

Aus dem Medizinischen Zentrum für Operative Medizin  
der Philipps-Universität Marburg  
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. P. Griss

Klinik für Unfall-, Wiederherstellungs- und Handchirurgie  
Direktor: Prof. Dr. med. L. Gotzen

---

**Molekularbiologische Untersuchung  
der differentiellen Genexpression  
in osteoblastären Zellen**

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

vorgelegt von

**Ina Fichtel**  
aus Gevelsberg

Marburg 2003

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin  
Der Philipps-Universität Marburg  
am 20. März 2003

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. med. Bernhard Maisch  
Referent: Prof. Dr. med. Leo Gotzen  
1. Correferent: Prof. Dr. Martin Eilers  
2. Correferent: Prof. Dr. Guntram Suske

**Meinen Eltern  
und  
Großeltern**

# INHALTSVERZEICHNIS

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>             | <b>9</b>  |
| <b>1. Einleitung.....</b>                      | <b>11</b> |
| <b>1.1. Problemstellung.....</b>               | <b>11</b> |
| <b>1.2. Funktion des Knochens.....</b>         | <b>12</b> |
| <b>1.3. Zusammensetzung des Knochens .....</b> | <b>12</b> |
| <b>1.4. Knochenumbau .....</b>                 | <b>13</b> |
| 1.4.1. Modelling .....                         | 13        |
| 1.4.2. Remodelling .....                       | 14        |
| 1.4.3. Perforationen .....                     | 14        |
| 1.4.4. Mikrokallusformationen.....             | 15        |
| <b>1.5. Entwicklung des Knochens.....</b>      | <b>15</b> |
| <b>1.6. Zellen des Knochens.....</b>           | <b>16</b> |
| <b>1.7. Gewebereparatur .....</b>              | <b>19</b> |
| <b>2. Ziel der Arbeit .....</b>                | <b>21</b> |
| <b>3. Material und Methoden.....</b>           | <b>22</b> |
| <b>3.1. Material.....</b>                      | <b>22</b> |
| 3.1.1. Chemikalien und Ausrüstung .....        | 22        |
| 3.1.2. Zelllinie und primäre Zellkultur .....  | 23        |
| 3.1.3. Puffer und Lösungen .....               | 23        |
| 3.1.4. Polymerasekettenreaktion Primer.....    | 23        |
| <b>3.2. Methoden .....</b>                     | <b>25</b> |
| 3.2.1. Materialgewinnung.....                  | 25        |
| 3.2.1.1. Zellkultur.....                       | 25        |
| 3.2.1.2. Primäre Zellkultur .....              | 25        |
| 3.2.2. Behandlung der Zellen .....             | 26        |

|   |           |
|---|-----------|
| 3.2.3. Von-Kossa-Färbung .....                          | 27        |
| 3.2.4. Alkalische Phosphatase Enzymreaktion.....        | 27        |
| 3.2.5. Radiologische Untersuchung.....                  | 27        |
| 3.2.6. Extraktion der Ribonukleinsäuren.....            | 28        |
| 3.2.7. Polymerasekettenreaktion .....                   | 28        |
| 3.2.7.1. Synthese der komplementären DNA.....           | 28        |
| 3.2.7.2. Reverse Transkription                          |           |
| Polymerasekettenreaktion .....                          | 29        |
| 3.2.7.3. RNA-Arbitrarily-Primed                         |           |
| Polymerasekettenreaktion .....                          | 29        |
| 3.2.8. Elektrophorese.....                              | 29        |
| 3.2.8.1. Agarosegelelektrophorese .....                 | 29        |
| 3.2.8.2. Page und Silberfärbung.....                    | 30        |
| <br>  |           |
| <b>4. Ergebnisse.....</b>                               | <b>31</b> |
| <b>4.1. Zellmorphologie und Wachstumsverhalten.....</b> | <b>31</b> |
| 4.1.1. SaOS2-Zellen .....                               | 31        |
| 4.1.2. Primäre Humane Osteoblasten .....                | 33        |
| <b>4.2. Molekularbiologische Untersuchungen.....</b>    | <b>35</b> |
| 4.2.1. RNA-AP-PCR .....                                 | 35        |
| 4.2.2. Spezifische RT-PCR.....                          | 36        |
| 4.2.2.1. Qualitätskontrolle mit $\beta$ -Actin .....    | 36        |
| 4.2.2.2. Matrixproteine.....                            | 36        |
| 4.2.2.2.1. Alkalische Phosphatase .....                 | 36        |
| 4.2.2.2.1.1. SaOS2-Zellen.....                          | 36        |
| 4.2.2.2.1.2. Osteoblasten.....                          | 37        |
| 4.2.2.2.2. Osteonectin .....                            | 38        |
| 4.2.2.2.2.1. SaOS2-Zellen.....                          | 38        |
| 4.2.2.2.2.2. Osteoblasten.....                          | 39        |
| 4.2.2.2.3. Osteopontin.....                             | 40        |
| 4.2.2.2.3.1. SaOS2-Zellen.....                          | 40        |
| 4.2.2.2.3.2. Osteoblasten.....                          | 40        |

|   |    |
|---|----|
| 4.2.2.2.4. Osteocalcin .....                  | 41 |
| 4.2.2.2.4.1. SaOS2-Zellen .....               | 41 |
| 4.2.2.2.4.2. Osteoblasten .....               | 42 |
| 4.2.2.3. Kollagene .....                      | 42 |
| 4.2.2.3.1. Kollagen Typ I .....               | 42 |
| 4.2.2.3.1.1. SaOS2-Zellen .....               | 42 |
| 4.2.2.3.1.2. Osteoblasten .....               | 44 |
| 4.2.2.3.2. Kollagen Typ II .....              | 44 |
| 4.2.2.3.2.1. SaOS2-Zellen .....               | 44 |
| 4.2.2.3.2.2. Osteoblasten .....               | 45 |
| 4.2.2.3.3. Kollagen Typ III .....             | 46 |
| 4.2.2.3.3.1. SaOS2-Zellen .....               | 46 |
| 4.2.2.3.3.2. Osteoblasten .....               | 47 |
| 4.2.2.4. Knochenmorphogenese-Proteine .....   | 48 |
| 4.2.2.4.1. Bone Morphogenetic Protein 7 ..... | 48 |
| 4.2.2.4.1.1. SaOS2-Zellen .....               | 48 |
| 4.2.2.4.1.2. Osteoblasten .....               | 49 |
| 4.2.2.4.2. Bone Morphogenetic Protein 8 ..... | 50 |
| 4.2.2.4.2.1. SaOS2-Zellen .....               | 50 |
| 4.2.2.4.2.2. Osteoblasten .....               | 51 |
| 4.2.2.5. Insulin-Like-Growth-Factor-          |    |
| Rezeptor-Familie .....                        | 52 |
| 4.2.2.5.1. Insulin-Like-Growth-Factor-        |    |
| Rezeptor 1 .....                              | 52 |
| 4.2.2.5.1.1. SaOS2-Zellen .....               | 52 |
| 4.2.2.5.1.2. Osteoblasten .....               | 54 |
| 4.2.2.6. Notch-Rezeptor-Familie .....         | 54 |
| 4.2.2.6.1. Notch 1 .....                      | 54 |
| 4.2.2.6.1.1. SaOS2-Zellen .....               | 54 |
| 4.2.2.6.1.2. Osteoblasten .....               | 56 |
| 4.2.2.6.2. Notch 2 .....                      | 56 |
| 4.2.2.6.2.1. SaOS2-Zellen .....               | 56 |
| 4.2.2.6.2.2. Osteoblasten .....               | 57 |

|                                     |           |
|-------------------------------------|-----------|
| 4.2.2.6.3. Notch 3 .....            | 58        |
| 4.2.2.6.3.1. SaOS2-Zellen .....     | 58        |
| 4.2.2.6.3.2. Osteoblasten .....     | 58        |
| 4.2.2.6.4. Notch 4 .....            | 59        |
| 4.2.2.6.4.1. SaOS2-Zellen .....     | 59        |
| 4.2.2.6.4.2. Osteoblasten .....     | 60        |
| 4.2.2.7. Human Hairy .....          | 60        |
| 4.2.2.7.1. SaOS2-Zellen .....       | 60        |
| 4.2.2.7.2. Osteoblasten .....       | 61        |
| 4.2.2.8. Zusammenfassung .....      | 62        |
| <br>                                |           |
| <b>5. Diskussion .....</b>          | <b>63</b> |
| <b>5.1. Dexamethason .....</b>      | <b>64</b> |
| <b>5.2. Vitamin D3 .....</b>        | <b>65</b> |
| <b>5.3. Matrixproteine .....</b>    | <b>66</b> |
| 5.3.1. Alkalische Phosphatase ..... | 66        |
| 5.3.1.1. SaOS2-Zellen .....         | 67        |
| 5.3.1.2. Osteoblasten .....         | 67        |
| 5.3.1.3. Zusammenfassung .....      | 68        |
| 5.3.2. Osteonectin .....            | 68        |
| 5.3.2.1. SaOS2-Zellen .....         | 69        |
| 5.3.2.2. Osteoblasten .....         | 69        |
| 5.3.2.3. Zusammenfassung .....      | 69        |
| 5.3.3. Osteopontin .....            | 70        |
| 5.3.3.1. SaOS2-Zellen .....         | 71        |
| 5.3.3.2. Osteoblasten .....         | 71        |
| 5.3.3.3. Zusammenfassung .....      | 71        |
| 5.3.4. Osteocalcin .....            | 71        |
| 5.3.4.1. SaOS2-Zellen .....         | 72        |
| 5.3.4.2. Osteoblasten .....         | 72        |
| 5.3.4.3. Zusammenfassung .....      | 72        |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>5.4. Kollagene.....</b>                                    | <b>73</b> |
| 5.4.1. Kollagen Typ I.....                                    | 73        |
| 5.4.1.1. SaOS2-Zellen.....                                    | 74        |
| 5.4.1.2. Osteoblasten.....                                    | 74        |
| 5.4.1.3. Zusammenfassung .....                                | 74        |
| 5.4.2. Kollagen Typ II .....                                  | 75        |
| 5.4.2.1. SaOS2-Zellen.....                                    | 75        |
| 5.4.2.2. Osteoblasten.....                                    | 75        |
| 5.4.2.3. Zusammenfassung .....                                | 75        |
| 5.4.3. Kollagen Typ III.....                                  | 76        |
| 5.4.3.1. SaOS2-Zellen.....                                    | 76        |
| 5.4.3.2. Osteoblasten.....                                    | 76        |
| 5.4.3.3. Zusammenfassung .....                                | 76        |
| <b>5.5 Knochen-Morphogenese-Proteine .....</b>                | <b>77</b> |
| 5.5.1. Knochen-Morphogenese-Protein 7.....                    | 77        |
| 5.5.1.1. SaOS2-Zellen.....                                    | 78        |
| 5.5.1.2. Osteoblasten.....                                    | 78        |
| 5.5.1.3. Zusammenfassung .....                                | 78        |
| 5.5.2. Knochen-Morphogenese-Protein 8.....                    | 78        |
| 5.5.2.1. SaOS2-Zellen.....                                    | 79        |
| 5.5.2.2. Osteoblasten.....                                    | 79        |
| 5.5.2.3. Zusammenfassung .....                                | 79        |
| <b>5.6. Insulin-Like-Growth-Factor-Rezeptor-Familie .....</b> | <b>79</b> |
| 5.6.1. Insulin-Like-Growth-Factor-Rezeptor-Familie.....       | 79        |
| 5.6.1.1. SaOS2-Zellen.....                                    | 80        |
| 5.6.1.2. Osteoblasten.....                                    | 80        |
| 5.6.1.3. Zusammenfassung .....                                | 80        |
| <b>5.7. Notch-Rezeptor-Familie .....</b>                      | <b>81</b> |
| 5.7.1. Notch 1 .....  | 81        |
| 5.7.1.1. SaOS2-Zellen.....                                    | 81        |
| 5.7.1.2. Osteoblasten.....                                    | 82        |
| 5.7.1.3. Zusammenfassung .....                                | 82        |

|   |            |
|---|------------|
| 5.7.2. Notch 2 .....  | 82         |
| 5.7.2.1. SaOS2-Zellen.....                                    | 82         |
| 5.7.2.2. Osteoblasten.....                                    | 82         |
| 5.7.2.3. Zusammenfassung .....                                | 82         |
| 5.7.3. Notch 3 .....  | 83         |
| 5.7.3.1. SaOS2-Zellen.....                                    | 83         |
| 5.7.3.2. Osteoblasten.....                                    | 83         |
| 5.7.4. Notch 4 .....  | 83         |
| 5.7.4.1. SaOS2-Zellen.....                                    | 83         |
| 5.7.4.2. Osteoblasten.....                                    | 83         |
| 5.7.4.3. Zusammenfassung .....                                | 84         |
| <b>5.8. Human Hairy .....</b>                                 | <b>84</b>  |
| 5.8.1. SaOS2-Zellen.....                                      | 84         |
| 5.8.2. Osteoblasten.....                                      | 84         |
| 5.8.3. Zusammenfassung .....                                  | 84         |
| <b>5.9. Molekularbiologische Untersuchungstechniken .....</b> | <b>85</b>  |
| <b>5.10. Zellkultur .....</b>                                 | <b>86</b>  |
| <br>  |            |
| <b>6. Zusammenfassung.....</b>                                | <b>90</b>  |
| <br>  |            |
| <b>7. Literaturverzeichnis .....</b>                          | <b>92</b>  |
| <br>  |            |
| <b>8. Anhang .....</b>  | <b>111</b> |
| 8.1. Akademische Lehrer .....                                 | 111        |
| 8.2. Publikationen.....                                       | 112        |
| 8.3. Danksagung.....  | 113        |

## Abkürzungsverzeichnis

Alle verwendeten Maßeinheiten stimmen mit den Standard International Einheiten (SI Einheiten) überein.

|                                 |  |
|---------------------------------|--|
| A                               | Adenosin                                   |
| Abb.                            | Abbildung                                  |
| ALP                             | Alkalische Phosphatase                     |
| AP-PCR                          | Arbitrary Primed Polymerase Chain Reaction |
| β-GP                            | β-Glycerophosphat                          |
| BMP                             | Bone Morphogenetic Protein                 |
| BMU                             | Basic Metabolic Unit                       |
| Bp                              | Basenpaare                                 |
| C                               | Cytosin                                    |
| C DNA                           | Complementary Desoxribonucleic Acid        |
| DEPC                            | Diethyl-Pyrocarbonat                       |
| DEX                             | Dexamethason                               |
| DMEM                            | Dulbeco`s Modified Eagle Medium            |
| DNA                             | Desoxyribonucleic Acid                     |
| D NTPs                          | Desoxy-Nucleotid-Triphosphat               |
| EDTA                            | Ethylenediaminetetraacetic Acid            |
| Et al.                          | et alii                                    |
| FCS                             | Fetal Calf Serum                           |
| G                               | Guanosin                                   |
| GCSP                            | Glycine Cleavage System P-protein          |
| GRE                             | Glukokortikoid-responsives Element         |
| IGF-R                           | Insulin Like Growth Factor Receptor        |
| IRS                             | Insulin Rezeptor Substrat Familie          |
| KCl                             | Kaliumchlorid                              |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | Kaliumdihydrogenphosphat                   |
| L/K/N ALP                       | Leber/Knochen/Niere Alkalische Phosphatase |

|                                  |  |
|----------------------------------|--|
| mAS                              | milli Amperesekunde                                  |
| min.                             | Minute   |
| M-MLV RT                         | Moloney Murine Leukaemia Virus Reverse Transkriptase |
| m-RNA                            | Messenger Ribonucleic Acid                           |
| NaCl                             | Natriumchlorid                                       |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | Dinatriumhydrogenphosphat                            |
| PBS                              | Phosphate Buffer Saline                              |
| PCR                              | Polymerase Chain Reaction                            |
| RNA                              | Ribonucleic Acid                                     |
| RT-PCR                           | Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction      |
| T                                | Thymin   |
| Tab.                             | Tabelle  |
| TAE                              | Tris-Acetat-EDTA-Puffer                              |
| TBE                              | Tris-Borat-EDTA-Puffer                               |
| TE                               | Tris-EDTA-Puffer                                     |
| Tris                             | Tris(hydroxymethyl)aminomethan                       |
| U                                | Units  |
| Usw.                             | und so weiter  |
| VDR                              | Vitamin D3 Rezeptor                                  |
| VDRE                             | Vitamin D3 responsives Element                       |
| Z.B.                             | Zum Beispiel   |

# **1. Einleitung**

## **1.1. Problemstellung**

Die Therapie von Erkrankungen des Knochengewebes, aber auch von Frakturen und deren Heilungsstörungen, setzt ein grundlegendes Verständnis des Knochenstoffwechsels unter physiologischen Bedingungen und seiner pathologischen Veränderungen voraus. In den letzten Jahren hat das Wissen in Diagnostik und Therapie von Gelenk- und Knochenerkrankungen explosionsartig zugenommen. Im Bereich der klinischen Forschung konnte durch die Entwicklung von Markern für den Knochenumsatz sowie exakte Meßmethoden für den Knochenmineralhaushalt die Erforschung und Diagnose von Erkrankungen des Knochens erleichtert werden. Ebenfalls erhielt man dadurch die Möglichkeit, Therapien in ihrer Wirksamkeit zu prüfen und im Verlauf zu beobachten. Die Entwicklung von neuen Techniken in der Biologie führte zu neuen Erkenntnissen in einer lokalen Endokrinologie auf zellulärer Ebene, gesteuert durch Zytokine und intrazelluläre Faktoren, wie z.B. Transkriptionsfaktoren. Die rasante Entwicklung der Molekularbiologie ermöglicht immer tiefergehende Einblicke in Stoffwechselforgänge, die zugrundeliegenden regulativen Mechanismen und seine Störungen. Hieraus werden sich für die Zukunft zunehmend kausale Therapieansätze ergeben [153].

Ziel der Arbeit war es, die differentielle Genexpression in osteoblastären Zellen unter modifizierten Umgebungsbedingungen mit einem Screeningverfahren, als Ausgangsbasis für spätere systematische Untersuchungen zum Knochenstoffwechsel nachzuweisen.

## 1.2. Funktion des Knochens

Knochen gehört zu den dynamischen Geweben und erfüllt eine Vielzahl von Funktionen. Zu den mechanischen Aufgaben des Knochens zählt der Schutz der inneren Organe und sowie die Stützfunktion des Skeletts. Durch Übertragung von Kräften von den Weichteilen (Nerven, Muskeln, Sehnen, Bänder) auf das Skelett wird die Fortbewegung des Individuums gewährleistet [155]. Im Knochen selber befinden sich das blutbildende Knochenmark, sowie ein Speicher für Calcium, Magnesium und Phosphat. Insgesamt bilden Spongiosa und das Canaliculi-Netz eine Ionenaustauschfläche von  $250\text{m}^2$ , die wiederum den Regulationsmechanismen verschiedener Organe (Epithelkörperchen, Nieren, Darm) unterworfen ist [82, 181].

## 1.3. Zusammensetzung des Knochens

Das Knochengewebe setzt sich aus Mineralien, Kollagen, Wasser, nichtkollagenen Proteinen, Lipiden, Gefäßen und Zellen zusammen [14]. Die einzelnen Komponenten sind dabei in einer Struktur angeordnet, die von der makroskopischen bis in die molekulare Dimension reicht und dem Verbundbau von Stahlbeton ähnelt [90]. Der ursprünglich bei der desmalen und chondralen Ossifikation angelegte Knochen hat einen histologisch ungeordneten Aufbau und wird deswegen als Faserknochen bezeichnet. Durch Umbauprozesse entsteht Lamellenknochen, der als kleinste Einheit das Osteon (Zentrales Blutgefäß umgeben von konzentrisch geschichteten Speziallamellen) besitzt. Die Verschachtelung aus vielen winzigen Lamellen nennt man den *Breccienbau* des Knochens (breccia = Felsgestein; geologischer Begriff für ein bröckeliges, durch Kittsubstanz zusammengehaltenes Gestein) [186].

## 1.4. Knochenumbau

Die Spongiosa ist die wichtigste Struktur des Knochens für den Erhalt der mechanischen Funktion. Die Aufrechterhaltung einer funktionsfähigen Struktur ist das Ergebnis zellulärer Grundmechanismen, die wiederum einer Vielzahl an mechanischen, metabolischen und endokrinen Einflüssen unterliegen [84].

### Regulationsmechanismen des Spongiosaumbaus

#### *Modelling*

Funktion von Osteoblasten und Osteoklasten ungekoppelt

#### *Remodelling*

Funktion von Osteoblasten und Osteoklasten gekoppelt

#### *Perforation*

Osteoklastentätigkeit ohne nachfolgende Reparatur des Defektes durch Osteoblasten

#### *Mikrokallusformation*

Reparatur von Frakturen einzelner Trabekel durch Kallus

#### *Makrokallus*

Reparatur von Frakturen eines Skelettabschnittes

**Tab. 1:** Regulationsmechanismen des Spongiosaumbaus modifiziert nach Delling 1997

### 1.4.1. Modelling

Während des Längenwachstums erfolgt die Anlagerung von Osteoid an die Wachstumsfuge durch Osteoblasten. Osteoklasten sind an anderen Abschnitten ohne Kopplung zu anderen Knochenzellen aktiv. Typische Modellingprozesse sind das Längenwachstum, die Zunahme der Dicke von langen Röhrenknochen während des Wachstums und die Größenzunahme der Schädelknochen in der Wachstumsphase [17].

### **1.4.2. Remodelling**

Entsprechend dem „Quantenkonzept“ bilden die *basic metabolic units* - *BMUs* – die kleinste zelluläre Struktureinheit des Knochengewebes. Jede BMU wird mit einer Phase der osteoklastären Resorption eingeleitet, die sich im Schnitt über 30 Tage erstreckt. Anschließend kommt es zu einer Besiedelung durch mononukleäre Zellen in den Resorptionslakunen. Wahrscheinlich wird von diesen Zellen eine Zementlinie angelegt, die durch chemotaktische Reize die Osteoblasten zur Knochenneubildung anregt. Die Zeitspanne des osteoblastären Knochenanbaus beträgt circa 60–90 Tage, so dass ein vollständiger Knochenumbauzyklus 90–120 Tage in Anspruch nimmt. Das geregelte Zusammenspiel von Osteoblasten und Osteoklasten bezeichnet man als *coupling*.

### **1.4.3. Perforationen**

Die mittlere Durchschnittsbreite eines Trabekels beträgt 120  $\mu\text{m}$ , die Tiefe normaler Resorptionslakunen ca. 60  $\mu\text{m}$ . Liegen nun zwei Resorptionslakunen gegenüber oder ist eine Resorptionslakune abnorm tief, kommt es zur vollständigen Durchtrennung des Trabekels, zur sogenannten *Perforation*. Den Osteoblasten fehlt nun ein morphologisches Substrat, um neuen Knochen anzulegen, es kommt zum *uncoupling*. Bei skelettgesunden Personen kommt es in der fünften Lebensdekade zur Häufung solcher Perforationen, wobei die Trabekelbreite mit zunehmendem Alter nur minimale Veränderungen erfährt.

#### **1.4.4. Mikrokallusformationen**

Ein bisher wenig untersuchtes Phänomen im Knochenumbauprozess sind Mikrokallusformationen, die das Ergebnis von Mikrofrakturen zu sein scheinen. Sie scheinen aber auch in Arealen mit Spannungsspitzen ohne Frakturereignis aufzutreten. Man geht davon aus, dass unterhalb eines bestimmten Schwellenwertes (11 % Knochenvolumen im Wirbelkörper) Mikrokallusformationen regelhaft auftreten. Bei der renalen Osteopathie z. B. treten Mikrokallusformationen in einer exzessiven Anzahl auf. Mikrokallus stellt mit einer lokal begrenzten, überschießenden Knochenneubildung eine der wenigen bisher bekannten De-novo-Bildung von Trabekeln dar.

### **1.5. Entwicklung des Knochens**

Histogenetisch unterscheidet man zwei Arten von Knochen. Bei der desmalen Ossifikation entsteht Knochen direkt aus einer bindegewebigen Vorstufe. Auf diese Weise entsteht beim Menschen der Gesichts- und Schädelknochen [163]. Der Rest des Skeletts wird durch die knöchernen Umformung eines Knorpelskeletts gebildet, durch die sogenannte endochondrale Ossifikation [25]. Zunächst wachsen Blutgefäße in den Knorpel ein. Es folgt die Ablagerung von Knochen in die verkalkende Knorpelsubstanz, die kontinuierlich abgebaut wird [56]. Dieser Knochen wird auf Somiten zurückgeführt, die multipotenten Stammzellen enthalten [160].

## 1.6. Zellen des Knochens

Die zwei Hauptzelltypen des Knochens sind Osteoblasten, die die organische Knochengrundsubstanz synthetisieren [105], und Osteoklasten, deren Hauptaufgabe in der Knochenresorption liegt [83].

Neben der Synthese von Knochengrundsubstanz, nämlich von Kollagenen, Proteoglykanen und Glykoproteinen, haben Osteoblasten weitere Funktionen. Anzutreffen sind sie an der Oberfläche von Knochenbälkchen. In der Synthesephase sind Osteoblasten kubisch bis hochprismatisch, nimmt die Syntheseaktivität ab, werden sie flach. Sie verfügen über ein gut entwickeltes Rauhes Endoplasmatisches Retikulum, sowie einen deutlichen Golgiapparat. Sie besitzen somit alle Anzeichen aktiver, proteinbildender Zellen. Sie produzieren Typ-I-Kollagen und sezernieren Alkalische Phosphatase [65, 157]. Ferner finden sich im Zytoplasma PAS-positive Granula, die wahrscheinlich neutrale Glykoproteine für die Knochengrundsubstanz enthalten. Osteoblasten sind polarisierte Zellen. Die Abgabe der Syntheseprodukte erfolgt jeweils dort, wo die Zellen mit der Knochengrundsubstanz in Berührung stehen. Die neugebildete, noch nicht verkalkte Grundsubstanz, die von den Osteoblasten abgegeben wurde, wird als Osteoid oder Vorknochen bezeichnet. Die Hauptfunktion der Osteoblasten ist die Produktion und darauf folgende Mineralisation der Knochenmatrix [111]. Diese Matrix besteht aus 85 bis 90 % Typ-1-Kollagen. Die restlichen 10 bis 15 % des gesamten Proteinanteils werden durch nichtkollagene Proteine gebildet, von denen wiederum der größte Teil von Osteoblasten synthetisiert wird. Die Aufgabe der meisten nichtkollagenen Proteine ist bisher unbekannt. Einige von ihnen, wie das Fibronectin und Osteopontin, sind wahrscheinlich für die Zelladhäsivität verantwortlich. Andere, wie das Osteonektin und Osteocalcin haben eine große Affinität zu freiem Calcium. Der Knochenmineralisationsprozeß wird im primitiven fetalen Knochengewebe und Geflechtknochen durch Matrixvesikel, die von den Osteoblasten abgeschnürt werden, induziert [15].

Im reifen lamellären Knochen initiiert die Knochenmatrix selbst die Mineralisation. Bei der Regulation der Mineralisation spielen nichtkollagene Proteine eine Rolle, jedoch ist hier Näheres nicht bekannt [170, 189]. Eine weitere wichtige Funktion der Osteoblasten ist ihre Rolle als zentraler Regulator des Knochenmetabolismus.

Osteoblasten, aber nicht Osteoklasten besitzen Rezeptoren für die wichtigsten knochenresorbierenden Hormone wie Parathormon und 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. Daneben synthetisieren Osteoblasten eine Vielzahl von Zytokinen, die an der Regulation von sowohl osteoklastären als auch osteoblastären Aktivitäten beteiligt sind. Nach Beendigung der Syntheseleistung liegen sie in der Ruhephase auf den trabekulären Oberflächen des Knochens als sogenannte *lining cells*. Sie sind in der Lage auf knochenresorbierende Hormone zu reagieren, indem sie Botenstoffe sezernieren, die zur Aktivierung von Osteoklasten führen.

Im Knochengewebe eingelagert befinden sich die Osteozyten, die aus den Osteoblasten hervorgehen und deren Aufgabe die Erhaltung des Knochens ist. Gehen Osteozyten zugrunde, wird die benachbarte Knochenmatrix abgebaut. Reife Osteozyten liegen in Schichten angeordnet in verkalkter Grundsubstanz. Charakteristisch sind die filipodienartigen Fortsätze. Sie befinden sich in feinen Knochenkanälchen, die radiär von den Knochenhöhlen ausgehen, in denen die Osteozyten liegen. Die Fortsätze stehen untereinander durch Gap Junctions in Verbindung, die einen interzellulären Fluß von Ionen und den Transport von kleinen Molekülen ermöglichen. Die Form der Osteozyten vergrößert die Zelloberfläche enorm und Stoffe können bis zu 15 Zellen weit transportiert werden. Man nimmt an, dass sie an der interzellulären Kommunikation der Zellen teilnehmen, indem sie Druckänderungen und chemische Informationen an die *lining cells* weitergeben. Der Zelleib der Osteozyten ist flach und mandelförmig. Im Vergleich zu den Osteoblasten hat er wenig Rauhes Endoplasmatisches Retikulum und einen kleinen Golgi-Apparat, was der verminderten Syntheseleistung der Osteozyten entspricht. Funktionell liegen Osteozyten in zwei verschiedenen Formen vor, als *osteoblastische* und *osteolytische* Osteozyten.

Osteoblastische Osteozyten enthalten protein- und glykoproteingebundenes Calciumphosphat und dienen der Erhaltung der vorhandenen Grundsubstanz. Osteolytische Osteozyten enthalten viele Lysosomen und finden sich vor allem in den tiefen Lagen der Knochensubstanz. Durch ihre Fähigkeit Hartschubstanz abzubauen, kann Calcium aus Knochen freigesetzt werden [53, 129].

Der Ursprung der Osteoblasten ist eine multipotente Stammzelle, die sich in eine Vielzahl von Zelllinien in Knochen und Knochenmark differenzieren kann [4, 22, 26]. Neben der Entwicklung in Chondrozyten über Prächondroblasten und Chondroblasten differenziert sich die multipotente Stammzelle über osteogene Progenitorzellen, Präosteoblasten, Osteoblasten weiter in Osteozyten und osteoblastische *lining cells* [28, 144]. Vorläuferzellen sind mesenchymaler Herkunft und liegen in der Nähe der äußeren und inneren Knochenoberfläche sowie den Havers-Kanälen [7]. Histologisch sind Vorläuferzellen relativ undifferenziert. Sie sind spindelförmig und haben nur wenig rauhes Endoplasmatisches Retikulum, sowie einen spärlich entwickelten Golgiapparat. Vorläuferzellen sind während des Knochenwachstums aktiv. Später werden sie z.B. bei Knochenbrüchen wieder aktiviert. Untersuchungen mit radioaktiv markierten Substanzen ( $^3\text{H}$ -Thymidin) bei jungen Ratten, deren Knochenzellen schnell proliferieren, geben Aufschluss über die Beziehung von Osteoblasten und Osteozyten [150]: Osteoblasten gehen aus Knochenstammzellen, die leicht differenzierten Mesenchymzellen entsprechen, hervor. Die Generationszeit beträgt für Knochenstammzellen etwa 36 Stunden. Einige der neu gebildeten Zellen wandeln sich in Osteoblasten um. Hierfür sind mindestens 9 Stunden erforderlich. Weder Osteoblasten noch Osteozyten sind teilungsfähig. Die meisten Osteoblasten werden zu Osteozyten. Einige bleiben Osteoblasten, einige gehen zugrunde und weitere werden offenbar wieder zu Vorläuferzellen. Osteozyten können lange Zeit Osteozyten bleiben, mindestens jedoch 50 Stunden. Wird Grundsubstanz zerstört, z.B. im Rahmen des Knochenumbaus, können auch sie wieder zu Vorläuferzellen werden [195].

Osteoklasten sind große, bewegliche Zellen, die 50 oder mehr Zellkerne enthalten können. Sie entstehen durch Fusion aus mononukleären Vorläuferzellen des

Makrophagensystems [185]. Osteoklasten sind mobil, sie heften sich mit einer ringförmigen Außenzone am Knochengewebe an (*clean zone*) und lösen mit Hilfe des Bürstensaumes die Knochensubstanz und bauen sie ab [35]. Beeindruckend ist die Tatsache, dass ein Osteoklast pro Zeiteinheit in der Lage ist, die gleiche Menge Knochen abzubauen, die von 100-150 Osteoblasten aufgebaut wurde. Dabei geht aus Studien hervor, dass Osteoblasten in der Lage sind, Osteoklasten in Anwesenheit von Parathormon oder Vitamin D3 zu aktivieren und die Osteoklastendifferenzierung zu regulieren [136, 187].

## 1.7. Gewebereparatur

Die Reparatur und Regeneration von Gewebe erfordert Zellproliferation und die Produktion von neuer Matrix, um die nicht beschädigten Gewebeanteile zu überbrücken. Die Zellen, von denen die Reparatur ausgeht, können vor Ort und ausdifferenziert sein. Osteoblasten können in der Lage sein, kurze Gewebedefekte zu überbrücken, wie z.B. in stabilen, nicht dislozierten Frakturen. Für die Reparatur der meisten Frakturen sind jedoch wesentlich komplexere Interaktionen zwischen Osteoblasten, Chondrozyten und Endothelzellen erforderlich [210]. Die Frakturheilung umfasst die Chemotaxis von mesenchymalen Stammzellen, Proliferation und Differenzierung von knochenbildenden Zellen, die Synthese von Extrazellulärmatrix, Kallusformation und *remodelling*. Dieser Prozess wird durch Signale reguliert und kontrolliert, die ihre Wirkung über eine Kaskade von molekularen Ereignissen ausüben, wie Biosynthese, Sekretion, Aktivierung, Transport, Signaltransduktion und Genexpression. Die molekularen Ereignisse werden wiederum von zahlreichen Faktoren, wie Blutzufuhr, mechanischen Reizen, extra- und intrazellulären Umgebungsbedingungen usw. beeinflusst [105]. An der Induktion der Geweberegeneration sind unter anderem auch Polypeptidwachstumsfaktoren wie die Knochenmorphogenese-Proteine beteiligt. Da sie in tierexperimentellen Untersuchungen die Knochenneubildung in Knochendefekten induzieren konnten und die verschiedenen Isoformen

gentechnisch in größeren Mengen hergestellt werden können, erhofft man sich eine breite klinische Anwendung, um die heute immer noch aufwendigen knöchernen Rekonstruktionen zu vereinfachen [30, 97]. Bislang spielen die biologischen Knochenheilungs- und Regenerationsverfahren keine große klinische Rolle, da sie die Qualität der Knocheninduktion, wie sie durch Segmenttransport oder Kallusdistraction erzielt wird, nicht erreicht haben [89, 196].

## 2. Ziel der Arbeit

Traumatische, degenerative und entzündliche Schädigungen des Knochens sind ein klinisch relevantes Problem. Die ursächliche Behandlung der Erkrankungen setzt tiefgehende biologische Kenntnisse der Knochenbiologie voraus.

Das Zusammenspiel von zellulären, extrazellulären, biochemischen und biomechanischen Vorgängen ist weitgehend nur im Ansatz verstanden [115, 150]. Um einen tieferen Einblick in die physiologischen Bedingungen und pathologischen Veränderungen des Knochenstoffwechsels zu gewinnen, ist eine Screening-Untersuchung notwendig. Die transkriptionelle Regulation der Genexpression ist dabei gut für eine Screening-Untersuchung geeignet [100].

Das Verstehen des Gleichgewichts im Knochenstoffwechsel beruht auf der Charakterisierung der Genexpression, die die Entstehung und Resorption des Knochens kontrolliert [133, 165, 174].

Mit der vorliegenden Arbeit sollte ein Screening der m-RNA-Genexpression von humanen Knochenzellen unter unterschiedlichen Bedingungen erfolgen:

1. Darstellung morphologischer Unterschiede von humanen Knochenzellen in verschiedenen Differenzierungsgraden
2. Darstellung von Unterschieden in der differentiellen Expression und Regulation der Zellen mittels der RNA-Arbitrarily Primed-PCR als Screeningverfahren
3. Darstellung von Unterschieden in der differentiellen Expression und Regulation spezifischer Gene mittels der spezifischen Reverse Transkription-PCR

## 3. Material und Methoden

### 3.1. Material

#### 3.1.1. Chemikalien und Ausrüstung

Alle Chemikalien wurden, sofern im Text nicht anders vermerkt, von der Firma Boehringer Ingelheim Biotechnologie, Heidelberg, bezogen. Steriles Plastikmaterial für Zellkulturen sowie Vitamin C und  $\beta$ -Glycerophosphat stammten von der Firma Greiner Labortechnik, Frickenhausen. DMEM Medium, FCS, Trypsin, Glutamin, Penicillin und Streptomycin stammten von der Firma Gibco-BRL, Karlsruhe, Vitamin D3 von ICN, Aurora, OH, USA, HEPES-Pufferlösung und Natriumbikarbonat von der Firma Biochrom KG Seromed, Berlin.

*Taq* DNA Polymerase und Rneasy RNA Isolation Kits wurden von Quiagen, Hilden, bezogen. Hexanucleotid Primer, Moloney Murine Leukaemia Virus (M-MLV) Reverse Transkriptase, 2'-deoxynucleoside 5'-triphosphate (dNTPs) Set und DNA Größenmarker stammten von Boehringer Mannheim, Mannheim. Agarose stammte von der Firma Roth, Karlsruhe.

Folgende Ausrüstung wurde benutzt:

Zellen wurden in einem Stericult 200 Inkubator kultiviert. PCR Reaktionen wurden in einem PTC-100 Thermocycler von MJ Research Inc., Watertown, Mass., USA, durchgeführt. Gelelektrophoresekammern stammten von Biorad, Hercules, CA, USA und Power Units von der Firma Pharmacia LKB, Freiburg. Die radiologische Untersuchung der Zellen wurde mit einem Mammomat 300, Siemens, München durchgeführt.

### 3.1.2. Zelllinie und Primäre Zellkultur

Die humane osteoblastenähnliche Osteosarkomzelllinie SaOS 2 stammten von der American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA.

Primäre humane Osteoblasten wurden aus Spongiosa von Hüftköpfen gewonnen. Verwendet wurden ausschließlich Hüftköpfe von Patienten, die einen Hüftgelenkersatz durch Totalendoprothese erhalten haben.

### 3.1.3. Puffer und Lösungen

Folgende Standardpuffer wurden benutzt:

|                  |   |
|------------------|---|
| TE (pH 8,0) :    | 10mM Tris (pH 8,0), 1mM EDTA (pH 8,0)   |
| TAE (pH 8,0) :   | 40mM Tris-Acetat, 2mM EDTA (pH 8,5)   |
| TBE :            | 89mM Tris, 89mM Borsäure, 0,2mM EDTA  |
| PBS (pH 7,4) :   | 137mM NaCl, 2,7mM KCl, 4,3 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ,<br>1,4mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> |
| DNA-Ladepuffer : | 50 % Glycin, 0,025 % Bromphenolblau,<br>0,025 % Xylen-Cyanol (nicht-denaturierend)                        |
| DNA-Ladepuffer:  | 0.1 % Bromphenolblau, 0,1 % Xylen-Cyanol,<br>10 mM EDTA, in (denaturierendem) Formamid                    |

### 3.1.4. Polymerasekettenreaktion-Primer

Ausser den arbiträren Primern wurden alle in der Tabelle aufgelisteten Oligonucleotide bei spezifischen Anlagerungstemperaturen in die PCR eingesetzt. Alle Primer wurden von der Firma MWG-Biotech, Ebersberg, hergestellt.

| Name     | Lokus                               | L   | T        | Z  | Sequenz sense<br>Sequenz antisense                       |
|----------|-------------------------------------|-----|----------|----|--|
| βActin   | β-Actin                             | 180 | 58       | 24 | CTTGATGAGGTAGTCAGTCCAGGTCC<br>TATCCAGGCTGTTGCTATCCCTGTAC |
| HPontin  | Osteopontin                         | 243 | 59       | 32 | AGCAGGAGGAGGCAG<br>GATGGGTCAGGGTTTAGC                    |
| HNectin  | Osteonectin                         | 184 | 54       | 30 | CACACGATGTTGTCAAGGATG<br>GGTAAAGGAGGAAATGGTGAT           |
| HCalcin  | Osteocalcin                         | 228 | 58       | 30 | AGCGAGGTAGTGAAGAGACCC<br>CCTGGAGAGGAGCAGAAGCTG           |
| HAlkPhos | Alkalische<br>Phosphatase           | 300 | 50       | 27 | AGAAAGAGAAAGACCCCAAGTA<br>TTCACCCACACAGGTAG              |
| HCol1    | Kollagen I                          | 159 | 54       | 32 | CCCAAGGACAAGAGGCAT<br>GCAGTGGTAGGTGATGTTCTG              |
| HCol2a2  | Kollagen II                         | 126 | 57       | 32 | GCTGGAAAACCTGGAAAAGC<br>GCCTGGATAACCTCTGTGACC            |
| HCol3    | Kollagen III                        | 229 | 54       | 32 | GGGTCCTACTGGTCCTATTGG<br>GCCTCCTCACCTTTCTCAC             |
| HBmp7    | Bone Morpho-<br>Genetic Protein 7   | 198 | 56       | 32 | ATGCCATCTCCGTCCTCTAC<br>AGGGGAAGGTCTCACAAAAG             |
| HBmp8    | Bone Morpho-<br>Genetic Protein 8   | 185 | 56       | 32 | AGCCGAAGAAAAGCAACG<br>CTCCCCCTCACAGTAATAGGC              |
| HIGFR-1  | Insulin Growth<br>Factor Rezeptor 1 | 248 | 59       | 32 | ACTACGCCCTGGTCATCTTC<br>GGTGGTCTTCTCACACATCG             |
| HTAN1    | Notch 1                             | 177 | 56       | 32 | GCACTGCGAGGTCAACAC<br>AGGCACTTGGCACCATTTC                |
| HNotch2  | Notch 2                             | 182 | 53       | 32 | TGGTTCAGAGAAAACATACA<br>TCCAATTCATACTCACAGTTGA           |
| HNotch3  | Notch 3                             | 164 | 56       | 32 | GGAGGGAGAAGCCAAGTC<br>GGGAAAAGGCAATAGGC                  |
| HNotch4  | Notch 4                             | 176 | 56       | 32 | TTCGGGACTTCTGTTTCAGC<br>GGTGTTATGGCAGGAGGT               |
| HHairy   | Human<br>Hairy                      | 213 | 58       | 30 | GGCTCACTTTCCTTTCTTGC<br>AATGCCTCTCACACCACG               |
| OPN 21   | Arbiträr                            |     | variabel |    | ACCAGGGGCA   |
| OPN 25   | Arbiträr                            |     | variabel |    | GGGGCACCAG   |
| OPN 27   | Arbiträr                            |     | variabel |    | GGCACCAGGG   |
| IUC 1A   | Arbiträr                            |     | variabel |    | ACGAAGAAGAG  |

**Tab. 2:** Name = Name des Oligonukleotids  
Lokus = Bezeichnung  
L = Länge des PCR-Fragments  
T = Anlagerungstemperatur  
Z = Länge des Oligonukleotids  
Sequenz = Nukleotidsequenz, sense/antisense=Orientierung

## **3.2. Methoden**

### **3.2.1. Materialgewinnung**

#### **3.2.1.1. Zellkultur**

Die Zelllinie SaOS 2 wurde als Monolayer in DMEM mit 10 % FCS, 2 mM L-Glutamin, Penicillin (100U/ml) und Streptomycin (100µg/ml) kultiviert.

Mit primären humanen Osteoblasten wurde ebenso verfahren, jedoch erhielten sie zusätzlich Vitamin C (50µg/ml). Alle Zellen wurden bei 37°C in 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert.

Der Zeitpunkt der Zellpassage wurde sowohl für die Zelllinie als auch für die Primärkultur anhand des Zellwachstums abgeschätzt. Nach der ersten Passage wurden die Zellen in 30 % Dichte ausgesät und nach Erreichen einer Konfluenz von 70 % subkultiviert.

#### **3.2.1.2. Primäre Zellkultur**

Aus den unter 3.1. erwähnten Hüftköpfen wurde Spongiosa gewonnen.

Die gereinigten Spongiosabälkchen wurden für 10 Tage in dem unter 3.2.2. genannten Medium in 6 cm Petrischalen belassen. Danach wurde das Knochenmaterial entfernt. Nachdem die Zellen 70 % Konfluenz erreicht hatten, wurden sie subkultiviert.

Ein Teil der Zellen wurde auf Objektträger ausgesät und es wurde die unter 3.2.4. beschriebene Färbung durchgeführt.

### 3.2.2. Behandlung der Zellen

Um Experimente durchzuführen, wurden alle Zellen innerhalb der zweiten Passage in 2 cm große Zellkulturplatten ausgesät. Innerhalb von 2 bis 3 Tagen erreichten die Zellen Konfluenz. Standardkulturbedingungen wurden beibehalten, indem über 28 Tage alle 24 Stunden ein Mediumwechsel mit unten beschriebenen Wachstumsmedium erfolgte. An Versuchstag 0, 2, 7, 14 und 28 wurde RNA extrahiert (siehe 3.2.6.).

|   | <b>Wachstumsmedium 1</b>   | <b>Kontrollmedium 1.1</b>  | <b>Kontrollmedium 1.2</b>                               |
|---|--|--|---|
| <b>SaOS-2</b><br><b>Primäre Humane Osteoblasten</b> | DMEM-Medium,<br>10 % Fötale Kälberserum (FCS),<br>1 % L-Glutamin,<br>1 % Penicillin/Streptomycin (P/S),<br>10 <sup>-7</sup> M Dexamethason gelöst in 5µl/ml EtOH | DMEM-Medium,<br>10 % FCS,<br>1 % L-Glutamin,<br>1 % P/S,<br>5 µl/ml EtOH | DMEM-Medium,<br>10 % FCS,<br>1 % L-Glutamin,<br>1 % P/S |

**Tab. 3:** Versuchsreihe I mit Dexamethason mit den im den Medien enthaltenen Stoffen

|   | <b>Wachstumsmedium 2</b>   | <b>Kontrollmedium 2.1</b>  | <b>Kontrollmedium 2.2</b>                               |
|---|--|--|---|
| <b>SaOS-2</b><br><b>Primäre Humane Osteoblasten</b> | DMEM-Medium,<br>10 % Fötale Kälberserum (FCS),<br>1 % L-Glutamin,<br>1 % Penicillin/Streptomycin (P/S),<br>10 <sup>-7</sup> M Vitamin D3 gelöst in 5µl/ml EtOH | DMEM-Medium,<br>10 % FCS,<br>1 % L-Glutamin,<br>1 % P/S,<br>5 µl/ml EtOH | DMEM-Medium,<br>10 % FCS,<br>1 % L-Glutamin,<br>1 % P/S |

**Tab. 4:** Versuchsreihe II mit Vitamin D3 mit den in den Medien enthaltenen Stoffen

|   | <b>Wachstumsmedium 3</b>  | <b>Kontrollmedium 3.1</b>  | <b>Kontrollmedium 3.2</b>  |
|---|---|--|--|
| <b>SaOS-2</b><br><b>Primäre Humane Osteoblasten</b> | DMEM-Medium,<br>10 % Fötale Kälberserum (FCS),<br>1 % L-Glutamin,<br>2 mM NaHCO <sub>3</sub> ,<br>10 mM HEPES,<br>0,25 mM Vitamin C,<br>10 mM β-Glycerophosphat | DMEM-Medium,<br>10 % FCS,<br>1 % L-Glutamin,<br>2 mM NaHCO <sub>3</sub> ,<br>10 mM HEPES,<br>0,25 mM Vitamin C | DMEM-Medium,<br>10 % FCS,<br>1 % L-Glutamin,<br>2 mM NaHCO <sub>3</sub> ,<br>10 mM HEPES,<br>10 mM β-Glycerophosphat |

**Tab. 5:** Versuchsreihe III mit Vitamin C und β-Glycerophosphat mit den in den Medien enthaltenen Stoffen

Ein Teil der Zellen wurde unter gleichen Versuchsbedingungen auf Objektträgern mitgeführt, wobei nach 28 Tagen eine unter 3.2.3. beschriebene Histologie zum Kalknachweis erfolgte.

### **3.2.3. Von-Kossa-Färbung**

Nach einem Waschschrift mit eiskaltem PBS wurden die Zellen für 20 min. mit eiskaltem Ethanol auf den Objektträgern fixiert. Nachfolgend wurden sie für 60 min. in 5 % Silbernitratlösung inkubiert, einige min. in 1 % Pyrogallussäurelösung eingelegt und 5 min. mit 5 % Natriumthiosulfat fixiert. Die Gegenfärbung erfolgte mit Kernechtrot (2,7 mM Kernechtrot gelöst in 5 % Aluminiumsulfatlösung).

### **3.2.4. Alkalische Phosphatase Enzymreaktion**

25 mg Naphtol Alkalische Phosphatase Phosphat wurden in 0,5 ml Dimethylformamid gelöst und mit 50 ml Tris-HCl-Puffer gemischt. 50 mg Diazoniumsalz wurden zugemischt, und die Lösung wurde anschließend filtriert. Die auf Objektträgern ausgesäten humanen Osteoblasten wurden für 10 min. in eiskaltem Methanol fixiert und anschließend mit PBS gespült. Die Inkubation mit dem oben beschriebenen Medium erfolgte für 5-60 min. bei Raumtemperatur bis zur Entwicklung des sichtbaren Reaktionsproduktes. Die Inkubation wurde durch sorgfältiges Spülen mit destilliertem Wasser beendet.

### **3.2.5. Radiologische Untersuchung**

Sämtliche Zellkulturen wurden an Kulturtag 28 durchleuchtet. Die Untersuchung wurde mit 20 KV, 10 mAS durchgeführt. Belichtet wurde auf handelsüblichem Mammographiefilm.

### **3.2.6. Extraktion der Ribonucleinsäuren**

Die Isolation der Ribonucleinsäuren (RNA) wurde mit einem Rneasy-Kit nach Protokoll des Herstellers durchgeführt. Alle Arbeitsschritte erfolgten mit RNase-freien Materialien und Lösungen. Nach einem Waschschrift der Monolayerkulturen mit PBS wurden die Zellen unter hoch denaturierenden Bedingungen lysiert und in einem hochkonzentrierten Salz-Puffersystem verdünnt. Anschließend wurden die Proben auf eine Waschsäule gegeben, über dessen Membran in den folgenden Waschschriften Gesamt-RNA gebunden wurde. Die RNA wurde in DEPC behandelten Wasser aufgenommen und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Zur quantitativen und qualitativen Überprüfung der Proben wurde ein unter 3.2.8.1.1. beschriebenes Agarosegel angefertigt.

### **3.2.7. Polymerasekettenreaktion**

#### **3.2.7.1. Synthese der komplementären DNA**

Für die Erststrangsynthese der komplementären DNA (cDNA) wurden 250 ng der Gesamt-RNA eingesetzt. Zunächst wurde die RNA zur Auflösung der Sekundärstrukturen denaturiert (10 min.,  $70^{\circ}\text{C}$ ). Die Anlagerungsreaktion wurde mit zufällig generierten Hexamer-Oligonucleotiden in Reaktionspuffer (50 mM Tris-HCl pH 8,3, 75 mM KCl, 3 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,5  $\mu\text{l}$  random hexamers, 5 mM dNTP's, 10 mM DTT und DEPC behandeltem Wasser) in einem Volumen von 20  $\mu\text{l}$  10 min. bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Strangverlängerungsreaktion erfolgte durch Zugabe von 100 U MMLV Reverser Transkriptase (120 min.,  $37^{\circ}\text{C}$ ), und wurde durch anschließende Erhitzung (5 min.,  $95^{\circ}\text{C}$ ) beendet. Die Zweitstrangsynthese wurde im initialen Zyklus der unter 3.2.7.2. beschriebenen Polymerasekettenreaktion durchgeführt.

**3.2.7.2. Reverse Transkription Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)**

Die Polymerasekettenreaktion fand in einem Reaktionsgemisch, das 2,5 µl des Erststranges, 0,3 µM Primer, 10 mM Tris-HCl, 75 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM dNTP's und 1 U *taq* Polymerase enthielt, in jeweils 50 µl Volumen statt. Zunächst erfolgte die Denaturierung der DNA (5 min., 95°C), anschließend die PCR (1 min., 94°C, 1 min. bei spezifischer Anlagerungstemperatur, 2 min. 72°C, x Zyklen), gefolgt von einem abschließenden Zyklus der Strangverlängerung (5 min., 72°C). Zykluszahl und Anlagerungstemperatur richteten sich nach den Oligonucleotiden (siehe Tab. 2) und wurden jeweils empirisch ermittelt.

**3.2.7.3. RNA-Arbitrarily-Primed Polymerasekettenreaktion (RAP-PCR)**

Die Erststrangsynthese erfolgte in Abwandlung der Reaktionsbedingungen wie unter 4.2.7.1. beschrieben mit 2,5 µM Oligonucleotidprimern. RNA wurde in zwei verschiedenen Konzentrationen (150 ng und 200 ng) eingesetzt. Nachfolgend wurden 20 µl PCR-Puffer (30 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 % Triton X-100, 0,8 mM dNTP's, 1,5 µM Oligonucleotidprimer und 2,5 U *taq*-Polymerase) zugegeben, und die PCR mit einem Zyklus niedriger Stringenz (5 min. 94°C, 5 min. 40°C, 5 min. 72°C), gefolgt von 34 Zyklen hoher Stringenz (1 min. 94°C, 1 min. 58°C, 1:30 min. 72°C) durchgeführt. Um Primerkombinationen zu erhalten, wurde der zweite Primer dem PCR-Puffer nach der Erststrangsynthese zugegeben.

**3.2.8. Elektrophorese****3.2.8.1. Agarosegelelektrophorese**

2 µl RNA wurden zusammen mit Ladepuffer auf ein 0,5-1,0 %iges Agarosegel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei maximal 10 V/cm in 1xTAE. Vor Sichtbarmachung und Dokumentation der Nucleinsäuren wurde das Agarosegel in 0,01 % EtBr 5 min. gefärbt und der Überschuss 30 min. in destilliertem Wasser ausgewaschen.

### **3.2.8.2. Polyacrylamidgelelektrophorese und Silberfärbung**

10 µl PCR-Produkt der semiquantitativen PCR wurde mit 2 µl Ladepuffer (nicht-denaturierend) auf ein nicht-denaturierendes Polyacrylamidgel (12,5 %) aufgetragen und für 1 Std. bei 125 V aufgetrennt.

3 µl Probe der RAP-PCR wurde mit 3 µl Ladepuffer (denaturierend) versetzt und bei 2000 V für 3 Std. auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel (6,7 % Polyacrylamid: Bis-Acrylamid (19:1)) elektrophoretisch getrennt.

Die visuelle Darstellung der PCR-Fragmente erfolgte mit einer modifizierten Silberfärbung. Dazu wurden die Gele 5 min. in 10 % Ethanol fixiert, 3 min. in 1 % Salpetersäure oxidiert, 20 min. in 0,012 M Silbernitrat inkubiert und in einer Lösung aus 0,28 M Natriumcarbonat und 0,019 % Formalin reduziert, bis Banden sichtbar wurden. Die Reaktion wurde mit 10 % Eisessig für 2 min. beendet und die Gele für 2 min. in destilliertes Wasser überführt, bevor sie auf Whatman-Papier getrocknet wurden. Die Fragmentgröße der PCR-Produkte wurde durch den Vergleich mit einem Standard-Größenmarker ermittelt.

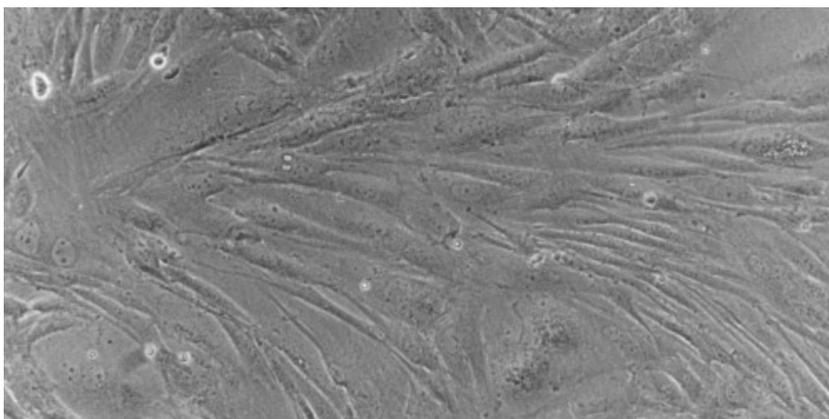
## 4. Ergebnisse

### 4.1. Zellmorphologie und Wachstumsverhalten

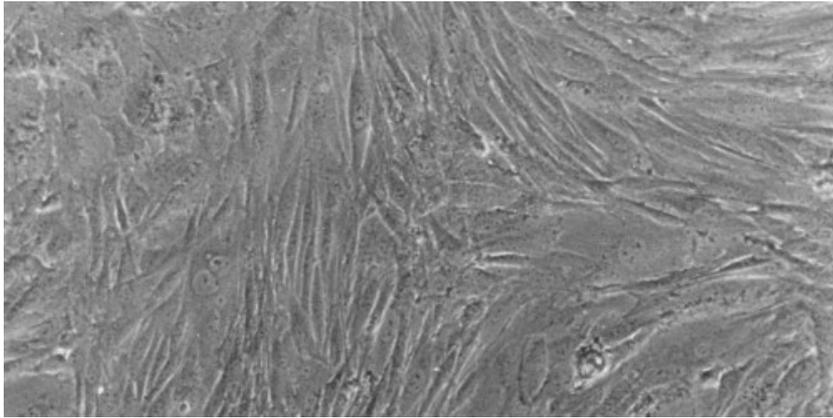
#### 4.1.1. SaOS2-Zellen

Die Zellzahlverdopplungszeit der humanen osteoblastenähnlichen SaOS2-Zellen betrug durchschnittlich 32 Stunden. Zellen, die in unsupplementierten Medium wuchsen, zeigten einen fibroblastenartigen Phänotyp. Mit zunehmender Kulturdauer formten die Zellen einen Multilayer und nahmen eine eher polygonale Form an. Wie bei den primären humanen Osteoblasten nahm die Proliferationsrate unter Dexamethason deutlich ab. Unter Vitamin D3-Behandlung konnte kein Unterschied zu den Kontrollzellen beobachtet werden.

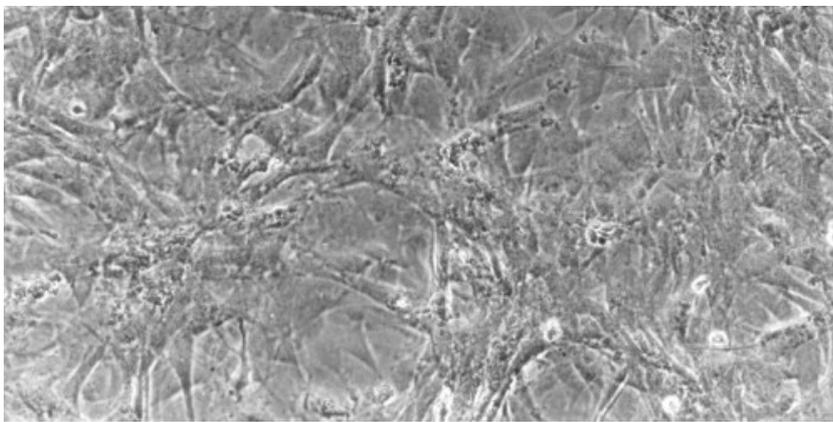
SaOS2-Zellen mit  $\beta$ -Glycerophosphat zeigten in postkonfluenten Kulturen eine deutliche Abnahme der Proliferationsrate, nicht jedoch in proliferierenden Kulturen. Bei den mit Vitamin C und  $\beta$ -Glycerophosphat behandelten Zellen konnten ab dem 24.-26. Kulturtag kleine knötchenförmige Formationen beobachtet werden, die sich in der von-Kossa-Färbung und den durchgeführten Röntgenuntersuchungen als Kalkformationen nachweisen ließen (siehe Tab. 6).



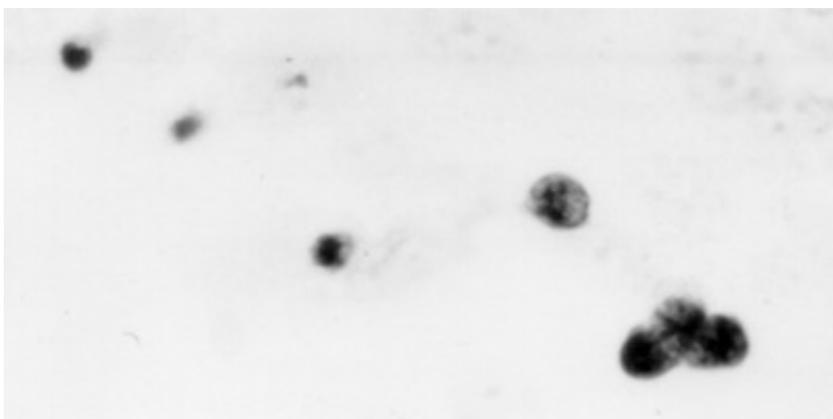
**Abb. 1:** Konfluente SaOS2-Zellen unter Dexamethason-Behandlung mit fibroblastenartigem, spindelzellförmigem Aussehen



**Abb. 2:** Konfluente SaOS2-Zellen unter Vitamin D3-Behandlung



**Abb. 3:** SaOS2-Zellen unter Vitamin C und  $\beta$ -Glycerophosphat-Behandlung mit polygonalen, knötchenförmigen Zellen



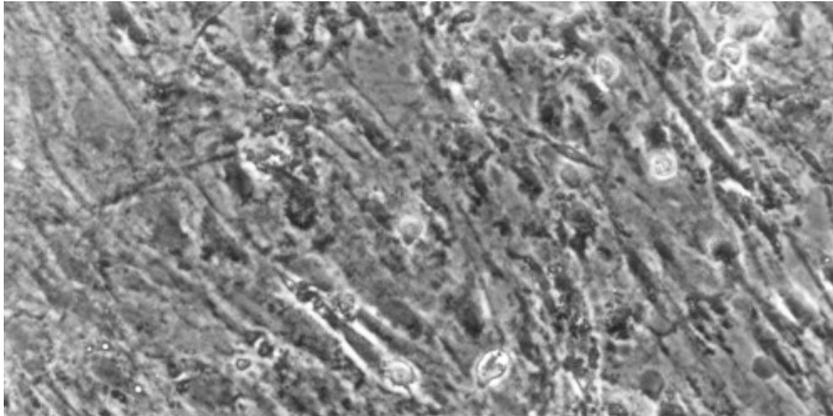
**Abb. 4:** Positive von-Kossa-Färbung von kalzifizierenden SaOS2-Zellen



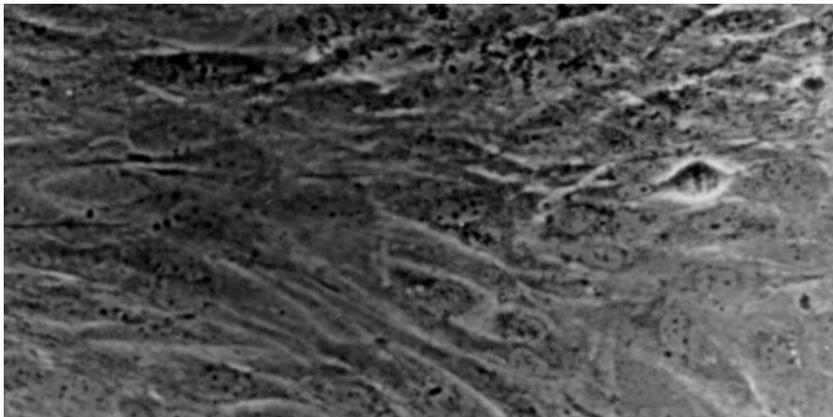
**Abb. 5:** Röntgenuntersuchung von SaOS2-Zellen mit spritzerförmigem, röntgendichtem Kalknachweis

#### **4.1.2. Primäre Humane Osteoblasten**

Durch das Auswachsenlassen der Osteoblasten aus gereinigten Spongiosabälkchen konnten Zellen mit einer Vitalität von über 90 % gewonnen werden. Die Zellzahlverdopplungszeit betrug durchschnittlich 72 Stunden. In der Lichtmikroskopie zeigten frisch isolierte Osteoblasten eine polygonale Form mit langen Zytoplasmafortsätzen. Mit zunehmender Kulturdauer wiesen die Zellen einen fibroblastenartigen Phänotyp auf. Die Identifikation der primären humanen Osteoblasten erfolgte mit der unter 3.2.4. beschriebenen Enzymreaktion für Alkalische Phosphatase (Daten nicht gezeigt). Die mit Dexamethason behandelten Osteoblasten zeigten eine deutlich niedrigere Proliferationsrate gegenüber den Kontrollzellen. Unter Vitamin D3-Stimulation konnte kein Unterschied zu den Kontrollen beobachtet werden. Osteoblasten, die einer Behandlung mit Vitamin C und  $\beta$ -Glycerophosphat unterzogen wurden, begannen am 2.- 4. Tag in Kultur abzuschwimmen. Spätestens am 6. Kulturtag waren alle Zellen avital. Unter alleiniger  $\beta$ -Glycerophosphat-Stimulation trat der Effekt durchschnittlich 1 – 2 Tage früher auf. Die mit Vitamin C behandelten Kontrollen zeigten keine Veränderungen (siehe Tab. 6). Letzlich wurde die Versuchsreihe in den molekularbiologischen Untersuchungen nicht berücksichtigt.



**Abb. 6:** Humane Osteoblasten unter Dexamethason mit spindelförmigem Zelleib



**Abb. 7:** Humane Osteoblasten unter Vitamin D3 mit fibroblastenartigem Aussehen

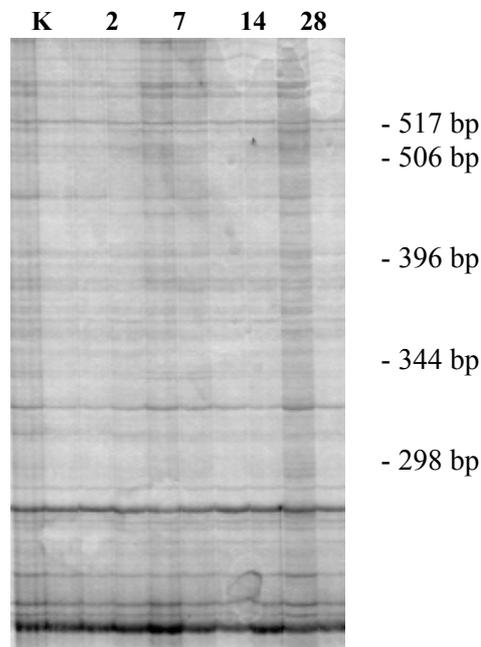
|   | <b>SaOS2-Zellen</b>                             | <b>Humane Osteoblasten</b>                 |
|---|---|--|
| <b>Dexamethason</b>                                     | Abnahme der Proliferationsrate                  | Abnahme der Proliferationsrate             |
| <b>Vitamin D3</b>                                       | Keine Veränderung gegenüber den Kontrollen      | Keine Veränderung gegenüber den Kontrollen |
| <b>Vitamin C und <math>\beta</math>-Glycerophosphat</b> | Kleine Kalkformationen ab dem 24.-26. Kulturtag | Absterben der Zellen ab dem 3. Kulturtag   |

**Tab. 6:** Zusammenfassung der morphologischen Veränderungen der Zellkulturen nach Zugabe der beschriebenen Substanzen

## 4.2. Molekularbiologische Untersuchungen

### 4.2.1. RNA-AP-PCR

Die RNA-AP-PCR wurde als Screeningverfahren zum Nachweis von unterschiedlichen Expressionsmustern der Zellen in verschiedenen Wachstums- und Differenzierungsstadien eingesetzt. In mehreren Experimenten konnte unter Verwendung verschiedener arbiträrer Primer und Primerkonzentrationen kein eindeutiger Unterschied zwischen den Zellen nachgewiesen werden.

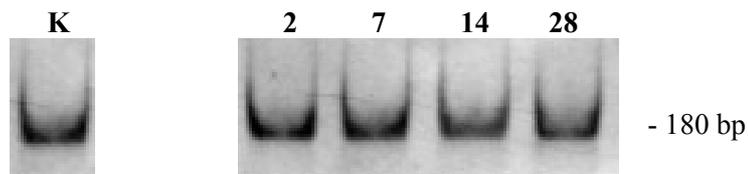


**Abb. 8:** Beispiel eines PAA-Gels  
Mit RAP-Produkten: SaOS2-Zellen  
Unter Vitamin C und  
 $\beta$ -Glycerophosphat  
K=Kontrolle Tag 0,  
2=Tag 2,  
7=Tag 7,  
14=Tag 14  
28=Tag 28,  
jeweils 150ng/200ng RNA

## 4.2.2. Spezifische RT-PCR

### 4.2.2.1. Qualitätskontrolle mit $\beta$ -Actin

Als positive Expressionskontrolle wurde die Expression des Haushaltsgens  $\beta$ -Actin in allen Experimenten als Kontrolle überprüft. Die  $\beta$ -Actin-m-RNA-Expression der verschiedenen Zellen war jeweils gleich stark.



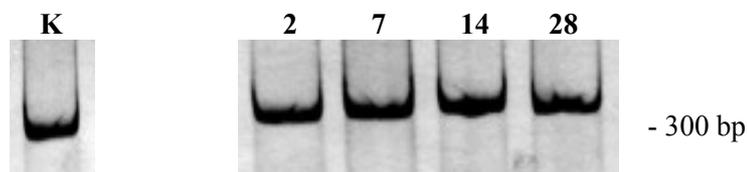
**Abb. 9:**  $\beta$ -Actin, SaOS2-Zellen  
K=Kontrolle Tag 0, 2=Tag 2, 7=Tag 7,  
14=Tag 14, 28=Tag 28

### 4.2.2.2. Matrix Proteine

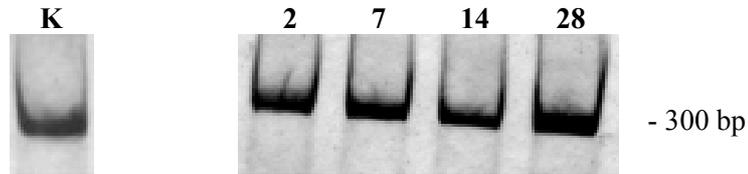
#### 4.2.2.2.1. Alkalische Phosphatase

##### 4.2.2.2.1.1. SaOS2-Zellen

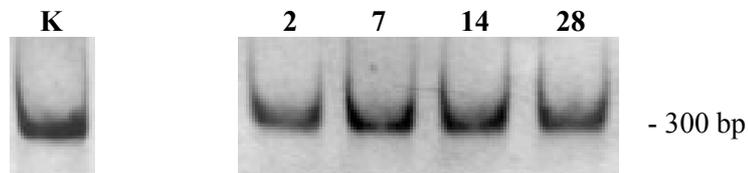
Das Alkalische Phosphatase-Gen wurde von SaOS2-Zellen stark exprimiert. Unter Vitamin C und  $\beta$ -Glycerophosphat veränderte sich die Expression nicht. Unter Dexamethason fanden sich geringe Unterschiede in der Expressionsstärke wie unter Vitamin D3.



**Abb. 10:** Alkalische Phosphatase, SaOS2-Zellen,  
Vitamin C und  $\beta$ -Glycerophosphat  
K=Kontrolle Tag 0, 2=Tag 2, 7=Tag 7,  
14=Tag 14, 28=Tag 28



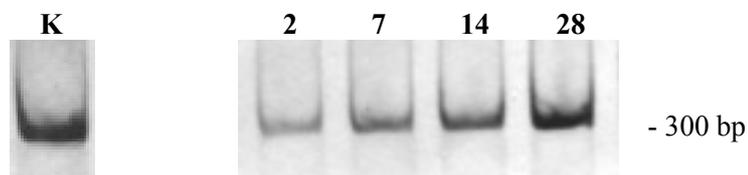
**Abb. 11:** Alkalische Phosphatase, SaOS2-Zellen,  
Dexamethason  
K=Kontrolle Tag 0, 2=Tag 2, 7=Tag 7,  
14=Tag 14, 28=Tag 28



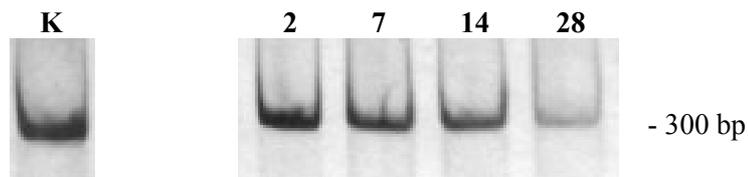
**Abb. 12:** Alkalische Phosphatase, SaOS2-Zellen,  
Vitamin D3  
K=Kontrolle Tag 0, 2=Tag 2, 7=Tag 7,  
14=Tag 14, 28=Tag 28

#### 4.2.2.2.1.2. Osteoblasten

In der Gruppe der mit Dexamethason stimulierten Zellen ließ sich eine Hochregulation der Alkalischen Phosphatase-m-RNA nachweisen, ebenso in den Kontrollgruppen. Unter Vitamin D3 dagegen fand sich eine Abnahme der Bandenstärke.



**Abb. 13:** Alkalische Phosphatase, Osteoblasten,  
Dexamethason  
K=Kontrolle Tag 0, 2=Tag 2, 7=Tag 7,  
14=Tag 14, 28=Tag 28



**Abb. 14:** Alkalische Phosphatase, Osteoblasten, Vitamin D3  
K=Kontrolle Tag 0, 2=Tag 2, 7=Tag 7,  
14=Tag 14, 28=Tag 28

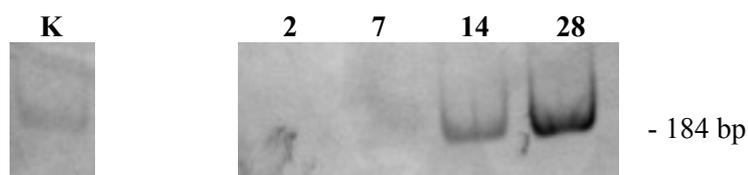
#### 4.2.2.2.2. Osteonectin

##### 4.2.2.2.2.1. SaOS2-Zellen

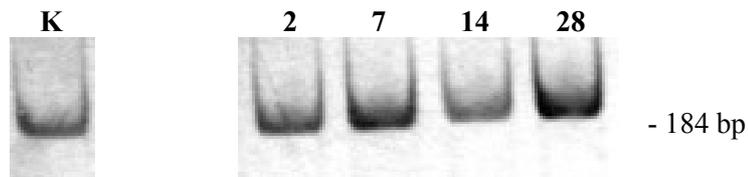
Für Osteonectin ließ sich eine schwache Genexpression nachweisen. Unter alleiniger Vitamin C-Stimulation wurde das Gen an Tag 28 nicht mehr exprimiert, unter Phosphat-Stimulation fanden sich keine Banden.

Unter Stimulation mit beiden Substanzen konnte eine deutlich erhöhte Expression an Kulturtag 14 und 28 nachgewiesen werden.

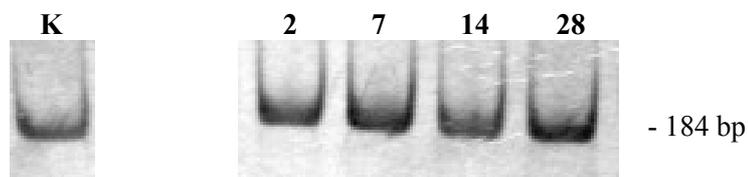
In der Versuchsreihe mit Dexamethason und Vitamin D3 zeigten sich quantitative Expressionsunterschiede, die nicht von Zeitdauer oder Substanzzusatz abhängig waren.



**Abb. 15:** Osteonectin, SaOS2-Zellen, Vitamin C und  $\beta$ -Glycerophosphat  
K=Kontrolle Tag 0, 2=Tag 2, 7=Tag 7,  
14=Tag 14, 28=Tag 28



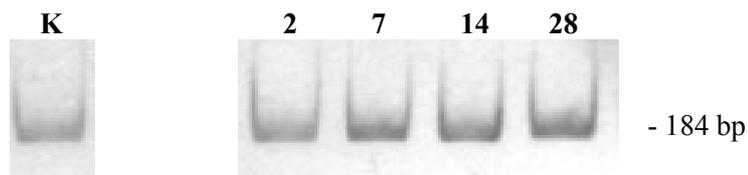
**Abb. 16:** Osteonectin, SaOS2-Zellen, Dexamethason  
K=Kontrolle Tag 0, 2=Tag 2, 7=Tag 7,  
14=Tag 14, 28=Tag 28



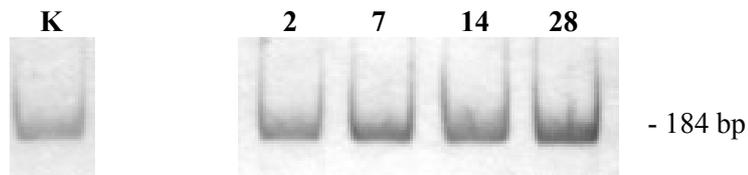
**Abb. 17:** Osteonectin, SaOS2-Zellen, Vitamin D3  
K=Kontrolle Tag 0, 2=Tag 2, 7=Tag 7,  
14=Tag 14, 28=Tag 28

#### 4.2.2.2.2. Osteoblasten

Das Osteonectin-Gen wurde von Osteoblasten exprimiert, jedoch zeigten sich keine Unterschiede in der Expressionsstärke.



**Abb. 18:** Osteonectin, Osteoblasten, Dexamethason  
K=Kontrolle Tag 0, 2=Tag 2, 7=Tag 7,  
14=Tag 14, 28=Tag 28



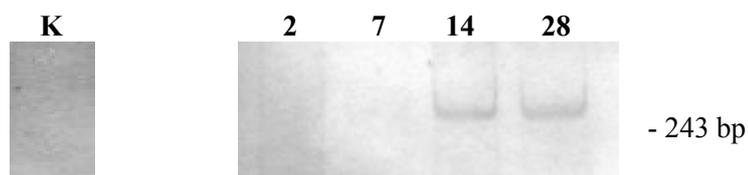
**Abb. 19:** Osteonectin, Osteoblasten, Vitamin D3  
K=Kontrolle Tag 0, 2=Tag 2, 7=Tag 7,  
14=Tag 14, 28=Tag 28

#### 4.2.2.2.3. Osteopontin

##### 4.2.2.2.3.1. SaOS2-Zellen

Eine basale Expression des Osteopontin-Gens konnte nicht nachgewiesen werden. Eine schwache Expression des Gens fand sich an Kulturtag 14 und 28 unter Vitamin C und  $\beta$ -Glycerophosphat. Deutlich schwächer zeigte sich diese Expression auch in der  $\beta$ -Glycerophosphat-Kontrolle.

Unter Dexamethason und Vitamin D3-Stimulation wurde Osteopontin nicht exprimiert.



**Abb. 20:** Osteopontin, SaOS2-Zellen, Vitamin C  
und  $\beta$ -Glycerophosphat  
K=Kontrolle Tag 0, 2=Tag 2, 7=Tag 7,  
14=Tag 14, 28=Tag 28

##### 4.2.2.2.3.2. Osteoblasten

Die Genexpression von Osteopontin konnte an humanen Osteoblasten nicht nachgewiesen werden.

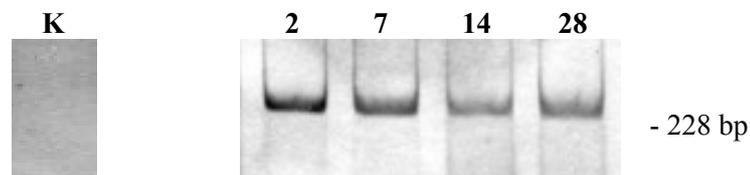
#### 4.2.2.2.4. Osteocalcin

##### 4.2.2.2.4.1. SaOS2-Zellen

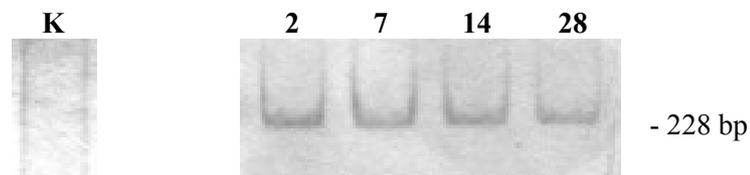
In SaOS2-Zellen fand sich keine basale Expression des Osteocalcin-Gens.

Unter Vitamin C und  $\beta$ -Glycerophosphat-Stimulation war die Expression an Tag 2 am höchsten und im Verlauf abnehmend.

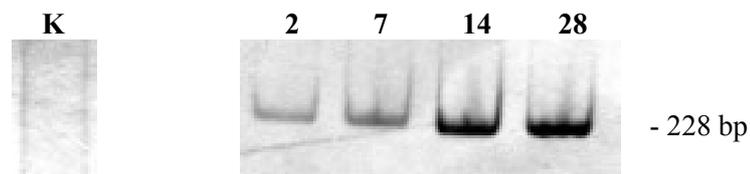
Unter Stimulation mit Dexamethason fand sich eine schwache Expression, unter Vitamin D3 nahm die Expressionsstärke in Abhängigkeit der Kulturdauer zu.



**Abb. 21:** Osteocalcin, SaOS2-Zellen, Vitamin C und  $\beta$ -Glycerophosphat  
K=Kontrolle Tag 0, 2=Tag 2, 7=Tag 7, 14=Tag 14, 28=Tag 28



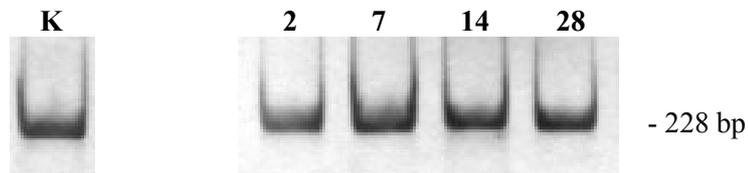
**Abb. 22:** Osteocalcin, SaOS2-Zellen, Dexamethason  
K=Kontrolle Tag 0, 2=Tag 2, 7=Tag 7, 14=Tag 14, 28=Tag 28



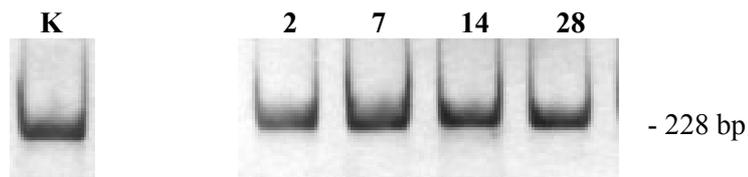
**Abb. 23:** Osteocalcin, SaOS2-Zellen, Vitamin D3  
K=Kontrolle Tag 0, 2=Tag 2, 7=Tag 7, 14=Tag 14, 28=Tag 28

#### 4.2.2.2.4.2. Osteoblasten

In Osteoblasten zeigten sich Unterschiede in der Expressionsstärke für Osteocalcin.



**Abb. 24:** Osteocalcin, Osteoblasten, Dexamethason  
K=Kontrolle Tag 0, 2=Tag 2, 7=Tag 7, 14=Tag 14, 28=Tag 28



**Abb. 25:** Osteocalcin, Osteoblasten, Vitamin D3  
K=Kontrolle Tag 0, 2=Tag 2, 7=Tag 7, 14=Tag 14, 28=Tag 28

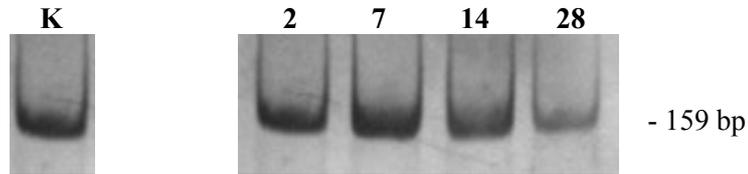
### 4.2.2.3. Kollagene

#### 4.2.2.3.1. Kollagen Typ I

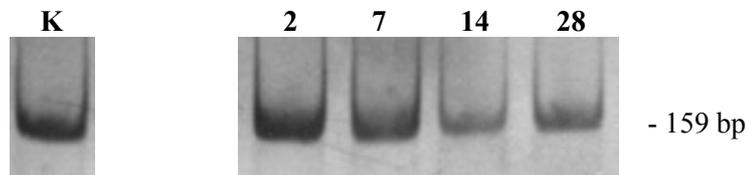
##### 4.2.2.3.1.1. SaOS2-Zellen

Unter alleiniger Vitamin C-Stimulation fand sich eine Abnahme der Expressionsstärke für Kollagen I, die sich unter Stimulation mit Vitamin C und  $\beta$ -Glycerophosphat nicht nachweisen ließ.

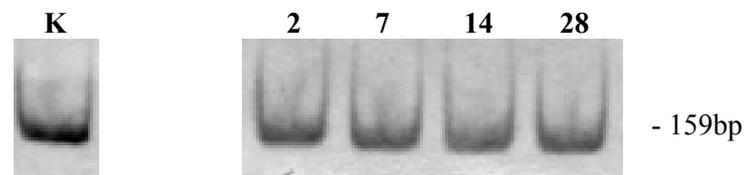
Unter Dexamethason und Vitamin D3 fand keine Regulation der Expression statt.



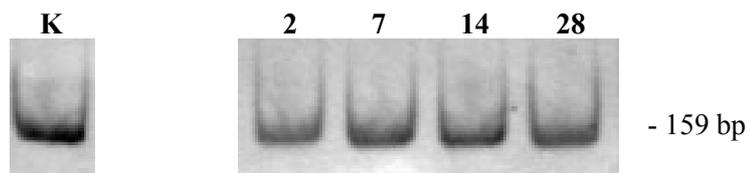
**Abb. 26:** Kollagen Typ I, SaOS2-Zellen, Vitamin C und  $\beta$ -Glycerophosphat  
K=Kontrolle Tag 0, 2=Tag 2, 7=Tag 7, 14=Tag 14, 28=Tag 28



**Abb. 27:** Kollagen Typ I, SaOS2-Zellen, Vitamin C  
K=Kontrolle Tag 0, 2=Tag 2, 7=Tag 7, 14=Tag 14, 28=Tag 28



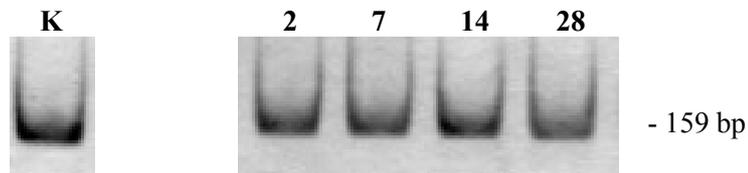
**Abb. 28:** Kollagen Typ I, SaOS2-Zellen, Dexamethason  
K=Kontrolle Tag 0, 2=Tag 2, 7=Tag 7, 14=Tag 14, 28=Tag 28



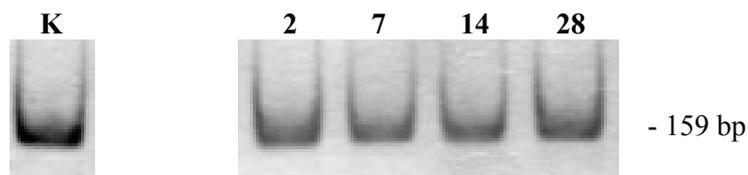
**Abb. 29:** Kollagen Typ I, SaOS2-Zellen, Vitamin D3  
K=Kontrolle Tag 0, 2=Tag 2, 7=Tag 7, 14=Tag 14, 28=Tag 28

#### 4.2.2.3.1.2. Osteoblasten

Unter Dexamethason und Vitamin D3 fand ebenfalls keine Regulation der Expression statt.



**Abb. 30:** Kollagen Typ I, Osteoblasten, Dexamethason  
K=Kontrolle Tag 0, 2=Tag 2, 7=Tag 7,  
14=Tag 14, 28=Tag 28

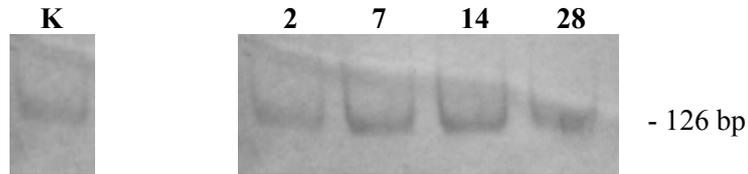


**Abb. 31:** Kollagen Typ I, Osteoblasten, Vitamin D3  
K=Kontrolle Tag 0, 2=Tag 2, 7=Tag 7,  
14=Tag 14, 28=Tag 28

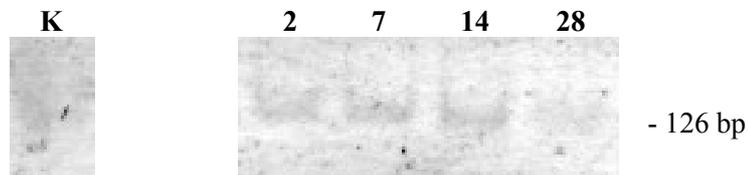
#### 4.2.2.3.2. Kollagen Typ II

##### 4.2.2.3.2.1. SaOS2-Zellen

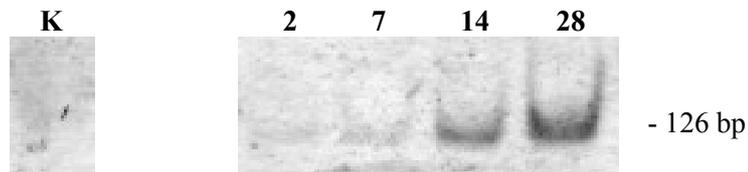
Unter Vitamin C und  $\beta$ -Glycerophosphat ließ sich eine schwache, nicht differentielle Genexpression nachweisen. Unter Dexamethason-Stimulation war die Genexpression von Kollagen Typ II fast nicht nachweisbar. Unter Stimulation mit Vitamin D3 wie auch in den Kontrollen fand sich eine Zunahme der Genexpressionsstärke.



**Abb. 32:** Kollagen Typ II, SaOS2-Zellen, Vitamin C und  $\beta$ -Glycerophosphat  
K=Kontrolle Tag 0, 2=Tag 2, 7=Tag 7, 14=Tag 14, 28=Tag 28



**Abb. 33:** Kollagen Typ II, SaOS2-Zellen, Dexamethason  
K=Kontrolle Tag 0, 2=Tag 2, 7=Tag 7, 14=Tag 14, 28=Tag 28



**Abb. 34:** Kollagen Typ II, SaOS2-Zellen, Vitamin D3  
K=Kontrolle Tag 0, 2=Tag 2, 7=Tag 7, 14=Tag 14, 28=Tag 28

#### 4.2.2.3.2.2. *Osteoblasten*

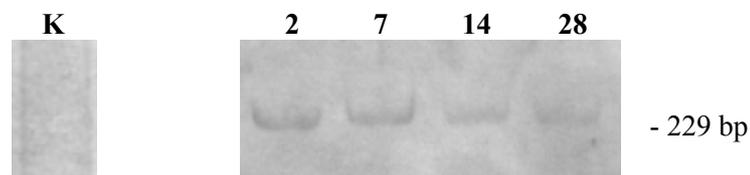
An Osteoblasten konnte eine Expression für das Kollagen Typ II-Gen nicht nachgewiesen werden.

### 4.2.2.3.3. Kollagen Typ III

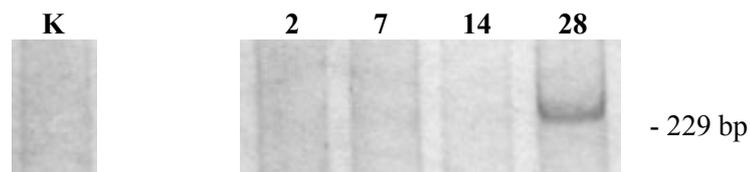
#### 4.2.2.3.3.1. SaOS2-Zellen

Unter Vitamin C und  $\beta$ -Glycerophosphat-Stimulation ließ sich lediglich in der Kontrollgruppe mit Vitamin C-Supplementierung eine kräftige Bande an Kulturtag 28 nachweisen. Ansonsten fand sich nur eine minimale Expression des Kollagen Typ III-Gens.

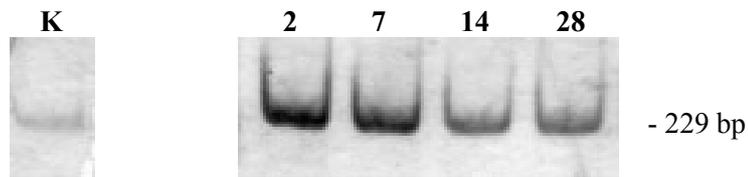
Sowohl unter Dexamethason als auch unter Vitamin D3 nahm die Genexpressionsstärke in Abhängigkeit von der Kulturdauer ab.



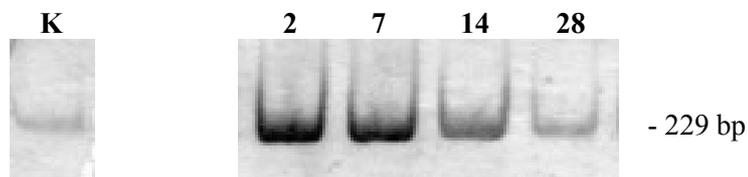
**Abb. 35:** Kollagen Typ III, SaOS2-Zellen, Vitamin C und  $\beta$ -Glycerophosphat  
K=Kontrolle Tag 0, 2=Tag 2, 7=Tag 7, 14=Tag 14, 28=Tag 28



**Abb. 36:** Kollagen Typ III, SaOS2-Zellen, Vitamin C  
K=Kontrolle Tag 0, 2=Tag 2, 7=Tag 7, 14=Tag 14, 28=Tag 28



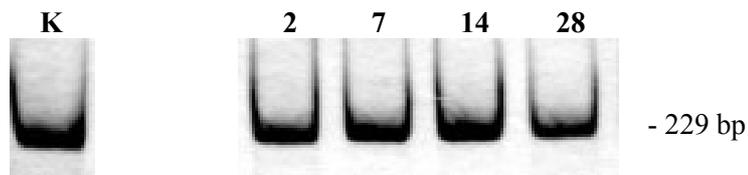
**Abb. 37:** Kollagen Typ III, SaOS2-Zellen,  
Dexamethason  
K=Kontrolle Tag 0, 2=Tag 2, 7=Tag 7,  
14=Tag 14, 28=Tag 28



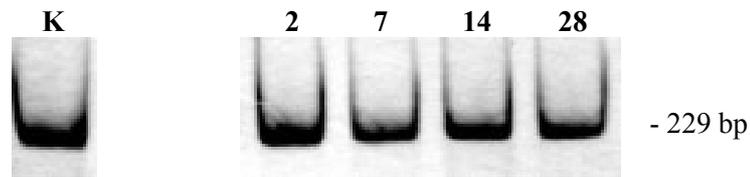
**Abb. 38:** Kollagen Typ III, SaOS2-Zellen, Vitamin D3  
K=Kontrolle Tag 0, 2=Tag 2, 7=Tag 7,  
14=Tag 14, 28=Tag 28

#### 4.2.2.3.3.2. Osteoblasten

Unter Dexamethason und Vitramin D3-Stimulation ließ sich eine differentielle Genexpression nicht nachweisen.



**Abb. 39:** Kollagen Typ III, Osteoblasten,  
Dexamethason,  
K=Kontrolle Tag 0, 2=Tag 2, 7=Tag 7,  
14=Tag 14, 28=Tag 28



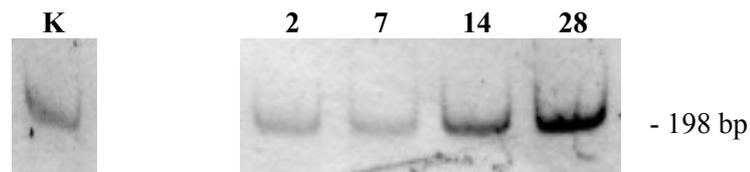
**Abb. 40:** Kollagen Typ III, Osteoblasten, Vitamin D3  
K=Kontrolle Tag 0, 2=Tag 2, 7=Tag 7,  
14=Tag 14, 28=Tag 28

#### 4.2.2.4. Knochenmorphogenese-Proteine

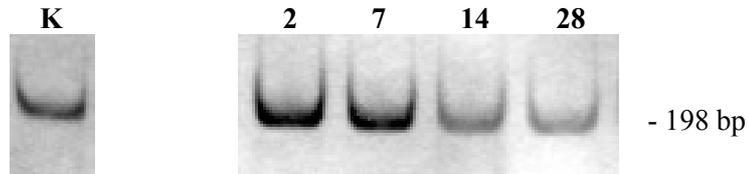
##### 4.2.2.4.1. Bone Morphogenetic Protein 7 (BMP 7)

###### 4.2.2.4.1.1. SaOS2-Zellen

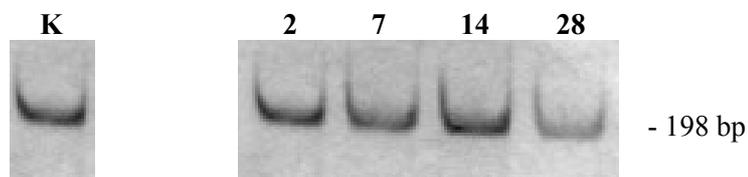
BMP 7 wurde in SaOS2-Zellen schwach exprimiert. Unter Vitamin C und  $\beta$ -Glycerophosphat-Stimulation nahm die Expression an Kulturtag 14 und 28 zu. Unter Dexamethson nahm die Expressionsstärke in Abhängigkeit der Kulturdauer ab, ebenso in den Kontrollen. Unter Vitamin D3-Stimulation fand man ein inhomogenes Expressionsmuster.



**Abb. 41:** BMP 7, SaOS2-Zellen, Vitamin C und  
 $\beta$ -Glycerophosphat  
K=Kontrolle Tag 0, 2=Tag 2, 7=Tag 7,  
14=Tag 14, 28=Tag 28



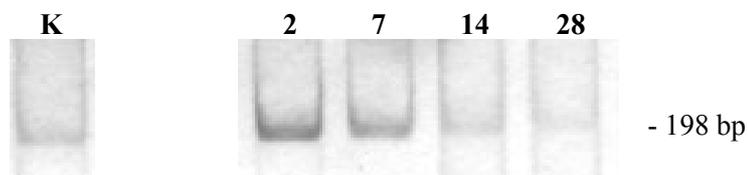
**Abb. 42:** BMP 7, SaOS2-Zellen, Dexamethason  
K=Kontrolle Tag 0, 2=Tag 2, 7=Tag 7,  
14=Tag 14, 28=Tag 29



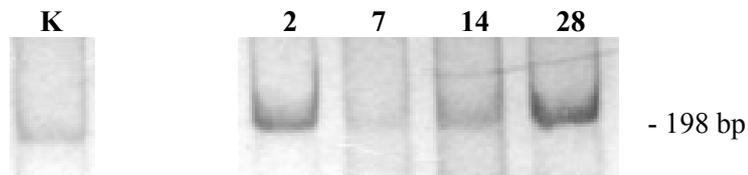
**Abb. 43:** BMP 7, SaOS2-Zellen, Vitamin D3  
K=Kontrolle Tag 0, 2=Tag 2, 7=Tag 7,  
14=Tag 14, 28=Tag 28

#### 4.2.2.4.1.2. Osteoblasten

BMP 7 wurde von Osteoblasten schwach exprimiert. Unter Dexamethason fand sich eine differentielle Regulation an Kulturtag 2 und 7, die man in den Kontrollen nicht beobachten konnte. Unter Vitamin D3-Stimulation ließ sich wie bei den SaOS2-Zellen ein inhomogenes Expressionsmuster nachweisen.



**Abb. 44:** BMP 7, Osteoblasten, Dexamethason  
K=Kontrolle Tag 0, 2=Tag 2, 7=Tag 7,  
14=Tag 14, 28=Tag 28



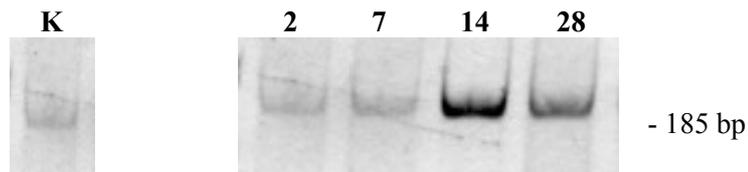
**Abb. 45:** BMP 7, Osteoblasten, Vitamin D3  
K=Kontrolle Tag 0, 2=Tag 2, 7=Tag 7,  
14=Tag 14, 28=Tag 28

#### 4.2.2.4.2. Bone Morphogenetic Protein 8 (BMP 8)

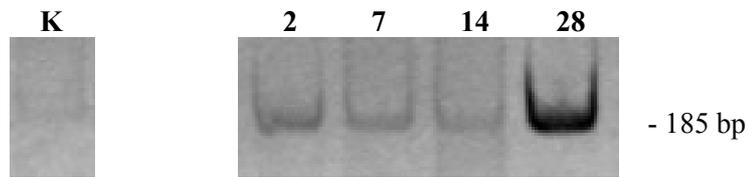
##### 4.2.2.4.2.1. SaOS2-Zellen

In den Kontrollzellreihen mit Vitamin C oder  $\beta$ -Glycerophosphat fand sich eine starke Silbergelbande an Tag 7 und 14. Unter beiden Substanzen ließ sich eine schwache Expression für BMP 8 nachweisen mit einem Maximum an Kulturtag 14.

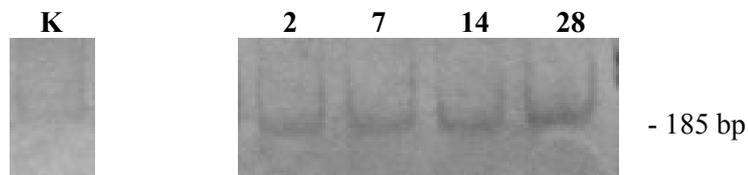
Unter Dexamethason, wie auch in den Kontrollen nahm die Expressionsstärke über den Zeitraum der Kulturdauer zu. Unter Vitamin D3 war die Expressionsstärke gleichbleibend schwach.



**Abb. 46:** BMP 8, SaOS2-Zellen, Vitamin C und  
 $\beta$ -Glycerophosphat  
K=Kontrolle Tag 0, 2=Tag 2, 7=Tag 7,  
14=Tag 14, 28=Tag 28



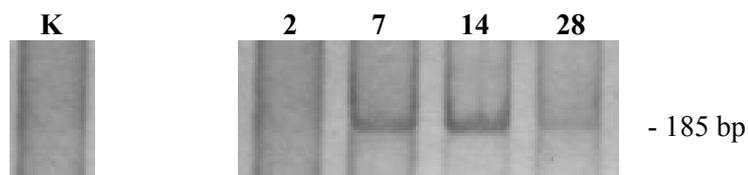
**Abb. 47:** BMP 8, SaOS2-Zellen, Dexamethason  
K=Kontrolle Tag 0, 2=Tag 2, 7=Tag 7,  
14=Tag 14, 28=Tag 28



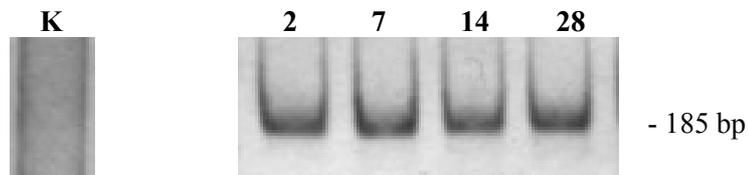
**Abb. 48:** BMP 8, SaOS2-Zellen, Vitamin D3  
K=Kontrolle Tag 0, 2=Tag 2, 7=Tag 7,  
14=Tag 14, 28=Tag 28

#### 4.2.2.4.2.2. Osteoblasten

An Kulturtag 7 und 14 ließ sich eine schwache Expression des BMP 8-Gens in allen Zellreihen nachweisen.



**Abb. 49:** BMP 8, Osteoblasten, Dexamethason  
K=Kontrolle Tag 0, 2=Tag 2, 7=Tag 7,  
14=Tag 14, 28=Tag 28



**Abb. 50:** BMP 8, Osteoblasten, Vitamin D3  
K=Kontrolle Tag 0, 2=Tag 2, 7=Tag 7,  
14=Tag 14, 28=Tag 28

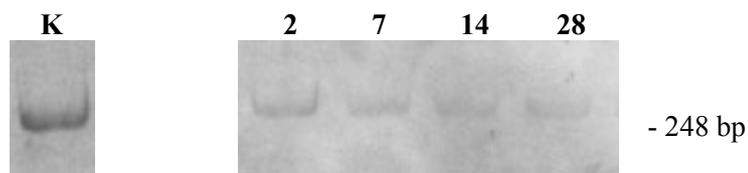
## 4.2.2.5. Insulin-like-Growth-Factor-Rezeptor-Familie

### 4.2.2.5.1. Insulin-like-Growth-Factor-Rezeptor 1 (IGFR-1)

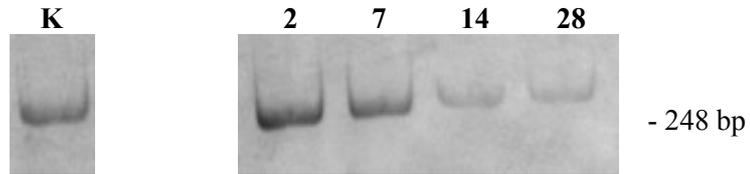
#### 4.2.2.5.1.1. SaOS2-Zellen

IGFR-1 wurde in SaOS2-Zellen stark exprimiert. In der Kontrollreihe mit Vitamin C wurde die Expression des Gens über die Kulturdauer schwächer. In der Zellreihe mit  $\beta$ -Glycerophosphat sowie  $\beta$ -Glycerophosphat und Vitamin C war die Expression gleichbleibend schwach.

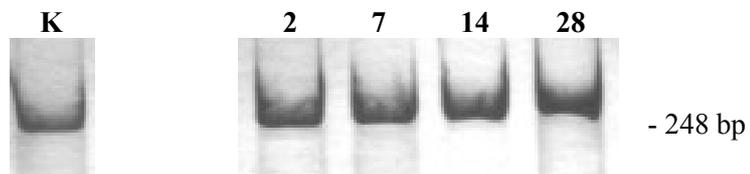
Unter Dexamethason und Vitamin D3 ließ sich eine unverändert starke Expression nachweisen.



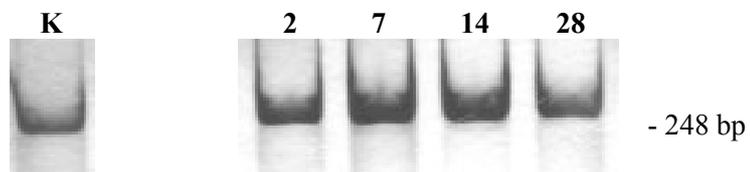
**Abb. 51:** IGFR-1, SaOS2-Zellen, Vitamin C und  
 $\beta$ -Glycerophosphat  
K=Kontrolle Tag 0, 2=Tag 2, 7=Tag 7,  
14=Tag 14, 28=Tag 28



**Abb. 52:** IGFR-1, SaOS2-Zellen, Vitamin C  
K=Kontrolle Tag 0, 2=Tag 2, 7=Tag 7,  
14=Tag 14, 28=Tag 28



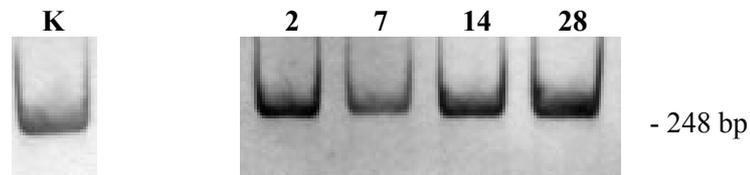
**Abb. 53:** IGFR-1, SaOS2-Zellen, Dexamethason  
K=Kontrolle Tag 0, 2=Tag 2, 7=Tag 7,  
14=Tag 14, 28=Tag 28



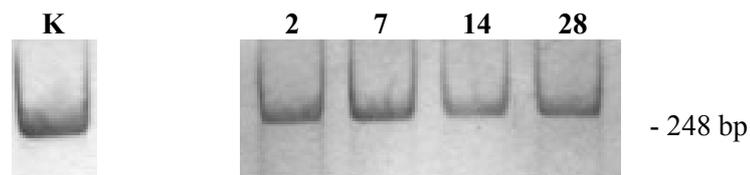
**Abb. 54:** IGFR-1, SaOS2-Zellen, Vitamin D3  
K=Kontrolle Tag 0, 2=Tag 2, 7=Tag 7,  
14=Tag 14, 28=Tag 28

#### 4.2.2.5.1.2. Osteoblasten

Wie in SaOS2-Zellen ließ sich in Osteoblasten unter Dexamethason und Vitamin D3 eine konstante Genexpression für IGFR-1 nachweisen.



**Abb. 55:** IGFR-1, Osteoblasten, Dexamethason  
K=Kontrolle Tag 0, 2=Tag 2, 7=Tag 7,  
14=Tag 14, 28=Tag 28



**Abb. 56:** IGFR-1, Osteoblasten, Vitamin D3  
K=Kontrolle Tag 0, 2=Tag 2, 7=Tag 7,  
14=Tag 14, 28=Tag 28

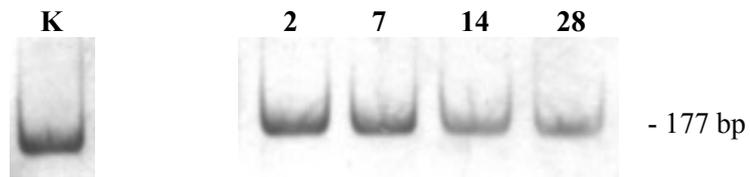
### 4.2.2.6. Notch-Rezeptor-Familie

#### 4.2.2.6.1. Notch 1

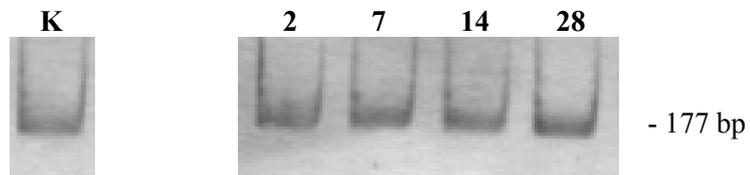
##### 4.2.2.6.1.1. SaOS2-Zellen

Unter  $\beta$ -Glycerophosphat und Vitamin C-Stimulation wie auch in den Kontrollen nahm die Notch 1-Expression konstant ab.

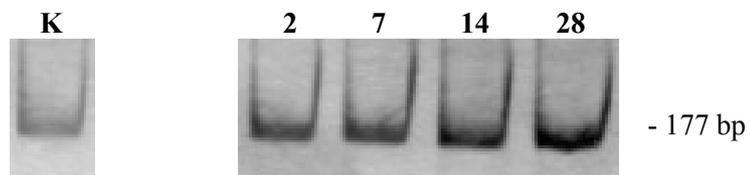
Nach Zugabe von Dexamethason blieb die Genexpression konstant, unter Vitamin D3-Stimulation ließ sich eine Zunahme der Expressionsstärke an Tag 14 und 28 nachweisen.



**Abb. 57:** Notch 1, SaOS2-Zellen, Vitamin C und  $\beta$ -Glycerophosphat  
K=Kontrolle Tag 0, 2=Tag 2, 7=Tag 7, 14=Tag 14, 28=Tag 28



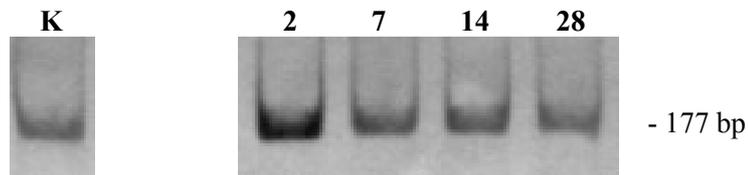
**Abb. 58:** Notch 1, SaOS2-Zellen, Dexamethason  
K=Kontrolle Tag 0, 2=Tag 2, 7=Tag 7, 14=Tag 14, 28=Tag 28



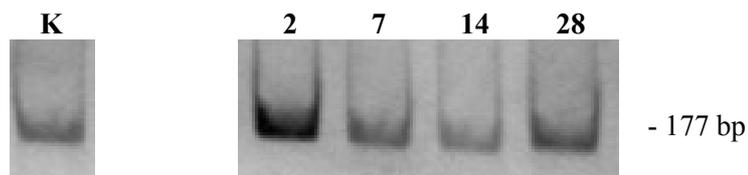
**Abb. 59:** Notch 1, SaOS2-Zellen, Vitamin D3  
K=Kontrolle Tag 0, 2=Tag 2, 7=Tag 7, 14=Tag 14, 28=Tag 28

#### 4.2.2.6.1.2. Osteoblasten

Unter Dexamethason und Vitamin D3-Stimulation war ein Expressionsmaximum an Kulturtag 2 nachzuweisen.



**Abb. 60:** Notch 1, Osteoblasten, Dexamethason  
K=Kontrolle Tag 0, 2=Tag 2, 7=Tag 7,  
14=Tag 14, 28=Tag 28



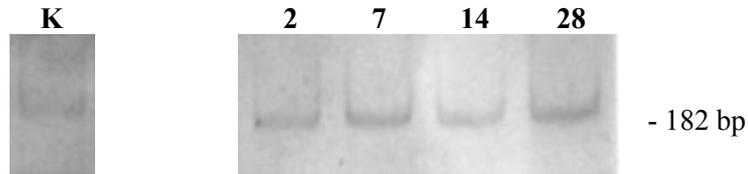
**Abb. 61:** Notch 1, Osteoblasten, Vitamin D3  
K=Kontrolle Tag 0, 2=Tag 2, 7=Tag 7,  
14=Tag 14, 28=Tag 28

#### 4.2.2.6.2. Notch 2

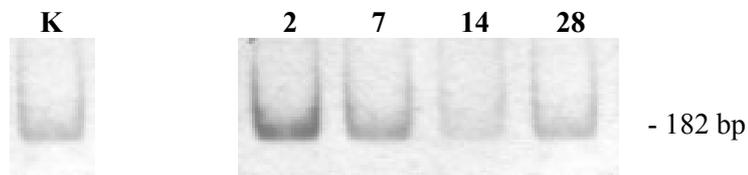
##### 4.2.2.6.2.1. SaOS2-Zellen

Unter Vitamin C und  $\beta$ -Glycerophosphat-Stimulation war eine schwache, aber konstante Genexpression nachweisbar.

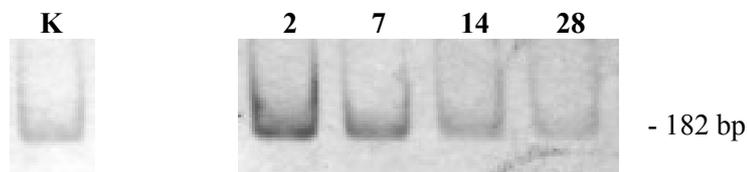
Die Zugabe von Dexamethason oder Vitamin D3 führte zu einer Abnahme der Expressionsstärke.



**Abb. 62:** Notch 2, SaOS2-Zellen, Vitamin C und  $\beta$ -Glycerophosphat  
K=Kontrolle Tag 0, 2=Tag 2, 7=Tag 7, 14=Tag 14, 28=Tag 28



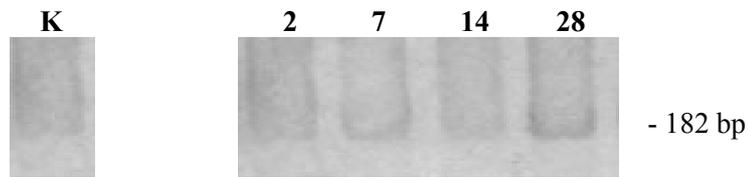
**Abb. 63:** Notch 2, SaOS2-Zellen, Dexamethason  
K=Kontrolle Tag 0, 2=Tag 2, 7=Tag 7, 14=Tag 14, 28=Tag 28



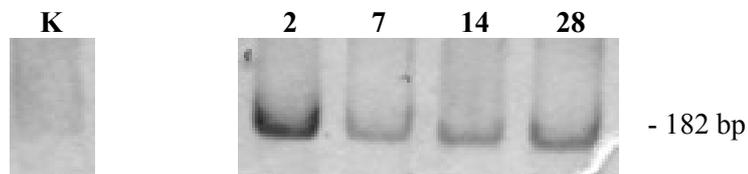
**Abb. 64:** Notch 2, SaOS2-Zellen, Vitamin D3  
K=Kontrolle Tag 0, 2=Tag 2, 7=Tag 7, 14=Tag 14, 28=Tag 28

#### 4.2.2.6.2.2. Osteoblasten

Wie in SaOS2-Zellen führte die Zugabe von Vitamin D3 wie auch in den Kontrollen zu einer Abnahme der Expressionsstärke. Unter Dexamethason-Stimulation allerdings ließ sich über die gesamte Kulturdauer nur ein minimales Expressionslevel nachweisen.



**Abb. 65:** Notch 2, Osteoblasten, Dexamethason  
K=Kontrolle Tag 0, 2=Tag 2, 7=Tag 7,  
14=Tag 14, 28=Tag 28



**Abb. 66:** Notch 2, Osteoblasten, Vitamin D3  
K=Kontrolle Tag 0, 2=Tag 2, 7=Tag 7,  
14=Tag 14, 28=Tag 28

#### 4.2.2.6.3. Notch 3

##### 4.2.2.6.3.1. SaOS-2-Zellen

Eine Genexpression konnte nicht nachgewiesen werden.

##### 4.2.2.6.3.2. Osteoblasten

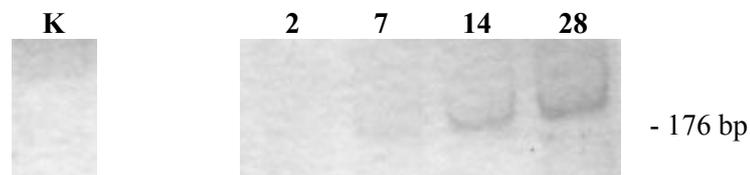
Eine Genexpression konnte nicht nachgewiesen werden.

#### 4.2.2.6.4. Notch 4

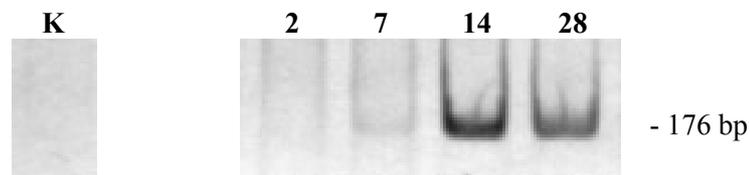
##### 4.2.2.6.4.1. SaOS2-Zellen

Eine schwache Expression des Notch 4-Gens konnte an Kulturtag 14 und 28 unter Vitamin C und  $\beta$ -Glycerophosphat-Stimulation nachgewiesen werden.

Nach Behandlung mit Vitamin D3 fand man ebenso eine Zunahme der Expression an Kulturtag 14 und 28. Unter Dexamethason-Stimulation und in den Kontrollen ließ sich eine Expression von Notch 4 nicht nachweisen.



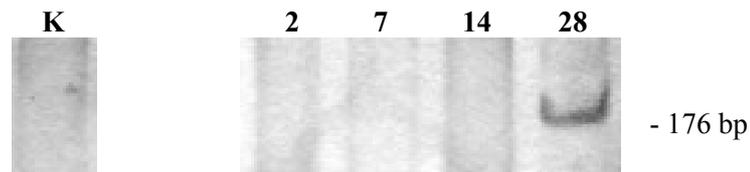
**Abb. 67:** Notch 4, SaOS2-Zellen, Vitamin C und  $\beta$ -Glycerophosphat  
K=Kontrolle Tag 0, 2=Tag 2, 7=Tag 7,  
14=Tag 14, 28=Tag 28



**Abb. 68:** Notch 4, SaOS2-Zellen, Vitamin D3  
K=Kontrolle Tag 0, 2=Tag 2, 7=Tag 7,  
14=Tag 14, 28=Tag 28

#### 4.2.2.6.4.2. Osteoblasten

Unter Vitamin D3-Stimulation beobachtete man an Kulturtag 28 eine schwache Expression des Notch 4-Gens. In den restlichen Zellreihen war die Expression des Gens nicht nachweisbar.



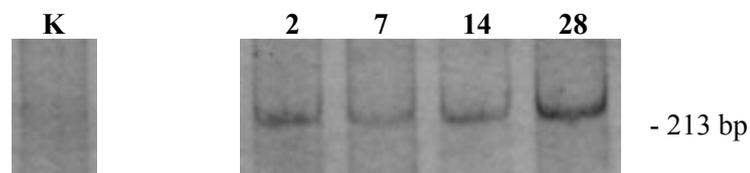
**Abb. 69:** Notch 4, Osteoblasten, Vitamin D3  
K=Kontrolle Tag 0, 2=Tag 2, 7=Tag 7,  
14=Tag 14, 28=Tag 28

#### 4.2.2.7. Human Hairy

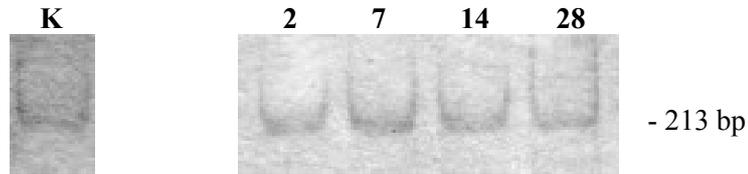
##### 4.2.2.7.1. SaOS2-Zellen

Unter Stimulation mit Vitamin C und  $\beta$ -Glycerophosphat konnte eine schwache Genexpression nachgewiesen werden. Eine differentielle Regulation ergab sich jedoch nicht.

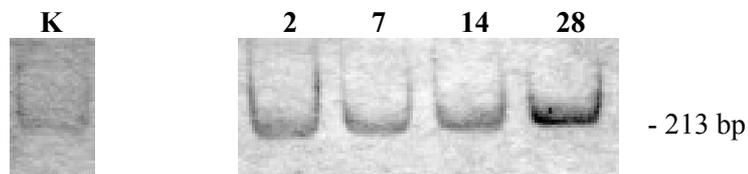
Eine differentielle Regulation konnte ebenfalls nicht nach Stimulation mit Dexamethason nachgewiesen werden. Eine verstärkte Expression fand man nach Gabe von Vitamin D3 an Kulturtag 28.



**Abb. 70:** HumanHairy, SaOS2-Zellen, Vitamin C und  
 $\beta$ -Glycerophosphat  
K=Kontrolle Tag 0, 2=Tag 2, 7=Tag 7,  
14=Tag 14, 28=Tag 28



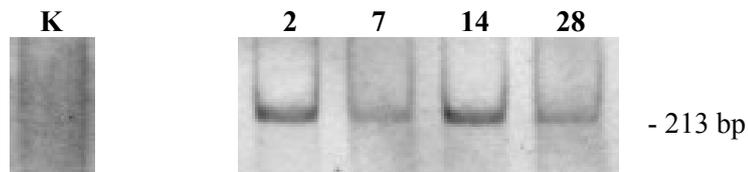
**Abb. 71:** HumanHairy, SaOS2-Zellen, Dexamethason  
K=Kontrolle Tag 0, 2=Tag 2, 7=Tag 7,  
14=Tag 14, 28=Tag 28



**Abb. 72:** HumanHairy, SaOS2-Zellen, Vitamin D3,  
K=Kontrolle Tag 0, 2=Tag 2, 7=Tag 7,  
14=Tag 14, 28=Tag 28

#### 4.2.2.7.2. Osteoblasten

Osteoblasten wiesen wie SaOS2-Zellen eine schwache Genexpression auf. Lediglich nach Gabe von Vitamin D3 zeigte sich eine inkonstante Expression des Human Hairy-Gens.



**Abb. 73:** HumanHairy, Osteoblasten, Vitamin D3  
K=Kontrolle Tag 0, 2=Tag 2, 7=Tag 7,  
14=Tag 14, 28=Tag 28

### 4.2.2.8. Zusammenfassung

| Gen                    | SaOS2-Zellen |        |             | Humane Osteoblasten |        |
|------------------------|--------------|--------|-------------|---------------------|--------|
|                        | DEX          | Vit D3 | Vit C & BGP | DEX                 | Vit D3 |
| Alkalische Phosphatase | -            | -      | -           | -                   | +      |
| Osteonectin            | -            | -      | +           | -                   | -      |
| Osteopontin            | -            | -      | +           | n.n.                | n.n.   |
| Osteocalcin            | +            | +      | +           | -                   | -      |
| Kollagen I             | -            | -      | -           | -                   | -      |
| Kollagen II            | -            | -      | -           | n.n.                | n.n.   |
| Kollagen III           | -            | -      | -           | -                   | -      |
| BMP 7                  | -            | -      | +           | +                   | -      |
| BMP 8                  | -            | +      | +           | -                   | -      |
| IGFR-I                 | -            | -      | -           | -                   | -      |
| Notch 1                | +            | +      | -           | +                   | +      |
| Notch 2                | +            | +      | -           | -                   | +      |
| Notch 3                | n.n.         | n.n.   | n.n.        | n.n.                | n.n.   |
| HumanHairy             | -            | +      | -           | -                   | -      |

**Tab. 7:** Zusammenfassung der untersuchten spezifischen Gene;

DEX Dexamethason

Vit D3 Vitamin D3

Vit C Vitamin C

βGP β-Glycerophosphat

- keine differentielle Regulation

+ differentielle Regulation

n.n. Gen nicht nachweisbar

## 5. Diskussion

Traumatische, degenerative und entzündliche Erkrankungen des Knochens sind ein klinisch relevantes Problem. Um therapeutisch in diese Prozesse eingreifen zu können, ist es notwendig, die Bildung von Gewebe, sowie dessen Reifung und Stabilität genau zu kennen [95, 145]. Der Knochen bildet ein komplexes Netzwerk aus unterschiedlichen Zelltypen in einer definierten Matrix. Dabei interagieren die Zellen sowohl untereinander als auch mit der Extrazellulärmatrix. Die Koordination von Proliferation und Zelldifferenzierung spielt eine wesentliche Rolle für die Entwicklung des Gewebes [39, 98, 179]. Es wurde eine Reihe von Modellen entwickelt, um die einzelnen Komponenten des Netzwerks zu studieren. Ein grundlegender Zugang ist die Kultivierung von Knochenzellen *in vitro*, und die Untersuchung von Synthesvorgängen und metabolischen Ereignissen, um die Faktoren zu analysieren, die das Zellwachstum und die Zelldifferenzierung steuern. Dabei wird die Beziehung von Proliferation und Differenzierung als Eckstein der Zellkulturmodelle gesehen, die sich mit der Regulation von Entwicklung beschäftigen [10]. Die von uns verwendeten Zellkulturmodelle sind geeignet, um die oben beschriebene Beziehung zu untersuchen. Für eine direkte Übertragung auf den Menschen eignen sie sich jedoch nicht. Ebenso sind die von uns untersuchten Faktoren der differentiellen Genexpression nicht direkt auf das Individuum übertragbar. Mit unseren Versuchen sollten funktionelle Zusammenhänge geklärt und regulative Abhängigkeiten auf der Ebene der Transkription identifiziert werden. Inwieweit die untersuchten Faktoren eine entscheidende Rolle im Knochenstoffwechsel und dessen Störungen spielen, ist offen und bedarf der weiteren Abklärung. Aus den Ergebnissen ergab sich jedoch ein interessanter Ansatz für weitere Forschungsarbeiten.

In den letzten Jahren hat sich der Schwerpunkt der unfallchirurgischen Forschung zunehmend von der klinischen und experimentell biomechanischen auf die Grundlagenforschung verlagert. Die rasche Entwicklung sowie die Aussagekraft der biologischen Untersuchungsmethoden, mit den daraus resultierenden Möglichkeiten und Konsequenzen für die Unfallchirurgie, machen es unumgänglich, sich mit der Bedeutung und den Möglichkeiten der Biowissenschaften für die Unfallchirurgie intensiv auseinanderzusetzen.

### **5.1. Dexamethason**

Glucocorticoide inhibieren die Proliferation in unterschiedlichen Zelltypen. Die Aktivierung des Glucocorticoidrezeptors, eines intrazellulären, liganden-aktivierten Transkriptions-Regulatorproteins führt zu einem G1-Zellzyklus-Arrest. Bindet das Hormon an den Rezeptor, kommt es zur Bindung des Komplexes an spezifische Glucocorticoid-Antwort-Elemente in Zielgenen und somit zur Modulation der Transskription von nahegelegenen Promotern [32, 42, 192]. Dabei kann der Rezeptor sowohl die Genexpression erhöhen als auch unterdrücken: Auf der einen Seite induziert der hormonaktivierte Reptor antimitogene Faktoren wie die cyclin-abhängigen Kinasen-inhibitorischen Proteinen -CDIs-, die für den Zellzyklusarrest verantwortlich sind. Auf der anderen Seite agiert der Rezeptor als Transkriptionsrepressor durch die Interaktion mit antimitogenen Substanzen, wie den Zyklinen und cyclinabhängigen Kinasen-CDKs [161].

SaOS2-Zellen sind p53 und Retinoblastom-defizient und exprimieren nur Cyclin D3 [41], d.h. der Zellzyklusarrest wird wahrscheinlich durch die Aktivierung der antimitogenen Proteine p21 und p27 bewirkt. Dabei beinhaltet der p21-Promoter verschiedene Antwortelemente für die Zelldifferenzierung [29]. Letzlich ist der genaue Weg von der Rezeptoraktivierung bis zum Zellzyklusarrest jedoch nicht geklärt. Zwar scheint dieser Weg in SaOS2-Zellen über die p21-Aktivierung gesteuert zu werden, jedoch aktiviert p21 wiederum p53 [106], das SaOS-Zellen nicht exprimieren.

## 5.2 Vitamin D3

In Eukaryoten umfaßt die Einleitung der Gentranskription ein koordiniertes Zusammenspiel von RNA-Polymerase II und generellen Initiationsfaktoren zu einem funktionellen Präinitiations-Komplex auf einem minimalem Promoterelement. Molekulare *cis*- und *trans*- Prozesse koordinieren die Gentranskription, wobei die *cis*-Faktoren aus Elementen bestehen, die intrinsisch zur Gensequenz oder zur strukturellen und molekularen Organisation des Genlokus sind [200]. Gemeinsam mit strukturellen Veränderungen im Chromatin, die den Zugang von Transkriptionsfaktoren zu den Zielgenen erlauben, wird die basale oder verstärkte Expression von dem Zusammenspiel von Transkriptionsfaktoren mit deren verwandten DNA-Bindungsseiten und Komponenten des Transkriptionskomplexes entweder direkt oder durch intermediäre Proteine kontrolliert. Die Aktivierung oder Repression von Transkription wird wahrscheinlich von spezifischen oder allgemeinen *trans*-Faktoren vermittelt, die an Kontrollelementen upstream, downstream oder zwischen Intron/Exon-Sequenzen des Gens binden, und so das Zusammenspiel und die Funktion des Präinitiationskomplexes steuern.

1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> ist der biologisch aktivste Metabolit des Vitamin D<sub>3</sub>, der seinen rezeptorvermittelten Einfluss auf Wachstum und Entwicklung durch Bindung an den Vitamin D<sub>3</sub>-Rezeptor (VDR) ausübt [43, 66, 128]. Der Vitamin D<sub>3</sub>-Rezeptorkomplex bindet an die Antwortelemente der Zielgene und modifiziert so deren Transkription durch Reaktion mit Chromatin, wie weiter oben beschrieben.

Die Rezeptoren kommen nicht nur in Zellen von Darm, Nieren und Knochen vor, sondern auch in anderen Geweben und Zelllinien, die nicht am Mineralstoffwechsel beteiligt sind. An Knochenmarksstammzellen bewirkt Vitamin D<sub>3</sub> eine Differenzierung von Knochenmarksstammzellen zu Osteoklasten und von osteoblasten-ähnlichen Zellen zu Osteoblasten. Dabei wurden Vitamin D<sub>3</sub>-Rezeptoren in osteoblastenähnlichen Knochenzellen, osteoblastenähnlichen Osteosarkomzellen, aber nicht in Osteoklasten nachgewiesen.

Ein möglicher Mechanismus, über den die biologische Antwort auf Vitamin D<sub>3</sub> gesteuert wird, ist die ligandenabhängige Hochregulation der Rezeptoren. Polly et

al. konnten Cyclin C als Zielgen für Vitamin D3 identifizieren [143]. Cyclin C moduliert den Polymerase II-Komplex. Vitamin D3 ist in der Lage, sowohl die mRNA als auch die Proteinexpression von Cyclin C zu erhöhen und nimmt so Einfluss auf die Regulation des Zellzyklus.

Vitamin D3 reguliert dabei eine Vielzahl von Genen oder Genprodukten auf unterschiedliche Weise, auf die hier nicht näher eingegangen werden soll (für eine Übersicht siehe [27]).

### **5.3. Matrixproteine**

#### **5.3.1 Alkalische Phosphatase (ALP)**

Die Alkalische Phosphatase ist ein Ectoenzym, das bei einem hohen pH-Optimum Monophosphatester hydrolysiert [206]. Die Alkalische Phosphatase gehört zu der Klasse der Zelloberflächenproteine, die kovalent an Phosphatidyl-Inositol (PI) Phospholipid-Komplexe in der Plasmemembran gebunden werden.

Für den Menschen sind vier Isoenzyme bekannt: Die Leber/Knochen/Nieren-Alkalische Phosphatase (L/K/N-ALP), die Plazenta-Alkalische Phosphatase, die intestinale Alkalische Phosphatase und die plazenta-ähnliche Alkalische Phosphatase. Jedes Isoenzym ist auf einem anderen Gen codiert [199]. Die physiologische Rolle von ALP in den meisten Geweben ist unbekannt, im Knochen jedoch spielt die Leber/Knochen/Nieren-Alkalische Phosphatase eine Rolle in der Mineralisation [44]. Fehlt die L/K/N-ALP, wie bei der angeborenen Hypophosphatasie, kommt es zu schweren Kalzifikationsstörungen. Die Alkalische Phosphatase ist in der Lage, anorganisches Phosphat aus organischen und anorganischen Substraten freizusetzen. Dabei entsteht aus anorganischem Phosphat und Calcium Hydroxyapatit [125]. Parathormon stimuliert die Freisetzung von Alkalischer Phosphatase aus Knochenzellen, wodurch die Calciumaufnahme in die Zellen erhöht wird [51].

Bei in vitro-Experimenten wird die Alkalische Phosphatase als relativer Marker für die Knochenzellendifferenzierung angesehen [156]. Dabei wird eine Zunahme

der Enzymaktivität in Korrelation mit dem Differenzierungsstadium des Osteoblasten gesehen [6].

#### 5.3.1.1. *SaOS2-Zellen*

Die SaOS2-Zellen hatten eine hohe Basisexpression von Alkalischer Phosphatase. Weder Dexamethason, Vitamin D3, Vitamin C noch  $\beta$ -GP hatten Einfluss auf die Expression. Von diesem Standpunkt aus haben die Zellen keine Differenzierung durchlaufen, obwohl morphologisch eine Differenzierung unter Vitamin C und  $\beta$ -GP stattgefunden hat. Auf der anderen Seite konnte nachgewiesen werden, dass eine steigende  $\beta$ -GP-Konzentration die Aktivität des Alkalischen Phosphatase steigern kann, jedoch nicht über die m-RNA-Transkription vermittelt wird [93]. Das anorganische Phosphat bewirkt seinen Effekt also entweder durch Beeinflussung der Translation, Veränderungen in der Degradation des Enzyms z.B. durch Proteolyse, und/oder Veränderung in der Aktivierung/Deaktivierung des Enzyms.

Vitamin D3 ist in der Lage, die Enzymaktivität zu steigern oder zu senken [9, 62, 178]. Dieser Prozess scheint ebenfalls nicht über die m-RNA-Transkriptionsebene gesteuert zu sein.

Der Zusammenhang, ob diese Prozesse mit der Herkunft der Zelllinie aus einem Osteosarkom stammen, ist in der Literatur nicht klar diskutiert. Bei Chondrosarkomen z.B. konnte eine erhöhte Enzymaktivität bei gleichbleibender m-RNA-Expression beobachtet werden [132].

#### 5.3.1.2. *Humane Osteoblasten*

Im Gegensatz zu den SaOS2-Zellen hatten Dexamethason und Vitamin D3 einen Einfluss auf die mRNA-Expression des Alkalischen Phosphatase-Gens. Bevor es zur Zelldifferenzierung kommt, muss die Proliferation der Zellen zurückgehen. Bei fetalen Rattenknochenzellen steigt die ALP-Expression bis Kulturtag 15 an, um dann wieder abzufallen, entsprechend der beginnenden Matrixkalzifikation [138].

Die Proliferation der humanen Osteoblasten ist unter Dexamethason zurückgegangen, die ALP-Expression angestiegen. Letztendlich schienen die

Zellen unter Dexamethason eine Teildifferenzierung durchlaufen zu haben. Ob die Länge der Kulturdauer von 28 Tagen nicht ausgereicht hatte, oder die Phosphatkonzentration im Medium zu gering war, um eine Matrixmineralisation zu beobachten, bedarf weiterer Abklärung. Unter Vitamin D3 kam es zu keinen lichtmikroskopischen Veränderungen der Zellen, die Expression der Alkalischen Phosphatase nahm ab, so dass Vitamin D3 hier einen direkten Einfluss auf der Transkriptionsebene zu haben scheint.

#### 5.3.1.3. *Zusammenfassung*

1. Humane Osteoblasten scheinen unter Dexamethason eine Teildifferenzierung durchlaufen zu haben.
2. Die ALP-Aktivität wird bei SaOS2-Zellen nicht über die m-RNA-Transkriptionsebene gesteuert.

#### 5.3.2. **Osteonectin**

Osteonectin, auch bekannt als SPARC (Secreted Protein Acidic Rich in Cysteine), wurde zuerst durch Termine et al. als ein Hauptbestandteil der Extrazellulärmatrix in bovinem Knochen identifiziert [190]. Der Anteil des Osteonectin-Proteins an der Extrazellulärmatrix beträgt ca. 2,5 % [194]. Ebenso konnte es als „Culture Shock“-Glycoprotein in proliferierenden, aortalen Endothelzellen [166] und in Fibroblasten [137] identifiziert werden. Osteonectin ist das Produkt eines Einzelgens, das beim Menschen auf dem langen Arm des Chromosom 11 liegt. Es ist ein hochkonserviertes Gen. Die unterschiedlichen Größen des Genprodukts bei den verschiedenen Spezies kommen wahrscheinlich durch differente Polyadenylierung, und nicht durch verschiedene m-RNA-Splice-Varianten zustande [123]. Die Osteonectin-c-DNAs von Vertebraten codieren für ein 298-304 Aminosäuren großes Protein, das posttranslational durch N-terminale Glycosilierung modifiziert wird [152].

Neben der klassischen Rolle als calciumbindendes Protein in der Entwicklung von mineralisiertem Gewebe übernimmt das Protein wahrscheinlich noch wesentliche Funktionen in der Gewebemorphogenese und Zelldifferenzierung, z.B. durch

Inhibition der Zellausbreitung und fokaler Adhäsion (Verbindung von Extrazellulärmatrix mit dem Zytoskelett), Inhibition des Zellzyklus, Außerkraftsetzung der Wachstumsfaktor-vermittelten Chemotaxis und Regulation der Produktion von Extrazellulärmatrix durch Modulation der Plasminogen-Aktivator-Inhibitor I-, Fibronectin-, Laminin-, und Thrombospondin I-Spiegel [18, 94, 126]. Über den genauen intrazellulären Signalweg ist bis jetzt noch nichts bekannt, ein Rezeptor konnte ebenfalls noch nicht gefunden werden [20, 207].

Osteonectin wird von Knochenzellen *in vitro* während der Proliferationsphase exprimiert. In der postproliferativen Phase sinkt die Expression und erreicht die maximale Stärke während der Matrixmineralisation [55, 182].

#### 5.3.2.1. *SaOS2-Zellen*

Eine Regulation durch Dexamethason und Vitamin D3 konnte nicht nachgewiesen werden. Nur unter Vitamin C und  $\beta$ -GP konnte das Expressionsmuster von differenzierenden Zellen, wie weiter oben beschrieben, nachgewiesen werden. Interessanterweise war eine Osteonectin-Expression unter alleiniger  $\beta$ -GP Stimulation nicht nachweisbar. Ob anorganisches Phosphat tatsächlich in der Lage ist, die Osteonectin-Expression zu regulieren, muss durch weitere Experimente abgeklärt werden.

#### 5.3.2.2. *Humane Osteoblasten*

Auch hier zeigte sich kein Effekt auf die Genexpression von Osteonectin durch Vitamin D3 oder Dexamethason.

#### 5.3.2.3. *Zusammenfassung*

1. Die kalzifizierenden SaOS2-Zellen zeigten das für differenzierende Knochenzellen typische Expressionsmuster des Osteonectin-Gens.
2. Die Expression von Osteonectin war weder zeitabhängig, noch durch Vitamin D3 oder Dexamethason reguliert.

### 5.3.3. Osteopontin

Osteopontin ist ein phosphoryliertes, saures Glycoprotein, das eine Rolle in einer Reihe von physiologischen und pathologischen Vorgängen spielt [135]. Osteopontin kommt als immobilisiertes Protein in mineralisiertem Gewebe, aber auch als Cytokin in Körperflüssigkeiten vor. Das Protein ist ca. 300 Aminosäuren lang [54]. Es enthält eine Integrin-bindende RGD-Sequenz (Arginin-Glycin-Aspartin-Säure) und weitere Sequenzen, die mit CD44v6/7 oder anderen adhäsiven Rezeptoren interagieren kann [209]. Eine de novo-Osteopontin-Expression tritt auf bei Tumoren [193], Arterienrestenosierung [131], Herzklappenstenosierung [169], Tubulofibrose der Niere [57], Myokardinfarkt [127] und Schlaganfall [58].

Osteopontin ist zum einem notwendig für die Verbindung von Knochenzellen und Extrazellulärmatrix [211], zum anderen ist es wahrscheinlich durch intrazelluläre Signaltransduktion dafür verantwortlich, dass Osteoklasten Knochenstrukturen erkennen können. Allerdings sind die Möglichkeiten der Signaltransduktion sehr vielfältig, da Osteopontin mit einer ganzen Reihe von Zellrezeptoren interagiert [37]. Osteopontin bindet an Osteocalcin und Typ I Kollagen [176] und bildet ein Substrat für Transglutaminase, ein Enzym, das Osteopontin und Fibronectin verbindet [116]. Vitamin D3 steigert die Osteopontin-Expression in Knochenzellen, ebenso Dexamethason. Dabei wird die Steigerung der Expression durch Glucokortikoide auf die Stimulation der Knochenbildung zurückgeführt, der Vitamin D3-Effekt dagegen auf die Stimulation der Knochenresorption, was die Multifunktionalität des Proteins im Knochenstoffwechsel widerspiegelt [176].

In *in vitro*-Zellkulturen wird Osteopontin in der frühen Differenzierungsphase exprimiert. Diese Expression bleibt bis zur Matrixmineralisation erhalten und gilt somit wie Alkalische Phosphatase und Osteocalcin als Differenzierungsmarker von Knochenzellen [36, 76].

#### 5.3.3.1. *SaOS2-Zellen*

Eine Osteopontin-Expression konnte nur in Zellen nachgewiesen werden, die eine Matrixmineralisation durchlaufen haben. Eine Regulation durch Vitamin D3 oder Dexamethason war nicht nachweisbar.

#### 5.3.3.2. *Humane Osteoblasten*

Eine Expression von Osteopontin war nicht nachweisbar.

#### 5.3.3.3. *Zusammenfassung*

1. Vitamin D3 und Dexamethason hatten keinen Einfluss auf die Osteopontin-Expression.
2. Differenzierte Zellen zeigten eine deutliche Osteopontin-Expression.

### **5.3.4. Osteocalcin**

Osteocalcin, auch „Bone Gla-Protein“ genannt, findet man sowohl im Knochen [49] als auch in Dentin [21]. Ein Hauptcharakteristikum des Osteocalcins sind drei gamma-Carboxyglutaminsäuren, die dem Protein posttranslational in einem Vitamin K-abhängigen Prozess hinzugefügt werden und für die Bindung von Calcium verantwortlich sind [172]. In vitro hat Osteocalcin eine hohe Affinität zu Hydroxyapatit [13], und für viele Jahre wurde das sezernierte Protein als Marker des reifen Osteoblasten angesehen [101]. Tatsächlich ist die Osteocalcin-Expression in vitro meistens erst zu Beginn der Matrixmineralisation nachzuweisen [138] und gilt somit als Differenzierungsmarker für Osteoblasten. An Mäusen, die das Osteocalcin-Gen nicht exprimierten, konnte kein Effekt auf die Mineralisation des Knochens beobachtet werden. Die Osteocalcintranskription wird positiv durch Vitamin D3 reguliert, ein entsprechendes Vitamin D-responsives Element (VDRE) ist im Osteocalcin-Promotor nachgewiesen worden [72, 99]. Das VDRE enthält im humanen Gen eine stark degenerierte AP-1-Erkennungsstelle. Der Transkriptionsfaktor AP-1 ist identisch mit dem c-Fos/c-Jun Heterodimer (sowohl der heterodimere Komplex der Oncogenprodukte c-Fos/c-Jun als auch der Vitamin D-Rezeptor fungieren als DNA-bindende

Transkriptionsfaktoren). Proliferierende, aber noch nicht differenzierende Zellen haben eine hohe Konzentration an aktivem AP-1, so daß der Vitamin D-Rezeptor nicht an den Osteocalcin-Promotor binden kann [102]. Treten die Zellen in die Differenzierungsphase, nimmt die AP-1-Konzentration ab, der Rezeptor kann an den Promotor binden [112]. Der Glucokortikoideffekt auf die Osteocalcin-transkription wird offensichtlich durch viele Glucokortikoid-responsive Elemente (GRE) im Osteocalcin-Promotor vermittelt [101].

#### 5.3.4.1. *SaOS2-Zellen*

In der Literatur wird für SaOS2-Zellen keine oder nur eine schwache Osteocalcin-Expression beschrieben [72].

Unter Vitamin C und  $\beta$ -GP war die Osteocalcin-Expression an Tag 2 am höchsten, also noch vor Eintritt der Zellen in die postproliferative Phase. Somit konnte Osteocalcin hier nicht als Differenzierungsmarker verwendet werden. Unter Dexamethason war eine schwache Expression nachzuweisen, lediglich unter Vitamin D3 war eine zunehmende Expression zu beobachten. Wie weiter oben beschrieben reguliert der Vitamin D-Rezeptor die Osteocalcin-Expression positiv, aber nicht in proliferierenden Zellen. Mahonen et al. konnten in einem ähnlichen Experiment keine Zunahmen der Osteocalcin m-RNA nach Vitamin D3 Behandlung beobachten [107]. Allerdings umfasste der Untersuchungszeitraum 96 Stunden. Wir beobachteten eine Zunahme der Genexpression erst nach einem Zeitraum von 7 Tagen.

#### 5.3.4.2. *Humane Osteoblasten*

Hier war eine Regulation der Osteocalcin-Expression weder durch Dexamethason noch durch Vitamin D3 zu beobachten.

#### 5.3.4.3. *Zusammenfassung*

1. Die Osteocalcin-Expression wurde in SaOS2-Zellen positiv durch Vitamin D3 reguliert, bei den humanen Osteoblasten hatte Vitamin D3 keinen Einfluss.
2. Die Osteocalcin-Expression konnte in SaOS2-Zellen nicht als Differenzierungsmarker gesehen werden.

## 5.4. Kollagene

Kollagene bilden typischerweise unlösliche Fasern mit hoher Zugfestigkeit aus. Bei Säugetieren machen die Kollagene ca. 25 % des Gesamtproteingewichtes aus. Sie sind der wichtigste Faserbestandteil von Knochen, Knorpel, Sehnen, Haut, Blutgefäßen und Zähnen. Die Hauptaufgabe der fibrillenbildenden Kollagene (Kollagen Typ I, II, III, V und XI) ist es, als Strukturelemente die Gewebearchitektur vorzugeben und die Gewebestabilität zu erhöhen [64, 183]. Bis jetzt sind über 20 verschiedene Kollagenen bekannt, wobei die meisten aus mehreren Alpha1-Untereinheiten bestehen. Die Größe und Ausrichtung der kollagenen Fasern hängen von ihrer zonalen Lokalisation ab. Einige Kollagene bilden Fibrillen, die in einem Hydrogel bestehend aus Proteoglykanen und Hyaluronsäure eingebettet sind.

Für die Kollagene ist eine rechtsgedrehte Triplehelix typisch, die sich aus drei Polypeptidketten zusammensetzt, die gleich lang sind und etwa aus 1000 Aminosäuren bestehen. Den größten Teil der fibrillenbildenden Kollagene repräsentiert die Triplehelix; nur an den Enden finden sich nicht-kollagene Domänen [197]. Ihre besondere Stabilität beruht darauf, dass jede 3. Position der Aminosäuresequenz durch Glycin und jede 5. Position durch Prolin bzw. Hydroxyprolin besetzt wird. Die Verdrillung zur Triplehelix erfolgt intrazellulär. Nach Ausschleusung aus der Zelle werden N- und C-terminale Prokollagenpeptide abgespalten. Jetzt erfolgt die Aggregation zu Fibrillen und die weitere Stabilisierung durch Quervernetzung [60, 201].

### 5.4.1. Kollagen Typ I

Kollagen Typ I ist das am häufigsten vorkommende und am längsten bekannte Kollagen. Es kommt in retikulären Fasern der meisten Organe wie Knochen, Lunge, Leber, Niere, und Milz vor. Eine Ausnahme bilden Gehirn und hyaliner Knorpel. Gebildet wird es von Fibroblasten, Osteoblasten und Odontoblasten. Im Knochen finden sich Fibrillen, die aus Kollagen Typ I und Kollagen Typ V zusammengesetzt sind und dadurch einen Durchmesser von 400 nm erreichen.

Durch die Verankerung mit Hydroxyapatit und den Knochenglycoproteinen erlangen die Fibrillen ihre hohe Zugfestigkeit und Widerstandskraft gegen Torsionskräfte [197]. Neben den biomechanischen Aufgaben spielt Kollagen Typ I eine wichtige Rolle in Gewebe und Organentwicklung, sowie in Zellproliferation, Differenzierung und in der Wundheilung [67], sowie möglicherweise in der Osteoporoseentstehung [86].

#### 5.4.1.1. *SaOS2-Zellen*

Eine Regulation der Kollagen Typ I-Expression konnte nur unter alleiniger Vitamin C-Stimulation nachgewiesen werden. Wie in der Literatur beschrieben, beeinflusste Dexamethason die Kollagen Typ I-Expression nicht [108]. In der Biosynthese der Kollagene ist Vitamin C ein notwendiger Faktor für die Hydroxylierung der Lysyl- und Prolylreste an der Triplehelix [142]. Inwieweit Vitamin C die Genexpression von Kollagen Typ I negativ beeinflusst, muss durch weitere Experimente untersucht werden.

#### 5.4.1.2. *Humane Osteoblasten*

Wie bei den SaOS2-Zellen wurde die Kollagen Typ I-m-RNA weder durch Dexamethason, Vitamin D3 oder die Kulturdauer beeinflusst.

#### 5.4.1.3. *Zusammenfassung*

1. Die Kollagen Typ I-Expression wurde sowohl in SaOS2-Zellen, als auch in humanen Osteoblasten weder durch Dexamethason, Vitamin D3 oder Differenzierungsgrad der Zellen beeinflusst.
2. Durch Stimulation mit Vitamin C kam es zu einer Abnahme der Kollagen Typ I-Expression.

### 5.4.2. Kollagen Typ II

Kollagen Typ II kommt vorwiegend im Gelenkknorpel vor. Es setzt sich aus drei gleichen  $\alpha 1$ -Typ II-Ketten zusammen und ist reich an Hydroxylysin. Hydroxylysin ist in der Lage sowohl Tropokollagenmoleküle als auch Disaccharide zu verbinden. Es existieren zwei Splice-Varianten: Variante IIA findet man als transiente Form im embryonalen Knorpel, Variante IIB im reifen Knorpel. Im Gegensatz zu anderen Kollagenen besitzt Kollagen Typ II antigene Eigenschaften. Bei Patienten mit rheumatoider Arthritis können Autoantikörper gegen das Kollagen Typ II nachgewiesen werden [184].

#### 5.4.2.1. *SaOS2-Zellen*

Im Gegensatz zu den humanen Osteoblasten exprimierten SaOS2-Zellen Kollagen Typ II. Hier fand sich eine zeitabhängige Hochregulation der Kollagen II-Expression, die durch Vitamin D3 nicht beeinflusst wurde. Dagegen beobachtete man unter Dexamethason, Vitamin C und  $\beta$ -GP eine gleichbleibend schwache Expression. Inwieweit die Kollagen II-Expression durch Steroidhormone reguliert wird, oder ob die Expression einen „jungen“ Osteoblasten repräsentiert, bzw. mit der Tumorgenese der SaOS2-Zellen in Zusammenhang steht, muss durch weitere Experimente abgeklärt werden.

#### 5.4.2.2. *Osteoblasten*

Für den Knochen typisch fand sich hier keine Kollagen II-Expression.

#### 5.4.2.3. *Zusammenfassung*

1. In SaOS2-Zellen ließ sich eine Kollagen Typ II-m-RNA-Expression nachweisen.

### 5.4.3. Kollagen Typ III

Kollagen Typ III ist für retikuläre Fasern typisch. Es dient der Strukturhaltung in Organen, die sich ausdehnen, kommt somit hauptsächlich in der glatten Muskulatur, Uterus, Arterien, Leber, Milz, Niere und Lunge vor. Kollagen Typ III kommt ebenfalls in fetalem Bindegewebe vor, wo es in der weiteren Entwicklung durch Kollagen Typ I ersetzt wird [81]. Die Freisetzung des alpha1(III)-N-Propeptids aus der Triplehelix in Gewebeflüssigkeiten oder in Serum kann als Marker für Fibrose oder für den Bindegewebsumsatz verwendet werden [130].

#### 5.4.3.1. *SaOS2-Zellen*

Sowohl unter Dexamethason als auch unter Vitamin D3 nahm die Expression des Kollagen Typ III-Gens in Abhängigkeit von der Zeitdauer ab. Die Faktoren nahmen keinen Einfluss auf die m-RNA-Expression.

Vitamin C jedoch war in der Lage, die Genexpression zu steigern. Unter Vitamin C verhielt sich die Expression des Gens gegensätzlich der Expression des Kollagen Typ I-Gens, so dass die Vermutung nahe liegt, dass Vitamin C in der Lage ist, die Genexpression der Kollagene zu modulieren. Welche Bedeutung das gegensätzliche Expressionsverhalten von Kollagen Typ I und Typ III für den Knochenstoffwechsel hat, bedarf der weiteren Abklärung.

#### 5.4.3.2. *Humane Osteoblasten*

Wie in den SaOS2-Zellen hatten Dexamethason und Vitamin D3 keinen Einfluss auf die Typ III Kollagen-Expression. Eine zeitliche Regulation konnte nicht nachgewiesen werden.

#### 5.4.3.3. *Zusammenfassung*

1. Vitamin C scheint in der Lage zu sein, sowohl die Kollagen Typ III-, als auch die Kollagen Typ I-m-RNA-Expression zu regulieren. Beide Gene wurden dabei gegensätzlich reguliert.
2. Dexamethason und Vitamin D3 hatten keinen Einfluss auf die Kollagen-Genexpression.

## **5.5. Knochen-Morphogenese-Proteine**

Die Familie der Knochen-Morphogenese-Proteine (Bone Morphogenetic Proteins, BMP) besteht aus mindestens 30 Mitgliedern, die alle bis auf BMP-1 zur TGF-beta Großfamilie gezählt werden [38, 148]. Der Name leitet sich aus der Fähigkeit der Proteine ab, die Neuformation von Knorpel und Knochen in vivo induzieren zu können [88, 91, 202, 203]. Drei Unterfamilien wurden bis jetzt identifiziert: BMP 2 und 4; BMP 3 und 3B; BMP 5, 6, 7 und 8 [149]. BMPs und GDFs (Growth and Differentiation Factors) sind für Zelldifferenzierung, Apoptose, Embryogenese, Skelett- und Gelenkbildung von fundamentaler Bedeutung [48, 204]. Sie übermitteln Signale durch Bindung an transmembranäre Typ I und II-Rezeptoren mit Serin/Threonin-Kinase Aktivität [175, 205]. Die Signaltransduktion über den aktivierten Typ I-Rezeptor wird über die Gruppe der Smad Proteine vom Zytoplasma zum Kern durch transnukleoläre Dislokation vermittelt. Bisher sind acht Smad-Proteine bekannt (Smad 1-8), wovon Smad 1, 5 und 8 durch BMPs aktiviert werden [59, 120].

### **5.5.1. Knochen-Morphogenese-Protein 7 (BMP 7)**

BMP 7, auch als Osteogenin 1 bekannt, ist notwendig zur normalen Entwicklung von Nieren, Augen und Extremitäten in Mäusen. Dabei wird BMP 7 sowohl im Epithel der Ureteren, als auch im undifferenzierten Mesenchym exprimiert. Man geht davon aus, dass BMP 7 ein unbedingt notwendiges Signal sendet, um eine normale Entwicklung zu gewährleisten. Die genaue Funktion ist aber weiterhin ungeklärt [31, 71]. Eine erhöhte BMP 7-Expression lässt sich auch in Knochenvorläuferzellen, proliferierenden Chondrozyten und Fibroblasten in frischen Frakturen sowie in osteoklastenähnlichen Zellen nachweisen [167].

#### 5.5.1.1. *SaOS2-Zellen*

Im Gegensatz zu der Arbeitsgruppe Raval et al. [147] konnten wir mit der RT-PCR eine basale BMP 7-Expression in SaOS2-Zellen nachweisen. In den mineralisierten Zellen fand sich eine verstärkte Expression des Gens. Die BMP 7-Expression könnte somit als Differenzierungsmarker für in vitro-Zellkulturen gesehen werden.

Unter Vitamin D3 konnte keine Regulation des Gens beobachtet werden. Unter Dexamethason fand man eine Herunterregulation des Gens, Dexamethason beeinflusste offensichtlich die Transkription des Gens. Inwieweit die BMPs eine Rolle in der steroidinduzierten Osteoporose spielen, bedarf der weiteren Abklärung.

#### 5.5.1.2. *Humane Osteoblasten*

Hier fanden sich dieselben Expressionsmuster wie für die SaOS2-Zellen, welches die Steuerung der BMP 7-Expression durch Glukokortikoide nahe legt, nicht aber die Steuerung durch Vitamin D3.

#### 5.5.1.3. *Zusammenfassung*

1. Von uns konnte die m-RNA-Expression des BMP 7-Gens an SaOS2-Zellen nachgewiesen werden.
2. Die BMP 7-Expression scheint der Steuerung durch Glukokortikoide zu unterliegen.

### **5.5.2. Knochen-Morphogenese-Protein 8 (BMP 8)**

Knochen-Morphogenese-Protein 8 ist auch als Osteogenin 2 bekannt [110]. BMP 8 wurde 1992 kloniert. Ob es ebenfalls wie BMP 7 osteoinduktive Eigenschaften besitzt, wurde bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht untersucht [63].

#### 5.5.2.1. *SaOS2-Zellen*

Eine basale BMP 8-Expression konnte nachgewiesen werden. An Kulturtag 7 und 14 war die Expression des Gens in allen Zellreihen stärker. Eine Regulation durch die in der Zellkultur verwendeten Substanzen war nicht zu beobachten. Die Expression des Gens wurde ebenfalls nicht durch Zelldifferenzierung beeinflusst.

#### 5.5.2.2. *Humane Osteoblasten*

Die Expression von BMP 8 verhielt sich wie bei den SaOS2-Zellen.

#### 5.5.2.3. *Zusammenfassung*

1. Eine schwache basale m-RNA-Expression des BMP 8-Gens konnte sowohl bei SaOS2-Zellen als auch bei humanen Osteoblasten nachgewiesen werden.
2. Die Expression des BMP 8-Gens wurde weder durch Vitamin C,  $\beta$ -GP, Vitamin D<sub>3</sub>, Dexamethason, noch durch das Differenzierungsstadium der Zellen beeinflusst.

## 5.6. **Insulin-Like-Growth-Factor-Rezeptor-Familie**

### 5.6.1. **Insulin-Like-Growth-Factor-Rezeptor I (IGFR-I)**

Knochenzellen verfügen sowohl über den Typ I als auch den Typ II IGF-Rezeptor [68]. Die Rezeptoren stimulieren die Genexpression und tragen zur Proteinbiosynthese bei. Wird der Rezeptor aktiviert, kommt es zur Phosphorylierung des Rezeptors und zur Aktivierung einer intrinsischen Tyrosinkinase. Die Tyrosinkinase phosphoryliert intrazelluläre Substrate, wie Mitglieder aus der Insulin-Rezeptor-Substrat-Familie (IRS). Durch Phosphorylierung des IRS-1 kommt es zur Stimulation der Phosphatidylinositid 3-Kinase (PI3K), Phosphotyrosinphosphatase und/oder des MAP-Kinase-Signalweges [213]. IGFR-I aktiviert also verschiedene Signalwege, die zum Zellerhalt oder zum Überleben der Zelle führen [23, 162]. IGF-Rezeptoren ähneln in ihrer Struktur den Insulinrezeptoren und binden vorzugsweise Insulin-like-Growth-Factor I (IGF I) [114], ein Faktor, der die Kollagensynthese, die

Matrixapposition und Zellreplikation steigert [70] und die Koordination von Osteoblasten und Osteoklasten zu vermitteln scheint [121]. Es konnte gezeigt werden, dass Glukokortikoide die Expression des IGF-R-I in Rattenchondrocyten supprimieren [92]. Von Glukokortikoiden wird angenommen, dass sie Signale über die IGF-Achse direkt oder indirekt senden, da sie gegensätzliche Effekte zu den Insulinartigen Wachstumsfaktoren aufweisen [24]. Auch für Vitamin D3 wird angenommen, dass es seinen Effekt auf die Knochenzellen durch Modulation des IGF-Systems ausübt [122].

#### 5.6.1.1. *SaOS2-Zellen*

IGF-R-I wurde in SaOS2-Zellen stark exprimiert. Eine Regulation durch Dexamethason oder Vitamin D3 fand nicht statt. Eine Abnahme der Expression fand sich in differenzierenden Zellen, welche durch Vitamin C bedingt zu sein scheint. Ob die Abnahme der Expression Voraussetzung für die Zelldifferenzierung ist, muss durch weitere Untersuchungen abgeklärt werden.

#### 5.6.1.2. *Humane Osteoblasten*

Auch hier fand sich keine Regulation der Genexpression durch Vitamin D3 oder Dexamethason.

#### 5.6.1.3. *Zusammenfassung*

1. Die IGF I-Rezeptor m-RNA-Expression wurde in humanen Osteoblasten und SaOS2-Zellen weder durch Vitamin D3 noch durch Dexamethason reguliert.
2. In differenzierenden SaOS2-Zellen fand eine Abnahme der IGF I-Rezeptor-m-RNA-Expression statt.

## 5.7. Notch-Familie

Notch-Gene codieren eine konservierte Familie von transmembranären Proteinen [46, 50], die eine wichtige Funktion in der Entwicklung einnehmen [1, 2, 74, 109]. Einer der bekanntesten Signalwege von Notch ist Funktion der lateralen Inhibition [171], bei der die Differenzierung von Zellen verhindert wird, die eine bereits differenzierte Zelle umgeben [3, 61]. Normalerweise kommt es zu einer liganden-gesteuerten Proteolyse, was zu einer nukleären Translokation des intrazellulären Anteils des Notch-Rezeptors führt, der dann zu einer Aktivierung des Transskriptionsfaktors der Su(H)/CBF1 Familie führt [19, 87, 151, 208].

Bei Vertebraten umfasst die Notchfamilie vier Rezeptoren (Notch 1-4) [198]. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass Notch die Osteoblastendifferenzierung von MC3T3-Zellen (Zelllinie der Maus) positiv reguliert [191]. An denselben Zellen konnte gezeigt werden, dass Glukokortikoide die Notch 1 und Notch 2-m-RNA-Expression steigern konnte [140]. Allerdings gehen Pareira et al. von einer negativen Osteoblastendifferenzierung durch Notch aus.

### 5.7.1. Notch 1

Notch 1, auch TAN 1 genannt, wurde zunächst in Vertebraten als ein Gen identifiziert, das in chromosomaler Translokation mit dem TGR $\beta$ -Gen in einigen Fällen von akuter T-Zell Leukämie involviert war [33, 154].

Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass Störungen im Notch 1-Signalweg die terminale Differenzierung von Adipozyten verhinderten [52], und in Anwesenheit von Glukokortikoiden die Apoptose umgangen wurde [119].

#### 5.7.1.1. *SaOS2-Zellen*

Unter Vitamin C und  $\beta$ -GP wie auch in den Kontrollen nahm die Expression von Notch 1 konstant ab. Unter Vitamin D3 und Dexamethason fand sich bis Kulturtag 14 eine hohe Expression.

#### 5.7.1.2. *Humane Osteoblasten*

Unter Dexamethason und Vitamin D3 fand sich eine maximale Notch 1-Expression an Kulturtag 2.

#### 5.7.1.3. *Zusammenfassung*

1. Die Notch 1-Expression wurde durch Dexamethason und Vitamin D3 sowohl in SaOS2-Zellen, als auch in Osteoblasten positiv reguliert.
2. Die Notch 1-Expression war in proliferierenden Zellen verstärkt, nicht aber in differenzierenden Zellen.

### 5.7.2. Notch 2

Eine Notch 2-Expression findet man wie Notch 1 in einer Vielzahl von Organen, wie Thymus, Milz, Lunge, Herz, Hoden, Ovarien und im Zentralen Nervensystem [73]. Fringe Proteine, die Glycotransferasen codieren, potenzieren das Serrate 1- und Delta 1-Signal über den Notch 2-Rezeptor. Über den Notch 1-Rezeptor blockieren die Proteine das Serrate 1-Signal [69].

#### 5.7.2.1. *SaOS2-Zellen*

Unter Vitamin C und  $\beta$ -GP war eine schwache, aber konstante Expression nachweisbar. Zugabe von Dexamethason oder Vitamin D3 führte zu einer Abnahme der Expressionsstärke.

#### 5.7.2.2. *Humane Osteoblasten*

Wie bei den SaOS2-Zellen führte der Zusatz von Vitamin D3 zu einer Abnahme der Notch 2-Expression. Die Zugabe von Dexamethason jedoch beeinflusste die Genexpression nicht.

#### 5.7.2.3. *Zusammenfassung*

1. Die Notch 2-Expression wurde durch Vitamin D3 negativ reguliert.
2. In differenzierenden Zellen blieb die Notch 2-Expression erhalten.

### 5.7.3. Notch 3

Notch 3-m-RNA-Expression konnte in embryonalem Nervengewebe, Thymus und Pankreas nachgewiesen werden [73]. Mutationen im Notch 3-Gen verursachen Cadasil (Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy), eine Arteriopathieform, die um das 45. Lebensjahr auftritt [79, 78]. Bei der Innenohrentwicklung des Huhns scheint Notch 3 als Antagonist zu Notch 1 zu fungieren [40].

#### 5.7.3.1. *SaOS2-Zellen*

Eine Expression des Notch 3-Gens war nicht nachweisbar.

#### 5.7.3.2. *Humane Osteoblasten*

Eine Expression von Notch 3 war ebenfalls nicht nachweisbar.

### 5.7.4. Notch 4

Notch 4 wird vorwiegend von endothelialen Zellen sowohl während der embryonalen Entwicklung, als auch in adultem Gewebe exprimiert [212]. Mutationen im Notch 4 Gen führen bei Mäusen zur Entstehung von Mamma-Carcinomen [8]. Die Mutationen im Gen verhindern die Kontaktinhibition der Zellproliferation in Zellen des Drüsenkörpers und es kommt zur Entstehung von anaplastischen Karzinomen [177].

#### 5.7.4.1. *SaOS2-Zellen*

Eine schwache Expression des Notch 4-Gens konnte in differenzierten Zellen nachgewiesen werden. In den Kontrollen und unter Dexamethason fand sich keine Expression. Unter Vitamin D3 kam es zu einer Zunahme der Expression an Tag 14 und 28.

#### 5.7.4.2. *Humane Osteoblasten*

Lediglich unter Vitamin D3-Stimulation war eine Expression an Kulturtag 28 nachweisbar.

#### 5.7.4.3. Zusammenfassung

1. Die Notch 4-Expression wurde wie die Notch 1-Expression positiv durch Vitamin D3 reguliert.
2. In differenzierenden Zellen war eine Notch 4-Expression nachweisbar.

### 5.8. Human Hairy

Human Hairy wurde 1994 von Feder et al. kloniert [45]. Es liegt auf Chromosom 3q28-q29. Die frühe Struktur des axialen Skeletts wird von Genen kontrolliert, die die Segmentation des paraxialen Mesoderms in Somiten und die weitere Differenzierung in Sklerotome regulieren [188]. Aus den Somiten entstehen die vertebrealen und dorsolateralen Rippen, die dorsal gelegene Dermis, die Skelettmuskeln des Rumpfes und die Gliedmaßen [134]. Die Somatogenese folgt dabei einem genau festgelegten Zeitplan, der auch durch schwankende Expressionslevel des Human Hairy-Gens mitbestimmt wird [139]. Ebenfalls eine Rolle spielen die Fringe Proteine ( $\beta$ N-Acetylglucosaminyltransferasen), die wiederum die Notch-Aktivität modulieren [47]. Hairy selbst ist eine downstream Komponente im Notch Signalweg [141].

#### 5.8.1. SaOS2-Zellen

Eine verstärkte Expression ließ sich nach Vitamin D3 Gabe an Kulturtag 28 beobachten. In differenzierten wie in proliferierenden Zellen konnte eine schwache Expression des Gens nachgewiesen werden.

#### 5.8.2. Humane Osteoblasten

Eine verstärkte Expression beobachtete man nach Vitamin D3 Gabe.

#### 5.8.3. Zusammenfassung

1. Human Hairy wurde sowohl in SaOS2-Zellen, wie in humanen Osteoblasten exprimiert.
2. Human Hairy wurde durch Vitamin D3 positiv reguliert.
3. Die Expression des Gens schien keine Rolle in der Zelldifferenzierung zu spielen.

## 5.9. Molekularbiologische Untersuchungstechniken

Mit der RAP-PCR, sowie der RT-PCR stehen molekularbiologische Techniken zur Verfügung, mit denen spezielle Gene nachgewiesen, unbekannte Gene identifiziert und komplexe Interaktionen abgebildet werden können [124].

Die Differential Display Techniken haben gegenüber anderen Methoden mehrere Vorteile: eine größere Anzahl verschiedener Proben kann direkt miteinander verglichen werden; geringe Probenmengen werden benötigt; und zuletzt stellen sie eine umfassendes Screeningverfahren dar, die eine Auswahl von Zielklonen in kurzer Zeit erlaubt [104, 113, 164].

Zudem entfällt bei der von uns angewandeten RAP-PCR der Umgang mit radioaktiven Substanzen [168].

Aber die AP-PCR hat auch ihre Grenzen: Die Unterschiede in den Bandenstärken wurden von uns aufgrund der Kontrollen nicht als Expressionunterschiede, sondern als Schwankungen in den eingesetzten RNA-Mengen gewertet. Von den verwendeten Zellen zeigten ausschließlich SaOS2-Zellen eine Änderung ihrer Morphologie unter Vitamin C und  $\beta$ -Glycerophosphat-Stimulation. Änderungen in der m-RNA-Genexpression konnten wir mit der AP-PCR jedoch nicht nachweisen. Expressionsunterschiede von einzelnen Genen ließen sich dagegen in den spezifischen RT-PCR sehr wohl nachweisen.

Ryoo et al. [164] konnten deutliche Unterschiede in der Genexpression in differenzierenden Knochenzellen mittels der Differenzial Display PCR zeigen. Allerdings wurde hier die doppelte RNA-Menge (300  $\mu$ g) eingesetzt. Aufgrund der niedrigen Zellzahl zu Beginn der Versuche verwendeten wir eine Menge von 150  $\mu$ g und 200  $\mu$ g. Die isolierten RNA-Mengen am Ende des Versuchs unterschieden sich aufgrund der viel höheren Zellzahl erheblich von den am Anfang gewonnenen. Verdünnungsfehler konnten nicht sicher ausgeschlossen werden. Schwankungen in der Genexpression haben wir in der Auswertung der AP-PCR als minimale Schwankungen der m-RNA-Konzentration gewertet.

Bei den in Ryoos Arbeit gezeigten PCRs ist anzumerken, dass keine Kontrollen mit unterschiedlichen RNA-Konzentrationen gezeigt werden.

Somit sind Schwankungen in den RNA-Konzentrationen auch hier nicht sicher auszuschließen. Allerdings verwendet er in den Versuchen fetale Rattenzellen. Die Auswirkungen des „Alters“ einer Knochenzelle und die Veränderung der damit verbundenen Genexpression werden ausführlich weiter unten diskutiert.

### **5.10 Zellkultur**

Primäre Knochenzellkultursysteme und klonale Tumorzelllinien repräsentieren in der Literatur gängige Knochenzellendifferenzierungssysteme [5, 85, 159]. Inwieweit sich primäre Knochenzellkulturen und klonale Zelllinien voneinander unterscheiden, ist bisher kaum untersucht [11, 158]. Um eine Vergleichbarkeit zum Menschen herstellen zu können, haben wir die humane Osteosarkomzelllinie SaOS2 und primäre humane Osteoblasten verwendet. Primäre humane Osteoblasten wurden durch Auswachsen von Hüftköpfen gewonnen. Auf eine enzymatische Zellgewinnung wurde bewusst verzichtet, da diese zwar gängig angewendet werden, der Effekt auf die Zellen selber aber bisher nur unzureichend untersucht ist [77]. Die verwendeten Hüftköpfe stammen ausschließlich von Patienten, die älter als 70 Jahre waren. Die Verwendung dieser Hüftköpfe wird von der Marburger Ethikkommission als unbedenklich angesehen. Die Verwendung von humanen embryonalen Stammzellen hingegen ist heute in kritischer Diskussion. Auf tierische Stammzellen haben wir verzichtet, um die Versuchsreihen miteinander vergleichen zu können.

Dexamethason bewirkt eine Differenzierung der Osteoprogenitorzelle zum Osteoblasten [173] und ist somit als Differenzierungsfaktor geeignet [103]. Dabei wird Dexamethason sowohl in primären Zellkulturen als auch in Zelllinien als Differenzierungsfaktor verwendet [12, 34]. Erstaunlich dabei ist, dass manche Autoren direkt von Kulturtag 1 Dexamethason anwenden, manche zu einem späteren Zeitpunkt, was letztendlich nicht immer nachvollziehbar scheint.

Ebenso supplementieren manche Autoren das Versuchsmedium zusätzlich mit Vitamin C und  $\beta$ -Glycerophosphat, um die Kalzifizierung der Matrix zu ermöglichen, manche nicht. Aber alle sprechen von Zelldifferenzierung im Sinne von organisierter Matrixmineralisation.

Um genau zwischen den Effekten der einzelnen Faktoren auf die Knochenzellen unterscheiden zu können, haben wir Versuchsreihen mit allen Einzelfaktoren durchgeführt.

Unter Dexamethason nahm sowohl bei den primären Osteoblasten als auch bei SaOS2-Zellen die Proliferationsrate ab. Im Allgemeinen können Glucokortikoide die Zellproliferation in verschiedenen Geweben und Zellen, wie z.B. in adulten Rattenhepatozyten oder Fibroblasten, inhibieren. Dieser Effekt ist auch an Osteoblasten beschrieben. Auf der anderen Seite können nach Glucokortikoidgabe Knochenvorläuferzellen zu Osteoblasten differenzieren, sogar die Förderung von Knochenneubildung in vitro konnte nach Glucokortikoidgabe beobachtet werden [75, 96].

Eine Matrixmineralisation fanden wir in unseren Zellkulturen nicht. Die mit Dexamethason stimulierten Zellen betrachten wir somit aus morphologischer Sicht als nicht differenziert. Eine mögliche Ursache ist die zu geringe Menge an anorganischem Phosphat im Kulturmedium (in dem verwendeten Medium kommt anorganisches Phosphat in einer Konzentration von 0,9 mM vor), so dass eine Matrixkalzifizierung nicht stattfinden konnte. Für die SaOS2-Zellen bezweifeln wir, dass sie unter alleiniger Glucokortikoidgabe, wie in der Literatur beschrieben, differenzieren.

Bei den primären Osteoblasten bleibt der Alterseffekt seitens der Patienten auf die Zellen und ihre Teilungsfähigkeit zu bedenken. Altersbedingte Unterschiede im Kultivierungsverhalten der Zellen sind nicht sicher auszuschließen.

Zwar waren die Osteoblasten Alkalische Phosphatase-positiv, doch letztlich haben wir keine Aussage über die „Reife“ der Zellen. Sinnvoll scheint hier die Reifebestimmung der Zellen mittels Antikörper, wie z.B. HOP-26 gegen Osteoprogenitorzellen [80].

Seit langem ist bekannt, dass Vitamin D<sub>3</sub> sowohl anabole als auch katabole Effekte auf den Knochenstoffwechsel ausübt. Chronische Behandlung kann die Zelldifferenzierung blockieren. Befinden sich die Zellen bereits in der Phase der Matrixmineralisation, wird diese durch erst jetzt beginnende Stimulation verstärkt. Werden Zellen kurzfristig zum Zeitpunkt der Proliferation mit Vitamin D<sub>3</sub> behandelt, scheint es zu einer Differenzierung zu kommen [146].

In unseren Versuchen konnten wir keine morphologischen Unterschiede im Vergleich zu den mitgeführten Kontrollzellen beobachten. Die möglichen Ursachen sind bereits bei den mit Dexamethason stimulierten Zellen erläutert worden.

In den mit  $\beta$ -Glycerophosphat und Vitamin C behandelten SaOS2-Zellkulturen konnte eine Matrixmineralisation sowohl lichtmikroskopisch als auch in der von-Kossa-Färbung nachgewiesen werden. Auch bei der radiologischen Untersuchung der Zellen ließen sich Kalkformationen nachweisen. Sie lassen sich jedoch nicht sicher von Kalkniederschlag aus dem Medium abgrenzen, so dass hier differenzierte Untersuchungen notwendig sind. Aus morphologischen Gesichtspunkten durchlaufen die Zellen die Phase der Proliferation, der Matrixreifung und Matrixmineralisation [180]. Die Zellen scheinen ein frühes Stadium in der Osteoblastendifferenzierung zu repräsentieren. McQuillan et al. machen dies unter anderem auch an der GCSP (Glycin Cleavage System P-Protein) Synthese der Zellen fest. Das GCSP ist ein typisches Syntheseprodukt von fetalem Knochen. Zudem konnte er nachweisen, dass die mineralisierte Matrix der von neu entstandenem Knochen in situ ähnlich ist [117]. Da es sich um eine transformierte Zelllinie handelt, steht eine ausreichende Zellzahl zur Verfügung. Allerdings ist darauf zu achten, Zellen aus einer niedrigen Zellpassage zu verwenden. Ab einer Passage von circa 12-15 konnten wir eine phänotypische Veränderung der Zellen beobachten. Sie ließen sich morphologisch von Fibroblasten nicht mehr unterscheiden und reagierten auf die angewendeten Substanzen nicht mehr.

Die mit  $\beta$ -Glycerophosphat behandelten primären humanen Osteoblasten starben in den ersten Kulturtagen. Der toxische Effekt von anorganischem Phosphat an Knochenzellen wird von Meleti et al. auf die Blockade mitochondrialer Enzyme zurückgeführt [118]. Der Effekt wurde aber nicht für  $\beta$ -Glycerophosphat beobachtet. Letzlich wurde eine sehr hohe, unphysiologische Phosphatkonzentration von 10 mM eingesetzt. Boyen et al schlagen eine Konzentration von 1-2 mM vor, also eher im physiologischen Bereich liegend [16]. Vorstellbar wäre aber auch eine verstärkte Radikalbildung im Zusammenhang mit den eingesetzten Antibiotika, die von der transformierten Zelllinie toleriert wird, da ihr im Gegensatz zu den primären Osteoblasten apoptoseinduzierende Signalproteine wie z.B. p53 fehlen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass SaOS2-Zellen ein geeignetes Zellkulturmodell zur Untersuchung der Knochendifferenzierung darstellen, da sie einen frühen Zeitpunkt in der osteoblastischen Differenzierung repräsentieren. Da es sich um eine transformierte Zelllinie handelt, bleibt jeweils von neuem abzuwägen, ob die Zellen für die jeweilig geplanten Fragestellungen geeignet sind.

Die Verwendung der von uns eingesetzten primären humanen Osteoblasten halten wir nur für eingeschränkt sinnvoll. Eine „Altersbestimmung“ der Zellen mittels Antikörper für die Untersuchung von Differenzierungsvorgängen halten wir für notwendig.

## 6. Zusammenfassung

Die Therapie von Erkrankungen des Knochengewebes, sowie von Frakturen und deren Heilungsstörungen, setzt ein grundlegendes Verständnis des Knochenstoffwechsels unter physiologischen Bedingungen und seiner pathologischen Veränderungen voraus. Mit der rasanten Entwicklung molekularbiologischer Verfahren stehen Techniken zur Verfügung, mit denen komplexe Interaktionen im Zellstoffwechsel analysiert und funktionelle Zusammenhänge besser erkannt werden können.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein Screening der m-RNA-Genexpression in humanen Knochenzellen während der Differenzierung durchzuführen. Primäre humane Osteoblasten und die humanen Osteosarkomzellen SaOS2 wurden mit Dexamethason, Vitamin D3, Vitamin C und  $\beta$ -Glycerophosphat stimuliert und morphologisch charakterisiert. Morphologische Veränderungen im Sinne einer Matrixkalcifikation zeigten nur die mit Vitamin C und  $\beta$ -Glycerophosphat stimulierten SaOS2-Zellen. Die ebenfalls mit Vitamin C und  $\beta$ -GP stimulierten humanen Osteoblasten begannen ab dem dritten Kulturtag abzusterben und wurden im weiteren Versuchsablauf nicht mehr berücksichtigt. Unter Dexamethason Stimulation ließ sich sowohl bei den SaOS2-Zellen als auch bei den humanen Osteoblasten ein Rückgang der Proliferationsrate beobachten. Die mit Vitamin D3 behandelten Zellen zeigten keinen Unterschied gegenüber den Kontrollzellen. Aus morphologischer Sicht haben nur die Vitamin C- und  $\beta$ -GP stimulierten SaOS2-Zellen eine Differenzierung im Sinne einer Matrixmineralisation durchlaufen. Sie stellen somit ein geeignetes Zellkulturmodell zur Knochendifferenzierung dar. Allerdings ist der Einsatz der Zellen für molekularbiologische Untersuchungen aufgrund des Fehlens von p 53 und des Retinoblastoms eingeschränkt und muss für weitere Untersuchungen jeweils von neuem durchdacht werden. Den Einsatz von aus Hüftköpfen gewonnenen humanen Osteoblasten halten wir ebenfalls für eingeschränkt sinnvoll. Der Effekt des Patientenalters auf die Zellen ist nicht gut untersucht. Über den Effekt auf den Knochenstoffwechsel konnte keine Aussage getroffen werden. Eine Zelldifferenzierung beobachteten wir nicht.

Als Untersuchungsmethoden wurde zum einen als Screening-Methode eine Variante der Differential Display-Polymerasekettenreaktion, die RNA-Arbitrarily Primed-PCR, zum anderen die Expression verschiedener Differenzierungs-assoziiierter Gene mit Hilfe einer spezifischen Reverse Transkription-PCR untersucht. Mit der RNA-Arbitrarily Primed-PCR konnte für keine der Versuchsreihen ein unterschiedliches Genexpressionsmuster festgestellt werden.

Mit der spezifischen Reverse Transkription-PCR konnte die Regulation sowohl von knochenspezifischen als auch von unspezifischen Genen nachgewiesen werden. Besonders hervorzuheben ist die differentielle Regulation der Notch 1, 2 und 4-Rezeptoren durch Vitamin D3. Das ähnliche Expressionsverhalten sowohl in SaOS2-Zellen als auch in humanen Osteoblasten legt eine grundlegende Expression von Notch-Rezeptoren und deren Beteiligung an der Knochenzellendifferenzierung nahe. Der Notch-Signalweg könnte somit einen neuen Ansatz in der Therapie von Erkrankungen des Knochengewebes darstellen.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Ahmad I, Zaouras P, Artavanis-Tsakonas S. Involvement of Notch-1 in mammalian retinal neurogenesis: association of Notch-1 activity with both immature and terminally differentiated cells. *Mech Dev* 1995; 53: 73-85.
2. Artavanis-Tsakonas S, Matsuno K, Fortini ME. Notch signaling. *Science* 1995; 268: 225-232.
3. Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* 1999; 284: 770-776.
4. Aubin JE. Bone stem cells. *J Cell Biochem Suppl* 1998; 31: 73-82
5. Aubin JE. Advances in the osteoblast lineage. *Biochem Cell Biol* 1998; 76: 899-910
6. Aubin JE, Heersche JNM. Osteoblastic Cell Lineage. In: M. Noda. *Cellular and Molecular Biology of Bone*. ed. San Diego: Academic Press; 1993. 1-29
7. Aubin JE, Liu F, Malaval L, Gupta AK. Osteoblast and chondroblast differentiation. *Bone* 1995; 17: 77S-83S.
8. Beatus P, Lendahl U. Notch and neurogenesis. *J Neurosci Res* 1998; 54: 125-136.
9. Beresford JN, Russell RGG. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 and human bone-derived cells in vitro: Effects on alkaline phosphatase, type I collagen, and proliferation. *Endocrinol* 1986; 119: 1176-1179
10. Bidwell JP, Alvarez M, Feister H, Onyia J, Hock J. Nuclear matrix proteins and osteoblast gene expression. *J Bone Miner Res* 1998; 13: 155-167.
11. Bilbe G, Roberts E, Birch M, Evans DB. PCR phenotyping of cytokines, growth factors and their receptors and bone matrix proteins in human osteoblast-like cell lines. *Bone* 1996; 19: 437-445.

12. Boden SD, McCuaig K, Hair G, Racine M, Titus L, Wozney JM, Nanes MS. Differential effects and glucocorticoid potentiation of bone morphogenetic protein action during rat osteoblast differentiation in vitro. *Endocrinology* 1996; 137: 3401-3407.
13. Boskey AL. Noncollagenous matrix proteins and their role in mineralization. *Bone Miner* 1989; 6: 111-123.
14. Boskey AL. Mineralisation, Structure, and Function of Bone. In: M-S Seibel. *Dynamics of Bone and Cartilage Metabolism*. ed. San Diego: Academic Press; 1999. 153-164
15. Boyan BD, Schwartz Z, Swain LD. Cell maturation-specific autocrine/paracrine regulation of matrix vesicles. *Bone Miner* 1992; 17: 263-268.
16. Boyan BD, Schwartz Z, Boskey AL. The importance of mineral in bone and mineral research. *Bone* 2000; 27: 341-342.
17. Boyce BF, Hughes DE, Wright KR, Xing L, Dai A. Recent advances in bone biology provide insight into the pathogenesis of bone diseases. *Lab Invest* 1999; 79: 83-94.
18. Bradshaw AD, Sage EH. SPARC, a matricellular protein that functions in cellular differentiation and tissue response to injury. *J Clin Invest* 2001; 107: 1049-1054.
19. Bray S, Furriols M. Notch pathway: making sense of suplessor of hairless. *Curr Biol* 2001; 11: 217-221
20. Brekken RA, Sage EH. SPARC, a matricellular protein: at the crossroads of cell-matrix. *Matrix Biol* 2000; 19: 569-580.
21. Bronckers AL, Butler WT. Immunolocalisation of  $\gamma$ -carboxyglutamic acid containing proteins in developing rat bones. *Collagen Relat Res* 1985; 5: 273-281
22. Bruder SP, Fink DJ, Caplan AI. Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy. *J Cell Biochem* 1994; 56: 283-294.

23. Butler AA, LeRoith D. Minireview: tissue-specific versus generalized gene targeting of the *igf1* and *igf1r* genes and their roles in insulin-like growth factor physiology. *Endocrinology* 2001; 142: 1685-1688.
24. Canalis E. Inhibitory actions of glucocorticoids on skeletal growth. Is lokal insulin-like growth factor I to blame? *Endocrinol* 1998; 139: 3041-3042
25. Cancedda R, Castagnola P, Cancedda FD, Dozin B, Quarto R. Developmental control of chondrogenesis and osteogenesis. *Int J Dev Biol* 2000; 44: 707-714.
26. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 1991; 9: 641-650.
27. Chatterjee M. Vitamin D and genomic stability. *Mutat Res* 2001; 475: 69-87.
28. Chen JL, Hunt P, McElvain M, Black T, Kaufman S, Choi ES. Osteoblast precursor cells are found in CD34+ cells from human bone marrow. *Stem Cells* 1997; 15: 368-377
29. Chin YE, Fu XY. Cell growth arrest and induction of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 WAF1/CIP1 mediated by STAT1. *Cell* 1996; 272: 719-722
30. Cook SD. Preclinical and clinical evaluation of osteogenic protein-1 (BMP-7) in bony sites. *Orthopedics* 1999; 22: 669-671.
31. Davies J. Intracellular and extracellular regulation of ureteric bud morphogenesis. *J Anat* 2001; 198: 257-264.
32. Dean DM, Sanders MM. Ten years after: reclassification of steroid-responsive genes. *Mol Endocrinol* 1996; 10: 1489-1495.
33. Deftos ML, Bevan MJ. Notch signaling in T cell development. *Curr Opin Immunol* 2000; 12: 166-172.
34. Delany AM, Dong Y, Canalis E. Mechanisms of glucocorticoid action in bone cells. *J Cell Biochem* 1994; 56: 295-302.
35. Delling G. Skelettsystem. In: W. Remmele. *Pathologie*. ed. Heidelberg: Springer; 1997.
36. Denhardt DT, Noda M. Osteopontin expression and function: role in bone remodeling. *J Cell Biochem Suppl* 1998; 31: 92-102

37. Denhardt DT, Noda M, O'Regan AW, Pavlin D, Berman JS. Osteopontin as a means to cope with environmental insults: regulation of inflammation, tissue remodeling, and cell survival. *J Clin Invest* 2001; 107: 1055-1061.
38. Ducy P, Karsenty G. The family of bone morphogenetic proteins. *Kidney Int* 2000; 57: 2207-2214.
39. Ducy P, Schinke T, Karsenty G. The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science* 2000; 289: 1501-1504.
40. Eddison M, Le Roux I, Lewis J. Notch signaling in the development of the inner ear: lessons from drosophila. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 11692-11699.
41. Ewen ME, Livingston DM. Functional interactions of the retinoblastoma protein with mammalian D-type cyclins. *Cell* 1993; 73: 487-497
42. Eyre LJ, Rabbitt EH, Bland R, Hughes SV, Cooper MS, Sheppard MC, Stewart PM, Hewison M. Expression of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase in rat osteoblastic cells: Pre-receptor regulation of glucocorticoid responses in bone. *J Cell Biochem* 2001; 81: 453-462
43. Farach-Carson MC, Ridall AL. Dual 1,25-dihydroxyvitamin D3 signal response pathways in osteoblasts: cross-talk between genomic and membrane-initiated pathways. *Am J Kidney Dis* 1998; 31: 729-742.
44. Fedde KN, Lane CC, Whyte MP. Alkaline phosphatase is an ectoenzyme that acts on micromolar concentrations of natural substrates at physiologic pH in human osteosarcoma (SAOS-2) cells. *Arch Biochem Biophys* 1988; 264: 400-409.
45. Feder JN, Li L, Jan LY, Jan YN. Genomic cloning and chromosomal localization of HRY, the human homolog to the Drosophila segmentation gene, hairy. *Genomics* 1994; 20: 56-61.
46. Fleming RJ. Structural conservation of Notch receptors and ligands. *Semin Cell Dev Biol* 1998; 9: 599-607.
47. Forsberg H, Brown NA. Waves of mouse Lunatic fringe expression, in four hour cycles at two-hour intervals, precede somite boundary formation. *Curr Biol* 1998; 8: 1027-1030

48. Francis-West PH, Parish J, Lee K, Archer CW. BMP/GDF-signalling interactions during synovial joint development. *Cell Tissue Res* 1999; 296: 111-119.
49. Fraser JD, Price PA. 1,25 Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> stimulates the synthesis of matrix  $\gamma$ -carboxyglutamic acid protein by osteosarcomacells. *J Biol Chem* 1988; 263: 911-916
50. Frisen J, Lendahl U. Oh no, Notch again! *Bioessays* 2001; 23: 3-7.
51. Fukayama S, Tashjian AH, Jr. Stimulation by parathyroid hormone of <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> uptake in osteoblast-like cells: possible involvement of alkaline phosphatase. *Endocrinology* 1990; 126: 1941-1949.
52. Garces C, Laborda J. Notch-1 controls the expression of fatty acid-activated transcription factors and is required for adipogenesis. *J Biol Chem* 1997; 272: 29729-29734
53. Gardner AF. The nature of bone tissue. A review. *Periodontics* 1968; 6: 183-188.
54. Gerstenfeld LC. Osteopontin in skeletal tissue homeostasis: An emerging picture of the autocrine/paracrine functions of the extracellular matrix. *J Bone Miner Res* 1999; 14: 850-855.
55. Gerstenfeld LC, Glimcher MJ. Ultrastructural immunolocalization of a major 66 kDa phosphoprotein synthesized by chicken osteoblasts during mineralization in vitro. *Anat Rec* 1990; 228: 93-103
56. Gerstenfeld LC, Shapiro FD. Expression of bone-specific genes by hypertrophic chondrocytes: implication of the complex functions of the hypertrophic chondrocyte during endochondral bone development. *J Cell Biochem* 1996; 62: 1-9.
57. Giachelli C, Lombardi D. Osteopontin expression in angiotensin II-induced tubulointerstitial nephritis. *Kidney Int* 1994; 45: 515-524
58. Giachelli C, Steitz S. Osteopontin: a versatile regulator of inflammation and biomineralization. *Matrix Biol* 2000; 19: 615-622.
59. Goumans MJ, Mummery C. Functional analysis of the TGF $\beta$  receptor/Smad pathway through gene ablation in mice. *Int J Dev Biol* 2000; 44: 253-265.

60. Grant ME, Prockop DJ. The biosynthesis of collagen. 1. *N Engl J Med* 1972; 286: 194-199.
61. Greenwald I. LIN-12/Notch signaling: lessons from worms and flies. *Genes Dev* 1998; 12: 1751-1762
62. Grigoriadis AE, Heersche JN. Modulation by retinoic acid of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> effects on alkaline phosphatase activity and parathyroid hormone responsiveness in an osteoblast-like osteosarcoma cell line. *Endocrinol* 1986; 119: 932-939
63. Groeneveld EHJ, Burger EH. Bone morphogenetic proteins in human bone regeneration. *Eur J Endocrinol* 2000; 142: 9-21
64. Gundberg CM. Biochemical markers of bone formation. *Clin Lab Med* 2000; 20: 489-501.
65. Hart SM, Eastell R. Biochemical markers of bone turnover. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1999; 8: 421-427.
66. Haussler MR, Haussler CA, Jurutka PW, Thompson PD, Hsieh JC, Remus LS, Selznick SH, Whitfield GK. The vitamin D hormone and its nuclear receptor: molecular actions and disease states. *J Endocrinol* 1997; 154 Suppl: S57-73.
67. Hay ED. Collagen and embryonic development. In: E. D. Hay. *Cell Biology of Extracellular Matrix*. ed. New York: Plenum; 1981.
68. Hayden JM, Mohan S, Baylink DJ. The insulin-like growth factor system and the coupling of formation to resorption. *Bone* 1995; 17: 93S-98S.
69. Hicks C, Weinmaster G. Fringe differentially modulates Jagged1 and Delta1 signalling through Notch1 and Notch2. *Nature Cell Biol* 2000; 2: 515-520
70. Hock JM, Canalis E. Insulin-like growth factor I (IGF-I) has independent effects on bone matrix formation and cell replication. *Endocrinol* 1988; 122: 254-260
71. Hogan BL. Bone morphogenetic proteins in development. *Curr Opin Genet Dev* 1996; 6: 432-438.

72. Jaaskelainen T, Pirskanen A, Ryhanen S, Palvimo JJ, Deluca HF, Maenpaa PH. Functional interference between AP-1 and the vitamin D receptor on osteocalcin gene expression in human osteosarcoma cells. *Eur J Biochem* 1994; 224: 11-20.
73. Jang MS, Zlobin A, Kast WM, Miele L. Notch signaling as a target in multimodality cancer therapy. *Curr Opin Mol Ther* 2000; 2: 55-65.
74. Jarriault S, Brou C, Logeat F, Schroeter EH, Kopan R, Israel A. Signalling downstream of activated mammalian Notch. *Nature* 1995; 377: 355-358.
75. Johnson TE, Vogel R, Rutledge SJ, Rodan G, Schmidt A. Thiazolidinedione effects on glucocorticoid receptor-mediated gene transcription and differentiation in osteoblastic cells. *Endocrinology* 1999; 140: 3245-3254.
76. Johnson-Pais TL, Leach RJ. Regulation of osteoblast gene expression in intratypic osteosarcoma hybrid cells. *Exp Cell Res* 1995; 221: 370-376.
77. Jonsson KB, Frost A, Nilsson O, Ljunghall SL, Junggren O. Three isolation techniques for primary culture of human osteoblast-like cells: a comparison. *Acta Orthop Scand* 1999; 70: 365-373.
78. Joutel A, Tournier-Lasserre E. Notch signalling pathway and human diseases. *Semin Cell Dev Biol* 1998; 9: 619-625.
79. Joutel A, Corpechot C, Ducros A, Vahedi K, Chabriat H, Mouton P, Alamowitch S, Domenga V, Cecillion M, Marechal E, Maciazek J, Vayssiere C, Cruaud C, Cabanis EA, Ruchoux MM, Weissenbach J, Bach JF, Bousser MG, Tournier-Lasserre E. Notch3 mutations in cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CADASIL), a mendelian condition causing stroke and vascular dementia. *Ann N Y Acad Sci* 1997; 826: 213-217.
80. Joyner CJ, Bennett A, Triffitt JT. Identification and enrichment of human osteoprogenitor cells by using differentiation stage-specific monoclonal antibodies. *Bone* 1997; 21: 1-6.
81. Junceira LC. Bindegewebe. In: L. C. Junceira, J. Carneiro. *Histologie*. ed. Berlin: Schiebler, T. H. Schneider, F.; 1991. 140-170

82. Junqueira LC, Carneiro J. Knochen und Knochenverbindungen. In: T. H. Schiebler, F. Schneider. Histologie. ed. Heidelberg: Springer-Verlag; 1991. 190-215
83. Karsenty G. The central regulation of bone remodeling. Trends Endocrinol Metab 2000; 11: 437-439.
84. Karsenty G. Bone formation and factors affecting this process. Matrix Biol 2000; 19: 85-89.
85. Kassem M, Risteli L, Mosekilde L, Melsen F, Eriksen EF. Formation of osteoblast-like cells from human mononuclear bone marrow cultures. Apmis 1991; 99: 269-274.
86. Keen RW, Woodford-Richens KL, Grant SF, Ralston SH, Lanchbury JS, Spector TD. Association of polymorphism at the type I collagen (COL1A1) locus with reduced bone mineral density, increased fracture risk, and increased collagen turnover. Arthritis Rheum 1999; 42: 285-290.
87. Kimble J, Henderson S, Crittenden S. Notch/LIN-12 signaling: transduction by regulated protein slicing. Trends Biochem Sci 1998; 23: 353-357.
88. Kingsley DM. What do BMPs do in mammals? Clues from the mouse short-ear mutation. Trends Genet 1994; 10: 16-21.
89. Klaushofer K, Peterlik M. [Pathophysiology of fracture healing]. Radiologe 1994; 34: 709-714.
90. Knese K-H. Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen 2/5. Berlin, Heidelberg, New York: Springer - Verlag; 1979. S. 625 ff.
91. Knutsen R, Honda Y, Strong DD, Sampath TK, Baylink DJ, Mohan S. Regulation of insulin-like growth factor system components by osteogenic protein-1 in human bone cells. Endocrinology 1995; 136: 857-865.
92. Koedam JA, Hoogerbrugge CM, Van Buul-Offers SC. Differential regulation of IGF-binding proteins in rabbit costal chondrocytes by IGF-I and dexamethasone. J Endocrinol 2000; 165: 557-567.

93. Kyeyune-Nyombi E, Nicolas V, Strong DD, Farley J. Paradoxical effects of phosphate to directly regulate the level of skeletal alkaline phosphatase activity in human osteosarcoma (SaOS-2) cells and inversely regulate the level of skeletal alkaline phosphatase mRNA. *Calcif Tissue Int* 1995; 56: 154-159.
94. Lane TF, Sage EH. The biology of SPARC, a protein that modulates cell-matrix interactions. *Faseb J* 1994; 8: 163-173.
95. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science* 1993; 260: 920-926.
96. Leboy PS, Beresford JN, Devlin C, Owen ME. Dexamethasone induction of osteoblast mRNAs in rat marrow stromal cell cultures. *J Cell Physiol* 1991; 146: 370-378.
97. Levine JP, Bradley J, Turk AE, Ricci JL, Benedict JJ, Steiner G, Longaker MT, McCarthy JG. Bone morphogenetic protein promotes vascularization and osteoinduction in preformed hydroxyapatite in the rabbit. *Ann Plast Surg* 1997; 39: 158-168
98. Lian JB, Stein GS. Concepts of osteoblast growth and differentiation: basis for modulation of bone cell development and tissue formation. *Crit Rev Oral Biol Med* 1992; 3: 269-305
99. Lian JB, Stein GS, Bortell R, Owen TA. Phenotype suppression: a postulated molecular mechanism for mediating the relationship of proliferation and differentiation by Fos/Jun interactions at AP-1 sites in steroid responsive promoter elements of tissue-specific genes. *J Cell Biochem* 1991; 45: 9-14.
100. Lian JB, Stein GS, Stein JL, van Wijnen AJ. Transcriptional control of osteoblast differentiation. *Biochem Soc Trans* 1998; 26: 14-21.
101. Lian JB, Stein GS, Stein JL, van Wijnen AJ. Regulated expression of the bone-specific osteocalcin gene by vitamins and hormones. *Vitam Horm* 1999; 55: 443-509
102. Lian JB, Stein JL, Stein GS, Montecino M, van Wijnen AJ, Javed A, Gutierrez S. Contributions of nuclear architecture and chromatin to vitamin D- dependent transcriptional control of the rat osteocalcin gene. *Steroids* 2001; 66: 159-170.

103. Lian JB, Shalhoub V, Aslam F, Frenkel B, Green J, Hamrah M, Stein GS, Stein JL. Species-specific glucocorticoid and 1,25-dihydroxyvitamin D responsiveness in mouse MC3T3-E1 osteoblasts: dexamethasone inhibits osteoblast differentiation and vitamin D down-regulates osteocalcin gene expression. *Endocrinology* 1997; 138: 2117-2127.
104. Liang P, Pardee A. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 1992; 257: 967-971
105. Liu Z, Luyten FP, Lammens J, Dequeker J. Molecular signaling in bone fracture healing and distraction osteogenesis. *Histol Histopathol* 1999; 14: 587-595.
106. Macleod KF, Jacks T. P53-dependent and independent expression of p21 during cell growth, differentiation and DNA damage. *Genes Dev.* 1995; 9: 935-944
107. Mahonen A, Pirskanen A, Keinanen R, Maenpaa PH. Effect of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> on its receptor mRNA levels and osteocalcin synthesis in human osteosarcoma cells. *Biochim Biophys Acta* 1990; 1048: 30-37.
108. Mahonen A, Jukkola A, Risteli L, Risteli J, Maenpaa PH. Type I procollagen synthesis is regulated by steroids and related hormones in human osteosarcoma cells. *J Cell Biochem* 1998; 68: 151-163.
109. Maier D, Stumm G, Kuhn K, Preiss A. Hairless, a *Drosophila* gene involved in neural development, encodes a novel, serine rich protein. *Mech Dev* 1992; 38: 143-156.
110. Maiti SK, Singh GR. Bone morphogenetic proteins--novel regulators of bone formation. *Indian J Exp Biol* 1998; 36: 237-244.
111. Marie PJ. Cellular and molecular alterations of osteoblasts in human disorders of bone formation. *Histol Histopathol* 1999; 14: 525-538.
112. Mayer H, Scutt A, Wingender E. [Differentiation of osteogenetic cells: systems and regulators]. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 1992; 130: 276-284.
113. Mc Clelland M, Ralph D, Cheng R, Welsh J. Interactions among regulators of RNA abundance characterized using fingerprinting by arbitrarily primed PCR. *Nucleic Acid Res* 1994; 22: 4419-4431

114. McCarthy TL, Centrella M. Regulation of IGF activity in bone. *Adv Exp Med Biol* 1993; 343: 407-414
115. McDonald JA. Matrix regulation of cell shape and gene expression. *Curr Opin Cell Biol* 1989; 1: 995-999.
116. McKee MD, Nanci A. Osteopontin: an interfacial extracellular matrix protein in mineralized tissues. *Connect Tissue Res* 1996; 35: 197-205
117. McQuillan DJ, Richardson MD, Bateman JF. Matrix deposition by a calcifying human osteogenic sarcoma cell line (SAOS-2). *Bone* 1995; 16: 415-426.
118. Meleti Z, Shapiro M, Adams CS. Inorganic Phosphate Induces Apoptosis of Osteoblast-like Cells in Culture. *Bone* 2000; 27: 359-366
119. Miele L, Osborne B. Arbiter of differentiation and death: Notch signaling meets apoptosis. *J Cell Physiol* 1999; 181: 393-409
120. Miyazono K. Signal transduction by bone morphogenetic protein receptors: functional roles of Smad proteins. *Bone* 1999; 25: 91-93.
121. Mochizuki H, Kumegawa M. Insulin-like growth factor-I supports formation and activation of osteoclasts. *Endocrinol* 1992; 131: 1075-1080
122. Mohan S, Baylink DJ. Characterization of the IGF regulatory system in bone. *Adv Exp Med Biol* 1993; 343: 397-406
123. Motamed K. SPARC (osteonectin/BM-40). *Int J Biochem Cell Biol* 1999; 31: 1363-1366.
124. Mullis KB. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am* 1990; 262: 56-61, 64-55.
125. Mundlos S. Expression patterns of matrix genes during human skeletal development. *Prog Histochem Cytochem* 1994; 28: 1-47
126. Murphy-Ullrich JE. The de-adhesive activity of matricellular proteins: is intermediate cell adhesion an adaptive state? *J Clin Invest* 2001; 107: 785-790.
127. Murry CE, Vracko R. Macrophages express osteopontin during repair of myocardial necrosis. *Am J Pathol* 1994; 145: 1450-1462

128. Nakajima S, Yamagata M, Sakai N, Ozono K. Effect of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and protein kinase A on ligand-dependent transactivation via the vitamin D receptor. *Mol Cell Endocrinol* 2000; 159: 45-51.
129. Noble BS, Reeve J. Osteocyte function, osteocyte death and bone fracture resistance. *Mol Cell Endocrinol* 2000; 159: 7-13.
130. Nowack H, Timpl R. Characterisation of the amino-terminal segment in type III procollagen. *Eur J Biochem* 1976; 205-216
131. O'Brian KD, Reichenbach DD. Osteopontin is expressed in human aortic valvular lesions: evidence that aortic valve calcification may be actively regulated. *Circ* 1994; 92: 2163-2168
132. Ogose A, Endo N. Elevation of Serum Alkaline Phosphatase in Clear Cell Chondrosarkoma of Bone. *Anticancer Research* 2001; 21: 649-656
133. Olsen BR. Genetic regulation of skeletal patterning, differentiation, and growth. *Bone* 1999; 25: 77-79.
134. Olsen BR, Reginato AM, Wang W. Bone development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2000; 16: 191-220
135. O'Regan A, Berman JS. Osteopontin: a key cytokine in cell-mediated and granulomatous inflammation. *Int J Exp Pathol* 2000; 81: 373-390.
136. Orlandini SZ, Formigli L, Benvenuti S, Lasagni L, Franchi A, Masi L, Bernabei PA, Santini V, Brandi ML. Functional and structural interactions between osteoblastic and preosteoclastic cells in vitro. *Cell Tissue Res* 1995; 281: 33-42.
137. Otsuka K, Termine JD. Biosynthesis of osteonectin by fetal porcine calvarial cells in vitro. *J Cell Biochem* 1984; 259: 9805-9812
138. Owen TA, Aronow M, Shalhoub V, Barone LM, Wilming L, Tassinari MS, Kennedy MB, Pockwinse S, Lian JB, Stein GS. Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. *J Cell Physiol* 1990; 143: 420-430.

139. Palmeirim IPouriquie O. Avian hairy gene expression identifies a molecular clock linked to vertebrate segmentation and somitogenesis. *Cell* 1997; 91: 639-648
140. Pareira RMCAnalis E. Cortisol regulates the expression of Notch in osteoblasts. *J Cell Biochem* 2002; 85: 252-258
141. Perron MHarris WA. Determination of vertebrate retinal progenitor cell fate by the Notch pathway and basic helix-loop-helix transcription factors. *Cell Mol Life Sci* 2000; 57: 215-223.
142. Petrides PE. Binde- und Stützgewebe. In: G. Löffler, P. E. Petrides. *Physiologische Chemie*. ed. Berlin: Springer-Verlag; 1988.
143. Polly P, Carberg V. Cyclin C is a primary Vitamin D3 responding gene. *J Cell Biochem* 2000; 77: 75-81
144. Prockop DJ, Azizi SA, Colter D, Digirolamo C, Kopen G, Phinney DG. Potential use of stem cells from bone marrow to repair the extracellular matrix and the central nervous system. *Biochem Soc Trans* 2000; 28: 341-345
145. Ralston SH. Genetic markers of bone metabolism and bone disease. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 1997; 227: 114-121
146. Rao LG, Sutherland MK, Reddy GS, Siu-Caldera ML, Uskokovic MR, Murray TM. Effects of 1alpha,25-dihydroxy-16ene, 23yne-vitamin D3 on osteoblastic function in human osteosarcoma SaOS-2 cells: differentiation-stage dependence and modulation by 17-beta estradiol. *Bone* 1996; 19: 621-627.
147. Raval P, Hsu HH, Schneider DJ, Sarras MP, Jr., Masuhara K, Bonewald LF, Anderson HC. Expression of bone morphogenetic proteins by osteoinductive and non- osteoinductive human osteosarcoma cells. *J Dent Res* 1996; 75: 1518-1523.
148. Reddi AH. Cartilage morphogenesis: role of bone and cartilage morphogenetic proteins, homeobox genes and extracellular matrix. *Matrix Biol* 1995; 14: 599-606.
149. Reddi AH. Bone morphogenetic proteins and skeletal development: the kidney-bone connection. *Pediatr Nephrol* 2000; 14: 598-601.

150. Reddi AH, Wientroub S, Muthukumaran N. Biologic principles of bone induction. *Orthop Clin North Am* 1987; 18: 207-212.
151. Redmond L, Ghosh A. The role of Notch and Rho GTPase signaling in the control of dendritic development. *Curr Opin Neurobiol* 2001; 11: 111-117.
152. Reed MJ, Sage EH. SPARC and the extracellular matrix: implications for cancer and wound repair. *Curr Top Microbiol Immunol* 1996; 213: 81-94.
153. Robert L. Matrix biology: past, present, future. *Pathol Biol (Paris)* 2001; 4: 279-283
154. Robson MacDonald H, Wilson A, Radtke F. Notch1 and T-cell development: insights from conditional knockout mice. *Trends Immunol* 2001; 22: 155-160.
155. Rodan GA. Bone mass homeostasis and bisphosphonate action. *Bone* 1997; 20: 1-4.
156. Rodan GA, Rodan SB. Expression of the osteoblastic phenotype. *Bone and Mineral Research* 1984; 2: 244-285
157. Rodan GA, Noda M. Gene expression in osteoblastic cells. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 1991; 1: 85-98
158. Rodan GA, Heath JK, Yoon K, Noda M, Rodan SB. Diversity of the osteoblastic phenotype. *Ciba Found Symp* 1988; 136: 78-91
159. Rodan SB, Imai Y, Thiede MA, Wesolowski G, Thompson D, Bar-Shavit Z, Shull S, Mann K, Rodan GA. Characterization of a human osteosarcoma cell line (Saos-2) with osteoblastic properties. *Cancer Res* 1987; 47: 4961-4966.
160. Rodeon G-A. The missing bone. *Cell* 1997; 89: 677-680
161. Rogatsky I, Trowbridge JM, Garabedian MJ. Glucocorticoid receptor-mediated cell cycle arrest is achieved through distinct cell-specific transcriptional regulatory mechanisms. *Mol Cell Biol* 1997; 17: 3181-3193.
162. Rosen CJ, Glowacki J, Craig W. Sex steroids, the insulin-like growth factor regulatory system, and aging: implications for the management of older postmenopausal women. *J Nutr Health Aging* 1998; 2: 39-44

163. Roughead ZK, Kunkel ME. Effect of diet on bone matrix constituents. *J Am Coll Nutr* 1991; 10: 242-246.
164. Ryoo HM, van Wijnen AJ, Stein JL, Lian JB, Stein GS. Detection of a proliferation specific gene during development of the osteoblast phenotype by mRNA differential display. *J Cell Biochem* 1997; 64: 106-116.
165. Sage EH. Regulation of interactions between cells and extracellular matrix: a command performance on several stages. *J Clin Invest* 2001; 107: 781-783.
166. Sage EH, Bornstein P. Characterisation of a novel serum albumin-binding glycoprotein secreted by endothelial cells in culture. *J Cell Biochem* 1984; 259: 3993-4007
167. Schmitt JM, Hwang K, Winn SR, Hollinger JO. Bone morphogenetic proteins: an update on basic biology and clinical relevance. *J Orthop Res* 1999; 17: 269-278.
168. Schnabel M, Bortolussi G, Fichtel I, Kraus A, Gotzen L, Schlegel J. Detection of differential gene expression in human osteoblastic cells by non-radioactive RNA arbitrarily primed PCR. *Int J Mol Med* 1998; 1: 593-595.
169. Schoen FJ, Piehler HR. Pathological considerations in replacement cardiac valves. *Cardiovasc Pathol* 1992; 1: 29-52
170. Schulz A, Loreth B, Battmann A, Knoblauch B, Stahl U, Pollex U, Bohle RM. [Bone matrix production in osteosarcoma]. *Verh Dtsch Ges Pathol* 1998; 82: 144-153
171. Schweisguth F, Gho M, Lecourtois M. Control of cell fate choices by lateral signaling in the adult peripheral nervous system of *Drosophila melanogaster*. *Dev Genet* 1996; 18: 28-39
172. Seibel MJ. Molecular markers of bone turnover: biochemical, technical and analytical aspects. *Osteoporos Int* 2000; 11: S18-29.
173. Shalhoub V, Conlon D, Tassinari M, Quinn C, Partridge N, Stein GS, Lian JB. Glucocorticoids promote development of the osteoblast phenotype by selectively modulating expression of cell growth and differentiation associated genes. *J Cell Biochem* 1992; 50: 425-440.

174. Siddhanti SR, Quarles LD. Molecular to pharmacologic control of osteoblast proliferation and differentiation. *J Cell Biochem* 1994; 55: 310-320.
175. Smith WC. TGF beta inhibitors. New and unexpected requirements in vertebrate development. *Trends Genet* 1999; 15: 3-5.
176. Sodek J, Ganss B, McKee MD. Osteopontin. *Crit Rev Oral Biol Med* 2000; 11: 279-303
177. Soriano JV, Irminger-Finger I, Uyttendaele H, Vaudan G, Kitajewski J, Sappino AP, Montesano R. Repression of the putative tumor suppressor gene *Bard1* or expression of *Notch4(int-3)* oncogene subvert the morphogenetic properties of mammary epithelial cells. *Adv Exp Med Biol* 2000; 480: 175-184
178. Spiess VH, Manolagas SC. Phenotype-associated changes in the effects of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> on alkaline phosphatase and bone GLA-protein of rat osteoblastic cells. *Endocrinol* 1986; 118: 1340-1346
179. Stein GS, Lian JB, Stein JL, van Wijnen AJ. Bone tissue specific transcriptional control: options for targeting gene therapy to the skeleton. *Cancer* 2000; 88: 2899-2902.
180. Stein GS, Lian JB, Gerstenfeld LG, Shalhoub V, Aronow M, Owen T, Markose E. The onset and progression of osteoblast differentiation is functionally related to cellular proliferation. *Connect Tissue Res* 1989; 20: 3-13
181. Stern PH. Vitamin D and bone. *Kidney Int Suppl* 1990; 29: S17-21.
182. Strauss PG, Erfle V. Gene expression during osteogenic differentiation in mandibular condyles in vitro. *J Cell Biol* 1990; 110: 1369
183. Stryer L. Bindegewebsproteine. In: L. Stryer. *Biochemie*. ed. Heidelberg: Spektrum der Wissenschaften; 1988. 272-293
184. Stuart JM, Kang AH. Collagen autoimmunity and arthritis. *FASEB J* 1988; 2950-2956
185. Szulczweski DH, Moeller K. Characterisation of bovine Osteoclasts on an isomeric Cement in Vitro. *Cells and Materials* 1993; 3: 83-92

186. Tackmann W. Repetitorium der Histologie, 1. Teil, S. 87. Berlin: Robert Tackmann Verlag; 1991. S. 87.
187. Takeda S, Karsenty G. Central control of bone formation. *J Bone Miner Metab* 2001; 19: 195-198
188. Tam PP, Trainor PA. Specification and segmentation of the paraxial mesoderm. *Anat Embryol* 1994; 189: 275-305
189. Termine JD. Non-collagen proteins in bone. *Ciba Found Symp* 1988; 136: 178-202
190. Termine JD, Martin GR. Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen. *Cell* 1981; 26: 99-105
191. Tezuka K, Hozumi N. Stimulation of osteoblastic cell differentiation by Notch. *J Bone Miner Res* 2002; 17: 231-239
192. Tsai M-J, O'Malley BW. Molecular mechanism of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu Rev Biochem* 1994; 63: 45-86
193. Tuck AB, Singhal H. Osteopontin and p53 expression are associated with tumor progression in a case of synchronous, bilateral, invasive mamma carcinoma. *Arch Pathol Lab Med* 1997; 121: 578-584
194. Urist MR. Bone differentiation and growth factors. *Science* 1983; 220: 680-685
195. van der Plas A, Aarden EM, Feijen JH, de Boer AH, Wiltink A, Alblas MJ, de Leij L, Nijweide PJ. Characteristics and properties of osteocytes in culture. *J Bone Miner Res* 1994; 9: 1697-1704.
196. Vogt PM, Peter FW, Steinau HU. Perspektiven des Gewebetransfers und der Gewebezüchtung. *Der Orthopäde* 1998; 27: 45-50
197. von der Mark K. Structure, Biosynthesis and Gene Regulation of Collagens in Cartilage and Bone. In: S. P. Robins and J. P. Bilezikian M. J. Seibel. *Dynamics of Bone and Cartilage Metabolism*. ed. San Diego: Academic Press; 1999.
198. Weinmaster G. The ins and outs of notch signaling. *Mol Cell Neurosci* 1997; 9: 91-102

199. Weiss MJ, Ray K, Henthorn PS, Lamb B, Kadesch T, Harris H. Structure of the human liver/bone/kidney alkaline phosphatase gene. *J Biol Chem* 1988; 263: 12002-12010.
200. White C, Gardiner E, Eisman J. Tissue specific and vitamin D responsive gene expression in bone. *Mol Biol Rep* 1998; 25: 45-61.
201. Wolff HH, Anemuller W. Haut. In: W. Remmele. Pathologie. ed. Heidelberg: Springer; 1997. 485-587
202. Wozney JM. Bone morphogenetic proteins. *Prog Growth Factor Res* 1989; 1: 267-280
203. Wozney JM. The bone morphogenetic protein family and osteogenesis. *Mol Reprod Dev* 1992; 32: 160-167.
204. Wozney JM. The bone morphogenetic protein family: multifunctional cellular regulators in the embryo and adult. *Eur J Oral Sci* 1998; 106 Suppl 1: 160-166.
205. Wozney JM, Rosen V. Bone morphogenetic protein and bone morphogenetic protein gene family in bone formation and repair. *Clin Orthop* 1998; 26-37.
206. Wuthier RE, Register TC. Role of alkaline phosphatase, a polyfunctional enzyme, in mineralizing tissues. In: W. T. Butler. *The Chemistry and Biology of Mineralized Tissues*. ed. Birmingham, Alabama: EBSCO Media; 1984. 114-124
207. Yan Q, Sage EH. SPARC, a matricellular glycoprotein with important biological functions. *J Histochem Cytochem* 1999; 47: 1495-1506.
208. Ye Y, Fortini ME. Proteolysis and developmental signal transduction. *Semin Cell Dev Biol* 2000; 11: 211-221
209. Yokasaki Y, Sheppard D. Mapping of the cryptic integrin-binding site in osteopontin suggests a new mechanism by which thrombin can regulate inflammation and tissue repair. *Trends Cardiovasc Med* 2000; 10: 155-159.
210. Yoo JU, Johnstone B. The role of osteochondral progenitor cells in fracture repair. *Clin Orthop* 1998; S73-81.

211. Young MF, Kerr JM, Ibaraki K, Heegaard AM, Robey PG. Structure, expression, and regulation of the major noncollagenous matrix proteins of bone. *Clin Orthop* 1992; 275-294.
212. Yung Yu C, Yang Z, Blanchong CA, Miller W. The human and mouse MHC class III region: a parade of 21 genes at the centromeric segment. *Immunol Today* 2000; 21: 320-328.
213. Zheng WH, Kar S, Dore S, Quirion R. Insulin-like growth factor-1 (IGF-1): a neuroprotective trophic factor acting via the Akt kinase pathway. *J Neural Transm Suppl* 2000; 60: 261-272

## **8. Anhang**

### **8.1. Akademische Lehrer**

Meine akademischen Lehrerinnen und Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren:

Amon, Arnold, Aumüller, Basler, Bauer, Baum, Berger, Friederich, Fuhrmann, Ganz, Garten, Gemsa, Geus, Gotzen, Gressner, Griss, Gröne, Happle, Havemann, Hildebrandt, Hilgermann, Jones, Joseph, Kaffarnik, Karlson, Kern, Kleine, Klose, Knoll, Kretschmer, Kroll, Kummer, Lang, Lange, Lennartz, Maisch, Mannheim, Mennel, Moosdorf, Müller, Oertel, Radsack, Riedmiller, Rothmund, Schäfer, Schachtschabel, Schlegel, Schnabel, Schwarz, Seifart, Slenczka, Sturm, Thomas, Voigt, Weber, von Wichert, Westermann, Vannucci.

## 8.2. Publikationen

Teile der vorliegenden Arbeit wurden in den nachfolgenden Veröffentlichungen verwendet:

1. Schnabel M, Fichtel I, Gotzen L, Schlegel J  
Differential expression of Notch genes in human osteoblastic cells  
Int J Mol Med 9: 229-232 (2002)
2. Schnabel M, Fichtel I, Hofmann C, Gotzen L, Schlegel J  
Der Einsatz der RNA-Arbitrarily-Primed-PCR (RAP-PCR) als nicht radioaktives molekularbiologisches Screeningverfahren zum Nachweis differentieller Veränderungen im Knochenstoffwechsel  
Hefte zur Zeitschrift der Unfallchirurg 278: 62-73 (2000)
3. Schnabel M, Bortolussi G, Fichtel I, Kraus A, Gotzen L, Schlegel J  
Detection of differential gene expression in human osteoblastic cells by non-radioactive RNA arbitrarily primed PCR  
Int J Mol Med 1, 593-595 (1998)
4. Fichtel I, Schnabel M, Schlegel J  
Molekularbiologische Untersuchungen zur Osteoblastenproliferation und Differenzierung  
In: Hefte zur Zeitschrift „Der Unfallchirurg“ 282, Haas NP, Stürmer KM (Hrsg) Springer Verlag Berlin Heidelberg 569-570 (2000)
5. Schnabel M, Fichtel I, Hofmann Ch, Gotzen L, Schlegel J  
Der Einsatz der RNA-Arbitrarily-Primed-PCR (RAP-PCR) als nicht radioaktives molekularbiologisches Screeningverfahren zum Nachweis differentieller Veränderungen im Knochenstoffwechsel  
VII. Arbeitstagung der Chirurgischen Arbeitsgemeinschaft für Biomaterialien (CAB)  
05.12.1997, Hamburg
6. Fichtel I, Schnabel M, Schlegel J  
Molekularbiologische Untersuchungen zur Osteoblastenproliferation und Differenzierung  
64. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Unfallchirurgie e.V.  
10. - 13. September 2000, Hannover

### 8.3. Danksagung

Mein Dank gilt denjenigen, die mir direkt oder indirekt bei der Durchführung und Vollendung meiner Arbeit geholfen haben. Dies waren in erster Linie:

Herr Prof. Dr. med. L. Gotzen, dem ich für die Bereitstellung des Themas und seine Förderung danken möchte.

Herrn PD Dr. med. M. Schnabel sei Dank für die Leitung bei der Durchführung der Arbeit sowie seine Unterstützung.

Bei Herrn Prof. Dr. med. H.-D. Mennel möchte ich mich für die vielen Freiheiten, die ich in seiner Abteilung genoß, für die Möglichkeit, die experimentelle Arbeit in seiner Abteilung durchzuführen und für die sehr freundliche Art und Weise im Umgang miteinander bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. J. Schlegel, der mir mit seinem Enthusiasmus die Welt der Wissenschaft eröffnet, mich in seiner Arbeitsgruppe aufgenommen und gefördert hat und weiterhin meinen Werdegang mit großem Interesse unterstützt.

Frau Ginette Bortolussi, Dr. med. G. Stumm und Verena Dippel danke ich für die Einarbeitung in die Welt der molekularbiologischen Arbeitsweisen und für die Unterstützung bei der Durchführung der Experimente.

Herrn PD Dr. med. H. Alfke danke ich für die Hilfe bei der Durchführung der radiologischen Untersuchungen.

Ebenso gilt mein besonderer Dank Frau Barbara Budde für ihre konstruktive Kritik, ihre tatkräftige Unterstützung und für ihre unersetzbare Freundschaft.

Bedanken möchte ich mich bei Stephan und Ute Dornbusch, die bei allem, was mit Computertechnik zu tun hat, nicht wegzudenken sind und nie aufgegeben haben, mir diese Welt näherzubringen.

Herrn Andreas Budde danke ich für die Unterstützung bei der Literaturbeschaffung; Frau Beate Dornbusch danke ich, dass sie mich unentwegt anspornte. Beide sind ebenfalls unersetzbare Freunde.

Frau Dr. Julia Hofmann danke ich für die kritische Durchsicht der Arbeit und die vielen anregenden Diskussionen.

Letztendlich gilt mein Dank meinen Großeltern Erwin und Hildegard Cattepoel sowie meinen Eltern Helmut und Ursula Vogler, die immer für mich da waren und mich in allem vorbehaltlos unterstützt haben.