

Aus dem Centrum für Muskuloskeletale Chirurgie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

PDLLA-BMP-2-beschichtete Titan-Kirschner-Drähte stimulieren die  
Genexpression humaner Primärosteoblasten *in vitro*

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae dentariae (Dr. med. dent.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Nadine Gubatz

aus Cottbus / Deutschland

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. med. G. Schmidmaier  
2. Prof. Dr.med. U. Stöckle  
3. Prof. Dr. med. J.-M. Langrehr

**Datum der Promotion: 11.07.2008**

INHALTSVERZEICHNIS.....	I
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	IV
TABELLENVERZEICHNIS.....	V
DIAGRAMMVERZEICHNIS.....	VI
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	VIII

## GLIEDERUNG

1 EINLEITUNG.....	1
1.1 Der allgemeine Überblick.....	2
1.2 Der theoretische Hintergrund.....	3
1.2.1 Die Osteoblastogenese.....	3
1.2.2 Die Faktoren der Osteoblastogenese.....	4
1.2.2.1 Die Transkriptionsfaktoren.....	4
1.2.2.2 Die extrazellulären Matrixproteine.....	5
1.2.2.3 Die Proteasen und Heat-Shock-Proteine.....	8
1.2.2.4 Die Wachstums-, Differenzierungsfaktoren und Hormone.....	10
1.2.2.5 Die Rezeptoren.....	15
1.2.2.6 Die SMADs.....	17
1.2.2.7 Die regulierenden Moleküle auf der Zelloberfläche.....	18
1.3 Problemstellung und Zielsetzung.....	20
2 MATERIAL UND METHODEN.....	22
2.1 Material.....	22
2.1.1 Geräte, Software.....	22
2.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	23
2.1.3 Chemikalien.....	23
2.1.4 Kits und Mikroarray-Reagenzien.....	24
2.1.5 Lösungen, Medien, Puffer.....	25

2.2	Methoden.....	26
2.2.1	Die Isolierung und Kultivierung humaner Primärosteoblasten.....	26
2.2.2	Der Stimulationsversuch.....	26
2.2.3	Die RNA-Isolierung.....	27
2.2.4	Die Bestimmung der RNA-Konzentration.....	28
2.2.5	Die DNase I – Behandlung.....	28
2.2.6	Die Lyophilisation.....	28
2.2.7	Die Mikroarraytechnologie zur Analyse der Genexpressionen.....	28
2.2.7.1	Das Prinzip der Mikroarraytechnologie.....	29
2.2.7.2	Die Mikroarraymethode.....	30
a)	Die cDNA-Synthese mit Biotin-16-dUTP.....	30
b)	Die Hybridisierungen.....	32
c)	Die chemilumineszente Darstellung.....	33
2.2.8	Die Datenverarbeitung und die Auswertung der Mikroarrays.....	35
a)	Die Hintergrundkorrektur.....	35
b)	Die Normalisierung gegenüber Housekeepinggenen.....	36
c)	Die Auswertung der Ergebnisse.....	36
3	DIE MIKROARRAYERGEBNISSE.....	38
3.1	Das Genexpressionsmuster humaner Primärosteoblasten <i>in vitro</i> – Die Kontrollgruppe im Verlauf des 15-Tageversuches.....	38
3.1.1	Die Transkriptionsfaktoren.....	38
3.1.2	Die extrazellulären Matrixproteine.....	39
3.1.3	Die Proteasen und Heat-Shock-Proteine.....	41
3.1.4	Die Wachstumsfaktoren.....	42
3.1.5	Die Rezeptoren.....	44
3.1.6	Die SMADs.....	45
3.1.7	Die Zelladhäsionsmoleküle.....	46
3.2	Die Kontrollgruppe im Vergleich zum Tag 0.....	47
3.2.1	Der Versuchstag 5.....	48
3.2.2	Der Versuchstag 10.....	49
3.2.3	Der Versuchstag 15.....	50
3.3	Die Versuchsgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe.....	51
3.3.1	Der Versuchstag 5.....	52
3.3.2	Der Versuchstag 10.....	55
3.3.3	Der Versuchstag 15.....	60
3.4	Das Genexpressionsmuster humaner Primärosteoblasten <i>in vitro</i> - Die PDLLA- und PDLLA-BMP-2-Versuchsgruppen im Verlauf des 15-Tageversuches.....	65

3.4.1	Die Transkriptionsfaktoren.....	65
3.4.2	Die extrazellulären Matrixproteine.....	66
3.4.3	Die Proteasen und Heat-Shock-Proteine.....	67
3.4.4	Die Wachstumsfaktoren.....	68
3.4.5	Die SMADs.....	69
3.4.6	Die Rezeptoren und Zelladhäsionsmoleküle.....	70
3.5	Die Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Mikroarraytechnologie - Am Beispiel der PDLLA-BMP-2-Gruppe des 10. Versuchstages .....	71
4	DISKUSSION.....	72
4.1	Die Diskussion der Mikroarrayergebnisse.....	76
4.1.1	Die Charakterisierung der Primärosteoblasten: Die Osteoblastenmarker.....	76
4.1.2	Der Transkriptionsfaktor MSX1.....	78
4.1.3	Die Kollagene.....	79
4.1.4	Die nichtkollagenen extrazellulären Matrixproteine.....	80
4.1.5	Die Proteasen.....	81
4.1.6	Das VEGF- / VEGF-Rezeptor-System.....	82
4.1.7	Die Wachstumsfaktoren TGF- $\beta$ 3 und FGFs.....	84
4.1.8	Der Rezeptor ALK-5 (TGF $\beta$ R-1).....	85
4.1.9	Die SMADs.....	86
4.1.10	Die Zelladhäsionsmoleküle.....	88
4.2	Die Diskussion der Methodik.....	89
4.2.1	Die Etablierung der Mikroarraytechnologie zur Analyse von Genexpressionen humaner Primärosteoblasten.....	89
4.3	Der Ausblick.....	92
4.4	Die Zusammenfassung.....	95
5	LITERATURVERZEICHNIS.....	97
	LEBENS LAUF.....	X
	DANKSAGUNG.....	XI
	EIDESSTÄTTLICHE ERKLÄRUNG.....	XII

**ABBILDUNGSVERZEICHNIS****Kapitel 1:**

Abbildung 1.1: Die Regulation der Knochenmasse.....	2
Abbildung 1.2: Von der Stammzelle zu den verschiedenen Zelltypen.....	3
Abbildung 1.3: Die Mitglieder der TGF $\beta$ -Superfamilie .....	10
Abbildung 1.4: Die BMPs und die Induktion der Osteoblastendifferenzierung.....	12
Abbildung 1.5: Die Wirkungen der verschiedenen FGFs während der Osteogenese.....	15
Abbildung 1.6: Die SMADs.....	18

**Kapitel 2:**

Abbildung 2.1: Der Versuchsaufbau.....	27
Abbildung 2.2: Das Prinzip des Mikroarrayverfahrens.....	29
Abbildung 2.3: Ein Röntgenbild einer Mikroarray-Nylonträgermembran.....	35
Abbildung 2.4: Die Auswertung eines Mikroarrays.....	35

**Kapitel 4:**

Abbildung 4.1: Die Zusammenfassung der erhöhten mRNA-Expressionen von den Versuchsgruppen....	75
---	----

**TABELLENVERZEICHNIS****Kapitel 2:**

Tabelle 2.1: Die Versuchsgruppen.....	27
Tabelle 2.2: Die Zusammensetzung des Annealing-Mixes.....	30
Tabelle 2.3: Die Zusammensetzung des RT-Cocktails.....	30
Tabelle 2.4: Die Zusammensetzung des LPR-Cocktails.....	31
Tabelle 2.5: Die Zeichenerläuterungen für die Darstellung der Mikroarrayergebnisse.....	37

**Kapitel 3:**

Tabelle 3.1: Die Kontrollgruppe im Vergleich zum Tag 0.....	47
Tabelle 3.2: Die Versuchsgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe des jeweiligen Versuchstages.....	51
Tabelle 3.3: Die PDLLA-Gruppe Tag 5	
- Die Gegenüberstellung der mRNA-Expressionen mit einer Ratio $\geq 2,0$ im Vergleich zur Kontrollgruppe.....	52
Tabelle 3.4: Die PDLLA-BMP-2-Gruppe Tag 5	
- Die Gegenüberstellung der mRNA-Expressionen mit einer Ratio $\geq 2,0$ im Vergleich zur Kontrollgruppe.....	53
Tabelle 3.5: Die Titan-Gruppe Tag 10	
- Die Gegenüberstellung der mRNA-Expressionen mit einer Ratio $\geq 2,0$ im Vergleich zur Kontrollgruppe.....	55
Tabelle 3.6: Die PDLLA-Gruppe Tag 10	
- Die Gegenüberstellung der mRNA-Expressionen mit einer Ratio $\geq 2,0$ im Vergleich zur Kontrollgruppe.....	56
Tabelle 3.7: Die PDLLA-BMP-2-Gruppe Tag 10	
- Die Gegenüberstellung der mRNA-Expressionen mit einer Ratio $\geq 2,0$ im Vergleich zur Kontrollgruppe.....	58
Tabelle 3.8: Die Titan-Gruppe Tag 15	
- Die Gegenüberstellung der mRNA-Expressionen mit einer Ratio $\geq 2,0$ im Vergleich zur Kontrollgruppe.....	60
Tabelle 3.9: Die PDLLA-Gruppe Tag 15	
- Die Gegenüberstellung der mRNA-Expressionen mit einer Ratio $\geq 2,0$ im Vergleich zur Kontrollgruppe.....	61
Tabelle 3.10: Die PDLLA-BMP-2-Gruppe Tag 15	
- Die Gegenüberstellung der mRNA-Expressionen mit einer Ratio $\geq 2,0$ im Vergleich zur Kontrollgruppe.....	63

**DIAGRAMMVERZEICHNIS****Kapitel 3:**

Diagramm III.1 Grafische Darstellung der Genfamilie der Transkriptionsfaktoren der Kontrollgruppe über den Versuchsverlauf .....	38
Diagramm III.2 Grafische Darstellung der Genfamilie der ECM-Proteine der Kontrollgruppe über den Versuchsverlauf .....	39
Diagramm III.3 Grafische Darstellung der Genfamilie der Kollagene, Typen 1A1, 2A1, 4A3, 4A4, 4A5, 7A1, 9A2, 10A1, 12A1, 15A1, 16A1, 17A1, 18A1, 19A1, der Kontrollgruppe über den Versuchsverlauf .....	40
Diagramm III.4 Grafische Darstellung der Genfamilie der Kollagene, Typen 3A1, 5A1, 11A1, 14A1, der Kontrollgruppe über den Versuchsverlauf .....	40
Diagramm III.5 Grafische Darstellung der Genfamilie der Proteasen der Kontrollgruppe über den Versuchsverlauf .....	41
Diagramm III.6 Grafische Darstellung der Genfamilie der Heat-Shock-Proteine der Kontrollgruppe über den Versuchsverlauf .....	41
Diagramm III.7 Grafische Darstellung der Genfamilie der Wachstumsfaktoren BMPs der Kontrollgruppe über den Versuchsverlauf.....	42
Diagramm III.8 Grafische Darstellung der Genfamilie der Wachstumsfaktoren IGFs, TGFs, VEGFs der Kontrollgruppe über den Versuchsverlauf .....	42
Diagramm III.9 Grafische Darstellung der Genfamilie der Wachstumsfaktoren CFSSs, FGFs, EGF, TNF $\alpha$ , PDGFG $\alpha$ der Kontrollgruppe über den Versuchsverlauf .....	43
Diagramm III.10 Grafische Darstellung der Genfamilie der Rezeptoren der Kontrollgruppe über den Versuchsverlauf .....	44
Diagramm III.11 Grafische Darstellung der Genfamilie der SMADs der Kontrollgruppe über den Versuchsverlauf .....	45
Diagramm III.12 Grafische Darstellung der Genfamilie der Zelladhäsionsmoleküle der Kontrollgruppe über den Versuchsverlauf .....	46
Diagramm III.13 PDLLA-Gruppe Versuchstag 10: Grafische Darstellung der erhöhten mRNA-Expressionen.....	57
Diagramm III.14 PDLLA-BMP-2-Gruppe Versuchstag 10: Grafische Darstellung der erhöhten mRNA-Expressionen.....	59
Diagramm III.15 PDLLA-Gruppe Versuchstag 15: Grafische Darstellung der erhöhten mRNA-Expressionen.....	62
Diagramm III.16 PDLLA-BMP-2-Gruppe Versuchstag 15: Grafische Darstellung der erhöhten mRNA-Expressionen.....	64
Diagramm III.17 PDLLA-Gruppe: Grafische Darstellung der erhöhten mRNA-Expressionen der Transkriptionsfaktoren.....	65
Diagramm III.18 PDLLA-BMP-2-Gruppe: Grafische Darstellung der erhöhten mRNA-Expressionen der Transkriptionsfaktoren.....	65

Diagramm III.19 PDLLA-Gruppe: Grafische Darstellung der erhöhten mRNA-Expressionen der ECM-Proteine.....	66
Diagramm III.20 PDLLA-BMP-2-Gruppe: Grafische Darstellung der erhöhten mRNA-Expressionen der ECM-Proteine.....	66
Diagramm III.21 PDLLA-Gruppe: Grafische Darstellung der erhöhten mRNA-Expressionen der Proteasen und Heat-Shock-Proteine.....	67
Diagramm III.22 PDLLA-BMP-2-Gruppe: Grafische Darstellung der erhöhten mRNA-Expressionen der Proteasen und Heat-Shock-Proteine.....	67
Diagramm III.23 PDLLA-Gruppe: Grafische Darstellung der erhöhten mRNA-Expressionen der Wachstumsfaktoren.....	68
Diagramm III.24 PDLLA-BMP-2-Gruppe: Grafische Darstellung der erhöhten mRNA-Expressionen der Wachstumsfaktoren.....	68
Diagramm III.25 PDLLA-Gruppe: Grafische Darstellung der erhöhten mRNA-Expressionen der SMADs.....	69
Diagramm III.26 PDLLA-BMP-2-Gruppe: Grafische Darstellung der erhöhten mRNA-Expressionen der SMADs.....	69
Diagramm III.27 PDLLA-Gruppe: Grafische Darstellung der erhöhten mRNA-Expressionen der Rezeptoren und Zelladhäsionsmoleküle.....	70
Diagramm III.28 PDLLA-BMP-2-Gruppe: Grafische Darstellung der erhöhten mRNA-Expressionen der Rezeptoren und Zelladhäsionsmoleküle.....	70

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

ActR	Activin Receptor
ALK	Activin receptor-like Kinase
ALP	Alkalische Phosphatase
ANXA5	Annexin V
ARSE	Arylsulfatase E
BGLAP	Bone gamma-carboxylglutamate (gla) Protein; Osteocalcin
BGN	Biglycan; human hPGI mRNA encoding bone small proteoglycan 1
BMPs	Bone Morphogenic Proteins
BMP-2	Bone Morphogenic Protein – 2
BMPR	Bone Morphogenic Protein Receptor
BMSCs	Bone marrow stromal cells
BSP	Bone Sialoproteinen
CASR	Calcium-sensing Receptor
Cbfa1	Core binding factor alpha 1; AML3; Runx2; Osf2
CBP	SERPINH; Serin-Proteinaseinhibitoren; HSP
CDMPs	Cartilage-derived Morphogenic Proteins
COLL	Kollagen
CSFs	Colony Stimulating Factors
CTSK	Cathepsin K
DCN	Decorin
DCP	human homozygous deletion target in pancreatic carcinoma; SMAD4
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxide
DOPC	Determined Osteoprogenitor Cells
DPP	Drosophila decapentaplegic
ECM	extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
FACITs	Fibril-Associated Collagens with Interrupted Tripel helices
FAT	Fatty Acid Translocase
FBS	Fötales Kälberserum
FGFs	Fibroblast Growth Factors
FGFRs	Fibroblast Growth Factor Receptors
FLT-1	homo sapiens Vascular Endothelial Growth Factor Receptor mRNA, Fms-related Tyrosine Kinase
FN	Fibronectin
GALP	Keimzellen-ALP
GAPDH	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase
G-CSF	Granulocyte-Colony Stimulating Factor
GDF	Growth and Differentiation Factor
GITC	Guanidin-Isothiocyanate
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage-Colony Stimulating Factor
hBMSCs	human Bone marrow stromal cells
HKG	Housekeepinggen
Hox	Homeobox
HSP	Heat shock Protein; CBP; SERPINH
ICAM	Intercelluläre Adhesionmolecul 1; CD54
IGFs	Insulin-like Growth Factors

IGF-1R	Insulin-like Growth Factor 1 Receptor
IL	Interleukin
IntALP	intestinale ALP
IOPC	Inducible Osteoprogenitor Cells
I-SMADs	Inhibitory SMADs
ITG	Integrin
LPR	lineare Polymerasereaktion
LRP/Wnt	Low-density lipoprotein (LDL)-receptor-related protein
M-CSF	Macrophage-Colony Stimulating Factor
MDSC	Marrow-Driven Stromalcells
MMPs	Matrixmetalloendoproteinases
MSX	Msh homeo box homolog
NF- $\kappa$ B	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1 (p105)
OC; OCN	Osteocalcin
OD	Optische Dichte
OPs	Osteogenic Proteins
OPN	Osteopontin
Osf2	Osteoblast-specific cis-acting element 2; Runx2; AML3; Osf2; Cbfa1
PALP	placentale ALP
PBS	Phosphat Buffered Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF $\alpha$	Platelet-derived Growth Factor alpha polypeptide
PDLLA	Poly (D,L-Laktid)
PIGF	Placenta Growth Factor-1
PMNs	polymorphkernige neutrophile Granulozyten
PTH	Parathyroid Hormon
RANKL	Receptor Activator of Nuclear Factor $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) Ligand
Rh-BMPs	Recombinant humane Bone Morphogenic Proteins
R-SMADs	Receptor-regulated SMADs
RT-PCR	Real-Time Reverse Transcriptions PCR
RUNX2	Runt-related Transcription Factor 2; AML3; Cbfa1; Osf2
SERMs	Selective Oestrogen-Receptor Modulator
SERPINH	Serin- (or Cystein) Proteinaseinhibitoren; clade H (HSP); CBP
SLRP	Small Leucine Rich Repeat Family
SMAD	homo sapiens MAD (mother against decapentaplegic) Drosophila homolog
SOST	Sclerostin
SOX 9	SRY (sex-determining region Y)-related HMG box gene 9
SPARC	Osteonectin (Homo sapiens secreted protein, acidic, cysteine-rich
SPP1	Secreted Phosphoprotein 1, Osteopontin, Bone Sialoprotein 1, early T-Lymphocyte activation 1
TEP	Totalendoprothese
TGF $\beta$ s	Transforming Growth Factor beta
TGF $\beta$ R	Transforming growth Factor beta Receptor
TIMPs	Tissue Inhibitors of Metalloproteinases
TNF $\alpha$	Tumor Necrosis Factor alpha
TNSALP	nichtgewebespezifische oder Niere- / Knochen- / Leber-ALP
TWIST	Basic helix-loop-helix Transcriptionfactor
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule
VDR	Vitamin D Hormon-Receptor
VEGFs	Vascular Endothelial Growth Factors

## 1 EINLEITUNG

Bei komplexen Vorgängen der Reparation und Regeneration von Geweben im Bereich der Wirbelsäulenchirurgie, der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie sowie der Versorgung von Frakturen spielen Wachstumsfaktoren eine wichtige Rolle. Vom klinischen Einsatz der Bone Morphogenic Proteine (BMPs) werden sich eine schnellere Heilung, Stabilität und Belastbarkeit des defekten Knochens erhofft. Rekombinante humane BMPs (Rh-BMPs) wurden in experimentellen Modellversuchen und seit einigen Jahren in der Klinik eingesetzt, um die Wundheilung und den Regenerationsprozess in humanem Knochen und parodontalem Gewebe zu fördern (Cheng et al., 2003; Cochran et al., 2000; Nakashima und Reddi, 2003; Park et al., 2003; Reddi et al., 2001). Die kollagenen Trägersubstanzen für z.B. BMP-2 sind tierischer Herkunft, besitzen keine Eigenstabilität in der Wunde und werden schnell und vollständig resorbiert. Trotz sehr guter klinischer Ergebnisse sind auch lokale Nebenwirkungen wie ungenügendes oder überschießendes Knochenwachstum und Knorpelresorptionen beschrieben worden (Poynton und Lane, 2002).

Schmidmaier et al. (2001b) etablierten ein neues kaltes Beschichtungsverfahren von Implantaten mit Poly (D,L-Laktid) (PDLLA). Verschiedene Studien zeigten, dass die PDLLA-Beschichtung allein mit eingearbeiteten Wachstumsfaktor einen stimulierenden Effekt auf die Frakturheilungsvorgänge *in vivo* aufweist, wobei keine unerwünschten systemischen Wirkungen beobachtet wurden (Schmidmaier et al., 2001a; 2001b; 2002a; Raschke et al., 2002; Wildemann et al., 2005; Partale et al., 2005). Die biologische Aktivität von Bone Morphogenic Protein-2 (BMP-2) besitzt einen potentiellen Wert bei der Behandlung von verschiedenen orthopädischen und craniofacialen Erkrankungen, einschließlich der Frakturheilung. Die lokale Applikation von BMP-2 über ein Implantat mit PDLLA als Trägermaterial wäre auch beim Menschen von Vorteil, da hierbei das Implantat gleichzeitig zur Stabilisierung und als Träger zur lokalen und kontrollierten Applikation von Wachstumsfaktoren dient.

Um lokale Nebenwirkungen wie ungenügendes oder überschießendes Knochenwachstum und Knochenresorption zu verhindern, müssen die molekularen Mechanismen der PDLLA-BMP-2-Beschichtung auf die umliegenden Zellen bekannt sein. Anhand der vorliegenden *in vivo* Versuche ist jedoch keine Aussage über die Wirkung von PDLLA-BMP-2 auf einen bestimmten Zelltyp möglich. Die Eigenschaften der bioaktiven Beschichtung wurden bereits in Vorversuchen zu dieser Studie untersucht (Schmidmaier et al., 2003).

## 1.1 DER ALLGEMEINE ÜBERBLICK

Das skeletale System wird von Knochen- und Knorpelgewebe bestimmt. Dazu gehören verschiedene spezifische Zellen: Chondrozyten im Knorpelgewebe und Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten im Knochengewebe. Der Knochen ist ein sehr stoffwechselaktives Gewebe. Es finden ständig Umbauprozesse statt. Zum Knochenmetabolismus werden die Knochenbildung, die Knochenresorption sowie die Kopplung dieser beiden Vorgänge gezählt. Die Resorption verläuft dabei schneller als die Knochenneubildung (Aarden et al., 1994; Canalis et al., 1989; Hagel-Bradway und Dziak, 1989). Der Umbau und die Knochenentwicklung sind von der gegenseitigen Beeinflussung von Vorläuferzellen des Knochens, Knochenzellen, Molekülen der extrazellulären Matrix, Wachstumsfaktoren, dem Immunsystem, humoralen Faktoren und mechanischen Kräfteinwirkungen abhängig, s. Abbildung 1.1 (Harada und Rodan, 2003; Pavalko et al., 2003).

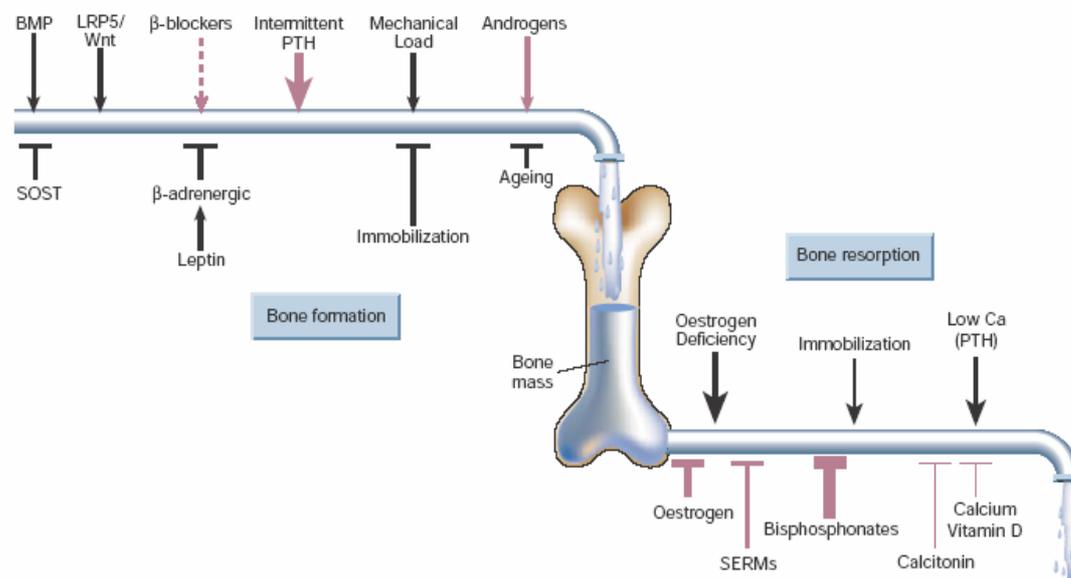


Abb.1.1: Die Regulation der Knochenmasse

[Abbildung übernommen von Harada, S.; Rodan, G.A. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature*, 2003, 423: 349-355.]

Knochengewebe besteht hauptsächlich aus Hydroxylapatitkristallen und verschiedenen extrazellulären Matrixproteinen (Young et al., 1992; Robey et al., 1993). Für die Synthese der organischen Bestandteile des Knochengewebes und die Regulation der Knochenresorption sind die Osteoblasten zuständig (Aarden et al., 1994; Hagel-Bradway und Dziak, 1989). Die Resorption des Knochengewebes erfolgt durch Osteoklasten (Hagel-Bradway und Dziak, 1989). Um das Knochenvolumen und die Calciumhomöostase zu sichern, ist eine Balance der Osteoblasten- und Osteoklastenfunktion von entscheidender Bedeutung. Osteoklasten leiten sich von pluripotenten, hämatopoetischen Stammzellen ab (Scheven et al., 1986). Die Vorläuferzellen der Osteoklasten werden in der Milz oder im Knochenmark gebildet. Dabei kontrollieren Osteoblasten und BMSCs (bone marrow stromal cells) die Osteoklastendifferenzierung (Takahashi et al., 1988; Katagiri und Takahashi, 2002).

## 1.2 DER THEORETISCHE HINTERGRUND

### 1.2.1 Die Osteoblastogenese

Pluripotente mesenchymale Stammzellen sind die Vorläuferzellen für osteoblastäre, adipöse, myoblastäre und chondrogene Zelldifferenzierungen (Ducy et al., 2000c; Aubin und Triffitt, 2002). Die Stammzellen durchlaufen sukzessive verschiedene Differenzierungsstadien mit abnehmendem Proliferationspotential und abnehmender Pluripotenz (Aubin, 1998). Die Grundlage von Zelldifferenzierungen ist die mitotische Zellteilung. Das Vorhandensein von Substraten, Wachstumsfaktoren und anderen Faktoren ermöglicht in der Interphase zwischen zwei Mitosen das zelluläre Wachstum und die Verdopplung des genetischen Materials. Unter dem Einfluss von Wachstumsfaktoren entwickeln sich undifferenzierte mesenchymale Vorläuferzellen zu „Inducible Osteoprogenitor Cells“ (IOPC) und später zu „Determined Osteoprogenitor Cells“ (DOPC), den Prä-Osteoblasten (Millett et al., 1995), s. Abb. 1.2. Die IOPCs und DOPCs befinden sich im Knochengewebe und dienen der intraskelletalen Knochenneubildung. Komponenten für die Knochenbildung werden deponiert und später mineralisiert (Owen et al., 1990). Unter systemischen und lokalen Einflussfaktoren entwickeln sich die DOPCs dann zu Osteoblasten (intramembranöse Ossifikation). Die Transkription neuer Gene wird aktiviert, die von anderen gehemmt. Die Zellen verändern zunehmend ihre Funktion und ihren Phänotyp. Neben der intramembranösen Ossifikation ist die endochondrale Ossifikation von Bedeutung. Hierbei differenzieren mesenchymale Zellen zunächst zu Chondrozyten. Diese reifen dann zu hypertrophen Chondrozyten heran und entwickeln sich zu Osteoblasten (Chung et al., 1998).

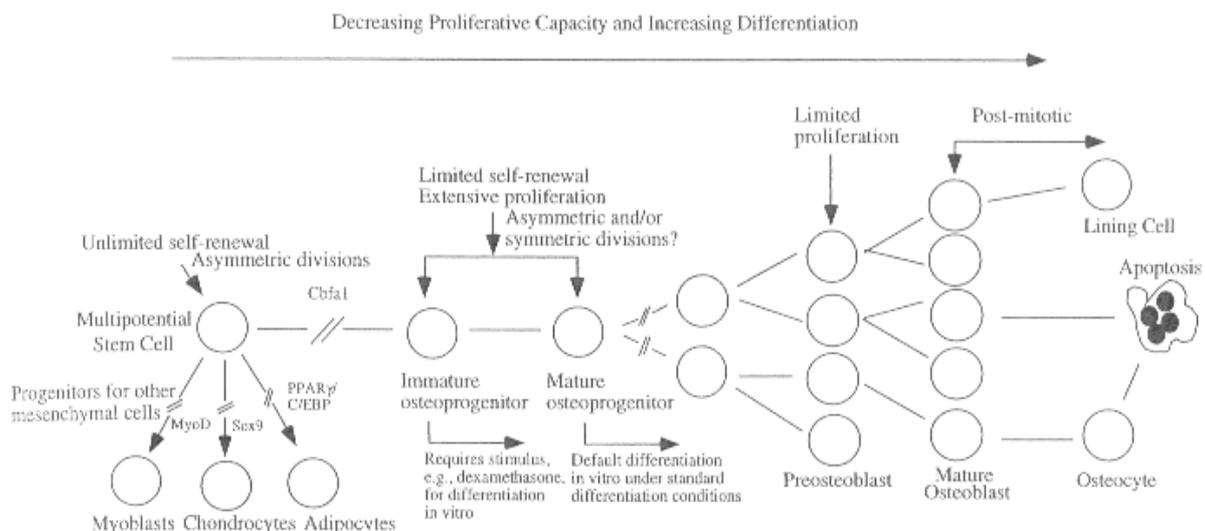


Abb. 1.2: Von der Stammzelle zu den verschiedenen Zelltypen

[Abbildung entnommen aus: Aubin, J.E.; Triffitt, J.T. *Mesenchymal Stem Cells and Osteoblast Differentiation*. In: Bilezikian, J.P.; Raisz, L.G.; Rodan, G.A. Eds. *Principles of Bone Biology, Volume 1, Inc. San Diego, Ca: Academic Press 2002: 63.*]

## 1.2.2 Die Faktoren der Osteoblastogenese

Die Osteoblastogenese ist ein streng kontrollierter Entwicklungsprozess, bei welchem zahlreiche extrinsische Faktoren, wie Hormone und Wachstumsfaktoren, osteoblastenspezifische Signalproteine und Transkriptionsfaktoren benötigt werden (Yamaguchi et al., 2000; Ducky, 2000a). Die Genese einer mesenchymalen Zelle zu einem Osteoblasten und weiter zu einem reifen Osteozyten wird durch eine Vielzahl von Proteinen reguliert. Anhand des DNA-Expressionsmusters einer Zelle kann sie charakterisiert und weitere Rückschlüsse über den Phänotyp und die Funktionen getroffen werden. Im Folgenden soll auf eine Auswahl osteoblastenspezifischer Gene näher eingegangen werden, welche für die Analyse der Osteoblastenfunktion eine Relevanz zeigen.

### 1.2.2.1 Die Transkriptionsfaktoren

Transkriptionsfaktoren sind DNA-Bindungsproteine und beeinflussen die Transkriptionseffizienz der zellulären RNA-Polymerase. Die Bindung eines Transkriptionsfaktors an die Regulatorregion eines Gens kann entweder zu einer Aktivierung oder zu einer Repression der Transkription des entsprechenden Zielgenes führen. Nur auf eine koordinierte Aktivität der Transkriptionsfaktoren folgen die Expressionen verschiedener Gene, die charakteristisch für die Osteoblastendifferenzierung und -funktion sind.

Bei der Entwicklung zum Osteoblasten nimmt der Transkriptionsfaktor CBF $\alpha$  1 (Core binding factor, alpha subunit 1) eine Schlüsselfunktion ein (Ducky et al., 1997). Die Induktion des Transkriptionsfaktors CBF $\alpha$ 1 kennzeichnet die Osteoblastenlinie (Komori et al., 1997; Otto et al., 1997). Er reguliert die Expression von vielen Genen im Osteoblasten (Ducky et al., 1997; 1999; Korchynskyi et al., 2003; Kim et al., 2004), aber auch von osteoblasten-spezifischen Genen in Fibroblasten und Myoblasten (Ducky et al., 1997). Außerdem wird CBF $\alpha$ 1 von Odontoblasten und hypertrophen Chondrozyten expremiert (Kim et al., 1999). Die temporären und lokalen Feinregulationen der CBF $\alpha$ 1-Aktivität werden von zahlreichen Cofaktoren beeinflusst (Lee et al., 1999a; Kundu et al., 2002; Yoshida et al., 2002). CBF $\alpha$ 1 ist auch als RUNX2 (Runt-related transcription factor 2), OSF2 (osteoblast-specific cis-acting element 2), AML3 oder pebp2 $\alpha$ A bekannt.

Für die Entwicklung der Säuger sind zusätzlich die Homeoproteine MSX1 (Msh homeo box homolog 1; Hox7; Homeobox 7) und MSX2 (Msh homeo box homolog 2; Hox8.1; Homeobox 8.1) verantwortlich (Satokata und Maas, 1994; Satokata et al., 2000; Hoffmann et al., 1994; Towler et al., 1994) als auch der Basic helix-loop-helix Transkriptionsfaktor (TWIST) von Bedeutung (Lee et al., 1999; Yousfi et al., 2001). Interaktionen zum Transkriptionsfaktor CBF $\alpha$ 1, zur Osteocalcin- und Alkalischen Phosphatase-Transkription wurden für diese Faktoren nachgewiesen (Jabs et al., 1993; Hoffmann et al., 1994; Towler et al., 1994; Satokata et al., 2000; Ducky et al., 2000c; Yousfi et al., 2002; Kim et al., 2004). Ein weiterer wichtiger Transkriptionsfaktor während der Skelettogenese und enchondralen Ossifikation ist SOX9 (SRY (sex-determining region Y)-related HMG box gene 9) (Akiyama et al., 2002). SOX9 ist für die

Chondrozytendifferenzierung und die Expression verschiedener chondrogener Gene verantwortlich (De Crombrughe et al., 2000).

Der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B (nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1, p105) wird in vielen verschiedenen Zelltypen nachgewiesen. Er reguliert die Expression einer Vielzahl von Genen, die bei der Immunabwehr, bei Entzündungen und apoptotischen Prozessen beteiligt sind. Insgesamt 5 NF- $\kappa$ B-Proteine sind bei Säugetieren bekannt. Zahlreiche Stimuli können für die Expression von NF- $\kappa$ B verantwortlich sein und ebenso zahlreich sind die Wirkungen von NF- $\kappa$ B auf die Sekretion und Expression einer Reihe von Effektormolekülen. Die NF- $\kappa$ B1-Expression von den Osteoblasten ist unmittelbar mit einer Hemmung der Knochenbildung assoziiert (Matsumoto et al., 1998; Itoh et al., 2000).

### 1.2.2.2 Die extrazellulären Matrixproteine

Die extrazelluläre Matrix (ECM) macht etwa 90% des Gesamtgewichtes von kompaktem Knochen aus. Zu den Hauptbestandteilen des mineralisierten Knochens gehören die organische Matrix, zu etwa einem Drittel, und anorganische Salze. Die organischen Substanzen bestehen wiederum zu 90% aus Kollagenen und zu 10% aus nichtkollagenen Proteinen. Die Kollagenfibrillen werden miteinander und mit Komponenten der extrazellulären Matrix verknüpft, was die Stabilität und die strukturelle Integrität des Knochens aufrechterhält.

#### Die Kollagene

Die Kollagenfamilie besteht aus 27 Kollagentypen (Bornstein und Sage 1980; Cheah, 1985; Vuorio, 1986). Die Kollagentypen I, II und III sind die drei Hauptmitglieder der Kollagenfamilie. Einige der Kollagene (Typen I, II, III, V und XI) sind zu Fibrillen arrangiert. Seine Zug- und Biegefestigkeit erlangt der Knochen durch Kollagen Typ I, den belastungsgerechten Verlauf seiner Fibrillen, den Fasern und deren Assoziation mit Proteoglykanen als „Kittsubstanz“.

Kollagen Typ I ist ein  $[\alpha_1(I)]_2\alpha_2(I)$  Heterotrimer und das meist vorkommende Kollagen in nahezu allen Geweben, hauptsächlich im Knochengewebe, aber auch der Haut, Sehnen, Ligamenten, Skleren, Cornae, Blutgefäßen, mit Ausnahme des Knorpels. Die Synthese von Kollagen Typ I gilt als Osteoblastenmarker und ist kennzeichnend für das Knochengewebe (Aubin und Triffitt, 2002). Kollagen Typ II steht für die Charakterisierung des Knorpelgewebes. Chondroblasten und Chondrozyten exprimieren Kollagen Typ II (Devlin et al., 1988). Kollagen Typ III wird oft auch „fetales Kollagen“ genannt, was auf seine Präsenz im fetalen Gewebe zurückzuführen ist (Epstein, 1972; Sykes et al., 1976) und es ist Hauptbestandteil der fibrösen Matrix der Periostoberfläche, aber auch der Haut und der Gefäße. Es ist weiterhin bekannt, dass sowohl bei der Kallusbildung, der Heilung von Haut und Sehnen als auch der Entwicklung der Röhrenknochen die von den mesenchymalen Zellen sezernierte fibröse

Matrix hauptsächlich von Kollagen Typ III und Kollagen Typ I bestimmt wird (Keene et al., 1987; Silver et al., 1981; Von der Mark und Von der Mark, 1977).

Kollagen Typ V wird im Knochen, im Bindegewebe und in den Gefäßwänden nachgewiesen und ist neben den Kollagentypen I, II, III für die Frakturheilung spezifisch. Die Kollagenfibrillen vom Typ I und III formen ein Gerüst und sind zusammen mit Kollagen Typ V für das Zellattachement, die Zellmigration und die Gefäßeinsprossung verantwortlich. Sowohl bei sich entwickelnden Röhrenknochen des Säugetiers als auch bei der Frakturheilung wurden ähnliche Vorgänge gezeigt: Zunächst sind Kollagen I, III und V im Mesenchym anzutreffen, die später ggf. von Kollagen II und dann von Kollagen IX, charakteristisch für hypertrophe Chondrozyten, ersetzt werden können. Es folgt die Mineralisierung und die Resorption des Knorpels mit dem Ersatz durch Knochen und der Kollagen Typ I Synthese (Schmid und Linsenmayer, 1985; Silver et al., 1981; Von der Mark et al., 1976; 1977).

Die Kollagentypen IX, XII, XIV werden auch FACITs (fibril-associated collagens with interrupted triple helices) genannt. Sie verbinden die Fibrillen mit anderen Matrixelementen (Gordon und Olsen, 1990).

Kollagen Typ IV ist der Hauptbestandteil der Basalmembrankollagene und bekannt in den endothelialen Zellen der Blutgefäße. Alle anderen Kollagene sind nur in geringer Menge nachweisbar und spielen eine Rolle als Verbindungselemente zwischen den Gewebekomponenten (Van der Rest und Garrone, 1991).

#### Die nichtkollagen Proteine

Lamellärer Knochen enthält mehr an nichtkollagenen Proteinen als Geflechtknochen (Conn und Termine, 1985). Zu den nichtkollagenen Proteinen gehören Osteonectin, Osteopontin, Bone Sialoproteine, kleine Mengen an Proteoglykanen (Biglycan, Decorin, Osteomodulin, Fibromodulin, Lumican, Osteoglycin, Chondroitin Sulfat Proteoglycan 2), die Matrix Gla Proteine (Osteocalcin) und Bone Acid Glycoproteine. Regulatorische Bedeutung bei der Osteogenese besitzen besonders Osteocalcin, Osteonectin, die Bone Sialoproteine und Osteopontin.

Osteocalcin (OCN; Bone gamma-carboxylglutamate (gla) Protein; BGLAP) wird von Osteoblasten und Osteozyten synthetisiert und gilt in der späten Phase der Osteoblastenreifung und der Mineralisation als Marker dieser (Owen et al., 1990; Ducy et al., 2000c). Osteocalcin ist das am meisten exprimierte nichtkollagene Protein der Knochenmatrix. Es besteht eine enorme Komplexität von vielen Klassen von Transkriptionsfaktoren, die mit dem Osteocalcinpromotor interagieren (Banerjee et al., 1997; Towler et al., 1994; Hoffmann et al., 1994; Franceschi, 1999). Zudem stimuliert  $1\alpha,25$ -Dihydroxy-Cholecalciferol über seinen spezifischen Rezeptor (VDR) die Expression von OCN (Paredes et al., 2004).

Osteonectin (Homo sapiens secreted protein, acidic, cysteine-rich; SPARC) ist ein phosphoryliertes calcium-bindendes Glycoprotein. Osteonectin verantwortet die Erhaltung der Knochenmasse und den geregelten Remodellingprozess. Es bindet an Kollagen und Hydroxylapatit und induziert *in vitro* die

Bildung von Kristallisationskeimen und die Mineralisation von Kollagen zusammen mit Osteocalcin (Roach, 1994). Es kann Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen blocken sowie die Zellmigration und Chemotaxis verhindern (Sodek et al., 2002).

Bone Sialoproteine (BSPs) werden bevorzugt im Osteoid unmittelbar am kalzifizierten Knorpel nachgewiesen und dienen als „Nukleator“ für die Hydroxylapatitbildung (Hunter und Goldberg, 1993). BSPs stimulieren die Differenzierung von Präosteoblasten zu „kalzifizierenden“ Osteoblasten (Zhou et al., 1995) und gehören somit zu den Expressionen, die in der frühen Differenzierungsphase stattfinden (Bianco et al., 1993). Osteopontin (OPN; SPP1; secreted phosphoprotein 1, bone sialoprotein 1, early T-Lymphocyte activation 1) ist ein phosphoryliertes Zellbindungsprotein und wird den Bone Sialoproteinen zugeordnet. Es existieren verschiedene Varianten von Osteopontin, 72kDa bis 42kDa. OPN wird vor allem von Osteoblasten, aber auch von Osteocysten, Osteoklasten und Bone-lining Zellen synthetisiert (Wang et al., 2005; Chen et al., 1993a; 1994). Die OPN-Expression ist eine der frühesten und spätesten sekretorischen Aktivitäten der Osteoblastenlinie (McKee und Nanci, 1996). Es ist für die Wundheilung, das Attachment von Osteoblasten und Osteoklasten in der ECM und die Knochenbildung verantwortlich (Boskey et al., 1993; 1995; Reinholt et al., 1990; Roach, 1994; McKee und Nanci, 1996).

#### Die Proteoglykane

Biglycan (BGN; human hPGI mRNA encoding bone small proteoglycan 1) und Decorin (DCN) sind Proteoglykane der small leucine rich repeat Family (SLRP). Ihre Primärstruktur ähnelt einander und die Promotorregionen zeigen eine gewisse Homologie (Ungefroren und Krull, 1996). BGN und DCN regulieren die Gewebeorganisation, die Zellmatrixinteraktionen und spielen somit eine wichtige Rolle in der Wachstumskontrolle (Makogonenko et al., 2002; Wiberg et al., 2002). Sie beeinflussen die Kollagen-Fibrillogenese: Biglycan ist bekannt für seine Interaktion mit Kollagen Typ I (Schönherr et al. 1994), Decorin interagiert vor allem mit Fibronectin, aber auch mit Kollagen Typ I, II und VI (Schmidt et al., 1991; Schönherr et al. 1994, 1995; Vogel et al., 1984).

#### Das Fibronectin

Fibronectin (FN-1) zählt zu den adhäsiven Glycoproteinen, vermittelt die Chemotaxis und die Anhaftung der Zellen in der Matrix. FN ist ebenso für das initiale Attachment der osteoblastären Zellen in der Zellkultur verantwortlich (Winnard et al., 1995; Yang et al., 2002). Es reguliert die Differenzierung und die Funktion der Osteoblasten und spielt eine bedeutende Rolle in der Wundheilung (Makogonenko et al., 2002; Winnard et al., 1995; Yang et al., 2002). FN ist nicht nur Bestandteil der ECM und der Basalmembran, sondern zirkuliert auch im Blutplasma.

### Das Annexin V

Annexin V (ANXA5) wurde ursprünglich als kollagenbindendes Protein (insbesondere von Kollagen I, II und X) identifiziert und gehört zu der strukturellen Gruppe der calciumbindenden Proteine (Rojas et al. 1990; Merzel et al., 2006). Es wird auch Anchorin CII genannt (Kirsch und Pfaffle, 1992; Von der Mark und Mollenhauer, 1997). Annexine sind an der Regulation von Membranfunktionen, an Entzündungs-, Proliferations- und Differenzierungsprozessen beteiligt. Auf der humanen Osteoblastenoberfläche wurden Annexin I, II, IV, V und VI identifiziert (Huber et al., 1992; Mohiti et al., 1995; Von der Mark und Mollenhauer, 1997).

### Die alkalische Phosphatase

Die alkalische Phosphatase (ALP; orthophosphoric-monoester phosphohydrolase, alkaline optimum) ist ein membrangebundenes Enzym, welches als wichtiger Faktor der Mineralisierung zuerst von Robison (1923) entdeckt wurde. Eine wichtige Rolle bei der Mineralisation von neu gebildeten Knochen wird ihr zugetragen, denn ein Fehlen der Enzymaktivität ist für die Osteomalzie verantwortlich. Sie gehört zu den Ubiquitin-Enzymen, katalysiert die Hydrolyse von Phosphatester und entfernt anorganisches Pyrophosphat. Die ALP-Familie besteht aus verschiedenen Isoenzymen, die von 4 Genen kodiert werden. Bekannt sind die intestinale ALP (IntALP), placentale ALP (PALP), Keimzellen-ALP (GALP) und nichtgewebespezifische oder Nieren- / Knochen- / Leber-ALP (TNSALP). Die ALP gilt als früher Osteoblasten-Differenzierungsmarker und unspezifischer Knochenbildungsmarker *in vitro* und *in vivo* (Turksen und Aubin, 1991; Watts, 1999; Zheng et al., 1992).

### **1.2.2.3 Die Proteasen und Heat-Shock-Proteine**

Zu der Gruppe der Proteasen werden die Peptidasen, Proteinasen, Serinproteasen, Cystinproteasen, saure Proteasen und Metalloproteinasen gezählt. Sie werden je nach Angriffsort in Exopeptidasen und Endopeptidasen unterteilt sowie, je nach ihrer physiologischen Bedeutung, in extrazelluläre und intrazelluläre Proteasen eingeordnet. Die Mengenregulation eines jeden Proteins in der Zelle wird durch sorgfältig kontrollierten Proteinabbau unterstützt. Hierbei ist die Erkennung und Beseitigung von beschädigten oder fehlerhaften Proteinen ebenso wichtig wie der schnelle Abbau von Proteinen, die nur eine kurze Lebensdauer haben.

Matrix-Metalloendoproteinasen (MMPs) sind neutrale Proteinase und enthalten Metallionen in ihrem katalytischen Zentrum ( $Zn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ). Mehr als 25 humane MMPs sind bekannt. Sie werden eingeteilt in Kollagenasen, Stromelysins, Gelatinasen und Matrilysine (Stamenkovic, 2000). Die Hauptaufgabe der MMPs besteht im Prozess des Geweberemodellings und dessen Balance, wie es bei der embryonalen Entwicklung, der Ovulation und der Wundheilung wichtig ist (Bord et al., 1998; Mc Cawley und Matrisian, 2001; Egeblad und Werb, 2002; Geoffroy et al., 2004). Hormone, Zytokine und Wachstumsfaktoren beeinflussen die MMP-Expressionen (Canalis et al., 1995; Varghese et al., 2000; 2005). MMPs

kontrollieren Zellinteraktionen sowohl physiologischer als auch pathologischer Natur und sie sind bei der Knochenresorption involviert (Bord et al., 1996; 1997; 1999). So kann eine anormale Expression dieser Proteasen zu pathologischen Prozessen beitragen (Kim et al., 1998; Bergers et al., 2000).

Kollagenasen sind Zinkproteasen, die von Osteoblasten, Osteoklasten und Chondrozyten synthetisiert werden (Bord et al., 1996; 1997; Hill et al., 1994). Mindestens 13 Enzyme unterschiedlicher Substratspezifität sind bekannt. Kollagenasen werden als inaktive Proenzyme in den Extrazellularräumen sezerniert und können durch andere Proteasen über limitierte Proteolyse aktiviert oder durch spezifische TIMPs (Tissue Inhibitors of Metalloproteinases) gehemmt werden (Bord et al. 1996; Deryugina et al., 2001). Kollagenasen gelten als regulierende Faktoren der Osteogenese *in vitro* (Filanti et al., 2000). Sie sind an der Eliminierung der N- und C-terminalen Peptide von den Prokollagenen und damit an der Schlüsselfunktion, der Aggregation zu löslichen Kollagenmolekülen, beteiligt. Es ist bekannt, dass Kollagenasen intakte Kollagenfibrillen spalten und Gelatinasen Kollagenfragmente danach digestiv abbauen (Mitchell et al., 1996).

CTSK (Cathepsin K) wird zu den Cystein-Proteinasen gezählt. Es spielt neben den MMPs eine entscheidende Rolle bei der Frakturheilung (Uusitalo et al., 2000) und wird vor allem in multinukleären Chondroblasten, Osteoklasten nachgewiesen (Littlewood-Evans et al., 1997; Soderstrom et al., 1999; Uemura et al., 2000), aber auch in humanen Osteoblasten, bone-lining Zellen, Osteozyten, osteoblastenähnlichen-*in vitro* Zellen (Mandelin et al., 2006) und humanen Fibroblasten (Everts et al., 2003). CTSK agiert als lysosomales Protein im Rahmen der proteolytischen Matrixdegradation und es baut Kollagenfibrillen von Knorpel- und Knochengewebe ab (Littlewood-Evans et al., 1997; Dodds et al., 1998).

BMP-1 (Bone Morphogenic Protein-1) ist ebenfalls eine Metalloproteinase und an Regulation der BMP-Aktivität beteiligt (Scott et al., 2000; Sarras, 1996). Es kontrolliert die Deposition fibröser ECM, spaltet Probiglycan (Scott et al., 2000) und entbindet das Carboxyl-Ende vom Kollagen Typ I-Propeptid (Kessler et al., 1996).

SERPINH1 (Genname: CBP1) und SERPINH2 (Genname: CBP2) sind Serin- (oder Cystein-) Proteinaseinhibitoren und zählen als clade H member 1 und 2 zu den Heat-Shock-Proteinen (HSP 47). Ihre spezifischen Aufgaben liegen in der Funktion als Chaperone während der Proteinbiosynthese, insbesondere von Kollagen Typ I, und in Reperaturmechanismen (Masuda et al., 1998; Sasaki et al., 2002; Nagata, 1998).

### 1.2.2.4 Die Wachstums-, Differenzierungsfaktoren und Hormone

Wachstumsfaktoren sind Proteine, die von Zellen sezerniert werden und auf bestimmte Zellen autokrin, parakrin oder endokrin wirken (Liebermann et al., 2002). Der Anteil der Wachstumsfaktoren im Knochengewebe beträgt weniger als 1% der nichtkollagenen Proteine. Jedoch üben sie eine wesentliche Kontrollfunktion auf das Knochen- und Knorpelgewebe aus. Für die Frakturheilung wichtige Wachstumsfaktoren sind Bone Morphogenic Proteins (BMPs), Transforming Growth Factors beta (TGFβs), Fibroblast Growth Factors (FGFs), Platelet-derived Growth Factors (PDGF) und Insulin-like Growth Factors (IGFs). Sie beeinflussen die Zellteilung, die Matrixsynthese und die Gewebedifferenzierung und tragen somit eine entscheidene Rolle bei der Knochen- und Knorpelbildung und der Reparatur muskuloskelettaler Gewebe (Bostrom et al., 1999).

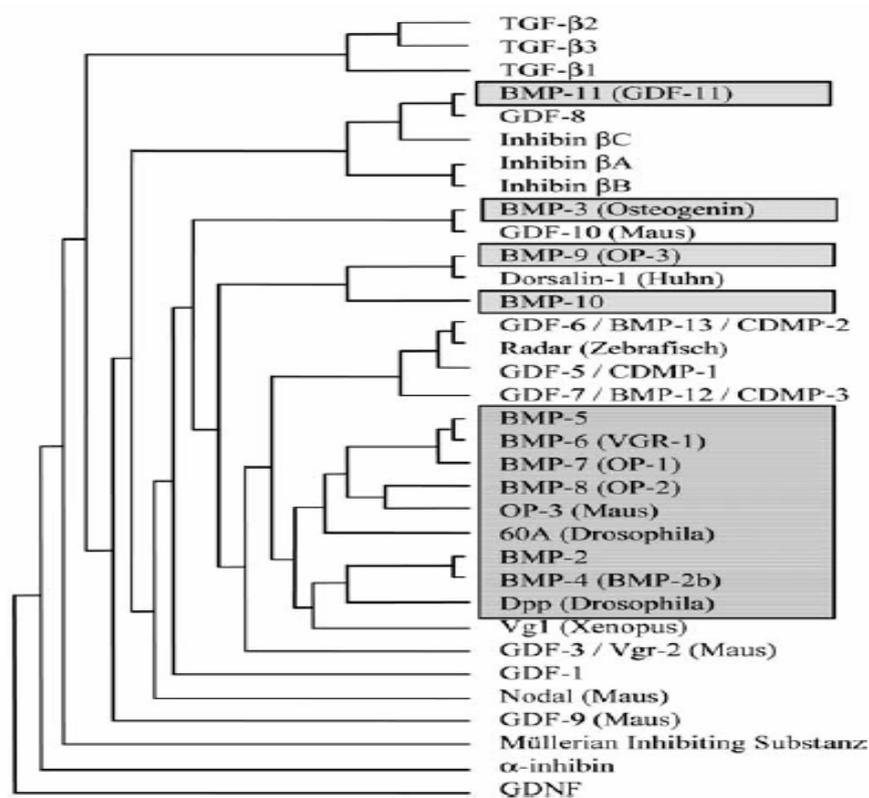


Abbildung 1.3: Die Mitglieder der TGFβ-Superfamilie

[Abbildung übernommen von: Bramlage, C.P.; Häupl, T.; Kaps, C. et al. *Bone Morphogenic Proteins – im Skelettsystem. Z Rheumatol* 2005, 64: 416-422.

#### Die BMPs

Von Dr. Marshall Urist und Mitarbeitern wurde der osteoinduktive Effekt vom Bone Morphogenic Protein (BMP) in demineralisiertem Knochen entdeckt (Urist et al. 1979; 1965). 1981 wurde der osteoinduktive Effekt sowohl auf die enchondrale als auf die direkte Knochenbildung beobachtet (Reddi, 1981). 1988 identifizierten Wozney et al. die genetische Sequenz der Bone Morphogenic Proteins (BMP-2 und -4)

und damit die verschiedenen Isoformen. Die Gruppe der Bone Morphogenic Proteins (BMPs) gehört zu der TGF- $\beta$ -Superfamilie (Abb. 1.3), zu welcher auch folgende TGF- $\beta$ -Isoformen zählen: TGF- $\beta$ 1 bis TGF- $\beta$ 5, GDF (Growth and Differentiation Factor), Activin, Inhibin und Müllerian Substanz (Kingsley, 1994; Liebermann et al., 2002). Mehr als 47 verschiedene BMPs wurden inzwischen identifiziert (Chubinskaya und Kuettnner, 2003). Sie werden klassifiziert in: BMPs, Osteogenetic Proteins (OPs), Carilage-derived Morphogenic Proteins (CDMPs), Growth and Differentiation Factors (GDFs) (Ducy und Karsenty, 2000b) und BMP-like Molecules verschiedener Spezies (Balemans und Van Hul, 2002). Zusätzlich können die BMPs in drei Untergruppen eingeteilt werden. Die erste Gruppe stellen BMP-2, BMP-4 und DPP (*Drosophila decapentaplegic*), sie gehören zur DPP-Klasse. Zur zweiten Gruppe, der 60A Klasse, werden BMP-5, BMP-6, BMP-7 (OP-1) und BMP-8 (OP-2) und 60A gezählt. Die Gruppe drei wird von BMP-3 (Osteogenin) gebildet. BMP-9 bis -15 werden den GDFs und CDMPs zugeschrieben (Cheng et al., 2003).

BMPs sind multifunktionelle Proteine und spielen eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung von Wirbel- und wirbellosen Tieren. BMPs regulieren die Zellproliferation, Apoptose, Differenzierung und Morphogenese bei der Entwicklung fast aller Organe und Gewebe (Jena et al., 1997; Hogan, 1996; Goumans und Mummery, 2000). Quellen für BMPs im Knochengewebe sind die Osteoprogenitorzellen, die Osteoblasten und die extrazelluläre Matrix selbst. BMPs nehmen Einfluss auf knochenspezifische, mesenchymale und endotheliale Zellen. Sie induzieren die Expression der ECM-Proteine, insbesondere die alkalische Phosphataseaktivität und die Kollagensynthese (Hughes et al., 1995; Hiraki et al., 1991; Takuwa et al., 1991). BMPs verfügen außerdem über die Fähigkeit Stamm- und Knochenvorläuferzellen zu Chondrozyten bzw. Osteoblasten zu differenzieren und den Prozess der Knochenmatrixbildung zu beeinflussen (s. Abbildung 1.4). Je nach Differenzierungsgrad der Osteoblasten stimulieren BMPs die Proliferation gering differenzierter osteoblastenähnlicher Zellen und hemmen die der reifen, differenzierteren Zellen (Yamaguchi et al., 1991). Zusätzlich wird von den BMPs die Fähigkeit zur Induktion der ektopen Knochenneubildung beschrieben (Sampath et al., 1992; Reddi, 1998).

Die osteogene Aktivität verschiedener BMPs bei pluripotenten Stammzellen, Präosteoblasten und humanen Osteoblasten wurde *in vitro* bewiesen (Cheng et al. 2003; Zoricic et al., 2003). Verschiedene BMPs induzieren die osteoblastenspezifische CBF $\alpha$ 1-Expression (Ducy et al., 1997). BMP-2, -4 und -7 spielen bei der Frakturheilung eine besondere Rolle und beeinflussen das Zellwachstum und die Knochenneubildung (Bostrom und Camacho, 1998; Onishi et al. 1998). BMP-2 und -4 sind nahezu homolog, können jedoch gravierende Unterschiede bei der Defektheilung *in vivo* bzw. *in vitro* provozieren (Wozney, 1993; Peng et al., 2005). BMP-2 wird in der fibrösen Matrix, in fibroblastären mesenchymalen Zellen, Fibrochondrozyten, Chondrozyten und in Osteoblasten beobachtet, BMP-7 (auch bekannt als OP-1, Osteogenic Protein-1) in hypertrophen Chondrozyten, Osteoblasten und jungen Osteozyten der endochondralen und intramembranösen Knochenbildung (Nakase et al., 2003; Zoricic et al., 2003). BMP-2 und -7 stimulieren sowohl im präklinischen Model als auch in klinischen Studien die Knochenheilung (Valentin-Opran et al., 2002; Friedlaender, 2001). Die Induktion der Osteoblastendifferenzierung durch BMPs wird in Abbildung 1.4 dargestellt.

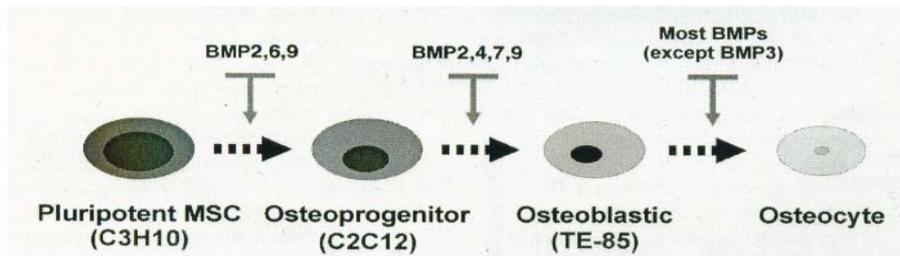


Abb. 1.4: Die BMPs und die Induktion der Osteoblastendifferenzierung

[Abbildung entnommen aus: Cheng, H.; Jiang, W.; Phillips, F.M. et al. *Osteogenic Activity of the fourteen types of human Bone Morphogenic Proteins (BMPs)*. *J Bone and Joint Surgery* **2003**, 8: 1544-1552.]

BMP-5 wird als ein Schlüsselsignal für die Bildung skelettaler Elemente sowie für die Entwicklung verschiedener Weichgewebe betrachtet (King et al., 1994). Zusätzlich ist BMP-5 bei der Frakturheilung beteiligt (Kingsley et al., 1994). BMP-6 spielt eine wichtige Rolle bei der Differenzierung humaner Osteoblasten *in vitro* (Jane et al., 2002; Cheng et al., 2003) und wird in jungen Osteozyten, Osteoklasten sowie in der Knochenmatrix nachgewiesen (Zoricic et al., 2003). Ein BMP-6-Mangel kann durch BMP-2 kompensiert werden (Solloway et al., 1998). BMP-8 ist auch als OP-2 bekannt (Osteogenic Protein-2) und bei der Spermatogenese, Epithelfunktionen und der epiphysealen Dysplasie involviert (DiLeone et al., 1997; Zhao et al., 2001).

Das meist vorhandene BMP im Knochengewebe Erwachsener stellt BMP-3 dar. Es ist auch als Osteogenin bekannt und wird von Osteoblasten und Osteoklasten exprimiert. Im Gegensatz zu den anderen BMPs ist BMP-3 als negativer Einflussfaktor der Knochendichte bekannt (Zoricic et al., 2003; Daluiski et al., 2001). Denn unter dem BMP-3-Einfluss wird keine osteogene Aktivität beobachtet (Amedee et al., 1994). BMP-3 antagonisiert mit BMP-2, -4, -6, -7 und -9 (Cheng et al., 2003; Bahamonde und Lyons, 2001). BMP-3B (GDF-10; Growth Differentiation Factor 10) ist ein BMP-3-verwandtes Protein und zu über 80% mit diesem identisch (Cunningham et al., 1995). Dennoch variieren ihre regulatorischen Funktionen (Takao et al., 1996; Zhao et al., 1999). BMP-3B kontrolliert u.a. die Osteoblastendifferenzierung (Hino et al., 1999).

### Die TGF- $\beta$ s 1-3

TGF- $\beta$ s (Transforming Growth Factors-beta) sind polypeptide Wachstumsfaktoren und zählen wie die BMPs zur TGF $\beta$ -Superfamilie (Abbildung 1.3). Sie werden von Osteoblasten, Osteoklasten und Chondrozyten synthetisiert (Cho et al., 2002; Joyce et al., 1990). TGF $\beta$ s beeinflussen die Embryogenese, die Zellproliferation und Zelldifferenzierung von Osteoblasten, Osteoklasten und Chondrozyten und spielen eine entscheidende Rolle bei der extrazellulären Matrixproduktion und bei Knochenumbauprozessen (Erlebacher et al., 1998; Bostrom und Asnis, 1998; Spinella-Jaegle et al., 2001; Fox und Lovibond, 2005). Doch die Effekte auf Osteoblasten *in vitro* sind je nach Differenzierungsstadium zahlreich und verschieden (Spinella-Jaegle et al., 2001; Bostrom und Asnis, 1998; Alliston et al. 2001). Sie gelten als bifunktionelle Regulatoren des Zellwachstums, welche die

Phasen der Proliferation bis zur Matrixsynthese stimulieren, aber die Mineralisation inhibieren (Breen et al., 1994; Heberden et al., 1998; Spinella-Jaegle et al., 2001).

### Die IGFs

IGF-I (Somatomedin C) und IGF-II (Somatomedin A) sind polypeptide Wachstumsfaktoren und strukturell mit dem Insulin verwandte Peptide (Insulin like Growth Factors). Die IGFs werden vor allem von Hepatozyten, aber auch von anderen Zellen, wie den Osteoblasten, gebildet. Sie sind die weitverbreitetsten Wachstumsfaktoren, die von Zellen des Skeletts sezerniert werden. In der extrazellulären Flüssigkeit werden sie an spezifische Proteine (IGF-Bindungsproteine) gebunden. IGF-I und -II agieren als autokrine und parakrine Regulatoren der Osteoblastenfunktion (Canalis et al., 1988b; Frolik et al., 1988) und spielen bei der Erhaltung der Knochenmasse und der Phänotypexpression der Osteoblasten eine Rolle (McCarthy et al., 1989; Canalis, 1995). Beide IGFs stimulieren die Kollagen Typ I Synthese, die Matrixapposition in der Zellkultur und verhindern den Kollagenabbau im Knochen (McCarthy et al., 1989; Canalis et al., 1995).

### Die VEGFs

VEGFs (Vascular Endothelial Growth Factors) sind dem PDGF (Platelet-derived Growth Factor alpha polypeptide) ähnliche Wachstumsfaktoren und werden von diversen Zellen, wie undifferenzierten mesenchymalen Zellen, Fibroblasten, Chondrozyten, embryonalen Zellen, Tumorzellen, Endothelzellen von großen Gefäßen und Tumorkapillaren, aber auch humanen Primärosteoblasten und Osteoklasten synthetisiert (Deckers et al., 2000; Ferrara, 2001; Mayr-Wohlfahrt et al., 2002; Pufe et al., 2002). Osteoblasten und hypertrophe Chondrozyten besitzen VEGF-Rezeptoren (Deckers et al., 2000; Schlaeppli et al., 1997). Den VEGFs werden wichtige Aufgaben bei der Endothelzellproliferation im Rahmen der Vaskularisation, Wundheilung und damit auch in der Knochen- und Zahnentwicklung, Frakturheilung und endochondralen Ossifikation zugeschrieben (Pufe et al., 2002; Gerber et al., 1999; Ferrara, 2001). Die VEGF-Synthese von Präosteoblasten ist der Hauptmechanismus während der Knochenfrakturheilung, bei dem Angiogenese und Osteogenese eng miteinander gekoppelt sind (Deckers et al., 2002; Furumatsu et al., 2003; Street et al., 2002). VEGFs induzieren die Knochenneubildung in Organkulturen und *in vivo*, indem sie die Vaskularisation und somit die Osteoklasten und die Knochenresorption stimulieren und die Apoptose inhibieren (Hiltunen et al., 2003; Nakagawa et al., 2000; Hay et al., 2004; Peng et al., 2005). Dieses VEGF- / VEGF-Rezeptoren-System ist jedoch mit dessen pathologischen Steigerung auch für die rheumatoide Arthritis und Osteoarthritis verantwortlich (Giatromanolaki et al., 2001).

In die Gruppe der VEGFs gehören VEGF (VEGF-A), PlGF (Placenta Growth Factor-1), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, zwei VEGF-like Proteine (wie VEGF-E) und außerdem GD-VPF, GD-VEGF und Vasculotropin. VEGFs wirken autokrin und parakrin (Mayer et al., 2005). VEGF-A, -B und -C stehen für die Vaskularisation von Tumorgewebe, von Knochen (VEGF-B), von Skelettmuskel (VEGF-B) und für die Lymphangiogenese (VEGF-C) (Nicosia, 1998; Olofsson et al., 1996; Aase et al., 1999).

### Die CSFs

CSFs (Colony Stimulating Factors) werden in vielen unterschiedlichen Zellen synthetisiert. Zu den CSFs gehören Interleukin-3 (multi-CSF), GM-CSF (granulocyte-macrophage-CSF 2; CSF 2), G-CSF (granulocyte-CSF) und M-CSF (macrophage-CSF). Nach Zheng et al. (1991) wirken CSFs bei der Osteoklastogenese aus deren Vorläuferzellen mit, nach Takahashi et al. (1991) jedoch nur unter Anwesenheit von Vitamin D<sub>3</sub> und von Osteoblasten. GM-CSF stimuliert die DNA-Synthese von Osteoblasten (Noda et al., 1990).

### Der TNF $\alpha$

TNF $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor alpha) gehört der TNF-Superfamilie an. Dieses proinflammatorische Zytokin ist neben TGF $\beta$ , RANKL (receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) ligand) und IL-1 $\beta$  (Interleukin 1 $\beta$ ) ein wichtiger Faktor für die Osteoklastogenese und agiert als ein pathologischer Aktivator der Knochenresorption, rheumatoiden Arthritis und Osteoporose und als ein Inhibitor der Knochenneubildung (Bertolini et al., 1986; Fox und Lovibond, 2005; Lam et al., 2000; Kwan Tan et al., 2004). TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  kooperieren bei der Induktion der Osteoklastogenese, einerseits unter inflammatorischen Bedingungen (Rifas, 1999), andererseits während der Knochenfrakturheilung (Gerstenfeld et al., 2001; Kon et al., 2001). TNF $\alpha$  wird dabei von vielen Zellen des Knochens expremiert (Wang et al., 2005). Es liegt in membrangebundener und löslicher Form vor. *In vitro* werden durch TNF $\alpha$  die Knochenbildung gehemmt, die Knochenresorption direkt stimuliert sowie die Expression des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B induziert (Gilbert et al., 2000; Taichmann und Hauschka, 1992; Katagiri und Takahashi, 2002).

### Der PDGF $\alpha$

PDGF $\alpha$  (Platelet-derived Growth Factor alpha polypeptide) ist ein multifunktionaler Wachstumsfaktor und wird u.a von Thrombozyten, Monozyten, Fibroblasten, Endothelzellen und diversen Tumorzellen expremiert. PDGF $\alpha$  besitzt Bedeutung bei der Wundheilung, Gewebereparation, Knochenheilung und bei Entzündungsreaktionen (Andrew et al., 1995; Nash et al., 1994; Zhang et al., 1998). Mesenchymale Zellen werden durch diesen Wachstumsfaktor zur Proliferation stimuliert. Zudem bewirkt PDGF $\alpha$  die Chemotaxis von Makrophagen, Mesenchymzellen und PMNs (polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten). Es konnte gezeigt werden, dass PDGF die Zellreplikation und die Synthese von kollagenen und nichtkollagenen Proteinen in Rattenschädelzellen stimuliert (Canalis, 1981).

### Die FGFs

Bis zu 10 verschiedene FGFs (Fibroblast Growth Factors) sind bekannt. FGF-1 (acidic; aFGF) und FGF-2 (basic; bFGF) werden von Osteoblasten, Fibroblasten, Myozyten, Endothelzellen, Makrophagen, T-Zellen, Embryonalzellen, Tumorzellen, Hepatozyten und Gliazellen expremiert. Sie regulieren die Proliferation, Migration und Differenzierung im muskuloskelettalen System (Klagsburn 1989; Gonzalez et

al., 1996) und sind somit bei der endostalen Knochenbildung, postnatalen Osteogenese, Chondrogenese, aber auch bei der Tumorentstehung, Ontogenese, Wundheilung, Angiogenese und Hämatopoese involviert (Nakamura et al., 1995; Mansukhani et al., 2000; Eppley et al., 1988). In Abhängigkeit von der Konzentration und dem Differenzierungsstadium besitzt FGF-2 einen stimulierenden oder einen hemmenden Charakter auf die Proliferation von Osteoblasten (Aspenberg et al., 1991; Simmons und Raisz, 1991; Zellin und Linde, 2000). In Abbildung 1.5 sind die Einflüsse der verschiedenen FGFs während der Osteogenese dargestellt.

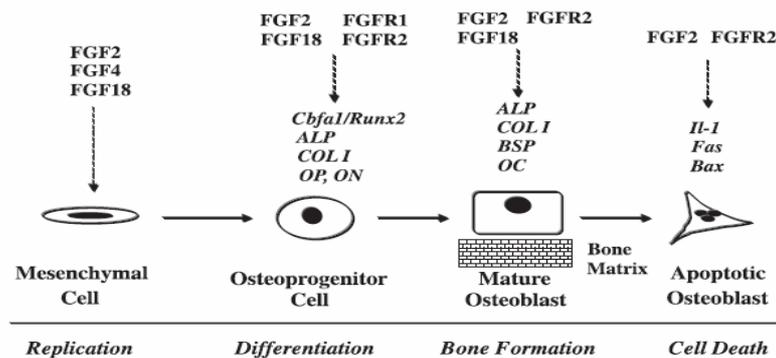


Abbildung 1.5: Die Wirkungen der verschiedenen FGFs während der Osteogenese.

[Abbildung übernommen von Marie, P.J. Fibroblast growth factor signaling controlling osteoblast differentiation. *Gene* 2003, 316: 23-32]

### Die EGFs

EGF (Epidermal Growth Factor beta urogastrone) wirkt als Mitogen und Differenzierungsfaktor für eine Vielzahl von Zellen ektodermalen, mesodermalen und entodermalen Ursprungs. EGFs besitzen eine proinflammatorische Wirkung. Sie sind bei der Prostaglandinbildung und beim Knochenabbau beteiligt und besitzen chemotaktische Eigenschaften (Tashjian und Levine, 1978). Eine EGF-Applikation stimuliert die Osteoprogenitorproliferation (Shupnik et al., 1980; Chien et al., 2000), hemmt jedoch die Kollagensynthese und verringert die ALP-Aktivität (Hata et al., 1984; Kumegawa et al., 1983).

### **1.2.2.5 Die Rezeptoren**

#### Die TGF $\beta$ -Rezeptoren

Alle Proteine der TGF- $\beta$ -Superfamilie binden extrazellulär an einen Komplex von Serin- / Threonin-Kinase-Rezeptoren (Ten Dijke et al., 1994b). Die transmembranen Rezeptoren werden in Serin- / Threonin-Rezeptor Typ I und II eingeteilt. Bei Säugetieren sind 7 Typ I-Rezeptoren und 5 Typ II-Rezeptoren bekannt (Wrana et al., 1994; Miyazono et al., 2000). Sie befinden sich auf Osteoblasten und Präosteoblasten (Ten Dijke et al., 2003). Liganden binden an ihren spezifischen Typ II-Rezeptor und bilden einen aktivierten heterotetrametrischen Rezeptorkomplex, bestehend aus zwei Paaren des Typ I- und II-Rezeptorkomplexes (Moustakas und Heldin, 2002). Während der Typ II-Rezeptor eine aktive

Kinase darstellt und den Typ I-Rezeptor bei einer Ligandenbindung transphosphoryliert, aktiviert der Typ I-Rezeptor intrazelluläre Signalmoleküle (Wrana et al., 1994). Über eine Kaskadenaktivierung wird eine Gruppe von intrazellulären Signaleffektoren (u.a. die SMAD-Proteine, s. Kap. 1.2.2.6) beansprucht.

TGF $\beta$ R-1 (Transforming growth factor beta receptor 1; ALK-5, Activin Receptor-like Kinase 5, Activin A Rezeptortyp II – Kinase, 53kD) gehört zu der Gruppe der Typ I-Rezeptoren und bindet TF $\beta$ s und Activin. TGF $\beta$ R-2 (Transforming growth factor, beta receptor 2; 70-80kD) stellt einen Typ II-Rezeptor der Serine- / Threonin-Kinase-Rezeptoren dar und zu seinen Liganden zählen die TGF $\beta$ s (Chen et al., 1993c).

Die BMPs der DPP- und 60A-Klasse nutzen unterschiedliche Rezeptorkomplexe für ihre Signaltransduktion, abhängig vom Typus der Zielzelle oder vom Entwicklungsstadium der Zellen (Zhao et al., 2001). Für die BMPs sind drei Typ II-Rezeptoren (BMP Typ II-Rezeptor (BMPR-II), Activin Typ IIA-Rezeptor (ActR-IIA) und Activin Typ IIB-Rezeptor (ActR-IIB)) und drei Typ I-Rezeptoren (auch Activin Rezeptor-like Kinasen genannt: BMPR-IA/ALK-3, BMPR-IB/ALK-6 und ActR-IA/ALK-2) bekannt (Rosenzweig et al., 1995; Kawabata et al., 1995; Ten Dijke et al., 1994a; Macias-Silva et al., 1998). Während BMPR-IA, -IB und -II spezifisch für die BMPs sind, spielen ActR-IA, -II und -IIB zusätzlich eine Rolle beim Activin-Signalweg. Diese Rezeptoren werden in unterschiedlichen Geweben expremiert und sind unentbehrlich für die Signaltransduktion. Die BMPs binden mit unterschiedlicher Affinität an die Rezeptortypen (Liu et al., 1995; Rosenzweig et al., 1995).

### Die IGF-Rezeptoren

Der Insulin-like Growth Factor (IGF) ist eine Komponente eines komplexen Systems von Peptidhormonen (IGF-I und -II), Zelloberflächenrezeptoren und zirkulierenden Bindungsproteinen. IGF-1R gehört zu den transmembranen Tyrosinkinaserzeptoren und wird, mit Ausnahme der Leber, in nahezu allen adulten Geweben synthetisiert (Okazaki et al., 1994). Durch die extrazelluläre Ligandenbindung erfolgt eine Konformitätsänderung mit nachfolgender Aktivierung der intrinsischen Tyrosinkinase. IGF-1R ist für die Proliferation, das Überleben, die Differenzierung und den Schutz vor Apoptose bzw. die Transformation von Zellen verantwortlich (Pollak, 2004). Eine Deregulation der IGF-1R-Aktivität spielt eine bedeutende Rolle bei der Potenzierung von Tumorwachstum und der Metastasierung von Tumorzellen (Pollak, 2004; Bahr und Groner, 2005).

### Die VEGF-Rezeptoren

FLT-1 ist ein Rezeptor für die Vascular Endothelial Growth Factors (Waltenberger et al., 1994). Er ist auch als VEGFR-1 oder fms-like tyrosine kinase receptor bekannt und für die Angiogenese, die vaskuläre Permeabilität und die Migration von humanen Primärosteoblasten, SaOS2-Zellen und humanen Monozyten bedeutend (Deckers et al., 2000; Mayr-Wohlfart et al., 2002; Barleon et al., 1996). Die endothelialen Zellen, Osteoprogenitorzellen und Osteoblasten synthetisieren FLT-1 (Ferrara, 2001). FLT-1 bindet VEGF-A, -B sowie PlGF. Weitere Rezeptoren für die VEGFs sind: VEGFR-2 (FLK-1/KDR) für

VEGF-A-, -C-, -D-Bindung, außerdem VEGFR-3 (FLT-4) für VEGF-C-, -D-Bindung sowie Neuropilin-1 und -2 als Co-Rezeptoren für VEGFR-2 (NRP1, NRP2).

#### Der Vitamin D Hormon-Rezeptor

VDR (Vitamin D Hormon-Rezeptor) ist beim skelettalen Wachstum, der Zellreifung und dem Remodellingprozess involviert (Martinez et al.; 2001; Paredes et al., 2004). Osteoblasten und Osteozyten besitzen Rezeptoren für Vitamin D<sub>3</sub> (Narbaiz et al., 1983; Boivin et al., 1994).

#### Die FGF-Rezeptoren

Verschiedene Isoformen der FGFRs (Fibroblast Growth Factor Receptors) sind bekannt. Sie sind sowohl an der cranialen Knochenbildung als auch der Suturenossifikation beteiligt (Rice et al., 2000; Anderson et al., 1998) und spielen eine wichtige Rolle bei der Frakturheilung und der Zellapoptose (Lemonnier et al., 2001; Rundle et al., 2002). Mesenchymzellen, Osteoblasten und Chondrozyten exprimieren FGFRs (Rundle et al.; 2002). Wie in Abbildung 1.5, in Kapitel 1.2.2.4, dargestellt, ist die Expression der FGFRs vom Differenzierungsstadium der Zellen abhängig.

#### Die EGF-Rezeptoren

EGFR stellt den Rezeptor des Epidermalen Growth Factors dar. Das EGF- / EGFR-System ist in den osteogenen Zellen bei der Phänotypausbildung und der Zellproliferation von Bedeutung (Chien et al., 2000; Yoneda, 1996).

#### Der Calcium-sensing Rezeptor

CASR (Calcium-sensing Receptor, hypocalciuric hypercalcemia 1, severe neonatal hyperparathyroidism) ist für die Regulation der Calcium-Homöostase vor allem in Geweben der Glandula parathyroidea, der Niere und den thyroidalen C-Zellen von Wichtigkeit (Quarles, 2003). Auch im Knochengewebe, insbesondere bei Osteoblasten und Knochenmarkszellen, wurde CASR nachgewiesen (House et al., 1997; Takeyama et al.; 2000).

### **1.2.2.6 Die SMADs**

Eine Schlüsselfunktion in der Osteoblastendifferenzierung wird den SMADs (homo sapiens MAD (mother against decapentaplegic) Drosophila homolog) zugeschrieben (Katagiri und Takahashi, 2002). SMADs sind Proteine, die TGF- $\beta$ -induzierte Signale von der Zelloberfläche zum Nukleus vermitteln. Im Nukleus sind sie für die Modulation spezifischer Gene verantwortlich (Massagué und Wotton, 2000). Funktionsspezifisch werden die SMADs in drei Gruppen eingeteilt.

Es gibt die Receptor-regulated SMADs (R-SMADs: SMAD 1, -2, -3, -5, -8). Die SMADs 1, 5 und 8 sind in den BMP-Signalweg involviert, denn sie werden von den Typ I-Rezeptoren der Serin- / Threonin-Kinase-Rezeptoren aktiviert (Hoodless et al., 1996; Nishimura et al., 1998; Chen et al., 1997; Kawai et al., 2000). SMAD 2 und 3 modulieren die TGF- $\beta$ - und Activin-Signalwege (Zhang et al., 1996). Die zweite Gruppe besteht aus dem Co-SMAD (Common Partner SMAD; SMAD 4; DPC4). Die R-SMADs bilden einen heterodimeren Komplex mit SMAD 4 und stellen somit die Verbindung zum Nukleus. Dieser Komplex ist essentiell für alle Signalwege (Lagna et al., 1996; Goumans und Mummery, 2000), s. Abbildung 1.6. Innerhalb des Nukleus kann der heterodimere SMAD-Komplex direkt oder über die Interaktion mit Co-Aktivatoren und Co-Repressoren an spezifische Sequenzen im Promoter der verschiedenen Zielgene binden und die Transkription dieser Zielgene zusammen mit anderen Transkriptionsfaktoren regulieren (Derynck et al., 1998; Balemans und Van Hul, 2002). SMAD 6 und 7 bilden die Gruppe der Inhibitory SMADs (I-SMADs). Die I-SMADs werden von den Mitgliedern der TGF- $\beta$ -Superfamilie induziert und nehmen an der negativen Autoregulation teil, um die Intensität und die Dauer der TGF- $\beta$ -Signale zu kontrollieren (Afrakhte et al., 1998; Miyazono, 1999).

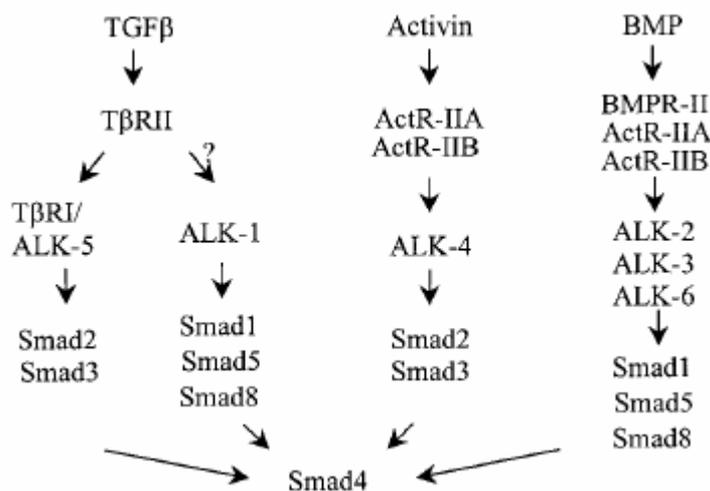


Abb. 1.6: Die SMADs

[Abbildung übernommen von Goumans, M.J.; Mummery, C. *Functional analysis of the TGF- $\beta$  receptor-/Smad pathway through gene ablation in mice. Int. J. Dev. Biol.* 2000, 44, 253-265.]

### 1.2.2.7 Die regulierenden Moleküle auf der Zelloberfläche

Interaktionen zwischen Zellen werden zum einen durch lösliche Effektormoleküle (Zytokine, Komplement, Immunglobuline) und zum anderen durch eine exakt abgestimmte Garnitur von Oberflächenmolekülen ermöglicht. Hierzu gehören MHC-Proteine, CD-Proteine, Rezeptorproteine und Adhäsionsproteine. Zu der Gruppe der Rezeptorproteine werden Antigen-, Immunglobulin-, Komplement- und Zytokin- / Interleukin-Rezeptoren gezählt.

Integrine sind eine große Gruppe von transmembranösen Adhäsionsrezeptoren, bestehend aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten. Integrine regulieren unterschiedlichste zelluläre Funktionen, wie Zelladhäsion, -motilität, -

morphologie, -wachstum, -differenzierung und -apoptose (Cowels et al., 2000; Franceschi, 1999; Shah et al., 1999; Carvalho et al., 2003; Cheng et al., 2001). Sie interagieren mit ECM-Proteinen (Ruoslahti und Pierschbacher, 1987; Damsky, 1999; Moursi et al., 1996; Globus et al., 1998). Das Zusammenspiel mit Komponenten des Zytosklettes und mit Signalmolekülen wird einerseits über eine extrazelluläre, aber auch durch eine intrazelluläre Domäne gewährleistet.

CD36-Proteine sind ubiquitär vorhandene Proteine und werden von zahlreichen Zelltypen synthetisiert. Sie gehören als sog. Glycoprotein IV zu den transmembranen Proteinen der Scavenger Rezeptorfamilie Klasse B. Verschiedene Termini sind für CD36 bekannt: GP88, GPIIb, PAS IV, FAT (fatty acid translocase) (Greenwalt et al., 1992). CD36-Proteine besitzen unterschiedlichste Liganden, wie Kollagen Typ I oder Thrombospondin, und unterschiedlichste Funktionen, sowohl in der Zelladhäsion, Angiogenese, Phagozytose, Inflammation, Entfernung von Apoptosezellen als auch beim Lipidtransfer (Tandon et al., 1989; Febbraio et al., 2001; Ibrahimi und Abumrad, 2002).

VCAM (vascular cell adhesion molecule 1; CD106) wird u.a. von Osteoblasten, Endothelzellen und aktivierten T-Lymphozyten expremiert. Es ist für die Osteoblastenaktivierung, aber auch für die Osteoklastogenese und das Homing der hämatopoetischen Progenitorzellen verantwortlich und spielt somit eine entscheidende Rolle beim Entzündungsprozess (Frenette et al., 1998; Tanaka et al., 1995; Lapidot und Petit, 2002; Rifas und Cheng, 2003).

### 1.3 PROBLEMSTELLUNG UND ZIELSETZUNG

Bone Morphogenetic Protein-2 besitzt ein osteoinduktives Potential (Katagiri et al., 1994; Harris et al., 1994; Reddi, 2001; Croteau et al., 1999). Über Typ I und Typ II Serine- / Threonin-Kinase-Rezeptoren (BMPR-IA, BMPR-IB, BMPR-II) wird dessen Wirkung initiiert (Rosenzweig et al., 1995; Kawabata et al., 1995; Ten Dijke et al., 1994a; Macias-Silva et al., 1998; Miyazono et al., 2000). Viele Arbeitsgruppen zeigten, dass BMP-2 zur Osteoblastendifferenzierung führt und die Expression früher und später Osteoblastenmarker (CBF $\alpha$ 1, Kollagen Typ I, alkalische Phosphatase und Osteocalcin) induziert (Lecanada et al., 1997; Yamaguchi et al., 2000; Takuwa et al., 1991). Histologische Daten von BMP-2-behandelten Tieren zeigten eine signifikant höhere Mineralisierung des Frakturkallus (Schmidmaier et al., 2002a; Gerhart et al., 1993). Außerdem beeinflusst BMP-2 die osteoblastäre Transdifferenzierung von fibrogenen, myogenen und adipogenen Zellen *in vitro* und *in vivo* (Katagiri et al., 1994; Kessler et al., 2000; Liebermann et al., 2002).

In der Arbeitsgruppe wurde eine biodegradierbare Beschichtung osteosynthetischer Materialien entwickelt. Mit einem sog. „kalten Beschichtungsverfahren“ wurden Implantate mit Poly (D,L-Laktid) (PDLLA) und aktiven Wachstumsfaktoren beschichtet. PDLLA diente als Trägersubstanz und ermöglichte eine genaue Dosierung und Kombination von aktiven Wachstumsfaktoren sowie deren gleichzeitige oder zeitlich versetzte, kontrollierte Freisetzung (Schmidmaier et al. 1999; 2001b). In verschiedenen *in vivo* Studien an der Ratte und am Schwein wurden die Eigenschaften der bioaktiven Beschichtung untersucht. Histologische und biomechanische Analysen bestätigten die stimulierende Wirkung der lokal freigesetzten Wachstumsfaktoren IGF-I, TGF- $\beta$ 1 und BMP-2 auf die Frakturheilung, ohne einen negativen systemischen oder lokalen Effekt von PDLLA (Schmidmaier et al. 2000; 2003; 2002a; 2002b; 2001a; 2001b; Raschke et al., 2002). Anhand der *in vivo* Versuche ist jedoch keine Aussage über die Wirkung der Wachstumsfaktoren und des PDLLAs auf einen bestimmten Zelltyp möglich. Bei der humanen Osteoblastenzelllinie hFOB 1.19 waren die *in vitro* Effekte der unbeschichteten und PDLLA-beschichteten Titanimplantate mit denen der Kontrollgruppe vergleichbar, keine Unterschiede der Zellproliferation, metabolischen Aktivität, Differenzierung und Kollagen Typ I Produktion wurden detektiert.

Die vorliegende *in vitro* Studie mit humanen Primärosteoblasten soll Aufschluss geben, wie diese in ihrer mRNA-Expression von PDLLA-BMP-2 beeinflusst werden. Genaue Untersuchungen des mRNA-Expressionsmodells der humanen Primärosteoblasten im Hinblick auf die Osteogenese sowie deren Beeinflussung durch die beiden Faktoren PDLLA und BMP-2 sollen mit Hilfe der Mikroarraytechnologie weitere Einblicke in die Regulationsmechanismen des Osteoblasten geben. Es wird der Frage nachgegangen, wie sich die Expression osteoblastenspezifischer Gene unter dem Einfluss von PDLLA und PDLLA-BMP-2 verändert. Welche Gene werden stimuliert und welche gehemmt? Zu welchen Versuchszeitpunkten erfolgen die PDLLA- und PDLLA-BMP-2-induzierten Veränderungen und wie lange halten diese Beeinflussungen an? Zugleich wird mit dieser Arbeit untersucht, welches Expressionsmuster die unbeeinflussten Primärosteoblasten im Laufe des *in vitro* Versuches und somit während der

Osteoblastogenese zeigen. Der Vergleich der unbeeinflussten und der beeinflussten Primärosteoblasten soll die Wirkungsweise von PDLLA und PDLLA-BMP-2 näher darstellen und ggf. die positiven *in vivo* Ergebnisse unterstreichen. Denn eine genaue Kenntnis dieser PDLLA-BMP-2-induzierten Vorgänge ist notwendig, um durch die Applikation des Wachstumsfaktors zum richtigen Zeitpunkt die Frakturheilung und die Störungen des Knochenstoffwechsels optimal zu therapieren.

Ziel des *in vitro* Versuches ist es, von humanen Primärosteoblasten die Genexpressionsveränderungen im Hinblick auf die Osteogenese unter dem Einfluss von PDLLA-BMP-2 zu analysieren. Zu den Versuchszeitpunkten Tag 0, 5, 10 und 15 werden die mRNA-Expressionsmuster der humanen Primärosteoblasten mit Hilfe der Mikroarraytechnologie nach der Applikation von unbeschichteten, PDLLA-beschichteten und PDLLA-BMP-2-beschichteten Titan-Kirschnerdrähten untersucht. Es gilt die Hypothese zu untersuchen, dass PDLLA-BMP-2-beschichtete Titan-Kirschner-Drähte die Genexpression humaner Primärosteoblasten *in vitro* stimulieren.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 MATERIAL

#### 2.1.1 Geräte, Software

- CO<sub>2</sub>-Inkubator Fa. Heraeus® KendroLab. Prod. GmbH, Hanau, D
- Lichtmikroskop Axioskop 2 plus // Axiovert 200 Fa. Carl Zeiss Mikroskopie, Jena, D
- Digitalkamera Coolpix 990 Fa. Nikon GmbH, Düsseldorf, D
- Laminar-Flow-bank HERAsafe® Fa. Heraeus® KendroLab. Prod. GmbH, Hanau, D
- Zentrifuge ROTANTA / P Fa. A. Hettich GmbH&CoKG, Tuttlingen, D
- Minispin-Zentrifuge Fa. Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, D
- Zentrifuge für PCR-Tubes Fa. Neo Lab®, Heidelberg, D
- Autoclav Varioklav® Fa. H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim, D
- Präzisionsfeinwaage, Typ 370-13 Fa. Kern Gottlieb&Sohn GmbH, Albstadt, D
- Vortex-Gerät Reax Control Fa. Heidolph Elektro GmbH&CoKG, Keilheim, D
- Speed Vac Plus Savant® Fa. Life Sciences International, Frankfurt, D
- Wasserbad WB/WO 7-45 Fa. Memmert GmbH & Co KG, Schwabach, D
- Vakuumpumpe Forschungswerkstatt, Charité-Virchow, D
- Hämocytometer, Neubauer Optik Fa. Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D
- Hybridisierungsöfen Fa. Heraeus® KendroLab. Prod. GmbH, Hanau, D
- Hybridisierungszylinder Fa. Biometra GmbH, Göttingen, D
- Thermocycler, Mastercycler Fa. Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, D
- Pipettierhilfe, akkubetrieben Fa. Hirschmann® Laborgeräte, Eberstadt, D
- Variable Pipettierhilfe Fa. Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, D
- Regulierbare 8-Kanal-Multipipette Fa. Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, D
- Quarzglas-Küvette, 105.202 QS Fa. Hellma Optik GmbH, Jena, D
- Spectral Photometer Gene Quant II (01-04/94) Fa. Pharmacia Biotech, Cambridge, GB
- Mikrotiterplatten-Enzymimmunoassayreader Fa. BIO RAD Laboratories GmbH, München, D
- Immuno Wash Microplatewasher (Model 1575) Fa. BIO RAD Laboratories GmbH, München, D
- Röntgenkassette Dupont Quanta Detail (Cronex) Fa. Du Pont Building, Bad Homburg, D
- Röntgenfolien Hyperfilm™ ECL™  
(High performance chemiluminescence film) Fa. Amersham Pharmciabiotech,  
Buckinghamshire, GB
- Röntgenentwicklungsgerät Protec 45 compact Fa. Protect-Gerätebau GmbH, Obere Ölmühle, D
- Scanner Plustek, Optic Plus ST48 Fa. Plustek Technology GmbH, Norderstedt, D
- GEArrayAnalyzer, Version 1.3 Fa. SuperArray Bioscience Corp., Frederick, USA
- ACDSsee™ Fa. ACDSsee, Miami, USA
- Digital Imaging System, Image Quant 5.2 Fa. Panasonic, Wiesbaden, D
- Microplate Manager™ PC (Version 5.2 ©1996) Fa. BIO RAD Laboratories GmbH, München, D
- Plastiksweißgerät Fa. Hit® Company, D

### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

- Einmal-Spritzen (5,0 ml) Fa. B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D
- Einmal-Sterilfilter; 0,2 µm LM-fest Fa. Sartorius AG, Göttingen, D
- gelbe Einmal-Kanülen Fa. B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D
- Gewebekulturflaschen (25 cm<sup>2</sup>, 75 cm<sup>2</sup>, 150 cm<sup>2</sup>) Fa. Biosciences, Bedford, USA
- 6-, 12-, 24-, 96-Wellplatten Fa. Falcon Becton Dickinson&Company, NJ, USA
- Mikrotiterplatten / 96-Wellplatten Fa. Nalge Nunc International, Wiesbaden, D
- Falcontubes (15 ml; 50 ml) Fa. Falcon Becton Dickinson&Company, NJ, USA
- Eppendorfreaktionsgefäße 1,5 ml und 2,0 ml Fa. Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, D
- Cryoröhrchen 1,8 ml Nalgene® Cryoware™ Fa. Nalge Company, Rochester, NY, USA
- Micro-PCR-Tubes (0,2 ml) Fa. Biozym Scientific GmbH, Hess.Oldendorf, D
- Combitips plus 0,5 ml; 1,0 ml Fa. Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, D
- Einmal-Pipetten, steril verpackt, (1;2;5;10;25ml) Fa. Falcon Becton Dickinson&Company, NJ, USA
- Pipettenspitzen (1-5 ml; 100-1000 µl;10-100 µl; 50-200 µl; 2-20 µl; 0,2-10 µl; 0,1-2,5 µl) Fa. Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, D
- Pipettenspitzen Filter Tips 10E Fa. Greiner Bio-one GmbH, Kremsmünster, A
- Pasteurpipetten Fa. Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D
- Nunc Tissue Culture Inserts (Porengr. 0,4 µm) Fa. NUNC™ Brand Products, Naperville, USA
- Titan-Kirschner-Drähte Fa. Synthes, AO/ASIF, AG Chur, CH
- Universalindikator (pH 0-14) Fa. Merck, Darmstadt, D
- Satin Plus® Einmalhandschuhe Fa. Safeskin GmbH, Neufahrn, D
- fusselfreies Filterpapier Kimwipes-Lite Fa. Safeskin GmbH, Neufahrn, D
- Klarsichtfolie

### 2.1.3 Chemikalien

- Kollagenase II Fa. Seromed Biochrom AG, Berlin, D
- DEPC (Diethylpyrocarbonat) Fa. Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Taufkirchen, D
- Ethanol 70%; 80% und 96%-100% Fa. Merck, KgaA, Darmstadt, D
- Fötale Kälberserum (FBS) 50ml/500ml(S0115) Fa. Seromed Biochrom AG, Berlin, D
- 20%-ige (D-)Glucoselösung Fa. Merck, KgaA, Darmstadt, D
- DMSO (Dimethylsulfoxide) Fa. Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Taufkirchen, D
- MEM-Earle Fa. Seromed Biochrom AG, Berlin, D
- HAM's F12 Fa. Seromed Biochrom AG, Berlin, D
- DMEM (Dulbecco's MEM) Fa. Seromed Biochrom AG, Berlin, D
- DULBECCO PBS <sup>w/o</sup> (Phosphat Buffered Saline) Fa. Seromed Biochrom AG, Berlin, D  
ohne Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>
- Penicillin- / Streptomycin-Lösung Fa. Seromed Biochrom AG, Berlin, D

- $\beta$ -Glycerophosphat Fa. Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Taufkirchen, D
- L-Ascorbat-2-Phosphat Fa. Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Taufkirchen, D
- Trypsinlösg. 2,5% w/v, in PBS w/o (Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>-frei) Fa. Seromed Biochrom AG, Berlin, D
- EDTA-Lösung (0,5 M) Fa. Gibco BRL, Life Technologies, Grand Island, N.Y., USA
- Trypanblaulösung T6146 Fa. Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Taufkirchen, D
- isotone Natrium-Chloridlösung 0,9% Fa. Merck, KgaA, Darmstadt, D
- Methanol Fa. Merck, KgaA, Darmstadt, D
- 3% Silbernitrat Fa. Merck, KgaA, Darmstadt, D
- 5% Natriumthiosulfat Fa. Merck, KgaA, Darmstadt, D
- Pikro-Fuchsin 2E 050 Fa. Chroma<sup>®</sup>Waldeck GmbH&CoKG, Münster, D
- 0,9 g Trizma Base Fa. Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Taufkirchen, D
- 6,6 g Trizma Hydrochlorid Fa. Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Taufkirchen, D
- NaOH Fa. Merck, KgaA, Darmstadt, D
- HCl Fa. Merck, KgaA, Darmstadt, D
- 25 ml 0,1 M Acetat-Puffer (pH 9,4) Fa. Dr.K.Hollborn&Söhne, Leipzig, D
- 25 mg Echtblausalz Fa. Chroma<sup>®</sup>Waldeck GmbH&CoKG, Münster, D
- 12,5 mg Naphtol-AS-MX-Phosphat Fa. Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Taufkirchen, D
- $\beta$ -Mercaptoethanol Fa. Merck KgaA, Darmstadt, D
- Albumin-Standard (BSA 2,0 mg/ml) Fa. Pierce; Perbio Sience GmbH, Bonn, D
- RLT-Puffer für den RNeasy Mini Kit Fa. Qiagen, Hilden, D
- Poly (D,L-Laktid) Fa. Boehringer IngelheimPharmaGmbH&CoKG,D
- rekombinantes-humanes BMP-2 Fa. Osteogenetics GmbH, Würzburg, D

#### 2.1.4 Kits und Mikroarray-Reagenzien

- RNeasy Mini Kit (Cat. No. 74104) Fa. Qiagen, Hilden, D
- GEArray<sup>™</sup> Q Series KIT for non-radioactive (chemiluminescent) Detection, Human Osteogenesis Gene Array Fa. SuperArray Bioscience Corp., Frederick, USA
- Desoxyribonuclease I (DNase I), Ampl. Grade Fa. Life Technologies, Grand Island, N.Y., USA
- MMLV (Reverse Transcriptase) (200 U/ml) Fa. Promega GmbH, Mannheim, D
- RNase Inhibitor (40 U/ml) Cat.No.N2511 Fa. Promega GmbH, Mannheim, D
- DTT (1 M) (Dithiothreitol) Fa. Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Taufkirchen, D
- dNTP Mix (5 mM dATP, 5 mM dGTP, 5 mM dCTP, 500  $\mu$ M dTTP) Fa. Promega GmbH, Mannheim, D
- Sheared salmon sperm DNA Fa. Life Technologies, Grand Island, N.Y., USA
- Non-radioactive Biotin-16-dUTP (1 mM) Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D

### 2.1.5 Lösungen, Medien, Puffer

#### Primärosteoblastenmedium:

Zu MEM-Earl und HAM's F12 (1:1) wurden 10%-iges hitzeinaktiviertes FBS (Fötales Bovines Serum),  $\beta$ -Glycerophosphat (0,05 mM) und L-Ascorbat-2-Phosphat (0,05 mM) beigemischt. Zusätzlich wurden Antibiotika Penicillin / Streptomycin (100 U/ml und 10.000 E / 10.000  $\mu$ g/ml) in einer 1:100 Verdünnung zugegeben.

#### RNAse freies Wasser:

Zur Herstellung von RNAse-freiem Wasser inkubierten Aqua Dest mit 0,1% DEPC (Diethylpyrocarbonat) über Nacht bei Raumtemperatur. Danach musste der Ansatz 3x autoklaviert werden, um Spuren von DEPC zu zersetzen.

#### Puffer-BN für Mikroarray:

Der Puffer-BN wurde für den RT-Cocktail (Mikroarray) aus 50  $\mu$ l 10X RT-Puffer, 1  $\mu$ l DTT (1M) und 50  $\mu$ l dNTP-Mix hergestellt. Die Lagerung erfolgte bei  $-20^{\circ}\text{C}$ . Im GEArray™ Q Series KIT for non-radioactive (chemiluminescent) Detection von Fa. SuperArray Bioscience Corp. (Frederick, USA) war der 10X RT-Puffer inbegriffen. Für den dNTP-Mix wurden in 84,5  $\mu$ l deionisiertem Wasser jeweils 5  $\mu$ l dATP (100 mM), dCTP (100 mM), dGTP (100 mM) und 0,5  $\mu$ l dTTP (100 mM) gegeben. DTT (Dithiothreitol) ist ein Reagenzium, welches Disulfidbindungen von Enzymen und anderen Proteinen reduziert und Monothiole in ihrem reduzierten Zustand erhält.

#### TRIZ-Puffer

In 1 l DEPC-Wasser wurden 8,78 g NaCl, 0,9 g Trizma Base und 6,6 g Trizma Hydrochlorid gegeben. Ein pH-Wert von 9,4 bzw. von 7,4 wurde mit NaOH bzw. HCl eingestellt.

#### 20X SSC-Lösung:

175,3 g NaCl und 88,2 g  $\text{Na}_3\text{Citrat}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  wurden in 900 ml dest $\text{H}_2\text{O}$  gelöst. Mit HCl (1M) wurde ein pH von 7,0 eingestellt und mit destilliertem  $\text{H}_2\text{O}$  auf 1000 ml aufgefüllt.

#### 20% SDS-Lösung:

200 g SDS wurde mit  $\text{H}_2\text{O}$  auf 1000 ml aufgefüllt. Um das SDS zu lösen, wurde es auf  $65^{\circ}\text{C}$  erhitzt.

#### Waschlösung I und II für Mikroarray:

Für 10 ml Waschlösung I wurden 1 ml SSC und 0,5 ml SDS in 8,5 ml deionisiertes Wasser gegeben.

Für 10 ml Waschlösung II wurden 0,05 ml SSC und 0,25 ml SDS in 9,7 ml deionisiertes Wasser gegeben.

## 2.2 METHODEN

### 2.2.1 Die Isolierung und Kultivierung humaner Primärosteoblasten

Die Primärzellen wurden im Rahmen einer Operation (Knie-TEP und Hüft-TEP) von normalerweise zu verwerfenden Gewebe gewonnen (Spender: weiblich, Geburtsjahr: 1916, keine Anzeichen oder Symptome einer Knochen- oder Autoimmunkrankheit). Dabei wurde keine zusätzliche Materialentnahme benötigt und es entstanden für den Patienten keine zusätzlichen Schmerzen oder längere OP-Zeiten. Die Entnahme wurde von der zuständigen Ethikkommission genehmigt (Nr.: 193/2002).

Modifiziert nach Freschney (1990a) wurde das Knochengewebe fein zerkleinert. Fettgewebe und nekrotisches Gewebe wurden grob entfernt, wobei darauf geachtet wurde, die Schädigung des Knochengewebes so gering wie möglich zu halten. Es folgten Waschvorgänge mit PBS, um Fettgewebe und Erythrozyten zu entfernen. Die Knochengewebsstückchen wurden mit Kollagenase II (0,7 g/ml; 170 U/mg) für 1 Stunde bei 37°C vorbehandelt. Nach Zentrifugation (600xg, 10 min) wurde die Kollagenase II von der dispergierten Zellsuspension entfernt, das Zellsediment mit Medium resuspendiert und in geeigneten Zellkulturflaschen ausgesät.

Die isolierten primären Zellen wurden in Zellkulturschalen unter Zellkulturbedingungen (95% Luftfeuchtigkeit; 5% CO<sub>2</sub> gesättigt; 37°C) und mit Medium für Primärosteoblasten kultiviert. Auf die Zugabe von Hormonen wurde verzichtet, um den Einfluss von Wachstumsfaktoren in einem Versuchsansatz besser überprüfen zu können. Die Zelldichte wurde dabei so gewählt, dass die Zellen wenig Zell-Zell-Kontakte besaßen (10<sup>4</sup> Zellen pro cm<sup>2</sup>). Dieses semikonfluente Wachstum ermöglichte die Proliferation. Die Zellzahl, Vitalität und Morphologie wurden regelmäßig überprüft. Der Medienwechsel erfolgte alle 2 - 3 Tage, wobei in der ersten Woche nur die Hälfte des Mediums ersetzt wurde, um die Adhäsion der Primärosteoblasten zu ermöglichen. blieb ihre Vitalität über einen längeren Zeitraum erhalten, wurden sie kryokonserviert. Alle Lösungen und Medien wurden bei 37°C eingesetzt.

### 2.2.2 Der Stimulationsversuch

Die Kultivierung der primären osteoblastenartigen Zellen erfolgte in 24-Well-Kulturschalen. In einem 15-Tageversuch wurden vier Versuchsgruppen mit je fünf Wells untersucht. Zwei Wells dienten der RNA-Isolierung und drei Wells der Zellzahlbestimmung. Die Zelldichte betrug zum Zeitpunkt der Aussaat 1x10<sup>5</sup> Zellen / Well (konfluente Aussaat). Es folgte eine Adaptationsphase, in welcher die Zellen die Glycocalyx wieder aufbauten und sich an der Unterlage lagerten, das Zytoskelett reorganisierten und Enzyme und Strukturproteine synthetisierten (Freschney, 1990b). Das Prinzip der Kontakthemmung, erstmals beschrieben von Abercombie und Heaysman (1954), sorgte für das Erlöschen der proliferativen Aktivität, die Differenzierung wurde induziert und die Zellen konnten Zellmatrix bilden. Drei Tage nach Start der Kultur erfolgte die Applikation der Titan-Kirschner-Drähte mit Hilfe von Nunc Tissue Culture Membranen,

wie in Abbildung 2.1 dargestellt. Die Drähte waren unbeschichtet, mit Poly (D,L-Laktid) (PDLLA) beschichtet oder mit PDLLA inkorporierten BMP-2 (5%  $w/w$ ; 25  $\mu\text{g}$  bei einer Gesamtlänge von 1,4 cm) beschichtet. Die Membranen besaßen eine Porengröße von 0,4  $\mu\text{m}$ . Somit blieben die Drähte vom Zellmonolayer abgegrenzt und die Zellen konnten nicht das Implantat bewachsen, die Lösungskinetik beeinflussen und wurden keinen Scherwirkungen ausgesetzt.

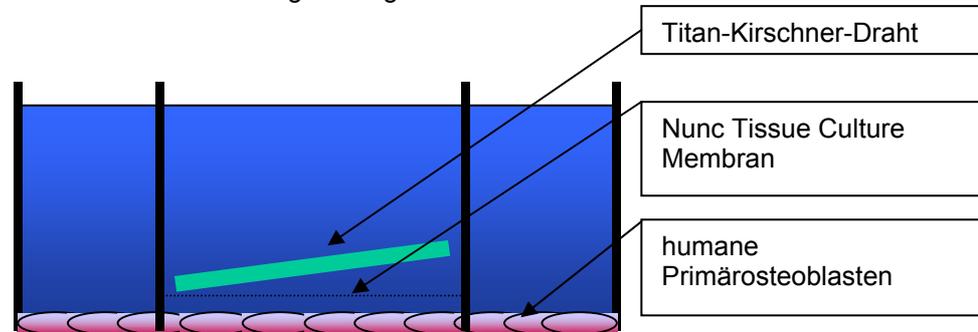


Abb. 2.1: Der Versuchsaufbau

Tabelle 2.1: Die Versuchsgruppen

Kontrollgruppe	Tissue Culture Membran ohne Drähte
Titangruppe	Tissue Culture Membran mit Titan-Kirschner-Drähten
PDLLA-Gruppe	Tissue Culture Membran mit PDLLA-beschichteten Titan-Kirschner-Drähten
PDLLA-BMP-2-Gr.	Tissue Culture Membran mit PDLLA-BMP-2-beschichteten Titan-Kirschner-Drähten

Die Zellen inkubierten unter Zellkulturbedingungen im Brutschrank (5%  $\text{CO}_2$ , 95% Luftfeuchtigkeit und 37°C). Die Analysen erfolgten zu den Zeitpunkten Tag 0, 5, 10 und 15 nach Applikation der Titan-Kirschner-Drähte. Die Medientnahme und der Mediumwechsel wurden täglich zu einem Drittel vorgenommen. Es wurde nicht das gesamte Mediumvolumen (1,34 ml) des jeweiligen Wells gewechselt, damit das BMP-2 und die von den Zellen produzierten Proteinmengen nicht zu stark verdünnt wurden.

### 2.2.3 Die RNA - Isolierung

Die Isolierung der RNA erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit von Quiagen an den Versuchstagen 0, 5, 10 und 15. Es wurde nach dem Protokoll „RNeasy Mini Protocols for Isolation of Total RNA from Animal Cells“ aus dem RNeasy Mini Handbook (Third Edition, Juni 2001; S. 30-35) gearbeitet. Bei diesem Kit wurde durch ein spezielles Salz-Puffer-System (RLT-Puffer) die Hydrathülle der RNA entzogen. Nach Angaben des Herstellers enthielt dieser verwendete RLT-Puffer Guanidin-Isothiocyante (GITC), welche RNasen inaktivierte. Die RNA-Moleküle lagerten sich dann an die OH-Gruppen einer Silikat-Membran. Es folgten Waschvorgänge, bei denen die restlichen ungebundenen Bestandteile entfernt wurden. Zum Schluss konnte mit Hilfe von RNase-freiem Wasser die RNA eluiert werden.

#### **2.2.4 Die Bestimmung der RNA-Konzentration**

Am Spektralphotometer erfolgten die Quantifizierung und die Bestimmung der Reinheit der isolierten RNA. Es wurde eine Dreifachbestimmung der gleichen Probe durchgeführt. Die RNA-Lösung wurde mit TRIZ-Puffer 1:40 verdünnt und gut durchgemischt. Das Minimalvolumen für eine Messung betrug 80 µl. Als Referenzwert dienten 80 µl TRIZ-Puffer. Das Absorptionsmaximum für Nukleinsäuren wurde bei einer optischen Dichte (OD) von 260 nm und das für Proteine bei einer OD von 280 nm angenommen. Der OD-Wert von 260 nm wurde für die Quantifizierung der RNA herangezogen. Die Reinheit ergab sich aus dem Verhältnis der OD-Werte von 260 nm zu 280 nm und sollte zwischen 1,7 und 2,0 liegen.

#### **2.2.5 Die DNase I – Behandlung**

Für die qualitativen und quantitativen Untersuchungen der Genexpression war es wichtig, dass die verwendete RNA keine DNA-Kontamination enthielt, da diese zu falsch-positiven Ergebnissen führen würde. Die DNase I –Behandlung erfolgte mit Desoxyribonuclease I (DNase I), Amplification Grade der Firma Life Technologies, Invitrogen, nach Herstellerangaben, wobei die einzel- und doppelsträngigen DNAs in Oligo-Desoxyribonukleotide gespalten wurden. Die verwendeten Puffer, die deaktivierten DNasen und das EDTA verblieben in der Lösung zusammen mit der RNA und wurden damit Bestandteile der nachfolgenden Untersuchungen. Laut Herstellerangaben sollen diese Bestandteile die RNA-Reinheit nicht beeinträchtigen.

#### **2.2.6 Die Lyophilisierung**

Bei der Lyophilisierung erfolgte die Konservierung labiler biologischer Substanzen durch Einfrieren und anschließender Entwässerung unter Hochvakuumbedingungen. Die Voraussetzung für das Mikroarrayverfahren war eine RNA-Menge von 1,5 µg in maximal 9 µl RNase-freiem Wasser.

#### **2.2.7 Die Mikroarraytechnologie zur Analyse der Genexpressionen**

Der verwendete Mikroarray, GEArray™ Q Series (Superarray Inc., USA), war speziell für humane Gene der Osteogenese ausgelegt. An den Versuchstagen 0, 5, 10 und 15 wurden mit Hilfe der Mikroarraytechnologie die Genexpressionen qualitativ untersucht. Die Durchführung der Mikroarrays von den jeweiligen Gruppen eines Versuchstages erfolgte gleichzeitig. Für den Tag 10 der PDLLA-BMP-2-Gruppe wurde ein zweiter Array ausgerichtet um die Reproduzierbarkeit der Methode zu evaluieren.

### 2.2.7.1 Das Prinzip der Mikroarraytechnologie

Beim Mikroarrayverfahren wurden die extrahierten mRNA-Moleküle mit einer Reversen Transkriptase in eine komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Mit Hilfe einer linearen Polymerase-Reaktion (LPR) erfolgte deren Amplifizierung. Im Gegensatz zur Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurden bei der LPR nur forward-Primer benutzt. In jedem Zyklus wurde nur der Strang der „originalen cDNA“ als Schablone (Template) genutzt und repliziert. Während eines Hybridisierungsprozesses fanden komplementäre Basenpaarungen statt, dazu band die cDNA an komplementären DNA-Sonden, welche auf einer Nylon-Trägermembran befestigt waren. Die DNA-Sonden entsprachen den humanen Genen der Osteogenese. Es folgten Waschvorgänge und die Markierung der gebundenen DNA-Stränge. Über chemilumineszente Darstellung konnten die Gene dann durch ein Röntgenbild analysiert werden. Das Prinzip des Mikroarrayverfahrens wird in Abbildung 2.2 verdeutlicht.

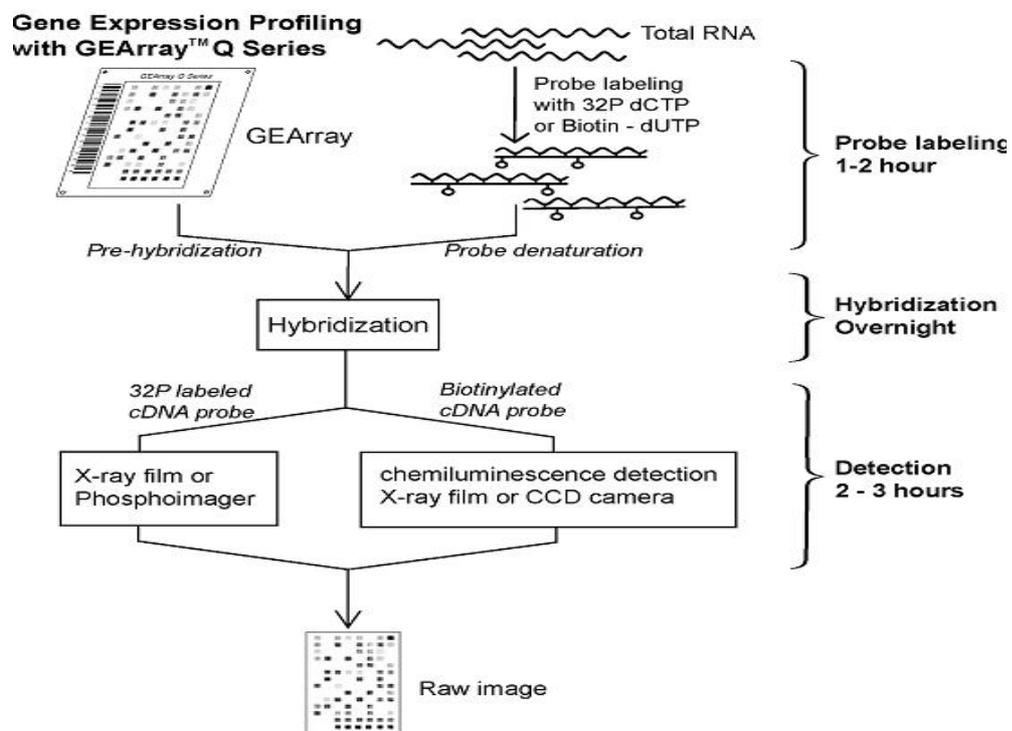


Abb. 2.2: Das Prinzip des Mikroarrayverfahrens

[übernommen vom User Manual GEMatrix™ Q and S Series Kits; Superarray Bioscience Corp. USA; Version 7.1]

Mit jeder GEMatrix™ Q Series Membran konnten 96 humane Gene der Osteogenese analysiert werden. Zusätzlich waren die Membranen mit drei Negativkontrollen (pUC 18 DNA), drei Blanks und zehn Housekeepinggenen, wie  $\beta$ -Actin, Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase (GAPDH), Cyclophilin A und dem ribosomalen Protein L13a, versehen. Housekeepinggene (HKGs) sind Gene, die in jeder Körperzelle konstant expremiert werden und für universelle Proteine kodieren, welche der Aufrechterhaltung des Stoffwechsels dienen, für Proteine des Zytoskletts, für ribosomale RNA oder Histone stehen. Sie dienten als Vergleichswert bei der Auswertung verändert expremierter Gene.

### 2.2.7.2 Die Mikroarraymethode

#### a) Die cDNA-Synthese mit Biotin-16-dUTP

##### Die Reverse-Transkriptase-Reaktion (RT-Reaktion)

Die Herstellung der cDNA lief nach folgendem Schema ab:

Ein kurzes Thymin-Oligonukleotid (Primer), das zum Poly(A)-Schwanz am 3'Ende der mRNA komplementär war, wurde zunächst an die mRNA hybridisiert. Dieses Oligonukleotid fungierte als Ausgangssequenz für die Reverse Transkriptase. Die Reverse Transkriptase, eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, kopierte dann die mRNA in eine komplementäre DNA-Kette (cDNA).

Zur Vorbereitung des Annealing-Mixes wurde benötigt:

Tabelle 2.2: Die Zusammensetzung des Annealing-Mixes

Gesamt-RNA	1,5 µg
Puffer P	1 µl
RNase-freies Wasser	zum Auffüllen auf 10 µl

- Die Reagenzien wurden in ein steriles PCR-Röhrchen gegeben, gut mit der Pipette gemischt und kurz zentrifugiert.
- Der Annealing-Mix wurde für 3 Minuten im Thermocycler auf 70°C erhitzt.
- Danach wurde der Mix für 10 Minuten auf 37°C warm gehalten.

Für den RT-Cocktail eines Mikroarrays wurde benötigt:

Tabelle 2.3: Die Zusammensetzung des RT-Cocktails

	1 Array	2 Arrays	4 Arrays
Puffer BN	4 µl	8 µl	16 µl
RNase-freies Wasser	4 µl	8 µl	16 µl
RNase Inhibitor (RI)	1 µl	2 µl	4 µl
Reverse Transkriptase (MMLV)	1 µl	2 µl	4 µl
Endvolumen	10 µl	20 µl	40 µl

- Der RT-Cocktail wurde für 1 Minute im Thermocycler auf 37°C erwärmt.
- Für jeden Array wurden 10 µl des RT-Cocktails zu 10 µl des Annealing-Mix gegeben. Mit der Pipette wurde gut gemischt, dann kurz zentrifugiert.
- Das RT-Reaktionsgemisch inkubierte 25 Minuten bei 37°C im Thermocycler.
- Danach wurde der Mix für 5 Minuten auf 85°C erwärmt, um die Hydrolyse der RNA zu ermöglichen und die Reverse Transkriptase zu inaktivieren. Das Produkt der RT-Reaktion wurde bis zum nächsten Schritt auf Eis gestellt.

### Die Lineare Polymerase Reaktion (LPR)

Zunächst wurden die vorliegenden einzelsträngigen cDNAs von der DNA-Polymerase in doppelsträngige cDNAs kopiert. Die Anzahl der Zyklen betrug 30 bei allen durchgeführten Mikroarrays.

Die Lineare Polymerase Reaktion wurde über Temperaturführung gesteuert. Jeder Reaktionszyklus begann mit einem kurzen Erhitzen, um die beiden Stränge der DNA zu trennen. Nach der Trennung wurde die DNA in Gegenwart von forward-Primern abgekühlt. Dabei lagerten sich diese an komplementären Sequenzen der „originalen cDNA“. Ausgehend von den Primern erfolgte die DNA-Synthese mit Hilfe der DNA-Polymerase und den vier Desoxyribonukleosidtriphosphaten. In jedem Zyklus wurde nur der Strang der „originalen cDNA“ als Schablone genutzt und repliziert. Die neusynthetisierte Menge nahm mit zunehmender Zykluszahl linear zu. Die cDNA-Proben wurden mit Biotin-16-dUTP markiert.

Zur Vorbereitung des LPR-Cocktails wurden in einem sterilen PCR-Röhrchen gemischt:

Tabelle 2.4: Die Zusammensetzung des LPR-Cocktails

	<u>1 Array</u>	<u>2 Arrays</u>	<u>4 Arrays</u>
Puffer L	18 µl	36 µl	72 µl
Puffer AF	9 µl	18 µl	36 µl
Biotin-16-dUTP	2 µl	4 µl	8 µl
DNA Polymerase (LE)	1 µl	2 µl	4 µl
Endvolumen	30 µl	60 µl	120 µl

- Dieser Cocktail wurde gut mit der Pipette gemischt und kurz zentrifugiert.
- Für jeden Array wurden 30 µl des LPR-Cocktails zu jedem RT-Reaktionsprodukt beigemischt, gut gemischt und kurz zentrifugiert.
- Für die Lineare Polymerase Reaktion wurde der Thermocycler programmiert:
  - 85°C für 5 Minuten
  - 30 Zyklen: 85°C, 1 Minute; 50°C, 1 Minute; 72°C, 1 Minute
  - und zum Schluss einmalig nochmals 72°C für 5 Minuten.
- Danach musste die Lineare Polymerase Reaktion sofort mit 5 µl Puffer C pro Tube gestoppt und auf Eis gestellt werden.
- Die cDNA wurde für 2 Minuten im Thermocycler bei 94°C denaturiert.
- Danach wurden die Proben sofort auf Eis gestellt oder bei -80°C lagert, sie waren für die Hybridisierung vorbereitet.

## b) Die Hybridisierungen

Die Bildung eines Duplexmoleküls aus zwei komplementären Nukleinsäuresträngen wird als Hybridisierung bezeichnet (Mikosch, 1999). Die Hybridisierung ist demnach das Resultat der Wiederherstellung komplementärer Wasserstoffbrückenbindungen.

Auf einer Nylonträgermembran befanden sich die humanen DNA-Sonden der osteogenesespezifischen Gene. Um unspezifische Bindungen der Target-Gen-DNA (cDNA) zu verhindern, wurde die Nylonträgermembran mit Lachssperma-DNA beschichtet. In einem Prehybridisierungsprozess wurde die Lachssperma-DNA zunächst hitzedenaturiert und dann auf der Nylonträgermembran fixiert. Die immobilisierten Moleküle wurden anschliessend mit der cDNA-Probe hybridisiert. Die Target-Gen-DNA band ausschließlich an die spezifischen Sonden des Arrays. Nicht gebundene und nicht hybridisierte Moleküle wurden durch Waschschrte entfernt.

### Die Prehybridisierung:

- Die GEAhb-Hybridisierungslösung wurde auf 60°C im Hybridisierungssofen erwärmt. Dabei wurde die Flasche mehrmals gewendet, um eine komplette Lösung der Komponenten zu ermöglichen.
- 30 µl Lachssperma-DNA pro Array wurde für 5 Minuten bei 100°C im Thermocycler denaturiert und anschliessend auf Eis gelagert.
- Die Nylonträgermembran, die sich in einem Hybridisierungsröhrchen befand, wurde mit 5 ml deionisiertem Wasser befeuchtet, während GEAphehyb-Lösung vorbereitet wurde.
- Für jeden Array wurden die 30 µl hitzedenaturierte Lachssperma-DNA in 3 ml vorgewärmte GEAhb-Lösung gegeben. Die Endkonzentration der GEAphehyb-Lösung betrug 100 µg/ml.
- Diese GEAphehyb-Lösung wurde bis zu ihrem Gebrauch im Hybridisierungssofen auf 60°C warm gehalten.
- Das deionisierte Wasser wurde aus den Hybridisierungsröhrchen entfernt.
- 2 ml der GEAphehyb-Lösung wurden in ein Hybridisierungsröhrchen mit Nylonträgermembran gefüllt und für ein paar Sekunden vorsichtig geschüttelt.
- Die Röhrchen wurden in den Hybridisierungszylinder gegeben. Für 1 bis 2 Stunden erfolgten dann die Prehybridisierungen im Hybridisierungssofen bei 60°C mit einer Umdrehung von 5 bis 10 rpm.

### Die Hybridisierung:

- 0,75 ml vorgewärmte GEAphehyb-Lösung wurden für jeden Array in ein steriles Eppendorfgefäß vorgelegt. Dazu wurde die gesamte cDNA eines jeden Arrays gegeben, gut gemischt und bei 60°C im Hybridisierungssofen warm gehalten.
- Die GEAphehyb-Lösung wurde aus den Hybridisierungsröhrchen verworfen.

- Das gesamte Volumen der GEHyb-Lösung (mit dem beinhalteten Untersuchungsmaterial) wurde in das jeweilige Hybridisierungsröhrchen gegeben.
- Im Hybridisierungssofen erfolgte über Nacht die Hybridisierung bei 60°C mit einer Umdrehung von 5 bis 10 rpm.

#### Die Waschvorgänge:

- Die Membranen wurden je zweimal in ihrem Hybridisierungsröhrchen mit 5 ml Waschlösung I und danach mit 5 ml Waschlösung II gewaschen. Jeder Waschschrift wurde 15 Minuten lang, bei 60°C und einer Umdrehung von 20-30 rpm durchgeführt.

### **c) Die chemilumineszente Darstellung**

Die Detektion der Biotin-16-dUTP markierten Nukleotide erfolgte mit Streptavidin. Streptavidin war mit dem Enzym Alkalische Phosphatase konjugiert. Das Substrat bestand aus dem chemilumineszenten Substrat CDP-Star. Die Aktivität der alkalischen Phosphatase bewirkte die Abspaltung einer Phosphatgruppe vom Substrat. Dabei wurde Licht emittiert, was auf Röntgenfilmen detektiert wurde. Alle Schritte erfolgten bei Raumtemperatur. Die GEA-blocking-Solution Q und der 5X Puffer F wurden vor Gebrauch kurz im Wasserbad auf 37°C erwärmt und mehrmals gewendet.

#### Das Stoppen der Reaktion

- Nach dem letzten Waschschrift wurden 2 ml GEA-blocking-Solution Q in das Hybridisierungsröhrchen gegeben. Die Inkubation erfolgte 40 Minuten lang, bei einer Umdrehung von 20-30 rpm.

#### Die Bindung des Alkalische Phosphatase-konjugierten Streptavidins

- Es wurde der 1X Puffer F vorbereitet: Dazu wurden in ein Falcon Tube 40 ml deionisiertes Wasser und 10 ml 5X Puffer F gefüllt.
- Für den Bindungspuffer wurde in einem zweiten Falcon Tube die Alkalische Phosphatase 1:7500 in 1X Puffer F verdünnt.
- Die GEA-blocking-Solution Q wurde aus dem Hybridisierungsröhrchen verworfen und 2 ml des Bindungspuffers wurden hinein gefüllt. Die Inkubation erfolgt für 10 Minuten, bei einer Umdrehung von 5-10 rpm.

### Der Waschvorgang

- Jede Membran wurde viermal mit 4 ml 1X Puffer F für 5 Minuten mit geringer Umdrehung gewaschen.
- Danach erfolgte zweimal eine kurzzeitige Einwirkung von 3 ml Puffer G. Die Röhrchen wurden dabei langsam gewendet.

### Die Detektion

- 1 ml CDP-Star Chemilumineszenz-Substrat wurde in das Hybridisierungsröhrchen gegeben. Unter vorsichtigem Umwenden des Röhrchens inkubierte das Substrat bei Raumtemperatur für 2 bis 5 Minuten. Hierbei war es besonders wichtig, dass die Membran gleichmäßig mit dem Substrat bedeckt und für jeden Array das gleiche Zeitintervall gewählt wurde. Nur so konnte eine gleichmäßige Detektion der Gene gewährleistet werden.
- Das Substrat wurde danach verworfen. Mit Handschuhen und einer sterilen Pinzette wurde die Membran aus dem Röhrchen genommen und mit fusselfreiem Filterpapier abgetupft. Die Membranen wurden faltenfrei zwischen zwei Klarsichtfolien gelegt. Mit einem Folienschweißgerät wurden die Folienkanten zu geschweißt.
- Im Dunkeln inkubierten die Mikroarrays dann 2 bis 4 Stunden.

## 2.2.8 Die Datenverarbeitung und die Auswertung der Mikroarrays

Die Nylonträgermembran war 3,8 x 4,8 cm groß. Auf der blanken Arrayseite waren die Gene gebunden. Sie zeigte zum Detektor, der Röntgenfolie. Je nach Qualität des Röntgenbildes verblieben die Folien 10-30 Sekunden in der Röntgenkassette. Es folgte die Entwicklung. Das Röntgenbild wurde eingescannt. Mit Hilfe des ACDSee-Programms wurde eine erste Bildbearbeitung zur optimalen Intensitäts-, Helligkeits-, Kontrasteinstellung vorgenommen. Mit dem Image Quant 5.2-Programm wurden die unterschiedlichen Grauintensitäten analysiert. Abbildung 2.3 zeigt ein beispielhaftes Röntgenbild der Nylonträgermembran und Abbildung 2.4 das Vorgehen bei der Auswertung des Röntgenbildes.

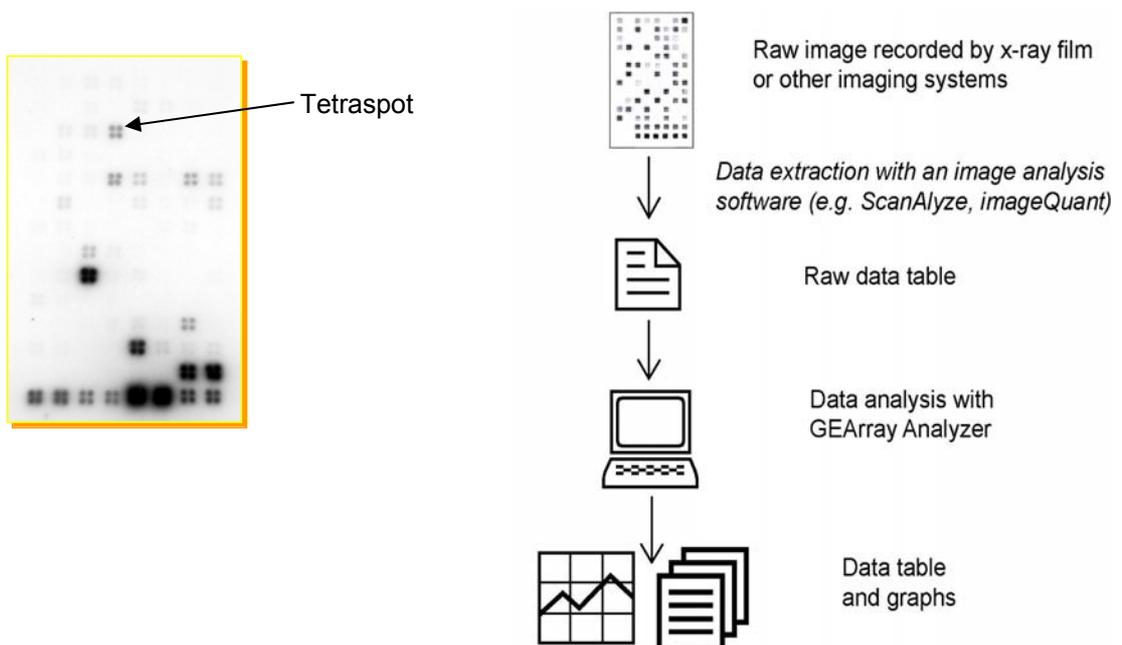


Abb. 2.3: Ein Röntgenbild einer Mikroarray-Nylonträgermembran [übernommen von GEArray; Superarray Inc. USA]

Abb. 2.4: Die Auswertung eines Mikroarrays [übernommen von GEArray; Superarray Inc. USA]

### a) Die Hintergrundkorrektur

Die chemilumineszente Substanz wurde bei allen durchgeführten Arrays mit der gleichen Einwirkzeit appliziert. Die Expositionsdauer des Röntgenfilmes war ebenfalls identisch, um eine vergleichbare Hintergrundintensität zu erlangen. Auf dem Röntgenbild waren unterschiedliche Grauintensitäten, als Folge variierender Genexpression, zu erkennen. Alle 112 cDNA-Fragmente wurden als „Tetraspotformat“ abgebildet (s. Abb. 2.3). Die Analyse mit dem Image-Quant 5.2 Programm ergab u.a. den mittleren Pixelwert (Averagewert). Diese Averagewerte wurden gegen den Hintergrund korrigiert, indem jeweils der geringste Averagewert der Negativkontrollen bzw. der Blanks subtrahiert wurde. Der Intensitätsbereich

zwischen dem kleinsten Intensitätswert von den auszuwertenden 96 mRNA-Expressionen und dem jeweiligen geringsten Negativ- / Blankwerte wurde somit nicht in die Auswertung einbezogen.

$$\text{hintergrundkorrigierter Wert} = \text{Averagewert} - \text{kleinster Negativ- bzw. Blankwert}$$

### b) Die Normalisierung gegenüber Housekeepinggenen

Die meisten Arbeitsgruppen beziehen ihre Ergebnisse auf den Mittelwert mehrere Housekeepinggene (HKGs), die auf der Mikroarraymembran vertreten sind (Beck et al., 2001; Pacicca et al., 2003; Vandesompele et al., 2002). Bei dem verwendeten GEArrays waren diese 4 Housekeepinggene insgesamt 10mal vertreten, von diesen 10 wurde der Mittelwert für die Normalisierung verwendet.

$$\text{normalisierter Wert} = \frac{\text{hintergrundkorrigierter Wert}}{\text{Mittelwert der 10 Housekeepinggene}}$$

### c) Die Auswertung der Ergebnisse

Die hintergrundkorrigierten und normalisierten Ergebnisse dienen als Ausgangswerte: Für die Analyse der unbeeinflussten Primärosteoblasten wurde von den 96 zu untersuchenden mRNA-Expressionswerten jeweils die Ratio gegenüber dem Versuchsbeginn (Tag 0) ermittelt. Für die Analyse der Versuchsgruppen (Titan-, PDLLA-, PDLLA-BMP-2-Gruppen) wurde die Ratio derer mRNA-Expressionen gegenüber den Kontrollgruppenexpressionen berechnet.

$$\text{Ratio} = \frac{\text{Kontrollgruppenergebnis des Versuchstages } x}{\text{Ergebnis des Versuchsbeginns Tag 0}}$$

$$\text{Ratio} = \frac{\text{Versuchsgruppenergebnis des Versuchstages } x}{\text{Kontrollgruppenergebnis desselben Versuchstages } x}$$

Um Veränderungen und damit Tendenzen der mRNA-Expressionsquantität gegenüber einer Vergleichsgruppe besser einzuschätzen, wurde für die Ratio ein Schwellenwert  $\geq 2$  bzw.  $< 0,5$  festgelegt. Es erfolgte eine Einteilung der Ratioergebnisse: 2,0 bis 5,0 (+), 5,1 bis 10,0 (++) und  $\geq 10,1$  (+++) sowie  $< 0,5$  (-), s. Tabelle 2.5, Zeile 1-4.

Für eine abgesicherte Aussage der erhöht exprimierten mRNAs (Ratio  $\geq 2$ ) wurde zusätzlich ein subjektiver optischer Vergleich der Expressionen vorgenommen (optischer Score 1-5). Dazu wurden die eingescannten Röntgenbilder am PC analysiert. Der Scorewert 1 stand für keine sichtbare Intensität, der Wert 5 hingegen für eine stark sichtbare Intensität des jeweiligen Genes auf dem Röntgenbild. Alle

mRNA-Expressionen wurden mit diesem optischen Scorewert 1 bis 5 bewertet, wobei nur die Scorewerte 2 bis 5 aufgelistet wurden, wenn zusätzlich eine Ratio  $\geq 2$  bestand (Zeile 5 bis 8; Tabelle 2.5). So konnten Intensitätsänderungen von geringen Messwerten, die eine große Ratio ergaben, besser validiert werden, wenn sie optisch auf dem Array bestätigt (Scorewert  $\geq 2$ ) bzw. nicht bestätigt wurden (Scorewert  $< 2$ ). Eine starke Expressionssteigerung wurde nur eingeschränkt bestätigt, wenn kein optischer Scorewert  $\geq 2$  registriert wurde.

Neben dieser optischen Bewertung wurden die Ergebnisse mit einer Ratio  $\geq 2$  erneut analysiert, um Veränderungen gegenüber GAPDH gesondert darzustellen und mit anderen Studienergebnissen vergleichbar zu machen. Die 96 hintergrundkorrigierten Averagewerte wurden zum Mittelwert des hintergrundkorrigierten Housekeepinggens GAPDH betrachtet. Kriterium war eine mindestens 50%-ig hohe Expression von GAPDH (Zeile 9; Tabelle 2.5). GAPDH ist ein sehr hoch expremiertes Housekeepinggen. Wenn eine erhöhte Expression (Ratio  $\geq 2$ ) ermittelt wurde und zusätzlich diese mRNA-Expression mehr als der 50%-igen GAPDH-Expression entsprach, so war daraus dessen besondere Relevanz für weitere molekulare Funktionen in den Primärosteoblasten ersichtlich.

hintergrundkorrigierter Wert > die 50%-ige GAPDH-Expression

Tabelle 2.5: Die Zeichenerläuterung für die Darstellung der Mikroarrayergebnisse

+	erhöhte Expression; Ratio 2,0fach bis 5,0fach
++	erhöhte Expression; Ratio 5,1fach bis 10fach
+++	erhöhte Expression; Ratio größer als 10,1fach
-	verminderte Expression; Ratio kleiner 0,5fach
2	optischer Scorewert von 2
3	optischer Scorewert von 3
4	optischer Scorewert von 4
5	optischer Scorewert von 5
X	mindestens 50% der GAPDH-Expression

Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Mikroarraytechnologie wurden von der PDLLA-BMP-2-Gruppe des 10. Versuchstages zwei Mikroarrays angefertigt. Verglichen wurden die Ergebnisse der optischen Scoreauswertungen sowie die hintergrundkorrigierten, normalisierten Intensitäten. Es wurde die Differenz der Intensitäten berechnet, die Ratio der Intensitäten ermittelt und Mittelwerte gebildet. Ziel war es außerdem für jeden optischen Scorewert einen Intensitätsbereich der hintergrundkorrigierten, normalisierten Werte zu bestimmen. Zusätzlich wurden die mRNA-Intensitäten der beiden Gruppen mit dem Korrelationskoeffizienten nach Bravais-Pearson bewertet.

Korrelationskoeffizient nach Bravais-Pearson =

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \cdot \sqrt{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}}$$

### 3 DIE MIKROARRAYERGEBNISSE

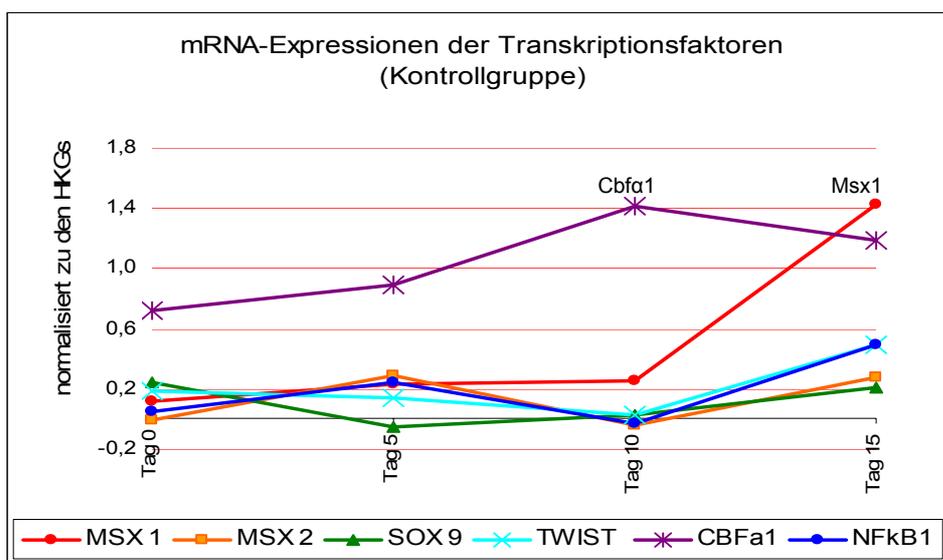
#### 3.1 Das Genexpressionsmuster humaner Primärosteoblasten *in vitro* - Die Kontrollgruppe im Verlauf des 15-Tageversuches

Humane Primärosteoblasten (hPOBs) wurden mit einem speziellen Primärosteoblastenmedium für drei Tage vorkultiviert. Danach erfolgten zu den Versuchstagen 0, 5, 10 und 15 die Isolierung der RNA und die Analyse der mRNA-Expressionen mit der Mikroarraytechnologie. In den Diagrammen III.1 bis III.12 werden die einzelnen Mitglieder der Genfamilien mit ihren hintergrundkorrigierten und zu den Houskeepinggenen normalisierten mRNA-Expressionen zu den jeweiligen Versuchstagen grafisch im Verlauf dargestellt.

##### 3.1.1 Die Transkriptionsfaktoren

In der Genfamilie der Transkriptionsfaktoren waren eine mRNA-Expressionssteigerung des Osteoblastenmarkers CBF $\alpha$ 1 bis zum Maximalwert am Tag 10 und eine Abnahme zum Tag 15 zu beobachten. Beim Expressionsverlauf vom Transkriptionsfaktor MSX1 zeigte sich ein erhöhter Wert zum Tag 15. Neben CBF $\alpha$ 1 (Tag 10 und Tag 15) wurde auch MSX1 (Tag 15) zu einem Prozentsatz von mehr als 50% der GAPDH-Expression expremiert. Die NF $\kappa$ B1-mRNA-Expressionen waren zu den Tagen 5 und 15 gering erhöht, ähnlich verhielt es sich mit der MSX2-mRNA-Expression. Die Expressionen von SOX9 und TWIST sanken vom Tag 0 bis zum Tag 10 und stiegen danach zum Tag 15 leicht an. Die Ergebnisse der auf dem Array vertretenden Transkriptionsfaktoren sind im Diagramm III.1 dargestellt.

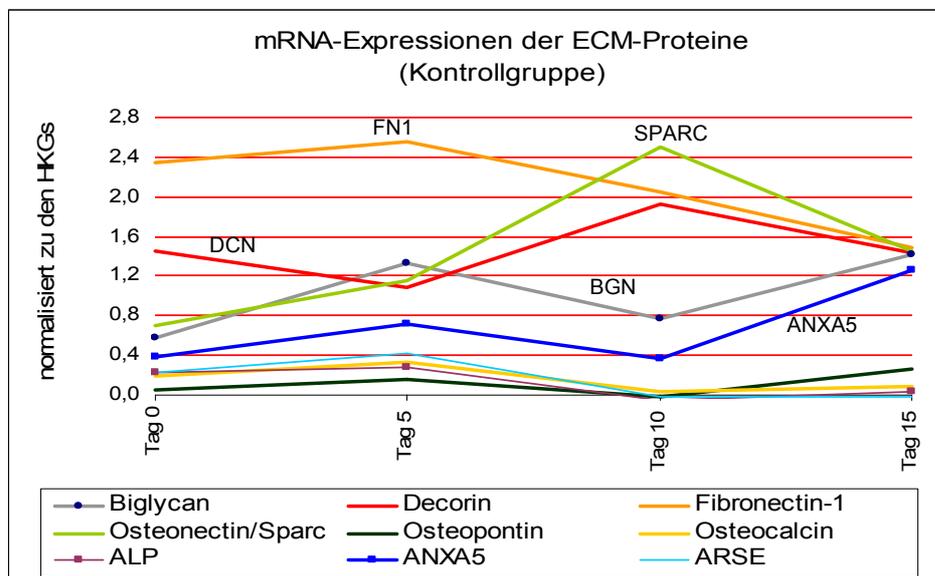
Diagramm III.1 Grafische Darstellung der Genfamilie der Transkriptionsfaktoren der Kontrollgruppe über den Versuchsverlauf



### 3.1.2 Die extrazellulären Matrixproteine

Die mRNA-Ergebnisse der ECM-Proteine sind in den Diagrammen III.2 bis III.4 dargestellt. In der Genfamilie der nichtkollagenen ECM-Proteine besaßen Fibronectin-1 (FN1) und Decorin (DCN) zum Tag 0 die höchsten Expressionen der ECM-Proteine (Diagramm III.2). Diese beiden zeigten als einzige mRNA-Expressionen am Versuchsbeginn eine Expressionshöhe von mehr als 50% der GAPDH-Expression. Am Tag 5 wurde bei der mRNA-Expression von Fibronectin ein Maximum und von Decorin ein Minimum beobachtet. Die Werte näherten sich zum Tag 10 einander an und fielen dann zum Tag 15. Über den gesamten Versuchsverlauf vom Tag 0 bis zum Tag 15 waren Decorin und Fibronectin mit einer größer als 50%-igen hohen Expression im Vergleich zur GAPDH-Expression vertreten. Am Versuchstag 5 wurde, neben Decorin und Fibronectin, auch bei Biglycan (BGN) und Osteonectin (SPARC) eine größer als 50%-ige GAPDH-Expression beobachtet. Am Versuchstag 10 gehörten zu diesem Kriterium Decorin, Fibronectin und Osteonectin (SPARC). Die am höchsten exprimierte mRNA der ECM-Proteine am Tag 10 war Osteonectin. Dessen Expression stieg vom Tag 0 an und fiel zum Tag 15 wieder ab. Biglycan (BGN) und Annexin V (ANXA5) besaßen ähnliche mRNA-Expressionsverläufe mit jeweils einem Maximum an den Tagen 5 und 15. Die mRNA-Expressionen von Osteopontin, ARSE und ALP waren mit dem Osteocalcin (BGLAP)-Verlauf vergleichbar, wobei sich wenig Expressionsveränderungen über den 15-Tageversuch herauskristallisierten. Am Versuchstag 15 zeigten dann Decorin, Fibronectin, Annexin, Biglycan und Osteonectin eine Expressionshöhe von mehr als der 50%-igen GAPDH-Expression.

Diagramm III.2 Grafische Darstellung der Genfamilie der ECM-Proteine der Kontrollgruppe über den Versuchsverlauf



Die mRNA-Expressionen für die Kollagentypen 1A1, 2A1, 4A3, 4A4, 4A5, 7A1, 9A2, 10A1, 12A1, 15A1, 16A1, 17A1, 18A1 und 19A1 zeigten alle einen ähnlichen Expressionsverlauf über den 15-Tageversuch (s. Diagramm III.3). Minimalwerte waren an den Versuchstagen 0 und 10 und Maximalwerte an den Versuchstagen 5 und 15 zu verzeichnen. Vor allem die mRNA-Expression von Kollagen 12A1 hob sich deutlich mit erhöhten Expressionen von den anderen Expressionsverläufen ab. Die Kollagentypen 16A1 und 18A1 spiegelten zum Tag 15 ebenfalls gesteigerte mRNA-Expressionen wider.

Die mRNA-Expressionen für die Kollagentypen 3A1, 5A1, 11A1 und 14A1 (Diagramm III.4) zeigten ein abweichendes Verhalten gegenüber den im Diagramm III.3 dargestellten Kollagentypen. Die Kollagentypen 11A1 und 14A1 besaßen über den gesamten Versuchsverlauf hinweg steigende mRNA-Expressionsstärken. Auch Kollagen 5A1 zeigte einen erhöhten mRNA-Expressionsverlauf, jedoch nur bis zum Tag 10 und eine, gegenüber dem Tag 10, gleichbleibende Expression zum Tag 15. Die Kollagen 3A1-mRNA-Expression fiel zum Tag 5 und wies am Tag 10 sein Maximum auf. Im Vergleich zur GAPDH-Expression lassen sich mit einer Expressionsstärke von mehr als 50% aufzählen: Kollagen 3A1 am Tag 5; Kollagen 3A1 und 5A1 am Tag 10; Kollagen 3A1, 5A1, 11A1, 12A1, 14A1 und 16A1 am Tag 15.

Diagramm III.3 Grafische Darstellung der Genfamilie der Kollagene, Typen 1A1, 2A1, 4A3, 4A4, 4A5, 7A1, 9A2, 10A1, 12A1, 15A1, 16A1, 17A1, 18A1, 19A1, der Kontrollgruppe über den Versuchsverlauf

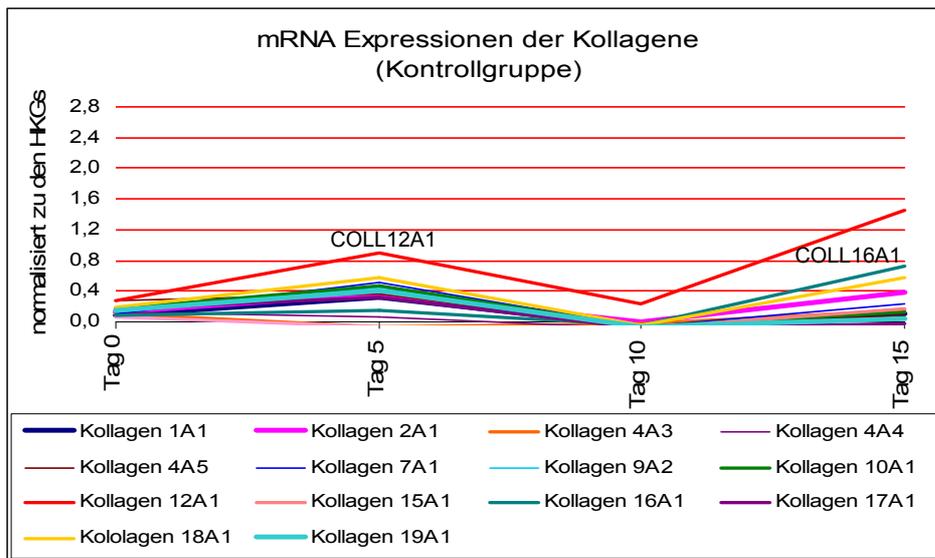
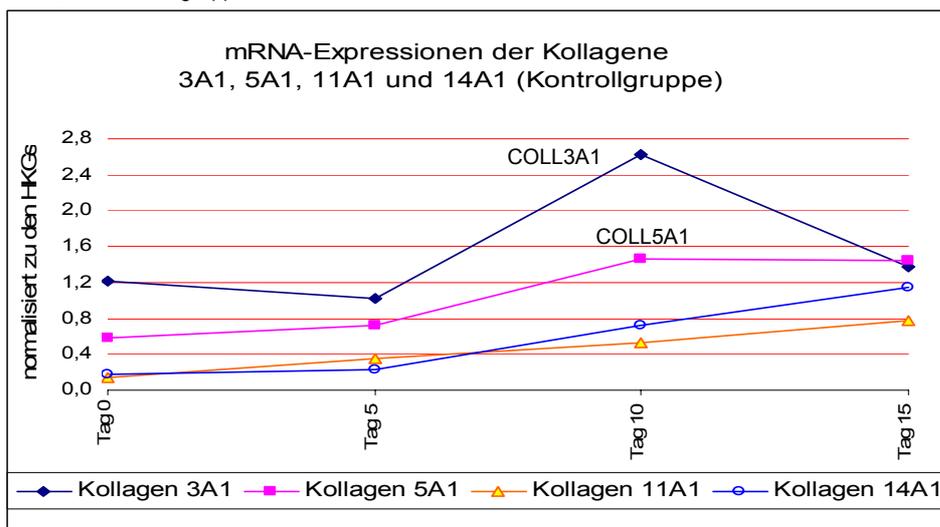


Diagramm III.4 Grafische Darstellung der Genfamilie der Kollagene, Typen 3A1, 5A1, 11A1, 14A1, der Kontrollgruppe über den Versuchsverlauf

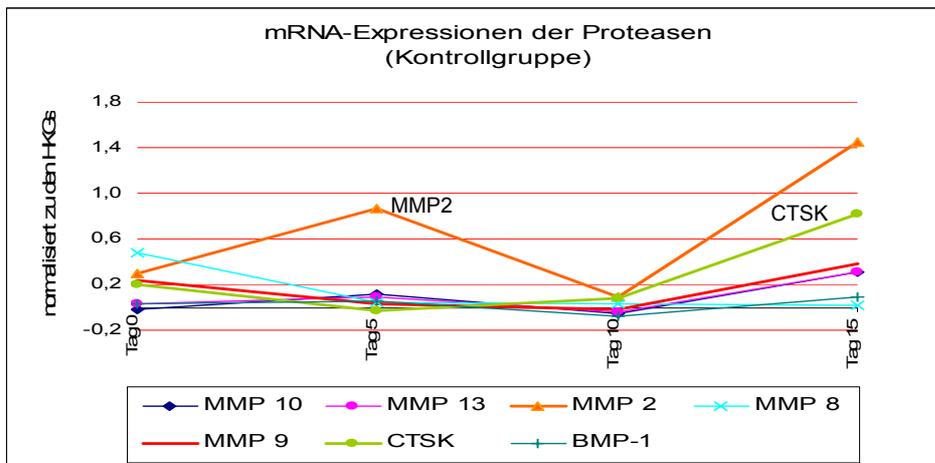


(Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde auf die römische Bezifferung der Kollagentypen in den Diagrammen verzichtet und auf arabische Zahlen zurückgegriffen.)

### 3.1.3 Die Proteasen und Heat-Shock-Proteine

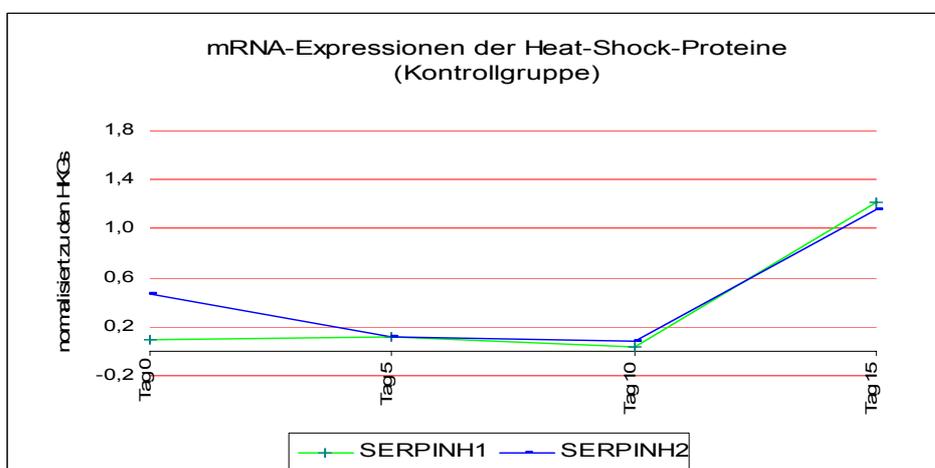
In der Genfamilie der Proteasen war besonders MMP2 zu den Tagen 5 und 15 hoch expremiert. Minimalwerte wurden an den Tagen 0 und 10 verzeichnet. MMP13, MMP10 und BMP-1 nahmen gemeinsam einen fast identischen Verlauf an: mit leicht erhöhten mRNA-Expressionen an den Tagen 5 und 15. Die MMP9-mRNA-, MMP8-mRNA- und CTSK-mRNA-Expressionen sanken zu den Tag 5 und 10, die von MMP9 und CTSK stiegen dann zum Tag 15 wieder. Die Grafen sind im Diagramm III.5 dargestellt. Im Vergleich zur GAPDH-Expression zeigte sich zum Tag 15 eine mehr als 50%-ige Expression bei CTSK und MMP2.

Diagramm III.5 Grafische Darstellung der Genfamilie der Proteasen der Kontrollgruppe über den Versuchsverlauf



Die Expressionen der Heat-Shock-Proteine sind im Diagramm III.6 dargestellt. Bei den beiden SERPINHs (CBPs) waren ähnliche Verläufe zu beobachten. Zum Versuchsbeginn war die Expression von SERPINH2 noch höher als die von SERPINH1. Zum Tag 15 war eine deutliche Expressionssteigerung beider mRNAs zu verzeichnen. SERPINH1 und 2 waren ab dem Tag 15 mit einer Expressionsstärke größer als 50% in Relation zur GAPDH-Expression vertreten.

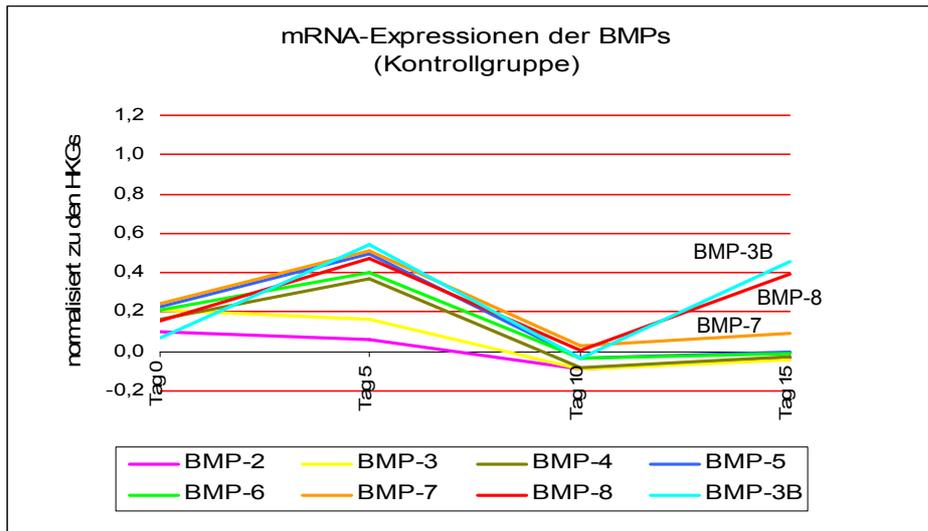
Diagramm III.6 Grafische Darstellung der Genfamilie der Heat-Shock-Proteine der Kontrollgruppe über den Versuchsverlauf



### 3.1.4 Die Wachstumsfaktoren

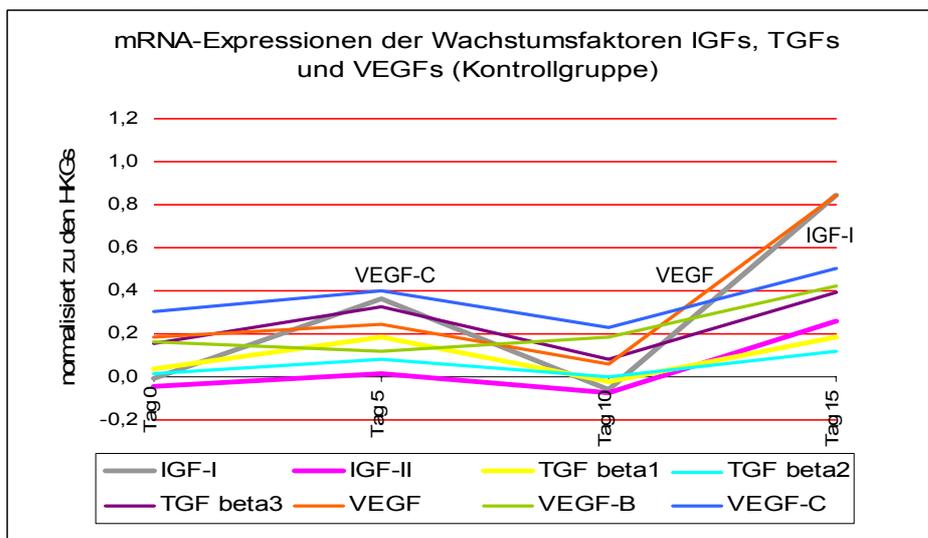
In der Gruppe der Wachstumsfaktoren wurden für die mRNA-Expressionen der BMPs (Diagramm III.7) Maximalwerte zu den Tagen 5 und 15 und Minimalwerte zu den Tagen 0 und 10 berechnet. Nur BMP-2 und BMP-3 folgten einem abweichenden Expressionsverlauf mit sinkenden Werten zum Tag 10 und gering steigenden zum Tag 15. Die Maximalwerte von BMP-2 und -3 waren am Tag 0 zu messen.

Diagramm III.7 Grafische Darstellung der Genfamilie der Wachstumsfaktoren BMPs der Kontrollgruppe über den Versuchsverlauf



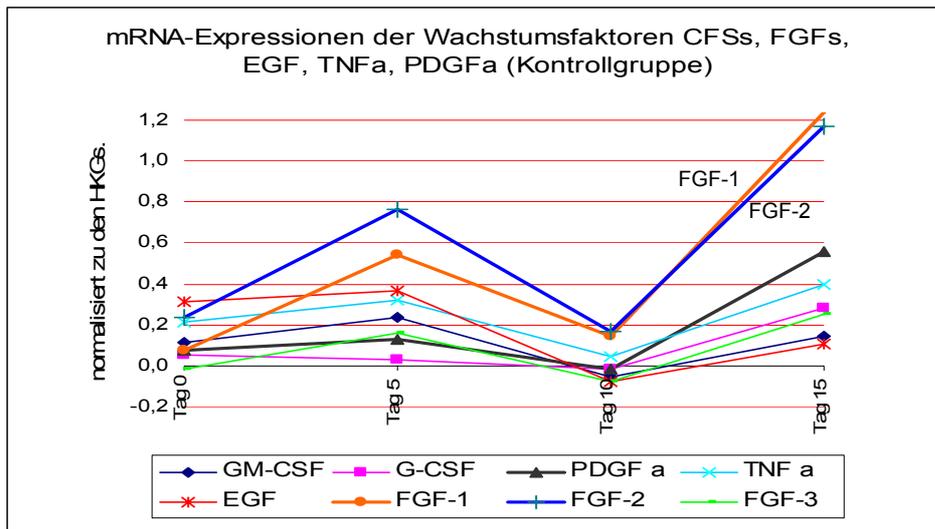
Bei den IGFs, TGFs und VEGFs zeichneten sich steigende Werte zu den Tagen 5 und 15 ab. Nur VEGF-B zeigte ein anderes Verhalten am Tag 5, wo ein Minimum zu verzeichnen war. Vom Tag 0 bis zum Tag 10 war VEGF-C das höchst exprimierte Gen der im Diagramm III.8 dargestellten Wachstumsfaktoren. IGF-I und VEGF (VEGF-A) zeigten zum Tag 15 einen starken Anstieg.

Diagramm III.8 Grafische Darstellung der Genfamilie der Wachstumsfaktoren IGFs, TGFs, VEGFs der Kontrollgruppe über den Versuchsverlauf



Bei den mRNA-Expressionen von GM-CSF, G-CSF, PDGFa, TNFa, EGF, FGF-1, FGF-2, FGF-3 und GDF-10 ergaben sich die gleichen Kurvenverläufe wie bei den anderen Wachstumsfaktoren: steigende Werte zu den Tagen 5 und 15 und abfallende Werte zum Tag 10 (Diagramm III.9). Erst zum Versuchstag 15 entsprachen die Expressionshöhen von FGF-1, FGF-2, IGF-1 und VEGF mehr als der 50%-igen GAPDH-Expression.

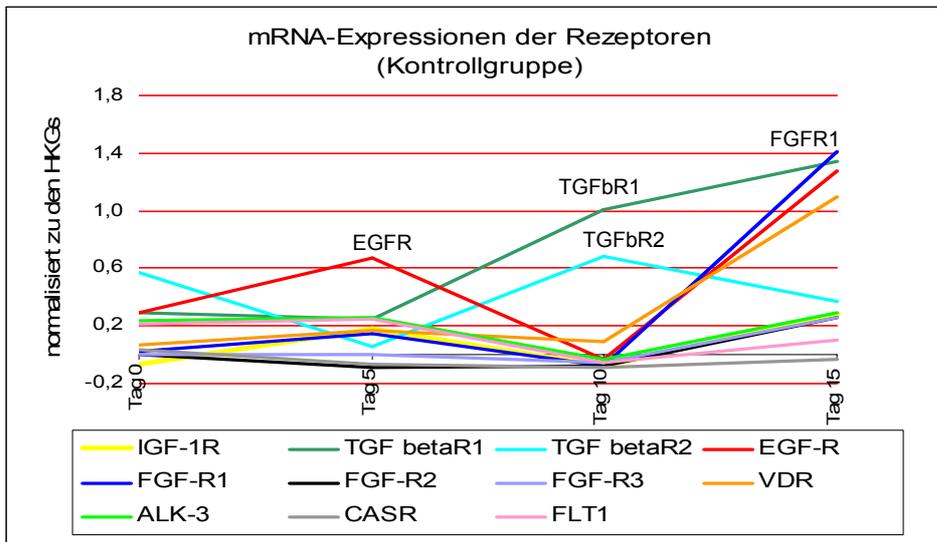
Diagramm III.9 Grafische Darstellung der Genfamilie der Wachstumsfaktoren CFSs, FGFs, EGF, TNFa, PDGFa der Kontrollgruppe über den Versuchsverlauf



### 3.1.5 Die Rezeptoren

Zum Versuchsbeginn waren die mRNA-Expressionen von TGF $\beta$ R-2, EGFR, TGF $\beta$ R-1, ALK-3 und FLT-1 in der Genfamilie der Rezeptoren am höchsten zu messen. Auffällig war der zum Tag 5 steigende Verlauf der EGFR-mRNA-Expression. Wohingegen ALK-3, FLT-1, VDR, FGFR-1 und IGF-1R nur schwach ansteigende und TGF $\beta$ R-2, TGF $\beta$ R-1, CASR und FGFR-2 sinkende bzw. keine sich ändernden (FGFR-3) mRNA-Expressionen zeigten. Am Tag 10 erhöhten sich besonders die mRNA-Expressionen von TGF $\beta$ R-1 und TGF $\beta$ R-2. Die anderen Expressionen waren fallend bzw. stiegen nur schwach. Zum Tag 15 sank die TGF $\beta$ R-2-mRNA-Expression als einzige der Rezeptoren. Die anderen Expressionsverläufe waren steigend, wobei die Expressionen von VDR, EGFR, FGFR-1 und TGF $\beta$ R-1 besonders ausgeprägt waren und mehr als der 50%-igen Expressionshöhe von GAPDH entsprachen. Die Verläufe der Rezeptorexpressionen sind aus dem Diagramm III.10 ersichtlich.

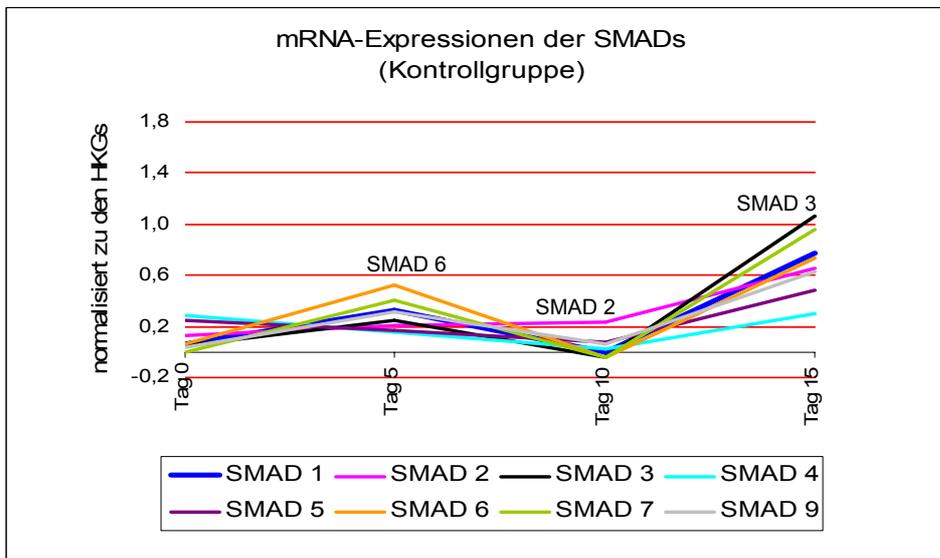
Diagramm III.10 Grafische Darstellung der Genfamilie der Rezeptoren der Kontrollgruppe über den Versuchsverlauf



### 3.1.6 Die SMADs

Die Verläufe der mRNA-Expressionen für die SMADs 1, 3, 6, 7 und 9 zeigten alle einen gleichen Expressionsverlauf über den 15-Tageversuch (Diagramm III.11). Minimalwerte wurden an den Versuchstagen 0 und 10 und Maximalwerte an den Versuchstagen 5 und 10 verzeichnet. Die Expressionshöhen von SMAD 1, 3, 6 und 7 waren so hoch, dass sie mehr als der 50%-igen Expression von GAPDH entsprachen. SMAD 2 stieg leicht bis zum Tag 10 und stärker zum Tag 15. SMAD 4 und 5 sanken mit ihren mRNA-Expressionen bis zum Tag 10 und stiegen zum Tag 15.

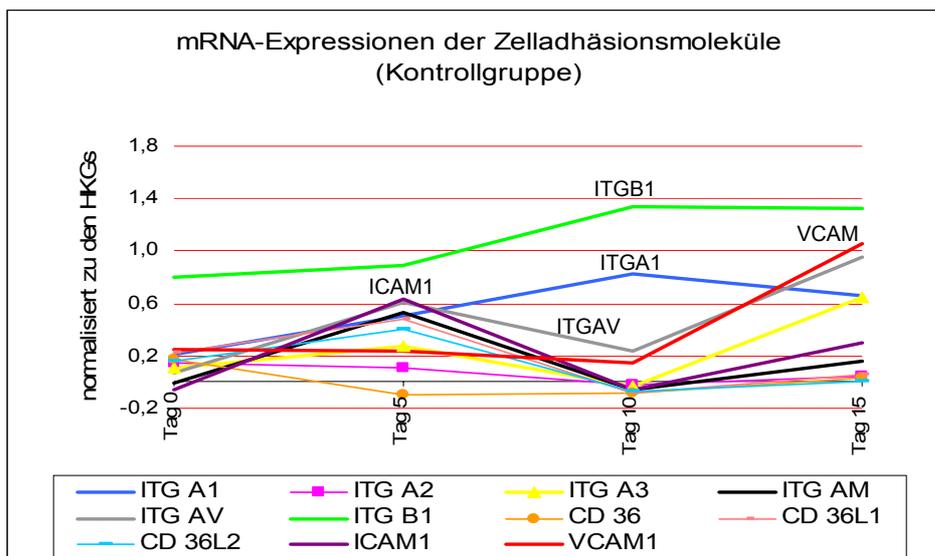
Diagramm III.11 Grafische Darstellung der Genfamilie der SMADs der Kontrollgruppe über den Versuchsverlauf



### 3.1.7 Die Zelladhäsionsmoleküle

In der Gruppe der Zelladhäsionsmoleküle (Diagramm III.12) zeigte ITGB1 über den gesamten Versuch eine erhöhte Expression gegenüber den anderen mRNA-Expressionen der Zelladhäsionsmoleküle. Die ICAM-1-mRNA und ITGAV-mRNA wurden am 5. Versuchstag erhöht expremiert, die mRNA von ITGA1 zum Tag 10 und die von VCAM-1, ITGAV, ITGA1 und ITGA3 zum Versuchtag 15. Während bei ITGA1 vom Tag 0 bis zum Tag 10 eine steigender Verlauf verzeichnet wurde, zeigten VCAM-1, ITGA2 und CD36 einen sinkenden bis zum Tag 10. Die mRNAs von ITGA3, ITGAM, ITGAV, aber auch ICAM-1, CD36L1 und L2 wiesen ihre Maximalwerte zu den Tagen 5 und 15 und ihre Tiefpunkte zu den Tagen 0 und 10 auf. Die drei höchsten expremierten mRNAs (ITGB1 zu den Tagen 10 und 15, ITGAV und VCAM-1 zum Tag 15) entsprachen dabei mehr als der 50%-igen Expressionsstärke vom Housekeepinggen GAPDH.

Diagramm III.12 Grafische Darstellung der Genfamilie der Zelladhäsionsmoleküle der Kontrollgruppe über den Versuchsverlauf



### 3.2 Die Kontrollgruppe im Vergleich zum Tag 0

Mit Hilfe der Mikroarraytechnologie wurde das mRNA-Expressionsmuster der hPOBs analysiert.

Zum Versuchsbeginn (Tag 0) konnten insgesamt 14 mRNAs auf der Arraymembran optisch bestätigt werden (optischer Score  $\geq 2$ ). Das Expressionsmuster war gekennzeichnet durch eine gesteigerte CBF $\alpha$ 1-mRNA, SMAD 1- und SMAD 6-mRNA. Außerdem waren der Wachstumsfaktor BMP-3 sowie die ECM-Proteine Biglycan, Fibronectin, Decorin, Osteonectin, Kollagentyp 3A1 und Kollagentyp 12A1 mit erhöht exprimierten mRNA-Intensitäten vertreten. Weiterhin gehörten die Gelatinase A (MMP2) und B (MMP9) dazu, aber auch die Zelloberflächenmoleküle ITGA1 und ITGB1 waren zum Tag 0 optisch stark exprimiert.

Die Ergebnisse der unbeeinflussten humanen POB der Versuchstage 5, 10 und 15 wurden zum Versuchsbeginn (Tag 0) in Beziehung gesetzt, um eine Verlaufskontrolle der Genexpressionen während des 15 Tageversuches zu erhalten. Die Tabelle 3. 1 zeigt die einzelnen Versuchstage von der Kontrollgruppe und die Anzahl der veränderten mRNA-Expressionen von insgesamt 96 zu untersuchenden Expressionen.

Tabelle 3.1: Die Kontrollgruppe im Vergleich zum Tag 0

	<u>Tag 0</u>	<u>Tag 5</u>	<u>Tag 10</u>	<u>Tag 15</u>
optischer Score $\geq 2$	14	15	17	53
50% von GAPDH	2	5	7	32
Steigerung (Ratio $\geq 2$ )	/	39	9	46
Verminderung (Ratio $< 0,5$ )	/	4	16	11

Während die Anzahl der optisch sichtbaren Intensitäten an den Tagen 0, 5 und 10 zwischen 14 bis 17 lagen, waren zum Tag 15 insgesamt 53 mRNAs zu registrieren. Dabei blieben besonders die mRNA-Expressionen von CBF $\alpha$ 1, SPARC, FN, DCN, BGN, COLL3A1, ITGA1 und ITGB1 vom Tag 0 über den gesamten Versuchsverlauf bei der Kontrollgruppe optisch stark ausgeprägt. Ähnlich verhielt es sich mit den rechnerisch ermittelten Intensitäten im Vergleich zu Glycerinaldehyde-3-phosphate Dehydrogenase (GAPDH) (Zeile 2). Zu den Tagen 0, 5 und 10 wiesen insgesamt 2, 5 bzw. 7 mRNA-Expressionen ein mindestens 50%-iges Ergebnis im Vergleich zu den GAPDH-Expressionen auf. Zum Tag 15 waren es 32 mRNAs. Die Expressionen, welche schon zum Tag 0 mehr als 50% der Expression von GAPDH entsprachen, waren DCN und FN. Am Tag 5 kamen zusätzlich BGN, SPARC, COLL3A1 dazu und am Tag 10 ITGB1, CBF $\alpha$ 1, COLL5A1 (jedoch ohne BGN).

Am Versuchstag 5 wurden bei der Kontrollgruppe 39 gesteigerte und 4 verminderte mRNA-Expressionen gegenüber dem Versuchsbeginn berechnet. Optisch bestätigt wurde diese große Anzahl der erhöhten Expressionen nicht und auch gegenüber der GAPDH-Expression blieb der Tag 5 eher unauffällig. Anders verhielt es sich zu den späteren Versuchszeitpunkten, wo sich miteinander vergleichbare Ergebnisse der berechneten und optischen Auswertung ergaben. Während am 10. Versuchstag 9 erhöhte und 16 verminderte mRNA-Expressionen gegenüber dem Tag 0 registriert wurden, zeigten sich am 15. Versuchstag 46 gesteigerte und 11 verminderte mRNAs.

### 3.2.1 Der Versuchstag 5

Am Versuchstag 5 wurde bei der Kontrollgruppe von insgesamt 39 mRNAs eine deutlich erhöhte Expression im Vergleich zum Tag 0 nachgewiesen.

- Eine mRNA-Expression war um mehr als das 10-fache im Vergleich zum Tag 0 erhöht: SMAD 9.
- Bei 8 mRNA-Expressionen wurden Steigerungen zwischen 5,1 und 10,0 registriert. Dazu zählten von der Genfamilie der Wachstumsfaktoren FGF-1, GDF-10 und TGF- $\beta$ 2, von der Rezeptorfamilie der FGF-Rezeptor-1, von den SMADs SMAD 1 und SMAD 6. Der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B1 und die mRNA-Expression von ITGAV wurden ebenfalls in diesem Maße erhöht.
- 30 Intensitäten waren bis zu einer 5-fachen Expression, im Vergleich zum Tag 0, erhöht. So waren eine 2- bis 5-fach höhere Intensität bei den ECM-Proteinen BGN, COLL1A1, 2A1, 7A1, 9A2, 10A1, 11A1, 12A1, 16A1, 18A1, 19A1 und OPN berechnet worden. In der Gruppe der Wachstumsfaktoren zeigte sich diese Steigerung bei BMP-4, -5, -7, -8, GM-CSF (CSF-2), FGF-2, TGF- $\beta$ 1 und - $\beta$ 2, außerdem bei den Proteinasen MMP2 und MMP13, den Rezeptoren EGFR und VDR und dem SMAD 3. Die mRNA des Transkriptionsfaktors MSX1 und der Zelloberflächenmoleküle CD36L1 und L2, ITGA1 und ITGA3 wurden ebenfalls erhöht berechnet.

Verminderte Expression ( $< 0,5$ ) gegenüber dem Tag 0 wurden bei 4 mRNA-Intensitäten berechnet: MMP8, MMP9, SERPINH2 und TGF $\beta$ R-2.

Optisch deutlich sichtbar waren 15 der 96 Gene. Sie wiesen einen Scorewert größer als 1 auf. Von den erhöhten mRNA-Intensitäten mit einer Ratio  $\geq 2$  wurden 6 Expressionen auch mit einem optischen Scorewert  $> 1$  bestätigt. Es waren BGN, COLL12A1, TGF- $\beta$ 3, MMP2, SMAD 6, ITGA1. Fünf der 15 sichtbaren Spots zeigten im Vergleich zum Tag 0 einen erhöhten Scorewert: TGF- $\beta$ 3, VEGF-C, COLL5A1, COLL12A1 und TNF $\alpha$ , wobei VEGF-C, COLL5A1 und TNF $\alpha$  keine Ratio  $\geq 2$  gegenüber dem Tag 0 aufwiesen. Alle anderen 45 mRNA-Expressionen besaßen optisch keinen Unterschied im Vergleich zum Tag 0.

Bei 5 der optisch präsenten mRNA-Expressionen entsprachen die hintergrundkorrigierten Werte mehr als 50% des Mittelwertes von den GAPDH-Expressionen: BGN, COLL3A1, DCN, FN-1 und SPARC.

Im Vergleich zum Tag 0 zeigte sich bei der Kontrollgruppe des 5. Versuchstages, dass 3 Spots nicht detektiert wurden (Scorewerte  $> 1$ ), obwohl dies am Tag 0 möglich war: MMP9, BMP-3, SMAD 1. Eine verminderte Expression konnte jedoch nur von MMP9 berechnet werden (Ratio  $< 0,5$ ), bei BMP-3 zeigte sich keine Veränderung und bei SMAD 1 wurde die Expression sogar um den Faktor 5,6 erhöht.

### 3.2.2 Der Versuchstag 10

Am Versuchstag 10 wurden insgesamt 9 mRNAs der Kontrollgruppe deutlich erhöht expremiert (Ratio  $\geq 2$ ) im Vergleich zum Tag 0.

- Alle mRNA-Expressionen wurden bis zu einer 5-fachen Expression gesteigert: die ECM-Proteine COLL11A1, 14A1, 3A1, 5A1, SPARC, der Transkriptionsfaktor MSX1, der TGF $\beta$ R-1 und die Zelloberflächenmoleküle ITGA1 und ITGAV.

Eine Intensitätsverminderung (Ratio  $< 0,5$ ) gegenüber dem Versuchsbeginn wurde bei 16 mRNA-Expressionen registriert. Dazu gehörten die ECM-Proteine OCN, COLL2A1, die Wachstumsfaktoren BMP-7 und -8, TGF- $\beta$ 2, TNF $\alpha$ , VEGF, die Proteinasen CTSK, MMP2, MMP8, außerdem die Inhibitoren SERPINH1 und 2, die SMADs SMAD 4 und 5, die Transkriptionsfaktoren SOX9 und TWIST.

17 Gene waren auf dem Mikroarray deutlich sichtbar, sie wiesen einen Scorewert größer von 1 auf. Von den erhöhten mRNA-Intensitäten mit einer Ratio  $\geq 2$  wurden alle 9 Expressionen mit einem optischen Scorewert  $> 1$  bestätigt. Erhöhte Scorewerte im Vergleich zum Tag 0 zeigten: MSX1, SPARC, ANXA5, COLL5A1, 11A1, 14A1, TGF $\beta$ R-1, TGF $\beta$ R-2, SMAD 2 und ITGAV. Mit der Ausnahme von ANXA5, TGF $\beta$ R-2 und SMAD 2 wurden alle dieser mRNAs auch mit einer erhöhten Ratio bestätigt. Die restlichen mRNA-Expressionen zeigten optisch keine Veränderung im Vergleich zum Tag 0.

Mit einem geringeren Scorewert als zum Tag 0 wurden die Expressionen von DCN, FN, COLL12A1, MMP2, MMP9, BMP-3, SMAD 1 und SMAD 6 bewertet. Rechnerisch ergab sich, dass nur MMP2 auch vermindert expremiert wurde (Ratio  $< 0,5$ ).

Bei 7 optisch presenten Gene entsprachen die hintergrundkorrigierten Werte mehr als dem 50%-igen Mittelwert vom Housekeepinggen GAPDH: COLL3A1, DCN, FN-1, SPARC, aber auch COLL5A1, CBF $\alpha$ 1 und ITGB1.

### 3.2.3 Der Versuchstag 15

Am Versuchstag 15 zeigten 46 mRNAs der Kontrollgruppe eine deutlich erhöhte Intensitätsveränderung im Vergleich zum Tag 0.

- Wobei 12 mRNA-Expressionen um mehr als das 10-fache gesteigert wurden. Dazu zählten aus der Genfamilie der Wachstumsfaktoren FGF-1, die Proteinase MMP13, der Inhibitor SERPINH1, die Rezeptoren FGFR-1 und VDR, die SMADs SMAD 1, 3, 6 und 9 sowie die Transkriptionsfaktoren MSX1 und NF- $\kappa$ B1 und das Zelladhäsionsmoleküle ITGAV.
- 8 mRNA-Expressionen wiesen eine Erhöhung zwischen 5,1 und 10,0 auf: COLL11A1, 14A1, 16A1, G-CSF (CSF-3), GDF-10, PDGF $\alpha$ , TGF- $\beta$ 2 und ITGA3.
- Bei 26 Genen wurden 2- bis 5-fache Expressionssteigerungen gemessen. Aus der Genfamilie der ECM-Proteine zählten dazu BGN, COLL2A1, 5A1, 7A1, 12A1, 15A1, 18A1, SPARC, ANXA5, OPN, aus der Genfamilie der Wachstumsfaktoren BMP-8, FGF-2, TGF- $\beta$ 1, - $\beta$ 3, VEGF, VEGF-B und bei den mRNAs der Proteinasen BMP-1, CSTK und MMP2, außerdem SERPINH2, der EGF-Rezeptor, TGF $\beta$ R-1, SMAD 2, der Transkriptionsfaktor TWIST sowie die Zelloberflächenmolekülen ITGA1 und VCAM-1.

Eine verminderte mRNA-Expression im Vergleich zum Tag 0 (Ratio < 0,5) wurde bei 11 Genen ermittelt. Es waren die mRNA-Expressionen von OCN, ALP, COLL4A5, COL19A1, BMP-7, EGF, MMP8, FLT-1, CD36, CD36L1 und ITGA2.

Zum 15. Versuchstag waren bei den unbeeinflussten Primärosteoblasten 53 Gene auf dem Mikroarray deutlich sichtbar, sie wiesen einen Scorewert größer als 1 auf. Von den 53 zeigten 50 einen erhöhten Scorewert im Vergleich zum Tag 0. Von diesen zeigten wiederum nur 36 auch eine erhöhte Expression (Ratio  $\geq$  2) im Vergleich zum Tag 0. Die deutlich sichtbar erhöhten Expressionen (Scorewert  $\geq$  2) von ITGB1, SMAD 5, SMAD 4, ALK-3, TGF $\beta$ R-2, TNF $\alpha$ , VEGF-C, COLL3A1, DCN und CBF $\alpha$ 1 wurden nicht mit einer erhöhten Ratio berechnet.

Optisch vermindert wurde BMP-3 im Vergleich zum Tag 0 expremiert (Tag 0: Scorewert 2; Tag 15: Scorewert 1), rechnerisch ergab sich jedoch keine deutlich Abweichung.

Bei 32 dieser optisch presenten Gene wurden Ergebnisse von mehr als 50% des Mittelwertes vom Housekeepinggen GAPDH festgestellt. Zu diesen mit GAPDH vergleichbaren Expressionen zählten neben BGN, COLL3A1, 5A1, DCN, FN-1, SPARC auch COLL11A1, 12A1, 14A1, 16A1, ANXA5 sowie die Wachstumsfaktoren FGF-1 und -2, IGF-1 und VEGF. Außerdem wurden diese großen Intensitätsänderungen bei den mRNAs von CTSK, MMP2, SERPINH1 und 2, den Rezeptoren EGFR, FGFR-1, TGF $\beta$ R-1, VDR, den SMADs SMAD 1, 3, 6, 7, den Transkriptionsfaktoren MSX1, CBF $\alpha$ 1 und den Zelloberflächenmolekülen ITGAV, ITGB1 und VCAM-1 beobachtet.

### 3.3 Die Versuchsgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe

Drei Tage nach dem Start der Zellkultur wurden Titan-Kirschner-Drähte mit den Nunc Tissue Culture Membranen zugegeben (=Tag 0). Die Drähte waren unbeschichtet (=Titan-Gruppe), mit Poly (D,L-Laktid) (PDLLA) beschichtet (=PDLLA-Gruppe) bzw. mit Poly (D,L-Laktid) (PDLLA) und inkorporierten BMP-2 beschichtet (=PDLLA-BMP-2-Gruppe). An den Versuchstagen 0, 5, 10 und 15 erfolgte die Isolierung der RNA und die Analyse des mRNA-Expressionsmusters mit Hilfe der Mikroarraytechnologie. Die mRNA-Expressionen der Versuchsgruppen (Titan-, PDLLA-, PDLLA-BMP-2-Gruppe) wurden mit den mRNA-Expressionen von der Kontrollgruppe des identischen Versuchstages verglichen, um die Expressionsveränderung der Genfamilie genauer zu analysieren. Tabellarisch wurden nur die mRNA-Expressionen aufgelistet, wenn eine Ratio  $\geq 2,0$  im Vergleich zur Kontrollgruppe bestand (s. Kapitel 3.3.1 bis 3.3.3).

Tabelle 3.2: Die Versuchsgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe des jeweiligen Versuchstages

		<u>Tag 5</u>	<u>Tag 10</u>	<u>Tag 15</u>
<b><u>Titan</u></b>	optischer Score $\geq 2$	11	12	40
	50% von GAPDH	1	4	20
	Steigerung (Ratio $\geq 2$ )	0	3	16
	Verminderung (Ratio $< 0,5$ )	43	6	6
<b><u>PDLLA</u></b>	optischer Score $\geq 2$	11	47	67
	50% von GAPDH	3	16	44
	Steigerung (Ratio $\geq 2$ )	4	26	14
	Verminderung (Ratio $< 0,5$ )	16	2	1
<b><u>PDLLA-BMP-2</u></b>	optischer Score $\geq 2$	26	54	58
	50% von GAPDH	7	32	38
	Steigerung (Ratio $\geq 2$ )	5	32	11
	Verminderung (Ratio $< 0,5$ )	38	1	8

Anhand der Tabelle 3.2 wird der Einfluss der unbeschichteten und PDLLA- bzw. PDLLA-BMP-2-beschichteten Titan-Kirschnerdrähte auf die humanen Primärosteoblasten *in vitro* deutlich.

### 3.3.1 Der Versuchstag 5

#### Die Titangruppe

Am Versuchstag 5 zeigten insgesamt 43 mRNAs von 96 zu untersuchenden mRNAs der Titan-Gruppe eine veränderte Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe desselben Versuchstages (Tabelle 3.2). Es wurden nur verminderte mRNA-Expressionen mit einer Ratio von  $< 0,5$  berechnet. 11 Gene der 96 waren auf dem Mikroarray deutlich sichtbar, sie wiesen einen Scorewert größer von 1 auf. Von diesen optisch präsenten Genen entsprach FN1 mehr als 50% des Mittelwertes von GAPDH.

Im Vergleich zur Kontrollgruppe des 5. Versuchstages verringerten sich die mRNA-Expressionen von CBF $\alpha$ 1 und TWIST. In der Gruppe der ECM-Proteine waren es die Expressionen von OPN, COLL1A1 und 2A1, sowie die Kollagene 5A1, 7A1, 9A2, 10A1, 11A1, 14A1, 18A1 und 19A1. Außerdem verminderte sich die Intensität von CBP1 (SERPINH1) und in der Gruppe der Wachstumsfaktoren von BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7, BMP-8 sowie von BMP-3B, TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 3, IGF-1, VEGF-C, GM-CSF, TNF $\alpha$ , PDGF $\alpha$ , FGF-1, -2 und -3. In der Genfamilie der Rezeptoren verringerte sich unter dem Einfluss der unbeschichteten Titan-Kirschner-Drähte die mRNA-Expressionen von TGF $\beta$ -R1, -R2, FLT1, VDR und EGFR. Von den SMADs veränderte sich die Expression von SMAD 9 und von den Zelloberflächenmolekülen die von ITGA1, ITGA3, ITGAV, VCAM-1, ICAM-1, CD36L1, CD36L2 mit einer Verminderung. Alle anderen mRNA-Expressionen zeigten keine oder nicht auswertbare Veränderungen gegenüber der Kontrollgruppe.

#### Die PDLLA-Gruppe

Bei der PDLLA-Gruppe wurden am 5. Versuchstag 4 mRNAs mit veränderten Expressionen im Vergleich zur Kontrollgruppe berechnet (Tabelle 3.3). Wobei die FGFR-3-mRNA-Expression eine Erhöhung von 8,4 aufwies und bei 3 Genen die Expression unter dem Einfluss von PDLLA beschichteten Titan-Kirschner-Drähten bis zu einer Ratio von 5 gesteigert wurden (MMP10, TGF- $\beta$ 2, IGF-2). Keine dieser erhöhten mRNA-Expressionen war auf dem Array optisch deutlich sichtbar (s. Tabelle 3.3).

Tabelle 3.3: Die PDLLA-Gruppe Tag 5 – Die Gegenüberstellung der mRNA-Expressionen mit einer Ratio  $\geq 2,0$  im Vergleich zur Kontrollgruppe

	<u>Expression</u>	<u>optisch sichtbar</u>	<u>50% relativ</u> <u>zu GAPDH</u>
TGF $\beta$ 2	+		
IGF2	+		
FGFR3	++		
MMP10	+		

Legende der Tabelle:

+	erhöhte Expression; Ratio 2,0fach bis 5,0fach
++	erhöhte Expression; Ratio 5,1fach bis 10fach
+++	erhöhte Expression; Ratio größer als 10,1fach

16 mRNA-Expressionen wurden, im Vergleich zur Kontrollgruppe, unter dem PDLLA-Einfluss vermindert gemessen (Ratio < 0,5). Bei den Transkriptionsfaktoren gehörte MSX1 dazu und bei der Genfamilie der ECM-Proteine verringerten sich die mRNA-Expressionen von COL2A1, 5A1, 9A2, 12A1 und 14A1. Bei den Wachstumsfaktoren sanken gegenüber der Kontrollgruppe die mRNA-Expressionen von BMP-7, BMP-3B und FGF-2 und in der Genfamilie der Rezeptoren die von TGF $\beta$ R-1 und EGFR. Bei den SMADs zeigten SMAD 3, 6 und 7 verringerte Intensitäten und bei den Zelloberflächenmolekülen ITGAV und ICAM-1.

11 Gene der 96 relevanten osteogenesespezifischen Genexpressionen waren auf dem Mikroarray deutlich sichtbar, sie wiesen einen Scorewert größer von 1 auf. Bei 3 von diesen optisch presenten Genen entsprachen die hintergrundkorrigierten Werte mehr als 50% des Mittelwertes von GAPDH: SPARC, DCN, FN1. Im Vergleich zur Kontrollgruppe desselben Versuchstages zeigten diese mRNA-Expressionen jedoch keine Ratio  $\geq 2,0$ .

### **Die PDLLA-BMP-2-Gruppe**

Am Versuchstag 5 wurden insgesamt 5 mRNAs der PDLLA-BMP-2-Gruppe mit einer deutlich erhöhten Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe berechnet (Tabelle 3.4). Dazu gehörten die Rezeptoren TGF $\beta$ R-1 und TGF $\beta$ R-2, die Wachstumsfaktoren IGF-2 und G-CSF und der Proteinase-Inhibitor CBP1 (SERPINH1). TGF $\beta$ R-1, TGF $\beta$ R-2 und CBP1 waren auf dem Array auch optisch deutlich sichtbar und wurden mit einem Scorewert >1 bewertet. Außerdem wurde für TGF $\beta$ R-1 berechnet, dass dessen Expression mehr als 50% der von GAPDH entsprach.

Tabelle 3.4: Die PDLLA-BMP-2-Gruppe Tag 5 – Die Gegenüberstellung der mRNA-Expressionen mit einer Ratio  $\geq 2,0$  im Vergleich zur Kontrollgruppe

	<u>Expression</u>	<u>optisch sichtbar</u>	<u>50% relativ</u> <u>zu GAPDH</u>
IGF2	+		
G-CSF	+		
TGF $\beta$ R1	+	4	X
TGF $\beta$ R2	+	2	
CBP1	+	2	

Legende der Tabelle:

+	erhöhte Expression; Ratio 2,0fach bis 5,0fach
++	erhöhte Expression; Ratio 5,1fach bis 10fach
+++	erhöhte Expression; Ratio größer als 10,1fach
2	optischer Scorewert von 2
3	optischer Scorewert von 3
4	optischer Scorewert von 4
5	optischer Scorewert von 5
X	mindestens 50% der GAPDH-Expression

Von 38 mRNAs wurden verminderte Intensitäten (Ratio < 0,5) berechnet. In der Gruppe der Transkriptionsfaktoren verringerte sich MSX2 und NF- $\kappa$ B1. Bei den ECM-Proteinen wurden von OCN, OPN, Arylsulfatase (ARSE), COLL1A1, 2A1, 7A1, 9A2, 10A1, 11A1, 18A1 und 19A1 am 5. Versuchstag verminderte mRNA-Expressionen ermittelt. Von den MMPs sanken gegenüber der Kontrollgruppe desselben Versuchstages die Expressionen von MMP9 und MMP10 und von den Wachstumsfaktoren die von BMP-6, -8, -3, -3B, TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 3, IGF-1, VEGF, GM-CSF, FGF-1, -2 und -3. Auch die mRNA-Expressionen der Rezeptoren ALK-3, IGF-R1 und EGFR wurden geringer expremiert. In der Gruppe der SMADs gehörten SMAD 1, 5, 7 und 9 dazu und in der Gruppe der Zelloberflächenmoleküle ITGA1, ITGA3, ITGAM und ITGAV.

26 Gene waren auf dem Mikroarray deutlich sichtbar, sie wiesen einen Scorewert größer als 1 auf. Außerdem entsprachen bei 7 dieser optisch präsenten mRNAs die hintergrundkorrigierten Werte mehr als 50% des Mittelwertes von GAPDH: SPARC, BGN, DCN, FN1, COLL3A1, MMP2, TGF $\beta$ R-1.

### 3.3.2 Der Versuchstag 10

#### Die Titangruppe

Am Versuchstag 10 zeigten 3 mRNAs der Titangruppe eine erhöhte Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe desselben Versuchstages (Tabelle 3.5). Dazu gehörten MMP2, TWIST und TNF $\alpha$ . Keine dieser erhöhten Expressionen war optisch sichtbar.

Tabelle 3.5: Die Titan-Gruppe Tag 10 – Die Gegenüberstellung der mRNA-Expressionen mit einer Ratio  $\geq 2,0$  im Vergleich zur Kontrollgruppe

	<u>Expression</u>	<u>optisch sichtbar</u>	<u>50% relativ</u> <u>zu GAPDH</u>
TWIST	+		
TNF $\alpha$	+		
MMP2	+		

Legende der Tabelle:

+	erhöhte Expression; Ratio 2,0fach bis 5,0fach
++	erhöhte Expression; Ratio 5,1fach bis 10fach
+++	erhöhte Expression; Ratio größer als 10,1fach

Bei 6 mRNA-Expressionen zeigten sich verminderte Intensitäten mit einer Ratio  $< 0,5$  im Vergleich zur Kontrollgruppe: TGF $\beta$ R-2, MSX1, COLL11A1, CBP1 (SERPINH1), VDR und ITGA1.

12 Gene der 96 relevanten waren auf dem Mikroarray deutlich sichtbar, sie wiesen einen Scorewert größer von 1 auf. Bei 4 dieser optisch präsenten Gene entsprachen die hintergrundkorrigierten Werte mehr als 50% des Mittelwertes von GAPDH: SPARC, DCN, FN1, COLL3A1.

#### Die PDLLA-Gruppe

Bei der PDLLA-Gruppe des 10. Versuchstages wurden 26 mRNAs mit einer deutlich veränderten Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe des 10. Versuchstages berechnet (Tabelle 3.6). Davon waren 7 mRNA-Expressionen über das 10,1-fache erhöht, 10 mRNA-Expressionen zeigten eine Erhöhung zwischen dem 5,1- bis 10,0-fachen und 9 Gene waren bis zu einer 5-fachen Expression gesteigert. Optisch sichtbar (Scorewert  $\geq 2$ ) waren alle dieser erhöht exprimierten mRNAs, mit Ausnahme von SOX9, OCN, COLL2A1, VEGFC, BMP-8 und SMAD 4.

Tabelle 3.6: Die PDLLA-Gruppe Tag 10 – Die Gegenüberstellung der mRNA-Expressionen mit einer Ratio  $\geq 2,0$  im Vergleich zur Kontrollgruppe

	<u>Expression</u>	<u>optisch sichtbar</u>	<u>50% relativ zu GAPDH</u>
TWIST	+++	2	
MSX1	++	4	X
SOX9	++		
BGN	+	4	X
OCN	+		
ANXA5	+	3	
COLL2A1	+++		
COLL12A1	++	4	X
MMP2	+++	4	X
CTSK	++	2	
CBP1	+++	3	
CBP2	++	3	
VEGF	+++	3	
VEGFB	+	3	
VEGFC	+		
TGF $\beta$ 3	++	2	
FGF1	+	2	
FGF2	++	3	X
TNF $\alpha$	+++	3	
BMP8	+++		
VDR	++	3	
SMAD2	+	2	
SMAD4	++		
SMAD5	+	2	
SMAD9	++	2	
VCAM	+	2	

Legende der Tabelle:

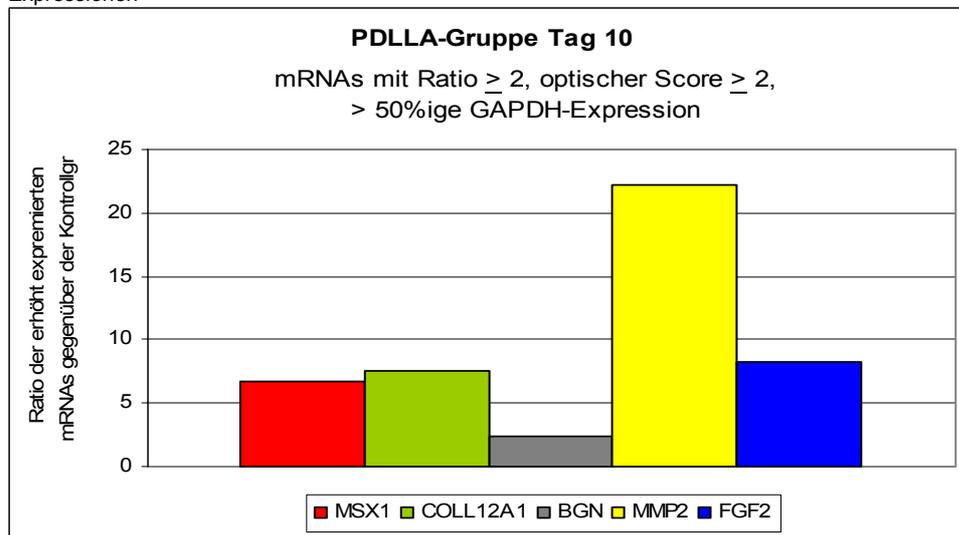
+	erhöhte Expression; Ratio 2,0fach bis 5,0fach
++	erhöhte Expression; Ratio 5,1fach bis 10fach
+++	erhöhte Expression; Ratio größer als 10,1fach
2	optischer Scorewert von 2
3	optischer Scorewert von 3
4	optischer Scorewert von 4
5	optischer Scorewert von 5
X	mindestens 50% der GAPDH-Expression

Zwei mRNA-Expressionen wurden, im Vergleich zur Kontrollgruppe, unter dem Einfluss PDLLA-beschichteter Titandrähten vermindert gemessen: TGF $\beta$ R-2 und ITGA1 (Ratio < 0,5).

47 Gene waren auf dem Mikroarray deutlich sichtbar, sie wiesen einen Scorewert von größer 1 auf. Außerdem entsprachen bei 16 dieser optisch präsenten Gene die hintergrundkorrigierten Werte mehr als 50% des Mittelwertes von GAPDH. Dazu zählten bei den Transkriptionsfaktoren CBF $\alpha$ 1 und MSX1. In der Gruppe der ECM-Proteine gehörten SPARC, BGN, DCN, FN1, COLL3A1, 5A1, 12A1 und 14A1 dazu. Zudem wurde eine mindestens 50%-ige Expression von GAPDH bei der Proteinase MMP2, dem Wachstumsfaktor FGF-2, dem Transkriptionsfaktor MSX1, dem Kollagen COLL12A1, dem Biglykan (BGN), den Rezeptoren TGF $\beta$ R-1, FGFR-1, EGFR und dem Zelloberflächenmolekül ITGB1 gemessen.

Im Diagramm III.13 sind die mRNA-Expressionen mit ihren Ratiowerten  $\geq 2$  dargestellt, die gleichzeitig optisch sichtbar waren (Scorewert  $\geq 2$ ) und dessen Expressionen mehr als der 50%-igen GAPDH-Expression entsprachen.

Diagramm III.13 PDLLA-Gruppe Versuchstag 10: Grafische Darstellung der erhöhten mRNA-Expressionen



### Die PDLLA-BMP-2-Gruppe

Am Versuchstag 10 zeigten 32 mRNAs der PDLLA+BMP-2-Gruppe eine deutliche Expressionsveränderung im Vergleich zur Kontrollgruppe desselben Versuchstages (Tabelle 3.7). Wobei 11 mRNA-Expressionen um mehr als das 10,1-fache erhöht waren, 11 mRNA-Expressionen eine Erhöhung zwischen dem Faktor 5,1 und 10,0 aufwiesen und 10 Gene bis zu einer 5-fachen Expression gesteigert wurden. Optisch sichtbar waren alle dieser 32 mRNA-Expressionen mit Ausnahme von COLL2A1, BMP-7, SOX9, MMP8 und OCN.

Tabelle 3.7: Die PDLLA-BMP-2-Gruppe Tag 10 – Die Gegenüberstellung der mRNA-Expressionen mit einer Ratio  $\geq 2,0$  im Vergleich zur Kontrollgruppe

	<u>Expression</u>	<u>optisch sichtbar</u>	<u>50% relativ</u> zu GAPDH
TWIST	+++	2	
MSX1	++	4	X
SOX9	++		
BGN	+	4	X
OCN	+		
ANXA5	+	3	X
COLL2A1	+++		
COLL11A1	+	4	X
COLL12A1	++	4	X
COLL14A1	+	4	X
MMP2	+++	4	X
MMP8	+		
CTSK	+++	3	X
CBP1	+++	2	
CBP2	++	3	
VEGF	+++	3	X
VEGFB	++	3	X
VEGFC	+	3	
TGFb3	+++	3	X
FGF1	++	3	X
FGF2	++	3	X
TNF $\alpha$	++	2	
BMP7	++		
BMP8	+++	2	
VDR	++	3	
SMAD2	++	4	X
SMAD4	+++	3	X
SMAD5	+++	3	X
SMAD9	+++	3	X
VCAM	+	3	
ITGA1	+	4	X
ITGAV	+	2	

Legende der Tabelle:

+	erhöhte Expression; Ratio 2,0fach bis 5,0fach
++	erhöhte Expression; Ratio 5,1fach bis 10fach
+++	erhöhte Expression; Ratio größer als 10,1fach
2	optischer Scorewert von 2
3	optischer Scorewert von 3
4	optischer Scorewert von 4

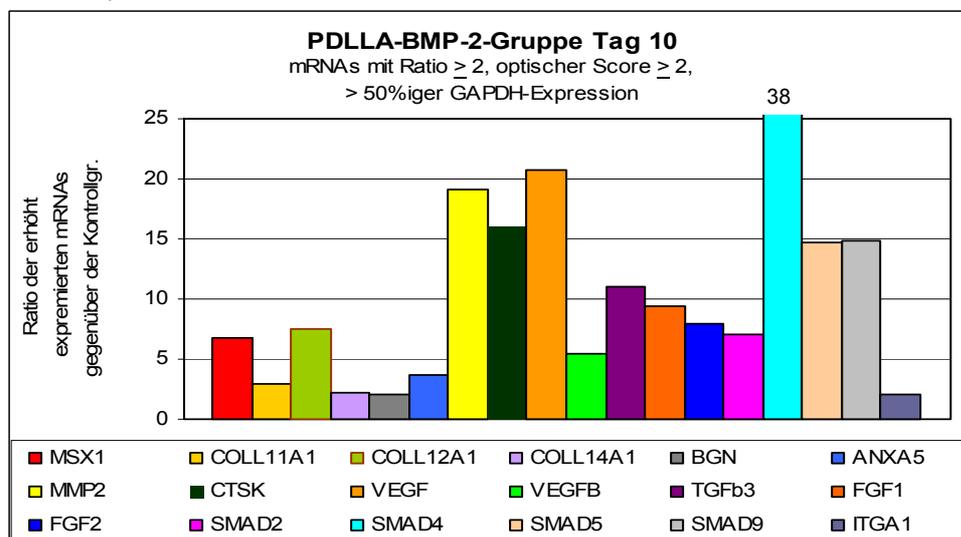
5	optischer Scorewert von 5
X	mindestens 50% der GAPDH-Expression

Die Intensität von TGFβR-2 wurde im Vergleich zur Kontrollgruppe des 10. Versuchstages vermindert gemessen (Ratio < 0,5).

54 Gene der 96 zu untersuchenden waren auf dem Mikroarray deutlich sichtbar, sie wiesen einen Scorewert von größer als 1 auf. Bei 32 dieser optisch presenten Gene entsprachen die hintergrundkorrigierten Werte mehr als 50% des Mittelwertes von GAPDH. In der Gruppe der Transkriptionsfaktoren gehörten CBFα1 und MSX1 dazu, bei den ECM-Proteinen SPARC, BGN, DCN, FN1, ANXA5, COLL3A1, 5A1, 11A1, 12A1, 14A1 und 16A1. Außerdem wurden diese erhöhten Expressionen auch bei MMP2, CTSK, TGF-β3, VEGF, VEGF-B, FGF-1, -2, den Rezeptoren TGFβR-1, FGFR-1 und EGFR beobachtet. Die Zelloberflächenmoleküle ITGA1 und ITGB1 und alle auf dem Array vertretenden SMADs gehörten in diese Gruppe, mit Ausnahme von SMAD 6.

Im Diagramm III.14 sind die mRNA-Expressionen mit ihren Ratiowerten ≥ 2 dargestellt, die gleichzeitig optisch sichtbar waren (Scorewert ≥ 2) und dessen Expressionen mehr als der 50%-igen GAPDH-Expression entsprachen.

Diagramm III.14 PDLLA-BMP-2-Gruppe Versuchstag 10: Grafische Darstellung der erhöhten mRNA-Expressionen



### 3.3.3 Der Versuchstag 15

#### Die Titangruppe

Am Versuchstag 15 zeigten 16 mRNAs der Titangruppe eine deutlich veränderte Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe (Tabelle 3.8). Bei zwei mRNA-Expressionen wurde eine Erhöhung zwischen dem Faktor 5,1 und 10,0 gemessen und 14 Gene waren bis zu einer 5-fachen Expression gesteigert. Keine dieser 16 erhöhten mRNA-Expressionen war jedoch optisch sichtbar.

Tabelle 3.8: Die Titan-Gruppe Tag 15 – Die Gegenüberstellung der mRNA-Expressionen mit einer Ratio  $\geq 2,0$  im Vergleich zur Kontrollgruppe

	<u>Expression</u>	<u>optisch sichtbar</u>	<u>50% relativ</u> <u>zu GAPDH</u>
OCN	+		
ALP	+		
COLL1A1	+		
COLL4A5	+		
COLL9A2	+		
COLL10A1	+		
COLL19A1	++		
MMP8	+		
BMP1	+		
BMP7	+		
GM-CSF	+		
EGF	+		
FLT1	+		
ITGA2	+		
CD36	++		
CD36L1	+		

Legende der Tabelle:

+	erhöhte Expression; Ratio 2,0fach bis 5,0fach
++	erhöhte Expression; Ratio 5,1fach bis 10fach
+++	erhöhte Expression; Ratio größer als 10,1fach

Im Vergleich zur Kontrollgruppe wurden bei der Titangruppe am 15. Versuchstag 6 mRNA-Expressionen vermindert expremiert. Dazu gehörten: TWIST, COLL16A1, CBP2 (SERPINH2), PDGF $\alpha$ , SMAD 3 und SMAD 7.

40 Gene waren auf dem Mikroarray deutlich sichtbar, sie wiesen einen Scorewert von größer 1 auf. Außerdem entsprachen bei 20 dieser optisch presenten Gene die hintergrundkorrigierten Werte über 50% des Mittelwertes vom Housekeepinggen GAPDH. Dazu zählten CBF $\alpha$ 1, MSX1, SPARC, BGN, DCN, FN1, ANXA5, die Kollagene COLL3A1, 5A1, 11A1, 12A1 und 14A1. Bei den Proteinasen gehörte MMP2,

bei den Rezeptoren TGF $\beta$ R-1, VDR und EGFR dazu. Auch SMAD 2 und die Zelloberflächenmoleküle ITGA1, ITGB1 und VCAM-1 wurden in diesem Ausmaß expremiert.

### Die PDLLA-Gruppe

Bei der PDLLA-Gruppe vom 15.Versuchstag wurden 14 mRNAs mit einer deutlich veränderten Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe desselben Versuchstages berechnet (Tabelle 3.9). Wobei 2 mRNA-Expressionen um mehr als das 10,1-fache erhöht waren (ITGA2, CD36), 2 mRNA-Expressionen eine Erhöhung zwischen dem Faktor 5,1 und 10,0 aufwiesen (CD36L1, MMP8) und die restlichen 10 mRNAs bis zu einer 5-fachen Expression gesteigert waren. Optisch sichtbar waren 9 von diesen erhöht expremierten mRNAs. Optisch nicht bestätigt wurden: OCN, COLL19A1, MMP8, TGF- $\beta$ 2 und BMP-7.

Tabelle 3.9: Die PDLLA-Gruppe Tag 15 – Die Gegenüberstellung der mRNA-Expressionen mit einer Ratio  $\geq 2,0$  im Vergleich zur Kontrollgruppe

	<u>Expression</u>	<u>optisch sichtbar</u>	<u>50%relativ zu GAPDH</u>
OCN	+		
COLL9A2	+	2	
COLL10A1	+	2	
COLL19A1	+		
MMP8	++		
TGF $\beta$ 1	+	3	
TGF $\beta$ 2	+		
TGF $\beta$ 3	+	4	X
VEGFB	+	4	X
BMP7	+		
SMAD4	+	4	X
ITGA2	+++	3	
CD36	+++	3	
CD36L1	++	3	

Legende der Tabelle:

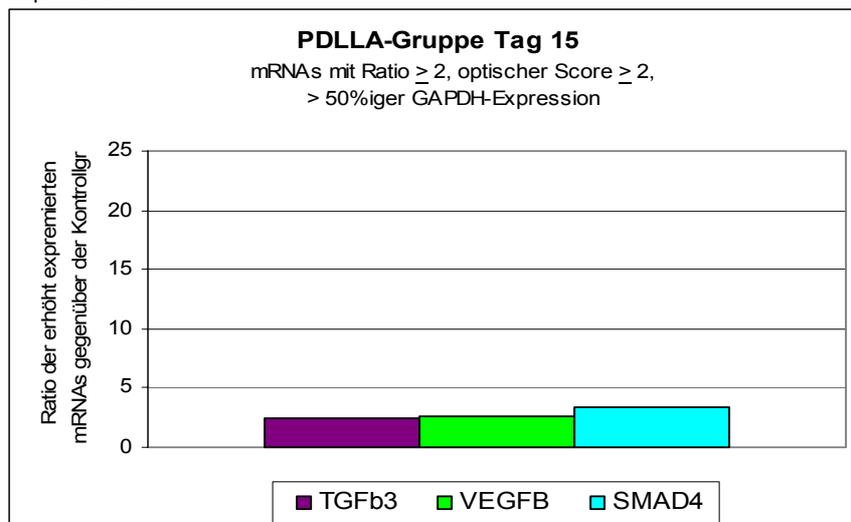
+	erhöhte Expression; Ratio 2,0fach bis 5,0fach
++	erhöhte Expression; Ratio 5,1fach bis 10fach
+++	erhöhte Expression; Ratio größer als 10,1fach
2	optischer Scorewert von 2
3	optischer Scorewert von 3
4	optischer Scorewert von 4
5	optischer Scorewert von 5
X	mindestens 50% der GAPDH-Expression

Die mRNA-Expression von COL18A1 wurde im Vergleich zur Kontrollgruppe als einzige mRNA vermindert expremiert (Ratio < 0,5).

67 mRNAs der 96 relevanten waren auf dem Mikroarray optisch deutlich sichtbar, sie wiesen einen Scorewert von größer 1 auf. Außerdem entsprachen bei 44 dieser optisch presenten Gene die hintergrundkorrigierten Werte mehr als 50% des Mittelwertes von GAPDH. In der Gruppe der Transkriptionsfaktoren waren es CBF $\alpha$ 1, MSX1, NF- $\kappa$ B1, bei den ECM-Proteinen SPARC, BGN, DCN, FN1, ANXA5, COLL3A1, 5A1, 11A1, 12A1, 14A1 und 16A1. Zudem zeigten die Proteinasen MMP2 und CTSK und die Proteinase-Inhibitoren CBP1 und 2 (SERPINH1 und 2) diese erhöhten Expressionen. In der Genfamilie der Wachstumsfaktoren gehörten BMP-3, TGF- $\beta$ 3, IGF-1, VEGF, VEGF-B, VEGF-C, PDGF $\alpha$ , FGF-1 und FGF-2 dazu. Bei den Rezeptoren waren es TGF $\beta$ R-1, VDR, FGFR-1, EGFR, außerdem die vertretenen SMADs (1-9) und die Zelloberflächenmoleküle ITGA1, ITGA3, ITGAV, ITGB1 und VCAM-1.

Im Diagramm III.15 sind die 3 mRNAs abgebildet, die alle 3 tabellarisch aufgestellten Kriterien (s. Tabelle 3.9) erfüllten.

Diagramm III.15 PDLLA-Gruppe Versuchstag 15: Grafische Darstellung der erhöhten mRNA-Expressionen



### Die PDLLA-BMP-2-Gruppe

Am Versuchstag 15 zeigten 11 mRNAs der PDLLA-BMP-2-Gruppe deutlich veränderte Expressionen im Vergleich zur Kontrollgruppe desselben Versuchstages (Tabelle 3.10). Eine mRNA-Expression war um mehr als das 10,1-fache erhöht (CD36), eine mRNA-Expression zeigte eine Steigerung um 9,9 (ITGA2) und 7 waren bis zu einer 5-fachen Expression gesteigert. Optisch deutlich sichtbar waren mit Ausnahme von MMP8 alle der erhöht gemessenen mRNA-Expressionen.

Tabelle 3.10: Die PDLLA-BMP-2-Gruppe Tag 15 – Die Gegenüberstellung der mRNA-Expressionen mit einer Ratio  $\geq 2,0$  im Vergleich zur Kontrollgruppe

	<u>Expression</u>	<u>optisch sichtbar</u>	<u>50%relativ</u> <u>zu GAPDH</u>
MMP8	+		
TGF $\beta$ 1	+	3	
TGF $\beta$ 3	+	3	X
VEGFB	+	3	X
SMAD2	+	4	X
SMAD4	+	4	X
SMAD5	+	4	X
ITGA1	+	4	X
ITGA2	++	3	
CD36	+++	3	
CD36L1	+	2	

Legende der Tabelle:

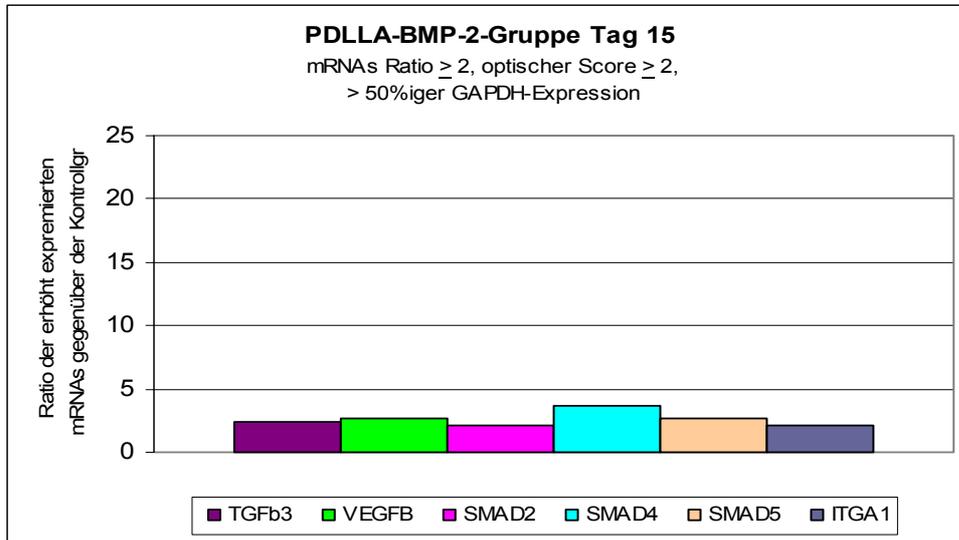
+	erhöhte Expression; Ratio 2,0fach bis 5,0fach
++	erhöhte Expression; Ratio 5,1fach bis 10fach
+++	erhöhte Expression; Ratio größer als 10,1fach
2	optischer Scorewert von 2
3	optischer Scorewert von 3
4	optischer Scorewert von 4
5	optischer Scorewert von 5
X	mindestens 50% der GAPDH-Expression

8 mRNA-Expressionen zeigten gegenüber der Kontrollgruppe unter dem Einfluss von PDLLA-BMP-2 eine verminderte Intensität mit einer Ratio  $< 0,5$ . Dazu gehörten die ECM-Proteine OCN, COLL4A4 und COLL18A1, die Wachstumsfaktoren FGF-3, EGF, die Rezeptoren FGFR-1, -2 und -3.

58 Expressionen der 96 zu untersuchenden waren auf dem Mikroarray deutlich sichtbar, sie zeigten einen Scorewert von größer als 1. Außerdem entsprachen bei 38 dieser optisch präsenten Gene die hintergrundkorrigierten Werte mehr als 50% des Mittelwertes von GAPDH. In der Genfamilie der Transkriptionsfaktoren zählte CBF $\alpha$ 1, MSX1, bei den ECM-Proteinen SPARC, BGN, DCN, FN1, ANXA5, COLL3A1, 5A1, 11A1, 12A1, 14A1 und 16A1 und die Proteinasen MMP2, CTSK sowie die Proteinase-Inhibitoren CBP1 und 2 dazu. In der Gruppe der Wachstumsfaktoren konnten ebenfalls entsprechend hohe Expressionen bei BMP-3, TGF- $\beta$ 3, VEGF, VEGF-B, FGF-1 und FGF-2 registriert werden und in der Gruppe der Rezeptoren bei TGF $\beta$ R-1, VDR und EGFR. Auch alle SMADs zeigten diese größer als 50%-ige Intensität im Vergleich zur GAPDH-Expression sowie die Zelloberflächenmoleküle ITGA1, ITGAV, ITGB1 und VCAM-1.

Im Diagramm III.16 sind die 3 mRNAs abgebildet, die alle 3 tabellarisch aufgestellten Kriterien (s. Tabelle 3.10) erfüllen.

Diagramm III.16 PDLLA-BMP-2-Gruppe Versuchstag 15: Grafische Darstellung der erhöhten mRNA-Expressionen



### 3.4 Das Genexpressionsmuster humaner Primärosteoblasten *in vitro* - Die PDLLA- und PDLLA-BMP-2-Versuchsgruppen im Verlauf des 15-Tageversuches

Die Induktionen von PDLLA-BMP-2 und PDLLA auf die relevanten mRNAs jeder Genfamilie, die eine Ratio  $\geq 2$  gegenüber der Kontrollgruppe desselben Versuchstages aufwiesen, werden grafisch in den Diagrammen III.17-III.28 gegenübergestellt. Bezugsgrößen sind die hintergrundkorrigierten und zu den HKGs normalisierten mRNA-Intensitäten der einzelnen Versuchstage.

#### 3.4.1 Die Transkriptionsfaktoren

TWIST und MSX1 zeigten in der Genfamilie der Transkriptionsfaktoren ein von der Kontrollgruppe abweichendes Expressionsverhalten. Beim Vergleich von den Diagrammen III.17 und III.18 wurde deutlich, dass die Verläufe der beiden Grafen bei der PDLLA- und PDLLA-BMP-2-Gruppe ähnlich waren.

Diagramm III.17 PDLLA-Gruppe: Grafische Darstellung der erhöhten mRNA-Expressionen der Transkriptionsfaktoren

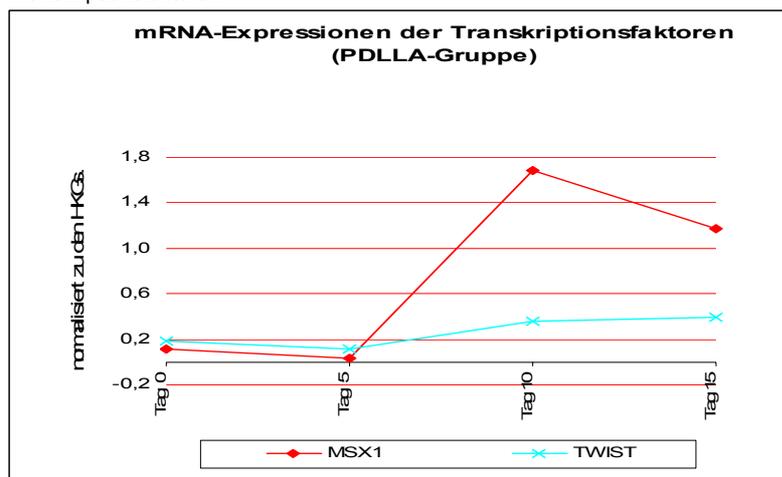
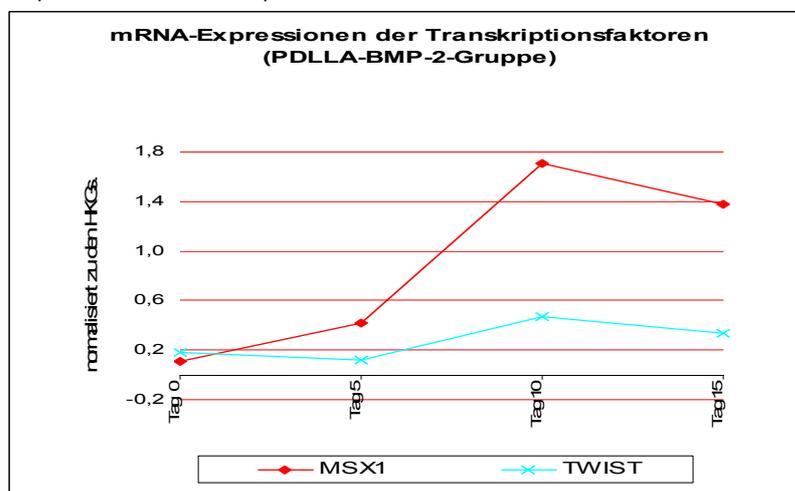


Diagramm III.18 PDLLA-BMP-2-Gruppe: Grafische Darstellung der erhöhten mRNA-Expressionen der Transkriptionsfaktoren



### 3.4.2 Die extrazellulären Matrixproteine

In der Genfamilie der ECM-Proteine spiegeln sich vergleichbare mRNA-Expressionen von BGN, ANXA5, COLL11A1, COLL12A1, COLL14A1 und COLL16A1 in der PDLLA- und PDLLA-BMP-2-Gruppe wider (Diagramm III.19 und III.20). Sinkende Expressionen waren bei der PDLLA-Gruppe, mit der Ausnahme von BGN, am Tag 5 zu verzeichnen, währenddessen bei der PDLLA-BMP-2-Gruppe nur die Expression von COLL12A1 vermindert wurde. Starke Expressionssteigerungen wurden am Tag 10 besonders bei der PDLLA-BMP-2-Gruppe deutlich. Zum 15. Versuchstag schienen sich die Expressionen von allen 5 dargestellten mRNAs denen von der Kontrollgruppe anzunähern ( $1 < \text{Ratio} < 1,5$ ).

Diagramm III.19 PDLLA-Gruppe: Grafische Darstellung der erhöhten mRNA-Expressionen der ECM-Proteine

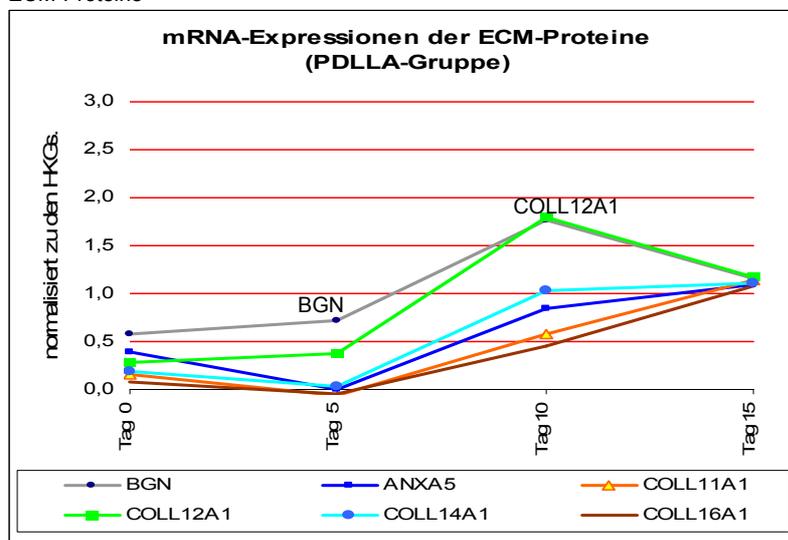
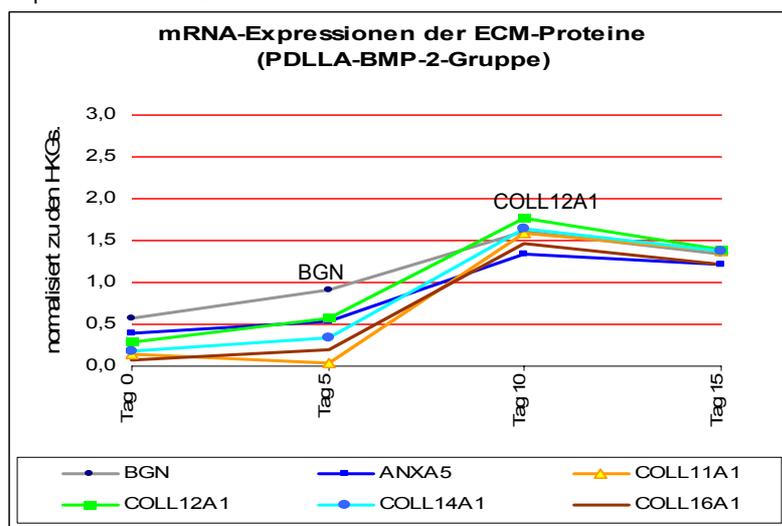


Diagramm III.20 PDLLA-BMP-2-Gruppe: Grafische Darstellung der erhöhten mRNA-Expressionen der ECM-Proteine



### 3.4.3 Die Proteasen und Heat-Shock-Proteine

Die Diagramme III.21 und III.22 zeigen die gegenüber der Kontrollgruppe deutlich veränderten mRNA-Expressionen der Genfamilie der Proteasen und Heat-Shock-Proteine (CBPs). Auffällig war der starke Expressionsanstieg von MMP2 bei der PDLLA-BMP-2-Gruppe am Tag 5. Diese deutliche Erhöhung wurde auch bei der PDLLA-Gruppe beobachtet, jedoch zu einem späteren Versuchszeitpunkt (Tag10). Erst zum Tag 10 wurden sowohl bei der PDLLA- als auch bei der PDLLA-BMP-2-Gruppe alle Steigerungskriterien (s. Tabellen 3.6 und 3.7) erfüllt. Die Verläufe von CBP1 und 2 blieben bei der PDLLA- und PDLLA-BMP-2-Gruppe ohne große abweichende Unterschiede. Die CTSK-Expression zeigte bei der PDLLA-BMP-2-Gruppe nur am Tag 10 sowohl grafisch als auch optisch und rechnerisch alle Kriterien einer mRNA-Steigerung.

Diagramm III.21 PDLLA-Gruppe: Grafische Darstellung der erhöhten mRNA-Expressionen der Proteasen und Heat-Shock-Proteine

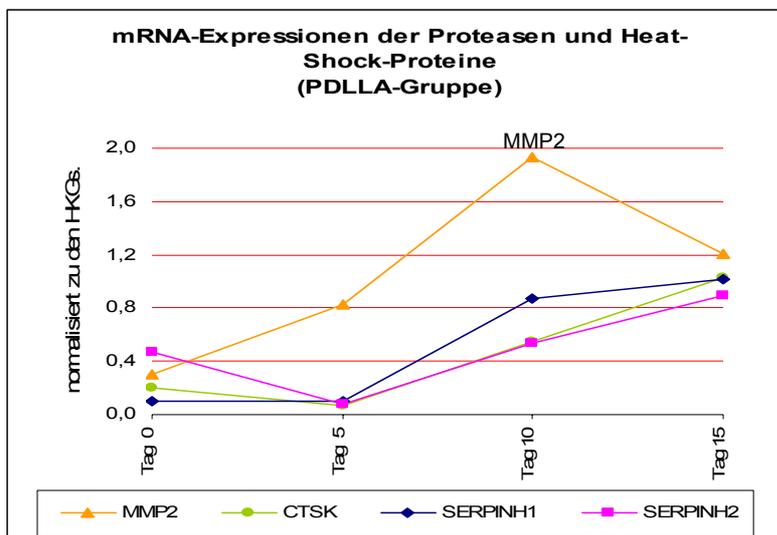
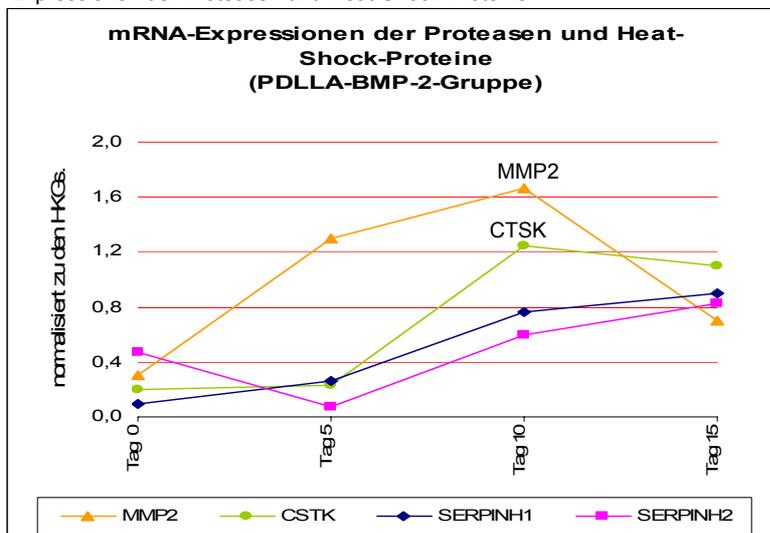


Diagramm III.22 PDLLA-BMP-2-Gruppe: Grafische Darstellung der erhöhten mRNA-Expressionen der Proteasen und Heat-Shock-Proteine



### 3.4.4 Die Wachstumsfaktoren

In der Genfamilie der Wachstumsfaktoren wurden die deutlichen Expressionssteigerungen sowohl bei der PDLLA- als auch bei der PDLLA-BMP-2-Gruppe zum Tag 10 deutlich. Während bei der PDLLA-Gruppe zum Tag 10 die FGF-2- und zum Tag 5 die VEGF-Expression einen starken Anstieg aufwiesen, waren es bei der PDLLA-BMP-2-Gruppe am Tag 10 die FGF-1- und FGF-2- und am Tag 5 die TNF $\alpha$ -Expressionen. Alle tabellarisch aufgelisteten Kriterien (s. Tabellen 3.6 und 3.7 in Kapitel 3.3) konnten in der Genfamilie der Wachstumsfaktoren erst zum Tag 10 erfüllt werden. In der PDLLA-Gruppe war es FGF-2 und in der PDLLA-BMP-2-Gruppe gehörten VEGF, VEGF-B, TGF- $\beta$ 3, FGF-1 und FGF-2 dazu. Wohingegen VEGF-C, TNF $\alpha$ , BMP-8 nicht alle gestellten Kriterien erfüllten. Im weiteren Verlauf waren bei der PDLLA-BMP-2-Gruppe weniger Veränderungen zu verzeichnen als bei der PDLLA-Gruppe.

Diagramm III.23 PDLLA-Gruppe: Grafische Darstellung der erhöhten mRNA-Expressionen der Wachstumsfaktoren

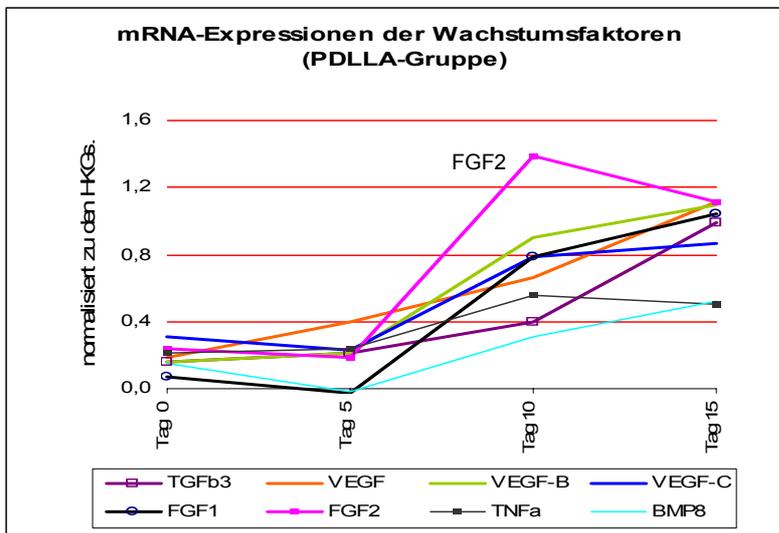
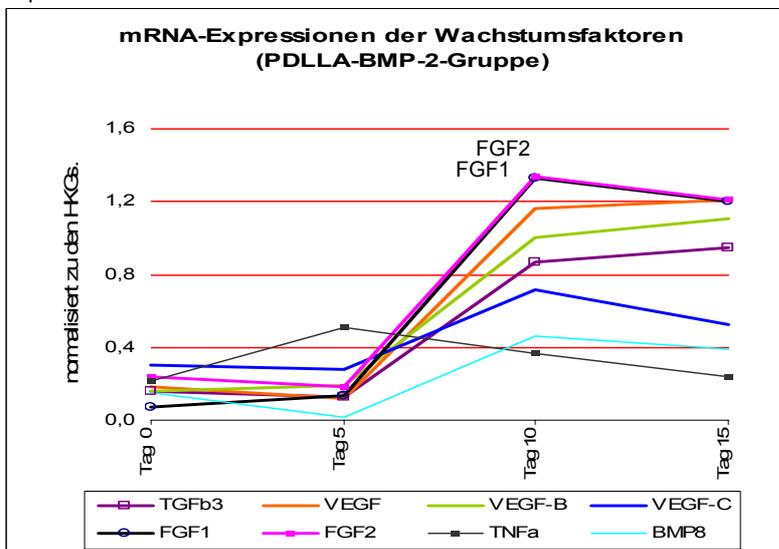


Diagramm III.24 PDLLA-BMP-2-Gruppe: Grafische Darstellung der erhöhten mRNA-Expressionen der Wachstumsfaktoren



### 3.4.5 Die SMADs

Der Unterschied zwischen der PDLLA- und PDLLA-BMP-2-Gruppe wurde grafisch besonders bei der Genfamilie der SMADs verdeutlicht. Starke mRNA-Expressionssteigerungen waren am Tag 10 bei der PDLLA-BMP-2-Gruppe zu verzeichnen, währenddessen der Anstieg bei der PDLLA-Gruppe zu den Tagen 10 und 15 moderat verlief. Am Tag 15 wurde bei der PDLLA-Gruppe nur der Anstieg von SMAD 4 mit den drei gesetzten Kriterien bestätigt (Tabelle 3.9). Bei der PDLLA-BMP-2-Gruppe wurden, trotz einer am Tag 15 grafisch sinkenden SMAD 2-Expression, nochmals gegenüber der Kontrollgruppe gesteigerte Expressionen für SMAD 2, 4 und 5 ermittelt (Tabelle 3.10).

Diagramm III.25 PDLLA-Gruppe: Grafische Darstellung der erhöhten mRNA-Expressionen der SMADs

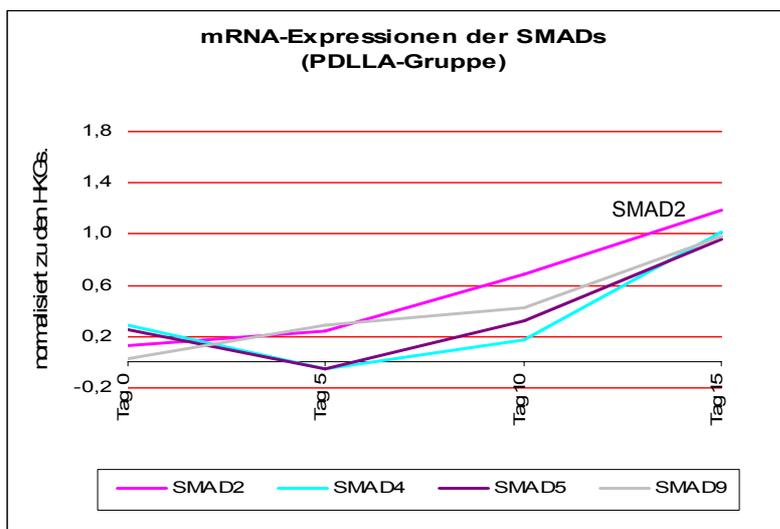
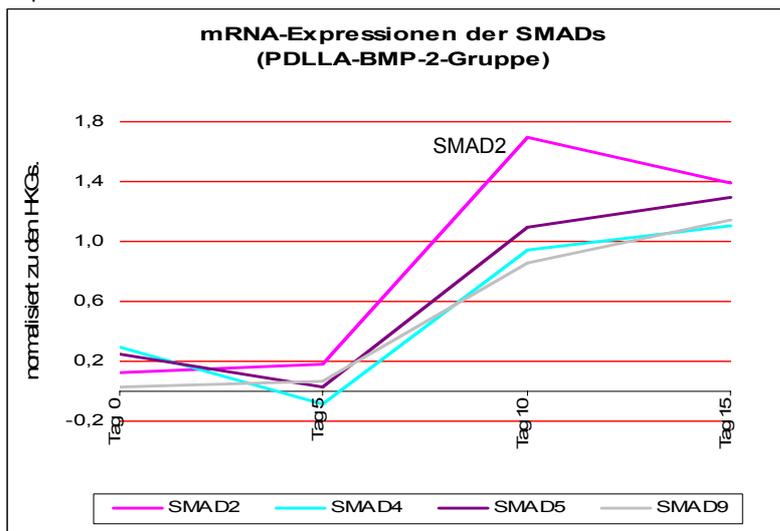


Diagramm III.26 PDLLA-BMP-2-Gruppe: Grafische Darstellung der erhöhten mRNA-Expressionen der SMADs



### 3.4.6 Die Rezeptoren und Zelladhäsionsmoleküle

In den Genfamilien der Rezeptoren und Zelladhäsionsmoleküle war bei der PDLLA-BMP-2-Gruppe am Tag 5 besonders die TGFβR-1-mRNA-Expression grafisch auffällig. Auch am Tag 10 blieb der Verlauf des TGFβR-1-Grafen erhöht. Sowohl die PDLLA-BMP-2- als auch die PDLLA-Gruppe zeigten von TGFβR-1 einen grafischen Anstieg. Rechnerisch und optisch bestätigte sich nur die TGFβR-1-Expression zum Tag 5 bei der PDLLA-BMP-2-Gruppe. Zum Versuchstag 10 war außerdem die ITGA1-mRNA-Expression bei der PDLLA-BMP-2-Gruppe gesteigert. Bei den restlichen Mitgliedern der Rezeptoren- und Zelladhäsionsmolekül-Genfamilien wurden grafisch keine vergleichbar starken Veränderungen wie bei TGFβR-1 und ITGA1 beobachtet.

Diagramm III.27 PDLLA-Gruppe: Grafische Darstellung der erhöhten mRNA-Expressionen der Rezeptoren und Zelladhäsionsmoleküle

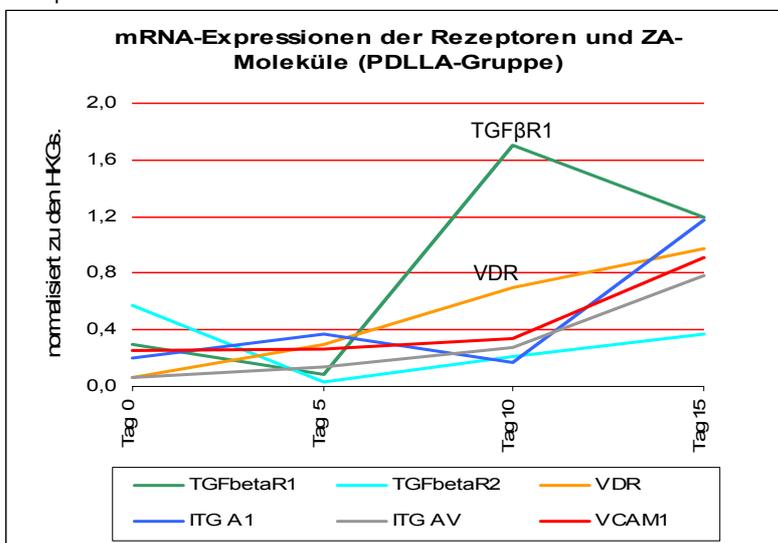
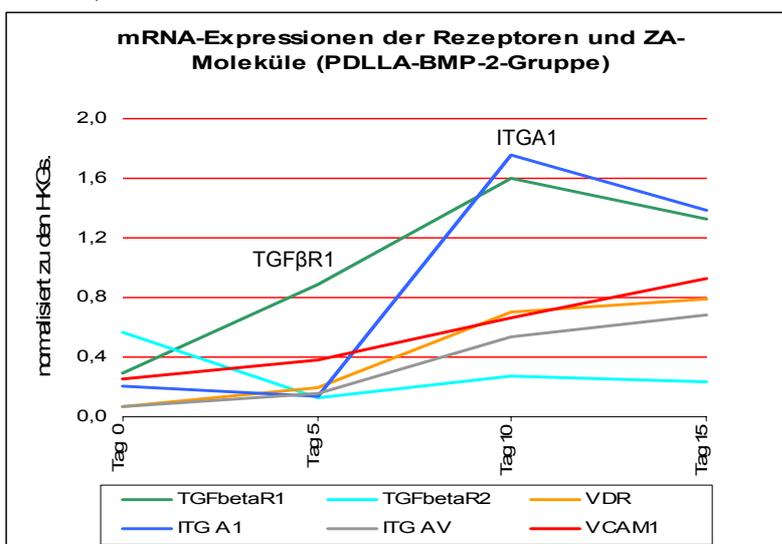


Diagramm III.28 PDLLA-BMP-2-Gruppe: Grafische Darstellung der erhöhten mRNA-Expressionen der Rezeptoren und Zelladhäsionsmoleküle



### **3.5 Die Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Mikroarraytechnologie - Am Beispiel der PDLLA-BMP-2-Gruppe des 10. Versuchstages**

Neben der Etablierung der Mikroarraytechnologie als Methode für die Analyse der PDLLA-BMP-2-beeinflussten humanen Primärosteoblasten war es das Ziel die Reproduzierbarkeit des Mikroarrayverfahrens einzuschätzen. Dazu wurden von der PDLLA-BMP-2-Gruppe des Versuchstages 10 zwei Mikroarrays unter den gleichen Bedingungen durchgeführt. Verglichen wurden die 96 hintergrundkorrigierten, normalisierten Intensitäten und die Ergebnisse der optischen Scoreauswertung.

- Als Differenz für die berechneten Intensitätsabweichungen ergaben sich Werte zwischen 0 bis 0,86 (Mittelwert 0,17).
- Es wurde eine Ratio zwischen 0,65 und 26,2 (Mittelwert 1,88) ermittelt.
- Der Korrelationskoeffizient nach Bravais-Pearson ergab einen Wert von 0,95.

Außerdem waren mRNA-Expressionen vertreten, bei denen keine Angabe der Differenz oder der Ratio möglich war: ALP, COLL17A1, BMP-2, -4, -5 und EGF. Hier ergaben sich nach der Normalisierung gegenüber der Housekeepinggene negative Intensitäten. Die Werte lagen demnach außerhalb des festgelegten Messbereiches, d.h. sie waren kleiner als der geringste Negativ- bzw. Blankwert. Eine Berechnung der Ratio war nicht möglich. Sie wurden in der Bewertung nicht berücksichtigt.

Bei der optischen Scoreauswertung wurden, unabhängig von den rechnerisch ermittelten Werten, 54 Übereinstimmungen und 42 Abweichungen festgestellt. Von den 42 Abweichungen wurden 39 mit einem erhöhten Scorewert in der Wiederholung registriert und 3 mit einem verringerten Scorewert. Der Unterschied lag bei 3 mRNAs bis zu 2 Scoreintensitäten. 8 Expressionen zeigten auf dem Wiederholungsarray einen Scorewert von 2, die bei der Ausgangsgruppe jedoch nicht sichtbar waren (Scorewert=1).

Der Vergleich der rechnerisch ermittelten und der optisch sichtbaren Ergebnisse lässt tendenziell folgende Aussage zu:

Scorewert 1: hintergrundkorrigierter, normalisierter Intensitätswerte  $> 0$  und  $< 0,43$ ;

Scorewert 2: hintergrundkorrigierter, normalisierter Intensitätswerte  $> 0,18$  und  $< 0,76$ ;

Scorewert 3: hintergrundkorrigierter, normalisierter Intensitätswerte  $> 0,23$  und  $< 1,34$ ;

Scorewert 4: hintergrundkorrigierter, normalisierter Intensitätswerte  $> 0,70$  und  $< 1,82$ ;

Scorewert 5: hintergrundkorrigierter, normalisierter Intensitätswerte  $> 1,22$

## 4 DISKUSSION

Der Wachstumsfaktor BMP-2 ist zur Behandlung von Frakturen langer Röhrenknochen seit 2002 in der Klinik zugelassen (Govender et al., 2002; Mc Kay, 2004; Poynton und Lane, 2002; Boden et al., 2000; Valentin-Opran et al., 2002). Präklinische und klinische experimentelle Daten sprechen für die osteoinduktive Wirksamkeit der rekombinanten humanen BMPs (Rh-BMPs). Schon 1965 entdeckte Urist das osteoinduktive Potential (Urist et al., 1965). In zahlreichen Studien wurde die Wirkungsweise von BMP-2 auf Osteoblasten (Kessler et al., 2000), auf die ektopische Knochenbildung (Katagiri et al., 1994; Kessler et al., 2000; Liebermann et al., 2002) und auf die Knochenregeneration analysiert (Schmidmaier et al., 2002a; Kandziora, et al., 2002d; Yasko et al., 1992; Gerhart et al., 1993). BMP-2 besitzt eine wichtige Funktion in der Kontrolle des Schicksals der Zellen und spielt eine Schlüsselrolle als parakrin und autokrin wirkendes Molekül bei der Knochenentwicklung. BMP-2 ist dafür bekannt, die Differenzierung pluripotenter mesenchymaler Stammzellen zu Osteoprogenitorzellen (Urist et al., 1983) und wiederum deren Differenzierung zu reifen Osteoblasten zu stimulieren (Vaes et al., 2002; Yamaguchi et al., 1991; Cheng et al., 2003).

Schmidmaier et al. (2002a) zeigten in einem Rattenmodell anhand radiologischer, biomechanischer und histologischer Untersuchungen einen stimulierenden Effekt von lokal appliziertem BMP-2 auf die Frakturheilung. Der Wachstumsfaktor wurde in dieser Studie lokal aus einer Implantatbeschichtung auf Basis von Poly (D,L-Laktid) freigesetzt. Die Effekte auf die humanen Osteoblastenzelllinie hFOB 1.19 *in vitro* waren bei den unbeschichteten und den PDLLA-beschichteten Titan-Kirschner-Drähten mit denen der Kontrollgruppe vergleichbar. Es wurden keine Unterschiede der Zellproliferation, metabolischen Aktivität, Differenzierung und Kollagen Typ I Produktion detektiert (Schmidmaier et al., 2003). Doch der genaue Wirkmechanismus des Trägermaterials PDLLA und des Wachstumsfaktors BMP-2 auf die Frakturheilung und die für die Knochenbildung notwendigen humanen Primärosteoblasten ist noch nicht eindeutig geklärt. Um dies genauer zu analysieren wurden in der vorliegenden Arbeit humane Primärosteoblasten unter dem Einfluss des Trägermaterials PDLLA und des Wachstumsfaktors BMP-2 hinsichtlich der Expression von 96 osteogeneserelevanten Genen *in vitro* untersucht. Für die Beurteilung der Osteoblastogenese im zeitlichen Verlauf, wurden die Versuchszeitpunkte Tag 0, 5, 10 und 15 festgelegt. Es wurden die mRNA-Expressionsmuster von humanen unbeeinflussten Primärosteoblasten, von humanen Primärosteoblasten unter dem Einfluss von unbeschichteten Titan-Kirschner-Drähten, unter dem Einfluss von PDLLA-beschichteten Titan-Kirschner-Drähten und unter dem Einfluss von PDLLA-BMP-2-beschichteten Titan-Kirschner-Drähten untersucht. Mit Hilfe der Mikroarraytechnologie konnten Tendenzen der mRNA-Expressionsveränderungen von 7 Genfamilien analysiert werden. Kriterien waren eine Ratio  $\geq 2$  gegenüber dem Versuchsbeginn bzw. der Kontrollgruppe. Neben der Analyse der rechnerisch ermittelten Ergebnisse wurden die Röntgenbilder der Mikroarrays subjektiv optisch bewertet. Dazu wurde eine optische Intensitätsskala mit den Abstufungen 5, 4, 3, 2 und 1 festgelegt, wobei 5 für eine stark sichtbare Intensität und damit positive Hybridisierungsreaktion auf der Mikroarraymembran stand und 1 keine sichtbare Veränderung gegenüber dem Hintergrund bedeutete. Aufgrund der Menge

an Daten beschränkt sich die Diskussion auf die Osteoblastenmarker und die eindeutig veränderten Ergebnisse. Diese mRNA-Ergebnisse wiesen als

1. Kriterium eine Ratio  $\geq 2$  gegenüber dem Tag 0 bzw. der Kontrollgruppe desselben Versuchstages auf. Gleichzeitig waren sie
2. auch optisch auf dem Array deutlich sichtbar (Scorewert  $\geq 2$ ) und hoben sich
3. in der grafischen Gegenüberstellung von den anderen Genfamilienmitgliedern ab.
4. Zusätzlich wurden die mRNA-Expressionen gegenüber der 50%-igen Expression vom Housekeepinggen GAPDH verglichen, um die Relevanz der Expressionsveränderung besser einschätzen zu können.

Es wurde folgenden Fragen nachgegangen: Welche Gene werden im Rahmen des Versuchsverlaufes durch die PDLLA- und PDLLA-BMP-2-Beschichtung stimuliert? Welche Genfamilien werden am ersten Versuchszeitpunkt expremiert, welche mRNAs sind erst am Ende des Versuches hoch reguliert? Ist aus den gewonnenen Ergebnissen ein zeitliches Muster der expremierten Genfamilien unter dem Einfluss von PDLLA-BMP-2 abzulesen? Die gewonnenen Erkenntnisse sollen Aufschluss für die Weiterentwicklung biologischer Einflussmöglichkeiten auf den Knochenstoffwechsel liefern.

Die optischen Scoreergebnisse der unbeeinflussten Primärosteoblasten zeigten schon zum Versuchsbeginn erhöhte Werte vom Transkriptionsfaktor CBF $\alpha$ 1, von verschiedenen ECM-Proteinen, wie Osteonectin (SPARC), Decorin, Biglykan, von verschiedenen Kollagentypen (III, XII), Fibronectin, aber auch von den SMADs (1 und 6), verschiedenen Zelladhäsionsproteinen (ITGA1, ITGB1), Proteasen, wie Gelatinase A (MMP2) und B (MMP9), und vom Wachstumsfaktor BMP-3. Am 5. Versuchstag stellten sich gegenüber dem Versuchsbeginn 39 gesteigerte mRNA-Expressionen (Ratio  $\geq 2$ ) in der Genfamilie der Transkriptionsfaktoren, der ECM-Proteine (Kollagene, Biglycan, Osteopontin), der Proteasen, Wachstumsfaktoren, Rezeptoren, SMADs und Zelladhäsionsproteine dar. Doch viele dieser mRNA-Expressionsveränderungen besaßen keinen optischen Scorewert  $\geq 2$  oder hoben sich nicht gegenüber dem GAPDH-Kriterium ab. Sie wurden demnach nicht eindeutig bestätigt. Am 10. Versuchstag waren bei den unbeeinflussten Primärosteoblasten weniger Steigerungen im Vergleich zum Tag 0 zu verzeichnen. Erst ab dem Versuchstag 15 wurden die Ratioergebnisse (gegenüber dem Tag 0) sowohl optisch als auch gegenüber der GAPDH-Expression stark erhöht. Zum 15. Versuchstag waren die gleichen Genfamilien vertreten wie zum Tag 5, jedoch mit mehr eindeutigen Ergebnissen. Zusätzlich wurden die Heat Shock Proteine (CBPs / SERPINHs) expremiert. Insgesamt 46 mRNAs steigerten am 15. Versuchstag im Vergleich zum Tag 0 ihre Expressionen (Ratio  $\geq 2$ ), was auf eine gesteigerte Syntheseleistung am Versuchstag 15 und somit auf die Proliferations- bzw. Matrixreifungsphase hindeutet. Somit wurde deutlich, dass humane Primärosteoblasten *in vitro* ab dem Versuchstag 15 erhöhte mRNA-Expressionen gegenüber dem Versuchsbeginn in verschiedenen Genfamilien aufwiesen.

Bei der PDLLA- und der PDLLA-BMP-2-Gruppe kristallisierten sich über den 15-Tageversuch deutliche Unterschiede gegenüber den unbeeinflussten Primärosteoblasten heraus. Während sich zum Tag 5 bei der Titan- und bei der PDLLA-Gruppe keine erhöhten mRNA-Expressionen gegenüber der Kontrollgruppe

abzeichneten, waren bei der PDLLA-BMP-2-Gruppe schon die Rezeptor- und Heat Shock Protein-Genfamilien mit gesteigerten mRNA-Expressionen vertreten: TGF $\beta$ R-1, TGF $\beta$ R-2 und CBP1 (SERPINH1) waren erhöht expremiert. Insbesondere die TGF $\beta$ R-1-mRNA-Expression stieg bei der PDLLA-BMP-2-Gruppe auf einen Wert an, der mehr als der 50%-igen Expression von GAPDH entsprach. Vor allem zum Versuchstag 10 bestätigte sich die Hypothese, dass PDLLA-BMP-2-beschichtete Titan-Kirschner-Drähte die mRNA-Expressionen spezifischer Gene in humanen Primärosteoblasten *in vitro* stimulieren. 27 der 96 untersuchten mRNA-Expressionen zeigten bei PDLLA-BMP-2-Gruppe eine Ratio  $\geq 2$  im Vergleich zur Kontrollgruppe. Bei der PDLLA-Gruppe waren 20 mRNA-Expressionen gegenüber der Kontrollgruppe erhöht. Wie bei der PDLLA-BMP-2-Gruppe wurden auch bei der PDLLA-Gruppe am 10. Versuchstag ähnliche Genfamilien expremiert: Transkriptionsfaktoren, ECM-Proteine, HSP, Proteasen, Wachstumsfaktoren, Rezeptoren, SMADs und Zelladhäsionsmoleküle.

Am 15. Versuchstag war das Expressionsmuster zwischen der PDLLA- und PDLLA-BMP-2-Gruppe unterschiedlich. Während bei der PDLLA-Gruppe die mRNA-Expressionen von den Genfamilien der ECM-Proteine, der Wachstumsfaktoren, der SMADs und der Zelloberflächenmoleküle weiterhin gegenüber der Kontrollgruppe gesteigert blieben, wurden bei der PDLLA-BMP-2-Gruppe dagegen keine ECM-mRNAs mehr erhöht expremiert. Starke Expressionssteigerungen, die sich bei der PDLLA-BMP-2-Gruppe am Tag 10 ergaben und auch noch am Tag 15 erhöht blieben, waren TGF- $\beta$ 3, VEGF-B, SMAD 2, SMAD 4, SMAD 5 und ITGA1. Insgesamt konnten vier mRNA-Expressionen nach den gestellten Kriterien festgelegt werden, die nur bei der PDLLA-BMP-2-Gruppe und bei keiner anderen Versuchsgruppe erhöht wurden: COLL11A1, COLL14A1, ITGA1 und TGF $\beta$ R-1. Bei der Titangruppe änderte sich während des gesamten Versuchsverlaufs das mRNA-Expressionsmuster nicht wesentlich im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die veränderten Expressionen der Titangruppe wurden weder mit dem optischen Scorewert  $\geq 2$  bestätigt noch hoben sie sich grafisch von den Expressionen der Kontrollgruppe ab. Auf der molekularen Ebene wurde somit die deutliche Beeinflussung von PDLLA-BMP-2 und von PDLLA am 10. Versuchstag auf humane Primärosteoblasten *in vitro* bewiesen. Die Ergebnisse mit den erfüllten Kriterien sind zusammenfassend in der Abbildung 4.1. dargestellt.

Abbildung 4.1: Die Zusammenfassung der erhöhten mRNA-Expressionen von den Versuchsgruppen (Rot dargestellt sind die mRNA-Expressionen, die neben der erhöhten Ratio  $\geq 2$  (im Vergleich zur Kontrollgruppe desselben Versuchstages) und dem erhöhten optischen Scorewert  $\geq 2$ , zusätzlich eine Expressionshöhe von mehr als der 50%-igen Expression vom Housekeepinggen GAPDH aufzeigten.)

	<b>Tag 5</b>	<b>Tag 10</b>	<b>Tag 15</b>
<b><u>Titangruppe</u></b>	/	/	/
<b><u>PDLLA-Gruppe</u></b>	/	<b>Transkriptionsfaktoren</b> (TWIST, <b>MSX1</b> ), <b>ECM-Proteine</b> ( <b>COLL12A1</b> , <b>BGN</b> , ANXA5), <b>HSP</b> (CBP1+2), <b>Proteasen</b> ( <b>MMP2</b> , CTSK), <b>Wachstumsfaktoren</b> (VEGF, VEGFB, TGF $\beta$ 3, FGF1, <b>FGF2</b> , TNF $\alpha$ ), <b>Rezeptoren</b> (VDR), <b>SMAD</b> (SMAD2+5+9), <b>ZAmoleküle</b> (VCAM)	<b>ECM-Proteine</b> (COLL9A2, COLL10A1), <b>Wachstumsfaktoren</b> (TGF $\beta$ 1, <b>TGF<math>\beta</math>3</b> , <b>VEGFB</b> ), <b>SMAD</b> ( <b>SMAD4</b> ), <b>ZAmoleküle</b> (ITGA2, CD36, CD36L1)
<b><u>PDLLA-BMP-2-Gruppe</u></b>	<b>HSP</b> (CBP1), <b>Rezeptoren</b> ( <b>TGF<math>\beta</math>R1</b> , TGF $\beta$ R2)	<b>Transkriptionsfaktoren</b> (TWIST, <b>MSX1</b> ), <b>ECM-Proteine</b> ( <b>COLL11A1</b> , <b>COLL12A1</b> , <b>COLL14A1</b> , <b>BGN</b> , <b>ANXA5</b> ), <b>HSP</b> (CBP1+2), <b>Proteasen</b> ( <b>MMP2</b> , <b>CTSK</b> ) <b>Wachstumsfaktoren</b> ( <b>VEGF</b> , <b>VEGFB</b> , VEGFC, <b>TGF<math>\beta</math>3</b> , <b>FGF1</b> , <b>FGF2</b> , TNF $\alpha$ , BMP8), <b>Rezeptoren</b> (VDR), <b>SMAD</b> ( <b>SMAD2+4+5+9</b> ), <b>ZAmoleküle</b> (VCAM, <b>ITGA1</b> , ITGAV)	<b>Wachstumsfaktoren</b> (TGF $\beta$ 1, <b>TGF<math>\beta</math>3</b> , <b>VEGFB</b> ), <b>SMAD</b> ( <b>SMAD2+4+5</b> ), <b>ZAmoleküle</b> ( <b>ITGA1</b> , ITGA2, CD36, CD36L1)

## 4.1 DIE DISKUSSION DER MIKROARRAYERGEBNISSE

Die Diskussion der Mikroarrayergebnisse beinhaltet die Osteoblastenmarker sowie die deutlichen PDLLA-BMP-2- bzw. PDLLA-induzierten mRNA-Expressionsveränderungen. Nur Expressionsveränderungen, bei denen folgende Kriterien zutrafen, sind in Abbildung 4.1 hervorgehoben und werden gegenüber den Literaturergebnissen näher beleuchtet: eine Ratio  $\geq 2$  gegenüber der Kontrollgruppe desselben Versuchstages, einen Scorewert von  $\geq 2$ , einen deutlichen grafischen Unterschied gegenüber den anderen Genfamilienmitgliedern sowie eine mRNA-Expression von  $\geq 50\%$  der GAPDH-Expression.

### 4.1.1 Die Charakterisierung der Primärosteoblasten: Die Osteoblastenmarker

Der Transkriptionsfaktor CBF $\alpha$ 1 gilt als der früheste und meist spezifische, exprimierte Marker der Osteoblastogenese. Verschiedene Arbeitsgruppen bewiesen anhand von *in vivo* und *in vitro* Studien, dass die CBF $\alpha$ 1-Expression streng auf skelettale Strukturen beschränkt ist und dass CBF $\alpha$ 1 die Expression von vielen osteoblastären Genen reguliert und somit die Knochenbildungsrate von differenzierten Osteoblasten kontrolliert (Ducy et al., 1997; Korchynskyi et al., 2003; Komori et al., 1997; Otto et al., 1997). CBF $\alpha$ 1 wird von Osteoprogenitorzellen schwach expremiert. Die Expression steigt jedoch mit der Osteoblastendifferenzierung an und sinkt bei Osteozyten wieder ab (Ducy et al., 1997; Kim et al., 1999). Während des Versuches wurden bei der unbeeinflussten Kontrollgruppe und bei den beeinflussten Versuchsgruppen eine hohe mRNA-Expression des osteoblastenspezifischen Markers CBF $\alpha$ 1 über den gesamten Versuchsverlauf beobachtet. In allen vier Versuchsgruppen zeigte sich grafisch ein Anstieg der Expressionen zu den Tagen 10 und 15, rechnerisch ergab sich jedoch keine Ratio  $\geq 2$ .

BMP-2 induziert die CBF $\alpha$ 1-Expression und die Osteoblastendifferenzierung (Gori et al., 1999; Viereck et al., 2002). Viereck et al. (2002) beobachteten, dass die CBF $\alpha$ 1-mRNA bei unbeeinflussten Primärosteoblasten in der Zellkultur erst zum Tag 21 und unter BMP-2-Einfluss zum Tag 14 (Maximum am Tag 21) erhöht wird, wobei eine schnellere und höhere CBF $\alpha$ 1-Expression mit einer beschleunigten Matrixreifung korreliert. Eine Expressionssteigerung unter dem PDLLA-BMP-2-Einfluss gegenüber der Kontrollgruppe wurde in diesem 15-Tageversuch jedoch nicht festgestellt. Unter dem Aspekt, dass CBF $\alpha$ 1 schon zum Versuchsbeginn hoch expremiert war und die Expression sich nicht wesentlich unter dem Einfluss von den beschichteten Titan-Kirschner-Drähten erhöhte, ist zu vermuten, dass bei allen Versuchsgruppen dieselben CBF $\alpha$ 1-abhängigen Strukturproteine expremiert und dieselben physiologischen osteoblastären Funktionen erfüllt werden wie am Versuchsanfang.

In vielen Studien wird Osteocalcin (OCN) als der „einzige wahre Osteoblastenmarker der voll differenzierten Osteoblasten“ bezeichnet (Price et al., 1980; Ducy et al., 2000c). OCN wird in der späten Phase der Osteoblastenreifung expremiert (Owen et al., 1990; Ducy, 2000a, Viereck et al., 2002; Siggelkow et al., 1999). Es bindet Calcium-Ionen und Hydroxylapatit mit hoher Affinität und kontrolliert die

Größe sowie die Geschwindigkeit der Kristallbildung (Romberg et al., 1986; Roach, 1994). Jedoch ist OCN nicht essentiell für die Mineralisation (Ducy et al., 1996). In der vorliegenden Studie zeigten sich während des gesamten Versuchsverlaufs keine Steigerungen bei der Kontrollgruppe. Es wurden zwar sowohl bei der PDLLA- als auch der PDLLA-BMP-2-Gruppe erhöhte Expressionen zum Tag 10 und zum Tag 15 gegenüber der Kontrollgruppe berechnet (Ratio  $\geq 2$ ), jedoch waren diese Expressionen weder grafisch noch optisch belegbar. Viereck et al. (2002) und Diefenderfer et al. (2003) beobachteten, dass BMP-2 allein keinen wesentlichen Einfluss auf die OCN-Expression bei humanen POBs und bei humanen BMSCs besitzt. Eine nicht deutlich erhöhte mRNA-Expression von OCN über den 15-Tageversuch könnte demnach bedeuten, dass die Zellen das Stadium der Mineralisation am 15. Tag noch nicht erreichten. Eine Tendenz der Differenzierung zum reifen Osteoblasten und der beginnenden Mineralisation ist jedoch aufgrund der geringen Steigerung zu vermuten. Siggelkow et al. (1999) belegten, dass in einer *in vitro* Kultur mit humanen Primärosteoblasten die OCN-Expression und somit die Mineralisationsphase selbst bis zum Tag 35 nicht zu verzeichnen war, wohingegen diese Beobachtungen bei Rattenosteoblasten möglich waren. Bekannt ist weiterhin, dass eine OCN-Expression nicht allein von CBF $\alpha$ 1 abzuhängen scheint (Viereck et al., 2002; Banerjee et al., 1997; Franceschi, 1999). MSX1 gilt als Co-Transkriptionsfaktor für CBF $\alpha$ 1 und reguliert somit ebenfalls die Osteocalcin-Transkription (Hoffmann et al., 1994; Towler et al., 1994; Ducy et al., 2000c). Eine Steigerung von MSX1 zum Tag 10 unter dem PDLLA- bzw. PDLLA-BMP-2-Einfluss könnte mit der beginnenden gering erhöhten Osteocalcin-Expression korrelieren und diese erklären. Um besser einschätzen zu können, ob und wann die humanen Primärosteoblasten das Stadium der Mineralisierung erreichen, bleibt der Zeitraum nach dem Tag 15 interessant.

Osteopontin (OPN) ist ein multifunktionelles ECM-Molekül und ebenfalls ein Osteoblastenmarker. OPN ist für die Regulation der Calciumbindung und die Verlängerung der Hydroxylapatitkristalle bei der Knochenbildung und somit für die Kalzifizierung wichtig (Chen et al., 1993b; Reinholt et al., 1990; Boskey et al., 1993; 1995). OPN reguliert außerdem das Zellattachement und die Migration von Osteoblasten und Osteoklasten über verschiedene Integrinrezeptoren (Sodek et al., 2002; Teitelbaum, 2000; Chen et al., 1994; McKee und Nanci, 1996). Die unbeeinflussten Primärosteoblasten exprimierten zum Tag 5 erhöht mRNA von Osteopontin. Am Tag 15 steigerte sich die mRNA von Osteopontin erneut. Doch sowohl grafisch als auch optisch waren die OPN-mRNA-Expressionen an beiden Tagen nicht auffällig. Bei den anderen Versuchsgruppen veränderten sich die mRNA-Expressionsmuster von Osteopontin gegenüber der Kontrollgruppe ebenfalls nicht. Lecanda et al. (1997) beobachteten hingegen unter BMP-2-Einfluss bei humanen MDSC (marrow-driven stromacells) eine erhöhte Osteopontin-mRNA zwischen dem 1. und 3. Tag. Beck et al. (2000) zeigten wiederum, dass die Osteopontinexpression stark von der ALP-Aktivität an der Zelloberfläche und zusätzlich von der Ascorbinsäure- und der  $\beta$ -Glycerophosphat-Anwesenheit im Medium abhängt, da freies Phosphat die OPN-RNA-Expression reguliert. Es wird vermutet, dass OPN, in Abhängigkeit vom intrazellulären Phosphatgehalt, einen entscheidenden Beitrag beim Calciumtransport spielt (Beck et al., 2000; Chen et al., 1992) und die Hydroxylapatitbildung inhibiert (Boskey et al., 1993; 1995). Die Induktion der ALP findet jedoch solange nicht statt, bis die Proliferation nicht abgeschlossen

ist. PDLLA- und PDLLA-BMP-2 besitzen in dem beobachteten Zeitraum keinen induzierenden Effekt auf die OPN-mRNA-Expressionen von humanen Primärosteoblasten *in vitro*.

Die alkalische Phosphatase (ALP) ist ein früher Osteoblastendifferenzierungsmarker (Turksen und Aubin, 1991; Watts, 1999; Zheng et al., 1992). In verschiedenen Zellkulturen konnte gezeigt werden, dass Ascorbat,  $\beta$ -Glycerophosphat (Siggelkow et al., 1999), aber auch Dexamethason (Diefenderfer et al., 2003) zu einer gesteigerten ALP-mRNA-Expression bzw. -Aktivität führen. Der BMP-Einfluss wird hingegen kontrovers diskutiert (Diefenderfer et al., 2003; Takuwa et al., 1991; Komori et al., 1997; Lecanda et al., 1997; Kim et al., 2004). Es wurde zu keinem Versuchszeitpunkt, weder bei der Kontrollgruppe noch bei den PDLLA- bzw. PDLLA-BMP-2-Versuchsgruppen, trotz Ascorbat- und  $\beta$ -Glycerophosphatzusatz, eine erhöhte ALP-mRNA-Expression beobachtet. Kim et al. (2004) ermittelten, dass eine Überexpression vom BMP-2-stimulierten Transkriptionsfaktor MSX2 mit einer verminderten ALP-Expression korreliert. In dem vorliegenden Versuchsaufbau wurde jedoch keine veränderte Homeoprotein-mRNA-Expression von MSX2 unter PDLLA-BMP-2 festgestellt. Hu et al. (2001) bewiesen in kultivierten primären Hühnerchondrozyten und Hühnerosteoblasten, dass MSX1 die ALP-Expression supprimiert. Eine Interaktion zwischen MSX1 und den Osteoblastenmarkern, ähnlich wie bei MSX2, kann demnach vermutet werden. Ein anderer Grund für die noch nicht erhöhte mRNA-Expression von ALP könnte darin liegen, dass es sich noch um junge Progenitorzellen handelt. Junge Progenitorzellen exprimieren noch keine Osteoblastenmarker, sie differenzieren zunächst über eine definierte Anzahl von Zellteilungen zu reifen Osteoblasten, die erst postmitotisch, in der Phase der Matrixreifung, Osteoblastenmarker, wie ALP, exprimieren (Aubin et al., 1993; Owen et al., 1990; Siggelkow et al., 1999).

#### 4.1.2 Der Transkriptionsfaktor MSX1

MSX1 (Hox 7) ist für die spezifischen zeitlichen und räumlichen Veränderungen des Genexpressionsmusters verantwortlich. MSX1 beeinflusst als Co-Transkriptionsfaktor die mRNA-Expressionen direkt oder indirekt über CBF $\alpha$ 1 (Hu et al., 2001). Gendefekte von MSX1 verursachen craniale und craniofaciale Anomalien (Jabs et al., 1993; Satokata und Maas, 1994). Während die Kontrollgruppe eine Expressionssteigerung zum Versuchstag 15 zeigte, erhöhte sich bei den beiden Gruppen mit den beschichteten Drähten (PDLLA- und PDLLA-BMP-2-Gruppe) die MSX1-mRNA-Expression gegenüber der Kontrollgruppe zum Tag 10 zusätzlich. Verschiedene Arbeitsgruppen bestätigten, dass MSX1 durch BMPs induziert wird (Jones et al., 1991; Lyons et al., 1995), zudem konnten 3 Bindungsstellen für SMAD am MSX1-Genpromotor nachgewiesen werden (Martinez et al., 2002). Binato et al. (2006) beobachteten, dass BMP-2, BMP-4, die SMAD 8- sowie die SMAD 4-Signalübermittlung für die Aktivierung von MSX1 notwendig sind. Demnach könnte in der Proliferations- und Matrixsynthesephase eine PDLLA- und PDLLA-BMP-2-induzierte SMAD-Expressionssteigerung mit einer erhöhten Expression von MSX1 korrelieren. Grafisch kristallisierte sich ein geringer Anstieg der MSX1-mRNA-Expression bei der PDLLA-BMP-2-Gruppe schon am Tag 5 heraus. In diesem Versuchsaufbau wurde jedoch erst am Tag 10 rechnerisch und optisch bewiesen, dass sowohl PDLLA

als auch PDLLA-BMP-2 die MSX1-mRNA-Expressionen gegenüber der Kontrollgruppe erhöhen. Ein deutlicher Unterscheid zwischen der PDLLA- und PDLLA-BMP-2-Gruppe wurde nicht beobachtet.

#### 4.1.3 Die Kollagene

Die Vielfältigkeit, die Repräsentanz der Kollagentypen in verschiedenen Geweben sowie ihre Interaktionen untereinander wurden in zahlreichen Studien untersucht (Van der Rest und Garrone, 1991). Kollagene besitzen eine bedeutende Rolle bei der Entwicklung und der Heilung von Geweben in Säugetieren. Sie wurden im vorliegenden Versuch über den gesamten Zeitraum von 15 Tagen erhöht von den Osteoblasten expremiert.

Das ubiquitär vorkommende Kollagen Typ I (COLL1A1) wird schon bei unreifen Osteoprogenitorzellen bis zum reifen Osteoblasten expremiert (Aubin und Triffitt, 2002) und ist deshalb ebenfalls als Osteoblastenmarker bekannt. Seine Expression wurde in der Differenzierungsphase beobachtet und verminderte sich zum Zeitpunkt der Mineralisation (Aubin und Triffitt, 2002). Die unbeeinflussten Primärosteoblasten expremierten in diesem Versuchsaufbau zum Tag 5 erhöht mRNA von Kollagen Typ 1A1. Doch sowohl grafisch als auch optisch (Score=1) war die Kollagen Typ 1A1-mRNA-Expression wenig auffällig. Bei den anderen Versuchsgruppen veränderten sich das mRNA-Expressionsmuster von Kollagen Typ 1A1 gegenüber der Kontrollgruppe ebenfalls nicht. Lecanda et al. (1997) beobachteten unter BMP-2-Einfluss bei humanen MDSCs hingegen eine erhöhte Kollagen Typ 1A1-mRNA-Expression ab dem 4. Tag. Aus diesen gewonnenen Erkenntnissen wird deutlich, dass PDLLA- und PDLLA-BMP-2 in dem beobachteten Zeitraum keinen induzierenden Effekt auf die Kollagen Typ I-mRNA-Expressionen von humanen Primärosteoblasten *in vitro* besitzen.

Anders verhielt es sich mit den Kollagentypen III und XII. Schon zum Versuchsbeginn waren die Kollagene Typ III und Typ XII deutlich sichtbar auf dem Mikroarray vertreten. Kollagen Typ XII geht mit Kollagen Typ I-Fibrillen eine Verbindung ein und moduliert die Interaktion mit anderen Matrixkomponenten (Bateman et al., 1996). Auch Kollagen Typ III steht für die Modulation der Fibrillen, welche es aber zusammen mit Kollagen Typ V durchführt (Niyibizi und Eyre, 1989). Kollagen Typ III spielt eine entscheidende Rolle bei der Wundheilung in Kollagen Typ I-basierenden Geweben, wo es zusätzlich auch von Chondrozyten expremiert wird (Eyre, 2002). Alle drei mRNAs der Kollagentypen (III, V, XII) waren bei der unbeeinflussten Kontrollgruppe im Versuchsverlauf gegenüber dem Tag 0 erhöht expremiert und blieben auch bei den anderen Versuchsgruppen gesteigert. Wie die Kollagentypen I und II sind auch die Kollagentypen III und V für die Frakturheilung von besonderer Bedeutung (Eyre, 2002; Lane et al., 1987; Keene et al., 1987; Von der Mark et al., 1976).

Zu den späteren Versuchszeitpunkten wurden bei der Kontrollgruppe zusätzlich die mRNAs der Kollagene Typ XI, XIV und XVI gesteigert (Tag 10 und 15). Das Kollagen Typ XIV gehört neben Kollagen Typ XII zu den FACIT-Kollagene, welche Sequenzähnlichkeiten mit Kollagen Typ I besitzen und so eine

Kooperation untereinander bzw. zu verschiedenen anderen fibrillenbindenden Proteinen, wie Decorin und Biglykan, eingehen können (Watt et al., 1991; Gordon und Olsen, 1990; Gordon et al., 1991).

Neben diesen gewonnenen Kollagen-Ergebnissen der unbeeinflussten Primärosteoblasten *in vitro* waren besonders die Kollagene XI, XII und XIV bei den anderen Versuchsgruppen interessant. Diese Kollagen-mRNAs zeigten unter dem PDLLA- und dem PDLLA-BMP-2-Einfluss eine zusätzliche Steigerung. Die Expressionen von Kollagen Typ XI und XIV wurden nur unter dem PDLLA-BMP-2-Einfluss gegenüber der Kontrollgruppe nochmals erhöht. Wichtig in diesem Zusammenhang scheint die Erkenntnis, dass Kollagen Typ XI die Regulation der Kollagenfibrillogenese im Knorpelgewebe übernimmt (Warner et al., 2007). Kollagen Typ XI kann sowohl mit den Kollagentypen II und IX im Knorpelgewebe als auch mit dem Kollagen Typ I im Knochengewebe assoziiert sein (Morris und Bächinger, 1987; Niyibizi und Eyre, 1989; Nishiyama et al., 1994; Eyre et al., 2006). Kollagen Typ XII wurde dagegen bei beiden Gruppen mit den beschichteten Titan-Kirschner-Drähten gesteigert.

Kollagen Typ XVI-mRNA wurde aufgrund des negativen Referenzwertes von der Kontrollgruppe (am Tag 10) nicht berechnet, doch anhand des optischen Scores und in der grafischen Auswertung zeigte sich ein starker Expressionsanstieg unter dem PDLLA-BMP-2-Einfluss am Tag 10. Die Kollagentypen IX und X wurden nur unter dem PDLLA-Einfluss erhöht. Beide Kollagentypen wurden zu einem geringen Anteil auch bei der Frakturheilung beobachtet (Ashhurst, 1990). Kollagen Typ IX wurde hauptsächlich in Knorpelgewebe und Kollagen Typ X in kalzifizierten Regionen, in der Nähe von Chondrozyten und hypertrophen Chondrozyten von verschiedenen Arbeitsgruppen nachgewiesen (Ashhurst, 1990; Sekiya et al., 2005; Hegert et al., 2002).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Kollagene zu jedem Versuchszeitpunkt hoch expremiert waren. Prinzipiell erhöhten sich in jeder Versuchsgruppe die gleichen Kollagentypen wie bei der Kontrollgruppe. Gesteigerte mRNAs von Kollagentypen unter dem PDLLA- bzw. PDLLA-BMP-2-Einfluss lassen eine positive Korrelation zu den biomechanischen *in vivo* Ergebnissen von Schmidmaier et al. (2002a) vermuten. Insbesondere die Kollagentypen XI, XII, XIV und wahrscheinlich auch XVI erhöhten unter dem PDLLA-BMP-2-Einfluss ihre mRNA-Expressionen gegenüber der Kontrollgruppe. Möglicherweise sind durch den PDLLA-BMP-2-Einfluss verfrühte mRNA-Expressionen in der Kollagenfamilie zu erwarten.

#### **4.1.4 Die nichtkollagenen extrazellulären Matrixproteine**

Die Expressionen von Matrixproteinen hängen vom Differenzierungsstatus der Osteoblasten ab und spielen eine Rolle im Mineralisierungsprozess. Bei den nichtkollagenen extrazellulären Matrixproteinen waren sowohl grafisch als auch optisch (Score  $\geq 2$ ) Fibronectin, Osteonectin (Sparc), Decorin und Biglycan (BGN), aber auch AnnexinV (ANXA5) bei allen Versuchsgruppen stark expremiert. Während Fibronectin, Decorin und Sparc über den gesamten Versuchsverlauf unverändert hoch blieben, wurden BGN und ANXA5 unter dem PDLLA- und PDLLA-BM-2-Einfluss gesteigert expremiert.

Decorin und Biglycan spielen eine bedeutende Rolle während der Osteoblastogenese in der Matrixsynthesephase, insbesondere der Kollagenfibrillenformation. Decorin und Biglycan konkurrieren um die Bindung an Kollagen, wobei Biglycan Decorin kompensieren kann (Schönherr et al. 1994; Corsi et al., 2002). In dem vorliegenden Versuch waren Decorin und Biglycan sowohl bei der Kontrollgruppe als auch bei den anderen Versuchsgruppen stark exprimiert. Die Wichtigkeit der Decorinexpression wird von dem Aspekt unterstrichen, dass Decorin die TGF- $\beta$ -Aktion moduliert (Ruoslahti und Yamaguchi, 1991; Yamaguchi et al., 1990). BMP-2 beeinflusst die Decorin- und Biglycan-Expressionen (Takagi et al., 1999). Für Biglycan wird ebenfalls eine Interaktion mit dem BMP-4-Signalweg diskutiert (Moreno et al., 2005). In diesem Versuch zeigte sich eine mRNA-Expressionssteigerung von Biglycan unter dem PDLLA- und dem PDLLA-BMP-2-Einfluss am Versuchstag 10. Decorin blieb unbeeinflusst hoch exprimiert. Entgegengesetzt verhielt es sich bei der Arbeitsgruppe von Lecanda et al. (1997). Sie zeigten unter dem BMP-2-Einfluss bei humanen Primärosteoblasten einen geringen Effekt auf die Biglycan-mRNA-Expression, wohingegen Decorin stärker exprimiert wurde. Beide Expressionen waren hoch, jedoch nur die von Biglycan war im beobachteten Versuchsverlauf durch PDLLA und PDLLA-BMP-2 beeinflussbar. Sowohl grafisch, optisch als auch rechnerisch ergaben sich zwischen diesen beiden Versuchsgruppen keine wesentlichen Unterschiede. Im Hinblick auf die Aufgaben der Proteoglykane und der unverändert hohen Expressionen während des Versuchsverlaufes, bleiben die mRNA-Expressionsverläufe und vor allem die Proteinexpressionen nach dem 15. Tag, aber auch zwischen den gewählten Versuchstagen zu untersuchen, um eine genaue Aussage über die regulierenden Funktionen unter dem PDLLA- und PDLLA-BMP-2-Einfluss zu ermitteln.

Annexin V (ANXA5) fungiert als Calciumionenkanal bzw. als eine Komponente des Ca<sup>2+</sup>-Signalweges und stellt einen Mechanosensor im Osteoblasten dar (Mohiti et al., 1995; Haut Donahue et al., 2004; Rojas et al., 1990; Merzel et al., 2006). Eine Interaktion zum Integrinrezeptor beta 5 wurde beschrieben (Andersen et al., 2002). Außerdem regulieren Annexine die Exozytose, Endozytose, Membranproteinaktivität und Signaltransduktion (Huber et al., 1992; Mohiti et al., 1995; Von der Mark und Mollenhauer, 1997). Bei der unbeeinflussten Kontrollgruppe stellte sich zu den Tagen 10 und 15 eine Annexin-Expressionssteigerung gegenüber dem Versuchsbeginn ein. Dass BMP-2 die Annexin V-mRNA von humanen Primärosteoblasten beeinflusst, wurde bisher in keiner Studie beobachtet. Unter dem PDLLA-BMP-2-Einfluss erhöhte sich die Annexin V-mRNA gegenüber der Kontrollgruppe am Tag 10. Möglicherweise wird somit auch hier, anhand der Annexin-Expression, eine verfrühte und erhöhte mRNA-Expressionssteigerung und damit Funktionsaufnahme der humanen POBs unter dem PDLLA-BMP-2-Einfluss unterstrichen. Annexin V wurde auch unter dem PDLLA-Einfluss erhöht (Ratio  $\geq 2$ , optischer Scorewert  $\geq 2$ ). Aber nur unter dem PDLLA-BMP-2-Einfluss wurde eine Expression ermittelt, die größer als die 50%-ige Expression von GAPDH war. Auch grafisch kristallisierte sich bei der PDLLA-BMP-2-Gruppe ein deutlich verändertes Annexin V-Expressionsmuster zu den Tagen 5 und 10 heraus.

#### 4.1.5 Die Proteasen

Proteasen sind bedeutend bei der Knochenmatrixsynthese und der Aktivierung des Knochenumbaus (Eeckhout und Delaisse, 1988; Einhorn und Majeska, 1991). Sie sind an der Schlüsselfunktion, der Aggregation zu löslichen Kollagenmolekülen, beteiligt. Bei der Analyse der Proteasengenfamilie war besonders die mRNA-Expression von MMP2 auffällig. MMP2 (72kD Gelatinase A, 72kD Kollagenase IV) ist als regulierender Faktor der Osteogenese *in vitro* bekannt (Filanti et al., 2000). Während die Expressionsverläufe von MMP2 bei der Kontrollgruppe und der Titangruppe über den gesamten Versuchsverlauf nahezu vergleichbar blieben, stiegen unter den PDLLA- und PDLLA-BMP-2-Einflüssen die MMP2-Expressionen zum Tag 10 stark an. Alle Kriterien wurden erfüllt, wobei die Ratiowerte in beiden Gruppen größer als 10 waren. Grafisch zeigten sich jedoch schon am Tag 5 deutlich veränderte Expressionen zwischen der PDLLA- und PDLLA-BMP-2-Gruppe. Eine verfrühte Expressionssteigerung ließ sich unter dem PDLLA-BMP-2-Einfluss gegenüber den anderen Versuchsgruppen am Tag 5 beobachten.

Der Tag 15 war dadurch gekennzeichnet, dass in den PDLLA- und PDLLA-BMP-2-Gruppen die MMP2-Expressionen wieder absanken, wobei bei der Kontrollgruppe und der Titangruppe zu diesem Zeitpunkt erst die Expressionssteigerungen verzeichnet wurden. Spezifische TIMPs und andere Proteasen können MMPs hemmen (Bord et al. 1996; Deryugina et al., 2001) und müssen besonders unter dem PDLLA- und dem PDLLA-BMP-2-Einfluss weiter mit untersucht werden, um den genauen Wirkmechanismus und deren Folgen besser einzuschätzen. Dieses fein regulierte Gleichgewicht steht in der Abhängigkeit vom Zelltyp und von der Verfügbarkeit der Substrate und ist für das Geweberemodelling verantwortlich (Bord et al., 1999; Mc Cawley und Matrisian, 2001; Egeblad und Werb, 2002). Das Ziel weiterer Forschungen könnte in diesem Zusammenhang die genau dosierte PDLLA-BMP-2-Konzentration für eine kontrollierte MMP-Synthese sein.

Cathepsin K (CTSK) ist für die proteolytischen Matrixdegradationen der Kollagenfibrillen von Knorpel- und Knochengewebe verantwortlich (Littlewood-Evans et al., 1997; Dodds et al., 1998). Die CTSK-mRNA-Expression wurde unter dem PDLLA-BMP-2-Einfluss am Versuchstag 10 stark erhöht (Ratio > 10), wohingegen die mRNA bei der Kontrollgruppe erst zum Tag 15 anstieg. Die Expression war am Tag 10 unter dem PDLLA-BMP-2-Einfluss größer als die 50%-ige GAPDH-Expression. Eine PDLLA-induzierte CTSK-Expression wurde ebenfalls am Tag 10 beobachtet, wobei die Ratio größer als 5 war. Jedoch wurden keine Werte größer als die 50%-ige GAPDH-Expression erreicht. Bekannt ist, dass die Osteoblasten fähig sind, die Cathepsin K-Expression je nach Differenzierungsstadium zu kontrollieren (Mandelin et al., 2006). Außerdem wird CTSK eine bedeutende Rolle während der Frakturheilung zugesprochen (Uusitalo et al., 2000). Es besteht durch CTSK eine Kopplung der Osteoblasten- und Osteoklastenaktivität und diese wird unterstrichen, durch den Fakt, dass eine Überexpression von Cathepsin K zu einer Knochenneubildung führt (Kiviranta et al., 2001). PDLLA-BMP-2 könnten durch eine starke Expressionssteigerung der CTSK-mRNA in humanen Primärosteoblasten möglicherweise zur Beschleunigung der Osteogenese ab dem 10. Versuchstag beitragen. Osteoblasten-Osteoklasten-

Cokulturen könnten in diesem Zusammenhang eine Auskunft geben, wie CTSK die Osteoblasten- und Osteoklastenaktivität beeinflusst und welche zusätzlichen Faktoren hierbei eine Rolle spielen.

#### 4.1.6 Das VEGF- / VEGF-Rezeptor-System

VEGFs und VEGF-Rezeptoren spielen eine zentrale Rolle bei der Angiogenese und Osteogenese (Deckers et al., 2000; Ferrara, 2001; Furumatsu et al., 2003). Die Expressionen von VEGF und seiner Rezeptoren ändern sich mit dem jeweiligen Differenzierungsstadium (Deckers et al., 2000). Osteoblasten synthetisieren VEGF als Antwort auf verschiedene Stimuli, aber auch als Antwort auf VEGF über einem autokrinen Weg in der späten Phase der Osteoblastendifferenzierung (Mayr-Wohlfahrt et al., 2002; Mayer et al., 2005; Decker et al., 2000). Verschiedene Studien zeigten einen induzierenden Effekt von VEGF auf die Proliferation, Migration und Differenzierung von Osteoblasten (Deckers et al., 2000; Mayr-Wohlfahrt et al., 2002). Dennoch ist die VEGF-Synthese nicht in die Osteoblastendifferenzierung involviert, sondern koppelt nur die Vorgänge der Angiogenese und der Knochenneubildung (Deckers et al., 2002), wobei auch Osteoklasten stimuliert werden (Kakudo et al., 2006; Peng et al., 2005; Hiltuen et al., 2003). Furumatsu et al. (2003) beobachteten hingegen keinen proliferationssteigernden Effekt auf Osteoblasten im frühen Differenzierungsstadium, sie sahen VEGF aber als einen induzierenden Marker der Knochenformation. Pufe et al. (2002) wiesen im Rattenfrakturkallus die Expression von VEGF vor allem in der Frühphase der Frakturheilung (Tag 5-10) nach. Die Bedeutung der VEGF-Expression wurde unterstrichen durch die Erkenntnis der VEGF-induzierten Hemmung der Osteoblastendifferenzierung *in vitro*. Außerdem blockierte VEGF die BMP-2-induzierte Angiogenese, die BMP-induzierte Mineralisation hingegen nicht (Street et al., 2002; Deckers et al., 2002).

Während des Versuchs zeigte sich bei der Kontrollgruppe am Tag 5 eine VEGF-C-mRNA-Expressionssteigerung gegenüber dem Versuchsbeginn. Von VEGF-A und -B erhöhten sich die mRNAs am 15. Versuchstag. Verschiedene Arbeitsgruppen zeigten eine BMP-2-induzierte Angiogenese über die VEGF-Synthese bei Osteoblasten zwischen dem 4. und 14. Tag (Deckers et al., 2000; 2002; Kakudo et al., 2006). In diesem Versuchsaufbau wurde ab dem 10. Versuchstag eine deutliche Steigerung der VEGFs-Expressionen unter dem Einfluss von PDLLA-BMP-2 beobachtet. Während die VEGF-A- und VEGF-B-Expressionen unter dem PDLLA-BMP-2-Einfluss am Tag 10 größer als die 50%-igen GAPDH-Expressionen waren, wurde bei der PDLLA-Gruppe zwar eine Ratio  $\geq 2$  und ein optischer Scorewert  $\geq 2$  registriert, eine mit GAPDH vergleichbare Expression war jedoch nur unter dem PDLLA-BMP-2-Einfluss zu sehen. Somit wurde verdeutlicht, dass PDLLA-BMP-2 die VEGF-A- und VEGF-B-mRNA-Expressionen ab dem 10. Versuchstag in einem gesteigerten Maße beeinflusst, was bei den anderen Versuchsgruppen zu diesem Versuchszeitpunkt nicht zu erkennen war. Dieser Expressionsanstieg könnte eine Schlüsselfunktion in der BMP-2-induzierten Angiogenese darstellen. Die Wichtigkeit dieser Beobachtung wird durch den Aspekt unterstrichen, dass VEGF-A das Überleben und die Aktivität von Endothelzellen, Osteoblasten und Osteoklasten reguliert (Ferrara, 2001; Mayr-Wohlfahrt et al., 2002; Deckers et al., 2000; Engsig, 2000). Am Tag 10 war zusätzlich die VEGF-C-mRNA bei der PDLLA-BMP-2-Gruppe erhöht (Ratio  $\geq 2$ , optischer Scorewert  $\geq 2$ ), was im weiteren Versuchsverlauf nicht mehr zu messen war.

Am 15. Versuchstag waren sowohl die PDLLA- als auch die PDLLA-BMP-2-Gruppe durch eine gesteigerte VEGF-B-Expression gekennzeichnet. In beiden Gruppen entsprachen die VEGF-B-mRNAs mehr als der 50%-igen GAPDH-Expression.

Durch die gesteigerten VEGFs-mRNA-Expressionen ab dem 10. Versuchstag konnte ein sich änderndes Differenzierungsstadium der humanen POBs unter dem Einfluss von PDLLA und PDLLA-BMP-2 bestätigt werden. Für weitere Untersuchungen müssten zunehmend die VEGF-A- und die VEGF-B-Synthese mit Hilfe der ELISA-Methode analysiert werden, um genauere Aussagen über die PDLLA-BMP-2- bzw. PDLLA-induzierten Vaskularisationsfunktionen zu treffen.

#### **4.1.7 Die Wachstumsfaktoren TGF- $\beta$ 3 und FGFs**

Mitglieder der TGF $\beta$ -Superfamilie werden als die wichtigsten Regulatoren der Osteoblasten- und Osteoklastenaktivität betrachtet. Sie besitzen eine Schlüsselfunktion bei der Inflammation, der Heilung und dienen als chemotaktischer Mediator. TGF $\beta$ s können die Proliferation und die frühe Differenzierung der Osteoblasten steigern, jedoch die terminale Differenzierung, die OCN-Expression und damit die Mineralisation der Knochenmatrix beeinträchtigen (Breen et al., 1994; Heberden et al., 1998; Spinella-Jaegle et al., 2001).

Im vorliegenden Versuch erhöhten die humanen Primärosteoblasten der unbeeinflussten Kontrollgruppe ihre mRNA-Expressionen von TGF- $\beta$ 3 am Tag 5 und am Tag 15. Die Applikation von PDLLA-BMP-2 steigerte schon ab Tag 10 die mRNA-Expression von TGF- $\beta$ 3 gegenüber der Kontrollgruppe, wobei diese Steigerung in der PDLLA-Gruppe erst am Tag 15 deutlich wurde. TGF $\beta$ s werden als latente Form von Knochenzellen sezerniert und können je nach Stadium der Knochenbildung durch z.B. MMPs (Karsdal et al., 2002) aktiviert bzw. inaktiviert werden (Bonewald und Dallas, 1994). Der wechselnde biologische Effekt der TGF $\beta$ s in den verschiedenen Stadien der Gewebeneubildung ist von zentraler Bedeutung und muss weiterhin im Hinblick auf die Rezeptorenexpressionen betrachtet werden. Denn die Expression der TGF $\beta$ s ist ein zeitlich genau abgestimmtes Geschehen und die TGF $\beta$ s können die osteoinduktive Aktivität der BMPs potenzieren (Carrington et al., 1988). Zudem koppeln sie die Knochenneubildung und die Knochenresorption während des Remodellingprozesses (Erlebacher et al., 1998). Möglicherweise wird durch diese zeitliche TGF $\beta$ -Induktion die Osteoblastendifferenzierung und -reifung unterdrückt und es könnte somit die geringe OCN-Expression des Versuches aufgeklärt werden (Spinella-Jaegle et al., 2001). Auf Basis dieser mRNA-Ergebnisse lässt sich nur vermuten, dass eine PDLLA- bzw. PDLLA-BMP-2-induzierte TGF $\beta$ -mRNA-Expression in einen Feedbackmechanismus involviert ist. Einerseits könnten diese Expressionssteigerungen für eine kontrollierte Resorption (Fox und Lovibond, 2005) und Osteogenese sorgen und andererseits könnten sie eine verminderte Fähigkeit von BMP-2, nämlich die Mineralisierung zu induzieren, bedeuten. Für eine beschleunigte und verbesserte Osteogenese sollten zunehmend die stark erhöhte und verfrühte TGF- $\beta$ 3-mRNA-Expressionssteigerung sowie die Wachstumsfaktorenerhöhung von VEGF-A und VEGF-B unter dem PDLLA-BMP-2-Einfluss in den

Mittelpunkt des Interesses gerückt werden. Wichtig bleiben weiterhin die entsprechenden MMPs, welche zur Aktivierung bzw. Inaktivierung des TGF $\beta$ s beitragen.

Die proliferationsfördernde Wirkung der FGFs auf die Osteoblasten wurde hauptsächlich in der frühen Phase der Skelettogenese bei der Kallusbildung beschrieben, während FGFs in der späten Phase besonders die Chondrozytendifferenzierung beeinflussen (Canalis et al., 1988a; Mansukhani et al., 2000; Mayr-Wohlfart et al., 2002). Es wurde ein positiver Effekt auf die Angiogenese festgestellt (Eppley et al., 1988; Folkman und Klagsbrun, 1987) sowie ein modulierender Effekt auf die Osteoklastogenese und die Knochenheilung (Aspenberg et al., 1991; Chikazu et al., 2000). Doch FGFs können auch die Differenzierung von Osteoblasten verhindern, die Expression verschiedener wichtiger Knochenbildungsmarker, wie Kollagen Typ I und ALP, vermindern und die Knochenresorption aktivieren (Simmons und Raisz, 1991; Hurley et al., 1993). Erhöhte FGF-1- und FGF-2-mRNA-Expressionen waren bei den unbeeinflussten Primärosteoblasten am 15. Versuchstag zu beobachten. Zwischen der TGF $\beta$ -Familie und den FGF-Expressionen wurde eine Interaktion nachgewiesen (Nakamura et al., 1995). In einer *in vitro* Studie wurde eine bFGF-induzierte TGF $\beta$ -mRNA-Expression ermittelt (Noda und Vogel, 1989). In diesem Versuchsaufbau konnte dagegen gezeigt werden, dass sowohl PDLLA als auch PDLLA-BMP-2 die FGF-1- und FGF-2-mRNA-Expressionen am Tag 10 erhöhten, wobei nur bei der PDLLA-BMP-2-Gruppe alle Kriterien der Expressionssteigerung bei FGF-1 und FGF-2 erfüllt wurden. Bei der PDLLA-Gruppe hingegen wurde keine erhöhte Expression gegenüber der 50%-igen GAPDH-Expression bei FGF1 beobachtet, jedoch bei FGF-2. Anhand dieser mRNA-Ergebnisse ist festzuhalten, dass bei den PDLLA-BMP-2- und PDLLA-Versuchsgruppen die FGF-Expressionen mit den Hochpunkten der mRNA-Expressionsmaxima korreliert, denn die Anzahl der gesamten erhöhten mRNA-Expressionen war bei der Kontrollgruppe am Tag 15, bei der PDLLA- und bei der PDLLA-BMP-2-Gruppe jeweils am Tag 10 am größten.

#### **4.1.8 Der Rezeptor ALK-5 (TGF $\beta$ R-1)**

Beim Signalweg der TGF $\beta$ s fungiert der Typ II-Rezeptor als Primärrezeptor, während der Typ I-Rezeptor sein Substrat darstellt und vom Typ II-Rezeptor phosphoryliert wird (Wrana et al., 1994). Die Expression des BMP-RII ist für die BMP-Bindung an den BMPR-IA, -IB bzw. ActR-I notwendig (Liu et al., 1995). Der verwendete GEArray beinhaltete von den BMP-Rezeptoren jedoch nur die Analyse von BMPR-IA (ALK-3). Während des gesamten Versuchs wurde keine deutliche BMPR-IA-mRNA-Expressionsveränderung bei den vier Versuchsgruppen nachgewiesen.

Die Rezeptortypen TGF $\beta$ R-1 und TGF $\beta$ R-2 werden ebenfalls in die Rezeptorklassen Typ I und II eingeteilt, besitzen jedoch unterschiedliche Antworten (Chen et al., 1993c). Denn der TGF $\beta$  Typ I-Rezeptor ist fähig, beide Typen von Rezeptorenantworten unabhängig vom Liganden oder vom Typ II-Rezeptor zu vermitteln (Wieser et al., 1995). Bei der Kontrollgruppe wurde eine Steigerung der mRNA-Expressionen von TGF $\beta$ R-1 und TGF $\beta$ R-2 zum Versuchstag 10 beobachtet. Diese Steigerungen der

beiden mRNAs waren zum Tag 10 bei allen vier Versuchsgruppen am höchsten, demnach änderte sich auch die Ratio nicht wesentlich. Im Vergleich zum BMP-Rezeptor wurde ein weitaus größerer Effekt unter dem PDLLA-BMP-2-Einfluss beim TGF $\beta$ -Rezeptor-1, aber auch beim TGF $\beta$ -Rezeptor-2 am Versuchstag 5 erzielt. Dabei entsprach die mRNA-Expression vom TGF $\beta$ R-1 gegenüber der Kontrollgruppe zum Tag 5 als einzige von den veränderten Expressionen schon mehr als der 50%-igen Expression von GAPDH. Eine unter dem PDLLA-BMP-2-Einfluss verfrühte und gegenüber der Kontrollgruppe stark erhöhte mRNA-Expression wurden somit zum Tag 5 bestätigt. Weder zu den anderen Versuchstagen noch bei den anderen Versuchsgruppen wurde eine so deutliche Expressionssteigerung der TGF $\beta$ R-1-mRNA analysiert. Eine BMP-Bindung an den TGF $\beta$ R-1 wurde nie festgestellt (Liu et al., 1995). Ebenso sind BMPR-II und TGF $\beta$ R-1 keine physiologischen Partner (Liu et al., 1995). Diese Tatsache deutet darauf hin, dass unter dem PDLLA-BMP-2-Einfluss zwar die mRNA-Expression des TGF $\beta$ -Rezeptors-1 besonders stimuliert wurde, jedoch über diesen stimulierten Rezeptortypen keine verstärkte PDLLA-BMP-2-induzierte Proteinbiosynthese erreicht würde. TGF $\beta$ R-1 und TGF $\beta$ R-2 sind für die TGF $\beta$ -Antwort verantwortlich. Möglicherweise wird durch PDLLA-BMP-2-beschichtete Titan-Kirschner-Drähte ein TGF $\beta$ -Einfluss gefördert.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass bei dem vorliegenden Versuch unter dem PDLLA-BMP-2-Einfluss eine erhöhte BMPR-IA-mRNA (ALK-3) nicht bestätigt wurde. Eine Expression von BMPR-IB (ALK-6) oder BMPR-II konnte in diesem Versuchsaufbau nicht überprüft werden. PDLLA-BMP-2 steigerte jedoch die mRNA von TGF $\beta$ R-I (ALK-5) in erhöhtem Maße am Tag 5. Es ist bekannt, dass BMP-2 selbst nicht an die TGF $\beta$ -Rezeptoren bindet, sondern nur TGF $\beta$  oder Activin. Interessanterweise erhöhte sich die mRNA von TGF $\beta$ 3 unter dem PDLLA-BMP-2-Einfluss am Tag 10 und von TGF- $\beta$ 1 und TGF- $\beta$ 3 am Tag 15 ebenso gegenüber der Kontrollgruppe, wobei nur TGF- $\beta$ 3 eine Expression größer als die 50%-ige GAPDH-Expression erreichte. Dieser Zusammenhang lässt eine PDLLA-BMP-2-induzierte TGF $\beta$ R-1-, TGF $\beta$ R-2-Antwort, aber auch eine TGF- $\beta$ 1-, TGF- $\beta$ 3-Antwort bei den humanen Primärosteoblasten annehmen.

#### 4.1.9 Die SMADs

Bei der Stimulierung des Wachstumsfaktoren-Signalweges spielen neben den Rezeptoren die SMADs eine entscheidende Rolle (Ten Dijke et al., 1994a; Rosenzweig et al., 1995). R-, I- und Co-SMADs sind wichtig für die Regulation von den Zielgenexpressionen, denn sie kooperieren im Zellkern mit Transkriptionsfaktoren, Co-Aktivatoren und -Repressoren.

Die Receptor-regulated SMADs 2 und -3 modulieren den TGF- $\beta$ - und Activin-Signalweg über den ALK-5- (TGF $\beta$ R-I) bzw. ALK-4-Rezeptor (Zhang et al., 1996; Goumans und Mummery, 2000). Der TGF $\beta$ -Signalweg kann auch über einen zweiten Weg, über ALK-1-Rezeptor und SMAD 1, induziert werden (Goumans und Mummery, 2000; Abbildung 1.6) oder aber über einen ERK1/2- abhängigen und somit SMAD 3-unabhängigen Weg (Spinella-Jaegle et al., 2001; Pannu et al., 2007). Für den BMP-2-Weg sind

dagegen die ALK-2, -3 und -6-Rezeptoren und die SMADs 1, 5 und 8 sehr bedeutend (Goumans und Mummery, 2000; Hoodless et al., 1996; Nishimura et al., 1998; Chen et al., 1997; Kawai et al., 2000; Massagué und Wotten, 2000). Alle SMADs, mit Ausnahme von SMAD 8, waren auf dem verwendeten Mikroarray vertreten. (Anstelle von SMAD 8 wurde SMAD 9 analysiert, über dessen humanspezifische Funktionen in der Literatur keine Hinweise gefunden wurden.)

Im Versuchsverlauf änderte sich das Expressionsmuster der unbeeinflussten Kontrollgruppe gegenüber dem Tag 0 dahingehend, dass am Tag 10 die SMAD 2-mRNA gesteigert wurde und am Tag 15 die mRNAs von SMAD 1, 2, 3, und 9. Diese Ergebnisse machen eine sich steigernde Signalantwort über den Versuchsverlauf bei der unbeeinflussten Versuchsgruppe deutlich. Unter den PDLLA- und PDLLA-BMP-2-Einflüssen veränderte sich das mRNA-Expressionsmuster bei den R-SMADs nochmals. Am Tag 10 waren die R-SMAD-Expressionen von SMAD 2, 5 und SMAD 9 stark erhöht gegenüber der Kontrollgruppe. Es konnte unter dem PDLLA-BMP-2-Einfluss von diesen erhöhten SMADs Intensitäten ermittelt werden, die zudem mehr als 50% der GAPDH-Expression entsprachen. Singhatanadgit et al. (2006) zeigten bei humanen POB ebenfalls eine BMP-2-induzierte SMAD 5-mRNA-Expressionserhöhung. Aber auch die SMAD 1- und SMAD 8-mRNAs wurden bei dieser Arbeitsgruppe gesteigert, was hier nicht zu beobachten war. Am 15. Versuchstag waren nur noch bei der PDLLA-BMP-2-Gruppe erhöhte mRNA-Expressionen von SMAD 2 und 5 gegenüber der Kontrollgruppe zu messen. Die Ergebnisse unterstreichen die gesteigerten und verfrühten mRNA-Expressionen unter dem PDLLA-BMP-2-Einfluss, auch in der Genfamilie der R-SMADs.

SMAD 4 (DPC4) agiert als Co-SMAD. Der phosphorylierte R-Smad-Co-Smad-Komplex stellt die Schlüsselfunktion in der Signaltransduktion der TGF $\beta$ -Familie von der Zellmembran zum Nukleus dar (Wrana, 2000; Derynck et al., 1998). SMAD 4 ist dafür bekannt, einen Cbfa1-unabhängigen Weg über die direkte Interaktion mit den Zielgenen zu nutzen (Jonk et al., 1998; Hanei et al., 1999). Diese Erkenntnisse unterstreichen die Wichtigkeit von SMAD 4 sowohl als „Common Partner“ als auch in der direkten Signalübermittlung von BMP-2, über einen Cbfa1-unabhängigen Weg. Die mRNA von SMAD 4 wurde während des Versuchsverlaufes bei der unbeeinflussten Kontrollgruppe gegenüber dem Versuchsbeginn nicht erhöht expremiert. Die Schlüsselfunktion von SMAD 4 bei der Komplexbildung mit den R-SMADs könnte somit unverändert gegenüber dem Versuchsbeginn sein. Es lässt sich daraus eine gleichbleibende Signaltransduktion in der TGF $\beta$ -Familie während des Versuchsverlaufes bei der unbeeinflussten Kontrollgruppe ableiten. Anders verhielt es sich dagegen bei der PDLLA- und PDLLA-BMP-2-Gruppe. Bei der PDLLA-BMP-2-Gruppe war die SMAD 4-mRNA-Expression ab dem Tag 10 und bei der PDLLA-Gruppe ab dem Tag 15 gegenüber der Kontrollgruppe gesteigert. Diese Erhöhung spricht für eine mögliche veränderte Signaltransduktionen in den TGF $\beta$ -, Aktivin- und BMP-Signalwegen. Die wachstumsfaktoreninduzierte Signaltransduktionen könnten so wohlmöglich effizienter vermittelt werden.

#### 4.1.10 Die Zelladhäsionsmoleküle

Verschiedene Integrinuntereinheiten ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha v$ ,  $\beta 1$  und  $\beta 5$ ) wurden in Knochenzellen nachgewiesen (Clover et al., 1992; Hughes et al., 1993; Saito et al., 1994). Die Interaktionen der Zelladhäsionen spielen eine kritische Rolle beim Überleben der Osteoblasten, der Matrixmineralisation und der Knochenneubildung (Moursi et al., 1996; Globus et al., 1998). Integrine regulieren unterschiedlichste zelluläre Funktionen, dabei werden Transkriptionsfaktoren aktiviert (Giancotti und Ruoslahti, 1999). Während der Osteoblastogenese interagieren Integrine mit verschiedenen ECM-Proteinen, wie Fibronectin, Bone Sialoproteinen, Osteopontin, Annexin V oder Kollagentyp I, aber auch MMPs (Andersen et al., 2002; Ruoslahti und Pierschbacher, 1987; Damsky, 1999; Moursi et al., 1996; Globus et al., 1998). So binden die Integrine  $\alpha 5 \beta 1$  Fibronectin, während  $\alpha 1 \beta 1$ ,  $\alpha 2 \beta 1$ ,  $\alpha 3 \beta 1$  und  $\alpha v \beta 1$  mit Kollagen Typ I assoziiert sind (Ganta et al., 1994). Es ist bekannt, dass die FN-Fibrillogenese mit einer Anhäufung von  $\alpha 5$ - und  $\beta 1$ -Integrinen nachzuweisen ist (Shah et al., 1999; Tang et al., 2003). Zusätzlich sind Integrine für die Differenzierung von Osteoblasten *in vitro* notwendig (Moursi et al., 1996). Die mRNA-Expressionen der Integrine waren über den gesamten *in vitro* Versuchsverlauf deutlich erhöht. Eine zeitlich regulierte Expression ließ sich an den Versuchszeitpunkten ablesen. So waren bei der unbeeinflussten Kontrollgruppe ITGA1- und -B1-mRNAs schon zum Versuchsbeginn gesteigert, die von ITG-AV ab dem 10. und von ITGA3 ab dem 15. Versuchstag (optischer Score). Es wurde bewiesen, dass die Integrinexpressionen durch BMP-2 erhöht werden (Shah et al., 1999; Tang et al., 2003). Während ITGB1 fast über den gesamten Versuchsverlauf die am stärksten exprimierte mRNA blieb, wurde unter dem PDLLA-BMP-2-Einfluss keine weitere Steigerung der mRNA-Expression von ITGB1 beobachtet. Stattdessen wurden die ITGA1-mRNA nach der Applikation von PDLLA-BMP-2-beschichteten Titan-Kirschner-Drähten am Tag 10 bzw. 15 gegenüber der Kontrollgruppe stark erhöht. Somit wurde bewiesen, dass PDLLA-BMP-2 nicht nur die mRNA-Expression von ECM-Proteinen erhöht, sondern auch in der Genfamilie der Zelladhäsionsmoleküle die Integrine, insbesondere von ITGA1, steigert. Kein anderes Zelladhäsionsmolekül erreichte dabei eine mRNA-Expressionssteigerung, welche größer als die 50%-ige GAPDH-Expression war, weder bei der PDLLA- noch bei der PDLLA-BMP-2-Gruppe. Integrine sind zusätzlich für das Attachment an Implantaten verantwortlich (Gronowicz und McCarthy, 1996; Sinha und Tuan, 1996). Möglicherweise wird durch die PDLLA-BMP-2-induzierte Integrinexpression diese attachmentfördernde Eigenschaft ebenfalls positiv beantwortet.

## **4.2 DIE DISKUSSION DER METHODIK**

### **4.2.1 Die Etablierung der Mikroarraytechnologie zur Analyse von Genexpressionen humaner Primärosteoblasten**

Die cDNA-Mikroarray-Technologie ermöglichte eine simultane Analyse zahlreicher knochenspezifischer Genexpressionen humaner Primärosteoblasten. In dieser experimentellen Arbeit erfolgte das mRNA-Studium eines einzelnen Individuums. Anhand des untersuchten Genexpressionsmusters sollten Rückschlüsse auf den Zustand, die Funktion und damit den Phänotyp einer Zelle gewonnen werden. Interindividuelle Abweichungen, die sich in den Vorversuchen ergaben (Daten dazu sind nicht in der Arbeit enthalten), beobachteten auch andere Arbeitsgruppen (Qi et al., 2003). Die genetische Variabilität bei Individuen ließ viele Arbeitsgruppen dazu übergehen, ihre RNA-Proben von verschiedenen Spendern zu poolen, bevor sie diese mit Hilfe der Mikroarraytechnologie analysierten (Chen et al., 2000). In anderen Studien wurden die RNA-Proben separat untersucht und im Anschluss erfolgte die Bildung der Mittelwerte ihrer Ergebnisse (Qi et al., 2003; Tanaka et al., 2000). Prinzipiell muss davon ausgegangen werden, dass die Expressionsstärke der Gene zwischen verschiedenen Patienten eine enorme Variabilität aufweisen kann (Aigner et al., 2003; Chen et al., 2004). Zunehmend wird auch das Alter der Spender in diesem Zusammenhang diskutiert (Desai et al., 2003; Meyer et al., 2003). Somit können die Ergebnisse nur tendenziell den Einfluss von PDLLA-BMP-2 auf die mRNA-Expressionen verschiedenener Genfamilien widerspiegeln.

Die cDNA-Mikroarraytechnologie ist laut Hersteller sowohl eine qualitative als auch eine quantitative Methode um Genexpressionen mit hoher Sensitivität zu untersuchen. Das Ziel der Arbeit war es, einen Überblick über erhöhte mRNA-Expressionen zu erhalten und Veränderungen innerhalb der Versuchsgruppen darzustellen. Bei der Analyse der Reproduzierbarkeit des Mikroarrayverfahrens ergaben sich jedoch Abweichungen, die sich in den optisch ermittelten Intensitäten und den gemessenen Genexpressionswerten niederschlugen.

Starke Intensitätsschwankungen sind bei der Mikroarraytechnologie vereinzelt möglich. So wurden bei den hintergrundkorrigierten und normalisierten Werten derselben mRNAs in der Wiederholung Abweichungen bis zu einem Wert von 0,86 ermittelt. Die Quotienten zwischen den Werten der PDLLA-BMP-2-Gruppe vom Tag 10 und der Wiederholung dieses Mikroarrays wurde berechnet (Ratio). Die Ratiowerte der Intensitätsmessungen schwankten zwischen 1 (=100%ige Übereinstimmung der Messergebnisse) bis 26,2 (keine Übereinstimmung der Messergebnisse). Qi et al. (2003) berechneten bei der Analyse der Reproduzierbarkeit von Hybridisierungsstudien einen Korrelationskoeffizienten zwischen 0,5 und 0,92. In diesem Versuchsaufbau lag der Korrelationskoeffizient (nach Bravais-Pearson) bei 0,95. Das bedeutet, dass trotz einzelner starker Abweichungen ein hoher positiver linearer Zusammenhang zwischen zwei durchgeführten Mikroarrays von derselben Versuchsgruppe besteht.

Um die Vergleichbarkeit des mRNA-Expressionsmusters von der unbeeinflussten Kontrollgruppe mit denen der PDLLA- / PDLLA-BMP-2-Gruppen zu analysieren, ist die Mikroarraytechnologie eine geeignete

qualitative (Shi et al., 2001), jedoch kritisch zu bewertende Methode. Intensitätsveränderungen von kleinen Messwerten könnten fehl gedeutet werden, weil für sie eine erhöhte Ratio gegenüber einem Vergleichswert berechnet wurde. Der Hersteller gibt deswegen an, dass geringe Signalintensitäten nicht gut reproduzierbar sind, insbesondere wenn die Signalintensität weniger als 1% der Intensität von GAPDH entspricht. Ein Ergebnis gilt hingegen als zuverlässig, wenn mindestens 10% der Signalintensität von GAPDH erreicht werden. Dieses Kriterium (>10%) lag in der vorliegenden *in vitro* Studie bei allen Expressionen vor. Es war dennoch notwendig, jede einzelne Expression dahingehend zu überprüfen und zusätzlich stark erhöhte Ratiowerte von relativ geringen Intensitätsveränderungen herauszusuchen. Mit Hilfe des optischen Scores (1 bis 5) sollte einer Fehldeutung von Messergebnissen entgegen gewirkt werden, indem die berechneten Ergebnisse zusätzlich optisch bewertet wurden. Neben den quantitativen Ergebnissen in Form der Ratiowerte konnte somit eine genauere tendenzielle Aussage getroffen werden. Für die Diskussion der Expressionsveränderungen wurden nur Ergebnisse mit einbezogen, die sowohl eine Ratio  $\geq 2$  als auch einen optischen Scorewerte  $\geq 2$  besaßen, sich grafisch von den anderen Genfamilienmitgliedern abhoben und zusätzlich einen Expressionswert aufwiesen, der größer als die 50%-ige GAPDH-Expression war.

Es wurde versucht, die optischen subjektiven Scorebewertungen mit einem gemessenen Intensitätswertebereich zu belegen. Dabei wurden jedoch Überschneidungen im Wertebereich beobachtet, so dass mit der optisch subjektiven Score-Auswertung nur eine tendenzielle Aussage zu treffen ist. Es zeigte sich, dass es nur schwer möglich ist, von einem Scorewert auf den ungefähren Intensitätswert zu schließen.

Die optisch ermittelten Scoreergebnisse der Mikroarrays vom Tag 10 der PDLLA-BMP-2-Gruppe ließen tendenziell eine reproduzierbare Aussage über das mRNA-Expressionsmuster zu. Der Wiederholungsarray wurde insgesamt mit einer höheren Scoreintensität bewertet. Das lag an der höheren Hintergrundintensität, weil die Arrays nicht zum gleichen Zeitpunkt durchgeführt wurden. Von den 96 zu bewertenden mRNA-Expressionen bekamen auf dem Wiederholungsarray zusätzlich 8 Expressionen einem Scorewert  $\geq 2$ . Die Mikroarraytechnologie ist ein geeignetes Verfahren, um einen qualitativen Vergleich spezifischer mRNA-Expressionsveränderungen zu studieren. Eine 100%-ige Korrelation bei der Analyse der Reproduzierbarkeit ergab sich in diesem Versuch nicht und auch bei den anderen Arbeitsgruppen nicht (Qi et al., 2003; Luo et al., 2002). Eine größere Anzahl von unterschiedlichen Spendern wäre sowohl bei den rechnerisch ermittelten Intensitäten als auch bei den optisch ermittelten notwendig um Variabilitäten der Ergebnisse zu vermindern.

Zahlreiche Studien benutzen die Mikroarraytechnologie um einen Überblick über das Transkriptionsprofil von Zellen zu erhalten. Interindividuelle Abweichungen und Kultivierungsunterschiede konnten in diesem Versuch ausgeschlossen werden. Für definitive Aussagen sollte jedoch zusätzlich ein quantitatives Verfahren, wie die real-time Reverse-Transcription-PCR (RT-PCR) oder Northern Blot Analysen, durchgeführt werden (Flück et al., 2005; Chuaqui et al., 2002; Tan et al., 2003), denn die Messergebnisse von cDNA-Mikroarrays weichen meisten von den Ergebnissen dieser konventionellen Methoden ab (Luo et al., 2002; De Jong et al., 2002). Luo et al. (2002) beobachteten eine 96%-ige Konkordanz zwischen den RT-PCR-Ergebnissen und den Mikroarray-Ergebnissen. Die Northern Blot- bzw. RT-PCR-Methoden

waren sensitiver und ergaben höhere Werte als sie bei der Mikroarrayanalyse ermittelt wurden (Luo et al., 2002). Jedoch können die Ergebnisse eines Genarrays auch gänzlich von den Ergebnissen einer RT-PCR abweichen. Locklin et al. (2001) zeigten, dass BMP-2 zwar keinen Einfluss auf die ALP-mRNA besitzt, jedoch die RT-PCR-Ergebnisse von der ALP erhöht gemessen wurden. Mit der cDNA-Mikroarray-Technologie können Veränderungen, im Gegensatz zur RT-PCR oder zum ADGE-Mikroarray, unterschätzt werden (Chen et al., 2003).

Probleme ergaben sich zusammenfassend bei kleinen Intensitätsänderungen mit großen Ratioergebnissen sowie bei Intensitätsmessungen, die kleiner als die Negativ- bzw. Blankwerte waren und demnach für weitere Analysen nicht mehr einbezogen wurden (Bsp.: Kollagen Typ XVI, Kontrollgruppe Tag 10). Kleine Expressionsveränderungen wurden weniger akkurat identifiziert und falsche negative Werte wurden dargestellt (Chen et al., 2003). Das Mikroarrayverfahren eignet sich zum Vergleich relativer Expressionshöhen, ist jedoch ungeeignet für absolute Intensitätsmessungen.

Mit Hilfe der Mikroarraytechnologie werden Expressionsmuster der Osteoblastogenese wider gespiegelt. Doch die Vergleichbarkeit mit anderen Studien ist oft schwer möglich. Es existieren viele verschiedene Arraymethoden und Auswertungsmöglichkeiten. Divergierende Ergebnisse zwischen verschiedenen cDNA- und Oligonukleotid-Mikroarrays sind die Folge (Chen et al., 2004; Tan et al., 2003; Mah et al., 2004). Einen entscheidenden Anteil bei den Ergebnissen besitzen die verschiedenen Normalisierungsmethoden, die Normalisierungsfaktoren sowie die Statistik (Vandesompele et al., 2002; Flück et al., 2005; Smyth und Speed, 2003). Die Datenanalyse ist aufgrund fehlender Standards komplex (Flück et al., 2005; Quackerbush, 2002). Zahlreiche Studien wiesen auf variable Expressionen von Housekeepinggenen hin und versuchten das optimale Kontrollgen heraus zu finden (Spanakis, 1993; Thellin et al., 1999; Eisenberg und Levanon, 2003; Beck et al., 2001; Pacicca et al., 2003). Vandesompele et al. (2002) zeigten, dass der Mittelwert mehrerer Housekeepinggene den besten Referenzwert darstellt. Ein weiteres Problem besteht darin, dass keine spezifischen Empfehlungen existieren, um eine korrekte biologische Interpretation aus den gewonnenen Ergebnissen zu erlangen (Quackerbush, 2002). Somit bleiben bei der Auswertung der mRNA-Expressionen mit Hilfe des Mikroarraymethode Fragen offen: Wie hoch ist der Faktor (Ratio) um zu entscheiden, ob die mRNA-Veränderung signifikant ist? Ist die Veränderung der mRNA ein wahrer Index für die Wichtigkeit eines Genes mit Zellfunktion? Bislang ist es noch nicht geklärt, was die Expressionshöhe einer mRNA über deren Wichtigkeit bei der Proteinbiosynthese aussagt. Die Probleme mit den verschiedenen Arrays, verschiedenen Methoden der Datenanalyse, verschiedenen Zellmodellen, verschiedenen Zellstimulatoren und den verschiedenen Kriterien zur Definition einer Veränderung bringen eine große Variabilität der Ergebnisse mit sich.

### 4.3 DER AUSBLICK

Wachstumsfaktoren spielen eine wichtige Rolle bei komplexen Vorgängen der Reparatoren und Regeneration von Geweben. Sie beschleunigen biologische Effekte wie die Chemotaxis, die Angiogenese, die Zelldifferenzierung und -proliferation. Die biologische Aktivität von BMP-2 besitzt einen potentiellen Wert bei der Behandlung von verschiedenen orthopädischen und craniofacialen Erkrankungen, einschließlich der Frakturheilung. Rh-BMPs wurden in experimentellen Modellversuchen und in der Klinik eingesetzt, um die Wundheilung und den Regenerationsprozess in humanen Knochen und parodontalen Gewebe zu fördern (Cheng et al., 2003; Cochran et al., 2000; Nakashima und Reddi, 2003; Park et al., 2003; Reddi, 2001). Jedoch sind die kollagenen Trägersubstanzen tierischer Herkunft, besitzen keine Eigenstabilität in der Wunde und werden schnell und vollständig resorbiert. Trotz sehr guter klinischer Ergebnisse wurden auch lokale Nebenwirkungen wie ungenügendes oder überschießendes Knochenwachstum und Knorpelresorptionen beschrieben. Nach klinischen Anwendungen wurde über transiente Antikörperbildungen gegen die xenogenen Kollagenträgermaterialien, aber auch gegen rh-BMP2 in 0,7% und gegen rh-OP-1 in 38% der behandelten Patienten berichtet (Poynton und Lane, 2002). Schmidmaier et al. (1999; 2000; 2001a; 2001b; 2002a; 2002b; 2003) etablierten das neue kalte Beschichtungsverfahren von Implantaten mit PDLLA. Kandziora et al. (2002b; 2002c; 2002d) analysierten im Schafmodell die PDLLA-Beschichtung als Carriersystem. Im Vergleich zum Kollagenträger wurden mit dem PDLLA-Carriersystem signifikant höhere Knochenkallusvolumina beobachtet (Kandziora et al. 2002a; 2002c; 2002d). Verschiedene Studien bewiesen, dass die PDLLA-Beschichtung ohne eingearbeiteten Wachstumsfaktor einen stimulierenden Effekt auf die Frakturheilungsvorgänge *in vivo* besitzt, wobei keine unerwünschten systemischen Wirkungen der biodegradierbaren PDLLA-Beschichtung beobachtet wurden (Schmidmaier et al., 1999; 2000; 2001a; 2002b; 2002a; 2002b; 2003; Raschke et al., 2002; Kandziora et al., 2002a; 2002b; 2002c; 2002d; Wildemann et al., 2005; Partale et al., 2005). Die lokale Applikation von BMP-2 über ein Implantat mit PDLLA als Trägermaterial wäre auch beim Menschen wünschenswert. Insbesondere in der Wirbelsäulenchirurgie, der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie sowie in der Versorgung therapierefraktärer Frakturen erhofft man sich vom klinischen Einsatz der BMPs eine schnellere Heilung, mehr Stabilität und Belastbarkeit des defekten Knochens.

Aufgrund des zukünftigen Potentials bei der Nutzung von PDLLA-BMP-2 zur Behandlung humaner Knochenerkrankungen, besteht die Notwendigkeit der Analyse der Osteoblastenantwort auf BMPs. Die Aufgabe des vorliegenden Versuchs war es gewesen anhand von 96 mRNA-Expressionen herauszufinden, welche davon klinisch relevant für die Osteogenesewirksamkeit beim Einwachsen eines beschichteten Nagels sein könnten. Um lokale Nebenwirkungen, wie ungenügendes oder überschießendes Knochenwachstum und Knochenresorption zu verhindern, müssen die molekularen Mechanismen der PDLLA-BMP-2-Beschichtung auf die umliegenden Zellen bekannt sein. Anhand der Mikroarrayergebnisse wurden die Grundlagen zu mRNA-Expressionsveränderungen und zur Weiterentwicklung des therapeutischen Einsatzes von PDLLA-BMP-2 analysiert. Die *in vitro* Untersuchungen haben gezeigt, dass PDLLA-BMP-2-beschichtete Titan-Kirschner-Drähte auf die

Expression osteoblastärer Gene einen stimulierenden Effekt besitzen. Genfamilien wie Transkriptionsfaktoren, ECM-Proteine, Heat-Shock-Proteine, Wachstumsfaktoren, Proteasen, SMADs, Rezeptoren und Zelladhäsionsmoleküle erhöhten unter dem PDLLA-BMP-2-Einfluss ihre mRNA-Expressionen. TGF $\beta$ R-1 (ALK-5) war die erste stark erhöhte mRNA-Expression, die am Tag 5 berechnet wurde. Heraus kristallisiert haben sich in dieser Arbeit weiterhin 6 mRNAs, die einen deutlichen Anstieg erstmals am Tag 10 gegenüber den anderen zeigten: TGF- $\beta$ 3, VEGF-B, SMAD 2, SMAD 4, SMAD 5 und ITGA1. Eine weitere Testung ergab, dass von diesen 6 mRNAs alle am Tag 15 eine weitere Steigerung gegenüber der Kontrollgruppe besaßen. TGF $\beta$ R-1 wurde dagegen weder am Tag 10 noch am Tag 15 nochmals erhöht gemessen. Neben den ITGA1- und TGF $\beta$ R-1-mRNA-Expressionen waren COLL11A1 und COLL14A1 die einzigen mRNAs, die allein in der PDLLA-BMP-2-Gruppe erhöht wurden. Für die Absicherung und Quantifizierung der erhöhten mRNA-Expressionen sind RT-PCRs bzw. Northern Blot Analysen notwendig. Zusätzlich müssen eventuelle Unterschiede zwischen mRNA-Ergebnissen und posttranskriptionalen Ergebnissen beachtet werden (Spinella-Jaegle et al., 2001). Somit stehen die Analysen des posttranskriptionalen und posttranslationalen Effektes im Mittelpunkt zukünftigen Interesses. Um eine Aussage über die klinische Wirksamkeit der Nagelbeschichtung und deren Wirksamkeit auf die Osteogenese beim Patienten zu bekommen, wäre die Frage nach der Blutkonzentration dieser 6 bis 9 Faktoren ein nächster Schritt. Praeoperative Konzentrationsbestimmungen für Ausgangswerte sowie Konzentrationsbestimmungen vom Tag 10 bis zum Tag 15 von diesen Faktoren wären klinisch relevant und ökonomisch zu vertreten. Somit zeigt die Arbeit, dass nicht die Vielfalt aller Faktoren bestimmt werden muss, sondern eine Konzentrationsbestimmung auf maximal 9 Faktoren beschränkt werden kann.

Vom biomedizinischen Standpunkt aus besteht die dringende Notwendigkeit die Regulationsmechanismen des Knochenremodellings zu verstehen, um die Erkenntnisse pharmakologisch zu nutzen. Der BMP-2-Effekt kann in Abhängigkeit von der BMPR-I-Expression variieren (Miyazono, 1999; Chen et al., 1998). BMPR-I ist einerseits an der Aktivierung der BMP-2-induzierten Osteoblastendifferenzierung beteiligt (Yamaguchi et al., 2000). Andererseits wird angenommen, dass die Aktivierung des BMP-Rezeptors-IB (ALK-6) eine Hauptrolle bei der Regulation der BMP-2-induzierten Apoptose der Osteoblasten spielt, die während der späten Phase des Differenzierungsstadiums beginnt (Hay et al., 2004). Die Wichtigkeit der Apoptose für die Osteoblastenfunktion wurde bei der Knochenentwicklung und dem Remodellingprozess bestätigt (Lynch et al., 1998; Manolagas, 2000). Jedoch ist es noch unbekannt, ob BMP-2 über einen selektiven BMP-R Typ I die Apoptose in den Osteoblasten induziert. Weiterführende Studien über die Beziehungen zwischen Rezeptoren, SMADs, Cbfa1 und Co-Transkriptionsfaktoren könnten die Induktion der Osteoblastendifferenzierung durch PDLLA-BMP-2 erklären.

Ein weiteres Kriterium zukünftiger Forschungen sind Kokulturen von Osteoblasten und Osteoklasten, die in den folgenden Untersuchungen mit einbezogen werden sollten. Denn Osteoblasten synthetisieren und sezernieren Moleküle, welche die Osteoklastendifferenzierung initiieren und kontrollieren (Teitelbaum, 2000; Amling et al., 2000). Zunehmend müssten auch das Alter des Patienten, die Zellteilungsfähigkeit

und die Syntheseaktivität der Zellen in den Fokus gerückt werden, das zeigten verschiedene Untersuchungen von Meyer et al. (2003). Es herrschen noch Unklarheiten in den Punkten: Wie beeinflussen Wachstumsfaktoren die Zellseneszenz? Wie wirken Wachstumsfaktoren auf Kontrollmechanismen? Welche Wachstumsfaktoren halten die Proliferation und die Apoptose im Gleichgewicht? Fest steht, dass Primärosteoblasten Faktoren synthetisieren, die für die Osteoklastogenese essentiell sind und umgekehrt Osteoklasten auch welche exprimieren, die für die Osteoblastogenese benötigt werden. Nur über weiterreichende Untersuchungen können Veränderungen der Knochenbildung und –resorption unter dem Einfluss von PDLLA und PDLLA-BMP-2 auf Osteoblasten und Osteoklasten verstanden werden.

Ziel ist es, aus den gewonnenen *in vivo* und *in vitro* Ergebnisse eine verbesserte und beschleunigte Frakturheilung auch beim Menschen zu erreichen. PDLLA-beschichtete Implantate dienen dabei nicht nur der mechanischen Stabilisierung, sondern auch als Wachstumsfaktoreinträger. Die vorliegenden Erkenntnisse von PDLLA-BMP-2-beeinflussten Regulationsmechanismen der Osteoblastendifferenzierung, der Matrixsynthese und Matrixdeposition könnten neue Behandlungsmöglichkeiten für die Frakturheilung, verschiedene Erbkrankheiten und orale Krankheiten bereitstellen.

#### 4.4 DIE ZUSAMMENFASSUNG

Der Wachstumsfaktor BMP-2 ist zur Behandlung von Frakturen langer Röhrenknochen seit 2002 in der Klinik zugelassen. Präklinische und klinische experimentelle Daten sprechen für die osteoinduktive Wirksamkeit der rekombinanten humanen BMPs (Govender et al., 2002; Mc Kay, 2004; Poynton und Lane, 2002; Boden et al., 2000; Valentin-Opran et al., 2002; Schmidmaier et al., 2002; Gerhart et al., 1993). Mit einem sog. „kalten Beschichtungsverfahren“ konnten Implantate mit Poly (D,L-Laktid) (PDLLA) und aktiven Wachstumsfaktoren beschichtet werden. PDLLA diente dabei als Trägersubstanz und ermöglichte eine Kombination und genaue Dosierung von aktiven Wachstumsfaktoren (Schmidmaier et al. 1999; 2001b). In verschiedenen *in vivo* Studien an der Ratte, am Schwein und am Schaf wurden die osteoinduktiven Eigenschaften der bioaktiven Beschichtung untersucht. Das Trägermaterial PDLLA trug dabei zu positiven Effekten bei der Frakturheilung bei (Schmidmaier et al., 1999; 2000; 2001a; 2002b; 2002a; 2002b; 2003; Raschke et al., 2002; Kandziora et al., 2002a; 2002b; 2002c; 2002d; Wildemann et al., 2005; Partale et al., 2005). Anhand der *in vivo* Versuche ist jedoch keine Aussage über die Wirkung der Wachstumsfaktoren und des PDLLAs auf einen bestimmten Zelltyp möglich.

Die vorliegende *in vitro* Studie mit humanen Primärosteoblasten sollte Aufschluss geben, wie die mRNA-Expressionsmuster von PDLLA-BMP-2-beschichteten Titan-Kirschner-Drähten beeinflusst werden. Genaue Untersuchungen der humanen Primärosteoblasten im Hinblick auf die Osteogenese sowie deren Beeinflussung durch die beiden Faktoren PDLLA und BMP-2 sollten mit Hilfe der cDNA-Mikroarraytechnologie zu den Versuchstagen 0, 5, 10 und 15 erbracht werden. Ziel war es, Erkenntnisse bei den Regulationsmechanismen des Osteoblasten zu erhalten. Dazu wurde, mit der Ausnahme von Ascorbat,  $\beta$ -Glycerophosphat und Antibiotika, auf die Zugabe weiterer osteoblastogenesebeeinflussender Faktoren verzichtet.

In der Studie wurde bestätigt, dass die Mikroarraytechnologie eine geeignete qualitative Methode ist, um einen Überblick über das mRNA-Expressionsmuster der humanen Primärosteoblasten *in vitro* zu erhalten. Die mRNA-Expressionen von Wachstumsfaktoren, deren Rezeptoren, von SMADs, Transkriptionsfaktoren, matrixassoziierten Proteinen und Zelladhäsionsmolekülen wurden analysiert. Aufgrund der Menge an Daten wurde die Diskussion auf die Analyse der deutlich veränderten mRNAs beschränkt. Diese Ergebnisse besaßen die Kriterien, dass eine mRNA-Expressionsveränderung mit einer Ratio  $\geq 2$  gegenüber der Kontrollgruppe vorlag, dass die Expression mit einem optischen Scorewert  $\geq 2$  bewertet wurde und damit optisch auf dem Röntgenbild der Arraymembran deutlich sichtbar war, dass sich die Expression grafisch von den anderen Mitgliedern derselben Genfamilie deutlich unterschied und dass die Expression mindestens 50% der GAPDH-Expression entsprach.

Die Ergebnisse dieser Arbeit bewiesen eine Beeinflussung der humanen Primärosteoblasten durch die PDLLA-BMP-2- und durch die PDLLA-Beschichtungen auch auf der molekularen Ebene. Die stimulierende Wirkung der PDLLA-BMP-2-beschichteten Titan-Kirschner-Drähte gegenüber den mRNA-Expressionen der Kontrollgruppe zeigte sich ab dem 5. Versuchstag, bei der PDLLA-Gruppe ab dem

10.Tag. Die erste mRNA-Expression, die sich unter dem PDLLA-BMP-2-Einfluss gegenüber der Kontrollgruppe abhob, war die des Rezeptors TGF $\beta$ R-1. Das Ausmaß der Stimulierung durch PDLLA und PDLLA-BMP-2 war dann am 10. Versuchstag besonders deutlich. 18 mRNA-Expressionen entsprachen bei der PDLLA-BMP-2-Gruppe mehr als 50% der GAPDH-Expression, während es bei der PDLLA-Gruppe 5 Expressionen waren. Zu den stark erhöhten mRNA-Expressionen unter der PDLLA-Beschichtung gehörten der Transkriptionsfaktor MSX1, die ECM-Proteine Kollagen 12A1, Biglycan, die Proteinase MMP2 und der Wachstumsfaktor FGF-2. Neben diesen erhöhten sich unter dem PDLLA-BMP-2-Einfluss zusätzlich die mRNAs von COLL11A1, COLL14A1, Annexin V, TGF- $\beta$ 3, FGF-1, VEGF-A, VEGF-B, den SMADs 2, 4, 5 und 9, ITGA1 und CTSK.

Möglicherweise sind anhand der gewonnenen *in vitro* Ergebnisse die positiven *in vivo* Ergebnisse von der PDLLA- und der PDLLA-BMP-2-Gruppe zu erklären. Anhand der gewonnenen m-RNA-Expressionsmuster zeigte sich, dass alle erhöht expremierten mRNAs von der PDLLA-Gruppe auch in der PDLLA-BMP-2-Gruppe gesteigert wurden. Neben den Zeitunterschieden und den scheinbaren variierenden Expressionshöhen bei den beiden Gruppen kristallisierte sich außerdem heraus, dass einige mRNAs nur unter dem PDLLA-BMP-2-Einfluss erhöht expremiert wurden. Unter diesen Aspekt fielen der Rezeptor TGF $\beta$ R1, die Kollagene 11A1, 14A1 und das Zelladhäsionsmolekül ITGA1. Starke Expressionssteigerungen, die sich bei der PDLLA-BMP-2-Gruppe am Tag 10 ergaben und auch noch am Tag 15 erhöht blieben, waren TGF $\beta$ 3, VEGFB, SMAD 2, 4, 5 und ITGA1. Es konnte in der *in vitro* Studie bestätigt werden, dass durch die PDLLA-Beschichtung von Titan-Kirschner-Drähten mRNA-Expressionen bei humanen Primärosteoblasten erhöht werden. Durch die zusätzliche BMP-2-Beschichtung werden weitere mRNA-Expressionssteigerungen bzw. frühere Expressionszeitpunkte erzielt. Die PDLLA- und PDLLA-BMP-2-beschichteten Titan-Kirschner-Drähte induzieren bei von humanen Primärosteoblasten in dem beobachteten Versuchszeitraum von 15 Tagen eine erhöhte Expression osteogeneserelevanter mRNAs.

## 5 LITERATURVERZEICHNIS

- Aarden, E.M.; Burger, E.H.; Nijweide, P.J. Function of osteocytes in bone. *J Cell Biochem* **1994**, *55*: 287-299.
- Aase, K.; Lymboussaki, A.; Kaipainen, A. et al. Localization of VEGF-B in the mouse embryo suggests a paracrine role of the growth factor in the developing vasculature. *Dev Dyn* **1999**, *215*: 12-25.
- Abercrombie, M.; Heaysman, J.E. Observations on the social behaviour of cells in tissue culture. II. Monolayering of fibroblasts. *Exp Cell Res* **1954**, *6(2)*: 293-306.
- Afrakhte, M.; Morén, A.; Jossan, S. et al. Induction of inhibitory Smad6 and Smad7 mRNA by TGF- $\beta$  family members. *Biochem Biophys Res Commun* **1998**, *249*: 505-511.
- Aigner, T.; Zien, A.; Hanisch, D. et al. Gene expression in chondrocytes assessed with use of microarrays. *Bone Joint Surg* **2003**, *85-A Suppl2*: 117-123.
- Akiyama, H.; Chaboissier, M.C.; Martin, J.F. et al. The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. *Genes dev.* **2002**, *16*: 2813-2828.
- Alliston, T.; Choy, L.; Ducey, P. et al. TGF-beta-induced repression of CBFA1 by Smad3 decreases cbfa1 and Osteocalcin expression and inhibits Osteoblast differentiation. *EMBO J* **2001**, *20*:2254-2272.
- Amedee, J.; Bareille, R.; Rouais, F. et al. Osteogenin (bone morphogenic protein 3) inhibits proliferation and stimulates differentiation of osteoprogenitors in human bone marrow. *Differentiation* **1994**, *58*: 157-164.
- Amling, M.; Schilling, A.F.; Rueger, J.M. Osteoklasten: universelle Zellen der Knochenumstrukturierung. Zelluläre Interaktion mit Biomaterialien. *Unfallchirurgie* **2000**, *278*, 43-61.
- Andersen, M.H.; Berglund, L.; Petersen, T.E. et al. Annexin V binds to the intracellular part of the beta(5) integrin receptor subunit. *Biochem Biophys Res Commun* **2002**, *292*: 550-557.
- Anderson, J.; Burns, H.D.; Enriquez-Harris, P. et al. Apert syndrome mutations in fibroblast growth factor receptor 2 exhibit increased affinity for FGF ligand. *Hum Mol Genet* **1998**, *7*: 1475-1483.
- Andrew, J.G.; Hoyland, J.A.; Freemont, A.J. et al. Platelet-derived growth factor expression in normally healing fractures. *Bone* **1995**, *16*: 455-460.
- Ashurst, M.A. Collagens synthesized by healing fractures. Basic science and pathology – section III. *Clin Orth Rel Res* **1990**, *255*: 273-283.
- Aspenberg, P.; Thorndren, K.G.; Lohmander, L.S. Dose-dependent stimulation of bone induction by basic fibroblast growth factor in rats. *Acta Orthop Scand* **1991**, *62*: 481-484.
- Aubin, J.E. Bone stem cells. *J Cell Biochem* **1998**, *31(Suppl)*: 73-82.
- Aubin, J.E.; Triffitt, J.T. Mesenchymal Stem Cells and Osteoblast Differentiation. In: Bilezikian, J.P.; Raisz, L.G.; Rodan, G.A. Eds. Principles of Bone Biology, Volume 1, Inc. San Diego, Ca: Academic Press **2002**: 63.
- Aubin, J.E.; Turksen, K.; Heersche, J.N.M. Osteoblastic cell lineage. In: Noda M. Ed. Cellular and Molecular Biology of Bone. Inc. San Diego, Ca: Academic Press **1993**: 1-45.
- Bahamonde, M.E.; Lyons, K.M. BMP-3: to be or not to be a BMP. *J Bone Joint Surg Am* **2001**, *83 Suppl 1(Pt 1)*: S56-62.
- Bahr, C.; Groner, B. The IGF-1 receptor and its contributions to metastatic tumor growth-novel approaches to the inhibition of IGF-1R function. *Growth Factors* **2005**, *23(1)*: 1-14.
- Balemans, W.; Van Hul, W. Extracellular Regulation of BMP Signaling in Vertebrates: A Cocktail of Modulators. *Dev Biol* **2002**, *250*:231-250.
- Banerjee, C.; McCabe, L.; Choi, J. et al. Runt homology domain proteins in osteoblast differentiation: AML3/CBFA1 is a major component of a bone-specific complex. *J Cell Biochem* **1997**, *66*: 1-8.
- Barleon, B.; Sozzani, S.; Zhou, D. et al. Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. *Blood* **1996**, *87*: 3336-3343.
- Bateman, J.F.; Lamande, S.R.; Ramshaw, J.A. Collagen superfamily. In: Comper W.D. Ed. Extracellular matrix, volume 2. Amsterdam: Hardwood Academic Publisher **1996**. 23-67.
- Beck, G.R.; Zerler, B.; Moran, E. Phosphate is a specific signal for induction of osteopontin gene expression. *PNAS* **2000**, *97*: 8352-8357.
- Beck, G.R.; Zerler, B.; Moran, E. Gene Array Analysis of Osteoblast Differentiation. *Cell Growth Differentiation* **2001**, *12*: 61-83.

- Bergers, G.; Brekken, R.; Mc Mahon, G. et al. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nature Cell Biol* **2000**; *2*: 737-744.
- Bertolini, D.R.; Nedwin, G.E.; Bringman, T.S. et al. Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation in vitro by human tumor necrosis factor. *Natur*, **1986**, *319*: 516-518.
- Bianco, P.; Riminucci, M.; Bonucci, E. et al. Bone Sialoprotein (BSP) secretion and osteoblast differentiation: relationship to bromodeoxyuridine incorporation, alkaline phosphatase, and matrix deposition. *J Histochem Cytochem* **1993**, *41*: 183-191.
- Binato, R.; Martinez, C.E.A.; Pizzatti, L. et al. SMAD8 binding to mice Mx1 basal promoter is required for transcriptional activation. *Biochem J* **2006**, *393*: 141-150.
- Boden, S.D.; Zdeblick, T.A.; Sandhu, H.S. et al. The use of rhBMP-2 in interbody fusion cages. Definitive evidence of osteoinduction in humans: a preliminary report. *Spine* **2000**, *25*: 376-381.
- Boivin, G.; Anthoine-Terrier, C.; Morel, G. Ultrastructural localization of endogenous hormones and receptors in bone tissue: an immunocytological approach in frozen samples. *Micron*, **1994**, *25*: 15-27.
- Bonewald, L.F.; Dallas, S.L. Role of active and latent transforming growth factor b in bone formation. *J Cell Biochem* **1994**, *55*: 350-357.
- Bord, S.; Horner, A.; Beeton, C.A. et al. Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 (TIMP-1) distribution in normal and pathological human bone. *Bone*, **1999**, *24(3)*: 229-235.
- Bord, S.; Horner, A.; Hembry, R.M. et al. Stromelysin-1 (MMP-3) and stromelysin-2 (MMP-10) expressed developing human bone: potential roles in skeletal development. *Bone* **1998**, *23(1)*: 7-12.
- Bord, S.; Horner, A.; Hembry, R.M. et al. Distribution of matrix metalloproteinases and their inhibitor, TIMP-1, in developing human osteophytic bone. *J Anat*, **1997**, *191*: 39-48.
- Bord, S.; Horner, A.; Hembry, R.M. et al. Production of collagenase by human osteoblasts and osteoclast in vivo. *Bone*, **1996**, *19*: 35-40.
- Bornstein, P.; Sage, H. Structurally distinct collagen types. *Annu Rev Biochem* **1980**, *49*: 957-1003.
- Boskey, A.L. Osteopontin and related phosphorylated sialoproteins: Effects on mineralization. *Ann NY Acad Sci* **1995**, *760*: 249-256.
- Boskey, A.L.; Maresca, M.; Ullrich, W. et al. Osteopontin – hydroxyapatite interactions in vitro: inhibition of hydroxyapatite formation and growth in a gelatin-gel. *Bone Miner* **1993**, *22*: 147-159.
- Bostrom, M.P.; Asnis, P. Transforming growth factor beta in fracture repair. *Clin Orthop* **1998**, *Suppl 355*: S124-S131.
- Bostrom, M.P.; Camacho, N.P. Potent role of bone morphogenic proteins in fracture healing. *Clin Orthop*, **1998**; *255 Suppl*: 274-82.
- Bostrom, M.P.; Saleh, K.J.; Einhorn, T.A. Osteoinductive growth factors in preclinical fracture and long bone defects models. *Orthop Clin North Am* **1999**, *30*: 647-658.
- Bramlage, C.P.; Häupl, T.; Kaps, C. et al. Bone Morphogenic Proteins – im Skelettsystem. *Z Rheumatol* **2005**, *64*: 416-422.
- Breen, E.C.; Igotz, R.A.; McCabe, L. et al. TGF beta alters growth and differentiation related gene expression in proliferating osteoblasts in vitro, preventing development of the mature bone phenotype. *J Cell Physiol* **1994**, *160*: 323-335.
- Canalis, E. Effect of platelet-derived growth factor DNA and protein synthesis in cultured rat calvariae. *Metabolism* **1981**, *30*: 970.
- Canalis, E.; Centrella, M.; McCarthy, T. Effects of basic fibroblast growth factor on bone formation in vitro. *J Clin Invest* **1988a**, *81*: 1572-1577.
- Canalis, E.; McCarthy, T.; Centrella, M. Isolation and characterization of insulin-like growth factor I (somatomedin-C) from cultures of fetal rat calvariae. *Endocrinology* **1988b**, *122*: 22-27.
- Canalis, E.; McCarthy, T.L.; Centrella, M. The role of growth factors in skeletal remodelling. *Endocrinol Metabol Clin North Amer*, **1989**, *18*: 903-918.
- Canalis, E.; Rydziel, S.; Delany, A.M. et al. Insulin-like growth factors inhibit interstitial collagenase synthesis in bone cell cultures. *Endocrinology* **1995**, *136*: 1348-1354.
- Carrington, J.L.; Roberts, A.B.; Flanders, K.C. et al. Accumulation, localization, and compartmentation of transforming growth factor-B during endochondral bone development. *J Cell Biol* **1988**, *107*: 1969-1975.
- Carvalho, R.S.; Kostenuik, P.J.; Salih, E. et al. Selective adhesion of osteoblastic cells to different integrin ligands induces osteopontin gene expression. *Matrix Biol* **2003**, *22*: 241-219.
- Cheah, K.S.E. Collagen genes and inherited connective tissue disease. *Biochem* **1985**, *229*: 287-303.

- Chen, D.; Ji, X.; Harris, M.A. et al. Differential roles for Bone Morphogenic Protein (BMP) receptor type IB and IA in differentiation and specification of mesenchymal precursor cells to osteoblast and adipocyte lineages. *J Cell Biol* **1998**, *142*: 295-305.
- Chen, J.J.; Delongchamp, R.R.; Tsai, C.A. et al. Analysis of variance components in gene expression data. *Bioinformatics* **2004**, *20(9)*: 1436-46.
- Chen, J.; Mc Culloch, C.A.G.; Sudek, J. Bone sialoprotein protein in developing porcine dental tissues: Cellular expression and comparison of tissue localization with osteopontin and osteonectin. *Arch Oral Biol*, **1993a**, *38*: 241-249.
- Chen, J.; Mc Kee, M.D.; Nanci, A. et al. Bone Sialoprotein mRNA expression and ultrastructural localization in fetal porcine calvarial bone: comparison with osteopontin. *Histoche J*, **1994**, *26*: 67-78.
- Chen, J.; Singh, K.; Mukherjee, B.B. et al. Developmental expression of Osteopontin (OPN) mRNA in rat tissue: Evidence for a role for OPN in bone formation and resorption. *Matrix* **1993b**, *13*: 113-123.
- Chen, R.H.; Ebner, R.; Derynck, R. Inactivation of type II receptor reveals two receptor pathways for the diverse TGF- $\beta$  activities. *Science* **1993c**, *260*: 13335-1338.
- Chen, Y.; Bal, B.S.; Gorski, J.P. Calcium and collagen binding properties of osteopontin, bone sialoprotein, and bone acid glycoprotein-75 from bone. *J Biol Chem* **1992**, *267*: 24871-24878.
- Chen, Y.; Bhushan, A.; Vale, W. Smad8 mediates the signaling of the receptor serine kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* **1997**, *94*: 12938-12943.
- Chen, Y.W.; Zhao, P.; Borup, R. et al. Expression profiling in muscular dystrophies: identification of novel aspects of molecular pathology. *J Cell Biol* **2000**, *151*: 1321-1336.
- Chen, Z.J.; Gaté, L.; Davis, W. et al. Sensitivity and fidelity of DNA microarray improved with integration of amplified differential gene expression (ADGE). *BMC Genomics* **2003**, *4(28)*: 1-11.
- Cheng, H.; Jiang, W.; Phillips, F.M. et al. Osteogenic Activity of the fourteen types of human Bone Morphogenic Proteins (BMPs). *J Bone and Joint Surgery* **2003**, *8*: 1544-1552.
- Cheng, S.L.; Lai, C.F.; Blystone, S.D. et al. Bone mineralization and osteoblast differentiation are negatively modulated by integrin  $\alpha\beta 3$ . *J Bone Miner res* **2001**, *16(2)*: 277-288.
- Chien, H.H.; Lin, W.L.; Cho, M. Down-Regulation of osteoblastic cell differentiation by Epidermal Growth Factor Receptor. *Calcif Tiss Int* **2000**, *67*: 141-150.
- Chikazu, D.; Hakeda, Y.; Ogata, N. et al. Fibroblast growth factor (FGF)-2 stimulates mature osteoclast function through activation of FGF receptor 1 and p42/p44 MAP kinase. *J Biol Chem* **2000**, *275*: 31444-31450.
- Cho, T.J.; Gerstenfeld, L.C.; Einhorn, T.A. Differential temporal expression of members of the transforming growth factor beta superfamily during murine fracture healing. *J Bone Miner Res* **2002**, *17*: 513-520.
- Chuaqui, R.F.; Bonner, R.F.; Best, C.J. et al. Post-analysis follow-up and validation of microarray experiments. *Nat Genet* **2002**, *32, Suppl*: 509-514.
- Chubinskaya, S.; Kuettner, K.E. Regulation of osteogenic proteins by chondrocytes. *Int J Biochem Cell Biol* **2003**, *35 (9)*: 1323-1340.
- Chung, U.I.; Lanske, B.; Lee, K. et al. The parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor coordinates endochondral bone development by directly controlling chondrocyte differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* **1998**, *95*: 13030-13035.
- Clover, J.; Dodds, R.; Gowen, M. Integrin subunit expression by human osteoblasts and osteoclasts in situ and in culture. *J Cell Sci* **1992**, *103*: 267-271.
- Cochran, D.L.; Jones, A.A.; Lilly, L.C. et al. Evaluation of recombinant human bone morphogenic protein-2 in oral applications including the use of endosseous implants: 3-year results of a pilot study in humans. *J Periodontal* **2000**, *71*: 1241-1257.
- Conn, K.M.; Termine, J.D. Matrix protein profiles in calf bone development. *Bone*, **1985**, *6*: 33-36.
- Corsi, A.; Xu, T.; Chen, X.D. et al. Phenotypic effects of biglycan deficiency are linked to collagen fibril abnormalities, are synergized by decorin deficiency, and mimic Ehlers-Danlos-like changes in bone and other connective tissues. *J Bone Miner Res* **2002**, *17*: 1180-1189.
- Cowels, E.A.; Brailey, L.L.; Gronowicz, G.A. Integrin-mediated signaling regulates AP-1 transcription factors and proliferation in osteoblasts. *J Biomed Mater Res* **2000**, *52*: 725-737.
- Croteau, S.; Rauche, F.; Silvestri, A. et al. Bone morphogenic proteins in orthopedics: from basic science to clinical practice. *Orthopedics* **1999**, *22*: 686-695.

- Cunningham, S.A.; Waxham, M.N.; Arrate, P.M. et al. Interaction of the FLT-1 tyrosine kinase receptor with the p85 subunit of phosphatidylinositol 3-kinase. Mapping of a novel site involved in binding. *J Biol Chem* **1995**, *270*: 20254-20257.
- Daluiski, A., Engstrand, T., Bahamonde, M.E. et al. Bone morphogenic protein-3 is a negative regulator of bone density. *Nat Genet* **2001**, *27*: 84-88.
- Damsky, C.H. Extracellular matrix-integrin interaction in osteoblast function and tissue remodeling. *Bone* **1999**, *25*: 95-96.
- Deckers, M.M.; Karperien, M.; Van der Bent, C. et al. Expression of vascular endothelial growth factors and their receptors during osteoblast differentiation. *Endocrinology* **2000**, *141*: 1667-1674.
- Deckers, M.M.; Van Bezooijen, R.L.; Van der Horst, G. et al. Bone morphogenic proteins stimulate angiogenesis through osteoblast-derived vascular endothelial growth factor A. *Endocrinology* **2002**, *143*: 1545-1553.
- De Crombrughe, B.; Lefebvre, V.; Behringer, R.R. et al. Transcriptional mechanisms of chondrocyte differentiation. *Matrix Biol* **2000**, *19(5)*: 389-394.
- De Jong, D.S.; Van Zoelen, E.J.; Bauerschmidt, S. et al. Microarray analysis of bone morphogenic protein, transforming growth factor beta, and activin early response genes during osteoblastic cell differentiation. *J Bone Miner Res* **2002**, *17*: 2119-2129.
- Devlin, C.J.; Brickell, P.M.; Taylor, E.R. et al. In situ hybridization reveals differential spatial distribution of mRNA for type I and II collagen in the chick limb bud. *Development* **1988**, *103*: 111.
- Derynck, R.; Zhang, Y.; Feng, X.H. Smads: transcriptional activators of TGF- $\beta$  responses. *Cell* **1998**, *95*: 737-740.
- Deryugina, E.I.; Ratnikov, B.; Monosov, E. et al. MT-1-MMP initiates activation of pro-MMP-2 and integrin  $\alpha$ v $\beta$ 3 promotes maturation of MMP-2 in breast carcinoma cells. *Exp Cell Res* **2001**, *263*: 209-223.
- Desai, B.J.; Meyer, M.H.; Porter, S. et al. The effect of age on gene expression in adult and juvenile rats following femoral fracture. *J Orthop Trauma* **2003**, *17*: 689-698.
- Diefenderfer, D.L.; Osyczka, A.M.; Garino, J.P. et al. Regulation of BMP-induced transcription in cultured human bone marrow stromal cells. *J Bone Joint Surg Am* **2003**, *85*: 19-28.
- DiLeone, R.J.; King, J.A.; Storm, E.E. et al. The Bmp8 Gene is expressed in developing skeletal tissue and maps near the achondroplasia locus on mouse chromosome 4. *Genomics* **1997**, *40*: 196-198.
- Dodds, R.A.; Connor, J.R.; Drake, F. et al. Cathepsin K mRNA detection is restricted to osteoclasts during fetal mouse development. *J Bone Miner Res* **1998**, *13*: 673-682.
- Ducy, P. Cbfa1: a molecular switch in osteoblast biology. *Developmental Dynamics* **2000a**, *219*: 461-471.
- Ducy, P.; Desbois, C.; Boyce, B. et al. Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature* **1996**, *382*: 448-452.
- Ducy, P.; Karsenty, G. The Family of bone morphogenic proteins. *Kidney International* **2000b**, *57*: 2207-2214.
- Ducy, P.; Schinke, T.; Karsenty, G. The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science* **2000c**, *289*: 1501-1504.
- Ducy, P.; Zhang, R.; Geoffroy, V. et al. Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* **1997**, *89*: 747-754.
- Eeckhout, Y.; Delaisse, J.M. The role of collagenase in bone resorption. *Pathol Biol (Paris)*, **1988**, *36(9)*: 1139-1146.
- Egeblad, M.; Werb, Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nature Rev* **2002**, *2*: 161-174.
- Einhorn, T.A.; Majeska, R.J. Neutral proteases in regenerating bone. *Clin Orthop*, **1991**, *262*: 286-297.
- Eisenberg, E.; Levanon, E.Y. Human housekeeping genes are compact. *Trends in Genetics* **2003**, *19(7)*: 362-365.
- Engsig, M.T. Matrix metalloproteinase 9 and vascular endothelial growth factor are essential for osteoclast recruitment into developing long bones. *J Cell Biol* **2000**, *151*: 879-889.
- Eppley, B.L.; Doucet, M.; Connolly, D.T. et al. Enhancement of angiogenesis by bFGF in mandibular bone graft healing in the rabbit. *J Oral Maxillofac Surg* **1988**, *46*: 391-398.
- Epstein, E.H. [ $\alpha$ 1(III)]a human skin collagen. *J Biol Chem* **1972**, *249*: 3225-3231.
- Erlebacher, A.; Filvaroff, E.H.; Ye, J.Q. et al. Osteoblastic responses to TGF- $\beta$  during bone remodelling. *Mol Biol Cell* **1998**, *9*: 1903-1918.
- Everts, V.; Hou, W.S.; Rialland, X. et al. Cathepsin K deficiency in pycnodystosis results in accumulation of non-digested phagocytosed collagen in fibroblasts. *Calcif Tissue Int* **2003**, *73*: 380-386.
- Eyre, D. Review: Collagen of articular cartilage. *Arthritis Res* **2002**, *4*: 30-35.
- Eyre, D.; Weis, M.A.; Wu, J.J. Articular cartilage collagen: an irreplaceable framework? *European Cells and Materials* **2006**, *12*: 57-63.

- Febbraio, M.; Hajjar, D.P.; Silverstein, R.L. CD36: A class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *J Clin Invest* **2001**, *108*: 785-791.
- Ferrara, N. Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* **2001**, *280*: C1358-1366.
- Filanti, C.; Dickson, G.R.; Di Martino, D. et al. The expression of metalloproteinase-2, -9, and -14 and of tissue inhibitors-1 and -2 is developmentally modulated during osteogenesis in vitro, the mature osteoblastic phenotype expressing metalloproteinase-14. *J Bone Miner Res* **2000**, *15*: 2154-2168.
- Flück, M.; Däpp, C.; Schmutz, S. et al. Transcriptional profiling of tissue plasticity: role of shifts in gene expression and technical limitations. *J Appl Physiol* **2005**, *99*: 397-413.
- Folkman, J.; Klagsbrun, M. Angiogenic factors. *Science* **1987**, *442*-447.
- Fox, S.W.; Lovibond, A.C. Current insights into the role of transforming growth factor- $\beta$  in bone resorption. *Mol Cell Endocrinology* **2005**, *243*: 19-26.
- Franceschi, R.T. The developmental control of osteoblast-specific gene expression: role of specific transcription factors and the extracellular matrix environment. *Crit Rev Oral Biol Med* **1999**, *10*(1): 40-57.
- Frenette, P.S.; Subbarao, S.; Mazo, I.B. et al. Endothelial selectins and vascular cell adhesion molecule-1 promotes hematopoietic progenitor homing to bone marrow. *Proc Natl Acad Sci USA* **1998**, *95*: 14423-14428.
- Freshney, R.I. In: Tierische Zellkulturen. Ein Methoden-Handbuch. Berlin, New York, Walter De Gruyter Verlag **1990a**: 112-127.
- Freshney, R.I. Wachstumszyklus, Latenzphase (lag-Phase). In: Tierische Zellkulturen. Ein Methoden-Handbuch. Berlin, New York, Walter De Gruyter Verlag **1990b**: 243.
- Friedlaender, G.E. OP-1 clinical studies. *J Bone Joint Surg Am* **2001**, *83 suppl 1*(Pt 2): S 160-1.
- Frolik, C.A.; Ellis, L.F.; Williams, D.C. Isolation and characterization of insulin-like growth factor II from human bone. *Biochem Biophys Res Commun* **1988**, *151*: 1011-1018.
- Furumatsu, T.; Shen, Z.N.; Kawai, A. et al. Vascular Endothelial Growth Factor principally acts as the main angiogenic factor in the early stage of human osteoblastogenesis. *J Biochem* **2003**, *133*(5): 633-639.
- Ganta, D.; Pastizzo, G.; McCarthy, M. et al. Ascorbic acid deficiency inhibits Integrin expression prior to its effect on collagen synthesis in fetal rat parietal bone cultures. *J Bone Miner Res* **1994**, *9*: S254.
- Geoffroy, V.; Marty-Morieux, C.; Le Goupil, N. et al. In vivo inhibition of osteoblastic metalloproteinases leads to increased trabecular bone mass. *J Bone Miner Res* **2004**, *19*(5): 811-822.
- Gerber, H.P.; Vu, T.H.; Ryan, A.M. et al. VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat Med* **1999**, *5*: 623-628.
- Gerhart, T.N.; Kirker-Head, C.A.; Kiz, M.J. et al. Healing segmental femoral defects in sheep using recombinant bone morphogenic protein. *Clin Orthop*, **1993**; *293*: 317-26.
- Gerstenfeld, L.C.; Cho, T.J.; Kon, T. et al. Impaired intramembranous bone formation during bone repair in the absence of tumor necrosis factor-alpha signaling. *Cells Tissues Organs* **2001**, *169*: 285-294.
- Giancotti, F.G.; Ruoslahti, E. Integrin signaling. *Science* **1999**; *285*: 1028-1032.
- Giatromanolaki, A.; Sivridis, E.; Athanassou, N. et al. The angiogenic pathway « vascular endothelial growth factor/flk-1(KDR)-receptor » in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *J Pathol* **2001**, *194*: 101-108.
- Gilbert, L.; He, X.; Farmer, P. et al. Inhibition of osteoblast differentiation by tumor necrosis factor-alpha. *Endocrinology* **2000**, *141*: 3956-3964.
- Globus, R.K.; Doty, S.B.; Lull, J.C. et al. Fibronectin is a survival factor for differentiated osteoblasts. *J Cell Sci* **1998**, *111*: 1385-1393.
- Gonzalez, A.M.; Hill, D.J.; Logan, A. et al. Distribution of fibroblast growth factor (FGF)-2 and FGF-receptor-I messenger RNA expression and protein presence in the mid-trimester human fetus. *Pediatr Res* **1996**, *39*: 375-385.
- Gordon, M.K.; Castagnola, P.; Dublet, B. et al. Cloning of a cDNA for a new member of the class of fibril-associated collagend with interrupted triple helices. *Eur J Biochem* **1991**, *201*: 333-338.
- Gordon, M.K.; Olsen, B.R. The contribution of collagenous proteins to tissue-specific matrix assemblies. *Curr Opin Cell Biol* **1990**, *2*: 833-838.
- Gori, F.; Thomas, T.; Hicok, K.C. et al. Differentiation of human marrow stromal precursor cells: bone morphogenic protein-2 increases OSF2/Cbfa1, enhances osteoblast commitment, and inhibits late adipocyte maturation. *J Bone Miner Res* **1999**, *14*(9): 1522-1535.

- Goumans, M.J.; Mummery, C. Functional analysis of the TGF-Beta receptor / Smad pathway through gene ablation in mice. *Int. J. Dev. Biol.* **2000**, *44*, 253-265.
- Govender, S.; Csimma, C.; Genant, H.K. et al. A. Recombinant human bone morphogenic protein-2 for treatment of open tibial fractures: a prospective, controlled, randomized study of four hundred and fifty patients. *J Bone & Joint Surg* **2002**, *84A*: 2123-2134.
- Greenwalt, D.E.; Lipsky, R.H.; Ockenhouse, C.F. et al. Membrane glycoprotein CD36: a review of its roles in adherence, signal transduction, and transfusion medicine. *Blood* **1992**, *80*: 1105-1115.
- Gronowicz, G.; McCarthy, M.B. Response of human osteoblasts to implant materials: integrin-mediated adhesion. *J Orthop Res* **1996**, *14*: 878-887.
- Hagel-Bradway, S.; Dziak, R. Regulation of bone cell metabolism. *J Oral Pathol Med*, **1989**, *18*: 344-351.
- Hanai, J.; Chen, L.F.; Kanno, T. et al. Interaction and functional cooperation of PEBP/2CBF with Samds. Synergistic induction of the immunoglobulin germline Calpha promotor. *J Biol Chem* **1999**, *274*: 31577-31582.
- Harada, S.; Rodan, G.A. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature* **2003**, *423(6937)*: 349-355.
- Harris, S.E.; Bonewald, L.F.; Harris, M.A. et al. Effects of transforming growth factor on bone nodule formation and expression of bone morphogenic protein 2, osteocalcin, ostopontin, alkaline phosphatase, and typ I collagen mRNA in long-term cultures of fetal rat calvarial osteoblasts. *J Bone Miner Res* **1994**, *9(6)*: 855-863.
- Hata, R.; Hori, H.; Nagai, Y. et al. Selective inhibition of type I collagen synthesis in osteoblastic cells by epidermal growth factor. *Endocrinology* **1984**, *115*: 867-876.
- Haut Donahue, T.L.; Genetos, D.C.; Jacobs, C.R. et al. Annexin V disruption impairs mechanically induced calcium signalling in osteoblastic cells. *Bone* **2004**, *35*: 656-663.
- Hay, E.; Lemonnier, J.; Fromigué, O. et al. Bone morphogenic protein receptor IB signaling mediates apoptosis independently of differentiation in osteoblastic cells. *J Biol Chem* **2004**, *279(3)*: 1650-1658.
- Heberden, C.; Denis, I.; Pointillart, A. et al. TGF- $\beta$  and calcitriol. *Gen Pharmacol* **1998**, *30*: 145-151.
- Hegert, C.; Kramer, J.; Hargus, G. et al. Differentiation plasticity of chondrocytes derived from mouse embryonic stem cells. *J Cell Sci* **2002**, *115*: 4617-4628.
- Hill, P.A.; Murphy, G.M.; Docherty, A.J.P. et al. The effects of selective inhibitors of matrix metalloproteinases (MMPs) on bone resorption and the identification of MMPs and TIMP-1 in isolated osteoclasts. *J Cell Sci*, **1994**, *107*: 3055-3064.
- Hiltunen, M.O.; Ruuskanen, M.; Huuskonen, J. et al. Adenovirus-mediated VEGF-A gene transfer induces bone formation in vivo. *FASEB J* **2003**, *17*: 1147-1149.
- Hino, J.; Matsuo, H.; Kangawa, K. Bone Morphogenic Protein-3b (BMP-3b) Gene Expression is correlated with differentiation in rat calvarial osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* **1999**, *256*: 419-424.
- Hiraki, Y.; Inoue, H.; Shigeno, C. et al. Bone Morphogenic proteins (BMP-2 and BMP-3) promote growth and expression of the differentiated phenotype of rabbit chondrocytes and osteoblastic MC3T3-E1 cells in vitro. *J Bone Miner Res* **1991**, *6*: 1373-1385.
- Hoffmann, H.M.; Catron, K.M.; van Wijnen, A.J. et al. Transcriptional control of the tissue-specific, developmentally regulated osteocalcin gene requires a binding motif for the Msx family of homeodomain proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **1994**, *91*: 12887-12891.
- Hogan, B.L. Bone morphogenic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes & Development* **1996**, *10*, 1580-1594.
- Hoodless, P.A.; Haerry, T.; Abdollah, S. et al. MADR1, a MAD-related protein that functions in BMP2 signaling pathways. *Cell* **1996**, *85*: 489-500.
- House, M.G.; Kohlmeier, L.; Chattopadhyay, N. et al. Expression of an extracellular calcium-sensing receptor in human and mouse bone marrow cells. *J Bone Miner Res* **1997**, *12*: 1959-1970.
- Hu, G.; Lee, H.; Price, S.M. et al. Msx homeobox gene inhibits differentiation through upregulation of cyclin D1. *Development* **2001**, *128*: 2373-2384.
- Huber, R.; Berendes, R.; Burger, A. et al. Crystal and molecular structure of human annexin V after refinement. Implications for structure, membrane binding and ion channel formation of the annexin family proteins. *J Mol Biol* **1992**, *223*: 683-704.
- Hughes, D.; Salter, D.; Dedhar, S. Integrin expression in human bone. *J Bone Miner Res* **1993**, *8*: 529-533.
- Hughes, F.J.; Collyer, J.; Stanfield, M. et al. The effect of bone Morphogenic protein-2, -4, and -6 on differentiation of rat Osteoblast cells in vitro. *Endocrinology* **1995**, *136*: 2671-2677.
- Hunter, G.K.; Goldberg, H.A. Nucleation of hydroxylapatite by bone sialoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* **1993**, *90*: 8562-8565.

- Hurley, M.M.; Abreu, C.; Harrison, J.R. et al. Basic fibroblast growth factor inhibits type I collagen gene expression in osteoblastic MC3T3 cells. *J Biol Chem* **1993**, *268*: 5588-5593.
- Ibrahimi, A.; Abumrad, N.A. Role of CD36 in membran transport of long-chain fatty acids. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **2002**, *5*: 139-145.
- Itoh, S.; Itoh, F.; Goumans, M.J. et al. Signaling of transforming growth factor-beta family members through Smad proteins. *Eur J Biochem* **2000**, *267*: 6954-6967.
- Jabs, E.W.; Müller, U.; Li, X. et al. A mutation in the homeodomain of the human MSX2 gene in a family affected with autosomal dominant craniosynostosis. *Cell* **1993**, *75*: 443-450.
- Jane, J.; Dunford, B.; Kron, A. et al. Ectopic osteogenesis using adenoviral bone morphogenic protein BMP-4 and BMP-6 gene transfer. *Mol Ther* **2002**, *6*: 464-470.
- Jena, N.; Martin-Seisdedos, C.; McCue, P. et al. BMP7 null mutation in mice: Development defects in skeleton, kidney and eye. *Exp Cell Res* **1997**, *230*: 28-37.
- Jones, C.M.; Lyons, K.M.; Hogan, B.L. Involvement of bone morphogenic protein-4 (BMP-4) and Vgr-1 in morphogenesis and neurogenesis in the mouse. *Development* **1991**, *111*: 531-542.
- Jonk, L.J.; Itoh, S.; Heldin, C.H. et al. Identification and functional characterization of a Smad binding element (SBE) in the JunB promotor that acts as a transforming growth factor-beta, activin, and bone morphogenic protein-inducible enhancer. *J Biol Chem* **1998**, *273*: 21145-21152.
- Joyce, M.E.; Jingushi, S.; Bolander, M.E. Transforming growth factor-beta in the regulation of fracture repair. *Orthop Clin North Am* **1990**, *21*: 199-209.
- Kakudo, N.; Kusumoto, K.; Wang, Y.B. et al. Immunolocalization of vascular endothelial growth factor on intramuscular ectopic osteoinduction by bone morphogenic protein-2. *Life Science* **2006**, *79*: 11847-1855.
- Kandziora, F.; Bail, H.; Schmidmaier, G. et al. Bone morphogenetic protein-2 application by a poly-(D,L-lactide)-coated interbody cage: in vivo results of a new carrier for growth factors. *J Neurosurg* **2002a**, *97(1 Suppl)*: 40-8.
- Kandziora, F.; Pflugmacher, R.; Scholz, M. et al. Comparison of BMP-2 and combined IGF-I/TGF-ss1 application in a sheep cervical spine fusion model. *Eur Spine J* **2002b**, *11(5)*: 482-493.
- Kandziora, F.; Schmidmaier, G.; Schollmeier, G. et al. IGF-I and TGF-beta1 application by a poly-(D,L-lactide)-coated cage promotes intervertebral bone matrix formation in the sheep cervical spine. *Spine* **2002c**, *27(16)*:1710-23.
- Kandziora, F.; Scholz, M.; Pflugmacher, R. et al. Experimentalfusion of the sheep cervical spine. Part II: Effect of growth factors and carrier systems on interbody fusion. *Chirurg* **2002d**, *73(10)*: 1025-1038.
- Karsdal, M.A.; Larsen, L.; Engsig, M.T. et al. Matrix metalloproteinase-dependent activation of latent transforming growth factor-beta controls the conservation of osteoblasts into osteocytes by blocking osteoblast apoptosis. *J Biol Chem* **2002**, *277(46)*: 44061-7.
- Katagiri, T.; Takahashi, N. Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. *Oral Diseases* **2002**, *8*: 147-159.
- Katagiri, T.; Yamaguchi, A.; Komaki, M. et al. Bone morphogenic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage. *J. Cell. Biol.* **1994**, *127*, 1755-1766.
- Kawabata, M.; Chytil, A.; Moses, H.L. Cloning of a novel type II serine / threonine kinase receptor through interaction with the type I transforming growth factor-beta receptor. *J Biol Chem* **1995**, *270*: 5625-5630.
- Kawai, S.; Faucheu, C.; Gallea, S. et al. Mouse Smad8 phosphorylation downstream of BMP receptors ALK-2, ALK-3, and ALK-6 induces its association with Smad4 and transcriptional activity. *Biochem Biophys Res Commun* **2000**, *271*:682-687.
- Keene, D.R.; Sakai, L.Y.; Bächinger, H.P. et al. Type III collagen can be present on banded collagen fibrils regardless of fibril diameter. *J Cell Biol* **1987**, *105*: 2393-2402.
- Kessler, E.; Takahara, K.; Biniaminov, L. et al. Bone morphogenic protein-1: the type I procollagen C-proteinase. *Science* **1996**, *271*: 360-362.
- Kessler, S.; Kastler, S.; Mayr-Wohlfart, U. et al. Stimulation primärer Osteoblastenkulturen mit rh- TGF-β, rh-bFGF, rh-BMP-2 und rx-BMP-4 in einem In-vitro-Modell. *Orthopädie* **2000**, *29*: 107-111.
- Kim, I.S.; Otto, F.; Zabel, B. et al. Regulation of chondrocyte differentiation by Cbfa1. *Mech. Dev.* **1999**, *80*: 159-170.
- Kim, J.; Yu, W.; Kovalski, K. et al. Requirement for specific proteases in cancer cell intravasation as revealed by a novel semiquantitative PCR-based assay. *Cell* **1998**, *94*: 353-362.
- Kim, Y.J.; Lee, M.-H.; Wozney, J.M. et al. Bone morphogenic protein-2-induced alkaline phosphatase expression is stimulated by Dlx5 and repressed by Msx2. *J Biol Chem* **2004**, *279(38)*: 50773-80.

- King, J.A.; Marker, P.C.; Seung, K.J. et al. BMP5 and the molecular, skeletal and soft-tissue alterations in short ear mice. *Dev Biol* **1994**, *166*: 112-122.
- Kingsley, D.M. The TGF-beta superfamily: New members, new receptors, and new genetic tests of function in different organism. *Genes Dev.* **1994**; *8*: 133-46.
- Kirsch, T.; Pfaffle, M. Selective binding of anchorin CII (annexin V) to type II and X collagen and to chondrocalcin (C-propeptide of type II collagen). Implications for anchoring function between matrix vesicles and matrix proteins. *FEBS Lett.* **1992**, *310*:143-7.
- Kiviranta, R.; Morko, J.; Uusitalo, H. et al. Accelerated turnover of metaphyseal trabecular bone in mice overexpressing cathepsin K. *J Bone Miner Res* **2001**, *16*: 1444-1452.
- Klagsburn, M. The fibroblast growth factor family: structural and biological properties. *Prog Growth Factor Res* **1989**, *1*: 207-235.
- Komori, T.; Yagi, H.; Nomura, S. et al. Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* **1997**, *89*: 755-764.
- Kon, T.; Cho, T.J.; Aizawa, T. et al. Expression of osteoprotegerin, receptor activator of NF-kappaB ligand (osteoprotegerin ligand) and related proinflammatory cytokines during fracture healing. *J Bone Miner Res* **2001**, *16*: 1004-1014.
- Korchynskyi, O.; Dechering, K.J.; Sijbers, A.M. et al. Gene array analysis of Bone Morphogenic Protein Type I Receptor-induced osteoblast differentiation. *J of Bone and Miner Res* **2003**, *18*(7): 1177-1185.
- Kumegawa, M.; Hiramatsu, M.; Hatakeyama, K. et al. Effects of epidermal growth factor on osteoblastic cells in vitro. *Calcif Tiss Int* **1983**, *35*: 542-548.
- Kundu, M.; Javed, A.; Jeon, J.P. et al. Cbfb interacts with Runx2 and has a critical role in bone development. *Nature Genet.* **2002**, *32*: 639-644.
- Kwan Tan, S.; Padrines, M.; Theoleyre, S. et al. IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine Growth Factor Rev* **2004**, *15*: 49-60.
- Lagna, G.; Hata, A.; Hemmati-Brivanlou, A. et al. Partnership between DPC 4 and SMAD proteins in TGF-beta signaling pathways. *Nature* **1996**, *383*: 832-836.
- Lam, J.; Takeshita, S.; Barker, J.E. et al. TNF-alpha induces osteoclastogenesis by direct stimulation of macrophages exposed to permissive levels of RANK ligand. *J Clin Invest* **2000**, *106*: 1481-1488.
- Lane, J.M.; Suda, M.; Von der Mark, K. et al. Development of osteogenic tissue in diffusion chambers from early precursor cells in bone marrow of adult rats. *Cell Tissue Res* **1987**, *4*: 318.
- Lapidot, T.; Petit, I. Current understanding of stem cell mobilization: the roles of chemokines, proteolytic enzymes, adhesion molecules, cytokines, and stromal cells. *Exp Hematol* **2002**, *30*: 973-981.
- Lecanda, F.; Aviolo, L.V.; Cheng, S.L. Regulation of bone matrix protein expression and induction of differentiation of human osteoblasts and human bone marrow stromal cells by bone Morphogenic protein-2. *J Cell Biochem* **1997**, *67*: 386-398.
- Lee, M.H.; Javed, A.; Kim, H.J. et al. Transient upregulation of Cbfa1 in response to bone morphogenic protein-2 and transforming growth factor beta1 in C2C12 myogenic cells coincides with suppression of the myogenic phenotype but is not sufficient for osteoblast differentiation. *J Cell Biol* **1999a**, *73*: 114-125.
- Lee, M.S.; Lowe, G.N.; Strong, D.D. et al. TWIST, a basic helix-loop-helix transcription factor, can regulate the human osteogenic lineage. *J Cell Biochem* **1999b**, *75*(4): 566-577.
- Lemonnier, J.; Hay, E.; Delannoy, P. et al. Increased Osteoblast apoptosis in apert craniosynostosis: role of protein kinase C and interleukin-1. *AM J Pathol* **2001**, *158*(5): 1833-1842.
- Liebermann, J.R.; Daluiski, A.; Einhorn, T.A. The Role of Growth factors in the repair of Bone. *Bone Joint Surg* **2002**, *84*: 1032-1044.
- Littlewood-Evans, A.; Kokubo, T.; Ishibashi, O. et al. Localization of cathepsin K in human osteoclasts by in situ hybridization and immunohistochemistry. *Bone* **1997**, *20*: 81-86.
- Liu, F.; Ventura, F.; Doody, J. et al. Human type II receptor for bone morphogenic proteins (BMPs): extension of the two-kinase receptor model to the BMPs. *Mol Cell Biol* **1995**, *15*: 3479-3486.
- Locklin, R.M.; Riggs, B.L.; Hicok, K.C. et al. Assessment of gene regulation by bone morphogenic protein 2 in human marrow stromal cells using gene array technology. *J Bone Miner Res* **2001**, *16*: 2192-2204.
- Luo, Y.; Cai, J.; Liu, Y. et al. Microarray analysis of selected genes in neural stem and progenitor cells. *J of Neurochemistry* **2002**, *83*: 1481-1497.
- Lynch, M.P.; Capparelli, C.; Stein, J.G. et al. Apoptosis during bone-like tissue development in vitro. *J Cell Biochem* **1998**, *68*: 31-49.

- Lyons, K.M., Hogan, B.L., Robertson, E.J. Colocalization of BMP-7 and BMP-2 RNAs suggests that these factors cooperatively mediate tissue interactions during murine development. *Mech Dev* **1995**, *50*: 71-83.
- Macias-Silva, M.; Hoodless, P.A.; Tang, S.J. et al. Specific activation of Smad1 signaling pathways by the BMP7 type I receptor, ALK-2. *J Biol Chem* **1998**, *273*: 25628-25636.
- Mah, N.; Thelin, A.; Lu, T. et al. A comparison of oligonucleotide and cDNA-based microarray systems. *Physiol Genomics* **2004**, *16*: 361-370.
- Makogonenko, E.; Tsurupa, G.; Ingham, K. et al. Interaction of fibrin(ogen) with fibronectin: further characterization and localization of the fibronectin-binding-site. *Biochemistry* **2002**, *41(25)*: 7907-7913.
- Mandelin, J.; Hukkanan, M.; Li, T.F. et al. Human osteoblasts produce cathepsin K. *Bone* **2006**, *38(6)*: 769-777.
- Manolagas, S.C. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev* **2000**, *21*: 115-137.
- Mansukhani, A.; Bellosta, P.; Sahni, M. et al. Signaling by fibroblast growth factor (FGF) and fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2)-activating mutations blocks mineralization and induces apoptosis in osteoblasts. *J Cell Biol* **2000**, *149*: 1297-1308.
- Marie, P.J. Review: Fibroblast growth factor signalling controlling osteoblast differentiation. *Gene* **2003**, *316*: 23-32.
- Martinez, C.E.A.; Binato, R.; Gonzalez, S. et al. Characterization of Smad motif similar to Drosophila Mad in mouse Msx-1 promotor. *Biochem Biophys Res Commun* **2002**, *291*: 655-662.
- Martinez, P.; Moreno, I.; De Minuel, F. et al. Changes in osteocalcin response to 1,25-dihydroxyvitamin D(3) stimulation and basal vitamin D receptor expression in human osteoblastic cells according to donor age and skeletal origin. *Bone* **2001**, *29(1)*: 35-41.
- Massagué, J.; Wotten, D. Transcriptional control by the TGF- $\beta$ /Smad signaling system. *EMBO J* **2000**, *19*: 1745-1754.
- Masuda, H.; Hosokawa, N.; Nagata, K. Expression and localization of collagen-binding stress protein HSP47 in mouse embryo development: comparison with type I and II collagen. *Cell Stress Chaperone* **1998**, *3*: 256-264.
- Matsumoto, A.; Deyama, Y.; Deyama, A. et al. Epidermal growth factor receptor-mediated expression of NF-kappaB transcription factor in osteoblastic MC3T3-E1 cells cultured under a low calcium environment. *Life Sci* **1998**, *62*: 1623-1627.
- Mayer, H.; Bertram, H.; Lindenmaier, W. et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF-A) expression in human mesenchymal stem cells: autocrine and paracrine role on osteoblastic and endothelial differentiation. *J Cell Biochem* **2005**, *95*: 827-839.
- Mayr-Wohlfahrt, U.; Waltenberger, J.; Hausser, H. et al. Vascular Endothelial Growth Factor stimulates chemotactic migration of primary human osteoblasts. *Bone* **2002**, *30(3)*: 472-477.
- Mc Carthy, T.L.; Centrella, M.; Canalis, E. Regulatory effects of insulin-like growth factor I and II on bone collagen synthesis in rat calvarial cultures. *Endocrinology* **1989**, *124*: 301-309.
- McCawley, L.J.; Matrisian, L.M. Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore! *Curr Opin Cell Biol* **2001**, *13*: 534-540.
- Mc Kay, B. Development of the first commercially available recombinant human BMP. In: Vukiceic S., Sampath K.T. Bone Morphogenic Proteins. *Birkhäuser, Basel* **2004**, p.163.
- McKee, M.D.; Nanci, A. Osteopontin at mineralized tissue interfaces in bone, teeth, and osteointegrated implants: Ultrastructural distribution and implications for mineralized tissue formation, turnover, and repair. *Microscopy Research and Technique* **1996**, *33*: 141-164.
- Merzel, F.; Hodoscek, M.; Janezic, D. et al. New force field for calcium binding sites in annexin-membrane complexes. *J Comp Chem* **2006**, *27*: 446-452.
- Meyer, R.A.; Meyer, M.H.; Tenholder, M. et al. Gene expression in older rats with delayed union of femoral fracture. *J Bone Joint Surg [AM]* **2003**, *85A*: 1243-1254.
- Mikosch, T. Blottingverfahren und Hybridisierungen. In: Gassen, H.G.; Schimpf, G. Eds. *Gentechnische Methoden*, 2. Aufl., *Spektrum Akademischer Verlag* **1999**: 243-261.
- Millett, P.J.; Allen Y, M.J.; Rushton Y, N. Synthetic Function and Regulation of Osteoblasts: Current Knowledge and Applications. *MJM* **1995**, *1*: 138-146.
- Mitchell, P.G.; Magna, H.A.; Reeves, L.M. et al. Cloning, expression, and type II collagenolytic activity of matrix metalloproteinase-13 from human osteoarthritic cartilage. *J Clin Invest* **1996**, *97*: 761-768.
- Miyazono, K. Signal transduction by bone Morphogenic protein receptors: functional roles of Smad proteins. *Bone* **1999**, *25(1)*: 91-93.
- Miyazono, K.; Ten Dijke, P.; Heldin, C.H. TGF- $\beta$  signaling by Smad proteins. *Adv Immunol* **2000**, *75*: 115-157.

- Mohiti J.; Caswell A.M.; Walker J.H. Calcium-induced relocation of annexins IV and V in the human osteosarcoma cell line MG-63. *Mol Membr Biol* **1995**, *12*: 321-9.
- Moreno, M.; Munoz, R.; Aroca, F. et al. Biglycan is a new extracellular component of the chordin-BMP4 signaling pathway. *EMBO J* **2005**, *24*: 1397-1405.
- Morris, N.P.; Bächinger, H.P. Type XI collagen is a heterotrimer with a composition (1 $\alpha$ , 2 $\alpha$ , 3 $\alpha$ ) retaining non-triple-helical domains. *J Biol Chem* **1987**, *262*: 11345-11350.
- Moursi, A.M.; Damsky, C.H.; Lull, J. et al. Fibronectin regulates calvarial osteoblast differentiation. *J Cell Sci* **1996**, *109*: 1369-1380.
- Moustakas, A.; Heldin, C.H. From mono- to oligo-Smads: the heart of the matter in TGF $\beta$  signal transduction. *Genes Dev* **2002**, *16*: 867-871.
- Nagata, K. Expression and function of the heat shock protein 47: a collagen-specific molecular chaperone in the endoplasmic reticulum. *Matrix Biol* **1998**, *16*: 379-386.
- Nakagawa, M.; Kaneda, T.; Arakawa, T. et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) directly enhances osteoclastic bone resorption and survival of mature osteoclasts. *FEBS Lett* **2000**, *473* : 161-164.
- Nakamura, T.; Hanada, K.; Tamura, M. et al. Stimulation of endosteal bone formation by systemic injection of recombinant basic fibroblast growth factors in rats. *Endocrinology* **1995**, *136*: 1276-1284.
- Nakase, T.; Miyaji, T.; Tomita, T. et al. Localization of bone morphogenic proein-2 in human osteoarthritic cartilage and osteophyte. *Osteoarthritis Cartilage* **2003**, *11(4)*: 278-284.
- Nakashima, M., Reddi, A.H. The application of bone morphogenic proteins to dental tissue engineering. *Nat Biotechnol* **2003**, *21*: 1025-1032.
- Narbaitz, R.; Stumpf, W.E.; Sar, M. et al. Autoradiographic localization of target cells for 1,25 dihydroxyvitam D<sub>3</sub> in bones from fetal rats. *Calcif Tiss Int*, **1983**, *35*: 175-182.
- Nash, T.J.; Howlett, C.R.; Martin, C. et al. Effect of platelet-derived growth factor on tibial osteotomies in rabbits. *Bone* **1994**, *15*: 203-208.
- Nicosia, R.F. VEGF-related molecules in tumours. *AM J Pathol* **1998**, *153*: 11-15.
- Nishimura, R., Kato, Y., Chen, D. et al. Smad5 and DPC4 are key molecules in mediating BMP-2 induced osteoblastic differentiation of the pluripotent mesenchymal precursor cell line C2C12. *J Biol* **1998**, *273*: 1872-1879.
- Nishiyama, T.; Mc Donough, A.M.; Bruns, R.R. et al. Type XII and XIV Collagens mediate interactions between banded collagen fibers in vitro and may modulate extracellular deformability. *J Biol Chem* **1994**, *269*: 28103-28199.
- Niyibizi, C.; Eyre, D.R. Bone type V collagen: chain composition and location of a trypsin cleavage site. *Connect Tissue Res* **1989**, *20*: 247-250.
- Noda, M.; Vogel, R. Fibroblast growth factor enhances type beta 1 transforming growth factor gene expression in osteoblast-like cells. *J Cell Biol* **1989**, *109*: 2529-2535.
- Noda, M.; Vogel, R.M.; Hasson, D.M. et al. Leukemia inhibitory factor suppresses proliferation, alkaline phosphatase activity, and type I collagen messenger ribonucleid acid levels and enhances osteopontin mRNA level in murine osteoblastlike (MC3T3-E1) cells. *Endocrinology*, **1990**, *127*: 185-190.
- Okazaki, R.; Riggs, B.L.; Conover, C.A. Glucocorticoid regulation of inulin-like growth factor-binding protein expression in normal human osteoblast-like cells. *Endocrinology* **1994**, *134(1)*: 126-132.
- Olofsson, B.; Pajusola, K.; Kaipainen, A. et al. Vascular endothelial growth factor B, a novel growth factor for endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **1996**, *93*: 2576-2581.
- Onishi, T.; Ishidou, Y.; Nagamine, T. et al. Distinct and overlapping patterns of localization of bone morphogenic protein (BMP) family members and a BMP type II receptor during fracture healing in rats. *Bone* **1998**, *22*: 605-612.
- Otto, F.; Thornell, A.P.; Crompton, T. et al. Cfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell* **1997**, *89*: 765-771.
- Owen, T.; Aronow, M.; Shalhoub, V. et al. Progressive development of the rat 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.
- Pacicca, D.M.; Patel, N.; Lee, C. et al. Expression of angiogenic factors during distraction osteogenesis. *Bone* **2003**, *33*: 889-898.
- Pannu, J.; Nakerakanti, S.; Smith, E. et al. TGF- $\beta$  receptor type I dependent fibrogenic gene program is mediated via activation of smad1 and erk1/2 pathways. *J Biol Chem* **2007**, *282(4)*: 10405-13.

- Paredes, R.; Arriagada, G.; Cruzat, F. et al. The Runx2 transcription factor plays a key role in the 1 $\alpha$ ,25-dihydroxy Vitamin D3-dependent upregulation of the rate Osteocalcin (OC) gene expression in osteoblastic cells. *J of Steroid Biochem & Mol Biol* **2004**, 89-90: 269-271.
- Park, J.; Ries, J.; Gelse, K. et al. Bone regeneration in critical size defects by cell-mediated BMP-2 gene transfer: A comparison of adenoviral vectors and liposomes. *Gene Ther* **2003**, 10: 1089-1098.
- Partale, K.; Klein, P.; Schell, H. et al. Poly (D, L-lactide) coating is capable of enhancing osseous integration of Schanz screws in the absence of infection. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* **2005**, 74(1): 608-616.
- Pavalko, F.M.; Norvell, S.M.; Burr, D.B. et al. A Model for mechanotransduction in bone cells: The load bearing mechanosomes. *J. Cell. Biochem.* **2003**, 88: 104-112.
- Peng, H.; Usas, A.; Olshanski, A. et al. VEGF improves, whereas sFlt1 inhibits, BMP-2-induced bone formation and bone healing through modulation of angiogenesis. *J Bone Miner Res* **2005**, 20(11): 2017-2027.
- Pollak, M.N. Insulin-like growth factors and neoplasia. *Novartis Found Symp* **2004**, 262: 84-107.
- Poynton, A.R.; Lane, J.M. Safety profile for the clinical use of bone morphogenetic proteins in the spine. *Spine* **2002**, 27(Suppl 1): 40.
- Price, P.A.; Parthemore, J.G.; Deftos, L.J. New biochemical marker for bone metabolism *Clin Invest* **1980**, 66: 878-883.
- Pufe, T.; Wildemann, B.; Petersen, W. et al. Quantitative measurement of splice variants 120 and 164 of the angiogenic peptide vascular endothelial growth factor in the time flow of fracture healing: a study in the rat. *Cell Tissue Res* **2002**, 309: 387-392.
- Quackenbush, J. Microarray data normalization and transformation. *Nat Genet* **2002**, 32, Suppl: 496-501.
- Quarles, L.D. Extracellular calcium-sensing receptors in the parathyroid gland, kidney, and other tissue. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **2003**, 12(4):349-355.
- Qi, H.; Aguiar, D.J., Williams, S.M. et al. Identification of genes responsible for osteoblast differentiation from human mesodermal progenitor cells. *PNAS* **2003**, 100(6): 3305-3310.
- Raschke, M.; Wildemann, B.; Inden, P. et al. Insulin-Like Growth Factor-1 and Transforming Growth Factor-Beta 1 Accelerates Osteotomy Healing Using Polylactide-Coated Implants as a Delivery System: a Biomechanical and Histological Study in Minipigs. *Bone* **2002**, 30, 144-151.
- Reddi, A.H. Cell biology and biochemistry of endochondral bone development. *Collagen Rel Res*, **1981**, 1: 209-226.
- Reddi, A.H. Role of morphogenetic proteins in skeletal tissue engineering and regeneration. *Nat Biotechnol* **1998**, 16: 247-252.
- Reddi, A.H. Bone morphogenetic proteins: from basic science to clinical applications. *J Bone Joint Surg Am* **2001**, Suppl1: S1-S6.
- Reinholt, F.P.; Hultenby, K.; Oldberg, C. et al. Osteopontin – a possible anchor of osteoblasts to bone. *Proc Natl Acad Sci USA* **1990**, 87: 4473-4475.
- Rice, D.P.; Aberg, T.; Chan, Y. et al. Integration of FGF and TWIST in calvarial bone and suture development. *Development* **2000**, 127: 1845-1855.
- Rifas, L. Bone and cytokines: beyond IL-1, IL-6 and TNF-alpha (review). *Calcif Tissue Int* **1999**, 64: 1-7.
- Rifas, L.; Cheng, S.L. IL-13 regulates vascular cell adhesion molecule-1 expression in human osteoblasts. *J Cell Biochem* **2003**, 89: 213-219.
- Roach, H.I. Why does bone matrix contain non-collagenous proteins? The possible roles of osteocalcin, osteonectin, osteopontin and bone sialoprotein in bone mineralization and resorption. *Cell Biol Int*, **1994**, 18: 617-628.
- Robey, P.G.; Fedarko, N.S.; Hefferan, T.E. et al. Structure and molecular regulation of bone matrix proteins. *Miner Res Suppl* **1993**, 2: S483-487.
- Robison, R. Antigenic relationship of Bact. Typhosum: I. Agglutination. *J Biochem* **1923**, 17: 286-293.
- Rojas, E.; Pollard, H.B.; Haigler, H.T. et al. Calcium-activated endonexin II forms calcium channels across acidic phospholipid bilayer membranes. *J Biol Chem* **1990**, 265: 21207-21215.
- Romberg, R.W.; Werness, P.G.; Riggs, B.L. et al. Inhibition of hydroxyapatite crystal growth by bone-specific and other calcium-binding proteins. *Biochemistry* **1986**, 25: 1176-1180.
- Rosenzweig, B.L.; Imamura, T.; Okadome, T. et al. Cloning and characterization of a human type II receptor for bone morphogenetic proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **1995**, 92: 7632-7636.
- Rundle, C.H.; Miyakoshi, N.; Ramirez, E. et al. Expression of the fibroblast growth factor receptor genes in fracture repair. *Clin Orthop* **2002**, 403: 253-263.
- Ruoslahti, E.; Pierschbacher, M.D. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science* **1987**, 238: 491-497.

- Ruoslahti, E.; Yamaguchi, Y. Proteoglycans as modulators of growth factor activities. *Cell* **1991**, *64*: 867-869.
- Saito, T.; Albelda, S.; Brighton, C. Identification of Integrin receptors on cultured human bone cells. *J Orthop Res* **1994**, *12*: 384-394.
- Sampath, T.K.; Maliakal, J.C.; Hauschka, P.V. et al. Recombinant human osteogenic protein-1 (hOP-1) induces new bone formation in vivo with a specific activity comparable with natural bovine osteogenic protein and stimulates osteoblast proliferation and differentiation in vitro. *J Biol Chem* **1992**, *267*: 20352-20362.
- Sarras, M.P. BMP-1 and the astacin family of metalloproteinases: a potential link between the extracellular matrix, growth factors and pattern formation. *Bioassay* **1996**, *18*: 439-442.
- Sasaki, H.; Sato, T.; Yamauchi, N. et al. Induction of heat shock protein 47 synthesis by TGF- $\beta$  and IL-1 $\beta$  via enhancement of heat shock element binding activity of heat shock transcription factor 1. *J Immunology* **2002**, *168*: 5178-5183.
- Satokata, I.; Ma, L.; Ohshima, H. et al. Msx2 deficiency in mice causes pleiotropic defects in bone growth and ectodermal organ formation. *Nat Genet* **2000**, *24*: 391-395.
- Satokata, I.; Maas, R. Msx1 deficient mice exhibit cleft plate and abnormalities of craniofacial and tooth development. *Nat Genet* **1994**, *6*: 348-356.
- Scheven, B.A.A.; Visser, J.W.M.; Nijweide, P.J. In vitro osteoclast generation from different bone marrow fractions, including a highly enriched haematopoietic stem cell population. *Nature*, **1986**, *321*: 79-81.
- Schlaeppli, J.M.; Gutzwiller, S.; Finkenzeller, G. et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 induces the expression of vascular endothelial growth factor in osteoblastic cells. *Endocrin Res* **1997**, *23*: 213-229.
- Schmid, T.M.; Linsenmayer, T.F. Immunohistochemical localization of short chain cartilage collagen (type X) in avian tissues. *J Cell Biol* **1985**, *100*: 593.
- Schmidmaier, G.; Wildemann, B.; Bail, H. et al. Local Application of Growth Factors (Insulin-Like Growth Factor-I and Transforming Growth factor-Beta 1) From a Biodegradable Poly (D, L-Lactide) Coating of Osteosynthetic Implants Accelerates Fractur Healing in rats. *Bone* **2001a**, *28*, 341-350.
- Schmidmaier, G.; Wildemann, B.; Bail, H. et al. Local liberation of IGF-I and TGF-beta 1 from a biodegradable Poly (D, L-lactide) coating of implants accelerates fracture healing. *Chirurg*. **2000**, *71(9)*:1016-22.
- Schmidmaier, G.; Wildemann, B.; Cromme, F. et al. BMP-2 Coating of Titanium Implants Increases Biomechanical Strength and Accelerates bone Remodleing in fracture treatment: A Biomechanical and Histological Study in Rats. *Bone* **2002a**, *6*, 618-622.
- Schmidmaier, G.; Wildemann, B.; Heeger, J. et al. Improvement of fracture healing by systemic administration of growth hormone and local application of insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor-beta1. *Bone*. **2002b**, *31(1)*:165-72.
- Schmidmaier, G.; Wildemann, B.; Lübberstedt, M. et al. IGF-I and TGF-beta 1 incorporated in a Poly (D, L-Lactide) implant coating stimulates osteoblast differentiation and collagen-1 production but reduces osteoblast proliferation in cell culture. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* **2003**, *65(1)*: 157-162.
- Schmidmaier, G.; Wildemann, B.; Stemberger, A. et al. Biodegradable Poly (D, L-Lactide) Coating of Implants for Continuous Release of Growth Factors. *J Biomed Mater Res* **2001b**, *58(4)*, 449-455.
- Schmidmaier, G.; Raschke, M.; Stemberger, A. et al. Poly (D, L-Lactide) Coating of Steel and Titanium Implants for Continuous Release of Locally Active Growth Factors (IGF-I and TGF-Beta1). *Trans. Orthop Res Soc*, **1999**, *45*, 501.
- Schmidt, G.; Hausser, H.; Kresse, H. Interaction of the small proteoglycan decorin with fibronectin. Involvement of sequence NKISK of the core protein. *Biochem J* **1991**, *280*: 411-414.
- Schönherr, E.; Hausser, H.; Beavan, L. et al. Decorin – Typ I Collagen Interaction. *J Biol Chem* **1995**, *270*: 8877-8883.
- Schönherr, E.; Witsch-Prehm, P.; Harrach, B. et al. Interaction of biglycan with type I collagen *J BiolChem* **1994**, *270*: 2776-2783.
- Scott, I.C.; Imamura, Y.; Pappano, W.N. et al. Bone Morphogenic Protein-1 processes Probiglycan. *J of Biol Chemistry* **2000**, *275(39)*: 30504-30511.
- Sekiya, I.; Larson, B.L.; Vuoristo, J.T. Comparison of effect of BMP-2, -4, and -6 on in vitro cartilage formation of human adult stem cells from bone marrow stroma. *Cell Tissue Res* **2005**, *320*: 269-276.
- Shah, A.K.; Lazatin, J.; Sinha, R.K. et al. Mechanism of BMP-2 stimulated adhesion of osteoblastic cells to titanium alloy. *Biology of the Cell* **1999**, *91*: 131-142.
- Shi, S.; Robey, P.G.; Gronthos, S. Comparison fo human dental pulp and bone marrow stromal stem cells by cDNA Microarray analysis. *Bone* **2001**, *29(6)*: 532-539.
- Shupnik, M.A.; Ip, N.Y.-Y.; Tashjian, A.H.Jr. Characterization and regulation of receptors for epidermal growth factor in mouse calvaria. *Endocrinology* **1980**, *107*: 1738-1746.

- Siggelkow, H.; Rebensdorff, K.; Niedhart, C. et al. Development of the osteoblast phenotype in primary human osteoblasts in culture: Comparison with rat calvarial cells in osteoblast differentiation. *J Cell Biochem* **1999**, *75*: 22-35.
- Silver, M.H.; Foidart, J.M.; Pratt, R.M. Distribution of fibronectin and collagen during limb and palate development. *Differentiation* **1981**, *18*: 141.
- Simmons, H.A.; Raisz, L.G. Effects of acid and basic fibroblast growth factor and heparin on resorption of cultured fetal rat long bones. *J Bone Miner Res* **1991**, *6*: 1301-1305.
- Singhatanadgit, W.; Salih, V.; Olsen, I. Bone Morphogenetic protein receptors and bone Morphogenetic proteins signalling are controlled by tumor necrosis factor- $\alpha$  in human bone cells. *Int J Biochem and Cell Biol* **2006**, *38(10)*: 1794-1807.
- Sinha, R.K.; Tuan, R.S. Regulation of human osteoblast integrin expression by orthopedic implant materials. *Bone* **1996**, *18*: 451-457.
- Smyth, G.K.; Speed, T. Normalization of cDNA microarray data. *Methods* **2003**, *31*: 265-273.
- Sodek, J.; Zhu, B.; Huynh, M.H. et al. Novel functions of matricellular proteins Osteopontin and Osteonectin/SPARC. *Connect Tiss Res* **2002**, *43(2-3)*:308-319.
- Soderstrom, M.; Salminen, H.; Glumoff, V. et al. Cathepsin expression during skeletal development. *Biochem Biophys Acta* **1999**, *1446*: 35-46.
- Solloway, M.J., Dudley, A.T., Bikoff, E.K. et al. Mice lacking BMP6 function. *Dev Genet* **1998**, *22*:321-339.
- Spanakis, E. Problems related to the interpretation of autoradiographic data on gene expression using common constitutive transcripts as controls. *Nucleic Acids Res* **1993**, *21*: 3809-3819.
- Spinella-Jaegle, S.; Roman-Roman, S.; Faucheu, C. et al. Opposite effects of bone Morphogenetic protein-2 and transforming growth factor-beta1 on Osteoblast differentiation. *Bone* **2001**, *29(4)*: 323-330.
- Stamenkovic, I. Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *Semin Cancer Biol* **2000**, *10*: 415-433.
- Street, J.; Bao, M.; de Guzman, L. et al. Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proc Natl Acad Sci USA* **2002**, *99*: 9656-9661.
- Sykes, B.; Puddle, B.; Francis, M. et al. The estimation of two collagens from human dermis by interrupted gel electrophoresis. *Biochem Biophys Res Commun* **1976**, *72*: 1472-1480.
- Taichmann, R.S.; Hauschka, P.V. Effects of interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha on osteoblastic expression of osteocalcin and mineralized extracellular matrix in vitro. *Inflammation* **1992**, *16*: 587-601.
- Takahashi, N.; Akatsu, T.; Udagawa, N. et al. Osteoblastic cells are involved in osteoclast formation. *Endocrinology* **1988**, *123*: 2600-2602.
- Takahashi, N.; Udagawa, N.; Akatsu, T. et al. Role of colony-stimulating factors in osteoclast development. *J Bone Min Res*, **1991**, *6*: 977-985.
- Takagi, M.; Yamada, T.; Kamiya, N. et al. Effects of bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor- $\beta$ 1 on gene expression of decorin and biglycan by cultured osteoblastic cells. *Histochem J* **1999**, *31*: 403-409.
- Takao, M.; Hino, J.; Takeshita, N. et al. Identification of rat Bone Morphogenetic Protein-3b (BMP-3b), a new member of BMP-3. *Biochem & Biophys Res Comm* **1996**, *219*: 656-662.
- Takeyama, S.; Yoshimura, Y.; Shirai, Y. et al. Low calcium environment effects osteoprotegerin ligand / osteoclast differentiation factor. *Biochem Biophys Res Commun* **2000**, *276*: 524-529.
- Takuwa, Y.; Ohse, C.; Wang, E.A. et al. Bone morphogenetic protein-2 stimulates alkaline phosphatase activity and collagen synthesis in cultured osteoblastic cells, MC3T3-E1. *Biochem Biophys Res Commun* **1991**, *174(1)*: 96-101.
- Tan, P.K.; Downey, T.J.; Spitznagel, E.L.Jr et al. Evaluation of gene expression measurements from commercial microarray platforms. *Nucleic Acid Res* **2003**, *31*: 5676-5684.
- Tanaka, T.S.; Jaradat, S.A.; Lim, M.K. et al. Genome-wide expression profiling of mid-gestation placenta and embryo using a 15,000 mouse development cDNA microarray. *Proc Natl Acad Sci USA* **2000**, *97*: 9127-9132.
- Tanaka, Y.; Morimoto, I.; Nakano, Y. et al. Osteoblasts are regulated by the cellular adhesion through ICAM-1 and VCAM-1. *J Miner Res* **1995**, *10(10)*: 1462-1469.
- Tandon, N.; Kralisz, U.; Jamison, G. Identification of glycoprotein IV (CD36) as a primary receptor for platelet-collagen adhesion. *J Biol Chem* **1989**, *264*: 7576-7583.
- Tang, C.H.; Yang, R.S.; Liou, H.C. et al. Enhancement of fibronectin synthesis and fibrillogenesis by BMP-4 in cultured rat osteoblast. *J Bone Miner Res* **2003**, *18(3)*: 502-511.

- Tashjian, A.H.; Levine, L. Epidermal Growth Factor stimulates prostaglandin production and bone resorption in culture mouse calvaria. *Biochem Biophys Res Commun* **1978**, *85*: 966-975.
- Teitelbaum, S.L. Bone Resorption by osteoclasts. *Science* **2000**, *289*: 1504-8.
- Ten Dijke, P.; Yamashita, H.; Sampath, T.K. et al. Identification of type I receptors for osteogenic protein-1 and bone morphogenic protein-4. *J Biol Chem* **1994a**, *269*: 16986-16988.
- Ten Dijke, P.; Korchynskiy, O.; Valdimarsdottir, G. et al. Controlling cell fate by bone morphogenic protein receptors. *Mol Cell. Endocrinol.* **2003**, *211*, 105-113.
- Ten Dijke, P.; Yamashita, H.; Ichijo, H.; Franzen, P. et al. Characterization of type I receptors for transforming growth factor- $\beta$  and activin. *Science* **1994b**, *264*: 101-104.
- Thellin, O.; Zorzi, W.; Lakye, B. et al. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J Biotechnol* **1999**, *75*: 291-295.
- Towler, D.A.; Rutledge, S.J.; Rodan, G.A. Msx-2 / Hox 8.1: A transcriptional regulator of rat osteocalcin promoter. *Mol Endocrinol* **1994**, *8*: 1484-1493.
- Turksen, K.; Aubin, J.E. Positive and negative immunoselection of two classes of osteoprogenitor cells. *J Cell Biol* **1991**, *114*: 373-384.
- Uemura, T.; Liu, Y.K.; Kuboki, Y. Preliminary communication. mRNA expression of MT1-MMP, MMP-9, cathepsin K, and TRAP in highly enriched osteoclasts cultured on several matrix proteins and ivory surfaces. *Biosci Biotechnol Biochem* **2000**, *64*: 1771-1773.
- Ungefroren, H.; Krull, N.B. Transcriptional regulation of the human Biglycan gene. *J Biol Chem* **1996**, *271*: 15787-15796.
- Urist, M.R. Bone: Formation by autoinduction. *Science*, **1965**, *150*: 893-899.
- Urist, M.R.; Delange, R.J.; Finerman, G.A.M. Bone cell differentiation and growth factors. *Science*, **1983**, *220*: 680-686.
- Urist, M.R.; Mikulski, A.; Lietze, A. Solubilized and in solubilized bone morphogenic protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1979**, *76*: 1828-1832.
- Uusitalo, H.; Hiltunen, A.; Söderstrom, M. et al. Expression of Cahepsin B, H, K, L, and S and Matrix Metalloproteinases 9 and 13 during chondrocyte hypertrophy and endochondral ossification in mouse fracture callus. *Calcif Tissue Int* **2000**, *67*: 382-390.
- Vaes, B.L.; Dechering, K.J.; Feijen, A. et al. Comprehensive Microarray analysis of bone Morphogenic protein 2 – induced Osteoblast differentiation resulting in the identification of novel markers for bone development. *J Bone Miner Res* **2002**, *17*: 2106-2118.
- Valentin-Opran, A.; Wozney, J. ; Csimma, C. et al. Clinical evaluation of recombinant human bone morphogenic protein-2. *Clin Orthop* **2002**, *395*: 110-120.
- Van der Rest, M.; Garrone, R. Collagen family of proteins. *FASEB J* **1991**, *5*: 2814-2823.
- Vandesompele, J.; De Preter, K.; Pattyn, F. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by genomic averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* **2002**, *3*(7): Research 0034.I-0034.I I.
- Varghese, S.; Rydziel, S.; Canalis, E. Basic fibroblast growth factor stimulates collagenase-3 promoter activity in osteoblasts through an activator protein-1-binding site. *Endocrinology* **2000**, *141*(6): 2185-2191.
- Varghese, S.; Rydziel, S.; Canalis, E. Bone morphogenic protein-2 suppresses collagenase-3 promoter activity in osteoblasts through a runt domain factor 2 binding site. *J Cell Physiol* **2005**, *202*: 391-399.
- Viereck, V.; Siggelkow, H.; Tauber, S. et al. Differential regulation of Cbfa1/Runx2 and Osteocalcin gene expression by Vitamin-D3, Dexamethasone, and local growth factors in primary human osteoblasts. *J Cell Biochem* **2002**, *86*: 348-356.
- Vogel, K.G.; Paulsson, M.; Heinegrad, D. Specific inhibition of type I and type II Collagen fibrillogenesis by the small proteoglycan of tendon. *Biochem J* **1984**, *223*: 587-597.
- Von der Mark, K.; Mollenhauer, J. Annexin V interactions with collagen. *Cell Mol Life Sci.* **1997**, *53*:539-45.
- Von der Mark, H.; Von der Mark, K.; Gay, S. Study of differential collagen synthesis during development of the chick embryo by immunofluorescence: I.Preparatin of collagen Type I and Type II specific antibodies and their application to early stages of the chick embryo. *Dev Biol* **1976**, *48*: 237.
- Von der Mark, K.; Von der Mark, H. The role of three genetically distinct collagen types in endochondral ossification and calcification of cartilage. *J Bone Joint Surg* **1977**, *59B* : 458.
- Vuorio, E. Connective tissue diseases: Mutations of collagen genes. *Ann Clin Res* **1986**, *18*: 234-241.
- Wallach, S.; Avioli, L.V.; Feinblatt, J.D. Cytokines and bone metabolism. *Calcif Tiss Int*, **1993**, *53*: 293-296.

- Waltenberger, J.; Claesson-Welsh, L.; Siegbahn, A. et al. Different signal transduction properties of KDR and Flt-1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* **1994**, *269*: 26988-26995.
- Wang, L.C.; Takahashi, I.; Sasano, Y. et al. Osteoclastogenic activity during mandibular distraction osteogenesis. *J Dent Res* **2005**, *84(11)*: 1010-1015.
- Warner, L.R.; Blasick, C.M.; Brown, R.J. et al. Expression, purification, and refolding of recombinant collagen alpha1 (XI) amino terminal domain splice variants. *Protein Expr Purif* **2007**, *52*: 403-409.
- Watt, S.L.; Lundstrum, H.G.P.; Mc Donough, A.M. et al. Characterization of collagen type XII and XIV from fetal bovine cartilage. *J Biol Chem* **1991**, *267*: 20093-20099.
- Watts, N.B. Clinical utility of biochemical markers of bone remodelling. *Clin Chem* **1999**, *45:8(B)*:1359-1368.
- Wiberg, C.; Heinegard, D.; Wenglen, C. et al. Biglycan organizes collagen VI into hexagonal-like networks resembling tissue structures. *J Biol Chem* **2002**, *277*: 49120-49126.
- Wieser, R.; Wrana, J.L.; Massagué, J. Constitutive activation of the TGF $\beta$  type I receptor reveals its downstream function in the receptor complex. *EMBO J* **1995**, *14*: 2199-2208.
- Wildemann, B.; Sander, A.; Schwabe, P. et al. Short term in vivo biocompatibility testing of biodegradable Poly(D, L-lactide)-growth factor coating for orthopedic implants. *Biomaterials* **2005**, *26(18)*: 4035-4040.
- Winnard, R.G.; Gerstenfeld, L.C.; Toma, C.D. et al. Fibronectin gene expression, synthesis and accumulation during in vitro differentiation of chicken osteoblasts. *J Bone Miner Res* **1995**, *10*: 1969-1977.
- Wozney, J.M. Bone morphogenic proteins and their gene expression. In: Noda M. Ed. Cellular and Molecular Biology of Bone. Inc. San Diego, Ca: Academic Press **1993**: 131-167.
- Wozney, J.M.; Rosen, V.; Celeste, A.J. et al. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science*, **1988**, *242*: 1528-1534.
- Wrana, J.L.; Attisano, L.; Wieser, R. et al. Mechanism of activation of the TGF- $\beta$  receptor. *Nature* **1994**, *370*: 341-347.
- Wrana, J.L. Regulation of Smad activity. *Cell* **2000**, *100*: 189-192.
- Yamaguchi, A.; Katagiri, T.; Ikeda, T. et al. Recombinant human bone morphogenic protein-2 stimulates osteoblastic maturation and inhibits myogenic differentiation in vitro. *J Cell Biol*, **1991**, *113*: 681-687.
- Yamaguchi, A.; Komori, T.; Suda, T. Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenic proteins, hedgehogs, and Cbfa1. *Endocr Rev* **2000**, *21(4)*: 393-411.
- Yamaguchi, Y.; Mann, D.M.; Ruoslahti, E. Negative regulation of transforming growth factor- $\beta$ 1 by the proteoglycan decorin. *Nature* **1990**, *346*: 281-284.
- Yang, R.S.; Tang, C.H.; Ling, Q.D. et al. Regulation of Fibronectin fibrillogenesis by protein kinases in cultured rat osteoblasts. *Mol Pharmacol* **2002**, *61*: 1163-1173.
- Yasko, A.W.; Lane, J.M.; Fellingner, E.J. et al. The healing of segmental bone defects, induced by recombinant human bone morphogenic protein-2 (rhBMP-2). A radiographic, histological, and biomechanical study in rats. *J Bone Joint Surg Am* **1992**; *74*: 659-70.
- Yoneda, T. Local regulation of bone: epidermal growth factor-transforming growth factor  $\alpha$ . In: Bilezikian, J.P.; Raisz, L.G.; Rodan, G.A. (eds.) Principles of bone biology. Academic Press, New York **1996**, pp 729-738.
- Yoshida, C.A.; Furuichi, T.; Fujita, T. et al. Core-binding factor  $\beta$  interacts with runx2 and is required for skeletal development. *Nature Genet.* **2002**, *32*: 633-638.
- Young, M.F.; Kerr, J.M.; Ibaraki, K. et al. Structure, expression, and regulation of the major noncollagenous matrix proteins of bone. *Clin Orthop* **1992**, *281*: 275-294.
- Yousfi, M.; Lasmoles, F.; Kern, B. et al. TWIST inactivation reduces Cbfa1/Runx2 expression and DNA binding to the osteocalcin promoter in osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* **2002**, *297*: 641-644.
- Yousfi, M.; Lasmoles, F.; Lomori, A. et al. Increased bone formation and decreased osteocalcin expression induced by reduced Twist dosage in Saethre-Chotzen syndrome. *J Clin Invest* **2001**, *107*: 1153-1161.
- Zellin, G.; Linde, A. Effects of recombinant human fibroblast growth factor-2 on osteogenic cell populations during orthopedic osteogenesis in vivo. *Bone* **2000**, *26*: 161-168.
- Zhang, A.; Chen, J.; Jin, D. Platelet-derived growth factor (PDGF)-BB stimulates osteoblastic bone resorption directly: The role of receptor beta. *Biochem Biophys Res Commun* **1998**, *251*: 190-194.
- Zhang, Y.; Feng, X.-H.; Wu, R.-Y. et al. Receptor-associated Mad homologues synergize as effectors of the TGF- $\beta$  response. *Nature* **1996**, *383*: 832-836.

- Zhao, G.Q.; Chen, Y.X.; Liu, X.M. et al. Mutation in Bmp7 Exacerbates the Phenotype of Bmp8a mutants in Spermatogenesis and Epididymis. *Developmental Biology* **2001**, *240*: 212-222.
- Zhao, R.; Lawler, A.M.; Lee, S.J. Characterization of GDF-10 expression patterns and Null Mice. *Develop Biol* **1999**, *212*: 68-79.
- Zheng, M.H.; Nicholson, G.C.; Warton, A. et al. What's new in osteoclast oncogeny? *Path Res Pract*, **1991**, *181*: 117-125.
- Zheng, M.H.; Wood, D.J.; Papdimitriou, J.M. What's new in the role of the cytokines on osteoblast proliferation and differentiation? *Patho Res Pract*, **1992**, *188*: 1104-1121.
- Zhou, H.Y.; Takita, H.; Fujisawa, R. et al. Stimulation by bone sialoprotein of calcification in Osteoblast-like MC3T3-E1-cells. *Calcif Tissue Int* **1995**, *56*: 403-407.
- Zoricic, S.; Maric, I.; Bobinac, D. et al. Expression of bone morphogenic proteins and cartilage-derived morphogenic proteins during osteophyte formation in humans. *J Anat* **2003**, *202*: 269-277.

## **Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

## Danksagung

Als erstes möchte ich Prof. Dr. med. Haas, Direktor des Centrums für Muskuloskeletale Chirurgie, danken, dass ich die Möglichkeit erhielt, meine Promotionsarbeit im Forschungslabor durchzuführen. Besonders bedanke ich mich bei meinen Betreuern PD Dr. rer. nat. Britt Wildemann und PD Dr. med. Gerhard Schmidmaier, die immer ein offenes Ohr für mich hatten, mich in jeder Phase meiner Promotionsarbeit unterstützten und zu denen ich anerkennend für ihren Einsatz in der Forschung aufschaue. Ein weiterer Dank gilt Dipl. Ing. Marc Lübberstedt, der mir vor allem in der schweren Anfangszeit bei den Experimenten bei stand. Dr. med. Richard Stange, Dr. Ing. Grit Kasper, Dr. Philip Schwabe und Dipl. Ing. Anke Kadow-Romacker danke ich, weil sie mir von ihren Erfahrungen berichteten und weil ich durch sie viel im Bereich der Frakturforschung und Biotechnologie dazu lernte. Außerdem möchte ich meinen Eltern und meinem Freund Olaf Reich danken, ohne die ich wohl nie so weit gekommen wäre, wenn ich nicht so viel Verständnis, Geduld und Aufmerksamkeit erhalten hätte.

**Erklärung**

„Ich, Nadine Gubatz, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „PDLLA-BMP-2-beschichtete Titan-Kirschner-Drähte stimulieren die Genexpression humaner Primärosteoblasten *in vitro*“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum: 01.10.2007

Unterschrift