

Aus dem Muskuloskelettalen Universitätszentrum München (MUM)

Zentrum der Universität München

Direktor:

Prof. Dr. med. Wolfgang Böcker

Prof. Dr. med. Boris Holzapfel

vormals

Klinik für Allgemeine, Unfall- und Wiederherstellungschirurgie

Klinik der Universität München

Der Einfluss von Hyaluronan auf humane Osteoblasten und Osteoklasten

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Zahnmedizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Anusha Abdullah

aus Kabul

2022

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Wolfgang Böcker

Mitberichterstatter: PD Dr. med. Florian Haasters

Mitbetreuung durch den
Promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. nat. Veronika Schönitzer

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 08.12.2022

Meiner Mama, meinem Papa

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Der Knochen	1
1.1.1	Die molekularen Bestandteile der Knochenmatrix	2
1.1.2	Knochenzellen	3
1.1.3	Der Knochenumbau	8
1.1.4	Extrazelluläre Matrix (ECM) des Knochens	9
1.2	Struktur, Vorkommen und Funktion von Hyaluronan	10
1.2.1	Synthese von HA	12
1.2.2	HA Rezeptoren	14
1.2.3	Degradation des HA	15
1.3	HA im Knochen	16
1.4	Klinische Anwendung von HA	18
1.5	Zielsetzung	20
2	Material und Methoden	21
2.1	Material	21
2.1.1	Chemikalien	21
2.1.2	Medien	23
2.1.3	Zellkulturmaterialien	25
2.1.4	Zellen	25
2.1.5	Färbelösungen	26
2.1.6	Kits	27
2.1.7	Utensilien zur Blutabnahme	27
2.1.8	Geräte	28
2.1.9	Software	29
2.2	Methoden	30
2.2.1	Zellkultur	30
2.2.2	Beschichtung der Zellkulturplatten mit Hyaluronan	33
2.2.3	Proliferation und metabolische Aktivität der Osteoblasten	34
2.2.4	Osteogene Differenzierung von Osteoblasten	37
2.2.5	Zellausbreitung (Spreading) der Osteoblasten	39

2.2.6	Adhäsion der Osteoblasten.....	40
2.2.7	Osteoklastogenese	40
2.2.8	Adhäsion der Osteoklasten.....	41
2.2.9	Statistische Auswertung.....	42
3	Ergebnisse	43
3.1	Der Einfluss von endogenem HA auf humane Osteoblasten.....	43
3.2	Der Einfluss von exogenem HA auf humane Osteoblasten	45
3.2.1	Die metabolische Aktivität.....	45
3.2.2	Die Modulation der Zellproliferation	47
3.2.3	Die initiale Adhäsion	49
3.2.4	Die Zellausbreitung der Osteoblasten.....	50
3.2.5	Die Fähigkeit zur osteogenen Differenzierung.....	52
3.3	Der Einfluss von exogenem HA auf humane Osteoklasten	57
3.3.1	Osteoklastogenese	57
3.3.2	Die initiale Anheftung der Osteoklastenvorläuferzellen	59
4	Diskussion	62
4.1	Die Bedeutung des Molekulargewichts und der Konzentration beim Einfluss des HA auf das Zellverhalten.....	62
4.2	Exogenes HA: Beschichtung oder Zugabe zum Kulturmedium?	65
4.3	Das Verhalten von humanen Osteoblasten unter Hyaluronaneinfluss.....	66
4.4	Das Verhalten von humanen Osteoklasten unter Hyaluronaneinfluss.....	71
4.5	Endogenes HA	73
4.6	Ausblick.....	77
5	Zusammenfassung	79
6	Literaturverzeichnis	83
7	Abkürzungsverzeichnis	94
	Danksagung	97

Eidesstaatliche Versicherung 98

1 Einleitung

1.1 Der Knochen

Das menschliche Skelett besteht aus über 200 Knochen [1]. Die Knochen gewähren dem Körper mechanische Stabilität, sie dienen als Ansatz für Muskeln, welche für die Motorik unerlässlich sind, schützen das Knochenmark, haben sowohl eine metabolische Funktion als Kalzium- und Phosphatspeicher als auch eine endokrine Funktion beispielsweise durch Bildung von FGF23 (fibroblast growth factor 23) [2] und Osteocalcin [3]. FGF 23 beeinflusst den Phosphatstoffwechsel in der Niere und Osteocalcin den Glukosestoffwechsel.

Knochen wird durch desmale oder enchondrale Ossifikation gebildet. Über desmale Ossifikation entwickeln sich direkt aus mesenchymalem Gewebe primär platte Knochen (Schädel- und Beckenknochen), enchondral über eine Zwischenstufe aus Knorpel entstehen hingegen lange Röhrenknochen, die aus einer Diaphyse, Metaphysen und Epiphysen bestehen [1].

Der Knochen kann makroskopisch in die Substantia Compacta und Substantia Spongiosa eingeteilt werden. Kompakter Knochen ist größtenteils mineralisiert und hat insbesondere eine Schutzfunktion, spongioser Knochen hingegen ist zu ungefähr 20% mineralisiert und hat hauptsächlich eine metabolische Funktion. Der Anteil an Kompakta und Spongiosa variiert je nach Knochen [1, 4].

An der Außenfläche des Knochens befindet sich eine dünne Gewebeschicht, das Periost, und innen ist der Knochen vom Endost ausgekleidet. Entlang der Innenseite des Periosts und des Endosts sind die knochenbildenden Zellen und Gefäße auffindbar [4, 5].

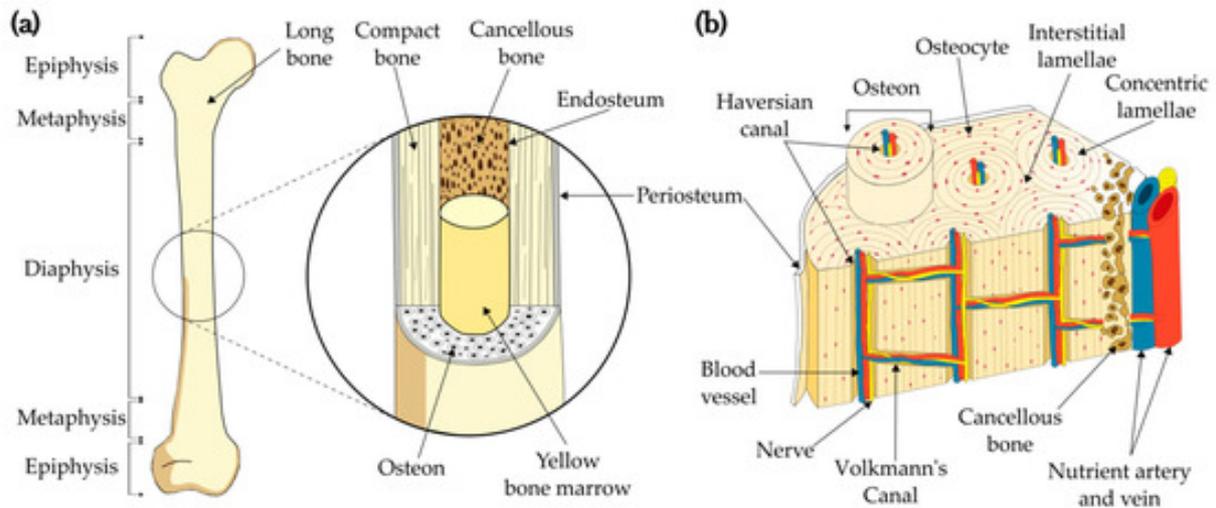


Abb. 1 Schematische Darstellung eines Röhrenknochens [6]

Um die Knochenfunktionen gewährleisten zu können, unterliegt jeder Knochen einem ständigen Knochenumbauprozess, dem „bone remodeling“. Ungefähr 6-10% des menschlichen Skeletts werden jährlich abgebaut und durch neuen Knochen ersetzt [7, 8]. Hierbei wird alter, geschädigter Knochen durch mechanisch widerstandsfähigeren Knochen ersetzt. An diesen Umbauprozessen sind knochenaufbauende Osteoblasten, Osteozyten und knochenabbauende Osteoklasten beteiligt [1, 4].

1.1.1 Die molekularen Bestandteile der Knochenmatrix

Auf molekularer Ebene besteht der Knochen aus dem Osteoid, dem organischen Anteil des Knochens, und den anorganischen Bestandteilen, Hydroxylapatitkristallen und Ionen. Der Osteoid besteht hauptsächlich aus Kollagen Typ I (90%), einem geringen Anteil an anderen Kollagentypen, Proteoglykanen und nicht kollagenen Proteinen [4].

Ein Kollagenmolekül besteht aus helikalen Proteinketten (Prokollagen), die eine Tripelhelix (Tropokollagen) bilden. Diese Kollagenketten können durch Vernetzung eine stabile Kollagenmatrix und somit eine Kollagenfibrille bilden [9]. Diese Kollagenfibrillen verleihen dem Knochen die notwendige Flexibilität. Die Steifigkeit des Knochens ist durch die nachfolgende Mineralisierung gegeben. Durch lokale Phosphat- und Kalziumfreisetzung aus Vesikeln, die von Osteoblasten freigesetzt

werden, mineralisiert Hydroxylapatit, welches die anorganische Matrix bildet. Physiologisch besteht der Knochen aus 60% bis 70% anorganischer Matrix, 20% bis 40% organischer Matrix und einem geringen Anteil an Wasser [1]. Ist dieses Verhältnis verändert, besteht keine Balance zwischen Flexibilität und Steifigkeit des Knochens und dies führt zu Erkrankungen wie Osteoporose oder Osteogenesis imperfecta [10, 11].

Die restlichen Proteine und Proteoglykane machen zwar nur einen kleinen Teil der organischen Matrix aus, beeinflussen aber Zellproliferation, Knochenstoffwechsel und Mineralisierung maßgeblich. Beispielsweise nimmt Osteocalcin eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Knochenbildung und Mineralisierung ein [1, 4].

Im anfänglich gebildeten Knochen verlaufen die Kollagenfasern nicht geordnet. Dies ist der sogenannte Faserknochen, welcher nachfolgend zum Lamellenknochen, in dem die Kollagenfasern dicht angeordnet und parallel verlaufend sind, umgebaut wird. Lamellenknochen weist im Vergleich zu Faserknochen eine höhere Festigkeit und einen höheren Mineralisationsgrad auf [1, 4, 12].

Auf mikroskopischer Ebene besteht der Knochen aus zahlreichen Osteonen. Ein Osteon besteht aus einem zentralen Havers-Kanal und um den Kanal konzentrisch angeordneten Knochenlamellen. Havers-Kanäle werden durch senkrecht verlaufende Volkmann-Kanäle verbunden, enthalten Gefäße und Osteoblastenvorläuferzellen und setzen somit das Endost fort [1].

1.1.2 Knochenzellen

Im Knochengewebe kommen verschiedene Zellen vor. Mesenchymale Stammzellen differenzieren zu Osteoblasten, die den Knochen aufbauen [13]. Osteozyten, die aus Osteoblasten entstehen, sind in der Knochenmatrix eingelagert und regulieren den Knochenumbau [14]. Die Osteoklasten bauen den Knochen ab. Im Folgenden werden die verschiedenen Zellen detailliert beschrieben.

1.1.2.1 Osteoblasten

Mesenchymale Stammzellen differenzieren unter Einfluss von Wachstumsfaktoren wie BMP (bone morphogenic proteins) [13], Wnt [15] und TGF- β zu Osteoblastenprogenitorzellen, die sich durch Parathormon und Calcitriol ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) zu Osteoblasten entwickeln. Auch die Transkriptionsfaktoren Runx2 (runt related transcription factor 2) und Osx (Osterix) sind entscheidend für die Osteoblastendifferenzierung. Osteoblasten können zu Osteozyten, welche sich nicht mehr teilen können und in die Knochenmatrix eingebettet sind, oder durch Einfluss von Runx2 zu sogenannten Saumzellen („bone lining cells“) reifen, die an der Knochenoberfläche verbleiben [14]. Diese Saumzellen können sich durch mechanische Reize oder über Stimulierung durch Parathormon wieder in aktive Osteoblasten umwandeln [16].

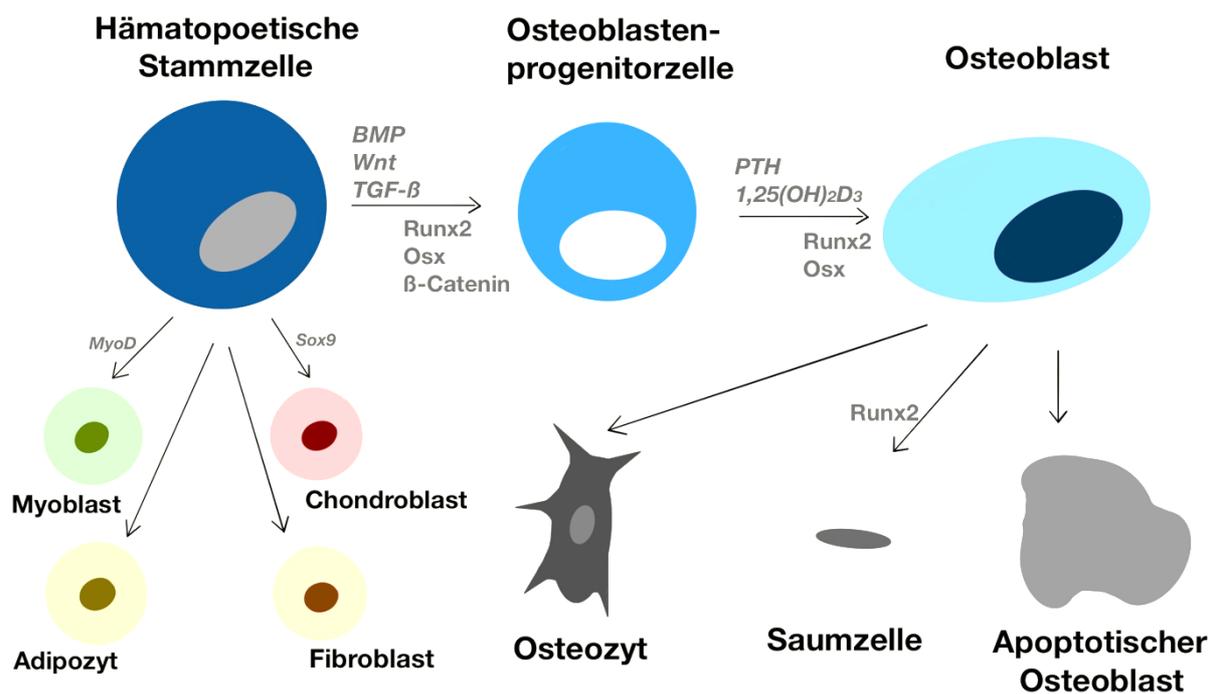


Abb. 2 Die Differenzierung eines Osteoblasten aus einer mesenchymalen Stammzelle. Modifiziert von: [14]

Osteoblasten können auch selbst BMPs, Wnts, TGF- β und IGFs (insulin-like growth factors) exprimieren, welche wiederum die Osteoblastenaktivität parakrin oder autokrin

beeinflussen können. Auf der Osteoblastenoberfläche sind zudem auch Rezeptoren für sämtliche Hormone u.a. Insulin, Parathormon, Calcitonin, Prolaktin und auch für Steroidhormone wie Calcitriol, Androgene, Östrogene, welche den Knochenstoffwechsel beeinflussen, zu finden [14, 17].

Essentielle Zytokine, die durch Osteoblasten freigesetzt werden, sind M-CSF (Macrophage Colony Stimulating Factor), RANKL (Receptor Activator of NF- κ B Ligand) und OPG (Osteoprotegerin). M-CSF ist wesentlich für die Differenzierung von Monozyten zu Osteoklastenvorläuferzellen und RANKL stimuliert durch Bindung an den RANK-Rezeptor auf der Osteoklastenoberfläche die Differenzierung und Reifung der Osteoklasten. OPG hingegen hemmt die Bindung von RANKL an den RANK-Rezeptor [4, 17, 18].

Das sympathische Nervensystem hemmt durch β_2 -adrenerge Rezeptoren auf der Osteoblastenoberfläche die Knochenbildung und stimuliert die Knochenresorption [19].

1.1.2.2 Osteozyten

Osteozyten sind reife Osteoblasten, die in die mineralisierte Knochenmatrix eingebettet sind und sich nicht mehr teilen können. Sie stehen über ihre Fortsätze, welche während der Osteogenese gebildet werden, mit anderen Osteozyten und auch mit Osteoblasten in Verbindung [1, 14, 20].

Funktionell sollen Osteozyten die Osteoblastenaktivität und die Knochenresorption durch Osteoklasten koordinieren. Sie sollen zudem auch eine wichtige Rolle bei der Regulation des Knochenstoffwechsels spielen, indem sie durch mechanische Stimuli eine Signaltransduktionskaskade in Gang setzen, welche den Knochenumbau steuert. Der genaue Mechanismus der Mechanorezeption durch Osteozyten ist jedoch weitgehend ungeklärt [21, 22].

Zwischen der Plasmamembran der Osteozyten und der Knochenmatrix ist der periosteozytische Raum, der mit extrazellulärer Flüssigkeit (ECF) gefüllt ist und die Nahrungsquelle für die Osteozyten darstellt. Die ECF soll bei Belastung durch geringe Kräfte über Mechanotransduktion den Knochenstoffwechsel regulieren, indem durch mechanosensitive Zilien an den Osteozyten diese Kräfte aufgenommen werden und

durch Stimulation der Osteoblasten die lokale Erhöhung der Konzentration von RANKL, Sclerostin (ein Wnt Antagonist) und OPG der Knochenstoffwechsel beeinflusst wird [21, 23]. Eine andere Hypothese besagt hingegen, dass die Osteozytenfortsätze direkt die mechanischen Stimuli detektieren können [24, 25].

Bei der Knochenresorption werden die Osteozyten mitsamt den restlichen Knochenbestandteilen durch Osteoklasten phagozytiert [21].

1.1.2.3 Osteoklasten

Hämatopoetische Stammzellen differenzieren durch Einfluss der Transkriptionsfaktoren PU-1 und MiTf zu myeloischen Stammzellen. Durch M-CSF werden diese Zellen zu Monozyten und letztlich wird durch RANKL die Differenzierung der Vorläuferzelle zum Osteoklasten durch Fusion mehrerer Vorläuferzellen bewirkt [1, 14]. Im Unterschied zu Makrophagen exprimieren Osteoklasten viele RANK- und Calcitonin- Rezeptoren. Unklar ist, ob auch Rezeptoren für Parathormon, Calcitriol und Östrogen vorhanden sind [4]. Ein Mangel an Östrogen bewirkt jedoch eine erhöhte IL-7 Aktivität, welche letztlich zu einer erhöhten Freisetzung von RANKL und TNF α führt [26].

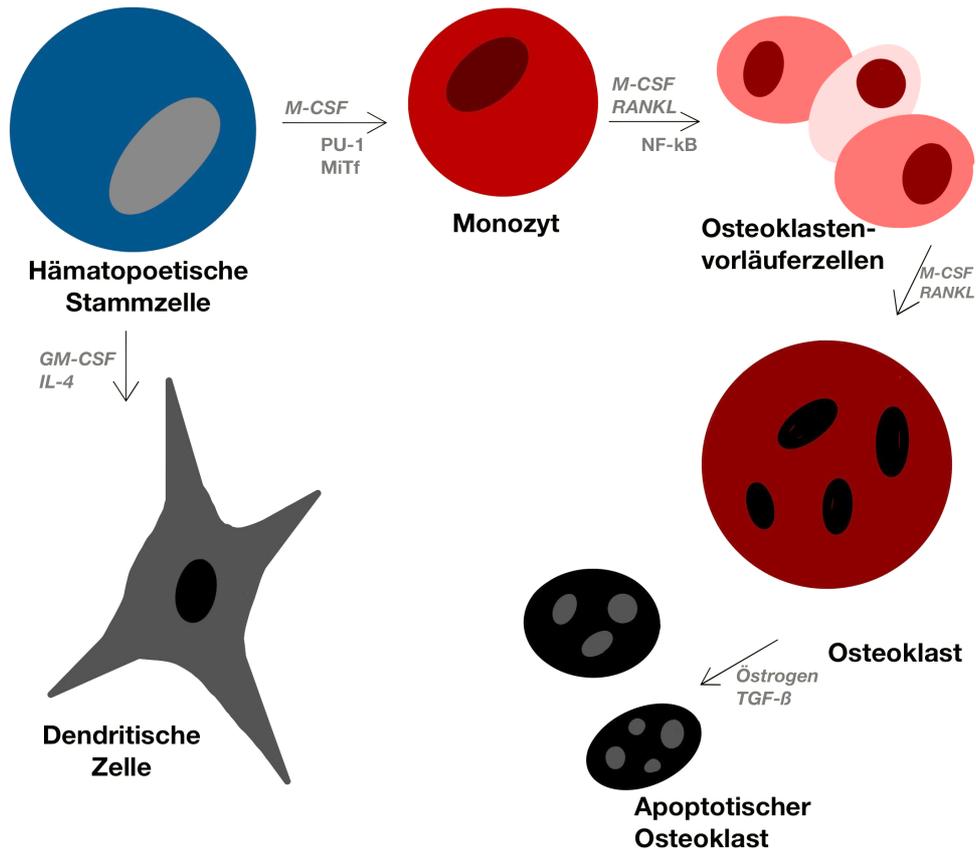


Abb. 3 Die Differenzierung eines Osteoklasten aus einer hämatopoetischen Stammzelle. Modifiziert von [14]

Osteoklasten sind knochenabbauende Zellen mit mehr als drei Zellkernen [27]. Sie binden über Integrinrezeptoren an den Knochen und können sich mit Hilfe von Podosomen auf dem Knochen fortbewegen. Sobald Osteoklasten an den Knochen binden, werden sie polarisiert, vergrößern ihre Oberfläche durch einen gefalteten Bürstensaum, sezernieren Protonen über Na^+/K^+ -ATPasen, $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ -Kanäle und Na^+/H^+ -Kanäle und setzen Vesikel mit Cathepsin K, TRAP (tartrate resistant acid) und anderen Enzymen frei [1, 4, 28, 29]. Dadurch entsteht ein saures Milieu, in dem sich die Hydroxylapatitkristalle lösen. Das Kollagen wird unter anderem durch Cathepsin K und Matrix-Metalloproteinasen abgebaut. Parathormon stimuliert durch die erhöhte Kalziumkonzentration Osteoblasten M-CSF, RANKL oder IL-6 zu bilden und beeinflusst somit die Knochenresorption [30].

Cathepsin K ist somit ein potenzieller, therapeutischer Angriffspunkt, um Knochenabbau zu hemmen. Auch monoklonale Antikörper gegen RANKL

(Denosumab) werden bereits klinisch bei Osteoporose eingesetzt, um eine übermäßige Osteoklastenaktivität einzuschränken [31].

Auch Zellen des Immunsystems können eine Osteoklastogenese bewirken, indem beispielsweise T-Zellen RANKL sezernieren und somit Osteoklasten aktivieren. Auch B-Zellen könnten einen Einfluss auf Osteoklastenvorläuferzellen haben [32].

Die Apoptose der Osteoklasten wird durch ERK (extracellular-signal-regulated kinase), Akt (serin/threonin kinase) und mTOR (mammalian target of rapamycin) beeinflusst, welche die Apoptosefaktoren BclX (B-cell lymphoma-extra large), Bim (BHs family member) und Mcl-1 (myeloid cell leukaemia sequence 1) bilden [33, 34].

Ist die Apoptose der Zellen gestört, führt dies zu einer erhöhten Osteoklastenaktivität. Dies kann zu verschiedenen Knochenerkrankungen wie beispielsweise dem Morbus Paget führen [35].

1.1.3 Der Knochenumbau

Der Knochenauf- und -abbau ist streng koordiniert. Beim Erwachsenen wird nur dort Knochen aufgebaut, wo zuvor Knochen resorbiert wurde. Durch Signale, die von Osteozyten als Folge von Frakturen oder Mikroschäden stammen können, werden - wie in 1.5 beschrieben - Osteoklasten aktiviert und beginnen die Knochenresorption in sogenannten Howship-Lakunen. Daraufhin werden Osteoblastenvorläuferzellen aktiviert. Sie differenzieren zu Osteoblasten und bilden das Osteoid, welches anschließend noch mineralisiert wird. Darauf folgt dann die Umstrukturierung zum Lamellenknochen [1, 4, 17].

Der Knochenumbauprozess beim Menschen dauert ungefähr 3 bis 4 Monate [4, 17].

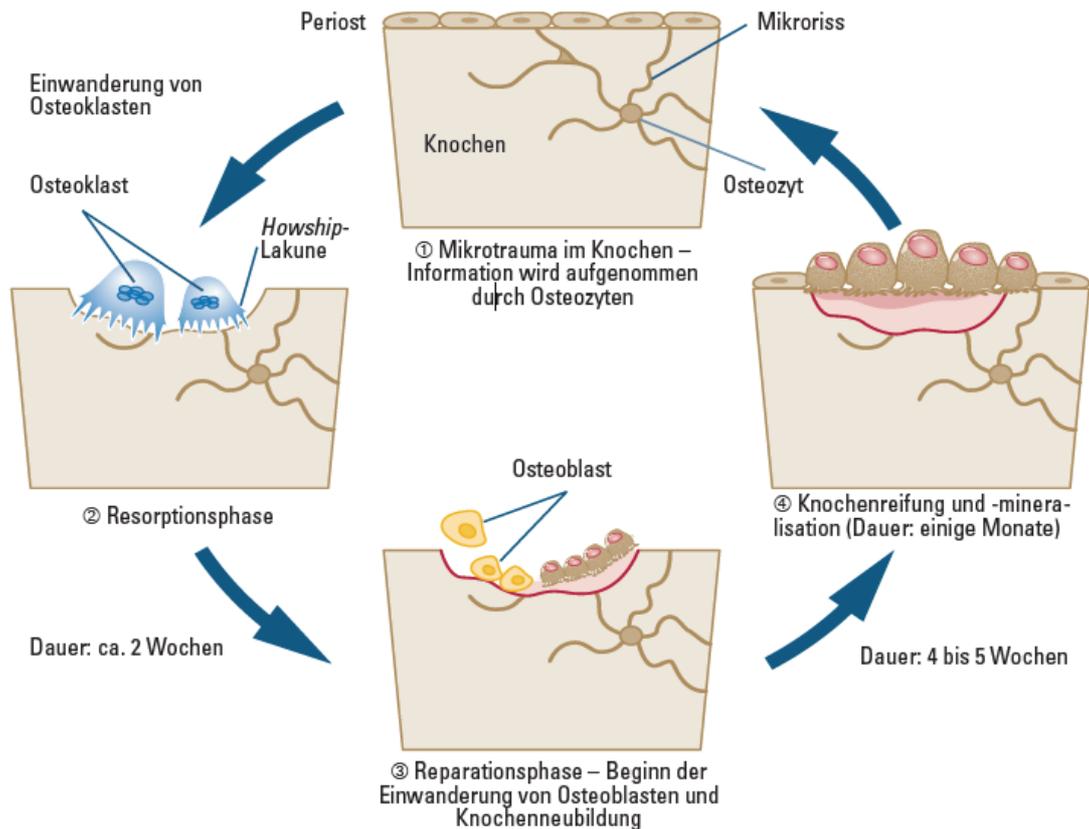


Abb. 4 Der Knochenumbau nach Wirkung eines Reizes auf den Knochen. [36]

Physiologisch sollte somit die zelluläre Aktivität der Osteoblasten und Osteoklasten ein ausgewogenes Verhältnis haben. Bei erniedrigter Osteoklastenaktivität sollten auch die Osteoblasten weniger Knochen aufbauen und bei erhöhter Osteoklastenaktivität die Osteoblasten dementsprechend mehr Knochen bilden. Ist dieses Gleichgewicht gestört, kommt es zu Dysfunktionen wie beispielsweise bei der Osteoporose oder der Osteopetrose [37].

1.1.4 Extrazelluläre Matrix (ECM) des Knochens

Neben Kollagen Typ I bilden auch verschiedene andere Proteine die ECM des Knochens [1].

Im Folgenden sind einige Proteine der ECM aufgelistet [1]:

- Kollagen: Typ I (90%), III, X
- Serumproteine: Albumin, α_2 -HS-Glykoprotein
- Glykosaminoglykane: Aggrecan, Versican, Decorin, Biglycan, Hyaluronan
- Glykoproteine: Alkalische Phosphatase, Osteonectin, Fibronectin, Vitronectin, Fibrillin 1 und 2
- SIBLING (small integrin binding ligand) Proteine: Osteopontin, Bone Sialoprotein
- γ -Carboxyglutaminsäure enthaltende Proteine: Osteocalcin, Protein S, Matrix Gla Protein

Besonders die Rolle des Hyaluronan im Knochen ist bisher weitgehend ungeklärt. Vermutet werden verschiedene Einflüsse auf Osteoblasten, Osteoklasten und Osteozyten [38, 39]

1.2 Struktur, Vorkommen und Funktion von Hyaluronan

Hyaluronan (HA) gehört zu den Glykosaminoglykanen. Dieses Polysaccharid wird aus einer Kette von Disacchariden bestehend aus D-Glucuronsäure und N-Acetyl-D-Glucosamin gebildet. HA ist ein wichtiger Bestandteil des Bindegewebes und Teil der extra- und perizellulären Matrix von allen Geweben der Wirbeltiere [40, 41].

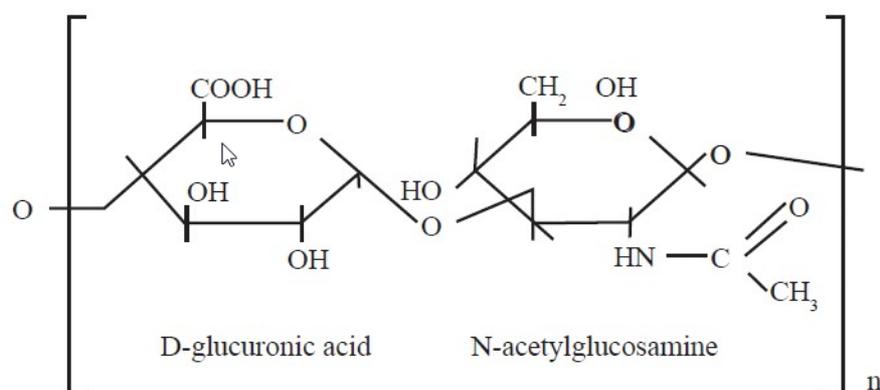


Abb. 5 Die Grundstruktur des Hyaluronans. [42]

Im Unterschied zu anderen Glykosaminoglykanen ist HA nicht sulfatiert und nicht an Kernproteine gebunden. Es wird nicht im Golgi-Apparat, sondern in der Plasmamembran von Synthasen gebildet. Es hat ein sehr hohes Molekulargewicht von 10^5 bis 10^7 Da [40]. Im Körper können die HA-Moleküle bis zu 1×10^7 Da groß sein [43].

Bei Ratten wurde die Hälfte des HA in der Haut, 25% im Skelett, Gelenke und Bänder und das restliche HA in den inneren Organen und in Muskeln gefunden [40]. Beim Menschen ist eine hohe Konzentration an HA in der Nabelschnur, in der Synovialflüssigkeit, in der Haut und im Glaskörper des Auges zu finden. Im Blutserum hingegen ist nur eine geringe Menge von HA vorzufinden [40, 43].

Durch die stark negative Ladung zieht HA positive Ionen an und stellt somit eine osmotische Imbalance her, welche Wasser anzieht. Daher hat HA einen hohen Stellenwert in der Wasserhomöostase. Damit ist auch eine wesentliche Funktion als Schmiermittel in Gelenken zu nennen. Je nach einwirkender Kraft verändert HA seine Viskosität. Bei hoher Krafteinwirkung sinkt die Viskosität, dennoch bleibt durch den chemischen Verbund zum Knorpel des Gelenks ausreichend HA im Gelenkbereich [40, 44] .

HA soll Proteoglykane des Knorpels binden und damit den hydrodynamischen Radius der Proteoglykane erhöhen, was letztlich eine Stabilisierung der Knorpelmatrix bewirkt. HA ist aber nicht nur das Schmiermittel, für das es lange Zeit gehalten wurde. Durch die Interaktion mit verschiedenen Rezeptoren soll HA zudem auch das zelluläre Verhalten wie Zytokinproduktion, Invasion, Zellmotilität, Zelladhäsion und Proliferation, beeinflussen [40, 45] .

Das Molekulargewicht der HA-Moleküle spielt bei den biologischen Funktionen eine wesentliche Rolle . HA von niedrigem Molekulargewicht („Low molecular weight“ HA, LMW-HA, <700 kDa) soll bei Immunreaktionen eine Rolle spielen [46, 47]. HA von hohem Molekulargewicht („High molecular weight“ HA, HMW-HA, $> 10^6$ Da) soll jedoch die Zellproliferation hemmen [48]. Das Molekulargewicht wird entweder von der herstellenden Hyaluronansynthase oder durch Degradation in kleinere Hyaluronanfragmente durch Hyaluronidasen bestimmt.

Weitere wichtige Funktionen des HA sollen bei der embryologischen Entwicklung [49], Angiogenese [50, 51], Wundheilung [52] und Tumorgenese [53] gegeben sein.

Metastasierung, Tumorwachstum und auch die Angiogenese sollen durch HA erhöht sein. Diese Eigenschaften werden im Tissue Engineering genutzt, um Knochenersatzmaterialien herzustellen [54].

1.2.1 Synthese von HA

In Säugern wird HA von den drei Hyaluronansynthasen 1, 2 und 3 (HAS 1, HAS 2 und HAS 3) gebildet. Diese Isoenzyme sind in der Plasmamembran lokalisiert. Nach der Synthese verbleibt das HA entweder im Zellinneren [55] oder wird durch einen noch unbekanntem Mechanismus in die extrazelluläre Matrix transportiert. Es gibt die Hypothese, dass die Hyaluronansynthasen (HASes) selbst Poren in der Plasmamembran bilden oder dass der Transport über den ABC Transporter MRP5 in Fibroblasten [56] oder CFTR in Epithelzellen [57, 58] reguliert wird. Außerdem ist der Transport auch abhängig von K^+ -Kanälen [59].

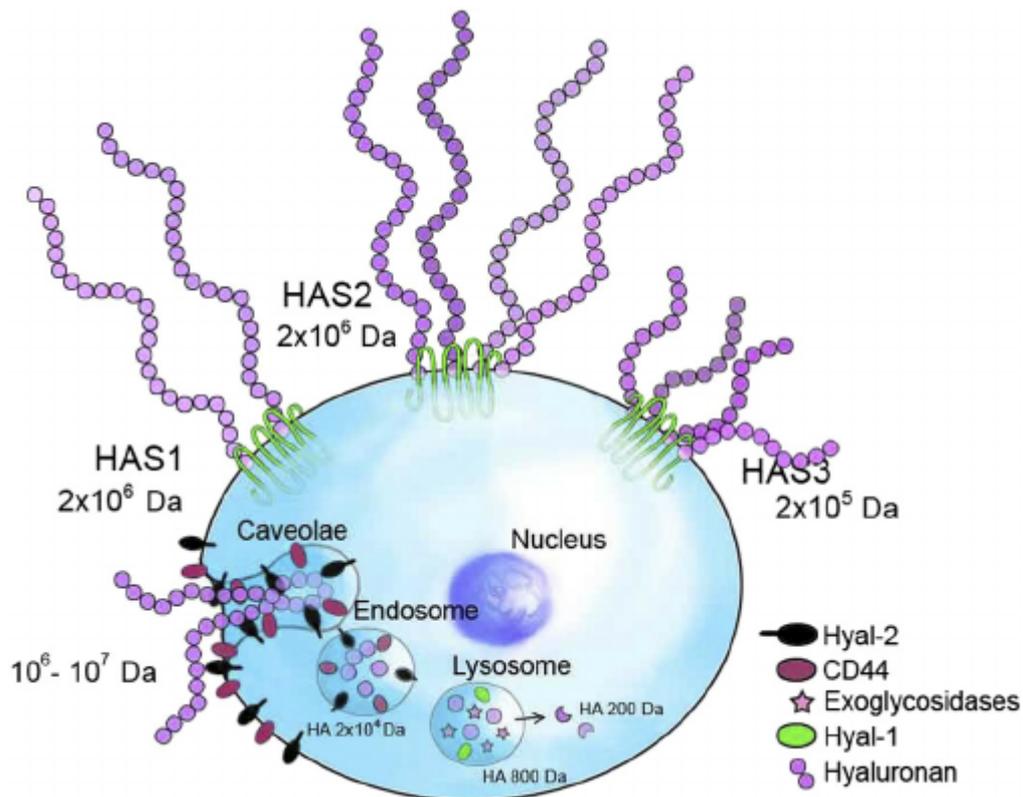


Abb. 6 Die Hyaluronansynthese durch HAS 1, HAS 2 und HAS 3 und Degradation durch Hyaluronidasen in kleinere Fragmente. [60]

Bei Säugetieren produzieren die drei HASes HA mit unterschiedlichem Molekulargewicht. HAS 1 und HAS 2 bilden HA mit einem Molekulargewicht von 2×10^5 bis 2×10^6 Da, HAS 3 hingegen mit einem Molekulargewicht von 1×10^5 - 1×10^6 Da. Je nach Zelltyp kann dies auch variieren [61]. Osteoblasten beispielsweise sollen lediglich HAS 2 und HAS 3 exprimieren [62]. Bei Patienten mit Multiplem Myelom wurde jedoch HAS 1 an humanen mesenchymalen Stammzellen stark exprimiert nachgewiesen [63]. Auch wurde bei COS-1 Zellen und 3Y1 Fibroblasten von Ratten gezeigt, dass der perizelluläre HA Gehalt bei HAS 2 und HAS 3 Transfektanten höher ist als bei HAS 1. Dies könnte zum einen an der geringen Stabilität der HAS 1 Enzyme, zum anderen aber auch an der Syntheserate liegen, da auch nachgewiesen wurde, dass HA, welches von HAS 3 gebildet wurde, *in vivo* und *in vitro* deutlich unterschiedliche Molekulargewichte hat [61]. Mäuse, denen die HAS 2 Gene während der Embryonalentwicklung fehlen, sterben bereits frühzeitig, während ein Fehlen der HAS 1 und HAS 3 Gene keine letalen Folgen mit sich bringt. Aus diesem Grund wird

besonders HAS 2, welches auch am stärksten exprimiert ist, als wichtig bei der Synthese von HA erachtet [64, 65].

Durch Überexpression oder Herunterregulation der jeweiligen HAS können somit unterschiedliche Effekte auf Zellen erreicht werden. Studien zeigen, dass Zellen wahrscheinlich die jeweilige HAS und somit die Funktion des produzierten HA kontrollieren können. Demzufolge kann diese kontrollierte HA Synthese im „Tissue engineering“ ausgenutzt werden [61].

Die genauen Mechanismen zur Regulation der HAS insbesondere in Bezug auf den Knochenremodellingprozess sind bisher nicht bekannt. Zudem werden auch Effekte von Wachstumsfaktoren auf die HASes vermutet [66].

1.2.2 HA Rezeptoren

Derzeit sind fünf Oberflächenrezeptoren, an die Hyaluronan binden kann, bekannt. Zu diesen gehören der CD44, RHAMM (CD168), HARE, LYVE1 und die Toll-like-Rezeptoren. Durch die Bindung von HA an verschiedene Oberflächenrezeptoren spielt HA eine entscheidende Rolle in der Organisation der perizellulären Matrix.

Im Knochen wird der Hauptrezeptor CD44 hauptsächlich in Osteoklasten und Osteozyten und weniger an Osteoblasten und Vorläuferzellen exprimiert [67]. Die Interaktion von HA mit dem CD44-Rezeptor beeinträchtigt die Osteoblasten-gesteuerte-Osteoklastogenese [68] und soll sowohl in der Kommunikation von Osteozyten untereinander als auch in der Kommunikation von Osteozyten mit Osteoklasten eine Rolle spielen [69]. Vermutet wird, dass durch die Interaktion des HA mit dem CD44-Rezeptor ein Stoppsignal an die knochenabbauenden Zellen gegeben wird [67, 70, 71].

Die Hyaluronanmenge im Gewebe kann durch den LYVE1-Rezeptor (Lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1) verändert werden, indem die Hyaluronanresorption vom Gewebe in das Lymphsystem gesteuert wird [72, 73]. Zudem soll durch Komplexbildung mit Wachstumsfaktoren und Prostaglandinen eine

Regulation der interzellulären Adhäsion und der Lymphangiogenese, welche bei der Tumorprogression eine entscheidende Rolle spielt, erfolgen [72, 74, 75].

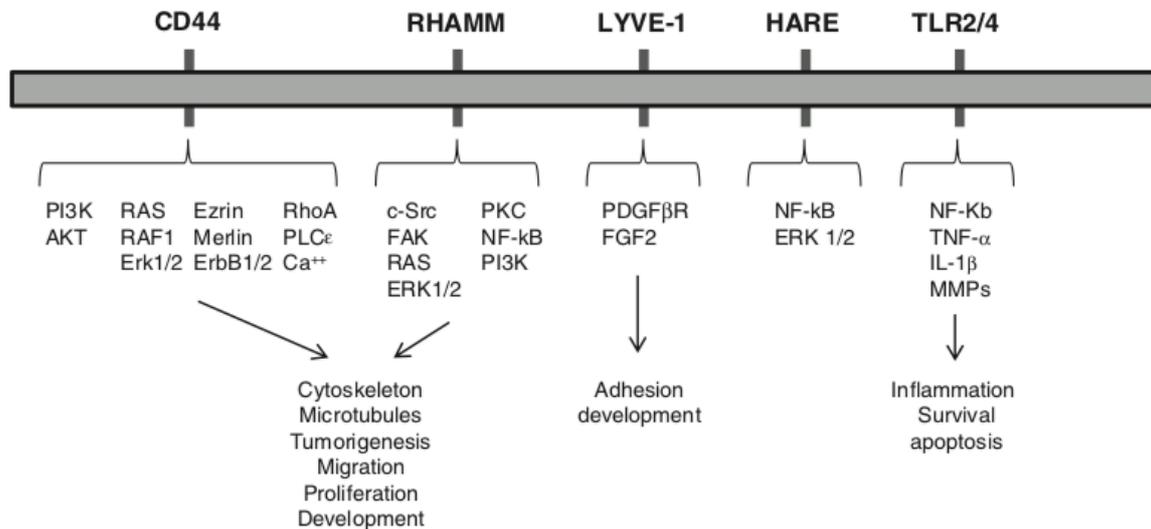


Abb. 7 Schematische Darstellung der Signalkaskade der Hyaluronanrezeptoren und dessen Einfluss auf die Zellfunktionen. [72]

1.2.3 Degradation des HA

Der Großteil des HA wird durch Endozytose in den Lymphknoten oder in der Leber durch den Rezeptor HARE (Hyaluronan receptor for endocytosis) entfernt [76]. Rezeptoren wie CD44, LYVE-1, RHAMM oder Layilin [75, 77-80] spielen hierbei besonders im Knochen und im Knorpel eine wichtige Rolle, da das HA hier nicht mobil ist und die Lymphorgane nicht erreichen kann. Nach der Endozytose wird Hyaluronan enzymatisch durch Hyaluronidasen, β -D-Glucuronidase und β -N-Acetyl-Hexosaminidase in den Lysosomen abgebaut. Hyaluronidase spaltet HA mit hohem Molekulargewicht in kleinere Oligosaccharide, während die β -D-Glucuronidase und β -N-Acetyl-Hexosaminidase die kleinen Oligosaccharidfragmente weiter degradieren [81].

Kleine HA-Fragmente (bis 25 kDa) sollen einen positiven Einfluss auf die Angiogenese haben, während Fragmente größer als 25 kDa diese nicht signifikant beeinflussen [48]. Durch Variation der Kettenlänge kann somit die Funktion des HA moduliert werden. Bis dato gibt es aber wenig Evidenz, dass diese kleinen Fragmente im Körper tatsächlich aufzufinden sind [43].

1.3 HA im Knochen

Die Rolle von HA im Knochen ist weitgehend ungeklärt, obwohl HA ein Bestandteil der extrazellulären Knochenmatrix ist. Es wird angenommen, dass HA einen Einfluss auf den Knochenmetabolismus hat. HA könnte die Knochenresorption durch Osteoklasten beeinflussen [39]. Auch könnte das Molekulargewicht des HA einen Einfluss auf den Effekt von HA haben. Durch Kommunikation zwischen RANK und RANKL ist in einer Maus-Monozyten-Zelllinie die Knochenresorption induziert worden [82]. Einige Studien besagen, dass ein Zusammenhang zwischen HA Synthese und Knochenabbau besteht [83]. Andere Studien wiederum deuten darauf hin, dass HA die Osteoklastenfunktion hemmt [84-86]. Exogenes HA soll die RANKL-induzierte Knochenresorption durch den Toll-like receptor 4 reduzieren [87].

Osteoblasten sollen durch HA stimuliert werden, auch soll die Knochenbildung abhängig von Molekulargewicht und Konzentration des Hyaluronans moduliert werden [88, 89]. Widersprüchlich ist jedoch eine andere Studie, die aufzeigt, dass die Knochenbildung bei der Distraktionsosteogenese durch HA nicht angeregt wird [90].

Eine Studie mit Osteoblasten aus der Schädelkalotte von Ratten, konnte bereits zeigen, dass die Zellproliferation unter Hyaluronaneinfluss signifikant erhöht wird. Die alkalische Phosphataseaktivität und Mineralisation ist hingegen nur bei hochmolekularem Hyaluronan erhöht [91]. Es wird vermutet, dass sowohl das Molekulargewicht als auch die Konzentration einen Einfluss auf die Effekte von Hyaluronan haben [91].

Es wurde auch gezeigt, dass HA die Kommunikation zwischen Osteoklasten und Osteoblasten beeinflusst, indem die Reaktionen von Osteoklasten auf das Parathormon reguliert werden. Da das Parathormon die Knochenresorption anregen

kann, wird angenommen, dass HA unter anderem den Knochenstoffwechsel moduliert [92].

Es konnte bereits mehrfach gezeigt werden, dass Änderungen im HA Gehalt, in der HA Synthese oder in der Freisetzung von HA einen Einfluss auf den Knochenstoffwechsel haben. Beispielsweise wurde im Knochen von Patienten mit Osteogenesis imperfecta ein um das Dreifache erhöhter HA Gehalt aufgezeigt [11]. Bei Patienten mit multiplem Myelom wurde eine erhöhte HAS 1 Expression und eine erniedrigte HAS 2 Expression entdeckt [63]. Auch bei Osteoporose soll der HA Rezeptor HMMR in humanen mesenchymalen Stammzellen weniger exprimiert sein als in hMSCs aus gesunden Patienten [93].

Unter hypoxischen Bedingungen wie beispielweise nach einer Fraktur wird die Aktivität der Hyaluronidasen erhöht, sodass wahrscheinlich HA als Reaktion auf die Hypoxie in kleinere Fragmente, die die Angiogenese fördern, geteilt wird [94].

Vermutet wird auch eine Funktion von HA in der Regulierung der Mineralisation [95], im longitudinalen Knochenwachstum, in der Gelenkbildung und in der Entwicklung von Gliedmaßen [43].

Eine aktuelle Studie zeigt, dass HA für die Entwicklung des Hartgaumens und der Mandibula eine maßgebliche Rolle einnimmt und bei Fehlregulationen zu Anomalien wie Gaumenspalten und mandibulärer Hypoplasie beitragen kann [96].

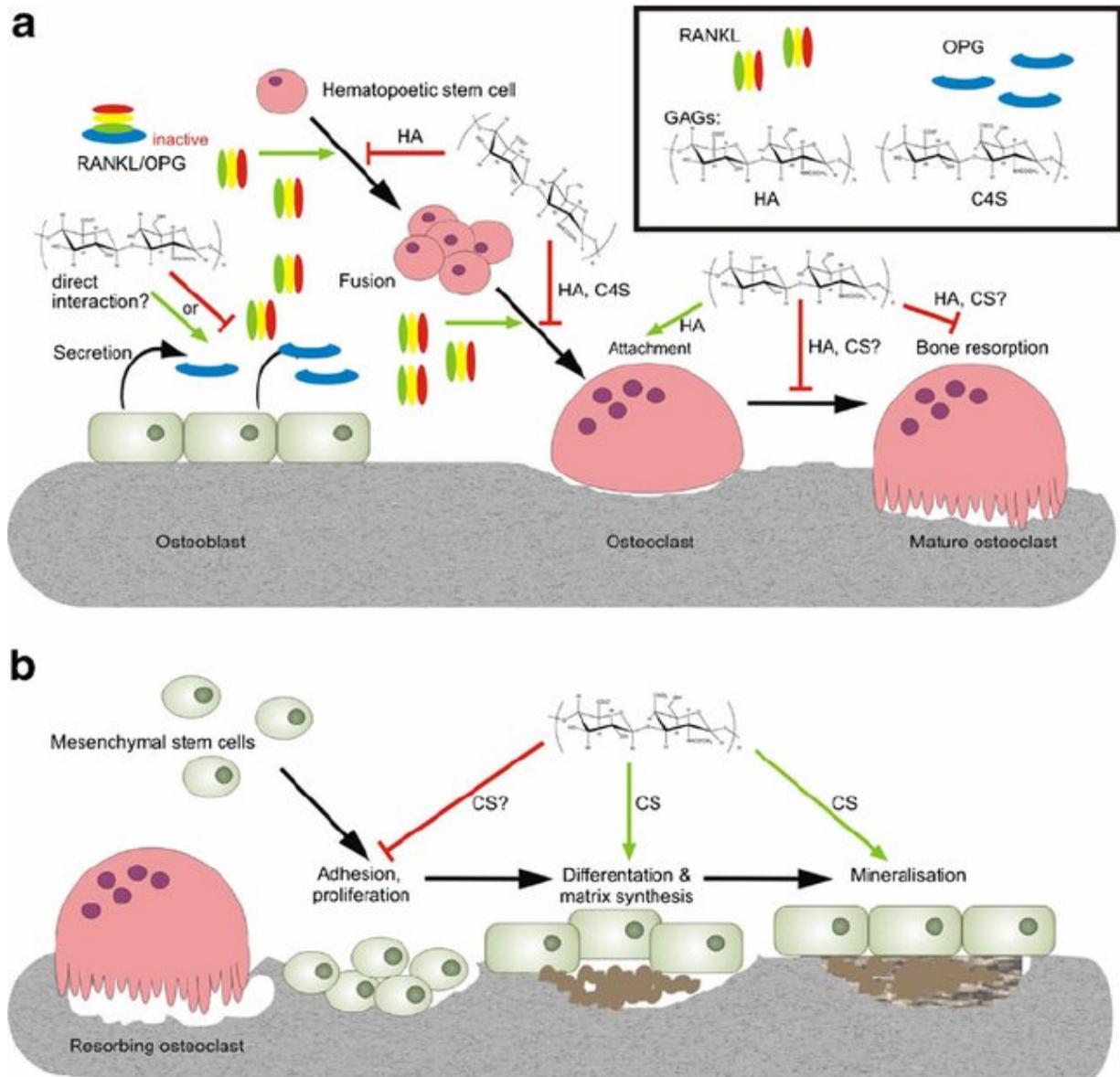


Abb. 8 Glykosaminoglykane im Knochen [38]. Glykosaminoglykane (GAGs) modulieren die Differenzierung und Funktion von Osteoklasten und Osteoblasten . a) Knochenabbau b) Knochenaufbau. Quelle: Salbach-Hirsch et al. (2011)

1.4 Klinische Anwendung von HA

Hyaluronan wird bereits seit Jahren klinisch angewendet. Exogen zugeführtes HA entstammt meist aus Bakterienkulturen, in denen das Molekulargewicht einfach verändert werden kann [97].

Hyaluronan mit hohem Molekulargewicht wird beispielsweise intraartikulär injiziert. Dies soll verhindern, dass eine Arthrose entsteht und auch Chondrozyten werden durch HA zur Proliferation stimuliert, sodass der Knorpelabbau dadurch reduziert wird [98-100]. *In vitro* wird bei Osteoarthritis eine knorpelschützende Funktion des Hyaluronan beschrieben [101].

Im Tissue engineering kann HA sowohl exogen als auch endogen durch Überexpression der HA Synthasen (HAS) angewendet werden. Exogen zugeführtes HA soll eine geringer stimulierende Wirkung durch eingeschränkte Stabilität und fehlende Stimuli als endogenes HA haben. HA ist leicht löslich bei Raumtemperatur und hat eine geringe Halbwertszeit, weshalb durch Vernetzung mit Kollagen eine frühzeitige Degradation verhindert und eine Langzeitstabilität gewährleistet wird. Dies wird bereits in der Orthopädie, Dermatologie, u.v.m. angewendet [44].

Auch die Anreicherung von Scaffolds mit HA ist sehr erfolgreich im Bereich des Tissue engineering. Jedoch soll endogen produziertes HA weitere Vorteile, die bei exogen zugeführtem HA nicht gegeben sind, beispielsweise die Bildung von HA-Schichten, mit sich bringen [44].

1.5 Zielsetzung

Hyaluronan ist ein Bestandteil der extrazellulären Matrix im Knochen und zeigt klinische Relevanz in unterschiedlichen Knochenerkrankungen. Es kommt in verschiedenen Molekulargewichten vor, kann exogen unter anderem im Rahmen des Tissue engineering angewendet werden oder aber auch endogen durch transgene Hyaluronansynthasen kann Hyaluronan unterschiedlicher Kettenlänge synthetisiert werden. Obwohl in der Literatur ein Einfluss von HA auf Knochenzellen impliziert wird, ist seine exakte Funktion in der Knochenregeneration bisher weitgehend ungeklärt.

Das Ziel dieser Arbeit ist es, den Einfluss von exogenem Hyaluronan unterschiedlicher Größe auf humane Osteoblasten und humane Osteoklasten zu untersuchen. Hyaluronan soll entweder in gelöster Form oder durch Beschichtung der verwendeten Zellkulturplatten den Zellen zugeführt werden. Außerdem soll der Einfluss von HAS-überexprimierenden hMSCs auf das Verhalten von humanen Osteoblasten untersucht werden.

Nach Behandlung mit Hyaluronan soll die Viabilität, die Mineralisierungskapazität und die Adhäsion von humanen Osteoblasten analysiert werden.

Humane Osteoklastenvorläuferzellen werden aus peripherem, venösem Blut isoliert. Danach soll die Anheftung mittels Timelapse-Mikroskopie und die Osteoklastogenese mittels TRAP-Färbung (tartrate resistant acid phosphatase) unter Hyaluronaneinfluss untersucht werden.

Unterschiede im Verhalten der Zellen unter Einfluss von Hyaluronan unterschiedlichen Molekulargewichtes und im Vergleich ohne Hyaluronan sollen die Funktion dieses Glykosaminoglykans im Knochen verdeutlichen. Letztlich kann die Studie dazu beitragen, dass die Hintergründe zum Einfluss des Hyaluronangehalts bzw. der Expression der Hyaluronansynthasen auf verschiedene Knochenerkrankungen besser nachvollzogen werden und mögliche Therapieansätze entwickelt werden können.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Bezeichnung	Bezugsquelle
Aquadest.	Thermo Fischer Scientific, Schwerte
L-Ascorbinsäure-2-Phosphat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Alizarin Red S	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ammoniaklösung (30 %)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
β -Glycerophosphat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dexamethason	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Fluoroshield™	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypan Blue Stain 0,4%	Invitrogen, Darmstadt
Bovines Serumalbumin (BSA)	Ruth, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
D-PBS	PAA, Pasching, Österreich
EDTA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Fetales Kälberserum (FBS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Material und Methoden

Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
NaCl	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Penicillin-Streptomycin-Lösung	PAA, Pasching, Österreich
Trypsin-EDTA (10fach)	PAA, Pasching, Österreich
D-MEM high-glucose	PAA, Pasching, Österreich
alpha MEM high-glucose	Life Technologies, Darmstadt
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DAPI	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Hyaluronan (high molecular weight)	R&D Systems, Minneapolis
Hyaluronan (low molecular weight)	R&D Systems, Minneapolis
Hyaluronan (ultra-low molecular weight)	R&D Systems, Minneapolis
Human M-CSF	Peprtech, Hamburg
Human sRANK-Ligand	Peprtech, Hamburg
BODIPY 581/591 SE	Thermo Fischer Scientific, Schwerte
Stem Pro Accutase	Thermo Fischer Scientific, Schwerte
TRIzol Reagent	Thermo Fischer Scientific, Schwerte
Zeocin	Invitrogen, Darmstadt
Histopaque	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Napthol AS-MX Phosphat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Fast Red Violet

Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Natriumacetat- Trihydrat

Merck, Darmstadt

2.1.2 Medien

2.1.2.1 Medium für Osteoblasten

15% FBS

1% Penicillin/Streptomycin

100 μ M L-Ascorbinsäure

in D-MEM high glucose

oder

10% FBS

1% Penicillin/Streptomycin

in α -MEM high glucose

2.1.2.2 Medium mit osteogenen Zusätzen

10 mM β -Glycerophosphat

100 nM Dexamethason

150 μ M L-Ascorbinsäure

15 % FBS

1 % Penicillin/Streptomycin

in D-MEM high glucose

2.1.2.3 Medium für Osteoklasten

15% FBS

1% Penicillin/Streptomycin

50 ng/ml M-CSF

100 ng/ml RANKL

in D-MEM high glucose

2.1.2.4 Medium für SCP1

10% FBS

1% Penicillin/Streptomycin

0,1 mg/ml Zeocin

in α -MEM high glucose

2.1.2.5 Einfriermedium

10% DMSO

10% FBS

80% α -MEM high glucose

2.1.3 Zellkulturmaterialien

Bezeichnung	Bezugsquelle
μ -Slide 8 Well ibiTreat	Ibidi, Gräfelfing
Quadriperm	Sarstedt, Nümbrecht
6 Well Zellkulturplatten	Nunc, Wiesbaden
Eppendorf Reaktionsgefäße	Thermo Fischer Scientific, Schwerte
25, 75, 150, 225 cm ² Zellkulturflaschen	Nunc, Wiesbaden
6 Well Zellkulturplatten	Sarstedt, Nümbrecht
24 Well Zellkulturplatten	Greiner Bio One, Neuburg
Rundboden-Polystyrolröhrchen	Thermo Fischer Scientific, Schwerte

2.1.4 Zellen

HOB-Zellen (PromoCell, Heidelberg):

Primäre humane Osteoblasten wurden vom Femur in der Knieregion oder in der Hüftgelenksregion isoliert.

HOC-Zellen:

Primäre Osteoklasten Vorläuferzellen wurden aus humanem peripherem venösem Blut isoliert (s. 2.2.1.6).

SCP1-HAS1-eGFP, SCP1-HAS2-eGFP, SCP1-HAS3-eGFP (Eva Hofbauer, ExperiMed, München):

Es wurden immortalisierte hMSC-Zellen (auch SCP1-Zellen genannt) über lentiviralen Gentransfer mit HAS1-eGFP, HAS2-eGFP, HAS3-eGFP transduziert. Die transgenen Enzyme werden konstitutiv unter Kontrolle eines CMV-Promoters exprimiert [102].

SCP1-mock (Eva Hofbauer, ExperiMed, München):

Immortalisierte hMSC-Zellen wurden mit einem Leervektor transduziert und dienen als Negativkontrolle für die mit HAS-eGFP transduzierten SCP1-Zellen.

2.1.5 Färbelösungen

2.1.5.1 40 mM Alizarin Red S Färbelösung

685 mg Alizarin Red S (Sigma-Aldrich) wurde in 50 ml deionisiertem Wasser gelöst. Der pH-Wert wurde mit 0,5 %iger Ammoniumhydroxidlösung auf 4,1 eingestellt. Anschließend wurde die Färbelösung zur Entfernung der Präzipitate filtriert.

2.1.5.2 TRAP Farbstoff

TRAP-Puffer:

0,2 M Na-Acetat und 0,3 M Na-Tartrat wurden in 300 ml Aqua dest. gelöst, 0,2 M Essigsäure wurde hinzugefügt und anschließend das Volumen auf 500 ml mit Aqua dest. gebracht.

5 mg Naphtol-AX-Phosphat und 15 mg Fast Red Violett (Sigma-Aldrich) wurden zu 50 ml vorgewärmter TRAP-Pufferlösung gegeben und vermischt.

2.1.5.3 DAPI Färbelösung

Der DAPI Farbstoff (Sigma-Aldrich) wurde im Verhältnis 1:10.000 mit PBS verdünnt.

2.1.6 Kits

Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric) Roche, Mannheim

CyQuant NF Cell Proliferation Assay Kit Life Technologies, Oregon

Cell Proliferation Reagent WST-1 Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Calcium Assay Kit (colorimetric) Abcam, UK

EasySep Direct Human Monocyte Isolation Kit StemCell Technologies, Canada

Hyaluronan Quantikine ELISA Kit R&D Systems, Minneapolis

Alkaline Phosphatase Activity Assay, 96 Well Cell Biolabs, San Diego

Micro BCA Protein Assay Kit Thermo Fisher Scientific, Massachusetts

2.1.7 Utensilien zur Blutabnahme

S-Monovette 4,5ml LH Sarstedt, Nümbrecht

S-Monovette 4,9 ml K3E Sarstedt, Nümbrecht

Safety-Multifly 21G 200 mm lang Sarstedt, Nümbrecht

2.1.8 Geräte

Wasserbad	GFL, Burgwedel
Time-lapse	Mikroskop Axiovert S100, Zeiss, Germany Incubator XL100/135 PeCon, Germany
Durchlichtmikroskop	Leica M165 FC, Leica, Germany
Fluoreszenz Mikroskop	Axio Observer Z1, Zeiss, Germany
Zellkultur Mikroskop, Typ Diavert	Leitz, Wetzlar
UV Leuchttisch	Vilber Lourmat, Eberhardzell
Pipetboy	Hirschmann, Eberstadt
Zentrifuge_Labor	Centrifuge 5415 D, Eppendorf, Germany
Zentrifuge_Zellkultur	Universal 16R, Hettich, Germany
pH Meter	WTW Inolab, Weilheim
Neubauer Zählkammer	Brand, Wertheim
Mischer Vortex-Genie 2	Scientific Industries, New York, USA
Mikropipetten, Pipetman classic	Glison, Middleton, USA
Magnetrührer	Axon, Kaiserslautern
Feinwaage, Typ 770	Kern, Balingen
Dampfsterilisator	H+P Labortechnik, Oberschleißheim

Brutschrank für Zellkultur Thermo Scientific, Schwerte

Multiskan FC (ELISA Reader) Thermo Scientific, Schwerte

2.1.9 Software

Adobe Photoshop CS6 (Version 13.0) Zur Bildbearbeitung

Adobe Illustrator CS6 (Version 16.0) zur Bildbearbeitung

ImageJ (Version 2.0) Zur Bildbearbeitung

Microsoft Word Version 14.0.7190.5000 (32bit),

Microsoft Office Professional Plus 2010 Microsoft Corporation, USA

Microsoft Excel Version 14.0.7190.5000 (32bit),

Microsoft Corporation, USA

Graph Pad Prism 8 Zur ELISA-Auswertung, Statistik

AxioVision (Version 4.8.1) Zur Time-lapse Mikroskopie

ZEN lite 2012 Zur Bildaufnahme und Bildbearbeitung

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Auftauen von Zellen

Nachdem die Zellen aus dem Stickstofftank entnommen wurden und auf Trockeneis gestellt wurden, wurden sie in einem Wasserbad bei 37°C aufgetaut. In der Sterilbank wurden die aufgetauten Zellen (1 ml) in ein zuvor mit 10 ml Medium befülltes Falcon pipettiert. Um die Zellen DMSO-frei zu kultivieren, wurde das Falcon mit den Zellen zentrifugiert. Die humanen Osteoblasten wurden bei 220×g für 3 Minuten und die SCP1-HAS1-eGFP, SCP1-HAS2-eGFP, SCP1-HAS3-eGFP und SCP1-mock-eGFP bei 500×g für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand mit dem DMSO-haltigen Medium wurde abgenommen und frisches Medium wurde auf das Zellpellet pipettiert. Die humanen Osteoblasten wurden mit 10 ml Medium in eine T75-Zellkulturflasche und die SCP1-Zellen mit 30 ml Medium in eine T225-Zellkulturflasche überführt. Die Zellen wurden bei 37°C mit 5% CO₂ im Inkubator kultiviert.

2.2.1.2 Kultivieren der Zellen

Die humanen Osteoblasten wurden entweder in α -MEM high glucose mit 10% FBS und 1% Penicillin/Streptomycin oder in D-MEM high glucose mit 15% FBS, 1% Pencillin/Streptomycin und 100 μ M L-Ascorbinsäure kultiviert.

Die SCP1-HAS1-eGFP, SCP1-HAS2-eGFP, SCP1-HAS3-eGFP und SCP1-mock-eGFP wurden in α -MEM high glucose mit 10% FBS, 1% Penicillin/Streptomycin und 0,1 mg/ml Zeocin kultiviert.

Alle Zellen wurden in einem Zellkultur-Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ Atmosphäre kultiviert. Der Medienwechsel erfolgte zwei Mal wöchentlich. Bei einer Konfluenz von ungefähr 90% wurden die Zellen passagiert.

2.2.1.3 Passagieren von Zellen

Das Kulturmedium wurde abgenommen und die Zellen mit D-PBS gewaschen. Die humanen Osteoblasten wurden mit 5x Trypsin, SCP1 mit 1x Trypsin vom Boden der Zellkulturflasche gelöst. Hierzu wurde nach Zugabe des Trypsins die Zellkulturflasche für 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Sobald die abgelösten Zellen unter dem Mikroskop sichtbar waren, wurde die doppelte Menge (bezogen auf das Volumen des Trypsins) an FBS-haltigem Zellkulturmedium hinzugegeben, um die Reaktion des Trypsins zu stoppen. Die abgelösten Zellen wurden mit dem trypsinhaltigen Medium in ein Falcon überführt, gezählt und dann zentrifugiert.

Die Osteoblasten wurden bei 220×g für drei Minuten und die SCP1-Zellen bei 500×g für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, frisches Kulturmedium wurde hinzugefügt und die Zellen wurden entweder weiterkultiviert oder eingefroren.

2.2.1.4 Zählen von Zellen

Die Zellen wurden mit einer Neubauer Zellzählkammer gezählt. Die Zellen in vier Quadranten wurden ausgezählt und die Zellzahl wurde mit folgender Formel berechnet.

Formel: $\frac{\text{ausgezählte Zellzahl in den 4 Quadranten}}{4} \cdot 10^4 \times F = \text{Zellzahl pro ml}$

(F= Verdünnungsfaktor)

2.2.1.5 Einfrieren von Zellen

Die Zellen wurden passagiert und gezählt. Pro Cryo-Vial wurden 1×10^6 Zellen eingefroren. Das erforderliche Volumen an Zellsuspension wurde zentrifugiert und in Einfriermedium resuspendiert. Es wurde 1 ml pro Cryo-Vial pipettiert, die Cryo-vials wurde auf Trockeneis gestellt, bis die Zellen in den Stickstofftank transferiert wurden.

2.2.1.6 Isolierung von humanen Osteoklastenvorläuferzellen

Zur Isolierung von humanen Osteoklastenvorläuferzellen aus humanem, peripherem Blut wurden zwei Methoden angewandt: die Aufreinigung mittels dem kommerziellen EasySep Direct Human Monocyte Isolation Kit (Stemcell Technologies) bzw. mittels Dichtezentrifugation unter Verwendung von Histopaque-Lösung (Sigma-Aldrich). Für beide Methoden wurde humanes Blut in EDTA-Monovetten abgenommen. Die Isolierung erfolgte unter einer Sterilbank.

Die Isolierung mittels EasySep Direct Human Monocyte Isolation Kit (Stemcell Technologies) wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Es wurde eine 1 mM EDTA-Lösung hergestellt. 1 ml Blut wurde in ein Polystyrene-Röhrchen übergeführt, 50 μ l Blut Isolation Cocktail und 50 μ l Rapid Spheres wurden hinzugegeben. Dies wurde für fünf Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Danach wurde 4 ml EDTA (1 mM) hinzugemischt und das Polystyrene Röhrchen für 3 Minuten in das EasySep Magnet™ (Stemcell Technologies) gestellt. In dem Magneten werden alle an die magnetischen Partikel gebundenen Blutzellen außer CD14+ Monozyten, die zu Osteoklasten differenziert werden können, angezogen, weshalb nach 3 Minuten der Inhalt vorsichtig in ein neues Polystyrene Röhrchen überführt wurde. Erneut wurden 50 μ l Rapid Spheres hinzugefügt, erst für fünf Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen und folglich für drei Minuten in den Magneten gestellt. Der Inhalt wurde in ein neues Polystyrene Röhrchen überführt, welches wieder für drei Minuten in den Magneten gestellt wurde. Nach diesem letzten Aufreinigungsschritt wurde der Inhalt in ein Falcon überführt, bei 500 \times g für fünf

Minuten zentrifugiert und das Zellpellet mit den isolierten Osteoklastenvorläuferzellen wurde in Kulturmedium resuspendiert.

Die zweite Methode zur Isolierung der Zellen ohne Kit erfolgte mit einer Histopaque-Lösung (Sigma-Aldrich). Zwei Falcons wurden mit je 5 ml Histopaque -Lösung befüllt und nachdem die Lösung bis auf Raumtemperatur erwärmt wurde, wurde vorsichtig 5 ml Blut auf das Histopaque so pipettiert, dass es eine Schicht oberhalb des Histopaque gebildet hat. Diese Lösung wurde für 30 Minuten bei 400×g ohne Bremse zentrifugiert. Die weißliche mittlere Schicht mit den Osteoklastenvorläuferzellen wurde in ein neues Falcon übertragen und in D-MEM resuspendiert. Die Zellsuspension wurde bei 250×g für 10 Minuten zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes erfolgt die Zugabe von Kulturmedium.

Das verwendete Nährmedium für Osteoklasten bestand aus D-MEM high glucose mit 15% FBS, 1% Penicillin/Streptomycin, 50 ng/ml M-CSF und 100 ng/ml RANKL. Der erste Medienwechsel wurde zwei Tage nach der Isolierung durchgeführt. Danach wurde das Medium zweimal wöchentlich gewechselt und die Kultivierung erfolgte in einem Inkubator bei 37°C und 5 % CO₂ Atmosphäre.

Osteoklastenvorläuferzellen und Osteoklasten wurden nicht subkultiviert.

Die Blutspenden erfolgten von mir.

2.2.2 Beschichtung der Zellkulturplatten mit Hyaluronan

Um den Einfluss von exogenem Hyaluronan auf humane Osteoblasten und Osteoklasten zu analysieren, wurden die Wellplatten, welche für die Durchführung der Versuche verwendet wurden, mit Hyaluronan beschichtet.

Es wurde Hyaluronan mit hohem Molekulargewicht (1350 kDa), niedrigem Molekulargewicht (20 kDa) und sehr niedrigem Molekulargewicht (4,8 kDa) von R&D Systems verwendet, welches wie auch im menschlichen Körper nicht sulfatiert ist. Eine Konzentration von 2,5 mg/ml wurde mit Aqua dest. eingestellt und das gelöste Hyaluronan wurde aliquotiert bei -20°C aufbewahrt.

Kurz vor dem Verwenden wurde das benötigte Volumen in einem Wasserbad (37°C) aufgetaut und zur Beschichtung auf die Wellplatten aufgetragen. Die Wellplatten wurden daraufhin für mindestens 16 Stunden bei 4°C inkubiert. Danach wurde das Hyaluronan abgenommen, die Wells mit D-PBS zwei Mal gewaschen und anschließend wurde bis zum Aussäen der Zellen die Wellplatte bei 37°C und 5% CO₂ Atmosphäre inkubiert.

Volumen an Hyaluronan für die jeweiligen Wellplatten:

96-Wellplatte	0,1 mg/0,32 cm ²	40 µl/Well
24-Wellplatte	0,5 mg/1,9 cm ²	200 µl/Well
6-Wellplatte	2,5 mg/ 9,5 cm ²	1 ml/Well
Ibidi 8-Well Slides	0,375/ cm ²	150 µl/Well

Für alle Versuche mit exogenem Hyaluronan wurde Hyaluronan einer Konzentration von 2,5 mg/ml in den oben angeführten Molekulargewichten verwendet.

2.2.3 Proliferation und metabolische Aktivität der Osteoblasten

Welchen Einfluss exogenes Hyaluronan unterschiedlichen Molekulargewichtes bei einer Konzentration von 2,5 mg/ml auf die Proliferation und metabolische Aktivität von humanen Osteoblasten hat, wurde mit dem WST-1-Assay, BrdU ELISA Assay und mit dem CyQUANT Assay untersucht. Es wurden Osteoblasten der Passage 2 bis 4 verwendet, welche in α -MEM high glucose (mit 10% FBS und 1% Penicillin/Streptomycin) kultiviert wurden. Zur Untersuchung des Einflusses von endogenem Hyaluronan, gebildet von den HAS 1, 2 und 3, wurde mit dem Zellkulturüberstand der SCP1-HAS1-eGFP, SCP1- HAS2- eGFP, SCP1- HAS3-eGFP und SCP1- mock- eGFP Zelllinien der BrdU ELISA Assay durchgeführt.

2.2.3.1 WST-1-Assay

Zum Nachweis der metabolischen Aktivität wurde eine mit Hyaluronan beschichtete 96-Wellplatte verwendet. Am nächsten Tag wurden humane Osteoblasten in einer Dichte von $0,6 \times 10^4$ Zellen pro Well ausgesät. Der Versuch wurde mit jedem Molekulargewicht des HA in Triplets durchgeführt. Als Kontrolle wurden Osteoblasten auf nicht beschichteten Wells in Triplet in gleicher Weise kultiviert. Nach 48-stündiger Inkubation bei 37°C wurde das Medium abgesaugt und das WST-1 Medium bestehend aus α -MEM high glucose und WST- Reagenz (10:1) hinzugefügt (150 μ l pro Well). Die Wellplatte wurde 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Danach wurde jeweils 100 μ l Suspension in eine neue 96-Wellplatte blasenfrei überführt und es folgte die Messung mit einem ELISA Reader bei 450 nm und 620 nm.

2.2.3.2 BrdU ELISA Assay mit exogenem HA

Auf eine mit Hyaluronan beschichtete 96-Wellplatte wurden humane Osteoblasten mit einer Dichte von $0,6 \times 10^4$ Zellen pro Well ausgesät. Für jedes Molekulargewicht des Hyaluronan wurde ein Triplet angelegt. Als Kontrolle diente ein Triplet mit nicht beschichteten Wells. Als Leerwert wurde 100 μ l Medium pro Well ohne Zellen verteilt. Nach 36-stündiger Inkubation wurde 10 μ l BrdU labeling solution pro Well hinzugefügt und anschließend wurde die Wellplatte für 16 Stunden bei 37°C inkubiert.

Die Zellen wurden fixiert, mit einer Anti-BrdU-Lösung für 90 Minuten inkubiert, gewaschen und mit dem Substrat Tetramethylbenzidin inkubiert. Die Reaktion wurde mit 0,5 M H_2SO_4 gestoppt und abschließend wurden die Absorptionen bei 450 nm und 690 nm mithilfe eines ELISA-Readers gemessen. Die gemessenen Werte korrelieren mit der Anzahl proliferierender Zellen und der Menge an DNA Synthese.

2.2.3.3 BrdU ELISA Assay mit endogenem HA

Zum Vergleich wurde dieses Experiment auch mit HA, welches von den SCP1-HAS1-eGFP, SCP-1-HAS2-eGFP, SCP1-HAS3-eGFP und SCP1-mock-eGFP produziert

wurde, durchgeführt. 48 Stunden vor Abnahme des Zellkulturüberstandes wurde das Zellkulturmedium (s. 2.2.1.2) abgenommen und frisches Medium mit 22 mg/ml N-Acetylglucosamin auf die Zellen gegeben. Nach zwei Tagen wurde der Zellkulturüberstand abgenommen und bei -20°C aufbewahrt.

Die Hyaluronanmenge im Zellkulturüberstand wurde mithilfe des Hyaluronan Quantikine ELISA Kits (R&D Systems) nach Herstellerangaben bestimmt. Es wurde zunächst das Capture Antibody auf die Wellplatte pipettiert. Nach 14 Stunden wurden die Wells mit dem Waschpuffer gewaschen und daraufhin die verdünnten Proben und Standardlösungen in die Wells pipettiert. Nach Zugabe des Detection Antibody und der Substratlösungen, die für jeweils 20 Minuten in die Wells aufgetragen wurden, wurde die Reaktion mit der Stopplösung gestoppt und die Absorptionen bei 450 nm und 550 nm abgelesen.

Für den BrdU ELISA Assay wurden die HOB-c in einer Dichte von $0,6 \times 10^4$ Zellen pro Well ausgesät und jeweils Triplets angelegt. Als Leerwert wurde auch hier 100 µl Medium pro Well ohne Zellen verteilt. Als Kontrolle dienen Wells mit Kulturmedium und N-Acetylglucosamin und Kulturmedium ohne N-Acetylglucosamin. Nach 24 Stunden wurde das Nährmedium abgesaugt und jeweils 100 µl der Überstände der SCP1-HAS1-eGFP, SCP-1-HAS2-eGFP, SCP1-HAS3-eGFP und SCP1-mock-eGFP als neues Medium zu den Osteoblasten gegeben. Es wurde in jedem Well 278 µg HA eingesetzt. Das Cell Proliferation ELISA, BrdU Kit von Roche wurde verwendet. Nach 38,5 stündiger Inkubation mit dem Überstand wurde die BrdU labeling solution hinzugefügt und die Platte wurde nochmals für 16 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden fixiert, mit einer Anti-BrdU-Lösung inkubiert und mit dem Substrat Tetramethylbenzidin inkubiert. Die Reaktion wurde mit 0,5 M H_2SO_4 gestoppt und abschließend wurden die Absorptionen bei 450 nm und 690 nm mithilfe eines ELISA-Readers gemessen (siehe 2.2.3.2).

2.2.3.4 CyQUANT Assay

Das CyQUANT NF Cell Proliferation Kit (Invitrogen) wurde verwendet, um die zelluläre DNA mittels eines fluoreszierenden Farbstoffes, welches an die DNA bindet, zu

bestimmen. Dazu wurden $0,6 \times 10^4$ HOB-c Zellen pro Well auf der 96 Wellplatte, welche zuvor mit Hyaluronan in Tripletts beschichtet wurde, ausgesät und 48 Stunden bei 37°C inkubiert. Danach wurde der fluoreszierende Farbstoff hinzugefügt. Nach 45-minütiger Inkubation bei 37°C wurde die Fluoreszenz mittels TECAN bei den Wellenlängen λ (Exzitation)= 485 nm und λ (Emission)= 530 nm gemessen.

2.2.4 Osteogene Differenzierung von Osteoblasten

Zur osteogenen Differenzierung der Osteoblasten unter Einfluss von exogenem Hyaluronan wurden keine beschichteten Wellplatten verwendet, sondern es wurde Hyaluronan mit dem osteogenen Differenzierungsmedium zwei Mal wöchentlich beim Medienwechsel frisch hinzugegeben. Bei allen Differenzierungen wurden Osteoblasten der sechsten Passage verwendet, die in D-MEM high glucose (mit 15 % FBS, 1 % Penicillin/Streptomycin und 100 μ M L-Ascorbinsäure) kultiviert wurden. Für jedes Molekulargewicht des Hyaluronans wurden Tripletts in 24-Wellplatten (Greiner Bio One) angelegt. Zum Vergleich wurde auch ein Tripletts ohne Zugabe von Hyaluronan angelegt. Als Kontrolle dienten Tripletts, die ohne osteogene Zusätze behandelt wurden.

Es wurden 25.000 Zellen pro Well in Kulturmedium mit Hyaluronan ausgesät. Nach 16 Stunden wurde das Medium abgenommen. Es wurde Medium mit osteogenen Zusätzen (s. 2.1.2.2) zur Stimulierung der osteogenen Differenzierung und Hyaluronan hinzugegeben. Zu den Kontrollen wurde Kulturmedium mit Hyaluronan zugegeben.

Es erfolgte zwei Mal wöchentlich ein Medienwechsel für 21 Tage. Nach 7 Tagen wurde der ALP-Aktivitätsassay durchgeführt. Nach 21 Tagen wurden die Zellen mit 4 %igem Paraformaldehyd (PFA) für 20 Minuten fixiert und es folgte eine Alizarin Red S Färbung.

Zunächst wurden drei Versuchsreihen mit 50 μ g/ml HA, 100 μ g/ml HA und 200 μ g/ml HA durchgeführt, um die optimale Hyaluronankonzentration für die osteogene Differenzierung zu ermitteln. Da hierbei jedoch keine beträchtliche Änderung des

Effekts auf die Zellen zu beobachten war, wurde in den nachfolgenden Versuchen lediglich 50 µg/ml HA hinzugegeben.

2.2.4.1 ALP- Aktivitätsassay

Zur Bestimmung der Aktivität der alkalischen Phosphatase wurden nach 7-tägiger osteogener Differenzierung die Zellen lysiert und der ALP-Aktivitätsassay (CellBiolabs) nach Herstellerangaben durchgeführt. Zur Lyse wurde die Wellplatte mit den Zellen auf Eis gestellt und mit kaltem PBS gewaschen. Daraufhin wurde 300 µl des Cell Lysis Buffer pro Well verteilt. Nach 10 Minuten wurde die Zellsuspension in ein Eppendorfgefäß umpipettiert, bei 12 000xg für 10 Minuten bei einer Temperatur von 4°C zentrifugiert. Das Zelllysate wurde anschließend abgenommen und in eine 96 Wellplatte aufgetragen. Als Leerwert dienten Wells mit Cell Lysis Buffer ohne Zelllysate. Es wurde 50 µl des Stem Tag AP Activity Substrat pro Well zugegeben. Nach 30 Minuten wurde die Reaktion mit 50 µl Stopplösung beendet und die Absorption bei 405 nm und 620 nm gemessen.

Zudem wurde die 5 mM Standard Stocklösung im Verhältnis 1:10 mit der Stopplösung verdünnt und jeweils 150 µl pro Well einer 96 Wellplatte in Duplikaten pipettiert. Anschließend wurde die Absorption bei 405 nm und 620 nm gemessen.

2.2.4.2 BCA Assay

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration in den jeweiligen Zelllysaten (s. 2.2.4.1) wurde der BCA-Assay (Thermo Fischer Scientific) durchgeführt. Zunächst wurde eine Verdünnungslösung mit dem Cell Lysis Buffer aus dem ALP-Aktivitätsassay und destilliertem Wasser in einem Verhältnis von 1:10 hergestellt. Diese wurde nochmals mit der Standard-Stocklösung (2 000 µg/ml) in einem Verhältnis von 1:3,33 verdünnt und eine Verdünnungsreihe (siehe Herstellerangaben) wurde hergestellt. In eine 96 Wellplatte wurden 5 µl der Zelllysate aufgetragen, 200 µl des Reaction Mix hinzugefügt und nach einstündiger Lagerung bei 60°C wurde die Absorption bei 550 nm bestimmt.

2.2.4.3 Alizarin Red S Färbung

Die Mineralablagerungen wurden mit einer Alizarin Red S Färbelösung (s. 2.1.5) angefärbt. Die fixierten Zellen wurden für 25 Minuten mit einer 40 mM Alizarin Red S-Lösung mit einem pH-Wert von 4,1 gefärbt und daraufhin mit Aqua dest. mehrmals gewaschen. Anschließend wurden Bilder mit dem Mikroskop aufgenommen.

2.2.4.4 Quantifizierung der Alizarin Red S Färbung

Zur Quantifizierung der gefärbten Mineralablagerungen (s.2.2.4.3) wurde zunächst eine Verdünnungsreihe mit einer 2 mM Lösung aus 40 µl Alizarin Red S Färbelösung und 760 µl Ammoniumacetat hergestellt. Diese 2 mM Lösung wurde 1:1 mit Ammoniumacetat verdünnt und in Tripletts mit je 100 µl auf eine 96 Wellplatte aufgetragen. Die Messung der Absorption erfolgte bei 405 nm.

Die gefärbten Zellen wurden mit einer 10%igen Essigsäure und einem Cell-Scraper von der 6 Wellplatte abgelöst und in hitzestabile Eppendorfgefäße überführt. Dann wurde es für 10 Minuten auf 85°C erhitzt, anschließend abgekühlt und für 15 Minuten bei 14000xg zentrifugiert. 375 µl des zentrifugierten Überstandes wurde mit 150 µl 3%igem Ammoniumhydroxid vermengt. Auf eine 96 Wellplatte wurde je 100 µl der Probe in Tripletts aufgetragen und die Absorption bei 405 nm gemessen.

2.2.5 Zellausbreitung (Spreading) der Osteoblasten

Um den Einfluss von Hyaluronan auf die Zellausbreitung nach initialer Adhäsion zu untersuchen wurde je ein Well eines 8-Well Slides (Ibidi) mit Hyaluronan unterschiedlichen Molekulargewichts und einer Konzentration von 2,5 mg/ml beschichtet. 24 Stunden vor Versuchsbeginn wurde das Kulturmedium der Osteoblasten der Passage 5 gegen serumfreies D-MEM ausgetauscht, um einen Einfluss auf die Adhäsion und Ausbreitung der Zellen durch das im Medium enthaltene FBS zu verhindern. Die Zellen wurden daraufhin 24 Stunden lang in serumfreiem Medium bei 37°C und einer 5 % CO₂ Atmosphäre inkubiert. Dann wurden die

Osteoblasten mit Accutase (400-600 units/ml) 5 Minuten lang von der Zellkulturflasche abgelöst. Es wurden 10.000 Zellen pro Well ausgesät. Nach 10, 20 und 40 Minuten Inkubation bei 37°C und 5 % CO₂ Atmosphäre wurden die Zellen mit 4 % PFA fixiert und bei 4°C aufbewahrt.

Die fixierten Zellen wurden mit BODIPY 581/591 SE (Thermo Fischer Scientific) für 1 Stunde bei 37°C gefärbt. Die Zellkerne wurden daraufhin mit der fluoreszierenden DAPI-Lösung (s. 2.1.5.3) für 5 Minuten lichtgeschützt gefärbt. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden mithilfe des Fluoreszenzmikroskopes (Axio Observer Z1, Zeiss) Bilder von jedem Well gemacht. Die Auswertung erfolgte nach Bildbearbeitung mit Adobe Photoshop CS6 durch Messung der Zellgröße mit Image J.

2.2.6 Adhäsion der Osteoblasten

Zur Analyse des Adhäsionsverhaltens humaner Osteoblasten unter Einfluss von HA, wurden je ein Well einer 6-Wellplatte mit HA unterschiedlichen Molekulargewichts und einer Konzentration von 2,5 mg/9,5 cm² beschichtet. Als Kontrolle diente ein unbeschichtetes Well. Es wurden 15.000 Osteoblasten (Passage 5 bis 6) pro Well in serumfreiem Medium ausgesät. Nach 5 Minuten wurde die Time-lapse Mikroskopie gestartet und im Minutentakt Bilder an 5 Positionen des Wells gemacht. Die Auswertung erfolgte mit GraphPad Prism 8.

2.2.7 Osteoklastogenese

Die Differenzierung von Osteoklastenvorläuferzellen zu Osteoklasten unter Einfluss von exogenem HA wurde 19 Tage lang durchgeführt. Die Osteoklastenvorläuferzellen wurden mit dem EasySep Human Monocyte Isolation Kit (Stemcell Technologies) isoliert (s. 2.2.1.6) und auf eine mit HA beschichtete 6-Wellplatte (Sarstedt) verteilt. Es wurde je ein Well pro Molekulargewicht des Hyaluronans beschichtet. Als Kontrolle diente ein nicht beschichtetes Well. Es wurden 1 x 10⁵ Zellen pro Well ausgesät.

Darauf folgte zwei Mal wöchentlich ein Medienwechsel unter Zugabe der Differenzierungsfaktoren M-CSF und RANKL. Nach 19 Tagen wurden die Osteoklasten mit einer TRAP-Färbung und einer fluoreszierenden Zellkernfärbung (DAPI) nachgewiesen.

2.2.7.1 TRAP Färbung

Die differenzierten Osteoklasten wurden mit D-PBS drei Mal gewaschen und mit Paraformaldehyd (4%) 30 Sekunden lang fixiert. Danach wurden sie drei Mal mit Aqua dest. gewaschen. 2 ml TRAP Farbstoff (s. 2.1.5.2) wurde pro Well verteilt und bei 37°C für 30 Minuten inkubiert. Daraufhin wurde wieder mit Aqua dest. drei Mal gewaschen.

Es folgte die Zellkernfärbung mittels DAPI.

2.2.7.2 DAPI Färbung

Die TRAP-gefärbten Zellen wurden zwei Mal mit D-PBS gewaschen, es wurde 300 µl DAPI Färbelösung (s.2.1.5.3) pro Well aufgetragen und für 2 Minuten lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde nochmals mit D-PBS gewaschen.

Bilder wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop (Axio Observer Z1, Zeiss) aufgenommen.

2.2.8 Adhäsion der Osteoklasten

Um festzustellen, ob das Adhäsionsverhalten von humanen Osteoklastenvorläuferzellen mit einer Hyaluronanbeschichtung beeinflusst wird, wurden je ein 6-Well (Sarstedt) mit HA unterschiedlichen Molekulargewichts und einer Konzentration von 2,5 mg/ml beschichtet. Als Kontrolle diente ein unbeschichtetes

Well. Osteoklastenvorläuferzellen wurden aus humanem peripherem Blut mithilfe des EasySep Human Monocyte Isolation Kit (StemCell Technologies) isoliert (s. 2.2.1.6) und nach Zugabe von 50 ng/ml M-CSF und 100 ng/ml RANKL wurden 1×10^5 Zellen pro Well in serumfreiem Medium ausgesät. Nach 4-6 Minuten wurde die Time-lapse Mikroskopie gestartet und im Minutentakt Bilder an 5 Positionen des Wells gemacht. Die Auswertung erfolgte mit GraphPad Prism 8.

2.2.9 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit Graph Pad Prism 8. Zur Untersuchung der statistischen Signifikanz wurde der one-way ANOVA Test angewendet. Statistische Signifikanz ist ab einem p-Wert $< 0,05$ gegeben. Die Diagramme dienen der Veranschaulichung der Mittelwerte inklusive der Standardabweichungen.

3 Ergebnisse

3.1 Der Einfluss von endogenem HA auf humane Osteoblasten

Durch Zugabe von HA, welches von HAS überexprimierenden Zellen synthetisiert wurde, zu humanen Osteoblasten wurde der Effekt von endogen gebildetem HA untersucht. Nach Abnahme des Überstandes aus der Zellkultur von SCP1-HAS1-eGFP, SCP1-HAS2-eGFP, SCP1-HAS3-eGFP und deren Negativkontrollzelllinie SCP1-mock-eGFP, wurde ein HA ELISA (TECOmedical) zur Ermittlung des HA Gehaltes in den jeweiligen Proben vorgenommen. Schließlich wurde zu jedem Well mit humanen Osteoblasten 278 µg HA aus den Überständen der oben angeführten Zellen hinzugefügt. Als Kontrolle dienten Wells, welche lediglich Zellkulturmedium ohne Zusätze enthielten. Es wurde der BrdU ELISA Assay zur Bestimmung der Zellproliferation durchgeführt.

Es wurden jeweils drei unabhängige Versuchsreihen mit je drei Replikaten (n=3, r=3) pro Versuchsgruppe durchgeführt.

Die Proliferation der humanen Osteoblasten erscheint mit endogenem HA aus den SCP1-HAS1-eGFP, SCP1-HAS2-eGFP und SCP1-HAS3-eGFP im Vergleich zur Negativkontrolle mit SCP1-mock-eGFP reduziert. Das von den SCP1-HAS2-eGFP gebildete HA hat tendenziell den größten Einfluss in der Reduktion der Zellproliferation. Eine Signifikanz ist hier jedoch nicht zu verzeichnen.

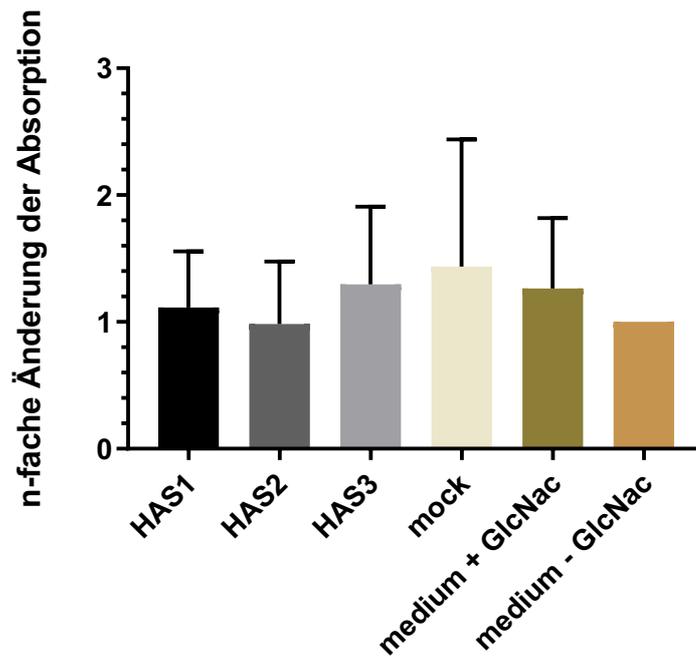


Abb. 9 Der Einfluss von endogenem HA auf die Proliferation von humanen Osteoblasten. Die gemessenen Absorptionen wurden auf die Kontrollgruppe ohne N-Acetyl-D-Glucosamine normalisiert. **HAS 1** stellt den Einfluss des im Überstand der SCP1-HAS1-eGFP vorhandenen HA auf humane Osteoblasten dar. **HAS 2** stellt den Einfluss des im Überstand der SCP1-HAS2-eGFP vorhandenen HA auf humane Osteoblasten dar. **HAS 3** stellt den Einfluss des im Überstand der SCP1-HAS3-eGFP vorhandenen HA auf humane Osteoblasten dar. **Mock** stellt den Einfluss des im Überstand der SCP1-mock-eGFP vorhandenen HA auf humane Osteoblasten und die Negativkontrolle dar. **Medium + GlcNac** stellt die Versuchsgruppe mit Zellkulturmedium und N-Acetyl-D-Glucosamine dar, die als Kontrolle zum Ausschuss des Einflusses von N-Acetyl-D-Glucosamine auf die Zellen dar. **Medium - GlcNac** stellt die Versuchsgruppe nur mit Zellkulturmedium dar, die als Kontrolle zum Ausschuss des Einflusses von N-Acetyl-D-Glucosamine auf die Zellen dient. (n=3; r=3)

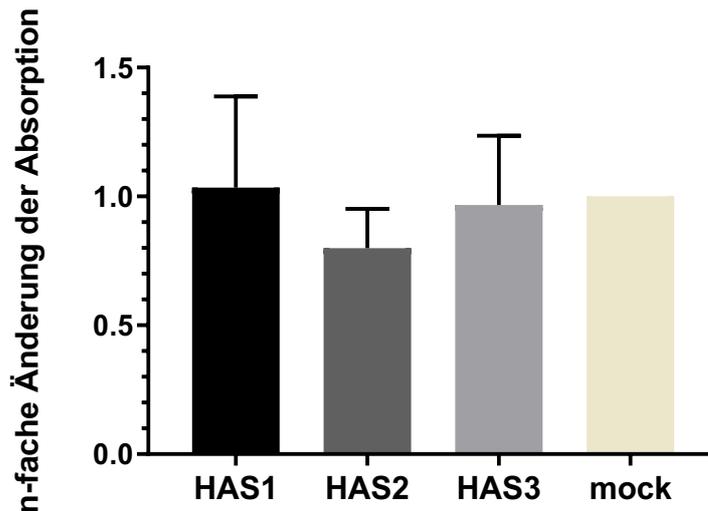


Abb. 10 Der Einfluss von endogenem HA auf humane Osteoblasten. Die gemessenen Absorptionen normalisiert auf den Mock-Wert. Mock stellt die Negativkontrolle der HAS1, HAS2 und HAS3 Gruppe dar. Nähere Erläuterungen s. Abb.9. (n=3; r=3)

3.2 Der Einfluss von exogenem HA auf humane Osteoblasten

Um den Einfluss von Hyaluronan auf die Proliferation von Osteoblasten zu untersuchen, wurde der BrdU ELISA Assay und der CyQuant Assay durchgeführt. Zur Analyse der metabolischen Aktivität der Osteoblasten unter Hyaluronaneinfluss wurde der WST-1 Assay durchgeführt.

Es wurden jeweils vier unabhängige Versuchsreihen mit je drei Replikaten (n=4, r=3) pro Molekulargewicht des Hyaluronan (c= 2,5 mg/ml) und mit drei Replikaten ohne Hyaluronan als Kontrolle durchgeführt.

3.2.1 Die metabolische Aktivität

WST-1 ist ein Tetrazoliumsalz, welches durch das Succinat-Tetrazolium Dehydrogenase System der Atmungskette enzymatisch in Formazan (dunkelrot) umgesetzt wird. Dieser Farbumschlag wird photometrisch gemessen und kann

Aufschlüsse über eine intakte Atmungskette geben. Die gemessenen Absorptionen können somit in Relation zur metabolischen Aktivität der Zellen gesetzt werden und erlauben Rückschlüsse über den Einfluss von HA auf die metabolische Aktivität der Osteoblasten zu ziehen.

Bei hochmolekularem und niedrigmolekularem HA ist die Absorption verglichen mit der Kontrollgruppe ohne Hyaluronan leicht reduziert. Der Effekt ist bei hochmolekularem HA größer als bei niedrigmolekularem HA. In Gegenwart von HMW-HA ist die metabolische Aktivität um das 0,79-fache reduziert, in Gegenwart von LMW-HA um das 0.89-fache. ULMW-HA verändert die metabolische Aktivität der Osteoblasten nicht im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne HA. Eine statistische Signifikanz ist jedoch nicht gegeben.

Der Effekt von HA auf die Zellen ist umso größer, je größer das Molekulargewicht des HA ist.

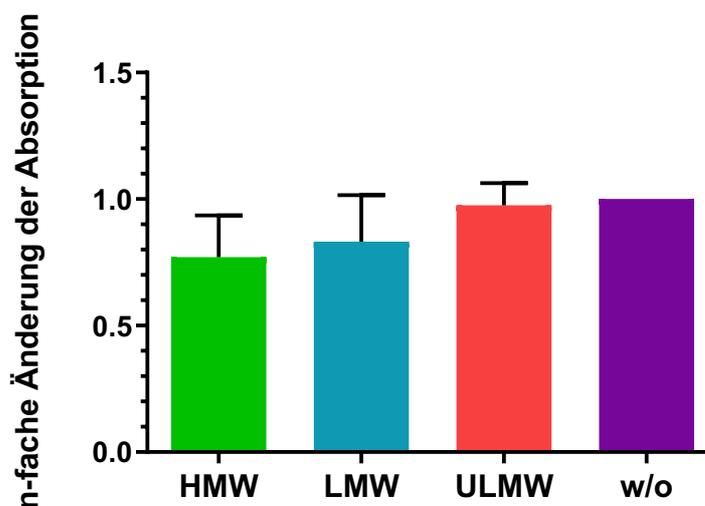


Abb. 11 WST-1 Assay. Die gemessenen Absorptionen der jeweiligen Versuchsbedingungen normalisiert auf die Kontrolle (w/o). **HMW** stellt den Einfluss von HA mit hohem Molekulargewicht („high molecular weight“; 1350 kDa) auf humane Osteoblasten dar. **LMW** stellt den Einfluss von HA mit niedrigem Molekulargewicht („low molecular weight“; 20 kDa) auf humane Osteoblasten dar. **ULMW** stellt den Einfluss von HA mit sehr niedrigem Molekulargewicht („ultra low molecular weight“; 4,8 kDa) auf humane Osteoblasten dar. **w/o** stellt die Versuchsgruppe ohne Hyaluronanbeschichtung dar, die als Kontrolle dient. (n=4; r=3)

3.2.2 Die Modulation der Zellproliferation

Um den Einfluss von Hyaluronan auf die Proliferation von Osteoblasten zu untersuchen, wurden der BrdU ELISA Assay und der CyQuant Assay durchgeführt.

Die Zellproliferation wurde mit dem Cell Proliferation ELISA, BrdU Kit (Roche) bestimmt, welches die Inkorporation des Nukleotidanalogs Bromodeoxyuridin (BrdU) in die DNA während der DNA Synthese bestimmt. Die gemessenen Absorptionen korrelieren mit der Menge an DNA Synthese und damit der Anzahl proliferierender Zellen.

Die Proliferation der Osteoblasten ist unter Einfluss von HMW-HA und LMW-HA mit hohem und niedrigem Molekulargewicht signifikant größer als ohne HA. Bei sehr niedrigem Molekulargewicht des HA ist jedoch keine signifikante Erhöhung der Proliferation und DNA Synthese der Zellen zu beobachten. In Gegenwart von HMW-HA proliferieren die Osteoblasten um das 1,61-fache schneller als ohne HA. LMW-HA erhöht die Proliferation um das 1,35 fache und ULMW-HA lediglich um das 1,14 fache. Analog zur metabolischen Aktivität ist auch hier der Effekt umso größer, je größer das HA ist.

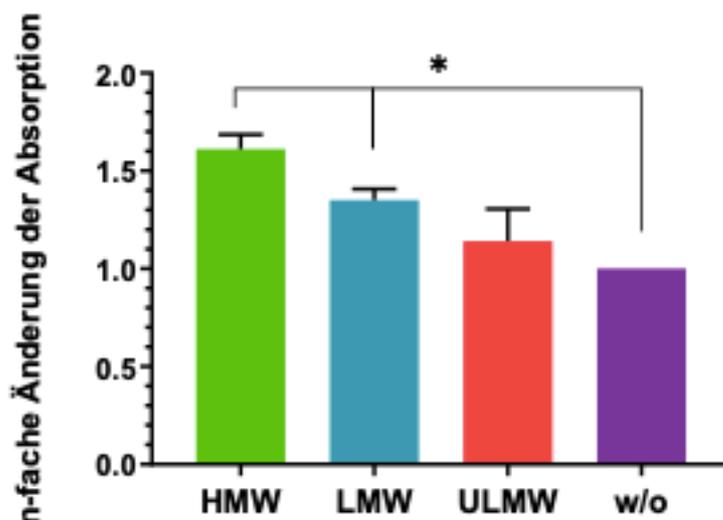


Abb. 12 BrdU ELISA Assay. Die gemessenen Absorptionen normalisiert auf die Kontrolle ohne Hyaluronan (w/o). Nähere Erläuterungen s. Abb. 9. (n=4; r=3)

Zur Verifizierung wurde ein weiterer Zellproliferationsassay, der CyQuant Assay, durchgeführt. Nach Bindung des fluoreszierenden Farbstoffs CyQuant GR an die Nukleinsäuren der Zellen kann die Zellpopulation quantifiziert werden. Dies lässt einen Rückschluss auf die Zellproliferation unabhängig von der metabolischen Aktivität, die auch durch sonstige Zellveränderungen beeinflussbar ist, zu.

Mit diesem Assay kann somit die Zellzahl unter Hyaluronaneinfluss bzw. ohne Hyaluronaneinfluss detektiert werden. Die gemessenen Fluoreszenzen wurden auf die Kontrolle ohne Hyaluronan normalisiert.

Auch in diesem Test ist die Erhöhung der Zellzahl und somit der Proliferation der Osteoblasten unter Einfluss von HA mit hohem Molekulargewicht ersichtlich. HMW-HA erhöht die gemessene Fluoreszenz um das 1,14-fache. Mit niedrigem und sehr niedrigem Molekulargewicht des Hyaluronans ist fast kein Effekt zu beobachten. Insgesamt ist kein signifikanter Effekt zu beobachten.

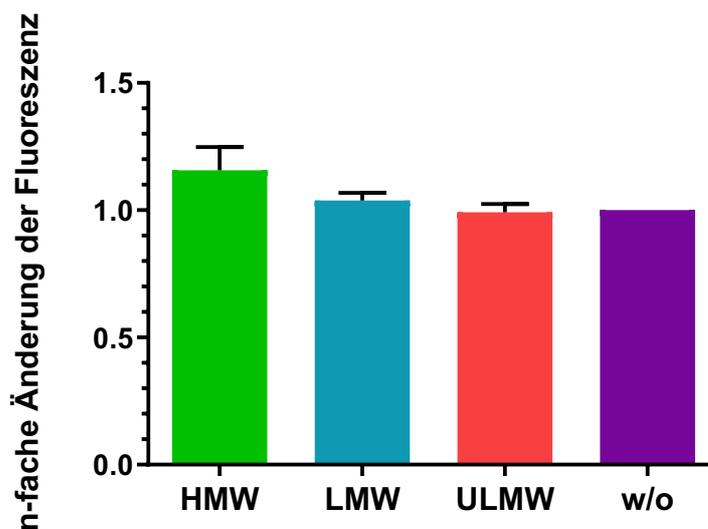


Abb. 13 CyQuant Assay. Die gemessenen Fluoreszenzen normalisiert auf die Kontrolle ohne Hyaluronan (w/o). Nähere Erläuterungen s. Abb. 9. (n=4; r=3)

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Effekt von HA auf die Proliferation der humanen Osteoblasten abhängig von dem Molekulargewicht des HA ist. Je größer das Molekulargewicht des HA ist, umso größer ist der Effekt.

3.2.3 Die initiale Adhäsion

Das Adhäsionsverhalten von humanen Osteoblasten auf mit HA beschichteten Oberflächen wurde unter serumfreien Bedingungen untersucht. Es erfolgten drei unabhängige Versuchsreihen mit je einem Well einer 6-Wellplatte pro Versuchsbedingung. Auch hier wurde HA mit hohem, niedrigem und sehr niedrigem Molekulargewicht in einer Konzentration von 2,5 mg/ml verwendet.

Die Auswertung der Timelapse-Aufnahmen erfolgte nach folgendem Schema:

- 1) Das Auftreten von ersten Zellausläufern wurde als Zeitpunkt der Adhäsion definiert [102] und für jede sichtbare Zelle notiert.
- 2) Anzahl der adhärenen Zellen zur jeweiligen Zeit wurde notiert.
- 3) Anteil der adhärenen Zellen an der ausgewerteten Gesamtzellzahl wurde berechnet.
- 4) Die Gesamtzellzahl pro Versuchsbedingung und pro Versuchsreihe in den Videos betrug mindestens 80 Zellen.

Durch Festlegung des Zeitpunktes, an dem 50% der Zellen auf den unterschiedlichen Hyaluronanbeschichtungen adhäreren, können die jeweiligen Versuchsgruppen verglichen werden.

Es kann kein signifikanter Unterschied in der Anheftung der humanen Osteoblasten an mit Hyaluronan beschichteten Oberflächen und an nicht beschichteten Oberflächen festgestellt werden. Dennoch ist eine beschleunigte Adhäsion der Zellen bei HA Beschichtung zu beobachten. Je größer das Molekulargewicht des HA ist, desto größer scheint der Einfluss auf die Adhäsion der Osteoblasten zu sein. In der Versuchsgruppe mit HMW-HA sind nach 176 min 50% der Zellen adhären, in der Versuchsgruppe mit LMW-HA nach 174 min und in der Versuchsgruppe mit ULMW-HA nach 180 min. In der Kontrollgruppe ohne HA benötigen hingegen die Zellen 204 min bis sie zu 50% adhären sind.

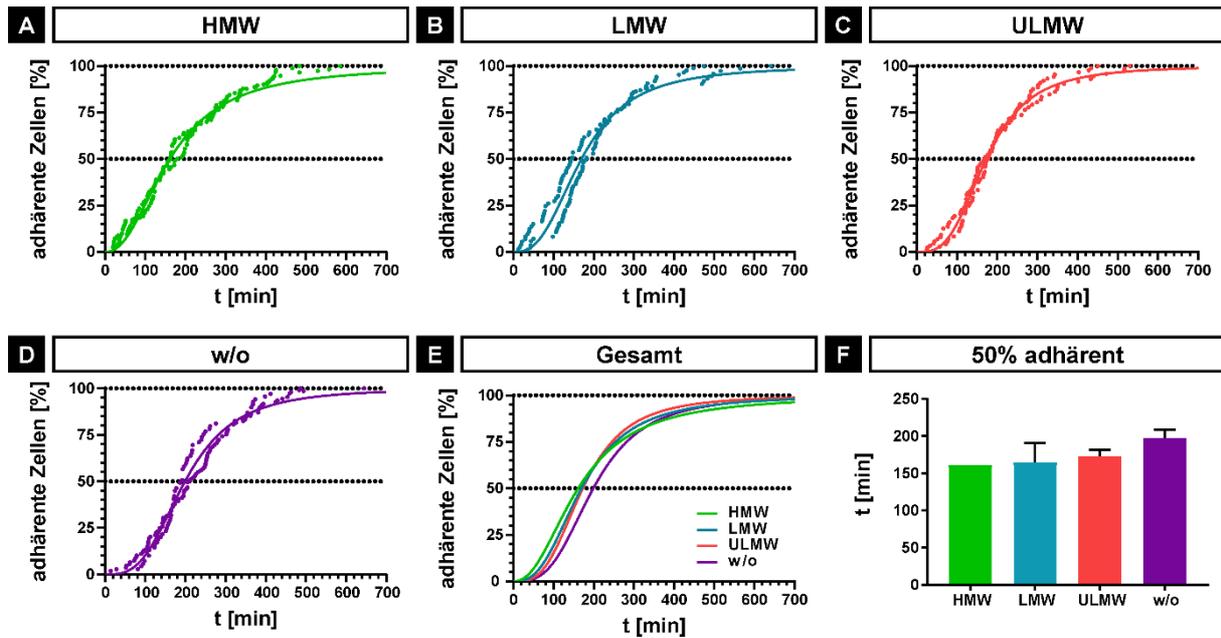


Abb. 14 Die initiale Zelladhäsion unter Einfluss von HA unterschiedlichen Molekulargewichts. Nach Beschichtung der Zellkulturplatten mit HMW-, LMW- und ULMW-HA wurden humane Osteoblasten ausgesät. Als Kontrolle dienten nicht beschichtete Wells. Mittels Time-lapse Mikroskopie wurde der Zeitpunkt, zu dem erste Zellausläufer sichtbar wurden, durch regelmäßige Bildaufnahme im Minutentakt verfolgt. (A-D) Nicht-lineare Regression einer sigmoidalen vier-Parameter Logistik. Die Punkte stellen den Zeitpunkt der Adhäsion mindestens einer Zelle in den Versuchsreihen dar. (E) Überlagerung der Kurven der vier Versuchsgruppen. (F) Der Zeitpunkt, an dem 50% der Zellen adhären waren, wurde für jede Versuchsreihe berechnet und dessen Mittelwert wird dargestellt. (n=3; r=1)

3.2.4 Die Zellausbreitung der Osteoblasten

Um die biologischen Effekte des HA auf humane Osteoblasten nach initialer Adhäsion zu untersuchen, wurde ein sogenannter Cell Spreading Assay durchgeführt.

Es wurden zwei unabhängige Versuchsreihen durchgeführt.

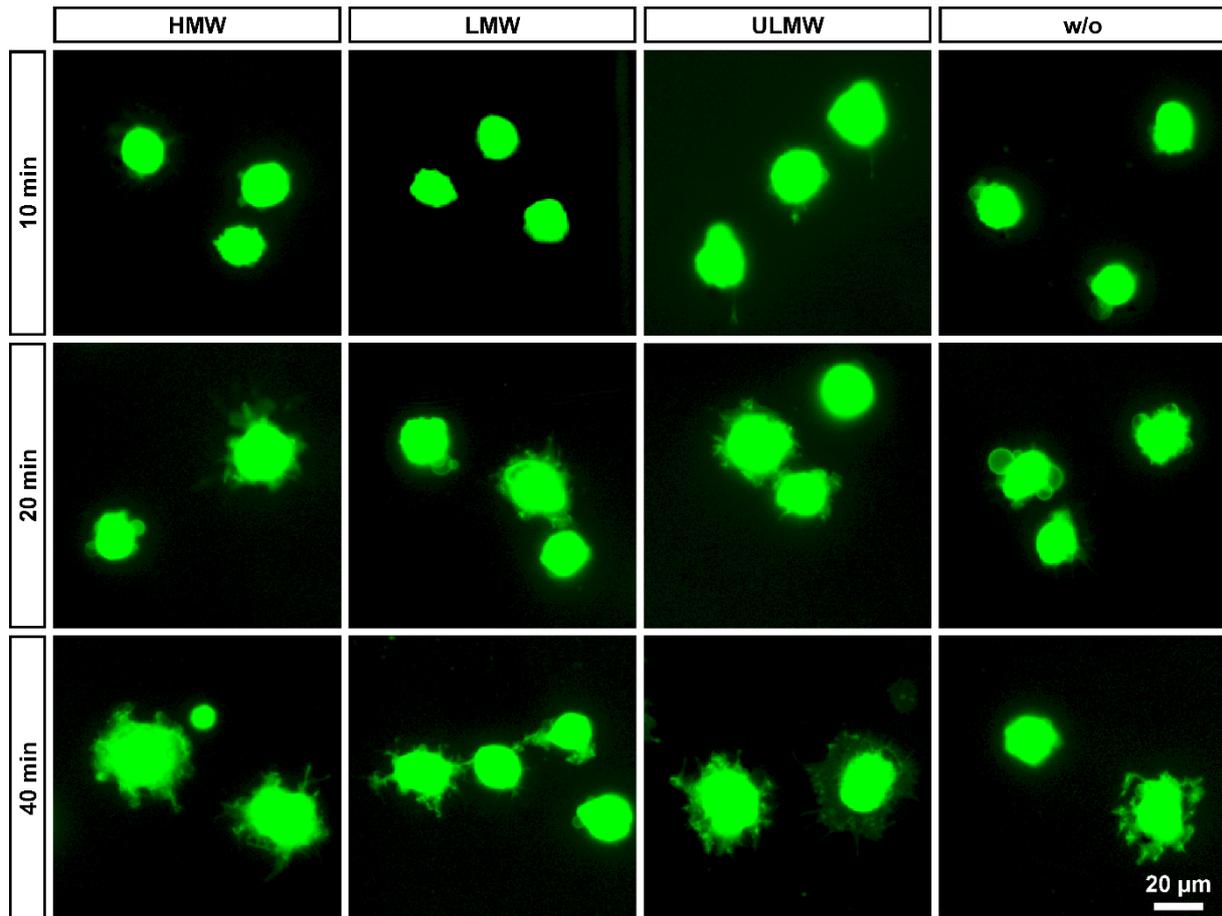


Abb. 15 Cell Spreading Assay. Die Aufnahme der fluoreszenz-mikroskopischen Bilder erfolgte nach Fixierung der Zellen nach 10, 20 und 40 Minuten und anschließender Färbung mittels Bodipy 581/591 SE. Signifikante Unterschiede in den jeweiligen Kontrollgruppen sind nicht zu erkennen. Nach 40 Minuten scheint unter LMW- und ULMW- HA Einfluss die Zellausbreitung tendenziell vermindert zu sein.

Die mikroskopischen Bilder weisen einen Unterschied der Zellausbreitung in den verschiedenen Versuchsgruppen auf. Unter Einfluss von HMW-HA und ULMW-HA sowie ohne Beschichtung sind bereits nach 10 Minuten schwache Fluoreszenzsignale in Zellausläufern zu sehen. Hingegen ist unter Einfluss von LMW-HA kein Fluoreszenzsignal in der entsprechenden Zellregion zu erkennen. Zudem scheinen die Flächen der Zellen nach 40 Minuten bei LMW-HA im Vergleich zu den Zellflächen, die bei den anderen Bedingungen zu beobachten sind, verkleinert zu sein.

Zur Objektivierung erfolgte die Messung der Zellgrößen mit Hilfe von ImageJ und dessen Auswertung mit Graph Pad Prism 8. Hierbei konnte jedoch kein statistisch

signifikanter Unterschied der Zellgrößen zu den jeweiligen Zeitpunkten festgestellt werden.

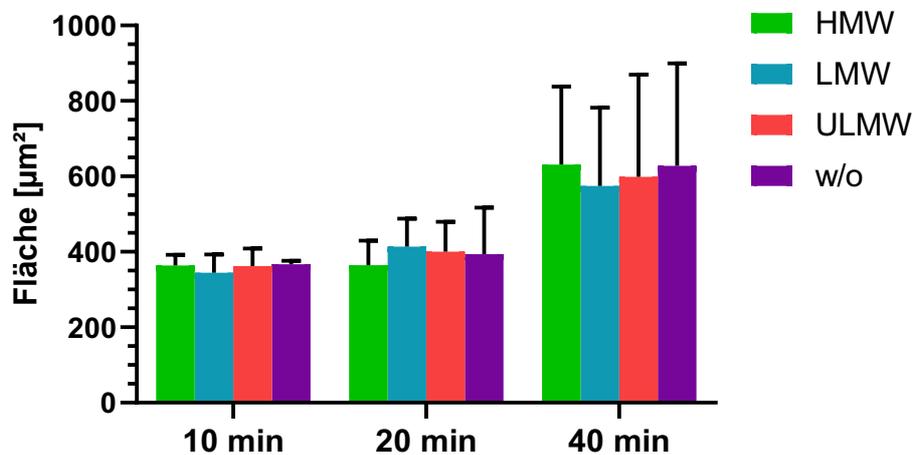


Abb. 16 Die Ausbreitung der Osteoblasten nach 10, 20 und 40 Minuten auf mit Hyaluronan beschichteten Slides. Hyaluronan mit hohem Molekulargewicht (HMW), mit niedrigem Molekulargewicht (LMW) und mit sehr niedrigem Molekulargewicht (ULMW) wurde verwendet. Die Zellgrößen (in μm^2) zwischen den untersuchten Gruppen wurden verglichen.

Hyaluronan scheint somit die initiale Adhäsion von Osteoblasten zu fördern, aber keinen Einfluss auf die Zellausbreitung zu haben.

3.2.5 Die Fähigkeit zur osteogenen Differenzierung

Um den Effekt von HA auf die osteogene Differenzierungskapazität von Osteoblasten zu untersuchen, wurden die Osteoblasten für 21 Tage in Gegenwart von HA unterschiedlichen Molekulargewichts in die osteogene Richtung differenziert.

3.2.5.1 Die Aktivität der alkalischen Phosphatase (ALP)

Verschiedene Gene, die im Rahmen der osteogenen Differenzierung verstärkt exprimiert werden, können als Differenzierungsmarker herangezogen werden, um das Differenzierungsverhalten zu untersuchen. Die alkalische Phosphatase, dessen genaue Funktionsweise nicht abschließend geklärt ist, wird als Frühmarker der Mineralisation herangezogen [103]. Die alkalische Phosphatase soll durch Hydrolyse von organischen Phosphatestern wie Pyrophosphat anorganisches Phosphat zur Mineralisation zur Verfügung stellen [104, 105]

Durch den Nachweis der ALP Aktivität bzw. dessen Änderung kann die Wirkung von HA der verschiedenen Molekulargewichte auf humane Osteoblasten analysiert werden. Nach Start der osteogenen Differenzierung wurde an Tag 7 der ALP Assay (s. 2.2.4.1) durchgeführt. Zusätzlich wurde zur Bestimmung der Proteinmenge ein BCA Assay mit den jeweiligen Proben gemacht und anschließend wurden die Ergebnisse auf die Proteinmenge normalisiert.

Zunächst konnte generell eine ALP Aktivität (siehe Abb.15) nachgewiesen werden. Auch ist eine erhöhte ALP Aktivität in der mit osteogenem Differenzierungsmedium stimulierten Versuchsgruppe im Vergleich zu der unstimulierten Versuchsgruppe ersichtlich. Insbesondere die Zugabe von ULMW-HA erhöht die ALP Aktivität im Rahmen der osteogenen Differenzierung und spricht für eine erhöhte ALP Expression. HMW-HA beeinflusst die ALP Aktivität zu diesem Zeitpunkt nicht.

Es wurden zwei unabhängige Versuchsreihen mit Triplets pro Versuchsbedingung durchgeführt (n=2, r=3).

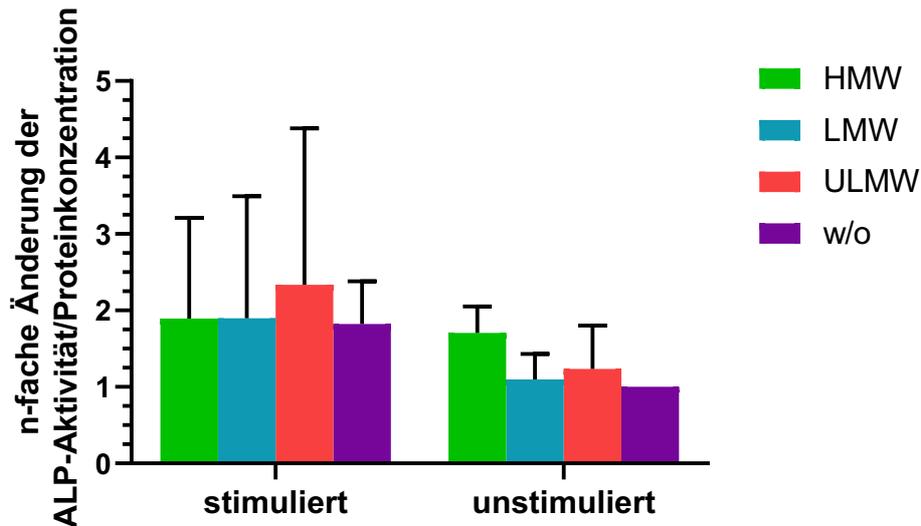


Abb. 17 Die ALP Aktivität nach 7-tägiger osteogener Differenzierung. Die Ergebnisse wurden auf die unstimulierte Kontrollgruppe (w/o), bei der kein HA zugegeben wurde, normalisiert. Durch Zugabe von osteogenem Differenzierungsmedium erhöht insbesondere ULMW-HA die ALP Aktivität. HMW-HA scheint auch ohne Zugabe von osteogenen Differenzierungszusätzen die ALP-Aktivität hochzuregulieren. (n=2; r=3)

3.2.5.2 Färbung und Quantifizierung der Mineralablagerungen

Um die Mineralisierungskapazität der humanen Osteoblasten unter Hyaluronaneinfluss zu analysieren, wurden die Zellen 21 Tage lang mit osteogenem Differenzierungsmedium stimuliert. Zur Visualisierung wurde daraufhin eine Alizarin Red S Färbung durchgeführt, welches zweiwertige Kationen wie Ca^{2+} anfärbt.

Es wurden drei unabhängige Versuchsreihen durchgeführt. Da die Ergebnisse teils unterschiedlich waren, folgt die separate Darstellung der jeweiligen Versuchsreihen.

Zunächst wurde HA in drei verschiedenen Konzentrationen (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) zur Zellkultur hinzugefügt, um die optimale HA Konzentration zu bestimmen. Da keine signifikanten Unterschiede im Einfluss auf die Mineralisation durch die verschiedenen HA Konzentrationen beobachtet werden konnten (Abb. 16), wurde in den folgenden Versuchsreihen 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ HA hinzugegeben.

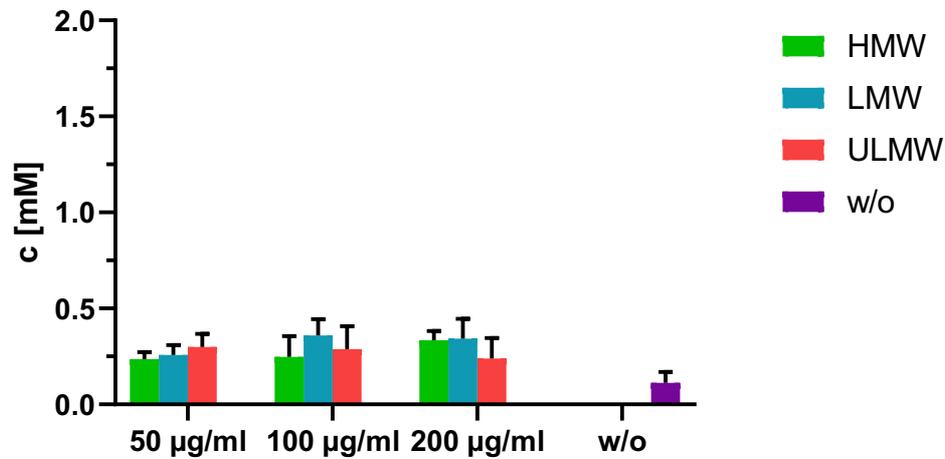


Abb. 18 Die Mineralisation der humanen Osteoblasten unter HA-Einfluss. Es wurde HA der Konzentration 50 µg/ml, 100 µg/ml und 200 µg/ml zu den Zellen bei jedem Medienwechsel mit osteogenem Differenzierungsmedium zugegeben. Nach 21 Tagen erfolgte eine ARS Färbung und eine Quantifizierung dieser Färbung. Eine erhöhte ARS Konzentration ist bei der Differenzierung in Gegenwart der drei unterschiedlichen HA im Vergleich zur osteogenen Stimulierung ohne Zugabe von HA zu beobachten. Allerdings ist kein signifikanter Einfluss der höheren HA Konzentration im Vergleich zur niedrigsten HA Konzentration mit 50 µg/ml zu erkennen. Wie zu erwarten, zeigten die unstimulierten Osteoblasten keine Färbung mit Alizarin Red S.

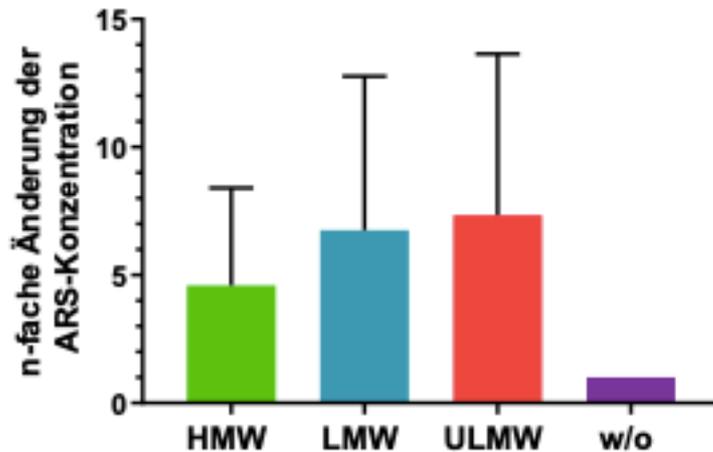


Abb. 19 Die Quantifizierung der ARS Färbung der Osteoblasten mit HMW-, LMW- und ULMW-HA und ohne HA nach osteogener Differenzierung. Die gemessenen Absorptionen wurden auf die Kontrolle ohne HA normalisiert. Eine Erhöhung der Mineralisation durch HA ist hier insbesondere im Vergleich zur Stimulierung ohne HA eindeutig zu erkennen. (n=3;r=3)

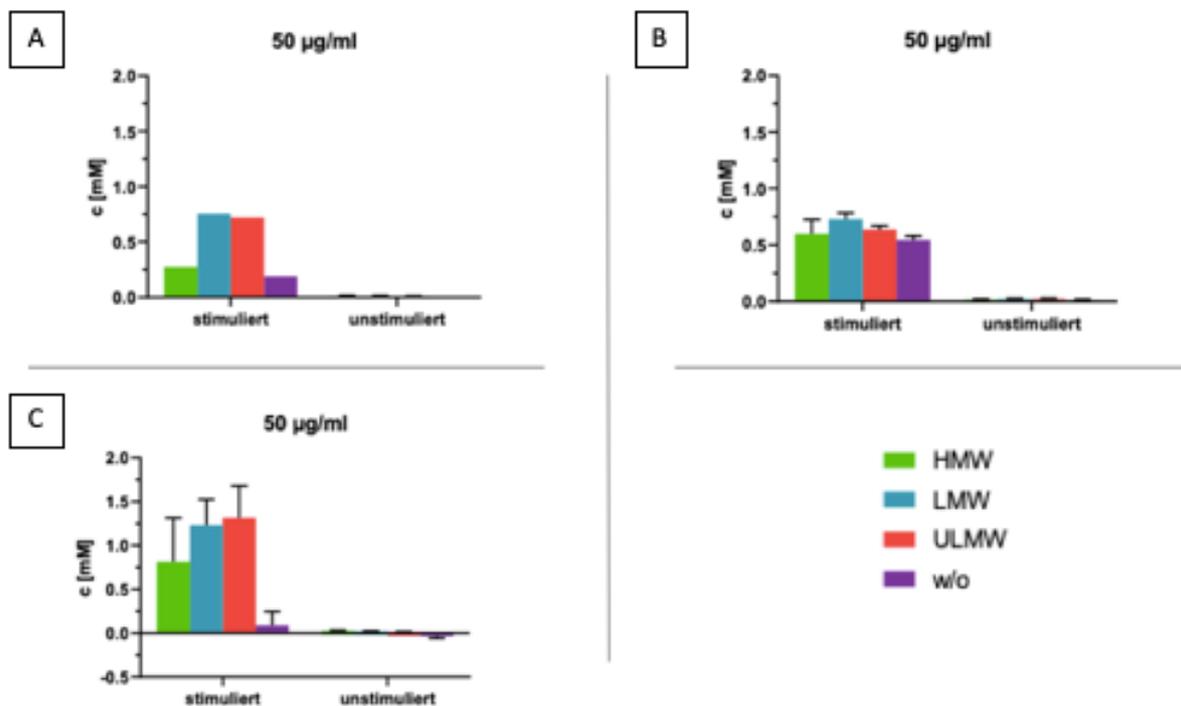


Abb. 20 Die Quantifizierung der ARS Färbung in den einzelnen Versuchsreihen. Analog zu Abb. 16 ist bei **A** und **C** eine erhöhte ARS Konzentration in den Versuchsgruppen mit HA zu erkennen. Insbesondere LMW-HA und ULMW-HA haben einen größeren Effekt als HMW-HA. **B** zeigt jedoch keine signifikante Erhöhung der ARS Konzentration unter HA Einfluss.

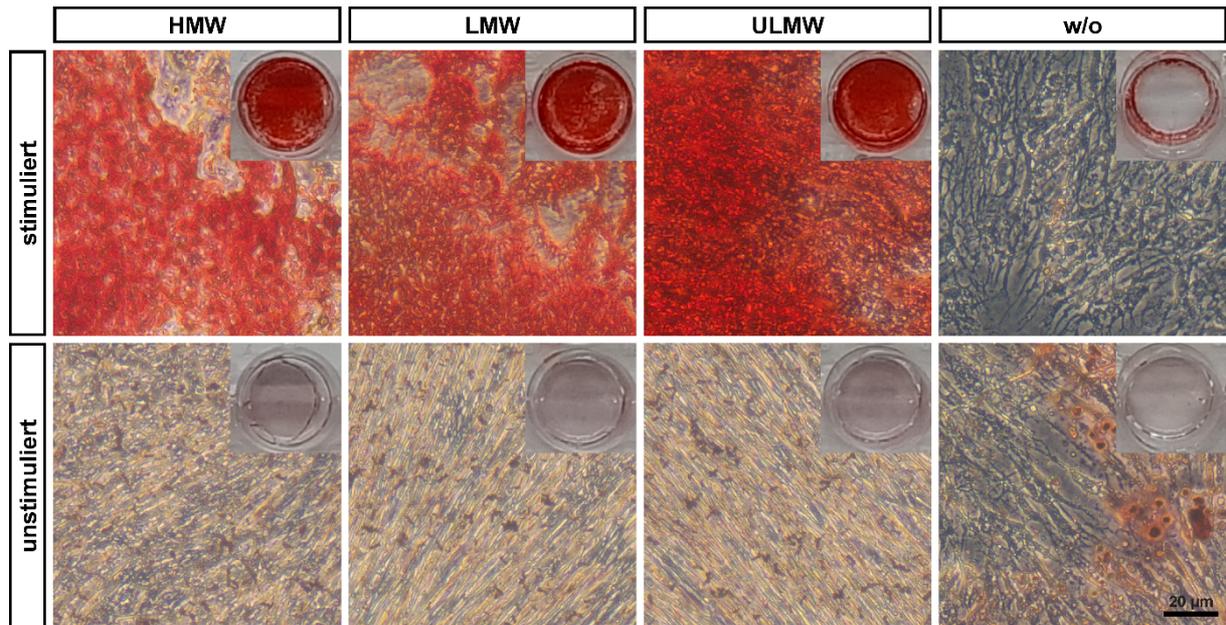


Abb. 21 Die Alizarin Red S Färbung nach 21 tägiger osteogener Differenzierung. Es wurden jeweils Triplets für Hyaluronan mit hohem, niedrigem und sehr niedrigem Molekulargewicht angelegt. Rot angefärbt sind die stimulierten Wells, unten sind die entsprechenden Kontrollen (unstimulierte Wells) zu sehen.

3.3 Der Einfluss von exogenem HA auf humane Osteoklasten

3.3.1 Osteoklastogenese

Die isolierten Osteoklastenvorläuferzellen aus humanem venösem Blut wurden auf mit Hyaluronan beschichteten Wellplatten ausgesät. Die Stimulation der Osteoklastogenese in Gegenwart der Differenzierungsfaktoren M-CSF und RANKL erfolgte 19 Tage lang. Die gebildeten Osteoklasten wurden mittels TRAP (tartrate resistant acid phosphatase) – Färbung und fluoreszierender Zellkernfärbung durch DAPI visualisiert. Unter Verwendung des Fluoreszenzmikroskops (Axio Observer Z1, Zeiss) wurden an fünf Stellen pro Well Bilder gemacht. Alle TRAP-positiven Zellen mit mehr als drei Zellkernen wurden als reife Osteoklasten identifiziert und gezählt, um die Anzahl der Osteoklasten in den verschiedenen Versuchsbedingungen zu bestimmen.

Die Normalisierung erfolgte auf die Zellzahl in der Kontrollgruppe ohne Hyaluronanbeschichtung.

Es wurden drei unabhängige Versuchsreihen durchgeführt.

In Gegenwart von HA sind tendenziell mehr Osteoklasten vorhanden als bei Kultivierung ohne Hyaluronan. Insbesondere LMW-HA und ULMW-HA haben den größten Effekt. Je kleiner das Molekulargewicht des HA ist, umso stärker scheint die Wirkung auf die Osteoklastogenese zu sein.

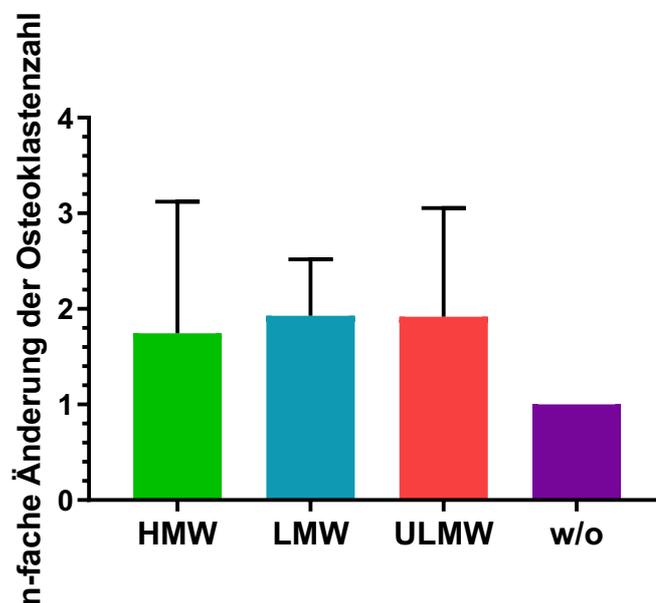


Abb. 22 Osteoklastogenese in Gegenwart von HA unterschiedlichen Molekulargewichts. Die gezählten Zellen in den jeweiligen Versuchsbedingungen wurden zur unbeschichteten Kontrollgruppe normalisiert. In Gegenwart von LMW- und ULMW-HA sind deutlich mehr Osteoklasten differenziert. Bei HMW-HA ist der Effekt geringer ausgeprägt.

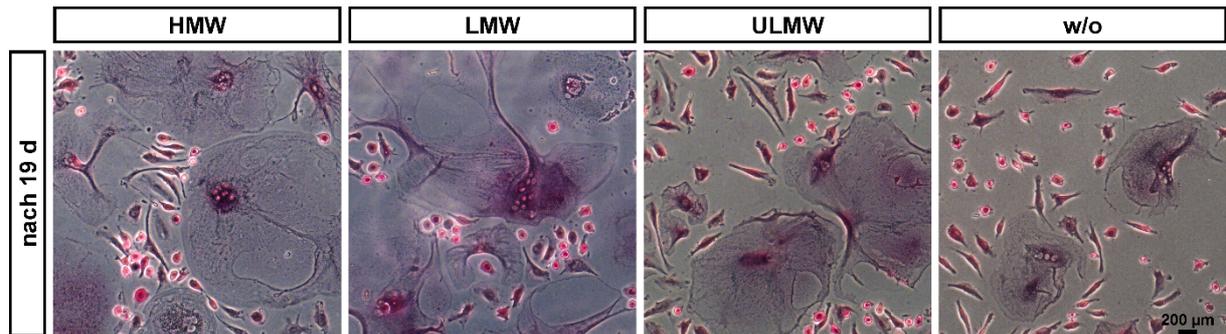


Abb. 23 TRAP-Färbung von Osteoklasten nach 19-tägiger Differenzierung unter Zugabe von M-CSF und RANKL in Gegenwart von HA unterschiedlichen Molekulargewichts. Zur Charakterisierung der gebildeten Osteoklasten wurden eine TRAP-Färbung und eine Zellkernfärbung mittels DAPI durchgeführt. Zellen, die TRAP positiv waren und mehr als drei Zellkerne hatten, wurden als Osteoklasten identifiziert.

3.3.2 Die initiale Anheftung der Osteoklastenvorläuferzellen

Das Adhäsionsverhalten von humanen Osteoklastenvorläuferzellen wurde mittels Time-lapse Mikroskopie nach Aussäen der Zellen auf mit Hyaluronan beschichteten Wellplatten untersucht. Die Kontrolle erfolgte ohne Hyaluronanbeschichtung.

Es wurden drei unabhängige Versuchsreihen durchgeführt, zur Auswertung wurden mindestens 80 Zellen pro Versuchsbedingung und pro Versuchsreihe herangezogen. Die Auswertung erfolgte nach dem bereits dargestellten Schema (s.3.2.3).

Insbesondere mit ULMW-HA Beschichtung ist die Adhäsion der humanen Osteoklastenvorläuferzellen deutlich beschleunigt. Hier sind bereits nach 11 min 50% der Vorläuferzellen adhären, LMW-HA zeigt nur eine minimale Beschleunigung der Zelladhäsion (13 min) und HMW-HA (14 min) scheint keinen wesentlichen Einfluss zu haben im Vergleich zur Adhärenz auf unbeschichtete Zellkulturplatten (14 min).

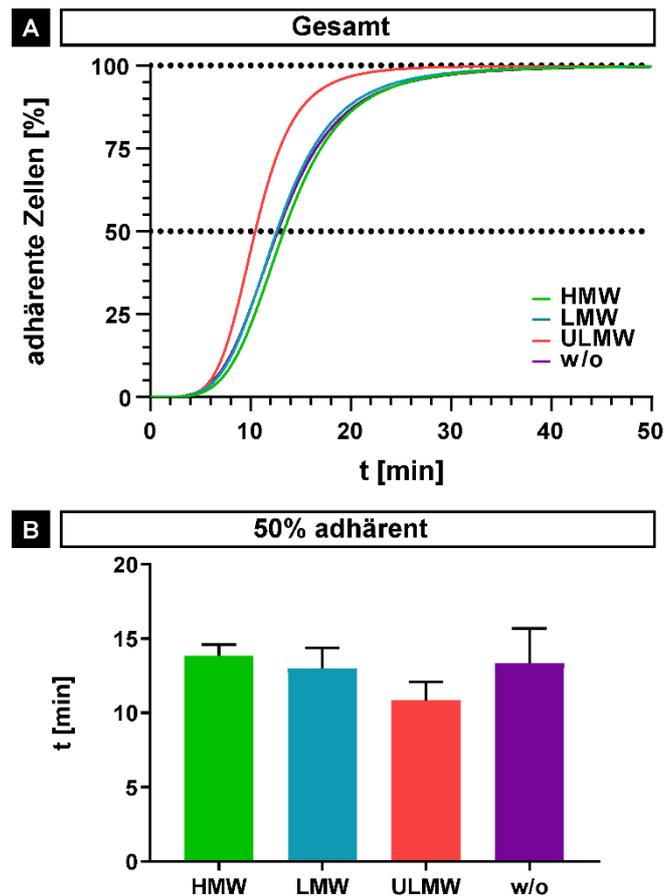


Abb. 24 Die Adhäsion der humanen Osteoklastenvorläuferzellen. (A) Nicht-lineare Regression einer sigmoidalen vier-Parameter Logistik mit Überlagerung der Kurven der vier Versuchsgruppen. (B) Der Zeitpunkt, zu dem 50% der Zellen adhärenent waren, wurde für jede Versuchsgruppe berechnet und dessen Mittelwert wird hier dargestellt. Auf mit ULMW-HA beschichtete Platten adhärenent die Osteoklastenvorläuferzellen bereits nach 11 min. Dagegen sind erst 50% der Zellen nach 13 min bei einer Beschichtung mit LMW-HA, und nach 14 min bei einer Beschichtung mit HMW-HA und ohne Beschichtung adhärenent. (n=3)

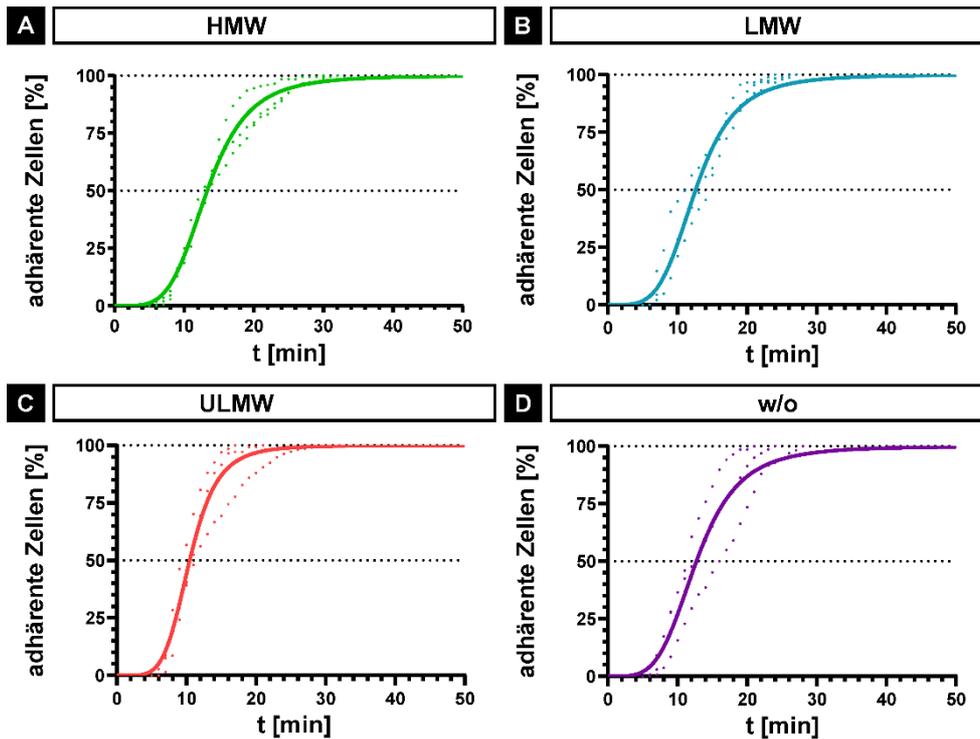


Abb. 11 Die initiale Zelladhäsion der Osteoklastenvorläuferzellen unter HA Einfluss. Nach Beschichtung der Zellkulturplatten mit HMW-, LMW- und ULMW-HA wurden humane Osteoklasten ausgesät. Als Kontrolle dienten nicht beschichtete Wells. Mittels Time-lapse Mikroskopie wurde der Zeitpunkt, zu dem erste Zellausläufer sichtbar wurden, durch regelmäßige Bildaufnahme im Minutentakt verfolgt. **(A-D)** Nicht-lineare Regression einer sigmoidalen vier-Parameter Logistik. Die Punkte stellen den Zeitpunkt der Adhäsion mindestens einer Zelle in den Versuchsreihen dar.

4 Diskussion

In der Knochenbiologie hat HA verschiedene Funktionen wie die Migration und Kondensation von humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSCs), die Bildung der Gelenkhöhle und das longitudinale Knochenwachstum [43]. HA wird von den verschiedenen Knochenzellen, den adulten hMSCs [63, 106], Osteoklast-artigen Zellen [107, 108], Osteoblasten [62] und Osteozyt-artigen Zellen [109, 110] synthetisiert und ist eine Hauptkomponente des Knochenmarks. Knochenresorption durch Osteoklasten und Knochenbildung durch Osteoblasten ist exakt ausbalanciert, wodurch es zu einer kontinuierlichen Umbildung der Knochenstruktur kommt, um diese an äußere Stimuli anzupassen. HA scheint dabei das Verhalten von hMSCs, Osteoklasten und Osteoblasten zu modulieren. Allerdings ist seine genaue Rolle beim Knochenumbauprozess noch unbekannt [111]. Insbesondere werden die meisten in der Literatur beschriebenen Studien nicht mit humanen Zellen durchgeführt. Außerdem muss auch beachtet werden, dass in diesen Studien gewöhnlich exogenes HA verwendet wird.

In der vorliegenden Doktorarbeit soll der Einfluss von HAS-überexprimierenden hMSCs sowie von exogenem HA unterschiedlichen Molekulargewichts auf das Verhalten von humanen Osteoblasten, Osteoklastenvorläuferzellen und Osteoklasten untersucht werden. Letztendliches Ziel ist das grundlegende Verständnis des Zusammenspiels und der Bedeutung von HA im Knochenregenerationsprozess. Die Anwendung von HAS-überexprimierenden hMSCs und exogenem HA erlaubt, die biologischen Effekte von HA auf die Knochenzellen aufzuklären.

4.1 Die Bedeutung des Molekulargewichts und der Konzentration beim Einfluss des HA auf das Zellverhalten

Der Einfluss von HA auf Zellen scheint maßgeblich vom Molekulargewicht des HA abzuhängen. Die Affinität zu den jeweiligen Rezeptoren und die nach der Bindung an den Rezeptor ausgelöste Signalkaskade soll durch die Hyaluronangröße beeinflusst werden [112]: je größer die Kettenlänge des HA ist, desto mehr Rezeptoren können

an HA binden. Insbesondere im Knochen sind die biologischen Effekte von HA und der Einfluss der Hyaluronangröße weitgehend ungeklärt.

Um den Einfluss des Molekulargewichtes auf das Zellverhalten von Osteoblasten und Osteoklasten zu untersuchen, wurde in dieser Studie kommerziell erhältliches exogenes HA in drei unterschiedlichen Molekulargewichten (R&D Systems) verwendet. Der Hersteller gibt für das „high molecular weight“ (HMW) HA ein Molekulargewicht von 1350 kDa, für das „low molecular weight“ (LMW) HA von 20 kDa und für das „ultra low molecular weight“ (ULMW) HA von 4,8 kDa an.

Im menschlichen Körper synthetisieren die verschiedenen HAS-Isoformen unterschiedliche Molekülgrößen. HAS 1 und HAS 2 produzieren *in vitro* HA mit einem Molekulargewicht von 2×10^5 bis über 2×10^6 Da, HAS 3 hingegen nur kleine Hyaluronangrößen von 1×10^5 bis 1×10^6 Da [112]. Hier wird ersichtlich, dass das exogene HMW-HA ein deutlich geringeres Molekulargewicht aufweist als das insbesondere von den HAS 2 produzierte HA mit über 2×10^6 Da. Somit kann lediglich der Einfluss von exogenem HA mit einem geringeren Molekulargewicht, im Vergleich zu den *in vivo* von den HAS gebildeten, sehr langkettigen HA Molekülen, untersucht werden. Allerdings wird das HA *in vivo* wiederum von Hyaluronidasen (HYAL) abgebaut. Die Familie der humanen HYAL besteht aus sechs Mitgliedern (HYAL1, HYAL2, HYAL3, HYAL4, HYALP1 und PH-20). HYAL1 und HYAL2 werden ubiquitär exprimiert und sind daher vermutlich die Hauptenzyme, die HA abbauen [43, 113]. HYAL2 ist über Glykosylphosphatidylinositol in der Plasmamembran verankert [114] und baut HA in bis zu 20 kDa große Fragmente ab [115]. HYAL-1 scheint ein lysomomales Enzym zu sein und schneidet HA in Disaccharide oder überwiegend in Tetrasaccharide [113]. Es wurde gezeigt, dass HYAL von Osteoblasten [62] und Osteoklasten exprimiert werden [116].

Normalerweise sind HA-Bildung und -Abbau ausbalanciert, um die physiologischen Bedingungen aufrechtzuerhalten [117]. Die in dieser Studie verwendeten Molekulargrößen an HA könnten also durchaus relevant bei der Regulation der Knochenzellen in der Knochenmikroumgebung sein, auch wenn die *in vitro*-Studien nur einen limitierten Einblick geben können.

In dieser Arbeit wurde analog zum natürlich vorkommenden HA HA in nicht-sulfatierter Form hinzugegeben, um zunächst den Effekt des nativen HA ohne Modifikationen zu analysieren. In anderen Studien wurde meist sulfatiertes HA verwendet [111], welches nach dieser chemischen Modifikation nicht mehr enzymatisch abgebaut wird, da die Enzyme, die für die Degradation verantwortlich sind, inhibiert werden. Für das sulfatierte HA wird eine verlängerte Stabilität angenommen [118].

Die Konzentration des verwendeten exogenen HA wurde auf 2,5 mg/ml für alle Versuche festgelegt. Grundlage dieser Entscheidung sind Vorversuche, in denen kein signifikanter Unterschied im Einfluss des HA auf die Zellen bei höheren Konzentrationen festgestellt werden konnte und aus Kostengründen demnach eine Konzentration konsequent verwendet wurde.

Studien implizieren, dass exogen hinzugefügtes HA und endogen produziertes HA unterschiedliche Effekte auf die Organisation der ECM und das Zellverhalten haben [119]. Um dies zu untersuchen, wurden die HAS überexprimierenden Zelllinien SCP1-HAS1-eGFP, SCP1-HAS2-eGFP und SCP1-HAS3-eGFP verwendet, deren Zellkulturüberstände endogen produziertes HA enthalten. Im Vergleich zu den mit einem Leervektor transduzierten Kontrollzellen, SCP1-mock-eGFP, sekretieren die SCP1-HAS-eGFP signifikant mehr HA in den Zellkulturüberstand. In Übereinstimmung mit Literaturdaten [61, 120], produzieren die SCP1-HAS3-eGFP die größte Menge an HA. Die genaue Länge der HA-Ketten ist jedoch unbekannt. Die HAS3-überexprimierenden Zellen bilden den dicksten perizellulären HA-Mantel, während die SCP1-HAS1-eGFP und die SCP1-HAS2-eGFP einen weniger dichten HA-Mantel aufweisen. Dabei haben die SCP1-mock-eGFP nur sehr wenig HA an der Zelloberfläche [102].

Limitationen der Untersuchungen dieser Doktorarbeit ergeben sich somit zum einen durch die Anwendung lediglich einer Hyaluronankonzentration und zum anderen durch das angewendete exogene HA, welches im Vergleich zum natürlich vorkommenden HA ein wesentlich geringeres Molekulargewicht aufweist. Der Einfluss von sehr langkettigem exogenem HA mit über 1350 kDa Molekulargewicht wird somit nicht erfasst.

4.2 Exogenes HA: Beschichtung oder Zugabe zum Kulturmedium?

Grundsätzlich gibt es zwei Möglichkeiten, Zellen *in vitro* HA auszusetzen. Zum einen durch Beschichtung von Zellkulturplatten mit HA und zum anderen durch Zugabe von HA zum Kulturmedium bei jedem Medienwechsel.

HA stellt eine wichtige Komponente der ECM des Knochens dar. Zahlreiche Funktionen wurden beschrieben, wie Stimulierung der Proliferation, Migration und intrazelluläre Signalwege [121, 122]. HA könnte auch für die Zelladhäsion der hMSCs, Osteoblasten und Osteoklastenvorkäufierzellen an die ECM des Knochens durch HA-Rezeptoren wie CD44 (s. 1.10) verantwortlich sein. Nach der Zelladhäsion an die ECM kann HA das weitere Zellverhalten wie Proliferation, Differenzierung und Migration beeinflussen [102]. Um diese Hypothese zu testen, wurden in den Untersuchungen dieser Doktorarbeit die Zellkulturplatten mit HA beschichtet und anschließend die Osteoblasten bzw. die Osteoklastenvorläuferzellen ausgesät, um folglich den Einfluss von HA auf das Proliferations-, Migrations- und Differenzierungsverhalten zu untersuchen.

Als Ausnahme ist die osteogene Differenzierung anzuführen. In diesen Versuchen wurde HA bei jedem Medienwechsel erneut zum Medium hinzugefügt, da die Beschichtung nicht bis zu 21 Tage lang stabil bleibt. Laborinterne Untersuchungen zur Stabilität der HA Beschichtung zeigten, dass diese für bis zu 4 Tage nachweisbar ist.

In einer Studie zum Effekt von HA auf die osteogene Differenzierung und der Proliferation von Osteoblasten aus Ratten wurde HA lediglich initial beim Aussäen der Zellen zum Kulturmedium hinzugegeben [91]. Die folgenden Medienwechsel erfolgten ohne HA Zugabe. Fraglich ist hierbei, ob dies das im Körper vorherrschende Milieu wiedergibt, da die Zellen laufend dem HA aus der ECM ausgesetzt sind. In anderen Studien zum Einfluss von HA auf das Verhalten von Osteoblasten und Osteoklasten hingegen wurde eine Beschichtung mit sulfatiertem HA durchgeführt [111]. Da exogenes HA in der regenerativen Medizin unter anderem auch in Form von Beschichtungen zur Biofunktionalisierung von Scaffolds angewendet wird [123] und durch die Beschichtung die Verhältnisse *in vivo* nachgeahmt werden können, erweist sich diese Methode als sinnvoll.

4.3 Das Verhalten von humanen Osteoblasten unter Hyaluronaneinfluss

HA bildet bei physiologischem pH-Wert eine Gelschicht, welche in der ECM optimale Bedingungen für die Zellproliferation und die Zellmigration bietet [41, 102]. Die Untersuchungen zur **metabolischen Aktivität** (s. 3.2.1) und **Proliferation** der Zellen (s. 3.2.2) mit exogenem HA zeigen, abhängig von der Größe des HA, ein unterschiedliches Zellverhalten. HMW-HA steigert die Proliferation im BrdU-Assay signifikant, aber auch bei niedrigerem Molekulargewicht war eine Tendenz zur erhöhten Proliferation ersichtlich. Im CyQuant-Assay war die Proliferation nicht so stark durch die Zugabe von HA stimuliert. Es ist aber dieselbe Tendenz zu beobachten: je größer das Molekulargewicht des HA ist, umso stärker wurde die Proliferation stimuliert. Auch in der Literatur wird beschrieben, dass *in vitro* der Effekt von HA auf die zelluläre Proliferation sowohl von dem Molekulargewicht als auch von der Konzentration abhängt. In einer Studie mit Osteoblasten aus der Schädelkalotte von Ratten konnte eine signifikant gesteigerte Proliferation der Zellen durch HA gezeigt werden [91]. Auch in der murinen mesenchymalen Stammzelllinie ST2 sowie den Osteoblastenvorläufer-Zelllinie MC3T3-E1 konnte eine Stimulierung der Proliferation durch natives HMW-HA von 2500 kDa gezeigt werden [124]. HA könnte also eine Rolle bei der Vergrößerung des Osteoblastenpools im Knochenregenerationsprozesses spielen.

In der vorliegenden Arbeit konnte keine signifikante Änderung der metabolischen Aktivität der humanen Osteoblasten unter Hyaluronaneinfluss gezeigt werden. Durch die Zugabe von HMW-HA und LMW-HA scheint sie sogar leicht reduziert zu werden. Salbach-Hirsch et al. (2014) beobachteten eine Zunahme der metabolischen Aktivität von hMSCs der Maus unter dem Einfluss von sulfatiertem HA mit 1175 kDa und 132,2 kDa. Die andere Spezies oder der andere Zelltyp könnten eine Erklärung für die gegensätzlichen Ergebnisse sein.

Da HA als Bestandteil der extrazellulären Matrix in der Regulation der Zell-/Substrat-Wechselwirkung beteiligt ist [102, 125], wurde mittels Time-lapse Mikroskopie das Adhäsionsverhalten der humanen Osteoblasten auf einer hyaluronanbeschichteten Zellkulturplatte untersucht. In diesen Versuchen wurde eine HA-Beschichtung

durchgeführt, um das HA in der ECM der Knochenmikroumgebung zu imitieren. Die Zellen adhäreren in Anwesenheit von HA schneller an die Oberfläche (s. 3.2.3) und auch bei diesen Untersuchungen zeigte sich mit HMW-HA der größte Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe. Eine Abhängigkeit des Effektes von der Größe des HA ist somit auch bei der Zelladhäsion anzunehmen.

Adhäsionsmoleküle wie Integrine, die für die Ausbildung von Fokalkontakten verantwortlich sind [126], aber auch der Hyaluronanrezeptor CD44 sind entscheidend für Zell-Zell- aber auch Zell-ECM-Adhäsionen. Der CD44 Rezeptor ist in Osteoblasten exprimiert [127], sodass die frühe Adhäsion von Osteoblasten durch eine Beschichtung der Zellkulturplatten mit HA positiv beeinflusst werden kann. Der stärker positive Effekt durch HMW-HA lässt sich vermutlich dadurch erklären, dass eine größere Anzahl von CD44-Rezeptoren an das langkettigere HA binden können und damit die Zellen stärker initial adhäreren. Salbach et al. beobachteten, dass murine MSCs auf mit nativem HMW-HA beschichteten Zellkulturplatten weniger adhären sind im Vergleich zur Kollagen-beschichteten Kontrolle [111]. Eine Beschichtung mit LMW-HA zeigte jedoch keinen Effekt. Allerdings wurde hier ein „klassischer“ Adhäsionsassay durchgeführt: 60 min nach dem Aussäen der Zellen wurden nicht-adhärenente Zellen gewaschen und die adhärenenten Zellen mittels Kristallviolett färbung bestimmt. Zudem können die Zellen auf der mit Kollagen beschichteten Zellkulturplatte über Integrin-vermittelte Fokalkontakte stärker adhäreren. In dem in dieser Arbeit vorliegenden, experimentellen Setup wurden hingegen die frühen adhäsiven Eigenschaften bestimmt.

Generell ist in der Literatur auch beschrieben, dass der perizelluläre HA-Mantel von Chondrozyten [130, 131], aber auch von hMSCs [102] die frühen Adhäsionseigenschaften von den Zellen, die auch in dieser Arbeit untersucht wurden, fördert. Auch hier wurde eine Abhängigkeit der Wirkung des HA auf die Adhäsion von der Dicke des HA-Mantels impliziert [128]. Zimmerman et al. (2002) erforschten die Bindung von Nierenepithelzellen aus *Xenopus laevis*, den A6-Zellen, an Zellkulturplatten sowie an Kalziumtartratkristalle als Substrat und zeigten, dass eine erhöhte Adhäsion durch HA gegeben ist, wenn lediglich eine Oberfläche (der Zelle oder des Substrates) mit HA beschichtet war. Bei Beschichtung beider Oberflächen (Zelle und Substrat) fand hingegen keine Adhäsion statt. Diese Studie zeigt die Bedeutung von HA als Modulator der initialen Adhäsion von Zellen an eine Oberfläche.

Obwohl Osteoblasten die HA bildenden HAS exprimieren, haben die Osteoblasten in unseren Zellkulturbedingungen vermutlich keinen dicken HA-Mantel. Zumindest konnte bei hMSCs kaum perizelluläres HA nachgewiesen werden [102]. Dies könnte die Förderung der frühen Adhäsion von Osteoblasten durch Beschichtung der Zellkulturplatten mit HA erklären.

Auf die ersten Adhäsionsschritte der Zellen folgt das aktive Ausbreiten („Spreading“) der Zellen [102]. Dabei werden die Integrine, transmembrane Adhäsionsrezeptoren, aktiviert und verbinden die ECM-Komponenten wie Fibronectin und Vitronectin mit dem Aktincytoskelett über intrazelluläre Bindepartner wie Talin. Fokaladhäsionskomplexe, die Paxillin, Vinculin und Talin enthalten, werden ausgebildet und reifen anschließend in fokalen Adhäsionsstellen und fibrillären Adhäsionen und die Zellen können sich auf dem Substrat ausbreiten [126, 130-132]. Als Zeichen der Zellausbreitung verlieren die Zellen ihre runde Form und flachen ab [133]. Die humanen Osteoblasten wurden analog zum Adhäsionsassay auf eine mit HA beschichtete Platte ausgesät und zu drei verschiedenen Zeitpunkten (s. 2.2.5) fixiert, gefärbt und mikroskopiert. Durch Messung der Fläche der gefärbten Zellen konnten die Versuchsgruppen verglichen werden. Mikroskopisch sind Unterschiede der Zellgrößen ersichtlich. Unter Einfluss von HMW-HA bilden die Zellen früher Zellausläufer als unter LMW-HA. Zudem erscheinen die Zellen nach 40 Minuten unter Einfluss von HMW-HA größer als unter Einfluss von LMW-HA. Es zeigte sich statistisch jedoch keine signifikante Beeinflussung der Zellausbreitung unter HA Einfluss. Dennoch ist zu beachten, dass die Zellen lediglich zu drei verschiedenen Zeitpunkten fixiert wurden und somit die Zellausbreitung auch nur innerhalb der ersten 40 Minuten analysiert werden konnte. Möglicherweise kann zu anderen Zeitpunkten oder durch Erhöhung der HA Menge ein Effekt nachgewiesen werden. Auch ist die Quantifizierung eine potenzielle Fehlerquelle, weshalb kleine Unterschiede der Zellgrößen schwer nachweisbar sind. Erste Hinweise für den unterschiedlichen Einfluss des Molekulargewichtes des HA auf die Zellausbreitung sind dennoch gegeben. Aus der Literatur ist bekannt, dass sich Fokaladhäsionskomplexe auf unbehandelten Zellkulturplatten ausbilden können, wenn auch weniger als auf Kollagen I-beschichteten Platten [102]. Eine Immunfluoreszenzfärbung von Proteinen der Fokaladhäsionskomplexen, wie z.B. von Vinculin, könnte hier jedoch in Zukunft über die mikroskopisch sichtbaren Unterschiede der Adhäsion von Osteoblasten auf Oberflächen mit und ohne HA-Beschichtung Aufschluss geben.

Die **osteogene Differenzierung** läuft in drei Phasen ab: auf eine proliferative Phase folgt eine Phase der ECM Synthese mit abschließender Mineralisation [134]. Um den Einfluss von HA als natürliche Komponente der ECM auf die osteogene Differenzierung und deren Regulation zu untersuchen, wurde nach 7 Tagen osteogener Differenzierung die Aktivität des frühen Differenzierungsmarkers Alkalische Phosphatase (ALP) bestimmt. Zudem wurde nach 21 Tagen osteogener Differenzierung die Mineralisationskapazität durch eine Alizarin Red S Färbung mit nachfolgender Quantifizierung der Färbung durchgeführt. Es konnte in allen Versuchsgruppen eine ALP Aktivität nachgewiesen werden und somit hat eine osteogene Differenzierung stattgefunden. Signifikante Unterschiede in den Versuchsgruppen mit HA und ohne HA konnten bei der ALP Aktivität jedoch nicht festgestellt werden.

Durch die ARS Färbung konnte eine Mineralisierung in jenen Gruppen visualisiert werden, die mit osteogenem Differenzierungsmedium und HA behandelt wurden. In der Kontrollgruppe ohne HA und in den nicht stimulierten Wells konnte jedoch keine Rotfärbung von zweiwertigen Kationen wie Ca^{2+} nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse implizieren, dass entweder die Adhäsion der Osteoblasten durch HA verstärkt wird und demnach mehr Mineralisierung ersichtlich ist oder, dass die Kalziumkationen durch das negativ geladene HA besser initial gebunden wurden und dadurch mehr Kristallisationskeime für eine verbesserte Mineralisation gebildet wurden.

Unter Biomineralisation versteht man den Prozess, bei dem lebende Organismen die Bildung hierarchisch strukturierter Mineralien unter anderem bei der Knochenbildung und bei der Zahnentwicklung kontrollieren. Eine mögliche Rolle von HA im Knochen ist die Regulation der Mineralisation [135], obwohl die Geschwindigkeit der Kristallisation von Hydroxylapatit nicht beeinflusst werden kann [95]. HA bindet Hydroxylapatit in kalzifiziertem Knorpel und Knochen. Durch die negativ geladenen Carboxylgruppen kann HA Kalzium in hohen Konzentrationen binden und so die Kristallisation induzieren. HA könnte bei der Initiation der Mineralisation auch eine Funktion durch die Schaffung von Platz und/oder durch die Organisation der ECM haben [136-138].

Die mögliche Rolle von HA bei der Kristallisation von Kalziumphosphat zu Hydroxylapatit könnte erklären, warum in den Versuchsgruppen mit HA und osteogenem Differenzierungsmedium eine ARS Färbung ersichtlich ist und in der Kontrolle ohne HA nicht.

Interessanterweise beobachteten wir auch in jenen Wells, die zwar mit osteogenem Differenzierungsmedium aber ohne HA behandelt wurden, eine erhöhte ALP-Aktivität im Vergleich zu den nicht osteogen stimulierten Kontrollen. Die Zugabe von HA erhöhte die ALP-Aktivität jedoch nicht zusätzlich. Dies deutet darauf hin, dass die Osteoblasten auch ohne Zugabe von HA osteogen differenzierten, auch wenn mittels Alizarin Red S keine Kalziumablagerungen angefärbt werden konnten. Es könnte demnach sein, dass das zugegebene HA die Kristallisation von Kalziumphosphat stimulierte oder die Kristalle stabilisierte. Geeignete Methoden für die Charakterisierung der gebildeten Mineralien in der Zellkultur wären zum Beispiel die Fourier-Transform-Infrarot (FTIR)-Spektroskopie, die Flüssigkristall-Polarisationsmikroskopie (LC-PolScope), die Rasterkraftmikroskopie (AFM) oder komplementäre Methoden der Kryo-Elektronenmikroskopie (Kryo-EM) wie die Kryo-Rasterelektronenmikroskopie (Kryo-REM), die Kryo-fokussierter Ionenstrahl-REM (Kryo-FIB-REM) sowie die Kryo-Transmissionselektronenmikroskopie (Kryo-TEM).

In einigen *in vitro*-Studien konnte gezeigt werden, dass HA die osteogene Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen oder von Osteoblasten induzierte. Zou et al. (2008) zeigten bei Untersuchungen zum Einfluss von HA auf die osteogene Differenzierung von pBMSCs (porcine bone marrow stromal cells) vermehrte Kalziumablagerungen bei Anwendung eines osteogenen Differenzierungsmediums mit Dexamethason, β -Glycerophosphat und Ascorbinsäure und mit 4,0 mg/ml HA (800 kDa) [139]. Eine durch HA vermehrte osteogene Differenzierung von hMSCs [140] und von MSCs aus Kaninchen [141] wurde ebenfalls nachgewiesen. Huang et al. (2003) zeigten eine erhöhte ALP Aktivität und vermehrte Kalziumablagerungen in Osteoblasten aus der Ratte insbesondere durch HMW-HA (>500 kDa- ~ 2000 kDa). LMW-HA (<8 kDa) stimulierte die Proliferation, zeigte jedoch keinen Einfluss auf die osteogene Differenzierung. Hier wird eine Abhängigkeit des Effektes von der Größe des HA ersichtlich. Da jedoch das HMW-HA mit 2000 kDa deutlich größer ist als das in dieser Studie verwendete HMW-HA mit 1350 kDa (s. 2.2.2), kann ein größerer

Einfluss auf die osteogene Differenzierung durch größeres HA angenommen werden. HA mit kleinem Molekulargewicht scheint jedoch keinen signifikanten Effekt zu haben.

4.4 Das Verhalten von humanen Osteoklasten unter Hyaluronaneinfluss

An der Differenzierung der Osteoklastenvorläuferzellen sind M-CSF und RANKL maßgeblich beteiligt. Welchen Einfluss die extrazelluläre Matrix an diesen Differenzierungsvorgängen hat, ist bisher ungeklärt [87]. In der Literatur wird eine erhöhte Knochenresorption mit vermehrter HA Synthese in Verbindung gebracht [39, 142]. Ein Einfluss von HA auf Osteoklasten wird durch die Bindung von HA an den CD44-Rezeptor an der Zelloberfläche der Osteoklasten angenommen [143]. Zelladhäsion, Zellmigration und die Aktivierung der Zellen könnten dadurch moduliert werden. Vermutlich spielt HA auch eine Rolle bei der Kommunikation zwischen Osteoblasten und Osteoklasten [43]. Hier wurde untersucht, wie das in dieser Arbeit verwendete Studie exogene HA (ULMW-HA: 4,8 kDa; LMW-HA: 20 kDa sowie HMW-HA: 1350 kDa) Einfluss auf das Adhäsionsverhalten von Osteoklastenvorläuferzellen und auf die Osteoklastogenese hat. Die Adhäsion der humanen Osteoklastenvorläuferzellen war insbesondere unter Einfluss von ULMW-HA beschleunigt. Eine Beschichtung der Zellkulturplatten mit HMW-HA zeigte tendenziell eine Verlangsamung der Adhäsion dieser Zellen. Auch in der Literatur wird beschrieben, dass eine Beschichtung der Zellkulturplatten mit nativem HA die Adhäsion von humanen Osteoklasten, aber nicht von der murinen Makrophagen-ähnlichen Zelllinie RAW264.7 im Vergleich zur unbeschichteten Zellkulturplatte steigert [144].

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich eine Tendenz zur Stimulierung der Osteoklastogenese durch HA (s. 3.3.1). LMW-HA und ULMW-HA scheinen einen größeren Effekt als HMW-HA zu haben. Analoge Ergebnisse sind in der Literatur beschrieben. In Untersuchungen von Ariyoshi et al. (2005) mit der Mausmakrophagen-ähnlichen Zelllinie RAW264.7 wurde gezeigt, dass LMW-HA (< 8 kDa) die Osteoklastogenese positiv beeinflusst und die RANK Expression erhöht. HMW-HA (> 900 kDa) hingegen zeigte keinen Einfluss auf die Differenzierung der Osteoklasten

[82]. Eine spätere Studie von Ariyoshi et al. (2013) zeigte eine reduzierte Expression von RANKL und eine verminderte Osteoklastogenese durch HMW-HA (2500 kDa) über die Aktivierung des Rho Kinase Signaltransduktionsweges [145]. Ein dosisabhängiger Effekt von HA kann somit angenommen werden.

Lee et al. (2014) untersuchten den Effekt mit LMW-HA (50 kDa) und zeigten eine Inhibition der RANKL-induzierten Osteoklastogenese als potenzielle anti-osteoporotische Therapie [146].

In einer Studie von Chang et al. (2007) mit BMMs (bone marrow macrophages) wird ein die Osteoklastogenese hemmender Effekt von HA über den Toll-like Rezeptor 4 (TLR 4) durch Eingreifen in den M-CSF Signalweg und nicht über den CD44 Rezeptor beschrieben [87]. Es wird angenommen, dass durch die Bindung von HA an den TLR4 die Differenzierung der Osteoklastenvorläuferzellen inhibiert wird und bei reifen Osteoklasten durch Interaktion von HA mit CD44 die Knochenresorption verhindert wird. Somit ist eine regulatorische Funktion von HA im Knochenkatabolismus möglich [87].

Toll-like Rezeptoren spielen insbesondere eine wichtige Rolle bei der Immunabwehr zur Erkennung von Pathogenen [147]. Ob das Immunsystem einen Einfluss auf die Wirkung von HA auf die Osteoklastendifferenzierung hat, gilt in weiteren Untersuchungen zu klären [87]. Es ist beschrieben, dass im Rahmen von Entzündungsprozessen HMW-HA durch Hyaluronidasen in kleinere HA Fragmente zerlegt wird [148]. Es konnte auch nachgewiesen werden, dass die Expression von Hyaluronidasen (HYAL1) bei der Osteoklastogenese hochreguliert wird und damit die Hydrolyse von HA stark erhöht ist [116]. Dieses LMW-HA könnte über eine Interaktion mit Osteoklastenvorläuferzellen deren Differenzierung beeinflussen. Eine Inhibition der Osteoklastogenese durch HMW-HA wird angenommen, LMW-HA hingegen soll die gegenteilige Wirkung durch Stimulation der Osteoklastogenese bewirken [82, 87].

Zusammenfassend lassen diese Ergebnisse darauf schließen, dass durch beschleunigte Adhäsion der Zellen und Promotion der Osteoklastogenese HA mit geringem Molekulargewicht den Knochenabbau fördert. Durch HMW-HA scheint jedoch nur ein geringfügiger Effekt gegeben zu sein.

Interessant wäre auch, künftig den Einfluss von HA in der Osteoblasten-Osteoklasten-Kommunikation zu untersuchen. So zeigten Cao et al. (2005) in ihrer Studie mit BMSC's (bone marrow mesenchymal stem cell) von Mäusen, dass HA einen Einfluss auf die Expression von OPG und RANKL hat. OPG hemmt die Aktivierung und Differenzierung von Osteoklastenvorläuferzellen, RANKL hingegen stimuliert die osteoklastäre Differenzierung. Beide werden unter anderem von Osteoblasten sezerniert [149]. Sie stellten fest, dass HA die Expression von RANKL durch Bindung an CD44 dosisabhängig erhöht. Für die Expression von OPG konnte keine signifikante Änderung beobachtet werden [150].

Salbach-Hirsch et al. haben in mehreren Studien die Wirkung von sulfatiertem HA auf Knochenzellen untersucht. Durch vermehrte OPG Expression durch Osteoblasten, zeigen sie eine verminderte osteoklastische Aktivität durch Zugabe von sulfatiertem HA [111]. Auch die Expression von TRAP, Cathepsin K und anderen osteoklastenspezifischen Markern wurde unterdrückt [144].

Zur genaueren Abklärung des Einflusses von HA auf humane Osteoklasten, sollten Untersuchungen zur Expression von RANK und zur Knochenresorption unter HA Einfluss durchgeführt werden.

4.5 Endogenes HA

Zur Untersuchung des Effektes von HA auf Zellen kann entweder exogenes HA analog zu seinen Anwendungen im Tissue engineering oder bei Baumaterialien zugeführt werden oder es kann durch Überexpression der HAS die endogene HA Produktion gefördert werden [119]. Endogenes HA und exogenes HA zeigen jedoch einen unterschiedlichen Effekt auf das Zellverhalten oder die Organisation der ECM [119]. Allison et al. (2008) konnten in ihren Untersuchungen zeigen, dass die Kontraktion und Festigkeit von mit glatten Muskelzellen besiedelten Kollagengelen durch exogenes HA gesteigert und durch endogenes HA reduziert wird. Sie vermuten unterschiedliche Retentionsmechanismen des HA in der ECM. Letztlich wird vermutet, dass die Zugabe von exogenem HA zu Kollagengelen ein Modell für die therapeutischen Funktionen

des HA und die Überexpression von HAS mit Bildung von endogenem HA ein Modell für eine pathologische Akkumulation von HA darstellt [119].

So könnten die unterschiedlichen Effekte des exogenen und des endogen gebildeten HA durch eine Änderung der biologischen Eigenschaften der Zellen aufgrund der Überexpression der HAS entstehen. In der Literatur ist z.B. eine Veränderung mit Bildung mikrovilli-ähnlicher Ausläufer auf Grund der Überexpression und erhöhten Aktivität von HASen beschrieben [119]. Die enorme Bildung einer HA-Matrix in 3Y1-Zellen aus der Ratte durch ektopische Expression der HAS-Isoformen führt zu einer Verminderung der Kontakthemmung des Zellwachstums und fördert die Migrationskapazität der Zellen. In den Zellen wurde eine Änderung der Organisation der Mikrofilamente und der Verteilung von N-Cadherin an den Zell-Zell-Grenzen beobachtet [54]. Das transmembrane N-Cadherin vermittelt die Zell-Zell-Adhäsion.

In der vorliegenden Studie sollte zunächst der Einfluss von exogenem HA (s. 2.2.3.2) mit dem Einfluss von endogenem HA (s. 2.2.3.3) auf die Proliferation der humanen Osteoblasten verglichen werden. Für die endogene Produktion von HA wurden die bereits im Labor etablierten und charakterisierten SCP1-HAS-eGFP und die mit einem Leervektor transduzierten Kontrollzellen SCP1-mock-eGFP verwendet [102]. Die endogene Expression der HAS in SCP-1 sowie die Überexpression der verschiedenen eGFP-getaggten HAS Isoformen wurde mittels RT-PCR auf mRNA-Ebene und mittels Westernblot auf Proteinebene nachgewiesen [102]. Die ELISA-Analyse des Zellkulturüberstandes der SCP1-HAS-eGFP und der SCP1-mock nach Kultivierung der Zellen in Gegenwart von dem Substrat N-Acetylglucosamin zeigte, dass die HAS-überexprimierenden Zelllinien mehr HA sekretierten als die Kontrollzellen. Auch bildeten die SCP1-HAS-eGFP, insbesondere die SCP1-HAS3-eGFP, einen dickeren perizellulären Mantel im Vergleich zu den SCP1-mock [102].

In der vorliegenden Arbeit wurden nach Stimulierung der HA-Produktion durch Zugabe des Substrats der HAS die Zellkulturüberstände geerntet und die Menge an HA mittels ELISA bestimmt. Anschließend wurde jeweils 278 µg HA zu den Osteoblasten gegeben. Laut Literatur sollten die verschiedenen HAS Isoformen HA unterschiedlicher Größe *in vitro* bilden: HAS1 und HAS2 polymerisieren HA-Ketten mit 2×10^6 Da und HAS3 bildet dagegen nur HA der Größe von 1×10^5 bis 1×10^6 Da [58, 61, 151]. Da HA unterschiedlicher Größe verschiedene Funktionen hat und das Zellverhalten unterschiedlich beeinflussen kann, wurde auch hier ein unterschiedlicher

Effekt des von den SCP1-HAS-eGFP sekretierten HA erwartet. Es wurde eine verminderte Proliferation in allen Gruppen (HAS 1, HAS 2 und HAS3) festgestellt. Im Vergleich zu SCP1-mock hatte HAS 2 den stärksten Effekt, darauf folgten HAS 1 und HAS 3 (s. 3.1). Der Zellkulturüberstand von SCP1-mock erhöhte die Proliferation hingegen im Vergleich zum Medium mit Substrat. Es ist daher anzunehmen, dass das endogene HA selbst inhibitorisch auf die Proliferation der Osteoblasten wirkt.

Hingegen konnte unter Einfluss von exogenem HA eine Stimulierung der Proliferation festgestellt werden (s. 3.2.2). Der Effekt ist umso größer, je größer das Molekulargewicht des HA ist.

Analog zu den in der Literatur beschriebenen Studien, ist also auch in dieser Arbeit ein gegenteiliger Effekt von endogenem und exogenem HA erkennbar. Die Hypothese von Allison et al. (2011) kann auch hier bestätigt werden, da exogenes HA insbesondere im Tissue engineering therapeutisch angewendet wird.

Endogenes HMW-HA kann unter pathologischen Konditionen wie Entzündungsvorgängen, Tumorinvasion, etc. durch Hyaluronidasen oder Sauerstoffradikale in LMW-HA degradiert werden und an spezifische Rezeptoren wie CD44, TLR u.v.m. binden [152]. Die pro-inflammatorische Wirkung des LMW-HA ist unter anderem bei COPD, bei allergischer Alveolitis, Sarkoidose und rheumatoider Arthritis beschrieben [112]. Sowohl die Tumorprogression als auch die Angiogenese werden durch LMW-HA gefördert [112].

Endogenes HA, welches also unter pathologischen Bedingungen wie Entzündungsreaktionen gehäuft vorkommt, scheint die Proliferation der Osteoblasten zu hemmen. Dies ist auch zu erwarten, da bei einer Inflammation zunächst verstärkt Osteoklasten gebildet werden und die Bildung von Osteoblasten gehemmt wird [153]. Insbesondere die Entzündungsmediatoren $\text{TNF}\alpha$, IL-1 und IL-6 spielen eine wichtige Rolle für die verstärkte Osteoklastenbildung [153].

Zur genaueren Abklärung bedarf es jedoch weiterer Untersuchungen. Es sollte der Einfluss von endogenem HA auf die Mineralisationskapazität von humanen Osteoblasten und auf die Expression von RANKL und OPG analysiert werden. Zudem ist zur Bestätigung der oben angeführten Hypothese auch die Wirkung von endogenem HA auf humane Osteoklasten zu untersuchen. Hier sollten insbesondere

die Osteoklastogenese und die Expression von RANK unter Einfluss des endogenen HA beleuchtet werden.

Auch wenn endogenes HA vermutlich nicht direkt therapeutisch eingesetzt werden kann, ist es wichtig seine Rolle im Knochenmetabolismus aufzuklären. Bei Knochenerkrankungen wie Osteogenesis imperfecta [11] und Multiples Myelom [63] wurde eine erhöhte Menge an HA im Knochen bzw. eine erhöhte HA-Produktion durch hMSCs nachgewiesen. Ein besseres Verständnis der regulatorischen Funktion von HA in der Knochenmikroumgebung könnte neue therapeutische Ansatzpunkte liefern.

4.6 Ausblick

HA ist ein versatiles Glykosaminoglykan, welches in verschiedenen Bereichen eingesetzt wird. Im Knochen spielt HA insbesondere therapeutisch bei der Entwicklung von Knochenersatzmaterialien, als Trägersubstanz für Wachstumsfaktoren oder bei der Beschichtung von Scaffolds eine Rolle.

Die diskutierten Ergebnisse verdeutlichen, dass HA den Knochenmetabolismus abhängig vom Molekulargewicht unterschiedlich beeinflussen kann. HMW-HA bewirkt eine erhöhte Proliferation und eine beschleunigte Adhäsion von humanen Osteoblasten. Auf die Osteoklastogenese und Anheftung der humanen Osteoklasten wirkt hingegen ULMW-HA besonders fördernd. Bei der Anwendung von exogenem HA sollten somit die Effekte der jeweiligen Hyaluronangröße bedacht werden.

In weiteren Untersuchungen sollte insbesondere HMW-HA mit größerem Molekulargewicht angewendet werden, um eine Verstärkung der Wirkung durch Zunahme der Größe des HA nachzuweisen. Salbach-Hirsch et al. verwendeten in ihren Studien sulfatiertes HA, welches stabiler sein soll als das hier angewendete nicht-sulfatierte HA. Möglich ist auch ein größerer Effekt durch Anwendung des stabilen sulfatierten HA, was eine Anwendung im Tissue engineering erleichtern würde.

Die Expression von RANKL und OPG unter Hyaluronaneinfluss von humanen Osteoblasten und die Expression von RANK durch humane Osteoklasten sollten analysiert werden, um die genaueren Mechanismen der Hyaluronanwirkung zu verstehen.

Besonders interessant ist die Wirkung des endogenen HA auf Knochenzellen. In dieser Studie konnte ansatzweise ein konträrer Effekt zum exogenen HA dargestellt werden. Um destruktive Knochenerkrankungen mit pathologisch erhöhtem HA Gehalt des Gewebes besser zu verstehen und effektiver zu therapieren, bedarf es weiterer Untersuchungen. Hier ist es auch notwendig, die Größe des HA, welches von den HAS überexprimierenden Zellen synthetisiert wird, zu bestimmen, um dessen Wirkung auf die umgebenden Zellen zu beleuchten.

Insgesamt stellt HA eine vielversprechende Substanz dar, welche nach Analyse der Wirkung auf Knochen therapeutisch effizienter zur Verbesserung von Knochenersatz und Knochenheilung eingesetzt werden kann.

5 Zusammenfassung

Hintergrund: Hyaluronan (HA) ist ein Bestandteil der extrazellulären Matrix des Knochens, dessen Wirkung auf den menschlichen Knochenmetabolismus bisher nicht beleuchtet wurde. Im Körper wird HA durch die Enzyme Hyaluronansynthase 1, 2 und 3 (HAS) produziert. Es beeinflusst das Zellverhalten über verschiedene Rezeptoren an den Zellen. Es ist ein Effekt auf die Migration, die Adhäsion, die Proliferation, die osteogene Differenzierung und die Expression von verschiedenen knochenspezifischen Markern beschrieben. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von sowohl exogen zugeführtem HA als auch von HA, welches endogen von den HAS gebildet wird, auf humane Osteoblasten und humane Osteoklastenvorläuferzellen untersucht.

Methoden: Die metabolische Aktivität der humanen Osteoblasten in Gegenwart von HA wurde mittels WST-1 Assay untersucht. Die Proliferation dieser Zellen unter Hyaluronaneinfluss konnte durch BrdU ELISA Assays und CyQuant Assays beleuchtet werden. Nach Zugabe von osteogenem Differenzierungsmedium und HA zu den Zellen wurde zudem die Aktivität der alkalischen Phosphatase mit Bestimmung der Proteinkonzentration über BCA Assay und die Mineralisierungskapazität durch Alizarin Red S Färbungen analysiert. Die initiale Zelladhäsion und die Zellausbreitung auf HA beschichteten Zellkulturplatten wurde mittels Time-lapse Mikroskopie untersucht. Humane Osteoklastenvorläuferzellen wurden aus humanem venösem Blut isoliert und nach Aussaat auf HA beschichtete Zellkulturplatten untersucht. Die Anzahl der differenzierten und reifen Osteoklasten unter Zugabe von M-CSF, RANKL und HA wurde zur Beurteilung der Osteoklastogenese nach TRAP-Färbung ausgezählt. Die Anheftung der humanen Osteoklastenvorläuferzellen an HA wurde unter serumfreien Bedingungen mittels Time-lapse Mikroskopie untersucht. Die Wirkung von endogenem HA auf humane Osteoblasten wurde nach Abnahme des HA-haltigen Überstandes der SCP1-HAS1-eGFP, SCP1-HAS2-eGFP und SCP1-HAS3-eGFP Zellkultur und Bestimmung der Hyaluronankonzentration mittels HA ELISA erforscht.

Ergebnisse: Hochmolekulares HA hatte den größten Effekt auf humane Osteoblasten. Es förderte insbesondere die Zellproliferation und die initiale Adhäsion. Endogenes HA hingegen hatte tendenziell einen inhibitorischen Einfluss auf die

Proliferation von humanen Osteoblasten. Insgesamt waren in den Versuchsgruppen mit HA nach osteogener Differenzierung die Kalziumablagerungen verstärkt färbbar mit Alizarin Red S Färbung, aber die alkalische Phosphatase Aktivität erschien nur geringfügig verändert durch die Zugabe von HA. Die initiale Adhäsion der humanen Osteoklastenvorläuferzellen war vor allem durch ULMW-HA beschleunigt. Die Anzahl der gebildeten Osteoklasten war in allen Versuchsgruppen mit HA erhöht, am deutlichsten war dies mit ULMW-HA zu verzeichnen.

Schlussfolgerung: Es konnte gezeigt werden, dass HA einen umso stärkeren Effekt auf humane Osteoblasten hat, je größer das Molekulargewicht des HA ist. Bei den humanen Osteoklasten aber ist ULMW-HA am einflussreichsten. Dieses Wissen ist essenziell bei der Anwendung von HA zum Gewebersatz und verdeutlicht, dass der unterschiedliche Effekt abhängig von Molekulargewicht bei der Auswahl des jeweiligen HA berücksichtigt werden muss. Durch weitere Untersuchungen mit stabilerem und langkettigerem HA könnten stärkere Effekt erzielt werden, die bei der Therapie von Knochenerkrankungen als neuen Ansatz fungieren können. Auch die polare Wirkung des endogenen HA könnte durch weitergehende Untersuchungen essenzielle Erkenntnisse zur Entstehung einiger Knochenerkrankungen liefern.

Abstract

Background: Hyaluronan (HA) is a component of the extracellular matrix whose impact on the human bone metabolism has not been analysed yet in detail. HA is synthesized by the Hyaluronan Synthases (HAS) 1, 2 and 3 and affects the cell behavior by different receptors. However, an impact on cell migration, cell adhesion, cell proliferation, osteogenic differentiation and the expression of bone-specific markers has been implicated. In this study, we explored the effect of exogenous HA and also of endogenous HA which has been synthesized by the HAS on human osteoblasts and human osteoclast precursors.

Methods: The metabolic activity of human osteoblasts was analysed via WST1-Assay in presence of HA. To investigate the effect of HA on the proliferation of human osteoblasts, BrdU ELISA assays and CyQuant assays have been performed. After adding osteogenic medium and HA to the cells, the alkaline phosphatase activity normalized on the protein concentration which has been determined by a BCA assay, has been analysed. The mineralization was explored with Alizarin Red S stainings. Initial cell adhesion and cell spreading of human osteoblasts on HA coated cell plated were studied using time-lapse microscopy. Human osteoclast precursor cells were isolated from human peripheral blood. After plating, osteoclast differentiation was stimulated by addition of M-CSF and RANKL. To analyze the osteoclastogenesis, TRAP stainings have been performed and the number of osteoclasts has been determined. The adhesion of osteoclast precursor cells was investigated with time-lapse microscopy under serum-free conditions. The impact of endogenous HA on human osteoblasts was analyzed by adding the supernatant of the cell culture of HAS overexpressing cells SCP1-HAS-eGFP. The HA concentration in these supernatants was studied through HA ELISA assays.

Results: High molecular weight HA had the highest effect on human osteoblasts. It promoted cell proliferation and cell adhesion. Endogenous HA had a more inhibiting impact on the proliferation of human osteoblasts. After osteogenic differentiation, the calcium deposits of the cells treated with HA are stained much stronger than the cells treated without HA, though alkaline phosphatase activity is slightly modified with HA treatment. The initial adhesion of the osteoclast precursor cells was accelerated by

ULMW-HA and the number of osteoclasts was elevated in the cells treated with HA, especially with ULMW-HA.

Conclusion: The impact of HA on human osteoblasts is higher, when HA with high molecular weight was used. On the contrary, the effect on human osteoclasts is more significant when HA with ultra-low molecular weight was used. This knowledge is essential for using HA in tissue engineering and clarifies that the different effects depending on the molecular weight of the HA have to be considered. Further investigation with higher molecular weight HA and more stable HA are necessary to illustrate greater effects which can be therapeutically used in bone disease treatment.

6 Literaturverzeichnis

1. Clarke, B., Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2008. 3 Suppl 3: p. S131-9.
2. Fukumoto, S. and T.J. Martin, Bone as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab*, 2009. 20(5): p. 230-6.
3. Zanatta, L.C., et al., Osteocalcin, energy and glucose metabolism. *Arq Bras Endocrinol Metabol*, 2014. 58(5): p. 444-51.
4. Moreira, C.A., D.W. Dempster, and R. Baron, Anatomy and Ultrastructure of Bone - Histogenesis, Growth and Remodeling, in *Endotext*, K.R. Feingold, et al., Editors. 2000, MDTText.com, Inc.: South Dartmouth (MA).
5. Buckwalter, J.A. and R.R. Cooper, Bone structure and function. *Instructional course lectures*, 1987. 36: p. 27-48.
6. Robles-Linares, J.A., et al., Parametric Modeling of Biomimetic Cortical Bone Microstructure for Additive Manufacturing. *Materials* (Basel, Switzerland), 2019. 12(6): p. 913.
7. Brandi, M.L., Microarchitecture, the key to bone quality. *Rheumatology*, 2009. 48(suppl_4): p. iv3-iv8.
8. Manolagas, S.C., Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocrine reviews*, 2000. 21(2): p. 115-137.
9. Brodsky, B. and A.V. Persikov, Molecular structure of the collagen triple helix. *Advances in protein chemistry*, 2005. 70: p. 301-339.
10. Biver, E., et al., Bone turnover markers for osteoporotic status assessment? A systematic review of their diagnosis value at baseline in osteoporosis. *Joint Bone Spine*, 2012. 79(1): p. 20-25.
11. Oohira, A. and H. Nogami, Elevated accumulation of hyaluronate in the tubular bones of osteogenesis imperfecta. *Bone*, 1989. 10(6): p. 409-13.
12. Su, X., et al., Organization of apatite crystals in human woven bone. *Bone*, 2003. 32(2): p. 150-62.
13. Cao, X. and D. Chen, The BMP signaling and in vivo bone formation. *Gene*, 2005. 357(1): p. 1-8.
14. Crockett, J.C., et al., Bone remodelling at a glance. *J Cell Sci*, 2011. 124(Pt 7): p. 991-8.

15. Day, T.F., et al., Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis. *Dev Cell*, 2005. 8(5): p. 739-50.
16. Hauge, E.M., et al., Cancellous bone remodeling occurs in specialized compartments lined by cells expressing osteoblastic markers. *J Bone Miner Res*, 2001. 16(9): p. 1575-82.
17. Hadjidakis, D.J. and I.I. Androulakis, Bone remodeling. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2006. 1092: p. 385-396.
18. Nakahama, K.-I., Cellular communications in bone homeostasis and repair. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 2010. 67(23): p. 4001-4009.
19. Eleftheriou, F., et al., Leptin regulation of bone resorption by the sympathetic nervous system and CART. *Nature*, 2005. 434(7032): p. 514-20.
20. Datta, H.K., et al., The cell biology of bone metabolism. *J Clin Pathol*, 2008. 61(5): p. 577-87.
21. Rochefort, G.Y., S. Pallu, and C.L. Benhamou, Osteocyte: the unrecognized side of bone tissue. *Osteoporos Int*, 2010. 21(9): p. 1457-69.
22. Uda, Y., et al., Osteocyte Mechanobiology. *Current osteoporosis reports*, 2017. 15(4): p. 318-325.
23. Weinbaum, S., S.C. Cowin, and Y. Zeng, A model for the excitation of osteocytes by mechanical loading-induced bone fluid shear stresses. *Journal of biomechanics*, 1994. 27(3): p. 339-360.
24. Malone, A.M.D., et al., Primary cilia mediate mechanosensing in bone cells by a calcium-independent mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007. 104(33): p. 13325-13330.
25. Xiao, Z., et al., Cilia-like structures and polycystin-1 in osteoblasts/osteocytes and associated abnormalities in skeletogenesis and Runx2 expression. *The Journal of biological chemistry*, 2006. 281(41): p. 30884-30895.
26. Weitzmann, M.N. and R. Pacifici, T cells: unexpected players in the bone loss induced by estrogen deficiency and in basal bone homeostasis. *Ann N Y Acad Sci*, 2007. 1116: p. 360-75.
27. Marino, S., et al., Generation and culture of osteoclasts. *BoneKEy reports*, 2014. 3: p. 570-570.
28. Feng, X. and S.L. Teitelbaum, Osteoclasts: New Insights. *Bone Res*, 2013. 1(1): p. 11-26.
29. Teitelbaum, S.L. and F.P. Ross, Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nature reviews. Genetics*, 2003. 4(8): p. 638-649.

30. Boyle, W.J., W.S. Simonet, and D.L. Lacey, Osteoclast differentiation and activation. *Nature*, 2003. 423(6937): p. 337-342.
31. Rizzoli, R., U. Yasothan, and P. Kirkpatrick, Denosumab. *Nat Rev Drug Discov*, 2010. 9(8): p. 591-2.
32. Takayanagi, H., Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nat Rev Immunol*, 2007. 7(4): p. 292-304.
33. Xing, L. and B.F. Boyce, Regulation of apoptosis in osteoclasts and osteoblastic cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005. 328(3): p. 709-20.
34. Sutherland, K.A., et al., RANKL increases the level of Mcl-1 in osteoclasts and reduces bisphosphonate-induced osteoclast apoptosis in vitro. *Arthritis Res Ther*, 2009. 11(2): p. R58.
35. Chamoux, E., et al., The p62 P392L Mutation Linked to Paget's Disease Induces Activation of Human Osteoclasts. *Molecular Endocrinology*, 2009. 23: p. 1668-80.
36. Troeltzsch, M., et al., Knochen und Skelettsystem – von der Embryologie bis zur Osteoporose Teil 1: Anatomie, Histologie, Physiologie und Pathophysiologie. *Die Quintessenz*, 2016. 67: p. 83-93.
37. Sims, N.A. and T.J. Martin, Coupling Signals between the Osteoclast and Osteoblast: How are Messages Transmitted between These Temporary Visitors to the Bone Surface? *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2015. 6: p. 41.
38. Salbach-Hirsch, J., et al., Regenerative potential of glycosaminoglycans for skin and bone. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, 2011. 90: p. 625-35.
39. Prince, C.W., Roles of hyaluronan in bone resorption. *BMC Musculoskelet Disord*, 2004. 5: p. 12.
40. Fraser, J.R., T.C. Laurent, and U.B. Laurent, Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *J Intern Med*, 1997. 242(1): p. 27-33.
41. Toole, B.P., Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue. *Nat Rev Cancer*, 2004. 4(7): p. 528-39.
42. Bansal, J., S. Kedige, and S. Anand, Hyaluronic acid: A promising mediator for periodontal regeneration. *Indian Journal of Dental Research*, 2010. 21(4): p. 575-578.
43. Bastow, E.R., et al., Hyaluronan synthesis and degradation in cartilage and bone. *Cell Mol Life Sci*, 2008. 65(3): p. 395-413.
44. Allison, D.D. and K.J. Grande-Allen, Review. Hyaluronan: a powerful tissue engineering tool. *Tissue Eng*, 2006. 12(8): p. 2131-40.

45. Hardingham, T.E. and H. Muir, The specific interaction of hyaluronic acid with cartilage proteoglycans. *Biochimica et biophysica acta*, 1972. 279(2): p. 401-405.
46. McKee, C.M., et al., Hyaluronan (HA) fragments induce chemokine gene expression in alveolar macrophages. The role of HA size and CD44. *J Clin Invest*, 1996. 98(10): p. 2403-13.
47. Hodge-Dufour, J., et al., Induction of IL-12 and chemokines by hyaluronan requires adhesion-dependent priming of resident but not elicited macrophages. *J Immunol*, 1997. 159(5): p. 2492-500.
48. West, D.C. and S. Kumar, Hyaluronan and angiogenesis. *Ciba Found Symp*, 1989. 143: p. 187-201; discussion 201-7, 281-5.
49. Schoenfelder, M. and R. Einspanier, Expression of hyaluronan synthases and corresponding hyaluronan receptors is differentially regulated during oocyte maturation in cattle. *Biol Reprod*, 2003. 69(1): p. 269-77.
50. Trochon, V., et al., Evidence of involvement of CD44 in endothelial cell proliferation, migration and angiogenesis in vitro. *Int J Cancer*, 1996. 66(5): p. 664-8.
51. West, D.C., et al., Angiogenesis induced by degradation products of hyaluronic acid. *Science*, 1985. 228(4705): p. 1324-6.
52. Foschi, D., et al., Hyaluronic acid prevents oxygen free-radical damage to granulation tissue: a study in rats. *Int J Tissue React*, 1990. 12(6): p. 333-9.
53. Toole, B.P. and V.C. Hascall, Hyaluronan and tumor growth. *Am J Pathol*, 2002. 161(3): p. 745-7.
54. Itano, N., et al., Abnormal accumulation of hyaluronan matrix diminishes contact inhibition of cell growth and promotes cell migration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. 99(6): p. 3609-14.
55. Hascall, V.C., et al., Intracellular hyaluronan: a new frontier for inflammation? *Biochim Biophys Acta*, 2004. 1673(1-2): p. 3-12.
56. Thomas, N.K. and T.J. Brown, ABC transporters do not contribute to extracellular translocation of hyaluronan in human breast cancer in vitro. *Exp Cell Res*, 2010. 316(7): p. 1241-53.
57. Schulz, T., U. Schumacher, and P. Prehm, Hyaluronan export by the ABC transporter MRP5 and its modulation by intracellular cGMP. *J Biol Chem*, 2007. 282(29): p. 20999-1004.
58. Weigel, P.H. and P.L. DeAngelis, Hyaluronan synthases: a decade-plus of novel glycosyltransferases. *J Biol Chem*, 2007. 282(51): p. 36777-81.

59. Tlapak-Simmons, V.L., et al., Properties of the hyaluronan synthase from group A *Streptococcus pyogenes*. *Biochem Soc Trans*, 1999. 27(2): p. 105-9.
60. Stridh, S., F. Palm, and P. Hansell, Renal interstitial hyaluronan: Functional aspects during normal and pathological conditions. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 2012. 302: p. R1235-49.
61. Itano, N., et al., Three isoforms of mammalian hyaluronan synthases have distinct enzymatic properties. *J Biol Chem*, 1999. 274(35): p. 25085-92.
62. Adams, J.R., G. Sander, and S. Byers, Expression of hyaluronan synthases and hyaluronidases in the MG63 osteoblast cell line. *Matrix Biol*, 2006. 25(1): p. 40-6.
63. Calabro, A., et al., Characterization of hyaluronan synthase expression and hyaluronan synthesis in bone marrow mesenchymal progenitor cells: predominant expression of HAS1 mRNA and up-regulated hyaluronan synthesis in bone marrow cells derived from multiple myeloma patients. *Blood*, 2002. 100(7): p. 2578-85.
64. Tien, J.Y. and A.P. Spicer, Three vertebrate hyaluronan synthases are expressed during mouse development in distinct spatial and temporal patterns. *Dev Dyn*, 2005. 233(1): p. 130-41.
65. Qu, C., et al., Extensive CD44-dependent hyaluronan coats on human bone marrow-derived mesenchymal stem cells produced by hyaluronan synthases HAS1, HAS2 and HAS3. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 2014. 48: p. 45-54.
66. Jacobson, A., et al., Expression of human hyaluronan synthases in response to external stimuli. *Biochem J*, 2000. 348 Pt 1: p. 29-35.
67. Noonan, K.J., et al., Spatial distribution of CD44 and hyaluronan in the proximal tibia of the growing rat. *J Orthop Res*, 1996. 14(4): p. 573-81.
68. Fujii, Y., et al., Crosslinking of CD44 on human osteoblastic cells upregulates ICAM-1 and VCAM-1. *FEBS Lett*, 2003. 539(1-3): p. 45-50.
69. Yamazaki, M., et al., Spatial and temporal distribution of CD44 and osteopontin in fracture callus. *J Bone Joint Surg Br*, 1999. 81(3): p. 508-15.
70. Spessotto, P., et al., Hyaluronan-CD44 interaction hampers migration of osteoclast-like cells by down-regulating MMP-9. *J Cell Biol*, 2002. 158(6): p. 1133-44.
71. Sterling, H., C. Saginario, and A. Vignery, CD44 occupancy prevents macrophage multinucleation. *J Cell Biol*, 1998. 143(3): p. 837-47.
72. Vigetti, D., et al., Hyaluronan: biosynthesis and signaling. *Biochim Biophys Acta*, 2014. 1840(8): p. 2452-9.

73. Girish, K.S. and K. Kemparaju, The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: a biological overview. *Life Sci*, 2007. 80(21): p. 1921-43.
74. Knopf-Marques, H., et al., Hyaluronic Acid and Its Derivatives in Coating and Delivery Systems: Applications in Tissue Engineering, Regenerative Medicine and Immunomodulation. *Adv Healthc Mater*, 2016. 5(22): p. 2841-2855.
75. Banerji, S., et al., LYVE-1, a new homologue of the CD44 glycoprotein, is a lymph-specific receptor for hyaluronan. *J Cell Biol*, 1999. 144(4): p. 789-801.
76. Weigel, J.A. and P.H. Weigel, Characterization of the recombinant rat 175-kDa hyaluronan receptor for endocytosis (HARE). *J Biol Chem*, 2003. 278(44): p. 42802-11.
77. Lesley, J., R. Hyman, and P.W. Kincade, CD44 and its interaction with extracellular matrix. *Adv Immunol*, 1993. 54: p. 271-335.
78. Hayflick, J.S., P. Kilgannon, and W.M. Gallatin, The intercellular adhesion molecule (ICAM) family of proteins. New members and novel functions. *Immunol Res*, 1998. 17(3): p. 313-27.
79. Turley, E.A., et al., Expression and function of a receptor for hyaluronan-mediated motility on normal and malignant B lymphocytes. *Blood*, 1993. 81(2): p. 446-53.
80. Bono, P., et al., Layilin, a novel integral membrane protein, is a hyaluronan receptor. *Mol Biol Cell*, 2001. 12(4): p. 891-900.
81. Leach, J.B., et al., Development of photocrosslinkable hyaluronic acid-polyethylene glycol-peptide composite hydrogels for soft tissue engineering. *J Biomed Mater Res A*, 2004. 70(1): p. 74-82.
82. Ariyoshi, W., et al., Mechanisms involved in enhancement of osteoclast formation and function by low molecular weight hyaluronic acid. *J Biol Chem*, 2005. 280(19): p. 18967-72.
83. Larjava, H., et al., The effect of human dental plaque on bone resorption and hyaluronic acid synthesis in in-vitro cultures of fetal rat calvaria. *Arch Oral Biol*, 1982. 27(2): p. 147-50.
84. Severson, A.R., The effect of cyclic nucleotides on the incorporation of 3H-glucosamine into hyaluronate in bone organ culture. *Horm Metab Res*, 1978. 10(3): p. 256-60.
85. Severson, A.R., Inhibition of bone resorption and increased incorporation of 3H-glucosamine into hyaluronate in bone organ cultures treated with dibutyl cyclic AMP and colchicine. *Exp Cell Biol*, 1983. 51(2): p. 70-6.
86. Severson, A.R., Colchicine stimulation of hyaluronate synthesis and secretion in bone organ culture. *J Cell Physiol*, 1979. 101(2): p. 341-8.

87. Chang, E.J., et al., Hyaluronan inhibits osteoclast differentiation via Toll-like receptor 4. *J Cell Sci*, 2007. 120(Pt 1): p. 166-76.
88. Itoh, S., et al., Enhancement of bone ingrowth in a titanium fiber mesh implant by rhBMP-2 and hyaluronic acid. *J Mater Sci Mater Med*, 2001. 12(7): p. 575-81.
89. Sasaki, T. and C. Watanabe, Stimulation of osteoinduction in bone wound healing by high-molecular hyaluronic acid. *Bone*, 1995. 16(1): p. 9-15.
90. Cho, B.C., et al., The role of hyaluronic acid, chitosan, and calcium sulfate and their combined effect on early bony consolidation in distraction osteogenesis of a canine model. *J Craniofac Surg*, 2002. 13(6): p. 783-93.
91. Huang, L., et al., The effect of hyaluronan on osteoblast proliferation and differentiation in rat calvarial-derived cell cultures. *J Biomed Mater Res A*, 2003. 66(4): p. 880-4.
92. Wong, G.L., Paracrine interactions in bone-secreted products of osteoblasts permit osteoclasts to respond to parathyroid hormone. *J Biol Chem*, 1984. 259(7): p. 4019-22.
93. Benisch, P., et al., The transcriptional profile of mesenchymal stem cell populations in primary osteoporosis is distinct and shows overexpression of osteogenic inhibitors. *PLoS One*, 2012. 7(9): p. e45142.
94. Gao, F., et al., Hypoxia-induced alterations in hyaluronan and hyaluronidase. *Adv Exp Med Biol*, 2005. 566: p. 249-56.
95. Boskey, A.L. and B.L. Dick, Hyaluronan interactions with hydroxyapatite do not alter in vitro hydroxyapatite crystal proliferation and growth. *Matrix*, 1991. 11(6): p. 442-6.
96. Lan, Y., C. Qin, and R. Jiang, Requirement of Hyaluronan Synthase-2 in Craniofacial and Palate Development. *J Dent Res*, 2019. 98(12): p. 1367-1375.
97. Chong, B.F., et al., Microbial hyaluronic acid production. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2005. 66(4): p. 341-51.
98. Bowman, S., et al., Recent advances in hyaluronic acid based therapy for osteoarthritis. *Clin Transl Med*, 2018. 7(1): p. 6.
99. Ghosh, P. and D. Guidolin, Potential mechanism of action of intra-articular hyaluronan therapy in osteoarthritis: are the effects molecular weight dependent? *Semin Arthritis Rheum*, 2002. 32(1): p. 10-37.
100. Greenberg, D.D., et al., Biochemical effects of two different hyaluronic acid products in a co-culture model of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*, 2006. 14(8): p. 814-22.

101. Akmal, M., et al., The effects of hyaluronic acid on articular chondrocytes. *J Bone Joint Surg Br*, 2005. 87(8): p. 1143-9.
102. Reiprich, S., et al., Adhesive Properties of the Hyaluronan Pericellular Coat in Hyaluronan Synthases Overexpressing Mesenchymal Stem Cells. *Int J Mol Sci*, 2020. 21(11).
103. Golub, E.E. and K. Boesze-Battaglia, The role of alkaline phosphatase in mineralization. *Current Opinion in Orthopaedics*, 2007. 18(5): p. 444-448.
104. Sapir-Koren, R. and G. Livshits, Bone Mineralization and Regulation of Phosphate Homeostasis. *IBMS BoneKEy*, 2011. 8(6).
105. Schmidt, J.R., et al., Osteoblast-released Matrix Vesicles, Regulation of Activity and Composition by Sulfated and Non-sulfated Glycosaminoglycans. *Molecular & cellular proteomics : MCP*, 2016. 15(2): p. 558-572.
106. Qu, C., et al., Extensive CD44-dependent hyaluronan coats on human bone marrow-derived mesenchymal stem cells produced by hyaluronan synthases HAS1, HAS2 and HAS3. *Int J Biochem Cell Biol*, 2014. 48: p. 45-54.
107. Wong, G.L., R.A. Luben, and D.V. Cohn, 1,25-dihydroxycholecalciferol and parathormone: effects on isolated osteoclast-like and osteoblast-like cells. *Science*, 1977. 197(4304): p. 663-5.
108. Wong, G.L., Basal activities and hormone responsiveness of osteoclast-like and osteoblast-like bone cells are regulated by glucocorticoids. *J Biol Chem*, 1979. 254(14): p. 6337-40.
109. Luben, R.A., G.L. Wong, and D.V. Cohn, Biochemical characterization with parathormone and calcitonin of isolated bone cells: provisional identification of osteoclasts and osteoblasts. *Endocrinology*, 1976. 99(2): p. 526-34.
110. Chopra, R.K., et al., Newly synthesized proteoglycans secreted by sequentially derived populations of cells from new-born rat calvaria: effects of transforming growth factor-beta and matrigenin activity. *Cell Differ Dev*, 1990. 32(1): p. 47-59.
111. Salbach-Hirsch, J., et al., Sulfated glycosaminoglycans support osteoblast functions and concurrently suppress osteoclasts. *J Cell Biochem*, 2014. 115(6): p. 1101-11.
112. Cyphert, J.M., C.S. Trempus, and S. Garantziotis, Size Matters: Molecular Weight Specificity of Hyaluronan Effects in Cell Biology. *Int J Cell Biol*, 2015. 2015: p. 563818.
113. Stern, R., Devising a pathway for hyaluronan catabolism: are we there yet? *Glycobiology*, 2003. 13(12): p. 105r-115r.

114. Andre, B., et al., Hyal2 is a glycosylphosphatidylinositol-anchored, lipid raft-associated hyaluronidase. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011. 411(1): p. 175-9.
115. Lepperdinger, G., B. Strobl, and G. Kreil, HYAL2, a human gene expressed in many cells, encodes a lysosomal hyaluronidase with a novel type of specificity. *J Biol Chem*, 1998. 273(35): p. 22466-70.
116. Puissant, E. and M. Boonen, Monocytes/Macrophages Upregulate the Hyaluronidase HYAL1 and Adapt Its Subcellular Trafficking to Promote Extracellular Residency upon Differentiation into Osteoclasts. *PLOS ONE*, 2016. 11(10): p. e0165004.
117. Khaldoyanidi, S.K., et al., Hyaluronan in the healthy and malignant hematopoietic microenvironment. *Adv Cancer Res*, 2014. 123: p. 149-89.
118. Schnabelrauch, M., D. Scharnweber, and J. Schiller, Sulfated glycosaminoglycans as promising artificial extracellular matrix components to improve the regeneration of tissues. *Curr Med Chem*, 2013. 20(20): p. 2501-23.
119. Allison, D.D., et al., Differential effects of exogenous and endogenous hyaluronan on contraction and strength of collagen gels. *Acta Biomater*, 2009. 5(4): p. 1019-26.
120. Brinck, J. and P. Heldin, Expression of recombinant hyaluronan synthase (HAS) isoforms in CHO cells reduces cell migration and cell surface CD44. *Exp Cell Res*, 1999. 252(2): p. 342-51.
121. Nusgens, B.V., [Hyaluronic acid and extracellular matrix: a primitive molecule?]. *Ann Dermatol Venereol*, 2010. 137 Suppl 1: p. S3-8.
122. Solis, M.A., et al., Hyaluronan regulates cell behavior: a potential niche matrix for stem cells. *Biochem Res Int*, 2012. 2012: p. 346972.
123. Krieghoff, J., et al., Increased pore size of scaffolds improves coating efficiency with sulfated hyaluronan and mineralization capacity of osteoblasts. *Biomater Res*, 2019. 23: p. 26.
124. Asparuhova, M.B., et al., Role of hyaluronan in regulating self-renewal and osteogenic differentiation of mesenchymal stromal cells and pre-osteoblasts. *Clinical Oral Investigations*, 2020. 24(11): p. 3923-3937.
125. Miyake, K., et al., Hyaluronate can function as a cell adhesion molecule and CD44 participates in hyaluronate recognition. *J Exp Med*, 1990. 172(1): p. 69-75.
126. Hynes, R.O., Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*, 2002. 110(6): p. 673-87.
127. Kaneko, K., et al., Hyaluronan inhibits BMP-induced osteoblast differentiation. *FEBS Letters*, 2015. 589(4): p. 447-454.

128. Evanko, S.P., et al., Hyaluronan-dependent pericellular matrix. *Advanced drug delivery reviews*, 2007. 59(13): p. 1351-1365.
129. Zimmerman, E., B. Geiger, and L. Addadi, Initial stages of cell-matrix adhesion can be mediated and modulated by cell-surface hyaluronan. *Biophysical journal*, 2002. 82(4): p. 1848-1857.
130. Geiger, B., et al., Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2001. 2(11): p. 793-805.
131. Petit, V. and J.P. Thiery, Focal adhesions: structure and dynamics. *Biol Cell*, 2000. 92(7): p. 477-94.
132. Zamir, E. and B. Geiger, Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. *J Cell Sci*, 2001. 114(Pt 20): p. 3583-90.
133. Ng, I.C., et al., Anatomy and Physiology for Biomaterials Research and Development, in *Encyclopedia of Biomedical Engineering*, R. Narayan, Editor. 2019, Elsevier: Oxford. p. 225-236.
134. Lian, J.B. and G.S. Stein, Development of the osteoblast phenotype: molecular mechanisms mediating osteoblast growth and differentiation. *Iowa Orthop J*, 1995. 15: p. 118-40.
135. Reiprich, S., et al., Hyaluronan Synthases' Expression and Activity Are Induced by Fluid Shear Stress in Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. *International journal of molecular sciences*, 2021. 22(6): p. 3123.
136. Chen, Z.-H., et al., The role of hyaluronic acid in biomineralization. *Frontiers of Materials Science*, 2012. 6(4): p. 283-296.
137. Knudson, C.B. and W. Knudson, Hyaluronan-binding proteins in development, tissue homeostasis, and disease. *Faseb j*, 1993. 7(13): p. 1233-41.
138. Fisher, L.W.T.N.o.t.P.o.B.E.M.B., AL, USA, 1985, *The Nature of the Proteoglycans of Bone*. 1985: EBESCO Media.
139. Zou, L., et al., Effect of hyaluronan on osteogenic differentiation of porcine bone marrow stromal cells in vitro. *J Orthop Res*, 2008. 26(5): p. 713-20.
140. Mathews, S., et al., Glycosaminoglycans enhance osteoblast differentiation of bone marrow derived human mesenchymal stem cells. *J Tissue Eng Regen Med*, 2014. 8(2): p. 143-52.
141. Zhao, N., et al., Effect of molecular weight and concentration of hyaluronan on cell proliferation and osteogenic differentiation in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2015. 465(3): p. 569-574.
142. Simmons, D.J., *Skeletal research: an experimental approach*. 2012: Elsevier.

143. Nakamura, H. and H. Ozawa, Immunolocalization of CD44 and the ERM family in bone cells of mouse tibiae. *J Bone Miner Res*, 1996. 11(11): p. 1715-22.
144. Salbach, J., et al., The effect of the degree of sulfation of glycosaminoglycans on osteoclast function and signaling pathways. *Biomaterials*, 2012. 33(33): p. 8418-29.
145. Ariyoshi, W., et al., High molecular weight hyaluronic acid regulates osteoclast formation by inhibiting receptor activator of NF-kappaB ligand through Rho kinase. *Osteoarthritis Cartilage*, 2014. 22(1): p. 111-20.
146. Lee, C.W., et al., Potential anti-osteoporotic activity of low-molecular weight hyaluronan by attenuation of osteoclast cell differentiation and function in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014. 449(4): p. 438-43.
147. Takeda, K. and S. Akira, Toll-like receptors in innate immunity. *International Immunology*, 2005. 17(1): p. 1-14.
148. Petrey, A.C. and C.A. de la Motte, Hyaluronan, a crucial regulator of inflammation. *Front Immunol*, 2014. 5: p. 101.
149. Haubeck, H.D., Osteoprotegerin, in *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*, A.M. Gressner and T. Arndt, Editors. 2019, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 1801-1801.
150. Cao, J.J., et al., Hyaluronan increases RANKL expression in bone marrow stromal cells through CD44. *J Bone Miner Res*, 2005. 20(1): p. 30-40.
151. Itano, N. and K. Kimata, Mammalian hyaluronan synthases. *IUBMB Life*, 2002. 54(4): p. 195-9.
152. Liu, M., C. Tolg, and E. Turley, Dissecting the Dual Nature of Hyaluronan in the Tumor Microenvironment. *Frontiers in immunology*, 2019. 10: p. 947-947.
153. Schett, G., Osteoimmunologie. *Zeitschrift für Rheumatologie*, 2016. 75(6): p. 531-533.

7 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ALP	Alkalische Phosphatase
BCA	Bicinchoninsäure
BclX	engl. B-cell lymphome- extra large
BrdU	Bromdesoxyuridin
CD44	engl. Cluster of differentiation 44
CFTR	engl. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
DAPI	4', 6'-Diamidin-2-phenylindol
D-MEM	engl. Dulbecco's minimum essential medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECF	Extrazelluläre Flüssigkeiten
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	engl. Enzyme linked immunosorbent assay
ERK	engl. Extracellular signal regulated kinase
FBS	Fetales Kälberserum
FGF 23	engl. Fibroblast growth factor 23
HA	Hyaluronan
HARE	engl. Hyaluronan receptor for endocytosis
HAS	Hyaluronansynthase

HMMR	engl. Hyaluronan-mediated motility receptor
HMW	engl. High molecular weight
HOB	Humane Osteoblasten
HOC	Humane Osteoklasten
IGF	engl. Insulin like growth factor
IL-6	Interleukin 6
LMW	engl. Low molecular weight
LYVE1	Endothelialer Hyaluronan Rezeptor 1 der Lymphgefäße
Mcl-1	engl. Myeloid cell leukaemia sequence 1
M-CSF	engl. Macrophage colony stimulating factor
MRP5	engl. Multidrug resistance-associated protein
mTOR	engl. Mammalian target of rapamycin
OPG	Osteoprotegerin
Osx	Osterix
PFA	Paraformaldehyd
RANKL	engl. Receptor activator of NF- κ B ligand
RHAMM	engl. Receptor for hyaluronan mediated motility
Runx2	engl. Runt related transcription factor 2
SIBLING	engl. Small integrin binding protein
TGF- β	engl. Tissue growth factor β
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TRAP	engl. Tartrate-resistant acid phosphatase

U	Units
ULMW	engl. Ultra-low molecular weight
w/o	engl. without; Kontrollgruppe ohne Hyaluronan
WST-1	engl. Water-soluble Tetrazolium 1

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei dieser Arbeit unterstützt und begleitet haben.

Ich danke meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Wolfgang Böcker für die Vergabe dieses innovativen Themas und für das Ermöglichen des Einstiegs in die wissenschaftliche Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. rer. nat. Veronika Schönitzer für ihre Betreuung. Ihre fachliche Unterstützung und ihre Anregungen waren für das Zustandekommen dieser Arbeit von maßgeblicher Bedeutung.

Herrn PD Dr. Attila Aszodi, Leiter des ExperiMed Labors, danke ich für die Bereitstellung der Laborräume und der Materialien. Außerdem gebührt Sebastian Reiprich mein aufrichtiger Dank für seine stetige Hilfsbereitschaft.

Mein größter Dank gilt meiner Familie und insbesondere meinen Eltern für ihre immerwährende Fürsorglichkeit und Motivation. Meinen Geschwistern, Sadaf Abdullah, Ahdiya Abdullah und Reschad Abdullah, danke ich herzlichst für ihre konstruktive Kritik und Unterstützung.

Eidesstaatliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel: „Der Einfluss von Hyaluronan auf humane Osteoblasten und Osteoklasten“ selbstständig 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 habe 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.

Anusha Abdullah

München, den 08.12.2022