

Aus der Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie
Muskuloskelettales Universitätszentrum München

Klinik der Universität München

Direktor:
Prof. Dr. med. Wolfgang Böcker
Prof. Dr. med. Boris Holzapfel

Vergleich dentaler und orthopädischer Implantatlockerung

Eine Analyse des Periimplantatgewebes

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Sabine Maria Sofie Schlüssel

aus Ulm

2022

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

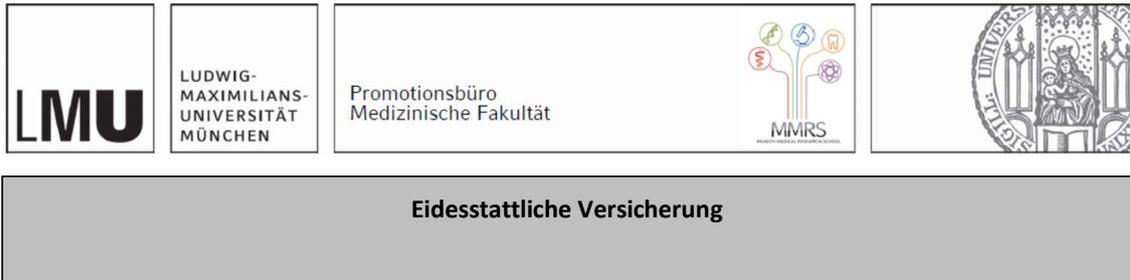
Berichterstatterin: Prof. Dr. med. Susanne Mayer

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Wenko Smolka
apr. Prof. Dr. rer. biol. hum. Bogna Stawarczyk

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 10.11.2022

Affidavit



Eidesstattliche Versicherung

Schlüssel, Sabine Maria Sofie

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel „Vergleich dentaler und orthopädischer Implantatlockerung - Eine Analyse des Periimplantatgewebes“ selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

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

München, 22.11.2022

Ort, Datum

Sabine Maria Sofie Schlüssel

Unterschrift Doktorandin

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| Affidavit | 1 |
| Inhaltsverzeichnis | 2 |
| Abkürzungsverzeichnis | 3 |
| Publikationsliste..... | 4 |
| 1. Beitrag zu den Veröffentlichungen | 5 |
| 1.1 Beitrag zu Paper I (Erstautorenschaft) | 5 |
| 1.2 Beitrag zu Paper II (Geteilte Erstautorenschaft) | 6 |
| 2. Einleitung..... | 8 |
| 2.1 Dentale und orthopädische Implantatlockerung | 8 |
| 2.2 Untersuchung des Periimplantatgewebes | 11 |
| 2.3 Projektziele..... | 12 |
| 3. Zusammenfassung | 14 |
| 4. Abstract (English) | 17 |
| 5. Paper I | 20 |
| 6. Paper II | 21 |
| 7. Literaturverzeichnis | 22 |
| Danksagung | 26 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------|---|
| COX-2 | Cyclooxygenase-2 |
| CTSK | Cathepsin K |
| HEP | Hüftgelenksendoprothese |
| KEP | Kniegelenksendoprothese |
| MCSF | Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor |
| ML | Monolayer |
| MMPs | Matrix-Metalloproteinasen |
| MSCs | Mesenchymale Stammzellen |
| OCN | Osteocalcin |
| OPG | Osteoprotegerin |
| PBMCs | Peripheral blood mononuclear cells |
| PCR | Polymerase chain reaction |
| PGE2 | Prostaglandin E2 |
| PPFs | periprothetische Fibroblasten |
| RANK | Receptor activator of NF- κ B |
| RANKL | Receptor activator of NF- κ B ligand |
| RNA | Ribonucleic acid |
| RT-PCR | Real-time Polymerase chain reaction |
| TNF α | Tumor necrosis factor alpha |
| TRAP | Tartrate resistant acid phosphatase |
| TW | Transwell |

Publikationsliste

Veröffentlichung I

Schluessel S, Hartmann ES, Koehler MI, Beck F, Redeker JI, Saller MM, Akova E, Krebs S, Holzapfel BM and Mayer-Wagner S (2022) Dental and Orthopaedic Implant Loosening: Overlap in Gene Expression Regulation. *Front. Immunol.* 13:820843. doi: 10.3389/fimmu.2022.820843 (**Erstautorenschaft**)

Veröffentlichung II

Hartmann ES, Schluessel S, Köhler MI, Beck F, Redeker JI, Summer B, Schönitzer V, Fottner A, Mayer-Wagner S. Fibroblast-like cells change gene expression of bone remodelling markers in transwell cultures. *Eur J Med Res.* 2020 Oct 29;25(1):52. doi: 10.1186/s40001-020-00453-y. PMID: 33121539; PMCID: PMC7596965. (**geteilte Erstautorenschaft**)

1. Beitrag zu den Veröffentlichungen

1.1 Beitrag zu Paper I (Erstautorenschaft)

Der Eigenteil der Doktorandin zur ersten Publikation mit dem Titel „Dental and Orthopaedic Implant Loosening: Overlap in Gene Expression Regulation“ (1) wird im Folgenden im Detail dargestellt.

Initiale Aufgabe der Doktorandin war die Gewinnung von dentalen Periimplantatgeweben. Die Periimplantatgewebe wurden von Patienten verwendet, die sich aufgrund einer aseptischen Periimplantitis einer Zahnimplantat-Revision unterzogen. Daraus mussten noch am selben Tag über einen mehrstufigen Prozess periprothetische Fibroblastsen (PPFs) isoliert werden. Nach Erhalt der PPFs wurden diese über mehrere Wochen bis zum Erreichen von Passage 2 kultiviert um eine ausreichende Zellzahl zu erhalten. Die dentalen PPFs unterlagen einer sehr viel langsameren Zellteilung, die bei Verwendung des für orthopädische PPFs etablierten Mediums nicht zu einem ausreichenden Zellwachstum führte. Nach Ergänzung des Mediums zu Kulturbeginn um 10% FCS und 1% non-essential amino acid solution konnte auch bei den dentalen PPFs eine entsprechende Zellteilung erreicht werden.

Die Periimplantatgewebe wurden zusätzlich separat aufbereitet, histologisch (HE und TRAP) und quantitativ mittels RT-PCR analysiert. Dieser gesamte Arbeitsschritt wurde von der Doktorandin durchgeführt.

Die orthopädischen Periimplantatgewebe wurden von Dr. Eliza Hartmann und Dr. Miriam Köhler im Rahmen ihrer Promotionen gesammelt, isoliert und kultiviert.

Das Herzstück der Doktorarbeit sah eine Kokultivierung von dentalen PPFs und PBMCs über einen Zeitraum von 28 Tagen vor, um die Osteoklastogenese im Periimplantatgewebe zu untersuchen. Dafür war die Gewinnung von PBMCs aus Buffy coats erforderlich. PBMCs wurden aus Buffy coats mittels Gradientenmediums-Zentrifugation generiert. Es wurden jeweils zwei PBMC-Spender pro PPF-Ansatz getestet, um eine möglichst durch PBMC-Spender unbeeinflusste Analyse zu erhalten. Folgende Versuchsgruppen wurden untersucht: PBMCs in Monokultur unstimuliert, PBMCs in Monokultur stimuliert (RANKL; MCSF), PPFs in Monokultur unstimuliert, PPFs in Monokultur stimuliert (RANKL; MCSF), Kokulturen PBMCs/PPFs unstimuliert, Kokulturen PBMCs/PPFs stimuliert (RANKL; MCSF). Dermale Fibroblasten wurden als Kontrolle zu PPFs ebenfalls in allen Gruppen analysiert. Es wurden jeweils Monolayer- und 3D-Transwellkulturen angefertigt. Diese wurden mittels Histologie, TRAP-Färbung, Dentin-Chips und RT-PCR an Tag 0,13,21 und 28 analysiert. Dieser Versuchsansatz wurde mit allen Einzelschritten zur Bestätigung der Ergebnisse insgesamt drei Mal von der Doktorandin für die dentalen PPFs durchgeführt.

Frau Dr. Miriam Köhler führte mit anderem PBMCs-Spender und orthopädischen PPFs initial den Versuch ein. Ein analoges Vorgehen war notwendig, um final die Ergebnisse von dentalen und orthopädischen Gruppen vergleichen zu können.

Aufgrund der großen Anzahl an Proben und vielen unterschiedlichen Versuchsgruppen waren insgesamt sehr viele RT-PCRs notwendig. Die Doktorandin führte ca. 50% der PCR-Untersuchung selbst durch, die verbleibenden 50% wurden von der MTA Natalia Cabeza pipettiert.

Die in diesem Großversuch gewonnenen Ergebnisse (histologisch, RT-PCR, Dentinchip-Analysen) wurden alle von der Doktorandin ausgewertet und unter Supervision der Doktormutter und Betreuerin Prof. Dr. Susanne Mayer interpretiert.

Als abschließende Untersuchung der Periimplantatgewebe war noch eine Sequenzierung der dentalen und orthopädischen Proben vorgesehen. Hierfür wurde die Qualität der orthopädischen und dentalen Proben mittels Bioanalyzer von der Doktorandin im Genzentrum der LMU bestimmt. Die weiteren Schritte der Sequenzierung wurden durch das Genzentrum (Ansprechpartner Dr. Stefan Krebs, AG Dr. Helmut Blum) durchgeführt.

Abschließend erfolgte die Erstellung der Publikation „Dental and Orthopaedic Implant Loosening: Overlap in Gene Expression Regulation“. Bei der Auswertung und Beschreibung der komplexen Sequencingergebnisse wurde die Doktorandin von Dr. Maximilian Saller und Elif Akova unterstützt.

Nach Erstellung der Publikation wurde das Feedback aller Koautoren eingearbeitet und von der Doktorandin zur Publikation bei Frontiers in Immunology eingereicht.

Die Rückfragen der Reviewer beantwortete die Doktorandin in enger Rücksprache mit Prof. Susanne Mayer. Alle Koautoren stimmten der finalen Fassung zu.

1.2 Beitrag zu Paper II (Geteilte Erstautorenschaft)

Der Eigenteil der Doktorandin zur zweiten Publikation mit dem Titel „Fibroblast-like cells change gene expression of bone remodelling markers in transwell cultures“ (2) wird im Folgenden dargestellt.

Die praktischen Umsetzungen der Versuche wurden im Wesentlichen von Dr. Eliza Hartmann zur Erlangung ihrer Promotion durchgeführt. Bei der Durchführung der RT-PCR übernahm die Doktorandin einen Teil der Analysen. Die Doktorandin war unterstützend an der Analyse und Interpretation der Daten beteiligt. Die Verfassung der Publikation fand als gemeinschaftliches Projekt der beiden Erstautorinnen statt. Die Kommentare aller Koautoren wurden von der Doktorandin eingearbeitet. Die Publikation bei dem European Journal of Medical Research wurde durch die Doktorandin

eingereicht. Der Review-Prozess wurde von der Doktorandin zusammen mit Prof Susanne Mayer durchgeführt. Alle Koautoren stimmten der finalen Fassung zu.

2. Einleitung

2.1 Dentale und orthopädische Implantatlockerung

In der zunehmend alternden Bevölkerung steigt die Versorgungserfordernis mit Zahnimplantaten und Endoprothesen (insbesondere Knie- und Hüftgelenkendoprothesen (KEP und HEP)) stetig an (3-5). Jährlich werden in Deutschland 1,3 Millionen dentale Implantate und über 400.000 KEP und HEP implantiert (6-8). Bis 2030 wird allein für die USA ein Anstieg der KEP und HEP auf 1,3 Millionen bzw. 640.000 p.a. prognostiziert (9). Implantatlockerungen stellen sowohl im Bereich der orthopädischen als auch der dentalen Chirurgie ein häufiges Problem der Endoprothesenversorgung dar (10, 11). Eine aktuelle Meta-Analyse zeigt eine 10-Jahres-Überlebensrate von circa 96,4% für dentale Implantate (12). In der Literatur finden sich vergleichbare Werte für den orthopädischen Bereich (KEP: 10-Jahres-Überlebensrate von 96,1% und HEP: 10-Jahres-Überlebensrate von 95,6%) (13). Dies macht deutlich, dass die Implantatlockerung als Spätkomplikation eine relevante Langzeitfolge der Endoprothesenversorgung darstellt.

Die initialen Auslöser orthopädischer und dentaler Implantatlockerung unterscheiden sich auf den ersten Blick. Bei orthopädischen Implantaten kommt es insbesondere durch mechanische Beanspruchung zum Abrieb der Endoprothese mit Freisetzung von Materialpartikeln (10, 14, 15). Dadurch bildet sich zwischen Endoprothese und Knochen ein fibröses Periimplantatgewebe (10). Bei dentalen Implantaten steht dagegen die Biofilmbildung im Vordergrund, durch die es zur Ausbildung einer Periimplantitis mit ebenfalls fibrösem Periimplantatgewebe kommt. In beiden Fällen erfolgt eine Aktivierung des Immunsystems. In den letzten Jahren wurde vermehrt postuliert, dass Autoimmunprozesse hauptverantwortlich für die Lockerung von Implantaten sind und der infektiösen Genese eine untergeordnete Bedeutung zukommt (16).

Autoimmunprozesse lösen aseptische Entzündungsreaktionen im Periimplantatgewebe aus. Dies führt zum Abbau von Knochen um das Implantat, der Osteolyse, die letztlich als finaler Schritt zur Lockerung der Endoprothese führt. Die Osteolyse bei dentalen Implantaten beginnt typischerweise im Weichteilgewebe und breitet sich kontinuierlich in den apikalen Implantatbereich aus (16). Das Osteolysemuster bei Hüftimplantaten ist vergleichbar. Der Knochenabbau beginnt im proximalen Bereich der Hüftprothese und breitet sich weiter nach distal aus (16).

Im Knochenstoffwechsel sind Osteoklasten und -blasten für die Knochenresorption und -bildung zuständig. Osteoblasten und -klasten kommunizieren über direkten Zell-Zell-Kontakt, Zytokine und die Interaktion mit der extrazellulären Matrix miteinander (17, 18).

An der Osteolyse sind neben Osteoblasten und -klasten auch Makrophagen und Fibroblasten beteiligt. CD68+ Monozyten und Makrophagen werden durch Abriebpartikel aktiviert und sind verantwortlich für die Phagozytose der partikelförmigen Ablagerung (19, 20). Im Rahmen eines chronischen Entzündungsprozesses können Makrophagen in Gegenwart von Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktoren (macrophage colony-stimulating factor, MCSF) zu Osteoklasten differenzieren (21, 22). Zusätzlich stimulieren Wachstumsfaktoren und Zytokine Osteozyten, reife Osteoblasten der Knochenmatrix, die mesenchymale Stammzellen (mesenchymal stem cells, MSCs) aus dem Knochenmark anlocken. MSCs differenzieren zu Prä-Osteoblasten, die MCSF und Receptor Activator of NF- κ B ligand (RANKL) exprimieren (23).

Die weitere Entwicklung zu den typischen multinukleären Osteoklasten (Osteoklastogenese) ist ein mehrstufiger Prozess, der maßgeblich durch periprothetische Fibroblasten (PPFs) beeinflusst wird (24). PPFs machen rund 70% des Periimplantatgewebes aus (25). PPFs bilden sowohl in orthopädischen als auch in dentalen Periimplantatgeweben Faktoren, die zur Bildung und Aktivierung von Osteoklasten beitragen. Obwohl man annehmen könnte, dass bei orthopädischen und dentalen Implantaten grundsätzlich unterschiedliche Lockerungsprozesse und Immunregulationen ablaufen, sind an den Kaskaden beider Prozesse ähnliche Zytokine beteiligt, die zur Bildung und Aktivierung von Osteoklasten führen (16, 26, 27).

PPFs in orthopädischen Periimplantatgeweben exprimieren Tumornekrosefaktor-alpha (TNF α), ein wichtiges Zytokin im Rahmen von lokalen und systemischen Entzündungsreaktionen (28). Wird MCSF in vitro hinzugegeben, triggern TNF α -exprimierende PPFs eine verstärkte Osteoklastenbildung und fördern damit die Implantatlockerung (28, 29). TNF α wird auch im Periimplantatgewebe von gelockerten Zahnimplantaten stark exprimiert (30). In gingivalen Fibroblasten führt TNF α zur Freisetzung von Prostaglandin E2 (PGE2) (31). PGE2, ein Signalprotein der Osteolyse, wurde in orthopädischen und dentalen Periimplantatgeweben nachgewiesen (32, 33). Die PGE2 synthetisierende Cyclooxygenase-2 (COX-2) wird in PPFs exprimiert und durch Titanpartikel, die zu oxidativem Stress führen, stimuliert (34). PGE2 induziert eine erhöhte Expression von RANKL in PPFs (25). RANKL hat einen starken Einfluss auf die Regulierung der Knochenbildung und -resorption. RANKL aktiviert Osteoklasten, indem es an den RANK-Rezeptor von Osteoklasten-Vorläuferzellen bindet und dadurch deren Differenzierung zu Osteoklasten initiiert. Die RANKL-Expression von PPFs induziert somit direkt die Osteoklastenbildung in orthopädischen und dentalen Geweben (35, 36).

Der Gegenspieler von RANKL ist Osteoprotegerin (OPG). OPG fungiert als Decoy-Rezeptor für RANKL und hemmt die Osteoklastendifferenzierung, da ein Decoy-

Rezeptor zwar an gleicher Stelle bindet, aber keine Zellsignale weiterleitet. Bei Parodontitis ist ein erhöhtes RANKL/OPG-Verhältnis (Hochregulierung von RANKL und Herunterregulierung von OPG) beschrieben (37, 38). In orthopädischen Periimplantatgeweben wurde ebenfalls eine verminderte Expression von OPG gefunden (39). Zusammenfassend ist die RANKL/OPG-ratio von zentraler Bedeutung für die Regulierung der Differenzierung, Aktivierung und das Überleben von Osteoklasten. Somit ist der RANKL/RANK/OPG-Pathway von zentraler Bedeutung für das Gleichgewicht zwischen Knochenbildung und -resorption (17).

PPFs exprimieren auch Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), die in erhöhten Konzentrationen in orthopädischen und dentalen Periimplantatgeweben zu finden sind (40). MMPs sind eine große Familie von Enzymen, die hauptsächlich am Abbau von extrazellulärer Matrix- und Basalmembranproteinen beteiligt sind und führen u.a. zum Kollagenabbau im Periimplantatgewebe. In dentalen Studien steigt die MMP8-Konzentration im gingivalen Sulkusfluid im Rahmen von periimplantären Erkrankungen an und wird als Biomarker diskutiert (41). MMP13 baut aufgrund der Substratspezifität für Kollagen Typ 1 auch Knochen ab (42). Darüber hinaus werden MMPs in periosteoklastischen Zellen (40) und in subosteoklastischen Resorptionslakunen von Osteoklasten gefunden und können so zusätzlich den Knochenverlust fördern (43). Betrachtet man die Expressionsmuster von PPFs im periimplantären Gewebe, ähneln diese stark sogenannten "aggressiven" Fibroblasten, wie sie auch für die rheumatoide Arthritis beschrieben sind (44).

Osteocalcin (OCN), ein extrazelluläres Matrixprotein, wird von reifen Osteoblasten synthetisiert und kann Knochenmineralisierung und -umbau beeinflussen (45, 46). Cathepsin K (CTSK), eine Cysteinprotease, wird hauptsächlich von Osteoklasten exprimiert und ist an der Spaltung von Kollagen in der extrazellulären Matrix beteiligt (47). Erhöhte OCN- und CTSK-Konzentrationen wurden im gingivalen Sulkusfluid bei Periimplantitis nachgewiesen und könnten auf einen erhöhten Knochenumsatz hinweisen (48). Mandelin et al. zeigten, dass auch PPFs des Periimplantatgewebes in der Lage sind, CTSK zu sezernieren (35).

Tartrat-resistente-Säure-Phosphatase (TRAP) ist ein osteoklastenspezifischer Marker, der eng mit der Knochenresorption verbunden ist. In frühen Phasen der orthopädischen Implantatlockerung werden erhöhte TRAP-Spiegel beschrieben, während späte Phasen mit verminderten TRAP-Mengen korrelieren (49). Es existieren zwei Isoformen (TRAP5a und TRAP5b), die Isoform TRAP5b ist ein biochemischer Marker für die Anzahl und Aktivität von Osteoklasten. Serum-TRAP5b wird als nützlicher Marker für die Knochenresorption diskutiert (50).

Zusammenfassend deuten diese Beispiele darauf hin, dass in orthopädischen und dentalen Periimplantatgeweben ähnliche Zytokine, Prostaglandine und MMPs beteiligt sind, die zur Bildung und Aktivierung von Osteoklasten beitragen. Somit sind in dentalen und orthopädischen periprothetischen Geweben ähnliche Lockerungsprozesse involviert.

2.2 Untersuchung des Periimplantatgewebes

Um den Lockerungsprozess besser zu verstehen und nachahmen zu können, ist es erforderlich das Periimplantatgewebe in vitro abzubilden. In periprothetischen Geweben bilden PPFs ein komplexes faseriges, dreidimensionales (3D) Netz, in dem die Zellen in der Regel von extrazellulärer Matrix, Knochen und endoprothetischen Komponenten umgeben sind. Zur Untersuchung des Periimplantatgewebes ist die Zellkultur essentiell. Immer noch werden heutzutage die meisten Zellkulturversuche in zweidimensionalen (2D) Ansätzen durchgeführt, obwohl die 3D Kultivierung die in vivo Situation deutlich besser widerspiegelt. Durch den 3D Ansatz werden Zell-Zell-Kontakte gefördert, die Zellen werden besser vom Medium umspült und haben weniger Kontakt zum Kunststoff des Kultivierungswells (51). Dies wirkt sich auf die Zellproliferation, Differenzierung und Genexpression aus (51).

Als 3D-Struktur werden gerüstbasierte Techniken wie Träger auf Hydrogelbasis oder harter Polymermaterialien, hydrophile Glasfasern und Organoide eingesetzt, die jeweils ihre individuellen Vorteile und Anwendungen bieten. Daneben gibt es auch gerüstfreie Techniken, wie z. B. Zellkulturen mit Magnetschwebverfahren (51). Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Transwell-System verwendet. Transwell-Kulturen sind für die Untersuchung zellulärer Interaktionen bekannt und wurden für Fibroblasten-Mehrschichtkulturen etabliert (52). Das Transwell-System entspricht einer Standardkulturplatte mit mehreren Wells. In diese Platte werden Wells mit einem Boden aus einer Polycarbonatmembran eingehängt. Dadurch werden die Zellen, die sich auf der Membran ansiedeln, von oben und unten mit Medium versorgt. Somit wird ein 3D-Wachstum in der Membran ermöglicht. Die Kultivierung von Fibroblasten im Transwell-System kann zu einer höheren Zellmasse und einer größeren Zellzahl führen (53). Die in Transwell-Kulturen gebildeten Konglomerate sind teilweise dreidimensional und mehrschichtig, wodurch die interzellulären Zellkontakte erhöht werden (53). In dieser Arbeit wurden parallel Monolayer-(2D) und Transwell-(3D) Kulturen untersucht, um mögliche Unterschiede aufzuzeigen. Die 3D-Kultur hat die Möglichkeit, die Forschungslücke zwischen klassischer 2D-Kultur und Tierversuch zu schließen.

Neben dem Kultursystem spielen auch die verwendeten Zellpopulationen eine entscheidende Rolle. Um die übergeordneten Immuneffekte im Hinblick auf die Osteoklastenbildung in dentalen und orthopädischen periprothetischen Geweben zu untersuchen, wurde ein gemeinsames Modell von Kokulturen verwendet, das periphere mononukleäre Blutzellen (PBMCs) und PPFs enthält (54). In vivo entstehen reife, mehrkernige Osteoklasten durch die Fusion von CD-14 positiven Monozyten (23). Auch in vitro kann eine Osteoklastogenese aus PBMCs durch Zugabe von RANKL und MCSF generiert werden, wobei eine vorherige Selektion der CD-14 positiven Monozyten hierbei keine Vorteile bringt (23). Die Verifizierung, ob reife Osteoklasten entstanden sind, kann über einen Dentinresorptionsassay erfolgen. Im Falle von reifen Osteoklasten kommt es zu Osteolyse mit Resorptionslakunen auf Dentinchips. Die aktuelle Studienlage bezüglich der Induktion einer vollständigen Osteoklastogenese ohne Stimulation und allein durch die Kokultivierung mit PPFs ist noch inhomogen. De Vries et al. konnten in Kokulturen von parodontalen Ligamentfibroblasten und PBMCs zeigen, dass es durch Kokultivierung zur Bildung von Osteoklasten kommt. Allerdings führte diese Osteoklastogenese zur keiner Knochenresorption. Dies führt zu der Annahme, dass Fibroblasten Hemmstoffe exprimieren und so die terminale Osteolyse verhindern (55). Bloemen et al untersuchten vergleichbare Kokulturen und bestätigten, dass PPFs die Osteoklastogenese begünstigten. Eine Knochenresorption konnte für PBMC-Monokulturen und Kokulturen unter zusätzlicher Stimulation mit M-CSF und RANKL beobachtet werden (56).

Insgesamt ergibt sich ein Bild, nach dem Fibroblasten einerseits das Expressionsmuster in Richtung Osteoklastogenese verändern und die Entwicklung von Osteoklasten begünstigen, andererseits aber ggf. die terminale Osteolyse verhindern können. Kurz zusammengefasst spielen PPFs eine entscheidende Rolle und sollten vermehrt zum besseren Verständnis der Implantatlockerung in den Fokus der Forschung gerückt werden.

2.3 Projektziele

Primäres Ziel dieser wissenschaftlichen Arbeit war es, die Osteoklastogenese in Kokulturen aus PBMCs und PPFs (orthopädischen und dentalen Ursprungs) zu vergleichen und so Rückschlüsse auf die dentale und orthopädische Implantatlockerung zu ziehen. Zusätzlich sollte die Hypothese, ob PPFs in Kokulturen mit PBMCs in der Lage sind, eine terminale Osteoklastogenese zu triggern, überprüft werden (1).

Als Nebenfragestellung sollte der Einfluss eines vermutlich mehr den *in vivo* Bedingungen entsprechendes 3D- Transwell-Systems evaluiert werden. Hierfür wurde,

das Transwellsystem in verschiedenen Fibroblastenkulturen in Mono- und Kokulturen untersucht (1, 2).

Die vorliegende Doktorarbeit beinhaltet einen Teil der wissenschaftlichen Arbeit, die im Rahmen des DFG-Projekts „Analyse periprothetischer Fibroblasten und deren Funktion im Bereich orthopädischer und dentaler Implantatlockerungen“ (Deutsche Forschungsgemeinschaft, Prof. Dr. med. Susanne Mayer, Projektnummer 192241435) durchgeführt wurde. Im Abschnitt 1 sind die Beiträge der Doktorandin zu den beiden Veröffentlichungen aufgelistet.

3. Zusammenfassung

Hintergrund:

Implantatlockerungen stellen ein relevantes Problem in der zahnärztlichen und orthopädischen Chirurgie dar (10, 11). Multifaktorielle Prozesse führen zur periprothetischen Osteolyse und somit zum Implantatverlust (15, 16). Orthopädische und dentale Implantatlockerungen unterscheiden sich in ihren ursprünglichen Auslösern. Auffällig ist jedoch, dass Periimplantatgewebe von gelockerten Endoprothesen in beiden Fällen zu einem großen Teil aus PPFs besteht (25). PPFs sind in der Lage, Partikel zu phagozytieren und Zytokine freizusetzen, die an der Pathogenese von Implantatlockerungen beteiligt sind. Darüber hinaus beeinflussen PPFs die Bildung und Aktivierung von Osteoklasten und spielen so eine Schlüsselrolle (35, 36).

Die *in vivo* Verhältnisse mit den zahlreichen Zellinteraktionen in einem dreidimensionalen Periimplantatgewebe in Zellversuchen nachzustellen stellt eine erhebliche Herausforderung dar. Ein Transwell-System bestehend aus einer netzartigen 3D-Struktur aus Polycarbonat ermöglicht, im Vergleich zu herkömmlichen Monolayerkulturen, das 3D-Wachstum in Zellkulturversuchen. Somit hat das 3D-Transwellmodell die Chance, den Verhältnissen *in vivo* näher zu kommen und einen realistischeren Ansatz zu bieten (51).

Ziele:

Ziel dieser Arbeit war es, dentale Periimplantatgewebe durch phänotypische Expressionsmuster zu charakterisieren und zu untersuchen, ob die Osteoklastogenese durch dentale PPFs induziert werden kann. Die Ergebnisse sollten dann mit den Vorversuchen unserer Arbeitsgruppe zu orthopädischen Kokulturen in Vergleich gesetzt werden. Zur Bestätigung dieser Ergebnisse war es unser Ziel, die orthopädischen und dentalen Kokulturen zusätzlich zu sequenzieren.

Um die Versuchsdurchführung zu optimieren, war es unsere Absicht, in Vorarbeiten ein neues 3D-Modell, das Transwellssystem, in verschiedenen Fibroblastenkulturen (dentale PPFs, orthopädische PPFs, Synovialfibroblasten bei Osteoarthritis und dermalen Fibroblasten) zu erproben.

Methoden:

Die PPFs wurden aus Periimplantatgeweben von Patienten isoliert, bei denen aufgrund einer aseptischen Periimplantitis eine Zahnimplantat-Revision indiziert war. Diese PPFs wurden mit peripheren mononukleären Blutzellen (PBMCs) in Transwell- (n=16) und Monolayersystemen (n=16) kultiviert, um den Einfluss auf die osteogene Differenzierung

zu untersuchen (1, 57). Unstimulierte und stimulierte (\pm MCSF und RANK-L) Monokulturen von PBMCs wurden als positive Kontrolle der Osteoklastenbildung verwendet. Monokulturen von PPFs dienen als Negativkontrolle für Fibroblasten. Die Kulturen wurden durch Färbung (HE, TRAP-Färbung und Hoechst) und quantitative real-time-PCR (RT-PCR) (osteoklastenspezifische Proteine und Zytokine: RANKL, OPG, RANK, MCSF, OCN, CTSK, TRAP, TNF α) an Tag 0, 13 und Tag 20 charakterisiert. Zum Nachweis einer terminalen Osteoklastogenese *in vitro* wurden die Zellen zusätzlich auf Dentinchips für 28 Tage kultiviert und die Resorptionslakunen mittels Toluidinblaulösung dargestellt. Die Sequenzierung wurde durchgeführt, um dentale und orthopädische Kokulturen in Monolayern zu vergleichen. Hierfür wurde RNA von PPFs, PBMCs und Kokulturen an Tag 20 sequenziert (1, 57).

Um eine Basisreferenz zu erhalten, wurde zusätzlich Originalgewebe von gelockerten Zahnimplantaten (n=8), ohne vorherige Zellisolierung, an Tag 0 *in toto* analysiert (1).

Für die Vorarbeiten im Transwellssystem wurden PPFs aus orthopädischen Periimplantatgeweben (n = 12), osteoarthritische synovialfibroblastenähnliche Zellen (n = 6) und dermale Fibroblasten (n=3) in Monolayer- oder Transwellkulturen für 10 oder 21 Tage kultiviert. Die Kulturen wurden mittels Histologie, TRAP-Färbung, Immunhistochemie (Anti-S100a4) und RT-PCR untersucht (2).

Ergebnisse:

Dentale Transwell-Kokulturen erhöhten die Expression von RANKL, RANK, MCSF, OCN und TNF α (Tag 13) und verringerten die Expression von OPG, TRAP (Tag 20) und CTSK (Tag 13) im Vergleich zu Monolayer-Kokulturen (1).

Die TRAP-Färbung ermöglicht den Nachweis von mehrkernigen osteoklastenähnlichen Zellen, ist aber kein spezifischer Marker für die Osteoklastogenese im Gegensatz zur Knochenresorption (57). In PBMCs-Monokulturen und allen Kokulturen waren TRAP positive, multinukleäre Zellen sichtbar. In PPF-Monokulturen waren diese nicht nachweisbar (1, 57).

In orthopädischen und dentalen Monolayer-Kokulturen zeigten sich hohe Mengen an OPG. Eine hohe OPG-Expression führt zu einer niedrigeren RANKL/OPG-ratio. Dies wiederum führte zu einer Hemmung der Osteolyse und passend dazu zeigten sich keine Resorptionslakunen auf den Dentinchips. Die Stimulation von PBMC-Monokulturen in Monolayern und Transwells mit RANK-L und M-CSF führte zu Resorptionslücken auf Dentinchips, während selbst stimulierte Kokulturen mit dentalen und orthopädischen PPFs keine Anzeichen einer terminalen Osteoklastogenese zeigten. Dies spricht für eine

osteoprotektive und immunregulatorische Wirkung der PPFs im Monolayer. Diese osteoprotektive Funktion wurde für dentale und orthopädische Monolayerkulturen gezeigt (1, 57).

Im Gegensatz dazu wurde OPG in den Transwell-Kokulturen signifikant herunterreguliert. In den dentalen Kokulturen kam es zu einem 20-fachen und in den orthopädischen Kokulturen sogar zu einem 100-fachen Rückgang von OPG (1, 57). In Transwell-Kulturen waren die RANKL/OPG-Ratios ähnlich hoch wie in den ursprünglichen Geweben, die als Basisreferenz dienten (1). Insgesamt entsprachen die Transwellergebnisse damit mehr den *in vivo* Bedingungen.

Die Sequencinganalysen zeigten eine starke Übereinstimmung der Expressionsmuster von dentalen und orthopädischen Kulturen (1).

In unseren Vorarbeiten zum Transwellsystem konnten wir zeigen, dass die 3D-Kultivierung alleine und ohne weiteren Stimulus in den Fibroblastenmonokulturen (PPFs, osteoarthritische Synovialfibroblasten und dermale Fibroblasten) zu einer signifikanten Änderung des Expressionsmusters führte. Das Transwellsystem ermöglicht mehr Zell-Zell-Kontakte und verändert dadurch das Expressionsprofil (2).

Schlussfolgerung:

PPFs können osteoklastische Mechanismen erheblich immunmodulieren und spielen eine wichtige Rolle bei der Lockerung von dentalen und orthopädischen Implantaten. Eine terminale Osteoklastogenese durch PPF-Kokultivierung konnte weder im Monolayer noch im Transwell gezeigt werden. PPFs im Transwell induzierten in den Kokulturen ein eher Osteoklastogenese förderndes Expressionsmuster. Das Transwellmodell entsprach besser den *in vivo* Verhältnissen (1, 2, 57).

Zusammenfassend gibt diese Arbeit einen ersten Hinweis darauf, dass beim dentalen und orthopädischen Implantatversagen ähnliche Entzündungs- und Lockerungsprozesse auf molekulargenetischer Ebene ablaufen (1).

4. Abstract (English)

Background:

Implant loosening is a relevant issue in dental and orthopaedic surgery (10, 11). Multifactorial processes lead to periprosthetic osteolysis and thus to implant loss (15, 16). Orthopaedic and dental implant loosening differ in their original triggers. However, it is striking that Periimplant tissues from loosened endoprostheses in both cases consist largely of peri-implant fibroblasts (25). PPFs are able to phagocytose particles and release cytokines that affect implant loosening. In addition, PPFs influence the formation and activation of osteoclasts and play an important part in osteolysis (35, 36).

Reproducing the *in vivo* conditions with numerous cell interactions in a three-dimensional tissue in cell experiments is challenging. A transwell system consisting of a net-like 3D structure made of polycarbonate enables 3D growth in cell culture experiments, unlike conventional monolayer cultures. Thus, the 3D transwell model is able to get closer to *in vivo* conditions and to provide a more realistic approach (51).

Objectives:

The aim of this work was to characterize dental periimplant tissues by phenotypic expression patterns and to investigate whether osteoclastogenesis can be induced by dental PPFs. The results should then be compared with the preliminary experiments of our working group on orthopaedic cocultures. To confirm these results, we aimed to additionally perform sequence analysis for orthopaedic and dental cocultures.

In order to optimize the experiments, it was our intention to assess a new 3D model, the transwell system, in different fibroblast cultures (dental PPFs, orthopaedic PPFs, synovial fibroblasts in osteoarthritis and dermal fibroblasts).

Methods:

PPFs were isolated from periimplant tissues of patients with dental implant revision due to aseptic peri-implantitis. These PPFs were cultured with peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) in transwell (n=16) and monolayer (n=16) systems to investigate the influence on osteogenic differentiation (1, 57). Unstimulated and stimulated (\pm MCSF and RANK-L) monocultures of PBMCs were used as positive controls of osteoclast formation. Monocultures of PPFs served as a negative control for fibroblasts. Cultures were analyzed by staining (HE, TRAP stain and Hoechst) and quantitative real-time PCR (RT-PCR) (osteoclast-specific proteins and cytokines: RANKL, OPG, RANK, MCSF, OCN, CTSK, TRAP, TNF α) at day 0, 13 and day 20 (1, 57). To detect terminal

osteoclastogenesis *in vitro*, the cells were additionally seeded on dentin chips for 28 days and the resorption lacunae were visualized using toluidine blue solution. Sequencing was performed to compare dental and orthopaedic cocultures in monolayers. For this purpose, RNA was sequenced from PPFs, PBMCs and cocultures on day 20.

In order to obtain a baseline reference, original tissues from loosened dental implants (n=8), without prior cell isolation, were additionally analyzed in total on day 0 (1).

For our preliminary work in transwell systems, PPFs from orthopaedic periimplant tissues (n = 12), osteoarthritic synovial fibroblast-like cells (n = 6) and dermal fibroblasts (n = 3) were cultured in monolayer or transwell cultures for 10 or 21 days. Cultures were examined by histology, TRAP staining, immunohistochemistry (anti-S100a4) and RT-PCR (2).

Results:

Dental transwell cocultures increased the expression of RANKL, RANK, MCSF, OCN and TNF α (day 13) and decreased the expression of OPG, TRAP (day 20) and CTSK (day 13) compared to monolayer cocultures (1).

TRAP staining allows detection of multinucleated osteoclast-like cells but is not a specific marker for osteoclastogenesis as opposed to bone resorption (57). In PBMCs monocultures and all cocultures, TRAP positive multinucleated cells were visible. They were not detectable in PPF monocultures (1, 57).

Orthopaedic and dental monolayer cocultures displayed high levels of OPG. High OPG expression leads to a decreased RANKL/OPG ratio. This resulted in inhibition of osteolysis and, appropriately, no resorptive lacunae were detected on the dentin chips. Stimulation of PBMC monocultures in monolayers and transwells with RANK-L and M-CSF resulted in resorption lacunae on dentin chips, while even stimulated co-cultures with dental and orthopaedic PPFs showed no signs of terminal osteoclastogenesis. This suggests an osteoprotective and immunoregulatory effect of PPFs in monolayers. This osteoprotective behaviour was demonstrated for dental and orthopaedic monolayer cultures (1, 57).

In contrast, OPG was significantly downregulated in transwell cocultures. In dental cocultures, there was a 20-fold and in orthopaedic cocultures even a 100-fold decrease of OPG (1, 57). In transwell cultures, the RANKL/OPG ratios were comparable to those in the original tissues, which served as a baseline reference (1). Overall, the transwell results were more consistent with the *in vivo* conditions.

Sequencing analyses indicated a strong match between the expression patterns of dental and orthopaedic cultures (1).

In our preliminary work on the transwell system, we were able to show that 3D cultivation alone without further stimulus in the fibroblast monocultures (PPFs, osteoarthritic synovial fibroblasts and dermal fibroblasts) led to a significant change in gene expression. The transwell system allows more cell-cell contacts, thereby altering the expression profile (2).

Conclusion:

PPFs are able to significantly immunomodulate osteoclastogenesis and play an important part in implant failure of dental and orthopaedic implants. Terminal osteoclastogenesis by PPF co-cultivation could not be demonstrated in either monolayer or transwell. PPFs in the transwell induced a more osteoclastogenesis-promoting expression pattern in cocultures. The transwell model corresponded better to *in vivo* conditions (1, 2, 57).

In summary, this work provides a first indication that similar inflammatory and loosening processes occur at the molecular genetic level in dental and orthopaedic implant failure (1).

5. Paper I

Schluessel S, Hartmann ES, Koehler MI, Beck F, Redeker JI, Saller MM, Akova E, Krebs S, Holzapfel BM and Mayer-Wagner S (2022) **Dental and Orthopaedic Implant Loosening: Overlap in Gene Expression Regulation**. *Front. Immunol.* 13:820843. doi: 10.3389/fimmu.2022.820843

<https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.820843>

Zur Publikation angenommen am 17. Januar 2022; online publiziert am 11. Februar 2022

6. Paper II

Hartmann ES, Schluessel S, Köhler MI, Beck F, Redeker JI, Summer B, Schönitzer V, Fottner A, Mayer-Wagner S. **Fibroblast-like cells change gene expression of bone remodelling markers in transwell cultures.** Eur J Med Res. 2020 Oct 29;25(1):52. doi: 10.1186/s40001-020-00453-y. PMID: 33121539; PMCID: PMC7596965.

<https://rdcu.be/cFrEB>

Zur Publikation angenommen am 21. Oktober 2020; online publiziert am 29. Oktober 2020

7. Literaturverzeichnis

1. Schluessel S, Hartmann ES, Koehler MI, Beck F, Redeker JI, Saller MM, et al. Dental and Orthopaedic Implant Loosening: Overlap in Gene Expression Regulation. *Frontiers in immunology*. 2022;13:820843.
2. Hartmann ES, Schluessel S, Köhler MI, Beck F, Redeker JI, Summer B, et al. Fibroblast-like cells change gene expression of bone remodelling markers in transwell cultures. *European journal of medical research*. 2020;25(1):52.
3. Nagira K, Hagino H, Enokida M, Enokida S, Ishida K, Hayashi I, et al. Total knee arthroplasty in the past three decades: Trends in patient characteristics and implant survivorship. *Mod Rheumatol*. 2021.
4. Sato Y, Kitagawa N, Isobe A. Implant treatment in ultra-aged society. *Jpn Dent Sci Rev*. 2018;54(2):45-51.
5. Gajda M, Pac A, Gryglewska B, Gajda P, Rózańska A, Wójkowska-Mach J. Patients Undergoing Hip or Knee Arthroplasty in Poland Based on National Data-Challenge for Healthcare in Aging Society. *Healthcare (Basel)*. 2021;9(8).
6. IQTIG- Institut für Qualitätssicherung und Transparenz im Gesundheitswesen, Bundesauswertung zum Erfassungsjahr 2019 Hüftendoprothesenversorgung Qualitätsindikatoren und Kennzahlen, Stand 14.07.2020. 2019. URL: https://iqtig.org/downloads/auswertung/2019/hep/QSKH_HEP_2019_BUAW_V02_2020-07-14.pdf (abgerufen am 09.03.2022)
7. IQTIG- Institut für Qualitätssicherung und Transparenz im Gesundheitswesen, Bundesauswertung zum Erfassungsjahr 2019 Knieendoprothesenversorgung Qualitätsindikatoren und Kennzahlen; Stand 14.07.2020. 2019. URL: https://iqtig.org/downloads/auswertung/2019/kep/QSKH KEP_2019_BUAW_V02_2020-07-14.pdf (abgerufen am 09.03.2022)
8. Deutsche Gesellschaft für Implantologie im Zahn-, Mund- und Kieferbereich, Zahnimplantate zunehmend erste Wahl: 1,3 Millionen werden in Deutschland pro Jahr eingepflanzt; Stand: 30.11.2018, 2018. URL: <https://idw-online.de/de/news707107#:~:text=%E2%80%9EAlleine%20in%20Deutschland%20ist%20die,Kongress%20der%20Gesellschaft%20in%20Wiesbaden.> (abgerufen am 09.03.2022)
9. Klug A, Gramlich Y, Rudert M, Drees P, Hoffmann R, Weißenberger M, et al. The projected volume of primary and revision total knee arthroplasty will place an immense burden on future health care systems over the next 30 years. *Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy : official journal of the ESSKA*. 2021;29(10):3287-98.
10. Goodman SB, Gallo J, Gibon E, Takagi M. Diagnosis and management of implant debris-associated inflammation. *Expert Rev Med Devices*. 2020;17(1):41-56.
11. Liaw K, Delfini RH, Abrahams JJ. Dental Implant Complications. *Semin Ultrasound CT MR*. 2015;36(5):427-33.
12. Howe MS, Keys W, Richards D. Long-term (10-year) dental implant survival: A systematic review and sensitivity meta-analysis. *J Dent*. 2019;84:9-21.
13. Bayliss LE, Culliford D, Monk AP, Glyn-Jones S, Prieto-Alhambra D, Judge A, et al. The effect of patient age at intervention on risk of implant revision after total replacement of the hip or knee: a population-based cohort study. *Lancet (London, England)*. 2017;389(10077):1424-30.
14. Goodman SB, Gallo J. Periprosthetic Osteolysis: Mechanisms, Prevention and Treatment. *Journal of clinical medicine*. 2019;8(12).
15. Dumbleton JH, Manley MT, Edidin AA. A literature review of the association between wear rate and osteolysis in total hip arthroplasty. *J Arthroplasty*. 2002;17(5):649-61.

16. Albrektsson T, Becker W, Coli P, Jemt T, Molne J, Sennerby L. Bone loss around oral and orthopedic implants: An immunologically based condition. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2019;21(4):786-95.
17. Chen X, Wang Z, Duan N, Zhu G, Schwarz EM, Xie C. Osteoblast-osteoclast interactions. *Connect Tissue Res*. 2018;59(2):99-107.
18. Kim JM, Lin C, Stavre Z, Greenblatt MB, Shim JH. Osteoblast-Osteoclast Communication and Bone Homeostasis. *Cells*. 2020;9(9).
19. Rao AJ, Gibon E, Ma T, Yao Z, Smith RL, Goodman SB. Revision joint replacement, wear particles, and macrophage polarization. *Acta Biomater*. 2012;8(7):2815-23.
20. Landgraeber S, Jäger M, Jacobs JJ, Hallab NJ. The pathology of orthopedic implant failure is mediated by innate immune system cytokines. *Mediators Inflamm*. 2014;2014:185150.
21. Kapasa ER, Giannoudis PV, Jia X, Hatton PV, Yang XB. The Effect of RANKL/OPG Balance on Reducing Implant Complications. *J Funct Biomater*. 2017;8(4).
22. Athanasou NA. The pathobiology and pathology of aseptic implant failure. *Bone Joint Res*. 2016;5(5):162-8.
23. Sharaf-Eldin WE, Abu-Shahba N, Mahmoud M, El-Badri N. The Modulatory Effects of Mesenchymal Stem Cells on Osteoclastogenesis. *Stem Cells Int*. 2016;2016:1908365.
24. Drees P, Eckardt A, Gay RE, Gay S, Huber LC. [Molecular pathways in aseptic loosening of orthopaedic endoprosthesis]. *Biomed Tech (Berl)*. 2008;53(3):93-103.
25. Tsutsumi R, Xie C, Wei X, Zhang M, Zhang X, Flick LM, et al. PGE2 signaling through the EP4 receptor on fibroblasts upregulates RANKL and stimulates osteolysis. *J Bone Miner Res*. 2009;24(10):1753-62.
26. Bordin S, Flemmig TF, Verardi S. Role of fibroblast populations in peri-implantitis. *The International journal of oral & maxillofacial implants*. 2009;24(2):197-204.
27. Pap T, Claus A, Ohtsu S, Hummel KM, Schwartz P, Drynda S, et al. Osteoclast-independent bone resorption by fibroblast-like cells. *Arthritis Res Ther*. 2003;5(3):R163-73.
28. Sabokbar A, Itonaga I, Sun SG, Kudo O, Athanasou NA. Arthroplasty membrane-derived fibroblasts directly induce osteoclast formation and osteolysis in aseptic loosening. *J Orthop Res*. 2005;23(3):511-9.
29. Sabokbar A, Kudo O, Athanasou NA. Two distinct cellular mechanisms of osteoclast formation and bone resorption in periprosthetic osteolysis. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. 2003;21(1):73-80.
30. Konttinen YT, Lappalainen R, Laine P, Kitti U, Santavirta S, Teronen O. Immunohistochemical evaluation of inflammatory mediators in failing implants. *The International journal of periodontics & restorative dentistry*. 2006;26(2):135-41.
31. Yucel-Lindberg T, Olsson T, Kawakami T. Signal pathways involved in the regulation of prostaglandin E synthase-1 in human gingival fibroblasts. *Cell Signal*. 2006;18(12):2131-42.
32. Jiranek WA, Machado M, Jasty M, Jevsevar D, Wolfe HJ, Goldring SR, et al. Production of cytokines around loosened cemented acetabular components. Analysis with immunohistochemical techniques and in situ hybridization. *J Bone Joint Surg Am*. 1993;75(6):863-79.
33. Salcetti JM, Moriarty JD, Cooper LF, Smith FW, Collins JG, Socransky SS, et al. The clinical, microbial, and host response characteristics of the failing implant. *The International journal of oral & maxillofacial implants*. 1997;12(1):32-42.
34. Wei X, Zhang X, Flick LM, Drissi H, Schwarz EM, O'Keefe RJ. Titanium particles stimulate COX-2 expression in synovial fibroblasts through an oxidative stress-induced, calpain-dependent, NF-kappaB pathway. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2009;297(2):C310-20.
35. Mandelin J, Li TF, Hukkanen M, Liljestrom M, Salo J, Santavirta S, et al. Interface tissue fibroblasts from loose total hip replacement prosthesis produce receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand, osteoprotegerin, and cathepsin K. *J Rheumatol*. 2005;32(4):713-20.

36. Mandelin J, Li TF, Liljestrom M, Kroon ME, Hanemaaijer R, Santavirta S, et al. Imbalance of RANKL/RANK/OPG system in interface tissue in loosening of total hip replacement. *J Bone Joint Surg Br.* 2003;85(8):1196-201.
37. Belibasakis GN, Bostanci N. The RANKL-OPG system in clinical periodontology. *J Clin Periodontol.* 2012;39(3):239-48.
38. Theodoridis C, Doulkeridou C, Menexes G, Vouros I. Comparison of RANKL and OPG levels in peri-implant crevicular fluid between healthy and diseased peri-implant tissues. A systematic review and meta-analysis. *Clinical oral investigations.* 2021.
39. Koulouvaris P, Ly K, Ivashkiv LB, Bostrom MP, Nestor BJ, Sculco TP, et al. Expression profiling reveals alternative macrophage activation and impaired osteogenesis in periprosthetic osteolysis. *J Orthop Res.* 2008;26(1):106-16.
40. Wagner S, H. Gollwitzer, D. Wernicke, R. Langer, K. A. Siebenrock, and W. Hofstetter. Interface membrane fibroblasts around aseptically loosened endoprostheses express MMP-13. *JOrthopRes.* 2008;26(2):143-52.
41. Gul SS, Abdulkareem AA, Sha AM, Rawlinson A. Diagnostic Accuracy of Oral Fluids Biomarker Profile to Determine the Current and Future Status of Periodontal and Peri-Implant Diseases. *Diagnostics (Basel).* 2020;10(10).
42. Ma GF, Ali A, Verzijl N, Hanemaaijer R, TeKoppele J, Konttinen YT, et al. Increased collagen degradation around loosened total hip replacement implants. *Arthritis and rheumatism.* 2006;54(9):2928-33.
43. Delaisse JM, Andersen TL, Engsig MT, Henriksen K, Troen T, Blavier L. Matrix metalloproteinases (MMP) and cathepsin K contribute differently to osteoclastic activities. *Microscopy research and technique.* 2003;61(6):504-13.
44. Aghakhani S, Zerrouk N, Niarakis A. Metabolic Reprogramming of Fibroblasts as Therapeutic Target in Rheumatoid Arthritis and Cancer: Deciphering Key Mechanisms Using Computational Systems Biology Approaches. *Cancers (Basel).* 2020;13(1).
45. Przekora A, Ginalska G. Enhanced differentiation of osteoblastic cells on novel chitosan/ β -1,3-glucan/bioceramic scaffolds for bone tissue regeneration. *Biomedical materials (Bristol, England).* 2015;10(1):015009.
46. Komori T. Functions of Osteocalcin in Bone, Pancreas, Testis, and Muscle. *International journal of molecular sciences.* 2020;21(20).
47. Yamalik N, Günday S, Kilinc K, Karabulut E, Berker E, Tözüm TF. Analysis of cathepsin-K levels in biologic fluids from healthy or diseased natural teeth and dental implants. *The International journal of oral & maxillofacial implants.* 2011;26(5):991-7.
48. Murata M, Tatsumi J, Kato Y, Suda S, Nunokawa Y, Kobayashi Y, et al. Osteocalcin, deoxypyridinoline and interleukin-1beta in peri-implant crevicular fluid of patients with peri-implantitis. *Clinical oral implants research.* 2002;13(6):637-43.
49. Maier GS, Eberhardt C, Strauch M, Kafchitsas K, Kurth AA. Is tartrate-resistant acid phosphatase 5b a potent bio-marker for late stage aseptic implant loosening? *International Orthopaedics.* 2014;38(12):2597-600.
50. Chao TY, Wu YY, Janckila AJ. Tartrate-resistant acid phosphatase isoform 5b (TRACP 5b) as a serum maker for cancer with bone metastasis. *Clin Chim Acta.* 2010;411(21-22):1553-64.
51. Jensen C, Teng Y. Is It Time to Start Transitioning From 2D to 3D Cell Culture? *Front Mol Biosci.* 2020;7:33.
52. Majety M, Pradel LP, Gies M, Ries CH. Fibroblasts Influence Survival and Therapeutic Response in a 3D Co-Culture Model. *PloS one.* 2015;10(6):e0127948.
53. Sabater D, Fernández-López J-A, Remesar X, Alemany M. The use of Transwells™ improves the rates of differentiation and growth of cultured 3T3L1 cells. *Analytical and Bioanalytical Chemistry.* 2013;405(16):5605-10.
54. Dickerson TJ, Suzuki E, Stanecki C, Shin HS, Qui H, Adamopoulos IE. Rheumatoid and pyrophosphate arthritis synovial fibroblasts induce osteoclastogenesis independently of RANKL, TNF and IL-6. *Journal of autoimmunity.* 2012;39(4):369-76.

55. de Vries TJ, Schoenmaker T, Wattanaroonwong N, van den Hoonaard M, Nieuwenhuijse A, Beertsen W, et al. Gingival fibroblasts are better at inhibiting osteoclast formation than periodontal ligament fibroblasts. *J Cell Biochem.* 2006;98(2):370-82.
56. Bloemen V, Schoenmaker T, de Vries TJ, Everts V. Direct cell-cell contact between periodontal ligament fibroblasts and osteoclast precursors synergistically increases the expression of genes related to osteoclastogenesis. *J Cell Physiol.* 2010;222(3):565-73.
57. Koehler MI, Hartmann ES, Schluessel S, Beck F, Redeker JI, Schmitt B, et al. Impact of Periprosthetic Fibroblast-Like Cells on Osteoclastogenesis in Co-Culture with Peripheral Blood Mononuclear Cells Varies Depending on Culture System. *International journal of molecular sciences.* 2019;20(10).

Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei meiner großartigen Doktormutter und Betreuerin Prof. Dr. med. Susanne Mayer für die gute Unterstützung während der gesamten Doktorarbeit. Ich habe viel Neues im Rahmen meiner Doktorarbeit gelernt und meine ersten Erfahrungen in Bezug auf wissenschaftliches Arbeiten gesammelt. Auf diesen Erfahrungsschatz kann ich in Zukunft sicherlich im Rahmen meiner weiteren wissenschaftlichen Tätigkeit aufbauen.

Zudem möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe, insbesondere Dr. Eliza Hartmann, Dr. Miriam Köhler, Dr. Felicitas Beck und Dr. Julia Redeker, für die gute Zusammenarbeit von Herzen bedanken.

Ein besonderer Dank gilt auch Bärbel Schmitt und Natalia Cabeza, die mich in der praktischen Umsetzung der methodischen Versuche meiner Doktorarbeit unterstützt haben.

In der großen Welt der Sequencing Daten haben mir PD Dr. Maximilian Saller und Elif Akova geholfen, nicht den Überblick zu verlieren, und den letzten Auswertungsabschnitt meiner Doktorarbeit erfolgreich abzuschließen.