

Aus der Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Carl Neuerburg

Evaluation der Expression Angiogenese-relevanter Parameter in
Osteoblasten von Osteoporosepatient*innen

Dissertation

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

vorgelegt von

Robert Felix Zimmermann

2026

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: PD Dr. med. Jan-Peter Graßmann

Zweitgutachterin: PD Dr. rer. nat. Doreen Floß

Auflistung der Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Osteologie 2023, Georg Thieme Verlag, Vol. 32 Ausgabe 03/2023 Abschnitt V, Seite 1.5,
DOI: 10.1055/s-0043-1769633 (1)

Zusammenfassung

Die Osteoporose ist als systemische Skeletterkrankung durch eine gestörte Knochenhomöostase, mikroarchitektonische Verschlechterung des Knochengewebes sowie eine reduzierte Knochenmasse gekennzeichnet. Innerhalb der Pathogenese kommen die Fehlregulationen des *Receptor Activator of NF- κ B/ Receptor Activator of NF- κ B ligand/ Osteoprotegerin (RANK/RANKL/OPG)*-Systems sowie der Blutversorgung des Knochens eine besondere Bedeutung zu. Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass eine verminderte Blutversorgung des Knochens mit osteoporotischen Veränderungen assoziiert ist. Die vorliegende Arbeit untersuchte den Einfluss von Osteoblasten (OB) von Patient*innen mit Osteoporose hinsichtlich Mechanismen der Angiogenese und der OPG-Expression. Hierzu wurde das Expressionsmuster der Angiogenese-relevanten Faktoren Interleukin (IL)6, IL8, Angiogenin (ANG), *Vascular endothelial growth factor (VEGF)*, *Chitinase-3 like-protein-1 (CHI3L1)* sowie der *Hypoxia-inducible factor-1-alpha (HIF-1 α)* in OB osteoporotischer Patient*innen (OB T \leq -2,5) analysiert. Darüber hinaus wurde der Einfluss konditionierter Medien von OB T \leq -2,5 auf das Proliferations- und Migrationsverhalten von Endothelzellen (EA.hy 926) untersucht. Des Weiteren wurde der Einfluss differentiell exprimierter Faktoren in OB T \leq -2,5 und deren spezifischen Inhibitoren auf das Proliferations- und Migrations-Verhalten von EA.hy 926 sowie auf die OPG-Expression humaner OB analysiert.

Humane OB wurden aus der Spongiosa von Femurköpfen, die bei der Implantation von Hüft-Totalendoprothesen entnommen wurden, isoliert und kultiviert. Die Knochendichte der Patient*innen wurde anhand einer *Dual X-ray Absorptiometry (DXA)*-Messung bestimmt. Eine vorliegende Osteoporose wurde ab einem Wert von T \leq -2,5 angenommen, Werte T \geq -1 wurden als nicht-osteoporotisch definiert. Der Überstand der OB-Zellkulturen wurde genutzt, um die Expression Angiogenese-relevanter Faktoren mittels Enzyme-Linked Immunosorbent Assays (ELISA) zu analysieren. Konditionierte Medien aus OB-Kulturen wurden genutzt, um in CellTiter-Blue (CTB) Assays sowie Migrationsassays den Einfluss von OB T \leq -2,5 auf das Proliferations- und Migrations-Verhalten von EA.hy 926 zu untersuchen. Zudem wurde in Migrationsassays der Effekt von IL6, IL8, ANG sowie deren spezifischen Inhibitoren Anti-IL6, Reparixin und Anti-ANG auf die Migration von EA.hy 926 analysiert. Darüber hinaus wurden humane OB mit IL6, IL8, ANG, Anti-IL6, Reparixin und Anti-ANG inkubiert, um die Effekte auf die OPG-Expression im Überstand der behandelten OB-Kulturen zu untersuchen.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass OB T \leq -2,5 ein differentielles Expressionsmuster Angiogenese-relevanter Faktoren aufweisen. Die Expression von IL6 war um 124 % signifikant erhöht, während die Expression von IL8 um 44 % und ANG um 35 % signifikant vermindert waren. Konditionierte Medien aus OB-Kulturen von OB T \leq -2,5 zeigten einen proliferations- und migrationsfördernden Effekt auf EA.hy 926. Darüber hinaus modulierten die in OB T \leq -2,5 differentiell exprimierten Faktoren und deren spezifischen Inhibitoren die Migrationskapazität von EA.hy 926 sowie die OPG-Expression in humanen OB. Die Migration von EA.hy 926 konnte durch ANG und Reparixin signifikant gesteigert werden, während sie unter dem Einfluss von IL6 und IL8 signifikant vermindert war. Die OPG-Expression im Überstand von OB-Kulturen zeigte sich durch Anti-IL6, Reparixin und ANG signifikant vermindert.

Vorliegende Ergebnisse legen nahe, dass der Pathomechanismus der Osteoporose auf zellulärer Ebene durch ein verändertes Expressionsmuster Angiogenese-relevanter Faktoren, insbesondere IL6, IL8 und ANG, durch OB T \leq -2,5 mitbeeinflusst wird. Dies umfasst eine mögliche Fehlregulation des *Osteogenesis-Angiogenesis Couplings* und des RANK/RANKL/OPG-Systems. Damit dient diese Arbeit als Grundlage weiterer Forschungsansätze, um die Mechanismen einer Fehlregulation der beteiligten Systeme im Kontext der Osteoporose weiter zu analysieren.

Summary

Osteoporosis is a systemic skeletal disorder characterized by impaired bone homeostasis, microarchitectural deterioration of bone tissue, and reduced bone mass. Within the pathogenesis, dysregulations of the receptor activator of NF- κ B/ receptor activator of NF- κ B ligand/ osteoprotegerin (RANK/RANKL/OPG) system as well as the blood supply to the bone play a pivotal role. Reduced bone perfusion has already been demonstrated to be associated with osteoporotic changes.

The present study investigated the influence of osteoblasts (OB) derived from patients with osteoporosis on mechanisms of angiogenesis and OPG expression. Specifically, the expression profiles of angiogenesis-related factors, including interleukin (IL)6, IL8, angiogenin (ANG), vascular endothelial growth factor (VEGF), chitinase-3 like-protein-1 (CHI3L1), and hypoxia-inducible factor-1-alpha (HIF-1 α) were analyzed in osteoblasts from osteoporotic patients. Furthermore, the effects of conditioned media from OB T \leq -2.5 on proliferation and migration of endothelial cells (EA.hy 926) were examined. In addition, the role of differentially expressed factors in OB T \leq -2.5 and their specific inhibitors on EA.hy 926 proliferation and migration, as well as on OPG expression in human OB, was assessed.

Human osteoblasts were isolated and cultured from the spongiosa of femoral heads obtained during the implantation of total hip arthroplasty. The bone density of the donors was determined using dual X-ray absorptiometry (DXA) measurements. Osteoporosis was assumed at a T score of \leq -2.5, while values \geq T -1 were defined as non-osteoporotic. Supernatants from OB cell cultures were analyzed for angiogenesis-related factors using enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA). Conditioned media from OB cultures were applied in CellTiter-Blue (CTB) assays and migration assays to evaluate their effects on EA.hy 926 proliferation and migration. Moreover, migration assays were employed to assess the effects of IL6, IL8, and ANG, as well as their specific inhibitors (Anti-IL6, Reparixin, Anti-ANG), on EA.hy 926 migration. Human OB were also treated with IL6, IL8, ANG, Anti-IL6, Reparixin, and Anti-ANG to investigate their effects on OPG expression in the culture supernatants.

The study demonstrated that OB T \leq -2.5 exhibit a distinct expression profile of angiogenesis-related factors. IL6 expression was significantly increased by 124%, whereas IL8 expression was reduced by 44% and ANG by 35%. Conditioned media from OB T \leq -2.5 cultures exerted proliferative and migration-promoting effects on EA.hy 926. Furthermore, the differentially expressed factors in OB T \leq -2.5 and their respective inhibitors modulated both EA.hy 926 migration capacity and OPG expression in human OB. EA.hy 926 migration was significantly enhanced by ANG and Reparixin, while markedly reduced by IL6 and IL8. OPG expression in OB culture supernatants was significantly decreased following treatment with Anti-IL6, Reparixin, and ANG.

These findings suggest that the cellular pathomechanisms of osteoporosis are influenced by altered expression patterns of angiogenesis-related factors, particularly IL6, IL8, and ANG, in OB T \leq -2.5. This may involve dysregulation of osteogenesis–angiogenesis coupling and the RANK/RANKL/OPG system. Accordingly, this study provides a foundation for further investigations aimed at elucidating the mechanisms underlying dysregulation of these systems in the context of osteoporosis.

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celcius
µm	Mykrometer
µM	Mykromol
Abb.	Abbildung
ACPA	<i>Anti citrullinated protein antibodies</i>
BCA	<i>Bicinchoninic acid</i>
BLC	<i>Bone lining cells</i>
BMD	<i>Bone mineral density</i>
BMPs	<i>Bone morphogenetic proteins</i>
BMU	<i>Basic molecular unit</i>
BRC	<i>Bone remodeling compartment</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
COX-2	Cyclooxygenase-2
CTB	<i>CellTiter-Blue</i>
CXCL8	<i>CXC-motiv-Chemokin 8</i>
CXCR	<i>CXC motif chemokine receptor</i>
DIF	Differenzierungsmedium
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DXA	<i>Dual X-ray Absorptiometry</i>
EDTA	<i>Ethylene diamine tetraacetic acid</i>
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
hGH	<i>Human growth hormone</i>
HUVEC	<i>Human umbilical vein endothelial cells</i>
IGF	<i>Insulin-like growth factor</i>
KM	Konditioniertes Medium
KM T ≤ -2,5	Konditioniertes Medium aus OB-Kulturen osteoporotischer Patient*innen
KM T ≥ -1	Konditioniertes Medium aus OB-Kulturen nicht-osteoporotischer Patient*innen
mAB	<i>Monoclonal antibody</i>
MCS	<i>Macrophage-colony-stimulating factor</i>
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mMol	Millimol

MPS	Mononukleär phagozytäres System
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i>
MSC	<i>Mesenchymal stromal cells</i>
NaCl	Natriumchlorid
NEAA	<i>Non-essential amino acid Solution</i>
NGS	<i>Normal goat serum</i>
nm	Nanometer
nM	Nanomol
OB	Osteoblasten
OB T \leq -2,5	Osteoblasten osteoporotischer Patient*innen
OB T \geq -1	Osteoblasten nicht-osteoporotischer Patient*innen
OC	Osteoklasten
OPG	Osteoprotegerin
PBMCs	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
Pen/Strep	Penicillin-Streptomycin
PGE2	Prostaglandin E2
RANK	<i>Receptor Activator of NF-κB</i>
RANKL	<i>Receptor Activator of NF-κB ligand</i>
rh-IL8	<i>Recombinant human IL8</i>
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation</i>
rpm	<i>Rounds per minute</i>
SDS	Dodecylnatriumsulfat
sIL6-R	<i>soluble IL6 receptor</i>
sRANKL	<i>Soluble Receptor Activator of NF-κB ligand</i>
Streptavidin-HRP A	<i>Streptavidin-Horseradish Peroxidase</i>
Tab.	Tabelle
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TBS-T	<i>Tris-buffered saline with Tween®20</i>
TNF	<i>Tumor-necrosis-factor</i>
VF	Verdünnungsfaktor
WHO	<i>World Health Organization</i>
Wnt	<i>Wingless pathway</i>
WR	<i>Working-reagent</i>

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	1
1.1.	Allgemeines	1
1.1.1.	Definition der Osteoporose	1
1.1.2.	Epidemiologie der Osteoporose	2
1.1.3.	Ätiologie und Risikofaktoren der Osteoporose.....	2
1.1.4.	Einflussgrößen der BMD	3
1.2.	Knochenhomöostase und Pathophysiologie.....	4
1.2.1.	Grundlagen des Knochenmetabolismus	4
1.2.2.	Bone modeling and remodeling	6
1.2.3.	RANK/RANKL/OPG-System	7
1.2.4.	Osteogenesis-Angiogenesis Coupling.....	9
1.3.	Ziele dieser Arbeit.....	13
2.	Material und Methoden.....	14
2.1.	Biologisches Material.....	14
2.1.1.	Humane Osteoblasten.....	14
2.1.2.	Humane Endothelzellen EA.hy 926	14
2.1.3.	Zytokine und Inhibitoren.....	15
2.2.	Nicht-biologisches Material	15
2.2.1.	Geräte	15
2.2.2.	Zellpflege	16
2.2.3.	Substanzen und Verbrauchsmaterialien	18
2.2.4.	Software und Sonstige.....	19
2.3.	Zellkulturmethoden.....	20
2.3.1.	Gewinnung humaner Osteoblasten.....	20
2.3.2.	Auftauen von Zellen.....	20
2.3.3.	Zellkulturpflege.....	21
2.3.4.	Enzymatisches Passagieren von Endothelzellen und OB.....	21
2.3.5.	Zellzählung mittels Neubauer-Zählkammer.....	22
2.3.6.	Herstellung einer Verdünnungsreihe.....	22
2.3.7.	Kryokonservierung.....	23
2.3.8.	Differenzierungsmedium.....	23
2.4.	Versuchsansätze	24

2.4.1.	Expression Angiogenese-relevanter Faktoren in Osteoblasten	24
2.4.2.	Einfluss von OB T \leq -2,5 auf Endothelzellen	25
2.4.3.	Einfluss differentiell exprimierter Faktoren in OB T \leq -2,5 auf Endothelzellen	26
2.4.4.	Einfluss differentiell exprimierter Faktoren in OB T \leq -2,5 auf die OPG-Expression in Osteoblasten.....	26
2.5.	Analyseverfahren	27
2.5.1.	Proteinisolierung, Konzentrationsbestimmung und Bestimmung der Gesamtproteinmenge.....	27
2.5.2.	Western-Blot zur Analyse der HIF-1 α -Expression	28
2.5.3.	Migrationsassay.....	30
2.5.4.	ELISA zur Quantifizierung von Osteoprotegerin	31
2.5.5.	CellTiter-Blue Assay.....	31
2.5.6.	ELISA zur Quantifizierung von IL6, IL8, ANG, VEGF und CHI3L1	32
2.6.	Statistische Auswertung	33
3.	Ergebnisse	34
3.1.	Expression Angiogenese-relevanter Faktoren in Osteoblasten	34
3.1.1.	VEGF-Expression in Osteoblasten.....	34
3.1.2.	CHI3L1-Expression in Osteoblasten.....	35
3.1.3.	HIF-1 α -Expression in Osteoblasten	36
3.1.4.	IL6-Expression in Osteoblasten	37
3.1.5.	IL8-Expression in Osteoblasten	38
3.1.6.	ANG-Expression in Osteoblasten	39
3.2.	Einfluss von OB T \leq -2,5 auf Endothelzellen	40
3.2.1.	Einfluss von OB T \leq -2,5 auf die Proliferation von Endothelzellen	41
3.2.2.	Einfluss von OB T \leq -2,5 auf die Migration von Endothelzellen	44
3.3.	Einfluss differentiell exprimierter Faktoren in OB T \leq -2,5 auf die Migration von Endothelzellen.....	46
3.3.1.	Einfluss von IL6 auf die Migration von Endothelzellen	47
3.3.2.	Einfluss von Anti-IL6 auf die Migration von Endothelzellen.....	48
3.3.3.	Einfluss von IL8 auf die Migration von Endothelzellen	49
3.3.4.	Einfluss von Reparixin auf die Migration von Endothelzellen	50
3.3.5.	Einfluss von ANG auf die Migration von Endothelzellen	51
3.3.6.	Einfluss von Anti-ANG auf die Migration von Endothelzellen.....	52
3.4.	Einfluss differentiell exprimierter Faktoren in OB T \leq -2,5 auf die OPG-Expression in Osteoblasten.....	53

3.4.1.	Einfluss von IL6 und Anti-IL6 auf die OPG-Expression in OB	54
3.4.2.	Einfluss von IL8 und Reparixin auf die OPG-Expression in OB.....	56
3.4.3.	Einfluss von ANG und Anti-ANG auf die OPG-Expression in OB	58
4.	Diskussion.....	60
4.1.	Expression Angiogenese-relevanter Faktoren in Osteoblasten	60
4.2.	Einfluss von OB T \leq -2,5 auf Endothelzellen	67
4.3.	Einfluss differentiell exprimierter Faktoren in OB T \leq -2,5 auf Endothelzellen	67
4.4.	Einfluss differentiell exprimierter Faktoren in OB T \leq -2,5 auf die OPG-Expression in Osteoblasten.....	71
4.5.	Schlussfolgerung.....	76
5.	Literatur- und Quellenverzeichnis.....	78

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Globale Prävalenz der Osteoporose nach Alter und Geschlecht.....	2
Abb. 2: Endogene Einflussgrößen auf den Knochenmetabolismus.....	4
Abb. 3: Grundzüge des RANKL/RANK/OPG-Systems.....	9
Abb. 4: Rechenformeln zur Zellzählung mittels Neubauer-Zählkammer.....	22
Abb. 5: Rechenformeln zur Anlage einer Verdünnungsreihe.....	23
Abb. 6: Zusammensetzung des osteogenen Differenzierungsmediums.....	24
Abb. 7: Prinzip des Wundheilungs-Assays.....	30
Abb. 8: VEGF-Expression in nativen Osteoblasten.....	34
Abb. 9: VEGF-Expression in Osteoblasten nach osteogener Differenzierung.....	35
Abb. 10: CHI3L1-Expression in nativen Osteoblasten.....	35
Abb. 11: CHI3L1-Expression in Osteoblasten nach osteogener Differenzierung.....	36
Abb. 12: HIF-1 α -Expression in nativen Osteoblasten.....	36
Abb. 13: HIF-1 α -Expression in Osteoblasten nach osteogener Differenzierung.....	37
Abb. 14: IL6-Expression in nativen Osteoblasten.....	37
Abb. 15: IL6-Expression in Osteoblasten nach osteogener Differenzierung.....	38
Abb. 16: IL8-Expression in nativen Osteoblasten.....	38
Abb. 17: IL8-Expression in Osteoblasten nach osteogener Differenzierung.....	39
Abb. 18: ANG-Expression in nativen Osteoblasten.....	39
Abb. 19: ANG-Expression in Osteoblasten nach osteogener Differenzierung.....	40
Abb. 20: Einfluss von Osteoblasten auf die Zellzahl von Endothelzellen (EA.hy 926).....	41
Abb. 21: Einfluss von Osteoblasten auf die Zellzahl von Endothelzellen (EA.hy 926).....	42
Abb. 22: Einfluss von Osteoblasten auf die Zellzahl von Endothelzellen (EA.hy 926).....	43
Abb. 23: Einfluss von Osteoblasten auf die Zellzahl von Endothelzellen (EA.hy 926).....	43
Abb. 24: Einfluss von Osteoblasten auf die Migration von Endothelzellen (EA.hy 926).....	44
Abb. 25: Exemplarische fotomikroskopische Darstellung des Einflusses von Osteoblasten auf die Migration von Endothelzellen (EA.hy 926).....	45
Abb. 26: Einfluss von Osteoblasten auf die Migration von Endothelzellen (EA.hy 926).....	45
Abb. 27: Exemplarische fotomikroskopische Darstellung des Einflusses von Osteoblasten auf die Migration von Endothelzellen (EA.hy 926).....	46
Abb. 28: Einfluss von IL6 auf die Migration von Endothelzellen (EA.hy 926).....	47
Abb. 29: Exemplarische fotomikroskopische Darstellung des Einflusses von IL6 auf die Migration von Endothelzellen (EA.hy 926).....	47
Abb. 30: Einfluss von Anti-IL6 auf die Migration von Endothelzellen (EA.hy 926).....	48
Abb. 31: Exemplarische fotomikroskopische Darstellung des Einflusses von Anti-IL6 auf die Migration von Endothelzellen (EA.hy 926).....	48

Abb. 32: Einfluss von IL8 auf die Migration von Endothelzellen (EA.hy 926)	49
Abb. 33: Exemplarische fotomikroskopische Darstellung des Einflusses von IL8 auf die Migration von Endothelzellen (EA.hy 926).....	49
Abb. 34: Einfluss von Reparixin auf die Migration von Endothelzellen (EA.hy 926)	50
Abb. 35: Exemplarische fotomikroskopische Darstellung des Einflusses von Reparixin auf die Migration von Endothelzellen (EA.hy 926).....	50
Abb. 36: Einfluss von ANG auf die Migration von Endothelzellen (EA.hy 926)	51
Abb. 37: Exemplarische fotomikroskopische Darstellung des Einflusses von ANG auf die Migration von Endothelzellen (EA.hy 926).....	51
Abb. 38: Einfluss von Anti-ANG auf die Migration von Endothelzellen (EA.hy 926).....	52
Abb. 39: Exemplarische fotomikroskopische Darstellung des Einflusses von Anti-ANG auf die Migration von Endothelzellen (EA.hy 926).....	52
Abb. 40: Einfluss von IL6 und Anti-IL6 auf die OPG-Expression humaner Osteoblasten	54
Abb. 41: Einfluss von IL6 und Anti-IL6 auf die Zellzahl humaner Osteoblasten	55
Abb. 42: Einfluss von IL8 und Reparixin auf die OPG-Expression humaner Osteoblasten.....	56
Abb. 43: Einfluss von IL8 und Reparixin auf die Zellzahl humaner Osteoblasten.....	57
Abb. 44: Einfluss von ANG und Anti-ANG auf die OPG-Expression humaner Osteoblasten ..	58
Abb. 45: Einfluss von ANG und Anti-ANG auf die Zellzahl humaner Osteoblasten	59
Abb. 46: Das differentielle Expressionsmuster Angiogenese-relevanter Faktoren durch OB $T \leq -2,5$	66
Abb. 47: Einfluss differentiell exprimierter Faktoren in OB $T \leq -2,5$ und spezifischer Inhibitoren auf die Migration von Endothelzellen (EA.hy 926).....	70
Abb. 48: Einfluss differentiell exprimierter Faktoren in OB $T \leq -2,5$ und spezifischer Inhibitoren auf die OPG-Expression in humanen Osteoblasten.	75

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Definition der Osteopenie und Osteoporose nach WHO	1
Tab. 2: Risikofaktoren für die Entwicklung einer primären Osteoporose	3
Tab. 3: Zellmaterial (humane Osteoblasten)	14
Tab. 4: Material (Zytokine und Inhibitoren)	15
Tab. 5: Material (Geräte)	16
Tab. 6: Material (Zellpflege)	17
Tab. 7: Material (Substanzen und Verbrauchsmaterialien)	19
Tab. 8: Material (Software und Sonstiges)	20
Tab. 9: Angestrebte Zellzahl/cm ² zum Zeitpunkt der Kultivierung	21
Tab. 10: Kulturgefäße und Kulturmedien der kultivierten Zellen	21
Tab. 11: Konzentration der verwendeten Zytokine und Inhibitoren zur Evaluation der Migration von EA.hy 926	26
Tab. 12: Konzentration der verwendeten Zytokine und Inhibitoren zur Evaluation der OPG-Expression	27
Tab. 13: Standardproben des BCA-Protein Assay Kit	28
Tab. 14: Zusammensetzung der im Western-Blot verwendeten Lösungen	29
Tab. 15: Datenübersicht der verwendeten ELISA	32

1. Einleitung

1.1. Allgemeines

1.1.1. Definition der Osteoporose

Die Osteoporose zählt laut der *World Health Organization* (WHO) zu den häufigsten Knochenerkrankungen. Als systemische Skeletterkrankung ist die Osteoporose durch eine verminderte Knochendichte mit einer verschlechterten Mikroarchitektur, einem Anstieg der Knochenfragilität und einer daraus entstehenden Frakturneigung gekennzeichnet (2, 3).

Nach der WHO wird die Osteoporose anhand der *bone mineral density* (BMD) definiert. Die BMD in g/cm^2 wird mittels *Dual X-ray Absorptiometry* (DXA) bestimmt. Die Messung wird vornehmlich im Bereich der Lendenwirbel L1-4 oder des proximalen Femurs durchgeführt (4). Auf Grundlage der BMD definieren sich T- und Z-Score. Der T-Score beschreibt die Differenz zwischen der gemessenen BMD und der mittleren BMD einer Referenzpopulation junger, gesunder Erwachsener gleichen Geschlechts und gleicher Ethnie. Der Z-Score beschreibt die Differenz zwischen der gemessenen BMD und der mittleren BMD einer altersgleichen Referenzpopulation gleichen Geschlechts und gleicher Ethnie (5, 6). Der T-Score findet seine Anwendung im Kollektiv postmenopausaler Frauen und Männern über 50 Jahren. Für jüngere Patient*innen wird der Z-Score verwendet (7). Eine Osteoporose wird ab einem T-Score $\leq -2,5$ diagnostiziert. Eine verminderte Knochendichte mit einem T-Score < -1 und $> -2,5$ wird als Osteopenie klassifiziert (Tab. 1). Voraussetzung für die Diagnostik der Osteoporose mittels T-Score ist der Ausschluss anderer Erkrankungen, die mit einer Verminderung der Knochendichte einhergehen (4).

Einteilung	T-Score	BMD
Normal	≥ -1	Innerhalb einer Standardabweichung des Mittelwerts eines jungen, gesunden Referenzkollektivs.
Osteopenie	-1 bis -2,5	Unterhalb einer bis 2,5 Standardabweichung des Mittelwerts eines jungen, gesunden Referenzkollektivs.
Osteoporose	$\leq -2,5$	Unterhalb 2,5 Standardabweichungen von dem Mittelwert eines jungen, gesunden Referenzkollektivs.

Tab. 1: Definition der Osteopenie und Osteoporose nach WHO

World Health Organisation (WHO), *Bone mineral density* (BMD). Basierend auf Sözen et al (8).

1.1.2. Epidemiologie der Osteoporose

Osteoporose ist eine weltweit verbreitete Erkrankung. Die globale Prävalenz wird in einem systematischen Review von Xiao et al. mit 19,7 % angegeben. Dabei variiert die Prävalenz in Abhängigkeit von Staaten, geographischen Regionen, Ethnien und weiteren Faktoren. So liegt die Prävalenz der Osteoporose in der Türkei bei 52 %, wohingegen sie in den Niederlanden lediglich 4,1 % beträgt (9). Innerhalb der Europäischen Union leiden schätzungsweise 22 Millionen Frauen und etwa 5,5 Millionen Männer an Osteoporose (10).

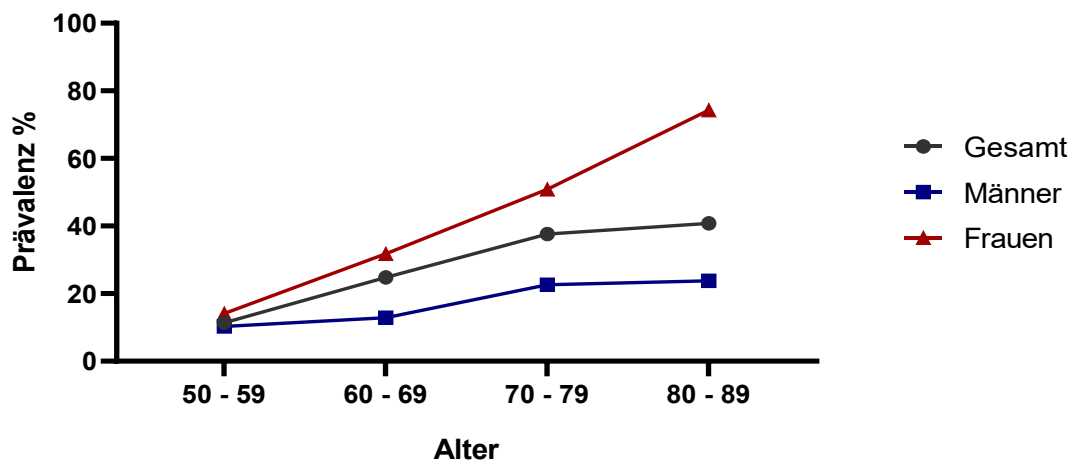


Abb. 1: Globale Prävalenz der Osteoporose nach Alter und Geschlecht
Basierend auf Xiao et al. (9)

Alter und Geschlecht beeinflussen die Prävalenz der Osteoporose maßgeblich. Frauen sind deutlich häufiger betroffen als Männer. Zudem nimmt die Prävalenz mit zunehmendem Alter zu (9, 11). Eine Darstellung der Altersentwicklung der globalen Prävalenz findet sich in Abb. 1. In einer alternden Gesellschaft steigt die Anzahl der Patient*innen mit Osteoporose und damit die Zahl assoziierter Komplikationen. Innerhalb der Europäischen Union wurden 2010 etwa 3,5 Millionen Fragilitätsfrakturen dokumentiert. Die dadurch entstandene ökonomische Belastung belief sich schätzungsweise auf 37 Milliarden Euro (10). Es ist zu erwarten, dass der gesellschaftlich-ökonomische Stellenwert der Osteoporose in Zukunft weiter zunimmt.

1.1.3. Ätiologie und Risikofaktoren der Osteoporose

Die Einteilung der Osteoporose erfolgt in die Form der primären Osteoporose, infolge natürlicher Alterungsprozesse, sowie der sekundären Osteoporose, die als Folge von Primärerkrankungen oder Medikation auftreten kann. Im Falle der primären Osteoporose wird der Typ I (postmenopausale Osteoporose) gegen den Typ II (senile Osteoporose) abgegrenzt. Eine seltene Form ist die idiopathische Osteoporose bei jungen Menschen. Die sekundäre Osteoporose kann

multiple Ursachen haben. Zu den häufigsten zählen hierbei endokrine Grunderkrankungen wie Hypercortisolismus, Hypogonadismus, Hyperthyreose und andere, Malabsorptionssyndrome und Essstörungen, Immobilisation oder medikamentöse Ursachen wie bspw. die Langzeittherapie mit Glucocorticoiden oder Protonenpumpeninhibitoren (12, 13).

Durch die verschiedenen Formen osteoporotischer Erkrankungen lassen sich eine Vielzahl potentieller Risikofaktoren aufzählen. Eine Auswahl der wichtigsten Risikofaktoren für die Entwicklung einer primären Osteoporose Typ I und II ist in Tab. 2 aufgeführt.

Nicht modifizierbare Risikofaktoren	Ggf. modifizierbare Risikofaktoren
– Alter	– Östrogenmangel
– Weibliches Geschlecht	– Östrogenexpositionszeit < 30 Jahre (Späte Menarche, frühe Menopause)
– Familiäre Osteoporose	– Körperliche Inaktivität/Immobilität
– u. a.	– Schlechter Ernährungszustand
	– Calciummangel, Vitamin-D-Mangel
	– Noxen (Rauchen, Alkoholismus)
	– u. a.

Tab. 2: Risikofaktoren für die Entwicklung einer primären Osteoporose
Basierend auf Herold et al. und Felsenberg et al. (13, 14)

1.1.4. Einflussgrößen der BMD

Die BMD steht in Abhängigkeit von den fortlaufenden Umbauprozessen des Knochens. Diese Umbauprozesse unterliegen einer Reihe endogener und exogener Einflussgrößen (15, 16). Das endokrine System ist maßgeblich an der systemischen Regulation der BMD beteiligt. Wachstumsregulatoren fördern den Aufbau neuer Knochenmasse. Sexualhormone vermitteln antiresorbierende Effekte und fördern den Knochenaufbau. Kalzitrope Hormone haben einen homöostatischen Effekt und regulieren das Gleichgewicht des Calcium-Phosphat-Haushalts (15, 21). Die beteiligten Faktoren üben teils pleiotrope Effekte auf den Knochenmetabolismus aus (17-19). So vermitteln beispielsweise Thyroxin, Oxytocin und Parathormon sowohl die Stimulation von Formations- als auch von Resorptionsprozessen. Vitamin D stimuliert die Resorption und wirkt sich über Absorptionsmechanismen von Calcium zusätzlich auf die Formationsprozesse des Knochengewebes aus (15, 20). Die Einflüsse einiger wichtiger endogener Faktoren auf die Regulation von Resorption und Neubildung der Knochensubstanz und somit auf die BMD sind in Abb. 3 dargestellt.

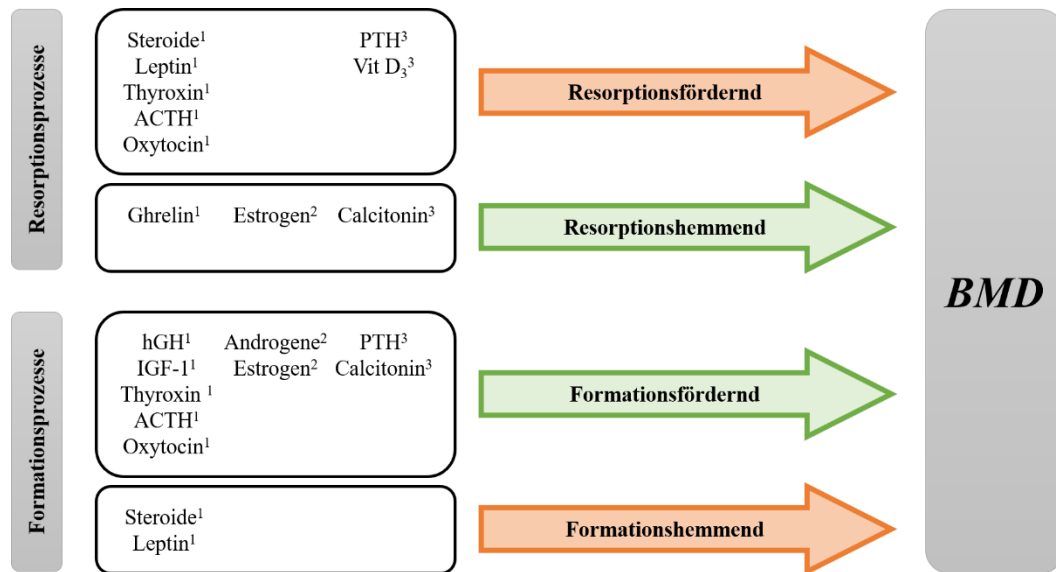


Abb. 2: Endogene Einflussgrößen auf den Knochenmetabolismus.

Basierend auf N.H. Hart et al. (15). *Bone mineral density* (BMD), Adrenokortikotropes Hormon (ACTH), Parathormon (PTH), Vitamin D3 (Vit D₃), *Human growth hormone* (hGH), *Insulin like growth factor 1* (IGF-1). Wachstumsregulatoren¹, Geschlechtshormone², Kalzitrope Hormone³.

1.2. Knochenhomöostase und Pathophysiologie

1.2.1. Grundlagen des Knochenmetabolismus

Die Knochensubstanz bildet die Grundlage für den Bewegungsapparat des Menschen und erfüllt weitere essentielle Aufgaben. Neben der strukturellen Stabilität bietet das knöcherne Skelett inneren Organen und Geweben Schutz vor äußeren Einflüssen, ist an der Regulation des Mineralstoffhaushalts beteiligt und dient als Reservoir für Wachstumsfaktoren und Zytokine. Des Weiteren bildet die Knochensubstanz das notwendige Milieu für die Hämatopoese des Knochenmarks. Knochen ist als Gewebe höchst adaptiv, strukturell dynamisch und metabolisch aktiv (22, 23).

Die Einteilung der Knochen erfolgt nach verschiedenen Kriterien wie Größe, Konsistenz oder Form. Für die folgenden Ausführungen wird sich hier auf die Einteilung in Ossa longa, brevia, plana, pneumatica und irregularia bezogen. Im Kontext der Osteoporose kommt den Ossa longa die größte Bedeutung zu (24). Makroskopisch setzen sich die Ossa longa aus Epiphyse, Diaphyse und der verbindenden Metaphyse zusammen. Auf mikroskopischer Ebene ist zwischen den Anteilen der Spongiosa und der Kompakta zu unterscheiden (25, 26). Die Spongiosa besteht aus einem Gitterwerk aus Trabekeln. Dieses Grundgerüst ist an die Zug- und Druckbelastung der jeweiligen Knochen adaptiert und bietet den anatomischen Raum für das Knochenmark (27). Obwohl die Spongiosa nur 20 % der Gesamtmasse der menschlichen Knochen ausmacht, hat sie

doch eine übergeordnete Bedeutung in Bezug auf die metabolische Aktivität der Knochen. Bedingt durch das hohe Verhältnis von Oberfläche zu Volumen steht die Spongiosa in einem engen Bezug zu zirkulierenden Wachstumsfaktoren und Zytokinen (28). Die Kompakta bildet den verhärteten, dichteren Rindbereich der Ossa longa, die Kortikalis. Diese ist durch eine große Widerstandsfähigkeit ausgezeichnet und verleiht den Knochen große Stabilität (25, 28, 29).

Osteoklasten (OC), Osteoblasten (OB) und Osteozyten bilden die zelluläre Grundlage des Knochen-Gewebes und Metabolismus. OC sind mehrkernige Riesenzellen, welche aus der Fusion mononukleärer Zellen der hämatopoetischen Stammzelllinie entspringen. Sie sind dem mononukleär phagozytären System (MPS) zugehörig (30-32). Vorläuferzellen der OC zirkulieren in der Blutlaufbahn. Unter dem Einfluss verschiedener Chemokine und Zytokine, insbesondere dem *Macrophage-colony-stimulating factor* (MCS) und dem *Receptor Activator of NF- κ B ligand* (RANKL), differenzieren die Vorläuferzellen zu reifen OC (33). Die Hauptaufgabe der OC besteht in der Resorption von Knochensubstanz. Aktive OC sind polarisiert. Eine *sealing zone* liegt dem Knochen direkt an und schafft eine laterale Abgrenzung der basolateralen Resorptionszone gegenüber umliegenden Strukturen. Innerhalb der Resorptionszone haben OC keinen direkten Kontakt zum Knochen. Hier bildet sich ein funktionell abgetrennter Bereich, in welchem die OC Protonen und Proteasen sezernieren. Diese lösen Hydroxylapatit und degradieren die organischen Komponenten mittels Proteolyse (34-37). Neben ihrer Hauptaufgabe, der Knochenresorption, weisen neuere Erkenntnisse auf weitere Funktionen der OC hin. Demnach beeinflussen sie beispielweise die Immunregulation und somit auch den Pathomechanismus maligner Tumorerkrankungen (30, 34).

OB sind für den Aufbau der Knochenmatrix verantwortlich. Sie entstammen der Linie mesenchymaler Stammzellen (MSC) und differenzieren sich unter dem Einfluss multipler Faktoren, insbesondere der Expression von *Bone morphogenetic proteins* (BMPs), Mitgliedern des *Wingless pathways* (Wnt) sowie des RANK/RANKL-Systems zu reifen OB (31, 38, 39). Reife OB sind cuboidale, polarisierte Zellen, die neue Knochensubstanz in zwei Schritten aufbauen. Zunächst sezernieren die OB das Osteoid, bestehend aus Kollagen, nicht-kollagene Proteine und Proteoglykanen. Es folgt die Mineralisierung des Osteoids. Zentral ist hierbei die Synthese von Hydroxylapatit aus Matrixvesikeln (31, 38, 40). Nachdem die Knochensubstanz gebildet wurde, differenzieren OB zum Teil zu Osteozyten in der Knochensubstanz, verbleiben als *Bone lining cells* (BLC) an der Knochenoberfläche oder werden apoptotisch (41, 42).

BLC sind ruhende abgeflachte OB, die die Knochenoberflächen bedecken, wenn sich diese nicht in akuten Umbauprozessen befindet (38, 43). Sie haben im Knochenmetabolismus wichtige Funktionen. So verhindern BLC die direkte Interaktion von OC mit der Knochenmatrix und damit eine überschießende Resorption des Knochens (44, 45). BLC bauen zudem Kollagenfibrillen ab,

die bei Umbauprozessen des Knochen durch die OC verbleiben (45). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass BLC wieder zu aktiven Osteoblasten differenzieren können und somit eine bedeutende Quelle für Osteoblasten im Erwachsenenalter sind (46-48).

Osteozyten sind der Linie der MSC zugehörig, haben eine lange Lebensdauer und stellen den größten Anteil der Knochenzellen. Sie differenzieren sich aus OB und lagern sich in der Knochenmatrix, in sogenannten Lakunen, ein (41, 49, 50). Im Rahmen der Differenzierung aus OB bilden Osteozyten bis zu 100 dendritische Ausläufer aus. Diese Ausläufer schaffen Verbindungen zu umliegenden Osteozyten, oberflächlich gelegenen OB, sowie dem vaskulären System. Innerhalb dieses funktionellen Netzwerks nehmen Osteozyten Einfluss auf den Knochenmetabolismus (51-53). Die Rolle des endokrinen Einflusses von Osteozyten auf den Knochenmetabolismus ist Gegenstand aktueller Forschung. Neben der Expression von RANKL und Osteoprotegerin (OPG) sind Osteozyten beispielsweise in der Lage, mechanische Belastung in biochemische Signale zu translatieren (54).

1.2.2. Bone modeling and remodeling

Die Knochensubstanz unterliegt fortlaufenden Auf- und Umbauprozessen. Das *bone modeling* beschreibt den Prozess des Knochenwachstums, der nach der Wachstumsphase endet, sowie die mechanisch induzierten Adaptionen des Knochens an Belastung (55). Das *bone remodeling* hingegen beschreibt die Reparatur von Mikroschäden (*targeted remodeling*) und den stochastischen Austausch der Knochensubstanz (*non-targeted remodeling*) (23, 56). Als lebenslanger Prozess erfordert das *bone remodeling* eine strikte Regulation, um die Integrität der Knochensubstanz zu gewährleisten. Physiologisch wird die abgebaute Knochensubstanz in Ort, Volumen und Funktion ersetzt (57). Auf zellulärer Ebene wird die Regulation des *bone remodeling* durch die *Basic molecular unit* (BMU) und das *Bone remodeling compartment* (BRC) gewährleistet (55).

Die BMU umfasst nach Frost Osteoklasten (OC), Osteoblasten (OB) und Osteozyten sowie die kapilläre Blutversorgung innerhalb der *bone remodeling cavity* (58). Die BMU tritt in Form von Howship'schen Lakunen an der Oberfläche der Trabekelknochen in der Spongiosa auf (59). Im Bereich der Kortikalis entstehen durch die Umbauprozesse des *bone remodeling* Tunnel, welche mit Knochensubstanz ausgekleidet werden. In diesen sogenannten Haver'schen Kanälen verbleiben kleinste Blutgefäße (55). Sowohl in den Howship'schen Lakunen als auch in den Haver'schen Kanälen werden die Zellen der BMU von dem BRC umgeben. Das BRC ist die funktionelle Einheit des *bone remodelings*. Es handelt sich hierbei um eine Überdachung aus einer dünnen Zellschicht, innerhalb derer das *bone remodeling* präzise reguliert wird (60). Diese geschlossene Mikroumgebung ermöglicht nach Hauge et al. einen effizienten Austausch der

notwendigen Matrixbestandteile und Mineralien, eine präzise Rekrutierung der Zellen der BMU und bildet somit die mikroanatomische Grundlage des *bone remodelings* (61).

Der Prozess des *bone remodelings* umfasst einen Zyklus mit fünf Phasen. Innerhalb der Aktivierungsphase werden Vorläuferzellen der OC rekrutiert und aktiviert. Initial auslösende Faktoren der Aktivierungsphase können durch Osteozyten vermittelte Signalwege sein (62). Beispielsweise wird mechanischer Scherstress durch Osteozyten von einem physikalischen Impuls zu einem biochemischen Signal translatiert und induziert so über die Rekrutierung von OC und OB Umbauprozesse des Knochengewebes als Adaption an spezifische Belastung (63). In einem ähnlichen Mechanismus werden im Rahmen des *targeted remodelings* durch die Apoptose von Osteozyten parakrine Faktoren freigesetzt, welche die Knochenbildung induzieren (64-66). In der folgenden Resorptionsphase wird Knochengewebe durch die gereiften OC resorbiert. Der Mechanismus des Wechsels von Resorption hin zur Bildung neuer Knochensubstanz in der Umkehrphase (*reversal phase*) ist bislang nicht vollständig aufgeklärt. Während der Formationsphase und der Terminationsphase wird durch die OB die Knochensubstanz aufgebaut. In der Folge differenzieren die OB zu Osteozyten innerhalb der Knochenmatrix, verbleiben als BLC an der Knochenoberfläche oder werden apoptotisch (55).

1.2.3. RANK/RANKL/OPG-System

Das Zusammenspiel von Resorptions- und Formationsprozessen ist essentiell, um die Integrität des Knochens zu gewährleisten. Die Feinregulation von OC, OB, BLC und Osteozyten wird maßgeblich über das RANKL/RANK/OPG-System vermittelt (67). Das System besteht aus drei miteinander interagierenden Proteinen. Dem *Receptor Activator of NF- κ B ligand* (RANKL), dem *Receptor Activator of NF- κ B* (RANK) und Osteoprotegerin (OPG) (68). In den späten 1990er Jahren wurde OPG als Mitglied der *Tumor-necrosis factor* (TNF)-Rezeptor Familie identifiziert, das *in vitro* die Differenzierung von OC verhinderte (69-71). In der Folge konnten mit RANKL und RANK weitere Proteine nachgewiesen werden, die im Zusammenspiel mit OPG die Signalwege zur Vermittlung von Resorptions- und Formationsprozessen des Knochens steuern (67, 72).

OPG wird als lösliches Protein von verschiedenen Zelltypen sezerniert. Neben B-Lymphozyten, Chondrozyten und glatten Gefäßmuskelzellen ist im Hinblick auf die Knochenhomöostase insbesondere die OPG-Expression der OB relevant. OPG wird als löslicher Rezeptor der TNF-Rezeptorfamilie exprimiert, bindet RANKL und inhibiert die biologischen Effekte von RANKL, indem es die Bindung von RANKL an RANK verhindert und somit die Aktivierung der OC unterbindet (73). Dadurch erfüllt OPG in Menschen eine osteoprotektive Funktion. Eine

homozygote partielle Deletion bei Patient*innen mit juvenilem Morbus Paget führte zu vermehrtem *bone remodeling*, Osteopenie, sowie einem erhöhten Frakturrisiko (74).

Auch RANKL gehört der TNF-Familie an. Er wird von Zellen lymphatischer Gewebe, Lungengewebe und v. a. von OB und deren Vorläuferzellen gebildet (73, 75, 76). Es existieren drei Isoformen, von denen eine als löslicher Ligand (sRANKL) fungiert. sRANKL entsteht hierbei durch die Proteolyse der Transmembrandomäne durch Metalloproteasen oder alternatives Splicen (77, 78). Während die membrangebundenen Formen des RANKL über Zell-Zell Kontakte eine strikte topographische Regulierung des *bone remodeling* ermöglichen, vermittelt sRANKL eine übergreifend systemische Wirkung (79).

RANKL bindet an den RANK-Rezeptor, welcher unter anderem von OC und deren Vorläufern gebildet wird und vermittelt so die Differenzierung und Aktivierung von OC, die Adhärenz an den Knochen, die Aufrechterhaltung der Resorptionsaktivität, sowie die systemische Freisetzung von OC und deren Vorläufern in die Blutlaufbahn (73, 80-83). Dieser Signalweg ist neben seiner übergeordneten Bedeutung für die Regulation der Knochenhomöostase auch für weitere Signalwege essentiell. RANK wird neben OC von Zellen multipler Gewebe exprimiert wie der Skelettmuskulatur, den Glandulae mammaria, dendritischen Zellen oder dem Thymus (73).

Das Verhältnis von RANKL zu OPG wird in der RANKL/OPG-Ratio erfasst. Eine erhöhte Konzentration oder Ratio zugunsten von RANKL ist mit einer vermehrten Resorption und einem höheren Knochenumsatz assoziiert, während eine niedrige Ratio die Knochenresorption reduziert. Das Gleichgewicht zwischen RANKL und OPG stellt eine wichtige Determinante hinsichtlich Knochen-Masse und Stärke dar (84-86). Ein Missverhältnis der RANKL/OPG-Ratio kann so eine verminderte Knochendichte im Sinne einer Osteoporose zur Folge haben. Abb. 3 zeigt eine graphische Darstellung des RANKL/RANK/OPG-Systems.

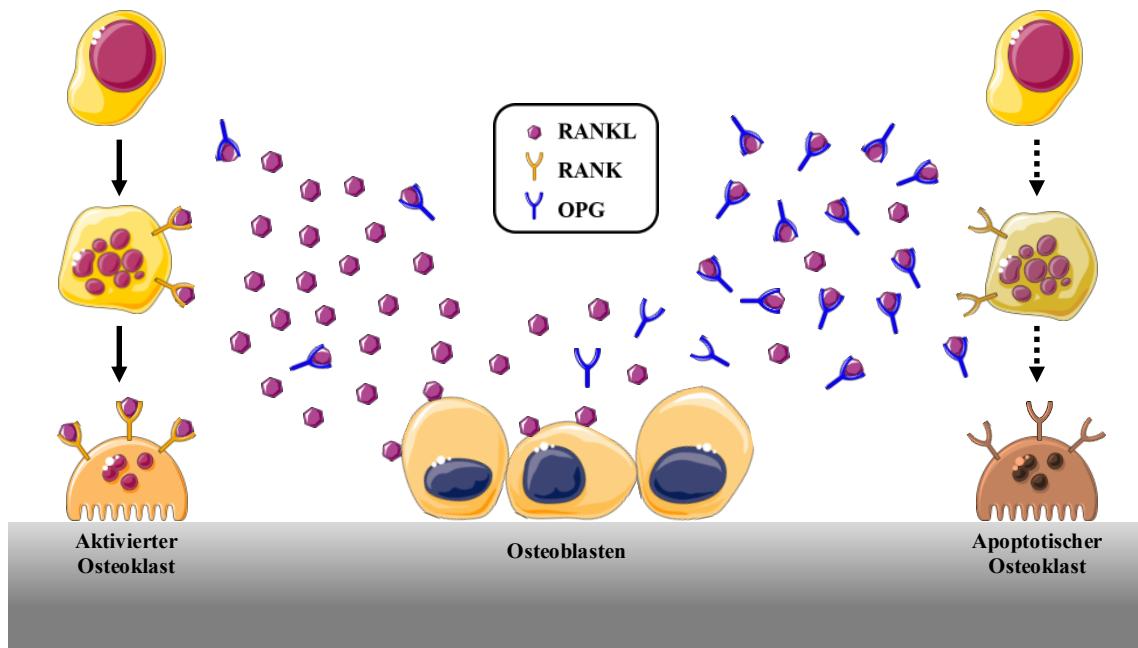


Abb. 3: Grundzüge des RANKL/RANK/OPG-Systems

Receptor Activator of NF- κ B ligand (RANKL), *Receptor Activator of NF- κ B* (RANK), Osteoprotegerin (OPG)

Links: Hoher Knochenumsatz bei hoher RANKL/OPG-Ratio. Rechts: Niedriger Knochenumsatz bei kleiner RANKL/OPG-Ratio. Basierend auf Silva, I. and J.C. Branco und Felsenberg, D. and L. Maurer. (73, 87) Die Abbildung wurde unter Verwendung von Servier Medical Art erstellt¹.

1.2.4. Osteogenesis-Angiogenesis Coupling

Das *Osteogenesis-Angiogenesis Coupling* beschreibt die Verknüpfung des Knochenmetabolismus mit der Angiogenese. Die Blutversorgung des Knochens umfasst in Ruhe etwa 10 - 15 % des Herz-Zeit-Volumens und ist essentiell für den Aufbau der Knochensubstanz im Rahmen des *bone modelings* sowie für die Umbauprozesse des *bone remodelings* (88). Die Angiogenese schafft dabei Transportwege für die beteiligten Zellen, gewährleistet die Sauerstoff- und Nährstoffversorgung, den Transport von Mineralstoffen sowie den Abtransport von Stoffwechselmetaboliten (69, 89, 90). Das Coupling von Osteogenese und Angiogenese wird maßgeblich durch den Crosstalk von Endothelzellen, OB und Osteozyten beeinflusst (90). An den Signalwegen beteiligte Faktoren umfassen den *vascular endothelial growth factor* (VEGF), den *hypoxia-inducible factor 1 alpha* (HIF-1 α), Notch, BMP, und den *Fibroblast growth factor* (FGF) (90).

In Bezug auf pathologische Veränderungen der BMD im Erwachsenenalter ist insbesondere die Angiogenese hinsichtlich der Prozesse des *bone remodelings* zu betrachten. Kapillargefäße sind

¹ Servier Medical Art. Zur Verfügung gestellt von Servier, lizenziert unter einer Creative Commons Attribution 3.0 Unported Lizenz.

Teil der BMU bzw. des BRC. Es konnte bereits demonstriert werden, dass sich im Bereich von *remodeling sites* eine erhöhte Dichte an Kapillargefäßen, OB-Progenitorzellen und weiteren proliferativen Zellen findet. Die stärkste Ausprägung befindet sich hierbei in den erodierten Bereichen des Knochens. Eine genau reguliert angiogene Reaktion ist demnach von entscheidender Bedeutung für das *bone remodeling* (89, 91). Störungen der Angiogenese sowie ein veränderter Blutfluss können dadurch mit verschiedenen Knochenerkrankungen wie der Osteoporose assoziiert sein. So konnte bei postmenopausalen Osteoporosepatientinnen eine verminderte Blutversorgung des Femurs nachgewiesen werden (92). Des Weiteren korrelierte eine verminderte Blutversorgung der unteren Extremität mit einer verminderten BMD (93).

Auch konnte in neueren Untersuchungen ein direkter Zusammenhang zwischen spezifischen Gefäß-Subtypen und einer modifizierten BMD nachgewiesen werden. Kusumbe et al. definieren im Mausmodell auf Basis morphologischer, molekularer und funktioneller Kriterien Endothelzellen der Typen H und L (94). Endothelzellen des Typ H sind mit der Anwesenheit von Osteoprogenitorzellen assoziiert, vermitteln die Neo-Angiogenese in Knochen und werden als sensitiver Biomarker der BMD diskutiert. Ein Verlust der Typ H Zellen in adulten Mäusen ist mit einer verminderten Knochendichte assoziiert (94-96).

Das Zusammenspiel von Osteogenese und Angiogenese wird durch lokale Mediatoren, sowie dem Crosstalk zwischen Endothelzellen, OB und Osteozyten reguliert. Die genauen Mechanismen des *Osteogenesis-Angiogenesis Coupling* im Hinblick auf pathologische Prozesse sind Gegenstand aktueller Forschung (90, 97). Angiogenese-relevante Faktoren, die von OB exprimiert werden, umfassen u. a. Interleukin (IL)6, IL8, Angiogenin (ANG), den *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *chitinase-3 like-protein-1* (CHI3L1), sowie den *hypoxia-inducible factor-1-alpha* (HIF-1 α).

IL6 ist als pluripotentes Zytokin Teil zahlreicher systemischer und lokaler Signalwege (98, 99). Im Hinblick auf den Knochenmetabolismus reguliert IL6 die Aktivität von OB, OC, Osteozyten und Knorpelzellen (100). Es vermittelt resorbierende Effekte durch die Induktion der Differenzierung von OC, sowie durch eine Aktivitätsminderung von OB (101-103). Zusätzlich modifiziert IL6 das RANKL/RANK/OPG-System und vermittelt hier einen proresorptiven Effekt. In murinen Versuchen induzierte IL6 die RANKL- und OPG-Expression in OB und reduzierte RANK (104). IL6 ist zudem maßgeblich an Prozessen der Frakturheilung beteiligt. Die globale Inhibition von IL6 in der Reparationsphase beeinträchtigt das *bone remodeling* (105, 106). Apoptotische Osteozyten sezernieren vermehrt IL6 und vermitteln so das *bone remodeling* (97, 107). Zudem konnte eine IL6-vermittelte Erhöhung von VEGF mRNA in verschiedenen Zelllinien nachgewiesen werden (108).

IL8 (auch *CXC-motiv-chemokine ligand 8* (CXCL8)) gehört zu der Familie der CXC-Proteinliganden (109). Als solches beeinflusst IL8 maßgeblich neoplastische Erkrankungen, Mechanismen der Metastasierung und die Angiogenese (110, 111). IL8 vermittelt chemotaktische Effekte auf Lymphozyten, neutrophile Granulozyten und vermittelt eine angiogene Wirkung durch direkte Steigerung der Endothelzellproliferation sowie eine Steigerung der Expression von Metalloproteasen in *CXC motiv chemokine receptor 1* (CXCR1) und CXCR2 positiven Endothelzellen. Bezogen auf das RANKL/RANK/OPG-System konnte eine durch IL8 vermittelte Steigerung der RANKL-Expression in OB, sowie eine Steigerung der OC-Differenzierung nachgewiesen werden. Dadurch fördert IL8 Resorptionsprozesse innerhalb des Knochens. Es konnten bislang keine Effekte von IL8 auf die OPG-Expression humaner OB beobachtet werden (112, 113). Aktuelle Arbeiten diskutieren die Relevanz von IL8 als Biomarker für die Rehospitalisierungsrate bei Patient*innen mit Osteoporose nach stattgehabter Hüftfraktur (114).

ANG ist ein Ribonuklease-Enzym und wurde als einer der ersten Faktoren identifiziert, der maßgeblich an der Regulation der Angiogenese beteiligt ist (115). Es stimuliert die Angiogenese sowohl autonom als auch synergistisch mit anderen angiogenen Faktoren wie etwa VEGF, den *basic fibroblast growth factors* (aFGF und bFGF) oder dem *epidermal growth factor* (EGF) (116). ANG nimmt zudem Einfluss auf Prozesse der Tumorgenese, vermittelt neuroprotektive Effekte, ist Teil von Entzündungsreaktionen, der angeborenen Immunantwort und Regenerationsprozessen (117). Bislang konnten keine direkten Einflüsse von ANG auf das RANKL/RANK/OPG-System gezeigt werden.

Die verschiedenen Mitglieder der VEGF-Familie, insbesondere VEGF-A, haben einen zentralen Einfluss auf die Regulation der Angiogenese. VEGF wirkt in Endothelzellen anti-apoptotisch und fördert deren Migration (118, 119). Auch im Knochenstoffwechsel ist VEGF von Bedeutung. So induziert VEGF die Proliferation und Migration von OB, unterstützt deren Invasion in das Knochengewebe und verlängert die Lebensdauer der OB. Mehrere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass OB in Reaktion auf verschiedene Stimuli VEGF freisetzen und selbst VEGF-Rezeptoren exprimieren (121-123). Huang et al. beschreiben zudem, dass VEGF zur Differenzierung von OC führen kann. Dies sei durch eine VEGF vermittelte Erhöhung der RANKL/OPG-Ratio in präosteoblastischen Zellen bedingt (120). Darüber hinaus ist VEGF an Prozessen der Frakturheilung beteiligt. In murinen Versuchsansätzen konnte nachgewiesen werden, dass eine Inhibition von VEGF zu einer verminderten Angiogenese, Knochenbildung und Mineralisation in Frakturen führte. Die Zugabe von exogenem VEGF führte hingegen zu einer erhöhten Bildung von Blutgefäßen sowie einer verstärkten Ossifikation und Reifung des Kallus (124). In Reaktion auf Frakturen setzen humane apoptotische Osteozyten vermehrt VEGF frei und unterstützen so Regenerationsprozesse (97, 107).

CHI3L1 wird u. a. von OB, Makrophagen, neutrophilen Granulozyten, Chondrozyten, Endothelzellen und glatten Muskelzellen sezerniert und ist an Entzündungsreaktionen, Zellmigration und Gewebs-remodeling beteiligt (125). Die genauen biologischen Funktionen von CHI3L1 sind noch weitestgehend unbekannt (126). Es steht in Zusammenhang mit Signalwegen, die die Chemotaxis, die Adhäsion und die Migration von Endothelzellen beeinflussen. *In vitro* führte die Zugabe von CHI3L1 zur vermehrten Migration von Endothelzellen, sowie deren tubulären Formation (127-129). CHI3L1 kann zu den akute-Phase Proteinen gezählt werden. Die Plasmakonzentration steigt infolge inflammatorischer Stimuli um über 25 % an (125, 130). Neuere Arbeiten evaluieren die Bedeutung von CHI3L1 bei Osteoporose. CHI3L1 induzierte durch das *bone morphogenetic protein* (BMP) 2 eine vermehrte Differenzierung von OB mit der Folge einer gesteigerten Knochenbildung. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass CHI3L1 die Osteoklastogenese inhibiert und die Knochenresorption durch eine verstärkte OPG-Expression gemindert wird (131). Die Inhibition von CHI3L1 führte in murinen Osteoporosemodellen zur Reduktion proinflammatorischer Zytokine und zu einem signifikant niedrigeren Verlust von Knochenmasse (132). Die genauen Effekte von CHI3L1 auf den Knochenmetabolismus sind bisher jedoch nur unzureichend beschrieben und Gegenstand aktueller Forschung.

HIF-1 α wird von multiplen Hypoxie-sensitiven Zellen als Reaktion auf Hypoxie transkribiert. Es ist an der Regulation des Sauerstoffhaushaltes, der Angiogenese, der Erythropoese, Wundheilungsprozessen, weiteren Stoffwechselprozessen und an Prozessen der Tumorgenese beteiligt (133, 134). Verschiedene Arbeiten evaluieren die Bedeutung von HIF-1 α im *Osteogenesis-Angiogenesis Coupling* und kommen hierbei zu teils gegensätzlichen Schlussfolgerungen. So konnte einerseits demonstriert werden, dass die HIF-1 α -Expression die Vaskularisierung, sowie die Osteogenese fördert. Auch hat eine verminderte HIF-1 α -Expression in OB eine reduzierte Angiogenese und Osteogenese zur Folge (90, 135). Dem entgegen stehen Beobachtungen, dass durch HIF-1 α die Aktivität und Differenzierung von OC gesteigert wird und damit pro-resorptive Effekte vermittelt werden (136). Die Inhibition von HIF-1 α konnte in mehreren murinen Versuchsansätzen den Knochenverlust bei Osteoporose signifikant mindern (137, 138). Hinsichtlich des Einflusses von HIF-1 α auf das *Osteogenesis-Angiogenesis Coupling* fördert die Aktivierung des HIF-1 α -Signalwegs die Expression von VEGF sowie die Bildung von Kapillaren des Typs H und steigert so potentiell die Osteogenese (94, 139). HIF-1 α beeinflusst direkt den Phänotyp von OB, den Knochenumbau und die Vaskularisierung des Knochens (140).

1.3. Ziele dieser Arbeit

Die Osteoporose ist eine Erkrankung verminderter Knochendichte und durch eine multifaktorielle Pathogenese gekennzeichnet. Zentrale Aspekte sind dabei Veränderungen des *Osteogenesis-Angiogenesis Coupling* sowie eine Dysregulation des RANKL/RANK/OPG-Systems. Eine Überbetonung von RANKL in der RANKL/OPG-Ratio sowie eine verminderte Blutversorgung des Knochens sind mit einer verminderten Knochendichte assoziiert.

Eigene Vorarbeiten aus der Arbeitsgruppe Grotheer (Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie des Universitätsklinikum Düsseldorf) wiesen auf eine veränderte Zytokinexpression in Osteoblasten osteoporotischer Patient*innen ($OB T \leq -2,5$) hin. Aus diesem Grund sollte die Expression von Angiogenese-relevanten Faktoren wie IL6, IL8, ANG, VEGF, CHI3L1 und HIF-1 α in $OB T \leq -2,5$ untersucht und deren Einfluss auf Endothelzellen detaillierter evaluiert werden. Dabei sollten folgende Fragestellungen beantwortet werden:

1. Unterscheidet sich das Expressionsmuster von IL6, IL8, ANG, VEGF, CHI3L1 und HIF-1 α in $OB T \leq -2,5$ im Vergleich zu nicht-osteoporotischen Kontrollgruppen?
2. Beeinflussen $OB T \leq -2,5$ die Proliferation und Migration humaner Endothelzellen?
3. Welchen Einfluss haben potentiell differentiell exprimierte Faktoren in $OB T \leq -2,5$ auf das Migrationsverhalten humaner Endothelzellen?
4. Welchen Einfluss haben potentiell differentiell exprimierte Faktoren in $OB T \leq -2,5$ auf die OPG-Expression humaner OB?

Ziel dieser Arbeit ist es, die Expression von IL6, IL8, ANG, VEGF, CHI3L1 und HIF-1 α aus dem Überstand humaner OB osteoporotischer und nicht-osteoporotischer Patient*innen zu quantifizieren und zu vergleichen. Zudem soll der Einfluss konditionierter Medien aus Kulturen von $OB T \leq -2,5$ auf die Zellzahl und die Migration humaner Endothelzellen analysiert werden, um einen möglichen Einfluss auf das *Osteogenesis-Angiogenesis Coupling* im Pathomechanismus der Osteoporose zu untersuchen. Sollte sich die differentielle Expression einzelner Faktoren durch $OB T \leq -2,5$ bestätigen, soll im Anschluss der Einfluss dieser Faktoren und spezifischer Inhibitoren auf die Migration humaner Endothelzellen und die OPG-Expression humaner OB analysiert werden.

Die durchgeführten Versuche sollen dazu beitragen, die Bedeutung der Osteoblasten im Pathomechanismus der Osteoporose im Hinblick auf das *Osteogenesis-Angiogenesis Coupling* und eine mögliche Einflussnahme auf das RANKL/RANK/OPG-System weiter aufzuklären.

2. Material und Methoden

2.1. Biologisches Material

2.1.1. Humane Osteoblasten

Humane OB wurden aus der Spongiosa von Femurköpfen isoliert und kultiviert. Die Knochensubstanz wurde bei der Implantation von Hüft-Totalendoprothesen am Universitätsklinikum Düsseldorf entnommen und mit Einwilligung zur Verfügung gestellt. Die Knochendichte der Spender*innen wurde anhand einer DXA-Messung bestimmt. Eine vorliegende Osteoporose wurde ab einem T-Score von $\leq -2,5$ diagnostiziert. Die entsprechenden OB-Zellkulturen werden im Folgenden mit OB T $\leq -2,5$ bezeichnet. Ein T-Score ≥ -1 wurde als nicht-osteoporotisch definiert. Die entsprechenden OB-Zellkulturen werden mit OB T ≥ -1 bezeichnet. Die Anzahl der Spender*innen sowie die Altersverteilung sind Tab. 3 zu entnehmen. Ein Ethikvotum zur „Erstellung einer Biobank für Osteoblasten und Osteoklasten zur Aufklärung molekularbiologischer Zusammenhänge von Knochenerkrankungen“ mit der Studiennummer 5885R liegt vor.

T-Score	n	m/w	M (Alter in Jahren)	SD (Alter in Jahren)
OB T ≥ -1	12	(m=4, w=8)	68,67	15,55
OB T $\leq -2,5$	8	(m=3, w=5)	82,63	11,16
OB ohne vorliegende Messung	3	(m=1, w=2)	85,67	11,72
Gesamt	23	(m=8, w=15)	75,74	15,20

Tab. 3: Zellmaterial (humane Osteoblasten)

Osteoblasten nicht-osteoporotischer Patient*innen (OB T ≥ -1) und Osteoblasten osteoporotischer Patient*innen (OB T $\leq -2,5$), Gesamtanzahl der Grundgesamtheit (n), männlich (m), weiblich (w), Mittelwert (M), Standardabweichung (SD).

2.1.2. Humane Endothelzellen EA.hy 926

Zur Untersuchung des Einflusses divergierender Faktoren auf die Migrationskapazität und Zellzahl humaner Endothelzellen wurde eine Zelllinie immortalisierter humaner Endothelzellen verwendet. EA.hy 926 ist eine etablierte Hybrid-Zelllinie, die aus humanen Endothelzellen aus Umbilicalvenen (HUVEC) gewonnen und mit A549-Zellen aus humanen Lungenkarzinomen fusioniert wurde (141).

2.1.3. Zytokine und Inhibitoren

Material	Hersteller
Recombinant Human IL-6 200-06	PeproTech - Thermo Fisher Scientific GmbH Schwerte; Deutschland
Recombinant Human IL-8 (CXCL8) 200-08M	PeproTech - Thermo Fisher Scientific GmbH Schwerte; Deutschland
Recombinant Human Angiogenin - 265-AN/CF	R&D Systems, Inc.; Minneapolis; USA
IL-6 Monoclonal Antibody (6708)	Thermo Fisher Scientific GmbH; Schwerte; Deutschland
Reparixin L-lysine salt - 266359-93-7	R&D Systems, Inc.; Minneapolis; USA
Angiogenin Monoclonal Antibody (26-2F),	Thermo Fisher Scientific GmbH; Schwerte; Deutschland
HIF-1 α (D2U3T) Rabbit mAb 14179	Cell Signaling Technology, Inc.; Denver; USA
HeLa Hypoxic / Normoxic Cell Lysate NBP2-36452	Novus Biologicals; Centennial; USA
Goat Anti-Rabbit Immunoglobulins HRP P0448	Agilent Technologies, Inc.; Santa Clara; USA

Tab. 4: Material (Zytokine und Inhibitoren)

2.2. Nicht-biologisches Material

2.2.1. Geräte

Material	Hersteller
Accu Jet Pipettierhilfe	BRAND GmbH & Co. KG; Wertheim; Deutschland
Autoklav - Systec DX 90	Systec GmbH; Linden; Deutschland
Brutschrank - HERACELL 150 i CO ₂ -Inkubator	Thermo Fisher Scientific GmbH; Schwerte; Deutschland
ChemiDoc MP Imaging System	Bio-Rad Laboratories GmbH; München; Deutschland
Eismaschine - RF 0244 A	Manitowoc Ice; Manitowoc; USA
Eiswanne	neoLab Migge GmbH; Heidelberg; Deutschland
Eppendorf® Multipette® Plus pipette	Eppendorf AG; Hamburg; Deutschland
Feinwaage (Kern 440; ABJ-N)	Kern & Sohn GmbH; Balingen; Deutschland
Gefrierschrank	Liebherr-International Deutschland GmbH Biberach an der Riß; Deutschland

Hämocytometer (Neubauer, Tiefe 0,1 mm)	LO Laboroptik; Friedrichsdorf; Deutschland
Heizbad	Thermo Fisher Scientific GmbH; Schwerte; Deutschland
Heizblock	Thermo Fisher Scientific GmbH; Schwerte; Deutschland
Kleinschüttler KM 2	Edmund Bühler GmbH; Bodelshausen; Deutschland
Kühlschrank - KUw1740	Liebherr-International Deutschland GmbH Biberach an der Riß; Deutschland
Magnetrührgerät VWR Standard 620	VWRInternational GmbH; Darmstadt; Deutschland
Mikroskop Zeiss Axiovert 200 / 40 C	Carl Zeiss AG; Oberkochen; Deutschland
Mikroskop Kamera - AxioCam MRC	Carl Zeiss AG; Oberkochen; Deutschland
Multilabel Microplate Reader VICTOR™ X2	Perkin Elmer; Waltham; USA
Pipetus Pippetierhilfe	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG Eberstadt; Deutschland
RotilaboAlu.Rack 1,5	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe; Deutschland
Sicherheitswerkbank mit Abzug TA 1500 x 900 – 900 Laborsystem mc6	Waldner Laboreinrichtungen GmbH & Co. KG Wangen; Deutschland
Sterile Werkbank - Euroflow EFA5	Clean Air Technik bv; Woerden; NL
Sterile Werkbank - Herasafe KS 18	Thermo Fisher Scientific GmbH; Schwerte; Deutschland
Taumelrollenmischer (RM5; RM 10 W)	Labortechnik Fröbel GmbH; Lindau; Deutschland
Trans-Blot Turbo	Bio-Rad Laboratories GmbH; München; Deutschland
Ultraschallprozessor UP50H	Hielscher Ultrasonics GmbH; Teltow; Deutschland
Vortexer (IKA MS3 basic (3000 U/min))	IKA-Werke GmbH & Co. KG; Staufen; Deutschland
Vortexer (Vortex mixer)	VWR International GmbH; Darmstadt; Deutschland
Werkbank Laborpumpe	KNF Neuberger GmbH; Freiburg; Deutschland
Zentrifuge Heraeus Megafuge 16 R	Thermo Fisher Scientific GmbH; Dreieich; Deutschland

Tab. 5: Material (Geräte)

2.2.2. Zellpflege

Material	Hersteller
6-, 12-, 24-, 96- Well-Platte (CELLSTAR® Tissue Culture Plates)	Greiner Bio-One GmbH; Kremsmünster; Österreich
Glasdeckplatte (1 mm)	Bio-Rad Laboratories GmbH; München; Deutschland
CELLSTAR® 15 ml Polypropylen Röhren	Greiner Bio-One GmbH; Kremsmünster; Österreich

CELLSTAR® 50 ml Polypropylen Röhren	Greiner Bio-One GmbH; Kremsmünster; Österreich
Filter, Millex-GP, 0,2 µm, Polyethersulfon	Merck KGaA; Darmstadt; Deutschland
Medizinische Einmalhandschuhe (MicroTouch® NitraTex®)	Ansell GmbH; München; Deutschland
Culture-Insert 2 Well in µ-Dish 35 mm	IBIDI GMBH; Gräfeling; Deutschland
Kontaminationsabfall	MAUSER Corporate GmbH; Brühl; Deutschland
Kryoröhren (Cryo.s™ Einfrierröhren 2 ml™)	Greiner Bio-One GmbH; Kremsmünster; Österreich
Messzylinder 100 ml	VWR®; Darmstadt; Deutschland
Messzylinder 500 ml	VWR®; Darmstadt; Deutschland
Multipettenspitze 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml Eppendorf Combitips advanced®	Eppendorf AG; Hamburg; Deutschland
Nitrocellulose Blotting-Membran 0,2 µm	Peqlab Biotechnologie GmbH; Erlangen; Deutschland
Objektträger 6,6 cm x 7,6 cm	Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH Edermünde; Deutschland
Fusselarme Papiertücher KIMTECH SCIENCE*	Kimberly-Clark Global Sales Inc.; Rosewell; USA
Papiertücher (tapira plus Kosmetiktücher)	GVS Großverbraucherspezialisten eG Heidenheim; Deutschland
Parafilm „M“	Bemis Company Inc., Neenah; USA
Pasteurpipetten, Glas (ISO 7712)	BRAND GmbH + CO KG; Wertheim; Deutschland
Petrischalen 100mm x 20mm	Greiner Bio-One GmbH; Kremsmünster; Österreich
Pipettenspitze mit Filter, 10/20 µl – 300 µl (Tip One)	STARLAB GmbH; Hamburg; Deutschland
Reaktionsgefäß (SafeLock Tubes™ 0,5 ml – 2 ml)	Eppendorf AG; Hamburg; Deutschland
Stripetten 5 ml – 50 ml (Corning® Costar® Shorty Stripette® Serological Pipets)	Merck KGaA; Darmstadt; Deutschland
T175-, T75- Zellkulturflasche, CELLSTAR® Cell Culture Flasks 175 cm² red filter cap	Greiner Bio-One GmbH; Kremsmünster; Österreich
Einweg-Wiegeschalen (Diamond weighting boats, white, antistatic)	Thermo Fisher Scientific GmbH; Schwerte; Deutschland
Zellschaber (28 cm, steril, einzeln verpackt)	Greiner Bio-One GmbH; Kremsmünster; Österreich

Tab. 6: Material (Zellpflege)

2.2.3. Substanzen und Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Acrylamide/Bis Solution 30 %	Bio-Rad Laboratories GmbH; Feldkirchen; Deutschland
2-Propanol	Sigma-Aldrich®, Merck KGaA; Darmstadt; Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich®, Merck KGaA; Darmstadt; Deutschland
AquaDest	Fresenius SE & Co. KGaA; Bad Homburg; Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA)	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe; Deutschland
Bromphenolblau	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe; Deutschland
Casting Frames	Bio-Rad Laboratories GmbH; Feldkirchen; Deutschland
Casting Stands	Bio-Rad Laboratories GmbH; Feldkirchen; Deutschland
CellTiter-Blue® Cell Viability Assay	Promega™ Corporation; Madison; WI; USA
Collagenase Type IV	Thermo Fisher Scientific GmbH; Schwerte; Deutschland
cOmplete™, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor	Roche Diagnostica GmbH; Mannheim; Deutschland
Desoxycholsäure Natriumsalz	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe; Deutschland
Dodecylnatriumsulfat (SDS)	VWR International, LLC.; Radnore; PA; USA
Dulbecco's Modified Eagle Medium	Thermo Fisher Scientific GmbH; Schwerte; Deutschland
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Sigma-Aldrich®, Merck KGaA; Darmstadt; Deutschland
Ethanol (Desinfektion)	Millipore®; Merck KGaA; Darmstadt; Deutschland
Fetales Rinderserum	PAA Laboratories GmbH; Cölbe; Deutschland
Fetales Rinderserum	PAN-Biotech GmbH; Aidenbach; Deutschland
Filterpapier 2,5 mm	Invitrogen - Thermo Fisher Scientific GmbH Schwerte; Deutschland
Glasplatten (0,75 mm)	Bio-Rad Laboratories GmbH; Feldkirchen; Deutschland
Glycerol	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe; Deutschland
Glycin	Sigma-Aldrich®, Merck KGaA; Darmstadt; Deutschland
Immobilon Forte Western HRP	EMD Millipore Corporation; Bunting; MA; USA
Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich®, Merck KGaA; Darmstadt; Deutschland
Methanol	Sigma-Aldrich®, Merck KGaA; Darmstadt; Deutschland
Milchpulver	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe; Deutschland

Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gels	Bio-Rad Laboratories GmbH; München; Deutschland
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich®, Merck KGaA; Darmstadt; Deutschland
Nitrocellulose-Membran (0,2 µm)	VWR International, LLC.; Radnore; PA; USA
Non-Essential Amino Acid Solution (NEAA)	Thermo Fisher Scientific GmbH; Schwerte; Deutschland
Nonidet-P40 substitute	United States Biological; Salem; MA; USA
Penicillin-Streptomycin (10.000 U/ml)	PAN-Biotech GmbH; Aidenbach; Deutschland
PhosSTOP™	Sigma-Aldrich®, Merck KGaA; Darmstadt; Deutschland
Pierce™ BCA Protein Assay Kits	Thermo Fisher Scientific GmbH; Schwerte; Deutschland
Pierce™ ECL Western Blotting Substrate	Thermo Fisher Scientific GmbH; Schwerte; Deutschland
Polyoxyethylen-20-sorbitanmonolaurat (Tween® 20)	Sigma-Aldrich®, Merck KGaA; Darmstadt; Deutschland
PonceauS	Thermo Fisher Scientific GmbH; Schwerte; Deutschland
ROTI®Mark WESTERN PLUS	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe; Deutschland
Sodium deoxycholate	Sigma-Aldrich®, Merck KGaA; Darmstadt; Deutschland
β-Phosphoglycerophosphat	Sigma-Aldrich®, Merck KGaA; Darmstadt; Deutschland
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe; Deutschland
Trizma® Base	Sigma-Aldrich®, Merck KGaA; Darmstadt; Deutschland
Trizma® Hydrochlorid -hydrochlorid	Sigma-Aldrich®, Merck KGaA; Darmstadt; Deutschland
Trypsin-EDTA-Lösung	Sigma-Aldrich®, Merck KGaA; Darmstadt; Deutschland

Tab. 7: Material (Substanzen und Verbrauchsmaterialien)

2.2.4. Software und Sonstige

Material	Hersteller
DuoSet® ELISA Human Osteoprotegerin/TNFRSF11B DY805	R&D Systems, Inc.; Minneapolis; USA
GraphPad Prism version 8.0.2	GraphPad Software, San Diego, California USA
Image Lab 6.1	Bio-Rad Laboratories GmbH; München; Deutschland
Quantikine®ELISA Human IL-8/CXCL8 Immunoassay D8000C	R&D Systems, Inc.; Minneapolis; USA
Quantikine®ELISA Human IL-8/CXCL8 Immunoassay D8000C	R&D Systems, Inc.; Minneapolis; USA
Quantikine®ELISA Human VEGF Immunoassay DVE00	R&D Systems, Inc.; Minneapolis; USA

Quantikine®ELISA Human Angiogenin Immunoassay DAN 00	R&D Systems, Inc.; Minneapolis; USA
Quantikine®ELISA Human Chitinase 3-like 1 Immunoassay DC3L10	R&D Systems, Inc.; Minneapolis; USA
VICTOR™ X Software 4.0	PerkinElmer LAS; Rodgau; Deutschland
Wound_healing_size_tool.ijm	Suarez-Arnedo, A., Torres Figueroa, F., Clavijo, C., Arbeláez, P., Cruz, J. C., & Muñoz-Camargo, C.

Tab. 8: Material (Software und Sonstiges)

2.3. Zellkulturmethoden

2.3.1. Gewinnung humaner Osteoblasten

Die Isolation humaner OB erfolgte aus operativ gewonnenen Hüftköpfen aus Operationsmaterial der Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie des Universitätsklinikum Düsseldorf. Vorbereitend wurden 100 mg Kollagenase Typ IV mit einer Einwaage abgewogen, in 40 ml Wachstumsmedium gelöst und bei einer Porengröße von 0,2 µm steril filtriert. Die vorbereitete Lösung wurde in einem Wasserbad auf 37 °C temperiert. Unter sterilen Arbeitsbedingungen wurde aus den Hüftköpfen mithilfe eines scharfen Löffels die Spongiosa von der Kompakta und dem umliegenden Bindegewebe getrennt. Die groben Knochenfragmente wurden zunächst in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen mit Wachstumsmedium gewaschen. Anschließend wurde das Wachstumsmedium abgenommen, die Knochenfragmente in die vorgewärmte Kollagenase IV-Lösung überführt und für 2,5 h bei 37 °C auf einem Taumel-Rollenmischer inkubiert. Die Kollagenase-Lösung wurde dann in ein frisches Zentrifugenröhrchen überführt und dieses für 5 min bei 300 g zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstands wurde mit Wachstumsmedium resuspendiert und nochmals für 5 min bei 300 g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit Wachstumsmedium aufgenommen und in zwei Zellkulturflaschen T75 überführt. Nach 24 h wurde das Medium erstmals gewechselt. Die isolierten OB wurden nun bei 37 °C in 5 % CO₂ in luftfeuchter Umgebung inkubiert.

2.3.2. Auftauen von Zellen

Wachstumsmedium wurde auf 37 °C vorgewärmt und in einem 10 ml Zentrifugenröhrchen bereitgestellt. Die kryokonservierten Zellen wurden im 37° C warmen Wasserbad aufgetaut, sofort mit dem angewärmten Wachstumsmedium resuspendiert und in das vorgelegte Zentrifugenröhrchen überführt, welches dann bei 300 g für 5 min zentrifugiert wurde. Nach Abnahme des Überstands wurde das Zellpellet entsprechend seiner makroskopischen Größe mit

1-5 ml Wachstumsmedium resuspendiert. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mittels Neubauer-Zählkammer. In Abhängigkeit der Zellart wurde eine Mindestanzahl von Zellen pro cm² in den Kulturgefäßen ausplattiert (Tab. 9).

Zellart	Angestrebte Zellzahl/cm ²
Humane Osteoblasten	5.000
Endothelzellen (EA.hy 926)	3.500

Tab. 9: Angestrebte Zellzahl/cm² zum Zeitpunkt der Kultivierung

2.3.3. Zellkulturpflege

Die Kultivierung der Zellkulturen erfolgte in Kulturgefäßen mit geeigneten Wachstumsmedien bei 37 °C und 5 % CO₂ (Tab. 10). Die Medienwechsel wurden in einem Intervall von 3 bis 4 Tagen durchgeführt. Im Rahmen der Kultivierung erfolgte parallel zu den Medienwechseln eine mikroskopische Begutachtung der Zellkulturen, um mögliche Kontaminationen der Kulturen auszuschließen.

Zellart	Kulturgefäß	Wachstumsmedium
Humane Osteoblasten	Kulturflasche T-175	500 ml DMEM high Glucose + 50 ml FCS + 50.000 U Pen/Strep
Endothelzellen (EA.hy 926)	Kulturschale 100 mm	500 ml DMEM high Glucose + 50 ml FCS + 50.000 U Pen/Strep + 5 ml NEAA

Tab. 10: Kulturgefäße und Kulturmedien der kultivierten Zellen

Fetal calf serum (FCS), Penicillin-Streptomycin (Pen/Strep), *Non-essential amino acid solution* (NEAA)

2.3.4. Enzymatisches Passagieren von Endothelzellen und OB

Vorbereitend wurde eine 1:10 Trypsin-EDTA-Lösung mit *Phosphate-buffered saline* (PBS) verdünnt angesetzt und auf 37 °C erwärmt. Von den kultivierten Zellen wurde zunächst das Medium abgenommen und die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen. Nach Abnahme des PBS wurde entsprechend der Größe des Kulturgefäßes 3 bis 10 ml Trypsin-EDTA-Lösung zu der Kultur hinzugefügt und diese dann bei 37 °C für maximal 5 min inkubiert. Das Ablösen der Zellen wurde mikroskopisch überwacht. Durch Schütteln („*Shaking-off*“) der Kulturflaschen oder den Einsatz eines Zellschabers wurde sichergestellt, dass sich alle Zellen ablösen. Die enzymatische Reaktion des Trypsin wurde durch Zugabe der gleichen Menge Wachstumsmedium gestoppt und die Zellsuspension bei 300 g für 5 min zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstands wurde das Zellpellet entsprechend seiner Größe mit 1 bis 5 ml Wachstumsmedium resuspendiert. Es folgte

die Zellzählung mittels Neubauer-Zellkammer. Die Zellen wurden anschließend in neuen Zellkulturflaschen mit entsprechender Wachstumsfläche und Medium ausplattiert (Tab. 10) oder weiteren Versuchen zugeführt.

2.3.5. Zellzählung mittels Neubauer-Zählkammer

Die Zellzählung mittels Neubauer-Zählkammer ermöglicht die Bestimmung der Zellzahl einer Suspensionslösung. Mithilfe von Trypanblau können vitale Zellen gezählt werden. Dies beruht auf der unmittelbaren Färbung avitaler Zellen durch Trypanblau. Vitale Zellen werden durch den Farbstoff zunächst nicht angefärbt. Es wurden 10 µl der Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau in einem Mikroreaktionsgefäß suspendiert. Diese Suspensionslösung wurde in eine Neubauer-Zählkammer überführt. In dieser wurden mikroskopisch alle vier Quadranten mäanderförmig ausgezählt. Hierbei wurden jeweils die Zellen mitgezählt, die innerhalb eines Quadrats liegen sowie diejenigen, die den unteren oder den rechten Rand der Kammer schneiden. Aus der Anzahl der Zellen wurde nach untenstehender Rechnung die Zellzahl pro ml, die Gesamtzellzahl der Zellsuspensionslösung sowie der Anteil vitaler Zellen errechnet (Abb. 4).

$$\text{Zellzahl/ml Zellsuspensionslösung} = \frac{\text{Zellzahl}}{4} \cdot 2 \text{ Verdünnungsfaktor} \cdot 10^4 \text{ Kammerfaktor}$$

$$\text{Gesamtzellzahl der Zellsuspensionslösung} = \frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} \cdot \text{Suspensionsvolumen}$$

$$\text{Anteil vitaler Zellen in Prozent} = \frac{\text{Anzahl vitaler (ungefärbter) Zellen}}{\text{Anzahl aller Zellen}} \cdot 100\%$$

Abb. 4: Rechenformeln zur Zellzählung mittels Neubauer-Zählkammer

2.3.6. Herstellung einer Verdünnungsreihe

Zuerst wurde die Zellzahl der Suspensionslösung bestimmt. Für die Anlage einer Verdünnungsreihe mit einer definierten Zellzahl/ml wurde zunächst der dimensionslose Verdünnungsfaktor (VF) als Quotient aus Zellzahl/ml in der Suspensionslösung und der gewünschten Zellzahl/ml in der Ziellösung errechnet. Dann wurde das Gesamtvolumen der Ziellösung festgelegt. Der Anteil der Suspensionslösung an der Ziellösung wurde als Quotienten von Volumen der Ziellösung und Verdünnungsfaktor berechnet (Abb. 5).

$$\text{Verdünnungsfaktor } VF = \frac{\text{Vorhandene Zellzahl/ml in der Zellsuspension}}{\text{Gewünschte Zellzahl/ml in der Ziellösung}}$$

$$\text{Anteil der Zellsuspension an der Ziellösung} = \frac{\text{Volumen der Ziellösung}}{VF}$$

$$\text{Anteil von Medium an der Ziellösung} = \text{Volumen der Ziellösung} - \text{Anteil der Zellsuspension}$$

Abb. 5: Rechenformeln zur Anlage einer Verdünnungsreihe

2.3.7. Kryokonservierung

Vorbereitend wurden ein vorgekühlter, 2-Propanol-gefüllter Cryo-Container, passende Cryo-Röhrchen, Einfrier-Medium bei 4 °C (FCS mit 10 % DMSO), Trypsin-EDTA im Verhältnis 1:10 mit PBS bei 37 °C sowie normales Wachstumsmedium bereitgestellt. Analog zum Verfahren des enzymatischen Passagierens und der Zellzählung mittels Neubauer-Zählkammer wurde die Gesamtzellzahl einer Suspensionslösung bestimmt. Die Zellsuspension wurde in der Folge bei 300 g für 5 min zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Zellpellet wurde zunächst mit 1 ml Einfriermedium resuspendiert und dann mit zusätzlichem Einfriermedium auf die gewünschte Zellkonzentration/ml aufgefüllt. Es wurden standardisiert $1 \cdot 10^6$ oder $2 \cdot 10^6$ Zellen pro 1000 µl Einfriermedium aufgenommen, in ein Cryo-Röhrchen überführt und sofort in einem vorgekühlten Cryo-Container bei -80 °C eingefroren. Für eine längere Konservierung wurden die Zellen frühestens nach 24 h, spätestens aber nach 14 Tagen in flüssigen Stickstoff überführt und dort weiter gelagert.

2.3.8. Differenzierungsmedium

Zur Differenzierung der humanen OB wurden diese in einem osteogenen Differenzierungsmedium (DIF) kultiviert. In der Vorbereitung wurde 500 ml *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) high Glucose + 50 ml FCS + 50.000 U Penicillin-Streptomycin (Pen/Strep) angesetzt. Separat wurden 100 mg L-Ascorbin-2-Phosphat in 5 ml Aqua dest. auf einer Schüttelplatte aufgelöst. Aus der resultierenden Lösung wurde auf das Volumen zurückgerechnet, das 50 µM (7,95 mg) L-Ascorbin-2-Phosphat enthält. Zudem wurde 10 g β-Glycerophosphat abgewogen und in 20 ml Aqua dest. aufgelöst und mithilfe eines Rührkolbens vermengt. Das Gesamtvolumen der Lösung nach Lösung des β-Glycerophosphats sowie das Volumen, welches 10 mMol (1,08 g) β-Glycerophosphat enthält wurden bestimmt.

Beide Lösungen wurden bei einer Porengröße von 0,2 µm steril filtriert und als Stocklösung für den Ansatz folgender Differenzierungsmedien bei 4 °C eingelagert. 500 nM (98 µg) Dexamethason wurde aus aliquotierten Einheiten aufgetaut und bereitgestellt. Dabei entsprachen

500 nM Dexamethason 100 μ l der aliquotierten Lösung. Die einzelnen Reagenzien wurden gemäß Abb. 6 zusammengeführt.

DMEM high Glucose (4,5 g/ml Glucose)	500 ml
FCS	50 ml
Pen/Strep	50.000 U (5 ml)
Dexamethason MW 392,46 g/mol	500 nM (98 μ g)
L-Ascorbin-2-Phosphat MW 289,54 g/mol	50 μ M (7,95 mg)
β -Glycerophosphat	10 mMol (1,08 g)

Abb. 6: Zusammensetzung des osteogenen Differenzierungsmediums
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Fetal calf serum (FCS), Penicillin-Streptomycin (Pen/Strep)

2.4. Versuchsansätze

2.4.1. Expression Angiogenese-relevanter Faktoren in Osteoblasten

Gemäß der zugrundeliegenden Fragestellung, ob sich das Expressionsmuster von IL6, IL8, ANG, VEGF, CHI3L1 und HIF-1 α in OB T \leq -2,5 im Vergleich zu nicht-osteoporotischen Kontrollgruppen unterscheidet, war das Ziel dieses Versuchsansatzes, die genannten Faktoren unter Wachstumsbedingungen sowie nach osteogener Differenzierung in OB T \leq -2,5 und OB T \geq -1 zu quantifizieren und zu vergleichen.

Die OB wurden in 6-Wellplatten ausplattiert. Dabei wurden aus einer Spenderzellkultur mindestens zwei 6-Wellplatten bestückt. Es wurde ein Ansatz mit 10⁵ OB pro Well in 3000 μ l Wachstumsmedium gewählt. 24 h nachdem die Zellen ausplattiert wurden erfolgte der erste Mediumwechsel. Von den angesetzten Zellen in 6-Wellplatten wurde jeweils die Hälfte mit Wachstumsmedium und die andere Hälfte mit osteogenem Differenzierungsmedium weiter kultiviert. Nach dem ersten Mediumwechsel startete definitionsgemäß Tag 0. Von den OB in Wachstumsmedium wurde ohne weiteren Mediumwechsel nach 96 h der Überstand abgenommen und aliquotiert sowie die Proteine geerntet. Für die OB in Differenzierungsmedium erfolgte der Mediumwechsel an Tag 0, 3, 6, 9, 13 und 17. An Tag 21, 96 h nach dem letzten Mediumwechsel, wurde der Überstand abgenommen und die Proteine geerntet. Das Medium einer 6-Wellplatte mit identischen Zellen einer Spenderkultur wurde abgenommen, zu einem Pool zusammengeführt, auf 10 x 1000 μ l aliquotiert und in der Folge bei -80 °C eingefroren. Der in den Wells verbliebene Rest des Mediums wurde abgesaugt und pro Well 1 ml Trypsin-EDTA (1:10) hinzugefügt. Nach 3 min wurden die Wells mithilfe eines Zellschabers ausgeschabt und die enzymatische Reaktion durch Zugabe von 2 ml Wachstumsmedium gestoppt. Die Zellsuspensionslösungen identischer Wells wurden zu einem Pool zusammengeführt, mit 3 ml PBS ausgespült und dieses ebenfalls

dem Pool zugeführt. Die entstandene Zellsuspensionslösung wurde bei 400 g für 5 min abzentrifugiert. Nach Abnahme des Überstands wurde das Zellpellet mit 1 ml PBS resuspendiert, in ein 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß überführt und abermals für 1 min bei $13 \cdot 10^3 \text{ rpm}$ (*rounds per minute*) in einem *Eppendorf Mini-Spin* zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das verbleibende Zellpellet mit *Radioimmunoprecipitation-Assay-Puffer* (RIPA-Puffer) bedeckt. Das zugeführte Volumen des Puffers betrug, je nach makroskopischer Größe des Zellpellets zwischen 70 und 120 μl . Die Proteine wurden sofort bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren. Die gewonnenen Proben aus Protein und Überstand dienten in der Folge der Bestimmung der Expression bzw. Sekretion von HIF-1 α mittels Western-Blot, sowie IL6, IL8, ANG, VEGF und CHI3L1 mittels ELISA. Dabei wurde der Nachweis Angiogenese-relevanter Zytokine im Überstand der OB-Kulturen auf die Gesamtproteinmenge zugrunde liegenden Probe normiert.

2.4.2. Einfluss von OB $T \leq -2,5$ auf Endothelzellen

Mit diesem Versuchsansatz wurde der Effekt von OB $T \leq -2,5$ im Vergleich zu OB $T \geq -1$ auf die Migrationskapazität und die Zellzahl von Endothelzellen (EA.hy 926) untersucht. Hierzu wurde zur Herstellung konditionierter Medien Kulturen von OB $T \leq -2,5$ sowie OB $T \geq -1$ mit $2 \cdot 10^6$ Zellen in T-175 Kulturflaschen ausplattiert. Nach 24 h erfolgte der erste Mediumwechsel. Dieser Zeitpunkt war definitionsgemäß Tag 0. An Tag 4 wurde das gesamte Medium der Kulturen abgenommen, aliquotiert, bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren und neues Wachstumsmedium hinzugegeben. Dieses wurde an Tag 8 abgenommen, aliquotiert und eingefroren.

Der Einfluss dieser konditionierten Medien auf Endothelzellen wurde in Migrationsassays und CTB-Assays untersucht. In den CTB-Assays wurde die *Cell Viability* bestimmt um auf die Zellzahl zurückzuschließen. Pro Ansatz wurden je sechs 24-Wellplatten mit 10^4 Zellen EA.hy 926 pro Well bestückt. Nach 24 h wurde die Ausgangszellzahl im CTB-Assay bestimmt und den Zellen der verbliebenen fünf 24-Wellplatten das konditionierte Medium der OB-Kulturen in Dreifachbestimmung sowie Kontrollen mit EA.hy-Wachstumsmedium mit je 400 μl pro Well hinzugefügt. Es folgte die tägliche Bestimmung der Zellzahl sowie ein Mediumwechsel mit identischem konditioniertem Medium an Tag 3 für die Zellen der verbliebenen drei 24-Wellplatten.

2.4.3. Einfluss differentiell exprimierter Faktoren in OB $T \leq -2,5$ auf Endothelzellen

Um zu untersuchen, welchen Einfluss differentiell exprimierte Faktoren in OB $T \leq -2,5$ auf das Migrationsverhalten humaner Endothelzellen haben, wurde die Migrationskapazität von Endothelzellen (EA.hy 926) unter den in Tab. 11 aufgeführten Zytokinen und deren spezifischen Inhibitoren untersucht.

Substanz	Konzentrationen	
Angiogenin	0,25 µg/ml	0,75 µg/ml
	0,5 µg/ml	1 µg/ml
Anti-Angiogenin	0,125 µg/ml	0,5 µg/ml
	0,25 µg/ml	1 µg/ml
Interleukin 6	25 Units	75 Units
	50 Units	100 Units
Anti-Interleukin 6	0,05 µg/ml	0,15 µg/ml
	0,1 µg/ml	0,2 µg/ml
Interleukin 8	25 Units	75 Units
	50 Units	100 Units
Reparixin	10^{-9} M	10^{-7} M
	10^{-8} M	10^{-6} M

Tab. 11: Konzentration der verwendeten Zytokine und Inhibitoren zur Evaluation der Migration von EA.hy 926

2.4.4. Einfluss differentiell exprimierter Faktoren in OB $T \leq -2,5$ auf die OPG-Expression in Osteoblasten

Aus den Ergebnissen der Versuchsreihe zur differentiellen Expression Angiogenese-relevanter Faktoren in OB $T \leq -2,5$ resultierte die Frage, welchen Einfluss differentiell exprimierte Faktoren in OB $T \leq -2,5$ auf die OPG-Expression humaner OB ausüben.

Humane OB $T \leq -2,5$, OB $T \geq -1$, sowie OB ohne vorliegende DXA-Messung wurden mit 20.000/Well auf einer 24-Wellplatte ausplattiert. Nach 24 h (Tag 1) erfolgte der erste Mediumwechsel mit Wachstumsmedium je 400 µl/Well. An Tag 4 wurden IL6, IL8 und ANG sowie deren spezifischen Inhibitoren Anti-IL6, Reparixin und Anti-ANG in aufsteigenden Konzentrationen sowie Kontrollen mit Wachstumsmedium mit je 400 µl/Well in Doppelbestimmung hinzugegeben. Die Kulturen wurden anschließend weitere vier Tage inkubiert. Die jeweilige Konzentration der Zytokine und Inhibitoren ist Tab.12 zu entnehmen. An Tag 8 wurde der Überstand identischer Wells zu einem Pool zusammengeführt und in zwei Einheiten je 350 µl aliquotiert und bei -80° C eingefroren. In der Folge wurde der restliche

Überstand abgenommen und die Zellen mit 500 µl PBS pro Well gewaschen. Daraufhin wurde umgehend die Zellzahl bestimmt, um ausschließen zu können, ob etwaig erhöhte OPG-Expressionslevel durch eine erhöhte Zellzahl bedingt wären. Die Auswertung der basierte auf der prozentualen Veränderung in den behandelten Kulturen. Die jeweilige Kontrollgruppe diente für jede Spender*innenkultur als Referenzwert.

Substanz	Konzentrationen		
Angiogenin	0,25 µg/ml	0,75 µg/ml	
	0,5 µg/ml	1 µg/ml	
Anti-Angiogenin	0,125 µg/ml	0,5 µg/ml	2 µg/ml
	0,25 µg/ml	1 µg/ml	
Interleukin 6	25 Units	75 Units	
	50 Units	100 Units	
Anti-Interleukin 6	0,05 µg/ml	0,15 µg/ml	0,3 µg/ml
	0,1 µg/ml	0,2 µg/ml	0,4 µg/ml
Interleukin 8	25 Units	75 Units	
	50 Units	100 Units	
Reparixin	10 ⁻⁷ M	10 ⁻⁵ M	
	10 ⁻⁶ M	10 ⁻⁴ M	

Tab. 12: Konzentration der verwendeten Zytokine und Inhibitoren zur Evaluation der OPG-Expression

2.5. Analyseverfahren

2.5.1. Proteinisolierung, Konzentrationsbestimmung und Bestimmung der Gesamtproteinmenge

Für die Proteinbestimmung wurde ein *Bicinchoninic Acid* (BCA)-Protein Assay Kit der Firma Pierce verwendet. Grundlage des Verfahrens ist die Reduktion von Kupferionen Cu²⁺ zu Cu¹⁺ durch Proteine in alkalischem Medium. Die freien Kupferionen bilden mit BCA einen wasserlöslichen, im alkalischen Milieu stabilen Farbkomplex. Die Absorption bei 562 nm korreliert linear mit steigender Proteinkonzentration.

Vorbereitend wurden die aufgetauten Proteinproben mittels eines Ultraschallgerät (UP50H Sonotrode MS1 von Welabo) mit 10 Impulsen sonifiziert. Die Proben wurden für die folgenden Arbeitsschritte durchgehend auf Eis gekühlt. Das BCA-Protein-Assay-Kit umfasst mehrere Standardproben A bis I (Tab.13). Diese wurden in Doppelbestimmung mit je 10 µl in die Reihen A und B einer 96-Wellplatte überführt. Für das weitere Vorgehen wurde ein *BCA-Working reagent* (WR) angesetzt. Hierzu wurde das Volumen des WR ermittelt. Das ermittelte Volumen

setzt sich aus 50 Teilen Reagent A und einem Teil Reagent B zusammen. Es wurde mindestens 10 % mehr WR hergestellt als für den Versuch rechnerisch notwendig war.

$$(\text{Anzahl Proben} + \text{Anzahl Standards}) \cdot \text{Anzahl Repikate} \cdot 200 \mu\text{l} \cdot 1,1 = \text{Volumen WR}$$

Von den sonifizierten Proben wurden je 4 μl in 20 μl PBS (Verdünnung 1:6) verdünnt und dann je 10 μl in Doppelbestimmung auf eine 96-Wellplatte pipettiert. Anschließend wurden den Standards und den Proben je 200 μl WR zugesetzt, die Platte für 30 Sekunden auf einer Schüttelplatte platziert, mit einer Folie abgedeckt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die Absorption der Proben bei $\lambda = 562 \text{ nm}$ mithilfe eines *Multilabel Microplate Reader VICTOR™ X2* bestimmt und mithilfe des Standards die Proteinkonzentration ermittelt.

Probe	Konzentration ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	BSA-Standard (μl)	PBS (μl)
A	2	300	0
B	1,5	375	125
C	1,0	325	325
D	0,75	175 von B	175
E	0,5	325 von C	325
F	0,25	325 von E	325
G	0,125	325 von F	325
H	0,025	100 von G	400
I	0	0	400

Tab. 13: Standardproben des BCA-Protein Assay Kit
Bovines Serumalbumin (BSA), *Phosphate-buffered saline* (PBS)

2.5.2. Western-Blot zur Analyse der HIF-1 α -Expression

Die Proteinkonzentration wurde nach dem oben beschriebenen Verfahren bestimmt und für jede Probe ein Mikroreaktionsgefäß mit einer Proteinmenge von 10 μg auf 10 μl vorbereitet. Vor Durchführung der Blots wurden die in Tab. 14 aufgeführten Lösungen vorbereitet, die Western-Marker aufgetaut und ein Heizblock auf 95 °C vorgeheizt. Vorgefertigte *Stain-free Gele* (4 - 15 %) der Firma BIO-RAD wurden in die entsprechenden Rahmen eingesetzt, das Behältnis mit Laufpuffer (Tab. 14) gefüllt und die Kämme entfernt. Die zu bestimmenden Proben wurden mit 4 μl Lämmli-Puffer (Tab. 14) versetzt, für 2 min abzentrifugiert, für 5 min bei 95 °C erhitzt und in der Folge sofort auf Eis gestellt. Von diesen Proben wurden je 13 μl in die vorbereiteten Gelkammern pipettiert. Der *PowerPac HC Power Supply* wurde zunächst auf 100 V eingestellt, bis die Proteinproben das Sammelgel passiert hatten. In der Folge wurde der Lauf mit 130 V fortgeführt und bis auf 180 V erhöht. Während des Laufs wurden Schnitte einer Nitrocellulose-

Membran vorbereitet. Nach Beendigung des Laufs, kurz bevor der Marker das Gel passierte, wurden die Gel-Rahmen aufgebrochen und die Gele zur Normalisierung der späteren Proben im ChemiDoc aktiviert. Die Proteine wurden aus dem Gel mithilfe von Blotting-Papier und einem BIO-RAD Turbo Blot auf die Nitrocellulose-Membran übertragen. Nach dem erfolgreichen Transfer wurde die Nitrozellulose-Membran mit 10 ml Blocking-Lösung (Tab. 14) in ein 50 ml Röhrchen überführt und auf einem Taumel-Rollenmischer für 60 min inkubiert. Nach Abnahme der Blocking-Lösung wurden die Membranen mit je 3 µl des Erstantikörpers *HIF-1α (D2U3T) Rabbit mAB* gelöst in 3000 µl (1:1000) Blocking Lösung über Nacht bei 4 °C auf einem Taumel-Rollenmischer inkubiert.

Am Folgetag wurde die Antikörperlösung abgenommen, die Membranen in drei Durchgängen mit jeweils 10 ml *Tris-buffered saline with Tween®20* (TBS-T) für 5 min auf einem Taumel-Rollenmischer im Dunklen gewaschen und in der Folge mit 4 µl des Zweitantikörpers Goat-Anti-Rabbit mAB gelöst in 4000 µl (1:1000) TBS.T für 60 min auf einem Taumel-Rollenmischer im Dunklen inkubiert. Nach Abgießen des Zweitantikörpers folgte dreimalig das Waschen mit jeweils 10 ml TBS.T für 5 min auf einem Taumel-Rollenmischer im Dunklen. Die Membranen wurden in eine Schale überführt und vollständig mit *Tris-buffered saline* (TBS) bedeckt für 30 min auf einer Schüttelplatte gelagert.

Die Dokumentation erfolgte nach Zugabe des Entwicklers in ChemiDoc MP. Die Membranen wurden für weitere Aufnahmen bei 4 °C in TBS gelagert. Die Auswertung wurde mit der Software *Image-Lab* von BIO-RAD durchgeführt.

Lösung	Zusammensetzung	
Blocking-Lösung	2,5 g BSA	50 ml TBS-T
Blotting-Puffer	60 ml Transferpuffer 25 x 75 ml Methanol	Ad 750 ml H ₂ O
Laufpuffer	25 mM Tris, pH = 8,3 - 8,8 192 mM Glycin	0,1 % SDS Ad 1000 ml H ₂ O
Lämmli Puffer	Tris-Glycine SDS Sample Buffer (5:1)	Betamercaptoethanol
TBS	7,7 mM Tris (pH = 7,5) 150 mM NaCl	Ad 1000 ml H ₂ O
TBS-T	7,7 mM Tris (pH 7,5) 150 mM NaCl	1 ml Tween 20 Ad 1000 ml H ₂ O
Transferpuffer 25 x	18,2 g Tris-Base 90 g Glycin	ad 500 ml H ₂ O

Tab. 14: Zusammensetzung der im Western-Blot verwendeten Lösungen

Bovines Serumalbumin (BSA), *Tris-buffered saline* (TBS), *Tris-buffered saline with Tween®20* (TBS-T), Dodecylnatriumsulfat (SDS), Natriumchlorid (NaCl)

2.5.3. Migrationsassay

Zur Bestimmung der Migrationskapazität humaner Endothelzellen (EA.hy 926) wurde ein Wundheilungs-Assay durchgeführt. Dafür wurden Silikoneinsätze der Firma Ibidi genutzt. Diese Einsätze bestehen aus zwei Kammern, die durch eine 500 µm breite Trennwand separiert sind. Bestückt man diese Kammern mit vitalen Zellen, so bilden sich, nachdem die Zellen adhärent geworden waren, zwei voneinander getrennte, konfluente Zellrasen aus. Nach Herausnahme der Silikoneinsätze erfolgte die fotomikroskopische Dokumentation der Migration der Zellen in den zellfreien Raum. Eine schematische Darstellung des Migrationsassays findet sich in Abb. 7.

Zur Untersuchung der Migrationskapazität von Endothelzellen wurden die Ibidi-Silikoneinsätze in 12-Wellplatten eingesetzt. In die beiden Kammern der Einsätze wurden je 75 µl einer Zelllösung mit jeweils 20.000 Zellen EA.hy 926 gegeben und für 24 h inkubiert. Nach Herausnahme der Silikoneinsätze wurden die Wells mit 3000 µl der jeweiligen Medien gefüllt. Die mikroskopische Fotodokumentation der Zellmigration erfolgte an denselben definierten Positionen zu Stunde 0, 4, 8 und 10. Mithilfe des Bildbearbeitungsprogramms *ImageJ* und dem *Wound_healing_size_tool.ijm* (142), das eine automatische Flächenbestimmung des zellfreien Arealis ermöglicht, wurden die Bilder der Fotodokumentation ausgewertet. Zielgröße der Auswertung war der prozentuale Anteil des zellfreien Spalts, der im Vergleich zur Ausgangsmessung (Stunde 0) von Zellen bedeckt wurde. Die Versuche wurden jeweils in Doppelbestimmung durchgeführt.

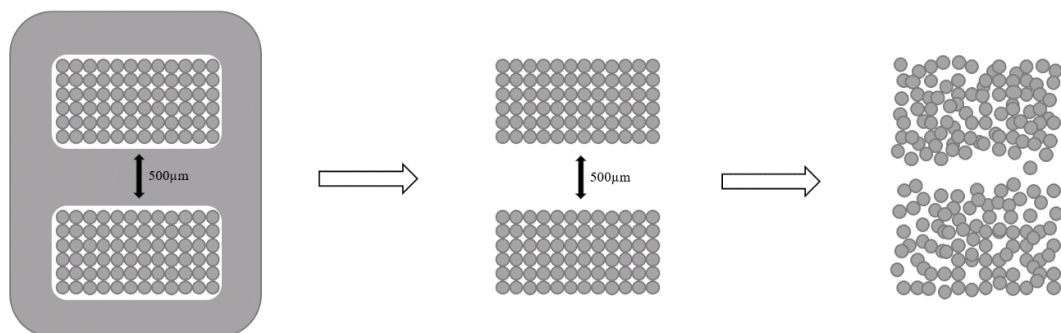


Abb. 7: Prinzip des Wundheilungs-Assays

Von links: 1. Konfluente Zellrasen in den Kammern des Ibidi-Einsatzes. 2. Zellfreier Spalt nach Herausnahme des Ibidi-Einsatzes. 3. Migration der Endothelzellen in den zellfreien Spalt im Zeitverlauf.

2.5.4. ELISA zur Quantifizierung von Osteoprotegerin

Die Quantifizierung der OPG-Expression humaner OB unter dem Einfluss von IL6, Anti-IL6, IL8 und Reparixin sowie ANG und Anti-ANG, erfolgte durch einen DuoSet® ELISA für humanes Osteoprotegerin von Biotechne R&D Systems (DY805).

Vorbereitend wurde der *Capture Antibody*, der *Detection Antibody*, der Standard und *Normal goat serum* (NGS) gemäß der Herstelleranleitung rekonstituiert, aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Für die ELISA wurde je Ansatz 100 µl *Capture Antibody* in einer *Working Concentration* von 2 µg/ml in PBS gelöst und über Nacht inkubiert. Waschpuffer wurde mit 500 ml PBS und 250 µl Tween 20 angesetzt und mittels eines Rührkolbens vermengt. *Reagent Diluent* wurde mit 150 ml PBS und 1,5 g Bovines Serumalbumin (BSA) angesetzt und die Reagenzien mittels Rührkolben vermischt. Nach der Inkubationszeit mit dem *Capture Antibody* folgte das dreimalige Waschen mit je 300 µl/Well Waschpuffer. Den Wells wurde 300 µl *Reagent Diluent* hinzugegeben und für mindestens 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Inkubationszeit wurden die Proben aufgetaut, mittels eines Vortexers vermengt, um dem Faktor 100 mit *Reagent Diluent* verdünnt und mit je 200 µl auf einer separaten 96-Wellplatte pro Well vorgelegt. Für den Standard wurde eine Verdünnungsreihe mit einer Bandbreite von 4000 pg/ml bis 0 pg/ml aufbereitet. Nach weiteren drei Waschgängen der ELISA Platte wurde diese mit den Proben und dem Standard mit je 100 µl pro Well bestückt und für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. In Folge der Inkubation wurden die Wells in drei Waschgängen gewaschen und der *Detection Antibody* in einer *Working Concentration* von 200 ng/ml in *Reagent Diluent* gelöst und 2 % NGS mit 100 µl pro Well hinzugefügt und für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten drei weitere Waschgänge, die Zugabe von 100 µl *Streptavidin-Horseradish Peroxidase* (Streptavidin-HRP A) pro Well in einer Konzentration von 1:200 gelöst in *Reagent Diluent* und die Inkubation für 20 min bei Raumtemperatur. Die *Substrate Solution* wurde durch Vermengung gleicher Anteile Color Reagent A und B vorbereitet und nach drei Waschgängen den Wells mit 100 µl/Well hinzugefügt. Nach 20 min Inkubationszeit im Dunkeln wurde die *Stop Solution* mit 50 µl/Well hinzugegeben und die optische Dichte bei $\lambda = 450$ nm mithilfe des *Multilabel Microplate Reader VICTOR™ X2* bestimmt.

2.5.5. CellTiter-Blue Assay

Zur Analyse der Zellzahl von EA.hy 926 und humanen OB unter dem Einfluss osteoporotischer OB sowie weiterer Angiogenese-relevanter Faktoren, wurde auf einen *CellTiter-Blue* (CTB) Assay der Firma Promega zurückgegriffen. Dieser kann zur Bestimmung der *Cell Viability* als Maß der Zellzahl verwendet werden. Zugrunde liegt die Reduktion des blauen Resazurin zu dem

violetten Farbstoff Resorufin durch vitale Zellen. Zur Durchführung des CTB-Assays wurde Wachstumsmedium mit CTB im Verhältnis 1:20 angesetzt und in 24-Well-Platten mit 500 µl pro Well auf die zu analysierenden Zellen gegeben. Zusätzlich wurde ein Blank mitgeführt. Die Inkubationszeit der Ansätze betrug 60 min bei 37 °C. Das mit CTB versetzte Medium wurde in Doppelbestimmung mit je 100 µl auf eine 96-Wellplatte überführt. Die Auswertung erfolgte durch Messung der optischen Dichte bei $\lambda = 590$ nm mithilfe eines *Multilabel Microplate Reader VICTOR™ X2*

2.5.6. ELISA zur Quantifizierung von IL6, IL8, ANG, VEGF und CHI3L1

Die Expression Angiogenese-relevanter Faktoren im Überstand der OB-Kulturen wurde durch Quantikine® Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) der Firma Biotechne R&D Systems quantifiziert. Die verwendeten ELISA basierten auf einem einheitlichen Prinzip, unterschieden sich jedoch in den eingesetzten Volumina der Reagenzien und Proben, in der Rekonstitution der Standardproben, den Inkubationszeiten sowie der Verdünnung der Proben. Die konkreten Unterschiede der durchgeführten ELISA sind Tab. 15 zu entnehmen. Grundsätzlich wurden die ELISAs nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

ELISA	IL6	IL8	VEGF	Angiogenin	CHI3L1
Nummer	D6050	D8000C	DVE00	DAN00	DC3L10
Maximale Verdünnung	1:4	1:3	1:1	1:3	1:1000
Standard	Calibrator	Calibrator	Calibrator	Calibrator	AquaDest
Rekonstitution	Diluent RD5T	Diluent RD5P	Diluent RD5K	Diluent RD5C	
Assay Diluent	100 µl RD1W	100 µl RD1-85	50 µl RD1W	50 µl RD1W	100 µl RD1-34
Standard/ Sample	100 µl	50 µl	200 µl	200 µl	50 µl
Inkubationszeit Standard/ Sample	2 h	2 h	2 h	1 h	2 h
Zytokin Conjugat	200 µl	100 µl	200 µl	200 µl	200 µl
Inkubationszeit Zytokin Conjugat	2 h	1 h	2 h	1 h	2 h
Inkubationszeit Substrate Solution	20 min	30 min	20 min	20 min	30 min

Tab. 15: Datenübersicht der verwendeten ELISA

Zunächst wurde der Waschpuffer und der *Calibrator Diluent* vorbereitet. In der Folge wurde die Standardprobe rekonstituiert und eine Standard-Verdünnungsreihe angesetzt. Die Proben des Überstands wurden aufgetaut, gevortext und auf Eis gelagert. Im Falle einer Verdünnung wurden

die Proben auf einer separaten 96-Wellplatte mit Calibrator Diluent verdünnt. Auf die 96-Wellplatte des ELISA wurde der *Assay Diluent* in die einzelnen Wells gegeben und die vorbereiteten Proben nach definierter Anordnung hinzugefügt. Es folgte eine Inkubation von 1 - 2 h bei Raumtemperatur. Nach der Inkubationszeit wurden die Proben abgenommen und die einzelnen Wells mit je 300 μ l Waschpuffer in drei bis vier Wiederholungen gewaschen. In der Folge wurde der restliche Überstand abgenommen und die jeweiligen Antikörper hinzugefügt. Es folgte eine Inkubation über 60 - 120 Minuten bei Raumtemperatur. Danach weitere Waschzyklen mit je 300 μ l/Well Waschpuffer, die Zugabe der *Substrate Solution* mit 200 μ l/Well und einer weiteren Inkubation von 20 - 30 min in Dunkelheit bei Raumtemperatur. Nach der Inkubation wurden 50 μ l *Stop Solution* hinzugegeben. Die Auswertung der optischen Dichte bei $\lambda = 450$ nm erfolgte mithilfe eines *Multilabel Microplate Reader VICTOR™ X2*.

2.6. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte unter der Verwendung von *GraphPad Prism version 8.0.2* für Windows in der Version vom 30. Januar 2019.² Die verwendeten Daten wurden auf das Vorliegen einer Normalverteilung geprüft. Der Student's *t*-Test, One-way ANOVA und Two-way ANOVA wurden zur Auswertung genutzt. Alle Ergebnisse mit einem p-Wert $\leq 0,05$ wurden als signifikant interpretiert und in den graphischen Darstellungen mit einem Stern gekennzeichnet. Die Darstellungen der Ergebnisse umfassen die Mittelwerte und Standardabweichungen der vorliegenden Daten.

² GraphPad Software, San Diego, California USA, www.graphpad.com

3. Ergebnisse

3.1. Expression Angiogenese-relevanter Faktoren in Osteoblasten

Um zu prüfen, ob Osteoblasten (OB) von Patient*innen mit Osteoporose ein differentielles Expressionsmuster von IL6, IL8, ANG, VEGF, CHI3L1 und HIF-1 α aufweisen, wurden diese Faktoren im Überstand von OB-Kulturen quantifiziert. Hierbei wurden native humane OB mit Wachstumsmedium (DMEM) sowie humane OB mit osteogenem Differenzierungsmedium (DIF) untersucht. Die Einteilung der zu vergleichenden Gruppen erfolgte anhand der DXA-Messung in OB osteoporotischer Patient*innen (OB $T \leq -2,5$) und OB nicht-osteoporotischer Patient*innen (OB $T \geq -1$) als Kontrollgruppe.

3.1.1. VEGF-Expression in Osteoblasten

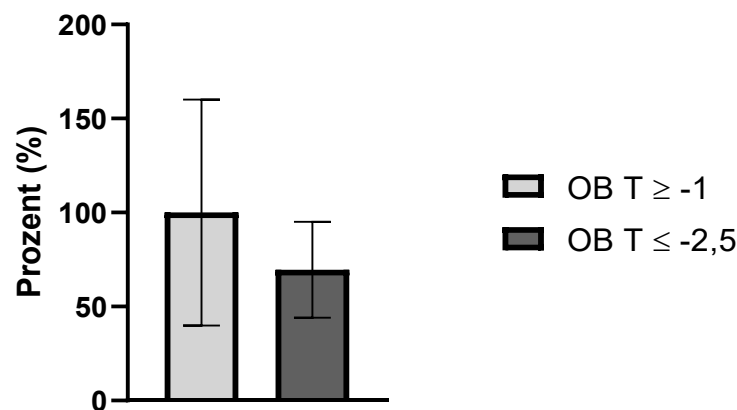


Abb. 8: VEGF-Expression in nativen Osteoblasten

Native Osteoblasten nicht-osteoporotischer Patient*innen (OB $T \geq -1$, $n = 8$) und osteoporotischer Patient*innen (OB $T \leq -2,5$, $n = 7$). Mittelwert + SD, t -Test, $p = 0,2364$. Eine Proteinexpression von 100 % ist auf den Mittelwert der VEGF-Expression in OB $T \geq -1$ normiert. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der VEGF-Expression zwischen OB $T \geq -1$ und OB $T \leq -2,5$.

Im Vergleich von OB $T \geq -1$ und OB $T \leq -2,5$ zeigten OB $T \leq -2,5$ eine tendenziell reduzierte, jedoch statistisch nicht signifikant veränderte Expression von VEGF (Abb. 8).

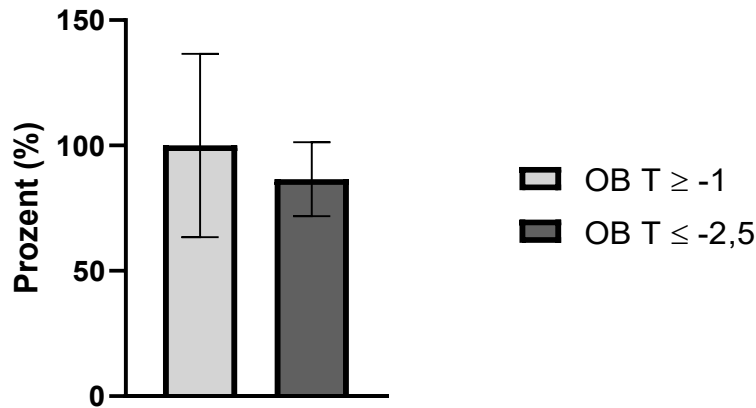


Abb. 9: VEGF-Expression in Osteoblasten nach osteogener Differenzierung

Osteogen differenzierte Osteoblasten nicht-osteoporotischer Patient*innen (OB T ≥ -1, n = 8) und osteoporotischer Patient*innen (OB T ≤ -2,5, n = 6). Mittelwert + SD, *t*-Test, p = 0,4130. Eine Proteinexpression von 100 % ist auf den Mittelwert der VEGF-Expression in OB T ≥ -1 normiert. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der VEGF-Expression zwischen OB T ≥ -1 und OB T ≤ -2,5.

Wurden die OB osteogen differenziert, konnte kein signifikanter Unterschied in der VEGF-Expression zwischen OB T ≤ -2,5 und OB T ≥ -1 demonstriert werden (Abb. 9).

3.1.2. CHI3L1-Expression in Osteoblasten

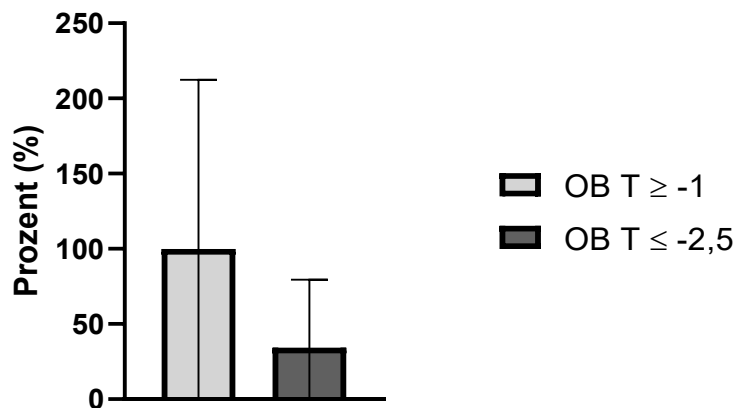


Abb. 10: CHI3L1-Expression in nativen Osteoblasten

Native Osteoblasten nicht-osteoporotischer Patient*innen (OB T ≥ -1, n = 8) und osteoporotischer Patient*innen (OB T ≤ -2,5, n = 8). Mittelwert + SD, *t*-Test, p = 0,1476. Eine Proteinexpression von 100 % ist auf den Mittelwert der CHI3L1-Expression in OB T ≥ -1 normiert. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der CHI3L1-Expression zwischen OB T ≥ -1 und OB T ≤ -2,5.

Im Vergleich von OB T ≥ -1 und OB T ≤ -2,5 zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der CHI3L1-Expression unter Inkubation mit DMEM (Abb. 10).

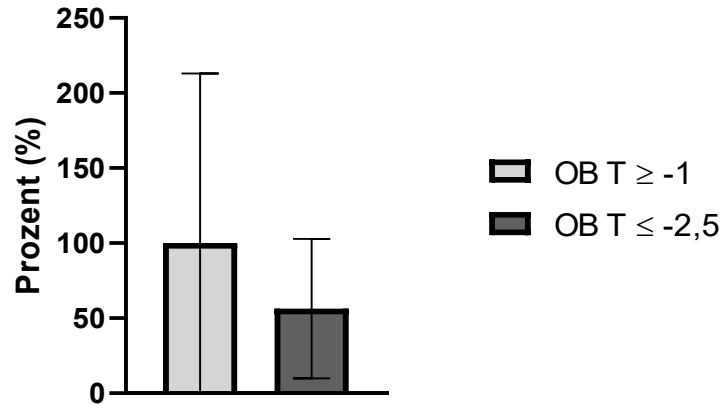


Abb. 11: CHI3L1-Expression in Osteoblasten nach osteogener Differenzierung

Osteogen differenzierte Osteoblasten nicht-osteoporotischer Patient*innen (OB T ≥ -1, n = 7) und osteoporotischer Patient*innen (OB T ≤ -2,5, n = 7). Mittelwert + SD, *t*-Test, p = 0,3630. Eine Proteinexpression von 100 % ist auf den Mittelwert der CHI3L1-Expression in OB T ≥ -1 normiert. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der CHI3L1-Expression zwischen OB T ≥ -1 und OB T ≤ -2,5.

Wurden die OB osteogen differenziert, konnte kein signifikanter Unterschied in der CHI3L1-Expression zwischen OB T ≤ -2,5 und OB T ≥ -1 demonstriert werden (Abb. 11).

3.1.3. HIF-1 α -Expression in Osteoblasten

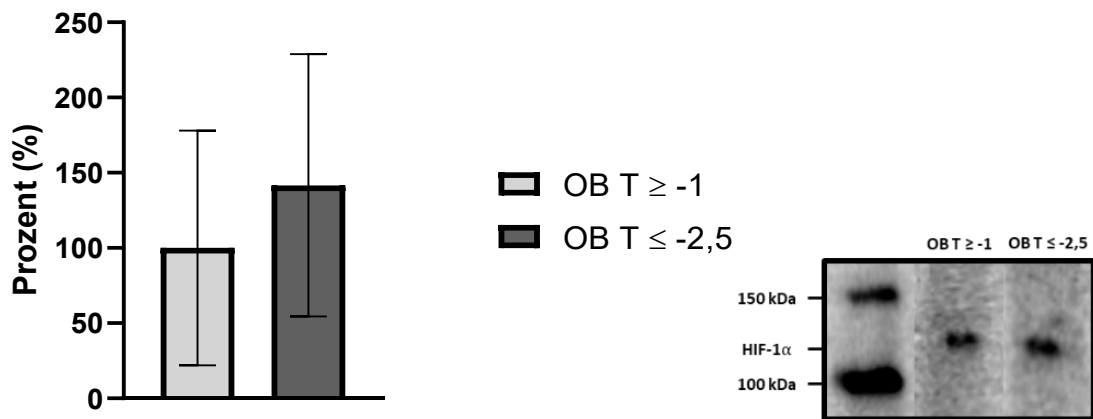


Abb. 12: HIF-1 α -Expression in nativen Osteoblasten

Native Osteoblasten nicht-osteoporotischer Patient*innen (OB T ≥ -1, n = 6) und osteoporotischer Patient*innen (OB T ≤ -2,5, n = 6). Mittelwert + SD, *t*-Test, p = 0,4035. Eine Proteinexpression von 100 % ist auf den Mittelwert der HIF-1 α -Expression in OB T ≥ -1 normiert. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der HIF-1 α -Expression OB T ≥ -1 und OB T ≤ -2,5.

Im Vergleich von OB T ≥ -1 und OB T ≤ -2,5 zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der HIF-1 α -Expression unter Inkubation mit DMEM (Abb. 12).

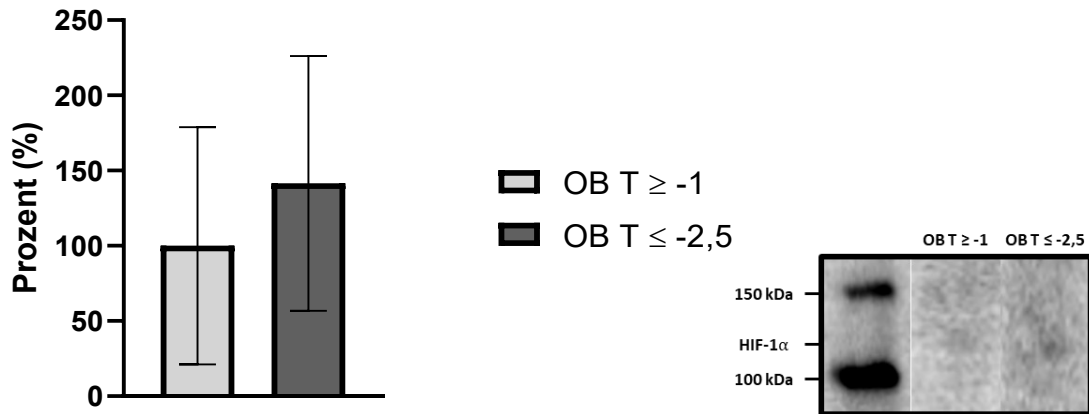


Abb. 13: HIF-1 α -Expression in Osteoblasten nach osteogener Differenzierung

Osteogen differenzierte Osteoblasten nicht-osteoporotischer Patient*innen (OB T \geq -1, n = 6) und osteoporotischer Patient*innen (OB T \leq -2,5, n = 6). Mittelwert + SD, *t*-Test, $p = 0,3999$. Eine Proteinexpression von 100 % ist auf den Mittelwert der HIF-1 α -Expression in OB T \geq -1 normiert. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der HIF-1 α -Expression zwischen OB T \geq -1 und OB T \leq -2,5.

Wurden die OB osteogen differenziert, zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der HIF-1 α -Expression zwischen OB T \leq -2,5 und OB T \geq -1 (Abb. 13).

3.1.4. IL6-Expression in Osteoblasten

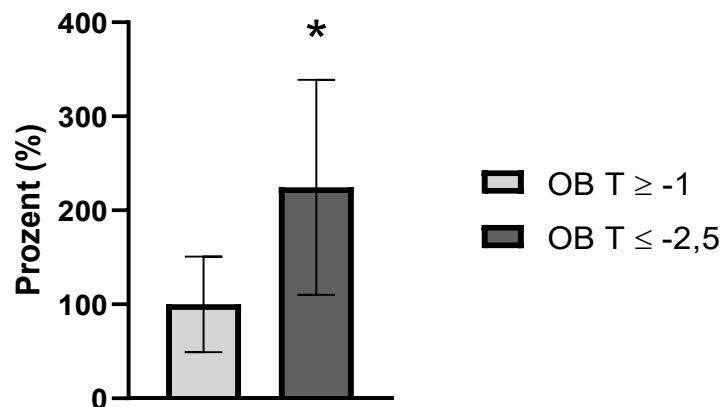


Abb. 14: IL6-Expression in nativen Osteoblasten

Native Osteoblasten nicht-osteoporotischer Patient*innen (OB T \geq -1, n = 7) und Osteoblasten osteoporotischer Patient*innen (OB T \leq -2,5, n = 6). Mittelwert + SD, *t*-Test, $p = 0,0244$. Eine Proteinexpression von 100 % ist auf den Mittelwert der IL6-Expression in OB T \geq -1 normiert. Es zeigte sich eine signifikant höhere IL6-Expression in OB T \leq -2,5.

IL6 wurde durch OB T \leq -2,5 signifikant vermehrt exprimiert. OB T \leq -2,5 zeigte eine im Mittelwert um 124,38 % ($p = 0,0244$) gesteigerte Expression von IL6 gegenüber OB T \geq -1 (Abb. 14).

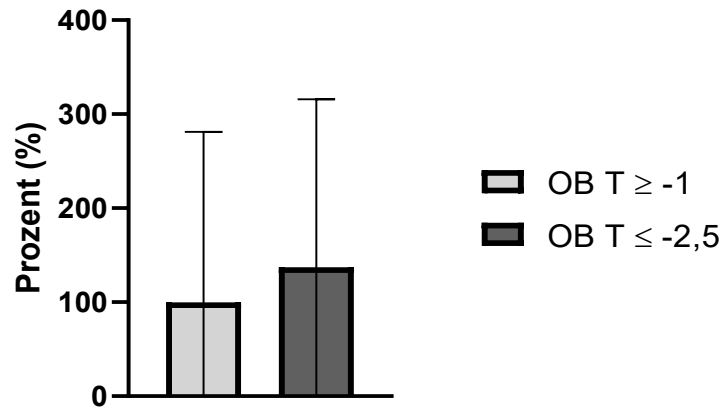


Abb. 15: IL6-Expression in Osteoblasten nach osteogener Differenzierung

Osteogen differenzierte Osteoblasten nicht-osteoporotischer Patient*innen (OB T ≥ -1, n = 6) und osteoporotischer Patient*innen (OB T ≤ -2,5, n = 8). Mittelwert + SD, *t*-Test, p = 0,7099. Eine Proteinexpression von 100 % ist auf den Mittelwert der IL6-Expression in OB T ≥ -1 normiert. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der IL6-Expression zwischen OB T ≥ -1 und OB T ≤ -2,5.

Wurden die OB osteogen differenziert, konnte hingegen kein signifikanter Unterschied in der IL6-Expression zwischen OB T ≤ -2,5 und OB T ≥ -1 demonstriert werden (Abb. 15).

3.1.5. IL8-Expression in Osteoblasten

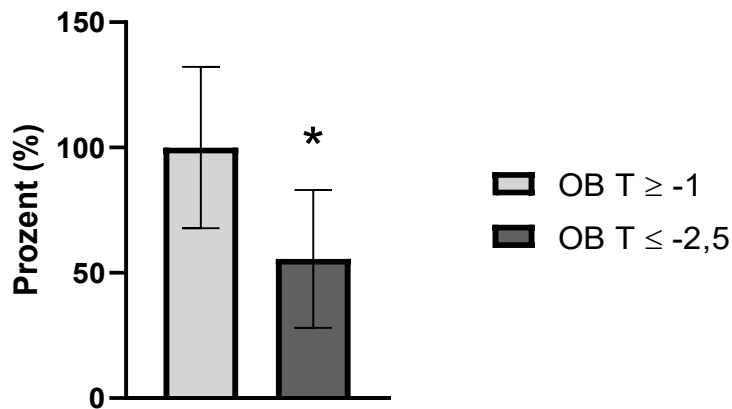


Abb. 16: IL8-Expression in nativen Osteoblasten

Native Osteoblasten nicht-osteoporotischer Patient*innen (OB T ≥ -1, n = 7) und osteoporotischer Patient*innen (OB T ≤ -2,5, n = 8). Mittelwert + SD, *t*-Test, p = 0,0129. Eine Proteinexpression von 100 % ist auf den Mittelwert der IL8-Expression in OB T ≥ -1 normiert. Es zeigte sich eine signifikant verminderte IL8-Expression in OB T ≤ -2,5.

IL8 wurde durch OB T ≤ -2,5 signifikant vermindert exprimiert. OB T ≤ -2,5 zeigte eine im Mittelwert um 44,39 % (p = 0,0129) reduzierte Expression von IL8 gegenüber OB T ≥ -1 (Abb. 16).

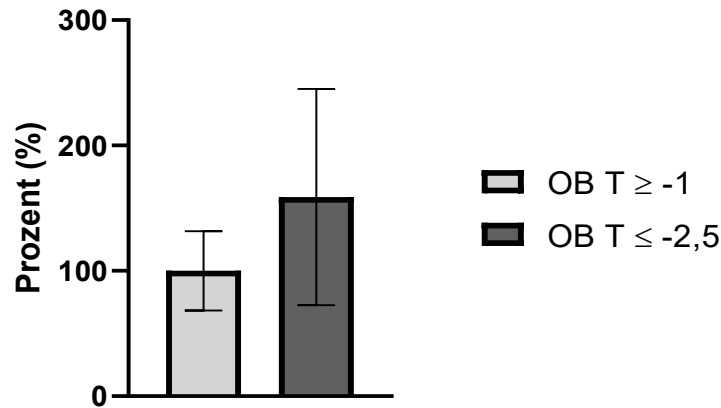


Abb. 17: IL8-Expression in Osteoblasten nach osteogener Differenzierung

Osteogen differenzierte Osteoblasten nicht-osteoporotischer Patient*innen (OB T ≥ -1, n = 8) und osteoporotischer Patient*innen (OB T ≤ -2,5, n = 7). Mittelwert + SD, *t*-Test, $p = 0,0939$. Eine Proteinexpression von 100 % ist auf den Mittelwert der IL8-Expression in OB T ≥ -1 normiert. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der IL8-Expression zwischen OB T ≥ -1 und OB T ≤ -2,5.

Wurden die Tage osteogen differenziert, konnte kein signifikanter Unterschied in der IL8-Expression zwischen den T ≤ -2,5 und OB T ≥ -1 demonstriert werden (Abb. 17).

3.1.6. ANG-Expression in Osteoblasten

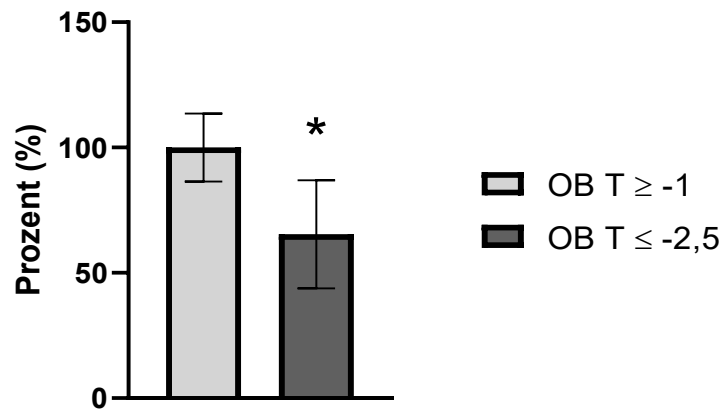


Abb. 18: ANG-Expression in nativen Osteoblasten

Native Osteoblasten nicht-osteoporotischer Patient*innen (OB T ≥ -1, n = 8) und osteoporotischer Patient*innen (OB T ≤ -2,5, n = 7). Mittelwert + SD, *t*-Test, $p = 0,0023$. Eine Proteinexpression von 100 % ist auf den Mittelwert der ANG-Expression in OB T ≥ -1 normiert. Es zeigte sich eine signifikant verminderte ANG-Expression in OB T ≤ -2,5.

ANG wurde durch OB T ≤ -2,5 signifikant vermindert exprimiert. OB T ≤ -2,5 zeigte eine im Mittelwert um 34,63 % ($p = 0,0023$) reduzierte Expression von ANG gegenüber OB T ≥ -1 (Abb. 18).

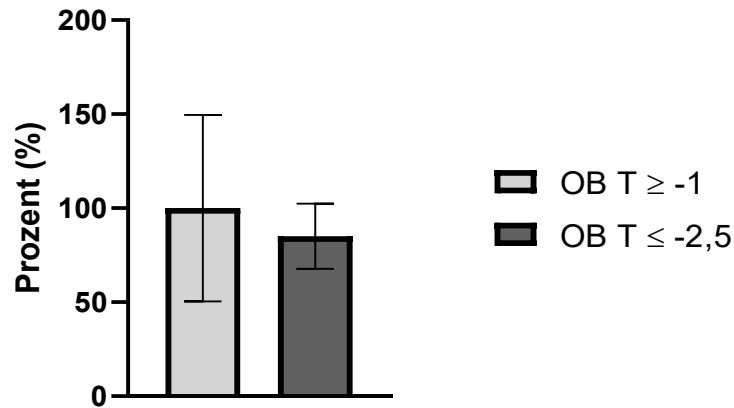


Abb. 19: ANG-Expression in Osteoblasten nach osteogener Differenzierung

Osteogen differenzierte Osteoblasten nicht-osteoporotischer Patient*innen (OB T ≥ -1 , n = 8) und osteoporotischer Patient*innen (OB T $\leq -2,5$, n = 6). Mittelwert + SD, *t*-Test, $p = 0,4975$. Eine Proteinexpression von 100 % ist auf den Mittelwert der ANG-Expression in OB T ≥ -1 normiert. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der ANG-Expression zwischen OB T ≥ -1 und OB T $\leq -2,5$.

Wurden die OB osteogen differenziert, konnte kein signifikanter Unterschied in der ANG-Expression zwischen OB T $\leq -2,5$ und OB T ≥ -1 demonstriert werden (Abb. 19).

3.2. Einfluss von OB T $\leq -2,5$ auf Endothelzellen

Um den Einfluss von Osteoblasten osteoporotischer Patient*innen (OB T $\leq -2,5$) auf die Proliferation und das Migrationsverhalten von Endothelzellen (EA.hy 926) zu analysieren, wurden Endothelzellen mit dem Überstand aus OB-Kulturen inkubiert. Konditioniertes Medium (KM) wurde aus OB-Kulturen osteoporotischer Patient*innen (KM T $\leq -2,5$) und nicht-osteoporotischer Patient*innen (KM T ≥ -1) generiert. Die Abnahme des KM aus den OB-Kulturen OB T $\leq -2,5$ und OB T ≥ -1 erfolgte nach vier Tagen (4 d) und nach acht Tagen (8 d) Inkubation.

3.2.1. Einfluss von OB T $\leq -2,5$ auf die Proliferation von Endothelzellen

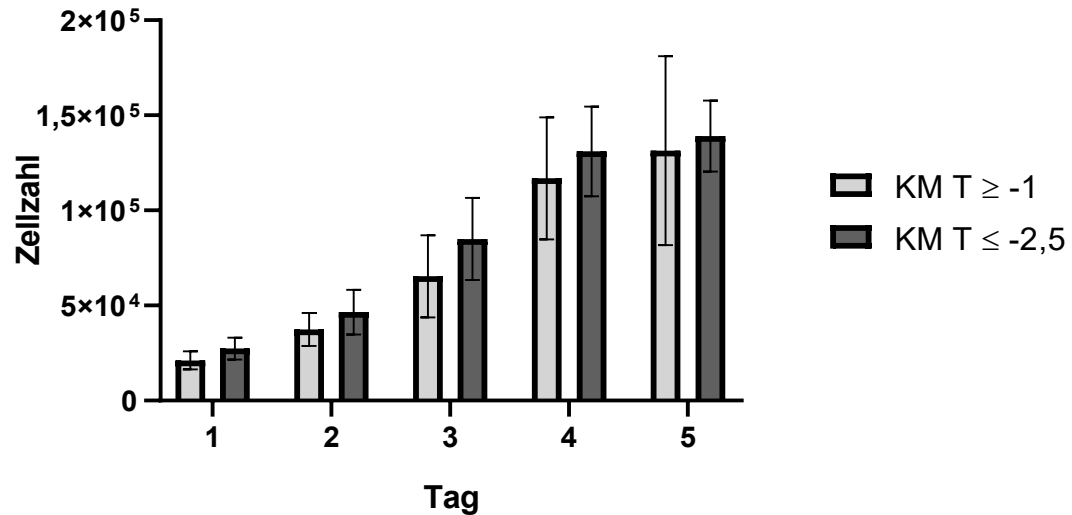


Abb. 20: Einfluss von Osteoblasten auf die Zellzahl von Endothelzellen (EA.hy 926)

KM nach 4 d Inkubation von Osteoblasten nicht-osteoporotischer Patient*innen (KM T ≥ -1 , n = 3, je 3 technische Replikate) und osteoporotischer Patient*innen (KM T $\leq -2,5$, n = 3, je 3 technische Replikate). Mittelwert + SD, Two-way ANOVA. Dargestellte Signifikanzen beziehen sich auf die Differenz zwischen KM T ≥ -1 und KM T $\leq -2,5$ an den jeweiligen Tagen. Es zeigte sich ein tendenziell proliferationsfördernder Einfluss von Osteoblasten osteoporotischer Patient*innen auf Endothelzellen.

Unter Inkubation mit KM, das den OB-Kulturen nach 4 d entnommen wurde, konnte durch OB T $\leq -2,5$ ein tendenziell proliferationsfördernder Effekt auf Endothelzellen beobachtet werden (Abb. 20).

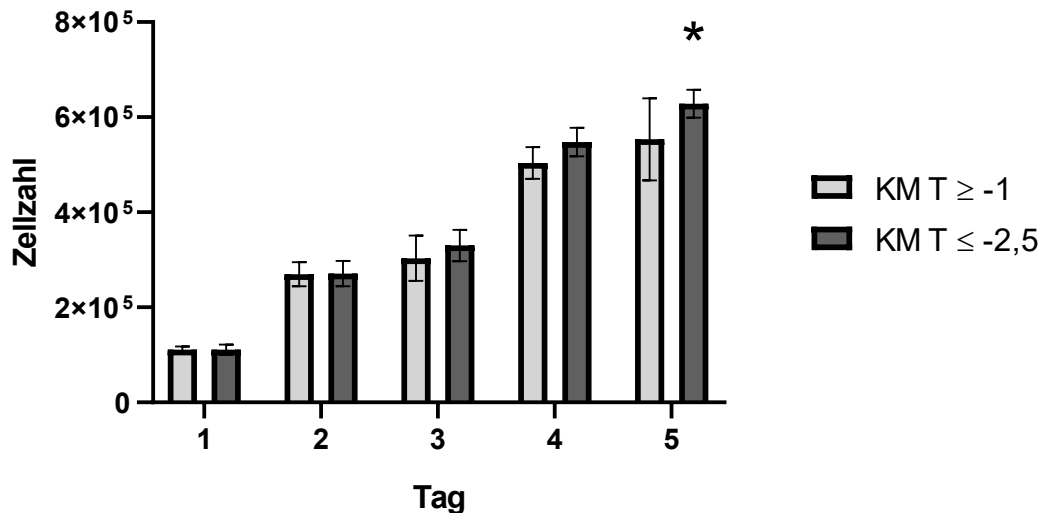


Abb. 21: Einfluss von Osteoblasten auf die Zellzahl von Endothelzellen (EA.hy 926)

KM nach 8 d Inkubation von Osteoblasten nicht-osteoporotischer Patient*innen (KM T ≥ -1, n = 3, je 3 technische Replikate) und osteoporotischer Patient*innen nach (KM T ≤ -2,5, n = 3, je 3 technische Replikate). Mittelwert + SD, Two-way ANOVA. Dargestellte Signifikanzen beziehen sich auf die Differenz zwischen KM T ≥ -1 und KM T ≤ -2,5 an den jeweiligen Tagen. Tag 5: p = 0,0006. Zu Tag 5 zeigte sich eine signifikant vermehrte Zellzahl der Endothelzellen unter dem Einfluss von Osteoblasten osteoporotischer Patient*innen.

Unter Inkubation mit KM, das den OB-Kulturen nach 8 d entnommen wurde, zeigte sich eine signifikante Steigerung der Endothelzellzahl durch OB T ≤ -2,5. An Tag 5 war die Endothelzellzahl unter dem Einfluss von KM T ≤ -2,5 hierbei um 13,49 % (p = 0,0006) erhöht (Abb. 21).

Bei der Herstellung der KM ist zu beachten, dass die OB das vorhandene Nährstoffangebot der hergestellten Medien reduzieren könnten. Es war zu prüfen, ob die signifikante Steigerung der Zellzahl von Endothelzellen unter dem Einfluss von KM T ≤ -2,5 Folge eines erhöhten Nährstoffangebots sein könnte, da OB T ≤ -2,5 vermeintlich langsamer wachsen und so weniger Nährstoffe verbrauchen. Hierzu wurden die Versuchsansätze zu Abb. 20 und 21 wiederholt, wobei den KM T ≥ -1 und KM T ≤ -2,5 jeweils 2,5 % FCS zugegeben wurde (KM T ≥ -1 + FCS und KM T ≤ -2,5 + FCS). Dies sollte eine mögliche Verzerrung der gezeigten Ergebnisse durch den Nährstoffverbrauch der OB bei der Herstellung der konditionierten Medien ausschließen.

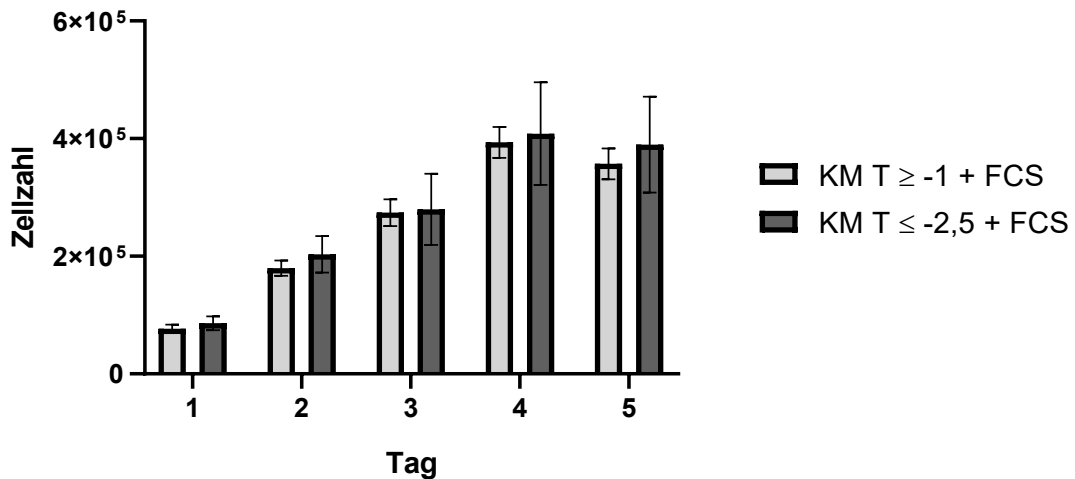


Abb. 22: Einfluss von Osteoblasten auf die Zellzahl von Endothelzellen (EA.hy 926)

KM nach 4 d Inkubation und Zugabe von 2,5 % FCS von Osteoblasten nicht-osteoporotischer Patient*innen (KM T \geq -1 + FCS, n = 3, je 3 technische Replikate) und osteoporotischer Patient*innen (KM T \leq -2,5 + FCS, n = 3, je 3 technische Replikate). Mittelwert + SD, Two-way ANOVA. Dargestellte Signifikanzen beziehen sich auf die Differenz zwischen KM T \geq -1 + FCS zu KM T \leq -2,5 + FCS an den jeweiligen Tagen. Es zeigte sich ein tendenziell proliferationsfördernder Einfluss von Osteoblasten osteoporotischer Patient*innen auf Endothelzellen.

Unter Inkubation mit KM + FCS, das den OB-Kulturen nach 4 d entnommen wurde, zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Einflusses auf die Endothelzellzahl (Abb. 22).

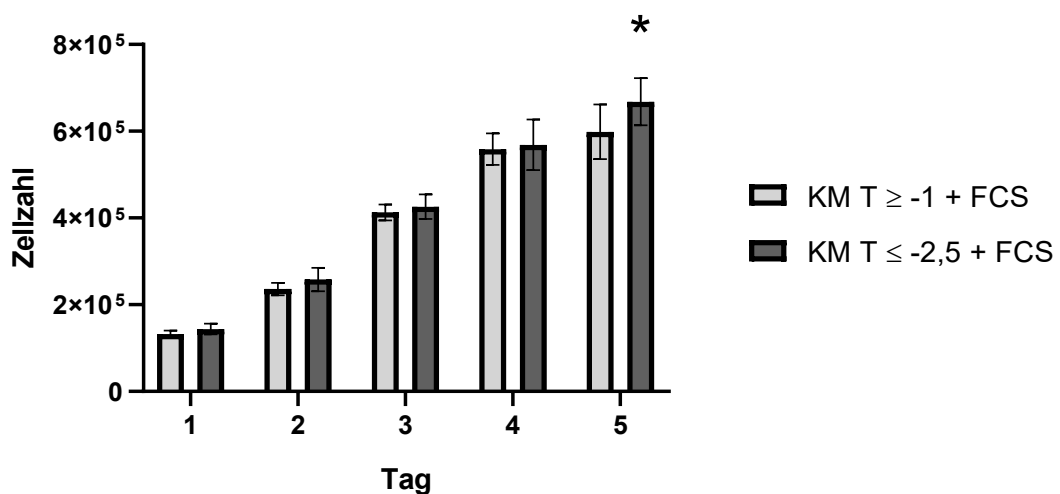


Abb. 23: Einfluss von Osteoblasten auf die Zellzahl von Endothelzellen (EA.hy 926)

KM nach 8 d Inkubation und Zugabe von 2,5 % FCS von Osteoblasten nicht-osteoporotischer Patient*innen (KM T \geq -1 + FCS, n = 3, je 3 technische Replikate) und osteoporotischer Patient*innen (KM T \leq -2,5 + FCS, n = 3, je 3 technische Replikate). Mittelwert + SD, Two-way ANOVA. Dargestellte Signifikanzen beziehen sich auf die Differenz zwischen KM T \geq -1 + FCS zu KM T \leq -2,5 + FCS an den jeweiligen Tagen. Tag 5: p = 0,0009. Zu Tag 5 zeigte sich eine signifikant vermehrte Zellzahl der Endothelzellen unter dem Einfluss von Osteoblasten osteoporotischer Patient*innen.

Unter Inkubation mit KM + FCS, das den OB-Kulturen nach 8 d entnommen wurde, zeigte sich eine signifikante Steigerung der Endothelzellzahl durch OB T \leq -2,5. An Tag 5 war die Zellzahl der Endothelzellen unter dem Einfluss von KM T \leq -2,5 + FCS hierbei um 11,58 % (p = 0,0009) erhöht (Abb. 23).

In allen Versuchsansätzen zeigte sich ein tendenziell proliferationsfördernder Einfluss der OB von Patient*innen mit Osteoporose auf die Zellzahl von Endothelzellen. Eine signifikante Steigerung der Zellzahl der Endothelzellen konnte nach 5 Tagen unter dem Einfluss von OB $T \leq -2,5$ nachgewiesen werden. Dieser Effekt zeigte sich auch weiterhin nach Zugabe von 2,5 % FCS und wurde somit nicht durch einen vermeintlichen Nährstoffmangel verursacht.

3.2.2. Einfluss von OB $T \leq -2,5$ auf die Migration von Endothelzellen

Um den Einfluss von OB $T \leq -2,5$ auf das Migrationsverhalten von Endothelzellen (EA.hy 926) zu überprüfen, wurden Endothelzellen mit KM aus OB-Kulturen nicht-osteoporotischer Patient*innen ($KM T \geq -1$) und osteoporotischer Patient*innen ($KM T \leq -2,5$) in Migrationsassays untersucht.

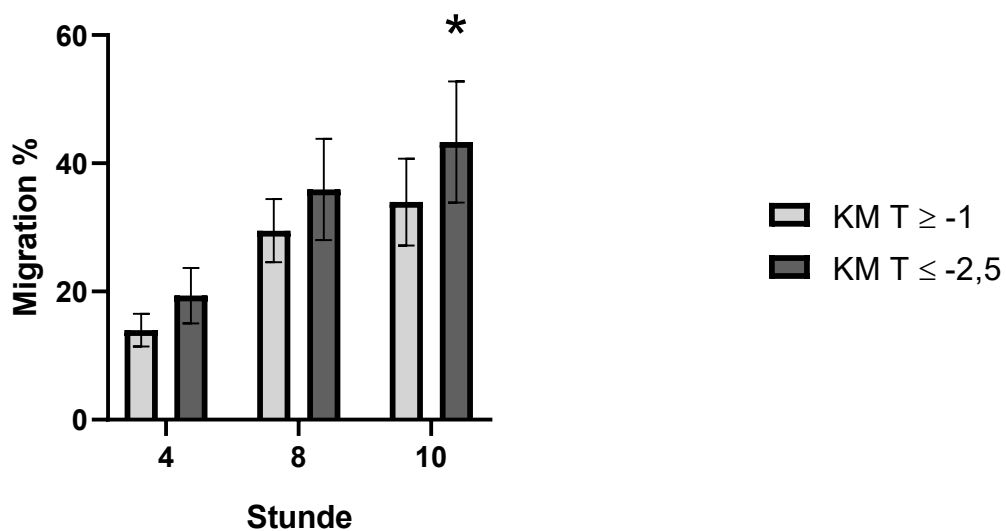


Abb. 24: Einfluss von Osteoblasten auf die Migration von Endothelzellen (EA.hy 926)

KM nach 4 d Inkubation von Osteoblasten nicht-osteoporotischer Patient*innen ($KM T \geq -1$, $n = 3$, je 2 technische Replikate mit 2 Messpunkten) und osteoporotischer Patient*innen ($KM T \leq -2,5$, $n = 3$, je 2 technische Replikate mit 2 Messpunkten). Zielgröße der Auswertung war der prozentuale Anteil des zellfreien Spalts, der im Vergleich zur Ausgangsmessung (Stunde 0) von Zellen bedeckt wurde. Mittelwert + SD, Two-way ANOVA. Dargestellte Signifikanzen beziehen sich auf die Differenz zwischen $KM T \geq -1$ und $KM T \leq -2,5$ zu den betrachteten Zeitpunkten. 10 h: $p = 0,0024$. Es zeigte sich ein signifikant migrationsfördernder Effekt von Osteoblasten osteoporotischer Patient*innen auf Endothelzellen.

Unter Inkubation mit KM, das den OB-Kulturen nach 4 d entnommen wurde, zeigten OB $T \leq -2,5$ einen migrationsfördernden Effekt auf Endothelzellen. Nach 10 h war die Migration unter dem Einfluss von $KM T \leq -2,5$ signifikant gesteigert ($p = 0,0024$) (Abb. 24, 25).

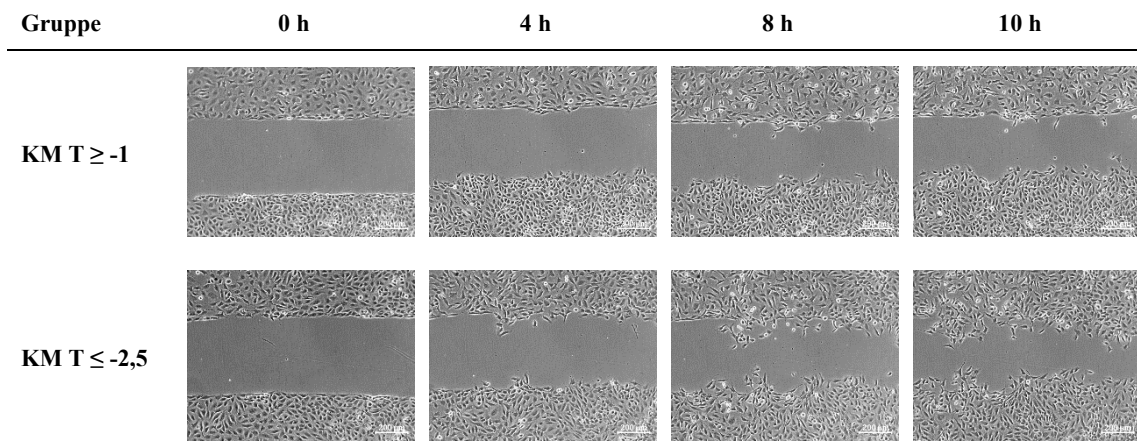


Abb. 25: Exemplarische fotomikroskopische Darstellung des Einflusses von Osteoblasten auf die Migration von Endothelzellen (EA.hy 926)
 KM nach 4 d Inkubation von Osteoblasten nicht-osteoporotischer Patient*innen (KM T ≥ -1) und osteoporotischer Patient*innen (KM T $\leq -2,5$). Der dargestellte Maßstab beträgt 200 μm . Es zeigte sich ein tendenziell migrationsfördernder Effekt von Osteoblasten osteoporotischer Patient*innen auf Endothelzellen.

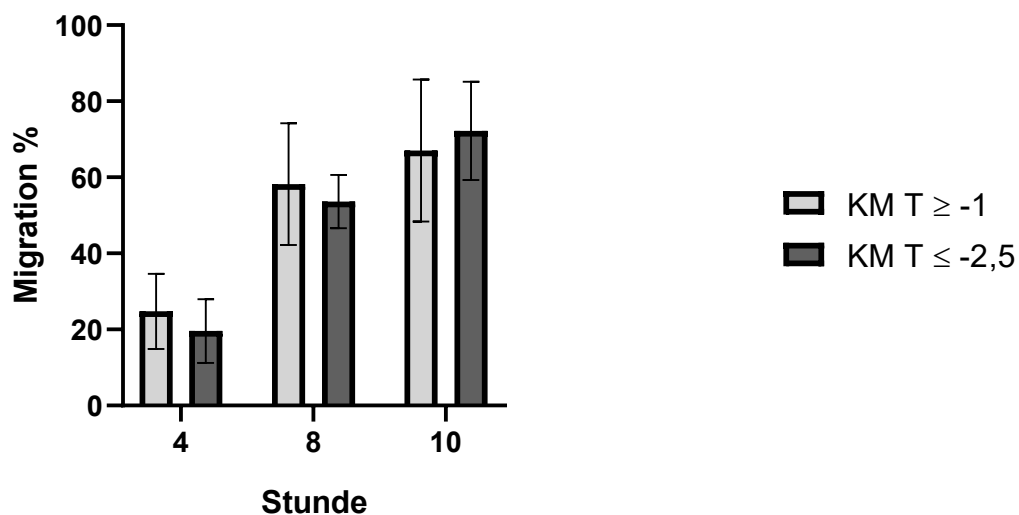


Abb. 26: Einfluss von Osteoblasten auf die Migration von Endothelzellen (EA.hy 926)
 KM nach 8 d Inkubation von Osteoblasten nicht-osteoporotischer Patient*innen (KM T ≥ -1 , n = 3, je 2 technische Replikate mit 2 Messpunkten) osteoporotischer Patient*innen (KM T $\leq -2,5$, n = 3, je 2 technische Replikate mit 2 Messpunkten). Zielgröße der Auswertung war der prozentuale Anteil des zellfreien Spalts, der im Vergleich zur Ausgangsmessung (Stunde 0) von Zellen bedeckt wurde. Mittelwert + SD, Two-way ANOVA. Dargestellte Signifikanzen beziehen sich auf die Differenz zwischen KM T ≥ -1 und KM T $\leq -2,5$ zu den betrachteten Zeitpunkten. Es zeigte sich kein signifikanter Einfluss von Osteoblasten osteoporotischer Patient*innen auf die Migration der Endothelzellen.

KM, das den OB-Kulturen nach 8 d entnommen wurde, hatte keinen signifikanter Einfluss auf die Migration von Endothelzellen (Abb. 26, 27).

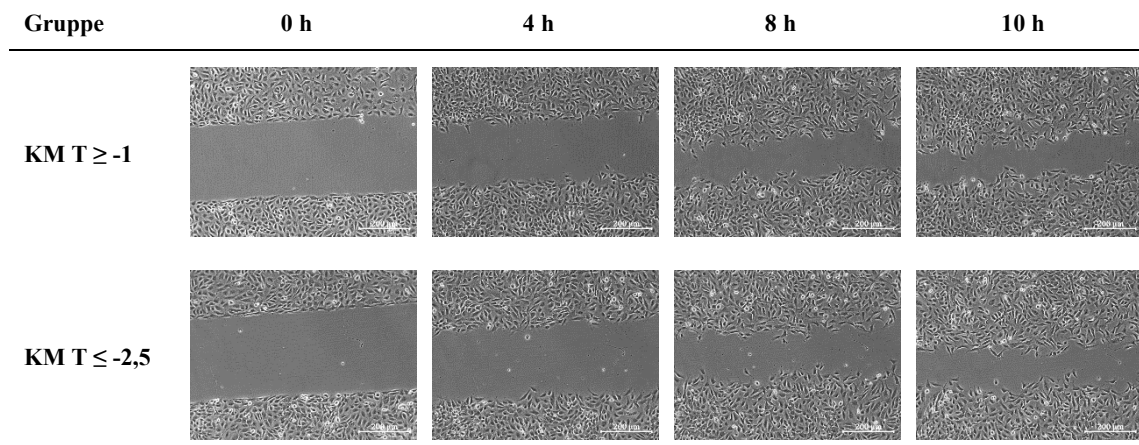


Abb. 27: Exemplarische fotomikroskopische Darstellung des Einflusses von Osteoblasten auf die Migration von Endothelzellen (EA.hy 926)

KM nach 8 d Inkubation von Osteoblasten nicht-osteoporotischer Patient*innen (KM T \geq -1) osteoporotischer Patient*innen (KM T \leq -2,5). Der dargestellte Maßstab beträgt 200 μ m. Es zeigte sich kein signifikanter Einfluss von Osteoblasten osteoporotischer Patient*innen auf die Migration der Endothelzellen.

3.3. Einfluss differentiell exprimierter Faktoren in OB T \leq -2,5 auf die Migration von Endothelzellen

In der Versuchsreihe 3.1 wurde die Expression Angiogenese-relevanter Faktoren in OB osteoporotischer Patient*innen (OB T \leq -2,5) und OB nicht-osteoporotischer Patient*innen (OB T \geq -1) untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass IL6 in nativen OB T \leq -2,5 signifikant stärker exprimiert wurde. Die Expression von IL8 und ANG durch native OB T \leq -2,5 war hingegen signifikant vermindert. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass konditioniertes Medium von OB T \leq -2,5 einen proliferations- und migrationsfördernden Effekt auf humane Endothelzellen ausübte. Um den Einfluss von OB T \leq -2,5 auf Endothelzellen detaillierter zu explorieren, wurde in der folgenden Versuchsreihe untersucht, welchen Einfluss die einzelnen differentiell exprimierten Faktoren IL6, IL8 und ANG sowie deren spezifischen Inhibitoren Anti-IL6, Reparixin und Anti-IL8 auf die Migration von Endothelzellen nehmen. Die jeweiligen Migrationsassays vergleichen die Migration der Endothelzellen unter Zugabe von IL6, IL8, ANG, Anti-IL6, Reparixin und Anti-ANG nach 4, 8 und 10 h.

3.3.1. Einfluss von IL6 auf die Migration von Endothelzellen

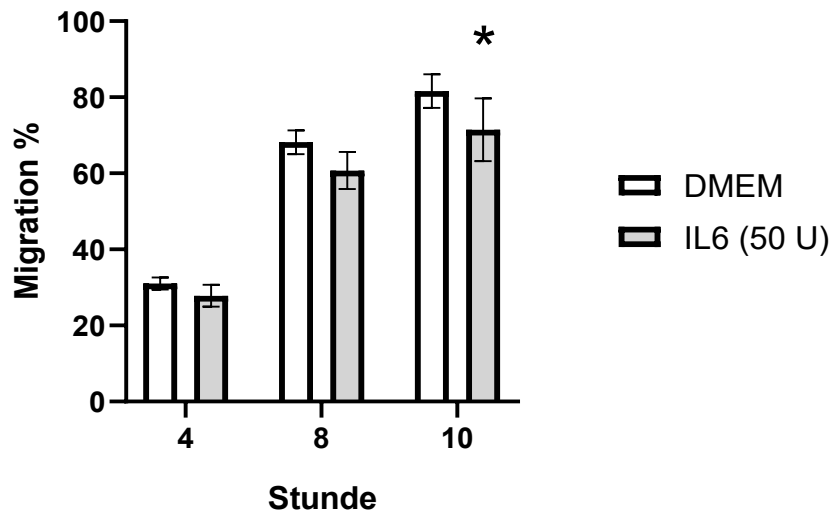


Abb. 28: Einfluss von IL6 auf die Migration von Endothelzellen (EA.hy 926)

Endothelzellen wurden mit IL6 inkubiert und in Migrationsassays analysiert (IL6 (50 U), n = 4 technische Replikate mit je 2 Messpunkten). Kontrollgruppe mit Wachstumsmedium (DMEM, n = 4 technische Replikate mit je 2 Messpunkten). Zielgröße der Auswertung war der prozentuale Anteil des zellfreien Spalts, der im Vergleich zur Ausgangsmessung (Stunde 0) von Zellen bedeckt wurde. Mittelwerte + SD, Two-way ANOVA. Die dargestellten Signifikanzen beziehen sich auf die Differenz zwischen DMEM und IL6 zu den betrachteten Zeitpunkten. 10 h: p = 0,0192. Es zeigte sich ein signifikant inhibierender Effekt von IL6 auf die Migration der Endothelzellen.

IL6 (50 U) inhibierte nach 10 h (p = 0,0192) das Migrationspotential humaner Endothelzellen signifikant (Abb. 28, 29).

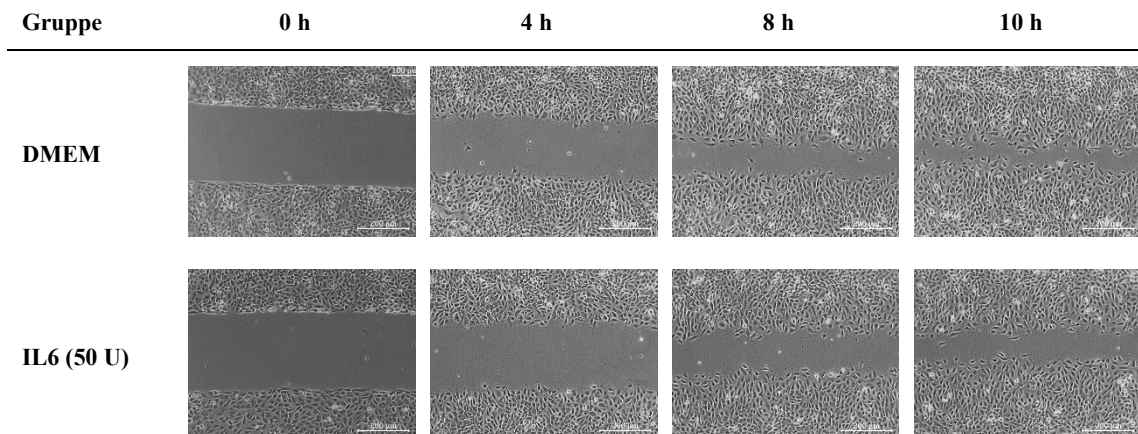


Abb. 29: Exemplarische fotomikroskopische Darstellung des Einflusses von IL6 auf die Migration von Endothelzellen (EA.hy 926)

Migrationsassay unter Inkubation mit IL6 (IL6 (50 U)), Kontrollgruppe mit Wachstumsmedium (DMEM). Der dargestellte Maßstab beträgt 200 µm. Es zeigte sich ein inhibitorischer Effekt von IL6 auf die Migration der Endothelzellen.

3.3.2. Einfluss von Anti-IL6 auf die Migration von Endothelzellen

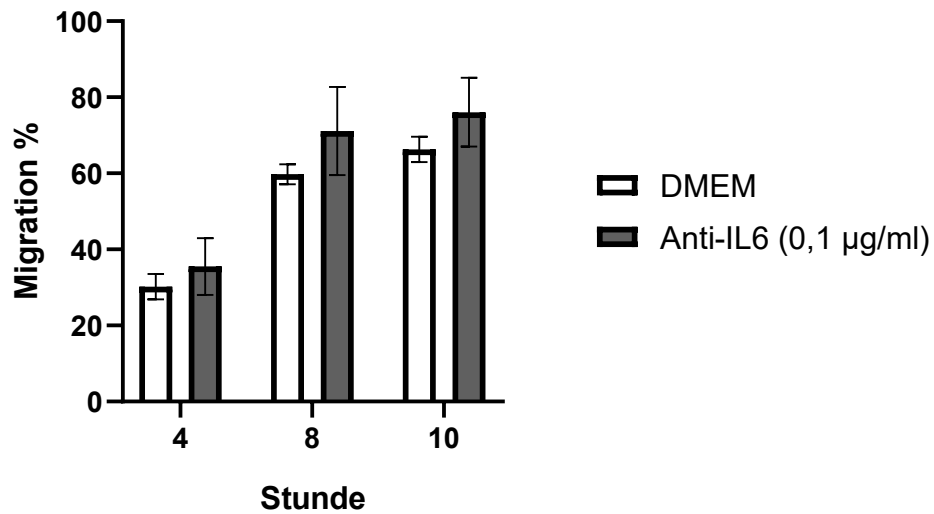


Abb. 30: Einfluss von Anti-IL6 auf die Migration von Endothelzellen (EA.hy 926)

Endothelzellen wurden mit Anti-IL6 inkubiert und in Migrationsassays analysiert (Anti-IL6 (0,1 µg/ml), n = 4 technische Replikate mit je 2 Messpunkten). Kontrollgruppe mit Wachstumsmedium (DMEM, n = 4 technische Replikate mit je 2 Messpunkten). Zielgröße der Auswertung war der prozentuale Anteil des zellfreien Spalts, der im Vergleich zur Ausgangsmessung (Stunde 0) von Zellen bedeckt wurde. Mittelwerte + SD, Two-way ANOVA. Die dargestellten Signifikanzen beziehen sich auf die Differenz zwischen DMEM und Anti-IL6 zu den betrachteten Zeitpunkten. Es zeigte sich ein tendenziell migrationsfördernder Effekt von Anti-IL6 auf Endothelzellen,

Der Einfluss von IL6 auf die Migration der Endothelzellen wurde evaluiert, indem IL6 durch Anti-IL6 (0,1 µg/ml) inhibiert wurde. Die IL6-Inhibition konnte die Migration der Endothelzellen tendenziell erhöhen (Abb. 30, 31).

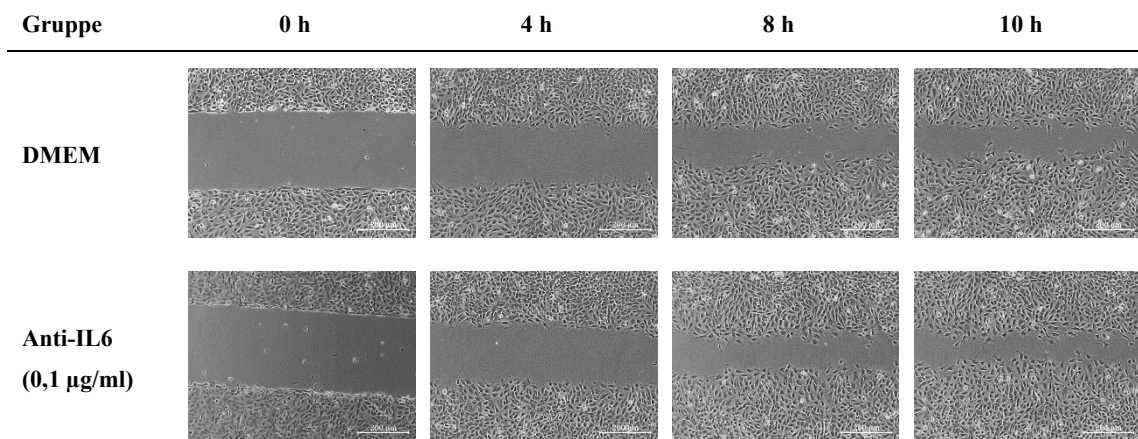


Abb. 31: Exemplarische fotomikroskopische Darstellung des Einflusses von Anti-IL6 auf die Migration von Endothelzellen (EA.hy 926)

Migrationsassay unter Inkubation mit Anti-IL6 (Anti-IL6 (0,1 µg/ml)). Kontrollgruppe mit Wachstumsmedium (DMEM). Der dargestellte Maßstab beträgt 200 µm. Es zeigte sich ein tendenziell migrationsfördernder Effekt von Anti-IL6 auf Endothelzellen,

3.3.3. Einfluss von IL8 auf die Migration von Endothelzellen

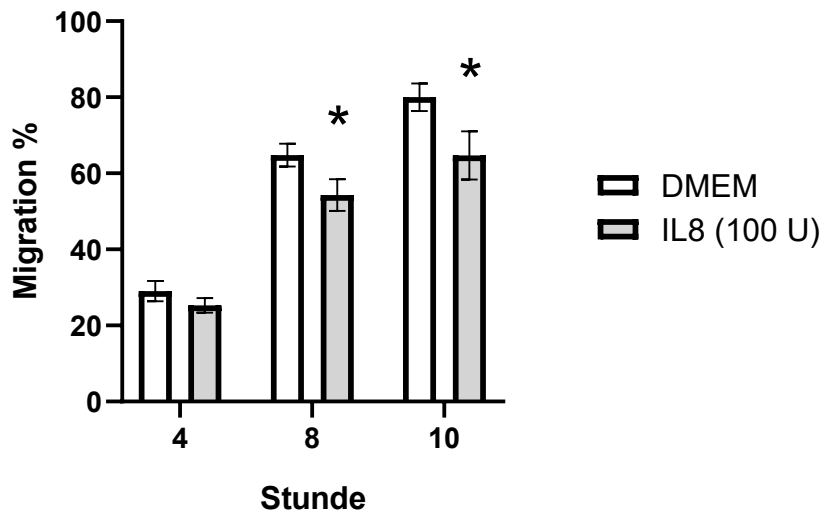


Abb. 32: Einfluss von IL8 auf die Migration von Endothelzellen (EA.hy 926)

Endothelzellen wurden mit IL8 inkubiert und in Migrationsassays analysiert (IL8 (100 U), n = 4 technische Replikate mit je 2 Messpunkten)). Kontrollgruppe mit Wachstumsmedium (DMEM, n = 4 technische Replikate mit je 2 Messpunkten). Zielgröße der Auswertung war der prozentuale Anteil des zellfreien Spalts, der im Vergleich zur Ausgangsmessung (Stunde 0) von Zellen bedeckt wurde. Mittelwerte + SD, Two-way ANOVA. Die dargestellten Signifikanzen beziehen sich auf die Differenz zwischen DMEM und IL8 zu den betrachteten Zeitpunkten. 8 h: $p = 0,0036$, 10 h: $p < 0,0001$. Es zeigte sich ein signifikant inhibierender Effekt von IL8 auf die Migration von Endothelzellen.

IL8 inhibierte nach 8 h ($p = 0,0036$) sowie nach 10 h ($p < 0,0001$) das Migrationspotential humaner Endothelzellen signifikant (Abb. 32, 33).

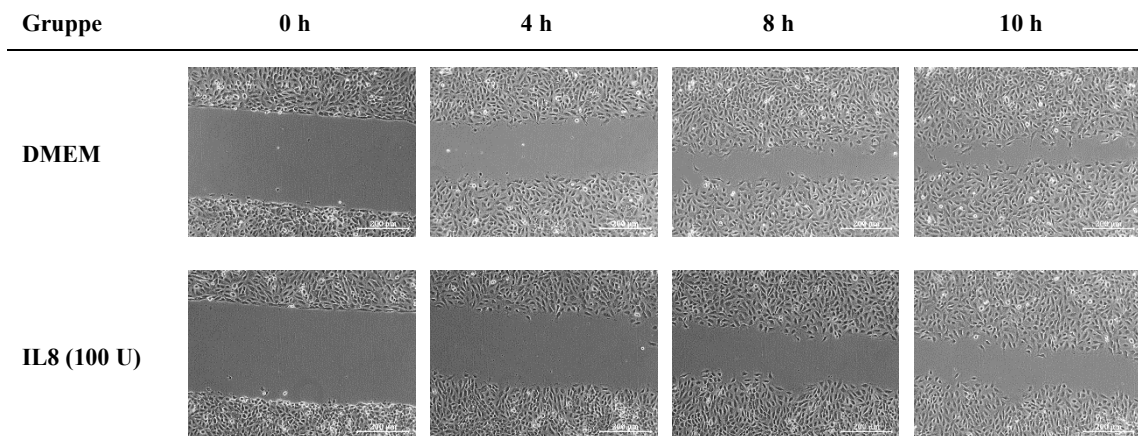


Abb. 33: Exemplarische fotomikroskopische Darstellung des Einflusses von IL8 auf die Migration von Endothelzellen (EA.hy 926)

Migrationsassays unter Inkubation mit IL8 (IL8 (100 U)). Kontrollgruppe mit Wachstumsmedium (DMEM), Der dargestellte Maßstab beträgt 200 μm . Es zeigte sich ein signifikant inhibierender Effekt von IL8 auf die Migration von Endothelzellen.

3.3.4. Einfluss von Reparixin auf die Migration von Endothelzellen

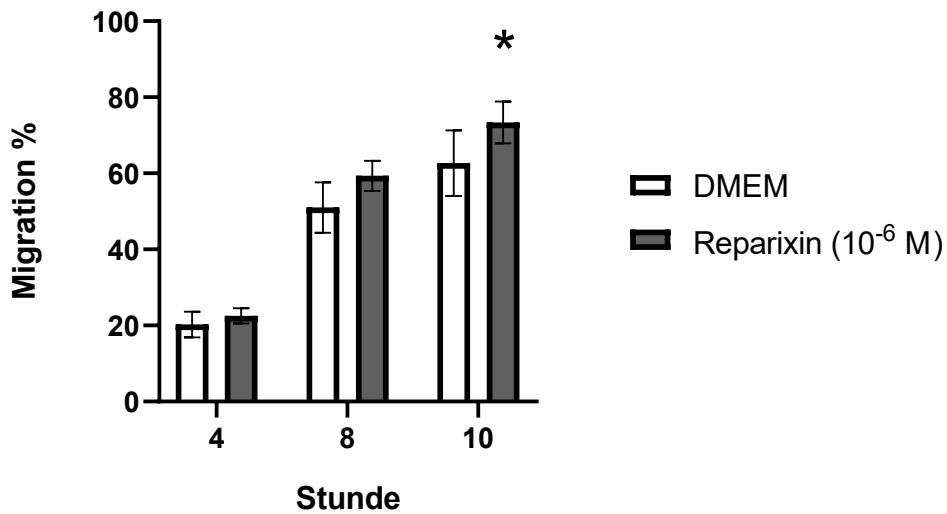


Abb. 34: Einfluss von Reparixin auf die Migration von Endothelzellen (EA.hy 926)

Endothelzellen wurden mit Reparixin inkubiert und in Migrationsassays analysiert (Reparixin (10⁻⁶ M), n = 4 technische Replikate mit je 2 Messpunkten). Kontrollgruppe mit Wachstumsmedium (DMEM, n = 4 technische Replikate mit je 2 Messpunkten). Zielgröße der Auswertung war der prozentuale Anteil des zellfreien Spalts, der im Vergleich zur Ausgangsmessung (Stunde 0) von Zellen bedeckt wurde. Mittelwerte + SD, Two-way ANOVA. Die dargestellten Signifikanzen beziehen sich auf die Differenz zwischen DMEM und Reparixin zu den betrachteten Zeitpunkten. 10 h: p = 0,0371. Es zeigte sich ein signifikant steigernder Effekt von Reparixin auf die Migration von Endothelzellen.

Der Einfluss von IL8 auf die Migration der Endothelzellen wurde evaluiert, indem IL8 durch Reparixin (10⁻⁶ M) inhibiert wurde. Die IL8-Inhibition führte nach 10 h zu einer signifikanten Steigerung (p = 0,0371) der Endothelzellmigration (Abb. 34, 35).

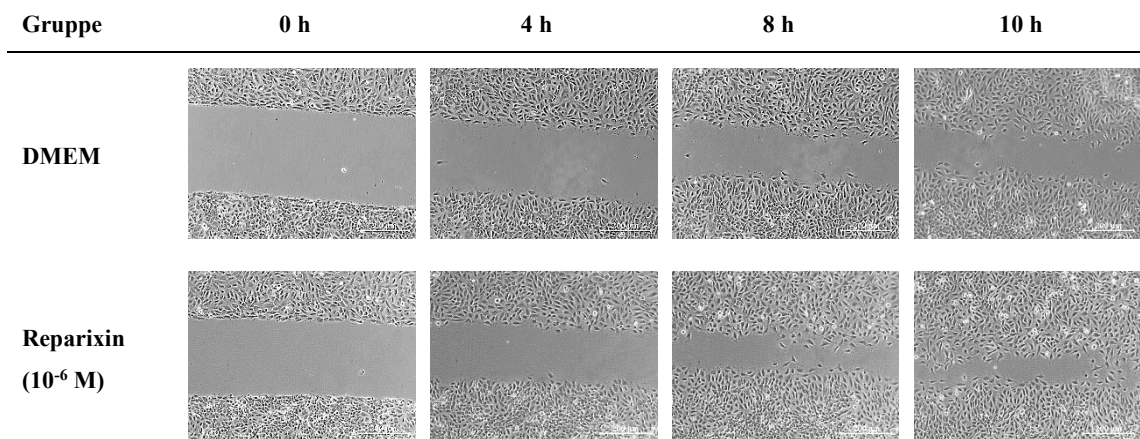


Abb. 35: Exemplarische fotomikroskopische Darstellung des Einflusses von Reparixin auf die Migration von Endothelzellen (EA.hy 926)

Migrationsassays unter Inkubation mit Reparixin (Reparixin (10⁻⁶ M)). Kontrollgruppe mit Wachstumsmedium (DMEM). Der dargestellte Maßstab beträgt 200 µm. Es zeigte sich ein signifikant steigernder Effekt von Reparixin auf die Migration von Endothelzellen.

3.3.5. Einfluss von ANG auf die Migration von Endothelzellen

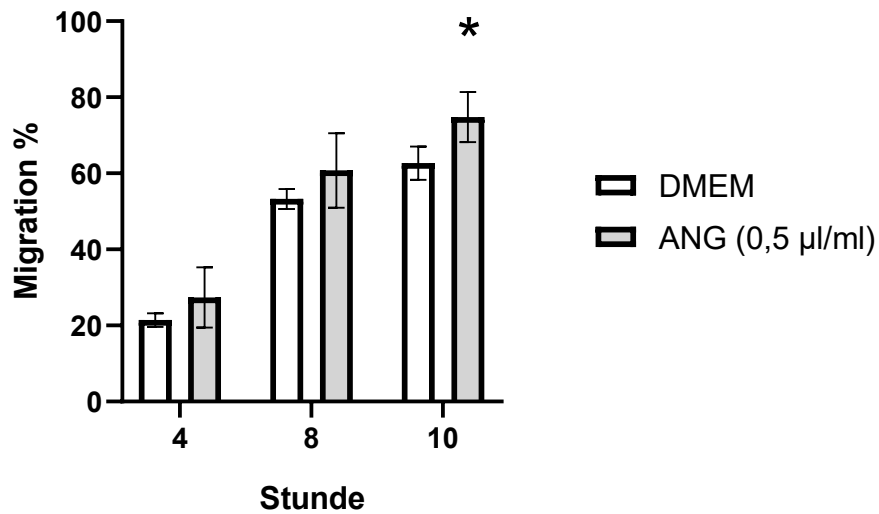


Abb. 36: Einfluss von ANG auf die Migration von Endothelzellen (EA.hy 926)

Endothelzellen wurden mit ANG inkubiert und in Migrationsassays analysiert (ANG (0,5 µg/ml), n = 4 technische Replikate mit je 2 Messpunkten). Kontrollgruppe mit Wachstumsmedium (DMEM, n = 4 technische Replikate mit je 2 Messpunkten). Zielgröße der Auswertung war der prozentuale Anteil des zellfreien Spalts, der im Vergleich zur Ausgangsmessung (Stunde 0) von Zellen bedeckt wurde. Mittelwerte + SD, Two-way ANOVA. Die dargestellten Signifikanzen beziehen sich auf die Differenz zwischen DMEM und ANG zu den betrachteten Zeitpunkten. 10 h: p = 0,0378. Es zeigte sich ein signifikant steigernder Effekt von ANG auf die Migration der Endothelzellen.

ANG (0,5 µl/ml) führte nach 10 h (p = 0,0192) zu einer signifikanten Steigerung der Migration von Endothelzellen (Abb. 36, 37).

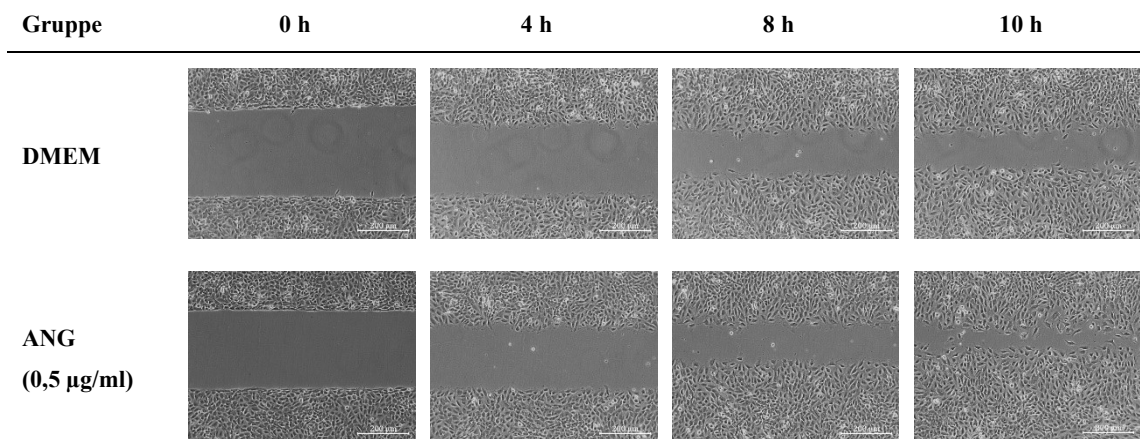


Abb. 37: Exemplarische fotomikroskopische Darstellung des Einflusses von ANG auf die Migration von Endothelzellen (EA.hy 926)

Migrationsassays unter Inkubation mit ANG (ANG (0,5 µg/ml)). Kontrollgruppe mit Wachstumsmedium (DMEM). Der dargestellte Maßstab beträgt 200 µm. Es zeigte sich ein signifikant steigernder Effekt von ANG auf die Migration der Endothelzellen.

3.3.6. Einfluss von Anti-ANG auf die Migration von Endothelzellen

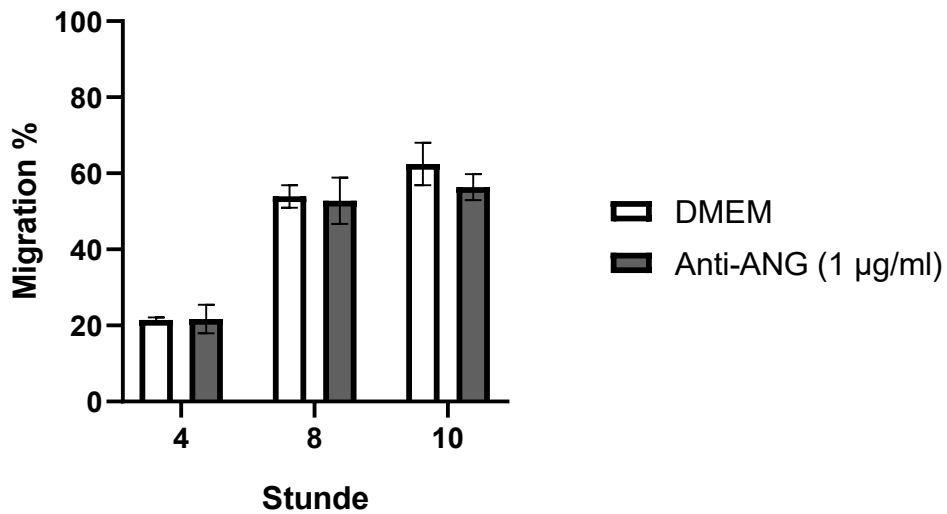


Abb. 38: Einfluss von Anti-ANG auf die Migration von Endothelzellen (EA.hy 926)

Endothelzellen wurden mit Anti-ANG inkubiert und in Migrationsassays analysiert (Anti-ANG (1 µg/ml), n = 4 technische Replikate mit je 2 Messpunkten). Kontrollgruppe mit Wachstumsmedium (DMEM, n = 4 technische Replikate mit je 2 Messpunkten). Mittelwerte + SD, Two-way ANOVA. Die dargestellten Signifikanzen beziehen sich auf die Differenz zwischen DMEM und Anti-ANG zu den betrachteten Zeitpunkten. Es zeigte sich ein tendenziell inhibierender Effekt von Anti-ANG auf die Migration der Endothelzellen.

Der Einfluss von ANG auf die Migration der Endothelzellen wurde evaluiert, indem ANG durch Anti-ANG (1 µg/ml) inhibiert wurde. Die ANG-Inhibition führte nach 10 h zu einer tendenziellen Reduktion der Migrationskapazität (Abb. 38, 39).

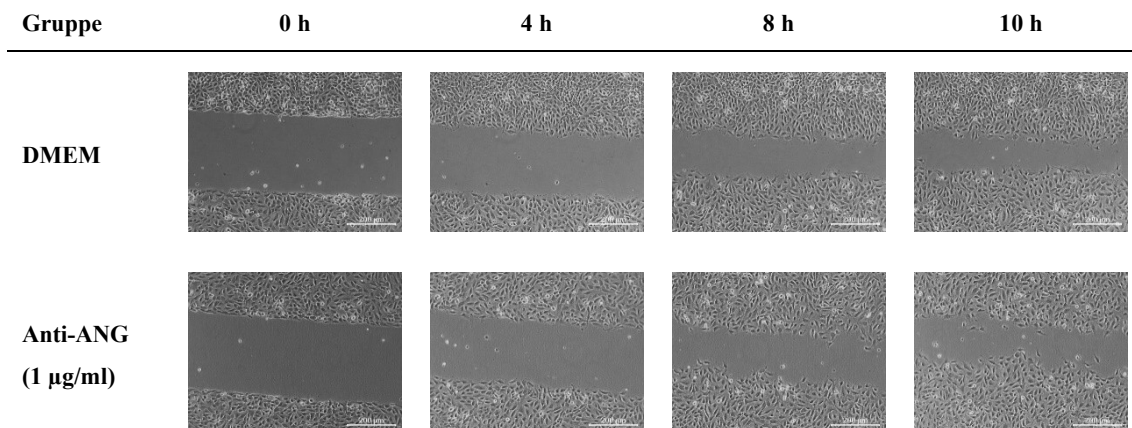


Abb. 39: Exemplarische fotomikroskopische Darstellung des Einflusses von Anti-ANG auf die Migration von Endothelzellen (EA.hy 926)

Migrationsassays unter Inkubation mit Anti-ANG (Anti-ANG (1 µg/ml)). Kontrollgruppe mit Wachstumsmedium (DMEM). Der dargestellte Maßstab beträgt 200 µm. Es zeigte sich ein tendenziell inhibierender Effekt von Anti-ANG auf die Migration der Endothelzellen.

3.4. Einfluss differentiell exprimierter Faktoren in OB $T \leq -2,5$ auf die OPG-Expression in Osteoblasten

In der Versuchsreihe 3.1 wurde die Expression Angiogenese-relevanter Faktoren in OB osteoporotischer Patient*innen ($OB T \leq -2,5$) und nicht osteoporotischer Patient*innen ($OB T \geq -1$) untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass IL6 durch native OB $T \leq -2,5$ signifikant stärker exprimiert wurde. IL8 und ANG wurden durch native OB $T \leq -2,5$ hingegen signifikant vermindert exprimiert. Da eine verminderte OPG-Expression am Pathomechanismus der Osteoporose beteiligt ist, sollte analysiert werden, ob das differentielle Expressionsmuster Angiogenese-relevanter Faktoren die OPG-Expression in humanen OB beeinflusst.

In der folgenden Versuchsreihe wurde untersucht, welchen Einfluss IL6, IL8 und ANG sowie deren spezifischen Inhibitoren Anti-IL6, Reparixin und Anti-IL8 auf die OPG-Expression von OB nehmen. Darüber hinaus wurde der Einfluss der Proteine auf die Zellzahl der OB mittels CTB-Assay untersucht, um auszuschließen, dass etwaig Veränderungen der OPG-Expressionslevel durch eine relevante Veränderung der Gesamtzellzahl bedingt wären.

Jede zugeführte Spender*innenkultur wurde in drei Teilversuche unterteilt. Eine Kultur wurde unter dem Einfluss der zu untersuchenden Proteine, eine weitere unter dem Einfluss des spezifischen Inhibitors und eine dritte Kultur als Kontrollgruppe unter Wachstumsmedium analysiert. Die Auswertung basierte auf der prozentualen Veränderung in den behandelten Kulturen, wobei die jeweilige Kontrollgruppe für jede Spender*innenkultur als Referenzwert diente.

3.4.1. Einfluss von IL6 und Anti-IL6 auf die OPG-Expression in OB

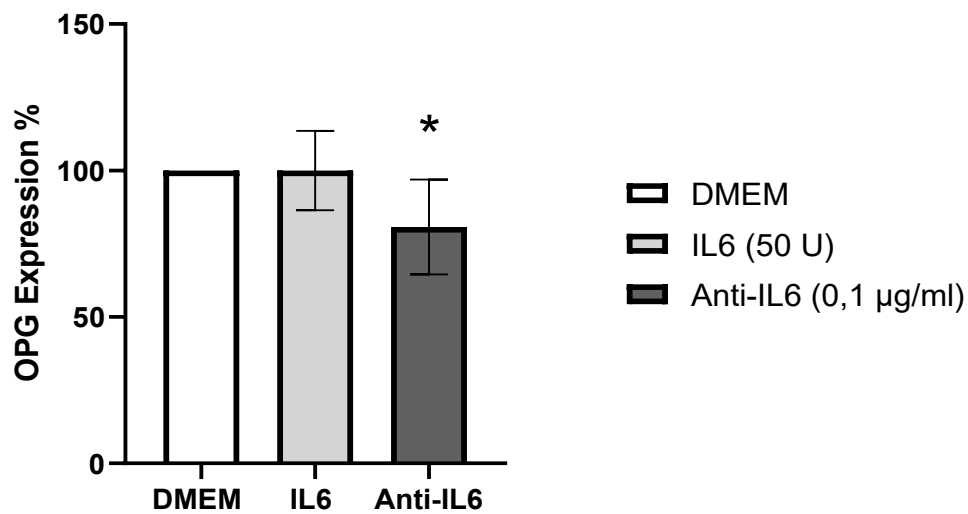


Abb. 40: Einfluss von IL6 und Anti-IL6 auf die OPG-Expression humaner Osteoblasten

Native Osteoblasten wurden mit IL6 (IL6 (50 U), n = 7), Anti-IL6 (Anti-IL6 (0,1 µg/ml), n = 7) und Wachstumsmedium (DMEM, n = 7) inkubiert und die OPG-Expression analysiert. Mittelwert + SD, *t*-Test. Eine OPG-Expression von 100 % ist auf die jeweilige OPG-Expression in der Kontrollgruppe DMEM normiert. Dargestellte Signifikanzen beziehen sich auf die Differenz zwischen IL6 und Anti-IL6 zur Kontrollgruppe DMEM. DMEM vs. IL6: $p = 0,9961$, DMEM vs. Anti-IL6: $p = 0,0084$, IL6 vs. Anti-IL6: $p = 0,0327$. Es zeigte sich eine signifikant verminderte OPG-Expression unter dem Einfluss von Anti-IL6.

Wurde IL6 inhibiert, erniedrigte sich die OPG-Expression in OB signifikant. So zeigte sich unter Inkubation mit Anti-IL6 (0,1 µg/ml) eine um 19,27 % verminderte OPG-Expression gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe ($p = 0,0084$). Gegenüber den OB unter Inkubation mit IL6 (50 U), wurde die OPG-Expression um 19,25 % vermindert ($p = 0,0327$). Die Zugabe von IL6 hatte hingegen keinen signifikanten Effekt auf die OPG-Expression in OB (Abb. 40).

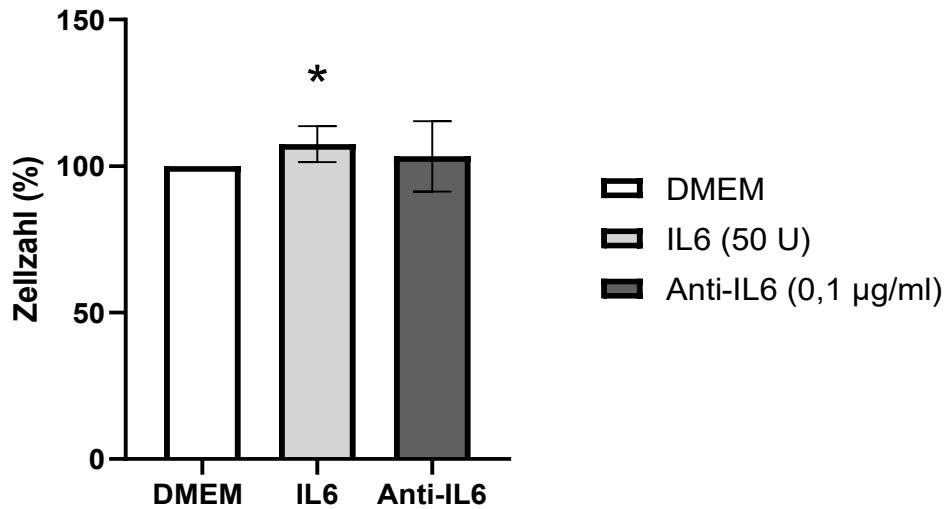


Abb. 41: Einfluss von IL6 und Anti-IL6 auf die Zellzahl humaner Osteoblasten

Native Osteoblasten wurden mit IL6 (IL6 (50 U), n = 7), Anti-IL6 (Anti-IL6 (0,1 µg/ml), n = 7) und Wachstumsmedium (DMEM, n = 7) inkubiert und die Zellzahl der OB analysiert. Mittelwert + SD, *t*-Test. Eine Zellzahl von 100 % ist auf die jeweilige Zellzahl in der Kontrollgruppe DMEM normiert. Dargestellte Signifikanzen beziehen sich auf die Differenz zwischen IL6 und Anti-IL6 zur Kontrollgruppe DMEM. DMEM vs. IL6: $p = 0,0070$, DMEM vs. Anti-IL6: $p = 0,4769$, IL6 vs. Anti-IL6: $p = 0,4315$. Es zeigte sich eine signifikant erhöhte Zellzahl unter dem Einfluss von IL6.

Die Inhibition von IL6 hatte keinen Effekt auf die Zellzahl der OB. Der Einfluss von Anti-IL6 (0,1 µg/ml) auf die Zellzahl der OB war sowohl gegenüber der Kontrollgruppe DMEM ($p = 0,4769$) als auch gegenüber der Gruppe unter IL6 (50 U) nicht signifikant ($p = 0,4315$) (Abb. 41). So konnte demonstriert werden, dass die Inhibition der OPG-Expression durch Zugabe von Anti-IL6 (Abb. 40) nicht aus einer Verminderung der OB resultiert.

3.4.2. Einfluss von IL8 und Reparixin auf die OPG-Expression in OB

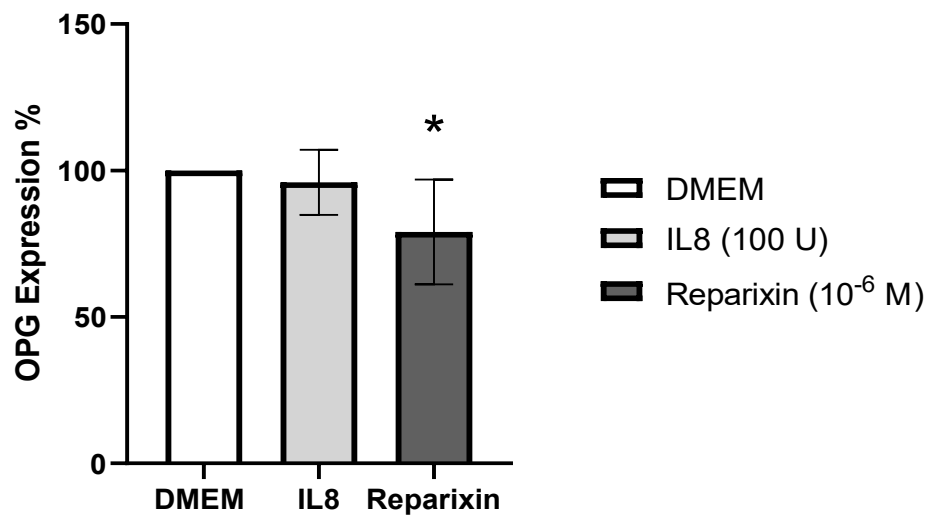


Abb. 42: Einfluss von IL8 und Reparixin auf die OPG-Expression humaner Osteoblasten

Native Osteoblasten wurden mit IL8 (IL8 (100 U), n = 7), Reparixin (Reparixin (10⁻⁶ M), n = 7) und Wachstumsmedium (DMEM, n = 7) inkubiert und die OPG-Expression analysiert. Mittelwert + SD, t-Test. Eine Proteinexpression von 100 % ist auf die jeweilige OPG-Expression in der Kontrollgruppe DMEM normiert. Dargestellte Signifikanzen beziehen sich auf die Differenz zwischen IL8 und Reparixin zur Kontrollgruppe DMEM. DMEM vs. IL8: p = 0,3567, DMEM vs. Reparixin: p = 0,0090, IL8 vs. Reparixin: p = 0,3842. Es zeigte sich eine signifikant verminderte OPG-Expression unter dem Einfluss von Reparixin.

Wurde IL8 durch Reparixin inhibiert, erniedrigte sich die OPG-Expression in OB signifikant. So zeigte sich unter Inkubation mit Reparixin (10⁻⁶ M) eine um 21,01 % verminderte OPG-Expression gegenüber der Kontrollgruppe DMEM (p = 0,0090) (Abb. 42).

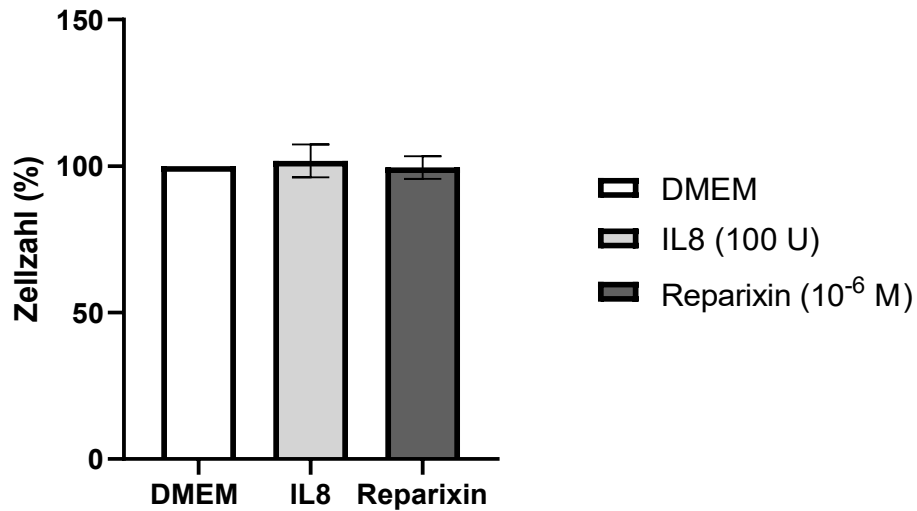


Abb. 43: Einfluss von IL8 und Reparixin auf die Zellzahl humaner Osteoblasten

Native Osteoblasten wurden mit IL8 (IL8 (100 U), n = 7), Reparixin (Reparixin (10⁻⁶ M), n = 7) und Wachstumsmedium (DMEM, n = 7) inkubiert und die Zellzahl der OB analysiert. Mittelwert + SD, *t*-Test. Eine Zellzahl von 100 % ist auf die jeweilige Zellzahl in der Kontrollgruppe DMEM normiert. Dargestellte Signifikanzen beziehen sich auf die Differenz zwischen IL8 und Reparixin zur Kontrollgruppe DMEM. DMEM vs. IL8: p = 0,4193, DMEM vs. Reparixin: p = 0,7558, IL8 vs. Reparixin: p = 0,4017. Es zeigte sich kein signifikanter Effekt von IL8 und Reparixin auf die Zellzahl.

Die Inhibition von IL8 hatte keinen Effekt auf die Zellzahl der OB. Der Einfluss von Reparixin (10⁻⁶ M) auf die Zellzahl war sowohl gegenüber der Kontrollgruppe DMEM (p = 0,7558) als auch gegenüber der Gruppe unter Inkubation mit IL8 (50 U) nicht signifikant (p = 0,4017) (Abb. 43). So konnte demonstriert werden, dass die Inhibition der OPG-Expression durch Zugabe von Reparixin (Abb. 42) nicht aus einer Verminderung der OB resultiert.

3.4.3. Einfluss von ANG und Anti-ANG auf die OPG-Expression in OB

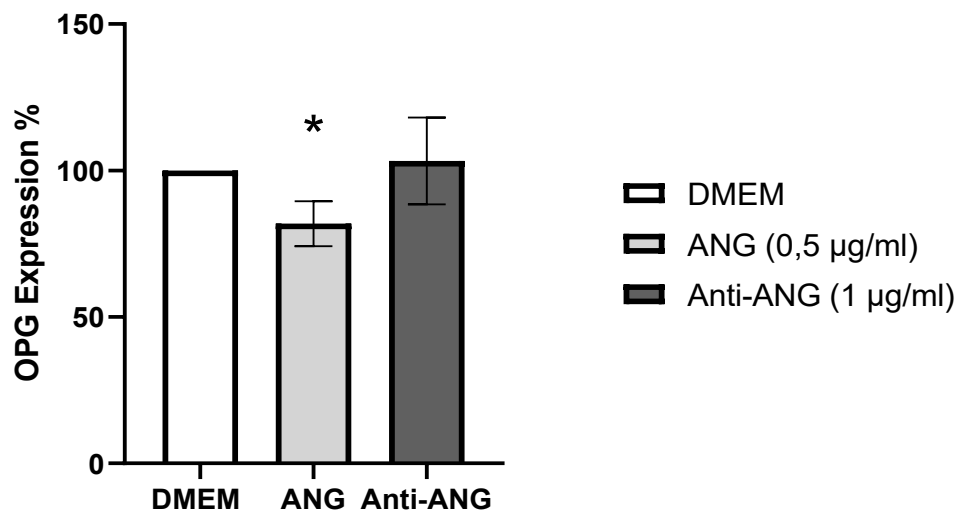


Abb. 44: Einfluss von ANG und Anti-ANG auf die OPG-Expression humaner Osteoblasten

Native Osteoblasten wurden mit ANG (ANG (0,5 µg/ml), n = 7), Anti-ANG (Anti-ANG (1 µg/ml), n = 7) und Wachstumsmedium (DMEM, n = 7) inkubiert und die OPG-Expression analysiert. Mittelwert + SD, *t*-Test. Eine Proteinexpression von 100 % ist auf die jeweilige OPG-Expression in der Kontrollgruppe DMEM normiert. Dargestellte Signifikanzen beziehen sich auf die Differenz zwischen ANG und Anti-ANG zur Kontrollgruppe DMEM. DMEM vs. ANG: $p < 0,0001$, DMEM vs. Anti-ANG: $p = 0,5711$, ANG vs. Anti-ANG: $p = 0,0053$. Es zeigte sich eine signifikant verminderte OPG-Expression unter dem Einfluss von ANG.

Angiogenin inhibierte die OPG-Expression in OB signifikant. So zeigte sich unter Inkubation mit ANG (0,5 µg/ml) eine um 18,17 % verminderte OPG-Expression gegenüber der Kontrollgruppe DMEM ($p < 0,0001$) sowie eine um 20,76 % verminderte OPG-Expression gegenüber OB, die unter Anti-ANG (1 µg/ml) inkubiert wurden ($p = 0,0053$) (Abb. 44).

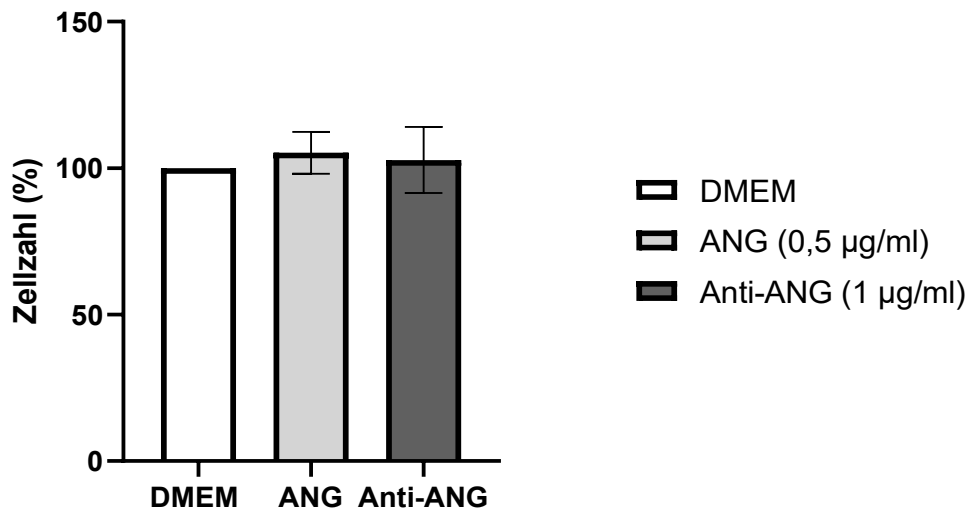


Abb. 45: Einfluss von ANG und Anti-ANG auf die Zellzahl humaner Osteoblasten

Native Osteoblasten wurden mit ANG (ANG (0,5 µg/ml), n = 7), Anti-ANG (Anti-ANG (1 µg/ml), n = 7) und Wachstumsmedium (DMEM, n = 7) inkubiert und die Zellzahl der OB analysiert. Mittelwert + SD, *t*-Test. Eine Zellzahl von 100 % ist auf die jeweilige Zellzahl in der Kontrollgruppe DMEM normiert. Dargestellte Signifikanzen beziehen sich auf die Differenz zwischen ANG und Anti-ANG zur Kontrollgruppe DMEM. DMEM vs. ANG: p = 0,0748, DMEM vs. Anti-ANG: p = 0,5267, ANG vs. Anti-ANG: p = 0,6309. Es zeigte sich kein signifikanter Effekt von ANG und Anti-ANG auf die Zellzahl.

Die Zugabe von ANG hatte keinen signifikanten Effekt auf die Zellzahl der OB (Abb. 45). So konnte demonstriert werden, dass die Inhibition der OPG-Expression durch zugefügtes ANG (Abb. 44) nicht aus einer Verminderung der OB resultiert.

4. Diskussion

In vorliegender Arbeit konnte demonstriert werden, dass OB osteoporotischer Patient*innen ($OB\ T \leq -2,5$) im Vergleich zu OB nicht-osteoporotischer Patient*innen ($OB\ T \geq -1$) IL6, IL8 und ANG differentiell exprimierten. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass $OB\ T \leq -2,5$ einen proliferations- und migrationsfördernden Effekt auf humane Endothelzellen ausübten. Dies wurde über die Anwendung konditionierter Zellkulturmedien aus OB-Kulturen evaluiert. Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass differentiell exprimierte Faktoren das Migrationsverhalten humaner Endothelzellen modifizierten und zudem einen Einfluss auf die OPG-Expression in humanen OB hatten. Die vorliegenden Ergebnisse werden im Folgenden anhand der zugrunde liegenden Fragestellungen einzeln diskutiert.

4.1. Expression Angiogenese-relevanter Faktoren in Osteoblasten

Zugrunde lag die Fragestellung, ob sich das Expressionsmuster von IL6, IL8, ANG, VEGF, CHI3L1 und HIF-1 α in $OB\ T \leq -2,5$ im Vergleich zu einer nicht-osteoporotischen Kontrollgruppe unterscheidet. Es konnte gezeigt werden, dass $OB\ T \leq -2,5$ unter Inkubation mit Wachstumsmedium signifikant mehr IL6 exprimierten, während die Expression von IL8 und ANG signifikant vermindert war. Wurden die OB hingegen osteogen differenziert, zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Expression dieser Proteine.

IL6-Expression durch $OB\ T \leq -2,5$

In der vorliegenden Arbeit konnte eine signifikant erhöhte Expression von IL6 in $OB\ T \leq -2,5$ nachgewiesen werden. Wie bereits in anderen Arbeiten gezeigt wurde, nimmt IL6 als proinflammatorisches Zytokin, insbesondere im Hinblick auf das Krankheitsbild der Osteoporose bei postmenopausalen Patientinnen, einen maßgeblichen Einfluss auf den Knochenmetabolismus (100). Genetische Polymorphismen, die die Aktivität der IL6-Promoter-Region mindern und somit die IL6-Expression verringern, sind in Metaanalysen von Fjar et al. und Moffett et al. mit einem verminderten Risiko für Osteoporose und einer höheren BMD assoziiert (146, 147). IL6 eignet sich zudem als Prädiktor für den postmenopausalen Knochenverlust (152). In einer populationsbasierten, longitudinalen Studie konnte demonstriert werden, dass IL6 im Serum postmenopausaler Patientinnen als prädiktiver Wert für den folgenden Knochenverlust, insbesondere in der ersten postmenopausalen Dekade, herangezogen werden kann (152).

IL6 gilt dabei als Resorptions-förderndes Zytokin (101), jedoch unterscheiden sich die komplexen Effekte von IL6 auf das *bone remodeling* je nach Modell und experimentellen Bedingungen erheblich (154). IL6 führte in mehreren Studien zu einer verstärkten Aktivierung von OC und

begünstigte so Resorptionsprozesse im Knochenmetabolismus (101, 102, 153). Gleichzeitig scheint IL6 eine zentrale Bedeutung in Prozessen der Frakturheilung zuzukommen. Die globale Inhibition von IL6 beeinträchtigte das *bone remodeling* im Rahmen der Frakturheilung (106). Darüber hinaus konnten mehrere Arbeitsgruppen nachweisen, dass apoptotische Osteozyten vermehrt IL6 sezernierten und so das *bone remodeling* vermittelten (97, 107). Aktuelle Arbeiten von Sims et al. gehen davon aus, dass die IL6-vermittelten Effekte sowohl die resorptionsfördernde Aktivierung der OC umfassen, als auch eine stimulierende Wirkung auf die Differenzierung von OB vermitteln und somit die Knochenbildung begünstigen (100).

Im Hinblick auf Veränderungen der IL6-Expression bei Osteoporose wurde die IL6-Expression einzelner Zelltypen bereits in anderen Arbeiten untersucht. Hierbei konnte ein pro-resorptiv verändertes Zytokin-Expressionsmuster in Patient*innen mit verminderter Knochendichte nachgewiesen werden. Azizieh et al. verglichen die Zytokinexpression von *Peripheral blood mononuclear cells* (PBMCs) *in vitro* und konnten in den Zellen von Patient*innen mit verminderter Knochendichte eine erhöhte Expression proresorptiver Zytokine, darunter auch IL6, nachweisen (150). Der Nachweis einer differentiellen Expression von IL6 durch OB von Patient*innen mit Osteoporose beschränkte sich in einzelnen Studien auf den Nachweis der *Messenger ribonucleic acid* (mRNA) von IL6 mittels *Polymerase chain reaction* (PCR). Walsh et al. konnten in humanen OB von Patient*innen mit osteoporotischen Frakturen mRNA von IL6 nachweisen. Die IL6-mRNA war in dieser Studie sowohl in den kultivierten OB von Patient*innen mit osteoporotischen Frakturen, als auch in den OB der Kontrollgruppe nachweisbar und zeigte keinen signifikanten Unterschied. Hierbei erfolgte jedoch keine Quantifizierung der IL6-mRNA der einzelnen Proben, sondern lediglich der Nachweis eines positiven Signals in der PCR der jeweiligen Proben (143). Im Gegensatz hierzu konnten Ralston et al. in Knochengewebsbiopsien von postmenopausalen Patientinnen mit Osteoporose signifikant häufiger IL6-mRNA nachweisen, als im Vergleich zu einer Kontrollgruppe postmenopausaler Patientinnen ohne Osteoporose. Auch hier erfolgte lediglich der Nachweis eines positiven Signals für IL6-mRNA und kein quantitativer Nachweis der vorhandenen IL6 oder IL6-mRNA Level der verwendeten Proben (155).

Die vorliegende Arbeit demonstriert, dass IL6 durch OB $T \leq -2,5$ signifikant vermehrt exprimiert wird. Der Nachweis von IL6 erfolgte mittels ELISA aus dem Überstand der OB-Kulturen. Diese Methodik erlaubt eine genaue Konzentrationsbestimmung und somit eine direkte Aussage zur Quantität der IL6-Expression in OB und ergänzt Ergebnisse der Arbeiten, in denen IL6-mRNA mittels PCR nachgewiesen wurde. Die vorliegenden Ergebnisse werden durch den häufigeren Nachweis von IL6-mRNA in OB von postmenopausalen Patientinnen mit Osteoporose durch Ralston et al. (155) unterstützt. Auch die nachgewiesene systemische Erhöhung des IL6 im Serum sowie die vermehrte IL6-Expression durch PBMCs bei Patient*innen mit Osteoporose (150)

stärken diese Annahme. Die vermehrte IL6-Expression durch $OB T \leq -2,5$ könnte somit Teil einer generell vermehrten IL6-Expression bei Osteoporose sein, die durch die OB mitverursacht wird. Unter der Annahme, dass IL6 klassischerweise resorptionsfördernde Effekte vermittelt, könnte die verstärkte IL6-Expression durch $OB T \leq -2,5$ direkten Einfluss auf die umliegenden Zellen nehmen und so eine Aktivierung der OC fördern. Bei einer vorliegenden Osteoporose könnte so die Knochenarchitektur geschädigt und die BMD weiter verringert werden.

IL8-Expression durch $OB T \leq -2,5$

In der vorliegenden Arbeit exprimierten $OB T \leq -2,5$ signifikant weniger IL8. Wie bereits in anderen Arbeiten demonstriert werden konnte, nimmt IL8 Einfluss auf die Osteoklastogenese, das RANKL/RANK/OPG-System, osteolytische Prozesse im Rahmen von malignen Tumorerkrankungen und die Angiogenese. Mehrere Arbeitsgruppen konnten die regulative Wirkung von IL8 auf die Osteoklastogenese und eine damit verbundene Steigerung der Knochenresorption feststellen (110, 112, 113).

IL8 aktiviert die Osteoklastogenese. Dabei beeinflusst IL8 vornehmlich die Expression von RANKL. Bendre et al. konnten nachweisen, dass *Recombinant human IL8* (rh-IL8) zu einer Steigerung der RANKL-Expression in Kulturen von *stromal osteoblastic cells* führte. Des Weiteren konnte demonstriert werden, dass rh-IL8 die Differenzierung humaner PBMCs zu OC begünstigt (112, 156). Amarasekara et al. beschreiben eine RANKL-induzierte Expression von IL8 in humanen OC, die einen autokrinen Einfluss auf die RANKL-induzierte Osteoklastogenese nimmt und so die Knochenresorption begünstigt (113). Dieser autokrine Effekt von IL8 als zentraler Regulationsmechanismus der Osteoklastogenese wird von einer weiteren Arbeitsgruppen beschrieben (157).

Bei Patient*innen mit *Anti citrullinated protein antibodies* (ACPA) positiver rheumatoider Arthritis konnten Liu, Krishnamurthy et al. erhöhte Serumspiegel von IL8 nachweisen. Die *in vitro* Zugabe von IL8 führte zu einer erhöhten Zellzahl ausdifferenzierter OC. Zudem konnte die RANKL-induzierte Osteoklastogenese durch die Zugabe von Reparixin reduziert werden (158). IL8 wird zudem als prädiktiver Marker für erneute Krankenhauseinweisungen bei Zustand nach Hüftfrakturen diskutiert (114). Cedeno-Veloz et al. konnten eine positive Korrelation der Rate rehospitalisierter Patient*innen nach Hüftfrakturen mit erhöhten IL8-Spiegeln in Blutproben nachweisen.

Auf zellulärer Ebene untersuchten Walsh et al bereits die Zytokinexpression in Osteoblasten von Osteoporosepatient*innen, darunter auch IL8. Hierbei erfolgte der qualitative Nachweis von IL8-mRNA mittels PCR. Sowohl in der Gruppe osteoporotischer Patient*innen, als auch in der Kontrollgruppe konnte IL8-mRNA nachgewiesen werden. Es erfolgte jedoch keine Konzentrationsbestimmung des exprimierten IL8 (143).

In vorliegender Arbeit konnte demonstriert werden, dass IL8 von OB $T \leq -2,5$ signifikant vermindert sekretiert wird. Der Nachweis erfolgte mittels ELISA aus dem Überstand der OB-Kulturen. Die in dieser Arbeit durchgeführte Methodik erlaubt in Ergänzung zu den Ergebnissen von Walsh et al. eine quantitative Aussage zu der Expression von IL8 durch OB $T \leq -2,5$. Die Annahme, dass systemisch erhöhtes IL8 ein relevanter Biomarker für den Krankheitsverlauf bei Zustand nach Hüftfrakturen sein könnte, deckt sich mit den zellulären Effekten von IL8, welche einen resorptionsfördernden Effekt vermitteln. Die verminderte Expression von IL8 durch OB $T \leq -2,5$ könnte hingegen in der direkten Umgebung der OB zu einer verminderten Aktivierung der OC führen. Ob die verringerte Expression von IL8 durch OB $T \leq -2,5$ in diesem Kontext einen relevanten Einfluss auf die BMD nimmt, bleibt an dieser Stelle fraglich.

ANG-Expression durch OB $T \leq -2,5$

In der vorliegenden Arbeit konnte eine signifikant verminderte Expression von ANG durch OB $T \leq -2,5$ nachgewiesen werden. ANG ist ein bekannter pro-angiogener Faktor, der seine Effekte sowohl autonom als auch synergistisch mit anderen angiogenen Faktoren wie VEGF, aFGF, bFGF oder EGF vermittelt (116). Darüber hinaus ist ANG an fetalen Vaskularisierungsprozessen und der Immuntoleranzentwicklung beteiligt (159, 160), nimmt Einfluss auf Mechanismen der Tumorgenese (161) und könnte ein relevanter Faktor in neurodegenerativen Erkrankungen sein (162). Die aktuell vorhandene Literatur bezüglich des Einflusses von ANG auf die BMD und das Krankheitsbild der Osteoporose ist hingegen stark begrenzt.

ANG scheint am Prozess der Frakturheilung beteiligt zu sein. So konnte bereits demonstriert werden, dass die Serumlevel von ANG in Patient*innen nach Distraktionsosteogenese im Vergleich zum Ausgangswert postoperativ signifikant erhöht waren (163). Weiss et al. zeigten zudem, dass sich die Serum-ANG-Konzentration im Verlauf von Frakturheilung dynamisch verändert. In Individuen mit physiologischer Frakturheilung konnte nach einem initialen ANG-Anstieg eine stetige Abnahme der ANG-Konzentration beobachtet werden. Individuen mit eingeschränkter Frakturheilung wiesen diese Dynamik der ANG-Konzentration nicht auf (164). Aus diesen Ergebnissen wird von den Autoren auf eine starke Assoziation der Frakturheilungsprozesse mit der systemischen Aktivität von ANG geschlossen. In Untersuchungen boviner Milch konnte ANG als derjenige Faktor identifiziert werden, der die Knochenresorption durch OC inhibierte. Hierbei konnte durch bovines ANG die Aktivität muriner OC *in vitro* und *in vivo* inhibiert werden (165).

Unter Berücksichtigung der aktuell verfügbaren Literatur kann davon ausgegangen werden, dass ANG osteoprotektive Prozesse begünstigt und für eine suffiziente Frakturheilung notwendig ist (163-165). Die vorliegenden Ergebnisse weisen darauf hin, dass eine differentielle Expression

von ANG durch OB $T \leq -2,5$ Teil des Pathomechanismus der Osteoporose ist. Die verminderte ANG-Expression in OB $T \leq -2,5$ könnte dadurch osteoprotektive Effekte mindern und zu einer reduzierten Vaskularisierung des Knochens führen. Zudem könnte die reduzierte Expression von ANG die synergistischen angiogenen Effekte mit anderen angiogenen Faktoren, beispielsweise VEGF, beeinflussen. Es ist davon auszugehen, dass das *bone remodeling* hierdurch maßgeblich eingeschränkt wird und somit ein negativer Effekt auf die BMD resultiert.

VEGF-Expression durch OB $T \leq -2,5$

In der vorliegenden Arbeit konnte keine signifikant veränderte Expression von VEGF durch OB $T \leq -2,5$ nachgewiesen werden. VEGF beeinflusst die Regulation der Angiogenese und den Knochenmetabolismus. Es konnte bereits demonstriert werden, dass OB VEGF freisetzen und selbst VEGF-Rezeptoren exprimieren (122, 123). Bezüglich der Frage nach einer differentiellen VEGF-Expression durch OB osteoporotischer Patient*innen sind die Aussagen in der vorhandenen Literatur bislang widersprüchlich. Senel et al. untersuchten die Konzentration des Serum-VEGF osteoporotischer Patient*innen. Hierbei zeigte sich die Serum-VEGF-Konzentration bei einer Stichprobengröße von 35 Osteoporosepatient*innen gegenüber einer gesunden, altersgleichen Gruppe signifikant vermindert (166). Dem entgegen stehen Arbeiten, die eine tendenzielle Erhöhung des Serum-VEGFs in Osteoporosepatient*innen beobachten konnten, welche jedoch nicht signifikant war (167). Unsere Ergebnisse werden durch Ergebnisse von Corrado et al. unterstützt. Deren Arbeit untersuchte *in vitro* OB von Osteoporosepatient*innen und konnte keine signifikant veränderte VEGF-mRNA-Expression nachweisen. Auch der Nachweis von VEGF mittels ELISA zeigte keinen signifikanten Unterschied der VEGF-Expression (168).

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen eine in der Tendenz erniedrigte, jedoch nicht signifikant reduzierte VEGF-Expression in OB $T \leq -2,5$. Eine Ursache könnte hierbei die geringe Anzahl der zugrundeliegenden Proben sein. Dennoch können vorliegende Ergebnisse die Annahme einer verminderten VEGF-Expression von Senel et al. stützen. Da VEGF eine osteoprotektive Wirkung zugeschrieben wird (122) und zudem Regenerationsprozesse des Knochens unterstützt (97, 107), könnte eine verminderte Expression von VEGF in OB $T \leq -2,5$ die BMD im Pathomechanismus der Osteoporose weiter verringern.

CHI3L1-Expression durch OB $T \leq -2,5$

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen keine signifikante Veränderung der CHI3L1-Expression durch OB $T \leq -2,5$. Auch wenn die genauen biologischen Funktionen von CHI3L1 noch weitestgehend ungeklärt sind, konnte bereits nachgewiesen werden, dass CHI3L1 von Makrophagen, neutrophilen Granulozyten, Chondrozyten, Endothelzellen, glatten Muskelzellen

sowie OB sezerniert wird und Einfluss auf Entzündungsreaktionen, Zellmigration und *tissue remodeling* nimmt (125, 169, 170). Es konnte bereits demonstriert werden, dass die Expression von CHI3L1 einen entscheidenden Einfluss auf die Entwicklung des muskuloskelettalen Systems ausübt und insbesondere in Geweben mit hoher Proliferationsgeschwindigkeit vermehrt CHI3L1 exprimiert wird (169). Neuere Arbeiten von Park et al. diskutieren die Bedeutung von CHI3L1 im Krankheitsbild der Osteoporose. Demnach führe CHI3L1 über das *Bone morphogenetic protein* (BMP) 2 zu einer vermehrten Differenzierung von OB und einer vermehrten Knochenbildung (131). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Osteoklastogenese durch CHI3L1 inhibiert und die Knochenresorption durch eine verstärkte Expression von OPG gemindert wird (131). Die genauen Effekte von CHI3L1 auf den Knochenmetabolismus sind bisher jedoch nur unzureichend beschrieben und Gegenstand aktueller Forschung. In murinen Versuchsansätzen konnten Wang et al. beispielsweise demonstrieren, dass CHI3L1 die Entstehung von Osteoporose begünstigt. Dabei wurde die Differenzierung von OC durch CHI3L1 stimuliert (171).

Auch wenn zur detaillierten Aufklärung der Wirkmechanismen von CHI3L1 weitere Forschung notwendig ist, ist davon auszugehen, dass CHI3L1 die Regulation des Knochenmetabolismus moduliert und einen relevanten Einfluss auf den Pathomechanismus der Osteoporose haben könnte. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen keine signifikant veränderte Expression von CHI3L1 in den untersuchten OB. Die tendenziell verminderte Expression durch OB $T \leq -2,5$ ist bei hohen Standardabweichungen der vorliegenden Versuche vorsichtig zu interpretieren. Als mögliche Ursachen der Abweichungen kommen unter anderem interindividuelle Unterschiede und multifaktorielle Vorerkrankungen der Spender*innen sowie die Verwendung primärer Zellkulturen in Betracht.

HIF-1 α -Expression durch OB $T \leq -2,5$

HIF-1 α reguliert sowohl OB als auch OC und moduliert die Angiogenese (137, 140, 172). Dabei konnte nachgewiesen werden, dass durch HIF-1 α die Aktivität und Differenzierung von OC gefördert wird und so pro-resorptive Effekte vermittelt werden (136). Durch die Inhibition von HIF-1 α konnte bereits in mehreren murinen Versuchsansätzen der Knochenverlust bei Osteoporose signifikant gemindert werden (137, 138). Zudem nimmt HIF-1 α einen direkten Einfluss auf OB. Chen et al. konnten demonstrieren, dass die Expression von HIF-1 α unter hypoxischen Bedingungen die Differenzierung von BMSCs zu OB reguliert (172). Gleichzeitig wird durch HIF-1 α vermehrt VEGF gebildet. Im Rahmen des *Angiogenesis-Osteogenesis-Coupling* werden durch HIF-1 α somit sowohl die Angiogenese als auch die Aktivität von OB und OC reguliert (94, 172). Entgegen der Annahme, dass HIF-1 α pro-resorptive Effekte vermittelt, beschreiben Shao et al. eine Zunahme der Osteogenese und Angiogenese, ausgelöst durch

artefizielle Überexpression von HIF-1 α in einem murinen Versuchsmodell. Hierbei wurde auch die *in vitro* OPG-Expression der OB durch HIF-1 α signifikant gesteigert (173).

Obwohl HIF-1 α die Regulation des Knochenmetabolismus maßgeblich beeinflusst, finden sich bislang keine Arbeiten, die eine differenzielle Expression von HIF-1 α durch OB bei Osteoporose thematisieren. Auch die vorliegende Arbeit konnte keine signifikant veränderte Expression von HIF-1 α durch OB T \leq -2,5 nachweisen.

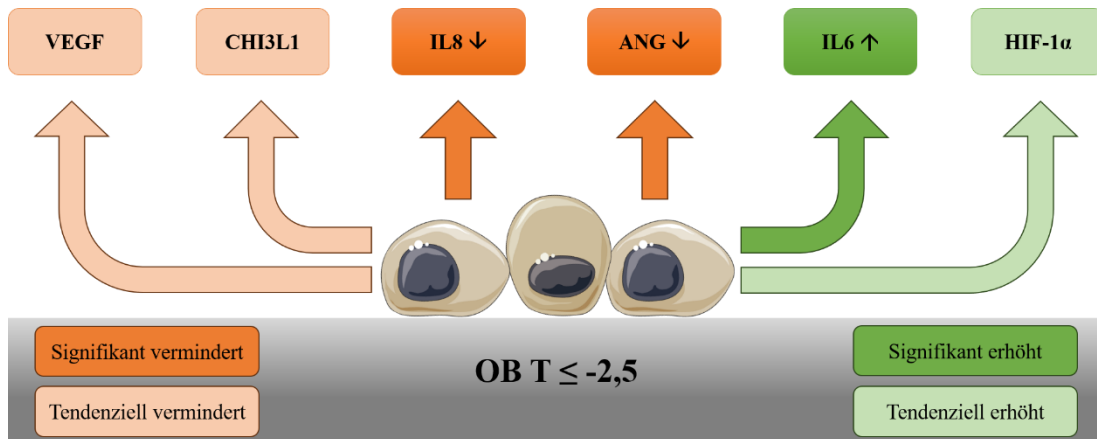


Abb. 46: Das differentielle Expressionsmuster Angiogenese-relevanter Faktoren durch OB T \leq -2,5
 Osteoblasten osteoporotischer Patient*innen (OB T \leq -2,5), Interleukin 6 (IL6), Interleukin 8 (IL8), Angiogenin (ANG), *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *chitinase-3 like-protein-1* (CHI3L1), *hypoxia-inducible factor-1-alpha* (HIF-1 α). Die Expression von IL6 durch OB T \leq -2,5 zeigte sich signifikant gesteigert, während die Expression von IL8 und ANG signifikant vermindert war.

Abb. 46 zeigt eine zusammenfassende Darstellung der vorliegenden Ergebnisse. Hierbei ist anzumerken, dass die Aussagekraft der oben beschriebenen Versuchsreihe kritisch zu betrachten ist. Der limitierende Faktor war hierbei insbesondere die Anzahl der verfügbaren Spender*innen, die Knochensubstanz zur Verfügung stellten. In der Arbeit mit primären OB war es zudem nicht möglich, die potenziellen Einflüsse interindividueller Unterschiede der Spender*innen wie Alter, Geschlecht, Allgemeinzustand oder vorhandene Vorerkrankungen in die Interpretation der gezeigten Ergebnisse einfließen zu lassen. Insbesondere die hier nicht signifikante Modifikation der Expression von VEGF, CHI3L1 und HIF-1 α durch OB T \leq -2,5 sollte in größeren Ansätzen reevaluiert werden.

4.2. Einfluss von OB T \leq -2,5 auf Endothelzellen

Die Blutversorgung des Knochens ist essentiell, um eine physiologische Knochenhomöostase zu gewährleisten und somit die Integrität des Knochens zu wahren. Veränderungen der Blutversorgung, insbesondere in Form einer Minderversorgung, sind mit einer verminderten Knochendichte assoziiert (92, 93). Dabei unterliegt die Blutversorgung des Knochens multiplen Einflussgrößen. Aktuelle Forschungsansätze untersuchen den Zusammenhang von Osteogenese und Angiogenese, insbesondere den *Crosstalk* von Endothelzellen, OB und Osteozyten sowie beteiligte Signalwege (90, 137, 175). Der Einfluss von OB osteoporotischer Patient*innen auf die Blutversorgung des Knochens ist bislang jedoch nur unzureichend beschrieben und kaum untersucht. Hieraus resultierte die Fragestellung, ob OB T \leq -2,5 die Proliferation und Migration humaner Endothelzellen beeinflussen.

In vorliegender Arbeit konnte gezeigt werden, dass OB T \leq -2,5 im Vergleich zu OB T \geq -1 die Proliferation und Migration von Endothelzellen fördern. Ein proliferationsfördernder Effekt unter Inkubation mit konditioniertem Medium von OB T \leq -2,5 (KM T \leq -2,5) konnte nach fünf Tagen Kultivierung nachgewiesen werden. Dieser Effekt blieb auch bestehen, wenn den konditionierten Medien KM T \leq -2,5 und KMT \geq -1 zusätzlich FCS zugefügt wurde, um einen etwaigen Nährstoffmangel auszugleichen. Es kann somit davon ausgegangen werden, dass sich der proliferationsfördernde Einfluss von KM T \leq -2,5 alleine aus der Expression Angiogenese-relevanter Zytokine ergibt. Darüber hinaus konnten die vorliegenden Daten demonstrieren, dass die Migrationskapazität von EA.hy 926 durch OB T \leq -2,5 signifikant gesteigert wird. Der migrationsfördernde Effekt unter KM T \leq -2,5 zeigte sich bereits mit den KM, das den OB-Kulturen nach 4 Tagen entnommen wurde. Wurde das Medium nach 8 Tagen entnommen, zeigten sich keine relevanten Effekte gegenüber KM T \geq -1.

4.3. Einfluss differentiell exprimierter Faktoren in OB T \leq -2,5 auf Endothelzellen

KM von OB T \leq -2,5 zeigte in der vorliegenden Arbeit einen proliferations- und migrationsfördernden Effekt auf Endothelzellen. Untersucht werden sollte, welche Faktoren des KM diesen Einfluss vermitteln und ob einzelne differentiell exprimierte Faktoren in OB T \leq -2,5 diese pro-angiogene Wirkung induzieren. Gemäß der zugrundeliegenden Fragestellung, welchen Einfluss differentiell exprimierte Faktoren in OB T \leq -2,5 auf das Migrationsverhalten humaner Endothelzellen nehmen, wurde in 3.3 der Einfluss von IL6, IL8 und ANG sowie deren spezifischen Inhibitoren Anti-IL6, Reparixin und Anti-ANG auf die Migrationskapazität humaner Endothelzellen untersucht.

Einfluss von IL6 und Anti-IL6 auf Endothelzellen

IL6 vermittelt als pleiotropes Zytokin sowohl inflammatorische als auch anti-inflammatorische Effekte. Die IL6-Signalkaskaden vermitteln über den klassischen Signalweg mittels IL6-Rezeptor und über die Trans-Signalgebung per löslichem IL6-Rezeptor (sIL6-R) eine große Bandbreite biologischer Effekte (177, 178). Im Hinblick auf Prozesse der Angiogenese sind indirekte pro-angiogene Effekte von IL6 über eine Erhöhung von VEGF beschrieben (179, 180). Bezogen auf den Einfluss von IL6 auf die Migration humaner Endothelzellen zeichnet sich aus der vorhandenen Literatur ein bislang heterogenes Bild.

So konnte bereits gezeigt werden, dass Zytokine der IL6-Familie in Versuchsansätzen mit HUVECs zu einer Anreicherung migrationsfördernder Proteine führten (181). Dem entgegen stehen Arbeiten, in denen durch den *Knockdown* von IL6 in HUVECs Funktionen der Migration und der zellulären Bewegung aktiviert wurden. Dies deutet auf eine autokrine Kontrolle der Migration humaner Endothelzellen durch IL6 hin (182). Darüber hinaus konnte in einer Arbeit von Zegeye et al. mittels Migrationsassays ein inhibierender Einfluss von IL6 auf die Migration von HUVECs nachgewiesen werden. Hierbei vermittelte insbesondere die Signalkaskade über den löslichen IL6-Rezeptor eine verminderte Migration. Die alleinige Zugabe von IL6 ohne den sIL6-R führte hingegen nur zu einer nicht signifikanten Minderung der Migrationskapazität (183).

In vorliegender Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Migrationskapazität humaner Endothelzellen durch IL6 signifikant reduziert wird. Dies steht im Einklang mit vorherigen Untersuchungen durch Zegeye et al. (183). Passend dazu zeigte sich unter dem Einfluss von Anti-IL6 eine tendenziell gesteigerte Migration der Endothelzellen. Unter der Annahme, dass IL6 durch OB T $\leq -2,5$ vermehrt exprimiert wird, muss in Betracht gezogen werden, dass dadurch die Angiogenese inhibiert wird. Eine resultierende Minderversorgung der Knochen sowie eine reduzierte kapilläre Versorgung des *Bone remodeling compartments* (BRC) könnte die Regenerationsprozesse osteoporotisch geschädigter Knochen fortlaufend einschränken und einen entscheidenden Beitrag zum Krankheitsprogress liefern. Der beobachtete pro-angiogene Effekt von OB T $\leq -2,5$ lässt sich hier nicht durch die vermehrte Expression von IL6 erklären.

Einfluss von IL8 und Reparixin auf Endothelzellen

IL8 vermittelt als Mitglied der CXC-Proteinliganden chemotaktische Effekte (110, 184). Insbesondere der pro-angiogene Einfluss von IL8 im Rahmen von Tumorerkrankungen ist belegt (185-187). In Versuchsansätzen mit HUVECs konnte durch Li et al. sowohl eine verstärkte Endothelzellproliferation als auch eine gesteigerte Migration nachgewiesen werden (111, 188). Lai, Shen et al. zeigten in Migrationsassays unter dem Einfluss von 100 ng/ml IL8 eine signifikant gesteigerte Migration von EA.hy 926 (186).

Die vorliegenden Ergebnisse divergieren von der bisher veröffentlichten Literatur. In den durchgeführten Versuchsreihen wurde die Migration der Endothelzellen durch die Zugabe von IL8 inhibiert, während sie unter dem Einfluss des IL8-spezifischen Inhibitors Reparixin signifikant gesteigert war. Eine mögliche Erklärung dieser Divergenz könnte in Unterschieden der zugrundeliegenden Versuchsdurchführung liegen. Li et al. verwendeten in ihren Arbeiten HUVECs der *American Type Culture Collection*, um deren Migration in einem Ansatz mit *Transwell Chambers* zu untersuchen. Die Migration der Endothelzellen durch eine Polycarbonatmembran eignet sich zur Untersuchung der Migrationskapazität, unterscheidet sich jedoch grundlegend von den in dieser Arbeit verwendeten Migrationsassays. Es ist zudem zu beachten, dass die Migration der Endothelzellen durch Li et al. bereits nach 4 h Inkubation ausgewertet wurde. Die hier beschriebenen Effekte von IL8 und Reparixin auf Endothelzellen waren frühestens nach 8 h signifikant. Die Ergebnisse von Lai, Shen et al. basieren auf *Scratch-wound migration assays* mit Endothelzellen des Typs EA.hy 926. Relevante Unterschiede liegen hier in der Durchführung und Auswertung der Migrationsassays. Zum einen wurde die Migration der Endothelzellen nach 6 h in einem Zeitrahmen betrachtet, in dem die hier vorliegenden Ergebnisse der Migration unter dem Einfluss von IL8 nicht signifikant waren. Zum anderen wurde die zurückgelegte Distanz einzelner Endothelzellen in μm in den zellfreien Spalt als Zielgröße der Auswertung definiert. Dem entgegen steht in dieser Arbeit als Zielgröße der prozentuale Anteil des zellfreien Spalts, der im Vergleich zur Ausgangsmessung (Stunde 0) von Zellen bedeckt wurde. Die Differenz des betrachteten Zeitintervalls in Zusammenspiel mit den unterschiedlichen Zielgrößen der Auswertung könnte die konträre Interpretation des Einflusses von IL8 auf die Migration von EA.hy 926 erklären.

In dieser Arbeit konnte demonstriert werden, dass IL8 zu einer verminderten Migration von Endothelzellen führt und dass IL8 durch $\text{OB T} \leq -2,5$ vermindert exprimiert wird. Dies könnte in der direkten Umgebung der OB eine Enthemmung der Angiogenese zur Folge haben und einer Minderversorgung der betroffenen Knochen entgegenwirken. Die verminderte Expression von IL8 durch $\text{OB T} \leq -2,5$ könnte somit mitverantwortlich für die gesteigerte Migration von Endothelzellen durch $\text{KM} \leq -2,5$ sein.

Einfluss von ANG und Anti-ANG auf Endothelzellen

ANG ist ein potenter pro-angiogener Faktor. Dabei ist der Einfluss von ANG auf verschiedene Zelltypen wie etwa Neuroblastome, Prostata-Fibroblasten, HeLa und auch Endothelzellen beschrieben (189). Die migrationsfördernden Effekte von ANG auf Endothelzellen konnten in Versuchsansätzen mit Endothelzellen unterschiedlichen Ursprungs nachgewiesen werden (117, 190, 191). Des Weiteren ist beschrieben, dass ANG als notwendige Bedingung für die Wirkung anderer angiogener Proteine wie aFGF, bFGF, EGF und dem VEGF vorhanden sein muss (191).

Auch die vorliegenden Ergebnisse weisen auf eine verstärkte Migration von Endothelzellen unter dem Einfluss von ANG hin. Die Interpretation wird durch die nicht signifikante Inhibition der Migration durch Anti-ANG gestützt. Unter der Annahme, dass ANG durch $OB T \leq -2,5$ vermindert exprimiert wird, muss in Betracht gezogen werden, dass dadurch ein wichtiger pro-angiogene Einfluss fehlt. Dies könnte zu einer reduzierten kapillären Versorgung des BRC und einer generellen Minderversorgung des Knochens führen. Der beobachtete pro-angiogene Effekt von $OB T \leq -2,5$ lässt sich hingegen nicht durch die reduzierte Expression von ANG erklären.

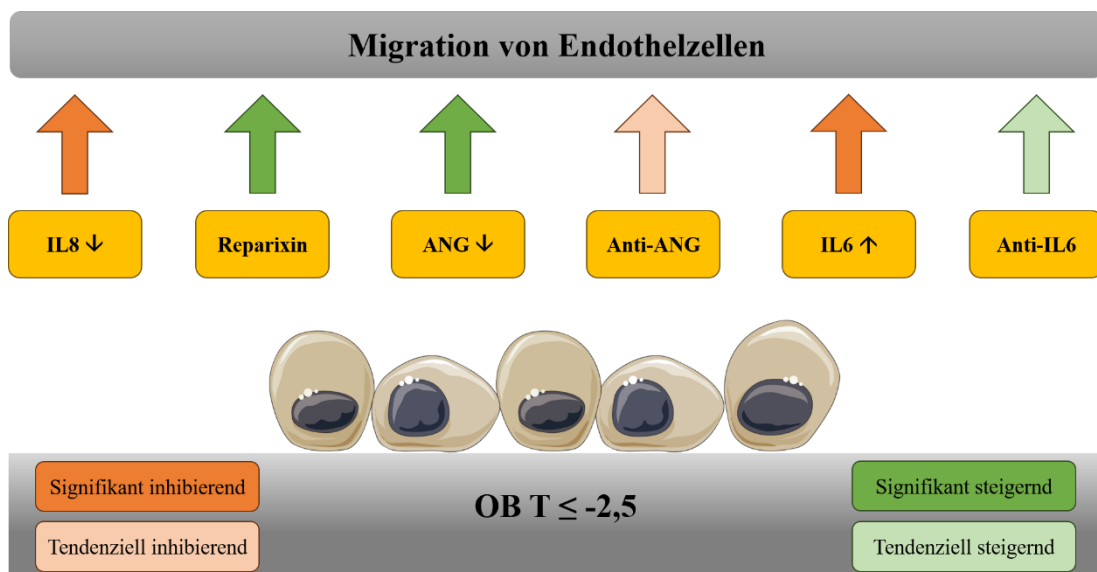


Abb. 47: Einfluss differentiell exprimierter Faktoren in $OB T \leq -2,5$ und spezifischer Inhibitoren auf die Migration von Endothelzellen (EA.hy 926)

Osteoblasten osteoporotischer Patient*innen ($OB T \leq -2,5$), Interleukin 6 (IL6), Interleukin 8 (IL8), Angiogenin (ANG). IL8 und ANG wurden durch $OB T \leq -2,5$ vermindert exprimiert. IL6 wurde durch $OB T \leq -2,5$ verstärkt exprimiert. Es zeigte sich ein signifikant migrationsfördernder Effekt von Reparixin und ANG, während IL6 und IL8 die Migration der Endothelzellen signifikant reduzierten.

Abb. 47 zeigt eine zusammenfassende Darstellung der vorliegenden Ergebnisse. Der Einfluss einzelner differentiell exprimierter Angiogenese-relevanter Faktoren durch $OB T \leq -2,5$ auf die Migrationskapazität von Endothelzellen kann an dieser Stelle nicht gänzlich den unter $KM T \leq -2,5$ beobachteten migrationsfördernden Effekt erklären. IL8 wird durch $OB T \leq -2,5$ signifikant vermindert exprimiert, was zu einer Förderung der Migration von Endothelzellen führen könnte. Jedoch müsste die gesteigerte Expression von IL6 und die verminderte Expression von ANG durch $OB T \leq -2,5$ einen gegenteiligen Effekt vermitteln. Der pro-angiogene Effekt von $KM T \leq -2,5$ könnte dementsprechend auch auf andere angiogene Faktoren zurückzuführen sein, die in dieser Arbeit nicht betrachtet wurden.

4.4. Einfluss differentiell exprimierter Faktoren in OB $T \leq -2,5$ auf die OPG-Expression in Osteoblasten

Die Interaktion von OC, OB, *bone lining cells* und Osteozyten wird maßgeblich über das RANKL/RANK/OPG-System vermittelt (67). Das System besteht aus drei miteinander interagierenden Proteinen: dem *Receptor Activator of NF- κ B ligand* (RANKL), dem *Receptor Activator of NF- κ B* (RANK) und Osteoprotegerin (OPG) (68). Das RANKL/RANK/OPG-System ist als Signalweg an der Regulation verschiedener physiologischer und pathologischer Prozesse beteiligt. Dazu zählen die Regulation von Immunprozessen, die Entwicklung lymphoider Organe, die Formation der Glandulae mammaria sowie ein relevanter Einfluss auf die Tumorgenese von Tumoren verschiedener Entitäten mit einer besonderen Relevanz für die Entstehung von Knochenmetastasen (68, 192-196). Eine der wichtigsten Funktionen des RANKL/RANK/OPG-Systems ist die Feinregulation des Zusammenspiels von OC, OB, BLC und Osteozyten, um die Integrität der Knochenarchitektur zu wahren (67, 197). RANKL bindet an den RANK-Rezeptor, welcher von OC und deren Vorläufern exprimiert wird. Hierdurch wird die Differenzierung und Aktivierung von OC sowie deren Adhärenz an den Knochen, die Aufrechterhaltung der Resorptionsaktivität und die systemische Freisetzung von OC und deren Vorläufern in die Blutlaufbahn vermittelt (68, 75-78). OPG wird als löslicher Rezeptor der TNF-Rezeptorfamilie exprimiert und inhibiert die biologischen Effekte von RANKL, indem es die Bindung von RANKL an RANK verhindert (73). Das Verhältnis von RANKL zu OPG wird in der RANKL/OPG-Ratio erfasst. Eine erhöhte Konzentration oder Ratio zugunsten von RANKL ist mit einer vermehrten Resorption und einem höheren Knochenumsatz assoziiert, während eine niedrige Ratio die Knochenresorption reduziert. Das Gleichgewicht zwischen RANKL und OPG ist eine wichtige Determinante hinsichtlich Knochen-Masse und Stärke (84-86). Ein Missverhältnis der RANKL/OPG-Ratio kann eine verminderte Knochendichte im Sinne einer Osteoporose zur Folge haben.

Hinsichtlich der zugrundeliegenden Fragestellung, ob die durch OB $T \leq -2,5$ differentiell exprimierten Faktoren einen Einfluss auf die OPG-Expression humaner OB nehmen, ist die aktuell vorhandene Forschungsliteratur deutlich begrenzt.

Einfluss von IL6 und Anti-IL6 auf die OPG-Expression in Osteoblasten

Hinsichtlich der Auswirkung von IL6 auf die OPG-Expression in OB konnten Palmqvist et al. eine IL6-induzierte Überexpression von RANKL und OPG bei einer gleichzeitig verminderten Expression von RANK demonstrieren (104). In den Versuchen mit murinen OB wurde OPG unter dem Einfluss von IL6 in Kombination mit sIL6-R sowohl in semiquantitativen rt-PCR als auch in Untersuchungen des entsprechenden Überstands mittels ELISA vermehrt nachgewiesen.

Jedoch konnte keine Auswirkung von IL6 in Abwesenheit des sIL6-R auf die Expression von RANKL, OPG oder RANK dokumentiert werden (104). Im Gegensatz hierzu wurde von Sanchez et al. und Liu et al. ein reduzierender Effekt von IL6 auf die OPG-Expression in OB beschrieben. Sanchez et al. konnten in Untersuchungen mit primären murinen OB nachweisen, dass durch Kompression der OB IL6, Prostaglandin E2 (PGE2) und OPG modifiziert wurden. Dabei wurde die IL6-mRNA sowie die Cyclooxygenase-2 (COX-2) mRNA vermehrt exprimiert und IL6 sowie PGE2 im Überstand der OB vermehrt nachgewiesen. Es konnte zudem eine Reduktion der OPG-Expression mit einer geringen zeitlichen Latenz zum Anstieg der IL6 Konzentration nachgewiesen werden. Diese Reduktion der OPG-Expression entfiel unter dem zusätzlichen Einfluss IL6-spezifischer Antikörper (198). Die resultierende Schlussfolgerung, dass IL6 für eine Reduktion der OPG-Expression verantwortlich ist, wird durch Untersuchungen von Liu et al. gestützt. In Versuchen mit standardisierten *MC3T3 osteoblast cells* konnte IL6 als Mediator einer PGE2 vermittelten Reduktion der OPG-Expression in OB identifiziert werden. Auch hier stabilisierten IL6-spezifische Antikörper die basale OPG-Expression und blockierten den inhibitorischen Effekt von PGE2 (199-201). Kuebart et al. untersuchten kürzlich in den Laboren der Uniklinik Düsseldorf die OPG-Expression osteogen differenzierter humaner OB unter dem Einfluss von IL6. Hierbei wurde die OPG-Expression durch IL6 (250 U/ml) signifikant verringert (202).

In der vorliegenden Arbeit konnte kein relevanter Effekt von IL6 auf die OPG-Expression nativer humaner OB nachgewiesen werden. Hingegen wurde die OPG-Expression durch Zugabe des IL6-spezifischen Antikörpers Anti-IL6 signifikant reduziert. Die Divergenz zu den Erkenntnissen von Sanchez et al. und Liu et al. könnte Resultat der verwendeten murinen Zellen und den zugrundeliegenden Versuchsdurchführungen sein. Die kompressionsbedingte Dynamik von IL6 und OPG in OB wurde durch Sanchez et al. über einen Zeitraum von 8 h evaluiert. Liu et al. exponierten die OB für 24 h mit den entsprechenden Reagenzien, während die hier vorliegenden Versuchsansätze die Exposition der OB mit IL6 und Anti-IL6 über einen Zeitraum von 4 Tagen betrachteten. Es ist anzunehmen, dass sich über die Inkubationszeit die Dynamik der betrachteten Parameter erheblich ändert. Auch Kuebart et al. konnten eine reduzierte OPG-Expression unter dem Einfluss von IL6 nachweisen. Die zugrundeliegende Versuchsreihe unterscheidet sich jedoch an entscheidenden Stellen von dieser Arbeit. Zum einen wurden OB analysiert, welche über 21 Tage osteogen differenziert wurden, wohingegen die Ergebnisse dieser Arbeit auf der Untersuchung nativer Osteoblasten basieren. Zum anderen erfolgte die Inkubation der differenzierten OB durch Kuebart et al. mit einer fünffach höheren IL6-Konzentration (250 U/ml) (202). Darüber hinaus wurde in vorliegender Arbeit zusätzlich der Einfluss von IL6 auf die Zellzahl der OB untersucht, um auszuschließen, dass veränderte OPG-Expressionslevel durch eine erhöhte Gesamtzellzahl bedingt sein könnten. Eine möglicherweise veränderte Zellzahl der

OB-Kulturen nach osteogener Differenzierung wurde in anderen Arbeiten nicht thematisiert. Ferner könnte die Arbeit mit primären humanen OB Ursache der abweichenden Erkenntnisse sein. In dieser Versuchsreihe wurden sowohl $OB T \leq -2,5$, $OB T \geq -1$ als auch OB ohne vorliegende DXA-Messung verwendet. Um eine Verzerrung der Ergebnisse zu minimieren, wurde der Einfluss der Zytokine (IL6, IL8 und ANG) und deren spezifischen Inhibitoren in vorliegender Arbeit jeweils an Replikaten identischer Zellkulturen getestet und ausgewertet. Jede zugeführte Spender*innenkultur wurde auf drei Teilversuche aufgeteilt: eine Gruppe als Kontrolle, eine Gruppe unter dem Einfluss der Zytokine und eine weitere Gruppe unter dem Einfluss der spezifischen Inhibitoren. Die Auswertung basierte auf der prozentualen Veränderung in den behandelten Kulturen, wobei die jeweilige Kontrollgruppe der einzelnen Spender*innenkultur als Referenzwert diente. Trotz dieses standardisierten Vorgehens muss davon ausgegangen werden, dass interindividuelle Unterschiede der Spender*innen der OB in Geschlecht, Alter oder Vorerkrankungen einen relevanten Einfluss auf die resultierenden Ergebnisse nehmen.

Die Zusammenschau der hier gezeigten Ergebnisse und der vorhandenen Literatur erschweren eine endgültige Interpretation der Bedeutung von IL6 für die OPG-Expression im Rahmen der Osteoporose. Der Einfluss von IL6 auf die OPG-Expression scheint einer starken Konzentrationsabhängigkeit zu unterliegen und zusätzlich durch die Expositionszeit bedingt zu sein. Unter der Annahme, dass IL6 die OPG-Expression fördert, könnten $OB T \leq -2,5$ durch eine vermehrte IL6-Expression einen osteoprotektiven Effekt vermitteln und die Resorptionsprozesse im Rahmen der Osteoporose durch eine zugunsten von OPG modifizierte RANKL/OPG-Ratio abschwächen. Sollte IL6 hingegen direkt oder indirekt zu einer Reduktion der OPG-Expression führen, würde dies auf eine Beschleunigung der Resorptionsprozesse durch das von $OB T \leq -2,5$ vermehrt exprimierte IL6 hinweisen.

Einfluss von IL8 und Reparixin auf die OPG-Expression in Osteoblasten

IL8 beeinflusst das RANKL/RANK/OPG-System. Es konnte bereits durch Bendre et al. gezeigt werden, dass in *stromal osteoblastic cells* unter dem Einfluss von rekombinantem humanem IL8 die RANKL-mRNA-Expression sowie die RANKL-Proteinexpression stimuliert werden (112). Dadurch modifiziert IL8 die RANKL/OPG-Ratio zugunsten von RANKL und wirkt resorptionsfördernd. In der aktuell vorhandenen Fachliteratur finden sich bislang keine Hinweise darauf, dass die OPG-Expression in OB durch IL8 modifiziert wird.

In vorliegender Arbeit konnte gezeigt werden, dass IL8 in primären humanen OB keinen Einfluss auf die OPG-Expression nimmt. Auch wurde die Zellzahl der OB durch die zugegebene Konzentration von 100 U im Vergleich zu den Kontrollgruppen nicht beeinflusst. Jedoch führte die Zugabe des IL8-spezifischen Inhibitors Reparixin zu einer signifikanten Reduktion der IL8-

Expression bei nicht modifizierter Zellzahl der OB. Die Anwesenheit von IL8 scheint in dieser Konstellation eine Voraussetzung für eine suffiziente Expression von OPG zu sein. Unter der Annahme, dass IL8 durch OB $T \leq -2,5$ signifikant vermindert exprimiert wird, könnte dies zu einer Modifikation der RANKL/OPG-Ratio zuungunsten von OPG führen und so Resorptionsprozesse begünstigen. Bei dieser Interpretation wird allerdings außer Acht gelassen, dass auch die RANKL-Expression durch IL8 positiv beeinflusst wird. Um die genauen Auswirkungen der differentiellen IL8-Expression von OB $T \leq -2,5$ auf das RANKL/RANK/OPG-System im Rahmen der Osteoporose zu identifizieren, ist weiterführende Forschung erforderlich.

Einfluss von ANG und Anti-ANG auf die OPG-Expression in Osteoblasten

Das RANKL/RANK/OPG-System steht in einem engen Zusammenhang mit der Physiologie und den pathologischen Prozessen von Endothelzellen (203). OPG ist hierbei an der zytoskelettalen Reorganisation von Endothelzellen beteiligt und vermittelt einen pro-angiogenen Effekt (204, 205). Obwohl der Einfluss des RANKL/RANK/OPG-Systems auf die Angiogenese im Zentrum aktueller Forschung steht, sind bislang keine Arbeiten zu dem Einfluss von ANG auf die OPG-Expression in OB vorhanden.

In der vorliegenden Arbeit konnte interessanterweise demonstriert werden, dass ANG einen signifikant inhibierenden Effekt auf die *in vitro* OPG-Expression in nativen OB hat. Die Inhibition von ANG durch den spezifischen Inhibitor Anti-ANG zeigte sich ohne Auswirkung auf die OPG-Expression in OB. Da OB $T \leq -2,5$ signifikant weniger ANG exprimierten, könnte hierdurch die OPG-Expression enthemmt werden. Dies würde durch eine Modifikation der RANKL/OPG-Ratio zugunsten von OPG einen osteoprotektiven Effekt vermitteln.

Im Gegensatz hierzu muss beachtet werden, dass durch die reduzierte ANG-Expression durch OB $T \leq -2,5$ ein relevanter pro-angiogener Faktor fehlt und dies die kapilläre Blutversorgung des BRC beeinträchtigen könnte. Da die suffiziente Blutversorgung für den Knochenmetabolismus unabdingbar ist (89, 90), würde eine reduzierte ANG-Expression den physiologischen Knochenumbau relevant einschränken und den Krankheitsprogress der Osteoporose begünstigen.

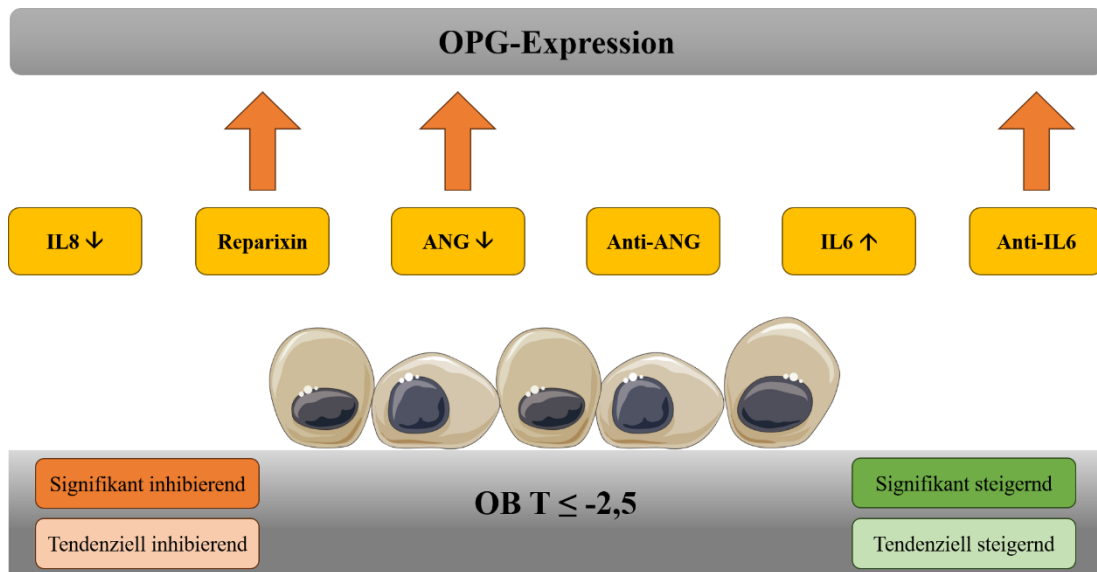


Abb. 48: Einfluss differentiell exprimierter Faktoren in $OB T \leq -2,5$ und spezifischer Inhibitoren auf die OPG-Expression in humanen Osteoblasten.

Osteoblasten osteoporotischer Patient*innen ($OB T \leq -2,5$), Interleukin 6 (IL6), Interleukin 8 (IL8), Angiogenin (ANG). IL8 und ANG wurden durch $OB T \leq -2,5$ vermindert exprimiert. IL6 wurde durch $OB T \leq -2,5$ verstärkt exprimiert. Es zeigte sich ein signifikant inhibierender Effekt von Reparixin, ANG und Anti-IL6 auf die OPG-Expression in humanen Osteoblasten.

Abb. 48 zeigt eine zusammenfassende Darstellung der vorliegenden Ergebnisse. Hervorzuheben ist, dass der Einfluss der differentiell exprimierten Faktoren in $OB T \leq -2,5$ auf die OPG-Expression auf Basis der vorhandenen Kulturen primärer OB untersucht wurde. Die Untersuchungsreihe zur OPG-Expression umfasste dementsprechend OB osteoporotischer Patient*innen, nicht-osteoporotischer Patient*innen und OB-Kulturen ohne vorliegende Knochendichtebestimmung. Mögliche interindividuelle Unterschiede der Spender*innen stellen somit eine Limitation der getroffenen Aussagen dar. Um die beschriebenen Effekte der differentiell exprimierten Faktoren in $OB T \leq -2,5$ zu bestätigen, sollte die Versuchsreihe unbedingt mit OB osteoporotischer und nicht-osteoporotischer Spender*innen sowie gegebenenfalls an standardisierten murinen Zellreihen wiederholt werden.

4.5. Schlussfolgerung

Die vorliegende Arbeit evaluierte die Expression Angiogenese-relevanter Parameter in Osteoblasten von Osteoporosepatient*innen ($OB T \leq -2,5$) entlang folgender Fragestellungen:

1. Unterscheidet sich das Expressionsmuster von IL6, IL8, ANG, VEGF, CHI3L1 und HIF-1 α in $OB T \leq -2,5$ im Vergleich zu nicht osteoporotischen Kontrollgruppen?
2. Beeinflussen $OB T \leq -2,5$ die Proliferation und Migration humaner Endothelzellen?
3. Welchen Einfluss nehmen potentiell differentiell exprimierte Faktoren in $OB T \leq -2,5$ auf das Migrationsverhalten humaner Endothelzellen?
4. Welchen Einfluss nehmen potentiell differentiell exprimierte Faktoren in $OB T \leq -2,5$ auf die OPG-Expression humaner OB?

Auf der Grundlage der zugrundeliegenden Fragestellungen, den hier gezeigten Ergebnissen und der vorhandenen Literatur leiten sich folgende Aussagen ab:

$OB T \leq -2,5$ weisen ein signifikant differentielles Expressionsmuster der Angiogenese-relevanten Faktoren IL6, IL8 und ANG auf. Es konnte gezeigt werden, dass in $OB T \leq -2,5$ im Vergleich zu einer nicht-osteoporotischen Kontrollgruppe signifikant mehr IL6 exprimiert wurde. Die Expression von IL8 und ANG durch $OB T \leq -2,5$ war hingegen signifikant reduziert. Im Hinblick auf das *Osteogenesis-Angiogenesis Coupling* ist anzunehmen, dass sich diese differentielle Expression von IL6, IL8 und ANG direkt auf die Angiogenese und somit die Blutversorgung des Knochens auswirkt.

$OB T \leq -2,5$ wirken sich positiv auf die Proliferation und Migration humaner Endothelzellen aus. In den durchgeführten Versuchen zeigte konditioniertes Medium aus Kulturen von $OB T \leq -2,5$ (KM $T \leq -2,5$) einen proliferations- und migrationsfördernden Einfluss auf Endothelzellen des Typs EA.hy 926. Die pro-angiogenen Effekte von KM $T \leq -2,5$ deuten auf eine reaktive Steigerung der Angiogenese im Pathomechanismus der Osteoporose hin, um eine suffiziente Versorgung der betroffenen Knochen sicherzustellen.

Die differentiell exprimierten Faktoren in $OB T \leq -2,5$ beeinflussen das Migrationsverhalten humaner Endothelzellen des Typs EA.hy 926. IL6 und IL8 führten zu einer reduzierten Migrationskapazität. ANG steigerte die Migrationskapazität der Endothelzellen. Es ist anzunehmen, dass das Expressionsmuster Angiogenese-relevanter Faktoren in $OB T \leq -2,5$ direkten Einfluss auf die Blutversorgung betroffener Knochen nimmt. Im Rahmen dieser Arbeit war es jedoch nicht vollumfänglich möglich, den pro-angiogenen Einfluss von KM $T \leq -2,5$ den einzelnen differentiell exprimierten Faktoren IL6, IL8 oder ANG zuzuordnen.

Die differentiell exprimierten Faktoren in $OB T \leq -2,5$ beeinflussen die OPG-Expression in humanen OB. Unter dem Einfluss von ANG zeigte sich eine reduzierte OPG-Expression bei unveränderter Zellzahl der OB gegenüber den Kontrollgruppen. Die differentielle Expression Angiogenese-relevanter Faktoren in $OB T \leq -2,5$ beeinflusst somit nicht nur die Prozesse der Angiogenese, sondern greift zudem in die Regulation des RANK/RANKL/OPG-Systems ein. Dies beeinflusst maßgeblich die zelluläre Feinregulation des Knochenmetabolismus.

Die Zusammenschau der Ergebnisse legt nahe, dass der Pathomechanismus der Osteoporose auf zellulärer Ebene durch ein verändertes Expressionsmuster Angiogenese-relevanter Faktoren durch die OB maßgeblich mitbeeinflusst wird. Dies umfasst eine Modifikation des *Osteogenesis-Angiogenesis Couplings* und die Störung der Feinregulation des RANK/RANKL/OPG-Systems. Ob die differentielle Expression Angiogenese-relevanter Faktoren in $OB T \leq -2,5$ in ihrer Gesamtheit pro-resorptive Mechanismen begünstigt und so den Krankheitsprogress der Osteoporose beschleunigt oder osteoprotektiv wirkt, ist an dieser Stelle nicht zu beantworten. Dies liegt an der Komplexität der zugrundeliegenden Systeme und den teils pleiotropen Effekten der untersuchten Faktoren auf den Knochenmetabolismus. Darüber hinaus ist die Verfügbarkeit aktueller wissenschaftlicher Literatur als Interpretationsgrundlage noch stark eingeschränkt. Hier ist weiterführende Forschung notwendig, um ein kohärentes Gesamtbild aufzeigen zu können.

Die vorliegende Arbeit trägt dazu bei, die Pathomechanismen der Osteoporose auf zellulärer Ebene differenzierter zu verstehen, relevante Faktoren zu benennen und dabei insbesondere die Bedeutung der OB hinsichtlich ihres Einflusses auf die Angiogenese und das RANK/RANKL/OPG-System zu beleuchten. Die Erkenntnisse dieser Arbeit liefern damit wichtige Ansätze für ein tieferes Verständnis der zugrundeliegenden zellulären Mechanismen. Dies eröffnet Perspektiven für zukünftige Forschungsarbeiten. Insbesondere die Beeinflussung der Angiogenese und des RANK/RANKL/OPG-System durch $OB T \leq -2,5$ stellt einen zentralen Ausgangspunkt dar, um mögliche therapeutische Strategien zur gezielten Modulation des Knochenmetabolismus weiterzuentwickeln. Die Ergebnisse können somit als Grundlage dienen, um neue Ansätze zur Prävention und Behandlung der Osteoporose zu entwickeln.

5. Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Zimmermann R, Oezel L, Windolf J, Grassmann J, Grotheer V, Maus U. Das differentielle Expressionsmuster von Interleukin-6, Interleukin-8 und Angiogenin in osteoporotischen Osteoblasten beeinflusst in Zellkulturen die OPG-Expression. *Osteologie*. 2023;32(03):V 1.5.
2. Kanis JA, Cooper C, Rizzoli R, Reginster JY. European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. *Osteoporos Int*. 2019;30(1):3-44.
3. Gesellschaften Dddwo. Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der OSTEOPOROSE bei postmenopausalen Frauen und bei Männern. 2017.
4. e.V. DO. S3-Leitlinie Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der OSTEOPOROSE bei postmenopausalen Frauen und bei Männern ab dem 50.Lebensjahr. 2023;Langfassung V 2.1.
5. Blake GM, Fogelman I. The role of DXA bone density scans in the diagnosis and treatment of osteoporosis. *Postgrad Med J*. 2007;83(982):509-17.
6. Sawicki P, Tałałaj M, Życińska K, Zgliczyński WS, Wierzba W. Current Applications and Selected Technical Details of Dual-Energy X-Ray Absorptiometry. *Med Sci Monit*. 2021;27:e930839.
7. Diagnosis of osteoporosis in men, premenopausal women, and children. *J Clin Densitom*. 2004;7(1):17-26.
8. Sözen T, Özişik L, Başaran N. An overview and management of osteoporosis. *Eur J Rheumatol*. 2017;4(1):46-56.
9. Xiao PL, Cui AY, Hsu CJ, Peng R, Jiang N, Xu XH, et al. Global, regional prevalence, and risk factors of osteoporosis according to the World Health Organization diagnostic criteria: a systematic review and meta-analysis. *Osteoporos Int*. 2022;33(10):2137-53.
10. Hernlund E, Svedbom A, Ivergård M, Compston J, Cooper C, Stenmark J, et al. Osteoporosis in the European Union: medical management, epidemiology and economic burden. A report prepared in collaboration with the International Osteoporosis Foundation (IOF) and the European Federation of Pharmaceutical Industry Associations (EFPIA). *Arch Osteoporos*. 2013;8(1):136.
11. Fuchs J, Scheidt-Nave C, Kuhnert R. 12-Monats-Prävalenz von Osteoporose in Deutschland. Robert Koch-Institut, Epidemiologie und Gesundheitsberichterstattung; 2017.
12. Stein E, Shane E. Secondary osteoporosis. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2003;32(1):115-34, vii.
13. Herold G. *Innere Medizin* 2021/2021.
14. Felsenberg D, Maurer L. Osteoporose. In: Suttorp N, Möckel M, Siegmund B, Dietel M, editors. *Harrisons Innere Medizin*. 20. Auflage ed: ABW Verlag; 2020.
15. Hart NH, Newton RU, Tan J, Rantalainen T, Chivers P, Siafarikas A, et al. Biological basis of bone strength: anatomy, physiology and measurement. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2020;20(3):347-71.

16. Fonseca H, Moreira-Gonçalves D, Coriolano HJ, Duarte JA. Bone quality: the determinants of bone strength and fragility. *Sports Med.* 2014;44(1):37-53.
17. Tritos NA, Klibanski A. Effects of Growth Hormone on Bone. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2016;138:193-211.
18. Khosla S, Monroe DG. Regulation of Bone Metabolism by Sex Steroids. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2018;8(1).
19. Goltzman D. Physiology of Parathyroid Hormone. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2018;47(4):743-58.
20. Peichl P. Knochenstoffwechsel und Vitamin D. *rheuma plus.* 2014;13(3):18-21.
21. Venken K, Callewaert F, Boonen S, Vanderschueren D. Sex hormones, their receptors and bone health. *Osteoporosis International.* 2008;19(11):1517-25.
22. Clarke B. Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2008;3 Suppl 3(Suppl 3):S131-9.
23. Raggatt LJ, Partridge NC. Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. *J Biol Chem.* 2010;285(33):25103-8.
24. Schmidt W. Knochen. In: Aumüller G, Aust G, Conrad A, Engele J, Kirsch J, Maio G, et al., editors. *Duale Reihe Anatomie. 5., korrigierte Auflage ed: Georg Thieme Verlag KG; 2020.*
25. Lüllmann-Rauch R, Asan E. Knochen. In: Lüllmann-Rauch R, Asan E, editors. *Taschenlehrbuch Histologie. 6., vollständig überarbeitete Auflage ed: Georg Thieme Verlag; 2019.*
26. Ulfing N. Das Knochengewebe. In: Ulfing N, editor. *Kurzlehrbuch Histologie. 5., unveränderte Auflage ed: Georg Thieme Verlag KG; 2019.*
27. Oftadeh R, Perez-Viloria M, Villa-Camacho JC, Vaziri A, Nazarian A. Biomechanics and mechanobiology of trabecular bone: a review. *J Biomech Eng.* 2015;137(1):0108021-01080215.
28. Buck DW, 2nd, Dumanian GA. Bone biology and physiology: Part I. The fundamentals. *Plast Reconstr Surg.* 2012;129(6):1314-20.
29. Bayraktar HH, Morgan EF, Niebur GL, Morris GE, Wong EK, Keaveny TM. Comparison of the elastic and yield properties of human femoral trabecular and cortical bone tissue. *J Biomech.* 2004;37(1):27-35.
30. Boyce BF. Advances in the regulation of osteoclasts and osteoclast functions. *J Dent Res.* 2013;92(10):860-7.
31. Florencio-Silva R, Sasso GR, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *Biomed Res Int.* 2015;2015:421746.
32. Boyce BF, Hughes DE, Wright KR, Xing L, Dai A. Recent advances in bone biology provide insight into the pathogenesis of bone diseases. *Lab Invest.* 1999;79(2):83-94.
33. Omi M, Mishina Y. Roles of osteoclasts in alveolar bone remodeling. *Genesis.* 2022;60(8-9):e23490.

34. Boyce BF, Yao Z, Xing L. Osteoclasts have multiple roles in bone in addition to bone resorption. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2009;19(3):171-80.
35. Veis DJ, O'Brien CA. Osteoclasts, Master Sculptors of Bone. *Annu Rev Pathol.* 2023;18:257-81.
36. Mulari M, Vääräniemi J, Väänänen HK. Intracellular membrane trafficking in bone resorbing osteoclasts. *Microsc Res Tech.* 2003;61(6):496-503.
37. Arana-Chavez VE, Bradaschia-Correa V. Clastic cells: mineralized tissue resorption in health and disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009;41(3):446-50.
38. Capulli M, Paone R, Rucci N. Osteoblast and osteocyte: Games without frontiers. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 2014;561:3-12.
39. Ponzetti M, Rucci N. Osteoblast Differentiation and Signaling: Established Concepts and Emerging Topics. *Int J Mol Sci.* 2021;22(13).
40. Anderson HC. Matrix vesicles and calcification. *Current Rheumatology Reports.* 2003;5(3):222-6.
41. Bonewald LF. The amazing osteocyte. *J Bone Miner Res.* 2011;26(2):229-38.
42. Jilka RL, Weinstein RS, Bellido T, Parfitt AM, Manolagas SC. Osteoblast programmed cell death (apoptosis): modulation by growth factors and cytokines. *J Bone Miner Res.* 1998;13(5):793-802.
43. Miller SC, de Saint-Georges L, Bowman BM, Jee WS. Bone lining cells: structure and function. *Scanning Microsc.* 1989;3(3):953-60; discussion 60-1.
44. del Fattore A, Teti A. The tight Relationship between Osteoclasts and the Immune System. *Inflammation and Allergy - Drug Targets.* 2012;11(3):181-7.
45. Everts V, Delaissé JM, Korper W, Jansen DC, Tigchelaar-Gutter W, Saftig P, et al. The bone lining cell: its role in cleaning Howship's lacunae and initiating bone formation. *J Bone Miner Res.* 2002;17(1):77-90.
46. Matic I, Matthews BG, Wang X, Dymont NA, Worthley DL, Rowe DW, et al. Quiescent Bone Lining Cells Are a Major Source of Osteoblasts During Adulthood. *Stem Cells.* 2016;34(12):2930-42.
47. Dobnig H, Turner RT. Evidence that intermittent treatment with parathyroid hormone increases bone formation in adult rats by activation of bone lining cells. *Endocrinology.* 1995;136(8):3632-8.
48. Turner RT, Iwaniec UT, Wong CP, Lindenmaier LB, Wagner LA, Branscum AJ, et al. Acute exposure to high dose γ -radiation results in transient activation of bone lining cells. *Bone.* 2013;57(1):164-73.
49. Buenzli PR, Sims NA. Quantifying the osteocyte network in the human skeleton. *Bone.* 2015;75:144-50.
50. Manolagas SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev.* 2000;21(2):115-37.

51. Dallas SL, Prideaux M, Bonewald LF. The osteocyte: an endocrine cell ... and more. *Endocr Rev.* 2013;34(5):658-90.
52. Atkins GJ, Findlay DM. Osteocyte regulation of bone mineral: a little give and take. *Osteoporos Int.* 2012;23(8):2067-79.
53. Robling AG, Bonewald LF. The Osteocyte: New Insights. *Annu Rev Physiol.* 2020;82:485-506.
54. Dallas SL, Veno PA. Live imaging of bone cell and organ cultures. *Methods Mol Biol.* 2012;816:425-57.
55. Kenkre JS, Bassett J. The bone remodelling cycle. *Ann Clin Biochem.* 2018;55(3):308-27.
56. Eriksen EF. Cellular mechanisms of bone remodeling. *Rev Endocr Metab Disord.* 2010;11(4):219-27.
57. Feng X, McDonald JM. Disorders of bone remodeling. *Annu Rev Pathol.* 2011;6:121-45.
58. Frost HM. Skeletal structural adaptations to mechanical usage (SATMU): 2. Redefining Wolff's law: the remodeling problem. *Anat Rec.* 1990;226(4):414-22.
59. Gruber R. Molecular and cellular basis of bone resorption. *Wien Med Wochenschr.* 2015;165(3-4):48-53.
60. Andersen TL, Sondergaard TE, Skorzynska KE, Dagnaes-Hansen F, Plesner TL, Hauge EM, et al. A physical mechanism for coupling bone resorption and formation in adult human bone. *Am J Pathol.* 2009;174(1):239-47.
61. Hauge EM, Qvesel D, Eriksen EF, Mosekilde L, Melsen F. Cancellous bone remodeling occurs in specialized compartments lined by cells expressing osteoblastic markers. *J Bone Miner Res.* 2001;16(9):1575-82.
62. Goldring SR. The osteocyte: key player in regulating bone turnover. *RMD Open.* 2015;1(Suppl 1):e000049.
63. Bonewald LF. Osteocytes as dynamic multifunctional cells. *Ann N Y Acad Sci.* 2007;1116:281-90.
64. Chen H, Senda T, Kubo KY. The osteocyte plays multiple roles in bone remodeling and mineral homeostasis. *Med Mol Morphol.* 2015;48(2):61-8.
65. Verborgt O, Tatton NA, Majeska RJ, Schaffler MB. Spatial distribution of Bax and Bcl-2 in osteocytes after bone fatigue: complementary roles in bone remodeling regulation? *J Bone Miner Res.* 2002;17(5):907-14.
66. Kennedy OD, Herman BC, Laudier DM, Majeska RJ, Sun HB, Schaffler MB. Activation of resorption in fatigue-loaded bone involves both apoptosis and active pro-osteoclastogenic signaling by distinct osteocyte populations. *Bone.* 2012;50(5):1115-22.
67. Yasuda H. Discovery of the RANKL/RANK/OPG system. *J Bone Miner Metab.* 2021;39(1):2-11.

68. De Leon-Oliva D, Barrena-Blázquez S, Jiménez-Álvarez L, Fraile-Martínez O, García-Montero C, López-González L, et al. The RANK-RANKL-OPG System: A Multifaceted Regulator of Homeostasis, Immunity, and Cancer. *Medicina (Kaunas)*. 2023;59(10).
69. Boyce BF, Xing L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch Biochem Biophys*. 2008;473(2):139-46.
70. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Mochizuki SI, Yano K, Fujise N, et al. Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro. *Endocrinology*. 1998;139(3):1329-37.
71. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Lüthy R, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*. 1997;89(2):309-19.
72. Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, Tan HL, Timms E, Capparelli C, et al. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature*. 1999;397(6717):315-23.
73. Silva I, Branco JC. Rank/Rankl/opg: literature review. *Acta Reumatol Port*. 2011;36(3):209-18.
74. Whyte MP, Obrecht SE, Finnegan PM, Jones JL, Podgornik MN, McAlister WH, et al. Osteoprotegerin deficiency and juvenile Paget's disease. *N Engl J Med*. 2002;347(3):175-84.
75. Hofbauer LC, Schoppet M. Clinical implications of the osteoprotegerin/RANKL/RANK system for bone and vascular diseases. *Jama*. 2004;292(4):490-5.
76. Tobeiha M, Moghadasian MH, Amin N, Jafarnejad S. RANKL/RANK/OPG Pathway: A Mechanism Involved in Exercise-Induced Bone Remodeling. *Biomed Res Int*. 2020;2020:6910312.
77. Nakashima T, Kobayashi Y, Yamasaki S, Kawakami A, Eguchi K, Sasaki H, et al. Protein expression and functional difference of membrane-bound and soluble receptor activator of NF-kappaB ligand: modulation of the expression by osteotropic factors and cytokines. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;275(3):768-75.
78. Ikeda T, Kasai M, Utsuyama M, Hirokawa K. Determination of three isoforms of the receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and their differential expression in bone and thymus. *Endocrinology*. 2001;142(4):1419-26.
79. Wright HL, McCarthy HS, Middleton J, Marshall MJ. RANK, RANKL and osteoprotegerin in bone biology and disease. *Curr Rev Musculoskelet Med*. 2009;2(1):56-64.
80. Hsu H, Lacey DL, Dunstan CR, Solovyev I, Colombero A, Timms E, et al. Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(7):3540-5.
81. Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*. 1998;93(2):165-76.
82. Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C, et al. osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev*. 1998;12(9):1260-8.

83. Li J, Sarosi I, Yan XQ, Morony S, Capparelli C, Tan HL, et al. RANK is the intrinsic hematopoietic cell surface receptor that controls osteoclastogenesis and regulation of bone mass and calcium metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(4):1566-71.
84. Vega D, Maalouf NM, Sakhaee K. CLINICAL Review #: the role of receptor activator of nuclear factor-kappaB (RANK)/RANK ligand/osteoprotegerin: clinical implications. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92(12):4514-21.
85. Jura-Półtorak A, Szeremeta A, Olczyk K, Zoń-Giebel A, Komosińska-Vassev K. Bone Metabolism and RANKL/OPG Ratio in Rheumatoid Arthritis Women Treated with TNF- α Inhibitors. *J Clin Med*. 2021;10(13).
86. Theoleyre S, Wittrant Y, Tat SK, Fortun Y, Redini F, Heymann D. The molecular triad OPG/RANK/RANKL: involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2004;15(6):457-75.
87. Felsenberg D, Maurer L. Remodeling und Modeling. In: Suttorp N, Möckel M, Siegmund B, Dietel M, editors. *Harrisons Innere Medizin*. 20. Auflage ed: ABW Verlag; 2020.
88. Tomlinson RE, Silva MJ. Skeletal Blood Flow in Bone Repair and Maintenance. *Bone Res*. 2013;1(4):311-22.
89. Stegen S, van Gestel N, Carmeliet G. Bringing new life to damaged bone: The importance of angiogenesis in bone repair and regeneration. *Bone*. 2015;70:19-27.
90. Watson EC, Adams RH. Biology of Bone: The Vasculature of the Skeletal System. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2018;8(7).
91. Kristensen HB, Andersen TL, Marcussen N, Rolighed L, Delaisse JM. Increased presence of capillaries next to remodeling sites in adult human cancellous bone. *J Bone Miner Res*. 2013;28(3):574-85.
92. Griffith JF, Yeung DK, Tsang PH, Choi KC, Kwok TC, Ahuja AT, et al. Compromised bone marrow perfusion in osteoporosis. *J Bone Miner Res*. 2008;23(7):1068-75.
93. Vogt MT, Cauley JA, Kuller LH, Nevitt MC. Bone mineral density and blood flow to the lower extremities: the study of osteoporotic fractures. *J Bone Miner Res*. 1997;12(2):283-9.
94. Kusumbe AP, Ramasamy SK, Adams RH. Coupling of angiogenesis and osteogenesis by a specific vessel subtype in bone. *Nature*. 2014;507(7492):323-8.
95. Ramasamy SK, Kusumbe AP, Itkin T, Gur-Cohen S, Lapidot T, Adams RH. Regulation of Hematopoiesis and Osteogenesis by Blood Vessel-Derived Signals. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 2016;32(1):649-75.
96. Wang L, Zhou F, Zhang P, Wang H, Qu Z, Jia P, et al. Human type H vessels are a sensitive biomarker of bone mass. *Cell Death Dis*. 2017;8(5):e2760.
97. Neag G, Finlay M, Naylor AJ. The Cellular Choreography of Osteoblast Angiotropism in Bone Development and Homeostasis. *Int J Mol Sci*. 2021;22(14).
98. Ginaldi L, De Martinis M. Osteoimmunology and Beyond. *Curr Med Chem*. 2016;23(33):3754-74.
99. Nordan RP, Richards CD, Gauldie J. Measurement of interleukin 6. *Curr Protoc Immunol*. 2001;Chapter 6:Unit 6.

100. Sims NA. Influences of the IL-6 cytokine family on bone structure and function. *Cytokine*. 2021;146:155655.
101. Pietschmann P, Mechtcheriakova D, Meshcheryakova A, Foger-Samwald U, Ellinger I. Immunology of Osteoporosis: A Mini-Review. *Gerontology*. 2016;62(2):128-37.
102. Ishimi Y, Miyaura C, Jin CH, Akatsu T, Abe E, Nakamura Y, et al. IL-6 is produced by osteoblasts and induces bone resorption. *J Immunol*. 1990;145(10):3297-303.
103. Francis J, Hughes GLH. Interleukin-6 inhibits bone formation in vitro. *Bone and Mineral*. 1993;21(1):21-8.
104. Palmqvist P, Persson E, Conaway HH, Lerner UH. IL-6, leukemia inhibitory factor, and oncostatin M stimulate bone resorption and regulate the expression of receptor activator of NF-kappa B ligand, osteoprotegerin, and receptor activator of NF-kappa B in mouse calvariae. *J Immunol*. 2002;169(6):3353-62.
105. Schett G. Effects of inflammatory and anti-inflammatory cytokines on the bone. *Eur J Clin Invest*. 2011;41(12):1361-6.
106. Prystaz K, Kaiser K, Kovtun A, Haffner-Luntzer M, Fischer V, Rapp AE, et al. Distinct Effects of IL-6 Classic and Trans-Signaling in Bone Fracture Healing. *The American Journal of Pathology*. 2018;188(2):474-90.
107. Cheung WY, Liu C, Tonelli-Zasarsky RM, Simmons CA, You L. Osteocyte apoptosis is mechanically regulated and induces angiogenesis in vitro. *J Orthop Res*. 2011;29(4):523-30.
108. Cohen T, Nahari D, Cerem LW, Neufeld G, Levi BZ. Interleukin 6 induces the expression of vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem*. 1996;271(2):736-41.
109. Wedemeyer MJ, Mahn SA, Getschman AE, Crawford KS, Peterson FC, Marchese A, et al. The chemokine X-factor: Structure-function analysis of the CXC motif at CXCR4 and ACKR3. *J Biol Chem*. 2020;295(40):13927-39.
110. Belperio JA, Keane MP, Arenberg DA, Addison CL, Ehlert JE, Burdick MD, et al. CXC chemokines in angiogenesis. *J Leukoc Biol*. 2000;68(1):1-8.
111. Li A, Dubey S, Varney ML, Dave BJ, Singh RK. IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis. *J Immunol*. 2003;170(6):3369-76.
112. Bendre MS, Montague DC, Peery T, Akel NS, Gaddy D, Suva LJ. Interleukin-8 stimulation of osteoclastogenesis and bone resorption is a mechanism for the increased osteolysis of metastatic bone disease. *Bone*. 2003;33(1):28-37.
113. Amarasekara DS, Yun H, Kim S, Lee N, Kim H, Rho J. Regulation of Osteoclast Differentiation by Cytokine Networks. *Immune Netw*. 2018;18(1):e8.
114. Cedeno-Veloz B, Lozano-Vicario L, Rodríguez-García A, Zambom-Ferraresi F, Galbete A, Fernández-Irigoyen J, et al. Serum biomarkers related to frailty predict negative outcomes in older adults with hip fracture. *J Endocrinol Invest*. 2023.
115. Fett JW, Strydom DJ, Lobb RR, Alderman EM, Bethune JL, Riordan JF, et al. Isolation and characterization of angiogenin, an angiogenic protein from human carcinoma cells. *Biochemistry*. 1985;24(20):5480-6.

116. Kishimoto K, Liu S, Tsuji T, Olson KA, Hu GF. Endogenous angiogenin in endothelial cells is a general requirement for cell proliferation and angiogenesis. *Oncogene*. 2005;24(3):445-56.
117. Sheng J, Xu Z. Three decades of research on angiogenin: a review and perspective. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2016;48(5):399-410.
118. Melincovici CS, Boşca AB, Şuşman S, Mărginean M, Mişu C, Istrate M, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) - key factor in normal and pathological angiogenesis. *Rom J Morphol Embryol*. 2018;59(2):455-67.
119. Shibuya M. VEGF-VEGFR Signals in Health and Disease. *Biomol Ther (Seoul)*. 2014;22(1):1-9.
120. Huang H, Ma L, Kyrkanides S. Effects of vascular endothelial growth factor on osteoblasts and osteoclasts. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2016;149(3):366-73.
121. Hu K, Olsen BR. Osteoblast-derived VEGF regulates osteoblast differentiation and bone formation during bone repair. *J Clin Invest*. 2016;126(2):509-26.
122. Street J, Lenehan B. Vascular endothelial growth factor regulates osteoblast survival - evidence for an autocrine feedback mechanism. *J Orthop Surg Res*. 2009;4:19.
123. Keramaris NC, Calori GM, Nikolaou VS, Schemitsch EH, Giannoudis PV. Fracture vascularity and bone healing: a systematic review of the role of VEGF. *Injury*. 2008;39 Suppl 2:S45-57.
124. Street J, Bao M, deGuzman L, Bunting S, Peale FV, Jr., Ferrara N, et al. Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(15):9656-61.
125. Roslind A, Johansen JS. YKL-40: a novel marker shared by chronic inflammation and oncogenic transformation. *Methods Mol Biol*. 2009;511:159-84.
126. Ohno M, Kida Y, Sakaguchi M, Sugahara Y, Oyama F. Establishment of a quantitative PCR system for discriminating chitinase-like proteins: catalytically inactive breast regression protein-39 and Yml are constitutive genes in mouse lung. *BMC Mol Biol*. 2014;15:23.
127. Rathcke CN, Vestergaard H. YKL-40--an emerging biomarker in cardiovascular disease and diabetes. *Cardiovasc Diabetol*. 2009;8:61.
128. Malinda KM, Ponce L, Kleinman HK, Shackelton LM, Millis AJ. Gp38k, a protein synthesized by vascular smooth muscle cells, stimulates directional migration of human umbilical vein endothelial cells. *Exp Cell Res*. 1999;250(1):168-73.
129. Nishikawa KC, Millis AJ. gp38k (CHI3L1) is a novel adhesion and migration factor for vascular cells. *Exp Cell Res*. 2003;287(1):79-87.
130. Kronborg G, Østergaard C, Weis N, Obel N, Johansen JS, Price PA, et al. Serum Level of YKL-40 is Elevated in Patients with Streptococcus pneumoniae Bacteremia and is Associated with the Outcome of the Disease. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*. 2002;34(5):323-6.
131. Park K-R, Park J-I, Lee S, Yoo K, Kweon G-R, Kwon IK, et al. Chi3L1 is a therapeutic target in bone metabolism and a potential clinical marker in patients with osteoporosis. *Pharmacological Research*. 2022;184:106423.

132. Chen X, Jiao J, He X, Zhang J, Wang H, Xu Y, et al. CHI3L1 regulation of inflammation and the effects on osteogenesis in a Staphylococcus aureus-induced murine model of osteomyelitis. *Febs j.* 2017;284(11):1738-47.
133. Weidemann A, Johnson RS. Biology of HIF-1 α . *Cell Death & Differentiation.* 2008;15(4):621-7.
134. Masoud GN, Li W. HIF-1 α pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy. *Acta Pharm Sin B.* 2015;5(5):378-89.
135. Wan C, Gilbert SR, Wang Y, Cao X, Shen X, Ramaswamy G, et al. Activation of the hypoxia-inducible factor-1 α pathway accelerates bone regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(2):686-91.
136. Arnett TR, Gibbons DC, Utting JC, Orriss IR, Hoebertz A, Rosendaal M, et al. Hypoxia is a major stimulator of osteoclast formation and bone resorption. *J Cell Physiol.* 2003;196(1):2-8.
137. Bie M, Tang Y, Xia Y, Zhang Q, Tian Y, Cheng C, et al. HIF-1 α mediates osteoclast-induced disuse osteoporosis via cytophagia in the femur of mice. *Bone.* 2023;168:116648.
138. Fayed HA, Barakat BM, Elshaer SS, Abdel-Naim AB, Menze ET. Antiosteoporotic activities of isoquercitrin in ovariectomized rats: Role of inhibiting hypoxia inducible factor-1 α . *Eur J Pharmacol.* 2019;865:172785.
139. Wang Y, Wan C, Deng L, Liu X, Cao X, Gilbert SR, et al. The hypoxia-inducible factor alpha pathway couples angiogenesis to osteogenesis during skeletal development. *J Clin Invest.* 2007;117(6):1616-26.
140. Chang J, Jackson SG, Wardale J, Jones SW. Hypoxia modulates the phenotype of osteoblasts isolated from knee osteoarthritis patients, leading to undermineralized bone nodule formation. *Arthritis Rheumatol.* 2014;66(7):1789-99.
141. Edgell CJ, McDonald CC, Graham JB. Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1983;80(12):3734-7.
142. Suarez-Arnedo A, Torres Figueroa F, Clavijo C, Arbeláez P, Cruz JC, Muñoz-Camargo C. An image J plugin for the high throughput image analysis of in vitro scratch wound healing assays. *PLoS One.* 2020;15(7):e0232565.
143. Walsh CA, Birch MA, Fraser WD, Ginty AF, Gallagher JA. Cytokine expression by cultured osteoblasts from patients with osteoporotic fractures. *Int J Exp Pathol.* 2000;81(2):159-63.
144. Gür A, Denli A, Nas K, Cevik R, Karakoc M, Sarac AJ, et al. Possible pathogenetic role of new cytokines in postmenopausal osteoporosis and changes during calcitonin plus calcium therapy. *Rheumatol Int.* 2002;22(5):194-8.
145. Kany S, Vollrath JT, Relja B. Cytokines in Inflammatory Disease. *Int J Mol Sci.* 2019;20(23).
146. Moffett SP, Zmuda JM, Cauley JA, Stone KL, Nevitt MC, Ensrud KE, et al. Association of the G-174C variant in the interleukin-6 promoter region with bone loss and fracture risk in older women. *J Bone Miner Res.* 2004;19(10):1612-8.

147. Fajar JK, Azharuddin A. The association between interleukin 6 -174 G/C gene polymorphism and the risk of osteoporosis: A meta-analysis. *J Taibah Univ Med Sci.* 2017;12(3):212-20.
148. Czerny B, Kaminski A, Kurzawski M, Kotrych D, Safranow K, Dziedziejko V, et al. The association of IL-1beta, IL-2, and IL-6 gene polymorphisms with bone mineral density and osteoporosis in postmenopausal women. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2010;149(1):82-5.
149. Zheng SX, Vrindts Y, Lopez M, De Groote D, Zangerle PF, Collette J, et al. Increase in cytokine production (IL-1 beta, IL-6, TNF-alpha but not IFN-gamma, GM-CSF or LIF) by stimulated whole blood cells in postmenopausal osteoporosis. *Maturitas.* 1997;26(1):63-71.
150. Azizieh F, Raghupathy R, Shehab D, Al-Jarallah K, Gupta R. Cytokine profiles in osteoporosis suggest a proresorptive bias. *Menopause.* 2017;24(9):1057-64.
151. Yan L, Hu R, Tu S, Cheng WJ, Zheng Q, Wang JW, et al. Meta-analysis of association between IL-6 -634C/G polymorphism and osteoporosis. *Genet Mol Res.* 2015;14(4):19225-32.
152. Scheidt-Nave C, Bismar H, Leidig-Bruckner G, Woitge H, Seibel MJ, Ziegler R, et al. Serum interleukin 6 is a major predictor of bone loss in women specific to the first decade past menopause. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86(5):2032-42.
153. Axmann R, Böhm C, Krönke G, Zwerina J, Smolen J, Schett G. Inhibition of interleukin-6 receptor directly blocks osteoclast formation in vitro and in vivo. *Arthritis Rheum.* 2009;60(9):2747-56.
154. Le Goff B, Blanchard F, Berthelot J-M, Heymann D, Maugars Y. Role for interleukin-6 in structural joint damage and systemic bone loss in rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine.* 2010;77(3):201-5.
155. Ralston SH. Analysis of gene expression in human bone biopsies by polymerase chain reaction: evidence for enhanced cytokine expression in postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res.* 1994;9(6):883-90.
156. Bendre MS, Margulies AG, Walser B, Akel NS, Bhattacharya S, Skinner RA, et al. Tumor-derived interleukin-8 stimulates osteolysis independent of the receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand pathway. *Cancer Res.* 2005;65(23):11001-9.
157. Kopesky P, Tiedemann K, Alkekha D, Zechner C, Millard B, Schoeberl B, et al. Autocrine signaling is a key regulatory element during osteoclastogenesis. *Biol Open.* 2014;3(8):767-76.
158. Liu Y, Krishnamurthy A, Hensvold AH, Joshua V, Sun M, Engstrom M, et al. AB0078 Role of IL-8 and Its Receptor in Anti-Citrullinated Protein Antibody Mediated Osteoclastogenesis in RA. *Annals of the Rheumatic Diseases.* 2016;75(Suppl 2):923-.
159. Pavlov N, Frendo JL, Guibourdenche J, Degrelle SA, Evain-Brion D, Badet J. Angiogenin expression during early human placental development; association with blood vessel formation. *Biomed Res Int.* 2014;2014:781632.
160. Matousek J, Soucek J, Riha J, Zankel TR, Benner SA. Immunosuppressive activity of angiogenin in comparison with bovine seminal ribonuclease and pancreatic ribonuclease. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 1995;112(2):235-41.
161. Tello-Montoliu A, Patel JV, Lip GY. Angiogenin: a review of the pathophysiology and potential clinical applications. *J Thromb Haemost.* 2006;4(9):1864-74.

162. van Es MA, Schelhaas HJ, van Vught PW, Ticozzi N, Andersen PM, Groen EJ, et al. Angiogenin variants in Parkinson disease and amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol*. 2011;70(6):964-73.
163. Weiss S, Zimmermann G, Baumgart R, Kasten P, Bidlingmaier M, Henle P. Systemic regulation of angiogenesis and matrix degradation in bone regeneration--distraction osteogenesis compared to rigid fracture healing. *Bone*. 2005;37(6):781-90.
164. Weiss S, Zimmermann G, Pufe T, Varoga D, Henle P. The systemic angiogenic response during bone healing. *Arch Orthop Trauma Surg*. 2009;129(7):989-97.
165. Morita Y, Matsuyama H, Serizawa A, Takeya T, Kawakami H. Identification of angiogenin as the osteoclastic bone resorption-inhibitory factor in bovine milk. *Bone*. 2008;42(2):380-7.
166. Senel K, Baykal T, Seferoglu B, Altas EU, Baygutalp F, Ugur M, et al. Circulating vascular endothelial growth factor concentrations in patients with postmenopausal osteoporosis. *Arch Med Sci*. 2013;9(4):709-12.
167. Cebi H, Akşahin E, Yüksel HY, Celebi L, Aktekin CN, Hapa O, et al. Plasma vascular endothelial growth factor levels are similar in subjects with and without osteoporosis. *Ekleml Hastalik Cerrahisi*. 2010;21(2):91-7.
168. Corrado A, Neve A, Cantatore FP. Expression of vascular endothelial growth factor in normal, osteoarthritic and osteoporotic osteoblasts. *Clin Exp Med*. 2013;13(1):81-4.
169. Johansen JS, Høyer PE, Larsen LA, Price PA, Møllgård K. YKL-40 Protein Expression in the Early Developing Human Musculoskeletal System. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 2007;55(12):1213-28.
170. Johansen JS, Williamson MK, Rice JS, Price PA. Identification of proteins secreted by human osteoblastic cells in culture. *Journal of Bone and Mineral Research*. 1992;7(5):501-12.
171. Wang C, Zhang X, Chen R, Zhu X, Lian N. EGR1 mediates METTL3/m6A/CHI3L1 to promote osteoclastogenesis in osteoporosis. *Genomics*. 2023;115(5):110696.
172. Chen W, Wu P, Yu F, Luo G, Qing L, Tang J. HIF-1 α Regulates Bone Homeostasis and Angiogenesis, Participating in the Occurrence of Bone Metabolic Diseases. *Cells*. 2022;11(22).
173. Shao J, Zhang Y, Yang T, Qi J, Zhang L, Deng L. HIF-1 α disturbs osteoblasts and osteoclasts coupling in bone remodeling by up-regulating OPG expression. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2015;51(8):808-14.
174. Gao X, Xu Z. Mechanisms of action of angiogenin. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2008;40(7):619-24.
175. Yin Y, Tang Q, Xie M, Hu L, Chen L. Insights into the mechanism of vascular endothelial cells on bone biology. *Biosci Rep*. 2021;41(1).
176. Ramasamy SK, Kusumbe AP, Schiller M, Zeuschner D, Bixel MG, Milia C, et al. Blood flow controls bone vascular function and osteogenesis. *Nat Commun*. 2016;7:13601.
177. Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1813(5):878-88.

178. Baran P, Hansen S, Waetzig GH, Akbarzadeh M, Lamertz L, Huber HJ, et al. The balance of interleukin (IL)-6, IL-6·soluble IL-6 receptor (sIL-6R), and IL-6·sIL-6R·sgp130 complexes allows simultaneous classic and trans-signaling. *J Biol Chem.* 2018;293(18):6762-75.
179. Tzeng HE, Tsai CH, Chang ZL, Su CM, Wang SW, Hwang WL, et al. Interleukin-6 induces vascular endothelial growth factor expression and promotes angiogenesis through apoptosis signal-regulating kinase 1 in human osteosarcoma. *Biochem Pharmacol.* 2013;85(4):531-40.
180. Hashizume M, Hayakawa N, Suzuki M, Mihara M. IL-6/sIL-6R trans-signalling, but not TNF-alpha induced angiogenesis in a HUVEC and synovial cell co-culture system. *Rheumatol Int.* 2009;29(12):1449-54.
181. Lindkvist M, Zegeye MM, Grenegård M, Ljungberg LU. Pleiotropic, Unique and Shared Responses Elicited by IL-6 Family Cytokines in Human Vascular Endothelial Cells. *Int J Mol Sci.* 2022;23(3).
182. Ljungberg LU, Zegeye MM, Kardeby C, Fälker K, Repsilber D, Sirsjö A. Global Transcriptional Profiling Reveals Novel Autocrine Functions of Interleukin 6 in Human Vascular Endothelial Cells. *Mediators Inflamm.* 2020;2020:4623107.
183. Zegeye MM, Andersson B, Sirsjö A, Ljungberg LU. IL-6 trans-Signaling Impairs Sprouting Angiogenesis by Inhibiting Migration, Proliferation and Tube Formation of Human Endothelial Cells. *Cells.* 2020;9(6).
184. Strieter RM, Burdick MD, Gomperts BN, Belperio JA, Keane MP. CXC chemokines in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2005;16(6):593-609.
185. Prajapati DR, Molczyk C, Purohit A, Saxena S, Sturgeon R, Dave BJ, et al. Small molecule antagonist of CXCR2 and CXCR1 inhibits tumor growth, angiogenesis, and metastasis in pancreatic cancer. *Cancer Lett.* 2023;563:216185.
186. Lai Y, Shen Y, Liu XH, Zhang Y, Zeng Y, Liu YF. Interleukin-8 induces the endothelial cell migration through the activation of phosphoinositide 3-kinase-Rac1/RhoA pathway. *Int J Biol Sci.* 2011;7(6):782-91.
187. Wu T, Yang W, Sun A, Wei Z, Lin Q. The Role of CXC Chemokines in Cancer Progression. *Cancers (Basel).* 2022;15(1).
188. Abdel-Malak NA, Srikant CB, Kristof AS, Magder SA, Di Battista JA, Hussain SN. Angiopoietin-1 promotes endothelial cell proliferation and migration through AP-1-dependent autocrine production of interleukin-8. *Blood.* 2008;111(8):4145-54.
189. Dutta S, Bandyopadhyay C, Bottero V, Veettil MV, Wilson L, Pins MR, et al. Angiogenin interacts with the plasminogen activation system at the cell surface of breast cancer cells to regulate plasmin formation and cell migration. *Mol Oncol.* 2014;8(3):483-507.
190. Hu G, Riordan JF, Vallee BL. Angiogenin promotes invasiveness of cultured endothelial cells by stimulation of cell-associated proteolytic activities. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(25):12096-100.
191. Sadagopan S, Sharma-Walia N, Veettil MV, Bottero V, Levine R, Vart RJ, et al. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus upregulates angiogenin during infection of human dermal microvascular endothelial cells, which induces 45S rRNA synthesis, antiapoptosis, cell proliferation, migration, and angiogenesis. *J Virol.* 2009;83(7):3342-64.

192. Joshi PA, Waterhouse PD, Kannan N, Narala S, Fang H, Di Grappa MA, et al. RANK Signaling Amplifies WNT-Responsive Mammary Progenitors through R-SPONDIN1. *Stem Cell Reports*. 2015;5(1):31-44.
193. Cao Y, Bonizzi G, Seagroves TN, Greten FR, Johnson R, Schmidt EV, et al. IKK α provides an essential link between RANK signaling and cyclin D1 expression during mammary gland development. *Cell*. 2001;107(6):763-75.
194. Mueller CG, Hess E. Emerging Functions of RANKL in Lymphoid Tissues. *Front Immunol*. 2012;3:261.
195. Kim D, Mebius RE, MacMicking JD, Jung S, Cupedo T, Castellanos Y, et al. Regulation of peripheral lymph node genesis by the tumor necrosis factor family member TRANCE. *J Exp Med*. 2000;192(10):1467-78.
196. Renema N, Navet B, Heymann MF, Lezot F, Heymann D. RANK-RANKL signalling in cancer. *Biosci Rep*. 2016;36(4).
197. Boyce BF, Xing L. Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *Arthritis Res Ther*. 2007;9 Suppl 1(Suppl 1):S1.
198. Sanchez C, Gabay O, Salvat C, Henrotin YE, Berenbaum F. Mechanical loading highly increases IL-6 production and decreases OPG expression by osteoblasts. *Osteoarthritis Cartilage*. 2009;17(4):473-81.
199. Liu X-H, Kirschenbaum A, Yao S, Levine AC. Cross-Talk between the Interleukin-6 and Prostaglandin E2 Signaling Systems Results in Enhancement of Osteoclastogenesis through Effects on the Osteoprotegerin/Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B (RANK) Ligand/RANK System. *Endocrinology*. 2005;146(4):1991-8.
200. Liu XH, Kirschenbaum A, Yao S, Levine AC. Interactive effect of interleukin-6 and prostaglandin E2 on osteoclastogenesis via the OPG/RANKL/RANK system. *Ann N Y Acad Sci*. 2006;1068:225-33.
201. Liu X-H, Kirschenbaum A, Yao S, Stearns ME, Holland JF, Claffey K, et al. Upregulation of vascular endothelial growth factor by cobalt chloride-simulated hypoxia is mediated by persistent induction of cyclooxygenase-2 in a metastatic human prostate cancer cell line. *Clinical & Experimental Metastasis*. 1999;17(8):687-94.
202. Kuebart T, Oezel L, Gürsoy B, Maus U, Windolf J, Bittersohl B, et al. Periostin Splice Variant Expression in Human Osteoblasts from Osteoporotic Patients and Its Effects on Interleukin-6 and Osteoprotegerin. *Int J Mol Sci*. 2025;26(3).
203. Rochette L, Meloux A, Rigal E, Zeller M, Cottin Y, Vergely C. The Role of Osteoprotegerin and Its Ligands in Vascular Function. *Int J Mol Sci*. 2019;20(3).
204. Kobayashi-Sakamoto M, Isogai E, Holen I. Osteoprotegerin induces cytoskeletal reorganization and activates FAK, Src, and ERK signaling in endothelial cells. *Eur J Haematol*. 2010;85(1):26-35.
205. McGonigle JS, Giachelli CM, Scatena M. Osteoprotegerin and RANKL differentially regulate angiogenesis and endothelial cell function. *Angiogenesis*. 2009;12(1):35-46.

Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei Herrn PD Dr. med. Jan-Peter Graßmann und Frau PD Dr. rer. nat. Doreen Floß für die Betreuung dieser Arbeit bedanken. Mein Dank gilt ebenso dem gesamten Team des molekularbiologischen Labors der Orthopädie und Unfallchirurgie des UKD für die herzliche Unterstützung und die lehrreiche Begleitung während der Experimente. Insbesondere möchte ich mich bei Frau PD Dr. rer. nat. Vera Grotheer für die bereichernde Zusammenarbeit, die Geduld und die wichtigen Ratschläge in den letzten vier Jahren bedanken.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie sowie meinen Freundinnen und Freunden für den Rückhalt, den ihr mir in den letzten Jahren gegeben habt, eure unerschütterliche Unterstützung, eure Verlässlichkeit und eure Liebe.

Allen, die mich in der Zeit meines Studiums und meiner Promotion begleitet haben:

Danke – von ganzem Herzen.