

**Aus der Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. J. Windolf**

Funktionelle Charakterisierung von Osteoblasten von Patienten mit einer normalen Knochendichte (BMD), einer Osteopenie oder einer Osteoporose

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Nele Benölken

2024

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: PD Dr. med. Jan Graßmann

Zweitgutachter: PD Dr. med. Philipp Slotty

Widmung

Ich widme diese Arbeit meinen Eltern, Christoph und Claudia Benölken, die mich über die gesamte Dauer der Entstehung hinweg immer motiviert haben und keine Mühen gescheut haben, mich - wo immer möglich - zu unterstützen.

Gender-Hinweis: Aus Gründen der besseren Lesbarkeit wird bei Personenbezeichnungen und personenbezogenen Hauptwörtern im Folgenden ausschließlich die männliche Form verwendet. Falls nicht explizit anders erwähnt, ist dabei jedes Geschlecht gleichermaßen gemeint.

Zusammenfassung (deutsch)

Die Osteoporose gehört weltweit zu den häufigsten Knochenerkrankungen und ist eines der führenden Krankheitsbilder im hohen Lebensalter. Zu den zugrunde liegenden Mechanismen zählen eine verminderte Aktivität knochenbauender Osteoblasten (OB). Bekannt ist, dass im Rahmen von Alterungsprozessen der Anteil reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) zunimmt, in deren Folge oxidativer Stress entstehen kann. Dieser wiederum unterstützt die Pathogenese der Osteoporose. Ziel der Arbeit war es zu evaluieren, inwiefern Antioxidantien die Differenzierung und Funktion von OB von älteren Patienten modulieren können. Weiterhin wollten wir untersuchen, ob es Unterschiede zwischen den OB gesunder Probanden und den OB von an Osteoporose erkrankten Personen gibt.

Humane OB wurden aus operativ entnommenen Hüftköpfen von Patienten mit einer Schenkelhalsfraktur isoliert und proliferiert ($n = 29$; $\bar{O} = 77$ Jahre). Mit Hilfe der *dual-energy X-ray-absorptiometry* (DEXA)-Messung wurde die Knochendichte bei diesen Patienten bestimmt. Aufgrund dieser Messungen wurden die OB in drei Gruppen eingeteilt: OB von Patienten mit einer normalen Knochendichte, einer Osteopenie oder einer Osteoporose. Die OB wurden über 21 Tage osteogen differenziert. Um den Einfluss von Antioxidantien auf die Differenzierung und Funktion der OB zu analysieren, erfolgte die Differenzierung additiv zum osteogenen Differenzierungsmedium (OM) mit dem Antioxidans Katalase (62,5 U/ml), inaktivierter Katalase (ia Kat, 62,5 U/ml) oder MnTBAP (einem Mimetikum der Mangan-Superoxiddismutase, 25 μ M). Alternativ wurden die OB mit Fe_2SO_4 (Eisen(II)-Sulfat, 50 μ M), als Bestandteil des aktiven Zentrums der Katalase oder H_2O_2 (50 μ M) als relativ langlebiges ROS, kultiviert. Der Effekt der Antioxidantien auf die OB wurde unter anderem mittels Färbung der OB mit Alizarinrot-S-Lösung und anschließender Rücklösung als Maß für die osteogene Differenzierung sowie Messung der Alkalischen Phosphatase (AP) als Maß für die osteoblastäre Aktivität gemessen. Analysiert wurde auch die Expression weiterer, den Knochenmetabolismus beeinflussenden Proteine, wie Osteoprotegerin (OPG), das als Decoy-Rezeptor das osteoklasten-aktivierende RANKL (*Receptor Activator of NF- κ B Ligand*) abfängt, sowie der Vitamin D-Rezeptor (vdr). Daneben wurden Versuche zu Markern zellulärer Seneszenz durchgeführt und das Potential von OB zur Adipogenese evaluiert.

Es konnte gezeigt werden, dass das Antioxidans Katalase die osteogene Differenzierung in OB aller drei Versuchsgruppen steigern kann (in der Osteoporose-Gruppe in etwa verdoppelt). Zudem war in den OB von Osteoporose-Patienten wie erwartet im Vergleich zu den OB von Patienten mit normaler Knochendichte, eine bis zu 50 % erniedrigte OPG-Konzentration zu detektieren. Auch konnte tendenziell eine verstärkte Seneszenz und Adipogenese in den OB von Patienten mit einer Osteopenie oder Osteoporose (nach DEXA-Messung) detektiert werden.

Antioxidantien wie die Katalase oder MnTBAP können die osteogene Differenzierung und osteoporose-relevante Parameter in OB von älteren Patienten verbessern bzw. modulieren. Somit könnten

Antioxidantien zukünftig ein weiterer Ansatzpunkt sein, um die Therapie der Osteoporose zu verbessern.

Die durchgeführten Experimente dienten zudem der erfolgreichen Etablierung, um am Forschungsstandort standardisierte Methoden für die Erforschung von Knochenstoffwechselerkrankungen wie der Osteoporose zu etablieren.

Zusammenfassung (englisch)

Osteoporosis is one of the most common bone diseases worldwide and one of the leading disease profiles in old age. Underlying mechanisms include decreased activity of bone-building osteoblasts (OB). It is known that in the context of aging processes, the percentage of reactive oxygen species (ROS) increases, and as a result oxidative stress can occur. This in turn supports the pathogenesis of osteoporosis. The aim of this thesis is to evaluate to what extent antioxidants can modulate the differentiation and function of OB of elderly patients. Furthermore, we wanted to investigate whether there are differences between the OB of healthy subjects and the OB of subjects suffering from osteoporosis.

Human OB of surgically removed femoral heads of patients with femoral neck fracture were isolated and proliferated (n = 29; Ø = 77 years). Dual-energy X-ray absorptiometry (DEXA) measurements were used to determine bone density of these patients. Based on these measurements, OB were divided into three groups: OB of patients with normal bone density, osteopenia, or osteoporosis. OB were osteogenically differentiated for 21 days. To analyze the influence of antioxidants on OB differentiation and function, differentiation was performed additively to osteogenic differentiation medium (OM) with the antioxidant catalase (62.5 U/ml), inactivated catalase (ia Kat, 62.5 U/ml), or MnTBAP (a mimetic of manganese superoxide dismutase, 25 µM). Alternatively, OB were cultured with Fe₂SO₄ (iron(II)-sulfate, 50 µM), as a component of the active site of catalase, or H₂O₂ (50 µM) as a relatively long-lived ROS. The effect of antioxidants on OB was measured, among other things, by staining the OB with Alizarin-Red S Solution and subsequent redissolution as a measure of osteogenic differentiation and measurement of alkaline phosphatase (AP) as a measure of osteoblast activity. The expression of other proteins affecting bone metabolism was also analyzed, such as osteoprotegerin (OPG), which acts as a decoy receptor to scavenge the osteoclast-activating RANKL (Receptor Activator of NF-κB Ligand), and the vitamin D-receptor (vdr). In addition, experiments on markers of cellular senescence were performed and the potential of OB for adipogenesis was evaluated.

The antioxidant catalase was shown to increase osteogenic differentiation in OB of all three experimental groups (approximately doubled in the osteoporosis group). In addition, as expected, an up to 50% decreased OPG concentration was detected in the OB of osteoporosis patients compared to the OB of patients with normal bone density. Also, increased senescence and adipogenesis were more likely to be detected in the OB of patients with osteopenia or osteoporosis (after DEXA measurement).

Antioxidants such as catalase or MnTBAP may enhance or modulate osteogenic differentiation and osteoporosis-related parameters in OB of elderly patients. Thus, antioxidants could be another target to improve osteoporosis therapy in the future.

The experiments performed have also served to successfully establish standardized methods for research of bone metabolic diseases such as osteoporosis at the research location.

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
1,25 (OH)D3	1,25-Dihydroxy-Vitamin D
25-OH-Vit. D3	25-Hydroxycholecalciferol, Calcidiol
β-Gal	β-Galactosidase
γ-GT	Gamma-Glutamyltransferase
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µmol	Mikromol
a.u.	<i>arbitrary unit</i> , willkürliche Einheit
Abb.	Abbildung
AP	alkalische Phosphatase
Aqua dest./ A. dest.	<i>Aqua destillata</i> , destilliertes Wasser
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COPD	<i>chronic obstructive lung disease</i> , chronisch obstruktive Lungenerkrankung
CPC	Cetylpyridinium-Chlorid
CRP	C-reaktives Protein
CTB	CellTiter Blue®
Cu ²⁺	Kupfer-Ionen
d	Tag/e
dl	Deziliter
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMEM/F-12	Dulbecco's Modified Eagle Medium/ Nutrient Mixture F-12
DMSO	Dimethylsulfoxid

ebd.	<i>Ebenda</i> , ebendort
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
FBS	<i>fetal bovine serum</i> , fötales Rinder-/ Kälberserum
Fe	<i>Ferrum</i> , Eisen
Fe³⁺	dreiwertiges Eisen
Fe₂SO₄	Eisen(II)-Sulfat
FGF2	<i>Fibroblast Growth Factor</i> , Fibroblasten-Wachstumsfaktor
g	Beschleunigung
g	Gramm
GPR116	G protein-coupled receptor 116
h	Stunde
H⁺	Wasserstoffion
Hb	Hämoglobin
H₂O	Wasser
H₂O₂	Wasserstoffperoxid
I. E.	Internationale Einheit/en
ia Kat	inaktivierte Katalase
<i>in vitro</i>	außerhalb des lebenden Organismus; unter kontrollierten Bedingungen, zum Beispiel in Zellkultur
<i>in vivo</i>	innerhalb des lebenden Organismus
kDa	Kilodalton
L	Liter
M-CSF	<i>Macrophage colony-stimulating factor</i> / Monozytenkolonien-stimulierender Faktor
mg	Milligramm
min	Minute/n
Mio	Millionen

ml	Milliliter
mmol	Millimol
Mn²⁺	Mangan-Ionen
MnTBAP	Mangan(III)-Tetrakis-(4-Benzoessäure)-Porphyrin Chlorid
mol	Mol
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i> , Boten-Ribonukleinsäure
MSC	mesenchymale Stromazellen
mU	Milliunits
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
NP-40	Nonylphenoxyethoxyethanol
O₂	Sauerstoff
OB	Osteoblasten
OD	optische Dichte
OM	osteogenes Differenzierungsmedium
OPG	Osteoprotegerin
OSTF1	<i>Osteoclast stimulating factor 1</i>
PBS	Phosphate Buffered Saline
PFA	Paraformaldehyd
pg	Pikogramm
post-OP	postoperativ
PPARγ	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor gamma
prä-OP	präoperativ
PSG	Penicillin-Streptomycin-Glutamin
PTH	Parathormon

RANK	<i>Receptor Activator of NF-κB</i>
RANKL	<i>Receptor Activator of NF-κB Ligand</i>
RIPA-Puffer	Radioimmunpräzipitationspuffer
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung/en
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
sec	Sekunden
SERMS	selektive Estrogen-Rezeptor-Modulatoren
SOD	Superoxiddismutase
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TBS-T	<i>Tris-buffered saline with Tween20</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
TMB	Tetramethylbenzidin
HCl	Hydrogenchlorid, Chlorwasserstoff
U	Units
UV-Strahlung	Ultraviolettstrahlung
V	Volt
vdr	Vitamin D-Rezeptor
WHO	Weltgesundheitsorganisation
z. B.	zum Beispiel
Zn⁺²	Zink-Ionen

Inhaltsverzeichnis

Widmung.....	3
Zusammenfassung (deutsch).....	I
Zusammenfassung (englisch).....	III
Abkürzungsverzeichnis.....	IV
Inhaltsverzeichnis.....	VIII
1 Einleitung.....	1
1.1 Aufbau des Knochens.....	1
1.2 Zellen des Knochens.....	2
1.2.1 Osteoblasten.....	2
1.2.2 Osteozyten.....	3
1.2.3 <i>Bone lining Cells</i>	3
1.2.4 Osteoklasten.....	3
1.3 Extrazelluläre Knochenmatrix.....	4
1.4 Osteoporose.....	5
1.5 Therapeutische Optionen.....	7
1.6 Die Knochenentwicklung.....	8
1.7 Ablauf des Knochenumbaus.....	8
1.8 Steuerung des Knochenumbaus und Einflüsse darauf.....	9
1.8.1 Bedeutung von Hormonen und Vitaminen für den Knochen.....	10
1.8.2 Die Bedeutung der alkalischen Phosphatase für den Knochen.....	10
1.8.3 Das RANK-RANKL-OPG-System.....	10
1.8.4 Die Wirkung von Umwelteinflüssen auf den Knochenmetabolismus.....	12
1.9 Einfluss von reaktiven Sauerstoffspezies auf die Osteogenese.....	12
1.10 Die Rolle der Adipogenese im Knochenmetabolismus.....	14
1.11 Die Katalase als Antioxidans.....	14
1.12 Zelluläre Seneszenz von Osteoblasten.....	16
1.13 Ziele der Arbeit.....	17
2 Material.....	19

2.1	Geräte	19
2.2	Verbrauchsmaterial	23
2.3	Substanzen.....	27
2.4	Medien.....	32
2.5	Kits	33
2.6	Software	33
3	Methoden.....	35
3.1	Probenmaterial	35
3.2	Auftauen der Osteoblasten	35
3.3	Passagieren der Osteoblasten	35
3.4	Zellzahlbestimmung mittels Neubauer-Zählkammer	36
3.5	Einfluss von Antioxidantien auf die osteogene Differenzierung der Osteoblasten.....	36
3.6	Nachweis der Kalziumexposition mittels Alizarinrot S-Färbung	37
3.7	Viabilitätsmessung mit CellTiter-Blue®	37
3.8	Messung der Osteoblasten-Aktivität anhand des AP-Assay	38
3.9	Adipogene Differenzierung von Osteoblasten	38
3.10	Nachweis des adipogenen Differenzierungspotentials von Osteoblasten mittels Ölrot	38
3.11	ELISA zum Nachweis der Osteoprotegerin-Expression	39
3.12	Protein-Konzentrationsbestimmung.....	40
3.13	Western Blot-Analyse des Vitamin D-Rezeptors, von p53 und γ -H2AX	40
3.14	Durchführung des β -Galactosidase-Assays.....	41
3.15	Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung.....	42
3.16	Einfluss von verschiedenen Fe-Konzentrationen auf die Viabilität der OB	42
3.17	Auswirkung verschiedener Katalase-Konzentrationen auf die Differenzierung..... von Osteoblasten	42
3.18	Katalase-Aktivitäts-Assay	42
3.19	Datenauswertung.....	43
4	Ergebnisse	44
4.1	Einfluss von Antioxidantien auf die osteogene Differenzierung von Osteoblasten.....	45

4.2	Vergleich der Aktivität der alkalischen Phosphatase	48
4.3	Expression des Rezeptors Osteoprotegerin	50
4.4	Adipogene Differenzierung von OB	53
4.5	Beurteilung der Adipogenese nach osteogener Differenzierung.....	55
4.6	Der Vergleich der Vitamin D-Rezeptor-Expression	56
4.7	Vergleich der Proteinexpression von p53	57
4.8	Evaluation der γ -H2AX-Expression.....	58
4.9	Untersuchung der Seneszenz der OB	59
4.10	Der Einfluss von Fe auf die Viabilität von OB	60
4.11	Validierung der Inaktivierung der Katalase	61
4.12	Laboruntersuchungen des Blutes.....	62
4.12.1	C-reaktives Protein.....	62
4.12.2	Hämatokrit.....	63
4.12.3	Erythrozyten.....	64
4.12.4	Hämoglobin.....	65
4.12.5	γ -Glutamyltransferase	66
4.12.6	Vitamin D.....	67
4.12.7	Calcium	68
4.12.8	Alkalische Phosphatase	69
5	Diskussion	70
5.1	Einfluss von Antioxidantien und reaktiven Sauerstoffspezies auf Osteoblasten	70
5.1.1	Die Wirkung von Katalase auf die osteogene Differenzierung von OB	71
5.1.2	Die Wirkung von Mangan(III)-Tetrakis-(4-Benzoesäure)-Porphyrin Chlorid auf	
	die osteogene Differenzierung von OB	74
5.2	Rolle von Fe im Knochenmetabolismus	75
5.3	Zelluläre Seneszenz von OB des älteren Menschen.....	76
5.4	Rolle von Vitamin D und des Vitamin D-Rezeptors (vdr) im Knochenmetabolismus	78
5.5	Adipogenese nach osteogener Differenzierung.....	79
5.6	Bedeutung des RANK-RANKL-OPG-Systems.....	80

5.7	Veränderungen im Blutbild des älteren Menschen	81
5.8	Schlussfolgerung und Abschlussbetrachtung	84
5.9	Ausblick	85
6	Literaturverzeichnis.....	87
	Danksagung.....	97

1 Einleitung

Knochen ist ein essenzieller Bestandteil des menschlichen Körpers und macht etwa 15 % des Körpergewichtes aus (Bartl 2008). Er erfüllt viele wichtige Funktionen: Er ist unverzichtbar für die mechanische Stabilität und dient Muskeln als Hebelarm, bietet inneren Organen Schutz und stellt neben Mineralien auch Wachstumsfaktoren zur Verfügung. Zudem ist er relevant für die Homöostase von Mineralstoffen sowie den Säure-Basen-Haushalt und ist postnatal der zentrale Ort der Hämatopoese. (Buck und Dumanian 2012) Der Knochen ist einer steten Beanspruchung ausgesetzt. Um den biomechanischen Belastungen standzuhalten und sich an variierende äußere Anforderungen zu adaptieren, unterliegt der Knochen ständigen Erneuerungsprozessen, in denen der Knochen wiederholt sukzessive ab- und wieder aufgebaut wird. Dadurch wird er an veränderte Belastungen angepasst und alte oder beschädigte Substanz kann ausgetauscht werden. (Clarke 2008) Im Rahmen von Erkrankungen oder Alterungsprozessen kann es zu einer Störung der Homöostase kommen, in deren Folge der Knochen weniger belastbar und anfälliger für (Mikro-) Frakturierungen werden kann.

1.1 Aufbau des Knochens

Die 213 Knochen des menschlichen Körpers können grundlegend in vier Kategorien unterteilt werden. Neben langen Röhrenknochen wie dem Femur gibt es noch kurze und flache sowie irreguläre Knochen. (Clarke 2008) Die langen, röhrenförmigen Knochen können in drei Bereiche unterteilt werden. Der Knochenschaft wird als Diaphyse bezeichnet. Darauf folgt die Metaphyse, die die Diaphyse mit den an beiden Enden befindlichen Epiphysen verbindet. Die Epiphyse bildet die Gelenkflächen. Eine solche Einteilung lässt sich für flache Knochen nicht vornehmen. (Buck und Dumanian 2012) Obwohl die Knochen sehr verschieden sind, so ist ihr grundlegender Aufbau vergleichbar. Das zentrale Knochenmark ist umgeben von Knochengewebe und Periost. Dabei wird die Elastizität des Knochens durch Kollagen gegeben. Durch darin eingelagerte Kristalle aus Kalzium und Phosphat wird die nötige Stabilität gewonnen. (Bartl 2008)

Auf mikroskopischer Ebene werden zwei Bauweisen ersichtlich. Die Kompakta, auch Kortikalis oder Knochenrinde genannt, dominiert beispielsweise in den langen Röhrenknochen. Dahingegen findet man die Spongiosa, auch als trabekulärer Knochen oder Knochenbälkchen bezeichnet, vor allem im Achsenskelett. (Bartl 2008) Obwohl sich die Zusammensetzung sehr ähnelt, weisen sie doch essenzielle Unterschiede auf. Aufgrund der verschiedenen Aufgaben und Eigenschaften zeigt sich eine Varianz in der Knochendichte, dem dreidimensionalen Aufbau und der metabolischen Aktivität (Buck und Dumanian 2012). Insgesamt besteht das Skelett zu 80 % aus Kortikalis und zu 20 % aus Spongiosa. Im Laufe des Lebens dünnt die Kortikalis aus und wird poröser. (Clarke 2008)

Die Kortikalis der Röhrenknochen besteht aus konzentrischen Knochenlamellen oder Osteonen mit darin verlaufenden Havers- und Volkmann-Kanälen. Diese beherbergen die vom Periost kommenden Gefäße und Nervenfasern. (Bartl 2008)

Die Spongiosa hat durch ihre bälkchenartige Struktur eine besonders große Oberfläche. Das macht sie besonders anfällig für die Entwicklung einer Osteoporose. Diese Knochenbälkchen sind an die Belastungslinien des Körpers angepasst. (Bartl 2008) Die metabolische Aktivität übersteigt die der Kortikalis deutlich, sodass auch ein Großteil des Knochenumbaus hier stattfindet und schneller auf externe Stimuli reagiert werden kann (Buck und Dumanian 2012).

Histologisch kann man zwei Arten von Knochen unterscheiden. Den primären oder Geflechtknochen findet man vor allem im embryonalen Skelett, wo er im Laufe der Entwicklung fast vollständig durch Lamellenknochen ersetzt wird. Außerdem findet man diese Art des Knochens in Wachstumsfugen und bei der sekundären Frakturheilung. Mikroskopisch kennzeichnend ist der unstrukturierte Aufbau, der ihn sehr flexibel macht. Andererseits ist er auch wenig belastbar. Sekundärer oder auch Lamellenknochen hingegen ist hochorganisiert und ersetzt fast den gesamten primären Knochen während der Wachstumsphase und ist auch bei der Heilung von gut adaptierten Knochenbrüchen zu finden. Durch diesen geordneten Aufbau ist der Knochen deutlich stabiler und belastbarer. (Buck und Dumanian 2012)

Umgeben ist der Knochen vom Periost. Dies dient verschiedenen Strukturen wie Sehnen als Ansatz und unterstützt die Blutversorgung des Knochens. Auch beeinflusst es den Auf- und Umbau des Knochens. (Buck und Dumanian 2012)

Das Endost kleidet als dünne Schicht den Knochen inklusive der Knochenkanälchen von innen her aus. Auch dieses enthält Gefäße sowie Osteoprogenitorzellen. (Buck und Dumanian 2012)

1.2 Zellen des Knochens

Die Zellen des Knochens, bestehend aus Osteoprogenitorzellen, Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten, haben einen Anteil von rund 10 % am gesamten Knochenvolumen und sind entscheidend für die dort stattfindenden Umbauprozesse (Buck und Dumanian 2012).

1.2.1 Osteoblasten

Osteoblasten (OB) entstehen aus Osteoprogenitorzellen, die der mesenchymalen Stammzellreihe entspringen (Buck und Dumanian 2012). Aus diesen Stammzellen können aber unter veränderten Bedingungen der Umgebung auch Knorpel-, Fett- und Bindegewebszellen entstehen. Abhängig von der jeweiligen Anforderung der Zellumgebung können diese Zellen auch wieder dedifferenzieren und sich in einen anderen Zelltyp umwandeln. (Siggelkow 2008) Die Hauptaufgabe von OB ist die Produktion der Knochenmatrix, was durch verschiedenste Zytokine und Hormone gesteuert wird (Bartl 2008).

Diese noch unmineralisierte Knochenmatrix wird auch als Osteoid bezeichnet (Grabowski 2009). Bei einer sehr kurzen Lebensspanne von nur etwa 3 Monaten (Infante und Rodríguez 2018) verbleiben nach beendetem Knochenumbau nur etwa 30 – 50 % der OB im Knochen und werden zu Osteozyten und *bone lining cells*, der Rest geht in Apoptose (Clarke 2008).

1.2.2 Osteozyten

Ausgereifte OB können durch Einbau in die neu gebildete Knochenmatrix zu Osteozyten differenzieren. Diese befinden sich in Lakunen innerhalb des Osteoids und stehen untereinander durch Canaliculi und mit der Knochenoberfläche in Kontakt. Statt der Produktion von Matrix haben sie dann eine Funktion in der Knochenstruktur und im Knochenmetabolismus. Durch ihre aktive Beteiligung am Transport und Austausch wichtiger Knochenmetabolite sowie der Initiierung des Knochenumbaus sind sie unverzichtbar für den Knochen. Die genauen Eigenschaften sind aber bis heute unerforscht. (Bartl 2008) Sie machen mit 90 – 95 % den größten Bestandteil aller Knochenzellen aus (Parra-Torres et al. 2013). Die Lebensspanne eines Osteozyten kann die gesamte Lebensdauer eines Menschen betragen (Infante und Rodríguez 2018).

1.2.3 *Bone lining Cells*

Sie werden auch als Knochenbeleg- oder Knochensaumzellen bezeichnet und entstehen aus OB, zu denen sie sich durch den Einfluss von mechanischem Stress oder Parathyroidhormon auch redifferenzieren können (Clarke 2008). Sie befinden sich auf der Knochenoberfläche (Grabowski 2009). Im Knochen fungieren sie als Blut-Knochen-Schranke, indem sie den Ein- und Ausstrom von Mineralstoffen kontrollieren (Clarke 2008).

1.2.4 Osteoklasten

Osteoklasten sind mehrkernige Zellen, die aus mononukleären Vorläuferzellen entstehen und sich aus derselben hämatopoetischen Zelllinie wie Makrophagen entwickeln (Grabowski 2009). Sie sind als einzige bekannte Zellen in der Lage, Knochensubstanz zu resorbieren. Sie sezernieren Wasserstoff-Ionen zur Ansäuerung des betroffenen Gewebes. Weiterhin sekretieren sie lysosomale Enzyme wie Cathepsin K und Matrix-Metalloproteinase 9, die die Knochenmatrix degradieren. (Clarke 2008) So werden innerhalb weniger Tage kleinere Knochenareale abgebaut. Durch die fortwährend entstehenden Resorptionslakunen wird das Skelett konstant erneuert. Verschiedene Hormone und Wachstumsfaktoren spielen eine Rolle in der Rekrutierung der Osteoklasten, darunter Östrogen und Schilddrüsenhormone (Bartl 2008). Nach beendeter Resorption wird in den Osteoklasten in der Regel die Apoptose induziert (Infante und Rodríguez 2018).

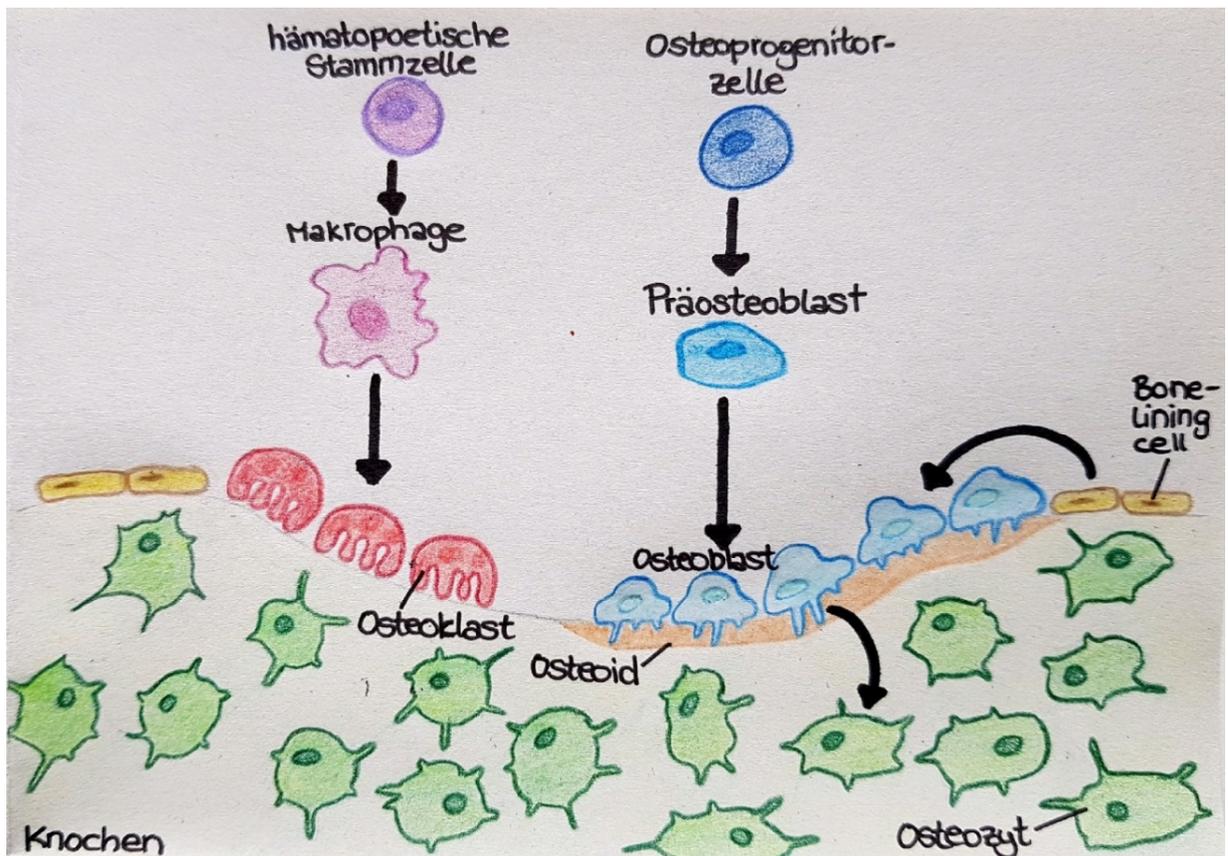


Abb. 1: Zellen des Knochens und ihre Entwicklung

OB und Osteoklasten sind für die Homöostase des Knochens verantwortlich. Sowohl OB als auch das Osteoid produzieren das für die Knochenmineralisierung nötige Hydroxylapatit und Calcium. Die Osteoklasten resorbieren Teile des Knochens. Das Gleichgewicht der beiden Fraktionen ist entscheidend für die Knochenhomöostase.

(In Anlehnung an (Salhotra et al. 2020))

1.3 Extrazelluläre Knochenmatrix

Die extrazelluläre Matrix (EZM) des Knochens macht mit etwa 90 % den Hauptbestandteil des Knochens aus und besteht aus vier Komponenten. Den größten Anteil davon mit 65 % bildet die anorganische Knochensubstanz. Sie besteht vor allem aus Calcium und Phosphat, die in Form von Hydroxylapatit zusammengelagert sind; sowie Magnesium und Natrium. Diese mineralisierte Matrix bedingt die Stabilität des Knochens. (Buck und Dumanian 2012)

Der zweite große Bestandteil der EZM (20 %) ist die organische Substanz, die von den OB produziert wird. Sie besteht zu etwa 90 % aus Kollagen Typ I, aber auch weitere Kollagene, Glykoproteine, Proteoglykane und Wachstumsfaktoren sind hier zu finden. Die organische Matrix gibt dem Knochen seine Form, Widerstandsfähigkeit und Elastizität. (Buck und Dumanian 2012)

Als weitere Komponenten der EZM sind zudem in kleinen Anteilen Lipide und Wasser zu nennen (Buck und Dumanian 2012).

1.4 Osteoporose

Die Osteoporose wird als systemische Skeletterkrankung definiert. Sie geht einher mit einer Verminderung der Knochenmasse und einer Verschlechterung der Mikroarchitektur des Knochengewebes. Dies ist mit einer erhöhten Anfälligkeit für Frakturen assoziiert. (Kerschán-Schindl 2016) Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) hat die Osteoporose als eine der zehn wichtigsten Volkskrankheiten eingestuft. Rund 10 % der Bevölkerung in Deutschland sind davon betroffen, wobei sich mit steigendem Alter ein exponentieller Anstieg der Inzidenz nachweisen lässt. (Bartl und Bartl 2021) Häufige Folge dieser Erkrankungen sind pathologische Frakturen; in 2019 rund 4,3 Millionen in Europa. Die dadurch entstandenen Kosten beliefen sich im selben Jahr auf rund 56 Billionen Euro. (Kanis et al. 2021)

Die Osteoporose ist charakterisiert durch eine verminderte Knochendichte und -qualität sowie eine gestörte Mikroarchitektur des Knochens (Committee on Practice Bulletins-Gynecology, The American College of Obstetricians and Gynecologists 2012). Definiert wird die Osteoporose nach der WHO (1994) anhand der Knochendichte (BMD, *bone mineral density*). Demnach liegt eine Osteoporose vor, wenn die BMD $\leq 2,5$ Standardabweichungen (SD) oder mehr unter dem Durchschnitt für junge gesunde Frauen liegt. Dieser Wert wird auch als T-Wert bezeichnet. Davon abzugrenzen ist die Osteopenie, bei der der T-Wert zwischen -1 und -2,5 SD unter dem Durchschnittswert liegt. Grundlage der Bestimmung der Knochendichte ist dabei standardmäßig die *Dual X-ray-Absorptiometry* (DXA), die mittels ionisierender Strahlung an der Hüfte und/oder der Lendenwirbelsäule bestimmt wird. Das Ergebnis dient neben der Einordnung der Schwere der Erkrankung zur Entscheidung einer möglichen Indikation zur (pharmakologischen) Intervention. (Therlault et al. 2006)

Die Erkrankung Osteoporose und ihre Therapie sind eine weltweite und relevante gesellschaftliche Belastung. Als eine Erkrankung, deren Inzidenz mit steigendem Lebensalter zunimmt, wird die Relevanz mit der demografischen Entwicklung der Gesellschaft in den kommenden Jahren weiter zunehmen. Dabei sind Frauen 5-mal häufiger betroffen als Männer (Committee on Practice Bulletins-Gynecology, The American College of Obstetricians and Gynecologists 2012).

Neben der Relevanz für den Menschen selbst durch gesteigerte Morbidität und Mortalität sind auch die Gesundheitskosten erheblich. Diese entstehen maßgeblich durch Frakturen, bedingt durch die verminderte Knochendichte. Am häufigsten ereignen sich die Brüche an Wirbelsäule, Hüfte, Unter- und Oberarm. Von an Osteoporose erkrankten Frauen erleiden bis zum 50. Lebensjahr alleine 20 % eine Fraktur im Bereich der Hüfte. (Bonjour et al. 2004)

Zu den relevanten Risikofaktoren für die Entwicklung einer Osteoporose werden neben dem Alter auch das weibliche Geschlecht, ein verminderter *Body-Mass-Index* (BMI), frühere Knochenbrüche, Hüftfrakturen der Eltern, Rauchen, längerfristige Einnahme von Corticosteroiden, übermäßiger Alkoholkonsum und die rheumatoide Arthritis gezählt (Committee on Practice Bulletins-Gynecology, The American College of Obstetricians and Gynecologists 2012).

Der zelluläre Hintergrund bei der Osteoporose ist ein Ungleichgewicht zwischen knochenaufbauenden OB und knochenabbauenden Osteoklasten, die für das Remodeling des Skeletts unerlässlich sind. Die Ursachen für dieses Ungleichgewicht können vielseitig sein. Einen wesentlichen Einfluss haben dabei die Sexualhormone. Östrogene als Beispiel steigern die Osteoblasto- und Osteoklastogenese. Essenziell dafür ist Interleukin-6 (IL-6) und dessen Rezeptor, die durch Sexualhormone supprimiert werden. Eine steigende Menge an IL-6 fördert die Entwicklung der OB und Osteoklasten. Da die Resorption durch Osteoklasten schneller ist als die Neuformation des Knochens durch OB und der neu gebildete Knochen zudem eine geringere Dichte hat, hat dies eine vermehrte Knochenresorption und ein tieferes Eindringen der Osteoklasten in den Knochen zur Folge. Außerdem verlängert sich die Lebensspanne der Osteoklasten durch sinkende Östrogenspiegel. Im Gegensatz dazu verkürzt sich die Lebenszeit der OB. Durch den erhöhten Anteil apoptotischer Osteozyten bleiben Mikroschäden am Knochen länger unentdeckt, sodass der Knochen schon früh instabil wird. Auch gesteigerte Konzentrationen vom Tumornekrosefaktor- α und - β (TNF) und des *Macrophage colony-stimulating factors* (M-CSF) sind, bedingt durch den Östrogen-Mangel, bei Osteoporose-Patienten zu finden. Und auch die OPG-Konzentration steigt unter dem Einfluss des Sexualhormons, um nur einige Beispiele zu nennen (Manolagas 2000).

Androgene haben einen vergleichbaren Effekt auf den Knochen wie Östrogene, woraus sich auch die Entstehung von Osteoporose beim Mann erklären lässt (Manolagas 2000).

Neben physiologisch fallenden Östrogenspiegeln mit dem Alter können Probleme wie eine verminderte Sexualhormon-Produktion oder Resistenz der Botenstoffe an den Rezeptoren Ursache für erniedrigte Östrogen-Spiegel sein und schon in früheren Jahren die Grundlage für eine Osteoporose legen, wenn eine maximale Knochendichte gar nicht erst erreicht wurde (Manolagas 2000).

Auch das Altern von Knochenzellen ist ein wichtiger Einflussfaktor für die Entstehung einer Osteoporose. Altersbedingt kommt es in der Zelle zu pathologischen Veränderungen und Fehlfunktionen. Dazu zählen neben einer Telomer-Verkürzung und einem veränderten Zellstoffwechsel auch Veränderungen in der DNA, die entweder spontan oder durch Fehler während der Replikation entstehen. Auch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) können durch ihren schädigenden Einfluss auf zelluläre Strukturen letztlich zu zellulärer Seneszenz führen, was einen Zellzyklusarrest bedingt und final im Zelltod endet. Zeichen für diese Seneszenz sind neben einem veränderten Aussehen der Zelle mit langem und flachem Zellkörper, viel Zytoplasma und Vakuolen auch ein erhöhtes Maß an Doppelstrangbrüchen der DNA sowie eine erhöhte Aktivität von β -Galactosidase (β -Gal). Die fehlende Replikationsfähigkeit der Zellen als Schutzmechanismus inhibiert zwar ein potenzielles Tumorwachstum, führt aber auch zur Akkumulation seneszenten Zellen im Gewebe. Außerdem kann sich das Gewebe aufgrund einer verminderten Anzahl von Stamm- und Progenitorzellen in geringerem Ausmaß regenerieren. Diese Vorgänge führen schließlich zu einer verminderten Osteoblasto- und Osteoklastogenese, was einen verminderten Knochenstoffwechsel bedingt, einhergehend mit einer gesteigerten Bildung von Adipozyten. (Manolagas 2000; Davalli et al. 2016; Abdollahi et al. 2005)

Als weiterer Risikofaktor für eine Reduktion der Knochendichte gilt die Einnahme von Glucocorticoiden, die dosisabhängig eine Osteoporose induzieren können. Eine übermäßige und langfristige Zufuhr oder gesteigerte Produktion von Glucocorticoiden beschleunigt die Knochenresorption bei gleichzeitig verminderter Knochenneubildung. Diese Steroidhormone bedingen eine verminderte Proliferation und Aktivität der OB. Weiterhin bedingen sie einen Mangel an Sexualhormonen und führen zu einem Hyperparathyreoidismus (durch einen Mangel an Calcium und Vitamin D). Manolagas beschreibt in seinem Artikel, dass neben den verminderten OB, auch die Zahl der Osteoklasten und Progenitorzellen durch ein Übermaß an Glucocorticoiden verringert ist. Auch wenn die Osteoklastogenese durch das Hormon gehemmt zu sein scheint, zeigt der Autor ein längeres Überleben bereits existierender Osteoklasten, was den Knochenabbau insgesamt fördert. Andere Autoren wie zum Beispiel Compston beschreiben hingegen eine verminderte Anzahl und Aktivität von Osteoklasten unter Einfluss von Glucocorticoiden. Einen weiteren Effekt der Glucocorticoide scheint die Inhibition von OPG zu sein, was die Osteoklasten-Aktivität weiter steigert. Eine verminderte Neubildung von OB verhindert schließlich den steten Knochenwiederaufbau. Auch induzieren Glucocorticoide die Apoptose von OB und Osteozyten. Eine Akkumulation dieser apoptotischen Zellen kann eine Osteonekrose verursachen. (Manolagas 2000; Compston 2018)

Neben den hier genannten gibt es noch zahlreiche andere Faktoren, die den Knochenmetabolismus beeinflussen wie weitere Hormone (z.B. Parathormon, Calcitonin, Schilddrüsenhormone), eine Mangelernährung oder eine verminderte mechanische Belastung, die ebenfalls die Entstehung einer Osteoporose begünstigen können (Parra-Torres et al. 2013).

1.5 Therapeutische Optionen

Bisherige Therapieprinzipien der Osteoporose fußen sowohl auf medikamentöse als auch nicht-medikamentöse Ansätze. Ganz allgemein ist allen Patienten ein ausreichendes Maß an körperlicher Bewegung und eine ausgewogene Ernährung anzuraten. Diese Aspekte können bereits präventiv angewendet werden. Regelmäßige Bewegung steigert die Knochenmasse, was das Risiko osteoporosebedingter Frakturen deutlich senken kann. Aber auch nach ereigneter Fraktur ist eine frühzeitige Mobilisierung wichtig. Bei bereits bestehender Osteoporose kommt der Sturzprävention ein großer Stellenwert zu, da ein Großteil der Hüftfrakturen durch Stürze entsteht. Bei den über 65-Jährigen, die in Pflegeeinrichtungen leben, stürzt die Hälfte mindestens einmal im Jahr, bei den allein Lebenden sind es immerhin 30 %. Auch hier spielt Muskelaufbau eine wichtige Rolle. (Kersch-Schindl 2016) Weiterhin sollten Risikofaktoren wie die Einnahme von Glucocorticoiden oder Gleichgewichtsbeeinflussenden Medikamenten minimiert werden. Auch eine psychosoziale Unterstützung kann hilfreich sein, um Betroffenen oder Gefährdeten die Angst vor Stürzen und Frakturen zu nehmen und so einer zunehmenden Bewegungseinschränkung entgegenzuwirken. (Dachverband Osteologie e.V.) Weiterhin ist die Aufnahme von ausreichend Kalzium (1000 mg/d) und Vitamin D₃ (800 - 1000 I. E. (Internationale Einheiten) täglich) sowohl prophylaktisch als auch therapeutisch sinnvoll. Gelingt dies

nicht in ausreichendem Maße über die Nahrung, sollte eine Supplementierung in Betracht gezogen werden. (Kersch-Schindl 2016)

Medikamentöse Maßnahmen kommen vor allem in Betracht, wenn ein deutlich erhöhtes Frakturrisiko besteht oder es bereits zu Frakturen gekommen ist (Dachverband Osteologie e.V.). Therapieprinzipien werden hierbei unterteilt in antiresorptive und anabolische Medikamente sowie Wirkstoffe mit dualer Wirkweise (Gallagher und Tella 2014).

Als Erstlinien-Therapie gelten dabei Bisphosphonate. Bisphosphonate gehören wie auch selektive Estrogen-Rezeptor-Modulatoren (SERMS) und Denosumab als monoklonaler Antikörper gegen RANKL zu der Gruppe der antiresorptiven Medikamente. Als anabole Therapieoption eignet sich die parenterale Gabe von Parathormon. Strontiumranelat als weitere relevante Substanz wirkt sowohl anabol als auch antiresorptiv. (Kersch-Schindl 2016) Ein noch recht neues Medikament, das erst 2020 auf dem deutschen Markt zugelassen worden ist, ist das *Biological* Romosozumab, das neben der Reduktion des Knochenabbaus auch den Knochenaufbau fördert (LeBoff et al. 2022). Daneben gibt es weitere, aber weniger angewendete Therapieansätze.

1.6 Die Knochenentwicklung

Man unterscheidet zwei grundsätzlich verschiedene Formen der Knochenbildung, nämlich die desmale (auch intramembranöse) von der chondralen (oder endochondralen) Ossifikation (Buck und Dumanian 2012).

Die desmale Ossifikation findet sich zum Beispiel an Schädel- und Gesichtsknochen sowie der primären Frakturheilung. Sie ist dadurch gekennzeichnet, dass sich mesenchymale Vorläuferzellen direkt zu OB differenzieren, die die Knochenmatrix generieren. Dabei wird Geflechtknochen gebildet, der im Verlauf durch Lamellenknochen ersetzt wird. (Buck und Dumanian 2012)

Im Gegensatz dazu wird bei der chondralen Ossifikation zuerst ein knorpeliges Skelett gebildet, indem mesenchymale Stammzellen (MSC) zu Chondrozyten differenzieren. Nach dem Zelltod der Chondrozyten wird das knorpelige Gerüst mittels OB, die sich ebenfalls aus MSC differenzieren, durch sogenannten Lamellenknochen ersetzt. Diese Form der Knochenbildung findet man zum Beispiel an langen Röhrenknochen oder bei Frakturen, wenn die Frakturrenden nicht optimal adaptiert sind. (Buck und Dumanian 2012)

1.7 Ablauf des Knochenbaus

Der Knochen wächst und entwickelt sich im Laufe der Kindheit und Jugend stetig weiter, was mit dem Schluss der Wachstumsfugen in der Pubertät endet. Doch auch danach wird das Skelett stetig weiter

umgebaut, um Mikroläsionen auszubessern und sich an veränderte Belastungsansprüche zu adaptieren. (Bartl 2008)

Die maximale Knochendichte wird in der Pubertät erreicht und ist ein wichtiger Prädiktor für die spätere Entwicklung einer Osteoporose. Daher scheint es wichtig, bereits früh Einfluss auf die Dichte des Knochens zu nehmen, was sich am besten durch die Ernährung und körperliche Aktivität bewerkstelligen lässt. Eine anhaltende körperliche Betätigung hat dabei den besten Effekt auf die Knochenmasse und wirkt sich auch noch positiv auf einen späteren Bewegungsmangel aus. (Grabowski 2009)

Bereits nach dem 30. Lebensjahr nimmt die Knochendichte wieder ab, bei Frauen beschleunigt sich dieser Prozess nach der Menopause durch Wegfall des Knochenaufbau-fördernden Östrogens (Bartl 2008).

Das *Remodeling* eines Knochenabschnitts dauert im Mittel 120 d und kann in verschiedene Phasen unterteilt werden. Nach einer Ruhephase wird der Knochen in der Phase der Aktivierung auf den Umbau vorbereitet, indem der Schutzmantel aus Endostzellen und Kollagen entfernt wird. Es folgt eine etwa 2-wöchige Resorption durch Osteoklasten. In der darauffolgenden Umschaltphase werden OB rekrutiert, die anschließend mit der Osteoid-Bildung beginnen. Nach Mineralisation der Substanz, was mehrere Monate dauern kann, kehrt wieder die Ruhephase ein. Auf diese Weise werden jährlich rund 8 % des gesamten Skeletts umgebaut. Da 10-mal mehr weicher, spongiöser Knochen umgebaut wird als Kortikalis, wird deutlich, warum eine verringerte Knochendichte zuerst in diesen Knochenanteilen auftritt. Gerade die Lendenwirbelsäule und der proximale Femur bestehen zu über 50 % aus Spongiosa. Die horizontalen Knochenbälkchen, die weniger Last tragen, sind von diesem Abbau als Erstes betroffen. (Bartl 2008; Clarke 2008)

1.8 Steuerung des Knochenbaus und Einflüsse darauf

Der Knochen und sein Wachstum sind von vielen weiteren Faktoren und Strukturen abhängig. Dazu zählen unter anderem Organe wie Niere und Darm, die wichtige Substanzen der Knochensubstanz absorbieren, als auch hormonell regulierende Organe wie Hypothalamus, Hypophyse, Gonaden, Nebenschilddrüsen, Leber und Haut. (Grabowski 2009) Beispielsweise ist die Abnahme der Östrogen-Konzentration nach der Menopause wahrscheinlich mitverantwortlich dafür, dass Frauen mit zunehmendem Alter durchschnittlich eine geringere Knochendichte haben als Männer und auch deutlich häufiger an Osteoporose leiden. Nicht zu vernachlässigen sind weiterhin auch große interpersonelle Unterschiede im Knochenmetabolismus. (Choi et al. 2021)

1.8.1 Bedeutung von Hormonen und Vitaminen für den Knochen

Weitere Hormone spielen eine relevante Rolle im Knochenmetabolismus. Vornan sind hier das Parathormon (PTH) und das Parathormon-verwandte Peptid (PTHrP, *parathyroid hormone-related*) zu nennen. Außerdem hat Vitamin D eine nennenswerte Wirkung auf den Knochen.

Neben der Wirkung von PTH direkt im Knochengewebe, die zur Freisetzung von Calcium und Phosphat führt, bewirkt es auch an den Nieren eine verstärkte Reabsorption von Calcium, während die Absorption von Phosphat verringert wird. Und auch im Darm wird die Calcium-Aufnahme durch PTH erhöht. Weiterhin wird die renale Produktion von 1,25(OH)₂-Vitamin D gefördert. (Grabowski 2009)

Auch das Vitamin D ist an der Aufrechterhaltung eines adäquaten Calcium- und Phosphatspiegels beteiligt. Indem es die intestinale Absorption beider Mineralstoffe fördert, trägt es indirekt zur Mineralisierung bei. Weiterhin begünstigt Vitamin D die OB-Differenzierung sowie die Expression verschiedener Zytokine, Zytokinrezeptoren und Enzyme, darunter Alkalische Phosphatase (AP) und Osteoprotegerin (OPG), die beide den Knochenmetabolismus positiv beeinflussen. (Clarke 2008)

Androgene sowie Östrogene als Geschlechtshormone übernehmen ebenfalls eine zentrale Rolle im Knochenmetabolismus. Androgene stimulieren direkt die Proliferation von OB. Indirekt halten sie auch die Aktivität der Osteoklasten aufrecht, indem sie die Bildung von OPG verhindern. Östrogene hingegen fördern die Produktion von OPG in Osteoblasten. Bei beiden Geschlechtern ist Östrogen eine entscheidende Variable für den Knochenabbau. Der Abfall des Hormons im Alter führt durch eine verringerte OPG-Konzentration zur verstärkten Aktivität der Osteoklasten. (Choi et al. 2021)

1.8.2 Die Bedeutung der alkalischen Phosphatase für den Knochen

Die AP ist ein glykosyliertes Protein und kommt im Knochen sowohl in gebundener als auch freier Form dort vor. Vier verschiedene Gene codieren für vier verschiedene Formen der AP. Neben der Darm-, Keimzellen- und Plazenta-AP gibt es die nicht-gewebsspezifische AP, die vor allem in den Nieren, dem zentralen Nervensystem und im Knochen vorkommt. Die vorrangige Aufgabe der AP ist die Hydrolyse von Phosphorsäuremonoestern, wobei Phosphate frei werden, was zur Mineralisierung des Knochens beiträgt. (Azpiazu et al. 2019; Clarke 2008)

1.8.3 Das RANK-RANKL-OPG-System

Eine zentrale Rolle in der Regulation des Knochenbaus spielt auch das RANK-RANKL-OPG-System. Der *Receptor Activator of NF-κB* (RANK) befindet sich unter anderem in der Zellmembran von Osteoklasten. Als Agonist, durch den die Osteoklasten aktiviert werden können, gilt der *Receptor Activator of NF-κB Ligand* (RANKL), der von osteoblastären Zellen sowie von aktivierten T-Lymphozyten produziert wird. (Bartl 2008) OB produzieren außerdem OPG, das aber als Decoy-Rezeptor an RANKL bindet. Dadurch wird der Ligand blockiert und die Aktivierung der Osteoklasten

verhindert. (Clarke 2008) RANKL und OPG können wiederum auch durch Vitamin D₃ und Östrogen regulatorisch beeinflusst werden (Bartl 2008).

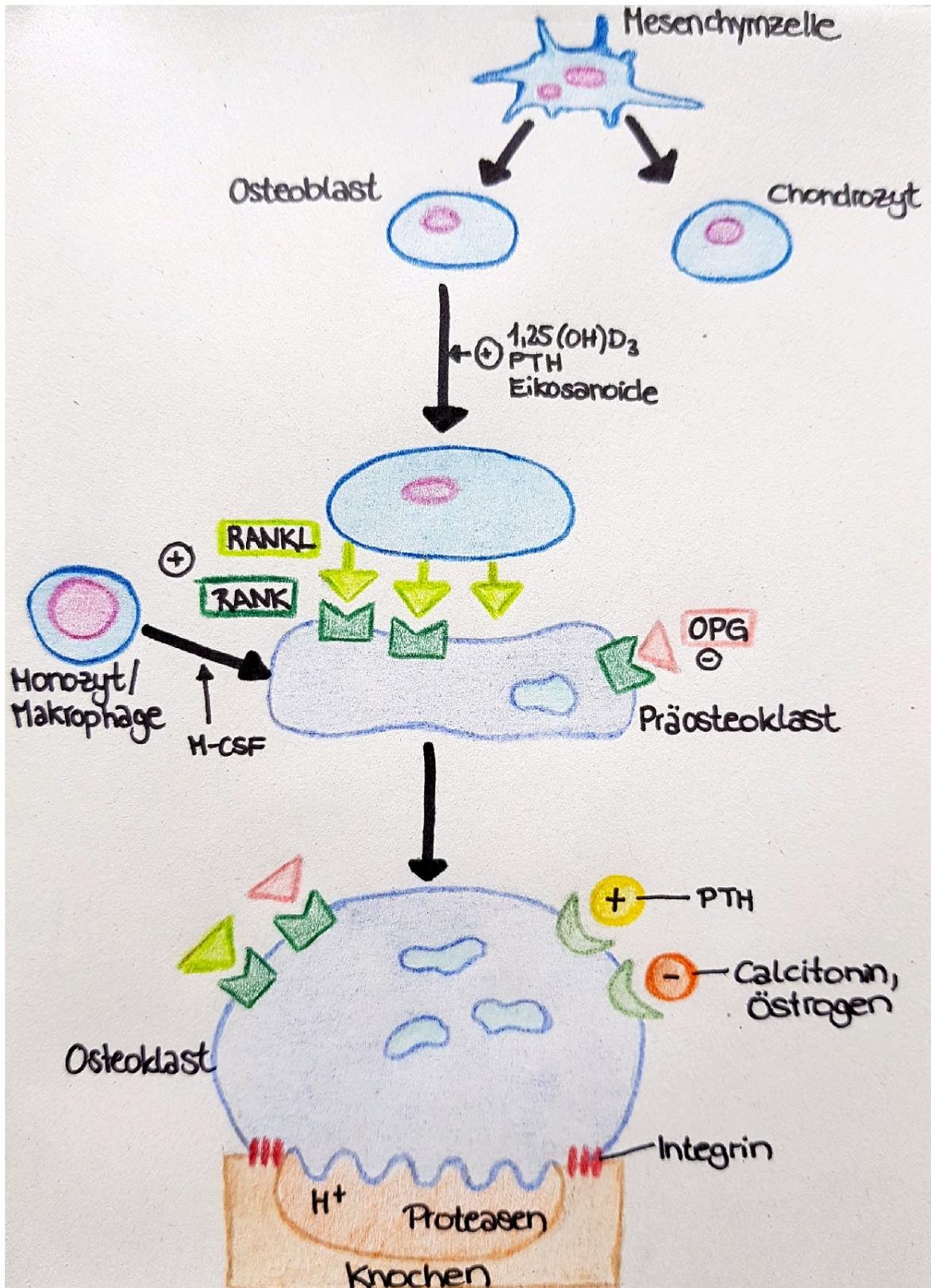


Abb. 2: Übersicht über Einflussfaktoren auf die Entstehung und Steuerung von OB und Osteoklasten (1,25 (OH)₃D = 1,25-Dihydroxy-Vitamin D, PTH = Parathormon, RANK = *Receptor Activator of NF- κ B*, RANKL = *Receptor Activator of NF- κ B Ligand*, OPG = Osteoprotegerin, M-CSF = *Macrophage colony-stimulating factor*/ Monozytenkolonien-stimulierender Faktor, H⁺ = Wasserstoffion) (In Anlehnung an (Bartl 2008))

1.8.4 Die Wirkung von Umwelteinflüssen auf den Knochenmetabolismus

Aber auch externe Einflüsse können gravierende Auswirkungen auf den Knochenmetabolismus haben. Hierzu zählen Lifestyle-Faktoren wie die Ernährung, Rauchen und exzessiver Alkoholkonsum, die Einnahme von Medikamenten wie Glucocorticoiden, eine Reihe von Erkrankungen wie der Diabetes mellitus oder chronisch entzündliche Darmerkrankungen ebenso wie nicht-veränderbare Faktoren, wozu das Lebensalter und das Geschlecht gezählt werden können. Dies sind aber nur ein paar wenige Beispiele für die große Bandbreite an äußeren Beeinflussungen. (Dachverband Osteologie e.V.) Die Konsequenzen bei Störung dieser Einflüsse reichen von mangelhafter Resorption von Metaboliten wie Calcium und Phosphat über veränderte Hormon-Konzentrationen bis zu einer erhöhten Konzentration von ROS (Parra-Torres et al. 2013).

1.9 Einfluss von reaktiven Sauerstoffspezies auf die Osteogenese

Als reaktive Sauerstoffspezies (ROS) werden Moleküle mit sehr hoher Reaktionsbereitschaft bezeichnet, deren Gemeinsamkeit ist, dass sie Sauerstoff-Moleküle (O_2) beinhalten. Sie alle enthalten ungepaarte Valenzelektronen oder instabile Bindungen. (Brieger et al. 2012) ROS können sowohl neutrale Moleküle (z. B. Wasserstoffperoxid (H_2O_2)), als auch Ionen (wie Superoxidanionen) oder Radikale (z. B. Hydroxyl-Radikale) sein. ROS übernehmen wichtige Funktionen in Apoptose und Bakterienabwehr, aber auch in Differenzierungs- und Entwicklungsprozessen. Beispiel für Quellen von Sauerstoffradikalen sind etwa die oxidative Phosphorylierung in Mitochondrien oder Enzyme wie die NADPH-Oxidase, aber auch epigenetische sowie externale Einflüsse (z. B. Strahlung) können zu ihrer Entstehung beitragen. Die Funktion der Moleküle ist vielfältig und abhängig von ihrer Konzentration am Wirkort sowie die Dauer ihrer Einwirkung. In geeigneter Menge – die abhängig von der jeweiligen Region ist – übernehmen sie wichtige Funktionen in verschiedenen Signalwegen, biosynthetischen Prozessen sowie einigen Abwehrmechanismen. Werden hohe Konzentrationen von ROS generiert, reagieren sie leicht mit Proteinen, Lipiden, Nukleinsäuren und weiteren Strukturen, was häufig irreversible Veränderungen oder sogar komplette Zerstörung von Strukturen oder Geweben hervorruft. Dies kann sich dann in kardiovaskulären Erkrankungen, Krebs, chronischen Entzündungen und vielen weiteren Pathologien äußern. Auch zu niedrige ROS-Konzentrationen haben negative Einflüsse und können zum Beispiel zu Hypothyreose oder einer verminderten mikrobiellen Abwehr führen. Ein völliges Fehlen der ROS-Produktion einzelner Strukturen führt zu gravierenden Erkrankungen wie der septischen Granulomatose. (Brieger et al. 2012; Abdollahi et al. 2005)

Geht das Gleichgewicht aus ROS und antioxidativen Schutzmechanismen verloren, sodass ROS überwiegen, wird dies als oxidativer Stress bezeichnet. Man geht davon aus, dass oxidativer Stress die Entstehung verschiedener chronischer Erkrankungen sowie den Alterungsprozess begünstigt. Vielfach wurde auch eine Assoziation zur Osteoporose-Entwicklung gezeigt. Bai et al. konnten zeigen, dass H_2O_2 in geringen Dosen durch Aktivierung von NF- κ B die Differenzierung von OB hemmt und hohe Dosen zum Zelltod führen. Gleichzeitig wird die Resorption des Knochens gefördert. (Bai et al. 2004)

Andersherum konnte festgestellt werden, dass eine verminderte Knochenneubildung und eine verminderte Zahl an OB einhergehen mit steigenden Mengen an ROS, verminderter Glutathion-Reduktase-Aktivität und einer gesteigerten Adipogenese (Kassem und Marie 2011). Diese dosisabhängige Wirkung von ROS beschränkt sich nicht auf den Knochen, sondern ist auch an anderen Zellkomponenten (z. B. Rezeptoren) und Signalwegen (unter anderem Komponenten des β -catenin/-Wnt-Signalwegs) nachzuweisen. Die Beeinflussung von Proteinen kann – abhängig von der Konzentration der ROS – von der Induktion eines Proliferations- und Zellzyklusarrestes bis hin zur Initiierung des Zelltods reichen. (Davalli et al. 2016) Weiterhin konnte gezeigt werden, dass oxidativer Stress zu einer Zunahme von inflammatorischen Zytokinen in vielen Geweben führt (Abdollahi et al. 2005).

Zu den natürlichen Schutzmechanismen, um ROS abzubauen, verfügt der Körper über antioxidative Enzyme (wie Superoxiddismutasen (SODs), Thioredoxin, Katalase und den Glutathion-Stoffwechselweg) und Radikalfänger (darunter Tocophenol (Vitamin E), Ascorbinsäure (Vitamin C), Carotenoide und Harnsäure). Die meisten Radikalfänger sind dabei diätetischen Ursprungs. (Brieger et al. 2012) Zu den Funktionsmechanismen der Antioxidantien zählen der enzymatische Abbau und das „Abfangen“ von ROS. Außerdem können einige Antioxidantien Metalle binden, die im freien Zustand die Produktion von ROS fördern würden. Bekannt dafür ist beispielsweise das Transferrin, das Fe- (Eisen-)Moleküle bindet. (Abdollahi et al. 2005)

Osteoklasten hingegen nutzen ROS. ROS dienen dem Abbau der Knochenmatrix und unterstützen den Knochenumbau. Außerdem werden die Bildung und Aktivität der Osteoklasten durch diese gefördert. (Abdollahi et al. 2005)

Knochenbestandteile	Wirkung von ROS
Osteoblasten	Differenzierungshemmung (Bai et al. 2004)
	Hemmung der Mineralisierung (Mody et al. 2001)
	Auslösung von Nekrose (Brayboy et al. 2001)
Osteoklasten	Steigerung der Aktivität (Fraser et al. 1996)
	Stimulierung der Bildung von Osteoklasten (Fraser et al. 1996)
	Resorption von Knochengewebe (Fraser et al. 1996)
Proinflammatorische Zytokine	Gesteigerte Expression (Sia et al. 2002)

Tabelle 1: Einfluss von ROS auf verschiedene Knochenbestandteile und Zellen
(In Anlehnung an (Abdollahi et al. 2005))

Potenzielle Mechanismen zur Reduktion hoher ROS-Konzentrationen sind die Minimierung der ROS-Generierung, das Fangen der Radikale und die Reparatur entstandener Schäden (Liochev 2013) sowie die Erhöhung von Antioxidantien (Martiniakova et al. 2020). Bereits klinisch eingesetzte Arzneimittel zeigen, dass die Beeinflussung ROS-metabolisierender Systeme förderlich wirken kann. Als Beispiel dafür kann das bei Gicht verwendete Allopurinol genannt werden, das durch Inhibierung der Xanthinoxidase die Bildung von ROS verhindert. Es gibt bereits verschiedene Forschungsansätze, gezielt ROS zu inhibieren. Wichtig dabei ist zu beachten, dass eine ungezielte, generalisierte Inhibierung von ROS fatale Auswirkungen haben kann (z. B. eine Inhibition der Atmungskette). (Brieger et al. 2012)

1.10 Die Rolle der Adipogenese im Knochenmetabolismus

Das Knochenmark beinhaltet nicht ausschließlich Knochenzellen; als weiterer Bestandteil können auch Adipozyten detektiert werden. Die abnehmende Knochendichte im Alter geht einher mit einem Anstieg der im Knochengewebe befindlichen Adipozyten (Ge et al. 2018). Sowohl OB als auch Adipozyten haben einen gemeinsamen Ursprung (Griffith et al. 2006); denn beide Zellreihen stammen von MSCs ab (Kassem und Marie 2011). Unter definierten Bedingungen sind MSCs nicht nur zur Selbsterneuerung fähig, sondern können sowohl zu OB und Adipozyten als auch zu Chondrozyten differenzieren. Auch ein Transdifferenzierungspotential gilt als erwiesen. Entscheidend dafür sind unterschiedliche Transkriptionsfaktoren. Während die Zahl der Knochenzellen bei Osteoporose abnimmt, steigt der Anteil von Fettzellen. Dies legt den Schluss nahe, dass es einige Zusammenhänge zwischen der Adipo- und der Osteogenese gibt. Es konnte zudem gezeigt werden, dass OB die Fähigkeit zur Dedifferenzierung besitzen, was auch die Zunahme an Fettgewebe im alternden Knochen erklären könnte. (Siggelkow 2008) Außerdem sind Proliferation und Funktion von MSCs bei altersinduziertem Knochenverlust vermindert. Ursache für die Imbalance zwischen OB und Adipozyten scheinen mitunter Veränderungen in den verantwortlichen Transkriptionsfaktoren (wie beispielsweise PPAR γ (Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor gamma)) zu sein. (Infante und Rodríguez 2018) Auch ein erhöhtes Maß an ROS hat Einfluss auf eine vermehrte Adipozyten-Differenzierung; denn hohe ROS-Konzentrationen können unter anderem die Expression des Kernrezeptors PPAR γ ändern. Und dieser ist einer der wichtigsten Transkriptionsfaktoren in der frühen Phase der Adipozyten-Differenzierung. (Rharass und Lucas 2019)

1.11 Die Katalase als Antioxidans

Die Katalase ist ein Enzym, das die Umwandlung von H₂O₂ in O₂ und Wasser katalysiert; daneben gibt es weitere ROS, die als Substrat dienen (z. B. Azide, Hydroperoxide) (Glorieux und Calderon 2017). Damit spielt die Katalase eine wichtige Rolle in der Kontrolle von potenziell schädlichen Radikalen. Es ist eines der am längsten bekannten Enzyme (Glorieux und Calderon 2017) und von bisher bekannten Antioxidantien hinsichtlich des Abbaus von Radikalen das Effektivste. Es ist in der Lage, sekundlich

etwa 10^7 Millionen H_2O_2 -Moleküle zu katalysieren, ohne dabei selbst freie Radikale zu erzeugen. (Goyal und Basak 2010) Insgesamt sorgt Katalase so für über 50 % des H_2O_2 -Umsatzes im menschlichen Körper (Glorieux und Calderon 2017).

Von den Katalasen können drei verschiedene Subtypen unterschieden werden, wobei nur die monofunktionale Katalase im menschlichen Organismus vorkommt. Sie hat eine Masse von 225 - 270 kDa und besteht aus vier identischen Untereinheiten. Jede dieser Untereinheiten enthält ein Häm-Molekül als prosthetische Gruppe, wobei das darin enthaltene Fe-Protoporphyrin-Molekül entscheidend zur Funktion des Enzyms beiträgt. Sie sind in einem weiten pH-Spektrum (5 - 10) funktionsfähig und wenig sensibel gegenüber Hitze. Die höchsten Aktivitäten des Enzyms findet man in der Leber und in Erythrozyten, gefolgt von der Niere, Fettgewebe, Lunge und Pankreas. Mit wenigen Ausnahmen ist sie fast in jedem Gewebe des menschlichen Körpers zu finden. (Goyal und Basak 2010)

Lokalisiert ist die Katalase in den Peroxisomen, allerdings existiert auch eine zytosolische Variante des Enzyms (Glorieux und Calderon 2017).

Die von der Katalase katalysierte Reaktion erfolgt in zwei Schritten. Zuerst reagiert das Fe-Molekül des Enzyms mit einem H_2O_2 -Molekül, wobei H_2O_2 reduziert und die Katalase oxidiert wird, sodass Wasser entsteht (Abb. 3, rechter Teil). Mit einem zweiten Molekül H_2O_2 werden sowohl das Radikal als auch die Katalase reduziert und O_2 oxidiert (Abb. 3, linker Teil). In Summe entstehen dabei aus zwei Molekülen H_2O_2 ein Molekül O_2 und zwei Moleküle H_2O . (Goyal und Basak 2010)

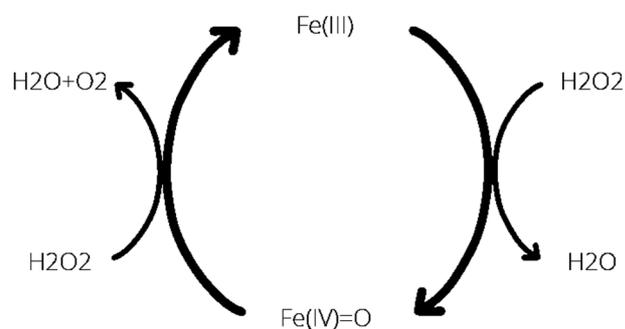


Abb. 3: Enzymatische Reaktion der Katalase

Zunächst wird das Enzym zu einem hypervalenten Fe-Produkt oxidiert. In einem zweiten Schritt wird mit Hilfe eines zweiten H_2O_2 -Moleküls der Ruhezustand wiederhergestellt. Je Zyklus werden so zwei Moleküle H_2O_2 zu H_2O und O_2 abgebaut.

Mit geeigneten Substraten kann die erste Verbindung, bestehend aus einem Fe-Ion und einem O_2 -Atom, auch bei niedrigen Radikal-Konzentrationen mit einem einzelnen Elektron zu einer weiteren – inaktiven – Verbindung reduziert werden. In dieser wird zwar das Porphyrinradikal reduziert, das Oxyferryl-Metallzentrum bleibt aber erhalten. (Glorieux und Calderon 2017)

Katalase hat vielerlei Funktionen; neben dem Schutz der Zellen vor oxidativem Schaden konnten Vetrano et al. auch eine gewisse Oxidase-Funktion nachweisen. Damit könnte das Enzym weitere Funktionen in Metabolismus und Entgiftung haben. (Vetrano et al. 2005)

Tierexperimentelle Versuche konnten zeigen, dass die Überexpression von Katalase die Lebensspanne verlängern kann. Ein Mangel des Enzyms hingegen scheint das Risiko für diverse Erkrankungen wie Diabetes mellitus Typ 2 und Hypertonie zu erhöhen. (Glorieux und Calderon 2017) Auch auf die Osteogenese hat die Katalase einen förderlichen Einfluss, der auch die schädigende Wirkung von ROS aufwiegen kann (Sahlender et al. 2022).

Neben der Katalase gibt es noch einige weitere Enzyme mit antioxidativer Funktion. Beispielhaft sind hier SODs und Glutathion-Reduktasen zu nennen (Zou et al. 2017).

1.12 Zelluläre Seneszenz von Osteoblasten

Ein Gewebe, das durch den Prozess der Zellalterung zelluläre Seneszenz erreicht, ist mitunter gekennzeichnet durch eine gesteigerte genomische Instabilität, einen vermehrten Zellabbau, einer Akkumulation von Zelltrümmern, epigenetischen Modifikationen, DNA-Mutationen, höhere ROS-Konzentrationen sowie Veränderungen in der Morphologie und dem Sekretionsverhalten. Zelluläre Seneszenz kann einen Zellzyklus-Arrest induzieren, der letztlich in der Apoptose münden kann. Die Entwicklung zellulärer Seneszenz in OB spielt eine entscheidende Rolle in der Entwicklung der Osteoporose. Die Zunahme an apoptotischen OB bei gleichzeitig verminderter Bildung neuer Zellen führt zu einer Abnahme der Knochendichte. Es gibt verschiedene Marker, um betroffene Zellen zu identifizieren und Zellalterung so messbar und vergleichbar zu machen. (Wei et al. 2018; Ogradnik 2021)

β -Galactosidase (β -Gal) ist ein Enzym, das nicht-reduzierende β -D-Galactose von verschiedenen Molekülen abspaltet (Maier et al. 2007). Aus Untersuchungen geht hervor, dass der Ursprung der mit Seneszenz assoziierten β -Gal in der lysosomalen β -Gal liegt (Lee et al. 2006).

Schon vor vielen Jahren wurde β -Gal in Studien als Marker für zelluläre Seneszenz beschrieben, da es von seneszenten Zellen vermehrt exprimiert wird (Dimri et al. 1995). *In vitro* korreliert die β -Gal-Konzentration negativ mit der Wachstumsgeschwindigkeit von Zellen. Dabei scheint die Konzentration vor allem vom Replikationsalter der Zellen und nicht vom chronologischen Alter des Lebewesens abzuhängen. (Maier et al. 2007)

Die genaue Funktion von β -Gal in alternden Zellen ist dabei bisher unklar. Vermutlich ist sie nur mit der Seneszenz der Zellen assoziiert, initiiert diese aber nicht. (Maier et al. 2007)

Durch den Zellzyklus-Arrest, der mit der Seneszenz einhergeht, kann die betroffenen Zelle nicht in die S-Phase des Zellzyklus eintreten (Dimri et al. 1995). Ein wichtiges Protein für die Initiierung dieses Arrestes ist p53 (Davalli et al. 2016). p53 ist in die Expression verschiedenster Gene involviert, die

zelluläre Prozesse steuern. Neben dem Zellzyklus zählen dazu auch Apoptose und Zelldifferenzierung. Basale Level des Proteins sind für die normale Funktion von Zellen notwendig. Eine Erhöhung der Konzentration des Proteins darüber hinaus ist aber mit einer Hemmung von Wachstum und Differenzierung sowie mit Seneszenz assoziiert. Auch durch Stress, beispielsweise durch ROS, wird p53 aktiviert. Hält diese Herunterregulierung von Wachstum und Differenzierung durch p53 zu lange an, können sich Erkrankungen entwickeln. (Nagpal und Yuan 2021) Es konnte bereits gezeigt werden, dass p53 bei von Osteoporose betroffenen Menschen verstärkt nachweisbar sind (Yu et al. 2020).

Zelluläre Seneszenz geht auch einher mit einer verminderten Stoffwechselaktivität von Zellen. Dazu gehört auch, dass entstehende Schäden an DNA, Lipiden und Proteinen nicht oder in geringerem Ausmaß beseitigt werden können und akkumulieren. Solche Defekte der DNA zu detektieren, stellt eine weitere Möglichkeit dar, Zellalterung erkennbar zu machen. (Davalli et al. 2016)

Histone sind Moleküle, die sich zu sogenannten Nukleosom-Komplexen zusammenschließen. Um diese Oktamere windet sich die DNA, um sie so zu kondensieren. H2AX ist eines dieser Histone und gehört zur Familie der H2A-Proteine. Kommt es zu Strangbrüchen in der DNA, werden innerhalb weniger Minuten mehrere hundert oder tausend H2AX-Moleküle phosphoryliert und fortan als γ -H2AX betitelt. Verschiedene Kinasen können die Strangbrüche detektieren, woraufhin sie die Phosphorylierung von H2AX durchführen. Führend scheint in diesem Prozess die Serin-Proteinkinase ATM (*Ataxia Teleangiectasia Mutated*). Im phosphorylierten Zustand wird das Protein an die Stelle des DNA-Bruchs rekrutiert. Erst nach Reparatur des Stranges wird γ -H2AX wieder dephosphoryliert. (Kuo und Yang 2008)

Das Molekül scheint in allen lebenden Organismen vorzukommen, wobei die Expression bei verschiedenen Zelllinien variiert. Neben Einzelstrangbrüchen sind es vor allem die Doppelstrangbrüche, die zur Produktion des phosphorylierten Proteins führen. Das Protein zeigt das Vorliegen von Doppelstrangbrüchen quantitativ an und ist somit ein sensitiver und früher Marker für Zellschäden sowohl in der Zellkultur als auch *in vivo*. (Kuo und Yang 2008)

1.13 Ziele der Arbeit

Die Osteoporose zählt mit mehr als 75 Millionen Betroffenen in den Vereinigten Staaten, Europa und Japan zu den häufigsten Knochenstoffwechselerkrankungen des alternden Menschen. Aufgrund der demographischen Entwicklung wird die Inzidenz noch weiter zunehmen. Die daraus häufig resultierenden Frakturen (mehr als 8,9 Millionen auf der Welt jährlich) haben einen relevanten Einfluss auf die Lebensqualität betroffener Patienten sowie auf das Gesundheitssystem. (Bonjour et al. 2004) Neben einer effizienten Therapie der Krankheit kommt daher auch der Früherkennung und Prävention eine entscheidende Rolle zu. Dazu ist es von Bedeutung, ein umfassendes Verständnis von Stoffwechselprozessen und Funktionen der Knochenzellen und möglichen Veränderungen im Alter zu erlangen sowie die Pathomechanismen der Erkrankung möglichst weiter zu entschlüsseln. Das daraus

resultierende Verständnis über den Knochen und die Erkrankung kann idealerweise dazu beitragen, direkte Ansatzpunkte für die Entwicklung von Therapien zu finden. Zu den bereits bekannten Mechanismen der Krankheitsentstehung gehören abnehmende zelluläre Funktionen und Teilungsraten von OB sowie die Zunahme von ROS im Alter.

Ein Ziel dieser Arbeit ist der Vergleich der OB von älteren Menschen mit Osteoporose, Osteopenie und einer Kohorte mit normaler Knochendichte, um mögliche Unterschiede zwischen diesen Gruppen zu detektieren. Diese Ergebnisse sollten erste Hinweise darauf liefern, ob und inwiefern sich die OB der Gruppen unterscheiden und sollten eine wichtige Grundlage sein, um die Ursachen von Knochenstoffwechselerkrankungen aufzuklären und etwaige neue Therapieoptionen ableiten zu können.

Ein weiterer Schwerpunkt der Arbeit liegt in der Evaluation des Einflusses von ROS auf OB älterer Menschen. Dabei wurde insbesondere der Einfluss auf die osteogene Differenzierung in den Fokus genommen. Auch wurde ein möglicher protektiver Einfluss von Antioxidantien untersucht.

Mittels Auswertung ebenfalls von den Spendern gewonnener Blutproben konnten viele weitere mögliche Parameter mit Einfluss auf den Knochenstoffwechsel analysiert werden.

Auch sollte die Adipogenese der OB als Marker der Knochenalterung und eine mögliche Fehlfunktion näher analysiert werden.

Darüber hinaus sollten mit Hilfe dieser Arbeit im Forschungslabor der Orthopädie und Unfallchirurgie des Universitätsklinikums Düsseldorf neue Methoden etabliert werden, um in Zukunft Knochenstoffwechselerkrankungen detailliert untersuchen zu können. Die daraus hervorgehenden Erkenntnisse sollen dann als Grundstein für weiterführende Forschung dienen mit dem Ziel, klinisch und therapeutisch relevante Erkenntnisse zur Behandlung von Osteoporose zu gewinnen.

2 Material

2.1 Geräte

Absauggerät	Laborport® Mini Vacuum Pump, #121435, KNF Neuberger, New Jersey, USA
Abzug	Laborabzug, Typ 2-453-DAHD, #017702, Köttermann
Autoclav	Systec DX-90, #9WV87-1273944, Systec GmbH, Linden, DE
Bildschirm	IPS-Monitor, 23 Zoll, LED-Display, #23MB35PM-B, LG Electronics Deutschland GmbH, Eschborn, DE
ChemiDoc Imager	ChemiDoc MP Imaging System, #12003154, Bio-Rad Laboratories GmbH, California, USA
Deckgläschen	Deckgläser 18 x 18 mm, #K11818, Engelbrecht GmbH, Edermünde, DE
Durchflusszytometer	BD Accuri™ C6 Plus, #660517, BD, Heidelberg, DE
Eisbad	neoLab Eisbad klein aus PS, innen 210 x 140 x 88 mm, #230116031, neoLab Migge GmbH, Heidelberg, DE
Eisbereiter	Manitowoc Flockeneisbereiter, Man-RF-0644-A, Manitowoc Ice, Manitowoc, USA
Elektrophorese-Apparatur	PowerPac™ Basic Power Supply, #1645050, BioRad Laboratories GmbH, California, USA
	Mini-PROTEAN Tetra Cell, #1658004, Bio-Rad Laboratories GmbH, California, USA
Gasbrenner	Fuego SCS basic, #8.201.000, WLD-TEC GmbH, Arenshausen, DE

Gefrierschrank	HERAfreeze HFC Series Ultra-Low Chest Freezer, HFC1390TV, #12354993, ThermoFisher Scientific™, Schwerte, DE
	Froster-720, #KIRSCH_7103, Philipp Kirsch GmbH, Willstätt-Sand, DE
Inkubator	Thermo Scientific™ Heracell™ 150i CO ₂ -Inkubator mit Edelstahlkammern, #51026282, Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
Kühlschrank	Laboratory Refrigerator SUPER-720-CHROMAT, #471-2550, Philipp Kirsch GmbH, Willstätt-Sand, DE
Laborschüttler	Kleinschüttler KM 2, #6113000, Edmund Bühler GmbH™
Magnetrührer	VWR Stirrer 620 Standard, 7 x 7 Glass Top, #12365-380, VWR International GmbH, Darmstadt, DE
Magnetrührstäbchen/-rührfische	Magnetstäbchen, #C267.1, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Mikroskope	Axio Vert.A1, #ZEISS-A1FL-R, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, DE
	Axiovert 200 Inverted Fluorescence Phase Contrast, #ZEISS-200-FLPH-R, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, DE
Mikroskop-Kamera	ZEISS AxioCam MRm, #426509-9901-000, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, DE
Minizentrifugen	Centrifuge MiniSpin®, nicht gekühlt, mit Rotor, #5452000010, Eppendorf AG, Hamburg, DE
	Heraeus™ Fresco™ 17 Mikrozentrifuge, gekühlt, #75002402, Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE

pH-Meter	Hanna Instruments HI 221 Calibration Check Microprocessor pH Meter, Hanna Instruments Deutschland GmbH, Vöhringen, DE
Pipetten	Eppendorf® 2, Einkanal, fix, 10 µl, mittelgrau, #L43.000217, Eppendorf, Wessling-Berzdorf, DE
	Eppendorf Research® plus, Einkanal, fix, 100 µl, gelb, #3124000075, Eppendorf, Wessling-Berzdorf, DE
	Eppendorf Research® plus, Einkanal, fix, 200 µl, gelb, #3124000083, Eppendorf, Wessling-Berzdorf, DE
	Eppendorf Research® plus, Einkanal, fix, 1.000 µl, blau, #3124000121, Eppendorf, Wessling-Berzdorf, DE
	Eppendorf Research® plus, 8-Kanal, variabel, 30 – 300 µl, orange, #3123000101, Eppendorf, Wessling-Berzdorf, DE
	Multipipette® M4, Einkanal, #4982000012, Eppendorf, Wessling-Berzdorf, DE
Pipettierhilfe	Pipettierhelfer accu-jet® pro, #2650, Brand®, Wertheim, DE
Reaktionsgefäß-Ständer	Mikroröhrchen-Racks, PP, Flipper™, #11550115, Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
	Combi-Rack für Reaktionsgefäße, 96 Plätze, #2-2572, neoLab Migge GmbH, Heidelberg, DE
Rollmischer	RM 5, Ingenieurbüro CAT, #60207-0070, M. Zipperer GmbH, Ballrechten-Dottingen, DE
Sonifizierer	UP50H - Compact Lab Homogenizer, #4064343394994, Hielscher Ultrasonics GmbH, Teltow, DE

Spektrometer	Eppendorf BioPhotometer 6131 Spectrometer, #17563, Eppendorf, Wessling-Berzdorf, DE
Stickstofftank	Locator™ Systeme für die Kryokonservierung (Rack & Box), #11825392, Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
Tastatur	Keyboard K120, #920-002516, Logitech Europe S.A., Lausanne, CH
Transfer-System (für Western Blot)	Trans-Blot Turbo Transfer System, #1704150, Bio-Rad Laboratories GmbH, California, USA
Victor X3	Victor X3 Multi-Mode Microplate Reader, #36966, Perkin Elmer Inc., Massachusetts, USA
Vortexer	neoLab Vortex Schüttler, stufenlos einstellbar 0 – 3.150 UpM, #7-2020, neoLab®, Heidelberg, DE
Waage	Sartorius ED224S lab balance, #EW-11219-04, Sartorius Lab Instruments GmbH & Co. KG, Göttingen, DE
	M-Prove Portable Balance, AY612, #EW-11220-44, Sartorius Lab Instruments GmbH & Co. KG, Göttingen, DE
Wärmeblock	Single block dry bath, FB15101, #88870001, Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
Wasserbad	Aqualine AL 12, #L000595, Lauda Dr. R. Wobser GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, DE
Werkbank	Thermo Scientific™ Herasafe™ KS 18, #51022715, Fischer Scientific GmbH, Schwerte, DE
Zählkammer	Zählkammer Neubauer, #PC73.1, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE

Zentrifuge	Heraeus™ Megafuge™ 16 Universalzentrifuge, #11779468, Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
------------	--

Tabelle 2: Liste der verwendeten Geräte

2.2 Verbrauchsmaterial

Abfallbehälter	MAUSER® WIVA VAT4 Container System, #WIVINF50, MAUSER Corporate GmbH, Brühl, DE
Autoklavierbeutel	Entsorgungsbeutel SEKUROKA® PP, 100 µm, 110 L, 1.100 x 700 mm, #XP68.1, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Autoklavier-Indikatorband	Comply™ Steam Indicator Tape, Class 1, #1322-18, 3M Deutschland, GmbH, Neuss, DE
Blotting-Papier	Blotting Filter Papers, 2,5 mm thick, 7,5 x 8,4 cm, #11599056, Invitrogen™, Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
Einmalhandschuhe	Micro-Touch®, Nitra-Tex™, Nitrile, Powder-Free, Examination Gloves, #700112, Ansell Europe, Brüssel, Belgien
Einmalspritzen	Injekt® 2 ml, #4606027V, Braun, Melsungen, DE
	Injekt® 5 ml, #4606051V, Braun, Melsungen, DE
	Injekt® 10 ml, #4606108V, Braun, Melsungen, DE
Einmalpipetten	Costar® STRIPETTE® 5 ml Serological Pipets, #4487, Corning Incorporated, New York, USA
	Costar® STRIPETTE® 10 ml Serological Pipets, #4488, Corning Incorporated, New York, USA

	Costar® STRIPETTE® 25 ml Serological Pipets, #4489, Corning Incorporated, New York, USA
Entsorgungsbeutel + Ständer	Vernichtungsbeutel 200 x 300 mm + Tischständer, #95.1297, Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, DE
Eppis	Eppendorf Safe-Lock Tubes, 0,5 ml, #0030121023, Eppendorf, Wessling-Berzdorf, DE
	Eppendorf Safe-Lock Tubes, 1,5 ml, #0030120086, Eppendorf, Wessling-Berzdorf, DE
	Eppendorf Safe-Lock Tubes, 2,0 ml, #0030120094, Eppendorf, Wessling-Berzdorf, DE
Falcons, 50 ml	Sarstedt Tube 50 ml, 114 x 28 mm, PP, #62.547.254, Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, DE
Falcons, 15 ml	Greiner Bio-One™ Cellstar™ Teströhrchen, #10384601, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
Filterpapier	Folded Filters, 3 hw, 110 mm, 65 g/m², #10468742, Sartorius Lab Instruments GmbH & Co. KG, Göttingen, DE
Flächendesinfektionstücher	Schülke wipes, #70000162, Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, DE
Glaspipette	Pasteurpipette, Natron-Kalk-Glas, Lang ausgezogen, feine Spitze, 225 mm, #747720, BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim, DE
Händedesinfektionsmittel	Sterilium Classic Pure, #9804681, Hartmann AG, Heidenheim, DE

Instrumenten-Desinfektionsmittel	Sekusept TM Plus, #3030910, Ecolab®, Monheim am Rhein, DE
Küvette	Halb-Mikro-Küvette, 3 ml aus PS, #67.742, Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, DE
Kryo-Röhrchen	Cryo.S TM , 2 ml, PP, runder Boden, Innengewinde, #10751761, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
Membran (für Transfer beim WB)	Nitrocellulose Membrane, Roll, 0,2 µm, 30 cm x 3,5 m, #1620112, Bio-Rad Laboratories GmbH, California, USA
Papiertücher	Facial Tissues WEPA prestige, #206450, WEPA Professional GmbH, Arnsberg, DE
Petrischalen (14,5 cm Durchmesser)	Zellkultur Schale, PS. 145/20 mm, Nocken, Cellstar® TC, steril, #639160, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
Pipettenspitzen	10 µl TipOne® Pipettenspitzen, graduiert, #S1111-3700, Starlab International GmbH, Hamburg, DE
	200 µl TipOne® Pipettenspitzen, graduiert, #S1111-0700, Starlab International GmbH, Hamburg, DE
	1.000 µl TipOne® Pipettenspitzen, graduiert, #S1111-6700, Starlab International GmbH, Hamburg, DE
	Combitips advanced®, Eppendorf Quality TM , 5 ml, blau, farblose Spitzen, #0030089456, Eppendorf, Wessling-Berzdorf, DE
Reservoir für Reagenzien	VWR® Disposable Pipetting Reservoirs, Polystyrene Reservoirs, 100 ml, sterile, #89094-656, VWR International GmbH, Darmstadt, DE
Schälchen zum Wiegen	Wiege-Schälchen, 5 ml, #G3909-1, Plano GmbH, Wetzlar, DE

Sterilfilter	Nalgene™ 25 mm-Spitzenfilter, SFCA, Porengröße 0,2 µm, steril, #15332388, Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
Stift (zur Beschriftung der Petrischalen)	Securline® Lab Marker, Fine Tip, Black, Aspen Surgical, #1400-20-PDC, Caledonia, Michigan, USA
Verschlussfolie	Parafilm® M All-Purpose Laboratory Film, #PM996, Bemis Company Inc., Neenah, US
Verschlussfolie, selbstklebend (für ELISA-Platte)	Polyesterfilme für ELISA und allgemeine Inkubation, unsteril, #SY091A, VWR International GmbH, Darmstadt, DE
Wischtücher	KIMTECH SCIENCE Präzisionstücher - weiß/klein, #7552, KIMBERLY-CLARK PROFESSIONAL™, Koblenz/Rheinhafen, DE
Zellkulturplatten	CELLSTAR® 6 Well Cell Culture Plate, #657160, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
	CELLSTAR® 12 Well Cell Culture Plate, #665102, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
	CELLSTAR® 24 Well Cell Culture Plate, #662102, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
	Greiner Bio-One Microplatte 96 Wells, PS, F-Boden, Transp., #655061, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
Zellschaber	TPP-Zellspachtel, fix, 14 mm, #99010, TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
	Costar cell lifter, 19 mm blade x 180 mm handle, #3008, Corning Incorporated, New York, USA

Tabelle 3: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien

2.3 Substanzen

4-Nitrophenol	4-Nitrophenol solution, 10 mmol, #N7660, Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, DE
β -Glycerophosphat	β -Glycerophosphate disodium salt hydrate, #G9422, Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, DE
γ -H2AX-Antikörper	Anti- γ H2.A.X (phospho S140) antibody, #ab22551, abcam, Berlin, DE
Alizarinrot S	Alizarin red S mono sodiumsalt (C.I. 58005), #106278, Merck KGaA, Darmstadt, DE
Amphotericin	Amphotericin B, Gibco™, #15290026, Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
Anti-mouse-Antibody	Polyclonal Goat Anti-Mouse Immunoglobins/HRP (affinity isolated), #P044701-2, Agilent, Santa Clara, USA
Anti-rabbit-Antibody	Polyclonal Goat Anti-Rabbit Immunoglobins/HRP (affinity isolated), #P044801-2, Agilent, Santa Clara, USA
Aqua dest.	Ampuwa® Spüllösung 1.000 ml Plastipur®, #1088811, Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, DE
Bromphenolblau	Bromphenolblau Natriumsalz, 10 g, #A512.1, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
BSA (Bovines Serumalbumin)	Albumin Fraktion V, 200 g, $\geq 98\%$, #8076.4, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
CellTiter Blue®	CellTiter-Blue® Reagent, #G8081, Promega GmbH, Walldorf, DE
Cetylpyridinium-Chlorid	1-Cetylpyridiniumchlorid-Monohydrat, #840008, Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, DE
Ciprofloxacin	Ciprofloxacin, #17850, Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, DE

Dexamethason	Dexamethasone, powder, BioReagent, suitable for cell culture, $\geq 97\%$, #D4902, Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, DE
Dimethylformamide	N,N-Dimethylformamide, #D4551, Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, DE
Entwicklerlösung (WB)	Immobilon Forte Western HRP substrate, 100 ml, #WBLUF0100, Millepore, Merck KGaA, Darmstadt, DE
	INTERCHIM UPTIMA UptiLight US WBlot HRP Chemiluminescent Substrate, #58372B, Interchim, Montlucon, France
Eosin-Lösung	Eosin G-Lösung 0,5 % wässrig, 500 ml, #X883.1, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Ethanol	Ethanol absolute for analysis, EMSURE®, #100983, Merck KGaA, Darmstadt, DE
FBS	FBS superior; standardized fetal bovine serum, 500 ml, #S0615, Biochrom AG, Berlin, DE
Fe ₂ SO ₄	Iron (II) sulfate heptahydrate, #215422, Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, DE
Gelatine	Gelatin from porcine skin, 100 g, #G1690, Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, DE
Gentamycin	Molecular Probes Gentamycin (10 mg/ml), Gibco™, #11500506, Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
Glycerol	Glycerin, 1 L, Kunst., ROTIPURAN®, #3783.1, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Glycin	Glycin, 1 kg, #3908.2, PUFFERAN®, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Hämalaun	Hämalaunlösung sauer nach Mayer, 500 ml, #T865.1, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE

Hepes	HEPES solution, 1 M, pH 7,0 – 7,6, sterile-filtered, #H3375, BioReagent, suitable for cell culture, Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, DE
Indomethacin	Indomethacin, #17378, Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, DE
Insulin	Insulin human, recombinant, expressed in yeast (proprietary host), #I2643, Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, DE
Isopropanol 99,5 %	2-Propanol, #818766, Emplura®, Merck Schuchardt OHG, Hohenbrunn, DE
Katalase	Catalase from bovine liver, aqueous suspension, 10.000 – 40.000 units/mg protein, #C30, Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, DE
Kollagenase IV	Collagenase, Type IV, powder, Gibco™, #17104019, Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
L-Ascorbin-2-Phosphat	L-Ascorbic acid 2-phosphate sesquimagnesium salt hydrate, #A8960, Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, DE
Medium	DMEM/F-12, Gibco™, #11320074, Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
	DMEM, high glucose, Gibco™, #41965039, Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
	DMEM, low glucose, pyruvate, Gibco™, #31885023, Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
Mercaptoethanol	2-Mercaptoethanol, 250 ml, #M3148, Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, DE
Methanol	Methanol, 2,5 L, Kunst., ROTINPURAN®, ≥ 99,9 %, #4627.2, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE

Methylisobutylxanthin	3-Isobutyl-1-methylxanthine, $\geq 99\%$ (HPLC), powder, #I5879, Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, DE
MnTBAP	MnTBAP, 25 mg, #475870, EMD Millipore Corp., USA, Affiliate of Merck KGaA Darmstadt, DE
NaCl (Natriumchlorid)	Natriumchlorid, 1 kg, $\geq 99,5\%$, p. a., ACS, ISO, #3947.1, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Natrium-Desoxycholat	Desoxycholsäure Natriumsalz (DOC), 10 g, $\geq 98\%$, #3484.1, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
NP-40 (Nonylphenoxypolyethoxyethanol)	N3500 Nonidet-P40 substitute, #9036-19-5, United States Biological, Salem, Massachusetts, USA
Ölrot O	Oil red O (C.I. 26125), #1.05230, Merck KGaA, Darmstadt, DE
p53-Antikörper	p53 Antibody, #9282, Cell Signaling Technology®, Frankfurt am Main, DE
Paraformaldehyd	Paraformaldehyd EMRPOVE® ESSENTIAL DAC, #1.04005, Merck KGaA, Darmstadt, DE
PBS	SIGMA® Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, #D8537, Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, DE
Penicillin-Streptomycin	10.000 U/ml Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin, #4251184105142, PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, DE
Propidiumjodid	Propidium iodide, $\geq 94\%$ (HPLC), #P4170, Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, DE
Protease-Inhibitor	cOmplete™, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail, #11836170001, Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, DE

Protein-Gel (WB)	4 - 20 % Mini-PROTEAN® TGX Stain-Free™ Protein Gels, 15 well, 15 µl, #4568096, BioRad Laboratories GmbH, California, USA
Proteinmarker (WB)	ROTI®Mark WESTERN PLUS, 2 y 250 µl, #2245.2, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
PSG (Penicillin-Streptomycin-Glutamin)	L-Glutamine-Penicillin-Streptomycin solution, with 200 mmol L-glutamine, 10.000 U penicillin and 10 mg streptomycin/ml in 0,9 % NaCl, sterile-filtered, BioReagent, suitable for cell culture, #G1146, Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, DE
SDS (Sodium Dodecyl Sulfate)	SDS, 250 g, #0183.2, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Staurosporin	Staurosporine Solution in Ethyl Acetate, 100 µg, #sc-360258, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA
Tris	TRIS, 1 kg, PUFFERAN®, ≥ 99,3 %, #AE15.2, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Tris-Base	Tris Base, Calbiochem, Millipore, #648310, Merck KGaA, Darmstadt, DE
Tris-HCl (Tris-Hydrogenchlorid)	Tris, Hydrochloride, Calbiochem, Millipore, #648317, Merck KGaA, Darmstadt, DE
Trypanblau	Trypan Blue solution, #T8154, Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, DE
Trypsin	Trypsin-EDTA 10X, #X0930, Sterile Filtered, biowest SAS, Nuaille, France
Tween 20	Tween® 20, Sigma-Aldrich, #P9416, Merck KGaA, Darmstadt, DE
Vdr-Antikörper	VDR (D-6): #sc-13133, Santa Cruz Biotechnology®, Dallas, USA

Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Hydrogen peroxide solution, #216763, contains inhibitor, 30 wt. % in H ₂ O, ACS reagent, Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, DE
---	--

Tabelle 4: Liste der verwendeten Substanzen

2.4 Medien

Adipogenes Differenzierungsmedium	<ul style="list-style-type: none"> • DMEM (low Glucose) • 350 µmol Insulin • 60 mmol Methylisobutylxanthin • 56 mmol Indomethacin • 10 µmol Dexamethason • 10 % FBS • PSG (200 mmol L-glutamine, 10.000 U Penicillin, 10 mg Streptomycin/ml)
Blottingpuffer	<ul style="list-style-type: none"> • Transferpuffer • Methanol • H₂O
Kultivierungsmedium	<ul style="list-style-type: none"> • DMEM/F-12 • 10 % FBS • 1 % Hepes • 1 % Penicillin-Streptomycin • Gentamycin (10 mg/ml) • Ciprofloxacin (10 mg/ml)
Laemmli-Puffer	<ul style="list-style-type: none"> • 252 mmol Tris-HCl • 40 % Glycerol • 8 % SDS • 0,01 % Bromphenolblau • 20 % Mercaptoethanol • H₂O
Laufpuffer	<ul style="list-style-type: none"> • 25 mmol Tris, pH 8,3 – 8,8 • 192 mmol Glycin • 0,1 % SDS • H₂O
Osteogenes Differenzierungsmedium	<ul style="list-style-type: none"> • DMEM (4,5 g/L Glucose) • 10 % FBS • 1 % Penicillin-Streptomycin • Gentamycin (10 mg/ml) • Ciprofloxacin (10 mg/ml) • 500 nmol Dexamethason • 500 µmol L-Ascorbin-2-Phosphat • 10 mmol β-Glycerophosphat
RIPA-Puffer (nach Abcam)	<ul style="list-style-type: none"> • 50 mmol Tris HCl (pH 8) • 150 mmol NaCl • 1 % NP-40 • 0,5 % Natrium-Desoxycholat • 0,1 % SDS • H₂O
TBS	<ul style="list-style-type: none"> • 7,7 mmol Tris (pH 7,5) • 150 mmol NaCl

	<ul style="list-style-type: none"> • H₂O
TBS-T	<ul style="list-style-type: none"> • 7,7 mmol Tris (pH 7,5) • 150 mmol NaCl • 0,1 % Tween 20 • H₂O
Transferpuffer	<ul style="list-style-type: none"> • 12 mmol Tris-Base • 96 mmol Glycin • H₂O

Tabelle 5: Liste der verwendeten Medien

2.5 Kits

Katalase-ELISA	Catalase Activity Assay Kit, #PK-CA577-K773, PromoCell GmbH, Heilberg, Germany
OPG-ELISA	Human TNFRSF11B (OPG) ELISA Kit, #EHTNFRSF11B, Thermo Scientific™ Pierce™, Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
Proteinkonzentrationsbestimmungs-Kit	Pierce™ BCA Protein Assay Kit, #23225, Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
RANKL-ELISA	Human TRANCE/RANK L/TNFSF11 DuoSet ELISA, #DY626, R&D systems®, Minneapolis, USA
Senescence β-Galactosidase Staining Kit	#9860, Cell Signaling Technology®, Frankfurt am Main, Germany

Tabelle 6: Liste der verwendeten Kits

2.6 Software

Bildanalyse-Software	Image Lab™ (Version 6.0.1), Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, US
Literaturverwaltungsprogramm	Citavi, Swiss Academic Software GmbH, Wädenswil, Schweiz
Mikroskop-Software	ZEN 2.0, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, DE
Statistik-Software	Prism 5 (Version 5.01), GraphPad Software Inc., San Diego, US

Tabellenkalkulations-Software	Excel 2016, Microsoft Corporation, Redmond, US
Textverarbeitungs-Software	Word 2016, Microsoft Corporation, Redmond, US

Tabelle 7: Liste der verwendeten Software

3 Methoden

3.1 Probenmaterial

In dieser Arbeit wurden primäre humane OB älterer Patienten miteinander verglichen. Die OB wurden aus Hüftköpfen isoliert, die im Rahmen notwendiger Implantationen von Hüft-Endoprothesen gewonnen wurden. Dieser Eingriff wurde bei Personen mit Arthrose des Hüft-Gelenkes oder Fraktur des proximalen Femurs durchgeführt. Der Ethikantrag „Erstellung einer Biobank für OB und Osteoklasten zur Aufklärung von molekularbiologischen Zusammenhängen der Osteoporose“ (Aktenzeichen/ Studiennummer 5585R) zur Verwendung und Lagerung der Proben wurde gestellt und bewilligt. Anhand von Knochendichtemessungen wurden die Patienten beziehungsweise die isolierten Osteoblasten in drei Versuchsgruppen unterteilt. Probanden mit normaler Knochendichte oder Arthrose als Vorerkrankung bilden die Kontrollgruppe, Probanden mit verminderter Dichte des Knochens wurden den Gruppen Osteopenie (T-Wert -1 bis -2,5 SD) und Osteoporose (T-Wert ab - 2,5 SD) zugeteilt. Die teilnehmenden Frauen und Männer waren zwischen 49 und 90 Jahre alt, mit einem Durchschnittsalter von 77,1 Jahren. Dabei betrug das durchschnittliche Alter der Gruppe mit normaler Knochendichte 76,3, der Probanden mit Osteopenie 76,5 und das der Osteoporose-Betroffenen 78,5 Jahre.

3.2 Auftauen der Osteoblasten

Die gefrorenen OB wurden im Wärmebad zügig zu $\frac{2}{3}$ aufgetaut. Ein schnelles Arbeiten schützt hierbei die OB vor dem toxischen Einfluss des im Einfriermedium enthaltenen DMSO, das die Bildung von Eiskristallen während des Einfrierprozesses verhindert. Anschließend wurden sie mit etwa 1 ml Kultivierungsmedium (bestehend aus DMEM/F-12, 10 % FBS, 1 % HEPES, 1 % Penicillin-Streptomycin, Gentamycin (10 mg/ml) und Ciprofloxacin (10 mg/ml)) vollständig resuspendiert und in eine Petrischale ($\varnothing = 14,5$ cm) pipettiert, in der 35 ml Kultivierungsmedium vorgelegt wurden.

Durch leichtes Schwenken wurden die OB im Kultivierungsmedium verteilt und dann bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Nach 24 h erfolgte der Mediumwechsel mit dem gleichen Medium. In der Regel wurde dieses anschließend 2- bis 3-mal wöchentlich gewechselt. Dabei wurde das Kultivierungsmedium zuvor auf Raumtemperatur (RT) gebracht.

3.3 Passagieren der Osteoblasten

Sobald die OB eine 80 %-ige Konfluenz erreicht hatten, wurden sie gesplittet. Nach Abnahme des Kultivierungsmediums und Waschen der OB mit PBS wurden etwa 7 ml 1 %-iges Trypsin-EDTA in die Petrischale ($\varnothing = 14,5$ cm) gegeben, um die Zellen abzulösen. Unter stetiger Kontrolle wurden die OB für 5 – 10 min bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Durch Klopfen der Schale gegen einen festen

Untergrund kann das *Detachment* der Zellen gefördert werden. Um eine zu lange Andauung durchs Trypsin zu vermeiden, wurden verbleibende adhärenente OB, falls nötig, mittels eines Schabers abgelöst. Mit der gleichen Menge an Kultivierungsmedium wurde die enzymatische Reaktion des Trypsins gestoppt. Die Zellsuspension wurde dann bei 300 g für 5 min gefügt. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet - auf mehrere Petrischalen ($\varnothing = 14,5$ cm) verteilt - erneut ausgesät.

3.4 Zellzahlbestimmung mittels Neubauer-Zählkammer

Etwa 20 μ l Zellsuspension wurde in die Zählkammer appliziert. Gezählt wurden alle OB der vier Großquadrate. Damit Zellen auf den Begrenzungslinien nicht doppelt gezählt wurden, wurden nur OB auf zwei der vier Linien in die Zählung einbezogen. Anschließend dividierte man die erhaltene Zahl durch die Anzahl der gezählten Großquadrate und die Zellzahl pro ml wurde berechnet, indem die erhaltene Zahl mit 10^4 als Kammerfaktor multipliziert wurde.

$$\text{Zellzahl/ml} = \frac{\text{gezählte Zellen}}{4 \text{ Großquadrate}} \times 10^4 \text{ (Kammerfaktor)}$$

3.5 Einfluss von Antioxidantien auf die osteogene Differenzierung der Osteoblasten

In diesem Versuch wurden OB auf 24-Well-Platten ausgesät. Bei Konfluenz wurden die OB für 21 d osteogen differenziert. Außer der Kontroll-OB wurden die OB zusätzlich zum osteogenen Differenzierungsmedium (OM) (mit den Bestandteilen DMEM (4,5 g/L Glucose), 10 % FBS, 1 % Penicillin-Streptomycin, Gentamycin (10 mg/ml), Ciprofloxacin (10 mg/ml), 500 nmol Dexamethason, 500 μ m L-Ascorbin-2-Phosphat und 10 mmol β -Glycerophosphat) additiv mit 62,5 U/ml Katalase bzw. ia Kat, 50 μ mol H_2O_2 , 50 μ mol Fe_2SO_4 oder 25 μ mol MnTBAP behandelt.

Für die Versuche haben wir Rinder-Katalase verwendet. Diese weist einige Unterschiede in der Aminosäuresequenz im Vergleich zur Katalase von Säugetieren wie der des Menschen auf. Da die funktionell relevanten Bereiche aber identisch sind, kann von einer vergleichbaren Funktion des Enzyms ausgegangen werden. (Kirkman und Gaetani 2006)

Die für mit ia Kat inkubierten Proben wurde die Katalase zuvor bei 95 °C für 30 min hitze-inaktiviert. Ein Mediumwechsel des Differenzierungsmediums erfolgte 2-mal wöchentlich. Die Auswertung erfolgte mittels CellTiter-Blue[®]- und des Alkalischen Phosphatase-Assays (AP-Assay) an Tag 0, 7, 14 und 21. Weiterhin wurde an Tag 0 und 21 eine Alizarinrot S-Färbung durchgeführt sowie an Tag 21 eine Färbung mit Ölrot.

3.6 Nachweis der Kalziumexposition mittels Alizarinrot S-Färbung

(Stanford et al. 2021)

Diese Färbung wurde zur Bestimmung der osteogenen Differenzierung genutzt; denn OB exponieren Kalzium in die extrazelluläre Matrix, was sich mit Hilfe der Alizarinrot S-Lösung visualisieren und der Cetylpyridinium-Chlorid-Lösung (CPC) quantifizieren lässt.

Das OM wurde abgenommen und die OB mit PBS gewaschen, danach wurden sie mit jeweils 0,5 ml 4 %-igem PFA in PBS für 15 min bei RT fixiert. Der Überstand wurde anschließend verworfen und die OB mit Aqua dest. gewaschen. Mit zugegebener Alizarinrot S-Lösung (pH 4,2) wurden die OB für 20 min bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

Für die Lösung wurden zuvor 0,25 g Alizarinrot S auf 50 ml mit Aqua dest. aufgefüllt und durch Schwenken aufgelöst. Für den weiteren Versuch wurde zudem eine 10 %-ige CPC-Lösung angesetzt, indem 4 g CPC in 40 ml Aqua dest. gelöst wurden.

Im Anschluss an die Inkubation wurden die OB so lange mit Aqua dest. gespült, bis der Überstand farblos war. Zur Rücklösung des Alizarinrot S-Farbstoffes wurden für 1 h 0,5 ml CPC-Lösung auf die OB gegeben, bis die Matrix vollständig entfärbt war. Nach Überführung des Überstandes in Küvetten konnte die optische Dichte (OD) 600 fotometrisch ermittelt werden. Bei starker Farbreaktion wurden die Überstände zuvor 2-, 10- oder 20-fach mit Aqua dest. verdünnt. Das Ergebnis des Tags 0 wurde von den Ergebnissen des Tags 21 abgezogen. Anschließend wurden die Werte auf OM = 1 normiert. Für jeden Spender wurde eine Vierfachbestimmung durchgeführt.

3.7 Viabilitätsmessung mit CellTiter-Blue®

(Promega Corporation 2016)

Um über die Viabilität auf die Zellzahl zurückzuschließen, wurden die OB mit CellTiter Blue® (CTB) in Kultivierungsmedium (1:20-Verdünnung) bei 37 °C und 5 % CO₂ für 1 h kultiviert. Der mitgeführte Blank (CTB mit Kultivierungsmedium versetzt) wurde für dieselbe Zeit im Brutschrank inkubiert. Der Brutschrank darf innerhalb dieser Zeit nicht geöffnet werden, da dies aufgrund der Lichtsensibilität von CTB das Ergebnis verfälschen würde.

Lebende OB reduzieren den enthaltenen blauen Farbstoff Resazurin in den violett fluoreszierenden Farbstoff Resorufin. Die Beziehung zwischen Zellzahl und Fluoreszenz ist hierbei linear.

Nach der Inkubation wurden je 100 µl des Mediums in eine 96-Wells-Platte überführt und die Emission im Victor X3 (bei $\lambda = 590$ nm) gemessen. Um die OB im Anschluss für weitere Versuche nutzen zu können, wurden sie mit PBS gewaschen und für mindestens 1 h in Kultivierungsmedium bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

3.8 Messung der Osteoblasten-Aktivität anhand des AP-Assay

AP ist ein Marker für die osteoblastäre Aktivität (Sharma et al. 2013).

Um diese zu messen, wurde zunächst der Überstand abgenommen und die OB 2-malig mit PBS gewaschen. Danach wurde die *4-Nitrophenol Solution* für 5 – 15 min im Dunkeln bei RT auf die Zellen gegeben.

Die AP hydrolysiert 4-Nitrophenolphosphat zu 4-Nitrophenol und anorganischem Phosphat. Das entstandene 4-Nitrophenol liegt komplexiert als gelbes 4-Nitropholat vor, dessen Absorption bei OD 405 gemessen werden kann und die proportional zur Enzymaktivität ist. (Fanjul-Bolado et al. 2006)

Vom Überstand wurden jeweils 100 µl pro Well auf eine 96-Wells-Platte überführt und die Auswertung am Victor X3 vorgenommen. Ein Blank wurde mitgeführt und von den erhaltenen Ergebnissen abgezogen. Bei Werten > 1 wurden die Überstände vor einer erneuten Messung 1:11 mit Aqua dest. verdünnt.

Um eine Aussage über die AP-Aktivität der einzelnen OB treffen zu können, wurde ein relativer AP-Wert ermittelt, indem der Quotient aus AP- und den zugehörigen CTB-Werten gebildet wurde. Wegen der interpersonellen Unterschiede wurde der Tag 0 jeweils mathematisch auf 1 gesetzt und die anderen Werte entsprechend ins Verhältnis gesetzt. Jede Patientenprobe wurde für den Kultivierungszeitraum in Doppelbestimmung angesetzt und die Analyse erfolgte zusätzlich als technisches Replikat.

3.9 Adipogene Differenzierung von Osteoblasten

Um das adipogene Differenzierungspotential der OB zu beurteilen, wurden die OB nach Erreichen 80 %-iger Konfluenz für 2 Wochen in adipogenem Differenzierungsmedium (bestehend aus DMEM (low Glucose), 300 µmol Insulin, 60 mmol Methylisobutylxanthin, 56 mmol Indomethacin, 10 µmol Dexamethason, 10 % FBS und PSG (200 mmol L-glutamine, 10.000 U Penicillin, 10 mg Streptomycin/ml)) kultiviert. Ein Wechsel dieses Differenzierungsmediums erfolgte 2-mal wöchentlich. An Tag 14 erfolgte die Färbung mittels Ölrot und anschließend die Bestimmung der Absorption bei $\lambda = 540$ nm mit dem Victor X3.

3.10 Nachweis des adipogenen Differenzierungspotentials von Osteoblasten mittels Ölrot

Das adipogene Differenzierungsmedium wurde abgenommen und die OB mit PBS gewaschen. Mit 300 µl/Well (einer 24-Well-Platte) 4 %-igem PFA wurden die OB danach bei RT für 5 min fixiert. Anschließend wurden die OB erneut mit PBS gewaschen, bevor sie für 15 min mit je 300 µl der Ölrotlösung bei RT überschichtet wurden, um die Triglyceride in den fixierten OB anzufärben.

Zur Herstellung der Ölot-Lösung wurden zuvor 0,5 g Ölot (408,5 g/mol) in 100 ml 99,5 %-igem Isopropanol gelöst. Sechs Teile dieser Stammlösung wurden dann mit vier Teilen Aqua dest. zur gebrauchsfertigen Lösung verdünnt. Diese wurde steril filtriert (Partikelrückhalt bis zu einer Größe von 8 – 12 μm), auch, um sie von größeren Farbpartikeln zu befreien.

Nach dem Färben erfolgte das Waschen mit Aqua dest. bis der Überstand farblos war. Zur Rücklösung wurden die OB mit 200 μl 99,5 %-igem Isopropanol pro Well überschichtet und für 15 min auf einem Taumler inkubiert. Danach wurde der Überstand in eine neue 24-Well-Platte überführt, um störende Einflüsse durch die OB und die kalzifizierte Matrix bei der spektrometrischen Messung zu vermeiden. Diese Proben wurden bei $\lambda = 540 \text{ nm}$ im Victor X3 gemessen. Für jeden Spender wurden vier technische Replikate mitgeführt und daraus der Mittelwert gebildet.

Für das Experiment zur Beurteilung der adipogenen Differenzierung von OB wurde die Versuchsdurchführung folgendermaßen optimiert:

Die Ölot-Stocklösung wurde aus 0,4 g Ölot und 100 ml Isopropanol hergestellt und diese anschließend filtriert. Die Gebrauchslösung, bestehend aus 6 ml Stocklösung und 4 ml Aqua dest., wurde vor Verwendung durch ein 0,2 μl -Sieb gegeben, um grobe Partikel zu entfernen. Die OB wurden mit PBS gewaschen und mit 500 μl PFA fixiert. Anschließend erfolgte das 2-malige Waschen mit Aqua dest.. Die Ölot-Gebrauchslösung (500 μl /Well) wurde für 10 min auf die OB gegeben. Nach Entfernung des Überstandes wurde für 3 min mit Leitungswasser gewaschen. Nach einem weiteren Waschdurchlauf mit Aqua dest. wurden die OB ebenfalls mit 200 μl Isopropanol überschichtet und für 15 min auf dem Taumler inkubiert. Danach erfolgte die Bestimmung der Absorption bei $\lambda = 540 \text{ nm}$ mit dem Victor X3.

3.11 ELISA zum Nachweis der Osteoprotegerin-Expression

Der ELISA wurde mit dem „Human TNFRSF11B (OPG) ELISA Kit“ von Thermo Scientific durchgeführt.

Er wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Dazu wurde primär eine Standardreihe hergestellt. Auf die 96-Well-Platte wurden dann je 100 μl der Standards und die mit Diluent B 1:4 verdünnten OB-Proben pipettiert. Von jedem Standard und auch jeder Probe wurden hierbei zwei technische Replikate angefertigt.

Nach Inkubation der Proben über Nacht bei 4 °C wurde der Überstand abgenommen und gewaschen. Anschließend wurde jedes Well mit 100 μl des 80-fach verdünnten Antikörper-Konzentrats befüllt und die Platte für 1 h unter leichtem Schütteln bei RT inkubiert. Nach erneutem Waschen kamen 100 μl Streptavidin-HRP in jedes Well und die Platte wurde erneut inkubiert, damit das Reagenz an den Antikörper binden konnte. Wieder wurde 4-malig gewaschen. Um den später messbaren Farbausschlag zu induzieren, wurden die Proben im Anschluss mit je 100 μl Tetramethylbenzidin-Substrat (TMB) für

ca. 15 min im Dunkeln bei RT unter stetigem Schwenken inkubiert. Unter stetiger Kontrolle der TMB-Wirkung wurde die Reaktion nach deutlicher Gelbfärbung der Proben und klar erkennbarem Standard mit jeweils 50 µl der Stopp-Lösung beendet. Mit dem Victor 3X wurde im Anschluss die Absorption bei $\lambda = 450$ nm gemessen.

3.12 Protein-Konzentrationsbestimmung

Diese wurde mit Hilfe des BCA Protein Assay Kit von Thermo Scientific™ durchgeführt.

Die verwendeten Proben wurden dabei stetig auf Eis gehalten. Um die OB aufzuschließen, wurden sie bei 50 Watt mit einer Ultraschallfrequenz von 30 kHz mit zehn Stößen sonifiziert. Danach wurden die Proben 1:6 mit PBS verdünnt. Im nächsten Schritt wurde mittels PBS ein BSA-Standard hergestellt. Weiterhin wurde das BCA-Working Reagenz laut Anleitung des Herstellers vorbereitet.

In eine 96-Well-Platte wurden Standard und Proben in Doppelbestimmung pipettiert, das Working-Reagenz wurde ergänzt. Nach der Inkubation (37 °C, 1 h) erfolgte die Auswertung mittels Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von $\lambda = 562$ nm mit dem Victor X3. Anhand der Ergebnisse konnten die Proben entsprechend vorbereitet werden, um eine vergleichbare Proteinmenge in der Western Blot-Analyse zu verwenden.

3.13 Western Blot-Analyse des Vitamin D-Rezeptors, von p53 und γ -H2AX

Die hierfür verwendeten OB wurden auf 6-Well-Platten ausplattiert und nach Erreichen von Konfluenz geerntet. Dazu wurden die OB mit Hilfe von 1 %-igem Trypsin-EDTA abgelöst und die Reaktion mit Kultivierungsmedium gestoppt. Nach 5-minütigem Zentrifugieren bei 300 g und Entfernen des Überstandes wurde das Pellet in 1 ml PBS resuspendiert. Nach nochmaliger Zentrifugation mit 12.100 g für 5 min und Absaugen des Überstandes wurden je nach Pellet-Größe 30 – 70 µl RIPA-Puffer auf die Proben gegeben und diese bis zur weiteren Verwendung bei - 80 °C eingefroren.

Vor Verwendung der Lysate wird die Proteinkonzentration in µg/µl (siehe oben) bestimmt, um eine einheitliche Proteinmenge zu verwenden. Um Proben mit 20 µg Protein in einem Volumen von 10 µl zu erhalten, wurde der errechnete benötigte Probenanteil mit Aqua dest. auf 10 µl aufgefüllt. Im Anschluss wurden zur Trennung der Proteine zu jeder Probe 4 µl Laemmli-Puffer (verdünnt mit Mercaptoethanol) gegeben. Es folgte die Zentrifugation für 2 min bei 17.000 g. Danach wurden die Proben für 5 min bei 95 °C erhitzt und anschließend direkt auf Eis gegeben.

Zur Vorbereitung der Gelelektrophorese wurde das zur Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe genutzte 4 – 20 %-ige Polyacrylamidgel in die Elektrophorese-Kammer eingespannt und die Kammer mit Laufpuffer aufgefüllt. Dann wurden 5 µl eines Proteinmarkers sowie je 17 µg Protein der Proben in die Lanes des vorbereiteten Gels gegeben. Der Durchlauf wurde zunächst mit 80 V gestartet und im

Verlauf nach und nach auf bis 180 V erhöht. Mittels UV-Licht-Aktivierung des *ChemiDoc Imagers* können die Proteine im Gel sichtbar gemacht und vor der Weiterverarbeitung des Gels fotodokumentiert werden. Nachfolgend wurde der Transfer der Proteine auf das Blotting-Papier vorbereitet. Dazu wurden eine Membran, gefolgt vom Blotting-Papier, dem Gel und einer weiteren Membran, alles getränkt mit Transferpuffer, übereinandergelegt und ins Trans-Blot Transfer System von biorad gelegt, um die Proteine aus dem Gel auf die Membran zu transferieren. Im Anschluss an den Transfer wurde die Blotting-Membran für 1 h im Dunkeln auf dem Rollmischer mit 5 %-igem BSA inkubiert, um unspezifische Bindungen zu blocken. Über Nacht folgte dann eine Inkubation mit den Antikörpern (siehe Tabelle 8) bei 4 °C auf dem Rollmischer.

Primärantikörper		Zweitantikörper	
	Verdünnungsfaktor		Verdünnungsfaktor
vdr	1:500	-	-
p53	1:1000	anti-rabbit	1:1000
γ -H2AX	1:2000	anti-mouse	1:1000

Tabelle 8: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper in ihrer entsprechenden Verdünnung

Die Antikörper vdr, p53 und γ -H2AX wurden entsprechend der oben genannten Verhältnisse mit BSA verdünnt, daran gekoppelt wurden mit TBS-T verdünnte Zweitantikörper.

Am nächsten Tag wurde die Membran 3-mal mit je 10 ml TBS-T für 5 min auf dem Rollmischer gewaschen. Es folgte die Bilddokumentation mit dem *ChemiDoc imager* zur Detektion des direkt gekoppelten vdr-Antikörpers. Der Nachweis von p53 und γ -H2AX erfolgte nach jeweiliger Inkubation (1 h) mit dem entsprechenden Zweitantikörper (siehe Tabelle 8) im Dunkeln, anschließendem 2-fachen Waschvorgang und zur Detektion der Banden mittels Chemilumineszenz Zugabe der Entwicklerlösung „Immobilon Forte Western HRP substrate“ von Millepore, indem erneut Bilder mit dem *ChemiDoc Imager* generiert wurden. Im Nachgang wurde die Membran bei 4 °C in TBS aufbewahrt, um sie falls nötig erneut entwickeln zu können.

Mittels *image Lab* wurden die erstellten Bilder ausgewertet. Dazu wurde die Stärke der generierten Banden ermittelt, die mit der Stärke der Proteinexpression korreliert und diese immer mit der entsprechenden Kontrolle verglichen. Normiert wurden diese Werte auf Totalprotein.

3.14 Durchführung des β -Galactosidase-Assays

Die Ausführung erfolgte mittels des Senescence β -Galactosidase Staining Kits von Cell Signaling Technology®.

Dafür wurden die verwendeten OB bis zu 80 %-iger Konfluenz inkubiert. Nach Waschen der OB mit PBS erfolgte die Fixierung nach Herstellerangaben für 10 – 15 min. Dem darauffolgenden

Waschvorgang schloss sich die Zugabe der Färbelösung an. Mit dieser wurden die OB über Nacht bei 37 °C inkubiert. Dabei werden Doppelstrangbrüche, die als Marker für Zellschäden gelten (Kuo und Yang 2008), durch Blaufärbung markiert. Am Folgetag konnte die Färbung der OB und damit ein Schaden der DNA mittels Mikroskopie quantitativ beurteilt werden. Um einzelne OB besser voneinander abgrenzen zu können, erfolgte eine zusätzliche Färbung der Zellen mit Hämatoxylin-Eosin (siehe unten).

3.15 Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung

Dazu wurde für 2 – 3 min zügig Hämalaun-Lösung in die Wells gegeben, um den Zellkern anzufärben. Zum Bläuen wurde im Anschluss für 5 – 10 min Leitungswasser auf die OB gegeben. Im zweiten Schritt wurden die OB für maximal 30 sec mit Eosin angefärbt und überflüssige Farbrückstände anschließend durch Waschen mit Aqua dest. entfernt, wodurch das Zytoplasma rötlich angefärbt wird.

3.16 Einfluss von verschiedenen Fe-Konzentrationen auf die Viabilität der OB

Um die Wirkung von Fe auf die Viabilität von OB beurteilen zu können, wurden OB in einer 24-Well-Platte ausgesät und der Versuch bei Erreichen 80 %-iger Konfluenz begonnen. Dafür wurden die OB zusätzlich zum OM additiv mit Fe_2SO_4 (25 – 150 μmol) behandelt. Die Versuchsreihe wurde in Quadruplets angesetzt. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C und 5 % CO_2 über 21 d. Nach 2 – 3 d wurde ein Mediumwechsel mit OM durchgeführt. Die Auswertung wurde nach 11 und 21 Tagen Inkubation mit CTB vorgenommen, indem bei einer Wellenlänge von $\lambda = 590 \text{ nm}$ mit dem Victor X3 die Absorption gemessen wurde. Dafür wurden jeweils zwei technische Replikate einer Probe analysiert und der entsprechende Mittelwert gebildet.

3.17 Auswirkung verschiedener Katalase-Konzentrationen auf die Differenzierung von Osteoblasten

Zum Nachweis des Potentials der ROS-abbauenden Katalase wurden OB verschiedener Spender für drei Wochen osteogen differenziert. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Katalase-Konzentration von 62,5 U/ml verwendet. Es sollte überprüft werden, ob höhere Konzentrationen des Antioxidans einen stärkeren Einfluss auf die OB haben. Neben den ausschließlich in OM inkubierten Kontroll-OB wurden die anderen Proben mit 62,5 oder 150 U/ml Katalase behandelt. Die Auswertung erfolgte an Tag 21 durch Färbung mit CTB, Messung der Aktivität der AP und Alizarinrot S-Färbung.

3.18 Katalase-Aktivitäts-Assay

Der Aktivität der Katalase wurde mit dem „Catalase Activity Assay Kit“ von PromoKine untersucht.

In eine 96-Well Platte wurden in Doppelbestimmung die zu analysierenden Katalase-Proben gegeben. Neben in OM gelöster Katalase (62,5 U) wurden noch verschiedene Proben hitzeinaktivierter (30 min bei 95 °C) Katalase (ia Kat, 62,5 U) in Doppelbestimmung untersucht. Die ia Kat wurde zum einen in 200 µl PBS oder aber im OM analysiert. Die Katalase in OM war dazu entweder frisch inaktiviert worden oder die Inaktivierung war vor 24 h bzw. 4 d erfolgt. Das war auch die längste Zeitspanne, die die OB in den übrigen Versuchen bis zum Mediumwechsel im selben OM kultiviert wurden. Zudem wurde eine Positiv-Kontrolle aus dem Kit mitgeführt. Alle Proben wurden mit Assay Puffer auf 78 µl aufgefüllt.

Zur angesetzten High Control wurde direkt die Stopp-Lösung gegeben und die Probe für 5 min bei 25 °C inkubiert, um die Katalase-Aktivität komplett zu inhibieren. Eine Standard-H₂O₂-Reihe wurde nach Herstellerangaben in die Wells pipettiert. Auch hier wurde direkt die Stopp-Lösung ergänzt.

Um die Katalase-Reaktion zu starten, wurden alle Proben mit H₂O₂-Lösung versetzt und die Platte für 30 min bei 25 °C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion in den Proben und der Positiv-Kontrolle durch Zugabe der Stopp-Lösung beendet. Auf alle Proben wurde nun der Entwicklungs-Mix gegeben und die Platte für 10 min bei 25 °C erneut inkubiert. Abschließend konnte die Reaktion mit Hilfe des Victors X3 (OD 570) analysiert werden. Mit den gemessenen Werten und den Angaben im Protokoll wurde die Aktivität der Katalase errechnet.

3.19 Datenauswertung

Die Daten aller Versuche wurden mit Excel gesammelt und gegebenenfalls direkt analysiert. Die graphische Darstellung und statistische Auswertung erfolgte letztlich mittels GraphPad Prism.

In einigen der durchgeführten Versuche war die Zahl der Probanden, insbesondere in der Gruppe mit normaler Knochendichte, recht klein. Mit Blick auf alle durchgeführten Testungen lag sie zwischen $n = 2$ und $n = 12$. Ursächlich war das nur begrenzt zur Verfügung stehende Spender-Material. Daher war eine Testung auf Normalverteilung mit dem verwendeten Programm Prism GraphPad nicht immer möglich. Trotzdem wurde aufgrund von vorausgegangenen Erfahrungen davon ausgegangen, dass auch die Daten in den Gruppen mit geringen n -Zahlen normalverteilt sind. Die statistische Testung erfolgte mittels *One-way* oder *Two-way ANOVA* und *Bonferroni's post-tests*.

4 Ergebnisse

Das Ziel dieser Arbeit war es, ein besseres Verständnis von OB älterer Menschen (n = 29, Ø 77 Jahre) zu erlangen. Dazu sollten OB von Probanden mit normaler Knochendichte (Kontrollen) (Ø 76 Jahre) mit OB von Patienten mit einer Osteopenie (Ø 77 Jahre) und Osteoporose (Ø 79 Jahre) verglichen werden. Dafür wurde unter anderem der Einfluss von Antioxidantien auf die Proliferation, die osteogene Differenzierung und andere osteoporose-relevante Parameter beurteilt.

4.1 Einfluss von Antioxidantien auf die osteogene Differenzierung von Osteoblasten

Um den Einfluss von Antioxidantien auf die osteogene Differenzierung zu untersuchen, wurden die OB von Patienten mit einer normalen Knochendichte mit denen von Spendern, die an einer Osteopenie oder Osteoporose leiden, verglichen. Die OB wurden für 21 d mit osteogenem Differenzierungsmedium (OM) und additiv mit den Antioxidantien Katalase und Mangan(III)-Tetrakis-(4-Benzoesäure)-Porphyrin Chlorid (MnTBAP), sowie inaktivierter Katalase (ia Kat), Eisen(II)-Sulfat (Fe_2SO_4) oder Wasserstoffperoxid (H_2O_2) als relativ langlebiges ROS und Signalmolekül inkubiert.

Katalase als antioxidatives Enzym baut H_2O_2 ab. In dieser Arbeit sollte die Wirkung des Enzyms auf OB der drei Gruppen näher analysiert werden. Dazu wurde vergleichend auch ia Kat im Experiment verwendet. Weiterhin wurden die OB mit Fe in Form von Fe_2SO_4 , das sich auch im aktiven Zentrum der Katalase befindet und an der Funktion des Enzyms beteiligt ist, inkubiert. Als weiteres Antioxidans wurde ein Mimetikum der SOD, MnTBAP, verwendet.

Als Maß für die osteogene Differenzierung wurde das Potential der OB, eine kalzifizierte extrazelluläre Matrix zu bilden, mittels Alizarinrot S-Lösung analysiert.

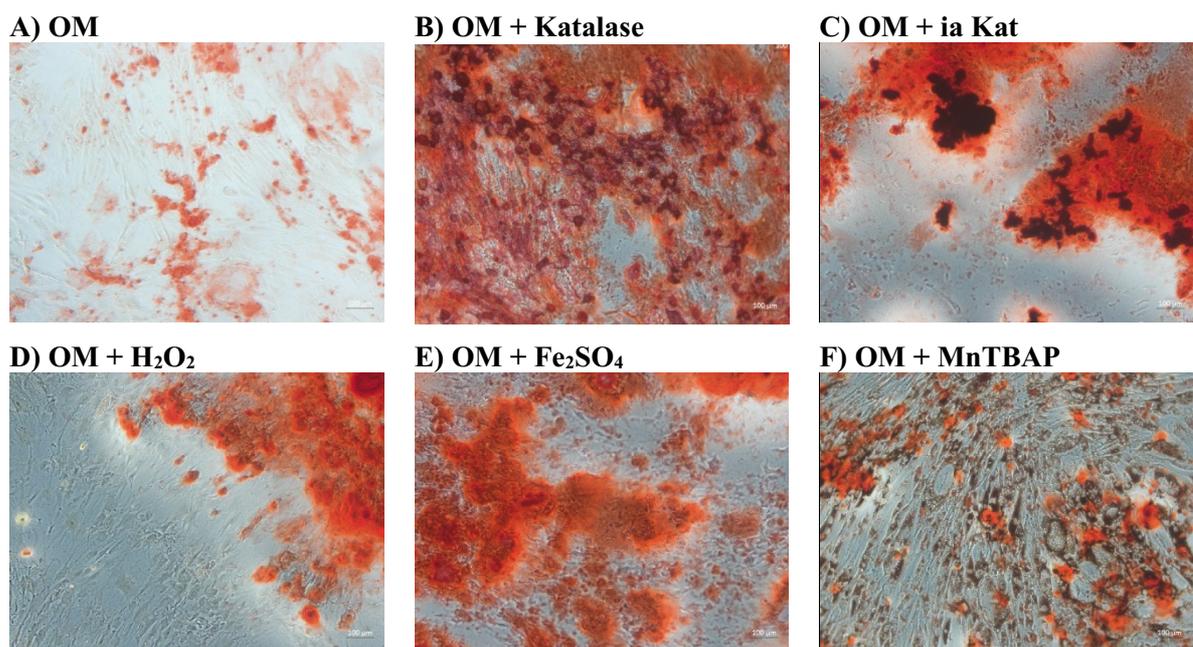


Abb. 4: Visualisierung der kalzifizierten Matrix der OB mit Alizarinrot S-Lösung

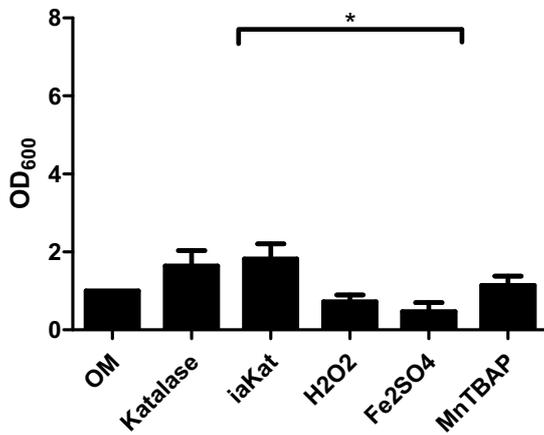
Färbung nach 21-tägiger Kultivierung mit OM (A), sowie zusätzlich mit Katalase (62,5 U/ml) (B), ia Kat (62,5 U/ml) (C), H_2O_2 (50 μmol) (D), Fe_2SO_4 (50 μmol) (E) oder MnTBAP (25 μmol) (F). Der Maßstabsbalken entspricht einer Länge von 100 μm .

Die Mikroskopieaufnahmen stellen den unterschiedlichen Einfluss der Antioxidantien auf die osteogene Differenzierung exemplarisch am Beispiel eines Spenders dar. Die kalzifizierte Matrix wird durch die Alizarinrot S-Lösung rot angefärbt. Eine vermehrte Bildung von kalzifizierender Matrix als Maß für eine verstärkte osteogene Differenzierung Matrix konnten vor allem die Katalase, die ia Kat und das Fe_2SO_4 induzieren. (Abb. 4)

Zur Bewertung der Differenzierung wurde die Färbung in einem zweiten Schritt mittels Cetylpyridinium-Chlorid (CPC) zurückgelöst und diese quantifiziert.

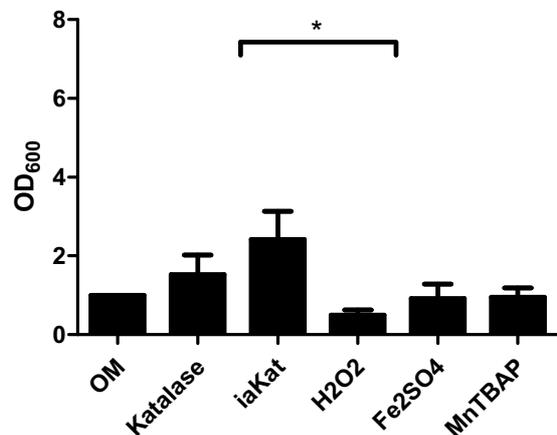
A)

normale Knochendichte



B)

Osteopenie



C)

Osteoporose

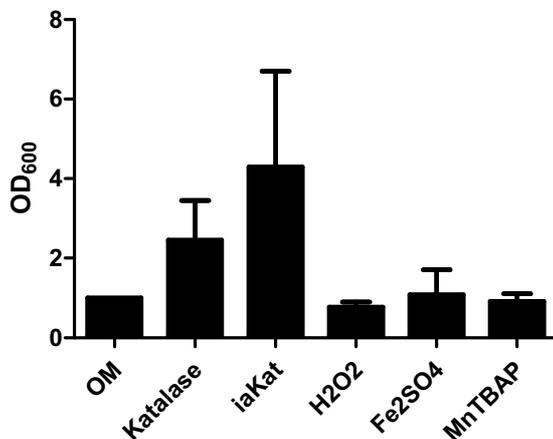


Abb. 5: Einfluss von Antioxidantien auf die osteogene Differenzierung

Quantifizierung der osteogenen Differenzierung von Probanden mit normaler Knochendichte (A), Osteopenie- (B) und Osteoporosespendern (C) nach 21-tägiger Inkubation mit OM, sowie zusätzlich mit Katalase (62,5 U/ml), ia Kat (62,5 U/ml), H₂O₂ (50 µmol), Fe₂SO₄ (50 µmol) oder MnTBAP (25 µmol). Sowohl die Katalase als auch die ia Kat fördern die osteogene Differenzierung in allen Gruppen. * = signifikant mit $p \leq 0,05$. Normiert wurde auf OM. (n = 5 – 8)

Nach einem 21-tägigen Differenzierungszeitraum zeigte sich dabei in der Gruppe mit normaler Knochendichte tendenziell eine verbesserte osteogene Differenzierung durch die Katalase und die ia Kat

(Abb. 5, A). Noch mehr wurde die osteogene Differenzierung in der Osteopenie- und Osteoporosegruppe durch Zugabe von Katalase oder ia Kat gesteigert (Abb. 5, B und C). In der Osteoporosegruppe wurde durch Zugabe von ia Kat eine 5-fache Steigerung der osteogenen Differenzierung im Vergleich zur Kultivierung in OM erzielt. In der Gruppe der Spender mit Osteopenie konnte durch die Kultivierung mit Katalase im Vergleich zur Kultivierung mit H₂O₂ eine signifikant gesteigerte osteogene Differenzierung nachgewiesen werden.

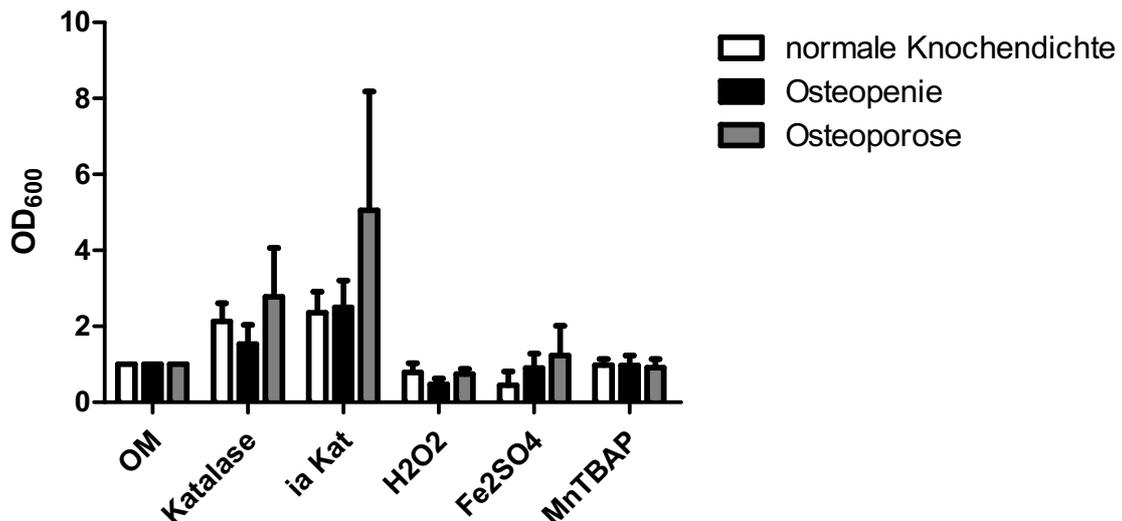


Abb. 6: Übersicht über den Einfluss von Antioxidantien auf die osteogene Differenzierung

Vergleich der osteogenen Differenzierung von Spendern mit normaler Knochendichte, Osteopenie- und Osteoporosespendern nach 21-tägiger Inkubation mit OM, sowie zusätzlich mit Katalase (62,5 U/ml), ia Kat (62,5 U/ml), H₂O₂ (50 µmol), Fe₂SO₄ (50 µmol) oder MnTBAP (25 µmol). Katalase und ia Kat steigern die Osteogenese bei den Probanden mit Osteoporose stärker als in der Gruppe mit unauffälliger Knochendichte. Normiert wurde auf OM. (n = 5 – 8)

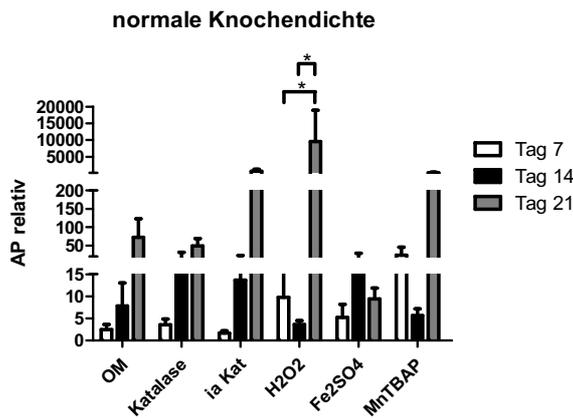
Im direkten Vergleich der drei Gruppen zeigte sich, dass die osteogene Differenzierung durch Zugabe der Katalase verstärkt werden kann. Auch durch die ia Kat wurde eine verbesserte Osteogenese beobachtet, insbesondere in der Osteoporosegruppe.

4.2 Vergleich der Aktivität der alkalischen Phosphatase

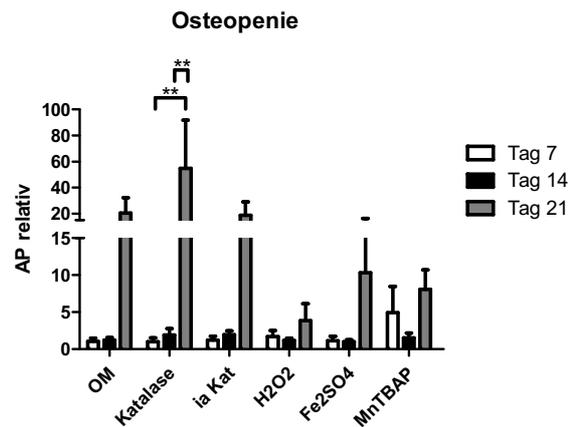
Alkalische Phosphatase (AP) übernimmt eine relevante Rolle in der Knochenmineralisation und wird von den OB sekretiert (Grabowski 2009). Somit ist die AP ein idealer Marker zur Beurteilung der osteoblastären Funktion.

Die relativen AP-Werte sind in den folgenden Abbildungen (Abb. 7 und Abb. 8) visualisiert. Dabei ist zu beachten, dass aufgrund der starken Messunterschiede zwischen den drei Versuchsgruppen unterschiedliche Skalierungen der Graphen verwendet wurden.

A)



B)



C)

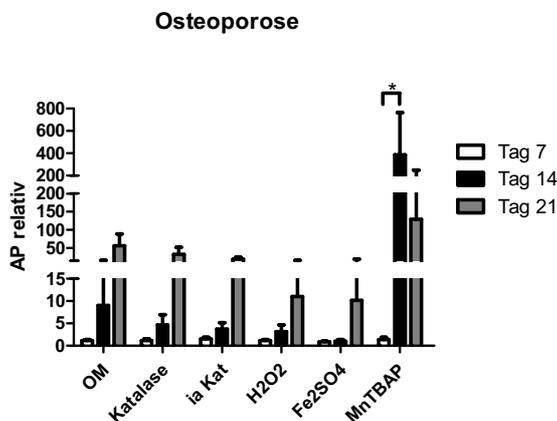


Abb. 7: Einfluss von Antioxidantien auf die Aktivität der alkalischen Phosphatase

An Tag 7, 14, und 21 wurde die Aktivität der AP in den Gruppen normale Knochendichte (A), Osteopenie (B) und Osteoporose (C) bestimmt; über diesen Zeitraum hinweg wurden die OB mit OM, sowie zusätzlich mit Katalase (62,5 U/ml), ia Kat (62,5 U/ml), H₂O₂ (50 µmol), Fe₂SO₄ (50 µmol) oder MnTBAP (25 µmol) kultiviert.

Überall war ein Anstieg der AP-Aktivität im zeitlichen Verlauf zu verzeichnen. * = signifikant mit $p \leq 0,05$; ** = signifikant mit $p \leq 0,01$. Normiert wurde auf Tag 0. (n = 6 – 8)

Die Kultivierung in OM, Katalase und ia Kat führte Gruppen-unabhängig über den zeitlichen Verlauf der Inkubation hinweg zu einem Anstieg der AP. Am deutlichsten war dies in der Osteopeniegruppe

(Abb. 7, B), mit einer signifikant erhöhten Aktivität an Tag 21 im Vergleich zu Tag 7 und 14 unter Kultivierung mit Katalase.

In der Gruppe der osteoporotischen Spender (Abb. 7, C) bewirkte auch das MnTBAP eine deutliche Steigerung der AP-Aktivität, wobei die stärkste Aktivierung – mit signifikantem Unterschied zu Tag 7 – an Tag 14 erreicht werden konnte.

Überraschenderweise bewirkte auch H₂O₂ eine Steigerung der AP-Enzymaktivität im Vergleich zur Behandlung ausschließlich mit OM, allerdings ausschließlich in der Gruppe mit normaler Knochendichte. Hier war die verzeichnete AP-Aktivität an Tag 21 signifikant höher als an Tag 7 und 14.

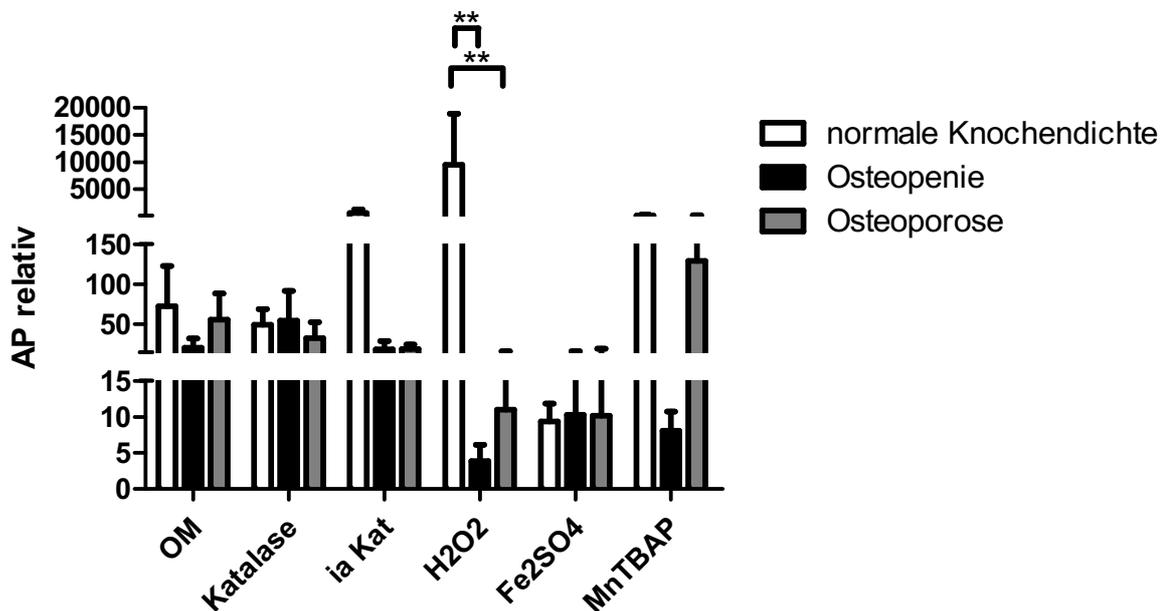


Abb. 8: Übersicht über die AP-Aktivität von OB

Verglichen wurden die drei Spendergruppen unter den Kultivierungsbedingungen allein mit OM, sowie zusätzlich mit Katalase (62,5 U/ml), ia Kat (62,5 U/ml), H₂O₂ (50 µmol), Fe₂SO₄ (50 µmol) oder MnTBAP (25 µmol) nach 21-tägiger Kultivierung und anschließender Messung der AP-Aktivität. Steigerungen in der AP-Aktivität im Vergleich zur Behandlung mit OM waren fast ausschließlich in der Gruppe mit normaler Knochendichte zu verzeichnen. ** = signifikant mit $p \leq 0,01$. (n = 5 – 8)

Im direkten Vergleich der Gruppen an Tag 21 (Abb. 8) zeigte sich, dass die Zugabe von ia Kat, H₂O₂ und MnTBAP die AP-Aktivität der OB in der Gruppe mit normaler Knochendichte besonders förderten. Darüber hinaus steigerte MnTBAP die AP-Aktivität der OB aber auch in der Osteoporosegruppe. Die Hinzugabe von Fe₂SO₄ verminderte die Aktivität der AP im Vergleich mit OM. H₂O₂ förderte in der Gruppe mit normaler Knochendichte im Vergleich mit den anderen Gruppen signifikant die AP.

4.3 Expression des Rezeptors Osteoprotegerin

Osteoprotegerin (OPG) wird von OB sezerniert und übernimmt eine bedeutende Funktion in der Metabolisierung des Knochens und möglicherweise auch in der Pathogenese der Osteoporose (Sheng et al. 2017). Wird OPG durch die OB vermindert exprimiert, wird in der Konsequenz die Aktivität der Osteoklasten gefördert und damit der Knochenabbau induziert (Chen et al. 2018). Hier sollte untersucht werden, ob es einen Unterschied oder eine Korrelation zwischen der OPG-Expression und den sich anhand der Knochendichte unterscheidenden Versuchsgruppen (normale Knochendichte, Osteopenie und Osteoporose) gibt. Zusätzlich wurde der Einfluss von Antioxidantien auf die OPG-Expression evaluiert.

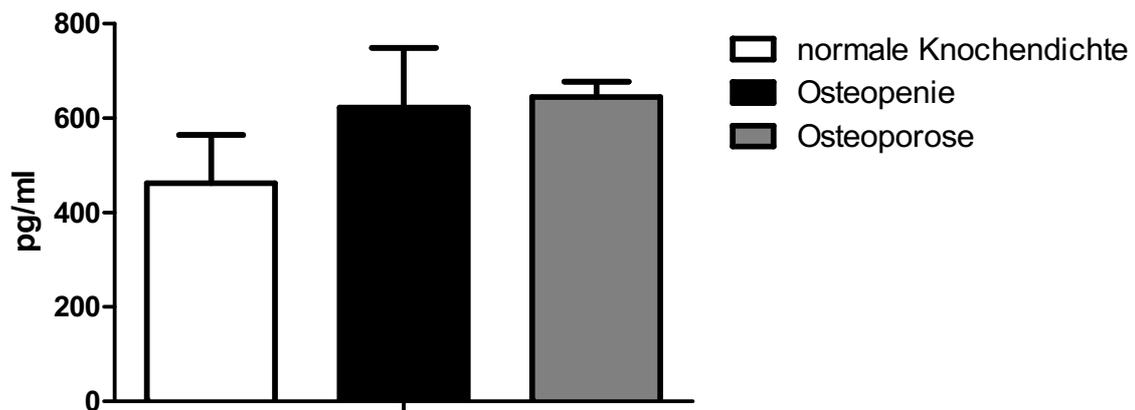
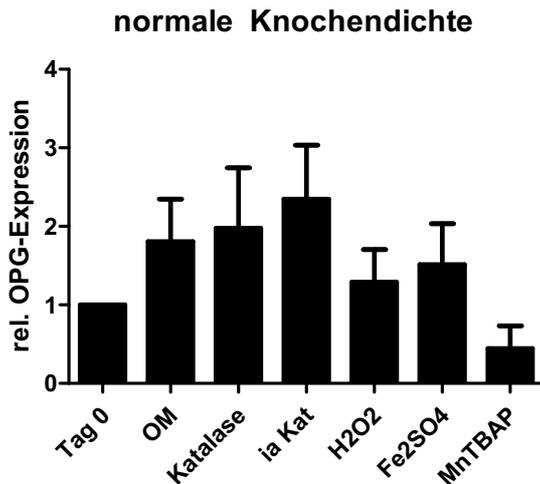


Abb. 9: OPG-Expression der OB an Tag 0

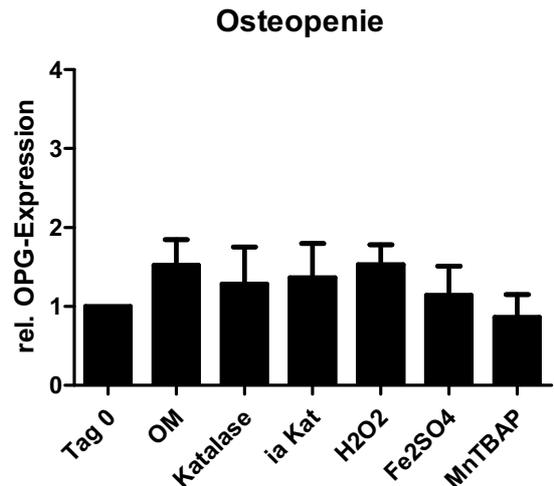
In der Gruppe mit normaler Knochendichte war die OPG-Konzentration tendenziell am geringsten. Dargestellt ist die OPG-Konzentration in pg/ml an Tag 0 unter Kultivierung mit OM im Gruppenvergleich (normale Knochendichte, Osteopenie und Osteoporose). (n = 4 – 8)

Zu Beginn des Inkubationszeitraumes wies die Gruppe mit normaler Knochendichte interessanterweise die geringste Expression von OPG auf (Abb. 9).

A)



B)



C)

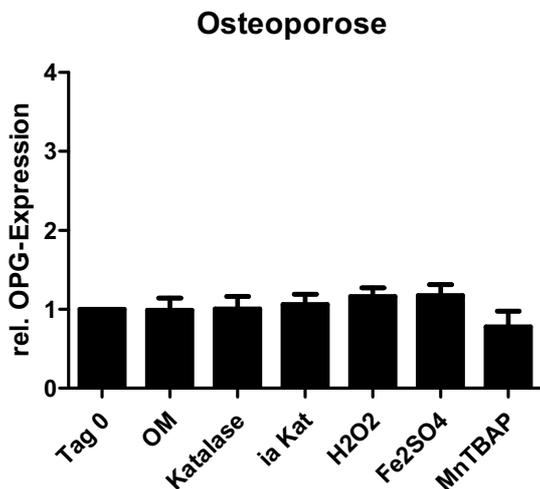


Abb. 10: Vergleich der OPG-Expression in der Gruppe mit normaler Knochendichte, mit Osteopenie und Osteoporose

Gemessen wurde die Expression von OPG in pg/ml an Tag 0 und nach 21-tägigem Kultivierungszeitraum mit OM, sowie zusätzlich mit Katalase (62,5 U/ml), ia Kat (62,5 U/ml), H₂O₂ (50 µmol), Fe₂SO₄ (50 µmol) oder MnTBAP (25 µmol). Eine deutlich gesteigerte OPG-Konzentration war lediglich durch Inkubation in der Gruppe mit normaler Knochendichte (A) zu erkennen. Normiert wurde auf Tag 0. (n = 4 – 8)

Die weiteren Auswertungen zeigten, dass in der Gruppe mit normaler Knochendichte (Abb. 10, A) sowohl der Inkubationszeitraum als auch die Kultivierung mit der Katalase und der ia Kat zu einer verstärkten OPG-Expression führten.

In der Osteopeniegruppe konnte nach dem 21-tägigen Kultivierungszeitraum durch die Zugabe der Oxidantien oder Antioxidantien eine geringe Modulation der OPG-Expression beobachtet werden (Abb. 10, B).

Im Gegensatz zu den vorhergehenden Ergebnissen ließ sich die OPG der Osteoporosegruppe (Abb. 10, C) weder durch Anti- noch Oxidantien beeinflussen.

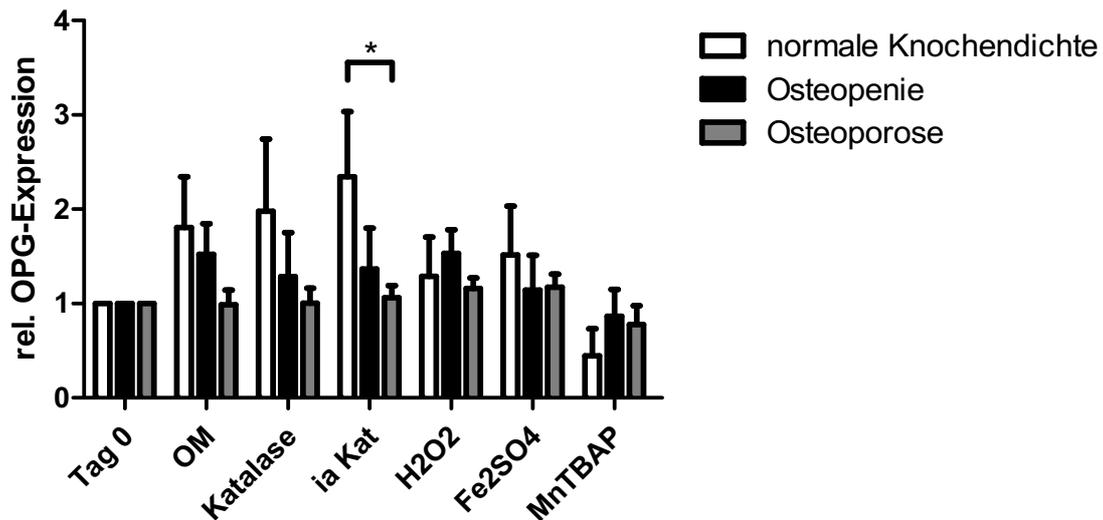


Abb. 11: Übersicht über die OPG-Expression der OB

Die OPG-Konzentration war in der Gruppe mit normaler Knochendichte am stärksten erhöht. Dargestellt ist die relative OPG-Konzentration an Tag 0 und 21 unter Kultivierung mit OM, sowie zusätzlich mit Katalase (62,5 U/ml), ia Kat (62,5 U/ml), H₂O₂ (50 µmol), Fe₂SO₄ (50 µmol) oder MnTBAP (25 µmol) im Gruppenvergleich (normale Knochendichte, Osteopenie und Osteoporose). Normiert wurde auf Tag 0. (n = 4 – 8)

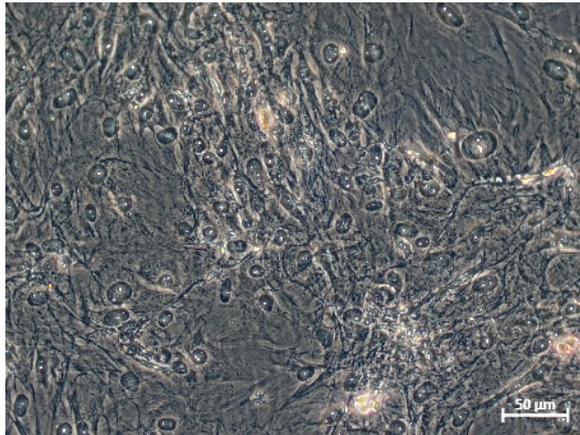
In Abb. 11 sind die Gruppen an Tag 21 im direkten Vergleich zu Tag 0 aufgetragen. In der Osteopenie- und Osteoporose-Gruppe hatten die Antioxidantien keinen wesentlichen Einfluss auf die OPG-Expression. Verhältnismäßig war die Konzentration des OPG bei den Spendern mit Osteoporose sogar geringer als bei denen mit Osteopenie. Nur in der Gruppe mit normaler Knochendichte war die Konzentration von OPG durch Inkubation mit Katalase und ia Kat tendenziell verdoppelt.

4.4 Adipogene Differenzierung von OB

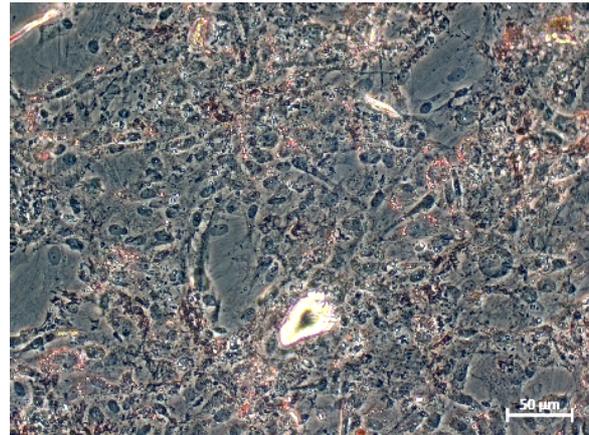
Da OB in der Lage sind, sich zu Adipozyten zu differenzieren und im Knochen von älteren Patienten vermehrt Fettzellen zu finden sind, sollte in diesem Experiment untersucht werden, welches Potential die OB generell haben, adipogen zu differenzieren.

Dazu wurden die OB nach 14-tägiger Inkubation in adipogenem Differenzierungsmedium mittels Ölfrotfärbung analysiert. Reife Adipozyten enthalten jeweils ein einzelnes Fettdroplet, dass durch Ölrot angefärbt werden kann (Tang und Lane 2012).

A)



B)



C)

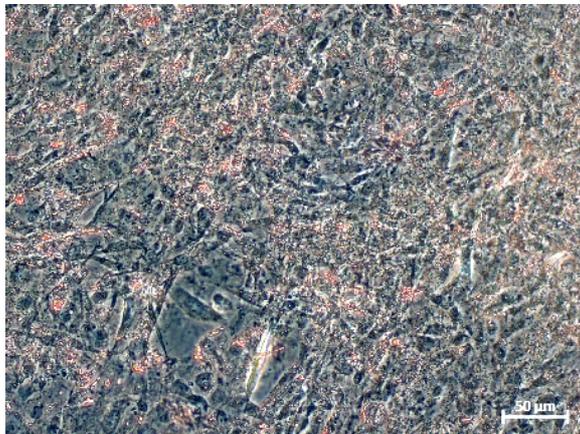


Abb. 12: Adipogene Differenzierung

In der exemplarischen Darstellung der Mikroskopiebilder zeigte sich nach adipogener Differenzierung eine Anfärbung der Fettdroplets mittels Ölrot. Es konnte eine Zunahme der Fettdroplets von A nach C beobachtet werden. A: Spender mit normaler Knochendichte, B: Osteopeniespender, C: Osteoporosespender. Der Maßstabsbalken entspricht einer Länge von 50 µm.

Bei den ausgewählten Spendern konnte ein Trend zu vermehrter Adipogenese in OB von Probanden mit Osteoporose demonstriert werden (Abb. 12).

Das Ausmaß der adipogenen Differenzierung wurde mit Hilfe der Ölrot-Rücklösung quantifiziert.

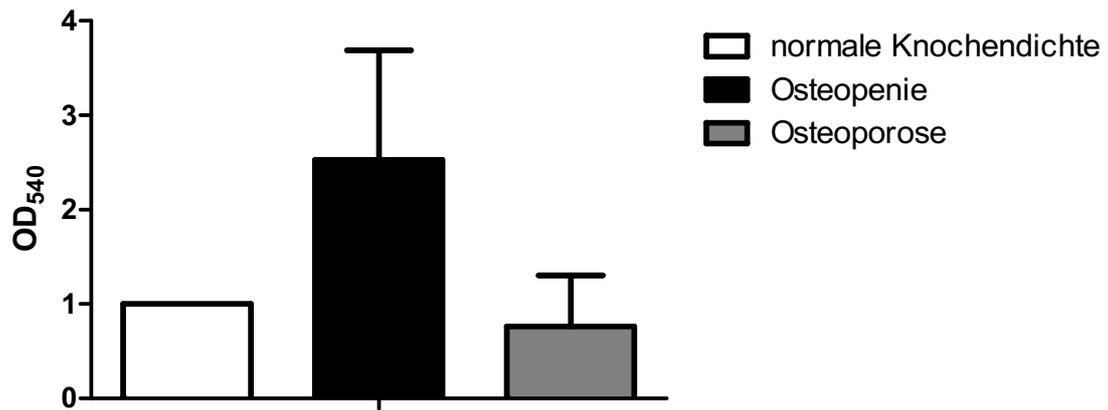


Abb. 13: Adipogene Differenzierung der OB

Rücklösung der Ölrot-Färbung der Fettdroplets nach 14-tägiger adipogener Differenzierung. Bestimmt wurde die Absorption bei $\lambda = 540 \text{ nm}$ bei OB von Probanden mit normaler Knochendichte, Probanden mit Osteopenie oder Osteoporose. Normiert wurde auf die normale Knochendichte. (n = 2 – 5)

Die Osteopeniegruppe zeigte tendenziell das stärkste Potential adipogen zu differenzieren (Abb. 13).

4.5 Beurteilung der Adipogenese nach osteogener Differenzierung

ROS hemmt die Osteogenese und wirkt förderlich auf die adipogene Differenzierung (Rharass und Lucas 2019). Diese Aussage wird durch die Beobachtung unterstützt, dass sich in Knochen älterer Patienten häufig sowohl erhöhte ROS-Konzentrationen als auch ein erhöhter Anteil an Fettzellen feststellen lässt (Huang et al. 2015).

Daher wurden die OB auch bezüglich ihres adipogenen Differenzierungspotentials verglichen, nachdem sie osteogen differenziert wurden. Dazu wurden die durch die OB ausgebildeten Fettdroplets nach osteogener Differenzierung mit Ölrot angefärbt und die Rücklösung der Färbung quantifiziert.

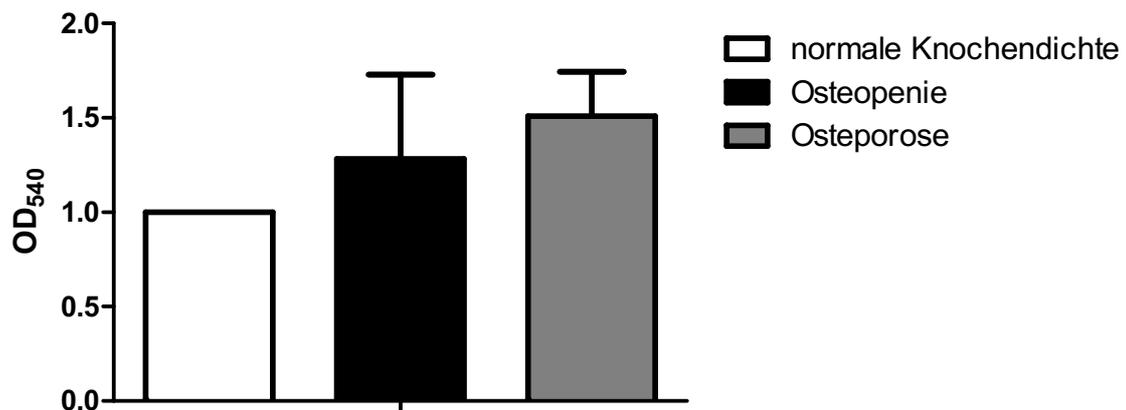


Abb. 14: Adipogenese nach osteogener Differenzierung

Das stärkste Potential zur Adipogenese wiesen die osteoporotischen Spender auf. Rücklösung der Ölrot-Färbung der Fettdroplets nach 21 d osteogener Differenzierung. Bestimmt wurde die Absorption bei $\lambda = 540$ nm. Normiert wurde auf die gesunden Kontrollen. (n = 6 – 8)

Wie Abb. 14 verdeutlicht, zeigte sich eine tendenziell erhöhte Adipogenese in den OB von osteopenen Probanden und den Patienten mit einer Osteoporose.

4.6 Der Vergleich der Vitamin D-Rezeptor-Expression

In diesem Versuch sollte die Expression des vdr durch die OB der Spender mit normwertiger Knochendichte, von Spendern mit Osteopenie und von denen mit Osteoporose verglichen werden.

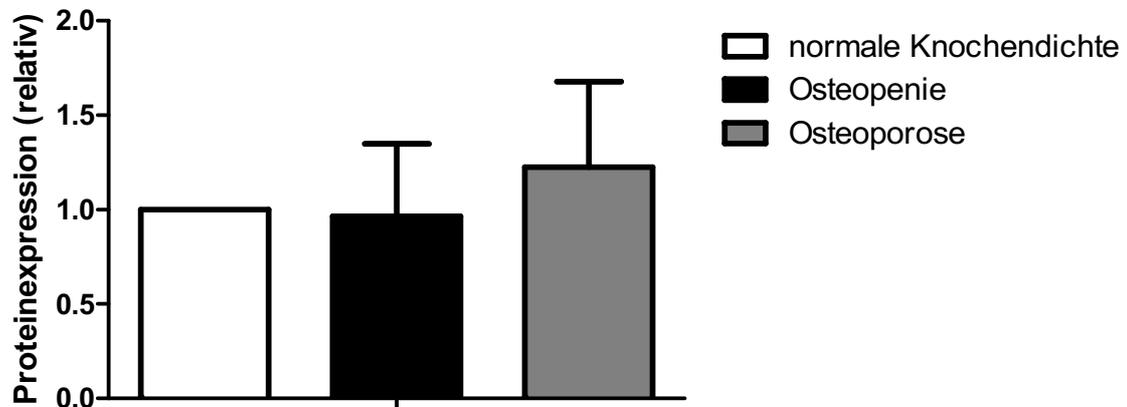


Abb. 15: Expression des Vitamin D-Rezeptors

Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden. Normiert wurde auf die normale Knochendichte. (n = 2 – 5)

Wie in Abb. 15 zu sehen ist, wiesen alle drei Gruppen eine ähnliche Expression des Rezeptors auf mit einer tendenziell stärkeren Expression bei den Spendern mit einer Osteoporose.

4.7 Vergleich der Proteinexpression von p53

Weiterhin wurde die Expression des Proteins p53 untersucht. Es kann den Zellzyklus anhalten, Apoptose und die DNA-Reparatur induzieren und ist bei Patienten mit einer Osteoporose hochreguliert (Yu et al. 2020).

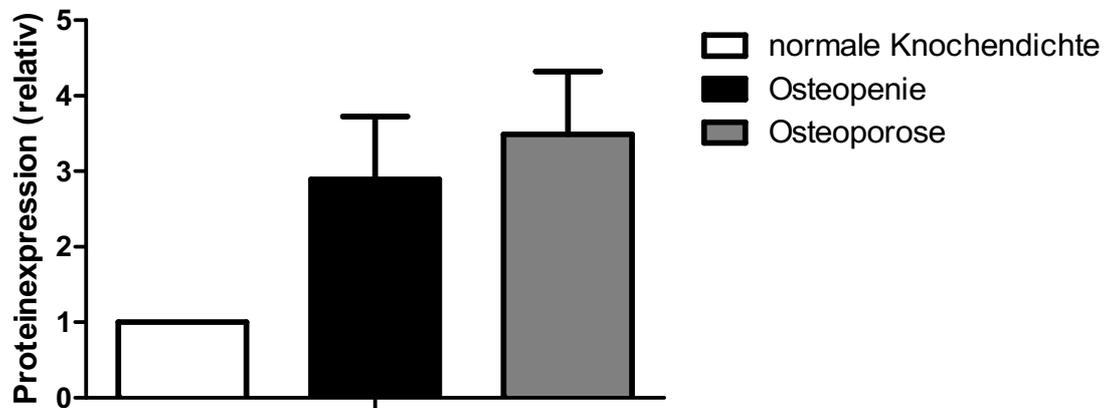


Abb. 16: Konzentration von p53

Die Proteinkonzentration von p53 stieg von den Spendern mit normaler Knochendichte hin zu den Osteoporosespendern an. Normiert wurde auf die normale Knochendichte. (n = 2 – 5)

Der Vergleich der Gruppen zeigte, dass p53 in den OB der Osteoporose-Patienten im Vergleich zu den Proben mit normaler Knochendichte 3-fach verstärkt exprimiert wurde (Abb. 16).

4.8 Evaluation der γ -H2AX-Expression

γ -H2AX ist ein Enzym, das zum Ort von DNA-Doppelstrangbrüchen rekrutiert wird und an der Mobilisierung von DNA-Reparaturproteinen beteiligt ist (Kuo und Yang 2008).

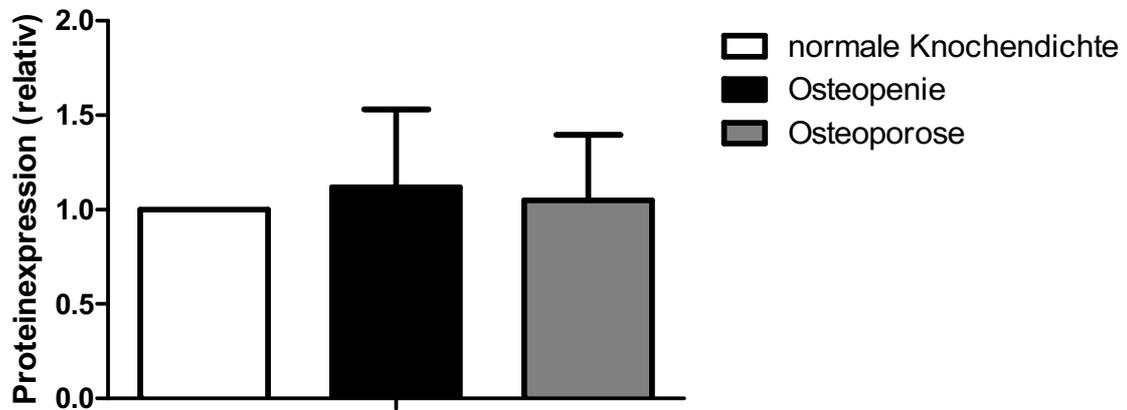


Abb. 17: Expression von γ -H2AX

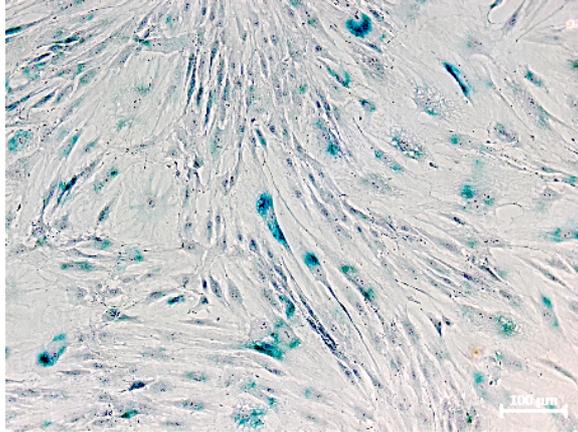
γ -H2AX wurde in allen Gruppen vergleichbar exprimiert. Normiert wurde auf die normale Knochendichte. (n = 2 – 5)

Wie die Abb. 17 verdeutlicht, wurde γ -H2AX in den Gruppen ungefähr in gleichem Ausmaß exprimiert.

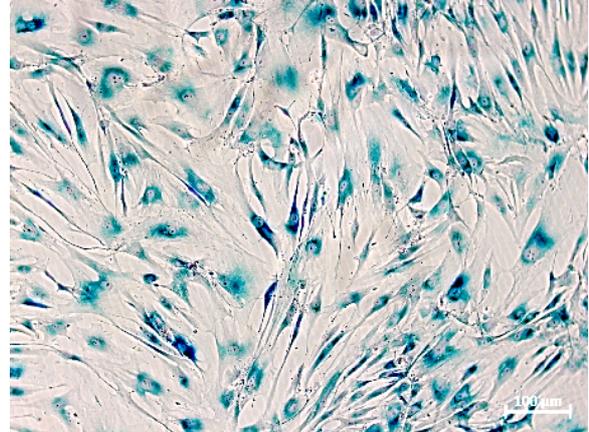
4.9 Untersuchung der Seneszenz der OB

Die zelluläre Seneszenz von OB als möglicher Marker der Osteoporose sollte untersucht werden. Dazu wurde die Expression des Enzyms β -Gal mittels Blaufärbung visualisiert.

A)



B)



C)

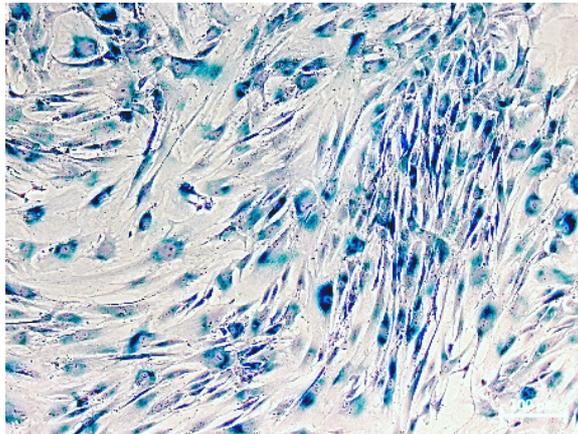


Abb. 18: β -Galactosidase-Expression als Marker für die Seneszenz in OB

Exemplarische Mikroskopie-Bilder der blauen Anfärbung von β -Gal; A: normale Knochendichte, B: Osteopenie, C: Osteoporose. Mit zunehmendem Erkrankungsstadium exprimierten mehr OB β -Gal als Marker der zellulären Seneszenz. Der Maßstabsbalken entspricht einer Länge von 100 μ m.

Die exemplarischen mikroskopischen Aufnahmen zeigten erwartungsgemäß eine verstärkte Expression des β -Gals als Marker für die zelluläre Seneszenz bei den Probanden mit einer Osteoporose (Abb. 18, Bild C) im Vergleich zu den anderen Gruppen (Abb. 18, Bild A und B).

4.10 Der Einfluss von Fe auf die Viabilität von OB

Das Zentralatom im Häm der Katalase ist Fe^{3+} . Um zu untersuchen, inwiefern die Wirkung der Katalase durch das Fe vermittelt wurde, wurde in den Versuchen, in denen die osteogene Differenzierung oder Osteoporose-relevante Parameter untersucht werden sollten, Fe_2SO_4 mitgeführt. Es sollte eine Fe-Konzentration genutzt werden, die die Zellviabilität nicht beeinflusst. Um das zu gewährleisten, wurden die OB mit OM und verschiedenen Fe_2SO_4 -Konzentrationen inkubiert und die Zellviabilität bestimmt.

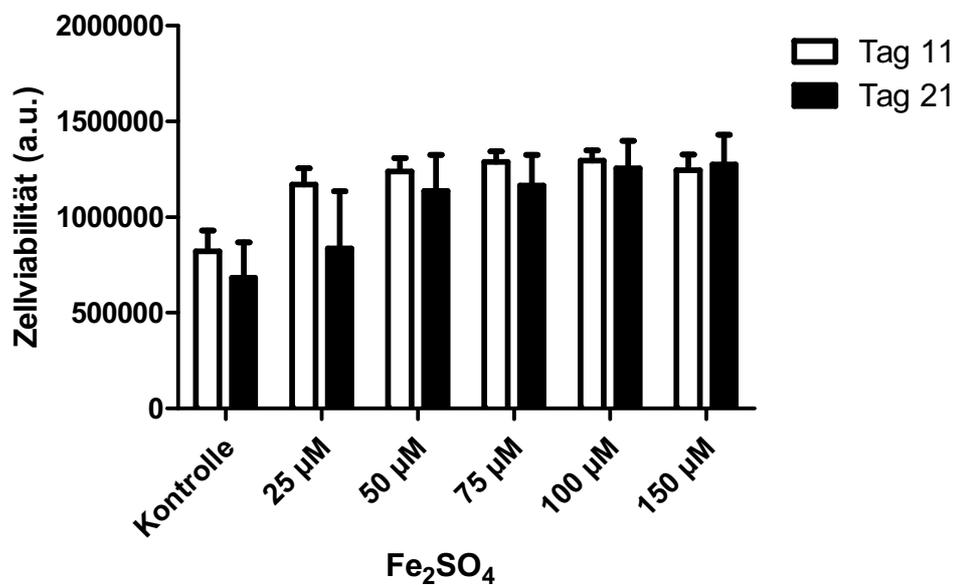


Abb. 19: Untersuchung des Einflusses verschiedener Fe-Konzentrationen auf die Viabilität der OB

Keine der Fe_2SO_4 -Konzentrationen inhibierte die Zellviabilität der OB. Messung der Zellviabilität nach 11- und 21-tägiger Inkubation in OM (Kontrolle) und zusätzlich mit 25 – 150 μmol Fe_2SO_4 . a.u. = *arbitrary unit*. (n = 2)

Es zeigt sich, dass die Zugabe zunehmender Fe_2SO_4 -Konzentrationen (25 – 150 μmol) keinen negativen Einfluss auf die Zellviabilität hatte (siehe Abb. 19).

4.11 Validierung der Inaktivierung der Katalase

Um die Effektivität der angewendeten Inaktivierungsmethode für die Katalase zu beurteilen, wurden die unbehandelte Katalase in zwei Konzentrationen (1 U sowie 1 mU) sowie die ia Kat (62,5 U/ml) mit Hilfe eines Katalase-Aktivitäts-Assays analysiert. Inaktiviert wurde das Enzym dafür mittels Hitze direkt vor dem Versuch, beziehungsweise 2 oder 4 d zuvor. Zusätzlich wurde eine ia Kat-Probe in PBS verwendet, um einen möglichen Einfluss des ansonsten verwendeten OM auszuschließen.

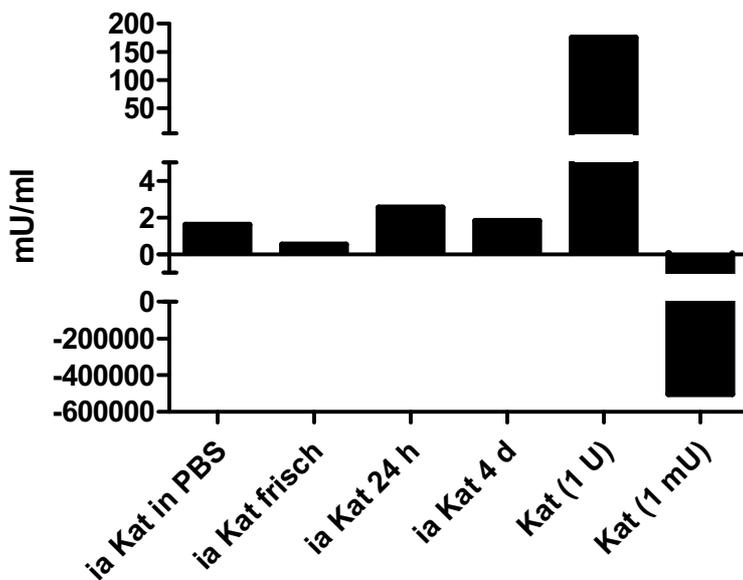


Abb. 20: Katalase-Aktivität

Dargestellt ist die Katalase-Aktivität in mU/ml verschiedener mit Katalase versetzter Proben: Katalase (1 U bzw. 1 mU) und ia Kat (62,5 U/ml) in OM oder PBS. Die ia Kat hatte eine deutlich geringere Enzymaktivität als die Probe mit 1 U Katalase. (n = 1)

Es zeigte sich, dass alle Proben mit ia Kat ähnlich niedrige Aktivitäts-Werte zwischen 0,5 und 2,6 mU/ml aufwiesen im Vergleich zur Aktivität von fast 175 mU/ml in der Probe mit 1 U Katalase. Eine völlige Inaktivierung konnte nicht erzielt werden. (Abb. 20) Die negative Katalase-Aktivität der 1 mU-Probe ist am ehesten als Fehlmessung zu werten. Möglicherweise ist das Kit nicht in der Lage, so niedrige Enzym-Konzentrationen nachzuweisen.

4.12 Laboruntersuchungen des Blutes

Zusätzlich zu den Gewebeproben (Femurköpfen) wurde den Patienten Blut abgenommen, um bestimmte Entzündungs- und Osteoporose-relevante Parameter zu analysieren. Es wurden wiederum die Probanden mit normaler Knochendichte mit den Osteopenie- und Osteoporosespendern verglichen.

4.12.1 C-reaktives Protein

Ein wichtiger und häufig bestimmter Blutwert ist das C-reaktive Protein (CRP), das unter anderem im Rahmen von Entzündungen, Infektionen und Traumata ansteigt.

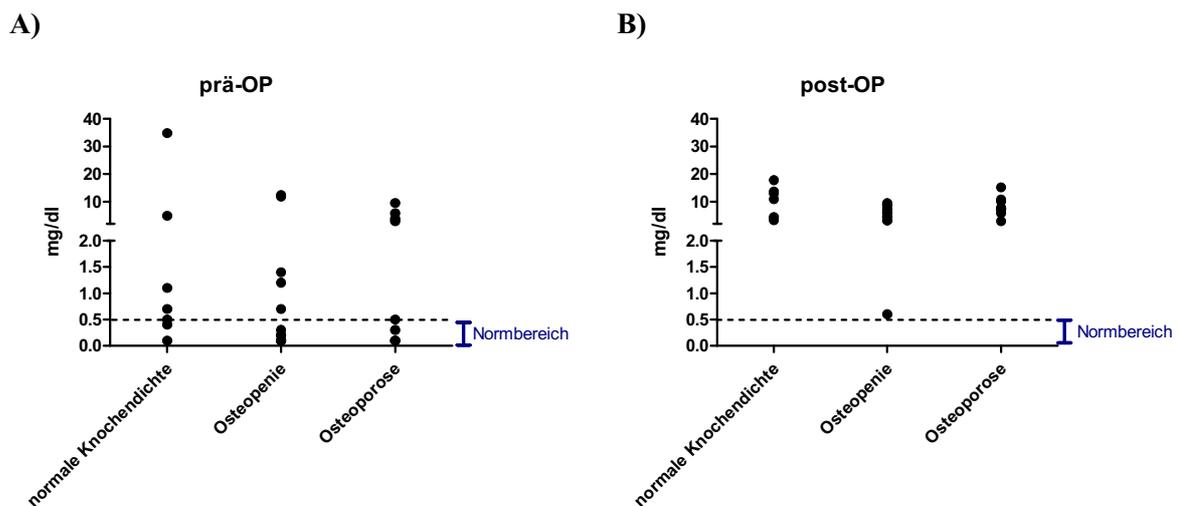


Abb. 21: C-reaktives Protein in mg/dl

Gruppenunabhängig war der Entzündungsparameter post-OP (B) stärker erhöht als prä-OP (A). (n = 7 – 12)

Bereits vor dem Eingriff wies ein erheblicher Teil der Probanden, am ehesten bedingt durch das Frakturtrauma oder die vorhandene Arthrose, pathologische CRP-Konzentrationen auf (Abb. 21, A). Messungen nach der Hüftkopf-Operation zeigten erhöhte CRP-Werte bei allen einbezogenen Personen (Abb. 21, B). Das Ausmaß der Erhöhung war dabei in allen Gruppen ähnlich. Post-OP war der Wert folgerichtig stärker erhöht als vor dem Eingriff.

Ein Zusammenhang zwischen Höhe des Entzündungsmarkers und Art der Grunderkrankung (Arthrose oder Fraktur) war nicht erkennbar.

Da die Blutbildung beim gesunden Erwachsenen maßgeblich im Knochen stattfindet, wurden auch einige Parameter des kleinen Blutbildes in die Auswertung einbezogen.

4.12.2 Hämatokrit

Der Hämatokrit (Hkt) umfasst den Anteil der zellulären Bestandteile im Blut und beinhaltet zum überwiegenden Teil die Erythrozyten.

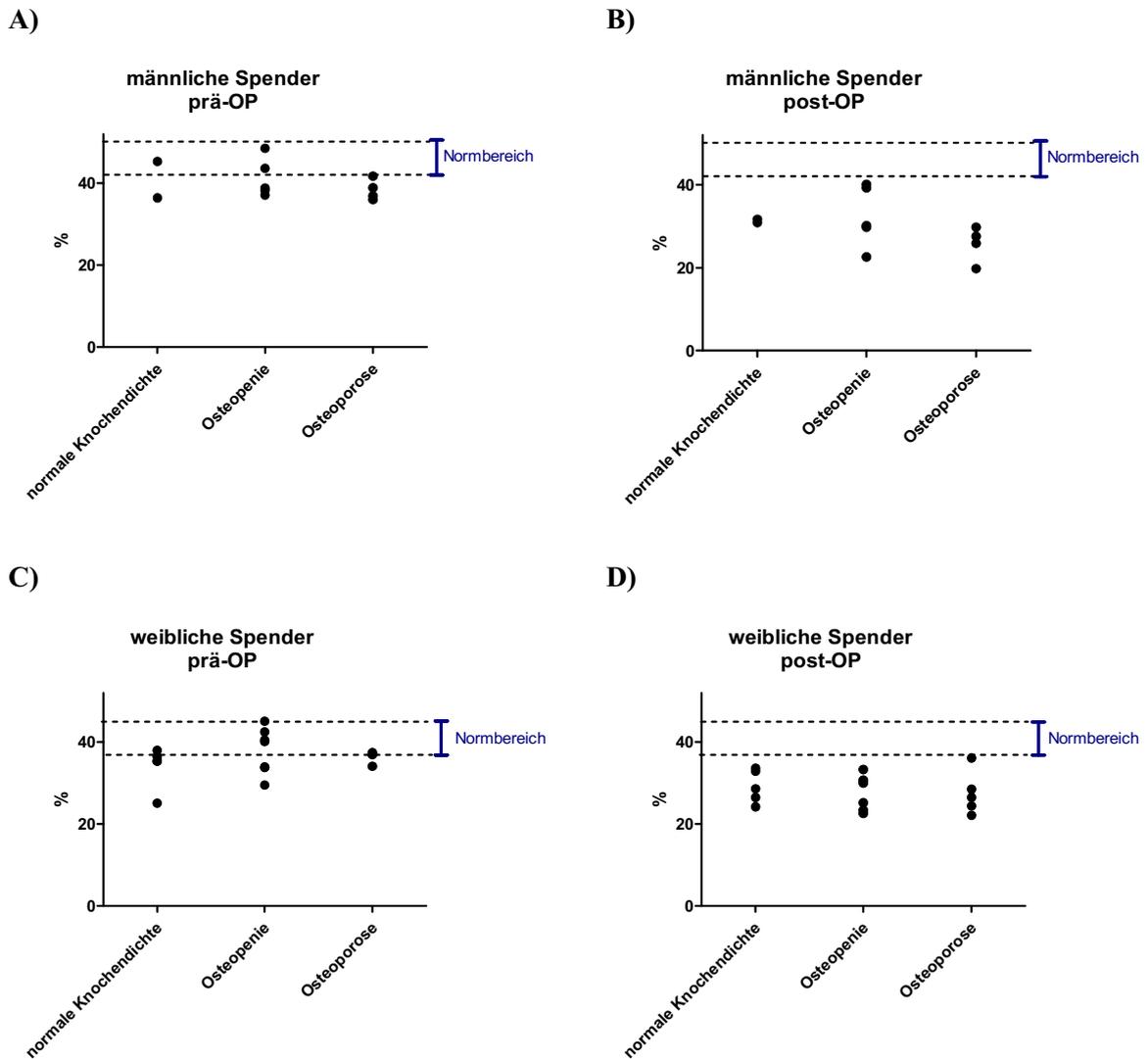


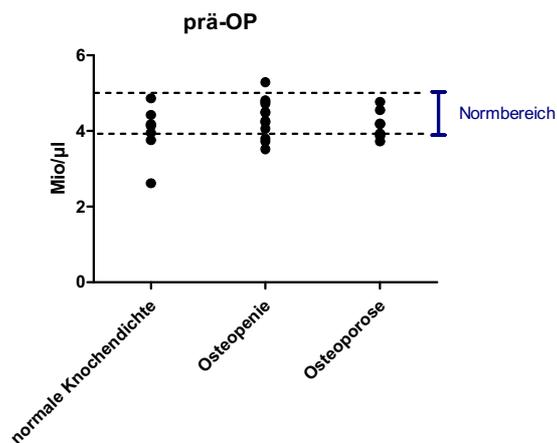
Abb. 22: Hämatokrit in %

Durchschnittlich war der Hkt nach der Operation (B und D) stärker erniedrigt als vor dem Eingriff (A und C). (n = 2 – 7)

Die festen Blutbestandteile waren bei den Untersuchten aller drei Gruppen post-OP erniedrigt, typischerweise bedingt durch den intraoperativen Blutverlust (Abb. 22, B und D). Da bekannt ist, dass eine Anämie bei älteren Menschen keine Seltenheit ist (Busti et al. 2019), war, wie zu erwarten, auch die Konzentration des Hämatokrits prä-OP bei einem Teil der Probanden erniedrigt (Abb. 22, A und C).

4.12.3 Erythrozyten

A)



B)

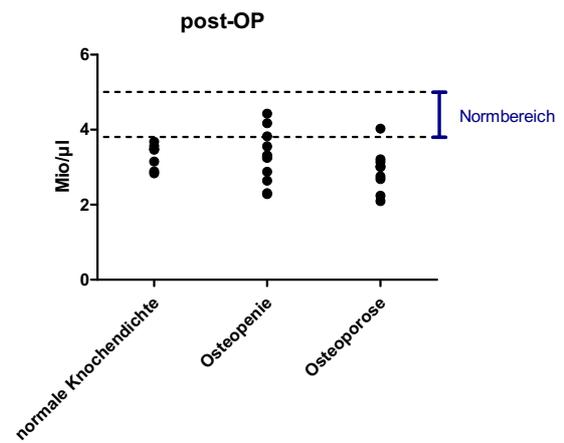


Abb. 23: Erythrozyten-Konzentration in Mio/µl

Einige Probanden hatten Werte unterhalb der Norm. (n = 7 – 12)

Vergleichbar mit dem Hämatokrit wiesen einige Patienten schon zu Behandlungsbeginn ein Erythrozyten-Defizit auf. Dieses verstärkte sich durch den Blutverlust in der Operation, sodass die Zahl der roten Blutkörperchen in allen Gruppen post-OP folgerichtig stärker erniedrigt war als vor dem operativen Eingriff (Abb. 23).

4.12.4 Hämoglobin

Hämoglobin (Hb) ist das Hauptprotein der Erythrozyten und maßgeblich für den O₂-Transport im Blut verantwortlich.

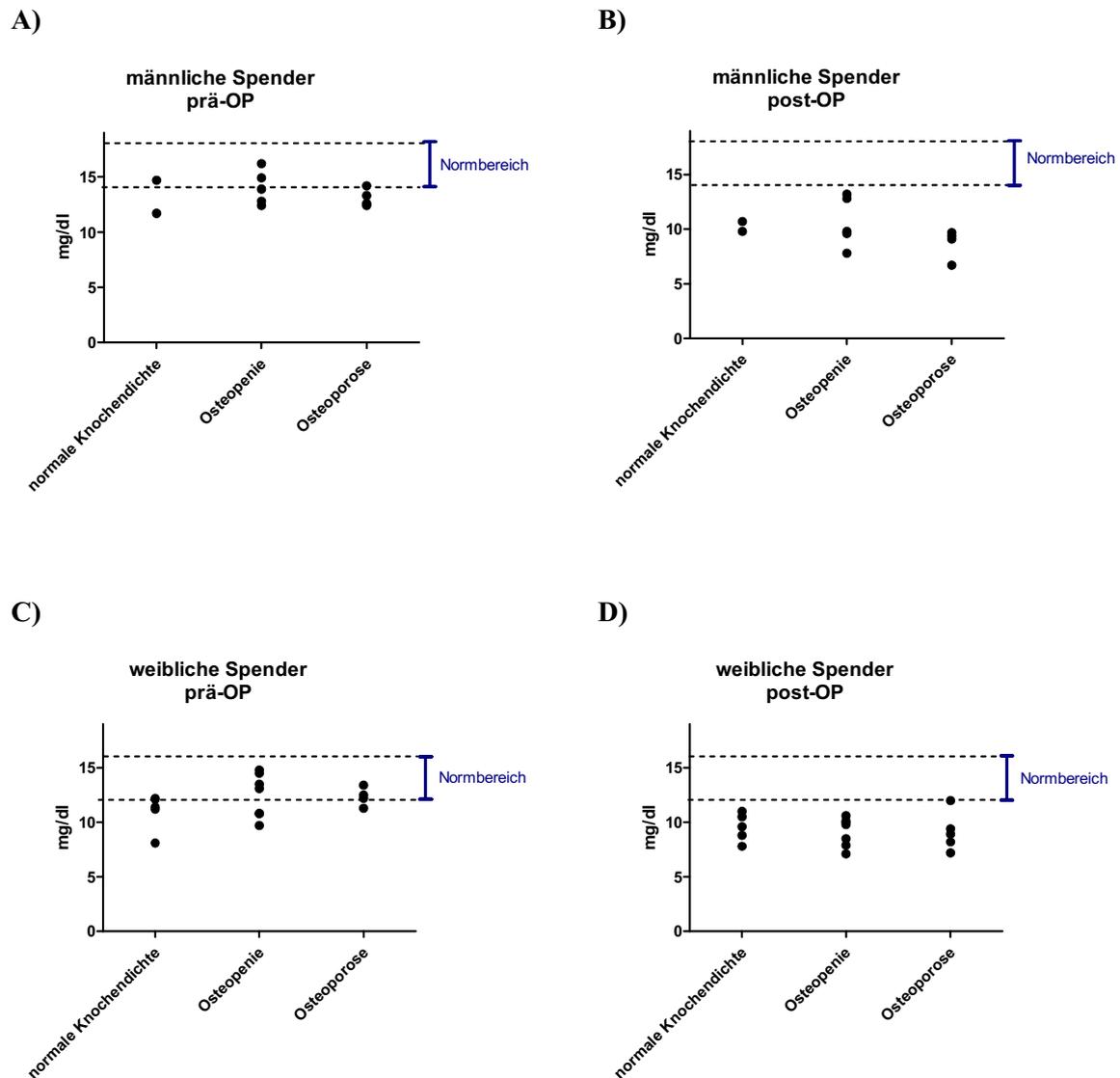


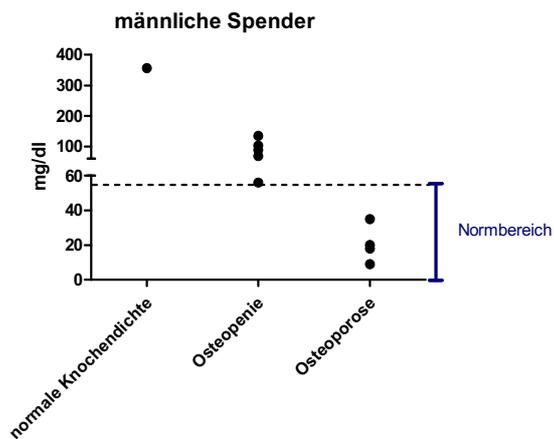
Abb. 24: Hämoglobin in mg/dl

Innerhalb des Operations-Zeitraumes kam es insgesamt zu einem Abfall des Hb. (n = 2 – 7)

Initial war das Hb bei vielen Patienten erniedrigt (Abb. 24, A und C). Wie durch die vorigen Ergebnisse und den operativen Eingriff zu erwarten, lag nach der Operation nur noch der Blutwert eines Untersuchten im Normbereich (Abb. 24, B und D).

4.12.5 γ -Glutamyltransferase

A)



B)

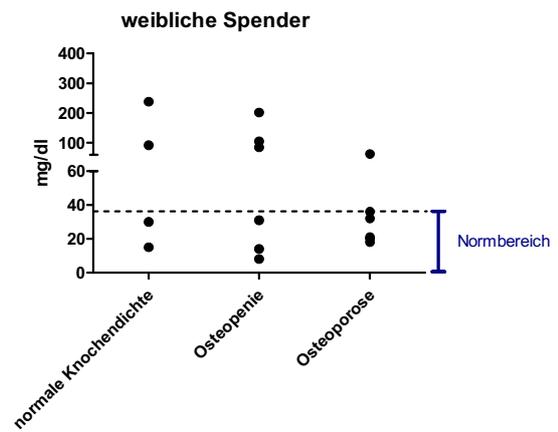


Abb. 25: γ -Glutamyltransferase in mg/dl

Das Enzym war bei den Patienten mit normaler Knochendichte und denen mit Osteopenie – unabhängig vom Geschlecht – häufiger und stärker erhöht als bei den Osteoporotikern, bei denen der Gehalt im Blut beinahe immer normwertig war. (n = 1 – 6)

γ -Glutamyltransferase (γ -GT) als wichtiger Cholestaseparameter erwies sich bei allen männlichen Spendern mit Osteopenie als erhöht, während Männer mit Osteoporose eine normwertige γ -GT-Konzentration aufwiesen (Abb. 25, A). In der Gruppe der Frauen wiesen alle drei Versuchsgruppen erhöhte Cholestaseparameter auf, insbesondere die Kontrollen mit normaler Knochendichte und die Osteopenie-Gruppe (Abb. 25, B).

4.12.6 Vitamin D

Vitamin D ist ein im Rahmen der Osteoporose-Diagnostik häufig bestimmter Marker; denn das Vitamin spielt eine wichtige Rolle bei der Knochenmineralisierung, indem es mitunter die Aufnahme von Calcium und Phosphat über Darm und Niere fördert.

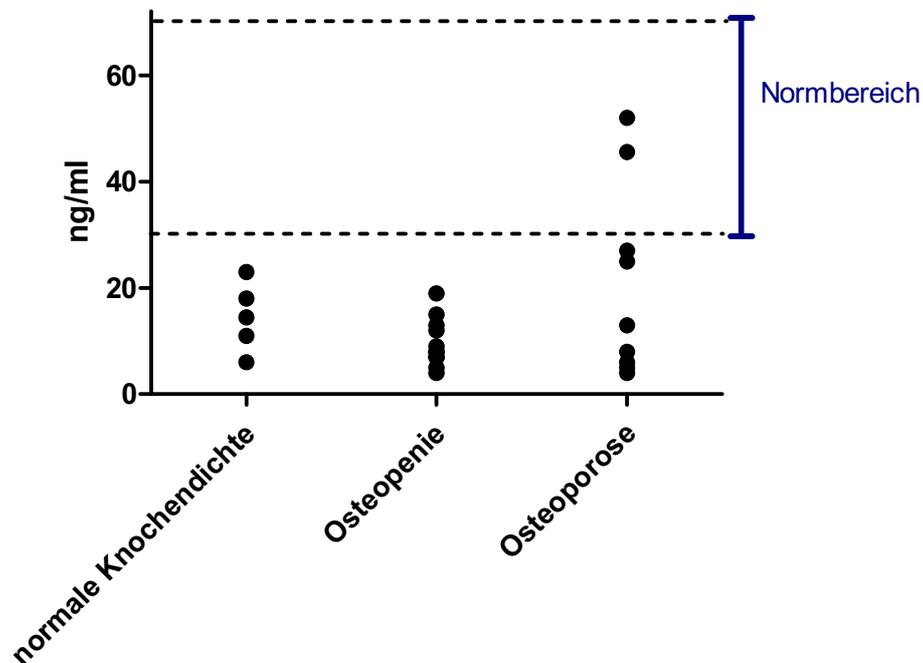


Abb. 26: 25-OH-Vitamin D₃ in ng/ml

Der Gehalt des Vitamins im Blut lag ausschließlich bei zwei Spendern mit Osteoporose innerhalb des Normbereiches. (n = 5 – 9)

Einen Mangel an 25-OH-Vitamin D₃, der Speicherform des Vitamin D, wiesen fast alle untersuchten Personen gleichermaßen, unabhängig von der zugehörigen Versuchsgruppe, auf. Interessanterweise lagen bei nur zwei Spendern der Osteoporosegruppe ausreichend hohe Vitamin D₃-Spiegel vor; diese erhielten allerdings bereits im Vorhinein eine orale Substitution des Vitamins. (Abb. 26)

4.12.7 Calcium

Calcium ist ein wichtiger Bestandteil der Knochensubstanz und ist dort mitverantwortlich für die Stabilität des Knochens.

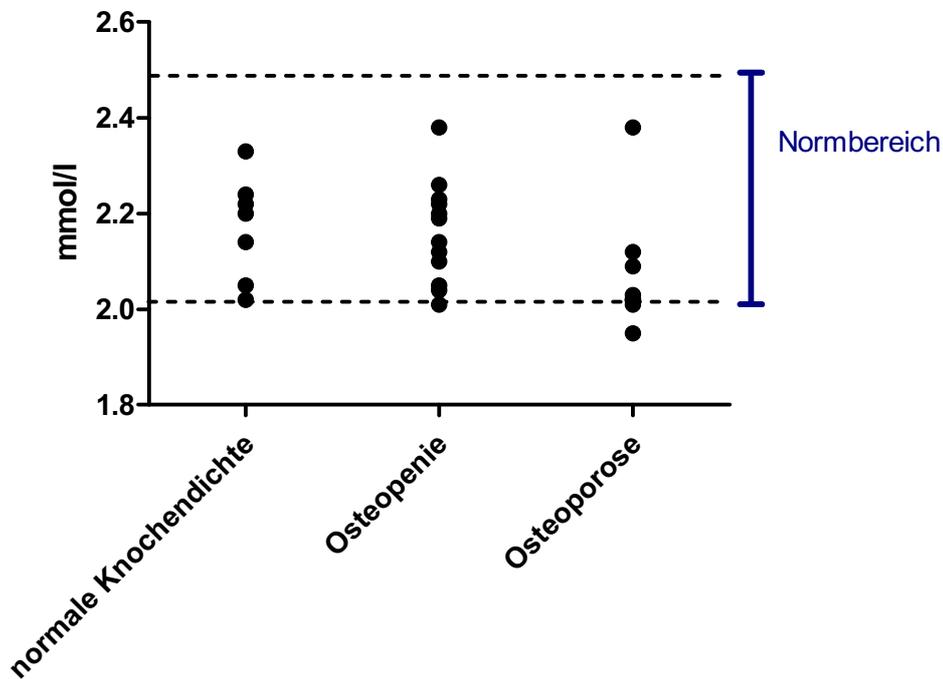


Abb. 27: Calcium in mmol/L

Die im Blut gemessenen Werte waren bei den Probanden mit normaler Knochendichte, mit Osteopenie und auch denen mit Osteoporose ähnlich und überwiegend normwertig. (n = 7 – 12)

Der Calcium-Spiegel lag bei einem Großteil der involvierten Probanden im Normbereich (Abb. 27).

4.12.8 Alkalische Phosphatase

Im menschlichen Körper gibt es verschiedene Isoformen des Enzyms; sie alle hydrolysieren Monophosphatester (Sharma et al. 2013). Dabei ist die knochenspezifische Alkalische Phosphatase (AP) relevant für den Knochenmetabolismus, indem sie das Phosphat für die Knochenmineralisation bereitstellt (Vimalraj 2020). Auch ist sie ein Marker für die Stoffwechselaktivität von OB (Magnusson und Farley 2002).

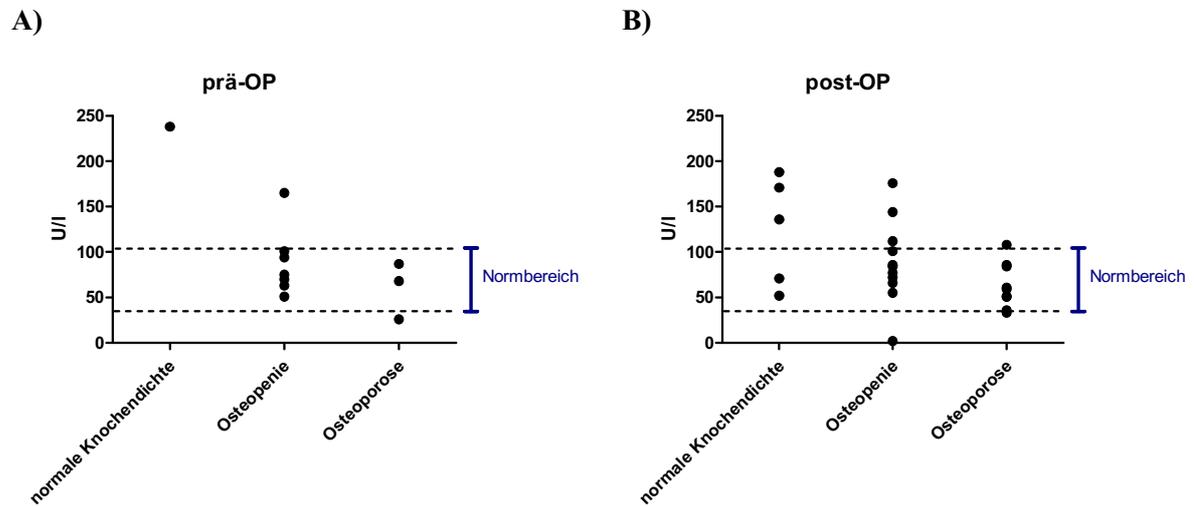


Abb. 28: Alkalische Phosphatase in U/L

Ein Großteil der Probanden wies unauffällige AP-Spiegel auf. (n = 1 – 11)

Die AP-Konzentration im Blut war bei dem überwiegenden Teil der Probanden normwertig, insbesondere bei den Patienten mit Osteoporose (Abb. 28, A). Ein ähnliches Bild ergab sich auch nach dem operativen Eingriff (Abb. 28, B).

5 Diskussion

Der demographische Wandel führt zu einer stetig alternden Gesellschaft. Nicht nur der Anteil älterer Menschen nimmt zu, auch das erzielte Lebensalter steigt seit vielen Jahren an. Damit einhergehend zeigen sich auch veränderte Stoffwechselfvorgänge (Manolagas 2000). Diese bergen Krankheitsrisiken, die typisch für den alternden Menschen sind. Auch im Knochen lassen sich im Laufe des Lebens Veränderungen – wie veränderte Konzentrationen von Biomarkern (beispielsweise β -Galactosidase) – beobachten, die mit dem Alter deutlich zunehmen (Dimri et al. 1995). Die nicht selten resultierende verringerte Knochendichte birgt das Risiko für Frakturen mit dem sich daraus ergebenden Anstieg der Morbidität und Mortalität sowie einer erhöhten Belastung für die betroffene Person und das Gesundheitssystem (Bonjour et al. 2004). Daher besteht ein berechtigtes Interesse daran, Störungen des Knochenstoffwechsels detaillierter zu verstehen. Daraus resultierende Ergebnisse könnten wichtige Hinweise bieten, um die Knochenstruktur älterer Menschen bereits präventiv oder supportiv zu unterstützen.

Der Schwerpunkt unserer Arbeit lag auf der Untersuchung von OB drei verschiedener Gruppen. Dazu wurden die aus dem Knochen der zwischen 61 und 90 Jahre alten Spender extrahierten OB mithilfe der DEXA-Messung in die Gruppen normale Knochendichte, Osteopenie und Osteoporose unterteilt. Ziel war es, mögliche Unterschiede zwischen den Gruppen zu erkennen und etwaige Einflussfaktoren auf den Knochenstoffwechsel zu identifizieren. Da bekanntermaßen ROS einen potenziell toxischen Einfluss auf Zellen und Gewebe haben können und möglicherweise auch eine relevante Ursache für Veränderungen des Knochenstoffwechsels darstellen (Abdollahi et al. 2005), haben wir die knochenbauenden OB osteogen differenziert und den Einfluss von ROS sowie von Antioxidantien auf diese Zellen evaluiert. Weitere Anhaltspunkte unserer Forschung waren verschiedene Metabolite und Marker des Knochenstoffwechsels und der zellulären Seneszenz mit dem Ziel, ein besseres Verständnis von den Vorgängen im Knochengewebe zu bekommen. Da vermutet wird, dass ein Übermaß an ROS die adipogene Differenzierung der OB begünstigt (Denu und Hematti 2016), haben wir die Adipogenese von OB detaillierter untersucht. Darüber hinaus wurden einige Laborparameter der Probanden ausgewertet, um ein möglichst umfassendes Bild von möglichen Veränderungen im Knochenstoffwechsel älterer Patienten zu erhalten.

5.1 Einfluss von Antioxidantien und reaktiven Sauerstoffspezies auf Osteoblasten

Um die Funktion der OB in den drei Spendergruppen vergleichen zu können, wurden die Zellen osteogen differenziert und die Aktivität der AP analysiert. Funktionelle Osteoblasten sezernieren Calciumphosphationen in die extrazelluläre Matrix (Clarke 2008). Die mineralisierte Matrix kann mittels Alizarinrot visualisiert werden. Durch erneutes Herauslösen und spektrometrische Messung der Färbung kann das Ausmaß der Kalzifizierung sehr genau quantifiziert werden. (Stanford et al. 2021)

Die ebenfalls evaluierte AP ist ein Marker für die osteoblastäre Aktivität und den Knochenumsatz (Sharma et al. 2013).

Vielfach belegt ist eine Zunahme der ROS im Verlauf von Alterungsprozessen und deren Beteiligung daran (Brieger et al. 2012; Bai et al. 2004; Davalli et al. 2016). Auf zellulärer Ebene können durch ROS verschiedene Signalwege beeinflusst, Wachstum oder Differenzierung von Zellen inhibiert und sogar die Apoptose initiiert werden. Auch an der Entstehung vieler Krankheiten, wie Diabetes oder Atherosklerose, können ROS beteiligt sein. Zudem ist ein Zusammenhang zwischen abnehmender Knochendichte und steigenden ROS-Konzentrationen bekannt. Aber auch Osteoklasten produzierten ROS, die direkt für den Abbau von Knochen verantwortlich sind. (Bai et al. 2004; Abdollahi et al. 2005) Trotzdem darf nicht vergessen werden, dass ROS auch physiologische Funktionen, wie zum Beispiel in der mikrobiellen Abwehr, übernehmen (Brieger et al. 2012).

5.1.1 Die Wirkung von Katalase auf die osteogene Differenzierung von OB

Kommt es zu einem Ungleichgewicht von Oxidantien und Antioxidantien zu Gunsten der Oxidantien, entsteht oxidativer Stress. Dieser kann zu Schäden an Zellen oder Proteinen führen. Antioxidantien können die Konzentration von ROS senken. Somit sind sie ein potenzieller und attraktiver Angriffspunkt, um den Einfluss von ROS auf die Zellalterung und Differenzierung zu untersuchen. (Davalli et al. 2016)

Als zu untersuchende antioxidative Substanz in den Kulturen verwendeten wir Katalase, da es einen relevanten Teil des im Körper anfallenden H_2O_2 abbaut (Goyal und Basak 2010).

Durch Kultivierung der OB mit Katalase konnten wir einen Zuwachs kalzifizierter Knochenmatrix beobachten. In allen drei Spendergruppen fördert das Enzym die osteogene Differenzierung, am stärksten sogar in der Gruppe der Osteoporosepatienten. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass entweder in OB von Patienten mit Osteoporose mehr ROS enthalten sind und diese die Matrixmineralisation inhibieren oder dass im Vergleich die OB von Osteoporose-Patienten die physiologisch vorkommenden ROS schlechter abbauen können als die Vergleichsgruppen. Allerdings konnte die Katalase die Aktivität der AP nicht beeinflussen. Zwar steigt die Konzentration, trotzdem gibt es keinen maßgeblichen Unterschied zu den Vergleichsproben, die ausschließlich in OM ohne weitere Zusätze kultiviert wurden. Dies könnte mitunter daran liegen, dass die AP nur zu drei Zeitpunkten gemessen wurde. Da sie aber nur im frühen Wachstumsprozess der Zellen exprimiert wird und anschließend ihre Konzentration wieder sinkt (Vimalraj 2020), könnten auch die Messzeitpunkte nicht optimal gewählt worden sein.

Außerdem haben wir im Blut der Probanden die AP bestimmt. Auch hier konnten wir keine Unterschiede im Gruppenvergleich ausmachen.

Eine Limitation des Versuchsaufbaus ist die fehlende pH-Messung der Proben, die mit Katalase inkubiert wurden; denn die Wirkung des Enzyms ist pH-abhängig (Goyal und Basak 2010). Da das Funktionsoptimum von Katalase allerdings mit einem pH zwischen 5 und 10 sehr breit ist (Goyal und Basak 2010), und sie in diesem Bereich auch eine etwa gleichbleibende Aktivität aufweist (Thibodeau und Keefe 1990), ist die Wahrscheinlichkeit groß, dass wir uns innerhalb des Versuchszeitraumes in diesem Bereich bewegt haben.

Weiterhin zeigte sich in allen drei Spendergruppen im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen, dass die Zugabe von H₂O₂ zu einer geringen Abnahme der osteogenen Differenzierung und Aktivität der AP führt. Lediglich die Konzentration der AP nach 21-tägiger Kultivierung in der Gruppe mit normaler Knochendichte ist sehr stark angestiegen. Möglicherweise können OB von Menschen mit normaler Knochendichte oxidativen Stress besser kompensieren. Ansonsten bestätigen die Ergebnisse, dass sich eine erhöhte Konzentration von H₂O₂ hemmend auf die Matrixmineralisation auswirkt, wie beispielsweise auch durch Bai et al. an Knochenmarkszellen von Kaninchen gezeigt werden konnte (Bai et al. 2004).

Katalase als antioxidatives Enzym fördert also die osteogene Differenzierung unabhängig von der vorliegenden Knochendichte, wobei die größte Steigerung in der Osteoporose-Gruppe verzeichnet wurde. Somit könnte der Einsatz von Antioxidantien, insbesondere bei Patienten mit einer Osteoporose, ein zukünftiger Ansatzpunkt sein, um die Therapie der Osteoporose zu verbessern, indem die Funktion des Knochens durch den Abbau von überschüssigem ROS gefördert wird. Bereits Martiniakova et al. beschreiben in ihrem Artikel mehrere natürlich vorkommende Antioxidantien, die in Versuchen die Knochendichte steigern konnten, darunter Resveratrol, Acteosid sowie Schwarztee-Extrakt (Martiniakova et al. 2020).

Neben Katalase wurden die Zellen der drei Versuchsgruppen auch mit inaktivierter Katalase (ia Kat) kultiviert. Damit sollte untersucht werden, inwieweit die enzymatische Funktion der Katalase an ihrem Einfluss auf OB beteiligt ist. Proteine sind dreidimensionale Moleküle. Nur in einer erhaltenen tertiären Struktur – gebildet durch Wechselwirkungen der enthaltenen Aminosäuren – sind sie voll funktionsfähig. Allerdings können diese Wechselwirkungen, wie die Wasserstoffbrücken- und Ionenbindungen, durch unterschiedliche Faktoren beeinflusst werden. Dazu zählen neben pH, hydrostatischem Druck und Salzgehalt auch die Temperatur. (Matsuura et al. 2015; Jaenicke 1992) Die Möglichkeit zur Inaktivierung von Katalase mittels Wärmeeinwirkung ist schon vor vielen Jahren beschrieben worden. Durch Einwirkung von Hitze verliert das Enzym nicht direkt seine katalytische Aktivität, wird aber empfindlicher für schädliche Einflüsse wie Strahlung. (Setlow 1951) Morgulis und sein Team beschreiben eine zeit- und temperaturabhängige Inaktivierung von Katalase. Unterhalb von 40 °C wird die Funktion des Enzyms nicht beeinträchtigt. Eine gänzliche Inhibierung der Funktion scheint mit weniger als 45 min Inkubationszeit bei 55 - 60 °C erreicht zu sein. Bereits nach 30 min ist nur noch eine minimale Restaktivität nachweisbar. Je höher die Temperatur, desto leichter wird das Enzym angreifbar und kann so auch durch H₂O₂ selbst zerstört werden. (Morgulis et al. 1926b) Die von

uns verwendete Inaktivierung bei 90 °C für 30 min führte zu einer deutlichen Reduktion der Katalase-Aktivität. Die Proben mit zu verschiedenen Zeitpunkten angesetzter ia Kat wiesen nur noch eine minimale Rest-Enzymaktivität im Vergleich zur unbehandelten Katalase auf. Aus den Studien von Morgulis et al. lässt sich zudem schlussfolgern, dass Katalase bei 35 - 50 °C ihr Funktionsoptimum hat (Morgulis et al. 1926b) und unsere Kultivierungsbedingungen bei 37 °C somit gute Bedingungen für die Funktion des Enzyms darstellen. Aber auch niedrige Temperaturen bis in den negativen Bereich scheinen keine Einschränkung für die Katalase zu haben (Morgulis et al. 1926b).

Obwohl man annehmen könnte, dass durch Inaktivierung der Katalase die OB in unseren Kulturen durch die fehlende ROS-abbauende Funktion einem größeren oxidativen Stress ausgesetzt sind und dadurch in ihrem Wachstum eingeschränkt werden, zeigten die OB aller drei Gruppen einen deutlichen Anstieg in der osteogenen Differenzierung, die sogar die Werte der Differenzierung unter Inkubation mit funktioneller Katalase überstieg. Der deutlichste Anstieg war in der Osteoporose-Gruppe zu verzeichnen. Die Aktivität der AP hingegen ähnelte der unter Inkubation mit nicht-inaktivierter Katalase beziehungsweise der Inkubation ausschließlich in OM. Möglicherweise besitzt die Katalase neben dem bekannten enzymatischen Mechanismus zur Inaktivierung von ROS noch weitere Funktionen, die das Wachstum von OB unterstützen, ohne dabei durch Hitze manipuliert zu werden. Vielleicht beeinflusst das Protein die OB direkt oder nimmt Einfluss auf dessen Stoffwechselwege.

Vetrano et al. konnten beispielsweise zeigen, dass die Katalase von Säugetieren neben ihrer Fähigkeit ROS abzubauen, in vitro auch eine Oxidase-Aktivität besitzen. Sie konnten nachweisen, dass unter Anwesenheit von O₂ verschiedene Substrate durch Katalase oxidiert werden können und diese Reaktion sogar unabhängig von Wasserstoffperoxid ist. (Vetrano et al. 2005) Möglicherweise kann eine derartige Funktion des Enzyms die Osteogenese positiv beeinflussen.

Des Weiteren sollte die Möglichkeit bedacht werden, dass der Inaktivierungsvorgang der Katalase nicht adäquat war, auch wenn wir diesen überprüft hatten. Wie Morgulis et al. in ihren Versuchsaufbauten feststellen konnten, begann die enzymatische Reaktion der Katalase in ihren Experimenten direkt mit Zugabe von H₂O₂. Temperaturabhängig dauerte diese Reaktion dann bis zur vollständigen Umsetzung der ROS aber unterschiedlich lange an und beinhaltet – wiederum abhängig von der Temperatur – intermittierende Pausen von bis zu 15 sec. (Morgulis et al. 1926a) Der durch uns durchgeführte Versuch zur Aktivitätsbestimmung der Katalase dauerte nur 30 min für die Inkubation mit H₂O₂, nach Morgulis et al. kann die Gesamtzeit der Reaktion aber bis zu 6 h dauern (Morgulis et al. 1926a). Somit ist es durchaus möglich, dass der von uns durchgeführte Inaktivierungsprozess nicht adäquat war und die vorhandene Aktivität oder Restaktivität wegen des kurzen Messintervalls nicht erfasst wurde. Dies sollte in einem erweiterten Versuch näher analysiert werden. Insbesondere da man weiß, dass die Katalase eine extrem hohe Umsatzgeschwindigkeit hat (10⁷ M/sec) (Goyal und Basak 2010), reichen wenige nicht-inaktivierte Enzyme aus, um eine adäquate Funktion des Proteins zu erzielen. Möglicherweise ist dies auch ein Hinweis darauf, dass geringere Katalasekonzentrationen besser geeignet sind, um die Funktion des Knochens zu unterstützen. Denn da ein gewisses Maß an ROS für verschiedenste

physiologische Prozesse im menschlichen Körper notwendig ist (Brieger et al. 2012), könnten hohe Konzentrationen von Antioxidantien das Maß an ROS zu weit reduzieren.

Untersucht werden könnte weiterhin, ob der Prozess der Inaktivierung zur Freisetzung des Fe aus der Katalase geführt hat, die wiederum einen positiven Einfluss auf die OB ausüben könnte. Vermutet werden könnte hier die Abspaltung des Fe aus dem Porphyrinring. Da aber die alleinige Inkubation der OB mit Fe_2SO_4 keinen förderlichen Einfluss auf die Entwicklung der OB erzielte, konnte ausgeschlossen werden, dass dieses Metall alleinig für den förderlichen Einfluss der ia Kat verantwortlich zu sein.

Interessant wäre es weiterhin, andere Inaktivierungsmethoden, wie beispielsweise mittels UV-Strahlung (Giordani et al. 1997) oder Cyanid (Sepasi Tehrani und Moosavi-Movahedi 2018) auf das Enzym anzuwenden und mit der Katalase zu vergleichen, bevor dessen alleiniger Einfluss auf die OB betrachtet wird.

5.1.2 Die Wirkung von Mangan(III)-Tetrakis-(4-Benzoessäure)-Porphyrin Chlorid auf die osteogene Differenzierung von OB

Neben der Katalase haben wir die Wirkung eines weiteren Antioxidans untersucht. Mangan(III)-Tetrakis-(4-Benzoessäure)-Porphyrin Chlorid (MnTBAP) ist ein Mimetikum der SODs. Der protektive Effekt auf den Knochen konnte bereits experimentell bestätigt werden. In ovariektomierten Mäusen konnte MnTBAP unter anderem den Knochenverlust und die Zahl an Osteoklasten mindern, während die Konzentration der OB anstieg. Auch konnte der Level an oxidativem Stress signifikant reduziert werden. (Cao et al. 2020).

Der vom Team um Cao erzielte Effekt konnte durch unsere Arbeit nicht bestätigt werden; denn die osteogene Differenzierung konnte durch die Zugabe von MnTBAP nur hinsichtlich der AP verbessert werden. Teilweise war die Aktivität deutlich höher als unter Inkubation ausschließlich mit OM oder mit Katalase.

Wichtig zu bedenken ist, dass der katalytische Mechanismus von MnTBAP im Vergleich zu dem der Katalase vor allem auf der Umsetzung von deutlich reaktiveren Hyperoxiden (O_2^-) zu H_2O_2 oder zu O_2 beruht (Rebouças et al. 2008; Spasojević und Batinić-Haberle 2001). Ebenso ist das Enzym aber dazu in der Lage, H_2O_2 zu Wasser und O_2 zu katalysieren, allerdings in deutlich geringerem Ausmaß ($0,32 \mu\text{mol}/\text{sec}$) als die Katalase ($10^7 \text{ M}/\text{sec}$) (Goyal und Basak 2010; Day et al. 1997). Vergleichbar zur Katalase ist zudem, dass die katalytische Reaktion von MnTBAP mittels des Metalls im Porphyrinring stattfindet. Allerdings handelt es sich hierbei um Mangan statt um Fe.

Es lässt sich festhalten, dass auch MnTBAP einen förderlichen Effekt auf die osteogene Differenzierung der OB hat. Die Aktivität der AP konnte durch das Antioxidans in der Gruppe mit normaler Knochendichte und mit Osteoporose deutlich gefördert werden. Im Vergleich zur Katalase konnte allerdings kein relevanter Einfluss auf die Knochenmineralisierung nachgewiesen werden. Diese konnte

durch Katalase v.a. in der Gruppe osteoporotischer Spender gezeigt werden. Ein relevanter Unterschied zwischen den beiden Antioxidantien sind auch die unterschiedlichen zu katalysierenden ROS. Daher ist ein direkter Vergleich beider Enzyme nur mit Einschränkungen möglich. Vermutlich hat die Katalase aber einen größeren protektiven Effekt auf den Knochen und kann darüber hinaus sogar den Aufbau von Knochenmatrix unterstützen, was insbesondere bei bereits reduzierter Knochendichte relevant ist.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass sowohl Katalase als auch MnTBAP als Antioxidans die osteogene Differenzierung in OB älterer Patienten fördern. Ein Effekt auf die Aktivität der AP konnte nur durch Zugabe von MnTBAP erzielt werden. Allerdings darf nicht außer Acht gelassen werden, dass es viele weitere Einflussfaktoren auf die AP gibt, die zu dessen Erhöhung oder Verminderung führen können. Erhöht sein kann sie unter anderem bei unbehandelter Zöliakie, verschiedenen Knochenkrankheiten, Kindern und Schwangeren oder bei obstruierten Gallengängen. Auch mögliche Gründe für erniedrigte Spiegel sind vielfältig. Darunter fällt beispielsweise eine Achondroplasie, eine schwere Anämie und die Östrogenbehandlung postmenopausaler Frauen mit Osteoporose. (Sharma et al. 2013) Mögliche negative Einflussfaktoren auf die Katalase sollten also in weitergehenden Versuchen eruiert und so weit wie möglich minimiert werden.

5.2 Rolle von Fe im Knochenmetabolismus

Fe ist ein essenzielles Spurenelement, das über die Nahrung aufgenommen werden muss und für viele Funktionen im menschlichen Körper wie den Transport von Elektronen oder O₂ sowie die Synthese der DNA mit-/verantwortlich ist. Außerdem hat es eine wichtige Redoxreaktivität. Aber es kann auch toxisch wirken und zur Produktion von ROS beitragen. (Wang und Pantopoulos 2011; Lu et al. 2020; Galaris et al. 2019) Ein langfristiger Eisenmangel kann eine Anämie verursachen. Karzinome, Diabetes mellitus und Herzinfarkte hingegen sind Beispiele für Erkrankungen, die mitunter Folge eines Überschusses an Fe sind, wie er bei einer Hämochromatose vorliegen kann. Außerdem ist ein erhöhtes Serum-Ferritin mit einer verringerten Knochendichte assoziiert. (Lu et al. 2020) Yamasaki und Hagiwara konnten zeigen, dass Fe-Ionen in gewissen Konzentrationen (1 µg/ml) die Differenzierung und Mineralisierung von OB reduziert, was zur Entstehung einer Osteoporose beitragen kann (Yamasaki und Hagiwara 2009). Außerdem wird die Aktivität von Osteoklasten durch Fe verstärkt. Aber auch ein langfristiger Fe-Mangel beeinflusst die Knochendichte negativ. (Che et al. 2019)

Weiterhin ist Fe essenzieller Bestandteil der Katalase. Die menschliche Katalase besteht aus vier identischen Untereinheiten, die je eine Häm-Gruppe besitzt. In jeder Häm-Gruppe ist ein Fe³⁺-Molekül in einem Porphyrin-Ring gebunden. Das Fe³⁺ hat durch den Transfer von Elektronen eine zentrale Rolle für die antioxidative Funktion des Enzyms. Durch Reduktion und Oxidation des Fe-Moleküls wird H₂O₂ abgebaut. (Goyal und Basak 2010)

Neben Katalase haben wir daher auch Fe in Form von Fe₂SO₄ für unsere Zellkulturen verwendet, um die Rolle des Metalls für die Katalase und den Einfluss auf OB zu beurteilen. Die Inkubation der von

uns verwendeten OB mit 50 $\mu\text{mol Fe}_2\text{SO}_4$ zeigte lediglich eine gering erhöhte osteogene Differenzierung der OB bei Osteoporosepatienten im Vergleich zu den Patienten mit normaler Knochendichte. Die Zugabe von Katalase hingegen wirkte sich deutlich stärker auf die inkubierten Zellen aus. Das lässt vermuten, dass das Fe-Molekül im Porphyrinring des Enzyms nicht für die gesteigerte osteogene Differenzierung verantwortlich ist.

Da hohe Konzentrationen des Metalls, wie bereits oben beschrieben, durch Erhöhung der ROS-Konzentration auch schädlich auf den Knochen wirken können und bekannt ist, dass Mengen von 50 $\mu\text{mol/L}$ bereits einen negativen Einfluss auf die Zellen des Knochens ausüben können (Che et al. 2019), haben wir in einem weiteren Experiment OB mit Fe_2SO_4 -Konzentrationen zwischen 25 und 150 μmol über 21 d inkubiert, ohne allerdings eine verringerte Zellviabilität ausmachen zu können., was die Annahme bestätigt, eine effektive und nicht toxische Konzentration für die Versuche verwendet zu haben.

Es könnte möglich sein, dass Zellen, wie von Wang und Pantopoulos beschrieben, dazu in der Lage sind, ein Überangebot an Fe durch Sekretion oder Speicherung von Fe in Form von Ferritin bis zu einem gewissen Maß zu kompensieren, um einem toxischen Effekt vorzubeugen (Wang und Pantopoulos 2011).

Mehrfach wurde publiziert, dass Fe ein relevantes Spurenelement für den menschlichen Körper und auch für die Funktion der Katalase ist (Che et al. 2019; Goyal und Basak 2010). Da Fe alleine keinen relevanten Einfluss auf die OB erzielen konnte, scheint es nicht an dem positiven Effekt der Katalase beteiligt zu sein. Und auch die Experimente von Lee et al., in denen sie Ratten mit bis zu 1255 ppm Fe supplementierten, ohne ein relevantes Maß an oxidativem Stress mit verstärkter Katalase-Aktivität zu erzeugen, legen den Schluss nahe, dass eine zusätzliche Fe-Substitution keinen Einfluss auf die antioxidative Funktion der Katalase hat (Lee et al. 2018).

Anhand unserer Forschungsergebnisse lässt sich die Hypothese formulieren, dass bei älteren Patienten, insbesondere mit Osteoporose, entweder die endogene Expression der Katalase, ihre Funktion oder die Konzentration anderer antioxidativer Enzyme verringert sein könnte, oder die Produktion von ROS erhöht ist, sodass die schützenden körpereigenen Mechanismen nicht mehr ausreichend sind, um oxidativen Stress zu kompensieren und ein Gleichgewicht von ROS und Antioxidanteien wiederherzustellen. Schon seit vielen Jahren weisen Forschungsergebnisse darauf hin, dass genau diese erhöhten ROS-Konzentrationen bei älteren Menschen vorliegen (Harman 1992). Die Menge der vorhandenen Katalase reicht dann nicht mehr aus, um das Übermaß an ROS abzubauen.

5.3 Zelluläre Seneszenz von OB des älteren Menschen

Zelluläre Seneszenz kann die Funktion der Knochenzellen einschränken und zu Knochenverlust im Sinne einer verminderten Knochendichte führen (Kassem und Marie 2011). Daher sollte analysiert

werden, ob die OB von Osteoporose-Spendern im Vergleich zu Probanden mit normaler Knochendichte verstärkt von Alterungsprozessen betroffen sind.

β -Gal ist ein häufig verwendeter Marker, um die zelluläre Seneszenz zu analysieren (Maier et al. 2007). Durch Kultivierung von OB mit β -Gal war es uns möglich, seneszente Zellen zu detektieren. Auch Wei et al. konnten in Versuchen, in denen sie gezielt Seneszenz induzierten, eine Zunahme dieser mittels β -Gal nachweisen (Wei et al. 2018). Das unterstützt unsere Annahme, mit β -Gal einen geeigneten Marker ausgewählt zu haben.

Anhand beispielhafter Spender konnte in unseren Versuchen visualisiert werden, dass OB von Osteoporose-Spendern, als Hinweis auf verstärkte Seneszenz, mehr β -Gal exprimieren als die Vergleichsgruppen. Allerdings waren die in unseren Ergebnissen gezeigten und gut sichtbaren Unterschiede nicht bei allen Probanden erkennbar.

Eine erhöhte Konzentration des Enzyms kann auch durch andere Bedingungen induziert werden. Konfluente Zell-Layer korrelieren mit erhöhten Raten an β -Gal. Und auch bei immortalisierten Zellreihen ist das Enzym detektierbar. Somit ist der Nachweis des Enzyms nicht zwingend ausschließlich auf die zelluläre Seneszenz zurückführbar. Trotzdem ist er unter definierten Bedingungen (wie einem pH von 6) ein attraktiver und gerne verwendeter Marker. (Maier et al. 2007)

Einige Forscher plädieren dafür, Untersuchungen nicht auf nur einen Marker für Seneszenz zu reduzieren, da keiner spezifisch genug sei. Zur zweifelsfreien Detektierung seneszenten Zellen wird daher eine Kombination von Markern empfohlen. So könnte man andere Marker zellulärer Seneszenz, wie beispielsweise eine Hypertrophie der Zellsomas mit verminderter Zellteilungsrate, veränderte Konzentrationen verschiedener Metabolite wie Glutamat oder Laktat, die Akkumulation von Lipiden, verkürzte Telomere, DNA-Doppelstrangbrüche oder Lipofuscin, evaluieren. (Ogrodnik 2021)

Aber auch eine vermehrte Anzahl von Doppelstrangbrüchen sowie die verstärkte Expression von p53 werden als Hinweise für Seneszenz gesehen (Ogrodnik 2021; Kritsilis et al. 2018). Daher haben wir auch diese zwei Marker untersucht.

Die erwähnten Doppelstrangbrüche (DSB) der DNA können zu Zellzyklusarrest und Apoptose, aber auch zu Mutationen und chromosomaler Instabilität führen und werden mit Zellseneszenz assoziiert. Die Häufigkeit von DSB nimmt mit dem Alter der Zellen zu. (Ogrodnik 2021) Da γ -H2AX Strangbrüche der DNA und vor allem DSB anzeigt (Kuo und Yang 2008), haben auch wir den Nachweis des Proteins genutzt, um Schäden des Erbmaterials in unseren Versuchsgruppen zu quantifizieren und zu vergleichen. Allerdings zeigten sich hier im Gegensatz zu β -Gal keine Unterschiede, die auf vermehrte DSB von Zellen osteoporotischer Spender schließen ließen.

ROS sind in der Lage, Schäden an der DNA zu verursachen und DSB sind ein klassisches Phänomen seneszenten Zellen (Davalli et al. 2016). Die Messung von γ -H2AX zum Nachweis von DSB ist eine einfache, sehr sensitive und verbreitete Methode, diese Schäden zu untersuchen (Kuo und Yang 2008).

Wenn wir annehmen, dass osteoporotischer Knochen einen erhöhten Prozentsatz seneszenten Zellen enthält im Vergleich zu dem von Probanden ohne verminderte Knochendichte, lassen die Ergebnisse unseres Experiments vermuten, dass eine Zunahme an DSB nicht für die Entwicklung dieser Seneszenz verantwortlich ist oder aber Reparaturmechanismen noch effektiv funktionieren. Diese Vermutung lässt sich durch die durch uns gemessene Expression des Proteins p53 in den drei Gruppen unterstützen. Das verstärkte Vorkommen in den Zellen von Spendern mit Osteopenie und Osteoporose zeigt, dass es in diesen Zellen zu einer häufigeren Unterbrechung des Zellzyklus kommen kann als in Zellen gesunder Spender, um Reparaturprozesse an der DNA zu initiieren.

Dass p53 in OB von Personen mit Osteoporose vermehrt exprimiert wird, konnten auch Yu et al. in ihren Studien zeigen. Weiterhin konnten sie nachweisen, dass eine Verringerung der Konzentration des Proteins die Osteogenese steigert. (Yu et al. 2020) Der Tumor-Suppressor p53 könnte somit eine relevante Rolle für die Osteoporose haben. Durch seine Funktion in der Induktion von Zellzyklus-Arrest könnte es aufgrund von Überexpression des Proteins zu einer verminderten Regeneration des Knochengewebes kommen.

5.4 Rolle von Vitamin D und des Vitamin D-Rezeptors (vdr) im Knochenmetabolismus

Durch die Aufrechterhaltung eines ausreichenden Calcium- und Phosphat-Spiegels bildet Vitamin D einen wichtigen Grundstein für eine stabile Knochensubstanz (Parra-Torres et al. 2013). Daher ist die Substitution von Cholecalciferol bei Konzentrationen unterhalb des Normwertes eine der ersten und häufigsten Maßnahmen zur Vorsorge oder Behandlung einer Osteoporose (Kerschán-Schindl 2016). Ein solcher Vitamin-Mangel ist in den meisten Regionen der Welt vertreten. Vor allem im mittleren Osten, China, der Mongolei und Indien ist er ein häufiges Problem. Und gerade in den Wintermonaten ist er keine Seltenheit. (van Schoor und Lips 2018) Das bestätigt sich auch bei Betrachtung der Laborergebnisse unserer Probanden. Alle von uns untersuchten Personen (mit Ausnahme derer, die bereits eine Substitution erhielten), haben eine Serum-Konzentration des 25-OH-Vitamin D₃ von unter 25 ng/ml. Spricht man dem Vitamin eine entscheidende Rolle in der Zuführung relevanter Stoffe für den Knochenmetabolismus zu, könnte man Vitamin D als mögliche mitverursachende Komponente für ein Frakturgeschehen einstufen. Allerdings war der Mangel nicht nur bei den Osteoporose-Spendern, sondern auch bei den Osteopenie-Spendern und den Kontrollen mit normaler Knochendichte nachweisbar. Auch in der Literatur können einige Arbeiten keinen Zusammenhang zwischen Vitamin D und der Knochendichte ausmachen (Safari et al. 2019), während andere zeigen, dass Vitamin D den durch ROS verursachten Schaden mindert und sich förderlich auf den Knochenmetabolismus auswirkt (Zhou et al. 2018).

Auf den ersten Blick konträr dazu verhalten sich die Calcium-Spiegel im Blut, die bei den meisten Probanden im Normbereich liegen. Allerdings gilt es zu bedenken, dass, wenn der notwendige Spiegel

von Calcium nicht durch die externe Aufnahme mit Hilfe von Vitamin D gelingen kann, die Konzentration auch durch Freisetzung aus dem Knochen aufrechterhalten wird. Bei andauernder Mobilisation aus diesem Depot kann dies zur Entstehung von Osteoporose führen oder beitragen. (Nordin)

Neuere Studien weisen zudem darauf hin, dass auch der vdr eine verringerte Knochendichte bedingen kann. Abhängig von Rezeptorpolymorphismen kann sich dabei sowohl eine geringere als auch eine erhöhte Knochendichte einstellen. (Zhang et al. 2018; Chen et al. 2020)

Wir haben in allen drei Versuchsgruppen die Expression des vdr analysiert, konnten aber keine Unterschiede detektieren. Mögliche Polymorphismen, die die Funktion steigern oder hemmen, wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht. Um den Aufbau oder die Funktion des Rezeptors in Zusammenhang mit der Entwicklung einer Osteoporose zu untersuchen, sind weitere Gensequenzierungen nötig.

5.5 Adipogenese nach osteogener Differenzierung

Das medulläre Fettgewebe macht mit etwa 70 % einen entscheidenden Anteil des Knochenmarks aus, und das bereits bei knochengesunden Menschen (Ge et al. 2018).

Der Alterungsprozess des Menschen geht einher mit einer abnehmenden Knochenmasse und damit von funktionsfähigen OB, wohingegen der Fettgehalt und der Anteil an Adipozyten des Knochens stetig zunimmt (Kassem und Marie 2011). Auch im osteoporotischen Knochen konnte dieser inverse Effekt nachgewiesen werden (Ge et al. 2018). OB und Adipozyten haben einen gemeinsamen ontologischen Ursprung. Beide differenzieren sich aus MSCs. (Siggelkow 2008)

Diesen veränderten Anteil an Fettzellen im pathologisch veränderten Knochen haben auch wir in einem Versuchsaufbau beobachten können. Dazu haben wir OB der drei Versuchsgruppen nach Kultivierung in OM bezüglich ihres Potentials zur adipogenen Differenzierung beurteilt. Dabei konnten wir zeigen, dass sich bei den Spendern mit Osteoporose deutlich mehr Fettdroplets gebildet haben, als dies in der Gruppe mit normaler Knochendichte und der mit Osteopenie der Fall war. Auch unsere mikroskopischen Aufnahmen unterstützen dieses Ergebnis.

Hauptsächlich werden zwei verschiedene Mechanismen diskutiert, die zu dieser Abnahme an OB und Zunahme an Adipozyten führen. Zum einen wird einer veränderten Expression von Transkriptionsfaktoren und Signalwegen eine relevante Rolle zugeschrieben, durch dessen Einfluss die Differenzierung neuer Adipozyten gefördert und die von OB gehemmt wird. Als ein solches Protein konnte zum Beispiel PPAR γ (Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor gamma) identifiziert werden. Man konnte zeigen, dass die Phosphorylierung dieses Transkriptionsfaktors eine entscheidende Rolle spielt, PPAR γ im Alter vermehrt exprimiert wird und sowohl zu einem Anstieg an Fettzellen des Knochenmarks führt als auch zu einer verminderten Aktivität und Differenzierung von OB. (Siggelkow

2008; Ge et al. 2018) Ge et al. führten Versuche mit PPAR γ -mutierten Mäusen durch, deren *gain of function*-Mutation zu einer Überexpression des Proteins führte. Hier konnten sie nachweisen, dass es in Zellkulturen mit OB, selbst wenn sie additiv mit osteogenem Differenzierungsmedium behandelt wurden, zur spontanen Entwicklung von Fettdroplets kam, so wie sie üblicherweise nur in Adipozyten zu finden sind. (Ge et al. 2018) Daneben wurden mittlerweile viele weitere Unterschiede zwischen Menschen mit ausreichender und verringerter Knochendichte gefunden, die Einfluss auf OB und Adipozyten haben können. Dazu zählen Veränderungen in exprimierten Genen und Signalmolekülen wie Wnt, PTH und FGF2 sowie mechanische Belastung. (Choi et al. 2017; Ge et al. 2018) Adipozyten scheinen dabei auch direkt hemmenden Einfluss auf benachbarte OB zu nehmen (Clabaut et al. 2021).

Der zweite diskutierte Mechanismus, der eine Abnahme der OB erklären könnte, ist eine Transdifferenzierung der OB zu Adipozyten. Auch wenn dieses Konzept noch umstritten ist, konnte in *In-vitro*-Experimenten von Clabaut et al. gezeigt werden, dass von Adipozyten sekretierte Faktoren innerhalb von Stunden zur Konversion von OB zu Präadipozyten führen. Dabei konnten spezifische Marker für Adipozyten wie PPAR γ nachgewiesen werden sowie eine verändertes DNA-Methylierungsmuster als Zeichen der Reprogrammierung. (Clabaut et al. 2021) Weiterhin gibt es bisher zahlreiche Nachweise von spontanen Transdifferenzierungen anderer Zelltypen, sowohl unter pathologischen als auch physiologischen Bedingungen. Beispielhaft wären hier Schwann-Zellen des Nervensystems zu nennen, die bei Vorliegen eines Nervenschadens entdifferenzieren, um die axonale Reparatur zu unterstützen und sich im Anschluss daran wieder differenzieren. (Merrell und Stanger 2016)

Auch wir haben in einem weiteren Versuchsaufbau die OB der drei Gruppen für zwei Wochen in adipogenem Differenzierungsmedium kultiviert, um ein mögliches adipogenes Differenzierungspotential nachzuweisen. Hier zeigten die Zellen der von Osteopenie betroffenen Spender einen deutlich größeren Anteil an Fettdroplets als die Proben der Spender mit normaler Knochendichte. Der erhöhte Gehalt an Fettzellen in den Osteopenie-Proben lässt darauf schließen, dass die OB tatsächlich ein gewisses Potential zur Transdifferenzierung besitzen. Dieses Potential konnten auch Clabaut et al. nachweisen (Clabaut et al. 2021). Andererseits muss auch die Möglichkeit bedacht werden, dass möglicherweise in den Proben noch vorhandene pluripotente Zellen oder Adipozyten das Ergebnis verfälschen können. Weiterhin muss der Umstand bedacht werden, dass sich Adipozyten vom Untergrund der Versuchsbehältnisse abgelöst haben könnten und beim regelmäßigen Mediumwechsel mit weggespült wurden. So können zum Beispiel in der Probe verbliebener Waschpuffer oder freie Lipide zu einem erleichterten Ablösen der Zellen beitragen (Alexandersson et al. 2020).

5.6 Bedeutung des RANK-RANKL-OPG-Systems

Das System aus RANK, RANKL und OPG spielt eine entscheidende Rolle im Knochenmetabolismus und in der Pathologie der Osteoporose. RANK ist ein transmembranöser Rezeptor, der von Osteoklasten

exprimiert wird. Die Interaktion des Rezeptors mit RANKL fördert die Aktivierung, Differenzierung und Reifung der Osteoklasten. RANKL wird von OB und Stromazellen des Knochenmarks sekretiert. Weiterhin produzieren osteoblastäre Zellen aber auch OPG, das als Decoy-Rezeptor die Interaktion von RANK und RANKL verhindert, indem es den Liganden abfängt. (Li et al. 2015) Eine Imbalance zwischen RANKL und OPG ist in die Entstehung verschiedener Erkrankungen involviert, darunter auch die der Osteoporose (Mamolini et al. 2017).

Dass die Osteoporose durch eine genetische Disposition induziert werden kann, ist bekannt, wobei bisher eine Vielzahl an möglicherweise beteiligten Genen aufgedeckt wurde, darunter *osteoclast stimulating factor 1* (OSTF1) und *G protein-coupled receptor 116* (GPR116) (Sheng et al. 2017; Yang et al. 2019). Die Auswirkung dieser genetischen Veränderungen scheint aber, abhängig von weiteren beeinflussenden Faktoren wie Alter und Ethnizität, unterschiedlich starken Einfluss auf den Knochenstoffwechsel zu haben. Mamolini et al. konnten zeigen, dass einige RANKL-Varianten in Proben von Spendern mit Osteoporose häufiger vorkommen als in einer Gruppe mit normaler Knochendichte. In der Metaanalyse von Sheng et al. konnten OPG-Polymorphismen ausfindig gemacht werden, die mit osteoporotischen Frakturen assoziiert sind. Daraus schlossen die Forscher auf einen wahrscheinlichen Einfluss von OPG- und RANKL-Varianten auf die Entwicklung der Osteoporose. (Sheng et al. 2017; Mamolini et al. 2017) Weiterhin konnte gezeigt werden, dass ein medikamentöser Eingriff ins RANK-RANKL-OPG-System eine effektive Möglichkeit der Osteoporose-Therapie darstellt. Denosumab als monoklonaler Antikörper gegen RANKL wird heutzutage bereits in der klinischen Therapie erfolgreich eingesetzt. (Gallagher und Tella 2014)

In unseren Experimenten haben wir die Expression von OPG evaluiert. Die geringste OPG-Konzentration wies die Osteoporose-Gruppe auf, gefolgt von den Spendern mit Osteopenie bis hin zu den Patienten mit normaler Knochendichte. Ähnliche Ergebnisse sind auch in den Studien von Li et al. zu finden. Im Tiermodell war die Konzentration der OPG-mRNA mit induzierter Osteoporose signifikant geringer als in der Gruppe mit unauffälliger Knochendichte. (Li et al. 2015) Die in unserer Arbeit erzielten Ergebnisse stützen die Annahme, dass eine verminderte OPG-Konzentration eine relevante Rolle auf die Knochendichte hat. Zudem konnten Forscher zeigen, dass Östrogen die Expression von OPG unterstützt und RANKL hemmt, sodass ein Mangel des Hormons eine verminderte Knochendichte bedingen kann (Li et al. 2015; Cheng et al. 2022).

5.7 Veränderungen im Blutbild des älteren Menschen

Um weitere Anhaltspunkte für mögliche Einflüsse auf den Knochenmetabolismus älterer Menschen oder Menschen mit Osteoporose zu erhalten, haben wir auch einige Blutwerte der Probanden analysiert.

Im Blut der von uns untersuchten Probanden zeigte sich, dass ein Teil der Personen einen erniedrigten Hb-Wert hatte. Die post-OP Erniedrigung bei allen Spendern ist mit großer Wahrscheinlichkeit auf den Blutverlust intraoperativ zurückzuführen. Da für die Produktion des Häm innerhalb des Hb, als zentraler

Bestandteil zum Transport von O₂, Fe notwendig ist (Galaris et al. 2019), ist Hb ein potenzieller Marker für einen Mangel an dem Spurenelement. Allerdings liegen die Konzentrationen gruppenübergreifend sowohl bei männlichen als auch weiblichen Spendern gleichermaßen im oder unterhalb des Normwertes, sodass hier kein konkreter Hinweis auf einen Eisenmangel zu finden ist. Auch bei der Betrachtung des Hämatokrits der Probanden verhielten sich die Ergebnisse ähnlich mit erniedrigten Konzentrationen in allen drei Versuchsgruppen. Da die Erythrozyten, die das Hb enthalten, den Hauptteil des Hämatokrits ausmachen, war ein solches Ergebnis zu erwarten.

Mehrfach konnte nachgewiesen werden, dass im Organismus von Patienten mit Osteoporose eine verstärkte Inflammation vorherrscht. Dabei produzierte proinflammatorische Zytokine wiederum führen zu einer vermehrten Produktion von ROS. (Zhang et al. 2021) Ein entzündliches Geschehen kann auch im Blut durch verschiedene Parameter nachgewiesen werden. Häufig verwendet wird dabei beispielsweise das CRP. Das Plasmaprotein zeigt einen messbaren Anstieg bei Vorliegen von Gewebeerkrankungen und diversen Infektionen und ist damit Teil der Akute-Phase-Reaktion des menschlichen Körpers (Black et al. 2004). In unserer Auswertung wurden allerdings erhöhte CRP-Parameter in allen Versuchsgruppen gleichermaßen festgestellt, insbesondere nach der Operation der zu versorgenden Fraktur. Auch in den Experimenten von Safari et al. konnte ein Zusammenhang zwischen CRP und Osteoporose nicht herausgearbeitet werden, wobei die Datenlage zu diesem Thema in der Literatur eher unstetig ist (Safari et al. 2019). Die Beurteilung des Proteins im Hinblick auf die Osteoporose ist insofern eingeschränkt, als dass ein Trauma allein, wie es bei unseren Probanden in Form von Frakturen des Femurs und durch die anschließende Operation vorlag, zu einem Anstieg des CRPs führen kann (Black et al. 2004).

Dass das Immunsystem einen bedeutenden Einfluss auf die Knochenhomöostase hat, konnte bereits in vielen Studien nachgewiesen werden. Ganz allgemein konnte festgestellt werden, dass chronische, systemische, niederschwellige Infektionen mit Alterungsprozessen assoziiert sind, was in der Wissenschaft auch als *inflamm-aging* bezeichnet wird. Neben der Osteoporose werden auch viele weitere Erkrankungen durch chronische Entzündungsprozesse initiiert oder gefördert, darunter Diabetes mellitus Typ 2, chronisch entzündliche Darmerkrankungen und COPD (chronisch obstruktive Lungenerkrankung). Mögliche Auslöser für eine solche chronische Inflammation können beispielsweise oxidativer Stress, Hormonveränderungen, Infektionen wie HIV oder epigenetische Veränderungen sein. Außerdem gibt es eine enge Beziehung zwischen Oxidation und Inflammation, was eine gemeinsame Mitbeeinflussung beider Prozesse auf den alternden Knochen vermuten lässt. Darüber hinaus konnte man zeigen, dass RANKL und OPG auch von Zellen des Immunsystems exprimiert werden und B-Zellen neben den knochenbildenden Einheiten im Knochen vorkommen. (Fougère et al. 2017; Pietschmann et al. 2016)

Um den Einfluss der Inflammation auf die Entwicklung oder Aggravierung einer Osteoporose beurteilen zu können, könnten weitere Entzündungsparameter und proinflammatorische Zytokine wie TNF- α oder verschiedene Interleukine (unter anderem IL-1, IL-6 und IL-17) analysiert werden (Sampaio Lacativa

und Fleiuss de Farinas, Maria Lucia 2010); Zha et al. sowie Scheffler et al. konnten beispielsweise bereits einen Einfluss von TNF- α und IL-17A auf den Knochenstoffwechsel bei Osteoporose nachweisen (Zha et al. 2018; Scheffler et al. 2020).

Die γ -GT ist ein Enzym, das in vielen Geweben des Körpers vorkommt. Es ermöglicht durch Hydrolyse des Antioxidans Glutathion dessen intrazellulären Transport, wo es antioxidativ wirken kann. Durch extrazelluläre Spaltung von Glutathion werden allerdings auch freie Radikale erzeugt, sodass γ -GT zusätzlich pro-oxidative Eigenschaften besitzt. Das Enzym ist ein häufig bestimmter Parameter, der bei Erhöhung auf vermehrten Alkoholkonsum, Leber- oder Gallenerkrankungen hinweist. (Brozek et al. 2022)

Die Auswertung unserer Daten zeigte, dass es einen Trend fallender γ -GT-Spiegel von den Probanden mit normaler Knochendichte, über die Osteopenie- bis zu den Osteoporosespendern gab. Während die Proben mit unauffälliger Knochendichte oftmals erhöhte Werte des Enzyms präsentierten, lagen die Werte bei nahezu allen Probanden mit Osteoporose im normwertigen Bereich. Diese Korrelation war bei den männlichen Spendern deutlicher zu erkennen als bei den weiblichen Probanden.

Für unsere Versuche wurde überwiegend Knochen von Probanden verwendet, die sich aufgrund einer Fraktur einer stationären und operativen Therapie unterziehen mussten. Möglicherweise zeigt sich an den erhöhten γ -GT-Werten neben Osteoporose eine zweite Ursache für Frakturen im Bereich der Hüfte. Alkohol, der durch Beeinträchtigung der Leberfunktion zu einer Erhöhung von γ -GT führen kann (Hiramatsu et al. 2007), ist auch für ein erhöhtes Sturzrisiko verantwortlich, das zu Frakturen führen kann (Pripp und Dahl 2015). Außerdem kann er die Knochenqualität negativ beeinflussen (Pripp und Dahl 2015). Unterstützt werden kann diese These auch dadurch, dass dieser Effekt stärker bei den männlichen Probanden nachzuweisen war, die in der Regel mehr und häufiger Alkohol konsumieren als Frauen (Erol und Karpyak 2015).

Interessanterweise ist in vielen anderen Studien ein gänzlich gegenteiliger Verlauf erkennbar, in denen also ein inverser Verlauf von γ -GT und Knochendichte auffiel. Bei systemischer Überexpression des Enzyms war eine Abnahme der Knochenmasse mit steigendem Risiko für Frakturen erkennbar. Als mögliche Ursache dafür konnte gezeigt werden, dass γ -GT die Bildung von Osteoklasten fördert. (Hiramatsu et al. 2007; Brozek et al. 2022)

Allerdings stellten Hiramatsu et al. auch die These auf, dass nicht die systemische, sondern die lokale Konzentration der γ -GT entscheidend für dessen resorptiven Effekt ist. Außerdem fiel dort auf, dass auch ein Mangel an γ -GT defizitäre Einflüsse auf die Knochendichte hat. (Hiramatsu et al. 2007)

Bezüglich des Einflusses von Alkohol konnten Brozek et al. nachweisen, dass in ihrer Studienpopulation das Risiko für Frakturen durch den Konsum von Alkohol nicht in Zusammenhang mit der Höhe der γ -GT stand. Auch wenn in unseren Versuchen der Zusammenhang zwischen γ -GT und dem Risiko für Frakturen bei Männern – die wie bereits beschreiben in der Regel mehr Alkohol konsumieren als Frauen – stärker ausgeprägt war. (Brozek et al. 2022)

5.8 Schlussfolgerung und Abschlussbetrachtung

Die begrenzte Lebenszeit und das langsame Wachstum der humanen OB erschwert die Erforschung der Pathomechanismen des alternden Knochens und der Osteoporose (Perinpanayagam et al. 2001). Bei einer mittleren Verdopplungszeit von rund 3 d (Javaheri et al. 2012) und einer Lebensspanne von durchschnittlich 3 Monaten (Manolagas 2000), hat dies wesentlichen Einfluss auf die Durchführung der Experimente. Weiterhin war die uns zur Verfügung stehende Menge an Probenmaterial begrenzt. So konnten wir im Laufe der Versuchsreihen mit OB von insgesamt 29 verschiedenen Spendern arbeiten.

Durch Verwendung von Antioxidantien wie Kat und MnTBAP gelang uns die Einflussnahme auf die osteogene Differenzierung von OB. Beide konnten die osteogene Differenzierung verstärken; in der Gruppe von Osteoporose- und Osteopenie-Patienten mehr als bei den Patienten mit normaler Knochendichte. Die Aktivität der AP wurde nicht merklich beeinflusst, was allerdings mittels MnTBAP gelang. Antioxidantien könnten somit eine wirksame therapeutische Option sein, um den schädigenden Einfluss von ROS auf den Knochen zu modulieren und die Matrixmineralisation zu verbessern.

Als zentraler Bestandteil der Katalase haben wir Fe untersucht, konnten aber nicht nachweisen, dass das Molekül am protektiven Effekt des Enzyms beteiligt ist. Um den schützenden Effekt von Katalase gezielt nutzen zu können, sind weitere Nachforschungen notwendig, die den Wirkmechanismus weiter aufschlüsseln.

Die durch unsere Versuche bestätigte, zunehmende Seneszenz von OB, vermehrte Reparaturvorgänge der DNA und auch eine Zunahme der Adipogenese weisen auf mögliche Veränderungen auf zellulärer Ebene im Knochen älterer Menschen hin, die potenziell pharmakologisch adressiert werden könnten. Außerdem könnten sie als hinweisende Marker für eine verminderte Knochendichte dienen.

Auch die Bedeutung des RANK-RANKL-OPG-Systems auf den Knochen konnten wir durch die abnehmende Konzentration von OPG in unseren Versuchsgruppen – mit dem geringsten Level in der Osteoporosegruppe – bestätigen. Die Verminderung von OPG in den Proben der osteoporotischen Spender kann zur gesteigerten Osteoklasten-Aktivität mit vermehrtem Knochenabbau führen (Chen et al. 2018). Ungleichgewichte in diesem System früher zu erkennen und die Funktionalität des Systems wiederherzustellen, könnten hier potenzielle Forschungs- und Therapieansätze sein.

Trotz der verhältnismäßig geringen Anzahl an Spendern war es uns möglich, Unterschiede zwischen den Gruppen mit verschiedener Knochendichte herauszuarbeiten, die auch für die Entwicklung einer Osteoporose relevant sein können. Das Wissen über diese Varianzen und ihr Einfluss auf den Knochenmetabolismus kann in Folgeversuchen ausgeweitet werden.

Allerdings fällt die in einigen Versuchen erkennbare Variabilität innerhalb der einzelnen Spendergruppen ins Gewicht. Bei einer größeren Spenderzahl würden „Ausreißer“ ebenso wie Nonresponder weniger stark ins Gewicht fallen. In Folgeversuchen sollte weiterhin die Zahl potenzieller

Confounder, wie beispielsweise andere bestehende systemische Erkrankungen oder die Einnahme von Medikamenten, minimiert werden. Da viele Experimente durch diese Arbeit erst etabliert wurden, sind einige Einflussfaktoren bisher möglicherweise gar nicht bekannt. Natürlich sind weiterführende Experimente auch deshalb notwendig, da erhaltene *in vitro*-Ergebnisse nicht direkt auf *in vivo*-Bedingungen übertragbar sind.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch diese Arbeit mehrere Methoden für Versuche in folgenden Forschungsprojekten etabliert werden konnten. Außerdem konnten einige signifikante Unterschiede zwischen OB einzelner Spender herausgearbeitet werden. Wir konnten zeigen, dass sich OB anhand der Knochendichte diskriminieren lassen und sich dadurch Hinweise auf unterschiedliche, altersabhängige Knochenstoffwechselstörungen ergeben. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass sich Antioxidantien in ihrer Wirkung auf OB von älteren Menschen unterscheiden und dass sie die Osteogenese verbessern können. Zudem können Antioxidantien auch die Expression von OPG bei Patienten mit normaler Knochendichte induzieren, sodass sie möglicherweise auch die Entstehung einer Osteoporose verhindern oder verzögern können.

5.9 Ausblick

Langfristiges Ziel unserer Versuchsreihen ist es, den Knochenmetabolismus im alternden Menschen besser zu verstehen und Pathomechanismen aufzuklären, die im Knochen von Patienten mit Osteoporose stattfinden.

Beides soll dazu beitragen, das Verständnis für diese Erkrankung zu erweitern sowie Methoden zu entwickeln, die die Knochenstabilität optimal fördern, verbessern oder wieder herstellen können. Daraus ließen sich dann in Zukunft optimalerweise kausale Therapieoptionen für Osteopenie- und Osteoporosepatienten ableiten, die auf lange Sicht zur Prävention von Frakturen, Verbesserung der Lebensqualität Betroffener und einer Kosteneinsparung im Gesundheitssystem beitragen.

Die hier etablierten Methoden sind eine wichtige Basis, auf die die weitere Forschung aufbauen kann.

Der förderliche Einfluss von Katalase auf die Funktionalität von OB bietet einen guten Ansatzpunkt für weitere Forschung. Aufgrund ihrer Effizienz und dem Vorkommen in fast allen Organismen findet sie bereits jetzt Anwendung in verschiedenen Branchen. Dazu zählen beispielsweise die Lebensmittel- und Textilindustrie (Kaushal et al. 2018).

Neben der Zuführung des Enzyms könnten sich Bemühungen auch darauf fokussieren, vorhandene Katalase-Moleküle stabiler und langlebiger zu machen. In diesem Bereich gibt es auch bereits Ansätze, wie beispielsweise die Stabilisierung des Enzyms mit Hilfe von Nanopartikeln. (Sepasi Tehrani und Moosavi-Movahedi 2018; Doğaç und Teke 2013) Dazu ist es essenziell, den Einfluss des Enzyms auf die Zellen des Knochens aufzuschlüsseln.

Auch wenn die Katalase gutes Potential für weitere Forschungen bietet, gibt es sicherlich viele weitere mögliche Bereiche, deren Einfluss auf den Knochen Möglichkeiten zur Beeinflussung bieten. Einige davon, wie das RANK-RANKL-OPG-System, konnten auch wir hier als vielversprechende Kandidaten vorstellen.

Abseits von medikamentösen Optionen zur Einflussnahme auf den Knochenstoffwechsel sollten natürlich auch weniger invasive Optionen wie körperliche Betätigung oder die Ernährung bedacht werden. Beispielsweise könnte eine ausgewogene Ernährung mit niedrig-normalem Gehalt bestimmter Spurenelemente und ausreichender Glukosemenge zusätzlichen Stress auf den Knochen mindern und zu einer Reduktion von schädlichem ROS führen. Denn wie Wang und sein Team zeigen konnten, führte die Kultivierung des Pilzes *Cordyceps militaris* mit niedrigen Glucose-Konzentrationen sowie hohen Mengen von Kupfer- (Cu^{2+}), Zink- (Zn^{+2}) und Mangan-Ionen (Mn^{2+}) zu erhöhten Spiegeln von Katalase und SODs, vermutlich als Reaktion des Pilzes auf erhöhte ROS-Konzentrationen, induziert durch die Metallionen (Wang et al. 2006).

6 Literaturverzeichnis

- Abdollahi, Mohammad; Larijani, Bagher; Rahimi, Roja; Salari, Pooneh (2005): Role of oxidative stress in osteoporosis. In: *Therapy* 2 (5), S. 787–796. DOI: 10.1586/14750708.2.5.787.
- Alexandersson, Ida; Harms, Matthew J.; Boucher, Jeremie (2020): Isolation and Culture of Human Mature Adipocytes Using Membrane Mature Adipocyte Aggregate Cultures (MAAC). In: *Journal of visualized experiments : JoVE* (156). DOI: 10.3791/60485.
- Azpiazu, Daniel; Gonzalo, Sergio; Villa-Bellosta, Ricardo (2019): Tissue Non-Specific Alkaline Phosphatase and Vascular Calcification: A Potential Therapeutic Target. In: *Current cardiology reviews*, S. 91–95. DOI: 10.2174/1573403X14666181031141226.
- Bai, Xiao-chun; Di Lu; Bai, Jie; Zheng, Hang; Ke, Zi-yong; Li, Xiao-ming; Luo, Shen-qiu (2004): Oxidative stress inhibits osteoblastic differentiation of bone cells by ERK and NF-kappaB. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 314 (1), S. 197–207. DOI: 10.1016/j.bbrc.2003.12.073.
- Bartl, Reiner (2008): Osteoporose : Prävention – Diagnostik – Therapie. Unter Mitarbeit von Reiner Bartl. 3., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Bartl, Reiner; Bartl, Christoph (2021): Das Osteoporose Manual. Biologie, Diagnostik, Prävention und Therapie. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Black, Steven; Kushner, Irving; Samols, David (2004): C-reactive Protein. In: *The Journal of Biological Chemistry* 279 (47), S. 48487–48490. DOI: 10.1074/jbc.R400025200.
- Bonjour, P.; Clark, P.; Cooper, C., Dawson-Hughes, B.; Laet, C. de; Delmas, P.; Johannson, H. et al. (2004): WHO Scientific Group on the Assessment of Osteoporosis at Primary Health Care Level. Summary Meeting Report, 05.05.2004.
- Brayboy, J. R.; Chen, X. W.; Lee, Y. S.; Anderson, J.J.B. (2001): The protective effects of Ginkgo biloba extract (EGb 761) against free radical damage to osteoblast-like bone cells (MC3T3-E1) and the proliferative effects of EGb 761 on these cells. In: *Nutrition Research*, S. 1275–1285.
- Brieger, K.; Schiavone, S.; Miller, F. J.; Krause, K-H (2012): Reactive oxygen species: from health to disease. In: *Swiss medical weekly* 142, w13659. DOI: 10.4414/smw.2012.13659.
- Brozek, W.; Ulmer, H.; Pompella, A.; Nagel, G.; Leiherer, A.; Preyer, O. et al. (2022): Gamma-glutamyl-transferase is associated with incident hip fractures in women and men ≥ 50 years: a large population-based cohort study. In: *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* 33 (6), S. 1295–1307. DOI: 10.1007/s00198-022-06307-z.

- Buck, Donald W.; Dumanian, Gregory A. (2012): Bone biology and physiology: Part I. The fundamentals. In: *Plastic and reconstructive surgery* 129 (6), S. 1314–1320. DOI: 10.1097/PRS.0b013e31824eca94.
- Busti, Fabiana; Marchi, Giacomo; Lira Zidanes, Acaynne; Castagna, Annalisa; Girelli, Domenico (2019): Treatment options for anemia in the elderly. In: *Transfusion and apheresis science : official journal of the World Apheresis Association : official journal of the European Society for Haemapheresis* 58 (4), S. 416–421. DOI: 10.1016/j.transci.2019.06.018.
- Cao, Xiangchang; Luo, Deqing; Li, Teng; Huang, Zunxian; Zou, Weitao; Wang, Lei et al. (2020): MnTBAP inhibits bone loss in ovariectomized rats by reducing mitochondrial oxidative stress in osteoblasts. In: *Journal of bone and mineral metabolism* 38 (1), S. 27–37. DOI: 10.1007/s00774-019-01038-4.
- Che, Jingmin; Yang, Jiancheng; Zhao, Bin; Zhang, Ge; Wang, Luyao; Peng, Songlin; Shang, Peng (2019): The Effect of Abnormal Iron Metabolism on Osteoporosis. In: *Biological trace element research*. DOI: 10.1007/s12011-019-01867-4.
- Chen, Bin; Zhu, Wang-Fa; Mu, Yi-Yang; Liu, Biao; Li, Hong-Zhuo; He, Xiao-Feng (2020): Association between vitamin D receptor Bsm1, FokI, and Cdx2 polymorphisms and osteoporosis risk: an updated meta-analysis. In: *Bioscience reports*. DOI: 10.1042/BSR20201200.
- Chen, Xiao; Wang, Zhongqiu; Duan, Na; Zhu, Guoying; Schwarz, Edward M.; Xie, Chao (2018): Osteoblast-osteoclast interactions. In: *Connective tissue research* 59 (2), S. 99–107. DOI: 10.1080/03008207.2017.1290085.
- Cheng, Chu-Han; Chen, Li-Ru; Chen, Kuo-Hu (2022): Osteoporosis Due to Hormone Imbalance: An Overview of the Effects of Estrogen Deficiency and Glucocorticoid Overuse on Bone Turnover. In: *International journal of molecular sciences* 23 (3). DOI: 10.3390/ijms23031376.
- Choi, Kyu Hwan; Lee, Jong Ho; Lee, Dong Gyu (2021): Sex-related differences in bone metabolism in osteoporosis observational study. In: *Medicine* 100 (21), 1-6. DOI: 10.1097/MD.00000000000026153.
- Choi, Yong Jun; Song, Insun; Jin, Yilan; Jin, Hyun-Seok; Ji, Hyung Min; Jeong, Seon-Yong et al. (2017): Transcriptional profiling of human femoral mesenchymal stem cells in osteoporosis and its association with adipogenesis. In: *Gene* 632, S. 7–15. DOI: 10.1016/j.gene.2017.08.015.
- Clabaut, Aline; Grare, Céline; Rolland-Valognes, Gaëlle; Letarouilly, Jean-Guillaume; Bourrier, Chantal; Andersen, Thomas L. et al. (2021): Adipocyte-induced transdifferentiation of osteoblasts and its potential role in age-related bone loss. In: *PloS one* 16 (1), 1-17. DOI: 10.1371/journal.pone.0245014.

- Clarke, Bart (2008): Normal bone anatomy and physiology. In: *Clinical journal of the American Society of Nephrology*, 131-139. DOI: 10.2215/CJN.04151206.
- Committee on Practice Bulletins-Gynecology, The American College of Obstetricians and Gynecologists (2012): Osteoporosis. In: *Obstetrics & Gynecology* (129), S. 718–734.
- Compston, Juliet (2018): Glucocorticoid-induced osteoporosis: an update. In: *Endocrine* 61 (1), S. 7–16. DOI: 10.1007/s12020-018-1588-2.
- Dachverband Osteologie e.V.: Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Osteoporose bei postmenopausalen Frauen und Männern. Leitlinie des Dachverbands der Deutschsprachigen Wissenschaftlichen Osteologischen Gesellschaften e.V.
- Davalli, Pierpaola; Mitic, Tijana; Caporali, Andrea; Lauriola, Angela; D'Arca, Domenico (2016): ROS, Cell Senescence, and Novel Molecular Mechanisms in Aging and Age-Related Diseases. In: *Oxidative medicine and cellular longevity*, S. 1–18. DOI: 10.1155/2016/3565127.
- Day, Brian J.; Fridovich, Irwin; Crapo, James D. (1997): Manganic porphyrins possess catalase activity and protect endothelial cells against hydrogen peroxide-mediated injury. In: *Archives of biochemistry and biophysics* 347 (2), S. 256–262. DOI: 10.1006/abbi.1997.0341.
- Denu, Ryan A.; Hematti, Peiman (2016): Effects of Oxidative Stress on Mesenchymal Stem Cell Biology. In: *Oxidative medicine and cellular longevity* 2016, S. 2989076. DOI: 10.1155/2016/2989076.
- Dimri, Goberdhan P.; Lee, Xinhua; Basile, George; Acosta, Meileen; Scott, Glynis; Roskelley, Calvin et al. (1995): A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, S. 9363–9367.
- Doğaç, Yasemin İspirli; Teke, Mustafa (2013): Immobilization of bovine catalase onto magnetic nanoparticles. In: *Preparative biochemistry & biotechnology* 43 (8), S. 750–765. DOI: 10.1080/10826068.2013.773340.
- Erol, Almila; Karpyak, Victor M. (2015): Sex and gender-related differences in alcohol use and its consequences: Contemporary knowledge and future research considerations. In: *Drug and alcohol dependence* 156, S. 1–13. DOI: 10.1016/j.drugalcdep.2015.08.023.
- Fanjul-Bolado, Pablo; González-García, María Begoña; Costa-García, Agustín (2006): Flow screen-printed amperometric detection of p-nitrophenol in alkaline phosphatase-based assays. In: *Analytical and bioanalytical chemistry* 385 (7), S. 1202–1208. DOI: 10.1007/s00216-006-0367-8.
- Fougère, Bertrand; Boulanger, Eric; Nourhashémi, Fati; Guyonnet, Sophie; Cesari, Matteo (2017): Chronic Inflammation: Accelerator of Biological Aging. In: *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences* 72 (9), S. 1218–1225. DOI: 10.1093/gerona/glw240.

Fraser, J.H.E.; Helfrich, M. H.; Wallace, H. M.; Ralston, S. H. (1996): Hydrogen Peroxide, But Not Superoxide, Stimulates Bone Resorption in Mouse Calvariae. In: *Bone* (19), S. 223–226.

Galaris, Dimitrios; Barbouti, Alexandra; Pantopoulos, Kostas (2019): Iron homeostasis and oxidative stress: An intimate relationship. In: *Biochimica et biophysica acta. Molecular cell research* 1866 (12), S. 1–15. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2019.118535.

Gallagher, J. Christopher; Tella, Sri Harsha (2014): Prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis. In: *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 142, S. 1–42. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2013.09.008.

Ge, Chunxi; Zhao, Guisheng; Li, BinBin; Li, Yan; Cawthorn, William P.; MacDougald, Ormond A.; Franceschi, Renny T. (2018): Genetic inhibition of PPAR γ S112 phosphorylation reduces bone formation and stimulates marrow adipogenesis. In: *Bone* 107, S. 1–9. DOI: 10.1016/j.bone.2017.10.023.

Giordani, A.; Morlière, P.; Aubailly, M.; Santus, R. (1997): Photoinactivation of cellular catalase by ultraviolet radiation. In: *Redox report : communications in free radical research* 3 (1), S. 49–55. DOI: 10.1080/13510002.1997.11747090.

Glorieux, Christophe; Calderon, Pedro Buc (2017): Catalase, a remarkable enzyme: targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach. In: *Biological chemistry* 398 (10), S. 1095–1108. DOI: 10.1515/hsz-2017-0131.

Goyal, Madhur M.; Basak, Anjan (2010): Human catalase: looking for complete identity. In: *Protein & cell* 1 (10), S. 888–897. DOI: 10.1007/s13238-010-0113-z.

Grabowski, Peter (2009): *Physiology of Bone* (16), S. 32–48.

Griffith, James F.; Yeung, David K. W.; Antonio, Gregory E.; Wong, Samuel Y. S.; Kwok, Timothy C. Y.; Woo, Jean; Leung, Ping C. (2006): Vertebral marrow fat content and diffusion and perfusion indexes in women with varying bone density: MR evaluation. In: *Radiology* 241 (3), S. 831–838. DOI: 10.1148/radiol.2413051858.

Harman, Denham (1992): Free radical theory of aging. In: *Mutation Research* (275), S. 257–266.

Hiramatsu, Kiyoshi; Asaba, Yutaro; Takeshita, Sunao; Nimura, Yuji; Tatsumi, Sawako; Katagiri, Nobuyoshi et al. (2007): Overexpression of gamma-glutamyltransferase in transgenic mice accelerates bone resorption and causes osteoporosis. In: *Endocrinology* 148 (6), S. 2708–2715. DOI: 10.1210/en.2007-0215.

Huang, Qiang; Shi, Jun; Gao, Bo; Zhang, Hong-Yang; Fan, Jing; Li, Xiao-Jie et al. (2015): Gastrodin: an ancient Chinese herbal medicine as a source for anti-osteoporosis agents via reducing reactive oxygen species. In: *Bone* 73, S. 132–144. DOI: 10.1016/j.bone.2014.12.059.

- Infante, Arantza; Rodríguez, Clara I. (2018): Osteogenesis and aging: lessons from mesenchymal stem cells. In: *Stem cell research & therapy* 9 (1), S. 1–7. DOI: 10.1186/s13287-018-0995-x.
- Jaenicke, Rainer (1992): Protein stability and molecular adaptation to extreme conditions. In: P. Christen und E. Hofmann (Hg.): *EJB Reviews* 1991. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, S. 715–728.
- Kanis, John A.; Norton, Nicholas; Harvey, Nicholas C.; Jacobson, Trolle; Johansson, Helena; Lorentzon, Mattias et al. (2021): SCOPE 2021: a new scorecard for osteoporosis in Europe. In: *Archives of osteoporosis* 16 (1), S. 82. DOI: 10.1007/s11657-020-00871-9.
- Kassem, Moustapha; Marie, Pierre J. (2011): Senescence-associated intrinsic mechanisms of osteoblast dysfunctions. In: *Aging Cell* 10 (2), S. 191–197. DOI: 10.1111/j.1474-9726.2011.00669.x.
- Kaushal, Jyoti; Mehandia, Seema; Singh, Gursharan; Raina, Arun; Arya, Shailendra Kumar (2018): Catalase enzyme: Application in bioremediation and food industry. In: *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 16, S. 192–199. DOI: 10.1016/j.bcab.2018.07.035.
- Kersch-Schindl, Katharina (2016): Prevention and rehabilitation of osteoporosis. In: *Wiener medizinische Wochenschrift (1946)* 166 (1-2), S. 22–27. DOI: 10.1007/s10354-015-0417-y.
- Kirkman, Henry N.; Gaetani, Gian F. (2006): Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries. In: *Trends in biochemical sciences* 32 (1), S. 44–50. DOI: 10.1016/j.tibs.2006.11.003.
- Kritsilis, Marios; Rizou, Sophia; Koutsoudaki, Paraskevi N.; Evangelou, Konstantinos; Gorgoulis, Vassilis G.; Papadopoulos, Dimitrios (2018): Ageing, Cellular Senescence and Neurodegenerative Disease. In: *International journal of molecular sciences* 19 (10). DOI: 10.3390/ijms19102937.
- Kuo, Linda J.; Yang, Li-Xi (2008): Gamma-H2AX - A Novel Biomarker for DNA Double-strand Breaks. In: *in vivo* 22, S. 305–310.
- LeBoff, M. S.; Greenspan, S. L.; Insogna, K. L.; Lewiecki, E. M.; Saag, K. G.; Singer, A. J.; Siris, E. S. (2022): The clinician's guide to prevention and treatment of osteoporosis. In: *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* 33 (10), S. 2049–2102. DOI: 10.1007/s00198-021-05900-y.
- Lee, Bo Yun; Han, Jung A.; Im, Jun Sub; Morrone, Amelia; Johung, Kimberly; Goodwin, Edward C. et al. (2006): Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. In: *Aging Cell* 5 (2), S. 187–195. DOI: 10.1111/j.1474-9726.2006.00199.x.
- Lee, Young H.; Layman, Donald K.; Bell, Roma R.; Norton, Horace W. (2018): Response of Glutathione Peroxidase and Catalase to Excess Dietary Iron in Rats. University of Minnesota Livraries.

- Li, C. W.; Liang, B.; Shi, X. L.; Wang, H. (2015): Opg/Rankl mRNA dynamic expression in the bone tissue of ovariectomized rats with osteoporosis. In: *Genetics and molecular research : GMR* 14 (3), S. 9215–9224. DOI: 10.4238/2015.August.10.1.
- Liochev, Stefan I. (2013): Reactive oxygen species and the free radical theory of aging. In: *Free radical biology & medicine* 60, S. 1–4. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.02.011.
- Lu, Meihan; Liu, Yawen; Shao, Mengyun; Tesfaye, Getachew C.; Yang, Shuman (2020): Associations of Iron Intake, Serum Iron and Serum Ferritin with Bone Mineral Density in Women: The National Health and Nutrition Examination Survey, 2005-2010. In: *Calcified tissue international* 106 (3), S. 232–238. DOI: 10.1007/s00223-019-00627-9.
- Magnusson, P.; Farley, J. R. (2002): Differences in sialic acid residues among bone alkaline phosphatase isoforms: a physical, biochemical, and immunological characterization. In: *Calcified tissue international* 71 (6), S. 508–518. DOI: 10.1007/s00223-001-1137-4.
- Maier, Andrea B.; Westendorp, Rudi G. J.; van Heemst, Diana (2007): Beta-Galactosidase Activity as a Biomarker of Replicative Senescence during the Course of Human Fibroblast Cultures. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 1100, S. 323–332. DOI: 10.1196/annals.1395.035.
- Mamolini, Elisabetta; Cervellati, Carlo; Greco, Pantaleo; Carrieri, Alberto; Massari, Leo; Crivellari, Ilaria et al. (2017): VDR, RANKL and OPG polymorphisms as possible predisposing cofactors of postmenopausal osteoporosis: explorative study in Italian population. In: *Gynecological endocrinology : the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology* 33 (12), S. 937–941. DOI: 10.1080/09513590.2017.1323205.
- Manolagas, Stavros C. (2000): Birth and Death of Bone Cells: Basic Regulatory Mechanisms and Implications for the Pathogenesis and Treatment of Osteoporosis. In: *Endocrine Reviews*.
- Martiniakova, M.; Babikova, M.; Omelka, R. (2020): Pharmacological agents and natural compounds: available treatments for osteoporosis. In: *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society* 71 (3). DOI: 10.26402/jpp.2020.3.01.
- Matsuura, Yoshinori; Takehira, Michiyo; Joti, Yasumasa; Ogasahara, Kyoko; Tanaka, Tomoyuki; Ono, Naoko et al. (2015): Thermodynamics of protein denaturation at temperatures over 100 °C: CutA1 mutant proteins substituted with hydrophobic and charged residues. In: *Scientific reports* 5, S. 1–9. DOI: 10.1038/srep15545.
- Merrell, Allyson J.; Stanger, Ben Z. (2016): Adult cell plasticity in vivo: de-differentiation and transdifferentiation are back in style. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 17 (7), S. 413–425. DOI: 10.1038/nrm.2016.24.

- Mody, Nilam; Parhami, Farhad; Sarafian, Theodore A.; Demer, Linda L. (2001): Oxidative Stress Modulates Osteoblastic Differentiation of Vascular and Bone Cells. In: *Free radical biology & medicine* (31), S. 509–519.
- Morgulis, Sergius; Beber, M.; Rabkin, I. (1926a): STUDIES ON THE EFFECT OF TEMPERATURE ON THE CATALASE REACTION. EFFECT OF DIFFERENT HYDROGEN PEROXIDE CONCENTRATIONS. In: *Journal of Biological Chemistry* 68 (3), S. 521–533. DOI: 10.1016/S0021-9258(18)84618-X.
- Morgulis, Sergius; Beber, M.; Rabkin, I. (1926b): STUDIES ON THE EFFECT OF TEMPERATURE ON THE CATALASE REACTION. LOSS OF CATALASE ACTIVITY. In: *Journal of Biological Chemistry* 68 (3), S. 535–545. DOI: 10.1016/S0021-9258(18)84619-1.
- Nagpal, Isha; Yuan, Zhi-Min (2021): The Basally Expressed p53-Mediated Homeostatic Function. In: *Frontiers in cell and developmental biology* 9, S. 1–10. DOI: 10.3389/fcell.2021.775312.
- Nordin, B. E. C.: Calcium Homeostasis. In: *Clinical Biochemistry* 1990 (23), S. 3–10.
- Ogrodnik, Mikolaj (2021): Cellular aging beyond cellular senescence: Markers of senescence prior to cell cycle arrest in vitro and in vivo. In: *Aging Cell* 20 (4), 1-19. DOI: 10.1111/accel.13338.
- Parra-Torres, Alma-Y.; Valds-Flores, Margarita; Orozco, Lorena; Velzquez-Cruz, Rafael (2013): Molecular Aspects of Bone Remodeling. In: Margarita Valds-Flores (Hg.): *Topics in Osteoporosis: InTech*, S. 1–27.
- Pietschmann, Peter; Mechtcheriakova, Diana; Meshcheryakova, Anastasia; Föger-Samwald, Ursula; Ellinger, Isabella (2016): Immunology of Osteoporosis: A Mini-Review. In: *Gerontology* 62 (2), S. 128–137. DOI: 10.1159/000431091.
- Pripp, Are Hugo; Dahl, Ola E. (2015): The population attributable risk of nutrition and lifestyle on hip fractures. In: *Hip international : the journal of clinical and experimental research on hip pathology and therapy* 25 (3), S. 277–281. DOI: 10.5301/hipint.5000229.
- Promega Corporation (2016): CellTiter-Blue Cell Viability Assay. Instructions for Use of Products. Technical bulletin.
- Rebouças, Júlio S.; Spasojević, Ivan; Batinić-Haberle, Ines (2008): Pure manganese(III) 5,10,15,20-tetrakis(4-benzoic acid)porphyrin (MnTBAP) is not a superoxide dismutase mimic in aqueous systems: a case of structure-activity relationship as a watchdog mechanism in experimental therapeutics and biology. In: *Journal of biological inorganic chemistry : JBIC : a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry* 13 (2), S. 289–302. DOI: 10.1007/s00775-007-0324-9.
- Rharass, Tareck; Lucas, Stéphanie (2019): High Glucose Level Impairs Human Mature Bone Marrow Adipocyte Function Through Increased ROS Production. In: *Frontiers in endocrinology* (10), Artikel 607, S. 1–15. DOI: 10.3389/fendo.2019.00607.

Safari, Anahid; Borhani-Haghighi, Afshin; Dianatpour, Mehdi; Heydari, Seyed Taghi; Foroughinia, Farzaneh; Ranjbar Omrani, Gholamhossein (2019): Circulating Serum Amyloid A, hs-CRP and Vitamin D Levels in Postmenopausal Osteoporosis. In: *Galen medical journal* 8, 1-9. DOI: 10.31661/gmj.v8i0.1548.

Sahlender, Benita; Windolf, Joachim; Suschek, Christoph V. (2022): Superoxide dismutase and catalase significantly improve the osteogenic differentiation potential of osteogenetically compromised human adipose tissue-derived stromal cells in vitro. In: *Stem cell research* 60, S. 102708. DOI: 10.1016/j.scr.2022.102708.

Salhotra, Ankit; Shah, Harsh N.; Levi, Benjamin; Longaker, Michael T. (2020): Mechanisms of bone development and repair. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 21 (11), S. 696–711. DOI: 10.1038/s41580-020-00279-w.

Sampaio Lacativa, Paulo Gustavo; Fleiuss de Farinas, Maria Lucia (2010): Osteoporosis and inflammation. In: *Arc Bras Endocrinol Metab.*, S. 123–132.

Scheffler, J. M.; Grahne, L.; Engdahl, C.; Drevinge, C.; Gustafsson, K. L.; Corciulo, C. et al. (2020): Interleukin 17A: a Janus-faced regulator of osteoporosis. In: *Scientific reports* 10 (1), S. 5692. DOI: 10.1038/s41598-020-62562-2.

Sepasi Tehrani, Hessam; Moosavi-Movahedi, Ali Akbar (2018): Catalase and its mysteries. In: *Progress in biophysics and molecular biology*, S. 1–8. DOI: 10.1016/j.pbiomolbio.2018.03.001.

Setlow, R. B. (1951): The Inactivation of Catalase by Deuterons and Heat. In: *Archives of biochemistry and biophysics* 34 (2), S. 396–408. DOI: 10.1016/0003-9861(51)90018-5.

Sharma, Ujjawal; Pal, Deeksha; Prasad, Rajendra (2013): Alkaline phosphatase: an overview. In: *Indian journal of clinical biochemistry : IJCB* 29 (3), S. 269–278. DOI: 10.1007/s12291-013-0408-y.

Sheng, Xiaoyong; Cai, Guangyong; Gong, Xingjun; Yao, Zouying; Zhu, Ye (2017): Common Variants in OPG Confer Risk to Bone Mineral Density Variation and Osteoporosis Fractures. In: *Scientific reports* 7 (1), S. 1–7. DOI: 10.1038/s41598-017-01579-6.

Sia, Ying Tung; Parker, Thomas G.; Liu, Peter; Tsoporis, James N.; Adam, Albert; Rouleau, Jean L. (2002): Improved post-myocardial infarction survival with probucol in rats: Effects on left ventricular function, morphology, cardiac oxidative stress and cytokine expression. In: *Journal of the American College of Cardiology* 39 (1), S. 148–156. DOI: 10.1016/S0735-1097(01)01709-0.

Siggelkow, Heide (2008): Does Osteoblast to Adipocyte Differentiation Play a Role in Osteoarthritis? In: *CRR* 4 (3), S. 1–4. DOI: 10.2174/157339708785133460.

- Spasojević, Ivan; Batinić-Haberle, Ines (2001): Manganese(III) complexes with porphyrins and related compounds as catalytic scavengers of superoxide. In: *Inorganica Chimica Acta* 317 (1), S. 230–242. DOI: 10.1016/S0020-1693(01)00701-0.
- Stanford, Clark M.; Jacobson, Paul A.; Eanes, E. David; Lembke, Lois A.; Midura, Ronald J. (2021): Rapidly Forming Apatitic Mineral in an Osteoblastic Cell Line. In: *The Journal of Biological Chemistry* (270), S. 9420–9428.
- Tang, Qi Qun; Lane, M. Daniel (2012): Adipogenesis: from stem cell to adipocyte. In: *Annual review of biochemistry* 81, S. 715–736. DOI: 10.1146/annurev-biochem-052110-115718.
- Therlault, Richard L.; Biermann, J. Sybil; Brown, Elisabeth; Brufsky, Adam; Demers, Laurence; Grewal, Ravinder K. et al. (2006): Bone Health and Cancer Care. NCCN Task Force Report. In: *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*.
- Thibodeau, Edward A.; Keefe, Theresa F. (1990): pH-dependent fluoride inhibition of catalase activity. In: *Oral Microbiology and Immunology*, S. 328–331.
- van Schoor, Natasja; Lips, Paul (2018): Worldwide Vitamin D Status. In: David Feldman (Hg.): *Vitamin D. Volume 2: Health, Disease and Therapeutics*: Elsevier, S. 15–40.
- Vetrano, Anna M.; Heck, Diane E.; Mariano, Thomas M.; Mishin, Vladimir; Laskin, Debra L.; Laskin, Jeffrey D. (2005): Characterization of the Oxidase Activity in Mammalian Catalase. In: *The Journal of Biological Chemistry* 280 (42), S. 35372–35381. DOI: 10.1074/jbc.M503991200.
- Vimalraj, Selvaraj (2020): Alkaline phosphatase: Structure, expression and its function in bone mineralization. In: *Gene* 754, S. 1–8. DOI: 10.1016/j.gene.2020.144855.
- Wang, Jian; Pantopoulos, Kostas (2011): Regulation of cellular iron metabolism. In: *The Biochemical journal* 434 (3), S. 365–381. DOI: 10.1042/BJ20101825.
- Wang, Zun-Sheng; Gu, Yu-Xiang; Yuan, Qin-Sheng (2006): Effect of nutrition factors on the synthesis of superoxide dismutase, catalase, and membrane lipid peroxide levels in *Cordyceps militaris* mycelium. In: *Current microbiology* 52 (1), S. 74–79. DOI: 10.1007/s00284-005-0193-9.
- Wei, Jinsong; Chen, Siyuan; Guo, Weixiong; Feng, Bailin; Yang, Shukai; Huang, Chengshuo; Chu, Jiaqi (2018): Leukotriene D4 induces cellular senescence in osteoblasts. In: *International immunopharmacology* 58, S. 154–159. DOI: 10.1016/j.intimp.2017.12.027.
- Yamasaki, Kanako; Hagiwara, Hiromi (2009): Excess iron inhibits osteoblast metabolism. In: *Toxicology letters* 191 (2-3), S. 211–215. DOI: 10.1016/j.toxlet.2009.08.023.

- Yang, Chenggang; Ren, Jing; Li, Bangling; Jin, Chuandi; Ma, Cui; Cheng, Cheng et al. (2019): Identification of gene biomarkers in patients with postmenopausal osteoporosis. In: *Molecular medicine reports* 19 (2), S. 1065–1073. DOI: 10.3892/mmr.2018.9752.
- Yu, Tao; You, Xiaomeng; Zhou, Haichao; Kang, Alex; He, Wenbao; Li, Zihua et al. (2020): p53 plays a central role in the development of osteoporosis. In: *Aging* 12 (11), S. 10473–10487. DOI: 10.18632/aging.103271.
- Zha, Li; He, Li; Liang, Yijian; Qin, Hui; Yu, Bin; Chang, Linli; Xue, Li (2018): TNF- α contributes to postmenopausal osteoporosis by synergistically promoting RANKL-induced osteoclast formation. In: *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 102, S. 369–374. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.03.080.
- Zhang, Liang; Yin, Xin; Wang, Jingcheng; Xu, Daolinag; Wang, Yongxiang; Yang, Jiandong et al. (2018): Associations between VDR Gene Polymorphisms and Osteoporosis Risk and Bone Mineral Density in Postmenopausal Women: A systematic review and Meta-Analysis. In: *Scientific reports* 8 (1), S. 1–16. DOI: 10.1038/s41598-017-18670-7.
- Zhang, Qiang; Song, Xiaoxia; Chen, Xiaoming; Jiang, Ruizhong; Peng, Ke; Tang, Xinqiao; Liu, Zhong (2021): Antiosteoporotic effect of hesperidin against ovariectomy-induced osteoporosis in rats via reduction of oxidative stress and inflammation. In: *Journal of biochemical and molecular toxicology* 35 (8), 1-9. DOI: 10.1002/jbt.22832.
- Zhou, J.; Wang, F.; Ma, Y.; Wei, F. (2018): Vitamin D3 contributes to enhanced osteogenic differentiation of MSCs under oxidative stress condition via activating the endogenous antioxidant system. In: *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* 29 (8), S. 1917–1926. DOI: 10.1007/s00198-018-4547-0.
- Zou, Xianghui; Ratti, Bianca A.; O'Brien, Joseph Gerald; Lautenschlager, Sueli O.; Gius, David R.; Bonini, Marcelo G.; Zhu, Yueming (2017): Manganese superoxide dismutase (SOD2): is there a center in the universe of mitochondrial redox signaling? In: *Journal of bioenergetics and biomembranes* 49 (4), S. 325–333. DOI: 10.1007/s10863-017-9718-8.

Danksagung

Diese Arbeit konnte nur entstehen, weil ich durch viele Personen tatkräftig unterstützt wurde. Sie alle hier namentlich aufzuführen, würde den Rahmen dieser Arbeit sprengen; aber ein paar Wenigen gebührt ein ganz besonderer Dank.

An erster Stelle sind hier meine Eltern Christoph und Claudia, meine Schwester Lissa und ihr Partner Lukas zu nennen. Durch ihre immerwährende Unterstützung und stetig offenen Ohren für meine Probleme, Fragen oder Wünsche ist nicht nur diese Dissertation erst möglich geworden, sondern auch mein gesamtes Studium und der Weg bis hierher.

Ein großer Dank gilt auch Vera, der Betreuerin meiner Arbeit, die immer bemüht war, die Experimente und ihre Durchführung zu verbessern. Außerdem hat sie viel Zeit und Mühe investiert, meine vielen Fragen zu beantworten und mich im Schreiben der Arbeit unterstützt, ohne jemals die Geduld zu verlieren.

Danke auch an Prof. Dr. Joachim Windolf für die Möglichkeit, diese Arbeit im Forschungslabor der Orthopädie und Unfallchirurgie anfertigen zu dürfen.

Weiterhin möchte ich mich bei Priv.-Doz. Dr. Jan-P. Graßmann für die Annahme der Erstbetreuung und Prof. Dr. med. Philipp Sloty für die Übernahme des Zweitgutachtens bedanken.

Auch den Mitarbeiter/innen des Labors bin ich zu großem Dank verpflichtet. Nur durch sie konnte ich mir so viel neues Wissen aneignen und viele Experimente erst durchführen, bei denen sie mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen.

Die Zeit im Labor ist mir trotz doch vieler langer Tage sehr positiv in Erinnerung geblieben. Einen sehr großen Beitrag dazu haben auf jeden Fall auch alle Promovierenden, Bacheloranden und Masteranden, die neben mir dort gearbeitet haben, beigetragen. Mit vielen kreativen Ideen und Humor ist die Zeit dort nur so verflogen.

Abschließend möchte ich auch meiner Mitbewohnerin Celina danken, die mich durch die Höhen und Tiefen in der Zeit begleitet hat, immer da war, wenn ich sie brauchte und die mich motiviert hat, voranzukommen.