

Aus dem Medizinischen Zentrum für operative Medizin
der Philipps-Universität Marburg
Geschäftsf. Direktor: Prof. Dr. P. Griss
Abteilung für experimentelle Orthopädie und Biomechanik
Direktor: Prof. Dr. D.B. Jones

Mechanotransduktion in Osteoblasten



Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Zahnmedizin
dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von
Petra Bromme, geb. Meisiek
aus Itzehoe
Marburg 2000

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg am 28. Juni 2001
gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. Rudolf Arnold

Referent: Prof. Dr. D.B. Jones

Korreferent: PD Dr. Mengel

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abkürzungen	5
I. Einleitung	7
1. Einführung in die Materie	7
2. Historische Übersicht	10
3. Zielsetzung	11
II. Mechanotransduktion in Osteoblasten	12
1. Mechanorezeption	14
1.1. Fluid Flow	14
1.2. Hydrostatischer Druck	16
1.3. Mechano-sensitive Ionenkanäle	17
1.4. Zytoskelett.....	23
1.5. G-Protein gekoppelte Oberflächenrezeptoren.....	27
1.5.1 Parathormon-Rezeptor	29
1.5.2 Prostaglandin-Rezeptor.....	31
1.6. Enzym-gekoppelte Oberflächenrezeptoren.....	32
1.6.1 Rezeptor-Tyrosinkinase.....	33
1.6.1.1 Insulin-like growth factor (IGF)-Rezeptor.....	33
1.6.1.2 Platelet derived growth factor (PDGF)-Rezeptor	34
1.6.1.3 Epidermal growth factor (EGF) -Rezeptor	34
1.6.2 Rezeptor-Serin/Threonin-Kinasen.....	36
1.6.2.1 Bone morphogenetic protein (BMP) -Rezeptor	36
1.6.2.2 Transforming growth factor β (TGF- β) -Rezeptor	37
1.6.3 Tyrosinkinase-assoziierte Rezeptoren	39
1.6.3.1 Cytokin-Rezeptor	39
1.6.3.2 Integrine	41
2. Signaltransduktion zum Kern	45
2.1 G-Protein-gekoppelte Signalübertragungswege.....	45
2.1.1 Adenylatcyclase mit cAMP als „second messenger“	46
2.1.1.1 Proteinkinase A (PKA)	48

2.1.2 Phospholipase C mit Inositol 1,4,5-Trisphosphat und Diacylglycerol als „second messenger“	49
2.1.2.1 Freisetzung von intrazellulärem Calcium	50
2.1.2.2 Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinasen (CaM-Kinasen)..	52
2.1.2.3 Aktivierung von Proteinkinase C	53
2.2 Weitere Signalmoleküle	56
2.2.1 Phospholipase D	56
2.2.2 Stickstoffmonoxid.....	58
2.2.3 cGMP	61
2.3 Signalübertragung durch RAS-Proteine.....	62
2.4 Signalwege der MAP-Kinase-Kaskade.....	65
2.5 Der Jak/STAT-Signalweg	72
3. Gen-Expression.....	76
III. Diskussion	81
IV. Zusammenfassung.....	95
V. Literatur.....	97
VI. Anhang	116

Verzeichnis der Abkürzungen

Arf	ADP-ribosylation factor
ATP	Adenosin-triphosphat
BMP	Bone morphogenetic protein
BMK1	big MAP-Kinase/ERK5
CaM-Kinase	Calcium/Calmodulin-Kinase
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
Cbfa1	Core binding factor 1
Cdk2	Cyclin-abhängige Kinase
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
COX-2	Cyclooxygenase-2
DAG	Diacylglycerol
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EGF	Epidermal growth factor
ERK	Extracelluar regulated kinase
EZM	Extrazelluläre Matrix
FAK	Fokal adhesion kinase
FGF	Fibroblast growth factor
GAP	GTPase activating protein
Gbr2	Growth factor receptor bound protein-2
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guanine nucleotide exchange factor
GNRP	Guanine nucleotide releasing protein
GP-Rezeptor	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GRE	Glucocorticoid response element
GTP	Guanosintriphosphat
HD	Hydrostatischer Druck
IFN	Interferon
IGF	Insulin-like growth factor
Ihh	Indian hedgehog
IL	Interleukin
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
JAK	Janus Kinase
JNK	c-jun N-terminal kinase
MAP-Kinase	Mitogen activated protein kinase
MEK	Mitogen activated ERK activating kinase
MINT	Msx2 interacting nuclear target
mRNA	messenger Ribonucleinsäure
Msc1	Mechanosensitive channels large
Mscs	Mechanosensitive channels small
Msx2	Homeobox-containing transcription factor
NO	Stickstoffmonoxid
OPG	Osteoprotegerin
OPG-L	Osteoprotegerin-Ligand
OPN	Osteopontin
Osf2	Osteoblast specific factor 2
PDGF	Plateled-derived growth factor
PI	Phosphatidylinositol
PI-3-Kinase	Phosphatidylinositol-3-Kinase

PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PG	Prostaglandin
PKC	Proteinkinase C
PKA	Proteinkinase A
PLA	Phospholipase A
PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D
POBs	primary bovine osteoblasts
PS	Phosphatidsäure
Ptc	Patched, Signalmolekül von Ihh
PTH	Parathormon
PTHrP	Parathormon related Protein
RACK	Receptor for activated C kinase
Raf	eine MAPKKK
Ras	eine monomere GTPase
Rho	ein Ras-Homolog
RK	Reactivating kinase
RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinase
SAPK	Stress-activated protein kinase
SEK	SAPK kinase
Shc	SH-2 containing adaptor protein
SH2/3	Src-Homologie Region 2/3
Smo	Smoothened, Signalmolekül von Ihh
SOCS	Suppressor of cytokine signaling
Sos	Säugerhomolog von Son-of-sevenless (ein Drosophila-Genprodukt), ein GEF
Src	hergeleitet vom Rous sarcoma virus oncoprotein
SSI	STAT-induced STAT inhibitor
STAT	Signal transducer and activator of transcription
STOC	Spontaneous transient outward current
TGF	Transforming growth factor
TNF	Tumor necrosis factor
VDRE	Vitamin D response element

I. Einleitung

1. Einführung in die Materie

Mechanische Belastung von Knochen kann Resorption verhindern und neue Knochenformation hervorrufen (Duncan & Turner, 1995).

Sie steigert die metabolische Aktivität und die Genexpression von Osteoblasten und trägt somit zu erhöhter Proliferation und Differenzierung bei (Jones D.B. *et al.*, 1991). Unphysiologisch hohe Belastung führt allerdings zur Degeneration der Knochenstruktur (Jones *et al.*, 1995).

Viele Belastungsfaktoren wirken auf das Knochengewebe ein und optimieren während der Wachstumsphase des Skeletts dessen Adaptation und Entwicklung.

Laut Turner lassen sich strukturelle Veränderungen der Knochenarchitektur durch mathematische Regeln folgendermaßen erklären:

Erstens wird die Knochenanpassung eher durch dynamische als durch statische Belastung erreicht, zweitens wirkt sich eine Ausweitung der Belastungsdauer vermindern auf weitere Knochenanpassung aus und drittens passen sich Knochenzellen dauerhafter mechanischer Belastung an und machen sie weniger empfindlich für „gewöhnliche“ Belastung (Turner & Pavalko, 1998).

Eine permanente Belastung der Knochen geht beispielsweise von der Gravitation aus. So hat man festgestellt, daß sich unter Bedingungen der Schwerelosigkeit die mechanosensible Wahrnehmung der Zellen verändert und zu einem gestörten Metabolismus der Osteoblasten führt. Zudem ändert sich auch die Dichte des Zytoskeletts (Burger & Klein-Nulend, 1998).

Der Verlust von Knochenmasse in Schwerelosigkeit zeigt sich zuerst in gewichttragenden Knochen und erst verzögert in weniger gewichttragenden Knochen (Vico *et al.*, 1998).

Bei Patienten, die längere Zeit bettlägerig waren, stellte man signifikante Verluste des Mineralgehalts der Knochen als Folge mangelnder Belastung fest.

Es kommt zu einer erhöhten Calciumausscheidung, die zum Verlust der Knochenfestigkeit führt (Leblanc *et al.*, 1990), was zeigt wie notwendig eine Stimulation für das Knochengewebe ist.

Von großem Interesse im Zusammenhang mit mechanischer Belastung ist auch die multifaktorielle Erkrankung der Osteoporose.

Diese Krankheit zeichnet sich durch geringere Knochenmasse und verminderte Knochenmikrostruktur gegenüber gesundem Knochen aus und führt zu erhöhter Frakturanfälligkeit (Eriksen & Langdahl, 1997) .

Der alters- oder hormonbedingte Knochenverlust kann durch gezielte Belastung positiv beeinflusst werden, da eine Verdichtung des Knochengewebes erreicht wird (Simkin A. *et al.*, 1987).

Die Bedeutung der mechanischen Stimulation für das Knochengewebe, besonders für differenzierungsfähige Osteoblasten, spielt eine immer größer werdende Rolle, seitdem die Forschung Einblick in immer kleinere Segmente der Signalübertragung in Knochenzellen gewonnen hat.

Schon die von Moss 1954 vertretene „Theorie der funktionellen Matrix“ besagt, daß extraskelettale Faktoren die primäre Ursache für alle adaptiven Prozesse des Knochengewebes sind (Moss, 1981). Fügt man dieser Theorie heutige Erkenntnisse über Mechanotransduktion und Knochenstruktur hinzu, ergibt sich eine komplette Hierarchie von der Muskelkontaktion bis hin zur zellulären und molekularen Ebene im Knochen (Moss, 1997).

Die große Anzahl der Publikationen und die Bandbreite der Forschungsthemen verrät, wie vielfältig das Forschungsgebiet zum Thema Mechanotransduktion ist.

Obwohl viele molekulare Mechanismen, die externe Stimuli in zelluläre Antworten umwandeln, erforscht worden sind, ist die Mechanotransduktion immer noch eines der Gebiete, auf dem großer Forschungsbedarf besteht.

Die Mechanotransduktion definiert sich als Umsetzung biophysikalischer Kräfte in eine zelluläre Antwort (Duncan & Turner, 1995).

Bei der Mechanotransduktion wird extrazelluläre mechanische Belastung in elektrische oder chemische Signale umgewandelt (Ghazi *et al.*, 1998).

Diese Signale werden über Botenstoffe weitergeleitet und setzen verschiedene Mechanismen in Kraft, die entweder Proliferation, Differenzierung oder Zelltod hervorrufen.

Die durch mechanische Stimuli ausgelöste Signaltransduktion innerhalb eines Osteoblasten setzt nicht nur einen Signalweg in Kraft. Es entsteht ein komplexer Zusammenhang zwischen einzelnen Kaskaden, wodurch verschiedene andere Antworten innerhalb der Zelle ausgelöst werden.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wird die Komplexität der einzelnen Signalwege, ausgelöst durch mechanische Belastung von Osteoblasten, deutlich werden.

Ein Anspruch auf Vollständigkeit kann selbstverständlich nicht erhoben werden, da in vielen Bereichen noch Forschungsbedarf besteht.

Letztendlich sollte bei der Wertung der Untersuchungen bedacht werden, daß viele Studien in Zellkulturen durchgeführt werden, und Zellen isoliert vom Gesamtorganismus eine veränderte Reaktion aufweisen können.

2. Historische Übersicht

Julius Wolff stellte vor mehr als hundert Jahren die „Trajektoriale Hypothese“ auf, die besagt, daß Knochenform und innere Knochenstruktur sich funktioneller und mechanischer Belastung anpassen.

Diese Hypothese ist bekannt unter dem Namen „Wolff's Law“ („Das Gesetz der Transformation der Knochen“) (Wolff J., 1994).

Die heutige Auffassung, daß Knochenremodelling einem kontinuierlichen dynamischen Kontrollprozeß unterliegt, wurde aber im wesentlichen von Roux geprägt. Dessen Aussage war, daß die Anpassung des Knochens von Zellen reguliert wird, die unter dem Einfluß von lokalisierter Belastung stehen (Mullender & Huiskes, 1995).

Weitere Untersuchungen von Frost zeigten, daß der direkte Stimulus für Knochenzellen die Belastung der Zelle durch Dehnung ist. Mit der „Mechanostat-Theorie“ machte er u.a. deutlich, daß Hormone die Effekte der mechanischen Belastung über den Weg der Signaltransduktion erhöhen oder vermindern können (Turner & Pavalko, 1998).

Rodan erweiterte diese Aussagen folgendermaßen:

Erhöhte mechanische Belastung stimuliert Knochenformation, abnehmende mechanische Belastung stimuliert Knochenresorption. Die Anpassung der Knochenstruktur an mechanische Belastung definiert sich über eine Kopplung von Knochenformation und Knochenresorption durch ein „Feedback-System“ (Rodan, 1997).

Viele Theorien wurden während des gesamten Forschungsverlaufs aufgestellt, die versuchen, die Mechanismen der Weiterleitung mechanischer Belastung in Zellen zu präzisieren.

Bereits 1962 äußerten Basset & Becker die Vermutung, daß Strömungspotentiale, die während der Knochendeformation entstehen, physiologische Antworten hervorrufen (Bassett C.A.L. & Becker R.O., 1962).

Rubin and Lanyon fanden 1984 als erste heraus, daß eine erhöhte Dauer der Knochenbelastung keinen proportionalen Anstieg der Knochenmasse bedeutet, sondern eher eine Abnahme hervorrufft (Rubin C.T.& Lanyon L.E., 1984)

1987 wurde erstmals ein Mechanismus entdeckt, der bei uniaxialer Belastung von Osteoblasten die membrangebundene Phospholipase C aktiviert (Jones D.B. & Scholuebbbers J.G., 1987; Jones D.B. *et al.*, 1993).

Ende der 80er Jahre erkannte Duncan, daß sich Ionenkanäle in osteoblasten-ähnlichen Zellen durch Dehnung aktivieren lassen (Duncan R. & Mislner S., 1989).

Momentan versucht man, neben der mechanischen Belastung durch Dehnung ebenfalls die Wirkung von Fluid Flow, Hydrostatischem Druck und anderen mechanischen Stimuli auf die Signalweiterleitung in der Zelle zu entschlüsseln.

3. Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist:

- A. eine Zusammenfassung jüngster Erkenntnisse der Mechanotransduktion in Osteoblasten zu liefern.
- B. das Aufzeigen von Forschungslücken.
- C. eine Anregung zur Vertiefung einzelner Forschungsbereiche zu schaffen.

II. Mechanotransduktion in Osteoblasten

Osteoblasten sind im Hinblick auf mechanische Belastung eine Zellgruppe, mit der die Wirkungswege nach Stimulation auf molekularer Ebene am besten verdeutlicht werden können. Diese Zellen haben das Potential, im Gegensatz zu Osteozyten und Osteoklasten, zu proliferieren und zu differenzieren.

Zwar bilden reine Osteoblasten nur einen Anteil von 5% aller Zellen auf der Knochenoberfläche (Cowin, 1998), besitzen aber mit den größten Anteil bei der Knochenneubildung.

Jones weist auf die Möglichkeit hin, daß nur periostale Osteoblasten auf der Knochenoberfläche sensibel auf physiologische, definierte Dehnung reagieren (Jones D.B. *et al.*, 1991).

Verglichen mit Osteoblasten sollen *junge Osteozyten*, d.h. noch nicht vollständig ausgereifte Osteozyten, ebenfalls eine hohe Sensibilität für mechanische Stimulation aufweisen (Mikuni-Takagaki, 1999).

Turner nimmt an, daß auch Osteozyten mögliche Sensoren für lokalisierte Dehnung sein können (Turner & Pavalko, 1998). Auch Jones und Bingmann stellten bei physiologischer Dehnung fest, daß sowohl Osteoblasten als auch Osteozyten als dehnungssensibel einzustufen sind (Jones D.B. & Bingmann D., 1991)

Findet die mechanische Belastung von Osteoblasten unter physiologischen Umständen statt - schon Lanyon erkannte 1984, daß unphysiologisch hohe Reize einen Verlust von Knochenmasse verursachen (Lanyon L.E., 1984) - , können reproduzierbare Signalwege innerhalb der Zelle erschlossen werden.

Die Signalübertragung erfolgt über einzelne Kaskaden, die vielfach untereinander verbunden sind, und die es nach wie vor gilt, vollständig zu entschlüsseln.

Neben der Signalübertragung durch mechanische Stimulation können auch Hormone und andere Faktoren Signalwege innerhalb der Osteoblasten aktivieren. Diese Signalwege können in enger Verbindung mit den mechanisch ausgelösten Signalwegen stehen und sollen somit im Folgenden auch zur Geltung kommen.

Die Wege der mechanisch induzierten Signalübertragung lassen sich im wesentlichen in folgende Punkte unterteilen:

1. Mechanorezeption
2. Signaltransduktion zum Kern
3. Gen-Expression

1. Mechanorezeption

Die mechanische Stimulation der Osteoblasten wird u.a. ausgelöst durch Dehnung, Fluid Flow oder Ausübung von hydrostatischem Druck auf die Zelle. Jeder dieser Faktoren spricht bestimmte Rezeptoren der Zellmembran an, die Reize über „second messenger“ ins Innere der Zelle weiterleiten. Rezeptoren, die nicht mechanisch stimuliert werden, aber dennoch in die Wege der Mechanotransduktion eingreifen, werden ebenfalls dargestellt.

1.1. Fluid Flow

Mechanische Belastung verursacht eine Deformation des Knochengewebes, wodurch Knochenzellen gedehnt werden und ein Flüssigkeitsfluß innerhalb der Canaliculae des Knochens entsteht (Duncan & Turner, 1995).

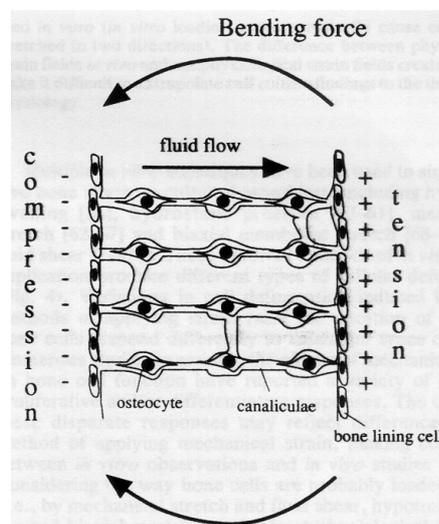


Abb. 1 Schematische Darstellung einer Knochenkortex unter Dehnungsbedingungen (Duncan & Turner, 1995)

Dehnung verursacht Kompression auf einer Seite des Knochens und Spannung auf der anderen. Dies führt zu einem Druckgradienten in der Interstitialflüssigkeit, der den Fluid Flow von den Regionen der Kompression zu Regionen der Spannung bewegt. Fluid Flow, der sich durch Canaliculae und über Osteozyten bewegt, verursacht Flow-bedingte Scherkräfte an den Zellmembranen.

1994 fand Turner heraus, daß interstitieller Flüssigkeitsfluß sogenannte „*stress-generated potentials*“, d.h. belastungserzeugte Potentiale hervorruft und somit die Knochenbildung erhöht (Turner *et al.*, 1994).

Bei Dehnung von Osteozyten stellte sich heraus, daß es zur Entstehung eines Druckgradienten im Knochengewebe kommt, woraus ein Flüssigkeitsfluß (Fluid Flow) hervorgeht.

Dieser Fluid Flow verursacht Scherkräfte (*fluid shear-stress*) und somit elektrische Felder im Knochen, die „*streaming potentials*“ genannt werden.

Sowohl Dehnung, Fluid Flow und elektrische Felder spielen eine Rolle bei der Mechanorezeption, wobei die elektrischen Felder in Bezug auf Knochenstimulation eher untergeordnet zu betrachten sind (Turner & Pavalko, 1998).

Kawata ist der Überzeugung, daß Scherkräfte, die durch Fluid Flow entstehen, der beste Stimulus sind, auf den Knochenzellen antworten (Kawata & Mikuni-Takagaki, 1998). Stetiger oder pulsierender Fluid Flow sollen laut Jacobs die Knochenzellen besser stimulieren als oszillierender Flow (Jacobs *et al.*, 1998).

In einigen Geweben ist Fluid Flow bereits physiologisch vorhanden, z.B. in Verbindung mit Endothelzellen. Die Mechanismen, die dort ablaufen, könnten auch für Knochenzellen relevant sein (Jones D.B. *et al.*, 1993).

In Endothelzellen von Blutgefäßen verursacht der Flüssigkeitsfluß eine mechanische Stimulation, die über Kompression, Spannung und tangentielle Scherkräfte vermittelt wird. Diese hämodynamische Belastung verursacht viele metabolische und strukturelle Antworten der Endothelzellen, die somit mechanosensitiv reagieren.

Endotheliale Antworten auf Scherkräfte verändern z.B. den Gefäßtonus oder sind in die Ätiologie von Gefäßabnormalitäten mit einbezogen. So wurden Gefäßdefekte bei Artherosklerose verstärkt an Kurvaturen festgestellt, wo Scherkräfte aus vielen Richtungen wirksam werden, bei Scherkräften aus nur einer Richtung traten kaum Defekte auf.

Dies deutet darauf hin, daß Endothelzellen nicht nur durch Flüssigkeitsfluß stimuliert werden, sondern auch zwischen unterschiedlichen Formen der Stimulation unterscheiden können. Die Wahrnehmung der Scherkräfte erfolgt wahrscheinlich durch Mechanosensoren auf der Zelloberfläche (Barakat & Davies, 1998).

Lehoux ist ebenfalls der Meinung, daß Belastungsänderungen in Gefäßen ein Remodelling bewirken. Dies führt zu einer angepaßten Veränderung in Morphologie

und Funktion der Zellen, die ein Zurechtkommen mit physiologischen oder pathologischen Gegebenheiten (z.B. Hypertrophie oder Hyperplasie) ermöglicht. Möglicherweise sind Faktoren wie Ionenkanäle, Integrin-Interaktion von Zelle und Extrazellulärer Matrix, Aktivierung von verschiedenen Tyrosinkinasen oder autokrine Produktion und Freisetzung von Wachstumsfaktoren an der strukturellen Veränderung der Endothelzellen beteiligt (Lehoux & Tedgui, 1998).

Die Wirkung des Fluid Flow ist sehr vielseitig und wird auch in noch folgenden Themenbereichen ständig Einfluß nehmen.

1.2. Hydrostatischer Druck

Hydrostatischer Druck (HD) in Verbindung mit Mechanorezeption scheint eine immer interessanter werdende Rolle im Gesamtbild der Umsetzung von mechanischer Stimulation zu spielen.

So wies Roelofsen 1995 nach, daß bei Einwirkung von *intermittierendem* hydrostatischen Druck auf die Zellen der köchernen Schädeldecke von Mäusen ein Anstieg der Knochenbildung erfolgt, und eine Änderung des Phänotyps der Osteoblasten eintritt. In weiteren Versuchen stellte er fest, daß es bei fehlender Stimulation durch intermittierenden hydrostatischen Druck zum Verlust von knochenspezifischer Genexpression kommt (Roelofsen *et al.*, 1995).

Salwen und Schwartz untersuchten die Effekte von *anhaltendem* hydrostatischen Druck. So fand Salwen 1998 heraus, daß es zu Veränderungen in der Zellproliferation und im Zytoskelett von Endothelzellen bei Rindern kommt, wenn anhaltender HD einwirkt (Salwen *et al.*, 1998).

Schwartz erkannte 1999 in Endothelzellen der Beinvene des Menschen eine durch anhaltenden HD stimulierte Zellproliferation und einen Anstieg der Integrin-Untereinheit alpha (Schwartz *et al.*, 1999).

Weitere Untersuchungen von Macdonald über die Wirkung von sehr geringem hydrostatischen Druck (micro-pressures) brachten folgende Ergebnisse:

Hydrostatischer Druck existiert überall im biologischen Umfeld, relativ geringer Druck zeigt sich innerhalb eines Organismus.

Geringer hydrostatischer Druck wird unabhängig von makroskopischen Deformationen weitergeleitet, er wirkt gleich stark in alle Richtungen und er erscheint sowohl in Gewebezellen als auch z.B. bei Meerestieren wie der Krabbe.

Bei der Einwirkung von geringem HD auf Gefäßendothelzellen kommt es zu einer Störung von Wachstum und Metabolismus. Der Effekt von hohem HD wird laut Macdonald über thermodynamische Mechanismen vermittelt.

Geringer HD wird im Gegensatz dazu bei Endothelzellen und Meerestieren durch mechanische Prozesse, den sogenannten „*mikro-mechanischen Effekt*“, übertragen.

Man nimmt an, daß die unterschiedliche Kompression zellulärer Strukturen im „mikro-pressure“-Bereich wahrscheinlich eine Deformation und ein Auftreten von Scherkräften bewirkt, die zu Änderungen von enzymatischer und Ionenkanal-Aktivität führen. Es stellt sich die Frage, ob die Wirkung dieses „*mikromechanischen Effekts*“ auch in Zellen vorhanden ist, die hohem hydrostatischen Druck unterworfen sind. Ob die Vermittlung von hohem und geringem HD durch den selben Rezeptor, evtl. auch noch gleichzeitig, erfolgen kann, ist noch nicht vollständig geklärt (Macdonald & Fraser, 1999).

Weitere Untersuchungen zu diesem interessanten Thema werden an späterer Stelle noch diskutiert.

1.3 Mechano-sensitive Ionenkanäle

Ionenkanäle sind Transmembranproteine, die Poren innerhalb einer Membran formen. Normalerweise sind Ionenkanäle nicht permanent geöffnet. Sie wechseln nach dem „Alles-oder-Nichts-Prinzip“ zwischen dem offen oder geschlossenen Zustand, wobei sich die Konformation der Proteine ändert.

Laut Ghazi beeinflussen verschiedene Stimuli die Kanäle, so unterscheidet man *Spannungs-abhängige Ionenkanäle, Liganden-abhängige Kanäle und mechanosensitive Kanäle* (Ghazi *et al.*, 1998).

Die Funktion von Spannungs-abhängigen Kanälen wurden in Verbindung mit elektrisch erregbaren Zellen bereits ausreichend identifiziert, die der Liganden-abhängigen Kanäle anhand von Neurotransmittern.

Obwohl die Existenz von mechanosensitiven Ionenkanälen (MS Ionenkanäle) schon sehr früh anhand von sensorischen Zellen aufgezeigt wurde, brachte erst die Entwicklung und Anwendung der „patch-clamp Technik“ 1984 genauere Ergebnisse: Durch Belastung aktivierte Ionenkanäle wurden mit dieser Technik zuerst von Guharay und Sachs 1984 anhand von Versuchen an Skelettmuskeln des Hühnerembryos beschrieben (Guharay & Sachs, 1984).

Mechanosensitive Ionenkanäle spielen u.a. eine Rolle in der Plasmamembran von Endothelzellen, Knochenzellen, aber auch in Bakteien wie z.B. *E.coli*.

Diese Kanäle können Kation-selektiv, Anion-selektiv oder nicht-selektiv sein, und sie antworten sowohl auf Membranspannung (T) als auch auf Druck (P) => *Laplace's Law*: $T = PR/2$ (R=Radius) (Ghazi *et al.*, 1998).

Über den Mechanismus der Aktivierung von mechanosensitiven Ionenkanälen stellten zum einen Hamill und McBride (Hamill & McBride, 1997) und zum anderen Martiniac (Martinac B. *et al.*, 1990) jeweils ein Modell auf (Abb.2).

Hamill und McBride vermuten, daß die relative Veränderung der Lage des Ionenkanals zu extrazellulärer Matrix oder zum Zytoskelett bei Dehnung die Kanäle anregt, zu öffnen oder zu schließen. So kommt es z.B. bei Haarsinneszellen nach druck-induzierter Deflektion der Stereocilien zur Öffnung von Ionenkanälen (Hudspeth & Corey, 1977).

Das Modell von Martiniac besagt, daß die in der Lipid-Doppelschicht entwickelte Spannung selbst für den Zustand der Ionenkanäle verantwortlich ist. Dies verdeutlichte auch Sukharev (Sukharev *et al.*, 1994b; Sukharev *et al.*, 1994a) anhand der großen mechanosensitiven Ionenkanäle (*MscL*) bei *E.coli*.

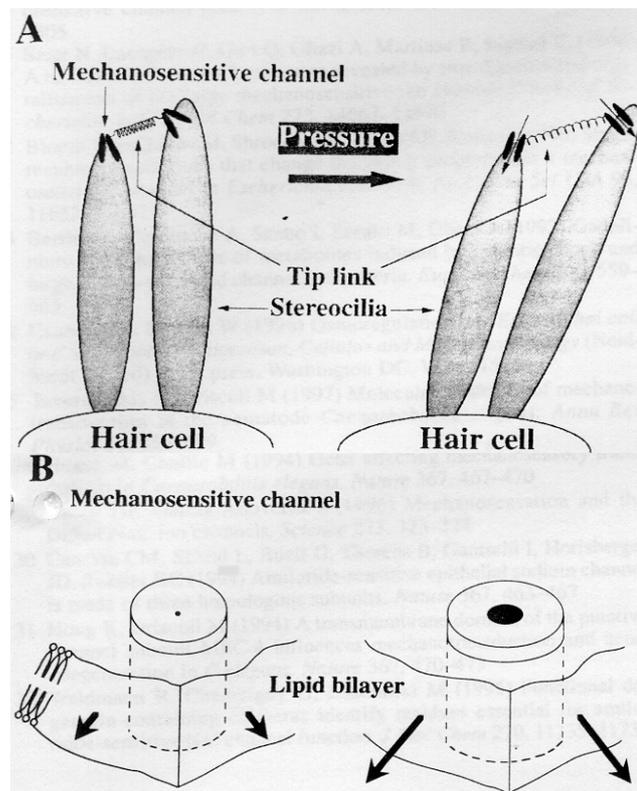


Abb. 2 Zwei Mechanismen zur Aktivierung von mechanosensitiven Kanälen.
A. Haarsinneszellen. Deflektion der Stereocilien induziert die Öffnung der mechanosensitiven Kanäle.
B. Lipid-Doppelschicht. Die erhöhte Membranspannung ist alleine verantwortlich für Konformationsänderung und Öffnung der Kanäle.
(Ghazi *et al.*, 1998).

Daß beide Modelle kein eindeutiger Beweis für den alleinigen Mechanismus der Aktivierung von mechanosensitiven Ionenkanälen sind, wird am Beispiel der Mechanotransduktion in *C.elegans* deutlich. Hier glaubt man, daß verschiedene nicht-membranöse Proteine von der extrazellulären Matrix oder vom Zytoskelett aus mit mechanosensitiven Kanälen interagieren (Tavernarakis & Driscoll, 1997).

Weitere Versuche an mechanosensitiven Ionenkanälen haben gezeigt, daß sich die Spannung in der Lipid-Doppelschicht bei Dehnung auf Kanäle, die in Verbindung mit dem Zytoskelett stehen, konzentriert. Es wurde eine direkte Interaktion zwischen dem Aktin-Zytoskelett und dehnungs-aktivierten Kationen-Kanälen in Osteoblasten nachgewiesen (Duncan & Turner, 1995).

In Osteoblasten spielen Calciumkanäle eine fundamentale Rolle bei der zellulären Antwort auf externe Stimuli, d.h. sowohl bei mechanischer Belastung als auch bei Hormonen. Möglicherweise verändern sie auch parakrine Signale zwischen

knochenbildenden Osteoblasten und knochenresorbierenden Osteoklasten => Remodelling.

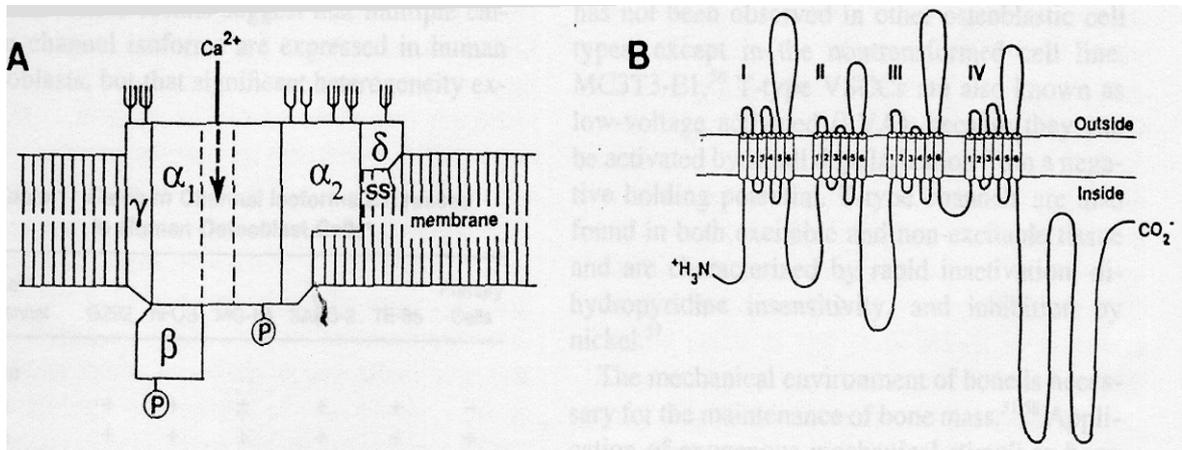


Abb. 3 Allgemeine Struktur der Calcium-Kanäle (Duncan *et al.*, 1998).

- A. Struktur der Untereinheiten. Heterodimere Struktur der Calciumkanäle bestehend aus fünf Untereinheiten ($\alpha_1, \alpha_2, \beta, \gamma, \delta$). Die α_1 -Untereinheit bildet die Pore des Kanals.
- B. Transmembrane Organisation des Calciumkanals. Die α_1 -Untereinheit besteht aus 4 Membran-durchspannenden Domänen von denen jede 6 transmembrane Regionen besitzt.

Untersuchungen an Calciumkanälen der Osteoblasten mittels patch-clamp-Technik haben gezeigt, daß sowohl spannungs-sensible als auch spannungs-unabhängige Kanäle vorkommen, die auf mechanische und hormonelle Stimulation antworten.

Bei Dehnung von Osteoblasten kommt es zu einem vorübergehenden Anstieg von intrazellulärem Calcium („second messenger“), diesem Calciumanstieg aus intrazellulären Depots folgt ein Calciumeintritt durch die Ionenkanäle. Der rapide Anstieg von Calcium bei Dehnung weist auf eine Verbindung zwischen Zytoskelett und Phospholipase C Pathway hin, worauf an späterer Stelle noch eingegangen wird. Bei Untersuchungen der Aktivierungsfolge der „second messenger“ stellte sich heraus, daß Calciumeintritt in die Zelle nach Dehnung von Osteoblasten wahrscheinlich das initiale Signal für die Osteoblastenantwort auf mechanische Dehnung ist (Jones D.B. & Bingmann D., 1991).

Calciumsignale charakterisieren sich durch vorübergehenden Anstieg des intrazellulären Calciums und der Aktivierung von intrazellulären Signalkaskaden. Es wird angenommen, daß mechanosensitive Ionenkanäle Calciumsignale in Osteoblasten erzeugen, die zur Mechanotransduktion im Knochen beitragen.

Duncan unterscheidet zwischen "Signalcalcium", das sich auf Änderungen des intrazellulären Calciumlevels bezieht, und „Mineralcalcium“, das sich auf den austauschbaren Pool von extrazellulärem Calcium bezieht. Die intrazelluläre Calcium-Homöostase wird durch ein Netzwerk von Calciumkanälen, Calcium-Pumpen, Ionen-Austauschern in der Plasmamembran und intrazellulären Organellen aufrecht erhalten. Es hat sich gezeigt, daß der Anstieg von intrazellulärem Calcium bei Belastung abhängig von der Anwesenheit des extrazellulären Calcium ist. Wie das Zusammenspiel zwischen Calcium-Influx und Calcium-Freisetzung aus intrazellulären Depots (z.B. des Endoplasmatischen Retikulums) genau aussieht, ist noch nicht vollständig geklärt.

Der Zusammenhang zwischen der Erzeugung von Calcium-Signalen und folgender Änderung der Gen-Expression scheint allerdings aufgedeckt. So führen Calcium-Signale in vielen verschiedenen Knochenzelltypen zur Änderung des Musters der Gen-Expression und verursachen so eine Vielzahl von physiologischen Antworten wie z.B. Proliferation, Differenzierung oder Apoptose (Duncan *et al.*, 1998).

Wie schon erwähnt besitzen auch *Escherichia coli*-Zellen MS Ionenkanäle (osmotische Aktivierung). Anhand von Untersuchungen an *MscL*, den Kanälen, die bei höchster Membranspannung aktiviert werden und dann die höchste Durchlässigkeit aufweisen, erkannte Ajouz eine Anpassung an osmotische Veränderungen. Es kommt zu einer Reaktion der Kanäle beim sofortigen Übergang von sehr hohem auf sehr niedriges osmotisches Umfeld => „osmotic downshock“ (Ajouz *et al.*, 1998).

Levina erkannte bei Untersuchungen an mechanosensitiven Ionenkanälen der *E.coli*, daß Kanäle, die schon bei niedriger Membranspannung aktiviert werden (*MscS*), ebenfalls bei starken osmotischen Druckschwankungen geöffnet werden. Diese Druckschwankungen können in ihrer Stärke bis kurz vor dem Zerreißen der Zelle, d.h. bis kurz vor dem Zelltod, toleriert werden (Levina *et al.*, 1999).

Die Strukturveränderungen innerhalb von Ionenkanälen nach Dehnung sind je nach Zelllinie sehr unterschiedlich. Der Mechanismus innerhalb der mechanosensitiven Ionenkanäle (*MscL*) bei *E.coli* unter Belastung verläuft beispielsweise folgendermaßen:

Ein Ionenkanal besteht aus 12 membran-durchspannenden alpha-Helices (jeweils 6 der M1 und M2 Transmembrandomänen vom *MscL* Monomer), die die Kanalpore wie ein Diemer durchziehen. N- und C-terminale Enden liegen einander innerhalb der Pore gegenüber, wenn der Kanal geschlossen ist. Bei Dehnung der Membrandoppelschicht werden die Monomere auseinandergezogen und etwas zueinander gekippt. Es wird angenommen, daß ein Inklinationwinkel von 3 - 4,1 Grad zwischen den gegeneinander gekippten Kanalmonomeren für das N-terminale Ende ausreicht, um von den anderen Domänen wegzuschwenken und so eine Kanalöffnung auszulösen. Somit erscheint das N-terminalen Ende als ein mechanosensitives Strukturelement, daß bei mechanischer Belastung *MscL* öffnet (Gu *et al.*, 1998).

Im Endothel agieren mechanosensitive Ionenkanäle als Mechanosensoren für hämodynamische Veränderungen (Hoyer *et al.*, 1998). Kohler stellte im Endocard-endothel bei Ratten fest, daß durch Druck aktivierte Kanäle eine Öffnung von Calcium-abhängigen nicht-selektiven Ionenkanälen zur Folge haben. Dies läßt vermuten, daß der Calcium-Influx durch druck-aktivierte Kanäle den Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration unterstützt (Kohler *et al.*, 1998).

Sokabe stellte ein dehnungs-induziertes Remodelling am humanen Beinvenen-Endothel fest. Dieses Remodelling ist abhängig vom Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration über calcium-permeable, dehnungs-aktivierte Kanäle, wobei die Abhängigkeit von extrazellulärer Calcium-Konzentration besteht.

Er stellte hierfür eine mögliche Signalkaskade auf:

Aktivierung der Kanäle durch Dehnung => intrazellulärer Calciumanstieg => Aktivierung der Tyrosinkinase *Src* => Protein-Tyrosin-Phosphorylierung => Neuordnung von Zytoskelett und fokaler Adhäsion => Zell-Remodelling (Sokabe *et al.*, 1997).

Nakao untersuchte die Wirkung von Flüssigkeitsfluß auf Ionenströmungen und intrazelluläre Calcium-Konzentration im humanen Aorta-Endothel. Es zeigte sich, daß Flüssigkeitsfluß einen intrazellulären Calcium-Anstieg zur Folge hatte, der abhängig von der Fließgeschwindigkeit und der extrazellulären Calcium-Konzentration ist (Nakao *et al.*, 1999).

Diese Erkenntnisse zeigen, wie umfassend der Einfluß der mechanosensitiven Ionenkanäle in Bezug auf Mechanorezeption ist, und daß die eigentlich überall folgende Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration eine wesentliche Rolle für die Signalweiterleitung darstellt. Inwiefern die Ergebnisse, die schon in Endothelzellen, etc. über die Funktion mechanosensitiver Ionenkanäle vorliegen, sich auf Knochenzellen übertragen lassen, wird bislang noch erforscht.

1.4 Zytoskelett

Das Zytoskelett ist eine dynamische Struktur, die ständig neu organisiert wird.

Es besteht aus drei Haupttypen von Proteinfilamenten:

- den Aktin-Filamenten, gebildet aus Aktin
- den Mikrotubuli, gebildet aus Tubulin
- den Intemediärfilamenten, gebildet aus fibrillären Proteinen (Vimentin, Lamin,...)

Aktinfilamente können in den Zellen sowohl stabile als auch labile Strukturen ausbilden. Sie sind mindestens 30 mal so groß wie Mikrotubuli, allerdings auch kürzer, und liegen in der Zelle verteilt, haben aber ihre größte Dichte direkt unter der Plasmamembran.

Mikrotubuli sind lange, steife Polymere, die sich durch das Zellplasma erstrecken und die Lage der membranumhüllten Organellen und anderer Zellbestandteile steuern.

Intermediärfilamente umgeben den Zellkern, erstrecken sich bis zur Zellperipherie und stehen in Wechselwirkung mit der Plasmamembran. Besonders gut ausgebildet sind Intermediärfilamente im Zytoplasma von Zellen, die mechanischer Belastung ausgesetzt sind. Die Hauptaufgabe dieser Filamente im Zytoplasma besteht darin, mechanische Belastungen aufzufangen (Galou *et al.*, 1997).

Es hat sich gezeigt, daß mechanische Belastung die Zellform und die Organisation des Zytoskeletts ändert. Das Zytoskelett formt ein Netzwerk zwischen Extrazellulärer Matrix (EZM) und dem Kern. Durch das Zytoskelett erzeugt die Zelle eine innere Kraft, die eine Spannung auf die EZM ausübt (Sims *et al.*, 1992). Aufgrund dieser Spannung werden physikalische Stimuli sofort zum Kern weitergeleitet.

Es hat sich erwiesen, daß zelluläres Attachment zur EZM eine wichtige Rolle in der Regulation von zellulärer Differenzierung, Proliferation und Gen-Expression spielt (Ingber & Folkman, 1989). Weitere Beobachtungen lassen vermuten, daß nicht die Veränderung der Zellform, sondern die Modulation des Zytoskeletts eine Änderung der Gen-Expression bei mechanischer Belastung bewirkt (Duncan & Turner, 1995). Turner fand heraus, daß Knochenzellen in Kultur unter mechanischer Belastung ihr Zytoskelett neu organisieren, um Aktinfasern auszubilden. Dies zeugt für eine zelluläre Anpassung der Zellen an eine bestimmte mechanische Belastung (Turner & Pavalko, 1998).

Auch Pavalko erkannte, daß die Organisation von Aktin- und Myosin-Filamenten zu kontraktile Fasern die Spannung innerhalb der Zelle erhöht. Die Entwicklung der inneren Spannung spielt eine zentrale Rolle in der Signalweiterleitung von EZM zum Kern. Über Integrine werden die Aktin-Filamente an sogenannten fokalen Adhäsionspunkten mit der EZM verbunden. Dabei helfen verschiedene Verbindungsproteine (Aktin-assoziierte Proteine) wie Vinculin, Talin, Tensin und alpha-Aktinin, die sich zwischen Integrinen und Aktinfilamenten einbauen (Pavalko *et al.*, 1991)

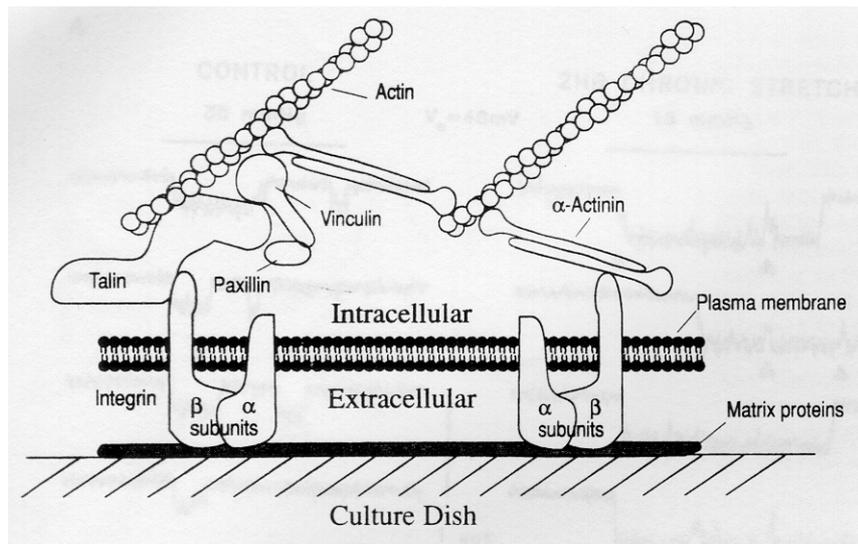


Abb. 4 Diagramm der zytoskelettalen Komponenten zum Zeitpunkt des Attachments mit der Extrazellulären Matrix (Turner & Pavalko, 1998).

Die Integrine, die aus den zwei Heterodimeren α und β bestehen, durchspannen die Plasmamembran der Zelle. Die extrazellulären Domänen binden an extrazelluläre Matrixproteine. Die intrazellulären Domänen interagieren entweder mit Talin oder α -Aktinin. Diese beiden Proteine binden wiederum an Aktin. Vinculin und Paxillin spielen ebenfalls eine Rolle bei der fokalen Adhäsion.

Anhand von Osteoblasten stellte Pavalko fest, daß das Aktin-Skelett und die Aktin-Membran-Interaktionen für die Weiterleitung mechanischer Signale und somit für die Änderung der Gen-Expression eine wichtige Rolle spielen. Mechanische Belastung durch Flüssigkeitsfluß verursachte eine Neuorganisation der Aktin-Filamente sowie eine Rekrutierung von Integrinen und alpha-Aktinin zu fokalen Adhäsionspunkten an der Zellmembran (Pavalko *et al.*, 1998).

Meazzini ist der Meinung, daß die strukturelle Vollständigkeit der Mikrofilamente in Osteoblasten notwendig für die Signaltransduktion bei mechanischer Stimulation sei. Qualitative und quantitative Änderungen innerhalb des Zytoskeletts hätten verschiedene Auswirkungen. Mittels Immunfluoreszenzmikroskop weist er durch mechanische Belastung von Osteoblasten nach, daß sich Aktinfasern verstärkt formiert haben und ihre Dicke angestiegen ist, bei gleichzeitiger Trennung von Mikrotubuli. Außerdem kommt es zu einem Anstieg von Vinculin in der Peripherie der Zelle.

Er kommt zu dem Ergebnis, daß die erhöhte Syntheserate und die erhöhte Ansammlung von Vinculin sowie der Anstieg von Fasern und fokalen Adhäsionskomplexen darauf schließen läßt, daß mechanische Belastung eine koordinierte Änderung in Zytoskelett und EZM-Proteinen bewirkt, die eine stärkere Bindung von Osteoblasten an die EZM ermöglicht (Meazzini *et al.*, 1998).

Die lokale Verteilung der Zellkomponenten ist ein wichtiger Faktor bei der mechanisch induzierten Signaltransduktion. So zeigte Rychly, daß mechanische Stimulation von Integrinen ihre Verbindung zum Zytoskelett induziert. Zytoskelett-assoziierte Proteine wie Vinculin und Talin akkumulieren sich in der Nähe des Ortes, wo die mechanische Belastung an der Zelloberfläche auf die Integrine einwirkt (Rychly *et al.*, 1998).

Meyer und Jones untersuchten 1997 an primären Osteoblasten die Wirkung mechanischer Stimulation auf Funktion und Ansammlung von Vinculin. Es hat sich gezeigt, daß Vinculin keine Rolle in der Mechanotransduktion spielt und auch signifikante mechanische Belastung nicht durch Vinculin übermittelt wird. Ebenso hat auch ein Verlust von Vinculin an den fokalen Adhäsionspunkten keine interessante Auswirkung auf die Zelladhäsion (Meyer *et al.*, 1997).

Auch im Zytoskelett von Gefäßendothelzellen verursacht die mechanische Belastung durch den Blutfluß eine aktive Neuorganisation. Laut Barakat wird die mechanische Stimulation über Ionenkanäle an den fokalen Adhäsionspunkten an das Zytoskelett weitergeleitet. Das Gefäßendothel antwortet mit Änderung der Zellform und Reorganisation des Zytoskeletts auf Flüssigkeitsfluß. Bekannt ist, daß Aktin-Filamente, Mikrotubuli und Intermediärfilamente in diese Prozesse der Signalaufnahme zentral mit einbezogen sind, der genaue Hergang bedarf allerdings noch weiterer Forschung (Barakat & Davies, 1998).

Die Extrazelluläre Matrix

Die Extrazelluläre Matrix besteht aus drei Komponenten,

- den Kollagenen, von denen es mindestens 12 Varianten gibt. Sie bilden Fasern, Fibrillen, Netze und Bänder und sind für Flexibilität und Zugfestigkeit zuständig.
- den Ankerproteinen, die die Verbindung zwischen den verschiedenen Bestandteilen der EZM herstellen. Wichtige Vertreter sind Lamin, Fibronectin und Elastin, die wichtige andere Matrixkomponenten binden und mit deren Hilfe die Zellen über Zelloberflächen-Rezeptoren (Integrine) an der intrazellulären Matrix fixiert werden.
- den Proteoglycanen, extrem großen Molekül-Komplexen aus Kohlenhydraten und Proteinen. Sie bilden die raumfüllenden Strukturen der EZM.

Bei Belastung der EZM kommt es zur Verschiebung der Komponenten, die eine Signalweiterleitung zum Zytoskelett aufgrund ihrer Verbindung zu Integrinen und Ionenkanälen ermöglichen (Duncan & Turner, 1995).

EZM-Moleküle wie z.B. Typ I Kollagen werden für Adhäsion, Bewegung, Proliferation und Differenzierung u.a. auch in Osteoblasten benötigt. Die Matrix-Komponenten lösen Zellreaktionen aus, indem sie mit Mitgliedern der Integrin-Familie der Zelloberflächen-Rezeptoren interagieren. Osteoblasten selbst setzen verschiedene Integrine wie z.B. $\alpha2\beta1$, den Hauptrezeptor für Typ I Kollagen, frei (Xiao *et al.*, 1998)

1.5 G-Protein gekoppelte Oberflächenrezeptoren

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren stellen mit die größte Familie von Rezeptoren im Knochen dar. Sie sind gekennzeichnet durch ihre Fähigkeit, an katalytische

heterotrimere G-Proteine zu koppeln und somit intrazelluläre Signalkaskaden auszulösen.

Viele Hormone wie Parathormon (PTH), Prostaglandin, ... vermitteln grundlegende autokrine und parakrine Mechanismen über die Aktivierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren.

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren sind integrale Membranproteine, die die Plasmamembran 7-fach durchspannen und aus einer extrazellulären Domäne, einer Transmembrandomäne und einer intrazellulären Domäne bestehen.

Heterotrimere G-Proteine setzen sich aus drei Untereinheiten zusammen (α , β und der kleineren γ -Untereinheit). Anhand der Sequenzen der α -Untereinheiten lassen sich die G-Proteine in 4 Familien einteilen: Gs, Gi, Gq und G12. Auch eine Vielzahl an β - und γ -Untereinheiten wurde in Verbindung mit α -Untereinheiten identifiziert. Diese G-Protein Unterfamilien können sowohl stimulierend als auch inhibierend wirken.

Die Ligandenbindung erfolgt durch Formation von extrazellulärer und transmembraner Domäne zu einer „Tasche“, in der Aminosäurereste Ligandenspezifität und Affinität bestimmen. Die Ligandenbindung bewirkt eine Konformationsänderung der zytoplasmatischen Domäne des Rezeptors und fördert die Bindung an inaktives GDP-gebundenes heterotrimeres G-Protein (Abb.5).

Diese Interaktion erhöht die Dissoziation von GDP vom Rezeptor/G-Proteinkomplex, ermöglicht so eine GTP-Bindung, α -Untereinheit-Aktivierung und Abspaltung vom Rezeptor. Dabei spaltet sich die aktivierte α -Untereinheit des G-Proteins zusätzlich von der β/γ -Untereinheit ab und bindet an ein Effektormolekül.

Durch intrinsische GTPase-Aktivität der α -Untereinheit kommt es zur Hydrolyse von GTP und somit zur Inaktivierung der α -Untereinheit, die in ihren ursprünglichen Konformationszustand zurückkehrt, ein Prozeß, der häufig durch Effektorbindung aktiviert wird. Die GDP-gebundene α -Untereinheit vereint sich wieder mit dem β/γ -Komplex und formt so ein inaktives G-Protein Heterotrimer, das wieder neu mit einem Rezeptor reagieren kann (Bowler *et al.*, 1998b). Ein extrazelluläres Signal wird so vom Rezeptor an viele intrazelluläre Signalwege weitergegeben.

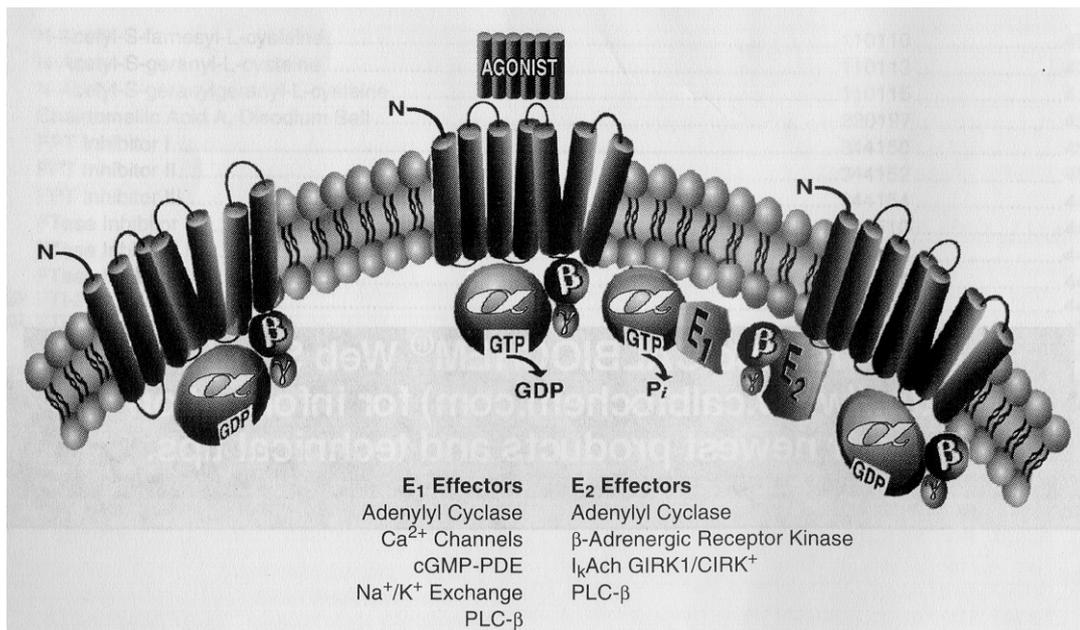


Abb. 5 Signalübertragung durch G-Proteine (Graber, 1999)

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren durchspannen die Plasmamembran 7-fach. Heterotrimeres G-Proteine setzen sich aus den drei Untereinheiten α , β und γ zusammen. Ligandenbindung bewirkt eine Konformationsänderung der zytosplasmatischen Domäne des Rezeptors und fördert die Bindung an inaktives GDP-gebundenes heterotrimeres G-Protein. Dadurch erhöht sich Dissoziation von GDP vom Rezeptor/G-Proteinkomplex und ermöglicht so eine GTP-Bindung, α -Untereinheit-Aktivierung und Abspaltung vom Rezeptor. Dabei spaltet sich die aktivierte α -Untereinheit des G-Proteins zusätzlich von der β/γ -Untereinheit ab und bindet an ein Effektormolekül.

1.5.1 Parathormon-Rezeptor

Parathormon (PTH) ist eines der Hauptregulatoren des Calcium-Mineral-Haushalts im Knochen. Es reguliert die Calciumkonzentration in der Extrazellulärflüssigkeit, indem ein verminderter Calciumspiegel eine erhöhte Freisetzung von PTH aus der Nebenschilddrüse bewirkt, woraufhin es zu erhöhter Calciumfreisetzung durch PTH aus dem Knochen kommt (Bowler *et al.*, 1998a).

Der Einfluß von PTH auf den Knochenmetabolismus läuft über den G-Protein-gebundenen PTH-Rezeptor, der von den Osteoblasten produziert wird (Kawane & Horiuchi, 1999a). Bei Bindung von PTH an den Rezeptor steigt die Menge an intrazellulären „second messengers“: Adenylatcyclase wird indirekt aktiviert und erhöht den c-AMP Spiegel, Diacylglycerol und intrazelluläres Calcium werden über

die Aktivierung von Phospholipase C freigesetzt (Kaplan *et al.*, 1995; Tyson *et al.*, 1999).

Werden diese „second messenger“ aktiviert, kommt es zu einer Genexpression in Osteoblasten. Laut Partridge vermittelt PTH die meisten biologischen Vorgänge in Osteoblasten, vorzugsweise über den c-AMP-Proteinkinase A-Pathway. Die Bindung von PTH an den Rezeptor zeigt außerdem eine Aktivierung von Proteinkinase A und C und einen Anstieg an intrazellulärem Calcium (Partridge *et al.*, 1994).

PTH-Rezeptoren aktivieren laut Bowler zwei Signaltransduktionswege: zum einen sind die Rezeptoren mit Gs- α gekoppelt und aktivieren so Adenylatcyclase, was eine Akkumulation von 3,5-c-AMP und die Aktivierung des Proteinkinase A Pathways bewirkt; zum anderen bindet der Rezeptor an Gq- α , wodurch Phospholipase C und damit die Proteinkinase C-Kaskade aktiviert wird (Erläuterung folgt in Abschnitt 2.). Diese duale Aktivierung zeigt ein komplexes System, das eine Verzahnung beider Pathways möglich macht (Bowler *et al.*, 1998).

PTH stimuliert sowohl die Knochenbildung als auch die Knochenresorption. Es stimuliert auch die Synthese von 1,25-dihydroxyvitamin D₃, das die intestinale Calcium- und Phosphatresorption erhöht und die Knochenbildung fördert. PTH wirkt hauptsächlich auf Osteoblasten, die im Gegensatz zu Osteoklasten PTH-Rezeptoren besitzen. Scheinbar übt PTH indirekt eine Wirkung auf die Osteoklasten aus und erhöht deren Anzahl und Aktivität (Chevalley & Rizzoli, 1999). Wie PTH *direkt* auf Osteoblasten wirkt ist noch nicht geklärt, möglicherweise werden auch gleichzeitig Osteoklasten direkt über parakrine Stoffe stimuliert. Paradoxerweise werden die PTH-Rezeptoren von den Osteoblasten selbst produziert, wobei doch PTH auch die Knochenresorption unterstützt. Die genauen Mechanismen, die darauf Einfluß nehmen, sind allerdings noch nicht erforscht (Bowler *et al.*, 1998).

Ein zweites Mitglied der PTH-Familie ist das Parathormon-related Protein (PTHrP), das ebenfalls im Knochen nachgewiesen wurde (Walsh *et al.*, 1995).

PTHrP bindet mit der gleichen Affinität an den gleichen Rezeptor wie PTH und aktiviert den Rezeptor mit gleicher Intensität. Aus diesem Grund wird der Rezeptor auch als PTH/PTHrP-Rezeptor bezeichnet. PTH, das systemisch wirkt, und PTHrP,

das lokal wirkt, interagieren möglicherweise miteinander in einem regulatorischen Komplex.

Es hat sich gezeigt, daß PTH verschiedene phänotypische Veränderungen in Osteoblasten bewirkt, die mit einem inhibitorischen Effekt auf Differenzierung und Reduktion von Osteocalcin und Typ I Kollagen einhergehen. PTH übt inhibitorische oder stimulatorische Effekte auf die Osteoblastenproliferation aus, abhängig vom untersuchten Zelltyp. Bei humanen Osteoblasten unterstützt PTH die Proliferation (MacDonald *et al.*, 1986). Ein PTH-Signal wird sowohl über den Adenylatcyclase/PKA-Pathway als auch über den Phospholipase C/ PKC/ Calcium-Pathway weitergeleitet. Die Aktivierung des Adenylatcyclase/PKA-Pathways ist dabei die Hauptkomponente der proliferativen Effekte von PTH (Sabatini *et al.*, 1996). Es hat sich gezeigt, daß die Wirkung von PTH auf Osteoblasten möglicherweise abhängig von Differenzierungsgrad und Entwicklung ist (Isogai *et al.*, 1996).

Tyson behauptet, daß PTH, obwohl es ein knochenresorbierendes Hormon ist, bei geringer Dosis und intermittierendem Behandlungsmuster die Knochenmasse durch einen bis jetzt noch nicht bekannten Mechanismus erhöhen kann. Es kommt außerdem zu einem schnellen, vorübergehenden Anstieg des „*immediate early gene*“ *c-fos* (Tyson *et al.*, 1999).

1.5.2 Prostaglandin-Rezeptor

Prostaglandine gehören zur Gruppe der Eicosanoide, sind oxygenierte Metaboliten der Arachidonsäure und üben eine Vielzahl an physiologischen Effekten über die Aktivierung von G-Protein gekoppelten PG-Rezeptoren aus.

Es hat sich erwiesen, daß die Prostaglandine PGE₂, PGF₂ und PGI₂ im Knochen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* freigesetzt werden, allerdings wird PGE₂ von den Knochenzellen am häufigsten erzeugt und übernimmt die funktionell wichtigste Rolle. Der PGE₂-Rezeptor besitzt 4 Subtypen, die sowohl an intrazelluläre Calcium-Mobilisation als auch an Stimulation oder Inhibition der Adenylatcyclase gekoppelt sind.

Die Funktion der PGE₂-Rezeptor Aktivierung ist noch nicht vollständig geklärt. Untersuchungen haben gezeigt, daß PGE₂ anabolische Prozesse auslöst, Differenzierung und Zellwachstum beeinflusst und einen proliferativen Effekt auf Osteoblasten ausübt (Bowler *et al.*, 1998).

Yang wies anhand von Rattenosteoblasten nach, daß PGE eine morphologische Veränderung in Osteoblasten bewirkt, die bei erhöhtem intrazellulären Calciumspiegel ansteigt. Eine Verbindung zwischen den morphologischen Veränderungen der Osteoblasten durch PGE und dem intrazellulären Calcium und cAMP-Level liegt nahe. Mittels Fluoreszenz zeigt sich, daß ein Bruch der Aktinfilamente stattfindet, Mikrotubuli und Vimentin-Filamente werden hingegen ausgespart (Yang *et al.*, 1998).

1.6. Enzym-gekoppelte Oberflächenrezeptoren

Enzym-gekoppelte Rezeptoren sind katalytische Transmembranproteine, die die Membran einfach durchspannen. Sie besitzen eine extrazelluläre, Liganden-bindende Domäne, eine Transmembran-Domäne und eine intrazelluläre Domäne, die entweder an ein Enzym gekoppelt ist, oder selbst katalytisch wirkt.

Es sind fünf Gruppen von Enzym-gekoppelten Rezeptoren bekannt, im Folgenden sollen drei Gruppen besonders herausgestellt werden:

1. die Gruppe der Rezeptor-Tyrosinkinase, die u.a. die Wachstumsfaktoren IGF und PDGF als Liganden bindet,
2. die Gruppe der Rezeptor-Serin/Threoninkinase, die die Wachstumsfaktoren BMP und TGF-beta als Liganden bindet,
3. die Gruppe der Tyrosinkinase-assoziierten Rezeptoren, die u.a. Cytokine als Liganden bindet

1.6.1 Rezeptor-Tyrosinkinasen

1.6.1.1 Insulin-like growth factor (IGF)-Rezeptor

Insulin-like growth factor I besteht aus einem 70-Aminosäure-Polypeptid, er weist eine vergleichbare strukturelle Homologie zu IGF-II und Insulin auf und spielt eine bedeutende Rolle für das skelettale Wachstum. IGFs sind beteiligt an den Vorgängen des Zellzyklus und an der Zellproliferation.

Die Bindung von IGF an den Rezeptor verursacht eine Rezeptor-Autophosphorylierung der intrazellulären Kinase-Domäne, wodurch eine entsprechende Signalkaskade aktiviert wird. IGF-II ist der Wachstumsfaktor mit der höchsten Konzentration in der Knochenmatrix, IGF-I ist aber 4-7 mal stärker wirksam als IGF-II (Lind, 1996). Cortisol verhindert eine IGF-I-Produktion (Pereira *et al.*, 1999), während PTH, PGE₂ und BMP-2 diese in Osteoblasten stimulieren können (Solheim, 1998a).

In Versuchen hat man festgestellt, daß IGF von verschiedenen Knochenzellen, auch von Osteoblasten, sezerniert wird. IGF kann als ein autokriner und parakriner Regulator der Osteoblastenfunktion fungieren und eine Stimulation der Kollagen TypI Synthese bewirken (Hock *et al.*, 1988), außerdem kann die Kollagenasevermittelte Kollagenverminderung in Osteoblasten verringert werden (Canalis *et al.*, 1995; Delany *et al.*, 1996) und eine Osteoblastenproliferation stattfinden.

Das von Osteoblasten produzierte IGF-I stimuliert die Knochenbildung und wird als einer der Faktoren angesehen, der Knochenbildung mit Knochenresorption innerhalb der Homöostase verbindet. Wie IGF auf die Knochenresorption wirkt, ist aber noch nicht klar. Anhand von SaOS-2 Zellen fand man heraus, daß IGF die Zahl an PTH/PTHrP-Rezeptoren reduziert und die durch PTH erhöhte cAMP-Produktion verhindert, indem es mit dem PTH-Rezeptor agiert oder den Rezeptor an Gs- α koppelt (Goad & Tashjian, 1993).

Die Rolle von IGF-I im MAP-Kinase-Pathway in UMR-106 Zellen wurde mit Hilfe des MAP-Kinase Inhibitors PD98059 dargestellt. Die sonst von IGF-I induzierte MAP-Kinase Aktivität wurde deutlich unterdrückt. Die Aktivierung von PI-3-Kinase spielt ebenfalls eine bedeutende Rolle in der IGF-I Signaltransduktion; dieses Enzym vermittelt die Aktivierung anderer Proteinkinasen wie z.B. PKC (Kawane & Horiuchi, 1999b).

1.6.1.2 Platelet derived growth factor (PDGF)-Rezeptor

PDGF ist ein Dimer aus zwei Peptiden, A und B, die eine 60%ige Homologie in ihrer Aminosäuresequenz aufweisen. Das PDGF-BB Homodimer ist biologisch aktiver als die anderen zwei Kombinationen. PDGF-BB und PDGF-AB fungieren als systemische Wachstumsfaktoren, PDGF-AA als lokaler Wachstumsfaktor im Knochen. In humanen Knochenzellen wird nur das PDGF-A-Gen gebildet.

PDGF wird von Thrombozyten, Monozyten, Makrophagen und Endothelzellen synthetisiert und erhöht die DNA-Synthese, Zellreplikation und Kollagensynthese in Knochenzellkulturen.

Die Rezeptoraktivierung erfolgt durch Bindung von PDGF an den Rezeptor, wobei die zwei Untereinheiten des PDGF-Rezeptors, α und β , Dimere bilden. PDGF-A Polypeptide binden bevorzugt an die α -Untereinheit, PDGF-B Polypeptide sowohl an α - als auch an β -Untereinheiten. Für eine ausreichende Antwort müssen beide Untereinheiten aktiviert werden (Solheim,1998).

Versuche haben ergeben, daß PDGF den Inositolphosphat-Level in MG63-Zellen und in menschlichen Osteoblasten erheblich anhebt und somit mitogen wirkt (Sandy *et al.*, 1998).

Wang hat herausgefunden, daß die Proliferation von Osteoblasten nach mechanischer Dehnung von einem Anstieg an PDGF-A mRNA begleitet wird. Der Hinweis auf Abhängigkeit der Osteoblastenproliferation nach Dehnung von der erhöhten PDGF Aktivität wird damit unterstützt (Wang *et al.*, 1997).

Shyy weist anhand von Endothelzellen auf, daß auch Flüssigkeits-Scherkräfte Einfluß auf die Produktion von PDGF-B haben können (Shyy,1997).

1.6.1.3 Epidermal growth factor (EGF) -Rezeptor

Der EGF-Rezeptor ist ebenfalls ein Transmembranrezeptor mit intrinsischer Tyrosinkinase-Aktivität. EGF ist ein Mitogen und stimuliert über diesen Rezeptor zahlreiche intrazelluläre Antworten, unabhängig davon ist EGF aber auch dafür bekannt, Knochenresorption zu stimulieren.

Es hat sich gezeigt, daß EGF die Aktivierung der „*extracellular regulated Kinase*“ (ERK) stimuliert und einen Anstieg von intrazellulärem Calcium unabhängig von der Hydrolyse von Inositolphospholipiden bewirkt. In Rattenosteoblasten stellte man zudem eine Aktivierung des PLD-Pathways durch EGF und die mögliche Teilnahme von PKC und Gi-Protein-abhängigen Mechanismen fest (Carpio & Dziak, 1998a).

Kawase zeigt 1999 anhand von Untersuchungen mit EGF an UMR 106-Zellen von Ratten, daß ein Zusammenhang zwischen dem Signalweg der EGF-Rezeptor-aktivierten Tyrosinphosphorylierung und den Calcium und G-Protein-vermittelten Signalwegen besteht (Kawase *et al.*, 1999).

Untersuchungen über die Rolle von extrazellulärem Calciuminflux bei EGF-induzierter Osteoblasten-Proliferation haben bei Rattenosteoblasten zu folgendem Ergebnis geführt: EGF bewirkt eine Änderung des Membranpotentials, wodurch es zu einem erhöhten Calciuminflux in die Osteoblasten kommt (Loza *et al.*, 1995b). Es folgt ein starker Anstieg an intrazellulärem Calcium, der in Verbindung mit dem extrazellulären Calciuminflux steht. Man geht davon aus, daß die EGF-induzierte Osteoblastenproliferation durch die Veränderung der intrazellulären Calciumkonzentration vermittelt wird (Loza *et al.*, 1995a).

Matsuda untersuchte 1998 die Wirkung von EGF und mechanischer Belastung auf die Aktivierung der MAP-Kinase in Verbindung mit Proliferation und Differenzierung von Ligamentzellen des humanen Parodonts. Diese Zellen enthalten Vorläuferzellen von Osteoblasten, die später proliferieren und differenzieren können. Die Untersuchungen zeigten, daß die Proliferation bei 10ng/ml EGF stimuliert und bei zyklischer Dehnung von 9% (physiologische Dehnung für Osteoblasten liegt bei ~ 4%) und 6 Zyklen/min verhindert wird. Die Zelldifferenzierung wurde dagegen durch EGF verhindert und durch zyklische Dehnung stimuliert. Zusätzlich wurde beobachtet, daß der mitogene Effekt von EGF zur Aktivierung von ERK1/2 führt. Bei den Zellen, die gedehnt wurden, kommt es zur Phosphorylierung und Aktivierung der *c-Jun N-terminal Kinase* (JNK). Diese Ergebnisse lassen, obwohl es in vitro Studien sind, vermuten, daß Proliferation und Differenzierung dieser Zellen selektiv durch ERK1/2 und JNK vermittelt werden, und daß eine Balance zwischen beiden Signalwegen besteht, die die weitere Zellentwicklung gemeinsam beeinflusst (Matsuda *et al.*, 1998).

1.6.2 Rezeptor-Serin/Threonin-Kinasen

1.6.2.1 Bone morphogenetic protein (BMP) -Rezeptor

1965 war Urist der Überzeugung, daß Osteoinduktion am demineralisierten Knochen durch einen in diesem enthaltenen Faktor, dem „*bone morphogenetic protein*“ ausgelöst wird (Urist, 1965). 1979 wurde ein Extrakt von osteoinduktiven Glycoproteinen aus dem Knochen gewonnen (Urist *et al.*, 1979), bis heute wurden mindestens 15 verschiedene BMPs identifiziert.

Die BMPs, außer BMP-1, sind Teil der TGF- β Supergen-Familie, sie sind u.a. beteiligt an Knochenaufbau und Knochenregeneration. Im Gegensatz zu TGF- β ist das Kennzeichen der BMP's die Induktion ektopischer Ossifikation.

BMPs sind Wachstumsfaktoren, die verschiedene pluripotente undifferenzierte Mesenchymzellen zur Differenzierung zu Osteoblasten anregen und Einfluß auf die Chondrogenese haben (Sanyal *et al.*, 1999).

Viele Rezeptoren für BMP-2 sind nicht nur in Osteoblasten, sondern auch in verschiedenen anderen Zellen identifiziert worden. Es wurde festgestellt, daß eine erhöhte Konzentration an BMP-2 eine frühere Knochenbildung begünstigt (Solheim, 1998).

BMP-2 und BMP-4 akkumulieren sich in früher Ontogenese in sogenannten Polarisierungszonen der Embryos und induzieren dort die Anlagen der Extremitäten (Enchondrale Ossifikation). Enchondrale Knochenformation beinhaltet eine Kaskade von zellulären Prozessen wie Proliferation, Reifung, hypertrophische Umwandlung und Kalzifizierung der Chondrozyten und letztendlich die Umwandlung von Knorpel in Knochen. Indian hedgehog (Ihh), ein Protein, das in frühen hypertrophen Chondrozyten exprimiert wird, soll die späte Phase der chondrogenen Differenzierung stimulieren. Ebenso soll Ihh die Gen-Expression des Osteoprotegerin-Liganden (OPGL), einem potentiellen Stimulator der Osteoklastogenese und der Osteoklastenaktivität, in differenzierten ATDC5-Zellen von Mäusen erhöhen (Akiyama *et al.*, 1999).

Indian hedgehog (Ihh) und seine Signalmoleküle Ptc (Patched) und Smo (Smoothed) sollen ebenfalls in die Regulation der chondrogenen Differenzierung bei Frakturheilungsprozessen involviert sein. So wurde bei Frakturen der Rippen von Mäusen eine Erhöhung der Ihh-, Ptc- und Smo-mRNA innerhalb von Stunden nach

der Fraktur festgestellt. Dabei waren die Transkripte von Ptc und Smo im Knochenmark der nicht-frakturierten Rippen lokalisiert, in der Umgebung der Fraktur wurden die Transkripte von Ihh, Ptc und Smo exprimiert (Ito *et al.*, 1999).

Anhand von Untersuchungen bei Femurfrakturen von Ratten stellte man fest, daß der Wachstumsfaktor BMP-4 vor der Fraktur sowohl im Knochen als auch im umgebenden Weichgewebe exprimiert wurde. 6 Stunden nach der Fraktur stieg die BMP-4-Expression im umgebenden Weichgewebe um das 10fache an und kehrte nach 72 Stunden auf die Werte vor der Fraktur zurück. Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß BMP-4 in die frühe Kallusformation der Frakturheilung involviert ist (Yaoita *et al.*, 2000).

Verschiedene Versuche an Ratten-Osteoblasten haben gezeigt, daß das Knochenbildungspotential der Knochenmatrix vom Neugeborenenalter bis zum Erwachsenenalter ansteigt, was mit Konzentrationsänderungen der essentiellen Wachstumsfaktoren zusammenhängt. BMPs und andere Wachstumsfaktoren werden in der Knochenmatrix gespeichert. Alterungsprozesse resultieren aber darin, daß mehr Matrix vorhanden ist als Zellen, und führen zu einem Konzentrationsabfall von BMP und anderen Wachstumsfaktoren. Das Potential für die Knochenbildung verringert sich und kann in Verbindung mit osteoporotischen Veränderungen im Knochen gesetzt werden (Solheim, 1998b).

1.6.2.2 Transforming growth factor β (TGF- β)-Rezeptor

TGF- β ist Mitglied der TGF- β Superfamilie, vier verschiedene Subtypen sind identifiziert worden. Die Mitglieder der TGF- β -Familie sind Homodimere und weisen eine 60-80%ige Ähnlichkeit in ihren Aminosäuresequenzen auf.

TGF- β wird von Osteoblasten produziert und in der Knochenmatrix gespeichert, was den Knochen zum größten Reservoir von TGF- β im Körper macht. Osteoblasten besitzen die höchste Zahl an TGF- β -Rezeptoren.

TGF- β 1 wurde im humanen Periost nach Frakturen nachgewiesen, es erhöht die Proliferation von Mesenchymzellen und Osteoblasten bei Frakturen (Solheim, 1998a).

Während BMPs Knochenbildung auch im artfremden Gewebe erzeugen können, kann die Stimulation von Knochenbildung durch TGF- β nur an spezifischem Gewebe erfolgen (Tanaka *et al.*, 1993).

TGF- β vermittelt seine Wirkung über mindestens drei verschiedene Oberflächenrezeptoren (I,II:Ser/Thr-Kinasen; III:Betaglycan).

Osteoblasten exprimieren TGF- β Rezeptoren *in vitro* in Abhängigkeit von Wachstumsfaktoren und Hormonen. Es hat sich gezeigt, daß bestimmte biologische Antworten abhängig vom Typ I TGF- β Rezeptor sind, genauere Einblicke bedürfen aber noch weiterer Forschung (Centrella *et al.*, 1998).

Zellin wies nach Applikation von menschlichem TGF- β 1 *in vivo* nach, daß erstens ein proliferativer Effekt bei Zellen zu erkennen ist, die schon der Osteoblasten-Linie angehören, zweitens aber die Wirkung von TGF- β 1 auf die Induktion von knochenbildenden Zellen inhibitorisch ist (Zellin *et al.*, 1998).

Erlebacher fand heraus, daß eine Überproduktion von TGF- β 2 in Osteoblasten von Mäusen das Knochenremodelling beeinflusst und zu einem altersabhängigen Verlust von Knochenmasse führt. TGF- β 2 ist somit ein physiologischer Regulator im Knochenremodelling, es stellt sich nur die Frage, wie er die unterschiedlichen Funktionen von Osteoblasten und Osteoklasten koordiniert. Untersuchungen haben ergeben, daß TGF- β direkt die *steady-state-Rate* der Osteoblastendifferenzierung von Osteoprogenitorzellen bis zu vollständig differenzierten Osteozyten beeinflusst und dabei die spätere Dichte der Osteozyten innerhalb der Knochenmatrix erhöht. Hinzu kommt, daß scheinbar auch die Osteoklastenaktivität zum TGF- β induzierten Anstieg der Osteoblastendifferenzierung im Zuge des Remodelling beiträgt. TGF- β kann also als physiologischer Regulator der Osteoblastendifferenzierung angesehen werden, dessen zentrale Rolle darin besteht, Knochenbildung und Knochenresorption während des Remodelling zu koordinieren (Erlebacher *et al.*, 1998).

Die Einwirkung von Flüssigkeitsscherkräften physiologischer Stärke auf humane SaOS-2 Zellen hat ergeben, daß die Produktion von TGF- β 1 nach drei Stunden um etwa das dreifache ansteigt und somit die Knochenbildung unterstützt wird (Sakai *et al.*, 1998).

Fujimoto untersuchte die Wirkung von TGF- β 1 in vivo anhand der Knochenbildung in der Schädelkalotte von Ratten. Es zeigte sich, daß TGF- β 1 nur abhängig von seiner Konzentration und vom Injektionsort einen Effekt auf die Knochenbildung ausüben kann. So kommt es bei subkutaner TGF- β 1-Injektion von auch hohen Dosen über längere Zeit zu verminderter Knochenapposition, Knochenbildungsrate und verzögerter Mineralisation. Bei direkter subperiostaler Injektion schon geringer TGF- β 1-Konzentration zeigte sich hingegen direkt eine periostale Zellproliferation (Fujimoto *et al.*, 1999).

Sasse untersuchte die Wirkung von TGF- β 1 in Verbindung mit Osteoporose und fand heraus, daß TGF- β nach zusätzlicher Applikation von IGF-I seine eigene mRNA sowohl bei Patienten mit Osteoporose als auch bei Patienten ohne Osteoporose in gleichem Maße erhöht. Die Proliferation von Knochenzellen wird allerdings bei Nicht-Osteoporose-Patienten durch TGF- β 1 bei einer Konzentration von 10^{-10} Mol verhindert, bei Osteoporose-Patienten findet hingegen ein Anstieg der Zellproliferation statt (Sasse *et al.*, 1998).

1.6.3 Tyrosinkinase-assoziierte Rezeptoren

1.6.3.1 Cytokin-Rezeptor

Der Name „Cytokine“ bedeutet ursprünglich „Faktoren, die von Zellen produziert werden“. Die Vertreter der Cytokine sind Interleukine (IL), Interferone (IFN), Tumor Nekrosis Faktor (TNF) und klassische Hormone. Cytokine sind Signalmoleküle, die eine überlappende biologische Aktivität in derselben Zelle ausüben können. Die Merkmale der Cytokine sind funktionelle Pleiotropie und Redundanz, sie übernehmen auch vielfältige Funktionen bei Wachstum und Differenzierung (Onishi *et al.*, 1998).

Cytokin-Rezeptoren besitzen im Gegensatz zu Rezeptor-Tyrosinkinasen keine Tyrosinkinase-Aktivität in der zytoplasmatischen Domäne. Bei Bindung von Cytokin an den Rezeptor wird darum eine assoziierte Tyrosinkinase aktiviert. Die meisten der assoziierten Protein-Tyrosinkinasen gehören zur Familie der *Src*-Kinasen und der *Jak*-Kinasen.

Nach Onishi können die Cytokin-Rezeptoren aufgrund struktureller Ähnlichkeiten in zwei Hauptgruppen unterteilt werden, zum einen in die Hämopoetin-Rezeptor-Familie (Typ I Cytokin-Rezeptor) und zum anderen in die Interferon-Rezeptor-Familie (Typ II Cytokin-Rezeptor). Diese Cytokin-Rezeptoren bestehen wiederum aus verschiedenen Untereinheiten. Die Bindung eines Liganden an den Cytokin-Rezeptor bewirkt eine Homo- oder Hetero-Dimerisierung der Rezeptorkomponenten. Jede liganden-bindende Untereinheit reagiert mit einem „Signaltransducer“, der verantwortlich für die Formation von hochaffinitiven Rezeptoren und der weiteren Signaltransduktion ist.

Einige der Hämopoetin-Rezeptor Untereinheiten besitzen in ihrer zytoplasmatischen Domäne einen membran-proximalen Teil, der für die Mitogenese eine Rolle spielt und den JAK/STAT-Pathway aktiviert, und einen membran-distalen Teil, der für die Aktivierung des Raf/Ras/MAP-Kinase-Pathway und die Expression von *c-fos* und *c-jun* benötigt wird.

Ein durch den Cytokin-Rezeptor vermitteltes Signal wird direkt über Proteinphosphorylierung als eine Differenzierungs-, Proliferierungs- oder Transkriptions-Nachricht an den Zellkern weitergeleitet. Man glaubte zuerst, daß der JAK/STAT-Pathway nur von spezifischen Cytokin-Rezeptoren aktiviert wird, mußte dann aber feststellen, daß auch eine Aktivierung über Nicht-Cytokin-Rezeptoren stattfindet.

Cytokine sollen außerdem die Transduktionswege der Tyrosinkinase-Rezeptoren und der G-Protein gekoppelten Rezeptoren beeinflussen. Es besteht die Möglichkeit, daß Cytokine und ihre Rezeptoren auch in intrazellulären Komponenten, den Nucleus mit einbezogen, lokalisiert sind. Cytokine könnten so als ihre eigenen Messenger mit Kernproteinen reagieren (Mertani *et al.*, 1999).

Jilka untersuchte die Wirkung von Wachstumsfaktoren und Cytokinen auf die Apoptose bei Osteoblasten. Er fand heraus, daß TGF-beta und IL-6 antiapoptotische Eigenschaften besitzen, und daß Wachstumsfaktoren und Cytokine apoptotische Vorgänge in Osteoblasten verändern können (Jilka *et al.*, 1998).

Jüngste Forschungsergebnisse liegen über ein Mitglied aus der TNF-Familie vor, den OPG-Liganden (Osteoprotegerin-Ligand). Er wird von Osteoblasten produziert, übt Effekte über die Bindung an seinen Rezeptor (osteoclast differentiation and activation receptor/ODAR) aus und liegt entweder löslich oder membrangebunden vor. Außerdem wird er von Osteoklasten zur Osteoklastendifferenzierung benötigt.

Die biologische Aktivität von OPG-L wird durch die Bindung an OPG (Osteoprotegerin) neutralisiert (Hofbauer *et al.*, 2000). OPG wird ebenfalls von Osteoblasten produziert und fungiert als „Decoy-Rezeptor“, der die Osteoklastendifferenzierung und somit die Resorption inhibiert (Aubin & Bonny, 2000). Osteoklastenformation kann damit durch das relative Verhältnis von OPG zu OPG-L im Mikrobereich des Knochenmarks bestimmt werden. Änderungen dieses Verhältnisses können zu metabolischem Ungleichgewicht führen und begünstigen Mangelzustände (z.B. Östrogenmangel), die zum Verlust von Knochenmasse (Osteoporose) führen (Hofbauer *et al.*, 2000).

1.6.3.2 Integrine

Transmembrane EZM-Rezeptoren wie die Integrine sind sehr gute Mechanorezeptoren, da sie Aktin-assoziierte Proteine in fokaler Adhäsion versammeln und dabei die EZM mit dem Zytoskelett verbinden. Bei Dehnung der EZM werden so mechanische Signale auf das Zytoskelett übertragen und biochemische Veränderungen in der Zelle bewirkt (Wang *et al.*, 1993). Integrin-vermittelte Prozesse äußern sich u.a. in Differenzierung, Änderung der Gewebsarchitektur, Apoptose, Tumorwachstum und Antwort auf mechanische Stimulation. Dies breite Spektrum wird erreicht durch die Kombination von funktioneller mechanischer Verbindung (Zell-Matrix und Zell-Zell-Verbindung) und der Fähigkeit zur Signaltransduktion. Osteoblasten erzeugen bestimmte Integrin-Rezeptoren, wobei das Erzeugungsmuster vom Grad der Zelldifferenzierung abhängt (Grzesik, 1997).

Integrine sind die Superfamilie der Oberflächen-Rezeptoren und bestehen aus nicht-kovalent verbundenen Heterodimeren der α - und β -Untereinheiten. Mehr als 20 verschiedene Mitglieder der Integrin-Familie sind in Vertebraten zu finden, bisher sind mindestens 16 verschiedene α -Ketten und mindestens 8 β -Ketten bekannt. Die Integrin Untereinheiten besitzen eine große extrazelluläre Domäne, eine einspannige transmembrane Domäne und für gewöhnlich eine kurze zytoplasmatische Domäne. Die extrazelluläre Domäne interagiert mit vielen extrazellulären Matrixmolekülen wie Fibronectin, etc..

Sowohl α - als auch β -Untereinheiten besitzen zusätzlich bivalente Kation-bindende Stellen, wobei die Anwesenheit bivalenter Kationen essentiell für die Integrin-Funktion ist. Drei bis vier Kationen bindende Stellen besitzen die α -Untereinheiten, mindestens eine die β -Untereinheiten (D'Souza *et al.*, 1994). Kationen stabilisieren die α/β Heterodimere und sind wesentliche Co-Faktoren bei der Integrin-Bindung. Viele Integrine zeigen geringe Spezifität in ihrer Eigenschaft, Liganden zu binden. So ist es möglich, daß ein bestimmter Rezeptor mit verschiedenen Liganden interagieren kann (Grzesik, 1997).

Integrine übermitteln die Information der EZM zur Zelle über *einen* „*outside-in-signaling*“-Prozeß (Sastry & Horwitz, 1993), der eine transmembrane Hierarchie molekularer Antworten wie Rezeptor-Clustering und Rekrutierung von Signal- und Zytoskelett-Proteinen zu fokaler Adhäsion darstellt. Die genaue Organisation der fokalen Adhäsion ist nicht bekannt, die zytoplasmatischen Domänen der Integrine interagieren aber mit zytoplasmatischen Proteinen und bewirken eine Umorganisation des Zytoskeletts. Die Aktin-bindenden Proteine, die mit Integrinen zusammen in fokaler Adhäsion vorliegen, sollen eine wichtige Rolle in der Zelladhäsion spielen, außerdem aktivieren sie mehrere Signaltransduktionswege wie z.B. die Phosphorylierung der Proteine „*focal adhesion kinase*“ (FAK), Tensin und Paxillin (BurrIDGE *et al.*, 1992).

Die Stimulation von Integrinen kann viele intrazelluläre Signalwege in Gang setzen, z.B. die Aktivierung von Serin-Threonin-Kinase-Familien wie Proteinkinase C (PKC) und Mitogen-Activated-Kinase (MAP-Kinase) sowie den Anstieg der intrazellulären Konzentration an freiem Calcium (Rodan & Rodan, 1997).

Clark & Brugge sind der Auffassung, daß Proteinphosphorylierung eine der ersten Antworten auf Integrin-Stimulation ist (Abb.6) (Clark & Brugge, 1995).

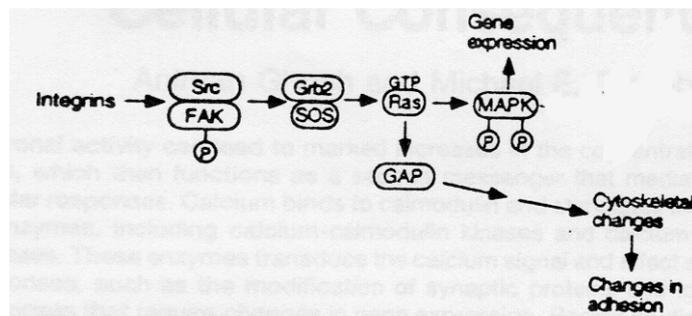


Abb. 6 Möglicher Intergrin-vermittelter Signaltransduktionsweg (modifiziert nach Clark & Brugge, 1995)

Integrinstimulation induziert die Bildung fokaler Adhäsion über einen komplexes Zusammenspiel von Signalwegen. Die Integrin-abhängige Aktivierung des MAP-Kinase-Pathways zeigt sich hier als ein einziger linearer Pathway. In der Realität wirken auf diesen Pathway verschiedene andere Signalwege ein.

Shyy und Chien sind der Meinung, daß Integrine nach Belastung folgendermaßen als Mechanotransduktoren reagieren (Abb.7):

Durch das „Clustering“ (Quervernetzung und Zusammenlagerung der Integrin-Rezeptoren) kommt es zur Ansammlung von FAK, Protein-Tyrosin-Kinase *Src* und den Signalmolekülen *Grb2*, *Sos* und MAP-Kinasen (ERK und JNK), die mechanische Belastung als chemische Signale weiterleiten (Shyy & Chien, 1997).

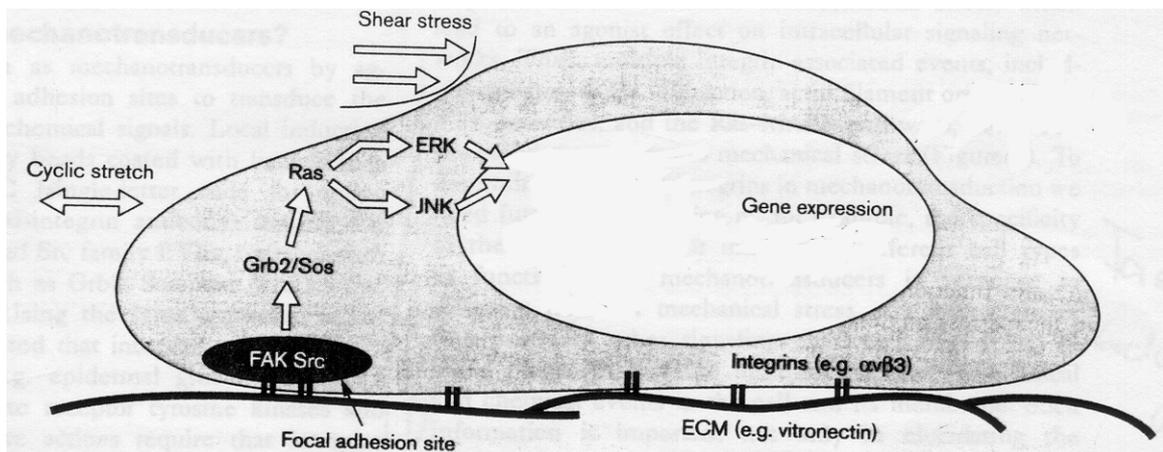


Abb. 7 Mögliche Signalwege der Mechanotransduktion als Antwort auf mechanische Belastung in Endothelzellen und Herzmyocyten (modifiziert nach Shyy & Chien, 1997).

Gezeigt wird nur die angenommene Rolle von EZM-Proteinen, Integrinen, FAK, Src, etc. bei der fokalen Adhäsion nach mechanischer Stimulation (Dehnung und Shear Stress). Mechanische Stimulation wird über FAK/Src an das „Docking-Protein“ Grb2 weitergeleitet, das die GTPase Ras aktiviert. Ras aktiviert die MAP-Kinasen ERK und JNK, die wiederum Transkriptionsfaktoren im Kern aktivieren und eine Gen-Expression hervorrufen.

FAK und *Src* spielen eine zentrale Rolle bei der Zelladhäsion und bei der Antwort auf mechanische Stimulation. Die Integrin-EZM-Interaktion induziert die Autophosphorylierung von FAK, diese Phosphorylierung unterstützt die Bindung von *Src* an FAK, *Src* phosphoryliert FAK, so daß *Grb2* gebunden werden kann, was zur Aktivierung von ERK/JNK und zur Gen-Expression führt.

Weiterhin fanden Shyy und Chien heraus, daß Integrine mit Wachstumsfaktoren (z.B. PDGF und EGF) kollaborieren, so Rezeptor-Tyrosin-Kinasen phosphorylieren und ERK aktivieren. Außerdem stellten sie die Hypothese auf, daß Mechanotransduktion von Scherkräften in chemische Signale über Integrin-Clustering erfolgt, unterstützt von der Beobachtung, daß Scherkräfte die Aggregation von Vironectin-Rezeptoren erhöhen. Pavalko beobachtete beim Einwirken von Flüssigkeitsfluß auf Osteoblasten, daß sich Aktinfilamente zu kontraktilen Fasern organisieren und sich β 1-Integrine sowie α -Aktinin zu fokaler Adhäsion rekrutieren (Pavalko *et al.*, 1998).

Salter fand heraus, daß die Rolle der Integrine in mechanisch stimulierten Knochenzellen von Änderungen des Membranpotentials beeinflusst wird. Er ist der Meinung, daß Integrine als Mechanorezeptoren der Knochenzellen agieren, und in Abhängigkeit von der Frequenz der mechanischen Stimuli bestimmte Signalwege aktivieren.

Integrine zeigen sich auch als Mechanorezeptoren in Endothelzellen. Mechanische Belastung angewandt auf Kapillar-Endothelzellen führt zur Organisation fokaler Adhäsionsherde und erhöht die Spannung des Zytoskeletts, über das Integrine mechanische Stimulation vermitteln.

Salter hält es nach Versuchen am Endothel ebenfalls für möglich, daß das Zytoskelett eine Rolle bei der Öffnung von Calcium-Kanälen in der Plasmamembran spielt (Salter *et al.*, 1997).

Danen zeigt, daß Integrin-vermittelte Adhäsion Signale der Wachstumsfaktoren z.B. über den PKC-Pfad oder den MAP-Kinase-Pfad regulieren kann. Die EZM kann z.B. die EGF-Rezeptoraktivität modulieren und Integrin-„Clustering“ kann die Aggregation des FGF-Rezeptors induzieren. Diese Ergebnisse zeigen, daß Integrine durch erhöhtes „Clustering“ der Rezeptoren die Wirkung von Wachstumsfaktoren potenzieren können. Sowohl Stimulation der Wachstumsfaktoren als auch Integrin-Aggregation induzieren ERK-Aktivierung, außerdem lösen beide den MAP-Kinase-

Pathway aus, so daß man von einem synergistischen Zusammenwirken in dieser Phase ausgehen kann (Danen *et al.*, 1998).

2. Signaltransduktion zum Kern

Signale, die an der Zelloberfläche durch Rezeptoren aufgenommen werden, werden zum Zellkern weitergeleitet und bewirken dort eine Veränderung der Genexpression, die wiederum das Verhalten der Zelle beeinflusst.

Die Weiterleitung der Signale erfolgt durch intrazelluläre Signalmoleküle, den „second messenger“-Molekülen, die zwischen Rezeptor und Kern eine wesentliche Verbindung herstellen. Die „second messenger“ sind Proteine, die durch bestimmte Proteinkinasen an den entsprechenden Aminosäuren phosphoryliert werden. In der Signaltransduktion entstehen so durch Phosphorylierung von Proteinen immer niedrigerer Ebene ganze Phosphorylierungs-Kaskaden, die die Genexpression des Kerns beeinflussen. Die einzelnen Kaskaden verschiedener Signale interagieren häufig miteinander, ebenso lösen in manchen Fällen nur Signalkombinationen eine bestimmte Phosphorylierungs-Kaskade aus.

Im Folgenden werden die einzelnen Wege der Signaltransduktion dargestellt. Laufende Forschungsergebnisse zeigen aber immer wieder neue Zusammenhänge der einzelnen Signalkaskaden untereinander auf, so daß hier nur eine Übersicht der momentanen Erkenntnisse wiedergegeben werden kann.

2.1 G-Protein-gekoppelte Signalübertragungswege

Aktivierte G-Proteine (s. 1.5) geben das Signal an nachgeschaltete Effektormoleküle weiter. Zwei wesentliche Effektormoleküle der G-Proteine sind

1. Adenylatcyclase und
2. Phospholipase C

2.1.1 Adenylatcyclase mit cAMP als „second messenger“

Die Adenylatcyclase ist ein großes Polypeptid (2080-1248 Aminosäuren), das die Plasmamembran zwölf mal in zwei Abschnitten von je sechs membrandurchspannenden Domänen kreuzt, wobei jedem Abschnitt eine lange zytosolische Domäne folgt (Cali *et al.*, 1994).

Adenylatcyclase wird über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die Hormone wie z.B. PTH binden, indirekt aktiviert und bewirkt eine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration (Tyson *et al.*, 1999). Dabei katalysiert die Adenylatcyclase die Bildung von zyklischem AMP (cAMP) aus ATP, cAMP aktiviert wiederum die Proteinkinase A (Abb.8). Eine Regulation der PKA findet über die cAMP-Phosphodiesterase statt. Aktivierte PKA aktiviert Phosphodiesterase, die cAMP zu AMP hydrolysiert, so daß es über einen Rückkopplungsmechanismus zur Beeinflussung der Signalübertragung durch PKA kommt (Pawson & Scott, 1997).

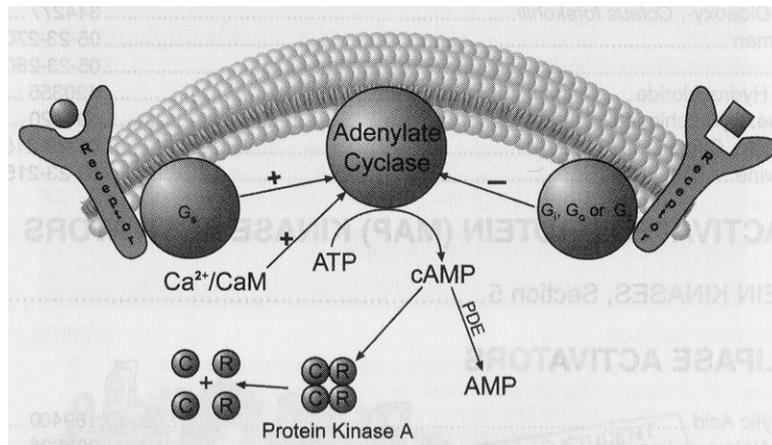


Abb. 8 G-Protein-vermittelte Aktivierung der Adenylatcyclase (Calbiochem, 1999)

Adenylatcyclase wird über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die Hormone wie z.B. PTH binden, indirekt aktiviert und bewirkt eine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration. Dabei katalysiert die Adenylatcyclase die Bildung von zyklischem AMP (cAMP) aus ATP, cAMP aktiviert wiederum die Proteinkinase A.

Mechanosensitive Zellen antworten auf Dehnung mit einer erhöhten Konzentration an „second messengers“ (Sandy & Farndale, 1991). In Osteoblasten steigt die cAMP-Konzentration nach Dehnung von 5 min signifikant an, innerhalb von Sekunden bewirkt Fluid Shear einen Konzentrationsanstieg von cAMP (Duncan & Turner, 1995).

Bei Dehnung von jungen Osteozyten auf physiologischem Level zeigte sich ebenfalls eine frühe Antwort erhöhter cAMP Sekretion (Mikuni-Takagaki, 1999).

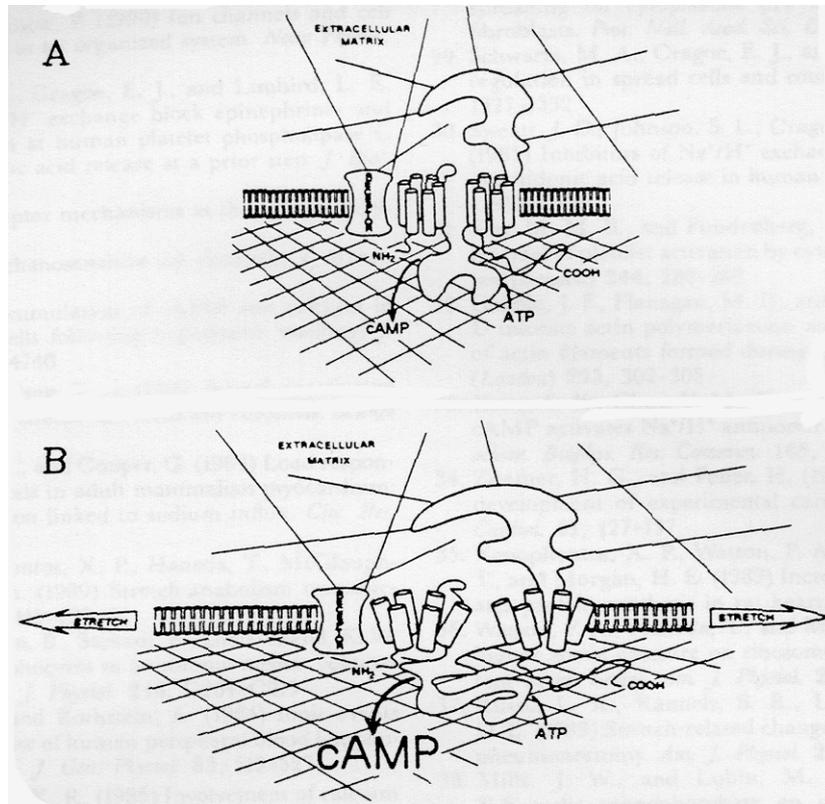


Abb. 9 Möglicher Mechanismus der Aktivierung von Adenylatcyclase durch physikalische Belastung während der Zelledeformation (Watson, 1991).

- A.** Adenylatcyclase in der Zellmembran ohne mechanische Belastung.
- B.** Veränderung des Adenylatcyclase-Moleküls während mechanischer Deformation mit folgender erhöhter katalytischer Aktivität.

Carvalho untersuchte die Wirkung von Dehnung an dentoalveolären Knochenzellen von Ratten und fand heraus, daß es neben einer initialen Erhöhung des IP₃-Levels und der PKC-Aktivität etwas später zu einem Anstieg an cAMP kommt. Diese Antwort wird potenziert, wenn zusätzlich zur Dehnung PTH appliziert wird (Carvalho *et al.*, 1994).

Donahue untersuchte die Adenylatcyclase-Aktivität anhand von Ratten-Osteoblasten unterschiedlichen Alters (4-28 Monate) und erkannte, daß es einen altersabhängigen Defekt bei der Bindung eines stimulatorischen G-Proteins (Gs) an Adenylatcyclase gibt, der auch zu verminderter Antwort von Osteoblasten auf PTH führt (Donahue *et al.*, 1997).

Bei Stimulation von Osteoblasten durch starke Hypergravität kam man zu dem Ergebnis, daß sich der intrazelluläre cAMP-Spiegel zwar erhöht, die Änderungen der Zellfunktion aber über einen PKA-unabhängigen Pathway in Gang gesetzt werden (Kawashima *et al.*, 1998).

Sadoshima stellte bei Dehnung von Herzmuskelzellen fest, daß zwar MAP-Kinase, Proteinkinase C, Phospholipase C und D aktiviert werden, der cAMP-Pathway aber durch Dehnung nicht signifikant beeinflusst wird (Sadoshima & Izumo, 1993).

2.1.1.1 Proteinkinase A (PKA)

In ihrer inaktiven Form ist die cAMP-abhängige PKA aus zwei katalytischen (C) und zwei regulatorischen (R) Untereinheiten zusammengesetzt. Die Bindung von cAMP an die R-Untereinheiten bewirkt eine Abspaltung der C-Untereinheiten, die nun aktiviert sind und spezifische Substratproteine phosphorylieren können (Pawson & Scott, 1997).

Bei Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration durch Zellstimulation bleibt die Verteilung der R-Untereinheiten der PKA gleich, die C-Untereinheiten gelangen aber zuerst ins Zytoplasma und später in den Kern, wo sie weitere Substrate phosphorylieren und so die Signaltransduktion gewährleisten (Mochly-Rosen, 1995). Es hat sich gezeigt, daß mechanische Belastung Veränderungen bei der Signalaktivität der „second messenger“ und bei der Genexpression auslöst. So hat Tyson nachgewiesen, daß eine PKA-Aktivität in Osteoblasten für die PTH-induzierte Expression des Gens *c-fos* notwendig ist (Tyson *et al.*, 1999).

Fitzgerald induzierte mittels mechanischer Belastung durch Zentrifugation (287xg) *c-fos* Expression in MC3T3-E1 Osteoblasten. Die Induktion von *c-fos* wurde durch den cAMP-abhängigen Proteinkinase Inhibitor H-89 aufgehoben, was zeigt, daß die Genexpression von *c-fos* über den cAMP/PKA-Pathway läuft (Fitzgerald & Hughes-Fulford, 1999).

Bei Einwirkung elektromagnetischer Felder niedriger Frequenz auf Rattenosteoblasten für 60 Minuten hat sich gezeigt, daß es zu einer erhöhten PKA-Aktivität kommt, die Proliferations- und Differenzierungsprozesse beeinflusst (Thumm *et al.*, 1999).

2.1.2 Phospholipase C mit Inositol 1,4,5-Trisphosphat und Diacylglycerol als „second messenger“

Es gibt mindestens drei Hauptgruppen der PLC: β , γ und δ (Anderson *et al.*, 1990). Jede dieser Gruppen besitzt eine bestimmte Zahl an Isoformen. PLC- β wird über heterotrimere G-Proteine reguliert, die bei Ligandenbindung an den Rezeptor aktiviert werden (Blank *et al.*, 1991). PLC- γ wird durch Rezeptor-Tyrosin-Kinasen aktiviert, wodurch eine Einbindung der PLC- γ in Wachstumsfaktor-kontrollierte Signalübertragungswege erfolgt (Abb.10).

Phospholipase C katalysiert die Freisetzung der intrazellulären „second messenger“ Inositol 1,4,5-trisphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG) durch Hydrolyse von Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat (PIP₂), einem in Membranen in geringen Mengen vorkommenden Phospholipid (Berridge, 1989; Berridge & Irvine, 1989).

IP₃ bindet an IP₃-abhängige Calciumkanäle der Membran des Endoplasmatischen Retikulums und bewirkt eine Ausschüttung intrazellulären Calciums, DAG aktiviert die Proteinkinase C (PKC), die eine Phosphorylierung weiterer zellulärer Proteine hervorruft (Nishizuka, 1984a; Nishizuka, 1984b).

1987 entdeckten Jones & Scholübbers als erste einen Anstieg der membrangebundenen PLC bei mechanischer Belastung von Osteoblasten innerhalb weniger Sekunden. Etwas später konnte anhand von Messungen der intrazellulären Calciumkonzentration nachgewiesen werden, daß PLC schon innerhalb von Millisekunden durch Dehnung aktiviert wird, und daß PLC-Aktivierung (PLC- γ 1) die erste meßbare biochemische Reaktion der Transduktion von Dehnung in Osteoblasten ist (Jones *et al.*, 1987 & 1991).

Versuche mit Oestrogen und Calcitriol, der hormonell aktiven Form von Vitamin D, an Rattenosteoblasten haben gezeigt, daß es über die Aktivierung der PLC zur Bildung von IP₃ und DAG kommt. Aktivierung von PLC- β durch beide Steroide bewirkt eine Calciumfreisetzung aus dem ER innerhalb von 5 Sekunden, PLC- γ war inaktiv (Le Mellay *et al.*, 1997).

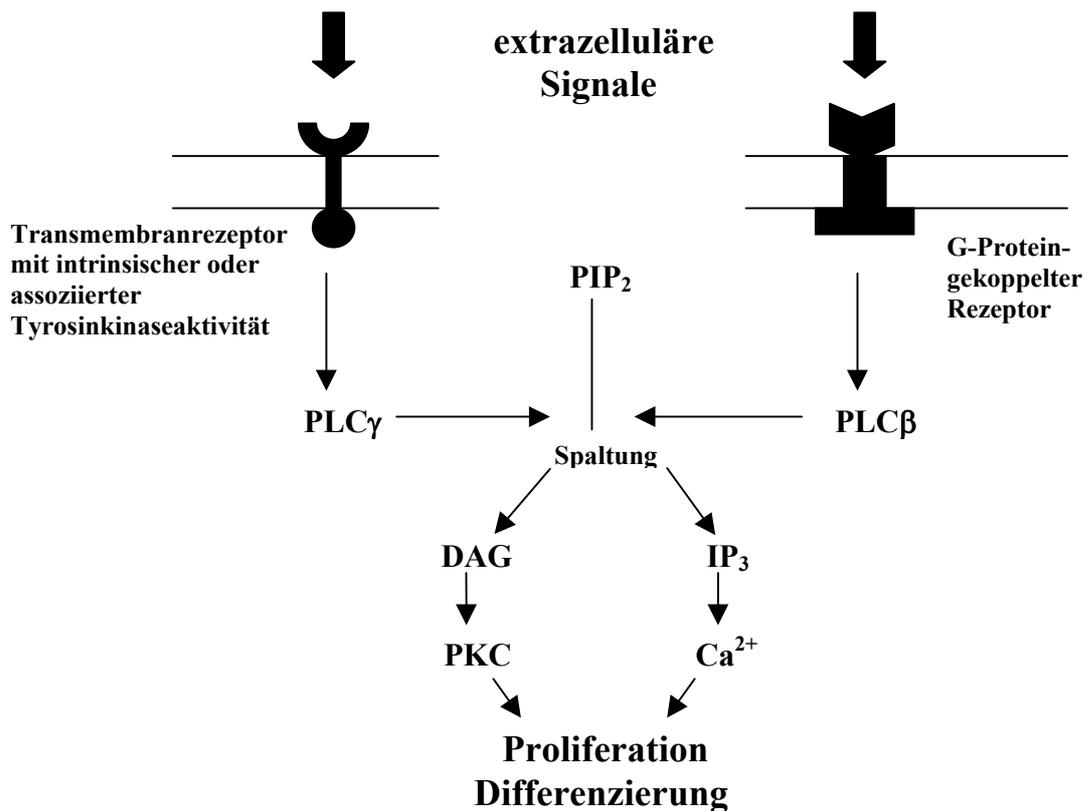


Abb. 10 Bildung und Funktion von DAG und IP $_3$ (Krauss, 1997).

Die Bildung von DAG und IP $_3$ unterliegt einer Regulation durch zwei zentrale Signalwege, die von Transmembranrezeptoren mit intrinsischer oder assoziierter Tyrosinkinase-Aktivität oder G-Protein-gekoppelten Rezeptoren ausgehen. DAG aktiviert die Proteinkinase C, IP $_3$ induziert die Freisetzung von Ca $^{2+}$. PKC und Ca $^{2+}$ greifen regulierend in die Zellproliferation ein.

2.1.2.1 Freisetzung von intrazellulärem Calcium

Die Freisetzung von Calcium aus den Speichern des Endoplasmatischen Retikulums durch IP $_3$ erfolgt über IP $_3$ -Rezeptoren (Berridge, 1993). Der IP $_3$ -Rezeptor ist ein intrazellulärer Calciumkanal, der in der ER-Membran lokalisiert ist und im Zuge der Signaltransduktion von IP $_3$ aktiviert wird (Kirkwood *et al.*, 1996).

Kompensatorische Mechanismen kontrollieren den vorübergehenden intrazellulären Calciumanstieg und bewirken über ATP-abhängige Calciumpumpen die Wiederherstellung der Ruhekonzentration durch Rücktransport in die Speicherorganellen und in den Extrazellulärbereich.

In einigen Fällen wird eine Calciumoszillation ausgelöst, die sich durch selbsterhaltenden Anstieg und Abfall der Calciumkonzentration charakterisiert. Dieses „Calciumsignal“ kann in Verbindung mit Transduktion biomechanischer Stimulation, Veränderung der Genexpression und Zelldifferenzierung gebracht werden (Duncan *et al.*, 1998)

Tsai fand 1999 anhand von osteoblasten-ähnlichen humanen Zellen heraus, daß spontane Oszillationen von intrazellulärem Calcium generell vorkommen. Die Auswirkung auf die Zellfunktion ist allerdings noch nicht geklärt. In einem weiteren Versuch reduzierte er die perizelluläre Osmolarität, was eine Dehnung der Plasmamembran und einen vorübergehenden Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration zur Folge hatte. Diese Beobachtung wurde unter Calciumfreiheit des Extrazellulärraums gemacht und induziert, daß osmotische Stimulation Calcium aus intrazellulären Pools freisetzt. Auch dies kann ein möglicher Signalweg sein, über den mechanische Dehnung anabolische Effekte ausüben kann (Tsai *et al.*, 1999).

Habel untersuchte 1998 anhand von menschlichen osteoblasten-ähnlichen Zellen die Wirkung extrazellulärer Calciumkonzentration in Abhängigkeit von der Veränderungsrate auf die intrazelluläre Calciumkonzentration. Er stellte fest, daß geringe Veränderung der extrazellulären Konzentration auch einen geringen Anstieg an intrazellulärem Calcium bewirkt. Stärkere Konzentrationsänderungen riefen einen schnellen Anstieg gefolgt von einer anhaltenden Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration hervor. Daraus läßt sich schließen, daß Zellen nicht nur die Calciumkonzentration sondern auch die Stärke der Konzentrationschwankungen in ihren Signalwegen verarbeiten können (Habel & Glaser, 1998).

Wenig ist bekannt über die exakte Kopplung von extrazellulärem Calciumeinfluß und intrazellulärer Calciumfreisetzung nach Stimulation in Osteoblasten.

Bekannt ist, daß u.a. Hormone, Cytokine und mechanische Stimulation (z.B. mechanische Dehnung oder Fluid Flow) einen vom extrazellulären Calcium abhängigen Calciumeinstrom und eine Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern des ER bewirken, der genaue Zusammenhang bedarf aber noch weiterer Klärung (Duncan *et al.*, 1998; Ajubi *et al.*, 1999).

Flow-Experimente an Knochenzellen haben bereits gezeigt, daß extrazelluläres Calcium (bzw. Calciuminflux) und die IP₃-induzierte Calciumfreisetzung aus intrazellulären Depots für die Erzeugung einer intrazellulären Calciumantwort notwendig sind (Hung *et al.*, 1996).

Diese Ergebnisse zeigen, daß die Beziehungen zwischen Calciumkonzentration, Calciumkanälen, Calcium-Signalen und den physiologischen Antworten der Zelle noch einer weiteren Aufschlüsselung der Signalwege durch weitere Forschung bedürfen.

2.1.2.2 Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinasen (CaM-Kinasen)

Die signalvermittelnde Funktion von Calcium wird in vielen Pathways über den Calcium/Calmodulin-Komplex ausgelöst. Calmodulin ist ein weit verbreiteter Calcium-Rezeptor, der zusammen mit Calcium spezifische Effektorproteine binden und deren Aktivität modulieren kann. Effektorproteine sind u.a. die Calcium/Calmodulin-abhängigen Proteinkinasen (CaM-Kinasen), die CaM-Kinase II ist bisher am häufigsten untersucht worden. Substrate der CaM-Kinasen sind u.a. Phospholipase A2 und EGF-Rezeptoren, außerdem beeinflussen sie den cAMP/cGMP-Stoffwechsel, allgemein übernehmen die CaM-Kinasen aber eine Schlüsselfunktion in mehreren Signalübertragungswegen unterschiedlicher Gewebe. Eine Erhöhung des intrazellulären Calciums bewirkt eine Aktivierung der regulatorischen CaM-Kinase. Diese Aktivierung bleibt auch nach dem Abklingen des Signals noch erhalten, indem das Enzym über Autophosphorylierung in einen autonomen aktivierten Zustand überführt wird, d.h. daß die CaM-Kinase sowohl über Autophosphorylierung als auch über den Calcium/Calmodulin-Komplex reguliert wird.

Die Calciumkonzentration steigt bei Stimulation Calcium-verbundener Pathways sowohl im Zytosol als auch im Kern an. Untersuchungen haben gezeigt, daß die multifunktionelle CaM-Kinase Familie, bestehend aus CaM-Kinase I, II und IV, im Kern vorkommt, und die Kinasen als Mediator nuklearer Calcium-Signale dienen. Diese Kinasen besitzen Aktivierungseigenschaften, die eine Unterscheidung

einzelner Calciumsignale abhängig von Frequenz, Amplitude und Dauer ermöglichen. Es besteht die Möglichkeit einer Kontrolle der Genexpression über die Phosphorylierung von regulatorischen Schlüsselstellen der Transkriptionsfaktoren im Kern durch die Kinasen. CaM-Kinasen dienen dem Kern somit als Decoder von Calciumsignalen und erzeugen somit eine Vielzahl von Zellantworten (Heist & Schulman, 1998).

Zhuang fand heraus, daß elektrische Stimulation von MC3T3-E1 Osteoblasten durch ein elektrisches Feld die TGF- β 1 mRNA-Konzentration erhöht und zwar über einen Mechanismus, der den Calcium/Calmodulin-Pathway mit einbezieht. So stellte er fest, daß Verampil und W-7, die sowohl spannungsabhängige Calciumkanäle als auch die Aktivierung des intrazellulären Calmodulins inhibieren, ebenfalls einen Konzentrationsanstieg von TGF- β 1 mRNA in Osteoblasten verhindern (Zhuang *et al.*, 1997).

2.1.2.3 Aktivierung von Proteinkinase C

Proteinkinase C gehört zur Familie der lipidabhängigen Serin/Threonin-Kinasen. Die PKC wird in verschiedene Untergruppen eingeteilt: Gruppe A besteht aus klassischen oder konventionellen PKCs, deren Funktion über Calcium reguliert wird; Gruppe B besteht aus neuen PKCs, deren Funktion Calcium-unabhängig ist und Gruppe C aus atypischen PKCs, die ebenfalls Calcium-unabhängig reagieren. Diese Untergruppen zeigen geringe Unterschiede in ihren enzymatischen Eigenschaften, in ihrer unterschiedlichen Verteilung in verschiedenen Geweben und in ihrer intrazellulären Lokalisation (Migliaccio *et al.*, 1998).

<u>PKC-Typ</u>		<u>Isoform</u>
Konventionell	Ca ²⁺ -abhängig, DAG-abhängig	α , β I, β II, γ
Neu	Ca ²⁺ -unabhängig DAG-abhängig	δ , ϵ , η , θ , μ
Atypisch	Ca ²⁺ -unabhängig DAG-unabhängig	ζ , ν λ

Bisher wurden 11 verschiedene PKC-Isoenzyme beschrieben, aufgrund verschiedener Ergebnisse geht man von einer unterschiedlichen physiologischen Rolle jedes Isoenzym abhängig von der Zellart aus (Newton, 1995; Traub *et al.*, 1997).

In Versuchen wurde die Antwort verschiedener Isoenzyme der PKC auf verschiedene physiologische Stimuli getestet. Es zeigten sich nicht nur Unterschiede in der Antwort der verschiedenen Isotypen innerhalb eines Zelltyps, sondern auch beim selben Isotyp in unterschiedlichen Zellarten (Dean, 1997).

PKC wird durch Diacylglycerol und Calcium aktiviert. Nach Aktivierung kommt es zu einer veränderten metabolischen Aktivität der Zelle und zu Langzeitantworten wie Differenzierung, Proliferation oder Apoptose (Nishizuka, 1992).

PKC aktiviert ERKs und MAP-Kinase, die wiederum die Wirkung von PKC auf Differenzierung und Proliferation vermitteln (Marais *et al.*, 1998). Bei Flow-Experimenten mit bovinen Endothelzellen fand man heraus, daß PKC- ϵ notwendig für die Signalvermittlung zur MAP-Kinase-Aktivierung ist, nicht aber PKC- α oder PKC- ζ . Die Aktivierung der MAP-Kinase erfolgte Calcium-unabhängig und Phorbolster-abhängig (Traub *et al.*, 1997).

Nach Mochly-Rosen ist die Aktivität von PKC abhängig von Phospholipid, Diacylglycerol und in einigen Fällen von Calcium. Die Bindung dieser Faktoren stabilisiert die PKC und macht sie zugänglich für Substratproteine, außerdem findet eine Translokation des Enzyms statt. PKC ist im Cytosol vorhanden, während die Aktivatoren hydrophob sind und sich in der Membran befinden. Bei Stimulation erhöht sich der DAG-Spiegel und bewirkt eine Umverteilung der PKC vom Zytosol zur Plasmamembran, zum Zytoskelett oder zum Kern (Mochly-Rosen, 1995).

Phorbolster (potentielle Tumorpromoter) können DAG substituieren und sorgen für eine verlängerte Aktivierung von PKC, da sie nicht so stark metabolisiert werden wie DAG. Phorbolster und DAG dienen als hydrophobe Anker, die PKC an der Membran rekrutieren, indem sie eine erhöhte Membranaffinität des Enzyms bewirken. Calcium hat keinen Effekt auf die erhöhte Affinität von PKC zu Liganden, es liegt aber nahe, daß eine Verbindung zwischen DAG und Calcium besteht, da beide durch Erhöhung ihrer intrazellulären Konzentration die Affinität von PKC zur Membran erhöhen (Newton, 1995).

Rezeptoren für aktivierte C Kinase (RACKs) sind membrangebundene Proteine, die Bindungsstellen für PKC an der Membran bereitstellen. Sie sind aber nicht unbedingt notwendig für eine Membranbindung der PKC. Man nimmt an, daß PKC im aktivierten Zustand verbleibt, wenn es an RACK gebunden ist (Pawson & Scott, 1997).

Yang testete 1997 die Wirkung von Staurosporin, einem PKC-Inhibitor, auf morphologische Veränderung von Rattenosteoblasten *in vitro*. Er fand heraus, daß eine morphologische Veränderung durch Staurosporin auftritt, gleichzeitig wurden diese morphologischen Veränderungen aber durch depolymerisierte Mikrotubuli und erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration verhindert. Aktin-Depolymerisierung erhöhte die Wirkung von Staurosporin. Er kommt zu dem Schluß, daß morphologische Veränderungen durch PKC-Inhibition zwar vorhanden sind, allerdings sind ebenfalls viele andere Mechanismen in diesen Vorgang mit einbezogen, die noch weiterer Aufklärung bedürfen. (Yang *et al.*, 1997).

Verschiedene Untersuchungen haben gezeigt, daß eine Interaktion zwischen Oestrogen-Rezeptoren und dem Signalweg der PKC besteht. Eine Aktivierung der PKC kann die Oestrogen-Rezeptoren und die Oestrogenantwort in Knochengewebe modulieren. Migliaccio wies anhand von ROS.SMER#14 Osteoblasten *in vitro* nach, daß die Oestrogenantwort des Knochengewebes sehr stark von bestimmten Isoformen der PKC reguliert wird. Daraus ergibt sich eine große Bedeutung für die hormonelle Modulation von Knochengewebe (Migliaccio *et al.*, 1998).

Ajubi untersuchte die Signaltransduktionswege, die an der Fluid Flow-induzierten PGE₂ Produktion in Osteozyten beteiligt sind. Er fand heraus, daß pulsierender Flüssigkeitsfluß die intrazelluläre Calciumkonzentration in Osteozyten erhöht, bedingt durch erhöhten Eintritt durch mechanosensitive Ionenkanäle in Kombination mit Calciumfreisetzung über intrazelluläre Depots. Calcium und PKC stimulieren dann die Phospholipase A₂, Arachidonsäure und letztendlich die PGE₂-Freisetzung (Ajubi *et al.*, 1999). Studien über den Einfluß von PKC bei flüssigkeitsfluß-induzierter PGE₂-Produktion wurden ebenfalls schon von Reich an Osteoblasten durchgeführt (Reich & Frangos, 1993).

Bereits 1991 erkannte Rosales, daß zyklische Dehnung bei Endothelzellen Veränderungen im Wachstum verursacht und die Translokation von PKC stimuliert

(Rosales *et al.*, 1991). Berk beschreibt 1995 u.a. PKC als Mediator der Signaltransduktion in Fluid-Flow-stimulierten Endothelzellen. Der Fluid-Flow-Rezeptor des Endothels aktiviert PLC, es kommt zur Bildung von DAG und Erhöhung des intrazellulären Calciums über IP₃ und letztendlich zur Aktivierung von Calcium-abhängigen Kinasen, d.h. PKC und CaM-Kinase (Berk *et al.*, 1995).

Obwohl schon viele Forschungsergebnisse in Bezug auf PKC vorliegen, bedarf es noch weiterer detaillierter Forschung, um die Rolle von PKC in der Signaltransduktion ganzheitlich darstellen zu können.

2.2 Weitere Signalmoleküle

2.2.1 Phospholipase D

Phospholipase D setzt nach seiner Aktivierung das membrangebundene Phospholipid Phosphatidylcholin durch Hydrolyse zu Phosphatidsäure (PS) um. Phosphatidsäure wird durch PS-Phosphohydrolase zu Diacylglycerol metabolisiert, so daß es zur Aktivierung von PKC kommt. PS kann auch die Hydrolyse von Phosphoinositiden und die Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Depots hervorrufen (Sadoshima & Izumo, 1993).

PLD-Aktivität wurde in Plasmamembranen, Golgi-Membranen und Kernmembranen entdeckt, unklar ist, ob bestimmte Isoformen für diese Variation verantwortlich sind oder ob PLD unterschiedlich reguliert wird. Die Subtypen der PLD kommen möglicherweise sowohl membran-assoziiert als auch im Zytosol vor (Liscovitch, 1996).

Die durch PLD-Aktivität gebildete PS kann als „messenger“-Molekül bei der Regulierung des Aktin-Zytoskeletts dienen und eine Kontrollfunktion des „Membranverkehrs“ übernehmen (Abb.11), außerdem ist es in die Zellproliferation, Hormonfreisetzung und Gentranskription verwickelt. Experimente haben gezeigt, daß PLD durch die Stimulation von PKC, PIP₂ und die GTP-bindenden Proteine *Arf* und *Rho* reguliert wird (Wakelam *et al.*, 1997).

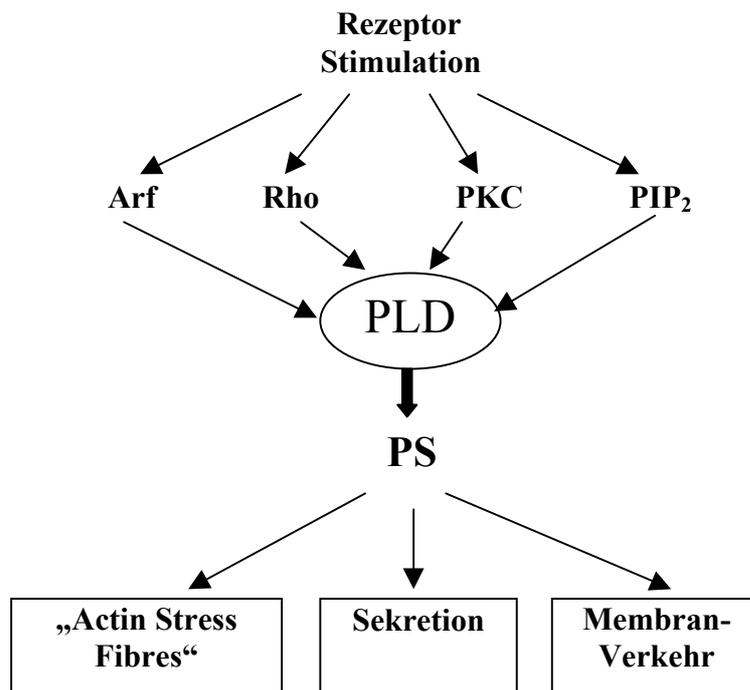


Abb. 11 Regulation der Phospholipase D Aktivität (modifiziert nach Wakelam, 1997).
Gezeigt sind mögliche Regulatoren der PLD und mögliche Funktionen des Produktes PS (Phosphatidsäure).

Del Peso zeigte kürzlich, daß PLD unabhängig von PKC durch *Ras* Proteine aktiviert werden kann. Wachstumsfaktoren wie PDGF und Fibroblast Growth Factor (FGF) aktivierten PLD über PKC-abhängige Mechanismen, während *Ras*-Onkogene eine PKC-unabhängige Aktivierung hervorriefen (del Peso *et al.*, 1996).

Im Knochengewebe wurde der PLD-Pathway an MC3T3-E1-Osteoblasten getestet. PLD-Aktivität konnte nach Stimulation mit PDGF, PGF₂ und extrazellulärem ATP nachgewiesen werden. Untersuchungen an Rattenosteoblasten haben gezeigt, daß EGF eine rezeptor-vermittelte Aktivierung der PLD-Kaskade bewirkt, und daß zumindest teilweise PKC- und Gi-Protein-abhängige Mechanismen in diesen Pathway involviert sind (Carpio & Dziak, 1998a).

Zusätzlich untersuchte Carpio die Wirkung von PS auf zytosolisches Calcium und Proliferation, ebenso wie die Verstrickung des PLD-Pathways in den Effekt von EGF auf intrazelluläres Calcium und Proliferation. Die Ergebnisse zeigten, daß PS die Zellproliferation und die Mobilisierung intrazellulären Calciums über extrazelluläre Pools stimuliert, und daß der mitogene Effekt von EGF von einer PLD-Aktivierung abhängig ist (Carpio & Dziak, 1998b).

Hodgkin stimulierte PLD in HL60-Zellen mit *Arf* (ADP-ribosylation factor), *Rho* und PKC. Er stellte fest, daß PKC- α und PKC- δ PLD mit gleicher Effektivität aktivieren, und daß die maximale PLD-Aktivität *Arf*, *Rho* und PKC benötigt (Hodgkin *et al.*, 1999).

Wird PLD durch Insulin aktiviert, kommt es über die Erzeugung von PS zur Aktivierung der *Raf-1*-mitogen-activated-Protein-Kinase-Kaskade. PS aktiviert weder *in vitro* noch *in vivo* direkt *Raf-1*, das durch PS nur verstärkt an der Plasmamembran rekrutiert wird. *Raf-1* wird dort durch andere Faktoren aktiviert, die Bindung an die Plasmamembran ist auch nur vorübergehend, allerdings verbleibt *Raf-1* immer gebunden an endozytische Vesikel in der Zelle (Rizzo *et al.*, 1999).

Kato untersuchte die Aufgabe von Proteinen der *Rho*-Familie bei PGF₂-induzierter PLD-Aktivierung in MC3T3-E1-Osteoblasten. Er stellte eine Beteiligung von *Rho A* an der PGF₂-vermittelten PLD-Aktivierung fest, außerdem resultiert die PLD-Aktivierung unabhängig vom Zytoskelett (Kato *et al.*, 1997).

Mechanische Dehnung von Herzmuskelzellen hat gezeigt, daß die Hydrolyse von Phosphatidylcholin stimuliert wird und es zu einem Anstieg an PS und Phosphatidylethanol, einem spezifischen Marker für PLD-Aktivierung kommt.

Sowohl PLD als auch PLC werden beide durch mechanische Dehnung aktiviert und produzieren auf unterschiedlichen Signalwegen DAG (Sadoshima & Izumo, 1993).

Diese Auswahl an Forschungsergebnissen zeigt, daß PLD auf vielen Gebieten bereits untersucht worden ist, genauere Einblicke in die wesentliche Signaltransduktion aber nur ansatzweise vorhanden sind.

2.2.2 Stickstoffmonoxid

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein ungeladenes freies Radikal und hat sich als multifunktionelles Signalmolekül mit breitem Wirkungsspektrum innerhalb verschiedener Gewebe erwiesen. NO wird enzymatisch aus *L-Arginin* mit Hilfe der *NO-Synthase* gebildet, bisher sind 3 unterschiedliche Isoformen der *NO-Synthase* bekannt: eine neuronale Form (nNOS), eine endotheliale Form (ecNOS) und eine induzierbare Form (iNOS) (Collin-Osdoby *et al.*, 1995).

ecNOS und nNOS sind überwiegend konstitutive Enzyme, ihre Aktivität wird hauptsächlich von Veränderung der intrazellulären Calciumkonzentration reguliert. Steigt die Calciumkonzentration intrazellulär an, bindet iCa^{2+} an Calmodulin, Calmodulin bindet an eine Erkennungsstelle an ecNOS oder nNOS, so daß beide NOS-Isoformen über einen Calcium/Calmodulin-Komplex aktiviert und reguliert werden. Die Aktivität von iNOS wird dagegen nicht durch Calcium reguliert und ist auf Genebene induzierbar (Evans & Ralston, 1996).

NO wird von verschiedenen Knochenzellen produziert und übernimmt viele verzweigte Aufgaben in Bezug auf Signaltransduktion, Differenzierung und Remodelling.

Cytokine sind wichtige Regulatoren der NO-Produktion. So besteht die Möglichkeit, daß NO als Mediator für Cytokineffekte auf Knochenresorption fungiert.

Es hat sich erwiesen, daß hohe Konzentrationen an NO durch Cytokin-Applikation nicht nur die Knochenresorption durch reife Osteoklasten verhindert, sondern auch inhibitorisch auf Osteoklastenbildung aus Porgenitorzellen wirkt (van't Hof & Ralston, 1997). Geringe NO-Konzentrationen stimulieren wiederum die Knochenresorption.

Cytokine wie IL-1, TNF und IFN- γ (synergistische Wirkung) erhöhen die NO-Produktion in Kulturen menschlicher Osteoblasten und MC3T3-E1-Zellen und tragen so u.a. zur Verhinderung der Knochenbildung bei. Allerdings wurde auch festgestellt, daß moderate NO-Synthese notwendig für das Zellwachstum ist, es aber eine Konzentrationsschwelle gibt, bei deren Überschreiten die NO-Synthese inhibitorisch und möglicherweise auch toxisch auf das Zellwachstum wirkt.

Eine gleichzeitige Bildung von konstitutiven und induzierbaren NOS, die zeitgleich unterschiedliche Funktionen innerhalb der Zelle ausüben, wird auch für möglich gehalten (Evans & Ralston, 1996).

Weiterhin wurde an Mausosteoblasten festgestellt, daß Cytokine die NO-Produktion erhöhen und so direkt eine Differenzierung der Osteoblasten erreicht wird (Hikiji *et al.*, 1997).

Ueno bestimmte 1998 die Aufgabe der PKC in der NO-Synthese von Ratten-Osteoblasten und gewann folgende Erkenntnis: Cytokine erhöhen die NO-Synthese, die Aktivierung von PKC durch Phorbolster stimuliert ebenfalls die NO-Synthese, die Cytokine aktivieren PKC und erhöhen die intrazelluläre Calciumkonzentration.

Durch PKC-Inhibitoren wurde die Cytokin-induzierte NO-Synthese blockiert, so daß man davon ausgehen kann, daß PKC in die NO-Synthese der Rattenosteoblasten involviert ist (Ueno *et al.*, 1998).

Es hat sich gezeigt, daß mechanische Belastung von Knochenzellen ebenfalls einen Anstieg der NO-Synthese bewirkt. Mechanische Dehnung von Knochenzellen induziert ebenso eine NO-Produktion (Pitsillides *et al.*, 1995) wie eine Belastung durch Fluid Flow.

Versuche an Kulturen menschlicher Knochenzellen haben gezeigt, daß pulsierender Fluid Flow (PFF) bestimmter Stärke innerhalb von 5 Min. einen 2-4 fachen Anstieg der NO-Produktion zur Folge hat. Dieser NO-Anstieg hielt sich nur vorübergehend während der ersten 15 Min. der einstündigen Belastung, danach kehrte er auf Kontrollwerte zurück. Laut Untersuchungen resultiert der NO-Anstieg aus der Aktivierung von eNOS (Klein-Nulend *et al.*, 1998). Bereits 1995 stellte Klein-Nulend eine Stimulation der PGE₂-Freisetzung und einen NO-Anstieg in Osteozyten nach Belastung mit PFF fest. Die Ergebnisse lassen vermuten, daß NO ein Mediator mechanischer Effekte in Knochenzellen ist, der auch in die erhöhte PGE₂-Freisetzung durch mechanische Belastung involviert ist (Klein-Nulend *et al.*, 1995).

Im Gefäßendothel induzieren Veränderungen von Druck oder Scherkräften eine schnelle NO-Freisetzung, es kommt zu einer Vasodilatation. Die NO-Sekretion wird von eNOS reguliert, welches in den Caveolae des Endothels lokalisiert ist. Erhöhter Flüssigkeitsfluß aktiviert über die Caveolae eNOS, dieses dissoziiert vom Caveolin und bindet an Calmodulin. Es wird vermutet, daß die Caveolae als mechanosensitive Organellen fungieren, die mechanische Stimuli auf verschiedenen molekularen Wegen übermitteln und dabei auch die eNOS-Aktivität regulieren (Rizzo *et al.*, 1998a).

Die Erhöhung der NO-Konzentration im Knochen kann zur Aktivierung der NO-sensitiven Guanylat-Cyclase führen und somit zu einem Anstieg an intrazellulärem cGMP. Versuche zeigten eine erhöhte Ansammlung von cGMP in Knochenzellen, die hydrostatischem Druck ausgesetzt wurden, eine Einbeziehung des NO-Pathways liegt nahe. Der Zusammenhang zwischen erhöhter cGMP- und NO-Produktion ist bislang unklar, NO scheint aber ein Vermittler mechanischer Belastung in Knochenzellen zu sein (Evans & Ralston, 1996).

2.2.3 cGMP

Der „second messenger“ cGMP reguliert die Aktivität der cGMP-abhängigen Proteinkinasen und steuert den Öffnungszustand von Kationenkanälen. Seine Bildung erfolgt aus GTP durch Katalyse von *Guanylatcyclase*, sein Abbau erfolgt durch *cGMP-Phosphodiesterase*, beides analog zu cAMP.

Cyclisches GMP ist u.a. an der Signalübertragung des Sehprozesses, der Phototransduktion beteiligt. Am äußeren Segment der Stäbchen werden ankommende Photonen von Photorezeptoren der Stäbchen in elektrische Signale umgewandelt. Der intrazelluläre Transmitter ist cGMP, der im Dunkeln an die Cationenkanäle der Plasmamembran der Stäbchen bindet und die Kanäle offen hält. Ankommende Photonen bewirken über biochemische Kaskaden eine Hydrolyse des cGMP und somit eine Schließung der Kanäle. Auch Calcium ist ein intrazellulärer Transmitter der Phototransduktion, es tritt in die Stäbchenzelle über die cGMP-regulierten Kanäle ein und wird über Natrium-, Calcium- und Kalium-Exchanger aus der Zelle herausgeschleust. Eine Änderung der cGMP-Konzentration bewirkt einen veränderten Einfluß an Calcium über die Kanäle. Calcium moduliert gleichzeitig cGMP-metabolisierende Enzyme, so daß Änderungen der Calciumkonzentration eine Verschiebung der cGMP-Konzentration hervorrufen. Beide Transmitter sind also gekoppelt, wobei cGMP sich schneller verteilt als Calcium, Calcium aber viel schneller umgesetzt wird als cGMP (Koutalos, 1999).

Aus der Beteiligung von cGMP an der Signaltransduktion im Auge ergibt sich die Frage, in welchem Zusammenhang cGMP mit der Signalübertragung in anderen Geweben, z.B. im Knochens steht. Auch die Kopplung von cGMP und Calcium verlangt nach Aufklärung im Knochengewebe, wo Calcium einen der wichtigsten „second messenger“ darstellt, der in viele verschiedene Signalwege involviert ist.

Schon 1975 fand Rodan an Zellen der Tibia-Epiphyse von Hühnerembryos heraus, daß Kompression physiologischer Stärke (60g/cm^2) die Konzentration von cGMP wie auch von cAMP reduziert. Hydrostatischer Druck, der auf die Zellen ausgeübt wurde, bewirkte eine Akkumulation der zyklischen Nucleotide.

Mechanische Stimulation hat also einen Einfluß auf cGMP im Knochengewebe. Die Regulation des intrazellulären Calciumspiegels über cGMP in Knochenzellen und die Signalwege, die so aktiviert werden, bedürfen aber noch weiterer Aufklärung (Rodan *et al.*, 1975).

Yamamoto untersuchte 1998 die Wirkung des Vitamin D₃-Metaboliten 24R,25(OH)₂D₃ auf humane Osteoblasten. Bei einer Konzentration von 10⁻⁹ M bis 10⁻⁸ M zeigte sich ein deutlicher Anstieg des cGMP-Gehalts um 200% innerhalb von 5-15 Minuten. Dieses Ergebnis läßt darauf schließen, daß dieser Metabolit eine physiologische Rolle im Metabolismus des Knochens spielt, über den Einfluß auf die Genexpression genommen werden kann (Yamamoto *et al.*, 1998).

Bisher wurde kaum Forschung im Bereich cGMP und Signaltransduktion im Knochen betrieben, so daß auch dies eines der vielen Gebiete darstellt, wo in Zukunft noch Aufklärungsbedarf besteht.

2.3 Signalübertragung durch RAS-Proteine

Ras-Proteine gehören zur *Ras*-Superfamilie der monomeren GTPasen. Die membran-gebundenen *Ras*-Proteine unterstützen die Signalübertragung von Rezeptor-Tyrosinkinasen, Rezeptoren mit assoziierter Tyrosinkinase und von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren zum Kern, wo sie Zellwachstum oder Differenzierung auslösen (McCormick, 1995; Yamamoto *et al.*, 1999).

Innerhalb der *Ras*-Superfamilie werden mindestens fünf Subfamilien unterschieden, die meisten Untersuchungen wurden mit den beiden Unterfamilien *Ras* und *Rac/Rho/Cdc42* durchgeführt.

Die Proteine der *Ras*-Superfamilie sind regulatorische GTPasen, die in einer aktiven GTP-Form oder in der inaktiven GDP-Form vorliegen können (Boguski & McCormick, 1993).

Zwei Gruppen von Signalproteinen regulieren den Aktivitätszustand von *Ras*:

GTPase-aktivierende proteine (GAPs) erhöhen die Hydrolysegeschwindigkeit des *Ras*-gebundenen GTP, wodurch *Ras* inaktiviert wird. *Guaninnucleotid-freisetzende Proteine* (GNRPs) fördern den Austausch von gebundenem GDP gegen GTP aus dem Cytosol, *Ras* wird so aktiviert. Möglicherweise dient GAP auch als Effektormolekül für nachfolgende Signalwege (Lancaster *et al.*, 1994).

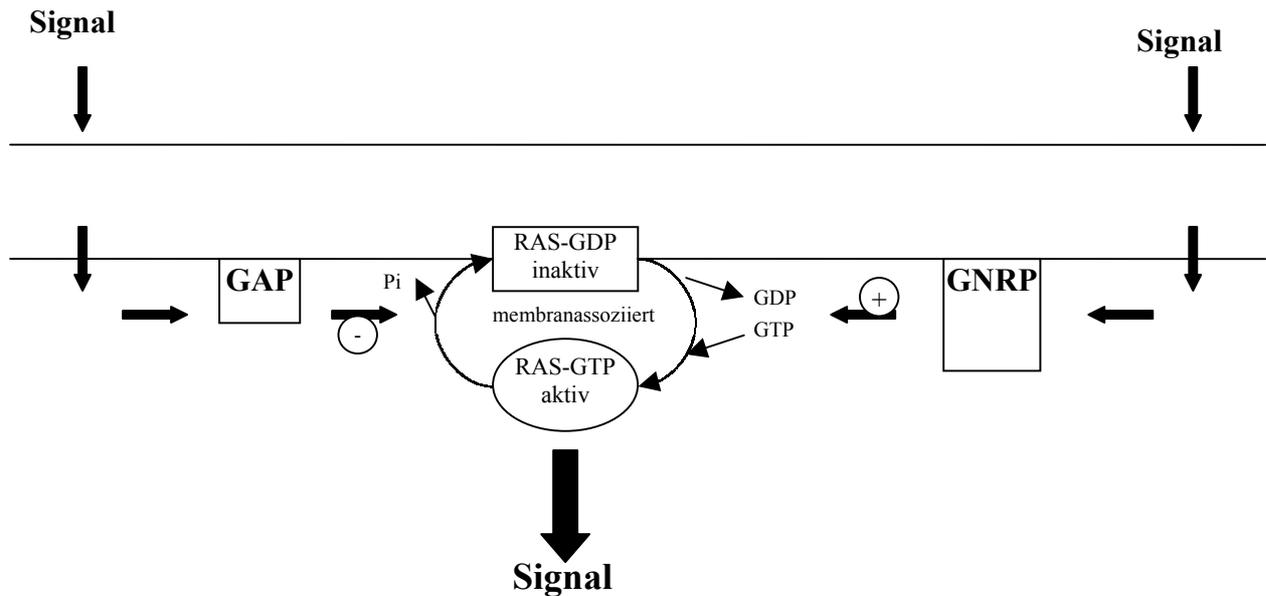


Abb. 12 Regulation des RAS-Proteins (Krauss, 1997)

Die Umwandlung des inaktiven Ras-GDP-Komplexes in den aktiven Ras-GTP-Komplex wird von Guanin-Nucleotid-Austauschfaktoren (GNRPs) bewirkt. Der aktivierte Zustand des Ras-Proteins wird durch Hydrolyse des gebundenen GTP terminiert. Infolge der intrinsisch langsamen GTPase-Aktivität des Ras-Proteins wird hierfür die Mithilfe eines GTPase-aktivierenden Proteins (GAP) benötigt. Das Ras-Protein übt alle Funktionen membranassoziiert aus.

Die Aktivierung von Tyrosin-Kinase- und Kinase-assoziierten-Rezeptoren durch Wachstumsfaktoren und Cytokine hat gezeigt, daß sich viele Proteine, u.a. Ras-spezifische GNRPs, an der Plasmamembran rekrutieren. Unter Einfluß von GNRP bindet Ras GTP, so daß ein Ras-Signal aktiviert wird. Das GTP-gebundene Ras interagiert nun mit GAP (*RasGAP*), dem die Funktion der negativen Regulation bei der Ras-Signalübertragung zugesprochen wird, und der *Raf*-Kinase, dem ersten Zielprotein der Ras-Signalübertragung (Marshall, 1995).

RasGAP gehört wie PLC- γ und *Src*-ähnliche Tyrosinkinase zu den Signalproteinen, die an aktivierte Rezeptor-Tyrosin-Kinasen binden. Jedes der Signalmoleküle besitzt zwei nicht katalytische Domänen, SH2 und SH3, die sich aus *Src*-Homologie-Region 2 und 3 ableiten. Die SH2-Domänen dieser Signalproteine binden an Tyrosin-phosphorylierte Polypeptide und vermitteln so eine Ansammlung von Proteinkomplexen nahe der Plasmamembran, die die Signalübertragung durch Tyrosinkinase kontrollieren. Die SH3-Domäne bewirkt zusammen mit SH2 eine Interaktion zwischen Cytoplasma und Membran, sie nehmen so an der Kontrolle der intrazellulären Antwort auf äußere Signale teil (Koch *et al.*, 1991). In *RasGAP* wird

die SH3-Domäne von zwei SH2-Domänen flankiert, diese Konstellation wurde auch in vielen anderen zellulären Signalproteinen gefunden (Hu & Settleman, 1997).

Über die SH2 und SH3-Domäne werden Rezeptor-Tyrosin-Kinasen mit intrazellulären Signalwegen gekoppelt, wobei SH2 und SH3 synergistisch wirken und u.a. den *Ras*-Pathway stimulieren und die PI-3-Kinase aktivieren (Pawson *et al.*, 1993; Smithgall, 1995). Laut Leblanc besteht die Möglichkeit, daß *RasGAP* den *Ras*- und *Rho*-Pathway miteinander verbindet (Leblanc *et al.*, 1998).

Qiu stellt 1995 in Versuchen heraus, daß bei Stimulation mit Wachstumsfaktoren oder dem Onkogen *Ras1* die GTPase *Rac1* eine Schlüsselkomponente in der Reorganisation des Zytoskeletts einnimmt. *Ras* hat Einfluß auf den *Rac*- und MAP-Kinase-Pathway, die wiederum bei weiteren Umwandlungsprozessen kooperieren (Qiu *et al.*, 1995).

Untersuchungen haben gezeigt, daß PI-3-Kinase für eine Wachstumsfaktor-induzierte Änderung des Aktin-Zytoskeletts, die von den GTPasen *Rac* und *Rho* vermittelt wird, benötigt wird. Es hat sich herausgestellt, daß *Rac* und *Rho* ebenfalls eine Rolle in der Regulierung der Gentranskription spielen. PI-3-Kinase stimuliert aber nicht das gesamte Repertoire an *Rac*- oder *Rho*-vermittelten Zellantworten (Reif *et al.*, 1996). Laut Berk scheint die PI-3-Kinase in die belastungsinduzierte Aktivierung der MAP-Kinase involviert zu sein (Berk *et al.*, 1995).

Die Mitglieder der *Rho*-Subfamilie regulieren die Organisation des Aktin-Zytoskeletts. *Rho* kontrolliert die Ansammlung von „*actin-stress-fibers*“ und fokalen Adhäsionskomplexen und *Rac* reguliert die Aktin-Filament-Akkumulation an der Plasmamembran. In Fibroblasten stimulieren *Rho*, *Rac* und *Cdc42* den Zellzyklus. Im Gegensatz zu *Ras* aktivieren die *Rho* GTPasen laut Olson nicht die MAP-Kinase-Kaskade (*Raf*/MEK/ERK), Frost stellte allerdings 1996 eine bisher unentdeckte Verbindung zwischen der *Rho*-Familie und dem ERK-Pathway fest (Frost *et al.*, 1996). Eine bestimmte MAP-Kinase, die *c-Jun* Kinase JNK/SAPK, wird von *Rac* und *Cdc42*, nicht aber von *Rho* stimuliert (Olson *et al.*, 1995).

Die Aktivierung von *Rho*, *Rac* und *Cdc42* ruft folgende Veränderungen der Zellmorphologie hervor: erhöhte Polymerisation von Aktin, Clustering von Integrinen und die Ansammlung großer Proteinkomplexe aus Vinculin, Talin, FAK und Paxillin (Machesky & Hall, 1996).

Zwei Signalprozesse führen laut Narumiya zur *Rho*-Aktivierung: zum einen die Aktivierung bestimmter G-Protein-gekoppelter Rezeptoren und zum anderen die Aktivierung anderer GTPasen wie *Ras*, *Cdc42* und *Rac* (Narumiya, 1996).

Hippenstiel stellte 1998 unter der Voraussetzung, daß *Rho*GTPasen PKC aktivieren, fest, daß eine Inhibition des *Rho*-Proteins die PKC-Translokation und Aktivierung in Endothel- und Epithelzellen blockiert (Hippenstiel *et al.*, 1998).

Mittels zwei neuer Techniken (*affinity chromatography* und *yeast two-hybrid technique*) fand Tapon 1997 heraus, daß *Rho* die Phosphatase der leichten Myosinketten reguliert. *Rho* und *Rac* sollen die Synthese von PIP₂ kontrollieren. Diese Erkenntnisse könnten helfen, den Effekt der GTPasen auf das Aktin-Zytoskelett weiter zu entschlüsseln (Tapon & Hall, 1997).

2.4 Signalwege der MAP-Kinase-Kaskade

Die MAP-Kinase (Mitogen-aktivierte-Proteinkinase) ist eine zytoplasmatische Proteinkinase, die durch extrazelluläre, häufig mitogen wirkende Liganden reguliert wird. Sie stellt eine Schlüsselverbindung zwischen membrangebundenen Rezeptoren und der Gen-Expression dar.

Drei MAP-Kinase-Kaskaden sind bekannt: die (ERK)-Kaskade, die Stress-aktivierte Proteinkinase/*c-jun* N-terminal Kinase (SAPK/JNK)-Kaskade und die p38MAPK-Kaskade (Abb.13). Jede der drei Kaskaden besitzt jeweils drei Levels, auf denen bestimmte chemische Reaktionen ablaufen: Level 1 ist die Ebene der MAPKKKs, zu der *Raf* und MEKK gehören, Level 2 ist die Ebene der MAPKK, zu der MEK, SEK und MKK gehören und Level 3 ist die Ebene der MAP-Kinasen ERK, SAPK/JNK und p38 (Paul *et al.*, 1997).

Jede der drei Kinase-Kaskaden spielt eine bestimmte Rolle in den unterschiedlichen Zellarten, sie stehen aber auch untereinander in Verbindung. Diese Signalwege fördern über Transkriptionsfaktoren die Aktivierung der „*immediate-early-genes*“, speziell die Aktivierung von Mitgliedern der *fos*- und *jun*-Familie der Proto-Onkogene.

Die MAP-Kinasen ERK, SAPK und p38MAPK werden über unterschiedliche Rezeptorarten aktiviert, u.a. von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen, Cytokin-Rezeptoren und G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Eine Aktivierung der MAP-Kinase kann auch über Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration, PKC-Aktivierung, verschiedene Arten der Belastung (mechanische Dehnung, etc.) und in bestimmtem Zusammenhang auch durch erhöhte cAMP/PKA-Aktivität erreicht werden (Hipskind & Bilbe, 1998).

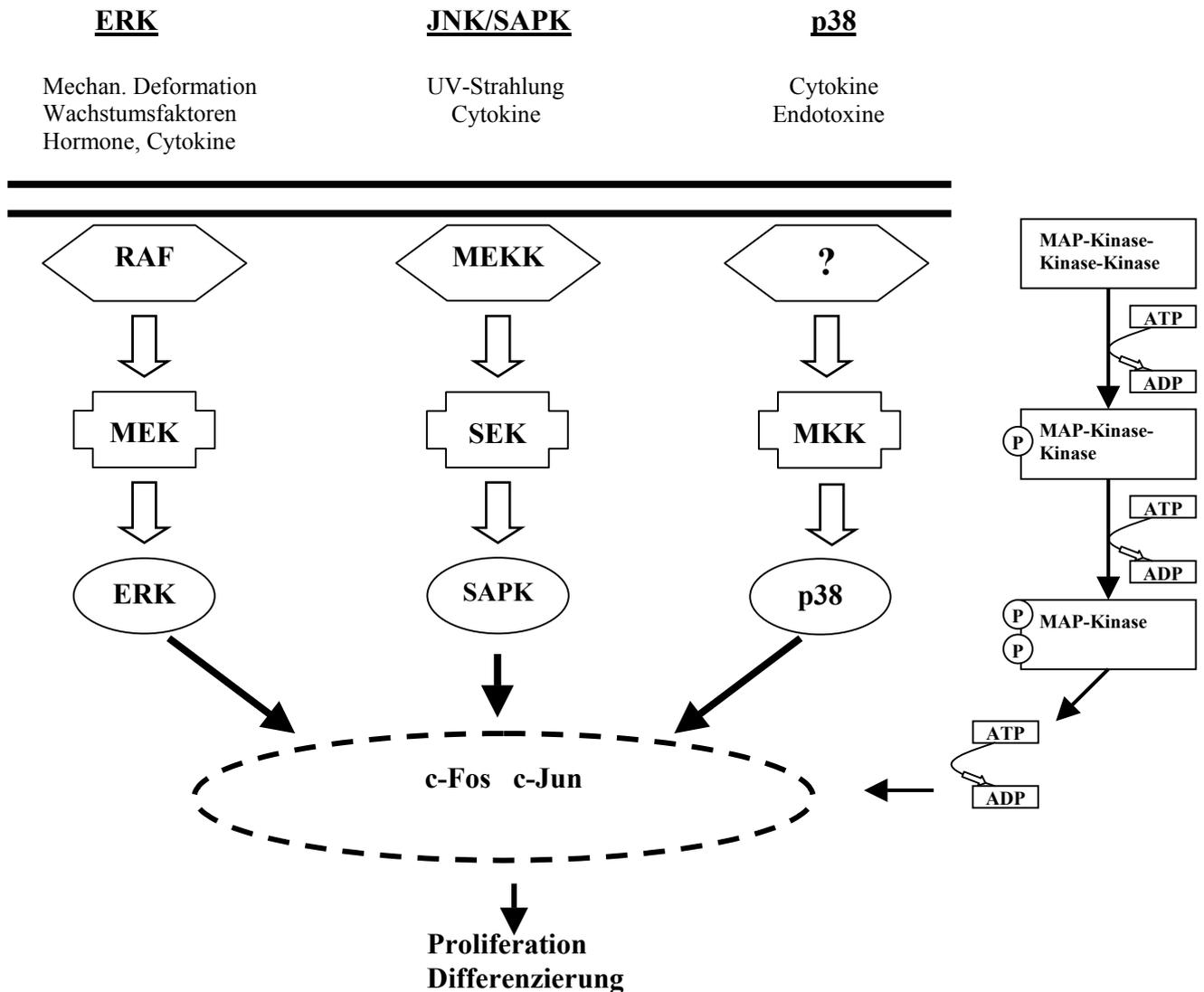


Abb. 13 Schematische Darstellung der drei MAP-Kinase-Kaskaden (modifiziert nach Hipskind & Bilbe, 1998)

Die Abbildung zeigt schematisch die drei MAP-Kinase-Kaskaden, die im Zytoplasma anzutreffen sind, sowie deren Phosphorylierungsschritte und die Faktoren die sie hauptsächlich aktivieren können. Im unteren Bereich sind die im Zellkern stimulierten Transkriptionsfaktoren aufgelistet .

ERKs

Wachstumsfaktoren und andere proliferationsfördernde Faktoren aktivieren die ERK-Kaskade.

Ras-Proteine interagieren mit *Raf* (MAP-Kinase-Kinase-Kinase), über das die ERK-Kaskade in Gang gesetzt wird. Um *Raf* aktivieren zu können muß Ras im aktiven Zustand vorliegen (Moodie *et al.*, 1993).

Aktivieren Wachstumshormone die Rezeptor-Tyrosin-Kinasen, bindet *Shc* an die phosphorylierten Tyrosine des Rezeptors, weitere Phosphorylierung von *Shc* erzeugt eine Bindungsstelle für die SH2-Domäne von *Grb2*. *Grb2* bindet über seine SH3-Domäne *Sos*, einen Guaninnucleotid Austauschfaktor, der das GTP-bindende Protein *Ras* aktiviert (Vanderkuur *et al.*, 1997).

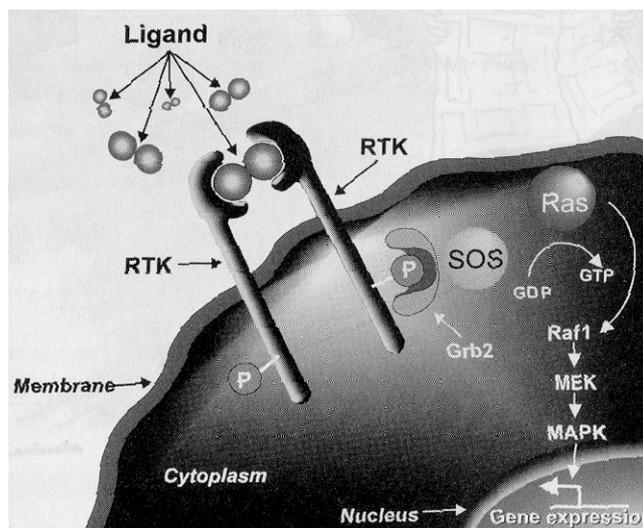


Abb. 14 Signalkaskade über eine Rezeptor-Tyrosin-Kinase (Calbiochem, 1999)

Die Bindung des Liganden stimuliert die Rezeptor-Tyrosin-Kinase (RTK) und führt zur Bindung von Grb2 und SOS an die phosphorylierten Tyrosine des Rezeptors. Ras wird somit aktiviert und setzt die MAP-Kinase-Kaskade in Gang, der die Gen-Expression folgt.

Die Abfolge der Sequenzen der ERK-Kaskade läuft wie folgt: *Ras* aktiviert die Serin/Threonin-Kinase *Raf*, die wiederum MEK (MAPK-/ERK-Kinase) aktiviert. MEK phosphoryliert und aktiviert daraufhin die zwei Isoformen ERK1 und ERK2, die sich in den Zellkern verlagern und dort Transkriptionfaktoren aktivieren, die wiederum Änderungen in der Genexpression, z.B. *c-fos*-Aktivierung, hervorrufen und so Proliferation und Differenzierung beeinflussen (Tibbles & Woodgett, 1999).

Raf ist eine zytosolische Proteinkinase, die durch aktives *Ras* an die Plasmamembran verlagert wird, wo es aktiviert wird. *Ras* wirkt nur als ein regulierender, membrangebundener Anker für *Raf* in der Nähe seiner Aktivatoren, erst andere Signale führen zur eigentlichen *Raf*-Aktivierung (Leevers *et al.*, 1994). Auf dem Weg seiner Translokation kann *Raf* von PKC aktiviert werden, wie die Phosphorylierung durch PKC genau vonstatten geht, wird noch kontrovers diskutiert (Seger & Krebs, 1995).

Einmal an der Plasmamembran rekrutiert wird aktiviertes *Raf* an das Zytoskelett gebunden, eine Verankerung mit *Ras* besteht nicht mehr (Stokoe *et al.*, 1994). Neue Untersuchungen haben gezeigt, daß *Raf* nicht das einzige Haupteffektorprotein von *Ras* ist. Die Signalübertragung durch *Ras* wird über viele andere Effektorproteine vermittelt und es besteht ein „crosstalk“ mit anderen GTPasen (Yamamoto *et al.*, 1999).

Nicht nur *Raf*, sondern auch MEKK kann die ERK-Kaskade aktivieren. Außerdem nimmt MEKK auch Einfluß auf den SAPK/JNK-Pathway, so daß man davon ausgehen kann, daß es auch noch andere spezifische Aktivatoren der ERK-Kaskade gibt.

Untersuchungen an Herzmyozyten haben gezeigt, daß ERKs auch höherstufige Sequenzen in ihrer Signalkaskade phosphorylieren können und dadurch über einen „feedback“-Mechanismus ihre eigene Aktivierung induzieren (Hefti *et al.*, 1997).

ERK wird mittels MAP-Kinase-Phosphatase dephosphoryliert und inaktiviert. Diese Phosphatasen werden von „*immediate early genes*“ codiert, so daß man hier auch von einer „feedback“-Regulierung ausgehen kann, die sichert, daß ERK nur vorübergehend aktiviert wird.

SAPK/JNK

Diese Familie der MAP-Kinase wurde über zwei Wege identifiziert: die Aktivierung durch unterschiedliche Belastung (SAPK) und über die Möglichkeit der Bindung und Phosphorylierung von Ser63 und Ser73, der NH₂-terminalen Transaktivierungsdomäne von *c-jun* (JNK). Beide werden durch zelluläre Belastung, Cytokine,

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und viele andere Stimulatoren aktiviert (Hipskind & Bilbe, 1998).

Die einzelnen Sequenzen der SAPK/JNK-Kaskade konnten bislang noch nicht eindeutig definiert werden. Bekannt ist, daß MEKK, das auch die ERK-Kaskade aktiviert, die Signalkaskade von SAPK/JNK einleitet. Die Aktivierung von MEKK kann über die *Ras*- oder die *Rho*-Familie der GTPasen erfolgen. MEKK gibt Signale über SEK (SAPK-Kinase) an SAPK und JNK weiter, wobei die biochemische Identität von SEK noch nicht geklärt ist (Hipskind & Bilbe, 1998).

p38

Diese MAP-Kinase wird über verschiedene Arten der Belastung und entzündungsbedingte Cytokine stimuliert, es bestehen Parallelen zur Aktivierung von SAPK/JNK. Die Unterschiede beider Pathways sind sehr fein und möglicherweise bestimmt durch Kinetik und Aktivierungsgrad der Signalwege. Bisherige Untersuchungen zeigen, daß MEKK keine p38-Aktivität induziert, einen Level tiefer erfolgt die Aktivierung von p38 durch eine MK-Kinase (Hipskind & Bilbe, 1998); Hefti *et al.*, 1997). Bisher sind Ergebnisse über die Einwirkung von Belastung und Cytokinen auf p38 kaum veröffentlicht worden, in Gefäßendothelzellen z.B. soll aber p38 durch osmotische Belastung aktiviert werden (Lehoux & Tegudi, 1998).

Untersuchungen an MG-63 Zellen haben gezeigt, daß Wachstumsfaktoren eher den ERK-Pathway aktivieren als den Signalweg von SAPK/JNK und p38. So aktiviert IGF-1 nur geringfügig JNK oder p38MAP-Kinase in MG-63-Zellen, stimuliert aber über den ERK-Pathway die Aktivierung der Cyclin-abhängigen Kinase (*Cdk2*) im Kern und fördert so die Zellproliferation (Zhang *et al.*, 1999).

Versuche von Hulley zeigen, daß die MAP-Kinase-Aktivität im Knochen durch PTH-induzierte PKA-Aktivierung inhibiert wird. PKA hindert *Raf* durch Phosphorylierung der *Ras*-Bindungsdomäne an der Bindung mit *Ras* und blockt somit die MAP-Kinase-Kaskade. Auch Steroide inhibieren den MAPK-Pathway auf

dem Level von *Raf* in Mastzellen und reduzieren die Phosphorylierung von *Raf*, MEK und ERK1/2 (Hulley *et al.*, 1998).

Chaudhary untersuchte mit Hilfe eines „in-Gel MAP-Kinase assays“ die Wirkung von FGF-2 (Fibroblast-Growth-factor) und PDGF-BB auf die MAP-Kinase-Aktivierung in menschlichen Osteoblasten. Die Versuche zeigten, daß sowohl die Konzentration von ERK-1 als auch von ERK-2 ansteigt, ERK-2 allerdings hauptsächlich aktiviert wird (Chaudhary & Avioli, 1997).

Schmidt stellte bei der physikalischen Belastung von U-2 OS-Zellen mittels Magnetobeads (magnetische Mikrokörnchen, die mit Integrinantikörpern überzogen sind) fest, daß die Aktivierung der MAP-Kinase stark ansteigt, verbunden mit einem Integrin-Clustering. Die Körnchen wurden zur mechanischen Reizung der Oberflächenrezeptoren auf den Zellen inkubiert und einem magnetischem Feld ausgesetzt. Die Aktivierung der MAP-Kinase durch Integrine hängt von einem intakten Zytoskelett und der Anwesenheit zytoskelett-assoziiierter Signalmoleküle wie FAK ab (Schmidt *et al.*, 1998).

Endoh fand 1997 heraus, daß in Rattenosteoblasten eine Aktivierung der MAP-Kinase bei Applikation von Oestrogen stattfindet. Bei einer Konzentration von 10nM-1pM kommt es innerhalb von 5 min. zum Anstieg der MAP-Kinase-Aktivität und zwar über Phosphorylierung. Diese Phosphorylierung wird laut Endoh möglicherweise über angebliche Plasmamembran-Rezeptoren vermittelt (Endoh *et al.*, 1997). Dagegen spricht, daß Steroidrezeptoren bisher nur im Zytoplasma lokalisiert nachgewiesen wurden.

Auch Untersuchungen am Skelettmuskel von Ratten haben gezeigt, daß mechanische Belastung Auswirkung auf die MAP-Kinasen hat. Bei Belastung, in diesem Fall Bewegung der Ratten im Laufrad bei definierter Drehzahl und Zeit, kommt es zu einem 2-3 fachen Anstieg der JNK. Die p38-Aktivität wird bei Belastung leicht stimuliert, die Aktivität von ERK wird erhöht (Goodyear *et al.*, 1996).

Yamazaki wies anhand von Ratten-Herzmyozyten nach, daß mechanische Belastung eine Hypertrophie der Zellen bewirkt, die mit einer Aktivierung von *Raf*-1 und der MAP-Kinase-Kaskade einhergeht (Yamazaki *et al.*, 1995).

Sadoshima dehnte Herzmyozyten und stellte eine MAP-Kinase-Aktivierung innerhalb 1 Min. fest. Der Höhepunkt der Aktivität wurde bei 10 Min. erreicht, danach sanken die Werte auf den Kontroll-Level (Sadoshima & Izumo, 1993).

Fluid Flow-Experimente am Gefäßendothel haben gezeigt, daß bei ansteigendem Flow zuerst eine Translokation der Signalmoleküle zu den Caveolae stattfindet und anschließend eine Aktivierung des *Ras-Raf*-MAP-Kinase-Pathways erfolgt (Rizzo *et al.*, 1998b).

Versuche am Aortenepithel von Rindern, das für 5-30 Minuten einem „*shear stress*“ von 20 dyn/cm² ausgesetzt wurde, führten zu einer Tyrosinphosphorylierung der MAP-Kinase. Möglicherweise ist die GTPase Rac1 (Punkt 2.3) an der MAP-Kinase-Aktivierung durch Scherkräfte beteiligt (Yeh *et al.*, 1999). Weitere Versuche zeigten, daß „*shear stress*“ die MAP-Kinasen ERK1/2 und JNK unterschiedlich reguliert. Man nimmt an, daß Gi2-protein (Punkt 1.5), Ras und Tyrosinkinase(n) die „Upstream“-Regulatoren der „*shear*“-abhängigen ERK-Aktivierung im Endothel sind. Die „*shear*“-abhängige Aktivierung von JNK wird möglicherweise von Mechanismen reguliert, die die G-Protein-Untereinheiten β/γ , Ras und Tyrosinkinase(n) mit einbeziehen (Jo *et al.*, 1997).

Takahashi stellte in „*shear-stress*“-Experimenten am Gefäßendothel fest, daß es zu einer zeitlichen Abfolge bei der Zellantwort kommt. Die Produktion von NO erscheint als *sofortige* Antwort, die Aktivierung von ERK1/2 *schnelle* Antwort und die Tyrosinphosphorylierung von FAK als *anhaltende* Antwort (Takahashi *et al.*, 1997).

BMK1 (big MAP-Kinase/ERK5), eine neue MAP-Kinase, soll ebenfalls im Aortenendothel durch Fluid Flow (12dyn/cm²) stimuliert werden können. Versuche mit spezifischen Inhibitoren und Aktivatoren haben gezeigt, daß die Flow-vermittelte BMK1-Aktivierung nicht von Faktoren wie intrazellulärem NO, Proteinkinase C und A, CaM-Kinase und PI-3-Kinase reguliert wird. Die Aktivierung von BMK1 scheint eher von Tyrosinkinase(n) und Calcium-Mobilisierung abhängig zu sein (Yan *et al.*, 1999).

Hung setzte 1999 die Hypothese auf, daß MAP-Kinase an der Fluid Flow-induzierten Mechanotransduktion in Chondrozyten beteiligt ist. Ein definierter mechanischer Stimulus („*shear stress*“ von 1,6 Pa) wurde mittels „laminar flow chamber“ auf Gelenkknorpelzellen von Rindern ausgeübt. ERK1/2 wurde nach 5-15 Minuten 1,6-3 fach stärker aktiviert. Behandlung mit Thapsigargin, einem Ca²⁺-ATPase-Blocker, hatte keinen Effekt auf die ERK-Aktivierung durch Fluid Flow, was möglicherweise

darauf hindeutet, daß eine Ca^{2+} -Mobilisierung für diese Antwort nicht notwendig ist (Hung *et al.*, 2000).

Diese Versuche zeigen, daß die Aktivierung MAP-Kinase ein komplexer Vorgang ist, bei dem sich viele Signalwege überlappen. Bei der Aufklärung der Zusammenhänge besteht weiterhin Forschungsbedarf.

2.5 Der Jak/STAT-Signalweg

Der Jak/STAT-Pathway geht von Cytokin-Rezeptoren aus und charakterisiert sich dadurch, daß er auf direktem Wege die Rezeptoraktivierung in Genexpression umsetzt. Cytokin-Rezeptoren sind mit Rezeptor-assoziierten Tyrosinkinase gekoppelt, in diesem Fall mit der Rezeptor-assoziierten *Janus-Kinase* (Jak). Bisher sind vier Mitglieder der Janus-Familie (Jak 1-3, Tyk2) und sieben Mitglieder der STAT-Familie (STAT 1-4, 5A,5B,6) bekannt.

Durch Liganden-induzierte Rezeptor-Dimerisierung nähern sich die Jaks aneinander an, so daß es zu einer Transphosphorylierung kommen kann, so aktivierte Jaks phosphorylieren dann Tyrosinreste des Rezeptors (Abb.15). Die Phosphotyrosinreste der jetzt aktivierten Cytokin-Rezeptoren binden an die SH2-Domänen der zytosolischen STATs. Die nun Rezeptor-assoziierten STATs werden an ihren Tyrosinresten von Jak-Kinasen phosphoryliert und aktiviert. Über ihre SH2-Domänen bilden die aktivierten STATs Homo- und Heterodimere und verlagern sich in den Kern. Zusätzlich findet eine Serin-Phosphorylierung, die von der MAP-Kinase katalysiert wird, statt, die erst zur vollen Aktivierung des STAT-Proteins führt. Im Kern binden die STATs an verschiedene Gen-Promotoren und beeinflussen die Transkription und Genexpression (Onishi *et al.*, 1998; Barinaga, 1995).

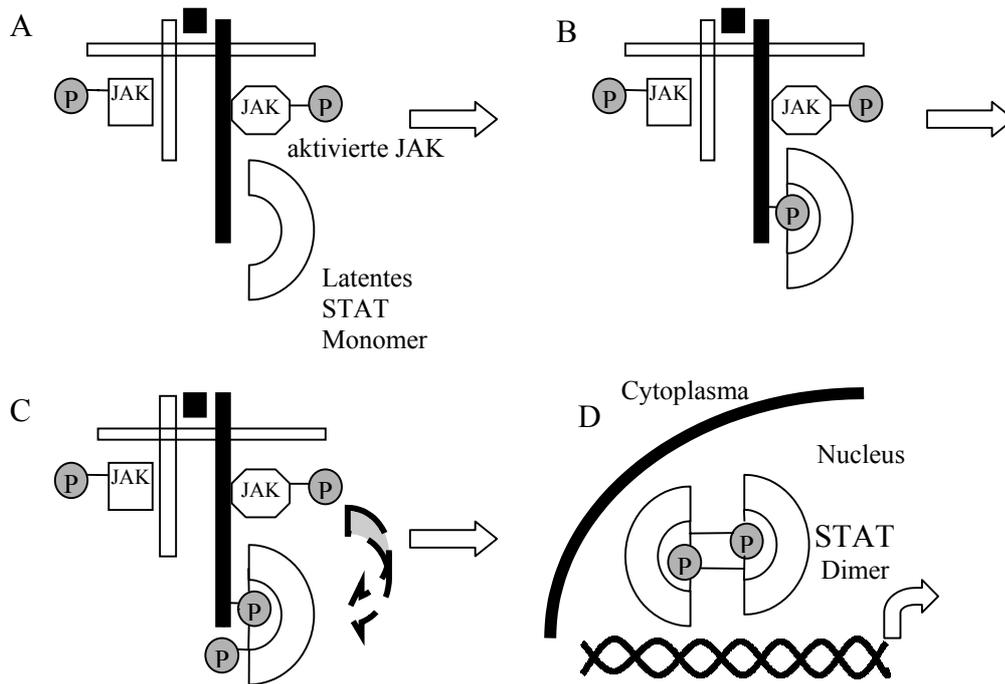


Abb. 15 Signaltransduktion über den JAK/STAT-Pathway (modifiziert nach Liu *et al.*, 1998).

Rezeptor-assoziierte JAKs bleiben inaktiv bis eine Liganden-induzierte Rezeptor-Dimerisierung stattfindet. Folgende Transphosphorylierung aktiviert JAK (A). Aktivierte JAKs phosphorylieren Tyrosinreste des Rezeptors. An die Phosphotyrosinreste binden die SH2-Domänen der zytosolischen STATs (B). Die Rezeptor-assoziierten STATs werden von JAK-Kinasen phosphoryliert und aktiviert (C). Aktivierte STATs bilden Homo- und Heterodimere und verlagern sich in den Kern (D).

STATs binden wie gezeigt an phosphorylierte Tyrosinreste der Cytokin-Rezeptoren, um von Jak phosphoryliert und aktiviert zu werden. Es können aber auch *Shc*-Proteine an die aktivierten Cytokin-Rezeptoren binden, die *Gbr2-Sos*-Komplexe rekrutieren und dadurch den *Ras*-MAP-Kinase-Pathway auslösen (Carter-Su & Smit, 1998).

Untersuchungen haben gezeigt, daß Jaks und STATs innerhalb von 1-15 Minuten nach Rezeptorstimulation phosphoryliert werden und die Verlagerung der STATs in den Nucleus direkt darauf erfolgt. Zusätzlich zur schnellen Aktivierung des Jak/STAT-Pathways unterliegt dieser auch einer relativ schnellen Inaktivierung. Jaks verlieren ihre Tyrosinphosphorylierung innerhalb von 2 Stunden, die STAT-Phosphorylierung und DNA-Bindung geht zwischen 0,5 und 4 Stunden nach Stimulation verloren (Liu *et al.*, 1998).

Kürzlich wurden spezifische Cytokin-induzierte Signalinhibitoren entdeckt. Diese SH2-tragenden Proteine nennen sich *SOCS* (suppressor of cytokine signaling), *JAB* (JAK-associated B-cell factor) und *SSI* (STAT-induced STAT-inhibitor). Die Transkription aller drei Inhibitoren wird durch Cytokine induziert, ihre Funktion ist der klassische „negative Feedback“-Mechanismus, um Signale des Jak/STAT-Pathways zu unterdrücken. Die genaue Wirkungsweise bezüglich der Angriffspunkte dieser negativen Regulatoren ist noch nicht vollständig geklärt (Heim, 1999; Endo *et al.*, 1997).

Bellido zeigte in Versuchen, daß Osteoblasten auf Stimulation mit dem Cytokin Interleukin-6 sowohl mit Aktivierung des Jak/STAT-Pathways als auch des MAP-Kinase-Pathways antworten. Obwohl Interleukin-6 auch osteoklastische Eigenschaften besitzt, zeigte sich eine Differenzierung von Osteoblasten zu einem reiferen Stadium unter Einwirkung von Interleukin-6. Die Differenzierung wurde hauptsächlich über den Jak/STAT-Pathway vermittelt (Bellido *et al.*, 1997).

Anfänglich ging man davon aus, daß der Jak/STAT-Pathway allein durch Cytokin-Rezeptoren in Gang gesetzt wird, es besteht aber auch eine Aktivierung über Rezeptor-Tyrosinkinasen (z.B. PDGF- und EGF-Rezeptor) und G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (Mertani *et al.*, 1999).

Über STAT-3 fand man heraus, daß es als ein Adaptermolekül agieren kann und PI-3-Kinase an Interferon Typ1-Rezeptoren bindet (Pfeffer *et al.*, 1997).

Beweise liegen auch dafür vor, daß STAT gelegentlich nicht an phosphorylierte Rezeptor-Tyrosine, sondern direkt an Jaks bindet (Fujitani *et al.*, 1997).

Pan stellte bei mechanischer Dehnung von Herzmyozyten bereits nach 2 Minuten einen Anstieg der Phosphorylierung von JAK/STAT fest. Diese dehnungs-induzierte Aktivierung des JAK/STAT-Pathways war hauptsächlich abhängig von der Interleukin-6-Familie der Cytokine und einem bestimmten Level an intrazellulärem Calcium (Pan *et al.*, 1999).

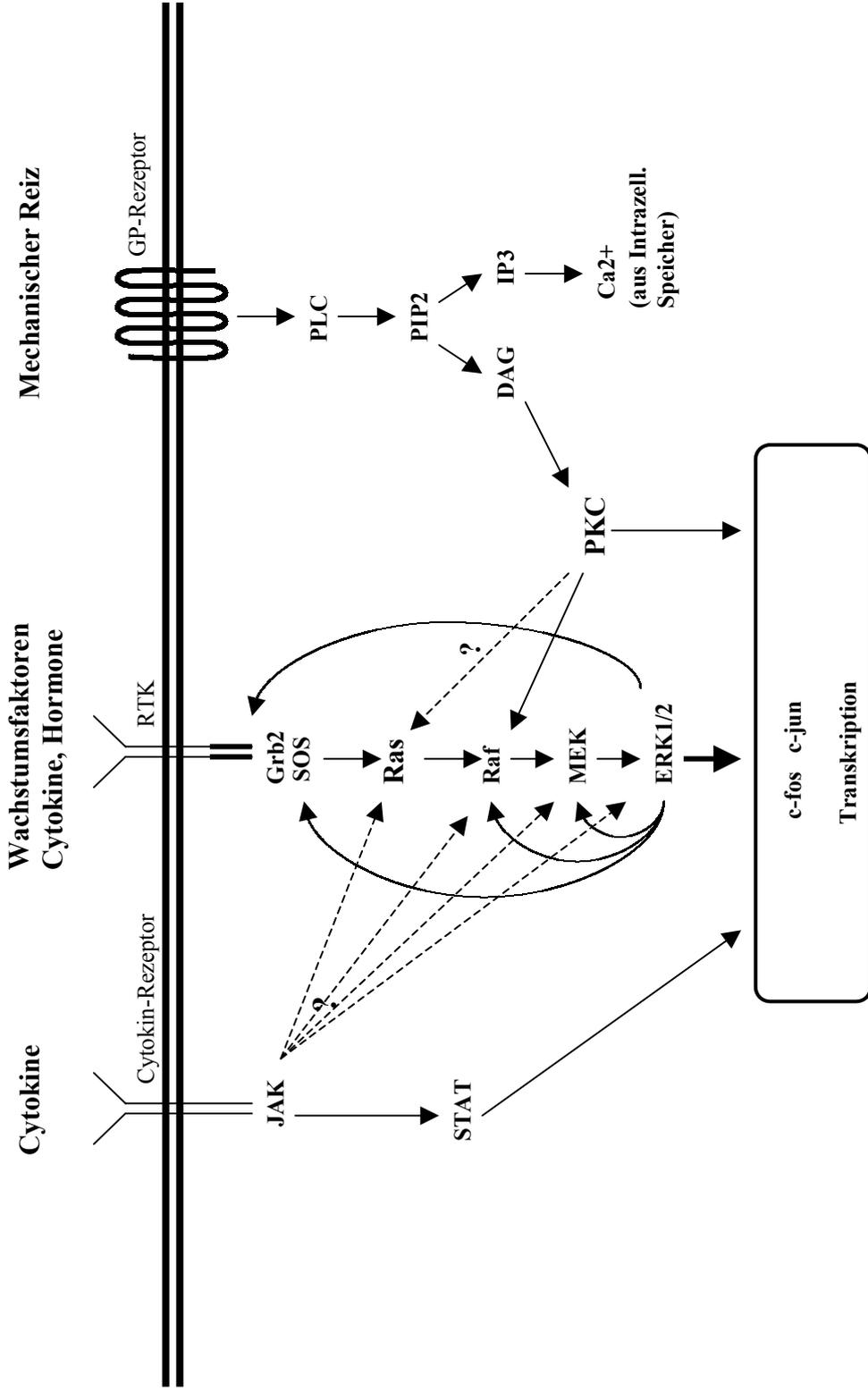


Abb. 16 Schematische Darstellung verschiedener Signaltransduktionswege (modifiziert nach Hefti *et al.*, 1997 und Barinaga, 1995)

Die Abbildung zeigt rechts den Signalweg in Osteoblasten, der durch Applikation eines mechanischen Reizes ausgelöst wird. Dieser Weg verläuft über PLC-PIP₂ und kann entweder über IP₃ Calcium aus intrazellulären Speichern freisetzen, oder über DAG-PKC direkt in die Aktivierung der ERK-Kaskade eingreifen. Der mittlere Signalweg wird durch Wachstumsfaktoren, Zytokine und Hormone an Rezeptortyrosinkinasen aktiviert, läuft über Grb2-SOS-ERK-Kaskade und endet in der Phosphorylierung von ERK1 und ERK2, bzw. der Phosphorylierung der Transkriptionsfaktoren im Zellkern. Es sind außerdem mögliche Feedback-Mechanismen von ERK1/ERK2 dargestellt, mit den Substraten MEK/Raf/SOS/RTK. Links ist die Janus-Kinase (JAK) gezeigt, von der man annimmt, daß auch sie in den Ras-Pathway eingreift.

3. Gen-Expression

Osteoblastenstruktur und Gen-Expression sind über molekulare Mechanismen verbunden, die aus der Vernetzung von EZM, Integrinen, Zytoskelett und der nuklären Matrix hervorgehen. Diese Strukturen vermitteln mechanische und chemische Stimulation, die zu Veränderungen der Zellmorphologie und Beeinflussung von Differenzierungsvorgängen durch spezifische Gen-Expression führen.

Nukläre Matrixproteine übernehmen bei der Regulation der Gen-Expression eine wichtige Rolle. Sie binden nach Aktivierung als Transkriptionsfaktoren z.B. an Osteocalcin-, ein speziell in mineralisiertem Gewebe vorkommendes Matrixprotein, und Typ1-Kollagen-Promotoren ihrer Zielgene. Über die Bindung an die Promotoren wird die Gentranskription und somit die Osteoblastendifferenzierung in Gang gesetzt. Die nuklären Matrixproteine werden auch als „architektonische Transkriptionsfaktoren“ bezeichnet, die durch Bindung an die Promotoren die Gen-Expression regulieren und so eine veränderte Osteoblastenstruktur hervorrufen. Folgende nukläre Matrixproteine finden sich in Osteoblasten:

1. NMP1/YY1, das sowohl in der nuklären Matrix als auch im Chromatin lokalisiert ist.
2. NMP2/Cbfa1, das an den Osteocalcin-Promoter bindet und der Transkriptions-Aktivator für Osteoblastendifferenzierung ist.
3. NMP4, das an den Typ 1 Kollagen-Promoter bindet, auf PTH reagiert und DNS bindet.
4. Topoisomerase II- α und - β , die unterschiedlich in reifen und unreifen Knochenzellen exprimiert werden. Topoisomerase II- α -Expression reagiert auf PTH.

Momentan stellt sich die Frage, wie mechanische Dehnung auf die DNS wirkt und was zur Regulation der Promoter-Aktivität führt. Welchen Mechanismen unterliegt der Kommunikationsweg Zytoskelett-Nukleus? Untersuchungen haben gezeigt, daß die Promoter-Geometrie, d.h. der Windungsgrad und/oder der Umfang einer Dehnung oder Aufwindung in der DNS, eine signifikante Rolle in der regulatorischen Aktivität von Genen spielt. Einige „architektonische Transkriptionsfaktoren“ sind im Nukleoskelett oder in der nuklären Matrix lokalisiert und verbinden somit die Unterstrukturen der Zelle mit Promoter-Aktivität und

Genaktivierung. Die Veränderung des genetischen Programms einer Zelle ist somit viel mehr als nur eine Umverteilung von Phosphatgruppen zwischen Proteinen (Bidwell *et al.*, 1998).

Stein postuliert, daß drei Parameter nuklärer Struktur zur Transkriptionskontrolle führen:

1. Die lineare Darstellung der Promoterelemente zeugt für eine Verantwortlichkeit im Zusammenhang mit Phänotyp-abhängiger Regulierung und Entwicklung der Zelle.
2. Die Chromatin-Struktur und Nukleosom-Organisation reduziert die Distanz zwischen unabhängigen regulatorischen Elementen, die sich eventuell in der Transkriptionskontrolle ergänzen.
3. Die Nukläre Matrix unterstützt die Gen-Expression und ermöglicht sowohl Gen-Lokalisierung als auch Konzentrierung von Transkriptionsfaktoren (Stein *et al.*, 1995).

Osteoblasten sind differenzierte Zellen, die Knochenmatrix produzieren, unter anderem das knochenspezifische Protein Osteocalcin. Der Osteocalcin Gen-Promoter wurde zum Modell dafür, wie Gene in Osteoblasten reguliert werden (Goldberg *et al.*, 1996):

Osf2/Cbfa1, der zuerst identifizierte Osteoblasten-spezifische Transkriptionsfaktor, wird in der frühen Osteoblastenentwicklung exprimiert und interagiert mit spezifischen DNS-Sequenzen im Osteocalcin-Promoter (Franceschi, 1999).

Cbfa1 ist ein essentieller Transkriptionsfaktor für Osteoblastendifferenzierung und Knochenformation. Bereits drei Isoformen von Cbfa1 sind bekannt: Typ I, II und III. Jede Isoform induzierte in mit Cbfa1 behandelten Zellen eine Osteocalcin-, Osteopontin- und Kollagen Typ1-Gen-Expression. Mit Typ II behandelte Zellen erreichten den höchsten Expressions-Level des Osteocalcin-Gens. Alle drei Isoformen sind somit an stimulatorischen Prozessen der Osteoblastendifferenzierung beteiligt, aber jede übt dabei eine unterschiedlich Funktion aus (Harada *et al.*, 1999). Osf2/Cbfa1 bindet an verschiedene Gene in Osteoblasten und reguliert deren Expression. Die Inaktivierung von Osf2/Cbfa1 zeigte bei Versuchen an Mäusen, daß mesenchymale Progenitorzellen die Fähigkeit verlieren, zu Osteoblasten zu differenzieren (Karsenty, 1998). Untersuchungen an MC3T3-E1 Osteoblasten über

die Rolle des MAP-Kinase-Pathways in der Regulierung Cbfa1-abhängiger Transkription haben folgendes ergeben: PD98059, ein spezifischer MEK-Inhibitor, inhibierte die EZM-abhängige Aktivierung des Osteocalcin-Promoters. Dies bedeutet, daß der MAP-Kinase-Pathway und möglicherweise auch die Phosphorylierung von Cbfa1 für die Antwort der Osteoblasten auf Signale der EZM von Bedeutung sind (Xiao *et al.*, 2000).

Osteocalcin ist eine nichtkollagene Proteinkomponente der EZM und wird ausschließlich von Osteoblasten im späten Entwicklungsstadium synthetisiert und sezerniert. Die Expression von Osteocalcin wird vom Transkriptionsfaktor Cbfa1 angeregt. Msx2, ein Transkriptionsfaktor, der während der frühen Proliferationsphase der Osteoblastendifferenzierung exprimiert wird, hemmt die Osteocalcin-Expression (Hopyan *et al.*, 1999). Untersuchungen an MC3T3E1-Osteoblasten haben gezeigt, daß ein neues nukläres Matrixprotein „MINT“ (Msx2-interacting nuclear target protein) an Msx2 bindet und an der Regulierung von Osteocalcin beteiligt ist. Msx2 und MINT binden an eine informationsdichte, osteoblastenspezifische regulatorische Region des Osteocalcin-Promoters. Möglicherweise übt MINT sowohl positive als auch negative regulatorische Prozesse bei der Organisation von Transkriptionsprozessen in der Nuklären Matrix aus (Newberry *et al.*, 1999).

Es besteht die Annahme, daß die Regulierung der Osteocalcin-Expression unter anderem auch von PKA- und PKC-abhängigen Mechanismen erfolgt (Boguslawski *et al.*, 2000). Man geht davon aus, daß Osteocalcin ebenfalls eine Rolle bei der Knochenresorption spielt, da es die Fähigkeit besitzt, die Rekrutierung und Differenzierung von Osteoklasten an der Knochenoberflächen zu beeinflussen (Raymond *et al.*, 1999).

Es besteht die Hypothese, daß Hormone unterschiedliche Effekte auf Osteoblasten in Relation zum Stadium der Phänotypentwicklung ausüben. Vitamin D blockiert beispielsweise die Differenzierung proliferierender Osteoblasten, während die Zugabe von Glucocorticoid die Produktion der Knochenmatrix in proliferierenden Osteoblasten erhöht und die Differenzierungszeit beschleunigt. In postproliferativen Kulturen erhöhen beide Hormone die Osteocalcin mRNA in den weiter differenzierten Osteoblasten, die mit der Knochenmatrix in Verbindung stehen

(Pockwinse *et al.*, 1995). Glucocorticoide stimulieren bei der Knochenbildung die Osteoblastendifferenzierung und die Bildung der Knochenmatrix durch Interaktion mit einem spezifischen intrazellulären Rezeptor (Glucocorticoid-Rezeptor), der die Gen-Transkription über das „glucocorticoid response element“ (GRE), das im Promoter der Zielgene sitzt, reguliert (Ogata *et al.*, 1995). Vitamin D reguliert die Gen-Transkription ebenfalls über ein „Vitamin D response element“ (VDRE), das in den Promotoren der Zielgene sitzt (Javed *et al.*, 1999).

Untersuchungen der Mechanotransduktion in primären Osteozyten von Ratten haben gezeigt, daß mechanische Belastung auf physiologischem Level eine Expression von „*immediate early gene*“ *c-fos*, IGF-1 und Osteocalcin hervorruft. Die Vermutung liegt nahe, daß mechanische Belastung physiologischen Levels die Knochenbildung auf zwei unterschiedlichen Wegen beeinflusst: zum einen die direkte anabolische Reaktion der Osteozyten, Matrixproteine wie Osteocalcin zu produzieren, und zum anderen der indirekte Effekt auf die primären Osteozyten durch IGF, der zur Proliferation von „bone-lining cells“ und OB-Precursor-Zellen führt (Kawata & Mikuni-Takagaki, 1998).

Pavalko untersuchte 1998 an MC3T3-E1-Osteoblasten die Rolle des Aktin-Zytoskeletts und der Aktin-Membran-Interaktionen bei der Signalübertragung mechanischer Belastung, speziell von Fluid Flow, die zu veränderter Gen-Expression führt (Punkt 1.4). Fluid Flow von 1 Stunde bei 12dyn/qcm *in vitro* bewirkt unter Beteiligung des Zytoskeletts eine erhöhte Expression von *c-fos* und COX-2 (Cyclooxygenase-2). Die Fluid shear-induzierte Mechanotransduktion bewirkt in Osteoblasten die Reorganisation des Zytoskeletts, das Attachment der Aktinfilamente an Integrine in fokaler Adhäsion und die Entwicklung einer zellinternen Spannung. Untersuchungen haben gezeigt, daß Fluid-shear-induzierte Reorganisation des Zytoskeletts durch Behandlung der Osteoblasten mit Cytochalasin D inhibiert wird. Die Expression von COX-2 wurde damit blockiert. Bei Mikroinjektion eines proteolytischen Fragments von α -Aktinin, das die α -Aktinin-vermittelte Bindung der Aktinfilamente an Integrine verhindert, zeigte sich ebenfalls eine Blockierung der Genexpression von *c-fos* und COX-2 (Pavalko *et al.*, 1998).

Weitere Versuche haben ergeben, daß durch physiologischen Fluid Flow in humanen SaOS-Zellen die Produktion von TGF- β unter Beteiligung dehnungs-aktivierter

Kationenkanäle induziert wird. Eine dreifach erhöhte mRNA Expression von TGF- β 1 konnte nach 3 Stunden nachgewiesen werden, eine Expression der mRNA von PDGF-A, IGF-I, IGF-II oder IL-6 findet nicht statt (Sakai *et al.*, 1998).

Wang stellte an MC3T3-E1-Osteoblasten fest, daß mechanische Dehnung eine erhöhte Freisetzung der mRNA von PDGF-A hervorruft, die zu einer Proliferation der Osteoblasten führt (Wang *et al.*, 1997).

Vor kurzem haben Untersuchungen an MC3T3-E1-Osteoblasten gezeigt, daß möglicherweise Ca^{2+} die Fluid-shear-induzierte Reorganisation des Zytoskeletts und Genexpression reguliert. Osteoblasten wurden mit Thapsigargin, das die intrazellulären Calciumdepots leert, behandelt und einem physiologischen Fluid Flow unterworfen. Es kam zur kompletten Inhibierung der „Aktin stress fiber“-Bildung und *c-fos*/COX-2 Produktion (Chen *et al.*, 2000).

Aus diesen Ergebnissen, aber auch aus den vorangegangenen Themenkomplexen wird deutlich, wie viele Faktoren an der Gen-Expression beteiligt sind.

Osteoblasten synthetisieren Wachstumsfaktoren wie TGF- β und PDGF und Moleküle der Knochenmatrix wie u.a. Typ1-Kollagen, Osteocalcin und Osteopontin. Über verschiedene bereits genannte Signalkaskaden kommt es zur Aktivierung der „*immediate-early-genes*“ *c-fos* und *c-jun*. Die Freisetzung dieser verschiedenen Proteine charakterisiert den späteren Phänotyp des Knochens. Der Phänotyp wird durch die Gesamtheit der regulatorischen Mechanismen der Signaltransduktion während der Differenzierung gestaltet (Rodan & Noda, 1991). Die Wirkung mechanischer Belastung auf die Genexpression und somit auf den Phänotyp gewinnt heutzutage in Bezug auf Fraktur- und Osteoporosetherapie immer mehr an Bedeutung .

III. Diskussion

Die Zellantwort auf mechanische Belastung ist ein grundlegendes biologisches Phänomen, dessen Abläufe immer noch nicht vollständig aufgeklärt sind. Die Knochenmasse wird durch die Funktion der Osteblasten und Osteoklasten einem „remodelling“ unterworfen, das über die Mechanotransduktion und die Signalwege von Cytokinen und Wachstumsfaktoren beeinflusst werden kann.

Diese Signalwege übermitteln spezifische extrazelluläre Informationen, die das Muster der Gen-Expression verändern und somit einen neuen Phänotyp schaffen. Über die Art und Weise wie extrazelluläre Signale zum Zellkern weitergeleitet werden, um dort eine veränderte Gen-Expression hervorzurufen, gibt es neben den bereits anerkannten Mechanismen immer noch eine Vielzahl an kontrovers diskutierten neueren Ergebnissen, die einen immer komplexer werdenden Zusammenhang der einzelnen Signalwege offenbaren.

Gap junctions vermitteln bei mechanischer Dehnung eine physiologische Antwort zwischen den einzelnen Osteoblasten. Sie bestehen hauptsächlich aus Connexin 43 (Schirmacher *et al.*, 1992), vermitteln bis zu 40% elektrophysiologischer Signale an die Nachbarzelle und können als Sensoren für mechanische Stimulation bezeichnet werden. Diese gap junctions werden durch Calcium und PKC, die beide durch physiologische Dehnung stimuliert werden, in ihrer Aktivität reguliert (Jones & Bingham, 1991; Turner & Pavalko, 1998). Der Durchmesser einer gap junction-Kommunikationseinheit beträgt ca. 7-10 Zellen. Es besteht somit die Möglichkeit, daß bei mechanisch induzierter Belastung innerhalb dieser Kommunikationseinheiten die Differenzierung von Knochenzellen reguliert wird (Donahue, 2000).

Eine physiologische Dehnung von Knochenzellen *in vivo* erfolgt niemals gleichmäßig in Bezug auf Richtung und Stärke. *In vitro*-Studien können diese individuellen Verhältnisse nicht nachahmen und haben dadurch nur eine eingeschränkte Aussagekraft. Um dennoch reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, die annähernd an die Verhältnisse *in vivo* angeglichen sind, werden die Versuche mit *uniaxialer* Dehnung von Osteoblasten durchgeführt. Eine *biaxiale* Dehnung

ist unphysiologisch und liefert somit insuffiziente Ergebnisse, die sich nicht auf den Knochen *in vivo* übertragen lassen.

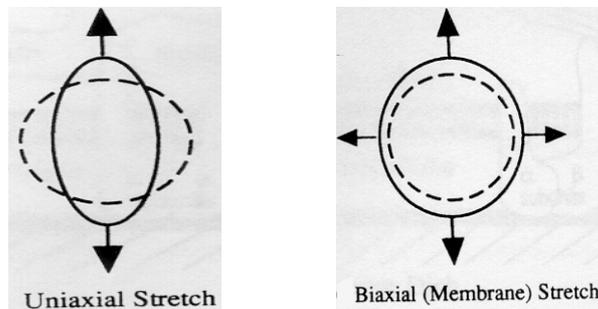


Abb. 17 Schematische Darstellung der Zelldeformation unter verschiedenen Dehnungsarten *in vitro* (modifiziert nach Duncan & Turner, 1995)

Im „Labor der experimentellen Orthopädie und Biomechanik der Universität Marburg“ unter der Leitung von Prof.Dr. D.B.Jones zeigten Untersuchungen an Knochenzellen nach mechanischer Belastung folgende Ergebnisse:

Osteoblasten antworten auf Dehnung mit einem Anstieg an intrazellulärer Calciumkonzentration, die sich aus intrazellulären Calcium-Depots wie beispielsweise dem ER rekrutiert. Untersuchungen von Tenbosch haben gezeigt, daß dieser Calcium-Anstieg aus intrazellulären Reservoirs nach physiologischer Dehnung erst verzögert nach 120 sec. auftritt und somit möglicherweise nicht als initiales Signal der intrazellulären Signaltransduktion nach Dehnung verstanden werden darf (unveröffentlichte Ergebnisse Tenbosch, 1999).

Durch Fluid Flow entstehende Scherkräfte, die auch in Endothelzellen eine Mechanotransduktion auslösen, wirken wie bereits nachgewiesen auch auf die Proliferation und Differenzierung von Osteoblasten. Versuche an POBs haben ergeben, daß bei mechanischer Induktion von 30dyn/cm^2 Scherkräfte entstehen, die eine Erhöhung der Konzentration an intrazellulärem Calcium bewirken. Dieser Calciumanstieg tritt ebenfalls wie bereits oben festgestellt verzögert auf. Messungen haben gezeigt, daß umso mehr Zellen reagieren je höher die einwirkende Kraft ist, und daß der Gesamtgehalt an intrazellulärem Calcium parallel dazu ansteigt. Es stellt sich nun die Frage, ob die erhöhte Calciumkonzentration sich nur auf den Fluid Flow zurückführen läßt oder ob Ionenkanäle oder andere Calcium-steigernde Prozesse

wirksam werden, die durch erhöhte dehnungsbedingte Aktivität das Ergebnis beeinflussen (unveröffentlichte Ergebnisse Rieger, 1999).

Owan verglich 1997 die jeweilige Wirkung von mechanischer Dehnung und Fluid Flow auf MC3T3-E1-Osteoblasten anhand der Expression von Osteopontin (OPN) mRNA. Er stellte fest, daß ein erhöhter Flüssigkeitsfluß unabhängig von der Stärke der Dehnung eine erhöhte OPN mRNA-Expression auslöst. Daraus leitete er ab, daß Osteoblasten stärker auf den Fluid Flow in der Knochenmatrix antworten als auf mechanische Dehnung. Da die OPN mRNA-Expression in diesem Zusammenhang allein sicherlich nicht repräsentativ für alle mechanosensitiven Vorgänge in den Osteoblasten ist, sollte dieses Ergebnis wirklich nur auf die Bedeutung von OPN für den Knochen bezogen werden. Fluid Flow und mechanische Dehnung haben sicherlich in Osteoblasten sowohl jeweils alleine eine Wirkung auf die Gen-Expression als auch in Kombination durch die Überlappung ihrer Signalwege. Aus diesem Grund sollte man das Ergebnis von Owan sehr differenziert betrachten (Owan *et al.*, 1997).

Eine Aktivierung der MAP-Kinase-Kaskade kann wie bereits erläutert indirekt über erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration, aktivierte PLC, aktivierte PKC oder über aktivierte JAKs erfolgen. Untersuchungen an primären Rinderosteoblasten (POBs) brachten folgende Ergebnisse über die Stimulierbarkeit von Osteoblasten und die Aktivierung der MAP-Kinase:

Erstmals wurde von Mitarbeitern des Labors Jones eine Aktivierung der MAP-Kinase in primären Rinderosteoblasten nachgewiesen (unveröffentlichte Daten Leitsch, 1999).

Grundlage aller Versuche war die uniaxiale 4-Punkt-Dehnung bei 4000 μ str (0,4%), 1Hz und 30 Zyklen.

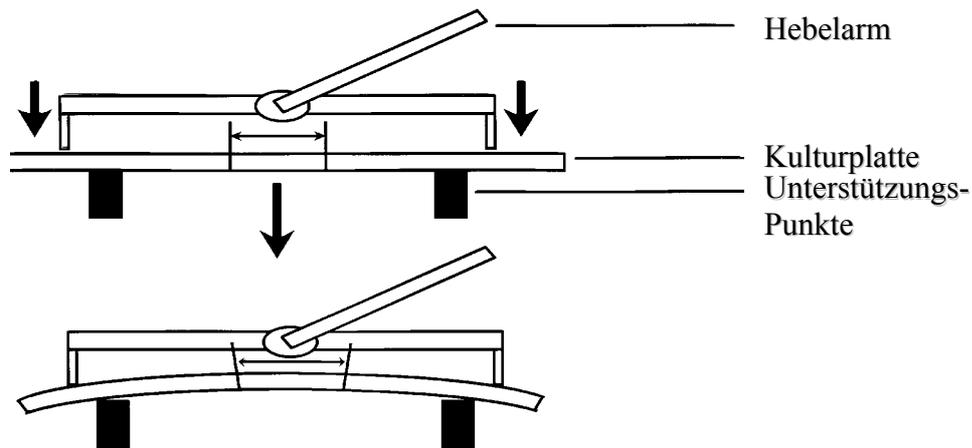


Abb. 18 Vier-Punkt-Dehnungsmaschine

In diese Apparatur werden biegsame Polycarbonatplatten eingespannt, die an ihrer Unterseite auf zwei Punkten aufliegen. Bei Dehnung über den Hebelarm drücken nun zwei weitere Punkte (welche einen größeren Abstand zueinander haben, als die Auflagepunkte der Unterseite) auf die Oberseite der Platte. Es resultiert eine nach oben konvexe Dehnung der Platte und somit eine Dehnung der an der Platte anhaftenden Zellen.

Zur Feststellung der Stimulierbarkeit von Osteoblasten wurden POBs über 2 Tage gedehnt. Das Ergebnis mittels MTT-Test zeigte eine Zunahme der Proliferation von 27% gegenüber den Kontrollzellen.

Die Aktivierung der MAP-Kinase in POBs nach Stimulation wurde anhand verschiedener Inkubationszeiten nachgewiesen. Die erste MAP-Kinase-Aktivierung zeigte sich nach 2 min. Inkubationszeit und erreichte ihr Maximum bei 5 min.. Nach 10 min. Inkubationszeit wurde die MAP-Kinase deaktiviert.

PTH, ein Aktivator der PLC, aktiviert nachweislich ebenfalls die MAP-Kinase in Osteoblasten.

Versuche mit dem MEK-Inhibitor PD98059 an POBs zeigten, daß die Bildung der MAP-Kinase (ERK1/ ERK2) erwartungsgemäß inhibiert wird. Dies bedeutet, daß die ERK-Aktivierung abhängig von MEK (MAP-Kinase-Kinase) ist. Die ERK-Aktivierung durch PKC erfolgt somit nachweislich nicht direkt, sondern „downstream“ in der Kaskade.

Bei weiteren Versuchen stellte sich nach Zugabe eines PKC-Inhibitors und anschließender Dehnung von POBs heraus, daß keine MAP-Kinase-Aktivierung erfolgte. Die Aktivierung der MAP-Kinase findet also offensichtlich unter Mitwirkung von PKC statt. Auch bei Inhibition von PLC zeigte sich bei geringer Inhibitor-Konzentration (1-10 μmol) keine MAP-Kinase-Aktivität, Konzentrationen

ab 20 μmol bewirkten eine Ablösung der Zellen, so daß man von zytostatischen, apoptotischen oder zytotoxischen Vorgängen ausgehen kann. Somit nimmt möglicherweise auch PLC Einfluß auf die MAP-Kinase-Aktivierung in Osteoblasten. Weitere Ergebnisse zeigten, daß die intrazelluläre Calciumkonzentration möglicherweise nicht in die MAP-Kinase-Aktivierung nach Dehnung mit einbezogen ist (unveröffentlichte Ergebnisse Leitsch & Bromme, B., 1999).

Bei der Dehnung von Osteosarkomzellen (MG63) stellte sich heraus, daß diese Zellen ebenfalls mechano-sensitiv sind, und auch hier das Maximum der MAP-Kinase-Aktivierung wieder bei 5 min. liegt (unveröffentlichte Ergebnisse Bromme, B., 1999). Ob man für weitere Forschung nun die relativ schnell wachsenden Osteosarkomzellen anstelle der wenig teilungsintensiven Osteoblasten verwenden kann, müßte noch genauer untersucht werden, da einige Eigenschaften beider Zelllinien übereinstimmen und somit auch in kürzerer Zeit neue Forschungsergebnisse erzielt werden könnten.

Die Versuche von Bromme haben gezeigt, daß bei Dehnungs-induzierter MAP-Kinase-Aktivierung eine PKC-Abhängigkeit vorliegt. Ob die Aktivierung der PKC Calciumsignal-abhängig oder Calciumsignal-unabhängig ist, muß in Folgeversuchen geklärt werden. Dabei werden spezifische Inhibitoren der PKC-Isoformen (Ca^{2+} -abhängig/ Ca^{2+} -unabhängig) sowie intrazelluläre Ca^{2+} -Chelatoren (z.B. BAPTA-AM) eine wesentliche Rolle spielen.

Diskutiert wird momentan, ob bei mechanischer Dehnung eine PKC-Aktivierung außer über Calcium und DAG auch über Intergrine (Integrine- \rightarrow FAK- \rightarrow PKC- ϵ) stattfinden kann, was letztendlich auch zur MAP-Kinase-Aktivierung führt (PKC- ϵ - \rightarrow Raf/MEK/MAPK). Flow-Experimente an bovinen Endothelzellen hatten gezeigt, daß PKC- ϵ bei der Signalvermittlung zur MAP-Kinase-Aktivierung nötig ist (Traub *et al.*, 1997). Welches Signalmolekül upstream von PKC- ϵ aktiviert wird, z.B. PI-3-Kinase (Integrin, FAK) oder PLC- β -Isoform (G-Protein vermittelt), muß ebenfalls noch geklärt werden.

Eine Aktivierung der Phospholipase C erfolgt in weniger als 1 Sekunde nach mechanischer Stimulation (Jones & Scholübbbers, 1987). Bisherige Experimente des Labors Jones über die Gen-Expression von PLC in primären humanen Osteoblasten,

Rinderosteoblasten und in Osteosarkomzellen nach mechanischer Dehnung haben folgendes gezeigt:

Legt man die Isoformen von PLC (β , γ und δ) zugrunde, wurde nach Dehnung eine Gen-Expression von PLC- β 2 in mechanosensiblen Zellen festgestellt, in den mechanoinsensiblen Zellen wurde PLC- β 2 nicht exprimiert. Weitere Versuche zur Bestimmung der Genexpression von PLC sind noch nötig, um auch mögliche Rückkopplungsmechanismen aufzudecken. Die alleinige Verantwortung von mechanischer Dehnung für die Expression von PLC- β 2 in mechanosensitiven Zellen steht ebenfalls noch in Frage (unveröffentlichte Ergebnisse Hoberg, 1999).

Neben der Erforschung der Aufgaben von PLC und PLD bei der Mechano-transduktion in Osteoblasten gewinnt die Phospholipase A immer mehr an Interesse. Phospholipase A (PLA) hydrolysiert wie PLD das Membranphospholipid Phosphatidylcholin, dabei wird Arachidonsäure freigesetzt. Die Stimulation von PLA erfolgt durch G-Protein-gekoppelte Signalübertragungswege. Enzym-gekoppelte Wege der Signaltransduktion kommen ebenfalls in Frage, müssen aber noch eingänglicher untersucht werden. Bisher ist wenig bekannt über die Details der Aktivierung und die Interaktion mit anderen Pathways. Die Forschung in Bezug auf PLA ist zwar sehr weitreichend und intensiv betrieben worden, allerdings richtete sie sich bislang hauptsächlich auf Funktion und Dysfunktion von Organen und die Rolle von PLA bei der Entzündungsantwort. Im Bereich der Knochenzellen liegen bisher wenig Ergebnisse über die Aktivierung und Wirkung der PLA besonders in Bezug auf die Signaltransduktion vor.

Bekannt ist, daß die Freisetzung von Arachidonsäure durch PLA-Aktivierung die Synthese von ProstaglandinE2 in Mausosteoblasten reguliert, und PDGF die PLA-Aktivierung sehr schnell auslöst (Chen *et al.*, 1997).

Ajubi testete 1999 die mechanische Belastung von Osteozyten durch Fluid Flow und erkannte, daß Calcium und PKC die Phospholipase A, die Arachidonsäure und die Freisetzung von PGE2 stimulieren (Ajubi *et al.*, 1999).

Weitere Ergebnisse zeigen, wie die Rauigkeit von Implantaten, die nachweislich Proliferation und Differenzierung von Osteoblasten beeinflusst, auf MG63-Zellen bei Applikation von 1,25-(OH)(2)D(3) wirkt. Es kommt zu einer Zellantwort der MG63-

Zellen, die durch PLA2 und PKA vermittelt wird, PKC ist hierbei nicht von Bedeutung (Lohmann *et al.*, 1999).

Die Erforschung der mechanischen Belastung von Knochenzellen, insbesondere von Osteoblasten mit hohem Differenzierungspotential, sollte aufgrund der wenigen Erkenntnisse, die man bisher über die Wirkung von PLA in Knochenzellen erlangt hat, weiter vorangetrieben werden. Offensichtlich kommt der Phospholipase A auch im Hinblick auf die Implantatversorgung bei Knochenverletzungen und der Wirkung von Hormonen auf das Knochengewebe eine nicht von der Hand zu weisende wichtige Aufgabe zu, die in Bezug auf Fraktur- und Osteoporosebehandlung von weitreichender Bedeutung sein könnte.

Welche Rolle Hydrostatischer Druck, der in geringer physiologischer Menge in jedem Organismus vorhanden ist, bei der Mechanotransduktion in Knochenzellen spielt, ist bisher noch nicht ausreichend erforscht worden. Auch hier gibt es unterschiedliche Auffassungen darüber, ob Hydrostatischer Druck überhaupt eine signifikante Änderung bei der Signaltransduktion *in vivo* bewirken kann.

Nachdem festgestellt worden war, daß akkustische Überstimulation einen Anstieg an intrazellulärem Calcium in den äußeren Haarzellen des Corti-Organs bewirkt, erkannte man, daß diese Zellen mechanosensitiv reagieren und versuchte, dieses Ergebnis auf ähnliche Vorgänge zu übertragen. Conradi übte daraufhin stark erhöhten statischen Druck auf die sensorischen äußeren Haarzellen des Corti-Organs aus und stellte fest, daß diese Veränderung keinen Einfluß auf die funktionelle Integrität der Haarzellen hat (Conradi & Ulfendahl, 1999). Macdonald hingegen erkannte, daß sich die mechanosensitiven Reaktionen von sensorischen Zellen, wie sie z.B. in den Balanceorganen („Fühlern“) der Krabbe zu finden sind, auf den Bereich von „micro-pressures“ beschränken. Übertragen auf Osteoblasten kann man vermuten, daß eine geringe Veränderung des physiologisch vorhandenen Hydrostatischen Drucks eine Mechanotransduktion bewirken kann und so zur Proliferation und Differenzierung führt. Da allerdings Messungen im Bereich von wenigen kPa durchgeführt werden müssen, dürften kaum Geräte zur präzisen Messung der Reaktionen existieren, müßten also noch entwickelt werden. Außerdem kann nicht ausgeschlossen werden, daß bei der Applikation von „micro-pressures“ Scherkräfte und Dehnung entstehen,

die ebenfalls die Mechanotransduktion beeinflussen und somit zu einem verfälschten Ergebnis führen können (Macdonald & Fraser, 1999).

Die Rolle von mechano-sensitiven Ionenkanälen in der Mechanotransduktion ist bisher vielfach nachgewiesen und diskutiert worden. Die Wirkungsweise der mechano-sensitiven Ionenkanäle in Osteoblasten wurde bisher allerdings noch nicht weitreichend erforscht. Am Beispiel der häufig nachgewiesenen Mechanotransduktion in sensorischen Haarzellen von Vertebraten wird deutlich, daß mehrere Hypothesen über die mechanisch ausgelöste Aktivierung und Inaktivierung von Ionenkanälen bestehen, und man nicht davon ausgehen kann, diese Ergebnisse ohne weiteres auf andere Zellen übertragen zu können (Punkt 1.3).

Bei sensorischen Haarzellen z.B. sind Stereocilien verantwortlich für die mechanosensitive Transduktion von Signalen. Die „gating-spring“-Hypothese besagt, daß feine Filamente, die „tip-links“, direkt mit mechanosensitiven Ionenkanälen in Verbindung stehen und wie eine Sprungfeder agieren, die die Ionenkanäle öffnet, wenn die Stereocilien mechanisch gedehnt werden (Abb.2).

Eine weitere Hypothese besagt, daß Cilium-zu-Cilium-Membranverbindungen nahe der „tips“ bestehen, die bei Dehnung mechanosensitive Ionenkanäle aktivieren (Nicolson *et al.*, 1998). Verschiedene Thesen über die Aktivierung und Inaktivierung mechano-sensitiver Ionenkanäle unterschiedlicher Zelltypen wurden bisher aufgestellt, wobei man unterschiedliche Öffnungsmechanismen der Ionenkanäle verschiedener Zelltypen feststellen konnte. Welcher Mechanismus bei Osteoblasten nach Dehnung zur Wirkung kommt, wurde zwar 1995 von Duncan & Turner und Jones *et al.* beschrieben, muß aber noch im einzelnen bestätigt werden (Punkt 1.3). Ist die Veränderung der Membranspannung alleine schon für eine ausreichende Aktivität der Ionenkanäle verantwortlich? Wie stark ist das Zytoskelett der Osteoblasten in diese Vorgänge involviert? Welche Abläufe werden durch die veränderte intrazelluläre Calciumkonzentration ausgelöst? Wie wirkt sich die Mechanorezeption durch Ionenkanäle auf die weitere Signaltransduktion und Gen-Expression in Osteoblasten aus und welche Signalwege werden dabei angesprochen und interagieren miteinander? Bisher stehen diese Fragen noch offen und bedürfen in Zukunft noch weiterer Forschung.

Wenig weiß man bisher über die exakte Verbindung zwischen Calcium-Einstrom aus dem Extrazellulärraum und der Calcium-Freisetzung aus intrazellulären Depots, die beide über mechanische Stimulation von Osteoblasten ausgelöst werden. Eine Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Depots mittels Thapsigargin, einem Ca^{2+} -ATPase-Blocker, verursacht z.B. parallel eine erhöhte Ca^{2+} -Durchlässigkeit der Plasmamembran (Duncan *et al.*, 1998). Fluoreszenz-Experimente an primären Osteoblasten zeigten eine Calcium-Translokation durch die Plasmamembran, Thapsigargin verlängerte die Fluoreszenz an der Membran. Man diskutiert nun, ob eine Plasmamembran Ca^{2+} -ATPase an diesen Vorgängen beteiligt ist (Lloyd *et al.*, 1995). Zur vollständigen Aufklärung der Verbindung zwischen extrazellulärem Ca^{2+} -Einstrom und intrazellulärer Ca^{2+} -Freisetzung und speziell der Beteiligung von „second-messenger“-erzeugter gegenüber möglicherweise Ca^{2+} -erzeugter Ca^{2+} -Freisetzung, müssen noch weitere Untersuchungen folgen. Versuche am Aortaendothel von Rindern haben gezeigt, daß durch Flüssigkeitsfluß verursachte Scherkräfte eine oszillierende Erhöhung von intrazellulärem Calcium bewirken, die gleichzeitig zu einer hyperpolarisierenden K^+ -Strömung oder STOC (*spontaneous transient outward current*) führt. Calcium-Anstieg und STOC-Aktivierung sind beide abhängig von Calcium-Einfluß-induzierter Calcium-Freisetzung aus intrazellulären Depots, die durch mechanische Belastung ausgelöst wurde (Hoyer *et al.*, 1998). Auch im Labor Jones wurde an Knochenzellen eine Hyperpolarisierung infolge einer erhöhten intrazellulären Calciumkonzentration nachgewiesen (unveröffentlichte Ergebnisse Labor Jones).

Osteoblasten setzen auf Signale wie mechanische Dehnung und Fluid Flow über einen festgelegten Signalweg bestimmte Gene frei, u.a. für Ca^{2+} -Kanäle (Duncan *et al.*, 1998). Der genaue Zusammenhang zwischen Calciumkanälen, Calcium-Signalen und physiologischer Antwort des Knochengewebes ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Deutlich wird aber, daß Calcium eine wesentliche Rolle in der Signaltransduktion und letztendlich für die Gen-Expression spielt, und daß sicherlich die meisten Signalwege in Osteoblasten mit der Calciumkonzentration direkt oder indirekt in Verbindung gebracht werden können.

Intergrine sind das Verbindungselement zwischen EZM, Proteinen des Zytoskeletts und Aktinfilamenten. Mechanische Belastung verursacht die Deformation der EZM

und daraufhin Konformationsänderung und Clustering der Integrine. Organisation des Zytoskeletts, Phosphorylierung assoziierter Signalmoleküle und Aktivierung von Signalwegen sind die Folge. Die Rolle der Integrine in Bezug auf das Öffnen von Ionenkanälen, das notwendig ist für eine Änderung des Membranpotentials als Antwort auf mechanische Belastung, muß noch vollständig erforscht werden (Salter *et al.*, 1997).

Untersuchungen des Cytokin-induzierten Jak/STAT –Pathways *in vivo* haben ergeben, daß Jaks eine zentrale Rolle in der Signalweiterleitung „down-stream“ der Cytokin-Rezeptoren übernehmen, daß aber STATs eine überraschend geringe Rolle, entgegengesetzt ihrer weitreichenden Aktivierung *in vitro*, spielen. Es wurden viele neue und unerwartete Funktionen für Jaks und STATs identifiziert wie z.B. eine Rolle bei Apoptose und eine Adapterfunktion. Des weiteren hat sich herausgestellt, daß der Jak/STAT-Pathway ein wichtiges regulatorisches System in der Signalübertragung ist. Die molekularen Mechanismen dieses Pathways, die in Zusammenhang mit dem Cytokin-Netzwerk und mit anderen Signalwegen stehen, bedürfen noch weiterer Untersuchungen (Liu *et al.*, 1998)

Cytokine können Knochenbildung verhindern, ein Teil dieses inhibitorischen Effekts beruht in primären menschlichen Osteoblasten nachweislich auf der Produktion von Stickstoffmonoxid. NO scheint einen wesentlichen Effekt auf die skelettale Physiologie auszuüben, und seine Produktion durch Knochenzellen, die Modulation durch andere Signalmoleküle (Hormone, Cytokine) und seine chemischen Interaktionen mit anderen freien Radikalen stellen eine interessante Facette vieler verschiedener miteinander kommunizierender Pathways dar, die das „remodelling“ kontrollieren. Es wird diskutiert, daß NO möglicherweise die Osteoklastenaktivität unterdrückt. Bisher ist sehr wenig bekannt über die skelettalen Effekte von NO *in vivo* (Evans & Ralston, 1996; Collin-Osdoby *et al.*, 1995). Smalt stellte 1997 anhand von Versuchen an Osteoblasten fest, daß zyklische Dehnung weder eine Produktion von PG noch von NO induziert (Smalt *et al.*, 1997). Vorläufige Experimente von Jones widerlegen dies, hier wurde bereits 1 min nach zyklischer Dehnung eine NO-Produktion in Osteoblasten nachgewiesen (unveröffentlichte Ergebnisse Labor Jones).

In Endothelzellen soll Oestrogen die Produktion von NO steigern. Diskutiert wird nun, inwiefern man die Wirkung von Oestrogen auf den Knochen über die Modulation der eNOS-Aktivität in Knochenzellen vermitteln kann.

Wachstumsfaktoren besitzen wichtige regulatorische Eigenschaften für Knochenremodelling und Knochenheilung. In vivo-Studien belegen, daß Wachstumsfaktoren in Zukunft wichtige Kandidaten für die klinische Anwendung in der orthopädischen Behandlung sind. So zeigten mit einer dünnen Keramiksicht überzogene Implantate, die zusätzlich mit TGF- β 1 behandelt wurden, innerhalb einer festgelegten Zeit eine erhöhte mechanische Belastbarkeit und eine stabilere Implantatfixierung in vivo gegenüber der Kontrollgruppe (Lind, 1998).

Die Abwesenheit von PTH in Osteoblasten verursacht ein reduziertes Knochen-„remodelling“. Knochendichte und mechanische Eigenschaften des Knochens werden ebenfalls reduziert. Die offensichtlichen anabolischen Effekte des PTH auf das Knochengewebe versprechen eine mögliche Therapieform für Osteoporose, genauere Untersuchungen müssen aber noch stattfinden, da die Rolle des PTH in der Knochenresorption ebenfalls noch nicht vollständig geklärt ist (Chevalley & Rizzoli, 1999).

Die Bioaktivität von Wachstumsfaktoren konnte ebenfalls anhand von in vivo-Studien mit TGF- β 1 nachgewiesen werden. RhTGF- β 1 Applikation in bikortikale Defekte zeigte eine komplette Knochenheilung innerhalb von 28 Tagen, Kontrolldefekte erreichten nur eine Verknöcherungsrate von 40-50%. Wie bereits in vitro-Studien zeigen diese Ergebnisse, daß TGF- β 1 primär einen proliferativen Effekt auf die Zellen der Osteoblasten-Linie ausübt, allerdings fehlt noch der Gegenbeweis, daß TGF- β 1 in vivo nicht auch inhibitorisch auf knochenbildende Zellen wirken kann (Zellin *et al.*, 1998).

Untersuchungen haben gezeigt, daß Herzmyozyten mechanische Dehnung in Wachstumssignale konvertieren, woraus eine Hypertrophie der Zellen resultiert. Dies bedeutet eine Gewebszunahme infolge von Zellvergrößerung, nicht infolge von Zellteilung, und wird begleitet von Veränderungen in der Gen-Expression. Hypertrophie kann in Herzmuskelzellen auch durch hämodynamische Überlastung verursacht werden. Weitere hypertrophische Stimuli sind Hormone, Cytokine und

Wachstumsfaktoren, die spezifische Wege der Signaltransduktion ansprechen, einen „cross-talk“ der Pathways ermöglichen und so die Morphologie des Phänotyps beeinflussen. Experimente an Herzmyozyten haben ergeben, daß *Ras* die Signale von G-Protein-gekoppelten-Rezeptoren, Wachstumsfaktor-Rezeptoren und Cytokin-Rezeptoren nicht nur über den *Raf*-MEK-ERK-Pathway zum Kern transportiert, sondern auch über verschiedene zytosolische Effektoren (Hefti *et al.*, 1997). Bisher gibt es keine Veröffentlichungen darüber, ob *Ras* auch in Osteoblasten parallel zum MAP-Kinase-Pathway verschiedene zytosolische Effektoren aktiviert und welche Konsequenzen sich daraus für die Gen-Expression und für den Phänotyp ergeben.

Eine Vielzahl an Forschungsergebnissen hat bislang gezeigt, daß die mechanische Dehnung von Osteoblasten eine Veränderung der Gen-Expression hervorruft und somit den Phänotyp des Knochengewebes, d.h. auch die Gewebematrix verändert. Ob die Gen-Expression die Organisation der Gewebematrix reguliert oder ob die Gewebematrix die Gen-Expression kontrolliert ist experimentell noch nicht eindeutig belegt. Momentane Studien gehen von einer reziproken Beziehung beider Möglichkeiten aus (Bidwell *et al.*, 1998).

Verschiedene Hypothesen über die zelluläre Transduktion nach mechanischer Belastung in Osteoblasten mit folgender MAP-Kinase-Aktivierung liegen zur Zeit vor. Scherkräfte und zyklische Dehnung sollen ein Integrin-Clustering hervorrufen, das eine Ansammlung von FAK/*Src* und *Grb2/Sos* bewirkt, die über *Ras* den MAP-Kinase-Pathway in Gang setzen (Punkt 1.6.3.2) (Shyy&Chien, 1997). Versuche an mechanosensitiven Ionenkanälen haben gezeigt, daß sich die Membranspannung bei Dehnung auf Kanäle konzentriert, die mit dem Zytoskelett in Verbindung stehen. Dehnung der Osteoblasten führt zu einem Calciumanstieg aus intrazellulären Depots und einem Calciumeintritt durch die Ionenkanäle. Dieser rapide Calciumanstieg weist auf eine Verbindung zwischen Zytoskelett und Phospholipase C-Pathway hin (Punkt 1.3) (Duncan *et al.*, 1998). PLC aktiviert neben der Calciumausschüttung aus intrazellulären Depots auch PKC (Punkt 2.1.2). Über PKC kann ebenfalls der MAP-Kinase-Pathway in Gang gesetzt werden (Abb.16).

Wachstumsfaktoren aktivieren die MAP-Kinase über den Ras/Raf/MEK-Pathway. PI-3-Kinase wird dabei für eine Wachstumsfaktor-induzierte Änderung des Aktin-

Zytoskeletts benötigt (Punkt 2.3). Diesen Ergebnissen, die alle in der Aktivierung der MAP-Kinase münden, liegen unterschiedliche experimentelle Systeme zu Grunde, die Anlaß zur Diskussion geben. Mechanotransduktion über mechanosensitive Ionenkanäle wurde mittels Patch-clamp-Technik nachgewiesen, dabei führt osmotische Schwellung zur Öffnung der Kanäle. Dieser osmotische Reiz ist allerdings nicht definierbar und nicht vergleichbar mit uniaxialer Dehnung definierter Stärke, bei der es *nicht* zur Öffnung mechanosensitiver Kanäle kommt (unveröffentlichte Ergebnisse Labor Jones). Unter Anwendung von Magnetobeads wurden Knochenzellen einem magnetischen Feld ausgesetzt. Es kam zu einem Integrin-Clustering und zur MAP-Kinase-Aktivierung (Schmidt *et al.*, 1998). Diese Art der mechanischen Belastung ist abzugrenzen von Experimenten mit Fluid Flow oder zyklischer Dehnung von Knochenzellen, da die Definition des mechanischen Reizes bei diesen Versuchen ebenfalls nicht identisch sein kann. Ein direkter Vergleich der Versuchsergebnisse sollte somit immer nur unter Berücksichtigung der angewandten experimentellen Technik erfolgen, um Fehlinterpretationen zu vermeiden.

Die Übertragbarkeit der Ergebnisse von *in vitro*-Studien auf die Abläufe *in vivo* ist wie bereits erwähnt mit Schwierigkeiten behaftet. 1998 wurde eine neue Zelllinie (TF274) entdeckt. Diese Zelllinie wird aus dem menschlichen Knochenmark gewonnen und kann Knochen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* bilden. TF274 weist die Charakteristika des Osteoblasten-Phänotyps auf und repräsentiert durch das knochenbildende Potential eine bestehende Quelle von Zellen, die es ermöglicht, Osteoblastendifferenzierung im menschlichen Knochengewebe sowohl *in vivo* als auch *in vitro* zu studieren (Prabhakar *et al.*, 1998). Es bedarf aber noch weiterer Studien, um die Effektivität dieser zweigleisigen Anwendung zu bestätigen.

Guldberg beobachtete 1997 *in vivo* die zellulären und mikrostrukturellen Mechanismen, die in künstlichen Knochendefekten, den sogenannten „hydraulic bone chambers“, nach mechanischer Stimulation ablaufen. Er stellte eine Adaptation von Knochengewebe und Knochenzellen an einen kontrollierten mechanischen Stimulus *in vivo* während der Wiederherstellung des Knochengewebes fest. Dieses „hydraulic bone chamber“ wird momentan als effizientes experimentelles Modell für

Studien über mechanische und biologische Abläufe in Zusammenhang mit der Knochenregeneration eingeführt (Guldberg *et al.*, 1997) .

Die Bandbreite der Forschungsthemen unter dem Aspekt der Mechanotransduktion in Osteoblasten sollte anhand der vorangegangenen Betrachtungen deutlich zum Vorschein gekommen sein.

Die Vielzahl der Forschungsansätze und Ergebnisse verglichen mit den Fragen und Diskussionen, die sich daraus ergeben, deutet darauf hin, daß es in naher Zukunft sicherlich nicht zu einer vollständigen Aufklärung der mechanisch induzierten Signaltransduktion in Osteoblasten kommen wird.

Wichtig im Zusammenhang mit den Forschungsergebnissen ist sicherlich immer die kritische Betrachtung von Material und Methode der Versuche, da diese Parameter zum überwiegenden Teil ausschlaggebend für die Aussagekräftigkeit eines Experimentes sind.

Die Erkenntnisse, die bislang im Hinblick auf mechanische Stimulation von Knochengewebe erzielt wurden, stellen eine wichtige Grundlage für die klinischen Behandlungsverfahren von Osteoporose und Frakturen dar. Je stärker die Zusammenhänge auf molekularer Basis deutlich werden, desto erfolgreicher wird die klinische Therapie verlaufen.

IV. Zusammenfassung

Knochengewebe ist ein hochspezialisiertes Gewebe, das einer permanenten zellulären Aktivität unterliegt. Dies ist die Voraussetzung für den Wachstumsprozeß und „modelling“ zu einem ausgereiften Knochenskelett. Nach Vollendung des Längenwachstums setzt der Prozeß des „remodellings“ ein, d.h. Knochenbildung durch Osteoblasten und Knochenresorption durch Osteoklasten.

Ein Anstieg an durchschnittlicher mechanischer Belastung führt zu einer erhöhten Zellproliferation und Differenzierung der Osteoblasten. Ein Abfall der mechanischen Belastung führt zu verminderter Zellantwort und begünstigt katabolische Prozesse, so daß das Gewebe degenerieren kann. Katabolische und anabolische Effekte hängen neben der mechanischen Belastung auch von anderen Faktoren wie z.B. den Hormonen ab. Die intrazellulären Signalwege, die durch mechanische Belastung und Hormone ausgelöst werden, interagieren vielfältig miteinander und führen zum Teil gemeinsam zur Gen-Expression, d.h. zur letztendlichen Gestaltung des Phänotyps der Osteoblasten. Eine zu hohe mechanische Belastung kann eine Fehlentwicklung des Gewebes hervorrufen und wirkt somit anabolischen Prozessen entgegen.

Die Mechanotransduktion gliedert sich in die Mechanorezeption, die Signaltransduktion zum Kern und die Gen-Expression.

Über die Mechanorezeption werden mechanisch induzierte Signale an der Zellmembran registriert und an das Zellinnere weitergeleitet. Die Signaltransduktion zum Kern erfolgt über verschiedene „second messenger“, die unterschiedliche Signalwege aktivieren. Diese Signalwege interagieren vielfach miteinander und vermitteln die Gen-Expression im Kern, die eine Proliferation oder Differenzierung und somit eine Veränderung des Phänotyps der Osteoblasten bewirkt. Mechanisch induzierte Proliferation und Differenzierung der Osteoblasten führt unter physiologischen Verhältnissen zu einer Verdichtung der Knochenmasse. Dieser Effekt spielt eine wichtige Rolle bei der Behandlung von Osteoporosepatienten, die eine verminderte Knochendichte aufweisen. Mechanische Belastung von Knochenzellen hat sich ebenfalls bei der Behandlung von Frakturen und Knochendefekten als eine mögliche Therapieform herausgestellt, da unter

physiologischen Bedingungen Knochenwachstum induziert wird, und so der Heilungsprozeß schneller vorangetrieben werden kann.

Um die klinischen Behandlungsmethoden in Zukunft noch effektiver gestalten zu können, ist es nötig, die molekularen Mechanismen des Knochens noch präziser zu definieren. Aus diesem Grund wird die Forschung auf dem Gebiet der Mechanotransduktion in Osteoblasten weiterhin eine wesentliche Herausforderung bleiben.

V. Literatur

- AJOUZ B., BERRIER C., GARRIGUES A., BESNARD M. & GHAZI A. (1998) Release of thioredoxin via the mechanosensitive channel MscL during osmotic downshock of Escherichia coli cells. *J.Biol.Chem.* **273**, 26670-26674.
- AJUBI N.E., KLEIN-NULEND J., ALBLAS M.J., BURGER E.H. & NIJWEIDE P.J. (1999) Signal transduction pathways involved in fluid flow-induced PGE2 production by cultured osteocytes. *Am.J.Physiol.* **276**, E171-E178
- AKIYAMA H., SHIGENO C., IYAMA K., ITO H., HIRAKI Y., KONISHI J. & NAKAMURA T. (1999) Indian hedgehog in the late-phase differentiation in mouse chondrogenic EC cells, ATDC5: upregulation of type X collagen and osteoprotegerin ligand mRNAs. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **257**, 814-820.
- ANDERSON D., KOCH C.A., GREY L., ELLIS C., MORAN M.F. & PAWSON T. (1990) Binding of SH2 domains of phospholipase C gamma 1, GAP, and Src to activated growth factor receptors. *Science* **250**, 979-982.
- AUBIN J.E. & BONNELYE E. (2000) Osteoprotegerin and its ligand: A new paradigm for regulation of osteoclastogenesis and bone resorption. *Medscape.Womens.Health 2000.Mar.;*5.(2.):5. **5**, 5
- BARAKAT A.I. & DAVIES P.F. (1998) Mechanisms of shear stress transmission and transduction in endothelial cells. *Chest* **114**, 58S-63S.
- BARINAGA M. (1995) Cell biology - 2 major signaling pathways meet at map-kinase. *Science* **269**, 1673-1673.
- BASSETT C.A.L. & BECKER R.O. (1962) Generation of Electric Potentials by Bone in Response to Mechanical stress. *Science* **137**, 1063-1064.
- BELLIDO T., BORBA V.Z., ROBERSON P. & MANOLAGAS S.C. (1997) Activation of the Janus kinase/STAT (signal transducer and activator of transcription) signal transduction pathway by interleukin-6-type cytokines promotes osteoblast differentiation. *Endocrinology* **138**, 3666-3676.
- BERK B.C., CORSON M.A., PETERSON T.E. & TSENG H. (1995) Protein kinases as mediators of fluid shear stress stimulated signal transduction in endothelial cells: a hypothesis for calcium-dependent and calcium-independent events activated by flow. *J.Biomech.* **28**, 1439-1450.
- BERRIDGE M.J. (1989) The Albert Lasker Medical Awards. Inositol trisphosphate, calcium, lithium, and cell signaling. *JAMA* **262**, 1834-1841.
- BERRIDGE M.J. (1993) Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* **361**, 315-325.
- BERRIDGE M.J. & IRVINE R.F. (1989) Inositol phosphates and cell signalling. *Nature* **341**, 197-205.

- BIDWELL J.P., ALVAREZ M., FEISTER H., ONYIA J. & HOCK J. (1998) Nuclear matrix proteins and osteoblast gene expression. *J.Bone Miner.Res.* **13**, 155-167.
- BLANK J.L., ROSS A.H. & EXTON J.H. (1991) Purification and characterization of two G-proteins that activate the beta 1 isozyme of phosphoinositide-specific phospholipase C. Identification as members of the Gq class. *J.Biol.Chem.* **266**, 18206-18216.
- BOGUSKI M.S. & MCCORMICK F. (1993) Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature* **366**, 643-654.
- BOGUSLAWSKI G., HALE L.V., YU X.P., MILES R.R., ONYIA J.E., SANTERRE R.F. & CHANDRASEKHAR S. (2000) Activation of osteocalcin transcription involves interaction of protein kinase A- and protein kinase C-dependent pathways. *J.Biol.Chem.* *2000.Jan.14.;275.(2.):999.-1006.* **275**, 999-1006.
- BOWLER W.B., GALLAGHER J.A. & BILBE G. (1998a) G-protein coupled receptors in bone [In Process Citation]. *Front.Biosci.* **3:D769-80**, D769-D780
- BOWLER W.B., GALLAGHER J.A. & BILBE G. (1998b) G-protein coupled receptors in bone [In Process Citation]. *Front.Biosci.* **3:D769-80**, D769-D780
- BURGER E.H. & KLEIN-NULEND J. (1998) Microgravity and bone cell mechanosensitivity. *Bone* **22**, 127S-130S.
- BURRIDGE K., TURNER C.E. & ROMER L.H. (1992) Tyrosine phosphorylation of paxillin and pp125FAK accompanies cell adhesion to extracellular matrix: a role in cytoskeletal assembly. *J.Cell Biol.* **119**, 893-903.
- CALI J.J., ZWAAGSTRA J.C., MONS N., COOPER D.M. & KRUPINSKI J. (1994) Type VIII adenylyl cyclase. A Ca²⁺/calmodulin-stimulated enzyme expressed in discrete regions of rat brain. *J.Biol.Chem.* **269**, 12190-12195.
- CANALIS E., RYDZIEL S., DELANY A.M., VARGHESE S. & JEFFREY J.J. (1995) Insulin-like growth factors inhibit interstitial collagenase synthesis in bone cell cultures. *Endocrinology* **136**, 1348-1354.
- CARPIO L.C. & DZIAK R. (1998a) Activation of phospholipase D signaling pathway by epidermal growth factor in osteoblastic cells. *J.Bone Miner.Res.* **13**, 1707-1713.
- CARPIO L.C. & DZIAK R. (1998b) Phosphatidic acid effects on cytosolic calcium and proliferation in osteoblastic cells. *Prostaglandins Leukot.Essent.Fatty Acids.* **59**, 101-109.
- CARTER-SU C. & SMIT L.S. (1998) Signaling via JAK tyrosine kinases: growth hormone receptor as a model system. *Recent.Prog.Horm.Res.* **53:61-82; discussion 82-3**, 61-82.

- CARVALHO R.S., SCOTT J.E., SUGA D.M. & YEN E.H.K. (1994) Stimulation of signal-transduction pathways in osteoblasts by mechanical strain potentiated by parathyroid-hormone. *Journal Of Bone And Mineral Research* **9**, 999-1011.
- CENTRELLA M., JI C. & MCCARTHY T.L. (1998) Control of TGF-beta receptor expression in bone [In Process Citation]. *Front.Biosci.* **3**:D113-24, D113-D124
- CHAUDHARY L.R. & AVIOLI L.V. (1997) Activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 (ERK1 and ERK2) by FGF-2 and PDGF-BB in normal human osteoblastic and bone marrow stromal cells: differences in mobility and in-gel renaturation of ERK1 in human, rat, and mouse osteoblastic cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **238**, 134-139.
- CHEN N.X., RYDER K.D., PAVALKO F.M., TURNER C.H., BURR D.B., QIU J. & DUNCAN R.L. (2000) Ca(2+) regulates fluid shear-induced cytoskeletal reorganization and gene expression in osteoblasts. *Am.J.Physiol.Cell Physiol.* 2000.May.; 278.(5.):C989.-97. **278**, C989-C997
- CHEN Q.R., MIYAURA C., HIGASHI S., MURAKAMI M., KUDO I., SAITO S., HIRAIDE T., SHIBASAKI Y. & SUDA T. (1997) Activation of cytosolic phospholipase A2 by platelet-derived growth factor is essential for cyclooxygenase-2-dependent prostaglandin E2 synthesis in mouse osteoblasts cultured with interleukin-1. *J.Biol.Chem.* **272**, 5952-5958.
- CHEVALLEY T. & RIZZOLI R. (1999) [Bone and hormones. Effects of parathyroid hormone on the bone]. *Presse Med.* **28**, 547-553.
- CLARK E.A. & BRUGGE J.S. (1995) Integrins and signal-transduction pathways - the road taken. *Science* **268**, 233-239.
- COLLIN-OSDOBY P., NICKOLS G.A. & OSDOBY P. (1995) Bone cell function, regulation, and communication: a role for nitric oxide. *J.Cell Biochem.* **57**, 399-408.
- CONRADI P. & ULFENDAHL M. (1999) Outer hair cells isolated from the organ of corti exposed to increased hydrostatic pressure. *ORL J.Otorhinolaryngol.Relat.Spec.* **61**, 57-62.
- COWIN S.C. (1998) On mechanosensation in bone under microgravity. *Bone* **22**, 119S-125S.
- D'SOUZA S.E., HAAS T.A., PIOTROWICZ R.S., BYERS-WARD V., MCGRATH D.E., SOULE H.R., CIERNIEWSKI C., PLOW E.F. & SMITH J.W. (1994) Ligand and cation binding are dual functions of a discrete segment of the integrin beta 3 subunit: cation displacement is involved in ligand binding. *Cell* **79**, 659-667.
- DANEN E.H., LAFRENIE R.M., MIYAMOTO S. & YAMADA K.M. (1998) Integrin signaling: cytoskeletal complexes, MAP kinase activation, and regulation of gene expression. *Cell Adhes.Commun.* **6**, 217-224.

- DEL PESO L., HERNANDEZ R., ESTEVE P. & LACAL J.C. (1996) Activation of phospholipase D by ras proteins is independent of protein kinase C. *J.Cell Biochem.* **61**, 599-608.
- DELANY A.M., RYDZIEL S. & CANALIS E. (1996) Autocrine down-regulation of collagenase-3 in rat bone cell cultures by insulin-like growth factors. *Endocrinology* **137**, 4665-4670.
- DONAHUE H.J. (2000) Gap junctions and biophysical regulation of bone cell differentiation. *Bone* 2000.May.;26.(5.):417.-22. **26**, 417-422.
- DONAHUE H.J., ZHOU Z., LI Z. & MCCAULEY L.K. (1997) Age-related decreases in stimulatory G protein-coupled adenylate cyclase activity in osteoblastic cells. *Am.J.Physiol.* **273**, E776-E781
- DUNCAN R. & MISLER S. (1989) Voltage-activated and stretch-activated Ba⁺⁺ conducting channels in an osteoblast-like cell line (UMR 106). *FEBS Lett.* **251**, 17-21.
- DUNCAN R.L., AKANBI K.A. & FARACH-CARSON M.C. (1998) Calcium signals and calcium channels in osteoblastic cells. *Semin.Nephrol.* **18**, 178-190.
- DUNCAN R.L. & TURNER C.H. (1995) Mechanotransduction and the functional response of bone to mechanical strain. *Calcif.Tissue Int.* **57**, 344-358.
- ENDO T.A., MASUHARA M., YOKOUCHI M., SUZUKI R., SAKAMOTO H., MITSUI K., MATSUMOTO A., TANIMURA S., OHTSUBO M., MISAWA H., MIYAZAKI T., LEONOR N., TANIGUCHI T., FUJITA T., KANAKURA Y., KOMIYA S. & YOSHIMURA A. (1997) A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases. *Nature* **387**, 921-924.
- ENDO H., SASAKI H., MARUYAMA K., TAKEYAMA K., WAGA I., SHIMIZU T., KATO S. & KAWASHIMA H. (1997) Rapid activation of MAP kinase by estrogen in the bone cell line. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **235**, 99-102.
- ERIKSEN E.F. & LANGDAHL B.L. (1997) The pathogenesis of osteoporosis. *Horm.Res.* **48 Suppl 5:78-82**, 78-82.
- ERLEBACHER A., FILVAROFF E.H., YE J.Q. & DERYNCK R. (1998) Osteoblastic responses to TGF-beta during bone remodeling. *Mol.Biol.Cell* **9**, 1903-1918.
- EVANS D.M. & RALSTON S.H. (1996) Nitric-oxide and bone. *Journal Of Bone And Mineral Research* **11**, 300-305.
- FITZGERALD J. & HUGHES-FULFORD M. (1999) Mechanically induced c-fos expression is mediated by cAMP in MC3T3-E1 osteoblasts. *FASEB J.* **13**, 553-557.

- FRANCESCHI R.T. (1999) The developmental control of osteoblast-specific gene expression: role of specific transcription factors and the extracellular matrix environment. *Crit.Rev.Oral Biol.Med.* **10**, 40-57.
- FROST J.A., XU S., HUTCHISON M.R., MARCUS S. & COBB M.H. (1996) Actions of Rho family small G proteins and p21-activated protein kinases on mitogen-activated protein kinase family members. *Mol.Cell Biol.* **16**, 3707-3713.
- FUJIMOTO R., TANIZAWA T., NISHIDA S., YAMAMOTO N., SOSHI S., ENDO N. & TAKAHASHI H.E. (1999) Local effects of transforming growth factor-beta1 on rat calvaria: changes depending on the dose and the injection site. *J.Bone Miner.Metab.* **17**, 11-17.
- FUJITANI Y., HIBI M., FUKADA T., TAKAHASHI-TEZUKA M., YOSHIDA H., YAMAGUCHI T., SUGIYAMA K., YAMANAKA Y., NAKAJIMA K. & HIRANO T. (1997) An alternative pathway for STAT activation that is mediated by the direct interaction between JAK and STAT. *Oncogene* **14**, 751-761.
- GALOU M., GAO J., HUMBERT J., MERICKSKAY M., LI Z., PAULIN D. & VICART P. (1997) The importance of intermediate filaments in the adaptation of tissues to mechanical stress: evidence from gene knockout studies. *Biol.Cell* **89**, 85-97.
- GHAZI A., BERRIER C., AJOUZ B. & BESNARD M. (1998) Mechanosensitive ion channels and their mode of activation. *Biochimie* **80**, 357-362.
- GOAD D.L. & TASHJIAN A.H.J. (1993) Insulin-like growth factor-I inhibits parathyroid hormone-stimulated and enhances prostaglandin E2-stimulated adenosine 3',5'-monophosphate production by human osteoblast-like SaOS-2 cells. *Endocrinology* **133**, 1585-1592.
- GOLDBERG D., POLLY P., EISMAN J.A. & MORRISON N.A. (1996) Identification of an osteocalcin gene promoter sequence that binds AP1. *J.Cell Biochem.* **60**, 447-457.
- GOODYEAR L.J., CHANG P.Y., SHERWOOD D.J., DUFRESNE S.D. & MOLLER D.E. (1996) Effects of exercise and insulin on mitogen-activated protein kinase signaling pathways in rat skeletal muscle. *Am.J.Physiol.* **271**, E403-E408
- GRABER S.G. (1997) G-Proteins: An Introduction. *Calbiochem 1999*, **6**
- GRZESIK W.J. (1997) Integrins and bone--cell adhesion and beyond. *Arch.Immunol.Ther.Exp.(Warsz.)* **45**, 271-275.
- GU L., LIU W. & MARTINAC B. (1998) Electromechanical coupling model of gating the large mechanosensitive ion channel (MscL) of Escherichia coli by mechanical force. *Biophys.J.* **74**, 2889-2902.

- GUHARAY F. & SACHS F. (1984) Stretch-activated single ion channel currents in tissue-cultured embryonic chick skeletal muscle. *J.Physiol.(Lond.)* **352:685-701**, 685-701.
- GULDBERG R.E., CALDWELL N.J., GUO X.E., GOULET R.W., HOLLISTER S.J. & GOLDSTEIN S.A. (1997) Mechanical stimulation of tissue repair in the hydraulic bone chamber. *J.Bone Miner.Res.* **12**, 1295-1302.
- HABEL B. & GLASER R. (1998) Human osteoblast-like cells respond not only to the extracellular calcium concentration but also to its changing rate. *Eur.Biophys.J.* **27**, 411-416.
- HAMILL O.P. & MCBRIDE D.W.J. (1997) Induced membrane hypo/hyper-mechanosensitivity: a limitation of patch-clamp recording. *Annu.Rev.Physiol.* **59:621-31**, 621-631.
- HARADA H., TAGASHIRA S., FUJIWARA M., OGAWA S., KATSUMATA T., YAMAGUCHI A., KOMORI T. & NAKATSUKA M. (1999) Cbfa1 isoforms exert functional differences in osteoblast differentiation. *J.Biol.Chem.* **274**, 6972-6978.
- HEFTI M.A., HARDER B.A., EPPENBERGER H.M. & SCHAUB M.C. (1997) Signaling pathways in cardiac myocyte hypertrophy. *J.Mol.Cell Cardiol.* **29**, 2873-2892.
- HEIM M.H. (1999) The Jak-STAT pathway: cytokine signalling from the receptor to the nucleus. *J.Recept.Signal.Transduct.Res.* **19**, 75-120.
- HEIST E.K. & SCHULMAN H. (1998) The role of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases within the nucleus. *Cell Calcium* **23**, 103-114.
- HIKIJ H., SHIN W.S., OIDA S., TAKATO T., KOIZUMI T. & TOYO-OKA T. (1997) Direct action of nitric oxide on osteoblastic differentiation. *FEBS Lett.* **410**, 238-242.
- HIPPENSTIEL S., KRATZ T., KRULL M., SEYBOLD J., VON EICHEL-STREIBER C. & SUTTORP N. (1998) Rho protein inhibition blocks protein kinase C translocation and activation. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **245**, 830-834.
- HIPSKIND R.A. & BILBE G. (1998) MAP kinase signaling cascades and gene expression in osteoblasts [In Process Citation]. *Front.Biosci.* **3:D804-16**, D804-D816
- HOCK J.M., CENTRELLA M. & CANALIS E. (1988) Insulin-like growth factor I has independent effects on bone matrix formation and cell replication. *Endocrinology* **122**, 254-260.
- HODGKIN M.N., CLARK J.M., ROSE S., SAQIB K. & WAKELAM M.J. (1999) Characterization of the regulation of phospholipase D activity in the detergent-insoluble fraction of HL60 cells by protein kinase C and small G-proteins. *Biochem.J.* **339**, 87-93.

- HOFBAUER L.C., KHOSLA S., DUNSTAN C.R., LACEY D.L., BOYLE W.J. & RIGGS B.L. (2000) The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. *J.Bone Miner.Res.* 2000.Jan.;15.(1.):2-12. **15**, 2-12.
- HOPYAN S., GOKGOZ N., BELL R.S., ANDRULIS I.L., ALMAN B.A. & WUNDER J.S. (1999) Expression of osteocalcin and its transcriptional regulators core-binding factor alpha 1 and MSX2 in osteoid-forming tumours. *J.Orthop.Res.* **17**, 633-638.
- HOYER J., KOHLER R. & DISTLER A. (1998) Mechanosensitive Ca²⁺ oscillations and STOC activation in endothelial cells. *FASEB J.* **12**, 359-366.
- HU K.Q. & SETTLEMAN J. (1997) Tandem SH2 binding sites mediate the RasGAP-RhoGAP interaction: a conformational mechanism for SH3 domain regulation. *EMBO J.* **16**, 473-483.
- HUDSPETH A.J. & COREY D.P. (1977) Sensitivity, polarity, and conductance change in the response of vertebrate hair cells to controlled mechanical stimuli. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **74**, 2407-2411.
- HULLEY P.A., GORDON F. & HOUGH F.S. (1998) Inhibition of mitogen-activated protein kinase activity and proliferation of an early osteoblast cell line (MBA 15.4) by dexamethasone: role of protein phosphatases. *Endocrinology* **139**, 2423-2431.
- HUNG C.T., ALLEN F.D., POLLACK S.R. & BRIGHTON C.T. (1996) Intracellular Ca²⁺ stores and extracellular Ca²⁺ are required in the real-time Ca²⁺ response of bone cells experiencing fluid flow. *J.Biomech.* **29**, 1411-1417.
- HUNG C.T., HENSHAW D.R., WANG C.C., MAUCK R.L., RAIA F., PALMER G., CHAO P.H., MOW V.C., RATCLIFFE A. & VALHMU W.B. (2000) Mitogen-activated protein kinase signaling in bovine articular chondrocytes in response to fluid flow does not require calcium mobilization. *J.Biomech.* 2000.Jan.;33.(1.):73.-80. **33**, 73-80.
- INGBER D.E. & FOLKMAN J. (1989) Mechanochemical switching between growth and differentiation during fibroblast growth factor-stimulated angiogenesis in vitro: role of extracellular matrix. *J.Cell Biol.* **109**, 317-330.
- ISOGAI Y., AKATSU T., ISHIZUYA T., YAMAGUCHI A., HORI M., TAKAHASHI N. & SUDA T. (1996) Parathyroid hormone regulates osteoblast differentiation positively or negatively depending on the differentiation stages. *J.Bone Miner.Res.* **11**, 1384-1393.
- ITO H., AKIYAMA H., SHIGENO C., IYAMA K., MATSUOKA H. & NAKAMURA T. (1999) Hedgehog signaling molecules in bone marrow cells at the initial stage of fracture repair. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **262**, 443-451.

- JACOBS C.R., YELLOWLEY C.E., DAVIS B.R., ZHOU Z., CIMBALA J.M. & DONAHUE H.J. (1998) Differential effect of steady versus oscillating flow on bone cells. *J.Biomech.* **31**, 969-976.
- JAVED A., GUTIERREZ S., MONTECINO M., VAN WIJNEN A.J., STEIN J.L., STEIN G.S. & LIAN J.B. (1999) Multiple Cbfa/AML sites in the rat osteocalcin promoter are required for basal and vitamin D-responsive transcription and contribute to chromatin organization. *Mol.Cell Biol.* **19**, 7491-7500.
- JILKA R.L., WEINSTEIN R.S., BELLIDO T., PARFITT A.M. & MANOLAGAS S.C. (1998) Osteoblast programmed cell death (apoptosis): modulation by growth factors and cytokines. *J.Bone Miner.Res.* **13**, 793-802.
- JO H., SIPOS K., GO Y.M., LAW R., RONG J. & MCDONALD J.M. (1997) Differential effect of shear stress on extracellular signal-regulated kinase and N-terminal Jun kinase in endothelial cells. Gi₂- and G_β/γ-dependent signaling pathways. *J.Biol.Chem.* **272**, 1395-1401.
- JONES D.B. & BINGMANN D. (1991) How do osteoblasts respond to mechanical stimulation? *Cells and Methods* **1**, 329-340.
- JONES D.B., LEIVSETH G., SAWADA Y., VAN DER SLOTEN J. & BINGMANN D. (1993) Application of homogenous, defined strains to cell cultures. In *Society for Experimental Biology Seminar Series 54: Biomechanics and Cells*. Eds F.Lyall & A.J.El Haj. Cambridge: Cambridge University Press. pp. 197-219.
- JONES D.B., NOLTE H., SCHOLUBBERS J-G., TURNER E. & VELTEL D. (1991) Biochemical signal transduction of mechanical strain in osteoblast-like cells. *Biomaterials* **12**, 101-110.
- JONES D.B. & SCHOLUEBBERS J.G. (1987) Evidence that phospholipase C mediates the mechanical stress effect in bone. *Calcif.Tiss.Int.* **41**, supp p4
- JONES D., LEIVSETH G. & TENBOSCH J. (1995) Mechano-reception in osteoblast-like cells. *Biochem.Cell Biol.* **73**, 525-534.
- KAPLAN A.D., REIMER W.J., FELDMAN R.D. & DIXON S.J. (1995) Extracellular nucleotides potentiate the cytosolic Ca²⁺, but not cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate response to parathyroid hormone in rat osteoblastic cells. *Endocrinology* **136**, 1674-1685.
- KARSENTY G. (1998) Transcriptional regulation of osteoblast differentiation during development [In Process Citation]. *Front.Biosci.* **3:D834-7**, D834-D837
- KATO Y., BANNO Y., DOHJIMA T., KATO N., WATANABE K., TATEMATSU N. & NOZAWA Y. (1997) Involvement of Rho family proteins in prostaglandin F₂ α-induced phospholipase D activation in the osteoblast-like cell line MC3T3-E1. *Prostaglandins* **54**, 475-492.

- KAWANE T. & HORIUCHI N. (1999a) Insulin-like growth factor I suppresses parathyroid hormone (PTH)/PTH-related protein receptor expression via a mitogen-activated protein kinase pathway in UMR-106 osteoblast-like cells. *Endocrinology* **140**, 871-879.
- KAWANE T. & HORIUCHI N. (1999b) Insulin-like growth factor I suppresses parathyroid hormone (PTH)/PTH-related protein receptor expression via a mitogen-activated protein kinase pathway in UMR-106 osteoblast-like cells. *Endocrinology* **140**, 871-879.
- KAWASE T., ORIKASA M., OGURO A. & BURNS D.M. (1999) Possible regulation of epidermal growth factor-receptor tyrosine autophosphorylation by calcium and G proteins in chemically permeabilized rat UMR106 cells. *Arch.Oral Biol.* **44**, 157-171.
- KAWASHIMA K., SHIBATA R., NEGISHI Y. & ENDO H. (1998) Stimulative effect of high-level hypergravity on differentiated functions of osteoblast-like cells. *Cell Struct.Funct.* **23**, 221-229.
- KAWATA A. & MIKUNI-TAKAGAKI Y. (1998) Mechanotransduction in stretched osteocytes--temporal expression of immediate early and other genes. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **246**, 404-408.
- KIRKWOOD K.L., DZIAK R. & BRADFORD P.G. (1996) Inositol trisphosphate receptor gene expression and hormonal regulation in osteoblast-like cell lines and primary osteoblastic cell cultures. *J.Bone Miner.Res.* **11**, 1889-1896.
- KLEIN-NULEND J., HELFRICH M.H., STERCK J.G., MACPHERSON H., JOLDERSMA M., RALSTON S.H., SEMEINS C.M. & BURGER E.H. (1998) Nitric oxide response to shear stress by human bone cell cultures is endothelial nitric oxide synthase dependent. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **250**, 108-114.
- KLEIN-NULEND J., SEMEINS C.M., AJUBI N.E., NIJWEIDE P.J. & BURGER E.H. (1995) Pulsating fluid flow increases nitric oxide (NO) synthesis by osteocytes but not periosteal fibroblasts--correlation with prostaglandin upregulation. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **217**, 640-648.
- KOCH C.A., ANDERSON D., MORAN M.F., ELLIS C. & PAWSON T. (1991) SH2 and SH3 domains: elements that control interactions of cytoplasmic signaling proteins. *Science* **252**, 668-674.
- KOHLER R., DISTLER A. & HOYER J. (1998) Pressure-activated cation channel in intact rat endocardial endothelium. *Cardiovasc.Res.* **38**, 433-440.
- KOUTALOS Y. (1999) Intracellular spreading of second messengers. *J.Physiol.(Lond.)* **519**, 629
- KRAUSS, G. (1997) Biochemie der Regulation und Signaltransduktion
- LANCASTER C.A., TAYLOR-HARRIS P.M., SELF A.J., BRILL S., VAN ERP H.E. & HALL A. (1994) Characterization of rhoGAP. A GTPase-activating protein for rho-related small GTPases. *J.Biol.Chem.* **269**, 1137-1142.

- LANYON L.E. (1984) Functional strain as a determinant for bone remodeling. *Calcif.Tiss.Int.* **36**, 556-561.
- LE MELLAY V., GROSSE B. & LIEBERHERR M. (1997) Phospholipase C beta and membrane action of calcitriol and estradiol. *J.Biol.Chem.* **272**, 11902-11907.
- LEBLANC A.D., SCHNEIDER V.S., EVANS H.J., ENGELBRETSON D.A. & KREBS J.M. (1990) Bone mineral loss and recovery after 17 weeks of bed rest. *J.Bone Miner.Res.* **5**, 843-850.
- LEBLANC V., TOCQUE B. & DELUMEAU I. (1998) Ras-GAP controls Rho-mediated cytoskeletal reorganization through its SH3 domain. *Mol.Cell Biol.* **18**, 5567-5578.
- LEEVERS S.J., PATERSON H.F. & MARSHALL C.J. (1994) Requirement for Ras in Raf activation is overcome by targeting Raf to the plasma membrane. *Nature* **369**, 411-414.
- LEHOUX S. & TEDGUI A. (1998) Signal transduction of mechanical stresses in the vascular wall. *Hypertension* **32**, 338-345.
- LEVINA N., TOTEMEYER S., STOKES N.R., LOUIS P., JONES M.A. & BOOTH I.R. (1999) Protection of Escherichia coli cells against extreme turgor by activation of MscS and MscL mechanosensitive channels: identification of genes required for MscS activity. *EMBO J.* **18**, 1730-1737.
- LIND M. (1996) Growth factors: possible new clinical tools. A review. *Acta orthop.scand.* **67**, 407-417.
- LIND M. (1998) Growth factor stimulation of bone healing. Effects on osteoblasts, osteomies, and implants fixation. *Acta Orthop.Scand.Suppl.* **283:2-37**, 2-37.
- LISCOVITCH M. (1996) Phospholipase D: role in signal transduction and membrane traffic. *J.Lipid Mediat.Cell Signal.* **14**, 215-221.
- LIU K.D., GAFFEN S.L. & GOLDSMITH M.A. (1998) JAK/STAT signaling by cytokine receptors. *Curr.Opin.Immunol.* **10**, 271-278.
- LLOYD Q.P., KUHN M.A. & GAY C.V. (1995) Characterization of calcium translocation across the plasma membrane of primary osteoblasts using a lipophilic calcium-sensitive fluorescent dye, calcium green C18. *J.Biol.Chem.* **270**, 22445-22451.
- LOHMANN C.H., SAGUN R.J., SYLVIA V.L., COCHRAN D.L., DEAN D.D., BOYAN B.D. & SCHWARTZ Z. (1999) Surface roughness modulates the response of MG63 osteoblast-like cells to 1,25-(OH)(2)D(3) through regulation of phospholipase A(2) activity and activation of protein kinase A. *J.Biomed.Mater.Res.* **47**, 139-151.
- LOZA J., CARPIO L., LAWLESS G., MARZEC N. & DZIAK R. (1995a) Role of extracellular calcium influx in EGF-induced osteoblastic cell proliferation. *Bone* **16**, 341S-347S.

- LOZA J., MARZEC N., SIMASKO S. & DZIAK R. (1995b) Role of epidermal growth factor-induced membrane depolarization and resulting calcium influx in osteoblastic cell proliferation. *Cell Calcium* **17**, 301-306.
- MACDONALD A.G. & FRASER P.J. (1999) The transduction of very small hydrostatic pressures. *Comp.Biochem.Physiol.A.Mol.Integr.Physiol.* **122**, 13-36.
- MACDONALD B.R., GALLAGHER J.A. & RUSSELL R.G. (1986) Parathyroid hormone stimulates the proliferation of cells derived from human bone. *Endocrinology* **118**, 2445-2449.
- MARAIS R., LIGHT Y., MASON C., PATERSON H., OLSON M.F. & MARSHALL C.J. (1998) Requirement of Ras-GTP-Raf complexes for activation of Raf-1 by protein kinase C [published erratum appears in *Science* 1998 May 15;280(5366):987]. *Science* **280**, 109-112.
- MARSHALL M. (1995) Interactions between Ras and Raf: key regulatory proteins in cellular transformation. *Mol.Reprod.Dev.* **42**, 493-499.
- MARTINAC B., ADLER J. & KUNG C. (1990) Mechanosensitive ion channels of *E. coli* activated by amphipaths. *Nature*, **348**:261-263,.
- MATSUDA N., MORITA N., MATSUDA K. & WATANABE M. (1998) Proliferation and differentiation of human osteoblastic cells associated with differential activation of MAP kinases in response to epidermal growth factor, hypoxia, and mechanical stress in vitro. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **249**, 350-354.
- MCCORMICK F. (1995) Ras-related proteins in signal transduction and growth control. *Mol.Reprod.Dev.* **42**, 500-506.
- MEAZZINI M.C., TOMA C.D., SCHAFFER J.L., GRAY M.L. & GERSTENFELD L.C. (1998) Osteoblast cytoskeletal modulation in response to mechanical strain in vitro. *J.Orthop.Res.* **16**, 170-180.
- MERTANI H.C., MOREL G. & LOBIE P.E. (1999) Cytoplasmic and nuclear cytokine receptor complexes. *Vitam.Horm.* **57:79-121**, 79-121.
- MEYER U., MEYER T. & JONES D.B. (1997) No mechanical role for vinculin in strain transduction in primary bovine osteoblasts. *Biochem.Cell Biol.* **75**, 81-87.
- MIGLIACCIO S., BERNARDINI S., WETSEL W.C., KORACH K.S., FARAGGIANA T. & TETI A. (1998) Protein kinase C modulates estrogen receptors in differentiated osteoblastic cells in vitro. *Steroids* **63**, 352-354.
- MIKUNI-TAKAGAKI Y. (1999) Mechanical responses and signal transduction pathways in stretched osteocytes. *J.Bone Miner.Metab.* **17**, 57-60.
- MOCHLY-ROSEN D. (1995) Localization of protein kinases by anchoring proteins: a theme in signal transduction. *Science* **268**, 247-251.

- MOODIE S.A., WILLUMSEN B.M., WEBER M.J. & WOLFMAN A. (1993) Complexes of Ras.GTP with Raf-1 and mitogen-activated protein kinase kinase [see comments]. *Science* **260**, 1658-1661.
- MOSS M.L. (1981) Genetics, epigenetics, and causation. *Am.J.Orthod.* **80**, 366-375.
- MOSS M.L. (1997) The functional matrix hypothesis revisited. 1. The role of mechanotransduction. *Am.J.Orthod.Dentofacial.Orthop.* **112**, 8-11.
- MULLENDER M.G. & HUISKES R. (1995) Proposal for the regulatory mechanism of Wolff's law. *J.Orthop.Res.* **13**, 503-512.
- NAKAO M., ONO K., FUJISAWA S. & IJIMA T. (1999) Mechanical stress-induced Ca²⁺ entry and Cl⁻ current in cultured human aortic endothelial cells. *Am.J.Physiol.* **276**, C238-C249
- NARUMIYA S. (1996) The small GTPase Rho: cellular functions and signal transduction. *J.Biochem.(Tokyo.)* **120**, 215-228.
- NEWBERRY E.P., LATIFI T. & TOWLER D.A. (1999) The RRM domain of MINT, a novel Msx2 binding protein, recognizes and regulates the rat osteocalcin promoter. *Biochemistry* **38**, 10678-10690.
- NEWTON A.C. (1995) Protein kinase C: structure, function, and regulation. *J.Biol.Chem.* **270**, 28495-28498.
- NICOLSON T., RUSCH A., FRIEDRICH R.W., GRANATO M., RUPPERSBERG J.P. & NUSSLEIN-VOLHARD C. (1998) Genetic analysis of vertebrate sensory hair cell mechanosensation: the zebrafish circler mutants. *Neuron* **20**, 271-283.
- NISHIZUKA Y. (1984a) The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature* **308**, 693-698.
- NISHIZUKA Y. (1984b) Turnover of inositol phospholipids and signal transduction. *Science* **225**, 1365-1370.
- NISHIZUKA Y. (1992) Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* **258**, 607-614.
- OGATA Y., YAMAUCHI M., KIM R.H., LI J.J., FREEDMAN L.P. & SODEK J. (1995) Glucocorticoid regulation of bone sialoprotein (BSP) gene expression. Identification of a glucocorticoid response element in the bone sialoprotein gene promoter. *Eur.J.Biochem.* **230**, 183-192.
- OLSON M.F., ASHWORTH A. & HALL A. (1995) An essential role for Rho, Rac, and Cdc42 GTPases in cell cycle progression through G1. *Science* **269**, 1270-1272.
- ONISHI M., NOSAKA T. & KITAMURA T. (1998) Cytokine receptors: structures and signal transduction. *Int.Rev.Immunol.* **16**, 617-634.

- OWAN I., BURR D.B., TURNER C.H., QIU J., TU Y., ONYIA J.E. & DUNCAN R.L. (1997) Mechanotransduction in bone: osteoblasts are more responsive to fluid forces than mechanical strain. *Am.J.Physiol.* **273**, C810-C815
- PAN J., FUKUDA K., SAITO M., MATSUZAKI J., KODAMA H., SANO M., TAKAHASHI T., KATO T. & OGAWA S. (1999) Mechanical stretch activates the JAK/STAT pathway in rat cardiomyocytes. *Circ.Res.* **84**, 1127-1136.
- PARTRIDGE N.C., BLOCH S.R. & PEARMAN A.T. (1994) Signal transduction pathways mediating parathyroid hormone regulation of osteoblastic gene expression. *J.Cell Biochem.* **55**, 321-327.
- PAUL A., WILSON S., BELHAM C.M., ROBINSON C.J., SCOTT P.H., GOULD G.W. & PLEVIN R. (1997) Stress-activated protein kinases: activation, regulation and function. *Cell Signal.* **9**, 403-410.
- PAVALKO F.M., CHEN N.X., TURNER C.H., BURR D.B., ATKINSON S., HSIEH Y.F., QIU J. & DUNCAN R.L. (1998) Fluid shear-induced mechanical signaling in MC3T3-E1 osteoblasts requires cytoskeleton-integrin interactions. *Am.J.Physiol.* **275**, C1591-C1601
- PAVALKO F.M., OTEY C.A., SIMON K.O. & BURRIDGE K. (1991) Alpha-actinin: a direct link between actin and integrins. *Biochem.Soc.Trans.* **19**, 1065-1069.
- PAWSON T., OLIVIER P., ROZAKIS-ADCOCK M., MCGLADE J. & HENKEMEYER M. (1993) Proteins with SH2 and SH3 domains couple receptor tyrosine kinases to intracellular signalling pathways. *Philos.Trans.R.Soc.Lond.B.Biol.Sci.* **340**, 279-285.
- PAWSON T. & SCOTT J.D. (1997) Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. *Science* **278**, 2075-2080.
- PEREIRA R.C., BLANQUAERT F. & CANALIS E. (1999) Cortisol enhances the expression of mac25/insulin-like growth factor- binding protein-related protein-1 in cultured osteoblasts. *Endocrinology* **140**, 228-232.
- PFEFFER L.M., MULLERSMAN J.E., PFEFFER S.R., MURTI A., SHI W. & YANG C.H. (1997) STAT3 as an adaptor to couple phosphatidylinositol 3-kinase to the IFNAR1 chain of the type I interferon receptor. *Science* **276**, 1418-1420.
- PITSILLIDES A.A., RAWLINSON S.C., SUSWILLO R.F., BOURRIN S., ZAMAN G. & LANYON L.E. (1995) Mechanical strain-induced NO production by bone cells: a possible role in adaptive bone (re)modeling? *FASEB J.* **9**, 1614-1622.
- POCKWINSE S.M., STEIN J.L., LIAN J.B. & STEIN G.S. (1995) Developmental stage-specific cellular responses to vitamin D and glucocorticoids during differentiation of the osteoblast phenotype: interrelationship of morphology and gene expression by in situ hybridization. *Exp.Cell Res.* **216**, 244-260.

- PRABHAKAR U., JAMES I.E., DODDS R.A., LEE-RYKACZEWSKI E., RIEMAN D.J., LIPSHUTZ D., TRULLI S., JONAK Z., TAN K.B., DRAKE F.H. & GOWEN M. (1998) A novel human bone marrow stroma-derived cell line TF274 is highly osteogenic in vitro and in vivo. *Calcif.Tissue Int.* **63**, 214-220.
- QIU R.G., CHEN J., KIRN D., MCCORMICK F. & SYMONS M. (1995) An essential role for Rac in Ras transformation. *Nature* **374**, 457-459.
- RAYMOND M.H., SCHUTTE B.C., TORNER J.C., BURNS T.L. & WILLING M.C. (1999) Osteocalcin: genetic and physical mapping of the human gene BGLAP and its potential role in postmenopausal osteoporosis. *Genomics* **60**, 210-217.
- REICH K.M. & FRANGOS J.A. (1993) Protein kinase C mediates flow-induced prostaglandin E2 production in osteoblasts. *Calcif.Tissue Int.* **52**, 62-66.
- REIF K., NOBES C.D., THOMAS G., HALL A. & CANTRELL D.A. (1996) Phosphatidylinositol 3-kinase signals activate a selective subset of Rac/Rho-dependent effector pathways. *Curr.Biol.* **6**, 1445-1455.
- RIZZO M.A., SHOME K., VASUDEVAN C., STOLZ D.B., SUNG T.C., FROHMAN M.A., WATKINS S.C. & ROMERO G. (1999) Phospholipase D and its product, phosphatidic acid, mediate agonist-dependent raf-1 translocation to the plasma membrane and the activation of the mitogen-activated protein kinase pathway. *J.Biol.Chem.* **274**, 1131-1139.
- RIZZO V., MCINTOSH D.P., OH P. & SCHNITZER J.E. (1998a) In situ flow activates endothelial nitric oxide synthase in luminal caveolae of endothelium with rapid caveolin dissociation and calmodulin association. *J.Biol.Chem.* **273**, 34724-34729.
- RIZZO V., SUNG A., OH P. & SCHNITZER J.E. (1998b) Rapid mechanotransduction in situ at the luminal cell surface of vascular endothelium and its caveolae. *J.Biol.Chem.* **273**, 26323-26329.
- RODAN G.A. (1997) Bone mass homeostasis and bisphosphonate action. *Bone* **20**, 1-4.
- RODAN G.A., BOURRET L.A., HARVEY A. & MENSI T. (1975) Cyclic AMP and cyclic GMP: mediators of the mechanical effects on bone remodeling. *Science* **189**, 467-469.
- RODAN G.A. & NODA M. (1991) Gene expression in osteoblastic cells. *Crit.Rev.Eukaryot.Gene Expr.* **1**, 85-98.
- RODAN S.B. & RODAN G.A. (1997) Integrin function in osteoclasts. *J.Endocrinol.* **154 Suppl:**S47-56, S47-S56
- ROELOFSEN J., KLEINNULEND J. & BURGER E.H. (1995) Mechanical stimulation by intermittent hydrostatic compression promotes bone-specific gene-expression in-vitro. *Journal Of Biomechanics* **28**, 1493-1503.

- RUBIN C.T. & LANYON L.E. (1984) Regulation of bone formation by applied dynamic loads. *J.B.J.Surg.* **66A**:397-402.
- RYCHLY J., POMMERENKE H., DURR F., SCHREIBER E. & NEBE B. (1998) Analysis of spatial distributions of cellular molecules during mechanical stressing of cell surface receptors using confocal microscopy. *Cell Biol.Int.* **22**, 7-12.
- SABATINI M., LESUR C., PACHERIE M., PASTOUREAU P., KUCHARCZYK N., FAUCHERE J.L. & BONNET J. (1996) Effects of parathyroid hormone and agonists of the adenylyl cyclase and protein kinase C pathways on bone cell proliferation. *Bone* **18**, 59-65.
- SADOSHIMA J. & IZUMO S. (1993) Mechanical stretch rapidly activates multiple signal transduction pathways in cardiac myocytes: potential involvement of an autocrine/paracrine mechanism. *EMBO J.* **12**, 1681-1692.
- SAKAI K., MOHTAI M. & IWAMOTO Y. (1998) Fluid shear stress increases transforming growth factor beta 1 expression in human osteoblast-like cells: modulation by cation channel blockades. *Calcif.Tissue Int.* **63**, 515-520.
- SALTER D.M., ROBB J.E. & WRIGHT M.O. (1997) Electrophysiological responses of human bone cells to mechanical stimulation: evidence for specific integrin function in mechanotransduction. *J.Bone Miner.Res.* **12**, 1133-1141.
- SALWEN S.A., SZAROWSKI D.H., TURNER J.N. & BIZIOS R. (1998) Three-dimensional changes of the cytoskeleton of vascular endothelial cells exposed to sustained hydrostatic pressure. *Med.Biol.Eng.Comput.* **36**, 520-527.
- SANDY J., DAVIES M., PRIME S. & FARNDAL R. (1998) Signal pathways that transduce growth factor-stimulated mitogenesis in bone cells. *Bone* **23**, 17-26.
- SANDY J.R. & FARNDAL R.W. (1991) Second messengers: regulators of mechanically-induced tissue remodelling. *Eur.J.Orthod.* **13**, 271-278.
- SANYAL A., SARKAR G., SARIS D.B., FITZSIMMONS J.S., BOLANDER M.E. & O'DRISCOLL S.W. (1999) Initial evidence for the involvement of bone morphogenetic protein-2 early during periosteal chondrogenesis. *J.Orthop.Res.* **17**, 926-934.
- SASSE T., BECKER P., DORFLING P., SCHUHR T. & BROCK J. (1998) TGF beta-1 mRNA expression and proliferation of human osteoblastic cells in nonosteoporotic and osteoporotic women under influence of TGF beta-1 and IGF-I. *Calcif.Tissue Int.* **62**, 140-147.
- SASTRY S.K. & HORWITZ A.F. (1993) Integrin cytoplasmic domains: mediators of cytoskeletal linkages and extra- and intracellular initiated transmembrane signaling. *Curr.Opin.Cell Biol.* **5**, 819-831.
- SCHIRRMACHER K., SCHMITZ I., WINTERHAGER E., TRAUB O., BRUMMER F., JONES D. & BINGMANN D. (1992) Characterization of

- gap junctions between osteoblast-like cells in culture. *Calcif.Tissue Int.* **51**, 285-290.
- SCHMIDT C., POMMERENKE H., DURR F., NEBE B. & RYCHLY J. (1998) Mechanical stressing of integrin receptors induces enhanced tyrosine phosphorylation of cytoskeletally anchored proteins. *J.Biol.Chem.* **273**, 5081-5085.
- SCHWARTZ E.A., BIZIOS R., MEDOW M.S. & GERRITSEN M.E. (1999) Exposure of human vascular endothelial cells to sustained hydrostatic pressure stimulates proliferation. Involvement of the alphaV integrins. *Circ.Res.* **84**, 315-322.
- SEGER R. & KREBS E.G. (1995) The MAPK signaling cascade. *FASEB J.* **9**, 726-735.
- SHYY J.Y. & CHIEN S. (1997) Role of integrins in cellular responses to mechanical stress and adhesion. *Curr.Opin.Cell Biol.* **9**, 707-713.
- SIMKIN A., AYALON J. & LEICHTER I. (1987) Increased trabecular bone density due to bone-loading exercises in postmenopausal osteoporotic women. *Calcif.Tissue Int.* **40**:59-63.
- SIMS J.R., KARP S. & INGBER D.E. (1992) Altering the cellular mechanical force balance results in integrated changes in cell, cytoskeletal and nuclear shape. *J.Cell Sci.* **103**, 1215-1222.
- SMITHGALL T.E. (1995) SH2 and SH3 domains: potential targets for anti-cancer drug design. *J.Pharmacol.Toxicol.Methods* **34**, 125-132.
- SOKABE M., NARUSE K., SAI S., YAMADA T., KAWAKAMI K., INOUE M., MURASE K. & MIYAZU M. (1997) Mechanotransduction and intracellular signaling mechanisms of stretch- induced remodeling in endothelial cells. *Heart Vessels Suppl* **12:191-3**, 191-193.
- SOLHEIM E. (1998a) Growth factors in bone. *Int.Orthop.* **22**, 410-416.
- SOLHEIM E. (1998b) Osteoinduction by demineralised bone. *Int.Orthop.* **22**, 335-342.
- STEIN G.S., VAN WIJNEN A.J., STEIN J., LIAN J.B. & MONTECINO M. (1995) Contributions of nuclear architecture to transcriptional control. *Int.Rev.Cytol.* **162A:251-78**, 251-278.
- STOKOE D., MACDONALD S.G., CADWALLADER K., SYMONS M. & HANCOCK J.F. (1994) Activation of Raf as a result of recruitment to the plasma membrane [see comments] [published erratum appears in Science 1994 Dec 16;266(5192):1792-3]. *Science* **264**, 1463-1467.
- SUKHAREV S.I., BLOUNT P., MARTINAC B., BLATTNER F.R. & KUNG C. (1994a) A large-conductance mechanosensitive channel in e. Coli encoded by mscl alone. *Nature* **368**, 265-268.

- SUKHAREV S.I., BLOUNT P., MARTINAC B., BLATTNER F.R. & KUNG C. (1994b) A large-conductance mechanosensitive channel in *E. coli* encoded by *mscL* alone. *Nature* **368**, 265-268.
- TAKAHASHI M., ISHIDA T., TRAUB O., CORSON M.A. & BERK B.C. (1997) Mechanotransduction in endothelial cells: temporal signaling events in response to shear stress. *J.Vasc.Res.* **34**, 212-219.
- TANAKA T., TANIGUCHI Y., GOTOH K., SATOH R., INAZU M. & OZAWA H. (1993) Morphological study of recombinant human transforming growth factor beta 1-induced intramembranous ossification in neonatal rat parietal bone. *Bone* **14**, 117-123.
- TAPON N. & HALL A. (1997) Rho, Rac and Cdc42 GTPases regulate the organization of the actin cytoskeleton. *Curr.Opin.Cell Biol.* **9**, 86-92.
- TAVERNARAKIS N. & DRISCOLL M. (1997) Molecular modeling of mechanotransduction in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Annu.Rev.Physiol.* **59:659-89**, 659-689.
- THUMM S., LOSCHINGER M., GLOCK S., HAMMERLE H. & RODEMANN H.P. (1999) Induction of cAMP-dependent protein kinase A activity in human skin fibroblasts and rat osteoblasts by extremely low-frequency electromagnetic fields [In Process Citation]. *Radiat.Enviro.Biophys.* **38**, 195-199.
- TIBBLES L.A. & WOODGETT J.R. (1999) The stress-activated protein kinase pathways. *Cell Mol.Life Sci.* **55**, 1230-1254.
- TRAUB O., MONIA B.P., DEAN N.M. & BERK B.C. (1997) PKC-epsilon is required for mechano-sensitive activation of ERK1/2 in endothelial cells. *J.Biol.Chem.* **272**, 31251-31257.
- TSAI J.A., LARSSON O. & KINDMARK H. (1999) Spontaneous and stimulated transients in cytoplasmic free Ca(2+) in normal human osteoblast-like cells: aspects of their regulation. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **263**, 206-212.
- TURNER C.H., FORWOOD M.R. & OTTER M.W. (1994) Mechanotransduction in bone - do bone-cells act as sensors of fluid- flow. *Faseb Journal* **8**, 875-878.
- TURNER C.H. & PAVALKO F.M. (1998) Mechanotransduction and functional response of the skeleton to physical stress: the mechanisms and mechanics of bone adaptation. *J.Orthop.Sci.* **3**, 346-355.
- TYSON D.R., SWARTHOUT J.T. & PARTRIDGE N.C. (1999) Increased osteoblastic c-fos expression by parathyroid hormone requires protein kinase A phosphorylation of the cyclic adenosine 3',5'- monophosphate response element-binding protein at serine 133. *Endocrinology* **140**, 1255-1261.
- UENO M., FUKUDA K., OH M., ASADA S., NISHIZAKA F., HARA F. & TANAKA S. (1998) Protein kinase C modulates the synthesis of nitric oxide by osteoblasts. *Calcif.Tissue Int.* **63**, 22-26.

- URIST M.R. (1965) Bone: formation by autoinduction. *Science* **150**, 893-899.
- URIST M.R., MIKULSKI A. & LIETZE A. (1979) Solubilized and insolubilized bone morphogenetic protein. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **76**, 1828-1832.
- VAN'T HOF R.J. & RALSTON S.H. (1997) Cytokine-induced nitric oxide inhibits bone resorption by inducing apoptosis of osteoclast progenitors and suppressing osteoclast activity. *J.Bone Miner.Res.* **12**, 1797-1804.
- VANDERKUR J.A., BUTCH E.R., WATERS S.B., PESSIN J.E., GUAN K.L. & CARTER-SU C. (1997) Signaling molecules involved in coupling growth hormone receptor to mitogen-activated protein kinase activation. *Endocrinology* **138**, 4301-4307.
- VICO L., LAFAGE-PROUST M.H. & ALEXANDRE C. (1998) Effects of gravitational changes on the bone system in vitro and in vivo. *Bone* **22**, 95S-100S.
- WAKELAM M.J., HODGKIN M.N., MARTIN A. & SAQIB K. (1997) Phospholipase D. *Semin.Cell Dev.Biol.* **8**, 305-310.
- WALSH C.A., BIRCH M.A., FRASER W.D., LAWTON R., DORGAN J., WALSH S., SANSOM D., BERESFORD J.N. & GALLAGHER J.A. (1995) Expression and secretion of parathyroid hormone-related protein by human bone-derived cells in vitro: effects of glucocorticoids. *J.Bone Miner.Res.* **10**, 17-25.
- WANG N., BUTLER J.P. & INGBER D.E. (1993) Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton [see comments]. *Science* **260**, 1124-1127.
- WANG W., ZHUANG H., LEVITZ C.L., FAN H., SELDES R.M., TAHERNIA A.D. & BRIGHTON C.T. (1997) The increased level of PDGF-A contributes to the increased proliferation induced by mechanical stimulation in osteoblastic cells. *Biochem.Mol.Biol.Int.* **43**, 339-346.
- WOLFF J. (1994) Das Gesetz der transformation der Knochen. *p.152.A.Hirschwald.Berlin.1892.*
- XIAO G., JIANG D., THOMAS P., BENSON M.D., GUAN K., KARSENTY G. & FRANCESCHI R.T. (2000) MAPK pathways activate and phosphorylate the osteoblast-specific transcription factor, Cbfa1. *J.Biol.Chem.2000.Feb.11.;275.(6):4453.-9.* **275**, 4453-4459.
- XIAO G., WANG D., BENSON M.D., KARSENTY G. & FRANCESCHI R.T. (1998) Role of the alpha2-integrin in osteoblast-specific gene expression and activation of the Osf2 transcription factor. *J.Biol.Chem.* **273**, 32988-32994.
- YAMAMOTO T., OZONO K., SHIMA M., YAMAOKA K. & OKADA S. (1998) 24R,25-dihydroxyvitamin D3 increases cyclic GMP contents, leading to an enhancement of osteocalcin synthesis by 1,25-dihydroxyvitamin D3 in cultured human osteoblastic cells. *Exp.Cell Res.* **244**, 71-76.

- YAMAMOTO T., TAYA S. & KAIBUCHI K. (1999) Ras-induced transformation and signaling pathway. *J.Biochem.(Tokyo.)* **126**, 799-803.
- YAMAZAKI T., KOMURO I., KUDOH S., ZOU Y., SHIOJIMA I., MIZUNO T., TAKANO H., HIROI Y., UEKI K. & TOBE K. (1995) Mechanical stress activates protein kinase cascade of phosphorylation in neonatal rat cardiac myocytes. *J.Clin.Invest.* **96**, 438-446.
- YAN C., TAKAHASHI M., OKUDA M., LEE J.D. & BERK B.C. (1999) Fluid shear stress stimulates big mitogen-activated protein kinase 1 (BMK1) activity in endothelial cells. Dependence on tyrosine kinases and intracellular calcium. *J.Biol.Chem.* **274**, 143-150.
- YANG R., FU W., WANG S., LIU T. & LIN-SHIAU S. (1997) Mechanism of the morphological changes induced by staurosporine in rat osteoblasts. *Calcif.Tissue Int.* **61**, 68-73.
- YANG R.S., FU W.M., WANG S.M., LU K.S., LIU T.K. & LIN-SHIAU S.Y. (1998) Morphological changes induced by prostaglandin E in cultured rat osteoblasts. *Bone* **22**, 629-636.
- YAOITA H., ORIMO H., SHIRAI Y. & SHIMADA T. (2000) Expression of bone morphogenetic proteins and rat distal-less homolog genes following rat femoral fracture. *J.Bone Miner.Metab.2000.;18.(2.):63.-70.* **18**, 63-70.
- YEH L.H., PARK Y.J., HANSALIA R.J., AHMED I.S., DESHPANDE S.S., GOLDSCHMIDT-CLERMONT P.J., IRANI K. & ALEVRIADOU B.R. (1999) Shear-induced tyrosine phosphorylation in endothelial cells requires Rac1-dependent production of ROS. *Am.J.Physiol.* **276**, C838-C847
- ZELLIN G., BECK S., HARDWICK R. & LINDE A. (1998) Opposite effects of recombinant human transforming growth factor-beta 1 on bone regeneration in vivo: effects of exclusion of periosteal cells by microporous membrane. *Bone* **22**, 613-620.
- ZHANG W., LEE J.C., KUMAR S. & GOWEN M. (1999) ERK pathway mediates the activation of Cdk2 in IGF-1-induced proliferation of human osteosarcoma MG-63 cells. *J.Bone Miner.Res.* **14** , 528-535.
- ZHUANG H., WANG W., SELDES R.M., TAHERNIA A.D., FAN H. & BRIGHTON C.T. (1997) Electrical stimulation induces the level of TGF-beta1 mRNA in osteoblastic cells by a mechanism involving calcium/calmodulin pathway. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **237**, 225-229.

VI. Anhang

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. D.B. Jones für die Überlassung des Themas der vorgelegten Arbeit.

Herrn Dr. Jochen Tenbosch danke ich für sehr viele Anregungen und die freundschaftliche Betreuung der Dissertation.

Bei den Doktoranden des Labors der „Experimentellen Orthopädie und Biomechanik“ bedanke ich mich für die Überlassung von Forschungsergebnissen zur Diskussion.

Meinem Mann Berndt danke ich insbesondere für seine unermüdliche Motivation und Geduld bezüglich des Themas „Doktorarbeit“.

Ich bedanke mich ebenfalls besonders bei meinen Eltern und Großeltern, die durch ihre finanzielle Unterstützung die Annahme einer Doktorarbeit erst möglich gemacht haben.

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die dem Fachbereich Humanmedizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

Mechanotransduktion in Osteoblasten

in der Abteilung für experimentelle Orthopädie und Biomechanik
unter Leitung von Prof. Dr.D.B. Jones

ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.