

Untersuchung der zellulären Verträglichkeit von Polymeren mit PEI-Kern und Glutamatschale in vitro

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Thomas Manfred Bernhard Franke
aus Berlin

Gießen (2020)

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Labor für experimentelle Unfallchirurgie der Klinik für Unfall-, Hand- und
Wiederherstellungschirurgie des Fachbereichs Medizin der
Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachterin: Prof. Dr. Katrin S. Lips

Gutachter: Prof. Dr. Jörg Meyle

Tag der Disputation: 09.07.2021

1 EINLEITUNG	1
1.1 KNOCHEN	1
1.1.1 Osteoklasten	1
1.1.2 Osteoblasten und Osteozyten	2
1.1.3 Mesenchymale Knochenstammzellen	3
1.2 OSTEOPOROSE	6
1.3 NANOPARTIKEL	9
1.3.1 Nanopartikel in der Medizin	10
1.4 BRAIN-DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR (BDNF)	13
1.5 ZIELSETZUNG UND FRAGESTELLUNG	17
2 MATERIAL UND METHODEN	18
2.1 KULTIVIERUNG MESENCHYMALER STAMMZELLEN	18
2.2 POLYETHYLENIMINNANOPARTIKEL	20
2.3 KONVENTIONELLE LICHTMIKROSKOPIE	22
2.4 FLUORESZENZMIKROSKOPIE	22
2.5 LAKTATDEHYDROGENASE-ASSAY	24
2.6 INTERLEUKIN-6 ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (IL-6 ELISA)	26
2.7 REAL-TIME POLYMERASE-KETTENREAKTION (REAL-TIME PCR)	28
2.7.1 Isolierung von Ribonukleinsäuren (RNA)	28
2.7.2 Messung von Konzentration und Reinheit der gewonnenen RNA	29
2.7.3 Synthese von cDNA	29
2.7.4 Bedingungen der Real-Time PCR	30
2.7.5 Auswertung der Real-Time PCR	31
2.8 STATISTISCHE AUSWERTUNG	32
3 ERGEBNISSE	33
3.1 KONVENTIONELLE LICHTMIKROSKOPIE	33
3.2 FLUORESZENZMIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNG DER AUFNAHME RHODAMIN B-MARKIERTER NANOPARTIKEL IN DIE ZELLEN	42
3.3 LAKTATDEHYDROGENASE-ASSAY	44
3.4 IL-6 ELISA	51
3.5 ERGEBNISSE DER REAL-TIME PCR	53
3.5.1 Cyclin D1 (CCND1)	53
3.5.2 C/EBP homologous protein (CHOP)	56
3.5.3 NAD(P)H dehydrogenase (quinone 1) (NQO1)	60
3.5.4 Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 3 (RIPK3)	63
3.5.5 Interleukin-6 (IL-6)	65
4 DISKUSSION	68
4.1 POTENTIELLE ZYTOTOXISCHE WIRKUNG DER VERWENDETEN NANOPARTIKEL	68
4.1.1 Untersuchungsmethoden	68
4.1.2 Lichtmikroskopische Lebendzellbeobachtung	70
4.1.3 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Nanopartikelaufnahme	70
4.1.4 Zytotoxische Effekte der untersuchten Nanopartikel	72
4.2 POTENTIELLE PROINFLAMMATORISCHE WIRKUNG DER VERWENDETEN NANOPARTIKEL	75
4.2.1 Untersuchungsmethoden	75
4.2.2 Proinflammatorische Wirkung der verwendeten Nanopartikel	75
4.3 BEEINFLUSSUNG DES ZELLZYKLUS UND ZELLSTOFFWECHSELS	80
4.3.1 Einfluss der verwendeten Nanopartikel auf die Expression von CCND1	80
4.3.2 Einfluss der verwendeten Nanopartikel auf die Expression von CHOP	82
4.3.3 Einfluss der verwendeten Nanopartikel auf die Expression von NQO1	86
4.3.4 Einfluss der verwendeten Nanopartikel auf die Expression von RIPK3	88
4.4 EINFLUSS VON BDNF	91
4.5 BEANTWORTUNG DER FRAGESTELLUNG UND AUSBLICK	92
5 ZUSAMMENFASSUNG	96
6 SUMMARY	98

7 ABBILDUNGSVERZEICHNIS	100
8 TABELLENVERZEICHNIS	102
9 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	103
10 LITERATURVERZEICHNIS.....	107
11 ERKLÄRUNG ZUR DISSERTATION	123
12 DANKSAGUNG	124

1 Einleitung

1.1 Knochen

Der menschliche Knochen stellt ein hochspezialisiertes, mineralisiertes Bindegewebe dar, welches im menschlichen Körper in vielerlei Hinsicht eine tragende Rolle einnimmt. Als eine der augenscheinlichsten bietet er Muskeln und deren Sehnen Ursprungs- und Ansatzpunkte und ist damit unentbehrlich für die Lokomotion. Außerdem dient er, mit seiner hohen mechanischen Belastbarkeit, vielerorts dem Schutz innerer Organe. Doch auch in weniger offensichtlichen Bereichen spielt Knochen eine wichtige Rolle. Beispielsweise stellt er ein geeignetes Milieu für das Knochenmark dar, was ihn zu einem wichtigen Faktor für die ungestörte Funktion der Hämatopoese und des Immunsystems macht (Lorenzo et al., 2008; Valderrábano und Wu, 2018). Zusätzliche Bedeutung kommt ihm bei der Aufrechterhaltung der Elektrolythomöostase als Reservoir, vornehmlich für Kalzium und Phosphat, zu (Doyle und de Beur, 2008; Pu et al., 2016). Auf Grund der durch diese unterschiedlichen Anforderungen geprägten Funktionen handelt es sich bei Knochen, entgegen seines auf den ersten Blick statischen Erscheinungsbildes, um ein in hohem Maße dynamisches und anpassungsfähiges Gewebe (Datta et al., 2008; Florencio-Silva et al., 2015). Um all die ihm abverlangten Eigenschaften zu erreichen, ist ein Zusammenspiel verschiedener, spezialisierter Zellpopulationen nötig. Im Wesentlichen für den Knochenstoffwechsel verantwortlich sind dabei zwei verschiedene Zelllinien. Einerseits die osteoklastäre Zelllinie, welche sich von monozytären Vorläuferzellen ableitet (Marks und Walker, 1981; Loutit und Nisbet, 1982; Kurihara, 1989), andererseits die osteogene Zelllinie, welche ihren Ursprung in mesenchymalen Stammzellen (MSC) hat (Pittenger et al., 1999).

1.1.1 Osteoklasten

Osteoklasten sind für die Auflösung von Knochengewebe im Rahmen des Remodeling des Knochens verantwortlich. Der Begriff Remodeling beschreibt den kontinuierlichen Prozess der Erneuerung vorhandener Knochensubstanz. Es dient der Ausbesserung mikroskopischer Knochenschäden und der Anpassung des Knochengewebes an die vorherrschenden mechanischen Krafteinwirkungen, wobei davon auszugehen ist, dass das ausgewachsene Skelett auf diese Weise etwa alle 10 Jahre komplett erneuert wird (Manolagas, 2000). Zuerst erfolgt dabei die Auflösung der anorganischen, später im

zeitlichen Verlauf auch die Auflösung der organischen Komponenten des Knochengewebes (Blair et al., 1986). Hierzu schaffen Osteoklasten bei Aktivierung durch Kontakt mit ihrem Substrat einen von der Umgebung weitgehend abgetrennten Bereich, welcher durch einen engen, ringförmigen Kontakt zwischen der Plasmamembran der Osteoklasten und der Oberfläche des Knochens ermöglicht wird (Lakkakorpi et al., 1989; Zhou et al., 1993; Väänänen und Horton, 1995). Die der Knochenoberfläche gegenüberliegende Zellmembran bildet die sogenannte *ruffled border*, welche einer Vergrößerung der Zelloberfläche durch die Bildung von Membranausstülpungen entspricht (Stenbeck, 2002). Im Bereich der Resorptionsfläche kommt es durch die Aktivität einer Adenosintriphosphat (ATP)-abhängigen Protonenpumpe zu einem Abfall des pH-Wertes, der durch Auflösung des Kalziumhydroxylapatits zu einem Abbau der anorganischen Knochensubstanz führt (Silver et al., 1988; Blair et al., 1989). Die organische Knochensubstanz besteht zum überwiegenden Teil aus Kollagen Typ I. Bei ihrem Abbau spielen vor allem die Cysteinproteinase Cathepsin K und verschiedene Matrixmetalloproteasen eine Rolle, welche ebenfalls durch Osteoklasten gebildet werden (Everts et al., 1992; Delaissé et al., 2003).

1.1.2 Osteoblasten und Osteozyten

Bei Osteoblasten handelt es sich um kuboide Zellen, die für den Aufbau des mineralisierten Knochengewebes verantwortlich sind (Pritchard, 1952). Dieser erfolgt im Wesentlichen in zwei charakteristischen Schritten. Im ersten Schritt wird die organische Knochenmatrix gebildet. Dies geschieht durch die Sekretion von Kollagenen und anderen Proteinen, wie zum Beispiel Osteonectin und Osteopontin sowie Proteoglykanen (Florencio-Silva et al., 2015). Der zweite Schritt beinhaltet die Mineralisierung der entstandenen organischen Knochenmatrix. Um diese zu initiieren, bilden Osteoblasten sogenannte Matrixvesikel. In der Membran dieser Abschnürungen sind verschiedene Proteine enthalten, welche für einen Anstieg des Kalzium- und des Phosphatspiegels im Inneren der Matrixvesikel sorgen. Wird das Löslichkeitsprodukt für Kalzium und Phosphat im Inneren der Vesikel überschritten, kommt es zur Bildung von Kalziumphosphatkristallen. Diese werden im Folgenden in den extravasikulären Raum freigesetzt und dienen dort der Anlagerung weiteren Kalziums und Phosphats, wodurch letztendlich eine Mineralisierung der organischen Knochenmatrix erreicht wird (Anderson, 1995, 2003). Die Lebensdauer aktiver Osteoblasten liegt bei bis zu drei Monaten (Parfitt, 1994). Jedoch kann diese durch die Umwandlung zu Osteozyten, welche etwa 95% aller Knochenzellen stellen, auf mehrere Jahrzehnte ausgedehnt

werden (Knothe Tate et al., 2004). Es bestehen unterschiedliche Theorien darüber, wie genau der Übergang von Osteoblasten zu Osteozyten vonstatten geht und ob sich die betreffenden Osteoblasten selbst in das entstehende Knochengewebe einbetten oder von angrenzenden Osteoblasten mit höherer Syntheseleistung eingeschlossen werden (Franz-Odenaal et al., 2006). Klar ist jedoch, dass die Osteozyten keinesfalls von den anderen Zellen des Knochens isoliert sind, sondern über ein Netzwerk aus dendritischen Ausstülpungen, welche durch die Canaliculi innerhalb des Knochens verlaufen, mit benachbarten Osteozyten, Zellen an der Oberfläche des Knochens sowie Zellen des Knochenmarks in Verbindung stehen (Manolagas, 2006). Die Kommunikation zwischen den verschiedenen Zellen findet dabei direkt über Zell-Zell-Kontakte (Doty, 1981; Palazzini et al., 1998) sowie parakrin, sowohl über kurzlebige, kleine Metabolite wie Prostaglandine, Stickstoffmonoxid (NO) und ATP (Zaman et al., 1999; Cherian, 2005; Genetos et al., 2007), als auch über Makromoleküle wie *insulin-like growth factor I* (IGF-I) und Sclerostin statt (Lean et al., 1995; Poole, 2005). Auf diese Weise nehmen Osteozyten Einfluss auf die Aktivität der Osteoklasten sowie der Osteoblasten (Marotti et al., 1992; Xiong et al., 2011). Kombiniert mit ihrer Fähigkeit, die bei der Beanspruchung des Knochens auftretenden mechanische Belastung wahrzunehmen (Weinbaum et al., 1994; Takai et al., 2004), verfügen Osteozyten über optimale Voraussetzungen, das Remodeling von Knochengewebe zu beeinflussen und bedarfsgerecht zu koordinieren (Schaffler et al., 2014).

1.1.3 Mesenchymale Knochenstammzellen

Der Begriff „mesenchymale Stammzellen“ (MSC) wurde erstmalig durch Caplan (1991) eingeführt. Er beschrieb diese als eine Art multipotenter adulter Stammzellen, welche das Potential haben, sich zu verschiedenen Zelltypen mesenchymalen Ursprungs differenzieren zu können. Zuvor waren MSC bereits von Friedenstein et al. (1968) aus Knochenmark von Mäusen isoliert worden, welche diese als fibroblastische Vorläuferzellen beschrieben und ihnen keinen definitiven anatomischen Platz innerhalb des Knochenmarks zuordnen konnten. Durch Pittenger et al. (1999) gelang erstmalig die Isolation aus humanem Knochenmark. Seitdem konnten MSC aus verschiedenen Gewebetypen, darunter Fettgewebe (Wagner et al., 2005), Haut und Vorhaut (Bartsch et al., 2005; Riekstina et al., 2008), Skelettmuskel (Williams et al., 1999), Gehirn (Paul et al., 2012), Leber (Pan et al., 2011), Nieren (Gupta et al., 2006), Milz und Thymus (Krampera et al., 2007a), Pankreas (Hu et al., 2003), Synovialmembran (Harvanová et al., 2011) und Nabelschnur (McElreavey et al., 1991), gewonnen werden.

Durch Dominici et al. (2006) wurden im Rahmen eines Positionspapiers der *International Society for Cellular Therapy* die sogenannten Minimalkriterien zur Charakterisierung multipotenter mesenchymaler Stammzellen erarbeitet, welche bis heute als allgemein anerkannt gelten. Nach diesen Kriterien müssen MSC (1) die Fähigkeit zur Selbsterneuerung besitzen, (2) multipotent sein, das heißt über osteogenes, chondrogenes sowie adipogenes Potential verfügen, und (3) spezifische Oberflächenmarker wie *cluster of differentiation* (CD)73, CD90, und CD105 exprimieren, während CD14, CD34, CD45 und humanes Leukozytenantigen-DR (HLA-DR) nicht exprimiert sein dürfen. Weiterhin sollen MSC *in vitro* an Plastik adhärent anwachsen und sich über mehrere Passagen hinweg stabil verhalten. Mit Einführung dieser Minimalkriterien wurde dem Fakt Rechnung getragen, dass es sich bei MSC nicht um eine klar definierte, homogene Zellpopulation handelt. Dabei ist anzumerken, dass MSC noch über ein deutlich größeres Differenzierungspotential als das im Rahmen der Minimalkriterien geforderte verfügen. Es wurden für aus Knochenmark gewonnene MSC unter anderem erfolgreiche Differenzierungen zu Hepatozyten (Stock et al., 2014), Myozyten (Wakitani et al., 1995), Zellen des Pankreas (Tang et al., 2012) und zu neuronalen Zellen (Krampera et al., 2007b) beschrieben.

Zur Durchführung von Versuchen ist die Gewinnung von Stammzellen aus embryonalem Gewebe zwar prinzipiell möglich, jedoch scheidet diese Variante auf Grund gesetzlicher Bestimmungen einerseits sowie ethischer Bedenken andererseits aus. Daher werden Methoden favorisiert, bei denen MSC von adulten Spendern gewonnen werden. Einerseits lässt sich dies, wie von Pittenger et al. (1999) demonstriert, durch die Aspiration von Knochenmark bei freiwilligen Spendern realisieren. Andererseits besteht auch die Möglichkeit, für die Gewinnung Knochenmaterial zu nutzen, welches im Rahmen unfallchirurgischer oder orthopädischer Operationen als Restgewebe anfällt. MSC können beispielsweise aus entfernten Femurköpfen welche bei endoprothetischen Eingriffen anfallen kultiviert (Tuli et al., 2003) oder wie im Rahmen der vorliegenden Arbeit aus Bohrmehl gewonnen werden (Wenisch et al., 2005). Das Bohrmehl besteht überwiegend aus Anteilen der inneren Kortikalis und wird bei Verwendung der größten eingesetzten Bohrwelle in die Windungen selbiger gepresst. Für die auf diese Weise gewonnene MSC ist auch die Bezeichnung *reaming debris* MSC (rdMSC) geläufig. Innerhalb der kultivierten rdMSC lassen sich die selben charakteristischen Zelltypen finden, welche auch in Kulturen aus Knochenmark gewonnener MSC beschrieben wurden (Trinkaus et al., 2006). Dabei unterscheidet man im Wesentlichen drei in ihrer Morphologie unterschiedliche Zelltypen. Zum einen lassen sich große, flächige Zellen beobachten, welche oft zweikernig sind und durch die vielen, in ihrem Zytoplasma lokalisierten Vakuolen granuliert erscheinen. Diese Zellen werden als *mature* MSC

(mMSC) bezeichnet und weisen eine niedrige Teilungsrate sowie einen Anstieg des Gehalts an alkalischer Phosphatase (ALP) auf. Dies deutet darauf hin, dass die Zellen sich zumindest teilweise zu Osteoblastenvorläuferzellen umwandeln (Colter et al., 2001). Zum anderen zeigen sich fibroblastenähnliche, spindelförmige Zellen deren Teilungsrate charakteristischer Weise höher liegt als die der mMSC (Prockop et al., 2001). Zudem wurde das Vorhandensein von *rapidly self-renewing* (RS)-Zellen beschrieben. Diese kleinen, runden oder polygonalen Zellen besitzen ein hohes Verhältnis von Zellkern zu Zytoplasma und weisen unter allen aufgeführten Zelltypen die höchste Teilungsrate auf. Sie können weiterhin in RS1- und RS2-Zellen unterteilt werden, wobei RS2-Zellen sich durch ihr granuliert erscheinendes Zytoplasma von den RS1-Zellen unterscheiden (Colter et al., 2001).

Durch ihre vielfältige Differenzierbarkeit bei vergleichsweise einfacher Möglichkeit der Gewinnung stellen MSC eine vielversprechende Option zur Anwendung in regenerativen medizinischen Verfahren dar (Shyam et al., 2017). Auch für die Behandlung von Erkrankungen des Knochens, beispielsweise der Osteoporose, konnten im Tiermodell bereits positive Ergebnisse durch den Einsatz von MSC erzielt werden (Kiernan et al., 2016).

Scanu et al. (2011) untersuchten MSC hinsichtlich ihrer Eignung zur *in vitro* Testung toxischer Substanzen und einer möglichen Übertragbarkeit auf diese Weise gewonnener Ergebnisse auf *in vivo* Modelle. Hierbei kamen sie zu dem Ergebnis, dass diese mit der Eignung bereits etablierter und zu diesen Zwecken eingesetzter Zelllinien vergleichbar ist. Unter diesen Gesichtspunkten erscheint die Testung neuartiger, potentiell für die Anwendung im menschlichen Knochen geeigneter Werkstoffe, wie der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Nanopartikel, an aus Bohrmehl gewonnenen Spenderzelllinien als ein realistisches und aussagekräftiges *in vitro* Modell. Dies legen auch zahlreiche Verwendungen in vorangegangenen Versuchen nahe (Kokesch-Himmelreich et al., 2013; Pauksch et al., 2014; Lautenschläger et al., 2015; Lorenzetti et al., 2015; Charyeva et al., 2016).

1.2 Osteoporose

Bei der Osteoporose handelt es sich um eine systemische Erkrankung des Skelettsapparates, bei der es durch eine herabgesetzte mechanische Belastbarkeit des Knochens zu einem erhöhten Risiko für das Auftreten von Frakturen im Bereich des Hüftgelenks, der Wirbelkörper und des distalen Radius kommt (NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy, 2001; US Department of Health and Human Services, 2004). Diese ergeben sich aus einer Verminderung der Knochensubstanz, einer verringerten Knochendichte sowie einer gestörten Mikroarchitektur des betroffenen Knochengewebes. Ab dem 50. Lebensjahr kommt es dabei zu einem Anstieg der Prävalenz, wobei Frauen stärker betroffen sind als Männer (Kanis et al., 2000). Somit kann die Osteoporose als eine typische Erkrankung des alternden Menschen bezeichnet werden. In der klinischen Praxis ist die Messung der Knochendichte (*bone mineral density*, BMD) die gebräuchlichste Untersuchung zur Diagnosestellung und Abschätzung des Osteoporoserisikos. Dabei wird für verschiedene Knochen, in der Regel für den 1. bis 4. Lendenwirbelkörper sowie den Oberschenkelhals, die BMD in Gramm (g) pro Quadratzentimeter (cm²) mittels *dual-energy X-ray absorptiometry* (DXA) bestimmt. Für die erhaltenen Werte wird der sogenannte *T-score* ermittelt, indem diese mit den Referenzwerten einer Population gesunder, junger Frauen verglichen werden. Weichen nun die ermittelten Werte um 2,5 oder mehr Standardabweichungen (*standard deviation*, SD) von den Referenzwerten ab, beträgt der *T-score* also $\leq -2,5$, so ist klinisch die Diagnose einer Osteoporose zu stellen (Kanis et al., 1994; WHO Study Group, 1994). Das Robert Koch-Institut gibt in seinem 2014 veröffentlichten Bericht „Gesundheit in Deutschland Aktuell 2012“ für die Osteoporose eine Lebenszeitprävalenz von 14,5% für Frauen über 50 Jahren und von 5,5% für Männer über 50 Jahren an (Robert Koch-Institut, 2014). Durch die Auswertung von Versichertendaten schätzten Hadji et al. (2013) die Zahl der an Osteoporose erkrankten Menschen in Deutschland auf 6,3 Millionen, bei einer Anzahl von etwa 885.000 neu diagnostizierten Fällen pro Jahr. Aus dieser großen Zahl an Osteoporose Erkrankter ergeben sich auch wirtschaftliche Konsequenzen. Demzufolge schätzten Häussler et al. (2007) die im Jahr 2003 insgesamt durch die Behandlung an Osteoporose erkrankter Patienten entstandenen Kosten für das deutsche Gesundheitssystem auf 5,4 Milliarden Euro. Dabei entstanden 61,3% der Kosten durch die Behandlung osteoporotisch bedingter Frakturen, welche die Autoren für diesen Zeitraum mit insgesamt 333.322 bezifferten. Weltweit beläuft sich die Zahl der durch Osteoporose bedingten Frakturen auf schätzungsweise 9 Millionen pro Jahr (Johnell und Kanis, 2004). Jenseits von volkswirtschaftlichen Überlegungen ist weiterhin zu bedenken, dass sich die Erkrankung und vor allem die durch die Erkrankung bedingten Frakturen in erheblichem Maße auf die Lebensqualität der betroffenen Patienten auswirken. Gerade

Frakturen im Bereich des Hüftgelenks sind in der Regel mit längeren Phasen der Hospitalisierung und einer langwierigen, teils unvollständigen Wiederherstellung der Funktion oder sogar einer dauerhaften Unterbringung in einer Pflegeeinrichtung verbunden (Braithwaite et al., 2003; Lips und van Schoor, 2005). Des Weiteren ermittelten (Vestergaard et al., 2007) für Patienten, die eine Fraktur im Bereich des Hüftgelenkes erlitten hatten, ein im Vergleich zur Kontrollgruppe etwa doppelt so hohes Mortalitätsrisiko.

Anfänglich wurden vor allem die im Laufe des Lebens auftretenden Veränderungen der Sexualhormon-Spiegel, insbesondere der Rückgang der Östrogenproduktion, für den Verlust der Knochensubstanz verantwortlich gemacht (Riggs et al., 1998). Mittlerweile wurden jedoch auch weitere Faktoren wie der Alterungsprozess des Organismus und das damit verbundene, vermehrte Aufkommen freier Radikale mit dem Auftreten von Osteoporose in Zusammenhang gebracht (Almeida et al., 2007; Manolagas, 2010). Zur Behandlung von an Osteoporose erkrankten Patienten wurden bereits verschiedene Ansätze entwickelt. Der auf dem pathophysiologischen Modell veränderter Sexualhormonspiegel basierende Therapieansatz besteht in der Substitution von Östrogen. Auf Grund des erhöhten Auftretens adverser Effekte wie beispielsweise einem vermehrten Vorkommen von Brustkrebs und kardiovaskulären Ereignissen unter der Hormonersatztherapie (Writing Group for the Womens Health Initiative, 2002) wurde diese jedoch weitestgehend verlassen und findet heute im klinischen Alltag nur noch in Einzelfällen Anwendung. Die Gruppe der Bisphosphonate inhibiert die Aktivität der Osteoklasten und wirkt dadurch dem Abbau von Knochensubstanz entgegen. Durch die Anwendung dieses Medikamententyps lässt sich das Risiko des Auftretens osteoporotischer Frakturen effektiv reduzieren (Byun et al., 2017). Allerdings ergeben sich auch bei der Dauertherapie mit Bisphosphonaten unerwünschte Nebenwirkungen wie zum Beispiel Osteonekrosen des Kiefers und atypische Frakturen (Watts und Diab, 2010). Aus diesem Grund wird für eine länger andauernde Therapie mit Bisphosphonaten eine regelmäßige Reevaluation, gegebenenfalls mit anschließender Einnahmepause, empfohlen.

Die Entwicklung neuer Therapieansätze spielt im Falle der Osteoporose eine besonders entscheidende Rolle, da durch die steigende Lebenserwartung der Bevölkerung mit einer Zunahme der Prävalenz der Erkrankung zu rechnen ist und somit eine effektive und möglichst nebenwirkungsarme Therapie die Zielsetzung darstellen muss. Eine vielversprechende Möglichkeit stellt in dieser Hinsicht die Verwendung von neuartigen Werkstoffen wie beispielsweise Nanopartikeln dar. Verschiedene Arbeiten zeigen unter anderem das Potential mit Nanopartikeln funktionalisierter Implantatoberflächen im Bezug auf die positive Beeinflussung der Aktivität von Osteoblasten und Osteoklasten (Alghamdi et al., 2014; Bosco et al., 2015). In den Studien von (Fricain et al., 2013; Xu

et al., 2015) konnte beispielsweise im Tiermodell für die Behandlung von Knochendefekten mit Nanohydroxylapatit enthaltenden Knochenersatzstoffen eine verbesserte Mineralisierung nachgewiesen werden. Aus den genannten Gründen erscheint daher die Untersuchung potentieller Nutzen und Risiken verschiedener Nanopartikel und deren Wirkung auf den osteoporotisch erkrankten Knochen sinnvoll.

1.3 Nanopartikel

Zum ersten Mal fand das Konzept Nanotechnologie im Jahre 1959 durch den späteren Nobelpreisträger Richard Feynman Erwähnung. Dieser führte in seinem Vortrag „*There`s plenty of Room at the Bottom*“ am *California Institute of Technology* die Idee der Herstellung „molekularer Maschinen“ ein, deren Entwicklung es ermöglichen sollte Arbeiten auf atomarer Ebene auszuführen (Feynman, 1960). Im Jahr 1974 fand der Begriff der Nanotechnologie erstmals durch Norio Taniguchi Verwendung in einer wissenschaftlichen Publikation. Taniguchi gebrauchte ihn im Zusammenhang mit der Herstellung und Bearbeitung von Materialien auf der Nanometerebene (Taniguchi, 1974). In den folgenden Jahrzehnten rückte die Nanotechnologie und mit ihr auch Nanopartikel immer stärker in den Fokus der Wissenschaft, wodurch sich wesentliche Fortschritte verzeichnen ließen.

Es bestehen verschiedene Definitionen für die Größe von Nanopartikeln. Die wohl gängigste liefert die Standardisierungsorganisation *ASTM International*, welche Nanopartikel als Stoffe unterschiedlicher Zusammensetzung beschreibt, die in zwei oder mehr räumlichen Dimensionen zwischen 1 Nanometer (nm) und 100 nm messen (ASTM International 2006). Dabei ist es möglich, Nanopartikel aus unterschiedlichen Stoffklassen unter anderem Metallen, Keramiken, Polymeren, organischen Stoffen oder deren Kombinationen herzustellen. Es bestehen dadurch zahlreiche Möglichkeiten, Partikel unterschiedlichster Eigenschaften zu erzeugen. Die jeweiligen Eigenschaften einzelner Nanopartikel ergeben sich allerdings nur teilweise aus ihrer chemischen Zusammensetzung. Einen wesentlichen Anteil an ihrer großen Reaktionsfreudigkeit hat auch die im Verhältnis zur abnehmenden Größe zunehmende Oberfläche, die dafür sorgt, dass die Partikel mit vielen anderen Molekülen in Interaktion treten können (Roduner, 2006). Während das Volumen eines sphärischen Körpers proportional zur 3. Potenz des Radius ist ($V = 4/3 \pi r^3$), verhält sich seine Oberfläche proportional zur 2. Potenz des Radius ($A = 4 \pi r^2$), wodurch das Verhältnis von Oberfläche zu Volumen sich zum Radius umgekehrt proportional verhält. Hieraus ergibt sich auch die Tatsache, dass für die toxische Wirkung von Nanopartikeln auf ein biologisches System weniger die Konzentration der eingesetzten Partikel als vielmehr deren kombinierte Oberfläche ausschlaggebend ist (Oberdörster et al., 2005; Stoeger et al., 2006). Im Gegenteil sind in der Literatur für steigende eingesetzte Konzentrationen von Nanopartikeln teilweise geringere toxische Wirkungen beschrieben, was sich durch die bei höheren Konzentrationen auftretende Bildung von Nanopartikelaggregaten erklären lässt (Churg et al., 1998). Durch diese verkleinert sich nicht nur die für Reaktionen zur Verfügung

stehende Oberfläche, sondern die Partikel werden auf diesem Wege auch leichter durch Phagozyten erfasst.

1.3.1 Nanopartikel in der Medizin

Durch ihre hohe Modifizierbarkeit und die daraus resultierenden unterschiedlichen physikalischen und chemischen Eigenschaften sind Nanopartikel auch für die Verwendung in der Medizin interessant. Sie bergen als vergleichsweise neuartige Gruppe von Materialien, sowohl das Potential bereits bestehende Therapien zu verbessern als auch bisher unbekannte Therapieansätze zu entwickeln. Mechanistisch gesehen bieten Nanopartikel hierzu diverse Möglichkeiten. Beispielsweise können sie selbst eine direkte Wirkung auf menschliche Zellen (Tran und Webster, 2011), Bakterien (Salem et al., 2015) oder Viren (Cagno et al., 2018) entfalten. Des Weiteren können Nanopartikel dazu verwendet werden Medikamente, Kontrastmittel, Proteine oder Gene zu umhüllen und dadurch die Eigenschaften der jeweiligen Substanz zu beeinflussen. Als sogenannte *drug delivery systems* (DDS) sind Nanopartikel hierbei in der Lage, die Löslichkeit und Stabilität ihrer Ladung zu verbessern und deren Transport über biologische Barrieren, wie beispielsweise den Intestinaltrakt oder die Blut-Hirn-Schranke, zu erleichtern und eine gezielte Substanzfreisetzung zu ermöglichen (Kou et al., 2018). Die Freisetzung wird dabei im Wesentlichen von der Löslichkeit der gebundenen Substanz, ihrer Diffusionsfähigkeit durch die Nanopartikelmatrix sowie die Degradierung dieser bestimmt (Singh und Lillard 2009). Es ist ebenfalls möglich dem Abbau von therapeutisch genutzten Substanzen, durch die Modifikation mit Nanopartikeln entgegenzuwirken. Dieses Prinzip findet zum Beispiel bei der PEGylierung von Interferon- α zur Behandlung der Hepatitis Verwendung. Durch die Umhüllung mit Polyethylenglycol (PEG) verringert sich die renale Ausscheidung des Medikaments durch das erhöhte Molekulargewicht (Caliceti und Veronese, 2003). Außerdem verringert sich die Interaktion mit umgebenden Plasmaproteinen, was zu einer geringeren Opsonierung und somit auch zu einer geringeren Aufnahme und Ausschaltung der umhüllten Substanz durch das retikuloendotheliale System führt (Gref et al., 2000). Seit der Zulassung im Jahr 2008 steht mit Abraxane® in der Europäischen Union auch für die Behandlung des metastasierten Mammakarzinoms, des metastasierten Pankreaskarzinoms sowie des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms eine nanopartikelgestützte Therapieform zur Verfügung. Hierbei handelt es sich um eine modifizierte Variante des in der Krebstherapie bereits etablierten Mitosehemmstoffes Paclitaxel. Durch die Verbindung des Wirkstoffes mit Albuminnanopartikeln entsteht *nanoparticle albumin bound* (nab)-Paclitaxel. Dieses bietet gegenüber der

herkömmlichen Darreichungsform einige wesentliche Vorteile. Da es sich bei Paclitaxel um ein hydrophobes Molekül handelt, ist dieses nur unter Zuhilfenahme von Lösungsvermittlern intravenös anwendbar, was unter Therapie zum Auftreten allergischer Reaktionen führen kann. Dies ist bei Verwendung von nab-Paclitaxel nicht der Fall. Weiterhin reichert sich der Wirkstoff stärker im Tumorgewebe an, was sich vermutlich über die Bindung an durch die Tumorzellen exprimiertes Osteonectin erklären lässt (Gradishar, 2006). Um die Spezifität eines DDS zu erhöhen, ist es weiterhin möglich, die Oberfläche mittels spezifischer Liganden, welche zu einer vermehrten Aufnahme im Zielgewebe führen, zu modifizieren. Dabei können Antikörper, Proteine, Kohlenhydrate, Peptide und andere Moleküle Verwendung finden (Friedman et al., 2013). Die auf diesem Wege gesteigerte Spezifität der Therapie geht mit einer verringerten nötigen Gesamtdosis und damit auch mit einem geringeren Risiko potentieller unerwünschter Arzneimittelwirkungen einher und schafft damit die Option einer besonders zielgerichteten Therapie.

Auch für die Behandlung der Osteoporose sind derzeit verschiedene nanopartikelbasierte Therapieansätze Gegenstand der Forschung. Für die Behandlung von Erkrankungen des Knochens erscheint der Einsatz von Nanopartikeln sinnvoll, da der hierarchisch strukturierte Aufbau des Knochengewebes bereits auf der Nanometerebene beginnt. Seine extrazelluläre Matrix besteht dabei im Wesentlichen aus regelmäßig, im Abstand von 67 nm, angeordneten Kollagenfibrillen mit jeweils 40 nm großen Abständen zwischen den einzelnen Kollagenmolekülen. In den auf diese Weise entstehenden Zwischenräumen werden Kalziumphosphatkristalle eingelagert, was die mechanische Widerstandsfähigkeit des Gewebes erhöht (Gong et al., 2015). Hinsichtlich der unterschiedlichen Therapieansätze lassen sich im Wesentlichen vier verschiedene Wege unterscheiden, auf denen versucht wird, das therapeutische Potential von Nanopartikeln bei der Behandlung der Osteoporose nutzbar zu machen. (1) Die Verwendung von Nanopartikeln als DDS, die dazu genutzt werden, Therapeutika an das Knochengewebe abzugeben. Beispielsweise konnten Hu et al. (2010) in Versuchen mit Rattenosteoblasten eine höhere Aktivität alkalischer Phosphatase sowie eine erhöhte Mineralisation bei Behandlung der Zellen mit β -Estradiol beladenen, mesoporösen Siliziumnanopartikeln, die als Reservoir für das angewendete Therapeutikum dienten, nachweisen. (2) Die Regulation des Knochenstoffwechsels durch die Wirkung der Nanopartikel selbst, wie unter anderem von Bosco et al. (2015) beschrieben. Hier konnte durch die Verwendung mittels Alendronat funktionalisierter Hydroxylapatitnanokristalle als Beschichtung für Titanimplantate in vitro eine reduzierte Aktivität von Osteoklasten nachgewiesen werden. (3) Die Verbesserung von Materialien, welche im Bereich des *tissue engineering* der Beschleunigung der Regeneration ossärer

Defekte dienen. Hierzu lässt sich beispielsweise die Arbeit von Fricain et al. (2013) anführen, in der für eine mit Hydroxylapatitnanokristallen versehene Matrix aus den Polysacchariden Pullulan und Dextran *in vitro* eine verbesserte Zelldifferenzierung und -proliferation sowie *in vivo* eine vermehrte zelluläre Infiltration und Mineralisation nachgewiesen werden konnten. (4) Schließlich ergeben sich aus den genannten Verwendungen zusätzliche kombinierte Ansätze. Beispielsweise erzeugten Liu et al. (2009) eine mit Hydroxylapatitnanokristallen beladene Matrix aus Gelatine und Fibrin, die zusätzlich mittels *bone morphogenic protein 2* (BMP-2) funktionalisiert wurde. Dieses Beispiel zeigt das Potential kombinatorischer Therapieansätze, da auf diese Weise die Vorteile der einzelnen Methoden zusammengeführt werden können.

Bei den dieser Arbeit zugrunde liegenden Untersuchungen kamen Polyethylenimin (PEI)-Nanopartikel zum Einsatz, welche zu den Dendrimeren zählen. Die Gruppe der Dendrimere, deren Name sich vom griechischen Wort „*dendros*“, übersetzt „Baum“ ableitet, besteht aus hochgradig verzweigten, chemischen Verbindungen, die sich aus unterschiedlichen chemischen Grundstrukturen synthetisieren lassen (Lee et al., 2005). PEI-Nanopartikel zeichnen sich dabei durch eine vergleichsweise einfache Synthetisierbarkeit und viele verschiedene Möglichkeiten zur Modifikation aus (Diebold et al., 1999; Fajac et al., 2003; Appelhaus et al., 2015). Eine Modifizierbarkeit der Strukturen ist im Falle von PEI-Nanopartikeln besonders wünschenswert, da sich für diese in ihrer unmodifizierten Form sowohl *in vitro* als auch *in vivo* toxische Effekte beobachten lassen (Regnström et al., 2006; Castan et al., 2018). Die genaue Art und Umsetzung der chemischen Modifikation, der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Nanopartikel, ist in Abschnitt 2.2 beschrieben.

1.4 Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)

Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) ist Teil der sich strukturell ähnelnden Molekülfamilie der Neurotrophine (Barde, 1990). Als erster Vertreter dieser Gruppe wurde 1951 der *nerve growth factor* (NGF) durch Levi-Montalcini und Hamburger (1951) als das Überleben und die Proliferation von sympathischen Nervenzellen fördernder Faktor beschrieben. Barde et al. (1982) gelang erstmalig die Isolation von BDNF aus Schweinegehirnen sowie der Nachweis einer das Überleben von Ganglienzellen fördernden Wirkung von BDNF. In den folgenden Jahren konnten mit *neurotrophin-3* (NT-3) (Maisonpierre et al., 1990) und *neurotrophin-4/5* (NT-4/5) (Hallböök et al., 1991; Ip et al., 1992) zwei weitere Vertreter der Neurotrophine mit definierten trophischen Effekten auf neuronale Zellen des peripheren und zentralen Nervensystems (ZNS) isoliert werden. Die höchsten Konzentrationen von BDNF finden sich im ZNS in Strukturen des Neokortex und des Hippocampus (Skaper, 2008). Allerdings finden sich sowohl BDNF als auch die anderen Vertreter der Neurotrophine ebenso in Zellen des peripheren Nervensystems (PNS) (Ernsberger, 2009). Eine der wesentlichsten Funktionen von BDNF im Bereich des ZNS besteht in der Beeinflussung der synaptischen Übertragung durch die Induktion von Langzeitpotenzierung (Korte et al., 1995; Minichiello et al., 2002). Diese spielen eine wichtige Rolle für die Etablierung neuronaler Verbindungen und sind somit mitverantwortlich für neuronale Plastizität, Lernen und Gedächtnisleistung (Thoenen, 1995; Nabavi et al., 2014).

Neurotrophine vermitteln ihre Wirkung über die Bindung an zwei unterschiedliche Rezeptortypen. Zum einen binden alle vier Neurotrophine mit niedriger Affinität an den Rezeptor p75 (oder auch *p75 neurotrophin receptor* (p75NTR)), welcher zur Superfamilie der Tumornekrosefaktorrezeptoren (TNFR) gehört (Johnson et al., 1986; Rodriguez-Tebar et al., 1990; Rodríguez-Tébar et al., 1992). Wie die übrigen Vertreter der TNFR-Superfamilie besitzt auch p75NTR keine intrinsische enzymatische Aktivität, sondern vermittelt seine Wirkung über die Bindung von Adapterproteinen, unter anderem den sogenannten *TNFR-associated factors* (TRAFs). Von den verschiedenen TRAF-Isoformen sind bezüglich der Wirkungsvermittlung von p75NTR vor allem TRAF-4 sowie TRAF-6 relevant (Krajewska et al., 1998; Khursigara et al., 1999). Weitere der zahlreichen Adapterproteine, die mit p75NTR in Interaktion treten können, umfassen unter anderem *Schwann cell factor-1* (SC-1) (Chittka und Chao, 1999), *Neurotrophin receptor-interacting factor* (NRIF) (Casademunt et al., 1999), *Neurotrophin receptor-interacting MAGE homolog* (NRAGE) (Salehi et al., 2000), *p75NTR-associated death executor* (NADE) (Mukai et al., 2000) und *Receptor-interacting protein-2* (RIP2) (Khursigara et al., 2001). Dabei ist zu erwähnen, dass p75NTR verschiedene, teils

konträr erscheinende Wirkungen vermittelt. Es wurden für den Rezeptor sowohl proapoptotische als auch das Überleben unterschiedlicher Zellpopulationen fördernde Wirkungen beschrieben. Zusätzlich zu ihrer p75NTR-vermittelten Wirkung zeigen die Neurotrophine auch eine Interaktion mit einer weiteren Rezeptorengruppe, den Tropomyosin-Rezeptorkinasen (Trk), aus der Familie der Rezeptortyrosinkinasen. Mit TrkA, TrkB und TrkC existieren drei unterschiedliche Rezeptorisoformen mit unterschiedlicher und im Gegensatz zu p75NTR spezifischer Affinität zu einzelnen Neurotrophinen. TrkA wurde durch Kaplan et al. (1991) als Rezeptor für NGF identifiziert. TrkB bindet mit hoher Spezifität BDNF und NT-4/5, während NT-3 durch TrkC gebunden wird (Barbacid, 1994). Nach Bindung des jeweiligen Liganden erfolgt die Aktivierung des Rezeptors in der für Rezeptortyrosinkinasen typischen Art und Weise. Dabei kommt es zuerst zur Dimerisierung des Rezeptors sowie zur anschließenden Autophosphorylierung der intrazellulär lokalisierten, tyrosinreichen Rezeptorabschnitte (Huang und Reichardt, 2003). Durch die Aktivierung verschiedener, rezeptorgebundener Moleküle wird daraufhin eine rezeptorunabhängige Signalkaskade in Gang gesetzt. Wie p75NTR sind auch die Trk in der Lage, mit unterschiedlichen Adapterproteinen in Interaktion zu treten und somit verschiedene Signalkaskaden in Gang zu setzen. Diese überwiegend die Zellproliferation und Differenzierung stimulierenden Signalwege umfassen unter anderem die Aktivierung der Phospholipase-C- γ (PLC- γ) (Stephens et al., 1994), des G-Protein Ras (*rat sarcoma*) (Jian et al., 1996) und der Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K) (Yao und Cooper, 1995).

Abseits ihrer jeweiligen spezifischen Wirkungen zeigt sich zusätzlich auch eine Interaktion zwischen den beiden durch die Familie der Neurotrophine stimulierten Rezeptortypen. So wurde beispielsweise für TrkB eine Modulation der Rezeptoreigenschaften durch p75NTR hin zu einer höheren Spezifität für seinen primären Liganden BDNF beschrieben (Benedetti et al., 1993). Weiterhin beeinflussen beide Rezeptortypen teilweise dieselben Signalwege, wodurch es vor allem zu einer inhibierenden Wirkungen der durch p75NTR vermittelten, proapoptotischen Effekte durch die Aktivierung von TRK kommt (Yoon et al., 1998). Die Abbildung (Abb.) 1.1 stellt in schematischer Weise die über p75NTR und die TRK vermittelten Wirkungen und deren Interaktion dar.

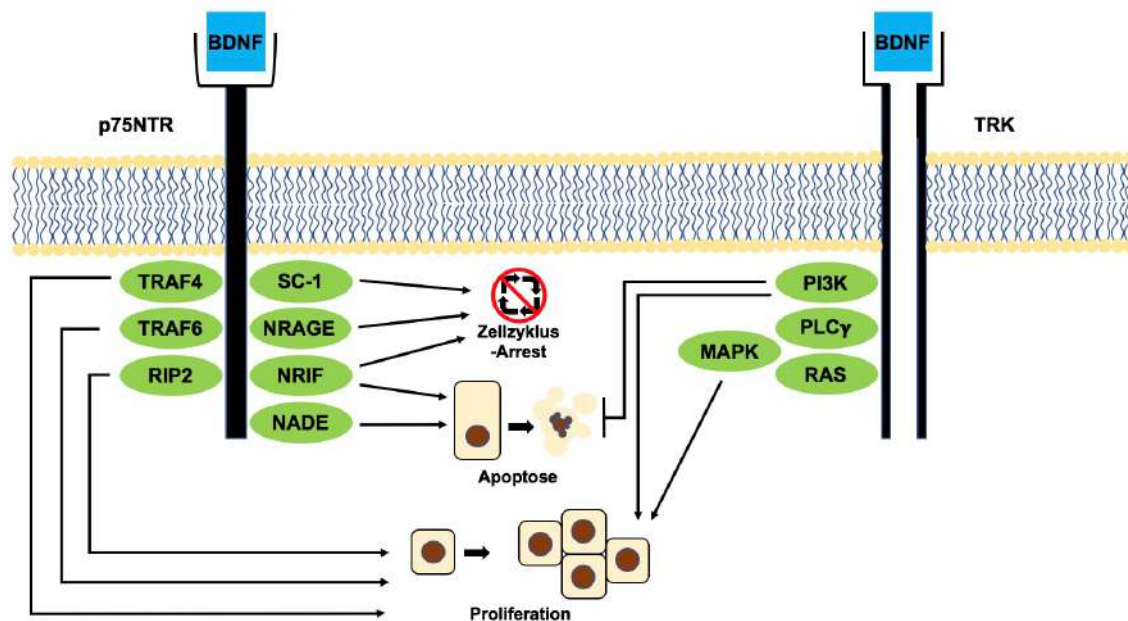


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der über die unterschiedlichen Neurotrophinrezeptoren vermittelten Wirkungen und deren Wechselwirkungen. Die Grafik erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit. BDNF = Brain-derived neurotrophic factor; MAPK = MAP-Kinase; NADE = p75NTR-associated death executor; NRAGE = Neurotrophin receptor-interacting MAGE homolog; NRIF = Neurotrophin receptor-interacting factor; p75NTR = p75 neurotrophin receptor; PI3K = Phosphoinositol-3-Kinase; PLC γ = Phospholipase-C- γ ; RAS = Rat sarcoma; RIP2 = Receptor-interacting protein-2; SC-1 = Schwann cell factor-1; Trk = Tropomyosin-Rezeptortyrosinkinase

Eine Sekretion von BDNF wurde allerdings nicht nur für Zellen des ZNS und PNS, sondern auch für humane MSC nachgewiesen (Laurenzi et al., 1998; Wilkins et al., 2009; Brohlin et al., 2012; Taghi et al., 2012). Welche Rolle BDNF dabei im Rahmen des Knochenstoffwechsels einnimmt, ist bisher noch nicht abschließend geklärt, jedoch konnten verschiedene Arbeiten eine Beteiligung von BDNF im Rahmen der Differenzierung von Knochenzellen sowie der Knochenbildung nachweisen. Dabei fördert BDNF über die Bindung an TrkB die Differenzierung von Osteoklasten aus mononuklearen Zellen (Sun et al., 2012). Auch konnten während der Differenzierungsphase muriner Osteoblasten erhöhte BDNF-Konzentrationen nachgewiesen werden, was einen Beitrag des Neurotrophins zur osteoblastären Zelldifferenzierung nahelegt (Nakanishi et al., 1994). Weiterhin ließ sich durch die Applikation von BDNF *in vitro* ein erhöhter Grad der Mineralisierung für Cementoblasten, welche ähnlich wie Osteoblasten im Knochen im Bereich der Zähne für die Herstellung mineralisierten Bindegewebes mitverantwortlich sind, feststellen (Kajiya et al., 2008). Durch Kilian et al. (2014) gelang der Nachweis von BDNF und seines Rezeptors TrkB in humanen Knochenproben während unterschiedlicher Stadien der Frakturheilung, was eine Beteiligung des Neurotrophins im Prozess der Frakturheilung nahelegt. Bezüglich des Effektes von BDNF auf MSC konnte in verschiedenen Untersuchungen *in vitro* eine

gesteigerte Proliferation der Zellen nach Zugabe von BDNF nachgewiesen werden (Choi et al., 2010; He et al., 2015; Liu et al., 2018). Dies sowie die Tatsache, dass MSC TrkB exprimieren (Laurenzi et al., 1998), lässt eine autokrine und/oder parakrine Funktion von BDNF für MSC vermuten, welche bereits in verschiedenen Arbeiten nachgewiesen werden konnten (Choi et al., 2010; Ahn et al., 2017). Unter diesen Gesichtspunkten erscheint eine Zugabe von BDNF *in vitro* zur Abmilderung oder gar Nivellierung potentiell schädigender Einflüsse auf die in den vorliegenden Untersuchungen verwendeten MSC erfolgversprechend.

1.5 Zielsetzung und Fragestellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zwei unterschiedliche PEI-basierte Nanopartikel mit Glutamatschale hinsichtlich ihrer potentiellen zytotoxischen Effekte auf humane, aus Bohrmehl gewonnene, mesenchymale Stammzellen unterschiedlicher Spender zu untersuchen. Weiterhin sollten mögliche unterschiedliche Wirkungen der Nanopartikel auf MSC knochengesunder und osteoporotischer Spender sowie eine eventuelle Abschwächung zellschädigender Effekte durch die Zugabe des Neurotrophins BDNF untersucht werden. Durch das experimentelle Vorgehen sollten einerseits konzentrationsabhängige, andererseits auch von der Nanopartikelstruktur abhängige Effekte beurteilbar gemacht werden.

Die hauptsächlichen Fragestellungen waren dabei die Folgenden:

1. Sind für die zu untersuchenden Nanopartikel zytotoxische Effekte nachweisbar? Lassen sich diese Effekte auf mikroskopischer Ebene oder durch die Verwendung funktioneller Assays nachweisen?
2. Besteht ein Zusammenhang zwischen der Inkubationsdauer bzw. der eingesetzten Nanopartikelkonzentration und dem Ausmaß potentiell zellschädigender Effekte?
3. Lässt sich durch eine Modifikation der PEI-basierten Nanopartikel mit Glutamatschale durch Maltosemoleküle eine Reduktion etwaiger zytotoxischer Effekte erreichen?
4. Ist durch die Zugabe des Neurotrophins BDNF *in vitro* eine Reduktion potentiell zellschädigender Effekte auf die MSC erzielbar?
5. Wie unterscheiden sich die MSC knochengesunder und osteoporotischer Spender hinsichtlich ihrer Reaktion auf die zu untersuchenden Nanopartikel?

Um in einem nächsten Schritt die Anwendbarkeit der Nanopartikel *in vivo* im Tiermodell untersuchen zu können, ist es im Vorfeld nötig, mögliche zytotoxische Effekte aufzudecken auch um für folgenden Versuche Konzentrationen unterhalb eines schädigenden Niveaus festlegen zu können. Zusätzlich sollten durch die Zugabe von BDNF weitere Hinweise auf dessen Rolle im Knochenstoffwechsel erlangt werden.

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Versuche wurden am 09.07.2009 von der Ethikkommission des Fachbereichs 11 der Justus-Liebig-Universität Gießen genehmigt (Aktenzeichen 74/09).

2 Material und Methoden

2.1 Kultivierung mesenchymaler Stammzellen

In den durchgeführten Untersuchungen fanden aus Bohrmehl gewonnene, mesenchymale Stammzellen (rdMSC) Verwendung. Das Bohrmehl fiel bei unfallchirurgischen Eingriffen an und wurde durch die Klinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Verfügung gestellt. Dabei folgte die Kultivierung der rdMSC aus dem Bohrmehl der bereits durch Trinkaus et al. (2005) und Wenisch et al. (2005) etablierten Vorgehensweise.

Die erhaltenen Zellen wurden in geeignetem Medium bestehend aus fetalem Kälberserum (FKS, PANSera ES, PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland) und 10% Dimethylsulfoxid (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) in Suspension gebracht und im Gefrierbehälter (Mr. Frosty™ Gefrierbehälter, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) um 1°C pro Minute, auf -80°C abgekühlt. Anschließend wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff (< 77 K) eingefroren, um eine spätere Verwendung zu ermöglichen.

Nach dem Auftauen wurden die Zellen zur Kultivierung in Zellkulturflaschen (CELLSTAR®, Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich) überführt. Das verwendete Standardkulturmedium setzte sich aus F12K (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, USA), gemischt mit 20% fetalem Kälberserum (PANSera ES, PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland) und 1% Penicillin + Streptomycin (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, USA) zusammen (Trinkaus et al., 2005). Ein Wechsel des Nährmediums erfolgte im Abstand von fünf Tagen. Die Inkubation der Zellen fand im Brutschrank (Heraeus, Hanau, Deutschland) unter sterilen Bedingungen, bei konstanter Temperatur (37°C) sowie konstantem Gehalt von CO₂ (5%) statt.

Um einerseits eine für die Versuche ausreichende Menge Zellen zu erhalten und andererseits die Lebensbedingungen der Zellen zu optimieren, wurden diese nach Erreichen von etwa 80% bis 90% Konfluenz aufgeteilt. Hierzu wurde das Medium entfernt und die Zellen mit phosphatgepufferter Salzlösung (Phosphate Buffered Saline, PBS, Gibco, Life Technologies, Carlsbad, USA) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von 0,05% Trypsin (Gibco, Life Technologies) proteolytisch von der Zellkulturflasche gelöst. Das Trypsin wurde nach fünf- bis zehnminütiger Inkubation und lichtmikroskopischer Kontrolle der Ablösung durch Zugabe von FKS deaktiviert und die erhaltene Zellsuspension wurde für 5 Minuten bei 1200 revolutions per minute (rpm) und 21°C zentrifugiert (Rotina 380r, Hettich, Kirchlingern, Deutschland). Nach Entfernung

des Überstandes wurde das Zellpellet in frischem Nährmedium gelöst. Die Suspension wurde auf neue Zellkulturflaschen aufgeteilt. Die für die Untersuchungen verwendeten Zellen wiesen Passagezahlen von höchstens fünf auf.

In den Experimenten kamen insgesamt zehn Spenderzelllinien zum Einsatz, von denen sieben von weiblichen und drei von männlichen Spendern stammten. Fünf dieser zehn Spender litten zum Zeitpunkt der Operation und der damit verbundenen Gewinnung des Bohrmehls unter einer klinisch diagnostizierten Osteoporose.

Mittels durchflusszytometrischer Untersuchungen wurde der Stammzellgehalt der verwendeten Spenderkulturen ermittelt, welcher in den untersuchten Spenderzelllinien zwischen 12,8% und 76% betrug (Tabelle 2.1). Zur Identifizierung dienten zu diesem Zweck die Oberflächenmarker CD73 und CD105 (Delorme et al., 2008; Akiyama et al., 2012).

Tabelle 2.1: Überblick über die verwendeten Spenderzelllinien

	Gesunde Spender					Osteoporotische Spender				
ID	ZK37	ZK46	ZK48	ZK51	ZK94	ZK69	ZK71	ZK74	ZK105	ZK112
Geschlecht	w	m	w	m	w	w	w	w	m	w
Geburtsjahr	1934	1981	1949	1967	1930	1942	1935	1931	1952	1945
CD73/CD105	28,4%	23,8%	20,8%	45,3%	12,8%	52%	76%	68%	19%	41,3%

ID = Identifikationsnummer, ZK = Zellkultur, w = weiblich, m = männlich

Nach einer ausreichenden Vermehrung der Zellen wurden diese, je nach Versuch, auf 24-Well-Zellkulturplatten (Falcon Multiwell, Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA), 96-Well-Zellkulturplatten (Falcon Multiwell, Becton Dickinson) oder Chamber-Slides (Nunc® Lab-Tek® Chamber Slide™, Sigma-Aldrich) in einer Konzentration von 20.000 pro cm² ausgesät. Zur Bestimmung der dafür erforderlichen Menge an Zellsuspension wurde ein Casy TT (OLS OMNI Life Science, Bremen, Deutschland) verwendet. Mit diesem, auf dem Coulter-Prinzip (Coulter, 1953) basierenden, durchflusszytometrischen Verfahren lässt sich die Zellzahl in einem gegebenen Volumen bestimmen.

Alle Arbeiten im Bereich der Zellkultur wurden unter einer Laminar-Flow-Sicherheitswerkbank (HeraSafe HS 12, Heraeus, Hanau, Deutschland) durchgeführt. Sämtlichen verwendeten Materialien und Substanzen waren steril beziehungsweise steril filtriert (Sterifix® 0,2 µm Injektionsfilter, B. Braun Melsungen, Melsungen, Deutschland).

2.2 Polyethyleniminnanopartikelf

Sämtliche in den Versuchen eingesetzten Nanopartikel wurden durch die Arbeitsgruppe um Dr. Appelhans, aus dem Leibniz-Institut für Polymerforschung in Dresden zur Verfügung gestellt.

Es wurden zwei auf unterschiedliche Weise modifizierte PEI-basierte Nanopartikel untersucht. Polyethylenimin-poly-L-Glutaminsäure (PEI-PGLU-346) setzt sich aus einem verzweigten Polyethyleniminkern und einer Schale aus Poly- α -Glutamat zusammen. Polyethylenimin-poly-L-Glutaminsäure-Maltose (PEI-PGLU-346-MAL) weist zusätzlich eine weitere, aus Maltose bestehende, Schale auf. (Abb. 2.1)

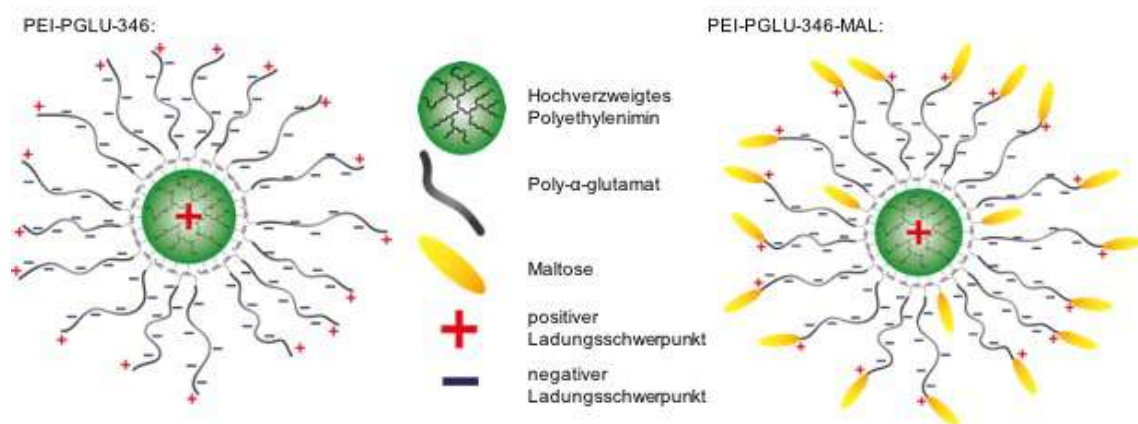


Abb. 2.1: Schematische Struktur der verwendeten PEI-Nanopartikel; Abb. modifiziert nach Striegler (2016)

Die Synthese der Nanopartikel erfolgte in mehreren Teilschritten, welche ausführlich in Striegler et al. (2015) sowie Striegler (2016) beschrieben sind. Zu Beginn wurden hochgradig verzweigte Polyethylenimine (PEI, Lupasol G100, M_w 5000 g/mol, BASF SE, Ludwigshafen, Deutschland) mit L-Glutaminsäure- γ -Benzylester-N-Carboxyanhydrid (γ -BLG-NCA) polymerisiert. Der entstandene Polyethylenimin-poly- γ -benzyl-L-Glutaminsäureester (PEI-PBLG) wurde im darauffolgenden Schritt durch Hydrolyse in PEI-PGLU-346 umgewandelt. Die Herstellung von PEI-PGLU-346-MAL erforderte einen zusätzlichen Reaktionsschritt. Mittels reduktiver Aminierung wurden die terminalen Bereiche des PEI-Moleküls mit D-(+)-Maltose-Monohydrat substituiert. (Abb. 2.2)

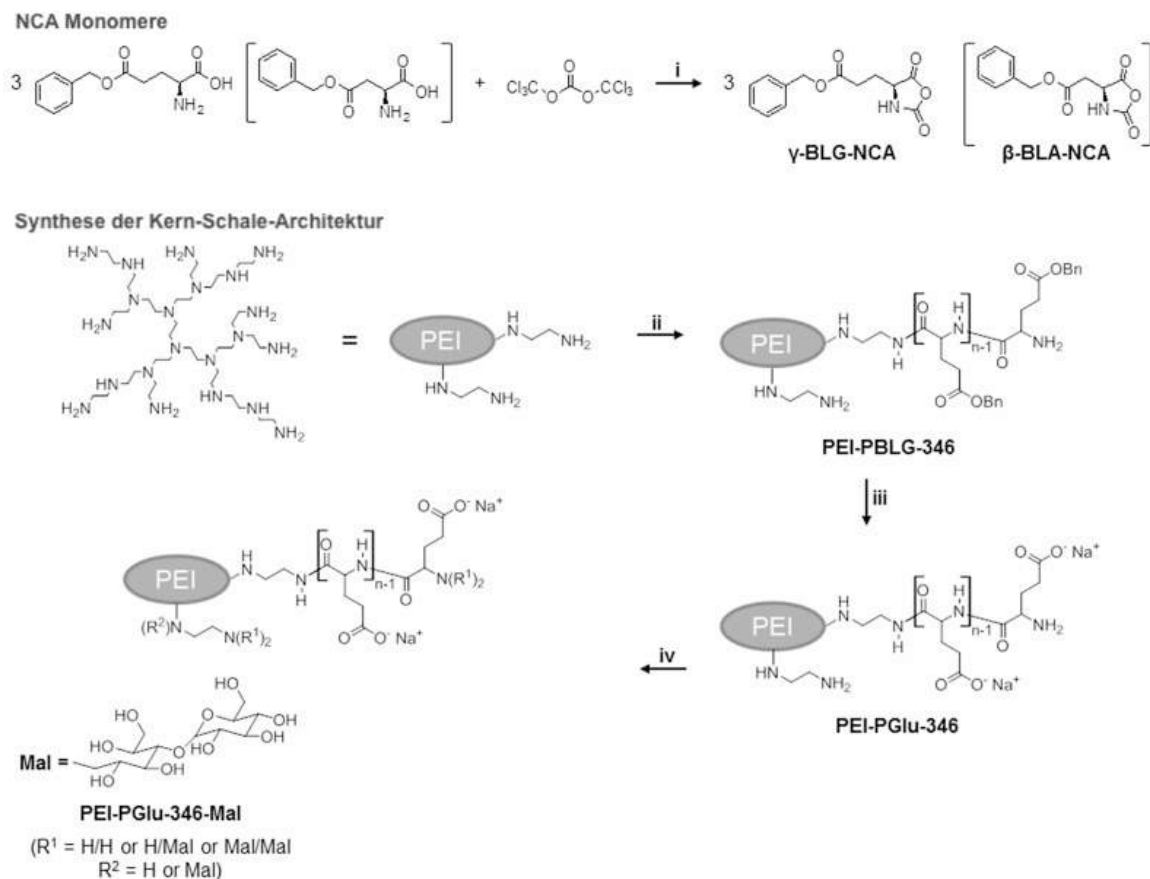


Abb. 2.2: Darstellung der Synthese von PEI-PGLU-346 und PEI-PGLU-346-MAL; Abb. modifiziert nach Striegler et al. (2015)

Laut den Untersuchungen von Striegler et al. (2015) ergibt sich für PEI-PGLU-346 eine zahlenmittlere Molmasse (M_n) von 6700 g/mol. Für PEI-PGLU-346-MAL liegt M_n bei 20.600. Der hydrodynamische Durchmesser (D_h) in einem physiologisch gewählten pH-Bereich von 7,4 liegt für PEI-PGLU-346 bei 6 Nanometer (nm), für PEI-PGLU-346-MAL bei 8 nm. Für diesen pH-Bereich ließ sich außerdem die Bildung von Nanopartikelaggregaten ausschließen. Dadurch ist davon auszugehen, dass die PEI-Nanopartikel auch unter den Versuchsbedingungen, welche dieser Arbeit zugrunde lagen, hauptsächlich als isolierte Makromoleküle vorlagen.

Zur Herstellung der mit Nanopartikeln versetzten Zellkulturmedien wurde jeweils eine Stammlösung der beiden untersuchten Nanopartikel mit einer Konzentration von 50 mg/mL hergestellt. Nach Auflösen der Nanopartikel in Standardkulturmedium durch behutsames Vortexen (Vortex-Genie 2, Scientific Industries, Bohemia, USA) wurden die Lösungen steril filtriert und bei 8°C, lichtgeschützt gelagert. Zur Herstellung der für die Versuche benötigten Nanopartikelkulturmedien wurde die Stammlösung mit Standardzellkulturmedium verdünnt. Auf diese Weise wurden Kulturmedien mit Nanopartikelkonzentrationen von 1 µg/mL, 50 µg/mL sowie 500 µg/mL hergestellt.

2.3 Konventionelle Lichtmikroskopie

Die Betrachtung der Zellen mittels konventioneller Lichtmikroskopie erfolgte mit einem Inversionsmikroskop (Axiovert 10, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) mit integrierter Digitalkamera (DS-Fi1, Nikon, Tokio, Japan). Die Aufnahmen in 10-facher und 32-facher Vergrößerung wurden unter Verwendung eines Polarisationsfilters angefertigt und mittels eines angeschlossenen Computersystems verarbeitet. Die Bilder wurden mit Maßstäben versehen. Hierzu wurde das Programm Fiji Is Just ImageJ (FIJI, open source software) verwendet.

2.4 Fluoreszenzmikroskopie

Um herauszufinden, ob eine Aufnahme der Nanopartikel durch die Zellen stattfand, wurden die Spenderzellen mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Dabei kamen mittels Rhodamin B farbig markierte Konjugate von PEI-PGLU-346 und PEI-PGLU-346-MAL zur Anwendung. Diese wurden ebenso wie die übrigen Nanopartikel durch die Arbeitsgruppe um Dr. Appelhans zur Verfügung gestellt.

Die Färbung der Zellkerne erfolgte mittels des Farbstoffes Höchst 33258 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Um die Aktinfilamente im Bereich des Zytoplasma anzufärben, wurde an Phalloidin gekoppeltes Fluorescein (FITC) (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung wurde jeweils mit beiden fluoreszenzmarkierten Nanopartikeln für eine knochengesunde (ZK94) und eine osteoporotische (ZK112) Spenderzelllinie durchgeführt. Als zeitliche Endpunkte wurden 72 h definiert. Die markierten Nanopartikel wurden dem Kulturmedium in einer Konzentration von 500 µg/mL zugegeben. Die Untersuchung der Zellen erfolgte mittels eines Konfokalmikroskops (Leica TCS SP5, Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland). In Tabelle 2.2 sind die gewählten Anregungs- und Detektionswellenlängen zusammengefasst.

Tabelle 2.2: Anregungs- und Detektionswellenlängen der Fluoreszenzmikroskopie

Farbstoff	Anregung	Detektion
Höchst 33258	352 nm	455 nm
Phalloidin FITC	499 nm	519 nm
Nanopartikel	545 nm	568 nm

Zu Beginn des Versuches wurden 20.000 Zellen pro cm² auf Chamber-Slides (Nunc® Lab-Tek® Chamber Slide™, Sigma-Aldrich) ausgesät und mit 300 µL Standard-

Kulturmedium für 24 h unter den oben genannten Bedingungen inkubiert. Nach lichtmikroskopischer Kontrolle der Adhärenz der Zellen wurde das Standardkulturmedium entfernt und durch das mit den fluoreszenzmarkierten Nanopartikeln versetzte Medium ersetzt.

Zum Endpunkt wurde das Medium abgesaugt und die Zellen wurden behutsam 2 Mal mit PBS mit einer Temperatur von 4°C gespült. Anschließend wurden 200 µL einer 4% Paraformaldehydlösung (PFA, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) mit einer Temperatur von 4°C hinzugegeben und die Zellen für 10 Minuten auf Eis gelagert inkubiert. Im Folgenden wurden die Zellen 3 Mal vorsichtig mit auf 4°C gekühlter PBS gewaschen. Anschließend wurden 200 µL ebenfalls auf 4°C gekühltes 0,1% Triton-X100 (Sigma-Aldrich) in PBS zugegeben und die Zellen für 5 Minuten auf Eis gelagert inkubiert. Nach erneutem 3-maligen Spülen der Zellen mit auf 4°C gekühlter PBS wurden 200 µL 1% Phalloidin FITC in PBS hinzugefügt. Im Anschluss wurden die Zellen für 40 Minuten bei Raumtemperatur und unter Lichtabschluss inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen insgesamt 6 Mal mit auf 4°C gekühlter PBS gewaschen, bevor die Zugabe von 200 µL 1% Höchst 33258 in PBS erfolgte. Nach 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur und unter Lichtabschluss wurden die Zellen erneut 6 Mal mit auf 4°C gekühlter PBS gespült. Die Kammer des Chamber-Slides wurde vorsichtig entfernt und die Zellen wurden unter Verwendung von ProLong™ Gold Antifade Mountant (Thermo Fisher Scientific) eingedeckelt. Bis zur Aufnahme der Bilder wurden die Objektträger bei 8°C unter Lichtabschluss gelagert.

2.5 Laktatdehydrogenase-Assay

Um eine mögliche Schädigung der Zellen vor allem im Bereich der Zellmembran feststellen zu können, wurde die Konzentration des Enzyms Laktatdehydrogenase (LDH) quantitativ bestimmt. Bei der LDH handelt es sich um ein im Zytosol lokalisiertes Enzym, welches aus intakten Zellen in geringem Maße in das Kulturmedium übergeht. Für die Messungen wurde der CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega, Fitchburg, USA) verwendet. Dieser colorimetrische Assay beruht auf einer durch die LDH katalysierten Reduktion von NAD^+ und Laktat zu NADH und Pyruvat. In einer darauffolgenden Reaktion wird das Tetrazoliumsalz Iodonitrotetrazolium (INT) zu Formazan reduziert. Die

Absorption dieses roten Farbstoffes kann mittels Platten-Reader (Synergy HT, BioTek Instruments, Winooski, USA) bei einer Wellenlänge von 490 nm gemessen werden, wobei die Menge des gebildeten Farbstoffes zur Anzahl der lysierten Zellen proportional

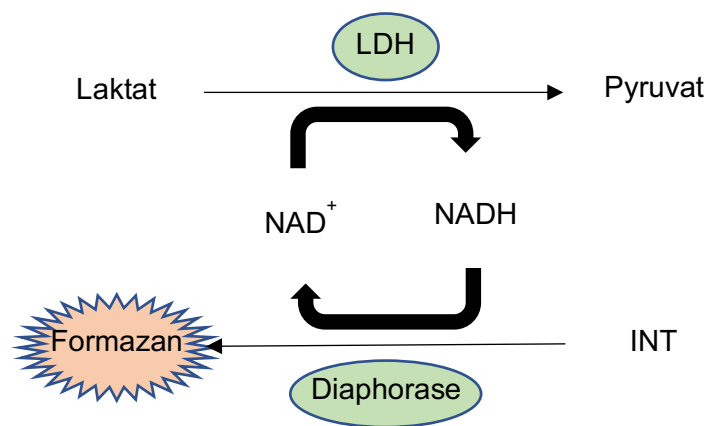


Abb. 2.3: Schematische Darstellung der Funktionsweise des LDH-Assays

ist. Zur Untersuchung der Zytotoxizität wurde sowohl eine Messung der LDH im Kulturmedium als auch eine Messung der LDH im Zelllysats vorgenommen. Dies ist nötig, um den Gesamt-LDH-Gehalt zu bestimmen, welcher für die Berechnung des Quotienten der Zellschädigung verwendet werden kann. Um diesen Quotienten zu erhalten, wird die Menge an im Medium enthaltener LDH durch die Summe der Menge der im Medium und im Zelllysats enthaltenen LDH geteilt.

$$\text{Quotient der Zellschädigung} = \frac{\text{LDH im Medium}}{\text{LDH im Medium} + \text{LDH im Zelllysats}}$$

Zu Beginn des Versuches wurden 20.000 Zellen pro cm^2 auf 24-Well Platten (Falcon Multiwell) ausgesät und für 24 h unter den oben genannten Bedingungen, inkubiert. Nach Ablauf der Inkubation wurde die Adhärenz der Zellen lichtmikroskopisch überprüft. Zeigte sich ein Anwachsen der ausgesäten Zellen, wurde das Standardmedium in den

Versuchs-Wells durch mit Nanopartikeln versetztes Medium ersetzt. Hierbei wurden jeweils in sechsfacher Ausführung, 1 mL Medium pro Well, mit Nanopartikelkonzentrationen von 1 µg/mL, 50 µg/mL sowie 500 µg/mL, zugegeben. Zu jeweils drei der sechs Wells wurden anschließend zusätzlich BDNF (PAN Sera ES, PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland) in einer Konzentration von 40 ng/mL hinzugegeben. Die weitere Inkubation der Zellen erfolgte bis zum Erreichen der Endpunkte bei 24 h und 72 h unter den oben genannten Bedingungen.

Nach Erreichen der Endpunkte wurden die Wells lichtmikroskopisch fotografiert. Anschließend wurden je 50 µL Medium aus den Wells der 24-Well Platte, reines Standardmedium als Negativkontrolle sowie eine vom Hersteller mitgelieferte Positivkontrolle auf je drei Wells einer 96-Well Platte übertragen. Den auf diesem Wege erhaltenen Triplets wurden, dem Protokoll des Herstellers folgend, jeweils 50 µL CytoTox 96® Reagent zugesetzt. Anschließend wurde die Platte unter Lichtabschluss für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Folgenden wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 µL Stopplösung beendet und die Absorption im Platten-Reader bei einer Wellenlänge von 490 nm gemessen.

Zur Messung des LDH-Gehaltes der Zellysate wurde das restliche Medium aus den Wells der 24-Well Platte abgesaugt. Das Medium wurde zur späteren Untersuchung mittels *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) zum Nachweis von Interleukin-6 (IL-6), in 1,5 mL Eppendorfgefäße (Sigma-Aldrich) überführt und bei –80°C eingefroren. Nach zweimaligem Spülen mit PBS wurde jedem Well zwecks osmotischer Lysierung der Zellen 1 mL 1% Triton-X100 (Sigma-Aldrich) zugegeben. Die Platten wurden auf Eis gelagert und für 15 Minuten auf einem Laborschüttler (Edmund Bühler, Hechingen, Deutschland) bewegt. Darauf folgend wurden die Zellysate in 1,5 mL Eppendorfgefäße (Sigma-Aldrich) überführt und für 4 Minuten bei 250 g und Raumtemperatur zentrifugiert (Micro 220r, Hettich, Kirchlingern, Deutschland). Anschließend wurden je 50 µL Lysat, Lysispuffer als Negativkontrolle sowie eine vom Hersteller mitgelieferte Positivkontrolle in Triplets auf eine 96-Well Platte übertragen. Die restliche Versuchsdurchführung war mit der für die Medien beschriebenen Vorgehensweise identisch.

Um das Ausmaß der Zellschädigung zu quantifizieren, wurde der bereits oben beschriebene Quotient aus LDH-Gehalt im Medium und dem Gesamt-LDH-Gehalt berechnet.

2.6 Interleukin-6 enzyme linked immunosorbent assay (IL-6 ELISA)

Um den Gehalt an Interleukin 6 (IL-6) in den Proben zu untersuchen, kam ein IL-6 spezifischer ELISA (Human IL-6 DuoSet ELISA, R&D Systems, Minneapolis, USA) zur Anwendung. Bei den untersuchten Proben handelte es sich um die im Rahmen des LDH-Assays eingefrorenen Medien des Endzeitpunktes 72 h der Kontrollgruppe sowie der mit 50 µg/mL und 500 µg/mL Nanopartikel behandelten Zellen jeweils mit und ohne 40 ng/mL BDNF. Es wurden die Medien von vier knochengesunden (ZK37, ZK46, ZK48, ZK51) sowie vier osteoporotischen (ZK69, ZK71, ZK74, ZK112) Spenderzelllinien untersucht.

Um eine Interaktion der Nanopartikel mit dem Testverfahren auszuschließen, wurde der Assay mit nanopartikelhaltigen Medien in den Konzentrationen 1 µg/mL, 50 µg/mL, 500 µg/mL und 1000 µg/mL durchgeführt. Hierbei ließ sich kein Einfluss der Nanopartikel auf das Ergebnis des Assays feststellen.

Zu Beginn der Versuche wurde der *capture antibody* im Verhältnis 1:120 mit PBS verdünnt. Von der auf diesem Wege erhaltenen Gebrauchslösung wurden je 100 µL pro Well auf eine 96-Well Platte (Nunc MaxiSorp™ flat-bottom, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) gegeben. Die Wells wurden anschließend mit Parafilm M (Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA) abgedeckt und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Um überschüssige *capture antibodies* zu entfernen, wurden die Wells durch Absaugen der Gebrauchslösung entleert und drei Mal mit 400 µL Waschpuffer (0,05% Tween in PBS, Sigma-Aldrich) gespült, wobei die Wells nach jedem Spülvorgang durch behutsames Ausklopfen gegen saubere Papiertücher von überschüssiger Flüssigkeit befreit wurden. Zum Blockieren etwaiger unspezifischer Bindungsstellen der *capture antibodies* wurden pro Well 300 µL *reagent diluent* bestehend aus 1% bovinem Serumalbumin (BSA, Sigma-Aldrich) in PBS zugegeben. Die Wells wurden wiederum mittels Parafilm M verschlossen und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Die aufgetauten Proben wurden nach behutsamem Durchmischen mittels Vortexen für 5 Minuten bei 14.000 rpm und 4°C zentrifugiert und in einem Verhältnis von 1:40 mit *reagent diluent* verdünnt. Die vom Hersteller mitgelieferte Standardstammlösung wurde zum Erhalt einer Standardreihe nach den Angaben des Herstellers schrittweise mit *reagent diluent* verdünnt.

Nach Ende der Inkubation wurden die Wells abermals nach der oben genannten Methode gespült. Anschließend wurden pro Versuchs-Well je 50 µL *reagent diluent* vorgelegt und, in Duplets, je 50 µL der verdünnten Proben hinzugegeben. Als Negativkontrolle wurden 100 µL *reagent diluent* eingesetzt. Zusätzlich wurden je 100 µL der verschieden stark verdünnten Standardlösungen in die für die Standardreihe

vorgesehenen Wells pippetiert. Die 96-Well Platte wurde mit Parafilm M abgedeckt und für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Der *detection antibody* wurde im Verhältnis 1:60 mit *reagent diluent* verdünnt und nach beendeter Inkubation und abermaligem Spülen nach der oben beschriebenen Vorgehensweise wurden pro Well je 100 µL des verdünnten *detection antibodies* hinzugegeben. Die 96-Well Platte wurde daraufhin abermals mit Parafilm M verschlossen und für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Zur Herstellung einer Gebrauchslösung wurde die Stammlösung der *Streptavidin-horseradish peroxidase* (HRP) im Verhältnis 1:40 mit *reagent diluent* verdünnt. Nach erneutem Spülen in der bereits beschriebenen Weise wurden pro Well je 100 µL der Streptavidin-HRP Gebrauchslösung zugegeben. Die 96-Well Platte wurde mittels Parafilm M abgedeckt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Um die Substratlösung zu erhalten, wurden die beiden Reagenzien Farblösung a und Farblösung b in einem Verhältnis von 1:1 miteinander gemischt. Nach dem Spülen der Wells, bei dem abermals wie zuvor beschrieben vorgegangen wurde, wurden pro Well 100 µL der Substratlösung eingesetzt. Die 96-Well Platte wurde durch Parafilm M verschlossen und für 20 Minuten bei Raumtemperatur und unter Lichtabschluss inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Reaktion durch die Zugabe von 50 µL Stopplösung pro Well beendet. Den Angaben des Herstellers folgend wurde anschließend die Absorption im Platten-Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm bestimmt sowie eine Korrekturmessung bei einer Wellenlänge von 540 nm durchgeführt.

2.7 Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (Real-Time PCR)

Die Untersuchungen mittels Real-Time PCR wurden mit Zellen sämtlicher, in Tabelle 2.1 aufgeführter Spenderzelllinien durchgeführt. Dabei wurden die Zellen für 72 h mit nanopartikelhaltigen Kulturmedien der Konzentrationen 50 µg/mL sowie 500 µg/mL inkubiert. Der Hälfte der Wells wurden zusätzlich 40 ng/mL BDNF zugesetzt.

Hierzu wurden 20.000 Zellen pro cm² auf einer 24-Well Platte ausgesäht und für 24 h mit Standardnährmedium, unter den oben beschriebenen Bedingung, inkubiert. Nach lichtmikroskopischer Kontrolle der Adhäsion wurde in den Versuchs-Wells das Standardkulturmedium durch nanopartikelhaltiges Kulturmedium ersetzt. Anschließend fand eine Inkubation der Zellen für weitere 72 h statt.

2.7.1 Isolierung von Ribonukleinsäuren (RNA)

Die Isolierung der RNA aus den kultivierten Zellen erfolgte mit Hilfe des RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland).

Nach Ablauf der Inkubation wurde das Medium aus den Wells abgesaugt und die Zellen wurden 2 Mal mit PBS gespült. Anschließend wurden die Zellen durch die Zugabe von 600 µL Puffer RLT lysiert. Das so gewonnene Zelllysat wurde zur Homogenisierung auf eine QIA-shredder Säule aufgetragen und bei 14.000 rpm und 25°C für 2 Minuten zentrifugiert. Nach Zugabe von 600 µL 70 % Ethanol wurde die erhaltene Lösung auf die RNeasy *spin column* gegeben und bei 10.000 rpm und 25°C für 15 Sekunden (s) zentrifugiert. Die in der Probe enthaltene RNA wurde auf diesem Wege selektiv an die in der RNeasy *spin column* befindliche Silicagelmembran gebunden.

Um die RNA von möglichen Verunreinigungen zu befreien, wurden nun insgesamt drei Waschschrte durchgeführt, die das Auftragen verschiedener Waschpuffer und die anschließende Zentrifugation der RNeasy *spin column* beinhalteten. Im ersten Schritt wurde die Probe nach Zugabe von 700 µL RW1-Waschpuffer für 15 s bei 10.000 rpm und 25°C zentrifugiert. Im zweiten und dritten Schritt wurden jeweils 500 µL RPE-Waschpuffer zugegeben, welcher vor Verwendung im Verhältnis 1:5 mit 96% Ethanol verdünnt wurde. Anschließend wurden die Proben für jeweils 15 s bei 10.000 rpm und 25°C zentrifugiert. Die bei diesen Waschschrten anfallenden Durchflüsse wurden verworfen.

Um die auf diese Weise aufgereinigte RNA von der RNeasy *spin column* zu eluieren, wurden auf diese 30 µL RNase-freies Wasser pipettiert. Nach einer 5-minütigen Wartezeit wurde die RNeasy *spin column* bei 10.000 rpm und 25°C für 1 Minute zentrifugiert.

Die gewonnene RNA wurde im Anschluss entweder direkt zur Synthese von komplementärer Desoxyribonukleinsäure (cDNA) verwendet oder bis zu dieser Verwendung bei -80°C eingefroren.

2.7.2 Messung von Konzentration und Reinheit der gewonnenen RNA

Um eine Aussage über die Konzentration und Reinheit der gewonnenen RNA treffen zu können, wurden die Proben mit Hilfe eines Spektrometers (NanoDrop® ND-1000, NanoDrop Technologies, Wilmington, USA) und dem dazugehörigen Computerprogramm (ND-1000 V 3.5.2, NanoDrop Technologies) untersucht. Zunächst wurde hierzu 1 µL RNase-freies Wasser mittig auf die Messvorrichtung gegeben. Dabei wurde darauf geachtet, dass sich keine Luftblasen in der Flüssigkeit befanden. Im Anschluss an diese Leermessung konnte die Messung des RNA-Gehaltes der Proben erfolgen. Hierzu wurde jeweils 1 µL der entsprechenden Probe mittig auf die Messvorrichtung gegeben, wobei wiederum auf Blasenfreiheit geachtet wurde. Die Absorption der Proben wurde bei einem Absorptionsmaximum von 260 nm (A_{260}) bestimmt. Der Gehalt an RNA in der jeweiligen Probe wurde durch die Software ausgegeben.

Durch Proteine bedingte Verunreinigungen der Probe weisen in der Regel ein Absorptionsmaximum bei 280 nm (A_{280}) auf, weshalb eine zusätzliche Messung der Proben bei dieser Wellenlänge erfolgte. Anhand des Verhältnisses der ermittelten Absorptionsmaxima (A_{260}/A_{280}) ließ sich eine Aussage über die Reinheit der gewonnenen RNA-Proben treffen. Dabei wurde bei einem A_{260}/A_{280} -Verhältnis von $\geq 1,9$ von einer ausreichenden Reinheit der erhaltenen RNA-Proben ausgegangen.

2.7.3 Synthese von cDNA

Da die Amplifikation von Desoxyribonukleinsäuren (DNA) im Rahmen der Polymerase-Kettenreaktion auf der Verwendung DNA-abhängiger DNA-Polymerasen beruht, ist es nicht möglich, RNA mittels PCR zu amplifizieren. Aus diesem Grund ist es nötig, die im vorangegangenen Schritt isolierte RNA in cDNA umzuschreiben.

Für die cDNA-Synthese und die vorangehende Eliminierung genomischer DNA in den Proben wurde das QuantiTect® Reverse Transcription Kit (Qiagen) verwendet. Dem Protokoll des Herstellers folgend wurden je 750 Nanogramm (ng) der zuvor isolierten RNA mit 3 µL DNA Wipeout Buffer versetzt und anschließend durch Zugabe von RNase-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 21 µL aufgefüllt. Die Proben wurden daraufhin für 5 Minuten bei 42°C im Thermocycler (Primus 25 advanced®, PEQLAB

Biotechnologie, Erlangen, Deutschland) inkubiert und nach Beendigung der Inkubation umgehend auf Eis gelagert. Auf diesem Wege wurde etwaige bei der Isolation der RNA nicht vollständig entfernte genomische DNA eliminiert.

Im nächsten Schritt wurden den Proben je 1 µL Quantiscript Reverse Transcriptase, 4 µL Quantiscript RT Buffer sowie 1 µL RT Primer Mix hinzugefügt. Letzterer stellt ein Gemisch von Oligo(dT)- und Random-Primern dar. Die Synthese der cDNA erfolgte durch 30-minütige Inkubation im Thermocycler bei 42°C. Durch eine angeschlossene 3-minütige Inkubation bei 95°C wurde die Reverse Transkriptase in den Proben inaktiviert. Zur Sicherstellung der vollständigen Elimination genomischer DNA wurde je ein Negativansatz aus jeder RNA-Probe hergestellt. Dazu wurde den Proben anstatt der Quantiscript Reverse Transcriptase je 0,5 µL RNase-freies Wasser zugegeben. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.7.4 Bedingungen der Real-Time PCR

Die Durchführung der Real-Time PCR erfolgte mit Hilfe eines PCR-Cyclers (iCycler iQ™, Bio-Rad, Hercules, USA) und der iQ™5 Optical System Software Version 2.0 (Bio-Rad). Die Untersuchung sämtlicher Proben wurde dabei in Doppelbestimmung und unter Mitführung der entsprechenden Negativkontrollen vorgenommen. Hierzu wurden je 1 µL der cDNA-Probe mit je 24 µL Mastermix versetzt. Dieser bestand aus 12,5 µL QuantiFast SYBR Green Mastermix (Qiagen), 11,5 µL RNase-freiem Wasser und jeweils 0,5 µL *forward*- sowie *reverse primer* (entsprechend je 20 µg) (Tabelle 2.3). Im Falle der Negativkontrollen kamen anstatt 1 µL Probe 1 µL RNase-freies Wasser zum Einsatz. Die Proben wurden initial für 1 Minute auf 95°C erhitzt, wodurch die Doppelstrang-DNA denaturiert wurde. Nach schrittweisem Abkühlen wurden die Proben für 1 Minute bei 60°C inkubiert, was dem Vorgang der Primerbindung sowie der Elongation der DNA-Stränge diente. In der Folge wurden die Proben für insgesamt 41 Zyklen abwechselnd schrittweise mit 0,5°C pro 10 s, auf 95°C erhitzt und auf 65°C abgekühlt. Zum Ende jedes der Zyklen wurde der Fluoreszenzwert für die Proben ermittelt.

Tabelle 2.3: Verwendete Primer mit Primersequenzen

Primer	Sequenz (5'→3')	IS	Produktlänge	Genbank-Zugangsnummer
CCND1 for rev	CAACAACCTTCCTGTCCTACT GGGTCCATGTTCTGCT	ja	144 bp	NM_053056.2
Nqo1 for rev	AGCTGGAAGCCGCAGACCTTG TGAACACTCGCTCAAACCAGCC	ja	93 bp	NM_000903.2
CHOP for rev	ACCCTGCTTCTCTGGCTTGGC GGAGAGTGAGGGCTCTGGGAGG	nein	82 bp	NM_001195057.1
RIPK3 for rev	TGAATGCTGCTGTCTCCACG CATTTCTGTCCCTCCTTGGC	ja	101 bp	NM_006871.3
IL-6 for rev	ATGAGGAGACTTGCCTGGTGAA GCTCTGGCTTGTTCTCACTA	ja	106 bp	NM_000600.3
B2M for rev	TCTCTCTTTCTGGCCTGGAG CAACTCAATGTCGGATGGA	ja	135 bp	NM_004048.2

IS = intronspannend, for = forward, rev = reverse, bp = Basenpaar, CCND1 = Cyclin D1, NQO1 = NAD(P)H dehydrogenase (quinone 1), CHOP = C/EBP homologous protein, RIPK3 = Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 3, IL-6 = Interleukin-6, B2M = β 2-Mikroglobulin

2.7.5 Auswertung der Real-Time PCR

Am Beginn der Auswertung der Ergebnisse der Real-Time PCR stand die logarithmische Darstellung der Daten, für welche die Fluoreszenzwerte der einzelnen Proben auf der Y-Achse gegen die Anzahl der durchlaufenen Zyklen auf der X-Achse aufgetragen wurden.

Anhand dieser Darstellung ließ sich nun manuell der sogenannte *threshold level* festlegen, der den Punkt auf der Y-Achse beschreibt, welcher die Verlaufskurven sämtlicher Proben jeweils etwa in ihrem Wendepunkt schneidet.

Nun konnten für die einzelnen Proben die Werte für den jeweiligen *cycle threshold* (Ct) bestimmt werden. Der Ct-Wert stellt den Punkt auf der X-Achse dar, an dem die Verlaufskurve der jeweiligen Probe den *threshold level* schneidet und sich somit das Fluoreszenzsignal der Probe erstmalig vom Hintergrundsignal abhebt.

Der Ct-Wert verhält sich demzufolge invers zur Menge der in der Probe enthaltenen cDNA. Je mehr cDNA in der jeweiligen Probe vorhanden ist, desto früher wird das Fluoreszenzsignal der Probe sich vom Hintergrundsignal abheben und damit den *threshold level* schneiden.

Vor der statistischen Auswertung der erhaltenen Ergebnisse wurden die Ct-Werte der Proben mittels der $\Delta\Delta$ Ct-Methode (Pfaffl, 2001) gegen die Ct-Werte des Housekeeping-Gens β 2-Mikroglobulin normalisiert. Hierzu wurden die gemittelten Ct-Werte des Housekeeping-Gens von den gemittelten Ct-Werten der jeweiligen Probe subtrahiert, wodurch sich die Δ Ct-Werte für die Proben ergaben. Erst durch diesen Zwischenschritt wurden die Ergebnisse der einzelnen Proben quantifiziert und untereinander vergleichbar gemacht

2.8 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Ergebnisse wurde mit Hilfe der Statistik- und Analysesoftware IBM SPSS Statistics 24 (IBM, Armonk, USA) durchgeführt.

Im Vorfeld erfolgte eine statistische Beratung durch Frau Dr. Windhorst aus dem Institut für medizinische Informatik der Justus-Liebig-Universität Gießen.

Die erhaltenen Daten wurden mittels explorativer Datenanalyse, welche die Anwendung des Kolmogorov-Smirnov Tests beinhaltet, auf das Vorhandensein einer Normalverteilung hin überprüft. Dabei wurde bei einem p-Wert $\geq 0,2$ im Kolmogorov-Smirnov Test eine Normalverteilung der Daten angenommen. Bei positiv getesteter Normalverteilung wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse (*analysis of variance*, ANOVA) mit paarweisen Vergleichen durch post-hoc Testung nach Sidak berechnet. Ließ sich keine Normalverteilung feststellen, wurden die Daten durch eine nicht parametrische ANOVA nach Kruskal-Wallis mit paarweisen Vergleichen untersucht. Als Signifikanzniveau wurde 0,05 und als Konfidenzintervall 0,95 festgelegt.

Zusätzlich zu den Mittelwerten werden im Ergebnisteil auch die dazugehörigen Standardabweichungen (englisch standard deviation, SD) angegeben.

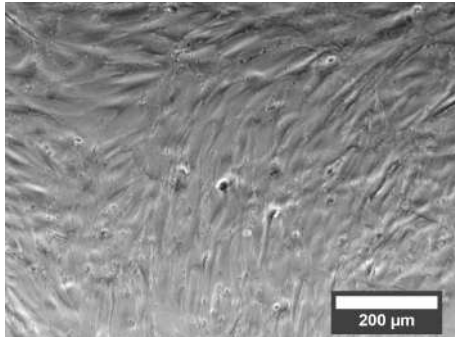
Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte ebenfalls mit Hilfe von IBM SPSS Statistics 24 in Form von Boxplots. Hierbei entspricht die Box dem Bereich, in welchen 50 % der Daten fallen, wobei die Länge der Box gleich dem Interquartilsabstand (englisch interquartile range, IQR) ist. Der Median wird durch einen durchgehenden, waagerechten Strich markiert. Der untere Rand der Box markiert den Beginn des unteren Quartils. 25% der Daten sind kleiner, beziehungsweise gleich diesem Wert. Der obere Rand der Box kennzeichnet den Beginn des oberen Quartils. 75% der Daten sind kleiner, beziehungsweise gleich diesem Wert. Die Whisker bezeichnen die Extremwerte des Datensatzes, welche keine Ausreißer darstellen. Ausreißer sind in der Grafik als Kreise, beziehungsweise Sternchen, in der Farbe der jeweiligen Box dargestellt. Dabei stehen Kreise für Ausreißer, die zwischen dem 1,5-fachen und 3-fachen IQR, Sternchen für Ausreißer, die über dem 3-fachen IQR liegen.

3 Ergebnisse

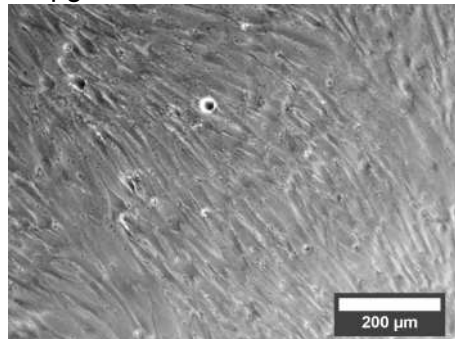
3.1 Konventionelle Lichtmikroskopie

Ein sicherer lichtmikroskopischer Nachweis einer Zellschädigung war zu den Untersuchungszeitpunkten nach 24 h und 72 h weder für die unterschiedlichen untersuchten Konzentrationen von PEI-PGLU-346, noch für die unterschiedlichen untersuchten Konzentrationen von PEI-PGLU-346-MAL möglich. Für die mit einer Konzentration von 500 µg/mL PEI-PGLU-346 inkubierten osteoporotischen Spenderzellen ließ sich nach 72 h Inkubationsdauer allenfalls eine beginnende Vermehrung der Zelltrümmer sowie eine unregelmäßigere Berandung der rdMSC nachweisen (siehe hierzu Abb. 3.5 und 3.6). Im Übrigen ließen sich lichtmikroskopisch keine wesentlichen Veränderungen der mit unterschiedlichen Konzentrationen der beiden verwendeten Nanopartikel inkubierten Zellen feststellen. Die Aufnahmen der Kontrollgruppen zeigten sich unauffällig. Es lassen sich deutlich die verschiedenen Subtypen mesenchymaler Stammzellen identifizieren. Einerseits zeigten sich typische, langgestreckte, fibroblastenähnliche Zellen (siehe hierzu z.B. die Kontrollserie in Abb. 3.2 und 3.4), andererseits ließen sich auch kleine, polygonale RS-Zellen mit hohem Verhältnis von Zellkern zu Zytoplasma darstellen (siehe hierzu z.B. die Kontrollserien in Abb. 3.1 und 3.3). Auch mMSC, die sich als große, flächige, oft zweikernige und durch den hohen Anteil im Zytoplasma lokalisierter Vakuolen granuliert erscheinender Zellen darstellen, sind auf den Aufnahmen erfasst (siehe hierzu z.B. die Kontrollserie in Abb. 3.7 und 3.8).

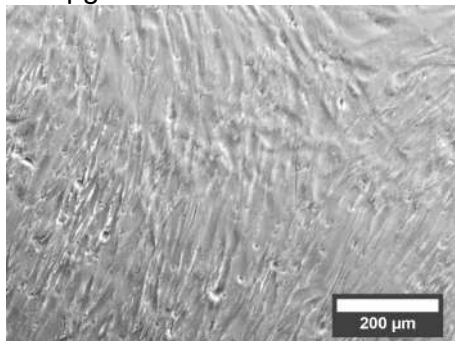
Kontrolle:



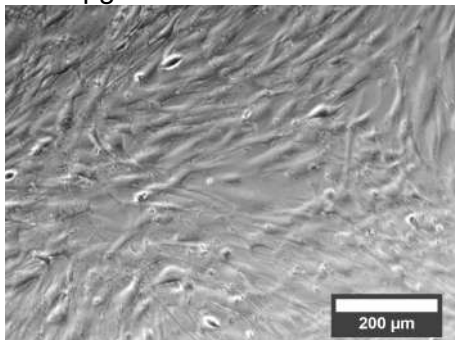
1 µg/mL:



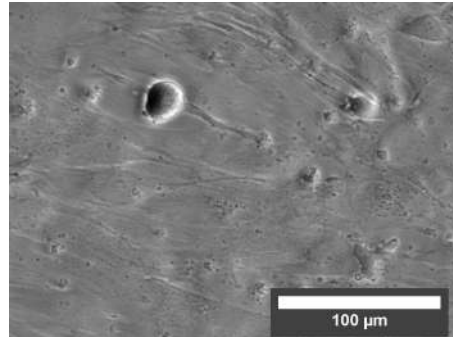
50 µg/mL:



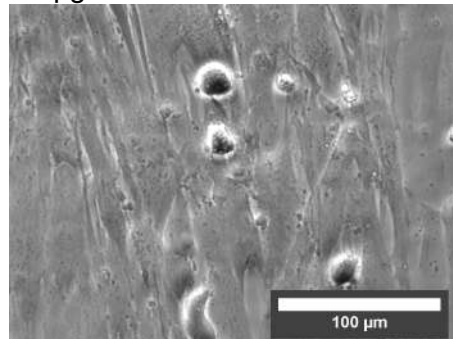
500 µg/mL:



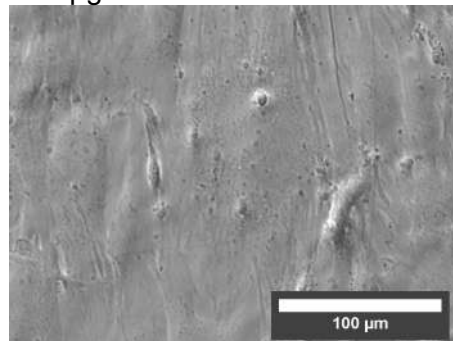
Kontrolle:



1 µg/mL:



50 µg/mL:



500 µg/mL:

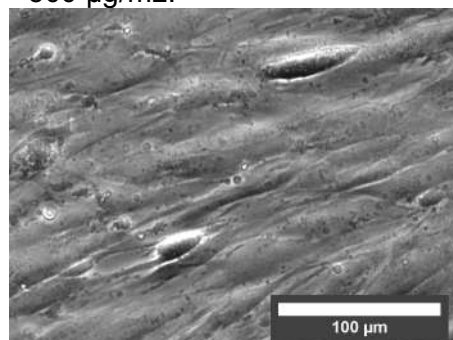
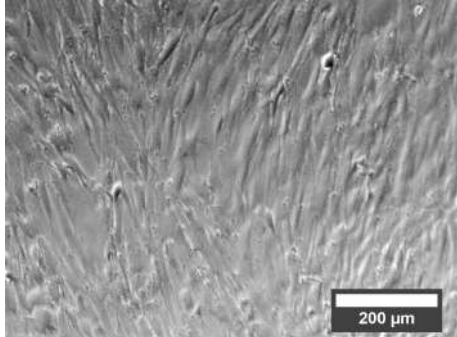
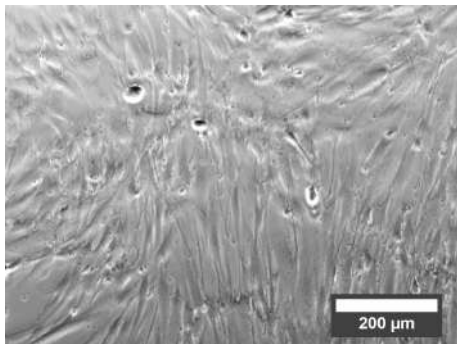


Abb. 3.1: Lichtmikroskopische Aufnahmen von knochengesunden Spenderzellen, die für 72 h mit unterschiedlichen Konzentrationen von PEI-PGLU-346 inkubiert wurden.

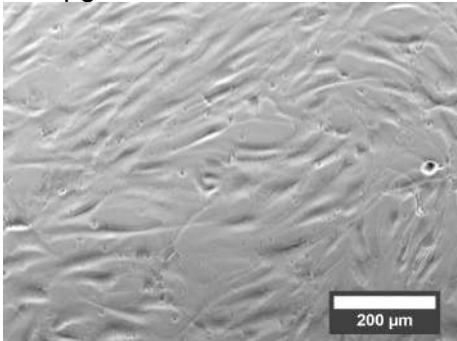
Kontrolle:



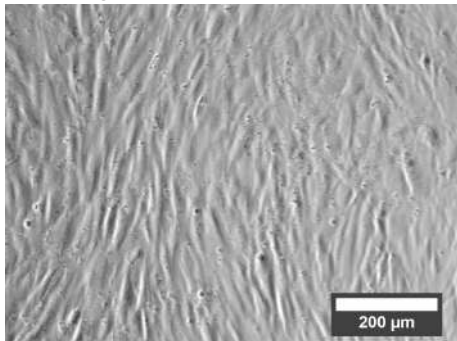
1 µg/mL:



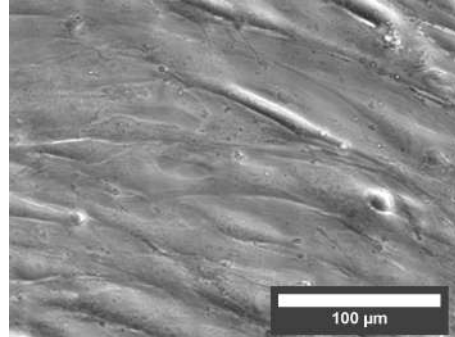
50 µg/mL:



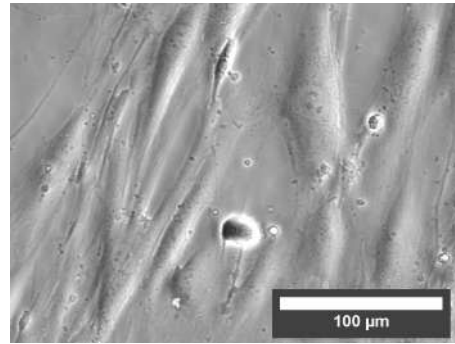
500 µg/mL:



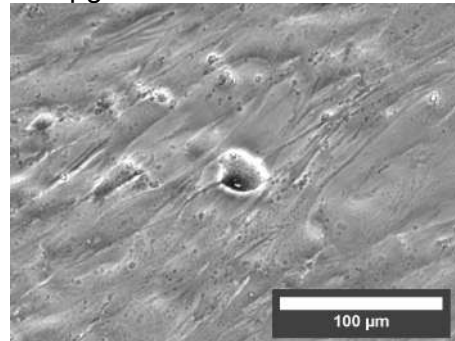
Kontrolle:



1 µg/mL:



50 µg/mL:



500 µg/mL:

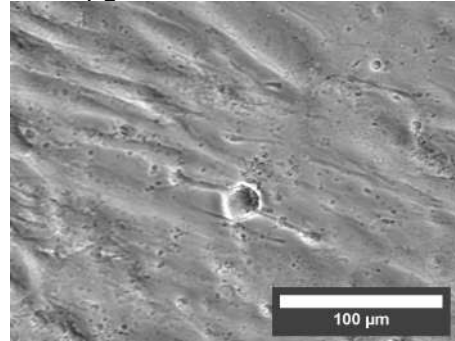
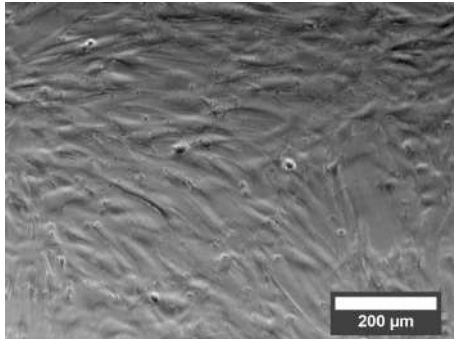
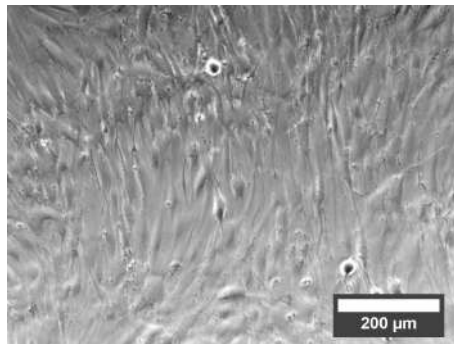


Abb. 3.2: Lichtmikroskopische Aufnahmen von knochengesunden Spenderzellen, die für 72 h mit unterschiedlichen Konzentrationen von PEI-PGLU-346 und 40 ng/mL BDNF inkubiert wurden.

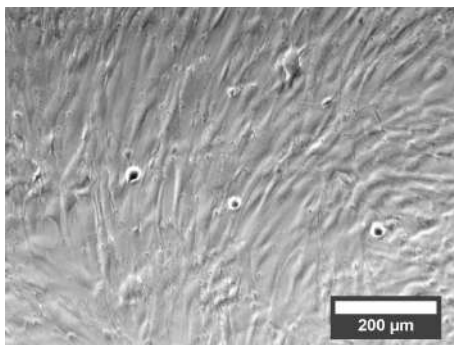
Kontrolle:



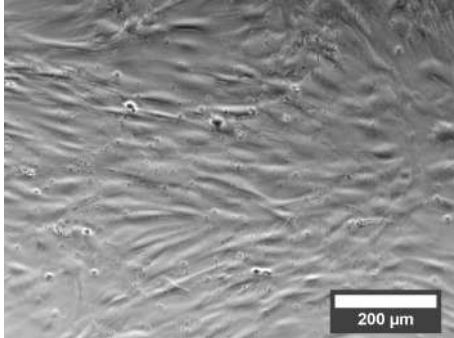
1 µg/mL:



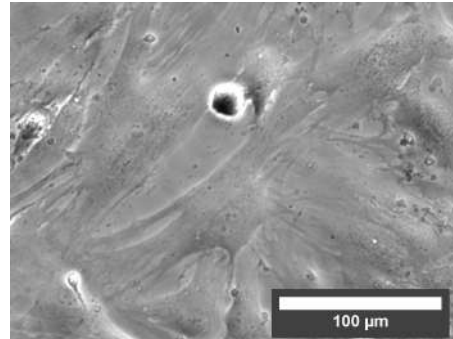
50 µg/mL:



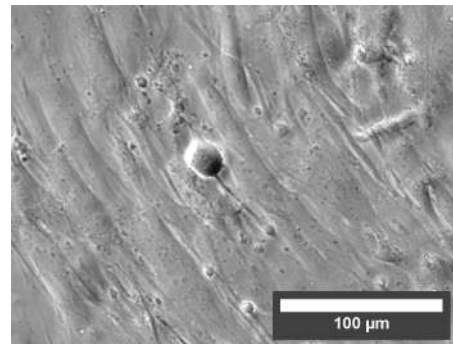
500 µg/mL:



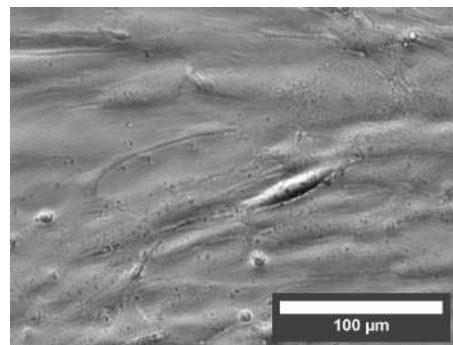
Kontrolle:



1 µg/mL:



50 µg/mL:



500 µg/mL:

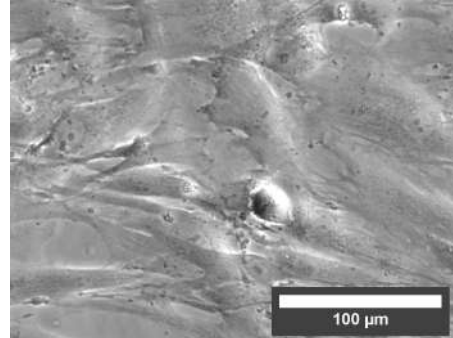
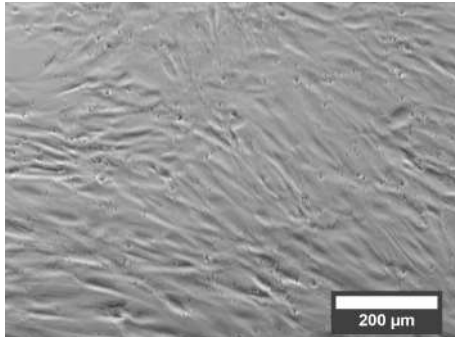
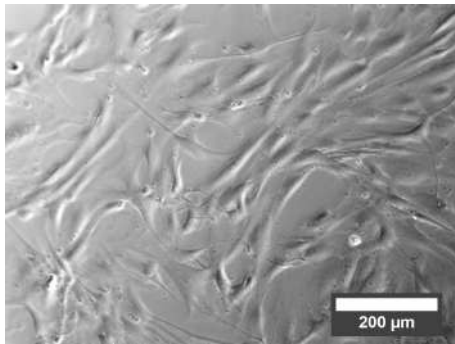


Abb. 3.3: Lichtmikroskopische Aufnahmen von knochengesunden Spenderzellen, die für 72 h mit unterschiedlichen Konzentrationen von PEI-PGLU-346-MAL inkubiert wurden.

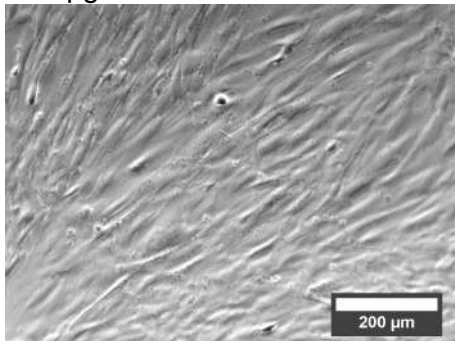
Kontrolle:



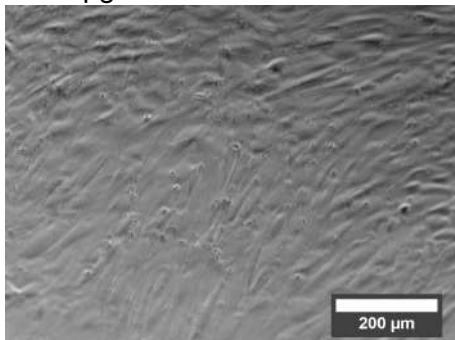
1 µg/mL:



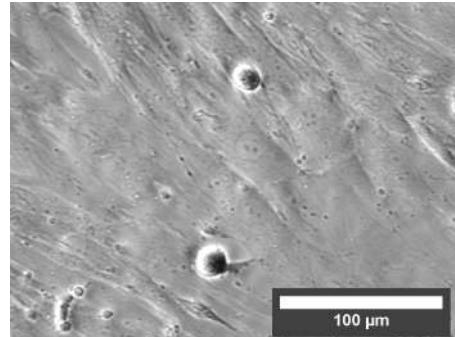
50 µg/mL:



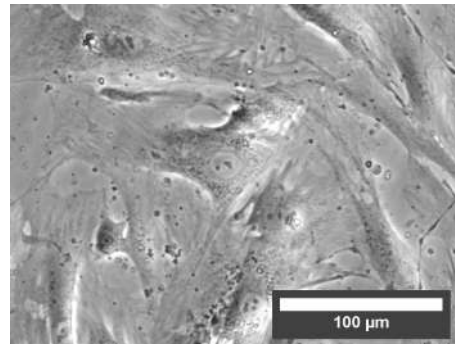
500 µg/mL:



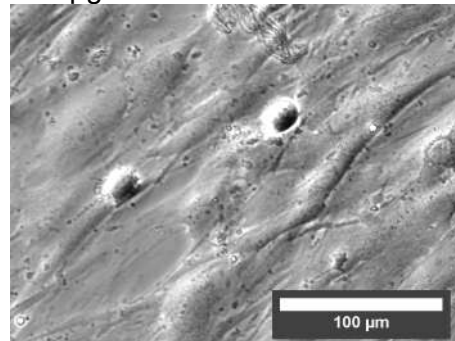
Kontrolle:



1 µg/mL:



50 µg/mL:



500 µg/mL:

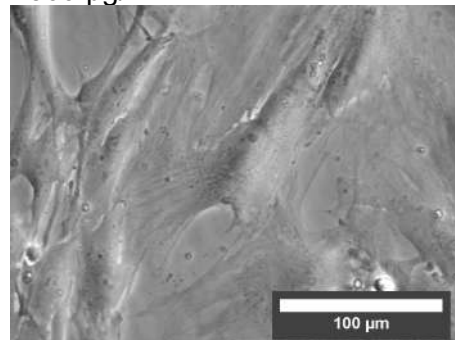
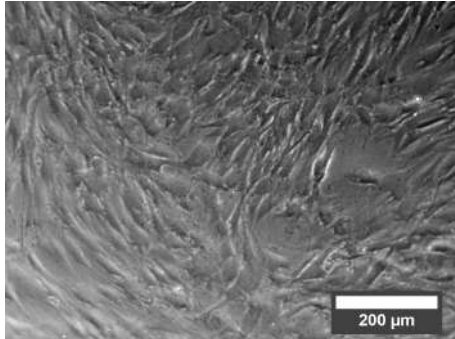
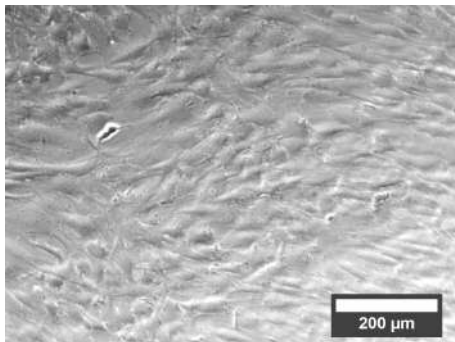


Abb. 3.4: Lichtmikroskopische Aufnahmen von knochengesunden Spenderzellen, die für 72 h mit unterschiedlichen Konzentrationen von PEI-PGLU-346-MAL und 40 ng/mL BDNF inkubiert wurden.

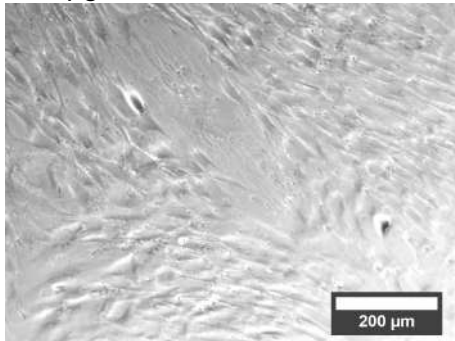
Kontrolle:



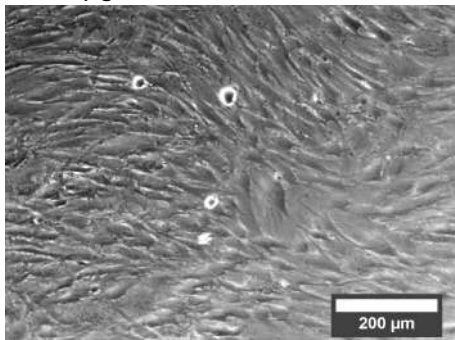
1 µg/mL:



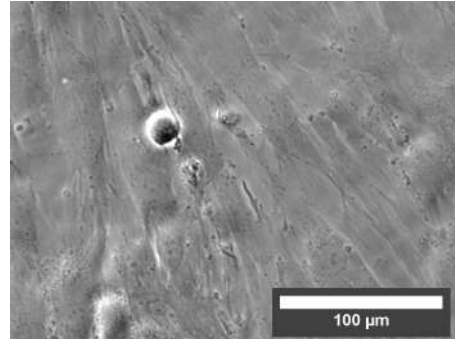
50 µg/mL:



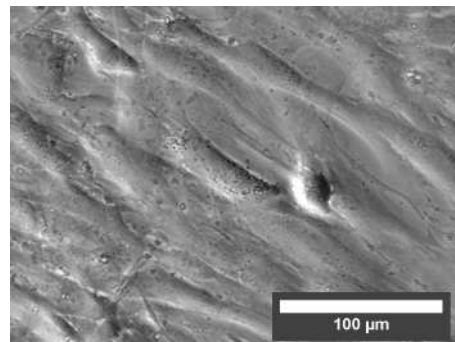
500 µg/mL:



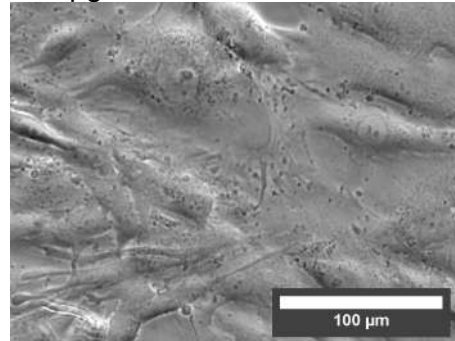
Kontrolle:



1 µg/mL:



50 µg/mL:



500 µg/mL:

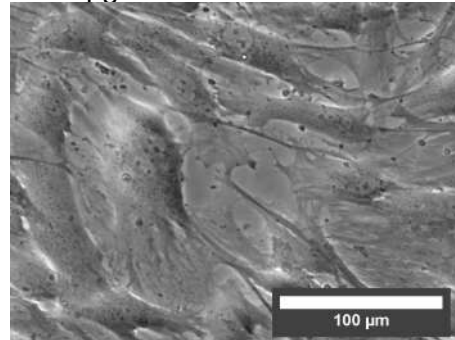
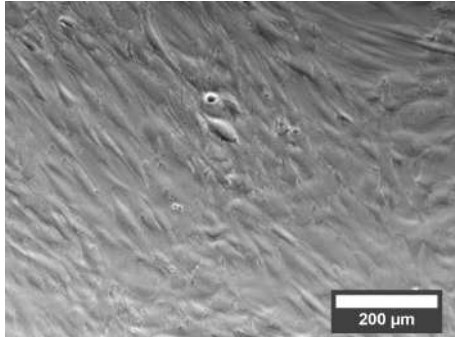
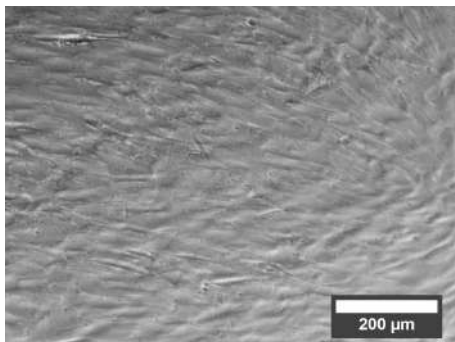


Abb. 3.5: Lichtmikroskopische Aufnahmen von osteoporotischen Spenderzellen, die für 72 h mit unterschiedlichen Konzentrationen von PEI-PGLU-346 inkubiert wurden.

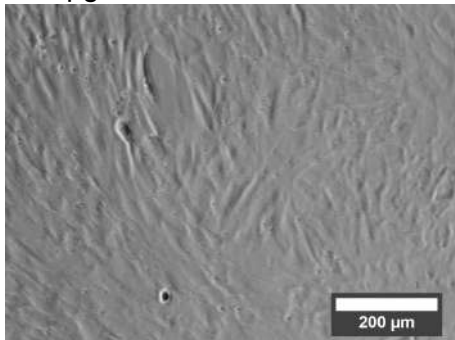
Kontrolle:



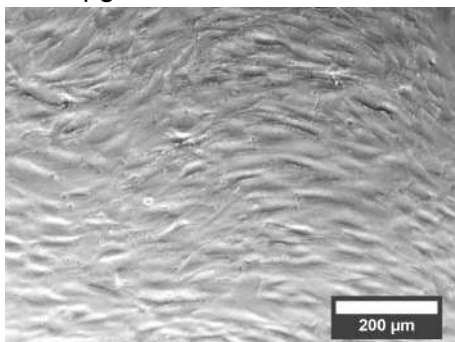
1 µg/mL:



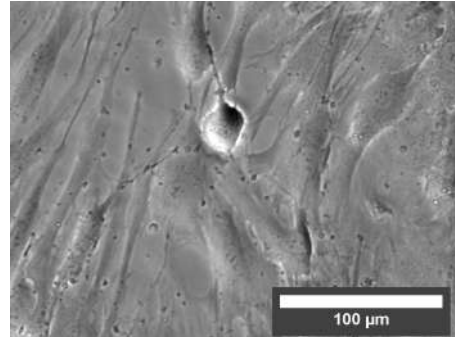
50 µg/mL:



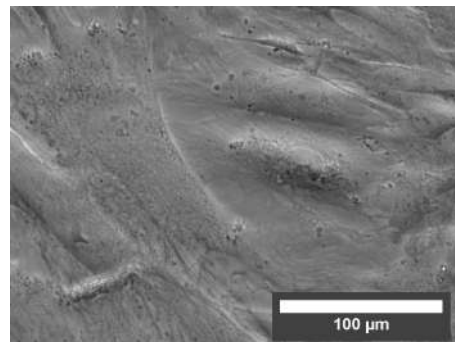
500 µg/mL:



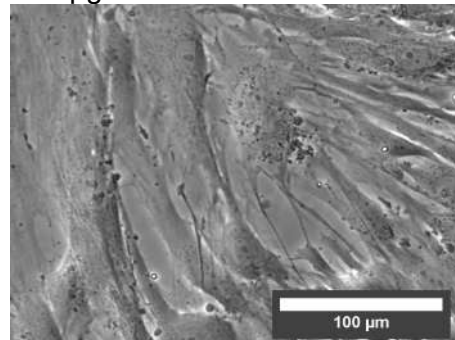
Kontrolle:



1 µg/mL:



50 µg/mL:



500 µg/mL:

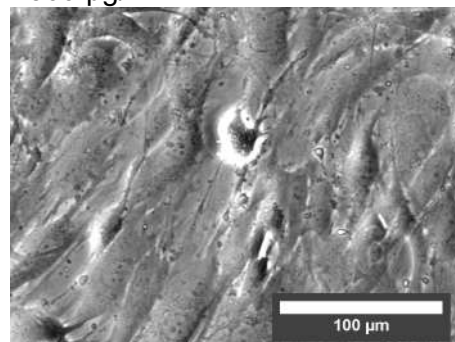
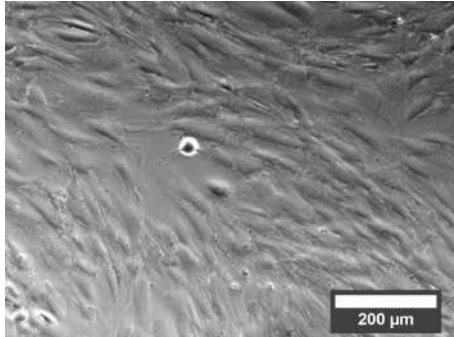
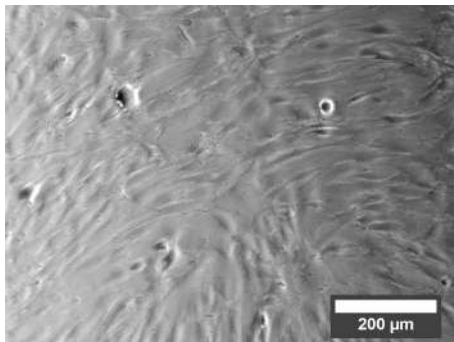


Abb. 3.6: Lichtmikroskopische Aufnahmen von osteoporotischen Spenderzellen, die für 72 h mit unterschiedlichen Konzentrationen von PEI-PGLU-346 und 40 ng/mL BDNF inkubiert wurden.

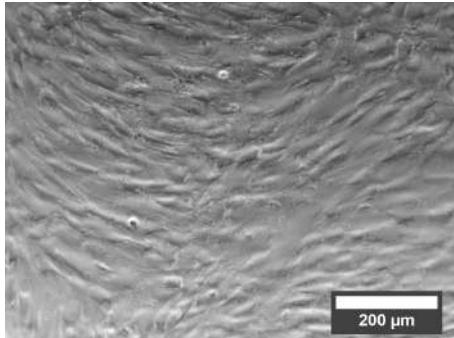
Kontrolle:



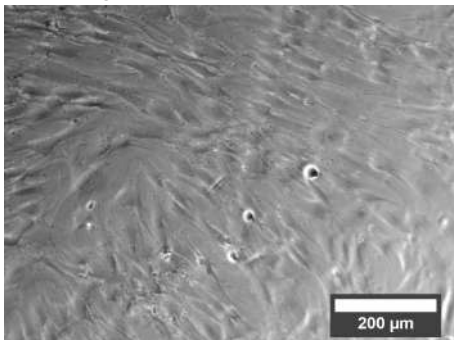
1 µg/mL:



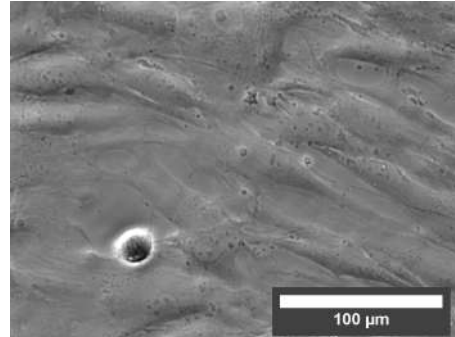
50 µg/mL:



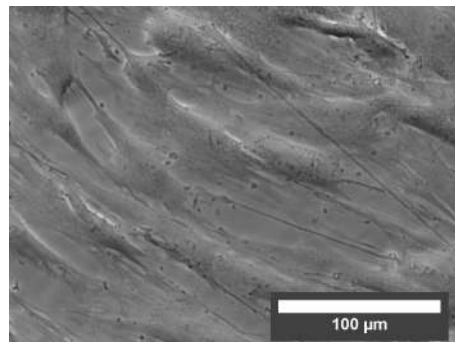
500 µg/mL:



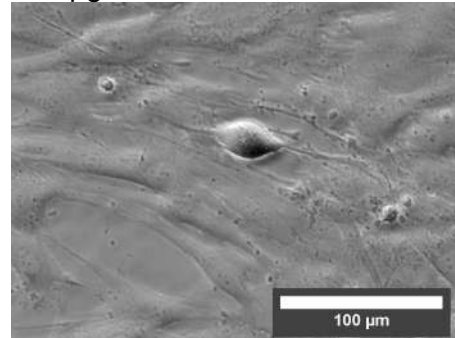
Kontrolle:



1 µg/mL:



50 µg/mL:



500 µg/mL:

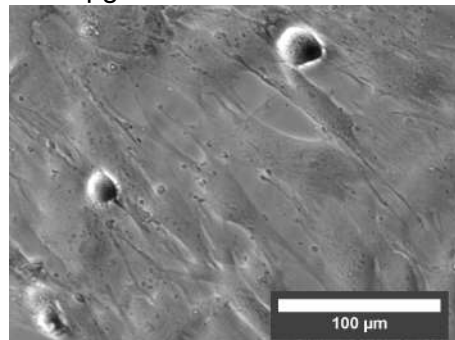
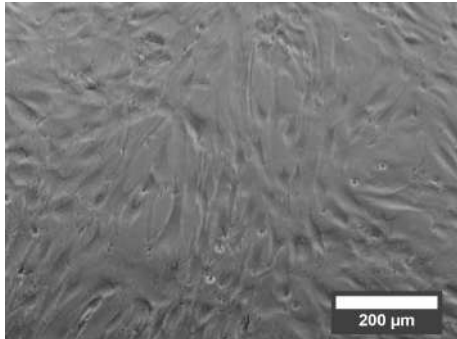
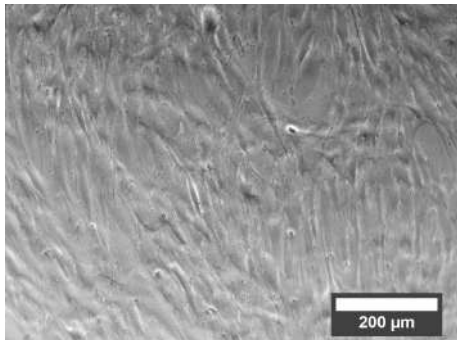


Abb. 3.7: Lichtmikroskopische Aufnahmen von osteoporotischen Spenderzellen, die für 72 h mit unterschiedlichen Konzentrationen von PEI-PGLU-346-MAL inkubiert wurden.

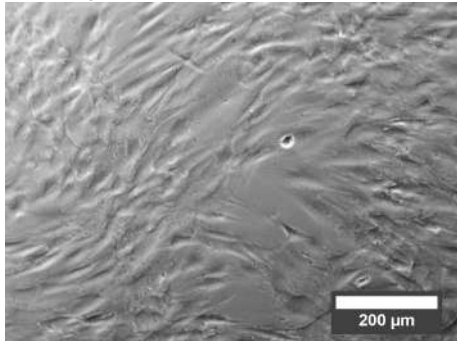
Kontrolle:



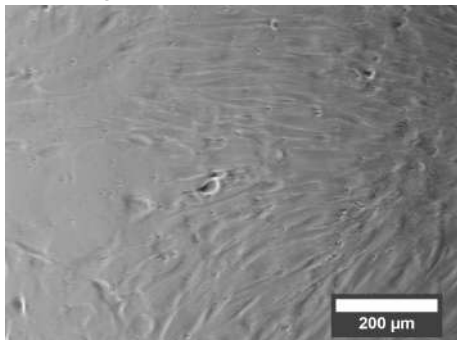
1 µg/mL:



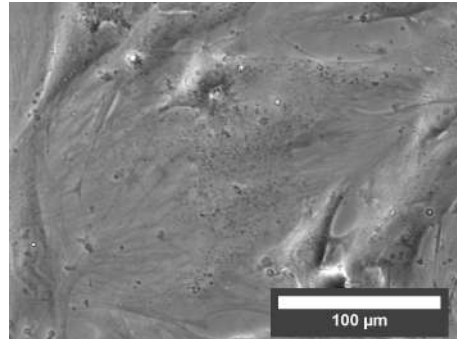
50 µg/mL:



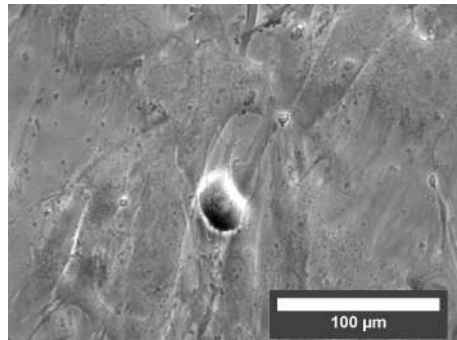
500 µg/mL:



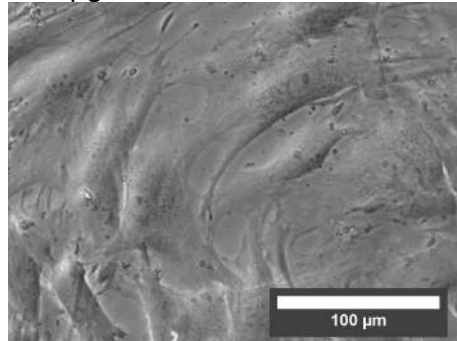
Kontrolle:



1 µg/mL:



50 µg/mL:



500 µg/mL:

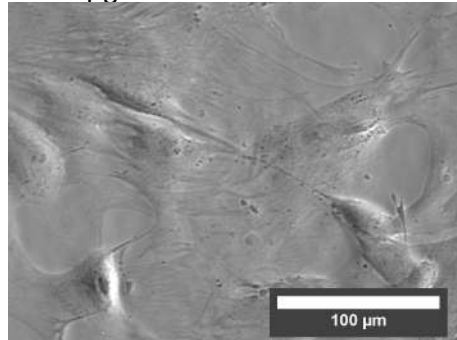


Abb. 3.8: Lichtmikroskopische Aufnahmen von osteoporotischen Spenderzellen, die für 72 h mit unterschiedlichen Konzentrationen von PEI-PGLU-346-MAL und 40 ng/mL BDNF inkubiert wurden.

3.2 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Aufnahme Rhodamin B-markierter Nanopartikel in die Zellen

In den Aufnahmen der mittels Fluoreszenzmikroskopie untersuchten Zellen stellen sich die mittels Höchst 33258 angefärbten Zellkerne blau sowie die mit Phalloidin FITC gefärbten, größtenteils parallel zueinander ausgerichteten Aktinfilamente grün dar. Die mittels Rhodamin B markierten Nanopartikel werden durch ihr rotes Signal sichtbar.

Abb. 3.9 A zeigt die nicht mit Nanopartikeln inkubierte Kontrollgruppe der knochengesunden Spenderzellen (ZK 94). Es kommen die bereits in der Lichtmikroskopie (Abschnitt 3.1) beschriebenen teils länglich, teils flächig geformten Zellen zur Darstellung.

Nach Inkubation der knochengesunden Spenderzellen (ZK 94) mit 500 µg/mL PEI-PGLU-346 (Abb. 3.9 B) bzw. 500 µg/mL PEI-PGLU-346-MAL (Abb. 3.9 C) über 72 h zeigt sich eine deutliche Anreicherung der mit Rhodamin B markierten Nanopartikel betont perinukleär. Demgegenüber zeigt sich in der zytosolischen Peripherie der Zellen keine wesentliche Signalanreicherung. Eine vergleichbare Verteilung der aufgenommenen Nanopartikel ergab sich auch in der Gruppe der osteoporotischen Spenderzellen (Bilder nicht gezeigt).

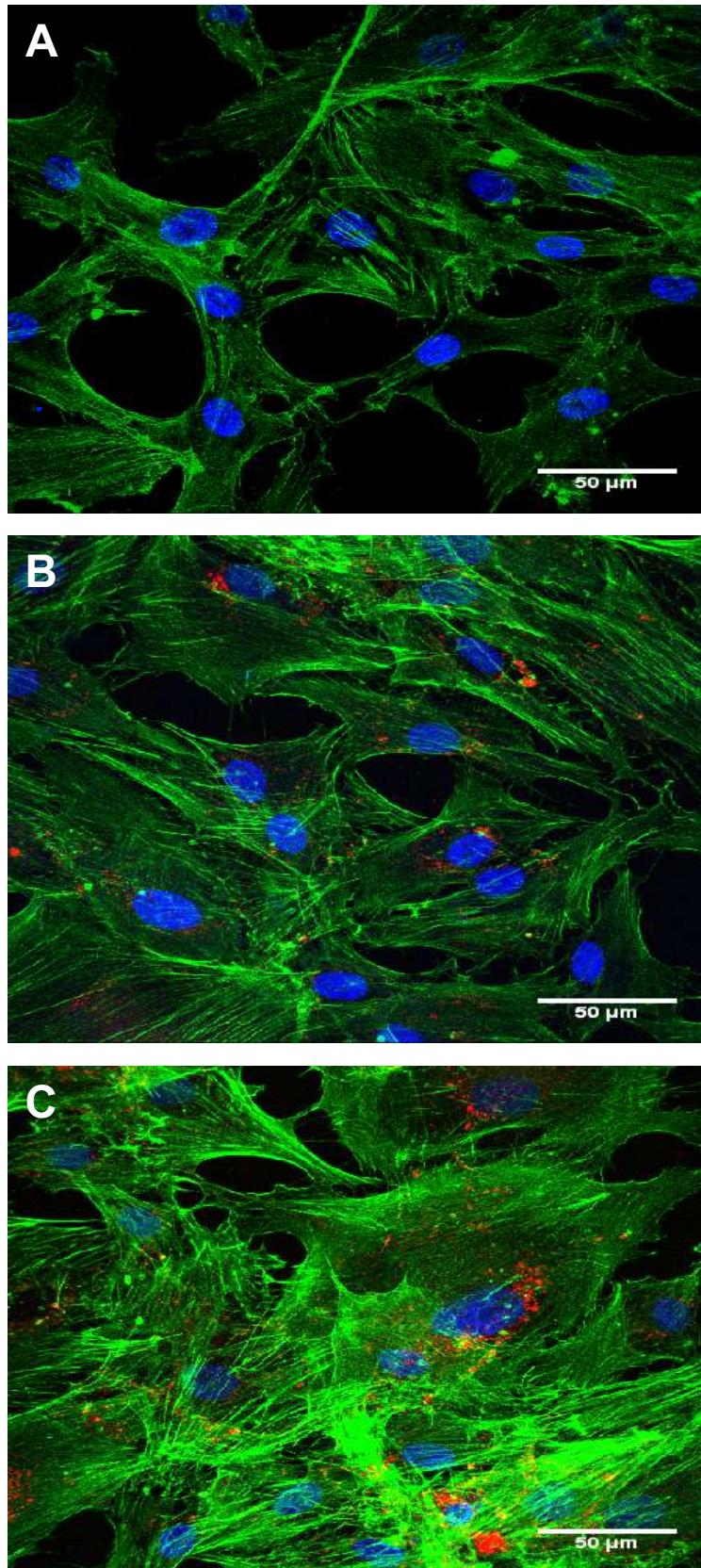


Abb. 3.9: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen: A) Kontrollgruppe ohne Zugabe von Nanopartikeln nach 72 h, B) Nach Inkubation mit 500 µg/mL fluoreszenzmarkierter PEI-PGLU-346 für 72 h, C) Nach Inkubation mit 500 µg/mL fluoreszenzmarkierter PEI-PGLU-346-MAL für 72 h

3.3 Lactatdehydrogenase-Assay

Beim Vergleich der Mittelwerte des LDH-Quotienten zum Zeitpunkt von 24 h und zum Zeitpunkt von 72 h zeigte sich im zeitlichen Verlauf ein signifikanter Anstieg sowohl in der Gruppe der mit PEI-PGLU-346 ($p < 0,001$) als auch in der Gruppe der mit PEI-PGLU-346-MAL ($p < 0,001$) behandelten Spenderzellen.

Zusätzlich ergab sich nach einer Inkubationsdauer von 72 h für die Gruppe der mit PEI-PGLU-346 behandelten Spenderzellen verglichen mit der Gruppe der für 72 h mit PEI-PGLU-346-MAL behandelten Spenderzellen ein signifikant höherer mittlerer LDH-Quotient ($p < 0,001$). Für eine Inkubationsdauer von 24 h ergab sich zwischen den mit unterschiedlichen Nanopartikeln behandelten Spenderzellen kein signifikanter Unterschied ($p = 0,145$) (Abb. 3.10).

Die statistische Auswertung erfolgte mittels nicht parametrischer ANOVA nach Kruskal-Wallis mit paarweisen Vergleichen, da sich für die untersuchten Daten keine Normalverteilung nachweisen ließ.

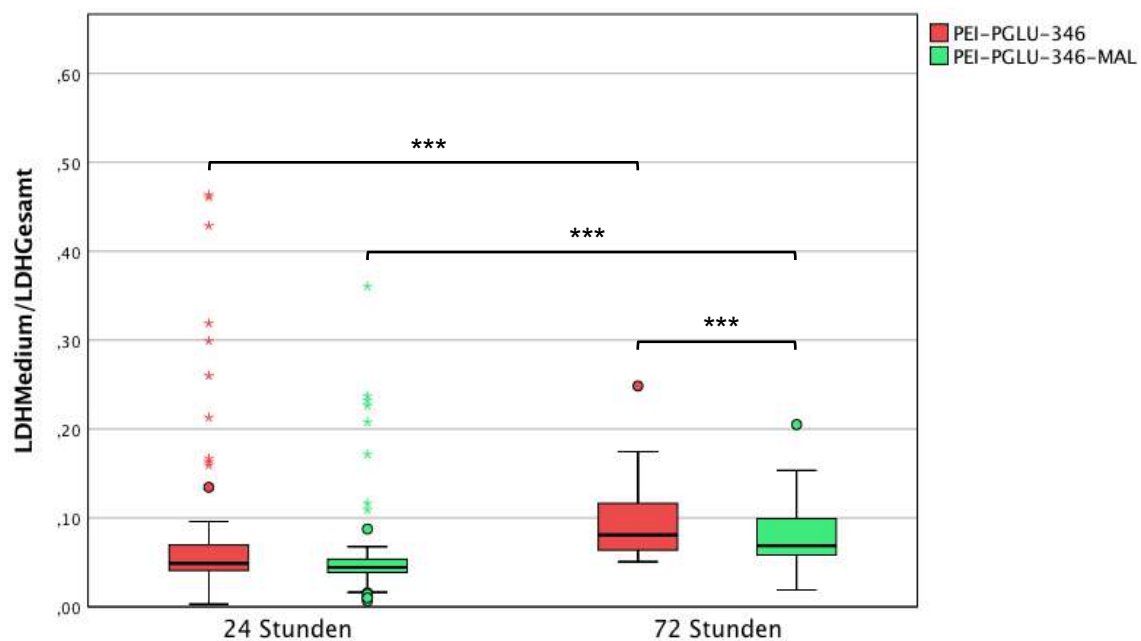


Abb. 3.10: Boxplot der mittleren LDH-Quotienten von PEI-PGLU-346 und PEI-PGLU-346-MAL nach einer Inkubationszeit von 24 h sowie 72 h. *** = $p \leq 0,001$

Bei Gegenüberstellung der unterschiedlichen eingesetzten Nanopartikelkonzentrationen ergab sich nach einer Inkubationszeit von 24 h in der Gruppe der mit 500 µg/mL PEI-PGLU-346 behandelten Spenderzellen ein signifikant erhöhter mittlerer LDH-Quotient gegenüber der Kontrollgruppe ($p = 0,017$).

In der Gruppe der mit PEI-PGLU-346-MAL behandelten Spenderzellen ließen sich keine signifikanten, konzentrationsabhängigen Unterschiede nachweisen (Abb. 3.11).

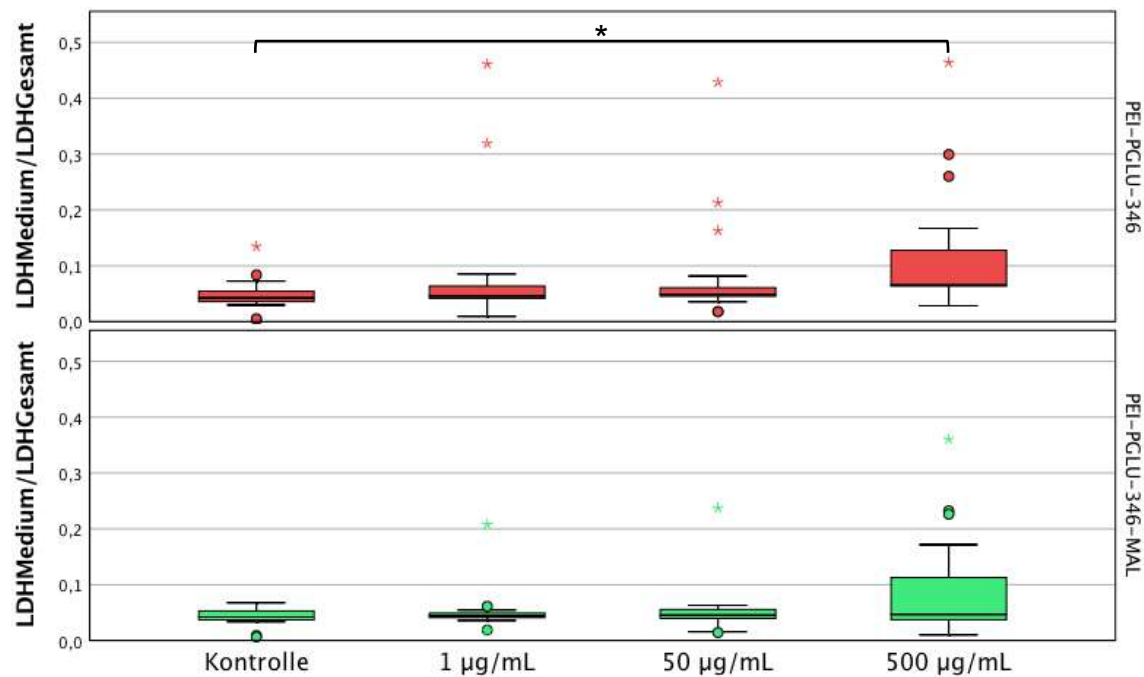


Abb. 3.11: Boxplot der konzentrationsabhängigen, mittleren LDH-Quotienten von PEI-PGLU-346 und PEI-PGLU-346-MAL, nach einer Inkubationszeit von 24 h. In der Gruppe der mit PEI-PGLU-346 behandelten Spenderzellen zeigt sich für eine Konzentration von 500 µg/mL ein, gegenüber der Kontrolle, erhöhter LDH-Quotient. * = $p \leq 0,05$

Nach einer Inkubationszeit von 72 h zeigte sich der mittlere LDH-Quotient der Gruppe der mit 500 µg/mL PEI-PGLU-346 behandelten Spenderzellen signifikant erhöht gegenüber der Gruppe der mit 50 µg/mL ($p = 0,019$) und 1 µg/mL ($p = 0,004$) behandelten Spenderzellen sowie gegenüber der Kontrolle ($p = 0,047$).

In der Gruppe der mit PEI-PGLU-346-MAL behandelten Spenderzellen ergaben sich auch nach einer Inkubationsdauer von 72 h keine konzentrationsabhängigen Unterschiede (Abb. 3.12).

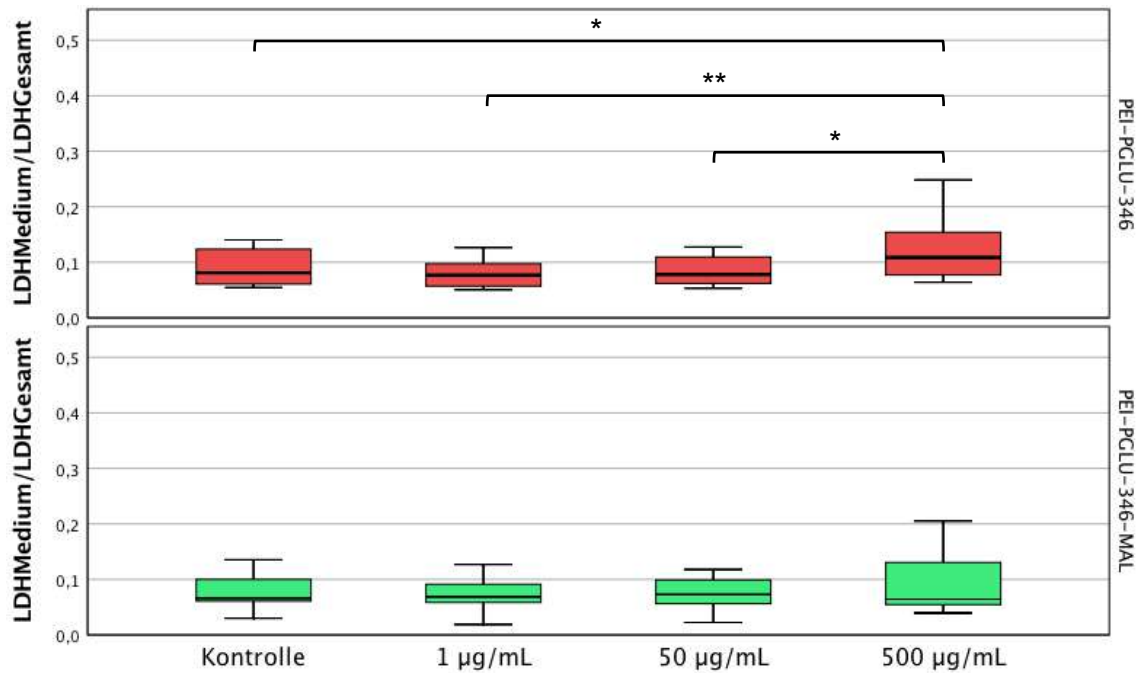


Abb. 3.12: Boxplot der konzentrationsabhängigen, mittleren LDH-Quotienten von PEI-PGLU-346 und PEI-PGLU-346-MAL, nach einer Inkubationszeit von 72 h. In der Gruppe der mit PEI-PGLU-346 behandelten Spenderzellen zeigt sich für eine Konzentration von 500 µg/mL ein, gegenüber der Kontrolle sowie gegenüber den anderen verwendeten Konzentrationen, signifikant erhöhter LDH-Quotient. * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$

Bei gesonderter Betrachtung der LDH-Quotienten der knochengesunden und osteoporotischen Spenderzellen ergaben sich folgende Ergebnisse:

In der Gruppe der knochengesunden Spenderzellen zeigte sich nach Inkubation über 24 h ein signifikant höherer mittlerer LDH-Quotient für die mit PEI-PGLU-346 inkubierten Spenderzellen verglichen mit den mit PEI-PGLU-346-MAL inkubierten Spenderzellen ($p = 0,005$). Gleiches war für eine Inkubation über 72 h zutreffend ($p = 0,001$).

Demgegenüber ließen sich in der Gruppe der osteoporotischen Spenderzellen für den Einsatz der verschiedenen Nanopartikel, abhängig von den unterschiedlichen Inkubationszeiten keine signifikanten Unterschiede nachweisen.

Sowohl in der Gruppe der knochengesunden als auch in der Gruppe der osteoporotischen Spenderzellen ergab sich beim Vergleich der unterschiedlichen Inkubationszeitpunkte für beide eingesetzten Nanopartikel ein signifikanter Anstieg des mittleren LDH-Quotienten. In der Gruppe der knochengesunden Spenderzellen war dieser Anstieg für PEI-PGLU-346 mit ($p < 0,001$), für PEI-PGLU-346-MAL mit ($p = 0,002$) signifikant. In der Gruppe der osteoporotischen Spenderzellen zeigte sich die Zunahme für PEI-PGLU-346 mit ($p = 0,006$), für PEI-PGLU-346-MAL mit ($p < 0,001$) signifikant (Abb. 3.13).

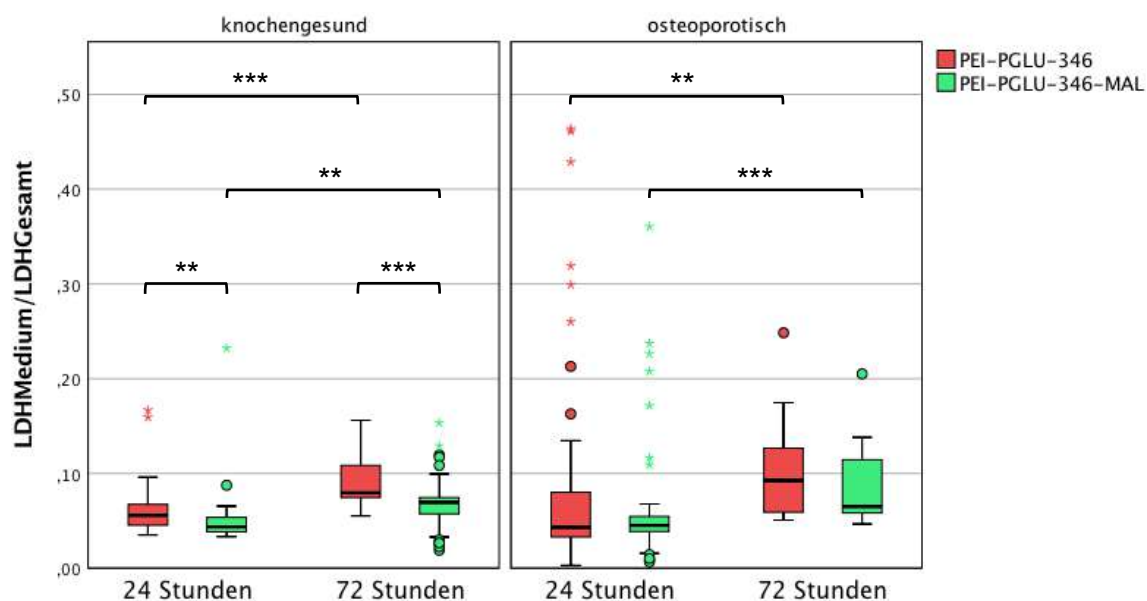


Abb. 3.13: Boxplot der mittleren LDH-Quotienten der knochengesunden und osteoporotischen Spenderzellen, für die Inkubation mit PEI-PGLU-346 und PEI-PGLU-346-MAL, nach 24 h sowie 72 h. ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$

Betrachtet man den Einfluss der Nanopartikelkonzentration auf den LDH-Quotienten in der Gruppe der knochen gesunden Spenderzellen, ergaben sich nach Inkubation mit PEI-PGLU-346 signifikante Unterschiede. Hier war der LDH-Quotient der mit 500 µg/mL PEI-PGLU-346 inkubierten Spenderzellen gegenüber der Kontrolle ($p < 0,001$), der Inkubation mit 1 µg/mL ($p < 0,001$) sowie der Inkubation mit 50 µg/mL ($p = 0,001$) jeweils signifikant erhöht.

Für die Inkubation mit PEI-PGLU-346-MAL ergaben sich keine konzentrationsabhängigen Unterschiede (Abb. 3.14).

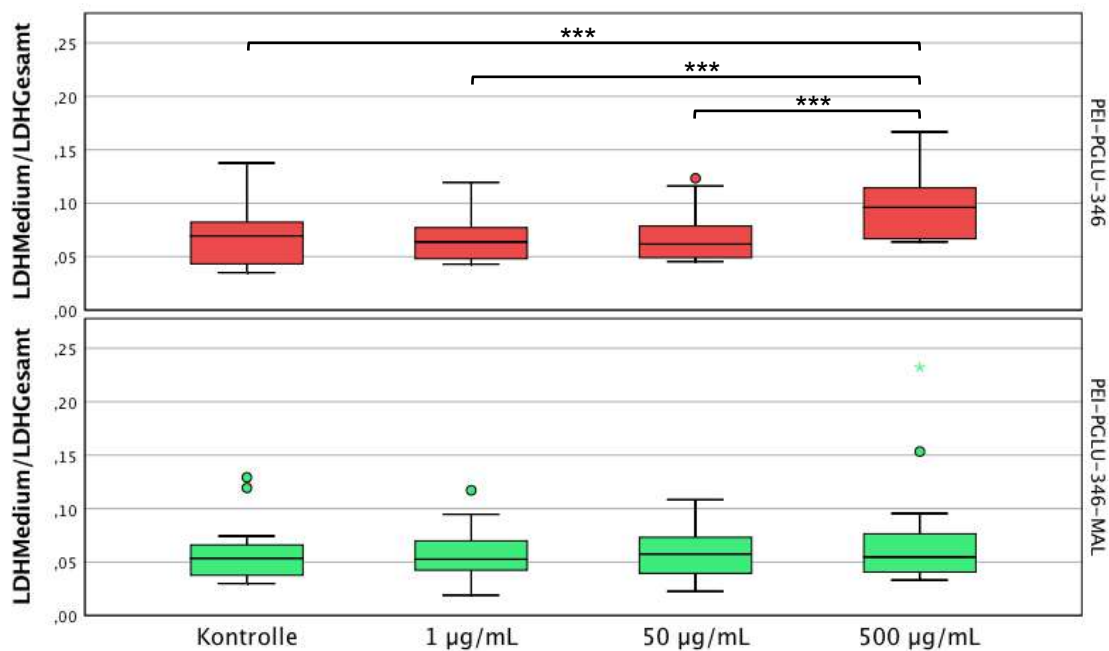


Abb. 3.14: Boxplot der konzentrationsabhängigen, mittleren LDH-Quotienten der knochen gesunden Spenderzellen, für die Inkubation mit PEI-PGLU-346 und PEI-PGLU-346-MAL. *** = $p \leq 0,001$

Bei Betrachtung des Einflusses der Nanopartikelkonzentration auf den LDH-Quotienten in der Gruppe der osteoporotischen Spenderzellen ergab sich nach Inkubation mit 500 $\mu\text{g/mL}$ PEI-PGLU-346 eine signifikante Erhöhung, gegenüber der Kontrolle ($p = 0,05$). Für die Inkubation mit PEI-PGLU-346-MAL ergaben sich keine konzentrationsabhängigen Unterschiede (Abb. 3.15).

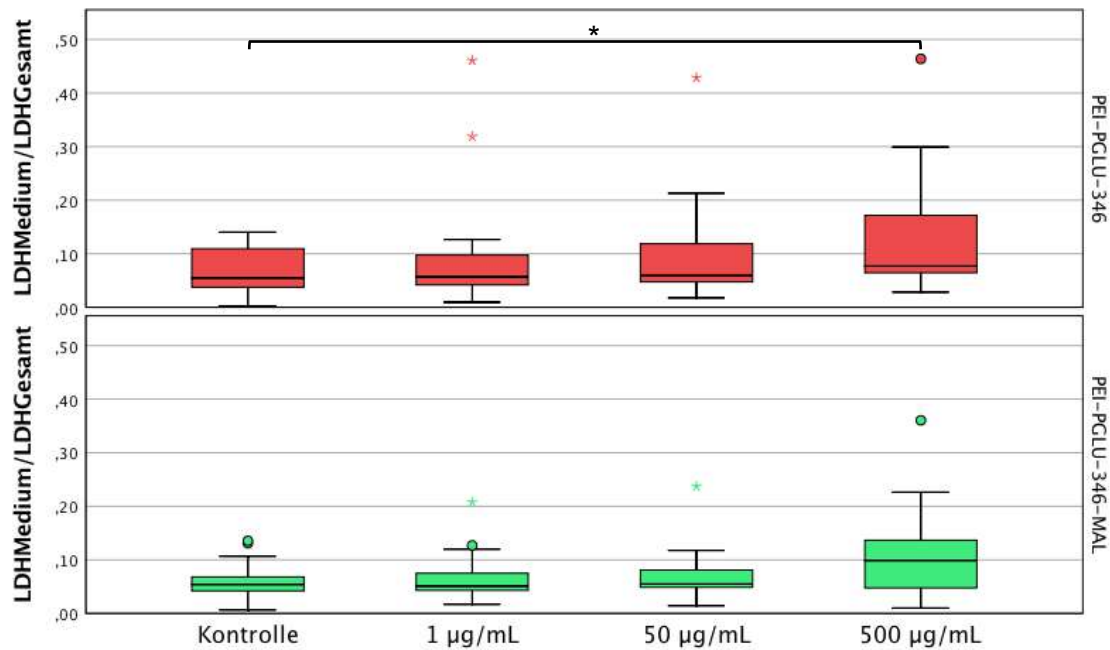


Abb. 3.15: Boxplot der konzentrationsabhängigen, mittleren LDH-Quotienten der osteoporotischen Spenderzellen, für die Inkubation mit PEI-PGLU-346 und PEI-PGLU-346-MAL. * = $p \leq 0,05$

Bei der Betrachtung des Einflusses der Zugabe von BDNF ergaben sich hinsichtlich des mittleren LDH-Quotienten keine signifikanten Unterschiede. Dies galt für den Vergleich der mit verschiedenen Nanopartikeln inkubierten Zellen ebenso wie für die Gegenüberstellung der unterschiedlichen Knochenstatus (Abb. 3.16 und Abb. 3.17).

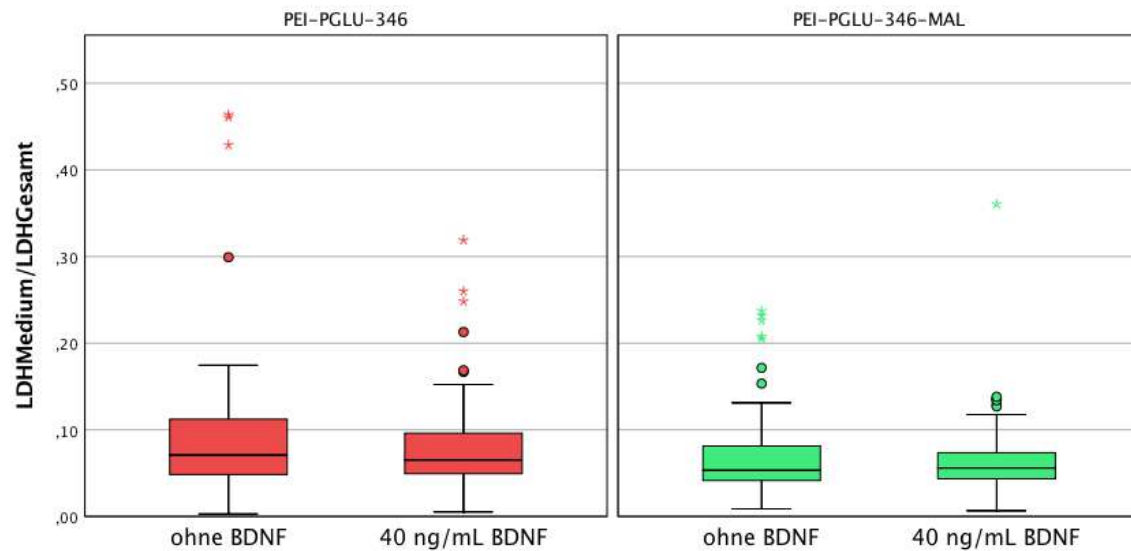


Abb. 3.16: Boxplot der mittleren LDH-Quotienten in Abhängigkeit der Wirkung von BDNF auf die Gruppen der mit unterschiedlichen Nanopartikeln inkubierten Spenderzellen

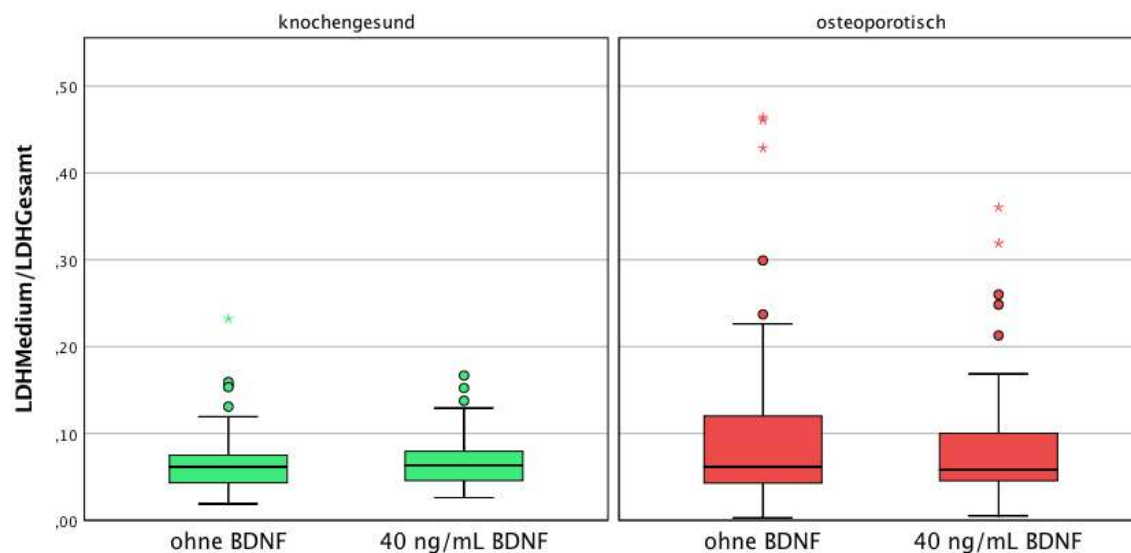


Abb. 3.17: Boxplot der mittleren LDH-Quotienten in Abhängigkeit der Wirkung von BDNF auf die Gruppen der Spenderzellen mit unterschiedlichen Knochenstatus

3.4 IL-6 ELISA

IL-6 ist ein proinflammatorisches Cytokin und spielt eine wesentliche Rolle in der Vermittlung der Akuten-Phase-Reaktion.

Der Vergleich des Gehalts an IL-6 im Medium der mit PEI-PGLU-346 und PEI-PGLU-346-MAL behandelten Spenderzellen ergab keine signifikanten Unterschiede (Abb. 3.18). Gleiches galt für die Untersuchung des Einflusses der Nanopartikelkonzentration (Abb. 3.19), des Knochenstatus (Abb. 3.20) sowie der Zugabe von BDNF (Abb. 3.21).

Die statistische Auswertung erfolgte mittels nicht parametrischer ANOVA nach Kruskal-Wallis mit paarweisen Vergleichen, da sich für die untersuchten Daten keine Normalverteilung nachweisen ließ.

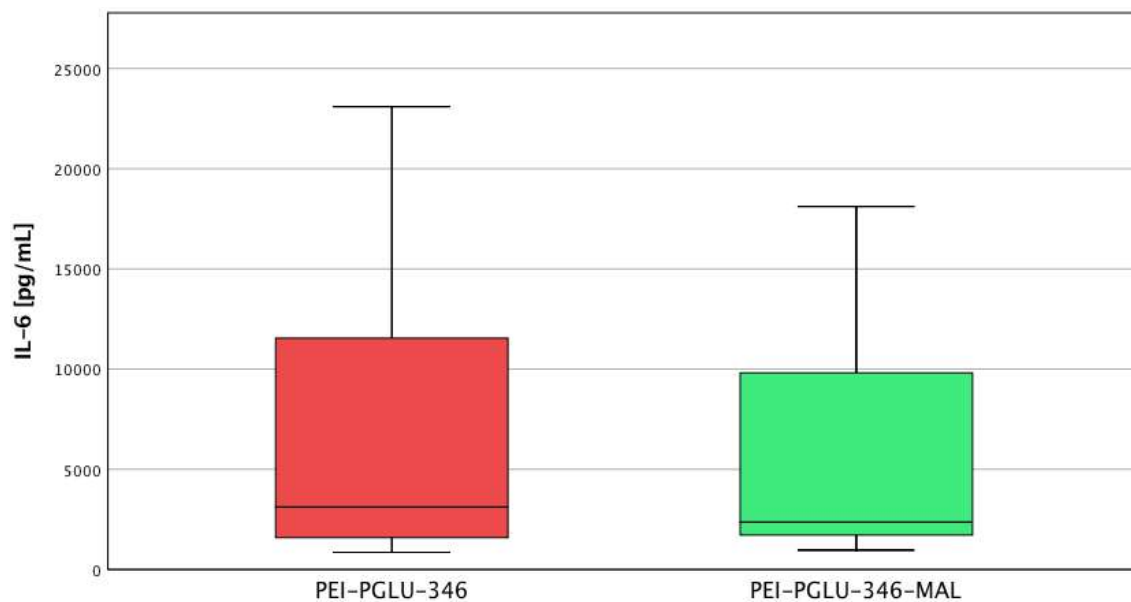


Abb. 3.18: Boxplot des Gehaltes von IL-6 im Medium der mit PEI-PGLU-346 und PEI-PGLU-346-MAL behandelten Spenderzellen

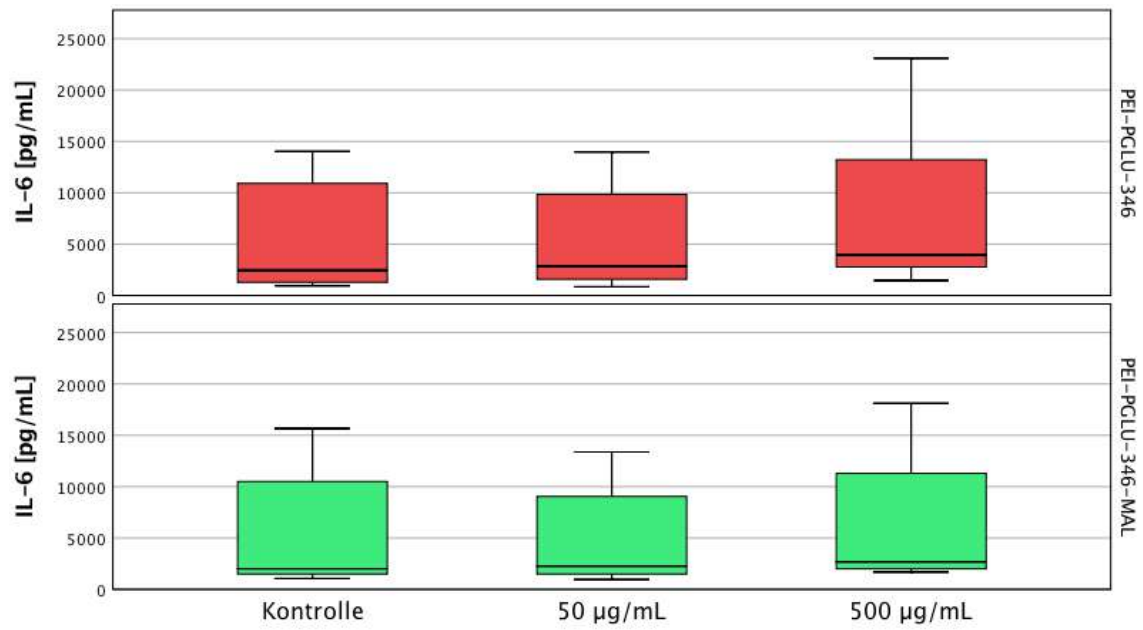


Abb. 3.19: Boxplot des Gehaltes von IL-6 im Medium der Kontrolle sowie der mit unterschiedlichen Konzentrationen von PEI-PGLU-346 und PEI-PGLU-346-MAL inkubierten Spenderzellen.

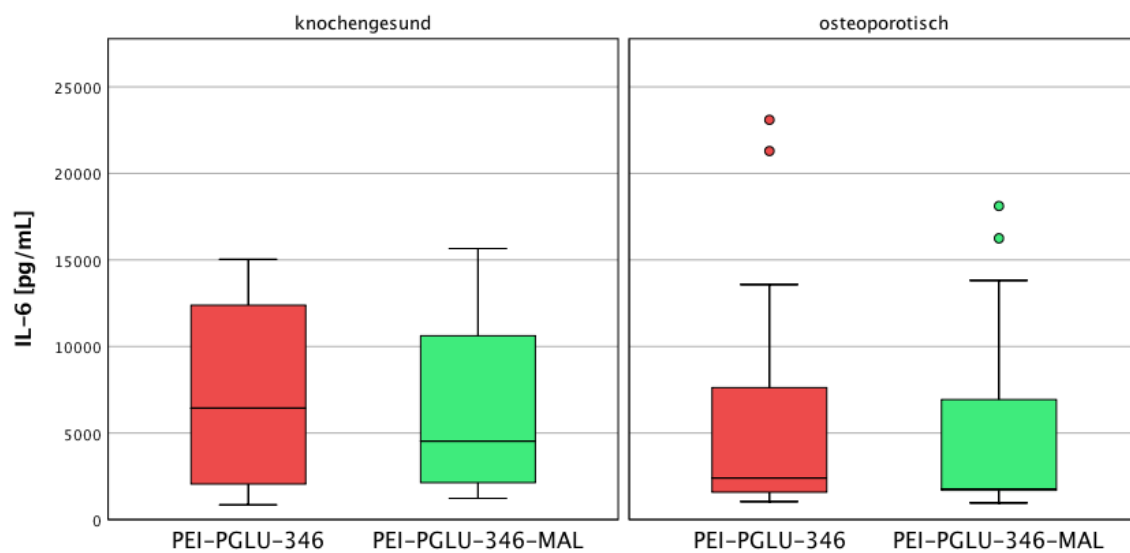


Abb. 3.20: Boxplot des Gehaltes von IL-6 im Medium in der Gruppe der knochengesunden und osteoporotischen, mit PEI-PGLU-346 und PEI-PGLU-346-MAL inkubierten Spenderzellen.

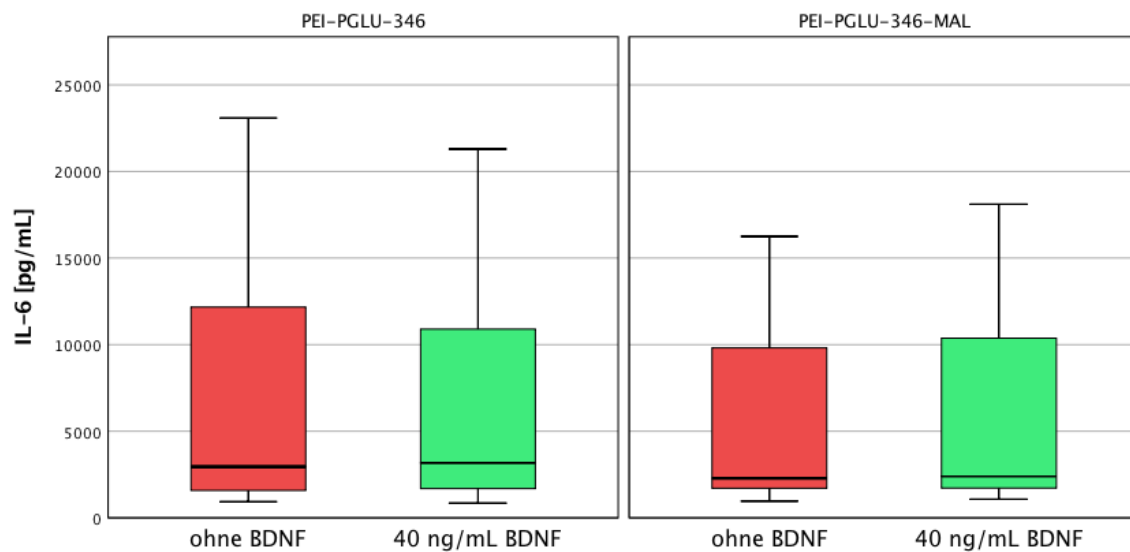


Abb. 3.21: Boxplot des Gehaltes von IL-6 im Medium in der Gruppe mit PEI-PGLU-346 und PEI-PGLU-346-MAL inkubierten Spenderzellen, mit und ohne Zugabe von 40 ng/mL BDNF.

3.5 Ergebnisse der Real-Time PCR

3.5.1 Cyclin D1 (CCND1)

Bei CCND1 handelt es sich um einen Marker der Zellproliferation. Mittels Real-Time PCR wurde untersucht, ob die eingesetzten Nanopartikel einen Einfluss auf die Expression der CCND1 mRNA und somit auf die proliferative Aktivität der rdMSC haben. Bei der Gegenüberstellung der ΔC_t -Werte der knochengesunden und osteoporotischen Spenderzellen ergab sich ein signifikanter Unterschied ($p = 0,011$) bezüglich der Expression von CCND1 mRNA. Hier lag der Mittelwert der ΔC_t -Werte für die Gruppe der knochengesunden Spenderzellen bei 2,79 (SD = 1,23), für die Gruppe der osteoporotischen Spenderzellen bei 3,28 (SD = 0,5). Der threshold level wurde demzufolge bei der Untersuchung der Proben knochengesunder Spenderzellen schneller erreicht. In diesen Proben war also relativ mehr CCND1 mRNA enthalten (Abb. 3.22).

Die statistische Auswertung erfolgte mittels nicht parametrischer ANOVA nach Kruskal-Wallis mit paarweisen Vergleichen, da sich für die untersuchten Daten keine Normalverteilung nachweisen ließ.

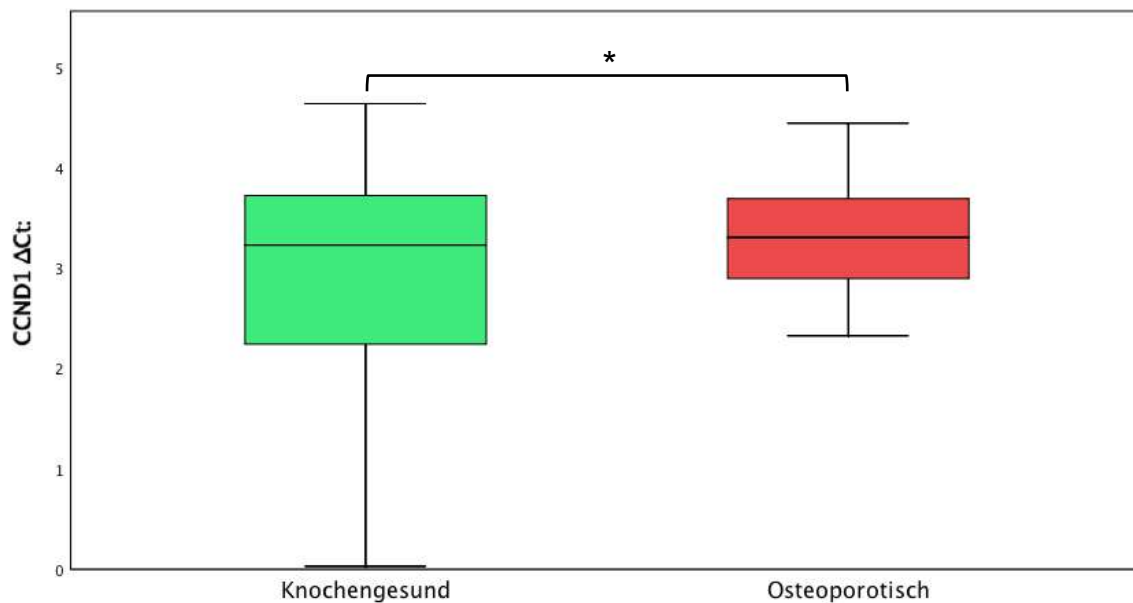


Abb. 3.22: Boxplot der ΔC_t -Werte von CCND1 in der Gruppe der knochengesunden und der Gruppe der osteoporotischen Spenderzellen. * = $p \leq 0,05$

Der Vergleich der ΔC_t -Werte knochengesunder und osteoporotischer, jeweils mit PEI-PGLU-346 und PEI-PGLU-346-MAL inkubierter Spenderzellen erbrachte einen signifikanten Unterschied für die Gruppe der mit PEI-PGLU-346 behandelten Zellen ($p = 0,046$). Die ΔC_t -Werte von CCND1 lagen dabei in der Gruppe der knochengesunden Spenderzellen (Mittelwert 2,74; SD = 1,12) niedriger als in der Gruppe der osteoporotischen Spenderzellen (Mittelwert 3,2; SD = 0,48). Der threshold level wurde demzufolge bei der Untersuchung der Proben knochengesunder, mit PEI-PGLU-346 inkubierter Spenderzellen schneller erreicht. In diesen Proben war also relativ mehr CCND1 mRNA enthalten (Abb. 3.23).

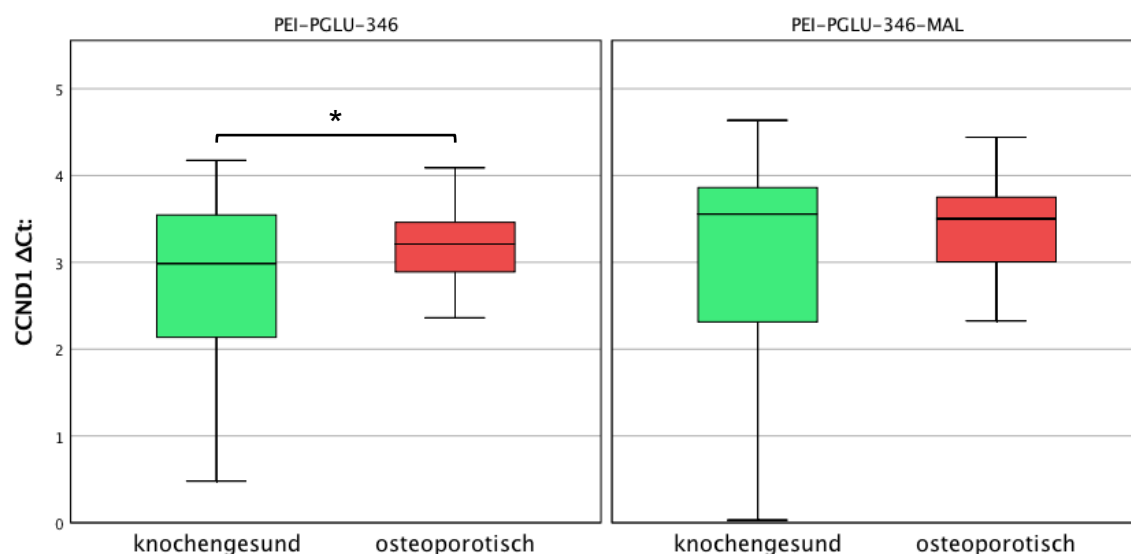


Abb. 3.23: Boxplot der ΔC_t -Werte von CCND1 der knochengesunden und osteoporotischen, mit PEI-PGLU-346 bzw. PEI-PGLU-346-MAL inkubierten Spenderzellen. * = $p \leq 0,05$

Beim Vergleich der Auswirkung der Auswirkung der unterschiedlichen Nanopartikel (Abb. 3.24), der Zugabe von BDNF (Abb. 3.25) sowie der unterschiedlichen Nanopartikelkonzentrationen (Abb. 3.26) auf die ΔCt -Werte von CCND1 ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

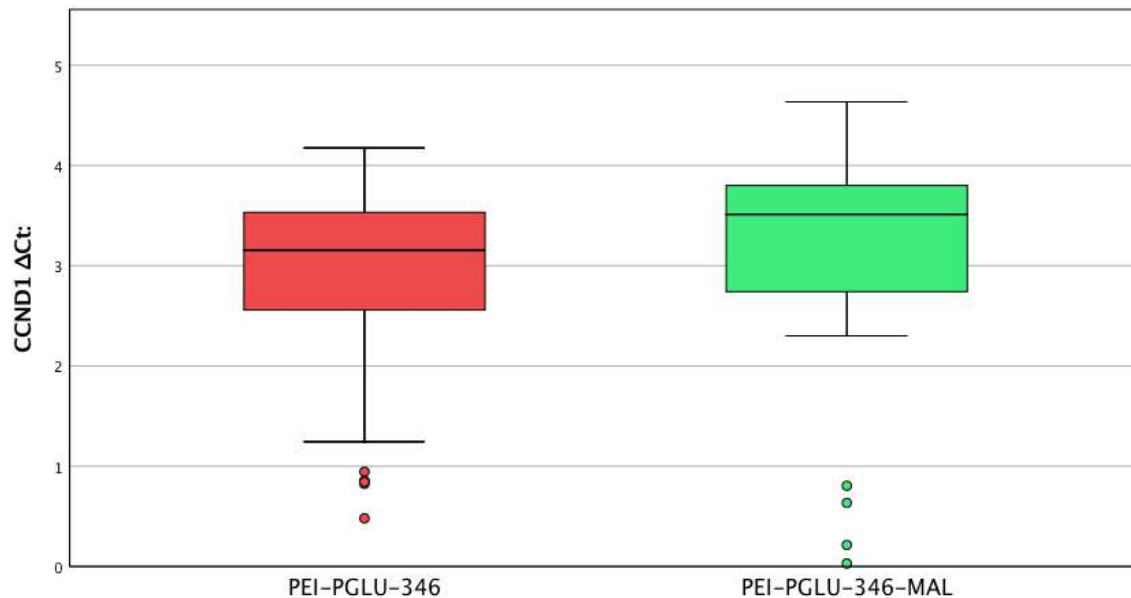


Abb. 3.24: Boxplot der ΔCt -Werte von CCND1 in der Gruppe der mit PEI-PGLU-346 und mit PEI-PGLU-346-MAL inkubierten Spenderzellen.

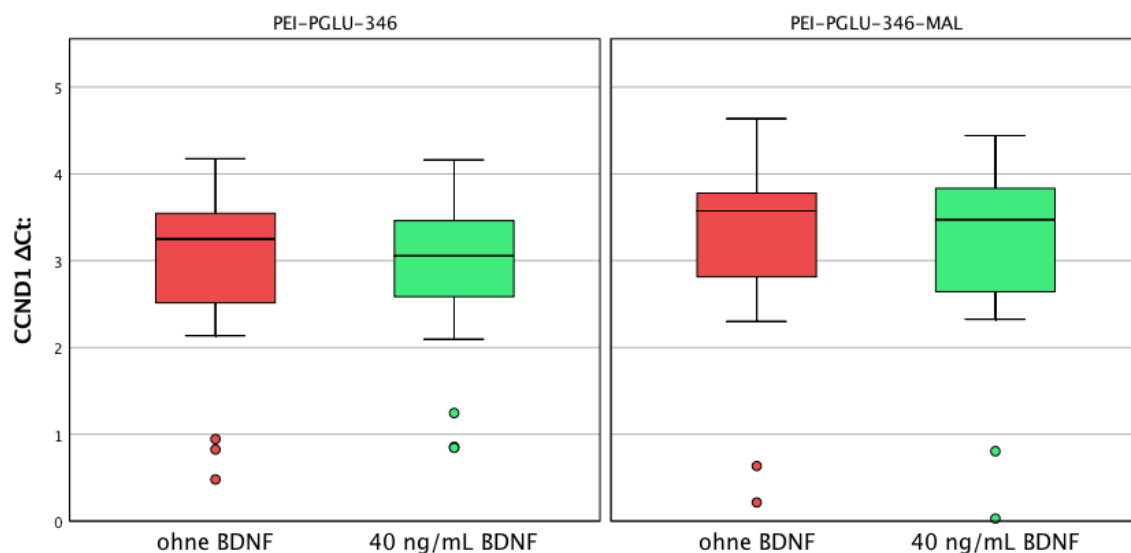


Abb. 3.25: Boxplot der ΔCt -Werte von CCND1 in der Gruppe der mit 40 ng/mL BDNF behandelten, mit PEI-PGLU-346 und mit PEI-PGLU-346-MAL inkubierten Spenderzellen

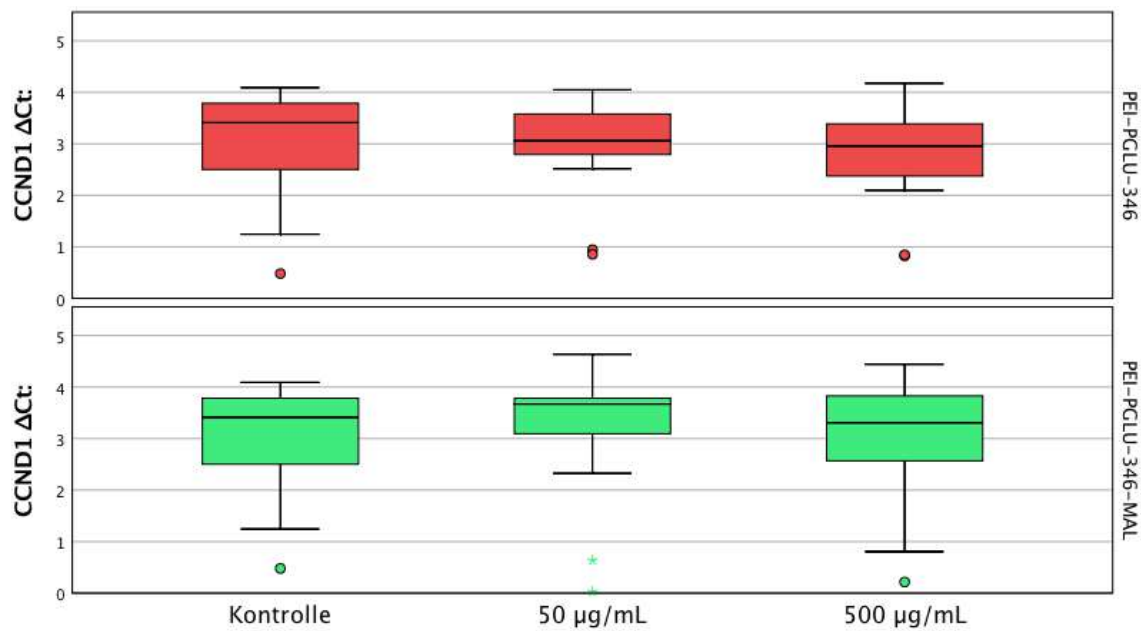


Abb. 3.26: Boxplot der ΔC_t -Werte von CCND1 in der Kontrollgruppe und den mit 50 µg/mL bzw. 500 µg/mL PEI-PGLU-346 und PEI-PGLU-346-MAL inkubierten Spenderzellen

3.5.2 C/EBP homologous protein (CHOP)

C/EBP homologous protein (CHOP) oder auch growth arrest- and DNA damage-inducible gene 153 (GADD153) spielt eine wichtige Rolle im Rahmen von Stressreaktionen des endoplasmatischen Retikulums (ER).

Beim Vergleich der ΔC_t -Werte der CHOP mRNA-Expression nach Inkubation mit den unterschiedlichen Nanopartikeln zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (Abb. 3.31). Gleiches galt für die Auswirkung der Nanopartikelkonzentration (Abb. 3.32).

Demgegenüber zeigte sich ein signifikanter Unterschied beim Vergleich der ΔC_t -Werte der knochengesunden und osteoporotischen Spenderzellen hinsichtlich der CHOP mRNA-Expression ($p < 0,001$). Hier lag der Mittelwert der ΔC_t -Werte in der Gruppe der knochengesunden Spenderzellen bei 5,51 (SD = 0,34), in der Gruppe der osteoporotischen Spenderzellen bei 5,84 (SD = 0,43) (Abbildung 3.27).

Die statistische Auswertung erfolgte mittels nicht parametrischer ANOVA nach Kruskal-Wallis mit paarweisen Vergleichen, da sich für die untersuchten Daten keine Normalverteilung nachweisen ließ.

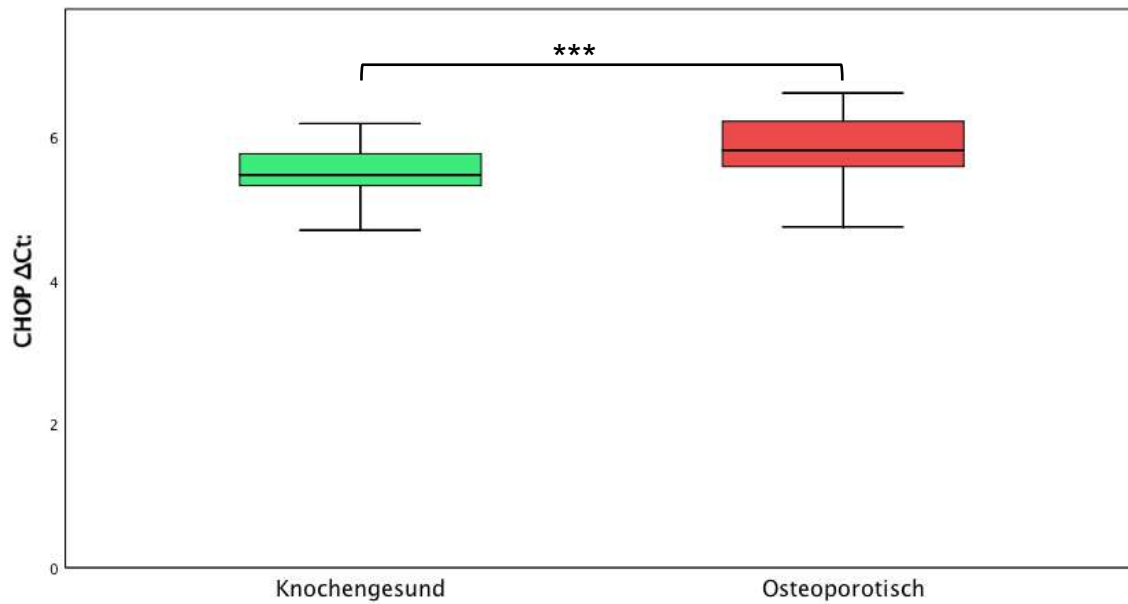


Abb. 3.27: Boxplot der ΔCt -Werte von CHOP in der Gruppe der knochengesunden und der Gruppe der osteoporotischen Spenderzellen. *** = $p \leq 0,001$

Ebenfalls zeigten sich hinsichtlich der CHOP mRNA-Expression signifikante Unterschiede beim Vergleich der ΔCt -Werte der mit PEI-PGLU-346 und PEI-PGLU-346-MAL inkubierten Spenderzellen unterschiedlicher Knochenstatus. Für die knochengesunden mit PEI-PGLU-346 inkubierten Spenderzellen lagen die ΔCt -Werte bei 5,47 (SD = 0,37) gegenüber 5,85 (SD = 0,44) für die osteoporotischen Spenderzellen ($p < 0,001$). Bei Inkubation der knochengesunden Zellen mit PEI-PGLU-346-MAL lagen die ΔCt -Werte bei 5,56 (SD = 0,3), für die osteoporotischen mit PEI-PGLU-346-MAL inkubierten Zellen bei 5,83 (SD = 0,42) ($p = 0,02$) (Abb. 3.28).

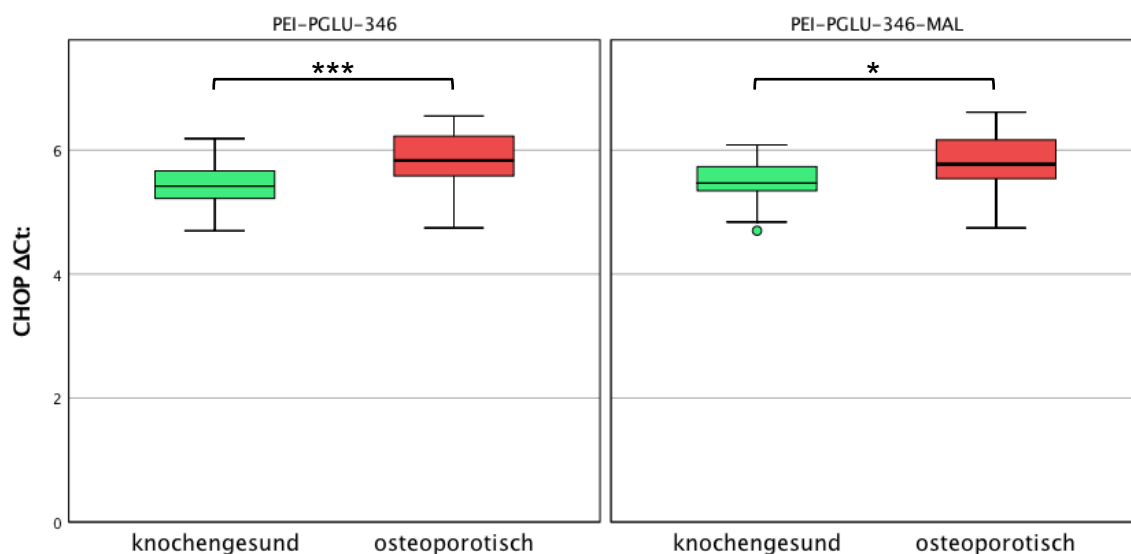


Abb. 3.28: Boxplot der ΔCt -Werte von CHOP der knochengesunden und osteoporotischen, mit PEI-PGLU-346 bzw. PEI-PGLU-346-MAL inkubierten Spenderzellen. * = $p \leq 0,05$; *** = $p \leq 0,001$

Auch hinsichtlich der Verwendung von BDNF ergab sich bezüglich der ΔCt -Werte ein signifikanter Unterschied ($p = 0,004$). Deren Mittelwert lag in der Gruppe der mit 40 ng/mL BDNF behandelten Zellen bei 5,57 (SD = 0,42), in der Gruppe der nicht mit BDNF behandelten Zellen bei 5,79 (SD = 0,39) (Abb. 3.29).

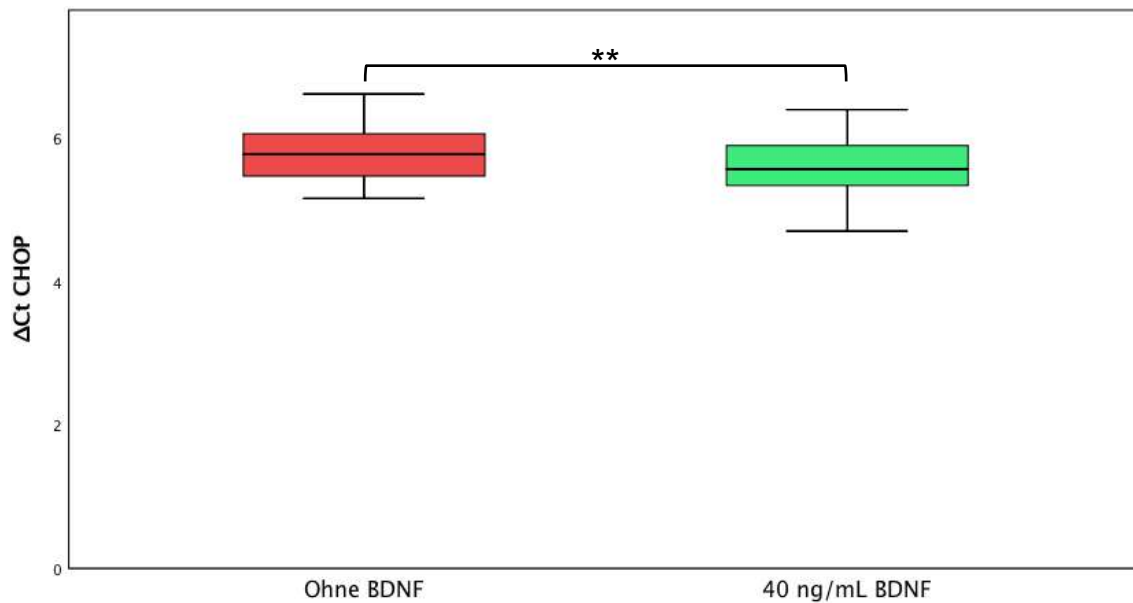


Abb. 3.29: Boxplot der ΔCt -Werte von CHOP der ohne und mit 40 ng/mL BDNF behandelten Spenderzellen.
 ** = $p \leq 0,01$

Unter Zugabe von 40 ng/mL BDNF zeigten sich sowohl in der Gruppe der mit PEI-PGLU-346 ($p = 0,049$) als auch in der Gruppe der mit PEI-PGLU-346-MAL ($p = 0,034$) inkubierten Spenderzellen signifikante Unterschiede. In der Gruppe der mit PEI-PGLU-346 inkubierten Spenderzellen lag der Mittelwert der ΔCt -Werte unter Zugabe von 40 ng/mL BDNF bei 5,55 (SD = 0,44), ohne Zugabe von BDNF bei 5,76 (SD = 0,431). In der Gruppe der mit PEI-PGLU-346-MAL inkubierten Spenderzellen lag der Mittelwert der ΔCt -Werte unter Zugabe von 40 ng/mL BDNF bei 5,574 (SD = 0,41), ohne Zugabe von BDNF bei 5,82 (SD = 0,32) (Abb. 3.30).

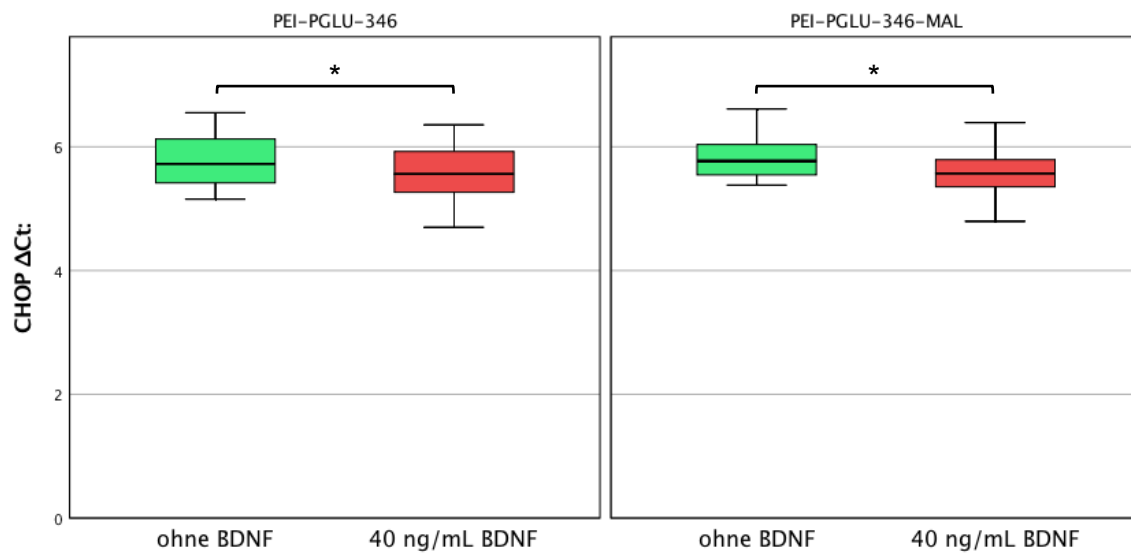


Abb. 3.30: Boxplot der ΔC_t -Werte von CHOP der ohne und mit 40 ng/mL BDNF behandelten, mit PEI-PGLU-346 und mit PEI-PGLU-346-MAL inkubierten Spenderzellen. * = $p \leq 0,05$

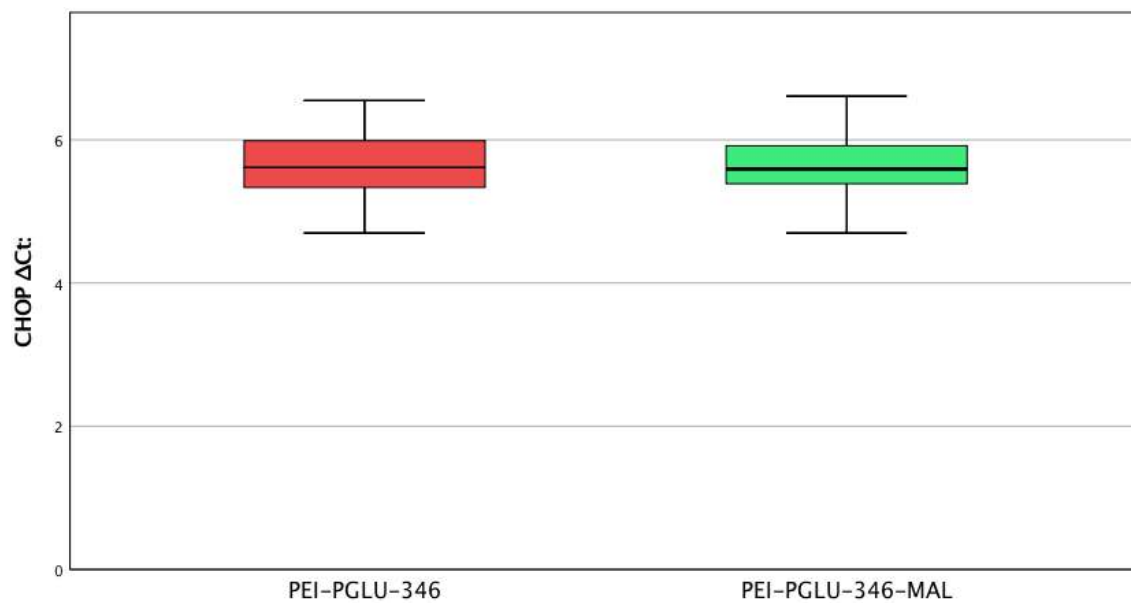


Abb. 3.31: Boxplot der ΔC_t -Werte von CHOP der mit PEI-PGLU-346 und mit PEI-PGLU-346-MAL inkubierten Spenderzellen

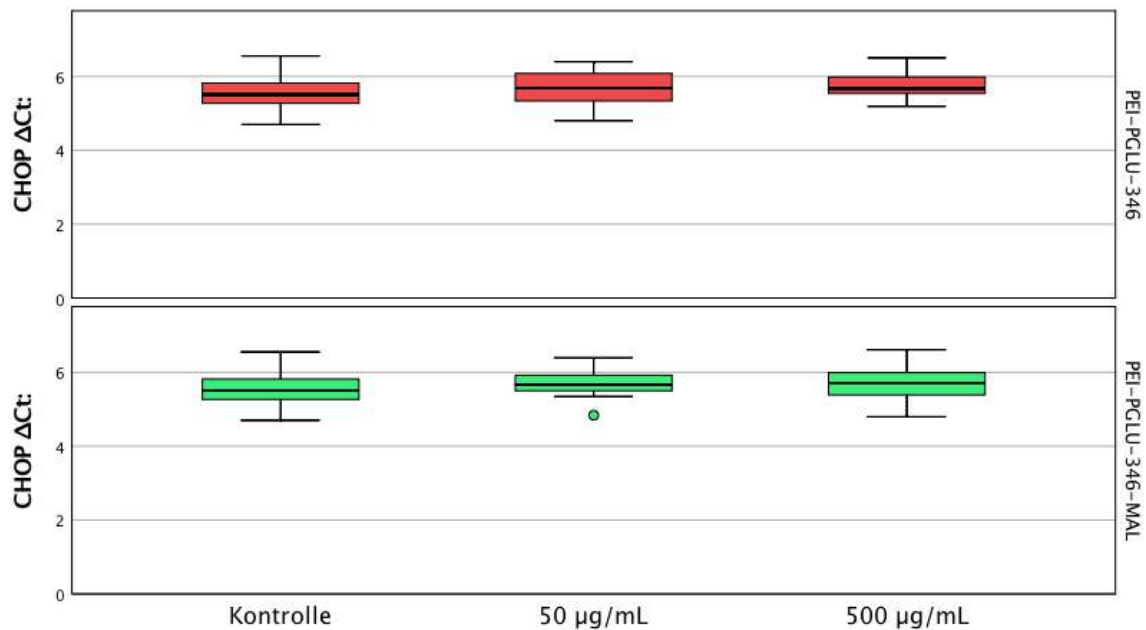


Abb. 3.32: Boxplot der ΔC_t -Werte von CHOP in der Kontrollgruppe und den mit 50 $\mu\text{g/mL}$ bzw. 500 $\mu\text{g/mL}$ PEI-PGLU-346 und PEI-PGLU-346-MAL inkubierten Spenderzellen

3.5.3 NAD(P)H dehydrogenase (quinone 1) (NQO1)

Mittels Real-Time PCR wurde der Einfluss der untersuchten Nanopartikel auf die Expression von NQO1 und der damit verbundenen Induktion oxidativen Stresses untersucht.

Beim Vergleich der ΔC_t -Werte der NQO1 mRNA-Expression nach Inkubation mit den unterschiedlichen Nanopartikeln zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (Abb. 3.34). Gleiches galt für die Auswirkung der unterschiedlichen Nanopartikelkonzentrationen (Abb. 3.35) sowie der Zugabe von BDNF (Abb. 3.36).

Allerdings ließ sich, wie schon für CCND1 und CHOP, ein signifikanter Unterschied ($p = 0,025$) beim Vergleich der ΔC_t -Werte der knochengesunden und osteoporotischen Spenderzellen feststellen (Abb. 3.33). Der Mittelwert der ΔC_t -Werte lag in der Gruppe der knochengesunden Spenderzellen bei 4,48 (SD = 0,74), in der Gruppe der osteoporotischen Spenderzellen bei 4,17 (SD = 0,66). Dies spricht für eine vermehrte Expression von NQO1 mRNA in den Zellen der osteoporotischen Spender.

Die statistische Auswertung erfolgte mittels nicht parametrischer ANOVA nach Kruskal-Wallis mit paarweisen Vergleichen, da sich für die untersuchten Daten keine Normalverteilung nachweisen ließ.

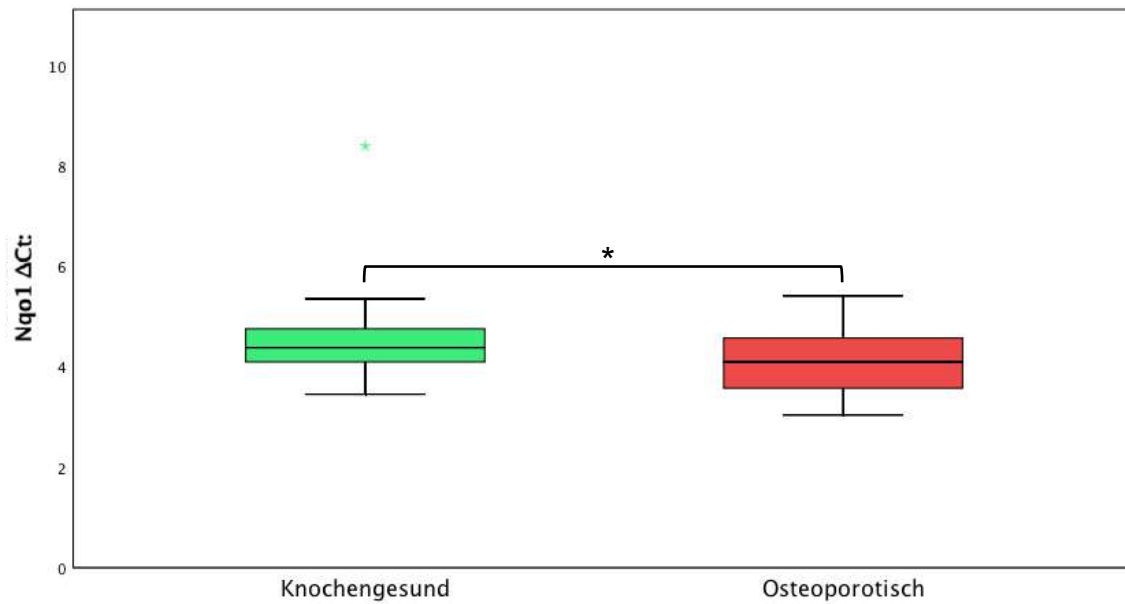


Abb. 3.33: Boxplot der ΔC_t -Werte von NQO1 in der Gruppe der knochengesunden und der Gruppe der osteoporotischen Spenderzellen. * = $p \leq 0,05$

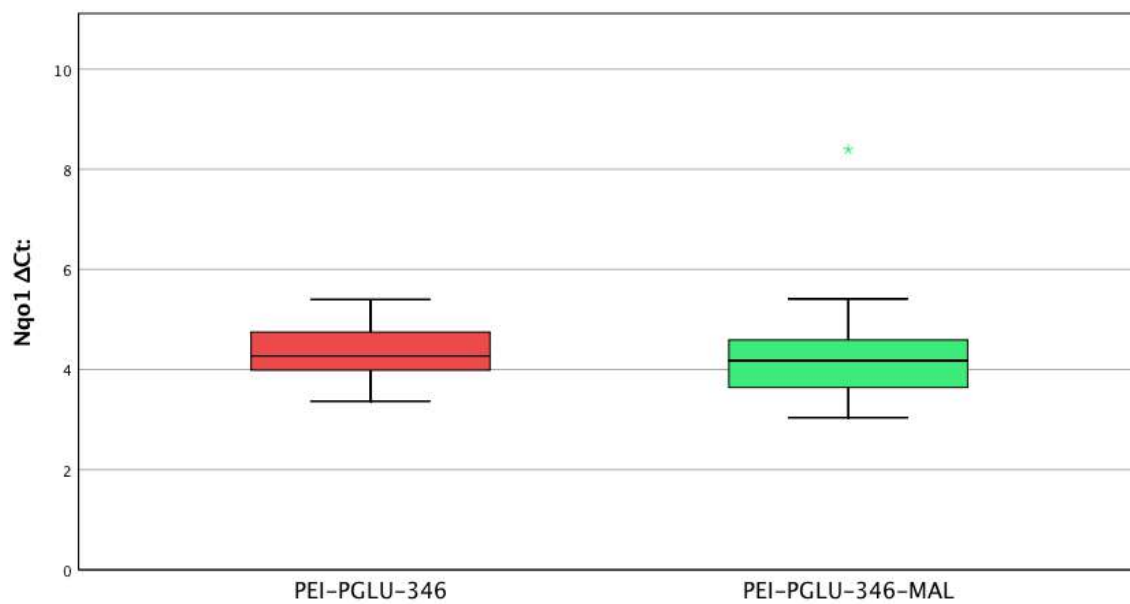


Abb. 3.34: Boxplot der ΔC_t -Werte von NQO1 der mit PEI-PGLU-346 und mit PEI-PGLU-346-MAL inkubierten Spenderzellen

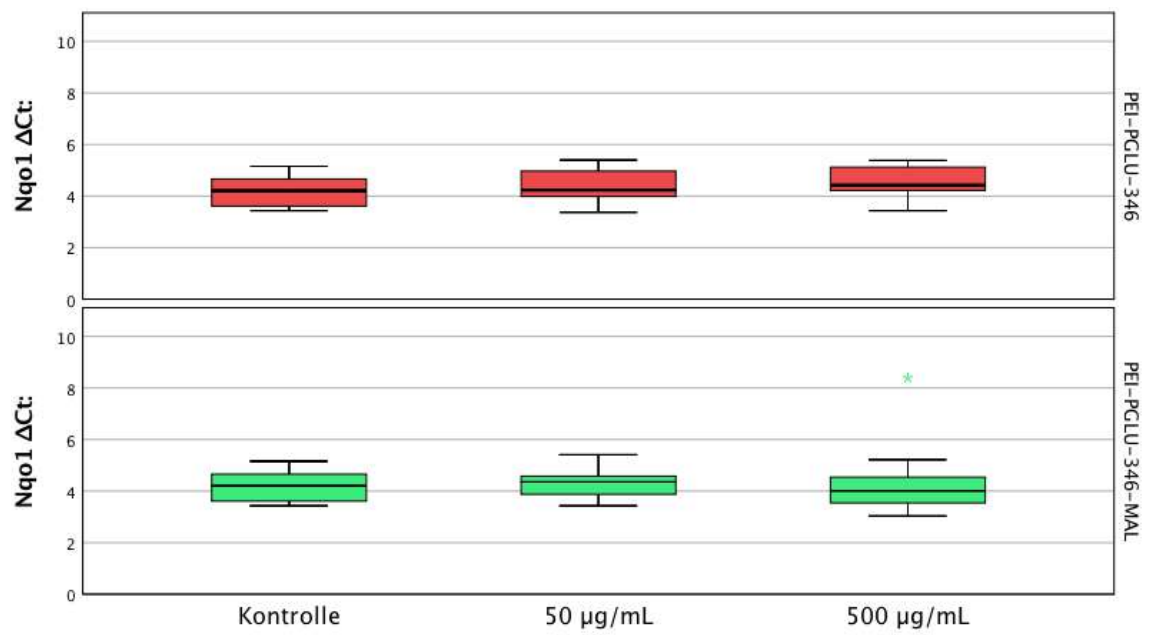


Abb. 3.35: Boxplot der ΔC_t -Werte von NQO1 in der Kontrollgruppe und den mit 50 µg/mL bzw. 500 µg/mL PEI-PGLU-346 und PEI-PGLU-346-MAL inkubierten Spenderzellen

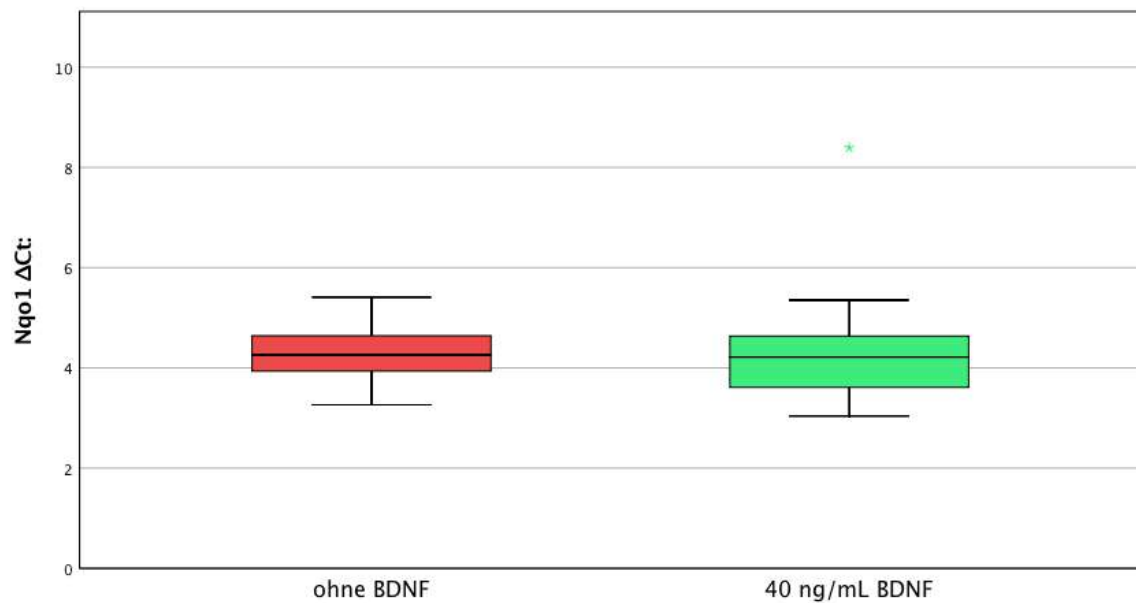


Abb. 3.36: Boxplot der ΔC_t -Werte von NQO1 der ohne und mit 40 ng/mL BDNF behandelten Spenderzellen

3.5.4 Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 3 (RIPK3)

Mittels Real-Time PCR wurde der Einfluss der untersuchten Nanopartikel auf die Expression des Nekroptosemarkers RIPK3 untersucht.

Beim Vergleich der ΔCt -Werte der RIPK3 mRNA-Expression nach Inkubation mit den unterschiedlichen Nanopartikeln zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (Abb. 3.37). Gleiches galt für die Untersuchung des Einflusses der unterschiedlichen Nanopartikelkonzentrationen (Abb. 3.38), des Knochenstatus (Abb. 3.39) sowie der Zugabe von BDNF (Abb. 3.40).

Die statistische Auswertung erfolgte mittels nicht parametrischer ANOVA nach Kruskal-Wallis mit paarweisen Vergleichen, da sich für die untersuchten Daten keine Normalverteilung nachweisen ließ.

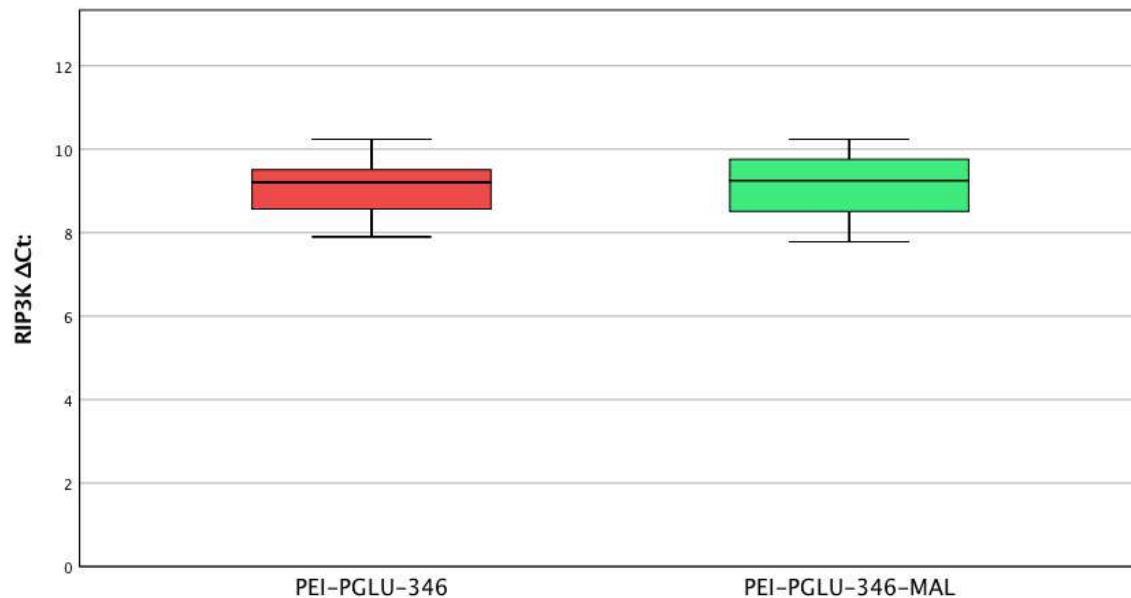


Abb. 3.37: Boxplot der ΔCt -Werte von RIPK3 der mit PEI-PGLU-346 und mit PEI-PGLU-346-MAL inkubierten Spenderzellen

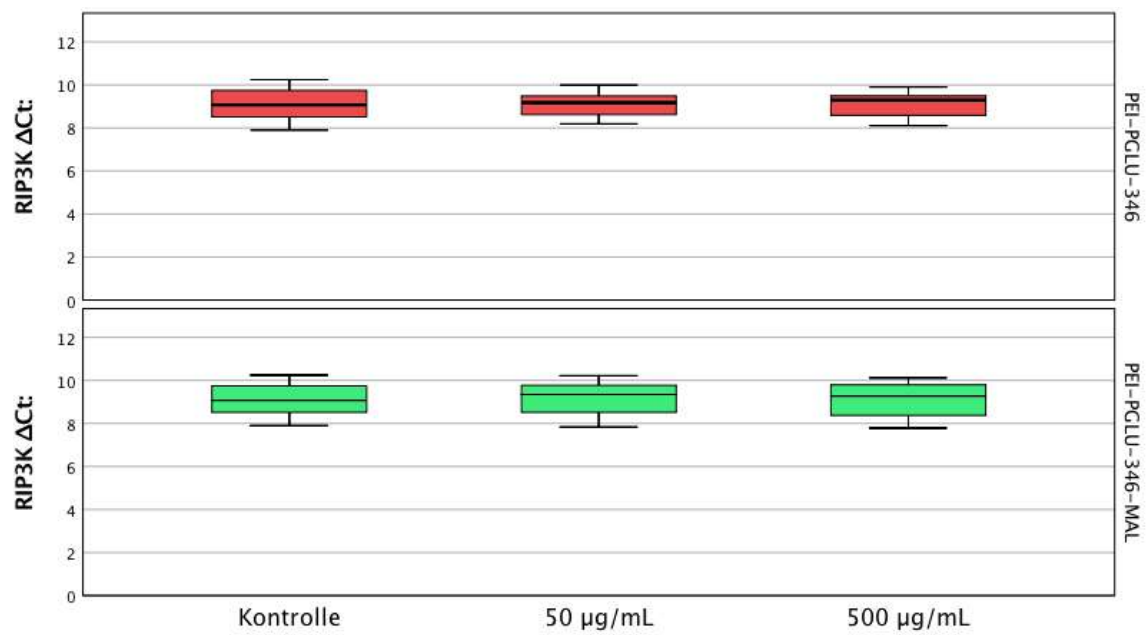


Abb. 3.38: Boxplot der ΔC_t -Werte von RIPK3 in der Kontrollgruppe und den mit 50 µg/mL bzw. 500 µg/mL PEI-PGLU-346 und PEI-PGLU-346-MAL inkubierten Spenderzellen

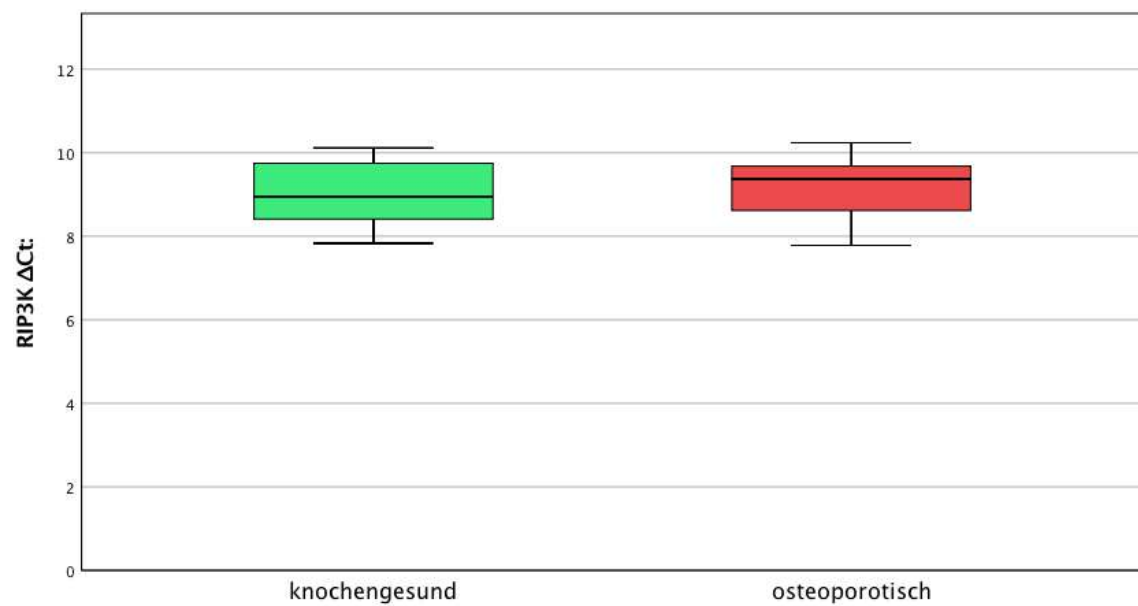


Abb. 3.39: Boxplot der ΔC_t -Werte von RIPK3 in der Gruppe der knochengesunden und der Gruppe der osteoporotischen Spenderzellen

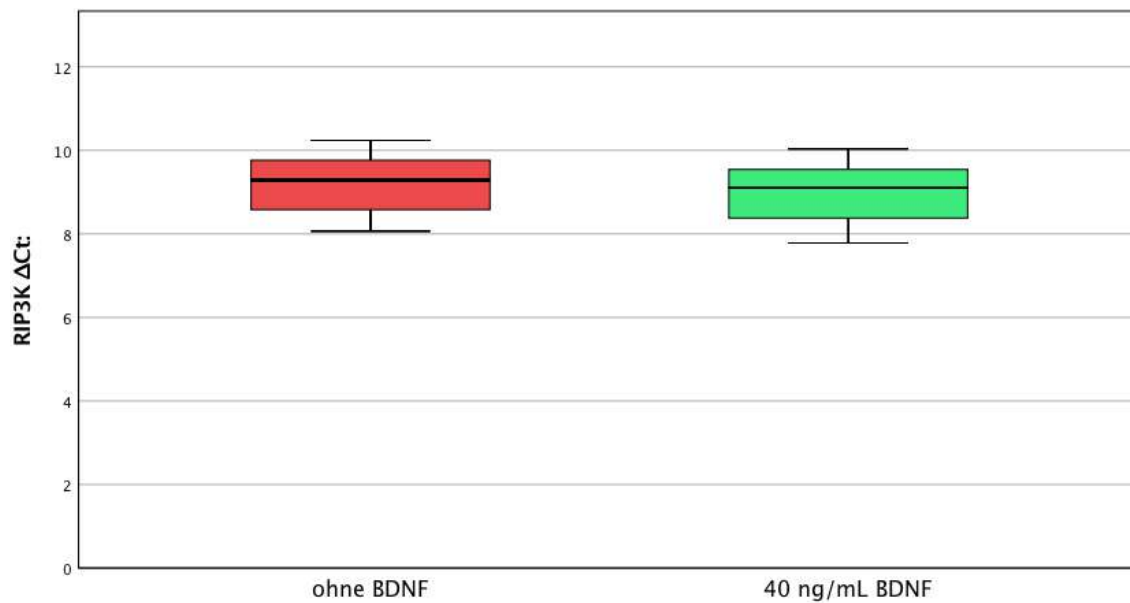


Abb. 3.40: Boxplot der ΔC_t -Werte von RIPK3 der ohne und mit 40 ng/mL BDNF behandelten Spenderzellen

3.5.5 Interleukin-6 (IL-6)

Mittels Real-Time PCR wurde die Expression von IL-6 auf Ebene der mRNA untersucht, um mögliche Effekte der Nanopartikel auf diese feststellen zu können.

Beim Vergleich der ΔC_t -Werte der IL-6 mRNA-Expression nach Inkubation mit den unterschiedlichen Nanopartikeln zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (Abb. 3.41). Gleiches galt für die Untersuchung des Einflusses der unterschiedlichen Nanopartikelmengen (Abb. 3.42), des Knochenstatus (Abb. 3.43) sowie der Zugabe von BDNF (Abb. 3.44).

Die statistische Auswertung erfolgte bei Normalverteilung mittels einfaktorieller ANOVA und paarweisen Vergleichen durch post-hoc Testung nach Sidak.

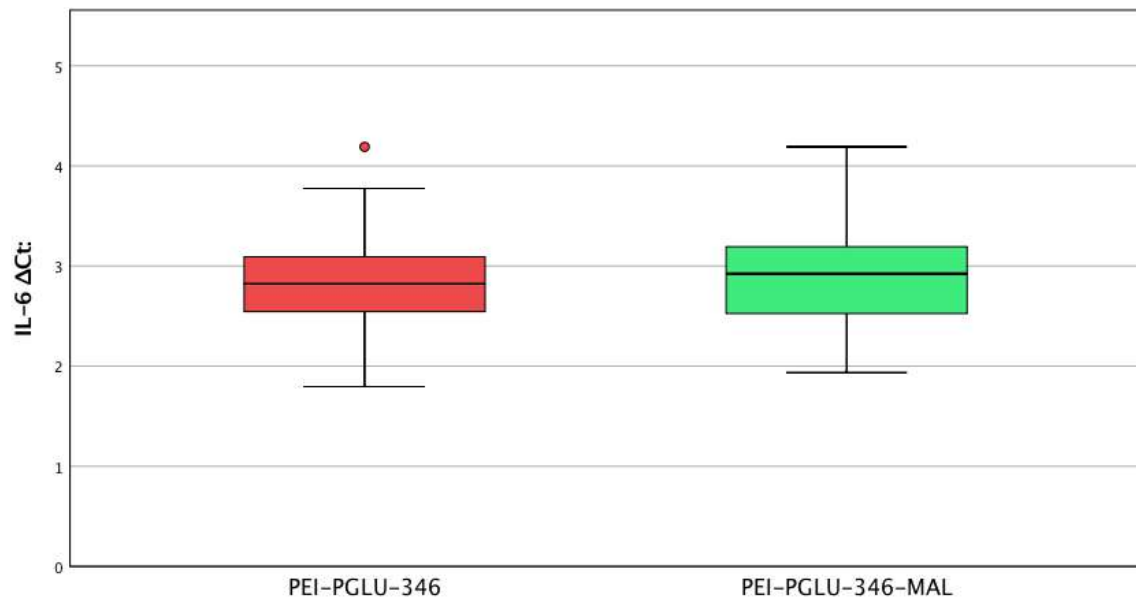


Abb. 3.41: Boxplot der ΔC_t -Werte von IL-6 der mit PEI-PGLU-346 und mit PEI-PGLU-346-MAL inkubierten Spenderzellen

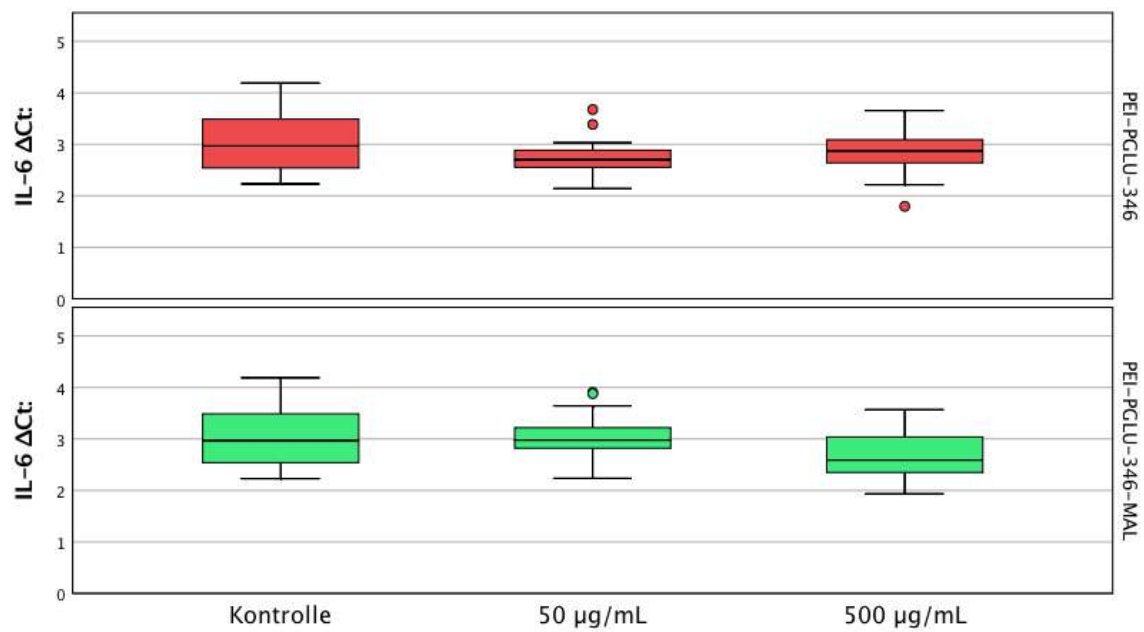


Abb. 3.42: Boxplot der ΔC_t -Werte von IL-6 in der Kontrollgruppe und den mit 50 $\mu\text{g/mL}$ bzw. 500 $\mu\text{g/mL}$ PEI-PGLU-346 und PEI-PGLU-346-MAL inkubierten Spenderzellen

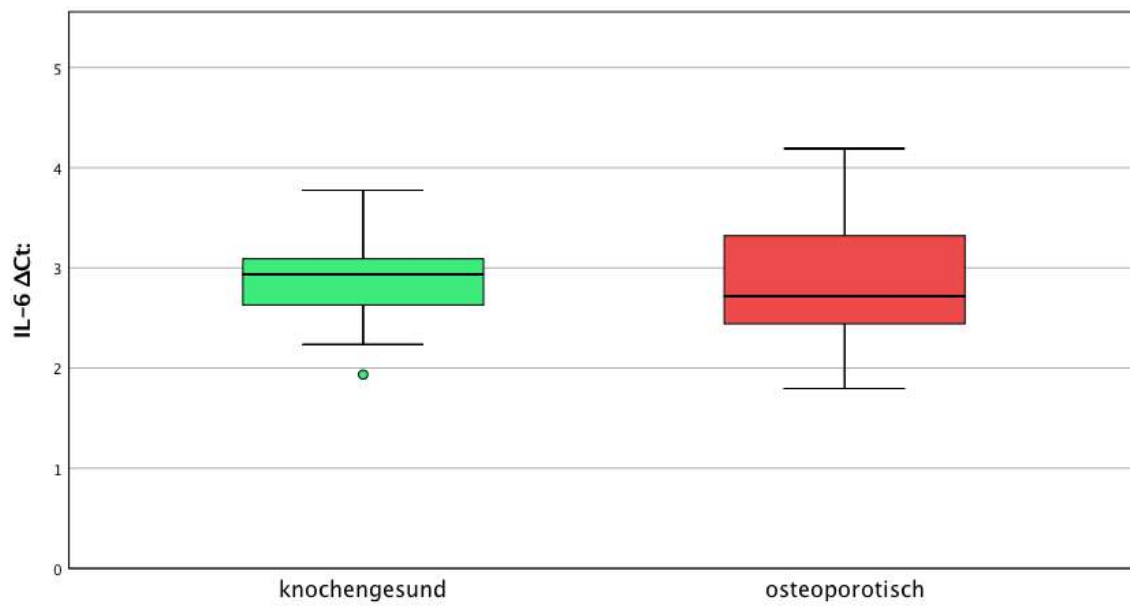


Abb. 3.43: Boxplot der ΔC_t -Werte von IL-6 in der Gruppe der knochengesunden und der Gruppe der osteoporotischen Spenderzellen

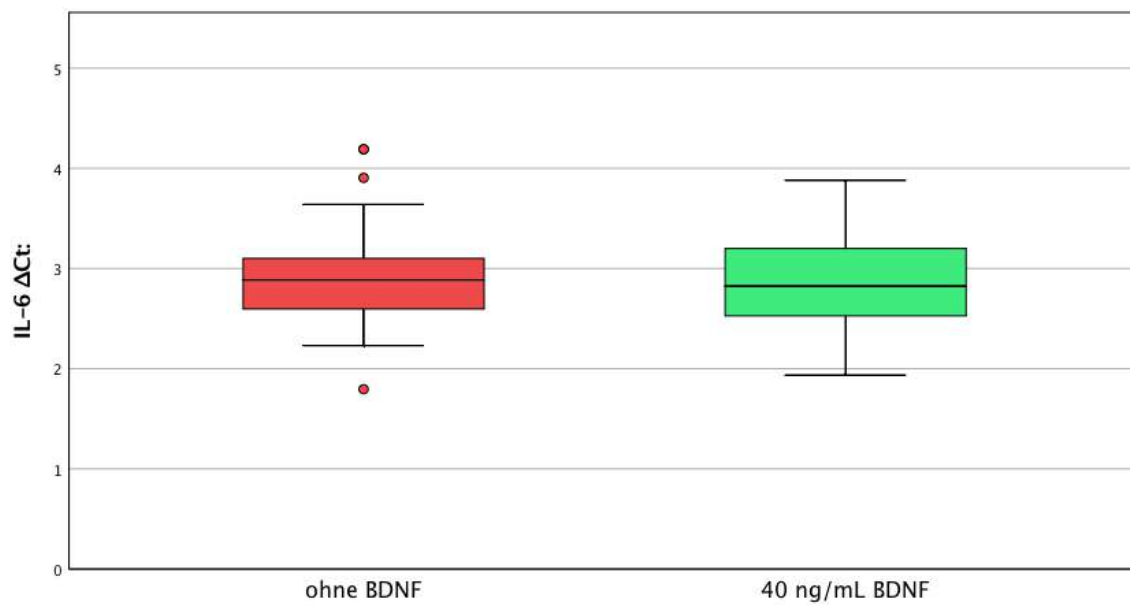


Abb. 3.44: Boxplot der ΔC_t -Werte von IL-6 der ohne und mit 40 ng/mL BDNF behandelten Spenderzellen

4 Diskussion

Wie in den vorangegangenen Abschnitten beschrieben, verfügen polyethyleniminbasierte Nanopartikel, so wie Nanopartikel im Allgemeinen, über ein beträchtliches medizinisches Potential. Um die Möglichkeiten dieser in der medizinischen Anwendung vergleichsweise noch recht jungen Stoffgruppe möglichst umfangreich ausschöpfen zu können, ist eine gründliche Untersuchung der einzelnen Substanzen unabdingbar. Hierbei spielt im Vorfeld einer etwaigen therapeutischen Nutzung, wie auch für andere potentielle Therapeutika üblich, besonders die Untersuchung möglicher adverser Effekte im Rahmen der Risikoabschätzung eine wichtige Rolle.

Bevor die Substanzen in weiterführenden *in vivo*-Experimenten hinsichtlich ihrer Eigenschaften untersucht werden, ermöglicht die *in vitro*-Untersuchung mittels Zellkulturmodellen eine erste Einschätzung biologischer Eigenschaften, möglicher dosisabhängiger sowie möglicher negativer Effekte.

4.1 Potentielle zytotoxische Wirkung der verwendeten Nanopartikel

4.1.1 Untersuchungsmethoden

Um eine etwaige zytotoxische Wirkung der verwendeten Nanopartikel zu untersuchen, kamen einerseits die Lebendzellbeobachtung mittels Lichtmikroskopie sowie andererseits die Untersuchung mittels eines quantitativen LDH-Assays zur Anwendung. Die regelmäßige lichtmikroskopische Lebendzellbeobachtung ermöglicht eine Einschätzung der Vitalität von Zellkulturen anhand der Beurteilung von Zellform, Zellgröße, Zelldichte und Kern-Plasma-Relation. Auf die Verwendung von Färbemethoden wurde für die Lebendzellbeobachtung bewusst verzichtet, da hierdurch die nachfolgend durchgeführten Untersuchungen beeinflusst worden wären.

Zur Untersuchung der Toxizität stehen neben dem hier verwendeten LDH-Assay noch weitere unterschiedliche Methoden zur Verfügung. So lässt sich die Stoffwechselaktivität und damit auch Viabilität eukaryotischer Zellen beispielsweise mit unterschiedlichen colorimetrischen Assays untersuchen. Bei den meisten dieser Methoden finden dabei unterschiedliche Tetrazoliumsalze Verwendung, welche durch intrazellulär vorhandene Enzyme und Reduktionsäquivalente in Formazane umgewandelt werden. Beispielhaft seien hier (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) (MTT) und (2-(4-Iodphenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium) (WST-1)

erwähnt, welche bereits seit längerem Bestandteile etablierter Testverfahren sind. Im Rahmen der Assays werden die meist farblosen bzw. schwach färbenden Tetrazoliumsalze unter Aufspaltung des Tetrazolringes in stark färbende Formazane umgesetzt, welche sich im Folgenden unter Verwendung eines Mikroplatten-Readers photometrisch detektieren lassen. Dabei ist die Ausprägung der Färbung proportional zum Gehalt an intrazellulären Reduktionsäquivalenten (insbesondere NADH) und steht somit im Zusammenhang mit der intrazellulären Glykolyseaktivität (Berridge et al., 2005). Über die auf diese Weise bestimmte Zellviabilität lässt sich indirekt auch eine Aussage über eine etwaige Toxizität treffen, welche sich in einer Reduktion der Viabilität widerspiegeln würde.

Als relativ neue Methode steht seit 2008 alternativ auch die *real-time cell analysis* (RTCA) zur Verfügung. Bei diesem in der vorliegenden Arbeit nicht angewendeten Verfahren werden am Boden der Wells der verwendeten Kulturplatten eingebrachte Mikrochipelektroden genutzt, um die zelluläre Adhäsion, Proliferation und Morphologie in Echtzeit zu beurteilen (Stefanowicz-Hajduk und Ochocka, 2020). Die RTCA stellt dabei eine Weiterentwicklung des von Giaever und Keese (1993) beschriebenen *cell-substrate impedance sensing* (ECIS) dar, welches auf der Messung von Impedanzunterschieden beruht, die durch die Interaktion der kultivierten Zellen mit einem am Boden der Wells anliegenden Spannungsfeld hervorgerufen werden. Ein wesentlicher Vorteil der RTCA gegenüber den colorimetrischen Assays besteht in der Möglichkeit der kontinuierlichen Erfassung von Echtzeitdatensätzen, die gegenüber der Messung von Endpunkten auch eine detaillierte Beurteilung von Dynamiken erlaubt. Auch bei Verwendung der RTCA lässt sich die Toxizität letztendlich indirekt über eine Abnahme der Zellviabilität bestimmen.

Anders als bei den zuvor beschriebenen Methoden liefert der hier verwendete LDH-Assay einen direkten Nachweis möglicher toxischer Effekte. Das durch den Assay nachgewiesene Enzym LDH katalysiert als essentieller Bestandteil des anaeroben Zellstoffwechsels die Umwandlung von Pyruvat zu Lactat und ist in allen menschlichen Zellen vorhanden. Nach Schädigung der Zellmembran tritt LDH in den Extrazellularraum, in diesem Fall das Kulturmedium, über und kann im Folgenden mittels unterschiedlicher Testverfahren nachgewiesen werden. Dabei ist die Messung der LDH-Konzentration im Serum auch im klinischen Alltag ein etabliertes Verfahren, welche beispielsweise als Hinweis auf einen Untergang von Gewebe dienen kann (Skillen, 1984). Sowohl auf Grund des etablierten Testverfahrens als auch des engen Bezugs zum klinischen Alltag stellt die Verwendung des LDH-Assays eine geeignete Methode zur Beurteilung der Toxizität und Beantwortung der Fragestellung dar.

4.1.2 Lichtmikroskopische Lebendzellbeobachtung

Wie im Ergebnisteil 3.1 der vorliegenden Arbeit beschrieben, ergab die lichtmikroskopische Lebendzellbeobachtung nach 24 h und 72 h weder für die unterschiedlichen untersuchten Konzentrationen von PEI-PGLU-346 noch für die unterschiedlichen untersuchten Konzentrationen von PEI-PGLU-346-MAL einen sicheren Nachweis einer Zellschädigung.

Lediglich bei den mit der höchsten eingesetzten Konzentration von 500 µg/mL PEI-PGLU-346 inkubierten osteoporotischen Spenderzellen zeigte sich nach einer Inkubationsdauer von 72 h eine leichte Vermehrung der Zelltrümmer sowie eine teilweise unregelmäßige Berandung der Zellen. Diese können als möglicher Hinweis für eine beginnende Zellschädigung gewertet werden (siehe hierzu Abb. 3.5 und 3.6).

Dabei ist anzunehmen, dass die Verwendung höherer Nanopartikelkonzentrationen oder die Inkubation der Zellen über einen längeren Zeitraum deutlichere morphologische Veränderungen der Spenderzellen hervorgerufen hätte. So wurden für rdMSC, welche über längere Zeiträume von bis zu 21 Tagen mit höheren Konzentrationen von bis zu 1000 µg/mL PEI-basierter Nanopartikel inkubiert wurden, bereits wesentlich eindeutiger, lichtmikroskopisch nachweisbare Zellschädigungen beschrieben (Lautenschläger et al., 2015).

Da in den dieser Arbeit zugrunde liegenden Versuchen auf eine Langzeitbeobachtung der Zellen sowie eine Verwendung höherer Konzentrationen der untersuchten Nanopartikel verzichtet wurde, lassen die beschriebenen Ergebnisse keine wirklich valide Einschätzung des Ausmaß einer längerfristigen, lichtmikroskopisch nachweisbaren Zellschädigung zu. Jedoch ist andererseits festzuhalten, dass die eingesetzten Nanopartikel zumindest im hier untersuchten Zeitraum bis 72 h zu keiner eindeutig lichtmikroskopisch nachweisbaren Zellschädigung führten.

4.1.3 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Nanopartikelaufnahme

Mittels Fluoreszenzmikroskopie wurde die Aufnahme der mit Rhodamin B konjugierten Nanopartikel in die Zellen untersucht. Nach einer Inkubationsdauer von 72 h ließen sich für beide markierten Nanopartikel Fluoreszenzsignale registrieren. Dabei zeigten sich für beide Nanopartikel eine perinukleär betonte Anreicherung, was für eine Akkumulation der Partikel in diesem Bereich spricht. Eine solche perinukleär betonte Anreicherung wurde bereits in verschiedenen Arbeiten für PEI-basierte, PEI-haltige und im Komplex mit DNA-Bruchstücken vorliegende Nanopartikel beschrieben (Bieber et al., 2002; Lautenschläger et al., 2015; Petrizzo et al., 2015). Als Aufnahmemechanismen für

PEI-basierte Nanopartikel sind in der Literatur sowohl durch Clathrin als auch durch Caveolin vermittelte Formen der Endozytose beschrieben (Hwang et al., 2015). Auch die Aufnahme PEI-basierter Nanopartikel durch Makropinozytose ist in der Literatur beschrieben (Grosse et al., 2005). Die genannten Mechanismen der Internalisierung führen letztendlich zur Bildung von Endosomen und Lysosomen. Der genaue Mechanismus der Freisetzung PEI-basierter Nanopartikel aus dem endosomalen bzw. lysosomalen System ist jedoch noch nicht abschließend geklärt. Einen möglichen Erklärungsansatz bietet die Theorie des Protonenschwamms. Dieser beschreibt die zunehmende Protonisierung polykationischer Moleküle wie PEI bei abnehmendem pH-Wert im Inneren des späten Endosoms respektive des Lysosoms. Durch die hohe Pufferkapazität der eingeschlossenen Polykationen kommt es dabei zu einem zunehmendem Einstrom von Chloridionen, welcher im Folgenden einen vermehrten Einstrom von Wasser nach sich zieht. Hierdurch steigt der intraendosomale/intralysosomale Druck und es kommt letztendlich zum Aufplatzen der endosomalen/lysosomalen Membran und damit zu einer Freisetzung des Inhaltes (Boussif et al., 1995). Obgleich die Theorie des Protonenschwamms einen allgemein akzeptierten Erklärungsansatz für die Freisetzung polykationischer Moleküle aus Endosomen/Lysosomen darstellt, bietet sie dennoch keine vollständige mechanistische Erklärung und ist folgerichtig weiterhin Gegenstand des wissenschaftlichen Diskurs. Gegen diesen Erklärungsansatz sprechen neuere Untersuchungen, beispielsweise von Benjaminsen et al. (2013), die die Messung des intraendosomalen/intralysosomalen pH-Wertes mittels pH-sensitiver fluoreszenzmarkierter Nanosonden beinhaltete. Im Rahmen dieser kamen die Autoren zu dem Schluss, dass PEI keine signifikante Erhöhung des pH-Wertes in Endosomen/Lysosomen vermitteln, was den Stellenwert der Theorie des Protonenschwamms für die Freisetzung der Polykationen infrage stellt. Als alternativer Erklärungsansatz dient die direkte, durch die Oberflächenladung der Polykationen vermittelte Interaktion mit der endosomalen/lysosomalen Membran. Ähnlich den in Abschnitt 4.1.4 beschriebenen Mechanismen kommt es dabei zu einer Destabilisierung der Membran bzw. der Bildung von Nanoporen, welche den Austritt der Polykationen in das Zytoplasma ermöglichen, ohne dabei zu einer vollständigen Zerstörung des Endosoms/Lysosoms zu führen (Rehman et al., 2013; Vaidyanathan et al., 2016). Vereinzelt finden sich in der Literatur auch Arbeiten, die eine Aufnahme von aggregierten Nanopartikel durch Phagozytose beschreiben (Kopatz et al., 2004). Jedoch erscheint ein solcher phagozytotischer Aufnahmemechanismus für die hier untersuchten rdMSC nicht wahrscheinlich.

4.1.4 Zytotoxische Effekte der untersuchten Nanopartikel

Die zytotoxischen Eigenschaften PEI-basierter dendritischer Nanopartikel lassen sich auf unterschiedliche ursächliche Mechanismen zurückführen. Für die in der vorliegenden Arbeit zur Beurteilung der Zytotoxizität verwendete Freisetzung von LDH in das Kulturmedium spielt dabei vor allem die Wirkung der Nanopartikel auf die Integrität der Zellmembran eine Rolle, da LDH bei intakter Zellmembran nicht in größeren Mengen in den Extrazellularraum übergeht. Einerseits führt ein Zelluntergang zur Freisetzung von LDH, andererseits kann hierfür auch eine Schädigung der Zellmembran ohne einen damit einhergehenden Zelltod verantwortlich sein.

PEI-basierte Nanopartikel tragen, so wie auch andere dendritische Polymere, periphere Aminogruppen, was unter physiologischen Bedingungen zu einer positiven Nettoladung ihrer Oberfläche führt. Aufgrund dieser kationischen Ladung entstehen vermehrt Wechselwirkungen mit negativ geladenen biologischen Membranen (Janaszewska et al., 2019). Durch diese Interaktion kann es zur Einlagerung von einzelnen Partikeln oder von Polymerclustern in die Membranen kommen, was neben der Ausdünnung der Membranstruktur auch zur Entstehung von Nanoporen bis hin zu Membrandisruptionen führen kann (Mecke et al., 2004). Durch Untersuchungen mittels Rasterkraftmikroskopie konnten Leroueil et al. (2008) diese Art der Schädigung durch PEI-basierte Nanopartikel sowohl für die Interaktion mit künstlich erzeugten Lipiddoppelschichten als auch mit den Zellmembranen *in vitro* kultivierter humaner und muriner Zellen nachweisen. Es fand sich dabei eine Korrelation zwischen dem Schweregrad der durch die Nanopartikel herbeigeführten Membrandisruptionen, der Menge an in das Medium freigesetzten intrazellulären Enzymen (in diesem Fall LDH und Luciferase) sowie der indirekt mittels MTT-Assay bestimmten Zytotoxizität der Nanopartikel. Dabei steigt die Toxizität nicht nur mit der Konzentration der applizierten Nanopartikel und der Dauer der Inkubation, sondern auch mit dem Grad ihrer Verzweigung, da höhergradig verzweigte Nanopartikelmoleküle eine größere Anzahl peripherer Aminogruppen und damit auch eine stärkere positive Ladung aufweisen (Malik et al., 2000; Fischer et al., 2003; Jevprasesphant et al., 2003; Lautenschläger et al., 2015). Da „nackte“ PEI-Nanopartikel verglichen mit anderen polykationischen Dendrimeren eine vergleichsweise hohe positive Oberflächenladungsdichte aufweisen (Hong et al., 2006), spielt hier die Nutzung von Oberflächenmodifikationen eine besonders wichtige Rolle.

Auch in den dieser Arbeit zugrunde liegenden Experimenten ließen sich im LDH-Assay eine von der Inkubationsdauer (72 h gegenüber 24 h) sowie für die Inkubation mit PEI-PGLU-346 auch eine von der Konzentration der eingesetzten Nanopartikel abhängige Erhöhung der zytotoxischen Wirkung auf die rdMSC beobachten (Abschnitt

3.3, Abb. 3.10 und Abb. 3.11). Ebenso zeigte sich nach 72-stündiger Inkubation eine erhöhte Toxizität von PEI-PGLU-346 gegenüber PEI-PGLU-346-MAL (Abschnitt 3.3, Abbildung 3.10). Für die Verwendung von PEI-PGLU-346 zeigte sich sowohl nach 24 h als auch nach 72 h ein erwartbarer, konzentrationsabhängiger Anstieg der Zytotoxizität, wobei die Konzentrationen von 1 µg/mL und 50 µg/mL sich hinsichtlich ihrer Zytotoxizität nicht signifikant von der Kontrollgruppe unterschieden. Für die Verwendung von PEI-PGLU-346-MAL ließen sich zu den gewählten Zeitpunkten keine konzentrationsabhängigen Unterschiede hinsichtlich der Zytotoxizität finden.

Dies legt den Rückschluss nahe, dass sich über die zusätzliche Oberflächenmodifikation der eingesetzten Nanopartikel mittels Maltosemolekülen eine verbesserte Abschirmung der positiven Oberflächenladung der PEI-Kerne und somit eine geringere Schädigung der Zellmembranen erreichen lässt. Eine Verringerung zytotoxischer Eigenschaften von Nanopartikeln durch den Einsatz verschiedener Oberflächenmodifikationen, unter anderem mittels Maltose und anderer Kohlenhydrate, ist in der Literatur bereits für unterschiedliche Nanopartikel beschrieben (Agashe et al., 2006; Agrawal et al., 2007; Kolhatkar et al., 2007; Stasko et al., 2007; Wrobel et al., 2017). Hinsichtlich der Eingrenzung möglicher, *in vivo* verwendbarer, Konzentrationen erscheint unter dem Gesichtspunkt der zytotoxischen Wirkung auf rdMSC auch die Applikation höherer Konzentrationen von PEI-PGLU-346-MAL möglich. Zumindest legen dies die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit nahe. Da die zytotoxische Wirkung pharmakologisch genutzter Substanzen *in vivo* allerdings nicht ausschließlich von der Wirkung auf die jeweiligen Zielzellen bestimmt wird, sondern diese innerhalb des Organismus unter anderem einer Beeinflussung durch Faktoren wie Aufnahme, Anflutung, Verteilung innerhalb unterschiedlicher Kompartimente und Exkretion unterliegen, sind hier weiterführende Untersuchungen unverzichtbar.

Zu welchen Anteilen die Freisetzung der LDH in den vorliegenden Experimenten aus der Schädigung der Zellmembranen der rdMSC beziehungsweise dem Untergang von Zellen resultierte, ist nicht sicher zu beantworten, da der hier verwendete LDH-Assay keine Unterscheidung zwischen diesen beiden Freisetzungsmechanismen erlaubt. In Zusammenschau mit den Ergebnissen der lichtmikroskopischen Lebendzellbeobachtung (Abschnitt 4.1.2) lässt sich jedoch vermuten, dass die Freisetzung der LDH in das Kulturmedium in eher geringem Maße durch einen Untergang von rdMSC bedingt war. Dabei muss jedoch in Betracht gezogen werden, dass gerade in frühen Phasen auch eine zytotoxische Schädigung der Zellen ohne direktes, lichtmikroskopisch sichtbares Korrelat möglich ist. Um hier eine abschließende Differenzierung zu ermöglichen, sind weiterführende Untersuchungen notwendig.

Bei gesonderter Betrachtung der zytotoxischen Effekte auf die rdMSC knochengesunder und osteoporotischer Spender zeigte sich für beide Gruppen ebenfalls ein zeitabhängiger Anstieg der Zytotoxizität (Abschnitt 3.3, Abb. 3.14 und 3.15). Interessanterweise ließ sich jedoch nur in der Gruppe der knochengesunden Spenderzellen eine geringere Zytotoxizität bei Inkubation mit PEI-PGLU-346-MAL gegenüber einer Inkubation mit PEI-PGLU-346 nachweisen, während sich für die Inkubation osteoporotischer Spenderzellen keine signifikanten Unterschiede zeigten. Zum Zeitpunkt des Verfassens ist dem Autor keine Arbeit bekannt, welche einen protektiven Effekt einer osteoporotischen Zellstoffwechsellage hinsichtlich nanopartikelvermittelter zytotoxischer Effekte untersucht oder beschrieben hätte. Am ehesten lässt sich diese Diskrepanz mit der geringen Größe der untersuchten Gruppen erklären, zumal für die hier verwendeten rdMSC teilweise deutliche interindividuelle Unterschiede hinsichtlich ihres Verhaltens in der Zellkultur vorbeschrieben wurden (Lautenschläger, 2017). Natürlich wäre die Untersuchung einer größeren Anzahl verschiedener Spenderzellkulturen, durch welche die interindividuellen Unterschiede der rdMSC weniger stark ins Gewicht fallen würden, wünschenswert. Betrachtet man jedoch den nicht unerheblichen personellen, logistischen und auch monetären Aufwand, welcher mit der Gewinnung der Spenderzellen sowie deren Aufbereitung, Einlagerung und experimentellen Verwendung verbunden ist, wird schnell klar, dass hier eine Einschränkung der Gruppengrößen sinnvoll, teilweise sogar unumgänglich ist.

Nach Zugabe von BDNF ergaben sich in den durchgeführten Experimenten hinsichtlich der zytotoxischen Wirkung der Nanopartikel in den untersuchten Gruppen keine Unterschiede (Abschnitt 3.3, Abbildung 3.16 und 3.17). Zur genaueren Einordnung des durch BDNF vermittelten Effekts in den durchgeführten Experimenten siehe auch Abschnitt 4.4.

4.2 Potentielle proinflammatorische Wirkung der verwendeten Nanopartikel

4.2.1 Untersuchungsmethoden

Zur Beurteilung potentieller proinflammatorischer Effekte der verwendeten Nanopartikel wurde die Expression von IL-6 auf mRNA-Ebene sowie auf Proteinebene mittels Real-Time PCR und ELISA untersucht.

IL-6 ist ein proinflammatorisches Cytokin aus der Familie der IL-6 Cytokine, zu welcher unter anderem die strukturell ähnlichen IL-11, IL-27, *ciliary neurotrophic factor* (CNTF), *leucemia inhibitory factor* (LIF), *oncostatin M* (OSM), *cardiotrophin 1* (CT-1) und *cardiotrophin-like cytokine* (CLC) gehören (Rose-John, 2018). All diese Cytokine vermitteln ihre Wirkung über die Bindung an das Glykoprotein 130 (Gp130), wobei der Signaltransduktion im Falle von IL-6 die Dimerisierung von Gp130 mit einem Komplex aus IL-6 und dessen Rezeptor, dem *IL-6 receptor α* (IL-6R α) beziehungsweise dessen löslicher Rezeptorvariante *soluble IL-6 receptor* (sIL-6R) vorausgeht (Murakami et al., 1993; Ward et al., 1996). Neben anderen Zellpopulationen konnte auch für aus Knochenmarksproben gewonnene humane MSC die Sekretion von IL-6 experimentell nachgewiesen werden (Aggarwal and Pittenger, 2005; Pricola et al., 2009). Wechselwirkungen des verwendeten ELISA mit anderen Mitgliedern der Familie der IL-6 Cytokine wurden durch den Hersteller unter Verwendung rekombinanter humaner Proteine ausgeschlossen, wodurch eine Spezifität des Tests für humanes IL-6 gewährleistet werden kann.

4.2.2 Proinflammatorische Wirkung der verwendeten Nanopartikel

Zu der Wirkung von IL-6 gehört unter anderem die Induktion der hepatischen Produktion von Akute-Phase-Proteinen wie C-Reaktives Protein (CRP), Serumamyloid A, Fibrinogen und Haptoglobin (Heinrich et al., 1990), die Differenzierung aktivierter B-Lymphozyten zu Immunglobulin sezernierenden Plasmazellen (Kishimoto, 1988) sowie die Differenzierung CD4-positiver T-Zellen zu Subpopulationen von T-Effektorzellen (Korn et al., 2009).

Im Knochenstoffwechsel sind die Cytokine der IL-6-Familie an einer Vielzahl physiologischer und pathologischer Prozesse beteiligt, wobei die durch sie vermittelten Wirkungen und die zwischen den Cytokinen entstehenden Wechselwirkungen in ihrer Gesamtheit noch nicht abschließend verstanden sind. Sie wirken sowohl auf Zellen der osteoklastären als auch auf Zellen der osteogenen Zelllinie und vermitteln teilweise widersprüchliche teils knochenanabole, teils knochenkatabole Effekte.

So konnten bereits unterschiedliche Arbeiten eine durch IL-6 vermittelte Differenzierung osteogener Progenitorzellen, darunter auch aus Knochenmark gewonnene humane MSC, hin zu Zellen der osteogenen Linie nachweisen (Bellido et al., 1997; Taguchi et al., 1998; Erices et al., 2002). Hieraus leitet sich auch die Zugabe von IL-6 zum Kulturmedium als möglicher Ansatz einer Differenzierung von MSC hin zu Zellen der osteogenen Linie in *in vitro* Experimenten ab (Boon et al., 2004; Xie et al., 2018). Auch sind für die Zugabe von IL-6 zu osteoblastischen Zellkulturen *in vitro* antiapoptotische Effekte beschrieben (Bellido et al., 1998; Jilka et al., 1998).

Im Kontrast hierzu finden sich in der Literatur jedoch ebenfalls Arbeiten, welche keinen oder teilweise sogar einen inhibierenden Effekt von IL-6 auf die osteogene Differenzierung sowohl humaner als auch muriner MSC beschreiben (Kim et al., 1997; Malaval et al., 2005; Peruzzi et al., 2012). Ein Erklärungsansatz für diese uneinheitlichen, teils widersprüchlichen Beobachtungen liegt in der unterschiedlichen Wirkung von IL-6 und der anderen Vertreter der Cytokine der IL-6-Familie zu unterschiedlichen Zeitpunkten der osteogenen Zelldifferenzierung. So scheinen die initialen Schritte hin von MSC zu osteogenen Progenitorzellen und Preosteoblasten durch IL-6 induzierbar. Die Differenzierung von Preosteoblasten zu reifen Osteoblasten dagegen wird durch IL-6 scheinbar gehemmt und differenzierte Osteoblasten erhalten eine Stimulation hin zu weniger stoffwechselaktiven Osteozyten sowie teils auch proapoptotische Signale (Blanchard et al., 2009).

Die Aktivität von Osteoklasten kann durch IL-6 sowohl direkt als auch indirekt beeinflusst werden. Einerseits stimuliert IL-6 die Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen hin zu osteoklastären Progenitorzellen (Otsuka et al., 1991), andererseits führt IL-6 in Osteoblasten zu einer vermehrten Expression von *Receptor Activator of NF- κ B Ligand* (RANKL) (Palmqvist et al., 2002) sowie zu einer gesteigerten Expression von *Receptor Activator of NF- κ B* (RANK) in osteoklastären Progenitorzellen (Liu et al., 2005). Dies führt letztendlich zu einer vermehrten Differenzierung und einer gesteigerten Aktivität von Osteoklasten und somit zu einem vermehrten Abbau von Knochensubstanz.

Im Kontrast hierzu finden sich in der Literatur jedoch ebenso Arbeiten, welche eine Inhibition der osteoklastären Aktivität durch IL-6 beschreiben. So fanden Duplomb et al. (2008) und Yoshitake et al. (2008) eine Reduktion der RANKL-induzierten Differenzierung humaner und muriner osteoklastärer Vorläuferzellen sowie eine Reduktion der Knochenresorption, welche am ehesten durch eine vermehrte Differenzierung der Vorläuferzellen hin zu Zellen des mononukleären phagozytären Systems zustande kamen. Des Weiteren stimuliert IL-6 in Osteoklasten die Freisetzung von Osteotransmittern und *coupling factors*, welche eine Stimulation der osteogenen Aktivität von Osteoblasten und damit letztendlich einen vermehrten Umsatz von

Knochensubstanz zur Folge haben (Johnson et al., 2015). Zusammenfassend scheinen die antiosteogenen und proosteoklastären Effekte von IL-6 zu überwiegen, was insgesamt die Entstehung einer knochenkatabolen Stoffwechsellage begünstigt (Harmer et al., 2019). Abb. 4.1 stellt die unterschiedlichen Wirkungen von IL-6 auf Zellen der osteoblastären und osteoklastären Zelllinie schematisch dar.

Auf Grund der zuvor beschriebenen Wirkung auf den Knochenstoffwechsel spielt IL-6 auch für die Entstehung und Aufrechterhaltung der Osteoporose eine wichtige Rolle. So nimmt mit zunehmendem Alter die Expression von IL-6 zu, was sich durch das Absinken der Sexualhormonspiegel nach der Menopause bzw. Andropause erklären lässt (Ershler und Keller, 2000). Das Steroidhormon 17- β -Östradiol (E2) inhibiert im Normalzustand die Sekretion von IL-6 durch MSC, Monozyten und osteoblastäre Zellen, weshalb es durch einen altersbedingten Rückgang der Steroidhormonspiegel zu einer vermehrten Expression von IL-6 kommt (Girasole et al., 1992; Kramer et al., 2004). Im Normalzustand wird die Aktivität von NF- κ B durch eine E2-vermittelte Stabilisierung seines zytoplasmatischen Inhibitors I κ B α reduziert. Bei sinkenden E2-Spiegeln kommt es zu einer vermehrten Phosphorylierung und anschließenden Degradierung von I κ B α . Hierdurch wird NF- κ B freigesetzt und bindet nach Translokation in den Nucleus, unter anderem an die Promotorregion des IL-6-Gens (Sun et al., 1998). Folgerichtig weisen IL-6-defiziente Mäuse nach Östrogendepletion durch Ovariectomie keine osteoporosetypische Verringerung der Knochendichte auf (Poli et al., 1994). Unabhängig von der Inhibition durch E2 scheinen unterschiedliche Polymorphismen des IL-6 Gens mit unterschiedlich hohen Risiken für die Entwicklung einer Osteoporose vergesellschaftet zu sein (Ferrari et al., 2001). Eine therapeutische Nutzung von IL-6-modulierenden Substanzen ist bis dato für die Behandlung der Osteoporose noch nicht etabliert. Mit Tocilizumab (RoActemra®) steht seit seiner Zulassung im Jahr 2011 ein monoklonaler Antikörper gegen IL-6 für die Behandlung der rheumatoiden Arthritis zur Verfügung, für den bereits ein protektiver Effekt hinsichtlich des Erhalts der Knochendichte beschrieben wurde (Chen et al., 2017). Bis die pharmakologische Modulation von IL-6 auch für die Behandlung der Osteoporose eine Alternative darstellt, werden jedoch noch weitere Untersuchungen notwendig sein.

Werden all diese Faktoren in Betracht gezogen, so erscheint für die Behandlung mit nanopartikelbasierten Arzneistoffen wie auch für die Applikation anderer Pharmaka, eine möglichst geringe Induktion von IL-6, insbesondere im osteoporotischen Knochenmilieu wünschenswert, da durch eine vermehrte Expression von IL-6 eine progrediente Verschiebung hin zu einer knochenkatabolen Stoffwechsellage zu erwarten wäre. Zum Einfluss von PEI-basierten Nanopartikeln auf die Expression von IL-6 liegen bisher nur wenige Arbeiten vor. Beyerle et al. (2010) konnten für die Inkubation muriner

Alveolarepithelzellen mit unterschiedlichen unmodifizierten und PEGylierten, PEI-basierten Nanopartikeln mittels Immunoassay eine gegenüber der Kontrollgruppe bis zu 10-fach erhöhte Expression von IL-6 nachweisen. Li et al. (2018a) beschreiben für die Inkubation muriner, aus Knochenmark gewonnener dendritischer Zellen ebenfalls eine Erhöhung der mittels ELISA detektierten IL-6 Konzentration für mit unterschiedlichen, unmodifizierten PEI-Nanopartikeln kombinierte, mesoporöse Siliziumnanopartikel gegenüber einer alleinigen Applikation von mesoporösen Siliziumnanopartikeln. Im Falle der letztgenannten Arbeit stellte dies allerdings ein wünschenswertes Ergebnis dar, da die Zielsetzung hier in einer Amplifikation der Immunantwort durch die als Impfstoffadjuvanz eingesetzten PEI-Nanopartikel bestand. Im Gegensatz zu den genannten Arbeiten ließ sich in den dieser Arbeit zugrunde liegenden Untersuchungen für PEI-PGLU-346 und PEI-PGLU-346-MAL weder auf mRNA-Ebene noch auf Proteinebene eine gegenüber der Kontrollgruppe vermehrte Expression von IL-6 nachweisen. Auch zwischen den verwendeten Nanopartikeln ergaben sich keine signifikanten Unterschiede (siehe Abschnitt 3.4 und 3.5.5). Dies legt die Vermutung nahe, dass die Oberflächenmodifikationen der hier verwendeten Nanopartikel einen positiven Einfluss auf die Expression des proinflammatorischen Zytokins IL-6 haben, wobei in diesem Punkt durch die zusätzliche Modifikation mittels Maltosemolekülen kein Vorteil gegenüber der alleinigen Modifikation mittels Glutamatmolekülen erkennbar war. Ein möglicher Erklärungsansatz für diesen positiven Effekt könnte in der Maskierung der kationischen Oberflächenladung der Nanopartikel liegen. Die Zellen des angeborenen Immunsystems verfügen über eine Gruppe genetisch hochgradig konservierter Rezeptoren, die sogenannten *pattern recognition receptors* (PRRs), welche sogenannte *pathogen associated molecular patterns* (PAMPs) unterschiedlicher potentieller Pathogene, wie beispielsweise Bakterien, Viren oder Pilze, erkennen und darauf mit einer Immunantwort, die auch die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine wie IL-6 beinhaltet, reagieren. Da viele der PAMPs selbst kationische Ladungsschwerpunkte besitzen, könnte eine Maskierung der positiven Oberflächenladung gegebenenfalls eine Detektion der Nanopartikel durch das unspezifische Immunsystem verhindern oder zumindest erschweren. Im Sinne dieser theoretischen Überlegung konnten Cubillos-Ruiz et al. (2009) für PEI-Nanopartikel in humanen und murinen Ovarialkarzinomzellen eine agonistische Wirkung am *toll-like receptor 5* (TLR-5), einem Rezeptor aus der Klasse der PRRs, nachweisen. Da die Studienlage in diesem Bereich allerdings noch sehr begrenzt ist, lässt sich letztendlich noch keine wirklich belastbare Aussage über die zugrunde liegenden Mechanismen der Induktion von IL-6 durch PEI-basierte Nanopartikel treffen.

Festzuhalten bleibt jedoch, dass die hier verwendeten Nanopartikel hinsichtlich einer potentiellen Induktion von IL-6 in den zugrunde liegenden Versuchen keine erkennbaren adversen Effekte zeigten. Dies ist, aus den zuvor dargelegten Gründen, insbesondere im Hinblick auf eine mögliche Verwendung im osteoporotisch vorerkrankten Knochen als positiv zu bewerten.

Als sinnvolle experimentelle Ergänzung der vorliegenden Arbeit könnte in zukünftigen Untersuchungen mit MSC eine mögliche Induktion von IL-6 durch unmodifizierte PEI-basierte Nanopartikel überprüft werden. Auf diese Weise ließe sich eine genauere Einschätzung der Wirkung der Oberflächenmodifikation der untersuchten Partikel vornehmen.

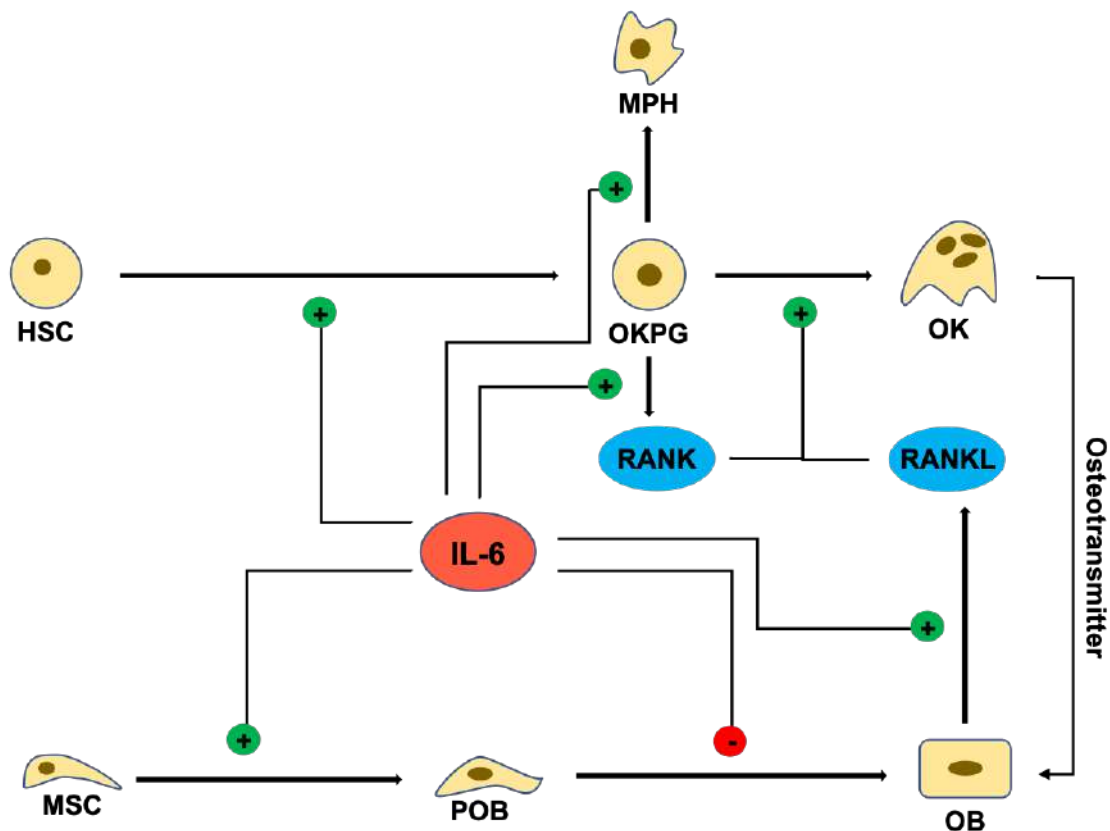


Abb. 4.1: Schematische Darstellung der Wirkung von IL-6 auf Zellen der osteoblastären und osteoklastären Zelllinie. HSC = Hämatopoetische Stammzelle; IL-6 = Interleukin 6; MPH = Makrophagen; MSC = Mesenchymale Stammzellen; OB = Osteoblasten; OK = Osteoklasten; OKPG = Osteoklastäre Progenitorzellen; POB = Präosteoblasten; RANK = Receptor Activator of NF- κ B; RANKL = Receptor Activator of NF- κ B Ligand; Modifiziert nach Blanchard et al. (2009)

4.3 Beeinflussung des Zellzyklus und Zellstoffwechsels

4.3.1 Einfluss der verwendeten Nanopartikel auf die Expression von CCND1

Der Zellzyklus eukaryotischer Zellen setzt sich aus vier Phasen zusammen, welche letztendlich in der mitotischen Zellteilung der Zelle und der Entstehung zweier genetisch identischer Tochterzellen münden. Dabei bauen die verschiedenen Phasen in ihrer Abfolge aufeinander auf und müssen sämtlich nacheinander durchlaufen werden, woraus ein stark kontrollierter und regulierter Prozess resultiert. In der *gap 1* (G1)-Phase, welche auch als postmitotische oder präsynthetische Phase bezeichnet wird, findet die Produktion von für die DNA-Replikation notwendigen Proteinen statt. Die anschließende Synthese (S)-Phase dient der Verdopplung der im Zellkern befindlichen DNA. In der auf die S-Phase folgenden *gap 2* (G2)-Phase, auch postsynthetische oder prämitotische Phase genannt, werden für die Zellteilung notwendige Proteine synthetisiert, um die eigentliche Mitose vorzubereiten. Diese läuft in der Mitose (M)-Phase ab, in der sowohl die im Zellkern befindlichen Chromosomen als auch die übrigen Zellbestandteile auf die beiden entstehenden Tochterzellen aufgeteilt werden. Häufig werden die G1-Phase, die S-Phase und die G2-Phase zur Interphase zusammengefasst. Nach Abschluss der M-Phase können die Zellen entweder erneut in die G1-Phase eintreten oder in einen vorübergehenden bzw. permanenten Ruhezustand, die sogenannte *gap 0* (G0)-Phase, übergehen (Schafer, 1998). Um Fehler während der mitotischen Zellteilung möglichst zu vermeiden, unterliegt der Zellzyklus einem genetisch hochgradig konservierten Kontrollsystem, welches durch das Zusammenspiel von Zyklin abhängigen Kinasen (*cycline dependent kinase*; CDK) mit den zu unterschiedlichen Zeitpunkten unterschiedlich stark exprimierten Zyklinen geprägt ist.

Einen wesentlichen Checkpoint im Ablauf des Zellzyklus bildet dabei die Cyclin D1-abhängige Phosphorylierung des Tumorsuppressorgens *retinoblastoma protein* (pRB) am Übergang der G1-Phase in die S-Phase. Nach Stimulation der Expression des durch das CCND1-Gen codierten Proteins Cyclin D1 durch Wachstumsfaktoren bildet Cyclin D1 einen Komplex mit der *cyclin-dependent-kinase 4* (CDK4) und der *cyclin-dependent-kinase 6* (CDK6) (Pardee, 1989; Matsushime et al., 1994; Lundberg und Weinberg, 1998). Im Folgenden resultiert hieraus eine Phosphorylierung des pRB, welches in seinem hypophosphorylierten Zustand die für die Progression des Zellzyklus in die S-Phase notwendigen Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie bindet und dadurch inaktiviert (Chen et al., 2009). Durch die mit der Phosphorylierung des pRB verbundene Freisetzung dieser

Transkriptionsfaktoren wird der Zelle letztendlich der Übergang in die S-Phase ermöglicht.

Hinsichtlich der Beeinflussung der Expression von CCND1 durch Nanopartikel liegen in der Literatur zu diesem Zeitpunkt lediglich vereinzelte Untersuchungen vor. So konnten Periasamy et al. (2016) eine erhöhte Expression von CCND1 und eine damit verbundene Alteration des Zellzyklus in mit aluminiumbasierten Nanopartikeln inkubierten hMSC nachweisen. Arbeiten, welche explizit die Wirkung PEI-basierter Nanopartikel auf die Expression von CCND1 bzw. eine Beeinflussung des Zellzyklus durch PEI-basierte Nanopartikel untersuchen, sind dem Autor zum jetzigen Zeitpunkt jedoch nicht bekannt. Demgegenüber ist die Anzahl der Arbeiten, welche sich mit der Beeinflussung des Zellzyklus durch unterschiedliche Nanopartikel im Allgemeinen beschäftigen etwas größer. So konnten beispielsweise Huang et al. (2009) für mit superparamagnetischen Eisenoxidnanopartikeln inkubierte hMSC eine Beschleunigung des Zellzyklus, v. a. der S-Phase sowie der G2- und M-Phase, und eine damit verbundene erhöhte Zellproliferation nachweisen. Diese Effekte wurden auf die intrinsische peroxidaseähnliche Aktivität der verwendeten Partikel und die damit verbundene Reduktion des zellulären oxidativen Stresses zurückgeführt. Im Kontrast hierzu fanden Asharani et al. (2009) für mit Stärke umhüllten Silbernanopartikeln inkubierte humane Lungenfibroblasten und humane Glioblastomzellen einen Zellzyklusarrest in der G2- und M-Phase, welchen die Autoren auf eine Schädigung mitochondrialer Membranen und einen damit einhergehenden, erhöhten oxidativen Stress zurückführten.

Generell geben Mahmoudi et al. (2011) zu bedenken, dass der überwiegende Anteil an Untersuchungen, welche sich mit der Beeinflussung des Zellzyklus und der Zellviabilität durch Nanopartikel beschäftigen, sich auf die Verwendung der mit einer entsprechenden Wirkstoffkomponente konjugierten Formen der jeweiligen Partikel beschränkt, nicht aber die „nackten“ Partikel selbst einer Testung unterzieht. Diese Tatsache erschwert die Abschätzung der Wirkung der jeweiligen Nanopartikel zusätzlich und verringert zugleich auch die Vergleichbarkeit unterschiedlicher Nanopartikel untereinander.

Wie in Abschnitt 3.5.1 beschrieben, ergab sich in dieser Arbeit für die Untersuchung der Proben der hMSC knochengesunder Spender mittels Real-Time PCR ein erhöhter Gehalt an CCND1-mRNA gegenüber der Gruppe der hMSC osteoporotischer Spenderzellen. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen anderer Arbeiten. Zheng et al. (2018) konnten beispielsweise für die MSC osteoporotischer Mäuse ebenfalls eine reduzierte Expression von CCND1-mRNA gegenüber MSC knochengesunder Mäuse nachweisen. Des Weiteren konnten Giner et al. (2009) für aus osteoporotischem menschlichen Knochen isolierte Zellen neben einer erniedrigten Stoffwechselrate auch eine Verlängerung des Zellzyklus und eine damit verbundene,

geringere Teilungsrate feststellen. Zieht man dies in Betracht, erscheint eine erniedrigte CCND1-Expression in den Proben der hMSC osteoporotischer Spender schlüssig.

Als positive Beobachtung bleibt festzuhalten, dass die Inkubation der Spenderzellen mit den verwendeten Nanopartikeln nicht zu einer Verringerung der Expression von CCND1 und einer damit verbundenen, potentiellen negativen Beeinflussung des Zellzyklus führte. Dies wäre insbesondere für die Verwendung der Nanopartikel im osteoporotischen Knochen ein nicht wünschenswerter Effekt, da hierdurch gegebenenfalls die im Vergleich zu den Zellen knochengesunder Spender bereits erniedrigte CCND1-Expression noch weiter reduziert würde, was möglicherweise eine weitere Einschränkung der Zellproliferation zur Folge hätte. Natürlich ist hierbei einschränkend zu bedenken, dass es sich bei CCND1 nicht um den einzigen, für den problemlosen Ablauf des Zellzyklus wichtigen Faktor handelt. Eine genauere Untersuchung der Wirkung der verwendeten Nanopartikel auf den Zellzyklus mittels Bestimmung zusätzlicher Marker wäre daher eine sinnvolle mögliche Ergänzung für zukünftige Untersuchungen.

4.3.2 Einfluss der verwendeten Nanopartikel auf die Expression von CHOP

C/EBP homologous protein (CHOP) oder synonym auch *growth arrest- and DNA damage-inducible gene 153* (GADD153) spielt eine wichtige Rolle im Rahmen von Stressreaktionen des endoplasmatischen Retikulums (ER).

Das ER dient als räumlich vom Zytosol getrenntes zelluläres Kompartiment in erster Linie dazu, die korrekte sterische Konfiguration der durch die Zelle produzierten Proteine sicherzustellen. Zu diesem Zweck beinhaltet es eine große Menge unterschiedlicher Enzyme, welche als Katalysatoren den durch die Zelle synthetisierten Proteinen zu ihrer physiologischen Sekundärstruktur verhelfen. Hier ist vor allem die Gruppe der Chaperone zu nennen, die sich aus unterschiedlichen Proteinen mit jeweils unterschiedlichen, spezifischen Substraten zusammensetzt.

Unter normalen Umständen besteht ein Gleichgewicht zwischen den anfallenden fehlgefalteten Proteinen und der enzymatischen Faltungskapazität des ER. Durch unterschiedliche Umwelteinflüsse kann es jedoch zu einer Verschiebung dieses Verhältnisses hin zu einem vermehrten Anfallen fehlgefalteter Proteine kommen, wodurch diese innerhalb des ER akkumulieren und eine Stressreaktion hervorrufen können. Diese Reaktion des ER wird treffender Weise auch als *unfolded proteins response* (UPR) bezeichnet. Sie stellt in erster Linie einen Adaptationsmechanismus dar und beinhaltet eine Hemmung der ribosomalen Translationsleistung sowie eine vermehrte Expression sowohl der für die korrekte Faltung von Proteinen als auch der für

die Degradierung fehlgefalteter Proteine verantwortlichen Enzyme (Xu et al., 2005). Lässt sich der ER-Stress auf diese Weise nicht hinreichend reduzieren oder besteht das Ungleichgewicht über einen längeren Zeitraum, kann es zu einer Aktivierung proapoptotischer Signalwege durch das ER kommen, wodurch letztendlich eine Beeinflussung der zellulären Funktionen durch fehlgefaltete Proteine verhindert werden soll (Sano und Reed, 2013).

CHOP gehört zur Familie der *CCAAT/enhancer binding proteins* (C/EBPs) und ist an der Regulation unterschiedlicher Gene beteiligt, welche für Proteine codieren, die eine Rolle für die Proliferation, Differenzierung sowie den Energiestoffwechsel der Zelle spielen. Im physiologischen Zustand ist CHOP ubiquitär in sehr geringen Mengen exprimiert, erfährt jedoch unter, durch pathologische Bedingungen hervorgerufenen ER-Stress, eine deutliche Hochregulation (Ron und Habener, 1992). Hierfür sind im Wesentlichen drei unterschiedliche Signalwege verantwortlich, welche über *protein kinase RNA-like endoplasmatic reticulum kinase* (PERK), *activating transcription factor 6* (ATF6) und *inositol requiring protein 1* (IRE1) reguliert werden.

PERK ist als Transmembranprotein Teil der Membran des ER. Mit seiner innerhalb des ER gelegenen Domäne ist es in der Lage, ungefaltete Proteine zu erkennen, woraufhin es zu einer Di- bzw. Oligomerisation von PERK und in der Folge zu dessen Autophosphorylierung kommt. In einem nächsten Schritt wird über die cytosolische Domäne die Phosphorylierung von *eucaryotic translation initiation factor 2 α* (eIF2 α) katalysiert (Korennykh und Walter, 2012). In seiner phosphorylierten Form weist eIF2 α eine geringere Aktivität auf, wodurch es zu einer globalen Reduktion der zellulären Proteintranslationsleistung kommt, wobei jedoch bestimmte wie die für den *activating transcription factor 4* (ATF4) codierende mRNA einen selektiven Translationsvorteil erhalten. Hierdurch werden die durch diese codierten Proteine relativ vermehrt exprimiert (Wek et al., 2006). In einem nachgeschalteten Schritt migriert ATF4 in den Zellkern und bindet dort, neben anderen Zielsequenzen, auch an die Promotorsequenz von CHOP, wodurch letztendlich dessen Expression gesteigert wird (Michel et al., 2015). Bei ATF6 handelt sich ebenfalls um ein Transmembranprotein, welches Bestandteil der Membran des ER ist. Bei Aktivierung im Rahmen der UPR kommt es zur Translokation von ATF6 in den Golgi-Apparat, wo dessen cytosolische Domäne proteolytisch abgespalten wird (Ye et al., 2000). In der Folge migriert der auf diese Weise aktivierte ATF6 in den Nucleus und bindet dort an unterschiedliche Promotorregionen für die UPR relevanter Gene, unter anderem CHOP, und steigert deren Expression (Ron und Walter, 2007).

Auch IRE1 ist ein in der ER-Membran integriertes Transmembranprotein, welches sowohl eine Proteinkinaseaktivität als auch eine Endoribonucleaseaktivität besitzt. Nach

Stimulation im Rahmen der UPR kommt es zur Oligomerisierung und in der Folge zur proteinkinasevermittelten Autophosphorylierung von IRE1, wodurch dessen Endoribonucleaseaktivität aktiviert wird (Han et al., 2009). Das auf diese Weise aktivierte IRE1 spleißt im nächsten Schritt die Introns aus der mRNA des Vorläuferproteins XBP-1, wodurch der reife Transkriptionsfaktor *X-box binding protein 1* (XBP-1) entsteht, welcher über die Bindung an verschiedenen Promotorregionen die Expression von CHOP sowie anderer für den Ablauf der UPR relevanter Proteine heraufreguliert (Yoshida et al., 2001). Kommt es auf diese Weise zu einer Überexpression von CHOP, kann dies durch die Beeinflussung unterschiedlicher Signalwege eine proapoptotische Wirkung erzeugen. Zum einen ist CHOP in der Lage, die mitochondrial gesteuerte Apoptose über die Regulation pro- und antiapoptotischer Gene zu initiieren. Dabei wird die Expression antiapoptotischer Gene wie BCL-2 herabreguliert, während gleichzeitig die Expression proapoptotischer Gene wie BAK und BAX gefördert wird, was letztendlich zur Aktivierung der mitochondrienabhängigen, intrinsischen Apoptose führt (Tsukano et al., 2010). Zum anderen wurde für den PERK-ATF4-CHOP Signalweg auch eine Aktivierung extrinsischer Apoptosemechanismen nachgewiesen. Dabei induziert CHOP die Expression des *death receptor 5* (DR5) über die Bindung an dessen Gensequenz (Chen et al., 2016). Durch die Akkumulation von DR5 wird die Formierung des *death-inducing signaling complex* (DISC) begünstigt, welcher zur Aktivierung von Caspase 8 und damit zur Initiierung der Apoptose führt (Lu et al., 2014).

Zusätzlich zur Aktivierung der intrinsischen und der extrinsischen Apoptose kann CHOP auch über die Beeinflussung des Stoffwechsels des ER zur Induktion der Apoptose beitragen. CHOP induziert die Expression der *ER reductase 1 α* (ERO1 α), welche die Oxidation von Protein-Disulfid-Isomerasen (PDI) katalysiert, was zum vermehrten Anfall von H₂O₂ im ER führt. Durch diesen höhergradig oxidierten Zustand des ER kommt es zu einer Leckage von H₂O₂ in das Cytosol, was zum Entstehen reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) führt (Chen et al., 2015). Diese lösen in der Zelle eine Reihe inflammatorischer und proapoptotischer Reaktionen aus (Ramming et al., 2015).

Mittlerweile liegen verschiedene Studien vor, die für unterschiedliche Arten von Nanopartikel *in vitro* eine Induktion der UPR und eine damit einhergehende Verringerung der Zellviabilität nachweisen konnten (Yang et al., 2015; Rana et al., 2018). Auch wenn die genauen zugrundeliegenden Mechanismen noch nicht vollständig verstanden sind, scheint die Entstehung von ROS und die damit verbundene Alteration intrazellulärer Proteine durch die verwendeten Nanopartikel eine Schlüsselrolle in der Induktion der UPR einzunehmen (Cao et al., 2017). Auf Grundlage dieser Überlegung schlugen Nel et al. (2006) ein hierarchisch organisiertes Modell des durch Nanopartikel verursachten oxidativen Stresses vor. Dieses besteht aus 1) der Induktion antioxidativer Enzyme

durch niedrigschwelligen oxidativen Stress, 2) der Aktivierung proinflammatorischer Signalwege unter mittelgradigem oxidativem Stress und schließlich 3) der Induktion proapoptotischer Signalwege durch ein auf zellulärer Ebene nicht mehr adäquat kompensierbares Aufkommen von ROS. Auch für PEI-basierte Nanopartikel konnte *in vitro* bereits konzentrationsabhängig eine signifikant erhöhte Induktion von ROS in humanen Nabelvenenendothelzellen nachgewiesen werden (Calarco et al., 2013).

Ebenso wurden PEI-basierte Nanopartikel bereits hinsichtlich einer potentiellen Induktion von Zellorganellschäden unter anderem auch hinsichtlich ihres ER-Stressprofils untersucht. Dabei testeten Dabbaghi et al. (2017) die Auswirkung PEI-basierter DDS auf die in diesem Fall mittels MTT-Assay bestimmte Zellviabilität sowie die Expression unterschiedlicher Stressmarker des ER in einer murinen Neuroblastomzelllinie. Bereits nach vierstündiger Inkubationsdauer mit 25 µg/mL der unmodifizierten PEI-Nanopartikel ließ sich dabei mittels Real-Time PCR ein signifikanter Anstieg der Expression von CHOP auf das dreifache Expressionsniveau der Kontrollgruppe nachweisen. Dies ist insofern erwähnenswert, als dass sich in der vorliegenden Arbeit selbst nach deutlich längeren Inkubationszeiten (72 h gegenüber 4 h) mit bis zu 20-fach höheren Nanopartikelkonzentrationen (50 µg/mL bzw. 500 µg/mL gegenüber 25 mg/mL) keine signifikante Erhöhung der Expression von CHOP nachweisen ließ. Daher liegt die Annahme nahe, dass sowohl die alleinige Modifikation der PEI-Nanopartikel mit Polyglutamatgruppen als auch die zusätzliche Modifikation mit Maltosemolekülen hinsichtlich der Induktion der UPR und der damit verbundenen, potentiellen Aktivierung CHOP-abhängiger, proapoptotischer Signalwege einen positiven Effekt aufweisen. Die Frage, ob dabei eine verringerte Induktion von ROS eine Verringerung der direkten Interaktion zwischen Nanopartikeln und intrazellulären Proteinen oder zusätzliche, bisher nicht berücksichtigte Faktoren ausschlaggebend sind, lässt sich zum jetzigen Zeitpunkt nicht hinreichend beantworten. Hierzu wären weitere, gezielte Untersuchungen notwendig.

Wie in Abschnitt 3.5.2 beschrieben, ließ sich sowohl bei Inkubation mit PEI-PGLU-346 als auch mit PEI-PGLU-346-MAL eine signifikant erhöhte Expression von CHOP-mRNA für die Gruppe der knochengesunden Spenderzellen gegenüber der Gruppe der osteoporotischen Spenderzellen nachweisen. Diese Beobachtung steht im Widerspruch zu den bisher in der Literatur beschriebenen Zusammenhängen zwischen ER-Stress und einer osteoporotischen Knochenstoffwechsellaage. Liu et al. (2012) konnten beispielsweise in menschlichen Individuen mit einem mit einer Überaktivierung des PERK-eIF2 α -Signalweges assoziierten Haplotypen des PERK-Genes eine Verringerung der Knochendichte nachweisen. Eine Überaktivierung dieser Signalkaskade würde, obwohl in der genannten Studie nicht explizit überprüft, auch für

eine konsekutiv höhere Expression von CHOP in diesen Individuen sprechen. Ein möglicher Erklärungsansatz für diese widersprüchliche Beobachtung könnten ggf. zum Zeitpunkt der Bohrmehlentnahme unbekannte bzw. nicht dokumentierte Stoffwechselerkrankungen in der Gruppe der knochengesunden Spender darstellen. So wurde im Mausmodell bereits eine Erhöhung der CHOP-Expression in den Osteoblasten diabetischer Versuchstiere beschrieben (Liu et al., 2013).

Interessanterweise ergab sich auch für die Gruppe der mit BDNF behandelten Spenderzellen eine im Vergleich zur Gruppe der nicht mit BDNF inkubierten Spenderzellen signifikant erhöhte Expression von CHOP. Vor dem Hintergrund, dass bereits für die Inkubation humaner Neuroblastomzellen mit BDNF (Chen et al., 2007; Qiu et al., 2013) sowie für das Nieren- und Lebergewebe mit BDNF behandelter Mäuse (Cirrik et al., 2019; Cirrik et al., 2019) eine durch BDNF vermittelte Reduktion der CHOP-Expression beschrieben wurden, stellt dies ein eher unerwartetes Ergebnis dar. Leider liegen zum jetzigen Zeitpunkt keine Studien vor, in denen die Wirkung von BDNF auf die Expression von CHOP in hMSC untersucht wurde, weshalb es schwer fällt die hier beschriebenen Beobachtungen vergleichend in Bezug zu setzen.

4.3.3 Einfluss der verwendeten Nanopartikel auf die Expression von NQO1

Bei NQO1 handelt es sich um ein antioxidatives Enzym aus der Gruppe der Reduktasen, welches vor allem Chinone, Chinonimine und Azole reduziert und auf diesem Wege der zellschädigenden Wirkung von ROS entgegenwirkt (Ross et al., 2000; Siegel et al., 2004). Wie bereits in Abschnitt 4.3.2 beschrieben, ist die Induktion von ROS, welche auch für PEI-basierte Nanopartikel nachgewiesen werden konnte, einer der wesentlichen Mechanismen, über den die zellschädigende Wirkung von Nanopartikeln vermittelt wird.

Die Induktion von ROS führt dabei zu einer Oxidierung der Thiolgruppen des *kelch-like associated protein 1* (Keap1), welches im Normalzustand den *nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2* (Nrf2) ubiquitiniert und auf diesem Wege zu dessen proteolytischer Degradierung beiträgt. Hierdurch kommt es zu einer Freisetzung von Nrf2, welches in der Folge in den Zellkern transloziert und dort an *antioxidant response elements* (AREs), teilweise auch *electrophile response elements* (EpREs) genannt, bindet welche Teil der Promotorregionen unterschiedlicher, für antioxidative Proteine codierender Gene sind, zu denen auch das für NQO1 codierende Gen gehört (Zhang et al., 2019).

Eine auf diesem Wege ablaufende Antwort auf die Induktion oxidativen Stresses konnte bereits für verschiedene Nanopartikel, darunter beispielsweise cerdioxid- (Eom and Choi,

2009), silizium- (Michael Berg et al., 2013) sowie silberbasierte (Aueviriyavit et al., 2014) Nanopartikel beschrieben werden, wobei in den genannten Arbeiten lediglich die Expression von Nrf2, nicht jedoch von NQO1 bestimmt wurde. Pauksch et al. (2014) konnten für die Inkubation humaner rdMSC mit silberbasierten Nanopartikeln eine signifikante Zunahme der Expression von NQO1-mRNA nachweisen, wobei in dieser Arbeit längere Inkubationszeiträume von bis zu 21 Tagen untersucht wurden. Zum jetzigen Zeitpunkt ist dem Autor keine Arbeit bekannt, in deren Rahmen explizit die durch Nrf2 vermittelte Induktion antioxidativer Proteine nach Exposition gegenüber PEI-basierten Nanopartikeln untersucht wurde.

In der vorliegenden Arbeit ergaben sich gegenüber der Kontrolle weder für die Verwendung von PEI-PGLU-346 noch für die Verwendung von PEI-PGLU-346-MAL signifikante Unterschiede hinsichtlich der mittels Real-Time PCR bestimmten NQO1-Expression. Dies kann als Hinweis darauf aufgefasst werden, dass durch die verwendeten Nanopartikel keine relevante, durch Nrf2 vermittelte Induktion antioxidativer Proteine stattfand. Dabei bleibt jedoch einschränkend zu bedenken, dass auch eine direkte Beeinflussung der Expression von Nrf2 durch Nanopartikel denkbar ist. Gui et al. (2013) konnten für das Nierengewebe mit titandioxidbasierten Nanopartikeln inkubierter Ratten eine gegenüber der Kontrollgruppe signifikante Herabsetzung der Expression von Nrf2 und seiner nachgeschalteten Effektorproteine bei gleichzeitig vermehrtem Gehalt an ROS nachweisen. Dies würde bedeuten, dass sich ein durch Nanopartikel verursachtes, vermehrtes Aufkommen von oxidativem Stress scheinbar nicht in jedem Fall in einer von Nrf2 abhängigen, vermehrten Transkription von NQO1-mRNA detektieren ließe. Um diesbezüglich Klarheit zu schaffen, wäre es sinnvoll, in weiterführenden Experimenten die Expression von Nrf2 zu untersuchen. Gegebenenfalls könnte zusätzlich auch der beispielsweise mit Hilfe funktioneller Assays nachweisbare, intrazelluläre Gehalt an ROS nach Inkubation der hMSC mit Nanopartikeln bestimmt werden.

Interessanterweise ergab sich für die Gruppe der osteoporotischen Spenderzellen eine gegenüber der Gruppe der knochengesunden Spenderzellen signifikant erhöhte Expression von NQO1-mRNA. Dies steht im klaren Widerspruch zu der in der Literatur beschriebenen Rolle von NQO1 sowie der übrigen, Nrf2-abhängigen Effektorproteine im osteoporotischen Knochen. Beispielsweise konnten Hyeon et al. (2013) im Mausmodell bei Nrf2-defizienten Tieren eine vermehrte Differenzierung von Osteoklasten aus osteoklastären Vorläuferzellen nachweisen. Im Einklang mit diesen Ergebnissen wurden in der jüngeren Vergangenheit weitere Studien veröffentlicht, welche sich mit oxidativem Stress als für die Pathogenese der Osteoporose mitverantwortlichem Faktor beschäftigten. Altindag et al. (2008) beispielsweise beschrieben eine signifikante,

negative Korrelation des aus den Blutproben osteoporotischer Studienteilnehmer bestimmten *oxidative stress index* (OSI) und der BMD der jeweiligen Individuen. Das zunehmende Interesse an der Rolle von oxidativem Stress in der Entstehung der Osteoporose beinhaltet auch die Untersuchung möglicher, neuartiger Therapieoptionen. Li et al. (2018b) konnten im Tiermodell osteoporotischer Ratten einen protektiven Effekt für das aus der Gruppe der Carotinoide stammende, antioxidativ wirkende Molekül Lutein nachweisen. In den mit Lutein behandelten Tieren fanden sich in aus den Femora gewonnenen Knochenproben sowohl eine Verringerung der ROS als auch eine durch Nrf2 induzierte, vermehrte Expression von NQO1.

Vor diesem Hintergrund erscheint eine vermehrte Expression von NQO1-mRNA in der Gruppe der osteoporotischen Spenderzellen daher zu diesem Zeitpunkt nicht auf plausible Art und Weise mit den bisher zu diesem Thema veröffentlichten Studien vereinbar. Gegebenenfalls spielen hier auch die artifiziellen Bedingungen der Zellkultur eine Rolle, in welcher die Spenderzellen nicht dem Einfluss der *in vivo* im Patienten herrschenden systemischen osteoporotischen Stoffwechsellaage unterlagen.

4.3.4 Einfluss der verwendeten Nanopartikel auf die Expression von RIPK3

Bei RIPK3, teils auch *receptor interacting proteine 3* (RIP3) genannt, handelt es sich um eine erstmals von Stanger et al. (1995) beschriebene Serin/Threonin-Kinase, welche eine Schlüsselrolle in der Aktivierung der Nekroptose einnimmt. Diese beschreibt eine regulierte Form des nekrotischen, caspaseunabhängigen Zelltodes, der einen alternativen Mechanismus zum, zu diesem Zeitpunkt weitaus besser erforschten und verstandenen Weg des apoptotischen Zelltodes darstellt (Degterev et al., 2005). Die Initiierung der zugehörigen Signalkaskade ist dabei über unterschiedliche extrinsische Stimuli beispielsweise die Aktivierung von TNFR (Micheau und Tschopp, 2003), *toll-like receptors* (TLR) (He et al., 2011) oder Fas (Holler et al., 2000) sowie über eine durch ROS stimulierte intrinsische Aktivierung (Zhang et al., 2017) möglich, wobei die Aktivierung über TNFR zu diesem Zeitpunkt als in der Literatur am besten charakterisiert erscheint.

Im Rahmen der durch TNF induzierten Nekroptose bilden dabei die *Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1* (RIPK1) und *Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 3* (RIPK3) einen auch als Nekrosom bezeichneten Proteinkomplex, welcher über ein homotypisches, C-terminales Interaktionsmotiv an RIPK1 und RIPK3 stabilisiert wird (Sun et al., 2002). Auf diesem Wege kommt es zu einer Phosphorylierung von RIPK3, welches in einem nachgeschalteten Schritt die Phosphorylierung des *mixed lineage kinase domain-like protein* (MLKL) katalysiert, was

eine Oligomerisation von MLKL zur Folge hat (Cai et al., 2014). Die entstandenen MLKL-Oligomere translozieren in die Zellmembran und führen hier über die Bildung von Poren sowie die Induktion eines Influx von Natrium- und Calciumionen letztendlich zu einem Untergang der Zelle (Chen et al., 2014; Wang et al., 2014).

Die auf diesem Wege vermittelte Form des Zellunterganges konnte durch Tait et al. (2013) auch in mitochondriendepletierten humanen Samenbläschenepithelzellen nachgewiesen werden. Durch die Aktivierung der RIPK3-induzierten Nekroptose besteht somit ein vom mitochondrialen Weg der Apoptose gänzlich unabhängiger, paralleler Mechanismus, welcher zu einem auf zellulärer Ebene regulierten Zelltod führt.

In Versuchen mit murinen Kardiomyozyten konnten Luedde et al. (2014) nach mittels eines adenoviralen Vektors induzierter Überexpression von RIPK3 im MTT-Assay sowie nach Färbung mit Propidiumiodid eine verringerte Zellviabilität für die auf diesem Wege behandelten Zellen nachweisen. Eine Überexpression von RIPK3 war somit in der genannten Arbeit für die Induktion der Nekroptose ausreichend.

Fischer et al. (2003) untersuchten verschiedene polykationische Polymere, unter diesen auch unkonjugierte PEI-basierte Nanopartikel *in vitro* hinsichtlich ihrer cytotoxischen Effekte auf murine Fibroblasten. Dabei ergab sich eine mittels LDH-Assay detektierte Schädigung der Zellmembranen, welche in ihrem Ausmaß von der Inkubationsdauer sowie der verwendeten Nanopartikelkonzentration abhängig war. Ebenfalls zeigte sich im MTT-Assay eine von der Inkubationsdauer und der verwendeten Konzentration abhängige Verringerung der Zellviabilität. Interessanterweise ließen sich nach Färbung mittels 4',6-Diamidin-2-Phenylindol (DAPI) bei lichtmikroskopischer Untersuchung der Zellen keine für einen apoptotischen Zelltod typischen morphologischen Veränderungen der Zellkerne nachweisen. Ebenso ließen sich die cytotoxischen Effekte der Nanopartikel nicht durch die zusätzliche Behandlung der Zellen mit dem Pancaspaseinhibitor zVAD.fmk nivellieren. Diese Ergebnisse legen einen nekrotischen Zelluntergang nahe, wobei eine mögliche Aktivierung der nekroptotischen Signalwege in der genannten Arbeit nicht nähergehend untersucht wurde. Vor dem Hintergrund dieser Ergebnisse sowie der Tatsache, dass sich auch in der vorliegenden Arbeit lichtmikroskopisch keine apoptosetypischen Veränderungen der Zellmorphologie nachweisen ließen, erschien die Untersuchung der Expression von RIPK3 mittels Real-Time PCR sinnvoll, um auf diesem Wege gegebenenfalls Hinweise auf eine Aktivierung nekroptotischer Signalwege zu erhalten. In der Literatur sind für unterschiedliche Gewebetypen darunter beispielsweise Lebergewebe (Csak et al., 2011), Pankreasgewebe (He et al., 2009) und retinale Photorezeptorzellen (Viringipurampeer et al., 2014) eine erhöhte Expression von RIPK3 bei Aktivierung der Nekroptose beschrieben.

Wie bereits in Abschnitt 3.5.4 beschrieben, ergaben sich hinsichtlich der Expression von RIPK3 keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen. Dieses Ergebnis legt nahe, dass es durch die verwendeten Nanopartikel nicht zu einer Aktivierung nekroptotischer Signalwege durch die Überexpression von RIPK3 kommt. Jedoch ist einschränkend zu erwähnen, dass nicht jedem nekroptotischen Zelluntergang auch eine Überexpression von RIPK3 vorauszugehen scheint. Insbesondere vor dem Hintergrund der mittels LDH-Assay detektierten Schädigung der Zellmembranen sowie den fehlenden apoptosetypischen Veränderungen der Zellmorphologie sind hier auch andere, von einer Überexpression von RIPK3 unabhängige Wege der Aktivierung nekroptotischer Signalwege denkbar. Insofern könnten in weiterführenden experimentellen Untersuchungen beispielsweise mittels *western blot* die unterschiedlichen Phosphorylierungszustände von RIPK3 und MLKL genauer untersucht werden (McQuade et al., 2013), um auf diesem Wege gegebenenfalls weitere Hinweise hinsichtlich eines potentiellen nekroptotischen Zellunterganges, nach Inkubation mit den hier verwendeten Nanopartikeln zu erhalten.

4.4 Einfluss von BDNF

Wie bereits in Abschnitt 3 beschrieben, ergaben sich lediglich hinsichtlich der Expression von CHOP signifikante Unterschiede zwischen der Gruppe der nicht mit BDNF behandelten und der Gruppe der mit 40 ng/mL BDNF inkubierten Spenderzellen, wobei eine Inkubation mit BDNF mit einer gesteigerten Expression von CHOP verbunden war. Diese Beobachtung steht im Widerspruch zu den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, welche für die Inkubation unterschiedlicher Zelltypen mit BDNF eine Reduktion der Expression von CHOP nachweisen konnten. Dabei erscheint eine genauere Einordnung dieser Ergebnisse aufgrund der in diesem Punkt bisher fehlenden, mit hMSC durchgeführten Untersuchungen schwierig (siehe Abschnitt 4.3.2).

Im Übrigen ließen sich für die Inkubation mit BDNF in der vorliegenden Arbeit keine signifikanten Effekte ermitteln. Insbesondere die zytotoxische Wirkung der verwendeten Nanopartikel ließ sich durch die Zugabe von BDNF nicht beeinflussen.

Kilian et al. (2014) konnten BDNF sowie seinen Rezeptor TrkB bereits in humanen Knochenproben, welche sich in unterschiedlichen Stadien der Frakturheilung befanden, nachweisen, wobei in späteren Phasen der Frakturheilung auch die untersuchten Osteoblasten und nicht nur Zellen des umgebenden Granulationsgewebes positiv auf BDNF und TrkB getestet wurden. Diese Tatsache legt eine Beeinflussung der Frakturheilung und damit letztendlich auch der Osteogenese durch BDNF nahe.

Für die Herabregulation der Expression von BDNF durch BDNF-*antisense* RNA (BDNF-AS) in aus dem Knochenmark ostoporotischer Mäuse gewonnener MSC konnten Feng et al. (2018) eine Verringerung der osteogenen Differenzierung und eine Inhibition der mit der Differenzierung verbundenen Signalwege nachweisen. In einer von Liu et al. (2018) durchgeführten Untersuchung zeigten im Rahmen von Dysgnathieoperationen gewonnene humane MSC nach Inkubation mit 100 ng/mL BDNF ebenfalls eine verstärkte, mittels ALP-Assay ermittelte osteogene Differenzierung. Interessanterweise hatte die Zugabe von BDNF jedoch keinen Einfluss auf die Proliferationsrate der kultivierten Zellen.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass BDNF eventuell eher eine Rolle für die osteogene Differenzierung von MSC als für deren Proliferation, respektive das Zellüberleben zu spielen scheint. Damit ließe sich auch das Ausbleiben positiver Effekte auf die zytotoxische Wirkung der verwendeten Nanopartikel erklären.

Von Interesse für zukünftige Untersuchungen könnten daher in diesem Zusammenhang Versuche zur osteogenen Differenzierbarkeit der MSC unter dem Einfluss einer Inkubation mit den verwendeten Nanopartikeln sein. Dabei ließe sich auch ein etwaiger Einfluss von BDNF auf deren osteogenes Potential genauer untersuchen.

4.5 Beantwortung der Fragestellung und Ausblick

Abschließend soll hier auf die eingangs in Abschnitt 1.5 formulierten Fragestellungen eingegangen und eine zusammenfassende Einordnung der vorliegenden Arbeit vorgenommen werden.

1. Sind für die zu untersuchenden Nanopartikel zytotoxische Effekte nachweisbar?
Lassen sich diese Effekte auf mikroskopischer Ebene oder durch die Verwendung funktioneller Assays nachweisen?

Für die verwendeten Nanopartikel ließ sich in der lichtmikroskopischen Lebendzellbeobachtung kein eindeutiger Nachweis einer Zellschädigung erbringen (siehe Abschnitt 4.1.2). Demgegenüber zeigten sich in der Untersuchung mittels LDH-Assay von der Inkubationszeit sowie der verwendeten Nanopartikelkonzentration abhängige Anstiege der Zytotoxizität, wobei letztere lediglich für die höchste verwendete Konzentration von PEI-PGLU-346 nachweisbar waren (siehe Abschnitt 4.1.3).

2. Besteht ein Zusammenhang zwischen der Inkubationsdauer bzw. der eingesetzten Nanopartikelkonzentration und dem Ausmaß potentiell zellschädigender Effekte?

Im Falle von PEI-PGLU-346 hatten sowohl die Inkubationszeit als auch die Konzentration einen Einfluss auf das Ausmaß der mittels LDH-Assay nachweisbaren Zytotoxizität. Für PEI-PGLU-346-MAL traf dies lediglich auf die Dauer der Inkubation zu, wobei sich hier jedoch zu keinem der gewählten Zeitpunkte eine im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikante Erhöhung der im Kulturmedium nachweisbaren LDH zeigte.

3. Lässt sich durch eine Modifikation der PEI-basierten Nanopartikel mit Glutamatschale durch Maltosemoleküle eine Reduktion etwaiger zytotoxischer Effekte erreichen?

Die zusätzliche Modifikation der Nanopartikel mit Maltosemolekülen ergab hinsichtlich der durch die Nanopartikel vermittelten zytotoxischen Wirkung einen klaren Vorteil gegenüber der alleinigen Oberflächenmodifikation mit Glutamat. So zeigte sich nach einer Inkubationszeit von 72 h im LDH-Assay eine signifikant erhöhte zytotoxische Wirkung in der Gruppe der mit PEI-PGLU-346 gegenüber der mit PEI-PGLU-346-MAL inkubierten Spenderzellen. Des Weiteren war für keine der verwendeten

Konzentrationen von PEI-PGLU-346-MAL eine gegenüber der Kontrollgruppe signifikante Erhöhung der zytotoxischen Wirkung nachweisbar. Dagegen führte die Inkubation mit 500 µg/mL PEI-PGLU-346 bereits nach 24 h zu einer gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erhöhten Zytotoxizität. Nach 72 h zeigte sich diese sowohl gegenüber der Kontrollgruppe als auch gegenüber allen anderen eingesetzten Konzentrationen signifikant erhöht.

4. Ist durch die Zugabe des Neurotrophins BDNF *in vitro* eine Reduktion potentiell zellschädigender Effekte auf die MSC erzielbar?

Durch die Zugabe von BDNF zu den mit Nanopartikeln inkubierten Spenderzellen ließ sich in den dieser Arbeit zugrundeliegenden Untersuchungen kein positiver Effekt im Sinne einer Reduktion zellschädigender Effekte nachweisen.

5. Wie unterscheiden sich die MSC knochengesunder und osteoporotischer Spender hinsichtlich ihrer Reaktion auf die zu untersuchenden Nanopartikel?

Sowohl in der Gruppe der knochengesunden als auch in der Gruppe der osteoporotischen Spenderzellen führte die Inkubation mit 500 µg/mL PEI-PGLU-346 zu einem gegenüber der Kontrollgruppe signifikanten Anstieg der Zytotoxizität, wobei dieser in der Gruppe der knochengesunden Spenderzellen auch gegenüber den übrigen eingesetzten Konzentrationen signifikant erhöht war. Insofern ergaben sich hier keine Unterschiede in der Reaktion der Spenderzellen mit unterschiedlichen Knochenstatus auf die eingesetzten Nanopartikel, da in beiden Fällen lediglich die Inkubation mit der höchsten eingesetzten Konzentration von PEI-PGLU-346 eine signifikante Erhöhung der Zytotoxizität zur Folge hatte.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit ein Vorteil der zusätzlichen Modifikation der untersuchten Nanopartikel mit Maltosemolekülen gegenüber einer alleinigen Modifikation mit Glutamatmolekülen hinsichtlich der zytotoxischen Wirkung auf humane MSC knochengesunder sowie osteoporotischer Spender nachgewiesen werden. Dabei ergab sich für PEI-PGLU-346-MAL selbst in der höchsten eingesetzten Konzentration von 500 µg/mL keine mittels LDH-Assay nachweisbare Erhöhung der Zytotoxizität. Diese Beobachtung lässt sich am ehesten durch eine verbesserte Abschirmung positiver Ladungsschwerpunkte und einer damit verbundenen, geringeren Interaktion mit den Zellmembranen der Spenderzellen erklären.

Auch konnte in den dieser Arbeit zugrundeliegenden Untersuchungen für die verwendeten Nanopartikel weder auf mRNA-Ebene noch auf Proteinebene eine signifikant erhöhte Expression von IL-6 im Sinne einer proinflammatorischen Reaktion nachgewiesen werden.

Unter diesen Gesichtspunkten erscheint eine weiterführende Testung von PEI-PGLU-346-MAL *in vivo* beispielsweise im Rahmen eines Tiermodells denkbar. In diesem Zusammenhang wäre es auch möglich, erste Erkenntnisse über die pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Eigenschaften des Nanopartikels zu erhalten. In einem nachgeschalteten Schritt könnten, eine vorteilhafte Darstellung der Nanopartikeleigenschaften vorausgesetzt, auch Kombinationen aus Nanopartikeln und Wirkstoffen im Sinne eines DDS untersucht werden. Dabei wäre neben der Überprüfung potentiell adverser Effekte besonders eine Untersuchung der Deposition des gekoppelten Wirkstoffs im Zielgewebe von Bedeutung.

Für die vermehrte zytotoxische Wirkung von PEI-PGLU-346 ließ sich in der vorliegenden Arbeit kein eindeutiger ursächlicher Faktor nachweisen. So erbrachten weder die lichtmikroskopische Lebendzellbeobachtung noch die Untersuchung unterschiedlicher, mit Inflammation sowie verschiedenen Aspekten des Zellstoffwechsels assoziierter Marker Hinweise auf den zugrundeliegenden Mechanismus der Zellschädigung. Wie in Abschnitt 4.1.3 dargestellt, spielte hier am ehesten eine direkte Interaktion der Nanopartikel mit den biologischen Membranen der Zellen eine Rolle. In weiterführenden Untersuchungen könnte daher gegebenenfalls eine Darstellung der Zellmembranen nach Inkubation der Zellen mit Nanopartikeln beispielsweise mittels Rasterkraftmikroskopie weitere Einblicke in die für die Zellschädigung ursächlichen Vorgänge geben.

Insgesamt stellt eine mögliche Nutzung PEI-basierter Nanopartikel als DDS, ähnlich der im experimentellen Rahmen bereits etablierten Nutzung als nichtviralem Transfektionsvektor, eine vielversprechende und potentiell vielseitig anwendbare Möglichkeit dar, um bereits bestehende Therapien zu ergänzen und zu verbessern sowie

völlig neue, gezielte Therapieansätze zu ermöglichen. Aus diesem Grund erscheinen weitere Investitionen in die Erforschung dieser vergleichsweise jungen Arzneimittelgruppe ebenso wie die Erforschung der therapeutischen Nutzbarmachung von Nanopartikeln im Allgemeinen sinnvoll.

5 Zusammenfassung

Nanopartikel stellen in der medizinischen Nutzung eine vergleichsweise junge Gruppe von Materialien dar, welche durch ihre strukturelle Vielfalt und den daraus resultierenden, unterschiedlichen chemischen und physikalischen Eigenschaften sowohl das Potential zur Verbesserung bereits bestehender Therapien als auch zur Entwicklung neuartiger Therapieansätze bieten. Beispielsweise werden durch die Nutzung von Nanopartikeln als DDS eine Stabilisierung zu transportierender Therapeutika, ein Transport über biologische Barrieren hinweg sowie eine gezielte Freisetzung in unterschiedlichen Zielgeweben möglich. Osteoporose stellt, als systemische Erkrankung des Skelettapparates, in den alternden Gesellschaften der westlichen Welt eine zunehmende gesundheitliche sowie volkswirtschaftliche Herausforderung dar. Um dieser auf adäquate Weise begegnen zu können, erscheint die Verbesserung bestehender und die Entwicklung neuartiger beispielsweise nanopartikelbasierter Therapieansätze unumgänglich. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei PEI-basierte Nanopartikel mit und ohne zusätzliche Oberflächenmodifikation mit Maltosemolekülen hinsichtlich einer potentiellen zellschädigenden Wirkung auf humane, aus Bohrmehl gewonnene mesenchymale Knochenstammzellen untersucht.

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Versuche wurden mit rdMSC je 5 knochengesunder und 5 osteoporotischer humaner Spender durchgeführt. Diese wurden aus im Rahmen operativer endoprothetischer Versorgungen anfallendem Knochenbohrmehl isoliert. Die Zellen wurden für 24 h bzw. 72 h mit unterschiedlichen Konzentrationen der Nanopartikeln inkubiert und in regelmäßigen zeitlichen Abständen lichtmikroskopisch untersucht. Die Aufnahme der verwendeten Nanopartikel wurde mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie dargestellt. Anschließend wurden die unterschiedlichen Nanopartikel mittels LDH-Assay hinsichtlich ihrer zytotoxischen Wirkung evaluiert. Mittels eines ELISA für IL-6 wurden potentielle proinflammatorische Wirkungen der Nanopartikel untersucht. Zusätzlich wurden verschiedene Marker des Zellstoffwechsels mittels Real-Time PCR gemessen. Um mögliche positive Effekte des Neurotrophins BDNF auf die inkubierten Zellen zu überprüfen, wurden die beschriebenen Versuche zusätzlich nach Zugabe von BDNF durchgeführt.

Durch die Modifikation der Nanopartikel mit Maltosemolekülen ließ sich eine signifikante Reduktion der Zytotoxizität erzielen. Nach Inkubation mit den maltosemodifizierten Nanopartikeln ließ sich für keine der verwendeten Konzentrationen eine Erhöhung der Zytotoxizität gegenüber der Kontrollgruppe nachweisen. Die Nanopartikel bewirkten keine signifikante proinflammatorische Reaktion der Spenderzellen. Die Gruppe der knochengesunden und osteoporotischen Spenderzellen unterschieden sich hinsichtlich

der durch die Nanopartikel vermittelten Zytotoxizität nicht voneinander. Durch die Zugabe von BDNF konnte kein positiver Effekt auf die inkubierten Spenderzellen erzielt werden.

Die Modifikation der Nanopartikel mit Maltosemolekülen führte gegenüber der unmodifizierten Form zu einer signifikanten Verringerung der Zytotoxizität. Dies galt sowohl für die Inkubation der knochengesunden als auch der osteoporotischen Spenderzellen. Die Inkubation mit keinem der Nanopartikel führte zu einer signifikanten proinflammatorischen Reaktion. Da Inflammation in der Entstehung und Aufrechterhaltung der Osteoporose eine nicht unwesentliche Rolle einnimmt, ist dies insbesondere bei potentieller Anwendung im osteoporotischen Knochen von Relevanz. Insgesamt erscheint eine zukünftige Testung des maltosemodifizierten Nanopartikels *in vivo*, beispielsweise im Tiermodell denkbar. Auf diesem Wege könnten auch erste Erkenntnisse über dessen pharmakokinetische und pharmakodynamische Eigenschaften gesammelt werden, um so einer möglichen therapeutischen Anwendung näher zu kommen.

6 Summary

In the context of medical use, nanoparticles constitute a relatively new group of materials. Their structural diversity and the resulting differences in their chemical and physical properties make them suitable for improving already existing therapeutics as well as developing novel therapeutic approaches. For example, the use of nanoparticles as DDS allows for the stabilization of conjugated therapeutics, transportation across biological barriers and a targeted release in different tissues. Osteoporosis, as a systemic disease of bone homeostasis poses an increasing challenge for healthcare systems in the aging societies of the western world. To adequately confront this problem, nanoparticles may represent a promising option to improve on already existing therapeutics, as well as to open up new therapeutic approaches. In this study, two PEI-based nanoparticles with and without additional maltose moieties were tested for possible cell damaging effects on human rdMSC.

For this study rdMSC of 5 healthy human donors and 5 human donors suffering from osteoporosis were obtained by isolating them from remaining debris, collected during endoprosthetic hip surgeries. The cells were incubated with different concentrations of the nanoparticles for 24 h or 72 h. During incubation the cells were microscopically assessed in regular intervals. The cellular uptake of the nanoparticles was examined via confocal fluorescence microscopy. The cytotoxic effects of the nanoparticles were examined by using an LDH-assay. Potential proinflammatory effects of the nanoparticles were evaluated using an IL-6 ELISA kit. In addition, different markers of cell metabolism were measured via Real-Time PCR. To investigate possible positive effects of the neurotrophin BDNF, the experiments were conducted with and without the admission of BDNF to the cultured cells.

The addition of maltose moieties to the nanoparticles resulted in a significant reduction of cytotoxic effects. After incubation with the different concentrations of the maltose modified nanoparticles no significant increase in cytotoxicity could be detected. Neither of the nanoparticles caused a significant proinflammatory response in the rdMSC. In regard to cytotoxicity, there appeared to be no significant difference between the rdMSC obtained from healthy and osteoporotic donors. The addition of BDNF did not have a positive effect on the incubated rdMSC.

The addition of maltose moieties to the tested nanoparticles resulted in a significant reduction of cytotoxicity. This applied to the rdMSC of healthy, as well as to the rdMSC

of osteoporotic human donors. Neither of the nanoparticles caused a significant proinflammatory response in the cells. This is particularly important for a potential use in osteoporotic patients, as inflammation plays a pivotal role in the development and maintenance of osteoporosis. Overall from the standpoint of this study, further testing of the maltose modified nanoparticles *in vivo*, i. e. testing in animal models, seems to be feasible. In this way it would be possible to obtain first insights into the pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of the nanoparticles and possibly move one step closer to a therapeutic use.

7 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: WIRKUNGEN UND WECHSELWIRKUNGEN DER UNTERSCHIEDLICHEN NEUROTROPHINREZEPTOREN	15
Abb. 2.1: STRUKTUR DER VERWENDETEN NANOPARTIKEL; MODIFIZIERT NACH (STRIEGLER 2016)	20
Abb. 2.2: SYNTHESE VON DER VERWENDETEN; MODIFIZIERT NACH (STRIEGLER ET AL., 2015).....	21
Abb. 2.3: FUNKTIONSWEISE DES LDH-ASSAYS	24
Abb. 3.1: LICHTMIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN FÜR 72 H MIT PEI-PGLU-346 INKUBIERTER, KNOCHENGESUNDER SPENDERZELLEN	34
Abb. 3.2: LICHTMIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN FÜR 72 H MIT PEI-PGLU-346 UND 40 NG/ML BDNF INKUBIERTER, KNOCHENGESUNDER SPENDERZELLEN	35
Abb. 3.3: LICHTMIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN FÜR 72 H MIT PEI-PGLU-346-MAL INKUBIERTER, KNOCHENGESUNDER SPENDERZELLEN	36
Abb. 3.4: LICHTMIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN FÜR 72 H MIT PEI-PGLU-346-MAL UND 40 NG/ML BDNF INKUBIERTER, KNOCHENGESUNDER SPENDERZELLEN	37
Abb. 3.5: LICHTMIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN FÜR 72 H MIT PEI-PGLU-346 INKUBIERTER, OSTEOPOROTISCHER SPENDERZELLEN	38
Abb. 3.6: LICHTMIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN FÜR 72 H MIT PEI-PGLU-346 UND 40 NG/ML BDNF INKUBIERTER, OSTEOPOROTISCHER SPENDERZELLEN	39
Abb. 3.7: LICHTMIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN FÜR 72 H MIT PEI-PGLU-346-MAL INKUBIERTER, OSTEOPOROTISCHER SPENDERZELLEN	40
Abb. 3.8: LICHTMIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN FÜR 72 H MIT PEI-PGLU-346-MAL UND 40 NG/ML BDNF INKUBIERTER, OSTEOPOROTISCHER SPENDERZELLEN	41
Abb. 3.9: FLUORESZENZMIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN	43
Abb. 3.10: LDH-QUOTIENTEN VON PEI-PGLU-346 UND PEI-PGLU-346-MAL, NACH 24 H SOWIE 72 H	44
Abb. 3.11: LDH-QUOTIENTEN VON PEI-PGLU-346 UND PEI-PGLU-346-MAL, NACH 24 H	45
Abb. 3.12: LDH-QUOTIENTEN VON PEI-PGLU-346 UND PEI-PGLU-346-MAL, NACH 72 H	46
Abb. 3.13: LDH-QUOTIENTEN DER KNOCHENGESUNDEN UND OSTEOPOROTISCHEN SPENDERZELLEN NACH INKUBATION MIT PEI-PGLU-346 UND PEI-PGLU-346-MAL, NACH 24 H SOWIE 72 H	47
Abb. 3.14: LDH-QUOTIENTEN DER KNOCHENGESUNDEN SPENDERZELLEN, NACH INKUBATION MIT PEI-PGLU-346 UND PEI-PGLU-346-MAL	48
Abb. 3.15: LDH-QUOTIENTEN DER OSTEOPOROTISCHEN SPENDERZELLEN, NACH INKUBATION MIT PEI-PGLU-346 UND PEI-PGLU-346-MAL	49
Abb. 3.16: LDH-QUOTIENTEN DER MIT UNTERSCHIEDLICHEN NANOPARTIKELN INKUBIERTEN SPENDERZELLEN MIT UND OHNE ZUGABE VON BDNF	50
Abb. 3.17: LDH-QUOTIENTEN DER SPENDERZELLEN MIT UNTERSCHIEDLICHEN KNOCHENSTATUS MIT UND OHNE ZUGABE VON BDNF	50
Abb. 3.18: IL-6-GEHALT IM MEDIUM NACH INKUBATION MIT PEI-PGLU-346 UND PEI-PGLU-346-MAL	51
Abb. 3.19: IL-6-GEHALT IM MEDIUM NACH INKUBATION MIT UNTERSCHIEDLICHEN KONZENTRATIONEN VON PEI-PGLU-346 UND PEI-PGLU-346-MAL	52
Abb. 3.20: IL-6-GEHALT IM MEDIUM DER MIT PEI-PGLU-346 UND PEI-PGLU-346-MAL INKUBIERTEN SPENDERZELLEN UNTERSCHIEDLICHEN KNOCHENSTATUS	52
Abb. 3.21: IL-6-GEHALT IM MEDIUM DER MIT PEI-PGLU-346 UND PEI-PGLU-346-MAL INKUBIERTEN SPENDERZELLEN, MIT UND OHNE ZUGABE VON BDNF	53
Abb. 3.22: Δ Ct-WERTE VON CCND1 DER KNOCHENGESUNDEN UND OSTEOPOROTISCHEN SPENDERZELLEN	54
Abb. 3.23: Δ Ct-WERTE VON CCND1 DER KNOCHENGESUNDEN UND OSTEOPOROTISCHEN, MIT PEI-PGLU-346 UND PEI-PGLU-346-MAL INKUBIERTEN SPENDERZELLEN	54
Abb. 3.24: Δ Ct-WERTE VON CCND1 DER MIT PEI-PGLU-346 UND PEI-PGLU-346-MAL INKUBIERTEN SPENDERZELLEN	55
Abb. 3.25: Δ Ct-WERTE VON CCND1 DER MIT BDNF BEHANDELTEN, MIT PEI-PGLU-346 UND PEI-PGLU-346-MAL INKUBIERTEN SPENDERZELLEN	55
Abb. 3.26: Δ Ct-WERTE VON CCND1 DER MIT UNTERSCHIEDLICHEN KONZENTRATIONEN VON PEI-PGLU-346 UND PEI-PGLU-346-MAL INKUBIERTEN SPENDERZELLEN	56
Abb. 3.27: Δ Ct-WERTE VON CHOP IN DER GRUPPE DER KNOCHENGESUNDEN UND OSTEOPOROTISCHEN SPENDERZELLEN	57
Abb. 3.28: Δ Ct-WERTE VON CHOP DER KNOCHENGESUNDEN UND OSTEOPOROTISCHEN, MIT PEI-PGLU-346 UND PEI-PGLU-346-MAL INKUBIERTEN SPENDERZELLEN	57
Abb. 3.29: Δ Ct-WERTE VON CHOP DER OHNE UND MIT BDNF BEHANDELTEN SPENDERZELLEN	58

Abb. 3.30: Δ Ct-Werte von CHOP der ohne und mit BDNF behandelten, mit PEI-PGLU-346 und PEI-PGLU-346-MAL inkubierten Spenderzellen	59
Abb. 3.31: Δ Ct-Werte von CHOP der mit PEI-PGLU-346 und PEI-PGLU-346-MAL inkubierten Spenderzellen	59
Abb. 3.32: Δ Ct-Werte von CHOP der mit unterschiedlichen Konzentrationen von PEI-PGLU-346 und PEI-PGLU-346-MAL inkubierten Spenderzellen	60
Abb. 3.33: Δ Ct-Werte von NQO1 der knochengesunden und osteoporotischen Spenderzellen	61
Abb. 3.34: Δ Ct-Werte von NQO1 der mit PEI-PGLU-346 und PEI-PGLU-346-MAL inkubierten Spenderzellen	61
Abb. 3.35: Δ Ct-Werte von NQO1 der mit unterschiedlichen Konzentrationen von PEI-PGLU-346 und PEI-PGLU-346-MAL inkubierten Spenderzellen	62
Abb. 3.36: Δ Ct-Werte von NQO1 der ohne und mit BDNF behandelten Spenderzellen	62
Abb. 3.37: Δ Ct-Werte von RIPK3 der mit PEI-PGLU-346 und PEI-PGLU-346-MAL inkubierten Spenderzellen	63
Abb. 3.38: Δ Ct-Werte von RIPK3 der mit unterschiedlichen Konzentrationen von PEI-PGLU-346 und PEI-PGLU-346-MAL inkubierten Spenderzellen	64
Abb. 3.39: Δ Ct-Werte von RIPK3 der knochengesunden und osteoporotischen Spenderzellen	64
Abb. 3.40: Δ Ct-Werte von RIPK3 der ohne und mit BDNF behandelten Spenderzellen	65
Abb. 3.41: Δ Ct-Werte von IL-6 der mit PEI-PGLU-346 und PEI-PGLU-346-MAL inkubierten Spenderzellen	66
Abb. 3.42: Δ Ct-Werte von IL-6 der mit unterschiedlichen Konzentrationen von PEI-PGLU-346 und PEI-PGLU-346-MAL inkubierten Spenderzellen	66
Abb. 3.43: Δ Ct-Werte von IL-6 der knochengesunden und osteoporotischen Spenderzellen	67
Abb. 3.44: Δ Ct-Werte von IL-6 der ohne und mit BDNF behandelten Spenderzellen	67
Abb. 4.1: Wirkung von IL-6 auf Zellen der Osteoblastären und Osteoklastären Zelllinie; Modifiziert nach Blanchard et al. (2009)	79

8 Tabellenverzeichnis

TABELLE 2.1: ÜBERBLICK ÜBER DIE VERWENDETEN SPENDERZELLINIEN	19
TABELLE 2.2: ANREGUNGS- UND DETEKTIONSWELLENLÄNGEN DER FLUORESZENZMIKROSKOPIE	22
TABELLE 2.3: VERWENDETE PRIMER MIT PRIMERSEQUENZEN.....	31

9 Abkürzungsverzeichnis

Abbildung	– Abb.
ALP	– Alkalische Phosphatase
ANOVA	– <i>analysis of variance</i>
ARE	– <i>antioxidant response element</i>
ATF4	– <i>activating transcription factor 4</i>
ATF6	– <i>activating transcription factor 6</i>
BDNF	– <i>Brain-derived neurotrophic factor</i>
BDNF-AS	– BDNF- <i>antisense RNA</i>
BMD	– <i>bone mineral density</i>
BMP-2	– <i>bone morphogenic protein 2</i>
bp	– Basenpaar
BSA	– Bovines Serumalbumin
°C	– Grad Celsius
γ -BLG-NCA	– γ -Benzyl-L-Glutamat N-Carboxyanhydrid
C/EBPs	– <i>CCAAT/enhancer binding proteins</i>
CCND1	– Cyclin D1
CD	– <i>cluster of differentiation</i>
CDK	– <i>cyclin dependent kinase</i>
CDK4	– <i>cyclin dependent kinase 4</i>
CDK6	– <i>cyclin-dependent-kinase 6</i>
cDNA	– komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CHOP	– <i>C/EBP homologous protein</i>
CLC	– <i>cardiotrophin-like cytokine</i>
cm ²	– Quadratzentimeter
CNTF	– <i>ciliary neurotrophic factor</i>
CO ₂	– Kohlenstoffdioxid
CRP	– C-Reaktives Protein
CT-1	– <i>cardiotrophin 1</i>
DAPI	– 4',6-Diamidin-2-Phenylindol
DDS	– <i>drug delivery system</i>
DISC	– <i>death-inducing signaling complex</i>
DNA	– Desoxyribonukleinsäure
DR5	– <i>death receptor 5</i>
DXA	– <i>dual-energy X-ray absorptiometry</i>
E2	– 17- β -Östradiol

ECIS	– <i>cell-substrate impendance sensing</i>
eIF2 α	– <i>eucaryotic translation initiation factor 2α</i>
ELISA	– <i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
EpRE	– <i>electrophile response element</i>
ER	– <i>endoplasmatisches Retikulum</i>
ERO1 α	– <i>ER reductase 1α</i>
FIJI	– <i>Fiji Is Just ImageJ</i>
FITC	– <i>Fluorescein</i>
FKS	– <i>Fetales Kälberserum</i>
for	– <i>forward</i>
g	– <i>Gramm</i>
G0	– <i>gap 0</i>
G1	– <i>gap 1</i>
G2	– <i>gap 2</i>
GADD 153	– <i>growth arrest- and DNA damage-inducible gene 153</i>
Gp130	– <i>Glykoprotein 130</i>
h	– <i>Stunde</i>
HLA-DR	– <i>humanes Leukozytenantigen-DR</i>
HRP	– <i>Horseradish peroxidase</i>
ID	– <i>Identifikationsnummer</i>
IGF-I	– <i>insulin-like growth factor I</i>
IL	– <i>Interleukin</i>
IL-6	– <i>Interleukin 6</i>
IL-6R α	– <i>IL-6 receptor α</i>
IQR	– <i>interquartile range</i>
IRE1	– <i>inositol requiring protein 1</i>
ISO	– <i>International Organisation for Standardization</i>
K	– <i>Kelvin</i>
Keap1	– <i>kelch-like associated protein 1</i>
LDH	– <i>Laktatdehydrogenase</i>
LIF	– <i>leucemia inhibitory factor</i>
m	– <i>männlich</i>
M-Phase	– <i>Mitose-Phase</i>
MLKL	– <i>mixed lineage kinase domain-like protein</i>
mMSC	– <i>mature MSC</i>
mRNA	– <i>messenger RNA</i>
MSC	– <i>Mesenchymale Stammzellen</i>

MTT	– (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid)
n	– Stichprobenumfang
nab	– <i>nanoparticle albumin bound</i>
NAD ⁺	– Nikotinamidadenindinukleotid in oxidierte Form
NADH	– Nikotinamidadenindinukleotid in reduzierte Form
ng	– Nanogramm
NGF	– <i>nerve growth factor</i>
nm	– Nanometer
NO	– Stickstoffmonoxid
NQO1	– <i>NAD(P)H dehydrogenase (quinone 1)</i>
Nrf2	– <i>nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2</i>
NT-3	– <i>neurotrophin-3</i>
NT-4/5	– <i>neurotrophin-4/5</i>
OSI	– <i>oxidative stress index</i>
OSM	– <i>oncostatin M</i>
p75NTR	– <i>p75 neurotrophin receptor</i>
PAMPs	– <i>pathogen associated molecular patterns</i>
PBS	– <i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	– Polymerase-Kettenreaktion
PDI	– Protein-Disulfid-Isomerase
PEG	– Polyethylenglycol
PEI-PBLG	– Polyethylenimin-Poly(γ -Benzyl-L-Glutamat)
PERK	– <i>protein kinase RNA-like endoplasmatic reticulum kinase</i>
PFA	– Paraformaldehyd
PI3K	– Phosphoinositol-3-Kinase
PLC- γ	– Phospholipase-C- γ
PNS	– Peripheres Nervensystem
pRB	– <i>retinoblastoma protein</i>
PRRs	– <i>pattern recognition receptors</i>
RANK	– <i>Receptor Activator of NF-κB</i>
RANKL	– <i>Receptor Activator of NF-κB Ligand</i>
Ras	– <i>rat sarcoma</i>
rBP	– <i>retinoblastoma protein</i>
rdMSC	– mesenchymale Stammzellen aus Bohrmehl
rev	– <i>reverse</i>
RIP3	– <i>receptor interacting proteine 3</i>
RIPK1	– <i>Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1</i>

RIPK3	– <i>Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 3</i>
RNA	– <i>Ribonucleic acid</i>
ROS	– reaktive Sauerstoffspezies
rpm	– <i>revolutions per minute</i>
RS	– <i>rapidly self-renewing</i>
RTCA	– <i>real-time cell analysis</i>
s	– Sekunde
S-Phase	– Synthese-Phase
SD	– <i>standard deviation</i>
sIL-6R	– <i>soluble IL-6 receptor</i>
TLR	– <i>toll-like receptor</i>
TLR-5	– <i>toll-like receptor 5</i>
TNFR	– Tumornekrosefaktor-Rezeptor
TRAF	– <i>TNFR-associated factor</i>
Trk	– Tropomyosin-Rezeptorkinase
UPR	– <i>unfolded proteine response</i>
w	– weiblich
WST-1	– (2-(4-Iodphenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-Tetrazolium)
XBP-1	– <i>X-box binding protein 1</i>
ZK	– Zellkultur
ZNS	– Zentrales Nervensystem

10 Literaturverzeichnis

- Agashe, H. B. et al.** (2006) 'Investigations on the toxicological profile of functionalized fifth-generation poly(propylene imine) dendrimer', *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 58(11), pp. 1491–1498. doi: 10.1211/jpp.58.11.0010.
- Aggarwal, S. and Pittenger, M. F.** (2005) 'Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses', *Blood*, 105(4), pp. 1815–1822. doi: 10.1182/blood-2004-04-1559.
- Agrawal, P. et al.** (2007) 'Glycoconjugated peptide dendrimers-based nanoparticulate system for the delivery of chloroquine phosphate', *Biomaterials*, 28(22), pp. 3349–3359. doi: 10.1016/j.biomaterials.2007.04.004.
- Ahn, S. Y. et al.** (2017) 'Pivotal Role of Brain-Derived Neurotrophic Factor Secreted by Mesenchymal Stem Cells in Severe Intraventricular Hemorrhage in Newborn Rats', *Cell Transplantation*, 26(1), pp. 145–156. doi: 10.3727/096368916X692861.
- Akiyama, K. et al.** (2012) 'Characterization of bone marrow derived mesenchymal stem cells in suspension', *Stem Cell Research & Therapy*, 3(5), p. 40. doi: 10.1186/sct131.
- Alghamdi, H. S. et al.** (2014) 'Synergistic effects of bisphosphonate and calcium phosphate nanoparticles on peri-implant bone responses in osteoporotic rats', *Biomaterials*, 35(21), pp. 5482–5490. doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.03.069.
- Almeida, M. et al.** (2007) 'Skeletal involution by age-associated oxidative stress and its acceleration by loss of sex steroids', *Journal of Biological Chemistry*, 282(37), pp. 27285–27297. doi: 10.1074/jbc.M702810200.
- Altindag, O. et al.** (2008) 'Total oxidative/anti-oxidative status and relation to bone mineral density in osteoporosis', *Rheumatology International*, 28(4), pp. 317–321. doi: 10.1007/s00296-007-0452-0.
- Anderson, H. C.** (1995) 'Molecular Biology of Matrix Vesicles', *Clinical Orthopaedics and Related Research*, (314), pp. 266–80. doi: 10.1097/00003086-199505000-00034.
- Anderson, H. C.** (2003) 'Matrix vesicles and calcification', *Current rheumatology reports*, 5(3), pp. 222–226. doi: 10.1007/s11926-003-0071-z.
- Appelhans, D. et al.** (2015) 'Dendritic glycopolymers based on dendritic polyamine scaffolds: view on their synthetic approaches, characteristics and potential for biomedical applications', *Chemical Society Reviews*, 44(12), pp. 3968–3996. doi: 10.1039/C4CS00339J.
- Asharani, P. V. et al.** (2009) 'Cytotoxicity and Genotoxicity of Silver', *ACS Nano*, 3(2), pp. 279–290.
- Aueviriyavit, S. et al.** (2014) 'Mechanistic study on the biological effects of silver and gold nanoparticles in Caco-2 cells - Induction of the Nrf2/HO-1 pathway by high concentrations of silver nanoparticles', *Toxicology Letters*, 224(1), pp. 73–83. doi: 10.1016/j.toxlet.2013.09.020.
- Barbacid, M.** (1994) 'The Trk family of neurotrophin receptors', *Journal of Neurobiology*, 25(11), pp. 1386–1403. doi: 10.1002/neu.480251107.
- Barde, Y.-A.** (1990) 'The nerve growth factor family', *Progress in Growth Factor Research*, 2(4), pp. 237–248. doi: 10.1016/0955-2235(90)90021-B.
- Barde, Y. A. et al.** (1982) 'Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain.', *The EMBO Journal*, 1(5), pp. 549–553. doi: 10.1002/j.1460-2075.1982.tb01207.x.
- Bartsch, G. et al.** (2005) 'Propagation, Expansion, and Multilineage Differentiation of Human Somatic Stem Cells from Dermal Progenitors', *Stem Cells and Development*, 14(3), pp. 337–348. doi: 10.1089/scd.2005.14.337.
- Bellido, T. et al.** (1997) 'Activation of the Janus kinase/STAT (signal transducer and activator of transcription) signal transduction pathway by interleukin-6-type cytokines

promotes osteoblast differentiation', *Endocrinology*, 138(9), pp. 3666–3676. doi: 10.1210/endo.138.9.5364.

Bellido, T. et al. (1998) 'Transcriptional activation of the p21(WAF1,CIP1,SDI1) gene by interleukin-6 type cytokines: A prerequisite for their pro-differentiating and anti-apoptotic effects on human osteoblastic cells', *Journal of Biological Chemistry*, 273(33), pp. 21137–21144. doi: 10.1074/jbc.273.33.21137.

Benedetti, M. et al. (1993) 'Differential expression of nerve growth factor receptors leads to altered binding affinity and neurotrophin responsiveness.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(16), pp. 7859–7863. doi: 10.1073/pnas.90.16.7859.

Benjaminsen, R. V. et al. (2013) 'The possible "proton sponge " effect of polyethylenimine (PEI) does not include change in lysosomal pH', *Molecular Therapy*, 21(1), pp. 149–157. doi: 10.1038/mt.2012.185.

Berridge, M. V. et al. (2005) 'Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction', *Biotechnology Annual Review*, 11(SUPPL.), pp. 127–152. doi: 10.1016/S1387-2656(05)11004-7.

Beyerle, A. et al. (2010) 'Toxicity pathway focused gene expression profiling of PEI-based polymers for pulmonary applications', *Molecular Pharmaceutics*, 7(3), pp. 727–737. doi: 10.1021/mp900278x.

Bieber, T. et al. (2002) 'Intracellular route and transcriptional competence of polyethylenimine-DNA complexes', *Journal of Controlled Release*, 82(2–3), pp. 441–454. doi: 10.1016/S0168-3659(02)00129-3.

Blair, H. C. et al. (1986) 'Isolated osteoclasts resorb the organic and inorganic components of bone', *Journal of Cell Biology*, 102(4), pp. 1164–1172. doi: 10.1083/jcb.102.4.1164.

Blair, H. C. et al. (1989) 'Osteoclastic bone resorption by a polarized vacuolar proton pump.', *Science*, 245(4920), pp. 855–857. doi: 10.1126/science.2528207.

Blanchard, F. et al. (2009) 'The dual role of IL-6-type cytokines on bone remodeling and bone tumors', *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 20(1), pp. 19–28. doi: 10.1016/j.cytogfr.2008.11.004.

Boon, C. H. et al. (2004) 'Strategies for directing the differentiation of stem cells into the osteogenic lineage in vitro', *Journal of Bone and Mineral Research*, 19(9), pp. 1379–1394. doi: 10.1359/JBMR.040714.

Bosco, R. et al. (2015) 'Hydroxyapatite nanocrystals functionalized with alendronate as bioactive components for bone implant coatings to decrease osteoclastic activity', *Applied Surface Science*, 328, pp. 516–524. doi: 10.1016/j.apsusc.2014.12.072.

Boussif, O. et al. (1995) 'A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(16), pp. 7297–301. doi: 10.1073/pnas.92.16.7297.

Braithwaite, R. S. et al. (2003) 'Estimating hip fracture morbidity, mortality and costs', *Journal of the American Geriatrics Society*, 51(3), pp. 364–370. doi: 10.1046/j.1532-5415.2003.51110.x.

Brohlin, M. et al. (2012) 'Aging Effect on Neurotrophic Activity of Human Mesenchymal Stem Cells', *PLoS ONE*. Edited by P. Rameshwar, 7(9), p. e45052. doi: 10.1371/journal.pone.0045052.

Byun, J.-H. et al. (2017) 'The Efficacy of Bisphosphonates for Prevention of Osteoporotic Fracture: An Update Meta-analysis.', *Journal of bone metabolism*, 24(1), pp. 37–49. doi: 10.11005/jbm.2017.24.1.37.

Cagno, V. et al. (2018) 'Broad-spectrum non-toxic antiviral nanoparticles with a virucidal inhibition mechanism', *Nature Materials*, 17(2), pp. 195–203. doi: 10.1038/NMAT5053.

Cai, Z. et al. (2014) 'Plasma membrane translocation of trimerized MLKL protein is required for TNF-induced necroptosis', *Nature Cell Biology*, 16(1), pp. 55–65. doi: 10.1038/ncb2883.

- Calarco, A. et al.** (2013) 'The genotoxicity of PEI-based nanoparticles is reduced by acetylation of polyethylenimine amines in human primary cells', *Toxicology Letters*, 218(1), pp. 10–17. doi: 10.1016/j.toxlet.2012.12.019.
- Caliceti, P. and Veronese, F. M.** (2003) 'Pharmacokinetic and biodistribution properties of poly(ethylene glycol)-protein conjugates', *Advanced Drug Delivery Reviews*. Elsevier, pp. 1261–1277. doi: 10.1016/S0169-409X(03)00108-X.
- Cao, Y. et al.** (2017) 'A review of endoplasmic reticulum (ER) stress and nanoparticle (NP) exposure', *Life Sciences*. Pergamon, pp. 33–42. doi: 10.1016/j.lfs.2017.08.003.
- Caplan, A. I.** (1991) 'Mesenchymal stem cells', *Journal of Orthopaedic Research*, 9(5), pp. 641–650. doi: 10.1002/jor.1100090504.
- Casademunt, E. et al.** (1999) 'The zinc finger protein NRIF interacts with the neurotrophin receptor p75NTR and participates in programmed cell death', *EMBO Journal*, 18(21), pp. 6050–6061. doi: 10.1093/emboj/18.21.6050.
- Castan, L. et al.** (2018) 'Comparative study of cytotoxicity and genotoxicity of commercial Jeffamines® and polyethylenimine in CHO-K1 cells', *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, 106(2), pp. 742–750. doi: 10.1002/jbm.b.33882.
- Charyeva, O. et al.** (2016) 'Biocompatibility of magnesium implants in primary human reaming debris-derived cells stem cells in vitro', *Journal of Orthopaedics and Traumatology*, 17(1), pp. 63–73. doi: 10.1007/s10195-015-0364-9.
- Chen, B. L. et al.** (2015) 'CCAAT-Enhancer-Binding Protein Homologous Protein Deficiency Attenuates Oxidative Stress and Renal Ischemia-Reperfusion Injury', *Antioxidants and Redox Signaling*, 23(15), pp. 1233–1245. doi: 10.1089/ars.2013.5768.
- Chen, G. et al.** (2007) 'Brain-derived neurotrophic factor suppresses tunicamycin-induced upregulation of CHOP in neurons', *Journal of Neuroscience Research*, 85(8), pp. 1674–1684. doi: 10.1002/jnr.21292.
- Chen, H. Z. et al.** (2009) 'Emerging roles of E2Fs in cancer: An exit from cell cycle control', *Nature Reviews Cancer*, 9(11), pp. 785–797. doi: 10.1038/nrc2696.
- Chen, P. et al.** (2016) 'Neddylolation inhibition activates the extrinsic apoptosis pathway through ATF4-CHOP-DR5 axis in human esophageal cancer cells', *Clinical Cancer Research*, 22(16), pp. 4145–4157. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-2254.
- Chen, X. et al.** (2014) 'Translocation of mixed lineage kinase domain-like protein to plasma membrane leads to necrotic cell death', *Cell Research*, 24(1), pp. 105–121. doi: 10.1038/cr.2013.171.
- Chen, Y.-M. et al.** (2017) 'Tocilizumab potentially prevents bone loss in patients with anticitrullinated protein antibody-positive rheumatoid arthritis.', *PloS one*, 12(11), p. e0188454. doi: 10.1371/journal.pone.0188454.
- Cherian, P. P.** (2005) 'Mechanical Strain Opens Connexin 43 Hemichannels in Osteocytes: A Novel Mechanism for the Release of Prostaglandin', *Molecular Biology of the Cell*, 16(7), pp. 3100–3106. doi: 10.1091/mbc.E04-10-0912.
- Chittka, A. and Chao, M. V.** (1999) 'Identification of a zinc finger protein whose subcellular distribution is regulated by serum and nerve growth factor.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(19), pp. 10705–10710. doi: 10.1073/PNAS.96.19.10705.
- Choi, Y. J. et al.** (2010) 'Enhancing trophic support of mesenchymal stem cells by ex vivo treatment with trophic factors', *Journal of the Neurological Sciences*, 298(1–2), pp. 28–34. doi: 10.1016/J.JNS.2010.09.003.
- Churg, A. et al.** (1998) 'Comparison of the uptake of fine and ultrafine TiO₂ in a tracheal explant system.', *The American journal of physiology*, 274(1 Pt 1), pp. L81-6. doi: 10.1152/ajplung.1998.274.1.L81.
- Cirrik, S. et al.** (2019) 'Renal response to tunicamycin-induced endoplasmic reticulum stress in BDNF heterozygous mice', *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 28(9), pp. 1161–1170. doi: 10.17219/acem/100647.
- Cirrik, S. et al.** (2019) 'Endoplasmic reticulum stress in the livers of BDNF

heterozygous knockout mice', *Archives of Physiology and Biochemistry*, 125(4), pp. 378–386. doi: 10.1080/13813455.2018.1489850.

Colter, D. C. et al. (2001) 'Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(14), pp. 7841–7845. doi: 10.1073/pnas.141221698.

Coulter, W. (1953) 'Means for counting particles suspended in a fluid. 1953', *U.S. Patent 2,656,508* (1953). doi: www.google.com/patents/US2656508.

Csak, T. et al. (2011) 'Mitochondrial antiviral signaling protein defect links impaired antiviral response and liver injury in steatohepatitis in mice', *Hepatology*, 53(6), pp. 1917–1931. doi: 10.1002/hep.24301.

Cubillos-Ruiz, J. R. et al. (2009) 'Polyethylenimine-based siRNA nanocomplexes reprogram tumor-associated dendritic cells via TLR5 to elicit therapeutic antitumor immunity', *Journal of Clinical Investigation*, 119(8), pp. 2231–2244. doi: 10.1172/JCI37716.

Dabbaghi, M. et al. (2017) 'Evaluating polyethyleneimine/DNA nanoparticles-mediated damage to cellular organelles using endoplasmic reticulum stress profile', *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, 2 January, pp. 1–8. doi: 10.1080/21691401.2017.1304406.

Datta, H. K. et al. (2008) 'The cell biology of bone metabolism', *Journal of Clinical Pathology*. BMJ Publishing Group, pp. 577–587. doi: 10.1136/jcp.2007.048868.

Degterev, A. et al. (2005) 'Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury', *Nature Chemical Biology*, 1(2), pp. 112–119. doi: 10.1038/nchembio711.

Delaissé, J. M. et al. (2003) 'Matrix metalloproteinases (MMP) and cathepsin K contribute differently to osteoclastic activities', *Microscopy Research and Technique*, 61(6), pp. 504–513. doi: 10.1002/jemt.10374.

Delorme, B. et al. (2008) 'Specific plasma membrane protein phenotype of culture-amplified and native human bone marrow mesenchymal stem cells', *Blood*, 111(5), pp. 2631–2635. doi: 10.1182/blood-2007-07-099622.

Diebold, S. S. et al. (1999) 'Mannose polyethylenimine conjugates for targeted DNA delivery into dendritic cells', *Journal of Biological Chemistry*, 274(27), pp. 19087–19094. doi: 10.1074/jbc.274.27.19087.

Dominici, M. et al. (2006) 'Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement', *Cytotherapy*, 8(4), pp. 315–317. doi: 10.1080/14653240600855905.

Doty, S. B. (1981) 'Morphological evidence of gap junctions between bone cells.', *Calcified tissue international*, 33(5), pp. 509–512. doi: 10.1007/BF02409482.

Doyle, M. E. and Jan de Beur, S. M. (2008) 'The skeleton: Endocrine regulator of phosphate homeostasis', *Current Osteoporosis Reports*, pp. 134–141. doi: 10.1007/s11914-008-0024-6.

Duplomb, L. et al. (2008) 'Interleukin-6 inhibits receptor activator of nuclear factor κ B ligand-induced osteoclastogenesis by diverting cells into the macrophage lineage: Key role of serine727 phosphorylation of signal transducer and activator of transcription 3', *Endocrinology*, 149(7), pp. 3688–3697. doi: 10.1210/en.2007-1719.

Eom, H. J. and Choi, J. (2009) 'Oxidative stress of CeO₂ nanoparticles via p38-Nrf-2 signaling pathway in human bronchial epithelial cell, Beas-2B', *Toxicology Letters*, 187(2), pp. 77–83. doi: 10.1016/j.toxlet.2009.01.028.

Erices, A. et al. (2002) 'Gp130 Activation By Soluble Interleukin-6 Receptor/Interleukin-6 Enhances Osteoblastic Differentiation of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells', *Experimental Cell Research*, 280(1), pp. 24–32. doi: 10.1006/excr.2002.5627.

Ernsberger, U. (2009) 'Role of neurotrophin signalling in the differentiation of neurons from dorsal root ganglia and sympathetic ganglia', *Cell and Tissue Research*. Springer-Verlag, pp. 349–384. doi: 10.1007/s00441-009-0784-z.

- Ershler, W. B. and Keller, E. T.** (2000) 'Age-Associated Increased Interleukin-6 Gene Expression, Late-Life Diseases, and Frailty', *Annual Review of Medicine*, 51(1), pp. 245–270. doi: 10.1146/annurev.med.51.1.245.
- Everts, V. et al.** (1992) 'Degradation of collagen in the bone-resorbing compartment underlying the osteoclast involves both cysteine-proteinases and matrix metalloproteinases', *Journal of Cellular Physiology*, 150(2), pp. 221–231. doi: 10.1002/jcp.1041500202.
- Fajac, I. et al.** (2003) 'Uptake of plasmid/glycosylated polymer complexes and gene transfer efficiency in differentiated airway epithelial cells', *Journal of Gene Medicine*, 5(1), pp. 38–48. doi: 10.1002/jgm.318.
- Feng, X. et al.** (2018) 'Long non-coding RNA BDNF-AS modulates osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells', *Molecular and Cellular Biochemistry*, 445(1–2), pp. 59–65. doi: 10.1007/s11010-017-3251-2.
- Ferrari, S. L. et al.** (2001) 'A functional polymorphic variant in the interleukin-6 gene promoter associated with low bone resorption in postmenopausal women.', *Arthritis and rheumatism*, 44(1), pp. 196–201. doi: 10.1002/1529-0131(200101)44:1<196::AID-ANR26>3.0.CO;2-5.
- Feynman, R. P.** (1960) 'There's Plenty of Room at the Bottom', *CaltechES*, 23(5), pp. 22–36. Available at: <http://calteches.library.caltech.edu/1976/1/1960Bottom.pdf> (Accessed: 25 May 2018).
- Fischer, D. et al.** (2003) 'In vitro cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis', *Biomaterials*, 24, pp. 1121–1131. doi: 10.1016/S0142-9612(02)00445-3.
- Florencio-Silva, R. et al.** (2015) 'Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells', *BioMed Research International*, 2015, pp. 1–17. doi: 10.1155/2015/421746.
- Franz-Odenaal, T. A. et al.** (2006) 'Buried alive: How osteoblasts become osteocytes', *Developmental Dynamics*. Wiley-Blackwell, pp. 176–190. doi: 10.1002/dvdy.20603.
- Fricain, J. C. et al.** (2013) 'A nano-hydroxyapatite - Pullulan/dextran polysaccharide composite macroporous material for bone tissue engineering', *Biomaterials*, 34(12), pp. 2947–2959. doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.01.049.
- Friedenstein, A. J. et al.** (1968) 'Heterotopic transplants of bone marrow', *Transplantation*, pp. 230–247. doi: 10.1097/00007890-196803000-00009.
- Friedman, A. et al.** (2013) 'The Smart Targeting of Nanoparticles', *Current Pharmaceutical Design*, 19(35), pp. 6315–6329. doi: 10.2174/13816128113199990375.
- Genetos, D. C. et al.** (2007) 'Oscillating fluid flow activation of gap junction hemichannels induces ATP release from MLO-Y4 osteocytes', *Journal of Cellular Physiology*, 212(1), pp. 207–214. doi: 10.1002/jcp.21021.
- Giaever, I. and Keese, C. R.** (1993) 'A morphological biosensor for mammalian cells', *Nature*, 366(6455), pp. 591–592. doi: 10.1038/366591a0.
- Giner, M. et al.** (2009) 'RANKL/OPG in primary cultures of osteoblasts from post-menopausal women. Differences between osteoporotic hip fractures and osteoarthritis', *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 113(1–2), pp. 46–51. doi: 10.1016/j.jsbmb.2008.11.005.
- Girasole, G. et al.** (1992) '17 beta-estradiol inhibits interleukin-6 production by bone marrow-derived stromal cells and osteoblasts in vitro: a potential mechanism for the antiosteoporotic effect of estrogens.', *The Journal of clinical investigation*, 89(3), pp. 883–891. doi: 10.1172/JCI115668.
- Gong, T. et al.** (2015) 'Nanomaterials and bone regeneration', *Bone Research*. Nature Publishing Group, p. 15029. doi: 10.1038/boneres.2015.29.
- Gradishar, W. J.** (2006) 'Albumin-bound paclitaxel: a next-generation taxane', *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 7(8), pp. 1041–1053. doi: 10.1517/14656566.7.8.1041.
- Gref, R. et al.** (2000) "Stealth" corona-core nanoparticles surface modified by

- polyethylene glycol (PEG): Influences of the corona (PEG chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption', *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 18(3–4), pp. 301–313. doi: 10.1016/S0927-7765(99)00156-3.
- Grosse, S. et al.** (2005) 'Potocytosis and cellular exit of complexes as cellular pathways for gene delivery by polycations', *Journal of Gene Medicine*, 7(10), pp. 1275–1286. doi: 10.1002/jgm.772.
- Gui, S. et al.** (2013) 'Renal injury and Nrf2 modulation in mouse kidney following chronic exposure to TiO₂ nanoparticles', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(37), pp. 8959–8968. doi: 10.1021/jf402387e.
- Gupta, S. et al.** (2006) 'Isolation and Characterization of Kidney-Derived Stem Cells', *Journal of the American Society of Nephrology*, 17(11), pp. 3028–3040. doi: 10.1681/ASN.2006030275.
- Hadji, P. et al.** (2013) 'The epidemiology of osteoporosis--Bone Evaluation Study (BEST): an analysis of routine health insurance data.', *Deutsches Ärzteblatt international*, 110(4), pp. 52–7. doi: 10.3238/arztebl.2013.0052.
- Hallböök, F. et al.** (1991) 'Evolutionary studies of the nerve growth factor family reveal a novel member abundantly expressed in xenopus ovary', *Neuron*, 6(5), pp. 845–858. doi: 10.1016/0896-6273(91)90180-8.
- Han, D. et al.** (2009) 'IRE1 α Kinase Activation Modes Control Alternate Endoribonuclease Outputs to Determine Divergent Cell Fates', *Cell*, 138(3), pp. 562–575. doi: 10.1016/j.cell.2009.07.017.
- Harmer, D. et al.** (2019) 'Interleukin-6 interweaves the bone marrow microenvironment, bone loss, and multiple myeloma', *Frontiers in Endocrinology*, 10(JAN), pp. 1–15. doi: 10.3389/fendo.2018.00788.
- Harvanová, D. et al.** (2011) 'Isolation and Characterization of Synovial Mesenchymal Stem Cells', *Folia Biologica (Praha)*, 57(3), pp. 119–124. doi: FB2011A0018 [pii].
- Häussler, B. et al.** (2007) 'Epidemiology, treatment and costs of osteoporosis in Germany--the BoneEVA Study.', *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*, 18(1), pp. 77–84. doi: 10.1007/s00198-006-0206-y.
- He, S. et al.** (2009) 'Receptor Interacting Protein Kinase-3 Determines Cellular Necrotic Response to TNF- α ', *Cell*, 137(6), pp. 1100–1111. doi: 10.1016/j.cell.2009.05.021.
- He, S. et al.** (2011) 'Toll-like receptors activate programmed necrosis in macrophages through a receptor-interacting kinase-3-mediated pathway', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(50), pp. 20054–20059. doi: 10.1073/pnas.1116302108.
- He, S. et al.** (2015) 'Effect of Brain-Derived Neurotrophic Factor on Mesenchymal Stem Cell-Seeded Electrospinning Biomaterial for Treating Ischemic Diabetic Ulcers via Milieu-Dependent Differentiation Mechanism', *Tissue Engineering Part A*, 21(5–6), pp. 928–938. doi: 10.1089/ten.tea.2014.0113.
- Heinrich, P. C. et al.** (1990) 'Interleukin-6 and the acute phase response', *Biochemical Journal*, 265(3), pp. 621–636. doi: 10.1042/bj2650621.
- Holler, N. et al.** (2000) 'Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule.', *Nature immunology*, 1(6), pp. 489–495. doi: 10.1038/82732.
- Hong, S. et al.** (2006) 'Interaction of polycationic polymers with supported lipid bilayers and cells: Nanoscale hole formation and enhanced membrane permeability', *Bioconjugate Chemistry*, 17(3), pp. 728–734. doi: 10.1021/bc060077y.
- Hu, Y. et al.** (2003) 'Isolation and identification of mesenchymal stem cells from human fetal pancreas', *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 141(5), pp. 342–349. doi: 10.1016/S0022-2143(03)00022-2.
- Hu, Y. et al.** (2010) 'Layer-by-layer assembly of β -estradiol loaded mesoporous silica

nanoparticles on titanium substrates and its implication for bone homeostasis', *Advanced Materials*, 22(37), pp. 4146–4150. doi: 10.1002/adma.201000854.

Huang, D. M. et al. (2009) 'The promotion of human mesenchymal stem cell proliferation by superparamagnetic iron oxide nanoparticles', *Biomaterials*, 30(22), pp. 3645–3651. doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.03.032.

Huang, E. J. and Reichardt, L. F. (2003) 'Trk Receptors: Roles in Neuronal Signal Transduction', *Annual Review of Biochemistry*, 72(1), pp. 609–642. doi: 10.1146/annurev.biochem.72.121801.161629.

Hwang, M. E. et al. (2015) 'Dependence of PEI and PAMAM gene delivery on clathrin- and caveolin-dependent trafficking pathways', *Pharmaceutical Research*, 32(6), pp. 2051–2059. doi: 10.1007/s11095-014-1598-6.

Hyeon, S. et al. (2013) 'Nrf2 deficiency induces oxidative stress and promotes RANKL-induced osteoclast differentiation', *Free Radical Biology and Medicine*, 65, pp. 789–799. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.08.005.

International, A. (2006) "Terminology for Nanotechnology.", ASTM E 2456-06.

Ip, N. Y. et al. (1992) 'Mammalian neurotrophin-4: structure, chromosomal localization, tissue distribution, and receptor specificity.', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(7), pp. 3060–3064. doi: 10.1073/pnas.89.7.3060.

Janaszewska, A. et al. (2019) 'Cytotoxicity of dendrimers', *Biomolecules*, 9(8), pp. 1–23. doi: 10.3390/biom9080330.

Jevprasesphant, R. et al. (2003) 'The influence of surface modification on the cytotoxicity of PAMAM dendrimers', *International Journal of Pharmaceutics*, 252(1–2), pp. 263–266. doi: 10.1016/S0378-5173(02)00623-3.

Jian, Z. et al. (1996) 'Activation of Ras and protection from apoptotic cell death by BDNF in PC12 cells expressing TrkB', *Cellular Signalling*, 8(5), pp. 365–370. doi: 10.1016/0898-6568(96)00069-1.

Jilka, R. L. et al. (1998) 'Osteoblast programmed cell death (apoptosis): Modulation by growth factors and cytokines', *Journal of Bone and Mineral Research*, 13(5), pp. 793–802. doi: 10.1359/jbmr.1998.13.5.793.

Johnell, O. and Kanis, J. A. (2004) 'An estimate of the worldwide prevalence, mortality and disability associated with hip fracture', *Osteoporosis International*, 15(11), pp. 897–902. doi: 10.1007/s00198-004-1627-0.

Johnson, D. et al. (1986) 'Expression and structure of the human NGF receptor', *Cell*, 47(4), pp. 545–554. doi: 10.1016/0092-8674(86)90619-7.

Johnson, R. W. et al. (2015) 'Glycoprotein130 (Gp130)/interleukin-6 (IL-6) signalling in osteoclasts promotes bone formation in periosteal and trabecular bone', *Bone*, 81, pp. 343–351. doi: 10.1016/j.bone.2015.08.005.

Kajiya, M. et al. (2008) 'Brain-derived neurotrophic factor stimulates bone/cementum-related protein gene expression in cementoblasts.', *The Journal of biological chemistry*, 283(23), pp. 16259–67. doi: 10.1074/jbc.M800668200.

Kanis, J. A. et al. (1994) 'The diagnosis of osteoporosis', *Journal of Bone and Mineral Research*, 9(8), pp. 1137–1141. doi: 10.1002/jbmr.5650090802.

Kanis, J. A. et al. (2000) 'Risk of hip fracture according to the World Health Organization criteria for osteopenia and osteoporosis', *Bone*, 27(5), pp. 585–590. doi: 10.1016/S8756-3282(00)00381-1.

Kaplan, D. R. et al. (1991) 'The trk proto-oncogene product: A signal transducing receptor for nerve growth factor', *Science*, 252(5005), pp. 554–558. doi: 10.1126/science.1850549.

Khursigara, G. et al. (2001) 'A prosurvival function for the p75 receptor death domain mediated via the caspase recruitment domain receptor-interacting protein 2', *Journal of Neuroscience*, 21(1529-2401 LA-eng), pp. 5854–5863. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2111-01.2001.

Khursigara, G. et al. (1999) 'Association of the p75 neurotrophin receptor with TRAF6.', *The Journal of biological chemistry*, 274(5), pp. 2597–600. doi: 10.1074/JBC.274.5.2597.

Kiernan, J. et al. (2016) 'Systemic Mesenchymal Stromal Cell Transplantation

Prevents Functional Bone Loss in a Mouse Model of Age-Related Osteoporosis', *STEM CELLS Translational Medicine*, 5(5), pp. 683–693. doi: 10.5966/sctm.2015-0231.

Kilian, O. et al. (2014) 'BDNF and its TrkB receptor in human fracture healing', *Annals of Anatomy*, 196(5), pp. 286–295. doi: 10.1109/ISAPM.1998.664448.

Kim, C. H. et al. (1997) 'Lack of autocrine effects of IL-6 on human bone marrow stromal osteoprogenitor cells', *Endocrine Research*, 23(3), pp. 181–190. doi: 10.3109/07435809709031852.

Kishimoto, T. (1988) 'The Biology of Interleukin-6', *Blood*, 71(1), pp. 1–8.

Knothe Tate, M. L. et al. (2004) 'The osteocyte', *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. Pergamon, pp. 1–8. doi: 10.1016/S1357-2725(03)00241-3.

Kokesch-Himmelreich, J. et al. (2013) 'ToF-SIMS analysis of osteoblast-like cells and their mineralized extracellular matrix on strontium enriched bone cements', *Biointerphases*, 8(1), p. 17. doi: 10.1186/1559-4106-8-17.

Kolhatkar, R. B. et al. (2007) 'Surface acetylation of polyamidoamine (PAMAM) dendrimers decreases cytotoxicity while maintaining membrane permeability', *Bioconjugate Chemistry*, 18(6), pp. 2054–2060. doi: 10.1021/bc0603889.

Kopatz, I. et al. (2004) 'A model for non-viral gene delivery: through syndecan adhesion molecules and powered by actin.', *The journal of gene medicine*, 6(7), pp. 769–776. doi: 10.1002/jgm.558.

Korenykh, A. and Walter, P. (2012) 'Structural Basis of the Unfolded Protein Response', *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 28(1), pp. 251–277. doi: 10.1146/annurev-cellbio-101011-155826.

Korn, T. et al. (2009) 'IL-17 and Th17 Cells', *Annual Review of Immunology*, 27(1), pp. 485–517. doi: 10.1146/annurev.immunol.021908.132710.

Korte, M. et al. (1995) 'Hippocampal long-term potentiation is impaired in mice lacking brain-derived neurotrophic factor.', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(19), pp. 8856–8860. doi: 10.1073/pnas.92.19.8856.

Kou, L. et al. (2018) 'Transporter-guided delivery of nanoparticles to improve drug permeation across cellular barriers and drug exposure to selective cell types', *Frontiers in Pharmacology*. Frontiers, pp. 1–16. doi: 10.3389/fphar.2018.00027.

Krajewska, M. et al. (1998) 'TRAF-4 expression in epithelial progenitor cells. Analysis in normal adult, fetal, and tumor tissues.', *The American journal of pathology*, 152(6), pp. 1549–61. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9626059> (Accessed: 11 December 2018).

Kramer, P. R. et al. (2004) '17 β -estradiol regulates cytokine release through modulation of CD16 expression in monocytes and monocyte-derived macrophages', *Arthritis and Rheumatism*, 50(6), pp. 1967–1975. doi: 10.1002/art.20309.

Krampera, M., Sartoris, S., et al. (2007a) 'Immune Regulation by Mesenchymal Stem Cells Derived from Adult Spleen and Thymus', *Stem Cells and Development*, 16(5), pp. 797–810. doi: 10.1089/scd.2007.0024.

Krampera, M., Marconi, S., et al. (2007b) 'Induction of neural-like differentiation in human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, fat, spleen and thymus', *Bone*, 40(2), pp. 382–390. doi: 10.1016/j.bone.2006.09.006.

Kurihara, N. (1989) 'Generation of osteoclasts from isolated hematopoietic progenitor cells', *Blood*, 74(4), pp. 1295–1302. Available at: <http://www.bloodjournal.org/content/bloodjournal/74/4/1295.full.pdf?sso-checked=true> (Accessed: 6 March 2018).

Lakkakorpi, P. et al. (1989) 'Organization of osteoclast microfilaments during the attachment to bone surface in vitro', *Journal of Bone and Mineral Research*, 4(6), pp. 817–825. doi: 10.1002/jbmr.5650040605.

Laurenzi, M. A. et al. (1998) 'Expression of mRNA encoding neurotrophins and neurotrophin receptors in human granulocytes and bone marrow cells-enhanced neurotrophin-4 expression induced by LTB₄', *Journal of Leukocyte Biology*, 64(2), pp. 228–234. doi: 10.1002/jlb.64.2.228.

- Lautenschläger, F. S.** (2017) *Einfluss von Maltose-modifizierten Polyethylenimin-Nanopartikeln auf mesenchymale Stammzellen und Osteoblasten.*
- Lautenschläger, S. et al.** (2015) 'Effects of dendritic core-shell glycoarchitectures on primary mesenchymal stem cells and osteoblasts obtained from different human donors', *Journal of Nanobiotechnology*, 13(1), p. 65. doi: 10.1186/s12951-015-0128-y.
- Lean, J. M. et al.** (1995) 'Increased insulin-like growth factor I mRNA expression in rat osteocytes in response to mechanical stimulation.', *The American journal of physiology*, 268(2 Pt 1), pp. E318-27. doi: 10.1152/ajpendo.1995.268.2.E318.
- Lee, C. C. et al.** (2005) 'Designing dendrimers for biological applications', *Nature Biotechnology*. Nature Publishing Group, pp. 1517-1526. doi: 10.1038/nbt1171.
- Leroueil, P. R. et al.** (2008) 'Wide varieties of cationic nanoparticles induce defects in supported lipid bilayers', *Nano Letters*, 8(2), pp. 420-424. doi: 10.1021/nl0722929.
- Levi-Montalcini, R. and Hamburger, V.** (1951) 'Selective growth stimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and sympathetic nervous system of the chick embryo', *Journal of Experimental Zoology*, 116(2), pp. 321-361. doi: 10.1002/jez.1401160206.
- Li, A. W. et al.** (2018a) 'A facile approach to enhance antigen response for personalized cancer vaccination.', *Nature materials*, 17(6), pp. 528-534. doi: 10.1038/s41563-018-0028-2.
- Li, H. et al.** (2018b) 'Lutein suppresses oxidative stress and inflammation by Nrf2 activation in an osteoporosis rat model', *Medical Science Monitor*, 24, pp. 5071-5075. doi: 10.12659/MSM.908699.
- Lips, P. and van Schoor, N. M.** (2005) 'Quality of life in patients with osteoporosis.', *Osteoporosis international*. Springer-Verlag, pp. 447-455. doi: 10.1007/s00198-004-1762-7.
- Liu, J. et al.** (2012) 'A functional haplotype in EIF2AK3, an ER stress sensor, is associated with lower bone mineral density', *Journal of Bone and Mineral Research*, 27(2), pp. 331-341. doi: 10.1002/jbmr.549.
- Liu, Q. et al.** (2018) 'Effect of Brain-Derived Neurotrophic Factor on the Neurogenesis and Osteogenesis in Bone Engineering', *Tissue Engineering Part A*, 24(15-16), pp. 1283-1292. doi: 10.1089/ten.tea.2017.0462.
- Liu, W. et al.** (2013) 'Hyperglycemia induces endoplasmic reticulum stress-dependent CHOP expression in osteoblasts', *Experimental and Therapeutic Medicine*, 5(5), pp. 1289-1292. doi: 10.3892/etm.2013.978.
- Liu, X. H. et al.** (2005) 'Cross-talk between the interleukin-6 and prostaglandin E2 signaling systems results in enhancement of osteoclastogenesis through effects on the osteoprotegerin/receptor activator of nuclear factor- κ B (RANK) ligand/RANK system', *Endocrinology*, 146(4), pp. 1991-1998. doi: 10.1210/en.2004-1167.
- Liu, Y. et al.** (2009) 'Segmental bone regeneration using an rhBMP-2-loaded gelatin/nanohydroxyapatite/fibrin scaffold in a rabbit model', *Biomaterials*, 30(31), pp. 6276-6285. doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.08.003.
- Lorenzetti, M. et al.** (2015) 'Enhanced osteogenesis on titanium implants by UVB photofunctionalization of hydrothermally grown TiO₂ coatings', *Journal of Biomaterials Applications*, 30(1), pp. 71-84. doi: 10.1177/0885328215569091.
- Lorenzo, J. et al.** (2008) 'Osteoimmunology: Interactions of the bone and immune system', *Endocrine Reviews*. Oxford University Press, pp. 403-440. doi: 10.1210/er.2007-0038.
- Loutit, J. F. and Nisbet, N. W.** (1982) 'The Origin of Osteoclasts', *Immunobiology*, 161(3-4), pp. 193-203. doi: 10.1016/S0171-2985(82)80074-0.
- Lu, M. et al.** (2014) 'Opposing unfolded-protein-response signals converge on death receptor 5 to control apoptosis', *Science*, 345(6192), pp. 98-101. doi: 10.1126/science.1254312.
- Luedde, M. et al.** (2014) 'RIP3, a kinase promoting necroptotic cell death, mediates adverse remodelling after myocardial infarction', *Cardiovascular Research*, 103(2), pp. 206-216. doi: 10.1093/cvr/cvu146.
- Lundberg, A. S. and Weinberg, R. A.** (1998) 'Functional Inactivation of the

- Retinoblastoma Protein Requires Sequential Modification by at Least Two Distinct Cyclin-cdk Complexes', *Molecular and Cellular Biology*, 18(2), pp. 753–761. doi: 10.1128/mcb.18.2.753.
- Mahmoudi, M. et al.** (2011) 'Effect of nanoparticles on the cell life cycle', *Chemical Reviews*, 111(5), pp. 3407–3432. doi: 10.1021/cr1003166.
- Maisonpierre, P. C. et al.** (1990) 'Neurotrophin-3: A neurotrophic factor related to NGF and BDNF', *Science*, 247(4949), pp. 1446–1451. doi: 10.1126/science.2321006.
- Malaval, L. et al.** (2005) 'GP130/OSMR is the only LIF/IL-6 family receptor complex to promote osteoblast differentiation of calvaria progenitors.', *Journal of cellular physiology*, 204(2), pp. 585–593. doi: 10.1002/jcp.20312.
- Malik, N. et al.** (2000) 'Dendrimers: Relationship between structure and biocompatibility in vitro, and preliminary studies on the biodistribution of 125I-labelled polyamidoamine dendrimers in vivo', *Journal of Controlled Release*, 65(1–2), pp. 133–148. doi: 10.1016/S0168-3659(99)00246-1.
- Manolagas, S. C.** (2000) 'Birth and Death of Bone Cells: Basic Regulatory Mechanisms and Implications for the Pathogenesis and Treatment of Osteoporosis 1', *Endocrine Reviews*, 21(2), pp. 115–137. doi: 10.1210/edrv.21.2.0395.
- Manolagas, S. C.** (2006) 'Choreography from the Tomb: An Emerging Role of Dying Osteocytes in the Purposeful, and Perhaps Not So Purposeful, Targeting of Bone Remodeling', *International Bone and Mineral Society Knowledge Environment*, 3(1), pp. 5–14. doi: 10.1138/20060193.
- Manolagas, S. C.** (2010) 'From estrogen-centric to aging and oxidative stress: A revised perspective of the pathogenesis of osteoporosis', *Endocrine Reviews*. Oxford University Press, pp. 266–300. doi: 10.1210/er.2009-0024.
- Marks, S. C. and Walker, D. G.** (1981) 'The hematogenous origin of osteoclasts: Experimental evidence from osteopetrotic (microphthalmic) mice treated with spleen cells from beige mouse donors', *American Journal of Anatomy*, 161(1), pp. 1–10. doi: 10.1002/aja.1001610102.
- Marotti, G. et al.** (1992) 'A quantitative evaluation of osteoblast-osteocyte relationships on growing endosteal surface of rabbit tibiae', *Bone*, 13(5), pp. 363–368. doi: 10.1016/8756-3282(92)90452-3.
- Matsushime, H. et al.** (1994) 'D-type cyclin-dependent kinase activity in mammalian cells.', *Molecular and cellular biology*, 14(3), pp. 2066–76. doi: 10.1128/MCB.14.3.2066.
- McElreavey, K. D. et al.** (1991) 'Isolation, culture and characterisation of fibroblast-like cells derived from the Wharton's jelly portion of human umbilical cord', *Biochemical Society Transactions*, 19(1), pp. 29S–29S. doi: 10.1042/bst019029s.
- McQuade, T. et al.** (2013) 'Positive and negative phosphorylation regulates RIP1- and RIP3-induced programmed necrosis', *Biochemical Journal*, 456(3), pp. 409–415. doi: 10.1042/BJ20130860.
- Mecke, A. et al.** (2004) 'Direct observation of lipid bilayer disruption by poly(amidoamine) dendrimers', *Chemistry and Physics of Lipids*, 132(1), pp. 3–14. doi: 10.1016/j.chemphyslip.2004.09.001.
- Michael Berg, J. et al.** (2013) 'Comparative cytological responses of lung epithelial and pleural mesothelial cells following in vitro exposure to nanoscale SiO₂', *Toxicology in Vitro*, 27(1), pp. 24–33. doi: 10.1016/j.tiv.2012.09.002.
- Micheau, O. and Tschopp, J.** (2003) 'Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes', *Cell*, 114(2), pp. 181–190. doi: 10.1016/S0092-8674(03)00521-X.
- Michel, S. et al.** (2015) 'Inhibition of mitochondrial genome expression triggers the activation of CHOP-10 by a cell signaling dependent on the integrated stress response but not the mitochondrial unfolded protein response', *Mitochondrion*, 21, pp. 58–68. doi: 10.1016/j.mito.2015.01.005.
- Minichiello, L. et al.** (2002) 'Mechanism of TrkB-mediated hippocampal long-term potentiation', *Neuron*, 36(1), pp. 121–137. doi: 10.1016/S0896-6273(02)00942-X.

Mukai, J. et al. (2000) 'NADE, a p75NTR-associated cell death executor, is involved in signal transduction mediated by the common neurotrophin receptor p75NTR.', *The Journal of biological chemistry*, 275(23), pp. 17566–70. doi: 10.1074/jbc.C000140200.

Murakami, M. et al. (1993) 'IL-6-induced homodimerization of gp130 and associated activation of a tyrosine kinase', *Science*, 260(5115), pp. 1808–1810. doi: 10.1126/science.8511589.

Nabavi, S. et al. (2014) 'Engineering a memory with LTD and LTP', *Nature*, 511(7509), pp. 348–352. doi: 10.1038/nature13294.

Nakanishi, T. et al. (1994) 'Expression of nerve growth factor family neurotrophins in a mouse osteoblastic cell line', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 198(3), pp. 891–897. doi: 10.1006/bbrc.1994.1127.

Nel, A. et al. (2006) 'Toxic potential of materials at the nanolevel', *Science*, pp. 622–627. doi: 10.1126/science.1114397.

NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy, Diagnosis, and Therapy (2001) 'Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy', *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 285(6), pp. 785–795. doi: 10.1001/jama.285.6.785.

Oberdörster, G. et al. (2005) 'Nanotoxicology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles', *Environmental Health Perspectives*. National Institute of Environmental Health Science, pp. 823–839. doi: 10.1289/ehp.7339.

Otsuka, T. et al. (1991) 'The effects of interleukin 6 and interleukin 3 on early hematopoietic events in long-term cultures of human marrow.', *Experimental hematology*, 19(10), pp. 1042–1048.

Palazzini, S. et al. (1998) 'Stromal cell structure and relationships in perimedullary spaces of chick embryo shaft bones', *Anatomy and Embryology*, 197(5), pp. 349–357. doi: 10.1007/s004290050145.

Palmqvist, P. et al. (2002) '<Palmqvist-2002-IL-6, leukemia inhib.pdf>', 6(23).

Pan, Q. et al. (2011) 'Mobilization of hepatic mesenchymal stem cells from human liver grafts', *Liver Transplantation*, 17(5), pp. 596–609. doi: 10.1002/lt.22260.

Pardee, A. B. (1989) 'G1 events and regulation of cell proliferation', *Science*, 246(4930), pp. 603–608. doi: 10.1126/science.2683075.

Parfitt, A. M. (1994) 'Osteonal and hemi-osteonal remodeling: The spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone', *Journal of Cellular Biochemistry*, 55(3), pp. 273–286. doi: 10.1002/jcb.240550303.

Pauksch, L. et al. (2014) 'Biocompatibility of silver nanoparticles and silver ions in primary human mesenchymal stem cells and osteoblasts', *Acta Biomaterialia*, 10(1), pp. 439–449. doi: 10.1016/j.actbio.2013.09.037.

Paul, G. et al. (2012) 'The adult human brain harbors multipotent perivascular mesenchymal stem cells', *PLoS ONE*. Edited by B. Nelson, 7(4), p. e35577. doi: 10.1371/journal.pone.0035577.

Periasamy, V. S. et al. (2016) 'Aluminum oxide nanoparticles alter cell cycle progression through CCND1 and EGR1 gene expression in human mesenchymal stem cells', *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 63(3), pp. 320–327. doi: 10.1002/bab.1368.

Peruzzi, B. et al. (2012) 'C-Src and IL-6 inhibit osteoblast differentiation and integrate IGFBP5 signalling', *Nature Communications*, 3. doi: 10.1038/ncomms1651.

Petruzzo, A. et al. (2015) 'Functional characterization of biodegradable nanoparticles as antigen delivery system', *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 34(1), pp. 1–13. doi: 10.1186/s13046-015-0231-9.

Pfaffl, M. W. (2001) 'A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR', *Nucleic Acids Research*, 29(9), pp. 45e – 45. doi: 10.1093/nar/29.9.e45.

Pittenger, M. F. et al. (1999) 'Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells', *Science*, 284(5411), pp. 143–147. doi: 10.1126/science.284.5411.143.

Poli, V. et al. (1994) 'Interleukin-6 deficient mice are protected from bone loss caused by estrogen depletion.', *The EMBO journal*, 13(5), pp. 1189–1196.

- Poole, K. E. S.** (2005) 'Sclerostin is a delayed secreted product of osteocytes that inhibits bone formation', *The FASEB Journal*, 19(13), pp. 1842–1844. doi: 10.1096/fj.05-4221fje.
- Pricola, K. L. et al.** (2009) 'Interleukin-6 maintains bone marrow-derived mesenchymal stem cell stemness by an ERK1/2-dependent mechanism.', *Journal of cellular biochemistry*, 108(3), pp. 577–588. doi: 10.1002/jcb.22289.
- Pritchard, J. J.** (1952) 'A cytological and histochemical study of bone and cartilage formation in the rat', *J Anat.*, 86(1947), pp. 259–277. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12980877> (Accessed: 19 March 2018).
- Prockop, D. J. et al.** (2001) 'Isolation and characterization of rapidly self-renewing stem cells from cultures of human marrow stromal cells', *Cytherapy*, 3(5), pp. 393–396. doi: 10.1080/146532401753277229.
- Pu, F. et al.** (2016) 'Calcium intake, calcium homeostasis and health', *Food Science and Human Wellness*, 5(1), pp. 8–16. doi: 10.1016/j.fshw.2016.01.001.
- Qiu, B. et al.** (2013) 'CART attenuates endoplasmic reticulum stress response induced by cerebral ischemia and reperfusion through upregulating BDNF synthesis and secretion', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 436(4), pp. 655–659. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.05.142.
- Ramming, T. et al.** (2015) 'A PDI-catalyzed thiol-disulfide switch regulates the production of hydrogen peroxide by human Ero1', *Free Radical Biology and Medicine*, 83, pp. 361–372. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.02.011.
- Rana, K. et al.** (2018) 'Renal toxicity of nanoparticles of cadmium sulphide in rat', *Chemosphere*, 193, pp. 142–150. doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.11.011.
- Regnström, K. et al.** (2006) 'Gene expression profiles in mouse lung tissue after administration of two cationic polymers used for nonviral gene delivery', *Pharmaceutical Research*, 23(3), pp. 475–482. doi: 10.1007/s11095-006-9563-7.
- Rehman, Z. U. et al.** (2013) 'Mechanism of polyplex- and lipoplex-mediated delivery of nucleic acids: Real-time visualization of transient membrane destabilization without endosomal lysis', *ACS Nano*, 7(5), pp. 3767–3777. doi: 10.1021/nn3049494.
- Riekstina, U. et al.** (2008) 'Characterization of human skin-derived mesenchymal stem cell proliferation rate in different growth conditions', *Cytotechnology*, 58(3), pp. 153–162. doi: 10.1007/s10616-009-9183-2.
- Riggs, B. L. et al.** (1998) 'A unitary model for involutional osteoporosis: Estrogen deficiency causes both type I and type II osteoporosis in postmenopausal women and contributes to bone loss in aging men', *Journal of Bone and Mineral Research*, 13(5), pp. 763–773. doi: 10.1359/jbmr.1998.13.5.763.
- Robert Koch-Institut** (2014) *Faktenblatt zu GEDA 2012: Ergebnisse der Studie »Gesundheit in Deutschland aktuell 2012« Osteoporose Einleitung*. Berlin. Available at: https://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Gesundheitsberichterstattung/GBEDownloadsF/Geda2012/Osteoporose.pdf;jsessionid=BF316DD7F0FA0DC50EECD691CC981538.1_cid372?__blob=publicationFile (Accessed: 25 March 2018).
- Rodríguez-Tébar, A. et al.** (1992) 'Binding of neurotrophin-3 to its neuronal receptors and interactions with nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor.', *The EMBO journal*, 11(3), pp. 917–22. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1547788> (Accessed: 10 December 2018).
- Rodriguez-Tebar, A. et al.** (1990) 'Binding of brain-derived neurotrophic factor to the nerve growth factor receptor', *Neuron*, 4(4), pp. 487–492. doi: 10.1016/0896-6273(90)90107-Q.
- Roduner, E.** (2006) 'Size matters: why nanomaterials are different', *Chemical Society Reviews*, 35(7), p. 583. doi: 10.1039/b502142c.
- Ron, D. and Habener, J. F.** (1992) 'CHOP, a novel developmentally regulated nuclear protein that dimerizes with transcription factors C/EBP and LAP and functions as a dominant-negative inhibitor of gene transcription', *Genes & Development*, 6, pp. 439–453. doi: 10.1101/gad.6.3.439.

- Ron, D. and Walter, P.** (2007) 'Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(7), pp. 519–529. doi: 10.1038/nrm2199.
- Rose-John, S.** (2018) 'Interleukin-6 family cytokines', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 10(2), pp. 1–18. doi: 10.1101/cshperspect.a028415.
- Ross, D. et al.** (2000) 'NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1): Chemoprotection, bioactivation, gene regulation and genetic polymorphisms', *Chemico-Biological Interactions*, 129(1–2), pp. 77–97. doi: 10.1016/S0009-2797(00)00199-X.
- Salehi, A. H. et al.** (2000) 'NRAGE, A Novel MAGE Protein, Interacts with the p75 Neurotrophin Receptor and Facilitates Nerve Growth Factor–Dependent Apoptosis', *Neuron*, 27(2), pp. 279–288. doi: 10.1016/S0896-6273(00)00036-2.
- Salem, W. et al.** (2015) 'Antibacterial activity of silver and zinc nanoparticles against *Vibrio cholerae* and enterotoxigenic *Escherichia coli*', *International Journal of Medical Microbiology*, 305(1), pp. 85–95. doi: 10.1016/j.ijmm.2014.11.005.
- Sano, R. and Reed, J. C.** (2013) 'ER stress-induced cell death mechanisms', *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1833(12), pp. 3460–3470. doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.06.028.
- Scanu, M. et al.** (2011) 'Evaluation of the use of human Mesenchymal Stem Cells for acute toxicity tests', *Toxicology in Vitro*, 25(8), pp. 1989–1995. doi: 10.1016/j.tiv.2011.07.006.
- Schafer, K. A.** (1998) 'The Cell Cycle: A Review', *Veterinary Pathology*, 35(6), pp. 461–478. doi: 10.1177/030098589803500601.
- Schaffler, M. B. et al.** (2014) 'Osteocytes: Master orchestrators of bone', *Calcified Tissue International*. Springer US, pp. 5–24. doi: 10.1007/s00223-013-9790-y.
- Shyam, H. et al.** (2017) 'Mesenchymal stem cells in regenerative medicine: a new paradigm for degenerative bone diseases', *Regenerative Medicine*, 12(2), pp. 111–114. doi: 10.2217/rme-2016-0162.
- Siegel, D. et al.** (2004) 'NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1: role as a superoxide scavenger', *Mol Pharmacol.*, 65(5), pp. 1238–1247. Available at: <http://molpharm.aspetjournals.org> (Accessed: 14 February 2018).
- Silver, I. A. et al.** (1988) 'Microelectrode studies on the acid microenvironment beneath adherent macrophages and osteoclasts', *Experimental Cell Research*, 175(2), pp. 266–276. doi: 10.1016/0014-4827(88)90191-7.
- Singh, R. and W., L. J.** (2009) 'Nanoparticle-based targeted drug delivery', *Exp. Mol. Pathol.*, 86(3), pp. 215–223. doi: 10.1016/j.yexmp.2008.12.004. Nanoparticle-based.
- Skaper, S.** (2008) 'The Biology of Neurotrophins, Signalling Pathways, and Functional Peptide Mimetics of Neurotrophins and their Receptors', *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*, 7(1), pp. 46–62. doi: 10.2174/187152708783885174.
- Skillen, A. W.** (1984) 'Clinical biochemistry of lactate dehydrogenase', *Cell Biochemistry and Function*, 2(3), pp. 140–144. doi: 10.1002/cbf.290020304.
- Stanger, B. Z. et al.** (1995) 'RIP: A novel protein containing a death domain that interacts with Fas/APO-1 (CD95) in yeast and causes cell death', *Cell*, 81(4), pp. 513–523. doi: 10.1016/0092-8674(95)90072-1.
- Stasko, N. A. et al.** (2007) 'Cytotoxicity of polypropylenimine dendrimer conjugates on cultured endothelial cells', *Biomacromolecules*, 8(12), pp. 3853–3859. doi: 10.1021/bm7008203.
- Stefanowicz-Hajduk, J. and Ochocka, J. R.** (2020) 'Real-time cell analysis system in cytotoxicity applications: Usefulness and comparison with tetrazolium salt assays', *Toxicology Reports*, 7(February), pp. 335–344. doi: 10.1016/j.toxrep.2020.02.002.
- Stenbeck, G.** (2002) 'Formation and function of the ruffled border in osteoclasts', *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 13(4), pp. 285–292. doi: 10.1016/S1084952102000587.
- Stephens, R. M. et al.** (1994) 'Trk receptors use redundant signal transduction pathways involving SHC and PLC- γ 1 to mediate NGF responses', *Neuron*, 12(3), pp.

691–705. doi: 10.1016/0896-6273(94)90223-2.

Stock, P. et al. (2014) 'Human bone marrow mesenchymal stem cell-derived hepatocytes improve the mouse liver after acute acetaminophen intoxication by preventing progress of injury', *International Journal of Molecular Sciences*, 15(4), pp. 7004–7028. doi: 10.3390/ijms15047004.

Stoeger, T. et al. (2006) 'Instillation of six different ultrafine carbon particles indicates a surface area threshold dose for acute lung inflammation in mice', *Environmental Health Perspectives*, 114(3), pp. 328–333. doi: 10.1289/ehp.8266.

Striegler, C. et al. (2015) 'Amino acid modified hyperbranched poly(ethylene imine) with disaccharide decoration as anionic core–shell architecture: Influence of the pH and molecular architecture on solution behaviour', *Polymer*, 80, pp. 188–204. doi: 10.1016/J.POLYMER.2015.10.042.

Striegler, C. (2016) *Dendritische Glykopolymere und deren Polyelektrolytkomplexe als effiziente Drug-Delivery-Systeme für die verzögerte Wirkstofffreisetzung aus Calciumphosphatzement*. Technische Universität Dresden. Available at: http://www.qucosa.de/fileadmin/data/qucosa/documents/21373/Diss_SLUB_18.11.16.pdf (Accessed: 9 February 2018).

Sun, C. Y. et al. (2012) 'Brain-derived neurotrophic factor is a potential osteoclast stimulating factor in multiple myeloma', *International Journal of Cancer*, 130(4), pp. 827–836. doi: 10.1002/ijc.26059.

Sun, W. H. et al. (1998) 'Estrogen inhibits phorbol ester-induced I κ B α transcription and protein degradation', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 244(3), pp. 691–695. doi: 10.1006/bbrc.1998.8324.

Sun, X. et al. (2002) 'Identification of a novel homotypic interaction motif required for the phosphorylation of receptor-interacting protein (RIP) by RIP3', *Journal of Biological Chemistry*, 277(11), pp. 9505–9511. doi: 10.1074/jbc.M109488200.

Taghi, G. M. et al. (2012) 'Characterization of in vitro cultured bone marrow and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells and their ability to express neurotrophic factors', *Cell Biology International*, 36(12), pp. 1239–1249. doi: 10.1042/CBI20110618.

Taguchi, Y. et al. (1998) 'Interleukin-6-type cytokines stimulate mesenchymal progenitor differentiation toward the osteoblastic lineage.', *Proceedings of the Association of American Physicians*, 110(6), pp. 559–574.

Tait, S. W. G. et al. (2013) 'Widespread Mitochondrial Depletion via Mitophagy Does Not Compromise Necroptosis', *Cell Reports*, 5(4), pp. 878–885. doi: 10.1016/j.celrep.2013.10.034.

Takai, E. et al. (2004) 'Osteocyte viability and regulation of osteoblast function in a 3D trabecular bone explant under dynamic hydrostatic pressure', *Journal of Bone and Mineral Research*, 19(9), pp. 1403–1410. doi: 10.1359/JBMR.040516.

Tang, D. Q. et al. (2012) 'In vitro generation of functional insulin-producing cells from human bone marrow-derived stem cells, but long-term culture running risk of malignant transformation', *Am J Stem Cells*, 1(2), pp. 114–127. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22833839> (Accessed: 20 March 2018).

Taniguchi, N. (1974) 'On the Basic Concept of Nanotechnology', in *Proc. of International Conference on Precision Engineering (ICPE)*, Tokyo, Japan, pp. 18–23.

Thoenen, H. (1995) 'Neurotrophins and Neuronal Plasticity', *Science*, 270(5236), pp. 593–598.

Tran, N. and Webster, T. J. (2011) 'Increased osteoblast functions in the presence of hydroxyapatite-coated iron oxide nanoparticles', *Acta Biomaterialia*, 7(3), pp. 1298–1306. doi: 10.1016/j.actbio.2010.10.004.

Trinkaus, K. et al. (2005) 'Bohrmehl: Eine Quelle vitaler Zellen!', *Der Unfallchirurg*, 108(8), pp. 650–656. doi: 10.1007/s00113-005-0960-x.

Trinkaus, K. et al. (2006) 'Differentiation capacity and characterisation of cells growing out of human reaming debris', in *Practice of Intramedullary Locked Nails: New Developments in Techniques and Applications*. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, pp.

57–63. doi: 10.1007/3-540-32345-7_5.

Tsukano, H. et al. (2010) 'The endoplasmic reticulum stress-C/EBP homologous protein pathway-mediated apoptosis in macrophages contributes to the instability of atherosclerotic plaques', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 30(10), pp. 1925–1932. doi: 10.1161/ATVBAHA.110.206094.

Tuli, R. et al. (2003) 'Characterization of Multipotential Mesenchymal Progenitor Cells Derived from Human Trabecular Bone', *Stem Cells*, 21(6), pp. 681–693. doi: 10.1634/stemcells.21-6-681.

US Department of Health and Human Services (2004) 'Bone health and osteoporosis: a report of the Surgeon General', *US Health and Human Services*, p. 437. doi: 10.2165/00002018-200932030-00004.

Väänänen, H. K. and Horton, M. (1995) 'The osteoclast clear zone is a specialized cell-extracellular matrix adhesion structure.', *Journal of cell science*, 108 (Pt 8, pp. 2729–2732.

Vaidyanathan, S. et al. (2016) 'Role of Cell Membrane-Vector Interactions in Successful Gene Delivery', *Accounts of Chemical Research*, 49(8), pp. 1486–1493. doi: 10.1021/acs.accounts.6b00200.

Valderrábano, R. J. and Wu, J. Y. (2018) 'Bone and blood interactions in human health and disease', *Bone*. doi: 10.1016/j.bone.2018.02.019.

Vestergaard, P. et al. (2007) 'Increased mortality in patients with a hip fracture-effect of pre-morbid conditions and post-fracture complications', *Osteoporosis International*, 18(12), pp. 1583–1593. doi: 10.1007/s00198-007-0403-3.

Viringipurampeer, I. A. et al. (2014) 'Rip3 knockdown rescues photoreceptor cell death in blind pde6c zebrafish', *Cell Death and Differentiation*, 21(5), pp. 665–675. doi: 10.1038/cdd.2013.191.

Wagner, W. et al. (2005) 'Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood', *Experimental Hematology*, 33(11), pp. 1402–1416. doi: 10.1016/j.exphem.2005.07.003.

Wakitani, S. et al. (1995) 'Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine.', *Muscle & nerve*, 18(12), pp. 1417–26. doi: 10.1002/mus.880181212.

Wang, H. et al. (2014) 'Mixed Lineage Kinase Domain-like Protein MLKL Causes Necrotic Membrane Disruption upon Phosphorylation by RIP3', *Molecular Cell*, 54(1), pp. 133–146. doi: 10.1016/j.molcel.2014.03.003.

Ward, L. D. et al. (1996) 'Influence of interleukin-6 (IL-6) dimerization on formation of the high affinity hexameric IL-6 receptor complex', *Journal of Biological Chemistry*, 271(33), pp. 20138–20144. doi: 10.1074/jbc.271.33.20138.

Watts, N. B. and Diab, D. L. (2010) 'Long-term use of bisphosphonates in osteoporosis', *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. Oxford University Press, pp. 1555–1565. doi: 10.1210/jc.2009-1947.

Weinbaum, S. et al. (1994) 'A model for the excitation of osteocytes by mechanical loading-induced bone fluid shear stresses', *Journal of Biomechanics*, 27(3), pp. 339–360. doi: 10.1016/0021-9290(94)90010-8.

Wek, R. C. et al. (2006) 'Coping with stress: eIF2 kinases and translational control', *Biochemical Society Transactions*, 34(1), p. 7. doi: 10.1042/bst20060007.

Wenisch, S. et al. (2005) 'Human reaming debris: A source of multipotent stem cells', *Bone*, 36(1), pp. 74–83. doi: 10.1016/j.bone.2004.09.019.

WHO Study Group (1994) *Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis*. Genf. Available at: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/39142/WHO_TRS_843_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y.

Wilkins, A. et al. (2009) 'Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells secrete brain-derived neurotrophic factor which promotes neuronal survival in vitro', *Stem Cell Research*, 3(1), pp. 63–70. doi: 10.1016/j.scr.2009.02.006.

Williams, J. T. et al. (1999) 'Cells isolated from adult human skeletal muscle capable

of differentiating into multiple mesodermal phenotypes.', *The American surgeon*, 65(1), pp. 22–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9915526> (Accessed: 20 March 2018).

Writing Group for the Womens Health Initiative (2002) 'Risks and Benefits of Estrogen Plus Progestin in Healthy Postmenopausal Women', *Jama*, 288(3), pp. 321–333.

Wrobel, D. et al. (2017) 'Influence of core and maltose surface modification of PEIs on their interaction with plasma proteins—Human serum albumin and lysozyme', *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 152, pp. 18–28. doi: 10.1016/j.colsurfb.2016.12.042.

Xie, Z. et al. (2018) 'Interleukin-6/interleukin-6 receptor complex promotes osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells', *Stem Cell Research and Therapy*, 9(1), pp. 1–10. doi: 10.1186/s13287-017-0766-0.

Xiong, J. et al. (2011) 'Matrix-embedded cells control osteoclast formation', *Nature Medicine*, 17(10), pp. 1235–1241. doi: 10.1038/nm.2448.

Xu, A. et al. (2015) 'Enhancement of osteogenesis on micro/nano-topographical carbon fiber-reinforced polyetheretherketone-nanohydroxyapatite biocomposite', *Materials Science and Engineering C*, 48, pp. 592–598. doi: 10.1016/j.msec.2014.12.061.

Xu, C. et al. (2005) 'Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions.', *The Journal of clinical investigation*, 115(10), pp. 2656–64. doi: 10.1172/JCI26373.

Yang, X. et al. (2015) 'Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress are involved in ZnO nanoparticle-induced hepatotoxicity', *Toxicology Letters*, 234(1), pp. 40–49. doi: 10.1016/j.toxlet.2015.02.004.

Yao, R. and Cooper, G. M. (1995) 'Requirement for phosphatidylinositol-3 kinase in the prevention of apoptosis by nerve growth factor', *Science*, 267(5206), pp. 2003–2006. doi: 10.1126/science.7701324.

Ye, J. et al. (2000) 'ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs', *Molecular Cell*, 6(6), pp. 1355–1364. doi: 10.1016/S1097-2765(00)00133-7.

Yoon, S. O. et al. (1998) 'Competitive signaling between TrkA and p75 nerve growth factor receptors determines cell survival.', *The Journal of Neuroscience*, 18(9), pp. 3273–3281. doi: 10.1523/JNEUROSCI.18-09-03273.1998.

Yoshida, H. et al. (2001) 'XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor', *Cell*, 107(7), pp. 881–891. doi: 10.1016/S0092-8674(01)00611-0.

Yoshitake, F. et al. (2008) 'Interleukin-6 directly inhibits osteoclast differentiation by suppressing receptor activator of NF- κ B signaling pathways', *Journal of Biological Chemistry*, 283(17), pp. 11535–11540. doi: 10.1074/jbc.M607999200.

Zaman, G. et al. (1999) 'Mechanical Strain Stimulates Nitric Oxide Production by Rapid Activation of Endothelial Nitric Oxide Synthase in Osteocytes', *Journal of Bone and Mineral Research*, 14(7), pp. 1123–1131. doi: 10.1359/jbmr.1999.14.7.1123.

Zhang, Y. et al. (2017) 'RIP1 autophosphorylation is promoted by mitochondrial ROS and is essential for RIP3 recruitment into necrosome', *Nature Communications*, 8(May 2016). doi: 10.1038/ncomms14329.

Zhang, Y. et al. (2019) 'Evaluation of Nrf2 with Exposure to Nanoparticles', 1894, pp. 133–143. doi: 10.1007/978-1-4939-8916-4.

Zheng, C. X. et al. (2018) 'Adipose mesenchymal stem cells from osteoporotic donors preserve functionality and modulate systemic inflammatory microenvironment in osteoporotic cytotherapy', *Scientific Reports*, 8(1), p. 5215. doi: 10.1038/s41598-018-23098-8.

Zhou, H. et al. (1993) 'Scanning electron microscopy of the osteoclast-bone interface in vivo', *Cells and Materials*, 3(2), pp. 141–150. Available at: <http://digitalcommons.usu.edu/cellsandmaterials> (Accessed: 8 March 2018).

11 Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

12 Danksagung

Zu allererst möchte ich Frau Prof. Lips danken, die mir die Anfertigung dieser Arbeit ermöglicht hat und mir sowohl während der experimentellen Arbeiten als auch während des Schreibprozesses stets mit Ratschlägen und Hilfestellungen zur Seite stand.

Gleichermaßen gilt mein Dank den MitarbeiterInnen des Labors für experimentelle Unfallchirurgie, insbesondere Frau Ivonne Bergen und Frau Olga Dakischew, für die Vermittlung der nötigen praktischen Fertigkeiten und die gute Gesellschaft während langer Tage im Labor.

Danke an die Klinik für Unfall-, Hand-, und Wiederherstellungschirurgie des Uniklinikums Gießen, unter der Leitung von Herrn Prof. Heiß, für die Bereitstellung der Knochenproben sowie den anonymen Spendern selbiger, ohne deren Einsatz diese Arbeit nicht hätte stattfinden können.

Ich danke der Arbeitsgruppe um Herrn Dr. Appelhans vom Leibnitz-Institut für Polymerforschung in Dresden für die Bereitstellung der in den Experimenten eingesetzten Nanopartikel. Ebenso gilt an dieser Stelle mein Dank dem Sonderforschungsbereich Transregio 79 der Deutschen Forschungsgemeinschaft, durch welchen diese Kooperation gefördert wurde.

Danke an das Prägraduierertenkolleg des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen, durch dessen fachliche und finanzielle Förderung im Rahmen seines Stipendienprogrammes mir mein Forschungssemester ermöglicht wurde.

Vielen Dank an Frau Dr. Windhorst aus dem Institut für Medizinische Informatik der Justus-Liebig-Universität Gießen für ihre kompetente statistische Beratung.

Danke an meine Eltern, die mich nun schon seit gut 30 Jahren bedingungslos unterstützen und ohne die ich heute nicht das wäre, was ich bin. Danke an meine Brüder Lukas und Markus, die sicher nicht damit einverstanden wären, an dieser Stelle nicht explizit genannt zu werden.

Ein besonderer Dank gilt meiner Freundin Nora, die mich in guten und weniger guten Phasen erträgt und ohne deren Motivationsansprachen diese Arbeit vermutlich erst 2035 ihren Weg in den Druck gefunden hätte.

Danke an all die guten FreundInnen, die mich auf meinem Weg bis hierher begleitet haben und mit denen ich hoffentlich noch ein gutes Stück vor mir habe (besonders zu nennen ist hier Can Winzerk für die Überprüfung des einen oder anderen Komma).