Effekt von BDNF auf die Angiogenese im humanen Kokultursystem aus Endothelzellen und osteoporotischen Osteoblasten

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

vorgelegt von Holtkamp, Katharina Ines Carmen
geb. Herwig
aus Eschwege

Gießen 2025

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Labor für experimentelle Unfallchirurgie

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

Gutachter: **Prof. Dr. Katrin Susanne Lips**

Gutachter: **Prof. Dr. Markus Rickert**

Tag der Disputation: **10.03.2025**

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1

1.1 Osteoporose 1

1.2 Knochen und osteogene Differenzierung 2

1.3 Alkalische Phosphatase 5

1.4 Gefäßversorgung des Knochens, Angiogenese und Endothelzellen 6

1.5 Der von Willebrand Faktor 8

1.6 *Brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) 9

1.7 Fragestellung 11

2 Material und Methoden 12

2.1 Zelllinien, Zellkultur und Kokultursystem 12

2.2 Versuchsaufbau 16

2.3 Durchgeführte Methoden 18

2.3.1 Lichtmikroskopie und Lebendzellbeobachtung 18

2.3.2 Immunofluoreszenzfärbung 18

2.3.3 Proteinbestimmung 20

2.3.4 ALP-Kinetik 21

2.3.5 vWF-ELISA 22

2.3.6 Statistik 23

3 Ergebnisse 24

3.1 Vorversuche 24

3.2 Lebendzellbeobachtung 27

3.3 Auswertung der Immunofluoreszenzfärbung 35

3.4 Auswertung der Gesamtproteinbestimmung und ALP-Kinetik 36

3.5 Auswertung des vWF-ELISA 39

4 Diskussion 43

4.1 Zellkulturen und Kokultursysteme 43

4.2 ALP Kinetik und Gesamtproteinbestimmung 49

4.3 vWF als Marker der Angiogenese 51
4.4 BDNF 54
4.5 Schlussfolgerung und Ausblick 56
5 Zusammenfassung 58
6 Summary 59
7 Abkürzungsverzeichnis 60
8 Abbildungsverzeichnis 62
9 Tabellenverzeichnis 63
10 Literaturverzeichnis 64
11 Publikationsverzeichnis 76
12 Ehrenwörtliche Erklärung 77
13 Danksagung 78

1 Einleitung

1.1 Osteoporose

Im Verlauf der letzten 100 Jahre zeigte sich im Blick auf die deutsche Bevölkerung ein kontinuierlicher Anstieg der Lebenserwartung. Lag es zunächst an der sinkenden Säuglingssterblichkeit so liegt der Schwerpunkt immer mehr bei der sinkenden Sterblichkeit im hohen Alter. Die mittlere Lebenserwartung für Männer liegt bei 78,6 und für Frauen bei 83,4 Jahren (statistisches Bundesamt 2021/23).

Ein Ausblick in die Zukunft lässt annehmen, dass die Lebenserwartung auch weiterhin ansteigt. Spekulativ könnte im Jahr 2060 die Lebenserwartung von Männern um vier bis acht Jahre und von Frauen um ca. drei bis sechs Jahre höher liegen als zum jetzigen Zeitpunkt (statistisches Bundesamt 2021/23). Mit dem steigenden Lebensalter und der damit einhergehenden Verschiebung der Alterspyramide steigen die Zahlen der Erkrankungen, die sich vor allem im hohen Alter manifestieren. Dazu zählt unter anderem die Osteoporose. Im Verlauf der Jahre zeigte sich ein Anstieg der Betroffenen, der zum einen durch die immer besser werdende Diagnostik und zum anderen durch das Altern der Bevölkerung erklärt werden kann. Durch den Anstieg der Betroffenen, die an Osteoporose leiden, steigen im Umkehrschluss auch die Kosten des Gesundheitssystems. So betrugen im Jahr 2015 die gesamten Krankheitskosten, die durch Osteoporose entstanden, 1.965 Millionen Euro. Diese Zahl setzt sich aus einem Anteil von ca. 87 % Frauen und 13 % Männern zusammen. Die höchsten Kosten verursachte die Altersgruppe zwischen 65 und 85 Jahren. Bei den Frauen nahm die Gruppe der 65 bis 85 Jährigen ca. 53 % der Kosten ein, aber auch die Gruppe der über 85 Jahre alten Frauen hatte einen Anteil von ca. 37 % (Statistisches Bundesamt 2019). Diese Zahlen zeigen die Relevanz der Osteoporose als Erkrankung des Alterns.

Die Osteoporose ist eine Systemerkrankung des Knochens, die sich durch eine mangelnde Knochendichte und veränderte Architektur des Knochens zeigt (NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis 1993). Unterteilt wird die Osteoporose in Schweregrade, die mithilfe der Doppelröntgenabsorptiometrie (Dual X-ray-Absorptiometry, DXA) definiert werden können. Dabei wird die Knochensubstanz des Patienten mit der Knochensubstanz einer 30-jährigen gesunden Person verglichen. Kommt es nun zu einer Abweichung der Knochensubstanz von der Norm um eine Standardabweichung zwischen -1 und -2 wird dies als Osteopenie

bezeichnet, eine Vorstufe der Osteoporose. Liegt eine Standardabweichung größer als -2,5 vor, wird eine Osteoporose angenommen. Eine manifeste Osteoporose liegt bei einer Standardabweichung von -2,5 und einer zusätzlichen pathologischen Fraktur vor (Grampp et al. 1997). Die Osteoporose wird in eine primäre und sekundäre Form unterteilt. Primäre Formen können in eine postmenopausale und eine senile Form unterteilt werden. Wobei die postmenopausale Osteoporose den Großteil der betroffenen Patienten umfasst. Ursachen einer sekundären Osteoporose können mannigfaltig sein, häufig sind Medikamenteneinnahmen, Immobilisation oder andere endokrine Stoffwechselstörungen beteiligt. Weitere Risikofaktoren sind das weibliche Geschlecht, Rauchen und Alkoholabusus (NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis 2001). Es kommt durch high- oder low-turnover Phänomenen zu einer mangelhaften Knochensubstanz. Ursache dieser Phänomene können Dysregulationen im Knochenstoffwechsel sein. Hierbei kann es zum einen zu einer mangelhaften Osteoblastenfunktion und zum anderen zu einer überschießenden Osteoklastenfunktion kommen. Eine Osteoporose zeigt sich nach langen asymptomatischen Verläufen häufig durch diffuse Knochenschmerzen oder durch pathologische Frakturen (Berger et al. 2009). Schätzungsweise treten bei 50 % der Frauen und bei 20 % der Männer in einem Alter über 50 Jahren eine Osteoporose bedingte Fraktur auf (Coughlan et al. 2014). Zusätzlich zeigten sich im Vergleich von knochengesunden Patienten zu Patienten mit einer Osteoporose im Schnitt mehr Komplikationen. Osteoporotische Patienten neigen zum Beispiel öfter zu postoperativem Implantatversagen (Duijsens et al. 2005).

Diese Frakturen traten vor allem hüftgelenksnah, im Bereich des Handgelenks oder der Wirbelsäule auf (Häussler et al. 2007). Für die primäre Osteoporose gibt es bislang keine kurative Therapie. Im Fokus der Therapie stehen zum einen die medikamentöse Sekundärprophylaxe zur Verbesserung der Knochensubstanz und zum anderen die Wiederherstellung der Funktionalität und Schmerzfreiheit bei Frakturen.

1.2 Knochen und osteogene Differenzierung

Der Knochen dient als Stützgerüst für den menschlichen Körper. Für die Entstehung des Knochens, die sogenannte Osteogenese, kommt es in der Embryonalzeit über eine Mesenchymalverdichtung entweder zu einer desmalen Osteogenese durch Differenzierung der mesenchymalen Zellen in Osteoblasten oder zu einer chondralen

Osteogense. Hier kommt es zu einem Knochenaufbau über eine knorpelige Vorstufe. Aufgebaut ist der Knochen aus einer mineralisierten Extrazellulärmatrix (EZM) und verschiedenen Zelltypen. Die EZM besteht vor allem aus Kollagenfibrillen und Hydroxyapatit-Kristallen, diese Kristalle weisen als Hauptkomponenten Calcium-, Phosphat- und Hydroxid-Ionen auf. Durch die spezielle Zusammensetzung der EZM weist der Knochen sowohl zug- also auch druckfeste Eigenschaften auf. Bis der Knochen seine festgelegte Form in der Entwicklung erreicht durchläuft er das sogenannte „Modeling“ (Kobayashi et al. 2003). Aber auch im ausgewachsenen Stadium unterliegt der Knochen einem ständigen „Remodeling“ (Parfitt 1982). Für diesen Umbau sind vor allem die im Knochen befindlichen Zellen verantwortlich. Die wichtigsten sind die Osteoblasten und ihrer Gegenspieler die Osteoklasten. Die Osteoblasten leiten sich von mesenchymalen Stammzellen (MSC) ab und werden zeitlebens neu generiert (Caplan 1991).

MSC sind multipotente Zellen, die aus Knochenmark und anderen Geweben, wie zum Beispiel Fettgewebe (Zuk et al. 2002), gewonnen werden können. MSC stammen von mesenchymalem Gewebe ab (Caplan 1991) und können sich in unterschiedliche Zelllinien weiterentwickeln. Durch eine Forschungsgruppe um Dominici et al. wurden drei minimale Anforderungen an MSCs definiert (Dominici et al. 2006).

1. Adhärentes Wachstums in Kulturflaschen
2. Expression von CD105, CD73 und CD90 bei ≥ 95 % der MSC Population, wohingegen sie für die Marker CD45, CD14 oder CD11b, CD79a oder CD19 und HLA-II negativ sind
3. Potential zur Differenzierung zu Adipozyten, Chondrozyten und Osteoblasten

In der Lichtmikroskopie präsentieren sich die MSC typischerweise als spindelförmige, eher flache und langgestreckte Zellen.

Durch den permanent stattfindenden Umbau der Knochenstruktur hat der Knochen ein Leben lang einen gewissen Grundbedarf an funktionsfähigen Osteoblasten. Diese entstehen durch eine osteogene Differenzierung aus MSC. Für die Differenzierung von MSC zu Osteoblasten im adulten Körper sind komplexe Regulationsmechanismen notwendig. In diesen Prozessen spielen viele unterschiedliche Wachstumsfaktoren eine Rolle (Komori et al. 1997). Ausgangspunkt der osteogenen Differenzierung sind MSC. Diese entwickeln sich unter dem Einfluss eines Transkriptionsfaktors, welcher auf der sex determining region Y (SRY-) box 9 codiert wird, (Sox9) zu osteochondronalen Progenitorzellen. Zu diesem Zeitpunkt können sich die Vorläuferzellen sowohl in

Osteoblasten als auch in Chondrozyten differenzieren. Durch den Einfluss osteoblastenspezifischer Transkriptionsfaktoren verläuft die Differenzierung der Progenitorzellen weiter Richtung reifer Osteoblasten. Einer dieser Faktoren ist Runt-related transcription factor 2 (Runx2). Durch eine spezifische Bindung von Runx2 und Aktivierung von Genabschnitten für Osteocalcin und andere osteoblastenspezifische Hormone kommt es zur Differenzierung von Osteoblasten (Karsenty 2008). Um nur zwei der wichtigsten Transkriptionsfaktoren der osteogenen Differenzierung zur nennen. Dieser Prozess umfasst eine Vielzahl von Faktoren und Zell-Zell-Interaktionen.

Zur Hauptaufgabe der Osteoblasten gehört die Bildung von Knochen, die sogenannte Osteogenese. Die Entwicklung von Osteoblasten und damit einhergehende Neubildung von Knochen Verläuft in 3 Phasen ab. Der erste Schritt umfasst die Proliferationsphase. Es kommt zur Zellvermehrung noch nicht reifer Osteoblasten unter Einwirkung von Zellzyklus- und zellulärer Wachstumsfaktoren. Die Möglichkeit der Proliferation nimmt dabei mit steigender Differenzierung immer weiter ab, sodass ein Übertritt in die zweite Phase erreicht wird. Hier kommt es zu steigenden Konzentrationen von alkalischer Phosphatase (ALP), wodurch die Matrixreifung möglich ist. Mit zunehmender Differenzierung und osteoblastischem Phänotyp der Zellen nehmen spezifische osteogene Differenzierungsmarker wie ALP, Osteocalcin und Osteopoetin zu. Dies ermöglicht die Einleitung der dritten Phase, der Mineralisation (Owen et al. 1990).

Dieser Übergang in die nächste Phase geschieht zum einem über die Bildung von Kollagen zum anderen über die Regulation der Mineralisation und Beeinflussung der Osteoklastenfunktion. Für die Mineralisation sind von Osteoblasten abgeschnürte Vesikel ein wichtiger Bestandteil und Initiator. Diese Matrixvesikel werden von der Oberflächenmembran von Osteoblasten abgetrennt. Die ALP ist ein membrangebundenes Enzym, welches zusammen mit zum Beispiel (z. B.) verschiedenen Phospholipiden und Kollagen Typ X Bestandteil dieser Vesikel ist (Orimo 2010).

Die Osteoklasten dagegen sind darauf spezialisiert mineralisierte Matrix abzubauen. Diese mehrkernigen Riesenzellen entstehen aus Monozyten des Blutes und Makrophagen (Boyle et al. 2003). Reguliert werden diese Umbauprozesse zum einen durch mechanische Beanspruchung und zum anderen durch unterschiedliche Regulatorproteine und Hormone (Manolagas 2000). Osteoprotegerin (OPG) ist als eins dieser Regulatorproteine zu nennen. OPG ist ein basisches Glykoprotein und wird unter anderem von Osteoblasten synthetisiert (Udagawa et al. 2000). Es konnte gezeigt werden, dass OPG die Differenzierung von Osteoklastenvorläuferzellen in Osteoklasten hemmt. Zudem konnte ein positiver Einfluss von Östrogen auf die Synthese von OPG

nachgewiesen werden (Hofbauer et al. 1999), sodass ein Zusammenhang zwischen sinkender Knochenmasse und Östrogenmangel bei postmenopausalen Frauen hergestellt werden kann. Um beispielsweise die regulierenden Hormone in den Knochen zu transportieren, sind die im Knochen befindlichen Gefäße wichtig, die einen essentiellen Bestandteil der Kommunikation zwischen Knochen und dem restlichen Körper herstellen (Plotkin et al. 1999).

1.3 Alkalische Phosphatase

Die alkalische Phosphatase gehört zu einer Gruppe von Enzymen, die ubiquitär im menschlichen Körper vorkommen (Goldstein et al. 1982). Sie können Phosphorsäureester dephosphorylieren, sodass Ethanol und Phosphat entsteht. Es gibt verschiedene genetisch kodierte Isoformen der ALP, die nach der Translation durch Glykosylierung weiter modifiziert werden. Im menschlichen Körper werden vier Isoformen voneinander unterschieden. Die Plazenta-ALP (Knoll et al. 1988), Keimzell-ALP (Chang et al. 1980), Interstitielle-ALP (Henthorn et al. 1988) und die nicht gewebsspezifische ALP (NTALP). Zu den NTALP zählen vor allem die Unterformen aus Leber, Niere und Knochen (Weiss et al. 1988). Diese Unterformen entstehen durch spezifische Glykolysierungsprozesse. Die größten Vorkommen an NTALP weisen Dünndarm, Leber, Gallenwege, Knochen und Niere auf. Im Blut gemessene ALP stammt vor allem aus Knochen und Leber. Zu Rate gezogen werden kann die ALP als Laborparameter, wenn der Verdacht auf eine Stoffwechselstörung von Leber, Galle oder Knochen besteht. Viele Erkrankungen können zu Veränderungen des Serumspiegeles von ALP führen. Bei Osteoporose (Swaminathan 2001), Knochentumoren oder auch einer Leberzirrhose kann es zu erhöhten laborchemischen Werten der ALP im Serum kommen. Wohingegen eine Erniedrigung der Serumwerte auf eine Hypothyreose deuten kann. In besonderen Situationen, wie dem Wachstum oder einer Schwangerschaft, müssen die Referenzwerte angepasst werden, da hier die ALP durch den erhöhten Stoffwechsel meist kompensatorisch erhöht ist. Die Funktion der unspezifischen ALP wurde bereits relativ früh erkannt und ein Zusammenhang zwischen Mineralisation der Knochenmatrix und ALP hergestellt (Harris 1989). Gezeigt werden konnte, dass die ALP ein sensitiver Marker für die Aktivität der knochenbildenden Osteoblasten darstellt (Dresner-Pollak et al. 1996). Zudem spielt die ALP eine wichtige Rolle in der Osteogenese. Um Knochen bilden zu können, müssen sowohl anorganische als auch organische Bestandteile vorhanden sein. Dabei übernimmt die ALP unter anderem die Synthese und Bereitstellung von anorganischen Bestandteilen, wie Phosphat, das

essentiell für die Mineralisation ist (Orimo 2010). Für die Mineralisation akkumulieren Hydroxyapatitkristalle zwischen Kollagenfibrillen, sodass ALP eine essentielle Rolle in der Mineralisierung des Knochens einnimmt.

Verwendung findet der Nachweis von ALP z. B. bei in vitro Versuchen mit osteogen differenzierten MSC. Denn um eine Differenzierung von MSC zu aktiven Osteoblasten zu beurteilen, gibt es unterschiedliche Differenzierungsmarker. Darunter zum Beispiel ALP aber auch Kollagen Typ 1 oder Osteopontin (Aubin 1998).

Für die Mineralisation und Entstehung neuen Knoches jedoch sind nicht nur intrazelluläre Vorgänge wichtig, sondern unter anderem auch eine ausreichende vaskuläre Versorgung notwendig.

1.4 Gefäßversorgung des Knochens, Angiogenese und Endothelzellen

Kommt es zum Wachstum aus einem bestehenden Kapillarbett heraus, also zur Ausdehnung des Gefäßsystems, wird dies als Angiogenese bezeichnet (Risau 1997). Auch im Rahmen der Frakturheilung kommt es zu einem solchen Prozess. Damit ist die Angiogenese Teil von physiologischen Prozessen, wie zum Beispiel der Wund- oder Frakturheilung (Folkman and Shing 1992). Aber auch von pathologischen Prozessen, wie der Tumorentstehung (Li et al. 2018).

Endothelzellen bilden im menschlichen Körper die innerste Auskleidung des Gefäßsystems. Diese Auskleidung wird als Intima bezeichnet und setzt sich aus einschichtigem flachem Plattenepithel, den Endothelzellen, zusammen. Die Hauptfunktion des Endothels ist die Bildung einer Barriere zwischen Blut und umliegendem Gewebe. Dabei ist je nach Organ die Durchlässigkeit des Endothels unterschiedlich. Die Blut-Hirn-Schranke ist durch kontinuierliches Endothel besonders dicht (Schneeberger 1984), wohingegen die Barriere in der Leber durch diskontinuierliches Endothel sogar für Zellen passierbar ist. Zudem spielen Endothelzellen eine wichtige Rolle in der Blutgerinnung. Zum einen durch die Synthese des von Willebrand Faktors (vWF), zum anderen durch die Aktivierung der Gerinnung bei Endothelschäden.

Die Vaskularisierung des Knochens spielt eine entscheidende Rolle für die Versorgung mit Nährstoffen und den Transport von Botenstoffen an den entsprechenden Zielort. Auch werden so Stamm- und Progenitorzellen versorgt, die sich im Knochen befinden und sowohl die Osteogenese als auch die Hämatopoese regulieren.
Je nach Bedarf und Lokalisation zeigen die vorliegenden Blutgefäße im Knochen

unterschiedliche Charakteristika. Unterschieden werden zwei Arten von Kapillaren, die den Knochen versorgen und aus vorgeschalteten größeren Arterien hervorgehen. Im Bereich der Metaphyse und des Knochenwachstums dominieren sogenannte Typ-H Kapillaren. Diese weisen eine hohe Expression von Endomucin und Cluster of Differentiation 31 (CD31) auf und stehen in engem Kontakt mit Vorläuferzellen des Knochens. Unter anderem erfolgt die Synthese von Wachstums- und Stimulationsfaktoren für den Knochen in Endothelzellen der Typ-H Kapillaren (Maes et al. 2014). Typ-L Kapillare hingegen weisen geringe Mengen von Endomucin und CD31 vor. Diese übernehmen die Hauptversorgung der Diaphyse und des Knochenmarkes. Bei Typ-L Kapillaren handelt es sich um Gefäße mit diskontinuierlichem Endothel, sodass ein enger Kontakt mit den umgebenden hämatopoetischen Vorläuferzellen besteht (Kusumbe et al. 2014).

Im Alter aber auch bei Erkrankungen mit Verlust der Knochensubstanz, wie zum Beispiel der Osteoporose, konnte gezeigt werden, dass vor allem ein Rückgang der Typ-H Gefäße eintritt. Durch die verminderte Anzahl der vorliegenden Typ-H Gefäße wird der mögliche Austausch mit den umliegenden Knochenvorläuferzellen verringert.

Damit zeigt sich im Knochen nicht nur eine enge räumliche Nähe von Osteogenese und Hämatopoese, sondern auch eine gegenseitige Regulation. Dabei spielen viele unterschiedliche endokrine Wege eine Rolle. Einer dieser Wege läuft über den Oxygenierungsgrad des Blutes und damit einhergehender Hypoxie der Endothelzellen bei Minderversorgung. In den Endothelzellen wird als Folge der Hypoxie der Hypoxie-induzierte Faktor (HIF) stärker exprimiert. HIF als Transkriptionsfaktor zählt zu den Initiatoren für die Frakturheilung. Dieser Faktor hat als typische Zielgene unter anderem Erythropoetin und *vascular endothelial growth factor* (VEGF) (Semenza 2012). Zum einen zeigt sich eine erhöhte Knochenmasse bei erhöhten HIF-Konzentrationen. Zum anderen konnte eine erhöhte Gefäßdichte im Rahmen der gesteigerten VEGF-Konzentrationen gezeigt werden (Wang et al. 2007).

Es konnte gezeigt werden, dass HIF einen positiven Einfluss auf die Synthese anderer proangiogener Faktoren hat, aber auch stimulierend auf die Typ-H Kapillaren wirkt. Im Umkehrschluss hat diese stimulierende Wirkung durch den engen Kontakt einen Effekt auf Osteoprogenitorzellen, der durch die Typ-H Kapillaren aufgebaut wird.

Im Rahmen einer Fraktur kommt es durch die enge Verbindung zeitgleich zu einer Verletzung von Blutgefäßen und des Knochens, sodass für eine Frakturheilung sowohl beschädigte Blutgefäße als auch Knochengewebe regeneriert werden muss. Ein durch die Fraktur verursachtes Hämatom initiiert eine Entzündungsreaktion in diesem Bereich.

Chemotaktische Anreize führen zu einer Koinvasion von Endothelzellen und MSC. Quellen der MSC sind vor allem das Perichondrium und Periost (Maes et al. 2013).

Um die Angiogenese in Zellkulturversuchen entsprechend untersuchen zu können, müssen passende Zelllinien verwendet werden. Immortalisierte humane dermale mikrovaskuläre endotheliale Zellen (HMEC) gehören zur Gruppe der Endothelzellen und haben entsprechend das Potential der Angiogenese. Untersuchungen in vitro gestalten sich oft durch eine kurze Lebensspanne und anspruchsvolle Isolations- und Kultivierungsbedingungen mit Endothelzellen erschwert. Um diese Schwierigkeiten zu umgehen, wurde die Zelllinie der HMEC eingeführt. Isoliert aus der Vorhaut von Neugeborenen, wurden die Zellen gewonnen (Kubota et al. 1988) und anschließend genetisch modifiziert. Durch die Modifikation mit dem Simian Virus 40 konnte eine Immortalisierung der Zellen ohne Verlust ihrer typischen Eigenschaften hervorgerufen werden (Ades et al. 1992). Zu den Eigenschaften zählen unter anderem das typische Wachstum in einer Einzelschicht mit kopfsteinpflasterartiger Morphologie der Zellen, sowie die Expression und Sekretion von vWF (Ades et al. 1992).

1.5 Der von Willebrand Faktor

Erstmalig in Erscheinung trat der vWF durch Forschungen des Finnen Eric von Willebrand um 1926. Dieser beschrieb Auffälligkeiten einer Familie im Hinblick auf die Sterblichkeit, in Zusammenhang mit einer bis dahin unbekannten Blutungsneigung. 1933 erweiterte er seine Forschungen rund um das Thema mit Hilfe des deutschen Rudolf Jürgens, sodass die von ihnen untersuchte Blutungsneigung nach den beiden Forschern als von Willeband-Jürgens-Erkrankung benannt wurde. Aber erst dem Forscherteam um Margareta Blombäck et al. gelang es 1957 den zuvor unbekannten vWF zu identifizieren.

Der vWF ist ein körpereigenes multimeres Glykoprotein, das eine wichtige Rolle in der Blutgerinnung einnimmt. Gebildet wird der Faktor von Endothelzellen (Jaffe et al. 1974) und Megakaryozyten (Nachman et al. 1977). Das Protein ist mit einem Gewicht von 500 bis 20.000 Kilodalton (kDa) ein großer Komplex, der als Multimer unterschiedlicher Größe vorliegt. Der Größenunterschied kommt durch eine variable Anzahl an Untereinheiten zustande, die sich zu einem Multimer zusammensetzten. Gespeichert wird das Protein in sogenannten *Weibel-Palade-Bodies* (Wagner et al. 1982) in den Endothelzellen, der subendothelialen Matrix und den Thrombozyten. Die zwei Hauptfunktionen des Proteins sind zum einen der Schutz von antihämophilem Globulin A, auch Faktor VIII genannt, vor dem proteolytischen Abbau (Weiss et al. 1977) und zum

anderen initiiert es die Adhäsion von Thrombozyten als wichtiger Bestandteil der Hämostase. Komplexe mit einem hohen Molekulargewicht übernehmen eher die Aufgabe der Hämostase und Komplexe mit einem niedrigeren Gewicht binden Faktor VIII. Kommt es zu einem Defekt oder einem Mangel an vWF, ist die Willebrand-Jürgens-Erkrankung die Folge. Epidemiologisch gesehen ist dieser Mangel beziehungsweise (bzw.) Defekt die häufigste Form der Blutungsneigungen. Die Erkrankung verläuft häufig asymptomatisch, kann jedoch auch durch Beeinflussung des Faktors VIII mit Gelenkeinblutungen imponieren oder in schweren Fällen durch petechiale Einblutungen bei gestörter Thrombozytenaggregation auffällig werden. Unterschieden werden angeborene von erworbenen Formen. Erworbene Formen können zum Beispiel durch hämato-onkologischen Erkrankungen ausgelöst werden. Die angeborene Formen wird unterteilt in Typ I-III, wobei Typ I mit rund 80 % die häufigste Form darstellt (Sadler et al. 1994). Von Bedeutung wird der vWF für diese Arbeit durch die Möglichkeit Endothelzellen zu detektieren, da sie vWF synthetisieren und an das Medium abgeben (Jaffe et al. 1974).

1.6 *Brain-derived neurotrophic factor* (BDNF)

Die Erstbeschreibung des *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) gelang Braden et al. im Jahre 1978 (Barde et al. 1978). Die erste Isolation des Faktors wurde 1982 aus dem Gehirn von Schweinen möglich (Barde et al. 1982). Schon hier konnte gezeigt werden, dass BDNF einen Einfluss auf das Überleben von neuronalen Zellen haben kann. Produziert wird der körpereigene Faktor in großen Teilen des Zentralen Nervensystems, wie dem Großhirn, Kleinhirn aber auch im Hippocampus (Ernfors et al. 1990; Hofer et al. 1990). BDNF gehört als einer von 5 Subtypen zur Klasse der Neurotrophine. Diese sind kleine basische Proteine, die als Übermittler zwischen Neuronen fungieren. Durch die mögliche Verknüpfung von Neuronen über die Neurotrophine sind diese unter anderem ein wichtiger Bestandteil der Gedächtnisbildung. Aufgebaut ist das Neurotrophin, das zur Gruppe der neuronalen Wachstumsfaktoren gehört, aus basischen homodimeren Proteinen (Rosenthal et al. 1991). Neurotrophine wirken an zwei Typen von membrangebundenen Rezeptoren. Zum einen an p57 Neurotrophin-Rezeptor (p57NTR), ein Rezeptor gehörend zu der Gruppe der Tumornekrosefaktor-Rezeptoren. Über diesen Rezeptor können alle 5 Subtypen der Neurotrophine eine Apoptose einleiten, jedoch haben die Neurotrophine eine geringe Affinität zu diesem Rezeptor. Eine höhere Affinität haben die Neurotrophine zur Klasse der Tyrosinkinase Rezeptoren, welche in 3 Subtypen unterteilt werden. BDNF beispielsweise bindet an die

Tyrosinrezeptorkinase B (TrkB) (Soppet et al. 1991). Als Nervenwachstumsfaktor ist BDNF mit beteiligt an der Entwicklung des ZNS, der Differenzierung und der Regeneration neuronaler Zellen (Kaisho et al. 1991; Kalcheim and Gendreau 1988; Middlemas et al. 1999). Durch die Rezeptoren werden unterschiedliche intrazelluläre Signalkaskaden angestoßen, um die gewünschten Effekte zu erzielen. In Zellkulturversuchen konnte gezeigt werden, dass BDNF nicht nur auf neuronale Zellen, sondern auch auf Osteoblasten Einfluss hat. In der Kokultur von Osteoblasten mit BDNF produzierenden Schwann-Zellen wurde von einer erhöhten Proliferation, Differenzierung und Mineralisation der Osteoblasten berichtet (Cai et al. 2010). Es stellte sich heraus, dass in der Kokultur im Vergleich zur Monokultur eine deutlich höhere BDNF Konzentrationen vorlag (Wang et al. 2021). Auch in vivo konnte gezeigt werden, dass BDNF einen positiven Einfluss auf den Knochen hat. Zum Beispiel förderte BDNF durch TrkB die VEGF Freisetzung aus Osteoblasten, wodurch die Angiogenese im Frakturspalten erhöht wurde (Zhang et al. 2017). Zusätzlich fördert die Signalkaskade über die Bindung an TrkB die vermehrte Expression von Runx2 und Osterix. Runx2 und Osterix stellen beide wichtige osteogene Transkriptionsfaktoren dar, die die osteogene Differenzierung fördern und stimulieren.

1.7 Fragestellung

Die Osteoporose als vorwiegende Erkrankung des Alters rückt bei zunehmendem Altersdurchschnitt immer weiter in den Vordergrund der Medizin. Durch ein gestörtes Gleichgewicht von Knochenauf- und Abbau kommt es bei der Osteoporose zur Entstehung von minderwertiger Knochenqualität. Auf zellulärer Ebene ist hier unter anderem das Zusammenspiel von osteogenen Zellen und Endothelzellen wichtig. Gezeigt werden konnte bereits, dass die Angiogenese und Osteogenese eng miteinander verbunden sind und sich gegenseitig stark beeinflussen und regulieren.

Vor diesem Hintergrund stellte sich in Bezug auf die Osteoporose die Frage, ob das Zusammenspiel von Angiogenese und Osteogenese durch Anpassung der Ausgangsbedingungen zu einer positiven Beeinflussung führen kann. Bereits in unterschiedlichen Versuchen konnte die positive Verbindung zwischen dem körpereigenen Protein BDNF und Endothelzellen gezeigt werden. Auch ein positiver Einfluss auf die Frakturheilung durch den Effekt auf Osteoblasten und Endothelzellen konnte bestätigt werden.

Wodurch sich die Frage stellt, ob und wenn in wie weit BDNF Endothelzellen in einem Kokultursystem aus Endothelzellen und osteogen differenzierten MSC beeinflusst. Zusätzlich gilt es zu klären, ob das verwendete BDNF sich nicht nur positiv auf die Endothelzellen auswirkt, sondern auch auf die verwendeten MSC. Und vor allem, ob es in diesem Rahmen der Differenzierung einen Unterschied zwischen osteoporotischen und knochengesunden Knochenzellen gibt.

Zu klären galt im Rahmen dieses Versuchsaufbaues, ob BDNF in Zukunft zur Verbesserung osteoporotischer Beschwerden, der Frakturheilung bei osteoporotischen Patienten oder vWF als prädiktiver Marker verwendet werden kann.

Zur Beantwortung dieser Fragen wurde ein Kokultursystem aus osteogen differenzierten MSC und Endothelzellen entwickelt.

Zur Beurteilung wurden nach Abschluss des Zellversuches die ALP-Aktivität und das Gesamtprotein in der ZK bestimmt. Als Marker für die Endothelzellen wurde ein vWF-ELISA etabliert und verwendet.

Möglicherweise kann durch einen positiven Einfluss von BDNF auf die Angiogenese und Osteogenese, das Osteoporoserisiko gesenkt oder eine neuartige Therapieform der Osteoporose etabliert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Zelllinien, Zellkultur und Kokultursystem

Für den Zellversuch wurden zum einen primäre Zellkulturen (ZK) mit enthaltenen MSCs und zum anderen HMEC verwendet. Vor der Verwendung der humanen Zelllinien wurde ein Ethikantrag gestellt und vor Beginn lag eine entsprechende Genehmigung (AZ 74/09) vor. Die Gewinnung der MSCs erfolgte durch das Labor der experimentellen Unfallchirurgie der Justus-Liebig-Universität durch intraoperativ gewonnene Proben. Nach Extrahierung der primären Zelllinien aus den intraoperativ angefallenen Restprodukten entstanden keine MSC Reinkulturen. Die gewonnen ZK lagen als Mischkulturen aus multipotenten Stromazellen mit bekanntem Gehalt an MSCs vor. In der anschließenden Arbeit wurde die vorliegende Mischkultur zur Vereinfachung der Nomenklatur als MSC bezeichnet. Die benötigten Proben fielen z. B. bei endoprothetischen Versorgungen der Hüfte an. Intraoperativ wurde der Hüftkopf entnommen und durch eine Prothese ersetzt. Das Restprodukt, beispielhaft der Hüftkopf (Abbildung 1) wurde steril entnommen und dem Labor für experimentelle Unfallchirurgie zur Verfügung gestellt. Zur weiteren Verarbeitung der Probe wurde die enthaltene Spongiosa steril entnommen, gewaschen, einem Verdauungsschritt und der Eryhtrolyse unterzogen, gefiltert, erneut gewaschen und letztendlich in das vorbereitete Kulturmedium überführt. Das Kulturmedium bestand aus MesenPro RS (Life Technologies, Carlsbad, USA), 10 % Fetal Bovine Serum ES (FBS, PAN-Biotech, Aidenbach, Deutschland), 1 % GlutaMAX (Life Technologies, Carlsbad, USA) und 1 % 100x Penicillin-Streptomycin (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Es erfolgte die Inkubation für mindestens 5 Tage oder bis zum Erreichen einer Konfluenz von 80 % bis zur weiterführenden Verwendung der gewonnenen Zelllinie. Verwendung fanden die MSC bis maximal zur 10. Passage. Die zweite humane Zelllinie, welche Verwendung in der vorliegenden Arbeit hatte, wurde durch das deutsche Krebsforschungszentrum, Translationale Immunologie, Im Neuenheimer Feld 280, 69120 Heidelberg unter Leitung von Reinhard Schwartz-Albiez in Form von wurden immortalisierte humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen (HMEC) zur Verfügung gestellt.

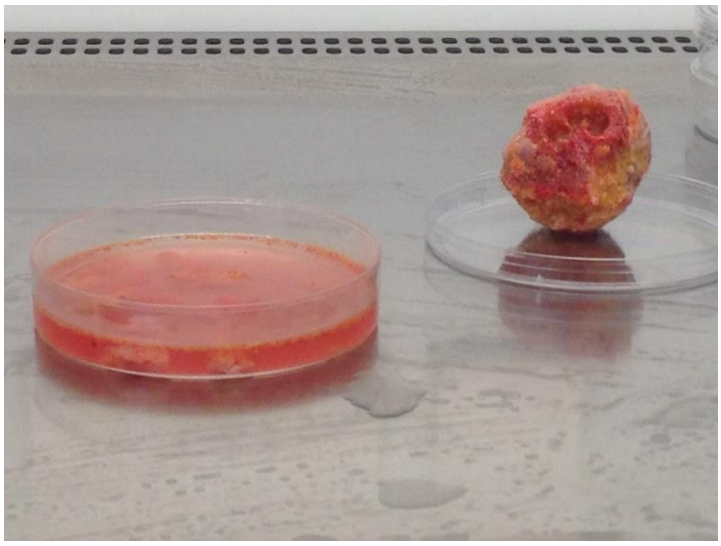

Abbildung 1: Intraoperativ entnommener Hüftkopf zur Gewinnung von MSC.

Nach Kultivierung der zwei Zelllinien in den jeweiligen Monokulturen wurde nach osteogener Differenzierung der MSC die Kokultur etabliert.

Jegliche Arbeiten an der ZK wurde unter sterilen Bedingungen unter Verwendung einer Werkbank Heraeus LaminAir HB2448 (Heraeus, Hanau, Deutschland) durchgeführt. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden jeweils Paare von Zelllinien gebildet, sodass jede osteoporotische ZK ein knochengesundes Gegenstück hatte. Bei der Bildung der Paare wurde darauf geachtet, dass die ZK von Probanden ähnlichen Alters und Geschlechts stammen. Insgesamt wurde mit einer Anzahl von 5 Paaren, also zehn unterschiedlichen ZK gearbeitet.

Tabelle 1: Verwendete humane, multipotente Stromazellen.

	Osteoporotische ZK	Knochengesunde ZK
1+2	ZK 71, weiblich (W) 1935, Erkrankungen: Osteoporose Entnahme: Schenkelhalsfraktur	ZK 48, W 1949 Entnahme: primäre Coxarthrose
3+4	ZK 70, W 1952, Erkrankungen: Osteoporose Entnahme: Coxarthrose	ZK 84, W 1959 Entnahme: Coxarthrose

5+6	ZK 69, W 1942, Erkrankungen: Osteoporose Entnahme: Pseudarthrose pretrochantärer Femur	ZK 94, W 1930 Entnahme: Coxarthrose
7+8	ZK 74, W 1931, Erkrankung: Osteoporose Entnahme: Radiusfraktur	ZK 37, W 1934 Entnahme: Implantation Hüft-TEP
9+10	ZK 112, W 1945, Erkrankungen: Osteoporose Entnahme: Implantation Hüft-TEP	ZK 109, W 1940 Entnahme: Implantation Hüft-TEP

W: weiblich, TEP: Totalendoprothese

a) Kultivierung MSC und osteogene Differenzierung

Vor einer möglichen osteogenen Differenzierung musste die primär gewonnene Mischkultur kultiviert werden.

Die MSC, welche in Stickstofftanks gelagert werden, galt es vor Verwendung aufzutauen und in entsprechende Kulturflaschen (Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich) zu überführen. Zum Auftauen der Zellen wurden die entsprechenden Reaktionsgefäße mit den enthaltenden Zellen für maximal 2 Minuten (min) in ein Wasserbad mit einer Temperatur von 37 Grad Celcius (°C) gegeben. Vor dem Prozess des Auftauens galt es die Zellkulturflaschen mit Kulturmedium vorzubereiten. Zusammengesetzt wurde das Kulturmedium aus folgenden Bestandteilen: MesenPro RS, 2 % MesenPRO RS Growth Supplement (Life Technologies), 20 % FBS ES, 1 % GlutaMAX (Life Technologies), 0,2 % Gentamicin/Amphotericin B 500x (Thermo Fisher Scientific).

Von dem Kulturmedium wurden jeweils 15 Milliliter (mL) in eine Kulturfalsche gegeben und für mindestens 30 min in einem Brutschrank mit 37°C und 6 % CO_2 inkubiert. Anschließend erfolgt die Inkubation der Zellen in den vorbereitet Kulturflaschen.

Ab einer Konfluenz von ca. 90 % wurden die Zellen mittels Trypsin-EDTA (Thermo Fisher Scientific) aus der Flasche gelöst und mit 20.000 Zellen pro Quadratzentimeter (cm^2) auf die Wellplatten (Greiner Bio-One International GmbH) aufgetragen. Zur Bestimmung der Zellzahl wurde ein Cell Counter Casy Modell TTC (OMNI Life Science, Bremen, Deutschland) verwendet. Zuvor wurde auf die 24-Wellplatte in die entsprechenden Wells jeweils 1 mL osteogenes Medium gegeben, um die Differenzierung zu induzieren. Das osteogene Medium setzte sich zusammen aus: Dulbeccos Modified Eagle Medium

(DMEM low Glu, PAN-Biotech, Aidenbach, Deutschland) mit 10 % FBS (Biochrom, Berlin, Deutschland), 10^{-7} M Dexamethason (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), $5x10^{-5}$ M Natrium-L-Ascorbat (Sigma-Aldrich), 10^{-2} M β-Glycerolphosphat-Hydrat (Sigma-Aldrich), 0,2 % Gentamicin/Amphotericin B 500x (Thermo Fisher Scientific), 10^{-7} M Vitamin D_3 (Sigma-Aldrich), 1,5 x 10^{-3} M Calciumchlorid (PromoCell, Heidelberg, Deutschland).

Der Mediumwechsel folgte alle 3 Tage. Endpunkt der osteogenen Differenzierung war Tag 10.

b) Kultivierung HMEC

Zur Vorbereitung auf die Kokultur wurden die HMEC 3 Tage vor ihrer Aussaat in die Wellplatte angezüchtet. Für die Aussaat der nicht adhärenten HMEC wurden die Zellkulturflaschen mit Attachment Faktor (Thermo Fisher Scientific) vorbehandelt. Nach einer Einwirkzeit von 30 Minuten wurde der Attachment Faktor wieder aus der Kulturflasche entfernt und durch das entsprechende Kulturmedium ersetzt. Das Kulturmedium bestand aus folgenden Komponenten: MCDB 131 Medium für humane mikrovaskuläre Endothelzellen (Thermo Fisher Scientific), 5 % Microvascular Growth Supplement (MVGS, Thermo Fisher Scientific), 5 % *heat-inactivated* FBS (hiFBS, Biochrom), 0,2 % Gentamicin/Amphotericin B 500x. Nach Beimpfung der Kulturflaschen wurden diese in einen Inkubator mit einer Temperatur von 37°C und einem CO_2-Gehalt von 5 % gegeben.

c) Kokultursystem

Für die Kokultur erfolgte die Anpassung des verwendeten Kulturmediums. Das osteogene Medium wurde durch HMEC-Medium ersetzt, jedoch mit $CaCl_2$ und Vitamin D_3 angereichert. Es wurden 80.000 HMEC-Zellen pro Well ausgesät. Die Zellzahl wurde experimentell durch den in Kapitel 2.2 beschriebenen Vorversuch bestimmt. Die Kokulturen wurden in Kontroll- und Probengruppe geteilt und erhielten je nach Gruppenstatus 20 ng/mL BDNF (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA).

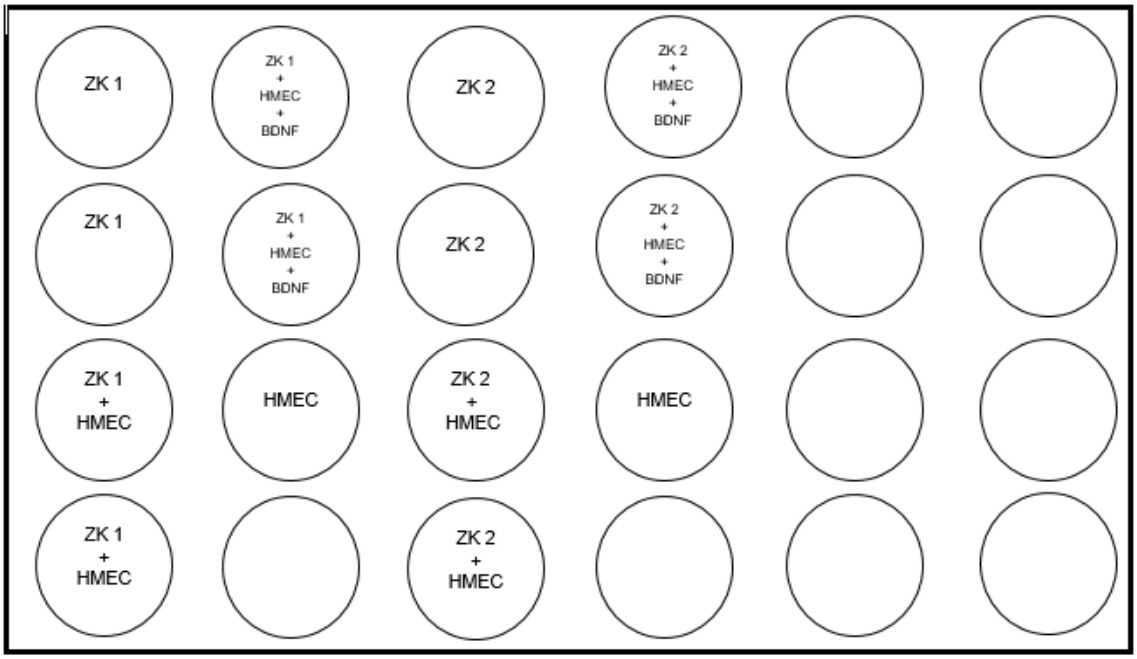

Abbildung 2: Plattenbelegung Hauptversuch. ZK 1 = osteoporotische Zellkulturen, ZK 2 =knochengesunde Zellkulturen

Das Kokultursystem wurde weiterhin in dem Brutschrank mit 37°C und 5 % CO_2-Gehalt kultiviert. Bis zum Versuchsende, das entweder nach 3 oder 5 Tagen war, wurde das Medium nicht mehr gewechselt. Die Überstände und die Wellplatten wurden mit dem jeweiligen Zellrasen separat nach Versuchende bei -80°C eingefroren, um für die folgenden Versuche konserviert zu werden.

2.2 Versuchsaufbau

Um das für das Experiment vorgesehene Kokultursystem aus HMEC und MSC etablieren zu können, waren Vorversuche zur Planung notwendig.

Durchgeführte Vorversuche:

- Zellzahlbestimmung HMEC
- Konzentrationsreihe BDNF

a) Zellzahlbestimmung

Um die Zellzahl der HMEC für das Kokultursystem zu bestimmen, wurden die HMEC nach folgendem Schema auf die Wellplatten verteilt.

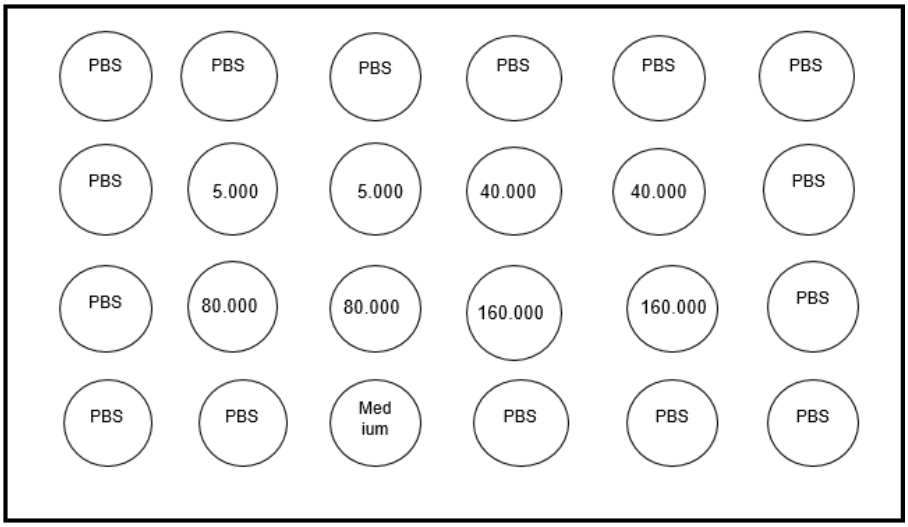

Abbildung 3: Plattenbelegung zur Zellzahlbestimmung HMEC.

Zur Überprüfung der bestmöglichen Zellzahl wurde nach 3 und 5 Tagen jeweils der Überstand abgenommen und das Medium mittels vWF-ELISA (RayBiotech, Peachtree Corners, USA) getestet.

b) Konzentrationsreihe BDNF

Um die benötigte Menge an BDNF (Sigma Aldrich) zu ermitteln, die in dem gewählten Kokultursystem zu Reaktionen führt, wurde folgender Versuchsaufbau gewählt. Auf eine 24-Wellplatte wurden jeweils Kokulturen aus MSC und HMEC gegeben. Hier wurde bereits mit einer knochengesunden und einer osteoporotischen ZK gearbeitet. Für den Vergleich wurde jeweils ein Well mit den 3 Monokulturen angelegt.

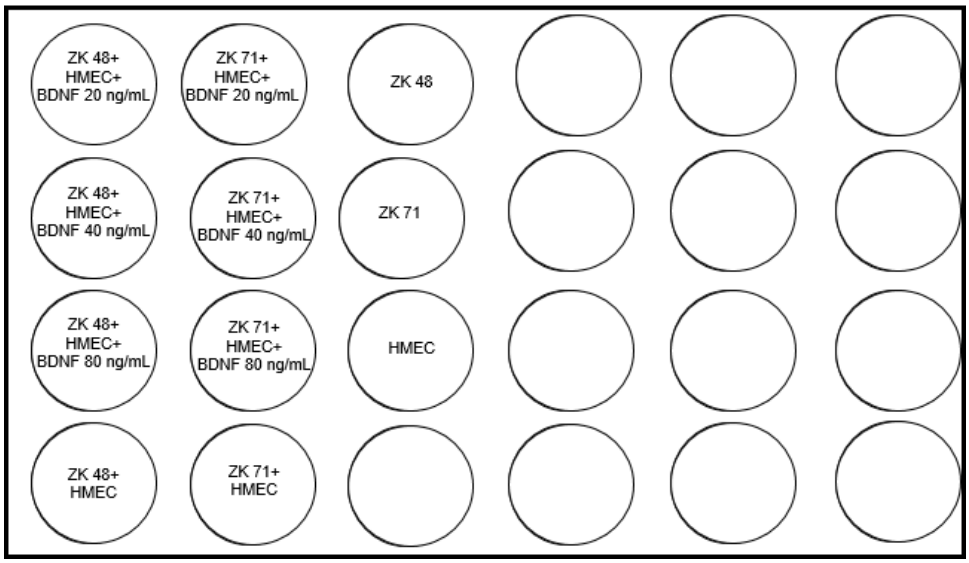

Abbildung 4: Konzentrationsreihe zur Bestimmung der benötigten Menge an BDNF.

Ab dem 10 Tag des Versuches wurden in die einzelnen Wells unterschiedliche Konzentrationen an BDNF gegeben. Die Monokulturen wurden als Kontrollen angelegt, hier wurde kein BDNF hinzugefügt. Nach 3 bzw. 5 Tagen im Kokultursystem wurde jeweils der Überstand abgenommen und die vWF-Konzentration mittels vWF-ELISA bestimmt.

2.3 Durchgeführte Methoden

2.3.1 Lichtmikroskopie und Lebendzellbeobachtung

Zur Dokumentation und Beobachtung des Zellwachstums wurde die Methode der konventionellen Lichtmikroskopie gewählt. Durchgeführt wurde die Mikroskopie mit einem Zeiss Axiovert 10 (Carl Zeiss Microscopy Deutschland GmbH, Oberkochen, Deutschland). Zur Dokumentation wurden jeweils am Tag 0, 4, 10, 13 und 15 Bilder in unterschiedlichen Vergrößerung gemacht. Anschließend wurden die Bilder mit dem Computerprogramm ImageJ (Rasband, W.S., ImageJ, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, USA) mit Maßstäben versehen, sowie die Helligkeit der Bilder angepasst.

2.3.2 Immunofluoreszenzfärbung

Zur optischen Darstellung der Auswirkungen von BDNF auf das Kokultursystem wurde die Methode der Immunofluoreszenzfärbung verwendet. Nach standardisierter osteogener Differenzierung und Anzucht der HMEC wurde die 24-Wellplatte wie folgt belegt:

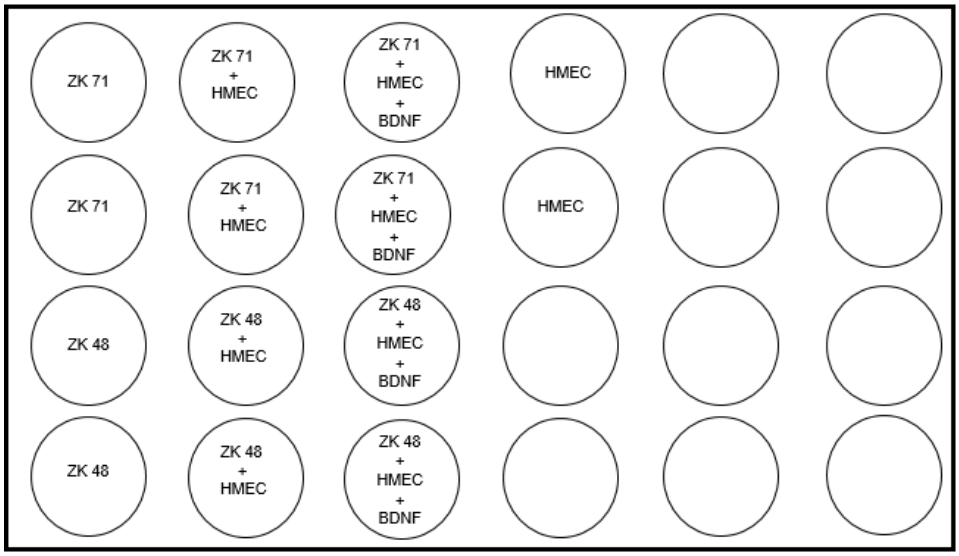

Abbildung 5: Plattenbelegung der Immunofluoreszenzfärbung. Es wurden 20 ng/mL BDNF hinzugefügt.

Mit Vollendung des 10. Tages der osteogenen Differenzierung wurden sowohl die HMEC mit einer Zellzahl von 5.000 pro cm² als auch das BDNF zum Zellsystem hinzugefügt. Insgesamt wurde das Kokultursystem weitere 5 Tage inkubiert.

Für die Immunofluoreszenz wurden die oben beschriebenen ZK am fünften Tag ihrer Inkubationszeit weiter verarbeitet. Hierfür wurde zunächst das Zellmedium vorsichtig abgetragen. Der verbliebene Zellrasen wurde mittels 4°C kalter phosphatgepufferter Kochsalzlösung (1 % PBS, Thermo Fisher Scientific) gespült. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt. Im nächsten Schritt zur Fixierung des Zellrasens erfolgte die Inkubation mit 4°C kalter 4 % Paraformaldehydelösung (PFA) für 10 Minuten. Der Ansatz der Fixationslösung wurde hergestellt aus 1 g PFA, welches in 25 mL PBS gelöst wurde. Nach abgelaufener Inkubationszeit wurden das PFA abgesaugt und der Zellrasen dreimal mit 4°C kaltem PBS gespült. Anschließend wurde der Zellrasen mit Triton-X 100 (0,1 %, Merck, Darmstadt, Deutschland) gelöst, in PBS benetzt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss erfolgte erneut die dreimalige Spülung des Zellrasens mit 4°C kaltem PBS.

Für diese Färbung wurde zunächst vWF Antikörper (AK, Merck Millipore, Billerica, USA) in die Wells pipettiert und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Gelöst wurde der AK in einem Blockierungspuffer aus bovinem Serumalbumin (5 % BSA; Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) und PSB in einem Verhältnis von 1:100. Durch diesen Schritt wird der in den ZK vorhandene vWF markiert und später in der Mikroskopie sichtbar. Nach der einstündigen Inkubation wurde der Überstand vorsichtig abgetragen und der Zellrasen erneut dreimal vorsichtig mit kaltem PBS gewaschen. Als nächstes

folgte die Zugabe von einem biotinylierten Sekundärantikörper (E0453, Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland). Auch dieser AK wurde in 5 % BSA/PBS gelöst. Anschließend folgte eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur. Es folgte ein weiterer Waschgang mit kaltem PBS, welcher dreimalig wiederholt wurde. Im nächsten Schritt erfolgte die Zugabe von mit Phycoerythrin konjugiertem Osteocalcin-AK in einem Verhältnis von 5:100 in 5 % BSA/PBS (R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA). Die Wellplatte wurde erneut für eine Stunde inkubiert. Erneute schloss sich ein Waschvorgange mit PBS an. Es folgte die Zugabe von mit Streptavidin konjugierten DyLight649 Antikörpern 1:100 in 5 % BSA/PBS (BioLegend Inc., San Diego, USA) und Tetramethylrhodamin B isothiocyanat-Phalloidin-Konjugat (1 % Phalloidin-TRITC) (Sigma Aldrich). Nach der Zugabe wurde die Platte im Dunklen für weitere 40 Minuten inkubiert. Um fortfahren zu können, musste der Zellrasen erneut vorsichtig gewaschen werden. Es folgt die Zugabe des Kernfarbstoffes Höchst33258 (1 % in PBS, Sigma Aldrich). Angeschlossen wurde eine 15 minütige Inkubationszeit im Dunklen mit Wiederholung des Waschvorganges. Der gewonnene Zellrasen wurde mit ProLong Gold Eindeckmittel (Thermo Fisher Scientific) abschließend eingedeckelt.

Nachdem die oben genannten Schritte durchgeführt wurden, zeigten sich die verwendeten AK in unterschiedlich farblichen Fluoreszenzen. Hierbei erschien das an der Doppelstrang Desoxyribonukleinsäure (DNS) gebundene Höchst33258 blau. Hervorgehoben wurden durch diese Färbung vor allem die Zellkerne der Zellen. Das verwendete Phalloidin färbte Aktinfilamente in den Zellen und präsentierte sich durch eine graue Färbung. Der Osteocalcin AK verband sich mit zellulärem Osteocalcin und zeigte sich grün. DyLight649 präsentierte sich rot und bindet an das über vWF-AK und den biotinylierten Sekundärantikörper markierte vWF-Protein.

2.3.3 Proteinbestimmung

Zur Bestimmung des Gesamtproteingehaltes wurde das Bio Rad DC™ Protein Assay (Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, Deutschland) verwendet.

Zur Vorbereitung der Proteinbestimmung wurde zunächst ein Lysispuffer aus 1 % Triton-X-100 und PBS angesetzt. Um das 2 %-ige Arbeitsreagenz herzustellen, wurde die im Kit vorliegende Tensidlösung (20 µL Reagenz S) mit der alkalischen Kupfer-Tartrat-Lösung (1 mL Reagenz A) gemischt. Wichtig für die spätere Auswertung war die Standardreihe. Diese wurde mittels Stammlösung aus dem Kit, BSA und Lysispuffer

hergestellt. Durch Verdünnung entstand folgende Standardreihe: 3 mg/mL, 1,5 mg/mL, 0,75 mg/mL, 0,375 mg/mL, 0,188 mg/mL und 0,094 mg/mL.

Für die Proteinbestimmung wurde der Überstand aus den entsprechenden Wells vorsichtig abgesaugt und in 500 µL Reaktionsgefäße pipettiert. Der freiliegende Zellrasen wurde vorsichtig mit 1 mL PBS gewaschen. Zur Gewinnung der adhärenten Zellen wurden 250 µL Lysispuffer in jedes Well gegeben und 10 min inkubiert. Das Lysat wurde in Reaktionsgefäße überführt und zentrifugiert. Auf eine 96-Wellplatte (Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich) wurden jeweils 5 µL Probe, Standard oder Hintergrundbestimmung pipettiert. Anschließend folgten jeweils zu den Proben 25 µL Reagenz A und 250 µL Reagenz B (Folin-Lösung). Das verwendete Auslesegerät, Synergy HT *plate reader* (BioTek, Winooski, VT, USA), wertete die Probe gegen die Hintergrundbestimmung bei einer Wellenlänge von 750 nm aus. Als Hintergrundbestimmung wurde der Lysispuffer gewählt.

Für eine bessere Vergleichbarkeit wurden die Proben in 3-fach Bestimmung und die Standardreihe in zweifacher Bestimmung gemessen.

2.3.4 ALP-Kinetik

Zur Bestimmung der ALP-Kinetik wurde das SensoLyte pNPP (p-Nitrophenylphosphat) Alkaline Phosphatase Assay Kit Colorimetric (AnaSpec, Fremont, USA) verwendet.

Zunächst erfolgte die Vorbereitung der notwendigen Reagenzien. Der Lysispuffer aus 1 % Triton-X-100 in PBS wurde angesetzt. Zusätzlich wurde der Assaypuffer auf Raumtemperatur gebracht und mit autoklaviertem Wasser im Verhältnis 1:10 verdünnt. Auch das pNPP Substrat wurde lichtgeschützt auf 30°C erwärmt.

Als Proben galt es wieder den Überstand aus dem bereits lysierten Zellrasen zu verwenden. Für die Kinetik wurde in eine 96-Wellplatte in 3-facher Bestimmung jeweils 40 µL Assaypuffer vorgelegt. Anschließend folgten jeweils 10 µL Probe oder Lysepuffer. In diesem Fall wurde der Lysepuffer als Hintergrundkontrolle verwendet. Nach Erwärmung der Wellplatte im Auslesegerät (Synergy HT *plate reader)* für ca. 15 Minuten wurde zum Schluss noch 50 µL pNPP Substrat hinzugefügt. Anschließend startete die Kinetikmessung bei 405 nm jeweils in dreifacher Bestimmung für 9 Messungen in einem Zeitraum von 45 Minuten mit einem Abstand von jeweils 5 Minuten.

2.3.5 vWF-ELISA

Der vWF ELISA, (RayBio® Human vWF ELISA Kit, RayBiotech, Peachtree Corners, USA), wurde für die Analyse der vWF Konzentration verwendet. Der verwendete ELISA beruht auf dem Prinzip der Kolometrie.
In der Vorbereitung auf den vWF-ELISA wurden alle Reagenzien und Proben auf Raumtemperatur gebracht. Eine im Kit vorhandene Pufferlösung ergab unter fünffacher Verdünnung mit destilliertem Wasser die notwendige Konzentration. Dieser Puffer diente zur Vorbereitung einer Standardlösung für eine Verdünnungsreihe. Für die Verdünnungsreihe wurde zunächst ein im Kit vorhandenes vWF Standardprotein mit 440 µL des Puffers aufgelöst. Daraus ergab sich eine Lösung mit einer Konzentration von 30 ng/mL vWF. Im Anschluss wurde in sieben weitere Reaktionsgefäße jeweils 300 µL Puffer pipettiert. Um die gewünschte Verdünnung zur erhalten, wurden jeweils 200 µL in das nächste Reaktionsgefäß pipettiert und gemischt. Nach diesem Vorgehen ergab sich eine Verdünnungsreihe mit Konzentrationen von 30 ng/mL, 12 ng/mL, 4,8 ng/mL, 1,92 ng/mL, 0,768 ng/mL, 0,307 ng/mL, 0,123 ng/mL und 0 ng/mL (ausschließlich Verwendung von Puffer). Die für die Waschvorgänge nötige Lösung wurde aus 20 mL Konzentrat (Kitkomponente) und 400 mL destilliertem Wasser hergestellt. Vor Verwendung, des mit Biotin konjugiertem AK, wurde dieser 80-fach mit dem im Kit vorliegendem Verdünnungspuffer vorbereitet. Ebenfalls vor Verwendung verdünnt werden musste das mit dem HRP-Enzym gekoppelte Streptavidin. Verwendet wurde zur 600-fachen Verdünnung der vorliegende Verdünnungspuffer.

Die Proben ergaben sich aus dem Überstand der ZK. Zu Beginn des ELISA wurden jeweils 100 µL Standard oder Probelösung in die Wells pipettiert und für 2,5 Stunden bei Raumtemperatur und leichtem schütteln inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Überstand entfernt und die Wells sechsmal mit jeweils 500 µL der vorbereiteten Waschlösung gewaschen. Nach dem letzten Waschvorgang wurde der Überstand entfernt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 100 µL biotinyliertem vWF-Antikörper pro Well. Eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur unter leichtem schütteln wurde angeschlossen. Wieder wurde der Überstand entfernt und die Wells, wie zuvor beschrieben, gewaschen. Nach dem Waschvorgang erfolgte die Zugabe von 100 µL enzymgekoppeltem Streptavidin (mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelt) mit anschließender Inkubationszeit von 45 Minuten bei Raumtemperatur und leichtem schütteln. Wieder wurden die Wells gewaschen. Im nächsten Schritt wurden jeweils 100 µL 3,3´,5,5´-Tetramethylbenzidin (TMB) Lösung in die Wells pipettiert und im Dunklen für weiter 30 Minuten inkubiert. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurde in die Wells jeweils 50 µL Fixierlösung hinzugefügt. Es folgte die direkte Bestimmung der

Absorptionswerte im Auslesegerät (Synergy HT *plate reader)* bei einer Extinktion von 450 nm. Teil der mitgelaufenen Standardreihe war eine Hintergrundbestimmung, die lediglich aus Puffer bestand. Die Standardreihe zeigte sich in allen Testungen kongruent zu den erwartenden Ergebnissen, sodass von einer erfolgreichen Testung ausgegangen werden konnte.

2.3.6 Statistik

Die durch die Experimente gesammelten Datensätze wurde mit Hilfe des Statistik-Programms SPSS (IBM SPSS Statistics for Windows, Version 25.0. Armonk, NY: IBM Corp.) ausgewertet. Die ermittelten Daten für die Konzentrationen von vWF, ALP und Gesamtprotein wurden hinsichtlich ihrer Verteilung mittels Kolmogorov-Smirnov-Test geprüft und als nicht normal verteilt bewertet. Anschließend wurden mittels des nicht-parametrischen Tests nach Kruskal-Wallis vWF, ALP, Gesamtprotein und ALP bezogen auf Gesamtprotein verglichen. Danach erfolgte der paarweise Vergleich mit anschließender Bonferroni-Korrektur. Im Anschluss wurde der nicht-parametrische, unabhängige Mann-Whitney-U-Test für den Vergleich von 2 Stichproben angewendet. Für den Vergleich von der mit BDNF behandelten bzw. unbehandelten Proben wurde ebenfalls der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Mit der gleichen Testung wurden die zwei Endpunkte Tag 3 und Tag 5 des Versuches überprüft. Festgelegt wurde ein Signifikanzniveau von $p = 0,05$ und ein Konfidenzintervall von $p = 0,95$. Dargestellt wurden die Signifikanzen im Verlauf folgendermaßen: * $p \leq 0,05$, ** $p < 0,01$, und *** $p < 0,001$. Für die graphische Darstellung wurden Boxplots verwendet. In den Graphen zeigten die Boxen die mittleren 50 % aller Werte auf. Entsprechend lagen 25 % der Werte unterhalb der Box, sodass das untere Ende der Box das erste Quartil und das obere Ende der Box mit dem dritten Quartil abschließt. Die durchgezogene Linie in den Boxen hob den Median hervor. Der Median teilte die Werte nach 50 % in zwei Blöcke ein. Die T-förmigen Whisker zeigten die Maximal- bzw. die Minimalwerte an, bleiben jedoch im Rahmen eines 1,5-fachen Interquartilabstandes. Werte außerhalb dieser Rahmenwerte werden als punktförmige bzw. sternförmige Ausreißer dargestellt.

3 Ergebnisse

Um die Auswirkung von BDNF auf das Kokultursystem aufdecken zu können, wurden zunächst die benötigten Kokulturen angelegt. An den Endpunkten konnten die Kulturen mittels ALP-Kinetik, Proteinbestimmung und vWF-ELISA untersucht werden. Zusätzlich, für die visuelle Interpretation des Versuches, erfolgte eine Immunofluoreszenzfärbung. Für die Datenanalyse wurden die gesammelten Ergebnisse in Datensets zusammengefasst und anschließend analysiert.

3.1 Vorversuche

a) Zellzahlbestimmung HMEC

Zur Bestimmung der notwendigen HMEC-Zellzahl wurden auf eine Well-Platte unterschiedlich hohe Konzentrationen an HMEC aufgetragen. Wie im Hauptversuch wurde das Versuchsende auf Tag 3 und 5 festgelegt. Anschließend konnte die jeweilige vWF-Konzentration bestimmt werden. Ziel des Vorversuches war es, die notwendige Menge an HMEC zu bestimmen, um mit dem ausgewählten vWF-ELISA in den Proben vWF nachweisen zu können. Unter Verwendung von 5.000 Zellen pro Well konnte weder an Tag 3 noch an Tag 5 vWF dokumentiert werden. In der nächst höher gewählten Zellanzahl von 40.000 Zellen pro Well konnte lediglich an Tag 5 vWF bestätigt werden, sodass die Verwendung von 5.000 und 40.000 HMEC im Hauptversuch zum Nachweis von vWF ausgeschlossen werden konnte. Wurden 80.000 HMEC pro Well verwendet, konnte vWF zuverlässig sowohl an Tag 3 als auch an Tag 5 nachgewiesen werden. Wie zu erwarten stieg die Konzentration von vWF deutlich mit Verdopplung der Zellzahl auf 160.000 an (Abbildung 6).

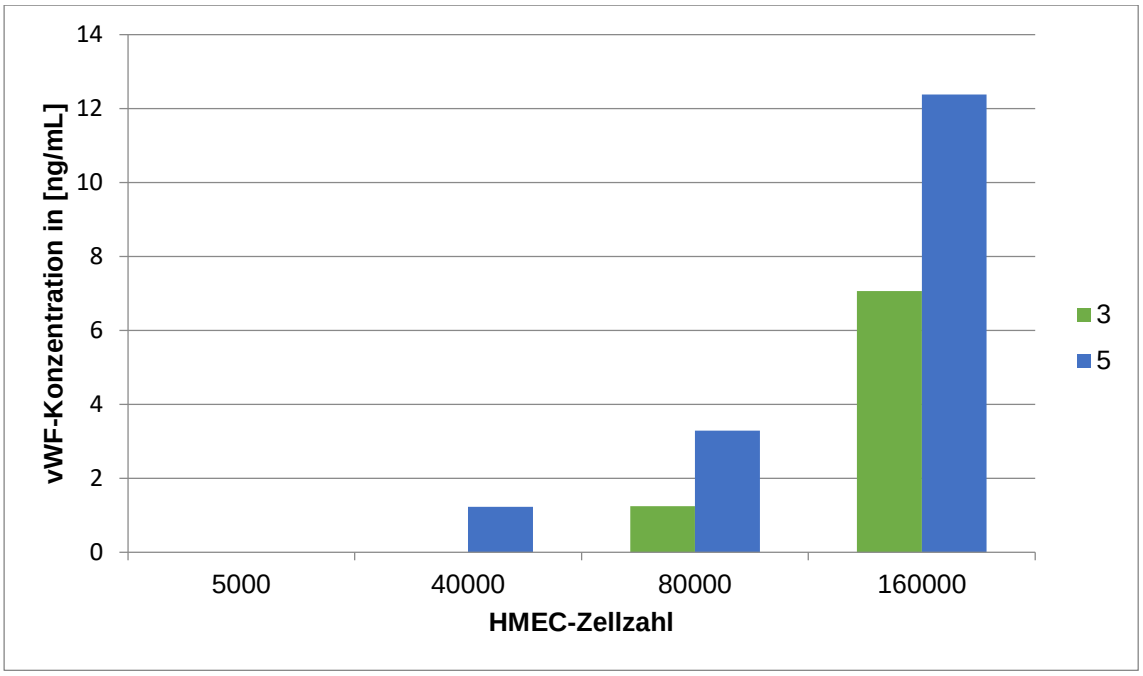

Abbildung 6: Zellzahlbestimmung-HMEC. vWF-Konzentration nach 3 (grüner Balken) und 5 (blauer Balken) Tagen Inkubationszeit und unterschiedlichen Zellzahlen.

Mit den gezeigten Ergebnissen wurde die HMEC-Zellzahl auf 80.000 pro Well festgelegt.

b) Konzentrationsreihe BDNF

Für die Konzentrationsreihe zur Bestimmung der notwendigen BDNF-Konzentration wurde eine Kokultur angelegt. Nach 3 bzw. 5 Tagen in der Kokultur konnte ein vWF-ELISA durchgeführt werden. Für die Konzentrationsreihe wurden 0 ng/mL, 20 ng/mL, 40 ng/mL und 80 ng/mL BDNF verwendet.

Hierbei zeigte sich, dass die Monokulturen aus differenzierten Osteoblasten kein vWF enthalten. Die Kokulturen der osteoporotischen und der knochengesunden Zellreihen zeigten einen deutlichen Anstieg zwischen dem 3. und 5. Tag. Wurden die vWF-Konzentrationen von Tag 3, sowohl von knochengesunden als auch osteoporotischen Kokulturen verglichen, zeigte sich keine erhöhte Expression unter Verwendung von BDNF. Bei den knochengesunden Kulturen waren die Messwerte annähernd konstant, zeigten jedoch eine fallende Tendenz mit steigenden BDNF Konzentrationen an Tag 3. Bei den osteoporotischen Zellen war die vWF Konzentration ohne BDNF sogar höher, als in den Kulturen mit BDNF. An Tag 5 zeigte sich die vWF-Konzentration sowohl in den osteoporotischen als auch in den knochengesunden Kokulturen positiv beeinflusst. Hier konnten vor allem positiv hohe Werte bei der Verwendung von 20 ng/mL BDNF beobachtet werden (Abbildung 7). Sodass für den Versuch, beruhend auf den erhobenen Ergebnissen, 20 ng/mL BDNF als Zusatz ausgewählt wurde.

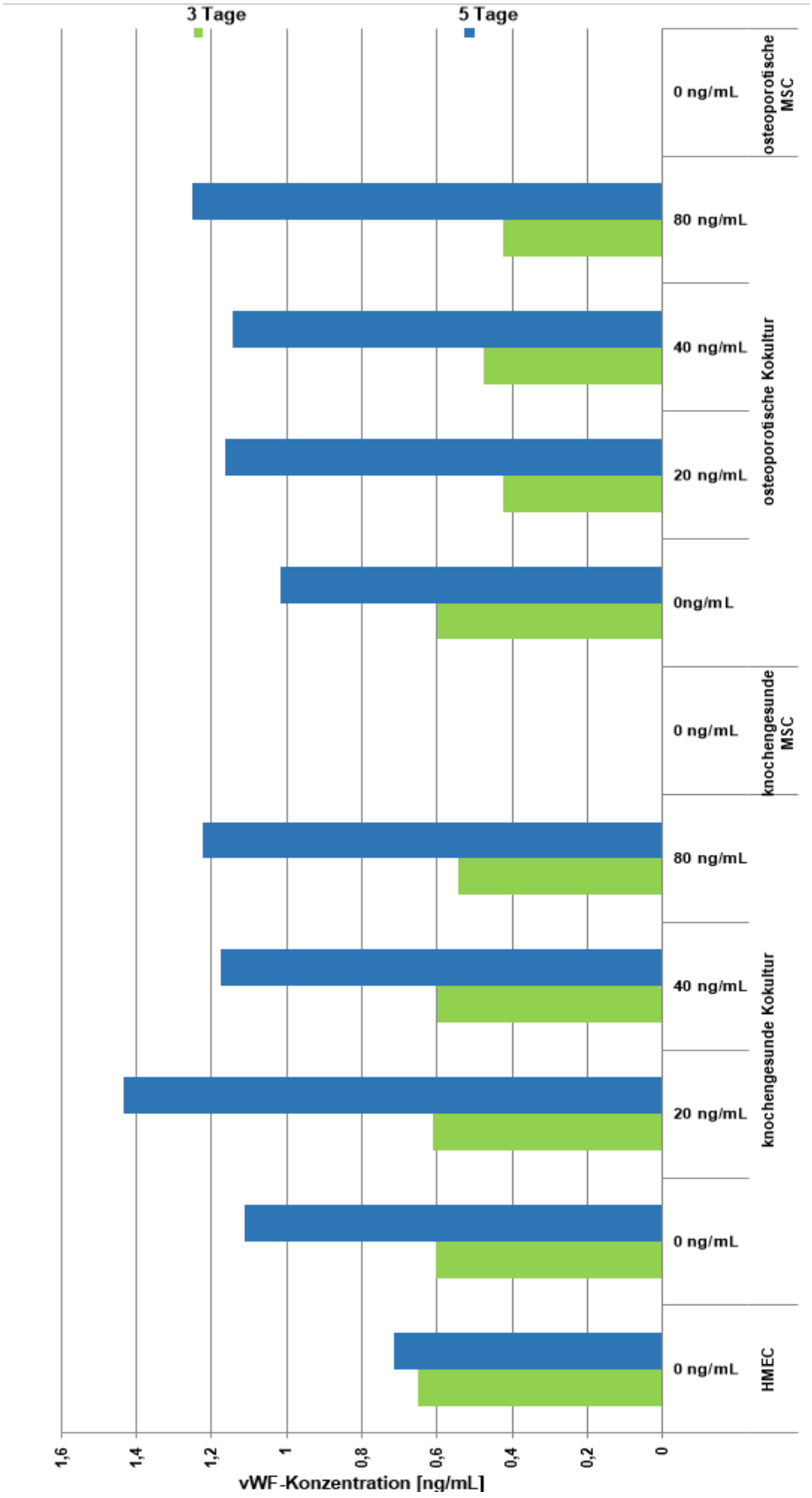

Abbildung 7: vWF ELISA zur Bestimmung der BDNF-Konzentration.

3.2 Lebendzellbeobachtung

Um den Effekt von BDNF auf die Entwicklung von HMEC in der Kokultur mit MSC zu beurteilen, wurden die ZK während ihrer Wachstums- und Entwicklungsphase lichtmikroskopisch beobachtet. Erhoben wurden dabei Bildbefunde in der Zeit der osteogenen Differenzierung und der Kokultur bis zum Ende des Zellversuches.

In dem Zeitraum von der Aussaat der MSC bis zur Etablierung der Kokultur an Tag 10 wurde zunächst lichtmikroskopisch die osteogene Differenzierung der Zellen beobachtet. Am Tag der Aussaat zeigten sich die Zellen charakteristischerweise adhärent, erhaben und in unterschiedlichsten Zellformationen. Beobachtet werden konnten zum Teil kleinere rundliche Zellen bis hin zu langgestreckten, durch mehrere Ausläufer gestaltete Formen der MSC (Abbildung 8 A, B). Eine Abflachung der Zellen mit begleitender Vergrößerung der Zelloberfläche durch zunehmend ausgeprägte Ausläufer mit raueren Oberflächen zeigte sich im zeitlichen Verlauf der Inkubationsdauer (Abbildung 8 C, D). Der Zellrasen nahm lichtmikroskopisch im zeitlichen Verlauf an Dichte nur geringfügig zu. Dies wurde als Zeichen für eine fortschreitende Differenzierung der Zellen gewertet, die mit steigender Differenzierung das Potential zur Proliferation verloren. Ein zusätzlicher Hinweis für die zunehmende Differenzierung der Zellen stellten die vermehrten extrazellulären Bestandteile im Überstand des Mediums dar (Abbildung 8 F), welche als Beginn einer extrazellulären Mineralisierung gewertet wurde. Durch die vermehrten Bestandteile sank die Übersichtlichkeit in der ZK. Die Zellgrenzen konnten nicht mehr eindeutig bestimmt werden.

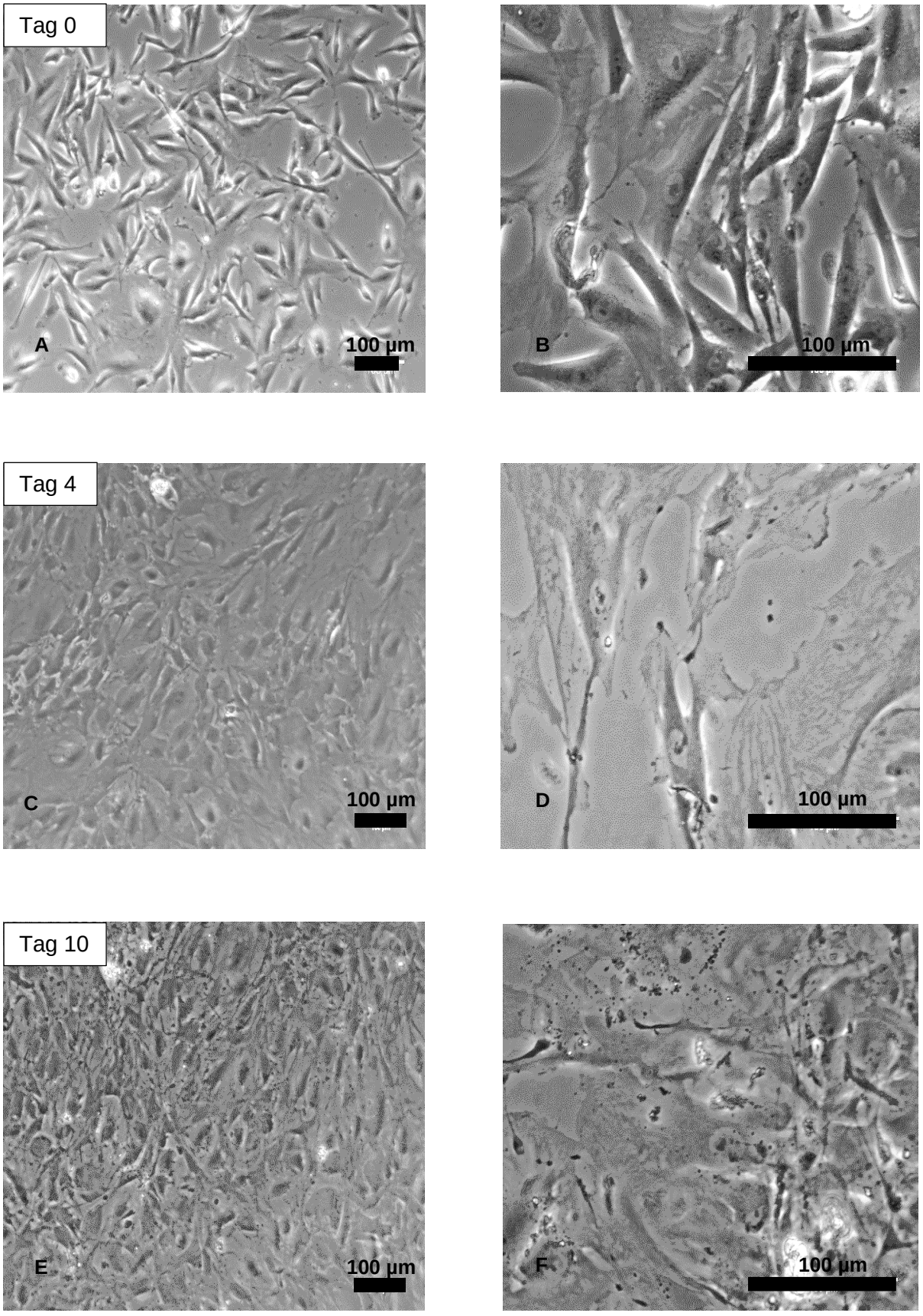

Abbildung 8: Lichtmikroskopie einer osteoporotischen Zellreihe. Osteogene Differenzierung der Zellen an Tag 0 (A, B), 4 (C, D) und 10 (E, F).

Für den Vergleich wurden sowohl knochengesunde als auch osteoporotische Zellreihen lichtmikroskopisch beobachtete. In der Zeit der Differenzierung zeigten sich knochengesunde und osteoporotische Zellreihen nahezu äquivalent. Auch hier konnte eine nur mäßige Proliferation bei zunehmender Differenzierung beobachtet werden (Abbildung 9).

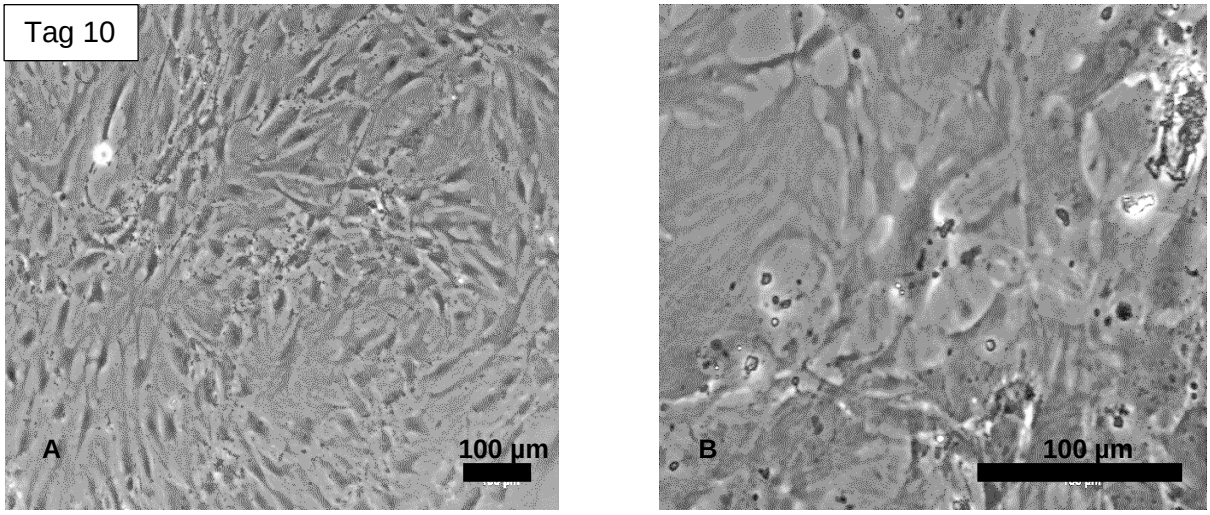

Abbildung 9: Lichtmikroskopie einer knochengesunden Zellreihe im Rahmen der osteogenen Differenzierung an Tag 10. (B) stellt einen Ausschnitt von A in höherer Vergrößerung dar.

Zwischen den ZK verschiedener Spender zeigten sich deutliche Unterschiede in der Entwicklung. Bei einigen der ZK nahm die Proliferationsrate mit steigendem Differenzierungsgrad der MSC stark ab. Wurden Zellen aus Kulturen mit deutlich flauerem Zellrasen mit Kulturen mit dichterem Zellrasen verglichen, dann wurde bei den flaueren Kulturen vermehrt großflächige Zellen mit mehreren Ausläufern ohne relevante Zunahme des Zellrasens im zeitlichen Verlauf beobachtet (Abbildung 10 A). Parallel konnte jedoch eine vermehrte Mineralisation bei zunehmendem Anteil extrazellulärer Bestandteile vermerkt werden (Abbildung 10 B). Diese Beobachtung konnte sowohl bei knochengesunden als auch bei osteoporotischen Zellreihen festgestellt werden.

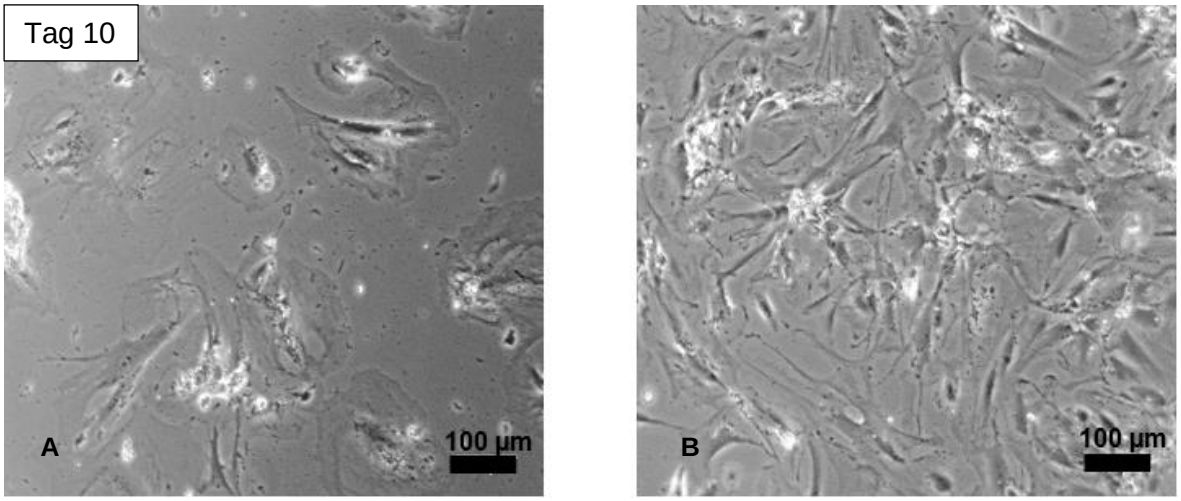

Abbildung 10: Lichtmikroskopie der osteogenen Differenzierung an Tag 10. A: knochengesunde Monokultur und B: osteoporotische Monokultur.

An Tag 10 wurden zur Generierung der Kokultur 80.000 HMEC pro Well zugefügt. Als Kontrolle wurden weiterhin osteoporotische und knochengesunde ZKs als Monokulturen, sowie eine Monokultur aus HMEC mitgeführt. Die verwendeten HMEC waren keine adhärenten Zellen. Eine lichtmikroskopisch sichtbare Adhärenz wurde durch die Verwendung eines Bindungsfaktors bewerkstelligt. Die Zellen zeigten sich nach der Aussaat erhaben, klein und rundlich (Abbildung 11 A). In der Vergrößerung konnte ein prominenter Zellkern in Relation zur Zellmatrix beobachtet werden (Abbildung 11 B). Bei einer Aussaat von 80.000 Zellen am ersten Inkubationstag zeigte sich der Zellrasen bereits an Tag 3 sehr dicht (Abbildung 11 A). Im zeitlichen Verlauf nahm die Dichte des Zellrasens nicht weiter zu. Es zeigten sich immer mehr gelöste Zellen im Medium (Abbildung 11 D mit Pfeil gekennzeichnet), nachdem die für die HMEC typisch Einzelschicht erreicht wurde, sodass bereits nach 5 Tagen Inkubationszeit eine Einschränkung der Proliferation durch Platzmangen sichtbar wurde.

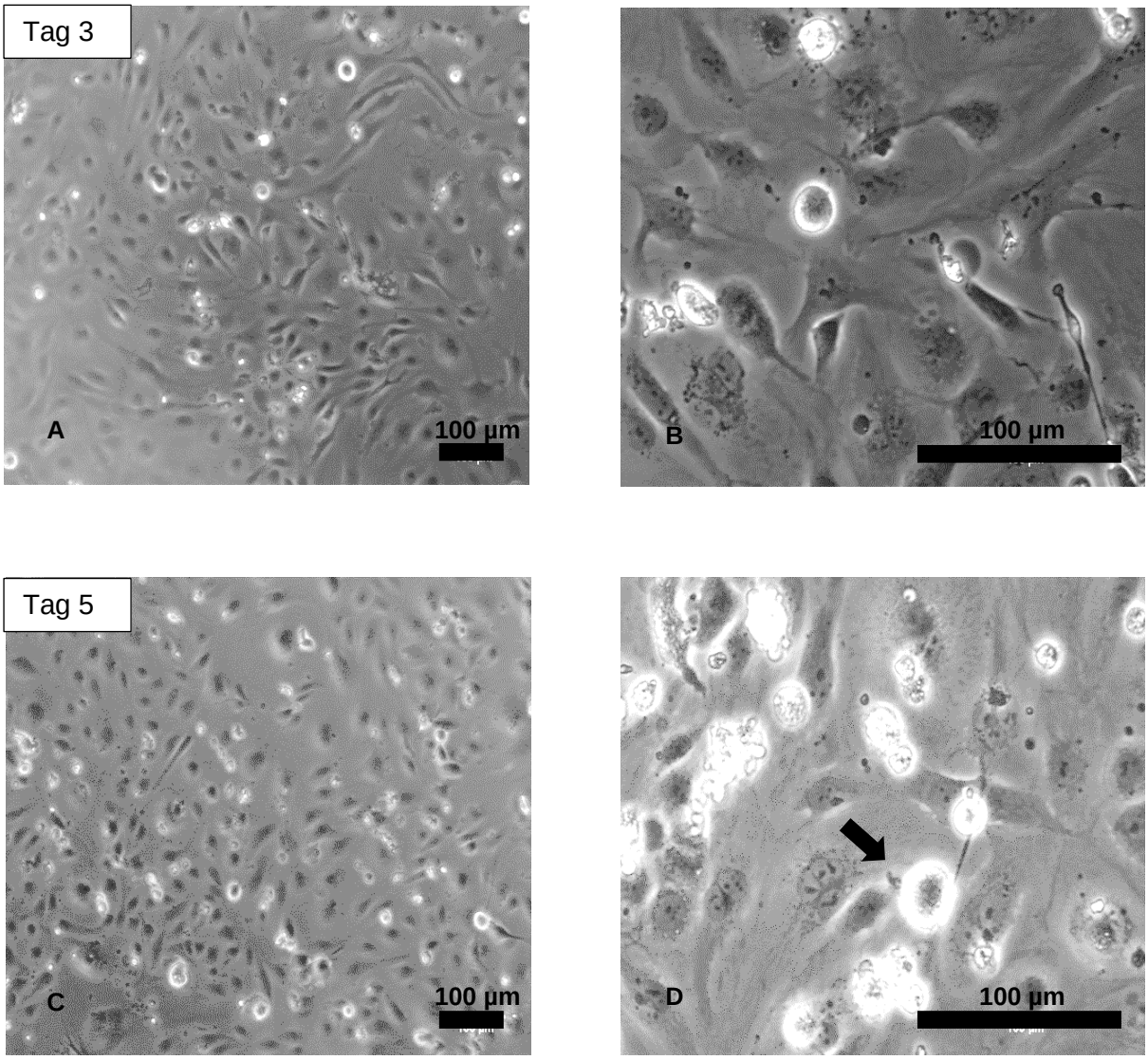

Abbildung 11: Lichtmikrokopie einer HMEC Monokultur. Inkubationszeit von 3 (A, B) und 5 (C, D) Tagen. Durch den Pfeil markierte vom Wellboden gelöste HMEC.

Bei den in den Abbildungen 12 sichtbaren Kokulturen handelte es sich um eine osteoporotische Zelllinie mit Endothelzellen ohne den Zusatz von BDNF. Zu sehen an Tag 3 sowie an Tag 5 waren dichte Zellrasen. Wobei die Zelldichte in den zusätzlichen zwei Tagen Inkubationszeit lichtmikroskopisch weiter anstieg. Die Mineralisation konnte an Tag 13 in der Kokultur noch visualisiert werden (Abbildung 12 B mit einem weißen Pfeil gekennzeichnet). An Tag 15 jedoch zeigte sich das extrazelluläre Mineral weniger offensichtlich. Zum einen könnte dies auf die steigende Zellzahl, zum anderen auf ein überlagerndes Wachstum durch die HMEC zurückzuführen sein (Abbildung 12 D).

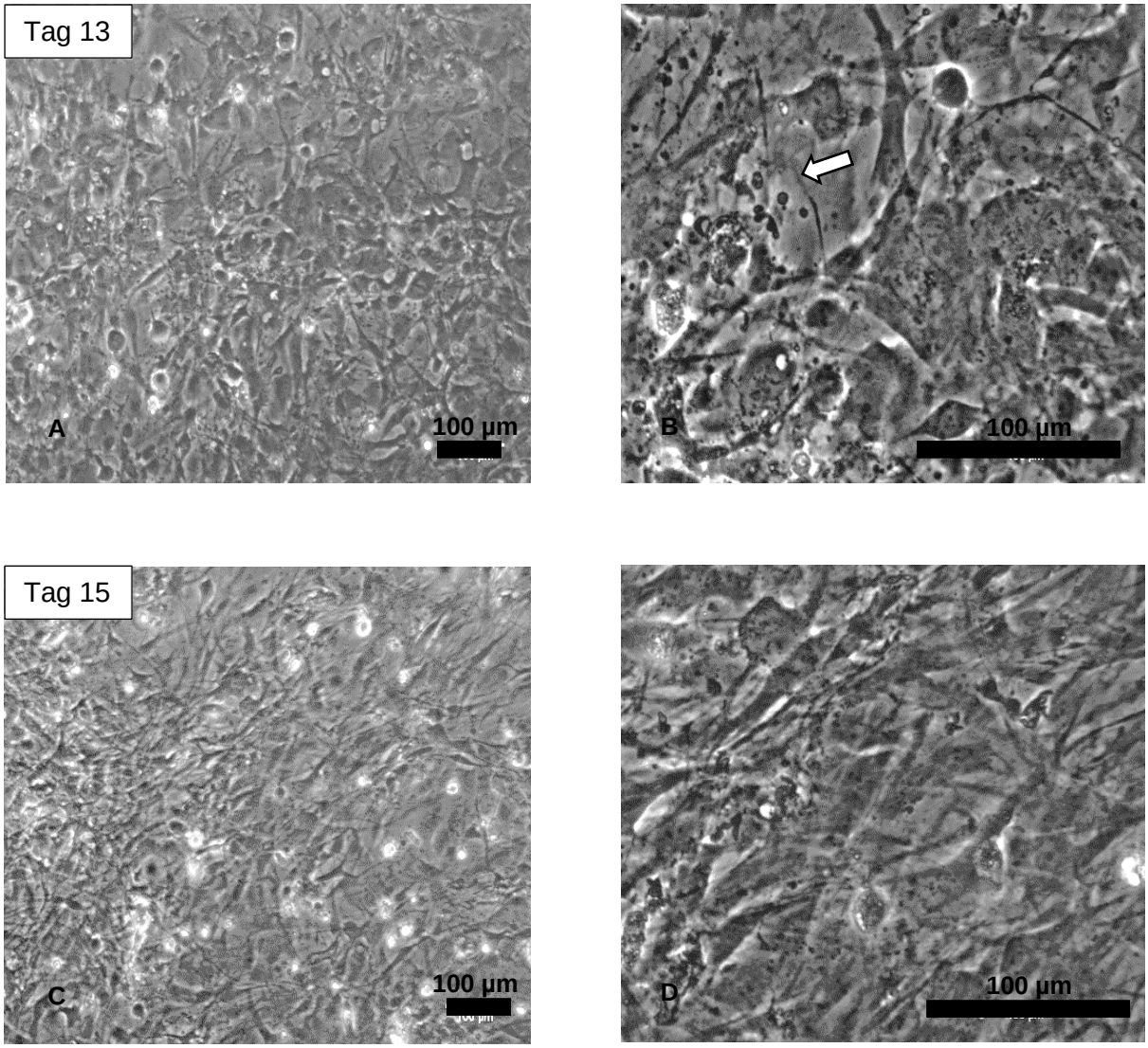

Abbildung 12: Kokultur osteoporotischer MSC und HMEC ohne Zugabe von BDNF. Tag 13 (A, B) und Tag 15 (C, D). Extrazelluläres Mineral durch einen weißen Pfeil gekennzeichnet.

Vergleichend zu den osteoporotischen Kokulturen zeigten sich die knochengesunden Kulturen etwas zellärmer mit der Folge, dass sowohl an Tag 13 als auch an Tag 15 Mineral in Zellkulturmedium sichtbar blieb (Abbildung 13 B, C durch schwarze Pfeile markiert). Wobei auch bei den knochengesunden Kokulturen ein Rückgang des Mineralgehaltes beobachtet werden konnte.

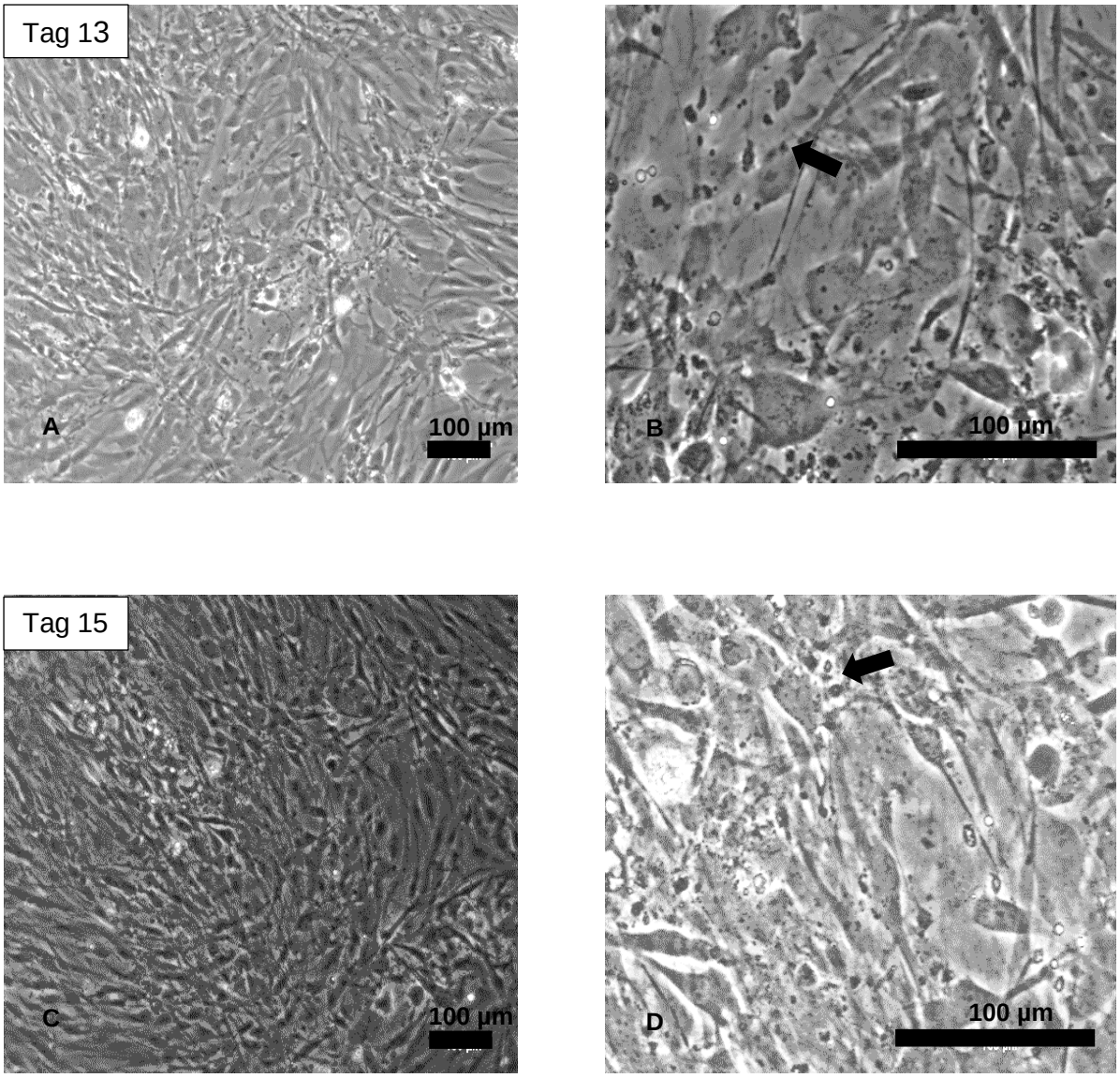

Abbildung 13: Kokultur knochengesunder MSC und HMEC ohne Zugabe von BDNF. Tag 13 (A, B) und Tag 15 (C, D). Extrazelluläres Mineral durch schwarze Pfeile gekennzeichnet.

Unter Verwendung von BDNF zeigte sich zunächst an Tag 13 die Zelldichte zu Kokulturen ohne Zugabe von BDNF weniger dicht. Sowohl an Tag 13 als auch an Tag 15 konnte das extrazelluläre Mineral deutlich aufgezeigt werden (Abbildung 14 C, D). In der kleineren Vergrößerung konnte die Zunahme der Dichte des Zellrasens beobachtet werden, dies wurde auf die vorhandene Proliferationsmöglichkeit der HMEC zurückgeführt (Abbildung 14 C). Bei guter Mineralisation konnte von einer hohen Differenzierung der MSC ausgegangen werden, wodurch im Umkehrschluss die Proliferationsrate der Zellen abnahm.

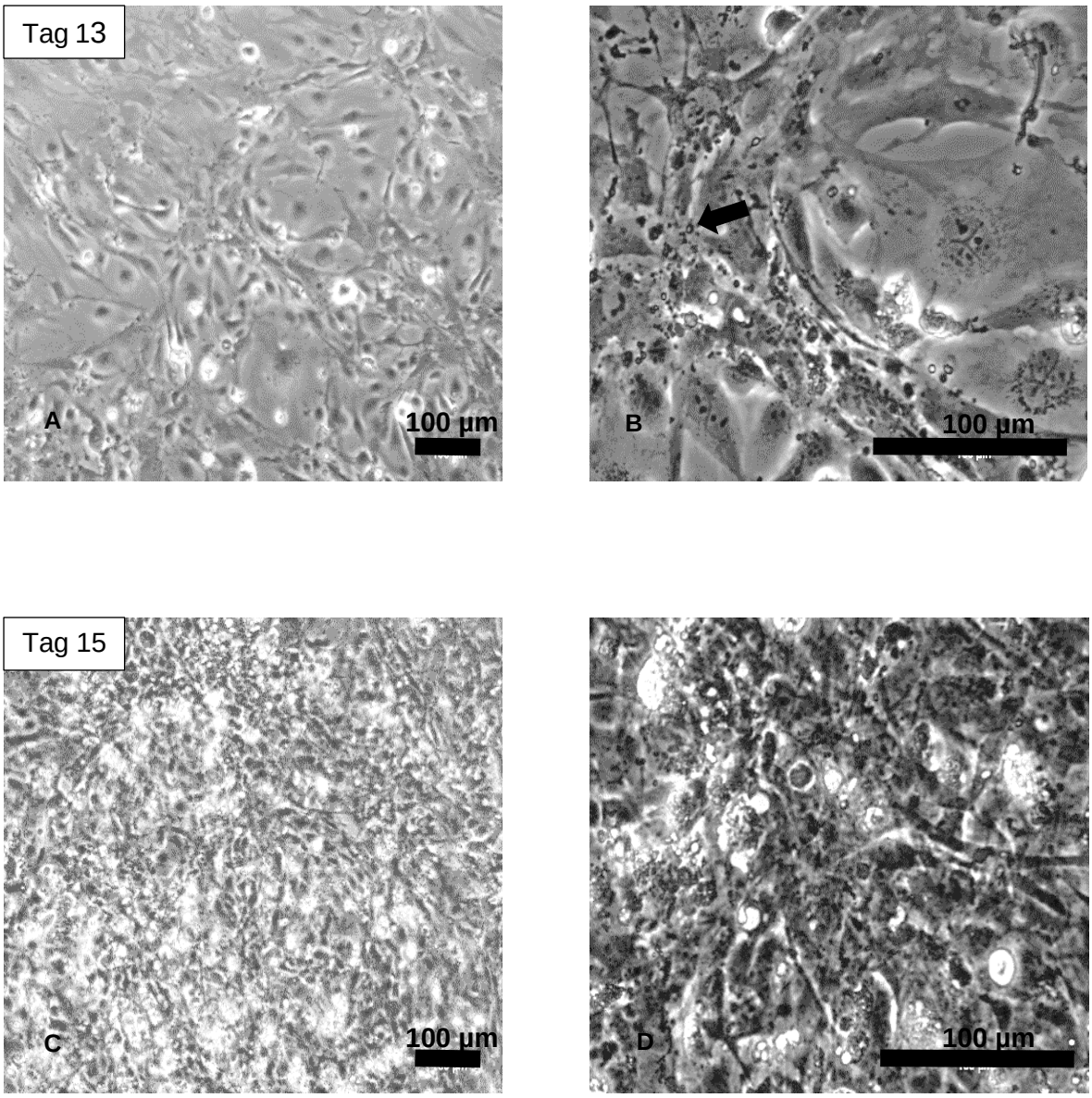

Abbildung 14: Kokultur knochengesunder MSC und HMEC mit Zugabe von BDNF. Tag 13 (A, B) und Tag 15 (C, D). Extrazelluläres Mineral durch schwarzen Pfeil gekennzeichnet.

3.3 Auswertung der Immunofluoreszenzfärbung

Für die Immunofluoreszenzfärbung wurde eine exemplarische Kokultur aus MSC und HMEC an Tag 15 der Inkubationszeit verwendet. Bei allen 4 Kokulturen waren die meisten Zellen durch den Aktin-Antikörper weiß markiert, wobei die Aktinfilamente sich zumeist parallel in den Zellen anordneten, was typisch für proliferierende MSC ist. Auch HMEC weisen Aktinfilamente auf, was eine Unterscheidung nur anhand der Aktinfilamente nicht möglich machte. Lediglich die unterschiedliche Größe und Form konnte Aufschluss auf die vorliegende Zellreihe geben. Bei den knochengesunden Zellen ohne BDNF-Zugabe (Abbildung 15 A) wurden einige wenige rot- bzw. grün-markierte Zellen gefunden, die auf die Präsenz von Osteocalcin-positiven reifen Osteoblasten (rote Markierung) bzw. auf vWF-positive Endothelzellen (grüne Markierung) hinweisen. Nach Zugabe von BDNF war ein Anstieg der Zellzahl durch die blaue Markierung der Zellkerne zu verzeichnen. Es war allerdings keine Zunahme Osteocalcin- und vWF-positiver Zellen zu beobachten (Abbildung 15 B). Die osteoporotische Kultur ohne BDNF wies deutlich weniger Zellen als die Kokultur mit knochengesunden MSC auf, was anhand der blau markierten Zellkerne zu erkennen war (Abbildung 15 C). Die weiß markierten Aktinfilamente deuten große flächige Zellen an, wie sie für adulte MSC bekannt sind. Bei einigen Zellen ist eine schwache rote Markierung zu erkennen, die vermuten lässt, dass einige Zellen Osteocalcin enthalten und sich zu reifen Osteoblasten entwickelt haben. Vereinzelt sind grüne Farbtupfen zu finden, die allerdings keiner Zelle zugeordnet werden können. Nach Zugabe von BDNF hat die Zellzahl der osteoporotischen Kultur stark zugenommen, was für eine Proliferation spricht. Weiterhin wurden viele Aktinfilamente nachgewiesen, die jedoch ohne eindeutige rote bzw. grüne Markierung als Anhalt für reife Osteoblasten bzw. HMEC (Abbildung 15 D). Lediglich indirekte Zeichen der Zelldifferenzierung waren in der Immunofluoreszenzfärbung durch die im Medium sichtbaren grünen und roten Akzente zu vermerken.

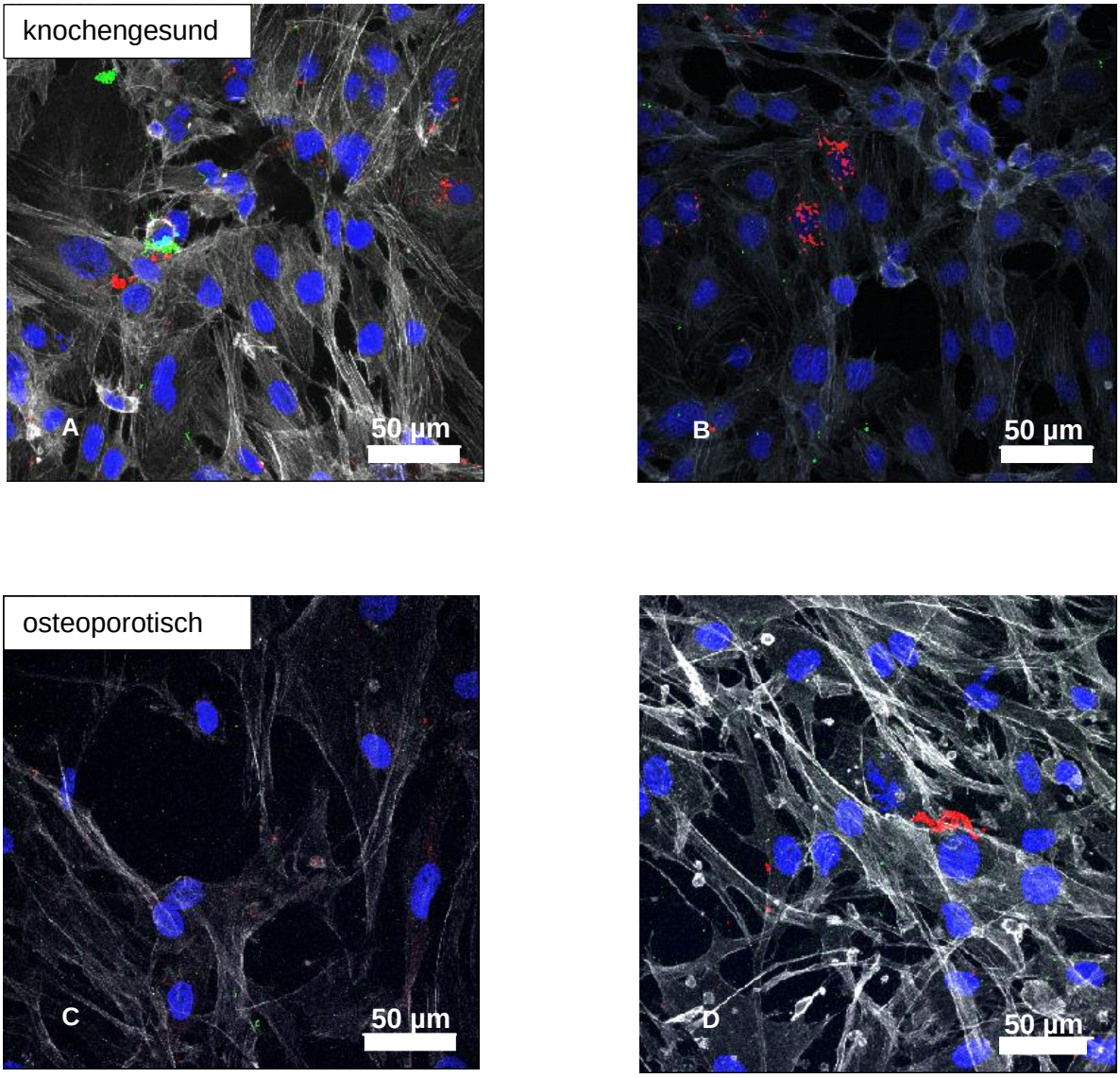

Abbildung 15: Kokulturen an Tag 15. Knochengesunde MSC ohne Zugabe von BDNF (A) und mit BDNF (B). Osteoporotische MSC ohne Zugabe von BDNF (C) und mit BDNF (D).

3.4 Auswertung der Gesamtproteinbestimmung und ALP-Kinetik

Um mögliche Unterschiede von knochengesunden zu osteoporotischen Zelllinien in der Kokultur aufzeigen zu können, wurde die ALP Aktivität in den Kulturen nach Beendigung der Versuche bestimmt. Um eine bessere Vergleichbarkeit der ZK untereinander zu erreichen, wurde zusätzlich nach Beendigung der Inkubationszeit von 3 bzw. 5 Tagen der Gesamtproteingehalt der Kultur bestimmt. Anschließend konnte die ALP-Aktivität auf den Gesamtproteingehalt der Kultur bezogen werden. Um die Repräsentativität zusätzlich zu steigern, wurden jeweils Dreifachbestimmungen von den unterschiedlichen

Zellkulturkonstellationen angelegt. So ergab sich am Ende der Bestimmung für jede ZK, sowohl für die Mono- als auch für die Kokulturen in den unterschiedlichen Zusammensetzungen aus knochengesunden und osteoporotischen Zelllinien, mit BDNF Zusatz und ohne, jeweils drei Ergebnisse für ALP-Aktivität und Gesamtprotein. Aus den drei erhobenen Ergebnissen wurde der Mittelwert gebildet, mit welchem anschließend die weitere Auswertung erfolgte. Die ermittelten Ergebnisse wurden anschließend statistisch verglichen und graphisch durch Boxplots dargestellt. Im direkten Vergleich von osteoporotischen zu knochengesunden Kokulturen konnte keine Signifikanz der ALP-Aktivität bezogen auf das Gesamtprotein bestimmt werden. Es zeigte sich bei den knochengesunden Kokulturen unter Verwendung von BDNF eine hohe Varianz. Dies könnte durch den unterschiedlichen Grad der Differenzierung der MSC zu reifen Osteoblasten bedingt sein (Abbildung 16 A). Wohingegen die Werte ohne Verwendung von BDNF, sowohl an Tag 3 als auch an Tag 5 sehr ähnlich ausfielen (Abbildung 16 B).

Als Kontrolle wurde ein Vergleich des Gesamtproteins über alle Kulturen durchgeführt. Auch hier zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Sodass von einer annähernd gleichen Proteinsyntheseleistung aller Kulturen ausgegangen werden konnte.

Als zusätzliche Kontrolle der ALP ergab sich mit einer Signifikanz von $p < 0{,}001$ ein Unterschied zwischen HMEC Monokulturen und den Kulturen, welche MSC enthielten, sodass durch diese Signifikanz bewiesen wurde, dass die Synthese von ALP lediglich von den MSC und nicht von den HMEC Zellen ausging. Dieses Ergebnis spiegelt sich ebenfalls in den Werten wieder, bei denen ALP auf das Gesamtprotein bezogen wurde. Auch hier zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den HMEC Monokulturen und den Kulturen, welche MSC enthielten.

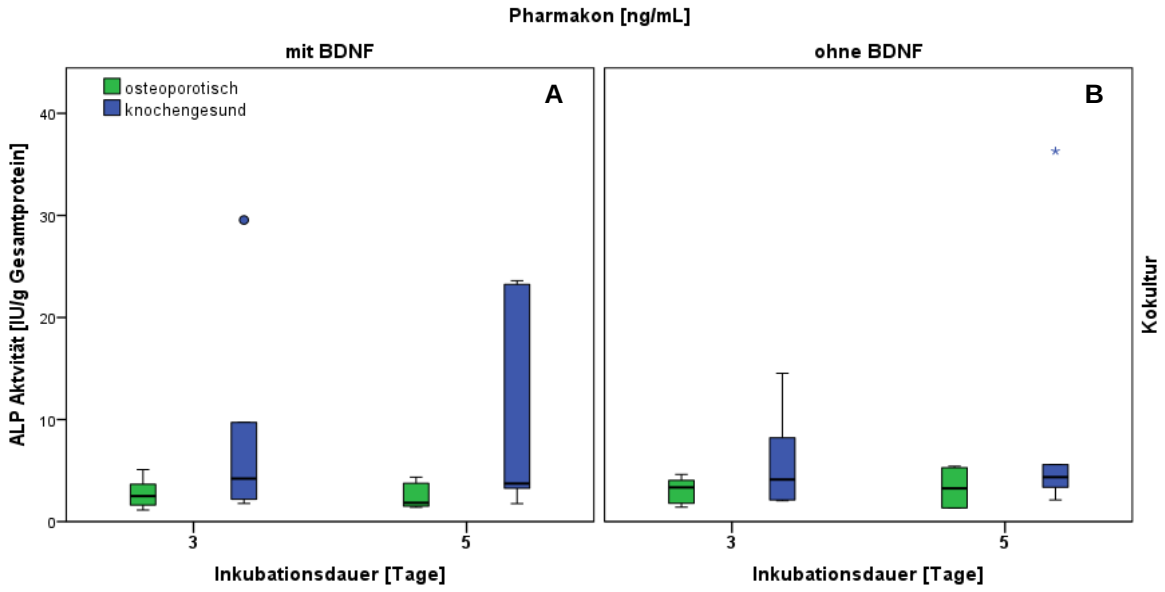

Abbildung 16: Boxplot der ALP Aktivität/Gesamtprotein. Vergleich osteoporotischer (grün) und knochengesunder (blau) Kokulturen an Tag 3 und 5. Unter Verwendung von BDNF (A) ohne Zugabe von BDNF (B). Der blaue Punkt bzw. der blaue Stern stellen statistische Ausreißer dar.

In der Monokultur aus MSC nach ihrer Differenzierung zu Osteoblasten wurde ebenfalls eine Bestimmung der ALP Aktivität bezogen auf das Gesamtprotein durchgeführt. Hierbei waren keine signifikanten Unterschiede zwischen osteoporotischen und knochengesunden MSC zu beobachten, wobei die knochengesunden MSC-Monokulturen generell höhere Werte aufwiesen, was jedoch zu keinem signifikanten Unterschied führte. Dies könnte durch die hohe Varianz, sowie durch die kleine Gruppengröße der humanen MSC (n = 5) bedingt sein. Ebenfalls ohne signifikante Differenz war der Vergleich der ZK von Tag 3 mit den Kulturen von Tag 5. Die hier beschriebenen Ergebnisse beziehen sich auf die Monokultur ohne die Zugabe von BDNF (Abbildung 17).

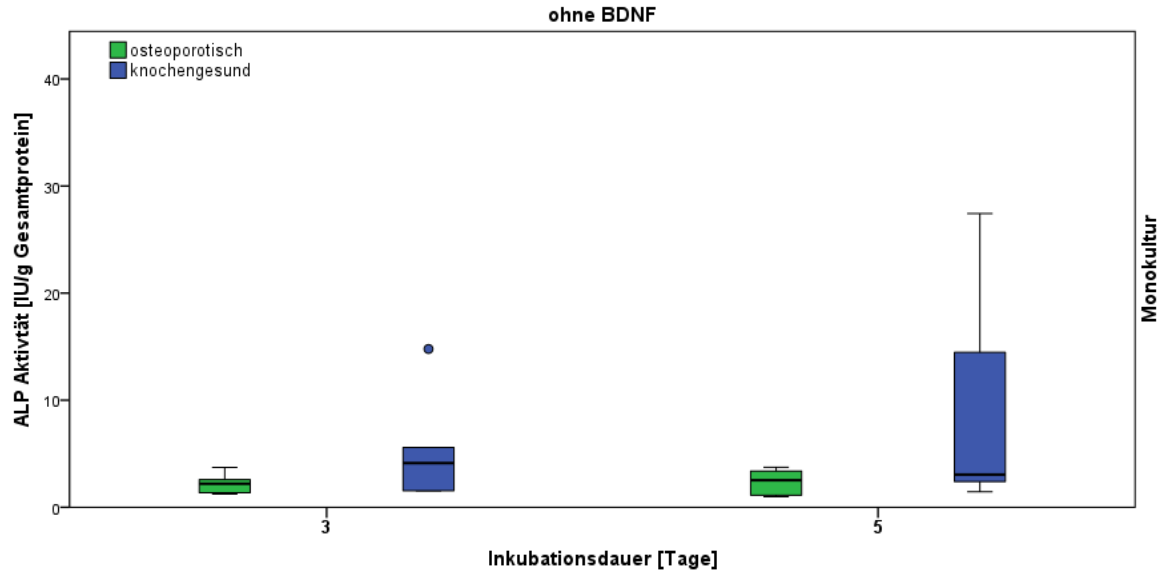

Abbildung 17: Relative ALP Aktivität der MSC-Monokultur. Vergleich osteoporotischer (grün) und knochengesunder (blau) Kokulturen an Tag 3 und 5 ohne Verwendung von BDNF. Der blaue Punkt stellt einen statistischen Ausreißer dar.

3.5 Auswertung des vWF-ELISA

In dieser Arbeit galt es einen Vergleich zu ziehen zwischen Kokulturen aus Endothelzellen und MSC mit unterschiedlichem Knochenstatus in Bezug auf die Verwendung von BDNF. Um die Auswirkung zu verdeutlichen wurde vWF als Marker der HMEC ausgewählt. Nach Erhebung der Daten wurden zur graphischen Veranschaulichung und zum statistischen Vergleich ebenfalls Boxplots aufgestellt.

Hier zeigten sich in der Testung mittels Mann-Whitney-U mehrere Auffälligkeiten. Diese bezogen sich alle auf den vWF in Bezug auf den zeitlichen Verlauf von 3 auf 5 Tage.

In den osteoporotischen Kokulturen stieg die Konzentration des vWF unter BDNF-Applikation von Tag 3 zu Tag 5 signifikant an ($p = 0{,}023$, $n = 5$) (Abbildung 18). Ohne die Zugabe von BDNF konnte dieser Effekt bei einem Signifikanzniveau von $p = 0{,}105$ nicht aufgezeigt werden. Jedoch fiel bei den osteoporotischen Zellen ohne Verwendung von BDNF eine hohe Varianz auf, sodass eine fehlende Signifikanz durch die geringe Versuchszahl von $n = 5$ bedingt sein könnte (Abbildung 19).

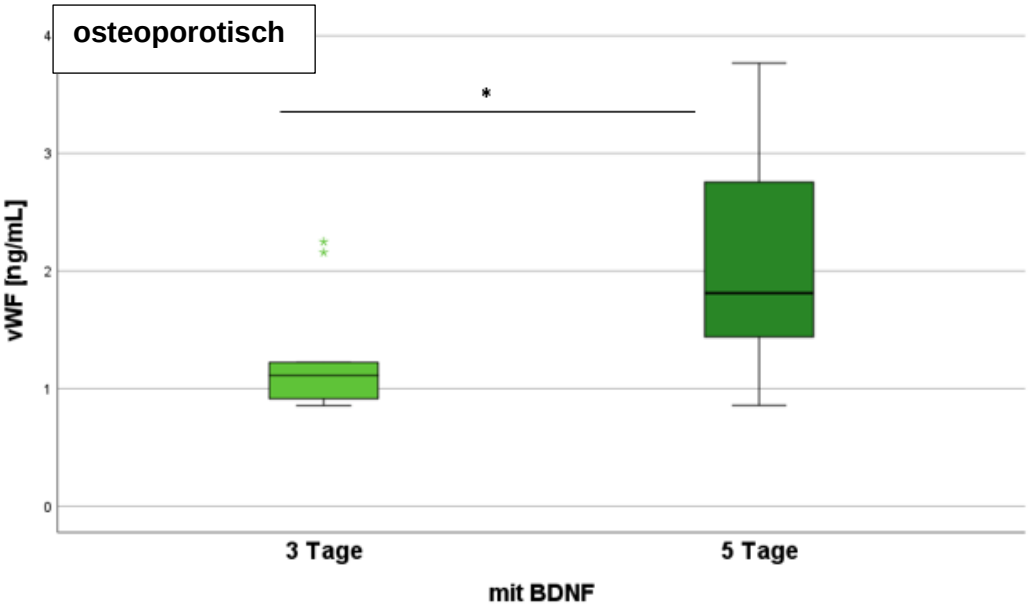

*Abbildung 18: Konzentration des vWFs osteoporotischer Kokulturen nach Zugabe von BDNF. Der Vergleich osteoporotischer Kokulturen von Tag 3 mit Tag 5 ergab unter Zugabe von BDNF einen signifikanten Anstieg des vWF. * entspricht p ≤ 0,05. Die grünen Sternchen markieren statistische Ausreißer.*

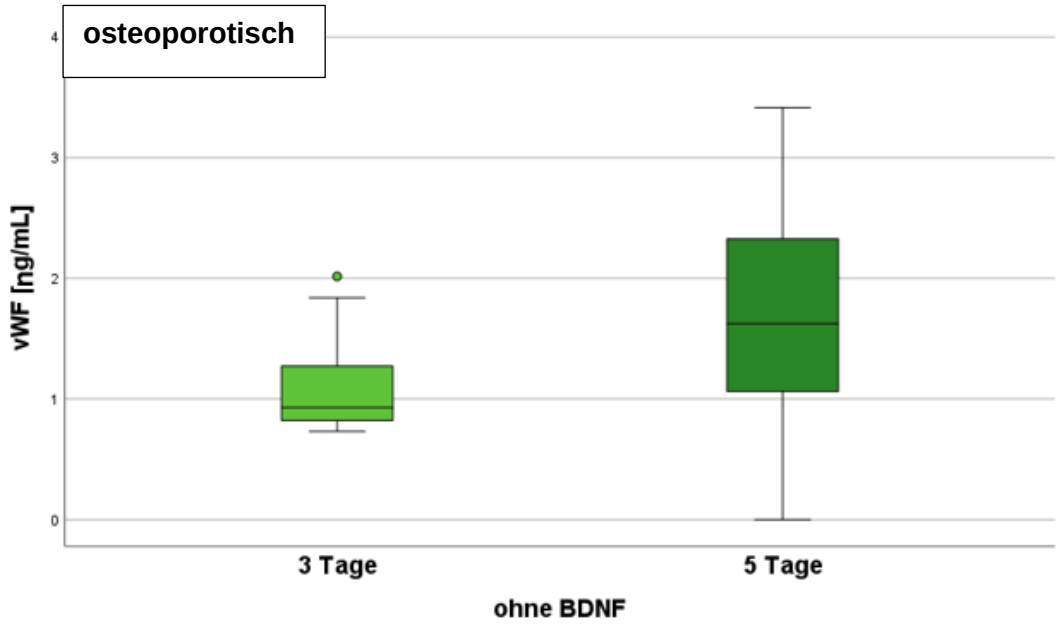

Abbildung 19: Konzentration des vWFs osteoporotischer Zellkulturen ohne Zugabe von BDNF. Der Vergleich osteoporotischer Kokulturen von Tag 3 mit Tag 5 ohne Zugabe von BDNF zeigte keinen signifikanten Anstieg in der Konzentration des vWF. Ein statistischer Ausreißer wurde durch den grünen Punkt markiert.

Ebenfalls unter Verwendung der Mann-Whitney-U-Testung zeigten sich in den knochengesunden Kokulturen signifikante Anstiege der vWF-Konzentration im zeitlichen Verlauf von 3 auf 5 Tagen. Die Konzentration von vWF stieg sowohl unter Verwendung von BDNF als auch ohne die Zugabe von BDNF an ($p = 0{,}019$, $p = 0{,}011$, $n = 5$) (Abbildung 20 und 21).

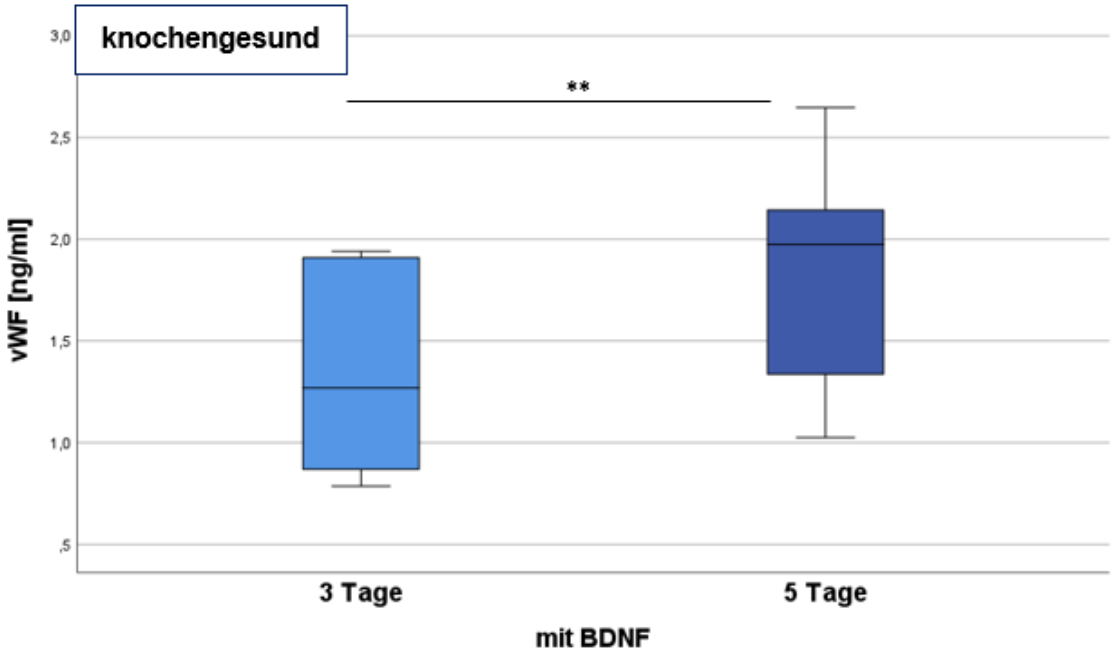

*Abbildung 20: Konzentration des vWFs knochengesunder Kokulturen unter Zugabe von BDNF. Der Vergleich knochengesunder Kokulturen von Tag 3 mit Tag 5 nach Zugabe von BDNF ergab einen signifikanten Anstieg der vWF-Konzentration an Tag 5. ** entspricht $p < 0{,}01$*

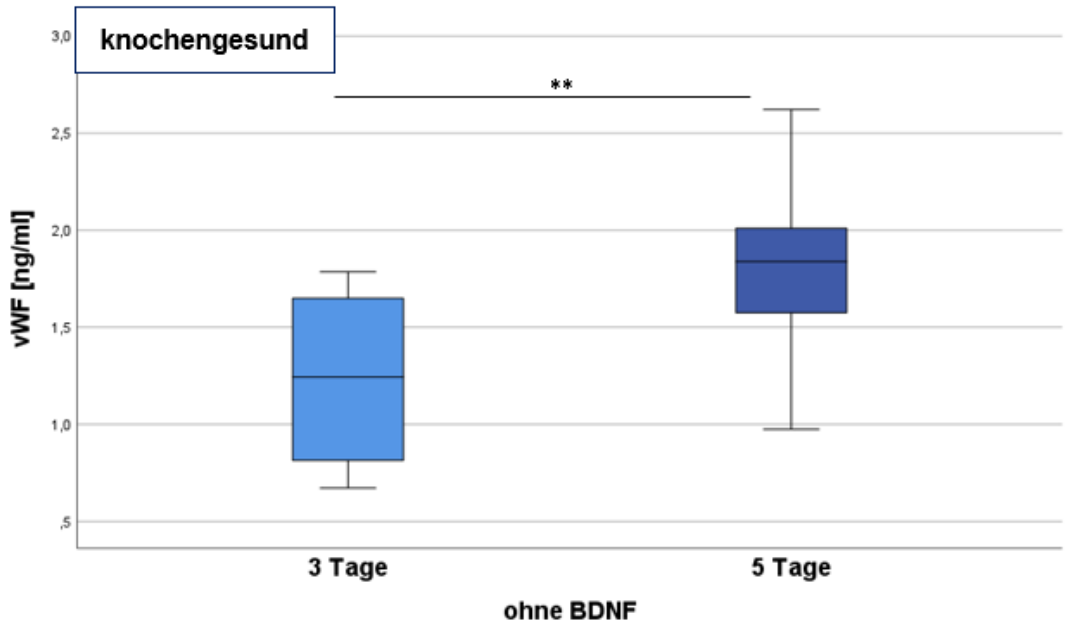

*Abbildung 21: Konzentration des vWFs knochengesunder Kokulturen ohne Zugabe von BDNF. Der Vergleich knochengesunder Kokulturen von Tag 3 mit Tag 5 ohne die Zugabe von BDNF führte zu einem signifikanten Anstieg des vWFs an Tag 5. ** entspricht $p < 0,01$*

Bezog sich die statistische Analyse der Auswirkung der BDNF-Applikation auf nur einen Zeitpunkt, also ohne die Einbeziehung des zeitlichen Verlaufs von Tag 3 zu Tag 5, so waren keine signifikanten Unterschiede zu ermitteln.

4 Diskussion

In einem Herzmodell konnten das Team um M. J. Donovan aufzeigen, dass das körpereigene Proteine BDNF die Angiogenese steigert, indem es das Überleben von Endothelzellen positiv beeinflusst (Donovan et al. 2000). Auch bestimmt werden konnte, dass BDNF zusammen mit dem dazugehörigen TrkB-Rezeptor sowohl in den Endothelzellen als auch in den Osteoblasten während der Frakturheilung erhöht ist (Kilian et al. 2014). In dem gewählten Versuchsaufbau dieser Arbeit wurde sich mit dem Einfluss von BDNF auf Osteoblasten in einer Kokultur mit HMEC fokussiert. Zusätzlich wurde ein Vergleich aus knochengesunden zu osteoporotischen Osteoblasten gezogen, um mögliche Unterschiede aufdecken zu können.

4.1 Zellkulturen und Kokultursysteme

Als Hauptbestandteil des Zellversuches wurden Mischkulturen aus humanen Knochenproben verwendet, die MSC enthielten. Diese Kultur wurde in der vorliegenden Arbeit als MSC bezeichnet. MSC haben das Potential, sich unter anderem in chondrogene, adipogene und osteogene Zellen zu differenzieren (Trinkaus et al. 2005). Sie wurden in operativen Prozessen aus Restprodukten, wie zum Beispiel Hüftköpfen, gewonnen. Eine weitere Möglichkeit MSC zu gewinnen ist eine Entnahme von Knochenmark aus adulten Spendern (Pittenger et al. 1999). Alternativ ist eine Gewinnung von MSC aus Bohrmehl, ebenfalls ein Produkt anfallend bei operativen Verfahren, möglich. Im Gegensatz zur Gewinnung von Bohrmehl oder Restprodukten aus anfallenden Operationen ist eine Probeentnahme aus dem Knochenmark meist mit einem separaten Eingriff verbunden. Dem entsprechend ist ein Vorteil von Bohrmehl und Restprodukten, dass eine notwendige operative Versorgung und die Probengewinnung in einem Eingriff erfolgen können. Bohrmehl fällt bei Marknagelversorgungen an, eine Methode zur Versorgung von Schaftfrakturen der Tibia, Femur oder des Humerus. Hier entsteht durch das Aufbohren des Markraumes, vor Einbringung des Nagels, Bohrmehl. Wenisch et al. 2005 zeigten, dass sich in dem gewonnenen Bohrmehl nicht nur MSC, sondern z. B. auch Zellen mit Oberflächenantigenen befinden, die typisch für Endothelzellen oder T-Lymphozyten sind. Aber auch die gewonnenen Zelllinien der MSC durch Restprodukte operativer Eingriffe sind eine Mischkultur. Um den Anteil an MSC in den vorliegenden Zellreihen zu bestimmen, wurde bei Kultivierung der Zellen der mesenchymale Anteil mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Dabei fiel auf, dass der mesenchymale Anteil in den Zellreihen der osteoporotischen Spender im Schnitt deutlich

höher lag, als die der knochengesunden Kontrollgruppe (Tabelle 2). Nichtsdestotrotz zeigten sich in der Lebendzellbeobachtung zwar Unterschiede in den Zelllinien, jedoch konnte hier keine klare Abgrenzung zwischen einer besseren osteoporotischen Differenzierung im Vergleich zu knochengesunden Zellen gezogen werden.

Tabelle 2: Anteil der MSC in den verwendeten Zelllinien

	Osteoporotische ZK	Knochengesunde ZK
1+2	ZK 71, W 1935, mesenchymaler Anteil 76 %	ZK 48, W 1949, mesenchymaler Anteil 20,8 %
3+4	ZK 70, W 1952, mesenchymaler Anteil 41 %	ZK 84, W 1959, mesenchymaler Anteil 10,6 %
5+6	ZK 69, W 1942, mesenchymaler Anteil 52 %	ZK 94, W 1930, mesenchymaler Anteil 20,4 %
7+8	ZK 74, W 1931, mesenchymaler Anteil 68 %	ZK 37, W 1934, mesenchymaler Anteil 28,4 %
9+10	ZK 112, W 1945, mesenchymaler Anteil 41,3 %	ZK 109, W 1940, mesenchymaler Anteil 17,5 %

Im Hinblick auf weitere Einflussfaktoren auf das Potential zur Differenzierung der MSC müssen somit noch andere Faktoren, wie z. B. Frakturen oder Systemerkrankungen berücksichtigt werden. In dem gewählten Versuchsaufbau wurden immer direkt zwei Zelllinien von einem knochengesunden und von einem Spender mit Osteoporose verglichen. Um die möglichen Einflussgrößen zu minimieren, wurden die Spender verglichen und weitestgehend aneinander angepasste Spender ausgewählt, um eine möglichst gute Vergleichbarkeit der Zellkulturversuche zu erreichen. Bei jedoch begrenzten Ressourcen mussten auch hier Kompromisse eingegangen werden. Ein Einflussfaktor könnten bestehende Frakturen bei der Gewinnung der Probe sein. In Begleitung einer Fraktur kommt es oft zur Verletzung der versorgenden Blutgefäße, was zu einer Hypoxie und Unterversorgung in dem entsprechenden Gebiet führt (Marenzana & Arnett 2013). So schütten beschädigte Zellen Zytokine aus, die wiederrum die Transkription unterschiedlichster Gene für die Reparation, Inflammation und Faktoren für die Angiogenese stimulieren (Baker et al. 2018). Auch das Alter der Spender kann als Einflussgröße gesehen werden. Es konnte gezeigt werden, dass sich die klonogene

und proliferative Kapazität der MSC verringert. Zudem wurde gezeigt, dass es vermehrt zu einer adipogenen statt zu einer osteogenen Differenzierung kommt (Kovtonyuk et al. 2016). Bei den gewählten Paaren kam es zu einer Variabilität des Altersunterschiedes zwischen 3 und 14 Jahren. Die Osteoporose als notwendiges Merkmal zur Vergleichsgruppe der knochengesunden Spender betrifft im höheren Alter häufiger Frauen, sodass vor allem weibliche osteoporotische Zelllinien zur Verfügung stehen. Entsprechend dem Vorkommen wurden in dieser Versuchsreihe nur weibliche Zelllinien miteinander verglichen, sodass eine generelle Übertragung auf das männliche Geschlecht nicht möglich ist. Vor allem das Alter und Geschlecht stellen variabel Einflussgrößen dar (Muschler et al. 2001). Weitere beeinflussende Größen könnten vorliegende Erkrankungen sein. Vor allem systemische Erkrankungen des Knochens können deutliche Unterschiede vorweisen. So wurden zum Beispiel Spender mit arthritischen Vorerkrankungen oder Knochentumoren ausgeschlossen (Karmakar et al. 2010). Die bekannten Vorerkrankungen der Spenderinnen wurden dementsprechend angepasst. Jedoch kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass unbekannte Vorerkrankungen oder den Knochen beeinflussende Medikamente genommen bzw. zum Zeitpunkt der Probeentnahme nicht bekannt waren. In diese Gruppe der beeinflussenden Medikamente zählen unter anderem Steroide wie Kortison, die sowohl Proliferation als auch Differenzierung je vorhandener Konzentration verändern können (Mikami et al. 2011).

Um die gewonnenen MSC für die vorgesehene Kokultur verwenden zu können, müssen diese zunächst differenziert werden. Zur Vorbereitung auf die Differenzierung muss die Proliferation der Zellen unterstützt werden. Denn mit steigendem Grad der Differenzierung verlieren, die dann aktiven Osteoblasten, die Eigenschaft der Teilbarkeit. Um den ausreichend proliferierten Zellen den Anstoß für die Differenzierung zu geben, erfolgte die Aussaat in entsprechend hoher Anzahl und zusätzlich ein Wechsel des verwendeten Mediums. Durch den Wechsel des Mediums kommt es zur Ausschüttung von Transkriptionsfaktoren wie Runx2 oder Osterix (Osx), die unter anderem für die Differenzierung zu aktiven Osteoblasten verantwortlich sind (Karsenty 2008; Nakashima et al. 2002). Nach Differenzierung lassen sich entsprechende Marker wie ALP oder Kollagen Typ 1 nachweisen.

Durch die Verwendung unterschiedlicher Spenderinnen kommt es zu einer gewissen Variabilität im Vergleich zur Nutzung lediglich einer Zelllinie. Denn Proliferation und Differenzierung sind nicht in jeder Kultur gleich gewichtet, so kommt es durch verschiedene Einflüsse zu unterschiedlichen Ausgangsbedingungen der Kokultur. Insbesondere in der Lebendzellbeobachtung konnten deutliche Unterschiede der

einzelnen Kulturen beobachtet werden, vor allem in Bezug auf die Differenzierungsrate, was mikroskopisch durch unterschiedlich dichte Zellrasen und die Ablagerung von Knochenmineral sichtbar wurde. Jedoch wurden bewusst Zelllinien unterschiedlicher Spenderinnen verwendet, um ein großes Spektrum abzudecken und mögliche Einflussfaktoren in der Auswertung zu ermitteln. Ein zusätzlicher Vorteil mehrere Zelllinien ist eine erhöhte Vergleichbarkeit zum klinischen Alltag und spiegelt die Variabilität der Patienten wider.

Um die entsprechende Differenzierung von MSC zu aktiven Osteoblasten zu bestimmen, gibt es unterschiedliche Differenzierungsmarker, darunter zum Beispiel ALP, Kollagen Typ 1 oder Osteopontin (Aubin 1998). Je nach Entwicklungsstadium weisen die Zellen unterschiedliche Marker auf. Eine der ersten Vorstufen sind unreife Osteoblasten. Diese synthetisieren bereits hohe Konzentrationen von ALP und Kollagen Typ 1 und bieten sich damit als Differenzierungsmarker an. Erreichen die Zellen das Stadium reifer Osteoblasten, so lässt sich zum Beispiel erstmals im Reifungsprozess Osteocalcin nachweisen. ALP ist bereits in den Vorstufen nachweisebar, jedoch mit ansteigendem Reifungsgrad der Zellen deutlich stärker exprimiert (Aubin 1998). Um den Differenzierungsgrad der Zellen vergleichbar zu machen, wurden die MSC Monokulturen jeweils 10 Tage osteogen differenziert. Gezeigt werden konnte, dass ab Tag 4 die ALP-Konzentration in den Kulturen als Differenzierungsmarker steigt und seinen Peak an Tag 8-12 vorweist (Bruder et al. 1997), sodass in Bezug auf diese Arbeit und durch laborinterne Standards eine Differenzierung von 10 Tagen festgelegt wurde. Eine zusätzliche Testung der ALP Konzentration fand am 10. Tag jedoch nicht statt, sondern erst mit Versuchsende am 13. oder 15. Tag. In der Lebendzellbeobachtung zeigte sich der Mineralgehalt an Tag 15 zum Teil im Vergleich zu Tag 13 verringert, sodass sich eine frühzeitigere Messung der ALP-Aktivität ggf. günstiger auf das Ergebnis ausgewirkt hätte. Der spärliche Nachweis von Osteocalcin-haltigen Zellen in der Immunofluoreszenzfärbung deutete eher auf einen mäßigen Grad an Differenzierung der MSC hin. Wobei anzumerken ist, dass auch die HMEC in der Immunofluoreszenzfärbung nicht zweifelsfrei nachweisbar waren, sodass im Umkehrschluss das erzielte Resultat in dieser Färbung kritisch zu hinterfragen ist.

Die zweite Zelllinie, die zum Aufbau des gewählten Kokultursystems verwendet wurde, waren mikrovaskuläre Endothelzellen. Endothelzellen spielen eine große Rolle in unterschiedlichsten Prozessen. Zum einen haben sie einen großen Einfluss auf die Wundheilung, jedoch auch in Entzündungsprozessen (Abbot et al. 1992) oder Tumormetastasierung (Scott et al. 1993). Für die Gewinnung von humanen mikrovaskulären Endothelzellen gibt es unterschiedliche Möglichkeiten. Zum einen ist

die Gewinnung aus einer fetalen Umbilicalvene (Jaffe et al. 1973) möglich, zum anderen über vorsichtiges Abtragen der Innenschicht größerer Blutgefäße (Scott et al. 1993). Problematisch bei der Verwendung von mikrovaskulären Endothelzellen in vitro ist der mögliche Verlust von zellspezifischen Markern sowie eine schwierige Kultivierung dieser Zellen (Unger et al. 2002). Zu den typischen Differenzierungsmarkern gehören CD31 und vWF. Jedoch konnte gezeigt werden, dass diese Zellen in vitro ihre Differenzierung und Charakterisierung verlieren können (Unger et al. 2002). Zusätzlich sollte berücksichtigt werden, dass die Zellen eine geringe Proliferationskapazität besitzen, welche das Wachstum nach entsprechend wenig Zellteilungen einschränkt (Karasek 1989), sodass in der vorliegenden Arbeit auf eine immortalisierte dermale Zelllinie zurückgegriffen wurde. Um diesen Schwierigkeiten in der Kultivierung entgegen zu wirken, wurden Zellen lediglich einer Passage verwendet, obwohl gezeigt werden konnte, dass bei der genetisch veränderten Zelllinie auch nach der 95. Passage die Proliferation der Zellen weiterhin möglich ist (Ades et al. 1992). Zusätzlich wurde stets eine gleiche Anzahl an Zellen nach entsprechender Zellzählung ausgesät.

Die Vaskularisation spielt eine große Rolle in der Knochenbildung, Heilung von Frakturen aber auch dem Calciumstoffwechsel. Somit sind die Regulationsmechanismen von Angio- und Osteogenese eng miteinander verbunden. Im gesunden menschlichen Knochen kommen entsprechende Stamm- und Vorläuferzellen in sogenannten Nischen im Knochenmark zusammen. Durch unterschiedliche Zell-Zellinteraktionen und äußere Einflussfaktoren kommt es zu entsprechend unterschiedlichen Differenzierungen der Zellen (Stucker et al. 2020). Für eine in vitro Untersuchung muss entsprechend eine Kokultur aus Osteoblasten und Endothelzellen entworfen werden. Es gibt unterschiedliche Ansatzpunkte eine solche Kokultur aufzubauen. Unterschieden werde können direkte von indirekten Kokulturen. In direkten Kokulturen werden beide Zelltypen in ein Well ohne Barriere aufgetragen. Indirekte ZK weisen eine trennende je nach Versuchsaufbau mit unterschiedlich großen Poren versehene Membran auf. Es konnte gezeigt werden, dass Endothelzellen die Proliferation und osteogene Differenzierung von Osteoblasten und MSC in der direkten ZK positiv beeinflussen. Die Arbeitsgruppe um D. Steiner konnte in einer Kokultur aus beiden Zelltypen ein Anstieg des ALPs durch eine Zunahme der ALP-Expression in den MSC messen (Steiner et al. 2012). Möglich wurde die gesteigerte ALP-Expression durch einen heterotrophen Zell-Zellkontakt zwischen HMEC und MSC, sodass die vermehrte Expression von ALP deutlicher über einen direkten Kontakt zwischen den zwei Zelltypen ausgelöst wurde und weniger über einen endokrinen Vorgang. Eine positive Beeinflussung des Wachstums der

Endothelzellen durch die Kokultur mit den MSC konnte jedoch nicht beobachtet werden (Steiner et al. 2012).

Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Osteoblasten in der Kokultur mit HMEC eine geringere Apoptoserate als in der Monokultur aufweisen (Lampert et al. 2016; Simunovic et al. 2013; Steiner et al. 2012). In dem hier verwendeten Versuchsaufbau wurde auf die Durchführung eines Apoptose-Assays verzichtet. Alternativ erfolgte die Lebendzellbeobachtung mit entsprechenden Einschränkung der Beurteilbarkeit, ob eine Nekrose oder Apoptose vorliegt. In der Lichtmikroskopie zeigten sich jedoch keine auffallend vermehrten Zelltrümmer oder abgestorbenen Zellen, somit konnte eine vermehrte Apoptoserate, soweit durch die Lichtmikroskopie beurteilbar, ausgeschlossen werden.

Unter Berücksichtigung dieser Quellen wurde in dem hier verwendeten Versuchsaufbau eine direkte Kokultur verwendet. In den Versuchen der Arbeitsgruppe um D. Steiner, die die positiven Effekte auf Proliferation und Differenzierung verdeutlichten, wurde jeweils identische Zellzahlen der zwei verwendeten Zelllinien in ein Well aufgetragen und untersucht. Dies könnte einer der Gründe sein, weshalb kein signifikanter ALP-Anstieg in der vorliegenden Arbeit reproduziert werden konnte. Im verwendeten Versuchsaufbau wurden erst MSC in einer Anzahl von 20.000 Zellen aufgetragen und zunächst für 10 Tage osteogen differenziert. Anschließend wurden pro Well 80.000 Zellen der HMEC für das Kokultursystem hinzugefügt, sodass die unterschiedlich ausgeprägte Beeinflussung von Differenzierung und Wachstum auf die MSC, durch ein nicht festgelegtes Verhältnis von MSC und HMEC, nicht gänzlich ausgeschlossen werden kann. Zusätzlich gilt es die unterschiedlichen Differenzierungsgrade der MSC zu berücksichtigen. Obwohl eine Zellzählung vor Etablierung der Kokultur einen guten Einblick in die Differenzierung gegeben hätte und ein exaktes Verhältnis zwischen HMEC und MSC gewählt werde hätte können, wurde darauf verzichtet. Eine Zellzählung z. B. anhand eines Casys wurde nicht durchgeführt, um die Zellen nicht aus den Wellplatten zu lösen und damit den Verlust der Differenzierung zu vermeiden. Eine lichtmikroskopische Zählung wurde ebenfalls ausgeschlossen, da durch die Zählung, die Zellen zu lange außerhalb des Inkubators gewesen wären. Zellen ohne ausreichende Versorgung mit CO_2 sowie der optimalen Haltungstemperatur bei 37°C neigen z. B. zu einem verfrühten Absterben. Dies hätte zu einer Verfälschung der Ergebnisse geführt.

4.2 ALP Kinetik und Gesamtproteinbestimmung

Die ALP wurde in dieser Versuchsreihe als Marker der osteogenen Differenzierung verwendet. Bei der hier verwendeten ALP-Bestimmung handelte es sich ausschließlich um die NTALP, da in der Kokultur außer den MSC keine weiteren ALP synthetisierenden Zellen vorhanden waren. Auch im klinischen Alltag findet die Untersuchung von ALP Anwendung. Es konnte gezeigt werden, dass ALP im Serum bei Patienten mit ossären Metastasen stark erhöht ist (Withold et al. 1996).

Das Enzym ALP hat im menschlichen Körper die Aufgabe im alkalischen Milieu Substrate zu dephosphorylieren. Diese Eigenschaft wird zum Nachweis vom ALP im Zellkulturversuch genutzt. Durch die Dephosphorylierung von dem Substrat pNPP durch die vorhandene ALP kommt es zu einem Farbumschlag, der kolometrisch gemessen werden kann. Eine alternative Methode zur Bestimmung von ALP ist die Markierung mit 3,6-Fluorescein-Diphosphat. Diese Methode kann bei sehr geringen Konzentrationen von ALP zur Anwendung kommen (Huang et al. 1992). Bei höheren Vorkommen von ALP, wie in dem vorliegenden Zellkulturversuch, ist eine kolometrische Bestimmung jedoch ausreichend.

Möglich ist zudem entweder die Aktivität oder die Konzentration der ALP zu messen. Bei einer linearen Korrelation beider Werte sind die unterschiedlichen Messmethoden jedoch als gleichwertig anzusehen (Withold et al. 1996).

Die gemessene ALP-Konzentration bzw. Aktivität wird in der Regel in Zellkulturversuchen auf eine Größe bezogen. Entweder wird die gemessene Konzentration auf eine bestimmte Zellzahl oder auf die Gesamtproteinmenge in der verwendeten Probe bezogen. Wird die Aktivität auf eine bestimmte Zellzahl bezogen, werden entsprechenden Messungen von der Proliferation als Einflussgröße unabhängig. Wird jedoch der Gesamtproteingehalt als Bezugsgröße gewählt, wird die entsprechende Syntheseleistung der ZK aufgezeigt. Dieser Bezug wurde für die hiesige Arbeit ausgewählt, sodass unterschiedliche Syntheseleistungen und dementsprechend indirekt auch die Proliferationsrate als Einflussfaktor auf die ALP-Konzentration vermindert werden konnte. In der hiesigen Arbeit wurde im ersten Schritt eine Differenzierung der MSC angestrebt. Mit der Differenzierung ist der Verlust der Proliferationsmöglichkeit vergesellschaftet. Bei identischen Ausgangsbedingungen sollte von einer ähnlichen Entwicklung der Zellen in der Kultur auszugehen sein. In der Lebendzellbeobachtung und auch durch die hohen Varianzen in der ALP Kinetik (Abbildung 17) zeigten sich jedoch Unterschiede, sodass im hiesigen Versuch von unterschiedlichen Differenzierungsgrade ausgegangen werden muss und folglich mit unterschiedlichen

Proliferationsraten, weshalb für künftige Untersuchungen ein Bezug auf die Zellzahl nach dem Differenzierungsprozess als sinnvoll zu erachten ist. Zusätzlich zu beachten ist, dass die Zugabe von z. B. Knochenersatzmaterialien die Bestimmung des Gesamtproteins in der Kultur fälschlicherweise erhöhen kann (Bernhardt et al. 2008).

Die Bestimmung der Proteinkonzentration in der verwendeten ZK erfolgte über die bereits 1951 durch Oliver H. Lowry entwickelte Methode. Es kommt hierbei durch zwei aneinanderschließende Reaktionen im alkalischen Milieu zu einem Farbumschlag der gemessen wird. Bereits bei der Entwicklung dieses Verfahrens zeigten sich zwei Schwachstellen, so variiert zum einen die Farbintensität mit den unterschiedlichen vorhandenen Proteinen und zum anderen ist die Farbe nicht immer stringent korrelierend mit der Konzentration der gemessenen Proteine (Lowry et al. 1951). Nichtsdestotrotz wird auf diese Methode bei hoher Sensitivität zurückgegriffen.

Mit der Gesamtproteinkonzentration als Bezugsgröße für die ALP-Aktivität, stellen alle Variablen, die die Syntheseleistung und Differenzierung der Zellen beeinflussen, Einflussgrößen dar. In der statistischen Auswertung der Gesamtproteinkonzentration konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die unterschiedlichen ZK durch gleiche Bedingungen ähnliche Mengen an Gesamtprotein synthetisiert haben. Hierdurch sollte die Vergleichbarkeit von ALP bezogen auf das Gesamtprotein möglich sein.

Die Ergebnisse zur Untersuchung der ALP-Aktivität zeigten einen signifikanten Unterschied. Dieser konnte im Vergleich zwischen HMEC Monokulturen und den Kulturen mit Beteiligung von MSC aufgezeigt werden. In HMEC Monokulturen konnte im Gegensatz zu den anderen Zellkultursystemen kein ALP nachgewiesen werden. Folglich war eine Abbildung in der Monokultur nicht möglich (Abbildung 17). Dies stellt einen Beweis für die ausschließliche Synthese von ALP durch die MSC dar.

Zum einen wurde die ALP-Aktivität als Marker für die Differenzierung der MSC verwendet, zum anderen wurde sie als Parameter für mögliche Unterschiede zwischen osteoporotischen und knochengesunden Zellen herangezogen. Es zeigten sich jedoch in der statistischen Analyse keine Unterschiede in der ALP-Aktivität knochengesunder zu osteoporotischen ZK. Die Messung der ALP-Aktivität fand in diesem Versuchsaufbau an Tag 3 und Tag 5 der Kokultur bzw. an Tag 13 und Tag 15 der osteogenen Differenzierung statt, da die Zusammenführung in die Kokulturen erst nach einer festgelegten Differenzierungszeit von zehn Tagen stattfand. Die Osteoporose ist eine Systemerkrankung, welche unter anderem mit niedriger Knochenmasse und Verschlechterung der architektonischen Struktur des Knochens einhergeht (NIH

Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis 2001). Dem entsprechend wurde im Vorfeld die Hypothese aufgestellt, dass die ALP-Aktivität bei osteoporotischen Zelllinien vermindert ist. In den hier erhobenen Ergebnissen bezüglich der ALP-Aktivität konnte eine solche Annahme nicht bestätigt werden. Ein signifikanter Unterschied zwischen knochengesunden und osteoporotischen ZK konnte in diesem Versuchsaufbau nicht erhoben werden. Mögliche Einflussfaktoren könnten die Untersuchungszeitpunkte sein. ALP ist ein Marker der frühen osteogenen Differenzierung (Seibel 2015). In einer anderen Arbeit wurde ein früher Anstieg der ALP-Aktivität osteoporotischer Zellen jedoch nur bis zu einem Zeitraum von Tag 6 bis 8 gezeigt. An Tag 12 bis 14 sanken die ALP-Konzentrationen wieder und näherten sich den Werten knochengesunder Zellen an (Shi et al. 2015), sodass eine mögliche Abweichung der ALP-Aktivität zwischen knochengesunden und osteoporotischen ZK nicht aufgezeigt werden konnte, da die Untersuchungszeitpunkte in Bezug auf die osteogene Differenzierung an Tag 13 und 15 erfolgt sind. Eine mögliche Alternative wären frühere Untersuchungszeitpunkte gewesen oder die Wahl eines anderen Markers der osteogenen Differenzierung, um einen späteren Zeitpunkt der Differenzierung besser zu erfassen, wie z.B. Osteocalcin (Seibel 2015).

4.3 vWF als Marker der Angiogenese

Die Angiogenese spielt nicht nur im Knochen, sondern im gesamten menschlichen Körper eine essentielle Rolle für die Versorgung. Im Knochen wird durch eine entsprechende Durchblutung die Versorgung von Progenitorzellen unterschiedlicher Zellreihen gewährleistet. Entsprechend des Vorkommens ist der Knochen Ausgangspunkt für die Osteogenese und der Hämatopoese. In dem vorliegenden Zellversuch sollte der Einfluss auf die Angiogenese durch BDNF in einem Kokultursystem bei knochengesunden und osteoporotischen Zellen untersucht werden.

Hierfür war es notwendig einen entsprechenden Marker zur Quantifizierung der Angiogenese einzusetzen. In der Literatur werden viele Marker für Endothelzellen beschrieben. Mit am besten untersucht sind dabei vWF und CD31 (Albelda et al. 1990; Jaffe et al. 1974). Für die Verwendung des vWFs als Marker für Endothelzellen spricht, dass vWF lediglich in Endothelzellen und Megakaryozyten synthetisiert wird. CD31 kommt hingegen in unterschiedlichen Zellen des Blut- und Gefäßsystems vor (Privratsky and Newman 2014).

Daraus lässt sich folgern, dass sichtbare Nachweise des vWFs in der Immunofluoreszenzfärbung und der über den ELISA gemessenen Wert in der Kokultur das ausschließliche Syntheseprodukt der Endothelzellen ist.

Die Angiogenese beschreibt die Entstehung von neuen Blutgefäßen aus bereits bestehenden Gefäßen. Anregung für die Angiogenese im Knochen geben viele unterschiedliche Einflussfaktoren, wie Zell-Zellkontakte oder Chemokine. Zu den pro-angiogenen Faktoren gehören unter anderem CXC-Motiv-Chemokine 12 (CXCL12), Stammzellfaktor (SCF) oder VEGF (Coskun 2010; Sugiyama et al. 2006). Gezeigt werden konnte zum Beispiel, dass CXCL12 an der Migration und an der Bindung von hämatopoetischen Stammzellen beteiligt ist (Nagasawa et al. 1996). Wohingegen der SCF als Tyrosinkinase-Rezeptor durch intrazelluläre Mechanismen die hämatopoetischen Stammzellen reguliert (Coskun 2010).

Bereits der Name des VEGF bezieht sich auf die Funktion als einer der wichtigsten pro-angiogenen Faktoren sowohl bei physiologisch als auch bei pathologischen Vorgängen. Erstmalig konnte das Protein 1970 isoliert werden (Folkman et al. 1970). Im Verlauf der Zeit konnten weitere Subgruppen des Proteins identifiziert werden. Der Marker, der für die Angiogenese die bedeutendste Rolle einnimmt, ist dabei das VEGF-A. Dieses interagiert über unterschiedliche Rezeptoren, wie dem VEGF-Rezeptor 1 oder 2 mit den entsprechenden Zielzellen (Ylä-Herttuala et al. 2007). Bereits 1960 konnte gezeigt werden, dass die embryonale Entwicklung bei Mäusen mit einem ausgeschalteten VEGF-Gen letal verläuft, da die Ausbildung der essentiell erforderlichen Blutgefäße massiv gestört ist (Ferrara et al. 1996), sodass VEGF insgesamt als sehr sensitiver Marker der Angiogenese angesehen werden kann.

Jedoch konnte gezeigt werden, dass auch Osteoblasten in der Lage sind VEGF zu synthetisieren. Zu einer verstärkten Expression von VEGF in Osteoblasten kam es, wenn eine Kokultur aus Osteoblasten und Endothelzellen vorlag (Grellier et al. 2009). Eine verstärkte Proliferation der Endothelzellen durch die erhöhten VEGF-Werte konnte jedoch nicht bestimmt werden (Grellier et al. 2009; Steiner et al. 2012), was die Verwendung von VEGF als Marker für die Angiogenese anfällig für äußere Einflussfaktoren macht. Folglich wurde ein anderer Marker der Angiogenese für diese Arbeit gesucht und ausgewählt.

Im klinischen Alltag wird der vWF oft mit der gleichnamigen Erkrankung, dem von-Willebrand-Syndrom, assoziiert. Dieses Syndrom zeigt sich in unterschiedlicher Ausprägung, von einer Minderfunktion bis zur Funktionslosigkeit des vWFs. Damit einher geht eine erhöhte Blutungsneigung der betroffenen Patienten. In der Klinik häufig

gesehen ist eine Assoziation des von-Willeband-Syndroms und der Angiodysplasie, welche zu gastrointerstitiellen Blutungen führen können. Dieser Zusammenhang wurde als Anlass für eine Arbeitsgruppe um Starke et al. Genommen, um das Zusammenspiel des vWFs und der Angiogenese zu untersuchen. Starke et al. konnten bei einem Verlust des vWFs oder in vWF-defizienten Mäusen eine erhöhte Angiogenese nachweisen (Starke et al. 2011). Im Umkehrschluss kann festgehalten werden, dass vWF einen starken Einfluss auf die Reduktion der Angiogenese hat.

Nichtsdestotrotz wurde für die Kokultur vWF als Marker der Angiogenese verwendet. Zum einen für die selektive Darstellung der Endothelzelle in vitro, zum anderen als nicht durch die Osteoblasten beeinflusster Marker der Angiogenese.

Diese selektive Synthese des vWFs durch die HMEC spiegelte sich auch in den Ergebnissen wieder. Hier zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen Monokulturen aus MSC und Kokulturen unter Verwendung von HMEC. In den Monokulturen, bestehend aus knochengesunden oder osteoporotischen MSC, konnte kein vWF nachgewiesen werden (Abbildung 7), sodass davon ausgegangen werden kann, dass die gemessenen vWF-Konzentrationen in den Kokulturen ausschließlich als Syntheseleistung der HMEC anzunehmen sind. Im zeitlichen Vergleich konnte erwartungsgemäß ein Anstieg der vWF-Konzentration in der HMEC Monokultur von Tag 3 zu Tag 5 beobachtet werden. Folglich konnte die erhobene Kontrolle als positiv für den hiesigen Versuchsaufbau vermerkt werden.

Ein Anstieg der vWF-Konzentration konnte auch in der Kokultur aus MSC und HMEC aufgezeigt werden. Dabei konnte der Anstieg des vWFs nach zwei zusätzlichen Tagen Inkubationszeit in allen Kokulturkonstellationen beobachtet werden. Die Ausnahme waren die Kokulturen aus osteoporotischen MSC ohne Zusatz von BDNF, womit ein negativerer Einfluss von osteoporotischen MSC auf die Syntheseleistung der HMEC angenommen werden kann. Bereits in multiplen Studien konnte gezeigt werden, dass die Osteoporose häufig mit einem Rückgang der Vaskularisierung des Knochens einhergeht (Cui et al. 2012; Weinstein et al. 2010; Yang et al. 2018). Wohingegen die Syntheseleistung der HMEC in Kokulturen mit osteoporotischen MSC bisher nicht untersucht wurden. Gezeigt werden konnte jedoch bereits bei knochengesunden MSC ein positiver Einfluss auf die Syntheseleistung proangiogener Faktoren durch HMEC in der Kokultur (Unger et al. 2007). Allerdings wurde in der Arbeit von Unger et al. nicht vWF, sondern VEGF als Marker verwendet (Unger et al. 2007), sodass die Übertragbarkeit auf den hier ausgeführten Versuchsaufbau eingeschränkt ist. Möglich wäre zum einen ein negativer Einfluss von osteoporotischen MSC auf die Synthese von angiogenen Faktoren wie vWF. Zum anderen stellt die Verwendung von vWF statt VEGF

als Marke der Angiogenese eine Möglichkeit dar. Zusätzlich muss beachtete werden, dass zwar der Einfluss des vWFs auf die Angiogenense durch die Untersuchung von Starke et al. (2011) aufgezeigt werden konnte, jedoch die Auswirkung des vWFs auf die Angiogenese als hemmend anzunehmen ist. Im Mäusemodel mit vWF-Mangel konnte eine erhöhte Angiogenese und ein vermehrtes Gefäßnetz dargestellt werden. Auch in vitro wurde eine erhöhte Stabilität der neu gebildeten Gefäße beobachtete (Starke et al. 2011). Folglich stellt sich die Frage, ob bei erhöhten vWF-Konzentrationen, welche in den Kokulturen gemessen wurden, im weiteren zeitlichen Verlauf ein instabileres und geringer ausgeprägtes Gefäßnetz vorgelegen hätte. Diesbezüglich wäre es sinnvoll hierzu weiterführende Untersuchungen durchzuführen.

4.4 BDNF

Der BDNF gehört zu Gruppe der körpereigenen Wachstumsfaktoren, der Neurotrophine. Vor allem in der neuronalen Differenzierung, aber auch im Knochenstoffwechsel, spielt BDNF eine entscheidende Rolle. Seine Funktion überträgt das BDNF über einen spezifischen Rezeptor, den TrkB (Zhang et al. 2013). Bereits unterschieden werden konnten die Wirkungsweisen von zentralem zu in der Peripherie wirksamen BDNF. Es konnte bei BDNF-knockout Mäusen eine erhöhte Knochenmasse bei einer vorwiegend metabolischen Stoffwechsellage gezeigt werden (Camerino et al. 2012). Wohingegen bei nicht-neuronalem Vorkommen, wie z. B. der Frakturheilung, ein positiver Effekt auf den Knochenstoffwechsel gezeigt werden konnte. Bereits nachgewiesen wurde ein deutlich erhöhter BDNF-Spiegel in osteoblastären Zellen in den Frakturzonen der Maus (Asaumi et al. 2000).

Für die optimale Konzentration an zugefügtem BDNF im Zellkulturversuch gibt es in der Literatur keine direkte Empfehlung. Die meisten Untersuchungen mit BDNF wurden bislang an neuronalen Zellen durchgeführt. Hier zeigte sich in der Verwendung von 40 ng/mL ein positiver Effekt auf die Proliferationsrate (Li et al. 2009). Wohingegen Zementoblasten, Zellen des Zahnhalteapparates, den Osteoblasten in ihrer Funktion ähnlich, bereits bei einer BDNF Konzentration von 20 ng/mL eine verbesserte osteogene Differenzierung zeigten (Kajiya et al. 2008). In vergleichbaren Zellkulturversuchen mit humanen Osteoblasten einer anderen Arbeitsgruppe (Liu et al. 2018) konnte eine verbesserte osteogene Differenzierung mit Anstieg der ALP bei Verwendung von 100 ng/mL BDNF beobachtet werden.

Die stark schwankenden Konzentrationen von BDNF in den zuvor diskutierten ZK legt eine große individuelle therapeutische Breite an BDNF für den gewünschten Effekt in der ZK dar. Vor Verwendung von 20 ng/mL BDNF in dem vorliegenden Zellkulturversuch wurde eine Konzentrationsreihe durchgeführt. Hauptbestandteil dieser Arbeit ist die Untersuchung der Einflüsse von BDNF auf die Angiogenese. Dementsprechend wurde nicht die osteogene Differenzierung mit ALP als Marker in der Konzentrationsreihe untersucht, sondern vWF als Marker der Angiogenese. Hier zeigte sich ein erhöhtes Level des vWFs bereits bei Verwendung von 20 ng/mL BDNF mit einem sicheren Nachweis des vWFs sowohl an Tag 3 als auch an Tag 5, sodass die Wahl der passenden BDNF-Konzentration, losgelöst von der Literatur, aber angelehnt an den Vorversuch der vorliegenden Arbeit getroffen wurde.

In der Auswertung sollte die Auswirkung von BDNF auf die Kokultur von osteoporotischen und knochengesunden MSC mit HMEC aufgezeigt werden. In der Lebendzellbeobachtung ergaben sich kaum sichtbare Unterschiede der verschiedenen Kokulturen. Auch die Immunofluoreszenzfärbung zeigte keine wesentlichen Unterschiede unter Verwendung von BDNF. Wobei in der Immunofluoreszenz der osteoporotischen Kulturen unter Verwendung von BDNF verglichen zu den Kulturen ohne Zugabe von BDNF eine vermehrte Zellzahl durch die Anfärbung der Zellkerne sichtbar wurde.

Zum einen wurde bereits durch mehrere Forschungsgruppen der positive Effekt von BDNF auf die osteogene Differenzierung und gesteigerte Synthese proosteogener Faktoren beschrieben (Kajiya et al. 2008; Yamashiro et al. 2001). Zum anderem konnte in diesen Arbeiten eine gesteigerte ALP-Synthese durch BDNF aufgezeigt werden. Diese Ergebnisse konnten in der Auswertung der vorliegenden Arbeit nicht verifiziert werden. Die Messergebnisse ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen Kokulturen mit und ohne Zusatz von BDNF. In anderen Arbeiten war dieser Effekt bei 100 ng/mL BDNF am stärksten (Liu et al. 2018). Beim hier vorliegenden, Versuchsaufbau wurden lediglich 20 ng/mL BDNF eingesetzt. Eine mögliche Erklärung für die fehlende Bestätigung könnte die Menge an verwendeten BDNFs sein.

Weiterhin gilt es die Auswirkungen von BDNF auf die Synthese des vWFs als Marker der Angiogenese zu berücksichtigen. Im Rahmen der Frakturheilung konnte ein positiver Effekt von BDNF auf die Ausschüttung von VEGF als Parameter der Angiogenese aufgezeigt werden. Jedoch wurde in dieser Arbeit 50 ng/mL BDNF verwendet und die Synthese von VEGF wurde durch Osteoblasten untersucht (Zhang et al. 2017). Wohingegen in der vorliegenden Arbeit BDNF in einer Konzentration von 20 ng/mL und vWF als Marker der Angiogenese verwendet wurde. Nichtsdestotrotz konnten auch in

der vorliegenden Arbeit mehrere Unterschiede aufgezeigt werden. Auffällig waren die signifikanten Anstiege der vWF-Konzentrationen der Kokulturen der knochengesunden MSC mit und ohne Zusatz von BDNF. In den Kokulturen der osteoporotischen Zelllinien konnte nur ein signifikanter Anstieg unter Verwendung von BDNF aufzeigt werden, sodass ein positiver Einfluss von BDNF auf die Syntheseleistung von HMEC in der Kokultur mit osteoporotischen MSC nicht ausgeschlossen werden kann. Eine solche positive Wirkung von BDNF auf osteoporotische Zellen konnte bereits in einem Tiermodel aufgezeigt werden (Park et al. 2024). In diesem Tiermodel wurden Ratten ovarektomiert, um eine Osteoporose zu induzieren. Anschließend erfolgten Injektionen mit BDNF. In der Auswertung zeigten sich eine Erhöhung der Knochenmineraldichte und eine gesteigerte Osteoblastenrate, jedoch ohne statistische Signifikanz. Bereits mehrfach diskutiert wurde der positive Einfluss von Neurotrophinen, darunter auch BDNF, auf die Knochenheilung durch die Anregung der Angiogenese (Su et al. 2018). Bezogen auf die Osteoporose, die sich zum Teil durch einen Rückgang des Gefäßsystems präsentiert, könnte in Bezug auf die vorliegende Arbeit BDNF durch die Steigerung der Angiogenese ein zukünftiges lokales Therapeutikum im Umgang mit der Osteoporose darstellen.

4.5 Schlussfolgerung und Ausblick

Zusammenfassend betrachtet können aus den Ergebnissen folgende Schlussfolgerungen gezogen werden. Es erfolgt die Synthese des vWFs ausschließlich in HMEC und die Synthese von ALP nur in den MSC sowohl in den knochengesunden als auch den osteoporotischen Zelllinien. Unterschiede in der ALP-Aktivität und der Gesamtproteinsynthese konnten in Bezug auf die Verwendung von BDNF auch im Hinblick auf knochengesunde und osteoporotische MSC in dieser Arbeit nicht aufgezeigt werden. Als mögliche Einflussfaktoren sind hier die Inkubationsdauer und die verwendete Konzentration von BDNF zu nennen. Es konnten Einflüsse auf die Kokultur im Hinblick auf die vWF-Konzentration beim Vergleich von 3 zu 5 Tagen aufgezeigt werden. In der knochengesunden Zelllinie ergaben sich positive Einflüsse auf die Konzentration des vWFs sowohl bei Verwendung von BDNF als auch bei fehlendem Zusatz. Dieser Einfluss konnte bei der osteoporotischen Kokultur lediglich unter Verwendung von 20 ng/mL BDNF beobachtet werden. In der entsprechenden Kontrollgruppe ohne Zusatz von BDNF konnte dieser Einfluss nicht aufgezeigt werden, sodass im Umkehrschluss ein positiver Einfluss von BDNF auf die osteoporotische Kokultur mit HMEC anzunehmen ist.

Mit zunehmender Alterung der Bevölkerung und mit immer weiterem Anstieg des Durchschnittsalters nehmen Systemerkrankungen, wie die Osteoporose, einen immer größeren Stellenwert ein. Bei Vorliegen einer Osteoporose im Alter sinkt die Knochenqualität und das Heilungspotential bei Frakturen bei gleichzeitig steigendem Frakturrisiko (Smith et al. 1975). Dieser Verlauf kann unter anderem mit dem Rückgang der Typ H Gefäße im Knochen in Zusammenhang gebracht werden (Ding et al. 2020; Kusumbe et al. 2014). Eine Steigerung der Angiogenese könnte ein möglicher Angriffspunkt zur positiven Beeinflussung einer Osteoporose darstellen. Eine enge Interaktion zwischen Angiogenese und osteogener Differenzierung konnte bereits mehrfach aufgezeigt werden. Diese positive Korrelation kann durch unterschiedliche Faktoren zusätzlich stimuliert werden. Als einer dieser Einflussfaktoren konnte BDNF definiert werden. Es konnte eine erhöhte Synthese von BDNF in Osteoprogenitorzellen im Rahmen der Frakturheilung aufgezeigt werden. Durch die erhöhten BDNF Konzentrationen stieg im Umkehrschluss die Konzentration an VEGF als potenter proangiogener Faktor (Zhang et al. 2017). Um den Bogen auf die vorliegende Arbeit zu spannen, ist die Bedeutung des vWFs als Marker der Angiogenese zu betrachten. Dass vWF einen Einfluss auf die Angiogenese hat, wurde bereits in anderen Arbeiten aufgezeigt (Kermani et al. 2007; Starke et al. 2011).

Jedoch konnte eine Arbeit um ein Forschungsteam um Jin et al. 2018 einen Zusammenhang zwischen BDNF und vWF-Spiegel im Serum von Patienten herstellen. Dabei zeigte sich bei erniedrigten BDNF-Spiegel und hohen vWF-Konzentrationen ein deutlich erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse (Jin et al. 2018), sodass ein möglicher Zusammenhang zwischen vWF und BDNF als Marker für eine Osteoporose und deren Risikoprofil in Ausblick gestellt werden könnten. Angelehnt an die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, in Bezug auf die Unterschiede der osteoporotischen Kokultur unter Verwendung von BDNF, könnte dies ein neuer Ansatzpunkt für zukünftige Arbeiten darstellen.

5 Zusammenfassung

Die Bildung und Stabilisierung von Blutgefäßen ist für die Frakturheilung von entscheidender Bedeutung. Im Herz konnte gezeigt werden, dass das Signalmolekül *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) die Angiogenese fördert. Vor diesem Hintergrund stellte sich die Frage, ob durch eine Applikation von BDNF die Bildung von Blutgefäßen stimuliert wird und ob die Osteoblasten osteoporotischer Spender hierbei regulierend wirken. Angelehnt an die gestellte Hypothese konnte kürzlich aufgezeigt werden, dass mesenchymale Stammzellen (MSC) und Osteoblasten bei Osteoporose phänotypische Veränderungen im Vergleich zu knochengesunden Zellen aufweisen. Zur Beantwortung der Frage wurden humane Osteoblasten und Endothelzellen im Kokultursystem untersucht. MSC wurden aus humaner Spongiosa isoliert, die bei der Endoprothetik als Restmaterial anfiel. Es wurden MSC von n = 5 knochengesunden und n = 5 osteoporotischen Spendern verwendet. Für das Kokultursystem wurden die MSC 10 Tage osteogen differenziert. Anschließend wurden immortalisierte humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen (HMEC), in einem Verhältnis von 1:4, sowie BDNF (20 ng/mL Medium) hinzugefügt. Nach 3 und 5 Tagen wurde der von-Willebrand-Faktor (vWF) im Zellkulturmedium mittels ELISA bestimmt. Die Zellen wurden ebenfalls nach 3 und 5 Tagen geerntet und zur Bestimmung der relativen alkalischen Phosphatase (ALP) Aktivität verwendet. Abschließend erfolgte eine statistische Analyse und graphische Darstellung. Die Konzentration des sezernierten vWF im Zellkulturmedium stieg von Tag 3 zu Tag 5 signifikant in Kokulturen mit humanen Osteoblasten von osteoporotischen Spendern nach Zugabe von BDNF an. In Kokulturen knochengesunder Osteoblasten konnte ein vergleichbarer Anstieg der vWF Konzentration auch ohne die zusätzliche Applikation von BDNF gemessen werden. Die Differenzierung und Aktivität der Osteoblasten wurde durch die relative Aktivität der ALP ermittelt. Es waren keine signifikanten Unterschiede in der ALP Aktivität in den Kokulturen knochengesunder und osteoporotische Osteoblasten, sowie nach Applikation von BDNF zu verzeichnen. Die Ergebnisse zeigen, dass Osteoblasten osteoporotischer Spender nach Zugabe von BDNF keinen negativen Einfluss auf die Bildung des vWF und somit auf die Angiogenese ausüben. Diese stimulierende Wirkung von BDNF ist in Kokulturen knochengesunder Osteoblasten nicht notwendig. BDNF zeigte im Kokultursystem mit humanen Endothelzellen keinen Einfluss auf die ALP Aktivität, die als Zeichen für die Aktivität der Osteoblasten verwendet wurde. Zusammenfassend zeigte sich durch BDNF eine positive Beeinflussung der osteoporotischen Kokultur in Bezug auf die Angiogenese, womit ein zukünftiger Ansatz im Umgang mit Osteoporose aufgezeigt werden konnte.

6 Summary

The formation and stabilization of blood vessels is crucial for fracture healing. In the heart, it has been shown that the signaling molecule brain-derived neurotrophic factor (BDNF) promotes angiogenesis. In this context, the question arose as to whether the application of BDNF stimulates the formation of blood vessels and whether the osteoblasts from osteoporotic donors have a regulating effect. In this regard, it was recently shown that mesenchymal stem cells (MSC) and osteoblasts exhibit phenotypic changes in osteoporosis compared to bone-healthy cells. To answer the question, human osteoblasts and endothelial cells were examined in a coculture system.

MSC were isolated from human cancellous bone, which was a residual material from endoprosthetics. MSCs from n = 5 bone-healthy and n = 5 osteoporotic donors were used. For the co-culture system, the MSCs were osteogenically differentiated for 10 days. Then, immortalized human dermal microvascular endothelial cells (HMEC), at a ratio of 1:4, and BDNF (20 ng/mL medium) were added. After 3 and 5 days, von Willebrand factor (vWF) was determined in the cell culture medium using ELISA. The cells were also harvested after 3 and 5 days and used to determine the relative ALP activity. Finally, a statistical analysis and graphical representation was carried out.

The concentration of secreted vWF in the cell culture medium increased significantly from day 3 to day 5 in cocultures with human osteoblasts from osteoporotic donors after addition of BDNF. In cocultures of bone-healthy osteoblasts, a comparable increase in vWF concentration could be measured, even without the additional application of BDNF. The differentiation and activity of osteoblasts was determined by the relative activity of ALP. There were no significant differences in ALP activity in the cocultures of healthy bone and osteoporotic osteoblasts, or after application of BDNF.

The results show that osteoblasts from osteoporotic donors do not have a negative influence on the formation of vWF and thus on angiogenesis after the addition of BDNF. This stimulating effect of BDNF is not necessary in cocultures of bone-healthy osteoblasts. BDNF showed no influence on ALP activity in the co-culture system with human endothelial cells, which was used as a sign of osteoblast activity. In summary, BDNF was shown to have a positive influence on osteoporotic coculture with regard to angiogenesis, which could demonstrate a future approach to dealing with osteoporosis.

7 Abkürzungsverzeichnis

3,3´,5,5´-Tetramethylbenzidin (TMB)

Alkalische Phosphatase (ALP)

Antikörper (AK)

Beziehungsweise (bzw.)

Biotinyliertem Sekundärantikörper (E0453)

Blockierpuffer aus bovinem Serumalbumin (BSA)

Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)

Cluster of Differentiation 31 (CD31)

CXC-Motiv-Chemokine 12 (CXCL12)

Desoxyribonukleinsäure (DNS)

Dual X-ray-Absorptiometry (DXA)

Dulbeccos modified Eagles medium (DMEM)

Extrazellulärmatrix (EZM)

Grad Celcius (°C)

Gramm pro Millimol (g/mmol)

Gramm pro Mol (g/mol)

G-Zahl (g)

Humane mikrovaskuläre endotheliale Zellen (HMEC)

Hypoxie-induzierter Faktor (HIF)

Kilodalton (kDa)

Meerrettich-Peroxidase (HRP)

Mesenchymale Stammzellen (MSC)

Mikrogramm pro Milliliter (µg/mL)

Mikroliter (µL)

Milligramm pro Milliliter (mg/mL)

Milliliter (mL)

Minuten (min)

Mol (mol)

Nanogramm pro Milliliter (ng/mL)

Nanometer (nm)

Nicht gewebsspezifische ALP (NTALP)

Osteoprotegerin (OPG)

Osterix (Osx)

p57 Neurotrophin-Rezeptor (p57NTR)

Phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS)

Quadratzentimeter (cm^2)

Runt-related transcription factor 2 (Runx2)

Sex determining region Y (SRY)

SRY-box 9 (Sox9)

Stammzellfaktor (SCF)

Tetramethylrhodamin B isothiocyanat-Phalloidin-Konjugat (Phalloidin-TRITC)

Tyrosinrezeptorkinase B (TrkB)

Vascular endothelial growth factor (VEGF)

Von Willebrand Faktor (vWF)

Weiblich (w)

Zellkulturen (ZK)

Zum Beispiel (z. B.)

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Intraoperativ entnommener Hüftkopf zur Gewinnung von MSC. 13
Abbildung 2: Plattenbelegung Hauptversuch 16
Abbildung 3: Plattenbelegung zur Zellzahlbestimmung HMEC. 17
Abbildung 4: Konzentrationsreihe zur Bestimmung der benötigten Menge an BDNF. 17
Abbildung 5: Plattenbelegung der Immunofluoreszenzfärbung. 19
Abbildung 6: Zellzahlbestimmung-HMEC. 25
Abbildung 7: vWF ELISA zur Bestimmung der BDNF-Konzentration. 26
Abbildung 8: Lichtmikroskopie einer osteoporotischen Zellreihe. 28
Abbildung 9: Lichtmikroskopie einer knochengesunden Zellreihe im Rahmen der osteogenen Differenzierung an Tag 10. 29
Abbildung 10: Lichtmikroskopie der osteogenen Differenzierung an Tag 10. 30
Abbildung 11: Lichtmikrokopie einer HMEC Monokultur. 31
Abbildung 12: Kokultur osteoporotischer MSC und HMEC ohne Zugabe von BDNF. 32
Abbildung 13: Kokultur knochengesunder MSC und HMEC ohne Zugabe von BDNF. 33
Abbildung 14: Kokultur knochengesunder MSC und HMEC mit Zugabe von BDNF. Tag 13 (A, B) und Tag 15 (C, D). Extrazelluläres Mineral durch schwarze Pfeile gekennzeichnet. 34
Abbildung 15: Kokulturen an Tag 15. Knochengesunde MSC ohne Zugabe von BDNF (A) und mit BDNF (B). Osteoporotische MSC ohne Zugabe von BDNF (C) und mit BDNF (D). 36
Abbildung 16: Boxplot der ALP Aktivität/Gesamtprotein. 38
Abbildung 17: Relative ALP Aktivität der MSC-Monokultur. 39
Abbildung 18: Konzentration des vWFs osteoporotischer Kokulturen nach Zugabe von BDNF. 40
Abbildung 19: Konzentration des vWFs osteoporotischer Zellkulturen ohne Zugabe von BDNF. 40
Abbildung 20: Konzentration des vWFs knochengesunder Kokulturen unter Zugabe von BDNF. 41
Abbildung 21: Konzentration des vWFs knochengesunder Kokulturen ohne Zugabe von BDNF. 42

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete humane multipotente Stromazellen. 13
Tabelle 2: Anteil der MSC in den verwendeten Zelllinien 44

10 Literaturverzeichnis

Abbot, Stewart E., Clifford R. Stevens, and David R. Blake. 1992. “Synovial Microvascular Endothelial Cell Isolation and Culture.” *Arthritis Rheuma* 35:401–6.

Ades, Edwin W., Francisco J. Candal, Robert A. Swerlick, Velma G. George, Susan Summers, Diane C. Bosse, and Thomas J. Lawley. 1992. “HMEC-1: Establishment of an Immortalized Human Microvascular Endothelial Cell Line.” *The Journal of Investigative Dermatology* 99:683–90.

Albelda, Steven M., Peter D. Oliver, Cardiovascular Pulmonary Division, Touro Infirmary, and New Orleans. 1990. “EndoCAM: A Novel Endothelial Cell-Cell Adhesion Molecule.” *The Journal of Cell Biology* 110(April):1227–37.

Asaumi, K., T. Nakanishi, H. Asahara, H. Inoue, and M. Takigawa. 2000. “Expression of Neurotrophins and Their Receptors (TRK) During Fracture Healing.” *Bone* 26(6):625–33.

Aubin, Jane E. 1998. “Bone Stem Cells.” *Journal of Cellular Biochemistry Supplements* 82:73–82.

Baker, Courtney E., Stephanie N. Moore-Lotridge, Alexander A. Hysong, Samuel L. Posey, J. Patton Robinette, Deke M. Blum, Michael A. Benvenuti, Heather A. Cole, Satoru Egawa, Atsushi Okawa, Masanori Saito, Jason R. McCarthy, Jeffry S. Nyman, Masato Yuasa, and Jonathan G. Schoenecker. 2018. “Bone Fracture Acute Phase Response—A Unifying Theory of Fracture Repair: Clinical and Scientific Implications.” *Clinical Reviews in Bone and Mineral Metabolism* 16(4):142–58.

Barde, Y. A., D. Edgar, and H. Thoenen. 1982. “Purification of a New Neurotrophic Factor from Mammalian Brain.” *Hoppe-Seyler’s Zeitschrift Für Physiologische Chemie*.

Barde, Y. A., R. M. Lindsay, D. Monard, and H. Thoenen. 1978. “New Factor Released by Cultured Glioma Cells Supporting Survival and Growth of Sensory Neurones.” *Nature* 274(5673):818.

Berger, C., L. Langsetmo, L. Joseph, D. A. Hanley, S. Davison, R. G. Josse, J. C. Prior, N. Kreiger, A. Tenenhouse, and D. Goltzman. 2009. “Association between Change in Bone Mineral Density (BMD) and Fragility Fracture in Women and Men.” *Journal of Bone Mineral Research*.

Bernhardt, Anne, Anja Lode, Sabine Boxberger, Wolfgang Pompe, and Michael Gelinsky. 2008. “Mineralised Collagen — an Artificial , Extracellular Bone Matrix — Improves Osteogenic Differentiation of Bone Marrow Stromal Cells.” *Journal of*

Materials Science: Materials in Medicine 19:269–75.

Boyle, William J., W. Scott Simonet, and David L. Lacey. 2003. “Osteoclast Differentiation and Activation.” *Nature* 423(May):337–42.

Bruder, Scott P., Neelam Jaiswal, and Stephen E. Haynesworth. 1997. “Growth Kinetics, Self-Renewal, and the Osteogenic Potential of Purified Human Mesenchymal Stem Cells During Extensive Subcultivation and Following Cryopreservation.” *Journal of Cellular Biochemistry* 64:278–94.

Cai, Xiao xiao, E. Luo, and Quan 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, and P. V. Hauschka. 2012. “Central Depletion of Brain-Derived Neurotrophic,Factorin Mice Results in High Bone Mass and Metabolic Phenotype.” *Endocrinology* 153(11):5394–5405.

Caplan, Arnold I. 1991. “Mesenchymal Stem Cells *.” *Journal of Orthopaedic Research* 9(5):641–50.

Chang, C. H., D. Ã, and William H. Fishman. 1980. “Presence of the Rare D-Variant Heat-Stable , Placental-Type Alkaline Phosphatase in Normal Human Testis1.” *Cancer Research* 40(May):1506–11.

Coskun, Suleyman; Hirschi Karen K. 2010. “Establishment and Regulation of the HSC Niche: Roles of Osteoblastic and Vascular Compartments.” *Birth Defects Res C Embryo Today* 90(4):229–42.

Coughlan, Tara and Frances Dockery. 2014. “Osteoporosis and Fracture Risk in Older People.” *Clinical Medicine* 14(2):187–91.

Cui, Liao, Ting Li, Yuyu Liu, Le Zhou, Pinghua Li, Bilian Xu, Lianfang Huang, Yan Chen, Yanzhi Liu, Xiaoyan Tian, Webster S. S. Jee, and Tie Wu. 2012. “Salvianolic Acid b Prevents Bone Loss in Prednisone-Treated Rats through Stimulation of Osteogenesis and Bone Marrow Angiogenesis.” *PLoS ONE* 7(4).

Ding, Wenge, Chenyang Xu, Yige Zhang, and Haifeng Chen. 2020. “Advances in the Understanding of the Role of Type-H Vessels in the Pathogenesis of Osteoporosis.” *Archives of Osteoporosis* 15(1).

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. 2006. "Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells." The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy.8(4):315-7.

Donovan, M. J., M. I. Lin, P. Wiegn, T. Ringstedt, R. Kraemer, R. Hahn, Shiyang Wang, C. F. Ibañez, Shahin Rafii, and B. L. Hempstead. 2000. “Brain Derived Neurotrophic Factor Is an Endothelial Cell Survival Factor Required for Intramyocardial Vessel Stabilization.” *Development* 127(21):4531–40.

Dresner-Pollak, R., R. A. Parker, M. Poku, J. Thompson, M. J. Seibel, and S. L. Greenspan. 1996. “Clinical Investigations Biochemical Markers of Bone Turnover Reflect Femoral Bone Loss in Elderly Women.” *Calcified Tissue International* 59:328–33.

Duijsens, A. W. H. B., S. Keizer, T. Vliet-Vlieland, and R. G. H. H. Nelissen. 2005. “Resurfacing Hip Prostheses Revisited.” *International Orthopaedics* 29:224–28.

Ernfors, Patrik, Cynthia Wetmore, Lars Olson, and Håkan Persson. 1990. “Identification of Cells in Rat Brain and Peripheral Tissues Expressing MRNA for Members of the Nerve Growth Factor Family.” *Neuron* 5(4):511–26.

Eveline E. Schneeberger, Robert D. Lynch. 1984. “Tight Junctions Their Structure, Composition, and Function.” *Circulation Research* 125(1):5–6.

Folkman J, Merler E, Abernathy C, Williams G. 1970. “Isolation of a Tumor Factor Responsible for Angiogenesis.” *J Exp Med* 133:275–88.

Folkman, J. and Y. Shing. 1992. “Angiogenesis.” *Journal of Biological Chemistry* 267(16):10931–34.

Goldstein, David J., Caprice Rogers, and Harry Harris. 1982. “A Search for Trace Expression of Placental-like Alkaline Phosphatase in Non-Malignant Human Tissues: Demonstration of Its Occurrence in Lung , Cervix , Testis and Thymus.” *Clinica Chimica Acta* 125:63–75.

Grampp, Stephan, Harry K. Genant, Ashwini Mathur, Philipp Lang, Michael Jergas, Masahiko Takada, Claus C. Glüer, Ying Lu, and Monica Chavez. 1997. “Comparisons of Noninvasive Bone Mineral Measurements in Assessing Age-Related Loss, Fracture Discrimination, and Diagnostic Classification.” *Journal of Bone and Mineral Research* 12(5):697–711.

Grellier, Maritie, Nancy Ferreira-Tojais, Chantal Bourget, Reine Bareille, and Fabien Guillemot. 2009. “Role of Vascular Endothelial Growth Factor in TheCommunication Between Human Osteoprogenitorsand Endothelial Cells.” *Journal of Biological Chemistry* 106:390–98.

Harris, Harry. 1989. “The Human Alkaline Phosphatases : What We Know and What We Don ’ t Know.” *Clinica Chimica Acta* 186:133–50.

Häussler, Bertram, Holger Gothe, Sandra Mangiapane, Gerd Glaeske, Ludger Pientka, Dieter Felsenberg, Frank Praetorius, Peter Schneider, Daniel Lohmann, and Matthias Perleth. 2007. “Outpatient Care for Osteoporosis Patients in Germany - Results from the BoneEVA Study: Discussion.” *Deutsches Arzteblatt* 104(4):2542–48.

Henthorn, Paula S., Michael Raduchaq, Tom Kadeschs, J. Weissvii, and Harry Harriev. 1988. “Sequence and Characterization of the Human Intestinal Alkaline Phosphatase Gene.” *The Journal of Biological Chemistry* 263(24):12011–19.

Hofbauer L. C., Khoslan S., Dustan C. R., Lacey D. L., Spelsberg T. C., Riggs B. L. 1999. “Estrogen Stimulates Gene Expression and Protein Production of Osteoprotegerin in Human Osteoblastic Cells.” *The Endocrine Society* 140(9):4367–70.

Hofer, M., S. R. Pagliusi, A. Hohn, J. Leibrock, and Y. A. Barde. 1990. “Regional Distribution of Brain-Derived Neurotrophic Factor MRNA in the Adult Mouse Brain.” *The EMBO Journal* 9(8):2459–64.

Huang, Zhijian, Nels A. Olson, Weimin You, and Richard P. Haugland. 1992. “A Sensitive Competitive ELISA for 2 , 4-Dinitrophenoi Using 3 , 6-Fluorescein Diphosphate as a Fluorogenic Substrate.” *Journal of Immununological Methods* 149:261–66.

Jaffe, Emc A., Ralph L. Nachman, Carl G. Becker, and C. Richard Miinick. 1973. “Culture of Human Endothelial Cells Derived from Umbilical Veins.” *The Journal of Clinical Investigation* 52(November):2745–56.

Jaffe, Eric A., Leon W. Hoyert, and Ralph L. Nachman. 1974. “Synthesis of von Willebrand Factor by Cultured Human Endothelial Cells.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* f71(5):1906–9.

Jin, Hong, Yifei Chen, Bilei Wang, Yi Zhu, Long Chen, Xiqiong Han, Genshan Ma, and Naifeng Liu. 2018. “Association between Brain-Derived Neurotrophic Factor and von Willebrand Factor Levels in Patients with Stable Coronary Artery Disease.” *BMC Cardiovascular Disorders* 18(1):1–8.

Kaisho, Yoshihiko, Asea Shintani, Yoshitaka Ono, Koki Kato, and Koichi Igarashi. 1991. “Regional Expression of the Nerve Growth Factor Gene Family in Rat Brain during Development.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 174(1):379–85.

Kajiya, Mikihito, Hideki Shiba, Tsuyoshi Fujita, Kazuhisa Ouhara, Katsuhiro Takeda, Noriyoshi Mizuno, Hiroyuki Kawaguchi, Masae Kitagawa, Takashi Takata, Koichiro Tsuji, and Hidemi Kurihara. 2008. “Brain-Derived Neurotrophic Factor Stimulates

Bone/Cementum-Related Protein Gene Expression in Cementoblasts." *Journal of Biological Chemistry* 283(23):16259–67.

Kalcheim, Chaya and Marcelle Gendreau. 1988. "Brain-Derived Neurotrophic Factor Stimulates Survival and Neuronal Differentiation in Cultured Avian Neural Crest." *Brain Research* 469(1–2):79–86.

Karasek, Marvin A. 1989. "Microvascular Endothelial Cell Culture." *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 93(2):S33–38.

Karmakar, Sougata, Jonathan Kay, and Ellen M. Gravallese. 2010. "Bone Damage in Rheumatod Arthritis: Mechanistic Insights and Approaches to Prevention." *Rheumatic Disease Clinics of North America* 36(2):385–404.

Karsenty, Gerard. 2008. "Transcriptional Control of Skeletogenesis." *The Annual Review of Genomics and Human Genetics* 9:183–98.

Kermani, Pouneh and Barbara Hempstead. 2007. "Brain-Derived Neurotrophic Factor: A Newly Described Mediator of Angiogenesis." *Trends in Cardiovascular Medicine* 17(4):140–43.

Kilian, Olaf, Sonja Hartmann, Nicole Dongowski, Srikanth Karnati, Eveline Baumgart-Vogt, Frauke V. Härtel, Thomas Noll, Reinhard Schnettler, and Katrin S. Lips. 2014. "Annals of Anatomy BDNF and Its TrkB Receptor in Human Fracture Healing." *Annals of Anatomy* 196(5):286–95.

Knoll, Brian J., Katrina N. Rothblum, and Maryann Longley. 1988. "Nucleotide Sequence of the Human Placental Alkaline Phosphatase." *The Journal of Biological Chemistry* 263(24):12020–27.

Kobayashi, S., H. E. Takahashi, A. Ito, N. Saito, M. Nawata, H. Horiuchi, H. Ohta, R. Iorio, N. Yamamoto, and K. Takaoka. 2003. "Trabecular Minimodeling in Human Iliac Bone." *Bone* 32(2):163–69.

Komori, T., H. Yagi, S. Nomura, A. Yamaguchi, K. Sasaki, K. Deguchi, Y. Shimizu, R. T. Bronson, Y. Gao, M. Inada, M. Sato, R. Okamoto, Y. Kitamura, S. Yoshiki, and T. Kishimoto. 1997. "Targeted Disruption of Cbfa1 Results in a Complete Lack of Bone Formation Owing to Maturational Arrest of Osteoblasts." *Cell Press* 89:755–64.

Kovtonyuk, Larisa V., Kristin Fritsch, Xiaomin Feng, Markus G. Manz, and Hitoshi Takizawa. 2016. "Inflamm-Aging of Hematopoiesis, Hematopoietic Stem Cells, and the Bone Marrow Microenvironment." *Frontiers in Immunology* 7(NOV):1–13.

Kubota, Y., H. K. Kleinman, G. R. Martin, and T. J. Lawley. 1988. "Role of Laminin and

Basement Membrane in the Morphological Differentiation of Human Endothelial Cells into Capillary-like Structures." *The Journal of Cell Biology* 107(4):1589–98.

Kusumbe, Anjali P., Saravana K. Ramasamy, and Ralf H. Adams. 2014. "Coupling of Angiogenesis and Osteogenesis by a Specific Vessel Subtype in Bone." *Nature* 507(7492):323–28.

Lampert, Florian M., Filip Simunovic, Günter Finkenzeller, Dietmar Pfeifer, G. Björn Stark, Oscar Winninger, and Dominik Steiner. 2016. "Transcriptomic Changes in Osteoblasts Following Endothelial Cell-Cocultivation Suggest a Role of Extracellular Matrix in Cellular Interaction." *Journal of Cellular Biochemistry* 117(8):1869–79.

Li, Tinglu, Guangbo Kang, Tingyue Wang, and He Huang. 2018. "Tumor Angiogenesis and Anti-Angiogenic Gene Therapy for Cancer (Review)." *Oncology Letters* 16(1):687–702.

Li, Tingsonga b; Jiang, Lia; Zhang, Xiaopingb; Chen, Hengshengb. 2009. „In-vitro effects of brain-derived neurotrophic factor on neural progenitor/stem cells from rat hippocampus." NeuroReport 20(3):p 295-300

Liu Q, Lei L, Yu T, Jiang T, Kang Y. 2018. „Effect of Brain-Derived Neurotrophic Factor on the Neurogenesis and Osteogenesis in Bone Engineering." Tissue Eng Part A.;24(15-16):1283-1292.

Lowry, H. and Rose J. Randall. 1951. "Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent." *Journal of Biological Chemistry* 193(1):265–75.

Maes, Christa and Thomas L. Clemens. 2014. "Angiogenic–Osteogenic Coupling: The Endothelial Perspective." *Nature* 3:1–4.

Maes, Christa, Tatsuya Kobayashi, Martin K. Selig, Sophie Torrekens, I. Sanford, Susan Mackem, Geert Carmeliet, and Henry M. Kronenberg. 2013. "Osteoblast Precursors, but Not Mature Osteoblasts, Move into Developing and Fractured Bones along with Invading Blood Vessels." *Developmental Cell* 19(2):329–44.

Manolagas, Stavros C. 2000. "Birth and Death of Bone Cells: Basic Regulatory Mechanisms and Implications for the Pathogenesis and Treatment of Osteoporosis." *Endocrine Reviews* 21(2):115–37.

Marenzana, Massimo and Timothy R. Arnett. 2013. "The Key Role of the Blood Supply to Bone." *Bone Research* 1:203–15.

Middlemas, David S., Brenda K. Kihl, Junfang Zhou, and Xiaoyan Zhu. 1999. "Brain-

Derived Neurotrophic Factor Promotes Survival and Chemoprotection of Human Neuroblastoma Cells." *Journal of Biological Chemistry* 274(23):16451–60.

Mikami, Yoshikazu, M. I. O. Lee, and Seiko Irie. 2011. "Dexamethasone Modulates Osteogenesis and Adipogenesis With Regulation of Osterix Expression in Rat Calvaria-Derived Cells." *Journal of Cellular Physiology* 226(3):573–852.

Muschler, George F., Hironori Nitto, Cynthia A. Boehm, and Kirk A. Easley. 2001. "Age- and Gender-Related Changes in the Cellularity of Human Bone Marrow and the Prevalence of Osteoblastic Progenitors." *Journal of Orthopaedic Research* 19:117–25.

Nachman, Ralph, Richard Levine, and Eric A. Jaffe. 1977. "Synthesis of Factor VIII Antigen by Cultured Guinea Pig Megakaryocytes." *The Journal of Clinical Investigation* 60(October):914–21.

Nagasawa Takashi, Hirota Seiichi , Tachibana Kazunobu, Takakura Nobuyuki, Nishikawa Shin-ichi, Kitamura Yukihiko, Yoshida Nobuaki, Kikutanit Hitoshi, Tadamitsu Kishimoto. 1996. "Defects of B-Cell Lymphopoiesis and Bone-Marrow Myelopoiesis in Mice Lacking the CXC Chemokine PBSF/SDF-1." *Nature* 382:635–38.

Nakashima, Kazuhisa, Xin Zhou, Gary Kunkel, Zhaoping Zhang, Jian Min Deng, Richard R. Behringer, and Benoit De Crombrugghe. 2002. "The Novel Zinc Finger-Containing Transcription Factor Osterix Is Required for Osteoblast Differentiation and Bone Formation." *Cell Press* 108:17–29.

Napoleone Ferrara, Karen Carver-Moore, Helen Chen, Mary Dowd, Lucy Lu, K. Sue O`Shea, Lyn Powell-Braxton, Kenneth J.Hillan, Mark W. Moore. 1996. "Heterozygous Embryonic Lethality Induced by Targeted Inacativation of the VEGF Gene." *Nature* 380:439–42.

NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy. 1993. "Consensus Development Conference: Diagnosis, Prophylaxis, and Treatment of Osteoporosis." *The American Journal of Medicine* 94(6):646–50.

NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy. 2001. "Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy." *Journal of the Americcan Medical Association* 285(6):785–95.

Orimo, Hideo. 2010. "The Mechanism of Mineralization and the Role of Alkaline Phosphatase in Health and Disease." *Journal of Nippon Medical School* 77(1):4–12.

Owen, Thomas A., Michael Aronow, Victoria Shalhoub, Leesa M. Barone, Laurens Wilming, Melissa S. Tassinari, Mary Beth Kennedy, Shirwin Pockwinse, Jane B. Lian, and Gary S. Stein. 1990. “Progressive Development of the Rat Osteoblast Phenotype in Vitro: Reciprocal Relationships in Expression of Genes Associated with Osteoblast Proliferation and Differentiation during Formation of the Bone Extracellular Matrix.” *Journal of Cellular Physiology* 143(3):420–30.

Parfitt, A. M. 1982. “The Coupling of Bone Formation to Bone Resorption: A Critical Analysis of the Concept and of Its Relevance to the Pathogenesis of Osteoporosis.” *Metabolic Bone Disease and Related Research* 4(1):1–6.

Park, Eugene J., Van Long Truong, Woo Sik Jeong, and Woo Kie Min. 2024. “Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) Enhances Osteogenesis and May Improve Bone Microarchitecture in an Ovariectomized Rat Model.” *Cells* 13(6).

Pittenger, Mark F., Alastair M. Mackay, Stephen C. Beck, Rama K. Jaiswal, Robin Douglas, Joseph D. Mosca, Mark A. Moorman, Donald W. Simonetti, Stewart Craig, and Daniel R. Marshak. 1999. “Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells.” *Science* 284(April):143–48.

Plotkin, Lilian I., Robert S. Weinstein, A. Michael Parfitt, Paula K. Roberson, Stavros C. Manolagas, and Teresita Bellido. 1999. “Prevention of Osteocyte and Osteoblast Apoptosis by Bisphosphonates and Calcitonin.” *Journal of Clinical Investigation* 104(10):1363–74.

Privratsky, Jamie R. and Peter J. Newman. 2014. “PECAM-1 : Regulator of Endothelial Junctional Integrity.” *Cell & Tissue Research* 355(3):607–19.

Risau, Werner. 1997. “Mechanisms of Angiogenesis.” *Nature* 386:671–74.

Ronald E. Unger, Vera Krump-Konvalinkova, Kirsten Peters and and C. James Kirkpatrick. 2002. “In Vitro Expression of the Endothelial Phenotype : Comparative Study of Primary Isolated Cells and Cell.” *Microvascular Research 64* 64:384–97.

Rosenthal, Arnon, D. V. Goeddel, T. Nguyen, E. Martin, L. E. Burton, A. Shih, G. R. Laramee, F. Wurm, A. Mason, K. Nikolics, and J. W. Winslow. 1991. “Primary Structure and Biological Activity of Human Brain-Derived Neurotrophic Factor.” *Endocrinology* 129(3):1289–94.

Sadler, J. E., U. Budde, J. C. J. Eikenboom, E. J. Favaloro, F. G. H. Hill, L. Holmberg, J. Ingerslev, C. A. Lee, D. Lillicrap, P. M. Mannucci, C. Mazurier, D. Meyer, W. L. Nichols, M. Nishino, I. R. Peake, F. Rodeghiero, R. Schneooenheim, Z. M. Ruggeri, A. Srivastava, R. R. Montgomery, and A. B. Federici. 1994. “Update on the

Pathophysiology and Classification of von Willebrand Disease : A Report of the Subcommittee on von Willebrand Factor." *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 4:2103–14.

Scott, Prudence A. E. and Roy Bicknell. 1993. "The Isolation and Culture of Microvascular Endothelium." *Journal of Cell Science* 273:269–73.

Seibel, Markus J. 2015. "Biochemical Markers of Bone TurnoverPart I: Biochemistry and Variability." *Clin Biochem Rev* 26(November):97–122.

Semenza, Gregg L. 2012. "Hypoxia-Inducible Factors in Physiology and Medicine." *Cell* 148(3):399–408.

Shi, Chunmin, Jun Wu, Quanquan Yan, Rong Wang, and Dengshun Miao. 2015. "Bone Marrow Ablation Demonstrates That Estrogen Plays an Important Role in Osteogenesis and Bone Turnover via an Antioxidative Mechanism." *Bone* 79:94–104.

Simunovic, F., D. Steiner, D. Pfeifer, G. B. Stark, Günter Finkenzeller, and F. Lampert. 2013. "Increased Extracellular Matrix and Proangiogenic Factor Transcription in Endothelial Cells after Cocultivation with Primary Human Osteoblasts." *Journal of Cellular Biochemistry* 114(7):1584–94.

Smith, D. M., M. R. A. Khairi, and C. C. Johnston. 1975. "The Loss of Bone Mineral with Aging and Its Relationship to Risk of Fracture." *Journal of Clinical Investigation* 56(2):311–18.

Soppet, Dan, Enrique Escandon, Johnne Maragos, David S. Middlemas, Susan W. Raid, Janet Blair, Louis E. Burton, Brian R. Stanton, David R. Kaplan, Tony Hunter, Karoly Nikolics, and Luis F. Parade. 1991. "The Neurotrophic Factors Brain-Derived Neurotrophic Factor and Neurotrophin-3 Are Ligands for the TrkB Tyrosine Kinase Receptor." *Cell* 65(5):895–903.

Starke, Richard D., Francesco Ferraro, Koralia E. Paschalaki, Nicola H. Dryden, Thomas A. J. Mckinnon, Rachel E. Sutton, Elspeth M. Payne, Dorian O. Haskard, Alun D. Hughes, Daniel F. Cutler, Mike A. Laffan, and Anna M. Randi. 2011. "Endothelial von Willebrand Factor Regulates Angiogenesis." *Blood* 117(3):1071–80.

statistisches Bundesamt. 2021. "Statistischer Bericht Sterbetafeln." (https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Bevoelkerung/Sterbefaelle-Lebenserwartung/Publikationen/Downloads-Sterbefaelle/periodensterbetafel-erlaeuterung-5126203207004.pdf?__blob=publicationFile).

statistisches Bundesamt. 2019. “Statistisches Jahrbuch 2019 - Kapitel 4 Gesundheit.” *Https://Www.Destatis.de/DE/Themen/Querschnitt/Jahrbuch/Jb-Gesundheit.Pdf?__blob=publicationFile* 127–62.

Steiner, Dominik, Florian Lampert, G. Björn Stark, and Günter Finkenzeller. 2012. “Effects of Endothelial Cells on Proliferation and Survival of Human Mesenchymal Stem Cells and Primary Osteoblasts.” *Journal of Orthopaedic Research* 30(10):1682–89.

Stucker, Sina, Junyu Chen, Fiona E. Watt, and Anjali P. Kusumbe. 2020. “Bone Angiogenesis and Vascular Niche Remodeling in Stress, Aging, and Diseases.” *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 8(November):1–20.

Su, Yu Wen, Xin Fu Zhou, Bruce K. Foster, Brian L. Grills, Jiake Xu, and Cory J. Xian. 2018. “Roles of Neurotrophins in Skeletal Tissue Formation and Healing.” *Journal of Cellular Physiology* 233(3):2133–45.

Sugiyama, Tatsuki, Hiroshi Kohara, and Mamiko Noda. 2006. “Maintenance of the Hematopoietic Stem Cell Pool by CXCL12-CXCR4 Chemokine Signaling in Bone Marrow Stromal Cell Niches.” *Immunity* 25:977–88.

Swaminathan, R. 2001. “Biochemical Markers of Bone Turnover.” *Clinica Chimica Acta* 313:95–105.

Trinkaus, Katja, Sabine Wenisch, Carsten Siemers, Dirk Hose, and Reinhard Schnettler. 2005. “Bohrmehl: Eine Quelle Vitaler Zelle!” *Unfallchirurg* 108(8):650–56.

Udagawa, Nobuyuki, Naoyuki Takahashi, Hisataka Yasuda, Atsuko Mizuno, Kanami Itoh, Yutaka Ueno, Toshimasa Shinki, Matthew T. Gillespie, T. John Martin, Kanji Higashio, and Tatsuo Suda. 2000. “Osteoprotegerin Produced by Osteoblasts Is an Important Regulator in Osteoclast Development and Function.” *Endocrinology* 141(9):3478–84.

Unger, Ronald E., Anne Sartoris, Kirsten Peters, Antonella Motta, Claudio Migliaresi, Martin Kunkel, Ulrike Bulnheim, Joachim Rychly, and C. James Kirkpatrick. 2007. “Tissue-like Self-Assembly in Cocultures of Endothelial Cells and Osteoblasts and the Formation of Microcapillary-like Structures on Three-Dimensional Porous Biomaterials.” *Biomaterials* 28(27):3965–76.

von Willebrand Eric A. 1926. „Hereditar pseudohemofili.“ *Fin Laekaresaellsk Hand.* 68:87–112.

Wagner, Denisa D., J. B. Olmsted, and Victor J. Marder. 1982. “Immunolocalization of von Willebrand Protein in Weibel-Palade Bodies of Human Endothelial Cells

Unlabeled Peroxidase-Anti-Peroxidase Staining." *The Journal of Cell Biology* 95(October):355–60.

Wang, Xiaoyu, Jia Xu, and Qinglin Kang. 2021. "Neuromodulation of Bone: Role of Different Peptides and Their Interactions (Review)." *Molecular Medicine Reports* 23(1).

Wang, Ying, Chao Wan, Lianfu Deng, Ximeng Liu, Xuemei Cao, Shawn R. Gilbert, Mary L. Bouxsein, Marie Claude Faugere, Robert E. Guldberg, Louis C. Gerstenfeld, Volker H. Haase, Randall S. Johnson, Ernestina Schipani, and Thomas L. Clemens. 2007. "The Hypoxia-Inducible Factor α Pathway Couples Angiogenesis to Osteogenesis during Skeletal Development." *Journal of Clinical Investigation* 117(6):1616–26.

Weinstein, Robert S., Chao Wan, Qinglan Liu, Ying Wang, Maria Almeida, Charles A. O'Brien, Jeff Thostenson, Paula K. Roberson, Adele L. Boskey, Thomas L. Clemens, and Stavros C. Manolagas. 2010. "Endogenous Glucocorticoids Decrease Skeletal Angiogenesis, Vascularity, Hydration, and Strength in Aged Mice." *Aging Cell* 9(2):147–61.

Weiss, Harvey J., Ira I. Sussman, and Leon W. Hoyer. 1977. "Stabilization of Factor VIII in Plasma by the von Willebrand Factor : Studies on Posttransfusion and Dissociated Factor VIII and in Patients with von Willebrand´s Diseas." *The Journal of Clinical Investigation* 60(2):390–404.

Weiss, Mitchell J., Kunal Ray, S. Henthornstil, Bruce Lambt, Tom Kadeschst, and Harry Harris. 1988. "Structure of the Human Liver / Bone / Kidney Alkaline Phosphatase Gene." *The Journal of Biological Chemistry* 263(24):12002–10.

Withold, Wolfgang, Ulrike Schulte, and Hans Reinauer. 1996. "Method for Determination of Bone Alkaline Phosphatase Activity: Analytical Performance and Clinical Usefulness in Patients with Metabolic and Malignant Bone Diseases." *Clinical Chemistry* 42(2):210–17.

Yamashiro, T., T. Fukunaga, K. Yamashita, N. Kobashi, and T. Takano-Yamamoto. 2001. "Gene and Protein Expression of Brain-Derived Neurotrophic Factor and TrkB in Bone and Cartilage." *Bone* 28(4):404–9.

Yang, Ping, Shan Lv, Yan Wang, Yi Peng, Zixing Ye, Zhuying Xia, Guoxian Ding, Xu Cao, and Janet L. Crane. 2018. "Preservation of Type H Vessels and Osteoblasts by Enhanced Preosteoclast Platelet-Derived Growth Factor Type BB Attenuates Glucocorticoid-Induced Osteoporosis in Growing Mice." *Bone* 114(May):1–13.

Ylä-Herttuala Seppo, Rissanen Tuomas T., Vajanto Ismo, Hartikainen Juha. 2007. “Vascular Endothelial Growth Factors Biology and Current Status of Clinical Applications in Cardiovascular Medicine.” *Journal of the American College of Cardiology* 49(10):1015–26.

Zhang, Zitao, Jin Fan, Yongxin Ren, Wei Zhou, and Guoyong Yin. 2013. “The Release of Glutamate from Cortical Neurons Regulatedby BDNF Via the TrkB/Src/PLC-G1 Pathway.” *Journal of Biological Chemistry* 151(May 2012):144–51.

Zhang, Zitao, Yan Zhang, Zhengnan Zhou, Hongfei Shi, Xusheng Qiu, Jin Xiong, and Yixin 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.

Zuk, Patricia A., Min Zhu, Peter Ashjian, Daniel A. De Ugarte, Jerry I. Huang, Hiroshi Mizuno, Zeni C. Alfonso, John K. Fraser, Prosper Benhaim, and Marc H. Hedrick. 2002. “Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells □.” *Molecular Biology of the Cell* 13(December):4279–95.

11 Publikationsverzeichnis

Nicht publizierter Kongressbeitrag

Katharina Holtkamp, Reinhard Schwartz-Albiez, Christian Heiß, Katrin Susanne Lips, Effekt von BDNF auf die Angiogenese im humanen Kokultursystem aus Endothelzellen und osteoporotischen Osteoblasten: Posterdemonstration bei der 67. Jahrestagung der Vereinigung Süddeutscher Orthopäden und Unfallchirurgen e.V. Baden-Baden 02.-04.05.2019, Baden-Baden, Deutschland

12 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 Unterschrift

13 Danksagung

Zunächst gilt ein großer Dank allen Mitarbeitern und Kollegen aus dem Labor für experimentelle Unfallchirurgie der Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand-, und Wiederherstellungschirurgie des Fachbereiches Medizin ohne deren Hilfe diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre. Darunter ein Dank an den Direktor Prof. Dr. med. Dr. h.c. Christian Heiß, für die Möglichkeit diese Arbeit zu verwirklichen.

Ein großer Dank gilt Frau Prof. Dr. Katrin S. Lips. Unter ihrer hervorragenden Betreuung und Anleitung wurde die Arbeit an diesem Thema möglich und Sie stand bei Problemen stets mit Rat und Tat zur Seite. Eine reibungslose Einarbeitung in die Welt der Labormedizin macht Frau Olga Dakischew möglich, der mein Dank für eine gute Zusammenarbeit und Betreuung gilt.

Ich danke herzlichst Reinhard Schwartz-Albiez als Leitung des deutschen Krebsforschungszentrum, Translationale Immunologie, Im Neuenheimer Feld 280, 69120 Heidelberg zur Bereitstellung der verwendeten endothelialen Zelllinie. Sowie der großzügigen auch finanziellen Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB/TRR 79, Projekte B7).

Nicht zuletzt gilt mein Danke meiner Familie, ohne deren Unterstützung ich nie so weit gekommen wäre.

Danke!