

Aus dem Lehrstuhl für Orthopädie

Prof. Dr. Dr. h.c. Joachim Grifka

der Fakultät für Medizin

der Universität Regensburg

Einfluss des sensiblen und sympathischen Nervensystems über die Neurotransmitter
Substanz P, α -Calcitonin gene-related peptide und Noradrenalin auf den Metabolismus und
die Differenzierung von Osteoblasten und Osteoklasten

Inaugural – Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizin

der

Fakultät für Medizin

der Universität Regensburg

vorgelegt von

Raphael Seebröcker

2018

Aus dem Lehrstuhl für Orthopädie

Prof. Dr. Dr. h.c. Joachim Grifka

der Fakultät für Medizin

der Universität Regensburg

Einfluss des sensiblen und sympathischen Nervensystems über die Neurotransmitter
Substanz P, α -Calcitonin gene-related peptide und Noradrenalin auf den Metabolismus und
die Differenzierung von Osteoblasten und Osteoklasten

Inaugural – Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizin

der

Fakultät für Medizin

der Universität Regensburg

vorgelegt von

Raphael Seebröcker

2018

Dekan:	Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
1. Berichterstatterin:	Prof. Dr. Susanne Grässel
2. Berichterstatter:	PD Dr. Richard Bauer
Tag der mündlichen Prüfung:	24.01.2019

*Der größte Feind des Wissens ist nicht die Ignoranz,
sondern die Illusion, wissend zu sein.*

Stephen Hawking

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	- 12 -
1.1. Funktion und Aufbau des Knochens.....	- 12 -
1.2. Die Osteogenese des Knochens	- 14 -
1.3. Der Knochenmetabolismus	- 16 -
1.3.1. Die Osteoblasten-Zelllinie	- 17 -
1.3.1.1. Die osteogene Differenzierung	- 17 -
1.3.1.2. Die Funktion der Osteoblasten und Osteozyten.....	- 19 -
1.3.2. Die Osteoklasten	- 21 -
1.3.2.1. Die Osteoklastogenese.....	- 21 -
1.3.2.2. Die Funktion der Osteoklasten.....	- 23 -
1.3.3. Das Bone Remodeling	- 24 -
1.4. Das Nervensystem.....	- 28 -
1.4.1. Der Einfluss des Nervensystems auf den Knochen	- 29 -
1.4.2. Das sensible Nervensystem.....	- 31 -
1.4.2.1. Der sensible Neurotransmitter Substanz P (SP).....	- 31 -
1.4.2.2. Der sensible Neurotransmitter Calcitonin gene-related peptide (CGRP) ...	- 33 -
1.4.3. Das sympathische Nervensystem und der katecholaminerge Neurotransmitter Noradrenalin (NA)	- 36 -
2. Ziel der Arbeit	- 39 -
3. Material und Methoden	- 40 -
3.1. Material	- 40 -

1. Einleitung

3.1.1. Geräte und Hilfsmittel	- 40 -
3.1.2. Chemikalien	- 43 -
3.1.3. Zellkulturmedien, Zusätze und Puffer	- 44 -
3.1.4. Kits	- 45 -
3.1.5. Software	- 46 -
3.2. Methoden.....	- 46 -
3.2.1. Entnahme von Knochengewebe	- 46 -
3.2.2. Isolierung primärer Osteoblasten und primärer Knochenmarksmakrophagen	- 46 -
3.2.3. Ernte und Aussaat der Knochenmarksmakrophagen und Induktion der Osteoklastogenese	- 48 -
3.2.4. Ernte und Aussaat der Osteoblasten	- 49 -
3.2.5. Stimulation der Knochenmarksmakrophagen, Osteoblasten und Osteoklasten-	51 -
3.2.6. Versuche mit Inhibitoren	- 51 -
3.2.7. RNA-Isolierung.....	- 52 -
3.2.8. Komplementäre Desoxyribonukleinsäure (cDNA) Synthese.....	- 52 -
3.2.9. Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)	- 53 -
3.2.10. BrdU-Assay	- 55 -
3.2.11. Tartrat-resistente saure Phosphatase (TRAP)-Färbung	- 55 -
3.2.12. Caspase 3/7-Assay	- 56 -
3.2.13. Alkalische Phosphatase (ALP)-Assay	- 57 -

1. Einleitung

3.2.14. BCA-Assay - 57 -

3.2.15. Kathepsin K-Assay - 58 -

3.2.16. Alizarin-Rot-Färbung - 58 -

4. Ergebnisse - 60 -

4.1. Osteoblasten - 60 -

4.1.1. Mineralisierungsassay als Differenzierungskontrolle der Osteoblasten - 60 -

4.1.2. Die Effekte der Stimulation mit SP, α -CGRP und NA auf die Proliferationsrate muriner Osteoblasten - 61 -

4.1.3. Die Effekte der Stimulation mit SP, α -CGRP und NA auf die Apoptoserate muriner Osteoblasten - 62 -

4.1.4. Die Effekte der Stimulation mit SP, α -CGRP und NA auf die ALP-Aktivität muriner Osteoblasten - 66 -

4.1.5. Vergleich der Genexpression in murinen Osteoblasten nach Stimulation mit SP, α -CGRP und NA - 68 -

4.1.5.1. Genexpression von bcl2 nach Stimulation mit SP, α -CGRP und NA - 68 -

4.1.5.2. Genexpression von col1a1 nach Stimulation mit SP, α -CGRP und NA - 69 -

4.1.5.3. Genexpression von bglap nach Stimulation mit SP, α -CGRP und NA - 71 -

4.1.5.4. Genexpression von sp7 nach Stimulation mit SP, α -CGRP und NA - 72 -

4.1.5.5. Genexpression von runx2 nach Stimulation mit SP, α -CGRP und NA - 74 -

4.1.5.6. Genexpression von tnfsf11 nach Stimulation mit SP, α -CGRP und NA - 74 -

4.1.5.7. Genexpression von tnfrsf11b nach Stimulation mit α -CGRP, SP und NA ... - 76 -

4.2. Osteoklasten - 77 -

1. Einleitung

4.2.1. Die Effekte der Stimulation mit SP, α -CGRP und NA auf die Proliferationsrate muriner Knochenmarksmakrophagen	- 77 -
4.2.2. Die Effekte der Stimulation mit SP, α -CGRP und NA auf die Apoptosesrate muriner Osteoklasten.....	- 79 -
4.2.3. Die Effekte der Stimulation mit SP, α -CGRP und NA auf die Kathepsin K-Aktivität muriner Osteoklasten.....	- 80 -
4.2.4. Die Effekte der Stimulation mit SP, α -CGRP und NA auf die Differenzierung muriner Osteoklasten.....	- 80 -
4.2.5. Vergleich der Genexpression muriner Osteoklasten nach Stimulation mit SP, α -CGRP und NA.....	- 82 -
4.2.5.1. Genexpression von ctsk nach Stimulation mit SP, α -CGRP und NA.....	- 82 -
4.2.5.2. Genexpression von mmp9 nach Stimulation mit SP, α -CGRP und NA.....	- 83 -
4.2.5.3. Genexpression von nfatc1 nach Stimulation mit SP, α -CGRP und NA.....	- 84 -
4.2.5.4. Genexpression von tnfrsf11a nach Stimulation mit SP, α -CGRP und NA ...	- 85 -
5. Diskussion	- 87 -
5.1. Der Einfluss von SP auf den Metabolismus und die Differenzierung von murinen Osteoblasten und Osteoklasten.....	- 87 -
5.2. Der Einfluss von α -CGRP auf den Metabolismus und die Differenzierung von murinen Osteoblasten und Osteoklasten.....	- 92 -
5.3. Der Einfluss von NA auf den Metabolismus und die Differenzierung von murinen Osteoblasten und Osteoklasten.....	- 98 -
6. Zusammenfassung.....	- 105 -
7. Abkürzungsverzeichnis	- 107 -
8. Literaturverzeichnis.....	- 111 -

1. Einleitung

9. Veröffentlichungen und Kongressbeiträge.....- 130 -

9.1. Veröffentlichungen- 130 -

9.2. Kongressbeiträge.....- 130 -

10. Danksagung.....- 131 -

1. Einleitung

1.1. Funktion und Aufbau des Knochens

Das knöcherne Skelett der Vertebrata besteht aus Knochen unterschiedlicher Form und Größe, die einerseits dem Schutz der inneren Organe und andererseits - als passiver Teil des Bewegungsapparates - der Haltung, Bewegung sowie der Fortbewegung des Individuums dienen (Zilles and Tillmann 2010).

Als Speicherort für Kalzium und Phosphat erfüllt der Knochen eine wichtige Funktion in der Homöostase der Mineralsalze. In den Hohlräumen der Röhrenknochen befindet sich das Knochenmark welches u. a. mesenchymale Stammzellen (*mesenchymal stem cells*, MSCs) für die Regeneration des Stütz- und Bindegewebes und hämatopoetische Stammzellen (*hematopoietic stem cells*, HSCs) für die Blutbildung enthält (Erlebacher et al. 1995; Welsch 2009).

Die Knochen werden nach der äußeren Form in fünf Gruppen unterteilt: die Röhrenknochen (*Ossa longa*) wie Humerus, Radius und Femur, die kurzen Knochen (*Ossa brevia*) wie Hand- und Fußwurzelknochen, die platten Knochen (*Ossa plana*), dazu gehören die Schädelknochen und die Scapula, die luftgefüllten Knochen (*Ossa pneumatica*) der Nasennebenhöhlen und der Paukenhöhlen sowie die *Ossa irregularia*, Knochen, die keiner Gruppe zuzuordnen sind (z.B. Wirbelknochen) (Aumüller et al. 2007; Welsch 2009).

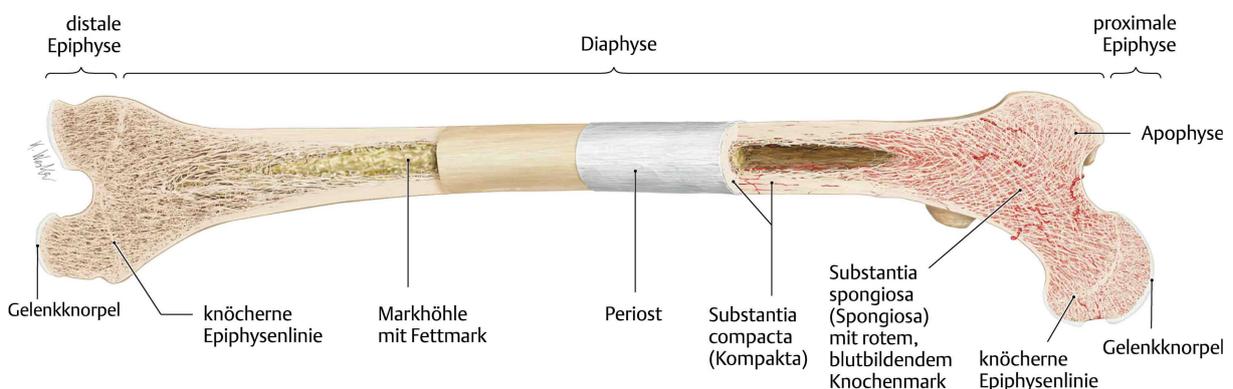


Abbildung 1: Darstellung eines Röhrenknochens am Beispiel des menschlichen Femurs (Schünke et al. 2007).

1. Einleitung

Röhrenknochen (Abb. 1) gliedern sich in die Diaphyse mit der *Substantia compacta* als äußere Schicht und der *Cavum medullare* (Markhöhle) im Inneren, die Metaphysen, die während des Wachstums die Epiphysenfugen beinhalten, und in die Epiphysen. Die Metaphyse verbindet die Diaphyse mit der proximalen und distalen Epiphyse, in den Epiphysen befindet sich die *Substantia spongiosa* mit Knochenbälkchen und den *Cellulae medullares* (Aumüller et al. 2007; Welsch 2009).

Makroskopisch lassen sich die *Substantia compacta* und die *Substantia spongiosa* unterscheiden (Abb. 2). Die *Substantia compacta* ist dicht strukturiert und bildet die äußere Schicht des Skelettknochens. Im Inneren befindet sich die *Substantia spongiosa*, sie besteht aus einem Netzwerk von Platten und Knochenbälkchen (Trabekel). Die Zwischenräume (*Cellulae medullares*) enthalten das blutbildende Knochenmark (Aumüller et al. 2007).

Das Periost umgibt den Knochen äußerlich als bindegewebsartige Schicht. Es enthält MSCs, Osteoblasten und Osteoklasten, ist reich an Blut- und Lymphgefäßen sowie Nervenfasern sensiblen und sympathischen Ursprungs. Das Endost grenzt die Knochenkanäle und die Markhöhle zum Knochenmark hin ab (Aumüller et al. 2007; Welsch 2009).

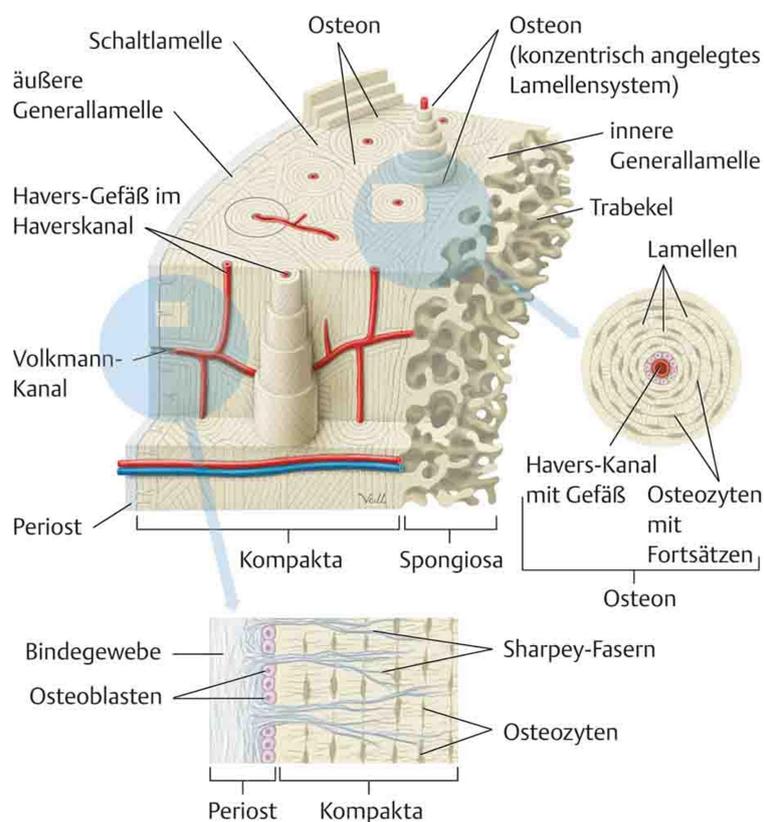


Abbildung 2: Aufbau eines Lamellenknochens (Baumgärtel and Al-Abtah 2015).

1. Einleitung

Das Knochengewebe kann in den Geflecht- bzw. Faserknochen und den Lamellenknochen unterteilt werden. Es besteht zu 65 % aus anorganischer Matrix, welche vor allem das kristalline Kalziumphosphat Hydroxylapatit enthält, und zu 35 % aus organischer Matrix, vornehmlich bestehend aus Kollagen I, Proteoglykanen und Glykoproteinen (z.B. Osteocalcin, Osteonectin und Osteopontin). Während der Mineralisierung lagern sich die Hydroxylapatitkristalle an die Kollagenfasern an und verleihen dem Knochen seine Steifigkeit (Welsch 2009).

Der Geflechtknochen zeichnet sich durch eine unstrukturierte Anordnung der Kollagenfasern und Blutgefäße aus. Durch einen geregelten Umbauprozess wird der Geflechtknochen nach und nach durch Lamellenknochen ersetzt. Dieser besteht aus einer regelmäßigen Anordnung von Osteonen. Ein Osteon (Abb. 2) besteht aus einem Havers-Kanal, um den sich bis zu 10 Knochenlamellen konzentrisch anordnen, die aus Kollagen I-Fasern bestehen und Speziallamellen genannt werden. Im Havers-Kanal verlaufen die Havers-Blutgefäße und Nervenfasern. Die Havers-Kanäle stehen durch quer verlaufende Volkmannkanäle untereinander in Kontakt (Abb. 2). Durch den Aufbau aus Osteonen und der Anordnung der Trabekel entlang der größten Druck- und Zugbelastung im Knochen ist der Lamellenknochen sehr stabil, bei zugleich geringem Gewicht und Materialverbrauch. Damit ist er besser an die funktionellen Belastungen im adulten Organismus angepasst als der Geflechtknochen. Zudem unterscheiden sich der Geflecht- und Lamellenknochen in der Zusammensetzung der Matrix. Die Extrazellulärmatrix des Geflechtknochens ist geringer mineralisiert und der Wassergehalt ist höher. Auch dies trägt zu einer geringeren mechanischen Stabilität des Geflechtknochens bei (Schünke 2000; Grabowski 2015).

1.2. Die Osteogenese des Knochens

Bei der Entstehung des Knochens wird zwischen der chondralen (enchondralen) (Abb. 3) und der desmalen (intramembranösen) Ossifikation unterschieden.

Die desmale Ossifikation beginnt mit der Kondensation der MSCs in einer Gestalt, die der späteren Form des Knochens ähnlich ist. In diesen Verdichtungen differenzieren die Zellen direkt zu Osteoblasten, die nach außen wandern und mit der Osteogenese beginnen, indem sie die organische, nicht-mineralisierte Knochenmatrix (Osteoid) bilden, die im weiteren Verlauf mineralisiert wird (Hartmann 2009; Percival and Richtsmeier 2013). An den

1. Einleitung

entstandenen Knochenbälkchen werden nach und nach weitere Schichten Osteoid abgelagert. So entsteht ein Netzwerk aus Knochenbälkchen, das als Geflechtknochen (primärer Knochen) bezeichnet wird. An den Gefäßen bildet sich das primäre Knochenmark aus. Das craniofaciale Skelett und die Clavicula werden durch desmale Ossifikation gebildet (Mundlos and Olsen 1997; Olsen et al. 2000; Grabowski 2015).

Die übrigen Knochen entstehen durch den Prozess der chondralen Ossifikation (*Osteogenesis cartilaginea*) (Abb. 3). Dieser beginnt ebenfalls mit der Kondensation von MSCs. Anders als bei der desmalen Ossifikation differenzieren MSCs im Inneren der Zellaggregate zunächst zu Chondrozyten, welche hyalinen Knorpel bilden, der als „Anlage“ bezeichnet wird und als Template für die spätere Knochenbildung fungiert (Erlebacher et al. 1995; Mundlos and Olsen 1997; Aumüller et al. 2007). Im Bereich des Perichondriums, später Periost genannt, differenzieren MSCs zu Osteoblasten, die eine dünne Osteoidschicht in Form einer Knochenmanschette bilden. Diese kalzifizierte Osteoidschicht umschließt das knorpelige Template, es begrenzt zum einen das Dickenwachstum der Anlage und beeinträchtigt zum anderen die Versorgung der Chondrozyten mit Nährstoffen. Die Chondrozyten beginnen folglich zu hypertrophieren und kalzifizieren die sie umgebende extrazelluläre Knorpelmatrix. Über Blutgefäße, die die Osteoidschicht durchdringen, wandern Vorläuferzellen ein, die zu Chondroklasten, Osteoblasten und Osteoklasten differenzieren. Während Chondroklasten und Osteoklasten die kalzifizierte Knorpelmatrix resorbieren, beginnen Osteoblasten an Stelle des resorbierten Knorpels Osteoid abzulagern, das im weiteren Verlauf verkalkt. Dabei befindet sich die Knochenmatrix schon während der Bildung in ständigem Umbau. Im diaphysären Bereich bildet sich durch Resorption der Knorpel- und Knochenmatrix eine Markhöhle aus, die später das Knochenmark enthält. In den Wachstumsfugen (*growth plates*) findet das Längenwachstum der Röhrenknochen statt (Abb. 3) (Junqueira and Carneiro 1996; Schünke 2000; Ortega et al. 2004; Aumüller et al. 2007).

Wie bei dem Prozess der desmalen Ossifikation wird auch bei der chondralen Ossifikation primär Geflechtknochen gebildet, der im Verlauf der Knochenentwicklung durch das *remodeling* von Lamellenknochen ersetzt wird (Schünke 2000; Lüllmann-Rauch and Paulsen 2012).

1. Einleitung

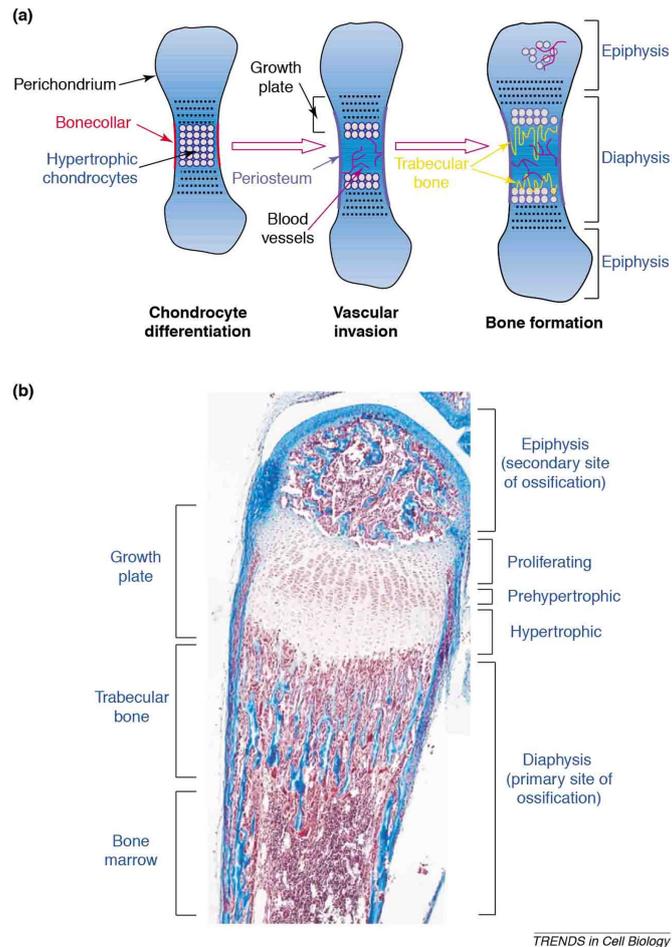


Abbildung 3: (a) Schematische Darstellung der chondralen Ossifikation. Chondrozyten bilden die „Anlage“ aus und hypertrophieren anschließend. Die Knorpelmatrix wird von Osteoklasten und Chondroklasten, die über Gefäße (*blood vessels*) eindringenden, abgebaut und zeitgleich wird Knochenmatrix (*trabecular bone*) durch Osteoblasten aufgebaut. In den Wachstumsfugen (*growth plate*) findet das Längenwachstum statt. (b) Ausschnitt eines *Os metatarsale* einer 2 Wochen alten Maus; Masson-Trichrom-Färbung (Ortega et al. 2004).

1.3. Der Knochenmetabolismus

Der Knochen befindet sich in einem ständigen Umbauprozess (*remodeling*), der nicht nur eine Reaktion auf Belastung und Schädigung ermöglicht, sondern auch die Aufrechterhaltung der Kalziumhomöostase gewährleistet. Um das *remodeling* der Knochenmatrix für diese Zwecke sicherzustellen, bedarf es einer Reihe spezialisierter Zelltypen, zu denen Osteozyten und Osteoblasten, die dem Knochenaufbau dienen, sowie Osteoklasten, die für den Abbau der Knochenmatrix zuständig sind, zählen. Dieser Prozess wird durch ein komplexes System der Regulation von Differenzierung, Funktion und Interaktion der einzelnen Zellkomponenten bestimmt (Ferguson et al. 1998; Raisz 1999; Welsch 2009).

1.3.1. Die Osteoblasten-Zelllinie

1.3.1.1. Die osteogene Differenzierung

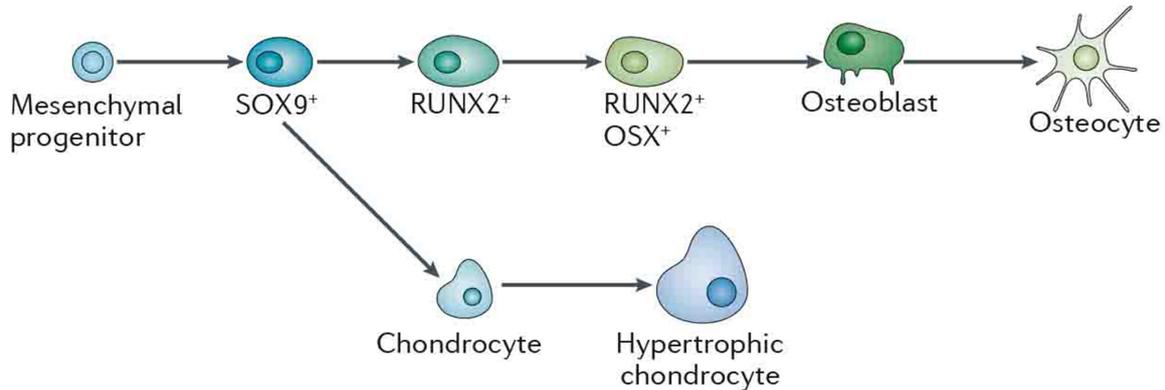


Abbildung 4: Die osteogene Differenzierung. Osteoblasten entwickeln sich aus Vorläuferzellen (*mesenchymal progenitor*) zu Osteozyten. Die Zwischenstadien der Differenzierung sind durch spezifische Marker gekennzeichnet (SOX9 (ein Transkriptionsfaktor), RUNX2 (*Runt-related transcription factor 2*), OSX (Osterix)) (Long 2012).

Osteoblasten und Osteozyten gehen aus pluripotenten Vorläuferzellen, den MSCs, hervor. Diese besitzen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und sind in der Lage in unterschiedliche Zelltypen zu differenzieren, welche Knochen, Knorpel, Sehnen, Muskel, Bänder, Fettgewebe und andere Bindegewebe bilden können (Caplan 1991; Bruder et al. 1994; Oreffo et al. 2005; Dominici et al. 2006). Im adulten Organismus finden sich MSCs im Knochengewebe, aber auch im Blut, in der Leber und im Fettgewebe. Sie können in verschiedene Gewebe migrieren und dort abhängig von den vorherrschenden extrinsischen und intrinsischen Faktoren in entsprechende Zelltypen wie z. B. Chondrozyten, Osteoblasten oder Adipozyten differenzieren (Liu et al. 2009). Eine osteogene Differenzierung humaner MSCs konnte *in vitro* durch die Zugabe von Dexamethason, β -Glycerolphosphat, Ascorbat und Serum nachgewiesen werden (Pittenger et al. 1999).

Durch die osteogene Differenzierung bilden sich aus den MSCs über mehrere Zwischenstufen (Osteoprogenitorzellen) reife Osteoblasten (Abb. 4). Das umgebende Milieu, die sogenannte Stammzellnische, spielt dabei eine wichtige Rolle. Die osteogene Differenzierung der MSCs wird durch den direkten Kontakt zu den umliegenden Zellen – dazu gehören Osteoblasten, Osteoklasten, Adipozyten, Fibroblasten, Immunzellen und hämatopoetische Stammzellen – aber auch durch Zytokine, Wachstumsfaktoren und

1. Einleitung

extrazelluläre Matrixproteine maßgeblich beeinflusst (Fuchs et al. 2004; Li and Xie 2005; Yin and Li 2006; Jones and Wagers 2008; Kuhn and Tuan 2010). Vor allem Osteoblasten und Osteozyten regulieren die Proliferation und Differenzierung der MSCs durch direkte Zell-Zell-Kontakte. Außerdem produzieren Osteoblasten das Glykoprotein Wnt, welches den Wnt-Signalweg in MSCs aktiviert und den Cadherin-Signalweg supprimiert, wodurch ebenfalls die Proliferation und osteogene Differenzierung der MSCs gefördert wird (Heino et al. 2004; Wang et al. 2007; Csaki et al. 2009).

Die osteogene Differenzierung kann in eine Proliferations- und Differenzierungsphase unterteilt werden. In der Proliferationsphase fördern Wachstumsfaktoren wie *Vascular endothelial growth factor* (VEGF), *Platelet-derived growth factor* (PDGF) und *Insulin-like growth factor* (IGF-1) die Proliferation der Osteoblastenvorläuferzellen (Linkhart et al. 1996; Scutt and Bertram 1999; Zhang et al. 2002; Heino et al. 2004; Huang et al. 2007). Bereits während dieser Entwicklungsphase wird von den Zellen Kollagen I und das Enzym Alkalische Phosphatase (ALP) exprimiert. Kollagen I und ALP dienen so als frühe Marker der osteogenen Differenzierung (Zernik et al. 1990; Quarles et al. 1992; Aubin 2001). ALP ist später an der Mineralisierung des Knochens beteiligt, indem es durch Hydrolyse von Phosphorsäureestern anorganisches Phosphat freisetzt, welches für die Bildung von Hydroxylapatit notwendig ist (Sharma et al. 2014; Lee et al. 2015).

Die Differenzierungsphase wird durch verschiedene Signalwege, wie z.B. Wnt- und BMP (*bone morphogenetic protein*)-Signalweg reguliert (Long 2012). Ein Marker früher mesenchymaler Progenitorzellen ist der Transkriptionsfaktor SOX-9. Progenitorzellen, welche den Weg der osteogenen Differenzierung eingeschlagen haben, exprimieren *Runt-related transcription factor 2* (RUNX2/CBFA1) (Abb. 4). Der Transkriptionsfaktor RUNX2 ist der Schlüsselfaktor der osteogenen Differenzierung. Er bindet über die *Runt*-Domäne an die DNA und ist u.a. für die Expression der Gene *bglap* (Osteocalcin), *spp1* (Osteopontin) und *col1* (Kollagen I) verantwortlich. Im Mausmodell zeigte sich, dass bei inaktiviertem RUNX2 keine Osteoblasten und somit auch keine Knochenstruktur ausgebildet werden (Ducy et al. 1997; Komori et al. 1997; Karsenty 2001; Long 2012). RUNX2 ist jedoch nicht nur für die Differenzierung der Osteoblasten bedeutend, es ist auch maßgeblich an der Funktion terminal differenzierter Osteoblasten und damit am Aufbau der knöchernen Matrix beteiligt,

indem es die Expression wichtiger Gene induziert (Ducy et al. 1999). In der späten Differenzierungsphase exprimieren Osteoblastenvorläuferzellen das Zinkfingerprotein Osterix (OSX) (Abb. 4). Ähnlich dem RUNX2 fördert OSX als Transkriptionsfaktor die Osteoblastendifferenzierung und Funktion der Osteoblasten und Osteozyten. Da es in RUNX2-defizienten Mäusen nicht gebildet wird, scheint es dem RUNX2 nachgeschaltet zu sein. Die Expression und Aktivität von RUNX2 und OSX werden durch eine Vielzahl nukleärer Faktoren reguliert. So fördert *Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 1* (NFATC1) die Aktivität von OSX und stimuliert so die Osteoblastendifferenzierung (Nakashima et al. 2002; Zhou et al. 2010; Long 2012; Grabowski 2015).

Prä-Osteoblasten entwickeln sich schließlich zu reifen, extrazelluläre Matrix produzierenden Osteoblasten. Osteoblasten, die in der Matrix eingelagert werden, differenzieren zu Osteozyten. Inaktive Osteoblasten werden als *bone lining cells* bezeichnet, sie können jederzeit wieder aktiviert werden (Heino et al. 2004; Ilmer et al. 2009; Birmingham et al. 2012).

1.3.1.2. Die Funktion der Osteoblasten und Osteozyten

Die wichtigste Funktion der Osteoblasten ist der Aufbau und Erhalt der mineralisierten Knochenmatrix. Sie produzieren Osteoid, das überwiegend aus Kollagen I und Proteinen wie Osteocalcin, Osteopontin und Proteoglykanen besteht. Kollagen I als wichtigster Bestandteil der organischen Matrix ist zugfest und kaum dehnbar, es besteht aus zwei α_1 - und einer α_2 -Kette, die durch posttranslationale Modifizierung eine Tripelhelix bilden. Mehrere Tripelhelices lagern sich zu Fibrillen zusammen (Rossert et al. 2000; Welsch 2009).

Das Osteoid wird im Verlauf mineralisiert. Für die Mineralisation werden Matrixvesikel, die als Kristallisationskerne dienen, von Osteoblasten abgespalten. In den Matrixvesikeln bilden sich kleine Hydroxylapatit-Kristalle, die schließlich aus der Vesikelmembran herauswachsen und in die Triplehelices des Kollagen I eingelagert werden. An der Mineralisation sind sowohl Hormone wie Vitamin D und Parathormon als auch Proteine wie Osteopontin und *bone sialoprotein* (BSP) beteiligt. Phosphatasen, insbesondere die Alkalische Phosphatase, stellen das anorganische Phosphat bereit (Sapir-Koren and Livshits 2011; Lüllmann-Rauch and Paulsen 2012; Grabowski 2015).

1. Einleitung

Osteopontin gehört zur Familie der *small integrin-binding ligand, N-linked glycoproteins* (SIBLINGs). Es befindet sich im Knochen vor allem in den Mineralisierungszentren des Osteoidsaumes und verhindert eine frühzeitige Kristallisierung von Hydroxylapatit (Franzen and Heinegard 1985; McKee and Nanci 1995; Sodek et al. 2000; Hunter 2013). BSP gehört wie Osteopontin ebenfalls zur SIBLING-Familie und findet sich ausschließlich in mineralisiertem Gewebe. Es wird von Osteoklasten, Osteoblasten, Osteozyten und Chondrozyten gebildet und ist an der Entstehung von Hydroxylapatit-Kristallen beteiligt. Des Weiteren fördert es die Osteoklastogenese (Chen et al. 1991; Wang et al. 2006; Gordon et al. 2007; Malaval et al. 2008; Staines et al. 2012). Osteocalcin bindet als Bestandteil der extrazellulären Knochenmatrix an Kalzium und Hydroxylapatit. Es wird ausschließlich von Osteoblasten und im Zahn von Odontoblasten gebildet. Nach den Kollagenen ist es das am häufigsten vorkommende Protein im Knochen (Hauschka et al. 1989; Ducy and Karsenty 1995; Brennan-Speranza and Conigrave 2015). Osteocalcin dient ebenso wie Osteopontin und BSP als Marker terminal differenzierter Osteoblasten (Ilmer et al. 2009; Birmingham et al. 2012).

Auch Osteozyten haben einen maßgeblichen Einfluss auf den Knochenmetabolismus. Sie bilden das Protein Sklerostin, welches als Antagonist der BMP-Proteine den BMP-Signalweg inhibiert. Zudem bindet es an *Lipoprotein receptor-related protein* (LRP)-5/6, einen wichtigen Ko-Rezeptor des Wnt-Signalwegs und hemmt die Signaltransduktion. Sklerostin ist damit ein potenter Inhibitor der osteogenen Differenzierung (Winkler et al. 2003; van Bezooijen et al. 2004; Bellido et al. 2005; Bellido 2014).

Durch die Expression von *Receptor Activator of NF- κ B-Ligand* (RANKL) und Osteoprotegerin (OPG) regulieren Osteozyten auch die Osteoklastogenese und haben somit einen Einfluss auf die Resorption der Knochenmatrix (Nakashima et al. 2011; Bellido 2014).

1.3.2. Die Osteoklasten

1.3.2.1. Die Osteoklastogenese

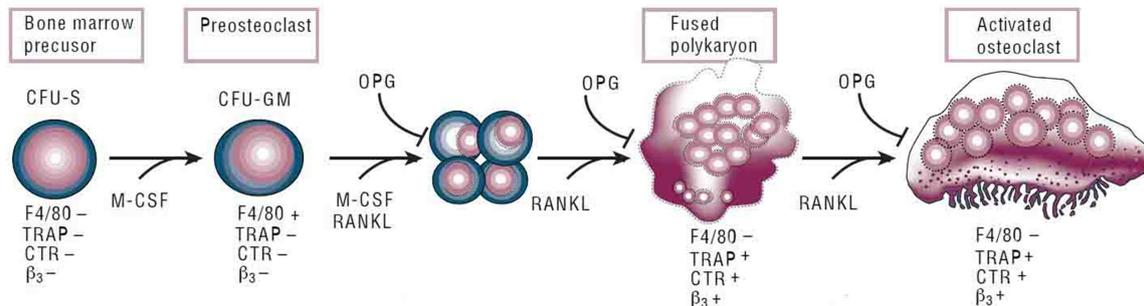


Abbildung 5: Die Osteoklastogenese. Aus Vorläuferzellen (*bone marrow precursor*) entwickeln sich unter dem Einfluss von M-CSF und RANKL multinukleäre, reife Osteoklasten. OPG (Osteoprotegerin) inhibiert die Osteoklastogenese. Die Differenzierungsstadien der Osteoklastenvorläuferzellen und reifen Osteoklasten sind durch die Expression unterschiedlicher Marker gekennzeichnet: F4/80, TRAP, CTR (Calcitoninrezeptor) und β₃ (β₃-Integrin); „+“ = Marker vorhanden; „-“ = Marker nicht vorhanden (Boyle et al. 2003).

Osteoklasten sind multinukleäre Zellen, die für den Abbau der Knochenmatrix zuständig sind. Sie stammen von hämatopoetischen Stammzellen (*hematopoietic stem cells* - HSCs) ab, entwickeln sich über myeloide Vorläuferzellen (*common myeloid precursors* - CMPs) und *colony-forming unit for granulocytes and macrophages* (CFU-GM) zu Osteoklastenvorläuferzellen (*preosteoclasts*) und fusionieren schließlich zu multinukleären Osteoklasten (Akashi et al. 2000; Boyle et al. 2003; Rubin and Greenfield 2005).

Der Transkriptionsfaktor PU.1 leitet die Osteoklastogenese ein, indem er die Bildung des M-CSF-Rezeptors (CSF1R) in CMPs fördert. Durch die Bindung von M-CSF, der von Osteoblasten sezerniert wird, an den CSF1R proliferieren die CFU-GM, was die Osteoklastogenese maßgeblich beeinflusst (Abb. 5). Des Weiteren regt M-CSF in Verbindung mit den Transkriptionsfaktoren PU.1, *microphthalmia-associated transcription factor* (MITF) und c-FOS die Produktion von *Receptor Activator of NF-κB* (RANK) an, dem Schlüsselfaktor der Osteoklastogenese (Hattersley et al. 1991; Kodama et al. 1991; Tanaka et al. 1993; Kwon et al. 2005; Rubin and Greenfield 2005).

An diesen bindet der vor allem von Osteoblasten und Osteozyten sezernierte Transkriptionsfaktor RANKL, der ausschlaggebend ist für die Differenzierung der CFU-GM zu Osteoklasten. Infolge der Aktivierung von RANK durch RANKL wird die Expression von Genen, die für die weitere Differenzierung und Funktion der Osteoklasten wichtig sind, u.a.

1. Einleitung

dendritic cell specific transmembrane protein (dc-stamp), wichtig für die Fusion der Osteoklastenvorläuferzellen, Calcitoninrezeptor, *ctsk* (Kathepsin K) und *mmp9* (Matrix-Metalloprotease 9), gesteigert. Die Osteoklastenvorläuferzellen fusionieren schließlich. Zudem wird durch die Bindung von RANKL an RANK der Transkriptionsfaktor *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF- κ B) aktiviert, der an den Promoter des Gens *nfatc1* bindet und somit die *nfatc1*-Expression deutlich steigert. Verstärkt wird dieser Effekt durch die Autoamplifikation von NFATC1 (Crockett et al. 2011; Mellis et al. 2011; Nakashima and Takayanagi 2011).

NFATC1 ist der entscheidende Transkriptionsfaktor für die Osteoklastendifferenzierung und induziert im Zusammenspiel mit den Transkriptionsfaktoren *activator protein* AP-1, *cAMP response element-binding protein* (CREB), PU.1 und MITF die Expression osteoklastenspezifischer Gene, u.a. für *tartrate-resistant acid phosphatase* (TRAP), Calcitonin-Rezeptor, Kathepsin K, *osteoclast-associated receptor* (OSCAR) und ATP6V0D2 (Untereinheit der osteoklastenspezifischen ATPase) (Takayanagi et al. 2002; Asagiri et al. 2005; Mellis et al. 2011; Nakashima and Takayanagi 2011).

Reguliert wird dieser Prozess vor allem durch die hemmenden Eigenschaften von OPG und dem Transkriptionsfaktor MAFB. OPG ist ein Mitglied der Tumornekrosefaktor-Superfamilie, der, ebenfalls von Osteoblasten und Osteozyten produziert, als *Decoy* („Köder“-)Rezeptor für RANKL agiert und somit die RANKL-vermittelte Osteoklastogenese hemmt. MAFB inhibiert NFATC1 und AP-1 und vermindert die Expression der osteoklastenspezifischen Gene (Simonet et al. 1997; Horwood et al. 1998; Yasuda et al. 1998; Mellis et al. 2011; Singh et al. 2012).

RANKL und M-CSF spielen auch in der Regulation der Osteoklastenaktivität eine entscheidende Rolle, indem sie im Verbund die Genexpression von TRAP und Kathepsin K induzieren und die Überlebenszeit der Osteoklasten verlängern (Boyle et al. 2003; Oursler 2005; Tanaka et al. 2006, 2010). Zudem ziehen RANKL und M-CSF im Blut zirkulierende Präosteoklasten an, die wieder in den Knochen gelangen und anschließend zu reifen Osteoklasten fusionieren (Simonet et al. 1997; Horwood et al. 1998; Yasuda et al. 1998; Mellis et al. 2011; Singh et al. 2012).

1.3.2.2. Die Funktion der Osteoklasten

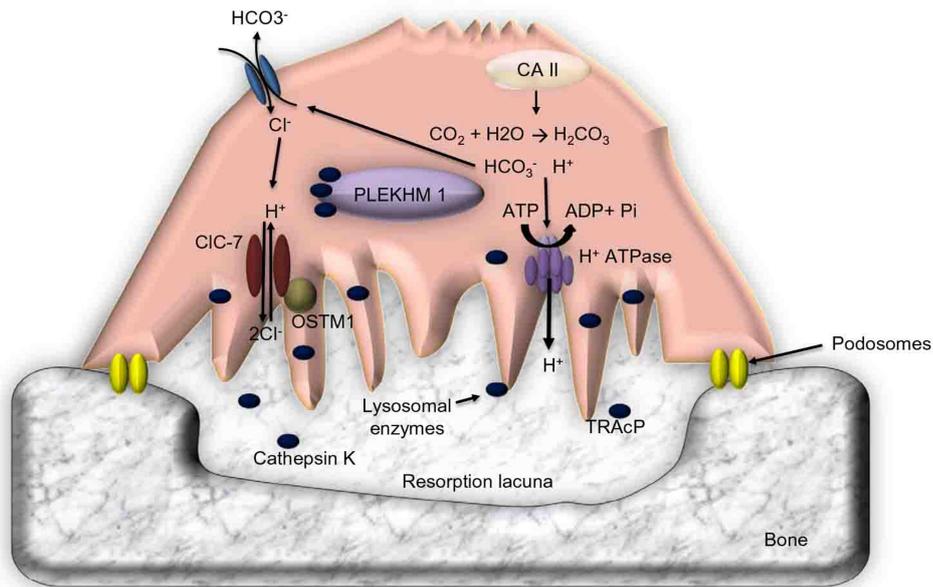


Abbildung 6: Resorption der Knochenmatrix durch einen Osteoklasten. Osteoklasten haften sich an die Knochenoberfläche (*Podosomes*) und bilden so eine Resorptionszone (*Resorption lacuna*). Neben H⁺- und Cl⁻-Ionen werden Enzyme wie Kathepsin K (Cathepsin K) und TRAP (TRAcP) über die *ruffled border* sezerniert und die Knochenmatrix abgebaut (Cappariello et al. 2014).

Um den Resorptionsprozess der Knochenmatrix zu starten, haften sich die Osteoklasten über $\alpha_v\beta_3$ -Integrine an die Knochenoberfläche an. Ein Teil der Zytoplasmamembran (*sealing membrane*) bildet zusammen mit dem angrenzenden Zytoplasma (*clear zone*) die *sealing zone*, wodurch die Resorptionszone (*resorption lacuna* bzw. Howship-Lakune) entsteht (Abb. 6). Durch die Podosome, bestehend aus Aktinmikrofilamenten, die einen stabilen Aktinring formen, wird die Resorptionslakune hermetisch von der Umgebung abgeschlossen. Im Bereich der Howship-Lakune fusionieren Lysosomen durch die Interaktion von $\alpha_v\beta_3$ -Integrin und RANK mit der Zytoplasmamembran, es entsteht die *ruffled border* (Abb. 6) (Domon et al. 2002; Boyle et al. 2003; Saltel et al. 2008; Teitelbaum 2011; Boyce 2013; Cappariello et al. 2014).

Über die *ruffled border* gelangen H⁺- und Cl⁻-Ionen durch die ATP-abhängige H⁺-Protonenpumpe V-H⁺-ATPase und den 2Cl⁻/H⁺-Antiporter in die Resorptionszone (Abb. 6). Durch das sich bildende saure Milieu wird die Knochenmatrix demineralisiert, indem die Hydroxylapatitkristalle herausgelöst und die organischen Bestandteile freigelegt werden. Von den Lysosomen werden nun Enzyme wie etwa saure Hydrolasen, Kathepsin K und TRAP

1. Einleitung

in die Howship-Lakune entleert, die die organischen Matrixbestandteile degradieren (Supanchart and Kornak 2008; Boyce 2013; Cappariello et al. 2014).

Kathepsin K gehört zu den Cysteinproteasen und ist zuständig für den Abbau von Kollagen I. Wie sich in Studien mit Mäusen zeigte, ist Kathepsin K essentiell für die Knochenresorption, das Ausschalten des Kathepsin K-Gens führte zur Entwicklung eines osteopetrotischen Knochenphänotyps (Saftig et al. 1998; Zaidi et al. 2001). Eine weitere Funktion von Kathepsin K ist die Aktivierung von TRAP. Die genaue Funktion von TRAP ist noch nicht abschließend geklärt, jedoch wiesen Osteoklasten von Mäusen mit ausgeschaltetem TRAP-Gen eine verminderte Resorptionsaktivität und einen gestörten intrazellulären Vesikeltransport auf (Hayman et al. 1996; Hollberg et al. 2002; Ljusberg et al. 2005). TRAP wird durch enzymatische Spaltung in eine ATPase umgewandelt und aktiviert das *TGF- β -receptor-interacting protein* (TRIP-1), welches nicht nur die osteogene Differenzierung der Osteoblasten fördert, sondern auch die Expression und Aktivität von ALP, OPG und RUNX2 in Osteoblasten steigert und damit den Aufbau der Knochenmatrix durch Osteoblasten unterstützt. Sowohl Kathepsin K als auch TRAP dienen als osteoklastenspezifische Markerproteine (Sheu et al. 2003; Mitic et al. 2005; Oursler 2005).

Osteoklasten exprimieren zusätzlich Matrix-Metalloproteasen (MMPs), welche ebenfalls an der Resorption der Knochenmatrix mitwirken. MMP-9 ist zudem an der Migration von Osteoklasten in den Knochen beteiligt (Delaisse et al. 2003).

1.3.3. Das Bone Remodeling

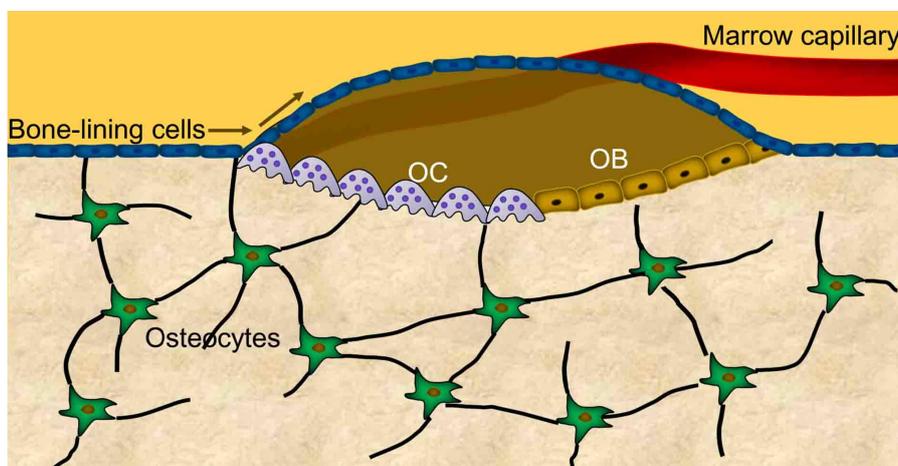


Abbildung 7: Schematische Darstellung eines *bone remodeling compartment* (BRC) mit Osteozyten, Osteoblasten (OB), Osteoklasten (OC) und *bone-lining cells*; modifiziert nach Khosla et al. (Khosla et al. 2012).

1. Einleitung

Als *bone remodeling* wird der ständig stattfindende Prozess des Knochenumbaus bezeichnet. Durch ihn wird der Knochen an die mechanischen Belastungen angepasst, zudem ist er wichtiger Bestandteil der Frakturheilung und an der Regulation der Homöostase von Kalzium und anderer Mineralsalze beteiligt. Der Knochenumbau findet in Hohlräumen, den *bone remodeling compartments* (BRCs) statt. Ein BRC wird von den *bone lining cells* und der darunterliegenden Knochenmatrix, die resorbiert werden soll, gebildet. Innerhalb des BRCs befindet sich die *basic multicellular unit* (BMU), bestehend aus Osteozyten, Osteoblasten und Osteoklasten (Abb. 7) (Hauge et al. 2001; Andersen et al. 2009; Teti and Rucci 2010; Khosla et al. 2012).

Das *bone remodeling* kann in mehrere Phasen unterteilt werden (Abb. 8). Die in der Knochenmatrix eingebetteten Osteozyten nehmen sowohl mechanische Belastung und Mikrotraumata im Knochen als auch hormonale Veränderungen wahr und können, zusammen mit den *bone lining cells*, den Prozess des *bone remodeling* über die Ausschüttung von RANKL einleiten (Abb. 8) (Teti and Rucci 2010; Bonewald 2011; Nakashima et al. 2011). Osteoklastenvorläuferzellen wandern über die Kapillaren ein und differenzieren unter dem Einfluss von RANKL zu reifen Osteoklasten (Aktivierungsphase). Es folgt die Resorptionsphase, in der die Osteoklasten die Knochenmatrix abbauen. Dabei werden Wachstumsfaktoren aus der Knochenmatrix freigesetzt. Zu diesen gehören vor allem BMP, FGFs, TGF- β und IGF, welche die Osteoblasten aktivieren. Um die Resorption zu begrenzen, gehen die Osteoklasten anschließend in die Apoptose über. Überreste des Abbaus werden in der Umkehrphase von makrophagenähnlichen Zellen phagozytiert. Die aktivierten Osteoblasten beginnen mit der Bildung neuer Knochenmatrix und ersetzen damit den resorbierten Knochen (Formationsphase) (Zhao et al. 2006; Pederson et al. 2008; Tang et al. 2009; Teti and Rucci 2010; Baron et al. 2011).

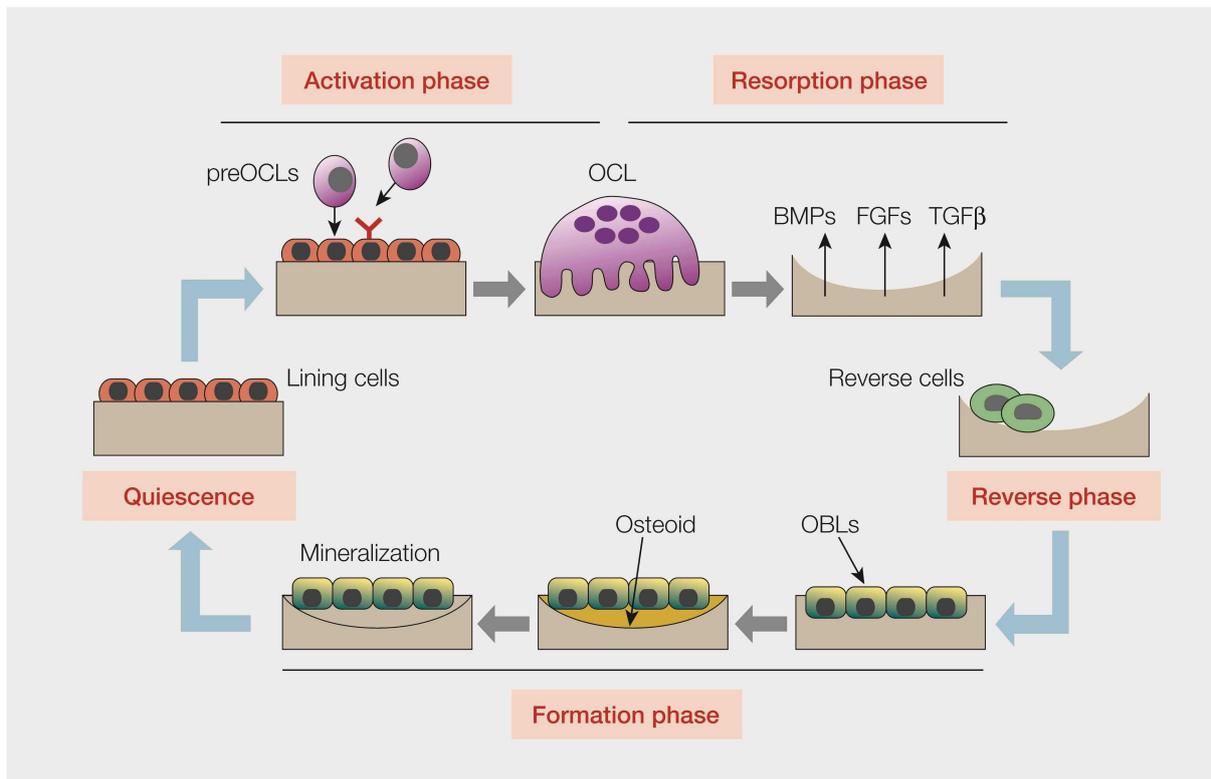


Abbildung 8: Die Phasen des *bone remodeling*: Aktivierungsphase (*Activation phase*), Resorptionsphase (*Resorption phase*), Umkehrphase (*Reverse phase*), Formationsphase (*Formation phase*), Ruhephase (*Quiescence*); Osteoklasten (OCL), Osteoblasten (OBL) (Teti and Rucci 2010).

Die Aktivität der BMUs sowie der einzelnen Zelltypen, unterliegt einer Vielzahl von Regulationsmechanismen. Das Parathormon (PTH) beeinflusst den Knochenumbau durch seine Effekte auf die Kalzium-Homöostase. PTH wird in den Hauptzellen der Nebenschilddrüsen gebildet und erhöht die Kalziumkonzentration im Blut. Durch Aktivierung der RANKL-Expression in Osteoblasten induziert PTH die Freisetzung von Kalzium aus dem Knochen. Gleichzeitig reduziert es die Expression von OPG und fördert somit die Differenzierung reifer Osteoklasten. Lang anhaltender Kalziummangel führt daher zu einem Verlust an Knochenmasse (Kondo et al. 2002; Harada and Rodan 2003).

Auch die Sexualhormone, allen voran das Östrogen, gehören zu den wichtigen Regulatoren des *bone remodeling*. Osteoporose und Osteopenie als Folgen eines Östrogenmangels verdeutlichen den großen Einfluss des weiblichen Sexualhormons (Pacifci 1998; Khosla et al. 2008, 2011). Es entfaltet seine anabole Wirkung im Knochen vor allem über den Östrogenrezeptor α (*estrogene receptor α – ER- α*), indem es sowohl die RANKL-induzierte Differenzierung von Osteoklasten, als auch die Produktion von RANKL in Osteoblasten

1. Einleitung

hemmt. Gleichzeitig fördert es die Produktion von OPG (Oursler et al. 1991; Shevde et al. 2000; Srivastava et al. 2001; Khosla et al. 2012; Borjesson et al. 2013).

Das Gleichgewicht zwischen Aufbau der Knochenmatrix durch die Osteoblasten und Abbau durch die Osteoklasten ist von essentieller Bedeutung. Eine Störung des komplexen Systems des *bone remodeling* kann zu unterschiedlichen Krankheitsbildern, wie Osteopetrose, Osteosklerose und Osteoporose führen.

Ursache der Osteopetrose ist eine verminderte Funktion der Osteoklasten, wodurch es zu einem geringeren Abbau der Knochenmatrix und damit zu einer Anhäufung von Knochensubstanz im Körper kommt. Die Osteosklerose entsteht durch eine gesteigerte Aktivität der Osteoblasten. Knochenmatrix wird vermehrt aufgebaut, was zu einer Hypertrophie des Knochengewebes führt. Die Osteoporose schließlich, eine der häufigsten Erkrankungen des Knochens, wird durch ein Ungleichgewicht zwischen dem Knochenaufbau bzw. -abbau zugunsten des Knochenabbaus hervorgerufen und äußert sich in einer verminderten Dichte und Qualität der Knochenstruktur (Karsenty 1999; Enderle 2003; Bartl and Bartl 2011).

Auch das Nervensystem ist ein wichtiger Faktor bei der Aufrechterhaltung des Gleichgewichts zwischen Auf- und Abbau. Patienten mit Verletzungen des Rückenmarks leiden an einer verminderten Knochendichte und haben dadurch ein erhöhtes Risiko einer Fraktur, insbesondere in den unteren Extremitäten (Dauty et al. 2000; Jiang et al. 2006). Eine andere Studie konnte zeigen, dass Frakturen bei Patienten mit Kopfverletzungen schneller und mit einer vermehrten Kallusbildung heilen (Perkins and Skirving 1987). Zudem konnten Niedermair et al. in Mausmodellen mit ausgeschaltetem sympathischen Nervensystem und fehlendem sensiblem Neurotransmitter Substanz P eine gestörte Frakturheilung und schlechtere biomechanische und strukturelle Knochenparameter nachweisen (Niedermair et al. 2014).

1.4. Das Nervensystem

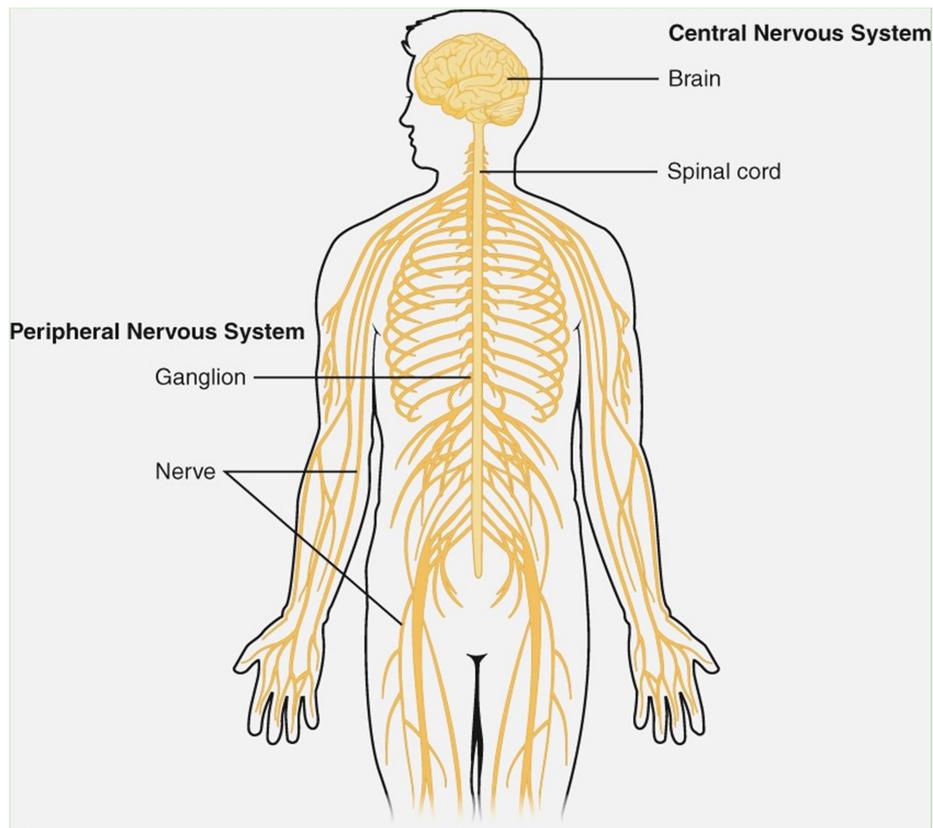


Abbildung 9: Das zentrale Nervensystem, bestehend aus Gehirn (*brain*) und Rückenmark (*spinal cord*), und das periphere Nervensystem. Lizenz: Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC BY 4.0).

Das Nervensystem kann morphologisch in das zentrale (ZNS) und das periphere Nervensystem (PNS) unterteilt werden (Abb. 9). Funktionell wird zwischen dem somatischen und dem vegetativen Nervensystem unterschieden. Das somatische Nervensystem koordiniert die Wahrnehmung der Umwelt und die Motorik, sensorische und sensible Nervenfasern (Afferenzen) nehmen Reize auf und leiten diese zum ZNS, motorische Fasern (Efferenzen) leiten Erregungen vom ZNS zu den Zielzellen. Das vegetative Nervensystem ist der willkürlichen Kontrolle weitestgehend entzogen und nimmt Einfluss auf die Vital- und Organfunktionen. Es wird in das sympathische Nervensystem (SNS) und parasympathische Nervensystem unterteilt, die überwiegend antagonistisch wirken (Aumüller et al. 2007; Klinke et al. 2010; Elefteriou et al. 2014).

Das Nervensystem besteht aus Neuronen (Nervenzellen) und Gliazellen. Gliazellen sind die Hilfszellen der Neurone und übernehmen eine Vielzahl verschiedener Aufgaben. Sie

1. Einleitung

fungieren u.a. als Stützzellen und sind an der Homöostase des ZNS beteiligt. Im peripheren Nervensystem bilden sie als Schwann-Zellen die Myelinscheiden um die langen Fortsätze der Neurone (Axone) aus. Neurone sind für die Erregungsübertragung und -weiterleitung, aber auch für die Verarbeitung und Speicherung von Informationen zuständig. Als Fortsätze des Zellkörpers besitzen sie das Axon und Dendriten. Axone verzweigen sich am Ende und bilden Axonterminale aus. Über sie werden die Informationen an andere Neurone oder Effektororgane übermittelt. Dendriten nehmen Informationen aus anderen Nervenzellen und Sinneszellen über synaptische Kontakte auf.

Die Signalübertragung auf andere Zellen findet über Synapsen statt, im menschlichen Nervensystem überwiegend indirekt über chemische Synapsen. Die Übertragung erfolgt durch chemische Signalmoleküle (Neurotransmitter), die aus Vesikeln der präsynaptischen Membran in den synaptischen Spalt abgegeben werden und an spezifische Rezeptoren der postsynaptischen Membran binden. Anschließend werden die Neurotransmitter rasch wieder abgebaut und in die präsynaptische Zelle oder eine Gliazelle aufgenommen (Aumüller et al. 2007; Welsch 2009; Klinke et al. 2010).

Neurotransmitter können exzitatorisch (erregend) oder inhibitorisch (hemmend) wirken. Im menschlichen Nervensystem gibt es eine Vielzahl an Neurotransmittern, zu ihnen gehören u.a. Acetylcholin, Monoamine wie Noradrenalin (NA) und Dopamin, Aminosäuren wie Glutamat und Aspartat und Neuropeptide wie Vasopressin, Substanz P (SP) und *Calcitonin gene-related peptide* (CGRP) (Welsch 2009; Klinke et al. 2010).

1.4.1. Der Einfluss des Nervensystems auf den Knochen

Eine große Anzahl an sensorischen und sympathischen Nervenfasern und Nervenendigungen innerviert den Knochen (Miller and Kasahara 1963; Grönblad et al. 1984; Bjurholm et al. 1988a). Das Periost und die Synovialmembran, wie auch die Epiphysenfuge, der mineralisierte Knochen und das Knochenmark sind von einem Netz aus Nervenfasern durchzogen. Sie dringen über die Sharpey-Fasern, die das Periost am Knochen fixieren, in den Knochen ein und verlaufen überwiegend in den Havers- und Volkmannkanälen entlang der Blutgefäße. Aber auch unabhängig der Blutgefäße verlaufende Nervenfasern und freie Nervenendigungen konnten identifiziert werden. Die Innervation mit sensiblen und sympathischen Nervenfasern korreliert dabei positiv mit der metabolischen Aktivität im

1. Einleitung

Knochen (Hukkanen et al. 1992; Hara-Irie et al. 1996; Mach et al. 2002; Elefteriou et al. 2014).

Das Nervensystem ist an der embryonalen Knochenentwicklung, sowie der Knochenhomöostase und Regeneration des Knochens im Erwachsenenalter beteiligt, indem Neurotransmitter durch sensible und sympathische Nervenfasern ausgeschüttet werden. Die Neurotransmitter wirken über spezifische Rezeptoren, die von Osteoblasten, Osteoklasten und deren Vorläuferzellen exprimiert werden. So reguliert es u.a. über die Neurotransmitter SP, CGRP, und Noradrenalin (NA) die Differenzierung von Osteoblasten und Osteoklasten (Abb. 10) (Konttinen et al. 1996; Garcia-Castellano et al. 2000; Jones et al. 2004; Offley et al. 2005; Grässel 2014). Der Nachweis von SP- und CGRP-positiven Nervenfasern im Frakturkallus lässt außerdem einen Einfluss des Nervensystems auf den Heilungsprozess von Frakturen vermuten. Auch am Längenwachstum der Knochen und der heterotopen Ossifikation ist das Nervensystem beteiligt (Hukkanen et al. 1993; Garcia-Castellano et al. 2000; Li et al. 2007; Niedermair et al. 2014).

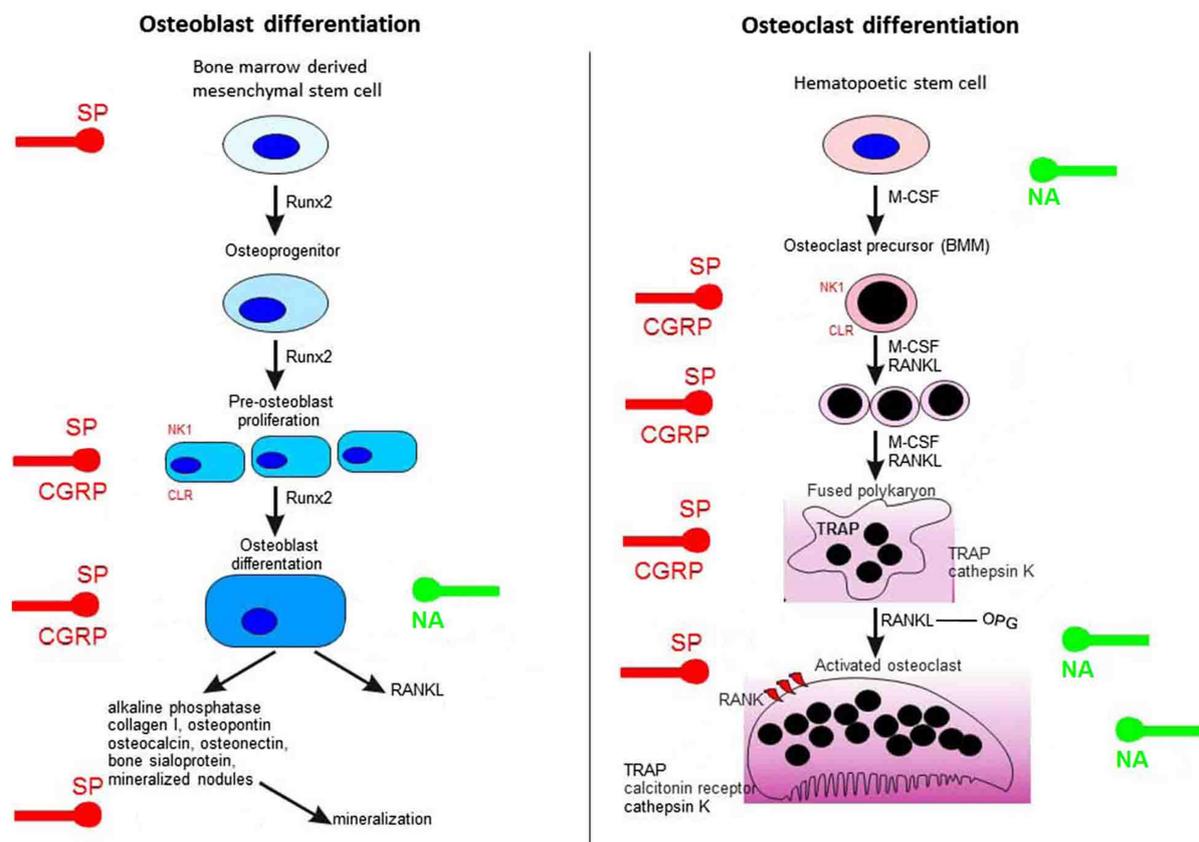


Abbildung 10: Einfluss der Neurotransmitter SP, CGRP und NA auf unterschiedliche Differenzierungsphasen von Osteoblasten und Osteoklasten. Die Transmitter binden an die spezifischen Rezeptoren: SP bindet an den NK1 - neurokinin 1 receptor, CGRP an den CLR - calcitonin receptor-like receptor; modifiziert nach Grässel (Grässel 2014).

1.4.2. Das sensible Nervensystem

1.4.2.1. Der sensible Neurotransmitter Substanz P (SP)

Das Neuropeptid SP besteht aus elf Aminosäuren und gehört zur Gruppe der Tachykinine. Weitere Vertreter dieser Gruppe sind Neurokinin A, Neurokinin B, Neuropeptid K und Neuropeptid γ (Lembeck 1953; Lerner and Persson 2008). SP leitet sich aus dem Präprotachykinin-A-Gen ab, welches auch Neurokinin A, Neuropeptid K und Neuropeptid γ verschlüsselt und kommt sowohl im ZNS als auch im PNS überwiegend in unmyelinisierten C-Fasern vor (Otsuka and Konishi 1976; Carter and Krause 1990; Goto and Tanaka 2002; Imai and Matsusue 2002). Vor allem von B-Zellen der Spinalganglien gebildet, gelangt es in Vesikeln durch axonalen Transport zu den Axonterminalen der Nervenzellen und wird bei Bedarf freigesetzt (Brimijoin et al. 1980; Harmar and Keen 1982; Plenderleith et al. 1990; Imai and Matsusue 2002). Als Neuropeptid wirkt SP über die Bindung an Tachykinin-Rezeptoren (auch Neurokinin-Rezeptoren - NK-R), die zur Familie der membranständigen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gehören und in drei Subtypen unterteilt werden können: NK₁-R, NK₂-R und NK₃-R (Abb. 11). Tachykinine können je nach Verfügbarkeit der Rezeptoren an alle NK-R binden, jedoch mit unterschiedlicher Präferenz. SP besitzt die höchste Affinität für den NK₁-R, Neurokinin A bindet vor allem an den NK₂-R und Neurokinin B überwiegend an den NK₃-R (Regoli et al. 1994; Harrison and Geppetti 2001; Severini et al. 2002). SP wird bei Erregung der Nozizeptoren ausgeschüttet und dient der Schmerzweiterleitung. Außerdem beeinflusst es viele physiologische Prozesse wie die Kontraktion der glatten Muskulatur, Vasodilatation, Paravasation, Angiogenese, Chemotaxis und Entzündungsreaktion (Lerner and Persson 2008).

1. Einleitung

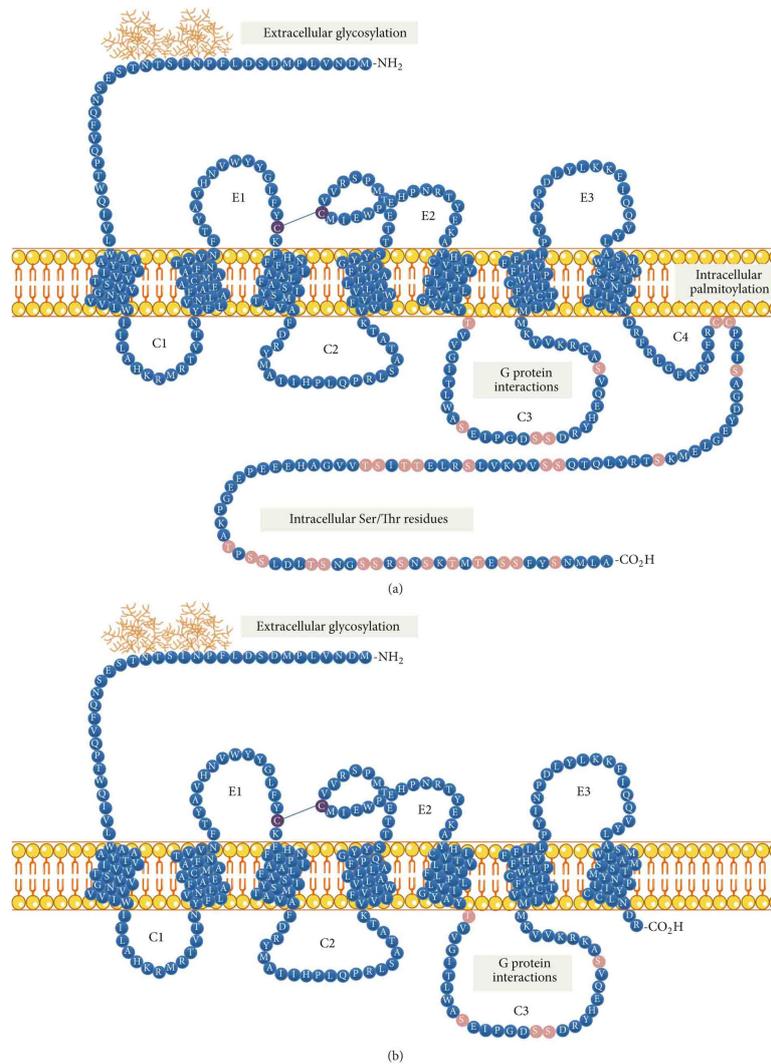


Abbildung 11: Schematische Darstellung eines NK₁-Rezeptors; komplette Isoform (a) und gekürzte Isoform (b); E1, E2, E3: extrazelluläre Schleifen, C1-C4: Intrazelluläre Schleifen (Garcia-Recio and Gascon 2015).

Im knöchernen Skelett konnten SP-positive Nervenfasern im Periost und Knochenmark, in der Epiphysenfuge und im subchondralen Knochen nachgewiesen werden. Eine geringe Anzahl dieser Fasern konnte auch in der Nähe der *bone lining cells* detektiert werden. SP-positive Nervenfasern gelangen mit den Blutgefäßen in den Knochen, trennen sich im Knochenmark ab und enden dort als freie Nervenendigungen (Grönblad et al. 1984; Hill and Elde 1991; Imai and Matsusue 2002; Liu et al. 2007).

Die NK₁-R finden sich sowohl auf der Plasmamembran als auch im Zytoplasma von Osteoklastenvorläuferzellen und Osteoklasten, ebenso in MSCs, Osteoblasten und Osteozyten, jedoch in geringerem Maße (Goto et al. 1998; Mori et al. 1999; Jones et al. 2004; Grässel 2014). Dass SP über die Bindung an den NK₁-R die Knochenbildung beeinflusst,

zeigte eine Studie mit Ratten, bei denen NK₁-R mit einem Antagonisten blockiert worden sind. Bei diesen Tieren konnte eine deutlich verminderte Mineralisierung des Knochens festgestellt werden (Kingery et al. 2003). Ebenso konnte in Mäusen, bei denen SP-positive Nervenfasern mit Capsaicin blockiert wurden, eine erhöhte Knochenresorption sowie eine geringere Knochenbildung und eine daraus resultierende Reduktion der Knochenmasse nachgewiesen werden (Offley et al. 2005). Die Bedeutung von SP für den Knochenmetabolismus ist jedoch nicht vollständig geklärt. Zum einen stimuliert SP die Proliferation von MSCs und induziert die Osteoblastendifferenzierung über den Wnt-vermittelten Signalweg (Mei et al. 2013; Fu et al. 2014; Mei et al. 2014), zum anderen wird die Aktivität von Osteoklasten durch SP gesteigert und die Osteoklastogenese durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B gefördert (Mori et al. 1999; Goto et al. 2001; Sohn 2005; Kojima et al. 2006; Liu et al. 2007; Wang et al. 2009). Die Effekte auf Osteoblasten sind jedoch von der vorherrschenden SP-Konzentration abhängig. Während SP bei einer Konzentration $> 10^{-8}$ mol/l die Differenzierung der Osteoblasten stimuliert, die Knochenmineralisierung fördert und die Expression von RUNX2, Osteocalcin und Kollagen I erhöht, übt es bei einer Konzentration von $< 10^{-8}$ mol/l einen katabolen Effekt aus, indem es die Osteoblastendifferenzierung und die Expression von BSP, Osteopontin und Osteocalcin hemmt (Adamus and Dabrowski 2001; Azuma et al. 2004; Goto et al. 2007; Wang et al. 2009; Grassel 2014; Niedermair et al. 2014). In dieser Arbeit wird der direkte Einfluss des Neuropeptids SP auf Osteoblasten und Osteoklasten untersucht.

1.4.2.2. Der sensible Neurotransmitter Calcitonin gene-related peptide (CGRP)

CGRP ist ein aus 37 Aminosäuren bestehendes Neuropeptid. Es entsteht durch alternatives Splicen des Calcitonin/CGRP-Gens, welches auf Chromosom 11 lokalisiert ist. Je nach Gewebe unterscheidet sich die gebildete *messenger RNA* (mRNA): im Schilddrüsengewebe entsteht die Präprocalcitonin kodierende mRNA, im Nervengewebe wird die mRNA für Präpro-CGRP abgeschrieben (Rosenfeld et al. 1983). Es existieren zwei Formen des CGRP, die sich in drei Aminosäuren unterscheiden: α -CGRP und β -CGRP. β -CGRP findet sich überwiegend im enterischen Nervensystem, wohingegen α -CGRP vor allem in den sensiblen Nervenfasern vorkommt (Wimalawansa 1996). α -CGRP wird, wie alle Neuropeptide, in sekretorischen Granula gespeichert und wirkt im Gegensatz zu klassischen

1. Einleitung

Neurotransmittern wie Glutamat, Acetylcholin oder γ -Aminobuttersäure, die ihre Wirkung an den postsynaptischen Rezeptoren augenblicklich nach deren Ausschüttung in den synaptischen Spalt entfalten, langsam und diffus. Neuropeptide werden nicht in den synaptischen Spalt abgegeben, sondern verteilen sich in einem größeren extrazellulären Volumen, um schließlich an ihre Rezeptoren zu binden (Zaidi et al. 1987a; Kelly 1993; Bean et al. 1994; Imai and Matsusue 2002).

CGRP ist sowohl im ZNS als auch im PNS weit verbreitet. Es findet sich im Cornu posterius des Rückenmarks und in sensiblen Ganglien. CGRP-positive Nervenfasern konnten zudem entlang der Arterien und Venen, in Herz, Lunge, Gastrointestinaltrakt und im Knochen nachgewiesen werden (Wimalawansa 2001; Hagner et al. 2002; Jones et al. 2004).

CGRP nimmt u.a. Einfluss auf das ZNS, insbesondere reguliert es das Schmerzempfinden und die Ausschüttung der Transmitter SP und Acetylcholin. Des Weiteren beeinflusst es das kardiovaskuläre System, indem es die Schlagfrequenz des Herzens erhöht und stark vasodilatativ auf das kapazitive Gefäßsystem wirkt. Die Freisetzung von Hormonen der Hypophyse, von Pankreasenzymen und der Magensäure wird ebenfalls durch CGRP gesteuert (Oku et al. 1987; Wimalawansa 1996; van Rossum et al. 1997; Wimalawansa 2001; Yallampalli et al. 2002; Kaygisiz et al. 2003; Rossi et al. 2003).

Seine Wirkung entfaltet CGRP über Rezeptoren, die zur Familie B oder Sekretin-Rezeptor-Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (*G-protein-coupled receptor* - GPCR) gehören. Diese heterodimeren Rezeptoren entstehen durch die Bildung eines Komplexes aus dem *calcitonin receptor-like receptor* (CRLR/CLR) und dem *receptor activity modifying proteine 1* (RAMP1) (Abb. 12). Der intrazelluläre Signalweg verläuft über die G-Proteine G_s und G_q . G_s erhöht durch Aktivierung der Adenylylcyclase die intrazelluläre Konzentration des *second messengers* cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP), durch G_q wird die Phospholipase $C\beta$ aktiviert, die Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) zu Inositol-1,4,5-triphosphat (IP_3) und Diacylglycerin (DAG) hydrolysiert (Kolakowski 1994; McLatchie et al. 1998; Harmar 2001; Rassow et al. 2008; Barwell et al. 2011). CGRP-Rezeptoren finden sich in großer Anzahl im kardiovaskulären System sowie im Nervensystem und wurden darüber hinaus in vielen Organen des Körpers, wie Gastrointestinaltrakt, Niere, Schilddrüse, Muskeln, Haut und Knochen nachgewiesen (Arulmani et al. 2004).

1. Einleitung

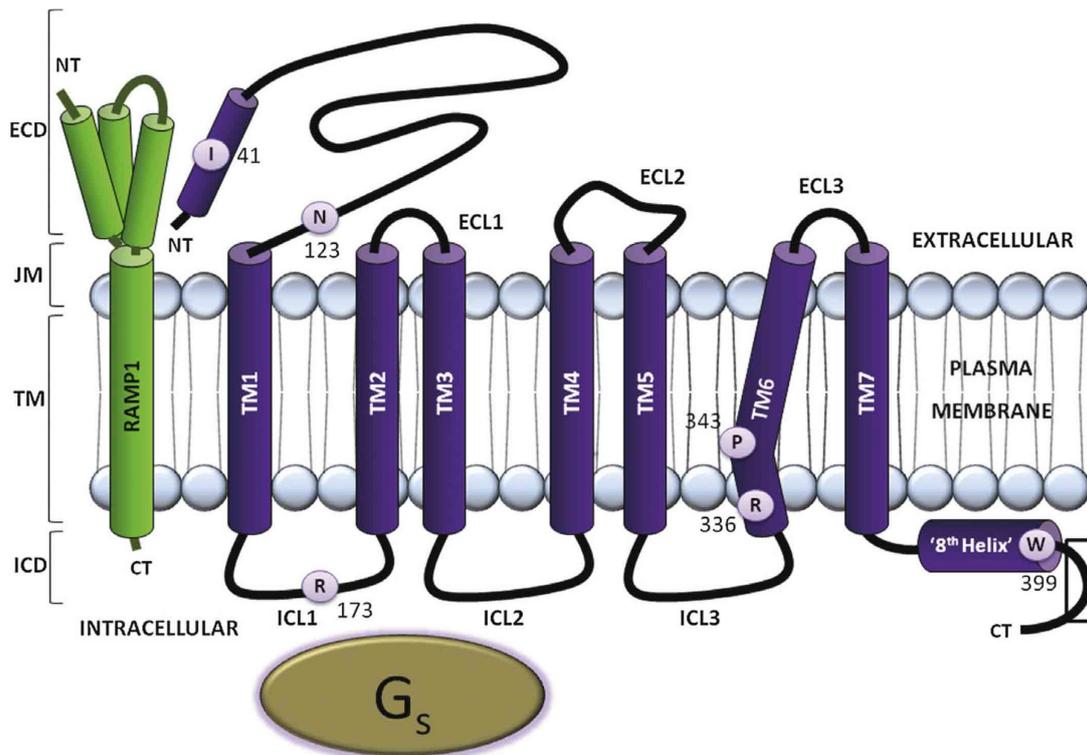


Abbildung 12: Schematische Darstellung eines CGRP-Rezeptors, der sich aus dem *calcitonin receptor-like receptor* (CLR; lila) und dem *receptor activity modifying protein 1* (RAMP1; grün) zusammensetzt; CT: C-Terminus, NT: N-Terminus, ECL1-3: extrazelluläre Schleifen, ICL1-3: lintrazelluläre Schleifen, TM1-7: Transmembranomäne (Barwell et al. 2011).

Im Knochen konnten neben CGRP-Rezeptor-exprimierenden Osteoblasten, Osteoklasten und MSCs auch CGRP-positive Nervenfasern in engem Kontakt zu Osteoblasten und Osteoklasten nachgewiesen werden (Hara-Irie et al. 1996; Jones et al. 2004; Grässel 2014). Mehrere Studien konnten einen direkten Einfluss von CGRP auf die zelluläre Aktivität von Osteoblasten und Osteoklasten zeigen. CGRP stimuliert die Differenzierung von Osteoblasten und die Bildung neuer Knochenmatrix. Gleichzeitig hemmt es die Osteoklastogenese, indem es die Bildung von RANKL reduziert und die Expression des Decoy-Rezeptors OPG fördert. Zudem wird auch die Aktivität der Osteoklasten und damit die Resorption der Knochenmatrix gehemmt (Zaidi et al. 1987b; Cornish et al. 1999, 2001; Lerner 2006; Lerner and Persson 2008; Yoo et al. 2014; Liang et al. 2015). Diese Effekte werden an CGRP-defizienten Mäusen deutlich, die an Osteopenie leiden (Schinke et al. 2004).

Die Stimulation von Osteoblasten mit CGRP erhöht intrazellulär die Konzentration von Kalzium und cAMP und senkte die Kaliumkonzentration über Adenosintriphosphat (ATP)-abhängige Kaliumkanäle mit daraus resultierender Hyperpolarisation (Michelangeli et al. 1989; Bjurholm et al. 1992; Kawase et al. 1995; Kawase and Burns 1998).

CGRP nimmt somit in unterschiedlichen Bereichen Einfluss auf die Knochenhomöostase. Jedoch basieren viele Erkenntnisse auf einer Denervierung des Knochens, bei der die sensiblen Nervenfasern ausgeschaltet werden. Diese Nervenfasern vermitteln ihre Wirkung aber nicht nur über CGRP, sondern auch über andere Neurotransmitter. Daher soll in dieser Arbeit speziell der Effekt des Neurotransmitters CGRP auf Osteoblasten bzw. Osteoklasten untersucht werden.

1.4.3. Das sympathische Nervensystem und der katecholaminerge Neurotransmitter Noradrenalin (NA)

Das SNS ist Teil des vegetativen Nervensystems, welches die Funktion der inneren Organe und Zellen, wie Kreislaufregulation, Thermoregulation und vegetative Reflexe, steuert. Die Axone des SNS ziehen vom Hirnstamm in das Rückenmark wo sie in Ganglien synaptisch umgeschaltet werden. Neurotransmitter aller präganglionären Neurone ist Acetylcholin. Der wichtigste postganglionäre Neurotransmitter ist Noradrenalin (NA), der wie alle Katecholamine über mehrere Zwischenschritte aus Tyrosin synthetisiert wird. Die Bildung von Dopa durch die Tyrosin-Hydroxylase ist dabei der geschwindigkeitsbestimmende Schritt. Schließlich entsteht NA durch Hydroxylierung aus Dopamin mit Hilfe der Dopamin- β -Hydroxylase. NA wird im Locus caeruleus und vor allem in der Nebennierenrinde gebildet und wirkt über Adrenozeptoren (AR) auf die Zielzellen. Die Adrenozeptoren gehören zu den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und werden in die fünf Subtypen α_1 , α_2 , β_1 , β_2 und β_3 unterteilt (Lands et al. 1967a, 1967b; Langer 1974; Rassow et al. 2008; Klinke et al. 2010). Die Subtypen sind an verschiedene G-Proteine gekoppelt. α_1 -AR aktivieren mit Hilfe des G_q -Proteins die Phospholipase C, die PIP_2 zu IP_3 und DAG hydrolysiert. α_2 -AR und β -AR wirken über die Adenylatcyclase, die die Bildung von cAMP aus ATP katalysiert. α_2 -AR inhibieren über das G_i -Protein die Adenylatcyclase, β -AR stimulieren die Adenylatcyclase über das G_s -Protein (Klinke et al. 2010).

α_1 -AR befinden sich vor allem in der glatten Muskulatur und beeinflussen die Muskelkontraktion, während α_2 -AR vor allem im Pankreas und den präsynaptischen adrenergen Neuronen zu finden sind und die Ausschüttung der Neurotransmitter im ZNS und SNS regulieren. Über β_1 -AR wird die Herzstimulierung, die Fettsäuremobilisation aus

1. Einleitung

Osteozyten als auch in Osteoklastenvorläuferzellen und Osteoklasten nachgewiesen werden (Aitken et al. 2009; Huang et al. 2009; Fonseca et al. 2011; Elefteriou et al. 2014; Grassel 2014).

In Osteoblasten fördert eine Aktivierung der α_1 -AR die Proliferation, wohingegen eine Stimulation der β_2 -AR die Proliferation inhibiert. Zudem erhöhen sowohl α_1 -AR-Agonisten als auch β_2 -AR-Agonisten die mRNA-Expression von RANKL und OPG in Abhängigkeit von Dosis und Dauer der Stimulation. Damit kann das SNS die Osteoklastogenese beeinflussen (Nishiura and Abe 2007; Huang et al. 2009; Kodama and Togari 2013).

Viele weitere Studien zeigen eine Wirkung des SNS über β_2 -AR, die die Mehrzahl der AR auf Osteoblasten darstellen (Moore et al. 1993; Togari et al. 1997; Kajimura et al. 2011). Eine Aktivierung von β_2 -AR führt zu einem Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration. In Osteoblasten wird dadurch der Transkriptionsfaktor CREB aktiviert, der die Expression von RANKL und Interleukin-6 (IL-6) steigert und somit die Differenzierung der Osteoklasten fördert, was phänotypisch in einer minderqualitativen Knochenmasse resultiert. Dieser Effekt des SNS wird durch eine verringerte Osteoblastenanzahl und -aktivität verstärkt (Kondo et al. 2001; Takeda et al. 2002; Yang et al. 2004; Bonnet et al. 2005; Elefteriou et al. 2005; Bonnet et al. 2007; Kajimura et al. 2011).

Das SNS wirkt jedoch nicht nur über RANKL auf die Osteoklasten, sondern auch direkt, indem es über *reactive oxygen species* (ROS), intrazelluläre Signalmoleküle der Stressantwort, die Osteoklastogenese stimuliert. Außerdem steigert es die Expression wichtiger osteoklastenspezifischer Gene, wie Kathepsin K und stimuliert insbesondere über β_2 -AR die Resorptionsaktivität der Osteoklasten (Bax et al. 1992; Adler et al. 1999; Arai et al. 2003; Kondo et al. 2013).

Die Wirkung von NA wird maßgeblich von der Wiederaufnahme von bis zu 90 % des NA aus dem synaptischen Spalt in die präsynaptischen Neurone durch den Na^+/Cl^- -abhängigen NA-Transporter (*norepinephrine transporter* - NET) beeinflusst. Eine Expression von NET konnte auch in Osteoblasten nachgewiesen werden, zudem besitzen sie die Fähigkeit NA abzubauen. Damit können Osteoblasten den Einfluss des SNS auf den Knochenmetabolismus kontrollieren (Ma et al. 2013; Elefteriou et al. 2014).

Um den direkten Effekt von NA auf Osteoblasten bzw. Osteoklasten genauer zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit Osteoblasten und Osteoklasten direkt mit NA stimuliert.

2. Ziel der Arbeit

Der im Knochen unentwegt stattfindende Umbauprozess (*remodeling*) trägt entscheidend zur Funktion des Knochens bei. Durch das *remodeling* kann sich der Knochen individuellen Belastungen anpassen, sich selbst, beispielsweise nach Frakturen, regenerieren und die Homöostase wichtiger Mineralsalze aufrechterhalten. Daran beteiligt sind in besonderem Maße Osteoblasten und Osteoklasten, die wichtigsten Zellen des Knochenaufbaus bzw. -abbaus. Gerät dieses System aus dem Gleichgewicht, kann dies zu Erkrankungen wie Osteoporose, Osteosklerose und Osteopetrose führen. Der *remodeling*-Prozess unterliegt einer Vielzahl an Regulationsmechanismen, an denen auch das sensible und sympathische Nervensystem beteiligt sind, die mit ihren Nervenfasern den Knochen innervieren und über das Ausschütten von Neurotransmittern den Metabolismus und die Differenzierung der Zellen im Knochen modulieren. So konnte durch Ausschalten bestimmter Rezeptoren in genetisch veränderten Tieren eine Veränderung der Eigenschaften des Knochens nachgewiesen werden. Auch die Deletion von sensiblen Neurotransmittern hatte deutliche Auswirkungen auf den Knochenmetabolismus.

In dieser Arbeit sollen die Effekte der sensiblen Neurotransmitter Substanz P und *α-Calcitonin gene-related peptide* sowie des sympathischen Neurotransmitters Noradrenalin auf den Metabolismus und die Funktion von Osteoblasten und Osteoklasten genauer untersucht werden. Dabei sollen folgende Fragen beantwortet werden:

- » Welchen Einfluss haben SP, α -CGRP und NA auf die Proliferation und Differenzierung von Osteoblasten und Osteoklasten?
- » Wie wird die Aktivität und Funktion von Osteoblasten und Osteoklasten durch die Neurotransmitter SP, α -CGRP und NA beeinflusst?
- » Inwiefern beeinflussen unterschiedliche Konzentrationen der Neurotransmitter die Funktion der Osteoblasten bzw. Osteoklasten?

Dazu wurden Osteoblasten und Knochenmarksmakrophagen aus murinen Röhrenknochen entnommen und diese *in vitro* mit den Neurotransmittern SP, α -CGRP und NA stimuliert. Durch den *in vitro*-Ansatz werden andere Faktoren, die den Metabolismus der Osteoblasten und Osteoklasten beeinflussen können, weitestgehend ausgeschlossen.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Geräte und Hilfsmittel

Name	Firma, Ort
Agagel Standard (Gelelektrophorese)	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland (D)
Analog Vortex Mixer (Vortexer)	VWR International, Radnor, Vereinigte Staaten von Amerika (USA)
Analysenwaage 770-60	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern, D
BD Discardit™ 5 ml (#309050) (Spritze)	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA
BD Microlance™ 3 (20 G 1 ½": #301300; 27 G ¾": #302200) (Injektionskanüle)	Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA
Camera Controller Digital Sight DS-U1	Nikon Corporation, Tokyo, Japan (J)
Cedex XS Cell Analyser	F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz (CH)
Cell Scraper 2-Posit. Blade 25 (#83.1830) (Zellschaber)	Sarstaedt AG & Co., Nümbrecht, D
CELLSTAR EASYstrainer™ 40 µm (#542040) (Zellsieb)	Greiner Bio-One International AG, Kremsmünster, Österreich (A)
Cellstar® 96W Black (#655086) (Mikrotiterplatte)	Greiner Bio-One International AG, Kremsmünster, A
CKX41 (Mikroskop)	Olympus Corporation, Tokyo, J
Corning® 96 Well (#3596) (Mikrotiterplatte)	Corning Inc., Corning, USA
Corning® 96 Well Black (#3904)	Corning Inc., Corning, USA
Corning® Cell Culture Flask 175 cm ² (#431080) (Zellkulturflasche)	Corning Inc., Corning, USA
Corning® Cell Culture Flask 25 cm ² (#430639) (Zellkulturflasche)	Corning Inc., Corning, USA

3. Material und Methoden

Corning® Cell Culture Flask 75 cm ² (#430641) (Zellkulturflasche)	Corning Inc., Corning, USA
Corning® Cell Lifter (#3008) (Zellschaber)	Corning Inc., Corning, USA
Corning® Centrifuge Tube PP 15 ml (#430791) (Zentrifugenröhrchen)	Corning Inc., Corning, USA
Corning® Centrifuge Tube PP 50 ml (#430829) (Zentrifugenröhrchen)	Corning Inc., Corning, USA
Costar® 24 Well (#3524)	Corning Inc., Corning, USA
Costar® 6 Well (#3516)	Corning Inc., Corning, USA
Costar® Stripette Serological Pipets 10 ml (#4488)	Corning Inc., Corning, USA
Costar® Stripette Serological Pipets 25 ml (#4489)	Corning Inc., Corning, USA
Costar® Stripette Serological Pipets 5 ml (#4487)	Corning Inc., Corning, USA
Costar® Stripette Serological Pipets 50 ml (#4490)	Corning Inc., Corning, USA
Duomax 1030 (Plattformschüttler)	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, D
Eclipse TE 2000-U (Mikroskop)	Nikon Corporation, Tokyo, J
Eppendorf Safe-Lock Tubes	Eppendorf AG, Hamburg, D
Gefrierschrank -20 °C	Liebherr AG, Biberach an der Riß, D
Gefrierschrank -80 °C	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, D
Hareus HERAcell® (CO ₂ -Inkubator)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
HERAsafe® (Sicherheitswerkbank)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Hirschmann pipetus (Pipettierhilfe)	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, D
Intas Gel Jet Imager	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, D

3. Material und Methoden

Kühlschrank 2-8 °C	Liebherr AG, Biberach an der Riß, D
Magnetrührer RCT basic	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, D
Microplate Reader GENios F129004	Tecan Group Ltd., Männedorf, CH
Mikrowelle 8022L	Privileg, Stuttgart, D
Minisart® NML Syringe Filter (Spritzenvorsatzfilter, 0,2 µm)	Sartorius AG, Göttingen, D
MiniSpin (Tischzentrifuge)	Eppendorf AG, Hamburg, D
Minizentrifuge Sprout	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, D
Mx3005P qPCR System	Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA
peqTWIST (Vortexer)	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, D
PerfectSpin 24 Plus (Zentrifuge)	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, D
Petrischale 94/16 MM (#632180)	Greiner Bio-One International AG, Kremsmünster, A
pH-Meter pH211	Hanna Instruments, Woonsocket, USA
qPCR Adhesive Seals (#4ti-0560)	4titude Limited, Wotton, Vereinigtes Königreich (UK)
qPCR-96-Well-Platten (#GK96HIGH)	Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Steinfurt, D
Research (2,5 µl, 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl), (Pipetten)	Eppendorf AG, Hamburg, D
ROTANTA/P Zentrifuge Typ 3502	Hettich AG, Bäch, CH
Spektralphotometer NanoDrop ND-2000	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, D
Standard Power Pack P25 (Netzteil)	Biometra GmbH, Göttingen, D
System V-95 (Autoklav)	System GmbH, Wettenberg, D
Thermocycler T Gradient	Biometra GmbH, Göttingen, D
Thermomixer comfort (Heizblock)	Eppendorf AG, Hamburg, D
TissueFAXSi plus	Tissue Gnostic, Wien, A
Wasserbad 1086	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, D

3.1.2. Chemikalien

Name	Firma, Ort
7-Amino-4-Methylcoumarin (#A9891)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Aceton (#9372.4)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Alizarin Rot C.I. 58005 (#0348.2)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Biozym LE Agarose (#840004)	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, D
Collagenase Typ II 300 Units/mg, Code: CLS-2 (#LS004174)	Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, USA
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$) (#1.06580)	Merck KGaA, Darmstadt, D
Dithiothreitol (DTT) (#A1101)	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Essigsäure (#6755.2)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Ethanol 100 % (#32205)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ethidiumbromid 1 % (#A1152,0010)	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) (#X986.2)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Fetal Bovine Serum (FBS) (#F7524)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Formaldehyd (#8775)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Iodessigsäure (#A2097)	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Kaliumchlorid (KCl) (#1.04936)	Merck KGaA, Darmstadt, D
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4) (#1.04873)	Merck KGaA, Darmstadt, D
Natriumazetat (#6673.1)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Natriumchlorid (NaCl) (#3957.1)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Paraformaldehyd (PFA) (#A3813)	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Propanol 70 %	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D
Protein Loading Buffer (5x) (#900216)	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, D

3. Material und Methoden

Schwefelsäure (#X873.1)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Triton X-100 (#T8787)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trypsin/EDTA (10x) (#T4174)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Z-Leu-Arg-AMC (#3210-v)	PeptaNova GmbH, Sandhausen, D

3.1.3. Zellkulturmedien, Zusätze und Puffer

Name	Firma, Ort
Antibiotic Antimycotic Solution (100x) (#A5955)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ascorbinsäure-2-Phosphat (#A8960)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
BIBN 4096 (#4561) (CGRP-Rezeptor-Antagonist)	Tocris Bioscience, Bio-Techne, Minneapolis, USA
Dexamethason (#D4902)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Doxazosin (#D9815)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Low glucose (1 g/l) (#31885-023)	Gibco®, Life Technologies, Carlsbad, USA
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)/Nutrient Mixture F-12 Ham (#D8437)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (Phosphat-Salz-Puffer, PBS) (#D8537)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
GlutaMAX™-I (100x) Supplement (#35050-038)	Gibco®, Life Technologies, Carlsbad, USA
ICI 118,551 hydrochloride (#0821) (β_2 -Adrenozeptor-Antagonist)	Tocris Bioscience, Bio-Techne, Minneapolis, USA
L-733,060 hydrochloride (#1145) (Neurokinin ₁ -Rezeptor-Antagonist)	Tocris Bioscience, Bio-Techne, Minneapolis, USA
L-Cystein (#C6852)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Minimum Essential Medium Eagle,	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

3. Material und Methoden

Alpha Modification (MEM) (#M4526)	
Minimum Essential Medium Eagle, Alpha Modification with RNA/DNA (MEM) (#M8042)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Nadolol (#N1892)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Noradrenalin (NA) (#N5785)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Pyruvat (#S8636)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Receptor Activator of NF- κ B Ligand (RANKL) (#462-TEC-010/CF)	R&D Systems, Bio-Techne, Minneapolis, USA
Recombinant Murine Macrophage Colony Stimulation Factor (M-CSF) (#315-02)	PeptoTech Inc., Rocky Hill, USA
Substanz P (SP) (#S6883)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Yohimbin (#Y3125)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
α -Calcitonin Gene Related Peptide (α -CGRP) (#C0292)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
β -Glycerophosphat (#G9422)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

3.1.4. Kits

Name	Firma, Ort
Absolutely RNA Miniprep Kit	F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, CH
Absolutely RNA Nanoprep Kit	F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, CH
Acid Phosphatase, Leukocyte (TRAP) Kit	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
AffinityScript QPCR cDNA Synthesis Kit	Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA
Apo-ONE [®] Homogeneous Caspase-3/7 Assay	Promega GmbH, Mannheim, D
Brilliant II SYBR [®] Green QPCR Master Mix	Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA
Cell Proliferation ELISA BrdU (colormetric)	F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, CH

3. Material und Methoden

JumpStart™ Taq DNA Polymerase (without MgCl ²)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Life Technologies, Carlsbad, USA
QuantiChrom™ Alkaline Phosphatase Assay Kit (DALP-250)	BioAssay Systems, Hayward, USA

3.1.5. Software

Name	Firma, Ort
Adobe® Photoshop® CS4 Extended Version 11.0	Adobe Systems Incorporated, San José, USA
GraphPad Prism 6	GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA
Microsoft Excel 2010	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Microsoft Word 2010	Microsoft Corporation, Redmond, USA
MxPro v4.10	Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA

3.2. Methoden

3.2.1. Entnahme von Knochengewebe

Die Entnahme von Knochengewebe erfolgte ausschließlich aus C57Bl/6J Mäusen im Alter von acht bis zehn Wochen von Charles River Laboratories Inc. (Sulzfeld, D). Die Mäuse wurden im Alter von sechs Wochen bestellt und bis zur Euthanasie im universitätseigenen Tierlaboratorium unter SPF-Bedingungen mit freiem Zugang zu Wasser und Futter gehalten. Sie waren bei gleichbleibender Raumtemperatur einem zwölfstündigen Hell-Dunkel-Rhythmus ausgesetzt.

3.2.2. Isolierung primärer Osteoblasten und primärer Knochenmarksmakrophagen

Die Isolierung der primären Osteoblasten und der primären Knochenmarksmakrophagen (*bone marrow-derived macrophages*, BMMs) erfolgte nach modifizierten Protokollen von

3. Material und Methoden

Dillon et al., Bakker und Klein-Nuland und Orriss und Arnett (Bakker and Klein-Nuland 2012; Dillon et al. 2012; Orriss and Arnett 2012).

Zunächst wurden die Mäuse mit Kohlenstoffdioxid (CO₂) euthanasiert und mit 2-Propanol desinfiziert. Danach wurden die Extremitäten mit Schere, Pinzette und Skalpell freipräpariert, vom restlichen Skelett getrennt und in PBS gewaschen. Die folgenden Schritte erfolgten unter einer Sterilbank. Die Röhrenknochen (Humerus, Ulna, Radius, Femur, Tibia) wurden aus dem sie umgebenden Gewebe herauspräpariert, aus den Gelenken herausgelöst und erneut in PBS gelagert.

Zur Entnahme des Knochenmarks wurden 10 ml α MEM - Medium (α MEM (#M4526), + 10 % FBS, + 1 % Antibiotic Antimycotic Solution 100x + 2 % GlutaMAXTM-I 100x) in Petrischalen vorgelegt, die Epiphysen der Röhrenknochen mit einer Schere abgetrennt und die Diaphysen in das Medium überführt. Anschließend wurde mit einer 5 ml Spritze und einer 27 G-Injektionskanüle das Medium aufgezogen, die Kanüle in das offene Knochenende vorgeschoben und das Knochenmark aus dem Knochen herausgespült, bis der Knochen weiß entfärbt war. Das Medium mit den darin enthaltenen Knochenmarkszellen wurde durch ein 40 μ m Zellsieb in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Um Zellhaufen zu vereinzeln, wurde mehrmals mit dem Stempel einer Spritze auf das Sieb geklopft und das Sieb erneut mit 10 ml Medium gespült. Das anschließende Abzentrifugieren der Zellen erfolgte in der ROTANTA/P Zentrifuge Typ 3502 für 5 min bei 1200 rpm. Der Mediumüberstand über dem Zellpellet wurde abgesaugt, das Zellpellet in 9 ml, 4 °C kaltem sterilem Aqua destillata (A. dest.) gelöst, um die Erythrozyten zu lysieren und kurz darauf 1 ml 10-fach PBS zur Pufferung dazugegeben. Die Zellen wurden erneut bei 1200 rpm für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 10 ml Medium resuspendiert und je 5 ml der Zellsuspension in Petrischalen überführt. Um die Proliferation der Knochenmarksmakrophagen zu stimulieren, wurde der Monozytenkolonien-stimulierende Faktor (M-CSF) in einer Konzentration von 20 ng/ml ins Medium hinzugefügt. Die Zellen wurden in einem Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂-Gehalt für zwei Tage kultiviert.

Zur Isolierung der Osteoblasten wurden die nach der Entfernung des Knochenmarks verbliebenen Diaphysen der Röhrenknochen mit einem Skalpell in kleine Stücke (Explantate ca. 1 mm x 2 mm) geschnitten und in 4 ml Kollagenaselösung (5,83 mg Collagenase Type II/10 ml PBS) für 20 min bei 37 °C auf einem Schüttler inkubiert. Die Kollagenaselösung

wurde anschließend abgesaugt und der Vorgang wiederholt. Durch die Zugabe von 5 ml Medium wurde die Kollagenasereaktion gestoppt und die Knochenstücke dreimal mit Medium gewaschen. Danach wurden die Knochenexplantate in 25 cm² Zellkulturflaschen mit jeweils ca. zehn Knochenstücken pro Kulturflasche in Wachstumsmedium (DMEM Low glucose (#31885-023), + 10 % FBS, + 1 % Antibiotic Antimycotic Solution 100x, + 2 % GlutaMAXTM-I (100x) Supplement, + 100 µmol/l Ascorbinsäure-2-Phosphat) bei 37 °C und 5 % CO₂-Gehalt im Inkubator kultiviert. Der Mediumwechsel erfolgte alle drei bis vier Tage. Die Zellen wuchsen aus den Knochenstücken heraus und waren nach ca. zehn bis zwölf Tagen konfluent.

3.2.3. Ernte und Aussaat der Knochenmarksmakrophagen und Induktion der Osteoklastogenese

Zwei Tage nach der Isolation wurden die BMM, nach Abnahme des Mediums und Waschen mit PBS, mit 5 ml 0,02 % EDTA in PBS (4 °C) abgelöst. Mit einem Zellschaber (Corning® #3008) konnten auch die verbliebenen Zellen gelöst werden. Nach dem Spülen mit Medium wurden die Zellen in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt, bei 1200 rpm für 5 min zentrifugiert (ROTANTA/P Zentrifuge Typ 3502), der Überstand abgenommen und das Zellpellet in 1 ml Medium resuspendiert, um anschließend die Zellzahl mit dem Cedex XS Cell Analyser zu messen. Für den BrdU-Assay, Kathepsin K-Assay und die TRAP-Färbung wurden die Zellen in 96-Well-Platten, bzw. in schwarzen 96-Well-Platten für den Caspase3/7-Assay in Triplikaten zu 5000 Zellen/Well ausgesät, für die RNA-Isolierung in 6-Well-Platten zu 150000 Zellen/Well.

Folgendes Differenzierungsmedium wurde verwendet:

- αMEM #M4526
- 10 % FBS
- 1 % Antibiotic Antimycotic Solution (100x)
- 2 % GlutaMAXTM-I (100x) Supplement
- M-CSF (20 ng/ml)
- RANKL (10 ng/ml)

Durch die Zugabe von M-CSF und RANKL differenzierten die Knochenmarksmakrophagen zu Osteoklasten (≥ 3 Zellkerne pro Zelle). Der Mediumwechsel erfolgte an Tag 2, die Zellen wurden für fünf Tage differenziert (Abb. 14).

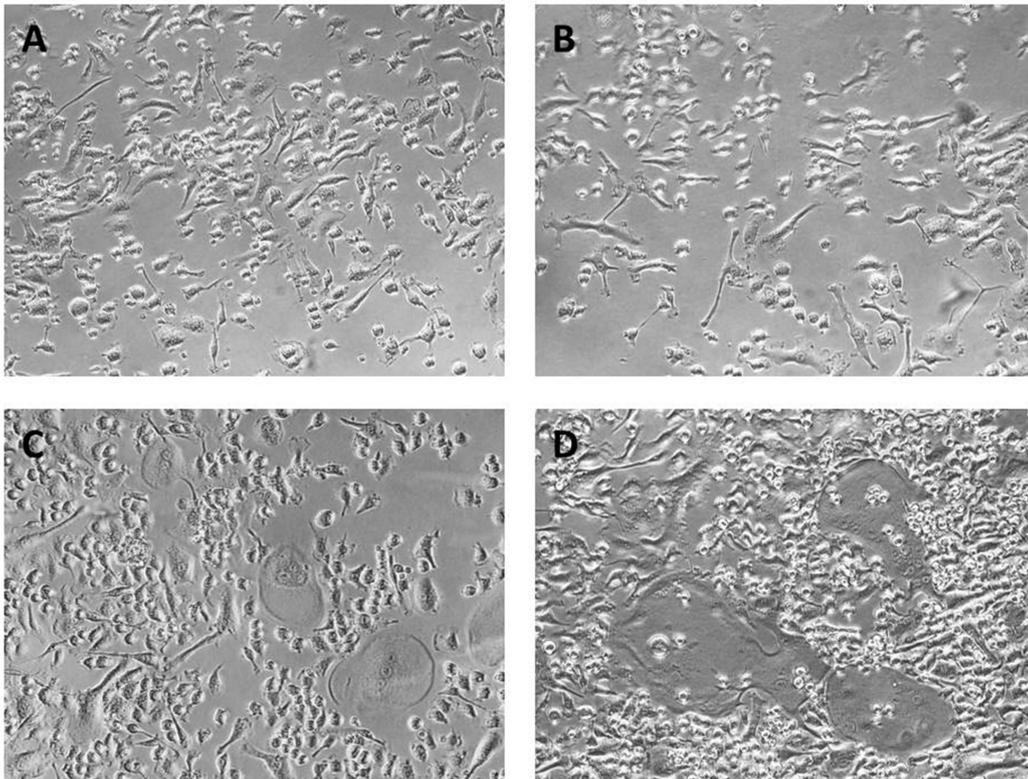


Abbildung 14: Knochenmakrophagen bzw. Osteoklasten 1 Tag (A), 3 Tage (B), 4 Tage (C) und 5 Tage (D) nach der Aussaat in Differenzierungsmedium; Vergrößerung: 20-fach.

3.2.4. Ernte und Aussaat der Osteoblasten

Je nach Wachstum der Osteoblasten aus den Knochenstücken und Konfluenz wurden diese nach zehn bis zwölf Tagen in neue Kulturgefäße ausgesät. Dazu wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit PBS gewaschen. Im Anschluss wurde zum Lösen der Zellen 1,5 ml Trypsin/EDTA (1x) zugegeben und diese für 6 min bei 37 °C inkubiert. Durch Klopfen der Kulturflaschen wurden auch die noch haftenden Osteoblasten gelöst. Die Reaktion wurde mit Medium gestoppt, die Zellen in ein Falcon überführt und für 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgenommen, das Zellpellet in 1 ml Medium resuspendiert und die Zellzahl mit dem Cedex XS Cell Analyser gemessen. Für die anschließenden Versuche wurden die Zellen in 96-Well-Platten in Triplikaten zu

3. Material und Methoden

5000 Zellen/Well ausgesät. Für die RNA-Isolierung wurden 6-Well-Platten mit 150000 Zellen/Well verwendet. Die Aussaat erfolgte in zweifacher Ausführung für die Differenzierungszeitpunkte Tag 7, 14 und 21 (Abb. 15).

Es wurde folgendes osteogenes Medium verwendet:

- α MEM (#M8042)
- 10 % FBS
- 1 % Antibiotic Antimycotic Solution (100x)
- 2 % GlutaMAXTM-I (100x) Supplement
- 10 μ mol/l Ascorbinsäure-2-Phosphat
- 10 mmol/l β -Glycerolphosphat
- 100 nmol/l Dexamethason

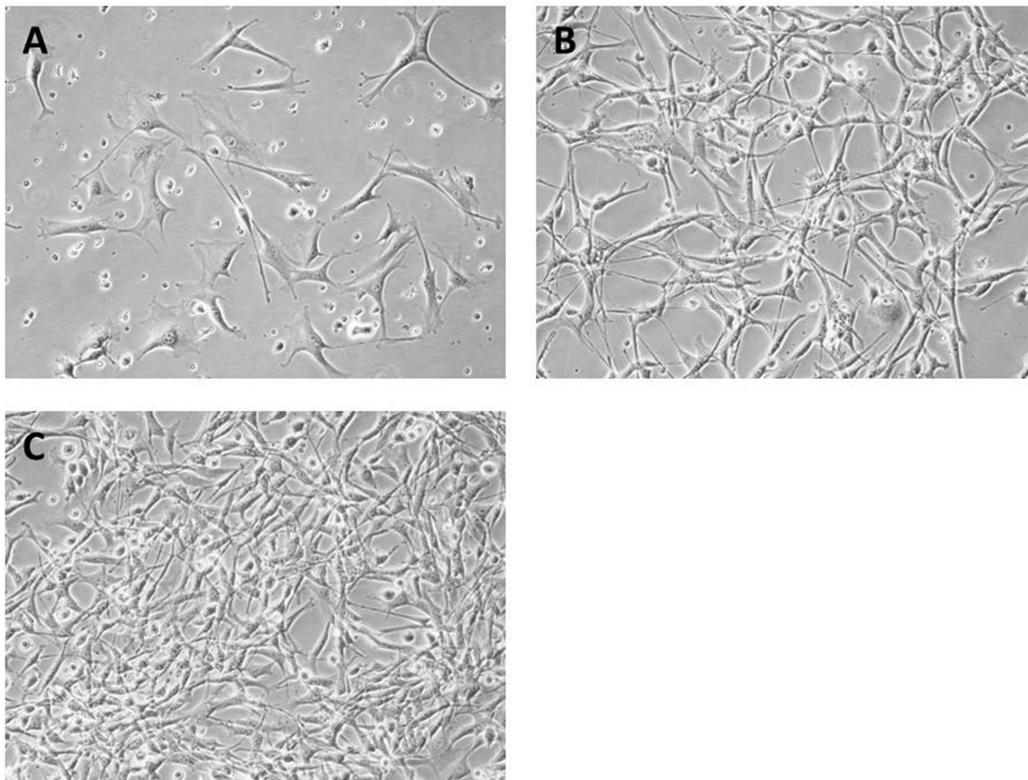


Abbildung 15: Osteoblasten 5 Tage (A), 8 (B) bzw. 9 Tage (C) nach der Aussaat in osteogenem Differenzierungsmedium; Vergrößerung: 40-fach.

3.2.5. Stimulation der Knochenmarksmakrophagen, Osteoblasten und Osteoklasten

Die Stimulation der Knochenmarksmakrophagen erfolgte an Tag 2 nach der Aussaat, zuvor wurden die Knochenmarksmakrophagen durch einen 24-stündigen FBS-Entzug synchronisiert.

Sowohl die Knochenmarksmakrophagen als auch die Osteoklasten und Osteoblasten wurden mit SP und α -CGRP in einer Konzentration von 10^{-8} mol/l und 10^{-10} mol/l und NA in einer Konzentration von 10^{-6} mol/l und 10^{-8} mol/l behandelt. Die Substanzen wurden nach Herstellerangaben in 0,05 mol/l Essigsäure gelöst, auf eine Konzentration von 10^{-6} mol/l und 10^{-8} mol/l (SP, α -CGRP) bzw. 10^{-4} mol/l und 10^{-6} mol/l (NA) verdünnt und für die Stimulation in einem Verhältnis von jeweils 1:100 dem Medium zugefügt, um die gewünschte Konzentration zu erhalten. Die Osteoklasten wurden vier Tage, die Osteoblasten 13 und 20 Tage nach der Aussaat stimuliert. Die Stimulation erfolgte für die letzten 24 h des Kultivierungszeitraums bei 37 °C und 5 % CO₂-Gehalt im Inkubator.

3.2.6. Versuche mit Inhibitoren

Als Stimulationskontrolle für SP, α -CGRP und NA wurden zusätzliche Versuche mit Inhibitoren durchgeführt. SP wurde mit L-733,060, einem Neurokinin₁-Rezeptor-Antagonist, inhibiert und α -CGRP mit dem CGRP-Rezeptor-Antagonisten BIBN 4096. Da NA in hoher Konzentration überwiegend über die β -AR wirkt, wurde bei der Stimulation mit 10^{-6} mol/l NA der kompetitive β -AR-Antagonist Nadolol bzw. der selektive β_2 -AR-Antagonist ICI-118,551 verwendet. Für die Stimulation mit 10^{-8} mol/l NA wurden der α_1 -AR-Antagonist Doxazosin und der α_2 -AR-Antagonist Yohimbine verwendet, da NA in dieser Konzentration seine Wirkung über die α -AR entfaltet (Harle et al. 2005; Straub et al. 2006). Die Inhibitoren wurden jeweils gleichzeitig mit SP, α -CGRP bzw. NA in einer Konzentration von 10^{-5} mol/l zugegeben. Zur Untersuchung agonistischer Wirkungen der verwendeten Inhibitoren wurden die Osteoklasten und Osteoblasten allein mit den jeweiligen Inhibitoren (10^{-5} mol/l) stimuliert.

3.2.7. RNA-Isolierung

Die Isolierung der Ribonukleinsäuren (*ribonucleic acid* - RNA) wurde mit dem *Absolutely RNA Miniprep Kit* für die Osteoklasten und dem *Absolutely RNA Nanoprep Kit* für die Osteoblasten nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Zunächst wurden die Osteoklasten mit 100 µl Lysepuffer (0,7 % β-Mercaptoethanol enthalten) lysiert, mit einem Zellschaber (Sarstaedt AG & Co, #83.1830) vom Wellboden gelöst und in ein 1,5 ml Eppendorf Tube überführt.

Osteoblasten wurden zunächst mit Trypsin/EDTA vom Wellboden gelöst, bei 1200 rpm für 5 min zentrifugiert (ROTANTA/P Zentrifuge Typ 3502) und das Zellpellet in 100 µl Lysepuffer lysiert. Danach wurde, sowohl bei den Osteoklasten als auch bei den Osteoblasten anstatt des im Protokoll angegebenen 80 % Sulfolan, 100 µl 70 % Ethanol (Ethanol 100 % verdünnt mit A. dest.) zugegeben und gut gemischt. Die Mischung wurde in ein RNA Binding Spin Cup überführt, für 60 s in der Tischzentrifuge MiniSpin (Eppendorf AG, Hamburg, D) bei 13400 rpm zentrifugiert und mit Niedrig-Salz-Waschpuffer gewaschen. Um genomische DNA zu entfernen wurde ein 15-minütiger Inkubationsschritt mit DNase durchgeführt, anschließend wurde die RNA durch mehrmaliges Hinzugeben von Hoch-Salz- und Niedrig-Salz-Puffer gewaschen und zuletzt in 30 µl (*Absolutely RNA Miniprep Kit*) bzw. 13 µl (*Absolutely RNA Nanoprep Kit*) Elutionspuffer durch Zentrifugation bei RT mit 13400 rpm für 2 min eluiert. Der Elutionspuffer wurde zuvor auf 60 °C im Heizblock Thermomixer comfort erhitzt. Die Konzentration der RNA wurde mit dem Spektralphotometer NanoDrop ND-2000 bestimmt und die RNA anschließend bei -80 °C aufbewahrt.

3.2.8. Komplementäre Desoxyribonukleinsäure (cDNA) Synthese

Das Umschreiben der RNA zu einzelsträngiger komplementärer Desoxyribonukleinsäure (cDNA) wurde mit dem *AffinityScript QPCR cDNA Synthesis Kit* nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Hierbei wird die RNA mithilfe der Reversen Transkriptase und Oligo-dT-Nukleotiden als Primer in cDNA umgeschrieben.

Reaktionsansatz:

cDNA Synthesis Master Mix (2x konz.)	10 µl
oligo(dT) Primer	3 µl
Affinity Script Reverse Transcriptase	1 µl
RNA (0,3 µg - 3 µg)	X µl
A. dest.	auffüllen auf 20 µl

Im Thermocycler erfolgten die Primerhybridisierung bei 25 °C (5 min) und die cDNA Synthese bei 42 °C (15 min). Beendet wurde die Reaktion durch eine 5-minütige Inkubation bei 95 °C. Die cDNA wurde bei -20 °C aufbewahrt.

3.2.9. Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Die qPCR ermöglicht durch die Quantifizierung der cDNA die Untersuchung der Expression einzelner Gene bezogen auf ein sogenanntes „Haushaltsgen“, dessen Expression auch unter verschiedenen Bedingungen als konstant angesehen wird. Dazu wird die Fluoreszenz gemessen, die sich proportional zur Menge des gebildeten PCR-Produkts verhält. Als interkalierender Fluoreszenzfarbstoff wurde Brilliant II SYBR® Green verwendet. Gemäß dem Protokoll wurde folgender Reaktionsansatz pipettiert:

Brilliant II SYBR® Green Master Mix	12,5 µl
forward Primer	0,5 µl
reverse Primer	0,5 µl
ROX-Referenzfarbstoff	0,375 µl
cDNA (25 ng)	bis zu 5 µl
A. dest.	auffüllen auf 25 µl

Spezifische Primer für die Gensequenzen wurden mit der Software Primer3 (sourceforge.net®) und der Genomdatenbank Ensembl (EMBL-EBI, Hinxton, Cambridgeshire, UK, www.ensembl.org/index.html) erstellt. Die Primer wurden von den Firmen Eurofins MWG GmbH (Ebersberg, D) und Microsynth AG (Balgach, CH) hergestellt.

3. Material und Methoden

Genname	Orientierung	Sequenz 5' – 3'
gapdh	forward	AAC TTT GGC ATT GTG GAA GG
	reverse	ACA CAT TGG GGG TAG GAA CA
tnfrsf11b	forward	CGA GTG TGT GAG TGT GAG GAA
	reverse	TGT TTC GCT CTG GGG TTC
bglap	forward	TGA GGA CCA TCT TTC TGC TCA
	reverse	TGG ACA TGA AGG CTT TGT CA
col1a1	forward	CAC CCT CAA GAG CCT GAG TC
	reverse	TCC CTC TCT TCC AGT CAG AGT
runx2	forward	CCT CTG ACT TCT GCC TCT GG
	reverse	ATG AAA TGC TTG GGA ACT GC
tnfsf11	forward	TGG AAG GCT CAT GGT TGG AT
	reverse	AGC AAA TGT TGG CGT ACA GG
sp7	forward	CCA CTT GAG CAA ACA TCA GC
	reverse	GCT GAT TGG CTT CTT CTT CC
bcl2	forward	TCG CAG AGA TGT CCA GTC AG
	reverse	CCG AAC TCA AAG AAG GCC AC

Tabelle 1: Primer Osteoblasten

Genname	Orientierung	Sequenz 5' – 3'
gapdh	forward	AAC TTT GGC ATT GTG GAA GG
	reverse	ACA CAT TGG GGG TAG GAA CA
tnfrsf11a	forward	GCT CCT GAA ATG TGG ACC AT
	reverse	CAC GAT GAT GTC ACC CTT GA
mmp9	forward	GAA GGC AAA CCC TGT GTG TT
	reverse	AGA GTA CTG CTT GCC CAG GA
ctsk	forward	AGG CGG CTA TAT GAC CAC TG
	reverse	TCT TCA GGG CTT TCT CGT TC
nfatc1	forward	GGT GCT GTC TGG CCA TAA CT
	reverse	GAA ACG CTG GTA CTG GCT TC

Tabelle 2: Primer Osteoklasten

Pro Ansatz wurden Duplikate erstellt und diese in 96-Well-PCR-Platten pipettiert. Die qPCR wurde mit dem MX3005P qPCR System und der zugehörigen Software MxPro v4.10 durchgeführt. Auf die Denaturierung bei 95 °C (10 min) folgten 40 Amplifikationszyklen mit der Denaturierung (95 °C, 30 s), der Primerhybridisierung (60 °C, 1 min) und der Elongation (72 °C, 1 min). Zur Prüfung der Spezifität der entstandenen PCR-Produkte wurden anschließend noch die Schmelzkurven untersucht. *Gapdh* wurde als „Haushaltsgen“ verwendet, die unstimulierten WT-Kontrollen dienten als Kalibrator. Zur Auswertung wurde der Kalibrator auf „0“ gesetzt und die Änderung der Genexpression mit \log_2 in Abhängigkeit zum Kalibrator berechnet.

3.2.10. BrdU-Assay

Der Bromdesoxyuridin (BrdU)-Assay dient der Untersuchung der Zellproliferation. Zur Analyse der Proliferation der Knochenmakrophagen enthielt das Medium keinen Zusatz von RANKL. Zusätzlich erhielten diese Zellen 24 h vor der Stimulation das in Abschnitt 3.2.3 genannte Medium ohne FBS, um die Zellen in die G_0 - Phase des Zellzyklus zu überführen (Synchronisation).

Die Durchführung erfolgte nach den Herstellerangaben des Cell Proliferation ELISA BrdU (colormetric)-Assays von Roche. BrdU ist ein Thymidinanalogon, welches anstelle von Desoxythymidintriphosphat während der S-Phase in die DNA eingebaut wird. Hierzu wurden die Zellen für 24 h mit BrdU inkubiert. Nach Zugabe des Peroxidase-gekoppelten Antikörpers anti-BrdU-POD bildet dieser mit BrdU einen Immunkomplex. Anschließend wurde der Substrat-Puffer hinzugefügt, welcher Tetramethyl-Benzidin enthält. Tetramethyl-Benzidin wird von der Peroxidase zu einem blauen Farbstoff umgesetzt. Die Reaktion wurde mit 1 mol/l H_2SO_4 gestoppt und daraufhin die Absorption gemessen. Sie steht in einem direkten Zusammenhang mit der Menge an synthetisierter DNA und damit der Zellproliferation. Die Messung erfolgte im Microplate Reader GENios F129004 bei 450 nm. Die Unterschiede der Zellproliferation wurden prozentual dargestellt, wobei die Wildtyp-Kontrollen (WT-Kontrollen) auf 100 % genormt wurden.

3.2.11. Tartrat-resistente saure Phosphatase (TRAP)-Färbung

Mit dem *Acid Phosphatase, Leukocyte (TRAP) Kit* wurde die Tartrat-resistente saure

Phosphatase (TRAP)-Färbung durchgeführt. TRAP ist ein Metalloprotein und Enzym, welches u.a. in Osteoklasten und Makrophagen vorkommt. Die in der Fast Garnet GBC Lösung enthaltene Proform des Farbstoffes wird durch TRAP zu einen kastanienbraunen Farbstoff umgesetzt, wodurch Osteoklasten identifiziert werden können. Dabei sind Osteoklasten im Gegensatz zu Makrophagen, die ebenfalls angefärbt werden, mehrkernig (min. 3 Zellkerne). Für die Digitalisierung der Wells wurde das TissueFAXSi plus verwendet, die Zählung der Zellen erfolgte mit Hilfe von Adobe® Photoshop® CS4 Extended. Die Unterschiede der Zellproliferation wurden prozentual dargestellt, die WT-Kontrollen wurden auf 100 % genormt.

3.2.12. Caspase 3/7-Assay

Der Caspase 3/7-Assay erfolgte nach dem Protokoll des Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 Assay von Promega. Caspasen (*cysteiny-aspartate specific protease*) sind die wichtigsten Enzyme der Apoptose. Mit dem Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 Assay kann die Aktivität der aktiven Caspasen 3 und 7 gemessen werden, wodurch Rückschlüsse auf die Apoptoserate der untersuchten Zellen gezogen werden können. Dazu wurde das nicht fluoreszierende Substrat Z-DEVD-Rhodamin 110, welches durch Abspaltung des DEVD-Peptids bei vorhandener Caspaseaktivität zu einem fluoreszierenden Farbstoff umgesetzt wird (Abb. 16), in einem lysierenden Puffer auf die Zellen gegeben. Die Messung der Emission erfolgte bei 535 nm nach 3 h 45 min, 6 h und 24 h im Mikrotiterplatten-Photometer (Anregungswellenlänge 485 nm). Die Ergebnisse wurden prozentual abgebildet, die WT-Kontrollen auf 100 % normiert.

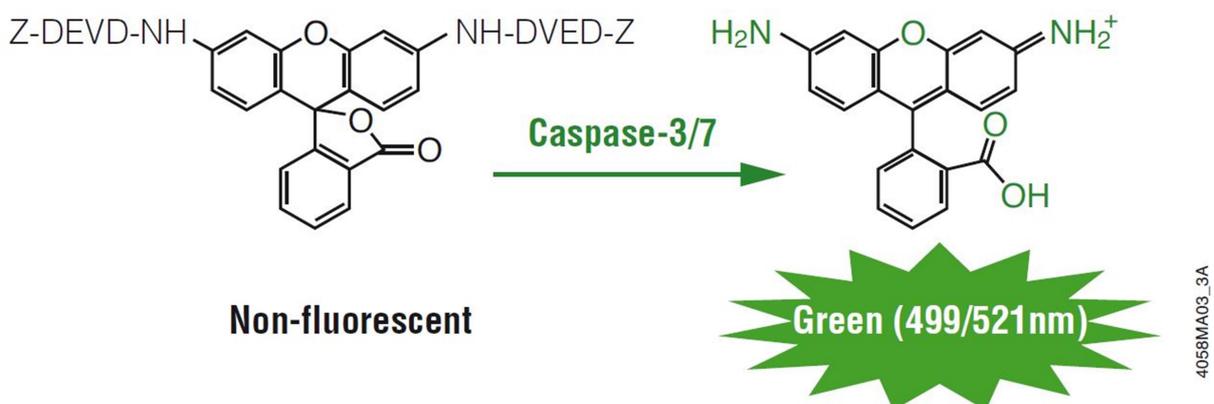


Abbildung 16: Bildung des fluoreszierenden Rhodamin 110 durch Abspaltung des DEVD-Peptids durch die Caspaseaktivität (Promega Corporation 2009).

3.2.13. Alkalische Phosphatase (ALP)-Assay

Alkalische Phosphatasen sind Enzyme, die Phosphorsäuremonoester spalten können und ihre höchste Aktivität im alkalischen Bereich besitzen. Sie kommen bei Säugetieren vor allem in Leber und Knochen vor. Im Knochen ist die Alkalische Phosphatase in Osteoblasten lokalisiert. Die ALP-Aktivität ist somit ein Maß für die Aktivität der Osteoblasten. Zur Messung der Aktivität der alkalischen Phosphatase wurde das QuantiChrom™ Alkaline Phosphatase Assay Kit (DALP-250) von BioAssay Systems verwendet, bei dem para-Nitrophenylphosphat durch die alkalische Phosphatase in das gelbe para-Nitrophenol hydrolysiert wird. Dem Protokoll folgend wurden die Zellen zuerst mit 0,2 % Triton lysiert und anschließend Arbeitslösung mit para-Nitrophenylphosphat zugegeben. Die Messung erfolgte im Mikrotiterplatten-Photometer nach 0 min, 4 min, 10 min, 14 min, 30 min und 34 min bei einer Wellenlänge von 405 nm, die ALP-Aktivität (IU/L) wurde mit folgender Formel berechnet:

$$= \frac{(\text{OD}_{\text{SAMPLE } t} - \text{OD}_{\text{SAMPLE } 0}) \cdot \text{Reaction Vol}}{(\text{OD}_{\text{CALIBRATOR}} - \text{OD}_{\text{H}_2\text{O}}) \cdot \text{Sample Vol} \cdot t} \times 35.3$$

Die Ergebnisse wurden auf die WT-Kontrollen (100 %) normiert.

3.2.14. BCA-Assay

Die Konzentration der Proteine im Überstand der Zellkultur wurde mit dem Pierce™ BCA Protein Assay Kit ermittelt. Cu^{2+} -Ionen können durch Proteine zu Cu^{1+} -Ionen reduziert werden. Mit diesen bildet Bicinchoninsäure (BCA) einen violett farbigen Komplex, dessen Absorption gemessen werden kann. Anhand einer Standardreihe mit bekannten Proteinnengen von bovinem Serumalbumin (BSA) gelöst im Wasser (0 - 2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$), kann die Proteinkonzentration von Proben bestimmt werden. Triplikate der Proben wurden 1:2 verdünnt und jeweils 10 μl der Probe bzw. 10 μl der Standardlösung mit 200 μl der BCA-Arbeitslösung gemischt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Absorption wurde im Mikrotiterplatten-Photometer bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen.

3.2.15. Kathepsin K-Assay

Die Cysteinprotease Kathepsin K wird von Osteoklasten gebildet und ist für den Abbau der organischen Knochenmatrix verantwortlich. Die Messung der Aktivität von Kathepsin K im Zellkulturüberstand der Osteoklasten gibt somit Auskunft über die Osteoklastenaktivität. Hierzu wurde nach dem Protokoll von Wittrant. et. al. (Wittrant et al. 2003) das Substrat Z-Leu-Arg-AMC (Benzyloxycarbonyl-L-Leucyl-L-Arginin 4-Methylcoumaryl-7-Amid) verwendet, welches durch Kathepsin K gespalten wird. Dadurch wird die fluoreszierende Methylcoumarin-Gruppe freigesetzt, deren Emission bei einer Anregung mit 365 nm bei 465 nm gemessen werden kann. Die Osteoklasten wurden nach der 24-stündigen Stimulation an Tag 4 mit FBS-freiem Differenzierungsmedium kultiviert und anschließend der Zellkulturüberstand abgenommen. Zu 25 µl der Proben wurde 70 µl Reaktionspuffer und 5 µl des nach Herstellerangaben gelösten Substrats Z-Leu-Arg-AMC hinzugefügt. Die Endkonzentration des Substrats im Well betrug 2,55 nmol. Für die Standardkurve wurde 7-Amino-4-Methylcoumarin verwendet. Die Stocklösung (0,05 mol/l) wurde in Reaktionspuffer 1:200 verdünnt und daraus eine Verdünnungsreihe mit folgenden Konzentrationen von 7-Amino-4-Methylcoumarin angesetzt: 250 µmol/l - 125 µmol/l - 62,5 µmol/l - 31,25 µmol/l - 15,625 µmol/l - 7,8 µmol/l. Pro Well wurden jeweils 95 µl Reaktionspuffer und 5 µl der jeweiligen Verdünnungen zugegeben. Anschließend wurden die Proben im Dunkeln bei 37 °C für 24 h inkubiert und die Reaktion durch die Zugabe von 50 µl Stop-Puffer angehalten. Die Anregung und Messung erfolgte mit dem Mikrotiterplatten-Photometer. Die Aktivität von Kathepsin K wurde in µmol/µg Protein/24 h angegeben, der Gesamtproteingehalt durch den BCA Protein Assay ermittelt und die Ergebnisse prozentual auf die normierten WT-Kontrollen (100 %) angegeben.

3.2.16. Alizarin-Rot-Färbung

Die Alizarin-Rot-Färbung dient dem Nachweis terminal differenzierter, matrixbildender Osteoblasten. Da Alizarin mit Kalzium einen leuchtend roten Komplex bildet, kann Kalziumphosphat, ein Bestandteil der von Osteoblasten gebildeten Knochenmatrix, nachgewiesen werden. Hierzu wurden die Zellen in 24-Well-Platten ausgesät und an Tag 21 mit PBS gewaschen und mit 10 % PFA fixiert. Nach erneutem Waschen mit saurem PBS (pH 4,2) wurde 2 % Alizarin-Rot-Lösung zugegeben, 20 min bei 37 °C inkubiert und anschließend

3. Material und Methoden

erneut mehrmals mit PBS gewaschen. Die Bilddokumentation erfolgte mit dem Mikroskop Nikon Eclipse TE2000-U.

4. Ergebnisse

Um die Effekte von sensiblen und sympathischen Neurotransmittern auf den Metabolismus von Osteoblasten und Osteoklasten zu untersuchen, wurden *in vitro* Experimente mit primären Zellkulturen durchgeführt. Dazu wurden Osteoblasten aus den Röhrenknochen und Knochenmarksmakrophagen aus dem Knochenmark von C57Bl/6J Mäusen isoliert. Nach osteogener bzw. osteoklastogener Differenzierung wurden die Zellen für die letzten 24 Stunden des Kulturzeitraums mit α -CGRP, SP und NA in jeweils zwei physiologisch bedeutsamen Konzentrationen stimuliert.

4.1. Osteoblasten

4.1.1. Mineralisierungsassay als Differenzierungskontrolle der Osteoblasten

Die von reifen Osteoblasten gebildete Knochenmatrix kann mit Hilfe der Alizarin-Rot-Färbung nachgewiesen werden. Die Färbung erfolgte nach 21 Tagen Differenzierung der Osteoblasten in osteogenem Medium und zeigt deutlich die Ausbildung von roten Komplexen, die durch den Nachweis von Kalziumablagerungen mittels Alizarin entstehen (Abb. 17). Damit ist der Nachweis von reifen, matrixproduzierenden Osteoblasten erbracht.

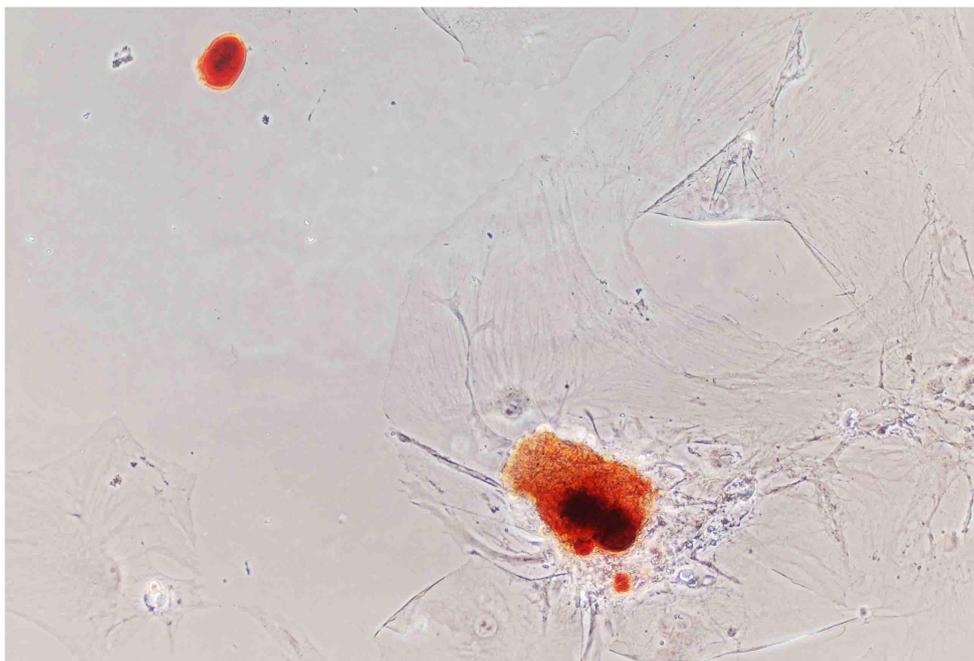


Abbildung 17: Nachweis von matrixproduzierenden Osteoblasten durch Anfärbung von Kalziumkomplexen mittels Alizarin-Rot-Färbung. Vergrößerung 40x.

4.1.2. Die Effekte der Stimulation mit SP, α -CGRP und NA auf die Proliferationsrate muriner Osteoblasten

Die Analyse der Zellproliferation wurde mittels BrdU-Assay durchgeführt. Die Messungen nach 14, wie auch nach 21 Tagen, osteogener Kultivierung zeigten eine Verdopplung der Proliferationsrate nach Stimulation der Osteoblasten mit NA in einer Konzentration von 10^{-6} mol/l (Abb. 18 A: 198,2 %, $p = 0,0313$; Abb. 18 B: 237,7 %, $p = 0,0313$). Nach 21 Tagen konnte auch nach Stimulation mit 10^{-8} mol/l NA eine signifikante Steigerung der Proliferationsrate festgestellt werden (Abb. 18 B: 155,6 %, $p = 0,0313$), während nach 14 Tagen nur ein tendenzieller Anstieg der Proliferation erkennbar war (Abb. 18 A). Durch Stimulation mit den Neurotransmittern SP und α -CGRP änderte sich die Proliferationsrate der Osteoblasten nicht.

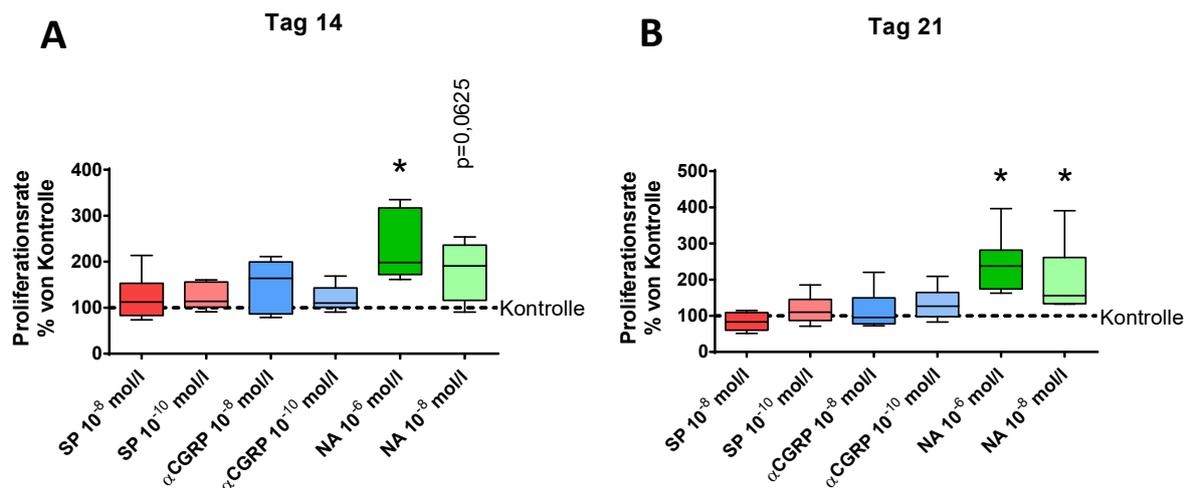


Abbildung 18: Proliferationsrate primärer Osteoblasten aus C57Bl/6J-Mäusen stimuliert mit SP, α -CGRP bzw. NA in zwei Konzentrationen im Vergleich zu unstimulierten Kontrollen nach 14 (A) bzw. 21 (B) Tagen in osteogenem Differenzierungsmedium. Die gestrichelte Linie entspricht den Werten der Kontrollen, die auf 100 % festgesetzt wurden. Dargestellt sind die Mediane +/- 5 %-95 % Perzentile normiert auf die Kontrollen (100 %); * = $p \leq 0,05$, $n = 6$.

Um herauszufinden, ob die Steigerung der Proliferationsrate über α_1 -, α_2 -, β_2 - oder allgemein über β -AR vermittelt wurde, erfolgten Versuche, in denen die einzelnen AR mit den entsprechenden Inhibitoren blockiert wurden. Die Untersuchung erfolgte an Tag 21, da sich hier in beiden NA-Konzentrationen eine signifikante Veränderung zeigte. Die gleichzeitige Stimulation der Osteoblasten mit 10^{-6} mol/l NA und den Inhibitoren Nadolol (β -AR-Antagonist) oder ICI-118,551 (β_2 -AR-Antagonist) ergab eine tendenziell erhöhte

4. Ergebnisse

Proliferationsrate. Gleiche Ergebnisse konnten für die Stimulation der Osteoblasten mit 10^{-8} mol/l NA und den Inhibitoren Doxazosin (α_1 -AR-Antagonist) bzw. Yohimbin (α_2 -AR-Antagonist) gemessen werden. (Abb. 19 A). Um die Inhibitoren auf eine mögliche partielle agonistische Aktivität hin zu prüfen, wurden die Osteoblasten allein mit den Inhibitoren stimuliert. Dabei zeigte sich durch Stimulation mit ICI-118,551 und Yohimbin ebenfalls eine tendenziell erhöhte Proliferationsrate (Abb. 19 B).

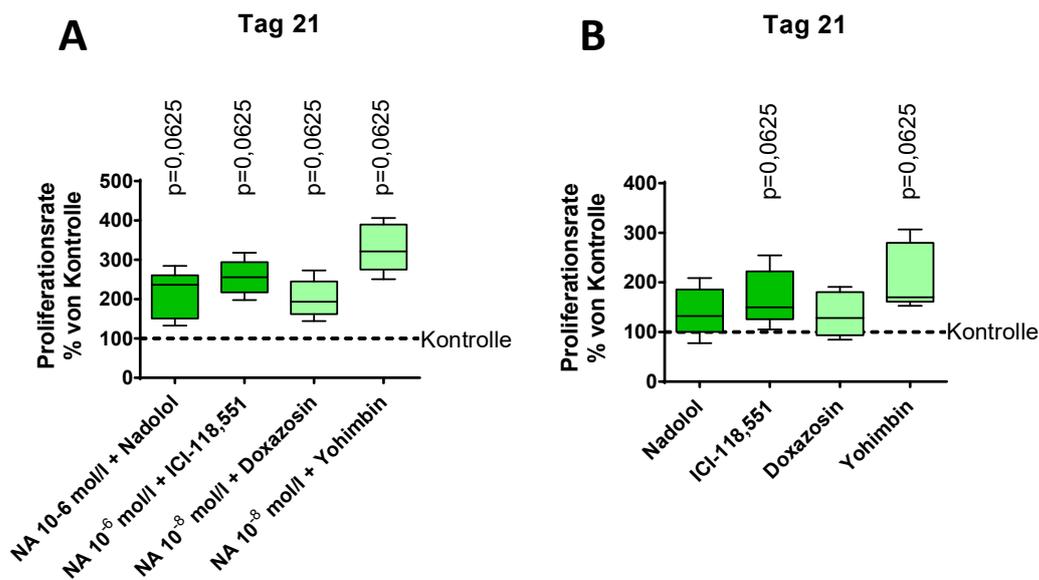


Abbildung 19: Proliferationsrate primärer Osteoblasten aus C57Bl/6J-Mäusen, stimuliert mit NA in zwei Konzentrationen und gleichzeitiger Stimulation mit den jeweiligen spezifischen Inhibitoren im Vergleich zu unstimulierten Kontrollen nach 21 Tagen in osteogenem Differenzierungsmedium. Nadolol ist ein β -AR-Antagonist, ICI-118,551 ein spezifischer β_2 -AR-Antagonist, Doxazosin ein α_1 -AR-Antagonist und Yohimbin ein α_2 -AR-Antagonist. Die gestrichelte Linie entspricht den Werten der Kontrollen, die auf 100 % festgesetzt wurden. Dargestellt sind die Mediane +/- 5 %-95 % Perzentile normiert auf die Kontrollen (100 %); n = 5.

4.1.3. Die Effekte der Stimulation mit SP, α -CGRP und NA auf die Apoptoserate muriner Osteoblasten

Die Apoptoserate der Osteoblasten wurde mit dem Caspase 3/7-Assay untersucht, die Graphen zeigen die Messwerte 6 Stunden und 24 Stunden nach Beginn der Apoptoseinduktion. Sechs Stunden nach Beginn der Messung wiesen Osteoblasten, die 14 Tage in osteogenem Medium kultiviert wurden, sowohl nach Stimulation mit 10^{-6} mol/l NA als auch mit 10^{-8} mol/l NA eine tendenziell reduzierte Apoptoserate in Relation zu unstimulierten Osteoblasten auf (Abb. 20 A). Diese Tendenz bestätigte sich nach 21 Tagen

4. Ergebnisse

osteogener Differenzierung mit einer signifikanten Reduktion der Apoptoserate (10^{-6} mol/l NA: 49,98 %, $p = 0,0313$; 10^{-8} mol/l NA: 58,53 %, $p = 0,0313$) nach Stimulation mit beiden NA-Konzentrationen (Abb. 20 B). Zudem zeigte sich nach 14 Tagen eine tendenziell verringerte Caspase 3/7-Aktivität in Osteoblasten, die mit SP bzw. α -CGRP jeweils in einer Konzentration von 10^{-10} mol/l stimuliert wurden (Abb. 20 A). Dieser Effekt konnte in der 6 h-Messung nach 21 Tagen nicht nachgewiesen werden (Abb. 20 B).

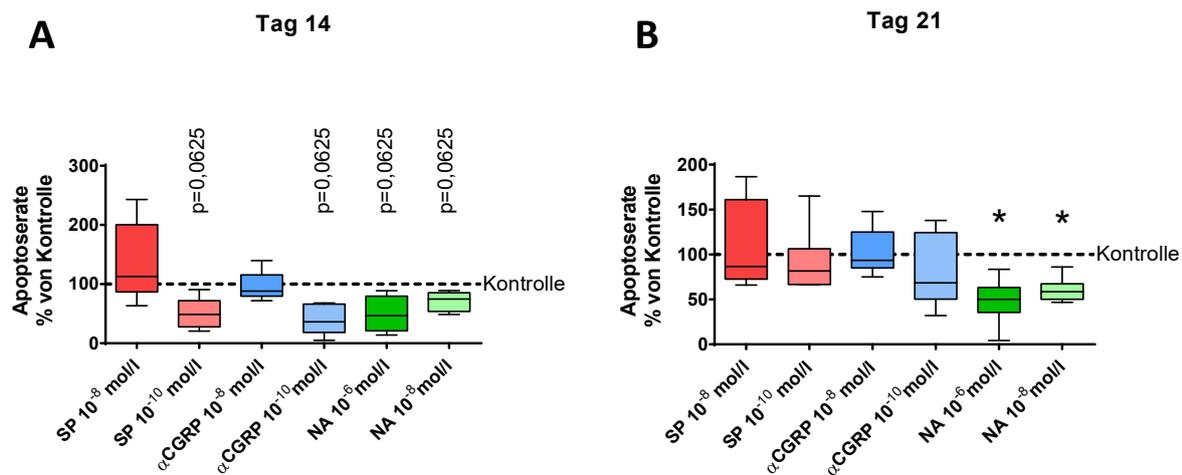


Abbildung 20: Apoptoserate primärer Osteoblasten aus C57Bl/6J-Mäusen stimuliert mit SP, α -CGRP bzw. NA in zwei Konzentrationen im Vergleich zu unstimulierten Kontrollen nach 14 (A, $n = 5$) bzw. 21 (B, $n = 6$) Tagen in osteogenem Differenzierungsmedium. Die gestrichelte Linie entspricht den Werten der Kontrollen, die auf 100 % festgesetzt wurden. Dargestellt sind die Mediane +/- 5 %-95 % Perzentile normiert auf die Kontrollen (100 %); * = $p \leq 0,05$, Messung nach 6 h.

Auch in der 24 h-Messung wurde nach NA-Stimulation eine reduzierte Apoptoserate von Osteoblasten beobachtet, die 21 Tage osteogen differenziert worden waren. Die Stimulation mit 10^{-6} mol/l führte zu einer signifikanten Hemmung der Apoptose (10^{-6} mol/l NA: 47,69 %, $p = 0,0313$), während 10^{-8} mol/l NA die Apoptoseinduktion tendenziell hemmten (Abb. 21 B). Nach 14 Tagen osteogener Differenzierung hatte die Stimulation mit NA keinen Einfluss auf die Apoptose (Abb. 21 A). Eine Stimulation mit SP und α -CGRP 24 Stunden nach Apoptoseinduktion in einer Konzentration von 10^{-10} mol/l bewirkte nach 21 Tagen osteogener Differenzierung eine signifikant reduzierte Apoptoserate von Osteoblasten verglichen mit den unstimulierten Kontrollen (Abb. 21 B: 10^{-10} mol/l SP: 52,77 %, $p = 0,0313$; 10^{-10} mol/l α -CGRP: 53,27 %, $p = 0,0313$). Dieser Effekt konnte bei Osteoblasten, die für 14 Tage osteogen differenziert worden waren, nicht nachgewiesen werden (Abb. 21 A). Auch

4. Ergebnisse

durch die Stimulation mit SP und α -CGRP in höheren Konzentrationen (10^{-8} mol/l) konnte keine Veränderung hinsichtlich der Apoptoserate festgestellt werden (Abb. 21).

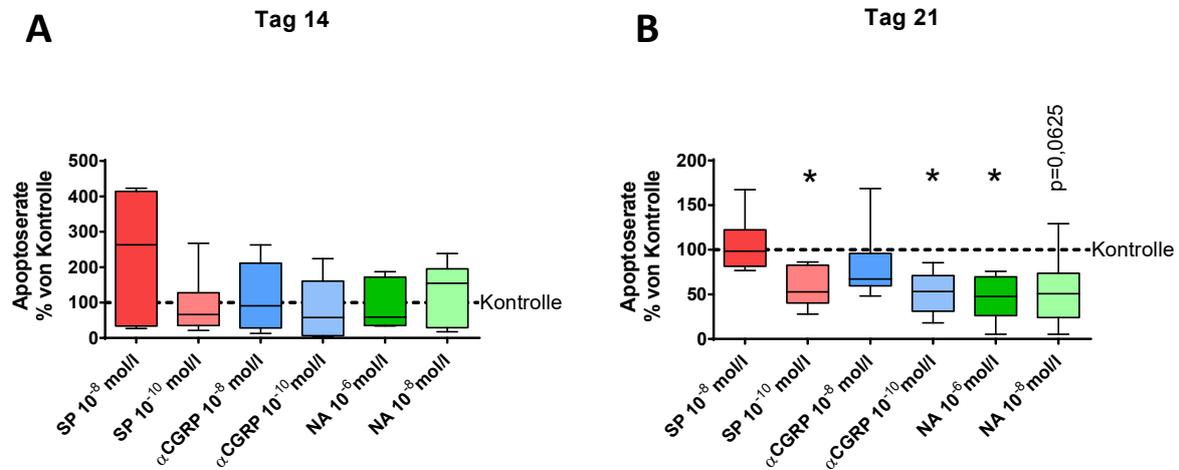


Abbildung 21: Apoptoserate primärer Osteoblasten aus C57Bl/6J-Mäusen stimuliert mit SP, α -CGRP bzw. NA in zwei Konzentrationen im Vergleich zu unstimulierten Kontrollen nach 14 (A, n = 5) bzw. 21 (B, n = 6) Tagen in osteogenem Differenzierungsmedium. Die gestrichelte Linie entspricht den Werten der Kontrollen, die auf 100 % festgesetzt wurden. Dargestellt sind die Mediane +/- 5 %-95 % Perzentile normiert auf die Kontrollen (100 %); * = $p \leq 0,05$, Messung nach 24 h.

Die spezifische Blockade der Neurotransmitterrezeptoren mit den entsprechenden Antagonisten zeigte in der Messung nach 6 h, dass die durch 10^{-10} mol/l SP und α -CGRP vermittelten Effekte durch L-733,060 bzw. BIBN 4096 aufgehoben werden konnten. Die durch 10^{-8} mol/l NA vermittelte Reduktion der Apoptoserate wurde in Gegenwart des α_1 -AR-Antagonisten Doxazosin inhibiert. Nach Stimulation mit 10^{-6} mol/l NA und dem β -AR-Antagonisten Nadolol konnte eine tendenziell erhöhte Apoptoserate nachgewiesen werden (Abb. 22 A). Eine Stimulation mit den Inhibitoren allein hatte keinen Einfluss auf die Apoptoserate im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (Abb. 22 B). Auch in der Messung nach 24 Stunden konnten die Effekte nach Stimulation mit den Neurotransmittern durch die Antagonisten aufgehoben werden (Abb. 23).

4. Ergebnisse

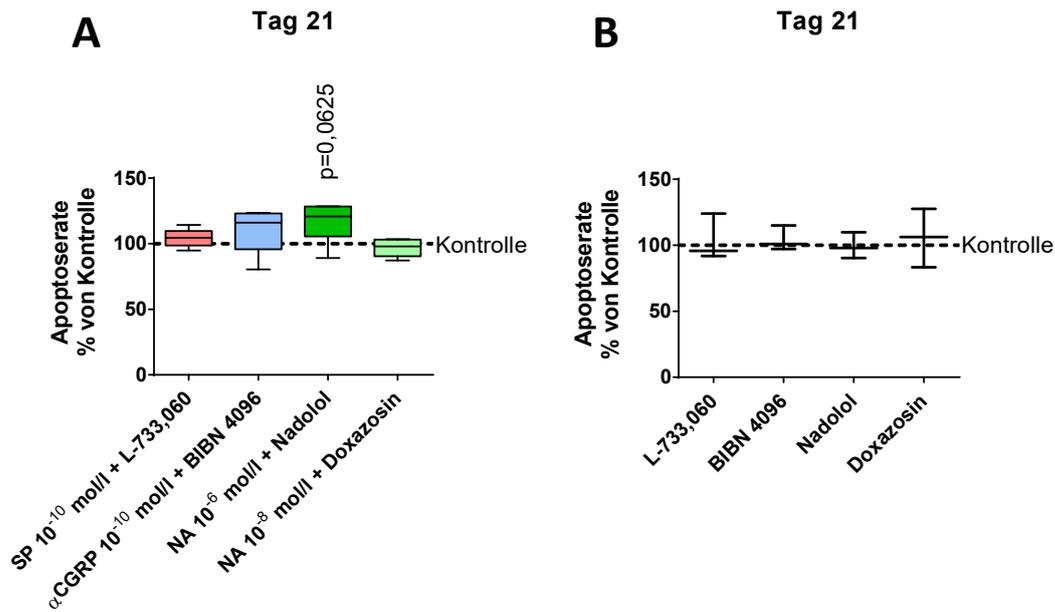


Abbildung 22: Apoptoserate primärer Osteoblasten aus C57Bl/6J-Mäusen, stimuliert mit SP, α -CGRP bzw. NA in zwei Konzentrationen und den jeweiligen spezifischen Inhibitoren (A, n = 6) sowie stimuliert mit den Antagonisten (B, n = 3) im Vergleich zu unstimulierten Kontrollen nach 21 Tagen in osteogenem Differenzierungsmedium. Die gestrichelte Linie entspricht den Werten der Kontrollen, die auf 100 % festgesetzt wurden. Dargestellt sind die Mediane +/- 5 %-95 % Perzentile normiert auf die Kontrollen (100 %), Messung nach 6 h.

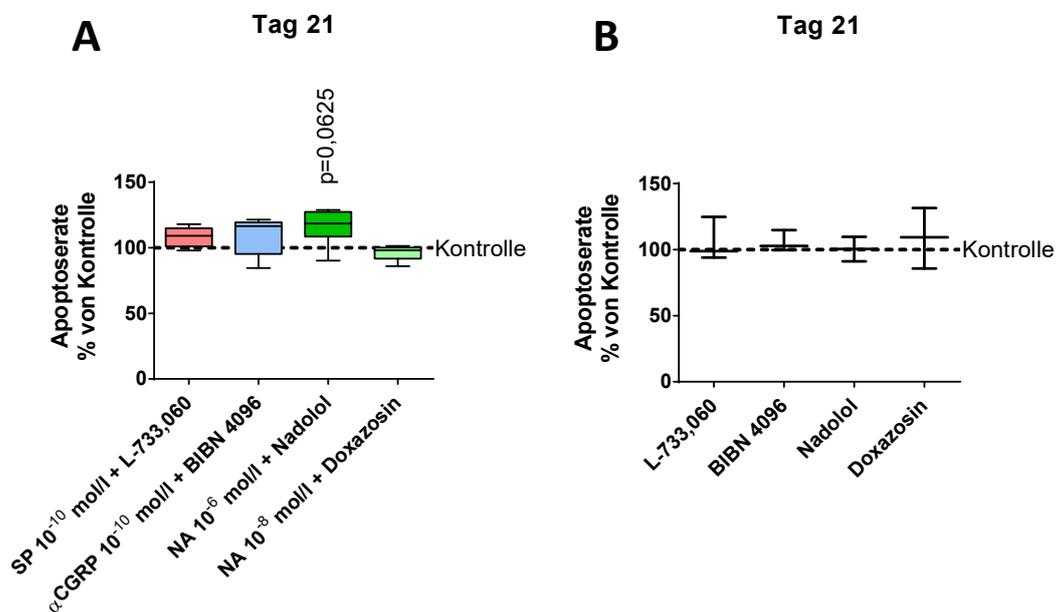


Abbildung 23: Apoptoserate primärer Osteoblasten aus C57Bl/6J-Mäusen, stimuliert mit SP, α -CGRP bzw. NA in zwei Konzentrationen und den jeweiligen spezifischen Inhibitoren (A, n = 6) sowie stimuliert mit den Antagonisten (B, n = 3) im Vergleich zu unstimulierten Kontrollen nach 21 Tagen in osteogenem Differenzierungsmedium. Die gestrichelte Linie entspricht den Werten der Kontrollen, die auf 100 % festgesetzt wurden. Dargestellt sind die Mediane +/- 5 %-95 % Perzentile normiert auf die Kontrollen (100 %), Messung nach 24 h.

4.1.4. Die Effekte der Stimulation mit SP, α -CGRP und NA auf die ALP-Aktivität muriner Osteoblasten

Zur Analyse der durch Neurotransmitter vermittelten Effekte auf die Osteoblastenaktivität wurde die Aktivität des Enzyms ALP gemessen. Sowohl nach 14 als auch nach 21 Tagen konnte durch die Stimulation mit SP, α -CGRP oder NA kein Einfluss auf die ALP-Aktivität von Osteoblasten nachgewiesen werden (Abb. 24 B/C). Da ALP bereits während der frühen Differenzierungsphase der Osteoblasten exprimiert wird, wurde in einem weiteren Versuch die ALP-Aktivität nach 7 Tagen bestimmt (Zernik et al. 1990). Die Stimulation fand, analog zu den vorherigen Experimenten, während der letzten 24 Stunden des Kultivierungszeitraumes statt. Wir konnten im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollen eine signifikante Reduktion der Aktivität bei Osteoblasten feststellen, die mit SP in einer Konzentration von 10^{-10} mol/l (79,33 %, $p = 0,0313$) und α -CGRP in einer Konzentration von 10^{-8} mol/l (73,58 %, $p = 0,0313$) und 10^{-10} mol/l (73,64 %, $p = 0,0313$) stimuliert wurden (Abb. 24 A). Eine Stimulation mit NA zeigte zu keinem Zeitpunkt eine Veränderung in der ALP-Aktivität im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle.

4. Ergebnisse

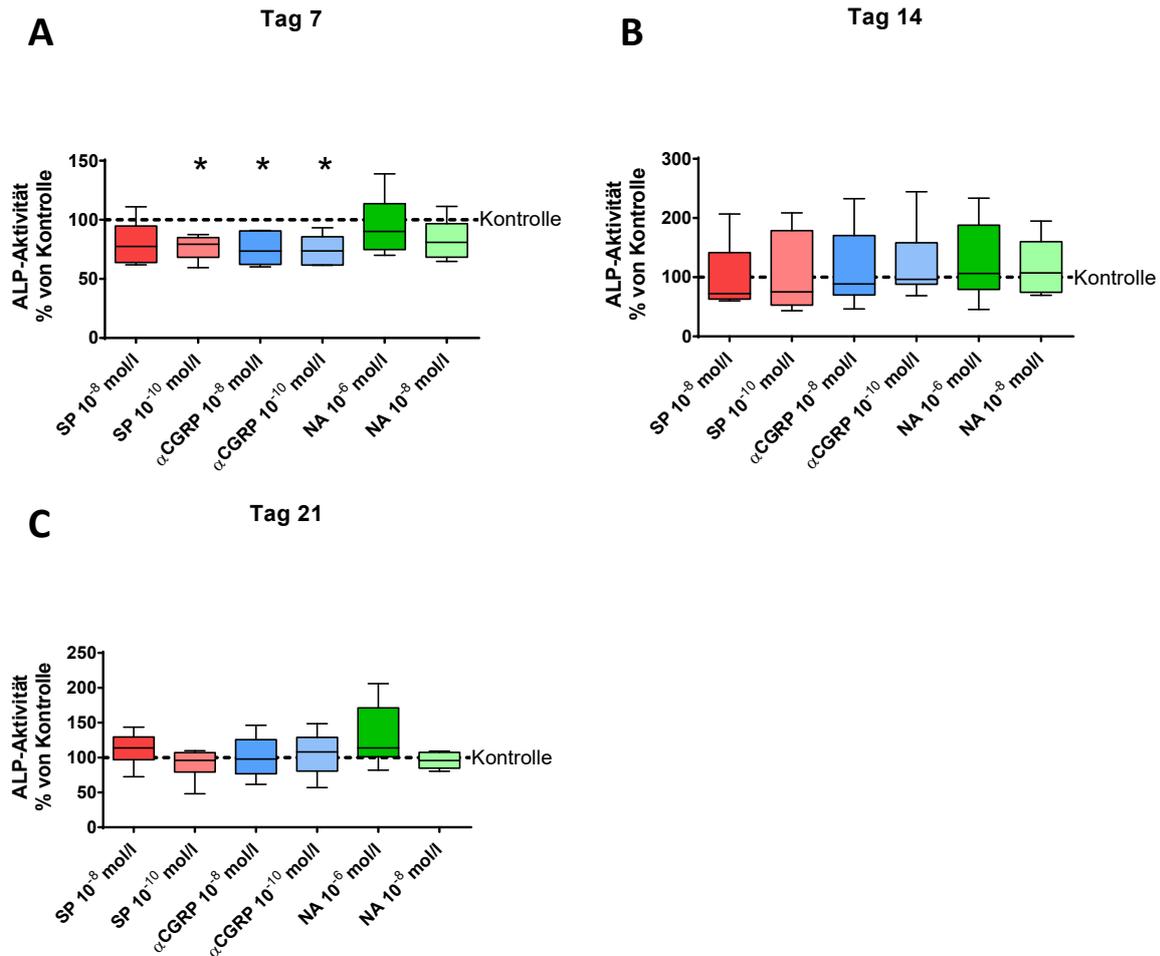


Abbildung 24: ALP-Aktivität primärer Osteoblasten aus C57Bl/6J-Mäusen stimuliert mit SP, α -CGRP bzw. NA in zwei Konzentrationen im Vergleich zu unstimulierten Kontrollen nach 7, 14 bzw. 21 Tagen in osteogenem Differenzierungsmedium. Die gestrichelte Linie entspricht den Werten der Kontrollen, die auf 100 % festgesetzt wurden. Dargestellt sind die Mediane +/- 5 %-95 % Perzentile normiert auf die Kontrollen (100 %); * = $p \leq 0,05$, $n = 6$.

Nach der Blockade des NK₁R und des CGRP-Rezeptors mit den spezifischen Inhibitoren während der Neurotransmitterstimulation mit SP bzw. α -CGRP (Abb. 25 A) konnten, ebenso wie für die Stimulation mit den Inhibitoren allein (Abb. 25 B), keine Unterschiede in der ALP-Aktivität der Osteoblasten im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollen gemessen werden. Damit wurden die Effekte auf die ALP-Aktivität durch die jeweiligen Inhibitoren aufgehoben.

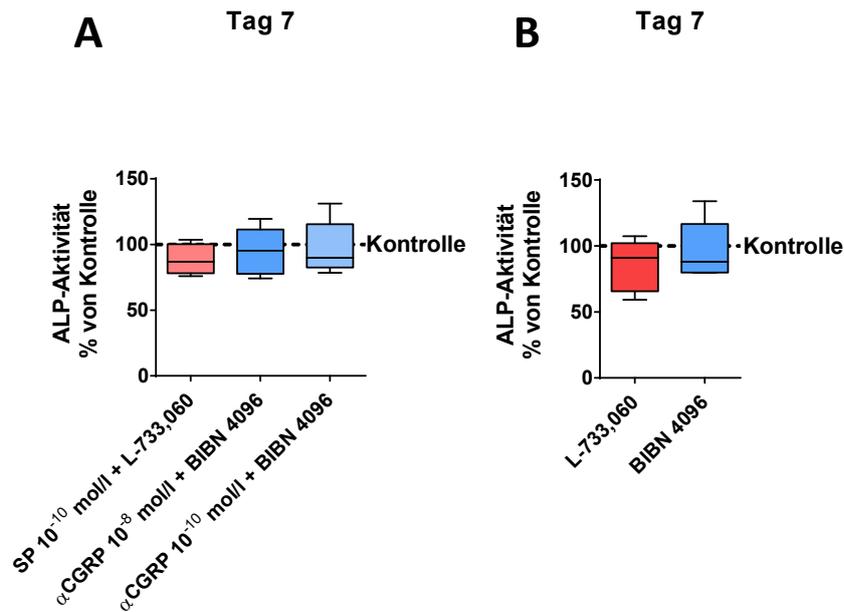


Abbildung 25: ALP-Aktivität primärer Osteoblasten aus C57Bl/6J-Mäusen, stimuliert mit SP, α -CGRP bzw. NA in zwei Konzentrationen und den jeweiligen spezifischen Inhibitoren sowie stimuliert mit den Antagonisten im Vergleich zu unstimulierten Kontrollen nach 7 Tagen in osteogenem Differenzierungsmedium. Die gestrichelte Linie entspricht den Werten der Kontrollen, die auf 100 % festgesetzt wurden. Dargestellt sind die Mediane +/- 5 %-95 % Perzentile normiert auf die Kontrollen (100 %); n = 5.

4.1.5. Vergleich der Genexpression in murinen Osteoblasten nach Stimulation mit SP, α -CGRP und NA

In den bisherigen Analysen konnte ein Einfluss der sensiblen Neuropeptide SP und α -CGRP sowie des sympathischen Neurotransmitters NA auf den Metabolismus und die Aktivität von Osteoblasten nachgewiesen werden. In den folgenden Analysen wurde mittels qPCR der Einfluss der Neurotransmitter auf die Expression selektiver osteoblastenspezifischer Gene untersucht, die an Differenzierungsvorgängen und dem Metabolismus der Osteoblasten sowie auch am *bone remodeling* beteiligt sind.

4.1.5.1. Genexpression von *bcl2* nach Stimulation mit SP, α -CGRP und NA

Das Gen *bcl2* kodiert das Protein *B-cell lymphoma 2*, welches an der Regulation der Apoptose beteiligt ist. Hierbei zeigt es eine anti-apoptotische Wirkung (Chao and Korsmeyer 1998). Sowohl nach 14 als auch nach 21 Tagen osteogener Differenzierung konnten keine Veränderungen der Genexpression von *bcl2* durch die Stimulationen mit α -CGRP, SP und NA festgestellt werden (Abb. 26).

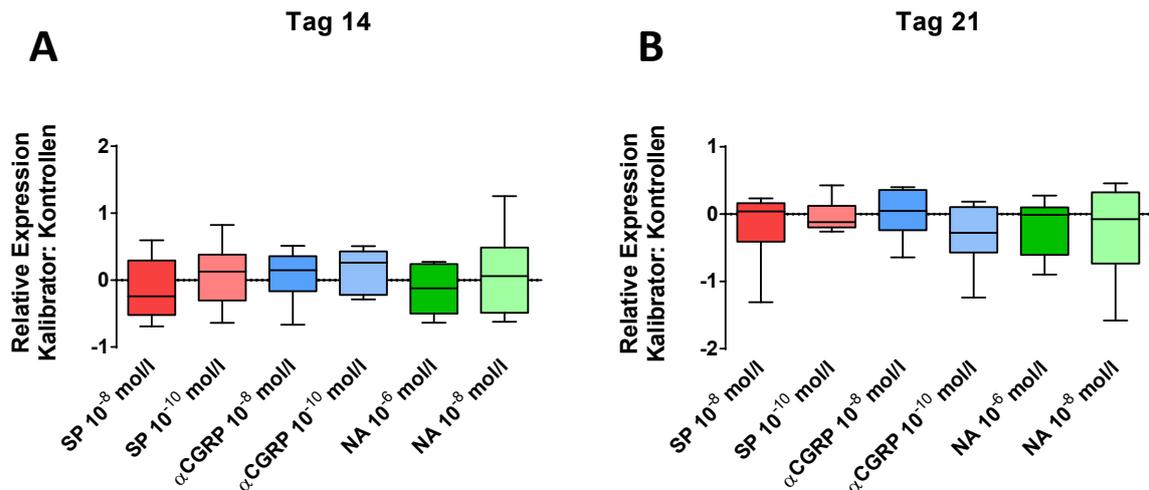


Abbildung 26: Relative Änderung (Log₂) der Genexpression von *bcl2* in primären Osteoblasten aus C57Bl/6J-Mäusen, stimuliert mit SP, α-CGRP bzw. NA in zwei Konzentrationen im Vergleich zu unstimulierten Kontrollen nach 14 bzw. 21 Tagen in osteogenem Differenzierungsmedium. Die 0-Linie (x-Achse) entspricht den unstimulierten Proben, die als Kalibrator verwendet wurden. Dargestellt sind die Mediane +/- 5 %-95 % Perzentile; n = 6.

4.1.5.2. Genexpression von *col1a1* nach Stimulation mit SP, α-CGRP und NA

Kollagen I ist der wichtigste Bestandteil der organischen Knochenmatrix und wird im Knochen vor allem durch Osteoblasten produziert. Es besteht aus 3 α-Ketten, wobei die α1-Kette durch das Gen *col1a1* kodiert wird. Nach 14 Tagen osteogener Differenzierung wurde durch Stimulation der Osteoblasten mit 10⁻⁸ mol/l NA ein tendenzieller Anstieg der Expression des Gens *col1a1* (Abb. 27 A) im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle beobachtet. Nach 21 Tagen war dieser Effekt nicht mehr nachweisbar (Abb. 27 B). Die Stimulationen mit SP, α-CGRP und NA in hoher Konzentration zeigten keinen Einfluss auf die Genexpression von *col1a1*.

4. Ergebnisse

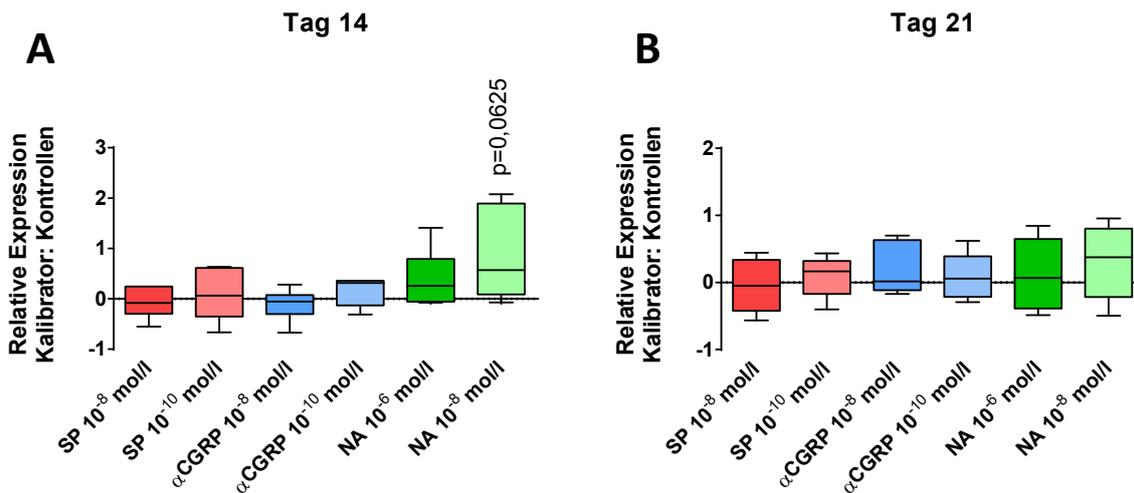


Abbildung 27: Relative Änderung (Log₂) der Genexpression von *col1a1* in primären Osteoblasten aus C57Bl/6J-Mäusen, stimuliert mit SP, α-CGRP bzw. NA in zwei Konzentrationen im Vergleich zu unstimulierten Kontrollen nach 14 bzw. 21 Tagen in osteogenem Differenzierungsmedium. Die 0-Linie (x-Achse) entspricht den unstimulierten Proben, die als Kalibrator verwendet wurden. Dargestellt sind die Mediane +/- 5 %-95 % Perzentile; n = 6.

In den Kontrollversuchen mit dem α₁-AR-Antagonisten Doxazosin konnten, bei Ko-Stimulation mit 10⁻⁸ mol/l NA, die durch NA vermittelten Effekte inhibiert werden. In der Inhibitorkontrolle mit Doxazosin konnte keine Veränderung der Genexpression von *col1a1* festgestellt werden (Abb. 28).

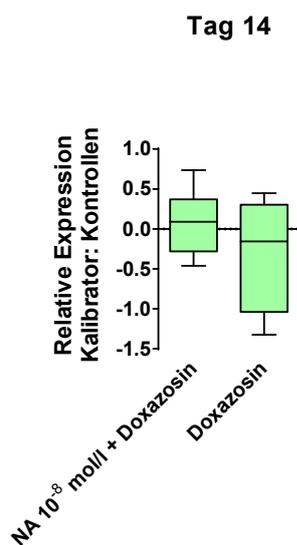


Abbildung 28: Relative Änderung (Log₂) der Genexpression von *col1a1* in primären Osteoblasten aus C57Bl/6J-Mäusen, stimuliert mit NA und Doxazosin (n = 6) bzw. mit Doxazosin (n = 4) im Vergleich zu unstimulierten Kontrollen nach 14 Tagen in osteogenem Differenzierungsmedium. Die 0-Linie (x-Achse) entspricht den unstimulierten Proben, die als Kalibrator verwendet wurden. Dargestellt sind die Mediane +/- 5 %-95 % Perzentile.

4.1.5.3. Genexpression von *bglap* nach Stimulation mit SP, α -CGRP und NA

Bglap kodiert das Protein Osteocalcin, das im Knochen ausschließlich von Osteoblasten gebildet wird und wichtig für den Prozess der Mineralisierung der Knochenmatrix ist. Durch Stimulation der Osteoblasten mit 10^{-8} mol/l α -CGRP wurde nach 14 Tagen Differenzierung die Expression von *bglap* im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle signifikant reduziert (Abb. 29 A, $p = 0,0313$). In Osteoblasten, die mit 10^{-8} mol/l NA stimuliert wurden, konnte eine tendenziell erhöhte *bglap*-Expression gemessen werden (Abb. 29 A). Eine Stimulation mit 10^{-10} mol/l α -CGRP, 10^{-6} mol/l NA und SP veränderte die Genexpression von *bglap* nicht. Nach 21 Tagen osteogener Differenzierung konnte in Osteoblasten nach Stimulation mit α -CGRP, SP oder NA keine Veränderung der *bglap*-Expression gemessen werden (Abb. 29 B).

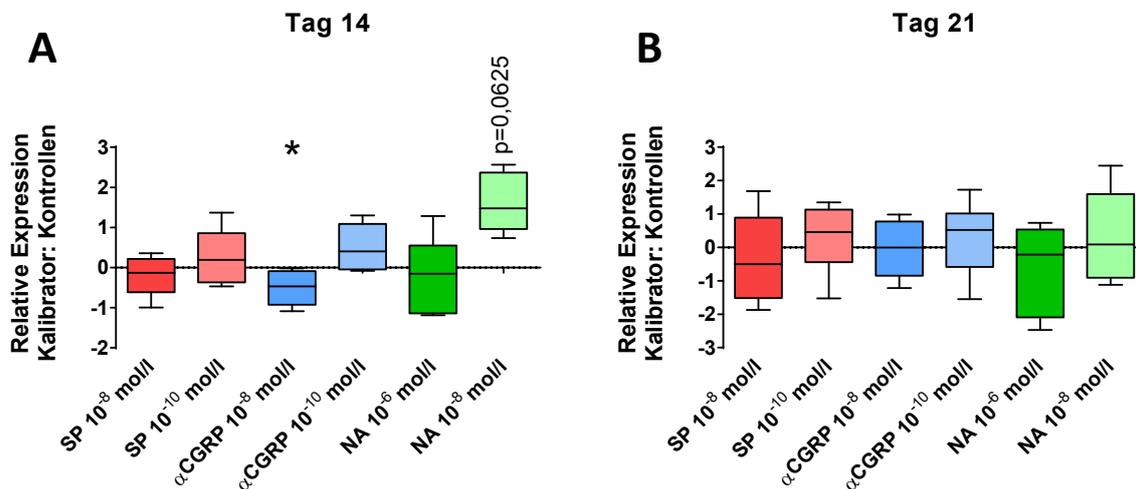


Abbildung 29: Relative Änderung (Log_2) der Genexpression von *bglap* in primären Osteoblasten aus C57Bl/6J-Mäusen, stimuliert mit SP, α -CGRP bzw. NA in zwei Konzentrationen im Vergleich zu unstimulierten Kontrollen nach 14 bzw. 21 Tagen in osteogenem Differenzierungsmedium. Die 0-Linie (x-Achse) entspricht den unstimulierten Proben, die als Kalibrator verwendet wurden. Dargestellt sind die Mediane +/- 5 %-95 % Perzentile; * = $p \leq 0,05$, $n = 6$; A: 10^{-8} mol/l NA: $n = 5$.

In Osteoblasten, die mit 10^{-8} mol/l α -CGRP und dem Rezeptorantagonisten BIBN 4096 ko-stimuliert wurden, war die Expression des Gens *bglap* signifikant reduziert (Abb. 30 A, $p = 0,0313$). Eine Ko-Stimulation mit Doxazosin inhibierte die Effekte von 10^{-8} mol/l NA. Die Inhibitorkontrollen zeigten aufgrund der geringeren Anzahl keine signifikanten Veränderungen (Abb. 30 B).

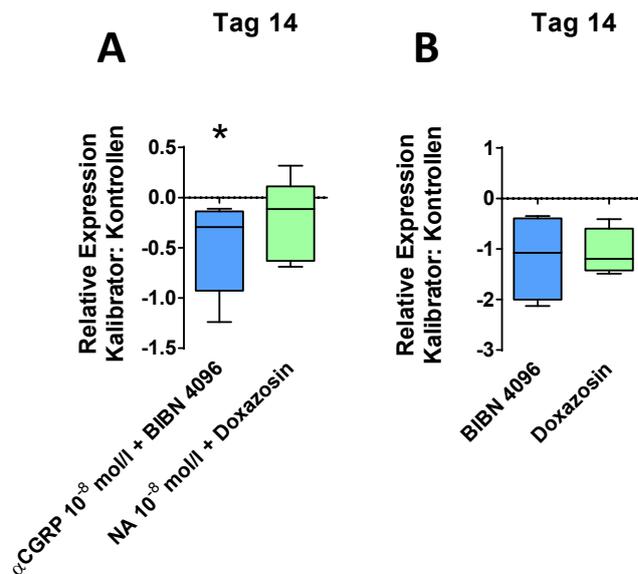


Abbildung 30: Relative Änderung (Log₂) der Genexpression von *bglap* in primären Osteoblasten aus C57Bl/6J-Mäusen, stimuliert mit α -CGRP bzw. NA und gleichzeitiger Stimulation mit den jeweiligen spezifischen Inhibitoren (A, n = 6) sowie stimuliert mit den Antagonisten (B, n = 4) im Vergleich zu unstimulierten Kontrollen nach 14 Tagen in osteogenem Differenzierungsmedium. Die 0-Linie (x-Achse) entspricht den unstimulierten Proben, die als Kalibrator verwendet wurden. Dargestellt sind die Mediane +/- 5 %-95 % Perzentile; * = p ≤ 0,05.

4.1.5.4. Genexpression von *sp7* nach Stimulation mit SP, α -CGRP und NA

Das Protein OSX, kodiert von dem Gen *sp7*, ist ein wichtiger Transkriptionsfaktor der Osteoblastendifferenzierung und wurde ebenfalls untersucht. Nach 14 Tagen osteogener Differenzierung konnte keine Veränderung der Genexpression von *sp7* durch die Stimulationen mit α -CGRP, SP und NA festgestellt werden (Abb. 31 A). Nach 21 Tagen konnte bei Osteoblasten, die mit 10^{-10} mol/l SP und 10^{-8} mol/l α -CGRP stimuliert wurden, eine tendenziell erhöhte Expression des Gens *sp7* gezeigt werden (Abb. 31 B). Die Stimulation von NA hatte keinen Einfluss auf die *sp7*-Expression in Osteoblasten, die 21 Tage in osteogenem Medium kultiviert wurden, ebenso wie die Stimulation von SP in einer Konzentration von 10^{-8} mol/l und α -CGRP in einer Konzentration von 10^{-10} mol/l (Abb. 31 B).

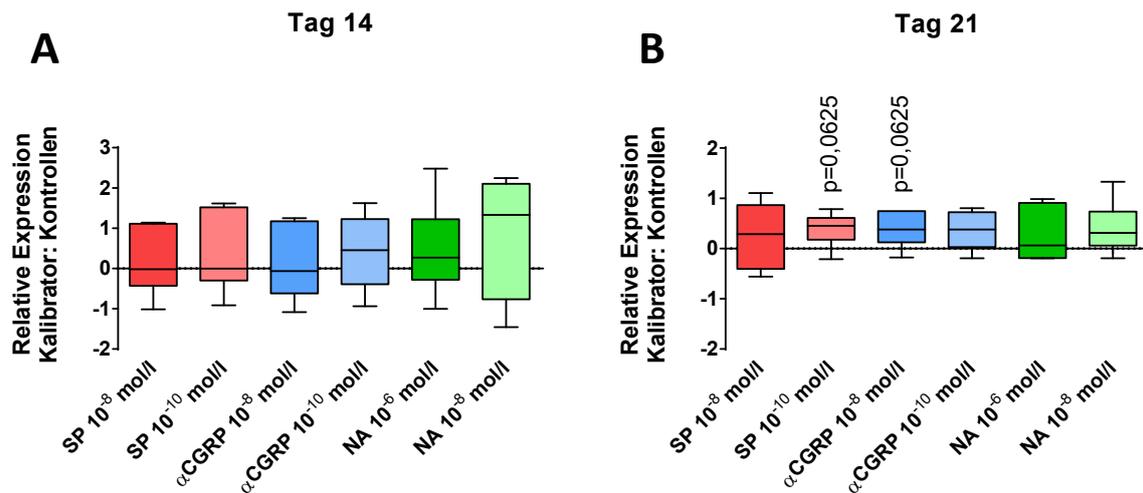


Abbildung 31: Relative Änderung (Log_2) der Genexpression von *sp7* in primären Osteoblasten aus C57Bl/6J-Mäusen, stimuliert mit SP, α -CGRP bzw. NA in zwei Konzentrationen im Vergleich zu unstimulierten Kontrollen nach 14 bzw. 21 Tagen in osteogenem Differenzierungsmedium. Die 0-Linie (x-Achse) entspricht den unstimulierten Proben, die als Kalibrator verwendet wurden. Dargestellt sind die Mediane +/- 5 %-95 % Perzentile; n = 6.

Die Effekte, die von 10^{-10} mol/l SP und 10^{-8} mol/l α -CGRP auf die Genexpression von *sp7* vermittelt wurden, konnten in den Kontrollversuchen mit dem NK_1 -Rezeptor-Antagonisten L-733,060 und dem CGRP-Rezeptor-Antagonisten BIBN 4096 inhibiert werden. Die Stimulation mit den Antagonisten L-733,060 bzw. BIBN 4096 allein zeigten keinen Einfluss auf die Genexpression von *sp7* (Abb. 32).

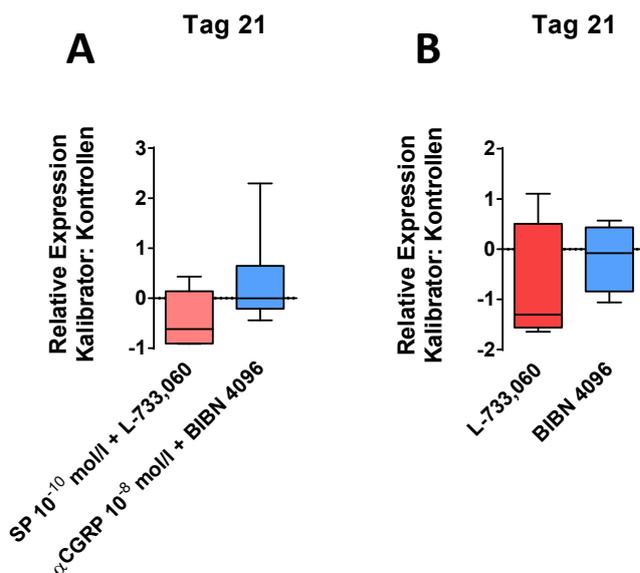


Abbildung 32: Relative Änderung (Log_2) der Genexpression von *sp7* in primären Osteoblasten aus C57Bl/6J-Mäusen, stimuliert mit SP bzw. α -CGRP und gleichzeitiger Stimulation mit den jeweiligen spezifischen Inhibitoren (A, n = 6) sowie stimuliert mit den Antagonisten (B, n = 4) im Vergleich zu unstimulierten Kontrollen nach 21 Tagen in osteogenem Differenzierungsmedium. Die 0-Linie (x-Achse) entspricht den unstimulierten Kontrollen.

4. Ergebnisse

unstimulierten Proben, die als Kalibrator verwendet wurden. Dargestellt sind die Mediane +/- 5 %-95 % Perzentile.

4.1.5.5. Genexpression von *runx2* nach Stimulation mit SP, α -CGRP und NA

RUNX2 ist der wichtigste Transkriptionsfaktor der osteogenen Differenzierung und wird schon in der frühen Phase der Differenzierung exprimiert. Durch die Stimulationen mit SP, α -CGRP und NA konnte weder an Tag 14 noch an Tag 21 eine Veränderung in der Expression des Gens *runx2* im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle festgestellt werden (Abb. 33)

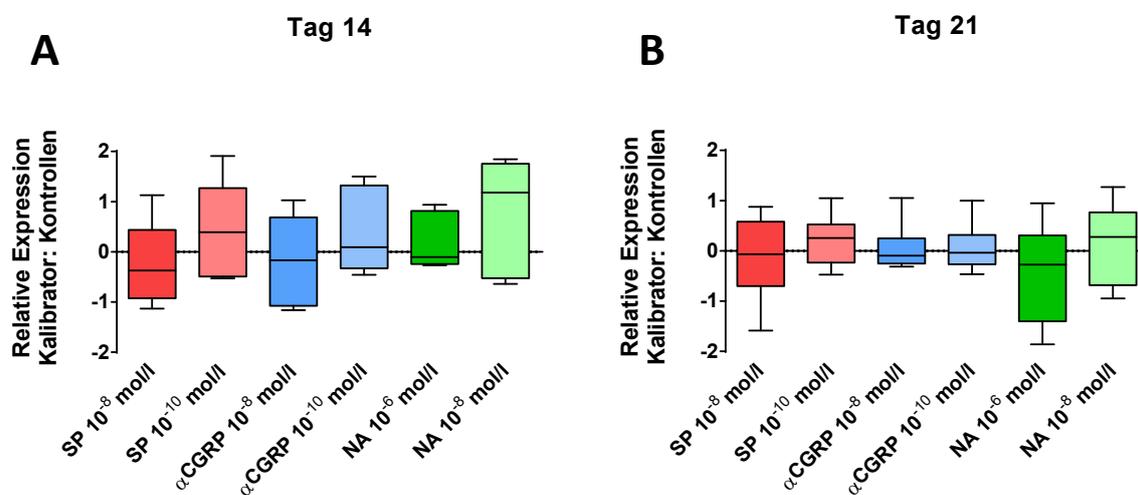


Abbildung 33: Relative Änderung (Log₂) der Genexpression von *runx2* in primären Osteoblasten aus C57Bl/6J-Mäusen, stimuliert mit SP, α -CGRP bzw. NA in zwei Konzentrationen im Vergleich zu unstimulierten Kontrollen nach 14 bzw. 21 Tagen in osteogenem Differenzierungsmedium. Die 0-Linie (x-Achse) entspricht den unstimulierten Proben, die als Kalibrator verwendet wurden. Dargestellt sind die Mediane +/- 5 %-95 % Perzentile; n = 6.

4.1.5.6. Genexpression von *tnfsf11* nach Stimulation mit SP, α -CGRP und NA

Der von Osteoblasten gebildete Schlüsselfaktor der Osteoklastogenese, das Protein RANKL, wird durch das Gen *tnfsf11* kodiert. RANKL spielt eine entscheidende Rolle in der Differenzierung von Osteoklastenvorläuferzellen zu reifen Osteoklasten. Durch die Stimulation der Osteoblasten mit SP und α -CGRP in einer Konzentration von jeweils 10⁻⁸ mol/l und NA in einer Konzentration von 10⁻⁶ mol/l konnte nach 14 Tagen osteogener Differenzierung eine signifikante Erhöhung der Genexpression von *tnfsf11* im Vergleich zu unstimulierten Osteoblasten nachgewiesen werden (Abb. 34 A: 10⁻⁸ mol/l SP: p = 0,0313, 10⁻⁸ mol/l α -CGRP: p = 0,0313, 10⁻⁶ mol/l NA: p = 0,0313). Stimulationen in der jeweils

4. Ergebnisse

niedrigeren Konzentration von SP, α -CGRP (10^{-10} mol/l) und NA (10^{-8} mol/l) ergaben keine Unterschiede in der Genexpression. Nach 21 Tagen wurde die *tnfsf11*-Genexpression nach Stimulation mit beiden Konzentrationen von SP sowie niedrigen Konzentrationen von α -CGRP und NA nicht beeinflusst. Osteoblasten, die nach 21 Tagen osteogener Differenzierung mit 10^{-8} mol/l α -CGRP und 10^{-6} mol/l NA stimuliert wurden, zeigten eine tendenziell erhöhte Expression von *tnfsf11* (Abb. 34 B).

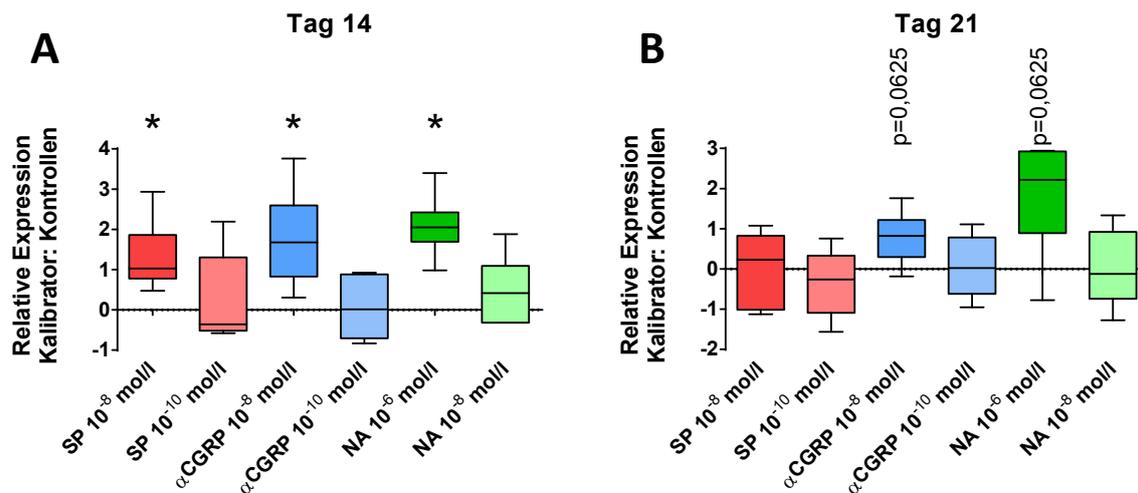


Abbildung 34: Relative Änderung (Log_2) der Genexpression von *tnfsf11* in primären Osteoblasten aus C57Bl/6J-Mäusen, stimuliert mit SP, α -CGRP bzw. NA in zwei Konzentrationen im Vergleich zu unstimulierten Kontrollen nach 14 bzw. 21 Tagen in osteogenem Differenzierungsmedium. Die 0-Linie (x-Achse) entspricht den unstimulierten Proben, die als Kalibrator verwendet wurden. Dargestellt sind die Mediane +/- 5 %-95 % Perzentile; * = $p \leq 0,05$, $n = 6$.

In den Kontrollversuchen zeigten Osteoblasten, die mit 10^{-8} mol/l SP und dem NK_1 -Rezeptorantagonisten L-733,060 ko-stimuliert wurden, eine signifikant erhöhte *tnfsf11*-Genexpression (Abb. 35 A, $p = 0,0313$). Eine Stimulation mit 10^{-8} mol/l α -CGRP und BIBN 4096 reduzierte die Genexpression von *tnfsf11* (Abb. 35 A). In Osteoblasten, die mit 10^{-6} mol/l NA und dem β -AR-Antagonisten Nadolol stimuliert wurden, war die Genexpression von *tnfsf11* tendenziell erhöht, eine Stimulation mit 10^{-6} mol/l NA zusammen mit dem β_2 -AR-Antagonist ICI-118,551 konnte die von NA vermittelte erhöhte *tnfsf11*-Genexpression inhibieren (Abb. 35 A). In den Inhibitorversuchen mit BIBN 4096, Nadolol und ICI-118,551 allein konnten keine signifikanten Veränderungen in der Genexpression von *tnfsf11* im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle festgestellt werden.

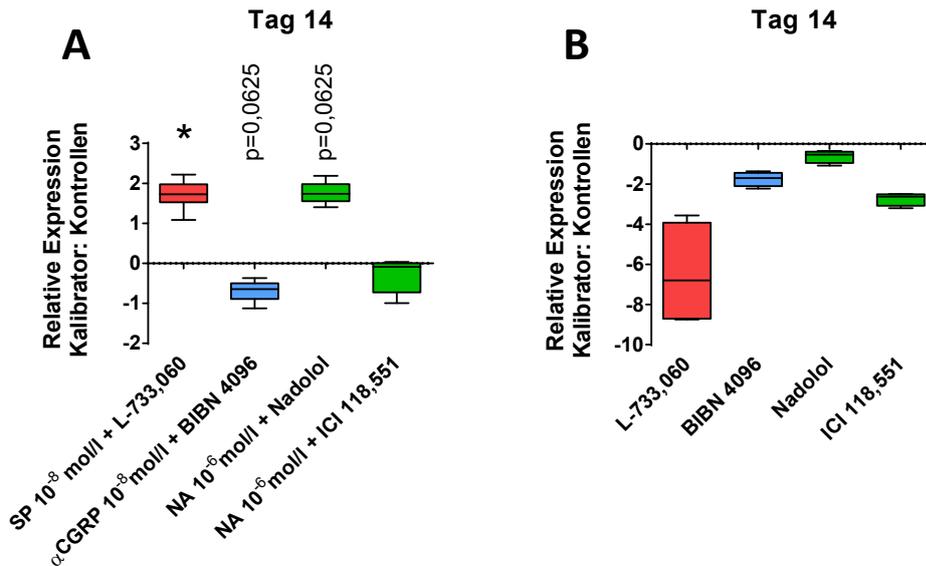


Abbildung 35: Relative Änderung (Log_2) der Genexpression von *tnfsf11* in primären Osteoblasten aus C57Bl/6J-Mäusen, stimuliert mit SP, α -CGRP bzw. NA und gleichzeitiger Stimulation mit den jeweiligen spezifischen Inhibitoren (A, n = 5; 10^{-8} mol/l SP + L-733,060: n = 6) sowie stimuliert mit den Antagonisten (B, n = 4) im Vergleich zu unstimulierten Kontrollen nach 14 Tagen in osteogenem Differenzierungsmedium. Die 0-Linie (x-Achse) entspricht den unstimulierten Proben, die als Kalibrator verwendet wurden. Dargestellt sind die Mediane +/- 5 %-95 % Perzentile; * = $p \leq 0,05$.

4.1.5.7. Genexpression von *tnfrsf11b* nach Stimulation mit α -CGRP, SP und NA

Des Weiteren wurde die Genexpression von *tnfrsf11b* untersucht. Es kodiert das Protein OPG, das als *Decoy*-Rezeptor für RANKL agiert und damit die Osteoklastogenese hemmt. Es zeigte sich weder an Tag 14 noch an Tag 21 der osteogenen Differenzierung eine Veränderung der Genexpression von *tnfrsf11b* nach Stimulation mit den Neurotransmittern SP, α -CGRP und NA (Abb. 36).

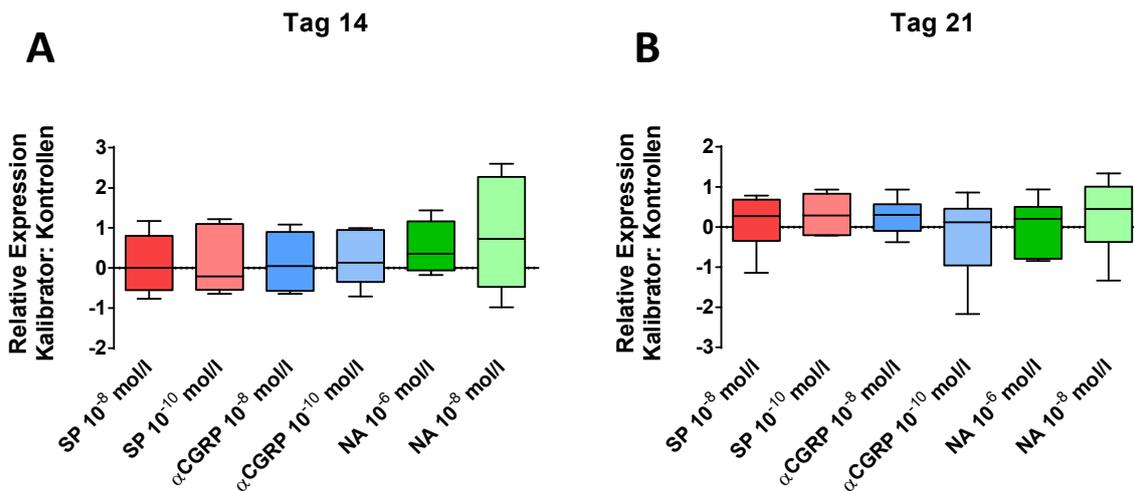


Abbildung 36: Relative Änderung (Log₂) der Genexpression von *tnfrsf11b* in primären Osteoblasten aus C57Bl/6J-Mäusen, stimuliert mit SP, α-CGRP bzw. NA in zwei Konzentrationen im Vergleich zu unstimulierten Kontrollen nach 14 bzw. 21 Tagen in osteogenem Differenzierungsmedium. Die 0-Linie (x-Achse) entspricht den unstimulierten Proben, die als Kalibrator verwendet wurden. Dargestellt sind die Mediane +/- 5 %-95 % Perzentile; n = 6.

4.2. Osteoklasten

4.2.1. Die Effekte der Stimulation mit SP, α-CGRP und NA auf die Proliferationsrate muriner Knochenmarksmakrophagen

Die Messung der Proliferationsrate erfolgte nach drei Tagen Kultivierung der Knochenmarksmakrophagen in Differenzierungsmedium mittels BrdU-Assay. Nach Stimulation mit NA in den Konzentrationen 10⁻⁶ mol/l und 10⁻⁸ mol/l konnte eine signifikante Reduktion der Proliferationsrate verglichen mit den unstimulierten Kontrollen nachgewiesen werden (Abb. 33 A, 10⁻⁶ mol/l NA: 58,02 %, p = 0,0156; 10⁻⁸ mol/l NA: 56,19 %, p = 0,0313). Bei Knochenmarksmakrophagen, die mit 10⁻¹⁰ mol/l α-CGRP stimuliert wurden, war die Proliferationsrate ebenfalls signifikant reduziert (Abb. 33 A, 58,5 %, p = 0,0469). Bei Knochenmarksmakrophagen, die mit SP oder α-CGRP in höherer Konzentration stimuliert wurden, ergaben sich keine Unterschiede in der Proliferation im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollen.

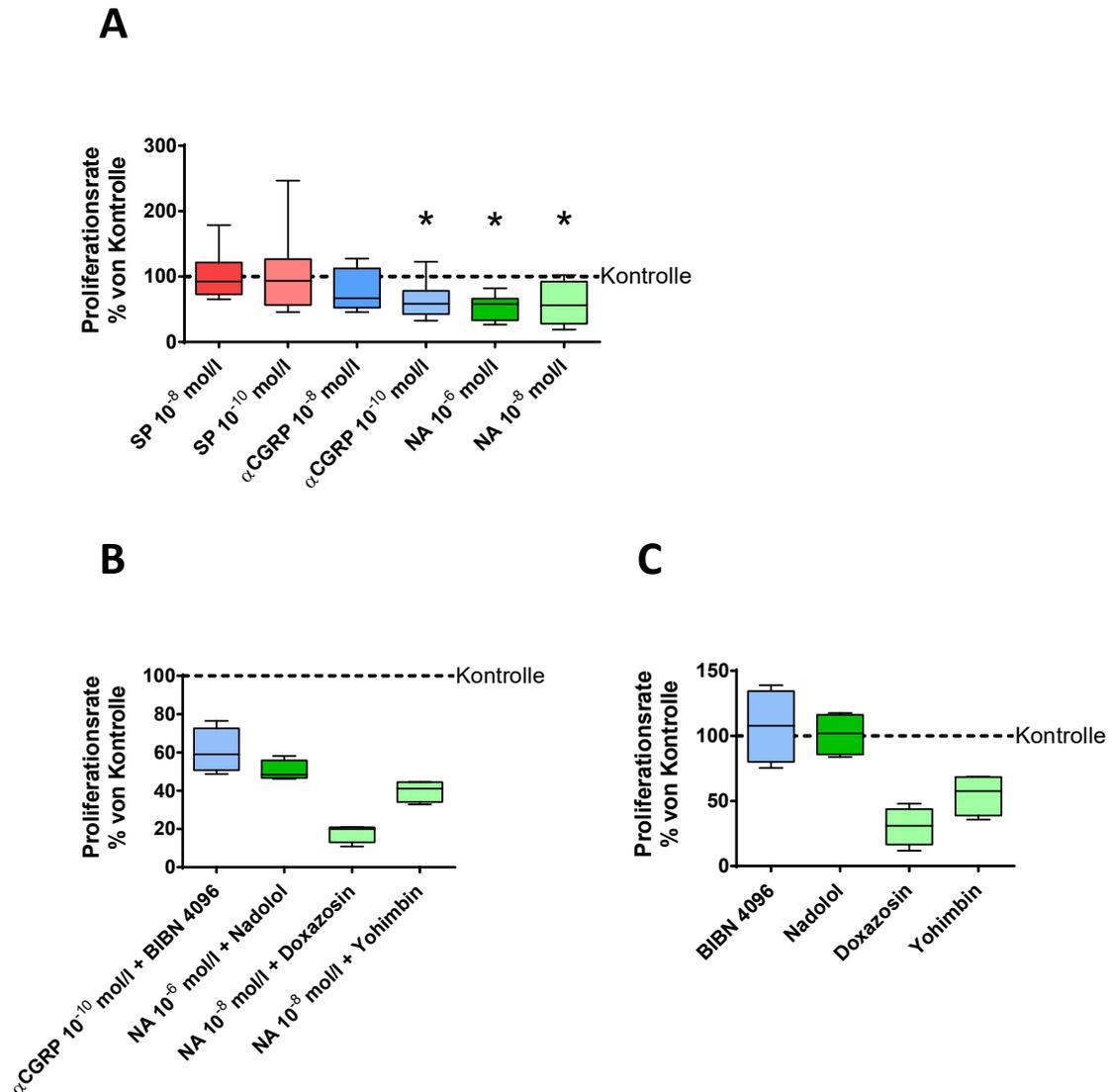


Abbildung 33: Proliferationsrate von Knochenmarksmakrophagen aus C57Bl/6J-Mäusen, stimuliert mit SP, α -CGRP bzw. NA in zwei Konzentrationen (A, $n = 7$), sowie stimuliert mit α -CGRP bzw. NA in zwei Konzentrationen und den jeweiligen spezifischen Inhibitoren (B, $n = 4$) bzw. allein mit den Antagonisten (C, $n = 4$) im Vergleich zu unstimulierten Kontrollen nach drei Tagen in Differenzierungsmedium. Die gestrichelte Linie entspricht den Werten der Kontrollen, die auf 100 % festgesetzt wurden. Dargestellt sind die Mediane \pm 5 %-95 % Perzentile normiert auf die Kontrollen (100 %); * = $p \leq 0,05$.

Um herauszufinden über welche Rezeptoren NA und α -CGRP ihre Wirkung entfalten, wurden Versuche mit den spezifischen Rezeptor-Antagonisten durchgeführt. Sowohl der β -AR-Antagonist Nadolol, als auch der α_1 -AR-Antagonist Doxazosin und der α_2 -AR-Antagonist Yohimbine inhibierten die Wirkung von NA auf die Proliferationsrate nicht (Abb. 33 B). Durch die geringe Anzahl der untersuchten Proben konnte keine Signifikanz ermittelt werden. Bei alleiniger Stimulation mit den verschiedenen Agonisten wurde durch Doxazosin und Yohimbine die Proliferationsrate tendenziell verringert, nicht jedoch durch Nadolol (Abb. 33 C). Die Proliferation von Knochenmarksmakrophagen, die mit BIBN 4096, einem

CGRP-Rezeptor-Antagonisten, und α -CGRP stimuliert wurden, war reduziert (Abb. 33 B). Die Stimulation mit BIBN 4096 allein hatte keine Auswirkung auf die Proliferation (Abb. 33 C).

4.2.2. Die Effekte der Stimulation mit SP, α -CGRP und NA auf die Apoptoserate muriner Osteoklasten

Nach fünf Tagen Kultivierung in Differenzierungsmedium wurde die Apoptoserate von Osteoklastenkulturen mit Hilfe des Caspase 3/7-Assays untersucht. Dabei fand sich im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle eine signifikant erhöhte Apoptoserate bei Osteoklasten, die mit 10^{-8} mol/l SP stimuliert wurden (Abb. 34, 119,4 %, $p = 0,0313$). Die Stimulation mit SP in niedriger Konzentration sowie mit α -CGRP und NA zeigten keine Auswirkungen auf die Apoptose der Osteoklasten im Vergleich zu unstimulierten Kontrollen.

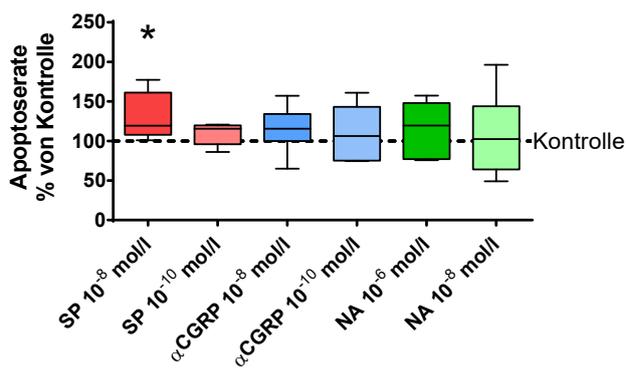


Abbildung 34: Apoptoserate von Osteoklasten aus C57Bl/6J-Mäusen, stimuliert mit SP, α -CGRP bzw. NA in zwei Konzentrationen im Vergleich zu unstimulierten Kontrollen nach fünf Tagen in Differenzierungsmedium. Die gestrichelte Linie entspricht den Werten der Kontrollen, die auf 100 % festgesetzt wurden. Dargestellt sind die Mediane +/- 5 %-95 % Perzentile normiert auf die Kontrollen (100 %); * = $p \leq 0,05$, $n = 6$.

Eine Ko-Stimulation von Osteoklasten mit dem NK_1R -Antagonisten L-733,060 und SP führte in diesem, ebenso wie in den anderen Assays, zu einem Sterben der Zellkulturen. Eine Untersuchung der Effekte des Inhibitors L-733,060 konnte daher nicht durchgeführt werden. Mögliche toxische Effekte des NK_1R -Antagonisten L-733,060 auf Osteoklasten-Kulturen konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht werden.

4.2.3. Die Effekte der Stimulation mit SP, α -CGRP und NA auf die Kathepsin K-Aktivität muriner Osteoklasten

Zur Analyse der Aktivität wurde das für den Knochenabbau wichtige Enzym Kathepsin K untersucht. Es wird von Osteoklasten exprimiert und kann daher als Marker für die Osteoklastenaktivität genutzt werden. Nach Stimulation mit den Neurotransmittern SP, α -CGRP und NA konnte keine Veränderung der Kathepsin K-Aktivität im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle festgestellt werden (Abb. 35).

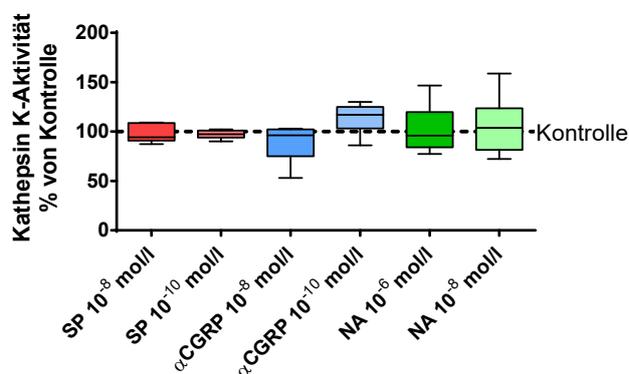


Abbildung 35: Kathepsin K-Aktivität von Osteoklasten aus C57Bl/6J-Mäusen, stimuliert mit SP, α -CGRP bzw. NA in zwei Konzentrationen im Vergleich zu unstimulierten Kontrollen nach fünf Tagen in Differenzierungsmedium. Die gestrichelte Linie entspricht den Werten der Kontrollen, die auf 100 % festgesetzt wurden. Dargestellt sind die Mediane +/- 5 %-95 % Perzentile normiert auf die Kontrollen (100 %); n = 6.

4.2.4. Die Effekte der Stimulation mit SP, α -CGRP und NA auf die Differenzierung muriner Osteoklasten

Durch Auszählung der TRAP-gefärbten Zellen mit ≥ 3 Zellkernen konnte der Einfluss der Neurotransmitterstimulation auf die Differenzierungs- und Fusionsaktivität der Osteoklasten untersucht werden. Im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle war die Anzahl der Osteoklasten, die mit α -CGRP in einer Konzentration von 10^{-8} mol/l stimuliert wurden, signifikant verringert (Abb. 36, 25,36 %, $p = 0,0313$). Abb. 37 zeigt einen beispielhaften Bildausschnitt der Osteoklastenkulturen, die mit 10^{-8} mol/l α -CGRP stimuliert wurden, und der unstimulierten Kontrolle. Eine tendenziell erhöhte Osteoklastenanzahl wurde nach Stimulation mit 10^{-10} mol/l α -CGRP nachgewiesen. Eine Stimulation mit SP oder NA führte zu

4. Ergebnisse

keiner Veränderung der Osteoklastenanzahl im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (Abb. 36).

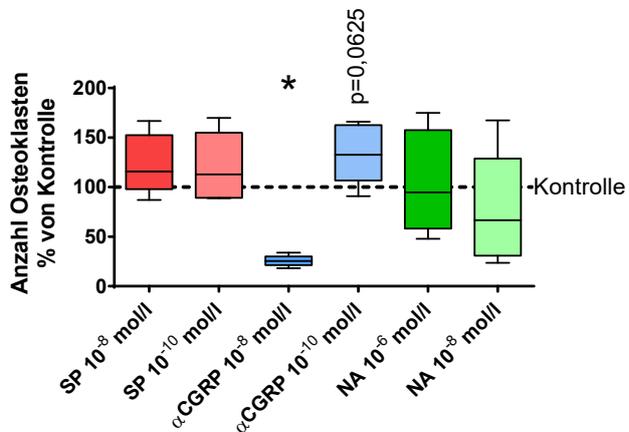


Abbildung 36: Anzahl der Osteoklasten aus C57Bl/6J-Mäusen, stimuliert mit SP, α -CGRP bzw. NA in zwei Konzentrationen im Vergleich zu unstimulierten Kontrollen nach fünf Tagen in Differenzierungsmedium. Die gestrichelte Linie entspricht den Werten der Kontrollen, die auf 100 % festgesetzt wurden. Dargestellt sind die Mediane +/- 5 %-95 % Perzentile normiert auf die Kontrollen (100 %); * = $p \leq 0,05$, $n = 6$.

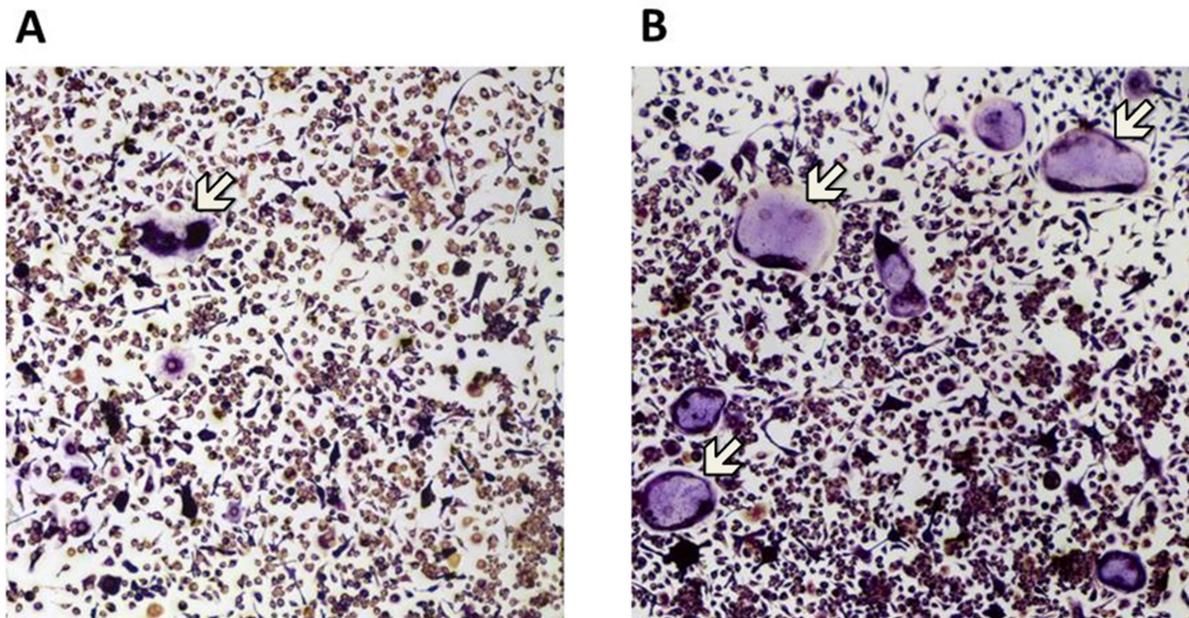


Abbildung 37: Ausschnitt aus einem Well; Vergleich Osteoklasten (Pfeile) stimuliert mit 10^{-8} mol/l α -CGRP (A) und unstimulierte Osteoklasten (B). TRAP-Färbung; Vergrößerung 4x.

4.2.5. Vergleich der Genexpression muriner Osteoklasten nach Stimulation mit SP, α -CGRP und NA

Mittels qPCR wurde die Genexpression verschiedener Differenzierungs- und Aktivitätsmarker von Osteoklasten nach Stimulation mit SP, α -CGRP und NA untersucht.

4.2.5.1. Genexpression von *ctsk* nach Stimulation mit SP, α -CGRP und NA

Das Gen *ctsk* kodiert das Enzym Kathepsin K, das für den Abbau von Kollagen I, dem Hauptbestandteil der organischen Knochenmatrix, zuständig ist. Durch die Stimulation mit 10^{-8} mol/l SP und 10^{-10} mol/l SP wurde die Expression des Gens *ctsk* im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle signifikant erhöht (Abb. 38 A, jeweils $p = 0,0313$). Dieser Effekt zeigte sich auch nach Stimulation mit beiden NA-Konzentrationen (Abb. 38 A, 10^{-6} mol/l NA: $p = 0,0313$; 10^{-8} mol/l NA: $p = 0,0313$) sowie nach Stimulation mit 10^{-10} mol/l α -CGRP (Abb. 38 A, $p = 0,0313$). Die hohe Konzentration von α -CGRP (10^{-8} mol/l) hatte keinen Einfluss auf die Genexpression von *ctsk*.

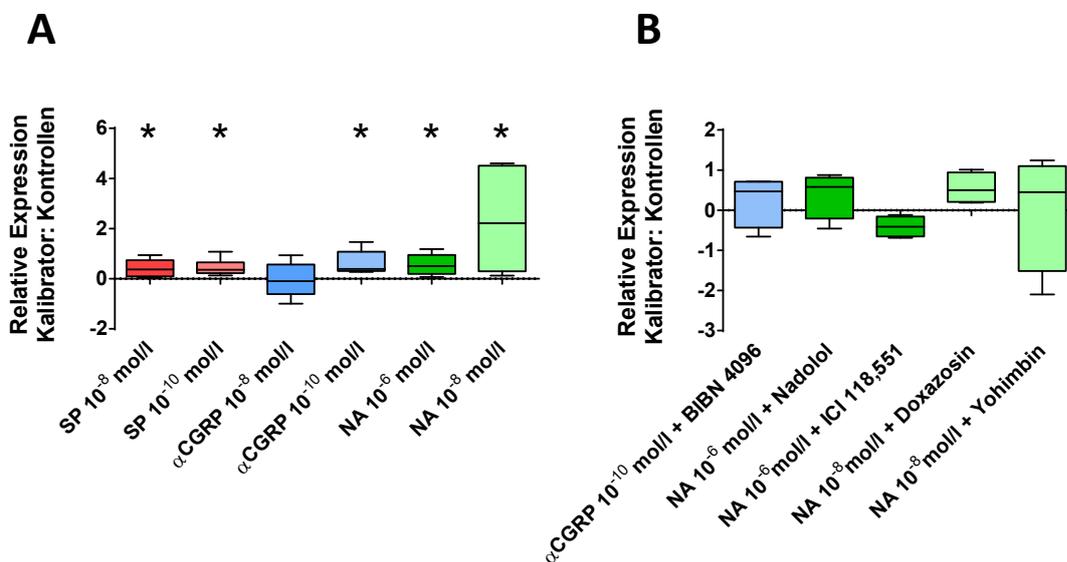


Abbildung 38: Relative Änderung (Log_2) der Genexpression von *ctsk* in Osteoklasten aus C57Bl/6J-Mäusen stimuliert mit SP, α -CGRP bzw. NA in zwei Konzentrationen (A, $n = 6$), sowie stimuliert mit α -CGRP bzw. NA in verschiedenen Konzentrationen und den jeweiligen spezifischen Inhibitoren (B, $n = 4$) im Vergleich zu unstimulierten Kontrollen nach fünf Tagen in Differenzierungsmedium. Die 0-Linie (x-Achse) entspricht den unstimulierten Proben, die als Kalibrator verwendet wurden. Dargestellt sind die Mediane +/- 5 %-95 % Perzentile; * = $p \leq 0,05$.

Durch die Blockade des CGRP-Rezeptors mit BIBN 4096 konnte die Wirkung von α -CGRP auf die Genexpression von *ctsk* aufgehoben werden (Abb. 38 B). Ebenso konnte der Effekt der hohen NA-Konzentration (10^{-6} mol/l) durch den β -AR-Antagonisten Nadolol und der niedrigen NA-Konzentration (10^{-8} mol/l) durch den α_2 -AR-Antagonisten Yohimbin inhibiert werden (Abb. 38 B). Bei der Ko-Stimulation der Osteoklasten mit 10^{-6} mol/l NA und dem β_2 -AR-Antagonisten ICI-118,551 wurde die *ctsk*-Expression tendenziell inhibiert, durch die Ko-Stimulation von 10^{-8} mol/l NA und dem α_2 -AR-Antagonisten Yohimbin tendenziell erhöht. Aufgrund der geringen Probenanzahl wurde keine statistische Signifikanz erreicht. Die Effekte nach alleiniger Stimulation mit den Antagonisten konnten in diesem Ansatz nicht analysiert werden, da nicht genügend Zellen für die Untersuchung zur Verfügung standen.

4.2.5.2. Genexpression von *mmp9* nach Stimulation mit SP, α -CGRP und NA

Das von den Osteoklasten sezernierte Protein MMP-9 ist neben Kathepsin K an der Resorption der organischen Knochenmatrix beteiligt. In den Versuchen zeigte sich im Vergleich zu unstimulierten Kontrollen eine erhöhte Genexpression von *mmp9* nach Stimulation mit 10^{-8} mol/l SP und 10^{-10} mol/l α -CGRP (Abb. 39 A, jeweils $p = 0,0313$). 10^{-10} mol/l SP und 10^{-8} mol/l α -CGRP zeigten keine Effekte. Beide Konzentrationen von NA führten tendenziell zu einer Erhöhung der *mmp9*-Genexpression (Abb. 39 A).

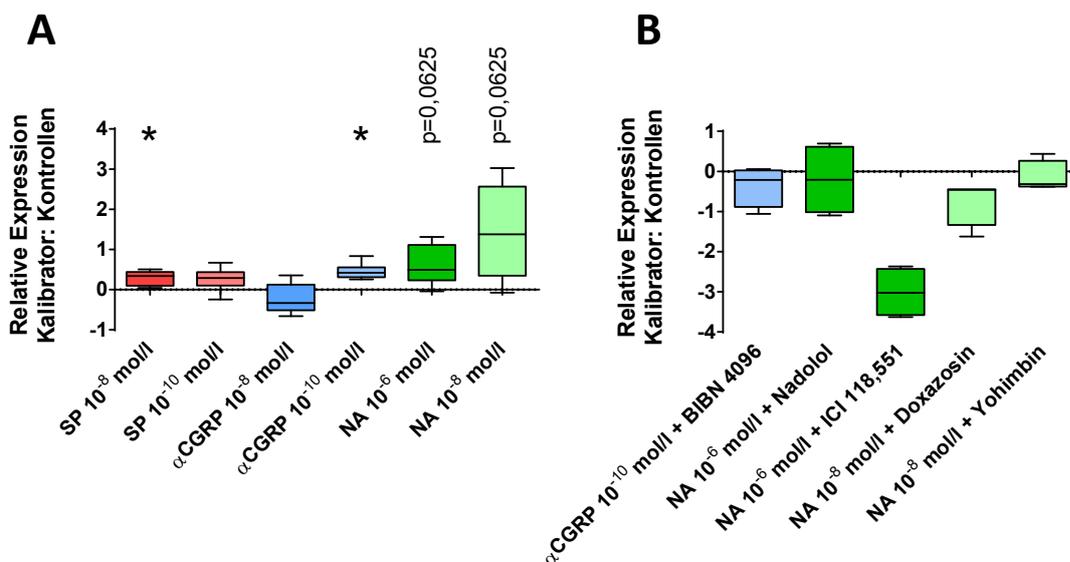


Abbildung 39: Relative Änderung (Log₂) der Genexpression von *mmp9* in Osteoklasten, aus C57Bl/6J-Mäusen stimuliert mit SP, α -CGRP bzw. NA in verschiedenen Konzentrationen (A, n = 6), sowie stimuliert mit α -CGRP bzw. NA in verschiedenen Konzentrationen und den jeweiligen spezifischen Inhibitoren (B, n = 4) im

4. Ergebnisse

Vergleich zu unstimulierten Kontrollen nach fünf Tagen in Differenzierungsmedium. Die 0-Linie (x-Achse) entspricht den unstimulierten Proben, die als Kalibrator verwendet wurden. Dargestellt sind die Mediane +/- 5 %-95 % Perzentile, * = $p \leq 0,05$.

In Analysen mit den spezifischen Rezeptorantagonisten zeigten sich bei der Ko-Stimulation der Osteoklastenkultur mit α -CGRP und BIBN 4096 keine Unterschiede in der Genexpression von *mmp9* im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (Abb. 39 B). Die Effekte von 10^{-6} mol/l NA wurden durch den β -AR-Antagonisten Nadolol, die Effekte von 10^{-8} mol/l NA durch den α_2 -AR-Antagonisten Yohimbin aufgehoben. Die gleichzeitige Stimulation mit 10^{-6} mol/l NA und ICI 118,551 bzw. 10^{-8} mol/l NA und Doxazosin führten zu einer Reduktion der *mmp9*-Genexpression (Abb. 39 B).

4.2.5.3. Genexpression von *nfatc1* nach Stimulation mit SP, α -CGRP und NA

Das Gen *nfatc1* kodiert das Protein NFATC1, einen wichtigen Transkriptionsfaktor der Osteoklastogenese. In einem Komplex mit weiteren Transkriptionsfaktoren induziert es die Expression vieler osteoklastenspezifischer Gene. Die Genexpression von *nfatc1* wurde durch Stimulation mit α -CGRP in beiden Konzentrationen signifikant erhöht (Abb. 40 A, jeweils $p = 0,0313$). Durch 10^{-8} mol/l NA wurde die *nfatc1*-Genexpression ebenfalls signifikant erhöht, durch 10^{-6} mol/l NA nur tendenziell (Abb. 40 A, 10^{-8} mol/l NA: $p = 0,0313$). Eine Stimulation mit SP veränderte die Genexpression von *nfatc1* im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle nicht.

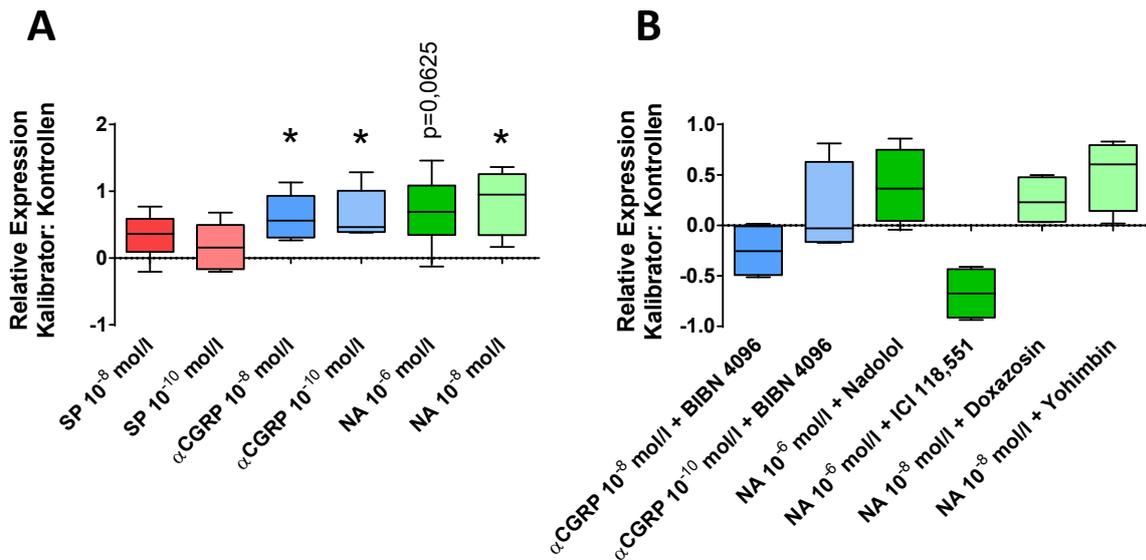


Abbildung 40: Relative Änderung (Log₂) der Genexpression von *nfatc1* in Osteoklasten, aus C57Bl/6J-Mäusen, stimuliert mit SP, α-CGRP bzw. NA in verschiedenen Konzentrationen (A; n = 6), sowie stimuliert mit α-CGRP bzw. NA in verschiedenen Konzentrationen und den jeweiligen spezifischen Inhibitoren (B, n = 4) im Vergleich zu unstimulierten Kontrollen nach fünf Tagen in Differenzierungsmedium. Die 0-Linie (x-Achse) entspricht den unstimulierten Proben, die als Kalibrator verwendet wurden. Dargestellt sind die Mediane +/- 5 %-95 % Perzentile; * = p ≤ 0,05.

In den Kontrollversuchen konnten bei Ko-Stimulation mit α-CGRP und dem CGRP-Rezeptor-Antagonisten BIBN 4096 keine Veränderungen in der Genexpression von *nfatc1* festgestellt werden und somit die α-CGRP-vermittelten Effekte inhibiert werden (Abb. 40 B). Doxazosin inhibierte teilweise die Effekte von 10⁻⁸ mol/l NA. Die Ko-Stimulation mit 10⁻⁶ mol/l NA und ICI 118,551 reduzierte die Expression von *nfatc1*. Die Inhibitoren Nadolol und Yohimbin zeigten keinen Einfluss auf die Effekte von NA.

4.2.5.4. Genexpression von *tnfrsf11a* nach Stimulation mit SP, α-CGRP und NA

tnfrsf11a ist das kodierende Gen für RANK, an den RANKL, der Schlüsselfaktor der Osteoklastogenese, bindet. Das Gen *tnfrsf11a* wies in Osteoklastenkulturen, die mit α-CGRP in einer Konzentration von 10⁻¹⁰ mol/l stimuliert wurden, eine tendenziell erhöhte Expression im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle auf (Abb. 41 A). Durch die Stimulation mit 10⁻⁸ mol/l α-CGRP sowie SP und NA konnte kein Einfluss auf die Genexpression von *tnfrsf11a* festgestellt werden.

4. Ergebnisse

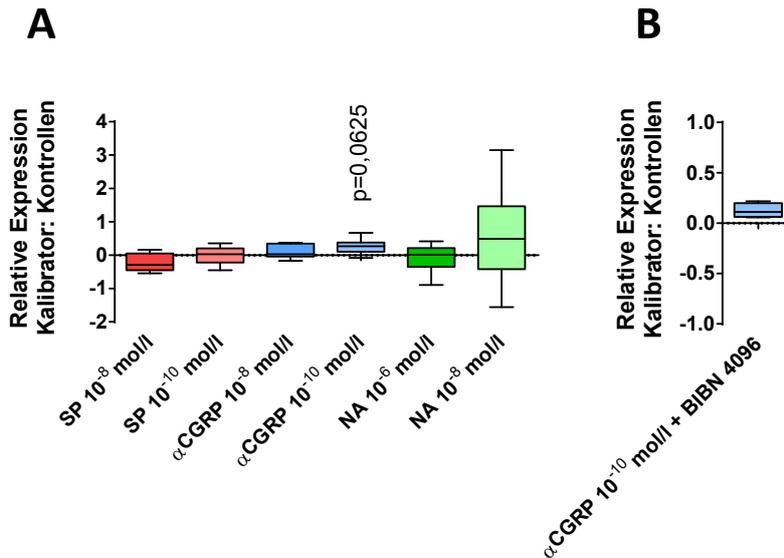


Abbildung 41: Relative Änderung (Log_2) der Genexpression von *tnfrsf11a* in Osteoklasten, aus C57Bl/6J-Mäusen stimuliert mit SP, α -CGRP bzw. NA in verschiedenen Konzentrationen (A, $n = 6$), sowie stimuliert mit α -CGRP und dem spezifischen Inhibitor BIBN 4096 (B, $n = 4$) im Vergleich zu unstimulierten Kontrollen nach fünf Tagen in Differenzierungsmedium. Die 0-Linie (x-Achse) entspricht den unstimulierten Proben, die als Kalibrator verwendet wurden. Dargestellt sind die Mediane +/- 5 %-95 % Perzentile.

Eine Ko-Stimulation mit 10^{-10} mol/l α -CGRP und dem CGRP-Rezeptor-Antagonisten BIBN 4096 konnte die von α -CGRP vermittelte Wirkung auf die *tnfrsf11a*-Genexpression nicht aufheben.

5. Diskussion

5.1. Der Einfluss von SP auf den Metabolismus und die Differenzierung von murinen Osteoblasten und Osteoklasten

SP ist ein prominenter Neurotransmitter des sensiblen Nervensystems. Die Auswirkungen von SP auf den Knochenmetabolismus sind weiterhin ein viel diskutiertes Thema. Abhängig von der Konzentration und Stimulationsdauer kommen bisherige Untersuchungen zu teils konträren Ergebnissen. In der vorliegenden Arbeit wurde daher der Einfluss von SP auf den Metabolismus von Osteoblasten- und BMM-/Osteoklastenkulturen genauer analysiert. Unsere Daten lassen vermuten, dass SP über den NK₁R-Rezeptor die Apoptoserate von Osteoblasten, abhängig von der Dosis und dem Differenzierungszeitpunkt der Zellen, beeinflusst. Nach Stimulation mit SP in niedriger Konzentration (10^{-10} mol/l) konnten wir in späteren Differenzierungsphasen der Osteoblasten (Tag 21) eine reduzierte Apoptoserate feststellen, wohingegen höhere SP-Konzentrationen das Überleben der Zellen nicht beeinflussten. Unterstützt werden unsere Beobachtungen durch aktuelle Studien von Fu et al. und Yang et al., die nachweisen konnten, dass bei gleichzeitiger Stimulation mit 10^{-10} mol/l SP eine durch Serumentzug induzierte Apoptose von osteogen differenzierten BMSCs bzw. MC3T3-Zellen nachweislich verhindert wird. Beide Studien konnten zudem eine Veränderung des Verhältnisses von bax und bcl2, zwei an der Apoptose-Kaskade beteiligte Proteine, feststellen. Während Fu et al. eine erhöhte bcl2-Expression nachweisen konnte, zeigte sich bei Yang et al. jedoch eine reduzierte bax-Expression (Fu et al. 2015; Yang et al. 2017). In der vorliegenden Arbeit konnte keine Änderung der mRNA-Expression von bcl2 festgestellt werden. Die Proteinexpression von bcl2 wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht analysiert.

Studien konnten bei BMSCs nicht nur eine reduzierte Apoptoserate, sondern ebenso einen Einfluss auf die Proliferation feststellen. Durch Stimulation mit SP wurde die Proliferation der Osteoblastenvorläuferzellen in Abhängigkeit von der Konzentration erhöht. Die größten Effekte zeigten sich in Konzentrationen von 10^{-10} mol/l bis 10^{-8} mol/l SP. Zudem konnte eine Abhängigkeit von der Stimulationsdauer festgestellt werden (Adamus and Dabrowski 2001; Mei et al. 2013; Liu et al. 2016). Auch in kostalen Chondrozyten lies sich eine positive Wirkung auf die Proliferation durch SP in Abhängigkeit der Dosis und Stimulationsdauer

nachweisen (Opolka et al. 2012). Wir hingegen konnten nach kurzer Stimulationsdauer weder für 10^{-8} mol/l SP noch für 10^{-10} mol/l SP eine Veränderung in der Proliferationsrate der Osteoblasten nach 14 und 21 Tagen osteogener Kultivierung nachweisen. Während Mei et al. nur eine mäßig erhöhte Proliferation nach 24 stündiger Stimulation nachweisen konnte, zeigte sich zu diesem Zeitpunkt bei Liu et al. keine Veränderung. Auch Adamus et al. stimulierten über einen längeren Zeitraum von drei Tagen. Allen drei Studien gemein ist zudem eine Stimulation mit SP während einer sehr frühen Differenzierungsphase der Osteoblastenvorläuferzellen (Adamus and Dabrowski 2001; Mei et al. 2013; Liu et al. 2016). Eine weitere Studie untersuchte diesen Aspekt genauer. Es zeigte sich, dass der Einfluss auf die Proliferation nach sieben Tagen osteogener Kultivierung am stärksten ausgeprägt ist. Zu späteren Zeitpunkten (14 und 21 Tage Kultivierung) veränderte eine Stimulation mit SP die Proliferationsrate der BMSCs nicht (Wang et al. 2009). Dies lässt vermuten, dass SP die Proliferation von Osteoblasten insbesondere in der Frühphase der osteogenen Differenzierung positiv beeinflusst. In fortgeschrittenen Differenzierungsstadien wiederum scheint es das Überleben der Osteoblasten durch eine reduzierte Apoptoserate zu fördern.

Die bisherigen Daten lassen vermuten, dass SP die Knochenbildung fördert. Wir untersuchten daher auch die Aktivität der Osteoblastenvorläuferzellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten der osteogenen Differenzierung. Interessanterweise zeigte sich nach sieben Tagen Kultivierung und damit in einer sehr frühen Phase der osteogenen Differenzierung eine reduzierte ALP-Aktivität nach SP-Stimulation in niedriger Konzentration (10^{-10} mol/l). Unsere Inhibitorversuche zeigten, dass diese Effekte über den NK₁R-Rezeptor vermittelt werden. Unterstützt werden die Beobachtungen von einer Studie von Adamus et al., in der die hemmende Wirkung auf die ALP-Aktivität in BMSCs nach dreitägiger Stimulation mit SP beobachtet wurde (Adamus and Dabrowski 2001). Der Effekt zeigte sich jedoch bei hohen Konzentrationen (10^{-8} mol/l). Unterschiede in der Zellherkunft (BMSCs als sehr frühe Vorläuferzellen bzw. primäre isolierte Osteoblasten) könnten ursächlich für die Konzentrationsunterschiede von SP sein. Ebenso konnten Azuma et al. zeigen, dass SP in Abhängigkeit von der Konzentration (10^{-7} mol/l bis 10^{-5} mol/l) die ALP-Aktivität von Osteoblasten inhibiert. Zudem zeigte sich in der von-Kossa-Färbung eine Hemmung der Knochenbildung (Azuma et al. 2004). Dem gegenüber stehen die Ergebnisse von Wang und Kollegen. Sie untersuchten BMSCs von Mäusen, die in osteogenem Medium kultiviert wurden, und konnten nach 14 Tagen Stimulation mit SP (10^{-10} mol/l und 10^{-12} mol/l) eine

erhöhte ALP-Aktivität nachweisen. Des Weiteren zeigte sich eine vermehrte Mineralisierung, die jedoch nur nach längerer Stimulationsdauer über 21 Tage ersichtlich war (Wang et al. 2009). Auch Goto et al. stellten fest, dass Osteoblastenvorläuferzellen von Ratten, die über 21 Tage mit SP in einer Konzentration von $\geq 10^{-8}$ mol/l stimuliert wurden, in späten Differenzierungsphasen eine vermehrte Knochenbildung aufweisen (Goto et al. 2007). Studien, in denen die SP-Stimulation über einen längeren Zeitraum durchgeführt wurde, zeigten auch eine erhöhte Genexpressionen von Osteocalcin und Kollagen I (Goto et al. 2007; Wang et al. 2009; Fu et al. 2014; Mei et al. 2014). In unseren Untersuchungen war die mRNA-Expression von *bglap* (Osteocalcin) und *col1a1* (Kollagen I) unverändert. Bei Betrachtung der unterschiedlichen Ergebnisse bezüglich der Aktivität wird deutlich, dass Osteoblasten, die über einen langen Zeitraum von ≥ 14 Tagen mit SP stimuliert wurden, eine erhöhte Knochenmatrix-bildende Aktivität aufweisen. Kürzere Stimulationsphasen mit SP dagegen scheinen einen gegenteiligen Effekt zu haben. Der Einfluss von SP auf die ALP-Aktivität der Osteoblasten scheint damit insbesondere von der Stimulationsdauer abhängig zu sein.

SP-vermittelte Effekte auf Osteoblasten scheinen abhängig von der Differenzierungsphase zu sein. Ob SP einen direkten Einfluss auf die Differenzierung von Osteoblastenvorläuferzellen hat, wurde in dieser Studie anhand der mRNA-Expression der Transkriptionsfaktoren Osterix und RUNX2 untersucht. Wir konnten nach Stimulation mit 10^{-10} mol/l SP eine tendenziell erhöhte mRNA-Expression von *sp7* (Osterix) in der späten Differenzierungsphase der Osteoblasten ermitteln. Bestätigt werden diese Daten durch Sun et al., die nach 14 Tagen Stimulation mit SP eine signifikant erhöhte Expression des Transkriptionsfaktors *sp7* (Osterix) nachweisen konnten (Sun et al. 2010). Die Expression von *runx2* war zu keinem Messzeitpunkt verändert, was mit Untersuchungen von Wang et al. konform ist (Wang et al. 2009). Dem gegenüber stehen Untersuchungen, bei denen die Stimulation mit höheren SP-Konzentrationen (10^{-7} mol/l) zu einer erhöhten Expression von *runx2* führte (Goto et al. 2007). Zudem analysierten Mei et al. sowie Fu et al. in aktuellen Studien die Expression des Transkriptionsfaktors zu einem sehr frühen Zeitpunkt der osteogenen Differenzierung und konnten ebenfalls eine erhöhte Expression feststellen. In späteren Differenzierungsphasen waren die Effekte deutlich weniger ausgeprägt bzw. nicht mehr vorhanden (Fu et al. 2014; Mei et al. 2014). Somit scheint der Neurotransmitter SP in Abhängigkeit von der Konzentration die osteogene Differenzierung auf Genexpressionsebene positiv zu

beeinflussen. Möglicherweise vermittelt SP in frühen Differenzierungsphasen seine Effekte überwiegend über den Transkriptionsfaktor RUNX2.

Anhand der vorliegenden Daten scheint der Neurotransmitter SP den Metabolismus von Osteoblasten bereits nach sehr kurzer Stimulationsdauer zu modulieren, wobei die SP-vermittelten Effekte abhängig vom Stadium der Zelldifferenzierung sind. Insbesondere in niedriger Konzentration (10^{-10} mol/l) besitzt das Neuropeptid einen protektiven Effekt auf Osteoblasten, zudem moduliert SP deren Aktivität. Unsere Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass kürzere Stimulationsphasen die Aktivität reduzieren. Auch die Genexpression differenzierungsrelevanter Transkriptionsfaktoren, wie Osterix und RUNX2, als Hinweis auf einen direkten Einfluss auf die osteogene Differenzierung, wird positiv beeinflusst.

Wir untersuchten des Weiteren mögliche Auswirkungen von SP auf den Metabolismus von Osteoklasten. Auf die Proliferation der Osteoklastenvorläuferzellen hatte SP in unseren Versuchen nach kurzer Stimulationsdauer von 24 Stunden keine Auswirkungen. Eine Studie von Wang et al. unterstützt unsere Daten. Sie konnten ebenfalls keine Veränderung der Proliferation in BMMs nach Stimulation mit SP feststellen (Wang et al. 2009). Gleichzeitig beobachteten wir jedoch, dass hohe SP-Konzentrationen (10^{-8} mol/l) die Apoptoserate steigerten. Dies legt die Vermutung nahe, dass SP über eine vermehrte Apoptose der Osteoklasten einen anabolen Effekt auf den Knochenmetabolismus ausübt, indem es die Anzahl der Osteoklasten reduziert. Dennoch konnten bereits Mori et al. feststellen, dass SP die Knochenresorption von Osteoklasten in Abhängigkeit von der Konzentration erhöht. In Osteoklastenkulturen zeigten sich nach SP-Stimulation signifikant größere Resorptionszonen im Vergleich zu unstimulierten Kontrollen (Mori et al. 1999). Wir untersuchten eines der für die Knochenresorption essenziellen Enzyme Kathepsin K (Saftig et al. 1998). Interessanterweise war in unseren Untersuchungen die Aktivität von Kathepsin K in Osteoklasten unverändert. Nichtsdestotrotz zeigte sich bei Betrachtung der mRNA-Expression des Kathepsin K-kodierenden Gens *ctsk* eine signifikant erhöhte Expression, sowohl bei der SP-Konzentration 10^{-10} mol/l als auch bei 10^{-8} mol/l. Demnach ist bei noch unveränderter Aktivität der Osteoklasten bereits nach kurzer Stimulationsdauer eine Induktion der mRNA-Expression erkennbar, was auf eine beginnende Veränderung der Stoffwechsellage hin zu einer vermehrten Aktivität der Osteoklasten deuten könnte. Auch die mRNA-Expression des Proteins MMP-9, welches ebenfalls an der Resorption der

Knochenmatrix beteiligt ist, zeigte sich nach Stimulation mit SP in hoher Konzentration (10^{-8} mol/l) signifikant erhöht. Dies bekräftigt die Annahme, dass SP bereits nach kurzer Stimulationsdauer einen positiven Effekt auf die Expression von Genen, welche die Osteoklastenaktivität steuern, ausübt. Möglicherweise verhindert SP eine übermäßige Knochenresorption, indem es die Apoptoserate der Osteoklasten erhöht, um so die Balance zwischen Knochenaufbau und -abbau zu bewahren. Ob SP seine Wirkung hierbei tatsächlich über den NK₁-R vermittelt, konnten wir nicht untersuchen, da eine Ko-Stimulation mit dem NK₁-R-Antagonisten L-733,050 zu einem Zellsterben in den Osteoklastenkulturen führte.

Die Differenzierung der Osteoklasten untersuchten Wang et al. mit Hilfe der TRAP-Färbung und ermittelten eine signifikant erhöhte Anzahl an TRAP-positiven Zellen nach SP-Stimulation von BMM-Kulturen. Der größte Effekt zeigte sich bei einer SP-Konzentration von 10^{-8} mol/l. SP scheint somit die Differenzierung der Osteoklasten zu fördern (Wang et al. 2009). Auch Sohn beschrieb insbesondere nach Stimulation mit SP-Konzentrationen $> 10^{-7}$ mol/l einen fördernden Einfluss auf die Osteoklastogenese (Sohn 2005). Wir hingegen konnten in unseren Analysen keine Veränderung der Anzahl an TRAP-positiven Zellen nachweisen. Auch die mRNA-Expression des wichtigen Transkriptionsfaktors NFATC1 wurde durch die kurzzeitige SP-Stimulation nicht beeinflusst. Ursächlich für die unterschiedlichen Ergebnisse ist möglicherweise die Stimulationsdauer. Während Wang et al. und Sohn die Stimulation mit SP über mehrere Tage durchführten, erfolgte sie in unseren Versuchen über 24 Stunden. Damit scheint ein positiver Einfluss auf die Osteoklastogenese erst nach längerer Stimulation mit SP einzutreten.

RANKL, der Schlüsselfaktor der Osteoklastogenese, wird vor allem von Osteoblasten und Osteozyten gebildet. Wir untersuchten daher den Einfluss des Neuropeptids SP auf die RANKL-Expression in Osteoblasten, um einen möglichen indirekten Effekt auf die Osteoklastogenese zu detektieren. Die mRNA-Expression von *tnfsf11* war in Osteoblasten, die 14 Tage in Differenzierungsmedium kultiviert wurden, nach Stimulation mit 10^{-8} mol/l SP signifikant erhöht, während die Expression des *decoy*-Rezeptor für RANKL, OPG, nicht verändert war. Auf die ebenfalls untersuchte mRNA-Expression von *tnfrsf11a* (RANK), dem Rezeptor für RANKL auf Osteoklasten, hatte SP keinen Einfluss. Durch eine Änderung des RANKL/OPG-Verhältnisses zugunsten von RANKL könnte der Neurotransmitter möglicherweise indirekt die Osteoklastogenese begünstigen. Inwieweit die gesteigerte

Expression von RANKL in Osteoblasten durch SP die Osteoklastogenese beeinflusst, könnte in Ko-Kulturen mit Osteoblasten und Osteoklasten oder mit konditioniertem Medium genauer untersucht werden. Auch eine quantitative Bestimmung der Proteine könnte mehr Informationen zu diesem Sachverhalt liefern. Einen Hinweis darauf geben bereits Wang et al., die in BMCSs ebenfalls eine erhöhte RANKL-Produktion feststellen konnten. In Ko-Kulturen von BMSCs mit RAW 264.7 Zellen war eine Induktion der Osteoklastogenese jedoch nicht nachweisbar (Wang et al. 2009).

Zusammenfassend lassen unsere Daten vermuten, dass der Neurotransmitter SP in Abhängigkeit von der Konzentration bereits nach kurzer Wirkdauer beginnt, den Metabolismus von Osteoklasten zu modulieren. Dabei zeigten sich Hinweise auf eine erhöhte Aktivität. Zudem scheint SP die Anzahl der Osteoklasten über eine gesteigerte Apoptoserate zu reduzieren, möglicherweise als Gegenregulation zur erhöhten Aktivität. Indirekt könnte SP über eine erhöhte RANKL-Expression in Osteoblasten möglicherweise auch die Osteoklastogenese fördern.

5.2. Der Einfluss von α -CGRP auf den Metabolismus und die Differenzierung von murinen Osteoblasten und Osteoklasten

Sensible Nervenfasern im Knochen sind in der Lage über CGRP-vermittelte Stimuli das *remodeling* der Knochenmatrix zu beeinflussen. Die genauen Effekte auf den Metabolismus der Knochenzellen sind jedoch nicht geklärt. In dieser Studie untersuchten wir *in vitro* gezielt den Einfluss des Neuropeptids α -CGRP auf den Metabolismus muriner Osteoblasten, BMM und Osteoklasten. Unsere Analysen zeigten, dass die Stimulation mit dem Neuropeptid α -CGRP in geringer Konzentration (10^{-10} mol/l) die Apoptoserate in Osteoblasten nach 14 und 21 Tagen osteogener Kultivierung tendenziell bzw. signifikant reduzierte. Vermittelt werden diese Effekte über den CGRP-Rezeptor, wie wir mithilfe des CGRP-Rezeptor-Antagonisten BIBN 4096 nachweisen konnten. Die Ergebnisse werden durch Untersuchungen von Liang et al. unterstützt. Sie konnten feststellen, dass α -CGRP konzentrationsabhängig insbesondere in der frühen Phase der Kultivierung die Apoptoserate von BMSCs aus osteoporotischem Knochen reduzierte. Die Stimulation erfolgte über einen Zeitraum von sieben Tagen (Liang et

al. 2015). Die Apoptose von Zellen wird u.a. über das antiapoptotisch wirkende Gen *bcl2* (*B-cell lymphoma 2*) reguliert, welches von Caspasen deaktiviert werden kann. Wir untersuchten daher auch die mRNA-Expression von *bcl2*, konnten jedoch keine Unterschiede nach α -CGRP-Stimulation nachweisen. Ursächlich dafür könnte sein, dass α -CGRP seine apoptotische Wirkung nicht über den intrinsischen Signalweg, an dem *bcl2* beteiligt ist, vermittelt. In dem von uns verwendeten Assay zur Bestimmung der Apoptoserate wurde die Aktivität der Effektor-Caspasen 3 und 7 gemessen, während *bcl2* durch Initiator-Caspasen gehemmt wird (Kurokawa and Kornbluth 2009).

Neben dem positiven Effekt auf die Überlebensdauer scheint die Stimulation mit α -CGRP auch die Proliferation von Osteoblasten zu beeinflussen. In Abhängigkeit von der Stimulationsdauer und -konzentration von α -CGRP konnten Liang et al. einen Anstieg in der Proliferationsrate von BMSCs feststellen (Liang et al. 2015). Wir hingegen konnten weder nach 14 Tagen noch nach 21 Tagen osteogener Differenzierung, unabhängig von der gewählten CGRP-Konzentration, eine Änderung der Proliferationsrate messen. Ursache für die Diskrepanz der Ergebnisse könnten die Dauer der Stimulation sowie die Herkunft der verwendeten primären Zellen sein. In der vorliegenden Arbeit fand die Stimulation der Osteoblasten-Kulturen über jeweils 24 Stunden statt, wohingegen Liang et al. erst nach einer CGRP-Stimulation über mehrere Tage eine erhöhte Proliferation der BMSC nachweisen konnten. Zudem wählten sie für die Stimulation frühe Vorläuferzellen (BMSC), während wir in unserer Studie differenzierte Osteoblasten verwendeten (Liang et al. 2015). Dies lässt vermuten, dass CGRP das Überleben von Osteoblasten in Abhängigkeit des Differenzierungsstatus und der Stimulationsdauer beeinflusst. In ihren Arbeiten untersuchten Liang et al. auch die Genexpression differenzierungsrelevanter Gene, u.a. *runx2*. Die Expression zeigte sich vor allem nach längerer CGRP-Stimulation signifikant erhöht (Liang et al. 2015). Auch in Studien an BMSCs von ovariektomierten Ratten konnten, sowohl auf Gen- als auch auf Proteinebene, eine erhöhte Expression der Transkriptionsfaktoren *sp7* (Osterix) und *runx2* in Abhängigkeit der CGRP-Konzentration festgestellt werden. Die Stimulation erfolgte über 21 Tage (Chen et al. 2016). Unsere Analysen hingegen ergaben, dass eine kurzzeitige Stimulation mit α -CGRP die mRNA-Expression von *runx2* nicht veränderten. Nach 21 Tagen osteogener Differenzierung zeigte sich eine tendenziell erhöhte Expression von *sp7*. Wir vermuten, dass α -CGRP erst nach der Stimulation über einen

längeren Zeitraum die Genexpression moduliert und die Differenzierung der Osteoblasten begünstigt.

Mehrere Studien deuten darauf hin, dass α -CGRP möglicherweise einen anabolen Einfluss auf die Knochenbildungsaktivität von Osteoblasten hat. So zeigten gentechnisch veränderte Mäuse, deren Osteoblasten humanes α -CGRP unter der Kontrolle des Osteocalcinpromoters exprimierten, *in vivo* eine erhöhte Knochenmasse und Knochendichte (Ballica et al. 1999). Schinke et al. untersuchten Mäuse mit ausgeschaltetem α -CGRP-Gen, die ab einem Alter von sechs Monaten unter ausgeprägter Osteopenie der Wirbelkörper litten, verursacht durch eine verminderte Knochenbildungsrate. Dabei hatte der Verlust von α -CGRP keinen Einfluss auf die Anzahl der Osteoblasten, woraus sie schlussfolgerten, dass hauptsächlich die Aktivität der Osteoblasten durch α -CGRP beeinflusst wird (Schinke et al. 2004). Interessanterweise konnten wir während der frühen osteogenen Differenzierung (nach sieben Tagen), vermittelt über den CGRP-Rezeptor, eine reduzierte ALP-Aktivität in Osteoblasten-Kulturen feststellen. In späteren Differenzierungsphasen (nach 14 bzw. 21 Tagen) war kein Einfluss von α -CGRP auf die ALP-Aktivität mehr erkennbar. Eine Abhängigkeit von der Neuropeptidkonzentration stellten wir nicht fest. Andere Studien konnten – konträr zu unseren Daten – eine signifikant erhöhte ALP-Aktivität nach Stimulation mit α -CGRP messen. Liang et al. stimulierten Osteoblastenvorläuferzellen jedoch über einen Zeitraum von 14 Tagen (Liang et al. 2015). Auch Wang und Kollegen konnten nach längerer Stimulation positive Effekte auf die Aktivität nachweisen. Der Anstieg der Genexpression von ALP, Kollagen I und Osteocalcin bekräftigte diese Effekte (Wang et al. 2010). Weitere Studien konnten nach längerer α -CGRP-Stimulation eine erhöhte Genexpression von Osteocalcin und Kollagen I feststellen (Liang et al. 2015; He et al. 2016). In unseren Versuchen war die mRNA-Expression von *col1a1* nach kurzer Stimulation über 24 Stunden nicht verändert. Dadurch liegt die Vermutung nahe, dass α -CGRP nur nach einer längeren Stimulationsdauer einen positiven Effekt auf die Aktivität der Osteoblasten ausübt. Zudem scheinen die Auswirkungen auf die Aktivität vom Differenzierungsstadium der Osteoblasten abhängig zu sein. Möglicherweise reduzieren kurzzeitige α -CGRP-Stimulationen die Osteoblastenaktivität in der frühen Phase der osteogenen Differenzierung. Die von uns festgestellte Reduktion der mRNA-Expression von Osteocalcin (nach 14 Tagen) unterstützt diese These.

Betrachtet man zusammenfassend die Ergebnisse hinsichtlich der Veränderung der Apoptose und Proliferation von Osteoblasten, scheint α -CGRP die Anzahl der knochenbildenden Zellen durch Verlängerung der Überlebensdauer (Reduktion der Apoptose) zu erhöhen. Damit könnte α -CGRP einen anabolen Effekt auf den Knochenmetabolismus haben. In unseren Untersuchungen wird auch deutlich, dass die Apoptoserate der Osteoblastenvorläuferzellen bereits nach kurzer Stimulation mit α -CGRP verändert wird, wohingegen es einen längeren Einfluss von α -CGRP bedarf, um die Proliferation zu modulieren (Liang et al. 2015). Auch die Aktivität und Differenzierung der Osteoblasten scheint erst nach längerer α -CGRP-Stimulation positiv beeinflusst zu werden.

Osteoblasten sind jedoch nicht nur durch den Aufbau von Knochenmatrix maßgeblich am *bone remodeling* beteiligt, sie nehmen auch Einfluss auf die Osteoklastogenese, indem sie RANKL und OPG sezernieren. Nach Stimulation der Osteoblasten mit 10^{-8} mol/l α -CGRP zeigte sich in der früheren Differenzierungsphase nach 14 Tagen und tendenziell auch nach 21 Tagen ein erhöhte mRNA-Expression von *tnfsf11* (RANKL), die mRNA-Expression von *tnfrsf11b* (OPG) hingegen war nicht verändert. Konträr zu diesen Ergebnissen fanden Yoo et al. heraus, dass eine CGRP-Stimulation von MC3T3-E1-Zellen (Osteoblastenvorläuferzellen) die Expression auf mRNA- und Proteinebene von OPG erhöht und die von RANKL reduziert (Yoo et al. 2014). Villa et al. untersuchten humane osteoblastenähnliche Zellen und konnten einen negativen Effekt von α -CGRP auf die mRNA-Expression von OPG feststellen (Villa et al. 2006). Betrachtet man die unterschiedliche Stimulationsdauer in den Studien, fällt auf, dass Yoo et al. über einen längeren Zeitraum von sieben Tagen stimulierten, während wir, ebenso wie Villa et al., eine Stimulation über 24 Stunden wählten. Schlussfolgernd scheint die Dauer der CGRP-Stimulation eine wichtige Rolle zu spielen. Vermutlich zeigen sich die von CGRP-vermittelten hemmenden Eigenschaften auf die Osteoklastogenese erst nach längerer Stimulation, während kurze Stimulationen einen gegenteiligen Effekt haben.

Aus unseren Daten geht hervor, dass α -CGRP auch einen direkten Einfluss auf Osteoklasten und deren Vorläuferzellen ausübt. Die Proliferation der Knochenmarksmakrophagen war nach α -CGRP-Stimulation in niedriger Dosierung (10^{-10} mol/l α -CGRP) signifikant reduziert, nicht jedoch in höherer Konzentration. Auch Owan und Ibaraki konnten eine reduzierte Proliferation von BMMs feststellen, jedoch bei CGRP-Konzentration von 10^{-8} mol/l und 10^{-6} mol/l (Owan and Ibaraki 1994). Ursächlich für diese Diskrepanz könnte die unterschiedliche

Zellherkunft sein, aber auch der Zeitpunkt der Stimulation. So stimulierten Owan und Ibaraki direkt zu Beginn der Kultivierung, während in unseren Versuchen die Stimulation erst nach vier Tagen Differenzierung erfolgte. Eine Ko-Stimulation mit BIBN 4096 konnte den α -CGRP-vermittelten Effekt nicht inhibieren, eine Stimulation mit dem CGRP-Rezeptor-Antagonisten allein lieferte keinen Hinweis auf eine agonistische Wirkung von BIBN 4096. Möglicherweise besteht eine unterschiedlich starke Bindung an die durch RAMP1, RAMP2 und RAMP3 gebildeten Subtypen des CGRP-Rezeptors (Kuwasako et al. 2004). Weiteren die Apoptoserate der Osteoklasten, die sich durch CGRP nicht veränderte. Hinsichtlich der Kathepsin K-Aktivität der Osteoklasten konnten wir nach Stimulation mit CGRP keine Unterschiede im Vergleich zu den unstimulierten Kulturen feststellen. Im Gegensatz dazu konnten mehrere Studien eine reduzierte Aktivität der Osteoklasten durch CGRP-Stimulation messen, indem sie nachwiesen, dass CGRP die Resorption von Knochenmatrix durch Osteoklasten inhibiert (Zaidi et al. 1987b; Cornish et al. 2001; Wang et al. 2010). Granholm et al. untersuchten Osteoklasten, die zuvor mit PTH stimuliert wurden. Nach Zugabe von CGRP fand sich auch hier eine signifikant reduzierte Aktivität der Osteoklasten (Granholm et al. 2011). Allen Studien gemein ist eine deutlich längere Stimulationsdauer als die von uns gewählte Dauer von 24 Stunden. CGRP scheint damit erst nach längerer Stimulationsdauer die Aktivität der Osteoklasten zu beeinflussen. Unterstützt wird die Aussage durch unsere Daten hinsichtlich der mRNA-Expression von Kathepsin K und MMP-9, zwei am Abbau der Knochenmatrix beteiligte Proteine. Dabei zeigte sich nach Stimulation mit 10^{-10} mol/l α -CGRP eine erhöhte mRNA-Expression der Gene *ctsk* (Kathepsin K) und *mmp9* (MMP-9). Wang et al. wiederum konnten nach längerer Stimulation eine signifikant reduzierte Expression von TRAP und Kathepsin K feststellen (Wang et al. 2010). Dies bestätigt unsere Vermutung, dass die Dauer der CGRP-Stimulation eine entscheidende Rolle für den Effekt CGRPs auf die Aktivität der Osteoklasten spielt. Wir vermuten, dass kurze CGRP-Stimulationen die Zellaktivität unter Umständen begünstigt.

Die Osteoklastogenese von Knochenmarksmakrophagen war nach Stimulation mit 10^{-8} mol/l α -CGRP stark beeinträchtigt. Die Anzahl multinukleärer Osteoklasten in den von uns untersuchten Kulturen war um ca. 75 % reduziert. Damit scheint CGRP in höheren Konzentrationen die Osteoklastogenese drastisch zu hemmen. Unsere Beobachtungen stimmen mit den Erkenntnissen von Cornish et al. überein. Sie zeigten, dass die Anzahl multi- sowie mono- und binukleärer TRAP-positiver Zellen durch CGRP ab einer Konzentration von

$\geq 10^{-9}$ mol/l reduziert und die Fusion von Osteoklastenvorläuferzellen zu multinukleären Zellen gehemmt wurde (Cornish et al. 2001). In Co-Kulturen mit Osteoblasten konnten auch Yoo et al. eine deutliche Reduktion an Osteoklasten nach CGRP-Stimulation feststellen (Yoo et al. 2014). Interessant war unsere Beobachtung, dass die Stimulation der Vorläuferzellen mit 10^{-10} mol/l α -CGRP, im Gegensatz zu 10^{-8} mol/l α -CGRP, die Anzahl an multinukleären TRAP-positiven Zellen tendenziell erhöhte. In unseren Analysen wurden TRAP-positive Zellen mit drei und mehr Kernen berücksichtigt, eine weitere Differenzierung hinsichtlich der Größe der Zellen und Anzahl der Kerne pro Zelle wurde nicht vorgenommen. Cornish et al. beschrieben, dass CGRP insbesondere in der späteren Phase der Osteoklastogenese die Fusion der Osteoklastenvorläuferzellen hemmt (Cornish et al. 2001). Möglicherweise könnte die hier angewandte Zählmethodik zu einer tendenziell erhöhten Anzahl an TRAP-positiven Zellen geführt haben, da eine Fusion der Zellen durch die Stimulation mit 10^{-10} mol/l α -CGRP verhindert wurde. In den unstimulierten Kontrollen wiederum sind die Osteoklastenvorläuferzellen zu Osteoklasten mit deutlich mehr Zellkernen fusioniert, was schließlich in einer geringeren Anzahl an Zellen in der unstimulierten Kultur resultierte, im Vergleich zu der Kultur, die mit α -CGRP stimuliert wurde. Die Daten lassen vermuten, dass α -CGRP in niedrigerer Konzentration insbesondere die Fusion der Osteoklastenvorläuferzellen zu hemmen scheint, während die negativen Effekte auf die Osteoklastogenese von hohen CGRP-Konzentrationen ausgeprägter sind und auch die Anzahl an Osteoklasten deutlich reduziert wird.

Trotz der Hinweise auf die hemmenden Eigenschaften von α -CGRP auf die Osteoklastogenese in der TRAP-Färbung, war die mRNA-Expression von wichtigen Transkriptionsfaktoren der Osteoklastogenese erhöht. Wir konnten signifikante Effekte auf die *nfatc1*-Expression nach Stimulation mit beiden α -CGRP-Konzentrationen feststellen, wohingegen die Induktion der *tnfrsf11a*-Expression, dem Schlüsselfaktor der Osteoklastogenese, nur in einer Konzentration von 10^{-10} mol/l α -CGRP detektiert werden konnte, was den Daten zur erhöhten Anzahl der Osteoklasten entspricht. Nichtsdestotrotz überwiegen auch nach kurzer Stimulationsdauer die hemmenden Eigenschaften CGRPs auf die Osteoklastogenese deutlich, wie unsere Daten der TRAP-Färbung zeigen.

Den bisherigen Konsens, dass α -CGRP auf den Prozess des *bone remodeling* überwiegend anabol wirkt, konnten wir in unseren Untersuchungen bestätigen. α -CGRP beeinflusst

sowohl die Differenzierung der Osteoklasten, als auch deren Metabolismus. Dabei scheint der Effekt mit der Dauer der Stimulation zuzunehmen, auch der Zeitpunkt der Differenzierungsphase ist entscheidend. Wir konnten jedoch auch zeigen, dass α -CGRP nach kurzer Stimulationsdauer, insbesondere in niedrigen Konzentrationen, die Osteoklastogenese möglicherweise positiv beeinflusst und somit regulierend in das *bone remodeling* eingreift. Auch die Knochenresorptionsaktivität der Osteoklasten scheint durch kurze α -CGRP-Stimulation möglicherweise erhöht.

5.3. Der Einfluss von NA auf den Metabolismus und die Differenzierung von murinen Osteoblasten und Osteoklasten

Die Auswirkungen des SNS untersuchten wir mithilfe des Neurotransmitters NA, der als nicht-selektiver Adrenozeptor-Agonist seine Wirkung sowohl über α -AR als auch über β -AR entfaltet. Es ist bereits bekannt, dass NA in Abhängigkeit von der Konzentration eine unterschiedliche Präferenz bezüglich der AR besitzt. In Konzentrationen von $\leq 10^{-8}$ mol/l bindet es vor allem an α -AR, bei $\geq 10^{-6}$ mol/l überwiegend an β -AR (Molinoff 1984; Grassel 2014).

In unseren Analysen konnten wir nahezu eine Verdopplung der Proliferation bei Osteoblasten, die für 24 Stunden mit NA stimuliert wurden, feststellen. Dabei zeigte sich eine Abhängigkeit von der NA-Konzentration und dem Zeitpunkt der Stimulation. Die Stimulation mit hohen und niedrigen NA-Konzentrationen steigerte die Proliferationsrate nach 14 Tagen osteogener Differenzierung um nahezu 100 %. Nach 21 Tagen osteogener Differenzierung ließ sich mit 10^{-6} mol/l NA ebenfalls eine deutlich gesteigerte Proliferationsrate feststellen (> 100 %). Ebenso hatten niedrigere NA-Konzentrationen einen positiven Einfluss, wenn auch in geringerem Maße (50 %). NA scheint die Proliferation der Osteoblastenvorläuferzellen sowohl in frühen Phasen als auch die der Osteoblasten in späteren Phasen der osteogenen Differenzierung positiv zu beeinflussen. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Kodama und Togari, die bei humanen Osteoblasten eine erhöhte Proliferation nach Stimulation mit NA-Konzentrationen von $< 3 \cdot 10^{-6}$ mol/l feststellen. Höhere NA-Konzentrationen ($> 3 \cdot 10^{-6}$ mol/l) reduzierten die Proliferation. Durch weitere

Analysen zeigten sie, dass NA über α -AR die Proliferation induzierte, wohingegen eine Aktivierung von β -AR die Proliferation hemmte (Kodama and Togari 2013). Auch Huang und Kollegen konnten zeigen, dass die α -AR-Agonisten Phenylephrin und Ciralzolin die Proliferation der Osteoblasten förderten, der β -AR-Agonist Fenoterol diese dagegen hemmte (Huang et al. 2009). In Übereinstimmung mit ihren Aussagen konnten wir in Versuchen mit β -AR-Antagonisten nachweisen, dass die positiven Effekte auf die Proliferation nicht über β -AR vermittelt werden. Jedoch war auch in hohen NA-Konzentrationen, in denen NA eine höhere Affinität für β -AR aufweist, die Proliferation der Osteoblastenvorläuferzellen erhöht. Nichtsdestotrotz zeigten sich in Ko-Stimulationen mit dem α_1 -AR-Antagonisten Doxazosin und dem α_2 -AR-Antagonisten Yohimbin weiterhin eine erhöhte Proliferation der Osteoblasten, ebenso nach Stimulation mit den α -AR-Antagonisten allein. Scheinbar besitzen Doxazosin und Yohimbin eine zusätzliche intrinsische Aktivität, was eine mögliche Erklärung für die Ergebnisse sein könnte. Insgesamt scheint hinsichtlich der Proliferation der Osteoblasten die Wirkung von NA über α -AR auch in höheren Konzentrationen von 10^{-6} mol/l zu überwiegen. Dieser Effekt könnte durch eine unterschiedliche Expression an α -AR und β -AR oder der Turnover-Zeit in der Zellmembran während der Differenzierung bedingt sein.

Unsere Daten lassen vermuten, dass NA in Abhängigkeit der Konzentration und des Differenzierungsstadiums die Proliferation der Osteoblasten begünstigt. Dies suggeriert einen anabolen Effekt auf den Knochenmetabolismus. Die Analysen bezüglich der Apoptose der Osteoblasten unterstützen diese These. Die Apoptoserate war nach NA-Stimulation für 24 Stunden sowohl in der frühen als auch in der späten osteogenen Differenzierungsphase deutlich verringert, wobei die Wirkung mit höherer NA-Konzentration zunahm. Interessanterweise konnten wir die NA-vermittelten Effekte auf die Apoptose sowohl durch Zugabe des β -AR-Antagonist Nadolol als auch durch Doxazosin (α_1 -AR-Antagonist) inhibieren. Die mRNA-Expression von *bcl2* war nicht verändert. Opolka et al. konnten auch bei kostalen Chondrozyten eine reduzierte Apoptoserate nach NA-Stimulation nachweisen (Opolka et al. 2012). Dem gegenüber stehen Studien an murinen Osteoblasten, die nach Gabe des β -AR-Agonisten Isoproterenol keine Veränderung in der Apoptose zeigten. Die Stimulation erfolgte jedoch über fünf Minuten, was eine Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse sein könnte (Takeda et al. 2002). Mehrere Studien konnten bereits bei β -AR einen Wechsel

der gebundenen G-Proteine nachweisen. Vermittelt über die β -Arrestin/Phosphodiesterase 4-Interaktion, wechselt das an den β -AR gekoppelte G-Protein G_s (stimulierend) zu G_i (inhibierend) (Baillie et al. 2003; Jenei-Lanzl et al. 2015). Möglicherweise werden dadurch sowohl durch α -AR- als auch β -AR-Signalwege aktiviert, die zu einer ähnlichen Wirkung auf die Apoptoserate der Osteoblasten führen.

Die Aktivität der Osteoblasten unter dem Einfluss von NA wurde u.a. von Aitken et al. untersucht. Sie stimulierten murine Osteoblasten in unterschiedlichen NA-Konzentrationen (10^{-6} mol/l – 10^{-9} mol/l) und stellten im Vergleich zu unstimulierten Kontrollen keine Veränderung der ALP-Aktivität fest. Auch auf die Bildung von Knochenmatrix zeigte sich kein Effekt (Aitken et al. 2009). Unsere Analysen bestätigen diese Ergebnisse, die ALP-Aktivität zeigte sich nach 24-stündiger Stimulation mit NA unverändert. Dennoch fanden wir Hinweise auf einen Einfluss von NA auf die Osteoblastenaktivität. Wir untersuchten die Expression der am Aufbau der Knochenmatrix beteiligten Gene *col1a1* und *bglap* (Osteocalcin) und konnten feststellen, dass in der frühen Differenzierungsphase (Tag 14) die mRNA-Expression durch NA in niedriger Dosierung (10^{-8} mol/l) tendenziell erhöht war. Dies lässt auf einen positiven Effekt von NA auf die Aktivität der Osteoblasten während der osteogenen Differenzierung schließen. Unsere Ergebnisse decken sich mit Untersuchungen an Chondrozyten, die mit NA stimuliert wurden und ebenfalls eine erhöhte Genexpression von *col1a1* aufwiesen (Opolka et al. 2012). Wie sich in unseren Inhibitorversuchen mit Doxazosin zeigte, scheinen die Effekte über den α -AR vermittelt zu werden. Unterstützt wird diese These durch Ergebnisse von Tanaka et al., die Mäuse *in vivo* über zwei Wochen mit dem α -AR-Antagonisten Prazosin stimulierten und eine signifikante Reduktion der mRNA-Expression von Osteocalcin feststellen konnten. Zudem fanden sich bei Mäusen mit ausgeschaltetem α_{1B} -AR Hinweise auf eine reduzierte Osteoblastenaktivität (Tanaka et al. 2016). Hingegen führten intermittierende Stimulationen über zwei Wochen mit dem β -AR-Agonisten Isoprenalin *in vivo* zu einer reduzierten Knochenbildung und mRNA-Expression von ALP in Osteoblasten (Kondo and Togari 2011). Dies lässt vermuten, dass die Effekte von NA auf die Osteoblastenaktivität je nach angesprochener Signalübertragung (α -AR oder β -AR) differieren. Deutliche Effekte auf die Osteoblastenaktivität manifestieren sich aber erst nach längerer Stimulation.

Inwiefern eine Stimulation der AR einen Einfluss auf die osteogene Differenzierung haben, untersuchten Takeda et al. mit Hilfe des β -AR-Agonisten Isoproterenol. Nach drei-tägiger Stimulation konnten sie eine reduzierte Expression des Transkriptionsfaktors RUNX2 feststellen (Takeda et al. 2002). Nuntapornsak et al. stimulierten UMR106-Zellen (osteoblastenähnliche Zellen) für 48 Stunden mit dem β_3 -AR-Agonisten BRL37344 und konnten nach Stimulation mit einer NA-Konzentration von 10^{-6} mol/l ebenfalls eine Reduktion der RUNX2-Expression feststellen, in höheren Konzentrationen (10^{-7} mol/l) war die Osterix-Expression erhöht (Nuntapornsak et al. 2010). In unseren Analysen war die mRNA-Expression von *sp7* und *runx2* nach Stimulation mit NA über 24 Stunden jedoch nicht verändert. Auch eine Aktivierung der α -AR scheint die Expression der wichtigen Transkriptionsfaktoren RUNX2 und Osterix zu hemmen. Tanaka et al. stimulierten dazu Mäuse über einen Zeitraum von zwei Wochen mit Prazosin, einem selektiven α_1 -AR-Agonisten (Tanaka et al. 2016). Dies legt die Vermutung nahe, dass NA möglicherweise über beide Rezeptortypen α -AR und β -AR die Differenzierung hemmt. Die Stimulationen in den genannten Studien erfolgten jedoch über einen längeren Zeitraum, sodass wir davon ausgehen, dass NA erst nach Langzeitstimulation die Genexpression der für die Differenzierung wichtigen Gene beeinflusst.

Zusammengefasst scheint NA bereits nach kurzer Stimulationsdauer während der osteogenen Differenzierung in Abhängigkeit von Konzentration und Zeitpunkt der Stimulation den Metabolismus und die Aktivität der Osteoblasten zu beeinflussen. Unsere Daten deuten darauf hin, dass NA die Proliferation von Osteoblasten fördert und deren Überleben verlängert. Zudem waren Hinweise für positive Effekte, im Sinne einer erhöhten Genexpression von Kollagen I und Osteocalcin, auf die Matrixbildung erkennbar. Diese Effekte werden insbesondere über α -AR vermittelt.

Die Mehrzahl der Studien kommt jedoch zu dem Ergebnis, dass NA- bzw. β -AR-vermittelte Effekte zu einem Verlust an Knochemasse führen und sich negativ auf die Qualität der Knochenmatrix auswirken. Ursächlich scheint eine Begünstigung der Osteoklastendifferenzierung durch eine vermehrte RANKL-Expression in Osteoblasten zu sein, die durch den β_2 -AR-Signalweg induziert wird (Moore et al. 1993; Takeda et al. 2002; Yirmiya et al. 2006; Aitken et al. 2009; Hu et al. 2010; Kondo and Togari 2011). Unsere Daten befürworten diese Annahme. Die mRNA-Expression von RANKL in Osteoblasten war nach

Stimulation mit hohen NA-Konzentrationen zu beiden untersuchten Differenzierungszeitpunkten erhöht. Eine Ko-Stimulation mit dem β_2 -AR-Antagonist ICI-118,551 inhibierte die Effekte. Gleichzeitig war die Expression von OPG nicht verändert. Damit scheint NA in hohen Konzentrationen, vermittelt über den β_2 -AR, das RANKL/OPG-Verhältnis zugunsten von RANKL zu verschieben und somit die Osteoklastogenese zu fördern. Interessanterweise reduzierte der direkte Einfluss von NA die Proliferation von Osteoklastenvorläuferzellen (BMM) nahezu um die Hälfte, verglichen zu unstimulierten Kontrollen. Ein Unterschied zwischen den NA-Konzentrationen bestand nicht. Die Apoptoserate der Osteoklastenkulturen war dagegen unverändert. Durch die Zugabe von Nadolol (β -AR-Antagonist) und den α -AR-Antagonisten Doxazosin und Yohimbin konnte der Effekt nicht inhibiert werden. Es zeigte sich aber in den Inhibitorcontrollen erneut eine möglicherweise intrinsische Aktivität der α -AR-Antagonisten. Anhand der Ergebnisse vermuten wir, dass die Wirkung von NA nicht über den β -AR-Signalweg vermittelt wird. Inwieweit die Signaltransduktion über α -AR an den Effekten auf die Proliferationsrate der Osteoklastenvorläuferzellen beteiligt ist, müsste in weiteren Versuchen mit Hilfe von spezifischen Agonisten für α_1 -AR, wie Prazosin, bzw. α_2 -AR, wie RS 79948, untersucht werden. Die Daten von Xiu et al. bekräftigten unsere Ergebnisse. Sie konnten in BMM-Kulturen, die mit NA-Konzentrationen von 10^{-6} mol/l und 10^{-8} mol/l stimuliert wurden, ebenfalls eine signifikante Reduktion der Proliferation nachweisen (Xiu et al. 2013).

Konträr zu diesen Beobachtungen stellten Hu et al. *in vivo* an Ratten, die durch induzierten Stress erhöhte Serum-NA-Spiegel aufwiesen, eine signifikant erhöhte Anzahl an Osteoklasten auf der Knochenoberfläche fest (Hu et al. 2010). NA scheint die Proliferation der Osteoklastenvorläuferzellen zu inhibieren und gleichzeitig jedoch deren Differenzierung zu Osteoklasten vor allem durch RANKL zu fördern. Diese These wird durch weitere Studien unterstützt, in denen nachgewiesen werden konnte, dass Isoprenalin die Osteoklastogenese begünstigt und die Anzahl an Osteoklasten erhöht. Der β -AR-Antagonist Propranolol inhibierte die Wirkung (Kondo and Togari 2011; Kondo et al. 2013). In unseren Versuchen war die Anzahl an multinukleären TRAP-positiven Zellen jedoch unverändert. Möglicherweise liegt dies in der kurzen Stimulationsdauer begründet. In den erwähnten Studien wurde über einen längeren Zeitraum als den von uns gewählten 24 Stunden stimuliert. Es fanden sich in unseren Analysen dennoch auch Hinweise auf eine positive Wirkung von NA auf die Osteoklastogenese. So war die mRNA-Expression des

Transkriptionsfaktor NFATC1 durch Stimulation mit hohen und niedrigen NA-Konzentrationen erhöht, wobei sich nach Stimulation mit 10^{-8} mol/l NA größere Auswirkungen zeigten. Ein Einfluss auf die mRNA-Expression von RANK in Osteoklasten war nicht zu beobachten. Eine Stimulation von RAW 264.7-Zellen und BMMs mit Isoprenalin bewirkte ebenfalls eine erhöhte Genexpression von NFATC1, Kathepsin K und TRAP (Kondo et al. 2013). Durch Stimulation mit dem α_1 -AR-Antagonist Doxazosin und dem β_2 -AR-Antagonisten ICI 118,551 konnten wir die Effekte auf die NFATC1-Expression inhibieren. Aufgrund der geringen Zellausbeute war es im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich, Kontrollversuche mit den α - bzw. β -AR-Antagonisten durchzuführen. Unsere Daten lassen jedoch vermuten, dass NA seine Wirkung auf wichtige osteoklastenspezifische Gene über α_1 -AR und β_2 -AR vermittelt und die Osteoklasteogenese so begünstigt. Bekräftigt wird diese Aussage durch die Daten von Tanaka et al., die mithilfe des α -AR-Antagonisten Prazosin eine signifikant reduzierte Expression von NFATC1 nachweisen konnten (Tanaka et al. 2016).

Schließlich untersuchten wir auch die Aktivität der Osteoklasten, konnten jedoch keine Veränderung der Kathepsin K-Aktivität feststellen. Allerdings war die mRNA-Expression von Kathepsin K erhöht, ebenso wie die mRNA-Expression von MMP9. Dabei zeigten sich in niedrigen NA-Konzentrationen größere Auswirkungen. Dies lässt vermuten, dass NA die Aktivität der Osteoklasten positiv beeinflusst. Unterstützt werden unsere Daten durch die Arbeit von Moore et al., welche zeigen konnten, dass die Knochenresorption in murinen Schädelknochen nach 72-stündiger Stimulation mit NA erhöht war (Moore et al. 1993). Erhöhte Serum-NA-Spiegel in Ratten führten *in vivo* zu einer erhöhten Knochenresorption, bedingt durch eine erhöhte Osteoklastenaktivität (Hu et al. 2010). Eine weitere Studie untersuchte humane osteoklastenähnliche, multinukleäre Zellen nach Stimulation mit Adrenalin und Isoprenalin. Auch hier fand sich eine vermehrte Resorptionsaktivität. Zudem war auch die mRNA-Expression u.a. von Kathepsin K erhöht (Arai et al. 2003). Erklären lässt sich die Diskrepanz der Ergebnisse möglicherweise durch die Dauer der Stimulationen. Moore et al. und Arai et al. stimulierten die Kulturen mit 3 bzw. 5 Tagen über einen deutlich längeren Zeitraum, als in der hier vorliegenden Untersuchung (Moore et al. 1993; Arai et al. 2003). Eine messbare Veränderung der Aktivität durch NA tritt damit erst nach einer gewissen Zeit ein. Sowohl α -AR-Antagonisten als auch β -AR-Antagonisten inhibierten die Effekte von NA.

Insgesamt scheint NA die Proliferation von Osteoklastenvorläuferzellen zu reduzieren, gleichzeitig fanden sich jedoch auch Hinweise auf eine Aktivierung der Osteoklastogenese und der Resorptionsaktivität. Mit zunehmender Stimulationsdauer sind die Effekte stärker ausgeprägt. Wir konnten auch zeigen, dass NA seine komplexe Wirkung sowohl über α -AR als auch β -AR entfaltet. Zudem gibt es Hinweise, dass NA indirekt die Osteoklastogenese, vermittelt über β -AR, durch eine erhöhte RANKL-Expression in Osteoblasten fördert. Dieser Aspekt könnte in Ko-Kulturen mit Osteoblasten oder konditioniertem Medium genauer untersucht werden.

6. Zusammenfassung

Durch den Auf- und Abbau von Knochenmatrix sind Osteoblasten und Osteoklasten für die Funktion des Knochens von essenzieller Bedeutung. Dieser physiologische Knochenturnover ermöglicht es dem Knochengewebe sich an verschiedene Belastungssituationen anzupassen, Schäden zu reparieren und sich zu regenerieren.

Über die Ausschüttung von Neurotransmittern moduliert das Nervensystem den Umbauprozess (*remodeling*) im Knochen. Osteoblasten und Osteoklasten, die wichtigsten Zellen des *remodeling* exprimieren geeignete Neurotransmitterrezeptoren, um auf diese Stimuli reagieren zu können. Wir konnten in dieser Arbeit zeigen, dass das sensible und sympathische Nervensystem durch die Neurotransmitter Substanz P (SP), α -Calcitonin gene-related peptide (α -CGRP) und Noradrenalin (NA) in Abhängigkeit von der Neurotransmitterkonzentration und dem Differenzierungsstadium der Zellen den Metabolismus und die Differenzierung von Osteoblasten und Osteoklasten modulieren.

In murinen Osteoblasten begünstigt SP, vermittelt über den NK₁R-Rezeptor, in niedrigen Konzentrationen das Überleben. Die ALP-Aktivität der Osteoblasten zeigte sich in einem sehr frühen Differenzierungsstadium reduziert. Nur geringe Auswirkungen waren auf die Genexpression selektiver osteoblastenspezifischer Gene erkennbar, möglicherweise aufgrund der kurzen Stimulationsdauer. Osteoblasten zeigten nach SP-Stimulation in hoher Konzentration eine erhöhte mRNA-Expression von RANKL. Eine Stimulation mit SP in hoher Konzentration führte auch zu einer erhöhten Apoptoserate von Osteoklasten. Hinweise auf eine Begünstigung der Aktivität von Osteoklasten waren insbesondere in hohen Konzentrationen durch erhöhte Genexpressionen von Aktivitätsmarkern wie Kathepsin K und MMP-9 erkennbar.

Wir konnten zeigen, dass α -CGRP seine Wirkung über den CGRP-Rezeptor (CRLR) vermittelt und bereits nach kurzer Stimulationsdauer die Apoptose von Osteoblasten reduziert. In sehr frühen Differenzierungsphasen hemmte α -CGRP deren ALP-Aktivität. Durch eine erhöhte Genexpression prominenter Differenzierungsmarker wie Osterix waren auch Hinweise auf einen positiven Effekt auf die osteogene Differenzierung erkennbar. Bei hoher α -CGRP-Konzentration zeigte sich ein positiver Einfluss auf die Genexpression von RANKL. Die Anzahl an TRAP-positiven multinukleären Zellen aber war deutlich reduziert. Somit scheint α -CGRP die Differenzierung der Knochenmarksmakrophagen eher negativ zu beeinflussen. Zudem war die Proliferation reduziert. In niedrigen α -CGRP-Konzentrationen zeigte sich jedoch auch

eine erhöhte mRNA-Expression von bekannten Aktivitäts- und Differenzierungsmarkern, wie Kathepsin K und NFATC1.

Eine Stimulation mit NA führte zu einer deutlichen Zunahme der Proliferationsrate der Osteoblasten. Dabei bestand eine Anhängigkeit von der Konzentration, höhere NA-Konzentrationen verstärkten den Effekt. Gleichzeitig zeigte sich eine reduzierte Apoptoserate, vermittelt sowohl über α_1 -AR als auch β -AR. Dies lässt vermuten, dass NA die Anzahl an Osteoblasten erhöht und somit einen anabolen Effekt auf den Knochenmetabolismus hat. Über den α_1 -AR erhöhte NA in niedriger Konzentration die mRNA-Expression selektiver Marker für die matrixbildende Aktivität. In hohen Konzentrationen zeigten Osteoblasten eine vermehrte Genexpression von RANKL. Die Proliferation der Osteoklastenvorläuferzellen war in beiden verwendeten NA-Konzentrationen nach kurzer Stimulation deutlich reduziert. Vermittelt wird dieser Effekt möglicherweise über α -AR. Zudem zeigte sich die mRNA-Expression des Transkriptionsfaktors NFATC1 erhöht. Dies könnte auf einen positiven Effekt auf die Osteoklastogenese hindeuten. NA begünstigte in beiden verwendeten Konzentrationen auch die Genexpressionen von Aktivitätsmarkern der Osteoklasten, wie Kathepsin K und MMP-9.

Wir konnten in unserer Arbeit damit zeigen, dass die Neurotransmitter SP, α -CGRP und NA den Metabolismus und die Aktivität der Osteoblasten und Osteoklasten modulieren und somit einen beträchtlichen Einfluss auf den *remodeling*-Prozess des Knochens haben.

7. Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
∞MEM	Minimum Essential Medium Eagle Alpha Modification
”	Zoll
°C	Grad Celsius
µg/ml	Mikrogramm pro Milliliter
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µmol	Mikromol
µmol/l	Mikromol pro Liter
A	Österreich
A ₂ P	Ascorbinsäure-2-Phosphat
Abb.	Abbildung
ALP	Alkalische Phosphatase
AR	Adrenozeptoren/Adrenerge Rezeptoren
ATP	Adenosintriphosphat
BMM	<i>bone marrow-derived macrophages</i>
BMSC	<i>bone mesenchymal stem cells</i>
BMP	<i>bone morphogenetic protein</i>
BMU	<i>basic multicellular unit</i>
BRC	<i>bone remodeling compartments</i>
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSP	<i>bone sialoprotein</i>
bzw.	beziehungsweise
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CGRP	<i>Calcitonin Gene-Related Peptide</i>
CH	Schweiz
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratzentimeter
CMP	<i>common myeloid precursors (myeloide Vorläuferzellen)</i>

7. Abkürzungsverzeichnis

CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i>
CRLR	<i>calcitonin receptor-like receptor, CLR</i>
CTR	Calcitoninrezeptor
D	Deutschland
DAG	Diacylglycerin
dest.	destilliert
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent Assay</i>
et al.	und andere
FasR/FasL	Fas-Rezeptor/Fas-Ligand
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i> (fetales Kälberserum)
G	Gauge
GPCR	<i>G-protein-coupled receptor</i> (G-Protein-gekoppelter Rezeptor)
h	Stunde/n
H ₂ SO ₄	Dihydrogensulfat
HSC	<i>hematopoietic stem cells</i> (hämatopoetische Stammzellen)
IGF-1	<i>Insulin-like growth factor</i>
IL-6	Interleukin-6
IP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphat
J	Japan
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
log ₂	Logarithmus zur Basis 2
M-CSF	<i>macrophage colony-stimulating factor</i>
MEM	Minimum Essential Medium
mg	Milligramm
min	Minuten
MITF	<i>microphthalmia-associated transcription factor</i>
ml	Milliliter

7. Abkürzungsverzeichnis

mm	Millimeter
mmol/l	Millimol pro Liter
MMP	Matrix-Metalloproteasen
mol	Einheit Stoffmenge
mol/l	Mol pro Liter
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MSC	<i>mesenchymal stem cells</i> (mesenchymale Stammzellen)
NA	Noradrenalin
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat
NaCl	Natriumchlorid
NET	<i>norepinephrine transporter</i> (Noradrenalin-Transporter)
NF-κB	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NFATc1	<i>Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 1</i>
ng	Nanogramm
ng/ml	Nanogramm pro Milliliter
NK-R	Neurokinin-Rezeptor/Tachikinin-Rezeptor
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
nmol/l	Nanomol pro Liter
OPG	Osteoprotegerin
OSX	Osterix
PBS	Phosphat-Salz-Puffer
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>
PFA	Paraformaldehyd
pH	pH-Wert
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PNS	peripheres Nervensystem
PTH	Parathyrin
qPCR	<i>quantitative real time polymerase chain reaction</i> (quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion)

7. Abkürzungsverzeichnis

RAMP	<i>receptor activity modifying proteine</i>
RANK	<i>Receptor Activator of NF-κB</i>
RANKL	<i>Receptor Activator of NF-κB Ligand</i>
RB	Retinoblastom-Protein
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RUNX2	<i>Runt-related transcription factor 2, (CBFA1)</i>
s	Sekunde/n
SCPP	<i>secretory calcium-binding phosphoprotein</i>
SIBLING	<i>small integrin-binding ligand, N-linked glycoproteins</i>
SNS	sympathisches Nervensystem
SP	Substanz P
TGF – β	<i>transforming growth factor β</i>
TRAP	<i>tartrate resistant acid phosphatase</i> (Tatrat-resistente saure Phosphatase)
TRIP-1	<i>TGF-β-receptor-interacting protein</i>
u.a.	unter anderem/und andere
UK	Vereinigtes Königreich von Großbritannien und Nordirland
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
UV	ultraviolett
V	Volt
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
WT	Wildtyp (C57Bl/6J Mäuse)
Z-Leu-Arg-AMC	Benzyloxycarbonyl-L-Leucyl-L-Arginin-4-Methylcoumaryl-7-Amid
ZNS	zentrales Nervensystem

8. Literaturverzeichnis

- Adamus MA, Dabrowski ZJ. Effect of the neuropeptide substance P on the rat bone marrow-derived osteogenic cells in vitro. *J Cell Biochem*. 2001;81(3).
- Adler V, Yin Z, Tew KD, Ronai Z. Role of redox potential and reactive oxygen species in stress signaling. *Oncogene*. 1999 Nov 1;18(45):6104–11.
- Aitken SJ, Landao-Bassonga E, Ralston SH, Idris AI. Beta2-adrenoreceptor ligands regulate osteoclast differentiation in vitro by direct and indirect mechanisms. *Arch Biochem Biophys*. 2009 Feb;482(1–2).
- Akashi K, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature*. 2000 Mar 9;404(6774):193–7.
- Amling M, Takeda S, Karsenty G. A neuro (endo)crine regulation of bone remodeling. *BioEssays News Rev Mol Cell Dev Biol*. 2000 Nov;22(11):970–5.
- 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 Jan;174(1):239–47.
- Arai M, Nagasawa T, Koshihara Y, Yamamoto S, Togari A. Effects of beta-adrenergic agonists on bone-resorbing activity in human osteoclast-like cells. *Biochim Biophys Acta*. 2003 May 12;1640(2–3):137–42.
- Arulmani U, Maassenvandenbrink A, Villalon CM, Saxena PR. Calcitonin gene-related peptide and its role in migraine pathophysiology. *Eur J Pharmacol*. 2004 Oct 1;500(1–3):315–30.
- Asagiri M, Sato K, Usami T, Ochi S, Nishina H, Yoshida H, et al. Autoamplification of NFATc1 expression determines its essential role in bone homeostasis. *J Exp Med*. 2005 Nov 7;202(9):1261–9.
- Aubin JE. Regulation of osteoblast formation and function. *Rev Endocr Metab Disord*. 2001 Jan;2(1).
- Aumüller G, Aust G, Doll A, Engele J, Kirsch J, Mense S, et al. *Anatomie*. Stuttgart: Thieme; 2007. (Duale Reihe).
- Azuma H, Kido J, Ikedo D, Kataoka M, Nagata T. Substance P enhances the inhibition of osteoblastic cell differentiation induced by lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontol*. 2004 Jul;75(7):974–81.
- Baillie GS, Sood A, McPhee I, Gall I, Perry SJ, Lefkowitz RJ, et al. beta-Arrestin-mediated PDE4 cAMP phosphodiesterase recruitment regulates beta-adrenoceptor switching from Gs to Gi. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Feb 4;100(3):940–5.
- Bakker AD, Klein-Nulend J. Osteoblast isolation from murine calvaria and long bones. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2012;816.

8. Literaturverzeichnis

- Ballica R, Valentijn K, Khachatryan A, Guerder S, Kapadia S, Gundberg C, et al. Targeted expression of calcitonin gene-related peptide to osteoblasts increases bone density in mice. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. 1999 Jul;14(7):1067–74.
- Baron R, Ferrari S, Russell RGG. Denosumab and bisphosphonates: different mechanisms of action and effects. *Bone*. 2011 Apr 1;48(4):677–92.
- Bartl R, Bartl C. Osteoporose: Prävention - Diagnostik - Therapie. 4., vollst. überarb. und erw. Aufl. Stuttgart: Thieme; 2011.
- Barwell J, Gingell JJ, Watkins HA, Archbold JK, Poyner DR, Hay DL. Calcitonin and calcitonin receptor-like receptors: common themes with family B GPCRs? *Br J Pharmacol*. 2011 May;166(1).
- Baumgärtel F, Al-Abtah J. *I Care, Pflege*. Stuttgart: Thieme; 2015. (I care).
- Bax BE, Alam AS, Banerji B, Bax CM, Bevis PJ, Stevens CR, et al. Stimulation of osteoclastic bone resorption by hydrogen peroxide. *Biochem Biophys Res Commun*. 1992 Mar 31;183(3):1153–8.
- Bean AJ, Zhang X, Hokfelt T. Peptide secretion: what do we know? *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 1994 Jun;8(9):630–8.
- Bellido T. Osteocyte-driven bone remodeling. *Calcif Tissue Int*. 2014 Jan;94(1):25–34.
- Bellido T, Ali AA, Gubrij I, Plotkin LI, Fu Q, O'Brien CA, et al. Chronic elevation of parathyroid hormone in mice reduces expression of sclerostin by osteocytes: a novel mechanism for hormonal control of osteoblastogenesis. *Endocrinology*. 2005 Nov;146(11):4577–83.
- van Bezooijen RL, Roelen BAJ, Visser A, van der Wee-Pals L, de Wilt E, Karperien M, et al. Sclerostin is an osteocyte-expressed negative regulator of bone formation, but not a classical BMP antagonist. *J Exp Med*. 2004 Mar 15;199(6):805–14.
- Birmingham E, Niebur GL, McHugh PE, Shaw G, Barry FP, McNamara LM. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells is regulated by osteocyte and osteoblast cells in a simplified bone niche. *Eur Cell Mater*. 2012;23.
- Bjurholm A, Kricbergs A, Brodin E, Schultzberg M. Substance P- and CGRP-immunoreactive nerves in bone. *Peptides*. 1988a Feb;9(1):165–71.
- Bjurholm A, Kricbergs A, Schultzberg M, Lerner UH. Neuroendocrine regulation of cyclic AMP formation in osteoblastic cell lines (UMR-106-01, ROS 17/2.8, MC3T3-E1, and Saos-2) and primary bone cells. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. 1992 Sep;7(9):1011–9.
- Bjurholm A, Kricbergs A, Terenius L, Goldstein M, Schultzberg M. Neuropeptide Y-, tyrosine hydroxylase- and vasoactive intestinal polypeptide-immunoreactive nerves in bone and surrounding tissues. *J Auton Nerv Syst*. 1988b Dec;25(2–3):119–25.

8. Literaturverzeichnis

- Bonewald LF. The amazing osteocyte. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. 2011 Feb;26(2):229–38.
- Bonnet N, Benhamou CL, Beaupied H, Laroche N, Vico L, Dolleans E, et al. Doping dose of salbutamol and exercise: deleterious effect on cancellous and cortical bones in adult rats. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985. 2007 Apr;102(4):1502–9.
- Bonnet N, Benhamou CL, Brunet-Imbault B, Arlettaz A, Horcajada MN, Richard O, et al. Severe bone alterations under beta2 agonist treatments: bone mass, microarchitecture and strength analyses in female rats. *Bone*. 2005 Nov;37(5):622–33.
- Borjesson AE, Lagerquist MK, Windahl SH, Ohlsson C. The role of estrogen receptor alpha in the regulation of bone and growth plate cartilage. *Cell Mol Life Sci CMLS*. 2013 Nov;70(21):4023–37.
- Boyce BF. Advances in the regulation of osteoclasts and osteoclast functions. *J Dent Res*. 2013 Oct;92(10):860–7.
- Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*. 2003 May 15;423(6937):337–42.
- Brennan-Speranza TC, Conigrave AD. Osteocalcin: an osteoblast-derived polypeptide hormone that modulates whole body energy metabolism. *Calcif Tissue Int*. 2015 Jan;96(1).
- Brimijoin S, Lundberg JM, Brodin E, Hokfelt T, Nilsson G. Axonal transport of substance P in the vagus and sciatic nerves of the guinea pig. *Brain Res*. 1980 Jun 9;191(2):443–57.
- Bruder SP, Fink DJ, Caplan AI. Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy. *J Cell Biochem*. 1994 Nov;56(3):283–94.
- Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res Off Publ Orthop Res Soc*. 1991 Sep;9(5):641–50.
- Cappariello A, Maurizi A, Veeriah V, Teti A. Reprint of: The Great Beauty of the osteoclast. *Arch Biochem Biophys*. 2014 Nov 1;561:13–21.
- Carter MS, Krause JE. Structure, expression, and some regulatory mechanisms of the rat preprotachykinin gene encoding substance P, neurokinin A, neuropeptide K, and neuropeptide gamma. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 1990 Jul;10(7):2203–14.
- Chao DT, Korsmeyer SJ. BCL-2 family: regulators of cell death. *Annu Rev Immunol*. 1998;16:395–419.
- Chen J, Ma G, Liu W, Liu Y, Ding Y. The influence of the sensory neurotransmitter calcitonin gene-related peptide on bone marrow mesenchymal stem cells from ovariectomized rats. *J Bone Miner Metab*. 2016 Sep 13;

8. Literaturverzeichnis

- Chen JK, Shapiro HS, Wrana JL, Reimers S, Heersche JN, Sodek J. Localization of bone sialoprotein (BSP) expression to sites of mineralized tissue formation in fetal rat tissues by in situ hybridization. *Matrix Stuttg Ger*. 1991 Apr;11(2):133–43.
- Cornish J, Callon KE, Bava U, Kamona SA, Cooper GJ, Reid IR. Effects of calcitonin, amylin, and calcitonin gene-related peptide on osteoclast development. *Bone*. 2001 Aug;29(2):162–8.
- Cornish J, Callon KE, Lin CQ, Xiao CL, Gamble GD, Cooper GJ, et al. Comparison of the effects of calcitonin gene-related peptide and amylin on osteoblasts. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. 1999 Aug;14(8):1302–9.
- Crockett JC, Rogers MJ, Coxon FP, Hocking LJ, Helfrich MH. Bone remodelling at a glance. *J Cell Sci*. 2011 Apr 1;124(Pt 7):991–8.
- Csaki C, Matis U, Mobasheri A, Shakibaei M. Co-culture of canine mesenchymal stem cells with primary bone-derived osteoblasts promotes osteogenic differentiation. *Histochem Cell Biol*. 2009 Feb;131(2):251–66.
- Dauty M, Perrouin Verbe B, Maugars Y, Dubois C, Mathe JF. Supralesional and sublesional bone mineral density in spinal cord-injured patients. *Bone*. 2000 Aug;27(2):305–9.
- Delaisse J-M, Andersen TL, Engsig MT, Henriksen K, Troen T, Blavier L. Matrix metalloproteinases (MMP) and cathepsin K contribute differently to osteoclastic activities. *Microsc Res Tech*. 2003 Aug 15;61(6):504–13.
- Dillon JP, Waring-Green VJ, Taylor AM, Wilson PJM, Birch M, Gartland A, et al. Primary human osteoblast cultures. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2012;816.
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315–7.
- Domon T, Yamazaki Y, Fukui A, Ohnishi Y, Takahashi S, Yamamoto T, et al. Three-dimensional distribution of the clear zone of migrating osteoclasts on dentin slices in vitro. *Tissue Cell*. 2002 Oct;34(5):326–36.
- Ducy P, Karsenty G. Two distinct osteoblast-specific cis-acting elements control expression of a mouse osteocalcin gene. *Mol Cell Biol*. 1995 Apr;15(4):1858–69.
- Ducy P, Starbuck M, Priemel M, Shen J, Pinero G, Geoffroy V, et al. A Cbfa1-dependent genetic pathway controls bone formation beyond embryonic development. *Genes Dev*. 1999 Apr 15;13(8):1025–36.
- Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell*. 1997 May 30;89(5):747–54.
- Eleftheriou F, Ahn JD, Takeda S, Starbuck M, Yang X, Liu X, et al. Leptin regulation of bone resorption by the sympathetic nervous system and CART. *Nature*. 2005 Mar 24;434(7032):514–20.

8. Literaturverzeichnis

- Elefteriou F, Campbell P, Ma Y. Control of bone remodeling by the peripheral sympathetic nervous system. *Calcif Tissue Int.* 2014 Jan;94(1):140–51.
- Enderle A. Orthopädie und orthopädische Chirurgie. Zichner L, Forst R, editors. Stuttgart: Thieme; 2003. (Orthopädie und orthopädische Chirurgie).
- Erlebacher A, Filvaroff EH, Gitelman SE, Derynck R. Toward a molecular understanding of skeletal development. *Cell.* 1995 Feb 10;80(3):371–8.
- Ferguson CM, Miclau T, Hu D, Alpern E, Helms JA. Common molecular pathways in skeletal morphogenesis and repair. *Ann N Y Acad Sci.* 1998 Oct 23;857.
- Fonseca TL, Jorgetti V, Costa CC, Capelo LP, Covarrubias AE, Moulatlet AC, et al. Double disruption of alpha2A- and alpha2C-adrenoceptors results in sympathetic hyperactivity and high-bone-mass phenotype. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res.* 2011 Mar;26(3):591–603.
- Franzen A, Heinegard D. Isolation and characterization of two sialoproteins present only in bone calcified matrix. *Biochem J.* 1985 Dec 15;232(3):715–24.
- Fu S, Jin D, Liu S, Wang L, Wang Z, Mei G, et al. Protective Effect of Neuropeptide Substance P on Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells against Apoptosis Induced by Serum Deprivation. *Stem Cells Int.* 2015;2015:270328.
- Fu S, Mei G, Wang Z, Zou Z-L, Liu S, Pei G-X, et al. Neuropeptide Substance P Improves Osteoblastic and Angiogenic Differentiation Capacity of Bone Marrow Stem Cells In Vitro. *BioMed Res Int.* 2014;2014:10.
- Fuchs E, Tumber T, Guasch G. Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell.* 2004 Mar 19;116(6):769–78.
- Garcia-Castellano JM, Diaz-Herrera P, Morcuende JA. Is bone a target-tissue for the nervous system? New advances on the understanding of their interactions. *Iowa Orthop J.* 2000;20.
- Garcia-Recio S, Gascon P. Biological and Pharmacological Aspects of the NK1-Receptor. *BioMed Res Int.* 2015;2015:495704.
- Gordon JAR, Tye CE, Sampaio AV, Underhill TM, Hunter GK, Goldberg HA. Bone sialoprotein expression enhances osteoblast differentiation and matrix mineralization in vitro. *Bone.* 2007 Sep;41(3):462–73.
- Goto T, Nakao K, Gunjigake KK, Kido MA, Kobayashi S, Tanaka T. Substance P stimulates late-stage rat osteoblastic bone formation through neurokinin-1 receptors. *Neuropeptides.* 2007 Feb;41(1).
- Goto T, Tanaka T. Tachykinins and tachykinin receptors in bone. *Microsc Res Tech.* 2002 Jul 15;58(2):91–7.

8. Literaturverzeichnis

- Goto T, Yamaza T, Kido MA, Takana T. Substance P Activates Osteoclast Formation and Osteoclastic Bone Resorption through the Neurokinin-1 Receptor. *ACTA Histochem Cytochem.* 2001;34(1):31–8.
- Goto T, Yamaza T, Kido MA, Tanaka T. Light- and electron-microscopic study of the distribution of axons containing substance P and the localization of neurokinin-1 receptor in bone. *Cell Tissue Res.* 1998 Jul;293(1).
- Grabowski P. Physiology of Bone. *Endocr Dev.* 2015;28.
- Granhölm S, Henning P, Lerner UH. Comparisons between the effects of calcitonin receptor-stimulating peptide and intermedin and other peptides in the calcitonin family on bone resorption and osteoclastogenesis. *J Cell Biochem.* 2011 Nov;112(11):3300–12.
- Grässel S, Straub RH, Jenei-Lanzl Z. The sensory and sympathetic nervous system in cartilage physiology and pathophysiology. Aszodi A, Grässel S, editors. Springer; 2017. (Chapter 9; vol. Cartilage Vol. 2).
- Grässel SG. The role of peripheral nerve fibers and their neurotransmitters in cartilage and bone physiology and pathophysiology. *Arthritis Res Ther.* 2014;16(6).
- Grönblad M, Liesi P, Korkala O, Karaharju E, Polak J. Innervation of human bone periosteum by peptidergic nerves. *Anat Rec.* 1984;209(3):297–9.
- Hagner S, Stahl U, Knoblauch B, McGregor GP, Lang RE. Calcitonin receptor-like receptor: identification and distribution in human peripheral tissues. *Cell Tissue Res.* 2002 Oct;310(1).
- Harada S, Rodan GA. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature.* 2003 May 15;423(6937):349–55.
- Hara-Irie F, Amizuka N, Ozawa H. Immunohistochemical and ultrastructural localization of CGRP-positive nerve fibers at the epiphyseal trabecules facing the growth plate of rat femurs. *Bone.* 1996 Jan;18(1).
- Harle P, Mobius D, Carr DJJ, Scholmerich J, Straub RH. An opposing time-dependent immunomodulating effect of the sympathetic nervous system conferred by altering the cytokine profile in the local lymph nodes and spleen of mice with type II collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 2005 Apr;52(4):1305–13.
- Harmar A, Keen P. Synthesis, and central and peripheral axonal transport of substance P in a dorsal root ganglion-nerve preparation in vitro. *Brain Res.* 1982 Jan 14;231(2):379–85.
- Harmar AJ. Family-B G-protein-coupled receptors. *Genome Biol.* 2001;2(12).
- Harrison S, Geppetti P. Substance p. *Int J Biochem Cell Biol.* 2001 Jun;33(6):555–76.
- Hartmann M. Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie: licht- und elektronenmikroskopischer Bildatlas. 4. überarb. Aufl. Wien: Facultas.wuv; 2009.

8. Literaturverzeichnis

- Hattersley G, Owens J, Flanagan AM, Chambers TJ. Macrophage colony stimulating factor (M-CSF) is essential for osteoclast formation in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991 May 31;177(1):526–31.
- 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 Off J Am Soc Bone Miner Res.* 2001 Sep;16(9):1575–82.
- Hauschka PV, Lian JB, Cole DE, Gundberg CM. Osteocalcin and matrix Gla protein: vitamin K-dependent proteins in bone. *Physiol Rev.* 1989 Jul;69(3).
- Hayman AR, Jones SJ, Boyde A, Foster D, Colledge WH, Carlton MB, et al. Mice lacking tartrate-resistant acid phosphatase (Acp 5) have disrupted endochondral ossification and mild osteopetrosis. *Dev Camb Engl.* 1996 Oct;122(10):3151–62.
- He H, Chai J, Zhang S, Ding L, Yan P, Du W, et al. CGRP may regulate bone metabolism through stimulating osteoblast differentiation and inhibiting osteoclast formation. *Mol Med Rep.* 2016 May;13(5):3977–84.
- Heino TJ, Hentunen TA, Vaananen HK. Conditioned medium from osteocytes stimulates the proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells and their differentiation into osteoblasts. *Exp Cell Res.* 2004 Apr 1;294(2):458–68.
- Hill EL, Elde R. Distribution of CGRP-, VIP-, D beta H-, SP-, and NPY-immunoreactive nerves in the periosteum of the rat. *Cell Tissue Res.* 1991 Jun;264(3):469–80.
- Hollberg K, Hultenby K, Hayman A, Cox T, Andersson G. Osteoclasts from mice deficient in tartrate-resistant acid phosphatase have altered ruffled borders and disturbed intracellular vesicular transport. *Exp Cell Res.* 2002 Oct 1;279(2):227–38.
- Horwood NJ, Elliott J, Martin TJ, Gillespie MT. Osteotropic agents regulate the expression of osteoclast differentiation factor and osteoprotegerin in osteoblastic stromal cells. *Endocrinology.* 1998 Nov;139(11):4743–6.
- Hu K, Zhou H, Zhang G, Qin R, Hou R, Kong L, et al. The effect of chemical sympathectomy and stress on bone remodeling in adult rats. *Neuro Endocrinol Lett.* 2010;31(6):807–13.
- Huang HH, Brennan TC, Muir MM, Mason RS. Functional alpha1- and beta2-adrenergic receptors in human osteoblasts. *J Cell Physiol.* 2009 Jul;220(1):267–75.
- Huang Z, Nelson ER, Smith RL, Goodman SB. The sequential expression profiles of growth factors from osteoprogenitors [correction of osteroprogenitors] to osteoblasts in vitro. *Tissue Eng.* 2007 Sep;13(9):2311–20.
- Hukkanen M, Konttinen YT, Rees RG, Santavirta S, Terenghi G, Polak JM. Distribution of nerve endings and sensory neuropeptides in rat synovium, meniscus and bone. *Int J Tissue React.* 1992;14(1).
- Hukkanen M, Konttinen YT, Santavirta S, Paavolainen P, Gu XH, Terenghi G, et al. Rapid proliferation of calcitonin gene-related peptide-immunoreactive nerves during

- healing of rat tibial fracture suggests neural involvement in bone growth and remodelling. *Neuroscience*. 1993 Jun;54(4):969–79.
- Hunter GK. Role of osteopontin in modulation of hydroxyapatite formation. *Calcif Tissue Int*. 2013 Oct;93(4):348–54.
- Ilmer M, Karow M, Geissler C, Jochum M, Neth P. Human osteoblast-derived factors induce early osteogenic markers in human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part A*. 2009 Sep;15(9):2397–409.
- Imai S, Matsusue Y. Neuronal regulation of bone metabolism and anabolism: calcitonin gene-related peptide-, substance P-, and tyrosine hydroxylase-containing nerves and the bone. *Microsc Res Tech*. 2002 Jul 15;58(2):61–9.
- Jenei-Lanzl Z, Zwingenberg J, Lowin T, Anders S, Straub RH. Proinflammatory receptor switch from Galphas to Galphai signaling by beta-arrestin-mediated PDE4 recruitment in mixed RA synovial cells. *Brain Behav Immun*. 2015 Nov;50:266–74.
- Jiang S-D, Dai L-Y, Jiang L-S. Osteoporosis after spinal cord injury. *Osteoporos Int J Establ Result Coop Eur Found Osteoporos Natl Osteoporos Found USA*. 2006 Feb;17(2):180–92.
- Jones DL, Wagers AJ. No place like home: anatomy and function of the stem cell niche. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008 Jan;9(1).
- Jones KB, Mollano AV, Morcuende JA, Cooper RR, Saltzman CL. Bone and brain: a review of neural, hormonal, and musculoskeletal connections. *Iowa Orthop J*. 2004;24:123–32.
- Junqueira LC, Carneiro J. *Histologie Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen. Unter Berücksichtigung der Histophysiologie [Internet]*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1996 [cited 2015 Jun 1]. Available from: <http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:1111-20130501716>
- Kajimura D, Hinoi E, Ferron M, Kode A, Riley KJ, Zhou B, et al. Genetic determination of the cellular basis of the sympathetic regulation of bone mass accrual. *J Exp Med*. 2011 Apr 11;208(4):841–51.
- Karsenty G. The genetic transformation of bone biology. *Genes Dev*. 1999 Dec 1;13(23):3037–51.
- Karsenty G. Minireview: transcriptional control of osteoblast differentiation. *Endocrinology*. 2001 Jul;142(7):2731–3.
- Kawase T, Burns DM. Calcitonin gene-related peptide stimulates potassium efflux through adenosine triphosphate-sensitive potassium channels and produces membrane hyperpolarization in osteoblastic UMR106 cells. *Endocrinology*. 1998 Aug;139(8):3492–502.
- Kawase T, Howard GA, Roos BA, Burns DM. Diverse actions of calcitonin gene-related peptide on intracellular free Ca²⁺ concentrations in UMR 106 osteoblastic cells. *Bone*. 1995 Apr;16(4 Suppl).

- Kaygisiz Z, Erksap N, Uyar R, Kabadere S, Kabadere TE, Dernek S. The effect of adrenomedullin, amylin fragment 8-37 and calcitonin gene-related peptide on contractile force, heart rate and coronary perfusion pressure in isolated rat hearts. *Acta Physiol Hung.* 2003;90(2):133–46.
- Kelly RB. Storage and release of neurotransmitters. *Cell.* 1993 Jan;72 Suppl.
- Khosla S, Amin S, Orwoll E. Osteoporosis in men. *Endocr Rev.* 2008 Jun;29(4):441–64.
- Khosla S, Melton LJ 3rd, Riggs BL. The unitary model for estrogen deficiency and the pathogenesis of osteoporosis: is a revision needed? *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res.* 2011 Mar;26(3):441–51.
- Khosla S, Oursler MJ, Monroe DG. Estrogen and the skeleton. *Trends Endocrinol Metab TEM.* 2012 Nov;23(11):576–81.
- Kingery WS, Offley SC, Guo T-Z, Davies MF, Clark JD, Jacobs CR. A substance P receptor (NK1) antagonist enhances the widespread osteoporotic effects of sciatic nerve section. *Bone.* 2003 Dec;33(6):927–36.
- Klinke R, Pape H-C, Kurtz A, Silbernagl S. *Physiologie. 6., vollst. überarb. Aufl.* Baumann R, Brenner B, Gay R, Rothenburger A, editors. Stuttgart: Thieme; 2010.
- Kodama D, Togari A. Noradrenaline stimulates cell proliferation by suppressing potassium channels via G(i/o)-protein-coupled alpha(1B)-adrenoceptors in human osteoblasts. *Br J Pharmacol.* 2013 Mar;168(5):1230–9.
- Kodama H, Nose M, Niida S, Yamasaki A. Essential role of macrophage colony-stimulating factor in the osteoclast differentiation supported by stromal cells. *J Exp Med.* 1991 May 1;173(5):1291–4.
- Kojima T, Yamaguchi M, Kasai K. Substance P stimulates release of RANKL via COX-2 expression in human dental pulp cells. *Inflamm Res Off J Eur Histamine Res Soc Al.* 2006 Feb;55(2):78–84.
- Kolakowski LFJ. GCRDb: a G-protein-coupled receptor database. *Receptors Channels.* 1994;2(1).
- Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, et al. Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell.* 1997 May 30;89(5):755–64.
- Kondo A, Mogi M, Koshihara Y, Togari A. Signal transduction system for interleukin-6 and interleukin-11 synthesis stimulated by epinephrine in human osteoblasts and human osteogenic sarcoma cells. *Biochem Pharmacol.* 2001 Feb 1;61(3):319–26.
- Kondo H, Guo J, Bringham FR. Cyclic adenosine monophosphate/protein kinase A mediates parathyroid hormone/parathyroid hormone-related protein receptor regulation of osteoclastogenesis and expression of RANKL and osteoprotegerin mRNAs by marrow stromal cells. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res.* 2002 Sep;17(9):1667–79.

8. Literaturverzeichnis

- Kondo H, Takeuchi S, Togari A. beta-Adrenergic signaling stimulates osteoclastogenesis via reactive oxygen species. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2013 Mar 1;304(5):E507-515.
- Kondo H, Togari A. Continuous treatment with a low-dose beta-agonist reduces bone mass by increasing bone resorption without suppressing bone formation. *Calcif Tissue Int.* 2011 Jan;88(1):23-32.
- Konttinen Y, Imai S, Suda A. Neuropeptides and the puzzle of bone remodeling. State of the art. *Acta Orthop Scand.* 1996 Dec;67(6):632-9.
- Kuhn NZ, Tuan RS. Regulation of stemness and stem cell niche of mesenchymal stem cells: implications in tumorigenesis and metastasis. *J Cell Physiol.* 2010 Feb;222(2):268-77.
- Kurokawa M, Kornbluth S. Caspases and kinases in a death grip. *Cell.* 2009 Sep 4;138(5):838-54.
- Kuwasako K, Cao Y-N, Nagoshi Y, Tsuruda T, Kitamura K, Eto T. Characterization of the human calcitonin gene-related peptide receptor subtypes associated with receptor activity-modifying proteins. *Mol Pharmacol.* 2004 Jan;65(1):207-13.
- Kwon OH, Lee C-K, Lee YI, Paik S-G, Lee H-J. The hematopoietic transcription factor PU.1 regulates RANK gene expression in myeloid progenitors. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005 Sep 23;335(2):437-46.
- Lands AM, Arnold A, McAuliff JP, Luduena FP, Brown TGJ. Differentiation of receptor systems activated by sympathomimetic amines. *Nature.* 1967a May 6;214(5088):597-8.
- Lands AM, Luduena FP, Buzzo HJ. Differentiation of receptors responsive to isoproterenol. *Life Sci.* 1967b Nov 1;6(21):2241-9.
- Langer SZ. Presynaptic regulation of catecholamine release. *Biochem Pharmacol.* 1974 Jul 1;23(13):1793-800.
- Lee W-H, Loo C-Y, Chrzanowski W, Rohanizadeh R. Osteoblast response to the surface of amino acid-functionalized hydroxyapatite. *J Biomed Mater Res A.* 2015 Jun;103(6):2150-60.
- Lembeck F. Zur Frage der zentralen Übertragung afferenter Impulse. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Für Exp Pathol Pharmacol.* 1953;219(3):197-213.
- Lerner UH. Deletions of genes encoding calcitonin/alpha-CGRP, amylin and calcitonin receptor have given new and unexpected insights into the function of calcitonin receptors and calcitonin receptor-like receptors in bone. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2006 Mar;6(1).
- Lerner UH, Persson E. Osteotropic effects by the neuropeptides calcitonin gene-related peptide, substance P and vasoactive intestinal peptide. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2008 Jun;8(2):154-65.

8. Literaturverzeichnis

- Li J, Kreicbergs A, Bergstrom J, Stark A, Ahmed M. Site-specific CGRP innervation coincides with bone formation during fracture healing and modeling: A study in rat angulated tibia. *J Orthop Res Off Publ Orthop Res Soc.* 2007 Sep;25(9):1204–12.
- Li L, Xie T. Stem cell niche: structure and function. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2005;21:605–31.
- Liang W, Zhuo X, Tang Z, Wei X, Li B. Calcitonin gene-related peptide stimulates proliferation and osteogenic differentiation of osteoporotic rat-derived bone mesenchymal stem cells. *Mol Cell Biochem.* 2015 Jan 7;
- Linkhart TA, Mohan S, Baylink DJ. Growth factors for bone growth and repair: IGF, TGF beta and BMP. *Bone.* 1996 Jul;19(1 Suppl).
- Liu D, Jiang L-S, Dai L-Y. Substance P and its receptors in bone metabolism. *Neuropeptides.* 2007 Oct;41(5):271–83.
- Liu H-J, Yan H, Yan J, Li H, Chen L, Han L-R, et al. Substance P Promotes the Proliferation, but Inhibits Differentiation and Mineralization of Osteoblasts from Rats with Spinal Cord Injury via RANKL/OPG System. *PLoS One.* 2016;11(10):e0165063.
- Liu Z-J, Zhuge Y, Velazquez OC. Trafficking and differentiation of mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem.* 2009 Apr 15;106(6):984–91.
- Ljusberg J, Wang Y, Lang P, Norgard M, Dodds R, Hultenby K, et al. Proteolytic excision of a repressive loop domain in tartrate-resistant acid phosphatase by cathepsin K in osteoclasts. *J Biol Chem.* 2005 Aug 5;280(31):28370–81.
- Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC. *Biochemie und Pathobiochemie.* 8., völlig neu bearb. Aufl. Löffler-Petrides-Heinrich, editor. Heidelberg: Springer Medizin; 2007. (Springer-Lehrbuch).
- Long F. Building strong bones: molecular regulation of the osteoblast lineage. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012 Jan;13(1):27–38.
- Lüllmann-Rauch R, Paulsen F. *Taschenlehrbuch Histologie.* 4., vollständig überarb. Aufl. Stuttgart: Thieme; 2012.
- Ma Y, Krueger JJ, Redmon SN, Uppuganti S, Nyman JS, Hahn MK, et al. Extracellular norepinephrine clearance by the norepinephrine transporter is required for skeletal homeostasis. *J Biol Chem.* 2013 Oct 18;288(42):30105–13.
- Mach DB, Rogers SD, Sabino MC, Luger NM, Schwei MJ, Pomonis JD, et al. Origins of skeletal pain: sensory and sympathetic innervation of the mouse femur. *Neuroscience.* 2002;113(1):155–66.
- Malaval L, Wade-Gueye NM, Boudiffa M, Fei J, Zirngibl R, Chen F, et al. Bone sialoprotein plays a functional role in bone formation and osteoclastogenesis. *J Exp Med.* 2008 May 12;205(5):1145–53.

8. Literaturverzeichnis

- McKee MD, Nanci A. Postembedding colloidal-gold immunocytochemistry of noncollagenous extracellular matrix proteins in mineralized tissues. *Microsc Res Tech.* 1995 May 1;31(1):44–62.
- McLatchie LM, Fraser NJ, Main MJ, Wise A, Brown J, Thompson N, et al. RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. *Nature.* 1998 May 28;393(6683):333–9.
- Mei G, Xia L, Zhou J, Zhang Y, Tuo Y, Fu S, et al. Neuropeptide SP activates the WNT signal transduction pathway and enhances the proliferation of bone marrow stromal stem cells. *Cell Biol Int.* 2013 Nov;37(11):1225–32.
- Mei G, Zou Z, Fu S, Xia L, Zhou J, Zhang Y, et al. Substance P activates the Wnt signal transduction pathway and enhances the differentiation of mouse preosteoblastic MC3T3-E1 cells. *Int J Mol Sci.* 2014;15(4):6224–40.
- Mellis DJ, Itzstein C, Helfrich MH, Crockett JC. The skeleton: a multi-functional complex organ: the role of key signalling pathways in osteoclast differentiation and in bone resorption. *J Endocrinol.* 2011 Nov;211(2):131–43.
- Michelangeli VP, Fletcher AE, Allan EH, Nicholson GC, Martin TJ. Effects of calcitonin gene-related peptide on cyclic AMP formation in chicken, rat, and mouse bone cells. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res.* 1989 Apr;4(2):269–72.
- Miller MR, Kasahara M. Observations on the innervation of human long bones. *Anat Rec.* 1963;145(1):13–23.
- Minneman KP, Pittman RN, Molinoff PB. Beta-adrenergic receptor subtypes: properties, distribution, and regulation. *Annu Rev Neurosci.* 1981;4(1):419–61.
- Mitic N, Valizadeh M, Leung EWW, de Jersey J, Hamilton S, Hume DA, et al. Human tartrate-resistant acid phosphatase becomes an effective ATPase upon proteolytic activation. *Arch Biochem Biophys.* 2005 Jul 15;439(2):154–64.
- Molinoff PB. Alpha- and beta-adrenergic receptor subtypes properties, distribution and regulation. *Drugs.* 1984;28 Suppl 2.
- Moore RE, Smith CK 2nd, Bailey CS, Voelkel EF, Tashjian AHJ. Characterization of beta-adrenergic receptors on rat and human osteoblast-like cells and demonstration that beta-receptor agonists can stimulate bone resorption in organ culture. *Bone Miner.* 1993 Dec;23(3):301–15.
- Mori T, Ogata T, Okumura H, Shibata T, Nakamura Y, Kataoka K. Substance P regulates the function of rabbit cultured osteoclast; increase of intracellular free calcium concentration and enhancement of bone resorption. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999 Aug 27;262(2):418–22.
- Mundlos S, Olsen BR. Heritable diseases of the skeleton. Part I: Molecular insights into skeletal development-transcription factors and signaling pathways. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 1997 Feb;11(2):125–32.

8. Literaturverzeichnis

- Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, et al. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell*. 2002 Jan 11;108(1).
- Nakashima T, Hayashi M, Fukunaga T, Kurata K, Oh-Hora M, Feng JQ, et al. Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. *Nat Med*. 2011 Oct;17(10):1231–4.
- Nakashima T, Takayanagi H. New regulation mechanisms of osteoclast differentiation. *Ann N Y Acad Sci*. 2011 Dec;1240:E13–18.
- Niedermair T, Kuhn V, Doranehgard F, Stange R, Wieskötter B, Beckmann J, et al. Absence of substance P and the sympathetic nervous system impact on bone structure and chondrocyte differentiation in an adult model of endochondral ossification. *Matrix Biol*. 2014;38(0):22–35.
- Nishiura T, Abe K. α 1-Adrenergic receptor stimulation induces the expression of receptor activator of nuclear factor κ B ligand gene via protein kinase C and extracellular signal-regulated kinase pathways in MC3T3-E1 osteoblast-like cells. *Arch Oral Biol*. 2007;52(8):778–85.
- Nuntapornsak A, Wongdee K, Thongbunchoo J, Krishnamra N, Charoenphandhu N. Changes in the mRNA expression of osteoblast-related genes in response to beta(3)-adrenergic agonist in UMR106 cells. *Cell Biochem Funct*. 2010 Jan;28(1):45–51.
- Offley SC, Guo T-Z, Wei T, Clark JD, Vogel H, Lindsey DP, et al. Capsaicin-sensitive sensory neurons contribute to the maintenance of trabecular bone integrity. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. 2005 Feb;20(2):257–67.
- Oku R, Satoh M, Fujii N, Otaka A, Yajima H, Takagi H. Calcitonin gene-related peptide promotes mechanical nociception by potentiating release of substance P from the spinal dorsal horn in rats. *Brain Res*. 1987 Feb 17;403(2):350–4.
- Olsen BR, Reginato AM, Wang W. Bone development. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2000;16.
- Opolka A, Straub RH, Pasoldt A, Grifka J, Grassel S. Substance P and norepinephrine modulate murine chondrocyte proliferation and apoptosis. *Arthritis Rheum*. 2012 Mar;64(3):729–39.
- Oreffo ROC, Cooper C, Mason C, Clements M. Mesenchymal stem cells: lineage, plasticity, and skeletal therapeutic potential. *Stem Cell Rev*. 2005;1(2):169–78.
- Orriss IR, Arnett TR. Rodent osteoclast cultures. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2012;816:103–17.
- Ortega N, Behonick DJ, Werb Z. Matrix remodeling during endochondral ossification. *Trends Cell Biol*. 2004 Feb;14(2).
- Otsuka M, Konishi S. Release of substance P-like immunoreactivity from isolated spinal cord of newborn rat. *Nature*. 1976 Nov 4;264(5581):83–4.

8. Literaturverzeichnis

- Oursler M. Osteolytic Enzymes of Osteoclasts. In: Bronner F, Farach-Carson M, Rubin J, editors. Bone Resorption [Internet]. Springer London; 2005. p. 24–33. (Topics in Bone Biology; vol. 2). Available from: http://dx.doi.org/10.1007/1-84628-016-8_2
- Oursler MJ, Osdoby P, Pyfferoen J, Riggs BL, Spelsberg TC. Avian osteoclasts as estrogen target cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Aug 1;88(15):6613–7.
- Owan I, Ibaraki K. The role of calcitonin gene-related peptide (CGRP) in macrophages: the presence of functional receptors and effects on proliferation and differentiation into osteoclast-like cells. *Bone Miner*. 1994 Feb;24(2):151–64.
- Pacifici R. Cytokines, estrogen, and postmenopausal osteoporosis--the second decade. *Endocrinology*. 1998 Jun;139(6):2659–61.
- Pederson L, Ruan M, Westendorf JJ, Khosla S, Oursler MJ. Regulation of bone formation by osteoclasts involves Wnt/BMP signaling and the chemokine sphingosine-1-phosphate. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Dec 30;105(52):20764–9.
- Percival CJ, Richtsmeier JT. Angiogenesis and intramembranous osteogenesis. *Dev Dyn Off Publ Am Assoc Anat*. 2013 Aug;242(8):909–22.
- Perkins R, Skirving AP. Callus formation and the rate of healing of femoral fractures in patients with head injuries. *J Bone Joint Surg Br*. 1987 Aug;69(4):521–4.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999 Apr 2;284(5411):143–7.
- Plenderleith MB, Haller CJ, Snow PJ. Peptide coexistence in axon terminals within the superficial dorsal horn of the rat spinal cord. *Synap N Y N*. 1990;6(4):344–50.
- Promega Corporation. Apo-ONE Homogeneous Caspase-3/7 Assay Instructions for use of Products G7790, G7791 and G7792. 2009.
- Quarles LD, Yohay DA, Lever LW, Caton R, Wenstrup RJ. Distinct proliferative and differentiated stages of murine MC3T3-E1 cells in culture: an in vitro model of osteoblast development. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. 1992 Jun;7(6):683–92.
- Raisz LG. Physiology and pathophysiology of bone remodeling. *Clin Chem*. 1999 Aug;45(8 Pt 2):1353–8.
- Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R. *Duale Reihe, Biochemie*. 2., aktualisierte Aufl. Stuttgart: Thieme; 2008. (Duale Reihe).
- Regoli D, Boudon A, Fauchere JL. Receptors and antagonists for substance P and related peptides. *Pharmacol Rev*. 1994 Dec;46(4):551–99.
- Rosenfeld MG, Mermod JJ, Amara SG, Swanson LW, Sawchenko PE, Rivier J, et al. Production of a novel neuropeptide encoded by the calcitonin gene via tissue-specific RNA processing. *Nature*. 1983 Jul 14;304(5922):129–35.

8. Literaturverzeichnis

- Rossert J, Terraz C, Dupont S. Regulation of type I collagen genes expression. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc.* 2000;15 Suppl 6:66–8.
- Rossi SG, Dickerson IM, Rotundo RL. Localization of the calcitonin gene-related peptide receptor complex at the vertebrate neuromuscular junction and its role in regulating acetylcholinesterase expression. *J Biol Chem.* 2003 Jul 4;278(27):24994–5000.
- van Rossum D, Hanisch UK, Quirion R. Neuroanatomical localization, pharmacological characterization and functions of CGRP, related peptides and their receptors. *Neurosci Biobehav Rev.* 1997 Sep;21(5):649–78.
- Rubin J, Greenfield E. Osteoclast: Origin and Differentiation. In: Bronner F, Farach-Carson M, editors. *Bone Resorption* [Internet]. Springer London; 2005. p. 1–23. (Topics in Bone Biology; vol. 2). Available from: http://dx.doi.org/10.1007/1-84628-016-8_1
- Saftig P, Hunziker E, Wehmeyer O, Jones S, Boyde A, Rommerskirch W, et al. Impaired osteoclastic bone resorption leads to osteopetrosis in cathepsin-K-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Nov 10;95(23):13453–8.
- Saltel F, Chabadel A, Bonnelye E, Jurdic P. Actin cytoskeletal organisation in osteoclasts: a model to decipher transmigration and matrix degradation. *Eur J Cell Biol.* 2008 Sep;87(8–9):459–68.
- Sapir-Koren R, Livshits G. Bone mineralization and regulation of phosphate homeostasis. *IBMS BoneKEy.* 2011 Jun;8(6):286–300.
- Schinke T, Liese S, Priemel M, Haberland M, Schilling AF, Catala-Lehnen P, et al. Decreased bone formation and osteopenia in mice lacking alpha-calcitonin gene-related peptide. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res.* 2004 Dec;19(12):2049–56.
- Schünke M. *Funktionelle Anatomie: Topographie und Funktion des Bewegungssystems.* Stuttgart: Thieme; 2000.
- Schünke M, Schulte E, Schumacher U. *Allgemeine Anatomie und Bewegungssystem: Prometheus: LernAtlas der Anatomie. 2., überarb. und erw. Aufl.* Stuttgart ; New York: Georg Thieme Verlag; 2007.
- Scutt A, Bertram P. Basic Fibroblast Growth Factor in the Presence of Dexamethasone Stimulates Colony Formation, Expansion, and Osteoblastic Differentiation by Rat Bone Marrow Stromal Cells. *Calcif Tissue Int.* 1999 Jan 1;64(1):69–77.
- Severini C, Improta G, Falconieri-Erspamer G, Salvadori S, Erspamer V. The tachykinin peptide family. *Pharmacol Rev.* 2002 Jun;54(2):285–322.
- Sharma U, Pal D, Prasad R. Alkaline phosphatase: an overview. *Indian J Clin Biochem IJCB.* 2014 Jul;29(3):269–78.
- Sheu T-J, Schwarz EM, Martinez DA, O’Keefe RJ, Rosier RN, Zuscik MJ, et al. A phage display technique identifies a novel regulator of cell differentiation. *J Biol Chem.* 2003 Jan 3;278(1):438–43.

8. Literaturverzeichnis

- Shevde NK, Bendixen AC, Dienger KM, Pike JW. Estrogens suppress RANK ligand-induced osteoclast differentiation via a stromal cell independent mechanism involving c-Jun repression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Jul 5;97(14):7829–34.
- Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*. 1997 Apr 18;89(2):309–19.
- Singh PP, van der Kraan AGJ, Xu J, Gillespie MT, Quinn JMW. Membrane-bound receptor activator of NFkappaB ligand (RANKL) activity displayed by osteoblasts is differentially regulated by osteolytic factors. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012 May 25;422(1).
- Sodek J, Ganss B, McKee MD. Osteopontin. *Crit Rev Oral Biol Med Off Publ Am Assoc Oral Biol*. 2000;11(3):279–303.
- Sohn SJ. Substance P upregulates osteoclastogenesis by activating nuclear factor kappa B in osteoclast precursors. *Acta Otolaryngol (Stockh)*. 2005 Feb;125(2):130–3.
- Srivastava S, Toraldo G, Weitzmann MN, Cenci S, Ross FP, Pacifici R. Estrogen decreases osteoclast formation by down-regulating receptor activator of. *J Biol Chem*. 2001 Mar 23;276(12):8836–40.
- Staines KA, MacRae VE, Farquharson C. The importance of the SIBLING family of proteins on skeletal mineralisation and bone remodelling. *J Endocrinol*. 2012 Sep;214(3):241–55.
- Straub RH, Wiest R, Strauch UG, Harle P, Scholmerich J. The role of the sympathetic nervous system in intestinal inflammation. *Gut*. 2006 Nov;55(11):1640–9.
- Sun H, Chen J, Liu Q, Guo M, Zhang H. Substance P stimulates differentiation of mice osteoblast through up-regulating Osterix expression. *Chin J Traumatol Zhonghua Chuang Shang Za Zhi*. 2010 Feb;13(1):46–50.
- Supanchart C, Kornak U. Ion channels and transporters in osteoclasts. *Arch Biochem Biophys*. 2008 May 15;473(2):161–5.
- Takayanagi H, Kim S, Koga T, Nishina H, Isshiki M, Yoshida H, et al. Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts. *Dev Cell*. 2002 Dec;3(6):889–901.
- Takeda S, Eleftheriou F, Levasseur R, Liu X, Zhao L, Parker KL, et al. Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system. *Cell*. 2002 Nov 1;111(3):305–17.
- Tanaka K, Hirai T, Kodama D, Kondo H, Hamamura K, Togari A. alpha1B -Adrenoceptor signalling regulates bone formation through the up-regulation of CCAAT/enhancer-binding protein delta expression in osteoblasts. *Br J Pharmacol*. 2016 Mar;173(6):1058–69.
- Tanaka S, Miyazaki T, Fukuda A, Akiyama T, Kadono Y, Wakeyama H, et al. Molecular mechanism of the life and death of the osteoclast. *Ann N Y Acad Sci*. 2006 Apr;1068:180–6.

8. Literaturverzeichnis

- Tanaka S, Takahashi N, Udagawa N, Tamura T, Akatsu T, Stanley ER, et al. Macrophage colony-stimulating factor is indispensable for both proliferation and differentiation of osteoclast progenitors. *J Clin Invest.* 1993 Jan;91(1):257–63.
- Tanaka S, Wakeyama H, Akiyama T, Takahashi K, Amano H, Nakayama KI, et al. Regulation of osteoclast apoptosis by Bcl-2 family protein Bim and Caspase-3. *Adv Exp Med Biol.* 2010;658:111–6.
- Tang Y, Wu X, Lei W, Pang L, Wan C, Shi Z, et al. TGF-beta1-induced migration of bone mesenchymal stem cells couples bone resorption with formation. *Nat Med.* 2009 Jul;15(7):757–65.
- Teitelbaum SL. The osteoclast and its unique cytoskeleton. *Ann N Y Acad Sci.* 2011 Dec;1240:14–7.
- Teti A, Rucci N. The unexpected links between bone and the immune system. *Medicographia* N° 105 Vol 32 – N°4 – 2010. 2010;(32):341–8.
- Togari A, Arai M, Mizutani S, Mizutani S, Koshihara Y, Nagatsu T. Expression of mRNAs for neuropeptide receptors and beta-adrenergic receptors in human osteoblasts and human osteogenic sarcoma cells. *Neurosci Lett.* 1997 Sep 19;233(2–3):125–8.
- Villa I, Mrak E, Rubinacci A, Ravasi F, Guidobono F. CGRP inhibits osteoprotegerin production in human osteoblast-like cells via cAMP/PKA-dependent pathway. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2006 Sep;291(3):C529-537.
- Wang J, Zhou H-Y, Salih E, Xu L, Wunderlich L, Gu X, et al. Site-specific in vivo calcification and osteogenesis stimulated by bone sialoprotein. *Calcif Tissue Int.* 2006 Sep;79(3):179–89.
- Wang L, Shi X, Zhao R, Halloran BP, Clark DJ, Jacobs CR, et al. Calcitonin-gene-related peptide stimulates stromal cell osteogenic differentiation and inhibits RANKL induced NF-kappaB activation, osteoclastogenesis and bone resorption. *Bone.* 2010 May;46(5):1369–79.
- Wang L, Zhao R, Shi X, Wei T, Halloran BP, Clark DJ, et al. Substance P stimulates bone marrow stromal cell osteogenic activity, osteoclast differentiation, and resorption activity in vitro. *Bone.* 2009 Aug;45(2):309–20.
- Wang Y, Volloch V, Pindrus MA, Blasioli DJ, Chen J, Kaplan DL. Murine osteoblasts regulate mesenchymal stem cells via WNT and cadherin pathways: mechanism depends on cell-cell contact mode. *J Tissue Eng Regen Med.* 2007 Feb;1(1).
- Welsch U. *Lehrbuch Histologie: Zytologie, Histologie, mikroskopische Anatomie.* 2., völlig überarb. Aufl., 4. Nachdr. München: Elsevier, Urban & Fischer; 2009.
- Wimalawansa SJ. Calcitonin gene-related peptide and its receptors: molecular genetics, physiology, pathophysiology, and therapeutic potentials. *Endocr Rev.* 1996 Oct;17(5):533–85.

8. Literaturverzeichnis

- Wimalawansa SJ. Blood pressure and cardiovascular tone: role of CGRP family of peptides. *Sci World J.* 2001;1:32–32.
- Winkler DG, Sutherland MK, Geoghegan JC, Yu C, Hayes T, Skonier JE, et al. Osteocyte control of bone formation via sclerostin, a novel BMP antagonist. *EMBO J.* 2003 Dec 1;22(23):6267–76.
- Wittrant Y, Theoleyre S, Couillaud S, Dunstan C, Heymann D, Redini F. Regulation of osteoclast protease expression by RANKL. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 Oct 24;310(3):774–8.
- Xiu F, Stanojic M, Jeschke MG. Norepinephrine inhibits macrophage migration by decreasing CCR2 expression. *PLoS One.* 2013;8(7):e69167.
- Yallampalli C, Chauhan M, Thota CS, Kondapaka S, Wimalawansa SJ. Calcitonin gene-related peptide in pregnancy and its emerging receptor heterogeneity. *Trends Endocrinol Metab TEM.* 2002 Aug;13(6):263–9.
- Yang J, Nie J, Fu S, Liu S, Wu J, Cui L, et al. The fast track to canonical Wnt signaling in MC3T3-E1 cells protected by substance P against serum deprivation-induced apoptosis. *Cell Biol Int.* 2017 Jan;41(1):71–8.
- Yang X, Matsuda K, Bialek P, Jacquot S, Masuoka HC, Schinke T, et al. ATF4 is a substrate of RSK2 and an essential regulator of osteoblast biology; implication for Coffin-Lowry Syndrome. *Cell.* 2004 Apr 30;117(3):387–98.
- Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S, et al. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Mar 31;95(7):3597–602.
- Yin T, Li L. The stem cell niches in bone. *J Clin Invest.* 2006 May;116(5):1195–201.
- Yirmiya R, Goshen I, Bajayo A, Kreisel T, Feldman S, Tam J, et al. Depression induces bone loss through stimulation of the sympathetic nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Nov 7;103(45):16876–81.
- Yoo Y-M, Kwag JH, Kim KH, Kim CH. Effects of neuropeptides and mechanical loading on bone cell resorption in vitro. *Int J Mol Sci.* 2014;15(4):5874–83.
- Zaidi M, Breimer LH, MacIntyre I. Biology of peptides from the calcitonin genes. *Q J Exp Physiol Camb Engl.* 1987a Oct;72(4).
- Zaidi M, Fuller K, Bevis PJ, GainesDas RE, Chambers TJ, MacIntyre I. Calcitonin gene-related peptide inhibits osteoclastic bone resorption: a comparative study. *Calcif Tissue Int.* 1987b Mar;40(3):149–54.
- Zaidi M, Troen B, Moonga BS, Abe E. Cathepsin K, osteoclastic resorption, and osteoporosis therapy. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res.* 2001 Oct;16(10):1747–9.

8. Literaturverzeichnis

Zernik J, Twarog K, Upholt WB. Regulation of alkaline phosphatase and alpha 2(I) procollagen synthesis during early intramembranous bone formation in the rat mandible. *Differ Res Biol Divers*. 1990 Sep;44(3):207–15.

Zhang X, Sobue T, Hurley MM. FGF-2 increases colony formation, PTH receptor, and IGF-1 mRNA in mouse marrow stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002 Jan 11;290(1):526–31.

Zhao C, Irie N, Takada Y, Shimoda K, Miyamoto T, Nishiwaki T, et al. Bidirectional ephrinB2-EphB4 signaling controls bone homeostasis. *Cell Metab*. 2006 Aug;4(2):111–21.

Zhou X, Zhang Z, Feng JQ, Dusevich VM, Sinha K, Zhang H, et al. Multiple functions of Osterix are required for bone growth and homeostasis in postnatal mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Jul 20;107(29):12919–24.

Zilles K, Tillmann BN. *Anatomie*. Heidelberg: Springer; 2010. (Springer-Lehrbuch).

9. Veröffentlichungen und Kongressbeiträge

9.1. Veröffentlichungen

- Substance P modulates bone remodeling properties of murine osteoblasts and osteoclasts
Nidermair, Tanja; Schirner, Stephan; **Seebröcker, Raphael**; Straub, Rainer H.; Grässel, Susanne
Scientific reports 2018 Jun 15, 8:9199, DOI:10.1038/s41598-018-27432-y

9.2. Kongressbeiträge

- Sensory Neurotransmitters Substance P and Alpha-calcitonin Gene-related Peptide Modulate Osteoblast Metabolism
Tanja Nidermair, **Raphael Seebröcker**, Stephan Schirner, Anja Pasoldt, Joachim Grifka, Susanne Grässel
Posterbeitrag Orthopaedic Research Society Annual Meeting 2017, San Diego, Kalifornien 2017
- Sensory Neurotransmitter Substance P and Alpha-calcitonin Gene-related Peptide Modulate Bone Cell Metabolism
Tanja Nidermair; Stephan Schirner; **Raphael Seebröcker**; Rainer H. Straub; Joachim Grifka; Susanne Grässel
Posterbeitrag Orthopaedic Research Society Annual Meeting 2018, New Orleans, Louisiana 2018

10. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Susanne Grässel und Dr. Tanja Niedermair für die Bereitstellung des Themas der Promotionsarbeit sowie die hervorragende Betreuung. Ich möchte mich für das entgegengebrachte Vertrauen und die umfassende fachliche Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit bedanken.

Außerdem bedanke ich mich bei Prof. Dr. Joachim Grifka, dem Direktor der Orthopädischen Klinik und Poliklinik, Universitätsklinikum Regensburg, für die Ermöglichung dieser Arbeit.

Ich danke insbesondere den Mitarbeitern des ZMB im Biopark, die mich herzlich willkommen heißen haben und mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite standen.

Von Herzen möchte ich meiner Familie danken, die mich immer unterstützt hat und ohne deren Rückhalt ich nicht an diesem Punkt stehen würde. Insbesondere möchte ich mich bei Grutti bedanken, die mich immer wieder von neuem motiviert hat.

Und schließlich möchte ich mich bei Monika Janke für ihre Geduld und ihre Ermutigungen, vor allem auch in schwierigen Phasen, bedanken.