

Justus-Liebig-Universität Gießen
Fachbereich 09
Studiengang Ernährungswissenschaften
Professur für molekulare Ernährungsforschung

Masterarbeit
zur Erlangung des akademischen Grades: Master of Science

Untersuchung des Potentials von Kollagenpeptiden zur Prävention von Osteoporose

Vorgelegt von:	Gadea Harder, Adrian
Matrikelnummer:	2034889
Betreuender Prüfer:	Prof. Dr. Uwe Wenzel
Zweitprüfer:	Dr. Daniel Beis

Gießen, der 12. August. 2022

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	IV
1. Einleitung	1
2. Knochen.....	2
2.1 Aufbau und Mikroarchitektur	2
2.2 Dynamik des Knochengewebes	2
2.3 Phasen der Knochenremodellierung	3
2.3.1 Aktivierungsphase	3
2.3.2 Resorptionsphase.....	4
2.3.3 Umkehrphase.....	4
2.3.4 Bildungsphase	4
2.4 Kommunikation zwischen den Knochenzellen.....	5
2.4.1 Gap-Junctions.....	5
2.4.2 Parakrine Signalisierung	5
2.4.3 Zell-Zell-Kontakte.....	6
2.4.4 Mechanotransduktion	6
3. Osteoporose	7
3.1 Definition und Häufigkeit.....	7
3.2 Diagnose	7
3.3 Formen der Osteoporose	7
3.3.1 Primäre Osteoporose	7
3.3.2 Sekundäre Osteoporose	8
3.4 Risikofaktoren.....	8
3.4.1 Genetische Risikofaktoren	8
3.4.2 Lebensstil	9
3.5 Pathogenese	10
3.5.1 Calcium-Homöostase	10
3.5.2 Östrogen und Testosteron.....	12
3.5.3 Proinflammatorische Zytokine	12
3.5.4 MicroRNAs	13
3.5.5 Osteoregulatorische Signalwege	14
4. Kollagen	17

4.1 Struktur	17
4.2 Biologische Funktion	18
4.3 Gewinnung bioaktiver Peptide.....	18
4.4 Physikochemische Eigenschaften	19
4.5 Anwendungsgebiete	19
4.6 Metabolismus.....	20
4.7 Sicherheit	21
5. Auswirkungen von Kollagenpeptiden auf Knochenzellen	22
5.1 Osteogene Differenzierung von OB-Vorläuferzellen über Runx2.....	22
5.2 Zellzyklusprogression der S-Phase in OB-Vorläuferzellen	28
5.3 Einfluss auf die Expression apoptose-regulierender Proteine in OB	32
5.4 Erhöhte Mineralisierung und Expression osteogener Proteine in OB.....	37
5.5 Verringerte OK-Differenzierung und Expression osteoklastischer Proteine	46
5.6 Osteoporose-präventive Wirkung in Tierversuchen	56
6. Zusammenfassung	69
7. Summary.....	71
8. Literaturverzeichnis	73
9. Eidesstattliche Erklärung	104

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Mikroarchitektur des Knochens.	2
Abbildung 2: Schematische Darstellung des Knochenumbaus.	5
Abbildung 3: Kollagenbestandteile: (a) Die Aminosäuren Glycin, Prolin und Hydroxyprolin. (b) Peptidstruktur aus zwei (Gly-Pro-Hyp)-Peptiden (A) Alpha-Polypeptidkette (B) Kollagen-Triplehelix	17
Abbildung 4: Expressionsprofil relevanter Proteine des MAPK/ERK-Signalwegs in MSZ, die mit verschiedenen Konzentrationen von HK kultiviert wurden	23
Abbildung 5: Osteogene mRNA-Expression von MSZ, die mit HK behandelt wurden ...	25
Abbildung 6: Zellzyklusanalyse von mit Kollagen Typ I behandelten Mesenchymalen Knochenmarkstammzellen.	29
Abbildung 7: Proteinexpression von P21, Bax, Bcl-2 und aktiver Caspase-3 sowie das Verhältnis von Bax zu Bcl-2 in Abhängigkeit der Zeit und der Konzentration	34
Abbildung 8: mRNA-Expression von FBXW7 (links) und p100 (rechts) in Saos-2-Zellen, die jeweils mit H ₂ O ₂ , NAC und HK (200-800 µg/ml) behandelt wurden	36
Abbildung 9: Zeitverlauf der Expression osteogener Gene in MG-63 Zellen. (A) COL1A1; (B) ALP (ALPL-Gen); (C) OCN (BGLAP-Gen); (D) OPN (SPP1-Gen).....	39
Abbildung 10: Auswirkungen von HK auf die Proteinexpression von OCN, BMP-2, OPN und Integrin β ₃ in NOS-1-Zellen	41
Abbildung 11: Einfluss von HK auf die Matrixmineralisierung im MC3T3-E1-Zellen nach 21 Tagen im Vergleich zur Kontrolle.....	43
Abbildung 12: Auswirkungen von HK auf die mRNA-Expression von TRAP, NFATc1 und c-fos während der RANKL-Induktion für 3 und 5 Tage in RAW264.7-Zellen.....	48
Abbildung 13: Effekt von HK-Typ 2 und Polypeptiden (57 kDa; 40 kDa) auf die Osteoklastogenese in OK-Vorläuferzellen	52
Abbildung 14: mRNA-Expression von TRAF6 und des RANKL/OPG-Verhältnisses bei Mäusen. C, Kontrollgruppe; M, Osteoporose-Modellgruppe	58
Abbildung 15: A) Auswirkungen von HK auf die Knochenmineraldichte (BMD) des gesamten Körpers und (B) der Lendenwirbelsäule. Schein; Gruppe mit Scheinoperation, OVX; Ovariectomierte Kontrollgruppe.....	62
Abbildung 16: Western-Blot-Analyse von TGF-β (links) und Smad7 (rechts) der Oberschenkelknochen von Mäusen, die mit HK behandelt wurden	66

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auswirkungen von KP-12 auf die Zellzyklusverteilung von OB.....	30
Tabelle 2: RANKL-Expression der OB zu verschiedenen Zeitpunkten (24, 48, 72h) und Konzentrationen (0.0125, 0.05, 0.2, 0.8 mg/ml) im Vergleich zur Kontrolle.....	44
Tabelle 3: Taqman Low Density Array an RAW264.7-Zellen.....	49

Abkürzungsverzeichnis

ADFP	Adipozytendifferenzierungs-assoziiertes Protein
ALP.....	alkalische Phosphatase
Bax.....	Bcl-2-assoziiertes X Protein
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
BMD	Knochendichte
BMI.....	Körpermasseindex
BMP.....	knochenmorphogenetisches Protein
BSA/BV.....	Verhältnis von Knochenoberfläche zu Knochenvolumen
BV/TV	Verhältnis von Knochenvolumen zu Gesamtvolumen
Ca.....	Calcium
Calcitriol.....	1,25-Dihydroxyvitamin D3
CDK.....	Cyclin-abhängige Kinase
COX-2	Cyclooxygenase-2
DEXA	Dual-Energy-Röntgenabsorptiometrie
DHNL	Dihydroxy-Lysinonorleucin
DKK1	Dickkopf-verwandtes Protein 1
ER.....	Östrogenrezeptor
FBXW7.....	F-Box-Protein 7
H2O2	Wasserstoffperoxid
HNL.....	Hydroxy-Lysinonorleucin
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IGF-1	insulinähnlicher Wachstumsfaktor-1
IL-1	Interleukin-1
IL-6.....	Interleukin-6
JAK.....	Janus-Kinase-Tyrosinkinase

k-ALP	knochenspezifische alkalische Phosphatase
KOL-1.....	Kollagen Typ 1
LH.....	Lysylhydroxylase
LOXL	Lysyloxidase
MALDI-MS.....	Matrix-Assistierte-Laser-Desroptions-Ionisierungs-Massenspektrometrie
MAP2	Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2
MAPK.....	mitogen-aktivierte Proteinkinase
M-CSF	Makrophagenkolonie-stimulierender Faktor
MDA.....	Malondialdehyd
MicroRNA	nicht-codierende Ribonukleinsäure
MMP.....	Matrix-Metalloproteinase
MSZs	mesenchymalen Stammzellen
MTHFR	Methylentetrahydrofolat-Reduktase
NAC.....	N-Acetyl-L-Cystein
NaOH.....	Natriumhydroxid
NaSe	Natriumselenit
NBT	Nitroblau-Tetrazolium
NFATc1	Kernfaktor-der-aktivierten-T-Zellen-1
OB.....	Osteoblast/en
OCN.....	Osteocalcin
OK	Osteoklast/en
ON	Osteonectin
OPG	Osteoprotegerin
OPN	Osteopontin
OZ.....	Osteozyt/en
PBMZ	periphere mononukleäre Zellen
PEF	gepulste elektrische Felder
PG-2.....	Prostaglandin-2
PI3K.....	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PLC- γ 1	Phosphoinositid-Phospholipase C Gamma 1
p-NPP	Nitrophenylphosphat
PTH.....	Parathormon
RANKL	Rezeptor-Aktivator-von-NF-kB-Liganden
ROS	reaktive Sauerstoffspezies

RT-PCR	Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion
Runx2	Runt-assoziiertes Transkriptionsfaktor 2
SD	Standardabweichung
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEC	Größenausschluss-Chromatographie
SOD	Superoxiddismutase
SP	Sialoprotein
TAK1	TGF-beta-aktivierte Kinase 1
TGF- β	Transformierender-Wachstumsfaktor-beta
TLDA	TaqMan Low-Density-Array-Analyse
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
TRAF	Tumornekrosefaktor-Rezeptor-assoziiertes Faktor
TRAP	Tartrat-resistente Säurephosphatase
VDR	Vitamin-D-Rezeptor
VEGFR2	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor-Rezeptor 2

1. Einleitung

Osteoporose ist eine systemische Skeletterkrankung, die durch eine Abnahme der Knochendichte und eine Verminderung der Knochenqualität gekennzeichnet ist (World Health Organization, 2007). Die Hauptkomplikation der Osteoporose ist die erhöhte Anfälligkeit für Frakturen, die sich negativ auf die Lebensqualität und Lebenserwartung auswirkt (Center et al., 1999; Hallberg et al., 2009). Es wird geschätzt, dass etwa ein Drittel aller Frauen und jeder fünfte Mann über 50 Jahre an Osteoporose leidet (Melton et al., 1998). Zurzeit wird davon ausgegangen, dass weltweit über 200 Millionen Menschen von Osteoporose betroffen sind (Sözen et al., 2017). Mit dem demografischen Wandel und der damit einhergehenden Alterung der Bevölkerung ist in den kommenden Jahren mit einem drastischen Anstieg dieser Zahl zu rechnen. Die Erkrankung entsteht oft schleichend und symptomlos, wodurch eine Diagnose häufig erst nach einem Knochenbruch erfolgt (Liu et al., 2016). Obwohl es diverse Medikamente zur Behandlung der Osteoporose gibt, wie Bisphosphonate oder Parathormon-Derivate, ist die Compliance gering und die Heilungschancen begrenzt (Ziller et al., 2012; Fardellone et al., 2019). So führt allein in Deutschland nur jeder sechste Patient nach einem Jahr seine medikamentöse Therapie fort (Hadjji et al., 2013).

Vor diesem Hintergrund sind evidenzbasierte Strategien zur Prävention von Osteoporose von besonderer Notwendigkeit. Eine solche Strategie ist ein nutritiver Ansatz, der mit weniger Nebenwirkungen und einer erhöhten Compliance einhergeht (Hubbard et al., 2012). In jüngster Zeit haben Kollagenpeptide als ergänzende Behandlungsoption für verschiedene Erkrankungen an Bedeutung gewonnen. Aktuelle Studien deuten darauf hin, dass die orale Einnahme von Kollagenpeptiden positive Auswirkungen auf die Wundheilung (Miyab et al., 2020), die Gelenkfunktion (Kumar et al., 2015), die Hautbeschaffenheit (Lee et al., 2023) und die Knochendichte bei postmenopausalen Frauen (König et al., 2018; Adamidou et al., 2022) hat. Dennoch bleibt die bioaktive Wirkung sowie die Interaktionen auf zellulärer und molekularer Ebene ein Schwerpunkt aktueller Forschung.

Ziel dieser Arbeit ist es, einen Überblick über die aktuelle Forschungslage zu geben und die molekularen Mechanismen von Kollagenpeptiden bei der Prävention von Osteoporose zu untersuchen. Die Fragestellung der Thesis lautet dabei: „Welche Auswirkungen haben Kollagenpeptide auf die Genexpression in Knochenzellen im Kontext der Osteoporoseprävention?“ Dazu werden im Hauptteil dieser Thesis aktuelle Studien hinsichtlich ihrer Methodik, Ergebnisse und Schlussfolgerungen präsentiert und verglichen.

2. Knochen

2.1 Aufbau und Mikroarchitektur

Die Mikroarchitektur des Knochens spielt eine Schlüsselrolle für das Verständnis der komplexen Strukturen und Funktionen des menschlichen Knochens. Die Struktur lässt sich in zwei Hauptkomponenten unterteilen, die Knochenrinde und den Schwammknochen (Abb. 1). Die Knochenrinde bildet die äußere, kompakte Schicht des Knochens und zeichnet sich durch ihre dichte Anordnung von Osteonen aus. Jedes Osteon stellt die funktionelle Einheit der Knochenrinde dar und verfügt über eine zylindrische Struktur aus konzentrisch angeordneten Lamellen (Rho et al., 1998). Die Lamellen selbst sind aus fein organisierten Kollagenfibrillen zusammengesetzt, deren Anordnung für die mechanische Stabilität und Elastizität des Knochens essentiell ist (Fratzl et al., 1998). Die in den Kollagenfibrillen eingelagerten Kristallpartikel verleihen dem Knochen seine charakteristische Härte und Kompressionsfestigkeit (Weiner et al., 1991; Ulian et al., 2021). Im Zentrum jedes Osteons befindet sich der Havers-Kanal, der sowohl Blutgefäße als auch Nervenfasern enthält. Diese zentrale Struktur ist für die Nährstoffversorgung und Kommunikation der Knochenzellen unerlässlich (Curtis et al., 1985). Der Schwammknochen hingegen, ist weniger dicht und hat eine poröse Struktur, dessen Hohlräume teilweise durch das Knochenmark gefüllt werden. Im Knochenmark erfolgt unter anderem die Bildung von mesenchymalen Stammzellen, die zu Knochen-, Knorpel- oder Fettgewebszellen differenzieren können (Minguell et al., 2001).

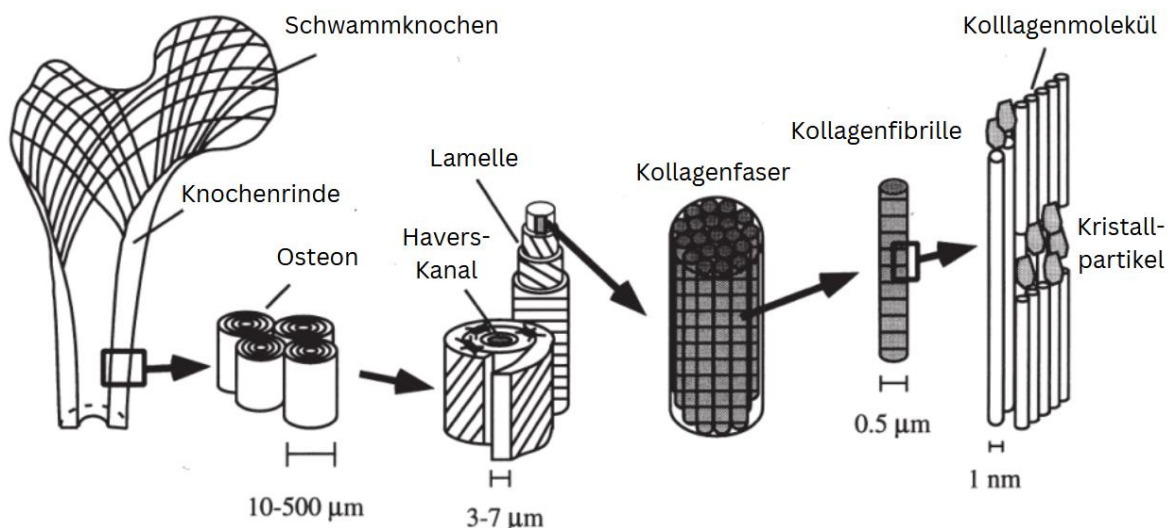


Abbildung 1: Mikroarchitektur des Knochens (In Anlehnung an Rho et al., 1998).

2.2 Dynamik des Knochengewebes

Das Knochengewebe stellt ein hoch dynamisches System dar, das hauptsächlich aus Knochenzellen und einer mineralisierten Knochenmatrix besteht. Die Knochenmatrix setzt sich neben Wasser zu etwa einem Drittel aus Kollagen Typ 1 (KOL-1) und Nicht-Kollagen-Proteinen wie Sialoprotein (SP), Osteopontin (OPN), Osteocalcin (OCN) und Osteonectin

(ON) zusammen (Feng, 2009; Na et al., 2021). Der Großteil der Knochenmatrix, über zwei Drittel, besteht aus anorganischen Calcium-Phosphat-Verbindungen, in Form von kristallinem Hydroxylapatit (Wang et al., 2010). Die Festigkeit und Elastizität des Knochengewebes beruhen auf den Wechselwirkungen zwischen den funktionellen Gruppen der Knochenmatrix-Proteine und den Calcium- oder Phosphat-Ionen (Farbod et al., 2014).

Im Laufe des Lebens unterliegt das Knochengewebe einem kontinuierlichen Umbauprozess, der als Knochenremodellierung bekannt ist. Dieser dynamische Prozess gewährleistet die Instandhaltung des Skeletts und beinhaltet die Anpassung an mechanische Belastungen (Tanne et al., 1990) und Mikroschäden (Burr et al., 1985). Als größtes Calcium-Phosphat-Reservoir des Körpers dient die Resorption des Knochens der Mobilisierung von Mineralstoffen und der Aufrechterhaltung der Calciumhomöostase (Maimoun et al., 2011). Es wird geschätzt, dass jährlich etwa 3% der Knochenrinde und 30% des Schwammknochens erneuert werden (Jimi et al., 2012).

2.3 Phasen der Knochenremodellierung

Die Aufrechterhaltung der Knochenremodellierung erfolgt durch ein fein abgestimmtes Gleichgewicht zwischen Knochenabbau und Knochenneubildung. Die Osteoblasten (OB) sind für die Synthese und Ablagerung neuer Knochenmatrix verantwortlich, während die Osteoklasten (OK) den Abbau und die Resorption durchführen (Robling et al., 2006). Die enge Zusammenarbeit der verschiedenen Knochenzellen erfolgt innerhalb der knochenremodellierenden Einheiten, die entlang des Knocheninneren oder entlang der Knochenoberfläche wandern (Hernandez et al., 1999). Der Knochenumbau besteht aus einem sequenziellen Ablauf von vier aufeinanderfolgenden Phasen, der Aktivierung, Resorption, Umkehr und Bildung (Siddiqui et al., 2016).

2.3.1 Aktivierungsphase

Die Sekretion von Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktoren (M-CSF) und Rezeptor-Aktivator-von-NF-kB-Liganden (RANKL) ist für die Migration und Differenzierung von OK aus den Vorläuferzellen des Makrophagensystems essentiell (Yamashita et al., 2012). M-CSF bindet spezifisch an CSF1-Rezeptoren und unterstützt sowohl das Überleben als auch die Aktivität ausgereifter OK (Hodge et al., 2011). Währenddessen bereiten Linienzellen, die normalerweise die Knochenoberfläche auskleiden, die Knochenremodellierungsstelle vor (Everts et al., 2002). Sie entfernen die überstehenden Kollagenstrukturen und lösen sich anschließend von der darunter liegenden Knochenoberfläche.

2.3.2 Resorptionsphase

In der Resorptionsphase bilden OK eine Bindung zur mineralisierten Knochenmatrix über den Vitronectin-Rezeptor $\alpha\beta 3$ Integrin, was eine isolierte Mikroumgebung zwischen den OK und dem Knochen schafft (Nakamura et al., 1999). Diese Bindung wird durch die Expression von OPN erleichtert, was die Zelladhäsion der OK weiter unterstützt (Dodds et al., 1995). Durch den aktiven Transport von Protonen über H^+ -ATPasen in die lakunäre Umgebung erzeugen die OK ein saures Milieu (Anderson et al., 1986). Die Phosphatverbindungen in der Knochenmatrix werden durch Tartrat-resistente Säurephosphatasen (TRAP) abgebaut, die auf der Oberfläche der OK exprimiert werden (Harada et al., 2013). Im weiteren Verlauf kommen proteolytische Enzyme wie Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) und Cathepsin K zum Einsatz, um die organischen Bestandteile der Knochenmatrix abzubauen (Bossard et al., 1996; Geoffroy et al., 2004). OB und Osteozyten (OZ) regulieren zusätzlich den Abbau der organischen Substanz durch die eigene Synthese von MMP oder ihre Gewebsinhibitoren (Hatori et al., 2004).

2.3.3 Umkehrphase

Während der Umkehrphase bereiten Linienzellen und osteoblastische Vorläuferzellen die Knochenoberfläche für die anschließende Phase der Knochenneubildung vor. Linienzellen spielen dabei eine wichtige Rolle bei der Bereinigung übrig gebliebener Kollagen-Fragmente in der Howships-Lakune, wobei sie spezifische Enzyme wie MMP einsetzen (Everts et al., 2002). Gleichzeitig sind auch osteoblastische Vorläuferzellen in diesen Prozess involviert. Sie synthetisieren eine dünne Schicht aus fibrillärem Kollagen und anderen Matrixkomponenten, die eine entscheidende Rolle bei der Adhäsion und Differenzierung von OB spielen (Domon et al., 2001; Mulari et al., 2004).

2.3.4 Bildungsphase

Reife OB, die aus mesenchymalen Stammzellen (MSZs) hervorgehen, beginnen mit der Produktion der nicht-mineralisierten Knochenmatrix, auch bekannt als Osteoid (Okumura et al., 1997). Diese Knochenmatrix umfasst die Synthese verschiedener Komponenten wie KOL-1, OCN, ON und knochenmorphogenetischen Proteine (BMP) (Cowles et al., 1998). Bei der nachfolgenden Kalzifikation des Osteoids, bei der kristallines Hydroxyapatit entsteht, sind Annexine und alkalische Phosphatase (ALP) beteiligt (Balcerzak et al., 2003). Die ALP übernimmt die Hydrolyse von Phosphatsubstraten, während Annexine den Ca^{2+} -Transport und die Bildung von Mineralkomplexen beeinflussen. Anschließend erfolgt die

Differenzierung der OB zu OZ, die mit der terminalen Expression von Podoplanin und Sclerostin sowie der Bildung dendritischer Verlängerungen einhergeht (Kaur et al., 2019).

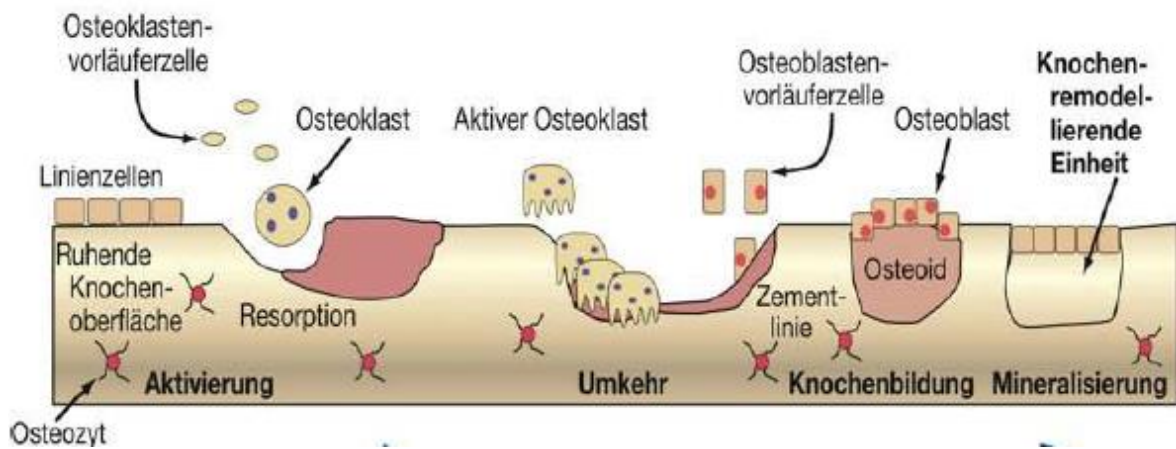


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Knochenbaus (Bringham et al., 2005).

2.4 Kommunikation zwischen den Knochenzellen

2.4.1 Gap-Junctions

Gap Junctions sind spezialisierte Proteinkanäle, die hauptsächlich aus Connexin-43 bestehen und sich in den Zellmembranen benachbarter Zellen zu Connexonen anordnen (Yellowley et al., 2000). Diese spezifische Anordnung ermöglicht den direkten Austausch von Calcium-Ionen zwischen den Knochenzellen. Calcium-Ionen spielen eine entscheidende Rolle bei der Differenzierung von Knochenzellen, indem sie die Expression der Transkriptionsfaktoren c-Fos in OB-Vorläuferzellen (Barradas et al., 2012) und Kernfaktor-der-aktivierten-T-Zellen-1 (NFATc1) in OK-Vorläuferzellen (Kang et al., 2020) regulieren.

2.4.2 Parakrine Signalisierung

Die parakrine Signalisierung im Knochengewebe wird durch verschiedene Faktoren bestimmt. Ein relevanter Faktor ist Osteoprotegerin (OPG), ein von OB produziertes Protein. OPG fungiert hauptsächlich als löslicher Decoy-Rezeptor für RANKL und unterbindet dessen Bindung an den RANK-Rezeptor auf OK-Vorläuferzellen (Simonet et al., 1997). Insbesondere das Verhältnis von RANKL zu OPG reguliert dabei die Osteoklastogenese in der Resorptionsphase der Knochenremodellierung (Tanaka et al., 2011). In reifen OK erhöht die Exposition gegenüber OPG die Aktivität von Caspase-3, was zur Induktion von Apoptose führt (Lacey et al., 2000). Ein weiterer relevanter Faktor ist Sclerostin, das von OZ produziert wird. Sclerostin hemmt den Wnt-Signalweg in OB durch seine inhibitorische Bindung an den Lrp5-Rezeptor, was zu einer Verlagerung des Knochenstoffwechsels zugunsten der Knochenresorption führt (Robling et al., 2008). Zusätzlich konkurriert Sclerostin um die Bindung an die BMP-Rezeptoren und hemmt dadurch die Mineralisierung

der OB (Winkler et al., 2003). Auch die Knochenresorptionsstelle enthält eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren, die eine koordinierte Wirkung auf OK und OB ausüben. Während des Prozesses der Knochenbildung werden unter anderem Transformierender-Wachstumsfaktor-beta (TGF- β), BMP-2 und der insulinähnliche Wachstumsfaktor-1 (IGF-1) in die Knochenmatrix eingelagert (Hyc et al., 2021). Dort fungieren sie als zeitlich verzögerte parakrine Signalmoleküle, die den späteren Knochenabbau regulieren. TGF-beta und IGF-1 fördern die Differenzierung von OK (Quinn et al., 2001, Wang et al., 2006). Matrix-IGF-1 reguliert zudem die Knochenmasse über den mTOR-Signalweg in OB-Vorläuferzellen (Xian et al., 2012).

2.4.3 Zell-Zell-Kontakte

Die Interaktionen zwischen Knochenzellen erfolgen auch über verschiedene Oberflächenproteine (Sakamoto et al., 2004). So ist etwa die EphrinB2/EphB4-Signalisierung an der bidirektionalen Kommunikation zwischen OK und OB beteiligt. Hierbei binden Ephrin-B2-Liganden in OK-Vorläuferzellen an Ephrin-B4-Rezeptoren in OB. Die rückwärtige Signalübertragung hemmt die Differenzierung von OK, indem sie den c-Fos-NFATc1-Signalweg unterdrückt, während die vorwärtige Signalübertragung durch Ephrin-B4 in OB die Knochenmasse in transgenen Mäusen erhöht (Zhao et al., 2006).

2.4.4 Mechanotransduktion

Die Umwandlung mechanischer Reize in biochemische Signale, wird durch überlappende Mechanismen der Ionenkanäle, Integrine, G-Proteine und des Zytoskeletts bestimmt (Scott et al., 2008). OZ reagieren dabei auf mechanische Stimuli mit einem Anstieg der Cyclooxygenase-2 (Cox-2) Expression, sowie einer verringerten Freisetzung von Prostaglandin-2 (PG-2) und RANKL (Lau et al., 2010). Mechanische Belastung führt in OB zu interstitiellem Flüssigkeitsscherstress, der über den PI3K/Akt-Signalweg die Genexpression von β -Catenin, c-Fos und Cox-2 reguliert und die Proliferation fördert (Rangaswami et al., 2012). Darüber hinaus trägt der Wnt-Signalweg, vermittelt durch Lrp-5, zur Aufrechterhaltung der Reaktionsfähigkeit auf mechanische Belastung bei (Zhao et al., 2013).

3. Osteoporose

3.1 Definition und Häufigkeit

Osteoporose ist eine systemische Skeletterkrankung, die durch eine Abnahme der Knochendichte und eine Verminderung der Knochenqualität gekennzeichnet ist (World Health Organization, 2007). Die Hauptkomplikation der Osteoporose ist die erhöhte Anfälligkeit für Frakturen, die sich negativ auf die Lebensqualität und Lebenserwartung auswirkt (Center et al., 1999; Hallberg et al., 2009). Es wird geschätzt, dass etwa ein Drittel aller Frauen und jeder fünfte Mann über 50 Jahre an Osteoporose leidet (Melton et al., 1998). Zurzeit wird davon ausgegangen, dass weltweit über 200 Millionen Menschen von Osteoporose betroffen sind (Sözen et al., 2017).

3.2 Diagnose

Die Basisdiagnostik der Osteoporose beinhaltet die Erfassung der Patientenanamnese, eine klinische Untersuchung, eine Knochendichtemessung, labormedizinische Untersuchungen und bei Verdacht auf osteoporotische Wirbelkörperfrakturen eine bildgebende Diagnostik (Czerwiński et al., 2007). Die radiologische Diagnose der Osteoporose erfolgt durch die Bestimmung der Knochendichte (BMD) mittels Dual-Energy-Röntgenabsorptiometrie (DEXA). Obwohl eine quantitative Ultrasonographie das Frakturrisiko vorhersagen kann, korreliert dieses Verfahren bei Schwellenwerten weniger präzise mit der genaueren DEXA-Messung (Nayak et al., 2006). Die Schweregrade der Osteopenie und Osteoporose beschreiben, inwieweit der Knochenmineralgehalt im Vergleich zu einer gesunden 30-jährigen Person abgenommen hat (T-Wert) und ob Knochenbrüche aufgetreten sind. Ein T-Wert zwischen -1 und -2,5 Standardabweichungen (SD) kennzeichnet eine Osteopenie. Eine Osteoporose liegt ab einem T-Wert von -2,5 SD oder niedriger vor. Im Falle einer schweren Osteoporose liegt ein T-Wert unter -2,5 SD vor, begleitet von Knochenbrüchen in den Extremitäten oder Lendenwirbeln (Rossini et al., 2016).

3.3 Formen der Osteoporose

3.3.1 Primäre Osteoporose

Primäre Osteoporose ist eine Knochenerkrankung, die durch eine altersbedingte Abnahme der Knochendichte gekennzeichnet ist und keine zugrunde liegende Krankheit als Ursache aufweist (Orimo et al., 2001). Im Verlauf des Lebens kommt es zu einer Zunahme der Knochenmasse, die bis zum Erreichen der sogenannten "Peak Bone Mass" in der Mitte des dritten Lebensjahrzehnts ihren Höchstwert erreicht (Baxter-Jones et al., 2011). Danach setzt eine Phase des langsamen Knochenabbaus ein, die sich bis hin zu einem beschleunigten Knochenverlust steigern kann. Männer erreichen ihren Höchstwert deutlich später als

Frauen, was unter anderem die höhere Frakturhäufigkeit bei Frauen erklärt (Avdagic et al., 2009). Die Phase des beschleunigten Knochenabbaus tritt bei Frauen im Rahmen der Menopause früher ein als bei Männern. Bei Frauen liegt daher häufig eine postmenopausalen Osteoporose vor. Der Knochenschwund beträgt in den ersten 10 Jahren nach der Menopause etwa -1,8 bis -2,3 % pro Jahr und pendelt sich anschließend bei -1 % bis -2 % pro Jahr ein (Finkelstein et al., 2008). Bei Männern liegt die altersbedingte Verlustrate bei ungefähr -0,59 % bis -1 % pro Jahr (Tuck & Datta et al., 2007). Nach dem 50. Lebensjahr kann es zu einem beschleunigten Verlust kommen, der einem exponentiellen Muster folgt (Liang et al., 2016). Zusätzlich nehmen die positiven Effekte von Ausdauer- und Widerstandstraining auf den Knochenstoffwechsel mit dem Alter ab (Stunes et al., 2022). Ab dem 65. Lebensjahr erhöht sich auch bei Männern die Rate an Wirbelbrüchen erheblich (Riggs et al., 1982). Eine Osteoporose, die erst im hohen Alter auftritt, wird als senile Osteoporose bezeichnet. Die Symptome der primären Osteoporose sind häufig unspezifisch und umfassen in manchen Fällen Knochenschmerzen, Rückenschmerzen und einen Verlust der Körpergröße (Peris et al., 1995; Kontor et al., 2004). Eine seltene Sonderform der primären Osteoporose stellt die idiopathische Osteoporose dar, die durch einen ungewöhnlich frühen Krankheitsbeginn charakterisiert ist (Stöver et al. 1974; Gennari & Bilezikian 2013)

3.3.2 Sekundäre Osteoporose

Sekundäre Osteoporose entsteht infolge anderen Erkrankungen oder unerwünschter Nebenwirkungen von Medikamenten, die sich negativ auf das Gleichgewicht der Knochenhomöostase auswirken. Die häufigsten Ursachen sekundärer Osteoporose sind endokrine Störungen, Autoimmunerkrankungen, Nierenerkrankungen, medikamenteninduzierte Osteoporose, hämatologische Erkrankungen und gastrointestinale Erkrankungen (Colangelo et al., 2019). Insbesondere eine Langzeittherapie mit Immunsuppressiva, Heparin oder Glukokortikoiden kann zu einer deutlichen Verringerung der Knochenmineraldichte führen (Thiébaudet et al., 1996; McKenzie et al., 2000; Yang et al., 2020). Jedoch gelten entzündungshemmende Glukokortikoide als die Hauptursache für medikamenteninduzierte Osteoporose (Bouvard et al., 2010).

3.4 Risikofaktoren

3.4.1 Genetische Risikofaktoren

Zwillingsstudien haben gezeigt, dass genetische Faktoren zur Entstehung von Osteoporose beitragen, indem sie die Knochendichte und das Frakturrisiko beeinflussen (Slemenda et al. 1991, Sosa et al. 2014). Analysen mit univariaten Modellen ergaben eine Heredität von 63% für die knochenspezifische alkalische Phosphatase (k-ALP) und 72% für die Knochendichte

der Lendenwirbelsäule und des Oberschenkelhalses. Gene, die speziell die k-ALP beeinflussen, trugen zu 16% der gesamten genetischen Variabilität der Knochendichte der Lendenwirbelsäule bei (Harris et al. 1998). Nach Berücksichtigung der Körpergröße und Ca-Zufuhr konnte gezeigt werden, dass 18 - 37% der Knochenmerkmale durch die maternale Abstammung bestimmt werden (Ferrari et al. 1998). Diverse Gene tragen zur Regulation dieser Merkmale bei, indem sie mit Umweltfaktoren wie dem Ernährungsstatus und der sportlicher Aktivität interagieren. Mutationen am Genlocus des Vitamin-D-Rezeptors tragen zu einem Teil der Heredität der Knochendichte der Lendenwirbelsäule bei (Gennari et al. 1999). Auch COLIA1-Spl-Polymorphismen korrelieren mit der Frakturhäufigkeit (Efstathiadou et al. 2001). Insbesondere unter Asiaten und Kaukasiern erhöht der LRP5-rs3736228-Polymorphismus das Osteoporose- und Frakturrisiko (Xu et al. 2014). Des Weiteren gibt es Hinweise darauf, dass Populationen asiatischer und afrikanischer Herkunft seltener Frakturen erleiden und eine höhere Knochendichte aufweisen (Morin et al. 2022; Bao et al. 2023). Individuen mit dem homozygoten Genotyp TT (C677T) des Methylentetrahydrofolat-Reduktase (MTHFR)-Gens haben im Vergleich zum heterozygoten Genotyp CT ein deutlich erhöhtes Risiko für Wirbelbrüche (Bai et al. 2013). Die OPG-A163G- und T245G-Mutationen sind Risikofaktoren für osteoporotische Frakturen, während die T950C-Variation protektiv wirkt (Ding et al. 2021). Derzeit erklären diese Polymorphismen nur einen kleinen Prozentsatz des Osteoporoserisikos und sind weiterhin Bestandteil intensiver Forschung.

3.4.2 Lebensstil

3.4.2.1 Sportliche Inaktivität

Körperliche Betätigung korreliert mit einem erhöhten Knochenumsatz. Personen mit geringer körperlicher Aktivität zeigen eine gesteigerte Knochenresorption, während bei aktiven Personen keine derartige Veränderung beobachtet wurde (Brooke-Wavell et al., 2001). Es wurde festgestellt, dass sitzende Tätigkeiten bei Frauen unabhängig von ihrer sonstigen körperlichen Betätigung einen negativen Einfluss auf die Knochendichte der Oberschenkel- und Hüftknochen hat (Chastin et al., 2014). Progressives Krafttraining hingegen erhöht auch bei älteren Erwachsenen die Muskelkraft und die Mineraldichte der Femur- und Hüftknochen (O'Bryan et al., 2022).

3.4.2.2 Geringes Körpergewicht

Ein niedriger Körpermasseindex (BMI) ist ein etablierter Risikofaktor für Frakturen. Im Vergleich zu Individuen mit einem BMI von 25 kg/m² wurde bei einem BMI von 20 kg/m² ein nahezu doppelt so hohes Risiko für Hüftfrakturen beobachtet (Laet et al., 2005). Dieser

Effekt wird auf eine verminderte mechanische Belastung und hormonelle Unterschiede zurückgeführt, die mit einem erhöhten Osteoporoserisiko einhergehen (Ravn et al., 1999).

3.4.2.3 Inadequate Nährstoffversorgung

Eine angemessene Versorgung mit Mikro- und Makronährstoffen ist von entscheidender Bedeutung für die Aufrechterhaltung gesunder Knochen, was sich durch die signifikante Abnahme der Knochendichte bei unterernährten Patienten zeigt (Hübel et al., 2019). Insbesondere Nährstoffe wie Calcium (Ca), Phosphor, Vitamin D, Vitamin K und Magnesium wirken sich positiv auf die Knochengesundheit aus. In Bezug auf den Zusammenhang zwischen dem Verzehr spezifischer Nährstoffe und dem Frakturrisiko ist die Evidenz nicht ausreichend gesichert, mit Ausnahme von Ca und Vitamin D (Bonjour et al., 2009). Eine Meta-Analyse randomisierter Kontrollstudien zeigte, dass die Ergänzung von Ca und Vitamin D mit einem 15%igen Rückgang des allgemeinen Frakturrisikos und einem 30%igen Rückgang des Hüftfrakturrisikos einherging (Weaver et al., 2016).

3.4.2.4 Konsum von Genussmitteln

In beiden Geschlechtern wurde ein Zusammenhang zwischen dem Konsum von Tabak und einer Verringerung der Knochenmineraldichte um 5–8 % festgestellt. Diese Beziehung zeigte sich unabhängig von der Ca-Zufuhr oder dem Körpergewicht. Bei ehemaligen Rauchern scheint dieser Effekt nicht mehr vorhanden zu sein (Nguyen et al. 1994). Auch zwischen Alkoholkonsum und Osteoporose besteht ein positiver Zusammenhang. Im Vergleich zu Alkoholabstinenzlern hatten Personen, die 1–2 Getränke pro Tag konsumierten, ein 1,34-fach erhöhtes Risiko, an Osteoporose zu erkranken (Cheraghi et al. 2019)

3.5 Pathogenese

Die Dysregulation der Knochenhomöostase ist ein hochgradig komplexer Prozess, der von einer Vielzahl von zellulären und molekularen Mechanismen abhängig ist. Neben der Interaktionen der Knochenzellen selbst, wie in Kapitel 2 beschrieben, hat insbesondere der Einfluss calcitroper Hormone, Geschlechtshormone und nicht-kodierende Ribonukleinsäuren im Kontext regulatorischer Signalwege zunehmendes Interesse erfahren. Die genauen Mechanismen, hinter der Pathogenese der Osteoporose, sind jedoch noch Gegenstand intensiver Forschung.

3.5.1 Calcium-Homöostase

Um die Mineralisierung des Skeletts zu gewährleisten und eine Verkalkung von Weichgeweben zu vermeiden, unterliegt die Aufnahme und Ausscheidung von Ca der hormonellen Regulation des Calciumstoffwechsels (Garmeliet et al., 2003). Bei einem

Abfall der Serum Ca-Konzentration erkennen Ca-sensitive Rezeptoren (CaSR) in den Nebenschilddrüsen die Veränderung im extrazellulären Milieu und stimulieren die Freisetzung von Parathormon (PTH). PTH wiederum fördert die Freisetzung von Ca aus den Knochen, verbessert die Absorption von Ca im Darm und hemmt die Ausscheidung über die Nieren (Goltzman et al., 2018). In OB stimuliert PTH die Freisetzung von RANKL, was über die Differenzierung von OK-Vorläuferzellen zu einer erhöhten Bereitstellung von Ca und Phosphat aus dem Knochengewebe führt (Reid & Bristow, 2020). PTH hat unterschiedliche Wirkungen auf OB, abhängig von deren Differenzierungsstadium. Es kann die Differenzierung unreifer OB stimulieren, während es bei ausgereiften OB hemmend wirkt (Isogai et al., 1996). Die Wirkung von PTH hängt auch von der Dauer der Exposition ab. Die intermittierende Gabe von PTH führt zu osteoanabolen Effekten, während eine kontinuierliche Exposition die Knochenresorption fördert (Pettway et al., 2008). Die altersbedingte Abnahme der Nierenfunktion scheint mit einem allgemeinen Anstieg der PTH-Spiegel verbunden zu sein (Marcus et al., 1984). Copp et al. (1962) entdeckten, dass ein hoher Kalziumspiegel im Blut die Freisetzung von Calcitonin aus den Nebenschilddrüsen verursacht, was wiederum den Kalziumspiegel im Blut senkt und der Wirkung von PTH entgegenwirkt. In OB fördert Calcitonin die Expression von ERKs über den MAPK-Signalweg und schützt dadurch vor Glucocorticoid-induziertem Zelltod (Plotkin et al., 1999). Darüber hinaus führt Calcitonin in OB zu einer dosisabhängigen Erhöhung der Wachstumshormone IGF-1 und IGF-2 (Farley et al., 2000). Ein weiteres Hormon, das die Calciumhomöostase reguliert, ist 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (Calcitriol). Calcitriol fördert die Aufnahme von Ca im Darm und die Wiederaufnahme von Ca in den Nieren, um den Ca-Spiegel im Blut aufrechtzuerhalten (Cromphaut et al., 2001; Beggs et al., 2017). Die Verabreichung von Calcitriol erhöht die Aufnahme von markiertem Ca-45 und senkt die PTH-Konzentration sowie Knochenresorptionsmarker (Brown et al., 2003). Durch Bindung an Vitamin-D-Rezeptoren (VDR) in Knochenzellen reguliert Calcitriol direkt den Knochenumbau, indem es die Expression von RANKL, OCN und OPN steuert (Haussler et al., 2012). Mit zunehmendem Alter nimmt die Expression von VDR und CYP27B1-Enzymen ab, die für die Umwandlung inaktiver Vitamin-D-Metaboliten zu Calcitriol verantwortlich sind (Jiang et al., 2020). Darüber hinaus wird eine Abnahme der Plasma-Vitamin-D-Spiegel im Alter beobachtet, was insbesondere bei älteren Menschen zu einer erhöhten Prävalenz von Vitamin-D-Mangelzuständen führt (Baker et al., 1980). Ein Vitamin-D-Spiegel von unter 12 ng/ml stellt einen unabhängigen Risikofaktor für die Entstehung von osteoporotischen Frakturen dar (Van Schoor et al., 2008).

3.5.2 Östrogen und Testosteron

Die Geschlechtshormone Östrogen und Testosteron, die zur Klasse der Steroidhormone gehören, spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation des Knochenstoffwechsels. Es wird vermutet, dass der allgemeine Rückgang der Geschlechtshormone, in Verbindung mit anderen hormonellen Veränderungen, zu einem altersbedingten Verlust der Knochendichte beiträgt (Khosla et al., 2008). Obwohl der Gesamt-Testosteronspiegel bei Männern im Alter häufig im Normbereich bleibt, gibt es Hinweise darauf, dass der Anteil des ungebundenen Testosterons allmählich abnimmt. Eine Studie an gesunden Probanden zeigte, dass die Prävalenz eines niedrigen freien Testosteronspiegels nach dem 50. Lebensjahr auf etwa 30% anstieg und nach dem 70. Lebensjahr etwa 45% erreichte (Li et al., 2005). Bei Frauen kommt es bereits vor Beginn der Menopause zu einer signifikanten Abnahme des Östrogenspiegels (Overlie et al., 1999). Östrogen wirkt hauptsächlich durch Bindung an die Östrogenrezeptoren ER- α und ER- β in Knochenzellen und reguliert dadurch die Knochenhomöostase (Monroe et al., 2003). Es fördert die Differenzierung von MSCs zu OB und hemmt die RANKL-induzierte Differenzierung von OK (Khosla et al., 2012). Darüber hinaus wirkt Östrogen dem Knochenschwund entgegen, indem es die apoptose-fördernde Induktion von Fas-Liganden in OK fördert (Nakamura et al., 2007). In weiteren Studien wurde beobachtet, dass Östrogen zu einer Abnahme von Sklerostin und Wise-Protein führt, die wichtige Inhibitoren der Signalübertragung von Wnt- und BMP-Proteinen sind (Mödder et al., 2011; Fujita et al., 2014). Durch die Umwandlung von Testosteron in Östrogen mittels des Enzyms Cytochrom P450 Aromatase kann Testosteron indirekt dieselben Auswirkungen auf den Körper entfalten (Heidrich et al., 2001). Testosteron bindet zudem direkt an den Androgenrezeptor und stimuliert dadurch die Expression von OPG in OB (Chen et al., 2004). Studien haben gezeigt, dass die Verabreichung von Testosteron bei älteren Männern mit und ohne Testosteronmangel zu einer Erhöhung der volumetrischen Knochendichte führt (Fui et al., 2021; Cauley et al., 2021).

3.5.3 Proinflammatorische Zytokine

Die proinflammatorischen Zytokine Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-6 (IL-6) und Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α) spielen eine wesentliche Rolle bei der Entstehung von Osteoporose. In verschiedenen Studien wurde eine positive Korrelation zwischen steigenden Konzentrationen von IL-6 und IL-1 im Blutplasma und dem Alter festgestellt (Wei et al., 1992; Roubenoff et al., 1998). Bei postmenopausalen Frauen wurde zudem eine erhöhte Aktivität von IL-1 in Monozyten beobachtet, was auf eine verminderte Expression des IL-1-Antagonisten IL-1ra zurückgeführt wird (Pacifci et al., 1993). Bei Osteoporosepatienten

wurde auch eine erhöhte Konzentration von TNF- α festgestellt (Zha et al., 2018). Die proinflammatorischen Zytokine IL-1, IL-6 und TNF- α wirken teilweise über ähnliche Mechanismen. TNF- α bindet an OK-Vorläuferzellen über den TNF-Rezeptor I/II und fördert über den Transkriptionsfaktor NF- κ B die Osteoklastogenese, vermittelt durch TRAF2 (Kanazawa & Kudo, 2005). Hingegen aktiviert IL-1 NF- κ B über TRAF6, wobei die Aktivierung von TRAF bei beiden Zytokinen über die Proteinkinase p62 erfolgt (Sanz et al., 2000). IL-6 hingegen aktiviert Janus-Kinase-Tyrosinkinasen (JAK) durch Bindung an den IL-6-Rezeptor/gp130, die wiederum Transkriptionsfaktoren der STAT-Familie aktivieren. Alternativ kann auch der MAPK-Signalweg sowie die Aktivierung von Src und der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) involviert sein (Kwan et al., 2004). Es wird angenommen, dass IL-6 die Effekte von IL-1 und TNF- α auf die Osteoklastenbildung vermittelt, da IL-6-Antagonisten wie Sant5 in der Lage sind, die stimulierenden Effekte auf OK zu hemmen (Devlin et al., 1998). Des Weiteren fördern IL-1 und TNF- α in OB die Produktion von weiteren entzündlichen Mediatoren und RANKL (Cheung et al., 2003). Eine Erhöhung der proinflammatorischen Zytokine verschiebt somit das Gleichgewicht der Knochenhomöostase zugunsten der Knochenresorption.

3.5.4 MicroRNAs

MicroRNAs sind nicht-codierende Ribonukleinsäuren, die eine wichtige Rolle bei der Regulation der Genexpression in Knochenzellen spielen. Als bedeutende Akteure der posttranskriptionalen Regulation beeinflussen sie die Expression funktionaler Proteine (Jing et al., 2015). Eine Fehlregulation zahlreicher miRNAs steht in Verbindung mit der Entwicklung verschiedener Knochenerkrankungen, einschließlich Osteoporose. MiR-21, MiR-29a und MiR-363-3p fördern die Knochenresorption, indem sie die Aktivität von OK fördern und somit den Knochenabbau begünstigen (Vázquez et al., 2021). Darüber hinaus haben MiR-23a, MiR-30c, MiR-34c, MiR-137, MiR-205, MiR-217 und MiR-338 negative Auswirkungen auf die Runx2-Expression und fördern teilweise die Adipogenese über den transkriptionellen Repressor TRPS1 (Wildman et al., 2019). Eine Überexpression von miR-133a führt zu einer reduzierten Differenzierung in osteoblastenähnliche Zellen, was mit einer Abnahme der ALP-Aktivität, der OC-Sekretion und der Runx2-Expression einhergeht (Liao et al., 2013). Hinsichtlich der Knochenbildung wirken sich die MicroRNAs MiR-101, MiR-433-3p, MiR-203, MiR-15b und MiR-29b positiv auf die Differenzierung von OB aus (Gao et al., 2020). MiR-335-5p ist in der Lage die Osteogenese zu fördern, indem es den Wnt-Antagonisten DKK1 herunterreguliert (Zhang et al., 2011).

3.5.5 Osteoregulatorische Signalwege

3.5.5.1 RANKL/RANK-Signalweg

Die Signalübertragung im RANKL/RANK-Signalweg spielt eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Knochenresorption. Nach der Rezeptoroligomerisierung von RANK werden intrazelluläre Tumornekrosefaktor-Rezeptor-assoziierte-Faktoren (TRAFs) freigesetzt, wobei TRAF6 als Schlüsselregulator des RANKL/RANK-Signalwegs fungiert (Armstrong et al., 2002). TRAF6 führt zur Aktivierung der Phosphoinositid-Phospholipase C Gamma 1 (PLC- γ 1), die wiederum eine Calcium-Ionen-abhängige Aktivierung der Phosphatase Calcineurin bewirkt. Calcineurin dephosphoryliert den Transkriptionsfaktor NFATc1 (Ye et al., 2017), was zur Induktion der Expression einer Reihe von Genen führt, die an der Differenzierung von Vorläuferzellen der OK beteiligt sind (Takayanagi et al., 2002). In reifen OK reguliert NFATc1 unter anderem die Expression von Cathepsin K (Matsumoto et al., 2004) und TRAP (Yu et al., 2009). Gleichzeitig erhöht NFATc1 über den RANK-Promotor die Expression des RANK-Rezeptors in OK (Kitazawa et al., 2021).

Im Rahmen des NF- κ B-Signalwegs aktiviert TRAF6 die I κ B-Kinase in Reaktion auf proinflammatorische Zytokine. Dies führt zur Phosphorylierung des Inhibitorproteins I κ B durch die I κ B-Kinase und ermöglicht die Translokation von NF- κ B in den Zellkern, indem der NF- κ B-Komplex aufgelöst wird (Deng et al., 2000). Die Hemmung des I κ B-Kinase/NF- κ B-Signalwegs konnte den osteoporotischen Knochenverlust bei ovariectomierten Mäusen verhindern (Chang et al., 2009). Zusätzlich zeigt die Hemmung der TRAF6-Signaltransduktion vielversprechendes Potenzial als potenzieller Ansatz zur Behandlung der postmenopausalen Osteoporose. Die Hemmung von TRAF6 unterdrückt die NF- κ B-, MAPK/AP-1- und ROS-Signalwege sowie die Expression von NFATc1, was die Osteoklastogenese hemmt (Tan et al., 2017).

3.5.5.2 WNT/ β -Catenin-Signalweg

Der kanonische WNT-Signalweg spielt eine zentrale Rolle in der Regulation der OB-Differenzierung und Mineralisierung (Zhang et al., 2012). Die Aktivierung des kanonischen WNT/ β -Catenin-Signalwegs beginnt durch die Liganden-Rezeptor-Interaktion von WNT-Proteinen mit dem Frizzled-Rezeptor und Co-Rezeptor LRP5/6 an der Zelloberfläche. Anschließend löst sich der "Zerstörungskomplex" auf, der unter anderem aus den Proteinen Axin, Adenomatous Polyposis Coli, Glykogen-Synthase-Kinase 3 und Casein-Kinase 1 besteht (Kim et al., 2013). Daraufhin wird die Phosphorylierung von β -Catenin aufgehoben, wodurch β -Catenin in den Zellkern transloziert, wo es sich mit den Transkriptionsfaktoren TCF und LEF verbindet, um die Genexpression zu modulieren (Schuijers et al., 2014). In

OB und MSC reguliert der kanonische WNT-Signalweg die Expression des Runx2-assoziierter-Transkriptionsfaktors 2 (Runx2) und Osterix (SP7-Gen), die für die MSC-Differenzierung und OB-Matrixbildung entscheidend sind (Gauer et al., 2005; Felber et al., 2015). Eine gestörte Aktivität des WNT-Signalwegs, in β -Catenin-defizienten Mäusen, führt zu einer drastischen Verringerung der Knochendichte (Kramer et al., 2010). Der WNT-Signaltransduktion wird von WNT-Signalantagonisten wie Sclerostin (SOST) und Dickkopf-verwandtes Protein 1 (DKK1) gehemmt, weshalb SOST/DKK1-Hemmer für die Prävention und Behandlung von Knochenverlust erforscht werden (Rossini et al., 2013).

3.5.5.3 p38/MAPK-Signalweg

Der p38/MAPK-Signalweg ist ein wichtiger Regulator verschiedener zellulärer Prozesse, wie Entzündungsreaktionen, Umstrukturierung des Zytoskeletts, Zellwachstum und Apoptose (Obata et al., 2000). Innerhalb der Familie der mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) stellt das Protein p38 eine bedeutende Untergruppe dar, zu der auch ERK und JNK gehören (Qin et al., 2015). Die Rezeptoraktivierung führt direkt oder indirekt über die Aktivierung von GTPasen aus der Rho-Kinase-Familie zur Aktivierung der TGF-beta-aktivierten Kinase 1 (TAK1), einem Mitglied der MAP3K-Familie (Zhang et al., 1995). TAK1 und andere Kinasen der MAPK (MKKKs) phosphorylieren und aktivieren daraufhin MKK3 und MKK6, die zur Gruppe der MAP2Ks gehören. MKK3/6 wiederum phosphorylieren und aktivieren die MAPK p38, die durch Phosphorylierung von Runx2 und dessen Assoziation mit dem CRE-Bindungsprotein die Expression von Genen in OB reguliert (Greenblatt et al., 2010). Liganden wie IGF-1, TGF-beta und BMP-2 können die Aktivierung von TAK1 in OB bewirken. Dadurch reguliert der p38-Signalweg neben Runx2 auch die Expression von Fibromodulin und Sialoprotein über den Transkriptionsfaktor Osterix (Ortuño et al., 2010). In OK und deren Vorläuferzellen aktivieren TNF- α und RANKL die TAK1-Signalkaskade über TRAF2 bzw. TRAF6. Der p38/MAPK-Signalweg führt anschließend zur verstärkten Aktivierung von NFATc1, MITF und STAT1 (Thouverey & Caverzasio 2015). Dieser Signalweg reguliert sowohl das Überleben von OK als auch, zusammen mit ERK und JNK, deren knochenresorbierende Aktivität (Yamashita et al., 2008; Wu et al., 2018). Zudem wird das Überleben von mesenchymalen Stammzellen ebenfalls unter anderem durch den p38/MAPK-Signalweg reguliert (Liu et al., 2018).

3.5.5.4 Smad-Signalweg

Der SMAD-Signalweg spielt eine bedeutende Rolle bei der Regulation der Knochenbildung und -regeneration und ist insbesondere an der Signalübertragung von Liganden wie TGF- β und BMP beteiligt (Song et al., 2009). Nach der Ligandenbindung erfolgt die Phosphorylierung und Aktivierung von transmembranen Serin/Threonin-Kinase Rezeptoren vom Typ I und Typ II. Diese aktivierten Rezeptoren phosphorylieren daraufhin SMAD-Proteine, welche als intrazelluläre Signaltransduktoren agieren (Souchelnytskyi et al., 2001). Bei dem TGF- β werden Smad2 und Smad3 phosphoryliert, während BMP die Aktivierung von Smad1, Smad5 und Smad8 bewirkt (Nakao et al., 1997; Caddy et al., 2020). Die aktivierten R-SMADs bilden anschließend zusammen mit SMAD4 einen heterodimeren Rezeptorkomplex. Rezeptor II phosphoryliert Rezeptor I in einer juxtamembranen GS-Domäne an Serin- und Threoninresten und aktiviert diesen, um das Signal weiterzuleiten. Der R-Smad/Co-Smad-Komplex transloziert dann in den Zellkern und bindet dort an Smad-Bindungselemente (Zawel et al., 1998). Ähnlich wie bei den WNT/beta-Catenin- und p38/MAPK-Signalwegen führt eine Hemmung des Smad-Signalwegs zu einer Beeinträchtigung der Knochenbildung, da die Expression von Runx2 und Osterix (Sp7) verringert wird (Yan et al., 2018). Umgekehrt fördert eine erhöhte Aktivität des BMP-2/Smad-Signalwegs die Heilung von Knochenbrüchen bei Mäusen (Liu et al., 2018).

4. Kollagen

4.1 Struktur

Kollagen ist das häufigste Strukturprotein des menschlichen Körpers und besteht aus drei miteinander verdrillten, linksdrehenden alpha-Polypeptidketten, die eine Triplehelix bilden (Berisio et al., 2002). Die Aminosäuren der alpha-Polypeptidketten sind in (Glycin-X-Y)_n-Sequenzen geordnet, wobei die Position-X häufig von Prolin und die Position-Y von Hydroxyprolin belegt wird (Long et al., 1993).

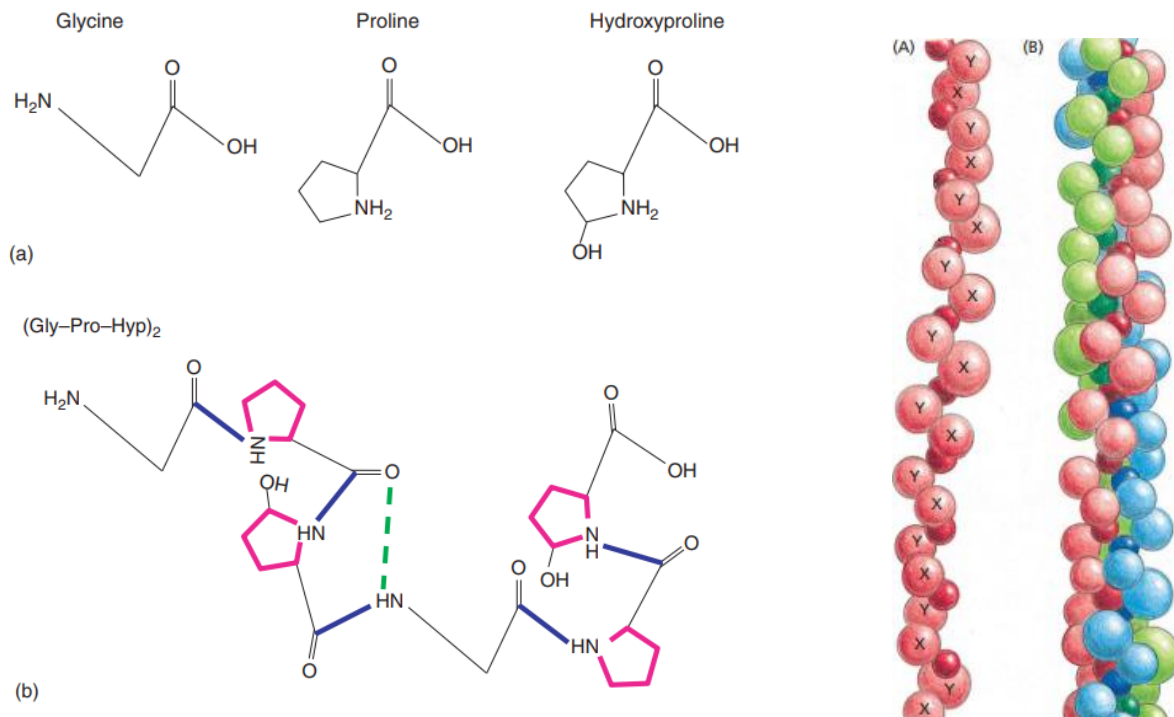


Abbildung 3: Kollagenbestandteile: (a) Die Aminosäuren Glycin, Prolin und Hydroxyprolin. (b) Peptidstruktur aus zwei (Gly-Pro-Hyp)-Peptiden (A) Alpha-Polypeptidkette (B) Kollagen-Triplehelix (Dunsmore 2006; Alberts 2022).

Die Seitenketten der Aminosäuren Prolin und Hydroxyprolin befinden sich an der Außenseite des Moleküls, während die Peptidbindungen zwischen den Aminosäuren (Abb. 1 blau) im Inneren der Kollagen-Triplehelix liegen. Zwischen der HN-Gruppe von Glycin und der Carbonylgruppe-Gruppe der Aminosäure in Position-X stabilisieren Wasserstoffbrückenbindungen (Abb. 1b; grün) die Kollagen-Triplehelix (Qi et al., 2022; Dunsmore 2006). Anschließend sind Kollagenmoleküle in der Lage sich selbstständig und lateral zu höhergeordneten Kollagenfibrillen zu organisieren (Rasheeda et al., 2019). Zu den spezialisierten Zellen die in der Lage sind Kollagenmoleküle zu synthetisieren gehören Fibroblasten, Chondrozyten und Osteoblasten (Fuss et al., 2000).

4.2 Biologische Funktion

Derzeit sind 28 verschiedene Typen von Kollagen bekannt, wobei Kollagen Typ I, II und III zu den häufigsten Vertretern gehören (Bielajew et al., 2020). Typ I Kollagen wird von den Genen COL1A1 und COL1A2 codiert und ist ein Hauptbestandteil von Knochen und Haut, wo es zur Festigkeit beiträgt, indem es eine stabile Kollagen-Fibrillen-Matrix bildet (Slack et al., 1993). Typ I Fasern sind die stabilsten, dichtesten und mit 90 % die häufigsten Vertreter (Fratzl et al., 1998). Typ II Kollagen wird von dem Gen COL2A1 codiert und ist in hohen Konzentrationen im Knorpel vorhanden, wo es die Elastizität des Gewebes unterstützt (Cheah et al., 1991). Typ III Kollagen, welches über das COL3A1-Gen codiert wird, ist ein wichtiger Bestandteil von retikulären Fasern in Blutgefäßen, Muskeln und der Haut (Liu et al., 1997). Insbesondere während der Geweberegeneration erhöht sich die Produktion von Typ III Kollagen in der Anfangsphase und wird im Verlauf durch festere Typ I Fasern ersetzt (Merkel et al., 1988).

4.3 Gewinnung bioaktiver Peptide

Kollagenpeptide (KP) werden typischerweise aus den kollagenhaltigen Fasern von Rinderhaut, Schweinehaut oder Fischeschuppen hergestellt (Fu et al., 2019). Der Prozess zur Gewinnung von KP beginnt mit der Vorbehandlung des Rohmaterials, wobei nicht-kollagene Substanzen entfernt und Kollagen angereichert wird (Ahmed et al., 2020). In dieser Phase kommt Natriumhydroxid (NaOH) zur Entfernung von nicht-kollagenen Proteinen, organische Lösungsmittel zur Lipidentfernung und Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) zur Entkalkung zum Einsatz. Hong et al. (2021) stellten fest, dass das Hinzufügen von alpha-Amylase in der Vorbehandlung zu einer vermehrten Spaltung von glykosidischen Bindungen der Quervernetzungen führt. Nach der Vorbehandlung erfolgt die Extraktion des Kollagens. Diese umfasst unter anderem die Anwendung von sauren Lösungen, mechanischen Extraktionsverfahren und eine Hitzebehandlung über 40 °C (Mohammad et al., 2014). Das gewonnene Kollagen in seiner nativen Form besitzt aufgrund seiner komplexen Triple-Helix-Struktur noch nicht die gewünschten funktionalen Eigenschaften. Daher wird eine nachfolgende enzymatische oder chemische Hydrolyse durchgeführt, um das Kollagen in Kollagenhydrolysate mit niedrigerem Molekulargewicht und hoher Hydrophilie zu fragmentieren (Hema et al., 2017). Die abschließende Trocknung der KP kann auf verschiedene Weisen erfolgen. Während die Methode der Sprühtrocknung aus Kostensicht am effizientesten ist, gewährleistet die Gefriertrocknung die beste Erhaltung der funktionalen Eigenschaften der Peptide (Zeng et al., 2013).

4.4 Physikochemische Eigenschaften

Die physikalisch-chemischen Eigenschaften von KP sind von mehreren Faktoren abhängig, einschließlich dem Hydrolyseverfahren, der Aminosäurezusammensetzung und der Molekulargrößenverteilung. Generell weisen glycinhaltige Peptide eine hohe chemische Stabilität auf und benötigen Temperaturen über 100 °C, in saurer Lösung, bei längerer Exposition von etwa 24 Stunden, um in freie Aminosäuren zu zerfallen (Shock 1992). Dabei besteht bei HK ein positiver Zusammenhang zwischen der thermischen Stabilität und dem Gehalt an Hydroxyprolin (Zhang et al., 2020). Die hydrophilen Eigenschaften und die geringe Viskosität ergeben sich aus dem niedrigen Molekulargewicht und der Polarität der Hydroxylgruppen (Bella et al. 1995; Li et al., 2014). Bei einem pH-Wert von 7,0 besitzen KP eine gute Wasserlöslichkeit und bilden eine klare Lösung (Li et al., 2020). Die Emulgieraktivität von KP, wie durch Schmidt et al. (2020) berichtet, zeichnet sich durch einen hohen Emulgieraktivitätsindex von etwa 130 m² /g aus. Es wird angenommen, dass diese hohe Emulgierungsfähigkeit auf eine gute Löslichkeit und ein geringes Molekulargewicht zurückzuführen ist, was eine erleichterte Verteilung der Peptide an die Öl-Wasser-Grenzfläche ermöglicht. Ein weiterer Aspekt ist der isoelektrische Punkt (pI) von Peptiden, der den pH-Wert darstellt, bei dem die Nettoladung neutral ist. Dieser wird durch saure und basische Aminosäurereste sowie andere ionisierbare Gruppen bestimmt. Fu et al. (2017) dokumentierten eine Bandbreite des pI zwischen 3,12 und 5,71, abhängig vom Hydrolyseprozess. Eine zusätzliche Eigenschaft von KP stellt ihre antioxidative Kapazität dar. Je niedriger das Molekulargewicht, desto größer ist die Fähigkeit, ein Elektron oder Wasserstoff zur Neutralisierung von freien Radikalen abzugeben (León-López et al., 2019).

4.5 Anwendungsgebiete

Die Verwendung von KP erstreckt sich auf verschiedene Anwendungsgebiete. In der Dermatologie werden KP topisch in Cremes eingesetzt, um die Hautelastizität und Feuchtigkeitsbindung zu verbessern (Trookman et al., 2009). Darüber hinaus werden KP als Nahrungsergänzungsmittel in der Schönheitsindustrie vermarktet. Studien zeigen zunehmend, dass die orale Einnahme von KP das Erscheinungsbild feiner Linien und Falten reduziert (Proksch et al., 2014; Kim et al., 2018). In der Lebensmittelindustrie dienen KP als Zusätze in verarbeiteten Lebensmitteln wie Fleisch- und Backwaren, um die sensorischen Eigenschaften zu verbessern und den Proteingehalt zu erhöhen (Sousa et al., 2017; Kumar et al., 2019). Darüber hinaus zeigen KP ein erhebliches Potential in der regenerativen Medizin, insbesondere in der Geweberegeneration. Sie fördern die Produktion extrazellulärer Matrix und stimulieren die Migration von Hautzellen, was zu einer

beschleunigten Wundheilung führt (Wang et al., 2015; Steiner et al., 2021). Des Weiteren werden KP als "diätetische Lebensmittel für besondere medizinische Zwecke" im Kontext von Osteoarthritis und postmenopausaler Osteopenie eingesetzt (DAZ, 2019). Randomisierte Kontrollstudien deuten darauf hin, dass die orale Einnahme von KP die Progression beider Krankheiten verringern kann (Kumar et al., 2015; König et al., 2018). Darüber hinaus finden KP Anwendung als ergänzender Bestandteil spezifischer Kulturmedien, um das Zellwachstum zu fördern (Edgar et al., 2018). Im Bereich des Tissue Engineering können hochmolekulare KP als Scaffolds verwendet werden, um die dreidimensionale Struktur von Geweben wie Haut, Knochen oder Knorpel nachzuahmen (Song et al., 2023).

4.6 Metabolismus

Die Absorption von KP ist abhängig von der Größe und Struktur der Peptide, die je nach Quelle und Hydrolisierungsverfahren unterschiedlich ausfallen (Kleinnijenhuis et al., 2020). Kleinere KP mit niedrigerem Molekulargewicht weisen in der Regel eine höhere Bioverfügbarkeit auf (Yamamoto et al., 2016). Grundsätzlich werden KP im Magen-Darm-Trakt durch endogene Proteasen in kleinere Peptide gespalten und durch die membrangebundenen Peptidtransporter (PEPT) enterischer Zellen absorbiert und in den Blutkreislauf abgegeben (Smith et al., 2013; Rohm et al., 2019). Über den Portalkreislauf gelangen KP in die Leber, wo sie teilweise in weitere Peptidfraktionen hydrolysiert werden (Osawa et al., 2018). Es wird angenommen, dass KP relativ stabil gegenüber Serumpeptidasen sind und zusätzlich über passive Diffusion der Zell-Gap-Junctions transportiert werden können (Osawa et al., 2018). Eine Besonderheit von KP ist hierbei, dass sie im Vergleich zu anderen Proteinquellen primär in Peptidform anstatt als Aminosäuren absorbiert werden. Die orale Einnahme von KP führt in-vivo zu einer Anreicherung von über 17 verschiedenen Oligopeptiden in humanem Blutserum, insbesondere von Gly-Pro-Hyp und von Pro-Hyp in der Haut von Mäusen (Yazaki et al., 2017). Eine Reihe von Studien haben gezeigt, dass oral eingenommene KP neben der Haut auch weitere Zielgewebe wie Knorpel und Knochen erreichen und dort ihre biologische Aktivität entfalten (Oesser et al., 1999; Taga et al., 2014).

4.7 Sicherheit

KP gelten allgemein als sicher und werden rechtlich als Lebensmittel klassifiziert (EFSA 2005). Aktuell existiert keine festgelegte tolerierbare Obergrenze für die tägliche Gesamtaufnahme. Toxikologische Tierstudien zeigten, dass die langfristige Aufnahme von KP zu keinen signifikanten Nebenwirkungen führt (Liang et al., 2012; Seo et al., 2023). Ein potenzielles Risiko für Bovine Spongiforme Enzephalopathie (BSE), das von Rinderkollagen und -gelatine ausgehen könnte, wurde in einem probabilistischen Modell als extrem gering eingestuft (Koutsoumanis et al., 2020). Seltene allergische Reaktionen, können nicht ausgeschlossen werden (Mullins et al., 1996). Insbesondere hochmolekulares Kollagen aus Fisch wurde als potentielles Allergen identifiziert und sollte bei Vorliegen einer Fischallergie vermieden werden (Hamada et al., 2001).

5. Auswirkungen von Kollagenpeptiden auf Knochenzellen

5.1 Osteogene Differenzierung von OB-Vorläuferzellen über Runx2

In einer Studie von Liu et al. (2014) wurde untersucht, ob hydrolysiertes Kollagen (HK) aus Fischschuppen ohne zusätzliche induktive Substanzen die multidirektionale Differenzierung von MSZ fördert. Im Rahmen der Untersuchung wurden MSZ aus den Femora und Tibiae von 4 Wochen alten Sprague-Dawley Ratten isoliert und in einem L-DMEM-Medium mit 10% fötalem Rinderserum, Penicillin und Streptomycin kultiviert. HK (700-1300 Da) wurde aus den Schuppen von Tilapia-Fischen extrahiert, indem es mit Salzsäure behandelt, mit Wasser gewaschen und mit einem Proteasegemisch bei 60 °C für 6 h hydrolysiert wurde. Die Zellviabilität wurde mit einem MTT-Assay bestimmt, indem die Zellen in 96-Well-Platten bei 1×10^4 Zellen/Vertiefung ausgesät und mit verschiedenen Konzentrationen von HK (2, 0.2 oder 0.02 mg/ml) für 24 h inkubiert wurden. Die optische Dichte wurde bei 570 und 630 nm mit einem Mikroplattenleser gemessen. Der MTT-Assay zeigte, dass HK in den getesteten Konzentrationen keinen signifikanten Einfluss auf die Zellviabilität von MSZ hat. Die Zellmorphologie wurde ebenfalls nicht beeinflusst. Um zu überprüfen, ob HK einen Einfluss auf die Differenzierung von MSZ hat, wurde die Expression von osteogenen Markern (Runx2, ALP, OCN und OPN), endothelialen Markern (CD31, VE-Cadherin und vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor-Rezeptor 2 (VEGFR2)), adipogenen Markern (Lipoproteinlipase und Adipozytendifferenzierung-assoziiertes Protein (ADFP)), chondrogenen Markern (Aggrecan und COL-II) und neuralen Markern (Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2 (MAP2); β 3-Tubulin) untersucht. MSZ wurden mit 2, 0.2 oder 0.02 mg/ml HK für 3 oder 10 Tage behandelt. Danach wurde die Gesamt-RNA mit Trizol extrahiert und in cDNA umgeschrieben. Die Expression wurde mit einem Bio-Rad-Sequenz-Detektionssystem und einer Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) quantifiziert. Das Kontrollgen GAPDH wurde als Referenz verwendet. Es wurde beobachtet, dass HK die Expression von osteogenen Markern (Runx2, ALP, OPN und OCN) sowie endothelialen Markern (CD31, VE-cadherin und VEGFR2) signifikant erhöhte. Die erhöhte Expression war bei den am längsten behandelten Zellen (10 Tage) und einer Konzentration von 0.2 mg/ml HK am höchsten. Zudem wurde beobachtet, dass HK die Expression von adipogenen Markern (LPL und ADFP) und chondrogenen Markern (Aggrecan und COL-II) bei allen getesteten Konzentrationen und nach 3 Tagen deutlich reduzierte. Keine Auswirkungen wurden auf neurale Differenzierungsmarker (MAP2 und β 3-tubulin) festgestellt, bis auf eine Abnahme der MAP2-Expression bei einer Konzentration von 2 mg/ml. Um zu überprüfen, ob im Rahmen der osteogenen Differenzierung Osteoblasten (OB) entstanden sind, wurde

ALP als charakteristischer Marker untersucht. Die ALP-Färbung wurde mit einem BCIP/NBT-ALP-Kit durchgeführt. Die Zellen wurden mit einer Mischung aus Nitroblau-Tetrazolium (NBT) und 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP) gefärbt. Die ALP-Färbung zeigte, dass HK bei einer Konzentration von 0,2 mg/ml die ALP-Aktivität signifikant erhöhte. Nach der Behandlung mit 2, 0.2 oder 0.02 mg/ml HK für 3 Tage wurde die Proteinexpression von p-ERK, ERK und Runx2 mittels Western Blot analysiert. Die Zellen wurden für 30 Minuten mit einem Lysepuffer und einem Phosphatase-Inhibitor-Cocktail lysiert. Anschließend wurden die Zelllysate auf SDS-Polyacrylamid-Gele geladen und auf Nitrocellulose-Membranen übertragen. Die verwendeten primären Antikörper waren gegen p-ERK/ERK, Runx2 und β -Aktin als Referenz. Die Blots wurden mit einem ECL-Chemilumineszenz-Reagenz visualisiert. Um die Hypothese zu bestätigen, dass der MAPK/ERK-Signalweg an der osteogenen Differenzierung über Runx2 beteiligt ist, verwendeten die Autoren zusätzlich PD98059, einen spezifischen ERK-Inhibitor. Wie in Abbildung 4 dargestellt, führte die Behandlung mit 0,2 mg/ml HK zu einer signifikanten Steigerung der ERK1/2-Phosphorylierung und der Expression von Runx2 in MSZ. Ebenso wurden in den Gruppen, die mit 2 bzw. 0,02 mg/ml HFC behandelt wurden, eine Erhöhung der p-ERK- und Runx2-Expression festgestellt. Der ERK-Inhibitor PD98059 führte zu einer signifikanten Verringerung der Expression von P-ERK und Runx2.

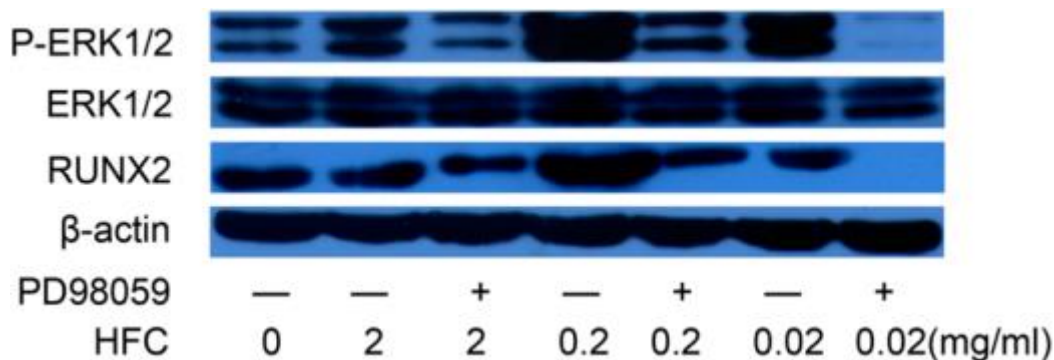


Abbildung 4: Expressionsprofil relevanter Proteine des MAPK/ERK-Signalwegs in MSZ, die mit verschiedenen Konzentrationen von HK kultiviert wurden, mit oder ohne PD98059. Die Zellen, die in einem L-DMEM-Medium kultiviert wurden, sind als Kontrollgruppe festgelegt (Liu et al., 2014)

Die Ergebnisse legen nahe, dass HK die Osteogenese in MSZ über den MAPK/ERK-Signalweg und die Expression des Transkriptionsfaktors Runx2 beeinflusst. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass HK ohne zusätzliche induktive Substanzen die multidirektionale Differenzierung von MSZ fördern kann. HK erhöht dabei insbesondere die Expression von osteogenen und endothelialen Markern, was auf die gezielte Differenzierung zu OB und Endothelzellen hindeutet.

Elango et al. (2019) untersuchen das osteogene Potential von HK aus Fischgräten der Goldmakrele. Ziel der Studie war es, Kollagenpeptide aus Fischgräten zu extrahieren und das osteogene Potential anhand von Maus-MSZ zu testen. Die Extraktion von Kollagen umfasste mehrere Schritte, darunter die Behandlung mit NaOH zur Entfernung von nicht-kollagenem Protein, die Behandlung mit Butylalkohol zur Entfernung von Fettmolekülen und die Behandlung mit EDTA zur Entfernung von Aschegehalt. Die vorbehandelten Gräten wurden dann in Wasser mit Alcalase inkubiert und bei 45 °C, pH 8,0 für 2 Stunden hydrolysiert. Die hydrolysierten Peptide wurden mit einer Cut-off-Membran filtriert. Das Molekulargewicht der Peptide wurde durch Tricin-SDS-PAGE bestimmt und ergab einen Wert von ~1 kDa. Die Studie verwendete mehrere Methoden zur Bewertung des osteogenen Potenzials von HK. Der Effekt von HK auf die Proliferation von MSZ wurde durch die Bestimmung der Anzahl lebensfähiger Zellen mit einem Invitrogen-Zellzähler untersucht. Die Zellzahl wurde nach 7 Tagen Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen von HK (10, 50, 100, 500 und 1000 ng/ml) gemessen. Es wurde beobachtet, dass die Proliferationsrate der MSZ in dosisabhängiger Weise anstieg. Im Vergleich zu den unbehandelten Zellen führte eine Konzentration von 50 ng/ml HK zu einem signifikanten Anstieg der Zellzahl, wohingegen der beobachtete Anstieg mit höheren Konzentrationen nicht mehr statistisch signifikant war. Der Effekt von HK auf die Differenzierung von MSZ (1×10^5 Zellen/Vertiefung) wurde anhand der Kultivierung in einem Wachstumsmedium mit 50 ng/ml HK für 21 Tage und anschließender Messung der ALP-Aktivität überprüft. Die Ergebnisse zeigten, dass die ALP-Aktivität in HK-behandelten Zellen signifikant höher war als in Kontrollzellen, was auf die gesteigerte Differenzierung zu OB hindeutet. Die osteogene Differenzierung wurde durch CP insgesamt um das 1,8-fache erhöht ($p < 0,05$). Die Ergebnisse wurden zusätzlich durch Hämatoxylin- und Eosin-Färbung der MSZ bestätigt und mit einer ImageJ Software quantifiziert. Die ALP-Färbung zeigte, dass HK-behandelte MSZ im Vergleich zu Kontrollzellen hohe ALP-Werte aufwiesen, insbesondere nach 21 Tagen Behandlung. Zusätzlich wurde in einem weiteren Versuch die Expression von Col-1 α 2 als Marker für OB untersucht. MSZ wurden mit einem primären Antikörper gegen Col-1 α 2 über Nacht inkubiert und mit einem sekundären Antikörper, der mit DyLight 594 gekoppelt war, für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Bilder wurden mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop aufgenommen. Die Ergebnisse bestätigen, dass Col-1 α 2 im Vergleich zu Kontrollzellen nach 21 Tagen Behandlung signifikant erhöht war. Elango et al. untersuchten auch die mRNA- und Proteinexpression osteogener Marker (Col-1 α 2, ALP und OC) und Signalmodulatoren (Runx2 und p38MAPK) in MSZ, die mit 50

ng/ml HK kultiviert wurden. Die mRNA-Expression wurde durch eine RT-PCR bestimmt, wobei die Gene anhand des Referenzgens GAPDH normalisiert wurden. Die Proteinexpression wurde durch Western Blot bestimmt, wobei die Proteine mit primären Antikörpern gegen GAPDH, Runx2, p38MAPK, Coll1 α 2 und OC und einem sekundären Antikörper, der mit einer Meerrettichperoxidase gekoppelt war, detektiert wurden. Die Banden wurden mit einem Chemilumineszenz-Reagenz visualisiert. Die Ergebnisse zeigen, dass die mRNA- und Proteinwerte dieser Gene in HK-behandelten Zellen signifikant höher waren als in Kontrollzellen nach 21 Tagen Behandlung ($p < 0,05$).

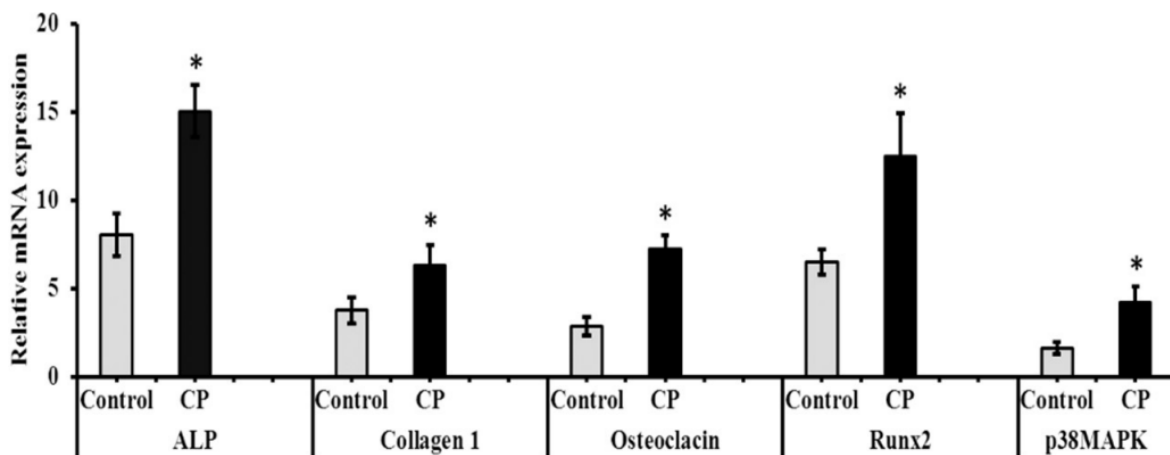


Abbildung 5: Osteogene mRNA-Expression von MSZ, die mit HK behandelt wurden. Das Symbol * steht für $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrollgruppe (Elango et al., 2019).

Zusammenfassend zeigten Elango et al., dass HK aus Fischgräten der Goldmakrele die Differenzierung von MSZ zu OB fördert und die osteogene Wirkung mit p38MAPK und dem Transkriptionsfaktor Runx2 im Zusammenhang steht.

Chotphruethipong et al. (2021) untersuchten die Wirkung von HK aus Seebarschhaut auf die Proliferation und Differenzierung von präosteoblastischen MC3T3-E1 Zellen. Um HK herzustellen, wurde Seebarschhaut verwendet, die durch die Anwendung von gepulsten elektrischen Feldern (PEF) vorbehandelt wurden, um die Zellmembranen aufzubrechen und die Extraktion zu erleichtern. Die Seebarschhaut wurde mit Natronlauge behandelt, mit Zitronensäure aufgequollen und mit einem Gemisch aus Pankreaslipasen entfettet. Die entfettete Seebarschhaut wurde anschließend mit Papain bei 40°C für 90 min und mit Alcalase bei 50°C für 90 min behandelt. Die resultierende Lösung wurde gefiltert und lyophilisiert. Die Molekulargewichtsverteilung von HK wurde mittels Matrix-assistierter Laser-Desorption-Ionisierung-Massenspektrometrie mit Flugzeitanalyse (MALDI-TOF-MS) bestimmt und entsprach einem Molekulargewicht von < 3 kDa. Die Wirkung von HK auf MC3T3-E1 Zellen (5×10^3 Zellen/Vertiefung) wurde mit verschiedenen Konzen-

trationen (50, 100, 200, 400 und 800 µg/ml) in einem α -MEM Medium mit 10% oder 1% FBS getestet. In den Versuchen wurden die Messungen jeweils nach 7, 14 und 21 Tagen durchgeführt. Die Zellproliferation wurde mit dem MTT-Assay gemessen und die Zellmorphologie mikroskopisch analysiert. Die ALP-Aktivität wurde mit dem p-Nitrophenylphosphat-Assay (p-NPP-Assay) und der BCIP/NBT-Färbung gemessen. Es wurde festgestellt, dass HK keine zytotoxischen Eigenschaften auf MC3T3-E1 Zellen hatte und die Zellproliferation bis zu einer Konzentration von 200 µg/ml förderte. Zudem erhöhte HK die ALP-Aktivität der präosteoblastischen Zellen mit zunehmender Kulturdauer. Die höchste ALP-Aktivität wurde bei einer Konzentration von 100 µg/ml HK nach 21 Tagen festgestellt. In einem weiteren Versuch wurde die Proteinexpression von Runx2, Akt und p-Akt in MC3T3-E1 Zellen (1×10^6 Zellen/35 mm) mittels Western Blot analysiert. Um zu untersuchen, ob der Akt-Signalweg mit der Differenzierung der OB-Vorläuferzellen zusammenhängt, wurde die Wirkung von HK in Verbindung mit einem Akt-Inhibitor (Perifosin) auf die ALP-Aktivität und Kalziumablagerung untersucht. Es wurde beobachtet, dass die Runx2-Expression in den mit HK behandelten Zellen bis zum 10. Tag der Kulturzeit anstieg ($p < 0,05$). Anschließend wurde am 14. Tag der Kulturperiode ein Rückgang der Runx2-Expression beobachtet. Die Expression von Akt wurde im Vergleich zur Kontrolle über alle Kulturzeiten erhöht. Die höchste Expression von p-Akt wurde nach 14 Tagen festgestellt. Die niedrigste ALP-Aktivität wurde bei den unbehandelten Kontrollzellen festgestellt. In Gegenwart von HK war die ALP-Aktivität deutlich erhöht ($p < 0,05$). Bei der Verwendung von HK in Kombination mit Perifosin wurde die ALP-Aktivität signifikant gesenkt ($p < 0,05$), was auf eine Hemmung des Akt-Signalwegs schließen lässt. Die Ergebnisse legen nahe, dass der Akt-Signalweg an der Differenzierung und Mineralisierung von OB beteiligt ist. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Behandlung von präosteoblastischen MC3T3-E1-Zellen mit HK aus Seebarschhaut eine stimulierende Wirkung auf Proliferation und die Differenzierung von OB-Vorläuferzellen hat. Diese gesteigerte Differenzierung wurde von einer erhöhten Expression von Runx2 begleitet, was auf eine Aktivierung des Akt-Signalwegs hindeutet, die durch HK verursacht wurde.

Die in-vitro Untersuchungen liefern konsistente Ergebnisse, die darauf hindeuten, dass HK die Proliferation und Differenzierung von OB-Vorläuferzellen fördert. Die Studien von Liu & Sun, Elango et al. und Chotphruethipong et al. verwendeten verschiedene Zelltypen, darunter MSZ aus Rattenfemora und -tibiae, MSZ aus dem Knochenmark von Mäusen und präosteoblastische MC3T3-E1-Zellen. Kollagen wurde jeweils aus Fischeschuppen oder -gräten extrahiert und enzymatisch hydrolysiert. Chotphruethipong et al. verwendeten

zusätzlich die PEF-Methode zur Vorbehandlung des Kollagens. Das Molekulargewicht der hydrolysierten Peptide lag bei 1-3 kDa. Zellproliferation und -viabilität wurden mittels MTT-Assays gemessen, wohingegen Elango et al. einen Invitrogen-Zellzähler verwendeten. Die ALP-Aktivität diente als primärer Marker für osteoblastische Zellen. Zusätzlich verwendeten Liu & Sun OCN und OPN sowie Elango et al. OCN als OB-Marker. Die Ergebnisse zeigen, dass mit steigender Konzentration von HK eine Zunahme der Zellproliferation beobachtet wurde. Jedoch war dieser Effekt bei Chotphruethipong et al. bei Konzentrationen über 200 µg/ml und bei Elango et al. über 50 ng/ml nicht mehr statistisch signifikant. Dies deutet darauf hin, dass die Steigerung der Zellproliferation begrenzt ist und von den experimentellen Bedingungen abhängt. Interessanterweise fanden Liu & Sun heraus, dass eine Behandlung mit 0,2 mg/ml die Proliferation von MSZ am stärksten förderte, während eine deutlich höhere Konzentration von 2 mg/ml die Proliferation signifikant reduzierte ($p < 0,05$). Dies lässt auf einen negativen Rückkopplungsmechanismus in den Zellen schließen, der zu einer Unterdrückung der Proliferation führt. Ein ähnliches Muster wurde bei der Untersuchung der mRNA- und Proteinexpression von osteogenen Markern, wie Runx2, ALP, OCN und OPN, mittels RT-PCR und Western Blot beobachtet. Bei allen Studien führte die Verwendung der Konzentrationen, die zu den höchsten Proliferationsraten führten, zu einer signifikanten Erhöhung osteogener Marker. Liu & Sun fanden heraus, dass bei Verwendung einer höheren Konzentration (2 mg/ml) die Expression dieser Marker im Vergleich zu einer Konzentration von 0,2 mg/ml signifikant niedriger war ($p < 0,05$). Zusätzlich wurde der Einfluss unterschiedlicher Signalwege auf die Expression von Runx2 und die osteogene Differenzierung untersucht. Elango et al. stellten eine erhöhte mRNA- und Proteinexpression von p38MAPK fest, die mit der osteogenen Differenzierung in Zusammenhang gebracht wird. Desweiteren beobachteten Liu & Sun eine erhöhte ERK1/2 Expression. Die Verwendung des ERK-Inhibitors PD98059 führte zu einer statistisch signifikanten Reduktion der p-ERK und Runx2 Expression, was darauf hindeutet, dass die Runx2-Expression und die damit einhergehende Differenzierung von MSZ durch den MAPK/ERK-Signalweg beeinflusst wird. Bei Chotphruethipong et al. wurde eine erhöhte p-Akt Expression im Vergleich zur Kontrolle festgestellt. Die Hemmung der Akt-Expression durch den PI3K-Inhibitor Perifosin verringerte die ALP-Aktivität signifikant. Die Ergebnisse legen nahe, dass der PI3K/Akt-Signalweg an der Osteogenese beteiligt ist.

5.2 Zellzyklusprogression der S-Phase in OB-Vorläuferzellen

Es konnte in Studien, die in Kapitel 5.1 vorgestellt wurden, gezeigt werden, dass die Differenzierung von Vorläuferzellen zu reifen OB durch HK gefördert wird. Der MAPK/ERK-Signalweg sowie der PI3K/Akt-Signalweg scheinen dabei an der Differenzierung über den Transkriptionsfaktor Runx2 beteiligt zu sein.

Li et al. (2016) untersuchten die Wirkung von HK-Typ 1 aus Sika-Hirschgeweih auf den Zellzyklus und die Osteogenese von MSZ. Die Autoren vermuteten, dass HK-Typ 1 die Proliferation und Differenzierung von MSZ stimuliert und den Smad-Signalweg aktiviert. Li et al. isolierten das Kollagen aus dem Hirschgeweih durch eine Trypsin-Hydrolysemethode und analysierten die Molekulargewichtsverteilung mittels HPLC. MSZ wurden aus den Femora von 12 Wochen alten männlichen Sprague-Dawley-Ratten isoliert. Für die Versuche wurden MSZ (5×10^4 Zellen/Vertiefung) in einem α -MEM mit 10% FKS und verschiedenen HK-Konzentrationen (0,5, 1,0, 2,5, 5,0, und 10,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) oder 10 nM Dexamethason (Dex) als positiver Kontrolle für 14 Tage kultiviert. Die Zellviabilität wurde mittels MTT-Assay bestimmt. Es konnte beobachtet werden, dass die Peptide aus dem HK-Typ 1 ein mittleres Molekulargewicht von etwa 9-14 kDa aufwiesen. Zudem zeigte HK-Typ 1 keine zytotoxischen Effekte auf MSZ und förderte die Proliferation in einer dosis- und zeitabhängigen Weise. Der höchste Effekt führte zu einer 20%igen Erhöhung bei 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ HK-Typ1 nach 14 Tagen. Eine Zellzyklusanalyse wurde mittels Durchflusszytometrie (FACS Aria) nach Propidiumiodid (PI)-Färbung durchgeführt. Die Zellen wurden mit 0,05% Trypsin für 3 Minuten bei Raumtemperatur abgelöst, mit Ethanol bei 4°C für 4 Stunden fixiert und anschließend mit 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PI gefärbt. Die Zellzyklusphasen jeder Probe wurden mit einer ModFit-LT-Software bestimmt. Der Versuch zeigte, dass HK-Typ 1 den Zellzyklus dosisabhängig beeinflusste und die S-Phase um etwa das 1,8-fache bei einer Konzentration von 5,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ hochregulierte (Abb. 6). Die Ergebnisse deuten auf eine erhöhte DNA-Synthese durch die Exposition mit HK-Typ 1 hin.

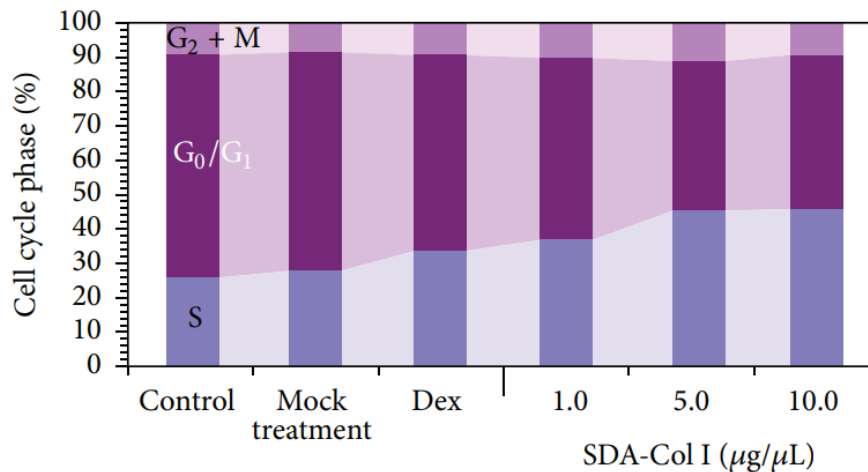


Abbildung 6: Zellzyklusanalyse von mit hydrolysiertem Kollagen Typ I (HK-Typ 1) behandelten MSZs. 4×10^5 Zellen wurden 14 Tage lang in Gegenwart von 0,5-10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ HK-Typ 1 oder 10 nM Dexamethason (Dex) kultiviert (Li et al., 2016).

In einem weiteren Versuch wurde die ALP- und OCN-Expression mittels RT-PCR und Western Blot untersucht. HK-Typ 1 induzierte die Expression beider osteogener Marker für die Differenzierung, sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene. Der beobachtete Effekt war ebenfalls bei 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ HK-Typ 1 am stärksten und führte zu einer 1.4-fachen Erhöhung im Vergleich zu Kontrollzellen. Höhere Konzentrationen unterdrückten die ALP-Expression und förderten die Lipidtröpfchenbildung, die durch eine Ölrot-O-Färbelösung nachgewiesen wurde. Die Akkumulation der Lipidtröpfchen deutet auf eine erhöhte Adipogenese hin. Um die Hypothese zu überprüfen, dass sich die Exposition auf den Smad-Signalweg auswirkt, wurden BMP2 und Smad2/3/4 mittels RT-PCR und Western Blot analysiert. Die Expression von BMP2 und Smad2, Smad3 und Smad4, die an dem BMP/Smad-Signalweg beteiligt sind, wurden sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene erhöhte. Die Effekte waren konzentrationsabhängig und führten zu einer 30-45%igen Erhöhung bei 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ HK-Typ 1. Zudem stellte sich heraus, dass HK-Typ 1 eine stärkere Wirkung Expression des BMP/Smad-Signalwegs hatte als Dex.

In einer weiteren Studie untersuchten Ye et al. (2020) die Wirkung von HK aus den Knochen von Yak-Rindern auf den Zellzyklus und die osteogene Differenzierung von MC3T3-E1 Zellen. Ziel der Studie war es die molekularen Mechanismen hinter der osteogenen Wirkung zu identifizieren. Für die Versuche wurden präosteoblastische MC3T3-E1-Zelle in einem α -MEM-Medium kultiviert, das 10% FKS und 1% Penicillin-Streptomycin-Mischung enthält. MC3T3-E1-Zellen wurden bei 90% Konfluenz und Behandlung mit 0,25% Trypsin passagiert. Die Anzahl der Zellen wurde mit einer Zählkammer gezählt und auf eine Zelldichte von $1,25 \times 10^4$ Zellen pro ml eingestellt. Für die Assays wurden 200 μL

Zellmedium in 96-Well-Platten gegeben. Um herauszufinden, welche Peptide die höchste proliferationsfördernde Aktivität aufweisen, wurde HK (~3 kDa) aus Yak-Rinderknochen mittels Größenausschluss-Chromatographie (SEC) in vier Subfraktionen aufgeteilt. Anschließend wurden die Subfraktionen mit dem MTT-Assay untersucht und die Subfraktion HK-III ausgewählt. Mittels Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) und Massenspektrometrie wurden 35 Peptide identifiziert. Ein erneutes MTT-Assay ergab, dass das Kollagenpeptid-12 (KP-12) zu der höchsten Zunahme der Proliferation von $42,7 \pm 1,82\%$ bei einer Konzentration von 0,05 mg/ml führte. Die folgenden Untersuchungen wurden jeweils dreimal bei Konzentrationen von 0, 0,02 und 0,05 mg/mL KP-12 durchgeführt. In einem weiteren Versuch wurde die Verteilung der Zellen in verschiedenen Phasen des Zellzyklus durch Durchflusszytometrie bestimmt. Wie in Tabelle 1 zu sehen, gab es nach Exposition gegenüber 0,02 und 0,05 mg/ml KP-12 eine signifikante Zunahme der Zellen in der G2/M-Phase von 7,17 % bzw. 7,92 % im Vergleich zu 5,96 % in der Kontrollgruppe ($p < 0,05$). Darüber hinaus war der Prozentsatz der Zellen in der S-Phase nach der Behandlung mit 0,05 mg/ml KP-12 signifikant höher als in der 0,02 mg/ml KP-12-Gruppe ($p < 0,05$).

Tabelle 1: Auswirkungen von KP-12 in Konzentrationen von jeweils 0.02 mg/ml oder 0.05 mg/ml auf die Zellzyklusverteilung von OB. Die Kontrollgruppe wurde mit einem Basismedium behandelt (Ye et al., 2020).

Phase	Different treatments		
	Control	0.02 mg mL ⁻¹ GP-12	0.05 mg mL ⁻¹ GP-12
G0/G1	72.26 ± 0.61	69.74 ± 0.68	67.58 ± 1.04
S	21.79 ± 0.43	23.09 ± 0.47	24.54 ± 0.70
G2/M	5.96 ± 0.62	7.17 ± 0.30	7.92 ± 0.51

Die Ergebnisse von Yi et al. deuten darauf hin, dass die Zellzyklusprogression nicht auf eine bestimmte Zellzyklusphase beschränkt war. Die Zunahme des Prozentsatzes von Zellen in den am stärksten proliferativen Phasen S und G2/M stimmt mit den Ergebnissen der höheren Proliferationsrate überein.

In einem weiteren Versuch untersuchten Ye et al. den Einfluss von KP-12 auf die mRNA- und Proteinexpression der Gene, die an der Osteoblastenproliferation und -differenzierung beteiligt sind, mittels RT-PCR und Western Blot. Im Vergleich zur Kontrollgruppe konnte

festgestellt werden, dass KP-12 die mRNA- und Proteinexpression von Cyclin D1, Runx 2, Osterix und Col I signifikant hochregulierte ($p < 0,05$). MC3T3-E1-Zellen, die mit 0,05 mg/mL KP-12 behandelt wurden, wiesen eine deutlich höhere Expression dieser Marker auf als die Gruppe, die mit 0,02 mg/mL KP-12 behandelt wurde. Diese Ergebnisse legen nahe, dass Cyclin D1, Runx 2, Osterix und Col I an der durch KP-12 geförderten Proliferation und Differenzierung von OB beteiligt waren und dass eine Dosis-Wirkungs-Beziehung vorliegt. Cyclin D1 diene als Marker, der mit dem Übergang in die G2/M-Phase in Verbindung steht. Um die Hypothese zu überprüfen, dass die Wirkung von KP-12 mit dem WNT/beta-Catenin-Signalweg in Verbindung steht, wurde ebenfalls die mRNA und Proteinexpression von beta-Catenin, Frizzled-5, Wnt5a und GSK-3beta untersucht. Laut den Autoren führt GSK-3 zum Abbau von beta-Catenin. Sein phosphorylierter Marker deutet dabei auf die Hemmung der GSK-3-Aktivität hin. Zusätzlich wurde der Inhibitor XAV-939 untersucht, der den Wnt/beta-Catenin-Signalweg blockiert, um zu bestätigen, dass KP-12 seine Wirkung durch diesen Signalweg ausübt. Ye et al. stellten fest, dass KP-12 im Vergleich zur Kontrollgruppe die mRNA- und Proteinexpression von beta-Catenin, Frizzled-5, Wnt5a und GSK-3beta signifikant erhöhte ($p < 0,05$). MC3T3-E1-Zellen, die mit 0,05 mg/ml KP-12 behandelt wurden, zeigten eine signifikant höhere mRNA- und Proteinexpression als bei 0,02 mg/ml. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass beta-Catenin, Frizzled-5, Wnt5a und GSK-3beta in einer dosisabhängigen Weise an der durch KP-12 geförderten Proliferation und Differenzierung beteiligt waren. Wie erwartet wurde die mRNA- und Proteinexpression der Marker nach der Behandlung mit 20 μ mol/l XAV-939 deutlich reduziert, was darauf hinweist, dass der Inhibitor die durch KP-12 verursachte Hochregulierung signifikant reduzieren konnte ($p < 0,05$). Zusammenfassend lässt diese Studie vermuten, dass KP-12 die Proliferation und Differenzierung von OB unter anderem durch Aktivierung des WNT/beta-Catenin-Signalwegs fördert. Einen Teil der proliferativen Wirkung lässt sich durch eine verstärkte S- und G2/M-Phase des Zellzykluses begründen.

Die Studien von Li et al. (2016) und Ye et al. (2020) untersuchten die Auswirkungen von HK auf den Zellzyklus von OB-Vorläuferzellen sowie molekulare Signalwege, die dafür verantwortlich sein könnten. Die Proliferation und Differenzierung von OB-Vorläuferzellen wurden ebenfalls untersucht, wie bereits in Kapitel 5.1 ausführlich beschrieben. In den Studien wurden verschiedene Zelltypen verwendet, darunter MSZ aus Rattenfemora und murine MC3T3-E1-Zellen. Das Kollagen wurde entweder aus Hirschgeweih oder Yak-Rinderknochen extrahiert und enzymatisch hydrolysiert, wobei das Molekulargewicht der

Peptide bei 9-14 kDa bzw. 3 kDa lag. Die Zellproliferation und -viabilität wurde mittels MTT-Assays gemessen. Die Ergebnisse legen nahe, dass HK die Zellproliferation und -differenzierung in einer dosis- und zeitabhängigen Weise stimuliert. Die höchste Wirkung wurde bei Li et al. bei einer Konzentration von 5 µg/ml HK-Typ 1 und bei Ye et al. von 0,05 mg/ml KP-12 beobachtet. Vergleichbar mit den Beobachtungen von Liu&Sun in Kapitel 5.1, stellten Li et al. bei höheren Konzentrationen einen gegenteiligen Effekt fest. Höhere Konzentrationen (> 0.05 mg/ml) führten zu einer verringerten ALP-Expression und verstärkten die Akkumulation von Lipidtröpfchen, was auf eine gesteigerte Adipogenese hinweist. In beiden Studien wurde die mRNA- und Proteinexpression von osteogenen Markern mittels RT-PCR und Western Blot untersucht. Li et al. stellten eine erhöhte Expression von ALP und OPN fest, während Ye et al. eine Erhöhung von Runx2, Col I und Osterix beobachteten. Eine interessante Beobachtung war, dass HK in beiden Untersuchungen zu einer Zellzyklusprogression in der S-Phase führte, wobei Ye et al. zusätzlich eine Erhöhung des Anteils von Zellen in der G2/M-Phase feststellte. Darüber hinaus wurde der Einfluss unterschiedlicher Signalwege auf die Osteogenese untersucht. Li et al. stellten eine erhöhte Expression von BMP2 und Smad2/3/4 fest, die jeweils Bestandteile des BMP/Smad-Signalwegs sind. Ye et al. beobachteten eine gesteigerte Expression von beta-Catenin, Frizzled-5, Wnt5a und GSK-3beta, die mit dem WNT/beta-Catenin-Signalweg assoziiert sind. Interessanterweise führte die Hemmung des WNT-Signalwegs durch XAV-939 zu einer signifikanten Reduktion osteogener Marker ($p < 0,05$). Insgesamt legen die Ergebnisse nahe, dass HK die Osteogenese durch Aktivierung weiterer Signalwege, wie den BMP/Smad- und WNT/beta-Catenin-Signalweg, fördert. Die proliferativen Effekte gehen dabei mit einer Zellzyklusprogression in der S-Phase einher.

5.3 Einfluss auf die Expression apoptose-regulierender Proteine in OB

In einer Studie von Zhu et al. (2020) wurde die osteogene Wirkung von HK aus Schweineknöchel auf MC3T3-E1-Zellen untersucht. Zusätzlich wurde die Expression von zellzyklus- & apoptose-assoziierten Proteinen untersucht. Ziel der Studie war es, die zugrunde liegenden molekularen Mechanismus zu erforschen. Die Autoren hydrolysierten Schweineknöchel-Kollagen enzymatisch mit einem Gemisch aus Alcalase und Trypsin bei pH 8,0 und 50 °C für 6 h. Über Ultrafiltrationsmembranen wurden die Peptide in unterschiedliche Molekulargewichte (<1, 1–3, 3–5 und >5 kDa) fraktioniert. Anschließend wurde die Zellviabilität der jeweiligen Fraktionen in unterschiedlichen Konzentrationen (0.05, 0.1, 0.5, 1 und 5 mg/ml) mit dem MTT-Assay analysiert. Die Fraktion mit dem niedrigsten Molekulargewicht zeigte eine dosisabhängige Erhöhung der Zellviabilität, die bereits

bei einer Konzentration von 0.1 mg/ml HK einen signifikanten Einfluss hatte ($p < 0,05$). Der größte Effekt wurde bei einer Konzentration von 0.5 mg/ml HK festgestellt, der zu einer 1,4-fach höheren Proliferation führte ($p < 0,01$). Die Behandlung mit einer hohen Dosis (5 mg/mL) hemmte die Zellproliferation. Für die folgenden Versuche wurde daher die “< 1 kDa“-HK-Fraktion mit der höchsten proliferativen Aktivität gewählt. Um den Effekt von HK (0.05, 0.5, 5 mg/ml) auf den Zellzyklus in MC3T3-E1-Zellen zu untersuchen, wurden zellzyklus-assoziierte Proteine wie Cyclin-abhängige Kinasen (CDKs) und Cycline mittels Western Blot untersucht. CDKs dienen als Marker für einen gesteigerten Zellzyklus. Es konnte beobachtet werden, dass die Expression von CDK-2, CDK-4, Cyclin B1 und Cyclin D1 durch die Behandlung mit HK zeit- und dosisabhängig erhöht wurde. Der größte Effekt wurde nach 72h und einer Konzentration von 5 mg/ml HK beobachtet ($p < 0,01$). Die Expression des inhibitorischen Regulators p21 wurde durch alle getesteten Konzentrationen signifikant reduziert ($p < 0,01$). In einem weiteren Versuch wurden die Effekte von HK auf die Expression von osteogenen Markern wie Osterix, COL1A1, Runx2 und ALP mittels Western Blot untersucht. MC3T3-E1-Zellen wurden für 24, 48 und 72 h in Gegenwart von 0, 0,05, 0,5 und 5 mg/ml HK kultiviert. Es wurde beobachtet, wie HK die Expression von Osterix, COL1A1 und Runx2 zeitabhängig erhöhte. Über alle osteogenen Marker hinweg hatte eine Dosis von 0.5 mg/ml HK den größten Einfluss ($p < 0,01$). Es konnte gezeigt werden, dass HK mit niedrigem Molekulargewicht die osteogene Aktivität von MC3T3-E1-Zellen förderte. Um die Hypothese zu bestätigen, dass HK über den PI3K/Akt-Signalweg Signalweg wirkt, wurde die Expression von Akt, p-Akt und PTEN mittels Western Blot gemessen. Um zu überprüfen, ob der PI3K/Akt-Signalweg an der durch HK induzierten Proliferation beteiligt ist, wurden die Effekte in Kombination mit dem PI3K-Inhibitor LY294002 untersucht. Es wurden keine signifikanten Unterschiede in der Expression von Akt beobachtet, während die aktive Form (p-Akt) dosis- und zeitabhängig erhöht wurde. Gleichzeitig wurde der natürliche Inhibitor PTEN signifikant reduziert ($p < 0,01$). Die Behandlung mit dem PI3K-Inhibitor reduzierte die Erhöhung der Zellviabilität von 122,63 % auf 108,80 %. Darüber hinaus hob LY294002 die durch HK induzierte Aktivierung von Akt auf. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die proliferationssteigernde Wirkung von HK teilweise von dem PI3K/Akt-Signalweg ausgeht. In einem weiteren Versuch untersuchten Zhu et al. den Einfluss von HK auf apoptose-assoziierte Marker wie Bcl-2-assoziiertes X Protein (Bax), Bcl-2 und aktive Caspase-3 mittels Western Blot. Die Apoptoserate wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Ergebnisse zeigten, dass HK die Apoptoserate von MC3T3-E1-Zellen nach 72 Stunden von 7,77 % auf 2,23 %

signifikant reduziert ($p < 0,05$). Nach 72h wurde die höchste Abnahme von Bax, Bcl-2 und Caspase-3 beobachtet (Abb. 7; $p < 0,01$). Insbesondere eine hohe Konzentration von 5 mg/ml HK führte zu einer deutlichen Abnahme der Werte. Obwohl die Proteinexpression von sowohl Bax als auch Bcl-2 für unterschiedliche Zeiträume abnahm, wurde das Bax/Bcl-2-Verhältnis zeit- und dosisabhängig reduziert ($p < 0,05$). Die Ergebnisse deuten auf eine verringerte Apoptose hin.

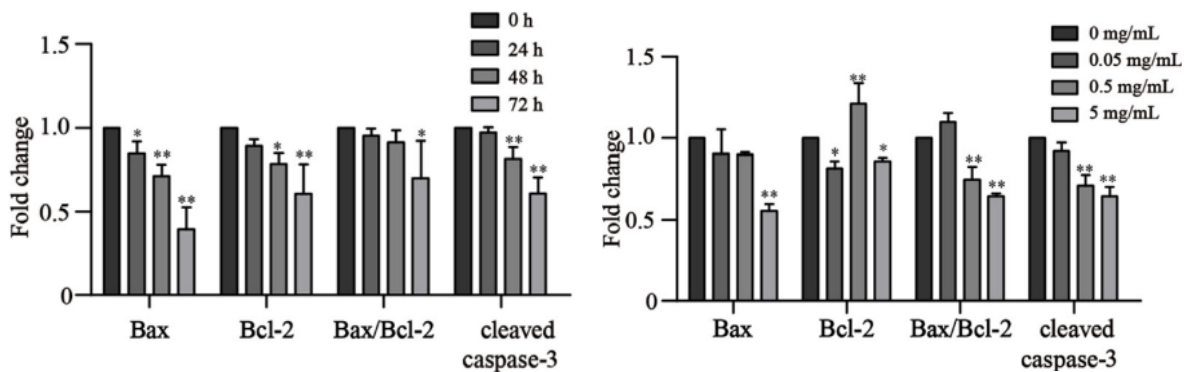


Abbildung 7: Proteinexpression von P21, Bax, Bcl-2 und aktiver Caspase-3 sowie das Verhältnis von Bax zu Bcl-2 in Abhängigkeit der Zeit (links) und der Konzentration (rechts). MC3T3-E1-Zellen wurden für unterschiedliche Zeiträume (0, 24, 48 und 72 h) bzw. für 72 h mit mit verschiedenen Dosen (0, 0,05, 0,5 und 5 mg/ml HK) behandelt. Die Daten werden als Mittelwerte \pm SD ausgedrückt. * $p < 0,05$ und ** $p < 0,01$ (Zhu et al., 2020).

Die Ergebnisse deuten zusammengefasst darauf hin, dass die Behandlung mit HK den PI3K/Akt-Signalweg in MC3T3-E1-Zellen aktivieren kann, indem es die Phosphorylierung von Akt erhöht und die Expression von PTEN verringert. Zusätzlich hat HK eine regulatorische Wirkung auf die Expression apoptose-assoziiierter Proteine.

Liu et al. (2020) untersuchten die anti-apoptotische Wirkung von HK aus Heilbutthaut auf OB, die oxidativen Stress ausgesetzt waren. Ziel der Studie war es zudem, die anti-osteoporotischen Mechanismen von HK zu untersuchen. Die Autoren verwendeten die menschliche OB-Zelllinie Saos-2 und kultivierte diese in einem alpha-MEM mit 10% FKS, 100 U/ml Penicillin und 100 μ g/ml Streptomycin bei 37°C. Die Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen von HK (200 bis 1000 μ g/ml) vorbehandelt. Anschließend wurden die Zellen oxidativen Stress durch Wasserstoffperoxid (H₂O₂) ausgesetzt. Das Antioxidans N-Acetyl-L-Cystein (NAC) diente als positive Kontrolle. Die Zellviabilität wurde unter normalen Bedingungen und nach H₂O₂-Behandlung mittels MTT-Assay gemessen. HK erhöhte die Zellviabilität von Saos-2-Zellen in einem Bereich von 200 bis 1000 μ g/ml signifikant ($p < 0,05$). Unter H₂O₂ wurde die Zellviabilität signifikant verringert ($p < 0,01$). Es wurde beobachtet, dass die Behandlung mit HK Saos-2-Zellen signifikant vor

durch H₂O₂ verursachte Apoptose bei Konzentrationen von 400 und 800 µg/ml schützte. Die jeweils niedrigste (200 µg/ml HK) und höchste (1000 µg/ml HK) Konzentration hatten keinen signifikanten Einfluss. Diese Ergebnisse legen nahe, dass HK die Zellviabilität fördert und H₂O₂-induzierte Apoptose unterdrückt. In einer anschließenden Untersuchung wurden die Zelllysate der jeweiligen Versuchsreihen hinsichtlich der ALP-Aktivität und oxidativer Marker mittels standardisierter Nachweis-Kits untersucht. Die intrazellulären reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) wurden mit einem ROS-Assay-Kit und einem Fluoreszenz-Mikroplatten-Lesegerät bestimmt. Die Fluoreszenz-Intensitäten der jeweiligen Gruppen wurden anschließend verglichen. Die Superoxiddismutase (SOD) diente in dem Versuch als Marker der antioxidativen Abwehr der Zellen. H₂O₂ führte zu einer deutlichen Abnahme der ALP-Aktivität, während HK die H₂O₂-induzierte Abnahme in einer konzentrationsabhängigen Weise abschwächte ($p < 0,05$ bei 200 µg/ml und $p < 0,01$ bei 400 bzw. 800 µg/ml HK). H₂O₂ führte ebenfalls zu einer deutlichen Erhöhung der ROS- und Malondialdehyd (MDA)-Werte, die mit einer eingeschränkten SOD-Aktivität einhergingen. Es zeigte sich, dass die Vorinkubation mit HK die ROS- und MDA-Spiegel in einer konzentrationsabhängigen Weise unterdrückte, während die SOD-Aktivität im Vergleich zur H₂O₂-behandelten Gruppe signifikant erhöht wurde ($p < 0,01$). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass HK oxidative Schäden, die durch H₂O₂ induziert wurden, abschwächen kann. Um die Hypothese zu überprüfen, dass die protektive Wirkung mit dem Nf-kB-Signalweg in Verbindung steht, wurde in einem weiteren Versuch der Effekt von HK auf F-Box-Protein 7 (FBXW7), p100 und NF-kB untersucht. Die mRNA- und Proteinexpression wurde mittels Western Blot und RT-PCR bestimmt. Wie in Abbildung 8 gezeigt, erhöhte H₂O₂ die mRNA-Expression von FBXW7, was darauf hinweist, dass oxidativer Stress mit FBXW7 in Verbindung steht. Die erhöhte FBXW7-Expression wurde durch HK dosisabhängig reduziert, wobei eine Konzentration von 800 µg/ml den größten Effekt hatte ($p < 0,01$). Zudem konnte beobachtet werden, dass H₂O₂ zu einer deutlichen Abnahme der p100-Expression führte, die ab einer Konzentration von 400 µg/ml HK wieder angehoben wurde, wobei 800 µg/ml HK einen in etwa doppelt so großen Effekt hatte (Abb. 8; $p < 0,01$). Die regulatorischen Effekte von NAC und 800 µg/ml HK waren hinsichtlich der Auswirkungen auf die FBXW7- und p100-Expression vergleichbar. Darüber hinaus führte die Behandlung mit HK bei Konzentrationen von 400 und 800 µg/ml in Saos-2-Zellen zu einer signifikanten Reduktion der NF-kB-Expression ($p < 0,01$).

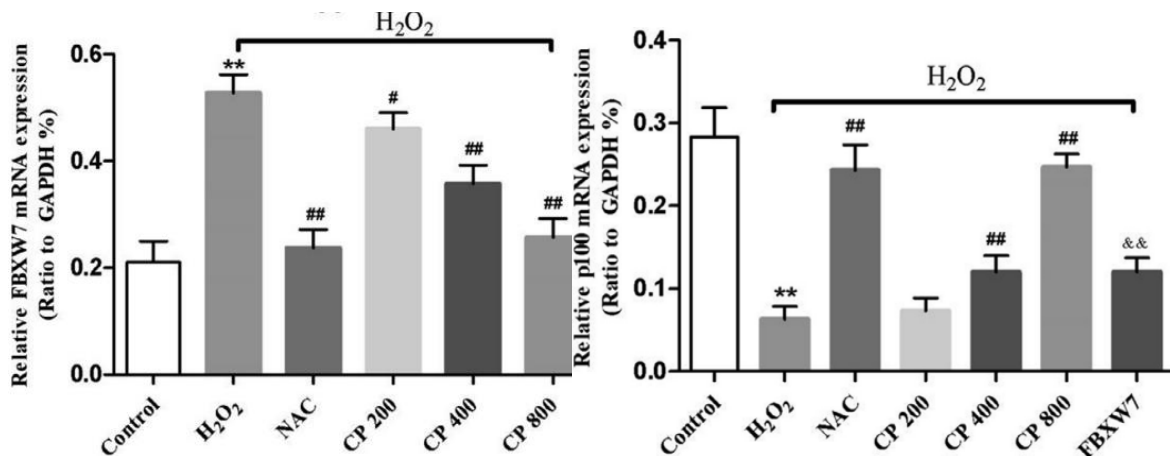


Abbildung 8: mRNA-Expression von FBXW7 (links) und p100 (rechts) in Saos-2-Zellen, die jeweils mit H₂O₂, NAC und HK (200-800 µg/ml) behandelt wurden. *p < 0,05 und **p < 0,01 vs. Kontrolle. #p < 0,05 und ##p < 0,01 vs. H₂O₂, und &p < 0,05 and &&p < 0,01 vs. HK (800 µg/ml) (Liu et al., 2020).

Um die molekularen Interaktionen hinter der protektiven Wirkung von HK zu untersuchen, wurden Saos-2-Zellen verwendet, die FBXW7 überexprimierten, NF-κB unterexprimierten oder p100 unterexprimierten. Die Protein- und mRNA-Expression wurde erneut mittels Western Blot und RT-PCR untersucht. Die Überexpression von FBXW7 verminderte die Expression von p100 und erhöhte die Expression von NF-κB. HK reduzierte die Expression von FBXW7 und NF-κB signifikant und förderte die Expression von p100. Die Beobachtungen deuten darauf, dass HK die negativen Auswirkungen einer FBXW7-Überexpression aufheben konnte. Darüber hinaus führte das Ausschalten von p100 zu einer Hochregulation der NF-κB-Expression. Die Daten legen nahe, dass zwischen FBXW7, p100 und NF-κB eine wechselseitige regulatorische Beziehung besteht. FBXW7 scheint dabei ein aufwärts gerichteter regulatorischer Faktor von p100 und NF-κB zu sein. P100 scheint dabei ein negativer Regulator des NF-κB-Signalwegs zu sein. Die Überexpression von FBXW7 sowie das Ausschalten von p100 verringerte zudem die protektiven Effekte von HK auf die Zellviabilität, ALP- und ROS-Aktivität signifikant (p < 0,05). Die Ergebnisse zeigten, dass HK über eine verringerte FBXW7- und gesteigerte p100-Expression den Nf-κB-Signalwegs reguliert und Saos-2-Zellen vor oxidations-induzierter Apoptose schützt.

Die Studien von Zhu et al. (2020) und Liu et al. (2020) untersuchten die Auswirkungen von HK auf apoptose-assoziierte Proteine sowie die molekularen Interaktionen, die dafür verantwortlich sein könnten. Dabei untersuchten Zhu et al. die Auswirkungen von HK unter Normalbedingungen, wohingegen Liu et al. die Effekte unter H₂O₂-induziertem, oxidativem Stress untersuchte. Für die Studien wurden murine MC3T3-E1-Zellen (Zhu et al.) und humane Saos-2-Zellen (Liu et al.) verwendet. Das Kollagen wurde aus Schweineknochen oder Heilbutthaut extrahiert und enzymatisch hydrolysiert. Zhu et al.

wählte die Peptidfraktion mit einem Molekulargewicht unter 1 kDa. Liu et al. machten keine Angaben zum Molekulargewicht der Peptide. Zellviabilität und -proliferation wurden durch MTT-Assays gemessen. Die Ergebnisse zeigten, dass HK die Zellviabilität und Differenzierung in einer dosis- und zeitabhängigen Weise stimuliert. Die höchste Wirkung wurde von Zhu et al. bei einer Konzentration von 0,5 mg/ml HK und von Liu et al. bei 800 µg/ml HK beobachtet. Zhu et al. und Liu et al. beobachtete einen entgegengesetzten Effekt bei höheren Konzentrationen (> 5 mg/ml bzw. 1000 µg/ml HK), der die Zellproliferation reduzierte. Zhu et al. untersuchten zusätzlich die mRNA- und Proteinexpression osteogener Marker mittels RT-PCR und Western Blot. Zhu et al. beobachteten eine erhöhte Expression von Osterix, Runx2, COL1A1 und ALP. Über alle osteogenen Marker hinweg hatte eine Dosis von 0.5 mg/ml HK den größten Einfluss ($p < 0,01$). Interessanterweise wurde ebenfalls eine Erhöhung zellzyklus-assoziiierter Proteine CDK-2, CDK-4, Cyclin B1 und Cyclin D1 festgestellt, was die Ergebnisse aus Kapitel 5.2 unterstreicht. Darüber hinaus wurde der Einfluss verschiedener Signalwege untersucht. Zhu et al. stellten eine erhöhte p-Akt-Expression und eine Reduktion von PTEN fest, die mit einem aktiven PI3K/Akt-Signalweg in Verbindung stehen. Liu et al. beobachteten eine durch H₂O₂ gesteigerte Expression von FBXW7 und NF-κB sowie eine Reduktion von p100, die durch HK deutlich reduziert wurde. Zudem konnte HK die Apoptoserate der Saos-2-Zellen signifikant reduzieren ($p < 0,05$). Zusätzlich führte die Hemmung des PI3K/Akt-Signalwegs durch LY294002 bei Zhu et al. zu einer signifikanten Reduktion der HK-assoziierten Effekte. Insgesamt deuten die Ergebnisse darauf hin, dass HK die Zellviabilität fördern kann, indem es das Bax/Bcl-Verhältnis zeit- und dosisabhängig reduziert. Darüber hinaus scheint HK vor oxidations-induzierter Apoptose zu schützen, indem es den NF-κB-Signalweg herunterreguliert, was mit einer erhöhten p100-Expression und einer verminderten FBXW7-Expression einhergeht.

5.4 Erhöhte Mineralisierung und Expression osteogener Proteine in OB

Zusätzlich zu der geförderten OB-Differenzierung wurde in den Studien aus Kapitel 5.2 eine höhere Zellviabilität festgestellt, die mit einer Zellzyklusprogression der S-Phase einherging. Die Effekte wurden mit dem BMP2/Smad- sowie dem Wnt/β-Catenin-Signalweg in Verbindung gebracht.

In einer Studie von Kim et al. (2014) wurden humane OB der Zelllinie MG-63 verwendet. Ziel der Studie war es, die Wirkung von HK auf die Expression osteogener Proteine und den MAPK-Signalweg zu untersuchen. Für die Untersuchungen wurde Schweinehautgelatine mit einem Gemisch aus Protamex & Aromazym bei 50 °C für 12 Stunden hydrolysiert. Mittels Ultra-zentrifugalfiltration wurden die Peptide auf ein Molekulargewicht von 3 kDa

normiert. Die humanen MG-63 OB wurden in einem Dulbecco Eagle Medium (DMEM) bei 37 °C kultiviert, das 10% FKS und 100 U/ml einer Penicillin-Streptomycin-Mischung enthielt. In einem ersten Versuch wurden die Auswirkung von HK auf die Proliferation von OB über ein BrdU-Zell-Proliferationsassay untersucht. Die Proliferation der MG-63-Zellen wurde dosisabhängig gesteigert und zeigte einen signifikanten 1,2-fachen Anstieg, bei einer Konzentration von 100 mg/ml HK ($p < 0,05$). Um die stimulierenden Effekte von HK auf OB zu untersuchen, wurde die ALP-Aktivität mittels p-Nitrophenol-Färbung ermittelt. Eine Picro-Sirius-Rot-Färbung diente als Kollagennachweis und ein Alizarin-Rot-S-Assay für die Bestimmung der Mineralisierung. Kim et al. konnten beobachten, dass die Behandlung mit HK zu einer signifikanten Steigerung der ALP-Aktivität führte ($p < 0,05$). Die ALP-Aktivität zeigte eine dosisabhängige Erhöhung (4,9%, 7,9%, 7,4% bzw. 8,1%) bei 10, 25, 50 bzw. 100 mg/ml HK. Die höchste ALP-Aktivität wurde bei der Behandlung mit 25 mg/ml HK erreicht. Der Kollagengehalt und die Calciumablagerung, wurden ebenfalls im Vergleich zur Kontrollgruppe dosisabhängig erhöht ($p < 0,05$). In einem weiteren Versuch, wurden molekulare Signalwege untersucht die für die Effekte von HK auf OB verantwortlich sein könnten. Drei verschiedenen MAPKs (ERK1/2, JNK1/2 und p38) sowie ihre Downstream-Proteine JUN und ELK1 wurden mittels Western Blot analysiert. HK führte bei einer Konzentration von 100 mg/ml zu einer deutlichen Expressionssteigerung aller drei MAPKs innerhalb der ersten Stunde, die nach 2 Stunden wieder auf den Ausgangswert zurückfiel. Bei der Messung nach 0,5 Stunden betrug die Erhöhung das 1,63-fache für ERK1/2 und das 1,98-fache für p38, im Vergleich zum Ausgangswert ($p < 0,05$). Die Expression des phosphorylierten JNK1/2-Proteins erhöhte sich auf das 1,55-fache bzw. 1,64-fache nach 0,5 bzw. 1 Stunde Behandlung ($p < 0,05$). Um die Hypothese zu bestätigen, dass der MAPK-Signalweg involviert ist, wurden unterschiedliche MAPK-Inhibitoren verwendet, um die hochregulierte Phosphorylierung der MAPKs zu unterdrücken. Die Exposition mit 100 mg/ml HK führte zu einer in etwa doppelten Erhöhung der MAPKs ERK1/2, JNK1/2 und p38, im Vergleich zur Kontrolle ($p < 0,05$). Die expressionsfördernden Effekte von HK auf die jeweiligen MAPKs wurden durch den ERK-Inhibitor PD98059, JNK-Inhibitor SP600125 und p38-Inhibitor SB203580 vollständig aufgehoben. Die Expression des phosphorylierten ELK1-Proteins wurde nach 0,5 Stunden HK-Behandlung um das 1,47-fache erhöht ($p < 0,05$). Nur die Expression von JUN blieb durch die HK-Behandlung unverändert. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass der MAPK-Signalweg durch HK aktiviert wird. Um die Auswirkungen von HK auf die Expression osteogener Gene zu untersuchen, wurde die mRNA-Expression von COL1A1, ALP, OC (BGLAP-Gen) und

OPN (SPP1-Gen) in MG-63-Zellen mittels RT-PCR gemessen (Abb. 9). HK führte zu einer deutlichen Hochregulierung der mRNA-Expression von COL1A1, ALP und OPN. Die erhöhte COL1A1- und ALP-Expression blieb für 8 Stunden erhalten ($p < 0,05$). Die OPN-Expression nahm nach 15 min zu und blieb über 2 Stunden signifikant erhöht ($p < 0,05$). Interessanterweise wurde die OC-Expression durch HK nicht signifikant beeinflusst.

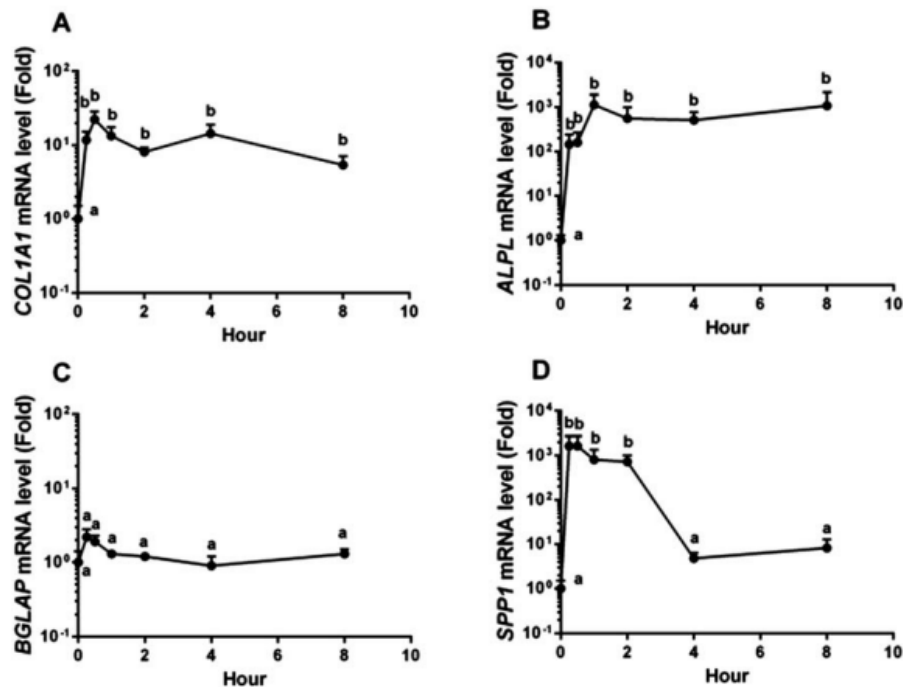


Abbildung 9: Zeitverlauf der Expression osteogener Gene in MG-63 Zellen. (A) COL1A1; (B) ALP (ALPL-Gen); (C) OCN (BGLAP-Gen); (D) OPN (SPP1-Gen). Alle Daten werden als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. * $p < 0,05$ (Kim et al., 2015).

Kim et al. beobachteten zudem, dass die erhöhte COL1A1-Expression durch die Inhibitoren PD98059, SP600125 und SB203580 deutlich beeinträchtigt wurde. Die durch HK erhöhte ALP- und OPN-Expression wurde jeweils durch PD98059 bzw. SB203580 blockiert. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass HK die Expression osteogener Proteine in OB fördert und zu einer gesteigerten Mineralisierung beiträgt. Ein Großteil dieser Effekte lässt sich durch die Aktivierung von MAPKs erklären.

In der vorliegenden Studie untersuchten Yamada et al. (2013) die biologischen Effekte von HK aus Kabeljau auf humane OB. Der Schwerpunkt der Studie lag auf der Erforschung der Auswirkungen auf die Expression osteogener Proteine und die Mineralisierung. Für die Untersuchung verwendete HK wurde aus den Gräten und der Haut von Kabeljau-Fischen gewonnen und wies ein Molekulargewicht von 3 kDa auf. Für die Versuche wurde die humane OB-Zelllinie NOS-1, welche aus einem Osteosarkom stammt, verwendet. Die Zellen wurden in 60 mm Kulturschalen bei einer Dichte von 2×10^5 Zellen ausgesät und

sieben Tage lang in einem α -MEM mit 10% FKS und 1% Penicillin-Streptomycin-Mischung bei 37°C kultiviert. Zunächst wurde die optimale HK-Konzentration durch die Auswirkung auf die ALP-Aktivität ermittelt. Die ALP-Aktivität wurde mittels einer ρ -Nitrophenylphosphat-Färbung in Kombination mit einem quantitativen Mikro-Lowry-Test bestimmt. Die ALP-Aktivität der 0,1% HK-Gruppe war signifikant höher als die der anderen Gruppen ($p < 0,05$). Nach sieben Tagen Inkubation betragen die ALP-Aktivitäten der Kontroll- und 0,1% HK-Gruppen 3,06 bzw. 2,63 $\mu\text{mol pNPP/mg Protein}$. Daher wurde die 0,1% HK Konzentration für die weiteren Untersuchungen verwendet. Anschließend wurde der Einfluss von HK auf die Zellproliferation mittels MTT-Assay und der DNA-Gehalt durch ein PicoGreen-Assay analysiert. Obwohl sich die Zellcluster in beiden Gruppen während des Experiments vergrößerten, war die Zelldichte in der HK-Gruppe ab dem dritten Tag der Inkubation signifikant höher als in der Kontrollgruppe ($p < 0,05$). Auch der DNA-Gehalt war nach fünf Tagen Inkubation signifikant höher im Vergleich zur Kontrolle ($p < 0,01$). Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass HK die Proliferation von NOS-1-Zellen fördert. In einem weiteren Versuch wurden die Auswirkungen von HK auf die Gen- und Proteinexpression von OCN, OPN, BMP-2 und Integrin $\beta 3$ mittels RT-PCR und Western Blot untersucht (Abb. 10). Die ausgewählten Proteine stehen mit der OB-Aktivität und Mineralisierung in Verbindung. Die Ergebnisse zeigten, dass die Expression aller vier Proteine nach drei Tagen Kultur mit HK anstieg. Die mRNA-Expression von OCN und BMP-2 fiel nach sieben Tagen Kulturdauer wieder auf das Ausgangsniveau. Im Gegensatz dazu blieb die OPN- und Integrin $\beta 3$ -Expression nach sieben Tagen Kultur immer noch erhöht. Die Ergebnisse der Western Blot Analyse zeigten, dass die Proteinexpression von BMP-2 und Integrin $\beta 3$ nach drei Tagen Kultur mit HK erhöht waren ($p < 0,01$ bzw. $p < 0,05$). Bei OCN und OPN konnte nach drei Tagen noch keine signifikante Zunahme im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden. Die erhöhte BMP-2-Expression nahm nach sieben Tagen Kultur mit HK wieder ab ($p < 0,01$). Die Proteinexpression von OCN, OPN und Integrin $\beta 3$ war nach sieben Tagen Kultur mit HK höher als in der Kontrollgruppe. Insgesamt führte HK zu einer erhöhten und teilweise zeitversetzten Expression osteogener Proteine in NOS-1-Zellen.

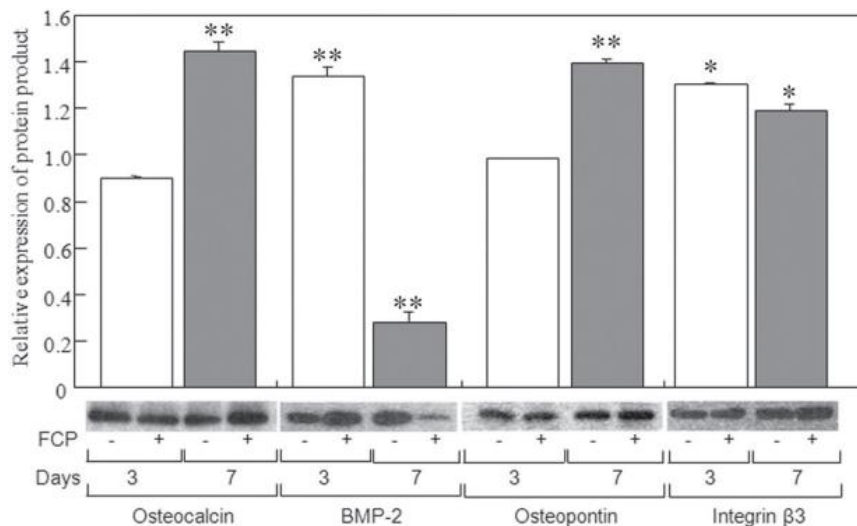


Abbildung 10: Auswirkungen von HK auf die Proteinexpression von OCN, BMP-2, OPN und Integrin β 3 in NOS-1-Zellen. Die Ergebnisse der Western Blot Analysen wurde jeweils nach 3 d (weiße Säule) und 7d (graue Säule) Kultur mit oder ohne Inkubation mit 0,1% HK grafisch dargestellt. * $p < 0.05$ im Vergleich zur Kontrolle; ** $p < 0.01$ im Vergleich zur Kontrolle (Yamada et al., 2013).

Um die Hypothese zu bestätigen, dass die osteogene Wirkung von HK die Mineralisierung von NOS-1-Zellen fördert, wurden diese in 35-mm-Kulturschalen bei einer Dichte von 2×10^5 Zellen kultiviert und nach Konfluenz mit 5 mM Natrium- β -Glycerophosphat behandelt. Nach 7, 14 und 21 Tagen wurden die Zellen einer Kossa-Färbung unterzogen, fixiert und unter Anwendung eines Phasenkontrastmikroskops analysiert. Die Kossa-Färbung ermöglichte die Visualisierung von dunkelbraun gefärbten, mineralisierten Knötchen. Es wurde beobachtet, dass die Dichte der mineralisierten Knötchen in beiden Gruppen zeitabhängig zunahm. Bereits nach sieben Tagen zeigten die Zellen, die mit HK inkubiert wurden, eine signifikant höhere Mineralisierung im Vergleich zur Kontrolle ($p < 0,01$). Die Mineralisierung nahm in beiden Gruppen weiterhin zu und war auch nach 14 und 21 Tagen in der HK-Gruppe im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöht ($p < 0,05$ bzw. $p < 0,01$). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die osteogene Wirkung von HK die Mineralisierung von NOS-1-Zellen stimuliert und somit zu einer erhöhten Bildung mineralisierter Knötchen führt. Die Beobachtungen unterstützen die Hypothese, dass HK positive Effekte auf die osteogene Differenzierung und Mineralisierung von NOS-1-Zellen hat.

In einer zweiten Studie von Yamada et al. (II) aus demselben Jahr wurden die Auswirkungen von HK auf Enzyme der Kollagenquervernetzung und die Mineralisierung in osteoblastischen Zellen untersucht. Das in der Studie verwendete HK stammt aus der Hydrolyse von Fischhäuten und wurde von der Firma Yaizu Suisankagaku (Shizuoka, Japan) zur Verfügung gestellt. Das Molekulargewicht wurde mittels TOF-MS bestimmt und lag im

Bereich von 2-8 kDa. Für die Versuche wurden murine MC3T3-E1-Zellen (Subklon 4) verwendet, die in einem α -MEM mit 10% FKS, 100 U/mL Penicillin und 100 μ g/mL Streptomycin bei 37°C kultiviert wurden. Die Zellen wurden mit einer Dichte von 2×10^4 Zellen/Vertiefung in einer 24-Well-Platte ausgesät und über Nacht kultiviert. Anschließend wurden die Zellen erneut in einem α -MEM mit oder ohne 0,2% HK kultiviert. Die Zellzahl wurde nach 2, 5, 7, 10 und 14 Tagen unter Verwendung eines Phasenkontrastmikroskops und einer Zählkammer gezählt. Es konnte im Zeitverlauf kein signifikanter Unterschied zwischen der mit HK behandelten Gruppe und der Kontrolle festgestellt werden. Um die Hypothese zu bestätigen, dass HK eine Auswirkung auf die Expression von Enzymen hat, die mit der Kollagenquervernetzung in Verbindung stehen, wurde die Genexpression diverser Enzyme mittels RT-PCR gemessen. Für den Versuch wurden MC3T3-E1-Zellen in einer 6-Well-Platte bei einer Dichte von 2×10^5 Zellen/Vertiefung kultiviert, bis sie konfluent waren. Das Medium wurde anschließend durch solche ersetzt, die jeweils 0,05%, 0,1%, 0,2% und 0,5% HK enthielten. Die HK-Behandlung führte zu einer signifikanten Hochregulierung der Expression des COL1A2-Gens sowie aller Lysylhydroxylasen (LHs), Lysyloxidasen 2–4 (LOXLs) und Galaktosyltransferase (GLT25D1-Gen) mRNAs. Eine Behandlung mit 0,2% HK führte zu einem 3,4-fachen Anstieg der LH2-Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p < 0.01$). Ebenfalls hohe Anstiege der mRNA-Expression im Vergleich zur Kontrolle wurden bei COL1A2 (3-fach), LOXL2 (2,4-fach), LOXL4 (1,8-fach), GLT25D1 (1,7-fach), LH1 (1,4-fach) und LOXL3 (1,3-fach) beobachtet ($p < 0.01$). Der Anstieg der LH3-Expression war ebenfalls statistisch signifikant ($p < 0,05$). Die mRNA-Expression von LOX und LOXL1 zeigte eine Tendenz zur Steigerung, erreichte jedoch keine statistische Signifikanz. In einem weiteren Versuch wurde der Gehalt verschiedener Kreuzvernetzungsprodukte mittels HPLC in Kombination mit einer Vernetzungsanalyse bestimmt. Die Zellen wurden für 14 Tage kultiviert und jeweils mit 50 μ g/mL Ascorbinsäure oder 0,2% HK kultiviert. Die Kreuzvernetzungsprodukte Dihydroxy-Norleucin (DHLNL) und Hydroxy-Norleucin (HNL) konnten in keiner Gruppe nachgewiesen werden. Die selbe Beobachtung wurde auch bei dem Vernetzungsmarker d-Pyr gemacht. Dihydroxy-Lysinonorleucin (DHLNL) und Hydroxy-Lysinonorleucine (HLNL) wurden in beiden Gruppen identifiziert. In der mit HK behandelten Gruppe konnte dabei eine Tendenz zu höheren DHLNL-Werten beobachtet werden. Im Gegensatz dazu war der Pyr-Gehalt in der HK-behandelten Gruppe signifikant höher als in der Kontrollgruppe ($p < 0,05$). Auch das Verhältnis von DHLNL zu HLNL (2.988 vs. 2.701 Mol/mMol) war in der HK-behandelten Gruppe signifikant höher als in der Kontrollgruppe ($p < 0,05$). Die Gesamtzahl der Aldehyde

unterschied sich zwischen den beiden Gruppen nicht signifikant. Zudem wurde beobachtet, dass der Anteil an Kollagen-Crosslinks in der HK-behandelten Gruppe deutlich höher war als in der Kontrollgruppe ($p < 0,01$). Um die Auswirkungen von HK auf die Mineralisierung von MC3T3-E1-Zellen zu untersuchen, wurden diese unter den Standardbedingungen für 21 Tage kultiviert und die Kalziumablagerungen mittels Alizarinrot-Färbung nachgewiesen. In beiden Gruppen konnte die Bildung mineralisierter Knötchen beobachtet werden (Abb. 11). Die mit HK behandelten MC3T3-E1-Zellen wiesen jedoch signifikant mehr Kalziumablagerungen auf als die unbehandelten Zellen (Abb. 11; $p < 0,05$).

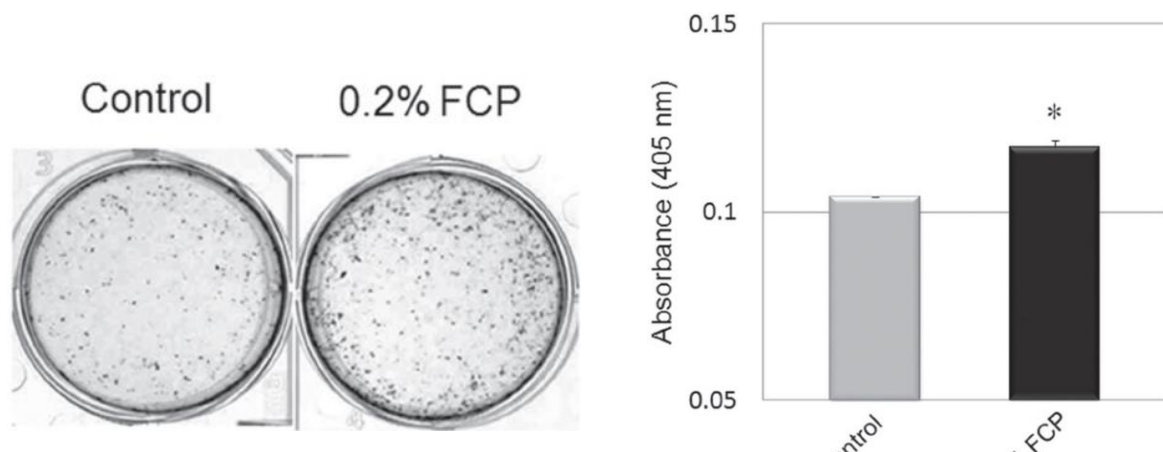


Abbildung 11: Einfluss von HK auf die Matrixmineralisierung im MC3T3-E1-Zellen nach 21 Tagen im Vergleich zur Kontrolle. Die Kulturen wurden mit Alizarinrot S gefärbt, um mineralisierte Knötchen sichtbar zu machen (links). Semiquantitative Erfassung des Mineralgehalts (rechts). Die Werte werden als Mittelwert \pm SD angegeben. * $p < 0,05$ (Yamada et al., 2013 (II)).

Insgesamt zeigt die vorliegende Studie, dass HK eine positive Wirkung auf die Kollagenquervernetzung und die Matrixmineralisierung in OB hat. Die gesteigerte Kollagen-quervernetzung steht dabei mit einer erhöhten Genexpression spezifischer Enzyme wie LHs, LOXL und GLT25D1 in Verbindung.

In einer Untersuchung von Wijaksana et al. (2021) wurde die Auswirkung von HK aus den Schuppen des Gurami-Fisches auf die Expression von OPG und RANKL in OB untersucht. Hierfür wurde ein Posttest-Only-Kontrollgruppendesign verwendet. Für die Versuche wurden Gurami-Fischschuppen vorbehandelt, indem sie in einer 1 M NaOH-Lösung bei 4 °C für 24 Stunden eingeweicht wurden, um nicht-kollagene Proteine zu entfernen. Die Hydrolyse erfolgte durch Inkubation mit 20 mg Papain und einer 0,1 M Natriumphosphatpufferlösung (pH 7,5) bei 55 °C und 50 U/min für 120 Stunden. Das erhaltene HK wurde anschließend für die experimentellen Versuche verwendet. Die OB wurden aus den Schädeldecken zwei Tage alter Ratten isoliert und in einem α -MEM mit 15% FKS, 50 U/ml Penicillin und 50 μ g/ml Streptomycin kultiviert. Wijaksana et al. führten

eine Immunzytochemie-Färbung durch, um die Expression von OPG und RANKL in den Zellen zu untersuchen. Dazu wurden die isolierten OB auf 24-Well-Platten kultiviert, bis sie eine Konfluenz von 60-70% erreichten. Anschließend wurden die Zellen mit primären und sekundären Antikörpern inkubiert. Die HK-Exposition erfolgte in Konzentrationen von 0,0125 mg/ml, 0,05 mg/ml, 0,2 mg/ml und 0,8 mg/ml und die Analyse erfolgte nach 24 h, 48 h und 72 h. Es wurde festgestellt, dass HK ab einer Konzentration von 0,05 mg/ml über alle Beobachtungszeiträume zu einer signifikant höheren OPG-Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe führte. Die höchste OPG-Expression wurde nach 72 Stunden bei einer Konzentration von 0,2 mg/ml HK erreicht ($p < 0,05$). Im Gegensatz dazu wurde nach 24 Stunden die höchste OPG-Expression bei einer Konzentration von 0,8 mg/ml HK gemessen ($p < 0,05$). Die RANKL-Expression zeigte insgesamt einen zeit- und dosisabhängigen Anstieg, jedoch wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen zu den gleichen Beobachtungszeitpunkten beobachtet (Tab. 2). Die höchste RANKL-Expression wurde nach 72 Stunden bei einer Konzentration von 0,8 mg/ml HK gemessen.

Tabelle 2: RANKL-Expression der OB zu verschiedenen Zeitpunkten (24, 48, 72h) und Konzentrationen (0.0125, 0.05, 0.2, 0.8 mg/ml) im Vergleich zur Kontrolle. Post-Hoc-Analyse der RANKL-Expression zwischen den Gruppen. Daten als Mittelwert \pm SD (Wijaksana et al., 2021).

Group	Control	0.0125 mg/ml (E1)	0.05 mg/ml (E2)	0,2 mg/ml (E3)	0.8 mg/ml (E4)	One-way ANOVA (<i>P</i>)
24 hours	7,42 \pm 1,94	10,41 \pm 1,37	12,50 \pm 2,82	13,92 \pm 3,18	14,33 \pm 3,21	0.05
48 hours	11,42 \pm 2,38	12,25 \pm 2,65	14,33 \pm 3,36	14,75 \pm 3,03	16,00 \pm 3,61	0.31
72 hours	11,28 \pm 3,78	13,67 \pm 7,15	15,00 \pm 2,41	15,48 \pm 1,08	17,00 \pm 2,00	0.18

Die Ergebnisse von Wijaksana et al. deuten darauf hin, dass HK die Expression von OPG zeit- und dosisabhängig erhöht. Dabei ist der Anstieg der OPG-Expression deutlich höher als die nicht-signifikante Erhöhung der RANKL-Expression. Es scheint eine inverse Beziehung zwischen der OPG- und RANKL-Expression zu bestehen. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass HK das RANKL/OPG-Verhältnis in OB zugunsten von OPG verschiebt.

In den vorliegenden in-vitro Studien wurden die Auswirkungen von HK auf die Expression osteogener Proteine in OB untersucht. Dabei verwendeten Kim et al. und Yamada et al. (I) humane OB-Zelllinien (MG-63 bzw. NOS-1), während Wijaksana OB aus der Schädeldecke von Ratten und Yamada et al. (II) murine MC3T3-E1 Zellen verwendeten. HK wurde aus verschiedenen Quellen wie Schweinehaut (Kim et al., 2013), Kabeljauhaut (Yamada et al. (I), 2013) und Gurami-Fischschuppen (Wijaksana et al., 2021) extrahiert und enzymatisch hydrolysiert. Die durchschnittliche Molekülmasse der Peptide lag bei etwa 3 kDa, wobei Wijaksana et al. und Yamada et al. (II) keine genauen Angaben machten. Die Zellproliferation wurde neben dem klassischen MTT-Assay bei Kim et al. durch das BrdU-Assay untersucht. In den Untersuchungen wurde ein signifikanter und dosisabhängiger Anstieg der Zellproliferation beobachtet ($p < 0,05$). Die optimale HK-Konzentration lag je nach Studie bei 0.1% (Yamada et al. (I) & (II)) oder 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Kim et al., 2013). Wijaksana et al. führten hingegen keine spezifischen Untersuchungen zur Zellproliferation durch. In allen Studien des Kapitels wurde nach der Behandlung mit HK eine erhöhte Gen- und Proteinexpression osteogener Marker beobachtet, die mittels RT-PCR oder Western Blot gemessen wurden. Wijaksana et al. nutzten hingegen eine immunhistochemische Färbung zur Messung der Proteinexpression. Kim et al. untersuchten die Genexpression in einem achtstündigen Zeitraum, um das initiale Stadium der OB zu erforschen. Insbesondere die mRNA-Expression von KOL-1 (COL1A1-Gen), ALP (ALPL-Gen) und OPN (SPP1-Gen) wurde durch die Inkubation mit HK signifikant erhöht ($p < 0,05$). Die OCN-Expression wurde in diesem kurzen Zeitraum nicht beeinflusst. Yamada et al. (I) ergänzte die Ergebnisse und untersuchte die Genexpression von OB am 3. und 7. Tag nach der Behandlung mit HK. Nach drei Tagen war die BMP-2- und Integrin $\beta 3$ -Expression deutlich erhöht im Vergleich zur Kontrolle ($p < 0,01$). Während die OPN-Expression nach sieben Tagen die der Kontrolle überstieg, fiel die BMP-2-Expression wieder ab. Die in beiden Gruppen erhöhte OCN-Expression, die nach 3 Tagen festgestellt wurde, diente als Marker für die Zunahme der Mineralisierung. Nach 7 Tagen war die OCN-Expression in der HK-Gruppe signifikant höher ($p < 0,01$). Im Gegensatz dazu untersuchten Wijaksana et al. die Expression von OPG und RANKL in einem Zeitraum von 1-3 Tagen, da deren Wechselwirkungen Einfluss auf die Osteogenese und die OK-Aktivität haben. Wijaksana et al. konnten beobachten, dass die Expression von OPG und RANKL proportional zum Beobachtungszeitraum zunahm. Der Anstieg der OPG-Expression war ab 0,05 mg/ml HK über alle Zeiträume höher im Vergleich zur Kontrolle ($p < 0,05$). Während der gesamten Untersuchung wurde kein Unterschied im Anstieg der RANKL-Expression im Vergleich zur Kontrolle festgestellt. Yamada et al.

stellten eine Hochregulierung der Enzyme der Kollagenquervernetzung (LHs, LOXLs und GLT25D1) sowie eine Erhöhung der Pyr-Kreuzvernetzungsprodukte fest, die mit einer verbesserten Matrixmineralisierung in Verbindung stehen. Die Effekte von HK auf die Expression spezifischer Proteine und Enzyme, die an der OB-Aktivität und Matrixmineralisierung beteiligt sind, decken sich mit den Ergebnissen der Mineralisierungsexperimente. Um die Mineralisierung der OB zu untersuchen, wurde die Kalziumablagerung bzw. die Bildung mineralisierter Knötchen durch Alizarin-Rot-Färbung (Kim et al. 2013; Yamada et al. 2013 (II)) oder Kossa-Färbung (Yamada et al. 2013 (I)) nachgewiesen. Wijaksana et al. untersuchten keine Effekte auf die Mineralisierung. In allen Untersuchungen wurde eine erhöhte Mineralisierung im Vergleich zur Kontrolle festgestellt. Yamada et al. (I) beobachteten bereits nach 7 Tagen eine erhöhte Dichte mineralisierter Knötchen ($p < 0,01$), die auch nach 21 Tagen noch signifikant war. Eine signifikant höhere Mineralisierung nach 21 Tagen wurde ebenfalls durch Kim et al. und Yamada et al. (II) bestätigt ($p < 0,05$). Kim et al. untersuchten zusätzlich die Beteiligung von MAPKs (Mitogen-Activated Protein Kinases) an den osteogenen Effekten von HK. Kim et al. stellten eine Aktivierung der MAPKs ERK1/2, JNK1/2 und p38 fest sowie eine erhöhte Expression des Downstream-Proteins ELK1. Die osteogenen Effekte wurden durch diverse MAPK-Inhibitoren aufgehoben. Insgesamt deuten die Ergebnisse des Kapitels darauf hin, dass HK die Expression osteogener Proteine und Enzyme fördert, die mit einer gesteigerten Kollagenynthese, Kollagenquervernetzung und Mineralisierung einhergehen. Insbesondere die Genexpression von COL1A1, ALP und OPN (SPP1-Gen) wird dabei über den MAPK-Signalweg reguliert. Des Weiteren führt HK zu einer Verschiebung des RANKL/OPG-Verhältnisses zugunsten von OPG, was eine verstärkte OK-Regulation ermöglicht.

5.5 Verringerte OK-Differenzierung und Expression osteoklastischer Proteine

In Kapitel 5.4 konnte gezeigt werden, dass HK nicht nur auf OB-Vorläuferzellen wirkt, sondern auch in reifen OB zu einer erhöhten Expression osteogener Proteine der OB-Aktivität und Matrixmineralisierung führt. Die Effekte stehen dabei mit dem MAPK-Signalweg in Verbindung und gingen mit einer gesteigerten Mineralisierung einher. Zudem wurde eine Verschiebung des RANKL/OPG-Verhältnisses zugunsten von OPG festgestellt.

In einer Studie von Kuo et al. (2021) wurden die Auswirkungen von hydrolysierte Gelatine (HK) auf die Osteoklastogenese von RAW264.7-Zellen untersucht. Ziel der Studie war es, die Auswirkungen auf die Zelldifferenzierung und Proteinexpression zu untersuchen. Für die Versuche wurden murine, präosteoklastische RAW264.7-Zellen die aus Makrophagen - Vorläufern abgeleitet wurden, verwendet. Die Zellen wurden in einem α -MEM, mit 1%

Antibiotika und 10% FKS bei 37°C kultiviert. Die Differenzierung zu Osteoklasten (OK) wurde durch Zugabe von 50 ng/ml RANKL mit 20 ng/ml mCSF induziert. Um den Einfluss verschiedener HK-Konzentrationen (0, 0.5%, 2%) auf der Differenzierung von RAW264.7-Zellen zu untersuchen, wurden nach 3 und 5 Tagen TRAP-Aktivitätstests und 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)-Färbungen durchgeführt. Es konnte beobachtet werden, dass die TRAP-positiven OK, die mit 0,5% und 2% HK kultiviert wurden, kleiner waren im Vergleich zur Kontrolle. Auch die Anzahl großer OK (>150 µm Durchmesser) war verringert. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass HK einen Einfluss auf die Verschmelzung von OK-Vorläuferzellen hat und die Bildung mehrkerniger OK beeinflusst. Auch der Grad der Verschmelzung nahm dosisabhängig ab und betrug bei Konzentrationen von 0.5% und 2% nur noch 44,5% bzw. 52,2% im Vergleich zu 73,3 % bei der Kontrolle ($p < 0,05$). In einem weiteren Versuch wurde die Bildung von Resorptionsgruben nach 8 Tagen mit und ohne HK-Behandlung untersucht. Die Gruben wurden unter einem Mikroskop mit 4-facher Vergrößerung betrachtet und mit der Image J-Software analysiert. Die RANKL-Behandlung von RAW264.7-Zellen führte nach 8 Tagen zu einer Resorptionsgrube die in etwa 45% der Fläche einnahm. Die Behandlung mit HK führte zu einer dosisabhängigen Reduktion der Resorptionsgrubenbildung. Die größte Reduktion (von ~45% zu ~13%) wurde bei einer Konzentration von 2% HK beobachtet ($p < 0,05$). In einer weiteren Versuchsreihe wurde die mRNA-Expression osteoklastischer Marker (TRAP, c-Fos, NFATc1, β -Integrin) sowie die Proteinexpression von TGF- β 1 und seinen Rezeptoren R1 und R2 mittels RT-PCR untersucht. Die Behandlung mit 2% HK führte zu einer signifikanten Abnahme der mRNA-Expression osteoklastogenetischer Marker, einschließlich TRAP, NFATc1 und β -Integrin. Die mRNA-Expression von c-Fos blieb während der RANKL-induzierten Differenzierung unverändert (Abb. 12). Eine verringerte β -Integrin steht dabei mit einer Hemmung der Osteoklastogenese in Verbindung.

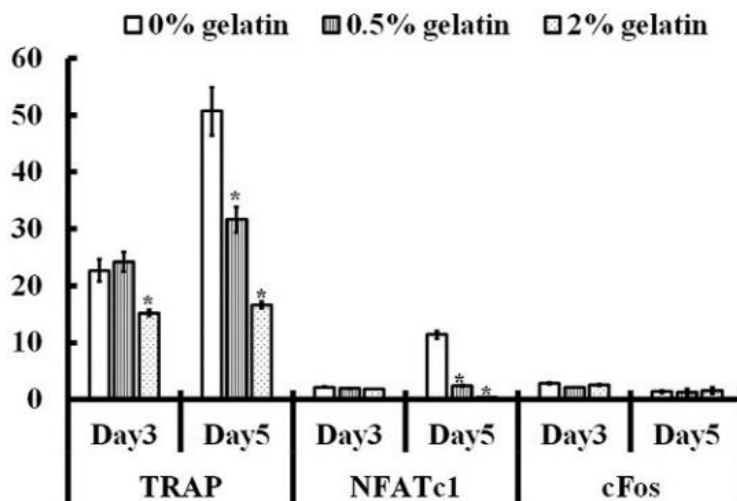


Abbildung 12: Auswirkungen auf die mRNA-Expression von TRAP, NFATc1 und c-fos während der RANKL-Induktion für 3 und 5 Tage in RAW264.7-Zellen, die ohne oder mit 0,5 % und 2 % hydrolysiertes Gelatine (HK) behandelt wurden. * $p < 0,05$ (Kuo et al., 2021).

RAW264.7-Zellen exprimierten vermehrt TGF- β 1 nach RANKL-Behandlung, zeigten jedoch eine verringerte Expression bei Verwendung von 0,5 % oder 2 % HK ($p < 0,01$). Unter Kontrollbedingungen kam es zu einem deutlichen Anstieg der TGF-beta Rezeptoren R1 & R2 nach 3 Tagen, die nach 5 Tagen abnahm, jedoch immer noch erhöht blieb. Unter Behandlung mit 0.5% und 2% kam es zu einer statistisch signifikanten Abnahme der Expression beider TGF-beta Rezeptoren im Vergleich zur Kontrolle ($p < 0,05$). Insgesamt zeigen die Ergebnisse der Studie, dass HK die Zellfusion, Osteoklastogenese und Resorptionsaktivität von OK signifikant beeinflusst. Darüber hinaus wurde eine Assoziation zwischen HK Exposition in OK und einer verringerten TRAP, NFATc1 und TGF-beta Aktivität festgestellt.

In einer Studie von Wauquier et al. (2019) wurden die Auswirkungen von kollagenhaltigem Blutserum auf die Zelldifferenzierung und Genexpression von Knochenzellen untersucht. Dabei wurde HK aus verschiedenen Quellen wie Rind (B2000), Schwein (P2000 und P5000) und Fisch (F2000) verwendet, das von der Firma Rousselot SAS (Courbevoie, Frankreich) bereitgestellt wurde. Das durchschnittliche Molekulargewicht der unverdauten Peptide betrug 2 kDa bzw. 5 kDa. Für die Experimente wurden präosteoklastische RAW264.7-Zellen und humane periphere mononukleäre Zellen (PBMZs) verwendet. Die RAW264.7-Zellen wurden in einem Standardmedium mit 2% FKS bei 37°C kultiviert. Die PBMZs wurden aus humanen Blutproben gewonnen, die mittels Dichtegradientenzentrifugation und einem Ficoll-Paque-Plus Separationsmedium isoliert wurden. Die Zellen wurden in Gegenwart von RANKL (25 ng/mL) und M-CSF (25 ng/mL) kultiviert, um die Differenzierung zu induzieren. In einer ersten Versuchsreihe wurde die Wirkung von kolla-

genangereichertem Blutserum auf OK-Vorläuferzellen untersucht. Hierfür wurde das Serum von Mäusen isoliert, die mit B2000, Casein oder einer Kontrolldiät gefüttert wurden. Das mit unterschiedlichen Metaboliten angereicherte Serum wurde an präosteoklastischen RAW264.7-Zellen und PBMZs getestet. Die Zellproliferation wurde unter Verwendung eines XTT-basierten Proliferationskits gemessen, das die optische Dichte (450 nm) der Zellen erfasst. Die TRAP-Aktivität wurde unter Verwendung von p-Nitrophenylphosphat-Färbung gemessen und als mittlere Absorption/Minute/mg Protein ausgedrückt. Die Ergebnisse zeigten, dass B2000-angereichertes Blutserum das Wachstum von RAW264.7-Zellen im Vergleich zu nativem Blutserum um 58% reduzierte ($p < 0,05$). Auch die Casein-Gruppe führte zu einer statistisch signifikanten Abnahme der Zellproliferation ($p < 0,05$), hatte jedoch keinen Einfluss auf die RANKL-induzierte Bildung von Riesenzellen nach vier Tagen, die mittels Videomikroskopie untersucht wurde. Um die Effekte auf Genebene zu untersuchen, wurden RAW264.7-Zellen nach der Inkubation mit angereichertem Serum mittels Taqman Low Density Arrays (TLDA) analysiert. Die mRNA wurde aus den Zellen isoliert und über eine reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Die cDNA wurde anschließend mittels TLDA analysiert und die relativen Werte wurden unter Verwendung einer Data-Assist-Software berechnet. GAPDH und Aktin dienten als Referenzgene. Konsistent mit den Daten der Videomikroskopie reduzierte ausschließlich das B2000-Serum die Expression von OK-Markern signifikant (Tab. 3). Insbesondere Marker der Zellfusion (CD36), Reifung (Traf6, Csf1r und Tnfrsf1b) und Aktivität (Acp5/TRAP und Car2) wurden durch B2000 signifikant reduziert ($p < 0,05$).

Tabelle 3: Taqman Low Density Array an RAW264.7-Zellen. CTRL: Kontrollbedingung; RQ: relative Quantifizierung; B2000: hydrolysiertes Kollagen (2000 Da) (Wauquier et al., 2019).

	CTRL (RQ)	CASEIN (RQ)	CASEIN (<i>p</i> -Value)	B2000 (RQ)	B2000 (<i>p</i> -Value)
Acp5	1.0	0.53	0.54	0.45	0.03
Car2	1.0	0.52	0.32	0.52	0.02
Csf1r	1.0	0.57	0.03	0.78	0.02
Ctsk	1.0	0.69	0.72	0.75	0.06
Itgb3	1.0	0.47	0.39	0.53	0.06
Mmp9	1.0	0.55	0.56	0.63	0.08
Nos2	1.0	0.47	0.15	0.24	0.06
Tgfbr1	1.0	0.43	0.37	0.34	0.06
Tnfrsf1b	1.0	0.58	0.17	0.49	0.07
Traf2	1.0	0.56	0.12	0.69	0.06
Traf6	1.0	0.60	0.05	0.64	0.04

In einem weiteren Versuch wurden die Auswirkungen von kollagenangereichertem, humanem Blutserum auf die Differenzierung von humanen PBMZs untersucht. Für den Versuch wurde das Blutserum von zehn Probanden entnommen, die eine Stunde zuvor 25 g hydrolysiertes Casein, P2000, P5000, B2000 oder F2000 mit 200 ml Wasser zu sich genommen hatten. Die Ergebnisse zeigten, dass weder Casein- noch HK-Serum eine signifikante Wirkung auf die PBMZ-Proliferation nach 7 Tagen Inkubation hatten. Hingegen hemmten alle vier angereicherten Seren signifikant die RANKL-induzierte TRAP-Aktivität im Vergleich zu nativem und Casein-angereichertem Serum. Die Hemmung betrug dabei -14%, -16%, -17% und -18% für F2000, P5000, B2000 und P2000. Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen kollagenangereicherten Proben bezüglich der Hemmung der RANKL-induzierten TRAP-Aktivität in PBMZs. Zusammenfassend deuten die Ergebnisse der Studie darauf hin, dass hydrolysiertes Kollagen (HK) aus dem Blutserum von Mäusen und Menschen eine regulatorische Wirkung auf die Differenzierung von Osteoklasten-Vorläuferzellen hat. Diese regulatorischen Effekte gehen mit einer herunterregulierten Genexpression von CD36 (Zellfusionsmarker), Traf6, Csf1r und Tnfrsf1b (Differenzierungsmarker) sowie Acp5/TRAP und Car2 (Aktivitätsmarker) einher.

In einer Studie von Elango et al. (2018) wurden die Auswirkungen von Haifischknorpel-Kollagen (HK) auf Osteozyten (OZ) untersucht, sowie deren Einfluss auf die Osteoklastogenese. Die Experimente wurden unter Verwendung von primären OZ und murinen Knochenmark-Makrophagen (OK-Vorläuferzellen) durchgeführt. Um die Testsubstanzen zu erhalten, wurde Kollagen Typ 2 aus dem Knorpel von Walhaien mittels 0,5 M Essigsäure und 1% Pepsin extrahiert und gereinigt. Anschließend wurde es mittels Thermolysin in 50 mM Natriumphosphat-Puffer bei 70°C für 60 Minuten behandelt, um HK-Typ 2 und zwei Polypeptidfraktionen (57 und 40 kDa) durch Ultrafiltration zu isolieren. In einem ersten Experiment wurden die Effekte von HK-Typ 2 (in Konzentrationen von 1, 10 und 50 µg/ml) sowie der beiden Polypeptide (40 und 57 kDa) auf die Proliferation und ALP-Aktivität der OZ untersucht. Die OZ wurden aus den Langknochen von Mäusen isoliert und in einem α -MEM und 10% fötalem Kälberserum bei 37°C kultiviert. Die Daten wurden nach 0, 4 und 7 Tagen erfasst, wobei der Proliferationsassay mit einem Invitrogen Zellzähler durchgeführt wurde. Die Ergebnisse zeigten, dass nach 4 Tagen die Gruppen, die mit HK-Typ 2 und dem 57-kDa-Polypeptid (bei 50 µg/ml) behandelt wurden, eine signifikant höhere Anzahl an OZ aufwiesen im Vergleich zur Kontrolle ($p < 0,05$). Nach 7 Tagen war dieser

Unterschied jedoch nicht mehr signifikant. Die ALP-Aktivität wurde mittels eines pNPP-Assays bestimmt. Es wurde festgestellt, dass die ALP-Aktivität durch die Behandlung mit HK-Typ 2 und seinen Polypeptiden dosisabhängig erhöht wurde (1 bis 50 µg/ml) im Vergleich zur Kontrolle. Die ALP-Aktivität blieb auch am 7. Tag in den Gruppen, die mit HK-Typ 2 (50 µg/ml), dem 40-kDa-Polypeptid und dem 57-kDa-Polypeptid behandelt wurden, im Vergleich zur Kontrolle erhöht ($p < 0,05$). Insgesamt deuten die Ergebnisse darauf hin, dass HK die Proliferation von OZ in der Anfangsphase fördert und mit einer erhöhten ALP-Aktivität in Verbindung steht. In einem weiteren Versuch wurde die mRNA-Expression osteogener Marker in den OZ mittels RT-PCR untersucht. Dazu wurden $2,5 \times 10^5$ Zellen pro Vertiefung in 6-Well-Mikrotiterplatten ausgesät und in Kombination mit verschiedenen Konzentrationen von HK (1, 10 und 50 µg/ml) kultiviert. Die mRNA-Expression von Sost, Il6ra, Tnfsf11, Tnfrsf11b und Col2a1 wurde zu verschiedenen Zeitpunkten (0, 1 und 6 Stunden) ermittelt. Die Ergebnisse zeigten, dass die Col2a1-Expression durch die Behandlungen nicht signifikant verändert wurde, außer bei einer hohen Dosis der Polypeptide (50 µg/ml) nach einer Stunde ($p < 0,05$). Nach 6 Stunden führte eine niedrige Dosis von HK-Typ 2 (1 µg/ml) und des 57-kDa-Polypeptids zu einer erhöhten Col2a1-Expression. Des Weiteren wurde in der Kontrollgruppe eine signifikante Erhöhung der Il6ra-Expression in den ersten sechs Stunden beobachtet ($p < 0,05$). Nach der ersten und sechsten Stunde verringerte sich die Il6ra-Expression mit steigender HK-Typ 2 und 57-kDa-Konzentration (bis 50 µg/ml) ($p < 0,05$). IL-6 dient als Marker für die Reifung, Aktivierung und Rekrutierung von OK. Die Expression von Tnfrsf11b blieb nach einer Stunde unabhängig von der Behandlung unverändert. Nach 6 Stunden wurde eine signifikante Erhöhung der Tnfrsf11b-Expression beobachtet, die mit Konzentrationen von HK-Typ 2 (10 und 50 µg/ml) sowie des 57-kDa-Polypeptids (50 µg/ml) zunahm ($p < 0,05$). Das Tnfrsf11b-Gen ist für die Synthese von OPG bekannt, welches die Knochenresorption hemmt. Das Tnfsf11-Gen ist hingegen für die Synthese von RANKL verantwortlich, welches die Osteoklastogenese fördert. Nach einer und sechs Stunden zeigte sich eine signifikante Verringerung der Tnfsf11-Expression mit steigender HK-Typ 2- und Polypeptid-Konzentration (bis 50 µg/ml) im Vergleich zur Kontrolle ($p < 0,05$). Das Sost-Gen ist verantwortlich für die Produktion von Sklerostin, das die Knochenbildung hemmt. Bereits nach einer Stunde wurde eine signifikante Verringerung der Sost-Expression festgestellt, während die Konzentration von HK-Typ 2 und den Polypeptiden (50 µg/ml) zunahm, im Vergleich zur Kontrolle ($p < 0,05$). Zusammenfassend deuten die Befunde darauf hin, dass die Expression osteogener Regulationsgene wie Col2a1 nach einer Stunde stimuliert und

später nach sechs Stunden in mit HK-behandelten OZ verringert wird. Die OK-regulatorische Gene, wie *Il6ra* und *Tnfsf11*, wurden in mit HK-Typ 2 und Polypeptiden behandelten OZ unterdrückt, was auf eine Herunterregulierung osteoklastogenetischer Signale hindeutet. In einem weiteren Versuch wurde die Wirkung von HK auf die Differenzierung von OK-Vorläuferzellen untersucht. Die OK-Vorläuferzellen wurden mit RANKL und MCSF behandelt, in Kombination mit verschiedenen HK-Konzentrationen. Die Ergebnisse zeigen, dass höhere Konzentrationen von HK-Typ 2 und den Polypeptiden die Anzahl der OK deutlich reduzierten ($p < 0,01$). Im Gegensatz dazu erhöhte die Behandlung mit murinem Oncostatin M (positive Kontrolle) die Anzahl der OK im Vergleich zur Kontrolle. Die Anzahl der OK mit zwei Kernen war jedoch in der m-OSM-behandelten Gruppe im Vergleich zur Kontrolle verringert ($p < 0,01$). Die Gruppen, die mit höheren Konzentrationen von HK-Typ 2 und den Polypeptiden behandelt wurden, zeigten eine erhebliche Verringerung sowohl von OK mit zwei Kernen als auch mit drei Kernen, im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 13; $p < 0,01$).

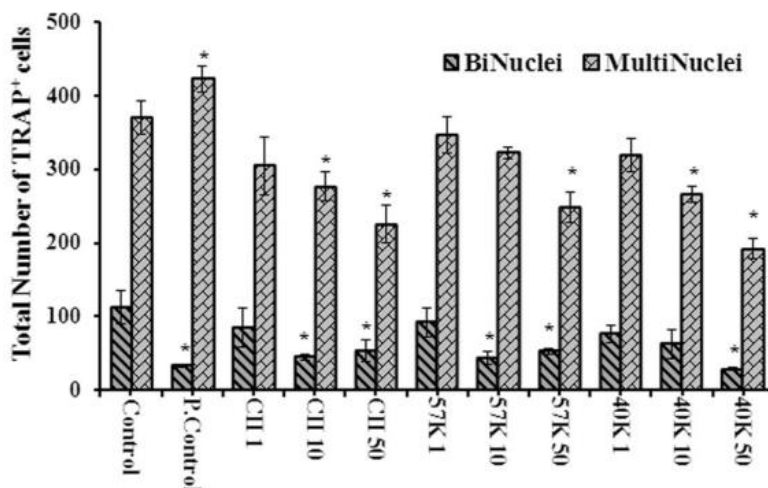


Abbildung 13: Effekt von HK-Typ 2 und Polypeptiden (57 kDa; 40 kDa) auf die Osteoklastogenese in OK-Vorläuferzellen. Kontrollzellen wurden nur mit M-CSF und RANKL behandelt. * $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle (Elango et al., 2018).

Unter Verwendung eines Lichtmikroskops bei 10-facher Vergrößerung wurden morphologische Veränderungen festgestellt, die auf Apoptose in den mit höheren Dosen von HK-Typ 2 behandelten OK hindeuten. Diese apoptose-assoziierten Veränderungen wurden jedoch nicht in der Gruppe mit niedrigerer Dosis beobachtet. Diese Beobachtung lässt darauf schließen, dass hohe Konzentrationen von HK-Typ 2 die Differenzierung beeinträchtigen und die Apoptoserate in OK erhöhen können. In einem weiteren Versuch wurde untersucht, wie sich HK in einem Co-Kulturmodell mit OZ und OK-Vorläuferzellen auf die Osteoklastogenese auswirkt. Die BMMs wurden zusammen mit OZ für 7 Tage kultiviert,

und die Auswirkungen der Behandlung mit dem OK-Stimulator m-OSM (50 ng/ml) in Kombination mit HK-Typ 2 (50 µg/ml) untersucht. Elango et al. beobachteten, dass in der mit m-OSM und HK behandelten Gruppe TRAP-positive Einzel- und Doppelkernzellen gebildet wurden. Allerdings war die Anzahl dieser TRAP-positiven Zellen signifikant geringer als in der positiven m-OSM-Kontrollgruppe ($p < 0,05$). Dieser Versuch zeigte, dass HK-Typ 2 die starke Wirkung der m-OSM-Stimulation unterdrücken konnte und die Osteoklastogenese verringert wurde. Zusammenfassend deuten die Ergebnisse der Studie darauf hin, dass HK-Typ 2 aus Knorpel die Differenzierung von OK-Vorläuferzellen verringert. In OZ wird die Expression osteoklastogenetischer Marker wie IL-6 und SOST herunterreguliert, während gleichzeitig osteogene Marker wie OPG hochreguliert werden.

N'deh et al. (2020) untersuchten im ersten Teil ihrer Studie die Auswirkungen eines Kollagenpeptidextrakts (KP) aus Ogye-Hühnern auf die Differenzierung und Genexpression von OK. Die in-vivo Untersuchungen von N'deh et al. werden im Kapitel 5.6 „Osteoporosepräventive Wirkung in Tierversuchen“ ergänzt. Der Kollagenpeptidextrakt wurde aus schwarzen Ogye-Hühnern gewonnen und durch Anwendung von Hitze und Druck isoliert, gefolgt von einer Filtration. Die Untersuchungen wurden unter Verwendung von präosteoklastischen RAW 264.7-Zellen durchgeführt, die in einem speziellen Zellkulturmedium (DMEM) mit 10% FKS und 1% Penicillin-Streptomycin bei 37 °C kultiviert wurden. Zunächst wurden die RAW 264.7-Zellen (5×10^4 Zellen) in einer 96-Well-Platte gesät und für 24 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen von KP (500 oder 1000 µg/mL) inkubiert, um die Zellviabilität mittels eines MTT-Assays zu bestimmen. Die Ergebnisse zeigten, dass KP bei den getesteten Konzentrationen keine zytotoxischen Effekte auf die OK-Vorläuferzellen hatte. Anschließend wurde die TRAP-Aktivität als Indikator für die OK-Differenzierung und -Funktion in RAW 264.7-Zellen gemessen, die mit KP (0, 250, 500 und 1000 µg/mL) für vier Tage nach Stimulation mit RANKL (50 ng/mL) behandelt wurden. Die Messungen wurden mithilfe eines pNPP-Assays in Kombination mit einem Leukozyten-Säurephosphatase-Assay-Kit durchgeführt. Es konnte beobachtet werden, dass KP (bei 500 und 1000 µg/mL) die TRAP-Aktivität 1,5- bzw. 1,8-fach im Vergleich zur Kontrollgruppe reduzierte ($p < 0,05$). Zusätzlich wiesen die mit KP behandelten RAW 264.7-Zellen signifikant weniger TRAP-positive multinukleäre Zellen auf, im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p < 0,05$). In einem weiteren Versuch untersuchten N'deh et al. die mRNA-Expression osteoklastischer Marker in den KP-behandelten Zellen mittels RT-PCR. Die Expression von OPG in den Zellen, die mit 500 µg/mL und 1000 µg/mL KP behandelt

wurden, war um das 2-fache höher als in der Kontrollgruppe ($p < 0,05$). Die mRNA-Expression von RANKL war unabhängig von der KP-Konzentration um das 1,6-fache reduziert. Das Verhältnis von RANKL zu OPG wurde bei 500 $\mu\text{g/mL}$ KP um das 4,2-fache reduziert und bei 1000 $\mu\text{g/mL}$ KP um das 3,4-fache, im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p < 0,05$). Des Weiteren wurde eine dosisabhängige Reduktion der TRAP-Expression in den KP-behandelten Zellen beobachtet: Bei 500 $\mu\text{g/mL}$ KP war sie um das 1,8-fache und bei 1000 $\mu\text{g/mL}$ KP um das 2,5-fache niedriger ($p < 0,05$). Die Expression von Cathepsin K wurde bei allen getesteten KP-Konzentrationen um etwa das 1,4-fache reduziert ($p < 0,05$). Insgesamt deuteten die Ergebnisse darauf hin, dass KP aus Ogye-Hühnern die Osteoklastogenese in RAW 264.7-Zellen beeinträchtigt und zu einer veränderten Genexpression osteoklastischer Marker führt. Interessanterweise wurde auch eine Verschiebung des RANKL-OPG-Verhältnisses zugunsten von OPG beobachtet.

Die vorgestellten Studien liefern interessante Einblicke, die darauf hindeuten, dass HK die Osteoklastogenese in OK-Vorläuferzellen hemmt und die Expression osteoklastischer Marker herunterreguliert. Die Studien von Kuo et al. (2021), Wauquier et al. (2019), Elango et al. (2018) und N'deh et al. (2020) verwendeten verschiedene OK-Zelllinien, darunter präosteoklastische RAW264.7-Zellen, humane periphere mononukleäre Zellen (PBMZs) und murine Knochenmark-Makrophagen (BMMs). Elango et al. verwendeten zudem Osteozyten (OZ), die als wichtige Regulatoren der Osteoklastogenese gelten. Im Rahmen der Studien wurde HK aus verschiedenen Quellen wie Rind (Wauquier et al.), Haifisch (Elango et al.) und Ogye-Huhn (N'deh et al.) extrahiert und hydrolysiert. Kuo et al. verwendeten hydrolysierte Gelatine ohne die Herkunft oder das Molekulargewicht zu deklarieren. Das Molekulargewicht der Peptide variierte zwischen 2 kDa und 5 kDa. Elango et al. untersuchten zusätzlich Polypeptide mit 40- und 57 kDa. Die Zellviabilität wurde mittels MTT-Assays und Invitrogen-Zellzählern gemessen. Wauquier et al. 2019 verwendete ein XTT-basiertes Proliferationskit. Präosteoklastische OK-Vorläuferzellen wurden zusammen mit RANKL (25 - 100 ng/ml) inkubiert. Während Kuo et al. und N'deh et al. 50 ng/ml verwendeten, setzten Elango et al. auf eine Konzentration von 100 ng/ml, um die Differenzierung zu induzieren. Die TRAP-Aktivität wurde in den Studien als primärer Marker für osteoklastische Zellen verwendet. Für die Analyse der TRAP-Aktivität wurden großteils pNPP-Assays verwendet. Alle Studien beobachteten eine signifikant verringerte TRAP-Aktivität in den mit HK-behandelten Zellen. Die Ergebnisse wurden durch die reduzierte Bildung mehrkerniger Zellen bestätigt. Kuo et al. beobachteten eine Verringerung

der Zellfusion (von ~73,3% zu ~52,2%) und eine verringerte Bildung von Resorptionsgruben (von ~45% zu ~13%) bei einer HK-Konzentration von 2%. Wauquier et al. verwendeten das Blutserum von Mäusen und Menschen, die zuvor HK konsumiert hatten und beobachteten in OK-Vorläuferzellen eine -18% (Humanserum) bis -58% (Mausserum) verringerte TRAP-Aktivität. N'deh et al. stellten eine 1,5- bis 1,8-fache Verringerung der TRAP-Aktivität in RAW-264.7-Zellen fest, die mit 500 bzw. 1000 µg/mL HK kultiviert wurden. Die Auswirkungen auf die verringerte Differenzierung von OK-Vorläuferzellen scheint deutlich zu sein und je nach Studiendesign unterschiedlich stark auszufallen. Darüber hinaus war die Untersuchung der Expression osteoklastischer Marker Schwerpunkt der vorgestellten Studien. Für die Analyse der mRNA-Expression wurden studienübergreifend RT-PCR-Analysen durchgeführt. Wauquier et al. verwendeten TaqMan Low-Density-Arrays (TLDA) zur Analyse der Genexpression, die auf der PCR-Methode basieren. Obwohl in den vorgestellten Studien teilweise unterschiedliche Gene und Marker analysiert wurden, lassen sich dennoch gemeinsame Muster erkennen. Ein wiederkehrendes Ergebnis war die verringerte mRNA-Expression von Genen, die mit der Aktivität und Funktion der OK in Verbindung stehen. Kuo et al. beobachteten, dass die Expression von TRAP, NFATc1 und β -Integrin signifikant reduziert wurden ($p < 0,05$). Wauquier et al. stellten zudem eine signifikante Reduktion von Markern der Zellfusion (CD36), Reifung (Traf6, Csf1r, Tnfrsf1b) und Aktivität von OK wie TRAP und Car2 fest. N'deh stellten ebenfalls eine verringerte TRAP-Expression, sowie eine 1,4-fache Verringerung der Cathepsin K-Expression fest. Darüber hinaus deuten die Ergebnisse von Elango et al. und N'deh et al. darauf hin, dass HK das Gleichgewicht bestimmter Wachstumsfaktoren beeinflussen könnte. N'deh stellte in OK eine Herunterregulierung von RANKL (Tnfrsf11-Gen) fest, während die OPG (Tnfrsf11b-Gen)-Expression gefördert wurde. Elango et al. beobachtete einen ähnlichen Effekt in OZ, bei denen die HK-Behandlung zu einer Herunterregulierung osteoklastenfördernder Marker wie IL-6 und SOST führte, während regulatorische Marker wie OPG hochreguliert wurden.

5.6 Osteoporose-präventive Wirkung in Tierversuchen

In den in-vitro Untersuchungen der vorherigen Kapitel konnte gezeigt werden, dass HK die Differenzierung von OB-Vorläuferzellen über Runx2 fördert. Im Gegensatz dazu wurde die Differenzierung von OK-Vorläuferzellen über eine Runterregulierung von NFATc1 gehemmt. In reifen OB konnte eine erhöhte Expression osteogener Proteine beobachtet werden, wohingegen es in OK zu einer deutlichen Abnahme der Expression lytischer Enzyme kam. Zusätzlich konnte in allen untersuchten Knochenzellen (OB, OK, OZ) eine Verschiebung des RANKL/OPG-Verhältnisses zugunsten von OPG beobachtet werden.

Liu et al. 2020 untersuchten die protektive Wirkung von HK auf Retinsäure-induzierte Osteoporose in Kunming-Mäusen. Im Rahmen der Studie erfolgte die Hydrolyse von Kollagen aus Schmerlenfischen mittels einer alkalischen Protease über einen Zeitraum von 2 Stunden, gefolgt von einer Sprühtrocknung bei 180°C. Die verwendeten Versuchstiere waren Kunming-Mäuse im Alter von 9-11 Wochen mit einem Durchschnittsgewicht von 38.14 ± 1.20 g, die vom Zhaoyan New Drug Research Center Co., Ltd. (Suzhou, China) beschafft wurden. Die Mäuse wurden zufällig in sechs Gruppen (n = 15/Gruppe) aufgeteilt, darunter die Kontrollgruppe (K), die Osteoporose-Modellgruppe (ohne jegliche Zusätze), die Gruppe mit niedriger HK-Dosis (1 g/kg/d), die Gruppe mit hoher HK-Dosis (2 g/kg/d), die Gruppe mit niedrig dosiertem HK in Kombination mit Natriumselenit (2 g/kg/d HK + 0,1 mg/kg/d NaSe) und die Gruppe mit hoch dosiertem HK in Kombination mit NaSe (2 g/kg/d HK + 0,2 mg/kg/d NaSe). Zur Induktion der Osteoporose erhielten die experimentellen Gruppen über einen Zeitraum von 2 Wochen eine intragastrische Retinsäure-Suspension (70 mg/kg/d), während die Kontrollgruppe mit einer Kochsalzlösung (70 mg/kg/d) behandelt wurde. Anschließend wurden die Gruppen über einen Zeitraum von 6 Wochen mit HK und NaSe intragastrisch behandelt. Nach Beendigung der Behandlung wurden die Mäuse euthanasiert, um Blut- und Knochenproben zu entnehmen. Die gewonnenen Blutproben wurden mittels Zentrifugation bei 3.000 U/min für 10 Minuten aufgearbeitet, um das Blutserum zu isolieren. In einem initialen Experiment wurde das isolierte Mäuseserum mithilfe standardisierter Testkits auf osteoporose-relevante Blutmarker, wie k-ALP, TRAP, Calcium und Phosphor untersucht. Die Ergebnisse ergaben, dass die Serumkonzentrationen von Calcium und Phosphor in der Modellgruppe signifikant höher waren im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p < 0,05$). Hingegen wiesen die vier anderen Gruppen signifikant niedrigere Calciumwerte im Vergleich zur Modellgruppe auf. Die Gruppen mit hoch dosiertem HK sowie in Kombination mit NaSe zeigten signifikant niedrigere Phosphorwerte im Serum im Vergleich zur Modellgruppe. Die Analyse der

Mineralstoffspiegel legt nahe, dass HK oder die Kombination von HK mit NaSe dazu beiträgt, den Calciumgehalt der Knochen auf einem normalen Niveau zu halten. Darüber hinaus konnte beobachtet werden, dass die Serumkonzentrationen der Enzyme TRAP und k-ALP in der Modellgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht waren ($p < 0,05$). In den HK-Gruppen sowie den Gruppen mit HK und NaSe zeigte sich eine Tendenz zur Verringerung der Aktivitäten dieser Enzyme im Vergleich zur Modellgruppe, jedoch wurde keine statistische Signifikanz erreicht. Mittels einer Mikro- Computertomographie(CT)-Analyse wurde die Mikroarchitektur der Schienbeine der Versuchstiere untersucht, wobei eine deutliche Reduktion der trabekulären Dichte und eine Lockerung der trabekulären Strukturen in der Modellgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe zu verzeichnen war. In den HK-Gruppen war der trabekuläre Knochenverlust geringer und die Abnahme der trabekulären Netzstruktur wurde vermindert. Die Gruppen, die mit HK in Kombination mit NaSe behandelt wurden, wiesen eine deutlich höhere trabekuläre Dichte auf ($p < 0,05$). Die Versuchsergebnisse deuten darauf hin, dass die Behandlung mit Retinsäure zu drastischen osteoporotischen Veränderungen führte. Die Behandlung mit einer hohen HK-Dosis sowie in Kombination mit NaSe zeigte eine signifikante Verbesserung der Mikroarchitektur der Mäuseknochen. In einem weiteren Experiment wurde der Einfluss von HK auf die mRNA-Expression in den Oberschenkelknochen untersucht. Hierzu wurden die Knochenproben homogenisiert und die RNA mittels sequenzieller Extraktion mit Chloroform und Isopropanol isoliert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 12.000 U/min für 15 Minuten bei 4 °C. Die Gesamt-RNA (3,0 µg) jeder Probe wurde mithilfe eines RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kits in cDNA umgeschrieben und mittels RT-PCR analysiert. Liu et al. beobachteten eine signifikant erhöhte mRNA-Expression von Wnt10, β -Catenin, Runx2 und Osterix in der Modellgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. Diese Überexpression konnte durch die Vorbehandlung mit HK und insbesondere in Kombination mit NaSe, normalisiert werden. Besonders die Kombination von HK mit NaSe zeigte deutliche regulatorische Effekte auf Runx2 und Osterix ($p < 0,05$). Die Befunde legen nahe, dass eine Retinsäure-induzierte Osteoporose durch eine Überexpression osteogener Marker gekennzeichnet ist. Die beobachtete Überexpression deutet darauf hin, dass eine kompensatorische Hyperplasie des Mäuseknochens als Reaktion auf den induzierten Knochenabbau stattfindet. Zusätzlich wurde in der Modellgruppe eine signifikant höhere mRNA-Expression von RANKL im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt, begleitet von einer deutlich verringerten OPG-Expression. Das RANKL/OPG-Verhältnis war folglich signifikant erhöht ($p < 0,05$). Im Gegensatz dazu wiesen die Gruppen, die mit HK oder in

Kombination mit NaSe behandelt wurden, ein signifikant niedrigeres RANKL/OPG-Verhältnis im Vergleich zur Modellgruppe auf (Abb. 14C; $p < 0,05$). Darüber hinaus beobachteten Liu et al. eine signifikant erhöhte mRNA-Expression von TRAF6, NF- κ B und NFATc1 in der Modellgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. In den Gruppen, denen HK in Kombination mit NaSe verabreicht wurde, zeigte sich hingegen eine deutliche Reduktion der mRNA-Expression von NF- κ B im Vergleich zur Modellgruppe. Insgesamt war die mRNA-Expression von TRAF6 durch die HK-Behandlung signifikant reduziert (Abb. 14D; $p < 0,05$). Die Expression von NFATc1 wurde jedoch nur in den Gruppen mit hochdosiertem HK in Kombination mit NaSe deutlich reduziert.

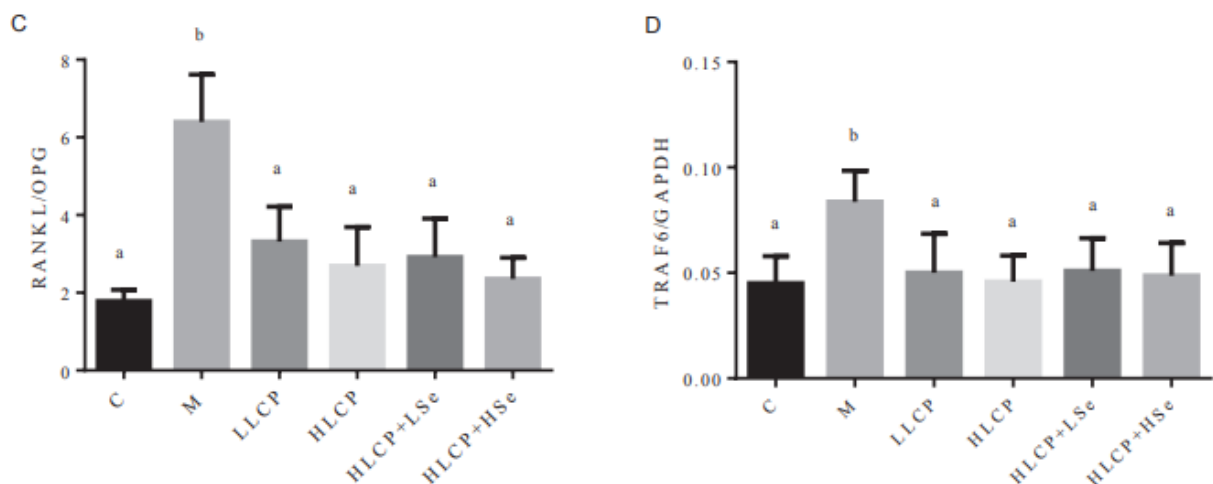


Abbildung 14: mRNA-Expression von TRAF6 und des RANKL/OPG-Verhältnisses bei Mäusen. C, Kontrollgruppe; M, Osteoporose-Modellgruppe; LLCP, Modell + niedrige Dosis LCP; HLCP, Modell + hohe Dosis LCP; HLCP + LSe, Modell + hohe Dosis LCP + niedrige Dosis Natriumselenit; HLCP + HSe, Modell + hohe Dosis LCP + hohe Dosis Natriumselenit. Die verschiedenen Buchstaben geben signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungen an ($p < 0,05$) (Liu et al., 2020).

Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass die Retinsäure-induzierte Osteoporose zu einer erhöhten Expression osteoklastischer Marker führt, die mit einer Überexpression osteogener Marker einhergeht. Zusammenfassend deuten die Erkenntnisse darauf hin, dass die Verabreichung von HK, insbesondere in Kombination mit NaSe, den Knochenabbau bei Retinsäure-induzierter Osteoporose effektiv reduzieren kann. Die beobachteten Effekte von HK gehen mit einer Regulierung des OPG/RANKL/NF- κ B-Signalwegs einher.

In Kapitel 5.5 wurden bereits die in-vitro Untersuchungen von N'deh et al. vorgestellt, bei denen die Effekte von HK aus Ogye-Hühnern auf Knochenzellen untersucht wurden. Im zweiten Teil der Studie verwendeten N'deh et al. (2020) vier Wochen alte Wistar-Ratten, die entweder einer Scheinoperation ($n = 12$) oder einer ovariectomierten OVX-Gruppe (vier Gruppen, $n = 48$) zugeteilt wurden. An der OVX-Gruppe wurde ein Eingriff zur Entfernung der Eierstöcke unterzogen, um eine postmenopausale Osteoporose zu simulieren. Das

durchschnittliche Gewicht der Ratten betrug 117 ± 7 g. Die negative OVX-Kontrollgruppe erhielt ein Futter mit geringerem Calciumgehalt (0,01 % Ca) im Vergleich zum regulären Futter (0,6 % Calcium). Die OVX-Ratten, die mit HK behandelt wurden, erhielten ebenfalls Futter mit niedrigem Calciumgehalt (0,01 %). Die Tiere wurden in fünf Gruppen aufgeteilt (n = 12 pro Gruppe): Schein-OP (normales Futter), OVX (OVX + niedriger Ca-Gehalt), positive Kontrolle (OVX + normales Futter), GDC2 (OVX + 2 g/kg HK) und GDC3 (OVX + 3 g/kg HK). Die Verabreichung von HK erfolgte enteral. Nach einer Fütterungsperiode von 8 Wochen wurden die Tiere euthanasiert. Anschließend wurden die Schienbeinknochen entnommen und Blutserum durch Zentrifugation bei $848 \times g$ für 30 Minuten gewonnen. In einem ersten Experiment wurde eine Mikro-CT-Analyse der Schienbeine durchgeführt, um die Knochenmineraldichte (BMD) in den trabekulären und kortikalen Bereichen zu quantifizieren. Ebenso wurden Knochenstrukturparameter wie das Verhältnis von Knochenoberfläche zu Knochenvolumen (BSA/BV), das Verhältnis von Knochenvolumen zu Gesamtvolumen (BV/TV) sowie die Abstände und Dicke der Trabekel erfasst. Die Ergebnisse der OVX-Ratten zeigten eine signifikante Verringerung der trabekulären und kortikalen BMD ($p < 0,05$). Ähnlich waren BV/TV, BSA/BV und die Trabekelparameter im Vergleich zur Schein-OP-Gruppe signifikant reduziert ($p < 0,05$). Im Gegensatz dazu wiesen sowohl die GDC2- als auch die GDC3-Gruppe im Vergleich zur negativen Kontrolle höhere Werte für trabekuläre und kortikale BMD auf. Auch das BV/TV-Verhältnis sowie die Trabekelzahl und -dicke waren in den GDC2- und GDC3-Gruppen im Vergleich zur negativen Kontrolle verbessert. Bestimmte Parameter wie das Verhältnis von BSA/TV und Trabekelabstände wiesen in den GDC2- und GDC3-Gruppen eine signifikante Verringerung im Vergleich zur negativen Kontrolle auf ($p < 0,05$). Trotz fehlender signifikanter Unterschiede in der BMD zwischen der GDC2- und GDC3-Gruppe wurde festgestellt, dass die Verabreichung von 2 g/kg HK im Vergleich zu 3 g/kg HK zu einem verbesserten BV/TV-Verhältnis und einer erhöhten Trabekeldicke führte ($p < 0,05$). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Zugabe von HK den Verlust der trabekulären Knochenmasse und -integrität bei OVX-Ratten positiv beeinflusst. In einem weiteren Experiment wurde die Genexpression mittels RT-PCR untersucht. Dabei wurde die mRNA-Expression von osteogenen und osteoklastischen Genen der Schienbeine analysiert, darunter BMP-2, RUNX2, Wnt3a, OC, COL-1, OPG, RANKL, TRAP und Cathepsin K. Die OVX-Kontrollgruppe zeigte im Vergleich zur Schein-OP-Gruppe eine signifikante Abnahme der mRNA-Expression für BMP-2 (1,8-fach), Wnt3a (3,3-fach), Runx2 (6-fach), OCN (1,6-fach) und Col-1 (4-fach) ($p < 0,05$). Die mit HK-behandelten Gruppen (2 g/kg bzw. 3 g/kg HK) wiesen im Vergleich

zur negativen Kontrolle eine signifikante Steigerung der mRNA-Expression für BMP-2 (1,7- bzw. 2,6-fach), WNT-3a (1,2- bzw. 1,3-fach), Runx2 (2,3- bzw. 3,7-fach), OCN (1,7- bzw. 1,8-fach) und Col-1 (2,2- bzw. 1,3-fach) auf. Abgesehen von Col-1 führte eine höhere HK-Dosis zu einer stärkeren mRNA-Expression osteogener Marker. Im Vergleich zur positiven Kontrolle führten die HK-Gruppen zu einer signifikant stärkeren Steigerung der BMP-2-, Runx2- und OCN-Expression ($p < 0,05$). Zudem wies die negative Kontrolle im Vergleich zur Schein-OP-Gruppe eine signifikant niedrigere Expression von OPG (3,7-fach), RANKL (5,3-fach), TRAP (4,0-fach) und Cathepsin K (9,5-fach) auf ($p < 0,05$). Im Gegensatz dazu zeigten die HK-Gruppen (2 g/kg bzw. 3 g/kg HK) im Vergleich zur negativen Kontrolle eine deutliche Steigerung der OPG-Expression (3,3- bzw. 2,6-fach) sowie eine signifikant niedrigere RANKL- (1,6- bzw. 2,8-fach), TRAP- (1,7- bzw. 1,5-fach) und Cathepsin K-Expression (7,5- bzw. 15-fach) auf ($p < 0,05$). Unter den HK-Dosierungen führte eine Dosis von 2 g/kg HK zu einer stärkeren Steigerung von OPG und einer stärkeren Abnahme der TRAP-Expression. Bei einer Dosis von 3 g/kg HK war das RANKL/OPG-Verhältnis sowie die RANKL- und Cathepsin K-Expression hingegen geringer. In Bezug auf die osteogenen Marker wurde bei einer höheren HK-Dosis (3 g/kg) eine höhere Expression festgestellt. Die Effekte von HK stehen dabei in Zusammenhang mit dem MAPK-Signalweg. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie legen nahe, dass HK zu einem deutlichen Anstieg der mRNA-Expression osteogener Gene führt, die mit einer gesteigerten Knochenbildung in Verbindung stehen. Zudem führt HK zu einer deutlichen Abnahme von Markern für Knochenabbau, die mit erhöhter Knochenresorption in Verbindung stehen. Um die Effekte von HK auf den MAPK-Signalweg zu untersuchen, erfolgte eine Analyse der Proteinexpression phosphorylierter Formen von ERK, p38 und JNK mittels Western Blot. Im Vergleich zur Schein-OP-Gruppe kam es bei der OVX-Kontrollgruppe zu einer deutlichen Abnahme der p-ERK-Expression (3,2-fach) sowie eine Reduktion von p38 (1,6-fach), begleitet von einer Zunahme von phosphoryliertem JNK (2-fach) ($p < 0,05$). Die Gruppen, die HK erhielten (2 g/kg bzw. 3 g/kg), zeigten hingegen eine bedeutsame Zunahme der phosphorylierten ERK-Proteinexpression (1,9- bzw. 1,3-fach) und eine Erhöhung der phosphorylierten p38-Proteinexpression (1,5- bzw. 1,6-fach). Gleichzeitig wurde die Expression von phosphoryliertem JNK in diesen Gruppen reduziert (1,2. bzw. 1,8-fach), verglichen mit der negativen Kontrollgruppe ($p < 0,05$). Besonders hervorzuheben ist, dass eine HK-Dosis von 2 g/kg eine verstärkte Zunahme der phosphorylierten ERK-Proteinexpression zeigte, während 3 g/kg HK die Hemmung der phosphorylierten JNK-Proteinexpression verstärkte. Die Resultate aus den Western Blot Analysen legen nahe, dass HK eine regulierende Wirkung

auf die osteogenen MAPK-Signalwege ausübt. Die Ergebnisse der in-vivo Versuche von N'deh legen nahe, dass HK osteoporotische Veränderungen in ovariectomierten Mäusen vermindern kann. HK führte dabei zu einer höheren Expression osteogener Marker sowie einer reduzierten Expression osteoklastischer Marker. Die protektiven Effekte von HK stehen dabei in Verbindung mit dem MAPK-Signalweg.

In einer Untersuchung von Kim et al. (2013) wurde die therapeutische Wirksamkeit von HK aus Schweinehaut in einem in-vivo Osteoporosemodell unter Verwendung ovariektomierter Ratten analysiert. Das Hauptziel der Studie lag in der Erfassung potenzieller Veränderungen relevanter Knochenparameter und Blutserummarker. Für die Versuche wurde Kollagen aus Schweinehaut mithilfe eines Enzymgemischs (1% Novozymes) bei einer Temperatur von 50 °C hydrolysiert. Anschließend wurde der Überstand nach Zentrifugation bei $3.000 \times g$ für 15 Minuten mittels eines Ultrazentrifugenfilters isoliert. Kim et al. verwendeten weibliche Sprague-Dawley-Ratten im Alter von 3 Monaten. Bei den Ratten wurden entweder eine Ovariectomie (OVX) oder eine simulierte Operation durchgeführt. Die Ratten wurden in insgesamt sieben Gruppen aufgeteilt, wobei jede Gruppe aus 12 Tieren bestand. Eine der OVX-Gruppen erhielt eine Diät mit 1% Casein, während die anderen Gruppen unterschiedliche Dosen von HK (0,1%, 0,3%, 1% und 4%) verabreicht bekamen. Nach einer Zeitspanne von 12 Wochen wurden bei betäubten Ratten die Knochendichte gemessen und Blutproben entnommen, bevor sie euthanasiert wurden. In einem ersten Versuch wurde die areale Knochendichte (aBMD) mittels DEXA-Scan analysiert. Die Ratten wurden für die Scans in eine horizontale Position platziert. Anhand der Scans wurden die aBMD für den gesamten Körper, die Lendenwirbelsäule (L1 - L5) sowie den Oberschenkelknochen berechnet. Es zeigte sich, dass die Ovariectomie zu einer signifikanten Reduktion der BMD des gesamten Körpers (-3,4%), der Lendenwirbelsäule (-12,4%) und der Oberschenkelknochen (-10,1%) im Vergleich zur Schein-OP-Gruppe führte (Abb. 15; $p < 0,01$). Hingegen zeigte die HK-Behandlung eine dosisabhängige Verbesserung der aBMD für den gesamten Körper und die Lendenwirbelsäule (Abb. 15A). Die Gabe von Casein hatte keine signifikante Auswirkung auf die aBMD. Interessanterweise hatte bereits eine HK-Konzentration von 0,3% einen signifikanten Einfluss auf die aBMD der Lendenwirbelsäule im Vergleich zur OVX-Kontrollgruppe (Abb. 15B; $p < 0,05$). Eine statistisch signifikante Erhöhung der aBMD für den gesamten Körper wurde jedoch erst bei einer HK-Konzentration von 1,0% erreicht ($p < 0,05$). Der höchste beobachtete Effekt auf die aBMD des gesamten Körpers trat bei einer Konzentration von 4,0% HK auf und führte zu aBMD-Werten, die mit denen der Schein-OP-Kontrollgruppe vergleichbar waren. Darüber hinaus

wurde bei einer HK-Konzentration von 1% eine leichte Steigerung der aBMD des Oberschenkelknochens festgestellt, die jedoch wie die Casein-Behandlung keine statistische Signifikanz aufwies. Zur Analyse der Auswirkungen auf die Mikroarchitektur des Knochens wurden Gewebeproben mittels SE-Fotomikroskopie untersucht. Die Verabreichung von HK führte zu einer erhöhten trabekulären Dichte und zu dickeren trabekulären Knochen. Diese Befunde deuten darauf hin, dass HK dem Knochenverlust präventiv entgegenwirken kann.

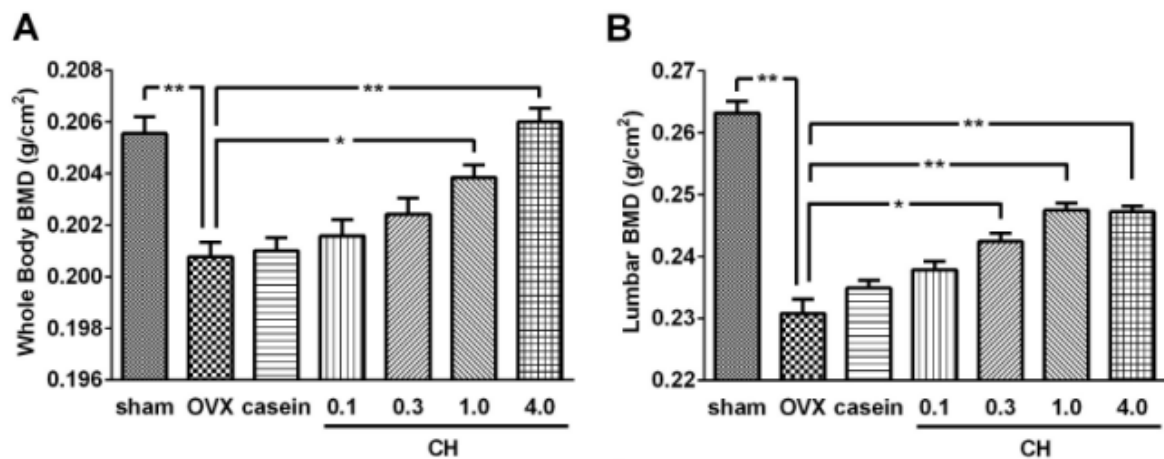


Abbildung 15: A) Auswirkungen von HK auf die Knochenmineraldichte (BMD) des gesamten Körpers und (B) der Lendenwirbelsäule. Sham; Gruppe mit Scheinoperation, OVX; ovariectomized control group, Casein; OVX + Casein (1%) Gruppe. 0,1, 0,3, 1,0 und 4,0; steht für die OVX-Ratten, denen 0,1% - 4,0% HK verabreicht wurden. Die Daten werden als Mittelwerte \pm SEM ausgedrückt. * $p < 0,05$ vs. OVX-Gruppe. ** $p < 0,01$ vs.

In einer weiteren Versuchsreihe wurden Blutserummarker wie k-ALP, das Prokollagen-Typ-1-N-Propeptid (PINP), OCN, TRAP5b sowie das carboxyterminale Typ-I-Kollagen-Telopeptid (CTX-1) mittels eines enzymgebundenen Immunosorbent Assays (ELISA) ermittelt. Die Durchführung einer Ovariectomie (OVX) bewirkte eine beachtliche Zunahme der Knochenresorptionsmarker CTX und des CTX/TRACP-Indexes. Auch eine geringe Erhöhung der Serummarker BSAP, PINP und OC wurde beobachtet. Die Verabreichung von HK führte über sämtliche Parameter hinweg zu einer dosisabhängigen Abnahme im Vergleich zur Kontrollgruppe, außer im Fall von BSAP. Die größten Effekte wurden bei Dosierungen von 500 und 2000 mg/kg HK festgestellt ($p < 0,05$). Die Serumkonzentrationen von PINP, die bei OVX-Ratten deutlich erhöht waren, wurden ebenfalls mittels HK dosisabhängig reduziert. Im Gegensatz dazu bewirkte die Verabreichung von Casein in sämtlichen Serummarkern keine signifikanten Abweichungen. Die Studie von Kim et al. veranschaulicht, dass HK eine dosisabhängige Erhöhung der BMD bewirkte und die Mikroarchitektur des Knochens verbesserte. Zusätzlich führte die Anwendung von HK zur

Reduzierung der Serummarker für den Knochenumbau und die -resorption in einem Osteoporosemodell.

In einer weiteren wissenschaftlichen Studie haben Zhang et al. (2018) die Auswirkungen von HK aus Silberkarpfenhaut auf Knochenparameter bei gealterten Kunming-Mäusen erforscht. Hierbei wurde Kollagen aus der Haut von Silberkarpfen extrahiert und durch Anwendung von alkalischer Protease (ACH-Kollagen) oder Kollagenase (CCH-Kollagen) hydrolysiert. Für die Studie wurden weibliche Kunming-Mäuse zwei verschiedener Altersgruppen einbezogen: zwei Monate alte (28 ± 2 g) und 13 Monate alte (45 ± 5 g) Mäuse wurden von Sibeifu (Peking, China) erworben. Innerhalb der gealterten Gruppe wurden insgesamt 6 Untergruppen gebildet ($n = 10$ /Gruppe), darunter die Modellgruppe (M) sowie verschiedene Behandlungsgruppen. Während die gealterte Modellgruppe (M) und die Kontrollgruppe der jungen Mäuse im Alter von zwei Monaten (Y) täglich 0,2 ml Kochsalzlösung erhielten, wurden den Behandlungsgruppen täglich 0,2 ml ACH (in Dosen von 200, 400 bzw. 800 mg/kg) intragastrisch verabreicht. Zusätzlich gab es eine Gruppe, die täglich 0,2 ml CCH (400 mg/kg) bekam. Die MP-Prolin-Gruppe (400 mg/kg) wurde als Kontrollgruppe herangezogen. Nach einer Zeitspanne von 8 Wochen wurden die Mäuse euthanasiert und Proben für weitere Analysen entnommen. Zunächst wurde die BMD der Schienbeine mittels DEXA-Scan untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass die BMD in der M-Gruppe signifikant niedriger war als in der Y-Gruppe ($p < 0,05$), was auf deutlichen Knochenverlust bei gealterten Mäusen hinweist. Auffallend war, dass sowohl die ACH- als auch die MCCH-Gruppe eine signifikante Verbesserung der BMD erzielten ($p < 0,05$). Hierbei konnte die ACH-Gruppe den stärksten Effekt aufweisen. Die Verabreichung von Prolin (MP) zeigte hingegen keinen signifikanten Einfluss auf die BMD. In einem weiteren Versuch wurde die Aktivität von ALP und TRAP-5b im Blutserum mittels handelsüblicher ELISA-Kits analysiert. Die Blutanalysen zeigten, dass der ALP-Spiegel in der M-Gruppe signifikant niedriger als in der YC-Gruppe war ($p < 0,05$). Es konnte ein dosisabhängiger Anstieg der ALP-Spiegel festgestellt werden, wobei ein signifikanter Unterschied zwischen der MACH- und der M-Gruppe beobachtet wurde ($p < 0,05$). Die Behandlungsgruppen MCCH und MP hatten hingegen keinen signifikanten Einfluss auf die ALP-Spiegel bei gealterten Mäusen. Darüber hinaus zeigte sich ein altersbedingter Anstieg der TRAP-5b-Aktivität, der keine statistische Signifikanz erreichte. Zudem wurde in den HK-Gruppen eine signifikante Verringerung der TRAP-5b-Spiegel beobachtet. Die Gabe von Prolin (MP) zeigte hingegen keine signifikante Beeinflussung der Serumwerte. In einem weiteren Versuch wurde mittels Western Blot die Proteinexpression von TGF- β 1, Smad3, Smad7,

Integrin $\alpha 2$ und $\beta 1$ analysiert. Die TGF- β -Expression war in der M-Gruppe im Vergleich zur YC-Gruppe signifikant reduziert ($p < 0,05$). Bei einer Behandlung mit HK oder Prolin wurde keine signifikante Steigerung der TGF- β -Expression festgestellt. Die Smad3-Expression zeigte keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen der YC- und M-Gruppe. In der MACH-Gruppe hingegen wurde im Vergleich zur M-Gruppe eine bedeutende Steigerung der Smad3-Expression beobachtet ($p < 0,05$). In den anderen behandelten Gruppen wurden hingegen keine signifikanten Abweichungen zur M-Gruppe festgestellt. Zusätzlich konnte in den HK-Gruppen eine Verringerung der Smad7-Expression beobachtet werden. Sowohl in der MACH- als auch in der HACH-Gruppe wurde eine statistisch signifikante Senkung der Smad7-Expression festgestellt ($p < 0,05$). Prolin und CCH zeigten keinen Einfluss auf die Smad7-Expression. In Bezug auf die Integrin $\alpha 2$ und $\beta 1$ Expression konnte in der gealterten M-Gruppe im Vergleich zur YC-Gruppe eine signifikante Verringerung festgestellt werden ($p < 0,05$). Die Behandlung mit HK führte bei den gealterten Tieren zu einer tendenziellen Steigerung der Integrin $\alpha 2$ - und $\beta 1$ -Expression. Besonders in der MACH-Gruppe konnte eine statistisch signifikante Erhöhung beobachtet werden ($p < 0,05$). Bei gleicher Dosierung zeigten die MCCH- und MP-Gruppen einen weniger ausgeprägten Effekt auf die Zunahme der Integrin $\alpha 2\beta 1$ -Expression. Die Ergebnisse der Untersuchung von Zhang et al. deuten darauf hin, dass die Verabreichung von HK in Mäusen zu einer bedeutenden Verbesserung der Knochendichte und der ALP-Aktivität führt. Gleichzeitig scheint HK regulierend auf die TRAP-5b-Aktivität zu wirken. Die Effekte von HK können mit dem TGF-beta/SMAD-Signalweg sowie einer gesteigerten Integrin-Expression in Verbindung gebracht werden.

Song et al. (2019) untersuchten die Auswirkungen von HK aus Rinderknochen auf die BMD und Serummarker bei gealterten Kunming-Mäusen. Gleichzeitig wurde die Hypothese getestet, ob HK in vivo durch den TGF-beta/Smad-Signalweg wirkt. Hierbei wurden sowohl HK mit niedrigem Molekulargewicht (ACP) als auch reguläres HK (CCP) verwendet. Zur Herstellung von HK wurden Rinderknochen zunächst für 6 Stunden in kochendem Wasser behandelt und anschließend filtriert. Das Filtrat wurde bei $4500 \times g$ für 15 Minuten zentrifugiert. Danach erfolgte die Hydrolyse des Kollagens mittels Kollagenasen bei einem pH-Wert von 7,5 für 3,0 Stunden. Die resultierenden Peptide wiesen ein durchschnittliches Molekulargewicht von < 1 kDa auf. Für die Versuchsreihe wurden weibliche Kunming-Mäuse aus zwei verschiedenen Altersgruppen eingesetzt: Eine junge Kontrollgruppe im Alter von 2 Monaten (28 ± 2 g) mit 10 Tieren sowie eine Gruppe von 13 Monate alten Mäusen (45 ± 5 g), die in 6 Untergruppen ($n = 10/\text{Gruppe}$) eingeteilt wurden. Zu den Unter-

gruppen gehören die Modellgruppe (M), die HK-Gruppen und eine Prolin-Gruppe. Während die jungen und die gealterten Kontrollgruppen jeweils 0,2 ml normale Kochsalzlösung erhielten, bekamen die HK-Gruppen entweder ACP (in Dosen von 200, 400 und 800 mg/kg) oder CCP (400 mg/kg). Die Prolin-Gruppe erhielt 400 mg Prolin pro kg Körpergewicht. Die Verabreichung erfolgte einmal täglich über acht Wochen mittels intragastrischer Applikation (0,2 ml). Nach Ablauf der acht Wochen wurden die Mäuse euthanasiert und Proben für weitere Analysen gesammelt. Die BMD der Oberschenkelknochen wurde mittels DEXA-Scan analysiert. Dabei wurde festgestellt, dass die BMD bei den gealterten Mäusen signifikant niedriger war als bei den jüngeren Mäusen ($p < 0,05$). Die Verabreichung von ACP führte zu einer dosisabhängigen Steigerung der BMD. In den Gruppen die mit ACP in den Dosierungen von 400 und 800 mg/kg HK behandelt wurden, konnten im Vergleich zur Modellgruppe signifikante Unterschiede festgestellt werden ($p < 0,05$). Im Gegensatz dazu hatte die Verabreichung von CCP oder Prolin in einer Dosierung von 400 mg/kg Körpergewicht keinen signifikanten Effekt auf die BMD im Vergleich zur Modellgruppe. Zudem wurde beobachtet, dass die trabekuläre Mikroarchitektur von Mäusen, die mit einer Dosis von 800 mg/kg ACP gefüttert wurden, vergleichbar war mit der von jungen Mäusen. Um die Wirkungen von HK auf den TGF-beta/Smad-Signalweg zu erforschen, wurde die Proteinexpression mittels Western Blot analysiert. Hierbei wurden die Oberschenkelknochen der Mäuse zunächst pulverisiert und anschließend lysiert und homogenisiert. Die Homogenate wurden zentrifugiert, um die Gesamtproteinkonzentration zu bestimmen. Jeweils 50 µg Gesamtprotein pro Probe wurden einer 10%igen Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) unterzogen. Die getrennten Proteine wurden auf PVDF-Membranen übertragen und mit Antikörpern gegen TGF-β, Smad3, Smad7 und GAPDH inkubiert, gefolgt von einem HRP-konjugierten Sekundärantikörper. Die Proteinexpression wurde mittels Image J Software quantifiziert. Die Ergebnisse der Analyse zeigten, dass die Expression von TGF-β und Smad3 in der gealterten Modellgruppe (M) signifikant geringer war als in der jüngeren Kontrollgruppe (Y) (Abb. 16; $p < 0,05$). Zusätzlich konnte beobachtet werden, dass die Expression von Smad7 in der M-Gruppe signifikant höher war als in der Y-Gruppe (Abb. 16; $p < 0,05$).

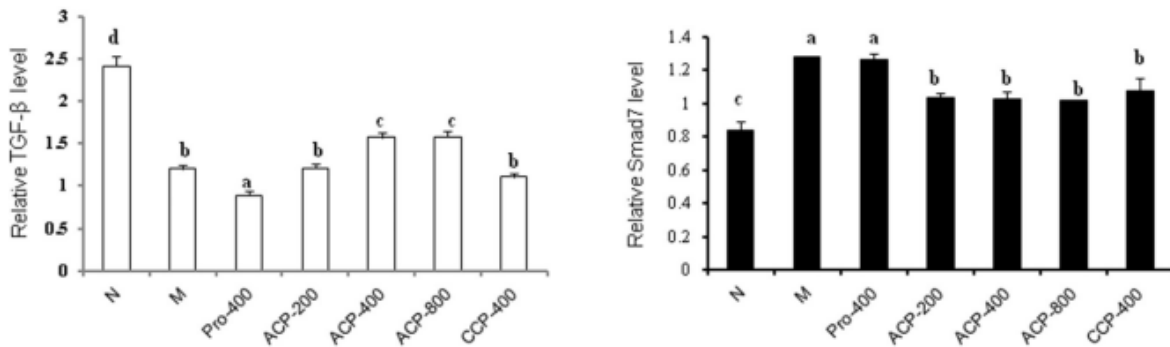


Abbildung 16: Western-Blot-Analyse von TGF- β (links) und Smad7 (rechts) der Oberschenkelknochen von Mäusen, die mit HK behandelt wurden. N steht für die junge Gruppe; M für die Modellgruppe (ältere Gruppe); Pro für die Prolin-Gruppe (400 mg/kg); ACP für die Verabreichung von HK mit niedrigem Molekulargewicht (200, 400 und 800 mg/kg). CCP für die Verabreichung von Kollagenpeptiden, die mit Kollagenase hergestellt wurden. Die Werte werden als Mittelwerte \pm Standardabweichungen dargestellt. Die Buchstaben (a-d) stehen für signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) (Song et al., 2019).

Die Daten deuten darauf hin, dass der Alterungsprozess mit einer Abnahme der TGF- β - und Smad3-Expression einhergeht, während die Smad7-Expression verstärkt wird. In der ACP-Gruppe zeigte sich eine dosisabhängige Erhöhung der TGF- β - und Smad3-Expression ($p < 0,05$). Zugleich bewirkt die Behandlung in den HK-Gruppen zu einer signifikanten Reduktion der Smad7-Expression ($p < 0,05$). Die Gruppen, die CCP oder Prolin erhielten, konnten bei einer Dosierung von 400 mg/kg keine signifikanten Auswirkungen auf die TGF- β - und Smad3-Expression verzeichnen. In einem weiteren Versuch wurden die Serumspiegel von ALP und TRAP mittels kommerziell erhältlicher Assay-Kits bestimmt. In der gealterten Modellgruppe (M) zeigte der ALP-Serumspiegel eine signifikante Abnahme im Vergleich zur jüngeren Kontrollgruppe (Y) ($p < 0,05$). Diese Beobachtung deutet auf eine reduzierte OB-Aktivität im Lauf des Alters hin. Der Serumspiegel von TRAP war in der M-Gruppe höher als in der Y-Gruppe, erreichte jedoch keine statistische Signifikanz. Die Verabreichung von ACP zeigte keinen Effekt auf den Serumspiegel von ALP. Allerdings bewirkte sie eine signifikante Senkung des Serumspiegels von TRAP bei Dosierungen von 400 oder 800 mg/kg im Vergleich zur M-Gruppe ($p < 0,05$). Die Gabe von CCP oder Prolin in einer Dosierung von 400 mg/kg führte im Vergleich zu den Modellmäusen zu keinen signifikanten Veränderungen der ALP- oder TRAP-Aktivität. Zusammenfassend zeigen die Resultate, dass die Verabreichung von HK zu einer dosisabhängigen Zunahme der BMD führt, insbesondere im Fall von HK mit niedrigem Molekulargewicht (ACP). Die Effekte stehen mit einer Hochregulierung des TGF-beta/Smad-Signalwegs in Verbindung.

In den in-vivo Studien des Kapitels 5.6 wurden die schützenden Effekte von HK auf die Entwicklung von Osteoporose untersucht. Dabei wurden verschiedene Osteoporose-Modelle im Rahmen der Untersuchungen verwendet. N'deh et al. und Kim et al. führten Ovariectomien an Wistar- bzw. Sprague-Dawley Ratten durch, um die Auswirkungen eines Östrogenmangels auf den Knochenstoffwechsel nachzuahmen. Zhang et al. und Song et al. nutzten 13 Monate alte Kunming-Mäuse als Modell für senile Osteoporose. Liu et al. induzierten Osteoporose bei Kunming-Mäusen durch die Verabreichung von Retinsäure, was zu einer Störung des Knochenstoffwechsels führt. HK wurde aus verschiedenen Quellen gewonnen, darunter Schweinehaut (Kim et al., 2013), Silberkarpfenhaut (Zhang et al., 2018), Rinderhaut (Song et al., 2019), Ogye-Hühner (N'deh et al., 2020) und Schmerlenfische (Liu et al., 2020). Das Kollagen wurde isoliert und anschließend enzymatisch hydrolisiert. Zur Messung der BMD in den Osteoporose-Modellgruppen wurden DEXA-Scans durchgeführt. Alternativ verwendeten Liu et al. und N'deh et al. Mikro-CT-Analysen, um die Schienbeine der Versuchstiere zu untersuchen. In allen Studien wurde in den Modellgruppen eine deutliche Abnahme der BMD sowie eine Verschlechterung der Mikroarchitektur festgestellt. Die Mikro-CT-Analysen lieferten detaillierte Einblicke in die Mikroarchitektur der Knochen und zeigten eine reduzierte Anzahl und Dicke der Trabekel. Die histomorphometrischen Analysen der Knochen bestätigten diese Beobachtungen. Kim et al. und Song et al. beobachteten eine dosisabhängige Verbesserung der BMD, die bei einer Dosierung von 1% bis 4% bzw. 400 - 800 mg/kg HK erreicht wurde. N'deh et al. verwendeten höhere Dosierungen und stellten fest, dass die Fütterung mit HK in einer Dosis von 3g/kg weniger wirksam war als mit 2g/kg Körpergewicht. In den senilen Osteoporose-Modellen führte die Behandlung mit HK zu einer Verbesserung der trabekulären Mikroarchitektur, die mit der jungen Kontrollgruppe vergleichbar war. Interessanterweise konnten Kim et al. trotz signifikanter Verbesserung der Lendenwirbel- und Gesamtkörper-BMD keinen Einfluss auf die BMD der Oberschenkel feststellen. Kim et al., Liu et al. und Song et al. untersuchten zusätzlich die Serumspiegel auf osteoporose-relevante Marker mithilfe standardisierter ELISA-Kits. Kim et al. beobachteten eine dosisabhängige Abnahme der Knochenbaumaarker OC und PINP sowie der Knochenabbaumaarker CTX und TRAP-5b. Song et al. stellten ebenfalls eine signifikante Senkung der TRAP-Spiegel fest, während der kALP-Spiegel unverändert blieb. Liu et al. beobachteten eine Normalisierung der Calcium- und Phosphatspiegel im Vergleich zur Modellgruppe, was auf einen verringerten Knochenabbau hindeutet. Allerdings erreichte die Verringerung der TRAP-Aktivität bei Liu et al. keine statistische Signifikanz. Um die Einflüsse von HK auf genetischer Ebene zu

untersuchen, analysierten Liu et al. und N'deh et al. mittels RT-PCR die mRNA-Expression in den Oberschenkel- bzw. Schienbeinknochen der Versuchstiere. Auf genetischer Ebene zeigte das durch Retinsäure induzierte Osteoporose-Modell deutliche Unterschiede zu den anderen Modellen. Im Retinsäure-Modell wurde eine untypische Überexpression osteogener Marker wie Runx2, Osterix, Wnt10b und beta-Catenin im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet, was auf eine mögliche kompensatorische Gegenregulation hinweist. Die Behandlung mit HK führte in den HK-Gruppen zu einer Normalisierung der osteogenen mRNA-Expression. Zusätzlich wurde die Überexpression von TRAF6, als auch das Verhältnis von RANKL/OPG-Verhältnis normalisiert. N'deh et al. konnten ebenfalls eine durch HK-verursachte Verringerung der RANKL-Expression beobachten, die mit einer gesteigerten OPG-Expression einherging. Zudem führte HK in dem OVX-Osteoporose-Modell von N'deh et al. zu einer deutlichen Steigerung der mRNA-Expression von BMP-2, WNT-3a, Runx2, OCN und COL-1. Des Weiteren analysierten die Studien des Kapitels die Effekte von HK auf die Proteinexpression in den Oberschenkelknochen (Zhang et al., 2018; Song et al., 2019) und Schienbeinknochen (N'deh et al., 2020) mittels Western Blot. Sowohl Zhang et al. als auch Song et al. beobachteten im senilen Osteoporose-Modell eine Abnahme der TGF- β - und Smad3-Expression, begleitet von einer verstärkten Smad7-Expression. Die Gabe von HK führte in beiden Studien zu einer Erhöhung der Smad3-Expression und einer Reduktion der Smad7-Expression. Die TGF- β -Expression stieg im Vergleich zur Modellgruppe an, erreichte jedoch nur bei Song et al. statistische Signifikanz. Zusätzlich bemerkte Zhang et al. eine verminderte Integrin α 2- und β 1-Expression, die in den HK-Gruppen aufgehoben wurde. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass HK der altersbedingten Regulation des TGF- β /SMAD-Signalwegs entgegenwirken kann. Im Gegensatz dazu untersuchten N'deh et al. die Effekte von HK auf den MAPK-Signalweg und beobachtete eine klare Abnahme der p-ERK- und p38-Expression, begleitet von einer Verdopplung der JNK-Expression. Diese Effekte konnten durch HK-angereichertes Futter deutlich reduziert werden.

Schlussfolgernd lässt sich sagen, dass die präsentierten Studien der Kapitel 5.1 bis 5.6 maßgeblich zum Verständnis der molekularen Mechanismen beitragen, durch welche HK die Genexpression in Knochenzellen beeinflusst und osteoporotische Veränderungen mindern kann. Das aufgezeigte Potential von HK, die Osteogenese zu fördern und die Osteoklastogenese zu hemmen, legt nahe, dass HK eine vielversprechende Rolle in der Prävention von Osteoporose spielen könnte. Interessanterweise wurde die Wirkung der Peptide stärker von Faktoren wie der Dosierung und dem Molekulargewicht beeinflusst als

von den unterschiedlichen tierischen Quellen, die für die Herstellung verwendet wurden. HK gilt als Lebensmittel und zeichnet sich durch seine exzellente Verträglichkeit aus, was sich positiv auf die Compliance in der klinischen Praxis auswirken könnte. Es ist jedoch wichtig anzumerken, dass weitere umfassende Forschung erforderlich ist, um die klinische Relevanz dieser Ergebnisse zu bestätigen und die genauen therapeutischen Anwendungsmöglichkeiten in der Osteoporoseprävention zu definieren. Dies gilt insbesondere unter Berücksichtigung der in-vitro beobachteten Rückkopplungseffekte bei zu hoher Dosierung.

6. Zusammenfassung

Die in-vitro Untersuchungen konnten zeigen, dass hydrolysiertes Kollagen (HK) in der Lage ist, die Differenzierung mesenchymaler Stammzellen (MSZ) zu reifen Osteoblasten (OB) zu fördern. Die Differenzierung von OB-Vorläuferzellen ging mit einer verstärkten Expression des Transkriptionsfaktors Runx2 einher. Ähnliche Beobachtungen wurden bei der Anwendung präosteoblastischer MC3T3-E1-Zellen gemacht. Darüber hinaus wurde eine zeitliche und dosisabhängige Erhöhung der Proliferation von OB-Vorläuferzellen nach der Behandlung mit HK festgestellt. In reifen OB wurde ebenfalls eine gesteigerte Expression von Runx2 sowie Osterix festgestellt. Die Inkubation mit HK führte zu einer signifikanten Zunahme der Proteinexpression von Kollagen Typ 1 (KOL-1), Osteocalcin (OCN), Osteopontin (OPN) und alkalischer Phosphatase (ALP). Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass HK die Expression zellzyklus-assoziiierter Proteine, wie CDK-2, CDK-4, Cyclin B1 und Cyclin D1, erhöhte, was mit einer Zellzyklusprogression der S-Phase einherging. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass HK die Zellviabilität durch eine zeit- und dosisabhängige Reduktion des Bax/Bcl-Verhältnisses erhöhte. Die Effekte gingen mit einer Herunterregulierung des NF- κ B-Signalwegs, einer gesteigerten p100-Expression und einer verminderten Expression von FBXW7 einher. In reifen OB führte die Anwendung von HK zur Hochregulierung von Enzymen, die für die Kollagenquervernetzung verantwortlich sind, darunter Lysylhydroxylasen (LH), Lysyloxidasen (LOXL) und Galaktosyltransferase (GLT-25D1). Dies begünstigte unter anderem die Matrixmineralisierung, was sich in der erhöhten Bildung mineralisierter Knötchen in-vitro widerspiegelte. Die osteogenen Effekte von HK konnten bis zu einem bestimmten Konzentrationsniveau beobachtet werden, oberhalb dessen sich ein negativer Rückkopplungsmechanismus offenbarte. Es gibt Hinweise darauf, dass die gesteigerte Expression von Runx2 in OB-Vorläuferzellen unter anderem auf den MAPK/ERK-Signalweg zurückzuführen ist. Diese Hypothese wurde durch den ERK-Inhibitor PD98059 bestätigt. Ähnliche Beobachtungen wurden an reifen OB gemacht, bei denen die Hemmung der MAPK-Signalwege (PD98059, SP600125 und SB203580) die

mRNA-Expression von Genen wie COL1A1 (KOL-1), SPP1 (OPN), BGLAP (OCN) und ALPL (ALP) deutlich reduzierte. Die Expression von ALP und phosphoryliertem Akt wurde durch den PI3K-Inhibitor Perifosin signifikant verringert, was auf die Beteiligung des PI3K/Akt-Signalwegs hinweist. Diese Ergebnisse wurden in einem weiteren Versuch mit dem PI3K-Inhibitor LY294002 bestätigt. Darüber hinaus wurde eine gesteigerte Expression der Smad2/3/4-Proteine sowie des knochenmorphogenetischen Proteins 2 (BMP2) festgestellt, die einen integralen Teil des osteogenen BMP/Smad-Signalwegs bilden. Eine Hemmung des Wnt/beta-Catenin-Signalwegs durch XAV-393 führte ebenfalls zu einer Reduktion osteogener Marker. Ebenso führte die Anwendung von HK zu einer Verschiebung des RANKL/OPG-Verhältnisses zugunsten von OPG, was auf eine verstärkte Regulation der Osteoklastogenese hindeutet. In experimentellen Versuchen mit osteoklastischen Vorläuferzellen wurde festgestellt, dass die Anwendung von HK zu einer Abnahme von TRAP-aktiven Zellen führte, was auf eine reduzierte Bildung ausgereifter Osteoklasten (OK) hindeutet. Dies wurde durch eine geringere Anzahl mehr-kerniger Zellen bestätigt, was auf eine Beeinträchtigung der Zellfusion hinweist. Ebenfalls wurde eine deutliche Reduktion der Bildung von Resorptionsgruben beobachtet, was mit einer verminderten Proteinexpression von lytischen Enzymen wie TRAP und Cathepsin K einherging. Auf genetischer Ebene konnte in OK nachgewiesen werden, dass die mRNA-Expression von Genen, die mit der Zellfusion (CD36-Gen) und Reifung (Traf6-Gen, Csf1r-Gen, Tnfrsf1b-Gen) in Verbindung stehen signifikant reduziert wurden. In Osteozyten (OZ) führte die Behandlung mit HK dazu, dass osteoklastenfördernde Marker wie IL-6 und SOST herunterreguliert wurden, während regulatorische Marker wie OPG hochreguliert wurden. Interessanterweise wurde auch in OK eine Herunterregulierung von RANKL über das Tnfrsf11-Gen und eine Hochregulierung von OPG über das Tnfrsf11b-Gen beobachtet, was auf gemeinsame Regulationsmechanismen der Knochenzellen hinweist. In umfassenden in-vivo-Untersuchungen wurden die Effekte von HK in verschiedenen murinen Osteoporose-Modellen untersucht. Die Analyse des Blutserums der mit HK behandelten Versuchstiere zeigte eine Verbesserung der Knochenumbau-marker OC und PINP sowie der Knochenabbau-marker CTX und TRAP-5b. Auch die Calcium- und Phosphatspiegel normalisierten sich im Vergleich zur Modellgruppe. Die mRNA-Expression osteogener Marker wie BMP-2, WNT-3a, Runx2, OCN und COL-1 aus den Oberschenkel- und Schienbeinknochen wies eine signifikante Steigerung auf. Zusätzlich führte HK zu einer Verringerung der RANKL-Expression, begleitet von einer gesteigerten OPG-Expression in den Knochen der Versuchstiere. Die in-vivo beobachteten mRNA-Expressionsmuster

stimmten mit den Ergebnissen der in-vitro-Untersuchungen überein. In Modellen der senilen Osteoporose konnte die altersbedingte Abnahme der TGF- β - und Smad3-Expression durch die Anwendung von HK teilweise entgegengewirkt werden. Ebenso kam es in den mit HK behandelten Gruppen zu keiner reduzierten Expression von p-ERK und p38, die in der Modellgruppe auftrat. Des Weiteren wurde eine gesteigerte Expression von Integrin α 2- und β 1 beobachtet. DEXA-Scans sowie Mikro-CT-Analysen zeigten eine verbesserte Knochendichte (BMD) und eine positiv beeinflusste trabekuläre Mikroarchitektur in allen Osteoporose-Modellen, die mit HK behandelt wurden. Zusammenfassend lassen die Daten darauf schließen, dass HK sowohl in in-vitro als auch in in-vivo eine positive Regulation der Gen- und Proteinexpression in Knochenzellen bewirkt und vor osteoporotischen Veränderungen schützt. In Anbetracht dieser Ergebnisse besitzt HK ein vielversprechendes Potential im Kontext der Osteoporoseprävention. Dennoch bedarf es weiterführende Forschung, um die klinische Relevanz zu validieren.

7. Summary

The in vitro studies demonstrated that hydrolyzed collagen (HC) is capable of promoting the differentiation of mesenchymal stem cells (MSC) into mature osteoblasts (OB). The differentiation of OB precursor cells was accompanied by an increased expression of the transcription factor Runx2. Similar observations were made when applying pre-osteoblastic MC3T3-E1 cells. Additionally, a time- and dose-dependent enhancement of proliferation in osteoblastic precursor cells was observed after treatment with HC. Increased expression of Runx2 and Osterix was also detected in mature OBs. Incubation with HC led to a significant increase in protein expression of collagen type 1 (COL-1), osteocalcin (OCN), osteopontin (OPN), and alkaline phosphatase (ALP). Furthermore, it was shown that HC increased the expression of cell cycle-associated proteins such as CDK-2, CDK-4, Cyclin B1, and Cyclin D1, correlating with cell cycle progression into the S-phase. Moreover, it was found that HC elevated cell viability through a time- and dose-dependent reduction of the Bax/Bcl ratio. These effects were accompanied by downregulation of the NF- κ B signaling pathway, increased p100 expression, and decreased expression of FBXW7. In mature OB, application of HC upregulated enzymes responsible for collagen cross-linking, including Lysyl Hydroxylases (LH), Lysyl Oxidases (LOXL), and Galactosyltransferase (GLT25D1). This, among other effects, enhanced matrix mineralization, reflected by increased formation of mineralized nodules in vitro. The osteogenic effects of HC were observable up to a certain concentration level, beyond which a negative feedback mechanism became apparent. There is evidence that the increased expression of Runx2 in OB precursor cells is, among other

factors, attributed to the MAPK/ERK signaling pathway. This hypothesis was confirmed using the ERK inhibitor PD98059. Similar observations were made in mature OBs, where inhibition of MAPK pathways (PD98059, SP600125, and SB203580) significantly reduced the mRNA expression of genes such as COL1A1 (COL-1), SPP1 (OPN), BGLAP (OCN), and ALPL (ALP). The expression of ALP and phosphorylated Akt was significantly reduced by the PI3K inhibitor Perifosin, indicating the involvement of the PI3K/Akt signaling pathway. These results were confirmed in a further experiment using the PI3K inhibitor LY294002. Furthermore, an increased expression of Smad2/3/4 proteins and Bone Morphogenetic Protein 2 (BMP2) was observed. Both being integral components of the osteogenic BMP/Smad signaling pathway. Inhibition of the Wnt/beta-Catenin pathway by XAV-393 also led to a reduction in osteogenic markers. Similarly, the application of HC resulted in a shift in the RANKL/OPG ratio in favor of OPG, suggesting enhanced regulation of osteoclastogenesis. In experimental trials with osteoclastic precursor cells, it was observed that the application of HC led to a decrease in TRAP-active cells, indicating a reduced formation of mature osteoclasts (OC). This was confirmed by a lower number of multinucleated cells, suggesting impaired cell fusion. Additionally, a significant reduction in the formation of resorption pits was observed, which was accompanied by a decreased protein expression of lytic enzymes like TRAP and Cathepsin K. At the genetic level, it was shown that mRNA expression of genes associated with cell fusion (CD36 gene) and maturation (Traf6 gene, Csf1r gene, Tnfrsf1b gene) were significantly reduced in OCs. In osteocytes (OZ), treatment with HC led to downregulation of osteoclast-promoting markers like IL-6 and SOST, while regulatory markers like OPG were upregulated. Interestingly, in OCs, a downregulation of RANKL through the Tnfsf11 gene and an upregulation of OPG through the Tnfrsf11b gene were also observed, suggesting shared regulatory mechanisms among bone cells. In comprehensive in-vivo investigations, the effects of HC were examined in various murine osteoporosis models. Analysis of the blood serum from the HC-treated experimental animals showed improvement in bone turnover markers OC and PINP, as well as bone resorption markers CTX and TRAP-5b. Calcium and phosphate levels also normalized compared to the model group. mRNA expression of osteogenic markers such as BMP-2, WNT-3a, Runx2, OCN, and COL-1 in the femur and tibia showed a significant increase. Additionally, HC led to a reduction in RANKL expression, accompanied by increased OPG expression in the bones of the experimental animals. The observed in-vivo mRNA expression patterns aligned with the results of the in-vitro investigations. In models of senile osteoporosis, the age-related decrease in TGF- β and Smad3 expression was

partially counteracted by the application of HC. Similarly, the HC-treated groups did not show the reduced expression of p-ERK and p38 observed in the model group. Furthermore, an increased expression of Integrin $\alpha 2$ and $\beta 1$ was observed. DXA scans and micro-CT analyses revealed improved bone mineral density (BMD) and positively influenced trabecular microarchitecture in all osteoporosis models treated with HC. In conclusion, the data suggest that HK elicits a positive regulation of gene and protein expression in both in vitro and in vivo, offering protection against osteoporotic changes. Given these findings, HK holds promising potential in the context of osteoporosis prevention. However, further research is warranted to validate its clinical relevance.

8. Literaturverzeichnis

Ahmed, Mofieed; Verma, Amit Kumar; Patel, Rajan (2020): Collagen extraction and recent biological activities of collagen peptides derived from sea-food waste: A review. In: Sustainable Chemistry and Pharmacy 18, S. 100315. DOI: 10.1016/j.scp.2020.100315.

Alberts, Bruce (2022): Molecular biology of the cell. Seventh edition, International student edition. New York: W.W. Norton and Company. ISBN: 978-0393884852.

Anderson, R. E.; Woodbury, D. M.; Jee, W. S. (1986): Humoral and ionic regulation of osteoclast acidity. In: Calcified tissue international 39 (4), S. 252–258. DOI: 10.1007/BF02555214.

Armstrong, Allison P.; Tometsko, Mark E.; Glaccum, Moira; Sutherland, Claire L.; Cosman, David; Dougall, William C. (2002): A RANK/TRAF6-dependent signal transduction pathway is essential for osteoclast cytoskeletal organization and resorptive function. In: The Journal of biological chemistry 277 (46), S. 44347–44356. DOI: 10.1074/jbc.M202009200.

Avdagić, Selma Cvijetić; Barić, Irena Colić; Keser, Irena; Cecić, Ivana; Satalić, Zvonimir; Bobić, Jasminka; Gomzi, Milica (2009): Differences in peak bone density between male and female students. In: Arhiv za higijenu rada i toksikologiju 60 (1), S. 79–86. DOI: 10.2478/10004-1254-60-2009-1886.

Bagheri Miyab, Katayoun; Alipoor, Elham; Vaghardoost, Reza; Saberi Isfeedvajani, Mohsen; Yaseri, Mehdi; Djafarian, Kurosh; Hosseinzadeh-Attar, Mohammad Javad (2020): The effect of a hydrolyzed collagen-based supplement on wound healing in patients with burn: A randomized double-blind pilot clinical trial. In: Burns : journal of the International Society for Burn Injuries 46 (1), S. 156–163. DOI: 10.1016/j.burns.2019.02.015.

- Bai, Rui; Liu, Wanlin; Zhao, Aiqing; Zhao, Zhenqun; Jiang, Dianming (2013): Quantitative assessment of the associations between MTHFR C677T and A1298C polymorphisms and risk of fractures: a meta-analysis. In: *Molecular biology reports* 40 (3), S. 2419–2430. DOI: 10.1007/s11033-012-2322-4.
- Baker, M. R.; Peacock, M.; Nordin, B. E. (1980): The decline in vitamin D status with age. In: *Age and ageing* 9 (4), S. 249–252. DOI: 10.1093/ageing/9.4.249.
- Balcerzak, Marcin; Hamade, Eva; Le Zhang; Pikula, Slawomir; Azzar, Gérard; Radisson, Jacqueline et al. (2003): The roles of annexins and alkaline phosphatase in mineralization process. In: *Acta biochimica Polonica* 50 (4), S. 1019–1038.
- Banitalebi, Ebrahim; Ghahfarrokhi, Majid Mardaniyan; Dehghan, Mortaza (2021): Effect of 12-weeks elastic band resistance training on MyomiRs and osteoporosis markers in elderly women with Osteosarcopenic obesity: a randomized controlled trial. In: *BMC geriatrics* 21 (1), S. 433. DOI: 10.1186/s12877-021-02374-9.
- Bao, Yueyang; Xu, Yingke; Li, Zhuowei; Wu, Qing (2023): Racial and ethnic difference in the risk of fractures in the United States: a systematic review and meta-analysis. In: *Scientific reports* 13 (1), S. 9481. DOI: 10.1038/s41598-023-32776-1.
- Barradas, Ana M. C.; Fernandes, Hugo A. M.; Groen, Nathalie; Chai, Yoke Chin; Schrooten, Jan; van de Peppel, Jeroen et al. (2012): A calcium-induced signaling cascade leading to osteogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. In: *Biomaterials* 33 (11), S. 3205–3215. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2012.01.020.
- Baxter-Jones, Adam D. G.; Faulkner, Robert A.; Forwood, Mark R.; Mirwald, Robert L.; Bailey, Donald A. (2011): Bone mineral accrual from 8 to 30 years of age: an estimation of peak bone mass. In: *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 26 (8), S. 1729–1739. DOI: 10.1002/jbmr.412.
- Beggs, Megan R.; Alexander, R. Todd (2017): Intestinal absorption and renal reabsorption of calcium throughout postnatal development. In: *Experimental biology and medicine* (Maywood, N.J.) 242 (8), S. 840–849. DOI: 10.1177/1535370217699536.
- Bella, J.; Brodsky, B.; Berman, H. M. (1995): Hydration structure of a collagen peptide. In: *Structure* (London, England : 1993) 3 (9), S. 893–906. DOI: 10.1016/S0969-2126(01)00224-6.

Berisio, Rita; Vitagliano, Luigi; Mazzarella, Lelio; Zagari, Adriana (2002): Crystal structure of the collagen triple helix model (Pro-Pro-Gly)₁₀(3). In: *Protein science : a publication of the Protein Society* 11 (2), S. 262–270. DOI: 10.1110/ps.32602.

Bielajew, Benjamin J.; Hu, Jerry C.; Athanasiou, Kyriacos A. (2020): Collagen: quantification, biomechanics, and role of minor subtypes in cartilage. In: *Nature reviews. Materials* 5 (10), S. 730–747. DOI: 10.1038/s41578-020-0213-1.

Bonjour, Jean-Philippe; Guéguen, Léon; Palacios, Cristina; Shearer, Martin J.; Weaver, Connie M. (2009): Minerals and vitamins in bone health: the potential value of dietary enhancement. In: *The British journal of nutrition* 101 (11), S. 1581–1596. DOI: 10.1017/S0007114509311721.

Bossard, M. J.; Tomaszek, T. A.; Thompson, S. K.; Amegadzie, B. Y.; Hanning, C. R.; Jones, C. et al. (1996): Proteolytic activity of human osteoclast cathepsin K. Expression, purification, activation, and substrate identification. In: *The Journal of biological chemistry* 271 (21), S. 12517–12524. DOI: 10.1074/jbc.271.21.12517.

Bouvard, Béatrice; Legrand, Erick; Audran, Maurice; Chappard, Daniel (2010): Glucocorticoid-Induced Osteoporosis: A Review. In: *Clinic Rev Bone Miner Metab* 8 (1), S. 15–26. DOI: 10.1007/s12018-009-9051-9.

Bravo Vázquez, Luis Alberto; Moreno Becerril, Mariana Yunuen; Mora Hernández, Erick Octavio; León Carmona, Gabriela García de; Aguirre Padilla, María Emilia; Chakraborty, Samik et al. (2021): The Emerging Role of MicroRNAs in Bone Diseases and Their Therapeutic Potential. In: *Molecules (Basel, Switzerland)* 27 (1). DOI: 10.3390/molecules27010211.

Brooke-Wavell, K.; Jones, P. R.; Hardman, A. E.; Tsuritan; Yamada, Y. (2001): Commencing, continuing and stopping brisk walking: effects on bone mineral density, quantitative ultrasound of bone and markers of bone metabolism in postmenopausal women. In: *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* 12 (7), S. 581–587. DOI: 10.1007/s001980170081.

Brown, S. A.; Ontjes, D. A.; Lester, G. E.; Lark, R. K.; Hensler, M. B.; Blackwood, A. D. et al. (2003): Short-term calcitriol administration improves calcium homeostasis in adults with cystic fibrosis. In: *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation*

between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA 14 (5), S. 442–449. DOI: 10.1007/s00198-002-1331-x.

Burr, D. B.; Martin, R. B.; Schaffler, M. B.; Radin, E. L. (1985): Bone remodeling in response to in vivo fatigue microdamage. In: *Journal of biomechanics* 18 (3), S. 189–200. DOI: 10.1016/0021-9290(85)90204-0.

Caddy, Jordan C.; Luoma, Leiah M.; Berry, Fred B. (2020): FOXC1 negatively regulates BMP-SMAD activity and Id1 expression during osteoblast differentiation. In: *Journal of cellular biochemistry* 121 (5-6), S. 3266–3277. DOI: 10.1002/jcb.29595.

Carmeliet, Geert; van Cromphaut, Sophie; Daci, Evis; Maes, Christa; Bouillon, Roger (2003): Disorders of calcium homeostasis. In: *Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism* 17 (4), S. 529–546. DOI: 10.1016/j.beem.2003.08.001.

Cauley, J. A.; Ellenberg, S. S.; Schwartz, A. V.; Ensrud, K. E.; Keaveny, T. M.; Snyder, P. J. (2021): Effect of testosterone treatment on the trabecular bone score in older men with low serum testosterone. In: *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* 32 (11), S. 2371–2375. DOI: 10.1007/s00198-021-06022-1.

Center, J. R.; Nguyen, T. V.; Schneider, D.; Sambrook, P. N.; Eisman, J. A. (1999): Mortality after all major types of osteoporotic fracture in men and women: an observational study. In: *Lancet (London, England)* 353 (9156), S. 878–882. DOI: 10.1016/S0140-6736(98)09075-8.

Chang, Jia; Wang, Zhuo; Tang, Eric; Fan, Zhipeng; McCauley, Laurie; Franceschi, Renny et al. (2009): Inhibition of Osteoblast Functions by IKK/NF- κ B in Osteoporosis. In: *Nature medicine* 15 (6), S. 682–689. DOI: 10.1038/nm.1954.

Chastin, S. F. M.; Mandrichenko, O.; Helbostadt, J. L.; Skelton, D. A. (2014): Associations between objectively-measured sedentary behaviour and physical activity with bone mineral density in adults and older adults, the NHANES study. In: *Bone* 64, S. 254–262. DOI: 10.1016/j.bone.2014.04.009.

Cheah, K. S.; Lau, E. T.; Au, P. K.; Tam, P. P. (1991): Expression of the mouse alpha 1(II) collagen gene is not restricted to cartilage during development. In: *Development (Cambridge, England)* 111 (4), S. 945–953. DOI: 10.1242/dev.111.4.945.

Chen, Q.; Kaji, H.; Kanatani, M.; Sugimoto, T.; Chihara, K. (2004): Testosterone increases osteoprotegerin mRNA expression in mouse osteoblast cells. In: *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme* 36 (10), S. 674–678. DOI: 10.1055/s-2004-826013.

Cheraghi, Zahra; Doosti-Irani, Amin; Almasi-Hashiani, Amir; Baigi, Vali; Mansournia, Nasrin; Etminan, Mahyar; Mansournia, Mohammad Ali (2019): The effect of alcohol on osteoporosis: A systematic review and meta-analysis. In: *Drug and alcohol dependence* 197, S. 197–202. DOI: 10.1016/j.drugalcdep.2019.01.025.

Cheung, J.; Mak, Y. T.; Papaioannou, S.; Evans, B. A. J.; Fogelman, I.; Hampson, G. (2003): Interleukin-6 (IL-6), IL-1, receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL) and osteoprotegerin production by human osteoblastic cells: comparison of the effects of 17-beta oestradiol and raloxifene. In: *The Journal of endocrinology* 177 (3), S. 423–433. DOI: 10.1677/joe.0.1770423.

Chotphruethipong, Lalita; Binlath, Thunwa; Hutamekalin, Pilaiwanwadee; Aluko, Rotimi E.; Tapaamorndech, Surapun; Zhang, Bin; Benjakul, Soottawat (2021): Impact of Hydrolyzed Collagen from Defatted Sea Bass Skin on Proliferation and Differentiation of Preosteoblast MC3T3-E1 Cells. In: *Foods (Basel, Switzerland)* 10 (7). DOI: 10.3390/foods10071476.

Colangelo, Luciano; Biamonte, Federica; Pepe, Jessica; Cipriani, Cristiana; Minisola, Salvatore (2019): Understanding and managing secondary osteoporosis. In: *Expert review of endocrinology & metabolism* 14 (2), S. 111–122. DOI: 10.1080/17446651.2019.1575727.

COPP, D. H.; CAMERON, E. C.; CHENEY, B. A.; DAVIDSON, A. G.; HENZE, K. G. (1962): Evidence for calcitonin--a new hormone from the parathyroid that lowers blood calcium. In: *Endocrinology* 70, S. 638–649. DOI: 10.1210/endo-70-5-638.

Cowles, E. A.; DeRome, M. E.; Pastizzo, G.; Brailey, L. L.; Gronowicz, G. A. (1998): Mineralization and the expression of matrix proteins during in vivo bone development. In: *Calcified tissue international* 62 (1), S. 74–82. DOI: 10.1007/s002239900397.

Curtis, T. A.; Ashrafi, S. H.; Weber, D. F. (1985): Canalicular communication in the cortices of human long bones. In: *The Anatomical record* 212 (4), S. 336–344. DOI: 10.1002/ar.1092120403.

Czerwiński, Edward; Badurski, Janusz E.; Marcinowska-Suchowierska, Ewa; Osieleniec, Jolanta (2007): Current understanding of osteoporosis according to the position of the World Health Organization (WHO) and International Osteoporosis Foundation. In: *Ortopedia, traumatologia, rehabilitacja* 9 (4), S. 337–356.

Deng, L.; Wang, C.; Spencer, E.; Yang, L.; Braun, A.; You, J. et al. (2000): Activation of the IkappaB kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. In: *Cell* 103 (2), S. 351–361. DOI: 10.1016/s0092-8674(00)00126-4.

Devlin, R. D.; Reddy, S. V.; Savino, R.; Ciliberto, G.; Roodman, G. D. (1998): IL-6 mediates the effects of IL-1 or TNF, but not PTHrP or 1,25(OH)2D3, on osteoclast-like cell formation in normal human bone marrow cultures. In: *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 13 (3), S. 393–399. DOI: 10.1359/jbmr.1998.13.3.393.

Ding, Jianfeng; Zhang, Chongyang; Guo, Yuning (2021): The association of OPG polymorphisms with risk of osteoporotic fractures: A systematic review and meta-analysis. In: *Medicine* 100 (31), e26716. DOI: 10.1097/MD.00000000000026716.

Dodds, R. A.; Connor, J. R.; James, I. E.; Rykaczewski, E. L.; Appelbaum, E.; Dul, E.; Gowen, M. (1995): Human osteoclasts, not osteoblasts, deposit osteopontin onto resorption surfaces: an in vitro and ex vivo study of remodeling bone. In: *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 10 (11), S. 1666–1680. DOI: 10.1002/jbmr.5650101109.

Domon, T.; Suzuki, R.; Takata, K.; Yamazaki, Y.; Takahashi, S.; Yamamoto, T.; Wakita, M. (2001): The nature and function of mononuclear cells on the resorbed surfaces of bone in the reversal phase during remodeling. In: *Annals of anatomy = Anatomischer Anzeiger : official organ of the Anatomische Gesellschaft* 183 (2), S. 103–110. DOI: 10.1016/S0940-9602(01)80027-3.

Dunsmore, S. E. (2006): EXTRACELLULAR MATRIX | Collagens. In: *Encyclopedia of Respiratory Medicine*: Elsevier, S. 168–175.

Edalat, A., & Uhl, D. (2019). Neue Loges-Produkte für die Knochen. *Deutsche Apothekerzeitung (DAZ)*. <https://www.deutsche-apotheker-zeitung.de/daz-az/2019/daz-27-2019>

Edgar, Suzanne; Hopley, Blake; Genovese, Licia; Sibilla, Sara; Laight, David; Shute, Janis (2018): Effects of collagen-derived bioactive peptides and natural antioxidant compounds on proliferation and matrix protein synthesis by cultured normal human dermal fibroblasts. In: *Scientific reports* 8 (1), S. 10474. DOI: 10.1038/s41598-018-28492-w.

Efstathiadou, Z.; Tsatsoulis, A.; Ioannidis, J. P. (2001): Association of collagen Ialpha 1 Sp1 polymorphism with the risk of prevalent fractures: a meta-analysis. In: *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 16 (9), S. 1586–1592. DOI: 10.1359/jbmr.2001.16.9.1586.

Elango, Jeevithan; Robinson, Jeyashakila; Zhang, Jingyi; Bao, Bin; Ma, Nan; Val, José Eduardo Maté Sánchez de; Wu, Wenhui (2019): Collagen Peptide Upregulates Osteoblastogenesis from Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells through MAPK- Runx2. In: *Cells* 8 (5). DOI: 10.3390/cells8050446.

Elango, Jeevithan; Sanchez, Christelle; Val, José Eduardo Maté Sánchez de; Henrotin, Yves; Wang, Shujun; Motaung, Keolebogile Shirley Caroline Mamotswere et al. (2018): Cross-talk between primary osteocytes and bone marrow macrophages for osteoclastogenesis upon collagen treatment. In: *Scientific reports* 8 (1), S. 5318. DOI: 10.1038/s41598-018-23532-x.

Everts, V.; Delaissé, J. M.; Korper, W.; Jansen, D. C.; Tigchelaar-Gutter, W.; Saftig, P.; Beertsen, W. (2002): The bone lining cell: its role in cleaning Howship's lacunae and initiating bone formation. In: *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 17 (1), S. 77–90. DOI: 10.1359/jbmr.2002.17.1.77.

Farbod, Kambiz; Nejadnik, M. Reza; Jansen, John A.; Leeuwenburgh, Sander C. G. (2014): Interactions between inorganic and organic phases in bone tissue as a source of inspiration for design of novel nanocomposites. In: *Tissue engineering. Part B, Reviews* 20 (2), S. 173–188. DOI: 10.1089/ten.teb.2013.0221.

Fardellone, Patrice; Lello, Stefano; Cano, Antonio; Sá Moreira, Eloisa de; Watanabe de Oliveira, Renato; Julian, Guilherme Silva; Tang, Boxiong (2019): Real-world Adherence and Persistence with Bisphosphonate Therapy in Postmenopausal Women: A Systematic Review. In: *Clinical therapeutics* 41 (8), S. 1576–1588. DOI: 10.1016/j.clinthera.2019.05.001.

- Farley, J.; Dimai, H. P.; Stilt-Coffing, B.; Farley, P.; Pham, T.; Mohan, S. (2000): Calcitonin increases the concentration of insulin-like growth factors in serum-free cultures of human osteoblast-line cells. In: *Calcified tissue international* 67 (3), S. 247–254. DOI: 10.1007/s002230001112.
- Felber, Katharina; Elks, Philip M.; Lecca, Maria; Roehl, Henry H. (2015): Expression of osterix Is Regulated by FGF and Wnt/ β -Catenin Signalling during Osteoblast Differentiation. In: *PloS one* 10 (12), e0144982. DOI: 10.1371/journal.pone.0144982.
- Feng, Xu (2009): Chemical and Biochemical Basis of Cell-Bone Matrix Interaction in Health and Disease. In: *Current chemical biology* 3 (2), S. 189–196. DOI: 10.2174/187231309788166398.
- Ferrari, S.; Rizzoli, R.; Slosman, D.; Bonjour, J. P. (1998): Familial resemblance for bone mineral mass is expressed before puberty. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 83 (2), S. 358–361. DOI: 10.1210/jcem.83.2.4583.
- Finkelstein, Joel S.; Brockwell, Sarah E.; Mehta, Vinay; Greendale, Gail A.; Sowers, MaryFran R.; Ettinger, Bruce et al. (2008): Bone mineral density changes during the menopause transition in a multiethnic cohort of women. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 93 (3), S. 861–868. DOI: 10.1210/jc.2007-1876.
- Fratzl, P.; Misof, K.; Zizak, I.; Rapp, G.; Amenitsch, H.; Bernstorff, S. (1998): Fibrillar structure and mechanical properties of collagen. In: *Journal of structural biology* 122 (1-2), S. 119–122. DOI: 10.1006/jsbi.1998.3966.
- Fu, Ruijie; Yao, Kai; Zhang, Qisheng; Jia, Dongying; Zhao, Jiayuan; Chi, Yuanlong (2017): Collagen Hydrolysates of Skin Shavings Prepared by Enzymatic Hydrolysis as a Natural Flocculant and Their Flocculating Property. In: *Applied biochemistry and biotechnology* 182 (1), S. 55–66. DOI: 10.1007/s12010-016-2310-6.
- Fu, Yu; Therkildsen, Margrethe; Aluko, Rotimi E.; Lametsch, René (2019): Exploration of collagen recovered from animal by-products as a precursor of bioactive peptides: Successes and challenges. In: *Critical reviews in food science and nutrition* 59 (13), S. 2011–2027. DOI: 10.1080/10408398.2018.1436038.
- Fujita, Koji; Roforth, Matthew M.; Demaray, Susan; McGregor, Ulrike; Kirmani, Salman; McCready, Louise K. et al. (2014): Effects of estrogen on bone mRNA levels of sclerostin

and other genes relevant to bone metabolism in postmenopausal women. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 99 (1), E81-8. DOI: 10.1210/jc.2013-3249.

Fuss, M.; Ehlers, E. M.; Russlies, M.; Rohwedel, J.; Behrens, P. (2000): Characteristics of human chondrocytes, osteoblasts and fibroblasts seeded onto a type I/III collagen sponge under different culture conditions. A light, scanning and transmission electron microscopy study. In: *Annals of anatomy = Anatomischer Anzeiger : official organ of the Anatomische Gesellschaft* 182 (4), S. 303–310. DOI: 10.1016/S0940-9602(00)80002-3.

Gao, Yongguang; Patil, Suryaji; Qian, Airon (2020): The Role of MicroRNAs in Bone Metabolism and Disease. In: *International Journal of Molecular Sciences* 21 (17). DOI: 10.3390/ijms21176081.

Gaur, Tripti; Lengner, Christopher J.; Hovhannisyan, Hayk; Bhat, Ramesh A.; Bodine, Peter V. N.; Komm, Barry S. et al. (2005): Canonical WNT signaling promotes osteogenesis by directly stimulating Runx2 gene expression. In: *The Journal of biological chemistry* 280 (39), S. 33132–33140. DOI: 10.1074/jbc.M500608200.

Gennari, L.; Becherini, L.; Mansani, R.; Masi, L.; Falchetti, A.; Morelli, A. et al. (1999): FokI polymorphism at translation initiation site of the vitamin D receptor gene predicts bone mineral density and vertebral fractures in postmenopausal Italian women. In: *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 14 (8), S. 1379–1386. DOI: 10.1359/jbmr.1999.14.8.1379.

Gennari, Luigi; Bilezikian, John P. (2013): Idiopathic osteoporosis in men. In: *Current osteoporosis reports* 11 (4), S. 286–298. DOI: 10.1007/s11914-013-0164-1.

Geoffroy, Valérie; Marty-Morieux, Caroline; Le Goupil, Nathalie; Clement-Lacroix, Phillippe; Terraz, Catherine; Frain, Monique et al. (2004): In vivo inhibition of osteoblastic metalloproteinases leads to increased trabecular bone mass. In: *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 19 (5), S. 811–822. DOI: 10.1359/jbmr.040119.

Giustina, A.; Bilezikian, J. P. (Hg.) (2018): *Vitamin D in Clinical Medicine*: S. Karger AG (Frontiers of Hormone Research).

Golchin, Negar; Frank, Scott H.; Vince, April; Isham, Lisa; Meropol, Sharon B. (2015): Polypharmacy in the elderly. In: *Journal of research in pharmacy practice* 4 (2), S. 85–88. DOI: 10.4103/2279-042X.155755.

Goltzman, David; Mannstadt, Michael; Marcocci, Claudio (2018): Physiology of the Calcium-Parathyroid Hormone-Vitamin D Axis. In: A. Giustina und J. P. Bilezikian (Hg.): Vitamin D in Clinical Medicine, Bd. 50: S. Karger AG (Frontiers of Hormone Research), S. 1–13.

Greenblatt, Matthew B.; Shim, Jae-Hyuck; Zou, Weiguo; Sitara, Despina; Schweitzer, Michelle; Hu, Dorothy et al. (2010): The p38 MAPK pathway is essential for skeletogenesis and bone homeostasis in mice. In: *The Journal of clinical investigation* 120 (7), S. 2457–2473. DOI: 10.1172/JCI42285.

Hadji, Peyman; Klein, Silvia; Gothe, Holger; Häussler, Bertram; Kless, Thomas; Schmidt, Torsten et al. (2013): The epidemiology of osteoporosis--Bone Evaluation Study (BEST): an analysis of routine health insurance data. In: *Deutsches Arzteblatt international* 110 (4), S. 52–57. DOI: 10.3238/arztebl.2013.0052.

Hallberg, Inger; Bachrach-Lindström, Margareta; Hammerby, Staffan; Toss, Göran; Ek, Anna-Christina (2009): Health-related quality of life after vertebral or hip fracture: a seven-year follow-up study. In: *BMC musculoskeletal disorders* 10, S. 135. DOI: 10.1186/1471-2474-10-135.

Hamada, Y.; Nagashima, Y.; Shiomi, K. (2001): Identification of collagen as a new fish allergen. In: *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 65 (2), S. 285–291. DOI: 10.1271/bbb.65.285.

Harada, Kana; Itoh, Hiromichi; Kawazoe, Yumi; Miyazaki, Shuichi; Doi, Kazuya; Kubo, Takayasu et al. (2013): Polyphosphate-mediated inhibition of tartrate-resistant acid phosphatase and suppression of bone resorption of osteoclasts. In: *PloS one* 8 (11), e78612. DOI: 10.1371/journal.pone.0078612.

Harris, M.; Nguyen, T. V.; Howard, G. M.; Kelly, P. J.; Eisman, J. A. (1998): Genetic and environmental correlations between bone formation and bone mineral density: a twin study. In: *Bone* 22 (2), S. 141–145. DOI: 10.1016/s8756-3282(97)00252-4.

Hatori, Kouki; Sasano, Yasuyuki; Takahashi, Ichiro; Kamakura, Shinji; Kagayama, Manabu; Sasaki, Keiichi (2004): Osteoblasts and osteocytes express MMP2 and -8 and TIMP1, -2, and -3 along with extracellular matrix molecules during appositional bone formation. In: *The anatomical record. Part A, Discoveries in molecular, cellular, and evolutionary biology* 277 (2), S. 262–271. DOI: 10.1002/ar.a.20007.

Haussler, Mark R.; Whitfield, G. Kerr; Kaneko, Ichiro; Haussler, Carol A.; Hsieh, David; Hsieh, Jui-Cheng; Jurutka, Peter W. (2013): Molecular mechanisms of vitamin D action. In: *Calcified tissue international* 92 (2), S. 77–98. DOI: 10.1007/s00223-012-9619-0.

Heidrich, D. D.; Steckelbroeck, S.; Klingmuller, D. (2001): Inhibition of human cytochrome P450 aromatase activity by butyltins. In: *Steroids* 66 (10), S. 763–769. DOI: 10.1016/s0039-128x(01)00108-8.

Hema, G. S.; Joshy, C. G.; Shyni, K.; Chatterjee, Niladri S.; Ninan, George; Mathew, Suseela (2017): Optimization of process parameters for the production of collagen peptides from fish skin (*Epinephelus malabaricus*) using response surface methodology and its characterization. In: *Journal of food science and technology* 54 (2), S. 488–496. DOI: 10.1007/s13197-017-2490-2.

Hernandez, C. J.; Hazelwood, S. J.; Martin, R. B. (1999): The relationship between basic multicellular unit activation and origination in cancellous bone. In: *Bone* 25 (5), S. 585–587. DOI: 10.1016/s8756-3282(99)00201-x.

Hernandez-de Sosa, Nerea; Athanasiadis, Georgios; Malouf, Jorge; Laiz, Ana; Marin, Ana; Herrera, Silvia et al. (2014): Heritability of bone mineral density in a multivariate family-based study. In: *Calcified tissue international* 94 (6), S. 590–596. DOI: 10.1007/s00223-014-9852-9.

Hodge, Jason M.; Collier, Fiona M.; Pavlos, Nathan J.; Kirkland, Mark A.; Nicholson, Geoffrey C. (2011): M-CSF potently augments RANKL-induced resorption activation in mature human osteoclasts. In: *PloS one* 6 (6), e21462. DOI: 10.1371/journal.pone.0021462.

Hong, Hui; Fan, Hongbing; Roy, Bimol C.; Wu, Jianping (2021): Amylase enhances production of low molecular weight collagen peptides from the skin of spent hen, bovine, porcine, and tilapia. In: *Food chemistry* 352, S. 129355. DOI: 10.1016/j.foodchem.2021.129355.

Hubbard, Gary P.; Elia, Marinos; Holdoway, Anne; Stratton, Rebecca J. (2012): A systematic review of compliance to oral nutritional supplements. In: *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)* 31 (3), S. 293–312. DOI: 10.1016/j.clnu.2011.11.020.

Hübel, Christopher; Yilmaz, Zeynep; Schaumberg, Katherine E.; Breithaupt, Lauren; Hunjan, Avina; Horne, Eleanor et al. (2019): Body composition in anorexia nervosa: Meta-

analysis and meta-regression of cross-sectional and longitudinal studies. In: *The International journal of eating disorders* 52 (11), S. 1205–1223. DOI: 10.1002/eat.23158.

Hyc, Anna; Moskalewski, Stanislaw; Osiecka-Iwan, Anna (2021): Growth factors in the initial stage of bone formation, analysis of their expression in chondrocytes from epiphyseal cartilage of rat costochondral junction. In: *Folia histochemica et cytobiologica* 59 (3), S. 178–186. DOI: 10.5603/FHC.a2021.0017.

Isogai, Y.; Akatsu, T.; Ishizuya, T.; Yamaguchi, A.; Hori, M.; Takahashi, N.; Suda, T. (1996): Parathyroid hormone regulates osteoblast differentiation positively or negatively depending on the differentiation stages. In: *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 11 (10), S. 1384–1393. DOI: 10.1002/jbmr.5650111003.

Jiang, Yi; Liao, Liyan; Li, Jina; Wang, Larry; Xie, Zhongjian (2020): Older Age Is Associated with Decreased Levels of VDR, CYP27B1, and CYP24A1 and Increased Levels of PTH in Human Parathyroid Glands. In: *International journal of endocrinology* 2020, S. 7257913. DOI: 10.1155/2020/7257913.

Jimi, Eijiro; Hirata, Shizu; Osawa, Kenji; Terashita, Masamichi; Kitamura, Chiaki; Fukushima, Hidefumi (2012): The Current and Future Therapies of Bone Regeneration to Repair Bone Defects. In: *International Journal of Dentistry* 2012, S. 1–7. DOI: 10.1155/2012/148261.

Jing, Dian; Hao, Jin; Shen, Yu; Tang, Ge; Li, Mei-Le; Huang, Shi-Hu; Zhao, Zhi-He (2015): The role of microRNAs in bone remodeling. In: *International journal of oral science* 7 (3), S. 131–143. DOI: 10.1038/ijos.2015.22.

Kanazawa, Kiyoshi; Kudo, Akira (2005): TRAF2 is essential for TNF-alpha-induced osteoclastogenesis. In: *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 20 (5), S. 840–847. DOI: 10.1359/JBMR.041225.

Kang, Jung Yun; Kang, Namju; Yang, Yu-Mi; Hong, Jeong Hee; Shin, Dong Min (2020): The Role of Ca²⁺-NFATc1 Signaling and Its Modulation on Osteoclastogenesis. In: *International Journal of Molecular Sciences* 21 (10). DOI: 10.3390/ijms21103646.

Kantor, Seth M.; Ossa, Kristen S.; Hoshaw-Woodard, Stacy L.; Lemeshow, Stanley (2004): Height loss and osteoporosis of the hip. In: *Journal of clinical densitometry : the official*

journal of the International Society for Clinical Densitometry 7 (1), S. 65–70. DOI: 10.1385/jcd:7:1:65.

Kaur, Kulwinder; Das, Sanskrita; Ghosh, Sourabh (2019): Regulation of Human Osteoblast-to-Osteocyte Differentiation by Direct-Write 3D Microperiodic Hydroxyapatite Scaffolds. In: ACS Omega 4 (1), S. 1504–1515. DOI: 10.1021/acsomega.8b03272.

Khosla, Sundeep; Amin, Shreyasee; Orwoll, Eric (2008): Osteoporosis in men. In: Endocrine reviews 29 (4), S. 441–464. DOI: 10.1210/er.2008-0002.

Khosla, Sundeep; Oursler, Merry Jo; Monroe, David G. (2012): Estrogen and the skeleton. In: Trends in endocrinology and metabolism: TEM 23 (11), S. 576–581. DOI: 10.1016/j.tem.2012.03.008.

Kim, Do-Un; Chung, Hee-Chul; Choi, Jia; Sakai, Yasuo; Lee, Boo-Yong (2018): Oral Intake of Low-Molecular-Weight Collagen Peptide Improves Hydration, Elasticity, and Wrinkling in Human Skin: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study. In: Nutrients 10 (7). DOI: 10.3390/nu10070826.

Kim, Hye Kyung; Kim, Myung-Gyou; Leem, Kang-Hyun (2014): Collagen hydrolysates increased osteogenic gene expressions via a MAPK signaling pathway in MG-63 human osteoblasts. In: Food & function 5 (3), S. 573–578. DOI: 10.1039/c3fo60509d.

Kim, Jeong Hwan; Liu, Xing; Wang, Jinhua; Chen, Xiang; Zhang, Hongyu; Kim, Stephanie H. et al. (2013): Wnt signaling in bone formation and its therapeutic potential for bone diseases. In: Therapeutic advances in musculoskeletal disease 5 (1), S. 13–31. DOI: 10.1177/1759720X12466608.

Kitazawa, Riko; Haraguchi, Ryuma; Kohara, Yukihiro; Kitazawa, Sohei (2021): RANK-NFATc1 signaling forms positive feedback loop on rank gene expression via functional NFATc1 responsive element in rank gene promoter. In: Biochemical and biophysical research communications 572, S. 86–91. DOI: 10.1016/j.bbrc.2021.07.100.

Kleinnijenhuis, Anne J.; van Holthoon, Frédérique L.; Maathuis, Annet J. H.; Vanhoecke, Barbara; Prawitt, Janne; Wauquier, Fabien; Wittrant, Yohann (2020): Non-targeted and targeted analysis of collagen hydrolysates during the course of digestion and absorption. In: Analytical and bioanalytical chemistry 412 (4), S. 973–982. DOI: 10.1007/s00216-019-02323-x.

König, Daniel; Oesser, Steffen; Scharla, Stephan; Zdzieblik, Denise; Gollhofer, Albert (2018): Specific Collagen Peptides Improve Bone Mineral Density and Bone Markers in Postmenopausal Women-A Randomized Controlled Study. In: *Nutrients* 10 (1). DOI: 10.3390/nu10010097.

Koutsoumanis, Konstantinos; Allende, Ana; Bolton, Declan Joseph; Bover-Cid, Sara; Chemaly, Marianne; Davies, Robert et al. (2020): Potential BSE risk posed by the use of ruminant collagen and gelatine in feed for non-ruminant farmed animals. In: *EFSA journal. European Food Safety Authority* 18 (10), e06267. DOI: 10.2903/j.efsa.2020.6267.

Kramer, Ina; Halleux, Christine; Keller, Hansjoerg; Pegurri, Marco; Gooi, Jonathan H.; Weber, Patricia Brander et al. (2010): Osteocyte Wnt/beta-catenin signaling is required for normal bone homeostasis. In: *Molecular and cellular biology* 30 (12), S. 3071–3085. DOI: 10.1128/MCB.01428-09.

Kumar, Anuj; Elavarasan, Krishnamoorthy; Hanjabam, Mandakini Devi; Binsi, P. K.; Mohan, C. O.; Zynudheen, A. A.; Kumar K, Ashok (2019): Marine collagen peptide as a fortificant for biscuit: Effects on biscuit attributes. In: *LWT* 109, S. 450–456. DOI: 10.1016/j.lwt.2019.04.052.

Kumar, Suresh; Sugihara, Fumihito; Suzuki, Keiji; Inoue, Naoki; Venkateswarathirukumara, Sriraam (2015): A double-blind, placebo-controlled, randomised, clinical study on the effectiveness of collagen peptide on osteoarthritis. In: *Journal of the science of food and agriculture* 95 (4), S. 702–707. DOI: 10.1002/jsfa.6752.

Kuo, Chia-Hsiao; Chen, Jiann-Yeu; Chen, Chuan-Mu; Huang, Cian Wei; Liou, Ying-Ming (2021): Effects of varying gelatin coating concentrations on RANKL induced osteoclastogenesis. In: *Experimental cell research* 400 (2), S. 112509. DOI: 10.1016/j.yexcr.2021.112509.

Kwan Tat, Steeve; Padrines, Marc; Théoleyre, Sandrine; Heymann, Dominique; Fortun, Yannick (2004): IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. In: *Cytokine & growth factor reviews* 15 (1), S. 49–60. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2003.10.005.

Lacey, D. L.; Tan, H. L.; Lu, J.; Kaufman, S.; Van, G.; Qiu, W. et al. (2000): Osteoprotegerin ligand modulates murine osteoclast survival in vitro and in vivo. In: *The American journal of pathology* 157 (2), S. 435–448. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)64556-7.

Laet, C. de; Kanis, J. A.; Odén, A.; Johanson, H.; Johnell, O.; Delmas, P. et al. (2005): Body mass index as a predictor of fracture risk: a meta-analysis. In: *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* 16 (11), S. 1330–1338. DOI: 10.1007/s00198-005-1863-y.

Lampropoulou-Adamidou, Kalliopi; Karlafti, Efthymia; Argyrou, Chrysoula; Makris, Konstantinos; Trovas, George; Dontas, Ismene A. et al. (2022): Effect of Calcium and Vitamin D Supplementation With and Without Collagen Peptides on Volumetric and Areal Bone Mineral Density, Bone Geometry and Bone Turnover in Postmenopausal Women With Osteopenia. In: *Journal of clinical densitometry : the official journal of the International Society for Clinical Densitometry* 25 (3), S. 357–372. DOI: 10.1016/j.jocd.2021.11.011.

Lau, Esther; Al-Dujaili, Saja; Guenther, Axel; Liu, Dawei; Wang, Liyun; You, Lidan (2010): Effect of low-magnitude, high-frequency vibration on osteocytes in the regulation of osteoclasts. In: *Bone* 46 (6), S. 1508–1515. DOI: 10.1016/j.bone.2010.02.031.

Lee, Miyeong; Kim, Eunyoung; Ahn, Hyunwoo; Son, Seokjun; Lee, Hyunjun (2023): Oral intake of collagen peptide NS improves hydration, elasticity, desquamation, and wrinkling in human skin: a randomized, double-blinded, placebo-controlled study. In: *Food & function* 14 (7), S. 3196–3207. DOI: 10.1039/D2FO02958H.

León-López, Arely; Fuentes-Jiménez, Lucía; Hernández-Fuentes, Alma Delia; Campos-Montiel, Rafael G.; Aguirre-Álvarez, Gabriel (2019): Hydrolysed Collagen from Sheepskins as a Source of Functional Peptides with Antioxidant Activity. In: *International Journal of Molecular Sciences* 20 (16). DOI: 10.3390/ijms20163931.

Li, J-Y; Li, X-Y; Li, M.; Zhang, G-K; Ma, F-L; Liu, Z-M et al. (2005): Decline of serum levels of free testosterone in aging healthy Chinese men. In: *The aging male : the official journal of the International Society for the Study of the Aging Male* 8 (3-4), S. 203–206. DOI: 10.1080/13685530500356010.

Li, Na; Zhang, Min; Drummen, Gregor P. C.; Zhao, Yu; Tan, Yin Fen; Luo, Su; Qu, Xiao Bo (2016): Sika Deer Antler Collagen Type I-Accelerated Osteogenesis in Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells via the Smad Pathway. In: *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2016, S. 1–13. DOI: 10.1155/2016/2109204.

- Li, Yulong; Qiao, Congde; Shi, Lei; Jiang, Qingwei; Li, Tianduo (2014): Viscosity of Collagen Solutions: Influence of Concentration, Temperature, Adsorption, and Role of Intermolecular Interactions. In: *Journal of Macromolecular Science, Part B* 53 (5), S. 893–901. DOI: 10.1080/00222348.2013.852059.
- Li, Zhijie; Liu, Jie; Zhang, Luan; Xiao, Yuelong; Tang, Keyong; Zheng, Xuejing; Pei, Ying (2020): Structure and stability analyses of collagen hydrolysate coacervates triggered by ethanol in aqueous solution. In: *J Appl Polym Sci* 137 (48), S. 49600. DOI: 10.1002/app.49600.
- Liang, Jiang; Pei, Xin-Rong; Zhang, Zhao-Feng; Wang, Nan; Wang, Jun-Bo; Li, Yong (2012): A chronic oral toxicity study of marine collagen peptides preparation from chum salmon (*Oncorhynchus keta*) skin using Sprague-Dawley rat. In: *Marine drugs* 10 (1), S. 20–34. DOI: 10.3390/md10010020.
- Liang, Wenbin; Chikritzhs, Tanya (2016): The Effect of Age on Fracture Risk: A Population-Based Cohort Study. In: *Journal of aging research* 2016, S. 5071438. DOI: 10.1155/2016/5071438.
- Liao, Xiao-Bo; Zhang, Zhi-Yuan; Yuan, Ke; Liu, Yuan; Feng, Xiang; Cui, Rong-Rong et al. (2013): MiR-133a modulates osteogenic differentiation of vascular smooth muscle cells. In: *Endocrinology* 154 (9), S. 3344–3352. DOI: 10.1210/en.2012-2236.
- Liu, Chao; Sun, Jiao (2014): Potential application of hydrolyzed fish collagen for inducing the multidirectional differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells. In: *Biomacromolecules* 15 (1), S. 436–443. DOI: 10.1021/bm401780v.
- Liu, De-Bao; Sui, Cong; Wu, Ting-Ting; Wu, Lian-Zhong; Zhu, You-Yu; Ren, Zhen-Hua (2018): Association of Bone Morphogenetic Protein (BMP)/Smad Signaling Pathway with Fracture Healing and Osteogenic Ability in Senile Osteoporotic Fracture in Humans and Rats. In: *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research* 24, S. 4363–4371. DOI: 10.12659/MSM.905958.
- Liu, Feng; Wang, Wencheng; Xia, Yunqiu; Chen, Xuehong; Han, Yantao; Miao, Desen et al. (2020): Protection by collagen peptides from walleye pollock skin on bone formation via inhibition of oxidative stress. In: *Journal of King Saud University - Science* 32 (5), S. 2527–2533. DOI: 10.1016/j.jksus.2020.03.006.

- Liu, Haiying; Huang, Lu; Wang, Jing (2020): Effects of loach skin collagen peptides in reducing osteoporosis in mice. In: *Journal of Functional Foods* 75, S. 104228. DOI: 10.1016/j.jff.2020.104228.
- Liu, W.; Yang, L-H; Kong, X-C; An, L-K; Wang, R. (2015): Meta-analysis of osteoporosis: fracture risks, medication and treatment. In: *Minerva medica* 106 (4), S. 203–214.
- Liu, X.; Wu, H.; Byrne, M.; Krane, S.; Jaenisch, R. (1997): Type III collagen is crucial for collagen I fibrillogenesis and for normal cardiovascular development. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (5), S. 1852–1856. DOI: 10.1073/pnas.94.5.1852.
- Liu, Yongyi; Wang, Ning; Zhang, Shaokun; Liang, Qingwei (2018): Autophagy protects bone marrow mesenchymal stem cells from palmitate induced apoptosis through the ROS JNK/p38 MAPK signaling pathways. In: *Molecular medicine reports* 18 (2), S. 1485–1494. DOI: 10.3892/mmr.2018.9100.
- Long, C. G.; Braswell, E.; Zhu, D.; Apigo, J.; Baum, J.; Brodsky, B. (1993): Characterization of collagen-like peptides containing interruptions in the repeating Gly-X-Y sequence. In: *Biochemistry* 32 (43), S. 11688–11695. DOI: 10.1021/bi00094a027.
- Maïmoun, Laurent; Fattal, Charles; Sultan, Charles (2011): Bone remodeling and calcium homeostasis in patients with spinal cord injury: a review. In: *Metabolism: clinical and experimental* 60 (12), S. 1655–1663. DOI: 10.1016/j.metabol.2011.04.005.
- Marcus, R.; Madvig, P.; Young, G. (1984): Age-related changes in parathyroid hormone and parathyroid hormone action in normal humans. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 58 (2), S. 223–230. DOI: 10.1210/jcem-58-2-223.
- Mathew-Steiner, Shomita S.; Roy, Sashwati; Sen, Chandan K. (2021): Collagen in Wound Healing. In: *Bioengineering* (Basel, Switzerland) 8 (5). DOI: 10.3390/bioengineering8050063.
- Matsumoto, Masahito; Kogawa, Masakazu; Wada, Seiki; Takayanagi, Hiroshi; Tsujimoto, Masafumi; Katayama, Shigehiro et al. (2004): Essential role of p38 mitogen-activated protein kinase in cathepsin K gene expression during osteoclastogenesis through association of NFATc1 and PU.1. In: *The Journal of biological chemistry* 279 (44), S. 45969–45979. DOI: 10.1074/jbc.M408795200.

McKenzie, R.; Reynolds, J. C.; O'Fallon, A.; Dale, J.; Deloria, M.; Blackwelder, W.; Straus, S. E. (2000): Decreased bone mineral density during low dose glucocorticoid administration in a randomized, placebo controlled trial. In: *The Journal of rheumatology* 27 (9), S. 2222–2226.

Melton, L. J.; Atkinson, E. J.; O'Connor, M. K.; O'Fallon, W. M.; Riggs, B. L. (1998): Bone density and fracture risk in men. In: *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 13 (12), S. 1915–1923. DOI: 10.1359/jbmr.1998.13.12.1915.

Merkel, J. R.; DiPaolo, B. R.; Hallock, G. G.; Rice, D. C. (1988): Type I and type III collagen content of healing wounds in fetal and adult rats. In: *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.) 187 (4), S. 493–497. DOI: 10.3181/00379727-187-42694.

Minguell, J. J.; Erices, A.; Conget, P. (2001): Mesenchymal stem cells. In: *Experimental biology and medicine* (Maywood, N.J.) 226 (6), S. 507–520. DOI: 10.1177/153537020122600603.

Mödder, Ulrike I.; Roforth, Matthew M.; Hoey, Kelley; McCready, Louise K.; Peterson, James M.; Monroe, David G. et al. (2011): Effects of estrogen on osteoprogenitor cells and cytokines/bone-regulatory factors in postmenopausal women. In: *Bone* 49 (2), S. 202–207. DOI: 10.1016/j.bone.2011.04.015.

Mohammad, Abdul Wahab; Suhimi, Norhazwani Mohd.; Aziz, Abdul Ghani Kumar Ab; Jahim, Jamaliah Md. (2014): Process for Production of Hydrolysed Collagen from Agriculture Resources: Potential for Further Development. In: *J. of Applied Sciences* 14 (12), S. 1319–1323. DOI: 10.3923/jas.2014.1319.1323.

Monroe, David G.; Getz, Barbara J.; Johnsen, Steven A.; Riggs, B. Lawrence; Khosla, Sundeep; Spelsberg, Thomas C. (2003): Estrogen receptor isoform-specific regulation of endogenous gene expression in human osteoblastic cell lines expressing either ERalpha or ERbeta. In: *Journal of cellular biochemistry* 90 (2), S. 315–326. DOI: 10.1002/jcb.10633.

Morin, Suzanne N.; Berger, Claudie; Papaioannou, Alexandra; Cheung, Angela M.; Rahme, Elham; Leslie, William D.; Goltzman, David (2022): Race/ethnic differences in the prevalence of osteoporosis, falls and fractures: a cross-sectional analysis of the Canadian Longitudinal Study on Aging. In: *Osteoporosis international : a journal established as result*

of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA 33 (12), S. 2637–2648. DOI: 10.1007/s00198-022-06539-z.

Mulari, M. T. K.; Qu, Q.; Härkönen, P. L.; Väänänen, H. K. (2004): Osteoblast-like cells complete osteoclastic bone resorption and form new mineralized bone matrix in vitro. In: *Calcified tissue international* 75 (3), S. 253–261. DOI: 10.1007/s00223-004-0172-3.

Mullins, R. J.; Richards, C.; Walker, T. (1996): Allergic reactions to oral, surgical and topical bovine collagen. Anaphylactic risk for surgeons. In: *Australian and New Zealand journal of ophthalmology* 24 (3), S. 257–260. DOI: 10.1111/j.1442-9071.1996.tb01589.x.

Na, Woojin; Kang, Min-Kyung; Park, Sin-Hye; Kim, Dong Yeon; Oh, Su Yeon; Oh, Moon-Sik et al. (2021): Aesculetin Accelerates Osteoblast Differentiation and Matrix-Vesicle-Mediated Mineralization. In: *International Journal of Molecular Sciences* 22 (22). DOI: 10.3390/ijms222212391.

Nakamura, I.; Pilkington, M. F.; Lakkakorpi, P. T.; Lipfert, L.; Sims, S. M.; Dixon, S. J. et al. (1999): Role of alpha(v)beta(3) integrin in osteoclast migration and formation of the sealing zone. In: *Journal of cell science* 112 (Pt 22), S. 3985–3993. DOI: 10.1242/jcs.112.22.3985.

Nakamura, Takashi; Imai, Yuuki; Matsumoto, Takahiro; Sato, Shingo; Takeuchi, Kazusane; Igarashi, Katsuhide et al. (2007): Estrogen prevents bone loss via estrogen receptor alpha and induction of Fas ligand in osteoclasts. In: *Cell* 130 (5), S. 811–823. DOI: 10.1016/j.cell.2007.07.025.

Nakao, A.; Imamura, T.; Souchelnytskyi, S.; Kawabata, M.; Ishisaki, A.; Oeda, E. et al. (1997): TGF-beta receptor-mediated signalling through Smad2, Smad3 and Smad4. In: *The EMBO journal* 16 (17), S. 5353–5362. DOI: 10.1093/emboj/16.17.5353.

Nayak, Smita; Olkin, Ingram; Liu, Hau; Grabe, Michael; Gould, Michael K.; Allen, I. Elaine et al. (2006): Meta-analysis: accuracy of quantitative ultrasound for identifying patients with osteoporosis. In: *Annals of internal medicine* 144 (11), S. 832–841. DOI: 10.7326/0003-4819-144-11-200606060-00009.

N'deh, Kaudjhis Patrick Ulrich; Yoo, Han-Seok; Chung, Kang-Hyun; Lee, Kwon-Jai; Kim, Dong-Hee; Yoon, Jin A.; An, Jeung Hee (2020): Collagen Extract Derived from Yeonsan

Ogye Chicken Increases Bone Microarchitecture by Suppressing the RANKL/OPG Ratio via the JNK Signaling Pathway. In: *Nutrients* 12 (7). DOI: 10.3390/nu12071967.

Ng Tang Fui, Mark; Hoermann, Rudolf; Bracken, Karen; Handelsman, David J.; Inder, Warrick J.; Stuckey, Bronwyn G. A. et al. (2021): Effect of Testosterone Treatment on Bone Microarchitecture and Bone Mineral Density in Men: A 2-Year RCT. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 106 (8), e3143-e3158. DOI: 10.1210/clinem/dgab149.

Nguyen, T. V.; Kelly, P. J.; Sambrook, P. N.; Gilbert, C.; Pocock, N. A.; Eisman, J. A. (1994): Lifestyle factors and bone density in the elderly: implications for osteoporosis prevention. In: *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 9 (9), S. 1339–1346. DOI: 10.1002/jbmr.5650090904.

Obata, T.; Brown, G. E.; Yaffe, M. B. (2000): MAP kinase pathways activated by stress: the p38 MAPK pathway. In: *Critical care medicine* 28 (4 Suppl), N67-77. DOI: 10.1097/00003246-200004001-00008.

O'Bryan, Steven J.; Giuliano, Catherine; Woessner, Mary N.; Vogrin, Sara; Smith, Cassandra; Duque, Gustavo; Levinger, Itamar (2022): Progressive Resistance Training for Concomitant Increases in Muscle Strength and Bone Mineral Density in Older Adults: A Systematic Review and Meta-Analysis. In: *Sports medicine (Auckland, N.Z.)* 52 (8), S. 1939–1960. DOI: 10.1007/s40279-022-01675-2.

Oesser, S.; Adam, M.; Babel, W.; Seifert, J. (1999): Oral administration of (14)C labeled gelatin hydrolysate leads to an accumulation of radioactivity in cartilage of mice (C57/BL). In: *The Journal of nutrition* 129 (10), S. 1891–1895. DOI: 10.1093/jn/129.10.1891.

Okumura, Motoaki; Ohgushi, Hajime; Dohi, Yoshiko; Katuda, Toshiya; Tamai, Susumu; Koerten, Henk K.; Tabata, Shiro (1997): Osteoblastic phenotype expression on the surface of hydroxyapatite ceramics. In: *J. Biomed. Mater. Res.* 37 (1), S. 122–129. DOI: 10.1002/(SICI)1097-4636(199710)37:1<122::AID-JBM15>3.0.CO;2-I.

Opinion of the Scientific Panel on biological hazards (BIOHAZ) on the safety of collagen and a processing method for the production of collagen (2005). In: *EFSA Journal* 3 (3), S. 174.

Orimo, H.; Hayashi, Y.; Fukunaga, M.; Sone, T.; Fujiwara, S.; Shiraki, M. et al. (2001): Diagnostic criteria for primary osteoporosis: year 2000 revision. In: *Journal of bone and mineral metabolism* 19 (6), S. 331–337. DOI: 10.1007/s007740170001.

Ortuño, María José; Ruiz-Gaspà, Silvia; Rodríguez-Carballo, Edgardo; Susperregui, Antonio R. G.; Bartrons, Ramon; Rosa, José Luis; Ventura, Francesc (2010): p38 regulates expression of osteoblast-specific genes by phosphorylation of osterix. In: *The Journal of biological chemistry* 285 (42), S. 31985–31994. DOI: 10.1074/jbc.M110.123612.

Osawa, Yoshihiro; Mizushige, Takafumi; Jinno, Sayuri; Sugihara, Fumihito; Inoue, Naoki; Tanaka, Hideyuki; Kabuyama, Yukihito (2018): Absorption and metabolism of orally administered collagen hydrolysates evaluated by the vascularly perfused rat intestine and liver in situ. In: *Biomedical research (Tokyo, Japan)* 39 (1), S. 1–11. DOI: 10.2220/biomedres.39.1.

Overlie, I.; Moen, M. H.; Morkrid, L.; Skjaeraasen, J. S.; Holte, A. (1999): The endocrine transition around menopause--a five years prospective study with profiles of gonadotropines, estrogens, androgens and SHBG among healthy women. In: *Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica* 78 (7), S. 642–647.

Pacifici, R.; Vannice, J. L.; Rifas, L.; Kimble, R. B. (1993): Monocytic secretion of interleukin-1 receptor antagonist in normal and osteoporotic women: effects of menopause and estrogen/progesterone therapy. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 77 (5), S. 1135–1141. DOI: 10.1210/jcem.77.5.8077304.

Peris, P.; Guañabens, N.; Monegal, A.; Suris, X.; Alvarez, L.; Martinez de Osaba, M. J. et al. (1995): Aetiology and presenting symptoms in male osteoporosis. In: *British journal of rheumatology* 34 (10), S. 936–941. DOI: 10.1093/rheumatology/34.10.936.

Pettway, Glenda J.; Meganck, Jeffrey A.; Koh, Amy J.; Keller, Evan T.; Goldstein, Steven A.; McCauley, Laurie K. (2008): Parathyroid hormone mediates bone growth through the regulation of osteoblast proliferation and differentiation. In: *Bone* 42 (4), S. 806–818. DOI: 10.1016/j.bone.2007.11.017.

Plotkin, L. I.; Weinstein, R. S.; Parfitt, A. M.; Roberson, P. K.; Manolagas, S. C.; Bellido, T. (1999): Prevention of osteocyte and osteoblast apoptosis by bisphosphonates and calcitonin. In: *The Journal of clinical investigation* 104 (10), S. 1363–1374. DOI: 10.1172/JCI6800.

- Proksch, E.; Schunck, M.; Zague, V.; Segger, D.; Degwert, J.; Oesser, S. (2014): Oral intake of specific bioactive collagen peptides reduces skin wrinkles and increases dermal matrix synthesis. In: *Skin pharmacology and physiology* 27 (3), S. 113–119. DOI: 10.1159/000355523.
- Qi, Yingying; Zhou, Daoning; Kessler, Julian L.; Qiu, Rongmao; Yu, S. Michael; Li, Gang et al. (2022): Terminal repeats impact collagen triple-helix stability through hydrogen bonding. In: *Chemical science* 13 (42), S. 12567–12576. DOI: 10.1039/d2sc03666e.
- Qin, Shuyan; Zhou, Wei; Liu, Shaoying; Chen, Puxiang; Wu, Hongjin (2015): Icaritin stimulates the proliferation of rat bone mesenchymal stem cells via ERK and p38 MAPK signaling. In: *International Journal of Clinical and Experimental Medicine* 8 (5), S. 7125–7133.
- Quinn, J. M.; Itoh, K.; Udagawa, N.; Hausler, K.; Yasuda, H.; Shima, N. et al. (2001): Transforming growth factor beta affects osteoclast differentiation via direct and indirect actions. In: *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 16 (10), S. 1787–1794. DOI: 10.1359/jbmr.2001.16.10.1787.
- Rangaswami, Hema; Schwappacher, Raphaela; Tran, Trish; Chan, Geraldine C.; Zhuang, Shunhui; Boss, Gerry R.; Pilz, Renate B. (2012): Protein kinase G and focal adhesion kinase converge on Src/Akt/ β -catenin signaling module in osteoblast mechanotransduction. In: *The Journal of biological chemistry* 287 (25), S. 21509–21519. DOI: 10.1074/jbc.M112.347245.
- Rasheeda, K.; Samyuktha, D.; Fathima, N. Nishad (2019): Self-association of type I collagen directed by thymoquinone through alteration of molecular forces. In: *International journal of biological macromolecules* 140, S. 614–620. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.08.190.
- Ravn, P.; Cizza, G.; Bjarnason, N. H.; Thompson, D.; Daley, M.; Wasnich, R. D. et al. (1999): Low body mass index is an important risk factor for low bone mass and increased bone loss in early postmenopausal women. Early Postmenopausal Intervention Cohort (EPIC) study group. In: *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 14 (9), S. 1622–1627. DOI: 10.1359/jbmr.1999.14.9.1622.
- Reid, Ian R.; Bristow, Sarah M. (2020): Calcium and Bone. In: *Handbook of experimental pharmacology* 262, S. 259–280. DOI: 10.1007/164_2019_324.

- Rho, J. Y.; Kuhn-Spearing, L.; Zioupos, P. (1998): Mechanical properties and the hierarchical structure of bone. In: *Medical engineering & physics* 20 (2), S. 92–102. DOI: 10.1016/S1350-4533(98)00007-1.
- Riggs, B. L.; Wahner, H. W.; Seeman, E.; Offord, K. P.; Dunn, W. L.; Mazess, R. B. et al. (1982): Changes in bone mineral density of the proximal femur and spine with aging. Differences between the postmenopausal and senile osteoporosis syndromes. In: *The Journal of clinical investigation* 70 (4), S. 716–723. DOI: 10.1172/JCI110667.
- Robling, Alexander G.; Castillo, Alesha B.; Turner, Charles H. (2006): Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling. In: *Annual review of biomedical engineering* 8, S. 455–498. DOI: 10.1146/annurev.bioeng.8.061505.095721.
- Robling, Alexander G.; Niziolek, Paul J.; Baldrige, Lee A.; Condon, Keith W.; Allen, Matthew R.; Alam, Imranul et al. (2008): Mechanical stimulation of bone in vivo reduces osteocyte expression of Sost/sclerostin. In: *The Journal of biological chemistry* 283 (9), S. 5866–5875. DOI: 10.1074/jbc.m705092200.
- Rohm, Florian; Skurk, Thomas; Daniel, Hannelore; Spanier, Britta (2019): Appearance of Di- and Tripeptides in Human Plasma after a Protein Meal Does Not Correlate with PEPT1 Substrate Selectivity. In: *Molecular nutrition & food research* 63 (5), e1801094. DOI: 10.1002/mnfr.201801094.
- Rossini, M.; Adami, S.; Bertoldo, F.; Diacinti, D.; Gatti, D.; Giannini, S. et al. (2016): Guidelines for the diagnosis, prevention and management of osteoporosis. In: *Reumatismo* 68 (1), S. 1–39. DOI: 10.4081/reumatismo.2016.870.
- Rossini, Maurizio; Gatti, Davide; Adami, Silvano (2013): Involvement of WNT/ β -catenin signaling in the treatment of osteoporosis. In: *Calcified tissue international* 93 (2), S. 121–132. DOI: 10.1007/s00223-013-9749.z.
- Roubenoff, R.; Harris, T. B.; Abad, L. W.; Wilson, P. W.; Dallal, G. E.; Dinarello, C. A. (1998): Monocyte cytokine production in an elderly population: effect of age and inflammation. In: *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences* 53 (1), M20-6. DOI: 10.1093/gerona/53A.1.M20.
- Sakamoto, Hiroshi; Zhang, Xiu-Qin; Suenobu, Souichi; Ohbo, Kazuyuki; Ogawa, Minetaro; Suda, Toshio (2004): Cell adhesion to ephrinb2 is induced by EphB4 independently of its

kinase activity. In: *Biochemical and biophysical research communications* 321 (3), S. 681–687. DOI: 10.1016/j.bbrc.2004.07.016.

Sanz, L.; Diaz-Meco, M. T.; Nakano, H.; Moscat, J. (2000): The atypical PKC-interacting protein p62 channels NF-kappaB activation by the IL-1-TRAF6 pathway. In: *The EMBO journal* 19 (7), S. 1576–1586. DOI: 10.1093/emboj/19.7.1576.

SCHMIDT, Michele Mantelli; Da FONTOURA, Andrine Menna; VIDAL, Alessandra Roseline; DORNELLES, Rosa Cristina Prestes; KUBOTA, Ernesto Hashime; MELLO, Renius de Oliveira et al. (2020): Characterization of hydrolysates of collagen from mechanically separated chicken meat residue. In: *Food Sci. Technol* 40 (suppl 1), S. 355–362. DOI: 10.1590/fst.14819.

Schuijers, Jurian; Mokry, Michal; Hatzis, Pantelis; Cuppen, Edwin; Clevers, Hans (2014): Wnt-induced transcriptional activation is exclusively mediated by TCF/LEF. In: *The EMBO journal* 33 (2), S. 146–156. DOI: 10.1002/embj.201385358.

Scott, Alexander; Khan, Karim M.; Duronio, Vincent; Hart, David A. (2008): Mechanotransduction in human bone: in vitro cellular physiology that underpins bone changes with exercise. In: *Sports medicine (Auckland, N.Z.)* 38 (2), S. 139–160. DOI: 10.2165/00007256-200838020-00004.

Seo, Heung-Sik; Kim, Jun-Ho; Kim, Sang-Ho; Park, Myeong-Kyu; Seong, Nak-Won; Kang, Geun-Hee et al. (2023): Toxicity of a 90-day repeated oral dose of a collagen peptide derived from skate (*Raja kenosjei*) skin: a rat model study. In: *Toxicological research* 39 (3), S. 383–398. DOI: 10.1007/s43188-023-00175-3.

Shock, Everett L. (1992): Stability of peptides in high-temperature aqueous solutions. In: *Geochimica et Cosmochimica Acta* 56 (9), S. 3481–3491. DOI: 10.1016/0016-7037(92)90392-V.

Siddiqui, Jawed A.; Partridge, Nicola C. (2016): Physiological Bone Remodeling: Systemic Regulation and Growth Factor Involvement. In: *Physiology (Bethesda, Md.)* 31 (3), S. 233–245. DOI: 10.1152/physiol.00061.2014.

Simonet, W. S.; Lacey, D. L.; Dunstan, C. R.; Kelley, M.; Chang, M. S.; Lüthy, R. et al. (1997): Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. In: *Cell* 89 (2), S. 309–319. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)80209-3.

- Slack, J. L.; Liska, D. J.; Bornstein, P. (1993): Regulation of expression of the type I collagen genes. In: *American journal of medical genetics* 45 (2), S. 140–151. DOI: 10.1002/ajmg.1320450203.
- Slemenda, C. W.; Christian, J. C.; Williams, C. J.; Norton, J. A.; Johnston, C. C. (1991): Genetic determinants of bone mass in adult women: a reevaluation of the twin model and the potential importance of gene interaction on heritability estimates. In: *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 6 (6), S. 561–567. DOI: 10.1002/jbmr.5650060606.
- Smith, David E.; Cléménçon, Benjamin; Hediger, Matthias A. (2013): Proton-coupled oligopeptide transporter family SLC15: physiological, pharmacological and pathological implications. In: *Molecular aspects of medicine* 34 (2-3), S. 323–336. DOI: 10.1016/j.mam.2012.11.003.
- Song, Buer; Estrada, Kristine D.; Lyons, Karen M. (2009): Smad signaling in skeletal development and regeneration. In: *Cytokine & growth factor reviews* 20 (5-6), S. 379–388. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2009.10.010.
- Song, Hongdong; Zhang, Siqi; Zhang, Ling; Li, Bo (2019): Ingestion of collagen peptides prevents bone loss and improves bone microarchitecture in chronologically aged mice. In: *Journal of Functional Foods* 52, S. 1–7. DOI: 10.1016/j.jff.2018.10.026.
- Song, Yuanyuan; Zhang, Yingying; Qu, Qingli; Zhang, Xiaoli; Lu, Tao; Xu, Jianhua et al. (2023): Biomaterials based on hyaluronic acid, collagen and peptides for three-dimensional cell culture and their application in stem cell differentiation. In: *International journal of biological macromolecules* 226, S. 14–36. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2022.11.213.
- Souchelnytskyi, S.; Rönnstrand, L.; Heldin, C. H.; Dijke, P. ten (2001): Phosphorylation of Smad signaling proteins by receptor serine/threonine kinases. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 124, S. 107–120. DOI: 10.1385/1-59259-059-4:107.
- Sousa, Samara C.; Fragoso, Sinara P.; Penna, Cristiane R.A.; Arcanjo, Narciza M.O.; Silva, Fábio A.P.; Ferreira, Valquíria C.S. et al. (2017): Quality parameters of frankfurter-type sausages with partial replacement of fat by hydrolyzed collagen. In: *LWT* 76, S. 320–325. DOI: 10.1016/j.lwt.2016.06.034.

- Sözen, Tümay; Özışık, Lale; Başaran, Nursel Çalık (2017): An overview and management of osteoporosis. In: *European journal of rheumatology* 4 (1), S. 46–56. DOI: 10.5152/eurjrheum.2016.048.
- Stöver, B.; Ball, F.; Walther, A. (1974): Idiopathische juvenile Osteoporose *. In: *Fortschr Röntgenstr* 121 (10), S. 435–444. DOI: 10.1055/s-0029-1229955.
- Stunes, Astrid Kamilla; Brobakken, Cathrine Langlie; Sujan, Md Abu Jafar; Aagård, Norun; Brevig, Martin Siksjø; Wang, Eivind et al. (2022): Acute Effects of Strength and Endurance Training on Bone Turnover Markers in Young Adults and Elderly Men. In: *Frontiers in endocrinology* 13, S. 915241. DOI: 10.3389/fendo.2022.915241.
- Taga, Yuki; Kusubata, Masashi; Ogawa-Goto, Kiyoko; Hattori, Shunji (2014): Stable isotope-labeled collagen: a novel and versatile tool for quantitative collagen analyses using mass spectrometry. In: *Journal of proteome research* 13 (8), S. 3671–3678. DOI: 10.1021/pr500213a.
- Takayanagi, Hiroshi; Kim, Sunhwa; Koga, Takako; Nishina, Hiroshi; Isshiki, Masashi; Yoshida, Hiroki et al. (2002): Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts. In: *Developmental cell* 3 (6), S. 889–901. DOI: 10.1016/s1534-5807(02)00369-6.
- Tan, Ee Min; Li, Lei; Indran, Inthrani Raja; Chew, Nicholas; Yong, Eu-Leong (2017): TRAF6 Mediates Suppression of Osteoclastogenesis and Prevention of Ovariectomy-Induced Bone Loss by a Novel Prenylflavonoid. In: *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 32 (4), S. 846–860. DOI: 10.1002/jbmr.3031.
- Tanaka, H.; Mine, T.; Ogasa, H.; Taguchi, T.; Liang, C. T. (2011): Expression of RANKL/OPG during bone remodeling in vivo. In: *Biochemical and biophysical research communications* 411 (4), S. 690–694. DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.07.001.
- Tanne, K.; Nagataki, T.; Matsubara, S.; Kato, J.; Terada, Y.; Sibaguchi, T. et al. (1990): Association between mechanical stress and bone remodeling. In: *The Journal of Osaka University Dental School* 30, S. 64–71.
- Thiébaud, D.; Krieg, M. A.; Gillard-Berguer, D.; Jacquet, A. F.; Goy, J. J.; Burckhardt, P. (1996): Cyclosporine induces high bone turnover and may contribute to bone loss after heart

transplantation. In: *European journal of clinical investigation* 26 (7), S. 549–555. DOI: 10.1046/j.1365-2362.1996.00170.x.

Thouverey, Cyril; Caverzasio, Joseph (2015): Focus on the p38 MAPK signaling pathway in bone development and maintenance. In: *BoneKEy reports* 4, S. 711. DOI: 10.1038/bonekey.2015.80.

Trookman, Nathan S.; Rizer, Ronald L.; Ford, Rosanne; Ho, Elizabeth; Gotz, Vincent (2009): Immediate and Long-term Clinical Benefits of a Topical Treatment for Facial Lines and Wrinkles. In: *The Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology* 2 (3), S. 38–43.

Tuck, Stephen P.; Datta, Harish K. (2007): Osteoporosis in the aging male: treatment options. In: *Clinical interventions in aging* 2 (4), S. 521–536. DOI: 10.2147/cia.s820.

Ulian, Gianfranco; Moro, Daniele; Valdrè, Giovanni (2021): Hydroxylapatite and Related Minerals in Bone and Dental Tissues: Structural, Spectroscopic and Mechanical Properties from a Computational Perspective. In: *Biomolecules* 11 (5). DOI: 10.3390/biom11050728.

van Cromphaut, S. J.; Dewerschin, M.; Hoenderop, J. G.; Stockmans, I.; van Herck, E.; Kato, S. et al. (2001): Duodenal calcium absorption in vitamin D receptor-knockout mice: functional and molecular aspects. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (23), S. 13324–13329. DOI: 10.1073/pnas.231474698.

van Schoor, N. M.; Visser, M.; Pluijm, S. M. F.; Kuchuk, N.; Smit, J. H.; Lips, P. (2008): Vitamin D deficiency as a risk factor for osteoporotic fractures. In: *Bone* 42 (2), S. 260–266. DOI: 10.1016/j.bone.2007.11.002.

Wang, Lin; Wang, Qing; Qian, Jing; Liang, Qiufang; Wang, Zhenbin; Xu, Junmin et al. (2015): Bioavailability and bioavailable forms of collagen after oral administration to rats. In: *Journal of agricultural and food chemistry* 63 (14), S. 3752–3756. DOI: 10.1021/jf5057502.

Wang, Xiao-Yan; Zuo, Yi; Di Huang; Hou, Xian-Deng; Li, Yu-Bao (2010): Comparative study on inorganic composition and crystallographic properties of cortical and cancellous bone. In: *Biomedical and environmental sciences : BES* 23 (6), S. 473–480. DOI: 10.1016/S0895-3988(11)60010-X.

Wang, Yongmei; Nishida, Shigeki; Elalieh, Hashem Z.; Long, Roger K.; Halloran, Bernard P.; Bikle, Daniel D. (2006): Role of IGF-I signaling in regulating osteoclastogenesis. In:

Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research 21 (9), S. 1350–1358. DOI: 10.1359/jbmr.060610.

Wauquier, Fabien; Daneault, Audrey; Granel, Henri; Prawitt, Janne; Fabien Soulé, Véronique; Berger, Juliette et al. (2019): Human Enriched Serum Following Hydrolysed Collagen Absorption Modulates Bone Cell Activity: from Bedside to Bench and Vice Versa. In: *Nutrients* 11 (6). DOI: 10.3390/nu11061249.

Weaver, C. M.; Alexander, D. D.; Boushey, C. J.; Dawson-Hughes, B.; Lappe, J. M.; LeBoff, M. S. et al. (2016): Calcium plus vitamin D supplementation and risk of fractures: an updated meta-analysis from the National Osteoporosis Foundation. In: *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* 27 (1), S. 367–376. DOI: 10.1007/s00198-015-3386-5.

Wei, J.; Xu, H.; Davies, J. L.; Hemmings, G. P. (1992): Increase of plasma IL-6 concentration with age in healthy subjects. In: *Life sciences* 51 (25), S. 1953–1956. DOI: 10.1016/0024-3205(92)90112-3.

Weiner, S.; Arad, T.; Traub, W. (1991): Crystal organization in rat bone lamellae. In: *FEBS letters* 285 (1), S. 49–54. DOI: 10.1016/0014-5793(91)80722-F.

Wijaksana, I Komang Evan; Prahasanti, Chiquita; Bargowo, Lambang; Sukarsono, Rika Mutiasari; Krismariono, Agung. *Journal of International Dental and Medical Research; Diyarbakir Bd. 14, Aug. 2, (2021): 618-622.*

Wildman, Benjamin J.; Godfrey, Tanner C.; Rehan, Mohammad; Chen, Yuechuan; Afreen, Lubana H.; Hassan, Quamarul (2019): MICROmanagement of Runx2 Function in Skeletal Cells. In: *Current molecular biology reports* 5 (1), S. 55–64. DOI: 10.1007/s40610-019-0115-4.

Winkler, David G.; Sutherland, May Kung; Geoghegan, James C.; Yu, Changpu; Hayes, Trenton; Skonier, John E. et al. (2003): Osteocyte control of bone formation via sclerostin, a novel BMP antagonist. In: *The EMBO journal* 22 (23), S. 6267–6276. DOI: 10.1093/emboj/cdg599.

Wu, Haobo; Hu, Bin; Zhou, Xiaopeng; Zhou, Chenhe; Meng, Jiahong; Yang, Yute et al. (2018): Artemether attenuates LPS-induced inflammatory bone loss by inhibiting

osteoclastogenesis and bone resorption via suppression of MAPK signaling pathway. In: *Cell death & disease* 9 (5), S. 498. DOI: 10.1038/s41419-018-0540-y.

Xian, Lingling; Wu, Xiangwei; Pang, Lijuan; Lou, Michael; Rosen, Clifford J.; Qiu, Tao et al. (2012): Matrix IGF-1 maintains bone mass by activation of mTOR in mesenchymal stem cells. In: *Nature medicine* 18 (7), S. 1095–1101. DOI: 10.1038/nm.2793.

Xu, Guang-Yue; Qiu, Yong; Mao, Hai-Jun (2014): Common polymorphism in the LRP5 gene may increase the risk of bone fracture and osteoporosis. In: *BioMed research international* 2014, S. 290531. DOI: 10.1155/2014/290531.

Yamada, Shizuka; Nagaoka, Hideaki; Terajima, Masahiko; Tsuda, Nobuaki; Hayashi, Yoshihiko; Yamauchi, Mitsuo (2013): Effects of fish collagen peptides on collagen post-translational modifications and mineralization in an osteoblastic cell culture system. In: *Dental materials journal* 32 (1), S. 88–95. DOI: 10.4012/dmj.2012-220.

Yamada, Shizuka; Yoshizawa, Yuu; Kawakubo, Atsushi; Ikeda, Takeshi; Yanagiguchi, Kajiro; Hayashi, Yoshihiko (2013): Early gene and protein expression associated with osteoblast differentiation in response to fish collagen peptides powder. In: *Dental materials journal* 32 (2), S. 233–240. DOI: 10.4012/dmj.2012-188.

Yamamoto, Shoko; Deguchi, Kisaburo; Onuma, Masamichi; Numata, Noriaki; Sakai, Yasuo (2016): Absorption and Urinary Excretion of Peptides after Collagen Tripeptide Ingestion in Humans. In: *Biological & pharmaceutical bulletin* 39 (3), S. 428–434. DOI: 10.1248/bpb.b15-00624.

Yamashita, Teruhito; Kobayashi, Yasuhiro; Mizoguchi, Toshihide; Yamaki, Mariko; Miura, Toshiki; Tanaka, Sakae et al. (2008): MKK6-p38 MAPK signaling pathway enhances survival but not bone-resorbing activity of osteoclasts. In: *Biochemical and biophysical research communications* 365 (2), S. 252–257. DOI: 10.1016/j.bbrc.2007.10.169.

Yamashita, Teruhito; Takahashi, Naoyuki; Udagawa, Nobuyuki (2012): New roles of osteoblasts involved in osteoclast differentiation. In: *World Journal of Orthopedics* 3 (11), S. 175–181. DOI: 10.5312/wjo.v3.i11.175.

Yan, Jianyun; Li, Jun; Hu, Jun; Zhang, Lu; Wei, Chengguo; Sultana, Nishat et al. (2018): Smad4 deficiency impairs chondrocyte hypertrophy via the Runx2 transcription factor in mouse skeletal development. In: *The Journal of biological chemistry* 293 (24), S. 9162–9175. DOI: 10.1074/jbc.RA118.001825.

Yang, Shuo; Niu, Qingyu; Gan, Liangying; Zhang, Xiaobo; Tu, Lingxue; Zuo, Li (2020): Effect of long-term use of unfractionated or low-molecular-weight heparin on bone mineral density in maintenance hemodialysis patients. In: Hemodialysis international. International Symposium on Home Hemodialysis 24 (3), S. 374–382. DOI: 10.1111/hdi.12854.

Yazaki, Misato; Ito, Yukihiko; Yamada, Masayoshi; Goulas, Spyros; Teramoto, Sachi-yuki; Nakaya, Masa-Aki et al. (2017): Oral Ingestion of Collagen Hydrolysate Leads to the Transportation of Highly Concentrated Gly-Pro-Hyp and Its Hydrolyzed Form of Pro-Hyp into the Bloodstream and Skin. In: Journal of agricultural and food chemistry 65 (11), S. 2315–2322. DOI: 10.1021/acs.jafc.6b05679.

Ye, Fei; Zhou, Qingzhong; Tian, Long; Lei, Fei; Feng, Daxiong (2017): The protective effect of berberine hydrochloride on LPS induced osteoclastogenesis through inhibiting TRAF6 Ca²⁺ calcineurin NFATc1 signaling pathway. In: Molecular medicine reports 16 (5), S. 6228–6233. DOI: 10.3892/mmr.2017.7338.

Ye, Mengliang; Zhang, Chunhui; Zhu, Lingyu; Jia, Wei; Shen, Qingshan (2020): Yak (*Bos grunniens*) bones collagen-derived peptides stimulate osteoblastic proliferation and differentiation via the activation of Wnt/ β -catenin signaling pathway. In: Journal of the science of food and agriculture 100 (6), S. 2600–2609. DOI: 10.1002/jsfa.10286.

Yellowley, C. E.; Li, Z.; Zhou, Z.; Jacobs, C. R.; Donahue, H. J. (2000): Functional gap junctions between osteocytic and osteoblastic cells. In: Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research 15 (2), S. 209–217. DOI: 10.1359/jbmr.2000.15.2.209.

Yu, Minjun; Moreno, Jose L.; Stains, Joseph P.; Keegan, Achsah D. (2009): Complex regulation of tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) expression by interleukin 4 (IL-4): IL-4 indirectly suppresses receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL)-mediated TRAP expression but modestly induces its expression directly. In: The Journal of biological chemistry 284 (47), S. 32968–32979. DOI: 10.1074/jbc.M109.001016.

Zawel, L.; Dai, J. L.; Buckhaults, P.; Zhou, S.; Kinzler, K. W.; Vogelstein, B.; Kern, S. E. (1998): Human Smad3 and Smad4 are sequence-specific transcription activators. In: Molecular cell 1 (4), S. 611–617. DOI: 10.1016/s1097-2765(00)80061-1.

Zeng, Qing-ran; Zhang, Min; Adhikari, Benu P.; Mujumdar, Arun. S. (2013): Effect of Drying Processes on the Functional Properties of Collagen Peptides Produced from Chicken

Skin. In: *Drying Technology* 31 (13-14), S. 1653–1660. DOI: 10.1080/07373937.2013.790826.

Zha, Li; He, Li; Liang, Yijian; Qin, Hui; Yu, Bin; Chang, Linli; Xue, Li (2018): TNF- α contributes to postmenopausal osteoporosis by synergistically promoting RANKL-induced osteoclast formation. In: *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 102, S. 369–374. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.03.080.

Zhang, Jin; Tu, Qisheng; Bonewald, Lynda F.; He, Xi; Stein, Gary; Lian, Jane; Chen, Jake (2011): Effects of miR-335-5p in modulating osteogenic differentiation by specifically downregulating Wnt antagonist DKK1. In: *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 26 (8), S. 1953–1963. DOI: 10.1002/jbmr.377.

Zhang, Juan; Zhang, Xiaofei; Zhang, Long; Zhou, Fangfang; van Dinther, Maarten; Dijke, Peter ten (2012): LRP8 mediates Wnt/ β -catenin signaling and controls osteoblast differentiation. In: *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 27 (10), S. 2065–2074. DOI: 10.1002/jbmr.1661.

Zhang, Ling; Zhang, Siqi; Song, Hongdong; Li, Bo (2018): Effect of Collagen Hydrolysates from Silver Carp Skin (*Hypophthalmichthys molitrix*) on Osteoporosis in Chronologically Aged Mice: Increasing Bone Remodeling. In: *Nutrients* 10 (10). DOI: 10.3390/nu10101434.

Zhang, S.; Han, J.; Sells, M. A.; Chernoff, J.; Knaus, U. G.; Ulevitch, R. J.; Bokoch, G. M. (1995): Rho family GTPases regulate p38 mitogen-activated protein kinase through the downstream mediator Pak1. In: *The Journal of biological chemistry* 270 (41), S. 23934–23936. DOI: 10.1074/jbc.270.41.23934.

Zhang, Xiaoxia; Xu, Songcheng; Shen, Lirui; Li, Guoying (2020): Factors affecting thermal stability of collagen from the aspects of extraction, processing and modification. In: *J Leather Sci Eng* 2 (1). DOI: 10.1186/s42825-020-00033-0.

Zhao, Chen; Irie, Naoko; Takada, Yasunari; Shimoda, Kouji; Miyamoto, Takeshi; Nishiwaki, Toru et al. (2006): Bidirectional ephrinB2-EphB4 signaling controls bone homeostasis. In: *Cell metabolism* 4 (2), S. 111–121. DOI: 10.1016/j.cmet.2006.05.012.

Zhao, Liming; Shim, Joon W.; Dodge, Todd R.; Robling, Alexander G.; Yokota, Hiroki (2013): Inactivation of Lrp5 in osteocytes reduces young's modulus and responsiveness to the mechanical loading. In: *Bone* 54 (1), S. 35–43. DOI: 10.1016/j.bone.2013.01.033.

Zhu, Lingyu; Xie, Yingying; Wen, Boting; Ye, Mengliang; Liu, Yusi; Imam, Khandaker Md Sharif Uddin et al. (2020): Porcine bone collagen peptides promote osteoblast proliferation and differentiation by activating the PI3K/Akt signaling pathway. In: Journal of Functional Foods 64, S. 103697. DOI: 10.1016/j.jff.2019.103697.

Ziller, Volker; Kostev, Karel; Kyvernitakis, Ioannis; Boeckhoff, Jelena; Hadji, Peyman (2012): Persistence and compliance of medications used in the treatment of osteoporosis--analysis using a large scale, representative, longitudinal German database. In: International journal of clinical pharmacology and therapeutics 50 (5), S. 315–322. DOI: 10.5414/cp201632.

9. Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Einer Überprüfung der Arbeit mittels Plagiatssoftware stimme ich zu. Die Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegen.

Ort, Datum:

Unterschrift