

Universität Ulm
Institut für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik
Direktor: Prof. Dr. Lutz Claes

**Bedeutung Heparin-bindender Polypeptide sowie des WNT/ β -Catenin-
Signaltransduktionsweges in der Regulation der Knochenmasse**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Humanbiologie (Dr. biol. hum.)
der medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von
Laura Diana Zöllner
Geboren in Ludwigsburg

Ulm 2008

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Anita Ignatius

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Rolf Brenner

Tag der Promotion: 13. Juni 2008

1. EINLEITUNG	1
1.1 Knochengewebe und osteoblastäre Differenzierung	1
1.2 Regulation des Knochen-Remodelings	3
1.3 Bedeutung des mechanischen Reizes für das Knochenremodeling	5
1.3.1 Mechanotransduktion	5
1.3.2 Effekte mechanischer Reize auf osteoblastären Zellen	7
1.4 Bedeutung des WNT/β-Catenin-Signaltransduktionsweges für die Regulation der Knochenmasse	8
1.5 Die Familie der Heparin-bindenden Polypeptide	11
1.5.1 Struktur, Vorkommen und Funktionen	11
1.5.2 Rezeptoren und Signaltransduktionswege	12
1.6 Ziel der Arbeit	15
2 MATERIAL UND METHODEN	16
2.1 Material	16
2.1.1 Zellen	16
2.1.2 Zellkulturmedien	16
2.1.3 Oligonukleotide (<i>Primer</i>)	17
2.1.4 Kits	17
2.1.5 Lösungen und Puffer	18
2.1.6 Chemikalien	18
2.1.7 Restriktionsenzyme	20
2.1.8 Geräte	20
2.2 Methoden	22
2.2.1 Zellkultur	22
2.2.2 Mechanische Stimulation	23
2.2.3 MTT-Test	23
2.2.4 Immunhistologie	24
2.2.5 Nachweis der Veränderungen der Genexpression auf mRNA-Ebene	24
2.2.6 Herstellung der Standard-DNA für die <i>Real-Time-PCR</i>	27
2.2.7 Transfektion	29
2.2.9 Statistik	31
3. ERGEBNISSE	33
3.1 Differenzierung osteoblastärer Zellen	33

3.1.1 Histologischer Nachweis der AP-Aktivität und der Mineralisierung in Kulturen von MC3T3-E1-Zellen und primären osteoblastären Zellen aus Mauskalvarien	33
3.1.2 Veränderung der Expression osteogener Markergene im Kultivierungsverlauf von MC3T3-E1 Zellen	35
3.1.3 Veränderung der Expression von PTN, MK und Genen des WNT/ β -CAT-Signaltransduktionsweges im Kultivierungsverlauf von MC3T3-E1-Zellen	36
3.1.4 Veränderung der Expression osteogener Markergene im Kultivierungsverlauf von primären osteoblastären Zellen aus Mauskalvarien	38
3.1.5 Veränderung der Expression von PTN, MK und Genen des WNT/ β -CAT-Signaltransduktionsweges im Kultivierungsverlauf von primären osteoblastären Zellen aus Mauskalvarien	39
3.1.6 Zusammenfassung	40
3.2 Einfluss uniaxialer Dehnung auf osteoblastäre Zellen	40
3.2.1 Beeinflussung der Genexpression in MC3T3-E1-Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Kultivierung	40
3.2.2 Beeinflussung der Genexpression in primären osteoblastären Zellen aus Mauskalvarien zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Kultivierung	41
3.2.3 Zusammenfassung	42
3.4 Untersuchungen an PTPRζ1-Knockout-Zellen	44
3.4.1 Veränderung der Genexpression osteogener Marker im Kultivierungsverlauf von PTPR ζ 1-Knockout-Zellen	44
3.4.2 Veränderung der Genexpression von PTN, MK, LEF-1 und c-FOS im Kultivierungsverlauf von PTPR ζ 1-Knockout-Zellen	45
3.4.3 Einfluss uniaxialer Dehnung auf die Expression von c-FOS, PTN und MK in PTPR ζ 1-Knockout-Zellen	46
3.4.4 Einfluss uniaxialer Dehnung auf TopFlash-transfizierte PTPR ζ 1-Knockout-Zellen	47
3.4.5 Zusammenfassung	48
3.5 Einfluss von MK und PTN auf primäre osteoblastäre Zellen aus Mauskalvarien und MC3T3-E1-Zellen	49
3.5.1 MTT-Test	49

3.5.2 Veränderung der Genexpression von c-FOS, H4, PTN, PTPR ζ 1, LEF-1 und AP in primären osteoblastären Zellen aus Mauskalvarien nach Zugabe von MK	49
3.5.3 Veränderung der Genexpression von c-FOS, H4, PTN, PTPR ζ 1 und LEF-1 in primären osteoblastären Zellen aus Mauskalvarien nach Zugabe von MK und nach Applikation uniaxialer Dehnung	50
3.5.4 Einfluss uniaxialer Dehnung auf TopFlash-transfizierte primäre osteoblastäre Zellen aus Mauskalvarien nach Zugabe von MK	51
3.5.5 Zusammenfassung	52
4. DISKUSSION	53
4.1 Charakterisierung der osteoblastären Zellen	53
4.2 Veränderung der Genexpression von PTN, MK, PTPRζ1 und Genen des WNT/β-CAT-Signaltransduktionsweges im Differenzierungsverlauf	56
4.3 Einfluss uniaxialer Dehnung auf osteoblastäre Zellen	58
4.3.1 Einfluss uniaxialer Dehnung auf die Expression der osteogenen Marker RUNX-2 und BSP	60
4.3.2 Einfluss uniaxialer Dehnung auf die Expression von PTN, MK, PTPR ζ 1 und Genen des WNT/ β -CAT-Signaltransduktionsweges	61
4.4 Untersuchungen an PTPRζ1-Knockout-Zellen	63
4.4.1 Differenzierung von osteoblastären PTPR ζ 1-Knockout-Zellen und Veränderung der Genexpression von AP, BSP, c-FOS, PTN, MK und LEF-1 im Kultivierungsverlauf	63
4.4.2 Einfluss uniaxialer Dehnung auf PTPR ζ 1-Knockout-Zellen	65
4.5 Einfluss von MK auf osteoblastäre Zellen	67
4.5.1 Einfluss von MK auf die Proliferation und die Differenzierung osteoblastärer Zellen	67
4.5.1 Einfluss von MK und uniaxialer Dehnung auf primäre osteoblastäre Zellen aus Mauskalvarien	68
4.6 Schlussfolgerung	70
5. ZUSAMMENFASSUNG	72
6. LITERATURVERZEICHNIS	73
Danksagung	85
Lebenslauf	86

(c)DNA	(komplementäre) Desoxyribonukleinsäure
β-CAT	beta-Catenin
A	Ampere
AK	Antikörper
AKT	<i>Thymoma viral proto-oncogene 1</i>
ALK	<i>Anaplastic lymphoma kinase</i>
AP	Alkalische Phosphatase
AP-1	activating protein-1
APC	<i>Adenomatous polyposis coli</i>
ATF-4	<i>Activating transcription factor 4</i>
BMP-2	<i>Bone morphogenetic protein 2</i>
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
BSP	<i>Bone Sialoprotein</i>
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
c-FOS	<i>FBJ Osteosarcoma Oncogene</i>
cm ²	Quadratcentimeter
CO ₂	Kohlendioxyd
COX-2	Cyclooxygenase 2
CREB	<i>cAMP responsive element binding protein</i>
c-SRC	<i>Rous sarcoma oncogene</i>
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSH	<i>Dishevelled</i>
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis(beta-aminoethylether)tetraacetat
ERK-1/2	extrazellulär-aktivierte Proteinkinase
FAK	Fokale Adhäsionskinase
FCS	Fötales Kälberserum
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FYN	<i>Fyn proto-oncogene</i>
g	Gramm
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GSK3	<i>Glycogen synthase kinase 3</i>
h	Stunde(n)
H ₂ O	Wasser
H4	Histon 4
HRP	<i>Horseradishperoxidase</i>
Hz	Hertz
IGF-I/II	<i>Insulin-like growth factor I/II</i>
IgG	Immunglobulin G
IHH	<i>Indian Hedgehog</i>
IRS-1	<i>Insulin receptor substrate-1</i>
JUN	<i>Jun oncogene</i>
KO	<i>Knockout</i>
KOLL-1	Kollagen 1
LB	Luria Bertani
LEF-1	<i>Lymphoid enhancer-binding factor 1</i>
LRP5/6	<i>Low density lipoprotein receptor-related protein 5/6</i>

MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
M-CSF	<i>Macrophage colony stimulating factor</i>
MEM	<i>Minimal essential Medium</i>
min	Minute(n)
MK	Midkine
ml	Milliliter
mM	millimolar
MSC	mesenchymale Stammzelle
MTT	Methylthiazolyldiphenyl-tetrazoliumbromid
NF κ B	<i>Nuclear factor κB</i>
nm	Nanometer
OC	Osteokalzin
OP	Osteopontin
OPG	Osteoprotegerin
OSX	Osterix
p	pico
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PI3	<i>Phosphatidylinositol 3</i>
PIT-1	<i>Pituitary-specific transcription factor 1</i>
PKA	cAMP-abhängige Proteinkinase
PKC	Protein Kinase C
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PO	primäre osteoblastäre Zellen aus Mauskalvarien
PTH	Parathormon
PTN	Pleiotrophin
PTP	Proteintyrosinphosphatase
PTPR ζ 1	Proteintyrosinphosphatase Rezeptor-Typ ζ 1
RANK	<i>Receptor activator of nuclear factor kappa B</i>
RANKL	<i>Receptor activator of nuclear factor kappa B ligand</i>
RAS	<i>Rat sarcoma oncogene</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RT	Reverse Transkriptase
RUNX-2	<i>Runt-related transcription factor 2</i>
s	Sekunde(n)
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SOST	Sclerostin
SOX-9	<i>SRY-box containing gene-9</i>
SRC	Src Protein
SYN-3	Syndecan 3
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TCF	<i>T cell factor</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF- β	<i>Transforming growth factor-β</i>
U	<i>Unit(s)</i>
UV	ultraviolett
V	Volt
w/v	Gewicht pro Volumen
WNT	zusammengesetzte Abkürzung aus <i>Wingless</i> und <i>Integration 1</i>
WT	Wildtyp

x g	-fache Zentrifugalbeschleunigung
μ	micro

1. EINLEITUNG

1.1 Knochengewebe und osteoblastäre Differenzierung

Im Knochengewebe, das reich an extrazellulärer Matrix ist, finden sich hauptsächlich Vorläuferzellen, Osteoblasten, Osteocyten und Osteoklasten, die sich aus den multipotenten Stammzellen im Knochenmark ableiten:

Die Vorläuferzellen oder mesenchymalen Progenitorzellen können sich unter anderem zu Chondrocyten, Adipocyten, Myoblasten, Fibroblasten und Osteoblasten entwickeln [1] und werden mittels bestimmter Signale zur Differenzierung angeregt [2, 3].

Die Osteoblasten sind die eigentlichen knochenbildenden Zellen. Sie lagern sich auf vorhandenem Gewebe ab und sezernieren die Proteine der extrazellulären Matrix, die zu ca. 90 % aus Kollagen I-Fasern und zu ca. 10 % aus nichtkollagenen Glykoproteinen besteht. Die Mineralisierung des neugebildeten sogenannten Osteoids erfolgt in erster Linie durch die Ablagerung von Calciumphosphatkristallen [4], welche die Knochenmatrix festigen und einen Großteil des Knochenminerals ausmachen. Die sezernierte und in der fortlaufenden Entwicklung mineralisierte Matrix schließt die Zellen sukzessiv ein und fördert die Differenzierung des Osteoblasten zum Osteocyten.

Der Osteocyt ist eine ausgereifte Knochenzelle, die vollkommen in die mineralisierte extrazelluläre Matrix eingeschlossen ist. Osteocyten befinden sich in den Lakunen im Inneren des Knochens und sind über lange cytoplasmatische Ausläufer in Kanälen der mineralisierten Matrix mit anderen Osteocyten verbunden [5].

Die aus mehreren Vorläuferzellen hämatopoetischen Ursprungs fusionierten mehrkernigen Osteoklasten [6] sind die resorptiven Zellen des Knochens.

Die Osteoblastogenese von der unreifen mesenchymalen Vorläuferzelle über den Osteoblasten zum Osteocyten wird in drei Hauptstadien unterteilt: die Proliferation, die Matrixbildung und die Mineralisierung. Diese sind durch die Expression von Markergenen wie H4, OP, BSP, AP, KOLL-1 und OC gekennzeichnet. Der Proliferationsmarker H4 wird während der Proliferationsphase und KOLL-1 zu Beginn der Differenzierung verstärkt exprimiert, die Expression dieser Gene sinkt jedoch während der weiteren Entwicklung der Zelle. Die Expression der Gene OP, AP und BSP geht mit der Matrixbildung einher. Während die Expression von AP im weiteren Differenzierungsverlauf wieder sinkt, steigt die Expression von OC und BSP in der Mineralisierungsphase weiter an. Letztere binden an den Hydroxyapatit der mineralisierten extrazellulären Matrix [7, 8].

Aus mesenchymalen Vorläuferzellen, die auch als Progenitorzellen bezeichnet werden, können sowohl Chondroblasten als auch Osteoblasten hervorgehen. Während für das chondrogene Zellschicksal der Transkriptionsfaktor SOX-9 benötigt wird, ist der Transkriptionsfaktor RUNX-2 (auch CBFA-1 genannt) für die osteogene Weiterentwicklung der Vorläuferzelle entscheidend [9]. Unreife Osteoblasten und eine fehlende Knochenbildung im transgenen Mausmodell sowie die fehlende Expression der charakteristischen Gene OP, KOLL-1, AP und OC verdeutlichen die Schlüsselrolle von RUNX-2 in der Osteoblastogenese [10-14]. Am *Knock-out*-Mausmodell wurde ein weiterer, für die terminale Entwicklung des Osteoblasten essentielle Transkriptionsfaktor OSX entdeckt [15]. Er moduliert ebenfalls die Expression osteogener Marker. Die Tatsache, dass in RUNX-2-defizienten Mäusen kein OSX, aber in OSX-defizienten Mäusen RUNX-2 exprimiert wird, lässt darauf schließen, dass OSX nach RUNX-2 aktiv ist. Somit könnte OSX für einen späteren Zeitpunkt der Differenzierung notwendig sein, wobei RUNX-2 keinen direkten Einfluss auf dessen Expression hat [16]. Die wichtigsten Gene der osteoblastären Differenzierung sind in Abbildung 1.1 zusammengefasst.

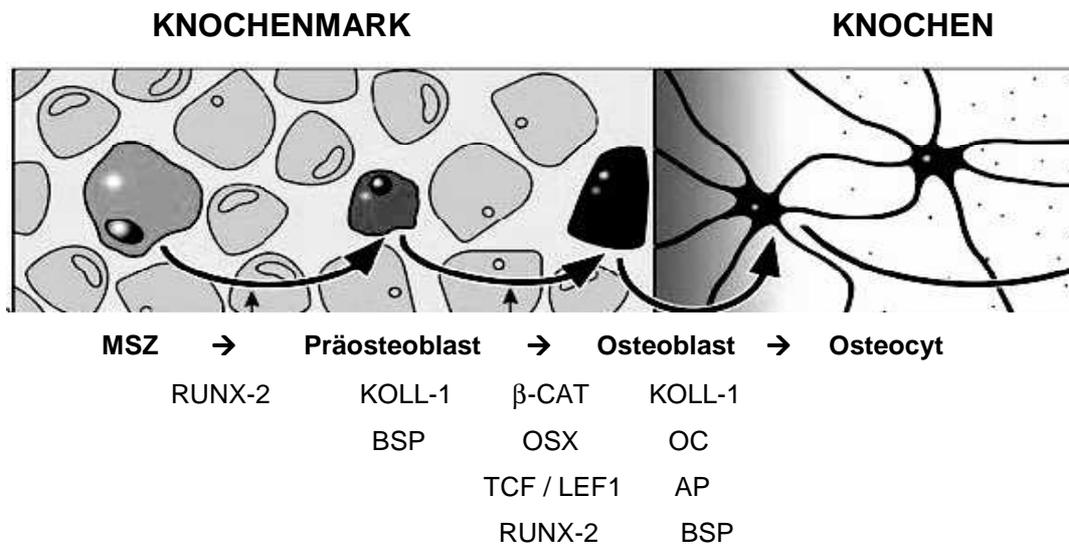


Abbildung 1.1

Expression osteogener Marker und bedeutender Moleküle des WNT/β-CAT-Signaltransduktionsweges im Differenzierungsverlauf nach Robling et al. [17]. β-CAT, beta-Catenin; AP, alkalische Phosphatase; BSP, *Bone Sialoprotein*; KOLL-1, Kollagen 1; LEF-1, *Lymphoid enhancer-binding factor 1*; MSZ, mesenchymale Stammzelle; OC, Osteokalzin; OSX, Osterix; RUNX-2, *Runt-related transcription factor 2*; TCF, *T cell factor*.

Einen weiteren positiven Einfluss auf die osteogene Entwicklung haben auch die Transkriptionsfaktoren c-FOS [18] und ATF-4 [19]. Des Weiteren können Cytokine wie FGF [20] oder BMP-2 die Osteoblastogenese über die Induktion von RUNX-2 und OSX [15, 21] modulieren. Der Transkriptionsfaktor LEF-1 kann die terminale Reifung des Osteoblasten im

fortgeschrittenen Differenzierungsstadium inhibieren [22]. Nach einer Aktivierung des WNT-Signaltransduktionsweges reguliert er zusammen mit β -CAT die Expression WNT-sensitiver Gene im Zellkern. Im frühen Entwicklungsstadium der osteoblastären Zelle fördert der WNT/ β -CAT-Signaltransduktionsweg zusammen mit dem IHH-Signaltransduktionsweg den osteogenen Fortschritt [23].

Die osteogene Differenzierung von Vorläuferzellen, Präosteoblasten oder Osteoblasten ist *ex vivo* möglich. Schon in mesenchymalen Vorläuferzellen kann die osteogene Entwicklung durch die Zugabe des synthetischen Glucocorticoids Dexamethason oder von Vitamin D₃ gefördert werden [24, 25]. Die präosteoblastäre, murine Zelllinie MC3T3-E1 [26] ist aufgrund ihrer Fähigkeit zur Differenzierung und ihrer Möglichkeit zu mineralisieren als *in vitro*-Modell für die osteoblastäre Entwicklung etabliert und gut untersucht. Die Differenzierung dieser Zellen kann mit Ascorbat-2-Phosphat und β -Glycerophosphat induziert werden [27, 28]. Nach Zusatz von Ascorbat-2-Phosphat erhöht sich die Synthese der mRNA für Typ I Prokollagen in MC3T3-E1-Zellen nachweislich [29] und eine extrazelluläre Kollagenmatrix kann wiederum die Differenzierung von Vorläuferzellen fördern [30, 31]. Primäre Osteoblasten können aus den Calvarien neonataler Mäuse oder Ratten gewonnen werden und nach Supplementierung des Kulturmediums mit Ascorbat-2-Phosphat und β -Glycerophosphat im Kultivierungsverlauf weiter differenzieren und mineralisieren [32]. Sie stellen somit ein weiteres Zellkulturmodell für die osteogene Differenzierung *in vitro* dar.

1.2 Regulation des Knochen-Remodelings

Der Knochen hat vielfältige Funktionen als Kalziumspeicher, Stützapparat, Anhaftungsstelle für Muskeln und Sehnen sowie als Schutzhülle für Organe. Das Knochengewebe ist ständiger Dynamik unterworfen und enthält viele Knochen-umbauende Einheiten, die auch als *Basic Multicellular Units* (BMU) bezeichnet werden. In einer BMU werden alle am Knochenumbau beteiligten Zellen zusammengefasst. Das Remodeling ist ein physiologischer Vorgang im Knochengewebe, bei dem sich die Resorption und der Knochenaufbau im Gleichgewicht befinden.

Die wichtigsten bekannten Faktoren und Signalmoleküle, die in den Remodelingprozess eingreifen, sind in Abbildung 1.2 zusammengefasst. Sowohl das Parathormon als auch Vitamin D₃ als Regulatoren der Kalziumhomöostase sowie Steroidhormone und Wachstumsfaktoren haben biochemische Einflüsse auf das Remodeling [33, 34]. Auch

physikalische Reize in Form von Dehnung oder Kompression sind für den Erhalt der Knochenmasse essentiell [35, 36].

Veränderungen der Balance zwischen Knochenabbau und -aufbau führen zu Knochenverlust (z.B. Osteoporose [37]) oder übermäßigem Wachstum (z.B. Osteopetrose [38]).

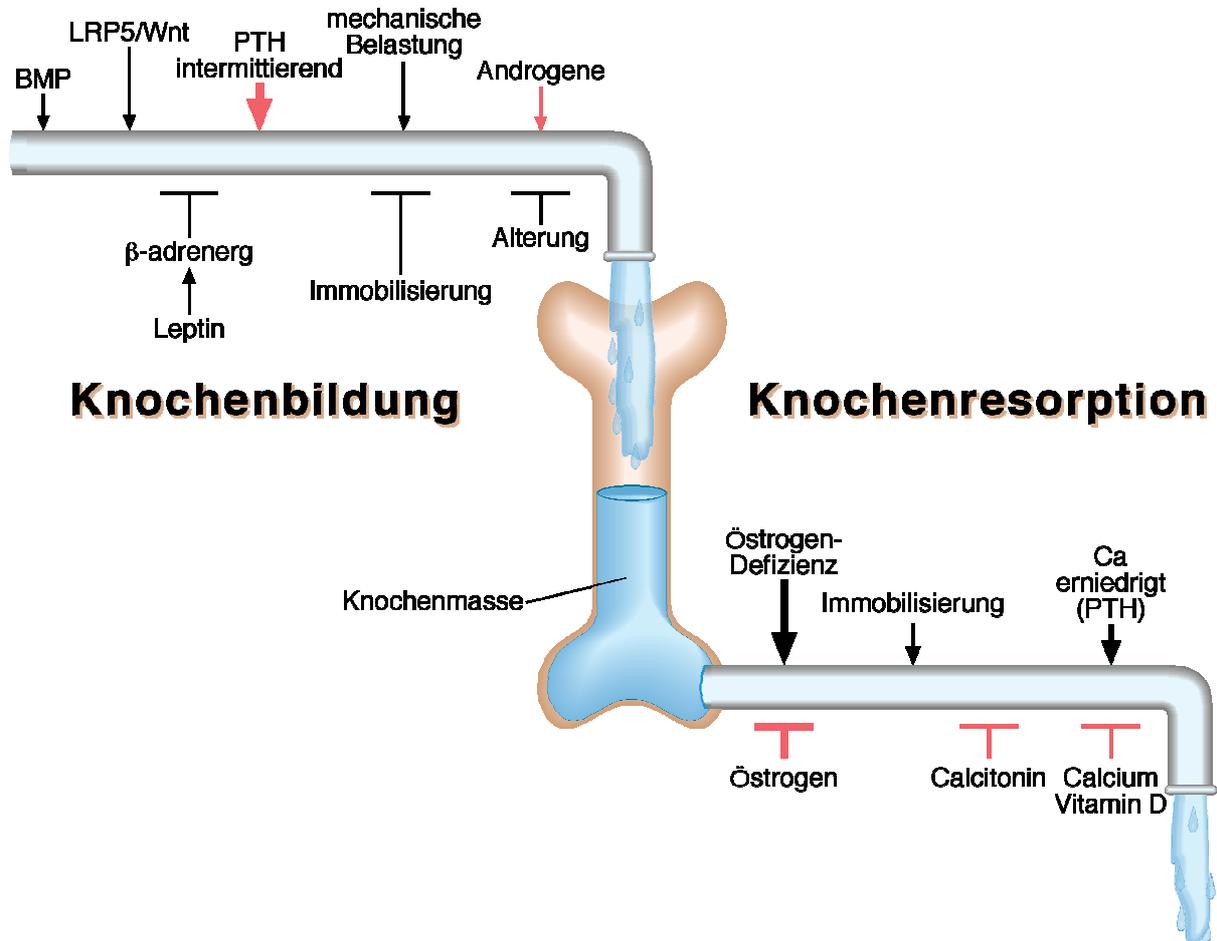


Abbildung 1.2

Übersicht der Einflussfaktoren auf die Knochenhomöostase nach Harada & Rodan 2003 [33]. BMP, Bone morphogenetic protein; Ca, Kalzium; LRP5, *Low density lipoprotein receptor-related protein*; PTH, Parathormon; *Wnt*, zusammengesetzte Abkürzung aus *Wingless* und *Integration-1*.

Die koordinierte Interaktion von Osteoklasten und Osteoblasten bzw. Osteocyten sind für das Remodeling von Knochen auf zellulärer Ebene verantwortlich. Die Osteoblasten können den Umbauprozess aktivieren. Sie exprimieren verstärkt M-CSF und RANKL als Antwort auf z.B. Vitamin D₃ [39], PTH [40] oder bestimmte Cytokine [41]. Osteoblasten induzieren über M-CSF und die Interaktion zwischen RANKL/RANK mit hämatopoetischen Vorläuferzellen deren verstärkte Proliferation sowie darauf folgend die terminale Differenzierung der Präosteoklasten zum multinukleären Osteoklasten [42, 43]. Ein kompetitives Molekül als

Gegenspieler der Osteoklastenreifung über die RANKL/RANK-Interaktion ist das von Osteoblasten synthetisierte lösliche OPG [44, 45]. Der polare aktive Osteoklast sezerniert auf der knochenzugewandten Seite Salzsäure, die zur Entstehung eines sauren Milieus führt, das die anorganischen Bestandteile des Knochens löst. Die ebenfalls ausgeschütteten proteolytischen Enzyme wie Cathepsin K und Metalloproteinasen degradieren die freigelegten organischen Bestandteile. Eine Inaktivierung der Osteoklasten kann über Östrogene und Bisphosphonate, die die apoptotischen Signalkaskaden in diesen Zellen stimulieren, erfolgen und dadurch indirekt die Absorption des Knochens reduzieren [46]. Eine Kopplung der Knochenresorption mit dem Knochenwiederaufbau findet auch über frei werdende Wachstumshormone wie IGF-I/II und TGF- β aus der abgebauten Matrix statt. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass die Osteoklasten selbst Wachstumsfaktoren für osteoblastäre Vorläuferzellen sezernieren [47]. Eine weitere Form der Rekrutierung könnte über die Signale der Osteocyten, von denen ca. 60% außerhalb der Reversal-Line das Vorgehen der Osteoklasten überleben [48], eingeleitet werden. Osteoblasten werden mittels freigesetzter Faktoren, die eine mitogene Wirkung haben (zum Beispiel TGF- β 1 [49]), rekrutiert und bauen den resorbierten Knochen wieder auf. Sie müssen sich an spezifischen Stellen anlagern, das Osteoid sezernieren und die neue Matrix anschließend mineralisieren.

1.3 Bedeutung des mechanischen Reizes für das Knochenremodeling

1.3.1 Mechanotransduktion

Wolff postulierte schon 1982 das Gesetz „Form folgt Funktion“ und erkannte damit, dass die Mechanik ein wichtiger Faktor für die Bildung und den Erhalt des Knochens ist [50]. Als Mechanotransduktion wird die Umwandlung des biophysikalischen Reizes in eine zelluläre, biochemische Antwort bezeichnet. Externe Kräfte führen zu einer flüssigkeitsinduzierten Scherspannung oder zu einer Deformation. Hierbei kann aufgrund ihrer Lokalisation im Knochengewebe angenommen werden, dass Osteoblasten eher auf eine Deformation der Matrix und Osteocyten eher auf die flüssigkeitsinduzierte Scherspannung reagieren [51, 52]. Für die Transduktion des biophysikalischen Signals in den Zellkern sind unterschiedliche Rezeptoren und Signaltransduktionswege verantwortlich. Die Komplexität dieses Mechanismus ist aus Abbildung 1.3 ersichtlich.

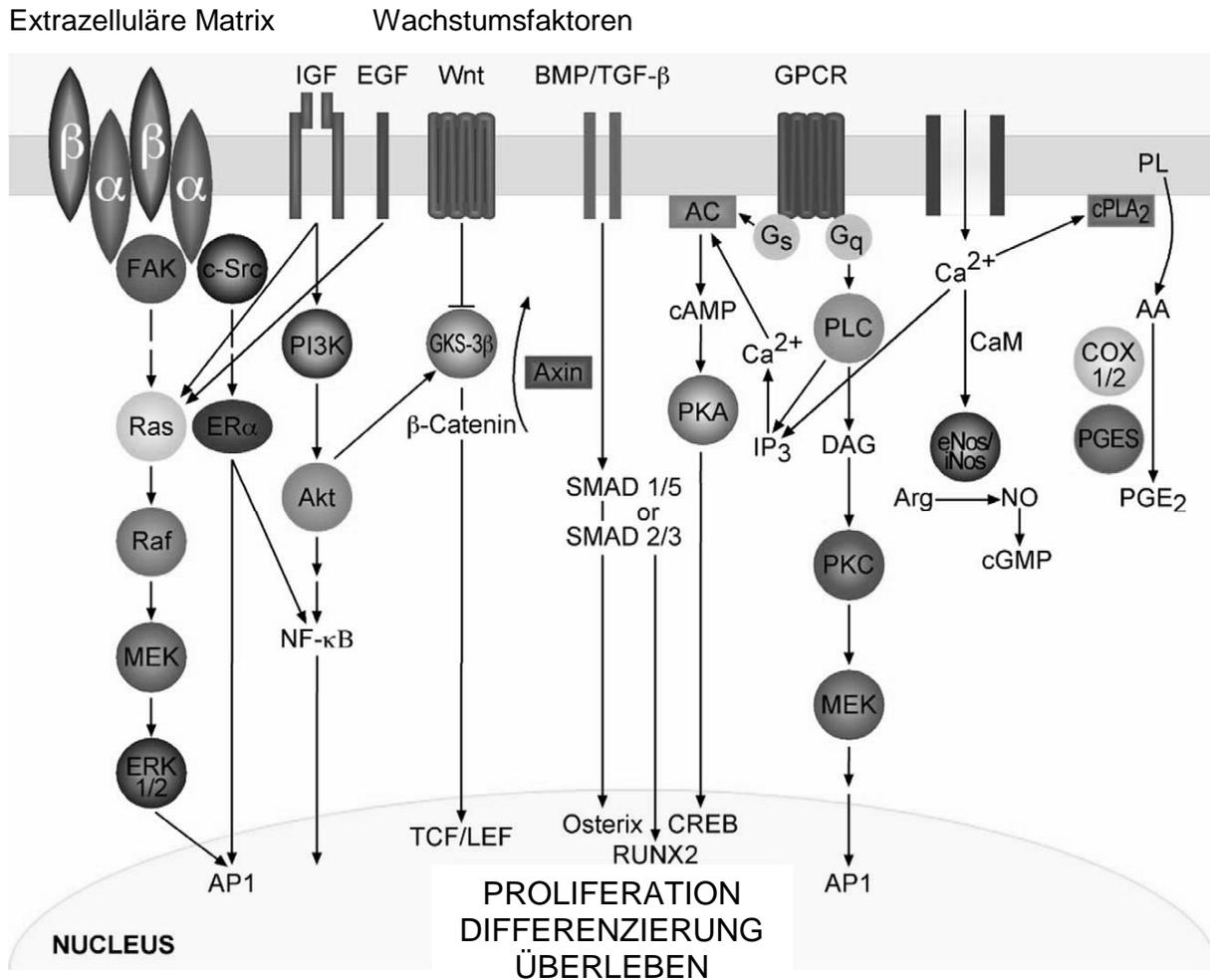


Abbildung 1.3

Übersicht der an der Mechanotransduktion beteiligten Faktoren nach Liedert 2006 et al. [53]. AA, *arachidonic acid*; AC, *adenylatylase*: Akt/PKB, *protein kinase B*; AP1, *activator protein 1*; BMP, *bone morphogenetic protein*; CAM, *Calmodulin*; COX 1/2, *Cyclooxygenase 1/2*; CREB, *c-AMP response element-binding protein*; c-Src, *Tyrosin Proteinkinase*; DAG, *Diacylglycerol*; EGF, *epidermal growth factor*; eNOS, *endothelial nitric oxide synthase*; ERα, *estrogen receptor α*; ERK-1/2, *extracellular signal regulated protein kinase 1/2*; FAK, *focal adhesion kinase*; GSK-3β, *glycogen synthase kinase-3β*; Gs, *stimulatory G-protein*; GPCR *seven-transmembrane-domain G-protein-coupled receptor*; Gq, *protein with aq subunit (activates PLC; phospholipase C-β)*; IGF, *insulin-like growth factor*; iNOS, *inducible nitric oxide synthase*; IP3: *inositol trisphosphate*; LEF, *lymphoid enhancer-binding factor*; MEK, *mitogen-activated protein kinase extracellular signal regulated protein kinase*; NF-κB, *nuclear factor-κB*; PI3K, *phosphoinositide 3-kinase*; PGE₂, *prostaglandin E2*; PGES, *prostaglandin synthase*; PKA, *protein kinase A*; PKC, *protein kinase C*; PL, *phospholipid*; Raf, *rat fibrosarcoma serin/Threonine protein kinase*; SMAD, *small, mother against decapentaplegic*; Ras, *rat sarcoma monomeric GTP-binding protein*; TCF, *T-cell factor*; TGF-β, *transforming growth factor-β*; wnt, *wingless/integration-1*.

Spannungs-regulierte und mechanosensitive Kalziumkanäle werden nach mechanischer Stimulation geöffnet und führen zu einer Erhöhung der Kalziumkonzentration in der Zelle

[54, 55]. Eine Erhöhung des Kalziumspiegels im Cytoplasma kann z.B. zu einer Translokation des Transkriptionsfaktors NFκB in den Zellkern führen. Dort reguliert er zum Beispiel die Expression von COX-2 [56].

Ein weiterer *second Messenger*, dessen Konzentration nach mechanischer Stimulation ansteigt, ist cAMP [57]. Ein Anstieg der cAMP-Konzentration führt zur verstärkten Aktivität von PKA. Diese wiederum kann über die Aktivierung verschiedener Kinasen die Phosphorylierung von ERK-1/2 initiieren. Der von diesem Signaltransduktionsweg aktivierte Transkriptionsfaktor AP-1 moduliert die Expression mechanosensitiver Gene wie z.B. c-FOS oder COX-2 [58]. Sowohl Kalziumionen als auch cAMP können über die *Gap Junctions*, deren Anzahl unter mechanischem Einfluss ebenfalls steigt, das Signal in die Nachbarzellen übertragen [59, 60].

Weitere Mechanorezeptoren stellen die Integrine dar. Sie verbinden die extrazelluläre Matrix mit dem Zytoskelett der Zelle [61]. Integrine interagieren mit FAK und können weitere Kinasen rekrutieren, die in der anschließenden Kaskade ERK-1/2 phosphorylieren [62].

Auch das Zytoskelett ist an der Mechanorezeption und der Weiterleitung des Signals beteiligt. Multiproteinkomplexe bilden aus spezifischen Adaptermolekülen und Transkriptionsfaktoren die sogenannten Mechanosomen. Diese Mechanosomen können unterschiedlich zusammengesetzt sein. Sie wandern in den Nukleus und modulieren abhängig von den beteiligten Transkriptionsfaktoren die Expression verschiedener Gene [63].

1.3.2 Effekte mechanischer Reize auf osteoblastäre Zellen

Mechanische Stimulation beeinflusst die Proliferation, Differenzierung und Orientierung von Osteblastenvorläuferzellen [64, 65]. In humanen Osteoblasten führte mechanische Stimulation zum Beispiel zu einer Erhöhung der Expression von Proliferationsmarkern und zu einer Erniedrigung der Expression von OC sowie der AP-Aktivität [66]. Sie verändert die Signaltransduktion in Osteoblasten und führt dadurch zu einer Veränderung der Expression verschiedener Gene [67, 68]. In Osteocyten ist z.B. die Transkription der Gene c-FOS, COX-2, IGF-I und OC nach zyklischer Dehnung *in vitro* verändert [69]. Auch die Art der mechanischen Stimulation ist von Bedeutung. Kaspar et al. berichteten von einem Einfluss der Zyklenzahl und Frequenz in *in vitro*-Versuchen [70]. Zusätzlich zu den bereits beschriebenen Faktoren werden immer mehr Moleküle beziehungsweise Signaltransduktionswege entdeckt, die an der Mechanotransduktion beteiligt sind.

Auch der WNT/ β -CAT-Signaltransduktionsweg, der ein wichtiger Modulator in der Knochenentwicklung und osteoblastären Differenzierung ist, wird durch mechanische Einflüsse verändert. Lau et al. untersuchten die Genexpression von murinen primären osteoblastären Zellen nach Stimulation mit einer Flüssigkeitsströmung *in vitro* und konnten eine Veränderung der Transkription der Gene des WNT/ β -CAT-Signaltransduktionsweges nachweisen. *In vivo*-Versuche an murinen Tibien konnten diese Erkenntnisse bestätigen [71]. In weiteren Versuchen an transgenen Mäusen konnte ebenfalls die Beeinflussung der WNT/ β -CAT-Signalkaskade durch Mechanik nachgewiesen werden. Zudem scheint eine Aktivierung dieses Signaltransduktionsweges die Mechanosensitivität von Knochenzellen zusätzlich zu erhöhen [71, 72]. Untersuchungen auf Proteinebene wiesen eine Translokation von β -CAT nach Flüssigkeitsströmung oder mechanischer Dehnung nach. β -CAT kumulierte im Zellkern und interagiert mit den Transkriptionsfaktoren TCF und LEF-1 [73, 74]. Detaillierte Analysen zur Rolle der einzelnen, am WNT/ β -CAT-Signaltransduktionsweg beteiligten Moleküle in der Mechanotransduktion stehen jedoch noch aus.

Nach mechanischer Stimulation konnten *in vitro* und *in vivo* Veränderungen der Genexpression des zur Familie der Heparin-bindenden Polypeptide gehörenden Faktors PTN nachgewiesen werden [75-77]. Der Einfluss mechanischer Stimulation auf die Expression des verwandten Wachstumsfaktors MK wurde jedoch im Knochen noch nicht untersucht.

1.4 Bedeutung des WNT/ β -CAT-Signaltransduktionsweges für die Regulation der Knochenmasse

Der von den Glykoproteinen der WNT-Familie induzierte kanonische Signaltransduktionsweg reguliert die Entwicklung in zahlreichen unterschiedlichen Geweben und ist in Abbildung 1.4 dargestellt. Spezifische WNT-Moleküle übertragen ihre Signale mittels Bindung an Rezeptoren der Frizzled-Familie [78] und den Rezeptoren LRP5 und LRP6 [79]. Über eine Signalkaskade stabilisieren die WNT-Moleküle β -CAT, das das Signal in den Zellkern übermittelt. Im Komplex mit den Transkriptionsfaktoren LEF-1 und TCF-1 reguliert β -CAT die Transkription WNT-sensitiver Gene [80]. Die Gene, die vom WNT/ β -CAT-Signaltransduktionsweg reguliert werden, modulieren in erster Linie die Zellproliferation und Zelldifferenzierung [81].

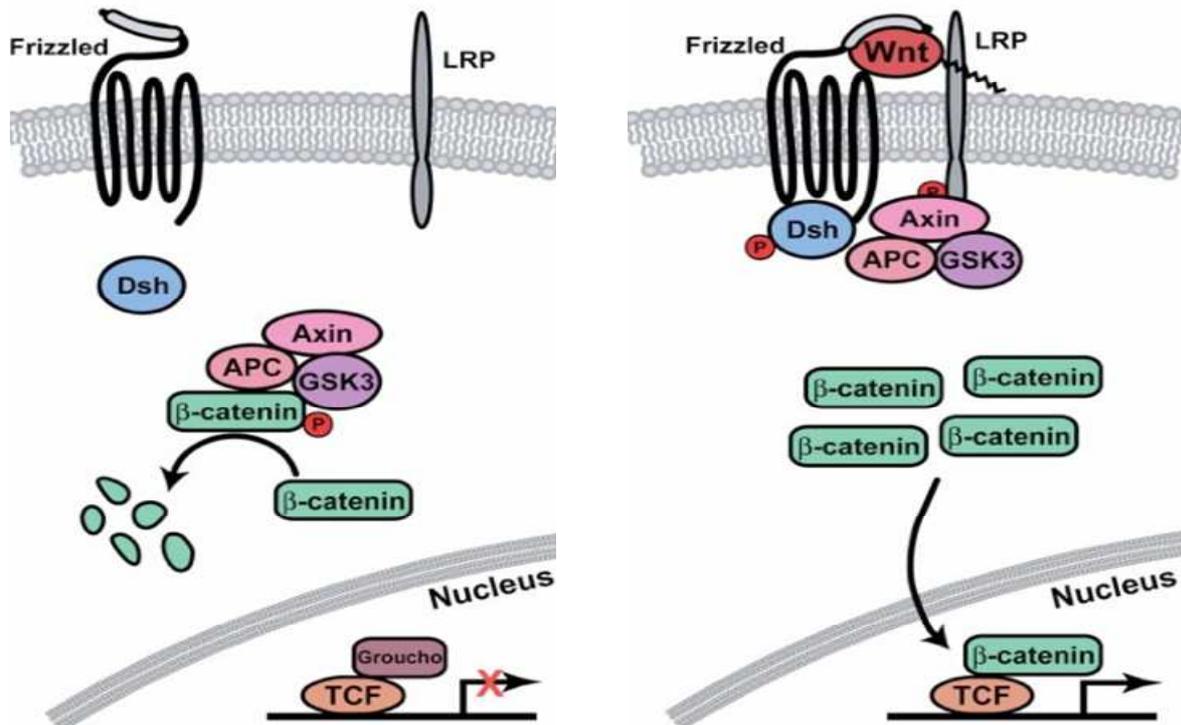


Abbildung 1.4:

Überblick über den kanonischen WNT/β-Catenin-Signaltransduktionsweg nach Gordon & Nusse [82].

Linke Abbildung: ohne WNT wird β-Catenin vom Axin/APC/GSK3-Komplex phosphoryliert und so für den Abbau markiert. Zur selben Zeit werden die Zielgene des WNT/β-Catenin-Signaltransduktionsweges über eine Interaktion von Groucho mit TCF reprimiert.

Rechte Abbildung: WNT bindet an den Frizzled- und LRP-Rezeptor, induziert die Phosphorylierung von LRP und darauf folgend die Rekrutierung von Axin. DSH wird ebenfalls phosphoryliert und inhibiert den Axin/APC/GSK3-Komplex, was zu einer Akkumulation von β-Catenin im Zytoplasma führt. β-Catenin kann in den Nucleus wandern, Groucho verdrängen und zusammen mit LEF-1 (in Abbildung nicht dargestellt) und TCF die Expression von Zielgenen des WNT/β-Catenin-Signaltransduktionsweges regulieren.

APC, *adenomatous polyposis coli*; DSH, *dishevelled*; GSK3, *glycogen synthase kinase-3*; LEF, *lymphoid enhancer-binding factor*; TCF, *T-cell factor*; WNT, *wingless/integration-1*.

Die Entdeckung einer *loss-of-function*-Mutation im humanen LRP5-Rezeptor, deren Träger das Osteoporose-Pseudogliom-Syndrom hatten, lieferte erste Hinweise auf die Bedeutung des WNT/β-CAT-Signaltransduktionsweges in der Knochenentwicklung und im Knochenerhalt [83]. Ein anderer Aminosäureaustausch in einer Untereinheit des LRP5-Rezeptors führte zu einer *gain-of-function*-Mutation und einer erhöhten Knochendichte bei den betroffenen Personen [38]. In einer Vielzahl von Studien wurde seitdem der Einfluss des WNT/β-CAT-Signaltransduktionsweges auf die Differenzierung des Osteoblasten sowie auf die

Osteoklastogenese untersucht und die Ergebnisse zeigten die Bedeutsamkeit dieses Signaltransduktionsweges in der Regulation der Knochenmasse.

Die mRNA-Expression vieler Gene, die am WNT/ β -CAT-Signaltransduktionsweg beteiligt sind, ist nach Induktion der Differenzierung mit Dexamethason in humanen Osteoblasten *in vitro* verändert [84]. In einem Tiermodell konnte nach Applikation des osteoinduktiven Wachstumsfaktors BMP-2 im murinen Muskel ebenfalls eine verstärkte Expression von WNT-Genen festgestellt werden [85]. Zum einen fördern die WNT-Moleküle das Überleben der frühen Vorläuferzellen [86], zum anderen ist die Aktivierung des kanonischen Signals entscheidend für das weitere Zellschicksal und die osteogene Differenzierung (siehe Abbildung 1.5).

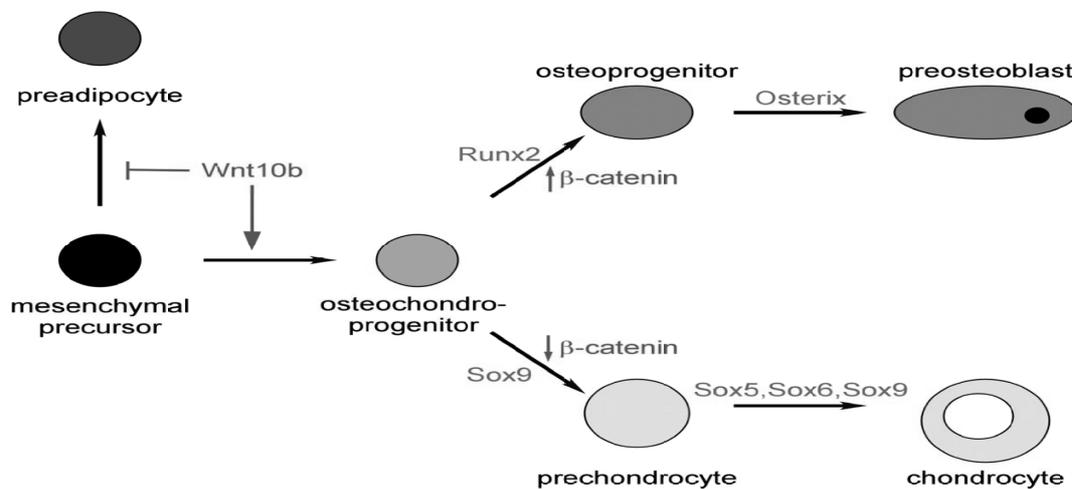


Abbildung 1.5

Einfluss des WNT/ β CAT-Signaltransduktionsweges auf die osteogene Differenzierung nach Glass & Karsenty 2007 [87]

Dunkelgrau: Einfluss des WNT/ β CAT-Signaltransduktionsweges, hellgrau: Markergene der Differenzierung. RUNX-2, *Runt-related transcription factor 2*; Sox, *SRY-box containing gene*; WNT, *wingless/integration-1*.

Das Polypeptid WNT10b wurde im transgenen Mausmodell untersucht. Es fördert bereits in der frühen Entwicklung die Festlegung des osteochondrogenen Zellschicksals, während es die adipogene Weiterentwicklung hemmt [88]. Hill et al. stellten fest, dass in Vorläuferzellen mit einer Mutation in β -CAT die Osteoblastogenese blockiert ist und sich statt dessen Chondrozyten entwickeln [89]. Eine andere Arbeitsgruppe inaktivierte β -CAT in mesenchymalen Vorläuferzellen und erzielte unter Versuchsbedingungen, die eigentlich nur die osteoblastäre Weiterentwicklung zuließen, eine chondrogene Differenzierung [90]. Beide Arbeitsgruppen postulierten, dass die quantitative Veränderung von β -CAT als molekularer

Schalter bei der Entscheidung zwischen dem osteogenen und dem chondrogenen Zellschicksal agiert.

Obwohl die Vermutung nahe liegt, dass der WNT/ β CAT-Signaltransduktionsweg die Expression des Differenzierungsmarkers RUNX-2 für die weiterführende osteogene Entwicklung reguliert, ist die RUNX-2-Expression unabhängig von LEF-1 [91]. Sclerostin (SOST) ist ein Antagonist der WNT-Moleküle und kann an LRP5 und 6 anbinden. Sein Verlust führt über einen verstärkt aktivierten WNT/ β -CAT-Signaltransduktionsweg zu einer erhöhten Knochenmasse [92].

Die Effekte der Aktivierung des WNT/ β -CAT-Signaltransduktionsweges sind jedoch abhängig vom Differenzierungsstadium der Zelle. In differenzierten Osteoblasten wird der WNT/ β -CAT-Signaltransduktionsweg für die weitere Entwicklung nicht mehr benötigt [93] und übernimmt andere Funktionen: In reifen Osteoblasten kann die Differenzierung von Osteoklasten über die zusätzliche Aktivierung des WNT/ β -CAT-Signaltransduktionsweges moduliert werden. In diesem Fall kontrolliert β -CAT zusammen mit TCF die Expression von OPG, das über einen kompetitiven Mechanismus mit RANK die Entstehung des Osteoklasten steuert [94].

1.5 Die Familie der Heparin-bindenden Polypeptide

1.5.1 Struktur, Vorkommen und Funktionen

PTN (auch HB-GAM, OSF-1, HBNF genannt) und MK bilden eine hochkonservierte, eigenständige Familie von Wachstumsfaktoren, die untereinander eine ca. 45%-ige Homologie ihrer Aminosäuresequenz besitzen und mit Heparin- und Chondroitinsulfatketten der extrazellulären Matrix assoziieren [95, 96]. Beide Proteine bestehen aus zwei Domänen, die von Disulfidbrücken gehalten werden und jeweils in drei antiparallele β -Faltblattstrukturen unterteilt sind [97, 98]. PTN wurde bei der Analyse neuronaler Wachstumsfaktoren im Rattengehirn und MK bei der Untersuchung Retinolsäure-induzierter Faktoren für die Zelldifferenzierung entdeckt [99, 100]. Wachstumsfaktoren kontrollieren die Entwicklung eines Gewebes, indem sie das Wachstum, die Differenzierung und das Überleben vieler Zelltypen regulieren. Erste Untersuchungen postulierten für beide Proteine zunächst eine Rolle in der Embryogenese und in der Tumorentwicklung [101-103]. Jedoch

scheinen die beiden Moleküle auch im Knochengewebe eine besondere Funktion zu besitzen. Sie sind in die Frakturheilung und in die Knochenbildung involviert:

Frakturheilungsstudien an murinen Tibien beschrieben immunhistologisch eine verstärkte Expression von MK in Chondrocyten während der Frakturheilung und Knochenentwicklung. Wenn MK in Knorpelzellen überexprimiert wurde, zeigten diese eine erhöhte Chondrogenese [104]. In einem weiteren Knochenfrakturmodell in der Ratte wurde ebenfalls eine erhöhte Menge PTN im neugebildeten Knochengewebe nachgewiesen [105]. *In vivo*-Mausmodelle mit einer PTN-Überexpression wiesen eine erhöhte Knochendichte auf [106, 107], wohingegen die PTN-Defizienz keinen Einfluss auf die Knochenbildung und Mineralisierung hatte [108]. Des Weiteren wurde der Verlust der Knochenmasse nach Ovariectomie in Mäusen durch PTN-Überexpression kompensiert. Dies unterstreicht die knochenanabole Wirkung dieses Proteins [109]. PTN förderte in *in vitro*-Versuchen die Proliferation und Differenzierung osteoblastärer MC3T3-E1-Zellen [110] und induzierte die Proliferation, Differenzierung und Knochenbildung humaner Vorläuferzellen [111]. Wie eine Studie zur murinen embryonalen Zahnentwicklung beschrieb, scheint der Effekt von MK auf die Proliferation von anderen Wachstumsfaktoren in der direkten Umgebung der betroffenen Zellen abhängig zu sein [112].

1.5.2 Rezeptoren und Signaltransduktionswege

Potentielle Rezeptoren für die beiden Heparin-bindenden Proteine (siehe auch Abbildung 1.6) sind sowohl die Syndecan-Rezeptoren, insbesondere SYN-3 [113-115] als auch PTPR ζ 1 [116, 117] und ALK [118, 119]. Für MK wurde zusätzlich LRP, der ein Modulator des WNT/ β -CAT-Signaltransduktionsweges ist, als Rezeptor beschrieben [120].

Syndecan-Rezeptoren sind membranständig, der zytosolische Teil kann einen Kinasenkomplex binden, der die Kinasen c-SRC und FYN sowie das c-SRC-Substrat *Cortactin* enthält. Bei einer Bindung von PTN an den Rezeptor wird dieser Komplex aktiviert und könnte über einen regulatorischen Einfluss auf das Zytoskelett die Zellmobilität und Morphologie verändern [121, 122].

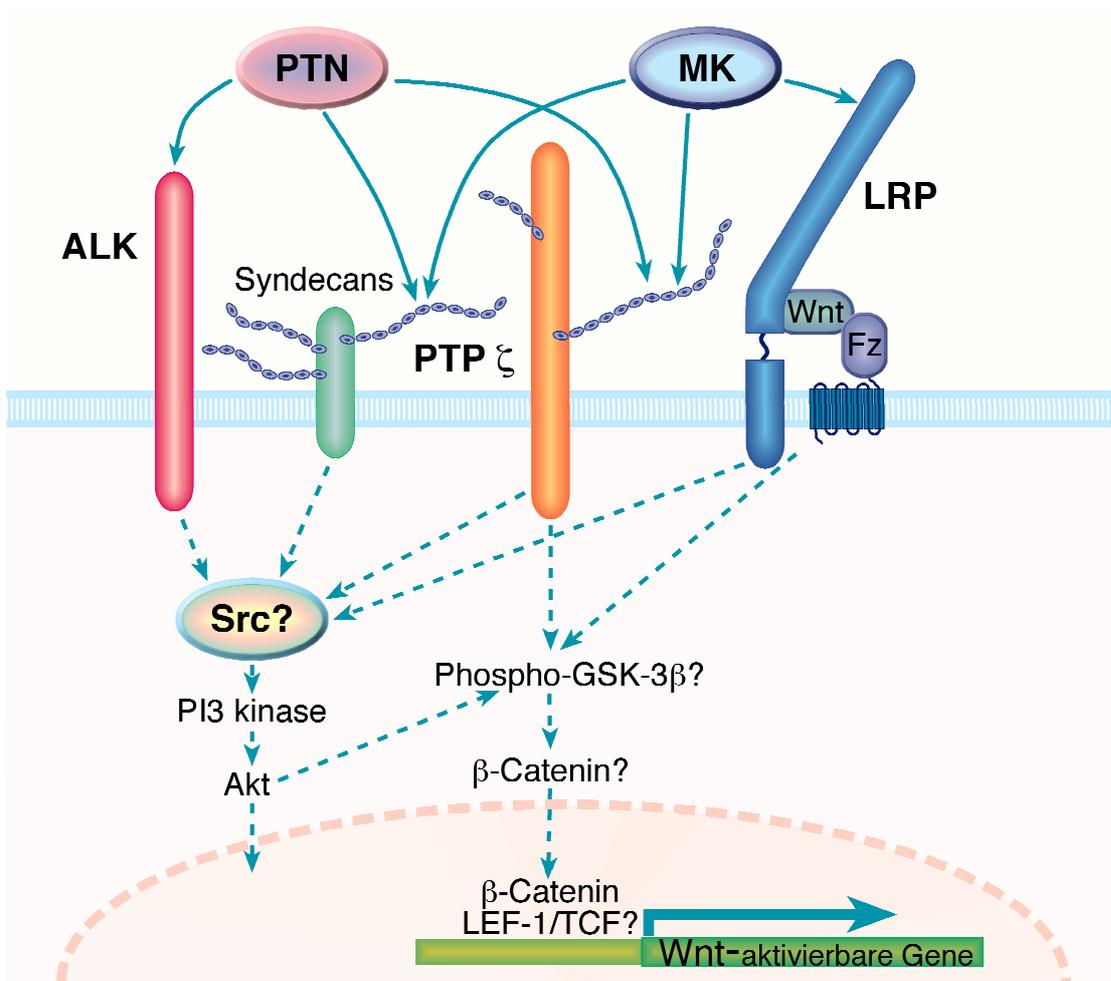


Abbildung 1.6

Potentielle Rezeptoren für PTN und MK. AKT, *Thymoma viral proto-oncogene 1*, ALK, Anaplastic Lymphoma Kinase; Fz, Frizzled; GSK-3, *Glycogen synthase Kinase*; LEF-1, *Lymphoid enhancer-binding factor 1*; LRP, *Low density lipoprotein receptor-related protein*; MK, Midkine; PI3 Kinase, *Phosphatidylinositol 3 Kinase*; PTN, Pleiotrophin; PTP ζ , Protein Tyrosin Phosphatase Rezeptor-Typ ζ ; Src, TCF, *T cell factor*; Wnt, zusammengesetzte Abkürzung aus *Wingless* und *Integration 1*.

Kuo et al. wiesen nach, dass für den wachstumsfördernden Effekt der MK/ALK Interaktion die Aktivierung von IRS-1 und NF κ B notwendig ist [123]. PTN kann über die Phosphorylierung von ALK die Phosphorylierung des anti-apoptischen Proteins AKT fördern und so zum Beispiel das Wachstum von neuronalen Tumorzellen induzieren [124]. In fibroblastären Zellen wird der anti-apoptotische Effekt der PTN/ALK-Interaktion über die Aktivierung der PI3-Kinase und MAPK gefördert [125].

Die Bindung von MK an PTP ζ 1 unterdrückt die Apoptose embryonaler Neuronen nach Serumentzug. Über Versuche mit Inhibitoren konnte festgestellt werden, dass dieser Effekt ebenfalls über SRC weitervermittelt wird [126]. Eine Interaktion von MK oder PTN mit PTP ζ 1 induziert die haptotaktische Migration von Osteoblasten-ähnlichen Zellen und

aktiviert hierzu die PI3-Kinase und PKC. MK kann zusätzlich über PTPR ζ 1 die MAPK aktivieren [127]. PTN kann über die Bindung von PTPR ζ 1 vermutlich den WNT/ β -CAT-Signaltransduktionsweg modulieren, indem es die Phosphorylierung von β -CAT reguliert [128]. Durch diese Phosphorylierung kann auch die Assoziation von β -CAT mit N-Cadherin unterbunden werden. Dieser Komplex beeinflusst die Zell-Zell-Adhäsion und führt über einen Umbau des Zytoskeletts wahrscheinlich zu einer erhöhten Zellmigration [129].

Für MK konnte bereits eine Interaktion mit den Rezeptoren LRP1 und LRP6 nachgewiesen werden. Die Bindung von MK an LRP1 fördert das Zellwachstum und für die Interaktion von MK mit LRP6 wurde PTPR ζ 1 als Korezeptor nachgewiesen [126, 130].

Da die LRP-Rezeptoren als Bestandteil des Rezeptorkomplexes mit Frizzled im WNT/ β -CAT-Signaltransduktionsweg eine Rolle spielen und PTPR ζ 1 ebenfalls diesen Signaltransduktionsweg modulieren kann, könnte ein Zusammenhang zwischen den beiden Proteinen PTN und MK der Familie der Heparin-bindenden Polypeptide und dem WNT/ β -CAT-Signaltransduktionsweg bestehen.

1.6 Ziel der Arbeit

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass der komplexe Prozess der osteogenen Reifung einer Knochenzelle die Aktivität unterschiedlicher Faktoren zu spezifischen Zeitpunkten voraussetzt, von denen bisher lediglich ein kleiner Anteil untersucht ist. Auch die Mechanotransduktion im Zusammenhang mit der Differenzierung in Knochenzellen ist noch unzureichend analysiert. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte ein Schwerpunkt auf die Bedeutung der Heparin-bindenden Polypeptide PTN und MK sowie des WNT/ β -CAT-Signaltransduktionsweges in der Differenzierung und in der Mechanotransduktion von osteoblastären Zellen gelegt werden.

Im Einzelnen sollten folgende Fragen beantwortet werden:

1. Wie verändert sich die Genexpression der beiden Wachstumsfaktoren PTN und MK sowie von Genen des WNT-Signaltransduktionsweges während der osteogenen Differenzierung von MC3T3-E1-Zellen und osteoblastären Zellen aus Mauskalvarien?
2. Sind diese Gene auch durch mechanische Belastung beeinflussbar?
3. Zeigen PTPR ζ 1-Knockout-Zellen Veränderungen bezüglich der Differenzierung und der Mechanotransduktion im Vergleich zum Wildtyp?
4. Welchen Einfluss hat MK auf die Proliferation und Mechanotransduktion muriner primärer osteoblastärer Zellen?

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Zellen

MC3T3-E1- Zellen

Die von den Calvarien-Zellen embryonaler C57BL/6-Mäuse abgeleitete, präosteoblastäre Zelllinie MC3T3-E1 wurde von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH in Braunschweig (Deutschland) bezogen.

Primärzellen

Murine primäre osteoblastäre Zellen wurden in unseren Laboren aus den Kalvarien von neonatalen C57BL/6 Mäusen, die im universitären Tierforschungszentrum gehalten wurden, isoliert. Murine PTPR ζ 1-*Knockout*-Zellen sowie die entsprechenden Wildtyp-Zellen wurden im Rahmen einer Kooperation (DFG AM 103/10-1, 19 18/3-1) von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. M. Amling aus dem Universitätsklinikum in Hamburg-Eppendorf zur Verfügung gestellt.

2.1.2 Zellkulturmedien

Alle Zellen wurden in Alpha-MEM mit entsprechenden Zusätzen kultiviert (Tabelle 2.1). Für die primären osteoblastären Zellen wurde das FCS zusätzlich für 30 min bei 56 °C Hitze inaktiviert.

Tabelle 2.1 Zellkulturmedien

Zusätze im Expansionsmedium	
Penicillin/Streptomycin	100 U/ml, 100 µg/ml
L-Glutamin	2 mM
FCS	10 %
Zusätze im Differenzierungsmedium	
Penicillin/Streptomycin	100 U/ml, 100 µg/ml
L-Glutamin	2 mM
FCS	10 %
β-Glycerophosphat	10 mM
Ascorbat-2-phosphat	0,2 mM

2.1.3 Oligonukleotide (*Primer*)

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma MWG (Ebersberg, Deutschland) hergestellt (Tabelle 2.2).

Tabelle 2.2 Oligonukleotide

Zielgen	Sequenz
AP	links: 5'-GCT GAT CAT TCC CAC GTT TT-3' rechts: 5'-GAG CCA GAC CAA AGA TGG AG-3'
β -CAT	links: 5'-GAT TCG AAA CCT TGC CCT TT-3' rechts: 5'-GTC GTG GAA TAG CAC CCT GT-3'
BSP	links: 5'-GAA GCA GGT GCA GAA GGA AC-3' rechts: 5'-GAA ACC CGT TCA GAA GGA CA-3'
c-FOS	links: 5'-CCA GTC AAG AGC ATC AGC AA-3' rechts: 5'-ATG ATG CCG GAA ACA AGA AG-3'
GAPDH	links: 5'-ACC CAG AAG ACT GTG GAT GG-3' rechts: 5'-GGA TGC AGG GAT GAT GTT CT-3'
H4	links: 5'-ATG TCA GGA CGA GGA AAA GG-3' rechts: 5'-CTT GGT AAT GCC CTG GAT GT-3'
KOLL-1	links: 5'-GCT GCA TAC ACA ATG GCC TA-3' rechts: 5'-TCA AGC ATA CCT CGG GTT TC-3'
LEF-1	links: 5'- TCA TCA CCT ACA GCG ACG AG-3' rechts: 5'- TGA CAT CTG ACG GGA TGT GT-3'
LRP6	links: 5'-TCA CTG AGT GCG AAG ACC AC-3' rechts: 5'-CTG GCA CAC TGG AAC TGA GA-3'
MK	links: 5'-AGA CCA TCC GCG TGA CTA AG-3' rechts: 5'-GGC TTT GGT CTT TGA CTT GG-3'
OC	links: 5'-GCG CTC TGT CTC TCT GAC CT-3' rechts: 5'-ACC TTA TTG CCC TCC TGC TT-3'
PTN	links: 5'-GAC CTC AAT ACC GCC TTG AA-3' rechts: 5'-GGC TTG GAG ATG GTG ACA GT-3'
PTPR ζ 1	links: 5'-AAT CCC GGG AAA AGG TAA TG-3' rechts: 5-TGG GTC ACT CTG ATC CAC AA-3'
RUNX-2	links: 5'-CCA CCA CTC ACT ACC ACA CG-3' rechts: 5'-CAC TCT GGC TTT GGG AAG AG-3'
SYN-3	links: 5'-ATA CTG GAG CGG AAG GAG GT-3' rechts: 5'-GTA GAT GAG CAG CGT GAC CA-3'

2.1.4 Kits

Tabelle 2.3 Kits

Bezeichnung	Verwendung	Hersteller	Ort
β -Galactosidase Enzyme Assay System	Transfektion	Promega	Madison, USA

Alkaline Phosphatase Staining Kit	Immunhistologie	Sigma	Deisenhofen, Deutschland
FuGENE® Transfection Kit	Transfektion	Roche	Indianapolis, USA
HotStarTaq Master Mix Kit	PCR	Qiagen	Hilden, Deutschland
Luciferase Assay System	Transfektion	Promega	Madison, USA
Omniscript RT Kit	cDNA-Synthese	Qiagen	Hilden, Deutschland
Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG	Real-time-PCR	Invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
Qiafilter Plasmid Midi Kit	Plasmid-Isolierung	Qiagen	Hilden, Deutschland
RNase Free DNase Set	RNA-Isolierung (DNA-Abbauenzym)	Qiagen	Hilden, Deutschland
RNeasy Mini Kit mit Qia Shredder	RNA-Isolierung	Qiagen	Hilden, Deutschland
TOPO TA Cloning Kit	Klonierung	Invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
X-Gal Staining Kit	Transfektion	Biosciences	Marseille, Frankreich

2.1.5 Lösungen und Puffer

Tabelle 2.4 Lösungen und Puffer

Bezeichnung	Verwendung	Zusammensetzung
Fixiernatriumlösung	Von Kossa-Färbung	5 % w/v Natriumthiosulfat-Pentahydrat
Kollagenverdaulösung	Isolation primärer Osteoblasten	Alpha-MEM 0,1 % Kollagenase Typ Ia 0,2 % Dispase sterilfiltrieren
Lysepuffer	RNA-Isolation	RLT-Puffer (Qiagen) 143 mM β -Mercaptoethanol
MTT-Lösung	MTT-Test	0,5 % w/v MTT in PBS, steril filtriert
Pyrogalluslösung	Von Kossa-Färbung	1 % w / v Pyrogallol
Silbernitratlösung	Von Kossa-Färbung	5 % w/v Silbernitrat
TAE-Puffer	Agarose-Gelelektrophorese	40 mM Tris/Essigsäure, pH 8,0 1 mM EDTA

2.1.6 Chemikalien

Tabelle 2.5 Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller / Vertrieb	Ort
β -Glycerophosphat (Dinatriumsalz)	Sigma	Deisenhofen, Deutschland

β -Mercaptoethanol	Fluka	Buchs, Schweiz
Agarose	Invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
Alpha-MEM	Biochrom	Berlin, Deutschland
Ampicillin	Sigma	Deisenhofen, Deutschland
Ascorbat-2-phosphat (Sesquimagenesium Salz)	Sigma	Deisenhofen, Deutschland
Basenpaarleiter (100 bp)	Gibco BRL	Karlsruhe, Deutschland
Basenpaarleiter (5000 bp)	Applichem	Darmstadt, Deutschland
Dispase	Roche	Indianapolis, USA
DMSO	Serva	Heidelberg, Deutschland
EDTA	Merck	Darmstadt, Deutschland
Eisessig	Merck	Darmstadt, Deutschland
Ethanol absolut	Merck	Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid	Serva	Heidelberg, Deutschland
FCS	PAA Laboratories	Pasching, Österreich
Formaldehyd	Merck	Darmstadt, Deutschland
Glycerin	Merck	Darmstadt, Deutschland
Glycin	Fluka	Buchs, Schweiz
Haematoxylinlösung	Chroma	Münster, Deutschland
Hefeextrakt	Gibco BRL	Karlsruhe, Deutschland
Kollagenase Typ Ia	Sigma	Deisenhofen, Deutschland
Ladepuffer (6x)	Sigma	Deisenhofen, Deutschland
L-Glutamin	Biochrom	Berlin, Deutschland
Methanol	Merck	Darmstadt, Deutschland
Midkine (human, rekombinant)	Dianova	Hamburg, Deutschland
MTT	Fluka	Buchs, Schweiz
Natriumchlorid	Riedel-de Haen	Seelze, Deutschland
Natriumhydroxid	Merck	Darmstadt, Deutschland
Natriumphosphat	Baker	Gross-Gerau, Deutschland
Paraformaldehyd	Merck	Darmstadt, Deutschland
PBS	PAA Laboratories	Pasching, Österreich
Penicillin/Streptomycin	Gibco BRL	Karlsruhe, Deutschland
Pyrogallol	Merck	Darmstadt, Deutschland
Salzsäure	Merck	Darmstadt, Deutschland
Select Agar	Gibco BRL	Karlsruhe, Deutschland
Select Yeast Extract	Gibco BRL	Karlsruhe, Deutschland
Silbernitrat	Roth	Karlsruhe, Deutschland
TopFlash-Vektor (TCF-Reporter-Plasmid)	Upstate	Hamburg, Deutschland
Tris	Merck	Darmstadt, Deutschland
Triton X-100	Merck	Darmstadt, Deutschland
Trypan Blau	Sigma	Deisenhofen, Deutschland
Trypsin/EDTA 0,05 %/0,02 %	Biochrom	Berlin, Deutschland

2.1.7 Restriktionsenzyme

Alle verwendeten Restriktionsenzyme wurden von Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) bezogen (Tabelle 2.6).

Tabelle 2.6 Restriktionsenzyme

Bezeichnung Restriktionsenzym
EcoRI + Puffer 3
MluI + Puffer 3
NcoI + Puffer 3
PstI + Puffer 3
SspI + Puffer 6

2.1.8 Geräte

Tabelle 2.7 Geräte

Bezeichnung	Modellbezeichnung	Hersteller	Ort
Bildverarbeitungssoftware	AnalySIS	Soft Imaging System	Münster, Deutschland
Brutschrank	Hera Cell 240	Heraeus	Hanau, Deutschland
Digitale Kamera	Coolpix 950	Nikon	Düsseldorf, Deutschland
Digitalkamera	IX70	Olympus	Hamburg, Deutschland
DNA-Workstation	UV Cleaner UVC/T-AR	Kisker	Steinfurt, Deutschland
ELISA-Reader	Versamax	Molecular Devices	Ismaning, Deutschland
Geldokumentationsgerät	75S03227	Biorad	München, Deutschland
Gelelektrophoresekammer	Horizon11-14	Life Technologies GmbH	Karlsruhe, Deutschland
iCycler	Optical Module	Biorad	München, Deutschland
Luminometer	Centro LB 960 DLReady	Bertholt Technologies	Bad Wildbad, Deutschland
Magnetrührer	RCT basic	IKA Labortechnik	Staufen, Deutschland
Mikroskop	IX 70	Olympus	Hamburg, Deutschland
Mikroskop	Axiophot 451887	Zeiss	Oberkochen, Deutschland
PCR-Gerät	Robocycler 96 Gradient Combo	Stratagene	Amsterdam, Holland
Spektralphotometer	Ultrospec Plus	Pharmacia LKB	Freiburg, Deutschland
Wärmeschüttler	SM-30	EB Labortechnik	Hechingen, Deutschland
Wasserbad	1012	GFL	Burgwedel, Deutschland
Zellstimulationsgeräte		Eigenbau	Ulm, Deutschland

Zellstimulationsgerät

Zur Applikation zyklischer, uniaxialer Reize in unterschiedlichen Frequenzen und Dehnungsamplituden wurde in unserer Arbeitsgruppe ein Zellstimulationsgerät (Abbildung 2.1) entwickelt [131]. In dieses Gerät können zellbesiedelte Silikonschalen eingespannt und mit Hilfe eines motorgesteuerten, rotierenden Exzenters gedehnt werden. Für die Dauer der mechanischen Stimulation (30 min) verblieben das Dehnungsgerät und die Proben im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂.

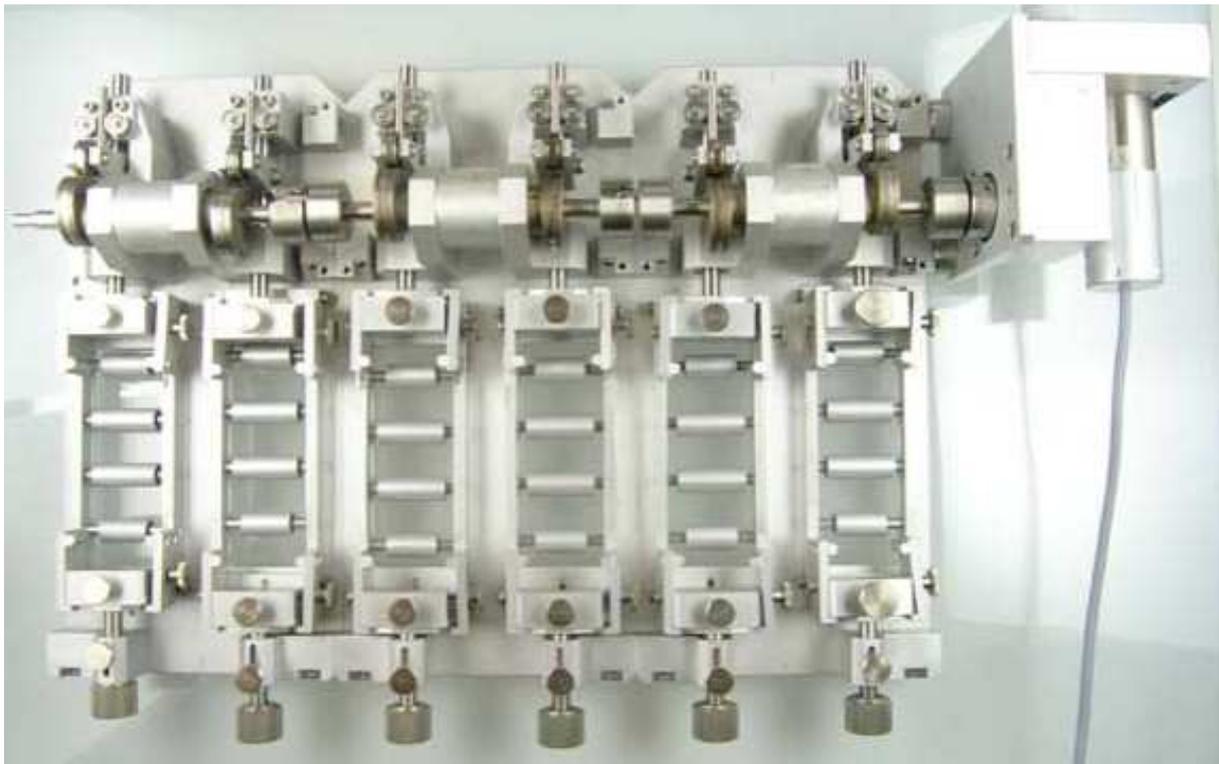


Abbildung 2.1

Zellstimulationsgerät zur Applikation uniaxialer Reize auf die Zellen.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Zelllinie

MC3T3-E1-Zellen wurden im Expansionsmedium bei 37 °C, 5 % CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit kultiviert. Das Kulturmedium wurde zweimal die Woche gewechselt. Mit Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen mit 0,05 % Trypsin/0,02 % EDTA abgelöst und im Verhältnis 1 : 4 gesplittet.

Isolierung und Zellkultur muriner, primärer Osteoblasten aus den Schädeldächern neonataler Mäuse

Das Ziel war die Gewinnung osteoblasten-ähnlicher Zellen nach einer von Mikuni-Takagaki et al. [32] veröffentlichten Methode. In neugeborenen Mäusen ist die Mineralisierung des Knochens noch nicht vollständig abgeschlossen. Folglich können die enthaltenen Knochenzellen durch einen enzymatischen Verdau der Matrix gewonnen werden.

Die jungen Mäuse wurden mit einer scharfen Schere dekapitiert und vor der Präparation zur Desinfektion kurz in 80 % Alkohol getaucht. Mit der Schere wurde über dem Hinterhauptsloch die Haut eingeschnitten und die Haut mit der Pinzette bis zur Nasenwurzel abgezogen. Anschließend wurde die Nasenwurzel mit der Pinzette festgehalten. Mit der Schere wurden zwei Schnitte vom Hinterhauptsloch bis zu den Augen durchgeführt. So ließ sich das Schädeldach hochklappen und abtrennen. Mit dem Skalpell konnten weitere Teile, die nicht zum Schädeldach gehören, entfernt werden. Die Schädeldächer wurden in einem 50-ml-Falconröhrchen in eiskaltem PBS gesammelt.

Nach der Präparation wurde das PBS entfernt, 10 ml Kollagen-Verdaulösung hinzugegeben und der Ansatz für 10 min bei 37 °C geschüttelt. Der Überstand mit der Zellsuspension des ersten Verdauenschrittes wurde vorsichtig abgenommen und verworfen, 10 ml Verdaulösung zur Schädelsuspension hinzugefügt und für den zweiten Verdau 10 min bei 37 °C geschüttelt. Die Verdauenschritte zwei bis fünf wurden zusammengefügt, die gesammelte Zellsuspension mit einem Zell-Filter filtriert und bei 1200 rpm für 6 min zentrifugiert. Die Zellen wurden im Expansionsmedium resuspendiert und in einer Dichte von ca. 15.000 Zellen/cm² ausgesät. Am folgenden Tag wurde ein Medienwechsel durchgeführt, um tote Zellen zu entfernen.

Differenzierung der Zellen

Um eine osteogene Differenzierung sowohl der MC3T3-E1-Zellen als auch der murinen primären osteoblastären Zellen zu induzieren, erhielten die Zellen ab dem vierten Versuchstag, an dem sie in der Regel zu 70–80 % konfluent waren, Differenzierungsmedium. Das Kulturmedium wurde zweimal die Woche ausgetauscht. Die Zellen wurden bei 37 °C, 5 % CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit bis zu 28 Tage kultiviert.

2.2.2 Mechanische Stimulation

Zellen wurden in einer Dichte von 11.000 Zellen/cm² mit 5 ml Expansionsmedium in vorkonditionierte Silikonschalen ausgesät. 24 h vor der mechanischen Stimulation wurde die FCS-Konzentration auf 2 % reduziert. Für die Untersuchungen zum Einfluss von MK wurde die FCS-Konzentration auf 0,5 % reduziert und 10 pg/ml MK dem Kulturmedium hinzugefügt. In allen Versuchsblöcken wurde die Stimulation der Zellen mit 1800 Lastzyklen (entspricht 30 min) bei einer Dehnung von 1 % (10000 μ strain) und einer Frequenz von 1 Hz durchgeführt. Der Versuchsabbruch erfolgte sofort nach der Stimulation.

2.2.3 MTT-Test

Der MTT-Test ist ein kolorimetrisches Verfahren zur Messung der Stoffwechselaktivität vitaler Zellen. MTT-Tetrazolium wird durch mitochondriale Succinatdehydrogenasen zu blauem, wasserunlöslichen MTT-Formazan reduziert.

Die Zellen wurden in einer Dichte von 2000 Zellen/Well in eine 96-Well-Platte ausgesät. Nach Adhäsion der Zellen (2-3 h) wurde das Medium abgesaugt und PTN oder MK in einer Konzentration von 1 pg/ml im Kulturmedium mit 0,5 % FCS hinzugefügt. Der Ansatz wurde für zwei bzw. fünf Tage bei 37 °C, 5 % CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit kultiviert. Darauf folgend wurden 10 μ l MTT-Lösung zu jedem Well hinzugefügt und die Platten für weitere 4 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellplatten für 10 min bei 4000 rpm zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgekippt. Der Niederschlag wurde in 100 μ l DMSO gelöst und die optische Dichte im ELISA-Reader bei 550 nm gemessen.

2.2.4 Immunhistologie

Histochemischer Nachweis von Alkalischer Phosphatase-Aktivität

Die Färbungen wurden sowohl an Zellen in Silikonschalen als auch an Zellen in Sechs-Well-Platten durchgeführt. Dazu wurden die Zellen einmal mit PBS gespült und dann nach Anweisung des Herstellers mit Hilfe des Alkaline Phosphatase Staining-Kit mittels einer Zitrat-Aceton-Formaldehyd-Lösung fixiert und unter Zugabe eines Alkalifarbstoffgemisches gefärbt. Eine Gegenfärbung erfolgte mit Hämatoxilinlösung.

Von Kossa-Färbung

Bei der von Kossa-Färbung wird das Kalzium in Phosphaten und Karbonaten gegen Silberionen ausgetauscht und dadurch kalziumhaltige Strukturen braunschwarz angefärbt. Mit Hilfe dieser Methode konnte Mineralisierung in osteogen differenzierten Zellen nachgewiesen werden.

Die Färbung wurde mit Zellen in Silikonschalen und mit Zellen in Sechs-Well-Platten durchgeführt. Dazu wurden die Zellen zweimal mit PBS gespült, für 10 min mit 4 % Paraformaldehyd fixiert, mit PBS gespült und für 15 min in Silbernitratlösung inkubiert. Nach einem weiteren Spülschritt mit Aqua dest. erfolgte eine 10-minütige Inkubation in Pyrogalluslösung mit anschließendem Aqua dest.-Waschschritt. Zuletzt wurden die Zellen für 5 min in Fixiernatriumlösung inkubiert und mit Leitungswasser gespült.

2.2.5 Nachweis der Veränderungen der Genexpression auf mRNA-Ebene

Um Veränderungen in der Menge der mRNA nach mechanischer Stimulation zu messen, wurde die Gesamt-RNA einer Versuchsprobe aus den Zellen isoliert und mittels reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Anhand dieser Probe konnten *Real-Time-PCR*-Untersuchungen durchgeführt werden. Für den Nachweis der Genexpression wurden für jedes Gen spezifische Oligonukleotide (*Primer*) auf Basis publizierter Sequenzen (PubMed Datenbank) mit Hilfe eines speziellen Computerprogramms (Primer3 V.04.0, Whitehead Institute for Biomedical Research, USA) entworfen. Diese *Primer* wurden in der *Real-Time-PCR* eingesetzt, um die Intensität der Expression eines Zielgens zu bestimmen. Die Expression des Zielgens wurde anhand einer Eichgeraden quantifiziert und auf die ebenfalls mittels einer Eichgeraden quantifizierte Expression des *Housekeeping*-Gens GAPDH

(Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) normiert. Für die Erstellung einer Eichgeraden wurde eine 1 : 10 Verdünnungsreihe mit einer Startkonzentration von 0,1 µg/µl mit der Plasmid-DNA, die die zu amplifizierende Sequenz enthielt, hergestellt. Die Plasmid-DNA wurde durch Klonierung des gewünschten PCR-Stücks in einen pCR4-TOPO-Vektor, anschließende Transformation in kompetente E.coli Bakterien, Vermehrung und nach Isolierung, Sequenzanalyse und Linearisierung erhalten.

Gesamt-RNA-Isolation

Die Zellen wurden bei Versuchsabbruch einmal mit PBS gewaschen, sofort in RLT-Puffer mit Mercaptoethanol aufgenommen und eingefroren. Die weitere Aufarbeitung erfolgte über Affinitätsbindung an Silica-Gel-Membranen mit Hilfe des RNeasy Mini-Kit mit Qia Shredder nach den Anweisungen des Herstellers. Die Probe wurde mit Hilfe einer Shredder-Säule lysiert und für die Anbindung an die RNeasy-Affinitäts-Säule mit 70 % Ethanol versetzt. Nach einem DNase-Verdau und mehreren Waschschritten wurde die Gesamt-RNA von der Säule eluiert, die Quantität und die Qualität bei 260/280 nm photometrisch bestimmt und die RNA bei -80 °C gelagert.

cDNA-Synthese

Zur Untersuchung der Expression von Genen mittels PCR wird die mRNA als Matrize für die Synthese einer komplementären DNA (cDNA) benutzt, da diese gegenüber einem Abbau in Lösung stabiler ist als die mRNA. Für die Synthese wird das Enzym Reverse Transkriptase benötigt, welches eine RNA-abhängige DNA-Polymeraseaktivität besitzt. Oligo-dT-Primer und Random-Hexamer-Primer dienen als Startpunkt für die cDNA-Synthese. Für die Synthese von cDNA aus 1 µg RNA in einem 20 µl-Ansatz wurde der Omniscript-Kit verwendet. Zuerst wurde die RNA-Lösung (1 µg RNA in RNase-freiem Aqua dest.) mit Wasser auf ein Volumen von 12 µl aufgefüllt und dann 5 min bei 65°C im PCR-Gerät denaturiert. Zum Reaktionsansatz wurden 2 µl Reaktionspuffer (10-fache Konzentration), 2 µl dNTPs (5 mM), 1 µl RNase Inhibitor (10 U/µl; Sigma: 40 U/ml), 1 µl Oligo-dT-Primer (0,1 mM), 1 µl Random-Hexamer-Primer (1 mM) und 1 µl Omniscript (4 U) pipettiert und sorgfältig gemischt. Die cDNA Synthese erfolgte im PCR-Gerät erst 60 min bei 37 °C, dann 60 min bei 42 °C.

Standard-PCR

Die Standard-Polymerase Kettenreaktion diente zur semiquantitativen Quantifizierung und für die Amplifikation von Sequenzen als Ausgangspunkt für Klonierungsreaktionen. Für die Synthese wurde der HotStarTaq Master Mix-Kit nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Dazu wurden cDNA (ca. 100 ng), Primer-Mix (0,5 μ M) und 10 μ l PCR-Mix zusammenpipettiert, mit Aqua dest. auf ein Gesamtvolumen von 20 μ l aufgefüllt und in die PCR-Maschine gestellt. Das PCR-Protokoll startete mit einer initialen Enzymaktivierung von 14 min bei 95 °C, darauf folgend 32 Zyklen mit Denaturierung von 1 min bei 94 °C, Annealing von 45 s bei 60 °C, Extension von 1 min bei 72 °C und eine finale Extension für 20 min bei 72 °C.

Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine Methode, mit der DNA-Moleküle mit Hilfe eines elektrischen Feldes nach ihrer Größe aufgetrennt werden können.

In der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode verwendet, um Produkte der Standard-PCR, der *Real-Time*-PCR und aufgereinigte Plasmid-DNA auf ihre Größe und Reinheit zu überprüfen. Für die PCR-Produkte, deren Größe zwischen 80 und 150 bp lag, wurde ein 3%-iges Agarose-Gel hergestellt, die ca. 4000 bp grosse Plasmid-DNA wurde in einem 1%-igen Agarose-Gel untersucht. Dafür wurden 3 g bzw. 1 g Agarose abgewogen und mit 100 ml TAE-Puffer in der Mikrowelle für 3 min aufgekocht, bis die Agarose gelöst war. Nach einem ersten Abkühlen der Agarose-Lösung wurde Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,1 μ g/ml zugegeben. Die Agarose wurde dann nach Einsetzen des gewünschten Gel-Kamms in den Gelschlitten gegossen. Nach vollständigem Gelieren wurde der Gelschlitten mit dem Gel in die Elektrophoresekammer eingesetzt und das Gel mit TAE-Puffer bedeckt. Die Proben wurden mit dem sechsfachen Gel-Lade-Puffer gemischt und nach vorsichtigem Auftragen von 10 μ l Probenvolumen in die Geltaschen bei Elektrophoresebedingungen von ca. 85–110 V für 30–60 min aufgetrennt. Die DNA Banden wurden unter UV-Licht mit einem Geldokumentationsgerät analysiert. Für die semiquantitative Quantifizierung wurde ein Bild des Agarose-Gels abgespeichert und mit Hilfe der Gel Doc 2000 Software (Gel-Dokumentationssystem, BIO-RAD) ausgewertet.

Real-Time-PCR

Das Prinzip der *Real-Time*-PCR beruht auf der Quantifizierung des PCR-Produktes über die mit der Menge des PCR-Produktes proportionalen Zunahme des DNA-bindenden

Fluoreszenzfarbstoffs (SYBR Green) während der einzelnen PCR-Zyklen. Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe der Standard-DNA die zusammen mit den zu untersuchenden Proben amplifiziert wurden. Um die Konzentration der DNA in den Proben zu bestimmen, wurden diese stets auf das Housekeeping-Gen GAPDH normiert.

Für die Auswertung mittels *Real-Time-PCR* wurde der Platinum SYBR Green Supermix-Kit nach Angaben des Herstellers verwendet. Nach Mischen der Lösung wurden 23 µl des Mixes pro *Well* vorgelegt und 2 µl der bis 1 : 4 verdünnten unbekanntes cDNA-Probe, Standard-cDNA oder Aqua dest. ergänzt, wobei alle Proben in Doppelbestimmungen aufgetragen wurden. Für die *Real-Time-PCR* im i-Cycler wurde folgendes Protokoll eingesetzt (Tabelle 2.8):

Tabelle 2.8 Protokoll für die *Real-Time-PCR*

Schritt	Zyklenzahl	Temperatur	Dauer
1. Initiale Denaturierung	1	95 °C	8 min 30 s
2. Denaturierung/ Annealing/Elongation	38	95 °C 60 °C	1 min 1min
3. Erstellung der Schmelzkurve	76	60 °C 15 °C	8 s Ende
4. Ende			

2.2.6 Herstellung der Standard-DNA für die *Real-Time-PCR*

Mit Hilfe des TOPO TA Cloning-Kit wurde die cDNA der einzelnen Zielgene, die mit Hilfe spezifischer Primerpaare durch PCR amplifiziert wurde, in einen Plasmid-Vektor (pCR4-TOPO) eingefügt. Die isolierte Plasmid-Vektor-DNA kann dann als Standard für die *Real-Time-PCR* verwendet werden. Das Plasmid, in das das spezifische Amplifikationsprodukt kloniert wurde, enthält ein Ampicillin-Resistenzgen. Bakterien, die das Plasmid aufgenommen hatten, wurden gegen Ampicillin resistent und konnten auf ampicillinhaltigem Nährboden wachsen. Die Plasmid-DNA der positiven Klone wurde nach ihrer Vermehrung und Isolation mittels Sequenzanalyse durch die Firma GATC Biotech in Konstanz kontrolliert. Anschließend wurde das Plasmid durch ein spezifisches Restriktionsenzym, das das enthaltene Insert nicht schneidet, linearisiert und als Standard in einem Konzentrationsbereich von 0,0001-100.000 pg/µl für die *Real-Time-PCR* eingesetzt.

Herstellung der Agar-Platten und des LB-Mediums

Für die Herstellung des LB-Mediums wurden 10 g Bactotrypton, 5 g Hefeextrakt und 10 g Natriumchlorid mit 1 l destilliertes Wasser (pH 7,0) gemischt und autoklaviert. Nach Abkühlen des Mediums wurde das Antibiotikum (50 µg/ml) zur selektiven Anreicherung der Ampicillin-resistenten Bakterienklone zugegeben. Für die Herstellung der Agarplatten wurden zu dem gleichen Ansatz noch 15 g Bacto-Agar zugegeben und der warme, noch flüssige Agar wurde unter der Sterilbank in sterile Petrischalen gegossen, die bis zur vollständigen Gelierung und Trocknung leicht geöffnet blieben.

Klonierungsreaktion und Transformation der Bakterien

Für jeden Ansatz wurde das entsprechende PCR-Produkt nach Angaben des Herstellers in den pCR4-TOPO-Vektor kloniert. Pro Ansatz wurde 1 µl PCR-Produkt, 1 µl TOPO-Vektor (pCR 4-TOPO), 1 µl Salzlösung und 2 µl steriles H₂O zu einem Reaktionsansatz zusammenpipettiert und vorsichtig gemischt. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur. Für die sich anschließende Transformation wurde der Reaktionsansatz auf Eis gestellt oder über Nacht bei -20 °C gelagert. Die Transformation des kompetenten E.coli Bakterienstammes (Top10 One Shot Chemical Competent E.coli) erfolgte ebenfalls nach dem Protokoll des Herstellers. Für die Transformation wurde der kompetente E. coli Bakterienstamm vorsichtig auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe von 2 µl des Transformationsansatzes zu dem Bakterienstamm und vorsichtigem Mischen erfolgte die Transformation der Zellen mittels Hitzeschock für 30-45 s bei 42 °C im Heizblock. Der Ansatz wurde anschließend sofort auf Eis überführt und mit 250 µl SOC-Medium für 1 h bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt. 50 und 200 µl der transformierten Bakterien wurden anschließend auf vorgewärmten, ampicillinhaltigen LB-Agar-Platten mit einem sterilen Drigalskispatel ausplattiert. Die Ansätze wurden im Brutschrank bei 37 °C über Nacht inkubiert.

Bakterienkultur

Die erfolgreich transformierten Bakterien wurden weiter vermehrt, indem von jeder LB-Platte eine Kolonie gepickt und in ein Röhrchen mit 5 ml LB-Medium überführt wurde. Die Kulturen wurden für ca. 8 h bei 37 °C und 250 rpm geschüttelt. Um die Klonierung zu überprüfen, wurde mit den zugehörigen Primerpaaren eine Standard-PCR mit 1 µl Bakteriensuspension durchgeführt und das Reaktionsprodukt auf einem Agarosegel aufgetrennt. Positive Vorkulturen wurden in 100 ml LB-Medium in Erlenmeyerkolben

überführt und für 12-16 h bei 37 °C und 250 rpm inkubiert. Aus diesen Bakterien wurde am nächsten Tag die Plasmid-DNA isoliert.

Isolation der Plasmid-DNA

Die Isolierung der Plasmide erfolgte mit Hilfe des Plasmid Midi-Kits nach Protokoll des Herstellers mit Hilfe der Affinitäts-Bindung über eine Säule. Die Bakterienkulturen wurden abzentrifugiert, der Überstand dekantiert und die Bakterien mit dem Puffersystem des Herstellers resuspendiert, lysiert und neutralisiert. Das Lysat wurde filtriert und die Plasmid-DNA an Affinitätssäulen gebunden. Nach einem Waschschrift wurde die DNA, eluiert und mit Isopropanol präzipitiert. Das DNA-Pellet wurde in Aqua dest. aufgenommen. Zur Quantifizierung und Überprüfung der Reinheit wurde die erhaltene DNA im Photometer bei 260 und 280 nm gemessen. Die isolierte Plasmid-DNA wurde auf das enthaltene Insert durch Sequenzierung (GATC, Konstanz) überprüft. Zusätzlich wurde die Funktionalität der Standards für die *Real-Time*-PCR im iCycler überprüft.

Linearisierung des Plasmids

Für die Verwendung der Plasmid-DNA als Standardreihe in der *Real-Time*-PCR musste die Plasmid-DNA mittels geeigneter Restriktionsenzyme linearisiert werden. Die Restriktionsenzyme wurden so ausgewählt, dass das Insert nicht zerschnitten wird. Für die Restriktion wurden 10 µg Plasmid-DNA mit 1 µl Restriktionsenzym (10 U/µl), und 1 µl zehnfacher Reaktionspuffer gemischt und mit H₂O auf 10 µl Endvolumen aufgefüllt. Der Reaktionsansatz wurde 1 h bei 37 °C inkubiert und das Enzym für weitere 10 min bei 65 °C hitzeinaktiviert. Von diesem Ansatz wurden Verdünnungen in einem Konzentrationsbereich von 100.000-0,0001 pg/µl erstellt, welche dann als Standardreihe für die *Real-Time*-PCR dienten.

2.2.7 Transfektion

Die Transfektion beschreibt das Einschleusen fremder DNA mittels physikalischer oder biochemischer Verfahren in eukaryontische Zellen. In der vorliegenden Arbeit wurde ein chemisches Verfahren, die Lipofektion angewendet. Bei der Lipofektion werden Plasmide, die das gewünschte Gen enthalten, mit Hilfe von Liposomen in eukaryontische Zellen eingebracht. Mit dieser Methode ist es z.B. möglich, Funktionsanalysen von bestimmten

Genabschnitten mit Hilfe von Reportervektoren beziehungsweise von Proteinen mit Hilfe von Expressionsplasmiden durchzuführen. In dieser Arbeit wurde der TopFlash-Vektor eingesetzt, der Bindungsstellen für den über den WNT-Signaltransduktionsweg aktivierten Transkriptionsfaktor TCF besitzt. Durch die Bindung des Transkriptionsfaktors an die entsprechende Bindungsstelle der Promoterregion im Reportervektor wird das nachgeschaltete Reportergen aktiviert. Als Reportergen diente das Enzym Luciferase, das somit indirekt über die Enzymaktivität die Aktivität des TCF anzeigte. Zur Normierung der gemessenen Aktivität und zur Bestimmung der Transfektionseffizienz wurde der pSV- β -Gal-Control-Vektor zusammen mit dem Reportervektor in die Zellen transfiziert.

Transfektion von MC3T3-E1-Zellen und primären osteoblastären Zellen

Für die Transfektion wurden die Zellen in einer Dichte von 22.000 Zellen/cm² ausgesät. Für die Transfektion wurde das FuGENE 6 Transfection-Reagenz nach dem Protokoll des Fabrikanten verwendet. Die Transfektionsansätze enthielten 94 μ l Serum-freies Medium, 6 μ l FUGENE-Reagenz und jeweils 2 μ g DNA der entsprechenden Vektoren. Der TopFlash-Vektor wurde mit dem pSV- β -Gal-Control-Vektor kotransfiziert. Die Transfektion erfolgte, indem die Transfektionsansätze tropfenweise den Zellen zugegeben wurden. Die mechanische Stimulation der Zellen wurde am zweiten Tag nach der Transfektion, 24 h nach der Serumreduktion auf 2 % durchgeführt. Sofort nach Stimulationsende wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen, in 400 μ l Reporter-Lysis-Puffer aufgenommen, auf Trockeneis überführt und nach dem Auftauen für 2 min bei 12.000 x g und 4 °C zentrifugiert.

Bestimmung der Luciferaseaktivität

Die Proben wurden mit dem Luciferase Assay System-Kit nach Anleitung des Herstellers aufgearbeitet und die Luciferaseaktivität im Luminometer gemessen. Dazu wurden die Zellen lysiert, Zellbestandteile abzentrifugiert und der Überstand in 96-Well-Platten pipettiert. Im Luminometer wurde das Luciferase-Assay-Reagenz automatisch hinzugefügt und die Aktivität der Luciferase über die Intensität der Lumineszenz gemessen. Die Luciferaseaktivität wurde auf die β -Galaktosidase-Aktivität normalisiert.

Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität

Zur Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität wurde der β -Galactosidase Enzyme Assay System-Kit nach Protokoll des Herstellers verwendet und die Enzymaktivität kolorimetrisch mit Hilfe einer Standardreihe im Spektrophotometer bestimmt. Dazu wurden 50 μ l Zelllysat

in eine 96-Well-Platte pipettiert, 50 µl 2x Assay Puffer hinzugefügt und die Proben für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach Abstoppen der Reaktion durch Zugabe von 150 µl 1M Natrium-Carbonat-Lösung wurde die Absorption bei 420 nm im ELISA-Reader gemessen.

Bestimmung der Transfektionseffizienz

Zur Bestimmung der Transfektionseffizienz wurde der X-Gal Staining-Kit nach Herstellerangaben benutzt. Dazu wurden die Zellen mit PBS gewaschen, fixiert und mit X-Gal-Lösung inkubiert. Die Detektion der blauen Zellen erfolgte unter dem Lichtmikroskop. In zufällig ausgewählten Feldern wurden die blauen und die ungefärbten Zellen ausgezählt und der Prozentsatz gefärbter Zellen von der Gesamtzellzahl berechnet.

2.2.8 Statistik

Für die statistische Überprüfung des mechanischen Stimulationseffekts und des Effekts der Differenzierung der Zellen durch Kultivierung mit Differenzierungsmedium wurde der Wilcoxon-Rangsummen-Test verwendet, ein nicht-parametrisches Verfahren, das für nicht normalverteilte, ungepaarte Variablen und kleine Stichproben geeignet ist. Ein nichtparametrisches Verfahren ist bei kleinen Stichproben, wie es in diesen Experimenten der Fall war geeigneter. Wird ein parametrisches Verfahren verwendet, obwohl keine Normalverteilung vorhanden ist, sind die erhaltenen Resultate nicht mehr zuverlässig.

Unabhängige Experimente wurden viermal in doppelten oder dreifachen Kulturansätzen durchgeführt. Die mittels *Real-Time*-RT-PCR ermittelte Expression der ausgewählten Gene wurde immer zuerst auf die Expression des *Housekeeping*-Gens GAPDH normiert. Um die Veränderung der Genexpression zwischen stimulierten Ansätzen und Kontrollansätzen verschiedener Zeitpunkte zu berechnen, wurde der Quotient der Genexpression der stimulierten Proben und der zugehörigen Kontrolle gebildet.

Die Nullhypothese nahm den Wert eins an, falls kein Unterschied in der Genexpression von stimulierten Ansätzen und Kontrollansätzen war. Die Hypothese wurde mit dem Wilcoxon-Rangsummen-Test beurteilt. Das Signifikanzniveau wurde auf 5 % festgelegt, d.h. bei einem p-Wert von $< 0,05$ wurde die Nullhypothese abgelehnt. In den Diagrammen wurden signifikante Ergebnisse jeweils mit einem Sternchen (*) markiert. In dieser Arbeit wurden im Boxplot-Diagramm das Maximum, der Bereich vom 75. Perzentil zum 25. Perzentil, der Median und das Minimum dargestellt.

3. ERGEBNISSE

3.1 Differenzierung osteoblastärer Zellen

3.1.1 Histologischer Nachweis der AP-Aktivität und der Mineralisierung in Kulturen von MC3T3-E1-Zellen und primären osteoblastären Zellen aus Mauskalvarien

Die AP-Aktivität von in Silikonschalen kultivierten MC3T3-E1-Zellen wurde über den Kultivierungsverlauf hinweg histochemisch nachgewiesen (Abbildung 3.1, A-E). Als Vergleich dienten die Kulturen am Tag 5. Ab dem 14. Tag der Differenzierung konnte eine schwache AP-Aktivität detektiert werden, deren Intensität sich am Tag 21 und 28 verstärkte.

Des Weiteren wurde die Mineralisierung der Osteoblastenkulturen mit Hilfe der von Kossa-Färbung nachgewiesen (Abbildung 3.1, F-J). Als Kontrolle dienten die Kulturen am Tag 5 des Kultivierungsverlaufs. Differenzierende MC3T3-E1-Zellkulturen waren in der Lage eine mineralisierte Matrix zu bilden. 14 Tage nach Induktion der Differenzierung konnte Mineral nachgewiesen werden. Die Menge stieg im weiteren Kultivierungsverlauf stetig an, war jedoch inhomogen über den Zellrasen verteilt.

Die AP-Aktivität der Kulturen primärer osteoblastärer Zellen aus Mauskalvarien wurde am Tag 14 überprüft und der histochemische Nachweis der aktiven AP war hier deutlich stärker als in den MC3T3-E1-Zellkulturen am Tag 14 (Abbildung 3.2 C).

In den primären osteoblastären Zellenkulturen konnten bereits am Tag 7 kleine mineralisierte Bereiche nachgewiesen werden. Am Tag 28 konnte eine stärkere Mineralisierung als in den MC3T3-E1-Zellkulturen am Tag 28 detektiert werden (Abbildung 3.2 A und B). Deutlich erkennbar war die inhomogene Differenzierung der Zellkulturen innerhalb einer Silikonschale.

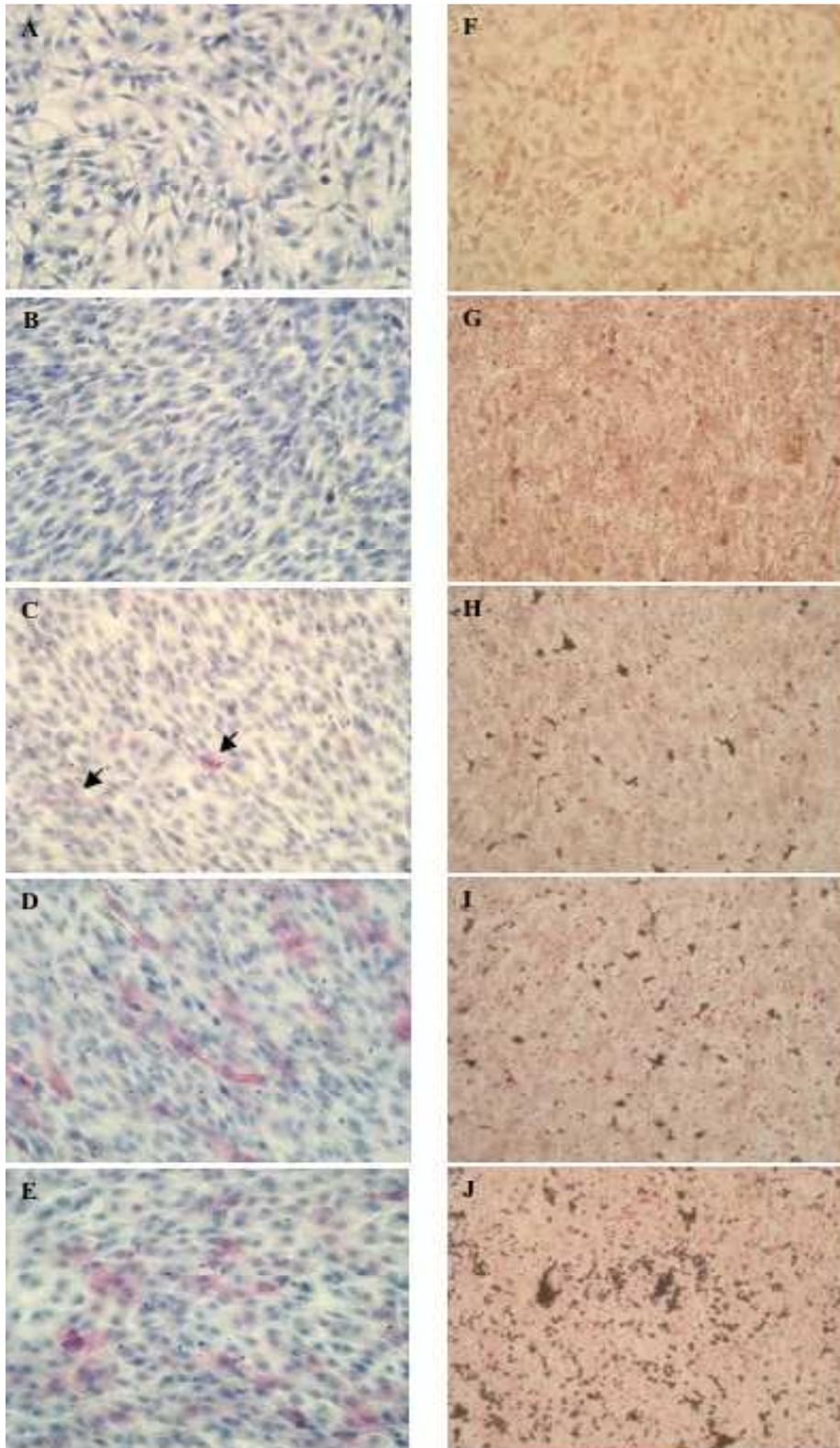


Abbildung 3.1

Histochemische Färbungen an Kulturen von MC3T3-E1-Zellen. Linke Spalte: AP-Nachweis (A-E). Rechte Spalte: Nachweis der Mineralisierung mit der von Kossa-Färbung (F-J). Zellen wurden für 5 Tage im Expansionsmedium (A/F) und anschließend für 2 (Tag 7, B/G), 9 (Tag 14, C/H), 16 (Tag 21, D/I) und 23 (Tag 28, E/J) Tage im Differenzierungsmedium kultiviert. Die Pfeile in Abbildung C weisen auf eine positive AP-Färbung hin. Die Bilder wurden mit einer 200-fachen Vergrößerung aufgenommen.

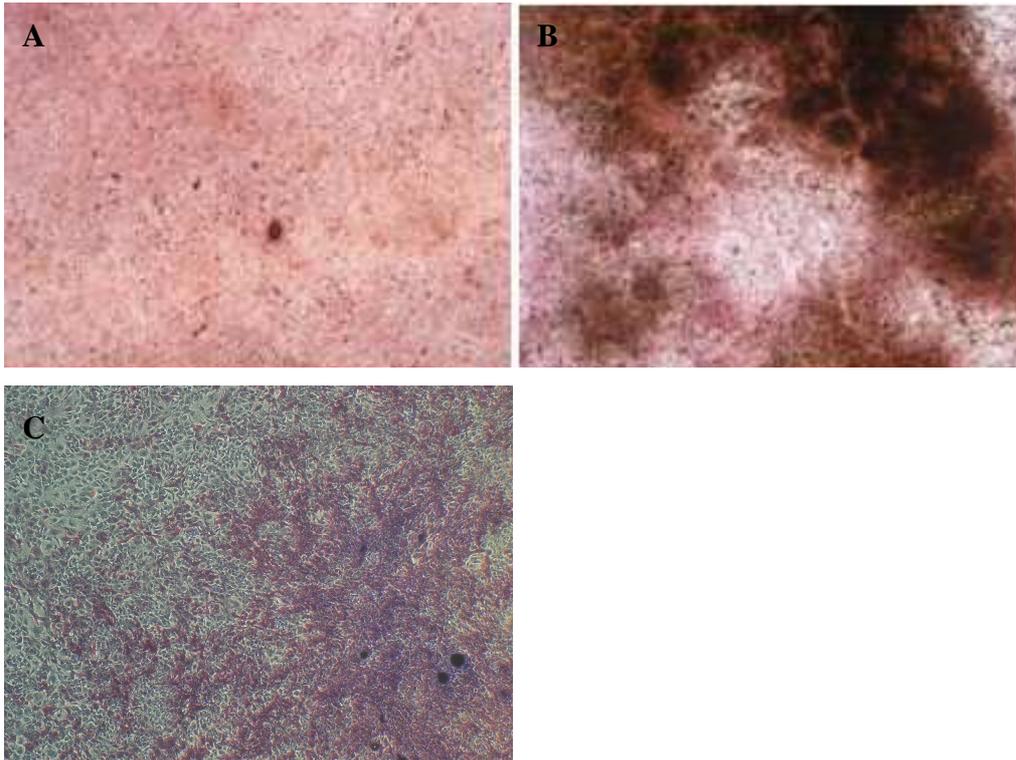


Abbildung 3.2

Histochemische Färbungen an Kulturen von osteoblastären Zellen aus Mauskalvarien. Bilder A und B: Nachweis der Mineralisierung mit der von Kossa-Färbung. Bild C: Histochemischer AP-Nachweis. Zellen wurden für 5 Tage im Expansionsmedium und anschließend für 2 (Tag 7, A), 9 (Tag 14, C) und 23 (Tag 28, B) Tage im Differenzierungsmedium kultiviert. Die Bilder wurden mit einer 40-fachen Vergrößerung aufgenommen.

3.1.2 Veränderung der Expression osteogener Markergene im Kultivierungsverlauf von MC3T3-E1-Zellen

Die osteogene Differenzierung in MC3T3-E1-Zellkulturen wurde auch über die Veränderung der relativen Expression der osteoblastären Marker AP und RUNX-2 mittels quantitativer *Real-Time-PCR* charakterisiert (Abbildung 3.3).

Die Expression von AP war am 5. und am 7. Tag der Kultivierungsperiode so gering, dass sie mittels *Real-Time-PCR* nicht bestimmt werden konnte, stieg aber signifikant am 14., 21. und 28. Tag der Kultivierung an. RUNX-2 war am Tag 7 des Kultivierungsverlaufs signifikant erhöht und erreichte am 14. Tag ein Maximum mit einer Verdoppelung der mRNA-Expression im Vergleich zu den undifferenzierteren Zellen am Tag 5.

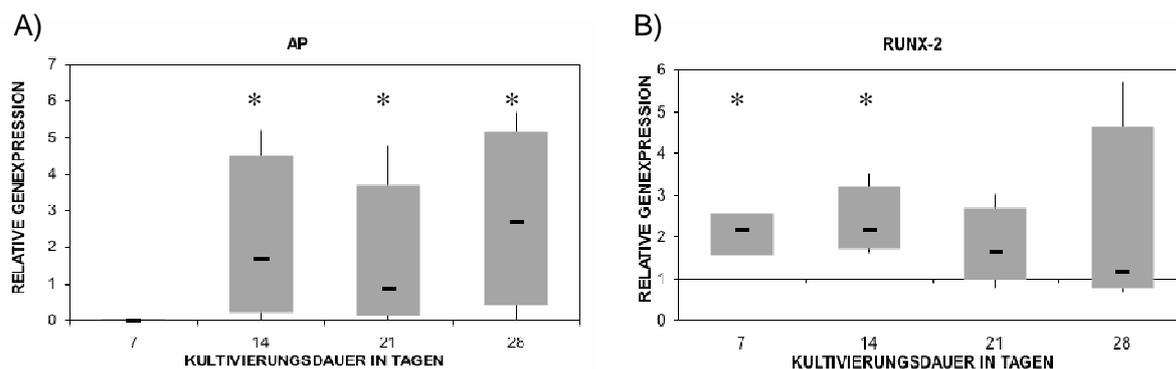


Abbildung 3.3

Quantitative Expressionsanalyse mittels *Real-Time-PCR*. In Boxplots dargestellt ist die Expression der Gene, die an der Osteoblastendifferenzierung beteiligt sind (n=4). MC3T3-E1-Zellen wurden für 5 Tage im Expansionsmedium und anschließend für 2 (7), 9 (14), 16 (21) und 23 (28) Tage im Differenzierungsmedium kultiviert. Zur Normalisierung wurde die Expression von GAPDH herangezogen. * : $p \leq 0,05$.

A) Da AP am Tag 5 (= undifferenzierte Kontrolle) nicht nachweisbar war, sind hier die Absolutwerte dargestellt. AP, alkalische Phosphatase.

B) Dargestellt ist der Quotient der Genexpression der differenzierten Probe und der undifferenzierten Kontrolle am Tag 5 (Kontrolllinie = 1). RUNX-2, *Runt-related transcription factor 2*

Die Gene OC, BSP und H4 waren für *Real-Time-PCR*-Analysen in den MC3T3-E1-Zellkulturen unter den gegebenen Versuchsbedingungen nicht ausreichend exprimiert. KOLL-1, OP und c-FOS wiesen im Kultivierungsverlauf in ihrer Expression keine signifikanten Veränderungen auf.

3.1.3 Veränderung der Expression von PTN, MK und Genen des WNT/ β -CAT-Signaltransduktionsweges im Kultivierungsverlauf von MC3T3-E1-Zellen

Die relative Expression von PTN, MK und Genen des WNT/ β -CAT-Signaltransduktionsweges in MC3T3-E1-Zellkulturen wurde im Zeitverlauf der Differenzierung mittels quantitativer *Real-Time-PCR* analysiert (Abbildung 3.4).

Die Expression von PTN und MK war am Tag 7 im Vergleich zu den nicht-differenzierten Kontrollen leicht erhöht und erreichte am Tag 14 eine signifikante maximale Expression. Ein ähnliches Expressionsmuster wiesen die beiden Gene des WNT/ β -CAT-Signaltransduktionsweges LRP6 und β -CAT im Kultivierungsverlauf auf. Die maximale Expression war ebenfalls am Tag 14 mit einer zweifachen Erhöhung gegenüber den nicht-differenzierten Zellkulturen erreicht.

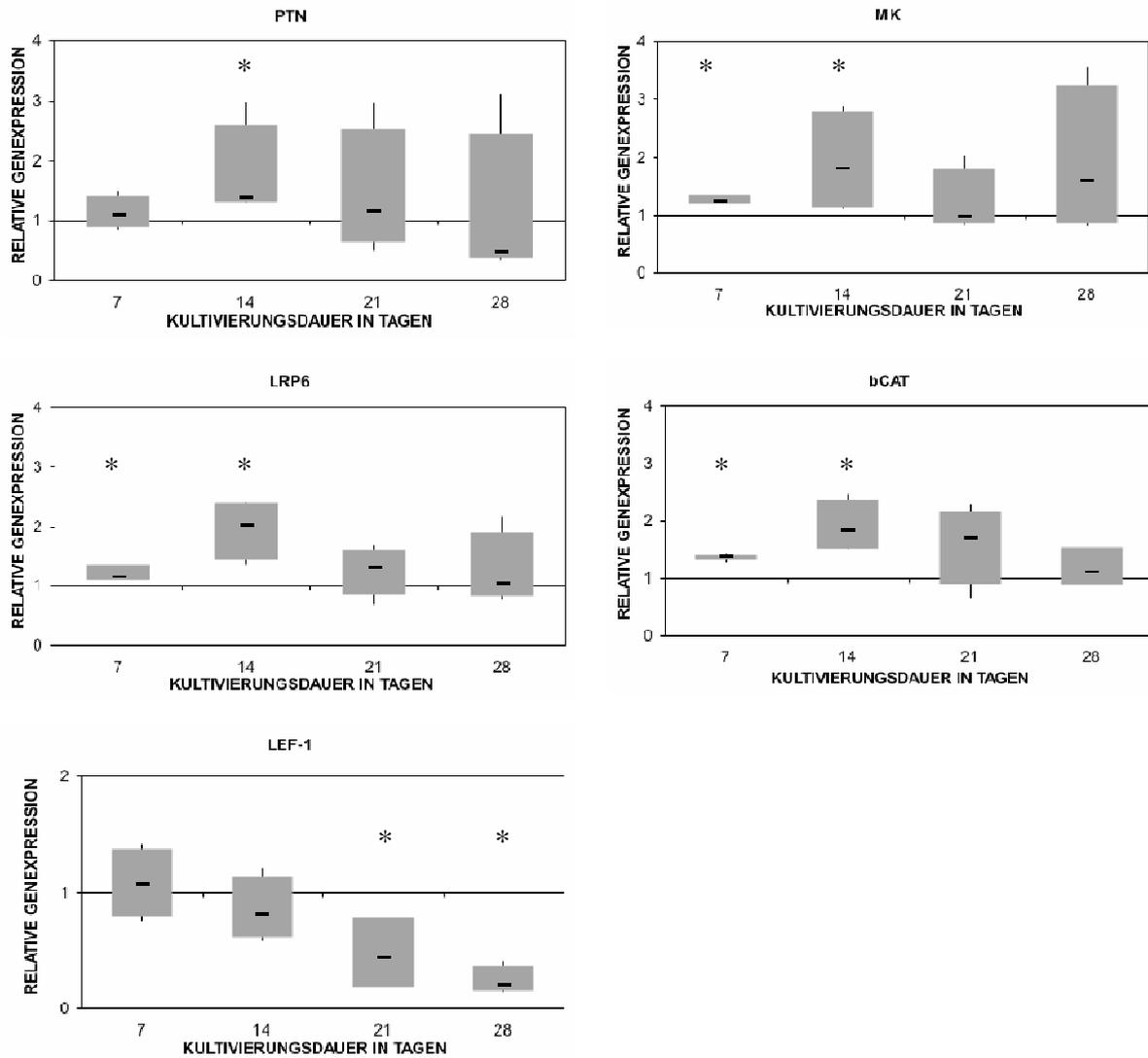


Abbildung 3.4

Quantitative Expressionsanalyse mittels *Real-Time-PCR*. In Boxplots dargestellt ist die Expression der Gene PTN, MK und die Gene des WNT/ β -CAT-Signaltransduktionsweges (n=4). MC3T3-E1-Zellen wurden für 5 Tage im Expansionsmedium (Kontrolllinie = 1) und anschließend für 2 (7), 9 (14), 16 (21) und 23 (28) Tage im Differenzierungsmedium kultiviert. Zur Normalisierung wurde die Expression von GAPDH herangezogen und anschließend der Quotient der Genexpression der differenzierten Probe und der undifferenzierten Kontrolle am Tag 5 gebildet. * : $p \leq 0,05$.

bCAT, beta-Catenin; LEF-1, *enhancer-binding factor 1*; LRP6, *Low density lipoprotein receptor-related protein 6*; MK, Midkine; PTN, Pleiotrophin.

Die Expression des Transkriptionsfaktors LEF-1 erniedrigte sich im Kultivierungsverlauf stetig und war am Tag 21 und 28 signifikant um die Hälfte reduziert. Unter den gegebenen Versuchsbedingungen veränderte sich die Expression von SYN-3 nicht signifikant und das Gen PTPR ζ 1 war für *Real-Time-PCR*-Analysen in den MC3T3-E1-Zellkulturen nicht ausreichend exprimiert.

3.1.4 Veränderung der Expression osteogener Markergene im Kultivierungsverlauf von primären osteoblastären Zellen aus Mauskalvarien

Die osteogene Differenzierung der primären osteoblastären Zellen aus Mauskalvarien wurde über die Veränderungen der relativen Expression der osteoblastären Markergene AP, RUNX-2 und BSP und des Proliferationsmarkergens H4 mittels quantitativer *Real-Time-PCR* charakterisiert (Abbildung 3.5).

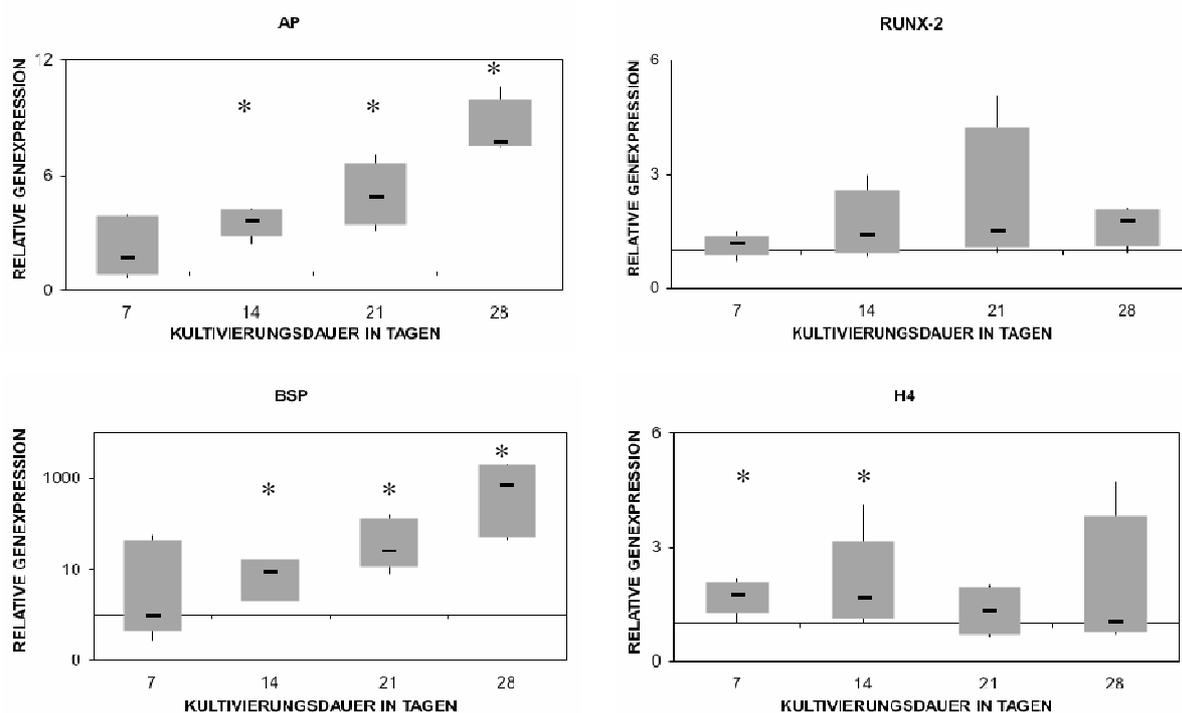


Abbildung 3.5

Quantitative Expressionsanalyse mittels *Real-Time-PCR*. In Boxplots dargestellt ist die Expression der Gene, die an der Osteoblastendifferenzierung beteiligt sind (n=4, bei BSP logarithmische Achse). Primäre osteoblastäre Zellen aus Mauskalvarien wurden für 5 Tage im Expansionsmedium (Kontrolllinie = 1) und anschließend für 2 (7), 9 (14), 16 (21) und 23 (28) Tage im Differenzierungsmedium kultiviert. Zur Normalisierung wurde die Expression von GAPDH herangezogen und anschließend der Quotient der Genexpression der differenzierten Probe und der undifferenzierten Kontrolle am Tag 5 gebildet. * : $p \leq 0,05$. AP, alkalische Phosphatase; BSP, Bone Sialoprotein; H4, Histon 4; RUNX-2, *Runt-related transcription factor 2*

Die Expression der Markergene AP und BSP wurde über den Kultivierungsverlauf ab Tag 14 signifikant erhöht, die Expression von BSP am Tag 28 sogar um das ca. 1000-fache. Die RUNX-2-Expression stieg tendenziell an. Die Expression des Proliferationsmarkers H4 war zu Beginn der Differenzierung noch signifikant erhöht, an den Kultivierungstagen 21 und 28 jedoch wieder auf die Expression der undifferenzierten Proben erniedrigt. Die Expression der

Gene KOLL-1, OP und c-FOS wies im Kultivierungsverlauf unter den gegebenen Versuchsbedingungen keine signifikanten Veränderungen auf. Das Gen OC war für Analysen mit *Real-Time-PCR* in den Kulturen primärer osteoblastärer Zellen aus Mauskalvarien unter den gegebenen Bedingungen nicht ausreichend exprimiert.

3.1.5 Veränderung der Expression von PTN, MK, PTPR ζ 1 und Genen des WNT/ β -CAT-Signaltransduktionsweges im Kultivierungsverlauf von primären osteoblastären Zellen aus Mauskalvarien

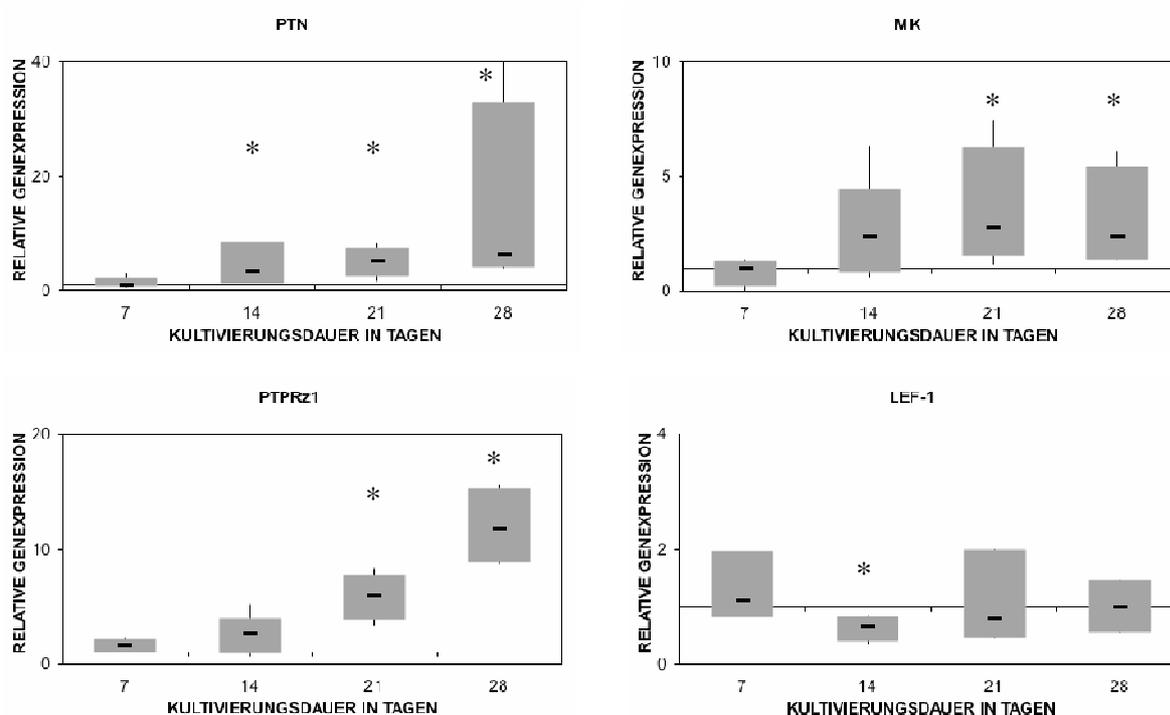


Abbildung 3.6

Quantitative Expressionsanalyse mittels *Real-Time-PCR*. In Boxplots dargestellt ist die Expression der Gene PTN, MK, PTPR ζ 1 und LEF-1 (n=4). Primäre osteoblastäre Zellen aus Mauskalvarien wurden für 5 Tage im Expansionsmedium (Kontrolllinie = 1) und anschließend für 2 (7), 9 (14), 16 (21) und 23 (28) Tage im Differenzierungsmedium kultiviert. Zur Normalisierung wurde die Expression von GAPDH herangezogen und anschließend der Quotient der Genexpression der differenzierten Probe und der undifferenzierten Kontrolle am Tag 5 gebildet. * : $p \leq 0,05$. LEF-1, *enhancer-binding factor 1*; MK, Midkine; PTN, Pleiotrophin; PTPR ζ 1, Proteintyrosinphosphatase Rezeptor-Typ ζ 1

Der Einfluss der Differenzierung auf die relative Expression von PTN, MK, PTPR ζ 1 und Genen des WNT/ β -CAT-Signaltransduktionsweges in primären osteoblastären Zellkulturen aus Mauskalvarien wurde mittels quantitativer *Real-Time-PCR* untersucht (Abbildung 3.6).

Die Expression von PTN wurde nach Induktion der Differenzierung ab Tag 14 signifikant um mindestens 5-fach, von MK ab Tag 21 um ca. 2-fach erhöht. Ein weiteres Gen, dessen Expression im Kultivierungsverlauf signifikant um ca. 10-fach induziert wurde, war PTPR ζ 1. LEF-1 wurde am Tag 14 der Differenzierung signifikant schwächer exprimiert. Die Genexpression von LRP6, SYN3 und β -CAT wurde während der Differenzierung unter den gegebenen Versuchsbedingungen nicht signifikant in ihrer Expression beeinflusst.

3.1.6 Zusammenfassung

Histochemisch konnte mittels AP- und von Kossa-Färbung die Differenzierung von MC3T3-E1-Zellkulturen und Kulturen primärer osteoblastärer Zellen aus Mauskalvarien auf Silikon gezeigt werden. In MC3T3-E1-Zellkulturen konnte im Kultivierungsverlauf eine Erhöhung der Expression der Gene AP und RUNX-2 und in den Primärzellkulturen der Gene AP, RUNX-2 und BSP nachgewiesen werden. Des Weiteren wurde in den MC3T3-E1-Zellkulturen die Expression der Gene PTN, MK, LRP6 und β -CAT bis Tag 14, sowie in den Primärzellkulturen die Expression der Gene PTN, MK und PTPR ζ 1 im Kultivierungsverlauf bis Tag 28 induziert. Die Expression des Transkriptionsfaktors LEF-1 erniedrigte sich in den MC3T3-E1-Zellkulturen über den Kultivierungsverlauf hinweg und in den Primärzellkulturen am Tag 14 signifikant.

3.2 Einfluss uniaxialer Dehnung auf osteoblastäre Zellen

3.2.1 Beeinflussung der Genexpression in MC3T3-E1-Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Kultivierung

Die Effekte mechanischer Stimulation auf die Expression von PTN, MK und Genen des WNT/ β -CAT-Signaltransduktionsweges wurden im Zeitverlauf der Kultivierung der MC3T3-E1-Zellen im Differenzierungsmedium analysiert. Mechanosensitive Gene sind in Abbildung 3.7 dargestellt. Die Expression von RUNX-2, SYN-3, β -CAT und LEF-1 veränderte sich nach mechanischer Stimulation unter den gegebenen Versuchsbedingungen nicht signifikant. Während die Expression von PTN in undifferenzierteren Zellen nach mechanischer Stimulation ca. 1,3-fach leicht aber signifikant erhöht wurde, zeigte MK eine signifikante 1,5-

fache Erhöhung der mRNA-Expression am Tag 21 und 28 der Differenzierung. Auch die Expression von LRP6 war am Tag 21 schwach verstärkt. Die Expression von c-FOS war zu jedem Zeitpunkt erhöht und erreichte am Tag 21 ihren Maximalwert.

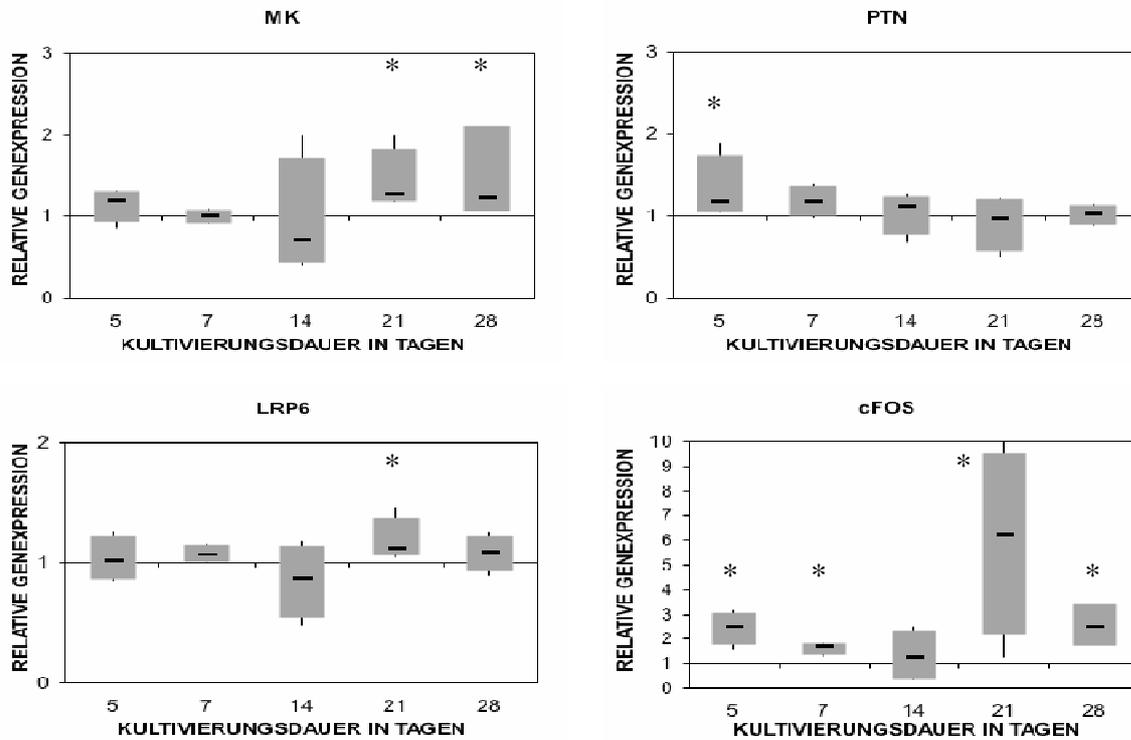


Abbildung 3.7

Quantitative Expressionsanalyse mittels *Real-Time-PCR*. In Boxplots dargestellt ist die Expression der Gene PTN, MK, cFOS und LRP6 (n=4). MC3T3-E1-Zellen wurden für 5 Tage im Expansionsmedium (5) und anschließend für 2 (7), 9 (14), 16 (21) und 23 (28) Tage im Differenzierungsmedium kultiviert. Die mechanische Stimulation erfolgte einmalig (1%, 1 Hz, 30 min) am entsprechenden Differenzierungstag. Zur Normalisierung wurde die Expression von GAPDH herangezogen und anschließend der Quotient der Genexpression der mechanisch stimulierten Probe und der unstimulierten Kontrolle (Kontrolllinie = 1) gebildet. * : $p \leq 0,05$. c-FOS, *FBJ Osteosarcoma Oncogene*; LRP6, *Low density lipoprotein receptor-related protein 6*; MK, *Midkine*; PTN, *Pleiotrophin*.

3.2.2 Beeinflussung der Genexpression in primären osteoblastären Zellen aus Mauskalvarien zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Kultivierung

Mechanische Stimulation mittels uniaxialer Dehnung veränderte in Kulturen primärer osteoblastärer Zellen aus Mauskalvarien die Expression zahlreicher Gene (Abbildung 3.8). Auch die osteogenen Markergene RUNX-2 und BSP waren beeinflussbar.

Die RUNX-2-Expression wurde am Kultivierungstag 5 nach mechanischer Stimulation signifikant leicht erniedrigt, wogegen BSP im fortschreitenden Kultivierungsverlauf am Tag 21 und 28 signifikant um das ca. 2- bis 5-fache erhöht wurde. Die Expression von PTN, MK, PTPR ζ 1 und LEF-1 wurde am Tag 5 nach uniaxialer Dehnung signifikant reduziert. Am Tag 7 wurde die Expression von LEF-1 signifikant erniedrigt.

Im Gegensatz dazu wurde PTN unter mechanischem Einfluss zu diesem Zeitpunkt um das ca. 1,5-fache erhöht. Die Expression von c-FOS wurde im Kultivierungsverlauf nach mechanischer Stimulation zu jedem Zeitpunkt signifikant erhöht. Die ebenfalls untersuchten Gene SYN3, LRP6, β -CAT und H4 wiesen in den primären osteoblastären Zellkulturen aus Mauskalvarien unter diesen Versuchsbedingungen keine signifikanten Veränderungen in ihrer Expression auf.

3.2.3 Zusammenfassung

Die Expression der untersuchten Gene in MC3T3-E1-Zellen und in primären osteoblastären Zellen aus Mauskalvarien konnte zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Differenzierung mittels mechanischer Belastung beeinflusst werden. In den MC3T3-E1-Zellkulturen konnte eine leichte Expressionserhöhung von PTN am Tag 5 sowie von MK und LRP6 in den differenzierteren Zellen festgestellt werden. Die Expression von c-FOS war in den MC3T3-E1-Zellkulturen am Tag 5, 7, 21 und 28 der Kultivierung deutlich erhöht. In den Primärzellkulturen konnte eine leichte Erniedrigung der Expression der Gene RUNX-2, PTN, MK, PTPR ζ 1 und LEF-1 am Tag 5 sowie eine deutliche Erhöhung von c-FOS zu jedem Zeitpunkt und von BSP am Tag 21 und 28 der Kultivierung nachgewiesen werden.

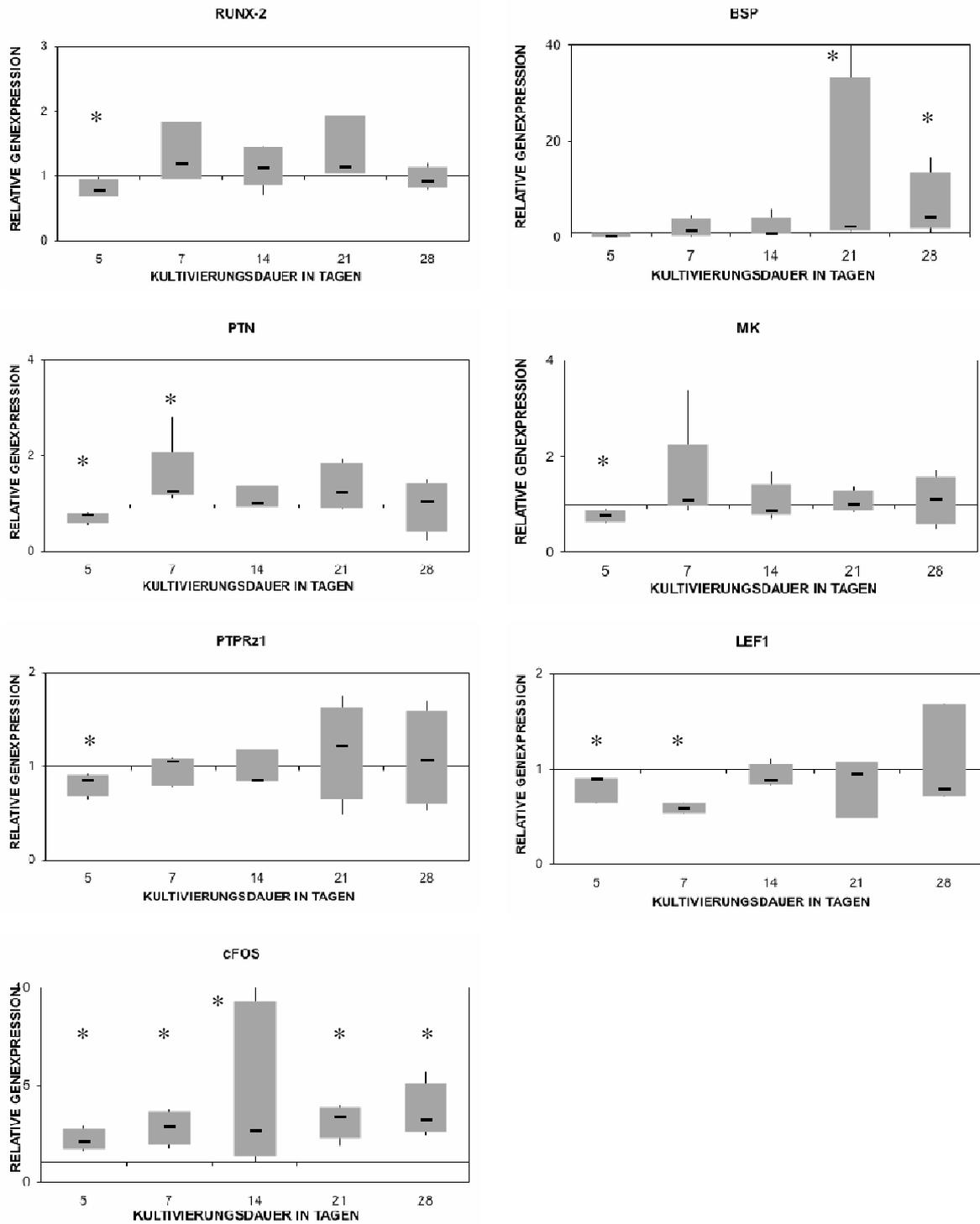


Abbildung 3.8

Quantitative Expressionsanalyse mittels *Real-Time-PCR*. In Boxplots dargestellt ist die Expression der Gene RUNX-2, BSP, PTN, MK, PTPR ζ 1, LEF-1 und cFOS (n=4). Primäre osteoblastäre Zellen aus Mauskalvarien wurden für 5 Tage im Expansionsmedium (5) und anschließend für 2 (7), 9 (14), 16 (21) und 23 (28) Tage im Differenzierungsmedium kultiviert. Die mechanische Stimulation erfolgte einmalig (1%, 1 Hz, 30 min) am entsprechenden Differenzierungstag. Zur Normalisierung wurde die Expression von GAPDH herangezogen und anschließend der Quotient der Genexpression der mechanisch stimulierten Probe und der unstimulierten Kontrolle (Kontrolllinie = 1) gebildet. * : p ≤ 0,05. BSP, Bone Sialoprotein; c-FOS, *FBJ Osteosarcoma*

Oncogene; MK, Midkine; PTN, Pleiotrophin, PTPR ζ 1, Proteintyrosinphosphatase Rezeptor-Typ ζ 1; RUNX-2, *Runt-related transcription factor 2*.

3.4 Untersuchungen an PTPR ζ 1-Knockout-Zellen

3.4.1 Veränderung der Genexpression osteogener Marker im Kultivierungsverlauf von PTPR ζ 1-Knockout-Zellen

Die Expression osteogener Markergene wurde in PTPR ζ 1-Knockout und -Wildtypzellkulturen nach Kultivierung im Standardmedium (bis Tag 5) und im Differenzierungsmedium (Tag 14 und 21) mittels quantitativer *Real-Time-PCR* bestimmt (Abbildung 3.9). Die Expression der untersuchten Gene AP, BSP, RUNX-2 und H4 in den Wildtypzellkulturen im Vergleich zu der Expression in den PTPR ζ 1-Knockout-Zellkulturen unterschied sich in den undifferenzierteren Zellen nicht signifikant voneinander. In beiden Zellkulturen wurde die Expression der osteogenen Marker AP und BSP im Kultivierungsverlauf signifikant erhöht, wobei die *Knockout*-Zellkulturen beide osteogene Marker am Tag 21 tendenziell schwächer exprimierten.

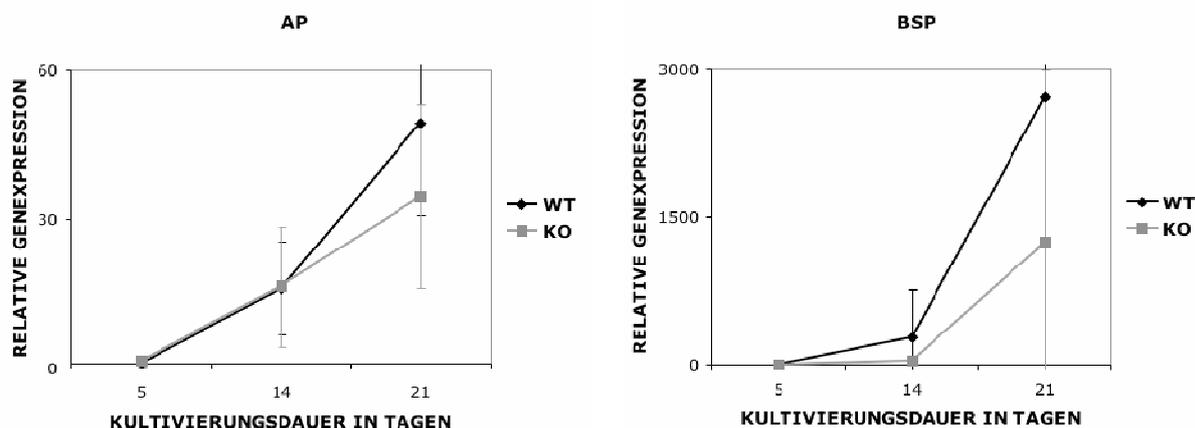


Abbildung 3.9

Quantitative Expressionsanalyse mittels *Real-Time-PCR*. Dargestellt ist die Expression der osteoblastären Marker AP und BSP. Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung im Liniendiagramm (n=4). Murine primäre osteoblastäre Zellen wurden für 5 Tage im Expansionsmedium (Wildtyp-Kontrolllinie = 1) und anschließend für 9 (14) und 16 (21) Tage im Differenzierungsmedium kultiviert. Zur Normalisierung wurde die Expression von GAPDH herangezogen und anschließend der Quotient der Genexpression der differenzierten Probe und der Kontrolle gebildet. Die Expression der *Knockout*-Zellen (KO) ist in Relation zur Expression der Wildtypzellen (WT) am Tag 5 dargestellt. * : $p \leq 0,05$. AP, alkalische Phosphatase; BSP, Bone Sialoprotein.

Die Expression des Transkriptionsfaktors RUNX-2 und des Proliferationsmarkers H4 veränderte sich in beiden Zellkulturen über den Kultivierungsverlauf nicht signifikant. Beide Gene wurden in den zwei Zellkulturen nicht unterschiedlich exprimiert.

3.4.2 Veränderung der Genexpression von PTN, MK, LEF-1 und c-FOS im Kultivierungsverlauf von PTPR ζ 1-Knockout-Zellen

Der Vergleich zwischen PTPR ζ 1-Knockout und -Wildtypzellkulturen mittels quantitativer *Real-Time-PCR* zeigte in der Expression der Gene PTN, MK, LEF-1 und c-FOS im Kultivierungsverlauf weitere Unterschiede (Abbildung 3.10).

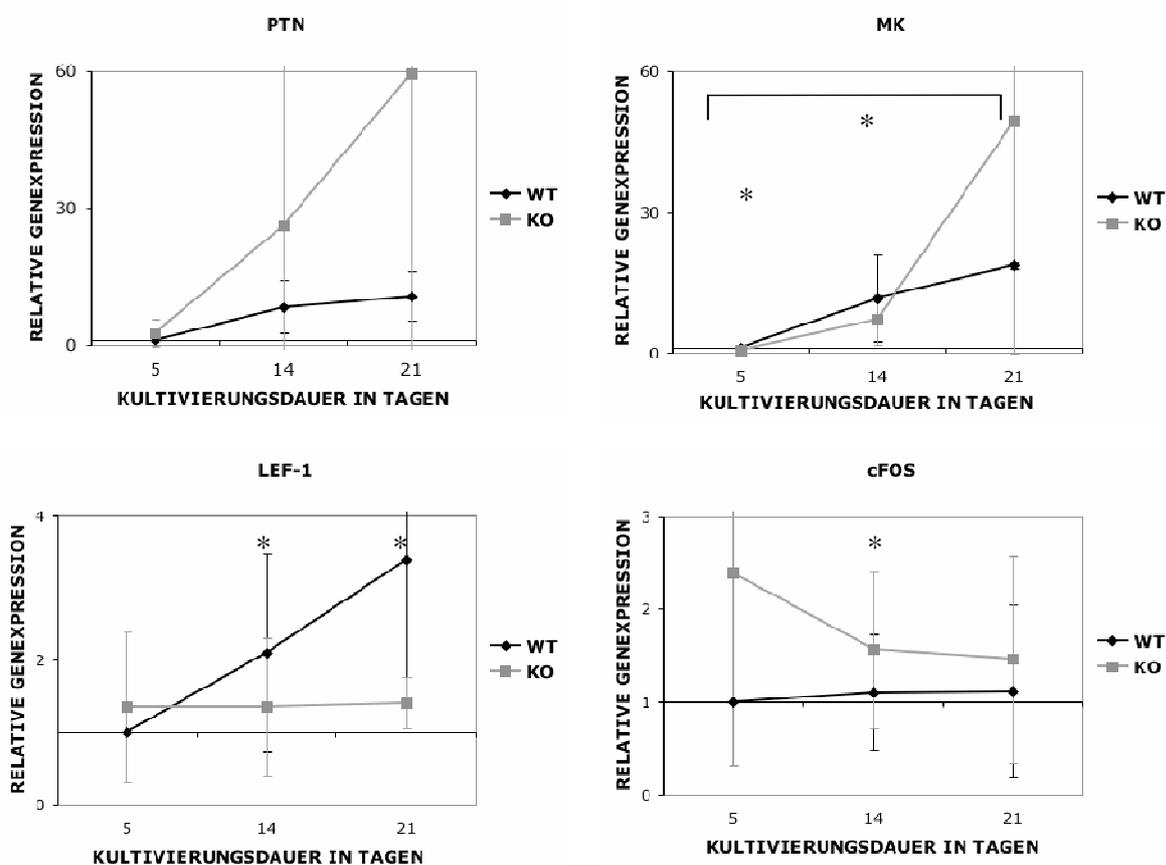


Abbildung 3.10

Quantitative Expressionsanalyse mittels *Real-Time-PCR*. Dargestellt ist die Expression von PTN, MK, LEF-1 und c-FOS. Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung im Liniendiagramm (n=4). Murine primäre osteoblastäre Zellen wurden für 5 Tage im Expansionsmedium (Wildtyp-Kontrolllinie = 1) und anschließend für 9 (14) und 16 (21) Tage im Differenzierungsmedium kultiviert. Zur Normalisierung wurde die Expression von GAPDH herangezogen und anschließend der Quotient der Genexpression der differenzierten Probe und der Kontrolle gebildet. Die Expression der *Knockout*-Zellen (KO) ist in Relation zur Expression der Wildtypzellen (WT) am Tag 5 dargestellt. *: $p \leq 0,05$. c-FOS, *FBJ Osteosarcoma Oncogene*; LEF-1, *enhancer-binding factor 1*; MK, *Midkine*; PTN, *Pleiotrophin*

Die PTN-Expression stieg im Differenzierungsverlauf jeweils signifikant an und war in den PTPR ζ 1-*Knockout*-Zellkulturen zu jedem Zeitpunkt tendenziell stärker erhöht. Am Tag 5 war die Expression von MK in den PTPR ζ 1-*Knockout*-Zellkulturen zwar signifikant geringer, stieg jedoch während der Differenzierung signifikant ca. 2-fach stärker an als in den Wildtypzellkulturen.

Die relative Expression in den PTPR ζ 1-*Knockout*-Zellkulturen von LEF-1 wies am Tag 5 keine Abweichung zu den Wildtypzellen auf. Nach osteogener Differenzierung konnte am Tag 14 und am Tag 21 eine signifikant geringere Expression von LEF-1 in den *Knockout*-Zellkulturen festgestellt werden. In beiden Zellkulturen veränderte sich die Expression von c-FOS über den Kultivierungsverlauf hinweg nicht signifikant. Jedoch exprimierten die PTPR ζ 1-*Knockout*-Zellkulturen am Tag 5 tendenziell und am Tag 14 signifikant ca. 1,5-fach mehr c-FOS als die Wildtypzellkulturen.

3.4.3 Einfluss uniaxialer Dehnung auf die Expression von c-FOS, PTN und MK in PTPR ζ 1-*Knockout*-Zellen

PTPR ζ 1-*Knockout* und -Wildtypzellkulturen wurden ebenfalls hinsichtlich einer veränderten Expression der Gene c-FOS, PTN und MK nach mechanischer Belastung mittels quantitativer *Real-Time-PCR* analysiert (Abbildung 3.11). Die Expression des Transkriptionsfaktors c-FOS wurde nach mechanischer Belastung in beiden Zellkulturen signifikant erhöht. Zudem war die Expression in den Wildtypzellkulturen nach mechanischer Belastung signifikant höher als in den PTPR ζ 1-*Knockout*-Zellkulturen.

Die Effekte mechanischer Stimulation auf die Expression der Gene PTN und MK unterschieden sich nicht signifikant voneinander. Während in den Wildtypzellkulturen die Expression beider Gene tendenziell erniedrigt wurde, erhöhte sich die Expression von PTN und MK tendenziell in den *Knockout*-Zellkulturen. Die ebenfalls untersuchten Gene LEF-1 und RUNX-2 wiesen in den *Knockout*-Zellkulturen unter den gegebenen Versuchsbedingungen keine signifikanten Veränderungen auf.

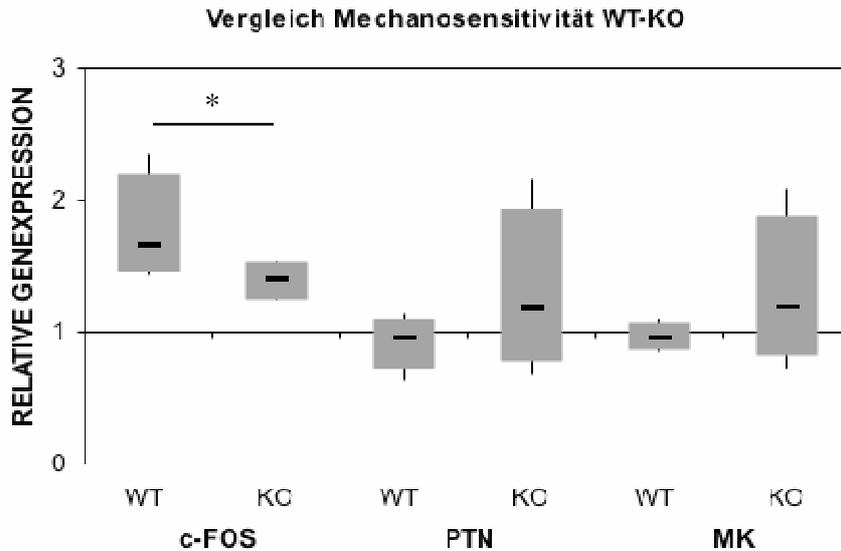


Abbildung 3.11

Quantitative Expressionsanalyse mittels *Real-Time-PCR*. In Boxplots dargestellt ist die Expression der Gene PTN, MK und c-FOS (n=4) in Wildtyp- (WT) und *Knockout*- (KO) Zellen. Murine primäre osteoblastäre Zellen wurden für 5 Tage im Expansionsmedium kultiviert. Die mechanische Stimulation erfolgte einmalig (1%, 1 Hz, 30 min). Zur Normalisierung wurde die Expression von GAPDH herangezogen und anschließend der Quotient der Genexpression der mechanisch stimulierten Probe und der unstimulierten Kontrolle gebildet (Kontrolllinie = 1). * : $p \leq 0,05$. c-FOS, *FBJ Osteosarcoma Oncogene*; MK, Midkine; PTN, Pleiotrophin

3.4.4 Einfluss uniaxialer Dehnung auf TopFlash-transfizierte PTPR ζ 1-*Knockout*-Zellen

Der TopFlash-Vektor enthält eine Bindungsstelle für den über den WNT/ β -CAT-Signaltransduktionsweg aktivierten Transkriptionsfaktor TCF. Durch Bindung des Transkriptionsfaktors an die entsprechende Bindungsstelle in der Promotorregion im Reportervektor wird das nachgeschaltete Reportergen (Luciferase) aktiviert. Untersucht wurde also die Aktivierung des WNT/ β -CAT-Signaltransduktionsweges.

Ein Vergleich von TopFlash-transfizierten PTPR ζ 1-*Knockout*- und Wildtypzellkulturen nach mechanischer Stimulation wies einen weiteren signifikanten Unterschied zwischen diesen beiden Zellkulturen auf (Abbildung 3.12).

Während die Wildtypzellkulturen nach uniaxialer Dehnung keine signifikante Veränderung in der Luciferaseaktivität zeigten, wurde die TCF-vermittelte Transkription des Luciferasegens in den PTPR ζ 1-*Knockout*-Zellkulturen um das ca. 3-fache erhöht.

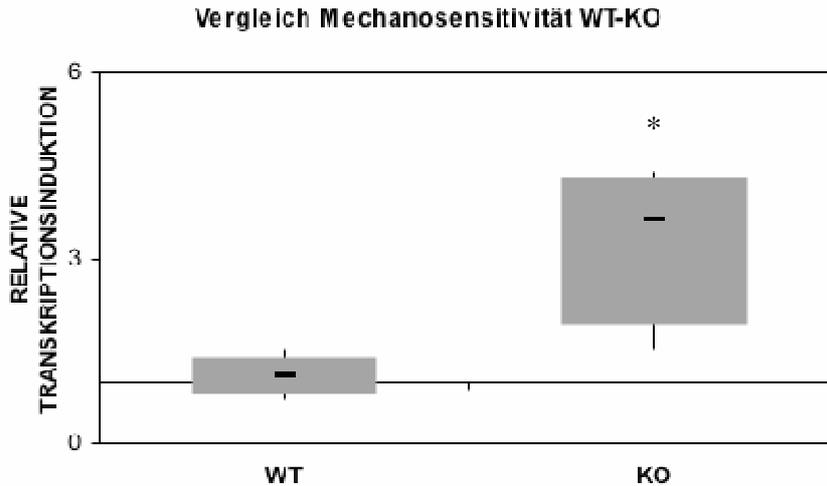


Abbildung 3.12

Quantitative Analyse der TCF-vermittelten Luciferasetranskription. TopFlash-transfizierte PTPR ζ 1-Wildtyp- (WT) und *Knockout*- (KO) Zellen wurden am Tag 5 der Kultivierung nach mechanischer Stimulation (1%, 1 Hz, 30 min) verglichen. Darstellung in Boxplots (n=4). Die Luciferaseaktivität wurde auf die β -Galaktosidase-Aktivität normalisiert und anschließend der Quotient der mechanisch stimulierten Probe und der unstimulierten Kontrolle gebildet (Kontrolllinie = 1). *: $p \leq 0,05$.

3.4.5 Zusammenfassung

PTPR ζ 1-*Knockout*-Zellen wurden mit Wildtypzellen hinsichtlich der Expression von Markergenen der osteogenen Differenzierung, PTN, MK, c-FOS und LEF-1 im Kultivierungsverlauf verglichen. Die *Knockout*-Zellen exprimierten tendenziell weniger AP und BSP und signifikant weniger LEF-1 als die Wildtypzellen und mehr PTN, MK und c-FOS. Beide Zelltypen unterschieden sich auch hinsichtlich der Expression von c-FOS nach mechanischer Belastung. In den PTPR ζ 1-*Knockout*-Zellen wurde die Expression von c-FOS nach mechanischer Stimulation nicht so stark erhöht. TopFlash-transfizierte PTPR ζ 1-*Knockout*-Zellen zeigten zudem eine verstärkte Aktivierung der TCF-vermittelten Transkription nach uniaxialer Dehnung.

3.5 Einfluss von MK und PTN auf primäre osteoblastäre Zellen aus Mauskalvarien und MC3T3-E1-Zellen

3.5.1 MTT-Test

Für einen Hinweis der Wirkung der Proteine PTN und MK auf die Proliferation osteoblastärer Zellkulturen wurde ein MTT-Test nach Zugabe der Proteine zu MC3T3-E1-Zellkulturen beziehungsweise primären osteoblastären Zellkulturen aus Mauskalvarien durchgeführt (Abbildung 3.13).

PTN führte in MC3T3-E1-Zellkulturen zu einer tendenziellen Erhöhung der Zellproliferation und in murinen primären osteoblastären Zellkulturen zu keiner Veränderung. In letzteren führte die Zugabe von MK zum Kulturmedium zu einer signifikanten Erniedrigung der Zellproliferation, in MC3T3-E1-Zellkulturen war jedoch kein Effekt erkennbar.

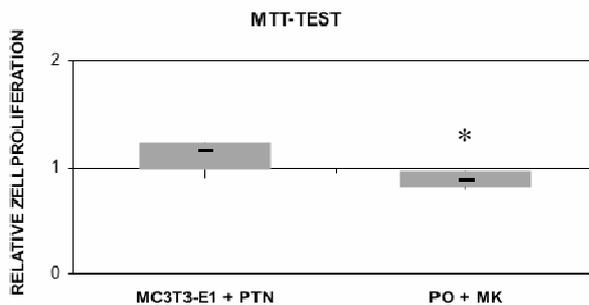


Abbildung 3.13

Kolorimetrische quantitative Analyse der Stoffwechselaktivität von osteoblastären Zellen. Dargestellt ist die relative Proliferation der MC3T3-E1-Zellkulturen und der primären osteoblastären Zellkulturen aus Mauskalvarien (PO) in Boxplots (n=4). Die Zellen wurden für 5 Tage im Expansionsmedium mit 1 pg/ml PTN beziehungsweise MK kultiviert. Es wurde der Quotient der MK- oder PTN-behandelten Probe und der unbehandelten Kontrolle gebildet (Kontrolllinie = 1). * : p ≤ 0,05. MK, Midkine; PTN, Pleiotrophin.

3.5.2 Veränderung der Genexpression von c-FOS, H4, PTN, PTPRζ1, LEF-1 und AP in primären osteoblastären Zellen aus Mauskalvarien nach Zugabe von MK

Um die Effekte von MK auf die Genexpression primärer osteoblastärer Zellkulturen aus Mauskalvarien zu analysieren, wurde MK dem Kulturmedium zugefügt.

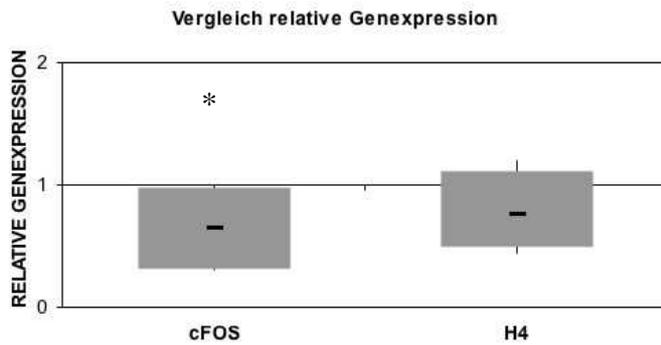


Abbildung 3.14

Quantitative Expressionsanalyse mittels *Real-Time-PCR*. In Boxplots dargestellt ist die relative Expression der Gene c-FOS und H4 (n=4). Primäre osteoblastäre Zellen aus Mauskalvarien wurden für 5 Tage im Expansionsmedium kultiviert. Die Zugabe von 10 pg/ml MK erfolgte einmalig 24 h vor Versuchsabbruch. Zur Normalisierung wurde die Expression von GAPDH herangezogen und anschließend der Quotient der MK-behandelten Probe und unbehandelten Kontrolle gebildet (Kontrolllinie = 1).

* : $p \leq 0,05$. c-FOS, *FBJ Osteosarcoma Oncogene*; H4, Histon 4.

Die Veränderungen der Expression des Transkriptionsfaktors c-FOS, des Proliferationsmarkers H4, des osteogenen Markers AP und der Gene PTPR ζ 1 und LEF-1 wurde mittels *Real-Time-PCR* analysiert (Abbildung 3.14). Die MK-behandelten Osteoblasten exprimierten signifikant weniger c-FOS und tendenziell weniger H4. Für die Gene PTN, PTPR ζ 1, LEF-1 und AP konnte unter den gegebenen Kulturbedingungen kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

3.5.3 Veränderung der Genexpression von c-FOS, H4, PTN, PTPR ζ 1 und LEF-1 in primären osteoblastären Zellen aus Mauskalvarien nach Zugabe von MK und nach Applikation uniaxialer Dehnung

Der Effekt von MK und mechanischer Stimulation wurde mittels *Real-Time-PCR* in undifferenzierten primären osteoblastären Zellkulturen aus Mauskalvarien quantitativ bestimmt (Abbildung 3.15).

Die Expression des Transkriptionsfaktors c-FOS wurde sowohl mit als auch ohne MK-Zusatz nach mechanischer Stimulation signifikant erhöht und unterschied sich in beiden Ansätzen nicht (nicht dargestellt).

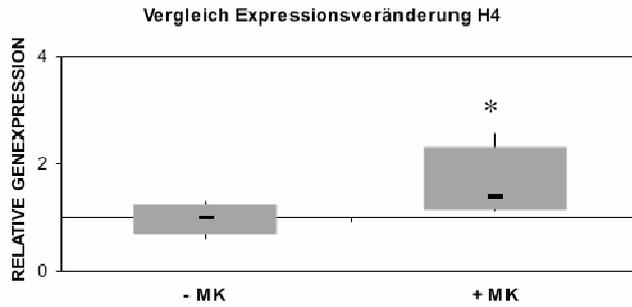


Abbildung 3.15

Quantitative Expressionsanalyse mittels *Real-Time-PCR*. In Boxplots dargestellt ist die Expression von H4 (n=4). Primäre osteoblastäre Zellen aus Mauskalvarien wurden für 5 Tage im Expansionsmedium kultiviert. Die Zugabe von 10 pg/ml MK erfolgte einmalig 24 h vor Versuchsabbruch. Die mechanische Stimulation erfolgte einmalig (1%, 1 Hz, 30 min). Zur Normalisierung wurde die Expression von GAPDH herangezogen und anschließend der Quotient der mechanisch stimulierten Probe und der unstimulierten Kontrolle gebildet (Kontrolllinie = 1). *: $p \leq 0,05$. MK, Midkine

Der Proliferationsmarker H4 wurde in unbehandelten Zellkulturen nach uniaxialer Dehnung in seiner Expression nicht beeinflusst. In den Osteoblasten, die MK im Kulturmedium erhielten, wurde die Expression von H4 nach mechanischer Stimulation signifikant leicht erhöht. Die Expression der Gene PTN, PTPR ζ 1 und LEF-1 veränderte sich unter den gegebenen Versuchsbedingungen nicht signifikant.

3.5.4 Einfluss uniaxialer Dehnung auf TopFlash-transfizierte primäre osteoblastäre Zellen aus Mauskalvarien nach Zugabe von MK

Um weitere Rückschlüsse auf die Bedeutung von MK in der Mechanotransduktion ziehen zu können, wurden primäre osteoblastäre Zellkulturen aus Mauskalvarien mit TopFlash transfiziert, MK zugefügt und die Zellkulturen mechanisch stimuliert. TopFlash-transfizierte osteoblastäre Zellkulturen aus Mauskalvarien ohne MK im Kulturmedium dienten als Kontrolle und zeigten sich nach mechanischer Stimulation wie in vorhergehenden Versuchen unbeeinflusst (Abbildung 3.16). MK-behandelte transfizierte Osteoblastenkulturen wiesen nach uniaxialer Dehnung eine signifikante 1,5-fache Erhöhung der Luciferaseaktivität, also eine gesteigerte Aktivierung der TCF-vermittelten Transkriptionsaktivität, auf.

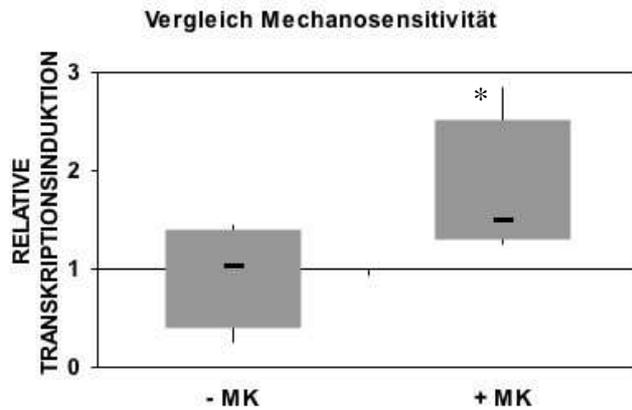


Abbildung 3.16

Quantitative Analyse der TCF-vermittelten Luciferasetranskription. TopFlash-transfizierte primäre osteoblastäre Zellen aus Mauskalvarien wurden am Tag 5 der Kultivierung nach mechanischer Stimulation (1%, 1 Hz, 30 min) verglichen. Darstellung in Boxplots (n=4). Die Zugabe von 10 pg/ml MK erfolgte einmalig 24 h vor Versuchsabbruch. Die Luciferaseaktivität wurde auf die β -Galaktosidase-Aktivität normalisiert und anschließend der Quotient der mechanisch stimulierten Probe und der unstimulierten Kontrolle gebildet (Kontrolllinie = 1). * : $p \leq 0,05$. MK, Midkine

3.5.5 Zusammenfassung

In MC3T3-E1-Zellkulturen förderte PTN tendenziell die Proliferation. Für MK konnte in osteoblastären Zellkulturen aus Mauskalvarien eine signifikante Erniedrigung der Proliferationsrate festgestellt werden. In den primären osteoblastären Zellkulturen konnte nach Zugabe von MK eine geringere Expression der Gene c-FOS und H4 nachgewiesen werden. Nach mechanischer Stimulation war die Expression des Gens H4 in den Zellkulturen, die MK erhielten, signifikant leicht erhöht. Wurde TopFlash-transfizierten Kulturen MK zugefügt und uniaxiale Dehnung appliziert, wiesen die MK-behandelten Kulturen eine verstärkte TCF-vermittelte Transkriptionsaktivität auf.

4. DISKUSSION

4.1 Charakterisierung der osteoblastären Zellen

Der Differenzierungsprozess der osteoblastären Zellen wird von unterschiedlichen Proteinen reguliert und ist für die Ontogenese notwendig. Zellen der präosteoblastären Zelllinie MC3T3-E1 und primäre osteoblastäre Zellen aus Mauskalvarien wurden im Kulturmedium mit Zusatz von Ascorbat-2-Phosphat und β -Glycerophosphat osteogen differenziert. Zur Untersuchung der osteogenen Entwicklung wurden die kultivierten Zellen, über eine gesamte Kultivierungsdauer von vier Wochen zu mehreren Zeitpunkten anhand der mRNA-Expression in der Literatur beschriebener osteoblastärer Marker charakterisiert.

Die osteogene Differenzierung wurde immunhistochemisch sowohl mittels AP-Färbung zum Nachweis aktiver alkalischer Phosphatase als auch mittels von Kossa-Färbung zum Nachweis der Mineralisierung überprüft. Die MC3T3-E1-Zellkulturen und die Kulturen primärer osteoblastärer Zellen wiesen im Verlauf der osteogenen Entwicklung in den Silikonschalen eine Erhöhung der AP-Aktivität sowie die Apposition von Mineral auf. Osteogene Differenzierung von MC3T3-E1-Zellkulturen und primären osteoblastären Zellen aus Mauskalvarien scheint also in Silikonschalen möglich zu sein. Andere Autoren hatten bereits die Erhöhung der AP-Aktivität und die Apposition von Mineral von MC3T3-E1-Zellkulturen und primären osteoblastären Zellen aus Kalvarien in handelsüblichen Zellkulturschalen publiziert [27, 32]. Ein Vergleich der Abbildungen der Kulturen der MC3T3-E1-Zellen und der murinen primären osteoblastären Zellen (Abbildung 3.1 und 3.2) zeigte, dass die Primärzellen am Tag 14 eine höhere AP-Aktivität und am Tag 28 eine stärkere Mineralapposition als die Kulturen der MC3T3-E1-Zellen zu den entsprechenden Zeitpunkten aufwiesen und somit differenzierter sein könnten als die Kulturen der MC3T3-E1-Zellen.

Mittels histochemischer Färbungen konnte eine inhomogene Differenzierung hinsichtlich der AP-Aktivität und der Mineralisierung sowohl in den Kulturen der MC3T3-E1-Zellen als auch in den Kulturen der osteoblastären Zellen aus Mauskalvarien auf Silikon festgestellt werden. Ein Problem der Monolayerkultur in den Silikonschalen war die inhomogene Besiedelung und die damit verbundene unterschiedliche Zelldichte und Proliferation der Zellen innerhalb einer Schale. Zelldichte und Zellproliferation haben einen Einfluss auf die Differenzierung [8]. Ein einheitlich konfluenter Zellrasen könnte zu einer homogeneren Differenzierung innerhalb der Silikonschalen führen. In Sechs-Well-Platten konnte jedoch ebenfalls eine inhomogene Differenzierung der osteoblastären Zellkulturen nachgewiesen werden (in

vorliegender Arbeit nicht dargestellt), so dass die inhomogene Differenzierung nicht ausschließlich auf die Silikonschalen zurückgeführt werden kann. Knochenzellen befinden sich *in vivo* in der dreidimensionalen Struktur einer aus spezifischen Proteinen zusammengesetzten, extrazellulären Matrix, die die gleichmäßige Differenzierung der Zellen beeinflussen könnte. Zum Beispiel fördert KOLL-1, aus dem die extrazelluläre Matrix im Knochen hauptsächlich besteht, in dreidimensionalen Kollagengelen die osteogene Differenzierung mesenchymaler Stammzellen [30]. Nach Kalajzic et al. sind nur ca. 15 % aller Zellen in mineralisierten Osteoblastenkulturen ausdifferenziert [132]. Die inhomogene Differenzierung der Zellen innerhalb der Kulturen kann auf enthaltene Subpopulationen zurückzuführen sein. Die Primärzellkultur von Osteoblasten hat den Nachteil, dass sie nicht zu 100 % aus Osteoblasten, sondern anteilig auch aus Präosteoblasten, Osteocyten oder anderen Zellen wie Fibroblasten zusammengesetzt sein kann, welche die Ergebnisse beeinflussen. Des Weiteren könnten die Primärzellen dedifferenzieren. Garcia et al. berichteten von der Expression adipogener Marker in Kulturen primärer Mauskalvarienzellen [133]. Die Inhomogenität der osteogenen Reifung führte zu einer erhöhten Variabilität in den Versuchen.

Die Matrixbildung ging bei den MC3T3-E1-Zellkulturen mit der Erhöhung der Expression der Gene AP und RUNX-2 einher (Abbildung 3.3). Wie in der histochemischen Färbung (Abbildung 3.1) die AP-Aktivität konnte die mRNA-Expression von AP in den MC3T3-E1-Zellkulturen auch erst ab Tag 14 detektiert werden. Bei den murinen primären osteoblastären Zellen stieg die Expression von AP, RUNX-2 und BSP im Verlauf der Kultivierung an (Abbildung 3.5). Die Expression des Proliferationsmarkers H4 war zu Beginn der Differenzierung noch erhöht, unterschied sich aber im weiteren Differenzierungsverlauf nicht mehr von den undifferenzierteren Zellen am Tag 5. *Microarray*-Analysen mit primären osteoblastären Zellen aus Mauskalvariolen (in vorliegender Arbeit nicht dargestellt), in denen die mRNA-Expression vom Tag 5 mit der Expression der differenzierteren Zellen am Tag 28 verglichen wurde, zeigten auch die Expressionsveränderungen von AP und BSP. In den *Microarray*-Analysen konnte außerdem eine Erhöhung der Expression von OC nachgewiesen werden, was mittels *Real-Time*-PCR nicht möglich war.

RUNX-2 ist ein essentieller Transkriptionsfaktor für die osteogene Differenzierung [9]. Er kann die Expression der Markergene für die osteogene Differenzierung BSP, OC, OP, KOLL-1 und AP regulieren [10, 13, 14]. Seine erhöhte Expression weist auf die Reifung der Zelle hin. BSP ist ein Protein der extrazellulären Matrix, es kann bereits in Osteoblastenvorläuferzellen detektiert werden und ist in reiferen Osteoblasten verstärkt

exprimiert. Ein Schlüsselenzym im Mineralisierungsprozess ist AP, das erst in reiferen Osteoblasten nachweisbar ist [2, 135]. Eine Erhöhung der Expression von AP und BSP im Verlauf der Kultivierung sowohl in den MC3T3-E1-Zellkulturen als auch in den Kulturen primärer osteoblastärer Zellen ging mit der Erhöhung der Expression von RUNX-2 einher und läßt auf differenziertere Zellen am Tag 28 im Vergleich zum Tag 5 schließen. Stein et al. berichteten von einer Erhöhung der Expression von H4 in primären Zellen zu Beginn des Kultivierungsverlaufs, die mit fortschreitender Differenzierung der Zelle wieder erniedrigt wurde [8]. Dies entspricht dem Expressionsmuster von H4 in den Kulturen primärer osteoblastärer Zellen in der vorliegenden Arbeit, so dass eine osteogene Reifung der Zellen angenommen werden kann.

Die Expression der Gene c-FOS, KOLL-1 und OP veränderte sich über die Kultivierungsdauer in den Kulturen der MC3T3-E1-Zellen sowie in den primären osteoblastären Zellen aus Mauskalvarien nicht signifikant.

Das Protoonkogen c-FOS spielt eine wichtige Rolle in der osteoblastären Differenzierung und Proliferation. Überexpression von c-FOS in Mäusen führt zu Osteosarkombildung, hier scheint die Proliferation der Zellen gestört zu sein [136, 137]. Eine gleichbleibende Expression kann also auf eine normale Proliferation und Differenzierung der MC3T3-E1-Zellkulturen und primären osteoblastären Zellen aus Mauskalvarien hinweisen.

Eine Erhöhung der Expression der osteogenen Markergene KOLL-1 und OP konnte nicht nachgewiesen werden. Unterschiede zu den Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen hinsichtlich dieser Gene [2, 8] sind möglicherweise auf die Versuchsbedingungen und die Spezies zurückzuführen. Auch die inhomogene Differenzierung innerhalb der Silikonschalen könnte leichte Expressionsveränderungen in Populationen mit differenzierteren Zellen im Gesamtdurchschnitt aller Zellen wieder ausgleichen.

Zusammenfassend bestätigen die vorliegenden Daten eine Induktion der Differenzierung sowohl der MC3T3-E1-Zellkulturen als auch der Kulturen muriner primärer osteoblastärer Zellen in den Silikonschalen. Ein Vergleich der beiden Zellkulturen lässt vermuten, dass die Primärzellen aus den murinen Kalvarien bereits in dem Moment, in dem sie isoliert werden, differenzierter sind als die Zellen der MC3T3-E1-Zelllinie. Bei beiden Zellarten ist die osteogene Differenzierung nach Induktion mit Ascorbat-2-Phosphat und β -Glycerophosphat nicht homogen.

4.2 Veränderung der Genexpression von PTN, MK, PTPR ζ 1 und Genen des WNT/ β -CAT-Signaltransduktionsweges im Differenzierungsverlauf

In den Kulturen der präosteoblastären Zelllinie MC3T3-E1 erhöhte sich nach Induktion der Differenzierung die Expression der Gene PTN, MK, LRP6 und β -CAT bis Tag 14 der Kultivierungsperiode (Abbildung 3.4). In den murinen primären osteoblastären Zellen stieg die Expression von PTN und MK sowie die Expression von PTPR ζ 1 nach Supplementation des Kulturmediums mit Ascorbat-2-Phosphat und β -Glycerophosphat über den gesamten Kultivierungsverlauf hinweg an (Abbildung 3.6). Die Expression des Transkriptionsfaktors LEF-1 erniedrigte sich in den Kulturen der MC3T3-E1-Zelllinie und der primären osteoblastären Zellen im Kultivierungsverlauf. Die Erhöhung der Genexpression von PTN, MK, LRP6, PTPR ζ 1 und β -CAT lässt auf einen Einfluss von PTN, MK und PTPR ζ 1 sowie des WNT-Signaltransduktionsweges auf den Reifungsprozeß der osteoblastären Zelle schließen.

Für PTN konnte bereits gezeigt werden, dass es die Differenzierung von MC3T3-E1-Zellen fördert [110] und die Knochenbildung erhöhen kann [138, 139]. Die Expression des PTN-Gens ist sowohl in RUNX-2-überexprimierenden C3H10T1/2-Fibroblasten als auch in RUNX-2-defizienten Gliedmaßen von murinen Embryonen erhöht [14, 140]. Dies lässt einen Einfluss des osteogenen Transkriptionsfaktors RUNX-2 auf die Expression von PTN vermuten.

Die Expression der mRNA des Wachstums- und Differenzierungsfaktors MK wurde im Kultivierungsverlauf erhöht. MK wird während der embryonalen Entwicklung unter anderem in skeletalem Gewebe [141] und während der Differenzierung neuroblastärer Zellen verstärkt exprimiert [142]. In Osteosarkomzellen ist MK überexprimiert [143]. Auch in differenzierenden humanen Osteoblasten konnte mittels Microarray-Analysen ein Anstieg der Expression von MK festgestellt werden [144]. Die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen und die Daten der vorliegenden Arbeit deuten auf eine wichtige Rolle von MK in der osteoblastären Differenzierung hin.

In der Entwicklung neuronaler Zellen ist der Expressionsverlauf von PTN und MK im Verlauf der Differenzierung vollkommen verschieden. Hier steigt in P19-Zellkulturen zunächst die Konzentration der MK-mRNA, wohingegen die mRNA von PTN erst zu einem späteren Stadium detektierbar ist [146]. Herradon et al. stellten fest, dass in der murinen Embryonalentwicklung von MK-*Knockout*-Mäusen in verschiedenen Organen mehr PTN-mRNA zu finden war als in den Wildtyp-Mäusen und in PTN-*Knockout*-Mäusen kein

Unterschied in der Menge der MK-mRNA im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen bestand. Sie postulierten, dass MK die Expression von PTN reguliert [147]. Mitsiadis et al. fanden weitere Unterschiede zwischen der Expression von PTN und MK. Sie wiesen immunhistochemisch auf Proteinebene in den Osteoblasten des sich entwickelnden murinen Embryos wenig MK und viel PTN nach [141]. Lehmann et al. konnten in der Knochenentwicklung von PTN-*Knockout*-Mäusen keinen Unterschied zur Knochenentwicklung von Wildtyp-Mäusen finden. Sie differenzierten primäre osteoblastäre Zellen aus Wildtyp-Mauskalvarien mit Ascorbat-2-Phosphat und β -Glycerophosphat und konnten mittels *Microarray*-Analysen am Tag 25 der Differenzierung im Vergleich zu undifferenzierteren Zellen am Tag 0 keine Veränderung der Expression von PTN feststellen, aber eine Erhöhung der Expression von MK. Sie nahmen an, dass MK der physiologische Regulator der Knochenbildung ist [108]. In der vorliegenden Arbeit wurde sowohl die Expression von MK als auch die Expression von PTN im Verlauf der Differenzierung erhöht. Der Unterschied zu Lehmann et al. könnte auf unterschiedliche Methoden der Zellisolation zurückzuführen sein. Auch ein Einfluss des FCS kann nicht ausgeschlossen werden. In diesem befinden sich je nach Charge und Produzent unterschiedliche wachstums- und differenzierungsfördernde Faktoren, die die Expression von MK und PTN modulieren können. Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit kann angenommen werden, dass beide Proteine eine Rolle in der osteoblastären Differenzierung spielen.

Während der Differenzierungsperiode der MC3T3-E1-Zellkulturen wurde die Expression der beiden am WNT/ β -CAT-Signaltransduktionsweg beteiligten Gene LRP6 und β -CAT ebenfalls verstärkt. Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen bestätigten bereits die wichtige Rolle des WNT/ β -CAT-Signaltransduktionsweges in der Knochenentwicklung und in der Knochenhomöostase [86, 87, 148]. LRP6 ist ein potentieller Rezeptor für MK und PTN [120, 149] und wie LRP5 ein bedeutender Rezeptor in der Knochenentwicklung [38, 83, 150]. Weitere Arbeitsgruppen postulierten, dass die quantitative Veränderung von β -CAT in mesenchymalen Stammzellen, den Vorläuferzellen der Osteoblasten, als molekularer Schalter für die osteogene Weiterentwicklung dient [89, 90]. Folglich kann ein Einfluss von LRP6 und β -CAT und somit des WNT/ β -CAT-Signaltransduktionsweges auf die osteogene Differenzierung muriner osteoblastärer Zellen angenommen werden.

PTPR ζ 1 könnte ebenfalls in die osteoblastäre Differenzierung involviert sein, der Rezeptor wurde in der vorliegenden Arbeit im Kultivierungsverlauf erhöht. Andere Arbeitsgruppen stellten fest, dass Tyrosinphosphatasen die Skelettentwicklung, den Knochenmetabolismus oder die Funktion der Osteoklasten regulieren [151-153]. Chengalvala et al. berichteten, dass

eine PTP, die in Knochen und Hoden von Ratten vorkommt, über den osteogenen Differenzierungsverlauf erhöht wird und für die osteoblastäre Entwicklung notwendig ist [154]. Diese osteotestikuläre PTP wird während der murinen embryonalen Skelettentwicklung und dort während der Osteoblastenentwicklung verstärkt exprimiert [155, 156]. Folglich kann davon ausgegangen werden, dass PTPen sowohl in der Knochenentwicklung als auch im Knochenremodeling von Bedeutung sind. PTPR ζ 1 hat einen Einfluss auf die Knochenbildung in Mäusen [157]. Ein Einfluss von PTPR ζ 1 auf β -CAT und ein daraus resultierender Einfluss auf den WNT/ β -CAT-Signaltransduktionsweg wird von Meng et al. diskutiert [128]. PTPR ζ 1 ist zudem ein potentieller Rezeptor für PTN und MK [116, 117], die in der osteogenen Entwicklung von osteoblastären Zellen eine Rolle spielen könnten. Für PTPR ζ 1 kann also eine Rolle in der Differenzierung des Osteoblasten angenommen werden.

Ein weiteres Gen, das im WNT/ β -CAT-Signaltransduktionsweg eine wichtige Rolle spielt, ist der Transkriptionsfaktor LEF-1. LEF-1 wird über den WNT/ β -CAT-Signaltransduktionsweg aktiviert und reguliert im Zellkern die Expression von Zielgenen des WNT/ β -CAT-Signaltransduktionswegs. Von Kahler et al. wurde die Erniedrigung der Expression dieses Faktors im osteoblastären Entwicklungsprozess beschrieben, die für die vollständige Reifung des Osteoblasten notwendig ist [22]. Auch in der vorliegenden Arbeit wurde LEF-1 in den MC3T3-E1-Zellkulturen über den Differenzierungsverlauf hinweg schwächer exprimiert und in der Primärzellkulturen am Tag 14 erniedrigt, so dass von einer osteogenen Weiterentwicklung der Zellen ausgegangen werden kann.

Abschließend ist festzuhalten, dass PTN und MK in der vorliegenden Arbeit im Verlauf der osteogenen Differenzierung in ihrer Expression erhöht wurden, was eine Rolle dieser beiden Moleküle innerhalb der osteoblastären Reifung vermuten lässt. Auch die Expression von PTPR ζ 1 und der am WNT/ β -CAT-Signaltransduktionsweg beteiligten Gene LRP6 und β -CAT wurde über den Differenzierungsverlauf hinweg erhöht. Die Expression des Transkriptionsfaktors LEF-1 wurde erniedrigt. Diese Moleküle scheinen ebenfalls in den osteoblastären Reifungsprozess involviert zu sein.

4.3 Einfluss uniaxialer Dehnung auf osteoblastäre Zellen

Der mechanische Stimulus ist ein wichtiger Faktor für den Erhalt der Knochenmasse. Mechanische Stimulation von Zellen beeinflusst ihre Proliferation, Differenzierung und

Orientierung [64] und setzt dafür Mechanorezeption, Mechanotransduktion und die daraus resultierende Expressionsveränderung bestimmter Gene der Zellen voraus.

Um den Einfluss uniaxialer Dehnung auf osteoblastäre Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Differenzierung zu analysieren, wurden die Zellen in Silikonschalen ausgesät, mit Ascorbat-2-Phosphat und β -Glycerophosphat osteogen differenziert und am Tag 5, 7, 14, 21 und 28 der Kultivierung einmalig für 30 min, mit 1% und 1Hz mechanisch stimuliert. Dehnungsamplitude, Stimulationsdauer und Frequenz haben einen Einfluss auf die Veränderung der Genexpression nach mechanischer Stimulation [70, 158]. Auch der Zeitpunkt des Versuchsabbruchs hat einen Einfluss auf den letztendlich gemessenen Effekt, da die Expressionsveränderung der Gene schnell (zum Beispiel *early-response*-Gene) oder langsam erfolgen kann. In Vorversuchen wurden die idealen Versuchsbedingungen ausgetestet (in vorliegender Arbeit nicht dargestellt).

In der vorliegenden Arbeit konnte auf mRNA-Ebene in den MC3T3-E1-Zellen nach uniaxialer Dehnung zu bestimmten Zeitpunkten der Differenzierung eine Erhöhung der Expression der Gene PTN, MK, LRP6 und c-FOS festgestellt werden (Abbildung 3.7). In den murinen primären osteoblastären Zellen konnte für PTN, MK, PTPR ζ 1, LEF-1 und c-FOS sowie für die osteogenen Marker RUNX-2 und BSP nach mechanischer Stimulation eine Veränderung in der Menge der mRNA festgestellt werden (Abbildung 3.8). Microarrayanalysen (in vorliegender Arbeit nicht dargestellt) wurden durch die *Real-Time-PCR*-Daten hinsichtlich der mechanisch induzierbaren Expressionsveränderung von PTN, MK und c-FOS in Primärzellkulturen am Tag 5 bestätigt.

Die Veränderung der Expression des Protoonkogens c-FOS wurde sowohl in den MC3T3-E1-Zellkulturen als auch in den Kulturen primärer osteoblastärer Zellen aus Mauskalarien, zu jedem untersuchten Zeitpunkt der Differenzierung analysiert. Sie diente als interne Kontrolle zur Verifizierung des mechanischen Stimulus, da die Erhöhung der Expression von c-FOS in osteoblastären Zellen nach mechanischer Stimulation bereits von anderen Autoren beschrieben wurde [159, 160]. Die Induktion der Expression von c-FOS war nicht zu allen Zeitpunkten gleich stark. Dies steht im Einklang zu den Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen, die den Zusammenhang zwischen dem Differenzierungszustand der Zelle und der Induzierbarkeit verschiedener Gene nach mechanischer Stimulation untersucht haben. Sie konnten Unterschiede in der Expressionsveränderung zwischen den unterschiedlich weit differenzierten Zellen feststellen [52, 69, 161].

4.3.1 Einfluss uniaxialer Dehnung auf die osteogenen Marker RUNX-2 und BSP

Nach uniaxialer Dehnung in murinen primären osteoblastären Zellen waren die osteogenen Marker RUNX-2 und BSP in ihrer Expression verändert (Abbildung 3.8). RUNX-2 spielt eine Schlüsselrolle in der Modulation der osteoblastären Differenzierung. Die Expressionsveränderung dieses Faktors nach mechanischer Stimulation wurde bereits in der Literatur beschrieben [162, 163]. Nukleotide werden von Zellen als Antwort auf mechanische Stimuli ausgeschüttet. Dieses Signal kann über Ras/ERK/MAPK den Transkriptionsfaktor RUNX-2 aktivieren [164, 165]. In der Literatur konnte die veränderte Expression von BSP *in vitro* nach mechanischer Dehnung und nach Exposition der Zellen in einem Magnetfeld nachgewiesen werden [166, 167]. Shimizu et al. führten zusätzlich Promoterstudien des BSP-Gens durch. Bei der Magnetfeld-induzierten Transkriptionsveränderung von BSP sind das FGF2-*response*-Element und der Transkriptionsfaktor PIT-1 involviert. Andere Arbeitsgruppen berichteten von einem cAMP-*response*-Element in der Promoterregion von BSP [168, 169]. Der mittels mechanischer Dehnung induzierte cAMP/PKA-Signaltransduktionsweg könnte folglich die Expression von BSP regulieren.

Die Expression von RUNX-2 wurde nach mechanischer Stimulation in den undifferenzierteren Zellkulturen am Tag 5 erniedrigt. Da der Transkriptionsfaktor RUNX-2 die Differenzierung der osteoblastären Zelle fördert, könnte eine Erniedrigung seiner Expression nach uniaxialer Dehnung am Tag 5 bedeuten, dass mechanische Stimulation zu diesem Zeitpunkt der Entwicklung die Differenzierung der osteoblastären Zellen aus Mauskalvarien zunächst hemmt. Dass mechanische Stimulation die Proliferation in Osteoblasten erhöhen und die Differenzierung erniedrigen kann, wurde bereits von anderen Arbeitsgruppen postuliert [66, 170]. Die Expression von BSP war am Tag 21 und 28 nach uniaxialer Dehnung erhöht. Mechanische Stimulation könnte die terminale osteogene Entwicklung in differenzierteren Zellen fördern.

In den MC3T3-E1-Zellkulturen konnte BSP mittels *Real-Time*-PCR nicht detektiert und eine signifikante Veränderung der Expression von RUNX-2 nach mechanischer Stimulation nicht nachgewiesen werden. Diese Zellkulturen befanden sich wie in Kapitel 4.1 anhand der Überprüfung osteogener Marker diskutiert, wahrscheinlich in einem anderen Differenzierungsstadium als die Kulturen primärer osteoblastärer Zellen. Sie exprimierten weniger AP, wiesen ein schwächeres Mineralisierungspotential auf und erhielten im Gegensatz zu den Primärzellkulturen kein hitzeinaktiviertes FCS was die Proliferation und Differenzierung dieser Zellen beeinflusst haben könnte.

4.3.2 Einfluss uniaxialer Dehnung auf die Expression von PTN, MK, PTPR ζ 1 und Genen des WNT/ β -CAT-Signaltransduktionsweges

Beide Heparin-bindenden Moleküle konnten in ihrer Expression mittels Mechanik beeinflusst werden (Abbildung 3.7 und Abbildung 3.8). Die Expression von PTN wurde in den MC3T3-E1-Zellkulturen und in den Kulturen osteoblastärer Zellen aus Mauskalvarien nach uniaxialer Dehnung verändert. Die Beeinflussung der Expression des PTN-Gens mittels mechanischer Stimulation wurde bereits von anderen Autoren beschrieben, wobei Liedert et al. *in vitro* eine Erniedrigung der relativen mRNA-Konzentration in SaOS-2-Zellkulturen fanden und die Arbeitsgruppe um Xing *in vivo* nach Vier-Punkt-Biegung von murinen Tibien eine Verstärkung der Expression feststellte [75, 77]. Liedert et al. untersuchten mittels Inhibitoren zusätzlich Signaltransduktionswege, die an der mechanischen Regulation der PTN-Expression beteiligt sein könnten [76]. Potentielle Modulatoren der PTN-Expression waren unter anderem die Integrine, das Zytoskelett und MAPK-Signaltransduktionswege, für die ein Einfluss auf die Mechanotransduktion bereits beschrieben wurde [61, 63].

Die Veränderungen der Expression von PTN nach mechanischer Stimulation waren in den MC3T3-E1-Zellkulturen und in den Primärzellkulturen verschieden. Zunächst ist festzuhalten, dass der Effekt von PTN auf die Knochenbildung zeit- und konzentrationsabhängig ist [139]. Wenn PTN zu MC3T3-E1-Zellkulturen hinzugefügt wird, kann es die osteogene Differenzierung der Zellen stimulieren [110]. Folglich wäre es möglich, dass eine leichte Erhöhung der Expression von PTN nach mechanischer Stimulation am Tag 5 in den MC3T3-E1-Zellkulturen die Differenzierung dieser präosteoblastären Zellen fördert. In den Kulturen primärer osteoblastärer Zellen wurde die Expression von PTN zusammen mit der Expression von RUNX-2 am Tag 5 der Kultivierung nach mechanischer Stimulation erniedrigt, so dass hier ein hemmender Einfluss auf die Differenzierung angenommen werden kann. Nach Induktion der Differenzierung mittels Ascorbat-2-Phosphat und β -Glycerophosphat wird die Expression von PTN am Tag 7 nach mechanischer Stimulation leicht erhöht. Es könnte sein, dass mechanische Stimulation die Expression dieses Gens abhängig vom Differenzierungszustand der Zelle reguliert, der mögliche Einfluss von PTN auf die Differenzierung osteoblastärer Zellen wurde in Kapitel 4.2 bereits diskutiert.

Die MK-Expression wurde nach mechanischer Stimulation in den MC3T3-E1-Zellkulturen am Tag 21 und 28 der Differenzierung verstärkt exprimiert, in den undifferenzierteren Primärzellkulturen sank die relative mRNA-Konzentration am Tag 5. Über den Einfluss mechanischer Belastung auf die MK-Expression wurde in der Literatur noch nicht berichtet.

Es liegt jedoch nahe, dass es als PTN-verwandtes Gen ebenfalls mittels mechanischer Stimulation beeinflusst wird. Die Expression von MK kann durch Retinolsäure induziert werden [100, 112]. In der Promoterregion dieses Gens befindet sich ein Retinolsäure-responsives Element [171], für das aus der Literatur jedoch noch kein Zusammenhang zur Mechanik hervorgeht. Es sind zudem noch keine ausführlichen Promoterstudien mit Hinblick auf Expressionsveränderungen nach mechanischer Stimulation zu diesem Gen durchgeführt worden. Eine selbst durchgeführte Suche nach putativen Transkriptionsfaktoren für das MK-Gen mit dem Suchprogramm *TFsearch* ergab eine mögliche Bindestelle für AP-1. Nach mechanischer Stimulation werden in einer Signalkaskade die Kinasen RAF / MEK / ERK1/2 aktiviert und ERK1/2 kann die Aktivität des Transkriptionsfaktors AP-1 beeinflussen [53]. Eine Beteiligung dieses Signaltransduktionsweges an der Regulation der Expression von MK müsste untersucht werden.

Die Expression von MK wurde in den MC3T3-E1-Zellkulturen am Tag 21 und 28 der Kultivierung nach mechanischer Stimulation signifikant leicht erhöht und in den Primärzellkulturen am Tag 5 der Kultivierung erniedrigt. Wie bei PTN besteht auch hier die Möglichkeit, dass die Expression des wahrscheinlich in die osteoblastäre Differenzierung involvierten Gens mittels mechanischer Stimulation abhängig vom Differenzierungszustand der Zelle zusätzlich reguliert wird.

Die Expression von PTPR ζ 1 und der am WNT/ β -CAT-Signaltransduktionsweg beteiligten Moleküle LRP6 und LEF-1 war nach mechanischer Stimulation verändert (Abbildung 3.7 und Abbildung 3.8).

Der Einfluss von Mechanik auf die Regulation der Transkription von PTPR ζ 1 ist aus der Literatur noch nicht bekannt. Protein-Tyrosin-Phosphatasen haben in der Skelettentwicklung und der Regulation der Osteoklastenfunktion eine modelierende Funktion [151-153]. PTPR ζ 1 ist in die Differenzierung von Osteoblasten und die Knochenbildung von Mäusen involviert [157].

Die Expression einiger Gene des WNT/ β -CAT-Signaltransduktionsweges kann mittels mechanischer Stimulation beeinflusst werden [74]. Lau et al. konnten die Expressionsveränderungen von LRP5 und LEF-1 nach Stimulation in einem Fluid Flow-Modell bereits feststellen [71]. So liegt es nahe, dass die Expression von LEF-1 und LRP6 durch mechanische Stimulation beeinflussbar ist.

In der vorliegenden Arbeit beeinflusste uniaxiale Dehnung β -CAT auf mRNA-Ebene nicht. Norvell et al. konnten *in vitro* an Fluidflow-Versuchen eine Translokation von β -CAT in den Zellkern nach Stimulation nachweisen [73]. So kann anhand der vorliegenden Ergebnisse

angenommen werden, dass mechanische Stimulation β -CAT wahrscheinlich über Phosphorylierung beeinflusst.

In den Kulturen von MC3T3-E1-Zellen korrelierten die Expressionsveränderungen von LRP6 und MK nach mechanischer Stimulation am Tag 21. In den Primärzellkulturen korrelierte die Erniedrigung der Expression von PTPR ζ 1 und LEF-1 und der osteoblastären Marker RUNX-2 und BSP ebenfalls mit der Erniedrigung der Expression von PTN und MK. Interaktionen der Moleküle PTN, MK mit ihren putativen Rezeptoren müssen noch weiter auf Proteinebene untersucht werden. Die unterschiedlichen Ergebnisse in den MC3T3-E1-Zellkulturen und in den Kulturen muriner primärer osteoblastärer Zellen sind darauf zurückzuführen, dass der Differenzierungszustand der Zelle die Antwort auf mechanische Stimuli beeinflusst [52, 161].

4.4 Untersuchungen an PTPR ζ 1-Knockout-Zellen

4.4.1 Differenzierung von osteoblastären PTPR ζ 1-Knockout-Zellen und Veränderung der Genexpression von AP, BSP, c-FOS, PTN, MK und LEF-1 im Kultivierungsverlauf

Osteoblastäre Zellkulturen aus Mauskalvarien von PTPR ζ 1-Knockout-Mäusen wurden mit Ascorbat-2-Phosphat und β -Glycerophosphat im Kulturmedium osteogen differenziert und mit osteoblastären Zellkulturen aus Mauskalvarien von Wildtyp-Mäusen hinsichtlich ihrer Genexpression verglichen. In den Wildtyp- und *Knockout*-Zellkulturen wurde die Expression des Transkriptionsfaktors RUNX-2 und des Proliferationsmarkers H4 im Differenzierungsverlauf untersucht. Es konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Die beiden osteoblastären Marker BSP und AP wurden in den Wildtyp- und *Knockout*-Zellkulturen über den Differenzierungsverlauf hinweg jedoch unterschiedlich stark exprimiert (Abbildung 3.9). Am Tag 21 nach Induktion der Differenzierung wurden beide Marker in den PTPR ζ 1-Knockout-Zellkulturen tendenziell schwächer exprimiert als in den Wildtyp-Zellkulturen. Dies könnte darauf hindeuten, dass die PTPR ζ 1-Knockout-Zellen möglicherweise verzögert differenzierten. In der vorliegenden Arbeit nicht dargestellte Beobachtungen der Zellkultur in unserem Labor wiesen auf eine verstärkte Proliferation der PTPR ζ 1-Knockout-Zellen hin. Schinke et al. stellten eine verringerte Expression der osteogenen Marker OC und BSP, eine erhöhte Proliferationsrate von PTPR ζ 1-Knockout-Zellen und eine Erniedrigung der Proliferationsrate von PTPR ζ 1-überexprimierenden MC3T3-E1-Zellen fest [157]. Eine Hemmung der PTP-Aktivität mittels Orthovanadat

stimulierte die Proliferation osteoblastärer Zellen [174]. Überexpression von PTP ϵ inhibierte in endothelialem Gewebe die Zellproliferation [175]. So liegt nahe, dass die PTPR ζ 1 im Osteoblasten einen Einfluss auf die Proliferation hat und vermutlich durch die Defizienz der PTPR ζ 1 die Zellproliferation gesteigert wird. Dies könnte einen Einfluss auf die Differenzierung der PTPR ζ 1-*Knockout*-Zellen haben.

Das Protoonkogen c-FOS hat eine wichtige Rolle in der osteoblastären Proliferation und Differenzierung [136] und war in den PTPR ζ 1-*Knockout*-Zellkulturen stärker exprimiert als in den Wildtyp-Zellen (Abbildung 3.10). c-FOS bildet mit Proteinen der JUN-Familie einen dimeren Transkriptionsfaktor, der auch als AP-1 bezeichnet wird [176] und beeinflusst die osteoblastäre Entwicklung und Proliferation [137]. Erhöhte c-FOS-Level beeinflussen die normale Proliferation osteoblastärer Zellen [137] und c-FOS scheint aufgrund des PTPR ζ 1-*Knockouts* anders exprimiert zu sein. Eventuell besteht ein Zusammenhang mit der verstärkten Proliferation der PTPR ζ 1-*Knockout*-Zellen.

Die Expression von PTN war sowohl in den undifferenzierten als auch in den differenzierteren PTPR ζ 1-*Knockout*-Zellkulturen tendenziell höher als in den Kulturen der Wildtypzellen (Abbildung 3.10). Am Tag 5 war die MK-Expression in den PTPR ζ 1-*Knockout*-Zellkulturen signifikant geringer, stieg jedoch über den Kultivierungsverlauf signifikant stärker an, als in den Kulturen der Wildtypzellen. Die Regulation der Expression dieser beiden Wachstumsfaktoren im Differenzierungsverlauf wurde in Kapitel 4.2 bereits diskutiert und könnte zusätzlich direkt von einer aktiven PTPR ζ 1 beeinflusst werden. PTP's können die MAPK durch Dephosphorylierung eines Tyrosinrestes inaktivieren [153]. In Kapitel 4.3.2 wurde bereits die Möglichkeit der Regulation von PTN über MAPK-Signaltransduktionswege diskutiert [76]. Als PTN-verwandtes Gen könnte die Expression von MK auch über MAPK-Signaltransduktionswege reguliert sein. Bei Nichtfunktion von PTPR ζ 1 könnte ein verstärkt aktivierter MAPK-Signalweg die Expression von PTN und MK erhöhen. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass die Expression von PTN und MK als indirekte Folge einer veränderten Proliferation und Differenzierung der PTPR ζ 1-*Knockout*-Zellkulturen beeinflusst wird.

Die PTPR ζ 1-*Knockout*-Zellkulturen und die Wildtypzellkulturen unterschieden sich auch hinsichtlich der Expression des Transkriptionsfaktors LEF-1 (Abbildung 3.10). PTPR ζ 1-*Knockout*-Zellen exprimierten während der osteogenen Differenzierung signifikant weniger LEF-1 als die Wildtypzellen. LEF-1 wird vom WNT/ β -CAT-Signaltransduktionsweg aktiviert und reguliert die Expression der Zielgene des WNT/ β -CAT-

Signaltransduktionswegs, die die Differenzierung und Proliferation der Zelle beeinflussen können. Die Expression von LEF-1 kann ebenfalls über den WNT/ β -CAT-Signaltransduktionsweg reguliert werden [177, 178]. Meng et al. diskutierten einen Einfluss von PTPR ζ 1 auf β -CAT [128], welcher wiederum den WNT/ β -CAT-Signaltransduktionsweg modulieren könnte. Bei einer Inaktivierung der PTPR ζ 1 könnte freies β -CAT im Zytoplasma kumulieren und für die verstärkte Weiterleitung der Signale des WNT/ β -CAT-Signaltransduktionsweges zur Verfügung stehen. Eine veränderte Aktivität des WNT/ β -CAT-Signaltransduktionsweges könnte zu einer veränderten Expression von LEF-1 führen. Folglich könnte eine veränderte Aktivität des WNT/ β -CAT-Signaltransduktionsweges in PTPR ζ 1-*Knockout*-Zellkulturen angenommen werden.

Die Nichtfunktion von PTPR ζ 1 führte zu einer Veränderung der Proliferation und einer verringerten Expression von AP, BSP und LEF-1 im Verlauf der Differenzierung. Die Expression von PTN, MK und c-FOS war in den PTPR ζ 1-*Knockout*-Zellkulturen erhöht, so dass hier ebenfalls ein Einfluss von PTPR ζ 1 auf die Expression dieser Gene angenommen werden kann.

4.4.2 Einfluss uniaxialer Dehnung auf PTPR ζ 1-*Knockout*-Zellen

PTPR ζ 1-*Knockout*-Zellen unterschieden sich von den Wildtyp-Zellen hinsichtlich ihrer Reaktion auf mechanische Belastung (Abbildung 3.11).

Die Erhöhung der Expression von c-FOS war nach mechanischer Stimulation in den Wildtypzellen signifikant höher als in den PTPR ζ 1-*Knockout*-Zellen. Dieser Unterschied könnte einerseits auf die verstärkte Proliferation der PTPR ζ 1-*Knockout*-Zellen zurückzuführen sein. Peake et al. beobachteten ein ähnliches Phänomen hinsichtlich der Induktion von c-FOS nach mechanischer Stimulation bei unterschiedlich stark proliferierenden Knochenzellen. Sie postulierten verschiedene Matrixzusammensetzungen aufgrund der Proliferationsrate als Ursache [160]. Andererseits war die Expression von c-FOS bereits in den unstimulierten PTPR ζ 1-*Knockout*-Zellkulturen höher, so dass Mechanik als Expressions-regulierender Mechanismus ein zusätzlicher modulierender Faktor der Expression von c-FOS sein könnte.

Der Vergleich der PTPR ζ 1-*Knockout*-Zellkulturen mit den Wildtypzellkulturen zeigt eine tendenzielle Umkehrung der Expressionsveränderung nach mechanischer Stimulation

hinsichtlich der Expression von PTN und MK. PTPR ζ 1 hat möglicherweise einen regulativen Einfluss auf die Expression von PTN und MK bei mechanischer Stimulation.

PTPR ζ 1-*Knockout*-Zellkulturen und Wildtypzellkulturen wurden mit einem TopFlash-Vektor transfiziert und mechanisch stimuliert. Der TopFlash-Vektor enthält im Promoter eine Bindungsstelle für den über den WNT/ β -CAT-Signaltransduktionsweg aktivierten Transkriptionsfaktor TCF. TCF bildet zusammen mit β -CAT und LEF-1 einen Komplex und reguliert die Expression der Zielgene des WNT/ β -CAT-Signaltransduktionsweges. Während in den Kulturen der Wildtypzellen nach mechanischer Stimulation keine Veränderung in der Aktivität der Luciferase gemessen werden konnte, war die TCF-vermittelte Luciferaseaktivität in den PTPR ζ 1-*Knockout*-Zellkulturen signifikant um das ca. 3-fache erhöht (Abbildung 3.12). Dieses Ergebnis kann bedeuten, dass PTPR ζ 1 die TCF-vermittelte Transkription negativ reguliert. PTPs dephosphorylieren β -CAT, so dass es an Cadherin binden kann und folglich dem WNT/ β -CAT-Signaltransduktionsweg nicht mehr zur Verfügung steht [129]. Bei Nichtfunktion von PTPR ζ 1 nach Bindung eines passenden Proteins könnte freies β -CAT im Zytoplasma kumulieren und für die verstärkte Weiterleitung der Signale des WNT/ β -CAT-Signaltransduktionsweges zur Verfügung stehen. Den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit zu Folge könnte das β -CAT zur Verstärkung des WNT-Signals rekrutiert werden.

Angenommen werden kann, dass PTPR ζ 1 in die mittels Mechanik induzierte Signaltransduktion involviert ist und die Aktivierung des WNT/ β -CAT-Signaltransduktionsweges beeinflusst.

4.5 Einfluss von MK auf osteoblastäre Zellen

4.5.1 Einfluss von MK auf die Proliferation und die Differenzierung osteoblastärer Zellen

Um einen Hinweis auf die Wirkung der Heparin-bindenden Polypeptide PTN und MK in osteoblastären Zellen zu erhalten, wurde ein MTT-Test mit Kulturen osteoblastärer Zellen unter Serum-reduzierten Bedingungen durchgeführt. Eine Serumreduktion auf 0 % war nicht möglich, da die Zellen innerhalb von 2 Tagen abstarben (nicht dargestellt). Unter den gewählten Bedingungen ließ sich nach einer Kultivierungsdauer von 5 Tagen für PTN ein

tendenziell fördernder Effekt auf die Proliferation in MC3T3-E1-Zellkulturen und für MK ein signifikanter, leicht-hemmender Effekt auf die Proliferation primärer osteoblastärer Zellen aus Mauskalvarien feststellen (Abbildung 3.13). Die verschiedenen Ergebnisse könnten auf den in Kapitel 4.1 diskutierten, unterschiedlichen Differenzierungszustand der Zellkulturen zurückzuführen sein. Mitsiadis et al. konnten zeigen, dass MK die Zellproliferation des dentalen Mesenchyms in Mäuseembryonen reduziert und Antikörper gegen MK die Differenzierung der mesenchymalen Zellen hemmen [112]. So könnte es sein, dass MK auch die Proliferation osteoblastärer Zellen aus Mauskalvarien beeinflusst. Da der Effekt von PTN nicht signifikant war, wurden die weiteren Untersuchungen mit MK durchgeführt.

In einem weiteren Versuchsblock wurde die Veränderung der Genexpression von c-FOS, H4, PTN, PTPR ζ 1, LEF-1 und AP nach Zugabe von MK in primären osteoblastären Zellkulturen aus Mauskalvarien untersucht. Der Transkriptionsfaktor c-FOS war in seiner Expression signifikant erniedrigt. Der Proliferationsmarker H4 war tendenziell erniedrigt (Abbildung 3.14).

Eine Einbindung des Transkriptionsfaktors c-FOS in die Zellproliferation und osteoblastäre Entwicklung wurde bereits im Kapitel 4.4.1 diskutiert. Es könnte sein, dass die erniedrigte Expression des Transkriptionsfaktors c-FOS auf eine Hemmung der Proliferation in MK-behandelten Zellen hinweist. Auch die tendenzielle Erniedrigung der Expression von H4 könnte auf eine Hemmung der Proliferation der osteoblastären Zellen deuten. Da eine Veränderung der Proliferation die Differenzierung der Zelle beeinflussen kann [180], könnte auch die Differenzierung der primären osteoblastären Zellkulturen verändert sein.

Herradon et al. postulierten eine Regulation der Expression von PTN über MK während der Embryogenese [147]. In der vorliegenden Arbeit konnte unter den gegebenen Versuchsbedingungen keine signifikante Veränderung der Expression von PTN nach Supplementation des Kulturmediums mit MK in murinen osteoblastären Zellen festgestellt werden. Auch für die Gene AP, PTPR ζ 1 und LEF-1 konnte in der vorliegenden Arbeit keine signifikante Veränderung der Expression festgestellt werden. Die Inkubationsdauer von 24 h könnte für langfristige Veränderung im Expressionsmuster der osteoblastären Zelle für signifikante Effekte zu kurz sein. Hier müssten Versuche über einen längeren Zeitraum durchgeführt werden. Kurzfristige Veränderungen der mRNA-Expression konnten bei einer Inkubationsdauer von 24 h wahrscheinlich nicht mehr erfasst werden.

Unter den gegebenen Versuchsbedingungen hat MK sowohl die Proliferation in Kulturen osteoblastärer Zellen aus Mauskalvarien im MTT-Test als auch die Expression von c-FOS und H4 erniedrigt, so dass davon ausgegangen werden kann, dass es die Proliferation

osteoblastärer Zellen regulieren kann. Hier ist ein Zusammenhang mit der Herunterregulation der Expression von MK in den Kulturen primärer osteoblastärer Zellen nach mechanischer Stimulation zu erkennen. Die Expression von MK wurde zusammen mit der Expression von RUNX-2 nach mechanischer Stimulation erniedrigt. Hier kann eine Hemmung der Differenzierung angenommen werden. Da der Effekt von PTN im MTT-Test nicht signifikant war, wurde zunächst ein Schwerpunkt auf den Einfluss von MK gelegt.

4.5.2 Einfluss von MK und uniaxialer Dehnung auf primäre osteoblastäre Zellen aus Mauskalvarien

Weiterhin wurde der kombinierte Effekt von MK und mechanischer Stimulation auf Kulturen primärer osteoblastärer Zellen aus Mauskalvarien untersucht.

Die Heraufregulation der Expression des Transkriptionsfaktors c-FOS nach mechanischer Stimulation zeigte in vorangegangenen Versuchen und in Studien anderer Arbeitsgruppen, dass der mechanische Stimulus von den osteoblastären Zellen aufgenommen wurde [69, 159]. In den MK-behandelten Zellen wurde die c-Fos-Expression genauso stark erhöht wie in den Kontrollen. Die Zellen, die zusätzlich MK erhielten, unterschieden sich hinsichtlich der Antwort auf mechanische Reize nicht von den unbehandelten Zellen. Die Expression der Gene PTN, PTPR ζ 1 und LEF-1 wurde im Vergleich zu den unbehandelten Zellen nicht signifikant beeinflusst. Folglich scheint MK in der Mechanotransduktion unter den gegebenen Bedingungen keinen Einfluss auf die Expression dieser Gene zu haben. Wie in Kapitel 4.5.1. diskutiert, könnten diese Ergebnisse jedoch mit der Dauer der MK-Exposition zusammenhängen. Die Expression des Proliferationsmarkers H4 wurde in den MK-behandelten Zellen nach uniaxialer Dehnung signifikant leicht erhöht (Abbildung 3.15), wogegen in den stimulierten Kontrollzellen sowie in den vorhergehenden Differenzierungsversuchen (Kapitel 3.2, Abbildung 3.7 und Abbildung 3.8) kein signifikanter Effekt erkennbar war. In den MK-behandelten Zellkulturen war die Proliferation der Zellen erniedrigt. Mechanische Stimulation könnte einen Proliferations-fördernden Reiz auf die MK-behandelten Zellkulturen haben.

Zusätzlich wurde der Einfluss von MK und mechanischer Stimulation auf TopFlash-transfizierte primäre osteoblastäre Zellen aus Mauskalvarien untersucht (Abbildung 3.16). Hier zeigte sich bei den Zellen ohne MK im Medium wie bei den PTPR ζ 1-Wildtypzellen nach mechanischer Stimulation kein signifikanter Unterschied in der TCF-vermittelten

Transkription. In den Proben, die zusätzlich MK im Medium enthielten, konnte eine signifikante Erhöhung der TCF-vermittelten Transkriptionsaktivität nachgewiesen werden. MK kann an die Rezeptoren PTPR ζ 1 und LRP6 binden [116, 120] und eine Aktivitätsveränderung dieser beiden Rezeptoren kann den WNT/ β -CAT-Signaltransduktionsweg modulieren [128, 181]. Für PTPR ζ 1 könnte eine Möglichkeit darin bestehen, dass die Bindung von MK an PTPR ζ 1 zu einer Inaktivierung der Tyrosin-Phosphatase-Aktivität führt, wie es bereits für die Interaktion von PTN und PTPR ζ 1 beschrieben wurde [182, 183]. Eine aktive PTPR ζ 1 kann die Aktivität des WNT/ β -CAT-Signaltransduktionsweges über die Dephosphorylierung von β -CAT beeinflussen [128]. Bei einer Inaktivierung der PTPR ζ 1 nach Bindung von MK könnte freies β -CAT im Zytoplasma kumulieren und für die verstärkte Weiterleitung der Signale des WNT/ β -CAT-Signaltransduktionsweges zur Verfügung stehen. Dies würde eine Erhöhung der TCF-vermittelten Transkriptionsaktivität nach mechanischer Stimulation erklären. Unsere Kooperationspartner in Hamburg konnten bei Kotransfektionen von WNT3, MK und dem TCF-Reporter-Plasmid in Kulturen von MC3T3-E1-Zellen ohne mechanische Stimulation feststellen, dass MK die WNT3-induzierte Luziferase-Expression dosisabhängig inhibieren kann. Dieser Effekt konnte durch die Co-Transfektion von PTPR ζ 1 zusätzlich verstärkt werden, so dass der WNT3-induzierte WNT/ β -CAT-Signaltransduktionsweg von der Anwesenheit von MK und PTPR ζ 1 inhibiert wurde [157]. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen vermuten, dass mechanische Stimulation in osteoblastären Zellen mit einer PTPR ζ 1-Defizienz bzw. nach Zugabe von MK Signalwege moduliert, die zu einer Aktivierung des WNT/ β -CAT-Signaltransduktionsweges führen.

Aus Kapitel 4.4.2 geht ein Einfluss der PTPR ζ 1 in die mechanisch induzierte WNT/ β -CAT-Signaltransduktion osteoblastärer Zellen hervor. Da PTPR ζ 1 als ein möglicher Rezeptor für MK diskutiert wird, kann vermutet werden, dass die Bindung von MK an diesen Rezeptor einen möglichen Regulationsmechanismus für den WNT/ β -CAT-Signaltransduktionsweg in Kulturen primärer osteoblastärer Zellen nach mechanischer Stimulation darstellt.

4.6 Schlussfolgerung

In der vorliegenden Arbeit konnte die Induktion der Differenzierung sowohl der MC3T3-E1-Zellkulturen als auch der Kulturen primärer osteoblastärer Zellen aus Mauskalvarien in Silikonschalen dargestellt werden. Im Verlauf der Differenzierung konnte sowohl für PTN und MK als auch für PTPR ζ 1, LRP6 und β -CAT eine Erhöhung der Expression festgestellt werden, was eine wichtige Rolle dieser Moleküle innerhalb der osteoblastären Reifung vermuten lässt. Die Expressionsveränderungen korrelierten miteinander.

Korrelationen in der Expressionveränderung von MK und LRP6 in den MC3T3-E1-Zellkulturen sowie von PTN, MK, PTPR ζ 1, RUNX-2 und LEF-1 in den Kulturen primärer osteoblastärer Zellen aus Mauskalvarien nach mechanischer Stimulation könnten auf einen Zusammenhang zwischen diesen Molekülen auf Proteinebene hinweisen, der über mechanische Einflüsse moduliert werden kann. Eine Interaktion von MK und LRP6 sowie zwischen PTN, oder MK und PTPR ζ 1 ist bereits von anderen Arbeitsgruppen postuliert worden [116, 117, 120, 149]. Muramatsu et al. postulierten für neuronale Zellen sogar einen funktionellen LRP6/PTPR ζ 1-Komplex für MK, der in einer Interaktion mit Integrinen das Signal weiterleitet [184].

In den verstärkt proliferierenden PTPR ζ 1-Knockout-Zellkulturen konnte im Verlauf der Differenzierung eine Veränderung der Expression osteogener Markergene, sowie der Expression von PTN und MK im Vergleich zu den Wildtypzellkulturen festgestellt werden. Hier kann ein Einfluss von PTPR ζ 1 auf die Signaltransduktionswege, die die Expression von PTN und MK im Verlauf der osteogenen Differenzierung regulieren, angenommen werden. Zudem könnte PTPR ζ 1 in die mittels Mechanik induzierte Signaltransduktion osteoblastärer Zellen involviert sein und die Aktivität des WNT/ β -CAT-Signaltransduktionsweges beeinflussen.

Der Faktor MK reduzierte die Proliferation in Kulturen osteoblastärer Zellen aus Mauskalvarien. Zudem scheint MK die WNT-vermittelte Signaltransduktion nach mechanischer Stimulation zu verstärken. Der WNT/ β -CAT-Signaltransduktionsweg kann die osteogene Differenzierung der osteoblastären Zelle beeinflussen [185], folglich könnte MK die Differenzierung von Osteoblasten modulieren.

Die funktionelle Redundanz der Faktoren PTN und MK wird in der Literatur diskutiert [147, 186]. Für PTN wurde die Bindung an PTPR ζ 1 und die daraus resultierende Inaktivierung des Rezeptors bereits beschrieben [128]. So könnte PTN wie MK über die Bindung an PTPR ζ 1

den WNT/ β -CAT-Signaltransduktionsweg und damit die Differenzierung osteoblastärer Zellen modulieren.

Ein eventueller Einfluss von PTN und MK auf den WNT/ β -CAT-Signaltransduktionsweg in der Differenzierung und der Mechanotransduktion weist auf einen weiteren Mechanismus der Regulation der Knochenmasse hin und wurde bisher noch nicht postuliert. PTN und MK könnten Differenzierungsfaktoren im Knochengewebe sein, die in Interaktion mit dem WNT/ β -CAT-Signaltransduktionsweg die voranschreitende osteogene Differenzierung der Zelle regulieren und von mechanischen Stimuli je nach Entwicklungszustand der Zelle beeinflusst werden.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die hochkonservierten, Heparin-bindenden Wachstums- und Differenzierungsfaktoren Pleiotrophin (PTN) und Midkine (MK) sind an der neuronalen Differenzierung und der Entwicklung von Tumoren beteiligt. Im Knochengewebe sind diese beiden Moleküle in die Frakturheilung und die Knochenbildung involviert. Ein Signalweg, dessen wichtige Rolle in der Knochenentwicklung und Knochenhomöostase in den letzten Jahren erkannt wurde, ist der WNT/ β -Catenin-Signaltransduktionsweg. *Low density lipoprotein receptor-related protein* (LRP)-Rezeptoren und Protein Tyrosin Phosphatase Rezeptor-Typ ζ 1 (PTPR ζ 1) sind potentielle Rezeptoren für PTN und MK. Beide Rezeptoren können den WNT/ β -Catenin-Signaltransduktionsweg modulieren und könnten so einen Zusammenhang zwischen PTN und MK und dem WNT/ β -Catenin-Signaltransduktionsweg herstellen. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Bedeutung von PTN und MK, sowie von Molekülen des WNT/ β -Catenin-Signaltransduktionsweges in der Differenzierung und der Mechanotransduktion von osteoblastären Zellen genauer zu untersuchen.

Dazu wurden die osteoblastäre Zelllinie MC3T3-E1 und primäre murine osteoblastäre Zellen aus Mauskalvarien mit Ascorbat-2-Phosphat und β -Glycerophosphat im Kulturmedium in Silikonschalen bis zu 28 Tagen osteogen differenziert. Die Veränderung der Genexpression im Verlauf der Kultivierung wurde mittels *Real-Time-PCR* gemessen. Eine osteogene Differenzierung konnte mit der Überprüfung osteogener Marker wie alkalische Phosphatase (AP), *Bone Sialoprotein* (BSP) und *Runt-related transcription factor 2* (RUNX-2) sowie histochemisch mit von Kossa- und AP-Färbung bestätigt werden. Die relative Expression von PTN, MK, PTPR ζ 1, LRP6 und β -Catenin war über den Differenzierungsverlauf hinweg erhöht. Dies weist auf einen Einfluss dieser Proteine auf die osteogene Differenzierung osteoblastärer Zellen hin. Nach uniaxialer Dehnung korrelierten die Expressionsveränderungen von MK und LRP6 in MC3T3-E1-Zellkulturen sowie von PTN, MK und PTPR ζ 1 in den Kulturen primärer osteoblastärer Zellen aus Mauskalvarien an spezifischen Tagen der Kultivierungsperiode. Mechanische Stimulation scheint Signaltransduktionswege in osteoblastären Zellen zu aktivieren, die die Expression dieser Gene regulieren.

PTPR ζ 1-*Knockout*-Zellkulturen exprimierten PTN und MK im Verlauf der Differenzierung stärker als die Wildtypzellen, so dass ein Einfluss von PTPR ζ 1 auf die Regulation der Expression von PTN und MK während der osteogenen Differenzierung angenommen werden

kann. PTPR ζ 1-*Knockout*-Zellkulturen, die mit einem *T cell factor* (TCF)-responsiven Vektor transfiziert und anschließend mechanisch stimuliert wurden, wiesen im Vergleich zu den Wildtypzellen eine erhöhte Aktivität des WNT/ β -Catenin-Signaltransduktionsweges auf. PTPR ζ 1 kann also einen Einfluss auf die Aktivität des WNT/ β -Catenin-Signaltransduktionsweges haben.

Eine Supplementation des Kulturmediums mit MK führte in einem Proliferationstest mit Kulturen primärer osteoblastärer Zellen aus Mauskalvarien zu einer leichten Reduktion der Proliferation. In MK-behandelten Zellkulturen war die Expression von *FBJ Osteosarcoma Oncogene* (c-FOS) und Histon 4 (H4) im Vergleich zu den Kulturen der Kontrollzellen erniedrigt. MK kann unter den gegebenen Versuchsbedingungen der vorliegenden Arbeit also die Proliferation osteoblastärer Zellen beeinflussen. Die Zugabe von MK modulierte den Einfluss uniaxialer Dehnung auf osteoblastäre Zellkulturen, die mit einem TCF-responsiven Vektor transfiziert wurden. Während in den Kontrollkulturen ohne MK kein Effekt beobachtet werden konnte, war der WNT/ β -Catenin-Signaltransduktionsweg in MK-behandelten Zellkulturen verstärkt aktiviert. Folglich kann MK die Aktivität des WNT/ β -Catenin-Signaltransduktionsweges nach mechanischer Stimulation beeinflussen und könnte so eine Rolle in der Mechanotransduktion osteoblastärer Zellen spielen.

Die durchgeführten Untersuchungen der vorliegenden Arbeit weisen auf einen Einfluss von PTN und MK auf die osteogene Differenzierung hin. MK und PTPR ζ 1 können den WNT/ β -Catenin-Signaltransduktionsweg modulieren und somit wahrscheinlich die Differenzierung osteoblastärer Zellen beeinflussen.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Pittenger, M.F.; Mackay, A.M.; Beck, S.C.; Jaiswal, R.K.; Douglas, R.; Mosca, J.D.; Moorman, M.A.; Simonetti, D.W.; Craig, S.; *Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells*. Science, 1999. **284**: p. 143-147.
2. Huang, W.; Yang, S.; Shao, J.; Li, Y.P.; *Signaling and transcriptional regulation in osteoblast commitment and differentiation*. Front Biosci, 2007. **12**: p. 3068-3092.
3. Bielby, R.; Jones, E.; McGonagle, D.; *The role of mesenchymal stem cells in maintenance and repair of bone*. Injury, 2007. **38 Suppl 1**: p. 26-32.
4. Arsenault, A.L.; Grynepas M.D.; *Crystals in calcified epiphyseal cartilage and cortical bone of the rat*. Calcif Tissue Int, 1988. **43**: p. 219-25.
5. Johnson, R.B.; Highison G.J.; *A re-examination of the osteocytic network of interdental bone*. J Submicrosc Cytol, 1983. **15**(3): p. 619-25.
6. Scheven, B.A.; Visser J.W.; Nijweide P.J.; *In vitro osteoclast generation from different bone marrow fractions, including a highly enriched haematopoietic stem cell population*. Nature, 1986. **321**: p. 79-81.
7. Bianco, P.; Fisher L.W.; Young, M.F.; Termine J.D.; Robey P.G.; *Expression of bone sialoprotein (BSP) in developing human tissues*. Calcif Tissue Int, 1991. **49**: p. 421-426.
8. Stein, G.S.; Lian, J.B.; *Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype*. Endocr Rev, 1993. **14**: p. 424-442.
9. Zou, L.; Zou, X.; Li, H.; Mygind, T.; Zeng, Y.; Lu, N.; Bunger, C.; *Molecular mechanism of osteochondroprogenitor fate determination during bone formation*. Adv Exp Med Biol, 2006. **585**: p. 431-441.
10. Ducy, P.; Zhang, R.; Geoffroy, V.; Ridall A.L. Karsenty, G.; *Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation*. Cell, 1997. **89**: p. 747-754.
11. Kern, B.; Shen, J.; Starbuck, M.; Karsenty, G.; *Cbfa1 contributes to the osteoblast-specific expression of type I collagen genes*. J Biol Chem, 2001. **276**: p. 7101-7107.
12. Komori, T.; Yagi, H.; Nomura, S.; Yamaguchi, A.; Sasaki, K.; Deguchi, K.; Shimizu, Y.; Bronson, R.T.; Gao, Y.H.; Inada, M.; Sato, M.; Okamoto, R.; Kitamura, Y.; Yoshiki, S.; Kishimoto, T.; *Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts*. Cell, 1997. **89**: p. 755-764.
13. Otto, F.; Thornell, A.P.; Crompton, T.; Denzel, A.; Gilmour, K.C.; Rosewell, I.R.; Stamp, G.W.; Mundlos, S.; Olsen B.R.; Selby, P.B.; Owen, M.J.; *BCbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development*. Cell, 1997. **89**: p. 765-771.
14. Vaes, B.L.; Ducyl, P.L.; Sijbers, A.M.; Hendriks, J.M.; van Someren E.P.; de Jong, N.G.; van den Heuvel, E.R.; Olijve, W.; van Zoelen E.J.; Dechering, K.J.; *Microarray analysis on Runx2-deficient mouse embryos reveals novel Runx2 functions and target genes during intramembranous and endochondral bone formation*. Bone, 2006. **39**: p. 724-738.
15. Nakashima, K.; Zhou, X.; Kunkel, G.; Zhang, Z.; Deng, J.M.; Behringer, R.R.; de Crombrughe, B.; *The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation*. Cell, 2002. **108**: p. 17-29.
16. Lee, M.H.; Kwon, T.G.; Park, H.S.; Wozney, J.M.; Ryoo, H.M.; *BMP-2-induced Osterix expression is mediated by Dlx5 but is independent of Runx2*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **309**: p. 689-694.
17. Robling, A.G.; Castillo, A.B.; Turner, C.H; *Biomechanical and Molecular Regulation of Bone Remodeling*. Annu Rev Biomed Eng, 2006.

18. Machwate, M.; Julliène, A.; Moukhtar, M.; Marie, P.J.; *Temporal variation of c-Fos proto-oncogene expression during osteoblast differentiation and osteogenesis in developing rat bone*. J Cell Biochem, 1995. **57**: p. 62-70.
19. Yang, X.; Matsuda, K.; Bialek, P.; Jacquot, S.; Masuoka, H.C.; Schinke, T.; Li, L.; Brancorsini, S.; Sassone-Corsi, P.; Hanauer, A.; Karsenty, G.; *ATF4 is a substrate of RSK2 and an essential regulator of osteoblast biology; implication for Coffin-Lowry Syndrome*. Cell, 2004. **117**: p. 387-398.
20. Jacob, A.L., Smith, C.; Partanen, J.; Ornitz, D.; *Fibroblast growth factor receptor 1 signaling in the osteo-chondrogenic cell lineage regulates sequential steps of osteoblast maturation*. Dev Biol, 2006. **296**: p. 315-328.
21. Phimphilai, M., Zhao, Z.; Boules, H.; Roca, H.; Franceschi, R.T.; *BMP signaling is required for RUNX2-dependent induction of the osteoblast phenotype*. J Bone Miner Res, 2006. **21**: p. 637-646.
22. Kahler, R.A., Galindo, M.; Lian, J.; Stein, G.S.; van Wijnen, A.; Westendorf, J.J.; *Lymphocyte enhancer-binding factor 1 (Lef1) inhibits terminal differentiation of osteoblasts*. J Cell Biochem, 2006. **97**: p. 969-983.
23. Rodda, S.J.; McMahon, A.P.; *Distinct roles for Hedgehog and canonical Wnt signaling in specification, differentiation and maintenance of osteoblast progenitors*. Development, 2006. **133**: p. 3231-3244.
24. Tuan, R.S.; Boland, G.; Tuli, R.; *Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering*. Arthritis Res Ther, 2003. **5**: p. 32-45.
25. zur Nieden, N.I., Kempka, G.; Ahr, H.J.; *In vitro differentiation of embryonic stem cells into mineralized osteoblasts*. Differentiation, 2003. **71**: p. 18-27.
26. Sudo, H., Kodama, H.A.; Amagai, Y.; Yamamoto, S.; Kasai, S.; *In vitro differentiation and calcification in a new clonal osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria*. J Cell Biol, 1983. **96**: p. 191-198.
27. Franceschi, R.T., Iyer, B.S.; Cui, Y.; *Effects of ascorbic acid on collagen matrix formation and osteoblast differentiation in murine MC3T3-E1 cells*. J Bone Miner Res, 1994. **9**: p. 843-854.
28. Quarles, L.D., Yohay, D.A.; Lever, L.W.; Caton, R.; Wenstrup, R.J.; *Distinct proliferative and differentiated stages of murine MC3T3-E1 cells in culture: an in vitro model of osteoblast development*. J Bone Miner Res, 1992. **7**: p. 683-692.
29. Franceschi, R.T.; Iyer, B.S.; *Relationship between collagen synthesis and expression of the osteoblast phenotype in MC3T3-E1 cells*. J Bone Miner Res, 1992. **7**: p. 235-246.
30. Kinoshita, S.; Finnegan, M.; Bucholz, R.; Mizuno, K.; *Three-dimensional collagen gel culture promotes osteoblastic phenotype in bone marrow derived cells*. Kobe J Med Sci, 1999. **45**: p. 201-211.
31. Shi, S.; Kirk, M.; Kahn, A.J.; *The role of type I collagen in the regulation of the osteoblast phenotype*. J Bone Miner Res, 1996. **11**: p. 1139-1145.
32. Mikuni-Takagaki, Y.; Kakai, Y.; Satoyoshi, M.; Suzuki, Y.; Kawase, T.; Saito, S.; *Matrix mineralization and the differentiation of osteocyte-like cells in culture*. J Bone Miner Res, 1995. **10**: p. 231-242.
33. Harada, S.; Rodan, G.A.; *Control of osteoblast function and regulation of bone mass*. Nature, 2003. **423**: p. 349-355.
34. Raisz, L.G., *Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects*. J Clin Invest, 2005. **115**: p. 3318-3325.
35. Frost, H.M., *Bone "mass" and the "mechanostat": a proposal*. Anat Rec, 1987. **219**: p. 1-9.
36. Lacroix, P., [Studies of internal remodeling of bones]. Arch Biol (Liege), 1970. **81**: p. 275-304.

37. Shoback, D., *Update in osteoporosis and metabolic bone disorders*. J Clin Endocrinol Metab, 2007. **92**: p. 747-753.
38. Little, R.D.; Carulli, J.P.; Del Mastro, R.G.; Depuis, J.; Osborne, M.; Folz, C.; Manning, S.P.; Swain, P.M.; Zhao, S.C.; Recker, R.R.; Johnson, M.M.; *A mutation in the LDL receptor-related protein 5 gene results in the autosomal dominant high-bone-mass trait*. Am J Hum Genet, 2002. **70**: p. 9-11.
39. Rubin, J., Rubin, C.; Jacobs, C.R.; *Regulation of murine osteoblast macrophage colony-stimulating factor production by 1,25(OH)2D3*. Calcif Tissue Int, 1996. **59**: p. 291-296.
40. Horwood, N.J., Elliott, J.; Martin, T.; Gillespie, M.T.; *Osteotropic agents regulate the expression of osteoclast differentiation factor and osteoprotegerin in osteoblastic stromal cells*. Endocrinology, 1998. **139**: p. 4743-4746.
41. Nakashima, T., Zhou, X.; Kunkel, G.; Zhang, Z.; Deng, J.M.; Behringer, R.; de Crombrughe, B.; *Protein expression and functional difference of membrane-bound and soluble receptor activator of NF-kappaB ligand: modulation of the expression by osteotropic factors and cytokines*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **275**: p. 768-775.
42. Takahashi, N., Udagawa, N.; Akatsu, T.; Tanaka, H.; Shionome, M.; Suda, T.; *Role of colony-stimulating factors in osteoclast development*. J Bone Miner Res, 1991. **6**: p. 977-985.
43. Suda, T., Takahashi, N., Udagawa, N.; Jimi, E.; Gillespie, M.T.; Martin, T.J.; *Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families*. Endocr Rev, 1999. **20**: p. 345-357.
44. Simonet, W.S.; Lacey, D.L.; Dunstan, C.R.; Kelley, M.; Chang, M.; Luthy, R.; Nguyen, H.Q.; Wooden, S.; Bennett, L.; Boone, T.; Shimamoto, G.; Elliott, R.; Colombero, A.; Lee, R.; Boyle, W.J.; *Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density*. Cell, 1997. **89**: p. 309-319.
45. Lacey, D.L., Timms, E.; Tan, H.L.; Kelley, M.; Dunstan, C.R.; Burgess, T.; Elliott, R.; Colombero, A.; Delaney, J.; Boyle, W.J.; *Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation*. Cell, 1998. **93**: p. 165-176.
46. Teitelbaum, S.L., *Bone resorption by osteoclasts*. Science, 2000. **289**: p. 1504-1508.
47. Martin, T.J.; Sims, N.A.; *Osteoclast-derived activity in the coupling of bone formation to resorption*. Trends Mol Med, 2005. **11**: p. 76-81.
48. Palumbo, C.; Ferretti, M.; Ardizzon, A.; Zaffe, D.; Marotti, G.; *Osteocyte-osteoclast morphological relationships and the putative role of osteocytes in bone remodeling*. J Musculoskelet Neuronal Interact, 2001. **1**: p. 327-332.
49. Kanaan, R.A.; Kanaan, L.A.; *Transforming growth factor beta1, bone connection*. Med Sci Monit, 2006. **12**: p. 164-169.
50. Wolff, J., *Das Gesetz der Transformation der Knochen*. (A. Hirschwald, Ed.) Berlin, 1892.
51. Klein-Nulend, J.; van der Plas, A.; Semeins, C.; Ajubi, N.; Frangos, J.; Nijweide, P.; Burger, E.; *Sensitivity of osteocytes to biomechanical stress in vitro*. Faseb J, 1995. **9**: p. 441-445.
52. Mikuni-Takagaki, Y., Suzuki, Y.; Kawase, T.; Saito, S.; *Distinct responses of different populations of bone cells to mechanical stress*. Endocrinology, 1996. **137**: p. 2028-2035.
53. Liedert, A.; Kaspar, D.; Blakytyn, R.; Claes, L.; Ignatius, A.; *Signal transduction pathways involved in mechanotransduction in bone cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **349**: p. 1-5.

54. Walker, L.M.; Publicover, S.J.; Preston, M.R.; Said Ahmend, M.A.; El Haj, A.; *Calcium-channel activation and matrix protein upregulation in bone cells in response to mechanical strain*. J Cell Biochem, 2000. **79**: p. 648-661.
55. Li, J.; Duncan, B.L.; Burr, D.; Turner, C.H.; *L-type calcium channels mediate mechanically induced bone formation in vivo*. J Bone Miner Res, 2002. **17**: p. 1795-1800.
56. Chen, N.X., Geist, D.J.; Genetos, D.C.; Pavalko, F.M.; Duncan, R.L.; *Fluid shear-induced NFkappaB translocation in osteoblasts is mediated by intracellular calcium release*. Bone, 2003. **33**: p. 399-410.
57. Fitzgerald, J.; Hughes-Fulford, M.; *Mechanically induced c-fos expression is mediated by cAMP in MC3T3-E1 osteoblasts*. Faseb J, 1999. **13**: p. 553-557.
58. Wadhwa, S.; Choudhary, S.; Voznesensky, M.; Epstein, M.; Raisz, L.; Pilbeam, C.; *Fluid flow induces COX-2 expression in MC3T3-E1 osteoblasts via a PKA signaling pathway*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **297**: p. 46-51.
59. Cherian, P.P., Cheng, B.; Gu, S.; Sprague, E.; Bonewald, F.; Jiang, J.X.; *Effects of mechanical strain on the function of Gap junctions in osteocytes are mediated through the prostaglandin EP2 receptor*. J Biol Chem, 2003. **278**: p. 43146-43156.
60. Alford, A.I., Jacobs, C.R.; Donahue, H.J.; *Oscillating fluid flow regulates gap junction communication in osteocytic MLO-Y4 cells by an ERK1/2 MAP kinase-dependent mechanism small star, filled*. Bone, 2003. **33**: p. 64-70.
61. Salter, D.M., Robb, J.E.; Wright, M.O.; *Electrophysiological responses of human bone cells to mechanical stimulation: evidence for specific integrin function in mechanotransduction*. J Bone Miner Res, 1997. **12**: p. 1133-1141.
62. Schlaepfer, D.D.; Jones, K.C.; Hunter, T.; *Multiple Grb2-mediated integrin-stimulated signaling pathways to ERK2/mitogen-activated protein kinase: summation of both c-Src- and focal adhesion kinase-initiated tyrosine phosphorylation events*. Mol Cell Biol, 1998. **18**: p. 2571-2585.
63. Pavalko, F.M.; Norvell, S.M.; Burr, D.; Turner, C.H.; Duncan, R.L.; Bidwell, J.P.; *A model for mechanotransduction in bone cells: the load-bearing mechanosomes*. J Cell Biochem, 2003. **88**: p. 104-112.
64. Ignatius, A., Blessing, H.; Liedert, A.; Kaspar, D.; Kreja, L.; Friemert, B.; Claes, L.; *[Effects of mechanical strain on human osteoblastic precursor cells in type I collagen matrices]*. Orthopade, 2004. **33**: p. 1386-1393.
65. Hughes-Fulford, M., *Signal transduction and mechanical stress*. Sci STKE, 2004. **2004**: p. RE12.
66. Kaspar, D.; Seidl, W.; Neidlinger-Wilke, C.; Ignatius, A.; Claes, L.; *Dynamic cell stretching increases human osteoblast proliferation and CICP synthesis but decreases osteocalcin synthesis and alkaline phosphatase activity*. J Biomech, 2000. **33**: p. 45-51.
67. Carvalho, R.S.; Scott, E.J.; Suga, D.; Yen, E.; *Stimulation of signal transduction pathways in osteoblasts by mechanical strain potentiated by parathyroid hormone*. J Bone Miner Res, 1994. **9**: p. 999-1011.
68. Turner, C.H.; *Mechanical loading and bone formation*. BoneKEY-Osteovision, 2004.
69. Kawata, A.; Mikuni-Takagaki, Y.; *Mechanotransduction in stretched osteocytes--temporal expression of immediate early and other genes*. Biochem Biophys Res Commun, 1998. **246**: p. 404-408.
70. Kaspar, D.; Seidl, W.; Neidlinger-Wilke, C.; Beck, A.; Claes, L.; Ignatius, A.; *Proliferation of human-derived osteoblast-like cells depends on the cycle number and frequency of uniaxial strain*. J Biomech, 2002. **35**(7): p. 873-80.
71. Lau, K.H.; Kapur, S.; Kesaven, C.; Baylink, D.; *Up-regulation of the Wnt, estrogen receptor, insulin-like growth factor-I, and bone morphogenetic protein pathways in*

- C57BL/6J osteoblasts as opposed to C3H/HeJ osteoblasts in part contributes to the differential anabolic response to fluid shear.* J Biol Chem, 2006. **281**: p. 9576-9588.
72. Robinson, J.A., Chatterjee-Kishore, M.; Yaworsky, P.; Cullen, D.; Zhao, W.; Li, C.; Kharode, Y.; Sauter, L.; Babij, P.; Brown, E.; Hill, A.; Akther, M.; Johnsson, M.; Recker, R.; Komm, B.; Bex, F.; *WNT/beta -catenin signaling is a normal physiological response to mechanical loading in bone.* J Biol Chem, 2006. **281**: p. 3653-3663
73. Norvell, S.M., Alvarez, M.; Bidwell, J.P.; Pavalko, F.M.; *Fluid shear stress induces beta-catenin signaling in osteoblasts.* Calcif Tissue Int, 2004. **75**: p. 396-404.
74. Armstrong, V.J., Muzylak, M.; Sunter, A.; Zaman, G.; Saxon, L.; Price, J.S.; Lanyon, L.E.; *Wnt/beta -catenin signaling is a component of osteoblastic bone cells' early responses to load-bearing, and requires estrogen receptor alpha.* J Biol Chem, 2007.
75. Liedert, A., et al., *Mechanical regulation of HB-GAM expression in bone cells.* Biochem Biophys Res Commun, 2004. **319**: p. 951-958.
76. Liedert, A.; Kaspar, D.; Claes, L.; Ignatius, A.; *Signal transduction pathways involved in mechanical regulation of HB-GAM expression in osteoblastic cells.* Biochem Biophys Res Commun, 2006. **342**: p. 1070-1076.
77. Xing, W.; Baylink, D.; Kesavan, C.; Hu, Y.; Kapoor, S.; Chadwick, R.; Mohan, S.; *Global gene expression analysis in the bones reveals involvement of several novel genes and pathways in mediating an anabolic response of mechanical loading in mice.* J Cell Biochem, 2005. **96**: p. 1049-1060.
78. Moon, R.T.; Brown, J.; Yang-Snyder, J.A.; Miller, J.R.; *Structurally related receptors and antagonists compete for secreted Wnt ligands.* Cell, 1997. **88**: p. 725-728.
79. Li, Y.; Bu, G.; *LRP5/6 in Wnt signaling and tumorigenesis.* Fut Oncol, 2005. **1**: p. 673-681.
80. Westendorf, J.J.; Kahler, R.A.; Schroeder, T.M.; *Wnt signaling in osteoblasts and bone diseases.* Gene, 2004. **341**: p. 19-39.
81. Jackson, A.; Vayssiere, B.; Garcia, T.; Newell, W.; Baron, R.; Roman-Roman, S.; Rawadi, G.; *Gene array analysis of Wnt-regulated genes in C3H10T1/2 cells.* Bone, 2005. **36**: p. 585-598.
82. Gordon, M.D.; Nusse, R.; *Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors.* J Biol Chem, 2006. **281**: p. 22429-22433.
83. Gong, Y.; Slee, R.B.; Fukai, N.; Rawadi, G.; Roman-Roman, S.; Reginato, A.; Wang, H.; Cundy, T.; Glorieux, F.; Lev, D.; Zacharin, M.; Oexle, K.; Marcelino, J.; Suwairi, W.; Heeger, S.; Sabatakos, G.; Olsen, B.; Warman, M.; *LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development.* Cell, 2001. **107**: p. 513-523.
84. Hurson, C.J.; Butler, J.; Keating, D.; Murray, D.; Sadler, D.; O'Byrne, J.; Doran, P.; *Gene expression analysis in human osteoblasts exposed to dexamethasone identifies altered developmental pathways as putative drivers of osteoporosis.* BMC Musculoskelet Disord, 2007. **8**: p. 12.
85. Chen, Y.; Whetstone, H.; Youn, A.; Nadesan, P.; Chow, E.; Lina, A.; Alman, B.; *Beta-catenin signaling pathway is crucial for bone morphogenetic protein 2 to induce new bone formation.* J Biol Chem, 2007. **282**: p. 526-533.
86. Almeida, M., Han, L.; Bellido, T.; Manolagas, S.; Kousteni, S.; *Wnt proteins prevent apoptosis of both uncommitted osteoblast progenitors and differentiated osteoblasts by beta-catenin-dependent and -independent signaling cascades involving Src/ERK and phosphatidylinositol 3-kinase/AKT.* J Biol Chem, 2005. **280**: p. 41342-41351.
87. Glass, D.A., 2nd; Karsenty, G.; *In vivo analysis of Wnt signaling in bone.* Endocrinology, 2007. *epub ahead of print.*

88. Bennett, C.N., Longo, K.; Wright, W.S.; Suva, L.; Lane, T.; Hankenson, K.; MacDougald, O.; *Regulation of osteoblastogenesis and bone mass by Wnt10b*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**: p. 3324-3329.
89. Hill, T.P.; Spater, D.; Taketo, M.; Birchmeier, W.; Hartmann, C.; *Canonical Wnt/beta-catenin signaling prevents osteoblasts from differentiating into chondrocytes*. Dev Cell, 2005. **8**: p. 727-738.
90. Day, T.F.; Guo, X.; Garrett-Beal, L.; Yang, Y.; *Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis*. Dev Cell, 2005. **8**: p. 739-750.
91. Galindo, M.; Kahler, R.; Teplyk, N.; Lian, B.; Stein, G.; Westendorff, J.; van Wijnen, A.; *Cell cycle related modulations in Runx2 protein levels are independent of lymphocyte enhancer-binding factor 1 (Lef1) in proliferating osteoblasts*. J Mol Histol, 2007. (epub ahead of print)
92. Li, X.; Zhang, Y.; Kang, H.; Liu, W.; Liu, P.; Zhang, J.; Harris, S.; Wu, D.; *Sclerostin binds to LRP5/6 and antagonizes canonical Wnt signaling*. J Biol Chem, 2005. **280**: p. 19883-19887.
93. Shi, Y.C.; Worton, L.; Esteban, L.; Baldock, P.; Eisman, J.; Gardiner, E.; *Effects of continuous activation of vitamin D and Wnt response pathways on osteoblastic proliferation and differentiation*. Bone, 2007. (epub ahead of print)
94. Glass, D.A., 2nd; Bialek, P.; Ahn, J.; Starbuck, M.; Patel, M.; Clevers, H.; Taketo, M.; Long, F.; Lang, R.; Karsenty, G.; *Canonical Wnt signaling in differentiated osteoblasts controls osteoclast differentiation*. Dev Cell, 2005. **8**: p. 751-764.
95. Haynes, L.; Rumsby, M.; *The pleiotropin/midkine family of cytokines: role in glial-neuronal signalling*. Prog Brain Res, 2001. **132**: p. 313-324.
96. Merenmies, J.; Rauvala, H.; *Molecular cloning of the 18-kDa growth-associated protein of developing brain*. J Biol Chem, 1990. **265**(: p. 16721-16724.
97. Fabri, L.; Maruta, H.; Muramatsu, H.; Muramatsu, T.; Simpson, R.; Burgess, A.; Nice, E.; *Structural characterisation of native and recombinant forms of the neurotrophic cytokine MK*. J Chromatogr, 1993. **646**: p. 213-225.
98. Fabri, L.; Nice, E.; Ward, L.; Maruta, H.; Burgess, A.; Simpson, R.; *Characterization of bovine heparin-binding neurotrophic factor (HBNF): assignment of disulfide bonds*. Biochem Int, 1992. **28**: p. 1-9.
99. Rauvala, H.; Peng, H.; *HB-GAM (heparin-binding growth-associated molecule) and heparin-type glycans in the development and plasticity of neuron-target contacts*. Prog Neurobiol, 1997. **52**: p. 127-144.
100. Muramatsu, T., *Midkine (MK), the product of a retinoic acid responsive gene, and pleiotrophin constitute a new protein family regulating growth and differentiation*. Int J Dev Biol, 1993. **37**: p. 183-188.
101. Dreyfus, J.; Brunet-de-Carvalho, N.; Duprez, D.; Raulais, D.; Digny, M.; *HB-GAM/pleiotrophin: localization of mRNA and protein in the chicken developing leg*. Int J Dev Biol, 1998. **42**: p. 189-198.
102. Hampton, B.S.; Marshak, D.R.; Burgess, W.; *Structural and functional characterization of full-length heparin-binding growth associated molecule*. Mol Biol Cell, 1992. **3**: p. 85-93.
103. Kurtz, A.; Schulte, A.M.; Wellstein, A.; *Pleiotrophin and midkine in normal development and tumor biology*. Crit Rev Oncog, 1995. **6**(2): p. 151-177.
104. Ohta, S.; Muramatsu, H.; Senda, T.; Zou, K.; Iwata, H.; Muramatsu, T.; *Midkine is expressed during repair of bone fracture and promotes chondrogenesis*. J Bone Miner Res, 1999. **14**: p. 1132-1144.

105. Petersen, W.; Wildeman, B.; Pufe, T.; Raschke, K.; Schmidmaier, G.; *The angiogenic peptide pleiotrophin (PTN/HB-GAM) is expressed in fracture healing: an immunohistochemical study in rats.* Arch Orthop Trauma Surg, 2004. **124**: p. 603-607.
106. Li, G.; Bunn, J.; Mushipe, M.; He, Q.; Chen, X.; *Effects of pleiotrophin (PTN) overexpression on mouse long bone development, fracture healing and bone repair.* Calcif Tissue Int, 2005. **76**: p. 299-306.
107. Tare, R.S.; Oreffo, R.; Sato, K.; Rauvala, H.; Clarke, N.; Roach, H.; *Effects of targeted overexpression of pleiotrophin on postnatal bone development.* Biochem Biophys Res Commun, 2002. **298**: p. 324-332.
108. Lehmann, W.; Schinke, T.; Schilling, A.; Catala-Lehnen, P.; Gebauer, M.; Pogoda, P.; Gerstenfeld, L.; Rueger, J.; Einhorn, T.; Amling, M.; *Absence of mouse pleiotrophin does not affect bone formation in vivo.* Bone, 2004. **35**: p. 1247-1255.
109. Masuda, H.; Tsijmura, A.; Arai, Y.; Kuboki, Y.; Mukai, T.; Nakamura, T.; Nakagawa, M.; Hashimoto-Gotoh, T.; *Bone mass loss due to estrogen deficiency is compensated in transgenic mice overexpressing human osteoblast stimulating factor-1.* Biochem Biophys Res Commun, 1997. **238**: p. 528-533.
110. Zhou, H.Y.; Ohnuma, Y.; Takita, H.; Fuijsawa, R.; Mizuno, M.; Kuboki, Y.; *Effects of a bone lysine-rich 18 kDa protein on osteoblast-like MC3T3-E1 cells.* Biochem Biophys Res Commun, 1992. **186**: p. 1288-1293.
111. Yang, X.; Tare, R.; Patrige, K.; Roach, H.; Claarke, N.; Howdle, S.; Shakesheff, K.; Oreffo, R.; *Induction of human osteoprogenitor chemotaxis, proliferation, differentiation, and bone formation by osteoblast stimulating factor-1/pleiotrophin: osteoconductive biomimetic scaffolds for tissue engineering.* J Bone Miner Res, 2003. **18**: p. 47-57.
112. Mitsiadis, T.A.; Muramatsu, T.; Muramatsu, H.; Thesleff, I.; *Midkine (MK), a heparin-binding growth/differentiation factor, is regulated by retinoic acid and epithelial-mesenchymal interactions in the developing mouse tooth, and affects cell proliferation and morphogenesis.* J Cell Biol, 1995. **129**: p. 267-281.
113. Deepa, S.S.; Yamada, S.; Zako, M.; Goldberger, O.; Sugahara, K.; *Chondroitin sulfate chains on syndecan-1 and syndecan-4 from normal murine mammary gland epithelial cells are structurally and functionally distinct and cooperate with heparan sulfate chains to bind growth factors. A novel function to control binding of midkine, pleiotrophin, and basic fibroblast growth factor.* J Biol Chem, 2004. **279**: p. 37368-37376.
114. Rauvala, H.; Huttunen, H.; Fages, C.; Kaksonen, M.; Kinnunen, T.; Imai, S.; Raulo, E.; Kilpelainen, I.; *Heparin-binding proteins HB-GAM (pleiotrophin) and amphoterin in the regulation of cell motility.* Matrix Biol, 2000. **19**: p. 377-387.
115. Nakanishi, T.; Kadomatsu, K.; Okamoto, T.; Ichihara-Tanaka, K.; Koijima, T.; Saito, H.; Tomoda, Y.; Muramatsu, T.; *Expression of syndecan-1 and -3 during embryogenesis of the central nervous system in relation to binding with midkine.* J Biochem (Tokyo), 1997. **121**: p. 197-205.
116. Maeda, N.; Ichihara-Tanaka, K.; Kimura, T.; Kadomatsu, K.; Muramatsu, T.; Noda, M.; *A receptor-like protein-tyrosine phosphatase PTPzeta/RPTPbeta binds a heparin-binding growth factor midkine. Involvement of arginine 78 of midkine in the high affinity binding to PTPzeta.* J Biol Chem, 1999. **274**: p. 12474-12479.
117. Maeda, N.; Nishiwaki, T.; Shintani, T.; Hamanake, H.; Noda, M.; *6B4 proteoglycan/phosphacan, an extracellular variant of receptor-like protein-tyrosine phosphatase zeta/RPTPbeta, binds pleiotrophin/heparin-binding growth-associated molecule (HB-GAM).* J Biol Chem, 1996. **271**: p. 21446-21452.
118. Stoica, G.; Kuo, A.; Aigner, A.; Sunitha, I.; Souttou, B.; Malercyz, C.; Caughney, D.; Wen, D.; Karanov, A.; Riegel, A.; Wellstein, A.; *Identification of anaplastic*

- lymphoma kinase as a receptor for the growth factor pleiotrophin.* J Biol Chem, 2001. **276**: p. 16772-16779.
119. Stoica, G.E.; Kuo, A.; Powers, C.; Bowden, E.; Sale, E.; Riegel, A.; Wellstein, A.; *Midkine binds to anaplastic lymphoma kinase (ALK) and acts as a growth factor for different cell types.* J Biol Chem, 2002. **277**: p. 35990-35998.
120. Muramatsu, H.; Zou, K.; Sakaguchi, N.; Ikematsu, S.; Sakuma, S.; Muramatsu, T.; *LDL receptor-related protein as a component of the midkine receptor.* Biochem Biophys Res Commun, 2000. **270**: p. 936-941.
121. Huang, C.; Ni, Y.; Wang, T.; Gao, Y.; Haudenschild, C.; Zhan, X.; *Down-regulation of the filamentous actin cross-linking activity of cortactin by Src-mediated tyrosine phosphorylation.* J Biol Chem, 1997. **272**: p. 13911-13915.
122. Kinnunen, T.; Kaksonen, M.; Saarinen, J.; Kalkkinen, N.; Peng, H.; Rauvala, H.; *Cortactin-Src kinase signaling pathway is involved in N-syndecan-dependent neurite outgrowth.* J Biol Chem, 1998. **273**: p. 10702-10708.
123. Kuo, A.H.; Stoica, G.; Riegel, A.; Wellstein, A.; *Recruitment of insulin receptor substrate-1 and activation of NF-kappaB essential for midkine growth signaling through anaplastic lymphoma kinase.* Oncogene, 2007. **26**: p. 859-69.
124. Powers, C.; Aigner, A.; Stoica, G.; McDonell, K.; Wellstein, A.; *Pleiotrophin signaling through anaplastic lymphoma kinase is rate-limiting for glioblastoma growth.* J Biol Chem, 2002. **277**: p. 14153-14158.
125. Bowden, E.T.; Stoica, G.E.; Wellstein, A.; *Anti-apoptotic signaling of pleiotrophin through its receptor, anaplastic lymphoma kinase.* J Biol Chem, 2002. **277**: p. 35862-35868.
126. Sakaguchi, N.; Muramatsu, H.; Ichihara-Tanaka, K.; Maeda, N.; Noda, M.; Yamamoto, T.; Michikata, M.; Ikematsu, S.; Sakuma, S.; Muramatsu, T.; *Receptor-type protein tyrosine phosphatase zeta as a component of the signaling receptor complex for midkine-dependent survival of embryonic neurons.* Neurosci Res, 2003. **45**: p. 219-224.
127. Qi, M.; Ikematsu, S.; Maeda, N.; Sakuma, S.; Noda, M.; Muramatsu, T.; Kadomatsu, K.; *Haptotactic migration induced by midkine. Involvement of protein-tyrosine phosphatase zeta. Mitogen-activated protein kinase, and phosphatidylinositol 3-kinase.* J Biol Chem, 2001. **276**: p. 15868-15875.
128. Meng, K.; Rodriguet-Pena, A.; Dimitrov, T.; Chen, W.; Yamin, M.; Noda, M.; Deuel, T.; *Pleiotrophin signals increased tyrosine phosphorylation of beta beta-catenin through inactivation of the intrinsic catalytic activity of the receptor-type protein tyrosine phosphatase beta/zeta.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**: p. 2603-2608.
129. Nelson, W.J.; Nusse, R.; *Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways.* Science, 2004. **303**: p. 1483-1487.
130. Chen, S.; Bu, G.; Takei, Y.; Sakamoto, K.; Ikematsu, S.; Muramatsu, T.; Kadomatsu, K.; *Midkine and LDL-receptor-related protein 1 contribute to the anchorage-independent cell growth of cancer cells.* J Cell Sci, 2007. (epub ahead of print)
131. Neidlinger-Wilke, C.; Wilke, H.J.; Claes, L.; *Cyclic stretching of human osteoblasts affects proliferation and metabolism: a new experimental method and its application.* J Orthop Res, 1994. **12**: p. 70-78.
132. Kalajzic, I.; Staal, A.; Yang, W.; Wu, Y.; Johnson, S.; Feyen, J.; Krueger, W.; Maye, P.; Yu, F.; Zhao, Y.; Kuo, L.; Gupta, R.; Achenie, L.; Wang, H.; Shin, D.; Rowe, D.; *Expression profile of osteoblast lineage at defined stages of differentiation.* J Biol Chem, 2005. **280**: p. 24618-24626.
133. Garcia, T.; Roman-Roman, S.; Jackson, A.; Theilhaber, J.; Connolly, T.; Spinella-Jaegle, S.; Kawai, S.; Courtois, B.; Bushnell, S.; Auberval, M.; Call, K.; Baron, R.;

- Behavior of osteoblast, adipocyte, and myoblast markers in genome-wide expression analysis of mouse calvaria primary osteoblasts in vitro.* Bone, 2002. **31**: p. 205-211.
134. Wang, D.; Christensen, K.; Chawla, K.; Xiao, G.; Krebsbach, P.; Franceschi, R.; *Isolation and characterization of MC3T3-E1 preosteoblast subclones with distinct in vitro and in vivo differentiation/mineralization potential.* J Bone Miner Res, 1999. **14**: p. 893-903.
135. Ibaraki, K.; Termine, J.; Whitson, S.; Young, F.; *Bone matrix mRNA expression in differentiating fetal bovine osteoblasts.* J Bone Miner Res, 1992. **7**: p. 743-754.
136. Grigoriadis, A.E.; Wang, Z.Q.; Wagner, E.F.; *Fos and bone cell development: lessons from a nuclear oncogene.* Trends Genet, 1995. **11**: p. 436-441.
137. Grigoriadis, A.E.; Schellander, K.; Wang, Z.; Wagner, E.; *Osteoblasts are target cells for transformation in c-fos transgenic mice.* J Cell Biol, 1993. **122**: p. 685-701.
138. Imai, S.; Kaksonen, M.; Raulo, R.; Kinnunen, T.; Fages, C.; Meng, X.; Lakso, M.; Rauvala, H.; *Osteoblast recruitment and bone formation enhanced by cell matrix-associated heparin-binding growth-associated molecule (HB-GAM).* J Cell Biol, 1998. **143**: p. 1113-1128.
139. Sato, Y.; Takita, H.; Ohata, M.; Tamura, M.; Kuboki, Y.; *Pleiotrophin regulates bone morphogenetic protein (BMP)-induced ectopic osteogenesis.* J Biochem (Tokyo), 2002. **131**: p. 877-886.
140. Stock, M.; Schaefer, M.; Fliegau, M.; Otto, F.; *Identification of novel genes of the bone-specific transcription factor Runx2.* J Bone Miner Res, 2004. **19**: p. 959-972.
141. Mitsiadis, T.A.; Salmivirta, M.; Muramatsu, T.; Muramatsu, H.; Rauvala, H.; Lehtonen, E.; Jalkanen, M.; Thesleff, I.; *Expression of the heparin-binding cytokines, midkine (MK) and HB-GAM (pleiotrophin) is associated with epithelial-mesenchymal interactions during fetal development and organogenesis.* Development, 1995. **121**: p. 37-51.
142. Koshizawa, S.H.; Matsumura, T.; Kadono, Y.; Sawada, T.; Kadomatsu, K.; Muramatsu, T.; Muramatsu, H.; *Alteration of midkine expression associated with chemically-induced differentiation in human neuroblastoma cells.* Cancer Lett, 1997. **111**: p. 117-125.
143. Maehara, H.; Kaname, T.; Yanagi, K.; Hanzawa, H.; Owan, I.; Kinjou, T.; Kadomatsu, K.; Ikematsu, S.; Iwamasa T.; Kanaya, F.; Naritomi, K.; *Midkine as a novel target for antibody therapy in osteosarcoma.* Biochem Biophys Res Commun, 2007. **358**: p. 757-762.
144. Billiard, J.; Moran, R.; Whitley, M.; Chatterjee-Kishore, M.; Dillis, G.; Brown, E.; Komm, B.; Bodine, P.; *Transcriptional profiling of human osteoblast differentiation.* J Cell Biochem, 2003. **89**: p. 389-400.
145. Maruyama, K.; Muramatsu, H.; Ishiguro N.; Muramatsu, T.; *Midkine, a heparin-binding growth factor, is fundamentally involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis.* Arthritis Rheum, 2004. **50**: p. 1420-1429.
146. Brunet-de Carvalho, N.; Raulais, D.; Rauvala, H.; Souttou, B.; Vigny, M.; *HB-GAM/Pleiotrophin and Midkine are differently expressed and distributed during retinoic acid-induced neural differentiation of P19 cells.* Growth Factors, 2003. **21**: p. 139-149.
147. Herradon, G.; Ezquerro, L.; Nguyden, T.; Silos-Santiago, I.; Deuel, T.; *Midkine regulates pleiotrophin organ-specific gene expression: evidence for transcriptional regulation and functional redundancy within the pleiotrophin/midkine developmental gene family.* Biochem Biophys Res Commun, 2005. **333**: p. 714-721.
148. Goldring, S.R.; Goldring, M.B.; *Eating bone or adding it: the Wnt pathway decides.* Nat Med, 2007. **13**: p. 133-134.

149. Muramatsu, T.; *Midkine and pleiotrophin: two related proteins involved in development, survival, inflammation and tumorigenesis*. J Biochem (Tokyo), 2002. **132**: p. 359-371.
150. Holmen, S.L.; Giambrenadri, T.; Zylstra, C.; Buckner-Berghuis, B.; Resau, H.; Hess, F.; Glatt, V.; Bouxsein, M.; Ai, M.; Warman, M.; Williams, B.; *Decreased BMD and limb deformities in mice carrying mutations in both Lrp5 and Lrp6*. J Bone Miner Res, 2004. **19**: p. 2033-2040.
151. Chiusaroli, R.; Knobler, H.; Luxenburg, C.; Sanjay, A.; Granot-Attas, S.; Tiran, Z.; Miyazaki, T.; Harmelin, A.; Barson, R.; Elson, A.; *Tyrosine phosphatase epsilon is a positive regulator of osteoclast function in vitro and in vivo*. Mol Biol Cell, 2004. **15**: p. 234-244.
152. Lau, K.H.; Wu, L.; Sheng, M.; Amoui, M.; Suhr, S.; Baylink, D.; *An osteoclastic protein-tyrosine phosphatase is a potential positive regulator of the c-Src protein-tyrosine kinase activity: a mediator of osteoclast activity*. J Cell Biochem, 2006. **97**: p. 940-955.
153. Schiller, K.R.; Mauro, L.J.; *Tyrosine phosphatases as regulators of skeletal development and metabolism*. J Cell Biochem, 2005. **96**: p. 262-277.
154. Chengalvala, M.V.; Bapat, A.; Hurlburt, W.; Kostek, B.; Gonder, D.; Mastroeni, R.; Frail, D.; *Biochemical characterization of osteo-testicular protein tyrosine phosphatase and its functional significance in rat primary osteoblasts*. Biochemistry, 2001. **40**: p. 814-821.
155. Yunker, L.A.; Undersander, A.; Lian, J.; Stein, G.; Carlson, C.; Mauro, L.; *The tyrosine phosphatase, OST-PTP, is expressed in mesenchymal progenitor cells early during skeletogenesis in the mouse*. J Cell Biochem, 2004. **93**: p. 761-773.
156. Wheeler, M.A.; Townsend, M.; Yunker, L.A.; Mauro, L.; *Transcriptional activation of the tyrosine phosphatase gene, OST-PTP, during osteoblast differentiation*. J Cell Biochem, 2002. **87**: p. 363-376.
157. Schinke, T., M. Gebauer, A.F. Schilling, S. Lamprianou, M. Priemel, C. Mueldner, C. Neunaber, T. Streichert, A. Ignatius, S. Harroch, M. Amling, *The protein tyrosine phosphatase Rptpz is expressed in differentiated osteoblasts and affects bone formation in mice*. Bone, 2007. **In Press, Accepted Manuscript**.
158. Winter, L.C.; Walboomers, X.; Bumgardner, J.; Jansen, A.; *Intermittent versus continuous stretching effects on osteoblast-like cells in vitro*. J Biomed Mater Res A, 2003. **67**: p. 1269-1275.
159. Lean, J.M.; Mackay, A.; Chow, J.; Chambers, T.; *Osteocytic expression of mRNA for c-fos and IGF-I: an immediate early gene response to an osteogenic stimulus*. Am J Physiol, 1996. **270**: p. E937-45.
160. Peake, M.A.; Cooling, L.; Magnay, J.; Thomas, P.; El Haj, A.; *Selected contribution: regulatory pathways involved in mechanical induction of c-fos gene expression in bone cells*. J Appl Physiol, 2000. **89**: p. 2498-2507.
161. Weyts, F.A.; Bosmans, B.; Niesing, R.; van Leuven, J.; Weinans, H.; *Mechanical control of human osteoblast apoptosis and proliferation in relation to differentiation*. Calcif Tissue Int, 2003. **72**: p. 505-512.
162. Ziros, P.G.; Basdra, E.; Papavassillou, A.; *The bone-specific transcriptional regulator Cbfa1 is a target of mechanical signals in osteoblastic cells*. J Biol Chem, 2002. **277**: p. 23934-23941.
163. Ziros, P.G., E.K. Basdra, and A.G. Papavassiliou, *Runx2: of bone and stretch*. Int J Biochem Cell Biol, 2007. (*pub ahead of print*)
164. Costessi, A.; Pines, A.; D'Andrea, P.; Romanello, M.; Damante, G.; Cesaratto, L.; Quadirfoglio, F.; Moro, L.; Tell, G.; *Extracellular nucleotides activate Runx2 in the*

- osteoblast-like HOBIT cell line: a possible molecular link between mechanical stress and osteoblasts' response.* Bone, 2005. **36**: p. 418-432.
165. Kanno, T.; Takahashi, T.; Tsuijsawa, T.; Ariyoshi, W.; Nishihara, T.; *Mechanical stress-mediated Runx2 activation is dependent on Ras/ERK1/2 MAPK signaling in osteoblasts.* J Cell Biochem, 2007. **101**: p. 1266-1277.
166. Carvalho, R.S.; Bumann, A.; Schaffer, J.; Gerstenfeld, C.; *Predominant integrin ligands expressed by osteoblasts show preferential regulation in response to both cell adhesion and mechanical perturbation.* J Cell Biochem, 2002. **84**: p. 497-508.
167. Shimizu, E.; Matsuda-Honjyo, Y.; Samoto, H.; Saito, R.; Nakajama, Y.; Kato, N.; Yamazaki, M.; Ogata, Y.; *Static magnetic fields-induced bone sialoprotein (BSP) expression is mediated through FGF2 response element and pituitary-specific transcription factor-1 motif.* J Cell Biochem, 2004. **91**: p. 1183-1196.
168. Takai, H.; Nakayama, Y.; Kim, D.; Arai, M.; Araki, S.; Mezawa, M.; Nakajima, Y.; Kato, N.; Masunaga, H.; Ogata, Y.; *Androgen receptor stimulates bone sialoprotein (BSP) gene transcription via cAMP response element and activator protein 1/gluocorticoid response elements.* J Cell Biochem, 2007. **102**: p. 240-251.
169. Samoto, H.; Shimizu, E.; Saito, R.; Nakao, S.; Yamazaki, M.; Furuyama, S.; Sugiya, H.; Sodek, J.; Ogata, Y.; *Prostaglandin E2 stimulates bone sialoprotein (BSP) expression through cAMP and fibroblast growth factor 2 response elements in the proximal promoter of the rat BSP gene.* J Biol Chem, 2003. **278**: p. 28659-28667.
170. Kapur, S.; Baylink, D.J.; Lau, K.H.; *Fluid flow shear stress stimulates human osteoblast proliferation and differentiation through multiple interacting and competing signal transduction pathways.* Bone, 2003. **32**: p. 241-251.
171. Matsubara, S.; Tomomura, M.; Kadomatsu, K.; Muramatsu, T.; *Structure of a retinoic acid-responsive gene, MK, which is transiently activated during the differentiation of embryonal carcinoma cells and the mid-gestation period of mouse embryogenesis.* J Biol Chem, 1990. **265**: p. 9441-9443.
172. Delghandi, M.P.; Johannessen, M.; Moens, U.; *The cAMP signalling pathway activates CREB through PKA, p38 and MSK1 in NIH 3T3 cells.* Cell Signal, 2005. **17**: p. 1343-1351.
173. Tanaka, K.; Fukuuchi, Y.; Nogawa, S.; Nozaki, H.; Nagata, E.; Suzuki, S.; Dembo, T.; Kosakai, A.; *[Alteration of cAMP-mediated signal transduction in cerebral ischemia--binding activity of PKA and phosphorylation of CREB].* Rinsho Shinkeigaku, 1999. **39**: p. 1298-1299.
174. Lau, K.H.; Tanimoto, H.; Baylink, D.; *Vanadate stimulates bone cell proliferation and bone collagen synthesis in vitro.* Endocrinology, 1988. **123**: p. 2858-2867.
175. Thompson, L.J.; Jiang, J.; Madamanchi, N.; Runge, M.; Patterson, C.; *PTP-epsilon, a tyrosine phosphatase expressed in endothelium, negatively regulates endothelial cell proliferation.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001. **281**: p. H396-403.
176. Chiu, R.; Boyle, W.; Meek, J.; Smeal, T.; Hunter, T.; Karin, M.; *The c-Fos protein interacts with c-Jun/AP-1 to stimulate transcription of AP-1 responsive genes.* Cell, 1988. **54**: p. 541-552.
177. Driskell, R.R.; Goodheart, M.; Neff, T.; Liu, X.; Luo, M.; Moothart, C.; Sigmund, C.; Hosokawa, R.; Chai, Y.; Engelhardt, J.; *Wnt3a regulates Lef-1 expression during airway submucosal gland morphogenesis.* Dev Biol, 2007. **305**: p. 90-102.
178. Liu, X.; Driskell, R.R.; Luo, M.; Abbott, D.; Filali, M.; Cheng, N.; Sigmund, C.; Engelhardt, J.; *Characterization of Lef-1 promoter segments that facilitate inductive developmental expression in skin.* J Invest Dermatol, 2004. **123**: p. 264-274.
179. Wellmann, A.; Doseeva, V.; Butscher, W.; Raffeld, M.; Fukushima, P.; Stetler-Stevenson, M.; Gardner, K.; *The activated anaplastic lymphoma kinase increases*

- cellular proliferation and oncogene up-regulation in rat 1a fibroblasts*. *Faseb J*, 1997. **11**: p. 965-972.
180. Stein, G.S.; Lian, B.; Stein, J.; van Wijnen, A.; Montecino, M.; *Transcriptional control of osteoblast growth and differentiation*. *Physiol Rev*, 1996. **76**: p. 593-629.
181. Tamai, K.; Semenov, M.; Kato, Y.; Sponok, M.; Liu, C.; Kasuyama, Y.; Hess, F.; Saint-Jean, J.; He, X.; *LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction*. *Nature*, 2000. **407**: p. 530-535.
182. Fukada, M.; Fujikawa, A.; Chow, J.; Ikamatsu, S.; Sakuma, S.; Noda, M.; *Protein tyrosine phosphatase receptor type Z is inactivated by ligand-induced oligomerization*. *FEBS Lett*, 2006. **580**: p. 4051-4056.
183. Pariser, H.; Herradon, G.; Ezquerro, L.; Perez-Pinera, P.; Deuel, T.; *Pleiotrophin stimulates tyrosine phosphorylation of beta-adducin through inactivation of the transmembrane receptor protein tyrosine phosphatase beta/zeta*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005. **335**: p. 232-239.
184. Muramatsu, H.; Zou, P.; Suzuki, H.; Oda, Y.; Chen, G.; Sakaguchi, N.; Sakuma, S.; Maeda, M.; Noda, M.; Takada, Y.; Muramatsu, T.; *alpha4beta1- and alpha6beta1-integrins are functional receptors for midkine, a heparin-binding growth factor*. *J Cell Sci*, 2004. **117**: p. 5405-4515.
185. Bodine, P.V.; Komm, B.S.; *Wnt signaling and osteoblastogenesis*. *Rev Endocr Metab Disord*, 2006. **7**: p. 9-15
186. Ezquerro, L.; Herradon, G.; Ngyuen, T.; Silos-Santiago, I.; Deuel, T.; *Midkine, a newly discovered regulator of the renin-angiotensin pathway in mouse aorta: significance of the pleiotrophin/midkine developmental gene family in angiotensin II signaling*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005. **333**: p. 636-643.

Mein Dank gilt allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Prof. Dr. Lutz Claes für die Möglichkeit der Promotion am Institut für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik, die angenehme Atmosphäre in diesem Institut und heitere Mittagstischgespräche.

Prof. Dr. Rolf Brenner für die Übernahme des zweiten Gutachtens.

Unseren Kooperationspartnern der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Michael Amling, insbesondere Claudia Neunaber, für die Zusammenarbeit und den wissenschaftlichen Austausch.

Prof. Dr. Anita Ignatius für die Überlassung des Themas dieser Arbeit, ihre Betreuung, ihr ständiges Interesse am Fortgang der Arbeit, ihr stets offenes Ohr für grosse und kleine Probleme und ihre Geduld gegenüber dem durch mich verursachten, erhöhten Lärmpegel im Zelllabor.

Dr. Astrid Liedert für ihre Betreuung.

Ursula Maile, Claudia Kinzelmann, Jenny Marinaci und Nadine Todt für ihre Hilfe, das humorvolle und herzliche Arbeitsklima welches über so manche Frustphase hinweggetröstet hat und die zahlreichen Aktivitäten ausserhalb der Arbeitszeit ☺

Den Mitarbeitern der Zellgruppe für die nette Zusammenarbeit und wissenschaftliche Diskussionen.

Herbert Schmitt für seine ständige Reparaturbereitschaft, einen unendlichen Schokoladenvorrat und Nutellagläser in allen Grössen.

Allen Mitarbeitern des Institutes für das stets freundliche Arbeitsklima.

Jörg Stippich für spontane Katastrophenbeseitigung am Computer.

Meinen Eltern, die mir immer zur Seite standen und mich in jeder erdenklichen Weise unterstützt haben.

Volker für die Liebe mit der er immer an mich geglaubt hat.

Laura Diana Zöllner

geboren am 23.10.1980 in Ludwigsburg

Schulbildung

1986–1987	Colegio Alemán Madrid / Spanien
1988–1990	Zeppelin-schule Leinfelden-Echterdingen
1990–1999	Philipp-Matthäus-Hahn-Gymnasium Leinfelden-Echterdingen Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Studium

1999–2005	Diplomstudiengang Biologie Eberhard-Karls-Universität Tübingen Abschluss: Diplom-Biologin
2004–2005	Diplomarbeit HNO-Klinik Tübingen, Abteilung Molekulare Otologie Betreuer: Prof. Dr. M. Knipper und Dr. H. Löwenheim Thema: „Caspase-abhängige Regulationsmechanismen des apoptotischen Zelltods im Corti'schen Organ“

Beruf

2005-2007	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik, Universität Ulm Leiter: Prof. Dr. L. Claes Arbeitsgruppe Zellbiologie, Prof. Dr. A. Ignatius
Seit 2008	Clinical Research Associate AMS Advanced Medical Services GmbH Mannheim, Clinical Operations