

Mareike Thederan
Dr. med. dent.

Differenzierung humaner Monozyten zu Osteoklasten

Geboren am 08.01.1979 in Heidelberg
Staatsexamen am 27.11.2006 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Immunologie
Doktormutter: Frau Prof. Dr. rer. nat. G. M. Hänsch

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Immunologie und Serologie der Universität Heidelberg im Labor von Frau Prof. Dr. G. M. Hänsch angefertigt und befasst sich mit der Thematik, ob persistierende bakterielle Infekte die Osteoklastenbildung steigern und somit zur Osteolyse am oder nahe dem Infektionsherd beitragen.

Für die Durchführung dieser Studie erfolgte zunächst die Generierung von reifen Osteoklasten in Kultur über einen Entwicklungszeitraum von 30 Tagen.

Es ist bekannt, dass sich *in vitro* Monozyten zu Osteoklasten differenzieren lassen. Darauf aufbauend wurde in dieser Studie die Methode etabliert aus Zellen der myeloischen prä-monozytären-Tumor-Zelllinie U937 reife Osteoklasten zu generieren. Dabei wurden in einem ersten Schritt U937 durch PMA im Wachstum arretiert und zu adhärenenten Monozyten-ähnlichen Zellen differenziert. Durch Weiterkultur der Zellen mit TNF- α /IL-4 und Lipopolysaccharid (LPS) konnten Zellen generiert werden, die zunächst dendritische Ausläufer bildeten und schließlich phänotypische und funktionelle Eigenschaften von reifen Osteoklasten erwarben.

Die Differenzierung dieser Zelllinie zu Osteoklasten ließ sich auch auf molekularer Ebene mittels reverse-Transkriptase Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) verfolgen. Dafür wurde RNA zu verschiedenen Entwicklungsstadien gewonnen und der Nachweis für verschiedene charakteristische osteoklastentypische Marker erbracht.

In einem weiteren Teil der Arbeit wurden die differenzierten und undifferenzierten Zellen mithilfe der Durchflusszytometrie hinsichtlich intrazellulärer Antikörperfärbung und Expression der verschiedenen Oberflächenmoleküle untersucht.

Zusätzlich wurden die aus U937 generierten Osteoklasten histologisch mithilfe der TRAP-Färbung identifiziert.

Im letzten Teil dieser Arbeit wurde ein organ-analoges Knochenmodell etabliert, das den funktionellen Nachweis der Knochenresorption *in vitro* darstellt und den Nachweis von reifen

und aktiven Osteoklasten erbringt. Dieses Modell weist die funktionelle Aktivität der in dieser Arbeit generierten Osteoklasten nach.

Im Ergebnisteil wird zunächst näher auf die morphologische Charakterisierung der Differenzierung von myeloischen Vorläuferzellen zu Osteoklasten eingegangen. Anschließend erfolgt mithilfe der RT-PCR auf mRNA-Ebene der Nachweis und die Expression osteoklastentypischer Marker.

Durch die Analyse und Auswertung der FACS-Daten konnten Aussagen über die Aufregulierung der untersuchten membranständigen sowie intrazellulären Markern zu verschiedenen Entwicklungsstadien gewonnen werden.

Mithilfe der TRAP-Färbung konnte die Differenzierung der Zellen zu Osteoklasten histologisch nachgewiesen werden.

Abschließend werden die Resorptionslakunen auf Elfenbein- und Dentinscheiben sowie auf Kalziumphosphat beschichteten Zellkulturplatten mittels Toluidinblaufärbung und der Färbung nach von Kossa nachgewiesen und dargestellt.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit morphologisch und auf molekularer Ebene sowie in einem organ-analogen Knochenresorptionsversuch *in vitro* der Nachweis erbracht werden, dass ein Zusammenhang zwischen persistierenden bakteriellen Knocheninfektionen und einer daraus resultierenden gesteigerten Osteoklastenbildung besteht. Diese Faktoren führen schließlich zu einer Osteolyse am oder nahe des Infektionsherdes.

Durch die Stimulation der myeloischen prä-monozytären Tumor-Zelllinie U937 mit PMA und LPS bzw. TNF- α /IL-4 konnten reife Osteoklasten ohne zusätzliche Faktoren generiert werden.