

**Der Effekt *Brain-derived neurotrophic factor*-
funktionalisierter Polyelektrolytkomplex-Nano-
partikel auf die Proliferation und Genexpression
der Osteozytenzelllinie MLO-Y4**

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

vorgelegt von Loy, Thomas Leonhard
aus Tübingen

Gießen 2022

**Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität
Gießen**

Experimentelle Unfallchirurgie der Klinik und Poliklinik für Unfall-,
Hand- und Wiederherstellungschirurgie

Gutachterin: Prof. Dr. Katrin S. Lips
Gutachter: Prof. Dr. Andreas Bräuninger

Tag der Disputation: 23.05.2023

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Osteoporose	1
1.2	Knochenersatzmaterial	2
1.3	PEK-NP	4
1.4	Knochenstoffwechsel	5
1.4.1	RANK/RANKL/OPG	6
1.5	Osteozyten	8
1.5.1	Sclerostin/SOST	10
1.5.2	MLO-Y4	11
1.6	BDNF/TrkB/p75NTR	13
1.7	BDNF-funktionalisierte PEK-NP	16
1.8	Fragestellung	17
2	Material und Methoden	19
2.1	Zellkultur	19
2.1.1	Monokultur muriner DRG-Neurone	19
2.1.2	Monokultur der MLO-Y4	21
2.1.3	Kokultur DRG-Neurone/MLO-Y4	22
2.2	BDNF ELISA	24
2.3	Proliferationsassay BrdU	25
2.4	Real-time RT-PCR	29
2.4.1	Versuchsaufbau	29
2.4.2	RNA-Extraktion	30
2.4.3	cDNA-Synthese und real-time RT-PCR	30
2.4.4	Primer	32
2.4.5	Kapillargelelektrophorese	34
2.5	Statistik	34
3	Ergebnisse	36
3.1	Zellkultur	36
3.1.1	Monokultur muriner DRG-Neurone	36
3.1.2	Monokultur der MLO-Y4	36

3.1.3	Kokultur MLO-Y4/DRG-Neurone.....	37
3.2	BDNF-Freisetzung aus PEK-NP.....	39
3.3	Proliferationsassay BrdU.....	42
3.4	Real-time RT-PCR.....	46
3.4.1	β -Actin.....	46
3.4.2	SOST.....	46
3.4.3	RANKL.....	46
3.4.4	OPG.....	47
3.4.5	BDNF.....	48
3.4.6	TrkB.....	49
3.4.7	p75NTR.....	49
3.4.8	Kapillargelelektrophorese.....	50
3.4.8.1	SOST.....	50
3.4.8.2	TrkB.....	52
4	Diskussion.....	54
4.1	Zellsystem und Proliferationsassay BrdU.....	54
4.1.1	MLO-Y4 als Osteozytenmodell.....	54
4.1.2	DRG-Neurone/Schwanzzellen als endogene BDNF-Quelle.....	56
4.1.3	Kokultur DRG-Neurone/MLO-Y4.....	56
4.1.4	Proliferationsassay BrdU.....	58
4.1.5	BDNF-Freisetzung aus PEK-NP.....	59
4.2	Zytokompatibilität von PEK-NP.....	61
4.3	BDNF fördert die Proliferationsrate von MLO-Y4.....	62
4.4	Einfluss von BDNF auf die Genexpression in MLO-Y4.....	65
4.4.1	Sclerostin/SOST.....	65
4.4.2	RANKL/OPG.....	67
4.4.3	BDNF/TrkB/p75NTR.....	69
4.5	Ausblick.....	71
5	Zusammenfassung.....	74
6	Summary.....	76
7	Verzeichnisse.....	77
7.1	Abkürzungsverzeichnis.....	77

7.2	Abbildungsverzeichnis	79
7.3	Tabellenverzeichnis	80
7.4	Literaturverzeichnis.....	80
8	Publikationen und Vorträge	100
8.1	Publikation	100
8.2	Konferenzvortrag	100
9	Ehrenwörtliche Erklärung	101
10	Danksagung.....	102

1 Einleitung

Durch den demographischen Wandel in Deutschland und der damit verbundenen Alterung der Gesellschaft, kommt es zu einem Anstieg von altersbedingten Erkrankungen (Frank und Ryll 2015).

Hierunter fällt auch die Osteoporose, welche eine unterschiedlich bedingte, aber vermehrt im Alter auftretende Abnahme der Knochendichte bezeichnet. Im Jahr 2009 wurde diese Erkrankung bei insgesamt 6,3 Millionen (Mio.) Personen festgestellt, wovon 5,2 Mio. Frauen und 1,1 Mio. Männer waren. Bei über 50-Jährigen fand sich eine Prävalenz von 24 % bei Frauen und 6 % bei Männern. Eine Hochrechnung ergab einen Wert von 885.000 Neuerkrankungen jährlich. Die Frakturnrate lag bei den Betroffenen innerhalb von 4 Jahren bei 52 % (Hadji et al. 2013).

Die Frakturbehandlung des osteoporotischen Knochens stellt eine besondere Herausforderung dar. Zur Stabilisierung und Defektfüllung wird stets nach besseren künstlichen Knochenersatzmaterialien gesucht. Hierbei werden Stoffe erforscht, die den Knochenstoffwechsel positiv beeinflussen und die Frakturheilung beschleunigen mit dem Ziel der Funktionalisierung des Ersatzmaterials. Darüber hinaus stellt sich die Frage, wie diese Stoffe auf die einzelnen Zellen des Knochens wirken und welchen Gesamteffekt sie erzielen.

1.1 Osteoporose

Die Ursachen der Osteoporose können in primäre und sekundäre eingeteilt werden. Primäre Ursachen bilden vor allem die senile sowie die postmenopausale Osteoporose, welche bei Frauen die häufigste Form darstellt. Hierbei kommt es zu einem Abfall von Östrogen, was zu einer verstärkten Resorption der Knochenmasse führt (Glaser und Kaplan 1997). Eine sekundäre Osteoporose kann beispielsweise medikamentös, z. B. durch Langzeittherapien mit Glucocorticoiden, Protonenpumpeninhibitoren, Antiepileptika oder Aromatasehemmern ausgelöst werden. Darüber hinaus zählen andauernde Immobilisation sowie hormonelle Ursachen (wie Hypercortisolismus, Hypogonadismus oder Vitamin D-Mangel) zu den sekundären Ursachen einer Osteoporose (Emkey und Epstein 2014).

Symptomatisch äußert sich die Osteoporose lange Zeit nur in unspezifischen Beschwerden wie Rückenschmerzen. In fortgeschrittenen Stadien kommt es dann zu pathologischen Frakturen der Wirbelkörper, des Oberschenkelhalses sowie des distalen Radius (Glaser und Kaplan 1997). Von pathologischen Frakturen wird im Allgemeinen

gesprochen, wenn ein nicht adäquates Trauma zu einem Frakturereignis führt (Maurer et al. 1995).

Neben der Stellung einer klinischen Verdachtsdiagnose und der Bestimmung von Laborparametern ist in der Diagnostik der Osteoporose vor allem die Flächendichtebestimmung des Knochens weit verbreitet. Von einer Osteoporose wird ab einer Standardabweichung (SD) in Relation zu der durchschnittlichen Knochendichte einer jungen Erwachsenen von -2,5 oder negativer (T-Score \leq -2,5 SD) gesprochen. Wenn der T-Score zwischen -1 SD und -2,5 SD liegt, wird dies als Osteopenie bezeichnet, also eine verminderte Knochendichte (Kanis et al. 2013).

Zur Behandlung der Osteoporose stehen unterschiedliche Medikamente zur Verfügung, wovon in der Praxis die Anwendung von Bisphosphonaten weit verbreitet ist, insbesondere für die durch Glucocorticoide induzierte Osteoporose. Bisphosphonate wirken über die Hemmung von knochenresorbierenden Osteoklasten und führen dadurch zu einem verminderten Abbau von Knochenmasse. Für diese Wirkstoffgruppe konnte eine Reduktion des Frakturrisikos und eine Erhöhung der Knochendichte gezeigt werden (Rateman et al. 2019). Zur Therapie der postmenopausalen Osteoporose können auf Basis des oben erwähnten Pathomechanismus selektive Östrogenrezeptor-Modulatoren verwendet werden. Eine weitere Therapieoption ist die Gabe eines Analogons des physiologisch im Körper vorkommenden Parathormons (Teriparatid). Dieses entfaltet seine Wirkung durch die Stimulierung des Knochenumbaus, indem es sowohl knochenaufbauende Osteoblasten als auch über diese Osteoklasten aktiviert. Dies resultiert ebenfalls in einer Erhöhung der Knochendichte (Tella und Gallagher 2014).

Die oben genannten Medikamente können teilweise die Heilung osteoporotischer Frakturen unterstützen (Goldhahn et al. 2012). Die operative Therapie osteoporotischer Frakturen stellt im Vergleich zu nicht osteoporotischen Frakturen aufgrund der Knochenbeschaffenheit eine Herausforderung dar. Hierbei finden beispielsweise bei distalen Radiusfrakturen winkelstabile Plattenosteosynthesen Einzug in Behandlungsschemata, da diese einen verstärkten Halt der Fraktur gewährleisten (Ostergaard et al. 2019). Ergänzend besteht die Möglichkeiten mit Knochenersatzmaterialien, die sich in den Knochen integrieren, die Fraktur zu stabilisieren (Van Lieshout und Alt 2016).

1.2 Knochenersatzmaterial

Die Ansprüche an Knochenersatzmaterialien sind aufgrund der Komplexität des physiologischen Knochens sehr hoch, sodass Kriterien für die Beurteilung von Ersatzmaterialien aufgestellt wurden. Diese Kriterien bilden hauptsächlich die Osteokonduktion, die

Einleitung

Osteoinduktion, die Osteogenese sowie die Osteointegration zusammen. Osteokonduktion meint hierbei die Fähigkeit des Materials als Gerüst für Blutgefäße und Zellwanderung zu dienen. Ein ideales Material sollte optimalerweise alle Kriterien erfüllen, was bisher synthetisch noch nicht erreicht wurde. Die Osteoinduktion bezeichnet die Stimulierung von Stammzellen zur Proliferation und Differenzierung in knochen- und knorpelbildende Zellen. Aktuelle Forschungsarbeiten beschäftigen sich vor allem mit Proteinen, die die Osteoinduktion vermitteln. Als Beispiel soll hier die Klasse der *bone morphogenic proteins* (BMP) dienen, die als Wachstumsfaktoren fungieren. Die Formation des neuen Knochens durch Stammzellen, Osteoblasten und Osteozyten, die entweder im Ersatzmaterial selbst enthalten sind oder sich an der Empfängerstelle befinden, wird Osteogenese genannt. Die Osteointegration meint das Potenzial des Materials, sich mit dem bestehenden Knochengewebe zu vereinen (Wang und Yeung 2017). Zuletzt muss der Knochenersatz mechanisch stabil sein, um die Trägerfunktion des Knochens zu erhalten.

Um einen Frakturspalt zu überbrücken bieten sich je nach Größe des Spalts unterschiedliche Möglichkeiten des Knochenersatzes an. Häufig wird hierzu auf körpereigene Knochenbestandteile zurückgegriffen, wobei das gängigste ein spongiöses Knochen-Transplantat beispielsweise (bspw.) aus dem Beckenkamm darstellt. Als Spongiosa wird der schwammartige innere Anteil des Knochens, der das Knochenmark beherbergt, bezeichnet. Hierdurch werden auch Knochenzellen und Stammzellen transplantiert, die die Frakturheilung fördern. Ein solches Transplantat wird bis auf die mechanische Stabilität allen oben genannten Kriterien gerecht. Für größere Defekte besteht zudem die Möglichkeit ein gesamtes Fragment eines Knochens zu transplantieren, inklusive der die Spongiosa umgebenden Kortikalis. Diese sorgt insbesondere für eine höhere Stabilität und deckt somit auch das letzte Kriterium mit ab. Da diese Formen jedoch nur begrenzt verfügbar und möglich sind, ist seit über 100 Jahren die Entwicklung von künstlich hergestellten Knochenersatzmaterialien Gegenstand der Forschung (Hagen et al. 2012).

Unter den synthetischen Knochenersatzmaterialien lassen sich die Biokeramiken in vier unterschiedliche Typen gliedern. Hierunter fallen Calciumsulfat, welches am längsten als Ersatz eingesetzt wird, Calciumphosphat, Tricalciumphosphat und Hydroxylapatit. Die vier Materialien haben gemeinsam, dass sie weder osteoinduktiv noch osteogen wirken, jedoch insbesondere eine osteokonduktive Funktion erfüllen (Fillingham und Jacobs 2016).

Es besteht die Möglichkeit Knochenersatzmaterialien mit Wachstumsfaktoren zu versehen, die die Osteoinduktion und teilweise auch die Osteogenese fördern. In einer Studie aus dem Jahr 2019 wurde Calciumphosphat mit der Desoxyribonukleinsäure (DNA) der Wachstumsfaktoren *vascular endothelial growth factor* (VEGF) und BMP-7 funktionalisiert und zur Defektbehandlung in Kaninchenknochen implantiert. Nach vier Wochen

konnte im Vergleich zur Kontrollgruppe ein signifikant höheres Knochenvolumen und eine signifikant höhere Anzahl an Osteoblasten festgestellt werden (Schlickewei et al. 2019). Ähnliche Effekte konnten für viele weitere Proteine nachgewiesen werden, die zum Großteil auch physiologisch eine Rolle im Knochenstoffwechsel einnehmen (Everding et al. 2019; Hollinger et al. 2008).

1.3 PEK-NP

Um Wirkstoffe an Knochenersatzmaterialien zu binden und diese nach und nach zum Zweck einer längeren Wirkdauer freizusetzen, wurden spezielle Polyelektrolytkomplex-Nanopartikel (PEK-NP) entworfen. PEK-NP bestehen aus positiv geladenen Polykationen und negativ geladenen Polyanionen, die beide als Polyelektrolyte bezeichnet werden. Die Größe und die innere Struktur der Nanopartikel kann über die Auswahl der Polykationen und -anionen, den pH-Wert im Medium und das Mischverhältnis der Polyelektrolyte variiert werden. Sphärische Nanopartikel können durch ein ungleiches Mischverhältnis zwischen Polykation und Polyanion gewonnen werden (Abbildung (Abb.) 1), wodurch ein Ausfallen der Partikel verhindert wird (Müller 2014).

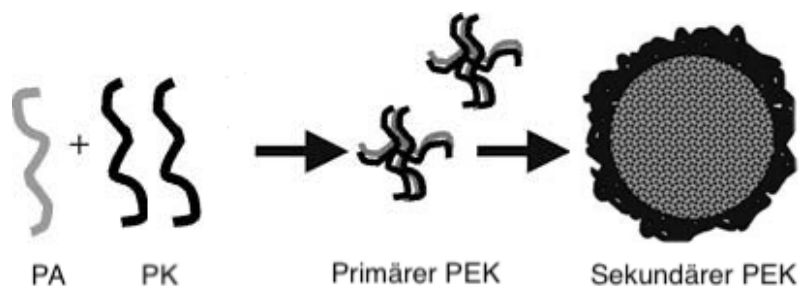


Abb. 1: Schema der Herstellung sphärischer PEK-NP, PA=Polyanionen; PK=Polykationen (modifiziert nach Müller et al. 2009)

Als Polykationen und -anionen können verschiedene Polyelektrolyte dienen. Polykationen stellen beispielsweise Poly(ethylenimin), (N,N-diethylamino)ethyl-dextran und Poly(L-Lysin) (PLL) dar, während als Polyanionen vor allem Dextransulfat und Chondroitinsulfat (CS) verwendet werden. Diese Ausgangsstoffe werden insbesondere wegen ihrer leichten Verfügbarkeit und Herstellung benutzt (Woltmann et al. 2014).

Das Ziel, PEK-NP an Knochenersatzmaterialien zu binden, setzt eine Stabilität der Nanopartikelmatrix voraus, damit die Polyelektrolyte sich nicht lösen und systemisch wirken können. Dies konnte in vitro unter Beladung mit einem Bisphosphonat und verzögerter Freisetzung dieses Wirkstoffs unter Einsatz eines PEK-NP aus Poly(ethylenimin) und CS erzielt werden. Die PEK-NP wurden in diesen Experimenten an eine Oberfläche aus Germanium gebunden (Müller und Keßler 2012; Müller et al. 2015). In einer weiteren

Studie wurden PEK-NP in zwei unterschiedlichen Ansätzen mit einem Bisphosphonat und dem Antibiotikum Rifampicin funktionalisiert. Diese wurden anschließend auf ein Knochenersatzmaterial aufgebracht und die Freisetzungskinetik wurde untersucht. Die Verträglichkeit der eingesetzten Materialien und Wirkstoffe wurde an mesenchymalen Stammzellen getestet. Nach 48 Stunden (h) konnte kein negativer Effekt der PEK-NP oder des Knochenersatzmaterials detektiert werden. Diese Zytokompatibilität der PEK-NP konnte auch bei Woltmann et al. 2014 gezeigt werden. Lediglich der Einfluss des Bisphosphonats zeigte nach 48 h eine verringerte Zellzahl, was als Toxizität des Wirkstoffs gewertet wurde. Darüber hinaus konnte in dieser Studie ermittelt werden, dass die Kombination aus PLL und CS die beste Dispergierbarkeit, also die Fähigkeit sich in einem Medium zu verteilen, aufweist (Vehlow et al. 2016). Diese wurden ebenfalls für die Versuche in der vorliegenden Arbeit verwendet, dabei jedoch nicht an eine Oberfläche gebunden, sondern in das Medium gegeben.

1.4 Knochenstoffwechsel

Um die Stabilität der Knochen als Gerüst des Menschen zu gewährleisten, ist es notwendig, dass an verschiedenen Stellen alter und schwacher Knochen abgebaut und anschließend neuer Knochen wiederaufgebaut wird. Für den Knochenstoffwechsel verantwortlich sind vor allem drei Zelltypen: Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten (Siddiqui und Partridge 2016).

Osteoblasten sind Knochenmatrix synthetisierende Zellen, die aus mesenchymalen Stammzellen hervorgehen. Den Hauptanteil der Knochenmatrixproteine stellt Kollagen Typ I dar, das von Osteoblasten produziert wird und mit Proteoglykanen, Fibronectin und anderen Knochenproteinen wie Osteocalcin das sogenannte Osteoid bildet. Dieses sorgt für die Flexibilität des Knochens, gibt jedoch keine Stabilität. Hierfür sorgt die anschließende Mineralisation des Osteoids. Die Mineralbildung erfolgt, indem von Osteoblasten sezernierte Phosphatasen Phosphat freisetzen und sich dieses mit Calcium, welches sich in der extrazellulären Flüssigkeit befindet, über Calciumphosphat zu Hydroxylapatit formiert (Crockett et al. 2011; Blair et al. 2017). Eine tragende Rolle im Knochenstoffwechsel nimmt der Wnt-Signalweg ein. WNT5A und WNT16 sind beides Faktoren, die von Osteoblasten sezerniert werden, jedoch gegenteilige Effekte haben. So führt WNT5A dazu, dass vermehrt Osteoklasten differenzieren, WNT16 aber hemmt die Osteoklastogenese (Han et al. 2018). Für andere Wnt-Untergruppen konnte ein auf Osteoblasten proliferierender und aktivitätsfördernder Effekt nachgewiesen werden (Karner und Long 2017). Sobald Osteoblasten sich selbst mit Knochenmatrix ummauert haben

und dem organisierten Zelltod, der Apoptose, entgangen sind, wird von Osteozyten gesprochen (Marotti et al. 1990).

Für den Abbau des alten und schwachen Knochens sind im Knochenstoffwechsel die Osteoklasten verantwortlich. Diese sind mehrkernige, aus hämatopoetischen Vorläuferzellen der Monozyten-Makrophagen-Linie hervorgehende Zellen, deren Differenzierung vor allem von Osteoblasten und Osteozyten gesteuert wird (Boyce und Xing 2008). Um eine überschießende Resorption des Knochens zu verhindern, gibt es Signalwege, über die Osteoklasten Osteoblasten aktivieren (Garimella et al. 2008).

1.4.1 RANK/RANKL/OPG

Pathophysiologisch spielen bei der postmenopausalen Osteoporose aufgrund der erniedrigten Östrogenspiegeln vor allem die Gegenspieler *receptor activator of nuclear factor- κ B ligand* (RANKL) und Osteoprotegerin (OPG) eine Rolle. Während Östrogen normalerweise RANKL hemmt, was zu einer verminderten Differenzierung von knochenresorbierenden Osteoklasten führt, wird OPG durch Einfluss von Östrogen vermehrt exprimiert (Drake et al. 2015). OPG wirkt auf Osteoklasten, indem es seinen Liganden bindet, welcher lange als OPGL bekannt war, jedoch mit RANKL identisch ist. Somit inhibiert OPG die Effekte von RANKL, die normalerweise in einer verstärkten Aktivität und einem längeren Überleben von Osteoklasten bestehen. Durch den Wegfall von Östrogen kommt es also, durch die Wirkung dieser beiden Proteine zu einer verstärkten Knochenresorption (Hofbauer et al. 1999; Lacey et al. 1998; Aubin und Bonnelye 2000). Über diese Schlüsselproteine im Knochenstoffwechsel verläuft ebenfalls die Pathophysiologie der sekundären Osteoporose als Nebenwirkung bei Einnahme von Glucocorticoiden. Es konnte gezeigt werden, dass Glucocorticoide (insbesondere Prednisolon) die Synthese von RANKL verstärken, jedoch die Produktion von OPG vermindern (Humphrey et al. 2006).

Bezüglich der Therapie der Osteoporose steht mit Denosumab ein Antikörper bereit, welcher an RANKL bindet und somit die Entwicklung und Aktivität von Osteoklasten inhibiert. Hierdurch kann eine Reduktion der Frakturrate sowie eine Vermehrung der Knochendichte erzielt werden (Cummings et al. 2009; Leipe et al. 2021).

Während sich RANKL auf der Oberfläche von Osteoblasten befindet und von Osteozyten und Osteoblasten sezerniert wird, ist der korrespondierende Rezeptor *receptor activator of NF- κ B* (RANK) sowohl auf der Oberfläche von Vorläuferzellen der Osteoklasten als auch auf Osteoklasten selbst lokalisiert. Durch die Bindung von RANKL an RANK wird die Osteoklastogenese gefördert (Honma et al. 2021). Die Expression von RANK wird

Einleitung

teilweise über den *extracellular signal-related kinases*-Signalweg (ERK-Signalweg) reguliert, über den es durch Insulin zu einer vermehrten Expression von RANK kommt. Hierdurch wird der Effekt von RANKL auf die Osteoklastogenese verstärkt (Oh und Lee 2017). Die Regulation der Expression von RANKL verläuft ebenfalls über den ERK-Signalweg (Mine et al. 2014), sodass dieser eine wichtige Rolle in der Regulierung der Osteoklastentätigkeit einnimmt. RANKL und RANK sind Teil der Familie der Tumornekrosefaktoren und der Tumornekrosefaktor-Rezeptoren. Dies verdeutlicht auch den bei Entzündungen des Knochens vermehrten Knochenabbau (Teitelbaum 2000; Merkel et al. 1999). OPG wirkt an dieser Stelle antagonistisch zu RANKL, indem es RANKL bindet und somit die Aktivierung von RANK verhindert (Abb. 2).

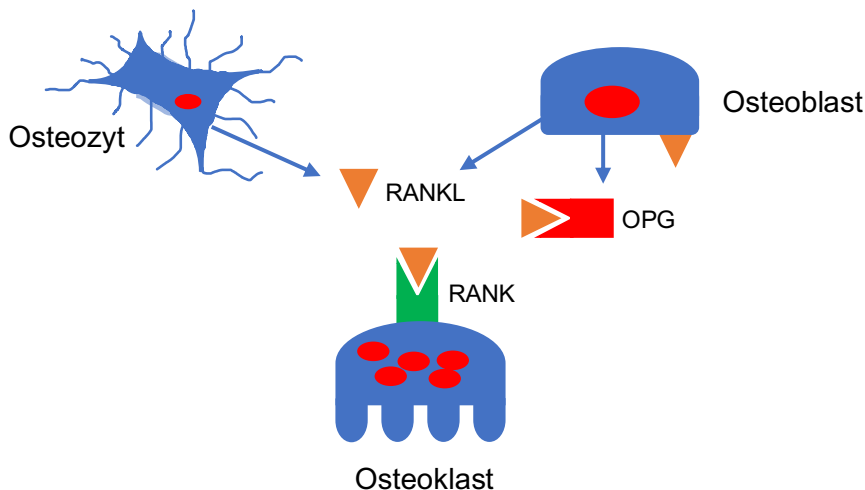


Abb. 2: Schematische Abbildung des Zusammenspiels von RANK (grün), RANKL (orange), OPG (rot) und der beteiligten Zellen im Knochenstoffwechsel

Daher ist es wichtig, bei der Analyse eines Effektes auf den Knochenstoffwechsel stets beide Proteine zu beleuchten. Aus diesem Grund wird in der Literatur häufig der RANKL/OPG-Quotient bestimmt, der eine bessere Einschätzung zulässt. OPG wird von Osteoblasten produziert, ist jedoch in Osteozyten ebenfalls exprimiert und wird sezerniert (Boyce et al. 2012; Rupp et al. 2019). Die OPG-Expression und -Sekretion wird durch den Wnt-Signalweg in Osteozyten positiv beeinflusst (Kramer et al. 2010).

Über diese Proteine wird die Wirkung verschiedener den Knochenstoffwechsel beeinflussende Stoffe wie Hormone oder Vitamine vermittelt. Vitamin D beispielsweise bewirkt im Knochen einerseits einen katabolen, andererseits jedoch auch einen anabolen Effekt, um so die Qualität des Knochens zu verbessern. Der resorbierende Effekt wird über die Induktion von RANKL und die Suppression von OPG erzielt (Hausler et al. 2013). Auch die knochenresorptive Wirkung von Parathormon verläuft über die vermehrte Expression von RANKL in Osteozyten und die damit indirekt verstärkte Differenzierung und Aktivität

von Osteoklasten. Wie vorher bereits erwähnt führt die Gabe von Parathormon bei Osteoporose über eine bestimmte Zeit jedoch ebenfalls zum Aufbau von Knochenmasse (Wein und Kronenberg 2018; Garimella et al. 2008; O'Brien et al. 2008). So spielt das RANK/RANKL/OPG-System auch klinisch bei Erkrankungen wie verschiedenen Formen der Osteoporose oder bei einem Hyperparathyreoidismus eine entscheidende Rolle. Ein Gleichgewicht dieses Systems ist für einen gesunden Knochen von Bedeutung (Hofbauer et al. 2004). Osteozyten nehmen in diesem System die Rolle eines Mediators ein, indem sie RANKL selbst sezernieren und über Sclerostin die Expression von OPG und RANKL regulieren (Robling und Bonewald 2020; Kramer et al. 2010; Shu et al. 2017; Boyce et al. 2012).

1.5 Osteozyten

Mit 90 bis 95 Prozent (%) der Zellen des Knochens stellen Osteozyten die klare Mehrheit dar (Feng et al. 2006), die im Knochenstoffwechsel, anders als früher angenommen, eine entscheidende Rolle übernehmen. Die Funktion von Osteozyten wurde in den letzten Jahren zunehmend erforscht und umfasst hauptsächlich die Rolle als Mechanosensoren, als Vermittler der Calciumhomöostase und der Knochenreparatur. Des Weiteren sind Osteozyten endokrin agierende Zellen (Bonewald 2017). Die Erfüllung dieser Aufgaben ist vor allem durch die ausgeprägte Verbindung der Osteozyten untereinander und mit anderen Zellen des Knochens und des Knochenmarks über Ausläufer, Dendriten genannt, möglich (Bonewald und Johnson 2008). Im Prozess der Transformation von Osteoblasten zu Osteozyten ändern Osteoblasten ihre Form, indem das Zellvolumen sich reduziert und das Zytoplasma Ausläufer bildet. Die Relation von Zellkern zu Zytoplasma nimmt dadurch zu (Marotti et al. 1990). Während der Transformation von Osteoblasten zu Osteozyten werden diese Dendriten zuerst in Richtung der Mineralisationsfront ausgebildet. Daraufhin bilden Osteozyten ebenfalls Dendriten bis hin zu den Blutgefäßen, um Botenstoffe in das Blutsystem abzugeben (Palumbo 1986). Darüber hinaus verlieren Osteoblasten während dieser Wandlung einen Teil ihrer Zellorganellen (Aarden et al. 1994).

Um die Kommunikation unter den Knochenzellen zu ermöglichen, sind sogenannte *gap junctions* notwendig. Diese Kanäle liegen beispielsweise zwischen zwei Zellen oder an den Enden der Dendriten, wo sie den Dendriten mit einer anderen Zelle verbinden. Durch die Verbindung von zwei Zellen über *gap junctions* können Nährstoffe, Botenstoffe oder Ionen ausgetauscht werden ohne einen aktiven Transporter zu benötigen (Zhang et al. 2020). Unter Ausschaltung dieser Kanäle in Osteozyten und Osteoblasten konnte eine

Einleitung

protrahierte Knochenheilung beobachtet werden (Chen et al. 2019). Die Dendriten der Osteozyten verlaufen durch kleine Kanäle im Knochen, Kanalikuli genannt. Zusammen mit den Lakunen, in denen die Osteozyten eingebettet sind, bilden die Kanalikuli das lakuno-kanalikuläre Netzwerk.

In diesem sind die Dendriten sowie die Zellkörper der Osteozyten von Knochenflüssigkeit umgeben, dessen Fluss unter Belastung des Knochens zunimmt und der zur Ernährung der Osteozyten und zur Entsorgung von Abfallprodukten dient (Weinbaum et al. 1994; Piekarski und Munro 1977; Cardoso et al. 2013). Die Flusszunahme der Knochenflüssigkeit führt unter Belastung außerdem zu einer Verformung der Zellmembran von Osteozyten, woraufhin es zur Freisetzung von Prostaglandin E₂ kommt. Hierdurch wird über Zwischenschritte der Wnt-Signalweg aktiviert, welcher letztendlich zu einer verminderten Apoptose von Osteozyten, also zu einem längeren Überleben führt (Bonewald und Johnson 2008; Kamel et al. 2010; Ajubi et al. 1996).

Es konnte gezeigt werden, dass bei Entlastung des Knochens vor allem das von Osteozyten sezernierte und auf Osteoklasten wirkende RANKL für den Knochenabbau verantwortlich ist. Bisher wurde angenommen, dass dieses hauptsächlich von Osteoblasten exprimiert und sezerniert wird (Xiong et al. 2011). Zu einem ähnlichen Ergebnis kommen auch Tatsumi et al. 2007, die durch Ausschaltung des Großteils der Osteozyten in einem Mausmodell einen verringerten Knochenabbau unter Entlastung des Knochens beobachtet haben.

Darüber hinaus gibt es Studien, die eine direkte Beteiligung der Osteozyten am Knochenauf- und -abbau vermuten lassen. Unter anderem konnte unter dem Einfluss von Parathormon eine Vergrößerung der Lakunen um Osteozyten beobachtet werden, was sich durch eine direkte Resorption von Knochen durch Osteozyten erklären lässt. An die Behandlung mit Parathormon anschließend konnte in den Lakunen unreife, unmineralisierte Knochenmatrix nachgewiesen werden, was für die Synthese von Knochenmatrix durch Osteozyten spricht (Teti und Zallone 2009; Tazawa et al. 2004; Robling und Bonewald 2020). Bereits von Baylink und Wergedal (1971) konnte eine knochenbildende Eigenschaft von Osteozyten gezeigt werden, auch wenn im Vergleich zu Osteoblasten dieser Anteil sehr gering ist.

Die endokrine Aktivität von Osteozyten beeinflusst einerseits den Phosphathaushalt und die Produktion von Vitamin D₃, andererseits den Parathormon-Spiegel im Blut. Bei erhöhten Phosphatspiegeln, wie zum Beispiel beim chronischen Nierenversagen hemmen Osteozyten durch Sekretion von Botenstoffen die Reabsorption von Phosphat in der Niere und die Synthese von Vitamin D₃. Ein inhibierender Einfluss konnte zudem auf die Expression der *messenger ribonucleic acid* (mRNA) und der Sekretion von Parathormon

nachgewiesen werden. Hieran kann die Beteiligung der Osteozyten über den Knochenstoffwechsel hinaus gesehen werden (Krajsnik et al. 2007; Tresguerres et al. 2020).

1.5.1 Sclerostin/SOST

Ein weiteres Protein, das von Osteozyten sezerniert wird, stellt Sclerostin dar, welches ein Produkt des SOST Gens ist (Weivoda et al. 2017). Dieses lässt sich jedoch erst in reifen Osteozyten nachweisen, die weiter von der Knochenoberfläche entfernt sind. In frisch eingemauerten Osteozyten ist die Expression noch gering (Poole et al. 2005).

Sclerostin nimmt eine weitere Schlüsselrolle im Knochenstoffwechsel ein, indem es die Formation neuen Knochens hemmt. Diese Funktion übt Sclerostin hauptsächlich über die Inhibierung des Wnt-Signalwegs aus, der sowohl die Apoptoseregulierung von Osteozyten als auch die Differenzierung und Proliferation von Osteoblasten und Osteoklasten reguliert (Bonewald und Johnson 2008; Tanaka und Matsumoto 2021). Unter Ausschaltung des Wnt-Signalweges konnte eine verringerte Expression von OPG in Osteozyten erreicht werden, was in einer verstärkten Osteoklastentätigkeit mündete (Kramer et al. 2010). Unter exogener Zugabe von Sclerostin konnte ein Effekt auf die OPG-Expression in Osteozyten bei Shu et al. (2017) jedoch nicht nachgewiesen werden. In der Studie von Shu et al. (2017) zeigte sich allerdings ein direkter positiver Einfluss von Sclerostin auf die Expression von RANKL in Osteozyten, was ebenfalls zu einer höheren Aktivität der Osteoklasten führt (Shu et al. 2017). Der hemmende Effekt von Sclerostin auf den Knochenaufbau wird nicht alleine über den Wnt-Signalweg vermittelt, sondern ebenfalls über die Inhibierung von BMP-Untergruppen. Als Beispiel sei hier vor allem das bereits erwähnte BMP-6 genannt, welches von Osteoklasten ausgeschüttet wird und die Proliferation und Differenzierung von Osteoblasten fördert. Durch die Hemmung von BMP-6 wirkt Sclerostin inhibierend auf die Differenzierung von Osteoblasten und damit auf den Knochenaufbau. Der Effekt ist auch im Pathomechanismus der Sklerosteose von Bedeutung, bei der den Betroffenen Sclerostin durch eine Mutation im SOST-Gen fehlt (Winkler et al. 2003; Jagga et al. 2021). Die Sklerosteose ist eine autosomal-rezessiv vererbte, seltene Erkrankung, die durch vermehrtes Knochenwachstum charakterisiert ist. Dies führt bereits im Kindesalter zu Symptomen, die vor allem durch das vermehrte Schädelwachstum zu erklären sind und aus Kopfschmerzen und Schwindel bestehen (Sebastian und Loots 2018).

Die Regulierung der Sclerostinfreisetzung geschieht vorrangig über Hormone. In der Menopause konnte beispielsweise ein erhöhter Sclerostinspiegel nachgewiesen werden, der somit ebenfalls eine Rolle im Pathomechanismus der postmenopausalen

Osteoporose spielt (Mirza et al. 2010). Unter einer Östrogentherapie der Osteoporose wurde dieser Effekt als reversibel beobachtet, was die Regulierung von Sclerostin über Östrogen wahrscheinlich macht (Mödder et al. 2011). Testosteron hingegen hat den gegenteiligen Effekt auf Sclerostin (Di Nisio et al. 2015; Drake und Khosla 2017). Auch der Knochenabbau bei längerer Entlastung des Knochens verläuft teilweise direkt über eine vermehrte Sekretion von Sclerostin durch Osteozyten. Früher wurde angenommen, dass dies mit einem erniedrigten Parathormonspiegel zusammenhängt (Spatz et al. 2015). Parathormon beeinflusst jedoch ebenfalls die Ausschüttung von Sclerostin. Bei Patienten mit primärem Hyperparathyreoidismus, also einer vermehrten Ausschüttung von Parathormon in den Nebenschilddrüsen, konnten erniedrigte Sclerostinspiegel gemessen werden. Diese normalisierten sich nach Entfernung der Nebenschilddrüsen. Unter Berücksichtigung dieses Zusammenhangs kann ein knochenanaboler Effekt von Parathormon angenommen werden, der sich auch bei der Osteoporosetherapie zu Nutze gemacht wird (Ardawi et al. 2012; Leder 2017).

Ein neuer Ansatz zur Osteoporosetherapie besteht in der direkten Antagonisierung von Sclerostin durch den Antikörper Romosozumab. Erste Studien an Männern und Frauen konnten bereits für beide Geschlechter eine Erhöhung der Knochendichte sowohl der Hüfte als auch der Lendenwirbelsäule zeigen. Dieser Effekt fiel stärker aus als bei der vergleichenden Therapie mit einem Parathormon-Analogon (McClung 2017).

Außer im Knochen konnte das SOST Gen auch in anderen Geweben wie im Knorpel, in der Leber und der Niere detektiert werden (Brunkow et al. 2001). In einer anderen Studie wurde zudem SOST mRNA im Herzen, der Lunge und im Pankreas nachgewiesen (Balemans et al. 2001; Wang et al. 2021). Bei Patienten mit primär biliärer Cholangitis (PBC), einer chronischen Erkrankung der Gallenwege, konnten sogar signifikant höhere Sclerostinspiegel im Blut und ein vermehrt exprimiertes SOST Gen in mit PBC befallenen Leberzellen als in gesunden Zellen der Kontrollgruppe festgestellt werden. Diese Erkrankung geht außerdem mit einem Verlust der Knochenmasse einher, was durch die erhöhten Sclerostinwerte erklärt werden könnte (Guañabens et al. 2016).

1.5.2 MLO-Y4

Die Osteozytenzelllinie *murine long bone osteocyte Y4* (MLO-Y4) wurde im Jahr 1997 aus murinen Osteozyten langer Röhrenknochen gewonnen, um die bis dahin unklare Rolle der Osteozyten im Knochenstoffwechsel besser untersuchen zu können. Hierfür wurden transgene Mäuse generiert, bei denen an die für Osteozyten typische Osteocalcin-Promotorregion ein onkogenes T-Antigen gekoppelt wurde, um die in vivo nicht

proliferationsfähigen Osteozyten zu immortalisieren. Dadurch konnten die proliferierenden Osteozyten isoliert und kultiviert werden. In nachfolgenden Untersuchungen zeigten sich die erhaltenen Eigenschaften von in vivo Osteozyten. Zudem wurde gezeigt, dass die Morphologie der Zellen auch nach 45 Passagen noch homogen ist. In den ersten Stunden nach Kultivierung zeigten die Zellen eine sternförmige Morphologie auf, nach ein bis zwei Tagen vergrößerten sich die Zellen, werden länglicher und bilden dendritische Ausläufer. Untereinander konnten so Kontakte ausgebildet werden (Abb. 3) (Kato et al. 1997).

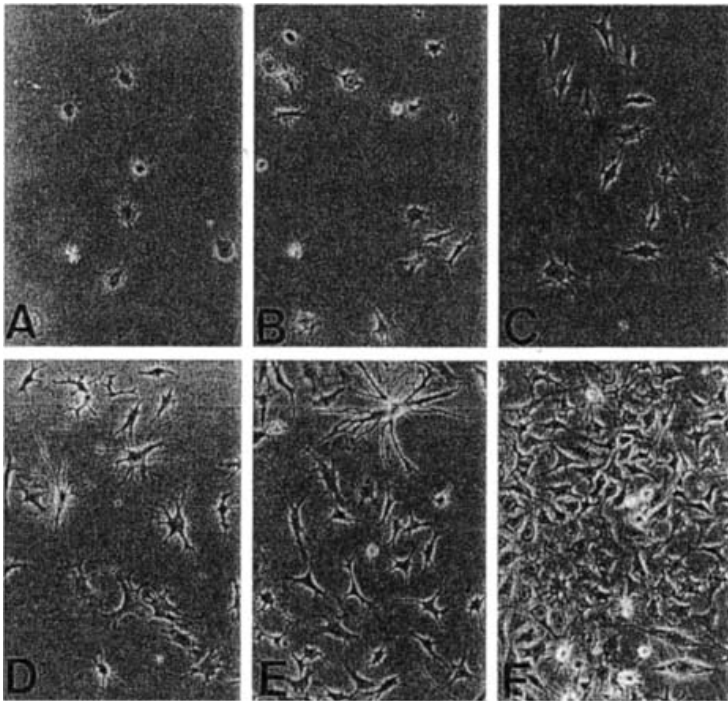


Abb. 3: Morphologie der MLO-Y4 in der Studie von Kato et al. (1997) auf einer Collagen-1-Beschichtung zwischen 3 h und 7 Tagen. Nach 3 h zeigt sich eine sternförmige und kleine Morphologie. Mit der Zeit nimmt die Länge der dendritischen Ausläufer zu und die Zellkörper werden größer. (A) 3 h; (B) 6 h; (C) 24 h; (D) 58 h; (E) 4 Tage; (F) 7 Tage. (Mit freundlicher Genehmigung von Kato et al. 1997)

Sowohl in der Morphologie als auch in der Genexpression ist die Osteozytenzelllinie MLO-Y4 den primären Osteozyten ähnlich. Bezüglich der Schlüsselproteine RANKL und OPG konnte sowohl in primären Osteozyten (Nakashima et al. 2011; Bellido 2014) als auch in MLO-Y4 (Yao et al. 2017; Zhao et al. 2002) in mehreren Studien eine Expression nachgewiesen werden. Auch für andere für Osteozyten charakteristische Proteine wie E11, welches für die Ausbildung der Dendriten in frühen Osteozyten verantwortlich ist (Bellido 2014), konnte eine Expression in MLO-Y4 nachgewiesen werden (Zhang et al. 2006).

Das vorherig beschriebene Gen SOST, welches in Osteozyten für die Synthese von Sclerostin zuständig ist, konnte in MLO-Y4 ebenfalls mehrfach nachgewiesen werden (Mabilleau et al. 2010; Shu et al. 2017).

1.6 BDNF/TrkB/p75NTR

Die Frakturheilung des menschlichen Knochens wird von vielen verschiedenen Faktoren beeinflusst. In der Arbeit von Kilian et al. (2014) konnte zum ersten Mal *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) während der Frakturheilung im Frakturspalt detektiert werden (Kilian et al. 2014). Dieser war bisher insbesondere durch seine Funktion im Gehirn von Bedeutung. BDNF gehört neben dem *nerve growth factor* (NGF), NT-3 und NT-4/5 zu der Gruppe der Neurotrophine (NT) (Hallböök 1999), die für das Überleben und die Differenzierung von Neuronen verantwortlich sind (Alderson et al. 1990). Dies spielt vor allem in der Gedächtnisbildung im Hippocampus eine Rolle, die schon häufig in Studien nachgewiesen wurde (Egan et al. 2003; Kang et al. 1997). Ein direkter Einfluss von BDNF besteht hier beispielsweise in der vermehrten Ausbildung von Dendriten von im Hippocampus lokalisierten Neuronen, was in einer verstärkten Vernetzung unter den Neuronen resultiert (Tolwani et al. 2002). Der Effekt von BDNF in Bezug auf die Gedächtnisbildung wird auch von der Erkenntnis gestützt, dass sich bei Alzheimer-Patienten eine verminderte Expression von BDNF mRNA herausgestellt hat (Phillips et al. 1991).

Die Wirkung von BDNF und anderen Neurotrophinen wird über zwei Rezeptorarten vermittelt. Diese sind einerseits die *tropomyosin receptor kinase* (Trk) Rezeptoren, die zu den Rezeptor-Tyrosinkinasen zählen, und andererseits der *p75 neurotrophin receptor* (p75NTR), an den die Neurotrophine mit einer geringen Affinität binden. Bezüglich der Trk-Rezeptoren wird noch einmal in TrkA, TrkB und TrkC unterteilt, wobei BDNF seine Effekte lediglich über TrkB entfaltet (Klein et al. 1991; Carter et al. 1996). Sobald Neurotrophine an den entsprechenden Trk-Rezeptor binden, dimerisiert dieser und eine Tyrosinkinase-Domäne des Rezeptors wird aktiviert, durch die eine Autophosphorylierung ausgelöst wird (Schlessinger und Ullrich 1992). Über die Aktivierung des Trk-Rezeptors konnte eine Inhibierung der Jun-Kinase-Kaskade nachgewiesen werden, die in Neuronen für die Einleitung der Apoptose verantwortlich ist (Yoon et al. 1998). Hieran kann der Effekt von Neurotrophinen bei Bindung an Trk als Überlebenssignal exemplarisch gesehen werden. Durch Bindung an den p75NTR wird jedoch der gegenteilige Effekt ausgelöst, indem der Jun-Kinase-Signalweg aktiviert und dadurch die Apoptose eingeleitet wird (Casaccia-Bonnel et al. 1996; Yang et al. 2021). In weiteren Studien konnte

Einleitung

gezeigt werden, dass eine proapoptotische Wirkung an p75NTR und dem Korezeptor Sortilin vor allem durch die Bindung von proBDNF (Abb. 4) erzielt wird (Teng et al. 2005; Yang et al. 2021).

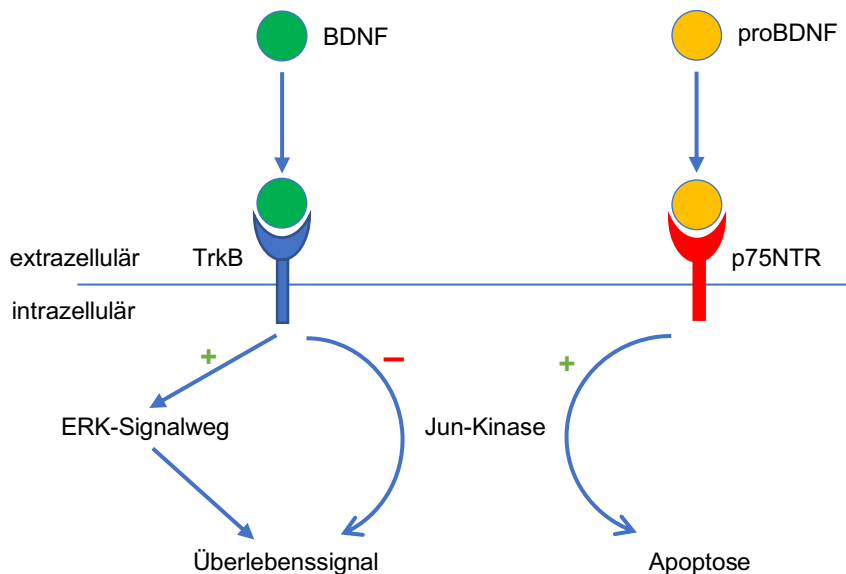


Abb. 4: Schematische Darstellung der Wirkweise von BDNF (grün) und proBDNF (gelb) auf die Rezeptoren TrkB (blau) und p75NTR (rot) sowie intrazellulär auf einzelne Signalwege

Die Synthese von BDNF wird teilweise von sensorischen Neuronen übernommen, die dadurch andere Neurone beeinflussen (Brady et al. 1999). Hier zu nennen seien vor allem Neurone der Spinalganglien (englisch *dorsal root ganglia*, DRG), die sensible Qualitäten an das Rückenmark vermitteln. In diesen Nervenzellen konnte eine hohe Expression von BDNF detektiert werden (Wetmore und Olson 1995). In Schwannzellen, den Zellen, die für die Synthese der Myelinscheide im peripheren Nervensystem verantwortlich sind, konnte ebenfalls BDNF mRNA ausgemacht werden. Diese scheinen in einer Kokultur mit Osteoblasten die Proliferation und Differenzierung dieser zu fördern, indem sie BDNF sezernieren (Cai et al. 2010; Meyer et al. 1992). Jedoch konnte zudem in Fibroblasten eine Expression von BDNF mRNA ermittelt werden (Cartwright et al. 1994). Neuere Studien wiesen eine Produktion von BDNF durch Endothelzellen von Lungenarterien nach. Eine vermehrte Sekretion konnte bei erniedrigten Sauerstoffwerten im Blut festgestellt werden, weshalb eine Beteiligung von BDNF bei Erkrankungen der Lungengefäße wie der pulmonalen Hypertonie diskutiert wird (Helan et al. 2014).

Kilian et al. (2014) haben darüber hinaus eine verstärkte Expression von BDNF im humanen Knochen während der Knochenheilung entdeckt. Schon vorher konnten BDNF, andere Neurotrophine und die zugehörigen Rezeptoren im Kallus während der Frakturheilung im Mausmodell detektiert werden. Die Expression von BDNF mRNA wurde hierbei insbesondere in osteoblasten-ähnlichen Zellen vorgefunden, wobei diese während

der Knochenheilung noch anstieg. TrkB, als Rezeptor von BDNF, konnte jedoch in keiner der beteiligten Zellen entdeckt werden (Asaumi et al. 2000). Sowohl im gesunden als auch im frakturierten Knochen konnten hingegen Kilian et al. (2014) TrkB mRNA nachweisen. Eine Expression von BDNF mRNA im gesunden spongiösen Knochen konnte nicht ermittelt werden, jedoch im Frakturspalt von Patienten nach Osteosynthesebehandlung in der Phase der Bildung der Fibrinmatrix und des Osteoids detektiert werden (Kilian et al. 2014). Eine weitere Studie konnte in Osteoblasten eine BDNF-abhängige Expression und Sekretion von VEGF feststellen. VEGF dient während der Frakturheilung dem Einsprossen von neuen Gefäßen und somit dem Einschwemmen von Zellen und Stoffen zur Knochenheilung (Zhang et al. 2017). Darüber hinaus exprimieren Osteoblasten unter dem Einfluss von BDNF vermehrt osteoblastentypische Marker wie Osteocalcin. Im Tiermodell konnte zudem eine schnellere Bildung von neuem Knochen nach einer Osteotomie des Unterkieferknochens bei exogener Zugabe von BDNF beobachtet werden. In Osteozyten konnte hierbei immunhistochemisch eine Hochregulierung von TrkB unter Zugabe von BDNF festgestellt werden (Ida-Yonemochi et al. 2017). Die Rolle von BDNF im Knochenstoffwechsel wurde ebenfalls in einer Studie erörtert, bei der Athletinnen mit einer funktionellen Amenorrhoe, also dem Ausbleiben der Menstruation und niedrigen Östrogen-Spiegeln, untersucht wurden. Bei ihnen konnte im Vergleich zu Athletinnen mit einem normalen Menstruationszyklus ein signifikant erniedrigter BDNF-Spiegel nachgewiesen werden. Auch die Knochenmasse lag bei den amenorrhöischen Athletinnen deutlich niedriger als bei der Kontrollgruppe. Unter einer Östrogentherapie erhöhte sich der BDNF-Spiegel wiederum, anders als in der unbehandelten Gruppe, in der der Spiegel weiter fiel (Nose et al. 2019). Dies wird auch von der Erkenntnis gestützt, dass eine Promotorregion des BDNF-Gens durch Östrogen beeinflusst und hierüber die Sekretion von BDNF hochreguliert wird (Fortress et al. 2014). Diese Annahmen weisen auf eine mögliche Rolle von BDNF bei der Osteoporose hin.

Um BDNF nicht dem gesamten Körper exogen zuzugeben und dadurch mögliche Nebenwirkungen auszulösen, bestand die Idee bei Kauschke et al. (2018B) darin, BDNF lediglich an dem Ort zu applizieren, an dem es wirken soll. Hierfür wurde die Knochenheilung von osteoporotischen Mäusen mit der von Wildtyp-Mäusen nach Osteotomie des Femurs verglichen. In den Frakturspalt wurde jeweils ein Knochenersatzmaterial auf der Basis von Tricalciumphosphat, welches mit mesoporösen, bioaktiven Glaspartikeln versehen war, gegeben. Die Glaspartikel wurden vorher entweder mit BDNF beladen oder ohne BDNF hinzugegeben. Dadurch sollte ein Freisetzen von BDNF aus dem Ersatzmaterial ermöglicht werden. In den Wildtyp-Mäusen konnte eine verstärkte Formation neuen Knochens unter Zugabe von BDNF im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen ohne Zugabe von BDNF zum Ersatzmaterial detektiert werden (Kauschke et al. 2018B).

1.7 BDNF-funktionalisierte PEK-NP

Mit der Funktionalisierung von PEK-NP mit BDNF soll erreicht werden, dass sich die positiven Effekte von BDNF mit der Funktion von PEK-NP als Bindemöglichkeit von Wirkstoffen an Knochenersatzmaterialien vereinen.

Bisher wurde der Effekt von BDNF-funktionalisierten PEK-NP lediglich auf die Differenzierung und Aktivität von Osteoklasten geprüft. Die PEK-NP bestanden bei dieser Studie aus PLL und CS. Durch einen höheren Einsatz des negativ geladenen Polyanions CS im Vergleich zu dem positiv geladenen Polykation PLL in die Synthese der PEK-NP konnte eine negative Nettoladung erzielt werden. Diese ist wichtig, da unter physiologischen Bedingungen BDNF positiv ist (Sasi et al. 2017) und somit die Bindung von BDNF an PEK-NP über eine Ionenbindung erreicht werden kann (Abb. 5).

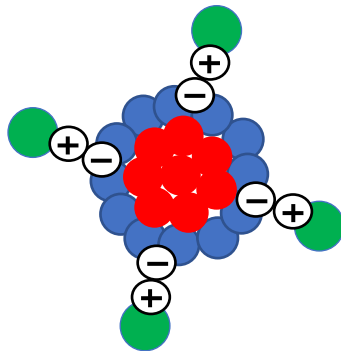


Abb. 5: Schematische Darstellung der Bindung von BDNF (grün) an PEK-NP, bestehend aus PLL (rot) und CS (blau)

Hierbei stellte sich heraus, dass eine hohe Konzentration von PEK-NP, unabhängig davon, ob diese mit oder ohne BDNF vorlagen, die Osteoklastogenese und die Aktivität von Osteoklasten hemmt. Dies zeigte sich auch in einer verminderten Resorption der Knochenmatrix. Bei einer Konzentration von 80 $\mu\text{mol/L}$ wurde die geringste Aktivität und Knochenresorption beobachtet. BDNF selbst schien keinen Einfluss auf die Osteoklastentätigkeit zu haben, was den knochenaufbauenden Effekt von BDNF untermauert (Kauschke et al. 2019). Weitere Studien, bei denen PEK-NP eingesetzt wurden, existieren bisher nicht.

1.8 Fragestellung

BDNF scheint sowohl im physiologischen Knochenstoffwechsel als auch bei der Frakturheilung und bei Erkrankungen des Knochens wie der Osteoporose eine wichtige Rolle einzunehmen. Um die Frakturheilung osteoporotischer Knochen zu verbessern und zu beschleunigen, wird weiterhin nach Wirkstoffen gesucht, mit denen Knochenersatzmaterialien funktionalisiert werden können. Die Kopplung solcher Wirkstoffe mit Ersatzmaterialien kann beispielsweise über PEK-NP geschehen, die vorher mit den entsprechenden Wirkstoffen versehen werden und diese verzögert freisetzen. Der Einfluss von PEK-NP ohne Wirkstoffe auf unterschiedliche Zelltypen des Knochenstoffwechsels wurde bereits in einigen Studien behandelt, wobei nach diesen Studien der Effekt von der Zellart abzuhängen scheint. Osteozyten fanden dabei als Zellart bisher noch keine Berücksichtigung. Auch der genaue Wirkmechanismus von BDNF auf den Knochenstoffwechsel und auf die einzelnen Knochenzellen ist Gegenstand aktueller Forschungsarbeiten. Dieser wurde bisher insbesondere in Bezug auf Osteoblasten und Osteoklasten untersucht (Abb. 6). Osteozyten nehmen allerdings im Knochenstoffwechsel eine immer deutlicher werdende Stellung ein.

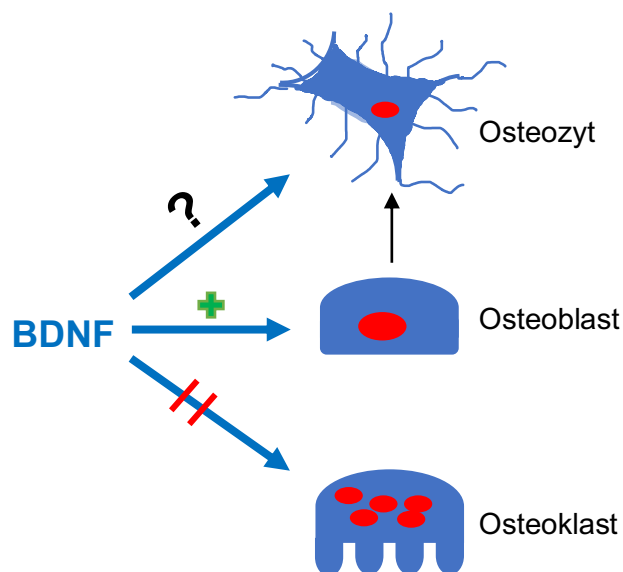


Abb. 6: Schema der bisher erforschten Wirkung von BDNF auf die Zelltypen des Knochens

Einleitung

Aus diesen Erkenntnissen ergeben sich folgende Fragen, die dieser Arbeit zu Grunde liegen:

- Welchen Effekt hat BDNF auf die Proliferation und die Aktivität der Osteozytenzelllinie MLO-Y4?
- Wirken sich PEK-NP auf die Vitalität von MLO-Y4 aus?
- Haben BDNF funktionalisierte PEK-NP einen abweichenden Effekt von der exogenen Zugabe von BDNF ohne PEK-NP?
- Beeinflussen DRG-Neurone als endogene Quelle von BDNF MLO-Y4 in ihrer Proliferation oder Aktivität?
- Wie wirkt sich BDNF auf die Expression des Osteozytenmarkers SOST und die knochenstoffwechselregulierenden Proteine RANKL und OPG aus?
- Werden BDNF, TrkB und p75NTR in Osteozyten exprimiert und beeinflusst die Zugabe von BDNF die Expression?

Durch die Erörterung des Effektes von BDNF auf Osteozyten kann der Knochenstoffwechsel besser verstanden werden und ein eventueller Benefit für die Knochenheilung abgeleitet werden. Die Erforschung der Zytokompatibilität der PEK-NP spielt hierbei ebenfalls eine wichtige Rolle, die bisher in Bezug auf Osteozyten noch nicht getestet wurde.

2 Material und Methoden

2.1 Zellkultur

2.1.1 Monokultur muriner DRG-Neurone

Zur Etablierung der murinen DRG-Neuronenkultur wurden die Spinalganglien von C57BL/6 Mäusen (Alter: 17-20 Wochen, Gewicht: 25,18 Gramm (g) - 33,13 g) entnommen. Nach Betäubung der Mäuse durch Isofluran wurden diese anschließend durch Genickbruch getötet und umgehend präpariert. Die Präparation erfolgte unter einem Präparationsmikroskop unter Zuhilfenahme einer Federschere, einer groben Schere, eines Skalpells und einer Pinzette. Nach Freilegung der autochthonen Rückenmuskulatur und der Wirbelsäule wurde diese mithilfe der groben Schere im Bereich der Lendenwirbelsäule abgetrennt und entlang der Processi spinosi nach kranial eröffnet. Nach Freilegung des Rückenmarks wurden durch Zug mit der Pinzette an den Radices posteriores die Spinalganglien aus den Foramina intervertebrales gezogen und mithilfe der Federschere distal abgetrennt. Daraufhin wurde die proximale Radix posterior ebenfalls mit der Federschere entfernt und das jeweilige Spinalganglion direkt in 25 mL, auf Eis gestelltes Hibernate-A Medium (life technologies, Paisley, Großbritannien) gegeben. Die Präparation dauerte pro Versuchsansatz - also pro Maus - ungefähr 30 Minuten. Nach der Präparation wurde der Verdauungsprozess begonnen, um die Neuronen aus den Spinalganglien herauszulösen. Hierfür wurde zunächst die Spinalganglien-Suspension zentrifugiert (300 *rounds per minute* (rpm), 90 Sekunden (s), 20°C) und vorsichtig der Überstand abpipettiert. Hierauf wurden 2 mL auf 37°C vorgewärmte Verdauungslösung [3 mg Collagenase (SIGMA, Steinheim, Deutschland) und 3 mg Dispase II (Roche, Mannheim, Deutschland), gelöst in 3 mL komplementiertem Hibernate-A Medium] hinzugegeben. Das komplementierte Hibernate-A Medium bestand aus Hibernate-A Medium, versetzt mit 1 % N1 Medium-Supplement (SIGMA), 1 % GlutaMax (life technologies, Darmstadt, Deutschland), 1 % Penicillin/Streptomycin (life technologies) und 5 % hitzeinaktiviertem fötalem Rinderserum (hiFBS, Biochrom, Berlin, Deutschland), welches auf 37°C vorgewärmt wurde. Die Hitzeinaktivierung erfolgte durch Erwärmen von FBS für 30 Minuten bei 56°C im Wasserbad.

Die Suspension aus Spinalganglien und Verdauungslösung wurde zunächst für 30 Minuten bei 37°C im Brutschrank auf einem Schüttler zur stetigen Durchmischung inkubiert. Eine nachfolgende mechanische Auftrennung der Spinalganglien wurde durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren in unterschiedlich weit geschmolzenen, nicht silikonisierten

Material und Methoden

Pasteurpipetten erreicht. Dadurch bot sich für die Verdaulösung in der Inkubationszeit bei 37°C zwischen den Pipettierschritten eine größere Angriffsfläche. Die Suspension wurde daraufhin durch ein Zellsieb mit einer Porengröße von 100 µm (100 µm Cell Strainer steril, Falcon, Corning, Wiesbaden, Deutschland) gegeben, um die Neurone von den bindegewebigen Anteilen zu trennen. Nach der Zugabe von 4 mL komplementiertem Hibernate-A Medium und abzentrifugieren der Suspension (1000 rpm, 3 Minuten, 25°C), wurde der Überstand vorsichtig abgeschüttet. Danach wurde das Pellet zweimal in 14 mL komplementiertem Hibernate-A Medium gewaschen (1000 rpm, 3 Minuten, 25°C).

Das gewaschene Pellet wurde im letzten Schritt in 2 mL komplementiertem Neurobasal-Medium (life technologies) suspendiert. Die Komplementierung war hierbei dieselbe wie die des Hibernate-A Mediums, lediglich ergänzt um die Zugabe des Mitoseinhibitors Arabinosylcytosin (AraC, SIGMA) in einer Konzentration von 10 nmol/L. Dieser sollte dazu dienen, das Wachstum der schnell proliferierenden Fibroblasten, sowie der langsamer proliferierenden Schwannzellen zu inhibieren.

Die Suspension aus Zellen und komplementiertem Neurobasal Medium wurde gleichmäßig auf insgesamt zwölf Wells einer 96-Well Platte (96-Well Platte PS TC steril, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) aufgeteilt. Pro Well wurden 100 µL komplementiertes Neurobasal-Medium hinzugegeben und die 96-Well-Platte im Brutschrank [37°C, 5 % Kohlendioxid (CO₂)] inkubiert.

Die Beschichtung der 96-Well-Platte erfolgte am Vortag pro Well mit 50 µL eines Gemisches aus Poly-L-Lysin (0,1 mg/mL), Specialty-Media, Darmstadt, Deutschland) und 1 % Laminin (Specialty Media). Vor Zugabe der Neuronensuspension wurden die Wells dreimal mit sterilem Wasser (Braun, Melsungen, Deutschland) gewaschen. Als Vitalitätszeichen der DRG-Neurone konnte die Ausbildung von Ausläufern (pseudounipolares Axon und Dendriten, Abb. 7) sowie die Formation eines Netzwerkes zwischen Neuronen und Schwannzellen beobachtet werden. Darüber hinaus diente das Anwachsen am beschichteten Untergrund als Indikator der Vitalität, sodass beim Mediumwechsel avitale Neurone oder Schwannzellen entfernt wurden. Ein Mediumwechsel fand alle drei Tage statt.

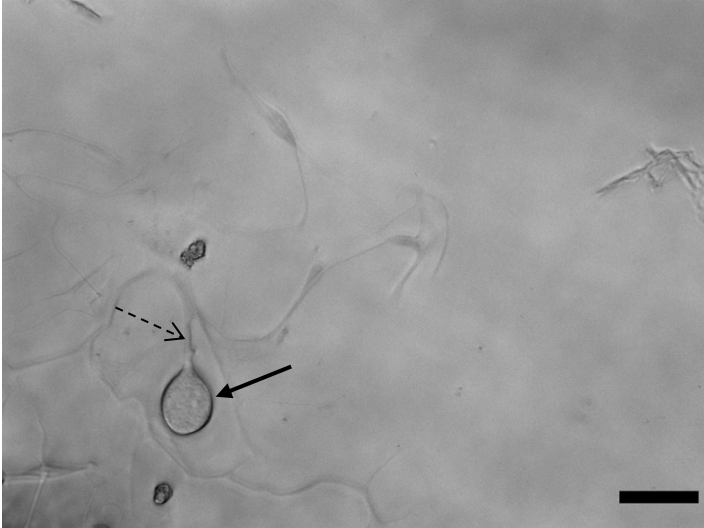


Abb. 7: Lichtmikroskopische Lebendzellbeobachtung der DRG-Neurone (Pfeil) mit ausgebildetem pseudounipolarem Axon (gestrichelter Pfeil) und umgebenden Schwannzellen in der Monokultur, Maßstab 50 μm .

2.1.2 Monokultur der MLO-Y4

Die Osteozytenzelllinie MLO-Y4 (LGC Standards GmbH, ATCC, Wesel, Deutschland) wurde als Passage 10 erworben. In den folgenden Experimenten wurde mit Passagen zwischen 16 und 23 gearbeitet. Zur Kultivierung wurden beschichtete 10 cm Zellkulturschalen verwendet, die jeweils einen Tag vorher mit Collagen-1 (Corning, Bedford, MA, USA) in 0,02 normaler (N) Essigsäure beschichtet wurden (15 Mikrogramm (μg) Collagen-1 pro Quadratzentimeter (cm^2) Wachstumsfläche). Diese wurden vor Kultivierung der MLO-Y4-Zellen zweimalig mit *phosphatgepufferter Saline* (PBS, life technologies) gewaschen. Als Kultivierungsmedium fand α -MEM Medium (life technologies) Anwendung, welches mit 5 % hiFBS, 5 % fötalem Kälberserum (NCS, PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland), sowie 0,2 % Gentamicin/Amphotericin B (life technologies) versetzt wurde. Die Kultur wurde ebenfalls im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert. Aufgrund der hohen Proliferationsrate wurde die Kultur alle drei bis vier Tage passagiert, wobei die Zellen mit Trypsin (TrypLE Express, life technologies) vom Untergrund gelöst wurden.

Mittels lichtmikroskopischer Beobachtung wurde die Morphologie der Zellen dokumentiert. Auch hier galt das Ausbilden von Ausläufern und von Kontakten unter den MLO-Y4 sowie die Proliferation der Zelllinie als Vitalitätsparameter. Darüber hinaus diente als Anzeichen einer adäquaten Differenzierung eine Größenzunahme der Zellen über die Zeit sowie eine Veränderung der Form von rundlich mit kurzen Ausläufern bis hin zu länglich mit spitzen und langen Ausläufern (Abb. 8).

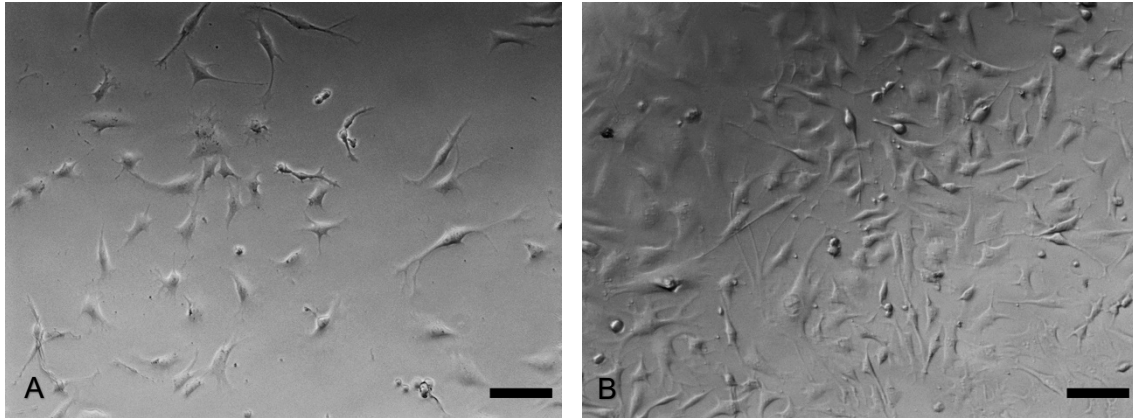


Abb. 8: Lichtmikroskopische Lebendzellbeobachtung der MLO-Y4-Monokultur 2 h (A) und 24 h nach BrdU-Zugabe (B). Sichtbar ist die Differenzierung der MLO-Y4 unter Zunahme des Zellvolumens als auch der Länge der Osteozytenausläufer, Maßstab 100 µm.

Nicht benötigte Zellen wurden in 5-prozentigem Dimethylsulfoxid (DMSO, ATCC) in hiFBS (Biochrom) zunächst im Isopropanolkühler (Nalgene, Neerijse, Belgien) auf -80°C abgekühlt und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.1.3 Kokultur DRG-Neurone/MLO-Y4

Die Etablierung der DRG-Neuronen/MLO-Y4-Kokultur geschah in modifizierter Form unter Anpassung an die hiesigen Laborbedingungen und -erfahrungen nach dem Vorbild von Boggs et al. 2011.

Da ein Gemisch aus Poly-L-Lysin und Laminin als eine geeignete Beschichtung für die Neuronenkultur im Labor bereits standardmäßig verwendet wurde, wurde diese in einem Vorversuch ebenfalls für die MLO-Y4-Monokultur untersucht. Hierbei wurde beobachtet, dass MLO-Y4 auf einer mit Poly-L-Lysin/Laminin beschichteten Wellplatte ähnliche morphologische und proliferative Eigenschaften aufwies wie auf einer mit Collagen-1 beschichteten Wellplatte (Abb. 9).

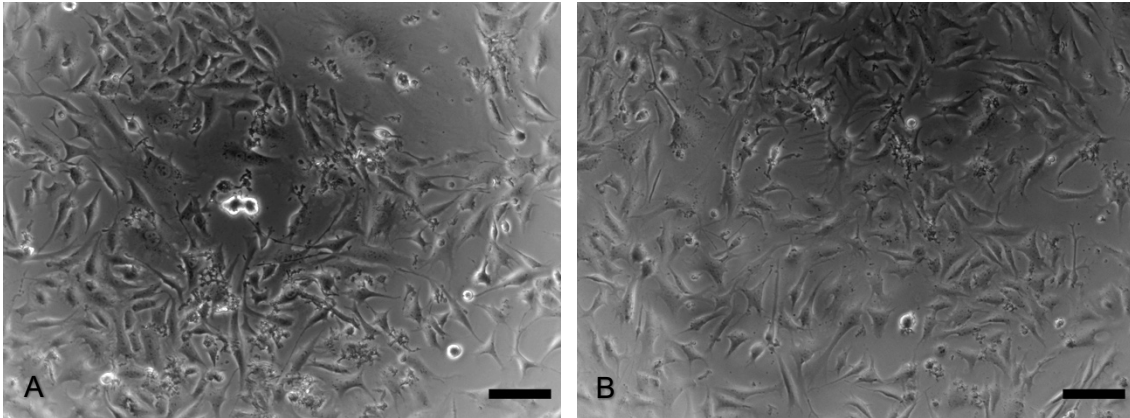


Abb. 9: Lichtmikroskopische Lebendzellbeobachtung der MLO-Y4-Monokultur nach 48 Stunden (h) auf kollagenbeschichtetem (A) und lamininbeschichtetem Zellkulturplastik (B). Sowohl die Morphologie als auch die Zelldichte der MLO-Y4 betreffend, lassen sich zwischen den Beschichtungen keine Unterschiede feststellen, Maßstab 100 μm .

Anhand dessen wurde die Poly-L-Lysin/Laminin-Beschichtung als geeignet für eine Kokultur aus DRG-Neuronen und MLO-Y4 befunden.

Zuerst wurde eine Monokultur von DRG-Neuronen wie oben beschrieben mit einer ungefähren Dichte von 500 Zellen/ cm^2 angelegt. Um ein Anwachsen der Zellen und die Wirkung des Mitoseinhibitors AraC auf Fibroblasten und Schwanzzellen zu ermöglichen, wurde die Kultur unter oben genannten Bedingungen für 22 h inkubiert. Anschließend wurden die Kulturen zur Entfernung von AraC zweimal mit PBS gewaschen, da AraC das Überleben der proliferierenden MLO-Y4 verhindert. Der proliferationshemmende Effekt von AraC auf MLO-Y4 bestätigte sich in Vorversuchen. Pro Well wurden ähnlich wie bei Boggs et al. (2011) 200 μL komplementiertes DMEM/F12 Medium (life technologies), welches vorher mit 1 % N1, 0,2 % Gentamicin/Amphotericin B und 5 % hiFBS versetzt wurde, vorgelegt.

Für die Zugabe der MLO-Y4 zu der DRG-Neuronen-Kultur wurden die Osteozyten aus einer Zellkulturschale zunächst mit Trypsin (TrypLE Express, 6 Minuten Inkubation) gelöst und danach in einem 50 mL Röhrchen abzentrifugiert (1200 rpm, 5 Minuten, 25°C). Nach vorsichtigem Abschütten des Überstands wurde das Zellpellet in 1-2 mL komplementiertem DMEM/F12 Medium resuspendiert. Die Zelldichte dieser Suspension wurde mit einem Zellzähler (CASY, innovatis, Bielefeld, Deutschland) bestimmt und pro Well anschließend die entsprechende Menge der Suspension zugegeben, um eine Zelldichte von 5000 MLO-Y4/ cm^2 zu erreichen. Die Entnahme dieser entsprechenden Menge wurde unter ständigem Schütteln der Zellsuspension vorgenommen. Die Dichte von 5000 MLO-Y4/ cm^2 stellte sich in Vorversuchen als geeignet heraus. Die Entwicklung der Kokultur wurde in den folgenden Tagen lichtmikroskopisch beobachtet und fotografisch dokumentiert. Ein Mediumwechsel fand alle drei Tage statt.

Im Anschluss wurde der Einfluss von exogenem BDNF und BDNF-funktionalisierten PEK-Nanopartikeln auf dieses Kokulturmodell überprüft.

2.2 **BDNF ELISA**

In Kooperation mit dem Leibniz-Institut für Polymerforschung Dresden e.V. stellte David Vehlow aus der Arbeitsgruppe PD Dr. Martin Müller für dieses Experiment mit BDNF (humanes rekombinantes BDNF, SIGMA) die erwähnten BDNF-funktionalisierten PEK-Nanopartikel (PEK-NP+BDNF) her. Sowohl die Produktbeschreibung des BDNF als auch die Proteindatenbanken (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) ergaben identische Aminosäuresequenzen von humanem und murinem BDNF sowie eine volle Kreuzreaktivität unter den Spezies, sodass in dieser Arbeit humanes BDNF für murine Zellkulturen verwendet wurde. Die Konzentration des gebundenen BDNFs belief sich in der PEK-NP Dispersion auf 0,008 µg/µL. Da bisher nicht untersucht war, welche Menge BDNF aus den Partikeln freigesetzt wird, wurde dies in einem Freisetzungsversuch näher beleuchtet. In vorherigen Arbeiten mit BDNF wurde wiederholt mit der Konzentration von 40 ng/mL gearbeitet (Kauschke et al. 2018A; Kauschke et al. 2019), sodass diese als Referenz galt. Um zusätzlich die Aufrechterhaltung der Konzentration im Medium zu überprüfen, wurde ein Versuch mit drei Messzeitpunkten und sechs unterschiedlichen Mengen BDNF-funktionalisierten PEK-NP durchgeführt. Die eingesetzten, an PEK-NP gebundenen Mengen BDNF beliefen sich auf 400, 200, 100, 60, 40 und 20 ng, die in 600 µL komplementiertes DMEM-Medium gegeben wurden. Die eingesetzten BDNF-Mengen wurde über die Menge der PEK-NP gesteuert, sodass für alle Ansätze eine Art PEK-NP+BDNF (PLL/CS 0,002 M) verwendet wurde. Die Konzentration des an PEK-NP gebundenen BDNF in der in Dresden hergestellten Lösung betrug nach der Funktionalisierung 0,008 µg/µL. 10 µL des Mediums wurden jeweils nach 1, 24 und 32 h entnommen und eingefroren, um alle Proben demselben Durchlauf des ELISA zu unterziehen. Im Anschluss daran folgte ein weiterer Freisetzungsversuch, in dem der Verlauf von mit 40 ng BDNF funktionalisierten PEK-NP und von 8 ng reinem BDNF (Zielkonzentration 40 ng/mL) verglichen wurde. Diese wurden jeweils in 200 µL komplementiertes DMEM/F12-Medium gegeben, woraufhin nach 1, 24, 32 und 48 h 10 µL des Mediums für die spätere Bestimmung der BDNF-Konzentration eingefroren (-80°C) wurden. Für den Ansatz mit Zugabe von PEK-NP+BDNF errechnete sich eine Konzentration der PEK-NP im Medium von 32 µmol/L.

Zur Quantifizierung der freigesetzten Menge BDNF aus den PEK-NP+BDNF wurde das Human Free BDNF ELISA Kit (Quantikine, R&D Systems, Abingdon, Großbritannien)

verwendet. Bei diesem Versuch handelte es sich um einen Sandwich-ELISA unter Verwendung einer mit anti-BDNF-Antikörpern vorbeschichteten Platte. Vor der Durchführung des ELISAs wurden der Waschpuffer (Kit-Bestandteil) und die Substratlösung (Kit-Bestandteil) nach den Angaben des mitgelieferten Protokolls, sowie eine Verdünnungsreihe eines BDNF Standards (Kit-Bestandteil) angesetzt. Der Bereich der Verdünnungsreihe und damit die bestimmbaren Konzentrationen lagen in einem Bereich zwischen 62,5 Pikogramm pro Milliliter (pg/mL) und 2000 pg/mL. Die Proben wurden in Eis schonend aufgetaut und entsprechend ihrer zu erwartenden Maximalkonzentration vorher mit DMEM-Medium (life technologies) verdünnt. Anschließend wurde gemäß der Anzahl der Proben in jedes Well 100 µL *Assay Diluent RD1S* (Kit-Bestandteil) gegeben. Nach Zugabe von 50 µL der jeweiligen Proben, der Standardreihe sowie einer Negativkontrolle mit Medium wurde die Wellplatte nach Abdeckung mit einer Folie für 2 h inkubiert. Daraufhin wurden 100 µL des Detektionsantikörpers (Kit-Bestandteil) hinzugegeben und für 1 h inkubiert. Der Inhalt der Wells wurde anschließend dekantiert und dreimal mit ungefähr 400 µL Waschpuffer (Kit-Bestandteil) gewaschen. Nach Zugabe von 200 µL Substratlösung pro Well wurde die Platte für 30 Minuten im Dunkeln inkubiert. Hierauf folgte der Zusatz von 50 µL Stopplösung (Kit-Bestandteil) pro Well. Im Anschluss wurde die Absorption im ELISA Reader (BioTek, Bad Friedrichshall, Deutschland) bei 450 nm mit einer Referenz von 540 nm gemessen. Die Standardreihe diente über eine Ausgleichsgerade zur Bestimmung der Konzentration der jeweiligen Probe. Die im ELISA gemessenen Konzentrationen wurden im Anschluss mit der anfänglichen Verdünnung der jeweiligen Probe multipliziert. Zudem wurde eine Probe mit Nanopartikeln ohne BDNF-Zusatz als Kontrolle mitgeführt.

2.3 Proliferationsassay BrdU

Um den Einfluss von BDNF auf das Proliferationsverhalten der MLO-Y4-Zelllinie zu untersuchen, wurde ein Proliferationsassay (Cell Proliferation ELISA BrdU, Roche) durchgeführt. Dieser basiert darauf, dass zu einem bestimmten Zeitpunkt das Pyrimidinanalogon 5-Brom-2'-Desoxyuridin (BrdU) zu dem Zellkulturmedium gegeben wurde und dieses anschließend bei jedem Mitosevorgang anstelle des Nukleosids Desoxythymidin in die DNA eingebaut wurde. Daraufhin war es möglich zu bestimmten Messzeitpunkten den Vorgang durch Absaugen des Mediums zu stoppen und die Zellen durch FixDenat (Kit-Komponente) zu denaturieren. Diese Denaturierung ist notwendig, um das in die DNA eingebaute BrdU für die im Folgenden zugegebenen Antikörper zugänglich zu machen. Durch Zugabe der anti-BrdU-Antikörper (Kit-Komponente), die bereits den

Detektionsantikörper enthalten, der wiederum mit einer Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt ist, konnte nach einem Waschvorgang die Peroxidase das zugegebene Substrat umsetzen. Je mehr Mitosen also stattfanden, desto mehr BrdU befand sich in der DNA, was im letzten Schritt zu einer schnelleren Umsetzung des Substrats führte (Abb. 10).

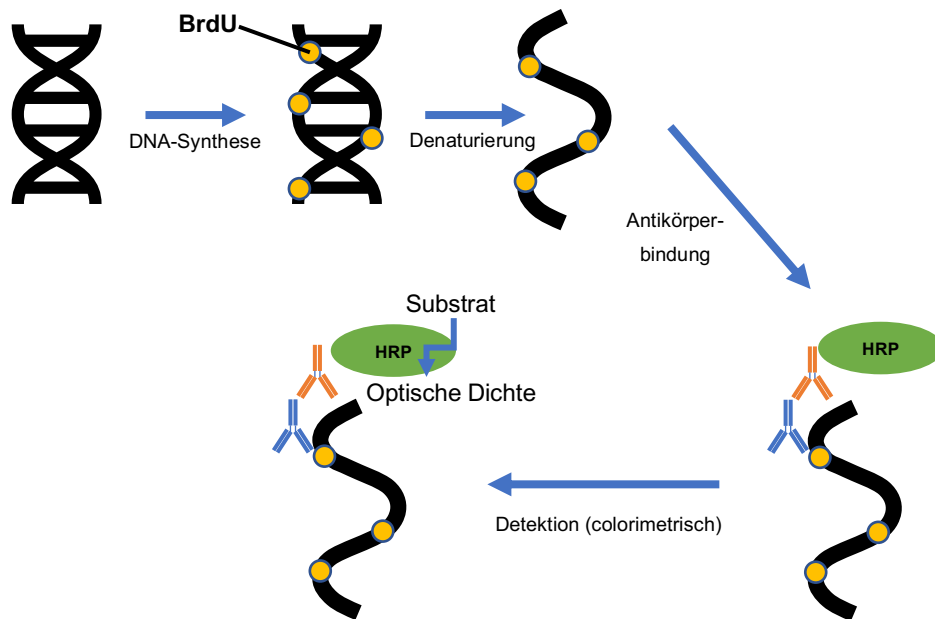


Abb. 10: Schematische Darstellung des Ablaufs des Proliferationsassays BrdU: DNA (schwarz), BrdU (gelbe Kreise), anti-BrdU-Antikörper (blauer Antikörper), Detektionsantikörper mit HRP (orangener Antikörper).

Der Umsatz des Substrats wurde nach 30 Minuten durch Schwefelsäure (H_2SO_4) gestoppt. Der Farbumschlag fand zunächst von farblos nach blau statt, durch Zugabe von Schwefelsäure schlug die Substratlösung in gelb um (Abb. 11).

Daher wurde im Anschluss die Absorption im ELISA Reader (BioTek) bei 450 nm mit einer Referenz von 690 nm gemessen.

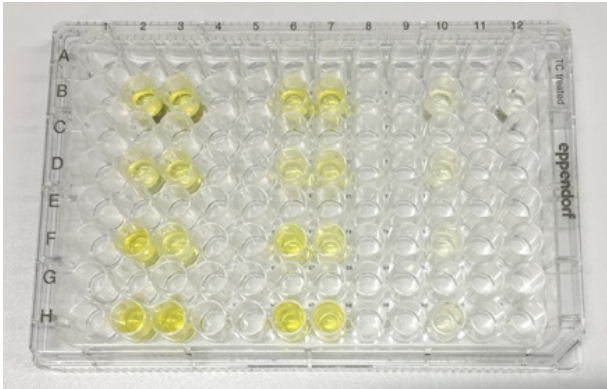


Abb. 11: Proliferationsassay BrdU nach Farbumschlag bei Zugabe der Schwefelsäure (vergleiche Schema Abb. 13).

Um die Reproduzierbarkeit der Proliferation der MLO-Y4-Monokultur bezogen auf die initial ausgesäte Zelldichte zu überprüfen, wurden im Rahmen eines Vorversuches vier Zelldichten untersucht. Hierfür wurde eine 96-Well-Platte (Eppendorf) wie oben beschrieben mit Poly-L-Lysin/Laminin beschichtet und MLO-Y4 in Zelldichten von 1500 Zellen/cm² (n = 3), 3000 Zellen/cm² (n = 3), 5000 Zellen/cm² (n = 3) sowie 10000 Zellen/cm² (n = 6) ausgesät. Die Zusammensetzung des Mediums wurde wie bei der Kokultur gewählt. Nach 24 h wurde allen Ansätzen BrdU hinzugegeben sowie 20 h später der BrdU-Assay durchgeführt. Hierbei zeigten sich nur geringe Schwankungen innerhalb der einzelnen Zelldichten, sodass von einer reproduzierbaren Proliferation der MLO-Y4 ausgegangen werden konnte (Abb. 12).

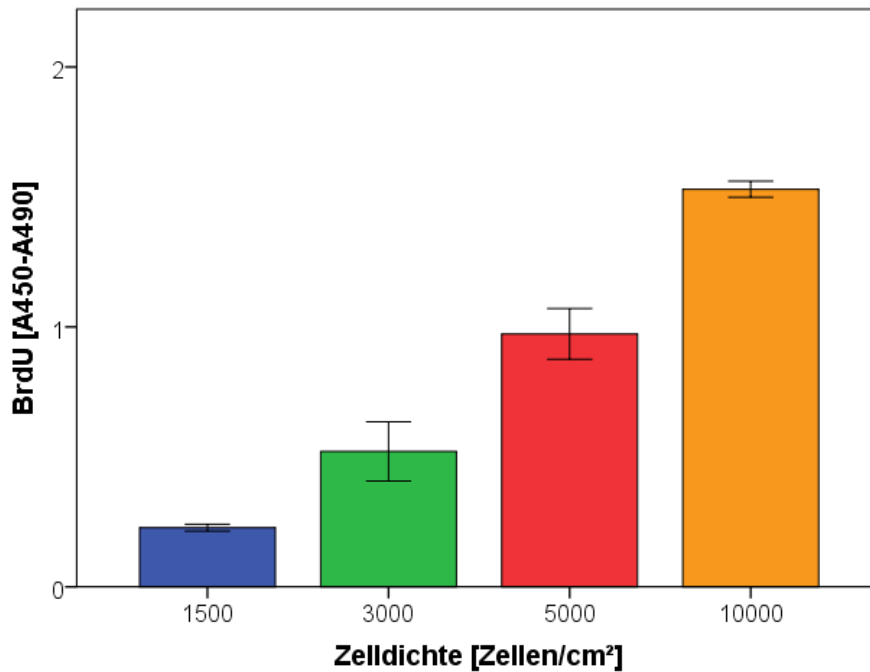


Abb. 12: Proliferation im BrdU-Assay einer MLO-Y4-Monokultur nach 20 h Inkubationszeit im Vergleich der initialen Aussaat von 1500 Zellen/cm² (blau), 3000 Zellen/cm² (grün), 5000 Zellen/cm² (rot); n = 3, sowie 10000 Zellen/cm² (orange); n = 6. Der Fehlerbalken zeigt das 95 % Konfidenzintervall an. Hierbei ergeben sich keine starken Schwankungen im BrdU-Wert unter Ansätzen mit der gleichen Zelldichte.

Für den Hauptversuch des Proliferationsassays wurde zunächst, wie in Kapitel 2.1.3 beschrieben, die DRG-Neurone/MLO-Y4-Kokultur sowie als Referenz jeweils DRG-Neurone- beziehungsweise (bzw.) MLO-Y4-Monokulturen angelegt. Da die Osteozyten in diesem Prozess erst später hinzugegeben wurden, wurden auch die Wells, die für die MLO-Y4-Kultur vorgesehen waren, wie die der Neurone behandelt. Dadurch wurde die Vergleichbarkeit vor allem zwischen der Kokultur und der Osteozytenkultur sichergestellt. Die Kulturen wurden anschließend 24 h nach Zugabe der Osteozyten inkubiert. Nach dieser Zeit wurde sowohl BrdU zu jeder Kultur als auch die einzelnen Zusätze in das Medium gegeben. Zum einen handelte es sich hierbei um den Zusatz von 8 ng BDNF zu 200 µL Medium, sodass eine Konzentration von 40 ng/mL erreicht wurde. Der zweite Zusatz bestand in den PEK-NP+BDNF, die mit einer Menge von 40 ng BDNF versetzt waren. Zur Kontrolle des Einflusses der Nanopartikel ohne BDNF auf die einzelnen Kulturen, wurden diese zudem als Kontrolle in der gleichen Konzentration wie im Ansatz der PEK-NP+BDNF (32 µmol/L) mitgeführt. Als weitere Kontrolle dienten Ansätze ohne Zusatz (Abb. 13). Pro Versuchsansatz wurden drei Wellplatten mit den Neuronen derselben Maus angesetzt, um die Proliferation anhand des Assays nach 8 h, 24 h und 32 h zu quantifizieren. Alle Zellkulturansätze wurden einer Doppelbestimmung unterzogen, die

DRG-Neuronenkultur ausgenommen. Dieser Versuch wurde insgesamt fünfmal mit jeweils Neuronen einer anderen Maus durchgeführt (n = 5).

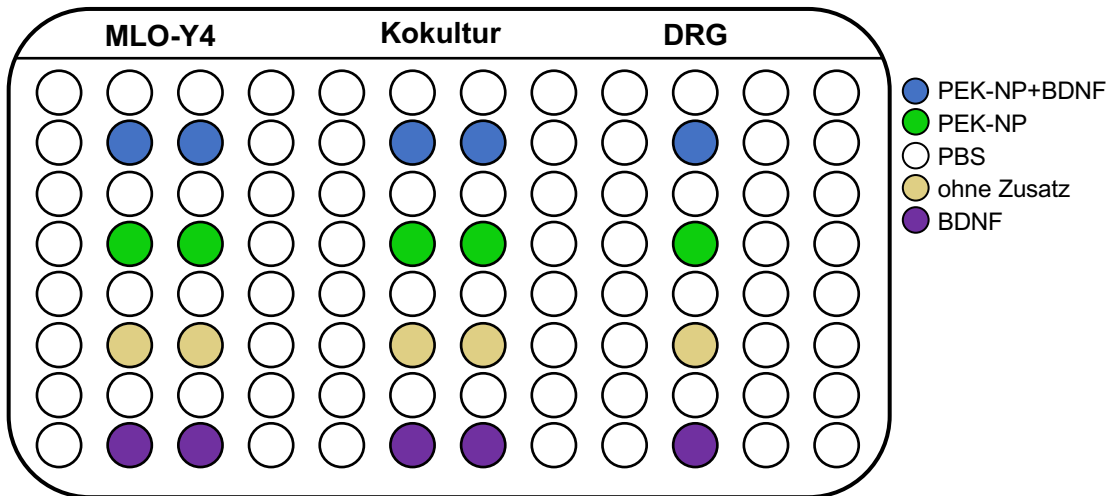


Abb. 13: Plattenlayout der 96 Well-Platte des BrdU-Proliferationsassays.

2.4 Real-time RT-PCR

2.4.1 Versuchsaufbau

Im weiteren Verlauf stellte sich die Frage, welche Auswirkungen BDNF auf die Expression der mRNA bestimmter Zielgene in den Osteozyten hat. Um dies näher zu untersuchen, wurde sowohl die Expression von BDNF und den zugehörigen Rezeptoren Trk-B und p75NTR als auch von SOST, welches die Apoptose von Osteozyten reguliert sowie Osteoblasten und Osteoklasten beeinflusst, näher betrachtet. Des Weiteren wurden die Genabschnitte des Osteoklastenregulators RANKL, sowie dessen Gegenspieler OPG untersucht. Hierdurch sollte ein möglicher Einfluss des BDNF auf den Knochenstoffwechsel über diese Regulatoren eruiert werden.

Um die nötige Menge RNA für die real-time Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (real-time RT-PCR) zu gewinnen, wurde eine 24 Well-Platte (Falcon, Corning, Wiesbaden, Deutschland) verwendet und später jeweils drei Wells gepoolt. Um den Aufbau ähnlich dem des Proliferationsassays zu gestalten, wurde die 24-Well-Platte ein Tag vor Zugabe der Zellen mit Poly-L-Lysin/Laminin beschichtet. Hierfür wurden 3 mL Poly-L-Lysin mit 30 μ L Laminin versehen und pro Well 275 μ L des Gemisches zugegeben. Am darauffolgenden Tag wurden die Wells dreimalig mit destilliertem Wasser vorsichtig gewaschen und pro Well 1,1 mL komplementiertes DMEM/F12-Medium vorgelegt. Die Komplementierung bestand ebenfalls in der Beigabe von 1 % N1, 0,2 % Gentamicin/Amphotericin B und 5 % hiFBS. Damit eine Genanalyse der MLO-Y4 möglich war, mussten

diese in einer Monokultur angelegt werden, was erneut mit einer Zelldichte von 5000 Zellen/cm² am Tag nach der Beschichtung geschah. Nach der Zellzahlbestimmung mittels CASY-Zellzähler, wurden pro Well 10.000 Zellen hinzugegeben. Die Zellen wurden für 22 h im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert, woraufhin eine Zugabe von 44 ng BDNF zu der Hälfte der Kulturen erfolgte (Zielkonzentration 40 ng/mL). Die andere Hälfte der Ansätze wurde ohne Zugabe von BDNF als Kontrolle geführt. Nach weiteren 24 h Inkubationszeit wurde die RNA extrahiert. Der Versuch wurde insgesamt fünfmal wiederholt (n = 5).

2.4.2 RNA-Extraktion

Die RNA-Extraktion erfolgte mit dem Qiagen RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland). Nach einmaligem Waschen der Zellen mit PBS wurden diese durch Zugabe von 200 µL RLT-Puffer (Kit-Komponente) pro Well und Auf- und Abpipettieren lysiert. Anschließend wurden jeweils drei Wells gepoolt, wodurch sich ein Gesamtvolumen von 600 µL Zell/Puffer-Gemisch ergab. Dieses wurde anhand einer Qiashredder-Säule mechanisch zerkleinert (14.000 rpm, 2 Minuten). Durch Zugabe von Ethanol (70 %) wurde erzielt, dass die RNA sich im nächsten Schritt optimal an die Spin-Säule haften konnte. Im Anschluss wurde die RNA auf die Spin-Säule aufgetragen und mittels verschiedener Pufferlösungen des Kits (RW1 und RPE) in drei Schritten gereinigt. Die gebundene RNA wurde im letzten Schritt in 30 µL RNase-freiem Wasser eluiert und die RNA-Konzentration anhand eines Photometers (Nano Drop 1000 Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific, Wisconsin, USA) bestimmt. Hierbei wurde darauf geachtet, dass der Proteinanteil der Proben nicht zu hoch war, was über den Absorptionsquotienten A₂₆₀/A₂₈₀ überprüft wurde. Dieser sollte stets zwischen den Werten 1,8 und 2,2 liegen, was bei allen Proben gegeben war (2,00 - 2,18). Die erhaltenen RNA-Konzentrationen befanden sich im Bereich von 31,2 - 68,1 Nanogramm pro Mikroliter (ng/µL). Die RNA-Proben wurden anschließend bei -80°C bis zur *complementary deoxyribunucleic acid* (cDNA)-Synthese aufbewahrt.

2.4.3 cDNA-Synthese und real-time RT-PCR

Die Synthese der cDNA erfolgte mithilfe des Quantitect Kit (Qiagen). In die cDNA-Synthese sollten pro Probe 500 ng RNA und für einen Reverse Transkriptase-negativen [RT (-)] - Ansatz 250 ng RNA eingesetzt werden. Der RT (-) - Ansatz war vor allem für den BDNF-Primer notwendig, da dieser nicht intronspannend ist. Die weiteren verwendeten

Material und Methoden

Primer waren intronspannende Primer. Die RNA wurde zunächst einer Elimination der genomischen DNA unterzogen, was anhand eines gDNA Wipeout Puffers erfolgte. Hierfür wurden jeweils teils mit RNase-freiem Wasser verdünnte 18 µL RNA mit 3 µL des gDNA Wipeout Puffers versehen. Da maximal mit 18 µL der RNA-Proben gearbeitet werden konnte, ergab sich für drei Proben eine geringere Menge RNA als 750 ng (mindestens 561,6 ng). Die gDNA-Eliminierung erfolgte für fünf Minuten bei 42°C.

Darauffolgend wurde für alle Proben ein Reverse Transkriptase-positiver (RT (+)) - Mastermix angesetzt, jeweils bestehend aus 1 µL Quantiscript Reverse Transkriptase, 4 µL eines Desoxynukleosidtriphosphat-Mixes sowie 1 µL eines RT-Primer-Mixes. Für den RT (-) - Mastermix wurde die Quantiscript Reverse Transkriptase durch RNase-freies Wasser ersetzt. Die RNA wurde anschließend jeweils mit dem RT (+) - bzw. dem RT (-) - Mastermix für 30 Minuten bei 42°C inkubiert. Für den RT (+) - Ansatz wurden je 14 µL RNA jeder Probe mit 6 µL RT (+) - Mastermix, für den RT (-) - Ansatz 7 µL RNA mit 3 µL RT (-) - Mastermix versetzt. Durch weitere drei Minuten Inkubation bei 95°C wurde die Reverse Transkriptase inaktiviert. Anschließend wurden alle Proben für beide Ansätze im Verhältnis 1:4 mit RNase-freiem Wasser verdünnt.

Bei der nachfolgenden real-time RT-PCR diente β -Actin als Referenzgen. Die PCR wurde mit dem QuantiFast SYBR Green RT-PCR Kit (Qiagen) durchgeführt. Dieses beruht darauf, dass während der PCR gebildete doppelsträngige DNA von dem im Mastermix vorliegenden Farbstoff SYBR Green gebunden wird und dieser daraufhin ein Fluoreszenzsignal emittiert. Die Emissionsmaxima dieses Farbstoffes liegen bei 494 nm und 521 nm.

4 µL der cDNA einer Probe wurden pro Durchlauf mit 0,2 µL des jeweiligen Primers, sowie 5 µL des vorgefertigten Mastermixes (bestehend aus HotStart Taq Plus DNA-Polymerase, Pufferlösung, dNTP-Mix, sowie SYBR Green und ROX Farbstoffe) versehen und mit 0,8 µL RNase-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 10 µL ergänzt. Dieser Ansatz wurde in eine Glaskapillare gegeben und zentrifugiert (2000 rpm, 20°C, 40 Sekunden). Pro Durchlauf wurde jeweils eine negative Kontrolle angesetzt, in der die cDNA durch RNase-freies Wasser ersetzt wurde. Nach Zentrifugation wurden die Proben im Lightcycler (Roche) mit folgendem PCR-Programm analysiert. Die anfängliche Aktivierung der HotStarTaq Plus DNA-Polymerase fand bei 95°C über fünf Minuten statt, worauf 40 PCR-Zyklen folgten. Ein Zyklus setzte sich aus 10 Sekunden Denaturierung bei 95°C, sowie Anlagern des Primers und Polymerisation für 30 Sekunden bei 60°C zusammen. Um die Spezifität der PCR-Reaktion sicherzustellen, wurde anschließend eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, indem die Temperatur kontinuierlich von 60°C auf 95°C erhöht wurde. Dadurch konnten gebildete Primerdimere oder unterschiedliche

PCR-Produkte detektiert bzw. ausgeschlossen werden. Alle PCR-Proben wurden einer Doppelbestimmung unterzogen.

Zur Berechnung der relativen (rel.) Genexpression wurden zunächst die Mittelwerte der *crossing point* (cp)-Werte der Doppelbestimmungen für β -Actin jedes Ansatzes und für das jeweilige Gen jedes Ansatzes bestimmt. Anschließend wurde für jeden Ansatz die Differenz aus dem cp-Wert des betreffenden Gens und dem cp-Wert des β -Actins gebildet (Δ cp). Daraufhin wurde ein Mittelwert aus den Δ cp-Werten aller Kontrollansätze (ohne BDNF-Zusatz) für das jeweilige Gen gebildet und dieser von den jeweiligen Δ cp-Werten subtrahiert ($\Delta\Delta$ cp). Nun wurde eine Potenz mit der Basis 2 und dem Exponenten $-\Delta\Delta$ cp gebildet, was die rel. Genexpression ergab.

2.4.4 Primer

Die Primer der Zielgene waren bis auf p75NTR im Labor der Experimentellen Unfallchirurgie Gießen bereits etabliert. Für das Primerdesign wurde vorerst aus der öffentlichen pubmed Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) die entsprechende Sequenz für das Zielgen ermittelt. Anhand eines Programms (<http://frodo.wi.mit.edu/>) wurden die Primer entworfen und anschließend auf ihre Genspezifität getestet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Alle Primer wurden von der Firma Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland) hergestellt.

Für die Etablierung des p75NTR-Primers wurde zuerst eine real-time RT-PCR mit einer p75NTR-positiven cDNA (Gehirn Maus) zum Einen mit dem p75NTR-Primer (murin, 98 bp), den es zu etablieren galt, zum Anderen mit einem zweiten p75NTR-Primer (murin, 636 bp) durchgeführt und das Produkt der PCR des zweiten Primers zur Etablierung verwendet. Dieses Produkt wurde daraufhin auf 1:10.000 und 1:1.000.000 mit reinem Wasser verdünnt und mit diesen Verdünnungen eine weitere PCR mit dem zu etablierenden p75NTR-Primer durchgeführt. Für die Verdünnung 1:10.000 ergab sich ein cp-Wert von 10,92. Um eine Standardkurve für den Primer zu erreichen, sollte eine Verdünnung entsprechend einem cp-Wert von ungefähr 16 entstehen. Da die Differenz zwischen diesen beiden cp-Werten bei ungefähr 5 lag, musste eine Verdünnung von $1:2^5$, also 1:32 gewählt werden, um einen cp-Wert von 16 zu erzielen. Hierfür wurden 5 μ L cDNA einer p75NTR-negativen Probe zu 43,3 μ L RNase-freiem Wasser gegeben, um die Wand des PCR-Röhrchens zu beschichten und eine Bindung des p75NTR-Produktes zu vermeiden. Anschließend wurden 1,7 μ L des PCR-Produktes hinzugegeben, was zu einer Verdünnung von ungefähr 1:32 führte. Diese neu entstandene Probe wurde daraufhin in eine Verdünnungsreihe eingesetzt, wobei jeweils 4 μ L der Probe zu 36 μ L

reinem Wasser gegeben wurden. Somit entstanden Verdünnungen von 1:10, 1:100, 1:1.000 und 1:10.000. Mit diesen Verdünnungen wurde daraufhin eine real-time RT-PCR mit dem Primer für p75NTR (murin, 98 bp) durchgeführt, vorerst in Einzelbestimmung, dann in technischer Doppelbestimmung. Hierbei wurde darauf geachtet, dass der Primer einerseits reproduzierbare Ergebnisse lieferte, andererseits die cp-Werte sich entsprechend der logarithmischen Skalierung von Verdünnung zu Verdünnung um ungefähr 3,3 unterschieden. Dieser Wert kommt dadurch zustande, dass eine Verzehnfachung der DNA-Menge in der Probe einer Erhöhung des cp-Wertes um ungefähr 3,3 ($2^{3,3} = 10$) entspricht. Im Durchschnitt lag die Differenz unter den jeweiligen Verdünnungen bei 3,44, womit der Primer als etabliert galt. In Tabelle 1 sind die Primerinformationen aufgeführt.

Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Primer

Zielgen	Sequenz (5'-3')	Produkt- länge (bp)	Genbankkennung
β-Actin	for. TGTTACCAACTGGGACGACA rev. GGGGTGTTGAAGGTCTCAA	165	NM_007393.3
SOST	for. GCCTCCTCCTGAGAACAACC rev. GGCCTGGGCCGTCTGTC	143	NM_024449.6
RANKL	for. TCCTGTACTTTTCGAGCGCAG rev. TCAGGTAGTGTGTCTTCACTCTC	136	NM_011613
OPG	for. ACTTCATCGAAAGCACCCCTGT rev. TGGTAGGAACAGCAAACCTGA	181	NM_008764
BDNF	for. GACGACATCACTGGCTGACAC rev. GTCCGCGTCCTTATGGTTTTTC	100	NM_007540.4
TrkB	for. ATCTCCGCTCACTTCATGGG rev. AATGTCAGTTGGCGTGGTC	99	NM_001025074.1
p75NTR	for. TGTGCGAGGACACTGAGC rev. GGGCGTAGACCTTGTGATCC	98	NM_033217

for.: forward primer; rev.: reverse primer. Modifiziert nach Loy et al. (2020)

2.4.5 Kapillargelelektrophorese

Im Anschluss an die real-time RT-PCR wurde für TrkB und SOST, die keine eindeutige Expression in der PCR zeigten, eine Kapillargelelektrophorese durchgeführt. Die PCR-Produkte inklusive Positiv- und Negativkontrollen wurden durch Zentrifugation (1600 rpm, 15 Sekunden) aus den PCR-Kapillaren in 0,5 mL Röhrchen überführt. Anschließend wurden in der entsprechenden Anzahl Röhrchen jeweils 10 μ L QX DNA Dilution Buffer (Qiagen) vorgelegt und daraufhin 5 μ L jedes PCR-Produktes zugegeben. Um die Verdunstung zu reduzieren, wurde ein Tropfen Weißöl (QX Mineral Oil, Qiagen) auf die Proben gegeben. Ein Ausrichtungsmarker (QX Alignment Marker 15 bp/3 kb, Qiagen) diente zur späteren Skalierung der entstandenen Banden. Die Kapillargelelektrophorese wurde mit dem QIAxcel Advanced System (Qiagen) durchgeführt. Das Verfahren verlief durch eine an das Gel angelegte Spannung, durch die die DNA-Produkte je nach Größe unterschiedlich schnell das Gel durchwanderten. Anschließend wurde der vorher in der DNA interkalierte Farbstoff detektiert und graphisch dargestellt. Hieraus ergaben sich für die DNA-Produkte Banden, denen mittels des mitgelaufenen Ausrichtungsmarkers eine Produktgröße zugeordnet werden konnte.

2.5 Statistik

Die statistische Auswertung und die Erstellung der Graphen des BDNF-Freisetzungstests für PEK-NP, des BrdU-Proliferationsversuches sowie der real-time RT-PCR wurde mit dem Programm IBM SPSS Statistics 23 durchgeführt. Zur Überprüfung der Verteilung wurde der Kolmogorov-Smirnov-Test angewendet. Zeigte sich hier eine Normalverteilung, wurde mit dem T-Test fortgefahren, wie bei der Statistik der real-time RT-PCR. Ergab sich hier keine Normalverteilung, wurde für die Analyse des BrdU-Proliferationsassays bezüglich der Zusätze zur Varianzanalyse zunächst der Kruskal-Wallis-Test durchgeführt. Wurden hierbei Signifikanzen festgestellt, wie in der Analyse des BrdU-Proliferationsassays bezogen auf die Zusätze, wurde der Wilcoxon-Vorzeichenrangtest vollzogen.

Für den Vergleich der BrdU-Werte im Proliferationsassay bezogen auf die Inkubationszeiten wurde zunächst die Anova-Varianzanalyse für verbundene Stichproben mit Messwiederholungen genutzt. Nachdem sich mittels Huynh-Feldt-Test keine Sphärizität fand, wurde der Bonferroni-Test für einen paarweisen Vergleich angewendet.

Material und Methoden

Nachfolgend werden Signifikanzniveaus $p < 0,05$ mit einem Stern gekennzeichnet und als signifikant, $p < 0,01$ mit zwei Sternen versehen und $p < 0,001$ mit drei Sternen markiert als hoch signifikant bezeichnet.

3 Ergebnisse

3.1 Zellkultur

3.1.1 Monokultur muriner DRG-Neurone

Nach der Kultivierung der Zellsuspension konnten sowohl DRG-Neurone, als auch Schwannzellen beobachtet werden. Bei Zugabe von AraC als Mitoseinhibitor blieb die Zellzahl der Schwannzellen unter lichtmikroskopischer Beobachtung annähernd konstant. Zudem konnte durch Betrachtung der DRG-Neurone die Ausbildung von Axonen als Vitalitätsparameter detektiert werden. Auch Schwannzellen entwickelten Ausläufer, die bis zu den Neuronen reichten und untereinander ein Netzwerk entwickelten. In der lichtmikroskopischen Beobachtung der DRG-Neuronenkultur während des Proliferationssassays zeigten sich morphologisch keine Unterschiede zwischen der Kultur unter Zusatz von PEK-NP und der Kultur ohne Zusatz (Abb. 14).

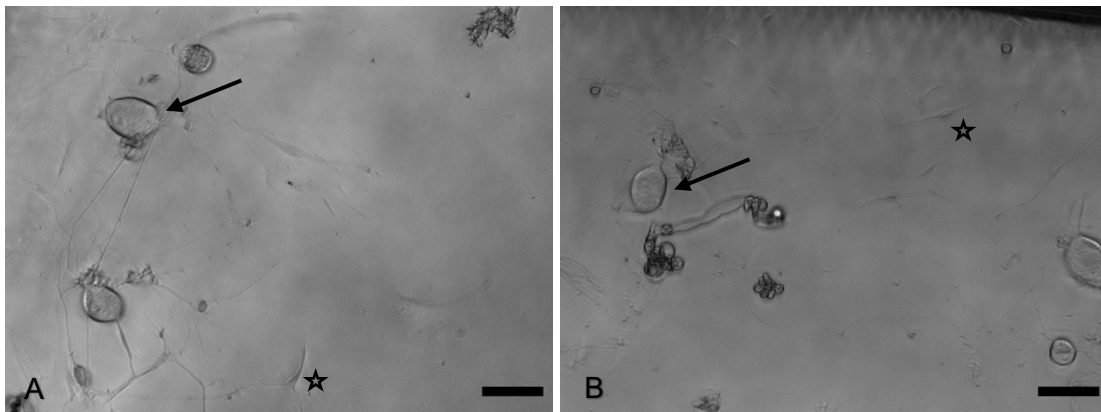


Abb. 14: Lichtmikroskopische Lebendzellbeobachtung der DRG-Neurone (schwarzer Pfeil) und Schwannzellen (Stern) im Vergleich ohne Zusatz (A) und mit PEK-NP (B). Morphologisch unterscheiden sich Neurone und Schwannzellen unter Zugabe von PEK-NP nicht verglichen mit der Kontrolle ohne Zusatz, Maßstab 50 μ m.

3.1.2 Monokultur der MLO-Y4

Die rein lichtmikroskopische Beobachtung zeigte bereits eine höhere Dichte der MLO-Y4-Zelllinie bei Zusatz von gelöstem BDNF (40 ng/mL) im Vergleich zu der Zelldichte ohne Zusätze. Diese Beobachtung ließ sich nach 8 und 24 h feststellen, nicht jedoch nach 32 h. Wie in Abb. 15 sichtbar, äußerte sich dieser Effekt am stärksten nach 24 h.

Ergebnisse

Die Morphologie der Zellen inklusive der Länge der Ausläufer wurde durch die Zugabe von BDNF in der lichtmikroskopischen Beobachtung nicht beeinflusst (Abb. 15).

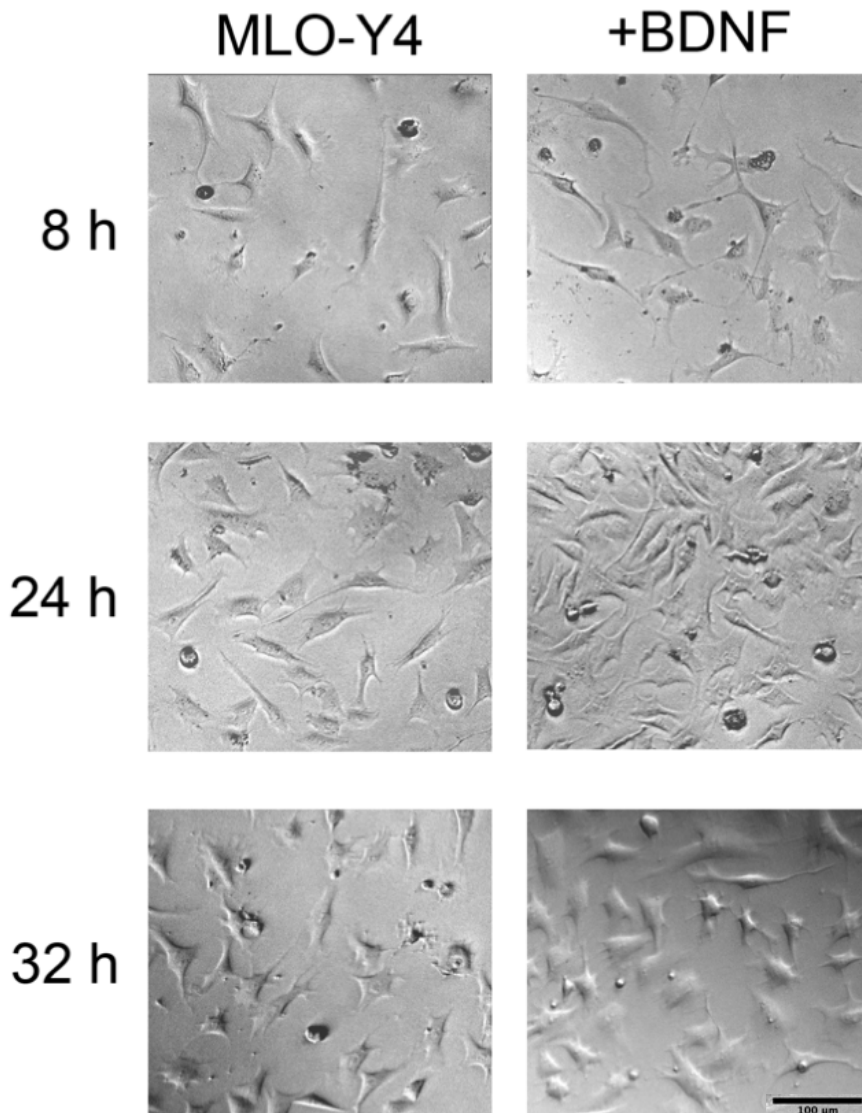


Abb. 15: Lichtmikroskopische Lebendzellbeobachtung der MLO-Y4 im BrdU-Versuch. Vergleich MLO-Y4 ohne Zusatz vs. MLO-Y4 mit BDNF 40 ng/mL gelöst nach 8 h, 24 h und 32 h. Nach 24 h fällt eine vermehrte Dichte der MLO-Y4-Monokultur auf. Nach 8 und 32 h lässt sich dieser Unterschied nicht beobachten, Maßstab 100 µm.

3.1.3 Kokultur MLO-Y4/DRG-Neurone

In der angelegten Kokultur aus MLO-Y4 und DRG-Neuronen traten beide Zellarten lichtmikroskopisch sichtbar über Ausläufer in Kontakt (Abb. 16, Einsatz 32 h). Morphologisch zeigten sich beide Zellarten vital. Ein reiner Einfluss von Neuronen/Schwannzellen in der

Ergebnisse

Funktion als endogene BDNF-Quelle auf die Zellzahl von MLO-Y4 ließ sich unter lichtmikroskopischer Lebendzellbeobachtung nicht nachweisen.

Die Wirkung des löslichen BDNF auf die beobachtete Zelldichte der MLO-Y4 in der Kokultur ließ sich hingegen erneut in der Kokultur detektieren. Dieser Effekt zeigte sich insbesondere 24 h nach BrdU-Zugabe (Abb. 16). Nach 8 und 32 h fand sich lichtmikroskopisch kein eindeutiger Unterschied in der Zelldichte zwischen dem Ansatz ohne Zugabe und der Zugabe von gelöstem BDNF. Auch die Morphologie der Zellen und die Länge der Ausläufer unterschied sich zwischen den Ansätzen nicht sichtbar.

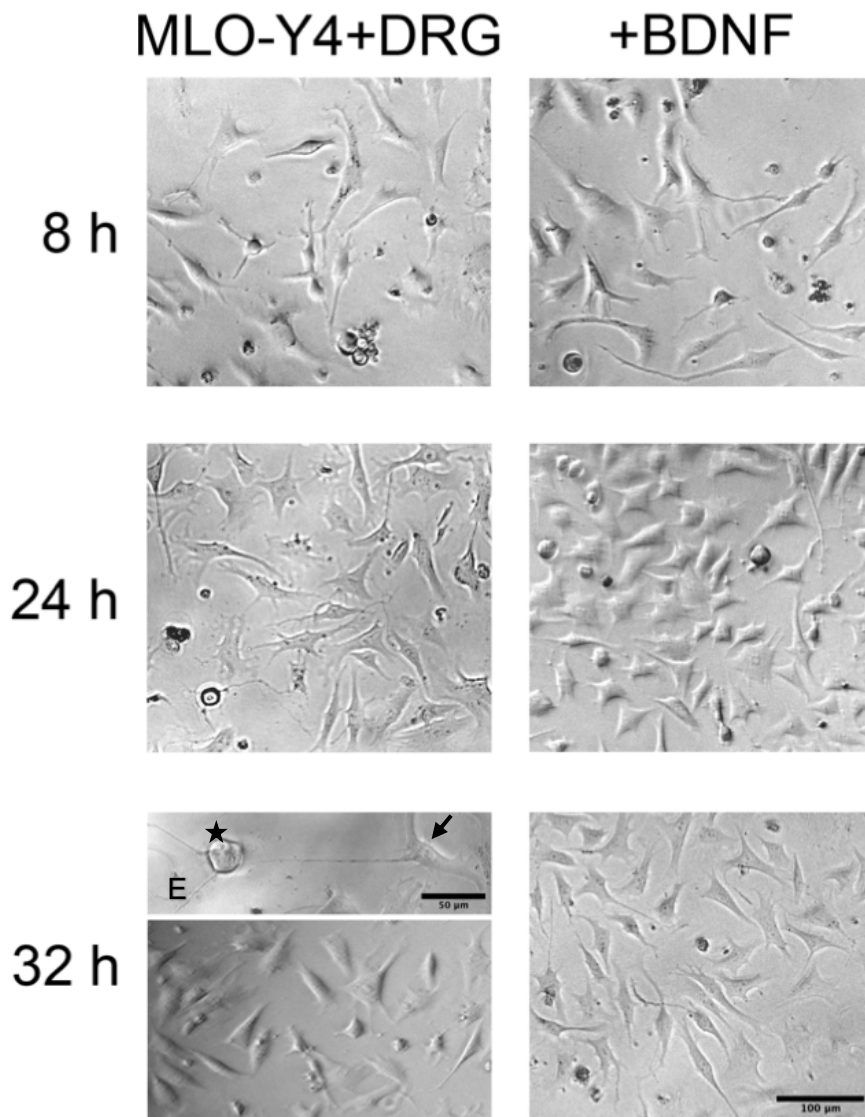


Abb. 16: Lichtmikroskopische Lebendzellbeobachtung der DRG-Neurone/MLO-Y4-Kokultur im BrdU-Versuch nach 8, 24 und 32 h, links ohne Zusatz, rechts mit BDNF (gelöst), Maßstab 100 µm. Nach 24 h fällt eine vermehrte Dichte der MLO-Y4 in der Kokultur auf. Nach 8 und 32 h lässt sich dieser Unterschied nicht beobachten. Einsatz (E): Ausbildung eines Kontaktes zwischen MLO-Y4 (Pfeil) und DRG-Neuron (Stern), Maßstab 50 µm.

Ergebnisse

Während des Proliferationsassays zeigten sich unter lichtmikroskopischer Beobachtung keine Unterschiede zwischen den Kokulturen, denen PEK-NP zugegeben wurden und den Kokulturen, die ohne Zusatz inkubiert wurden (Abb. 17).

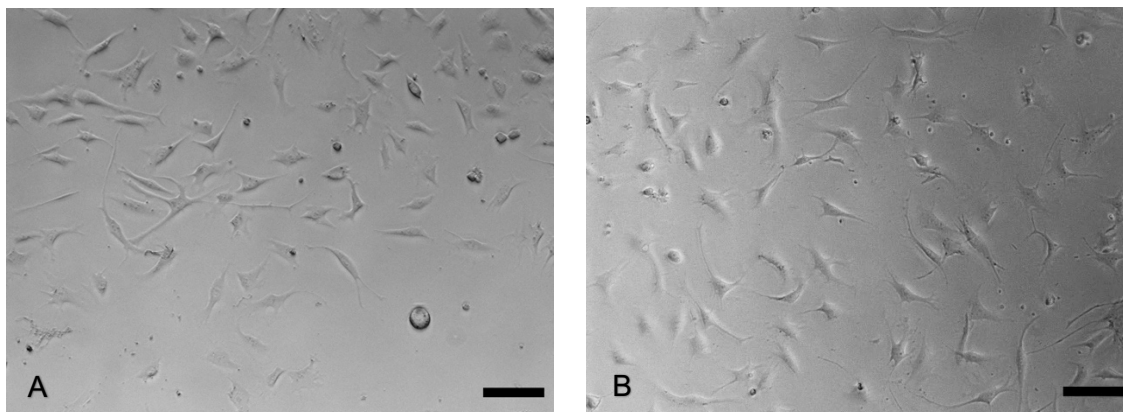


Abb. 17: Lichtmikroskopische Lebendzellbeobachtung der Kokultur im Vergleich ohne Zusatz (A) und mit PEK-NP (B) nach 24 h Inkubationszeit. Morphologisch lassen sich keine Unterschiede zwischen den Ansätzen feststellen, Maßstab 100 μm .

3.2 BDNF-Freisetzung aus PEK-NP

Im BDNF-Freisetzungsversuch mit sechs verschiedenen Mengen BDNF, gebunden an PEK-NP, zeigten sich die in Abb. 18 dargestellten Konzentrationsverläufe. Da die funktionalisierten Nanopartikel mit BDNF-Mengen von 400, 200, 100, 60, 40 und 20 ng in ein Verteilungsvolumen von 600 μL Medium gegeben wurden, konnte eine theoretische Maximalkonzentration bei vollständiger und sofortiger Freisetzung des BDNFs ermittelt werden. Im unten abgebildeten Graphen entsprechen 100 % jeweils den errechneten Maximalkonzentrationen, also beispielsweise für den Ansatz mit 400 ng BDNF einer Maximalkonzentration in einem Verteilungsvolumen von 600 μL von ungefähr 667 ng/mL.

Die prozentuale Freisetzung des BDNFs unterschied sich je nach Beladung der Nanopartikel mit verschiedenen BDNF-Mengen. Eine Stunde nach Zugabe der Nanopartikel zum Medium ließ sich eine Freisetzung von 19,1 % bis hin zu 49,4 % der errechneten Maximalkonzentration ermitteln. Die absoluten Konzentrationen lagen in einem Bereich zwischen 5,6 und 173,7 ng/mL. Nach 24 h ließ sich eine prozentuale Freisetzung zwischen 6,9 und 33,6 % messen. Auffällig war hierbei, dass eine niedrige prozentuale Freisetzung vor allem bei Nanopartikeln mit niedrigen BDNF-Mengen auftrat. Die absoluten BDNF-Konzentrationen nach 24 h befanden sich in einem Bereich zwischen 2,1 und 225 ng/mL. Bei allen eingesetzten Nanopartikeln fiel die Konzentration zwischen 1 h und 24 h ab, mit Ausnahme der höchsten eingesetzten BDNF-Menge von 400 ng, bei der ein Anstieg von durchschnittlich 9 % der Maximalkonzentration zu verzeichnen war. 32 h

Ergebnisse

nach Zugabe der Nanopartikel ließ sich im Vergleich zu 24 h ein über alle Nanopartikel durchschnittlicher Abfall von 5 % der Maximalkonzentration errechnen. Ausschließlich bei Zugabe des Nanopartikels mit einer Beladung von 400 ng BDNF war auch nach 32 h ein leichter Anstieg der prozentualen Freisetzung im Vergleich zu 24 h von durchschnittlich 1 % der errechneten Maximalkonzentration messbar. Die Werte der prozentualen Freisetzung nach 32 h lagen zwischen 3,7 und 36,9 % der Maximalkonzentration. Die gemessenen absoluten BDNF-Konzentrationen bewegten sich zwischen 2 und 247,3 ng/mL. Sowohl die Negativkontrolle mit Medium als auch die Kontrolle mit Zugabe von PEK-NP ohne BDNF ergaben keine messbaren BDNF-Konzentrationen (Abb. 18). Der Stichprobenumfang betrug $n = 2$.

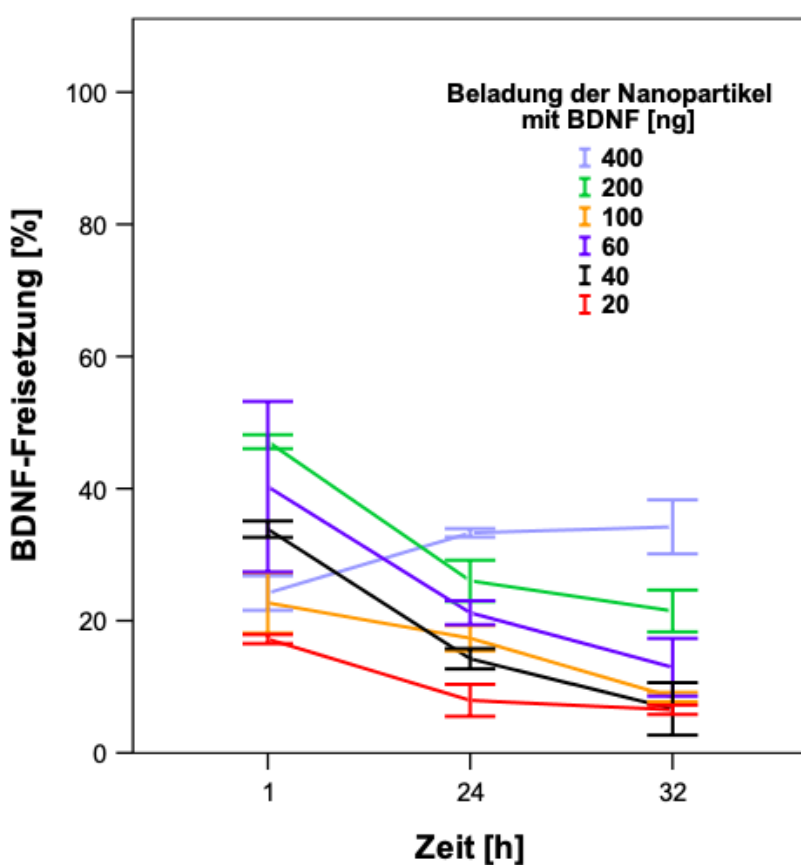


Abb. 18: Vergleich der BDNF-Freisetzung aus PEK-NP+BDNF, beladen mit 20, 40, 60, 100, 200 und 400 ng BDNF mittels Human Free BDNF ELISA nach 1 h, 24 h und 32 h. Prozentuale Darstellung der tatsächlichen Konzentration geteilt durch die maximal mögliche Konzentration bei vollständiger Freisetzung des BDNF. Je nach Beladungsmenge zeigt sich eine unterschiedliche Freisetzungskinetik, wobei eine Beladung von 400 ng BDNF einen initial steigenden Konzentrationsverlauf darstellt; $n = 2$. Modifiziert nach Loy et al. (2020)

Da die Zielkonzentration von BDNF im Medium in dem später durchgeführten Proliferationsassay 40 ng/mL betragen sollte, dienten die Ergebnisse des Freisetzungstests dazu, eine geeignete Beladung der Nanopartikel auszumachen. Das Verteilungsvolumen im Proliferationsassay betrug 200 μ L. Um bei diesem Volumen eine Konzentration

Ergebnisse

von 40 ng/mL zu erhalten, müssen 8 ng BDNF hinzugegeben werden. Auf Grundlage der Ergebnisse des Freisetzungstests der sechs Nanopartikel ließ sich aus der prozentualen Freisetzung der unterschiedlichen Mengen funktionalisierter Nanopartikel ermitteln, welche der Mengen am ehesten zur einer Zielkonzentration von 40 ng/mL führt. Die Nanopartikel entsprechend einer Beladungsmenge von 40 ng BDNF wiesen eine durchschnittliche prozentuale Freisetzung von 32 % nach einer Stunde und von 14 % nach 24 h auf. Die freigesetzten Mengen berechneten sich mit 12,8 ng BDNF nach einer Stunde und 5,6 ng nach 24 h. Dies würde bei einem Verteilungsvolumen von 200 μ L eine Konzentration von 64 ng/mL nach einer Stunde und 28 ng/mL nach 24 h bedeuten, weshalb sich diese Beladung als am besten geeignet zur Erreichung der gewünschten Zielkonzentration herausstellte.

Um den Konzentrationsverlauf von gelöstem BDNF ohne Nanopartikel in einer Konzentration von 40 ng/mL mit dem des Nanopartikels mit einer Beladung von 40 ng BDNF zu vergleichen, wurde ein zusätzlicher Versuch durchgeführt.

Im Vergleich des Konzentrationsverlaufes von mit 40 ng BDNF funktionalisierten PEK-NP und dem gelösten BDNF (40 ng/mL) zeigten sich über 48 h ähnliche Konzentrationen freien BDNFs beider Ansätze. Da bei diesem Versuch mit 200 μ L Medium gearbeitet wurde, ergibt sich für den Ansatz mit Zugabe von PEK-NP als theoretische Maximalkonzentration freien BDNFs 200 ng/mL. Der tatsächliche Wert nach einer Stunde Inkubationszeit lag bei durchschnittlich 30,7 ng/mL. Dies entspricht einer prozentualen Freisetzung von ungefähr 15,4 % der theoretischen Maximalkonzentration. Die Konzentration freien BDNFs im Ansatz BDNF lag nach einer Stunde bei durchschnittlich 38,2 ng/mL. Nach 24 h war die Konzentration in beiden Ansätzen in ähnlichem Ausmaß abgefallen, im Ansatz mit PEK-NP+BDNF um durchschnittlich 19,4 ng/mL auf 11,3 ng/mL, im Ansatz BDNF um durchschnittlich 24,3 ng/mL auf 13,9 ng/mL.

Nach 48 h betrug die Konzentration freien BDNFs im Ansatz PEK-NP+BDNF noch durchschnittlich 8,1 ng/mL, vergleichend im Ansatz BDNF durchschnittlich 9,7 ng/mL (Abb. 19).

Ergebnisse

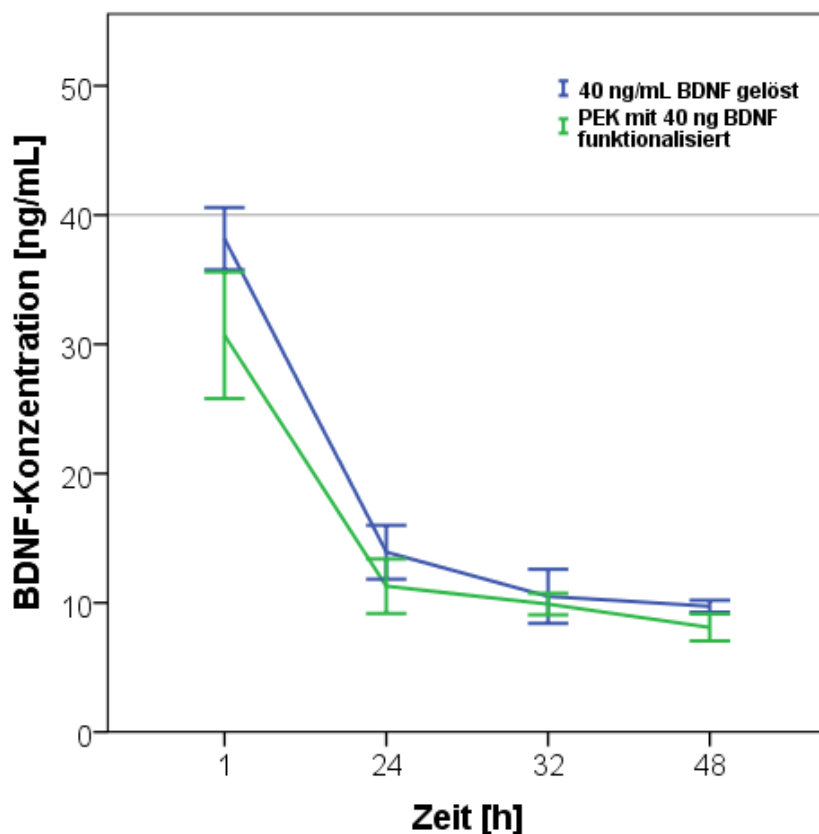


Abb. 19: Vergleich der freien BDNF-Konzentrationen zwischen BDNF und PEK-NP+BDNF im Zeitverlauf nach 1, 24, 32 und 48 h. Der Konzentrationsverlauf im Medium unter Zugabe von BDNF (40 ng/mL) verläuft ähnlich zu dem Konzentrationsverlauf nach Zugabe von PEK-NP+BDNF 40 ng, $n = 2$. Modifiziert nach Loy et al. (2020)

3.3 Proliferationsassay BrdU

Im Proliferationsverhalten der drei Kulturen zeichnete sich nach 8 h für keinen der Zusätze ein signifikanter Unterschied ab. Bezüglich der Kokultur lagen die BrdU-Werte nach 8 h für alle Zusätze durchschnittlich bei 1,5. Nach 24 h betrug der BrdU-Wert für die Kokultur und die MLO-Y4-Monokultur bei Zugabe von BDNF durchschnittlich mehr als das Doppelte. Die Zunahme des BrdU-Wertes von 8 h auf 24 h war für alle Zusätze sowohl in der Kokultur als auch in der MLO-Y4-Monokultur hoch signifikant ($p < 0,001$). Im Vergleich war dieser Proliferationsanstieg für die Kokultur ebenso wie für die MLO-Y4-Monokultur unter Zugabe von BDNF hoch signifikant stärker ausgeprägt als bei den übrigen Ansätzen. Die Signifikanzniveaus und detailliertere Darstellung der Differenzen sind im Text unter Abb. 20 aufgeführt. Zwischen 24 und 32 h Inkubationszeit proliferierten die Zellen der Kokultur und der MLO-Y4-Monokultur wieder langsamer, was durch die nur geringe Zunahme der BrdU-Werte widerspiegelt wird. Auch die BrdU-Werte zum Zeitpunkt 32 h waren verglichen mit den Werten nach 8 h in der Kokultur und der MLO-Y4-Monokultur hoch signifikant angestiegen ($p < 0,001$).

Ergebnisse

Die sehr niedrigen Absorptionswerte im BrdU-Proliferationsassay der DRG-Neuronenkultur sprechen für eine geringe Proliferationsrate der Schwanzzellen, die vorher mit AraC in der Neuronenkultur behandelt wurden (Abb. 20). Der Stichprobenumfang betrug jeweils $n = 5$.

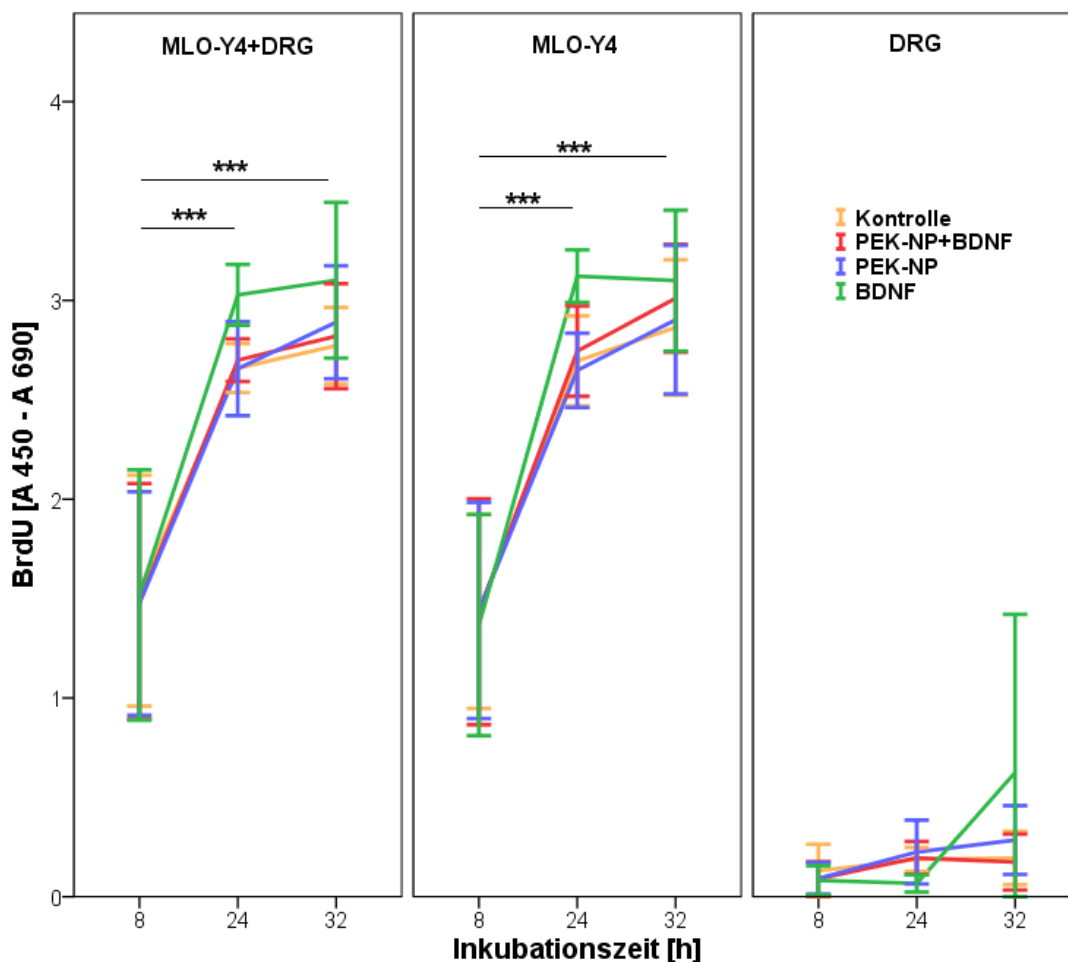


Abb. 20: Proliferation im BrdU-Assay der Kokultur, der MLO-Y4-Monokultur, sowie der DRG-Monokultur unter Einfluss von PEK-NP mit BDNF, PEK-NP ohne BDNF, BDNF gelöst 40 ng/mL sowie als Kontrolle ohne Zusatz. Der Proliferationsanstieg zeigte sich in der Kokultur und der MLO-Y4-Monokultur zwischen 8 und 24 h sowie zwischen 8 und 32 h hoch signifikant unter Einfluss aller Zusätze. In der DRG-Monokultur ließen sich keine Signifikanzen nachweisen. Drei Sterne in der Grafik markieren einen hoch signifikanten Unterschied ($p \leq 0,001$), $n = 5$. Modifiziert nach Loy et al. (2020)

Anhand der Absorptionswerte nach 8 h ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Ansätzen feststellen.

Bei Betrachtung der MLO-Y4-Monokultur stieg die Proliferationsrate nach 24 h unter gelöstem BDNF um 15,8 % im Vergleich zum Kontrollansatz. Vergleichend zu der Monokultur mit PEK-NP ließ sich sogar ein Anstieg um 17,9 % feststellen. Zwischen der MLO-Y4 Kultur mit gelöstem BDNF und der Kultur mit Zugabe von PEK-NP+BDNF betrug dieser Unterschied lediglich 13,7 %.

Ergebnisse

Ähnliches fand sich bei der Kokultur, wobei hierbei die Differenzen etwas geringer ausfielen. Unter Zugabe von gelöstem BDNF stieg die Proliferation um 14 % gegenüber der Beigabe von PEK-NP (13,9 % gegenüber der Kultur ohne Zusatz). Bezüglich der Kokultur ließ sich ebenfalls die geringste Differenz der Proliferationsraten zwischen BDNF und der Zugabe von PEK-NP+BDNF (12,2 %) feststellen.

Sowohl für die Kokultur als auch für die MLO-Y4-Monokultur ließ sich nach Applikation von gelöstem BDNF nach 24 h mittels BrdU-Assay ein hoch signifikanter positiver Effekt auf die Proliferationsrate im Vergleich zur Kontrolle und den weiteren Versuchsgruppen messen. Anhand des Wilcoxon-Rangsummentest ergaben sich für die Kokultur mit gelöstem BDNF nach 24 h vergleichend zur Kokultur ohne Zusatz Signifikanzniveaus von $p < 0,001$, zum Zusatz von PEK-NP+BDNF $p < 0,001$ und zum Zusatz von PEK-NP $p = 0,001$.

Bezüglich der MLO-Y4-Monokultur errechneten sich Signifikanzniveaus für gelöstes BDNF von $p < 0,001$ (im Vergleich zu „ohne Zusatz“), $p = 0,001$ (im Vergleich zu „PEK-NP+BDNF“) und $p < 0,001$ (im Vergleich zu „PEK-NP“) für den Messzeitpunkt 24 h.

Die Kokultur zeigte im Vergleich zur MLO-Y4-Monokultur keine signifikant erhöhten Proliferationswerte auf.

Ein signifikant negativer Einfluss von BDNF ließ sich zusätzlich auf die Proliferationsrate der DRG-Neuronenkultur gegenüber den anderen Ansätzen zum Zeitpunkt 24 h erkennen (Abb. 21).

Für die Werte nach 32 h ergaben sich in keinem Kulturansatz Signifikanzen.

In keiner der Zellkulturansätze konnte ein negativer Effekt von PEK-NP (32 $\mu\text{mol/L}$) auf die Proliferation nach 8, 24 oder 32 h festgestellt werden. Gleiches gilt für die Zugabe von PEK-NP, die mit BDNF funktionalisiert waren (Abb. 21).

Ergebnisse

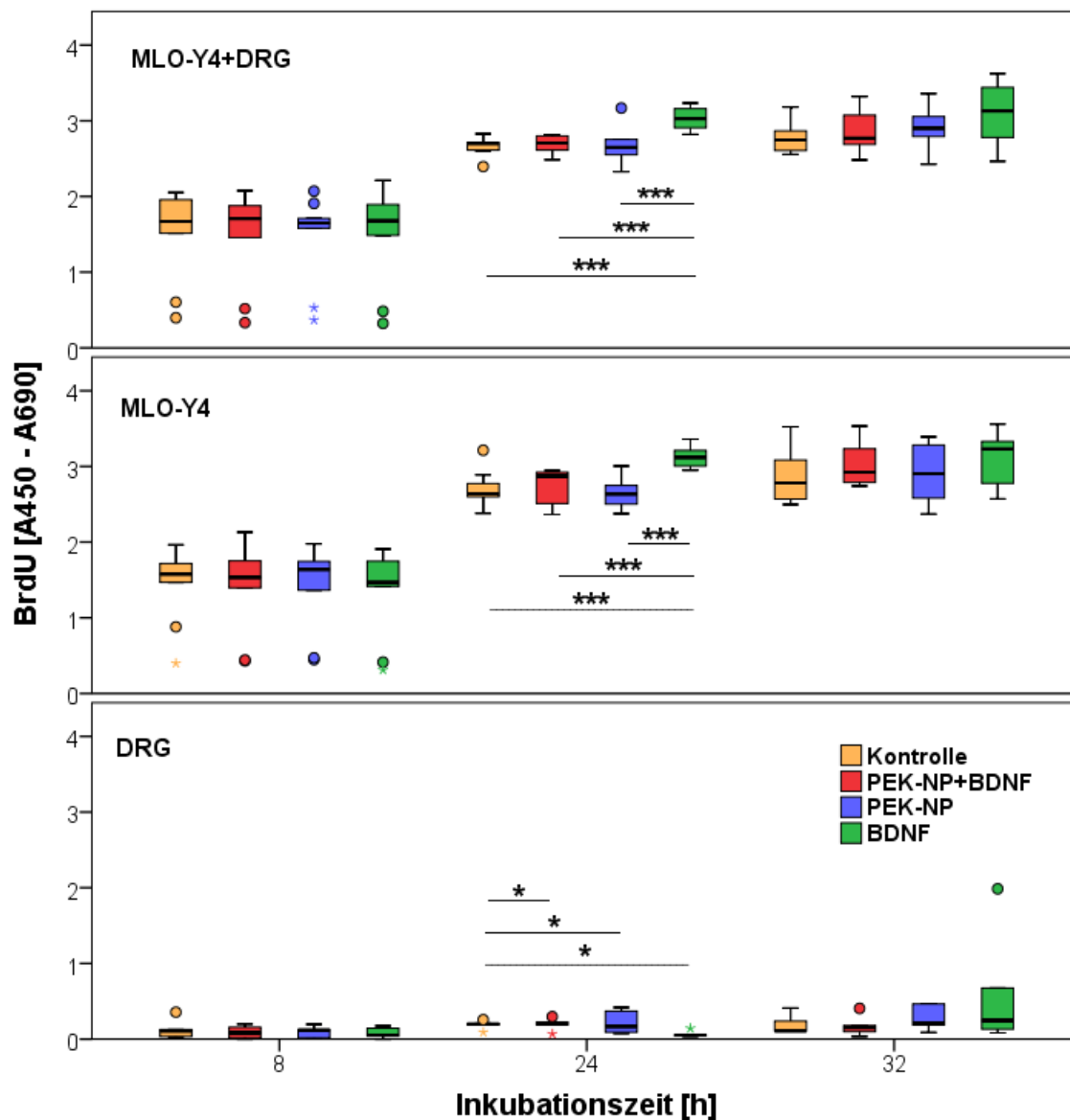


Abb. 21: Proliferation im BrdU-Assay der Kokultur, der MLO-Y4-Monokultur, sowie der DRG-Monokultur unter Einfluss von PEK-NP mit BDNF, PEK-NP ohne BDNF, BDNF gelöst 40 ng/mL sowie als Kontrolle ohne Zusatz. Nach 24 h ließ sich unter Zugabe von „BDNF gelöst“ sowohl in der Kokultur als auch in der MLO-Y4-Monokultur eine hoch signifikant höhere Proliferationsrate, jeweils verglichen mit den anderen Zusätzen, nachweisen. In der DRG-Monokultur zeigte sich eine signifikant reduzierte Proliferationsrate nach 24 h unter Zusatz von „BDNF gelöst“ im Vergleich zu den anderen Zusätzen. Nach 8 und 32 h ließen sich keine Signifikanzen nachweisen. Ein Stern markiert einen signifikanten Unterschied ($p \leq 0,05$), drei Sterne in der Grafik markieren einen hoch signifikanten Unterschied ($p \leq 0,001$). Farbige Kreise und farbige Sterne markieren Ausreißer, $n = 5$. Loy et al. (2020)

3.4 Real-time RT-PCR

3.4.1 β -Actin

β -Actin diente in der real-time RT-PCR als Referenzgen. Die cp-Werte aller Proben lagen in einem Bereich zwischen 15,2 und 16,9. Die rel. Genexpression der nachfolgenden Zielgene wurde, wie im Teil „Material und Methoden“ beschrieben, ins Verhältnis zu der Expression von β -Actin gesetzt, um die Proben untereinander zu vergleichen.

3.4.2 SOST

Obwohl in anderen Studien die Genexpression von SOST in MLO-Y4 nachgewiesen wurde (York et al. 2016; Yu et al. 2017), zeigten sich in der real-time RT-PCR sowohl für die Zellkulturen ohne BDNF als auch für jene mit BDNF cp-Werte von über 35. Hierdurch erschien eine zu geringe Expression von SOST wahrscheinlich, was zudem eine Berechnung der rel. Genexpression unmöglich machte. Die Überprüfung des Primers mit einer positiven cDNA-Probe zeigte an, dass der Primer funktionsfähig war und ergab einen Schmelzpunkt des PCR-Produktes von 86,8°C. Bei Betrachtung der Schmelzpunkte der Proben fand sich in keinem der Ansätze ein Wert in der Nähe von 86,8°C. In der Negativkontrolle mit RNase-freiem Wasser konnte kein PCR-Produkt ermittelt werden.

3.4.3 RANKL

Sowohl in den Ansätzen mit BDNF-Zusatz als auch in den Kontrollansätzen ohne BDNF ließ sich eine Expression von RANKL nachweisen. Die PCR ergab cp-Werte zwischen 19,1 und 21,9. Ein Hinweis eines Einflusses von BDNF auf die Knochenresorption über die Expression von RANKL konnte in der real-time RT-PCR nicht nachgewiesen werden. In der statistischen Auswertung ergab sich kein signifikanter Unterschied in der rel. Genexpression zwischen den Kontrollansätzen ohne BDNF-Zugabe und den mit BDNF behandelten Zellen (Abb. 22). In der Schmelzkurvenanalyse der PCR-Produkte aller Proben fanden sich Schmelzpunkte zwischen 81,54 und 81,87°C. Als Negativkontrolle wurde RNase-freies Wasser verwendet, was zu einem negativen Ergebnis führte.

Ergebnisse

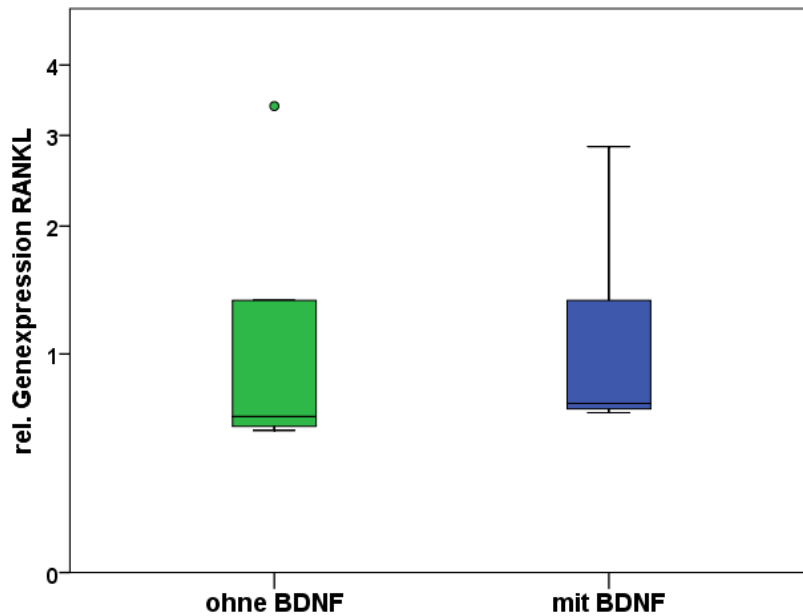


Abb. 22: Darstellung der rel. Genexpression für RANKL im Boxplot, Ansätze mit (blau) und ohne Applikation von BDNF (grün) im Vergleich. Es ließen sich keine signifikanten Unterschiede in der Genexpression zwischen den Ansätzen nachweisen. Der farbige Punkt stellt einen Ausreißer dar, $n = 5$. Modifiziert nach Loy et al. (2020)

3.4.4 OPG

In allen Zellkulturen ließ sich eine Expression von OPG ermitteln, wobei die cp-Werte zwischen 23,6 und 25,3 lagen. Der Vergleich ergab für die Ansätze mit BDNF-Zusatz in der statistischen Auswertung keinen signifikanten Unterschied zu den Kontrollansätzen ohne BDNF-Zugabe (Abb. 23). Die Schmelzpunkte der PCR-Produkte schwankten zwischen 83,06 und 83,31°C. Die Negativkontrolle mit RNase-freiem Wasser ergab keinen Nachweis eines PCR-Produktes.

Ergebnisse

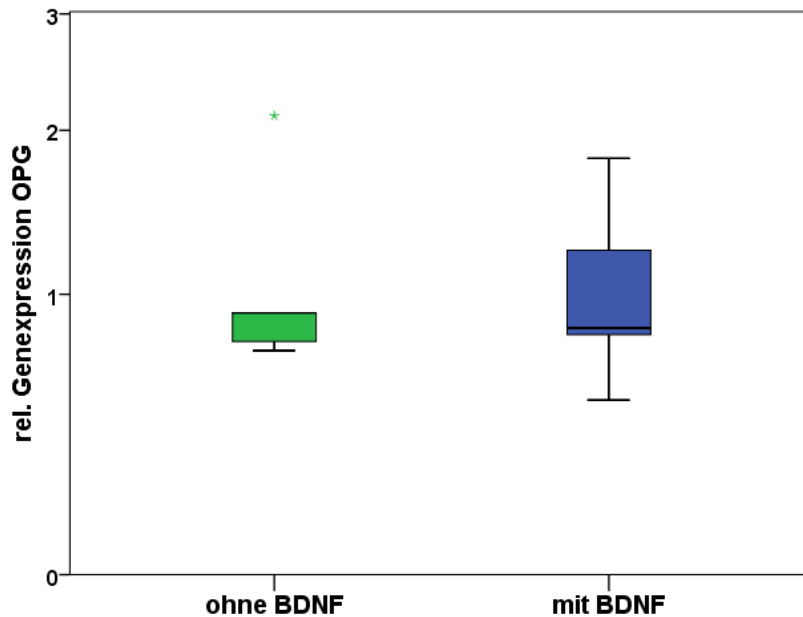


Abb. 23: Darstellung der rel. Genexpression für OPG im Boxplot, Ansätze mit (blau) und ohne Applikation von BDNF (grün) im Vergleich. Es ließen sich keine signifikanten Unterschiede in der Genexpression zwischen den Ansätzen nachweisen. Der farbige Stern stellt einen Ausreißer dar, $n = 5$. Modifiziert nach Loy et al. (2020)

3.4.5 BDNF

In der real-time RT-PCR für BDNF ließ sich für alle Zellkulturansätze eine im Vergleich zu den anderen Zielgenen starke Expression von BDNF ermitteln. Die c_p -Werte schwankten zwischen 18,6 und 19,8. Die rel. Genexpression von BDNF unterschied sich in der statistischen Auswertung nicht signifikant zwischen den Zellen, denen BDNF (löslich) zugeführt wurde und denen, die ohne BDNF kultiviert wurden (Abb. 24). Die Schmelzpunkte der PCR-Produkte lagen in einem Bereich zwischen 83,77 und 83,99°C. Da es sich bei dem BDNF-Primer nicht um einen Intron-überspannenden Primer handelte, wurden alle Proben ebenfalls ohne die RT in der PCR analysiert. Hierbei zeigten sich für alle Proben negative Ergebnisse. Die Negativkontrolle mit RNase-freiem Wasser war ebenfalls negativ.

Ergebnisse

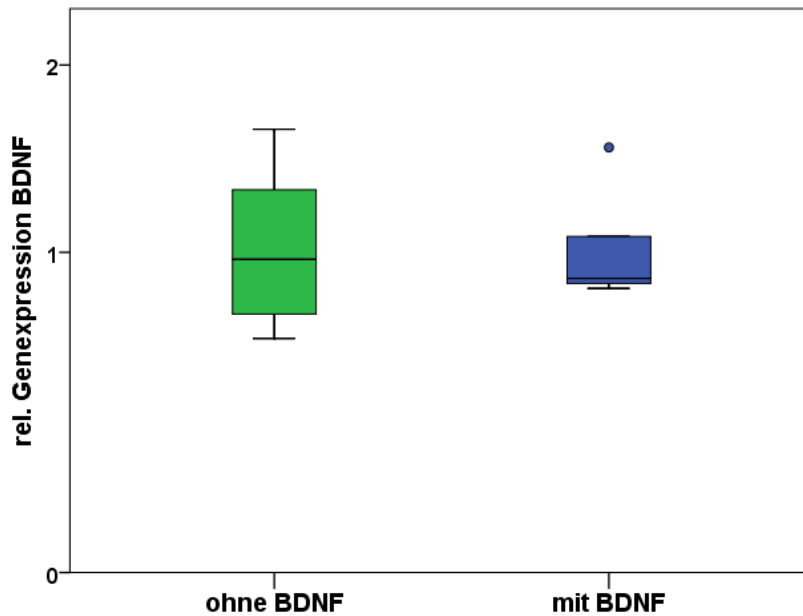


Abb. 24: Darstellung der rel. Genexpression für BDNF im Boxplot, Ansätze mit (blau) und ohne Applikation von BDNF (grün) im Vergleich. Es ließen sich keine signifikanten Unterschiede in der Genexpression zwischen den Ansätzen nachweisen. Der farbige Punkt stellt einen Ausreißer dar, $n = 5$. Modifiziert nach Loy et al. (2020)

3.4.6 TrkB

Für den Primer TrkB ergaben sich sowohl für die Kontrollansätze als auch für die mit BDNF behandelten Ansätze cp-Werte von über 31,5, sodass von einer geringen Genexpression ausgegangen werden kann. Zum Großteil lagen die cp-Werte jedoch im unbestimmbaren Bereich von über 35, womit die rel. Genexpression nicht berechnet werden konnte. Daraufhin wurde der Primer zusätzlich mit einer TrkB-positiven Probe überprüft. Dies zeigte bei unterschiedlichen Verdünnungen der Probe cp-Werte zwischen 19,5 und 29,8, was zeigte, dass der Primer seine Funktion erfüllte. Bei Betrachtung der Schmelzpunkte der PCR-Produkte zeigten sich bei sieben von insgesamt elf Proben Werte, die sehr nah am Schmelzpunkt des PCR-Produkts der Positivkontrolle lagen (ca. 83°C). Der Ansatz mit RNase-freiem Wasser fiel negativ aus.

3.4.7 p75NTR

In der real-time RT-PCR für p75NTR zeigten sich bei Einsatz der cDNA aller Proben cp-Werte von über 30,7, welches für eine geringe, jedoch vorhandene Expression von p75NTR sprach. Zwischen den Zellkulturansätzen mit Zusatz von BDNF und den

Ergebnisse

Kontrollansätzen ohne BDNF konnte kein signifikanter Unterschied in der Expression von p75NTR errechnet werden (Abb. 25). Die Negativkontrolle mit RNase-freiem Wasser zeigte kein Fluoreszenzsignal in der PCR.

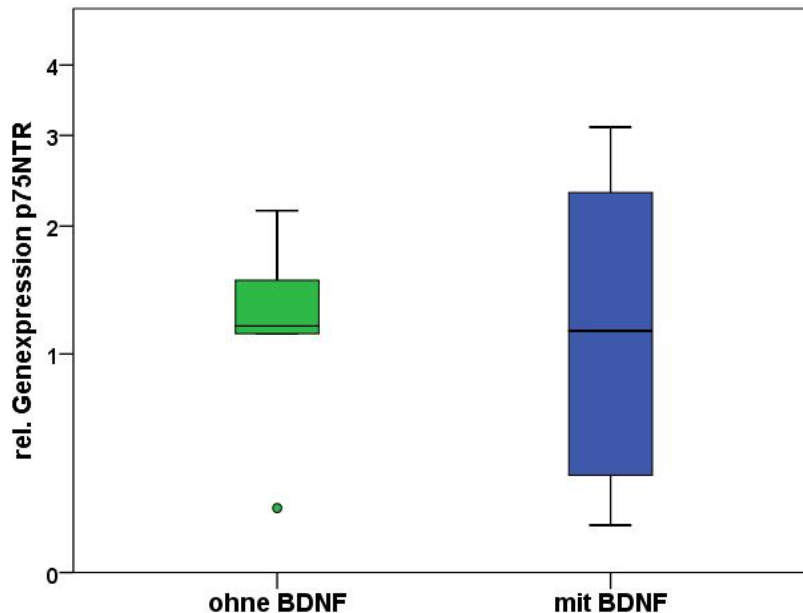


Abb. 25: Darstellung der rel. Genexpression für p75NTR im Boxplot, Ansätze mit (blau) und ohne Applikation von BDNF (grün) im Vergleich. Es ließen sich keine signifikanten Unterschiede in der Genexpression zwischen den Ansätzen nachweisen. Der farbige Punkt stellt einen Ausreißer dar, $n = 5$. Modifiziert nach Loy et al. (2020)

3.4.8 Kapillargelelektrophorese

3.4.8.1 SOST

Die PCR-Produkte der real-time RT-PCR für SOST wurden exemplarisch für drei der fünf vergleichenden Ansätze zwischen Kontrollansatz und Ansatz mit BDNF-Zusatz einer Kapillargelelektrophorese zugeführt. Hierbei konnte bei einer der sechs Proben, die von einer Zellkultur ohne BDNF-Zusatz stammte, eine Bande auf gleicher Höhe wie die Positivkontrolle für SOST zwischen 140 und 150 Basenpaaren (bp) detektiert werden (Abb. 26). Das PCR-Produkt des SOST-Primers ist laut Herstellerangaben 143 bp lang. Bei den restlichen Proben ließen sich keine Banden auf dieser Höhe beobachten. Die Negativkontrolle zeigte ebenfalls keine Bande.

Ergebnisse

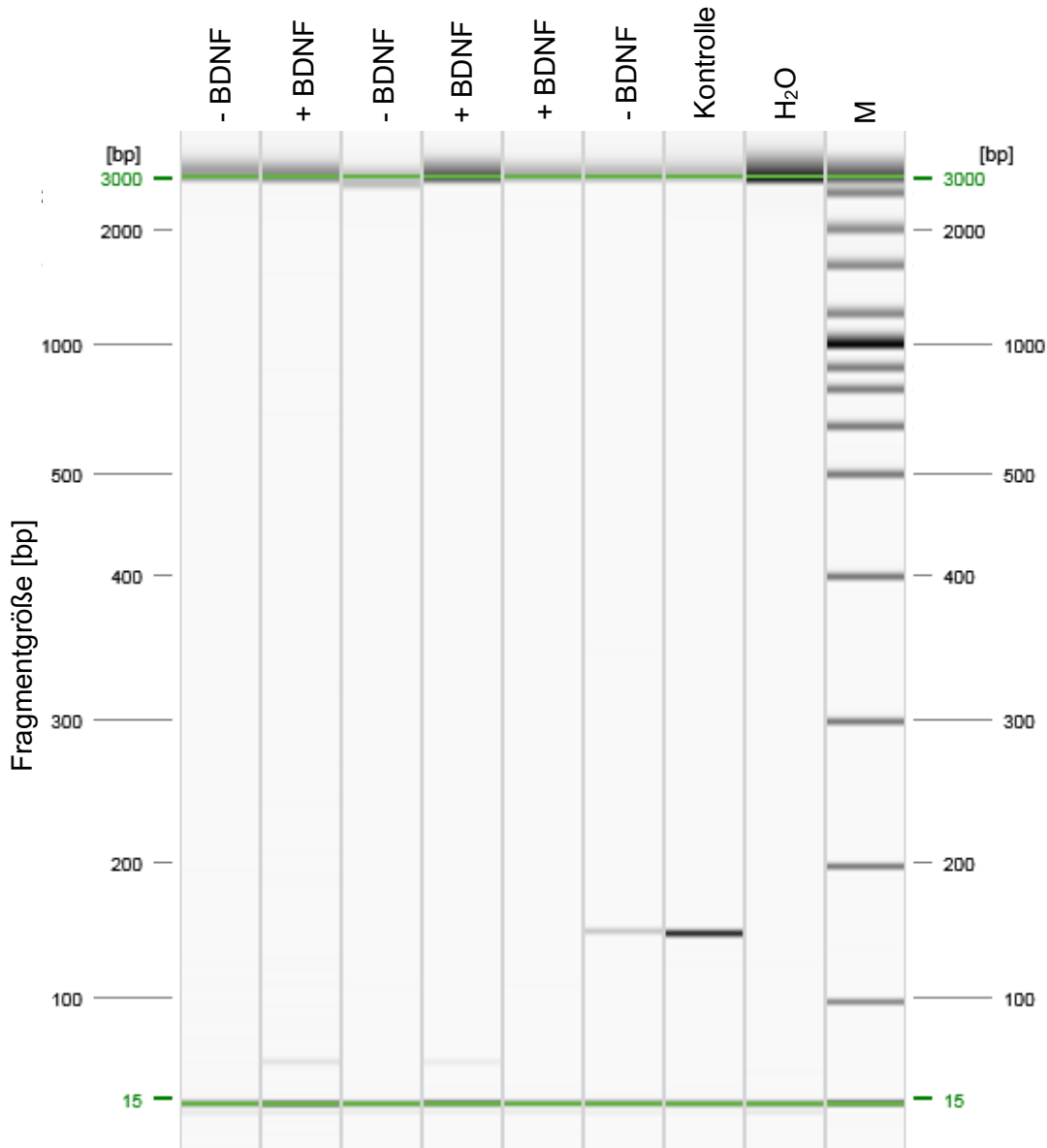


Abb. 26: Ergebnisse der Kapillargelelektrophorese der PCR-Produkte der real-time RT-PCR mit dem Primer für SOST (Kapitel 3.4.2). In einer von sechs Proben ließ sich ein PCR-Produkt auf Höhe der Positivkontrolle (Knochen Maus) nachweisen. Das PCR-Produkt des SOST-Primers hat eine Größe von 143 bp. Es konnte kein Unterschied zwischen den Kontrollansätzen (- BDNF) und den Ansätzen mit BDNF-Zusatz (+ BDNF) beobachtet werden. Die Negativkontrolle bestand aus reinem Wasser (H₂O). Ein Ausrichtungsmarker (M) zur Größenskalierung wurde mitgeführt. Modifiziert nach Loy et al. (2020)

Ergebnisse

3.4.8.2 TrkB

Da sich in der real-time RT-PCR eine geringe Expression von TrkB zeigte, wurden die PCR-Produkte einer Kapillargelelektrophorese unterzogen. In der Analyse der Kapillargelelektrophorese aller Ansätze zeigte sich bei insgesamt neun von elf Proben eine Bande bei ungefähr 100 bp. Das PCR-Produkt des TrkB-Primers ist 99 bp lang. Bei den negativ getesteten Proben handelte es sich um eine Probe mit Zusatz von BDNF zum Medium und um einen Kontrollansatz ohne Zusatz von BDNF. Bei der Probe „+ BDNF (0)“ handelte es sich um einen Ansatz, bei dem mit Zugabe der MLO-Y4 bereits BDNF zum Medium gegeben wurde und nicht, wie bei den anderen Ansätzen, nach einer Anwachphase von 22 h. Bei der Positivkontrolle ließ sich eine Bande ebenfalls auf Höhe von ungefähr 100 bp feststellen, der PCR-Ansatz mit RNase-freiem Wasser zeigte keine Bande (Abb. 27).

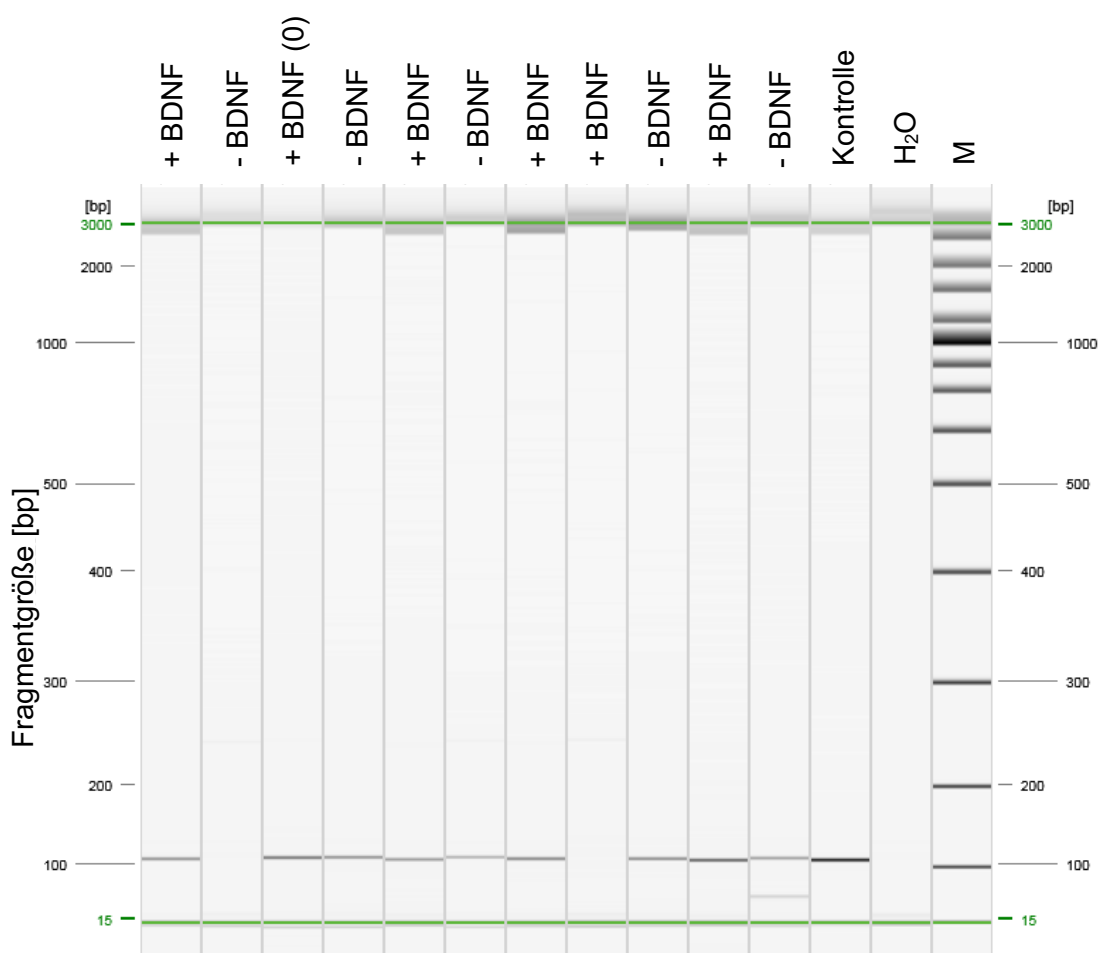


Abb. 27: Ergebnisse der Kapillargelelektrophorese der PCR-Produkte der real-time RT-PCR mit dem Primer für TrkB (Kapitel 3.4.6). In neun von elf Proben ließ sich ein PCR-Produkt auf Höhe von ca. 100 bp nachweisen. Dies entsprach der Positivkontrolle (Gehirn Maus). Das PCR-Produkt des TrkB-Primers hat eine Größe von 99 bp. Es konnte kein Unterschied zwischen den Kontrollansätzen (- BDNF) und den Ansätzen mit BDNF-Zusatz (+ BDNF) beobachtet werden. Die

Ergebnisse

Negativkontrolle (H₂O) bestand aus reinem Wasser. Ein Ausrichtungsmarker (M) zur Größenskalisierung wurde mitgeführt. Modifiziert nach Loy et al. (2020)

4 Diskussion

4.1 Zellsystem und Proliferationsassay BrdU

4.1.1 MLO-Y4 als Osteozytenmodell

MLO-Y4 wurden als Modell zur Untersuchung des Einflusses von BDNF und PEK-NP auf Osteozyten verwendet. Zur Gewinnung der immortalisierten Osteozytenlinie wurden transgene Mäuse hergestellt, bei denen die Promotorregion für Osteocalcin an den Genabschnitt des Simian-Virus 40 für T-Antigen, welches als Transgen fungierte, gebunden wurde. Anschließend wurden Osteozyten aus den langen Röhrenknochen isoliert, anhand ihrer Morphologie selektiert und kultiviert (Kato et al. 1997). Ein ähnliches Verfahren wurde bereits in anderen Studien benutzt, um beispielsweise eine immortalisierte Osteoblastenzelllinie herzustellen (Ghosh-Choudhury et al. 1996). Die Genexpression von MLO-Y4 entspricht größtenteils derer von Osteozyten (Kato et al. 1997), sodass diese regelmäßig in der Forschung verwendet wurde, um Osteozyten genauer zu untersuchen (Yao et al. 2017; Zhao et al. 2002; Ai et al. 2012). Am Beispiel von RANKL und OPG konnte eine Expression für diese Schlüsselproteine im Knochenstoffwechsel in MLO-Y4 detektiert werden (Yao et al. 2017; Zhao et al. 2002). Da in anderen Zellen teilweise eine Hochregulierung von RANKL durch den Einfluss von BDNF erreicht wurde (Ai et al. 2012) und die Mechanismen der Beeinflussung des Knochenstoffwechsels durch BDNF noch weitgehend unbekannt sind, wurde dies bezüglich der Expression von RANKL und OPG in MLO-Y4 unter dem Einfluss von BDNF überprüft.

Für BDNF, TrkB und p75NTR gab es bisher keine Nachweise, dass diese in MLO-Y4 exprimiert werden. In Osteozyten konnte jedoch in einem Rattenosteotomiemodell eine Expression von TrkB nachgewiesen werden, die unter Einfluss von BDNF sogar hochreguliert wurde (Ida-Yonemochi et al. 2017). Eine mögliche Expression von TrkB und ein Einfluss von BDNF auf die TrkB-Expression in MLO-Y4 wurde daher in dieser Arbeit untersucht.

Als Marker für reife Osteozyten diente Sclerostin, das über den Wnt-Signalweg eine wichtige Rolle als Inhibitor des Knochenaufbaus einnimmt. Auch in MLO-Y4 wurde in mehreren Studien eine Expression des Proteins Sclerostin bzw. des SOST-Gens ohne eine exogene Stimulation nachgewiesen. Durch exogene Stimulation wie Erhöhung der interzellulären Kontakte ließ sich die Expression in den jeweiligen Studien steigern (York et al. 2016; Yu et al. 2017). Da Sclerostin jedoch erst spät in Osteozyten exprimiert wird und MLO-Y4 eine frühe Osteozytenlinie ist, wird SOST teilweise als niedrig exprimiert

(Holdsworth et al. 2019; Poole et al. 2005), teilweise als nicht exprimiert beschrieben (Papanicolaou et al. 2009). Dies könnte erklären, warum in dieser Arbeit keine auswertbare Expression von SOST in den meisten Ansätzen in MLO-Y4 nachgewiesen werden konnte. Die Genexpression von SOST wird in einem separaten Kapitel (4.4.1) näher betrachtet und diskutiert.

Die Eigenschaft der MLO-Y4 als proliferationsfähige Zellen könnte als nicht geeignet zur Beurteilung der in vivo nicht teilungsfähigen Osteozyten angesehen werden. Ma et al. untersuchten jedoch die Proliferation von MLO-Y4 unter dem Einfluss von Acetylcholin und erreichten dabei reproduzierbare und signifikante Ergebnisse (Ma et al. 2014). Auch andere Studien beschäftigten sich mit der Teilungsrate von MLO-Y4 als Vitalitätsparameter für Osteozyten (Wei et al. 2015). Des Weiteren zeigte sich in einem der Vorversuche, dass der BrdU-Wert nach 20 h Inkubation bei gleicher Zellzahl MLO-Y4 keinen starken Schwankungen unterliegt (Abb. 12). Dies deutet darauf hin, dass die Proliferation von MLO-Y4 nicht willkürlich abläuft und von äußeren Einflüssen abzuhängen scheint. Daher wurde die Proliferationsrate als eine der Zielgrößen in dieser Arbeit gewählt.

Bei den Versuchen wurde bei der Aussaat eine Zelldichte von 5000 Zellen/cm² gewählt, da der Kontakt der Osteozyten untereinander die Wachstumsbedingungen verbessert (Zhang et al. 2006). Darüber hinaus wurde diese Zelldichte ebenfalls von anderen Arbeitsgruppen für MLO-Y4 verwendet (Boggs et al. 2011). Für eine Zelldichte von 2000 Zellen/cm² wurde zudem herausgefunden, dass die meisten MLO-Y4 keinen Kontakt zueinander haben (Randhawa et al. 2005). Hinzu kommt, dass eine geringe Anzahl an Zell-Zell-Kontakten die Genexpression in MLO-Y4 beeinflusst (York et al. 2016). Daher musste eine Dichte gewählt werden, die zum einen ein Wachstum zuließ, zum anderen jedoch eine ausreichende Nähe der Zellen untereinander garantierte. Hierbei stellte sich 5000 Zellen/cm² als geeignet heraus.

Im Proliferationsversuch schien die Proliferationsrate jedoch nach 32 h abzunehmen. Da die Zellen lichtmikroskopisch bereits sehr dicht beieinander lagen, könnte dies platzbedingt gewesen sein (Abb. 15). Mit Passagen zwischen 16 und 23 zu arbeiten erwies sich als zielführend, da, wie bereits bei Kato et al. (1997) erörtert wurde, MLO-Y4 auch nach 45 Passagen noch Osteozytenmorphologie aufweisen und sich in den vorliegenden Versuchen die Proliferation und Genexpression unter den Passagen nicht deutlich unterschied.

4.1.2 DRG-Neurone/Schwannzellen als endogene BDNF-Quelle

Um eine endogene Quelle für BDNF ohne eine exogene Zugabe zu schaffen, wurden Neurone aus Spinalganglien von Mäusen isoliert. Es wurden hierfür Mäuse mit einem Alter von 20 Wochen oder jünger gewählt, um überlebensfähigere Neurone zu erhalten. Bereits 1985 wurde entdeckt, dass gealterte DRG-Neurone im Vergleich zu denen jüngerer Mäuse eine verminderte Überlebensrate und Morphologie aufwiesen (Fukuda 1985). Der in der vorliegenden Arbeit zur Isolation von DRG-Neuronen verwendete C57BL/6 Wildtyp ist der am häufigsten verwendete Mäusestamm in der Forschung, mit deren Spinalganglien bereits andere Arbeitsgruppen Experimente durchführten (Lisi et al. 2017; Ma et al. 2009; Matsuoka et al. 2015).

Pro Versuchsansatz wurden die Spinalganglien einer Maus eingesetzt. Die Präparationsweise war stets die gleiche, um eine ähnliche Neuronenzahl zu erzielen. Bei der Präparation und Isolierung der DRG-Neurone wurde stets auf zügige, jedoch schonende Weise gearbeitet, um ein Überleben möglichst vieler Neurone zu erreichen. Das Überleben wurde anhand lichtmikroskopischer Beobachtung festgestellt und an der Ausbildung von Ausläufern (Dendriten und Axon) festgemacht. In Vorversuchen bestand die Intention darin, Neurone von in Spinalganglien vorkommenden Schwannzellen und Fibroblasten anhand eines Dichtegradienten zu separieren. Hierbei wurde die Ausbeute an Neurone jedoch als nicht ausreichend beurteilt oder trotz des Gradienten andere Zellarten beobachtet. Daher wurde schließlich mit einem Zellsieb gearbeitet, um den Großteil des Bindegewebes mit Fibroblasten verwerfen zu können. Mit der anschließenden Zugabe von AraC zu der Zellkultur wurde daraufhin die Proliferation von Schwannzellen und Fibroblasten verhindert. Darüber hinaus exprimieren und sezernieren Schwannzellen ebenfalls BDNF (Meyer et al. 1992; Luo et al. 2014), was der Funktion von DRG-Neuronen als endogene BDNF-Quelle gleichkommt.

4.1.3 Kokultur DRG-Neurone/MLO-Y4

Zur Untersuchung des Effekts von BDNF-exprimierenden Zellen auf die Proliferation und Vitalität von Osteozyten wurde nach dem Vorbild von Boggs et al. (2011) eine Kokultur aus DRG-Neuronen/Schwannzellen und MLO-Y4 etabliert. Bei Boggs et al. (2011) hat sich zur optimalen Kokultivierung eine alternierende Beschichtung der Petrischalen von Perlecan Domäne IV (PInDIV) und Laminin herausgestellt. Diese wurde durch sogenanntes *micro-contact printing* erreicht. Der Vorteil von PInDIV gegenüber Collagen-1, welches die übliche Beschichtung für MLO-Y4 darstellt (Kato et al. 1997), wurde darin

gesehen, dass MLO-Y4 auf einer Beschichtung mit PlnDIV vermehrt *dentin matrix protein 1* (DMP1) und *matrix extracellular phosphoglycoprotein* (MEPE) exprimierten. Beides sind Marker zur Identifizierung von reifen Osteozyten, die von diesen sezerniert werden. DMP1 spielt insbesondere eine Rolle bei der Differenzierung von Osteoblasten zu Osteozyten, MEPE hingegen reguliert den Knochenmetabolismus (Lu et al. 2004; Qin et al. 2007). Boggs et al. (2011) fanden darüber hinaus heraus, dass MLO-Y4 bevorzugt auf PlnDIV oder Collagen-1 gegenüber einer Beschichtung mit Laminin anwachsen, wenn beide Beschichtungen nebeneinander vorliegen (Boggs et al. 2011). Da die Methode des *micro-contact printings* in unserem Labor nicht verfügbar war, musste eine alternative Form der Beschichtung gefunden werden. Bei der Suche nach einer optimalen Beschichtung zur Kokultivierung wurden einerseits Collagen-1 als typische Beschichtung für MLO-Y4 (Kato et al. 1997), andererseits Poly-L-Lysin/Laminin als etablierte Beschichtung für DRG-Neurone in Erwägung gezogen (Francis et al. 2013; Sango et al. 2002). Laminin unterstützt hierbei das Überleben von Neuronen und die Formation von Neuronenausläufern (Fudge und Mearow 2013; Stabenfeldt und LaPlaca 2011). In Vorversuchen wurde geprüft, ob sich Poly-L-Lysin/Laminin entgegen der Erkenntnisse aus Boggs et al. (2011) als Beschichtung für MLO-Y4 ebenfalls eignet. Hierunter zeigten die Zellen morphologisch und proliferativ ähnliche Eigenschaften wie auf einer Collagen-1 Beschichtung. Für primäre Osteozyten, die aus Kükenschädeln isoliert wurden, konnten bereits in anderen Arbeiten gute Adhäsionsbedingungen auf einem Lamininsubstrat nachgewiesen werden (Aarden et al. 1996). Es wurde in dieser Arbeit jedoch nicht überprüft, ob sich die zur Kultivierung der Kokultur in der Proliferationsanalyse und der MLO-Y4-Monokultur in der Genexpressionsanalyse verwendete Poly-L-Lysin/Laminin-Beschichtung auf die Genexpression von MLO-Y4 im Vergleich zu einer Collagen-1-Beschichtung auswirkt.

Bei der Wahl des Mediums für die Kokultur wurde sich ebenfalls an Boggs et al. (2011) orientiert und ein DMEM/F12-Medium gewählt, welches mit 1 % N1, 0,2 % Gentamicin/Amphotericin B und 5 % hiFBS komplementiert wurde. Der Unterschied zu Boggs et al. (2011) bestand lediglich in der Wahl des Antibiotikums/Antimykotikums mit Gentamicin/Amphotericin B anstelle der Antibiotikakombination Penicillin/Streptomycin.

Zur Vermeidung eines Effekts des Mitoseinhibitors AraC, der zur Reduktion der Zellzahlen von Schwannzellen und Fibroblasten eingesetzt wurde, auf die proliferierenden MLO-Y4, wurde dieser vor Zugabe der MLO-Y4 zu der Neuronenkultur zweimalig ausgewaschen. Da sich im Anschluss hohe Proliferationsraten der MLO-Y4 zeigten und sich in einem Vorversuch der negative Einfluss von AraC auf die Proliferation von MLO-Y4 detektieren ließ, schien AraC durch den Waschschrift entfernt worden zu sein. Hierdurch konnte eine Beeinflussung des Proliferationsassays durch AraC vermieden werden. Die

Verwendung von AraC als Mitoseinhibitor zur Reduktion der Zellzahl von Schwannzellen und die Konzentration von 10 nmol/L im Medium erzielte bei Boggs et al. (2011) den gewünschten Effekt.

4.1.4 Proliferationsassay BrdU

Da eine untersuchte Zielgröße in dieser Studie die Proliferationsrate von MLO-Y4 war, musste eine Methode zur objektiven Messung dieser Größe gefunden werden. Hierfür gibt es unterschiedliche Assays, die speziell für diesen Zweck entworfen wurden. In dieser Arbeit wurde der BrdU-basierte Proliferationsassay genutzt, der anhand der Inkorporation von BrdU in die DNA von sich teilenden Zellen arbeitet. Anschließend wurde die DNA denaturiert, um die BrdU-Inkorporation mit Antikörpern zu detektieren und anhand der Absorptionswerte im ELISA die Proliferation zu quantifizieren. Dieses ist ein häufig angewandtes Verfahren, welches sich durch eine hohe Sensitivität und Spezifität auszeichnet. In der Vergangenheit wurde der BrdU Proliferationsassay vor allem im Vergleich zu anderen Proliferationsassays (s. nächster Abschnitt) als sensitiver bezeichnet (Maghni et al. 1999). Des Weiteren werden durch den Einbau von BrdU in neu synthetisierte DNA nur sich teilende Zellen dargestellt, sodass beispielsweise Neurone hierbei keinen Einfluss auf das Ergebnis haben. Die Bedeutung der Teilungsrate von Schwannzellen und Fibroblasten in der DRG-Neuronenkultur wird durch die Vorbehandlung mit AraC und anhand der Ergebnisse im BrdU-Proliferationsassay als gering eingeschätzt (Abb. 20 und 21).

Ma et al. (2014) untersuchten bei der Messung des Einflusses von Acetylcholin auf Osteozyten die Proliferation von MLO-Y4 anhand eines 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium (MTT)-Assays. Dieser wird normalerweise zur Bestimmung der Vitalität verwendet, kann darüber hinaus jedoch ebenfalls zur Messung der Proliferation eingesetzt werden. Das Prinzip des MTT-Assays beruht darauf, dass gelbes Tetrazolium-Salz in Mitochondrien vitaler Zellen zu violetterem Formazan umgesetzt wird und dieser Farbumschlag anhand von Absorptionmessungen quantifiziert werden kann (Isaian et al. 2003). Berücksichtigt werden hierbei alle vitalen Zellen, auch diejenigen, die sich noch nicht geteilt haben. Bezüglich der Sensitivität zur Messung der Proliferation wurde gezeigt, dass der BrdU-Proliferationsassay dem MTT-Assay überlegen ist (Bergler et al. 1993). Ein weiteres Verfahren zur Proliferationsmessung ist der neuere, jedoch dem BrdU-Assay ähnliche 5-Ethynyl-2'-desoxyuridin (EdU)-Proliferationsassay, welcher ohne die Denaturierung der DNA funktioniert. Hierin besteht im Allgemeinen ein Vorteil gegenüber dem BrdU-Assay (Zeng et al. 2010). Der BrdU-Assay gilt in unserem

Labor allerdings als Standard zur Messung der Proliferation, sodass die Erfahrung mit diesem größer ist. Außerdem ist dieser kostengünstiger als der EdU-Assay. Der fehlende Schritt der DNA-Denaturierung im EdU-Assay hätte eine direkt anschließende Untersuchung der Genexpression möglich gemacht. Der Plan einer Messung der Expression wurde jedoch erst aufgrund der Ergebnisse im Proliferationsassay konkretisiert. Darüber hinaus existiert zur Untersuchung der Proliferation von Zellen der früher häufig angewendete ³H-Thymidin Test, der mittels radioaktiv markiertem Thymidin arbeitet. Die Detektion der Radioaktivität kann anschließend zur Bestimmung der Proliferation dienen. Eine Studie zeigte jedoch, dass das radioaktiv markierte Thymidin die DNA-Synthese inhibiert und Ergebnisse, die mit dieser Methode entstanden sind, mit Vorsicht zu genießen sind (Hu et al. 2002). Die Sensitivität wird als ähnlich zu der des BrdU-Assays angesehen (Gratzner 1982; Hawker 2003). Vor diesem Hintergrund stellte sich der BrdU-Proliferationsassay als eine geeignete Methode zur Quantifizierung der Proliferationsrate von MLO-Y4 heraus. Laut Produkthinweis des BrdU-Assays ist die empfohlene Dauer der Einwirkung von BrdU für maximal 24 h vorgesehen. In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch mit 32 h ein späterer Untersuchungszeitpunkt gewählt. Dies könnte eine ergänzende Erklärung zu dem vorher bereits erwähnten Platzmangel sein, warum die BrdU-Werte nach 32 h im Vergleich zu 24 h nicht mehr signifikant anstiegen. Da in Vorversuchen ein Anstieg zu verzeichnen war, wurde dieser Untersuchungszeitpunkt in die Versuche inkludiert.

4.1.5 BDNF-Freisetzung aus PEK-NP

Um die Freisetzung von BDNF aus PEK-NP zu quantifizieren wurde der Human Free BDNF ELISA verwendet. Da dieser ELISA BDNF-Konzentrationen nur in einem Bereich von 62,5 bis 2000 pg/mL detektieren kann, wurden die Proben entsprechend der berechneten Höchstkonzentration verdünnt. Die Ergebnisse befanden sich daher stets in diesem Rahmen. Der Intra-Assay-Variationskoeffizient wird mit unter 6,2 % angegeben, der Inter-Assay-Variationskoeffizient unter 11,3 %. Hierbei schließt dieser ELISA etwas schlechter ab als andere kommerzielle BDNF ELISAs (Vrijen et al. 2017). Die Durchführungszeit des Assays ist jedoch im Vergleich zu anderen Tests relativ kurz (Polacchini et al. 2015). Weil es bei der Suche nach einer geeigneten Beladung von PEK-NP mit BDNF nicht auf sehr genaue Werte, sondern lediglich auf eine Annäherung an die gewünschte BDNF-Konzentration von 40 ng/mL ankam, wurden die etwas schlechteren Variationskoeffizienten toleriert und dafür ein bereits im Labor etabliertes Verfahren genutzt.

Diskussion

Da vorerst mit einer geringen Freisetzung von BDNF aus den PEK-NP gerechnet wurde, wurde in Vorversuchen teilweise mit relativ hohen Mengen BDNF funktionalisierter PEK-NP von 100, 200 und 400 ng BDNF gearbeitet. Darüber hinaus sollten jedoch im Falle einer geringen Freisetzung auch niedrigere Mengen BDNF beladener PEK-NP von 20, 40 und 60 ng BDNF untersucht werden. Im BDNF ELISA zeigte sich für die Gruppe der höheren Beladungsmengen der Nanopartikel nach 1 h eine BDNF-Freisetzung zwischen durchschnittlich 22,3 und 47,6 % der gesamten BDNF-Menge. Der Freisetzungstest der sechs unterschiedlichen Mengen funktionalisierter PEK-NP wurde anders als der Proliferationsassay in einem Volumen des Mediums von 600 μ L durchgeführt, um durch die Entnahme von 10 μ L Medium pro Untersuchungszeitpunkt das Ergebnis der späteren Zeitpunkte möglichst wenig zu verfälschen. Da der Proliferationsassay in einem Volumen von 200 μ L durchgeführt wurde, konnte anhand der prozentualen Freisetzung eine theoretische Konzentration in einem anderen Verteilungsvolumen errechnet werden. Die Konzentrationen hätten somit für die höheren Beladungen in einem Volumen von 200 μ L über der Zielkonzentration von 40 ng/mL gelegen (zwischen 95 ng/mL und 519 ng/mL). Bei Betrachtung der niedrigeren Beladungsmengen der Nanopartikel lag die prozentuale Freisetzung im Durchschnitt zwischen 19,1 und 40,3 % und damit in einem ähnlichen Bereich wie bei den hohen Mengen. Im Durchschnitt nahm die prozentuale Freisetzung jedoch bei niedrigeren Mengen funktionalisierter PEK-NP stärker im Zeitverlauf ab als bei Beladung mit höheren Mengen, bei denen die Freisetzung teilweise noch zunahm. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass ein Teil des BDNFs vom Plastik des Wells adsorbiert wurde und dies bei niedrigen Konzentrationen einen stärkeren Effekt hat als bei hohen Konzentrationen, bei denen der adsorbierte Anteil prozentual nur wenig ausmacht. Nichtsdestotrotz ergab sich für die funktionalisierten PEK-NP entsprechend einer Beladung von 40 ng BDNF eine Konzentration in einem Verteilungsvolumen von 200 μ L von 64,5 ng/mL (prozentuale Freisetzung: 32,2 %) nach 1 h und von 27,1 ng/mL (prozentuale Freisetzung: 13,6 %) nach 24 h, weshalb diese Menge des PEK-NP im Vergleich mit gelöstem BDNF in einem weiteren Versuch getestet werden sollte.

Bei der Funktionalisierung von PEK-NP mit 40 ng BDNF ergab sich im Vergleich zum Vorversuch mit einem Verteilungsvolumen von 600 μ L eine prozentual geringere Freisetzung von durchschnittlich 15,4 % nach 1 h in einem Verteilungsvolumen von 200 μ L. Trotz der geringen Freisetzung fiel die Konzentration in einem ähnlichen Verlauf wie diejenige von exogen zugesetztem BDNF ohne PEK-NP in einer Konzentration von 40 ng/mL (Abb. 19). Dies lässt vermuten, dass im Zeitverlauf nach einer Stunde keine weitere Freisetzung von BDNF aus PEK-NP stattgefunden hat.

Innerhalb von 32 h, dem Untersuchungsintervall des BrdU-Assays lagen die BDNF-Konzentrationen bei exogener Zugabe von BDNF ohne PEK-NP zwischen 38,2 ng/mL und

10,5 ng/mL. Für die Zugabe von PEK-NP+BDNF lagen diese Konzentrationen etwas niedriger, jedoch in einem ähnlichen Bereich zwischen 30,7 ng/mL und 9,9 ng/mL. Aufgrund dieses Ergebnisses der ähnlichen Konzentrationsverläufe, erwies sich diese Menge BDNF zur Funktionalisierung der PEK-NP für den Proliferationsassay als geeignet. Unklar bleibt hierbei, ob der ELISA tatsächlich nur freies BDNF oder ebenfalls an PEK-NP gebundenes BDNF detektiert. Hieraus ergab sich zudem die Frage, ob an PEK-NP gebundenes BDNF an seine Rezeptoren binden kann und somit einen Effekt auf Zellen ausübt oder die Bindestelle durch die PEK-NP blockiert ist. Dies sollte als Gegenstand einer weiterführenden Arbeit näher beleuchtet werden.

Bei Müller and Keßler (2012) zeigte sich für die Beschichtung einer Oberfläche mit Bisphosphonat-beladenen PEK-NP, dass im Vergleich zur Beschichtung ohne PEK-NP durch die Funktionalisierung eine verzögerte Freisetzung erreicht werden konnte. Die Beschichtung mit dem Bisphosphonat ohne PEK-NP war bereits nach einer Minute fast vollständig in das Medium übergegangen. Das Verhindern eines Abfalles der Konzentration von BDNF durch eine verzögerte Freisetzung konnte in der vorliegenden Arbeit nicht durch die Funktionalisierung erzielt werden. Eventuell würde sich hierfür eine Beschichtung wie bei Müller und Keßler (2012) besser eignen als funktionalisierte PEK-NP in Dispersion. Eine Beschichtung wäre in dem Versuchsmodell in dieser Arbeit jedoch problematisch gewesen, da zuerst die DRG-Neurone und daraufhin die MLO-Y4 anwachsen mussten und erst danach die Nanopartikel bzw. BDNF hinzugegeben werden sollte. Bei einer Beschichtung wäre zu diesem Zeitpunkt vermutlich bereits ein Großteil des BDNFs freigesetzt worden.

4.2 Zytokompatibilität von PEK-NP

Generell gelten PEK-NP als ein geeignetes System, um Wirkstoffe an Knochenersatzmaterialien zu binden und diese freizusetzen (Müller et al. 2018). Durch die Funktionalisierung werden die PEK-NP lokal appliziert, was die Wirkstoffkonzentration einerseits am gewünschten Ort erhöht, andererseits einen systemischen Effekt mit einhergehenden Nebenwirkungen weitgehend verhindert (De Witte et al. 2018). In der Arbeit von Wang et al. (2015) wurden beispielsweise BMP-2 funktionalisierte PEK-NP, die an Knochenersatzmaterial gebunden waren, in vivo untersucht. Hierbei wurde die Osteoinduktivität durch die Funktionalisierung des Knochenersatzmaterials erhöht und im Vergleich zum Ansatz ohne Funktionalisierung vermehrt Knochen gebildet. Im Gegensatz zu Wang et al. (2015), die PEK-NP nutzten, um den Wirkstoff zu inkorporieren, wurde in dieser Arbeit der Wirkstoff an PEK-NP durch die negative Nettoladung der NP gebunden.

Wang et al. (2015) und andere Arbeiten (Petzold et al. 2017) zeigten, dass PEK-NP als Trägersystem die Wirkung des Wirkstoffes nicht mildern und somit bezüglich des Knochens gut verträglich scheinen. Allerdings konnte bei Kauschke et al. (2019) ein konzentrationsabhängiger negativer Effekt der PEK-NP auf die Osteoklastenaktivität und die Osteoklastogenese detektiert werden. In Bezug auf mesenchymale Stammzellen wurde bei Woltmann et al. (2014) ein konzentrationsabhängiger negativer Effekt, vor allem der unkomplexierten Polyanionen, aber auch der unkomplexierten Polykationen, nachgewiesen. Die Verwendung der komplexierten PEK-NP und hierbei ebenfalls der auch in dieser Arbeit verwendeten PLL/CS PEK-NP zeigten diese ausgeprägten negativen Effekte jedoch nicht. Lediglich bei sehr hohen Konzentrationen wurde ein leichter negativer Einfluss auf die metabolische Aktivität mesenchymaler Stammzellen gemessen. Im Allgemeinen wurden bei Woltmann et al. (2014) sowie auch bei Vehlow et al. (2016) bezogen auf mesenchymale Stammzellen PEK-NP als zytokompatibel bezeichnet.

Zur Einschätzung der Zytokompatibilität bezüglich Osteozyten bzw. MLO-Y4, können die Ergebnisse des BrdU-Proliferationsassays sowie der lichtmikroskopischen Beobachtung herangezogen werden. Hierbei zeigte sich durch die reinen PEK-NP im Vergleich zur Kontrolle kein negativer Einfluss auf die Proliferation von MLO-Y4 (Abb. 20 und 21). Bei beiden Ansätzen belief sich die Konzentration der PEK-NP auf 32 µmol/L. Bei Kauschke et al. (2019) konnte für eine Konzentration von 40 µmol/L der gleichen PEK-NP zwar kein signifikant negativer Effekt auf die Genexpression der Osteoklasten festgestellt werden, wohl aber auf die Morphologie der Osteoklasten. Unter lichtmikroskopischer Beobachtung konnte bezüglich der MLO-Y4 und der DRG-Neurone morphologisch kein negativer Effekt von PEK-NP in einer Konzentration von 32 µmol/L festgestellt werden (Abb. 17). Dieser Hinweis auf eine Zytokompatibilität ließ sich im Hinblick auf die DRG-Neurone und Schwannzellen ebenfalls beobachten (Abb. 14, 20 und 21). Diese Erkenntnisse bestätigen die Möglichkeit eines Einsatzes von PEK-NP als Trägersystem und erstmals den Hinweis auf eine gute Zytokompatibilität in Bezug auf Osteozyten. Der Einfluss von PEK-NP auf die Genexpression in Osteozyten wurde in dieser Studie nicht analysiert. Daher sind weitere Studien notwendig, um den genauen Einfluss von PEK-NP auf Osteozyten und den Knochenstoffwechsel zu erforschen.

4.3 BDNF fördert die Proliferationsrate von MLO-Y4

Da in vorigen Arbeiten nachgewiesen werden konnte, dass BDNF eine Rolle während der Frakturheilung einnimmt und durch exogene Zugabe von BDNF die Knochenheilung unterstützt werden kann (Kauschke et al. 2018B; Kilian et al. 2014), wurde in dieser

Arbeit der Einfluss von BDNF auf Osteozyten untersucht. Bislang konnte in anderen Studien vor allem ein positiver Effekt von BDNF auf Osteoblasten detektiert werden, was in einer verstärkten Expression von osteogenen Differenzierungsmarkern und einer vermehrten Sekretion des VEGF bestand (Ida-Yonemochi et al. 2017; Zhang et al. 2017). Im BrdU-Proliferationsassay zeigte sich durch Zugabe von BDNF (40 ng/mL) eine hochsignifikant erhöhte Proliferationsrate sowohl der MLO-Y4-Monokultur als auch der Kokultur mit DRG-Neuronen nach 24 h im Vergleich zu den Ansätzen PEK-NP, BDNF funktionalisierte PEK-NP und ohne Zusatz. Da, wie bereits erläutert, die Proliferationsrate von MLO-Y4 als Vitalitätsparameter herangezogen werden kann, zeigt sich hierdurch ein positiver Einfluss von BDNF auf die Vitalität von MLO-Y4. Der Einfluss von BDNF auf Osteozyten wurde in dieser Studie erstmalig *in vitro* untersucht.

Die BDNF-Konzentration von 40 ng/mL stellte sich in früheren Arbeiten als optimal für die Beeinflussung von mesenchymalen Stammzellen, den Vorläuferzellen von Osteoblasten, heraus (Kauschke et al. 2018A). In anderen Studien wurde gezeigt, dass für osteoblastenähnliche Zellen (MC3T3-E1) eine BDNF-Konzentration von 80 ng/mL die besten Bedingungen liefert (Ida-Yonemochi et al. 2017) und bei einer Konzentration von 100 ng/mL den Osteoblasten ähnliche Zellen (HPL-Zellen) die stärkste Expression osteoblastentypischer Marker aufzeigten. Darüber hinaus konnte in HPL-Zellen bei einer Konzentration von 50 ng/mL die höchste BrdU-Inkorporation nachgewiesen werden (Takeda et al. 2005). Bei Sun et al. (2006) förderte eine BDNF-Konzentration von 100 ng/mL *in vitro* am stärksten die Formation von Blutgefäßen durch Endothelzellen. Auch die Genexpression wurde durch die BDNF-Konzentration beeinflusst. Hierbei ließ sich bei einer Konzentration von 50 ng/mL ein positiver Effekt feststellen. Die physiologischen Konzentrationen im menschlichen Serum liegen bei etwa $32,69 \pm 8,33$ ng/mL (Naegelin et al. 2018). Da in dieser Arbeit jedoch mit murinen Zellen gearbeitet wurde, war die BDNF-Serumkonzentration in Mäusen von Interesse. Mit diesem Thema beschäftigten sich Klein et al. (2011), in deren Studie zwar BDNF im Frontalkortex und im Hippocampus der Maus nachweisbar war, im Blut jedoch nicht bestimmt werden konnte. Im Vergleich hierzu lag die BDNF-Konzentrationen im Plasma von Ratten bei ungefähr 2,7 ng/mL. In der Studie von Klein et al. (2011) sollte eine Korrelation zwischen BDNF-Serumspiegeln und den BDNF-Konzentrationen in Frontalkortex und Hippocampus gezeigt werden (Klein et al. 2011). In einer Studie, in der der Einfluss von BDNF auf Schwanzzellen aus Ratten untersucht wurde, hat sich eine BDNF-Konzentration von 50 ng/mL als die wirksamste in Bezug auf die Proliferationsrate von Schwanzzellen herausgestellt (Hou et al. 2013). All diese Erkenntnisse zusammengenommen, wurde eine Konzentration von 40 ng/mL als sinnvoll angesehen, da viele der Studien diesbezüglich zwar an humanen Zellen durchgeführt wurden, jedoch beispielsweise bei Ida-Yonemochi

et al. (2017) und Hou et al. (2013) auch bei Ratten ein positiver Effekt ähnlicher BDNF-Konzentration gezeigt werden konnte. Zukünftig gilt es, die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse auch an humanen Osteozyten nachzuvollziehen und hierbei die BDNF-Konzentrationen zu variieren, um eine optimale Wirkstoffkonzentration zu evaluieren. Die vorliegende Studie diente jedoch zum erstmaligen Nachweis, dass überhaupt ein Einfluss von BDNF auf Osteozyten existiert.

Im Gegensatz zu gelöstem BDNF im Zellkulturmedium konnte dieser positive Effekt nicht für BDNF funktionalisierte PEK-NP gemessen werden, obwohl eine negative Wirkung von PEK-NP auf MLO-Y4 im Proliferationsassay ausgeschlossen wurde. Hiernach stellt sich die Frage, warum BDNF funktionalisierte PEK-NP diesen Einfluss trotz der vorher nachgewiesenen BDNF-Freisetzung nicht zeigen. Ein Erklärungsversuch wurde bereits genannt, wonach der ELISA zum Nachweis von freiem BDNF auch an PEK-NP gebundenes BDNF detektiert haben könnte. Hierzu gibt es keine Daten in der Literatur. Das an PEK-NP gebundene BDNF könnte dann entweder aus sterischen Gründen oder durch Blockade des Bindungszentrums nicht an seinen Rezeptor gebunden haben. Ein weiterer Erklärungsansatz wäre, dass PEK-NP nicht direkt die Proliferation von MLO-Y4, wohl aber anderweitig Einfluss auf MLO-Y4 nehmen und somit den positiven Einfluss von BDNF relativieren. Darüber hinaus konnte im BDNF-Freisetzungsversuch von PEK-NP, die mit 40 ng BDNF beladen waren, zwar ein ähnlicher Konzentrationsverlauf wie bei gelöstem BDNF festgestellt werden. Die BDNF-Konzentrationen der BDNF funktionalisierten PEK-NP lagen allerdings stets geringfügig unter denen des Ansatzes mit gelöstem BDNF. Dieser geringe Unterschied könnte ebenfalls eine Erklärung für das abweichende Proliferationsverhalten unter Einfluss von funktionalisierten PEK-NP liefern. Daher gilt es weiterhin zu eruieren, an welcher Stelle BDNF an PEK-NP gebunden ist und inwiefern PEK-NP Osteozyten beeinflussen.

Ein Effekt der Kokultivierung von MLO-Y4 mit DRG-Neuronen/Schwanzzellen auf die Proliferationsrate der osteozytenähnlichen Zellen konnte nicht wahrgenommen werden, obwohl beide Zellarten sichtlich in Kontakt traten. Im Kokulturmodell sollten Neurone und Schwanzzellen als endogene BDNF-Quelle dienen. In der Studie von Cai et al. (2010) konnte ein positiver Effekt von Schwanzzellen aus Ratten auf die Proliferation, Differenzierung und Mineralisation von Osteoblasten nachgewiesen werden. Die BDNF-Konzentration, die von den Schwanzzellen synthetisiert wurde, wurde zu verschiedenen Zeitpunkten im Kulturmedium gemessen und stieg stetig an. Nach drei Tagen lag diese bei ungefähr 50 pg/mL und unterschied sich auch durch Zugabe der doppelten Menge Schwanzzellen nicht signifikant (Cai et al. 2010). Hieran lässt sich verdeutlichen, dass die Konzentration, die durch Schwanzzellen aufgebaut werden kann, sehr gering ist. Die exogene Zugabe von BDNF 40 ng/mL lag im Vergleich zur Konzentration bei Cai et al.

(2010) fast tausendfach höher. Offen bleibt hierbei, welche Menge BDNF von DRG-Neuronen produziert und sezerniert wurde und ob sich murine Neurone und Schwannzellen stark in der sezernierten Menge BDNF von Ratten unterscheiden. Die BDNF-Konzentration im Hippocampus ist allerdings in Ratten ungefähr so hoch wie in Mäusen (Klein et al. 2011), sodass grundsätzlich von ähnlichen Wirkkonzentrationen in Ratten und Mäusen ausgegangen werden kann. Grundsätzlich konnte der positive Effekt von BDNF auf die Proliferation von MLO-Y4 durch die Kokultivierung mit Neuronen und Schwannzellen jedoch weiterhin nachgewiesen werden, dieser wurde nicht durch die Kokultivierung gemildert. Die Kokultur kommt der in vivo Situation näher als eine Monokultur, da der Knochen ebenfalls durch sensorische Neurone innerviert und beeinflusst wird (Ding et al. 2010).

4.4 Einfluss von BDNF auf die Genexpression in MLO-Y4

Da BDNF nachgewiesenermaßen die Proliferation von MLO-Y4 positiv beeinflusste, stellte sich die Frage, inwiefern BDNF Einfluss auf die Genexpression verschiedener osteozyttypischer Proteine ausübt. Hierfür wurden vor allem der Osteozytenmarker Sclerostin sowie die Schlüsselproteine im Knochenstoffwechsel RANKL und OPG als geeignet angesehen. Zudem sollte die Expression von BDNF und den Rezeptoren für BDNF, TrkB und p75NTR, bestimmt werden. Da die Ergebnisse des Proliferationsassays nach 24 h Inkubationszeit unter Zugabe von BDNF 40 ng/mL hoch signifikant waren, sollte auch zur Bestimmung der Genexpression in MLO-Y4 diese Inkubationszeit angewandt werden. Als Beschichtung wurde, wie im Proliferationstest, Poly-L-Lysin/Laminin verwendet. Hierdurch sollten die gleichen Versuchsbedingungen geschaffen werden, die ebenfalls zu den signifikanten Ergebnissen bezüglich der Proliferation von MLO-Y4 führten.

4.4.1 Sclerostin/SOST

In dieser Arbeit konnte keine Expression von SOST in der real-time RT-PCR nachgewiesen werden, obwohl diese in früheren Studien in MLO-Y4 festgestellt und die Expression als Zielgröße für verschiedene Einflussgrößen genutzt wurde (Tanaka et al. 2015). Bei der exemplarischen Untersuchung der PCR-Produkte von drei der insgesamt fünf Ansätzen ließ sich in der Kapillargelelektrophorese lediglich in einer Probe ohne Zusatz von BDNF eine Bande auf Höhe der Positivkontrolle für SOST detektieren. Somit konnte kein Einfluss von BDNF auf die Expression von SOST festgestellt werden. Sclerostin

und das zugehörige Gen SOST wurden als Untersuchungsobjekt ausgewählt, da es einerseits ein Marker für späte Osteozyten ist und andererseits eine wichtige Rolle im Knochenstoffwechsel einnimmt (Lerner und Ohlsson 2015; Poole et al. 2005). Vor allem die Beeinflussung der Apoptose von Osteozyten über den Wnt-Signalweg wurde als relevant angesehen, da dies den Effekt von BDNF auf die Proliferation von MLO-Y4 über die Regulierung der Genexpression von SOST hätte erklären können. Der Wnt-Signalweg führt normalerweise zu einer Inhibierung der Apoptose von Osteozyten. Durch ein Ausschalten der Inhibierung dieses Signalweges konnte eine verringerte Apoptose von Osteozyten erreicht werden (Bodine et al. 2004). Da Sclerostin ebenfalls den Wnt-Signalweg inhibiert (Semënov et al. 2005), kann von einer indirekten Regulierung der Apoptose durch Sclerostin ausgegangen werden. Dieser Einfluss von Sclerostin auf das Überleben von Osteozyten war darüber hinaus Teil einer Studie, in der nachgewiesen wurde, dass durch Ausschalten des SOST-Gens eine verminderte Apoptose von Osteozyten erzielt wurde (Lin et al. 2009). In der Arbeit von Sun et al. wurde der Einfluss mechanischer Vibrationen auf die Proliferation und Genexpression von MLO-Y4 untersucht. Hierbei zeigte sich ein positiver Einfluss der Vibrationen auf die Proliferation und ein negativer Einfluss auf die SOST-Expression, was einen Zusammenhang zwischen Proliferation und SOST-Expression nahelegt (Sun et al. 2020). Da die MLO-Y4 in der vorliegenden Arbeit eine hohe Proliferationsrate aufwiesen, könnte dies eine Erklärung für die ausbleibende SOST-Expression sein. Zudem scheint Sclerostin ebenfalls die Expression von RANKL zu steuern (Wijenayaka et al. 2011), was es umso bedeutender für den Knochenstoffwechsel macht und daher Bestandteil dieser Studie wurde.

Wie bereits erwähnt, ist ein weiterer Erklärungsversuch für das Ausbleiben einer SOST-Expression die Charakterisierung der MLO-Y4 als frühe Osteozytenzelllinie, während es sich bei Sclerostin um einen späten Osteozytenmarker handelt (Poole et al. 2005). In anderen Studien konnte in MLO-Y4 ebenfalls kein SOST nachgewiesen werden (Papanicolaou et al. 2009). Andererseits wurde SOST in weiteren Studien in den MLO-Y4 nachgewiesen (Mabilleau et al. 2010; Shu et al. 2017). Mabilleau et al. (2010) stellten fest, dass nach einer gewissen Anzahl an Passagen die MLO-Y4 kein Sclerostin im Western Blot mehr aufwiesen. Eine genaue Angabe, ab welcher Passage diese Beobachtung gemacht wurde, konnte nicht gefunden werden. In der vorliegenden Arbeit wurde mit Passagen zwischen 16 und 23 gearbeitet. Vincent et al. (2009) zeigten, dass die SOST-Expression in MLO-Y4 durch einen Induktor der Apoptose erst induziert wird und die Expression ohne diesen Induktor in einem sehr niedrigen Bereich liegt. Bei Betrachtung der Dauer der Kultivierung von MLO-Y4 in den unterschiedlichen Studien fällt auf, dass SOST teilweise bereits nach 1 h, teilweise nach 24 h nachgewiesen wurde. York et al. (2012) stellten die These auf, dass MLO-Y4 erst nach vier Tagen

Inkubationszeit ihre phänotypischen Merkmale ausbilden. Die Experimente wurden jedoch zur Evaluierung einer bestimmten Beschichtung im Vergleich zu einer Glasbeschichtung durchgeführt. Sclerostin wurde immunhistochemisch in der Studie von York et al. (2012) bereits nach 4 h detektiert, jedoch in geringerem Ausmaß als nach 72 Stunden (York et al. 2012). Auch bei Sun et al. (2020) wurde vor Messung der SOST-Genexpression die MLO-Y4-Kultur vier Tage kultiviert. Gupta et al. (2010) wiesen nach 24, 48 und 72 h eine Expression von SOST in MLO-Y4 nach. In der vorliegenden Arbeit wurde die Genexpression von SOST nach insgesamt 46 h bestimmt. Die kontroversen Ergebnisse in der Literatur bezüglich der Expression von SOST in MLO-Y4 suggerieren, dass eine Expression nur unter bestimmten Bedingungen nachweisbar ist.

Eine weitere Möglichkeit, warum eine Expression von SOST nicht nachgewiesen werden konnte, stellt die Wahl der Beschichtung dar. Da im Proliferationsassay aufgrund der Kokultivierung mit Neuronen eine von der üblichen Beschichtung für MLO-Y4 (Collagen-1) abweichende Beschichtung (Poly-L-Lysin/Laminin) gewählt wurde, sollten diese Bedingungen auch im Versuch der Genanalyse geschaffen werden. In Vorversuchen wurde diese Beschichtung bereits bezüglich Morphologie und Proliferation als geeignet für MLO-Y4 befunden (Abb. 9). Ein Einfluss auf die Genexpression wurde jedoch nicht untersucht. Daher besteht die Möglichkeit, dass SOST als typisches Osteozytenmerkmal aufgrund dieser unüblichen Beschichtung nicht exprimiert wurde. Boggs et al. beschrieben, dass die MLO-Y4 eine Collagen-1 oder PInDIV Beschichtung gegenüber einer Laminin-Beschichtung bevorzugten. Dies wurde jedoch nicht an der Genexpression festgemacht, sondern anhand des Vergleichs, auf welcher Beschichtung sich vermehrt Zellen ansiedeln (Boggs et al. 2011). Auch York et al. (2012) beschäftigten sich mit alternativen Beschichtungen zur Kultivierung von MLO-Y4. In der Studie von York et al. (2012) zeigten sich immunhistochemisch zwischen dem Wachstum auf Glas und auf Polydimethylsiloxan keine signifikanten Unterschiede in der Expression von SOST und eine Expression wurde zwischen 4 und 120 h stets nachgewiesen (York et al. 2012).

4.4.2 RANKL/OPG

Da RANKL und OPG wichtige Schlüsselproteine im Knochenstoffwechsel sind, über die die Resorption und der Aufbau von Knochenmasse gesteuert wird (Simonet et al. 1997; Quinn et al. 2001), sollte ein Effekt von BDNF auf die Expression der Gene dieser Proteine untersucht werden. In der vorliegenden Studie zeigte sich sowohl für RANKL als auch für OPG eine nachweisbare Expression in MLO-Y4. Ein signifikanter Unterschied in der Genexpression zwischen dem Ansatz mit BDNF (40 ng/mL) und dem

Kontrollansatz konnte allerdings nicht ausgemacht werden. Die Expression der beiden Gene wurde bereits in vorigen Studien (Kramer et al. 2010; Shu et al. 2017; Ai et al. 2012) sowohl in Osteozyten als auch speziell in MLO-Y4 nachgewiesen. Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass Sclerostin eine Induktion der RANKL-Expression bewirkt. In der Arbeit von Kramer et al. (2010) konnte durch eine Ausschaltung des Wnt-Signalwegs, der durch Sclerostin ebenfalls gehemmt wird, eine Suppression von OPG erzielt werden. Shu et al. (2017) konnten einen direkten Effekt von Sclerostin auf die Expression von OPG jedoch nicht detektieren. Da Sclerostin in der vorliegenden Arbeit nicht exprimiert wurde, bleibt auch die Frage offen, ob BDNF über Sclerostin die Expression von RANKL und OPG beeinflusst. Jedoch scheint eine direkte Wirkung von BDNF auf die Expression von RANKL und OPG in MLO-Y4 auf Grundlage der real-time RT-PCR-Ergebnisse dieser Arbeit unwahrscheinlich, was die Regulierung des Knochenstoffwechsels durch BDNF über andere Mechanismen wahrscheinlich macht. In Studien von Ai et al. (2012) konnte in Bezug auf andere Zelltypen ein Einfluss von BDNF auf die Expression von RANKL bewiesen werden. In humanen Stromazellen des Knochenmarks wurde eine Hochregulierung von RANKL durch Zusatz von BDNF (25 ng/mL) nachgewiesen (Ai et al. 2012). In derselben Studie konnte gezeigt werden, dass Zellen des Multiplen Myeloms, ein Lymphom, welches von Plasmazellen im Knochenmark ausgeht, BDNF produzieren, darüber RANKL in Stromazellen induzieren und so die Osteoklastogenese anregen. Dies könnte ein Pathomechanismus sein, durch den es zur Knochendestruktion beim Multiplen Myelom kommt (Ai et al. 2012). Ein Jahr später veröffentlichten Ai et al. eine Studie, in der ein dosisabhängig hemmender Effekt von BDNF auf die Sekretion von OPG und ein induktiver Einfluss auf die Sekretion von RANKL durch Osteoblasten detektiert wurde. Durch die Ausschaltung des BDNF/TrkB-Signalwegs konnte die Knochenresorption verringert werden (Ai et al. 2013). Da eine Bindung von BDNF an TrkB zu einer Aktivierung des ERK-Signalweges führt (Kajiyama et al. 2008) und der ERK-Signalweg auch die Expression von RANKL (Mine et al. 2014) reguliert, könnte hierüber die bei Ai et al. (2013) festgestellte verminderte Knochenresorption erklärt werden. Auch Camerino et al. (2012) konnten durch Ausschaltung des zentralnervösen BDNF eine Zunahme der Knochenmasse feststellen. Im Knochen blieb die Expression von BDNF allerdings erhalten. Die Ergebnisse der Studien von Ai et al. (2012 und 2013) stehen im Gegensatz zu den Studien, die BDNF als fördernd auf den Knochenaufbau herausstellten (Ida-Yonemochi et al. 2017; Kauschke et al. 2018B). Bei Ai et al. (2012 und 2013) wurden die in vivo Studien am Krankheitsmodell des Multiplen Myeloms durchgeführt, wodurch der physiologische Knochenstoffwechsel gestört ist. In vitro Studien zeigen allerdings einen positiven Effekt von BDNF auf die Expression von RANKL in Stromazellen und Osteoblasten, der in der vorliegenden Arbeit bezüglich

Osteozyten nicht nachgewiesen werden konnte, obwohl Osteozyten ebenfalls RANKL exprimieren und sezernieren (Xiong et al. 2011). Dieser Unterschied zwischen Osteoblasten und Osteozyten wirft die Frage auf, ob die Expression von RANKL und OPG in Osteozyten durch andere Mechanismen gesteuert werden als in Osteoblasten. Mit der Regulierung der RANKL Expression in Osteoblasten und Osteozyten beschäftigten sich mehrere Studien, die zu unterschiedlichen Ergebnissen führten. In der Signaltransduktion scheint vor allem die Janus-Kinase, sowie vorgeschaltet Interleukin-6 und der Signaltransduktor Glykoprotein 130 eine Rolle zu spielen. Dieser Signalweg findet sich sowohl in Osteozyten als auch in Osteoblasten *in vitro* zur Regulierung der Expression von RANKL (Murakami et al. 2017; Wu et al. 2017; Heinrich et al. 1998). In einer weiteren Studie zeigte sich jedoch für die Ausschaltung von Glykoprotein 130 in Osteoblasten *in vivo* kein Effekt im physiologischen Knochenstoffwechsel, für die Ausschaltung in Osteozyten hingegen schon (Johnson et al. 2014). Zur Regulierung der OPG-Expression in Osteozyten und Osteoblasten scheint der Wnt-Signalweg eine entscheidende Rolle zu spielen. In Osteoblasten induziert vor allem Wnt16 die OPG-Expression (Kramer et al. 2010; Glass et al. 2005; Movérare-Skrtic et al. 2014). Fraglich bleibt jedoch, warum in der vorliegenden Arbeit *in vitro* die Expression von RANKL und OPG durch BDNF trotz der ähnlichen Signalwege nicht wie in Osteoblasten hochreguliert wurde. Eine mögliche Erklärung wären bislang unbekannt Signalwege in MLO-Y4, die sich von denen in Osteoblasten unterscheiden und zu einer anderen Wirkweise von BDNF führen.

4.4.3 BDNF/TrkB/p75NTR

Bereits 1996 wurde vermutet, dass BDNF eine Rolle im Knochenstoffwechsel einnimmt. In der Studie von Jehan et al. (1996) konnte eine NGF- und BDNF-Genexpression in einer Osteoblastenzelllinie detektiert werden (Jehan et al. 1996). Eine Expression von BDNF wurde bisher im Knochen auch in anderen Arbeiten vor allem in Osteoblasten nachgewiesen (Asaumi et al. 2000; Yamashiro et al. 2001). Da in Neuronen BDNF an TrkB gebunden ein Überlebenssignal vermittelt (Huang und Reichardt 2003; Rose et al. 2004) und die Proliferation der MLO-Y4 durch BDNF positiv beeinflusst wurde, bestand die Vermutung, dass dieser Effekt über den TrkB-Rezeptor vermittelt wird. TrkB konnte bisher nur in einer Studie immunhistochemisch in Osteozyten nachgewiesen werden. Hierbei wurde durch die exogene Zugabe von BDNF TrkB hochreguliert (Ida-Yonemochi et al. 2017). Die Expression von TrkB sollte in dieser Arbeit *in vitro* an MLO-Y4 reproduziert werden. In der vorliegenden Studie konnte zum ersten Mal eine BDNF-Expression in der murinen Osteozytenzelllinie MLO-Y4 detektiert werden. Ob Osteozyten sogar

BDNF sezernieren und hierüber den Knochenstoffwechsel beeinflussen, wurde in dieser Arbeit nicht untersucht.

Eine Expression von TrkB konnte in der real-time RT-PCR nicht quantifiziert werden, da die cp -Werte für ein Großteil der Ansätze in einem Bereich von über 35 lagen. In der Schmelzkurvenanalyse zeigten sich jedoch bei der Mehrheit der Proben dem PCR-Produkt des TrkB-Primers ähnliche Schmelzpunkte. Daher wurde im Anschluss eine Kapillargelelektrophorese mit den gewonnenen PCR-Produkten durchgeführt, welche bei den meisten Proben eine Bande auf Höhe der Positivkontrolle für TrkB ergab. Bisher wurde in keiner anderen Studie TrkB speziell in MLO-Y4 nachgewiesen, jedoch, wie oben erwähnt, bereits einmal in nicht immortalisierten Osteozyten (Ida-Yonemochi et al. 2017). Somit wäre die positive Beeinflussung der Proliferation durch BDNF über den TrkB-Rezeptor denkbar. Ob TrkB wie in Neuronen auch in Osteozyten ein Überlebenssignal vermittelt, ist bisher nicht bekannt. In Zementoblasten, den Osteoblasten in mancher Hinsicht ähnliche Zellen (Bosshardt 2005), konnte eine Aktivierung des ERK-Signalweges, ähnlich wie in Neuronen (Lim et al. 2008), durch BDNF über die Bindung an TrkB bewiesen werden. Die Vermittlung des Effektes von BDNF auf den ERK-Signalweg über TrkB führte in Zementoblasten zu einer Induktion von BMP-2, welches ein Stimulator für die Knochenbildung ist (Kajiya et al. 2008). Somit könnte auch die fördernde Wirkung von BDNF auf den Knochenstoffwechsel über TrkB, den ERK-Signalweg und letztlich über die Hochregulierung von BMP-2 ablaufen. Eine Hochregulierung von TrkB durch die Zugabe von BDNF, wie bei Ida-Yonemochi et al. (2017) mittels Immunhistochemie in Osteozyten nachgewiesen, konnte in der vorliegenden Arbeit für MLO-Y4 *in vitro* nicht dargestellt werden.

Der zweite für BDNF bekannte Rezeptor ist der p75NTR. In Neuronen wird über eine Aktivierung des p75NTR ein proapoptotischer Effekt erzielt (Bamji et al. 1998). Die beiden Rezeptoren für BDNF, TrkB und p75NTR, scheinen sich in Neuronen gegenseitig zu beeinflussen. Dies führt dazu, dass einerseits durch die Aktivierung von TrkB die Signalwege, die durch p75NTR normalerweise aktiviert werden, inhibiert werden und andersherum. So konnte in vielen Studien gezeigt werden, dass der proapoptotische Effekt, der über p75NTR vermittelt wird, vor allem unter Ausschaltung des Trk Rezeptors in Erscheinung tritt (Kaplan and Miller 2000). Ein anderer Name für den p75NTR ist der *nerve growth factor receptor* (NGFR). Dessen Expression wurde bereits in mesenchymalen Stammzellen, den Vorläuferzellen von Osteoblasten und damit auch von Osteozyten, detektiert (Quirici et al. 2002). In einer weiteren Arbeit wurde sogar die Regulierung der Proliferation und Differenzierung einer humanen Osteoblastenzelllinie (MG63) durch p75NTR aufgezeigt (Akiyama et al. 2014). Dieses Ergebnis wurde mittels Herstellung einer p75NTR-exprimierenden Osteoblastenzelllinie erzielt, die

normalerweise kein p75NTR exprimiert. Die Expression von p75NTR in MLO-Y4 wurde in der vorliegenden Arbeit unter Einfluss von BDNF mittels real-time RT-PCR untersucht, da ein möglicher Einfluss von BDNF auf die Proliferation von MLO-Y4 über den p75NTR aufgezeigt werden sollte. Hierbei konnte p75NTR zum ersten Mal in MLO-Y4 und damit in einer Osteozytenzelllinie nachgewiesen werden. Es wurde jedoch kein signifikanter Unterschied in der p75NTR-Expression nach Zugabe von BDNF im Vergleich zur Kontrolle ermittelt. Nichtsdestotrotz könnte BDNF die Proliferation von MLO-Y4 einerseits über die Bindung an TrkB und andererseits über die Bindung an p75NTR beeinflussen haben, da beide in MLO-Y4 exprimiert sind. Durch den Einsatz der gleichen Menge cDNA in die real-time RT-PCR für TrkB und p75NTR lässt sich schlussfolgern, dass p75NTR stärker in MLO-Y4 exprimiert ist als TrkB. In der vorliegenden Arbeit wurde dem Zellkulturmedium jedoch das vor allem an TrkB bindende BDNF zugegeben, währenddessen p75NTR insbesondere durch proBDNF aktiviert wird (Teng et al. 2005; Yang et al. 2021). Hieraus ergibt sich ein Erklärungsversuch, obwohl trotz der höheren Expression von p75NTR das zugegebene BDNF einen positiven Einfluss auf die Proliferation der MLO-Y4 hatte. Darüber hinaus könnte dies den fehlenden Einfluss der DRG-Kokultivierung auf die Proliferation der MLO-Y4 begründen, da DRG-Neurone sowohl das antiapoptotisch wirkende *mature* BDNF als auch das proapoptotisch wirkende proBDNF exprimieren (Sun et al. 2012).

4.5 Ausblick

Die vorliegende Arbeit konnte den positiven Einfluss von BDNF auf die Proliferation einer Osteozytenzelllinie nachweisen. Hinzu kommen neue Erkenntnisse bezüglich der Expression von BDNF-Rezeptoren in diesen Zellen, welche die Basis für weitere Arbeiten hinsichtlich dieses Themas liefern. Im Zuge dessen sollte der Einfluss von BDNF auf Osteozyten bezüglich der Expression anderer Gene überprüft werden. Als Beispiel bietet sich hierfür VEGF, welches einerseits in Osteozyten während der Frakturheilung exprimiert zu sein scheint (Chu et al. 2008), andererseits in Osteoblasten durch BDNF, vor allem ab einer Konzentration von 50 ng/mL, hochreguliert und vermehrt sezerniert wird (Zhang et al. 2017). Es konnte gezeigt werden, dass dieser fördernde Einfluss auf VEGF über die Stimulation von TrkB vermittelt wird (Zhang et al. 2017). In vivo fungiert VEGF als Stimulator der Angiogenese während der Frakturheilung und somit der Frakturheilung selbst (Beamer et al. 2010). Zu überprüfen wäre daher, ob BDNF auch in Osteozyten zu einer stärkeren Expression von VEGF führt und Osteozyten während der Frakturheilung neben Osteoblasten ebenfalls als Regulatoren der Angiogenese dienen.

Die am Anfang dieser Arbeit vorgestellte Notwendigkeit neuer Therapiemöglichkeiten osteoporotischer Frakturen wirft zudem die Frage auf, ob die Erkenntnisse dieser Arbeit zu einer Verbesserung der Therapie beitragen könnten. Da sich BDNF in vorherigen Arbeiten bereits als Stimulator der Knochenheilung herausgestellt hat (Ida-Yonemochi et al. 2017; Kauschke et al. 2018B), ist ein Einsatz in der Therapie osteoporotischer Frakturen grundsätzlich denkbar. In den genannten Arbeiten (Ida-Yonemochi et al. 2017; Kauschke et al. 2018B) wurde BDNF stets lokal appliziert, um systemische Nebenwirkungen des Wirkstoffs weitgehend zu verhindern. Dieser Gedanke bestand in der vorliegenden Arbeit ebenfalls, weshalb die Funktionalisierung von PEK-NP untersucht wurde. PEK-NP dienen als Trägersystem für Wirkstoffe, die zur Funktionalisierung von Knochenersatzmaterialien eingesetzt werden könnten (Müller et al. 2018). Die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesene Zytokompatibilität der PEK-NP in Bezug auf Osteozyten ist ein weiterer Schritt in Richtung eines möglichen Einsatzes zur Funktionalisierung von Knochenersatzmaterialien. In einer früheren Arbeit wurde bezüglich der Zytokompatibilität auf Osteoklasten ein konzentrationsabhängiger negativer Effekt detektiert (Kauschke et al. 2019). In Bezug auf die Therapie der Osteoporose kann ein solcher negativer Effekt auf die knochenresorbierenden Osteoklasten von Vorteil sein, wenn eine Restaktivität gegeben ist. Für Vorläuferzellen von Osteoblasten (humane mesenchymale Stromazellen) konnte eine Kompatibilität von PEK-NP (z.B. PLL/CS) in einem gewissen Konzentrationsbereich bereits mehrfach gezeigt werden (Woltmann et al. 2014; Vehlow et al. 2016). Die Zytokompatibilität der Nanopartikel bezogen auf ausgereifte Osteoblasten wurde bisher nicht erforscht und sollte daher zur Komplettierung untersucht werden.

Bei Betrachtung der Funktionalisierung der PEK-NP mit BDNF in dieser Arbeit fällt auf, dass die BDNF-Konzentrationen bei den meisten Beladungsmengen recht schnell abfielen. Daher müsste zur Freisetzung von BDNF über mehrere Wochen bis zur Frakturheilung eine andere Art der Funktionalisierung gefunden werden, die die Wirkstoffkonzentration von 40 ng/mL länger aufrechterhalten kann. Eventuell würde sich für diesen Zweck eine Inkorporation des Wirkstoffes wie bei Wang et al. (2015) oder eine Beschichtung wie bei Müller and Keßler (2012) besser eignen. Wang et al. (2015) nutzten hierbei Nanopartikel, die aus Chitosan und Chondrotinsulfat bestanden. Zunächst wurde der Wirkstoff BMP-2 an Chondrotinsulfat gebunden, woraufhin die Zugabe der Komplexe zu einer azidotischen (pH = 5) Chitosan-Lösung erfolgte. Hieraus bildeten sich sphärische Nanopartikel mit inkorporiertem BMP-2 (Wang et al. 2015). In der Arbeit von Müller und Keßler (2012) wurden Komplexe aus dem Wirkstoff Pamidronat und dem Polykation Poly(ethylenimin) hergestellt und diese zu CS gegeben. Diese Wirkstoff-beladenen PEK-NP wurden anschließend auf ein Germaniumsubstrat gegeben und getrocknet. Somit entstand

eine Beschichtung aus PEK-NP, die den Wirkstoff verzögert freisetzt (Müller und Keßler 2012). Darüber hinaus sollte die Frage, warum das an PEK-NP gebundene BDNF nicht denselben Effekt erzielt wie das dem Medium zugegebene BDNF, obwohl die erreichten Konzentrationen sehr ähnlich waren, näher untersucht werden.

Bei Kauschke et al. (2018B) konnte anhand eines osteoporotischen Mausmodells der Effekt von BDNF auf osteoporotische Frakturen bereits beobachtet werden. Der fördernde Effekt von BDNF auf die Knochenheilung konnte jedoch nur im Wildtyp-Modell nachgewiesen werden. Hierbei wurde diskutiert, ob die BDNF-Konzentration von 40 ng/mL im osteoporotischen Knochen nicht ausreicht, um die Knochenheilung zu fördern. Dies müsste bei einem Einsatz von BDNF zur lokalen Förderung der Frakturheilung bei osteoporotischem Knochen berücksichtigt werden. Interessant wäre zudem, ob ein positiver Einfluss auf die Frakturheilung von der Form der Osteoporose abhängt. Wie in der Einleitung erwähnt gibt es sowohl primäre als auch sekundäre Ursachen für die Osteoporose.

Durch die Arbeit von Kauschke et al. (2018B) wird jedoch klar, dass der Einsatz von mit BDNF funktionalisiertem Knochenersatzmaterial sich nicht auf die Therapie osteoporotischer Frakturen beschränken muss. Allgemein könnte dies bei der Behandlung von Knochendefekten wie beispielsweise zum Auffüllen von Knochenzysten von Vorteil sein. Die osteokonduktiven Eigenschaften der synthetischen Knochenersatzmaterialien würden somit um die Eigenschaft der Osteoinduktivität ergänzt werden. Auch bei körpereigenen Knochenersatzverfahren wie der Verwendung eines Beckenkammspanns könnte ein Einsatz von BDNF sinnvoll sein, um die Integration zu beschleunigen. Zur verzögerten Freisetzung wäre hierbei ebenfalls eine Inkorporation des Wirkstoffs in PEK-NP denkbar, sodass bei lokaler Applikation eine Wirkung über längere Zeit erreicht werden würde.

5 Zusammenfassung

Obwohl die Vielfalt an Medikamenten zur Behandlung der Osteoporose zunimmt, gibt es weiterhin Bedarf die Therapie osteoporotischer Frakturen zu verbessern. *Brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), welcher bisher vor allem durch seine Funktion als Neurotrophin in der Förderung des Nervensystems bekannt ist, spielt nach neueren Erkenntnissen zusätzlich eine Rolle im Prozess der Frakturheilung. Bei exogener Zugabe fördert BDNF die Frakturheilung gesunden Knochens im Mausmodell nach einer Osteotomie (Kauschke et al. 2018B). Um Wirkstoffe direkt am Ort der Frakturheilung freizusetzen, gibt es die Möglichkeit diese über Polyelektrolytkomplex-Nanopartikel (PEK-NP) an Knochenersatzmaterialien zu binden. Diese Studie wurde zur Erforschung des Einflusses von BDNF und PEK-NP auf Osteozyten durchgeführt. *Spinalganglien* (DRG) wurden hierbei als endogene BDNF-Quelle eingesetzt.

Als Osteozytenmodell diente die murine Zelllinie *murine long bone osteocytes-Y4* (MLO-Y4), die als Monokultur und als Kokultur mit aus Mäusen isolierten DRG-Neuronen untersucht wurde. Die Kulturen wurden lichtmikroskopisch unter Zugabe von BDNF (40 ng/mL), PEK-NP und PEK-NP+BDNF im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle beobachtet. Die Proliferationsrate der MLO-Y4 wurde mittels eines BrdU Proliferationsassays nach 8, 24 und 32 Stunden (h) gemessen. Die Genexpressionanalyse in MLO-Y4 wurde anhand einer real-time Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (real-time RT-PCR) durchgeführt und teilweise durch eine Kapillargelelektrophorese ergänzt. Im Proliferationsversuch ließ sich nach 24 h Inkubationszeit ein hoch signifikant positiver Einfluss von BDNF (40 ng/mL) auf die Proliferationsrate von MLO-Y4 sowohl in Monokultur als auch in der Kokultur mit DRG-Neuronen nachweisen. Im Gegensatz hierzu zeigten weder BDNF funktionalisierte PEK-NP, pure PEK-NP noch die Kokultivierung mit DRG einen signifikanten Effekt auf die Proliferation von MLO-Y4. In der Genexpressionsanalyse mittels real-time RT-PCR ließ sich nach 24 h Inkubationszeit von BDNF (40 ng/mL) für *receptor activator of nuclear-factor κ B ligand* (RANKL) und Osteoprotegerin (OPG) kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle detektieren. Dieses Ergebnis zeigt, dass BDNF den Knochenstoffwechsel nicht über eine Induktion oder Inhibition dieser Schlüsselproteine im Knochenstoffwechsel beeinflusst. Darüber hinaus wurde eine Expression von BDNF sowie der korrespondierenden Rezeptoren von BDNF, *Tropomyosin receptor kinase B* (TrkB) und *p75 neurotrophin receptor* (p75NTR) zum ersten Mal in MLO-Y4 und teilweise überhaupt in Osteozyten nachgewiesen. Eine Expression von TrkB konnte in einer Arbeit bereits in primären Osteozyten gezeigt werden (Ida-Yonemochi et al. 2017). Des Weiteren konnte eine Expression des Apoptoseregulators SOST in den MLO-Y4 nicht nachgewiesen werden.

Zusammenfassung

Der positive Einfluss von BDNF auf die Proliferation und die Zytokompatibilität der PEK-NP in MLO-Y4-Zellkulturen zeigt unter Berücksichtigung vorheriger Arbeiten die Möglichkeit eines Einsatzes von BDNF und PEK-NP zur Beschichtung von Knochenersatzmaterialien, um die Knochenheilung zu stimulieren.

6 Summary

Although the variety of drugs for treating osteoporosis is increasing, there is still need for improvement of the treatment of osteoporotic fractures. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF), known as a neurotrophin to support neuronal development, was found to play a role in fracture healing. When added exogenously, BDNF promoted fracture healing after osteotomy of non-osteoporotic bone (Kauschke et al. 2018B). One option to apply drugs directly to the required location in fractured bone, is to bind them to bone substitute materials via PEC-NP. The present study was performed to investigate the effect of BDNF and PEC-NP on osteocytes. Dorsal root ganglia (DRG) neurons were used as an endogenous source of BDNF.

The murine osteocyte-like cell line, MLO-Y4 and murine DRG, isolated previously, were cultured as monocultures as well as coculture. Cells were observed by light microscopy after adding either BDNF (40 ng/mL), PEC-NP or BDNF functionalised PEC-NP. The proliferation rate of MLO-Y4 was measured by BrdU proliferation assay after 8, 24 and 32 hours (h). The mRNA expression was determined by real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (real-time RT-PCR) that was expanded for some targets by capillary gel electrophoresis.

BDNF had a highly significant positive effect on the proliferation rate of MLO-Y4 in monoculture and in coculture with DRG after 24 h of incubation. In contrast, neither BDNF-functionalised PEC-NP nor pure PEC-NP or DRG showed any significant influence. We suppose that the BDNF release rate from PEC-NP was too low. Furthermore, there was no significant difference in gene expression of receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) after 24 h of incubation time with BDNF (40 ng/mL). This result suggests that BDNF does not affect bone remodelling or proliferation through induction or inhibition of these key proteins. In the present study, BDNF expression and expression of its receptors tropomyosin receptor kinase B (TrkB) and p75 neurotrophin receptor (p75NTR) was detected in MLO-Y4 for the first time. TrkB expression was detected once in primary osteocytes before (Ida-Yonemochi et al. 2017). Furthermore, expression of the regulator of apoptosis SOST couldn't be detected in the majority of the samples.

Our results show that BDNF stimulated the proliferation of MLO-Y4. Additionally, the PEC-NP presented a good cytocompatibility. Thus, we suppose that PEC-NP are a suitable drug-delivery system and BDNF a promising medication for bone pathologies.

7 Verzeichnisse

7.1 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
al. alii/aliae	
AraC	Arabinosylcytosin
bp	Basenpaare
BDNF	brain-derived neurotrophic factor
BMP	bone morphogenic protein
BrdU	5-Brom-2'-Desoxyuridin
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
cDNA	complementary DNA
cp	crossing point
CS	Cellulosesulfat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DRG	dorsal root ganglia
EdU	5-Ethynyl-2'-desoxyuridin
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ERK	extracellular signal-related kinases
h	Stunde
hiFBS	hitzeinaktiviertes fötales bovines Serum
HRP	Meerrettichperoxidase
Mio	Millionen
MLO-Y4	murine long bone osteocyte Y4
mRNA	messenger ribonucleic acid
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium
N	Normalität
NGF	nerve growth factor
NT	Neurotrophin
OPG	Osteoprotegerin
p75NTR	p75 neurotrophin receptor
PBC	primär biliäre Cholangitis
PBS	phosphatgepufferte Saline
PEK-NP	Polyelektrolytkomplex-Nanopartikel
PLL	Poly(L-Lysin)
PInDIV	Perlecan Domäne IV
RANK	receptor activator of nuclear factor-κB

Verzeichnisse

RANKL receptor activator of nuclear factor- κ B ligand

rel. relative

rpm rounds per minute

RT-PCR Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion

s Sekunden

s. siehe

SD Standardabweichung

Trk tropomyosin receptor kinase

VEGF vascular endothelial growth factor

vs. versus

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schema der Herstellung sphärischer PEK-NP4

Abb. 2: Schematische Abbildung des Zusammenspiels von RANK, RANKL, OPG7

Abb. 3: Lichtmikroskopische Morphologie der MLO-Y4 aus Kato et al.12

Abb. 4: Schematische Darstellung der Wirkweise von BDNF auf TrkB und p75NTR...14

Abb. 5: Schematische Darstellung der Bindung von BDNF an PEK-NP 16

Abb. 6: Schema der Wirkung von BDNF auf die Zelltypen des Knochens17

Abb. 7: Lichtmikroskopische Lebendzellbeobachtung der DRG-Neurone21

Abb. 8: Lichtmikroskopische Lebendzellbeobachtung der MLO-Y4.....22

Abb. 9: Lichtmikroskopische Lebendzellbeobachtung der MLO-Y4 auf unterschiedlichen Beschichtungen.....23

Abb. 10: Schematische Darstellung des Ablaufs des Proliferationsassays BrdU26

Abb. 11: Proliferationsassay BrdU, Farbumschlag bei Zugabe der Schwefelsäure.....27

Abb. 12: Proliferation einer MLO-Y4-Monokultur mit unterschiedlichen Zelldichten (BrdU-Assay)28

Abb. 13: Plattenlayout der 96 Well-Platte des BrdU-Proliferationsassays29

Abb. 14: Lichtmikroskopische Lebendzellbeobachtung der DRG-Neurone mit PEK-NP36

Abb. 15: Lichtmikroskopische Lebendzellbeobachtung der MLO-Y4 im BrdU-Versuch37

Abb. 16: Lichtmikroskopische Lebendzellbeobachtung der DRG-Neurone/MLO-Y4-Kokultur im BrdU-Versuch.....38

Abb. 17: Lichtmikroskopische Lebendzellbeobachtung der Kokultur mit PEK-NP.....39

Abb. 18: Vergleich der BDNF-Freisetzung aus PEK-Nanopartikeln40

Abb. 19: Vergleich der freien BDNF-Konzentrationen zwischen BDNF und PEK-NP+BDNF42

Abb. 20: BrdU-Verlauf im BrdU-Assay der Kokultur, der MLO-Y4-Monokultur, sowie der DRG-Monokultur43

Abb. 21: Proliferation im BrdU-Assay der Kokultur, der MLO-Y4-Monokultur, sowie der DRG-Monokultur, Vergleich der Zusätze45

Abb. 22: Darstellung der rel. RANKL-Genexpression in MLO-Y447

Abb. 23: Darstellung der rel. OPG-Genexpression in MLO-Y448

Abb. 24: Darstellung der rel. BDNF-Genexpression in MLO-Y449

Abb. 25: Darstellung der rel. p75NTR-Genexpression in MLO-Y450

Abb. 26: Kapillargelelektrophorese für SOST51

Abb. 27: Kapillargelelektrophorese für TrkB52

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Primer.....33

7.4 Literaturverzeichnis

- Aarden, E. M., P. J. Nijweide, A. Van Der Plas, M. J. Alblas, E. J. Mackie, M. A. Horton, M. H. Helfrich. 1996. Adhesive Properties of Isolated Chick Osteocytes in Vitro. *Bone* 18 (4): 305–13.
- Aarden, E. M., P. J. Nijweide, E. H. Burger. 1994. Function of Osteocytes in Bone. *Journal of Cellular Biochemistry* 55 (3): 287–99.
- Ai, L. S., C. Y. Sun, Y. D. Wang, L. Zhang, Z. B. Chu, Y. Qin, F. Gao, H. Yan, T. Guo, L. Chen, D. Yang, Y. Hu 2013. Gene Silencing of the BDNF/TrkB Axis in Multiple Myeloma Blocks Bone Destruction and Tumor Burden in Vitro and in Vivo. *International Journal of Cancer* 133 (5): 1074–84.
- Ai, L. S., C. Y. Sun, L. Zhang, S. C. Zhou, Z. B. Chu, Y. Qin, Y. D. Wang, W. Zeng, H. Yan, T. Guo, L. Chen, D. Yang, Y. Hu. 2012. Inhibition of BDNF in Multiple Myeloma Blocks Osteoclastogenesis via Down-Regulated Stroma-Derived RANKL Expression Both In Vitro and In Vivo. *Public Library of Science One* 7 (10): 1–10
- Ajubi, N. E., J. Klein-Nulend, P. J. Nijweide, T. Vrijheid-Lammers, M. J. Alblas, E. H. Burger. 1996. Pulsating Fluid Flow Increases Prostaglandin Production by Cultured Chicken Osteocytes-A Cytoskeleton-Dependent Process. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 225 (1): 62–68.
- Akiyama, Y., Y. Mikami, E. Watanabe, N. Watanabe, T. Toriumi, T. Takahashi, K. Komiyama, K. Isokawa, N. Shimizu, M. J. Honda. 2014. The P75 Neurotrophin Receptor Regulates Proliferation of the Human MG63 Osteoblast Cell Line. *Differentiation* 87 (3–4): 111–18.
- Alderson, R. F., A. L. Alterman, Y. A. Barde, R. M. Lindsay. 1990. Brain-Derived Neurotrophic Factor Increases Survival and Differentiated Functions of Rat Septal Cholinergic Neurons in Culture. *Neuron* 5 (3): 297–306.

- Ardawi, M. S.M., A. M. Al-Sibiany, T. M. Bakhsh, A. A. Rouzi, M. H. Qari. 2012. Decreased Serum Sclerostin Levels in Patients with Primary Hyperparathyroidism: A Cross-Sectional and a Longitudinal Study. *Osteoporosis International* 23 (6): 1789–97.
- Asami, K., T. Nakanishi, H. Asahara, H. Inoue, M. Takigawa. 2000. Expression of Neurotrophins and Their Receptors (TRK) during Fracture Healing. *Bone* 26 (6): 625–33.
- Aubin, J. E., E. Bonny. 2000. Osteoprotegerin and Its Ligand: A New Paradigm for Regulation of Osteoclastogenesis and Bone Resorption. *Osteoporosis International* 11 (11): 905–13.
- Balemans, W., M. Ebeling, N. Patel, E. Van Hul, P. Olson, M. Dioszegi, C. Lanza, W. Wuyts, J. V. D Ende, P. Willems, A. F. Paes-alves, S. Hill, M. Bueno, F. J. Ramos, P. Tacconi, F. G. Dikkers, C. Stratakis, K. Lindpaintner, B. Vickery, D. Foerzler, W. V. Hul 2001. Increased Bone Density in Sclerosteosis Is Due to the Deficiency of a Novel Secreted Protein (SOST). *Human Molecular Genetics* 10 (5): 537–44.
- Bamji, S. X., M. Majdan, C. D. Pozniak, D. J. Belliveau, R. Aloyz, J. Kohn, C. G. Causing, F. D. Miller. 1998. The P75 Neurotrophin Receptor Mediates Neuronal Apoptosis and Is Essential for Naturally Occurring Sympathetic Neuron Death. *The Journal of Cell Biology* 140 (4): 911–23.
- Baylink, D. J., J. E. Wergedal. 1971. Bone Formation by Osteocytes. *American Journal of Physiology* 221 (3): 669–78.
- Beamer, B., C. Hettrich, J. Lane. 2010. Vascular Endothelial Growth Factor: An Essential Component of Angiogenesis and Fracture Healing. *The Musculoskeletal Journal of Hospital for Special Surgery* 6 (1): 85–94.
- Bellido, T. 2014. Osteocyte-Driven Bone Remodeling. *Calcified Tissue International* 94 (1): 25–34.
- Bergler, W., G. Petroiami, A. Schadel. 1993. Feasibility of Proliferation Studies Using the BrdU and MTT Assays with a Head and Neck Carcinoma Cell Line. *Journal for Otorhino-Laryngology, Head and Neck Surgery* 55 (4): 230–35.
- Blair, H. C., Q. C. Larrouture, Y. Li, H. Lin, D. Beer-Stoltz, L. Liu, R. S. Tuan, L. J. Robinson, P. H. Schlesinger, D. J. Nelson. 2017. Osteoblast Differentiation and Bone Matrix Formation *In Vivo* and *In Vitro*. *Tissue Engineering Part B: Reviews* 23 (3): 268–80.
- Bodine, P. V. N., W. Zhao, Y. P. Kharode, F. J. Bex, A. J. Lambert, M. B. Goad, T. Gaur,

Verzeichnisse

- G. S. Stein, J. B. Lian, B. S. Komm. 2004. The Wnt Antagonist Secreted Frizzled-Related Protein-1 Is a Negative Regulator of Trabecular Bone Formation in Adult Mice. *Molecular Endocrinology* 18 (5): 1222–37.
- Boggs, M. E., W. R. Thompson, M. C. Farach-Carson, R. L. Duncan, T. P. Beebe. 2011. Co-Culture of Osteocytes and Neurons on a Unique Patterned Surface. *Biointerphases* 6 (4): 200–209.
- Bonewald, L. F. 2017. The Role of the Osteocyte in Bone and Non-Bone Disease. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 46 (1): 1–18.
- Bonewald, L. F., M. L. Johnson. 2008. Osteocytes, Mechanosensing and Wnt Signaling. *Bone* 42 (4): 606–15.
- Bosshardt, D. D. 2005. Are Cementoblasts a Subpopulation of Osteoblasts or a Unique Phenotype? *Journal of Dental Research* 84 (5): 390–407.
- Boyce, B. F., E. Rosenberg, A. E. de Papp, L. T. Duong. 2012. The Osteoclast, Bone Remodelling and Treatment of Metabolic Bone Disease. *European Journal of Clinical Investigation* 42 (12): 1332–41.
- Boyce, B. F., L. Xing. 2008. Functions of RANKL/RANK/OPG in Bone Modeling and Remodeling. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 473 (2): 139–46.
- Brady, R., S. I. A. Zaidi, C. Mayer, D. M. Katz. 1999. BDNF is a Target-Derived Survival Factor for Arterial Baroreceptor and Chemoafferent Primary Sensory Neurons. *The Journal of Neuroscience* 19 (6): 2131–42.
- Brunkow, M. E., J. C. Gardner, J. Van Ness, B. W. Paeper, B. R. Kovacevich, S. Proll, J. E. Skonier, L. Zhao, P. J. Sabo, Y.-H. Fu, R. S. Alisch, L. Gillett, T. Colbert, P. Tacconi, D. Galas, H. Hamersma, P. Beighton, J. T. Mulligan 2001. Bone Dysplasia Sclerosteosis Results from Loss of the SOST Gene Product, a Novel Cystine Knot-Containing Protein. *The American Journal of Human Genetics* 68 (3): 577–89.
- Cai, X., E. Luo, Q. Yuan. 2010. Interaction between Schwann Cells and Osteoblasts In Vitro. *International Journal of Oral Science* 2 (2): 74–81.
- Camerino, C., M. Zayzafoon, M. Rymaszewski, J. Heiny, M. Rios, P. V. Hauschka. 2012. Central Depletion of Brain-Derived Neurotrophic Factor in Mice Results in High Bone Mass and Metabolic Phenotype. *Endocrinology* 153 (11): 5394–5405.
- Cardoso, L., S. P. Fritton, G. Gailani, M. Benalla, S. C. Cowin. 2013. A Review of Recent Advances in the Assessment of Bone Porosity, Permeability, and Interstitial Fluid Flow. *Journal of Biomechanics* 46 (2): 253–65.

Verzeichnisse

- Carter, B. D., C. Kaltschmidt, B. Kaltschmidt, N. Offenhauser, R. Bohm-Matthaei, P. A. Baeuerle, Y.-A. Barde. 1996. Selective Activation of NF-Kappa B by Nerve Growth Factor Through the Neurotrophin Receptor P75. *Science* 272 (5261): 542–45.
- Cartwright, M., A. M. Mikheev, G. Heinrich. 1994. Expression of Neurotrophin Genes in Human Fibroblasts: Differential Regulation of the Brain-Derived Neurotrophic Factor Gene. *International Journal of Developmental Neuroscience* 12 (8): 685–93.
- Casaccia-Bonnet, P., B. D. Carter, R. T. Dobrowsky, M. V. Chao. 1996. Death of Oligodendrocytes Mediated by the Interaction of Nerve Growth Factor with Its Receptor P75. *Nature* 383: 716–19.
- Chen, Y., M. Chen, T. Xue, G. Li, D. Wang, P. Shang, J. X. Jiang, H. Xu. 2019. Osteocytic Connexin 43 Channels Affect Fracture Healing. *Journal of Cellular Physiology*, 2019;234:19824–19832.
- Chu, T. W., Y. G. Liu, Z. G. Wang, P. F. Zhu, D. W. Liu. 2008. Vascular Endothelial Growth Factor and Its Receptor Expression during the Process of Fracture Healing. *Chinese Journal of Traumatology* 11 (3): 161–64.
- Crockett, J. C., M. J. Rogers, F. P. Coxon, L. J. Hocking, M. H. Helfrich. 2011. Bone Remodelling at a Glance. *Journal of Cell Science* 124 (7): 991–98.
- Cummings, S. R., J. S. Martin, M. R. McClung, E. S. Siris, R. Eastell, I. R. Reid, P. Delmas, H. B. Zoog, M. Austin, A. Wang, S. Kutilek, S. Adami, J. Zanchetta, C. Libanati, S. Siddhanti, C. Christiansen 2009. Denosumab for Prevention of Fractures in Postmenopausal Women with Osteoporosis. *The New England Journal of Medicine* 361: 756–65.
- Ding, Y., M. Arai, H. Kondo, A. Togari. 2010. Effects of Capsaicin-Induced Sensory Denervation on Bone Metabolism in Adult Rats. *Bone* 46 (6): 1591–96.
- Drake, M. T., B. L. Clarke, E. M. Lewiecki. 2015. The Pathophysiology and Treatment of Osteoporosis. *Clinical Therapeutics* 37 (8): 1837–1850.
- Drake, M. T., S. Khosla. 2017. Hormonal and Systemic Regulation of Sclerostin. *Bone* 96 (1): 8–17.
- Egan, M. F., M. Kojima, J. H. Callicott, T. E. Goldberg, B. S. Kolachana, A. Bertolino, E. Zaitsev, B. Gold, D. Goldman, M. Dean, B. Lu, D. R. Weinberger 2003. The BDNF Val66met Polymorphism Affects Activity-Dependent Secretion of BDNF and Human Memory and Hippocampal Function. *Cell* 112 (2): 257–69.
- Emkey, G. R., S. Epstein. 2014. Secondary Osteoporosis: Pathophysiology & Diagnosis.

Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism 28 (6): 911–935

- Everding, J., J. Stolberg-Stolberg, M. J. Raschke, R. Stange. 2019. Stimulation of Fracture Healing by Growth Factors and Cell-Based Technologies. *Unfallchirurg* 122 (7): 534–43.
- Feng, J. Q., L. M. Ward, S. Liu, Y. Lu, Y. Xie, B. Yuan, X. Yu, F. Rauch, S. I. Davis, S. Zhang, H. Rios, M. K. Drezner, L. D. Quarles, L. F. Bonewald, K. E. White 2006. Loss of DMP1 Causes Rickets and Osteomalacia and Identifies a Role for Osteocytes in Mineral Metabolism. *Nature Genetics* 38 (11): 1310–15.
- Fillingham, Y., J. Jacobs. 2016. Bone Grafts and Bone Substitutes. *The Bone & Joint Journal* 98 (B): 6–9.
- Fortress, A. M., J. Kim, R. L. Poole, T. J. Gould, K. M. Frick. 2014. 17 β -Estradiol Regulates Histone Alterations Associated with Memory Consolidation and Increases BDNF Promoter Acetylation in Middle-Aged Female Mice. *Learning and Memory* 21 (9): 457–67.
- Francis, N. L., P. M. Hunger, A. E. Donius, B. W. Riblett, A. Zavaliangos, U. G.K. Wegst, M. A. Wheatley. 2013. An Ice-Templated, Linearly Aligned Chitosan-Alginate Scaffold for Neural Tissue Engineering. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A* 101 (12): 3493–3503.
- Frank, J., A. Ryll. 2015. Demografischer Wandel, Morbidität und Inanspruchnahme: Zur Projektion des ambulanten Leistungsvolumens. *Gesundheitswesen* 77 (12): 932–38.
- Fudge, N. J., K. M. Mearow. 2013. Extracellular Matrix-Associated Gene Expression in Adult Sensory Neuron Populations Cultured on a Laminin Substrate. *BMC Neuroscience* 14 (15): 1–19.
- Fukuda, J. 1985. Nerve Cells of Adult and Aged Mice Grown in a Monolayer Culture: Age-Associated Changes in Morphological and Physiological Properties of Dorsal Root Ganglion Cells in Vitro. *Developmental Neuroscience* 7 (5–6): 374–94.
- Garimella, R., S. E. Tague, J. Zhang, F. Belibi, N. Nahar, B. H. Sun, K. Insogna, J. Wang, H. C. Anderson. 2008. Expression and Synthesis of Bone Morphogenetic Proteins by Osteoclasts: A Possible Path to Anabolic Bone Remodeling. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 56 (6): 569–77.
- Ghosh-Choudhury, N., J. J. Windle, B. A. Koop, M. A. Harris, D. L. Guerrero, J. M. Wozney, G. R. Mundy, S. E. Harris. 1996. Immortalized Murine Osteoblasts Derived

- from BMP 2-T-Antigen Expressing Transgenic Mice. *Endocrinology* 137 (1): 331–39.
- Glaser, D. L., F. S. Kaplan. 1997. Osteoporosis-Definition and Clinical Presentation. *Spine* 22 (24S): 12S–16S.
- Glass, D. A., P. Bialek, J. D. Ahn, M. Starbuck, M. S. Patel, H. Clevers, M. M. Taketo, F. Long, A. P. McMahon, R. A. Lang, G. Karsenty 2005. Canonical Wnt Signaling in Differentiated Osteoblasts Controls Osteoclast Differentiation. *Developmental Cell* 8 (5): 751–64.
- Goldhahn, J., J. M. Féron, J. Kanis, S. Papapoulos, J. Y. Reginster, R. Rizzoli, W. Dere, B. Mitlak, Y. Tsouderos, S. Boonen. 2012. Implications for Fracture Healing of Current and New Osteoporosis Treatments: An ESCEO Consensus Paper. *Calcified Tissue International* 90 (5): 343–53.
- Gratzner, H. G. 1982. Monoclonal Antibody to 5-Bromo- and 5-Iododeoxyuridine : A New Reagent for Detection of DNA Replication Placental Mononuclear Phagocytes as a Source of Interleukin-1. *Science* 218: 474–75.
- Guañabens, N., S. Ruiz-Gaspà, L. Gifre, R. Miquel, P. Peris, A. Monegal, M. Dubrueil, A. Arias, A. Parés. 2016. Sclerostin Expression in Bile Ducts of Patients With Chronic Cholestasis May Influence the Bone Disease in Primary Biliary Cirrhosis. *Journal of Bone and Mineral Research* 31 (9): 1725–33.
- Gupta, R. R., D. J. Yoo, C. Hebert, C. Niger, J. P. Stains. 2010. Induction of an Osteocyte-like Phenotype by Fibroblast Growth Factor-2. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 402 (2): 258–64.
- Hadji, P., S. Klein, H. Gothe, B. Häussler, T. Kless, T. Schmidt, T. Steinle, F. Verheyen, R. Linder 2013. The Epidemiology of Osteoporosis—Bone Evaluation Study (BEST): An Analysis of Routine Health Insurance Data. *Deutsches Arztebl Int.* 2013 110 (4): 52–7.
- Hagen, A., V. Gorennoi, M. P. Schönermark. 2012. Knochenersatzmaterialien zur Behandlung von traumatischen Frakturen der Extremitäten. *Deutsches Institut für Medizinische Dokumentation und Information*, 1–93.
- Hallböök, F. 1999. Evolution of the Vertebrate Neurotrophin and Trk Receptor Gene Families. *Current Opinion in Neurobiology* 9 (5): 616–21.
- Han, Y., X. You, W. Xing, Z. Zhang, W. Zou. 2018. Paracrine and Endocrine Actions of Bone - The Functions of Secretory Proteins from Osteoblasts, Osteocytes, and Osteoclasts. *Bone Research* 6 (1): 1–11.

Verzeichnisse

- Haussler, M. R., G. K. Whitfield, I. Kaneko, C. A. Haussler, D. Hsieh, J. C. Hsieh, P. W. Jurutka. 2013. Molecular Mechanisms of Vitamin D Action. *Calcified Tissue International* 92 (2): 77–98.
- Hawker, J. R. 2003. Chemiluminescence-Based BrdU ELISA to Measure DNA Synthesis. *Journal of Immunological Methods* 274 (1–2): 77–82.
- Heinrich, P. C., I. Behrmann, G. Müller-Newen, F. Schaper, L. Graeve. 1998. Interleukin-6-Type Cytokine Signalling through the Gp130/Jak/STAT Pathway. *Biochem. Journal* 334: 297–314.
- Helan, M., B. Aravamudan, W. R. Hartman, M. A. Thompson, B. D. Johnson, C. M. Pabelick, Y.S. Prakash. 2014. BDNF Secretion by Human Pulmonary Artery Endothelial Cells in Response to Hypoxia. *J Mol Cell Cardiol.* 68 (7): 89–97.
- Hofbauer, L. C., S. Khosla, C. R. Dunstan, D. L. Lacey, T. C. Spelsberg, B. L. Riggs. 1999. Estrogen Stimulates Gene Expression and Protein Production of Osteoprotegerin in Human Osteoblastic Cells. *Endocrinology* 140 (9): 4367–70.
- Hofbauer, L. C., C. A. Kühne, V. Viereck. 2004. The OPG/RANKL/RANK System in Metabolic Bone Diseases. *Journal of Musculoskeletal and Neruonal Interaction* 4 (3): 268–75.
- Holdsworth, G., S. J. Roberts, H. Z. Ke. 2019. Novel Actions of Sclerostin on Bone. *Journal of Molecular Endocrinology* 62 (2): R167–85.
- Hollinger, J. O., C. E. Hart, S. N. Hirsch, S. Lynch, G. E. Friedlaender. 2008. Recombinant Human Platelet-Derived Growth Factor: Biology and Clinical Applications. *Journal of Bone and Joint Surgery - Series A* 90 (SUPPL. 1): 48–54.
- Honma, M., Y. Ikebuchi, H. Suzuki. 2021. Mechanisms of RANKL Delivery to the Osteoclast Precursor Cell Surface. *Journal of Bone and Mineral Metabolism* 39 (1): 27–33.
- Hou, X., Q. Liang, Y. Wu. 2013. Transplantation of Schwann Cells Co-Cultured with Brain-Derived Neurotrophic Factor for the Treatment of Experimental Autoimmune Neuritis. *Journal of Neuroimmunology* 263 (1–2): 83–90.
- Hu, V. W., G. E. Black, A. Torres-Duarte, F. P. Abramson. 2002. 3H-Thymidine Is a Defective Tool with Which to Measure Rates of DNA Synthesis. *The FASEB Journal* 16 (11): 1456–57.
- Huang, E. J., L. F. Reichardt. 2003. Trk Receptors: Roles in Neuronal Signal Transduction. *Annual Review of Biochemistry* 72 (1): 609–42.

Verzeichnisse

- Humphrey, E. L., J. H. H. Williams, M. W. J. Davie, M. J. Marshall. 2006. Effects of Dissociated Glucocorticoids on OPG and RANKL in Osteoblastic Cells. *Bone* 38 (5): 652–61.
- Ida-Yonemochi, H., Y. Yamada, H. Yoshikawa, K. Seo. 2017. Locally Produced BDNF Promotes Sclerotic Change in Alveolar Bone after Nerve Injury *PLoS ONE* 12 (1): 1–18.
- Isaian, A., Z. Pourpak, L. Nikfarjam, A. Earhodi. 2003. Comparison of Two Proliferation Assays MTT and LTT in Immunodeficient Patients. *Iranian Journal of Allergy, Asthma, and Immunology* 2 (2): 111–114
- Jagga, S., A. R. Sharma, Y. H. Lee, J. S. Nam, S. S. Lee. 2021. Sclerostin-Mediated Impaired Osteogenesis by Fibroblast-Like Synoviocytes in the Particle-Induced Osteolysis Model. *Frontiers in Molecular Biosciences* 8 (6): 1–17.
- Jehan, F., P. Naveilhan, I. Neveu, D. Harvie, E. Dicou, P. Brachet, D. Wion. 1996. Regulation of NGF, BDNF and LINGFR Gene Expression in ROS 17/2.8 Cells. *Molecular and Cellular Endocrinology* 116 (2): 149–56.
- Johnson, R. W., H. J. Brennan, C. Vrahnas, I. J. Poulton, N. E. McGregor, T. Standal, E. C. Walker, T. T. Koh, H. Nguyen, N. C. Walsh, M. R. Forwood, T. J. Martin, N. A. Sims. 2014. The Primary Function of Gp130 Signaling in Osteoblasts Is to Maintain Bone Formation and Strength, Rather than Promote Osteoclast Formation. *Journal of Bone and Mineral Research* 29 (6): 1492–1505.
- Kajiya, M., H. Shiba, T. Fujita, K. Ouhara, K. Takeda, N. Mizuno, H. Kawaguchi, M. Kitagawa, T. Takata, K. Tsuji, H. Kurihara. 2008. Brain-Derived Neurotrophic Factor Stimulates Bone/Cementum-Related Protein Gene Expression in Cementoblasts. *Journal of Biological Chemistry* 283 (23): 16259–67.
- Kamel, M. A., J. L. Picconi, N. Lara-Castillo, M. L. Johnson. 2010. Activation of β -Catenin Signaling in MLO-Y4 Osteocytic Cells versus 2T3 Osteoblastic Cells by Fluid Flow Shear Stress and PGE₂: Implications for the Study of Mechanosensation in Bone. *Bone* 47 (5): 872–81.
- Kang, H., A. A. Welcher, D. Shelton, E. M. Schuman. 1997. Neurotrophins and Time: Different Roles for TrkB Signaling in Hippocampal Long-Term Potentiation. *Neuron* 19 (3): 653–64.
- Kanis, J. A., E. V. McCloskey, H. Johansson, C. Cooper, R. Rizzoli, J. Y. Reginster. 2013. European Guidance for the Diagnosis and Management of Osteoporosis in Postmenopausal Women. *Osteoporosis International* 24 (1): 23–57.

- Kaplan, D. R., F. D. Miller. 2000. Neurotrophin Signal Transduction in the Nervous System. *Current Opinion in Neurobiology* 10 (3): 381–91.
- Karner, C. M., F. Long. 2017. Wnt Signaling and Cellular Metabolism in Osteoblasts. *Cellular and Molecular Life Sciences* 74 (9): 1649–57.
- Kato, Y., J. J. Windle, B. A. Koop, G. R. Mundy, L. F. Bonewald. 1997. Establishment of an Osteocyte-like Cell Line, MLO-Y4. *Journal of Bone and Mineral Research* 12 (12): 2014–23.
- Kauschke, V., A. Gebert, M. Calin, J. Eckert, S. Scheich, C. Heiss, K. S. Lips. 2018A. Effects of New Beta-Type Ti-40Nb Implant Materials, Brain-Derived Neurotrophic Factor, Acetylcholine and Nicotine on Human Mesenchymal Stem Cells of Osteoporotic and Non Osteoporotic Donors. *PLoS ONE* 13 (2): 1–18.
- Kauschke, V., F. M. Hessland, D. Vehlow, M. Müller, C. Heiss, K. S. Lips. 2019. High Concentrations of Polyelectrolyte Complex Nanoparticles Decrease Activity of Osteoclasts. *Molecules* 24 (12): 2346-1–12.
- Kauschke, V., M. Schneider, A. Jauch, M. Schumacher, M. Kampschulte, M. Rohnke, A. Henss, C. Bamberg, K. Trinkaus, M. Gelinsky, C. Heiss, K. S. Lips. 2018B. Effects of a Pasty Bone Cement Containing Brain-Derived Neurotrophic Factor-Functionalized Mesoporous Bioactive Glass Particles on Metaphyseal Healing in a New Murine Osteoporotic Fracture Model. *International Journal of Molecular Sciences* 19 (11): 3531.
- Kilian, O., S. Hartmann, N. Dongowski, S. Karnati, E. Baumgart-Vogt, F. V. Härtel, T. Noll, R. Schnettler, K. S. Lips. 2014. BDNF and Its TrkB Receptor in Human Fracture Healing. *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger* 196 (5): 286–95.
- Klein, A. B., R. Williamson, M. A. Santini, C. Clemmensen, A. Ettrup, M. Rios, G. M. Knudsen, S. Aznar. 2011. Blood BDNF Concentrations Reflect Brain-Tissue BDNF Levels across Species. *International Journal of Neuropsychopharmacology* 14 (3): 347–53.
- Klein, R., V. Nanduri, S. Jing, F. Lamballe, P. Tapley, S. Bryant, C. Cordon-Cardo, K. R. Jones, L. F. Reichardt, M. Barbacid. 1991. The TrkB Tyrosine Protein Kinase Is a Receptor for Brain-Derived Neurotrophic Factor and Neurotrophin-3. *Cell* 66 (2): 395–403.
- Krajisnik, T., P. Björklund, R. Marsell, Ö. Ljunggren, G. Åkerström, K. B. Jonsson, G. Westin, T. E. Larsson. 2007. Fibroblast Growth Factor-23 Regulates Parathyroid Hormone and 1 α -Hydroxylase Expression in Cultured Bovine Parathyroid Cells.

Journal of Endocrinology 195 (1): 125–31.

- Kramer, I., C. Halleux, H. Keller, M. Pegurri, J. H. Gooi, P. B. Weber, J. Q. Feng, L. F. Bonewald, M. Kneissel. 2010. Osteocyte Wnt/ β -Catenin Signaling Is Required for Normal Bone Homeostasis. *Molecular and Cellular Biology* 30 (12): 3071–85.
- Lacey, D. L., E. Timms, H. Tan, M. J. Kelley, C. R. Dunstan, T. Burgess, R. Elliott, A. Colombero, G. E. S. Scully, H. Hsu, J. Sullivan, N. Hawkins, E. Davy, C. Capparelli, A. Eli, Y. Qian, S. Kaufman, I. Sarosi, V. Shalhoub, G. Senaldi, J. Guo, J. Delaney, W. J. Boyle. 1998. Osteoprotegerin Ligand Is a Cytokine That Regulates Osteoclast Differentiation and Activation. *Cell* 93: 165–76.
- Leder, B. Z. 2017. Parathyroid Hormone and Parathyroid Hormone-Related Protein Analogs in Osteoporosis Therapy. *Current Osteoporosis Reports* 15 (2): 110–19.
- Leipe, J., J. U. Holle, C. Weseloh, A. Pfeil, K. Krüger. 2021. German Society of Rheumatology Recommendations for the Management of Glucocorticoid-Induced Osteoporosis. German Version. *Zeitschrift Fur Rheumatologie* 80 (7): 670–87.
- Lerner, U. H., C. Ohlsson. 2015. The Wnt System: Background and its Role in Bone. *Journal of Internal Medicine* 277 (6): 630–49.
- Lieshout, E. M. M. van, V. Alt. 2016. Bone Graft Substitutes and Bone Morphogenetic Proteins for Osteoporotic Fractures: What Is the Evidence? *Injury* 47: S43–46.
- Lim, J. Y., S. I. Park, J. H. Oh, S. M. Kim, C. H. Jeong, J. Jun, K.-S. Lee, W. Oh, J.-K. Lee, S.-S. Jeun. 2008. Brain-derived Neurotrophic Factor Stimulates the Neural Differentiation of Human Umbilical Cord Blood-derived Mesenchymal Stem Cells and Survival of Differentiated Cells through MAPK/ERK and PI3K/Akt-dependent Signaling Pathways. *Journal of Neuroscience Research* 86: 2168–78.
- Lin, C., X. Jiang, Z. Dai, X. Guo, T. Weng, J. Wang, Y. Li, G. Feng, X. Gao, L. He. 2009. Sclerostin Mediates Bone Response to Mechanical Unloading through Antagonizing Wnt/ β -Catenin Signaling. *Journal of Bone and Mineral Research* 24 (10): 1651–61.
- Lisi, V., B. Singh, M. Giroux, E. Guzman, M. W. Painter, Y.-C. Cheng, E. Huebner, G. Coppola, M. Costigan, J. Clifford, K. S. Kosik. 2017. Enhanced Neuronal Regeneration in the CAST/Ei Mouse Strain Is Linked to Expression of Differentiation Markers after Injury. *Cell Rep.* 20 (5): 1136–47.
- Loy, T. L., D. Vehlow, V. Kauschke, M. Müller, C. Heiss, K. S. Lips. 2020. Effects of BDNF and PEC Nanoparticles on Osteocytes. *Molecules* 25 (18): 1–12.

Verzeichnisse

- Lu, C., S. Huang, T. Miclau, J. A. Helms, C. Colnot. 2004. Mepe Is Expressed during Skeletal Development and Regeneration. *Histochemistry and Cell Biology* 121 (6): 493–99.
- Luo, B., J. Huang, L. Lu, X. Hu, Z. Luo, M. Li. 2014. Electrically Induced Brain-Derived Neurotrophic Factor Release from Schwann Cells. *Journal of Neuroscience Research* 92 (7): 893–903.
- Ma, F., L. Zhang, K. N. Westlund. 2009. Reactive Oxygen Species Mediate TNFR1 Increase after TRPV1 Activation in Mouse DRG Neurons. *Molecular Pain* 5 (31): 1–11.
- Ma, Y., X. Li, J. Fu, Y. Li, L. Gao, L. Yang, P. Zhang, J. Shen, H. Wang. 2014. Acetylcholine Affects Osteocytic MLO-Y4 Cells via Acetylcholine Receptors. *Molecular and Cellular Endocrinology* 384 (1-2): 155–64.
- Mabileau, G., A. Mieczkowska, M. E. Edmonds. 2010. Thiazolidinediones Induce Osteocyte Apoptosis and Increase Sclerostin Expression. *Diabetic Medicine* 27 (8): 925–32.
- Maghni, K., O. M. Nicolescu, J. G. Martin. 1999. Suitability of Cell Metabolic Colorimetric Assays for Assessment of CD4 + T Cell Proliferation: Comparison to 5-Bromo-2-Deoxyuridine (BrdU) ELISA. *Journal of Immunological Methods* 223 (2): 185–94.
- Marotti, G., V. Canè, S. Palazzini, C. Palumbo. 1990. Structure-Function Relationships in the Osteocyte. *Ital. J. Miner. Electrolyte Metab.* 4 (2): 93–106.
- Matsuoka, M., T. Onodera, F. Sasazawa, D. Momma, R. Baba, K. Hontani, N. Iwasaki. 2015. An Articular Cartilage Repair Model in Common C57Bl/6 Mice. *Tissue Engineering - Part C: Methods* 21 (8): 767–72.
- Maurer, F., T. Ambacher, R. Volkmann, S. Weller. 1995. Pathologische Frakturen: Diagnostische Und Therapeutische Überlegungen Sowie Behandlungsergebnisse. *Langenbecks Archiv Für Chirurgie* 380 (4): 207–17.
- McClung, M.R. 2017. Sclerostin Antibodies in Osteoporosis: Latest Evidence and Therapeutic Potential. *Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease* 9 (10): 263–70.
- Merkel, K. D., J. M. Erdmann, K. P. McHugh, Y. Abu-Amer, F. P. Ross, S. L. Teitelbaum. 1999. Tumor Necrosis Factor- α Mediates Orthopedic Implant Osteolysis. *American Journal of Pathology* 154 (1): 203–10.
- Meyer, M., I. Matsuoka, C. Wetmore, L. Olson, H. Thoenen. 1992. Enhanced Synthesis

- of Brain-Derived Neurotrophic Factor in the Lesioned Peripheral Nerve. *The Journal of Cell Biology* 119 (1): 45–54.
- Mine, Y., S. Makihira, Y. Yamaguchi, H. Tanaka, H. Nikawa. 2014. Involvement of ERK and P38 MAPK Pathways on Interleukin-33-Induced RANKL Expression in Osteoblastic Cells. *Cell Biology International* 38 (5): 655–62.
- Mirza, F. S., I. D. Padhi, L. G. Raisz, J. A. Lorenzo. 2010. Serum Sclerostin Levels Negatively Correlate with Parathyroid Hormone Levels and Free Estrogen Index in Postmenopausal Women. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 95 (4): 1991–97.
- Mödder, U. I., M. M. Roforth, K. Hoey, L. K. McCready, J. M. Peterson, D. G. Monroe, M. J. Oursler, S. Khosla. 2011. Effects of Estrogen on Osteoprogenitor Cells and Cytokines/ Bone-Regulatory Factors in Postmenopausal Women. *Bone* 49 (2): 202–7.
- Movérare-Skrtic, S., P. Henning, X. Liu, K. Nagano, H. Saito, A. E. Börjesson, K. Sjögren, S. H. Windahl, H. Farman, B. Kindlund, C. Engdahl, A. Koskela, F.-P. Zhang, Fu-E. E. Eriksson, F. Zaman, A. Hammarstedt, H. Isaksson, M. Bally, A. Kassem, C. Lindholm, O. Sandberg, P. Aspenberg, L. Sävendahl, J. Q. Feng, J. Tuckermann, J. Tuukkanen, M. Poutanen, R. Baron, U. H. Lerner, F. Gori, C. Ohlsson. 2014. Osteoblast-Derived WNT16 Represses Osteoclastogenesis and Prevents Cortical Bone Fragility Fractures. *Nature Medicine* 20 (11): 1279–88.
- Müller, M., B. Keßler. 2012. Release of Pamidronate from Poly(Ethyleneimine)/Cellulose Sulphate Complex Nanoparticle Films: An in Situ ATR-FTIR Study. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 66: 183–90.
- Müller, M. 2014. Sizing, Shaping and Pharmaceutical Applications of Polyelectrolyte Complex Nanoparticles. *Advances in Polymer Science* 256: 197–260.
- Müller, M., V. Starchenko, N. Lebovka, W. Ouyang, B. Keßler. 2009. Preparation and Life Science Applications of Polyelectrolytecomplex Nanoparticles. *Current Trends in Polymer Science* 13: 1–10.
- Müller, M., B. Torger, D. Wehrum, D. Vehlow, B. Urban, B. Woltmann, U. Hempel. 2015. Drug Delivery and Cell Interaction of Adhesive Poly(Ethyleneimine)/Sulfated Polysaccharide Complex Particle Films. *Biointerphases* 10 (1): 011001-1–10.
- Müller, M., D. Vehlow, B. Torger, B. Urban, B. Woltmann, U. Hempel. 2018. Adhesive Drug Delivery Systems Based on Polyelectrolyte Complex Nanoparticles (PEC NP) for Bone Healing. *Current Pharmaceutical Design* 24 (13): 1341–48.

Verzeichnisse

- Murakami, K., Y. Kobayashi, S. Uehara, T. Suzuki, M. Koide, T. Yamashita, M. Nakamura, N. Takahashi, H. Kato, N. Udagawa, Y. Nakamura. 2017. A Jak1/2 Inhibitor, Baricitinib, Inhibits Osteoclastogenesis by Suppressing RANKL Expression in Osteoblasts in Vitro. *PLoS ONE* 12 (7): 4–15.
- Naegelin, Y., H. Dingsdale, K. Säuberli, S. Schädelin, L. Kappos, Y. A. Barde. 2018. Measuring and Validating the Levels of Brain-Derived Neurotrophic Factor in Human Serum. *ENeuro* 5 (2): 1–9.
- Nakashima, T., M. Hayashi, T. Fukunaga, K. Kurata, M. Oh-Hora, J. Q. Feng, L. F. Bonewald, T. Kodama, A. Wutz, E. F. Wagner, J. M. Penninger, H. Takayanagi. 2011. Evidence for Osteocyte Regulation of Bone Homeostasis through RANKL Expression. *Nature Medicine* 17 (10): 1231–34.
- Nisio, A. Di, L. De Toni, E. Speltra, M. S. Rocca, G. Tagliavoro, A. Ferlin, C. Foresta. 2015. Regulation of Sclerostin Production in Human Male Osteocytes by Androgens: Experimental and Clinical Evidence. *Endocrinology* 156 (12): 4534–44.
- Nose, S., O. Yoshino, K. Nomoto, M. Harada, M. Dohi, T. Kawahara, Y. Osuga, T. Fujii, S. Saito. 2019. Serum Brain-Derived Neurotrophic Factor Levels Mirror Bone Mineral Density in Amenorrhic and Eumenorrhic Athletes. *International Journal of Sports Medicine* 40 (4): 276–82.
- O'Brien, C. A., L. I. Plotkin, C. Galli, J. J. Goellner, A. R. Gortazar, M. R. Allen, A. G. Robling, M. Boussein, E. Schipani, C. H. Turner, R. L. Jilka, R. S. Weinstein, S. C. Manolagas, T. Bellido. 2008. Control of Bone Mass and Remodeling by PTH Receptor Signaling in Osteocytes. *PLoS ONE* 3 (8): 1–11.
- Oh, J. H., N. K. Lee. 2017. Up-Regulation of RANK Expression via ERK1/2 by Insulin Contributes to the Enhancement of Osteoclast Differentiation. *Molecules and Cells* 40 (5): 371–77.
- Ostergaard, P. J., M. J. Hall, T. D. Rozental. 2019. Considerations in the Treatment of Osteoporotic Distal Radius Fractures in Elderly Patients. *Current Reviews in Musculoskeletal Medicine* 12 (1): 50–56.
- Palumbo, C. 1986. A Three-Dimensional Ultrastructural Study of Osteoid-Osteocytes in the Tibia of Chick Embryos. *Cell and Tissue Research* 246 (1): 125–31.
- Papanicolaou, S. E., R. J. Phipps, D. P. Fyhrie, D. C. Genetos. 2009. Modulation of Sclerostin Expression by Mechanical Loading and Bone Morphogenetic Proteins in Osteogenic Cells. *Biorheology* 46 (5): 389–99.
- Petzold, R., D. Vehlow, B. Urban, A. L. Grab, E. A. Cavalcanti-Adam, V. Alt, M. Müller.

Verzeichnisse

2017. Colloid, Adhesive and Release Properties of Nanoparticulate Ternary Complexes between Cationic and Anionic Polysaccharides and Basic Proteins like Bone Morphogenetic Protein BMP-2. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 151: 58–67.
- Phillips, H. S., J. M. Hains, M. Armanini, G. R. Laramée, S. A. Johnson, J. W. Winslow. 1991. BDNF mRNA Is Decreased in the Hippocampus of Individuals with Alzheimer's Disease. *Neuron* 7 (5): 695–702.
- Piekarski, K., M. Munro. 1977. Transport Mechanism Operating between Blood Supply and Osteocytes in Long Bones. *Nature* 269 (5623): 80–82.
- Polacchini, A., G. Metelli, R. Francavilla, G. Baj, M. Florean, L. G. Mascaretti, E. Tongiorgi. 2015. A Method for Reproducible Measurements of Serum BDNF: Comparison of the Performance of Six Commercial Assays. *Scientific Reports* 5 (12): 1–10.
- Poole, K. E. S., R. L. Van Bezooijen, N. Loveridge, H. Hamersma, S. E. Papapoulos, C. W. Löwik, J. Reeve. 2005. Sclerostin Is a Delayed Secreted Product of Osteocytes That Inhibits Bone Formation. *FASEB Journal* 19 (13): 1842–44.
- Qin, C., R. D'Souza, J. Q. Feng. 2007. Dentin Matrix Protein 1 (DMP1): New and Important Roles for Biomineralization and Phosphate Homeostasis. *Journal of Dental Research* 86 (12): 1134–41.
- Quinn, J. M. W., K. Itoh, N. Udagawa, K. Häusler, H. Yasuda, N. Shima, A. Mizuno, K. Higashio, N. Takahashi, T. Suda, T. J. Martin, M. T. Gillespie. 2001. Transforming Growth Factor β Affects Osteoclast Differentiation via Direct and Indirect Actions. *Journal of Bone and Mineral Research* 16 (10): 1787–94.
- Quirici, N., D. Soligo, P. Bossolasco, F. Servida, C. Lumini, G. L. Dell'Isola. 2002. Isolation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells by Anti-Nerve Growth Factor Receptor Antibodies. *Experimental Hematology* 30 (7): 783–91.
- Randhawa, V. K., F. S. L. Thong, D. Y. Lim, D. Li, R. R. Garg, R. Rudge, T. Galli, A. Rudich, A. Klip. 2005. Insulin and Hypertonicity Recruit GLUT4 to the Plasma Membrane of Muscle Cells by Using. *Molecular Biology of the Cell* 16: 3100–3106.
- Rateman, H. G., I. E. M. Bultink, W. F. Lems. 2019. Current Treatments and New Developments in the Management of Glucocorticoid-Induced Osteoporosis. *Drugs* 79 (10): 1065–87.
- Roberts, T. T., A. J. Rosenbaum. 2012. Bone Grafts, Bone Substitutes and Orthobiologics the Bridge between Basic Science and Clinical Advancements in

- Fracture Healing. *Organogenesis* 8 (4): 114–24.
- Robling, A. G., L. F. Bonewald. 2020. The Osteocyte: New Insights. *Annual Review of Physiology* 82 (5): 485–506.
- Rose, C. R., R. Blum, K. W. Kafitz, Y. Kovalchuk, A. Konnerth. 2004. From Modulator to Mediator: Rapid Effects of BDNF on Ion Channels. *BioEssays* 26 (11): 1185–94.
- Rupp, M., F. Merboth, D. E. Daghma, C. Biehl, T. El Khassawna, C. Heiß. 2019. Osteocytes. *Z Orthop Unfall* 157 (2): 154–63.
- Sango, K., S. Yamanaka, K. Ajiki, A. Tokashiki, K. Watabe. 2002. Lysosomal Storage Results in Impaired Survival but Normal Neurite Outgrowth in Dorsal Root Ganglion Neurones from a Mouse Model of Sandhoff Disease. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 28 (1): 23–34.
- Sasi, M., B. Vignoli, M. Canossa, R. Blum. 2017. Neurobiology of Local and Intercellular BDNF Signaling. *Pflugers Archiv : European Journal of Physiology* 469 (5–6): 593–610.
- Schlessinger, J., A. Ullrich. 1992. Growth Factor Signaling by Receptor Tyrosine Kinases. *Neuron* 9 (3): 383–91.
- Schlickewei, C., T. O. Klatter, Y. Wildermuth, G. Laaff, J. M. Rueger, J. Ruesing, S. Chernousova, W. Lehmann, M. Epple. 2019. A Bioactive Nano-Calcium Phosphate Paste for in-Situ Transfection of BMP-7 and VEGF-A in a Rabbit Critical-Size Bone Defect: Results of an in Vivo Study. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 30 (15): 1–12.
- Sebastian, A., G. G. Loots. 2018. Genetics of Sost/SOST in Sclerosteosis and van Buchem Disease Animal Models. *Metabolism: Clinical and Experimental* 80: 38–47.
- Semënov, M., K. Tamai, X. He. 2005. SOST Is a Ligand for LRP5/LRP6 and a Wnt Signaling Inhibitor. *Journal of Biological Chemistry* 280 (29): 26770–75.
- Shu, R., D. Bai, T. Sheu, Y. He, X. Yang, C. Xue, Y. He, M. Zhao, X. Han. 2017. Sclerostin Promotes Bone Remodeling in the Process of Tooth Movement. *PLoS ONE* 12 (1): 1–16.
- Siddiqui, J. A., N. C. Partridge. 2016. Physiological Bone Remodeling: Systemic Regulation and Growth Factor Involvement. *Physiology* 31 (3): 233–45.
- Simonet, W. S., D. L. Lacey, C. R. Dunstan, M. Kelley, M. S. Chang, R. Lüthy, H. Q. Nguyen, S. Wooden, L. Bennett, T. Boone, G. Shimamoto, M. DeRose, R. Elliott,

Verzeichnisse

- A. Colombero, H. L. Tan, G. Trall, J. Sullivan, E. Davy, N. Bucay, L. Renshaw-Gegg, T. M. Hughes, D. Hill, W. Pattison, P. Campbell, S. Sander, G. Van, J. Tarpley, P. Derby, R. Lee, W. J. Boyle. 1997. Osteoprotegerin: A Novel Secreted Protein Involved in the Regulation of Bone Density. *Cell* 89 (2): 309–19.
- Spatz, J. M., M. N. Wein, J. H. Gooi, Y. Qu, J. L. Garr, S. Liu, K. J. Barry, Y. Uda, F. Lai, C. Dedic, M. Balcells-Camps, H. M. Kronenberg, P. Babij, P. D. Pajevic. 2015. The Wnt Inhibitor Sclerostin Is Up-Regulated by Mechanical Unloading in Osteocytes in Vitro. *Journal of Biological Chemistry* 290 (27): 16744–58.
- Stabenfeldt, S. E., M. C. LaPlaca. 2011. Variations in Rigidity and Ligand Density Influence Neuronal Response in Methylcellulose-Laminin Hydrogels. *Acta Biomater.* 7 (12): 4102–8.
- Sun, C.-Y., Y. Hu, H.-F. Wang, W.-J. He, Y.-D. Wang, T. Wu. 2006. Brain-Derived Neurotrophic Factor Inducing Angiogenesis through Modulation of Matrix-Degrading Proteases. *Chin Med J* 119 (7): 589–95.
- Sun, T., Z. Yan, J. Cai, X. Shao, D. Wang, Y. Ding, Y. Feng, J. Yang, E. Luo, X. Feng, D. Jing. 2020. Effects of Mechanical Vibration on Cell Morphology, Proliferation, Apoptosis, and Cytokine Expression/Secretion in Osteocyte-like MLO-Y4 Cells Exposed to High Glucose. *Cell Biology International* 44 (1): 216–28.
- Sun, Y., Y. Lim, F. Li, S. Liu, J. J. Lu, R. Haberberger, J. H. Zhong, X. F. Zhou. 2012. ProBDNF Collapses Neurite Outgrowth of Primary Neurons by Activating RhoA. *PLoS ONE* 7 (4): 1–12.
- Takeda, K., H. Shiba, N. Mizuno, N. Hasegawa, Y. Mouri, A. Hirachi, H. Yoshino, H. Kawaguchi, H. Kurihara. 2005. Brain-Derived Neurotrophic Factor Enhances Periodontal Tissue Regeneration. *Tissue Engineering* 11 (9–10): 1618–29.
- Tanaka, K. I., T. Yamaguchi, I. Kanazawa, T. Sugimoto. 2015. Effects of High Glucose and Advanced Glycation End Products on the Expressions of Sclerostin and RANKL as Well as Apoptosis in Osteocyte-like MLO-Y4-A2 Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 461 (2): 193–99.
- Tanaka, S., T. Matsumoto. 2021. Sclerostin: From Bench to Bedside. *Journal of Bone and Mineral Metabolism* 39 (3): 332–40.
- Tatsumi, S., K. Ishii, N. Amizuka, M. Li, T. Kobayashi, K. Kohno, M. Ito, S. Takeshita, K. Ikeda. 2007. Targeted Ablation of Osteocytes Induces Osteoporosis with Defective Mechanotransduction *Cell Metabolism* 5 (6): 464–75.
- Tazawa, K., K. Hoshi, S. Kawamoto, M. Tanaka, S. Ejiri, H. Ozawa. 2004. Osteocytic

Verzeichnisse

- Osteolysis Observed in Rats to Which Parathyroid Hormone Was Continuously Administered. *Journal of Bone and Mineral Metabolism* 22 (6): 524–29.
- Teitelbaum, S. L. 2000. Bone Resorption by Osteoclasts. *Science* 289 (5484): 1504–8.
- Tella, S. H., J. Christopher Gallagher. 2014. Prevention and Treatment of Postmenopausal Osteoporosis. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 142: 155–70.
- Teng, H. K., K. K. Teng, R. Lee, S. Wright, S. Tevar, R. D. Almeida, P. Kermani, R. Torkin, Z. Y. Chen, F. S. Lee, R. T. Kraemer, A. Nykjaer, B. L. Hempstead. 2005. ProBDNF Induces Neuronal Apoptosis via Activation of a Receptor Complex of P75NTR and Sortilin. *Journal of Neuroscience* 25 (22): 5455–63.
- Teti, A., A. Zallone. 2009. Do Osteocytes Contribute to Bone Mineral Homeostasis? Osteocytic Osteolysis Revisited. *Bone* 44 (1): 11–16.
- Tolwani, R. J., P. S. Buckmaster, S. Varma, J. M. Cosgaya, Y. Wu, C. Suri, E. M. Shooter. 2002. BDNF Overexpression Increases Dendrite Complexity in Hippocampal Dentate Gyrus. *Neuroscience* 114 (3): 795–805.
- Tresguerres, F. G. F., J. Torres, J. López-Quiles, G. Hernández, J. A. Vega, I. F. Tresguerres. 2020. The Osteocyte: A Multifunctional Cell within the Bone. *Annals of Anatomy* 227: 151422.
- Vehlow, D., R. Schmidt, A. Gebert, M. Siebert, K. S. Lips, M. Müller. 2016. Polyelectrolyte Complex Based Interfacial Drug Delivery System with Controlled Loading and Improved Release Performance for Bone Therapeutics. *Nanomaterials* 6 (3): 53.
- Vincent, C., D. M. Findlay, K. J. Welldon, A. R. Wijenayaka, T. S. Zheng, D. R. Haynes, N. L. Fazzalari, A. Evdokiou, G. J. Atkins. 2009. Pro-Inflammatory Cytokines TNF-Related Weak Inducer of Apoptosis (TWEAK) and TNF α Induce the Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK)-Dependent Expression of Sclerostin in Human Osteoblasts. *Journal of Bone and Mineral Research* 24 (8): 1434–49.
- Vrijen, C., H. M. Schenk, C. A. Hartman, A. J. Oldehinkel. 2017. Measuring BDNF in Saliva Using Commercial ELISA: Results from a Small Pilot Study. *Psychiatry Research* 254: 340–46.
- Wang, J. S., C. M. Mazur, M. N. Wein. 2021. Sclerostin and Osteocalcin: Candidate Bone-Produced Hormones. *Frontiers in Endocrinology* 12 (3): 1–15.
- Wang, W., K. W. K. Yeung. 2017. Bone Grafts and Biomaterials Substitutes for Bone Defect Repair: A Review. *Bioactive Materials* 2 (4): 224–47.

Verzeichnisse

- Wang, Z., K. Wang, X. Lu, M. Li, H. Liu, C. Xie, F. Meng, O. Jiang, C. Li, W. Zhi. 2015. BMP-2 Encapsulated Polysaccharide Nanoparticle Modified Biphasic Calcium Phosphate Scaffolds for Bone Tissue Regeneration. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A* 103 (4): 1520–32.
- Wei, C., B. Fan, D. Chen, C. Liu, Y. Wei, B. Huo, L. You, J. Wang, J. Chen. 2015. Osteocyte Culture in Microfluidic Devices. *Biomicrofluidics* 9 (1): 1–10.
- Wein, M. N., H. M. Kronenberg. 2018. Regulation of Bone Remodeling by Parathyroid Hormone. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 8 (8): 1–20.
- Weinbaum, S., S. C. Cowin, Yu Zeng. 1994. A Model for the Excitation of Osteocytes by Mechanical Loading-Induced Bone Fluid Shear Stresses. *Journal of Biomechanics* 27 (3): 339–60.
- Weivoda, M. M., S. J. Youssef, M. J. Oursler. 2017. Sclerostin Expression and Functions beyond the Osteocyte. *Bone* 96 (507): 45–50.
- Wetmore, C., L. Olson. 1995. Neuronal and Nonneuronal Expression of Neurotrophins and Their Receptors in Sensory and Sympathetic Ganglia Suggest New Intercellular Trophic Interactions. *Journal of Comparative Neurology* 353 (1): 143–59.
- Wijenayaka, A. R., M. Kogawa, H. P. Lim, L. F. Bonewald, D. M. Findlay, G. J. Atkins. 2011. Sclerostin Stimulates Osteocyte Support of Osteoclast Activity by a RANKL-Dependent Pathway. *PLoS ONE* 6 (10): 1–9.
- Winkler, D. G., M. K. Sutherland, J. C. Geoghegan, C. Yu, T. Hayes, J. E. Skonier, D. Shpektor, M. Jonas, B. R. Kovacevich, K. Staehling-Hampton, M. Appleby, M. E. Brunkow, J. A. Latham. 2003. Osteocyte Control of Bone Formation via Sclerostin, a Novel BMP Antagonist. *EMBO Journal* 22 (23): 6267–76.
- Witte, T.-M. De, L. E. Fratila-Apachitei, A. A. Zadpoor, N. A. Peppas. 2018. Bone Tissue Engineering via Growth Factor Delivery: From Scaffolds to Complex Matrices. *Regenerative Biomaterials* 5 (4): 197–211.
- Woltmann, B., B. Torger, M. Müller, U. Hempel. 2014. Interaction between Immobilized Polyelectrolyte Complex Nanoparticles and Human Mesenchymal Stromal Cells. *International Journal of Nanomedicine* 9 (1): 2205–15.
- Wu, Q., X. Zhou, D. Huang, Y. Ji, F. Kang. 2017. IL-6 Enhances Osteocyte-Mediated Osteoclastogenesis by Promoting JAK2 and RANKL Activity in Vitro. *Cellular Physiology and Biochemistry* 41 (4): 1360–69.

Verzeichnisse

- Xiong, J., M. Onal, R. L. Jilka, R. S. Weinstein, S. C. Manolagas, C. A. O'Brien. 2011. Matrix-Embedded Cells Control Osteoclast Formation. *Nature Medicine* 17 (10): 1235–41.
- Yang, B., L. Wang, Y. Nie, W. Wei, W. Xiong. 2021. ProBDNF Expression Induces Apoptosis and Inhibits Synaptic Regeneration by Regulating the RhoA-JNK Pathway in an in Vitro Post-Stroke Depression Model. *Translational Psychiatry* 11 (1): 1–10.
- Yamashiro, T., T. Fukunaga, K. Yamashita, N. Kobashi, T. Takano-Yamamoto. 2001. Gene and Protein Expression of Brain-Derived Neurotrophic Factor and TrkB in Bone and Cartilage. *Bone* 28 (4): 404–9.
- Yao, Q., H. Liang, B. Huang, L. Xiang, T. Wang, Y. Xiong, B. Yang, Y. Guo, P. Gong. 2017. Beta-Adrenergic Signaling Affect Osteoclastogenesis via Osteocytic MLO-Y4 Cells' RANKL Production. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 488 (4): 634–40.
- Yoon, S. O., P. Casaccia-Bonnel, B. Carter, M. V. Chao. 1998. Competitive Signaling Between TrkA and P75 Nerve Growth Factor Receptors Determines Cell Survival. *The Journal of Neuroscience* 18 (9): 3273–81.
- York, S. L., P. Sethu, M. M. Saunders. 2016. Impact of Gap Junctional Intercellular Communication on MLO-Y4 Sclerostin and Soluble Factor Expression. *Annals of Biomedical Engineering* 44 (4): 1170–80.
- York, S. L., A. R. Arida, K. S. Shah, P. Sethu, M. M. Saunders. 2012. Osteocyte Characterization on Polydimethylsiloxane Substrates for Microsystems Applications. *Journal of Biomimetics, Biomaterials, and Tissue Engineering* 16 (1): 27–42.
- Yu, C., D. Huang, K. Wang, B. Lin, Y. Liu, S. Liu, W. Wu, H. Zhang. 2017. Advanced Oxidation Protein Products Induce Apoptosis, and Upregulate Sclerostin and RANKL Expression, in Osteocytic MLO-Y4 Cells via JNK/P38 MAPK Activation. *Molecular Medicine Reports* 15 (2): 543–50.
- Zeng, C., F. Pan, L. Jones, M. M. Lim, E. Griffin, Y. I. Sheline, M. Mintun, D. M. Holtzman, R. H. Mach. 2010. Evaluation of 5-Ethynyl-2'-Deoxyuridine Staining as a Sensitive and Reliable Method for Studying Cell Proliferation in the Adult Nervous System. *Brain Research* 10 (1319C): 21–32.
- Zhang, D., X. Li, C. Pi, L. Cai, Y. Liu, W. Du, W. Yang, J. Xie. 2020. Osteoporosis- Decreased Extracellular Matrix Stiffness Impairs Connexin 43-Mediated Gap

Verzeichnisse

Junction Intercellular Communication in Osteocytes. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 52 (5): 517–26.

Zhang, K., C. Barragan-Adjemian, L. Ye, S. Kotha, M. Dallas, Y. Lu, S. Zhao, M. Harris, S. E. Harris, J. Q. Feng, L. F. Bonewald. 2006. E11/Gp38 Selective Expression in Osteocytes: Regulation by Mechanical Strain and Role in Dendrite Elongation. *Molecular and Cellular Biology* 26 (12): 4539–52.

Zhang, Z., Y. Zhang, Z. Zhou, H. Shi, X. Qiu, J. Xiong, Y. Chen. 2017. BDNF Regulates the Expression and Secretion of VEGF from Osteoblasts via the TrkB/ERK1/2 Signaling Pathway during Fracture Healing. *Molecular Medicine Reports* 15 (3): 1362–67.

Zhao, S., Y. Kato, Y. Zhang, S. Harris, S. S. Ahuja, L. F. Bonewald. 2002. MLO-Y4 Osteocyte-Like Cells Support Osteoclast. *Journal of Bone and Mineral Research* 17 (11): 2068–79.

8 Publikationen und Vorträge

8.1 Publikation

Loy, Thomas Leonhard, David Vehlow, Vivien Kauschke, Martin Müller, Christian Heiss und Katrin Susanne Lips. 2020. Effects of BDNF and PEC Nanoparticles on Osteocytes. *Molecules* 25 (18): 1–12.

8.2 Konferenzvortrag

Loy, Thomas Leonhard, David Vehlow, Martin Müller, Vivien Kauschke, Christian Heiss und Katrin S. Lips. 2019. "The Effect of BDNF-Functionalised PEC-NP on the Vitality and Proliferation of an Osteocyte-Neuron-Coculture." *2nd International Conference on Trauma Surgery Technology in Giessen 11 to 13 October 2019 Funded by the Deutsche Forschungsgemeinschaft University Medical Faculty Giessen (Germany)*.

9 Ehrenwörtliche Erklärung

„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

Thomas L. Loy

10 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen Mitarbeiter*innen des Labors für Experimentelle Unfallchirurgie in Gießen für die Unterstützung und Ermutigung bedanken.

Zunächst gilt mein besonderer Dank der Leiterin des Labors für Experimentelle Unfallchirurgie, Prof. Dr. Katrin S. Lips, die mir dieses Dissertationsthema überlassen hat und stets für Fragen, weitergehende Ideen sowie Probleme ein offenes Ohr hatte. Für all die konstruktiven Anregungen und wertvollen Korrekturen möchte ich mein Dank aussprechen.

Für die Ermöglichung der Arbeit im Rahmen des von der Deutschen Forschungsgemeinschaft geförderten Sonderforschungsbereiches/Transregio 79 danke ich dem Direktor des Labors für Experimentelle Unfallchirurgie, Prof. Dr. med. Dr. h.c. Christian Heiss.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei der Arbeitsgruppe von PD Dr. Martin Müller des Leibniz-Instituts für Polymerforschung Dresden e.V. und hierbei insbesondere bei David Vehlow für die gute Zusammenarbeit und die unkomplizierte Her- und Bereitstellung der funktionalisierten PEK-NP.

Des Weiteren danke ich Dr. rer. nat. Vivien Kauschke für die kompetente Instruktion in die Präparation der murinen Spinalganglien.

Für eine grandiose Einarbeitung in die Methoden des Labors, für eure guten Ratschläge, all die Zeit, die ihr euch genommen habt und zuletzt für angenehme Gespräche auch abseits der Arbeitsfläche, bedanke ich mich von ganzem Herzen bei Olga Dakischew und Ivonne Bergen.

Schließlich danke ich meiner Familie, meinen Freunden sowie meiner Freundin für deren ständige Unterstützung und Rückhalt während des Studiums und der Promotion.