

Effekt der Donepezil-Applikation auf knochenaufbauende Zellen
eines ovinen Osteoporose-Modells

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

vorgelegt von Nachlinger, Robert Josef
aus Passau

Gießen 2021

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Labor für experimentelle Unfallchirurgie
der Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie

Gutachterin: Prof. Dr. Katrin Susanne Lips

Gutachter: Prof. Dr. Ivo Meinhold-Heerlein

Tag der Disputation: 13.07.2022

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Knochen	1
1.1.1	Knochenzellen	2
1.1.2	Knochenmatrix	4
1.1.3	Crosstalk und Homöostase	5
1.2	Osteoporose	9
1.2.1	Epidemiologie	9
1.2.2	Pathophysiologie	10
1.2.3	Klinik, Diagnostik und Therapie	11
1.3	Cholinerges System	13
1.3.1	ACh-Synthese und -Degradation	13
1.3.2	ACh-Rezeptoren	14
1.3.3	Acetylcholinesterase	15
1.4	Fragestellung und Zielsetzung	17
2	Material und Methoden	19
2.1	Zellkultur	19
2.1.1	Auftauen	20
2.1.2	Passagieren	21
2.1.3	Aussäen	21
2.1.4	Einfrieren	22
2.2	Funktionelle Assays	23
2.2.1	Inhibitionskinetik	23
2.2.2	Bestimmung von Konzentration und Inkubationsdauer	26
2.2.3	AChE-Aktivitätsbestimmung	28
2.2.4	Proliferationsbestimmung	29
2.3	Real-time RT-PCR	31
2.3.1	Primerdesign	31
2.3.2	RNA-Isolation	34
2.3.3	cDNA-Synthese	35
2.3.4	Real-time RT-PCR	36
2.4	Statistik	37
3	Ergebnisse	39
3.1	Gruppenanalysen	39
3.2	Funktionelle Assays	43
3.2.1	AChE-Aktivität	43
3.2.2	Proliferation	45

3.3	Genexpression	47
3.3.1	AChE	47
3.3.2	BChE	49
3.3.3	Col1A1	51
3.3.4	OC	53
3.3.5	BDNF	55
4	Diskussion	57
4.1	Methodenauswahl	57
4.2	Gruppenanalysen	60
4.3	Funktionelle Assays	61
4.3.1	AChE-Aktivität	61
4.3.2	Proliferation	63
4.4	Genexpression	65
4.4.1	AChE	65
4.4.2	BChE	66
4.4.3	Col1A1	67
4.4.4	OC	68
4.4.5	BDNF	69
4.5	Ausblick	70
	Zusammenfassung	73
	Summary	74
	Abkürzungsverzeichnis	75
	Abbildungsverzeichnis	78
	Tabellenverzeichnis	79
	Literaturverzeichnis	80
	Anhang	94
	Publikationsverzeichnis	101
	Ehrenwörtliche Erklärung	102
	Danksagung	103
	Lebenslauf	104

1 Einleitung

Ziel dieser Arbeit war es, herauszufinden, welchen Effekt die Applikation des Acetylcholinesteraseinhibitors (AChEI) Donepezil auf knochenaufbauende Zellen eines ovinen Osteoporosemodells hat.

Um die Hintergründe dieser Zielsetzung verstehen zu können, wird in den folgenden Kapiteln das hierfür relevante Grundlagenwissen zusammengefasst. Dies beginnt mit einem Überblick über das Organ Knochen, setzt sich fort mit einer Definition der Systemerkrankung Osteoporose und endet mit einer Einführung in das cholinerge System, in welches der Wirkstoff Donepezil eingreift.

1.1 Knochen

Knochen stellen das wichtigste Stütz- und Bindegewebe eines jeden größeren Organismus dar. Neben dieser Funktion haben Knochen noch weitere Aufgaben. Darunter fallen Bewegung und Gelenkbildung, der Schutz von Weichteilen und des Knochenmarks sowie die Kalzium- und Phosphathomöostase (Florencio-Silva et al. 2015; Lüllmann-Rauch 2012).

Makroskopisch werden Spongiosa und Kompakta – auch Kortikalis genannt – am Knochen unterschieden. Die Spongiosa befindet sich im Inneren des Knochens, während die Kompakta die äußere Hülle bildet. Die Häufigkeitsverteilung dieser beiden Bauarten der 213 Knochen des erwachsenen menschlichen Skeletts liegt bei etwa 20 % Spongiosa und 80 % Kompakta, wobei diese Werte je nach betrachtetem Knochen stark abweichen können. Bei den Wirbeln beträgt die Ratio bspw. 75 : 25 zugunsten der Spongiosa, im Radius dagegen 5 : 95 (Clarke 2008). Hierdurch wird bereits deutlich, dass es sich bei Knochen um kein so simples Organ handelt, wie auf den ersten Blick vermutet werden könnte. Es muss eine deutliche Regulation des mikroskopischen Baus der unterschiedlichen Knochen vorliegen, um diese großen Abweichungen zu erhalten und erklären zu können.

Die Spongiosa besteht aus vielen dünnen Trabekeln, durch die der Knochen seine Biegefestigkeit erhält, indem diese trajektorieell ausgerichtet sind. Zwischen den Trabekeln befindet sich das Knochenmark. Damit die Trabekel immer auf diese Art und Weise angeordnet sein können, müssen sie ständig neu organisiert werden. Somit sind Knochen in der Lage, sich längerfristig an veränderte Belastungen anzupassen (Burr 2002). Ermöglicht wird dies durch den Abbau von altem Knochen, der anschließend wieder durch neuen in korrigierter Anordnung ersetzt wird. Dies wird durch die Zellen des Knochens ermöglicht, die im folgenden Kapitel näher beschrieben werden (Matsuo et al. 2008).

Wie der Name schon suggeriert, ist die Kompakta dichter aufgebaut als die Spongiosa. Es liegt hier eine andere Struktur vor. Es gibt kein Trabekelsystem, stattdessen

sind die Knochenlamellen vorwiegend konzentrisch angeordnet. Diese konzentrischen Anordnungen mit zentral vorliegender Blutversorgung (Havers-Kanal) werden als Havers-Systeme oder Osteone bezeichnet (Clarke 2008; Lüllmann-Rauch 2012). Sinn der Kompakta ist es, den Knochen insbesondere biegestabil zu machen und eine feste Grenze zur Umgebung aufzubauen. In Relation zur Spongiosa ist die Durchblutung der Kompakta durch die Havers-Kanäle geringer ausgeprägt (Bono et al. 2003).

Prinzipiell werden zwei Arten von Belastungen, die auf den Knochen wirken, unterschieden: Von außen wirkende Kraft (*stress*) und die dadurch bedingte interne Deformierung (*strain*). Während die Kompakta höheren *stress* verkraften kann, kommt es nach Überschreiten dieses höher gelegenen Grenzpunktes schneller zu *strain*. Die mechanischen Eigenschaften der Spongiosa verhalten sich genau invers hierzu: Deformationen beginnen schon bei geringerer Kraft, können jedoch besser ausgehalten werden (Hart et al. 2017).

Um die Beschreibung des mikroskopischen Baus des Knochens abzuschließen, sei noch erwähnt, dass er von außen durch das Periost umhüllt ist, einer Schicht aus fibrösem Bindegewebe. Das Periost ist mit Blutgefäßen, die den Knochen versorgen sowie Nervenfasern durchflochten, welche diese Knochenhaut sehr schmerzempfindlich machen. Die Sehnen der Muskulatur setzen nicht nur an den Knorpeln der Gelenke an, auch das Periost dient als solcher Ansatzpunkt. Im Inneren des Knochens werden Kortikalis, die Trabekel der Spongiosa und Blutgefäße durch das Endost ausgekleidet, wodurch eine Abgrenzung zum Knochenmark erfolgt. Außerdem lagern sich dem Endost mehrere im Folgenden beschriebene Zellen an. Es dient als eine Art Aufenthalts- und Warteort für diese Zellen, damit sie zur Stelle sein können, sobald sie gebraucht werden (Clarke 2008; Lüllmann-Rauch 2012).

1.1.1 Knochenzellen

Die wichtigsten im Knochen vorkommenden Zellen sind Osteoblasten, -zyten und -klasten. Osteoblasten sind von mesenchymalen Stammzellen (MSC) abstammende Zellen, deren Hauptaufgabe die Synthese von neuem Knochen ist (Florencio-Silva et al. 2015). Diverse Wachstumsfaktoren und Hormone stimulieren ihre Bildung. Die wichtigsten Faktoren hierbei sind *Bone Morphogenetic Proteins* (BMP), die zur Familie des *Transforming Growth Factor- β* (TGF- β)-Signalweges gehören. Ebenso essentiell sind Proteine des Wnt-Signalweges. Nun werden die MSC als Osteo-/Chondroprogenitorzellen bezeichnet, da sie nicht mehr in Richtung anderer Bindegewebszellen ausdifferenzieren können. Sie exprimieren nun weitere Faktoren, ohne die die weitere Differenzierung und Aktivierung der Osteoblasten nicht möglich wäre. Zu diesen zählen u. a. erneut Proteine des Wnt-Signalweges und Transkriptionsfaktoren der *Runt-related Transcription Factor 2* (Runx2)-Familie, *Distal-Less Homeobox 5* sowie Osterix. Durch die Expression von Runx2 und Wnt-Signalmolekülen können

diese lediglich in Richtung Osteo- und nicht mehr Chondroprogenitorzellen weiter differenzieren. Im Rahmen einer Proliferationsphase exprimieren die nun unreifen Präosteoblasten Proteine wie alkalische Phosphatase (ALP), Kollagen Typ I (Col1) und Osteopontin (OPN). Ausdifferenzierte, reife Osteoblasten exprimieren letztendlich noch weitere Proteine, eines der wichtigsten hierbei ist Osteocalcin (OC) (Del Fattore et al. 2012; Florencio-Silva et al. 2015). Entsprechend werden die genannten Proteine als Marker für Osteoblasten benutzt; Kollagen Typ I, alpha 1 (Col1A1) (ein Bestandteil von Col1-Fasern) und ALP für Präosteoblasten, OC für reife Osteoblasten (Huang et al. 2007). Nachdem sich Osteoblasten selbst in Extrazellulärmatrix (EZM) eingemauert haben, stoppen sie die Synthese von weiterer Knochenmatrix und werden als Osteozyten bezeichnet. Die restlichen Osteoblasten werden überflüssig, sobald sie die Mineralisation der Knochenmatrix abgeschlossen haben und gehen durch programmierten Zelltod (Apoptose) zugrunde (Florencio-Silva et al. 2015; Del Fattore et al. 2012). Alternativ können sie auch in einen inaktiven Ruhezustand übergehen, dann werden sie *Bone Lining Cells* genannt. Deren genaue Funktion ist noch nicht vollständig geklärt, jedoch ist bekannt, dass sie sich entlang von Knochengewebe anreihen, das im Moment weder weiter aufgebaut noch resorbiert werden soll. Auch sie nehmen an der Regulation der Knochenhomöostase teil und können durch äußere Stimuli zu sezernierenden Zellen reaktiviert werden (Florencio-Silva et al. 2015).

Die Funktion der Osteozyten war lange Zeit unbekannt, heute ist bekannt, dass sie wichtig für die Homöostase der Knochenmatrix und dem Crosstalk zwischen den anderen Zellen sind. Bei Absterben der Osteozyten wird die sie umgebende Knochenmatrix durch Osteoklasten abgebaut. Wie erwähnt kann sich Knochen Belastungen anpassen. Ein Hauptvermittler dieser Fähigkeit sind wohl die Osteozyten. Durch ihre Fähigkeit der Mechanozeption sind sie in der Lage, mechanische Beanspruchung des Knochens zu erkennen und daraufhin Osteoblasten und -klasten in ihrer Arbeit zu steuern. Dadurch kann das Trabekelsystem gezielt ausgerichtet werden (Klein-Nulend et al. 1995; Klein-Nulend et al. 2015). Die eingemauerten Zellen können durch ein Netzwerk schmaler Canaliculi miteinander kommunizieren. Dies erfolgt zum einen über Dendriten, die in den Kanälen durch *gap-junctions* miteinander verbunden sind, zum anderen auch über Botenstoffe, die von den Zellen sezerniert werden, durch die Canaliculi fließen und von den Osteozyten erkannt werden. Neben der Zell-Zell-Kommunikation dienen die Dendriten außerdem der erwähnten Mechanozeption. Über den piezoelektrischen Effekt kommt es zu einer Umwandlung eines mechanischen Stimulus in einen elektrischen, der wiederum an eine biochemische Reaktion gekoppelt ist und die entsprechende Reaktion der Zellen verursacht (Florencio-Silva et al. 2015).

Osteoklasten stammen von Makrophagen/Monozyten-Zelllinien ab, gehören also dem hämatopoetischen System an. Die Osteoklastogenese wird insbesondere stimu-

liert durch *Macrophage Colony-Stimulating Factor* (M-CSF). Ein weiterer wichtiger Faktor, der die vollständige Differenzierung und Aktivierung der Zellen ermöglicht, ist das System aus *Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B* (RANK) und dem dazu gehörenden Protein RANK-Ligand (RANKL), das im Folgenden noch genauer beschrieben wird (Ono et al. 2018). Osteoklasten bauen die von Osteoblasten synthetisierte Knochenmatrix wieder ab, um die Erneuerung des Knochens im Anschluss zu ermöglichen und/oder den Kalziumspiegel im Blut anzuheben (Boyle et al. 2003). Die Regulation der Osteoklastenfunktion spielt eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie vieler Erkrankungen. Bei einer übermäßigen Aktivität der Zellen vermindert sich die Knochenmasse, was zu instabilen und brüchigen Knochen führt. Ein Beispiel hierfür ist die Osteoporose, die insbesondere im Rahmen dieser Arbeit eine große Rolle spielt und später noch genauer beschrieben wird (Florencio-Silva et al. 2015). Andererseits führt auch eine verminderte Osteoklastenaktivität zu Problemen. Dies ist bei der Osteopetrose der Fall; dabei kommt es zu einer zu hohen Knochendichte (Sobacchi et al. 2013).

1.1.2 Knochenmatrix

Die Bestandteile der Knochenmatrix können in organische und anorganische Substanzen unterteilt werden. Organischer Hauptbestandteil ist Col1, aber auch weitere Proteine, wie bspw. OC sowie Proteoglykane sind zu finden. Neben vielen weiteren Ionen machen den größten Anteil der anorganischen Stoffe Kalzium- und Phosphat-Ionen aus, die als Hydroxyapatit-Kristalle ausfallen $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$. Diese Kristalle lagern sich entlang der Col1-Fibrillen an, nutzen diese also als eine Art Gerüst (Florencio-Silva et al. 2015). Während Hydroxyapatit druckstabil ist, bieten die Kollagenfibrillen Zugfestigkeit. Dieses Bauprinzip entspricht dem von Stahlbeton, wodurch es zur Biegefestigkeit des Knochens kommt (Clarke 2008; Lüllmann-Rauch 2012; Bono et al. 2003).

Der Aufbau neuer Knochenmatrix erfolgt durch Osteoblasten in zwei Schritten: Der Aufbau von Osteoid und der anschließenden Mineralisation. Osteoid bezeichnet das noch nicht mineralisierte Grundgewebe des Knochens. Hauptbestandteil des Osteoids sind wie erwähnt Kollagenfibrillen. Dabei werden viele verschiedene Kollagen-Typen differenziert. Im Knochengewebe ist Col1 der wichtigste Vertreter (Florencio-Silva et al. 2015). Col1 besteht dabei aus zwei $\alpha 1(\text{I})$ -Ketten und einer $\alpha 2(\text{I})$ -Kette, welche durch die Gene Col1A1 und Col1A2 codiert werden (Rest et al. 1991; Dalgleish 1997). Die Synthese aller Kollagenfibrillen erfolgt auf die gleiche Art und Weise: Sie beginnt mit der Bildung von drei Kollagen- α -Ketten. Nach Hydroxylierungen und Glykosylierungen lagern sich diese Ketten zu einer Tripelhelix zusammen; es handelt sich dabei nun um Prokollagen, das aus der Zelle sezerniert wird. Eine Peptidase spaltet nun extrazellulär die sog. Propeptide des Prokollagens ab, wodurch Tropokollagen entsteht.

Einige Tropokollagene werden anschließend miteinander zu Kollagenfibrillen quervernetzt. Von fertigen Kollagenfasern wird gesprochen, sobald sich mehrere der Fibrillen aneinandergelagert haben. Die wichtige mechanische Funktion des Kollagens auf den Knochen wird klar, wenn die Bedeutung von Mutationen betrachtet wird. Diese können zu Aufspaltungen der Fasern führen, was zur Krankheit Osteogenesis imperfecta führt (Viguet-Carrin et al. 2005; Hauser et al. 2012).

Nach Abschluss der Synthese des Osteoids folgt die Mineralisation. Diese kann in zwei Phasen unterteilt werden: In der vesikulären Phase werden neue EZM-Bestandteile in Vesikeln aus den Osteoblasten abgeschnürt, die an Proteoglykane und andere Proteine des Osteoids binden. Diese Proteine immobilisieren Kalzium-Ionen aufgrund ihrer negativen Ladungen. Die Osteoblasten sezernieren Enzyme, die die Proteoglykane abbauen, wodurch die Kalzium-Ionen wieder mobil werden und durch Annexine in die Vesikel kommen können. Osteoblasten sezernieren zudem das Enzym ALP. Dabei handelt es sich um eines der wichtigsten Enzyme der Knochenmineralisation; bei einem Mangel kommt es zu schwerwiegenden Störungen der Knochensynthese. ALP setzt Phosphat-Ionen innerhalb der Vesikel frei, wodurch diese zusammen mit Kalzium die Hydroxyapatit-Kristalle bilden. Da durch die hohen Konzentrationen der anorganischen Substanzen deren Löslichkeitsprodukt überstiegen wird, fallen diese aus. Die fibrilläre Phase wird erreicht, sobald durch diese Vorgänge die Membranen der Vesikel einreißen. Die Kristalle lagern sich dann der EZM und weiteren, bereits vorhandenen anorganischen Verbindungen an (Blair et al. 2011; Florencio-Silva et al. 2015).

Damit die trajektorielle Ausrichtung der Knochen trabekel bestehen bleiben kann, ist eine ständige Neuausrichtung dieser notwendig. Ermöglicht wird dies nur durch den Abbau und anschließenden Neuaufbau der Matrix. Außerdem können über diesen Mechanismus Schäden repariert und vorgebeugt werden (Burr 2002). Für den Abbau sind wie erwähnt die Osteoklasten zuständig. Diese Zellen besitzen eine H^+ -Adenosin triphosphatase (ATPase) über die sie H^+ -Ionen sezernieren. Die Protonen führen zu einer sauren Umgebung, wodurch Kalziumverbindungen und damit die anorganischen Kristallstrukturen, wie Hydroxyapatit aufgelöst werden. Zusätzlich werden lysosomale Enzyme wie Tartrat-resistente saure Phosphatase (TRAP), Cathepsin K und Matrix Metalloproteinase-9 sezerniert, die die organische Matrix auflösen. Die somit abgebauten Anteile der Knochenmatrix werden schließlich durch Endozytose von den Zellen aufgenommen (Florencio-Silva et al. 2015; Clarke 2008; Lüllmann-Rauch 2012).

1.1.3 Crosstalk und Homöostase

Um all diese Umbauprozesse regulieren zu können, ist eine stetige Kommunikation der Zellen untereinander notwendig – dies wird als *Crosstalk* bezeichnet. Eines der

wichtigsten Systeme hierfür besteht aus den drei Komponenten RANK, RANKL und Osteoprotegerin (OPG) (Lüllmann-Rauch 2012).

Nachdem die Osteoklastogenese durch von Osteoblasten sezerniertem M-CSF stimuliert wurde, fusionieren mehrere Osteoklastenvorläufer zu einem ausgereiften Osteoklasten. Dies wird durch die Bindung des an Osteoblasten membranständigem RANKL, der an RANK bindet, ermöglicht. RANK ist Bestandteil der Osteoklasten- und Osteoklastenvorläufermembran (Asagiri et al. 2007). Bei ausgereiften Osteoklasten führt der aktivierte RANK zur Aktivierung und damit zur Knochenresorption (Boyce et al. 2007).

Neben der Aktivierung der Osteoklasten können Osteoblasten diese auch inhibieren. Dies wird über OPG ermöglicht. OPG wird von den Zellen sezerniert und blockiert die Bindung des RANKL an RANK (Lacey et al. 2012). Neben der Hemmung von RANKL durch OPG greifen auch Östrogene in dieses System ein. Sie führen zu einer verminderten Expression von RANKL. Unter anderem geschieht dies durch eine östrogenvermittelte verringerte Anzahl an Zytokinen, wie Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und Interleukin-1 α (IL-1 α). Diese Zytokine wiederum stimulieren die Osteoklastogenese und führen zu einer erhöhten Expression von RANKL. Diese zytokinvermittelte Stimulation der Osteoklasten wird entsprechend durch Östrogene gehemmt (Khosla 2010). Zudem führen Östrogene auch zu einer vermehrten Anzahl an OPG-exprimierenden Zellen (Bord et al. 2003).

Ein weiterer Signalweg, der die RANK-Expression reguliert, wird durch Wnt5a gesteuert. Wnt5a wird durch Osteoblasten sezerniert und bindet Ror2, einen transmembranen Tyrosinkinase-Rezeptor der Osteoklasten. Über weitere intrazelluläre Signalmoleküle kommt es zu einer erhöhten Expression von RANK. Dadurch wird die über RANKL vermittelte Osteoklastogenese stimuliert (Maeda et al. 2012).

Ein Gegenspieler der bereits erwähnten Östrogene und des Knochenaufbaus im Allgemeinen sind Glucocorticoide. Beide Steroidhormone haben direkten Einfluss auf Osteoblasten- und -klastenvorläufer. Glucocorticoide führen zu einer erhöhten Konzentration reaktiver Sauerstoffradikale, während durch Östrogene deren Konzentration gesenkt wird. Diese Radikale aktivieren wiederum mehrere Transkriptionsfaktoren der *Forkhead Box Protein O*-Familie, die mehrere der genannten Regulationswege inhibieren (u. a. RANK/RANKL/OPG und Wnt) (Manolagas 2013).

Im Sinne einer negativen Rückkopplung sezernieren Osteoklasten im Rahmen ihres Knochenabbaus mehrere andere Proteine, die wiederum ihre Gegenspieler – die Osteoblasten – stimulieren. Zu diesen Botenstoffen zählen u. a. BMP-2, *Insulin-like Growth Factor-II* (IGF-II) und TGF- β (Matsuo et al. 2008).

Ausdifferenzierte Osteoblasten sezernieren OC, was entsprechend einen Marker für diese Zellen darstellt (Huang et al. 2007). OC kann in vivo als Marker für den Knochenumsatz verwendet werden (Vilaca et al. 2017). Für die lokale Wirkung

des Proteins muss es zuvor Vitamin K-abhängig carboxyliert werden (Hauschka et al. 1989). Eine der Funktionen ist es, die weitere Mineralisation zu inhibieren. Das Protein verhindert das Ausfallen von Kalziumsalzen. Nicht nur lokal in der Knochenmatrix spielt das Protein eine Rolle, sondern auch als Hormon im gesamten Organismus, insb. auf die Regulation des Metabolismus (Zoch et al. 2016).

Neben Osteoblasten und -klasten spielen wie erwähnt auch Osteozyten eine große Rolle in der Homöostase des Knochens. Sie erfüllen diese Aufgabe u. a. ebenfalls durch die Expression von RANKL. Nach Mechanostimulation produzieren sie außerdem eine Reihe von Botenstoffen, zu denen u. a. BMP- und Wnt-Signalmoleküle zählen (Klein-Nulend et al. 2015).

Da Knochen der größte Kalziumspeicher des Menschen ist, wird die Konzentration dieses Ions im Blut v. a. über den Eingriff in die Homöostase des Knochenauf- und -abbaus gesteuert. Ein wichtiger Botenstoff hierfür ist Parathormon (PTH). Es stimuliert die Osteoblasten, die über die genannten Wege wiederum Osteoklasten aktivieren und damit den Abbau von Knochenmatrix bewirken. Durch die dadurch bedingte Freisetzung von Kalzium steigt der Spiegel des Ions im Blut. Dazu ist jedoch zu sagen, dass PTH auch anabol auf den Knochen wirken kann. Dies scheint insbesondere von der Einwirkungsdauer und Konzentration des Hormons abhängig zu sein (Poole et al. 2005).

Ein Gegenspieler des Knochenabbaus ist hingegen das Hormon Calcitonin, das die Osteoklasten direkt hemmt, somit den Kalziumspiegel im Blut senkt und neue Knochenformation fördert (Hay et al. 2017). Die genaue Relevanz dieses Hormons beim Menschen ist noch nicht abschließend geklärt (Nicholson et al. 1986). Calcitonin wird in der Schilddrüse produziert und scheint eine untergeordnete Rolle in der Kalziumhomöostase und im Rahmen des Knochenumbaus des Menschen zu spielen. So gibt es keine beschriebene Skeletterkrankung unter erniedrigten Calcitoninspiegeln (Silverman 2003). Wird im Rahmen eines medullären Schilddrüsenkarzinoms vermehrt Calcitonin produziert, kommt es nur selten zu relevanten Hypokalzämien (Kleman et al. 1971). Klinisch spielt es hierbei eine wichtige Rolle als Tumormarker (Viola et al. 2019). Therapeutisch kann das Hormon zur Prävention von akutem Knochenverlust, beim Morbus Paget und bei Hyperkalzämie maligner Genese verwendet werden (Panpharma 2020).

Ein anderes Hormon, das Knochensynthese und -resorption beeinflusst, ist Calcitriol. Calcitriol ist der aktive Metabolit der Vitamin D-Gruppe. Ausgangspunkt der Synthese Calcitriols ist das Sterin 7-Dehydrocholesterin. Aus ihm kann durch UV-B-Licht in der Haut über die Zwischenstufe Prävitamin D₃ (Prächolecalciferol) Vitamin D₃ (Cholecalciferol) entstehen. Dieses Molekül kann alternativ auch oral aufgenommen werden. Cholecalciferol wird anschließend in die Leber weitertransportiert

und dort in Calcidiol (25-Hydroxy-Cholecalciferol) hydrolysiert. Nach erneutem Weitertransport wird es schließlich in der Niere durch die 1α -Hydroxylase in den aktiven Metaboliten Calcitriol (1,25-Dihydroxy-Cholecalciferol) umgesetzt. Die Regulation der Synthese erfolgt insbesondere in diesem letzten Schritt: Eine Stimulation der 1α -Hydroxylase erfolgt durch PTH sowie niedrige Kalzium- und Phosphatspiegel im Blut. Gehemmt wird das Enzym im Sinne einer negativen Rückkopplung durch Calcitriol selbst. Diverse andere Stoffe, wie Östrogene und Glucocorticoide sind ebenfalls an der Regulation beteiligt (Dusso et al. 2005; Aktories et al. 2013).

Calcitriol wirkt auf komplexe Art und Weise auf den Knochen. Als Steroidhormon bindet es an seinen intrazellulären Vitamin D-Rezeptor und wird danach in den Zellkern transportiert, wo es die Transkriptionsraten mehrerer Proteine moduliert (Carlberg et al. 2007). Für diese Arbeit ist die Funktion des Vitamins auf den Kalziumhaushalt relevant. Im Darm bewirkt es eine erhöhte Resorption des Ions, in den Nebenschilddrüsen die verminderte Synthese von PTH und in der Niere erhöht es die Rückresorption von Kalzium, außerdem reguliert es hier seine eigene Syntheserate. Durch die Funktion in diesen Organen erhöht Calcitriol also durchweg den Kalziumspiegel (Kochupillai 2008).

Ein weiteres wichtiges Zielorgan ist aber auch direkt der Knochen. Hier wirkt das Steroid über mehrere Mechanismen. In den Osteoblasten wird durch Calcitriol die Expression von RANKL erhöht, damit also Osteoklasten und Knochenabbau gefördert (Kochupillai 2008). Außerdem erhöht es die Synthese des Proteins OC (Zhang et al. 1997), das den Kalziumeinbau im Knochen zu inhibieren scheint; die genauen Funktionen des Hormons sind vielfältig und noch nicht abschließend geklärt (Li et al. 2016). Bei zu hoch dosierter Gabe von Vitamin D₃ zeigt sich entsprechend ein Verlust an Knochenmasse. Bei normaler Stoffwechsellage und normaler Konzentration des Vitamins führt es jedoch zu erhöhter Mineralisation des Knochens. Dies wird zum einen durch den erhöhten Kalziumspiegel, der durch die Wirkung Calcitriols in Darm und Niere bedingt wird, ermöglicht, zum anderen über die Hemmung von PTH (Kochupillai 2008; Zhang et al. 1997).

Ein weiteres Ion, das in enger Beziehung zu Kalzium steht, ist Phosphat. Es liegt meist als Komplex mit Kalzium vor und befindet sich ebenso überwiegend im Skelett. Eine Hypophosphatämie kann zur Osteomalazie, also einer gestörten Mineralisation des Knochens führen. Die Homöostase des Ions wird überwiegend über PTH, Calcitriol und das Hormon FGF23 reguliert. Diese Stoffe steuern insbesondere die renale Exkretionsrate von Phosphat (Christov et al. 2018).

1.2 Osteoporose

Bei Osteoporose handelt es sich um eine Erkrankung des Skeletts, bei der es zu einer verminderten Knochenmasse und strukturellen Einschränkungen der Knochenarchitektur kommt. Daraus folgen instabilere Knochen mit erhöhter Anfälligkeit für Frakturen. Bei einem gesunden Menschen liegt ein gleichmäßiger Ab- und Aufbau von Knochensubstanz vor. Ist dieses Equilibrium zugunsten des Abbaus gestört, kommt es zunächst zum symptomlosen Knochenschwund, der Osteopenie. Bei weiterem Fortschreiten der Erkrankung wird von Osteoporose gesprochen. Die Folge der Erkrankung sind vermehrte Knochenbrüche, die bei Patientinnen und Patienten im höheren Alter häufig zu langfristiger bis nie mehr zu überwindender Immobilität führen kann (World Health Organization 1994).

Die Osteoporose wird in eine primäre und sekundäre Form unterteilt. Der sekundären Form liegt eine andere Erkrankung zugrunde. Beispiele hierfür sind der Morbus Cushing, eine Hyperthyreose, ein Hypergonadismus oder ein Hyperparathyreoidismus. Die primäre Form der Erkrankung kommt dabei weitaus häufiger vor als die sekundären Formen. Sie wird nochmals unterteilt (Glaser et al. 1997; Imerci et al. 2015):

Typ 1 Postmenopausale Osteoporose; Östrogenmangel

Typ 2 Senile Osteoporose; altersabhängig, auch bei Männern vorkommend

Idiopathische Form Seltene juvenile Form

Im Folgenden werden Epidemiologie, Pathophysiologie und Klinik der Erkrankung beschrieben.

1.2.1 Epidemiologie

Im Jahr 2010 waren etwa 22 Millionen Frauen und 5,5 Millionen Männer in der EU an Osteoporose erkrankt (Hernlund et al. 2013). Im Jahr 2009 waren etwa 6,3 Millionen Menschen in Deutschland an Osteoporose erkrankt, davon 5,2 Millionen Frauen. Damit ist etwa jede vierte Frau und jeder 17te Mann über 50 Jahren in der Bundesrepublik von Osteoporose betroffen. Mehr als die Hälfte der Erkrankten erleiden innerhalb von vier Jahren eine Fraktur. Jedes Jahr kommt es zu ca. 885 000 neuen Fällen (Hadjji et al. 2013).

Entsprechend spielt die Erkrankung sowohl für die Lebensqualität der Betroffenen als auch für die finanzielle Situation des Gesundheitssystems eine große Rolle. Schätzungen zufolge haben osteoporotisch verursachte Frakturen im Jahr 2009 Kosten von etwa 860 Millionen € im stationären Bereich verursacht (Bleibler et al. 2013). Durch die Tatsache, dass fast ausschließlich Personen über 50 Jahren betroffen sind und die

Bevölkerungsstruktur in Deutschland immer weiter überaltert (Pötzsch et al. 2015), ist davon auszugehen, dass all diese Probleme in Zukunft noch ausgeprägter werden dürften.

1.2.2 Pathophysiologie

Im Lauf des Lebens eines jeden Menschen verändert sich die Gesamtknochenmasse physiologischerweise. Der Gipfel wird dabei im Alter von 16 bis 27 Jahren erreicht. Danach nimmt die Masse kontinuierlich ab. Bei Männern beträgt die Rate dabei etwa 0,3 % pro Jahr, bei Frauen etwa 0,5 % pro Jahr. Bei Frauen steigt diese Zahl nach der Menopause jedoch drastisch an; in den ersten fünf Jahren beträgt sie 5–6 % pro Jahr (Bono et al. 2003). Deshalb und aufgrund der Tatsache, dass Frauen statistisch gesehen älter werden als Männer (World Health Organization 2018), wird angenommen, dass die Prävalenz der Erkrankung beim weiblichen Geschlecht deutlich höher ist.

Nach der Menopause sinkt der Östrogenspiegel der Frau deutlich ab (Trévoux et al. 1986), was einen negativen Einfluss auf die Knochenmasse hat. Aufgrund der deutlich höheren Durchblutung des trabekulären Systems der Spongiosa und dem folglich stärkeren Einfluss aktiver Metabolite, ist dabei insbesondere diese und weniger die Kompakta betroffen (Bono et al. 2003).

Neben dem direkten Einfluss auf den Knochen wirken Östrogene außerdem auf die Skelettmuskulatur. Durch den postmenopausalen Mangel der Geschlechtshormone fehlt hier ein ausgeprägter anaboler Faktor auf den Muskel. Dadurch kommt es zum Muskelschwund, der Sarkopenie (Cruz-Jentoft et al. 2018). Dadurch ist eine absinkende körperliche Aktivität der betroffenen Frauen bedingt (Agostini et al. 2018). Wie erwähnt besitzen Osteozyten die Fähigkeit der Mechanozeption; durch erhöhten mechanischen Stress werden die Zellen stimuliert. Wenn dieser nicht mehr in ausreichendem Maß vorhanden ist, scheinen die Zellen durch Apoptose unterzugehen (Bakker et al. 2004). Durch die nun fehlenden Signalmechanismen der Osteozyten fehlt die Inhibition des Abbaus der mineralisierten Knochensubstanz (Florencio-Silva et al. 2015). Die Matrix wird also aufgrund der mangelnden mechanischen Belastung noch weiter abgebaut, was die Entwicklung einer Osteoporose begünstigt.

Neben der verminderten Mechanostimulation der Knochenzellen bei Sarkopenie, führt die verminderte Muskelmasse außerdem zu einer schwächeren Halte- und Stabilisierungsfunktion der Muskeln. Hierdurch erhöht sich die mechanische Belastung auf den bereits geschwächten Knochen, was Frakturen weiter begünstigt (Hart et al. 2017).

Des Weiteren muss erwähnt werden, dass Muskelzellen mehrere Hormone und Wachstumsfaktoren sezernieren, die auf den Knochen wirken. Beispiele hierfür sind Interleukine, IGF-I, BMP-1 und TGF- β (Hart et al. 2017; Karsenty et al. 2018).

Neben dem Östrogenmangel, spielt natürlich auch das Alter eine Rolle bei der körperlichen Aktivität und Muskelmasse. Hierdurch und durch die physiologisch geringere Knochenmasse im Alter ist die senile Form der Osteoporose bedingt.

Bei den sekundären Formen der Erkrankung spielt die exogene Zufuhr von Glucocorticoiden oder deren endogene Überproduktion im Rahmen eines Morbus Cushing eine große Rolle (Adami et al. 2019; Debono et al. 2016). Wie oben beschrieben, sind Glucocorticoide direkte Antagonisten der Östrogene, wodurch deren negativer Einfluss auf den Knochen bedingt wird (Manolagas 2013).

Neben den durch Glucocorticoiden bedingten sekundären Formen der Osteoporose gibt es noch viele weitere Ursachen, deren Aufzählung den Rahmen dieser Arbeit sprengen würde (Glaser et al. 1997).

Neben den negativen Einflüssen der Erkrankung auf das ausgereifte Zellsystem des Knochens, bestehend aus Osteoblasten, -zyten und -klasten, findet außerdem eine Modulation der MSC des Knochens statt. Die wichtigsten Effekte hierbei sind eine verminderte Proliferationsrate, Migration und Differenzierungsfähigkeit der Stammzellen (Rodríguez et al. 1999). Außerdem produzieren sie signifikant weniger Coll und TGF- β , wodurch zum einen weniger mineralisationsfähiges Osteoid produziert wird und zum anderen die knochenbauenden Osteoblasten weniger stimuliert werden (Rodríguez et al. 2000). Osteoporotische MSC, die normalerweise v. a. durch BMP-2 zur Differenzierung in Osteoblasten stimuliert werden, reagieren anders auf diesen wichtigen Wachstumsfaktor (Donoso et al. 2015). Stattdessen steigt das Potential, sich in Adipozyten zu differenzieren, die keinen Beitrag zur Knochenstabilität leisten (Pino et al. 2012).

Zwar bestehen Unterschiede in der resultierenden Verteilung der Schäden der Mikroarchitektur des Knochens und der durch Frakturen betroffenen Knochen, jedoch sind durch die Osteoporose insbesondere die horizontalen Trabekel der Spongiosa betroffen. Hierdurch resultiert eine Instabilität der vertikalen Trabekel der Knochenmatrix, da deren horizontale Querverstrebungen fehlen. Eine häufig genutzte Analogie als Erklärung hierfür ist eine einfache Steinmauer. Die einzelnen Steine einer solchen Mauer werden immer um eine halbe Querlänge versetzt zur darunterliegenden Schicht gestapelt. Hierdurch entsteht die erwähnte vertikale Stabilität. Erfolgt nun kein solches Versetzen, liegen alle Steine direkt aufeinander und haben keine feste Verbindung zu den seitlich anliegenden Steinen; die Mauer wird instabil und kann ein nur deutlich geringeres Gewicht tragen (Bono et al. 2003).

1.2.3 Klinik, Diagnostik und Therapie

Die Osteoporose manifestiert sich zu Beginn durch diffuse Rückenschmerzen, später kommt es zur Kyphosierung der Wirbelsäule (Gibbus, „Buckel“) und einer Abnahme der Körpergröße durch Sinterung der Wirbelkörper. Das größte Problem der Erkran-

kung sind die pathologischen Frakturen (Kim et al. 2006). Darunter verstehen sich Knochenbrüche, die ohne adäquates Trauma entstehen. Je nach Form der Osteoporose sind unterschiedliche Knochen eher betroffen. Es kommt dabei überwiegend zu Frakturen des distalen Radius, des proximalen Humerus, der thorakalen und lumbalen Wirbelkörper sowie des proximalen Femurs (Melton et al. 2012).

Das wichtigste Instrument zur Diagnosesicherung ist die Knochendichtemessung mittels Dual-Röntgen-Absorptiometrie (DEXA). Hierbei wird die Dichte der Lendenwirbelkörper LWK1-LWK4 und der Hüfte in g/cm^3 gemessen. Liegt die Dichte eine Standardabweichung unterhalb des Referenzwertes für junge Erwachsene (T-Score ≤ -1), so wird dies als Osteopenie bezeichnet, ab einer Abweichung von mindestens 2,5 (T-Score $\leq -2,5$) von Osteoporose (World Health Organization 1994). An laborchemisch bestimmbaren Knochenparametern stehen ALP, OC, Coll1-Propeptid und Kollagen-Telopeptide zur Verfügung (Vilaca et al. 2017; Jain et al. 2018). Dabei ist zu erwähnen, dass in der aktuellen deutschen Leitlinie für Osteoporose die Bestimmung solcher Parameter nicht empfohlen wird (Dachverband Osteologie e.V. 2017). In einer kürzlich durchgeführten Metaanalyse zeigte sich bspw., dass die Serumkonzentration von OC nicht signifikant zwischen Kontrollgruppe und Patientinnen mit postmenopausaler Osteoporose differiert (Liu et al. 2019).

Zum Ausschluss sekundärer Ursachen sollten u. a. die Leukozytenzahl im Blut, Kalzium und Kreatinin im Urin sowie Kalzium, Albumin, Phosphat und ALP im Blutplasma bestimmt werden (Glaser et al. 1997). Bei Männern mit erniedrigten Knochendichtewerten empfiehlt sich die Bestimmung der Testosteronkonzentration (Dachverband Osteologie e.V. 2017).

Zur Therapie der Krankheit stehen laut aktueller Leitlinie an primär empfohlenen Wirkstoffklassen Bisphosphonate, selektiver Östrogenrezeptormodulator (SERM), PTH-Analoga, Denosumab – ein monoklonaler Antikörper gegen RANKL – und mit Einschränkungen Östrogene zur Verfügung (Dachverband Osteologie e.V. 2017). Neben diesen primär empfohlenen Wirkstoffen sind noch Calcitonin und Strontiumranelat zur Behandlung zugelassen (Maeda et al. 2014).

Fast alle der genannten Wirkstoffklassen wirken lediglich resorptionshemmend auf den Knochen (Fleisch 1998; Delmas et al. 1997; Lacey et al. 2012; Khosla 2010; Chesnut et al. 2000). Teriparatid, das einzige zur Behandlung zugelassene PTH-Analogon, wirkt stimulierend auf den Knochen (Miyakoshi 2004; Tsuchie et al. 2013). Strontiumranelat nimmt eine Sonderstellung ein, da es sowohl antiresorptiv, als auch konstruktiv auf Knochen zu wirken scheint (Meunier et al. 2004).

1.3 Cholinerges System

Das cholinerge System ist eines der ältesten und ubiquitär vorkommenden Systeme der Natur (Wessler et al. 1999). Namensgebender Bestandteil dieses Systems ist das Molekül Acetylcholin (ACh) (Abb. 1). Durch die Arbeit von Henry Hallett Dale und Otto Loewi konnte gezeigt werden, dass ACh eines der wichtigsten Botenstoffe des Nervensystems ist (Fishman 1972). Es spielt nicht nur eine Rolle im Menschen und anderen tierischen Organismen, sondern auch in diversen primitiveren Ein- und Mehrzellern (Wessler et al. 2009).

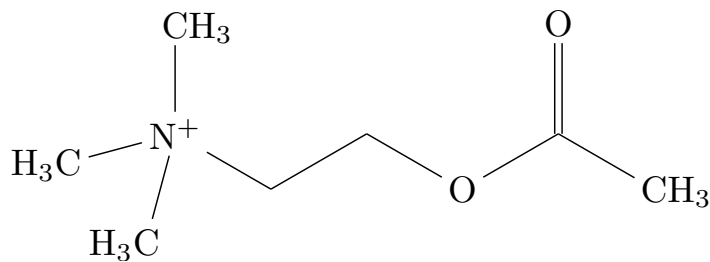


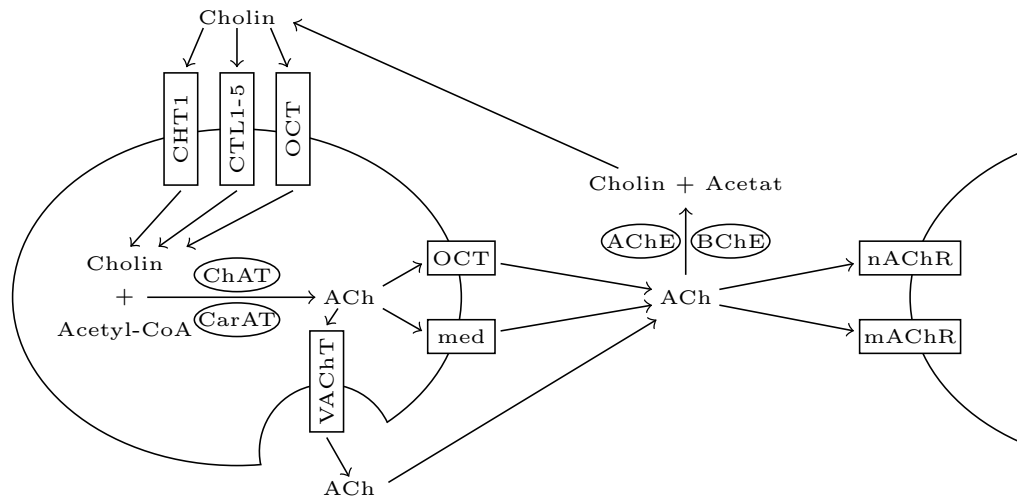
Abbildung 1: Acetylcholin

ACh ist zwar hauptsächlich für seine Funktion als Neurotransmitter bekannt, kommt allerdings nicht nur in den neuronalen Systemen des Körpers, sondern auch als lokaler Mediator vor. Es wirkt also auch als humoraler Vermittler diverser Funktionen. In diesem Fall wird vom non-neuronalen cholinergen System (NNCS) gesprochen, welches speziell im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurde. Das NNCS findet sich in nahezu allen Bereichen des menschlichen Organismus. Einige Beispiele sind das respiratorische und kardiovaskuläre System, der Verdauungstrakt und das insbesondere für diese Arbeit relevante muskuloskeletale System (Wessler et al. 2009). In vielen dieser Systeme scheint ACh eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie diverser Krankheiten zu spielen (Wessler et al. 2016).

1.3.1 ACh-Synthese und -Degradation

In den meisten neuronalen und non-neuronalen Zellen des cholinergen Systems wird ACh durch das Enzym Cholinacetyltransferase (ChAT) aus Cholin und Acetyl-Koenzym A (CoA) synthetisiert. Neben ChAT kann ACh in manchen Zellen auch durch das Enzym Carnitinacetyltransferase (CarAT) produziert werden. Die Freigabe von ACh erfolgt entweder durch den vesikulären Acetylcholintransporter (VACHT), direkt über organische Kationentransporter (OCT) oder das Protein Mediatophore. Die Wirkung von ACh wird durch seine Bindung an nikotinische (nAChR) oder muskarinische Acetylcholinrezeptoren (mAChR) entfaltet. Um die Wirkung des Moleküls zu beenden, wird es durch Acetylcholinesterase (AChE) oder Butyrylcholinesterase (BChE) wieder in seine Bestandteile Cholin und Acetat abgebaut. Der geschwin-

digkeitsbestimmende Schritt der ACh-Synthese stellt dabei die Wiederaufnahme von Cholin in die entsprechenden Zellen dar. In non-neuronalen Zellen geschieht dies entweder durch den auch in Neuronen vorkommenden Cholin-Transporter 1 (CHT1), Cholin-Transporter-ähnliche Proteine 1-5 (CTL1-5) oder durch OCT (Beckmann et al. 2013) (Abb. 2).



ACh = Acetylcholin, AChE = Acetylcholinesterase, BChE = Butyrylcholinesterase, CarAT = Carnitinacetyltransferase, ChAT = Cholinacetyltransferase, CHT1 = Cholin-Transporter 1, CoA = Koenzym A, CTL1-5 = Cholin-Transporter-ähnliche Proteine 1-5, med = Mediatophore, mAChR = muskarinischer Acetylcholinrezeptor, nAChR = nikotinischer Acetylcholinrezeptor, OCT = organischer Kationentransporter, VACHT = vesikulärer Acetylcholintransporter

Abbildung 2: Übersicht des non-neuronalen cholinergen Systems. Modifiziert nach Beckmann et al. 2013

1.3.2 ACh-Rezeptoren

Es gibt zwei Arten von ACh-Rezeptoren, nämlich den Rezeptor vom muskarinischen Typ und den vom nikotinischen Typ. Die Namen stammen von den beiden Stoffen Muskarin und Nikotin, die neben ACh in der Lage sind, den jeweiligen Rezeptor zu aktivieren.

Der mAChR ist ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor. Das bedeutet, dass der Effekt der Aktivierung des Rezeptors durch ein weiteres Protein ausgelöst wird, das G-Protein, das im aktivierten Zustand als G_q - oder G_i -Protein bezeichnet wird. Es werden fünf Typen an mAChR im menschlichen Organismus unterschieden: M_1 - M_5 . Die Subtypen M_1 , M_3 und M_5 verhalten sich bei Aktivierung ähnlich: Durch das G_q -Protein wird die Phospholipase C_β aktiviert, welche Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat in Inositoltrisphosphat und Diacylglycerin (DAG) umsetzt. Diese beiden als *Second Messenger* bezeichneten Stoffe führen zu einem Kalziumeinstrom und einer Depolarisation der Zelle, wodurch es zur eigentlichen Wirkung der Rezeptoraktivierung kommt. Außerdem führt die erhöhte Konzentration von DAG und

Kalzium in der Zelle zur Aktivierung der Proteinkinase C, welche die Zellaktivität zusätzlich moduliert. Bei Aktivierung der M_2 - und M_4 -Rezeptoren kommt es zu einer Aktivierung des inhibitorischen G_i -Proteins. Dieses öffnet Kaliumkanäle und hemmt die Adenylcyclase. Dies führt zu einem Kaliumausstrom aus der Zelle und einer verminderten Umsetzung von Adenosintriphosphat (ATP) in zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP), wodurch die Aktivität der Proteinkinase A und der Kalziueinstrom in die Zelle sinkt. Zusammengefasst hyperpolarisiert die Zelle und wird in ihrer Aktivität gehemmt (Lanzafame et al. 2003; Beckmann et al. 2013).

Der nAChR wird in einen nervalen und muskulären Subtyp unterteilt. Beide sind Ionenkanäle, die bei Bindung von ACh aktiviert werden, wodurch es insbesondere zu einem Natrium- und Kalziueinstrom kommt, der die Zelle depolarisiert und aktiviert. Neben diesem Effekt existieren noch weitere Signalmechanismen, die unterschiedliche Wirkungen auf die Zelle haben (Hurst et al. 2013; Beckmann et al. 2013).

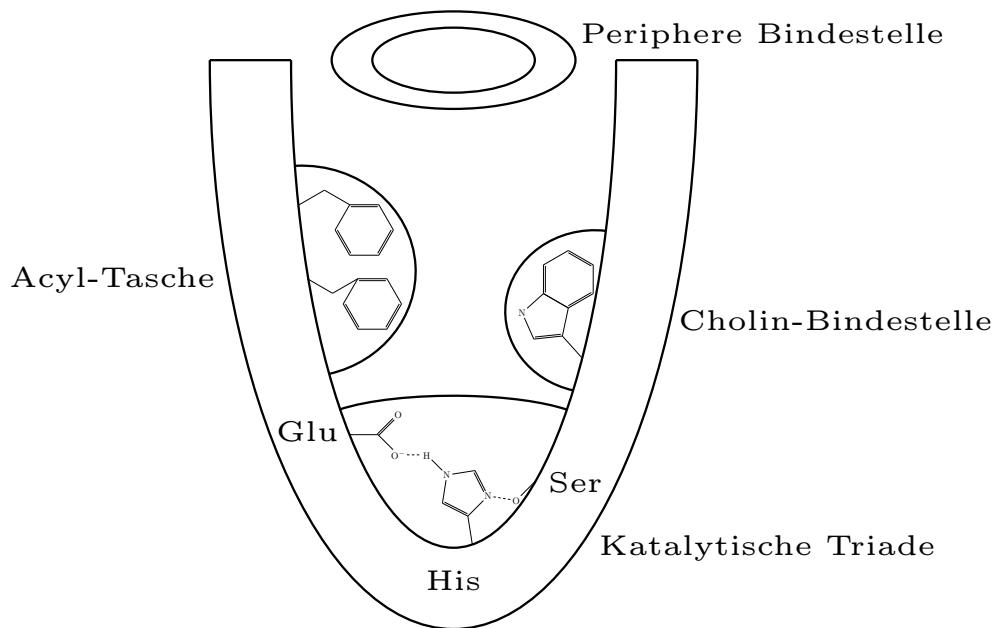
Relevant für das NNCS des Knochens sind sowohl der nAChR als auch der mAChR; es konnte gezeigt werden, dass beide Typen von Osteozyten, -blasten, -klasten und von MSC exprimiert werden (Eimar et al. 2013b). Für die Pathophysiologie der Osteoporose scheinen insbesondere die Rezeptoren vom nikotinischen und vom M_3 -Typ relevant zu sein (Beckmann et al. 2013).

1.3.3 Acetylcholinesterase

Das Enzym AChE ist eine Serinhydrolase, die sehr spezifisch ACh in Acetat und Cholin abbaut. Bemerkenswert ist die Geschwindigkeit des Enzyms, die bei etwa 25 000 Reaktionen pro Sekunde liegt. Diese Geschwindigkeit ist nötig, damit die synaptische Aktivität nach Nervenstimulation zeitnah beendet werden kann. Es besitzt eine für Serinhydrolasen klassische katalytische Triade, bestehend aus den Aminosäuren Serin (Ser), Histidin (His) und Glutamat (Glu) (Colovic et al. 2013) (Abb. 3).

Es bestehen mehrere Isoformen des Enzyms. Es werden drei Varianten des Splicens der entsprechenden prä-messenger RNA (mRNA) beschrieben; dabei entstehen die Varianten AChE-S, AChE-R und AChE-E. Die erste Variante des resultierenden Proteins (AChE-S, *synaptische* Form, teilweise auch als AChE-T (*tailed*) bezeichnet) findet sich in neuronalen Zellen und im muskuloskelettalen System. Sie entspricht sozusagen der „Standardvariante“ des Enzyms und liegt membrangebunden in den entsprechenden Zellen vor. Die *readthrough* Variante AChE-R wird bei Stress und in embryonalen und Tumorzellen exprimiert. AChE-E (teilweise auch als AChE-H (hydrophobisch) bezeichnet) kommt in den namensgebenden Erythrozyten vor (Grisaru et al. 1999; Xu et al. 2017).

Die Balance aus ACh-Synthese und -Degradation spielt bei vielen Erkrankungen eine große Rolle. Eines der bekanntesten Beispiele hierfür ist die Alzheimer-Demenz.



Glu = Glutamat, His = Histidin, Ser = Serin

Abbildung 3: Acetylcholinesterase. Modifiziert nach Colovic et al. 2013

Eine der Hypothesen der Krankheitsätiologie besagt, dass es zu einer verminderten Aktivität der ChAT kommt und es durch den dadurch bedingten ACh-Mangel zu den Symptomen der Erkrankung kommt, nämlich der Minderung der kognitiven Fähigkeiten. Therapeutisch wird sich dieses Wissen zu Nutze gemacht, indem Alzheimer-Patientinnen und -Patienten mit einem AChEI behandelt werden. Die bekanntesten Vertreter dieser Wirkstoffklasse sind Donepezil, Rivastigmin und Galantamin. Diese Medikamente hemmen die AChE, wodurch weniger ACh abgebaut wird und letztlich mehr dieses mangelhaft vorhandenen Moleküls zur Verfügung steht. Dadurch können die Symptome der Krankheit abgemildert werden (Barage et al. 2015).

Nicht verschwiegen werden darf jedoch, dass diese Medikamente teils starke Nebenwirkungen zeigen. Aufgrund der Tatsache, dass sie in das autonome Nervensystem des Menschen eingreifen, ist dies auch nicht verwunderlich. Typische Symptome sind gastrointestinale Beschwerden, wie Übelkeit, Diarrhöen und abdominelle Schmerzen sowie kardiale Beschwerden, die sich meist als Bradykardie manifestieren (Tayeb et al. 2012; Mohammad et al. 2017).

ACh spielt jedoch nicht nur in neuronalen Systemen eine Rolle, sondern auch im bereits erwähnten NNCS. Die Mechanismen der ACh-Synthese, -Degradation und Aktivierung der Rezeptoren funktionieren hier nach den gleichen Prinzipien wie im Nervensystem. Deshalb ist anzunehmen, dass AChEI auch hier eine relative ACh-Erhöhung auslösen können. Aus diesem Grund wurde auch in dieser Arbeit ein solcher AChEI, nämlich Donepezil (Abb. 4), verwendet. Donepezil ist ein reversibler,

spezifischer AChEI und in Deutschland zur Behandlung einer leichten bis mittelschweren Alzheimer-Demenz zugelassen (Tayeb et al. 2012; Deuschl et al. 2016). Wie erwähnt findet sich sowohl in neuronalen als auch in muskuloskelettalen Zellen die gleiche Isoform des Enzyms (AChE-S), sodass von einer gleichen Wirkweise des Medikamentes auszugehen ist.

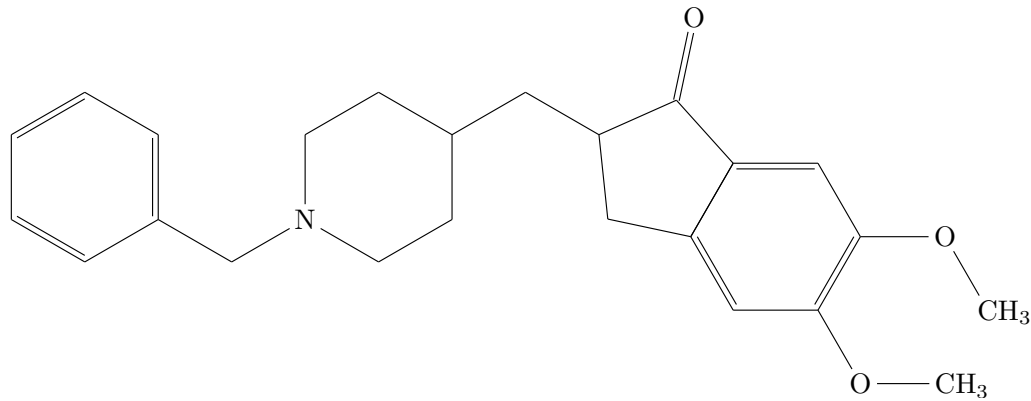


Abbildung 4: Donepezil

Neben AChE wird ACh wie erwähnt auch durch BChE abgebaut. Lange Zeit war vermutet worden, dass das Enzym keine physiologische Funktion habe, da es selbst Menschen gibt, die trotz absoluten Mangels des Proteins gesund sind (Lockridge 2015). Erstmals aufgefallen war eine klinische Relevanz, als erkannt wurde, dass das Enzym u. a. das Muskelrelaxans Succinylcholin abbaut. Patientinnen und Patienten mit einem entsprechenden Enzymdefekt laufen damit Gefahr, bei Operationen damit überdosiert zu werden. Auch sind einige Mutationen des BChE-Gens assoziiert mit einem erhöhtem Risiko, einige Erkrankungen zu entwickeln (Brimijoin et al. 2016). Wie oben erwähnt ist es jedoch auch an der Degradation von ACh beteiligt, arbeitet jedoch deutlich unspezifischer als AChE und scheint entsprechend eine eher untergeordnete Rolle in diesem Kontext zu spielen (Beckmann et al. 2013). Bei BChE-Knockout-Mäusen findet sich eine veränderte Mikroarchitektur des Knochens und eine erhöhte Anzahl an knochenabbauenden Osteoklasten. AChE scheint jedoch auch hier die Effekte der fehlenden BChE kompensieren zu können (Haupt et al. 2015). Umgekehrt scheint allerdings auch BChE einen Mangel an AChE teilweise zu kompensieren (Kauschke et al. 2015). Die genaue Rolle im Rahmen der Osteoporose steht zum Zeitpunkt des Verfassens dieser Arbeit noch nicht fest.

1.4 Fragestellung und Zielsetzung

AChEI wie Donepezil werden im Rahmen einer Alzheimer-Demenz therapeutisch genutzt, da sie die verminderte ACh-Konzentration erhöhen. In einer Fall-Kontroll-Studie konnte gezeigt werden, dass mit einem AChEI behandelte Alzheimer-Patientinnen und -Patienten ein geringeres Risiko haben, eine Hüftfraktur zu erleiden (Ta-

mimi et al. 2012). Dieses Ergebnis konnte in einer erneuten Fall-Kontroll-Studie mit deutlich größerer Stichprobenzahl verifiziert werden (Tamimi et al. 2017b). Neben diesem verringerten Risiko einer solchen Fraktur, zeigt sich außerdem eine verbesserte Heilungs- und erniedrigte Komplikationsrate nach erlittener Hüftfraktur bei Einnahme eines AChEI (Eimar et al. 2013a). Ebenso zeigte sich eine verringerte Mortalität nach durchgemachter Hüftfraktur (Tamimi et al. 2017a). Nach Applikation von Donepezil auf Mäuse konnte ein erhöhtes Knochenvolumen, eine erhöhte Knochendichte und vermehrte Trabekelbildung festgestellt werden (Eimar et al. 2016).

Daraus ergibt sich die Möglichkeit, dass AChEI auch einen Einfluss auf osteoporotische Zellen haben könnten. Sie könnten entsprechend insbesondere zu einem erhöhten Knochenvolumen, einer erhöhten Knochendichte und vermehrter Trabekelanzahl führen. Aus diesem Grund wurde Donepezil in vitro an MSC eines ovinen Osteoporose-Modells appliziert. Es ergeben sich folgende Fragen, die mittels dieser Arbeit beantwortet werden sollen:

- Zeigen sich unterschiedliche Phänotypen der untersuchten Zellgruppen, zeigen also osteoporotische MSC andere Expressionsmuster und anderes Verhalten als gesunde? Lassen sich diese erwarteten Unterschiede durch die Applikation Donepezils vermindern?
- Kommt es durch die Applikation des AChEI Donepezil zu einer signifikanten Verminderung der AChE-Aktivität der untersuchten Zellen und führt dies zu einer veränderten Expressionsrate von AChE oder BChE, was weitere Einflüsse des Wirkstoffes vermindern könnte?
- Führt Donepezil zu einer erhöhten Proliferationsrate der untersuchten Zellen?
- Kommt es durch die Applikation Donepezils zu einer erhöhten Expressionsrate der Osteoblastenmarker und Osteoidbestandteile Col1A1 und OC? Zeigt sich also eine vermehrte Differenzierung der MSC in Richtung Osteoblasten und eine erhöhte Produktion von Osteoid?
- Spielt *Brain-derived Neurotrophic Factor* (BDNF) in diesem Rahmen eine Rolle, kommt es also zu einer veränderten Expressionsrate dieses Wachstumsfaktors?

Durch die Beantwortung dieser Fragen soll geklärt werden, welchen potentiellen Nutzen Osteoporose-Patientinnen und -Patienten aus einer Therapie mit einem AChEI unter Berücksichtigung der bekannten Nebenwirkungen ziehen könnten.

2 Material und Methoden

2.1 Zellkultur

Voraussetzung zur Durchführung der Experimente war das Anlegen einer Zellkultur. Hierfür wurden MSC eines ovinen Osteoporosemodells verwendet. Es wurden Beckenkambbiopsien von Prof. Christian Heiß und Prof. Thaqif El Khassawna des T1-Projektes des Sonderforschungsbereiches/Transregio 79 der Deutschen Forschungsgemeinschaft zur Verfügung gestellt (Khassawna et al. 2017). Ziel des T1-Projektes war es, ein Tiermodell für Osteoporose zu etablieren. Als Modelltiere wurden Merinoschafe ausgewählt. Die Versuche am Tier wurden in der zentralen Forschungseinrichtung der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main von der genannten Forschungsgruppe durchgeführt. Der Tierversuchsantrag (Aktenzeichen: V 54 - 19c20/15 - F31/36) wurde durch das Regierungspräsidium Darmstadt am 27.09.2012 genehmigt.

Die Schafe wurden in Gruppen unterteilt; eine Kontrollgruppe und drei Interventionsgruppen, bei denen die Krankheit auf folgende Weise induziert wurde:

K Kontrollgruppe

OVX Ovariectomie (operative Eierstockentfernung)

OVX+D Ovariectomie und zusätzliche Kalzium- und Vitamin D₃-defiziente Diät

OVX+D+S Ovariectomie, Diät und zusätzlich regelmäßige Steroidinjektionen

Es wurden zu drei Zeitpunkten Proben aus dem Beckenkamm der Schafe entnommen und mittels DEXA die Knochendichte bestimmt, nämlich zu Beginn des Versuches – noch vor den Ovariectomien – erneut nach drei Monaten und nach Euthanasie der Schafe – acht Monate nach Versuchsbeginn. Im Rahmen dieser Arbeit wurden ausschließlich Proben des letzten Entnahmezeitpunktes verwendet. Die Tiere der Gruppen OVX+D und OVX+D+S erhielten zwei Wochen nach Ovariectomie ihre Spezialdiät (Tab. 1), letztere Gruppe ab diesem Zeitpunkt außerdem Steroidinjektionen in zweiwöchigen Abständen (jeweils 320 mg Methylprednisolon, Depo-Medrate ad us. vet., Pfizer, New York City, NY, USA). Das Futter beider Diäten wurde von der Firma Ssniff Spezialdiäten (Soest, Deutschland) bezogen.

Khassawna et al. konnten zeigen, dass es durch die genannten Interventionen zu einer gestörten Knochenmineralisation durch Ausdünnung der Trabekel, vermehrte apoptotische Osteozyten und unausgeglichene Metabolismus kam. Im DEXA-Scan der Schafe der Gruppe OVX+D+S acht Monate nach Beginn der Versuche ergab sich ein T-Score von $-3,3127$ (Heiss et al. 2017). Es konnte also erfolgreich ein osteoporotischer Phänotyp induziert werden.

Tabelle 1: Diäten

Bestandteil	Standard-Diät	Spezial-Diät
Natrium	0,18 %	0,26 %
Kalium	2,10 %	1,10 %
Kalzium	1,10 %	0,18 %
Magnesium	0,20 %	0,26 %
Phosphor	0,55 %	0,74 %
Vitamin A	12 000 IE/kg	12 000 IE/kg
Vitamin D₃	1100 IE/kg	0 IE/kg
Vitamin E	105 mg/kg	85 IE/kg

Nach den Probenentnahmen wurden MSC aus den Biopsien angezüchtet. Dies wurde im Labor für experimentelle Unfallchirurgie der Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen durch Dr. Katja Trinkaus unter Mitarbeit von Olga Dakischew und Dr. Vivien Kauschke durchgeführt. Das Verfahren hierfür erfolgte analog der Methode, MSC aus *Reaming Debris* zu extrahieren (Wenisch et al. 2005). Hierbei wurden die Zellen in *Ham's/Kaighn's F-12K Medium* (F12K) (Gibco, Waltham, MA, USA) mit 10 % fetalem Kälberserum (FBS) (PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland) und anfänglich 1 % Penicillin/Streptokinase (Gibco) angezogen. Aufgrund von Kontaminationsproblemen mit Bakterien wurde Penicillin/Streptokinase bald durch 0,2 % Gentamicin/Amphotericin B (Gibco) ersetzt. Die Zellen wurden dabei einmal pro Woche 1 : 3 gesplittet, ebenso fand einmal pro Woche ein Mediumwechsel statt. Nach ihrer Anzucht wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff eingefroren und für die Versuche dieser und weiterer Arbeiten wieder aufgetaut.

2.1.1 Auftauen

Aufgetaut wurden die Zellen in 250 mL Zellkulturflaschen (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich). Diese wurden mit 15 mL vorgewärmtem Medium, bestehend aus *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) (PAN Biotech) mit 10 % FBS und 0,2 % Gentamicin/Amphotericin B gefüllt und für 30 min in einen Brutschrank (37 °C, 10 % CO₂) gestellt, um eine möglichst exakte Temperatur von 37 °C zu erreichen. Anschließend wurden die Zellen aus dem Stickstofftank geholt und für etwa 1 min in einem 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut. Sobald der Rand des Zellpellets zu schmelzen begann, wurde das Kryoröhrchen aus dem Bad genommen und die Zellen in die Kulturflasche gegeben, durch Schwenken verteilt und in den Brutschrank gestellt.

Nach etwa 24–48 h Inkubation in diesem, waren die Zellen zu etwa 80–90 % konfluent – noch etwa 10–20 % des Bodens waren vom Zellrasen unbedeckt – und konnten

passagiert werden.

2.1.2 Passagieren

Als erster Schritt des Passagierens wurde das gesamte Zellmedium dekantiert und Proteinreste mittels phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) (Gibco) entfernt. Hierzu wurden 10 mL PBS in die Flasche gegeben und wieder dekantiert. Anschließend wurden 4 mL 0,05 μ M vorgewärmtes Trypsin-Ethylendiamintetraacetat (EDTA) (Gibco) auf den Zellrasen pipettiert und die so präparierte Kulturflasche für etwa 10 min in den Brutschrank gestellt. Trypsin löst Zell-Zell-Kontakte und Verbindungen mit dem Boden der Kulturflasche, wodurch sich der Zellrasen auflöst und die Zellen frei im Trypsin schwimmen.

Durch leichtes Beklopfen unter Mikroskopkontrolle wurden alle Zellen vom Boden der Flasche gelöst. Die Trypsinreaktion wurde durch Zugabe von 4 mL Medium gestoppt. Abschließend wurden jeweils 4 mL der Zellsuspension in zwei frische Kulturflaschen, die bereits mit erneut 15 mL des Mediums befüllt worden waren, überführt.

Nach dem Passagieren waren nun also pro Schaf zwei Flaschen an Zellen verfügbar und konnten nach einer weiteren Inkubationszeit von ca. 24–48 h – bis sie erneut zu 80–90 % konfluent waren – für die Versuche ausgesät werden.

2.1.3 Aussäen

Zum Durchführen der Versuche mussten die Zellen in Well-Platten ausgesät werden. Hierfür wurde das gleiche Medium wie auch beim Auftauen verwendet. Je nach Versuch wurden unterschiedliche Platten (alle Greiner Bio-One) und Medienvolumina verwendet:

- AChE-Aktivitätsbestimmung:
24-Well-Platten; 1000 μ L Medium
- Proliferationsbestimmung:
96-Well-Platten; 100 μ L Medium
- Ribonukleinsäure (RNA)-Isolation:
6-Well-Platten; 2500 μ L Medium

Nach dem Befüllen der Wells mit dem Zellkulturmedium wurden die ersten Schritte des Passagierens wiederholt: Dekantieren des Mediums, Waschen mit PBS, Trypsinieren, Stoppen der Reaktion.

Der nächste Schritt war das Bestimmen der Zellkonzentration in diesem Lysat, um die immer gleiche Anzahl an Zellen aussäen zu können. Diese Zellzahl wurde mit dem *Cell Counter* CASY TT (Roche Innovatis, Bielefeld, Deutschland) bestimmt. Zuerst

wurde die Suspension in ein 50 mL Zentrifugenröhrchen (Falcon-Röhrchen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) überführt und für 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand dekantiert und das entstandene Zellpellet in 1 mL Medium suspendiert. Nach gründlichem Schütteln des Behälters wurden 10 μ L mittels Pipette entnommen, in 10 mL CASY ton (Komponente CASY TT) pipettiert und anschließend die Zellzahl bestimmt. Dabei lag die Viabilität (Ratio lebende Zellen zu Zellresten) stets über 90 %.

Die Zellen wurden in einer Dichte von 15 000 Zellen pro cm^2 ausgesät. Dies entspricht einer Zellzahl von 144 000 Zellen pro Well in den 6-Well-Platten (9,6 cm^2 pro Well), 28 500 in den 24-Well-Platten (1,9 cm^2) und 4800 in den 96-Well-Platten (0,32 cm^2). Das jeweils entsprechende Volumen an Zellysat wurde in die Wells pipettiert und unter Mikroskopkontrolle gründlich gemischt, um eine homogene Aussaat zu garantieren. Die Plattenlayouts der einzelnen Versuche werden bei den jeweiligen Versuchsbeschreibungen dargestellt. Anschließend wurden die Zellen für 24 h im Brutschrank inkubiert, um ein Anwachsen am Boden der Platten zu ermöglichen.

Nach Ablauf dieser Zeit wurde auf das eigentliche Versuchsmedium, nämlich DMEM mit lediglich 1 % FBS und weiterhin 0,2 % Gentamicin/Amphotericin B gewechselt, das alte Medium dabei mit einer Peristaltikpumpe entfernt. Die Zellen der Kontrollgruppe erhielten außer diesen Inhalten keine weiteren Zusätze, die der Interventionsgruppe außerdem nun auch Donepezil (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in einer Konzentration von 15,4 nM in das Medium. Nach weiteren 12 h Inkubation wurden die Versuche gestartet.

Jeder der Versuche wurde insgesamt fünfmal wiederholt. Eine Wiederholung ($n = 1$) enthielt dabei jeweils Zellen aus allen vier Schafgruppen.

2.1.4 Einfrieren

Nicht mehr benötigte Zellen wurden wieder in flüssigem Stickstoff eingefroren, um eine spätere Wiederverwendung zu ermöglichen.

Hierzu wurden die Zellen erneut trypsinisiert und nach Stoppen der Trypsin-Reaktion in ein 50 mL Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 min bei Raumtemperatur und 1200 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig dekantiert und das übriggebliebene Zellpellet in FBS mit 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) (ATCC, Manassas, VA, USA) suspendiert. Dieses Lysat wurde in ein Kryoröhrchen pipettiert und in Isopropanol in einen -80°C Gefrierschrank gestellt, was eine langsame Abkühlung (ca. 1°C pro min) ermöglicht. Nach einer Wartezeit von mindestens 80 min und höchstens 24 h wurden die Zellen in den Stickstofftank gestellt.

2.2 Funktionelle Assays

Im Folgenden werden die beiden verwendeten funktionellen Assays beschrieben.

Erster Schritt war es jedoch, herauszufinden, in welcher Konzentration Donepezil welchen Anteil an AChE inhibiert und anschließend, welche Inhibitionsstärke für die Versuche zu verwenden ist. Diese beiden Pilotversuche werden entsprechend zuerst beschrieben.

2.2.1 Inhibitionskinetik

Da die Inhibitionsstärke Donepezils für die verwendeten Zellen vorerst nicht bekannt war, musste diese zuerst bestimmt werden. Es galt also herauszufinden, in welcher Konzentration welcher Anteil an AChE inhibiert wird. Hierfür wurde die Inhibitionskinetik von Donepezil bestimmt. Die resultierenden relevanten Ergebnisse hiervon sind die effektiven Konzentrationen (EC). Die EC_{30} entspricht beispielsweise der Konzentration, bei der 30 % der maximalen Inhibitorwirkung erreicht wird; 70 % des Enzyms (hier AChE) sind also noch aktiv. Hierfür wurde ein funktioneller Assay-Kit (Acetylcholinesterase Assay Kit (Fluorometric-Red), Abcam, Cambridge) verwendet.

Es wurde eine Donepezil-Verdünnungsreihe mit folgenden Konzentrationen in den Reaktionswells angelegt:

5 μ M, 1 μ M, 500 nM, 100 nM, 50 nM, 10 nM, 5 nM, 1 nM, 500 pM, 100 pM.

Für den Versuch wurden Zellen aus einer 250 mL Zellkulturflasche verwendet. Die Zellen wurden hierfür mit einem Zellschaber (TPP, Trasadingen, Schweiz) direkt im Kulturmedium abgeschabt, in ein 50 mL Zentrifugenröhrchen überführt und die Zellzahl bestimmt. Es wurde ein Volumen entsprechend 400 000 Zellen in ein neues Zentrifugenröhrchen pipettiert, dieses zentrifugiert (5 min, 1200 rpm, Raumtemperatur), der Überstand dekantiert und das Zellpellet in 4000 μ L Assay-Puffer (50 mM Kaliumphosphat-Puffer) resuspendiert. Anschließend wurde nach dem unten beschriebenen Protokoll verfahren, dabei Donepezil in den genannten Konzentrationen zu den Wells hinzugefügt.

Der gleiche Versuchsablauf wurde außerdem mit einem um 1 : 2 verdünnten Zelllysate, also 400 000 Zellen in 8000 μ L Puffer wiederholt, um zum einen die Resultate des ersten Versuchs zu bestätigen, zum anderen, um einen erwarteten linearen AChE-Aktivitätszusammenhang zu prüfen (halb so viele Zellen bedeutet halb so viel Enzym, folglich halb so viel Aktivität).

Zur Auswertung wurde die gemessene Fluoreszenz (Einheit: RFU = *relative fluorescence units*), die laut Protokollbuch des Herstellers direkt proportional zur AChE-Aktivität ist, gegen die logarithmierten Donepezil-Konzentrationen aufgetragen (Datenpunkte in Abb. 5). Mittels Regression (Methode der kleinsten Quadrate) konnte eine sigmoide Funktion (S-Funktion) folgender Form an die Messwerte angepasst

werden:

$$y = \frac{L}{1 + e^{-k \cdot (x-x_0)}}$$

$y = L$ entspricht hierbei der waagrechten Asymptoten, der sich die Funktion für $x \rightarrow -\infty$ annähert; also der maximalen AChE-Aktivität ohne Inhibition. x_0 entspricht der EC_{50} – mathematisch dem Wendepunkt des Graphen. Insbesondere k beschreibt die Steigung des Graphen in diesem Punkt. Durch algebraische Umformung dieser Funktion konnte die jeweilige Konzentration für die entsprechend passende Ratio der AChE-Inhibition ermittelt werden:

$$x = -\frac{\ln\left(\frac{L}{y} - 1\right)}{k} + x_0$$

Für die Berechnung der EC_{30} gilt $y = 0,7 \cdot L$, für die EC_{50} gilt $y = 0,5 \cdot L$ und für die EC_{70} gilt $y = 0,3 \cdot L$. Für die EC_{30} ergibt sich also beispielsweise:

$$x = -\frac{\ln\left(\frac{L}{0,7 \cdot L} - 1\right)}{k} + x_0 = -\frac{\ln\left(\frac{3}{7}\right)}{k} + x_0$$

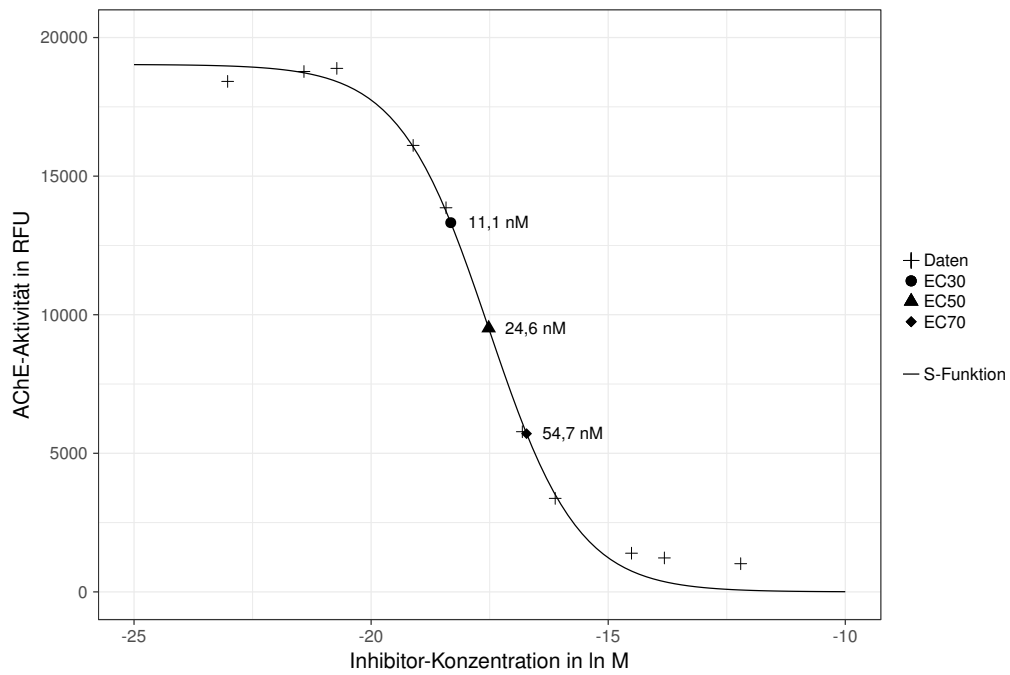
x hat dabei die Einheit $\ln M$. Durch das Berechnen von e^x werden die EC in M bestimmt.

Durch die Regression ergaben sich die in Tab. 2 dargestellten Werte für die Parameter und die daraus berechneten EC. Die resultierenden Funktionsgraphen sind in Abb. 5 dargestellt.

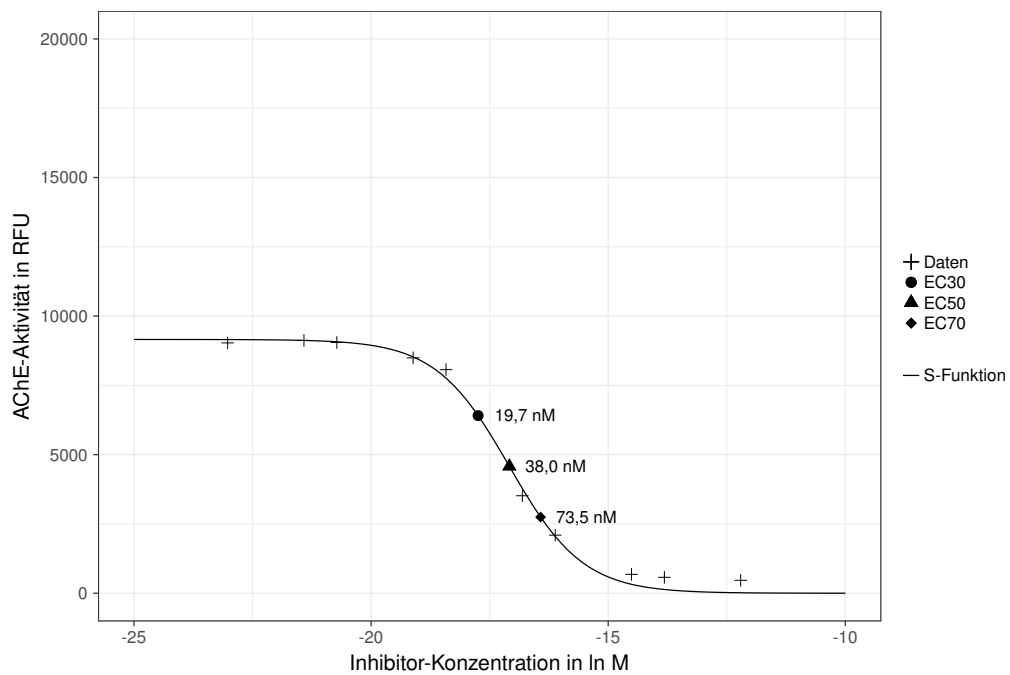
Tabelle 2: Ergebnis der Inhibitionskinetik

Parameter		unverdünnt	1 : 2 verdünnt	Durchschnitt
Name	Einheit			
L	RFU	19 030,40	9156,50	
k	1/ \ln nM	-1,06	-1,29	
x_0	\ln nM	-17,52	-17,08	
R^2	RFU ²	2 726 579,88	705 475,97	
EC_{30}	nM	11,1	19,7	15,4
EC_{50}	nM	24,6	38,0	31,3
EC_{70}	nM	54,7	73,5	64,1

EC = effektive Konzentration, $k/L/x_0$ = Parameter der S-Funktion, R^2 = Summe der Fehlerquadrate der Regression, RFU = *relative fluorescence units*



(a) unverdünnt



(b) 1 : 2 verdünnt

EC = effektive Konzentration, RFU = *relative fluorescence units*

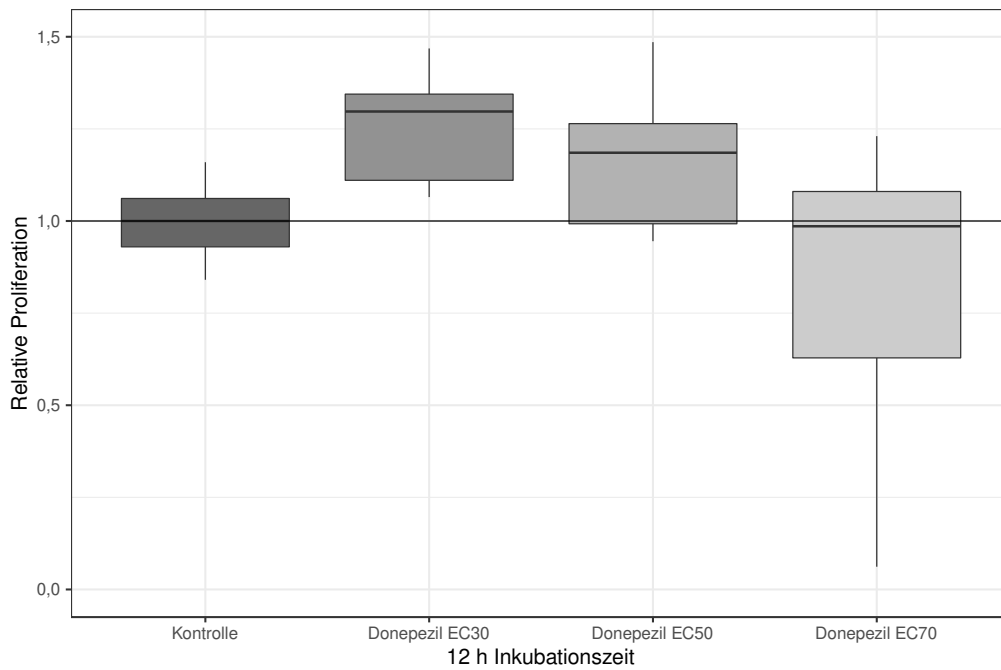
Abbildung 5: Inhibitionskinetik

2.2.2 Bestimmung von Konzentration und Inkubationsdauer

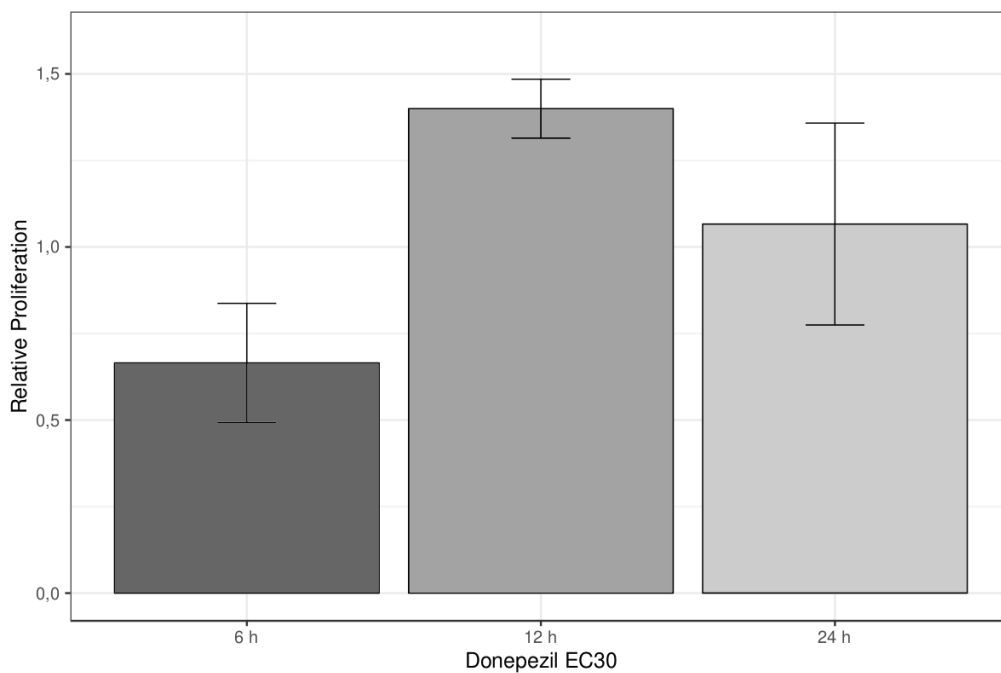
Nun war es zwar möglich alle EC Donepezils zu berechnen, jedoch war noch nicht bekannt, auf welche Stärke der Inhibition die Zellen am besten reagieren. Hierfür wurde ein weiterer funktioneller Assay durchgeführt, durch den die Proliferation der Zellen in Abhängigkeit der Donepezilkonzentration bestimmt werden konnte. Für die Bestimmung dieser Zellproliferationen wurde ein Bromdesoxyuridin (BrdU)-*Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA)-Kit (Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric), Roche, Basel, Schweiz) verwendet (genauer Versuchsablauf s. unten). Neben einer Kontrolle, die mit keinem Inhibitor inkubiert wurde, wurde Donepezil in den drei o. g. Durchschnittswerten der EC_{30} , EC_{50} und EC_{70} verwendet. Resultat dieses Versuches ist in Abb. 6 zu sehen. Es schien so, als würden die Zellen bei der EC_{30} Donepezils von 15,4 nM am besten proliferieren, weshalb in allen folgenden Experimenten diese verwendet wurde.

Nach Bestimmung der besten Konzentration musste nun noch die geeignetste Inkubationsperiode evaluiert werden. Dies wurde in einem weiteren Pilotversuch durchgeführt, in dem die Zellen für 6, 12 und 24 h mit Donepezil in der EC_{30} inkubiert wurden. Im Anschluss wurde auch hier die Proliferation mittels BrdU-Assay bestimmt. Die Zellen schienen am besten bei 12 h Inkubationszeit auf den Inhibitor anzusprechen. Aus diesem Grund wurde für alle folgenden Versuche mit diesem Zeitraum gearbeitet. Dies entsprach auch der von vornherein verwendeten Inkubationsperiode der bereits durchgeführten Pilotversuche, weshalb eine erneute Evaluation der Methodik mit anderen Zeiten nicht notwendig war.

Als abschließender Pilotversuch wurde nochmals die AChE-Aktivitätsbestimmung nach Inkubation mit Donepezil in der ausgewählten Konzentration und Inkubationszeit wiederholt, um den theoretisch berechneten Wert zu bestätigen. Wie in Abb. 7 zu sehen ist, wurde eine Inhibition auf 70,2 % AChE-Restaktivität erreicht, was die errechnete EC_{30} validierte.



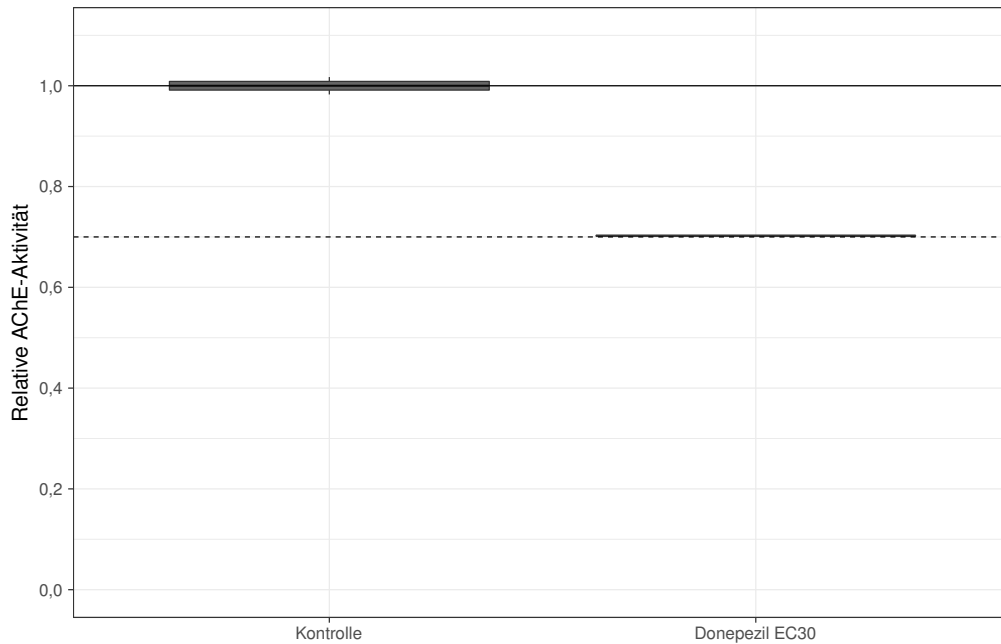
(a) Bestimmung der Konzentration



(b) Bestimmung der Inkubationszeit

EC = effektive Konzentration

Abbildung 6: BrdU-Pilotversuche

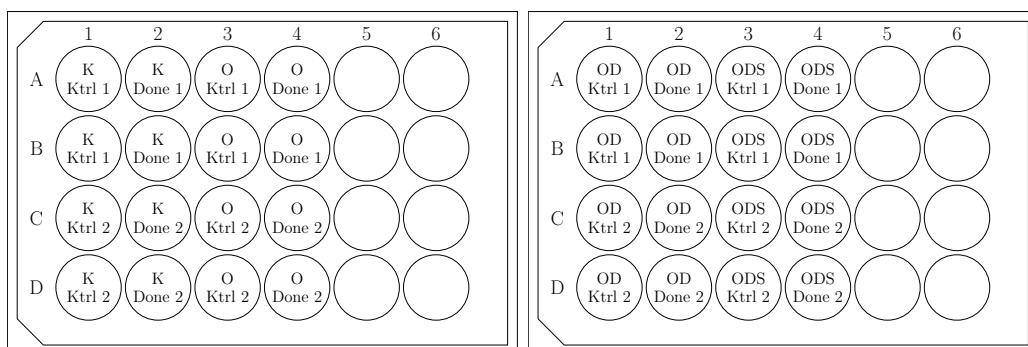


EC = effektive Konzentration

Abbildung 7: AChE-Pilotversuch

2.2.3 AChE-Aktivitätsbestimmung

Für die AChE-Aktivitätsbestimmung wurden die Zellen verwendet, die in den 24-Well-Platten ausgesät wurden (Layout in Abb. 8). Das Versuchsprinzip des verwendeten Assay-Kits ist angelehnt an den seit langem bekannten Ellman-Test (Ellman et al. 1961) und basiert auf folgendem Mechanismus: Die Intensität der zu messenden Fluoreszenz des Indikators AbRed beruht auf der Menge an vorhandenem Cholin, das durch AChE aus dem Abbau von ACh entsteht. Die CholinKonzentration ist dabei proportional zur AChE-Aktivität.



K = Kontrollgruppe, O = OVX, OD = OVX+D, ODS = OVX+D+S, Ktrl = Kontrolle, Done = Donepezil

Abbildung 8: AChE-Aktivitätsbestimmung Layout

Als erster Schritt wurde das Medium von jeweils zwei korrespondierenden Wells entfernt und die Zellen in 250 μ L Assay-Puffer mit der entsprechenden Donepezilkon-

zentrations suspendiert. Hierzu wurden alle Zellen mittels Zellschaber unter Mikroskopkontrolle abgeschabt. Nächster Schritt war das Homogenisieren des Lysats durch 15 Ultraschall-Impulse des Sonifiers Labsonic U (B. Braun, Melsungen, Deutschland; 0,5s *Duty Cycle*, *Output* etwa 45 W) und die anschließende Zentrifugation desselben bei ca. 20 000 g bei 4 °C für 5 min.

Nach dem Ansetzen der benötigten Lösungen laut Protokollbuch des Herstellers musste für jeden Versuch eine *ACh Probe Mixture* hergestellt werden. Diese bestand aus je 1000 Teilen *AChE Assay Mixture* (Kit-Komponente), vier Teilen *AbRed Stock Solution* (Kit-Komponente) und einem Teil *ACh Stock Solution* (Kit-Komponente).

Nach dem Befüllen einer schwarzen 96-Well-Platte (Layout in Abb. 9) mit jeweils 50 µL des Zelllysatüberstandes in Doppelbestimmung wurden je 50 µL dieser *ACh Probe Mixture* in jedes Well hinzupipettiert. Es folgte eine Inkubationsperiode von 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln, nach der die Fluoreszenz der Wellenlänge 530 nm bei einer Referenzwellenlänge von 590 nm mittels des *Mikroplatten-Readers* Synergy HT (BioTek, Winooski, VT, USA) gemessen werden konnte.

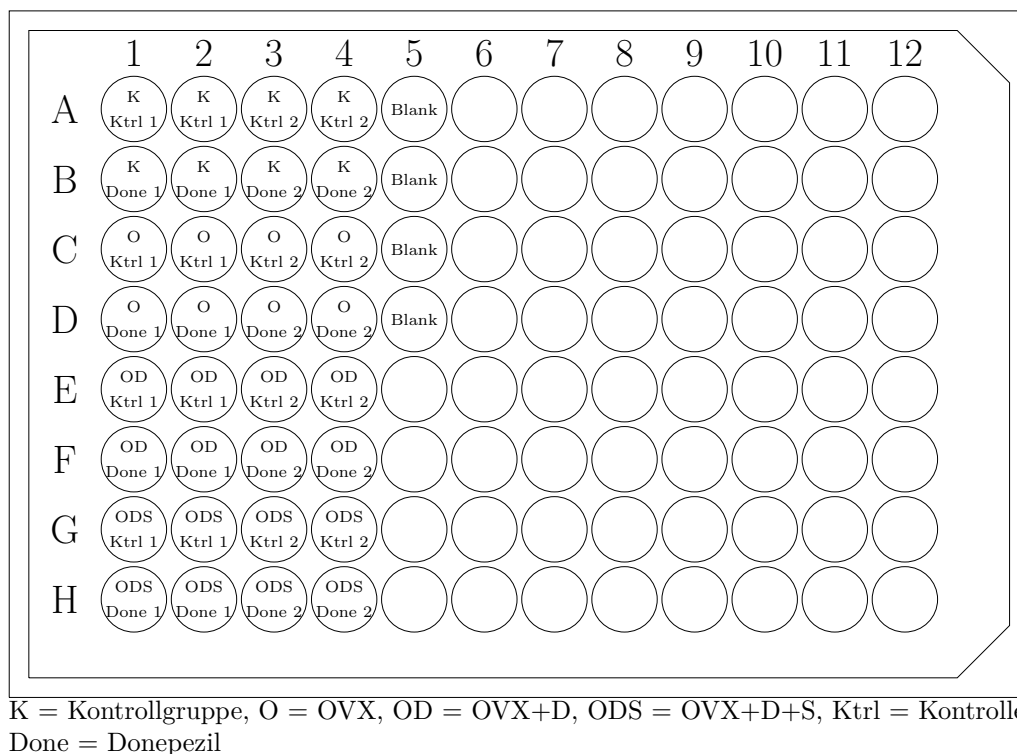
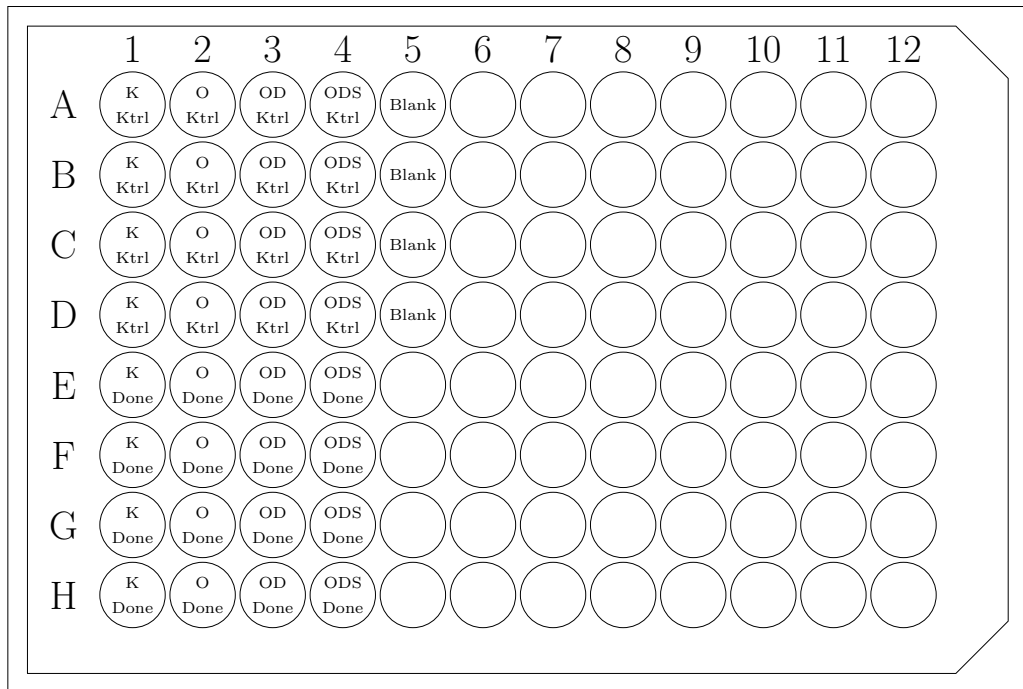


Abbildung 9: AChE-Aktivitätsbestimmung Mikroplatten Layout

2.2.4 Proliferationsbestimmung

Zur Zellproliferationsbestimmung wurden die in den 96-Well-Platten ausgesäten Zellen (Layout in Abb. 10) und der genannte BrdU-ELISA von Roche verwendet.

Dieser ELISA basiert auf folgendem Versuchsprinzip: Die Zellen werden zusammen mit dem Pyrimidin-Analogon BrdU in den Wells inkubiert, welches anstelle von



K = Kontrollgruppe, O = OVX, OD = OVX+D, ODS = OVX+D+S, Ktrl = Kontrolle, Done = Donepezil

Abbildung 10: BrdU-Layout

Thymidin in die Desoxyribonukleinsäure (DNA) der Zellen eingebaut wird, wenn diese ihr Erbgut replizieren, also proliferieren. Nach dieser Inkubationsperiode wird das Zellkulturmedium entfernt, die Zellen fixiert und die DNA denaturiert. Ein für BrdU spezifischer Antikörper lagert sich an die entsprechenden Stellen der DNA an. Das an diesen Antikörper gekoppelte Enzym Peroxidase (POD) katalysiert eine Reaktion, bei der Tetramethylbenzidin in ein Produkt bekannter Farbe umgesetzt wird, deren Intensität sich mittels Photospektrometrie quantifizieren lässt. Je stärker die Zellen nun proliferieren, umso mehr BrdU wird in die DNA eingelagert, entsprechend können mehr Antikörper an diesen Stellen binden und somit mehr Substrat umsetzen; die Farbe wird also intensiver.

BrdU wurde sechs Stunden nach Wechsel auf das Versuchsmedium hinzugefügt. Pro Well wurden zu den 100 μ L Medium 1 μ L 100x konzentrierter *BrdU-labeling-reagent* (Kit-Komponente) hinzupipettiert (vorheriges Verdünnen der 1000x konzentrierten Lösung im Inkubationsmedium um 1 : 10). In jedem Well befand sich nun BrdU in einer Konzentration von 10 μ M.

Nach dem Ablauf der Inkubationszeit im Brutschrank wurde das Medium dekantiert, die Wells sorgfältig abgetupft und jeweils 200 μ L *FixDenat* (Kit-Komponente) pro Well hinzupipettiert. Nach einer Inkubation von 30 min wurde der mitgelieferte Antikörper (Anti-BrdU-POD) 1 : 100 in *Antibody Dilution Solution* (Kit-Komponente) verdünnt, die Wellinhalte erneut geleert und abgetupft und je 100 μ L dieser Lösung in die Wells pipettiert. Es folgte eine weitere Inkubationsperiode von

90 min. Danach wurde die *Washing Solution* hergestellt, indem der *Washing Buffer* (Kit-Komponente) um 1 : 10 in destilliertem Wasser verdünnt wurde. Die Wells wurden fünfmal mit je 300 μL dieser Lösung gewaschen und anschließend wurden in jedes Well 100 μL der *Substrat Solution* (Kit-Komponente) pipettiert und dieser Inhalt für weitere 30 min inkubiert. All diese Inkubationsschritte erfolgten im Dunkeln und bei Raumtemperatur. Zum Stoppen der Reaktion wurden zuletzt in jedes Well 25 μL 1 M Schwefelsäure hinzugefügt und anschließend die Absorption im *Mikroplatten-Reader* bei 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 690 nm gemessen.

2.3 Real-time RT-PCR

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die mRNA-Expression von β_2 -Mikroglobulin (B2M), AChE, BChE, Col1A1, OC und BDNF untersucht. Diese wurde mittels der Methode der real-time reverse Transkriptase (RT)-Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durchgeführt.

2.3.1 Primerdesign

Die hierfür verwendeten Primer wurden mittels der Software Primer-BLAST (Ye et al. 2012) und der Gen-Datenbank RefSeq (O’Leary et al. 2015) designt.

Da das Schafgenom nicht in allen Fällen vollständig oder korrekt in der Datenbank zu finden war, mussten die Gensequenzen für AChE und BChE erst sequenziert werden. Hierfür wurde ein Standard-Primer entworfen, durch den ein längeres DNA-Fragment amplifiziert werden konnte, in dem das zu untersuchende Gen lag. Dieser DNA-Abschnitt wurde mittels PCR synthetisiert und durch eine Gelelektrophorese auf die korrekte Größe überprüft. Dies ist beispielhaft für den BChE-Primer in Abb. 11 dargestellt. Die Grafik zeigt auf der linken Seite das Produkt der PCR, das mittels des BChE-Standard-Primers synthetisiert wurde, auf der rechten Seite eine DNA-Leiter, durch die sich die Größe des Produktes (hier 897 bp erwartet) qualitativ bestimmen lässt. Durch die Lage des Produktes knapp unterhalb der 900 bp-Bande der DNA-Leiter kann die Synthese des richtigen Produktes angenommen werden.

Die Sequenzierung erfolgte durch die Firma Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland) von der auch sämtliche Primer bezogen wurden. Aus der nun bekannten DNA-Sequenz wurde dann der Primer designt.

Die verwendeten Primer sind in Tab. 3 dargestellt.

Zum Bestimmen der Schmelztemperatur und der Effizienz der Primer wurde eine Verdünnungsreihe einer komplementäre DNA (cDNA)-Probe erstellt und zusammen mit dem jeweiligen Primer eine PCR durchgeführt. Die cDNA wurde hierbei um jeweils 1 : 10 bis zu einer relativen Konzentration von 1 : 10 000 verdünnt. In Abb. 12 sind die Schmelzkurven der Proben am Beispiel des BChE-Primers dargestellt. Hier

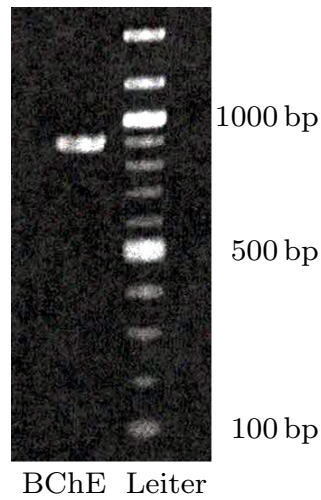


Abbildung 11: Gelelektrophorese des PCR-Produktes des BChE-Standard-Primers

Tabelle 3: Primer

Gen	Sequenz forward/reverse	Accession-Nr.	Länge	Eff.	T _m
B2M	CCAGAAGATGGAAAGCCAAA AGCGTGGGACAGAAGCTAGA	NM_001009284.1	159 bp	1,98	82,3 °C
AChE	CCCTCGCTCAACTACACCAT CGAAGTTGGCCAGTATCTC	Sequenzierung	70 bp	1,97	81,5 °C
BChE	AGGTGCCCTTGGATTCTTAGC TAGACCCACATTCCCTGGTG	Sequenzierung	61 bp	2,00	79,1 °C
Col1A1	CCAGTCACCTGCGTACAGAACG GCCAGTGTCTCCTTTGGGTCC	XM_012185918.1	246 bp	1,90	88,0 °C
OC	CAGCGAGGTGGTGAAGAGAC GCTCATCACAGTCAGGGTTG	NM_00104009.1	122 bp	1,86	87,0 °C
BDNF	CAGCAGTCAAGTGCCTTTGG CGGCATCCAGGTAATTTTTG	XM_004016359.2	71 bp	1,94	80,4 °C

Länge = Länge der resultierenden DNA-Abschnitte, Eff. = Effizienz, T_m = Schmelztemperatur, B2M = β_2 -Mikroglobulin, AChE = Acetylcholinesterase, BChE = Butyrylcholinesterase, Col1A1 = Kollagen Typ I, alpha 1, OC = Osteocalcin, BDNF = *Brain-derived Neurotrophic Factor*, A = Adenin, T = Thymin, G = Guanin, C = Cytosin

sind die Schmelzkurven der unverdünnten und bis 1 : 10 000 verdünnten cDNA-Proben und der Negativkontrolle zu sehen. Die Maxima der Kurven der Proben befinden sich alle im selben Temperaturbereich, was dafür spricht, dass das immer gleiche Produkt entstanden ist. Bei der Negativkontrolle ist kein Ausschlag der Kurve zu sehen, was bedeutet, dass kein Produkt entstanden ist. Der verwendete Mastermix war also nicht durch DNA verunreinigt, die das Ergebnis hätte verfälschen können.

Aus den relativen Konzentrationen der cDNA-Proben und den gemessenen *Cycle Threshold* (Ct)-Werten wurde eine Standardkurve erstellt, aus der sich die Effizienz des verwendeten Primers bestimmen lässt. Eine solche Kurve ist beispielhaft für den BChE-Primer in Abb. 13 dargestellt. Hier werden die gemessenen Ct-Werte der PCR (hier als *Crossing Point* bezeichnet) gegen die relativen Konzentrationen der Proben aufgetragen. So lässt sich eine Standardkurve an diese anpassen, durch die sich die Effizienz des verwendeten Primers bestimmen lässt. Es wird dabei eine Gerade erwartet. Eine Effizienz von 2,0 bedeutet, dass in jedem Zyklus der PCR die vorhandene DNA-Menge verdoppelt wird, was einer perfekten Effizienz entspricht. Der Fehler beschreibt, wie sehr die gemessenen Werte von diesem theoretischen Optimum abweichen.

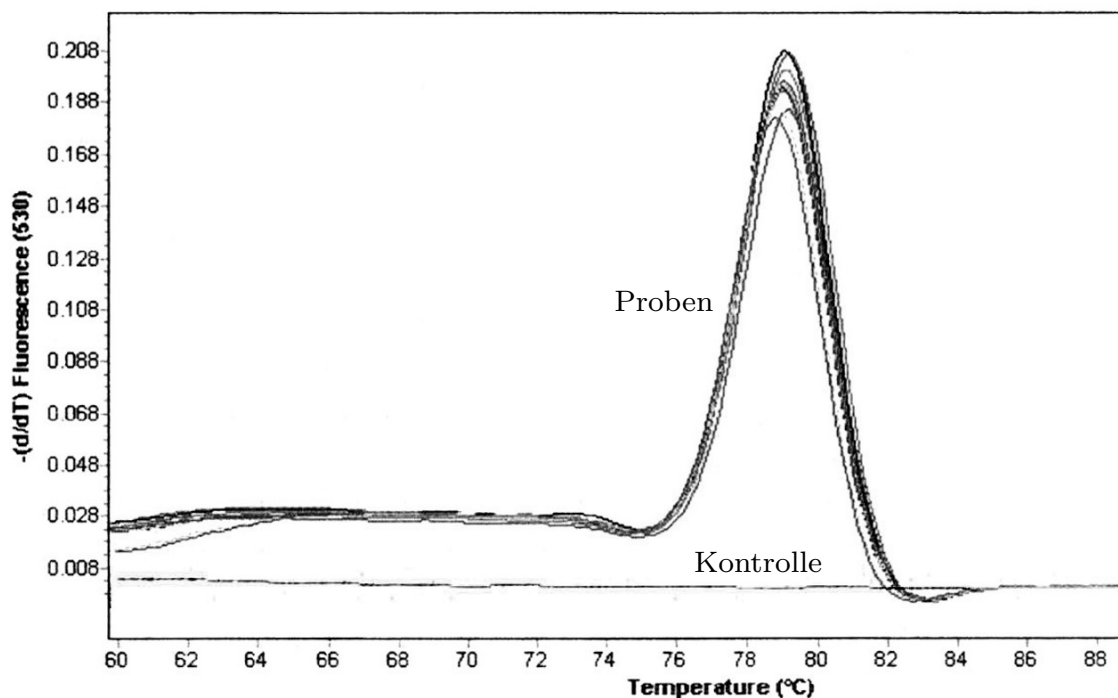


Abbildung 12: Schmelzkurven der PCR-Produkte der cDNA-Verdünnungsreihe des BChE-Primers

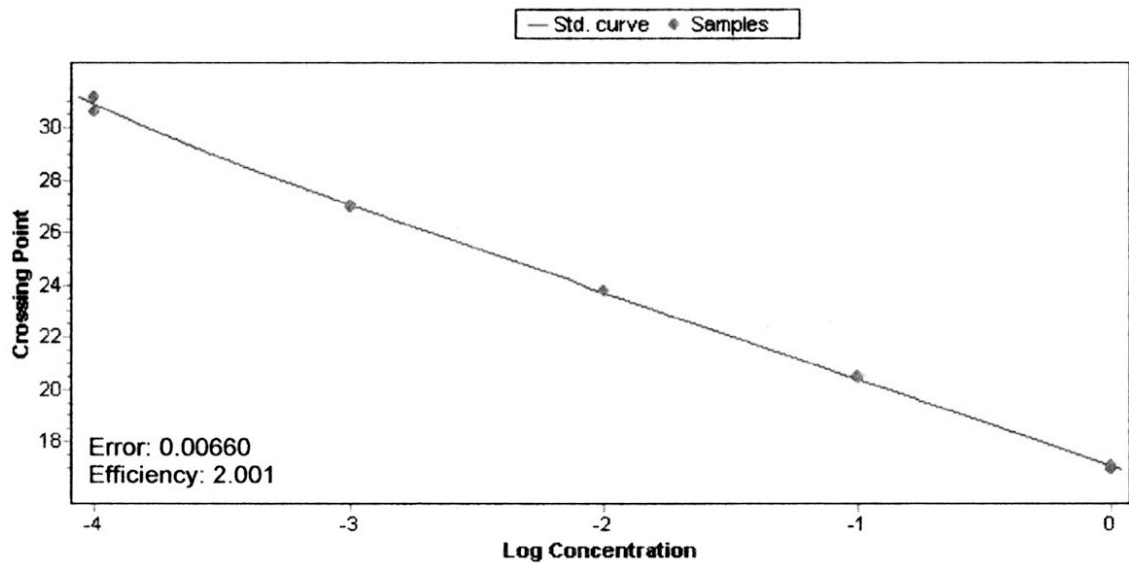


Abbildung 13: Standardkurve der PCR-Produkte der cDNA-Verdünnungsreihe des BChE-Primers

2.3.2 RNA-Isolation

Die RNA wurde mittels des RNeasy Mini-Kits (Qiagen, Hilden, Deutschland) geerntet.

Erster Schritt war das vollständige Entfernen des Kulturmediums aus den Wells der verwendeten 6-Well-Platten (Layout in Abb. 14). Hierzu wurde eine Peristaltikpumpe verwendet und die Wells anschließend mit 2,5 mL PBS gewaschen, welches erneut durch die Pumpe entfernt wurde. Anschließend wurde pro Well 600 μ L Lyse Puffer (Kit-Komponente) hinzugefügt. Die Platte wurde nun auf Eis auf einer Wippe für 30 min inkubiert.

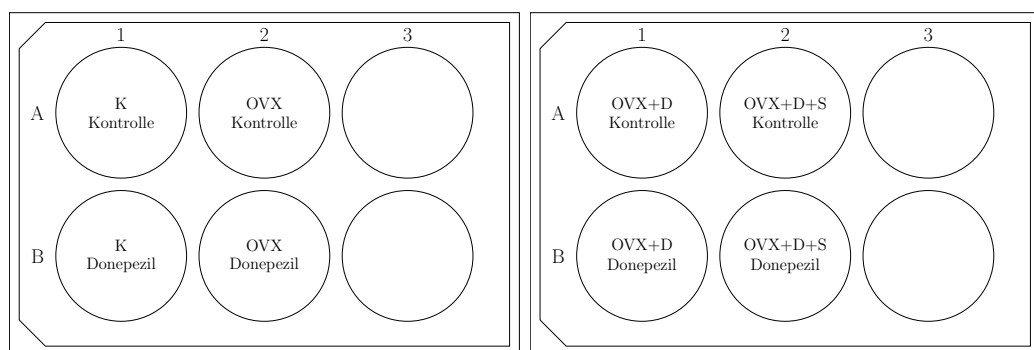


Abbildung 14: RNA-Isolation Layout

Um störende genomische DNA (gDNA) zu entfernen, wurde das komplette Zelllysate nach dieser Wartezeit auf eine *DNA Removing Column* (Kit-Komponente) überführt und 1 min bei 10 000 g zentrifugiert. Anschließend wurde zum Durchfluss 600 μ L 70 % Ethanol (Sigma-Aldrich) hinzugefügt und mittels Pipette sorgfältig gemischt. 600 μ L dieser Lösung wurden dann in eine *Perfect Bind RNA Column* (Kit-Komponente)

gegeben und erneut bei 10 000 g für 1 min zentrifugiert, der Durchfluss verworfen und diese Zentrifugation mit dem restlichen Lysat in derselben *Column* wiederholt, anschließend wurde ein neues *Collection Tube* (Kit-Komponente) verwendet.

Jetzt musste die RNA, die nun auf der Membran der *Column* gebunden war noch aufgereinigt und gelöst werden. Hierfür wurden 500 μL *RNA Wash Buffer I* (Kit-Komponente) auf die Säule pipettiert und erneut zentrifugiert, der Durchfluss verworfen. Dieser Schritt wurde noch zwei weitere Male mit *RNA Wash Buffer II* (Kit-Komponente) wiederholt. Um die Aufreinigung der RNA zu beenden, musste die Säule noch getrocknet werden, hierfür war eine weitere Zentrifugation der *Column* für 2 min bei 10 000 g nötig. Zum Lösen der nun fertig aufgereinigten RNA wurde die *Column* in ein neues 1,5 mL *Collection Tube* gestellt, 30 μL Ribonuklease (RNase)-freies Wasser in die Mitte der Membran hinzugefügt, 5 min gewartet und die *Column* bei 6000 g für 1 min zentrifugiert. Um die RNA-Ausbeute zu erhöhen, wurde dieser Durchfluss erneut auf die Membran pipettiert, nochmals 5 min gewartet und die Zentrifugation wiederholt.

Die Bestimmung der Konzentration erfolgte mittels Spektrophotometer NanoDrop (Thermo Fisher Scientific). 1 μL des Lysats wurde nach Eichen des *Readers* mittels 1 μL des zum Lösen verwendeten RNase-freien Wassers gemessen. Das Lysat wurde anschließend bis zur Durchführung der Synthese der cDNA bei -80°C aufbewahrt.

2.3.3 cDNA-Synthese

Zu Beginn der cDNA-Synthese wurde die zuvor isolierte RNA auf Eis zusammen mit allen benötigten Chemikalien des verwendeten QuantiTect-Kits (Qiagen) aufgetaut. Anschließend wurden die beiden benötigten Mastermixe hergestellt. Der RT-positive Mix bestand dabei aus einem Teil Quantiscript RT, vier Teilen Quantiscript RT *Buffer* und einem Teil RT Primer Mix (alles Kit-Komponenten). Der RT-negative Mix bestand aus vier Teilen *Buffer* und je einem Teil Primer Mix und RNase-freiem Wasser.

Erster eigentlicher Schritt der cDNA-Synthese war die Elimination noch verbliebener gDNA. Hierfür wurde je Probe eine Lösung mit einem Endvolumen von 21 μL benötigt. Diese Lösung bestand aus 3 μL *gDNA Wipeout Buffer* (Kit-Komponente), einem Volumen der Probe, das 1500 nmol RNA enthielt (max. 18 μL) und dem entsprechenden Volumen an RNase-freiem Wasser, um das genannte Endvolumen zu erreichen. Diese Lösung wurde mit der Pipette vorsichtig gemischt, leicht anzentrifugiert und dann 5 min bei 42°C inkubiert, wodurch der *gDNA Wipeout Buffer* arbeiten konnte. Anschließend wurden die Proben sofort auf Eis gestellt, um die Reaktion zu stoppen.

7 μL der Lösung wurden in ein neues Cup pipettiert und 3 μL des RT-negativen Mastermixes hinzugefügt. Zu den verbliebenen 14 μL wurden 6 μL des RT-positiven

Mixes pipettiert. Die Tubes wurden dann für 30 min bei 42 °C inkubiert. In dieser Zeit fand die Synthese der cDNA aus der isolierten RNA statt. Um die RT zu inaktivieren, wurde abschließend die Temperatur für 3 min auf 95 °C erhöht und die damit fertig synthetisierte cDNA bei –20 °C gelagert, nachdem sie zuvor im Verhältnis 1 : 8 mit Wasser verdünnt worden war.

2.3.4 Real-time RT-PCR

Die real-time PCR wurde mittels LightCycler 2.0 (Roche) durchgeführt.

Erster Schritt jeder PCR war es, einen Mastermix für jeden verwendeten Primer zu erstellen. Dieser bestand pro Probe aus je 0,8 µL Aqua ad iniectabilia, 0,2 µL Primer-Mix (je 20 µM *forward* und *reverse* Primer) und 5 µL des zweifach konzentrierten Mastermixes QuantiFast SYBR Green (Qiagen). In jede Kapillare (Roche) des Light-Cyclers wurden 6 µL dieser Lösung vorgelegt und mit 4 µL der synthetisierten cDNA aufgefüllt. Hierbei wurden die RT-positiven Proben in Doppelbestimmung verwendet, die RT-negativen einfach. Zusätzlich zu den Kontrollen der cDNA-Synthese wurde eine Negativkontrolle der PCR durchgeführt; Wasser anstatt cDNA.

Folgendes PCR-Protokoll wurde für alle Proben verwendet: 5 min bei 95 °C (Denaturierung), 40 Zyklen à 10 s bei 95 °C (Denaturierung) und 30 s bei 60 °C (Annealing und Elongation). Nach dem Durchlaufen aller Zyklen wurde eine Schmelzkurve aufgenommen, um etwaige Verunreinigungen zu erkennen und zu überprüfen, ob das richtige Produkt entstanden war.

Die Quantifizierung der entstandenen PCR-Produkte erfolgte durch Messung der Fluoreszenz der Proben in den Kapillaren durch den LightCycler. Je mehr DNA synthetisiert wird, umso mehr des in QuantiFast enthaltenen Farbstoffes SYBR Green interkaliert in diese, entsprechend steigt auch die Fluoreszenz. Die Auswertung der Proben erfolgte durch das Erfassen der *Cycle Threshold* (Ct)-Werte. Ein Ct-Wert beschreibt den Punkt der erfassten Fluoreszenz-Kurve, an dem ein bestimmter Schwellenwert des Produktes erreicht wird. Dieser Punkt wird früher erreicht, wenn mehr cDNA in der Probe vorliegt, die entsprechende Genexpression folglich höher ist. Umso niedriger ist dann also der gemessene Ct-Wert.

Im Rahmen einer real-time RT-PCR wird eine semiquantitative Bestimmung durchgeführt. Hierzu wird der Ct-Wert eines Haushaltsgens bestimmt. In dieser Arbeit wurde hierzu B2M verwendet. Es scheint sich dabei um eines der für das Schaf geeignetsten Haushaltsgenen zu handeln (Schulze et al. 2017). Die Genexpression im Vergleich zu dieser Referenz kann bestimmt werden, indem der Δ Ct-Wert berechnet wird (Livak et al. 2001; Pfaffl 2001):

$$\Delta Ct = Ct_{target} - Ct_{reference}$$

Ct_{target} ist dabei der Ct-Wert des zu erfassenden Gens, $Ct_{reference}$ der Ct-Wert des Haushaltsgens B2M. Um nun die Stärke der Expression von zwei Genen zu vergleichen, muss der $\Delta\Delta Ct$ -Wert berechnet werden.

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{sample} - \Delta Ct_{calibrator}$$

ΔCt_{sample} ist dabei der ΔCt -Wert der zu erfassenden Probe, die mit der Probe mit dem Wert $\Delta Ct_{calibrator}$ verglichen werden soll. Das Verhältnis der Genexpression dieser beiden Proben wird durch folgende Rechnung bestimmt:

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

2.4 Statistik

Die statistische Auswertung der beobachteten Daten erfolgte mittels der Statistik-Programmiersprache R (R Core Team 2016). Auch die Diagramme wurden in R mithilfe des Pakets „ggplot2“ (Wickham 2009) erstellt. Die Balkendiagramme visualisieren dabei den jeweiligen Mittelwert, deren Fehlerbalken das 95 %-Konfidenzintervall. Das Zentrum der Box-Whisker-Plots repräsentiert den Median, die Box den Bereich des Interquartilsabstandes (unteres bis oberes Quartil), die Whisker haben die 1,5-fache Länge dieses Abstandes. Noch weiter vom Median entfernt liegende Werte werden als Ausreißer dargestellt (Frigge et al. 1989).

Das Signifikanzniveau aller Tests wurde auf $\alpha = 0,05$ festgelegt. Signifikante Unterschiede werden in den Diagrammen durch Sterne veranschaulicht. Die Anzahl der Sterne gibt dabei die Größenordnung des jeweiligen p -Wertes an:

$$* = p < 0,05 \quad ** = p < 0,01 \quad *** = p < 0,001$$

Zu Beginn wurden die einzelnen Schafgruppen mittels einer Gruppenanalyse auf Heterogenität überprüft. Dies erfolgte durch Cochrans Q-Test (Cochran 1954), der im R-Paket „metafor“ (Viechtbauer 2010) enthalten ist.

Zusätzlich wurde I^2 als Maß der Inkonsistenz zwischen den Gruppen berechnet (Higgins 2003):

$$I^2 = \begin{cases} \frac{Q-df}{Q} \times 100\% & \text{für } Q \geq df \\ 0\% & \text{für } Q < df \end{cases}$$

Q ist dabei der Wert der χ^2 -verteilten Teststatistik und df die Anzahl der Freiheitsgrade (hier: $df = 3$). Ein I^2 von 0% bedeutet, dass keine Heterogenität beobachtet wurde. Höhere Werte sprechen für größere Heterogenität.

Durch die Tatsache, dass immer Zellen aus derselben Population und Passage für die Experimente verwendet wurden, konnte von genetischer Homogenität zwischen

Kontrollen und den mit Donepezil behandelten Zellen ausgegangen werden. Aus diesem Grund wurden die folgenden Tests in den Varianten für abhängige/gepaarte Stichproben verwendet.

Erster Schritt der Datenanalyse war die Überprüfung, ob die Differenzen der Messwerte zwischen Kontrollen und Interventionszellen normalverteilt waren oder nicht. Hierfür wurde der Shapiro-Wilk-Test (Shapiro et al. 1965) verwendet, der unter den bekanntesten Tests auf Normalverteilung die größte Teststärke zu haben scheint (Razali et al. 2011). Zusätzlich wurde eine graphische Überprüfung der Normalverteilung durch Quantil-Quantil-Diagramme (Q-Q-Plots) durchgeführt, um die Ergebnisse der Shapiro-Tests zu verifizieren. Liegen die Datenpunkte in einer solchen Graphik annähernd auf einer Geraden, so ist davon auszugehen, dass sie normalverteilt sind (Wilk et al. 1968).

Im Falle einer Normalverteilung konnte zum Vergleich der Proben ein parametrischer Test, nämlich ein gepaarter T-Test (Student 1908) verwendet werden. Falls dies nicht der Fall war, musste ein nicht-parametrischer Test, nämlich der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test (Wilcoxon 1945) durchgeführt werden.

Bei jedem dieser Tests wurde zusätzlich die Effektstärke bestimmt. Im Falle eines T-Tests wurde Cohens d und bei den Wilcoxon-Tests der Korrelationskoeffizient r berechnet (Fritz et al. 2012):

$$d = \frac{\bar{x}_{Donepezil} - \bar{x}_{Kontrolle}}{s_{Kontrolle}}$$

\bar{x} ist dabei der jeweilige Gruppenmittelwert, s die Standardabweichung.

$$r = \frac{z}{\sqrt{n}}$$

z ist dabei der Wert der z -Verteilung, die im Rahmen des Wilcoxon-Tests berechnet wurde und n die Anzahl der Messwerte.

Die Interpretation dieser Werte erfolgte wie in Tab. 4 dargestellt (Cohen 1992).

Tabelle 4: Grenzen der Effektstärken

Effektstärke	$ d $	$ r $
unbedeutend	$< 0,2$	$< 0,1$
klein	$\geq 0,2$	$\geq 0,1$
mittel	$\geq 0,5$	$\geq 0,3$
groß	$\geq 0,8$	$\geq 0,5$

d = Cohens d , r = Korrelationskoeffizient

3 Ergebnisse

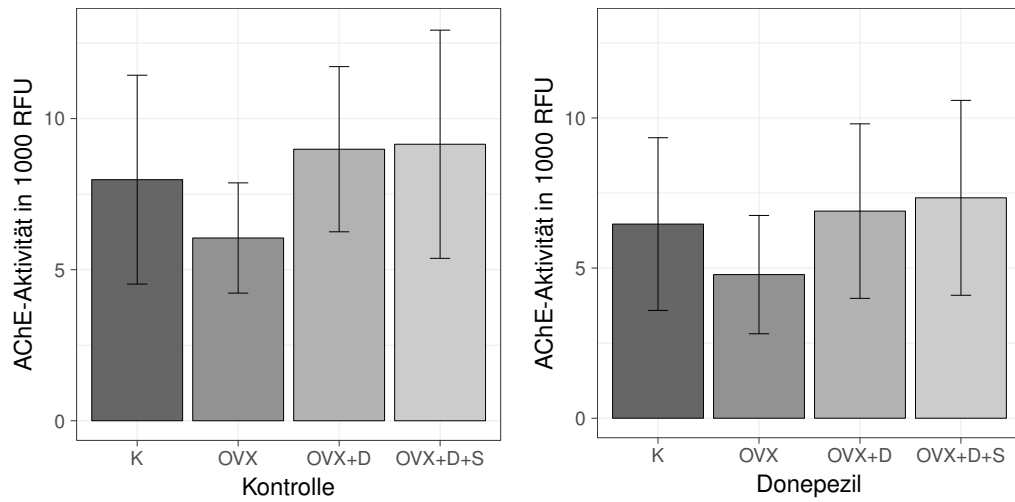
3.1 Gruppenanalysen

Nach Durchführung der Gruppenanalysen zum Vergleich der einzelnen Schafgruppen konnte von Homogenität zwischen den einzelnen Gruppen ausgegangen werden ($p \gg \alpha$ und $I^2 = 0\%$, Tab. 5, Abb. 15, 16 und 17). Deshalb waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen anzunehmen. Außerdem wurde das Poolen der Daten ermöglicht.

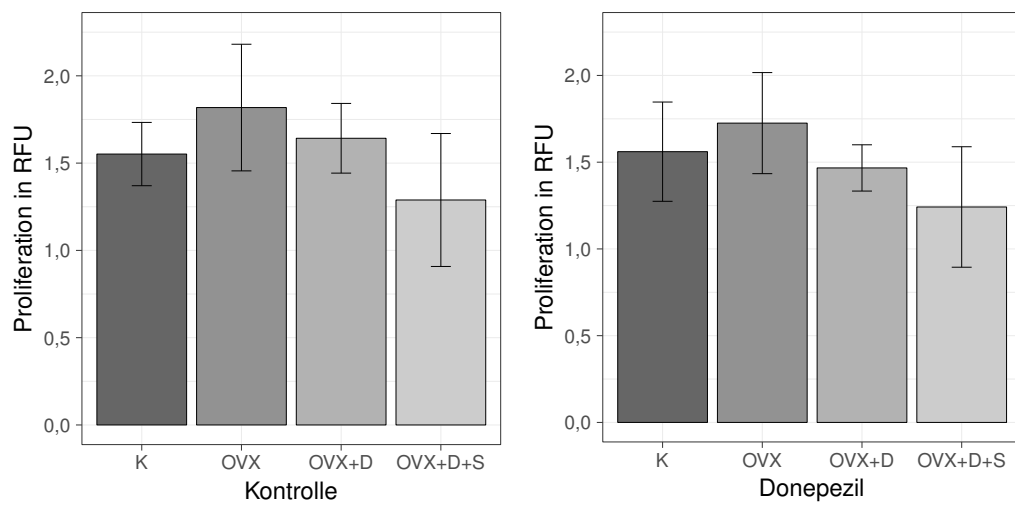
Tabelle 5: Gruppenanalysen der Schafgruppen, Tests auf Heterogenität

Funktionelle Assays	Q	p	I^2
AChE-Aktivität	0,071	0,995	0%
Proliferation	0,991	0,804	0%
Genexpression	Q	p	I^2
AChE	0,032	0,999	0%
BChE	0,271	0,965	0%
Col1A1	1,617	0,656	0%
OC	0,099	0,992	0%
BDNF	0,129	0,988	0%

AChE = Acetylcholinesterase, BChE = Butyrylcholinesterase, Col1A1 = Kollagen Typ I, alpha 1, OC = Osteocalcin, BDNF = *Brain-derived Neurotrophic Factor*, Q = Teststatistik, p = p -Wert, I^2 = Maß der Inkonsistenz zwischen den Schafgruppen



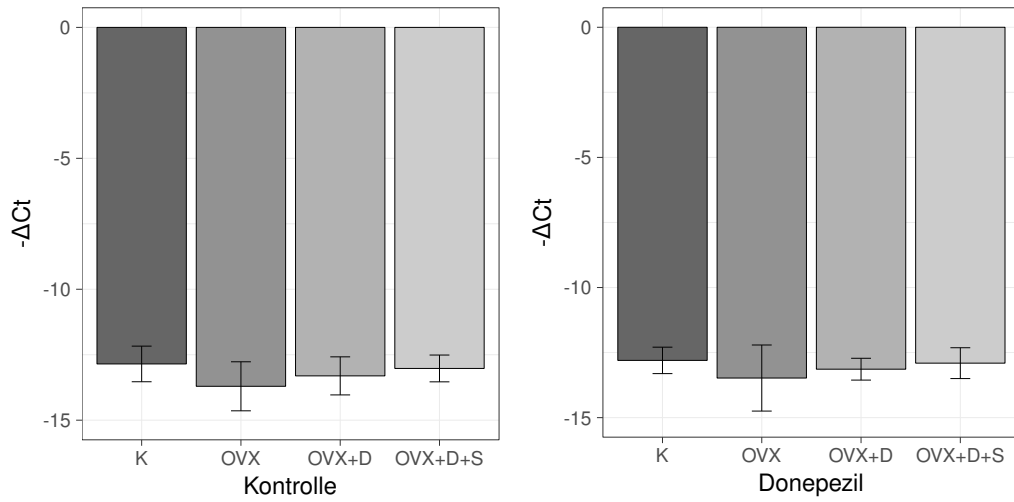
(a) AChE-Aktivität



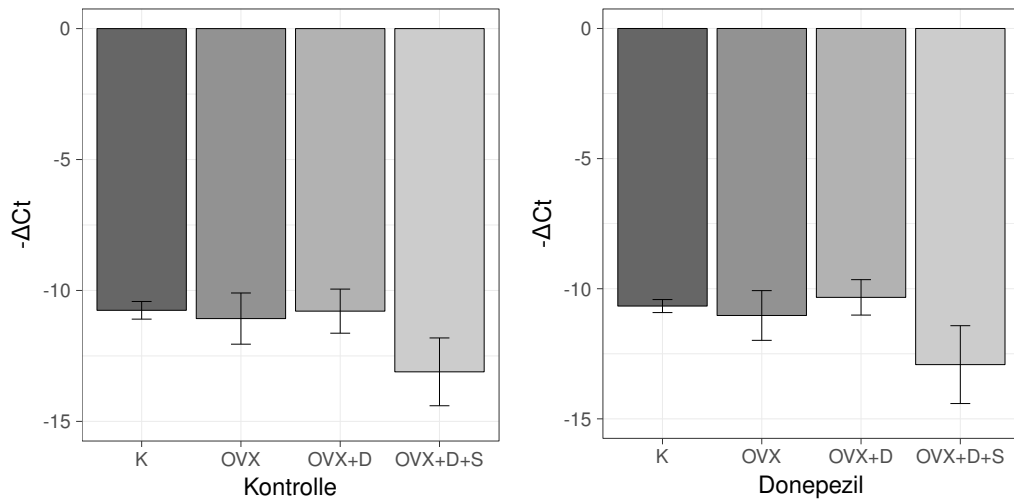
(b) Proliferation

AChE = Acetylcholinesterase, RFU = *relative fluorescence units*

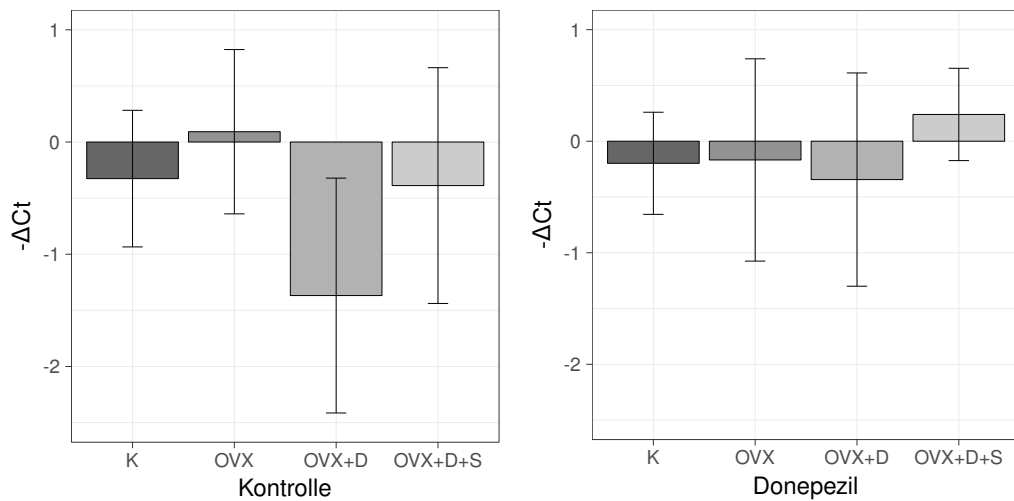
Abbildung 15: Übersicht funktionelle Assays



(a) AChE-Genexpression



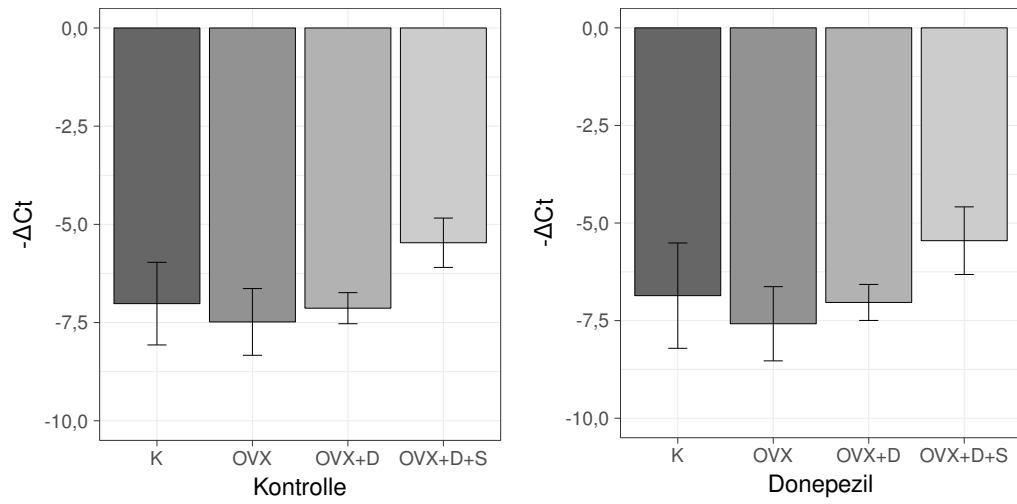
(b) BChE-Genexpression



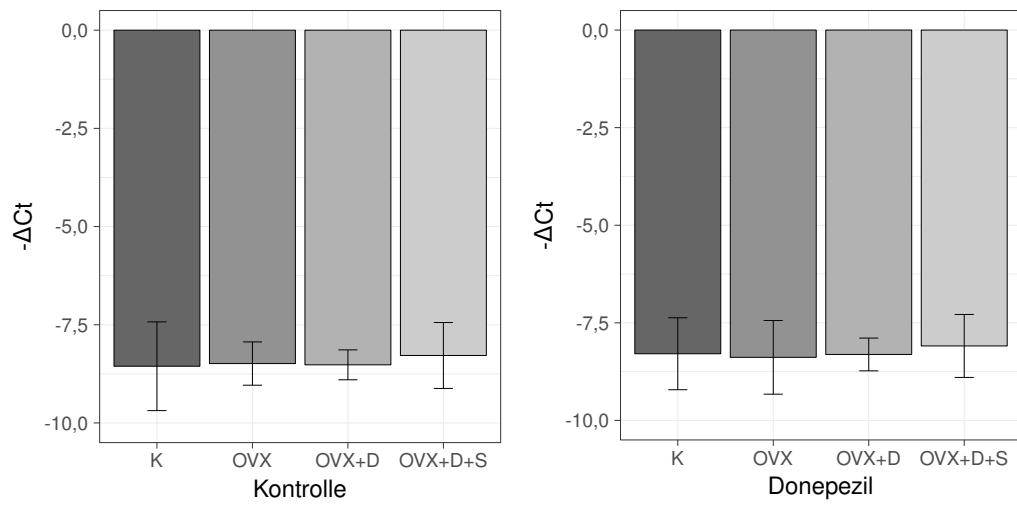
(c) Col1A1-Genexpression

AChE = Acetylcholinesterase, BChE = Butyrylcholinesterase, Col1A1 = Kollagen Typ I, alpha 1, Ct = Cycle Threshold

Abbildung 16: Übersicht Genexpression 1



(a) OC-Genexpression



(b) BDNF-Genexpression

OC = Osteocalcin, BDNF = *Brain-derived Neurotrophic Factor*, Ct = *Cycle Threshold*

Abbildung 17: Übersicht Genexpression 2

3.2 Funktionelle Assays

3.2.1 AChE-Aktivität

Die AChE-Aktivität wurde durch einen funktionellen Assay der Firma Abcam bestimmt.

Nach Durchführung der Shapiro-Tests auf Normalverteilung für die Differenzen der AChE-Aktivitäten zwischen den Kontrollen und den mit Donepezil behandelten Schafzellen konnte eine Normalverteilung nicht abgelehnt werden (Tab. 6). Auch eine graphische Auswertung mittels Q-Q-Plots bestätigte dieses Ergebnis (Abb. 18a und Abb. 25 im Anhang auf S. 94).

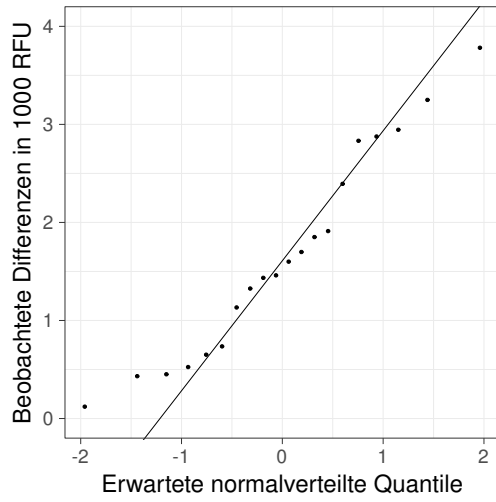
Die AChE-Aktivität der gepoolten Daten nahm signifikant ab ($p < 0,001$, Tab. 6, Abb. 18), ebenso die der Zellen K ($p = 0,017$), OVX+D ($p < 0,001$) und OVX+D+S ($p = 0,033$) isoliert betrachtet. Die Aktivität der Zellen OVX einzeln betrachtet zeigte keine signifikante Veränderung ($p = 0,127$). Die Effektstärken lagen dabei jeweils im kleinen bis mittleren Bereich.

Wie beschrieben, wurde Donepezil in der bestimmten EC_{30} von 15,4 nM verwendet. Entsprechend war bei den behandelten Zellen eine auf 70 % verminderte Enzymaktivität zu erwarten. Es ergaben sich jedoch Inhibitionsstärken im Bereich der EC_{20} , also eine auf lediglich ca. 80 % verminderte Enzymaktivität (Tab. 7).

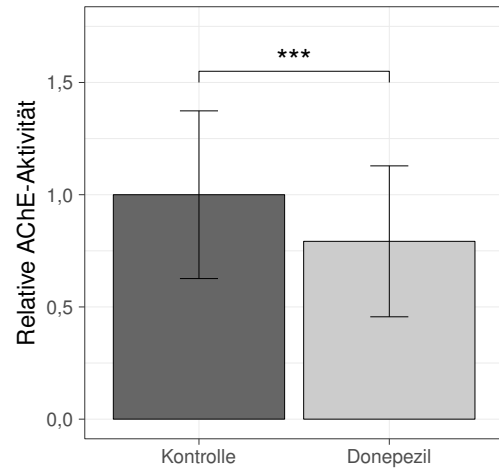
Tabelle 6: Ergebnis AChE-Aktivität

		n	\bar{x}	s	Shapiro-Test		T-Test		
					W	p	t	p	d
Alle Schafe	Ktrl	20	8042	3427	0,951	0,386	7,080	< 0,001	-0,487
	Done	20	6371	3085					
K	Ktrl	5	7979	3943	0,938	0,652	3,913	0,017	-0,384
	Done	5	6465	3281					
OVX	Ktrl	5	6049	2082	0,805	0,089	1,921	0,127	-0,608
	Done	5	4783	2247					
OVX+D	Ktrl	5	8987	3118	0,964	0,833	8,794	< 0,001	-0,670
	Done	5	6898	3315					
OVX+D+S	Ktrl	5	9152	4308	0,901	0,414	3,197	0,033	-0,421
	Done	5	7340	3703					

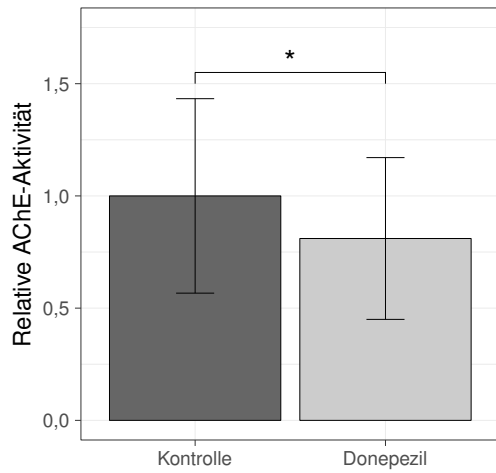
Ktrl = Kontrolle, Done = Donepezil, n = Anzahl der Messwerte, \bar{x} = Mittelwert in RFU, s = Standardabweichung in RFU, W = Teststatistik Shapiro-Test, p = p -Wert, t = Teststatistik T-Test, d = Cohens d



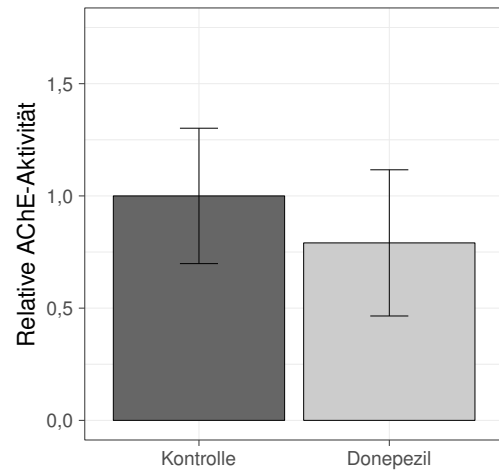
(a) Q-Q-Plot aller Schafe



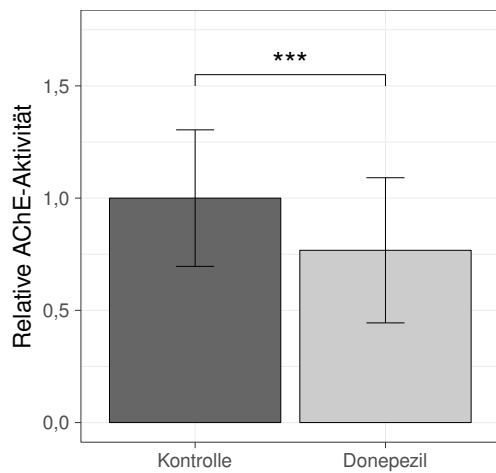
(b) Alle Schafe



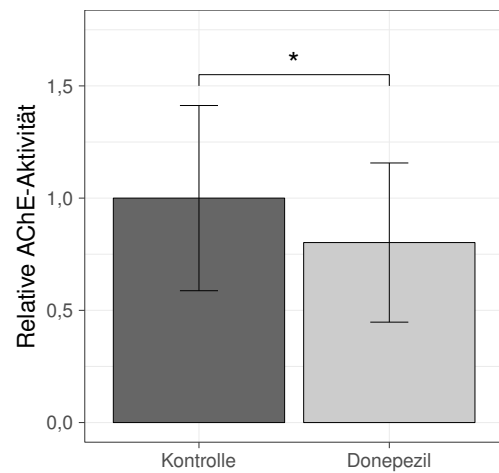
(c) K



(d) OVX



(e) OVX+D



(f) OVX+D+S

AChE = Acetylcholinesterase, RFU = *relative fluorescence units*

Abbildung 18: Ergebnis AChE-Aktivitätsbestimmung

Tabelle 7: Ergebnis AChE-Restaktivität

	Alle Schafe	K	OVX	OVX+D	OVX+D+S
Restaktivität	79,2 %	81,0 %	79,1 %	76,8 %	80,2 %

3.2.2 Proliferation

Die Proliferationsraten der Zellen wurden mittels des BrdU-ELISA-Kits von Roche quantifiziert.

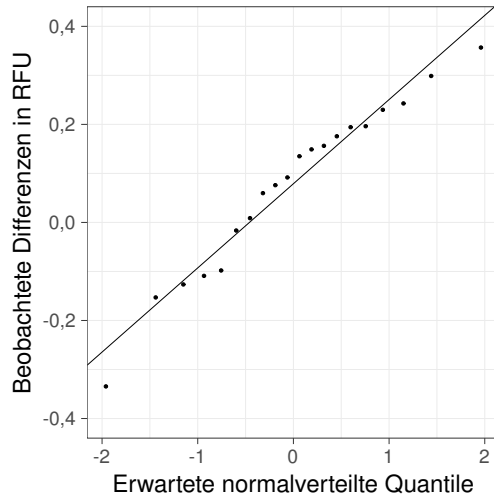
Nach der Durchführung der Shapiro-Tests (Tab. 8) und Analyse der Q-Q-Plots (Abb. 19a und Abb. 26 im Anhang auf S. 95), konnte bei den Proliferationsdifferenzen zwischen den Kontrollen und den mit Donepezil behandelten Zellen eine Normalverteilung nicht abgelehnt werden. Deshalb wurde zum Vergleich dieser Gruppen erneut auf den T-Test zurückgegriffen.

Ein signifikanter Unterschied der Proliferationsraten zeigte sich lediglich bei einzelner Betrachtung der Zellen OVX+D ($p = 0,025$, Tab. 8, Abb. 19). Diese proliferierten durch die Zugabe von Donepezil mit mittlerer Effektstärke weniger stark als die unbehandelten Zellen (Abb. 19).

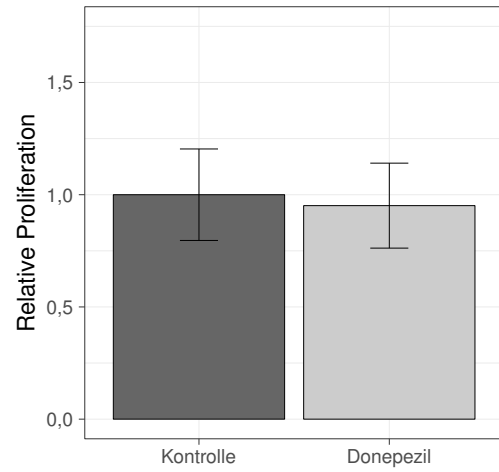
Tabelle 8: Ergebnis Proliferation

		n	\bar{x}	s	Shapiro-Test		T-Test		
					W	p	t	p	d
Alle Schafe	Ktrl	20	1,575	0,366	0,962	0,585	1,973	0,063	-0,209
	Done	20	1,499	0,340					
K	Ktrl	5	1,552	0,207	0,996	0,995	-0,081	0,940	0,042
	Done	5	1,561	0,326					
OVX	Ktrl	5	1,818	0,414	0,922	0,544	1,548	0,197	-0,225
	Done	5	1,725	0,332					
OVX+D	Ktrl	5	1,642	0,228	0,887	0,344	3,488	0,025	-0,770
	Done	5	1,467	0,152					
OVX+D+S	Ktrl	5	1,289	0,434	0,908	0,456	0,595	0,584	-0,108
	Done	5	1,242	0,396					

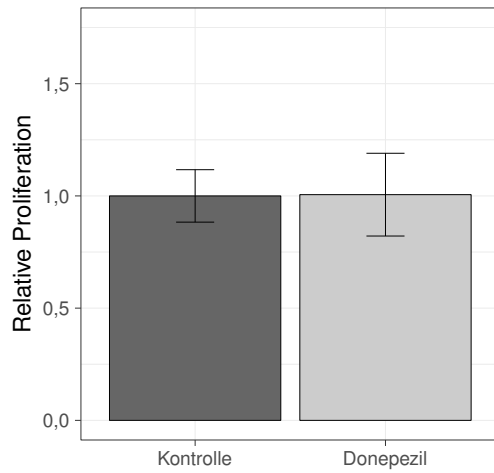
Ktrl = Kontrolle, Done = Donepezil, n = Anzahl der Messwerte, \bar{x} = Mittelwert in RFU, s = Standardabweichung in RFU, W = Teststatistik Shapiro-Test, p = p -Wert, t = Teststatistik T-Test, d = Cohens d



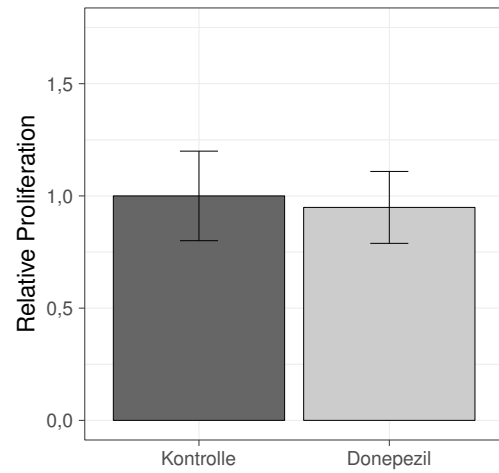
(a) Q-Q-Plot



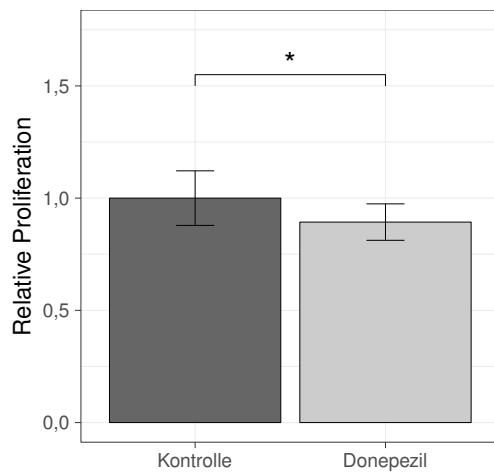
(b) Alle Schafe



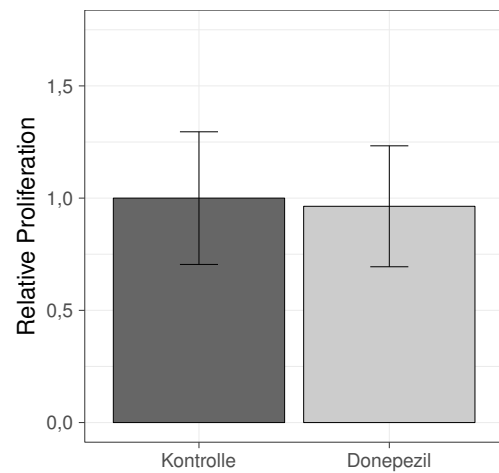
(c) K



(d) OVX



(e) OVX+D



(f) OVX+D+S

RFU = relative fluorescence units

Abbildung 19: Ergebnis Proliferationsbestimmung

3.3 Genexpression

3.3.1 AChE

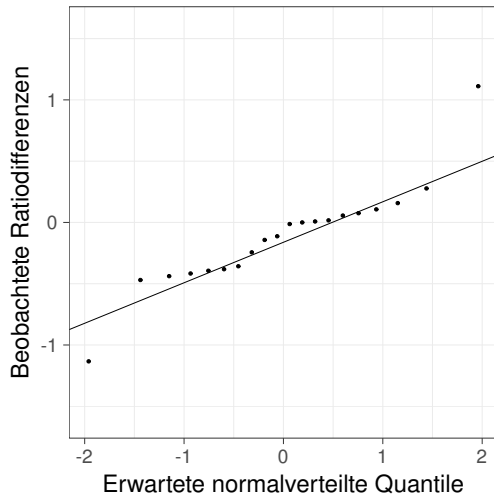
Durch den signifikant ausgefallenen Shapiro-Test der Ratioidifferenzen der AChE-Genexpression aller Zellen ($p = 0,032$, Tab. 9) und den mit diesem Ergebnis übereinstimmenden Q-Q-Plot (Abb. 20a) musste eine Normalverteilung dieser Daten abgelehnt werden. Zwar zeigten sich die übrigen Shapiro-Tests (Tab. 9) und Q-Q-Plots (Abb. 27 im Anhang auf S. 96) nicht signifikant bzw. schlossen eine Normalverteilung der Daten nicht aus, trotzdem wurde auch bei diesen Daten zur Sicherheit von keiner Normalität ausgegangen. Entsprechend wurden alle Ratioidifferenzen mittels Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests ausgewertet.

Diese Tests zeigten keine signifikanten Expressionsunterschiede von AChE (Tab. 9, Abb. 20).

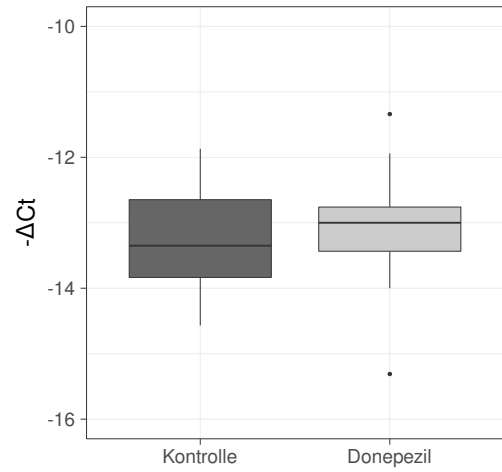
Tabelle 9: Ergebnis AChE-Genexpression

		n	\bar{x}	Shapiro-Test		Wilcoxon-Test		
				W	p	W	p	r
Alle Schafe	Ktrl	20	0,917	0,894	0,032	65	0,143	-0,463
	Done	20	1,167					
K	Ktrl	5	0,967	0,928	0,581	9	0,813	-0,075
	Done	5	0,967					
OVX	Ktrl	5	0,833	0,898	0,398	3	0,313	-0,319
	Done	5	1,032					
OVX+D	Ktrl	5	0,757	0,782	0,057	5	0,625	-0,155
	Done	5	1,255					
OVX+D+S	Ktrl	5	1,010	0,776	0,051	6	0,813	-0,075
	Done	5	1,113					

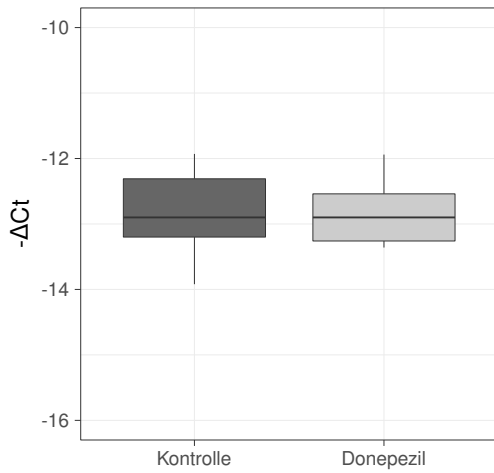
Ktrl = Kontrolle, Done = Donepezil, n = Anzahl der Messwerte, \bar{x} = Median Ratio, W = Teststatistik Shapiro-/Wilcoxon-Test, p = p -Wert, r = Korrelationskoeffizient



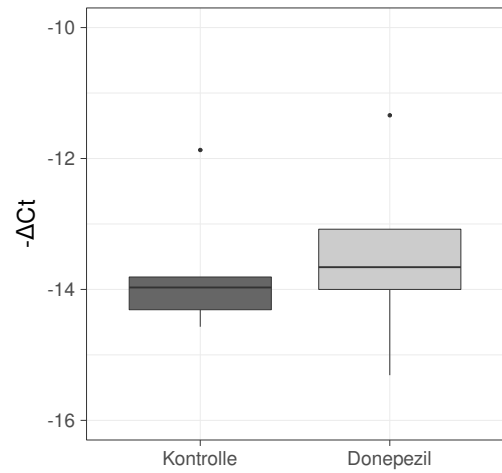
(a) Q-Q-Plot



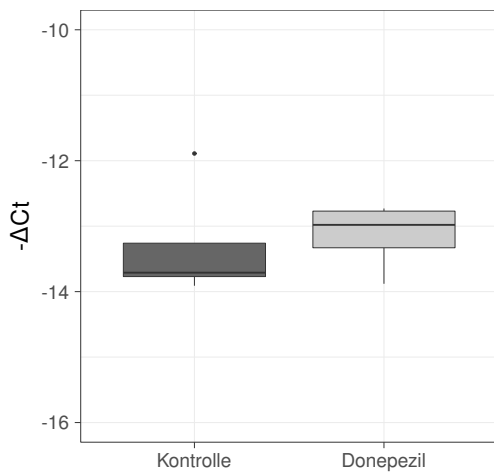
(b) Alle Schafe



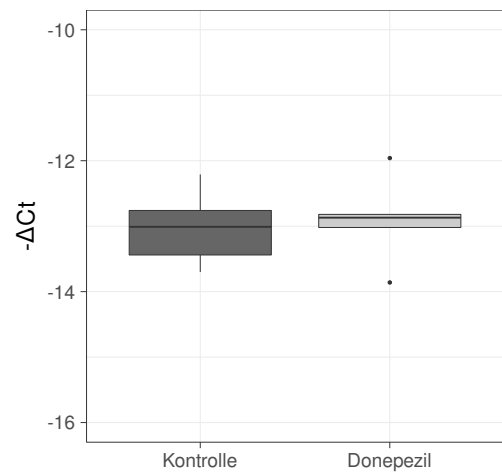
(c) K



(d) OVX



(e) OVX+D



(f) OVX+D+S

$Ct = \text{Cycle Threshold}$

Abbildung 20: Ergebnis AChE-Genexpression

3.3.2 BChE

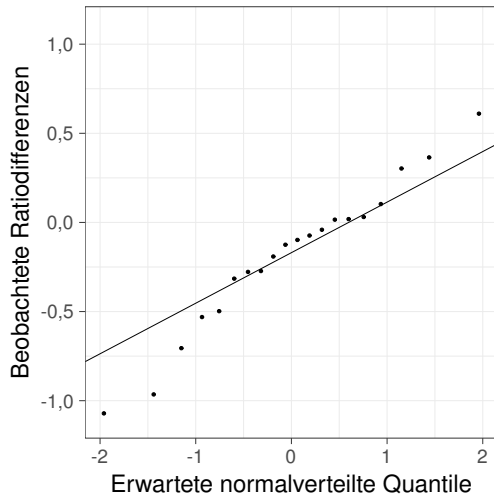
Die Tests auf Normalität mittels Shapiro-Tests (Tab. 10) und Q-Q-Plots (Abb. 21a und Abb. 28 im Anhang auf S. 97) ergaben keine signifikanten Abweichungen. Deshalb konnten zum Testen der BChE-Expressionsunterschiede T-Tests durchgeführt werden.

Diese zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kontrollen und den mit Donepezil behandelten Zellen (Tab. 10, Abb. 21).

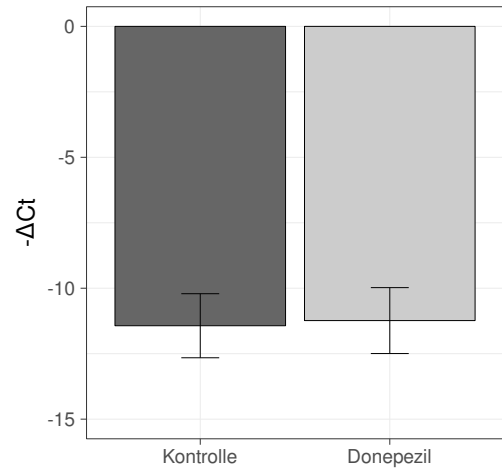
Tabelle 10: Ergebnis BChE-Genexpression

		n	\bar{x}	s	Shapiro-Test		T-Test		
					W	p	t	p	d
Alle Schafe	Ktrl	20	1,390	0,989	0,968	0,711	-1,983	0,062	0,189
	Done	20	1,576	1,064					
K	Ktrl	5	1,030	0,297	0,886	0,337	-0,437	0,685	0,177
	Done	5	1,083	0,219					
OVX	Ktrl	5	1,264	0,997	0,940	0,668	-0,116	0,913	0,015
	Done	5	1,279	0,905					
OVX+D	Ktrl	5	1,176	0,684	0,866	0,252	-2,486	0,068	0,524
	Done	5	1,534	0,786					
OVX+D+S	Ktrl	5	1,470	1,321	0,963	0,828	-1,126	0,323	0,196
	Done	5	1,728	1,390					

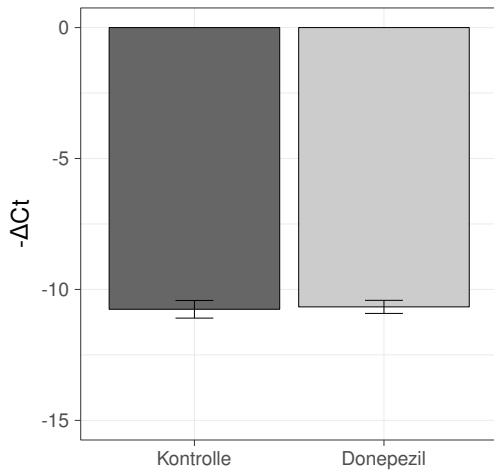
Ktrl = Kontrolle, Done = Donepezil, n = Anzahl der Messwerte, \bar{x} = Mittelwert Ratio, s = Standardabweichung Ratio, W = Teststatistik Shapiro-Test, p = p -Wert, t = Teststatistik T-Test, d = Cohens d



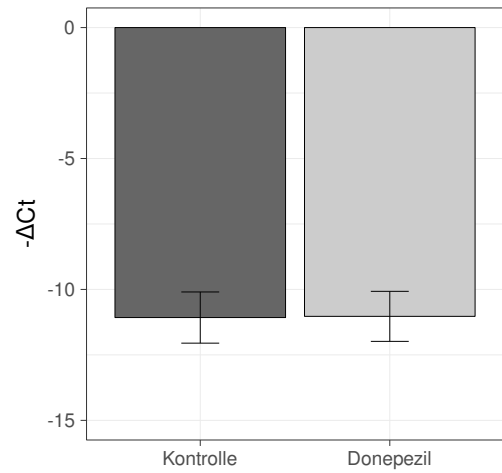
(a) Q-Q-Plot



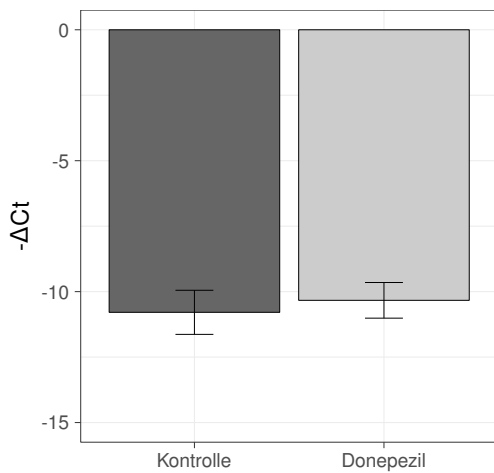
(b) Alle Schafe



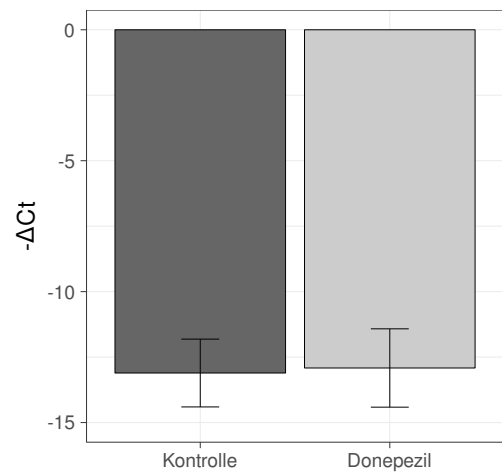
(c) K



(d) OVX



(e) OVX+D



(f) OVX+D+S

$Ct = \text{Cycle Threshold}$

Abbildung 21: BChE-Genexpression Vergleiche zwischen Kontrollen und Donepezil

3.3.3 Col1A1

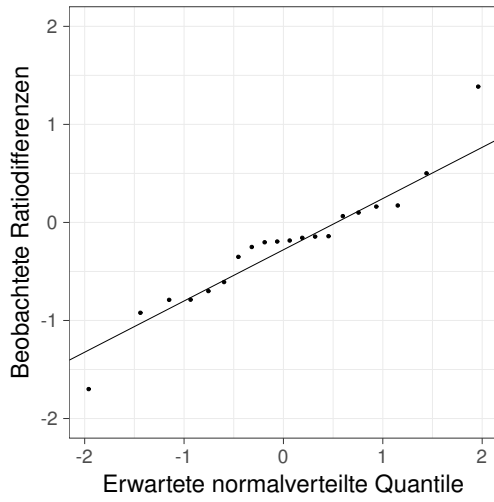
Die Shapiro-Tests der Ratioidifferenzen der Col1A1-Expression der Zellen OVX ($p = 0,008$, Tab. 11) und OVX+D+S ($p = 0,018$) zeigten eine signifikante Abweichung von einer Normalverteilung. Dies stimmt mit den Ergebnissen der Q-Q-Plots überein (Abb. 22a und Abb. 29 im Anhang auf S. 98). Deshalb wurden zum Test der Unterschiede Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests durchgeführt.

Es ergab sich nach Durchführung der Wilcoxon-Tests eine signifikant höhere Expression von Col1A1 bei den gepoolten Daten durch die Applikation von Donepezil ($p = 0,033$, Tab. 11, Abb. 22). Die Effektstärke befand sich dabei im großen Bereich.

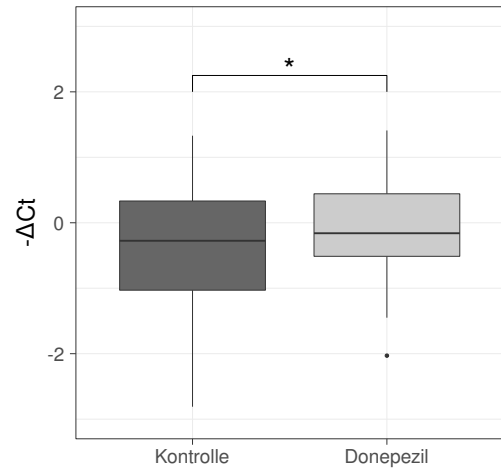
Tabelle 11: Ergebnis Col1A1-Genexpression

		n	\bar{x}	Shapiro-Test		Wilcoxon-Test		
				W	p	W	p	r
Alle Schafe	Ktrl	20	1,167	0,936	0,202	48	0,033	-0,675
	Done	20	1,265					
K	Ktrl	5	1,011	0,958	0,796	7	1,000	0,000
	Done	5	0,880					
OVX	Ktrl	5	0,834	0,694	0,008	6	0,813	-0,075
	Done	5	0,752					
OVX+D	Ktrl	5	0,985	0,893	0,372	0	0,063	-0,589
	Done	5	2,425					
OVX+D+S	Ktrl	5	1,238	0,728	0,018	2	0,188	-0,417
	Done	5	1,775					

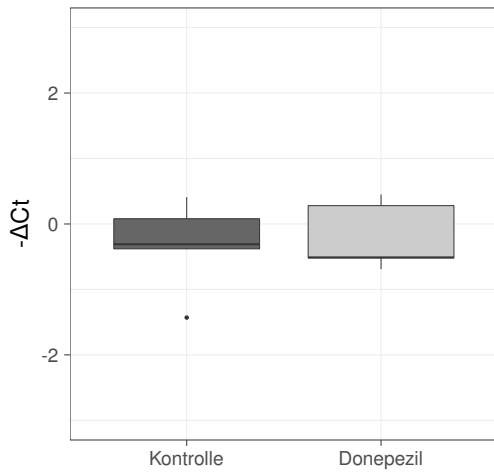
Ktrl = Kontrolle, Done = Donepezil, n = Anzahl der Messwerte, \bar{x} = Median Ratio, W = Teststatistik Shapiro-/Wilcoxon-Test, p = p -Wert, r = Korrelationskoeffizient



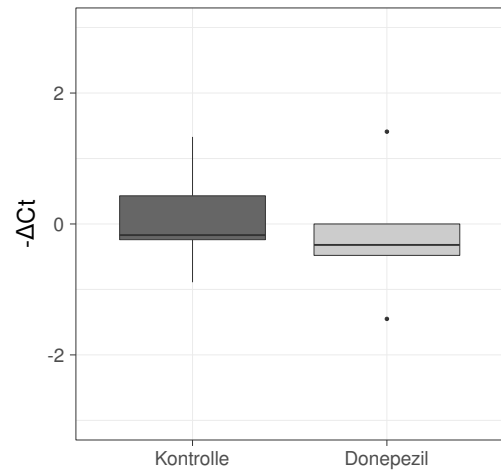
(a) Q-Q-Plot



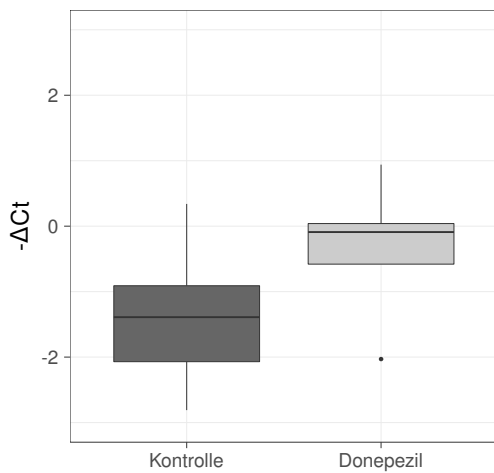
(b) Alle Schafe



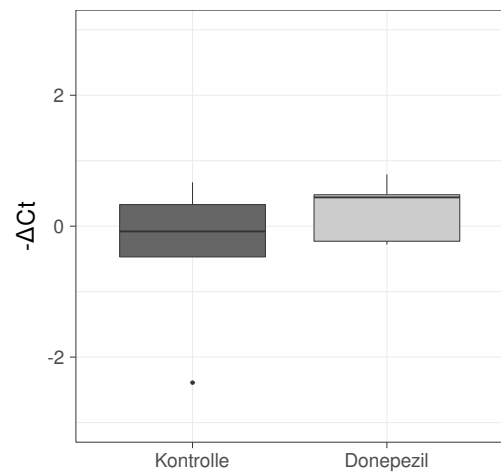
(c) K



(d) OVX



(e) OVX+D



(f) OVX+D+S

$Ct = \text{Cycle Threshold}$

Abbildung 22: Col1A1-Genexpression Vergleiche zwischen Kontrollen und Donepezil

3.3.4 OC

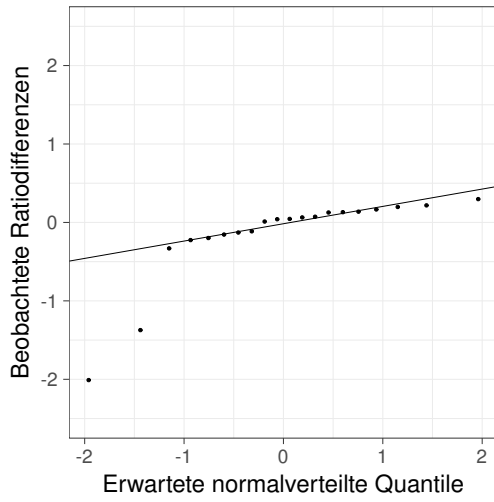
Durch die signifikant ausgefallenen Shapiro-Tests aller Schafe ($p < 0,001$, Tab. 12) und der Gruppe K allein betrachtet ($p = 0,001$) sowie den dazu passenden Q-Q-Plots (Abb. 23a und Abb. 30 im Anhang auf S. 99), konnte nicht von normalverteilten Daten ausgegangen werden.

Deshalb wurden Wilcoxon-Tests zur Auswertung der Daten verwendet. Diese ergaben keine signifikanten Unterschiede der Expressionsdifferenzen (Tab. 12, Abb. 23).

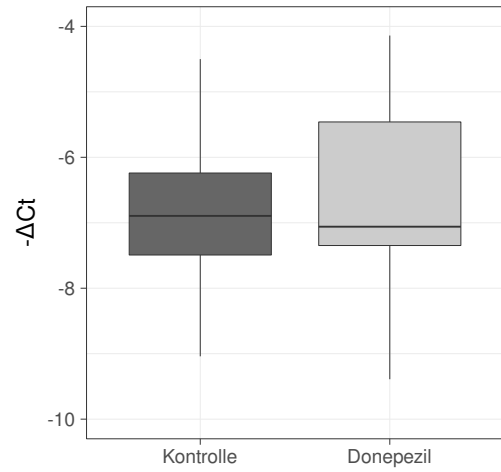
Tabelle 12: Ergebnis OC-Genexpression

		n	\bar{x}	Shapiro-Test		Wilcoxon-Test		
				W	p	W	p	r
Alle Schafe	Ktrl	20	0,921	0,640	< 0,001	98	0,812	-0,075
	Done	20	0,822					
K	Ktrl	5	1,100	0,625	0,001	10	0,625	-0,155
	Done	5	0,951					
OVX	Ktrl	5	1,128	0,852	0,201	10	0,625	-0,155
	Done	5	1,144					
OVX+D	Ktrl	5	0,982	0,950	0,735	5	0,625	-0,155
	Done	5	0,949					
OVX+D+S	Ktrl	5	1,048	0,833	0,147	5	0,625	-0,155
	Done	5	1,006					

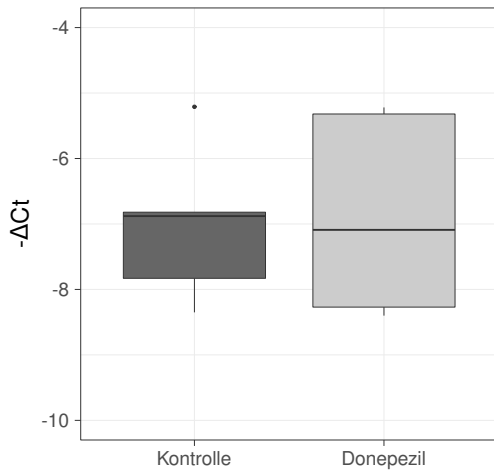
Ktrl = Kontrolle, Done = Donepezil, n = Anzahl der Messwerte, \bar{x} = Median Ratio, W = Teststatistik Shapiro-/Wilcoxon-Test, p = p -Wert, r = Korrelationskoeffizient



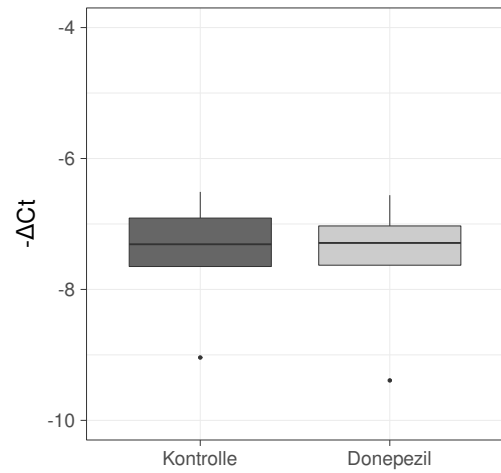
(a) Q-Q-Plot



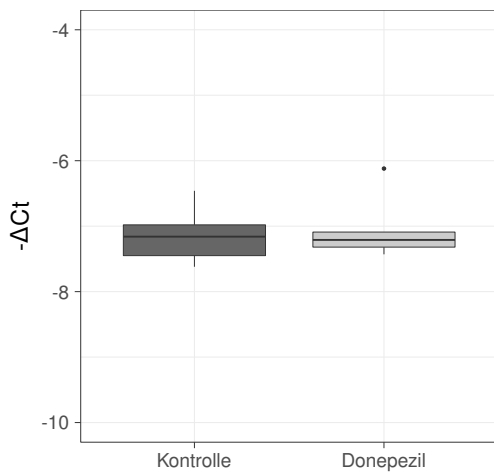
(b) Alle Schafe



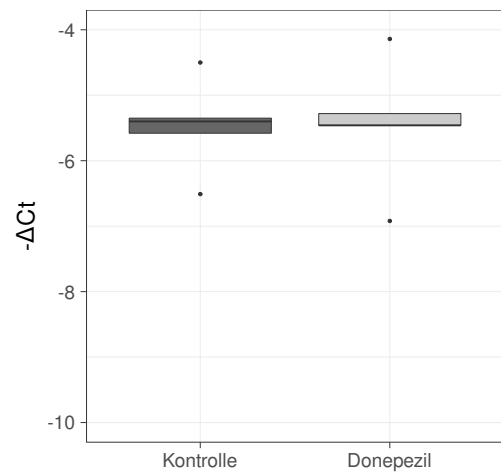
(c) K



(d) OVX



(e) OVX+D



(f) OVX+D+S

$Ct = \text{Cycle Threshold}$

Abbildung 23: OC-Genexpression Vergleiche zwischen Kontrollen und Donepezil

3.3.5 BDNF

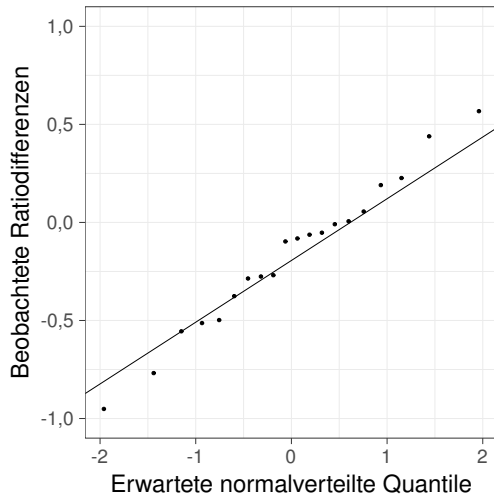
Die beobachteten BDNF-Ratiodifferenzen zeigten keinen Anlass, eine Normalverteilung ablehnen zu müssen; die Shapiro-Tests zeigten keine Signifikanzen (Tab. 13), die Q-Q-Plots (Abb. 24a und Abb. 31 im Anhang auf S. 100) bestätigten dies. Deshalb konnten zu ihrer Auswertung T-Tests verwendet werden.

Diese ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen den unbehandelten und behandelten Zellen (Tab. 13, Abb. 24).

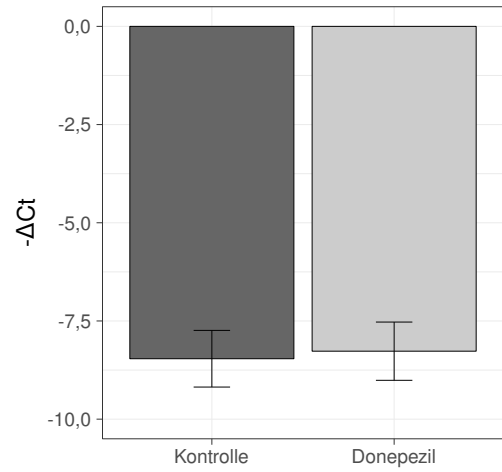
Tabelle 13: Ergebnis BDNF-Genexpression

		n	\bar{x}	s	Shapiro-Test		T-Test		
					W	p	t	p	d
Alle Schafe	Ktrl	20	1,187	0,834	0,985	0,984	-1,940	0,067	0,199
	Done	20	1,352	0,874					
K	Ktrl	5	1,405	1,394	0,911	0,475	-0,372	0,729	0,056
	Done	5	1,483	1,107					
OVX	Ktrl	5	1,075	0,435	0,988	0,974	-0,968	0,388	0,568
	Done	5	1,322	0,876					
OVX+D	Ktrl	5	1,038	0,324	0,891	0,361	-1,560	0,194	0,513
	Done	5	1,204	0,351					
OVX+D+S	Ktrl	5	1,218	0,961	0,907	0,452	-1,233	0,285	0,172
	Done	5	1,383	1,114					

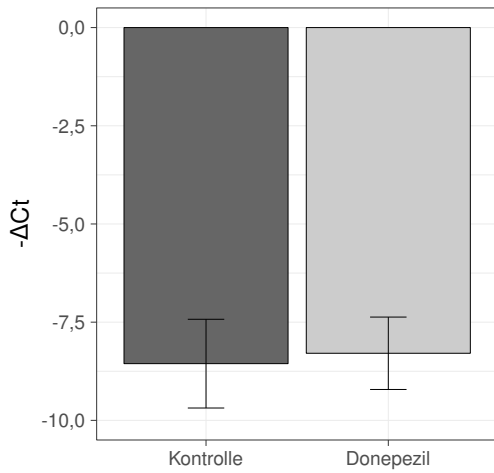
Ktrl = Kontrolle, Done = Donepezil, n = Anzahl der Messwerte, \bar{x} = Mittelwert Ratio, s = Standardabweichung Ratio, W = Teststatistik Shapiro-Test, p = p -Wert, t = Teststatistik T-Test, d = Cohens d



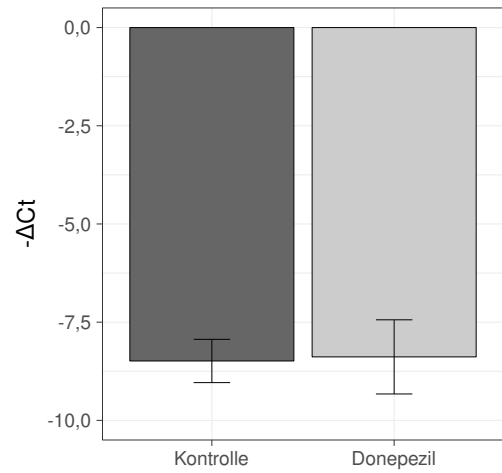
(a) Q-Q-Plot



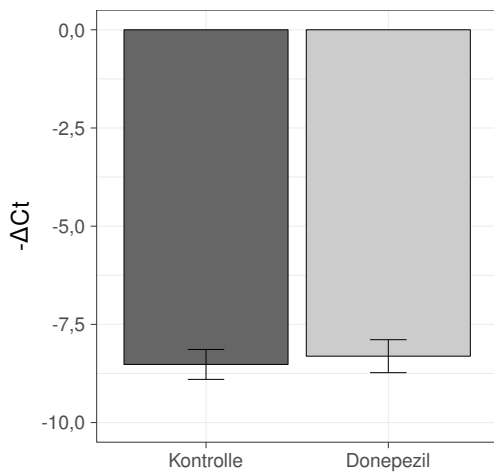
(b) Alle Schafe



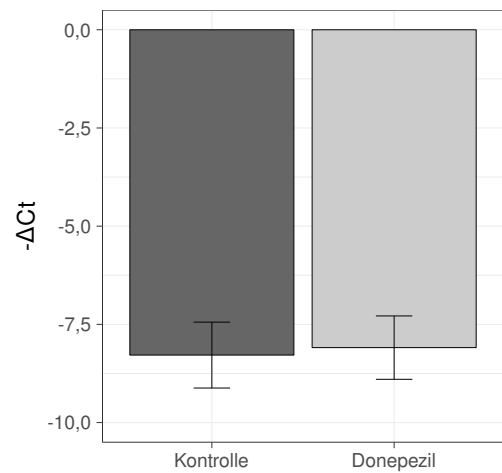
(c) K



(d) OVX



(e) OVX+D



(f) OVX+D+S

$Ct = \text{Cycle Threshold}$

Abbildung 24: Ergebnis BDNF-Genexpression

4 Diskussion

Bereits vor Beginn der Arbeit war bekannt, dass AChEI einen positiven Einfluss auf den Knochen zu haben scheinen (Eimar et al. 2013a; Eimar et al. 2016; Tamimi et al. 2017b). Da jedoch noch weitestgehend unbekannt ist, welche Vorgänge genau zu dieser Tatsache führen, wurde diese Arbeit durchgeführt.

4.1 Methodenauswahl

Um herauszufinden, inwiefern osteoporotische Zellen von einer Applikation eines solchen Medikaments profitieren können und welche Unterschiede zu gesunden Zellen bestehen, wurden sowohl gesunde als auch kranke – also osteoporotische – MSC eines bereits etablierten Schaf-Tiermodells verwendet (Khassawna et al. 2017). Durch die beschriebene Gruppeneinteilung der Schafe bestand die Möglichkeit, abgestufte Effekte dieser Unterschiede ausmachen zu können. Dies wurde durch die stufenweise Behinderung der Knochenzellen von unbeeinträchtigt (Gruppe K) bis hin zu einer dreifachen Schädigung (Gruppe OVX+D+S) reichend ermöglicht.

Das klassische Tiermodell zur Untersuchung der Osteoporose war lange Zeit die Ratte. Gegen dieses Modell sprechen jedoch mehrere Gründe: Rattenknochen bilden keine Havers-Kanäle aus; es liegt also eine andere mikroskopische Knochenarchitektur als beim Menschen vor (Turner 2001). Entsprechend ändert sich auch Umfang und Form des Knochenbaus (Erben 1996). Des Weiteren sind Ratten zu klein, um größere chirurgische Eingriffe, wie am Menschen durchführen zu können (Zarrinkalam et al. 2008).

Mit der Frage, welches Tier nun am besten als Modell für Osteoporose geeignet ist, beschäftigen sich schon seit geraumer Zeit Forscher. Bereits 1995 zeigten sich mehrere Vorteile des Schafes als Tiermodell im Gegensatz zu vielen anderen Modellen, wie exemplarisch Affen, Hunden, Katzen und diversen Kleintieren (Newman et al. 1995). Unter den erforschten Großtiermodellen für Osteoporose hat sich auch im weiteren Lauf der Zeit insbesondere das Schaf etabliert (Komori 2015). Die Größe des Skeletts entspricht annähernd der des Menschen, ebenso die mechanischen Eigenschaften, wodurch die Möglichkeit besteht, ähnliche chirurgische Eingriffe durchzuführen. Schafe bilden ein Havers-System mit ähnlichem Knochenbau aus. Merinoschafe haben einen ähnlichen Menstruationszyklus wie Frauen (Turner 2002). Nach Induktion der Osteoporose finden sich viele ähnliche pathophysiologische Eigenschaften wie beim menschlichen osteoporotischen Knochen (Zarrinkalam et al. 2012). Auch ist seit geraumer Zeit bekannt, dass die verwendeten Methoden der Ovariectomie und Glucocorticoid-Applikation bei Schafen zu der gewünschten osteoporotischen Knochenstruktur führen (Komori 2015; Chavassieux et al. 1997). Außerdem sind Schafe genetisch enger mit dem Menschen verwandt als Ratten oder andere Kleintiere (Zar-

rinkalam et al. 2008). Aus all diesen Gründen fiel auch in dieser Arbeit die Wahl des Tiermodells auf das Schaf.

Da es natürlich kein ideales Tiermodell gibt, liegen aber ebenso diverse Nachteile des Schafmodells vor. Durch ein anderes gastrointestinales System als es beim Menschen vorliegt, ist eine orale Applikation von Medikamenten als problematisch anzusehen (Newman et al. 1995). Da bei den Schafen, von denen die Zellen dieser Arbeit stammen, lediglich eine allgemeine Vitamin D-defiziente Diät und parenterale Steroidgaben durchgeführt wurden, ist dieser Malus in vorliegendem Fall zu vernachlässigen. Wie bereits erwähnt stehen Kalzium- und Phosphat-Haushalt in engem Zusammenhang. Beim Schaf ist der Phosphat-Haushalt jedoch grundlegend anders geregelt. Während der Mensch das Ion überwiegend über die Harnwege ausscheidet, wird dies beim Schaf v. a. über den Darm durchgeführt (Shirazi-Beechey et al. 1991). Zwar bilden Schafen wie der Mensch die genannten Havers-Kanäle aus, dies geschieht allerdings meist erst in einem Alter von sieben bis neun Jahren (Turner 2001). Dieses Alter hatten die verwendeten Schafe nie erreicht, weshalb von einer anderen Knochenstruktur als beim Menschen auszugehen ist.

Zusammenfassend kann nicht mit Sicherheit gesagt werden, welches Tier nun das optimale Modell für die hier durchgeführten Experimente dargestellt hätte. Jedoch ist davon auszugehen, dass mit dem Schaf aufgrund der genannten fürsprechenden Punkte ein zumindest nicht schlechtes Modell gewählt wurde.

Bezüglich der tatsächlich in dieser Arbeit verwendeten Zellen ist zu sagen, dass ein manifester osteoporotischer Phänotyp lediglich in der Gruppe OVX+D+S erreicht werden konnte. Die gemessene Knochendichte mittels DEXA-Scan zeigte sich ausschließlich in dieser Gruppe unter dem von der WHO als osteoporotisch definierten T-Score von $\leq -2,5$, nämlich $-3,3127$, bei den Gruppen OVX und OVX+D ergaben sich Werte von $0,9148$ und $0,3412$ (Heiss et al. 2017). Signifikant niedrigere Werte an gemessener mechanischer Stärke, Trabekeldichte und Anteil an mineralisiertem Knochen zeigten sich im Vergleich zur Kontrollgruppe ebenso nur in der dreifach intervenierten Gruppe, nicht bei OVX und OVX+D. Dies gilt auch für signifikant höhere Werte bzgl. prozentualem Fettgehalt und der Serumkonzentration von OC sowie ALP (Khassawna et al. 2017). Um den Effekt der Donepezil-Applikation an tatsächlich osteoporotischen Stammzellen zu messen, können also lediglich die Ergebnisse der Gruppe OVX+D+S betrachtet werden, da die Zellen der Gruppen OVX und OVX+D bzgl. ihres Phänotyps zwischen Kontrolle und Osteoporose liegen. Nichtsdestotrotz wurden auch diese Zellen für die Versuche verwendet, um mögliche Verläufe darstellen zu können.

Donepezil wurde als AChEI verwendet, da der Wirkstoff in der aktuellen Alzheimer-Therapie häufig verwendet wird, somit problemlos und leitliniengerecht dem Menschen verabreicht werden kann (Deuschl et al. 2016). Da es sich außerdem um

einen spezifischen Inhibitor handelt, war damit ein Einfluss der BChE ausgeschlossen (Tayeb et al. 2012). Die beiden weiteren leitliniengerecht verwendbaren Vertreter dieser Wirkstoffklasse sind Rivastigmin und Galantamin. Während Rivastigmin als pseudo-irreversibel und Galantamin als schnell-reversibel beschrieben wird, liegt Donepezil mit „normaler“ Reversibilität dazwischen (Colovic et al. 2013). Deshalb war von bekannter sigmoider Inhibitionskinetik des Medikaments auszugehen, was die beschriebenen Rechnungen zur Bestimmung der EC vereinfacht hat, da eine Überprüfung der vorliegenden Kinetik nicht nötig war. Natürlich kann nicht davon ausgegangen werden, dass es sich bei Donepezil um den am besten geeigneten AChEI für die durchgeführten Versuche handelt. Es hätten sich noch andere Erkenntnisse bei Verwendung eines anderen Wirkstoffes ergeben können.

Als Inkubationsperiode wurde eine Zeit von 12 h gewählt. Diese wurde in mehreren Pilotversuchen eruiert, indem die Proliferationsraten mittels des BrdU-Assays bestimmt wurden. Beim Wählen kürzerer Zeiten konnten keine Proliferationsunterschiede ausgemacht werden. Vermutlich ist dies dadurch bedingt, dass das Medikament in diesen Perioden seine Wirkung noch nicht voll entfalten konnte. Längere Zeiten führten zum selben Ergebnis. Hier konnte durch visuelle Begutachtung der Zellen unter dem Lichtmikroskop gesehen werden, dass dabei wohl der Mangel an weiterer Adhäsionsfläche am Boden der Wells der wahrscheinlichste Grund war. Bei Verwendung von Platten mit größerer Oberfläche ließe sich dieses Problem umgehen. Ggf. hätten sich hierbei längere Inkubationszeiten als überlegen herausgestellt und sich als Folge nicht nur eine etwaig erhöhte Proliferationsrate der Zellen, sondern auch noch weitere Erkenntnisse bei den untersuchten Genexpressionsraten ergeben.

Zur Verifizierung der Inhibitionswirkung Donepezils wurde der genannte fluorometrische Assay-Kit zur Bestimmung der AChE-Aktivität verwendet. Speziell dieses Kit wurde verwendet, da die Wahlmöglichkeiten auf dem Markt zu dieser Überprüfung zum Zeitpunkt der Etablierung der Experimente begrenzt waren. Das Versuchsprinzip basiert dabei in seinen Grundzügen auf dem lange bekannten Test nach Ellman (Ellman et al. 1961). Deshalb und durch die Ergebnisse der durchgeführten Pilotversuche, insbesondere den Donepezil-Verdünnungsreihen im Rahmen der EC-Bestimmungen, ist von Validität des Kits auszugehen. Bei jedem der Versuche wurden außerdem Negativkontrollen mit angesetzt, um falsch-positive Ergebnisse ausschließen zu können. Neben der Bestimmung von AChE wäre auch eine Messung der resultierenden ACh-Konzentration interessant gewesen. Insbesondere in Bezug auf mögliche, nicht-enzymatische Effekte Donepezils auf die Zellen hätten sich hier weitere Eigenschaften des Wirkstoffes zeigen können. Dies wird in den folgenden Kapiteln noch genauer erläutert.

Um die Proliferation der Zellen zu messen, wurde der genannte BrdU-Assay verwendet. Es handelt sich hierbei um eine bereits seit geraumer Zeit angewandte

Methode (Gratzner 1982), die in dem verwendeten Kit gut umgesetzt war. Wie in allen Versuchen wurden auch hier Negativkontrollen mit angesetzt. Entsprechend ist auch bei diesen Versuchen von Validität der Ergebnisse auszugehen.

Um die Effekte Donepezils auf die Syntheseraten verschiedener mRNA zu quantifizieren, wurde auf die seit Jahren etablierte Methode der real-time RT-PCR zurückgegriffen (Mullis et al. 1987; Chelly et al. 1994). Durch die schon seit langer Zeit angewendete und anerkannte Methode kann auch hier von großer Validität ausgegangen werden. Mittels Negativkontrollen und dem Aufzeichnen von Schmelzkurven bei jedem Lauf einer PCR konnten falsch-positive Ergebnisse sowie Verunreinigungen ausgeschlossen werden. Zur Auswertung wurde die relative Expression der jeweiligen mRNA mittels der anerkannten Δ CT-Methode (Livak et al. 2001; Pfaffl 2001) verwendet. Als Haushaltsgen wurde B2M ausgewählt; beim Schaf scheint es sich hierbei um eines der am besten geeigneten Gene zu handeln (Schulze et al. 2017).

4.2 Gruppenanalysen

Um zu untersuchen, ob es Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen der MSC gibt, wurden diese mittels Gruppenanalysen verglichen. Wie im Ergebnisteil dargestellt, ergab sich hierbei keine signifikante Heterogenität, weshalb die Nullhypothese, die besagt, dass keine Unterschiede vorliegen, nicht abgelehnt werden konnte.

Prospektiv war davon auszugehen, dass es insbesondere bei den Proliferationsraten und der Expression des Osteoblastenmarkers Col1A1 zu verminderten Messwerten bei den osteoporotischen Zellen im Vergleich zu den gesunden kommen sollte (Rodríguez et al. 1999; Rodríguez et al. 2000). Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

Bei OC handelt es sich um einen Marker für Knochenumbau, der bei erhöhter Synthese von Osteoid durch Osteoblasten gebildet wird und auch bei vermehrtem Abbau durch Osteoklasten freigesetzt wird (Singer et al. 2008). Da sich aus den MSC der verwendeten Zellkultur keine Osteoklasten bilden können, kann ein Anstieg von OC nur durch eine vermehrte Anzahl von Osteoblasten verursacht werden. Bei bekannter verminderter Differenzierungsrate von osteoporotischen MSC zu Osteoblasten (Rodríguez et al. 1999) war also auch mit einer verminderten Expressionsrate von OC auszugehen, da OC einen Marker für Osteoblasten darstellt (Huang et al. 2007). Eine der in dieser Arbeit zu untersuchenden Hypothesen besagte, dass die Applikation von Donepezil diese erwarteten Unterschiede minimieren könnte. Weder bei den Kontrollen noch bei den mit Donepezil behandelten Zellen zeigten sich jedoch signifikante Differenzen.

Um einen etwaigen Einfluss auf die Expression von AChE und BChE durch den osteoporotischen Phänotyp der entsprechenden Zellgruppen auszuschließen, wurden auch diese Werte bestimmt. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

BDNF scheint einen Einfluss auf die Differenzierungsrate von MSC zu Osteoblasten zu haben und je nach Polymorphismus die Entwicklung einer Osteoporose zu begünstigen (Yang et al. 2017). Außerdem scheint die BDNF-Konzentration bei A-/Eumenorrhoe verringert zu sein (Nose et al. 2019). Diese hätte sich auch im Vergleich der Gruppe K mit den übrigen ovariectomierten Gruppen widerspiegeln können. Auch hier zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

Da es bekanntermaßen bei der statistischen Auswertung von mehreren Gruppen zu Summationseffekten jeglicher Fehler kommt (Gorard 2013), sinkt hierbei die Verlässlichkeit der verwendeten statistischen Tests (Cohen 1988). Aus diesem Grund ist für valide Ergebnisse eine größere Stichprobengröße als beim Vergleich von nur zwei Gruppen nötig. Eine Stichprobengröße von $n = 5$, wie sie in dieser Arbeit verwendet wurde, ist entsprechend für solche Vergleiche relativ klein. Daher sind v. a. die Ergebnisse der Gruppenanalysen kritisch zu hinterfragen. Eine größere Stichprobengröße ist jedoch aufgrund der aufwendigen und teuren Tierversuche nicht realistisch umsetzbar. Ebenso würde dies dem seit langem anerkannten Prinzip der Reduktion im Rahmen der 3R-Prinzipien des Tierschutzes widersprechen (Russell et al. 1959), das sich auch in einer EU-Richtlinie wiederfindet (Europäisches Parlament und Rat der EU 2010).

4.3 Funktionelle Assays

4.3.1 AChE-Aktivität

Um die Wirkung Donepezils als AChEI zu überprüfen, wurde die AChE-Aktivität der Zellen quantifiziert. Wie im Ergebnisteil dargestellt, zeigte sich ein signifikanter Abfall der Enzym-Aktivität aller Zellen, sowie der einzelnen Zellgruppen isoliert betrachtet. Eine Ausnahme stellt hierbei die Gruppe OVX dar, bei der kein signifikanter Unterschied zu finden war.

Die Begründung hierfür ist lediglich spekulativer Art. Die MSC der Schafe wurden alle gleich behandelt, weshalb hier kein Einfluss auf die Enzymaktivität bestehen sollte. Um einen Einfluss Donepezils auf die AChE-Aktivität durch verminderte oder gesteigerte AChE- oder BChE-Expression ausschließen zu können, wurden die entsprechenden Expressionsraten mittels real-time RT-PCR bestimmt. Wie im Folgenden noch näher beschrieben, zeigten sich hier keine signifikanten Unterschiede.

In einer zeitlich früher stattgefundenen Arbeit mit denselben Schafen konnte eine erhöhte Expression von Carboanhydrase 2 (CA2) aus den iliakalen Knochenbiopsien der Gruppe OVX festgestellt werden (Khassawna et al. 2017). CA2 ist ein charakteristisches Enzym der Osteoklasten, dessen Expression ein Marker für deren Differenzierung ist (Lehenkari et al. 1998). Deshalb ist davon auszugehen, dass sich eine größere Anzahl dieser Zellen in der Kultur der Gruppe OVX befanden. Es be-

steht die Möglichkeit, dass die aus den Biopsien gezüchtete MSC-Kultur, die in dieser Arbeit verwendet wurde, von der erhöhten Anzahl an Osteoklasten beeinflusst wurde. Wie beschrieben stehen die verschiedenen Knochenzellen mittels Crosstalk in enger Kommunikation zueinander. Aus diesem Grund könnten Osteoklasten möglicherweise die Fähigkeit haben, MSC sowie deren Isolation und Anzucht zu beeinflussen.

Allerdings ist ein solcher Einfluss auf die verminderte Enzyminhibition der Gruppe OVX auch hierdurch nur mangelhaft erklärbar, da Donepezil unabhängig vom Zustand der Zellen arbeiten sollte. Der einzig mögliche kausale Unterschied wäre eine veränderte Expressionsrate an AChE. Eine solche konnte, bekanntermaßen und wie im Folgenden noch genauer diskutiert, nicht festgestellt werden.

Neben statistisch bedingter Varianz gibt es ansonsten keine andere Erklärung für die gemessene geringere AChE-Inhibition der OVX-Gruppe.

Donepezil wurde in einer Konzentration von 15,4 nM verwendet, was der errechneten und in einem weiteren Pilotversuch bestätigten EC_{30} entspricht. Es war also eine AChE-Restaktivität von 70 % zu erwarten. Wie bereits im Ergebnisteil dargestellt, zeigten sich jedoch Restaktivitäten von ca. 80 %, was lediglich einer Donepezilkonzentration im Bereich der EC_{20} entspricht.

Zum einen hätte die erwünschte stärkere Inhibition des Enzyms ein signifikantes Ergebnis der Aktivitätssenkung der Gruppe OVX wahrscheinlicher gemacht, zum anderen ist aber v. a. von einer verminderten Wirkung Donepezils auf sämtliche Zellen auszugehen. Andere Arbeitsgruppen verwendeten Donepezil in Konzentration von 5,7 nM (Sugimoto et al. 1995, entspricht hier dem EC_{50}) bis zu 2 mg/kg Körpergewicht eines Tiermodells (Sato et al. 2015). In dieser Arbeit war das Ziel, eine prophylaktische Wirkung Donepezils bei RANKL-Applikation zu erforschen. Mäusen wurden in regelmäßigen Abständen der Ligand intraperitoneal injiziert, zuvor jeweils Donepezil in der genannten Konzentration appliziert. Bei einem ungefähren Blutvolumen von 60 mL/kg bei Mäusen (Wolfensohn et al. 2003) und der molaren Masse von 419,95 g/mol von Donepezil (Sigma-Aldrich 2018) lässt sich eine Konzentration von ca. 80 nM errechnen. Bei dieser Rechnung handelt es sich natürlich nur um eine grobe Approximation, dennoch zeigt sie, dass die Größenordnung der verwendeten Donepezilkonzentration im richtigen Bereich liegt, auch wenn dieser starken Schwankungen zu unterliegen scheint. Bei der Therapie der Alzheimer-Demenz mit dem Medikament liegt die Inhibition im Bereich von 19–29 % (Prvulovic et al. 2014). Somit befindet sich die Inhibition in den hier durchgeführten Versuchen ebenso in diesem Bereich. Dies bestätigte sich auch in den weiteren Ergebnissen der Arbeit, da auch hier signifikant gemessene Unterschiede durch die Donepezil-Applikation zu finden waren. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass eine höhere Konzentration des Inhibitors zu weiteren Erkenntnissen hätte führen können. Auch die errechneten

Effektstärken der signifikant verminderten Aktivitäten des Enzyms, die lediglich im kleinen bis mittleren Bereich lagen, sprechen hierfür.

Es kann nicht abschließend geklärt werden, weshalb die verwendete Donepezilkonzentration von 15,4 nM nun doch nicht der EC_{30} zu entsprechen scheint. Ein Erklärungsversuch hierfür könnte sein, dass die Potenz Donepezils durch Alterungsprozesse abnehmen könnte. Dagegen spricht die vom Hersteller als unproblematisch angegebene Lagerungsmöglichkeit bei Raumtemperatur (Sigma-Aldrich 2018). In der Fachinformation von Aricept® wird eine lange Halbwertszeit des Medikamentes von 70 h und ein überwiegendes Vorliegen des Medikamentes in seiner Reinform nach oraler Aufnahme im menschlichem Organismus beschrieben, sodass auch hierbei von keiner bis lediglich geringer natürlicher Degradation auszugehen ist. Die Bioelimination erfolgt überwiegend renal in unveränderter Form und durch Biotransformation durch das Cytochrom P450-System (Esai/Pfizer 2018).

Ebenso konnte im Vergleich der Versuche untereinander bzgl. des zeitlichen Verlaufs der Durchführung keine Minderung der Inhibitionsstärke des Wirkstoffs beobachtet werden – die gemessene Inhibition der später durchgeführten Versuche war nicht merklich geringer als die der früher durchgeführten. Es bleibt nur die Hypothese, dass die im Pilotversuch festgestellte EC_{30} inkorrekt war. Aufgrund der durchgeführten Doppelbestimmung mit zwei unterschiedlichen Zellzahlen, der anschließenden Überprüfung der Konzentration in einem weiteren Pilotversuch und unveränderter Methodik der Versuchsdurchführung, ist auch diese Hypothese als unwahrscheinlich zu werten.

Somit scheint eine varianzbedingte Abweichung der Ergebnisse von den Messungen der Pilotversuche als Ursache der gemessenen Diskrepanzen die wahrscheinlichste Erklärung zu sein.

4.3.2 Proliferation

Wie im Ergebnisteil dargestellt, zeigte sich keine erhöhte Proliferationsrate der Zellen nach Donepezil-Applikation. Ganz im Gegenteil kam es bei den Zellen der Gruppe OVX+D sogar zu einer signifikant verminderten Proliferation bei mittlerer Effektstärke.

In einer in vitro-Studie konnte gezeigt werden, dass durch die Applikation von AChE die Osteoklastogenese stimuliert und analog durch die Donepezil-Applikation ebenjene Stimulation der Osteoklastogenese inhibiert wurde (Sato et al. 2015). Damit zeigt sich also, dass Donepezil einen direkten Einfluss auf das NNCS zu haben scheint. Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass es durch die Gabe von Donepezil an Mäuse zu keiner erhöhten Osteoblastenzahl kommt und zusätzlich die Anzahl der knochenabbauenden Osteoklasten sinkt (Eimar et al. 2016). Dazu ist zu sagen, dass es sich hierbei um eine in vivo-Studie handelte. Donepezil wirkte hierbei

wohl nur fraglich auf das NNCS, da das Medikament dort nur in deutlich höheren Konzentrationen zu wirken scheint und die Effekte eher über das Nervensystem vermittelt wurden. Hierfür gibt es mehrere Erklärungsansätze:

Die Konzentration von Donepezil im neuronalen System scheint höher zu sein als in der Peripherie und kann somit an dieser Stelle potenter wirken. Somit erklärt sich hier eine verminderte Wirkung. Bei der hier durchgeführten *in vitro*-Studie spielt diese Verteilungsproblematik keine Rolle, muss jedoch bei anderen *in vivo*-Versuchen und einer etwaigen klinischen Applikation berücksichtigt werden.

Eine andere Ursache könnte sein, dass es sich bei Donepezil um einen spezifischen AChEI handelt; BChE also nicht auch gehemmt wird. BChE kommt insb. im peripheren und kaum bis nicht im neuronalen Gewebe vor (Kosasa et al. 2000). Die Rolle von BChE ist nach wie vor nicht eindeutig geklärt. Auch wenn der Einfluss auf den ACh-Abbau nur eine geringe Rolle im Vergleich zu AChE hat, so liegt trotzdem eine erhöhte Degradation des Signalmoleküls im Vergleich zu neuronalen Zellen vor. Eine kombinierte Hemmung beider Enzyme mittels bspw. Rivastigmin könnte hier neue Erkenntnisse liefern. Auch eine direkte Bestimmung der ACh-Konzentration, evtl. im Vergleich mit einem spezifischen Inhibitor wie Donepezil, könnte zu interessanten Ergebnissen führen.

Eine weitere Ursache könnte das Vorkommen unterschiedlicher Isoenzyme von AChE sein. Zwar kommt sowohl in neuronalen als auch in muskuloskelettalen Zellen das gleiche Isoenzym AChE-S vor, allerdings findet sich im Plasma überwiegend die an Erythrozyten gebundene Variante AChE-E (Grisaru et al. 1999). Aufgrund der Blut-Hirn-Schranke könnte der Einfluss dieser Isoform im neuronalen System eine geringere Rolle als in der Peripherie spielen. Durch diese möglicherweise funktionell höhere Konzentration von AChE in der Peripherie und einer etwaigen differenten Wirkung Donepezils auf die unterschiedlichen Isoenzyme könnte es zu den genannten Unterschieden kommen. Auch hierbei könnte eine Untersuchung der ACh-Konzentration nach Applikation des Inhibitors zu weiteren Erkenntnissen führen. Ebenso wäre ein Vergleich der EC-Werte Donepezils bzgl. der unterschiedlichen Isoformen der AChE nützlich.

Da die alleinige Applikation von ACh jedoch nachgewiesen zu einer erhöhten Zellproliferation der Osteoblasten führt (Sato et al. 2010), ist es dennoch erstaunlich, dass sich dies in dieser Arbeit nicht widerspiegelt, schließlich müsste es durch die verminderte AChE-Aktivität zu einer erhöhten ACh-Konzentration kommen.

Schon seit geraumer Zeit ist bekannt, dass Cholinesterasen auch nicht-enzymatisch wirken können. Schon 1993 konnten Layer et al. genau dies zeigen. Sie erkannten, dass eine Inhibition von AChE und BChE nicht immer zu dem erwarteten verminderten Neuriten-Wachstum der verwendeten embryonalen Tectum-Zellen von Hühnern führten. Somit musste also ein weiterer Wirkungsmechanismus abgesehen von der

eigentlichen enzymatischen Funktion der Proteine vorliegen.

Sato et al. erwarteten in ihrer in vitro-Studie aus dem Jahr 2015 eine Akkumulation von ACh durch Applikation von Donepezil, was wiederum zu einer vermehrten Apoptose von RANKL-stimulierten Zellen und keinem Effekt auf TRAP-positive Zellen führen sollte. Entgegen dieser Erwartungen führte Donepezil zu keiner vermehrten Apoptose, jedoch zu einer verminderten Anzahl TRAP-positiver Zellen. Auch dies legt eine nicht-enzymatische Funktion Donepezils nahe.

In einer weiteren Studie wurde das Entwicklungsverhalten von Hühner-Extremitäten im Bezug auf AChE untersucht. Eines der Resultate war, dass sowohl ACh-Applikation als auch AChE-Inhibition das Wachstum beschleunigten. Eine Hemmung von BChE zeigte sich jedoch überwiegend wirkungslos, sodass eine zusätzliche nicht-enzymatische Wirkung der AChE nahe liegt (Spieker et al. 2016).

Des Weiteren scheint die Expression von AChE während der Osteoblastendifferenzierung über diverse Signalkaskaden, u. a. durch den Wnt3a-Signalweg über den Transkriptionsfaktor Runx2, geregelt zu sein. Es ergibt sich hierbei ein ähnliches Expressionsmuster wie bei ALP. Auch dies deutet auf eine Schlüsselrolle des Proteins im Hinblick auf Differenzierung und Crosstalk im Knochen hin, evtl. auch hier über eine zusätzliche non-enzymatische Komponente (Xu et al. 2017).

Das paradoxe Ergebnis dieser Arbeit, dass die Zellproliferation durch die Donepezil-Applikation nicht erhöht, teilweise sogar inhibiert wird, könnte durch eine etwaige nicht-enzymatische Funktion der AChE erklärt werden. Diese hypothetisch angenommene, möglicherweise durch Donepezil inhibierte Funktion des Enzyms könnte die proproliferative Wirkung von ACh übertreffen und eine Erklärung der Ergebnisse liefern. Weitere Versuche, evtl. in Kombination mit einer ACh-Konzentrationsbestimmung nach Applikation des Inhibitors könnten weitere Aufschlüsse für diese Überlegungen bringen.

In Zusammenschau mit den Ergebnissen der Genexpressionen von Col1A1, OC und BDNF ist davon auszugehen, dass die AChE-Inhibition durch Donepezil zwar zu keiner erhöhten Proliferation, dafür jedoch zu einer erhöhten Differenzierungsrate der Zellen führte.

4.4 Genexpression

4.4.1 AChE

Da eine Regulation der Expression der AChE durch Donepezil nicht auszuschließen war und dies die relative Inhibitionsstärke des Medikaments beeinflusst hätte, wurde die quantitative Bestimmung der Expression auch in den eigentlichen Versuchen durchgeführt. Auch die bereits erwähnte etwaige nicht-enzymatische Funktion der AChE machte diese Messung notwendig. Wie im Ergebnisteil zu sehen ist, kam es

zu keiner signifikanten Regulation der Expression. Hierdurch können die erwähnten unerwünschten Nebeneffekte des Medikaments ausgeschlossen werden.

In einer *in vivo*-Studie mittels Maus-Modell wurde mittels intracerebraler Injektion von β -Amyloid eine Alzheimer-Demenz induziert, anschließend die Mäuse mittels Donepezil behandelt und u. a. die resultierende AChE-Expression der entsprechenden Neuronen bestimmt. Hierbei zeigte sich eine signifikante Hochregulation der Expression, ca. um den Faktor 1,4 (Li et al. 2012). In einer klinischen Studie, in die 91 Alzheimer-Patientinnen und -Patienten eingeschlossen waren, wurde die AChE-Konzentration des Liquors bei Applikation mehrerer AChEI analysiert. Dabei fand sich ein signifikanter Anstieg der Konzentration bei Applikation von Donepezil und Galantamin sowie ein Abfall bei Therapie mit Rivastigmin (Parnetti et al. 2002). Der Anstieg bei Therapie mit Donepezil scheint dabei im Bereich eines Faktors von etwa 2,2 zu liegen (Prvulovic et al. 2014).

Diese Phänomene konnten in der hier durchgeführten Arbeit nicht repliziert werden. Zum einen handelt es sich nicht um neuronale Zellen wie in den genannten Arbeiten, zum anderen handelt es sich um eine *in vitro*-Studie, somit ist ein direkter Vergleich mit *in vivo*-Studien nicht möglich. Zum Zeitpunkt des Verfassens dieser Arbeit konnten keine weiteren *in vitro*-Ergebnisse dieser Art gefunden werden.

Neben bspw. Transkriptionsfaktoren kann die Expression von Genen auch über *micro RNA* (miRNA) gesteuert werden. Dabei handelt es sich um kurze RNA-Stränge, die posttranslational mRNA modifizieren und dabei i.d.R. die entsprechende Proteinbiosynthese vermindern (Felekkis et al. 2010). Im Rahmen der Alzheimer-Demenz ist die miRNA-206 hochreguliert, die wiederum die cerebrale BDNF-Expression supprimiert, was zu einer Verminderung der kognitiven Leistung im Rahmen der Erkrankung beiträgt. Es konnte gezeigt werden, dass durch Donepezil-Applikation bei Amyloid-Precursor-Protein/Präsenilin-1 transgenen Mäusen die pathologisch erhöhte miRNA-206-Konzentration gesenkt werden konnte (Wang et al. 2017). Im Rahmen der Entwicklung der postmenopausalen Osteoporose scheint die miRNA-133a eine Rolle zu spielen (Li et al. 2018). Ob Donepezil auch Einfluss auf die miRNA-133a oder andere die Osteoporose betreffende miRNA hat, steht aktuell noch nicht fest. Ein etwaiger Einfluss auf die Expression von AChE oder andere Proteine ist nicht auszuschließen.

4.4.2 BChE

Wie in der Einleitung erwähnt, degradiert BChE genau wie AChE ACh, jedoch deutlich langsamer und weniger spezifisch. Da Donepezil ein spezifischer AChEI ist (Tayeb et al. 2012) – also nur AChE und nicht auch BChE hemmt – war nicht davon auszugehen, dass Donepezil einen Einfluss auf die BChE-Expression hat. Dies gilt insbesondere, da auch die AChE-Expression durch Donepezil nicht beeinflusst

zu sein scheint. Dennoch wurden aus demselben Grund wie auch bei AChE die PCR zusätzlich mit dem BChE-Primer durchgeführt. Auch hier fand sich keine Modulation der Expressionsrate. Somit konnten auch hier die unerwünschten Nebeneffekte ausgeschlossen werden.

Da auch BChE einen Einfluss auf die Osteogenese und den Knochen im Allgemeinen hat (Haupt et al. 2015), wären weitere Experimente mit einer Inhibition, möglicherweise kombiniert mit erneuter AChE-Inhibition – bspw. mit Rivastigmin (Colovic et al. 2013) – aufschlussreich.

4.4.3 Col1A1

Col1A1 stellt neben dem Enzym ALP und dem Protein OPN einen Marker für unreife Osteoblasten dar (Huang et al. 2007).

Um eine Differenzierung der MSC in Osteoblasten feststellen zu können, wurde die Col1A1-Expression mittels real-time RT-PCR bestimmt. Es fand sich eine signifikant erhöhte Expression des Markers. Deshalb ist durch die Applikation von Donepezil von einer erhöhten Differenzierungsrate der Zellen auszugehen. Dies erfolgte, obwohl kein spezielles osteogenes Medium in den Versuchen verwendet wurde.

Col1A1 ist nicht nur ein Zellmarker für unreife Osteoblasten, sondern auch ein Hauptbestandteil des Osteoids. Entsprechend ist es eines der wichtigsten Proteine für die Stabilität des Knochens, v. a. im Hinblick auf seine Flexibilität und somit Bruchsicherheit (Nair et al. 2013). Wie bereits beschrieben, kommt es im Rahmen der Osteoporose zu diversen Einschränkungen im Hinblick auf Struktur, Menge und Verteilung des Proteins im Knochen, wodurch die erniedrigte Knochendichte im DEXA und die erhöhte Frakturanfälligkeit miterklärt werden können. Insbesondere im Hinblick auf diese Ursachen für die Erkrankung ist es erfreulich, dass es durch die Applikation Donepezils zu einer erhöhten Synthese an Col1A1 kam.

In Studien konnte gezeigt werden, dass Alzheimer-Patientinnen und -Patienten, die einen AChEI zu sich nehmen und sich die Hüfte brechen, postinterventionell bessere Adhäsion, qualitativ hochwertigeren Knochen und geringere Komplikationsraten haben. Dies wurde retrospektiv bei 46 über 75-jährigen Alzheimer-Patientinnen, die sich die Hüfte gebrochen haben, festgestellt. Die Adhäsion wurde radiologisch mittels Hammer-Index, die Knochenqualität mittels Singh-Index bestimmt (Eimar et al. 2013a).

Der Hammer-Index teilt einer Fraktur einen von 1 bis 5 reichenden, radiologisch zu evaluierenden Vereinigungsgrad der Knochenfragmente zu. Dieser ist abhängig von der Morphologie des bestehenden Kallus, der Frakturlinie und der Knochenfusion nach Fraktur. Dabei besteht eine Korrelation mit dem Grad der Stabilität des Knochens, wobei mit einer großen Unsicherheit gerechnet werden muss; die Wahrscheinlichkeit der korrekten Zuordnung beträgt etwa 50 % (Hammer et al. 1985).

Der Singh-Index klassifiziert die Knochenqualität anhand der röntgenologisch zu bestimmenden Trabekelstruktur. Es erfolgt eine Einteilung in sechs Grade, die mit histologischen Analysen der Knochenqualität korrelieren (Singh et al. 1970).

In einer auf der Studie von Eimar et al. aufbauenden Untersuchung konnte außerdem gezeigt werden, dass die Einnahme eines AChEI nicht nur zu einer besseren Heilungsrate und -qualität führt, sondern auch das Risiko einer Hüftfraktur mindert. Hierbei wurden aus einer etablierten Datenbank Alzheimer-Patientinnen und -Patienten identifiziert, anschließend das Risiko einer osteoporotischen Fraktur bei Patientinnen und Patienten, die einen AChEI einnehmen, mit dem der Personen ohne einer entsprechenden Medikation verglichen. Die AChEI-Applikation minderte dabei das Risiko signifikant (Tamimi et al. 2017b). Die in dieser Arbeit bestimmte, signifikant erhöhte Expressionsrate von Col1A1 mit großer Effektstärke passt zu dieser Beobachtung, da sich durch vermehrtes Vorhandensein des Strukturproteins mehr Hydroxyapatit in das Osteoid einlagern kann. Bei Hydroxyapatit handelt es sich um die hauptverantwortliche Verbindung für die hohe Masse der Knochen (Bono et al. 2003). Es ist also wahrscheinlich, dass die erhöhte Expression von Col1A1 durch einen AChEI den Hauptgrund für die gesünderen Knochen der untersuchten Personen darstellt.

Wie bereits erwähnt, können aber natürlich noch weitere, teils nicht-enzymatische Effekte der AChE hierfür eine relevante Rolle spielen, was durch die Durchführung weiterer Versuche bestätigt werden könnte.

Neben Col1A1 wäre es auch möglich gewesen, die Expression von Col1A2 zu bestimmen. Da in Col1 die zweifache Anzahl an $\alpha 1(I)$ - als $\alpha 2(I)$ -Ketten vorkommt (Rest et al. 1991), fiel die Entscheidung auf Col1A1. Es ist jedoch natürlich nicht auszuschließen, dass die Expressionsbestimmung von Col1A2 zu weiteren Erkenntnissen geführt hätte. Möglicherweise könnte es sogar noch andere Bestandteile des Kollagenstoffwechsels geben, die im Rahmen einer Osteoporose und deren Therapie eine Rolle spielen.

4.4.4 OC

Nach der weiteren Ausreifung der Osteoblasten synthetisieren die Zellen OC – bei OC handelt es sich also um einen Marker für reife Osteoblasten (Huang et al. 2007). Um eine vollständige Ausreifung der Osteoblasten erkennen zu können, wurde deshalb auch die Expression dieses Proteins bestimmt. Wie bereits dargestellt, kam es jedoch zu keiner signifikant erhöhten Biosynthese von OC.

In Kombination mit der erhöhten Expressionsrate von Col1A1 spricht dies dafür, dass die Differenzierung der MSC zwar in Richtung Osteoblasten stimuliert wurde, die Zellen jedoch nicht komplett ausreifen konnten und OC noch nicht relevanter exprimierten. Dies ist ein wünschenswertes Ergebnis bzgl. der Donepezil-Applikation,

da insbesondere die noch reifenden Osteoblasten Osteoid synthetisieren (Florencio-Silva et al. 2015).

OC ist jedoch nicht nur ein Marker für ausgereifte Osteoblasten, sondern hat natürlich auch weitere Funktionen im menschlichen Körper. Insbesondere die Funktion als humorales Protein im Energiehaushalt scheint sich in den letzten Jahren herauszukristallisieren (Ferron et al. 2014). Die Funktion im Knochen ist bis heute nicht komplett geklärt. So wurde initial angenommen, dass OC für die Mineralisation im Knochen benötigt wird (Karsenty 2017), später konnte jedoch gezeigt werden, dass OC-Knockout-Mäuse eine erhöhte Mineralisation zeigen (Ducy et al. 1996). Weiterhin hat das Protein auch eine mechanische Hilfsfunktion in der EZM (Zoch et al. 2016). Zusammen mit OPN bildet es Komplexe, die bei mechanischer Belastung den Knochen stabilisieren (Poundarik et al. 2012). Alles in allem ist die exakte lokale Funktion von OC im Knochen nach wie vor unklar.

Der aktuelle Konsens scheint zu sein, dass OC insbesondere die Mineralisation des Knochens inhibiert. Passend hierzu scheint die Konzentration von OC bei Patientinnen mit postmenopausaler Osteoporose signifikant erhöht zu sein (Jagtap et al. 2010). Entsprechend wäre eine verringerte OC-Konzentration durch die Donepezil-Applikation als Ursache der Zunahme der Knochendichte möglich gewesen. Diese Hypothese bestätigte sich nicht. Denkbar wäre jedoch ein verspäteter Anstieg von OC durch das Medikament. Weitere Versuche mit längerer Inkubationsdauer und ggf. Bestimmung einer Dynamik der Expressionsrate könnten hier weitere Aufschlüsse zeigen.

Ein weiterer erwähnenswerter Punkt ist, dass die Versuche in DMEM mit FBS durchgeführt wurden, also kein speziell osteogenes Medium verwendet wurde. Durch die Verwendung eines solchen Mediums in Kombination mit Donepezil könnte die Ausdifferenzierung ggf. schneller erreicht werden.

Genau dieser Fragestellung wurde im Anschluss an diese Arbeit durch andere Mitarbeiter der Forschungsgruppe nachgegangen. Auch in osteogenem Medium zeigte sich kein signifikanter Anstieg von OC. In osteogenem Medium zeigte sich außerdem ein signifikanter Anstieg von Col1A1 durch die Applikation von Donepezil zu MSC der Gruppe OVX+D+S (Nachlinger et al. 2018).

4.4.5 BDNF

BDNF ist ein neurotropher Wachstumsfaktor, der insbesondere für seine Funktion im zentralen Nervensystem bekannt ist. Hier spielt er für die Plastizität der Neurone und der Neurogenese eine wichtige Rolle. BDNF ist jedoch nicht nur in Neuronen, sondern auch in diversen anderen Geweben wie Knochen, Knorpel und Blutgefäßen zu finden (Liu et al. 2018). Es konnte gezeigt werden, dass BDNF von Osteoblasten und Endothelzellen verstärkt im Rahmen einer Fraktur exprimiert wird (Kilian et al.

2014) und einen positiven Einfluss auf die Frakturheilung hat (Su et al. 2017). Es wurde außerdem festgestellt, dass Donepezil einen Einfluss auf die Expression von BDNF in neuronalen Zellen hat. Neben des cholinergen Effektes hat der Wirkstoff hier auch einen positiven Einfluss auf die Kognition durch Erhöhung der BDNF-Konzentration (Zheng et al. 2018). Dieser Effekt lässt sich auch im peripheren Blut bei erwachsenen Alzheimer-Patientinnen und -Patienten nachweisen; die Konzentration von BDNF erhöht sich bei der Einnahme von Donepezil (Leyhe et al. 2007). Somit besteht die Möglichkeit, dass Donepezil auch im NNCS des Knochens einen ähnlichen Effekt auf BDNF haben könnte. Entsprechend stellte sich die Frage, ob die Applikation Donepezils einen Einfluss auf die BDNF-Konzentration hat und die beobachteten positiven Effekte auf den Knochen dadurch mitbedingt werden.

Wie im Ergebnisteil dargestellt, konnten jedoch keine Unterschiede der Expressionsrate von BDNF ausgemacht werden. Donepezil scheint also keinen Einfluss auf die Synthese des Wachstumsfaktors BDNF zu haben, die positiven Effekte des Wirkstoffs scheinen also hierdurch nicht mitbedingt zu sein.

4.5 Ausblick

Obwohl Osteoporose eine häufig auftretende Erkrankung der westlichen Welt ist, eine starke Einschränkung auf die Lebenserwartung und -qualität vieler Patientinnen und Patienten darstellt und hohe Kosten für das Gesundheitssystem erzeugt, gibt es nur sehr wenige Therapiemöglichkeiten zur Behandlung der Krankheit. Laut aktueller Leitlinie stehen an primär empfohlenen Wirkstoffklassen lediglich Bisphosphonate, SERM, PTH-Analoga, Denosumab – ein monoklonaler Antikörper gegen RANKL – und mit Einschränkungen Östrogene zur Verfügung (Dachverband Osteologie e.V. 2017). Neben diesen primär empfohlenen Wirkstoffen sind noch Calcitonin und Strontiumranelat zur Behandlung zugelassen (Maeda et al. 2014).

Fast alle der genannten Wirkstoffklassen wirken lediglich resorptionshemmend auf den Knochen (Fleisch 1998; Delmas et al. 1997; Lacey et al. 2012; Khosla 2010; Chesnut et al. 2000). Teriparatid, das einzige zur Behandlung zugelassene PTH-Analogon wirkt stimulierend auf den Knochen (Miyakoshi 2004; Tsuchie et al. 2013). Strontiumranelat nimmt eine Sonderstellung ein, da es sowohl antiresorptiv, als auch konstruktiv auf Knochen zu wirken scheint (Meunier et al. 2004). Insbesondere Wirkstoffe, die den Knochenaufbau stimulieren, wären also interessante und vielversprechende Ansatzpunkte neuer Therapiemöglichkeiten der Osteoporose. Ein Ansatz hierfür, der derzeit in diese Richtung verfolgt wird, ist die Anwendung von Romosozumab, einem monoklonalen Antikörper gegen Sklerostin. Sklerostin ist ein Inhibitor der Osteogenese, der durch Osteozyten sezerniert wird und über die Inhibition des Wnt-Signalweges wirkt. Der Antikörper bindet und inhibiert Sklerostin, wodurch

die Knochenresorption gehemmt und die -produktion stimuliert wird (Cosman et al. 2016).

Wie oben geschildert, scheint Donepezil auch in diese Kategorie der doppelt wirkenden Wirkstoffklassen zu fallen. Die Applikation des Medikamentes führte zu einer erhöhten Differenzierung der MSC in knochenaufbauende Osteoblasten und zur vermehrten Synthese des Osteoid-Proteins Col1A1. Außerdem ist bekannt, dass Donepezil in vitro die Osteoklastenfunktion hemmt und in vivo zu verminderter Knochenresorption führt. Donepezil scheint nicht-enzymatisch eine geringere RANK-Expression zu bedingen, wodurch diese Effekte wohl auftreten (Sato et al. 2015).

Für die potentiell positive Wirkung des Medikaments für Osteoporose-Patientinnen und -Patienten spricht zusätzlich, dass bereits bekannt ist, dass die Einnahme eines Medikaments aus der Gruppe der AChEI im Rahmen einer Alzheimer-Demenz zu einer besseren Knochendichte, -qualität und -heilung führt (Eimar et al. 2013a). AChEI könnten also in Zukunft durchaus eine Rolle in der Behandlung der Osteoporose spielen.

Wie erwähnt haben Medikamente dieser Wirkstoffklassen bei systemischer Applikation jedoch große Nebenwirkungen (Tayeb et al. 2012). Insbesondere die Wirkung auf das zentrale Nervensystem, welche die Behandlung des Morbus Alzheimer überhaupt erst ermöglicht, wäre bei einer Behandlung der Osteoporose nicht nur unnötig, sondern sogar unerwünscht. Eine Strategie, die diesen Umstand zu lösen versucht, ist es, Nanopartikel als *Drug Delivery System* (DDS) zu verwenden. Durch Verwendung solcher Systeme wird eine spezifischere Zielstruktur von Medikamenten ermöglicht und bspw. ein übermäßiges Übertreten der Blut-Hirn-Schranke und damit eine zentrale Wirkung verhindert. Das Medikament wirkt hierdurch überwiegend am erwünschten Zielorgan (Cheng et al. 2017). Es gibt schon länger Bestrebungen, ein solches DDS auch am Knochen zu verwenden. Eine knochenspezifische Therapie könnte bspw. durch Verwendung von Bisphosphonaten als Mediator zwischen Nanopartikel und dem kalziumhaltigen Knochen erreicht werden (Roohani-Esfahani et al. 2017). In einer in vitro-Studie konnte gezeigt werden, dass Donepezil bei Bindung an Nanopartikel zur Behandlung von Alzheimer die Blut-Hirn-Schranke besser überwinden kann und einen Effekt auf die betroffenen Neurone hat. Hierbei wurde das Medikament an PLGA-b-PEG-Nanopartikel gebunden (Baysal et al. 2016). Ggf. kann durch Verwendung anderer Nanopartikel und der genannten Kombination mit bspw. Bisphosphonaten dieser Übertritt der Blut-Hirn-Schranke verhindert werden und eine gezielte lokale Therapie ermöglicht werden. Es bleibt zu eruieren, an welche Form von Nanopartikeln Donepezil am besten zur Behandlung der Osteoporose gekoppelt werden könnte. Neben der systemischen Applikation können solche DDS auch direkt in Osteosynthesematerialien integriert werden. Somit ist auch intraoperativ eine kontrollierte, lokale Wirkstoffapplikation möglich (Kauschke et al. 2019).

Wie oben mehrfach erwähnt, führen die neuen Erkenntnisse aus dieser Arbeit zu vielen weiteren Fragestellungen, die durch zusätzliche Experimente beleuchtet werden könnten.

Es bleibt zu klären, ob die Applikation von AChE tatsächlich zu ausschließlich Differenzierung und nicht doch auch Proliferation führt, diese aber durch andere Faktoren blockiert wird. Da nicht-enzymatische Wirkungen der AChE hier die wahrscheinlichste Ursache zu sein scheinen, wäre speziell die Untersuchung davon relevant. Hier könnte eine ACh-Messung im Rahmen der AChEI-Applikation zu neuen Erkenntnissen führen.

Längere Inkubationsperioden mit dem Medikament könnten zeigen, ob die Osteoblasten komplett ausreifen. Das Problem der zu geringen Adhäsionsfläche in den Wells könnte entweder durch andere Platten oder durch eine geringe Dichte der Zellaussaat gelöst werden.

Da neben Donepezil noch weitere AChEI existieren, insbesondere Rivastigmin und Galantamin, könnte untersucht werden, ob andere Wirkstoffe auch andere Einflüsse auf die Knochenzellen haben. Auch wenn eine signifikant verschiedene Potenz der Medikamente unwahrscheinlich ist, kann sie zum derzeitigen Zeitpunkt nicht ausgeschlossen werden.

Zusammengefasst konnte durch diese Arbeit auf molekularer Ebene bestätigt werden, dass die Applikation des AChEI Donepezil zu einer erhöhten Differenzierung von MSC des Knochens zu knochenbauenden Osteoblasten und zur vermehrten Expression des im Osteoid enthaltenen Proteins Coll1A1 führte, was die positive Wirkung dieses Medikamentes auf gesunden und im Rahmen einer Osteoporose erkrankten Knochen miterklärt. Um die exakte Pathophysiologie abschließend zu klären, sind jedoch noch viele weitere Versuche nötig. Eine gezielte Behandlung von Patientinnen und Patienten mit Osteoporose durch diese Wirkstoffklasse liegt dabei noch in weiter Ferne, insbesondere durch starke Nebenwirkungen der Medikamente und deren im Rahmen einer Alzheimer-Erkrankung ausgenutzte Wirkung im zentralen Nervensystem, wobei durch die Verwendung eines DDS hier möglicherweise eine deutlich gezieltere Applikation mit eingeschränkten Nebenwirkungen ermöglicht werden könnte.

Zusammenfassung

Aus klinischen Studien ist bekannt, dass Alzheimer-Patientinnen und -Patienten, die einen AChEI wie Donepezil einnehmen, ein geringeres Risiko aufweisen, eine Hüftfraktur zu erleiden. Neben dem von vornherein geringeren Frakturrisiko zeigt sich im Falle eines Knochenbruchs außerdem eine verbesserte Heilungs- und verringerte Komplikationsrate sowie verringerte Mortalität. In *in vitro*-Studien konnte durch die Applikation von Donepezil bei Mäusen ein erhöhtes Knochenvolumen, eine erhöhte Knochendichte und vermehrte Trabekelbildung festgestellt werden. Aus diesen Gründen ergibt sich die Möglichkeit, dass Medikamente solcher Wirkstoffklassen auch einen Einfluss auf osteoporotische Stammzellen haben könnten, welche sich im Rahmen einer solchen Erkrankung auch anders verhalten. Aus diesem Grund wurde in der hier beschriebenen Arbeit an osteoporotischen Stammzellen eines ovinen Tiermodells Donepezil gegeben und die Zellen anschließend auf Proliferation und Differenzierung in Richtung Osteoblasten untersucht.

Es wurden Zellen eines bereits etablierten Tiermodells verwendet. Hierbei sind neben einer Kontrollgruppe drei Interventionsgruppen zu unterscheiden: OVX (Ovarektomie), OVX+D (Ovarektomie, Kalzium-/Vitamin D₃-defiziente Diät), OVX+D+S (Ovarektomie, Diät, Steroidinjektionen). Es wurden Pilotversuche zur Bestimmung der optimalen Donepezil-Konzentration mittels AChE-Aktivitätsassays und Proliferationsbestimmungen durchgeführt und die EC₃₀ von 15,4 nM verwendet. Die Proliferationsraten wurden mittels BrdU-ELISA gemessen. Mittels real-time RT-PCR wurden die mRNA-Expressionen von AChE, BChE, Col1A1, OC und BDNF bestimmt; als Haushaltsgen wurde B2M verwendet.

Mittels Gruppenanalysen konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Schafgruppen eruiert werden. Mit Ausnahme der Gruppe OVX zeigte sich bei allen Gruppen und den gepoolten Daten eine signifikant verminderte AChE-Aktivität, jedoch in etwas geringerem Ausmaß als im Bereich der EC₃₀. Die Zellen der Gruppe OVX+D proliferierten nach Zugabe von Donepezil signifikant geringer, alle anderen Zellen zeigten keine signifikanten Unterschiede. In den durchgeführten real-time RT-PCRs zeigte sich die Col1A1-Expressionsrate signifikant bei hoher Effektstärke erhöht. Ansonsten zeigten sich keine signifikant veränderten Expressionsraten.

Donepezil-Applikation führte zu keiner erhöhten Proliferation der MSC, jedoch zu einer erhöhten Synthese von hauptsächlich aus Col1 bestehendem Osteoid und erhöhter Differenzierung in Richtung knochenaufbauender Osteoblasten. Mittels eines DDS könnte die Möglichkeit einer nebenwirkungsarmen, gezielten systemischen oder lokalen, intraoperativen Therapie der Osteoporose, bzw. hierdurch bedingten Frakturen bestehen.

Summary

Clinical studies have shown that patients suffering from Alzheimer's disease who take an AChEI like Donepezil have a reduced risk of suffering hip fractures. Cure and complication rates in the event of a fracture are also improved, mortality rates are decreased. In vitro studies have shown increased bone volume, bone density, and increased trabecular synthesis in mice treated with Donepezil. Due to these reasons there seems to be the possibility that the application of AChEIs has a positive influence on osteoporotic stem cells, which show a different behavior than their healthy counterparts. In this regard Donepezil was added to osteoporotic stem cells of an ovine animal model to investigate proliferation rates and potential differentiation to osteoblasts.

Cells of an already established animal model have been used. They are divided into a control group and three intervention groups: OVX (ovariectomy), OVX+D (ovariectomy, calcium and vitamin D₃ deficient diet), OVX+D+S (ovariectomy, diet, steroid injections). The optimal Donepezil concentration was determined in pilot studies via AChE activity assays and proliferation assays. The EC₃₀ of 15,4 nM was used as a result. Proliferation was measured via BrdU ELISA. Expression of AChE, BChE, Col1A1, OC, and BDNF was determined via real-time RT-PCR, B2M was used as the housekeeping gene.

Group analyses showed no significant differences between the various cell groups. With the exception of OVX, all other groups and the pooled data showed a significant, but lower than expected, decrease of AChE activity. Cells of the group OVX+D alone showed a significantly decreased proliferation rate. Col1A1 showed a significantly increased expression rate with a high effect rate. All other expression rates showed no significant differences.

The application of Donepezil showed no increased proliferation rates, but a higher synthesis of osteoid, which mainly consists of Col1. Increased differentiation to bone building osteoblasts was also observed. There is the possibility of using a DDS conjugated with Donepezil to treat osteoporosis or osteoporotic fractures systemically or locally in the framework of an operation without major side effects.

Abkürzungsverzeichnis

ACh	Acetylcholin
AChE	Acetylcholinesterase
AChEI	Acetylcholinesteraseinhibitor
ALP	alkalische Phosphatase
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
B2M	β_2 -Mikroglobulin
bp	Basenpaare
BChE	Butyrylcholinesterase
BDNF	<i>Brain-derived Neurotrophic Factor</i>
BMP	<i>Bone Morphogenetic Protein</i>
BrdU	Bromdesoxyuridin
CA2	Carboanhydrase 2
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CarAT	Carnitinacetyltransferase
cDNA	komplementäre DNA
ChAT	Cholinacetyltransferase
CHT1	Cholin-Transporter 1
CoA	Koenzym A
Col1	Kollagen Typ I
Col1A1	Kollagen Typ I, alpha 1
Col1A2	Kollagen Typ I, alpha 2
Ct	<i>Cycle Threshold</i>
CTL1-5	Cholin-Transporter-ähnliche Proteine 1-5
DAG	Diacylglycerin
DDS	<i>Drug Delivery System</i>
DEXA	Dual-Röntgen-Absorptiometrie
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure

EC	effektive Konzentration
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
EZM	Extrazellulärmatrix
F12K	<i>Ham's/Kaighn's F-12K Medium</i>
FBS	fetales Kälberserum
gDNA	genomische DNA
Glu	Glutamat
His	Histidin
IE	internationale Einheiten
IGF	<i>Insulin-like Growth Factor</i>
IL	Interleukin
M	mol/l
mAChR	muskarinischer Acetylcholinrezeptor
M-CSF	<i>Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>
MSC	mesenchymale Stammzellen
mRNA	<i>messenger RNA</i>
miRNA	<i>micro RNA</i>
nAChR	nikotinischer Acetylcholinrezeptor
NNCS	non-neuronales cholinerges System
OC	Osteocalcin
OCT	organischer Kationentransporter
OPG	Osteoprotegerin
OPN	Osteopontin
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
POD	Peroxidase
PTH	Parathormon
Q-Q-Plot	Quantil-Quantil-Diagramm
RANK	<i>Receptor Activator of Nuclear Factor-κB</i>
RANKL	RANK-Ligand

RFU	<i>relative fluorescence units</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	reverse Transkriptase
Runx2	<i>Runt-related Transcription Factor 2</i>
Ser	Serin
SERM	selektiver Östrogenrezeptormodulator
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAP	Tartrat-resistente saure Phosphatase
VAcHT	vesikulärer Acetylcholintransporter

Abbildungsverzeichnis

1	Acetylcholin	13
2	Übersicht non-neuronales cholinerges System	14
3	Acetylcholinesterase	16
4	Donepezil	17
5	Inhibitionskinetik	25
6	BrdU-Pilotversuche	27
7	AChE-Pilotversuch	28
8	AChE-Aktivitätsbestimmung Layout	28
9	AChE-Aktivitätsbestimmung Mikroplatten Layout	29
10	BrdU-Layout	30
11	Gelelektrophorese des PCR-Produktes des BChE-Standard-Primers	32
12	Schmelzkurven der PCR-Produkte der cDNA-Verdünnungsreihe des BChE-Primers	33
13	Standardkurve der PCR-Produkte der cDNA-Verdünnungsreihe des BChE-Primers	34
14	RNA-Isolation Layout	34
15	Übersicht funktionelle Assays	40
16	Übersicht Genexpression 1	41
17	Übersicht Genexpression 2	42
18	Ergebnis AChE-Aktivitätsbestimmung	44
19	Ergebnis Proliferationsbestimmung	46
20	Ergebnis AChE-Genexpression	48
21	BChE-Genexpression Vergleiche zwischen Kontrollen und Donepezil	50
22	Col1A1-Genexpression Vergleiche zwischen Kontrollen und Donepezil	52
23	OC-Genexpression Vergleiche zwischen Kontrollen und Donepezil	54
24	Ergebnis BDNF-Genexpression	56
25	AChE-Aktivitätsbestimmung Q-Q-Plots	94
26	Proliferationsbestimmung Q-Q-Plots	95
27	AChE-Genexpression Q-Q-Plots	96
28	BChE-Genexpression Q-Q-Plots	97
29	Col1A1-Genexpression Q-Q-Plots	98
30	OC-Genexpression Q-Q-Plots	99
31	BDNF-Genexpression Q-Q-Plots	100

Tabellenverzeichnis

1	Diäten	20
2	Ergebnis der Inhibitionskinetik	24
3	Primer	32
4	Grenzen der Effektstärken	38
5	Gruppenanalysen der Schafgruppen, Tests auf Heterogenität	39
6	Ergebnis AChE-Aktivität	43
7	Ergebnis AChE-Restaktivität	45
8	Ergebnis Proliferation	45
9	Ergebnis AChE-Genexpression	47
10	Ergebnis BChE-Genexpression	49
11	Ergebnis Col1A1-Genexpression	51
12	Ergebnis OC-Genexpression	53
13	Ergebnis BDNF-Genexpression	55

Literaturverzeichnis

- Adami, G. und Saag, K. G. (2019). „Glucocorticoid-induced osteoporosis update“. In: *Current Opinion in Rheumatology* 31.4, S. 388–393.
- Agostini, D., Zeppa, S. D., Lucertini, F., Annibalini, G., Gervasi, M., Marini, C. F., Piccoli, G., Stocchi, V., Barbieri, E. und Sestili, P. (2018). „Muscle and Bone Health in Postmenopausal Women: Role of Protein and Vitamin D Supplementation Combined with Exercise Training“. In: *Nutrients* 10.8, S. 1103.
- Aktories, K. und Forth, W. (2013). *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie: für Studenten der Medizin, Veterinärmedizin, Pharmazie, Chemie und Biologie sowie für Ärzte, Tierärzte und Apotheker; mit 305 Tabellen*. Urban & Fischer in Elsevier.
- Asagiri, M. und Takayanagi, H. (2007). „The molecular understanding of osteoclast differentiation“. In: *Bone* 40.2, S. 251–264.
- Bakker, A., Klein-Nulend, J. und Burger, E. (2004). „Shear stress inhibits while disuse promotes osteocyte apoptosis“. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 320.4, S. 1163–1168.
- Barage, S. H. und Sonawane, K. D. (2015). „Amyloid cascade hypothesis: Pathogenesis and therapeutic strategies in Alzheimer’s disease“. In: *Neuropeptides* 52, S. 1–18.
- Baysal, I., Ucar, G., Gultekinoglu, M., Ulubayram, K. und Yabanoglu-Ciftci, S. (2016). „Donepezil loaded PLGA-b-PEG nanoparticles: their ability to induce destabilization of amyloid fibrils and to cross blood brain barrier in vitro“. In: *Journal of Neural Transmission* 124.1, S. 33–45.
- Beckmann, J. und Lips, K. S. (2013). „The Non-Neuronal Cholinergic System in Health and Disease“. In: *Pharmacology* 92.5-6, S. 286–302.
- Blair, H. C., Robinson, L. J., Huang, C. L.-H., Sun, L., Friedman, P. A., Schlesinger, P. H. und Zaidi, M. (2011). „Calcium and bone disease“. In: *BioFactors* 37.3, S. 159–167.
- Bleibler, F., Benzinger, P., Lehnert, T., Becker, C. und König, H.-H. (2013). „Frakturkosten im deutschen Krankenhausesektor – Welche Rolle spielt die Osteoporose?“. In: *Das Gesundheitswesen* 76.03, S. 163–168.
- Bono, C. M. und Einhorn, T. A. (2003). „Overview of osteoporosis: pathophysiology and determinants of bone strength“. In: *European Spine Journal* 12.0, S90–S96.
- Bord, S., Ireland, D., Beavan, S. und Compston, J. (2003). „The effects of estrogen on osteoprotegerin, RANKL, and estrogen receptor expression in human osteoblasts“. In: *Bone* 32.2, S. 136–141.
- Boyce, B. F. und Xing, L. (2007). „Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin“. In: *Arthritis Research & Therapy* 9.Suppl 1, S1.

- Boyle, W. J., Simonet, W. S. und Lacey, D. L. (2003). „Osteoclast differentiation and activation“. In: *Nature* 423.6937, S. 337–342.
- Brimijoin, S., Chen, V. P., Pang, Y.-P., Geng, L. und Gao, Y. (2016). „Physiological roles for butyrylcholinesterase: A BChE-ghrelin axis“. In: *Chemico-Biological Interactions* 259, S. 271–275.
- Burr, D. (2002). „Targeted and nontargeted remodeling“. In: *Bone* 30.1, S. 2–4.
- Carlberg, C. und Seuter, S. (2007). „The Vitamin D Receptor“. In: *Dermatologic Clinics* 25.4, S. 515–523.
- Chavassieux, P., Buffet, A., Vergnaud, P., Garnero, P. und Meunier, P. (1997). „Short-term effects of corticosteroids on trabecular bone remodeling in old ewes“. In: *Bone* 20.5, S. 451–455.
- Chelly, J. und Kahn, A. (1994). „RT-PCR and mRNA Quantitation“. In: *The Polymerase Chain Reaction*. Birkhäuser Boston, S. 97–109.
- Cheng, H., Chawla, A., Yang, Y., Li, Y., Zhang, J., Jang, H. L. und Khademhosseini, A. (2017). „Development of nanomaterials for bone-targeted drug delivery“. In: *Drug Discovery Today* 22.9, S. 1336–1350.
- Chesnut, C. H., Silverman, S., Andriano, K., Genant, H., Gimona, A., Harris, S., Kiel, D., LeBoff, M., Maricic, M., Miller, P., Moniz, C., Peacock, M., Richardson, P., Watts, N. und Baylink, D. (2000). „A randomized trial of nasal spray salmon calcitonin in postmenopausal women with established osteoporosis: the prevent recurrence of osteoporotic fractures study“. In: *The American Journal of Medicine* 109.4, S. 267–276.
- Christov, M. und Jüppner, H. (2018). „Phosphate homeostasis disorders“. In: *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 32.5, S. 685–706.
- Clarke, B. (2008). „Normal Bone Anatomy and Physiology“. In: *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* 3. Supplement 3, S131–S139.
- Cochran, W. G. (1954). „The Combination of Estimates from Different Experiments“. In: *Biometrics* 10.1, S. 101.
- Cohen, J. (1988). *Statistical power analysis for the behavioral sciences*. 2. Aufl. Hillsdale, NJ, USA: Erlbaum Press.
- Cohen, J. (1992). „Statistical Power Analysis“. In: *Current Directions in Psychological Science* 1.3, S. 98–101.
- Colovic, M. B., Krstic, D. Z., Lazarevic-Pasti, T. D., Bondzic, A. M. und Vasic, V. M. (2013). „Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology“. In: *Current Neuropharmacology* 11.3, S. 315–335.
- Cosman, F., Crittenden, D. B., Adachi, J. D., Binkley, N., Czerwinski, E., Ferrari, S., Hofbauer, L. C., Lau, E., Lewiecki, E. M., Miyauchi, A., Zerbini, C. A., Milmont, C. E., Chen, L., Maddox, J., Meisner, P. D., Libanati, C. und Grauer, A. (2016).

- „Romosozumab Treatment in Postmenopausal Women with Osteoporosis“. In: *New England Journal of Medicine* 375.16, S. 1532–1543.
- Cruz-Jentoft, A. J., Bahat, G., Bauer, J., Boirie, Y., Bruyère, O., Cederholm, T., Cooper, C., Landi, F., Rolland, Y., Sayer, A. A., Schneider, S. M., Sieber, C. C., Topinkova, E., Vandewoude, M., Visser, M., Zamboni, M., Bautmans, I., Baeyens, J.-P., Cesari, M., Cherubini, A., Kanis, J., Maggio, M., Martin, F., Michel, J.-P., Pitkala, K., Reginster, J.-Y., Rizzoli, R., Sánchez-Rodríguez, D. und and, J. S. (2018). „Sarcopenia: revised European consensus on definition and diagnosis“. In: *Age and Ageing* 48.1, S. 16–31.
- Dachverband Osteologie e.V. (2017). *Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der OSTEOPOROSE bei postmenopausalen Frauen und bei Männern. Leitlinie des Dachverbands der Deutschsprachigen Wissenschaftlichen Osteologischen Gesellschaften e.V.* URL: https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/183-0011_S3_Osteoporose-Prophylaxe-Diagnostik-Therapie_2019-02.pdf (besucht am 24.02.2021).
- Dagleish, R. (1997). „The human type I collagen mutation database.“ In: *Nucleic acids research* 25 (1), S. 181–187.
- Debono, M. und Newell-Price, J. D. (2016). „Cushing’s Syndrome: Where and How to Find It“. In: *Cortisol Excess and Insufficiency*. S. Karger AG, S. 15–27.
- Del Fattore, A., Teti, A. und Rucci, N. (2012). „Bone cells and the mechanisms of bone remodelling.“ In: *Frontiers in bioscience (Elite edition)* 4, S. 2302–2321.
- Delmas, P. D., Bjarnason, N. H., Mitlak, B. H., Ravoux, A.-C., Shah, A. S., Huster, W. J., Draper, M. und Christiansen, C. (1997). „Effects of Raloxifene on Bone Mineral Density, Serum Cholesterol Concentrations, and Uterine Endometrium in Postmenopausal Women“. In: *New England Journal of Medicine* 337.23, S. 1641–1647.
- Deuschl, G. und Maier, W. (2016). *S3-Leitlinie Demenzen*. Hrsg. von Deutsche Gesellschaft für Neurologie. Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie. Online: www.dgn.org/leitlinien (abgerufen am 24.02.2021).
- Donoso, O., Pino, A. M., Seitz, G., Osses, N. und Rodriguez, J. P. (2015). „Osteoporosis-associated alteration in the signalling status of BMP-2 in human MSCs under adipogenic conditions“. In: *Journal of Cellular Biochemistry* 116.7, S. 1267–1277.
- Ducy, P., Desbois, C., Boyce, B., Pinero, G., Story, B., Dunstan, C., Smith, E., Bonadio, J., Goldstein, S., Gundberg, C., Bradley, A. und Karsenty, G. (1996). „Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice“. In: *Nature* 382.6590, S. 448–452.
- Dusso, A. S., Brown, A. J. und Slatopolsky, E. (2005). „Vitamin D“. In: *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 289.1, F8–F28.

- Eimar, H., Perez Lara, A., Tamimi, I., Márquez Sánchez, P., Gormaz Talavera, I., Rojas Tomba, F., García de la Oliva, T. und Tamimi, F. (2013a). „Acetylcholinesterase inhibitors and healing of hip fracture in Alzheimer’s disease patients: a retrospective cohort study.“ In: *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions* 13 (4), S. 454–463.
- Eimar, H., Tamimi, I., Murshed, M. und Tamimi, F. (2013b). „Cholinergic regulation of bone.“ In: *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions* 13 (2), S. 124–132.
- Eimar, H., Alebrahim, S., Manickam, G., Al-Subaie, A., Abu-Nada, L., Murshed, M. und Tamimi, F. (2016). „Donepezil regulates energy metabolism and favors bone mass accrual.“ In: *Bone* 84, S. 131–8.
- Ellman, G. L., Courtney, K., Andres, V. und Featherstone, R. M. (1961). „A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity“. In: *Biochemical Pharmacology* 7.2, S. 88–95.
- Erben, R. G. (1996). „Trabecular and endocortical bone surfaces in the rat: Modeling or remodeling?“ In: *The Anatomical Record* 246.1, S. 39–46.
- Esai/Pfizer (2018). *Fachinformation Aricept®* 5 mg/10 mg. *Zulassungsnummern:* 40652.00.00, 40652.01.00. URL: <https://www.fachinfo.de/suche/fi/001940> (besucht am 21.02.2021).
- Europäisches Parlament und Rat der EU (2010). „Richtlinie 2010/63/EU des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22. September 2010 zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendete Tiere“. In: *Amtsblatt der Europäischen Union* L 276/33.
- Felekis, K., Touvana, E., Stefanou, C. und Deltas, C. (2010). „microRNAs: a newly described class of encoded molecules that play a role in health and disease“. In: *Hippokratia* 14.4, S. 236.
- Ferron, M. und Lacombe, J. (2014). „Regulation of energy metabolism by the skeleton: Osteocalcin and beyond“. In: *Archives of Biochemistry and Biophysics* 561, S. 137–146.
- Fishman, M. C. (1972). „Sir Henry Hallett Dale and acetylcholine story.“ In: *The Yale journal of biology and medicine* 45 (2), S. 104–118.
- Fleisch, H. (1998). „Bisphosphonates: Mechanisms of Action“. In: *Endocrine Reviews* 19.1, S. 80–100.
- Florencio-Silva, R., Silva Sasso, G. R. da, Sasso-Cerri, E., Simões, M. J. und Cerri, P. S. (2015). „Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells“. In: *BioMed Research International* 2015, S. 1–17.
- Frigge, M., Hoaglin, D. C. und Iglewicz, B. (1989). „Some Implementations of the Boxplot“. In: *The American Statistician* 43.1, S. 50.

- Fritz, C. O., Morris, P. E. und Richler, J. J. (2012). „Effect size estimates: Current use, calculations, and interpretation.“ In: *Journal of Experimental Psychology: General* 141.1, S. 2–18.
- Glaser, D. L. und Kaplan, F. S. (1997). „Osteoporosis. Definition and clinical presentation.“ In: *Spine* 22 (24 Suppl), 12S–16S.
- Gorard, S. (2013). „The propagation of errors in experimental data analysis: a comparison of pre- and post-test designs“. In: *International Journal of Research & Method in Education* 36.4, S. 372–385.
- Gratzner, H. G. (1982). „Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication.“ In: *Science (New York, N.Y.)* 218 (4571), S. 474–475.
- Grisaru, D., Sternfeld, M., Eldor, A., Glick, D. und Soreq, H. (1999). „Structural roles of acetylcholinesterase variants in biology and pathology“. In: *European Journal of Biochemistry* 264.3, S. 672–686.
- Hadji, P., Klein, S., Gothe, H., Häussler, B., Kless, T., Schmidt, T., Steinle, T., Verheyen, F. und Linder, R. (2013). „The epidemiology of osteoporosis—Bone Evaluation Study (BEST): an analysis of routine health insurance data“. In: *Deutsches Ärzteblatt International* 110.4, S. 52.
- Hammer, R. R. R., Hammerby, S. und Lindholm, B. (1985). „Accuracy of Radiologic Assessment of Tibial Shaft Fracture Union in Humans“. In: *Clinical Orthopaedics and Related Research* 199, S. 233–238.
- Hart, N. H., Nimphius, S., Rantalainen, T., Ireland, A., Siafarikas, A. und Newton, R. U. (2017). „Mechanical basis of bone strength: influence of bone material, bone structure and muscle action.“ In: *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions* 17 (3), S. 114–139.
- Haupt, M., Kauschke, V., Sender, J., Kampschulte, M., Kovtun, A., Dürselen, L., Heiss, C. und Lips, K. S. (2015). „Bone status of adult female butyrylcholinesterase gene-deficient mice“. In: *International Immunopharmacology* 29.1, S. 208–214.
- Hauschka, P. V., Lian, J. B., Cole, D. E. und Gundberg, C. M. (1989). „Osteocalcin and matrix Gla protein: vitamin K-dependent proteins in bone“. In: *Physiological Reviews* 69.3, S. 990–1047.
- Hauser, K., Deutzmann, R., Netzker, R. und Rassow, J. (2012). *Duale Reihe Biochemie*. Reihe, DUALE REIHE. Thieme.
- Hay, D. L., Garelja, M. L., Poyner, D. R. und Walker, C. S. (2017). „Update on the pharmacology of calcitonin/CGRP family of peptides: IUPHAR Review 25“. In: *British Journal of Pharmacology* 175.1, S. 3–17.
- Heiss, C., Kern, S., Malhan, D., Böcker, W., Engelhardt, M., Daghma, D. E. S., Stoetzel, S., Schmitt, J., Ivo, M., Kauschke, V., Lips, K. S., Tushtev, K., Rezwan, K. und Khassawna, T. E. (2017). „A New Clinically Relevant T-Score Standard

- to Interpret Bone Status in a Sheep Model“. In: *Medical Science Monitor Basic Research* 23, S. 326–335.
- Hernlund, E., Svedbom, A., Ivergård, M., Compston, J., Cooper, C., Stenmark, J., McCloskey, E. V., Jönsson, B. und Kanis, J. A. (2013). „Osteoporosis in the European Union: medical management, epidemiology and economic burden“. In: *Archives of Osteoporosis* 8.1-2.
- Higgins, J. P. T. (2003). „Measuring inconsistency in meta-analyses“. In: *BMJ* 327.7414, S. 557–560.
- Huang, W., Yang, S., Shao, J. und Li, Y.-P. (2007). „Signaling and transcriptional regulation in osteoblast commitment and differentiation.“ In: *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library* 12, S. 3068–3092.
- Hurst, R., Rollema, H. und Bertrand, D. (2013). „Nicotinic acetylcholine receptors: from basic science to therapeutics.“ In: *Pharmacology & therapeutics* 137 (1), S. 22–54.
- Imerci, A., Canbek, U., Haghari, S., Süre, L. und Kocak, M. (2015). „Idiopathic juvenile osteoporosis: A case report and review of the literature“. In: *International Journal of Surgery Case Reports* 9, S. 127–129.
- Jagtap, V. R., Ganu, J. V. und Nagane, N. S. (2010). „BMD and Serum Intact Osteocalcin in Postmenopausal Osteoporosis Women“. In: *Indian Journal of Clinical Biochemistry* 26.1, S. 70–73.
- Jain, S. und Camacho, P. (2018). „Use of bone turnover markers in the management of osteoporosis“. In: *Current Opinion in Endocrinology & Diabetes and Obesity* 25.6, S. 366–372.
- Karsenty, G. (2017). „Update on the Biology of Osteocalcin“. In: *Endocrine Practice* 23.10, S. 1270–1274.
- Karsenty, G. und Mera, P. (2018). „Molecular bases of the crosstalk between bone and muscle“. In: *Bone* 115, S. 43–49.
- Kauschke, V., Hessland, F. M., Vehlow, D., Müller, M., Heiss, C. und Lips, K. S. (2019). „High Concentrations of Polyelectrolyte Complex Nanoparticles Decrease Activity of Osteoclasts“. In: *Molecules* 24.12, S. 2346.
- Kauschke, V., Kneffel, M., Floel, W., Hartmann, S., Kampschulte, M., Dürselen, L., Ignatius, A., Schnettler, R., Heiss, C. und Lips, K. S. (2015). „Bone status of acetylcholinesterase-knockout mice“. In: *International Immunopharmacology* 29.1, S. 222–230.
- Khassawna, T. E., Merboth, F., Malhan, D., Böcker, W., Daghma, D. E., Stoetzel, S., Kern, S., Hassan, F., Rosenbaum, D., Langenstein, J., Bauer, N., Schlagenhaut, A., Rösen-Wolff, A., Schulze, F., Rupp, M., Hose, D., Secklinger, A., Ignatius, A., Wilke, H.-J., Lips, K. S. und Heiss, C. (2017). „Osteocyte Regulation of Receptor

- Activator of NF- κ B Ligand/Osteoprotegerin in a Sheep Model of Osteoporosis“. In: *The American Journal of Pathology* 187.8, S. 1686–1699.
- Khosla, S. (2010). „Update on Estrogens and the Skeleton“. In: *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 95.8, S. 3569–3577.
- Kilian, O., Hartmann, S., Dongowski, N., Karnati, S., Baumgart-Vogt, E., Härtel, F. V., Noll, T., Schnettler, R. und Lips, K. S. (2014). „BDNF and its TrkB receptor in human fracture healing.“ In: *Annals of anatomy = Anatomischer Anzeiger: official organ of the Anatomische Gesellschaft* 196 (5), S. 286–295.
- Kim, D. H. und Vaccaro, A. R. (2006). „Osteoporotic compression fractures of the spine current options and considerations for treatment“. In: *The Spine Journal* 6.5, S. 479–487.
- Kleeman, C. R., Massry, S. G. und Coburn, J. W. (1971). „The clinical physiology of calcium homeostasis, parathyroid hormone, and calcitonin. II.“ In: *California medicine* 114 (4), S. 19–30.
- Klein-Nulend, J., Plas, A. van der, Semeins, C. M., Ajubi, N. E., Frangos, J. A., Nijweide, P. J. und Burger, E. H. (1995). „Sensitivity of osteocytes to biomechanical stress in vitro.“ In: *The FASEB Journal* 9.5, S. 441–445.
- Klein-Nulend, J., Oers, R. F. van, Bakker, A. D. und Bacabac, R. G. (2015). „Bone cell mechanosensitivity, estrogen deficiency, and osteoporosis“. In: *Journal of Biomechanics* 48.5, S. 855–865.
- Kochupillai, N. (2008). „The physiology of vitamin D: current concepts.“ In: *The Indian journal of medical research* 127 (3), S. 256–262.
- Komori, T. (2015). „Animal models for osteoporosis“. In: *European Journal of Pharmacology* 759, S. 287–294.
- Kosasa, T., Kuriya, Y., Matsui, K. und Yamanishi, Y. (2000). „Inhibitory effect of orally administered donepezil hydrochloride (E2020), a novel treatment for Alzheimer’s disease, on cholinesterase activity in rats“. In: *European Journal of Pharmacology* 389.2-3, S. 173–179.
- Lacey, D. L., Boyle, W. J., Simonet, W. S., Kostenuik, P. J., Dougall, W. C., Sullivan, J. K., Martin, J. S. und Dansey, R. (2012). „Bench to bedside: elucidation of the OPG–RANK–RANKL pathway and the development of denosumab“. In: *Nature Reviews Drug Discovery* 11.5, S. 401–419.
- Lanzafame, A. A., Christopoulos, A. und Mitchelson, F. (2003). „Cellular signaling mechanisms for muscarinic acetylcholine receptors.“ In: *Receptors & channels* 9 (4), S. 241–260.
- Layer, P. G., Weikert, T. und Alber, R. (1993). „Cholinesterases regulate neurite growth of chick nerve cells in vitro by means of a non-enzymatic mechanism“. In: *Cell & Tissue Research* 273.2, S. 219–226.

- Lehenkari, P., Hentunen, T. A., Laitala-Leinonen, T., Tuukkanen, J. und Väänänen, H. (1998). „Carbonic Anhydrase II Plays a Major Role in Osteoclast Differentiation and Bone Resorption by Effecting the Steady State Intracellular pH and Ca²⁺“. In: *Experimental Cell Research* 242.1, S. 128–137.
- Leyhe, T., Stransky, E., Eschweiler, G. W., Buchkremer, G. und Laske, C. (2007). „Increase of BDNF serum concentration during donepezil treatment of patients with early Alzheimer’s disease“. In: *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience* 258.2, S. 124–128.
- Li, J., Zhang, H., Yang, C., Li, Y. und Dai, Z. (2016). „An overview of osteocalcin progress“. In: *Journal of Bone and Mineral Metabolism* 34.4, S. 367–379.
- Li, Q., Chen, M., Liu, H., Yang, L. und Yang, G. (2012). „Expression of APP, BACE1, AChE and ChAT in an AD model in rats and the effect of donepezil hydrochloride treatment.“ In: *Molecular medicine reports* 6 (6), S. 1450–1454.
- Li, Z., Zhang, W. und Huang, Y. (2018). „MiRNA-133a is involved in the regulation of postmenopausal osteoporosis through promoting osteoclast differentiation“. In: *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 50.3, S. 273–280.
- Liu, Q., Lei, L., Yu, T., Jiang, T. und Kang, Y. (2018). „Effect of Brain-Derived Neurotrophic Factor on the Neurogenesis and Osteogenesis in Bone Engineering“. In: *Tissue Engineering Part A* 24.15-16, S. 1283–1292.
- Liu, Z., Chen, R., Jiang, Y., Yang, Y., He, L., Luo, C., Dong, J. und Rong, L. (2019). „A meta-analysis of serum osteocalcin level in postmenopausal osteoporotic women compared to controls“. In: *BMC Musculoskeletal Disorders* 20.1.
- Livak, K. J. und Schmittgen, T. D. (2001). „Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} Method.“ In: *Methods (San Diego, Calif.)* 25 (4), S. 402–408.
- Lockridge, O. (2015). „Review of human butyrylcholinesterase structure, function, genetic variants, history of use in the clinic, and potential therapeutic uses“. In: *Pharmacology & Therapeutics* 148, S. 34–46.
- Lüllmann-Rauch, R., Hrsg. (2012). *Histologie*. Thieme Publishing Group.
- Maeda, K., Takahashi, N. und Kobayashi, Y. (2012). „Roles of Wnt signals in bone resorption during physiological and pathological states“. In: *Journal of Molecular Medicine* 91.1, S. 15–23.
- Maeda, S. S. und Lazaretti-Castro, M. (2014). „An overview on the treatment of postmenopausal osteoporosis.“ In: *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia* 58 (2), S. 162–171.
- Manolagas, S. C. (2013). „Steroids and osteoporosis: the quest for mechanisms“. In: *Journal of Clinical Investigation* 123.5, S. 1919–1921.
- Matsuo, K. und Irie, N. (2008). „Osteoclast–osteoblast communication“. In: *Archives of Biochemistry and Biophysics* 473.2, S. 201–209.

- Melton, L. J., Achenbach, S. J., Atkinson, E. J., Therneau, T. M. und Amin, S. (2012). „Long-term mortality following fractures at different skeletal sites: a population-based cohort study“. In: *Osteoporosis International* 24.5, S. 1689–1696.
- Meunier, P. J., Roux, C., Seeman, E., Ortolani, S., Badurski, J. E., Spector, T. D., Cannata, J., Balogh, A., Lemmel, E.-M., Pors-Nielsen, S., Rizzoli, R., Genant, H. K. und Reginster, J.-Y. (2004). „The Effects of Strontium Ranelate on the Risk of Vertebral Fracture in Women with Postmenopausal Osteoporosis“. In: *New England Journal of Medicine* 350.5, S. 459–468.
- Miyakoshi, N. (2004). „Effects of parathyroid hormone on cancellous bone mass and structure in osteoporosis.“ In: *Current pharmaceutical design* 10 (21), S. 2615–2627.
- Mohammad, D., Chan, P., Bradley, J., Lanctôt, K. und Herrmann, N. (2017). „Acetylcholinesterase inhibitors for treating dementia symptoms - a safety evaluation“. In: *Expert Opinion on Drug Safety* 16.9, S. 1009–1019.
- Mullis, K. B., Erlich, H. A., Arnheim, N., Horn, G. T., Saiki, R. K. und Scharf, S. J. (1987). *Process for amplifying, detecting, and/or-cloning nucleic acid sequences*. US Patent 4,683,195.
- Nachlinger, R. J., Kauschke, V., Trinkaus, K., El Khassawna, T., Heiss, C. und Lips, K. S. (2018). „Application of donepezil increased collagen 1 expression in mesenchymal stroma cells of an ovine osteoporosis model.“ In: *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions* 18 (3), S. 354–365.
- Nair, A. K., Gautieri, A., Chang, S.-W. und Buehler, M. J. (2013). „Molecular mechanics of mineralized collagen fibrils in bone“. In: *Nature Communications* 4.1.
- Newman, E., Turner, A. S. und Wark, J. D. (1995). „The potential of sheep for the study of osteopenia: current status and comparison with other animal models.“ In: *Bone* 16 (4 Suppl), 277S–284S.
- Nicholson, G. C., Moseley, J. M., Sexton, P. M., Mendelsohn, F. A. und Martin, T. J. (1986). „Abundant calcitonin receptors in isolated rat osteoclasts. Biochemical and autoradiographic characterization.“ In: *Journal of Clinical Investigation* 78.2, S. 355–360.
- Nose, S., Yoshino, O., Nomoto, K., Harada, M., Dohi, M., Kawahara, T., Osuga, Y., Fujii, T. und Saito, S. (2019). „Serum Brain-derived Neurotrophic Factor Levels Mirror Bone Mineral Density in Amenorrhic and Eumenorrhic Athletes“. In: *International Journal of Sports Medicine* 40.04, S. 276–282.
- O’Leary, N. A., Wright, M. W., Brister, J. R., Ciuffo, S., Haddad, D., McVeigh, R., Rajput, B., Robbertse, B., Smith-White, B., Ako-Adjei, D., Astashyn, A., Badretdin, A., Bao, Y., Blinkova, O., Brover, V., Chetvernin, V., Choi, J., Cox, E., Ermolaeva, O., Farrell, C. M., Goldfarb, T., Gupta, T., Haft, D., Hatcher,

- E., Hlavina, W., Joardar, V. S., Kodali, V. K., Li, W., Maglott, D., Masterson, P., McGarvey, K. M., Murphy, M. R., O'Neill, K., Pujar, S., Rangwala, S. H., Rausch, D., Riddick, L. D., Schoch, C., Shkeda, A., Storz, S. S., Sun, H., Thibaud-Nissen, F., Tolstoy, I., Tully, R. E., Vatsan, A. R., Wallin, C., Webb, D., Wu, W., Landrum, M. J., Kimchi, A., Tatusova, T., DiCuccio, M., Kitts, P., Murphy, T. D. und Pruitt, K. D. (2015). „Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: current status, taxonomic expansion, and functional annotation“. In: *Nucleic Acids Research* 44.D1, S. D733–D745.
- Ono, T. und Nakashima, T. (2018). „Recent advances in osteoclast biology“. In: *Histochemistry and Cell Biology* 149.4, S. 325–341.
- Panpharma (2020). *Fachinformation Calcitonin Panpharma 50 IE / 1 mL und 100 IE / 1 mL Injektionslösung. Zulassungsnummern: 39789.00.00, 39789.01.00*. URL: <https://www.fachinfo.de/suche/fi/020750> (besucht am 24.02.2021).
- Parnetti, L., Amici, S., Lanari, A., Romani, C., Antognelli, C., Andreasen, N., Minthon, L., Davidsson, P., Pottel, H., Blennow, K. und Gallai, V. (2002). „Cerebrospinal fluid levels of biomarkers and activity of acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase in AD patients before and after treatment with different AChE inhibitors“. In: *Neurological Sciences* 23.0, s95–s96.
- Pfaffl, M. W. (2001). „A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR.“ In: *Nucleic acids research* 29 (9), e45.
- Pino, A. M., Rosen, C. J. und Rodríguez, J. P. (2012). „In Osteoporosis, differentiation of mesenchymal stem cells (MSCs) improves bone marrow adipogenesis“. In: *Biological Research* 45.3, S. 279–287.
- Poole, K. und Reeve, J. (2005). „Parathyroid hormone — a bone anabolic and catabolic agent“. In: *Current Opinion in Pharmacology* 5.6, S. 612–617.
- Pöttsch, O. und Rößger, F. (2015). „Bevölkerung Deutschlands bis 2060 – 13. koordinierte Bevölkerungsvorausberechnung“. In: *Statistisches Bundesamt, Wiesbaden*.
- Poundarik, A. A., Diab, T., Sroga, G. E., Ural, A., Boskey, A. L., Gundberg, C. M. und Vashishth, D. (2012). „Dilatational band formation in bone“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109.47, S. 19178–19183.
- Prvulovic, D. und Schneider, B. (2014). „Pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation of donepezil for the treatment of Alzheimer’s disease“. In: *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* 10.7, S. 1039–1050.
- R Core Team (2016). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria.
- Razali, N. M., Wah, Y. B. et al. (2011). „Power comparisons of Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov, Lilliefors and Anderson-Darling tests“. In: *Journal of statistical modeling and analytics* 2.1, S. 21–33.

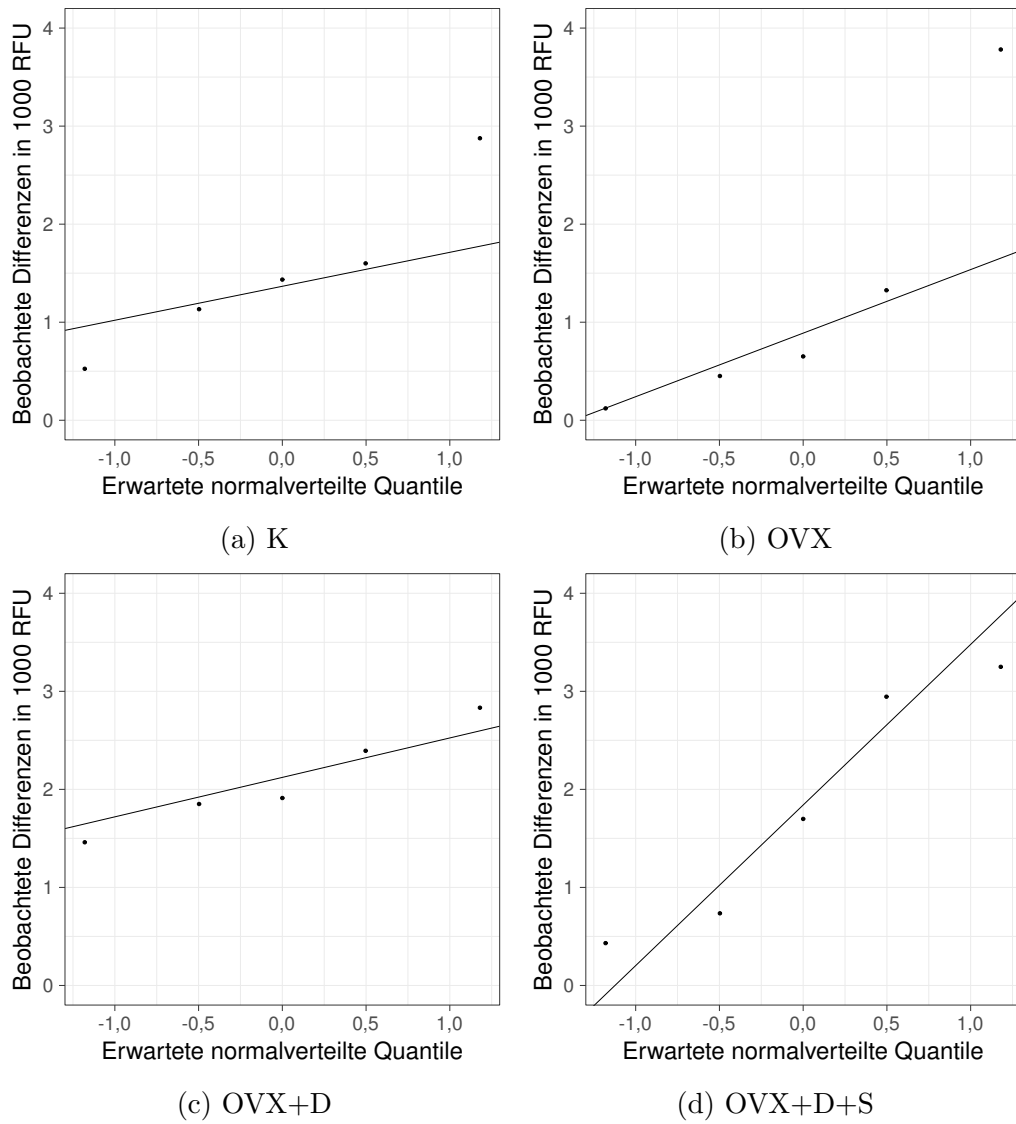
- Rest, M. van der und Garrone, R. (1991). „Collagen family of proteins.“ In: *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 5 (13), S. 2814–2823.
- Rodríguez, J. P., Garat, S., Gajardo, H., Pino, A. M. und Seitz, G. (1999). „Abnormal osteogenesis in osteoporotic patients is reflected by altered mesenchymal stem cells dynamics.“ In: *Journal of cellular biochemistry* 75 (3), S. 414–423.
- Rodríguez, J. P., Montecinos, L., Ríos, S., Reyes, P. und Martínez, J. (2000). „Mesenchymal stem cells from osteoporotic patients produce a type I collagen-deficient extracellular matrix favoring adipogenic differentiation.“ In: *Journal of cellular biochemistry* 79 (4), S. 557–565.
- Roohani-Esfahani, S.-I. und Zreiqat, H. (2017). „Nanoparticles: a promising new therapeutic platform for bone regeneration?“ In: *Nanomedicine* 12.5, S. 419–422.
- Russell, W. M. S. und Burch, R. L. (1959). *The principles of humane experimental technique*. London: Methuen.
- Sato, T., Abe, T., Chida, D., Nakamoto, N., Hori, N., Kokabu, S., Sakata, Y., Tomaru, Y., Iwata, T., Usui, M., Aiko, K. und Yoda, T. (2010). „Functional role of acetylcholine and the expression of cholinergic receptors and components in osteoblasts“. In: *FEBS Letters* 584.4, S. 817–824.
- Sato, T., Enoki, Y., Sakamoto, Y., Yokota, K., Okubo, M., Matsumoto, M., Hayashi, N., Usui, M., Kokabu, S., Mimura, T., Nakazato, Y., Araki, N., Fukuda, T., Okazaki, Y., Suda, T., Takeda, S. und Yoda, T. (2015). „Donepezil prevents RANK-induced bone loss via inhibition of osteoclast differentiation by downregulating acetylcholinesterase“. In: *Heliyon* 1.1, e00013.
- Schulze, F., Malhan, D., Khassawna, T. E., Heiss, C., Seckinger, A., Hose, D. und Rösen-Wolff, A. (2017). „A tissue-based approach to selection of reference genes for quantitative real-time PCR in a sheep osteoporosis model“. In: *BMC Genomics* 18.1.
- Shapiro, S. S. und Wilk, M. B. (1965). „An analysis of variance test for normality (complete samples)“. In: *Biometrika* 52.3-4, S. 591–611.
- Shirazi-Beechey, S., Beechey, R., Penny, J., Vayro, S., Buchan, W. und Scott, D. (1991). „Mechanisms of phosphate transport in sheep intestine and parotid gland: response to variation in dietary phosphate supply“. In: *Experimental Physiology* 76.2, S. 231–241.
- Sigma-Aldrich (2018). *Donepezil hydrochloride. D6821 Sigma*. URL: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/d6821?lang=de®ion=DE> (besucht am 24.02.2021).
- Silverman, S. L. (2003). „Calcitonin“. In: *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* 32.1, S. 273–284.

- Singer, F. R. und Eyre, D. R. (2008). „Using biochemical markers of bone turnover in clinical practice“. In: *Cleveland Clinic Journal of Medicine* 75.10, S. 739–750.
- Singh, M., Nagrath, A. R. und Maini, P. S. (1970). „Changes in Trabecular Pattern of the Upper End of the Femur as an Index of Osteoporosis“. In: *The Journal of Bone & Joint Surgery* 52.3, S. 457–467.
- Sobacchi, C., Schulz, A., Coxon, F. P., Villa, A. und Helfrich, M. H. (2013). „Osteopetrosis: genetics, treatment and new insights into osteoclast function“. In: *Nature Reviews Endocrinology* 9.9, S. 522–536.
- Spieker, J., Ackermann, A., Salfelder, A., Vogel-Höpker, A. und Layer, P. G. (2016). „Acetylcholinesterase Regulates Skeletal In Ovo Development of Chicken Limbs by ACh-Dependent and -Independent Mechanisms“. In: *PLOS ONE* 11.8. Hrsg. von Silman, I., e0161675.
- Student (1908). „The probable error of a mean“. In: *Biometrika*, S. 1–25.
- Su, Y.-W., Zhou, X.-F., Foster, B. K., Grills, B. L., Xu, J. und Xian, C. J. (2017). „Roles of neurotrophins in skeletal tissue formation and healing“. In: *Journal of Cellular Physiology* 233.3, S. 2133–2145.
- Sugimoto, H., Imura, Y., Yamanishi, Y. und Yamatsu, K. (1995). „Synthesis and structure-activity relationships of acetylcholinesterase inhibitors: 1-benzyl-4-[(5,6-dimethoxy-1-oxoindan-2-yl)methyl]piperidine hydrochloride and related compounds.“ In: *Journal of medicinal chemistry* 38 (24), S. 4821–4829.
- Tamimi, I., Madathil, S., Kezouh, A., Nicolau, B., Karp, I. und Tamimi, F. (2017a). „Effect of acetylcholinesterase inhibitors on post-surgical complications and mortality following a hip fracture: a cohort study“. In: *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions* 17.2, S. 69.
- Tamimi, I., Nicolau, B., Eimar, H., Madathil, S. A., Kezouh, A., Karp, I. und Tamimi, F. (2017b). „Acetylcholinesterase inhibitors and the risk of osteoporotic fractures: nested case-control study“. In: *Osteoporosis International*.
- Tamimi, I., Ojea, T., Sanchez-Siles, J. M., Rojas, F., Martin, I., Gormaz, I., Perez, A., Dawid-Milner, M. S., Mendez, L. und Tamimi, F. (2012). „Acetylcholinesterase inhibitors and the risk of hip fracture in Alzheimer’s disease patients: A case-control study“. In: *Journal of Bone and Mineral Research* 27.7, S. 1518–1527.
- Tayeb, H. O., Yang, H. D., Price, B. H. und Tarazi, F. I. (2012). „Pharmacotherapies for Alzheimer’s disease: beyond cholinesterase inhibitors.“ In: *Pharmacology & therapeutics* 134 (1), S. 8–25.
- Trévoux, R., Brux, J. D., Castanier, M., Nahoul, K., Soule, J.-P. und Scholler, R. (1986). „Endometrium and plasma hormone profile in the peri-menopause and post-menopause“. In: *Maturitas* 8.4, S. 309–326.
- Tsuchie, H., Miyakoshi, N., Kasukawa, Y., Aonuma, H. und Shimada, Y. (2013). „Intermittent Administration of Human Parathyroid Hormone before Osteosynthe-

- sis Stimulates Cancellous Bone Union in Ovariectomized Rats“. In: *The Tohoku Journal of Experimental Medicine* 229.1, S. 19–28.
- Turner, A. S. (2001). „Animal models of osteoporosis—necessity and limitations.“ In: *European cells & materials* 1, S. 66–81.
- Turner, A. S. (2002). „The sheep as a model for osteoporosis in humans.“ In: *Veterinary journal (London, England: 1997)* 163 (3), S. 232–239.
- Viechtbauer, W. (2010). „Conducting meta-analyses in R with the metafor package“. In: *Journal of Statistical Software* 36.3, S. 1–48.
- Viguet-Carrin, S., Garnero, P. und Delmas, P. D. (2005). „The role of collagen in bone strength“. In: *Osteoporosis International* 17.3, S. 319–336.
- Vilaca, T., Gossiel, F. und Eastell, R. (2017). „Bone Turnover Markers: Use in Fracture Prediction“. In: *Journal of Clinical Densitometry* 20.3, S. 346–352.
- Viola, D. und Elisei, R. (2019). „Management of Medullary Thyroid Cancer“. In: *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* 48.1, S. 285–301.
- Wang, C.-N., Wang, Y.-J., Wang, H., Song, L., Chen, Y., Wang, J.-L., Ye, Y. und Jiang, B. (2017). „The Anti-dementia Effects of Donepezil Involve miR-206-3p in the Hippocampus and Cortex“. In: *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 40.4, S. 465–472.
- Wenisch, S., Trinkaus, K., Hild, A., Hose, D., Herde, K., Heiss, C., Kilian, O., Alt, V. und Schnettler, R. (2005). „Human remaining debris: a source of multipotent stem cells“. In: *Bone* 36.1, S. 74–83.
- Wessler, I. und Kirkpatrick, C. J. (2009). „Acetylcholine beyond neurons: the non-neuronal cholinergic system in humans“. In: *British Journal of Pharmacology* 154.8, S. 1558–1571.
- Wessler, I., Kirkpatrick, C. J. und Racké, K. (1999). „The cholinergic ‘pitfall’: acetylcholine, a universal cell molecule in biological systems, including humans.“ In: *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 26 (3), S. 198–205.
- Wessler, I. und Kirkpatrick, C. J. (2016). „Detection of Non-neuronal Acetylcholine“. In: *Muscarinic Receptor: From Structure to Animal Models*. Neuromethods. Springer Science + Business Media, S. 205–220.
- Wickham, H. (2009). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York.
- Wilcoxon, F. (1945). „Individual comparisons by ranking methods“. In: *Biometrics bulletin* 1.6, S. 80–83.
- Wilk, M. B. und Gnanadesikan, R. (1968). „Probability Plotting Methods for the Analysis of Data“. In: *Biometrika* 55.1, S. 1.
- Wolfensohn, S. und Lloyd, M., Hrsg. (2003). *Handbook of Laboratory Animal Management and Welfare*. Blackwell Publishing Ltd.

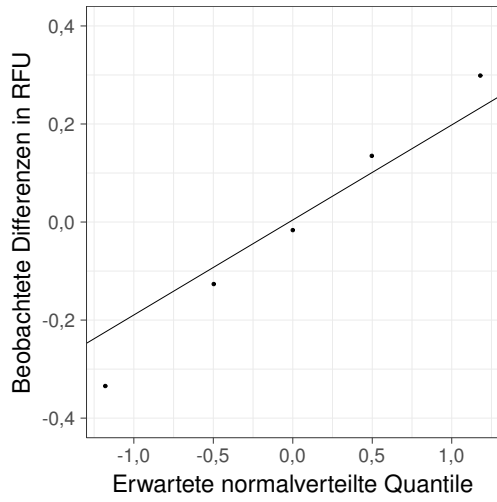
- World Health Organization (1994). „Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis: report of a WHO study group [meeting held in Rome from 22 to 25 June 1992]“. In: *Geneva: World Health Organization*.
- World Health Organization (2018). *Life Expectancy. Situation*. URL: http://www.who.int/gho/mortality_burden_disease/life_tables/situation_trends_text/en/ (besucht am 21.02.2021).
- Xu, M. L., Bi, C. W. C., Liu, E. Y. L., Dong, T. T. X. und Tsim, K. W. K. (2017). „Wnt3a induces the expression of acetylcholinesterase during osteoblast differentiation via the Runx2 transcription factor“. In: *Journal of Biological Chemistry* 292.30, S. 12667–12678.
- Yang, M., Lu, B.-J., Duan, Y.-Y., Chen, X.-F., Ma, J.-G. und Guo, Y. (2017). „Genetics association study and functional analysis on osteoporosis susceptibility gene BDNF.“ In: *Yi chuan = Hereditas* 39 (8), S. 726–736.
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S. und Madden, T. L. (2012). „Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction“. In: *BMC Bioinformatics* 13.1, S. 134.
- Zarrinkalam, M. R., Beard, H., Schultz, C. G. und Moore, R. J. (2008). „Validation of the sheep as a large animal model for the study of vertebral osteoporosis“. In: *European Spine Journal* 18.2, S. 244–253.
- Zarrinkalam, M. R., Schultz, C. G., Parkinson, I. H. und Moore, R. J. (2012). „Osteoporotic Characteristics Persist in the Spine of Ovariectomized Sheep after Withdrawal of Corticosteroid Administration“. In: *Journal of Osteoporosis* 2012, S. 1–6.
- Zhang, R., Ducy, P. und Karsenty, G. (1997). „1,25-Dihydroxyvitamin D₃ Inhibits *Osteocalcin* Expression in Mouse through an Indirect Mechanism“. In: *Journal of Biological Chemistry* 272.1, S. 110–116.
- Zheng, H., Niu, S., Zhao, H., Li, S. und Jiao, J. (2018). „Donepezil improves the cognitive impairment in a tree shrew model of Alzheimer’s disease induced by amyloid-1–40 via activating the BDNF/TrkB signal pathway“. In: *Metabolic Brain Disease* 33.6, S. 1961–1974.
- Zoch, M. L., Clemens, T. L. und Riddle, R. C. (2016). „New insights into the biology of osteocalcin“. In: *Bone* 82, S. 42–49.

Anhang

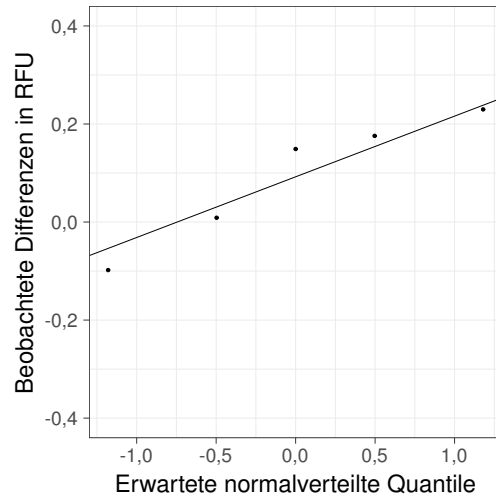


RFU = *relative fluorescence units*

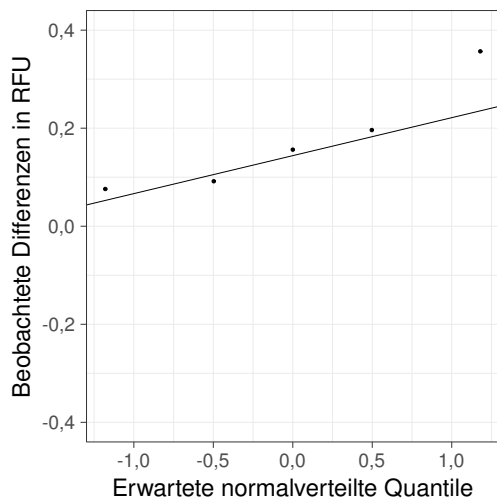
Abbildung 25: AChE-Aktivitätsbestimmung Q-Q-Plots



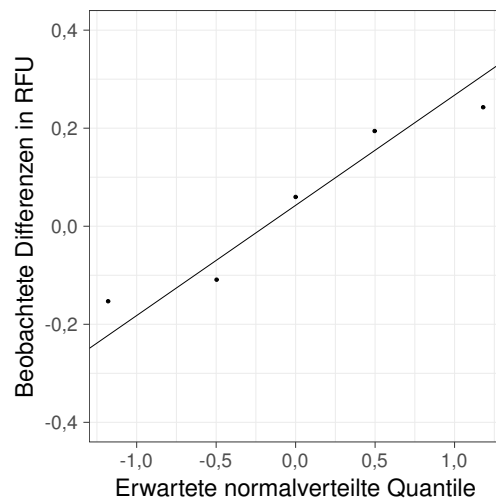
(a) K



(b) OVX



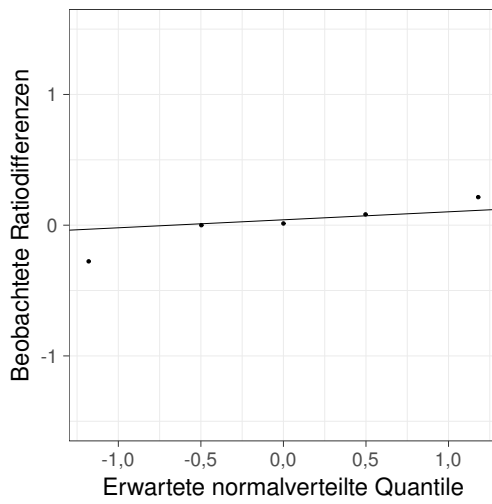
(c) OVX+D



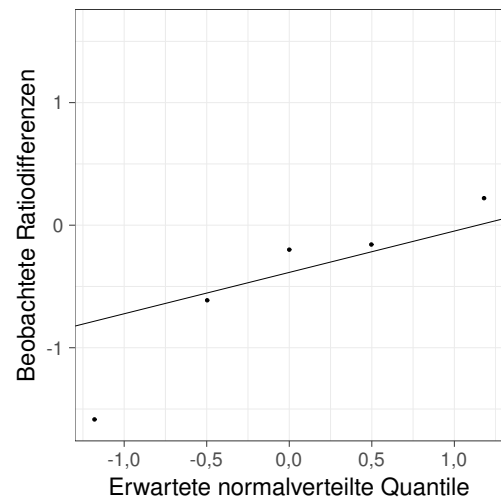
(d) OVX+D+S

RFU = *relative fluorescence units*

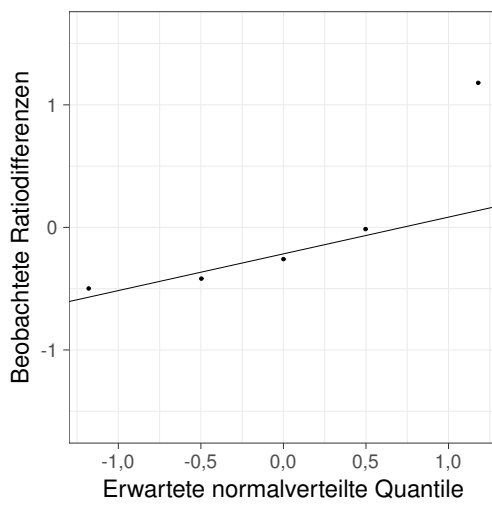
Abbildung 26: Proliferationsbestimmung Q-Q-Plots



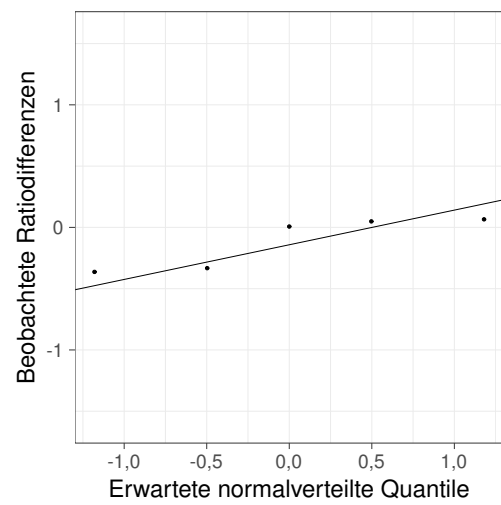
(a) K



(b) OVX

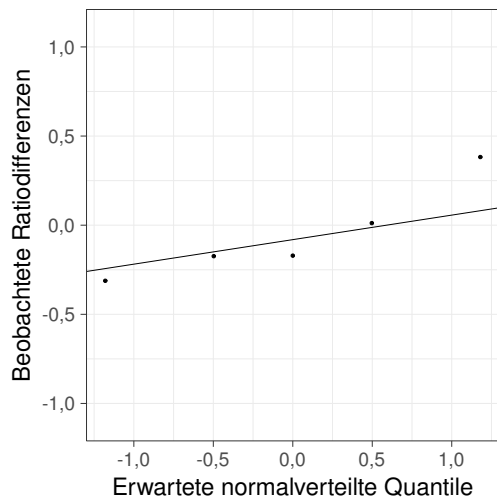


(c) OVX+D

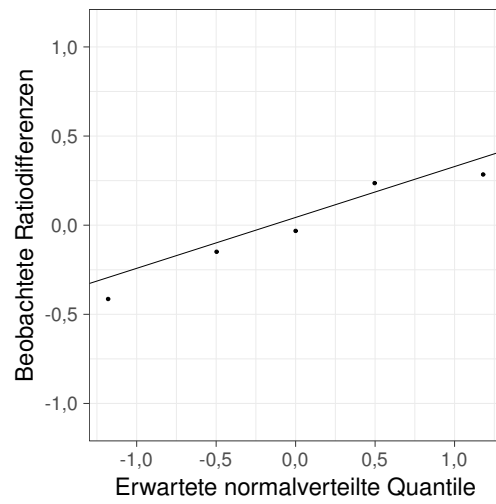


(d) OVX+D+S

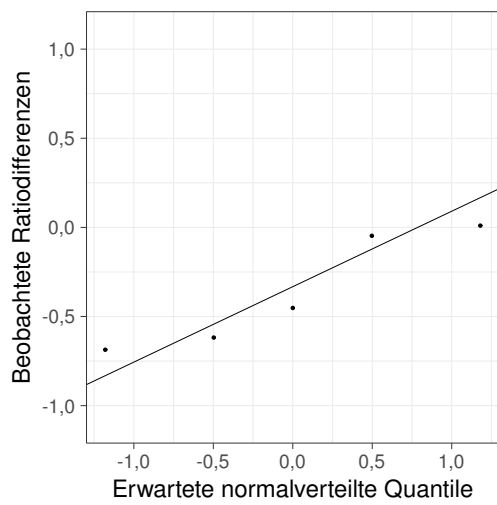
Abbildung 27: AChE-Genexpression Q-Q-Plots



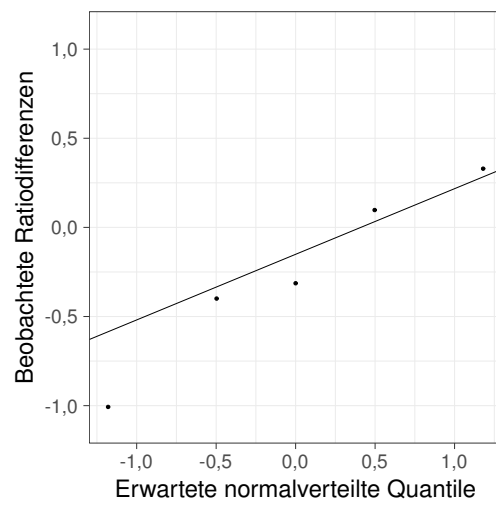
(a) K



(b) OVX

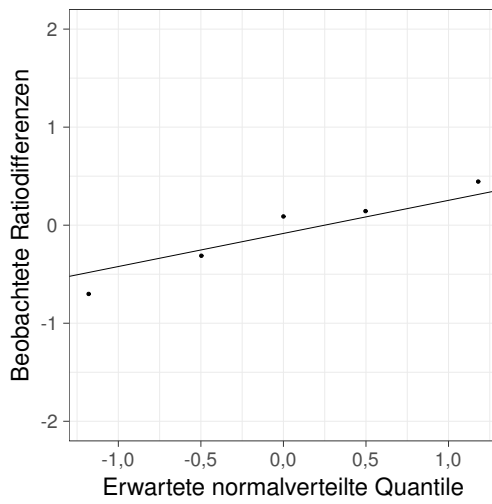


(c) OVX+D

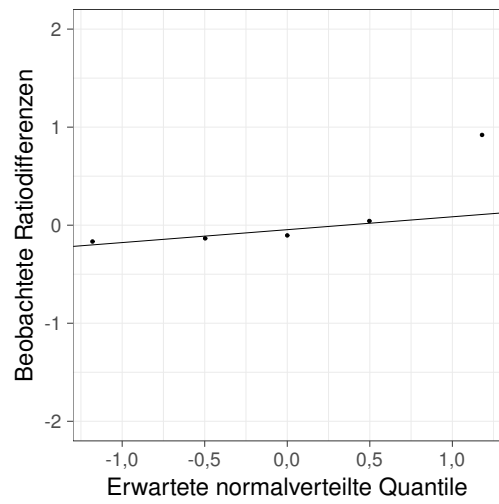


(d) OVX+D+S

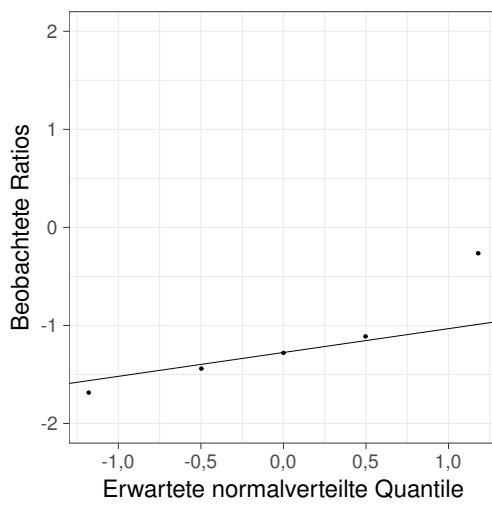
Abbildung 28: BChE-Genexpression Q-Q-Plots



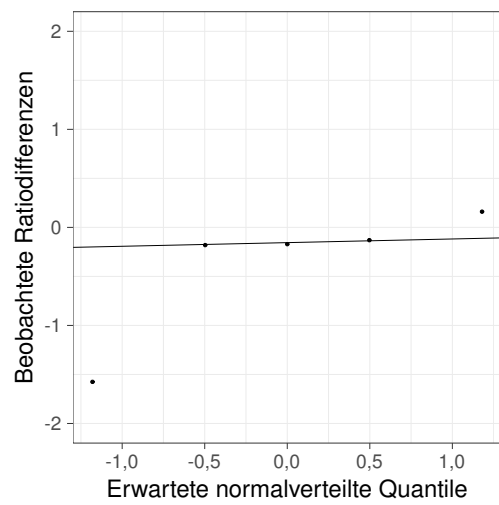
(a) K



(b) OVX

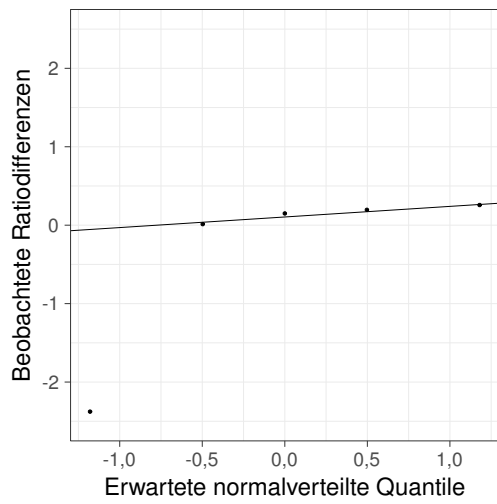


(c) OVX+D

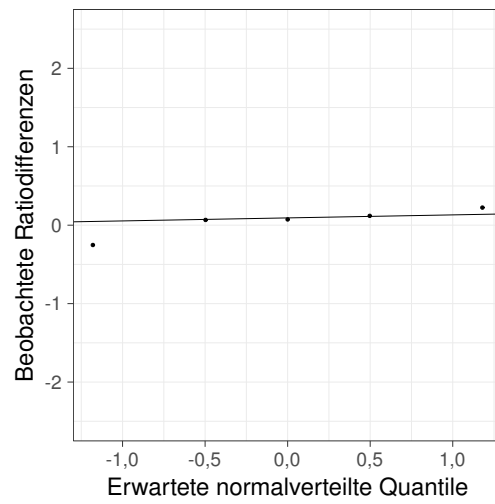


(d) OVX+D+S

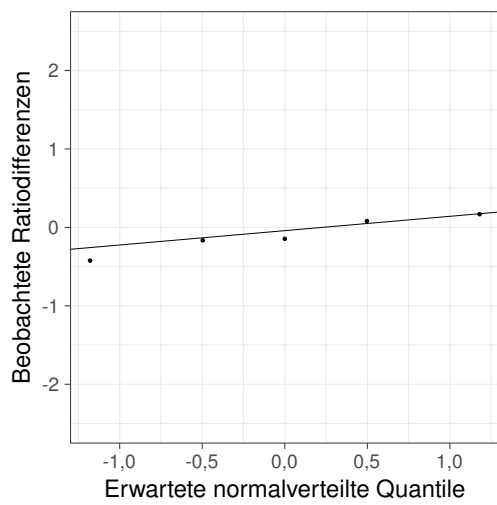
Abbildung 29: Col1A1-Genexpression Q-Q-Plots



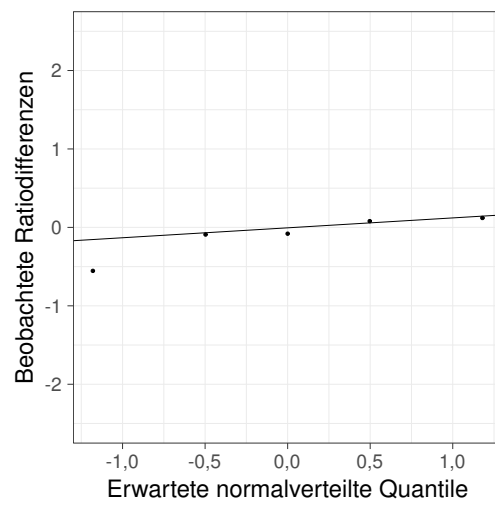
(a) K



(b) OVX

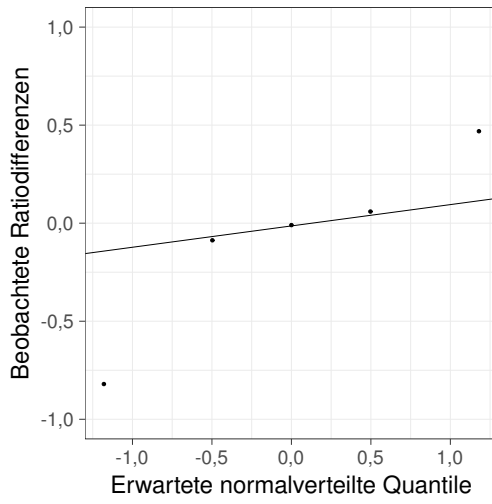


(c) OVX+D

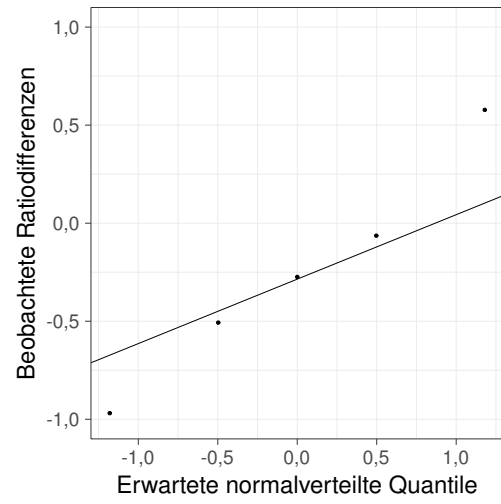


(d) OVX+D+S

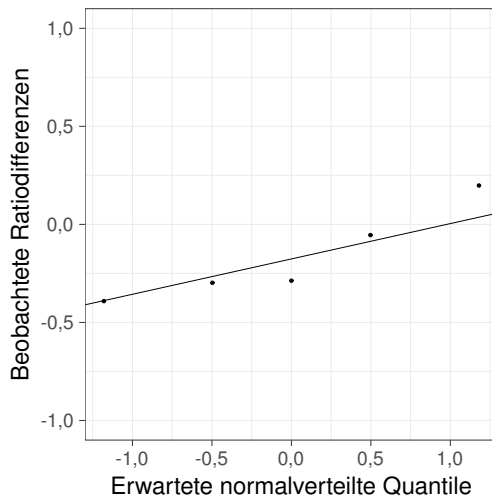
Abbildung 30: OC-Genexpression Q-Q-Plots



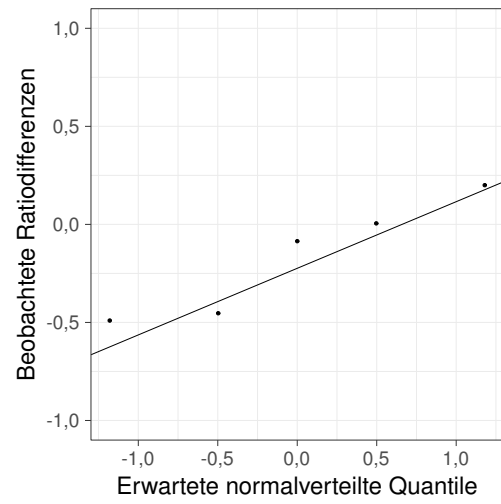
(a) K



(b) OVX



(c) OVX+D



(d) OVX+D+S

Abbildung 31: BDNF-Genexpression Q-Q-Plots

Publikationsverzeichnis

Publikation

Nachlinger, R. J., Kauschke, V., Trinkaus, K., El Khassawna, T., Heiss, C. und Lips, K. S. (2018). „Application of Donepezil increased collagen 1 expression in mesenchymal stroma cells of an ovine osteoporosis model.“ In: *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions* 18 (3), S. 354–365

Poster

Nachlinger, R. J., Kauschke, V., Trinkaus, K., Dakischew, O., El Khassawna, T., Heiss, C. und Lips, K. S. (2016). „Effect of Donepezil application on mesenchymal stem cells of a sheep osteoporosis model.“ Posterpräsentation während des *XVth International Symposium on Cholinergic Mechanisms* im Palais des Congrès in Marseille Chanot, Frankreich

Erklärung zur Dissertation

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

Ort, Datum

Unterschrift

Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Univ.-Prof. Dr. Dr. h. c. Christian Heiß, der mir unter seiner Direktion die Möglichkeit geboten hat, im Labor für experimentelle Unfallchirurgie der Justus-Liebig-Universität Gießen diese Promotionsarbeit durchführen zu können.

Besonders bedanke ich mich bei Prof. Dr. Katrin Susanne Lips dafür, dass sie mir dieses Projekt anvertraut hat, zusammen mit mir die Versuchsplanung durchgeführt hat und zu jeder Zeit ein offenes Ohr für Fragen, Probleme und Diskussionen hatte. Ohne ihre exzellente Betreuung würde diese Arbeit nicht existieren.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Labors für ihre Hilfe bedanken. Besonderer Dank gebührt dabei Dr. Katja Trinkaus für die Einarbeitung in die Zellkultur, Ivonne Bergen für die Einarbeitung in die Methoden der Molekularbiologie und Dr. Vivien Kauschke sowie meinen Mitdotorandinnen und -dotoranden für jederzeit gewährte Unterstützung. Gesondert möchte ich mich bei Olga Dakischew bedanken, mit der diverse Methoden etabliert und optimiert wurden, die immer Zeit für Fragen und bei Problemen immer ein offenes Ohr hatte sowie für jederzeit gewährte moralische Unterstützung – ohne die diese Arbeit schlichtweg nicht machbar gewesen wäre.

Bei der DFG möchte ich mich für die zur Verfügung gestellten Mittel im Rahmen des SFB/TRR 79 bedanken, bei Herrn Univ. Prof. Dr. Dr. h. c. Christian Heiß und Herrn Prof. Dr. Thaqif El Khassawna für die zur Verfügung gestellten, von mir verwendeten Stammzellen.

Danke meinen Lektoren Josef Nachlinger, Katha Weber und Marco Spindler.

Bedanken möchte ich mich vor allem bei meinen Eltern Inge und Josef Nachlinger, ohne die ich niemals soweit gekommen wäre, die immer für mich da sind, auf die ich mich immer verlassen kann und die mir im Lauf der Entstehung dieser Arbeit immer die nötige Unterstützung boten. Danke für Alles.

Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.