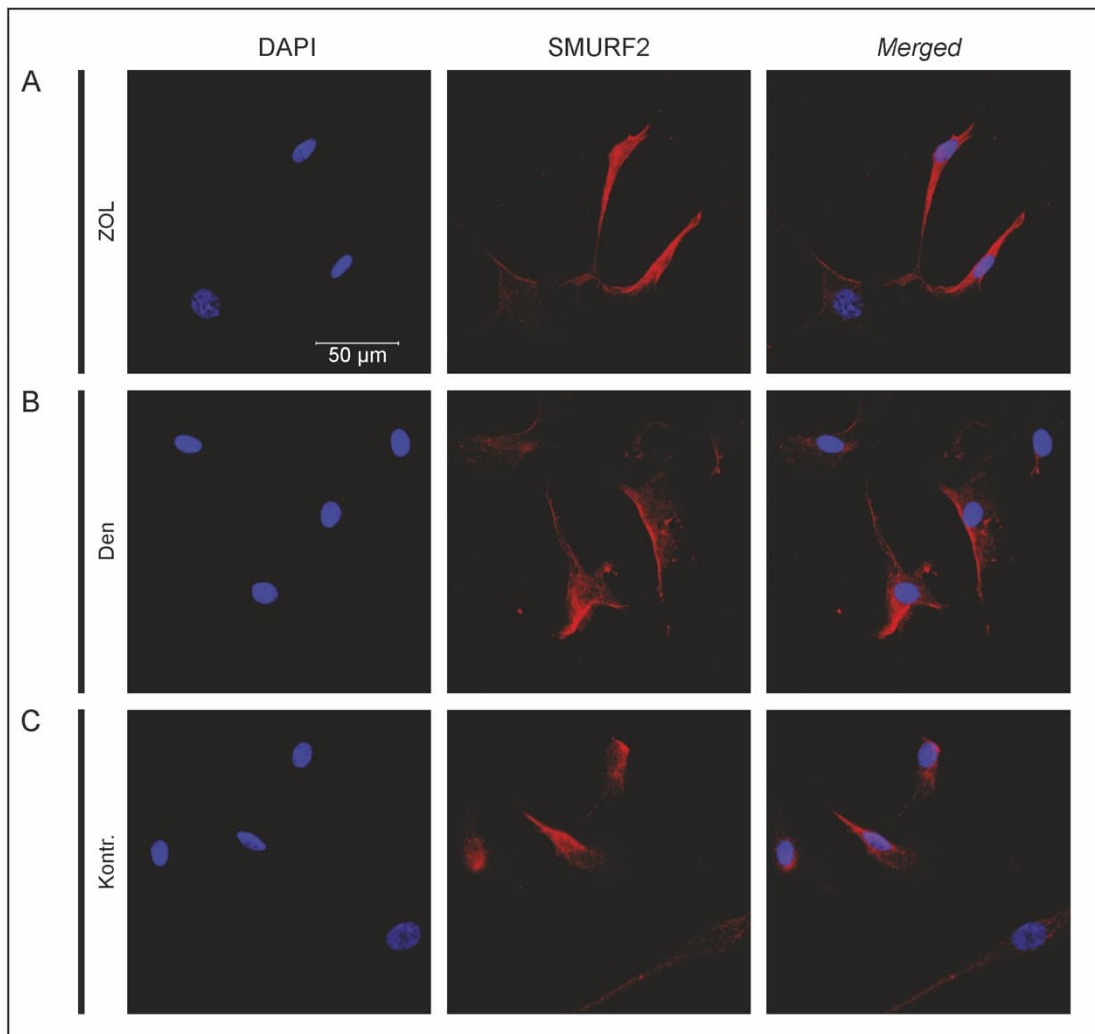


Abbildung 13: ICC, SMURF2, Patientin 2. Die linke Spalte zeigt die Zellkerne mit einer DAPI-Färbung. In der Mitte ist die AK- Fluoreszenzreaktion von SMURF2 gezeigt. Rechts wurden beide Aufnahmen zusammengeführt. Die Aufnahmen wurden mit 60-facher Vergrößerung durchgeführt. Der weiße Balken entspricht einer Länge von 50 µm. A: Zellen wurden mit ZOL behandelt B: Zellen wurden mit DEN behandelt. C: Kontrollgruppe ohne Behandlung.

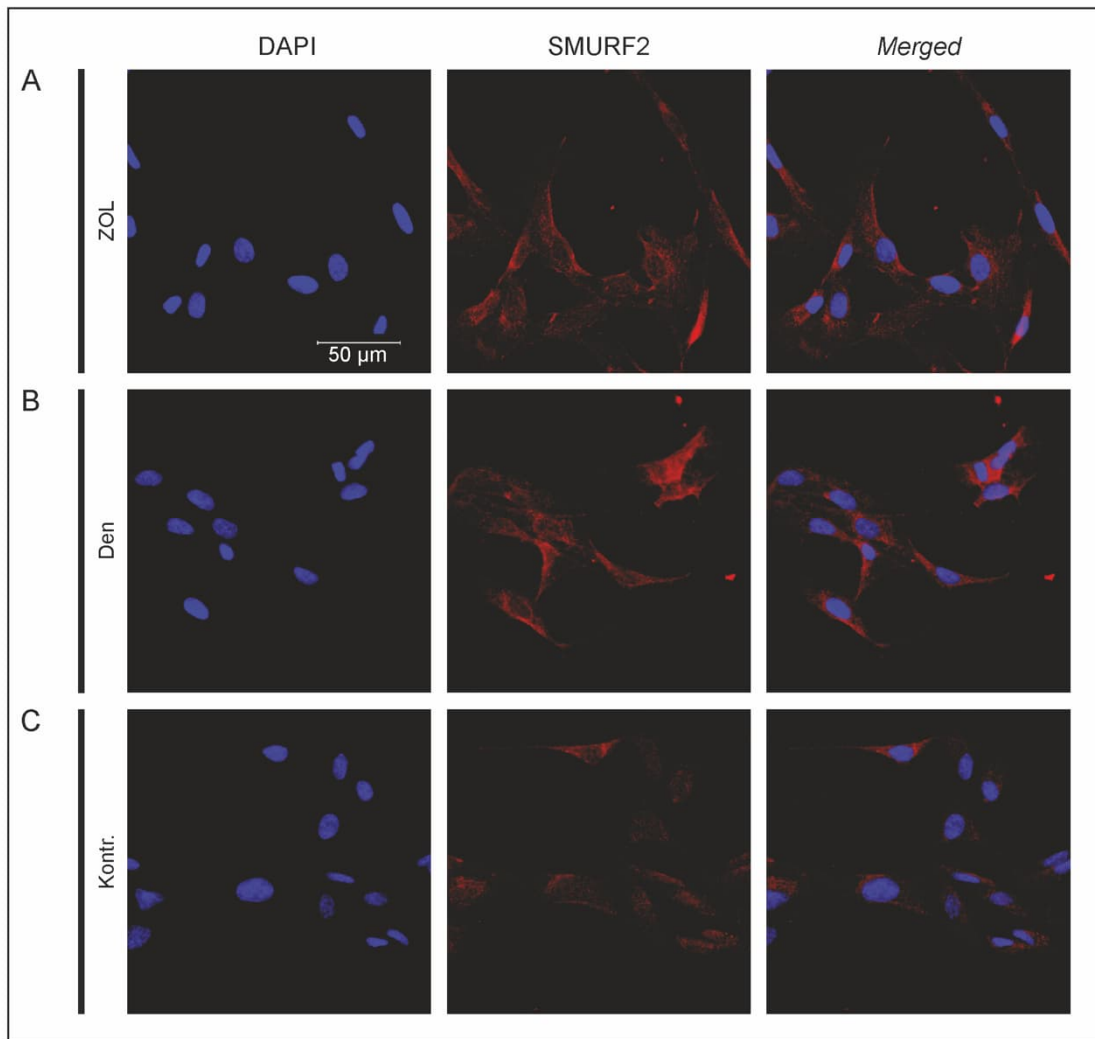


Abbildung 14: ICC, SMURF2, Patientin 3. Die linke Spalte zeigt die Zellkerne mit einer DAPI-Färbung. In der Mitte ist die AK-Fluoreszenzreaktion von SMURF2 gezeigt. Rechts wurden beide Aufnahmen zusammengeführt. Die Aufnahmen wurden mit 60-facher Vergrößerung durchgeführt. Der weiße Balken entspricht einer Länge von 50 μm . A: Zellen wurden mit ZOL behandelt B: Zellen wurden mit DEN behandelt C: Kontrollgruppe ohne Behandlung.

3.3 Bestimmung der relativen Proteinlevel

Die Westernblots hatten zum Ziel die Proteinmengen von COL1, RUNX2, RANKL und SMURF2 in den für 5 d mit ZOL und DEN behandelten Zellen semiquantitativ im Vergleich zur Kontrollgruppe zu bestimmen. Semiquantitativ deshalb, da es mit Westernblots nicht möglich ist absolute Proteinmengen zu bestimmen, sie aber über ubiquitär vorkommende *housekeeping*-Proteine wie α -Tubulin zu normalisieren und dann mit einer Kontrollgruppe ins Verhältnis zu setzen. Die Zellen der Kontrollgruppe wurden ausschließlich mit dem Standardmedium inkubiert. (vgl. 2.6.1). Eine Veränderung der relativen Proteinmengen lässt Rückschlüsse auf die Beeinflussung des Knochenstoffwechsels zu.

Pro Protein wurden Zellen der osteoblastären Linie von drei Patientinnen untersucht, wodurch sich pro Protein drei biologische Replikate ($n=3$) ergaben. Das Signifikanzniveau wurde mit einem *Students T-Test* ermittelt und die Ergebnisse bei einem p -Wert $< 0,05$ als signifikant erachtet (vgl. 2.6.7)

3.3.1 COL1

Bei den mit Zoledronat behandelten Zellen war bei allen drei Patientinnen eine Zunahme des relativen Proteinlevels von COL1 zu beobachten. Die Ergebnisse wiesen allerdings eine hohe Standardabweichung auf, weshalb sie statistisch nicht als signifikant bewertet werden konnten. Unter Denosumabbehandlung wichen die relativen Proteinlevel stark voneinander ab. Es wurde sowohl eine Zunahme als auch eine Abnahme der relativen Proteinlevel beobachtet werden (vgl. Abbildung 15).

3.3.2 RUNX2

Die Behandlung mit Zoledronat führte bei allen drei Patientinnen zu einer Reduktion des relativen Proteinlevels von RUNX2 um etwa 50 %. Dieses Ergebnis erwies sich statistisch als sehr signifikant (p -Wert= 0,0041). Eine Denosumab Behandlung führte wiederum zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen. Bei Patientin 1 erhöhte sich das relative Proteinlevel, bei Patientin 2 und 3 reduzierte es sich (vgl. Abbildung 16).

3.3.3 RANKL

Bei allen drei Patientinnen reduzierte sich das relative Proteinlevel von RANKL unter Behandlung mit Zoledronat. Allerdings war auch hier die Streuung zu groß, um die Ergebnisse als statistisch signifikant einzustufen. Der Einfluss von Denosumab auf das relative Proteinlevel von RANKL war wie bei RUNX2 und COL1 sehr divers. Es war erneut sowohl eine Erhöhung als auch eine Reduktion des relativen Proteinlevels zu beobachten (vgl. Abbildung 17)

3.3.4 SMURF2

Die relativen Proteinlevel von SMURF2 streuten sowohl bei den mit Zoledronat als auch bei den mit Denosumab behandelten Zellen. Keines der Ergebnisse war statistisch signifikant. Auch hier zeigten sich Reduktionen und Erhöhungen der relativen Proteinlevel innerhalb der gleichen Behandlungsgruppe.

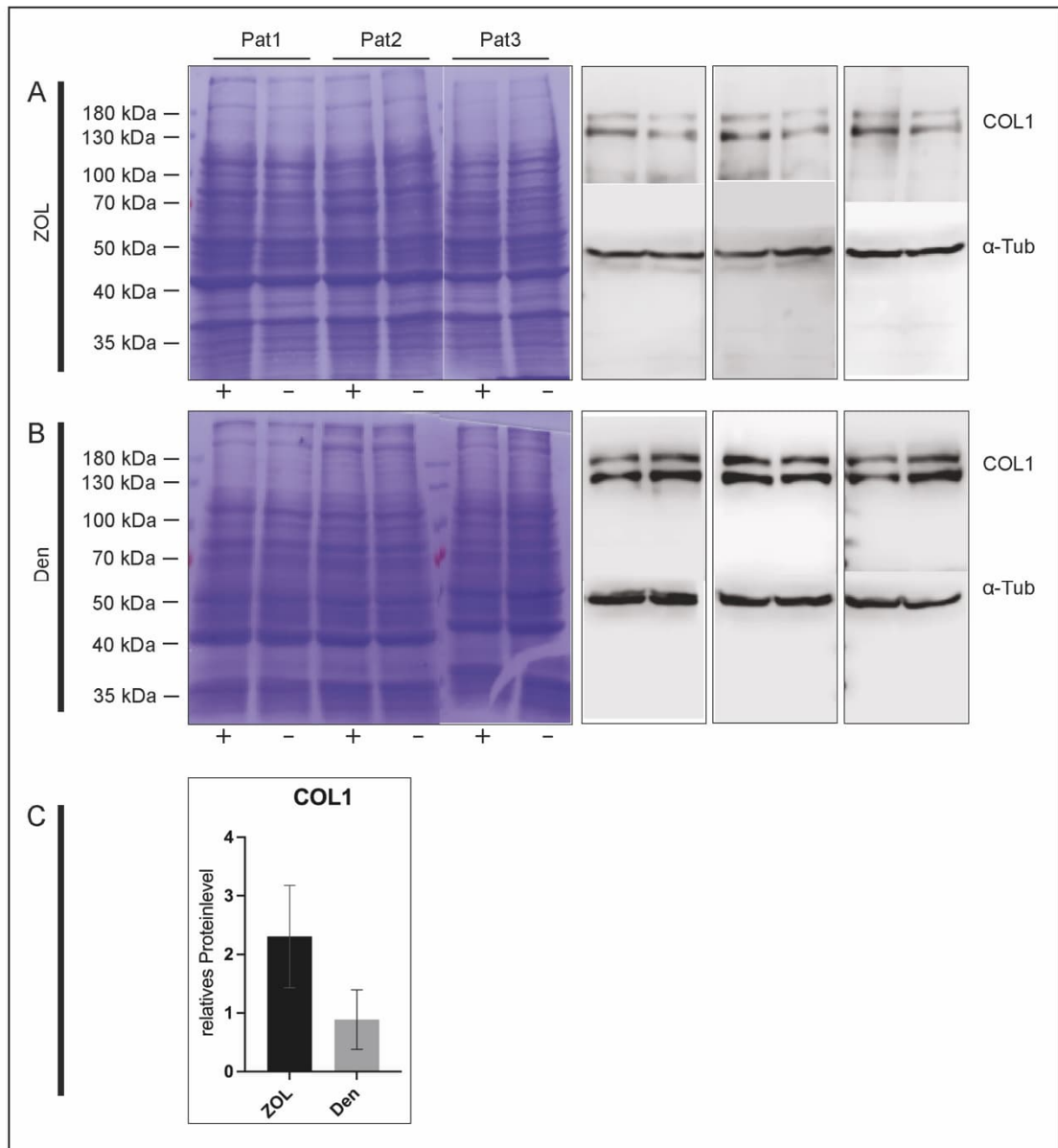


Abbildung 15: Westernblots, COL1. Die Coomassie-Färbungen zeigen eine angemessene Trennung der Proteinbanden. Das Plus (+) markiert die Taschen mit den medikamentös behandelten Proteingemischen. Das Minus (-) markiert die Kontrollgruppe. A: Westernblots zur Detektion von COL1 (150 kDa) bei den mit ZOL behandelten Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die α -Tubulin (50 kDa) Banden zeigen eine gleichmäßige Beladung der Gele. B: Westernblots zur Detektion von COL1 (150 kDa) bei den mit DEN behandelten Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die α -Tubulin (50 kDa) Banden zeigen eine gleichmäßige Beladung der Gele. C: Statistische Auswertung des relativen Proteinlevels. Die Säulen entsprechen den Mittelwerten von 3 unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen. Zusätzlich ist die Standardabweichung durch Fehlerindikatoren dargestellt. Bei einem p-Wert $< 0,05$ wurden die Ergebnisse als signifikant erachtet. (ZOL) p-Wert = 0,1223. (DEN) p-Wert = 0,7430. Keines der Ergebnisse war signifikant.

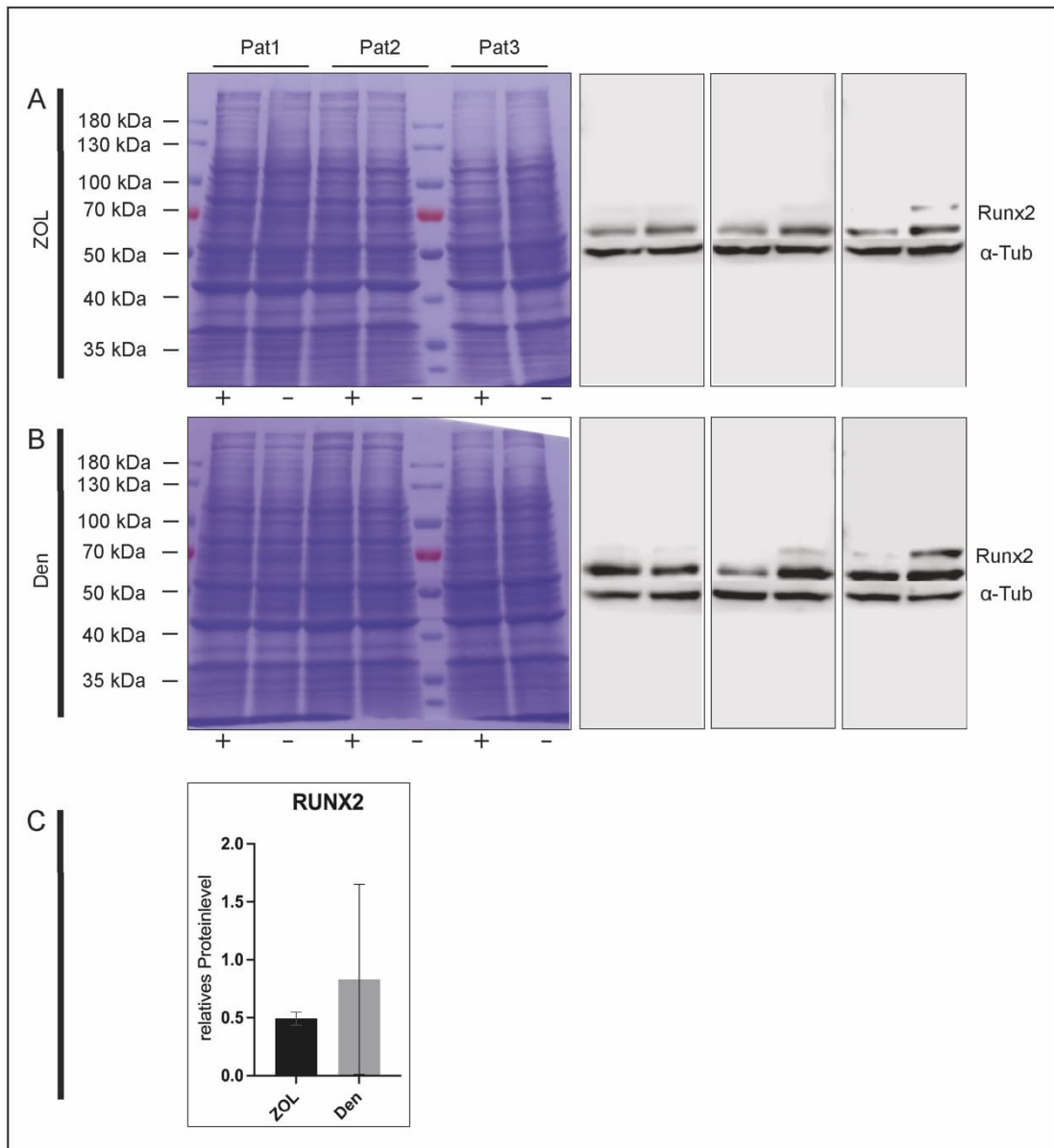


Abbildung 16: Westernblots, RUNX2. Die Coomassie-Färbungen zeigen eine angemessene Trennung der Proteinbanden. Das Plus (+) markiert die Taschen mit den medikamentös behandelten Proteingemischen. Das Minus (-) markiert die Kontrollgruppe. A: Westernblots zur Detektion von RUNX2 (60 kDa) bei den mit ZOL behandelten Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die α -Tubulin (50 kDa) Banden zeigen eine gleichmäßige Beladung der Gele. B: Westernblots zur Detektion von RUNX2 (60 kDa) bei den mit DEN behandelten Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die α -Tubulin (50 kDa) Banden zeigen eine gleichmäßige Beladung der Gele. C: Statistische Auswertung des relativen Proteinlevels. Die Säulen entsprechen den Mittelwerten von 3 unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen. Zusätzlich ist die Standardabweichung durch Fehlerindikatoren dargestellt. Bei einem p-Wert $< 0,05$ wurden die Ergebnisse als signifikant erachtet. (ZOL) p-Wert= 0,0041. (DEN) p-Wert= 0,7549. Das Ergebnis für die mit ZOL behandelten Zellen war signifikant.

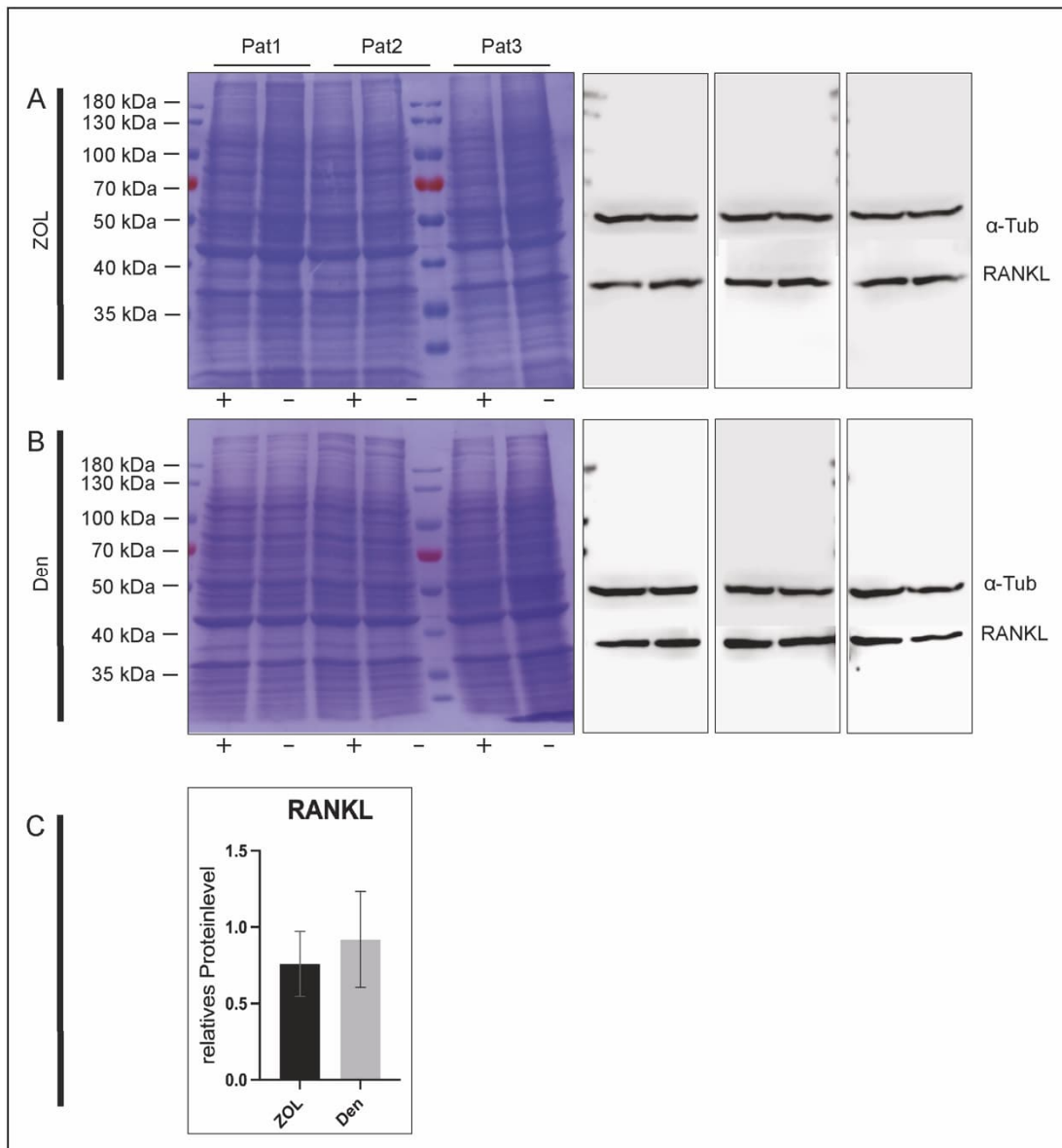


Abbildung 17: Westernblots, RANKL. Die Coomassie-Färbungen zeigen eine angemessene Trennung der Proteinbanden. Das Plus (+) markiert die Taschen mit den medikamentös behandelten Proteingemischen. Das Minus (-) markiert die Kontrollgruppe. A: Westernblots zur Detektion von RANKL (37 kDa) bei den mit ZOL behandelten Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die α -Tubulin (50 kDa) Banden zeigen eine gleichmäßige Beladung der Gele. B: Westernblots zur Detektion von RANKL (37 kDa) bei den mit DEN behandelten Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die α -Tubulin (50 kDa) Banden zeigen eine gleichmäßige Beladung der Gele. C: Statistische Auswertung des relativen Proteinlevels. Die Säulen entsprechen den Mittelwerten von 3 unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen. Zusätzlich ist die Standardabweichung durch Fehlerindikatoren dargestellt. Bei einem p-Wert $< 0,05$ wurden die Ergebnisse als signifikant erachtet. (ZOL) p-Wert= 0,1891. (DEN) p-Wert= 0,7001. Keines der Ergebnisse war signifikant.

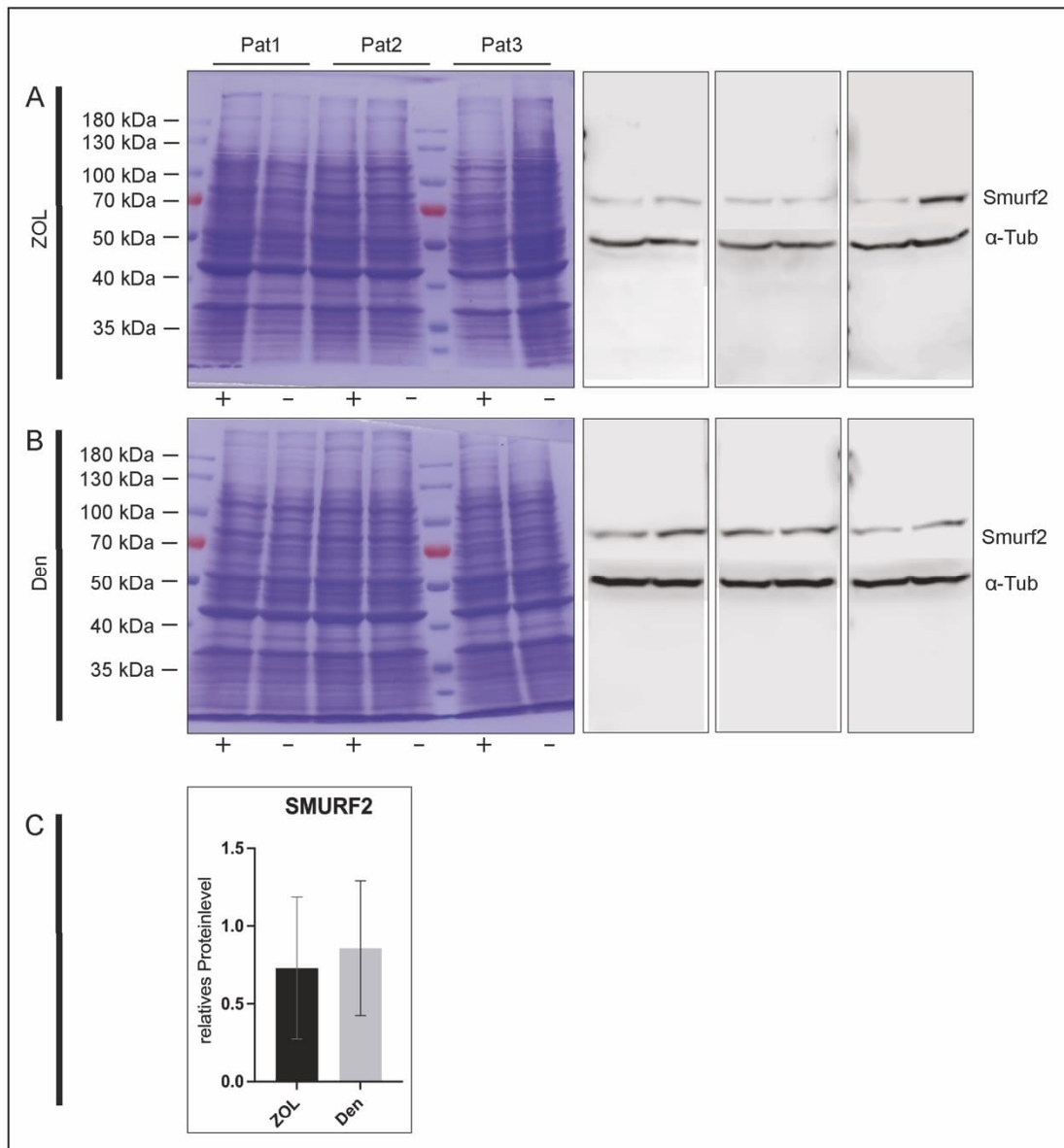


Abbildung 18: Westernblots, SMURF2. Die Coomassie-Färbungen zeigen eine angemessene Trennung der Proteinbanden. Das Plus (+) markiert die Taschen mit den medikamentös behandelten Proteingemischen. Das Minus (-) markiert die Kontrollgruppe. A: Westernblots zur Detektion von SMURF2 (37 kDa) bei den mit ZOL behandelten Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die α -Tubulin (50 kDa) Banden zeigen eine gleichmäßige Beladung der Gele. B: Westernblots zur Detektion von SMURF2 (37 kDa) bei den mit DEN behandelten Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die α -Tubulin (50 kDa) Banden zeigen eine gleichmäßige Beladung der Gele. C: Statistische Auswertung des relativen Proteinlevels. Die Säulen entsprechen den Mittelwerten von 3 unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen. Zusätzlich ist die Standardabweichung dargestellt. Bei einem p-Wert $< 0,05$ wurden die Ergebnisse als signifikant erachtet. (ZOL) p-Wert=0,4133. (DEN) p-Wert=0,6271. Keines der Ergebnisse war signifikant

3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

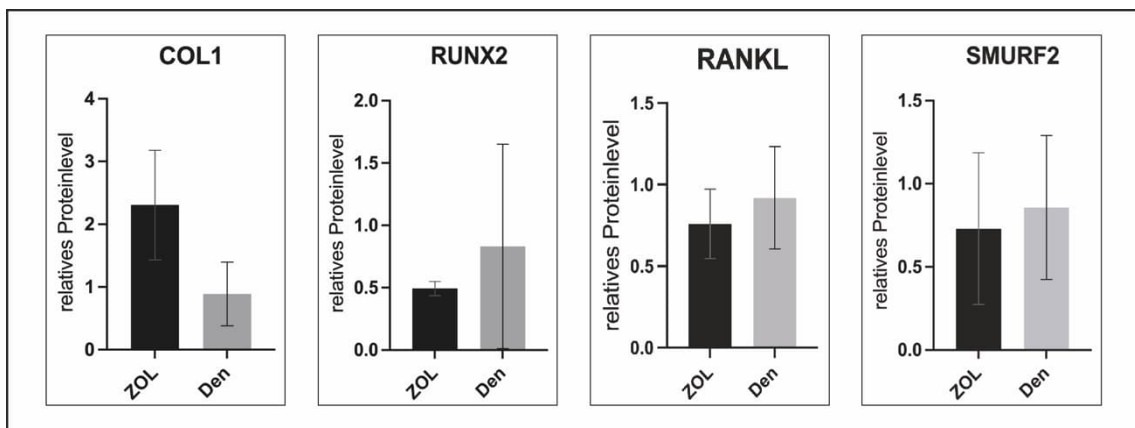


Abbildung 19: Übersicht der relativen Proteinlevel. Gezeigt werden die relativen Proteinlevel aller vier in dieser Arbeit untersuchten Proteine. Die Säulen entsprechen den Mittelwerten von 3 unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen. Zusätzlich ist die Standardabweichung dargestellt. Bei einem p-Wert $< 0,05$ wurden die Ergebnisse als signifikant erachtet. Die p-Werte wurden in den vorherigen Abbildungen erläutert (vgl. Abbildung 15, Abbildung 16, Abbildung 17, Abbildung 18).

Es konnten von allen drei Patientinnen erfolgreich Zellen aus dem Kieferknochen isoliert werden, die morphologisch einer Mischpopulation zuzuordnen waren. Osteoblastäre Zellen waren ebenso wie fibroblastenähnliche Zellen zu erkennen (vgl. Abbildung 2).

Sowohl COL1, RUNX2, RANKL als auch SMURF2, deren Beeinflussung durch Zoledronat und DEN in dieser Arbeit untersucht wurde, konnten immunzytochemisch bei den isolierten Zellen nachgewiesen werden. Das Vorhandensein von COL1, RUNX2 und RANKL lässt es zu, die Zellen der osteoblastären Linie zuzuordnen. Außer bei RANKL entsprach die Proteinlokalisierung den durch die Literatur vorgegebenen Erwartungen. Im anschließenden Kapitel müssen die unterschiedlichen Lokalisationen von RANKL im Zellkern und an der äußeren Zellmembran diskutiert werden.

Die Westernblots zeigten nur bei RUNX2 eine signifikante Änderung der relativen Proteinlevel. Bei allen drei Patientinnen wurde der für die osteoblastäre Differenzierung entscheidende Transkriptionsfaktor um 50 % reduziert. Die Proteinlevel von COL1 als Hauptbestandteil der EZM waren unter Behandlung mit ZOL bei allen Zellen erhöht. Die relativen Proteinlevel von RANKL reduzierten sich unter Behandlung mit ZOL, jedoch nicht signifikant. Bei allen anderen Versuchsreihen ergab sich eine breite Streuung der Ergebnisse. Unter der identischen Behandlung mit ZOL oder DEN waren die relativen Proteinlevel bei der einen Patientin erhöht, bei der anderen dagegen erniedrigt. Dies lässt keinen eindeutigen Rückschluss auf die Wirkung der Medikamente auf diese Proteine zu. Die möglichen Gründe müssen anschließend diskutiert werden.

4 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Wirkung von ZOL und DEN auf primär gewonnene Zellen der osteoblastären Linie aus dem Kieferknochen anhand knochenspezifischer Proteine zu untersuchen und anschließend neue Erkenntnisse über die Pathogenese der MRONJ zu erlangen. Die hier angewandten Methoden und gesammelten Ergebnisse werden folgend diskutiert.

4.1 Methodik der Probengewinnung der osteoblastären Linie

Die Probengewinnung orientierte sich an einem laboreigenen Protokoll zur Isolation osteogener Zellen aus Knochenproben (vgl. 2.4). Es wich von in der Literatur beschriebenen Protokollen zur gezielten Isolation von Osteoblasten insofern ab, als das nach erfolgtem Auswachsen der Zellen aus der organischen Matrix, keine weitere osteogene Differenzierung mit Dexamethason, β -Glycerophosphat oder Ascorbinsäure erfolgte und durch ausbleibendes *cell-sorting* eine Mischkultur der osteoblastären Linie entstand (Coussens et al. 2009; Wrobel et al. 2016). Häufig wurden zur in vitro Kultur auch kommerziell erworbene Zelllinien verwendet. Sie wurden zum Teil aus Osteosarkombiopsien gewonnen oder primäre Knochenzelllinien wurden in vitro durch Transfektion immortalisiert. Interindividuelle biologische Unterschiede von Individuum zu Individuum werden dadurch allerdings nicht dargestellt, weshalb diese Zelllinien eher dafür geeignet sind allgemeine Differenzierungs- und Zellinteraktionsmechanismen zu untersuchen (Kartsogiannis und Kong Wah 2004). Da Medikamente im Organismus nie isoliert mit nur einer Zellart in Kontakt kommen, in vivo hingegen eine Gewebedistribution stattfindet, wäre es also nicht zielführend gewesen eine kommerziell erworbene Zelllinie zu verwenden.

Morphologisch waren schon zu Beginn fibroblastenartige Zellen neben typischen kuboidalen osteoblastären Zellen zu erkennen (vgl. 3.1). Dies beobachteten Trubiani et al. auch bei einer kommerziell erworbenen primären osteoblastären Zelllinie (Trubiani et al. 2010). Auch Wrobel beschreibt mit seiner Arbeitsgruppe dieses morphologische Phänomen bei primären Zellkulturen aus dem distalen Femur, bevor die Zellen einem osteoblastären Differenzierungsmedium ausgesetzt wurden (Wrobel et al. 2016). Dies scheint ein Umstand morphologischer Veränderungen innerhalb der in vitro Verhältnisse zu sein, die zum einen der fehlenden Interaktion mit dem umgebenden Gewebe, als auch dem adhäsiven Kontakt zum Flaschenboden geschuldet sein können (Hughes und Aubin 1997).

Der klassische Nachweis osteoblastärer Zelllinien mit ALP oder OSX wurde aus folgenden Gründen nicht durchgeführt. ALP als wichtiges Enzym für die Knochenmineralisierung ist nur in den späten Stadien der osteoblastären Differenzierung, also bei bereits reifen Osteoblasten nachweisbar (Vimalraj 2020). Da hier die primäre Kultur allerdings keinem Differenzierungsmedium ausgesetzt wurde, war ein solcher Nachweis nicht zwingend zielführend. Die in dieser Arbeit zentralen Proteine COL1, RUNX2 und RANKL sind alle

stark vermehrt im Knochengewebe vorhanden (Boskey et al. 1999; Komori 2008; Eriksen 2010). Die Gen-Expression von RUNX2 ist bei den Vorläuferzellen zu beobachten, allerdings nicht bei den reifen Osteoblasten. Da ohne Genexpression keine Translation erfolgt, ist auch das Protein in den frühen Differenzierungsstadien nachzuweisen. Dementsprechend lässt sich daraus schließen dass es sich bei unseren Zellen um frühe Stadien der osteoblastären Linie handelt (Ansari und Sims 2019). Der immunzytochemische Nachweis dieser Proteine bestätigte somit auch den osteogenen Ursprung der Zellen (vgl. 3.2.1, 3.2.2, 3.2.3).

Um eine Kontamination mit anderen Bindegewebs- oder Blutzellen zu vermeiden, wurde bei der primären Isolation stark darauf geachtet, den kortikalen Knochen der gesammelten Proben von allen anderen Gewebebestandteilen, wie zum Beispiel parodontalem Gewebe, Knochenmark und Periost zu befreien, (vgl. 2.4). Die anschließende enzymatische Desintegration der organischen Matrix mit Collagenase I und Dispase ist eine der Standardmethoden, die in der Matrix enthaltenen Zellen der osteoblastären Linie freizusetzen und anschließend zu kultivieren (Voegelé et al. 2000; Czekanska et al. 2012).

4.2 Inkubation der Zellen mit ZOL und DEN

Viele Arbeitsgruppen beschreiben in der Literatur Zellviabilitätstests und Apoptose-assays, um die passenden Konzentrationen für die anschließenden Versuche zu ermitteln (Vgl. 2.4.2) (Viereck et al. 2002; Huang et al. 2015; Mosch et al. 2019). In dieser Arbeit wurde sich an Literaturangaben orientiert und Konzentrationen der beiden Medikamente innerhalb des Mediums ausgewählt, die zum einen eine beständige Zellproliferation gewährleisten, als auch deutliche Effekte auf die zu untersuchenden Proteine versprechen.

In einer 2012 fertiggestellten Dissertation an der Universität Göttingen untersuchte Sievers den Einfluss von ZOL auf primäre humane und porcine Osteoblastenkulturen. Die Proliferationstests zeigten einen geringen Einfluss auf die Proliferationsrate bei Konzentrationen geringer als 1 μM . Bei höheren Konzentrationen sank die Proliferationsrate drastisch (Sievers 2012). Otto et al. ermittelten für die *in vitro* Konzentration von ZOL equimolare Dosen zur *in vivo* Applikation bei onkologischer Indikation, wobei beispielsweise eine 1 μM *in vitro* Konzentration einer einmaligen intravenösen Gabe von 4 mg ZOL entsprachen. Es konnte eine Reduktion der Zellviabilität von mesenchymalen Stammzellen beobachtet werden, die mit höheren Konzentrationen stark zunahm (Otto et al. 2010).

Den konzentrationsabhängigen Einfluss von DEN auf kommerziell erworbene Zellen aus dem Kieferknochen untersuchten Mosch et al. anhand von Zellviabilitäts- und Toxizitäts-assays, der ALP-Aktivität und der Analyse der Genexpression von ALP, RUNX2 und COL1, wobei bereits ab einer Konzentration von 0,25 μM Effekte zu beobachten waren. Die Zellviabilität reduzierte sich erst ab einer Konzentration von 10 μM drastisch (Mosch et al.

2019). Eine weitere Arbeitsgruppe führte Zellviabilitätstests an Brustkrebs- und Umbilikalvenenzellen durch. Auch hier zeigten sich erst ab Konzentrationen von 10-20 μM zytotoxische Effekte (Misso et al. 2012).

Die Darstellungen und Ergebnisse der eben beispielhaft aufgeführten Literatur zeigten eine optimale Kombination aus anhaltender Zellproliferation und dennoch nachweisbaren Effekten auf die Expression wichtiger Gene und auf relative Proteinlevel bei einer Wirkstoffkonzentration von 1 μM , weshalb sie in dieser Arbeit sowohl für ZOL als auch für DEN Anwendung fand.

4.3 Ergebnisse der Immunzytochemie

Im Folgenden werden die Ergebnisse des immunzytochemischen Proteinnachweises diskutiert. Zunächst müssen allerdings noch einige Vor- und Nachteile der Methodik besprochen werden. Wie im Material & Methoden Teil bereits erläutert, stellt die ICC eine einfach durchzuführende Methode dar, um Proteine innerhalb von Zellen nachzuweisen und deren Lokalisation zu bestimmen (vgl. 2.5.1). Vor allem der Lokalisationsnachweis ist sehr zuverlässig, wodurch auch zellphysiologische Prozesse bewertet werden können (Donaldson 2015). Eine der größten Limitationen ist jedoch die begrenzte Auflösung der Weitfeld-Fluoreszenzmikroskopie, die durch lichteoptische Eigenschaften begrenzt ist (Hell 2003). Bevor das spezifisch emittierte Fluoreszenzlicht von der Kamera aufgenommen werden kann, muss es zunächst sowohl das Mowiol, als auch das DG durchdringen, die beide unterschiedliche Brechungsindizes besitzen. Die Dicke des Mowiolfilms ist bei manueller Anwendung nicht perfekt standardisierbar, wodurch auch die Position des DG bestimmt und somit die Brechung des Lasers und des emittierten Lichts beeinflusst werden (Lichtman und Conchello 2005; Sanderson et al. 2014). Dementsprechend ist es schwierig anhand von Unterschieden in der Fluoreszenzintensität Rückschlüsse auf relative Proteinlevel zu ziehen, wobei sie bei einheitlichen und deutlichen Unterschieden dennoch Hinweise darauf geben können.

4.3.1 COL1

COL1 war bei allen drei Patientinnen nachzuweisen und die Fluoreszenzreaktion zeigte sich an der für das Protein typischen Lokalisation im Zytoplasma, dort vor allem in Umgebung des endoplasmatischen Retikulums und teilweise innerhalb von zytoplasmatischen Vesikeln (vgl. 3.2.1) (Varma et al. 2016). Sind die Zellen, wie beispielsweise reife Osteoblasten, bereits fähig eine EZM zu bilden, würde man das Protein auch extrazellulär finden (Thul et al. 2017; COL1A1 - The Human Protein Atlas 2021). Die leichten Unterschiede der Fluoreszenzintensität bei Patientin 1 und 2 zwischen der ZOL und der DEN Gruppe waren nur schwach ausgeprägt und somit nicht eindeutig auf die Inkubation mit ZOL oder DEN zurückzuführen, sondern auf Normabweichungen der Methode.

4.3.2 RUNX2

Der Transkriptionsfaktor RUNX2 war bei den Proben aller Patientinnen nachzuweisen. Bei Patientin 1 und 3 entsprach die Fluoreszenzreaktion der prädiktabeln Lokalisation des Proteins innerhalb des Zellkerns (Thul und Lindskog 2018; RUNX2 - The Human Protein Atlas 2021). Die Zellen von Patientin 2 zeigten allerdings auch starke Fluoreszenzreaktion innerhalb des Zytoplasmas, vor allem unter ZOL und DEN Inkubation (vgl. 3.2.2). Eine Eigenfluoreszenz der Zellen ist auszuschließen, da die Aufnahmen bei allen drei Patientinnen mit den gleichen Belichtungseinstellungen erfolgten. Eine mögliche Erklärung ist eine durch physiologische Seneszenz ausgelöste Desintegration zellulärer Strukturen und somit einer Freisetzung des Transkriptionsfaktors in das Zytoplasma (Kuilman et al. 2010). Hayflick wies bereits 1961 nach, dass bei in vitro kultivierten, nicht immortalisierten Zellen nach wenigen Passagen morphologische Veränderungen festzustellen sind, die Zellen sich nicht endlos passagieren lassen und auch zellphysiologische Änderungen zu beobachten sind (Hayflick und Moorhead 1961; Hayflick 1965). Die Vermutung ist also eine im Vergleich zu den anderen Patientinnen früher einsetzende Limitation der Teilungsfähigkeit und beginnende Desintegration zellulärer Strukturen. Eine weitere Erklärung wäre eine im Vergleich zu den beiden anderen Patientinnen zu unterscheidende Reaktion auf die Behandlung mit ZOL und DEN, da dieser Effekt in der Kontrollgruppe weniger stark ausgeprägt war. Allerdings müssten dann auch bei Untersuchung der anderen Proteine derartige Unterschiede zwischen den Patientinnen zu beobachten sein.

4.3.3 RANKL

Die Ergebnisse des immunzytochemischen Nachweises von RANKL zeigten auffällige Fluoreszenzreaktionen des Zellkerns, die dem Verteilungsmuster nach nicht auf die Medikamente zurückzuführen waren und folgend diskutiert werden müssen. Bei Patientin 1 zeigte sich im Zellkern eine Fluoreszenzreaktion bei der mit DEN behandelten Gruppe, bei Patientin 2 in der Kontrollgruppe und bei Patientin 3 bei allen drei Behandlungsgruppen (vgl. 3.2.3). Das Typ II Membranprotein RANKL lässt sich typischerweise membranständig nachweisen, bevor es extrazellulär sezerniert wird, um als Ligand zu seinen passenden Rezeptoren zu gelangen. Direkt nach der Transkription ist es auch im Zytoplasma zu detektieren, was sich in dieser Arbeit bei allen Patientinnen und Behandlungsgruppen nachweisen lässt (Nagy und Penninger 2015). Die *human gene database genecards* gibt zusätzlichen Anhalt, dass RANKL auch im Zellkern nachweisbar sein kann und gibt erste Hinweise auf das oben beobachtete Phänomen (Stelzer et al. 2016; TNFSF11 - GeneCards - Human Genes - Gene Database 2021). Eine weitere mögliche Erklärung für starke Reaktion am Zellkern, könnten posttranslationale Modifikationsprozesse sein, die am endoplasmatischen Retikulum ablaufen (Deribe et al. 2010). Durch die zweidimensionale Darstellung der eigentlich dreidimensionalen Zellstruktur, können das endoplasmatische Retikulum und der Zellkern überlagern und den beobachteten Effekt erzeugen.

Eine Färbung des Zellkerns zeigt sich in der Literatur auch bei einem anderen RANKL Antikörper der Firma Santa Cruz (sc-377079) und deutet somit auf eine zufällige Normvariante der Immunfluoreszenz mit RANKL Antikörpern hin (Shams et al. 2021; RANKL Antikörper (G-1) 2021). Dies erklärt auch das unterschiedliche Verteilungsmuster des Phänomens zwischen den Behandlungsgruppen und lässt letztlich keine Rückschlüsse auf von Medikamenten ausgelöste Prozesse zu.

Die schwächere Fluoreszenz im Bereich der Zellmembran in der mit DEN behandelten Gruppe, zeigt die starke Affinität von DEN zum Transmembranprotein RANKL. Deren Interaktion verhindert ein Binden des für die ICC verwandten monoklonalen Antikörpers (Kostenuik et al. 2009).

4.3.4 SMURF2

Der Nachweis von SMURF2 erfolgte bei allen drei Patientinnen. Als Ubiquitin-Protein-Ligase ist SMURF2 seiner Funktion entsprechend sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma lokalisiert (vgl.3.2.4) (Thul et al. 2017; SMURF2 - The Human Protein Atlas 2021). Da eine negative Modulation von BMP durch SMURF2 vermutet wird, müssen die beiden Proteine interagieren können. Als Wachstumsfaktor ist BMP im Zytoplasma nachzuweisen und wird nach Bedarf sekretiert (Berndsen und Wolberger 2014). Dementsprechend muss auch SMURF2 im Zytoplasma vorhanden sein. Zudem zeigten Schminke et al. die eben beschriebene Lokalisation von SMURF 2 mit dem gleichen in dieser Arbeit angewandten Protokoll (Schminke et al. 2015). Es konnten Unterschiede in der Fluoreszenzintensität beobachtet werden, die sich allerdings als uneinheitlich zwischen den verschiedenen Gruppen darstellten und mit hoher Wahrscheinlichkeit dem Zufall unterlagen.

4.4 Ergebnisse der Westernblots

Um Proteinmengen quantitativ auswerten zu können sind Westernblots seit Jahrzehnten eine weitverbreitete und zuverlässige Methode (Taylor et al. 2013; Taylor und Posch 2014). Es lassen sich jedoch keine absoluten Proteinmengen bestimmen, lediglich relative Mengen im Verhältnis zu einem *Housekeeping*-Protein, weshalb man die Quantifizierung mit Westernblots auch als semiquantitativ bezeichnen kann (Hnasko und Hnasko 2015). Die Ergebnisse der in dieser Arbeit durchgeführten Westernblots geben mögliche Hinweise auf die Pathophysiologie der MRONJ und müssen folgend diskutiert werden.

4.4.1 COL1

Bei allen drei Patientinnen war in der mit ZOL behandelten Gruppe eine Erhöhung des relativen Proteinlevels um das 1,5- bis 3-fache zu beobachten. Aufgrund zu starker Streuung wurden diese Ergebnisse als nicht signifikant erachtet, waren aber dennoch von hoher

Relevanz (vgl. 3.2.1). Eine Erhöhung der COL1 Proteinsekretion bei primären humanen Osteoblasten unter Behandlung mit ZOL zeigte sich auch in einer von Viereck et al. durchgeführten Studie an der Universität Göttingen und bestätigte unsere Ergebnisse (Viereck et al. 2002). Zwei weitere in vitro Studien an primären humanen Osteoblasten konnten ebenfalls eine Erhöhung des COL1 mRNA- und Proteinlevels bei Gabe von ZOL in subtoxischen Konzentrationen feststellen (Koch et al. 2010; Zara et al. 2015). Andere in der Literatur veröffentlichten Studien zeigten dagegen eine Reduktion der mRNA Level von COL1 (Patntirapong et al. 2012). Die Menge der mRNA korreliert allerdings nicht zwangsläufig mit der tatsächlich vorhandenen Menge an Proteinen. Die für Proteine kodierende mRNA kann bereits vor der Translation abgebaut werden oder quantitativ durch medikamentöse Beeinflussung der Transkription reduziert werden, ohne jedoch die Menge an bereits translatierten Proteinen zu verändern (Li und Biggin 2015; Fortelny et al. 2017).

Die in dieser Arbeit erlangten Erkenntnisse über eine vermehrte COL1 Bildung, könnten Einfluss auf die Pathogenese von MRONJ haben. Wird mehr COL1 als Hauptbestandteil der EZM gebildet, kann anschließend auch mehr EZM mineralisiert werden. Da ZOL gleichzeitig die Aktivität von Osteoklasten vermindert, wird innerhalb des *bone remodellings* mehr Knochenaufbau als -resorption stattfinden und führt somit beispielsweise zur Einengung der gefäßführenden Havers-Kanäle (Buckwalter et al. 1995). Ein dadurch womöglich weniger stark vaskularisierter Knochen ist anfälliger für Infektionen, da Immunzellen das Infektionsgeschehen nicht mehr adäquat erreichen können. Pathophysiologisch unterstützt dies sowohl die *inside-outside*- als auch die *outside-inside*-Theorie, die beide die Beeinflussung des *bone-remodellings* als wichtigen pathophysiologischen Faktor der MRONJ betrachten (Hoefert et al. 2010; Lombard et al. 2016).

Der nicht eindeutige Einfluss von DEN auf COL1 ist logisch zu erklären und entspricht bisherigen Studienergebnissen. Therapeutisch ist das Ziel von DEN als monoklonaler Antikörper an den Osteoklasten aktivierenden Liganden RANKL zu binden und somit das Gleichgewicht zwischen Knochenaufbau und -resorption zu Gunsten des Aufbaus zu verschieben (McClung et al. 2006; Smith et al. 2009; Bone et al. 2017). Ein direkter und eindeutiger Einfluss auf den Stoffwechsel oder die Aktivität von Osteoblasten bei den in dieser Arbeit verwendeten Konzentrationen von DEN wurde bisher nicht beobachtet und bestätigt somit unsere Ergebnisse (Rachner et al. 2011; Sinnigen et al. 2012; Isawa et al. 2019)

4.4.2 RUNX2

Eine signifikante Reduktion der relativen Proteinlevel von RUNX2 zeigte sich bei allen drei Patientinnen in der mit ZOL behandelten Gruppe (vgl. 3.3.2). Huang et al. wiesen bei einer kommerziell erworbenen osteoblastären Zelllinie eine signifikante Reduktion der mRNA- und Proteinlevel von RUNX2 unter Behandlung mit ZOL nach (Huang et al. 2015). Auch Manzano-Moreno et al. zeigten eine Reduktion der Genexpression von RUNX2, diesmal

anhand primärer Osteoblastenkulturen aus dem Kieferknochen (Manzano-Moreno et al. 2018).

Bei den in dieser Arbeit kultivierten Zellen konnte keine Bildung einer EZM beobachtet werden, womit es sich um nicht reife Stadien der osteoblastären Linie handeln muss (Clarke 2008). Da RUNX2 essenziell ist für die weitere Differenzierungsfähigkeit dieser Zelllinie, erklärt sich die eingeschränkte Regenerationsfähigkeit des Kieferknochens bei MRONJ. Werden alte Osteoblasten apoptotisch oder innerhalb des Knochenaufbaus als Osteozyten eingemauert, können weniger SSC in Präosteoblasten umgewandelt werden und die eigentlich benötigte Zellerneuerung ist reduziert (Pittenger et al. 1999; Datta et al. 2008). Auch diese Ergebnisse unterstützen die bisherigen Theorien über die Pathophysiologie der MRONJ, wonach das *bone-remodelling* für die vorliegenden Grunderkrankungen eigentlich positiv beeinflusst wird, die erhöhte Knochendichte und eine eingeschränkte Regenerationsfähigkeit der Osteoblasten dagegen zu einer reduzierten Abwehrleistung des Kieferknochens führen (Lesclous et al. 2009; Hoefert et al. 2010; Lombard et al. 2016).

Die extrem gegensätzliche Streuung der Ergebnisse bei den mit DEN behandelten Gruppen lässt keine eindeutige Interpretation zu und unterliegt mit hoher Wahrscheinlichkeit zufälligen Prozessen. Die mögliche Erklärung wurde bei COL1 diskutiert (vgl. 4.4.1).

4.4.3 RANKL

Unter ZOL Behandlung war die Tendenz einer allgemeinen Reduktion der RANKL Proteinlevel zu erkennen. Die bisherigen Erkenntnisse in der Literatur sind widersprüchlich. Koch et al. zeigten beispielsweise eine Erhöhung der RANKL Genexpression, wobei dies wie bereits beschrieben keinen direkten Einfluss auf die Proteinmenge haben muss (Koch et al. 2012). In einer prospektiven Studie konnten bei 49 mit ZOL behandelten PatientInnen um 22 % reduzierte Serumwerte von RANKL festgestellt werden (Mercatali et al. 2013). Dies unterstützt wiederum die in dieser Arbeit beobachtete Tendenz. Eine Reduktion von RANKL würde eine unterstützende Wirkung auf die allgemein bei BP nachgewiesene negative Regulation der Osteoklastenaktivierung bedeuten (Bartl et al. 2006).

Wie schon bei COL1 und RUNX2 streuten die Ergebnisse der mit DEN behandelten Gruppen und lassen keine eindeutige Interpretation zu. Im Gegensatz zur Immunzytochemie ist eine Blockade von RANKL durch DEN bei der Antikörperreaktion der Westernblots nicht zu erwarten gewesen. Die Zellen durchlaufen einen Lyseprozess, bevor in der anschließenden SDS-PAGE eine Auflösung der Protein-Primärstruktur erfolgt. Eine zuvor bestehende Interaktion von DEN und RANKL wird somit aufgelöst (Taylor et al. 2013; Taylor und Posch 2014).

4.4.4 SMURF2

Die relativen Proteinlevel beider Behandlungsgruppen unterlagen starken gegensätzlichen Schwankungen und ließen keine Rückschlüsse auf eine medikamentöse Beeinflussung zu.

Tendenzen waren ebenfalls nicht zu erkennen (vgl. 3.3.4). Bisher gab es keine Studien, die den Zusammenhang einer antiresorptiven Therapie und SMURF-Proteinen untersuchten oder den Einfluss auf die Pathogenese von MRONJ nachweisen konnten.

4.5 Schlussfolgerung und Ausblick

Bisherige Arbeiten zur *in vitro* Untersuchung von antiresorptiven Medikamenten und deren Wirkung auf humane osteoblastäre Zellen verwendeten häufig kommerziell erworbene Zelllinien und konzentrierten sich bei ihrer Untersuchung auf die Zellviabilität und die Expressionsraten von für den Knochenstoffwechsel oder das *bone-remodelling* relevanten Genen. (Koch et al. 2010; Manzano-Moreno et al. 2018; Mosch et al. 2019). Deutlich weniger Studien beschäftigten sich mit deren Einfluss auf relative Proteinlevel. Da erhöhte mRNA Level aber nicht gleichbedeutend sind mit einer anschließenden proportionalen Translation in das dafür kodierte und später physiologisch wirksame Protein, ist deren Betrachtung überaus wichtig (Li und Biggin 2015; Fortelny et al. 2017).

Wie in den vorherigen Kapiteln geschildert, zeigten bisherige Studien widersprüchliche Ergebnisse. Dies deutet darauf hin, dass die Ergebnisse stark von der kultivierten Zelllinie abhängen. Um den *in vivo* Verhältnissen möglichst nahe zu kommen ist die Verwendung von primären Kulturen der osteoblastären Linie aus dem Kieferknochen daher eine der besten und zuverlässigsten Methoden, um die Pathophysiologie der MRONJ zu untersuchen.

Insgesamt kann man anhand der in dieser Arbeit erlangten Ergebnisse festhalten, dass die Behandlung mit ZOL im Gegensatz zu DEN eindeutige Effekte in den Zellen der osteoblastären Linie auslösten. Dies ermöglicht plausible Rückschlüsse auf die Pathophysiologie der MRONJ. Eine Erhöhung der COL1 Produktion erklärt zusätzlich zur Inhibition der Osteoklastenaktivität, weshalb die Knochendichte bei mit ZOL therapierten PatientInnen erhöht ist (Miller et al. 2016). Die Kombination dieser beiden Reaktionen könnte zu einer Verengung der gefäßführenden Havers- und Volkmann-Kanäle führen und somit die Vaskularisierung des Kieferknochens einschränken (Maggiano et al. 2021). Erfolgt nun eine Infektion des Knochens mit Mikroorganismen durch die Mundhöhle, ist die immunologische Abwehrleistung des Knochens herabgesetzt und eine daraus folgende Nekrose wird wahrscheinlicher (Datta et al. 2008; Zhao et al. 2012).

Alle bisherigen Studien zeigten apoptotische Effekte von ZOL auf osteoblastäre Zellen (Plotkin et al. 2006; Maruotti et al. 2012; Huang et al. 2015; Jung et al. 2018; Di Vito et al. 2020). Eine zusätzlich ausgelöste Reduktion von RUNX2, einem wichtigen Transkriptionsfaktor der frühen osteoblastären Differenzierung, könnte somit die Regenerationsfähigkeit des Kieferknochens beeinflussen, indem alte Osteoblasten apoptotisch werden, eine erneute Differenzierung vorhandener Vorläuferzellen jedoch ausbleibt (Bruderer et al. 2014; Komori 2019). Osteoblasten sind außerdem zentrale Modulatoren des *bone-remodellings*. Ist es reduziert, kann der Knochen weniger effektiv und

nur noch verzögert auf mechanische und mikrobiologische Einflüsse reagieren (Pozzi et al. 2009; Katsimbri 2017). Vor allem das gehäufte Auftreten von MRONJ nach oralchirurgischen Eingriffen unterstützt diese These, da beispielsweise Zahnextraktion das umgebende Weich- und Hartgewebe traumatisieren und ein Eindringen von Mikroorganismen erleichtert wird (Ruggiero et al. 2014).

Die nicht interpretierbaren relativen Proteinlevel unter DEN Behandlung sind mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die pharmakologischen Eigenschaften des Wirkstoffs zurückzuführen. Das primäre Ziel von DEN als monoklonaler Antikörper gegen RANKL ist die Aktivierung von Osteoklastenvorläufern über das RANK/RANKL/OPG-System, indem es die Wirkung von OPG imitiert und RANKL an der Bindung an RANK hindert (Baron et al. 2011). Dementsprechend könnte das Auftreten von MRONJ unter DEN Behandlung auf die allgemeine Reduktion des *bone-remodellings* zurückgeführt werden (Boquete-Castro et al. 2016).

Um in zukünftigen Studien die Signifikanz der Ergebnisse zu erhöhen, starke Streuungen zu vermeiden und die interindividuelle Vielfalt der PatientInnen darzustellen, sollte die Anzahl der biologischen Replikate erhöht werden. Das Vermeiden einer weiterführenden in vitro Differenzierung wurde in vorherigen Kapiteln ausführlich besprochen. Dennoch sollte es in zukünftigen Versuchen in Betracht gezogen werden, um auch den Einfluss auf höhere Differenzierungsstadien der osteoblastären Linie zu erfassen. Des Weiteren könnte eine Analyse der Genexpression anhand von mRNA-Leveln die Lücke zwischen Transkription und Translation schließen.

Abschließend lässt sich sagen, dass die Ergebnisse dieser Arbeit die bisherigen Erkenntnisse zur Pathophysiologie der MRONJ unterstützen und somit einen wichtigen Beitrag zum weiteren Verständnis dieses Phänomens leisten.

5 Zusammenfassung

Medication related osteonecrosis of the jaw stellen eine häufige Komplikation im Rahmen antiresorptiver Therapien dar. Bei Zoledronat und Denosumab handelt es sich um die meist verbreiteten und potentesten Medikamente zur antiresorptiven Therapie, die gleichzeitig mit der höchsten oral manifestierten Komplikationsrate verbunden sind. Da die Kiefernekrosen je nach Schweregrad eine recht aufwändige systemische und chirurgische Therapie nach sich ziehen ist es essenziell die Pathogenese dieses Nebeneffektes zu verstehen. Ein tieferes Verständnis ermöglicht es neue Therapieansätze zu entwickeln und frühzeitig mögliche Prophylaxemaßnahmen einzuleiten.

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von Zoledronat und Denosumab auf humane Zellen der osteoblastären Linie aus dem Kieferknochen untersucht. Die Zellen von drei Patientinnen wurden *in vitro* kultiviert, mit den oben genannten Medikamenten inkubiert und deren zelluläre Effekte anhand von vier Markerproteinen evaluiert. COL1, RUNX2, RANKL und SMURF2 wurden zunächst mithilfe von Immunzytochemie nachgewiesen und anschließend deren relative Proteinlevel im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollgruppe mit Westernblots ermittelt. Alle Proteine ließen sich bei den Patientinnen nachweisen und bestätigten somit auch den osteogenen Ursprung der Zellen.

Neuartig war im Zusammenhang mit der *in vitro* Wirkung von Zoledronat und Denosumab, dass die Zellen in dieser Arbeit keiner weiteren osteogenen Differenzierung ausgesetzt waren. Dadurch konnte die Reaktion einer unbeeinflussten primären Zellkultur auf die Inkubation mit Zoledronat und Denosumab beurteilt werden. Die Ergebnisse bestätigten die bisher durchgeführten Studien und verfestigten die vorherrschenden Theorien über den Pathomechanismus der *medication related osteonecrosis of the jaw*. Die zentralen Ergebnisse waren eine Erhöhung der relativen Proteinlevel von COL1 und eine signifikante Reduktion von RUNX2 unter ZOL Behandlung. Produzieren Zellen mehr COL1 als Grundgerüst der extrazellulären Matrix, könnte der Raum für Leitungsbahnen innerhalb der Havers- und Volkmannkanäle eingeengt, ein adäquates *bone-remodelling* eingeschränkt und der Transport von Immunzellen zu Entzündungsherden erschwert werden. Eine Reduktion von RUNX2 als zentralen Transkriptionsfaktor der osteoblastären Differenzierung führt zu einer eingeschränkten Regenerationsfähigkeit der knochenbauenden Zellen, womit die Regenerationsfähigkeit des gesamten Knochens nach pathologischen Veränderungen vermindert wird.

Die eigentlich positiv auf den Knochen wirkenden Effekte von antiresorptiven Medikamenten können somit in Kombination mit einer pathogen besiedelten Mundhöhle zu schweren Knochennekrosen im Bereich der Kiefer führen.

6 Literaturverzeichnis

- Aghaloo TL, Kang B, Sung EC, Shoff M, Ronconi M, Gotcher JE, Bezouglaia O, Dry SM, Tetradis S (2011): Periodontal disease and bisphosphonates induce osteonecrosis of the jaws in the rat. *J Bone Miner Res* 26, 1871–1882
- Aljohani S, Gaudin R, Weiser J, Tröltzsch M, Ehrenfeld M, Kaeppler G, Smeets R, Otto S (2018): Osteonecrosis of the jaw in patients treated with denosumab: A multicenter case series. *J Craniomaxillofac Surg* 46, 1515–1525
- Andersen TL, Sondergaard TE, Skorzynska KE, Dagnaes-Hansen F, Plesner TL, Hauge EM, Plesner T, Delaisse J-M (2009): A Physical Mechanism for Coupling Bone Resorption and Formation in Adult Human Bone. *Am J Pathol* 174, 239–247
- Ansari N, Sims NA: The Cells of Bone and Their Interactions. In: Stern PH (Hrsg.): Bone Regulators and Osteoporosis Therapy. Handbook of Experimental Pharmacology. Band 262; Springer International Publishing, Cham 2019 262, 1–25
- Armas L, Becker R (2012): Pathophysiology of osteoporosis: new mechanistic insights. *Endocrinol Metab Clin N Am* 41, 475–486
- Atkins GJ, Findlay DM (2012): Osteocyte regulation of bone mineral: a little give and take. *Osteoporos Int* 23, 2067–2079
- Atkins GJ, Kostakis P, Pan B, Farrugia A, Gronthos S, Evdokiou A, Harrison K, Findlay DM, Zannettino AC (2003): RANKL Expression Is Related to the Differentiation State of Human Osteoblasts. *J Bone Miner Res* 18, 1088–1098
- Baron R, Ferrari S, Russell RGG (2011): Denosumab and bisphosphonates: Different mechanisms of action and effects. *Bone* 48, 677–692
- Bartl R, Tresckow E von, Bartl C: Bisphosphonat-Manual: Wirkungen - Indikationen - Strategien. 1. Auflage; Springer, Berlin 2006
- Bassett CA, Donath A, Macagno F, Preisig R, Fleisch H, Francis MD (1969): Diphosphonates in the treatment of myositis ossificans. *Lancet* 2, 845
- Bellido T, Plotkin LI (2011): Novel actions of bisphosphonates in bone: preservation of osteoblast and osteocyte viability. *Bone* 49, 50–55
- Berndsen CE, Wolberger C (2014): New insights into ubiquitin E3 ligase mechanism. *Nat Struct Mol Biol* 21, 301–307
- Bi W, Deng JM, Zhang Z, Behringer RR, de Crombrughe B (1999): Sox9 is required for cartilage formation. *Nat Genet* 22, 85–89
- Black DM, Rosen CJ (2016): Postmenopausal Osteoporosis. *N Engl J Med* 374, 254–262
- Blair HC, Teitelbaum SI, Ghiselli R, Gluck S (1989): Osteoclastic bone resorption by a polarized vacuolar proton pump. *Science* 245, 855-857
- Bone HG, Wagman RB, Brandi ML, Brown JP, Chapurlat R, Cummings SR, Czerwiński E, Fahrleitner-Pammer A, Kendler DL, Lippuner K, et al. (2017): 10 years of denosumab

- treatment in postmenopausal women with osteoporosis: results from the phase 3 randomised FREEDOM trial and open-label extension. *Lancet Diabetes Endocrinol* 5, 513–523
- Bonewald LF (2007): Osteocytes as dynamic multifunctional cells. *Ann N Y Acad Sci* 1116, 281–290
- Bonewald LF (2011): The amazing osteocyte. *J Bone Miner Res* 26, 229–238
- Bonewald LF, Mundy GR (1990): Role of transforming growth factor-beta in bone remodeling. *Clin Orthop Relat Res* 250, 261–276
- Boquete-Castro A, Gómez-Moreno G, Calvo-Guirado JL, Aguilar-Salvatierra A, Delgado-Ruiz RA (2016): Denosumab and osteonecrosis of the jaw. A systematic analysis of events reported in clinical trials. *Clin Oral Implants Res* 27, 367–375
- Boskey AL, Wright TM, Blank RD (1999): Collagen and bone strength. *J Bone Miner Res* 14, 330–335
- Boyce BF, Xing L (2007): The RANKL/RANK/OPG pathway. *Curr Osteoporos Rep* 5, 98–104
- Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL (2003): Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 423, 337–342
- Bruderer M, Richards RG, Alini M, Stoddart MJ (2014): Role and regulation of RUNX2 in osteogenesis. *Eur Cell Mater* 28, 269–286
- Buck DWI, Dumanian GA (2012): Bone biology and physiology: Part I. The fundamentals. *Plast Reconstr Surg* 129, 1314–1320
- Buckwalter J, Glimcher M, Cooper R, Recker R (1995): Bone biology. *J Bone Joint Surg Am* 77, 1256–1275
- Burr DB (2002): The contribution of the organic matrix to bone's material properties. *Bone* 31, 8–11
- Choi N-K, Solomon DH, Tsacogianis TN, Landon JE, Song HJ, Kim SC (2017): Comparative safety and effectiveness of Denosumab versus Zoledronic acid in patients with osteoporosis: a cohort study. *J Bone Miner Res* 32, 611–617
- Christenson RH (1997): Biochemical markers of bone metabolism: an overview. *Clin Biochem* 30, 573–593
- Clarke B (2008): Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol* 3, 131–139
- COL1A1 - The Human Protein Atlas. <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000108821-COL1A1/subcellular>; Zugriff am 12.12.2021
- Coussens AK, Hughes IP, Morris CP, Powell BC, Anderson PJ (2009): In vitro differentiation of human calvarial suture derived cells with and without dexamethasone does not induce in vivo-like expression. *J Cell Physiol* 218, 183–191
- Crockett JC, Rogers MJ, Coxon FP, Hocking LJ, Helfrich MH (2011): Bone remodelling at a glance. *J Cell Sci* 124, 991–998

- Cummings SR, Martin JS, McClung MR, Siris ES, Eastell R, Reid IR, Delmas P, Zoog HB, Austin M, Wang A, et al. (2009): Denosumab for prevention of fractures in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med* 361, 756–765
- Czekanska EM, Stoddart MJ, Richards RG, Hayes JS (2012): In search of an osteoblast cell model for in vitro research. *Eur Cell Mater* 24, 1–17
- Datta HK, Ng WF, Walker JA, Tuck SP, Varanasi SS (2008): The cell biology of bone metabolism. *J Clin Pathol* 61, 577–587
- Delaissé J-M, Andersen TL, Engsig MT, Henriksen K, Troen T, Blavier L (2003): Matrix metalloproteinases (MMP) and cathepsin K contribute differently to osteoclastic activities. *Microsc Res Tech* 61, 504–513
- Deribe YL, Pawson T, Dikic I (2010): Post-translational modifications in signal integration. *Nat Struct Mol Biol* 17, 666–672
- Di Vito A, Chiarella E, Baudi F, Scardamaglia P, Antonelli A, Giudice D, Barni T, Fortunato L, Giudice A (2020): Dose-dependent effects of Zoledronic Acid on human periodontal ligament stem cells: an in vitro pilot study. *Cell Transplant* 29, 1-12
- Dodson TB (2015): The frequency of medication-related osteonecrosis of the jaw and its associated risk factors. *Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America* 27, 509–516
- Donaldson JG (2015): Immunofluorescence staining. *Curr Protoc Cell Biol* 69, 4.3.1-4.3.7
- D’Oronzo S, Coleman R, Brown J, Silvestris F (2019): Metastatic bone disease: Pathogenesis and therapeutic options: Up-date on bone metastasis management. *J Bone Oncol* 15, 004–4
- Einhorn TA, Gerstenfeld LC (2015): Fracture healing: mechanisms and interventions. *Nat Rev Rheumatol* 11, 45-54
- Eriksen E (2010): Cellular mechanisms of bone remodeling. *Rev Endocr Metab Disord* 11, 219–227
- Everts V, Delaissé JM, Korper W, Jansen DC, Tigchelaar-Gutter W, Saftig P, Beertsen W (2002): The bone lining cell: its role in cleaning howship’s lacunae and initiating bone formation. *J Bone Miner Res* 17, 77–90
- Fizazi K, Carducci M, Smith M, Damião R, Brown J, Karsh L, Milecki P, Shore N, Rader M, Wang H, et al. (2011): Denosumab versus zoledronic acid for treatment of bone metastases in men with castration-resistant prostate cancer: a randomised, double-blind study. *Lancet* 377, 813–822
- Fleisch H, Fast D, Rizzoli R, Trechsel U, Bonjour JP (1977): Diphosphonates. Mode of action and clinical applications. *Adv Exp Med Biol* 81, 279–289
- Fliefel R, Tröltzsch M, Kühnisch J, Ehrenfeld M, Otto S (2015): Treatment strategies and outcomes of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ) with characterization of patients: a systematic review. *Int J Oral Maxillofac Surg* 44, 568–585
- Fortelny N, Overall CM, Pavlidis P, Freue GVC (2017): Can we predict protein from mRNA levels? *Nature* 547, E19–E20

- Francis MD, Russell RG, Fleisch H (1969): Diphosphonates inhibit formation of calcium phosphate crystals in vitro and pathological calcification in vivo. *Science* 165, 1264–1266
- Franz-Odendaal TA, Hall BK, Witten PE (2006): Buried alive: How osteoblasts become osteocytes. *Dev Dyn* 235, 176–190
- Fratzl P, S. Gupta H, P. Paschalis E, Roschger P (2004): Structure and mechanical quality of the collagen-mineral nano-composite in bone. *J Mater Chem* 14, 2115–2123
- Giraud-Guille MM (1988): Twisted plywood architecture of collagen fibrils in human compact bone osteons. *Calcif Tissue Int* 42, 167–180
- Green JR, Müller K, Jaeggi KA (1994): Preclinical pharmacology of CGP 42'446, a new, potent, heterocyclic bisphosphonate compound. *J Bone Miner Res* 9, 745–751
- Hadji P, Hardtstock F, Wilke T, Joeres L, Toth E, Möckel L, Gille P (2020): Estimated epidemiology of osteoporosis diagnoses and osteoporosis-related high fracture risk in Germany: a German claims data analysis. *Arch Osteoporos* 15, 127
- Hall BK (1975): The origin and fate of osteoclasts. *Anat Rec* 183, 1–11
- Hayflick L (1965): the limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 37, 614–636
- Hayflick L, Moorhead PS (1961): The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 25, 585–621
- Hell SW (2003): Toward fluorescence nanoscopy. *Nat Biotechnol* 21, 1347–1355
- Hnasko TS, Hnasko RM (2015): The Western Blot. *Methods Mol Biol* 1318, 87–96
- Hoefert S, Schmitz I, Tannapfel A, Eufinger H (2010): Importance of microcracks in etiology of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: a possible pathogenetic model of symptomatic and non-symptomatic osteonecrosis of the jaw based on scanning electron microscopy findings. *Clin Oral Investig* 14, 271–284
- Huang X, Huang S, Guo F, Xu F, Cheng P, Ye Y, Dong Y, Xiang W, Chen A (2015): Dose-dependent inhibitory effects of zoledronic acid on osteoblast viability and function in vitro. *Mol Med Rep* 13, 613–622
- Hughes FJ, Aubin JE: Culture of cells of the osteoblast lineage. In: Arnett TR, Henderson B (Hrsg.): *Methods in Bone Biology*. 1. Auflage; Springer US, Boston, MA 1997, 1–49
- Isawa M, Karakawa A, Sakai N, Nishina S, Kuritani M, Chatani M, Negishi-Koga T, Sato M, Inoue M, Shimada Y, Takami M (2019): Biological effects of anti-RANKL antibody and Zoledronic acid on growth and tooth eruption in growing mice. *Sci Rep* 9, e19895
- Jilka RL (2003): Biology of the basic multicellular unit and the pathophysiology of osteoporosis. *Med Pediatr Oncol* 41, 182–185
- Jung J, Park JS, Righesso L, Pabst AM, Al-Nawas B, Kwon Y-D, Walter C (2018): Effects of an oral bisphosphonate and three intravenous bisphosphonates on several cell types in vitro. *Clin Oral Invest* 22, 2527–2534

- Jüppner H, Abou-Samra A, Freeman M, Kong X, Schipani E, J R, Lf K, J H, Jt P, Hm K (1991): A G protein-linked receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide. *Science* 254, 1024–1026
- Kartsogiannis V, Kong Wah N (2004): Cell lines and primary cell cultures in the study of bone cell biology. *Mol Cell Endocrinol* 228, 79–102
- Katsimbri P (2017): The biology of normal bone remodelling. *Eur J Cancer Care* 26, e12740
- Kenkre J, Bassett J (2018): The bone remodelling cycle. *Ann Clin Biochem* 55, 308–327
- Khosla S, Hofbauer LC (2017): Osteoporosis treatment: recent developments and ongoing challenges. *Lancet Diabetes Endocrinol* 5, 898–907
- Kim J-M, Lin C, Stavre Z, Greenblatt MB, Shim J-H (2020): Osteoblast-osteoclast communication and bone homeostasis. *Cells* 9, 2073
- Kobayashi S, Takahashi HE, Ito A, Saito N, Nawata M, Horiuchi H, Ohta H, Ito A, Iorio R, Yamamoto N, Takaoka K (2003): Trabecular minimodeling in human iliac bone. *Bone* 32, 163–169
- Koch FP, Yekta SS, Merkel C, Ziebart T, Smeets R (2010): The impact of bisphosphonates on the osteoblast proliferation and collagen gene expression in vitro. *Head Face Med* 6, 12
- Koch FP, Merkel C, Ziebart T, Smeets R, Walter C, Al-Nawas B (2012): Influence of bisphosphonates on the osteoblast RANKL and OPG gene expression in vitro. *Clin Oral Investig* 16, 79–86
- Komori T (2002): Runx2, a multifunctional transcription factor in skeletal development. *J Cell Biochem* 87, 1–8
- Komori T (2006): Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors. *J Cell Biochem* 99, 1233–1239
- Komori T (2008): Regulation of bone development and maintenance by Runx2. *Front Biosci* 13, 898–903
- Komori T (2019): Regulation of proliferation, differentiation and functions of osteoblasts by Runx2. *Int J Mol Sci* 20, 1694
- Komori T (2020): Molecular mechanism of Runx2-dependent bone development. *Mol Cells* 43, 168–175
- Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, Shimizu Y, Bronson RT, Gao YH, Inada M, et al. (1997): Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* 89, 755–764
- Kostenuik PJ, Nguyen HQ, McCabe J, Warmington KS, Kurahara C, Sun N, Chen C, Li L, Cattley RC, Van G, et al. (2009): Denosumab, a fully human monoclonal antibody to RANKL, inhibits bone resorption and increases BMD in knock-in mice that express chimeric (murine/human) RANKL. *J Bone Miner Res* 24, 182–195

- Krum S, Krum G, Hauschka P, Carroll J, Lane T, Freedman L, Brown M (2008): Estrogen protects bone by inducing Fas ligand in osteoblasts to regulate osteoclast survival. *EMBO J* 27, 535–545
- Kuilman T, Michaloglou C, Mooi WJ, Peeper DS (2010): The essence of senescence. *Genes Dev* 24, 2463–2479
- Kushioka J, Kaito T, Okada R, Ishiguro H, Bal Z, Kodama J, Chijimatsu R, Pye M, Narimatsu M, Wrana JL, et al. (2020): A novel negative regulatory mechanism of Smurf2 in BMP/Smad signaling in bone. *Bone Res* 8, 41
- Lee JH, Choi Y, Heo S, Lee JM, Cho J (2011): Tumor necrosis factor- α converting enzyme (TACE) increases RANKL expression in osteoblasts and serves as a potential biomarker of periodontitis. *BMB Rep* 44, 473–477
- Lesclous P, Abi Najm S, Carrel J-P, Baroukh B, Lombardi T, Willi J-P, Rizzoli R, Saffar J-L, Samson J (2009): Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: A key role of inflammation? *Bone* 45, 843–852
- Li JJ, Biggin MD (2015): Gene expression. Statistics requantitates the central dogma. *Science* 347, 1066–1067
- Lichtman JW, Conchello J-A (2005): Fluorescence microscopy. *Nat Methods* 2, 910–919
- Lombard T, Neirinckx V, Rogister B, Gilon Y, Wislet S (2016): Medication-related osteonecrosis of the jaw: New Insights into molecular mechanisms and cellular therapeutic approaches. *Stem Cells Int* 2016, 1–16
- Long F (2012): Building strong bones: molecular regulation of the osteoblast lineage. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 13, 27–38
- Luckman S, Hughes D, Coxon F, Graham R, Russell G, Rogers M (1998): Nitrogen-containing bisphosphonates inhibit the mevalonate pathway and prevent post-translational prenylation of GTP-binding proteins, including Ras. *J Bone Miner Res* 13, 581–589
- Macedo F, Ladeira K, Pinho F, Saraiva N, Bonito N, Pinto L, Goncalves F (2017): Bone metastases: An overview. *Oncol Rev* 11, 321
- Maggiano IS, Maggiano CM, Cooper DM (2021): Osteon circularity and longitudinal morphology: Quantitative and qualitative three-dimensional perspectives on human Haversian systems. *Micron* 140, e102955
- Manzano-Moreno FJ, Ramos-Torrecillas J, Melguizo-Rodríguez L, Illescas-Montes R, Ruiz C, García-Martínez O (2018): Bisphosphonate modulation of the gene expression of different markers involved in osteoblast physiology: Possible implications in bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *Int J Med Sci* 15, 359–367
- Martin TJ, Sims NA (2015): RANKL/OPG; Critical role in bone physiology. *Rev Endocr Metab Disord* 16, 131–139
- Maruotti N, Corrado A, Neve A, Cantatore FP (2012): Bisphosphonates: effects on osteoblast. *Eur J Clin Pharmacol* 68, 1013–1018

- Marx RE (2003): Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. *J Oral Maxillofac Surg* 61, 1115–1117
- McClung MR, Lewiecki EM, Cohen SB, Bolognese MA, Woodson GC, Moffett AH, Peacock M, Miller PD, Lederman SN, Chesnut CH, et al. (2006): Denosumab in postmenopausal women with low bone mineral density. *N Engl J Med* 354, 821–831
- Mercatali L, Ricci M, Scarpi E, Serra P, Fabbri F, Ricci R, Liverani C, Zanoni M, Zoli W, Maltoni R, et al. (2013): RANK/RANK-L/OPG in patients with bone metastases treated with anticancer agents and zoledronic acid: a prospective study. *Int J Mol Sci* 14, 10683–10693
- Migliorati CA, Brennan MT, Peterson DE (2019): Medication-related osteonecrosis of the jaws. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2019, 107–115
- Miller PD, Pannacciulli N, Brown JP, Czerwinski E, Nedergaard BS, Bolognese MA, Malouf J, Bone HG, Reginster J-Y, Singer A, et al. (2016): Denosumab or Zoledronic acid in postmenopausal women with osteoporosis previously treated with oral bisphosphonates. *J Clin Endocrinol Metab* 101, 3163–3170
- Misso G, Porru M, Stoppacciaro A, Castellano M, De Cicco F, Leonetti C, Santini D, Caraglia M (2012): Evaluation of the in vitro and in vivo antiangiogenic effects of denosumab and zoledronic acid. *Cancer Biol Ther* 13, 1491–1500
- Monier-Faugere M-C, Chris Langub M, Malluche HH: Bone Biopsies: A Modern Approach. In: *Metabolic bone disease and clinically related disorders*. 3. Auflage; Elsevier, San Diego 1998, 237–280
- Mosch A, Ettl T, Mamilos A, Schreml S, Spörl S, Spanier G, Klingelhöffer C (2019): Physiological concentrations of denosumab enhance osteogenic differentiation in human mesenchymal stem cells of the jaw bone. *Archives of Oral Biology* 101, 23–29
- Mücke T, Krestan C, Mitchell D, Kirschke J, Wutzl A (2016): Bisphosphonate and medication-related osteonecrosis of the jaw: A Review. *Semin Musculoskelet Radiol* 20, 305–314
- Mundlos S, Otto F, Mundlos C, Mulliken JB, Aylsworth AS, Albright S, Lindhout D, Cole WG, Henn W, Knoll JH, et al. (1997): Mutations involving the transcription factor CBFA1 cause cleidocranial dysplasia. *Cell* 89, 773–779
- Murshed M (2018): Mechanism of bone mineralization. *Cold Spring Harb Perspect Med* 8, a031229
- Muruganandan S, Roman AA, Sinal CJ (2009): Adipocyte differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells: Cross talk with the osteoblastogenic program. *Cell Mol Life Sci* 66, 236–253
- Nagy V, Penninger JM (2015): The RANKL-RANK Story. *Gerontology* 61, 534–542
- Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, de Crombrughe B (2002): The novel zinc finger-containing transcription factor Osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* 108, 17–29
- Nakashima T, Hayashi M, Fukunaga T, Kurata K, Oh-hora M, Feng JQ, Bonewald LF, Kodama T, Wutz A, Wagner EF, et al. (2011): Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. *Nat Med* 17, 1231–1234

- Nancollas GH, Tang R, Phipps RJ, Henneman Z, Gulde S, Wu W, Mangood A, Russell RGG, Ebetino FH (2006): Novel insights into actions of bisphosphonates on bone: differences in interactions with hydroxyapatite. *Bone* 38, 617–627
- Nasomyont N, Hornung LN, Gordon CM, Wasserman H (2019): Outcomes following intravenous bisphosphonate infusion in pediatric patients: A 7-year retrospective chart review. *Bone* 121, 60–67
- Nicolatou-Galitis O, Razis E, Galiti D, Galitis E, Labropoulos S, Tsimpidakis A, Sgouros J, Karampeazis A, Migliorati C (2015): Periodontal disease preceding osteonecrosis of the jaw (ONJ) in cancer patients receiving antiresorptives alone or combined with targeted therapies: report of 5 cases and literature review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 120, 699–706
- Nijweide PJ, Burger EH, Feyen JH (1986): Cells of bone: proliferation, differentiation, and hormonal regulation. *Physiol Rev* 66, 855–886
- Otto S, Pautke C, Opelz C, Westphal I, Drosse I, Schwager J, Bauss F, Ehrenfeld M, Schieker M (2010): Osteonecrosis of the jaw: effect of bisphosphonate type, local concentration, and acidic milieu on the pathomechanism. *J Oral Maxillofac Surg* 68, 2837–2845
- Patntirapong S, Singhatanadgit W, Chanruangvanit C, Lavanrattanakul K, Satravaha Y (2012): Zoledronic acid suppresses mineralization through direct cytotoxicity and osteoblast differentiation inhibition. *J Oral Pathol Med* 41, 713–720
- Pazianas M, Abrahamsen B (2011): Safety of bisphosphonates. *Bone* 49, 103–110
- 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, 143–147
- Plotkin LI, Manolagas SC, Bellido T (2006): Dissociation of the pro-apoptotic effects of bisphosphonates on osteoclasts from their anti-apoptotic effects on osteoblasts/osteocytes with novel analogs. *Bone* 39, 443–452
- Pozzi S, Vallet S, Mukherjee S, Cirstea D, Vaghela N, Santo L, Rosen E, Ikeda H, Okawa Y, Kiziltepe T, et al. (2009): High-dose Zoledronic acid impacts bone remodeling with effects on osteoblastic lineage and bone mechanical properties. *Clin Cancer Res* 15, 5829–5839
- Rachner TD, Khosla S, Hofbauer LC (2011): Osteoporosis: now and the future. *Lancet* 377, 1276–1287
- Ramshaw JA, Shah NK, Brodsky B (1998): Gly-X-Y tripeptide frequencies in collagen: a context for host-guest triple-helical peptides. *J Struct Biol* 122, 86–91
- RANKL Antikörper (G-1). <https://www.scbt.com/de/p/rankl-antibody-g-1;jsessionid=XqW4ghU1vEG0zzLok8IDtqwTve5-ELVDPcutAX-VUWc3CDIqL45a!-70907281>; Zugriff am 14.12.2021
- Reid IR, Green JR, Lyles KW, Reid DM, Trechsel U, Hosking DJ, Black DM, Cummings SR, Russell RGG, Eriksen EF (2020): Zoledronate. *Bone* 137, 115390

- Robey PG, Riminucci M: Skeletal stem cells: Tissue-specific stem/progenitor cells of cartilage, bone, stroma, and marrow adipocytes. In: Principles of Bone Biology. 4. Auflage; Elsevier 2020, 45–71
- Rodan GA, Martin T (1981): Role of osteoblasts in hormonal control of bone resorption--a hypothesis. *Calcified tissue international* 33, 349–351
- Rodan GA (1992): Introduction to bone biology. *Bone* 13, 3–6
- Rogers MJ (2003): New insights into the molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Curr Pharm Des* 9, 2643–2658
- Rogers MJ, Mönkkönen J, Munoz MA (2020): Molecular mechanisms of action of bisphosphonates and new insights into their effects outside the skeleton. *Bone* 139, e115493
- Rosert J, de Crombrughe B: Type I collagen: structure, synthesis, and regulation. In: Principles of bone biology. 2. Auflage; Academic Press, Amsterdam 2002, 189–210
- Ruggiero SL (2009): Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw (BRONJ): Initial Discovery and Subsequent Development. *J Oral Maxillofac Surg* 67, 13–18
- Ruggiero SL (2015): Diagnosis and Staging of Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am* 27, 479–487
- 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, 527–534
- Ruggiero SL, Dodson TB, Fantasia J, Goodday R, Aghaloo T, Mehrotra B, O’Ryan F (2014): American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on medication-related osteonecrosis of the jaw- 2014 Update. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 72, 1938–1956
- RUNX2 - The Human Protein Atlas. <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000124813-RUNX2/subcellular#human>; Zugriff am 12.12.2021
- Russell RGG (2011): Bisphosphonates: the first 40 years. *Bone* 49, 2–19
- Russell RGG, Watts NB, Ebetino FH, Rogers MJ (2008): Mechanisms of action of bisphosphonates: similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy. *Osteoporos Int* 19, 733–759
- Sanderson MJ, Smith I, Parker I, Bootman MD (2014): Fluorescence microscopy. *Cold Spring Harb Protoc* 2014, e071795
- Schaffler MB, Cheung W-Y, Majeska R, Kennedy O (2014): Osteocytes: master orchestrators of bone. *Calcif Tissue Int* 94, 5–24
- Schminke B, vom Orde F, Gruber R, Schliephake H, Bürgers R, Miosge N (2015): The pathology of bone tissue during peri-implantitis. *J Dent Res* 94, 354–361
- Sedghizadeh PP, Kumar SKS, Gorur A, Schaudinn C, Shuler CF, Costerton JW (2008): Identification of microbial biofilms in osteonecrosis of the jaws secondary to bisphosphonate therapy. *J Oral Maxillofac Surg* 66, 767–775

- Shams R, Banik NL, Haque A (2021): Implications of enolase in the RANKL-mediated osteoclast activity following spinal cord injury. *Biocell* 45, 1453–1457
- Shoulders MD, Raines RT (2009): Collagen structure and stability. *Annu Rev Biochem* 78, 929–958
- Sievers N: 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. Med. Diss. Göttingen 2012
- Silver IA, Murrills RJ, Etherington DJ (1988): Microelectrode studies on the acid microenvironment beneath adherent macrophages and osteoclasts. *Exp Cell Res* 175, 266–276
- Sinningen K, Tsourdi E, Rauner M, Rachner TD, Hamann C, Hofbauer LC (2012): Skeletal and extraskeletal actions of denosumab. *Endocrine* 42, 52–62
- Skjødt MK, Frost M, Abrahamsen B (2019): Side effects of drugs for osteoporosis and metastatic bone disease. *Br J Clin Pharmacol* 85, 1063–1071
- Smith MR, Egerdie B, Hernández Toriz N, Feldman R, Tammela TLJ, Saad F, Heracek J, Szwedowski M, Ke C, Kupic A, et al. (2009): Denosumab in men receiving androgen-deprivation therapy for prostate cancer. *N Engl J Med* 361, 745–755
- SMURF2 - The Human Protein Atlas. <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000108854-SMURF2/subcellular#human>; Zugriff am 13.12.2021
- Sousa S, Clézardin P (2018): Bone-targeted therapies in cancer-induced bone disease. *Calcif Tissue Int* 102, 227–250
- Stelzer G, Rosen N, Plaschkes I, Zimmerman S, Twik M, Fishilevich S, Stein TI, Nudel R, Lieder I, Mazor Y, et al. (2016): The GeneCards suite: from gene data mining to disease genome sequence analyses. *Curr Protoc Bioinformatics* 54, 1.30.1-1.30.33
- Stopeck AT, Lipton A, Body J-J, Steger GG, Tonkin K, de Boer RH, Lichinitser M, Fujiwara Y, Yardley DA, Viniegra M, et al. (2010): Denosumab compared with zoledronic acid for the treatment of bone metastases in patients with advanced breast cancer: a randomized, double-blind study. *J Clin Oncol* 28, 5132–5139
- Taichman RS (2005): Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche. *Blood* 105, 2631–2639
- Taylor SC, Posch A (2014): The design of a quantitative western blot experiment. *Biomed Res Int* 2014, e361590
- Taylor SC, Berkelman T, Yadav G, Hammond M (2013): A defined methodology for reliable quantification of Western blot data. *Mol Biotechnol* 55, 217–226
- Tella SH, Gallagher JC (2014): Prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 142, 155–170
- Thomas DM (2012): RANKL, denosumab, and giant cell tumor of bone. *Curr Opin Oncol* 24, 397–403
- Thompson K, Rogers MJ, Coxon FP, Crockett JC (2006): Cytosolic entry of bisphosphonate drugs requires acidification of vesicles after fluid-phase endocytosis. *Mol Pharmacol* 69, 1624–1632

- Thul PJ, Lindskog C (2018): The human protein atlas: A spatial map of the human proteome. *Protein Sci* 27, 233–244
- Thul PJ, Åkesson L, Wiking M, Mahdessian D, Geladaki A, Ait Blal H, Alm T, Asplund A, Björk L, Breckels LM, et al. (2017): A subcellular map of the human proteome. *Science* 356, eaal3321
- TNFSF11 - GeneCards - Human Genes - Gene Database. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TNFSF11>; Zugriff am 13.12.2021
- Tolar J, Teitelbaum SL, Orchard PJ (2004): Osteopetrosis. *N Engl J Med* 351, 2839–49
- Trubiani O, Fulle S, Traini T, Paludi M, La rovere R, Orciani M, Caputi S, Piattelli A (2010): Functional assay, expression of growth factors and proteins modulating bone-arrangement in human osteoblasts seeded on an anorganic bovine bone biomaterial. *European cells & materials* 20, 72–83
- Varma S, Orgel JPRO, Schieber JD (2016): Nanomechanics of type I collagen. *Biophys J* 111, 50–56
- Viereck V, Emons G, Lauck V, Frosch K-H, Blaschke S, Gründker C, Hofbauer LC (2002): Bisphosphonates Pamidronate and Zoledronic acid stimulate Osteoprotegerin production by primary human osteoblasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 291, 680–686
- Viguet-Carrin S, Garnero P, Delmas PD (2006): The role of collagen in bone strength. *Osteoporos Int* 17, 319–336
- Vimalraj S (2020): Alkaline phosphatase: Structure, expression and its function in bone mineralization. *Gene* 754, e144855
- Vitté C, Fleisch H, Guenther H (1996): Bisphosphonates induce osteoblasts to secrete an inhibitor of osteoclast-mediated resorption. *Endocrinology* 137
- Voegelé TJ, Voegelé-Kadletz M, Esposito V, Macfelda K, Oberndorfer U, Vecsei V, Schabus R (2000): The effect of different isolation techniques on human osteoblast-like cell growth. *Anticancer Res* 20, 3575–3581
- Voss PJ, Poxleitner P, Schmelzeisen R, Stricker A, Semper-Hogg W (2017): Update MRONJ and perspectives of its treatment. *J Stomatol Oral Maxillofac Surg* 118, 232–235
- Wang X, Bank RA, TeKoppele JM, Agrawal CM (2001): The role of collagen in determining bone mechanical properties. *J Orthop Res* 19, 1021–1026
- Wrobel E, Leszczynska J, Brzoska E (2016): The characteristics of human bone-derived cells (HBDCS) during osteogenesis in vitro. *Cell Mol Biol Lett* 21, 26
- Xing L, Boyce BF (2005): Regulation of apoptosis in osteoclasts and osteoblastic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 328, 709–720
- Yamauchi M, Sricholpech M (2012): Lysine post-translational modifications of collagen. *Essays Biochem* 52, 113–133
- Yasuda H (2021): Discovery of the RANKL/RANK/OPG system. *J Bone Miner Metab* 39, 2–11

- Zara S, De Colli M, di Giacomo V, Zizzari VL, Di Nisio C, Di Tore U, Salini V, Gallorini M, Tetè S, Cataldi A (2015): Zoledronic acid at subtoxic dose extends osteoblastic stage span of primary human osteoblasts. *Clin Oral Investig* 19, 601–611
- Zhao E, Xu H, Wang L, Kryczek I, Wu K, Hu Y, Wang G, Zou W (2012): Bone marrow and the control of immunity. *Cell Mol Immunol* 9, 11–19
- Zhao M, Qiao M, Harris SE, Oyajobi BO, Mundy GR, Chen D (2004): Smurf1 inhibits osteoblast differentiation and bone formation in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 279, 12854–12859
- Zohrabian VM, Poon CS, Abrahams JJ (2015): Embryology and Anatomy of the Jaw and Dentition. *Semin Ultrasound CT MR* 36, 397–406

Danksagung

Mein Dank gilt zunächst meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. N. Miosge für die Möglichkeit Teil einer wunderbaren Arbeitsgruppe gewesen zu sein und die großartigen Einblicke in den wissenschaftlichen Laboralltag.

Ein besonderer Dank gilt meinem direkten Betreuer Dr. med. dent. Boris Schminke. Ohne dich wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen.

Außerdem möchte ich ein riesiges Dankeschön an Jérôme Janssen und Elvira Henze aussprechen, die mir mit viel Geduld alle Methoden beigebracht haben und jederzeit ein offenes Ohr hatten. Es war eine sehr schöne Zeit mit euch.

Lebenslauf

Ich wurde am 10. August 1994 als Sohn von Christel Stinglhamer (geb. Baum, ehem. Lautenbacher) und Hermann Lautenbacher in Starnberg geboren und wuchs behütet im Landkreis Weilheim i. Ob. auf. Seit 2006 besuchte ich das Gymnasium Weilheim i.Ob., das ich 2013 mit dem Abitur verließ. Nach dem Abitur folgte ein einjähriger Bundesfreiwilligendienst bei der Caritas. Im Oktober 2014 begann das Zahnmedizinstudium in Göttingen, das ich 2019 erfolgreich mit dem Staatsexamen beenden konnte. Das folgende Jahr widmete ich meiner Promotion in der AG orale Biologie und Geweberegeneration unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Nicolai Miosge. Um dem langfristigen Ziel Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie nachzugehen, begann ich im Oktober 2020 zudem ein Humanmedizinstudium an der Universität Göttingen.