

**Aus dem CharitéCentrum 03
für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
Ehemals Abteilung für Parodontologie und Synoptische Zahnmedizin
(Prof. emeritus Dr. Dr. Jean-Pierre Bernimoulin)**

**Abteilung für Zahnerhaltung und Parodontologie
Direktor: Prof. Dr. med. dent. Andrej M. Kielbassa**

Habilitationsschrift

Bedeutung der extrazellulären Kollagenmodifikationen für die Osteoblastendifferenzierung und Entstehung von Knochengewebe

zur Erlangung der Lehrbefähigung für
das Fach Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

**Dr. med. dent. Nicole Pischon
geboren am 15.12.1970 in Berlin**

Eingereicht: Januar/2009

Datum der Habilitation: 25. Januar 2010

Dekanin: Frau Prof. Dr. med. A. Grütters-Kieslich

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. A. Sculean

2. Gutachter: Herr Prof. Dr. Dr. Ch. Kasperk

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
2. Wissenschaftlicher Hintergrund	3
2.1. Posttranslationale extrazelluläre Kollagenbiosynthese.....	3
2.1.1. Prokollagen C-Proteinasen	4
2.1.2. Kollagene Quervernetzung durch die Lysyloxidase	5
2.1.2.1. Weitere Funktionen der Lysyloxidase.....	8
2.1.2.2. Konsequenzen einer gestörten Lysyloxidase-Aktivität für das Knochengewebe	10
3. Fragestellungen der vorgestellten Arbeiten.....	11
4. Vorstellung der Originalarbeiten	12
5. Diskussion.....	18
5.1. Expression und Regulation der extrazellulären kollagenmodifizierenden Enzyme im Verlauf der Osteoblastendifferenzierung	18
5.2. Expression und Bedeutung von Lysyloxidase-Spaltprodukten in der Osteoblastendifferenzierung	21
5.3. Konsequenzen einer Inhibition der extrazellulären Kollagenmodifikation für die osteoblastäre Matrixakkumulation	22
5.4. Rolle des inflammatorischen Zytokins Tumor necrosis factor-alpha in der Regulation der extrazellulären Kollagenmodifikation	22
6. Schlussfolgerung und Ausblick	24
7. Zusammenfassung	25
8. Literaturverzeichnis	27
9. Danksagung	37

Abkürzungsverzeichnis

β -APN	beta-Aminopropionitril
BMP-1	Bone Morphogenic Protein-1
BSP	Bone Sialoprotein
COL1A1	Kollagen Typ I, alpha 1
deH-DHLNL	dehydro-Dihydroxylysinonorleucin
deH-HLNL	dehydro-Hydroxylysinonorleucin
deH-HHMD	dehydro-Histidinohydroxymerodesmosin
Dpd	Deoxypyridinolin
HHL	Histidinhydroxylysinonorleucin
LOX	Lsyloxidase
LOPP	Lsyloxidase Propeptid
LOXL	Lsyloxidase-like
NaBH ₄	Natriumborhydrid
mTLD	mammalian Tolloid
mTLL	mammalian Tolloid-like
PCP	Prokollagen C-Proteinasen
PCPE	Prokollagen C-Proteinase Enhancer
PNP	Prokollagen N-Proteinase
Pyr	Pyridinolin
rrg	ras recision gene
TGF- β	Transforming Growth Factor-beta
TNF- α	Tumor Necrosis Factor-alpha

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Enzyme der posttranslationalen, extrazellulären Modifikation des Prokollagens.....	4
Abbildung 2: Synthese und Spaltungsprozesse der Lysyloxidase	5
Abbildung 3: Lysyloxidase katalysiert oxidative Deaminierungen von Lysinresten.	6
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Entstehung nicht reduzierbarer, reifer kollagener Quervernetzungen im Knochengewebe.	7
Abbildung 5: Phasen der Osteoblastendifferenzierung.	19

1. Einleitung

Das Parodont ist eine komplexe Einheit aus Zahnwurzelzement, Desmodont, Gingiva und Alveolarknochen. Die durch Osteoblasten geförderte extrazelluläre Matrixakkumulation sowie die anschließende Matrixmineralisation sind wesentliche Voraussetzungen für die Entstehung, das Remodeling und die Regeneration des alveolären Knochengewebes, das ein grundlegender Bestandteil des parodontalen Zahnhalteapparates ist. Das Knochengewebe unterliegt hohen mechanischen Beanspruchungen und funktionellen Anpassungen an Zug- und Druckbelastungen sowie an metabolische und inflammatorische Reize. Fibrilläres Kollagen Typ I ist der Hauptbestandteil der extrazellulären Knochenmatrix. Die Bildung kollagener Quervernetzungen verschafft dem Knochen die nötigen biomechanischen Eigenschaften, wie Steifigkeit, Zugkräftigkeit und Viskoelastizität (Khoshla und Kleerekoper, 2003; Puxkandl *et al.*, 2002; Wassen *et al.*, 2000; Yamauchi, 1996). Verringerte Mengen an kollagenen Quervernetzungen korrelieren mit einer reduzierten Mineraldichte und einer verminderten mechanischen Belastbarkeit (Knott und Bailey, 1998; Oxlund *et al.*, 1995).

Die Kollagenbiosynthese beruht auf komplexen intrazellulären und extrazellulären Modifikationen des Kollagenmoleküls. Insbesondere extrazelluläre Kollagenmodifikationen scheinen für die Akkumulation einer unlöslichen, quervernetzten kollagenen Matrix entscheidend zu sein (Kagan, 1986a; Kagan und Trackman, 1991). Extrazellulär erfolgt die Abspaltung der N- und C-terminalen Propeptide vom Prokollagen durch die Prokollagen C-Proteinasen (PCP), Bone Morphogenic Protein-1 (BMP-1) und mammalian Tolloid (mTLD), und die Prokollagen N-Proteinase sowie die kollagene Quervernetzung der Tropokollagenmoleküle durch die Lysyloxidase (LOX) (Kessler *et al.*, 2001; Trackman *et al.*, 1992). Es wird angenommen, dass die Art und die Verteilung der kollagenen Quervernetzungen eine Voraussetzung für den Mineralisationsprozess der extrazellulären Matrix ist (Knott und Bailey, 1998). Die genauen Mechanismen der Interaktion zwischen kollagener Matrix und Zelldifferenzierung sowie der Entstehung von funktionellem Knochengewebe sind jedoch unklar.

Die vorliegende Habilitationsschrift fasst Originalarbeiten zusammen, die untersuchen, inwieweit die Enzyme der extrazellulären Kollagenbiosynthese im Verlauf der Differenzierung von Osteoblasten reguliert sind. Dabei war die Expression der Enzyme sowie die zelluläre Lokalisation in Osteoblasten von besonderem Interesse. Des Weiteren wurde die intrazelluläre Lokalisation des LOX-Spaltproduktes sowie der Einfluss des rekombinanten LOPP auf zelluläre Funktionen untersucht. Daneben wurde mittels spezifischer Inhibitoren

die Rolle der Enzyme in der Kontrolle der kollagenen Matrixakkumulation analysiert. Die Originalarbeiten untersuchen schließlich den Einfluss von Tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), das in hohen Konzentrationen bei entzündlichen Erkrankungen des Parodonts freigesetzt wird, auf die Regulation der extrazellulären kollagenmodifizierenden Enzyme und die osteoblastäre Matrixentstehung.

Die Kenntnis der Regulation der posttranslationalen extrazellulären Kollagenbiosynthese und dessen Relevanz für die Osteoblastendifferenzierung und die Osteogenese ist nicht nur aus grundlagenwissenschaftlicher Sicht wesentlich, sondern kann möglicherweise bei entzündlichen Erkrankungen des Knochengewebes wie der Parodontitis in Zukunft von diagnostischer und therapeutischer Bedeutung sein.

Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich um eine kumulative Habilitationsschrift. Zunächst wird ein Überblick über den wissenschaftlichen Hintergrund gegeben. Anschließend erfolgt die Formulierung der Fragestellungen sowie die Vorstellung der relevanten Originalarbeiten. In der Diskussion werden die Ergebnisse im gemeinsamen wissenschaftlichen Kontext erörtert, Schlussfolgerungen gezogen und ein Ausblick auf weiterführende Forschungsansätze gegeben. Schließlich wird eine Zusammenfassung der Arbeiten präsentiert.

2. Wissenschaftlicher Hintergrund

2.1. Posttranslationale extrazelluläre Kollagenbiosynthese

Kollagene sind strukturell grundlegende Bestandteile der extrazellulären Matrix, die zu einer Familie bestehend aus mindestens 39 Proteinen gehören (Kielty und Grant, 2002). Dabei ist fibrilläres Kollagen und dabei insbesondere Kollagen Typ I mit über 90 % Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix des Knochengewebes. Die Kollagenbiosynthese fibrillärer Kollagene erfordert eine Reihe posttranslatiöner intrazellulärer und extrazellulärer Modifikationen des Kollagenmoleküls. Im intrazellulären Raum werden die Prä-Prokollagenketten (2 alpha-1 und eine alpha-2 Ketten) im rauen endoplasmatischen Retikulum gebildet und nach Abspaltung des Signalpeptids hydroxyliert und glykosyliert. Die intrazellulären Kollagenmodifikationen beruhen im Wesentlichen auf der Enzymaktivität dreier Hydroxylasen (Prolyl-3-Hydroxylase, Prolyl-4-Hydroxylase, Lysylhydroxylase) und zweier Glykosyltransferasen (Hydroxyllysylgalaktosyltransferase, Hydroxyllysylglukosyltransferase) (Kivirikko, 1993; Kivirikko und Pihlajaniemi, 1998; Prockop und Kivirikko, 1995). Nach Translation und Modifikation sowie Tripplehelixbildung erfolgt die Sekretion der Prokollagenmoleküle.

Im extrazellulären Raum wird das Prokollagen anschließend durch proteolytische Spaltungsprozesse modifiziert und das Tropokollagen durch intra- und intermolekulare Quervernetzungen stabilisiert (Kagan, 1986a). Die extrazelluläre Modifikation des Kollagens umfasst die Abspaltung der N- und C-terminalen Propeptide und die Konversion der Lysin- und Hydroxylysinreste in reaktive Aldehyde und erfolgt im Wesentlichen durch die Enzyme PCP, PNP und LOX (Abbildung 1) (Kessler *et al.*, 2001; Trackman *et al.*, 1992). Die extrazellulären Prokollagenmodifikationen sind für die Akkumulation von quervernetztem und damit unlöslichem Kollagen verantwortlich und tragen damit wesentlich zu den biomechanischen Eigenschaften des Knochens bei (Kagan und Trackman, 1991; Knott und Bailey, 1998).

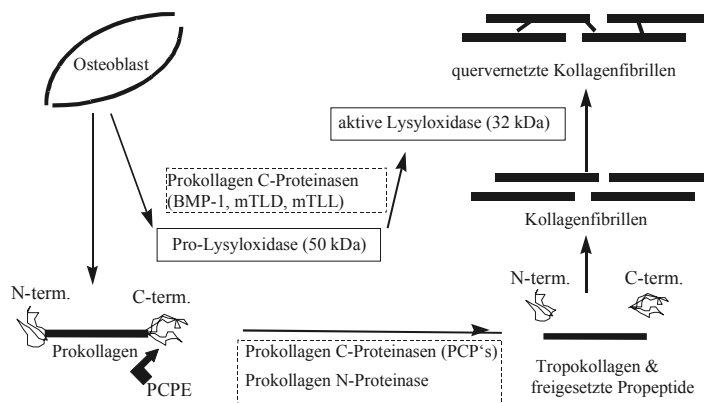


Abbildung 1: Enzyme der posttranslationalen, extrazellulären Modifikation des Prokollagens. Die Prokollagen C-Proteinasen, BMP-1 und mTLD, spalten sowohl das C-Propeptid des Prokollagens I-III als auch das Propeptid der Pro-Lysoxidase. BMP-1: Bone morphogenic protein-1; mTLD: mammalian Tolloid; mTLL: mammalian Tolloid-like; PCP: Procollagen C-Proteinasen; PCPE: Procollagen C-Proteinase Enhancer; PNP: Procollagen N-Proteinase

2.1.1. Prokollagen C-Proteinasen

Die Prokollagen C-Proteinasen (PCP) umfassen Bone morphogenic protein-1 (BMP-1), mammalian Tolloid (mTLD) und mammalian Tolloid-like protein (mTLL). Durch die PCP-Aktivität wird das globuläre C-terminale Propeptid vom Prokollagen abgespalten, wodurch sich die Kollagenlöslichkeit um das 10. 000-fache erniedrigt (Prockop und Kivirikko, 1995). Außerdem ist die Abspaltung der Prokollagen Propeptide eine wichtige Voraussetzung für die anschließende Fibrillenpolymerisation und die Initiierung der kollagenen Quervernetzung. Dabei scheint insbesondere die Abspaltung des C-terminalen Propeptids für die Fibrillenpolymerisation ausschlaggebend zu sein (Kadler *et al.*, 1987). Neben der Abspaltung des C-terminalen Propeptids spalten die PCP auch die 50 kDa große Pro-Lysoxidase (Pro-LOX), so dass das aktive Enzym LOX entsteht (Uzel *et al.*, 2001)

Das *Bmp-1*-Gen kodiert für BMP-1 und mTLD (Kessler *et al.*, 1996). BMP-1 gehört zur Tolloid Subfamilie der Metzinine, die an der Spaltung und Aktivierung zahlreicher extrazellulärer Matrixproteine wie Prokollagen I-III, V, VII, Chordin, Pro-Biglykan, Pro-Laminin, Pro-LOX beteiligt sind (Kessler *et al.*, 2001; Rattenholl *et al.*, 2002; Uzel *et al.*,

2001). *Bmp-1* knockout Mäuse weisen eine reduzierte Kollagenakkumulation sowie eine verminderte Ossifizierung der Kalvarien auf, was darauf hinweist, dass BMP-1 eine Rolle in der Osteogenese spielt (Suzuki *et al.*, 1996). Obwohl BMP-1 die stärkste Enzymaktivität innerhalb der Gruppe der PCP aufweist, zeigen auch alternative Spaltungsprodukte des *Bmp-1*-Gens wie mTLD und mTLL-1 geringfügige PCP-Aktivität (Uzel *et al.*, 2001).

2.1.2. Kollagene Quervernetzung durch die Lysyloxidase

Die Lysyloxidase (LOX, Protein-Lysin-6-Oxidase) wird als inaktives, 47 kDa großes Prä-Proenzym, mit einer N-terminalen Signalpeptidsequenz, gefolgt von einer Propeptidomäne und einer katalytischen Domäne, synthetisiert. Das Signalpeptid wird nachfolgend abgespalten und Pro-LOX im Golgi-Apparat zu einem 50 kDa großen Proenzym glykosyliert. Letzteres wird in die extrazelluläre Matrix sezerniert, wo es primär durch BMP-1 und andere PCP gespalten wird, so dass das 32-34 kDa große aktive Enzym, LOX, und das 18 kDa große Lysyloxidase Propeptid (LOPP) entstehen (Abbildung 2) (Uzel *et al.*, 2001).

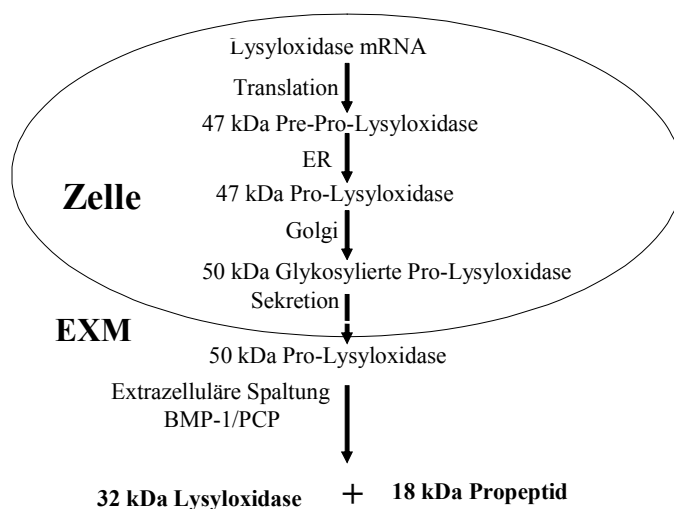


Abbildung 2: Synthese und Spaltungsprozesse der Lysyloxidase. ER: Endoplasmatisches Retikulum; Golgi: Golgi-Apparat; EXM: extrazelluläre Matrix

Die LOX katalysiert oxidative Deaminierungen von Peptidyllysin- und Peptidylhydroxylysinresten des Kollagen- und Elastinmoleküls, wodurch reaktive Aldehyde entstehen (Peptidyl- α -aminoadipische- δ -Semialdehyd, Peptidyl- δ -hydroxy- α -aminoadipische- δ -Semialdehyd) (Abbildung 3) (Kagan, 1986b; Kagan und Trackman, 1991).

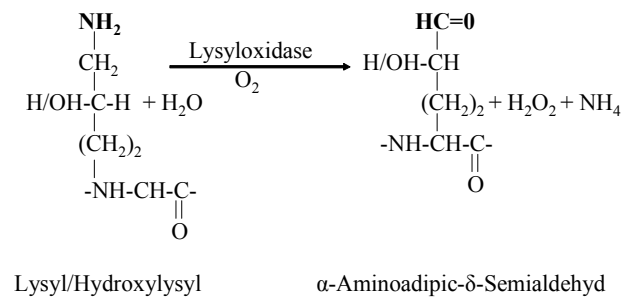


Abbildung 3: Lysyloxidase katalysiert oxidative Deaminierungen von Lysinresten.

Durch Kondensation der Aldehyde mit weiteren Lysin-, Hydroxylysin- oder Histidinresten entstehen intermolekulare kollagene Quervernetzungen (Abbildung 4). Natürlicherweise vorkommende intermolekulare Quervernetzungen des Kollagen Typ I sind dehydro-Dihydroxylysinonorleucin (deH-DHLNL), dehydro-Hydroxylysinonorleucin (deH-HLNL) und dehydro-Histidinhydroxymerodesmosin (deH-HHMD), welche zu den durch Natriumborhydrid (NaBH_4) reduzierbaren Quervernetzungen gehören, sowie die durch NaBH_4 nicht reduzierbaren Pyridinolin (Pyr, Hydroxylysylpyridinolin), Deoxypyridinolin (Dpd, Lysyl-Pyridinolin, d-Pyr), Histidinhydroxylysinonorleucin (HHL) und Pyrrol (Yamauchi, 1996).

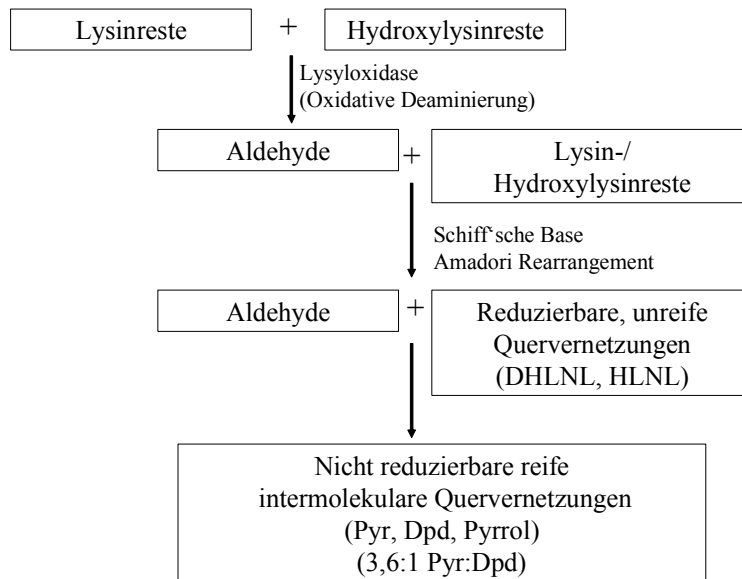


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Entstehung nicht reduzierbarer, reifer kollagener Quervernetzungen im Knochengewebe.

Eine Inaktivierung des *Lox*-Gens im Mausmodell ist nicht mit dem Leben vereinbar. Homozygote Tiere (*Lox*^{-/-}) sterben kurz vor oder unmittelbar nach der Geburt (Hornstra *et al.*, 2003; Mäki *et al.*, 2002). Die wenigen *Lox*^{-/-} Tiere, die die Geburt bis maximal einen halben Tag überleben, sind schwach und kraftlos. Sie leiden an ausgeprägten kardiovaskulären und pulmonalen Störungen (Hornstra *et al.*, 2003; Mäki *et al.*, 2002; Mäki *et al.*, 2005) und weisen Aortenaneurysmenrupturen auf, so dass ein Hämothorax und Hämoperitoneum beobachtet werden können. Es können des Weiteren Hernien im Diaphragma festgestellt werden. Die *Lox*-Gen Defizienz führt außerdem zu einem reduzierten Hydroxyprolinegehalt, zu verminderten DHLNL- und HLNL-Konzentrationen und zu einer diskontinuierlichen kollagenen Faserbildung (Hornstra *et al.*, 2003; Mäki *et al.*, 2002). In murinen *Lox*^{-/-} Fibroblasten und *Lox*^{-/-} vaskulären glatten Muskelzellen ist die Lysyloxidation um ca. 80 % reduziert (Mäki *et al.*, 2002). Der Anteil unreifer Quervernetzungen ist in *Lox*^{-/-} Embryos um ca. 40 % vermindert (Hornstra *et al.*, 2003).

Im Vergleich zum Bindegewebe weisen die verschiedenen Arten der intermolekularen Quervernetzungen zueinander ein charakteristisches Verhältnis im Knochengewebe auf. Dabei kann im Knochengewebe ein Verhältnis von Pyr zu Dpd von 3,6:1, mit einem vergleichsweise hohen Anteil an Dpd gemessen werden (Eyre, 1981; Eyre *et al.*, 1988; Knott und Bailey, 1998). Ein hoher Anteil an Dpd korreliert deutlich mit der Matrixmineralisation. Allerdings ist die absolute Konzentration an Pyr und Dpd (0,29 mol Pyr und Dpd per Mol Kollagen) im Knochengewebe, verglichen mit nicht-mineralisiertem Bindegewebe, äußerst gering. Es wird angenommen, dass die Verteilung der kollagenen Quervernetzungen der

spatialen Organisation der Mineralisationskristalle im mineralisierten Gewebe dient (Yamauchi und Katz, 1993; Yamauchi, 1996). Mit zunehmendem Lebensalter reifen reduzierbare Quervernetzungen (DHLNL, HLNL) zu nicht reduzierbaren (Pyr, Dpd) heran, d. h. es entsteht ein höherer Anteil an Pyridinolininen (Eyre *et al.*, 1988). Für das Knochengewebe ist die Persistenz eines relativ hohen Anteils an reduzierbaren Quervernetzungen im adulten Gewebe charakteristisch, was einerseits auf die hohe Remodelingrate des Knochengewebes aber auch auf eine verzögerte Umwandlung der reduzierbaren Quervernetzungen in reife Pyridinoline zurückgeführt wurde (Eyre *et al.*, 1988). Die Art und Verteilung der kollagenen Quervernetzungen bestimmt das molekulare Packing des Kollagens, das für die Mineralisation notwendig ist. Die Bildung der nicht reduzierbaren, reifen Quervernetzungen, Pyr und Dpd, verschafft dem Knochen die nötigen biomechanischen Eigenschaften, wie Steifigkeit, Zugfestigkeit und Viskoelastizität (Khoshla und Kleerekoper, 2003; Puxkandl *et al.*, 2002). Verringerte Mengen an Pyr-Quervernetzungen sind mit reduzierter Mineraldichte und verminderter mechanischer Belastbarkeit des Knochens assoziiert (Knott und Bailey, 1998; Oxlund *et al.*, 1995).

In den letzten Jahren sind neben LOX vier weitere LOX-Isoenzyme identifiziert worden, die als Lysyloxidase-like protein 1-4 (LOXL1-4) bezeichnet werden (Huang *et al.*, 2001; Ito *et al.*, 2001; Jourdan-Le Saux *et al.*, 1998; Jourdan-Le Saux *et al.*, 2001; Kenyon *et al.*, 1993; Kim *et al.*, 1995; Mäki und Kivirikko, 2001; Saito *et al.*, 1997). Die Proteinsequenzen von LOXL1-4 ähneln, bis auf die Propeptid Region, der LOX-Sequenz (Csiszar, 2001). Einige LOX-Isoenzyme weisen Aminoxidaseaktivität auf (Borel *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2003) und besitzen damit möglicherweise die Voraussetzung der kollagenen Quervernetzung.

2.1.2.1. Weitere Funktionen der Lysyloxidase

Neben der bisher bekannten kollagenquernetzenden Funktion der LOX kristallisieren sich seit einiger Zeit weitere Funktionen des Enzyms heraus. So weisen Untersuchungen darauf hin, dass die LOX auf den Erhalt eines normalen Zellphänotypes Einfluss nimmt (Contente *et al.*, 1990; Giampuzzi *et al.*, 2000; Hajnal *et al.*, 1993; Hamalainen *et al.*, 1995; Jeay *et al.*, 2003; Kenyon *et al.*, 1993; Krzyzosiak *et al.*, 1992; Kuivaniemi *et al.*, 1986). Es wurde nachgewiesen, dass die LOX-Expression in malignen Tumoren erniedrigt ist und die Induktion der LOX mit einer Reversion von Tumorzellen in einen normalen Phänotyp einhergeht (Contente *et al.*, 1990; Csiszar *et al.*, 2002; Giampuzzi *et al.*, 2000; Hajnal *et al.*, 1993; Hamalainen *et al.*, 1995; Kenyon *et al.*, 1991; Kenyon *et al.*, 1993; Krzyzosiak *et al.*, 1992; Kuivaniemi *et al.*, 1986; Ren *et al.*, 1998). Studien zeigen, dass die LOX, die bisher als

vorwiegend extrazellulär aktives Enzym beschrieben war, auch intrazellulär nachgewiesen werden kann (Li *et al.*, 1997; Nellaiappan *et al.*, 2000; Wakasaki und Ooshima, 1990). Es wird angenommen, dass LOX die Akt/PI3K-Aktivierung hemmt, was wiederum zur Inhibition der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B führt (Jeay *et al.*, 2003). NF- κ B ist ein wichtiger Transkriptionsfaktor, der zahlreiche biologische Prozesse wie z. B. das Zellwachstum reguliert (Jeay *et al.*, 2003). Diese Daten weisen darauf hin, dass LOX eine Bedeutung für die Zelldifferenzierung hat und damit möglicherweise auch in der Osteoblastendifferenzierung eine Rolle spielt.

2.1.2.2. **Konsequenzen einer gestörten Lysyloxidase-Aktivität für das Knochengewebe**

Die Bedeutung der Kollagenquervernetzung durch die LOX, insbesondere für die Entstehung funktionellen Knochengewebes, kann am Beispiel verschiedener angeborener und erworbener Erkrankungen, bei denen eine eingeschränkte Enzymaktivität vorliegt, studiert werden. Beim Ehlers-Danlos-Syndrom Typ IX (Occipital Horn Syndrome, x-linked Cutis Laxa) und bei der Menke's Disease (Kinky Hair Syndrome) kommt es aufgrund eines gestörten Kupferstoffwechsels zu verringerten Kupferspiegeln im Serum (Mercer *et al.*, 1999). Kupfer ist ein wesentlicher Kofaktor der LOX sowie ihrer Isoenzyme (Gacheru *et al.*, 1990). Atomabsorptionsspektrometrische Studien zeigen, dass jedes 32 kDa LOX-Monomer ein gebundenes Kupferatom aufweist und dass LOX durch die Entfernung des Kupferions katalytisch inaktiv wird. Bei den beschriebenen genetischen Erkrankungen führt die eingeschränkte LOX-Aktivität zu schwer wiegenden skelettalen Beeinträchtigungen (Shim und Harris, 2003). Auch eine Kupferdefizienz durch mangelnde Kupferaufnahme hat eine gestörte LOX-Enzymaktivität sowie eine verminderte kollagene Quervernetzung zur Folge, so dass Osteoporose, Knochendeformitäten und Knochenfragilität resultieren (Opsahl *et al.*, 1982).

Ein weiteres Beispiel für eine verminderte LOX-Aktivität ist der Osteolathyrismus, der im Tierversuch durch die Fütterung mit der Pflanze *Lathyrus odoratus* (Edelwicke, Gartenwicke) der Familie Fabaceae induziert werden kann (Geiger *et al.*, 1933). Ursache hierfür ist das in den Pflanzen enthaltene β -Aminopropionitril (β -APN), das ein spezifischer Inhibitor der LOX ist. Beim Osteolathyrismus zeigen sich eingeschränkte mechanische Knocheneigenschaften, Deformitäten der Röhrenknochen, Wirbelsäulenverkrümmungen und Distorsionen des thorakalen Skeletts (Geiger *et al.*, 1933; Selye, 1957).

Nicht nur eine verminderte LOX-Aktivität, sondern auch eine erhöhte Aktivität hat weit reichende Konsequenzen. Eine pathologisch erhöhte LOX-Aktivität fördert die Entstehung von Fibrosen, die durch eine exzessive Kollagenakkumulation und gesteigerte Pyr-Konzentration charakterisiert ist (Van der Slot *et al.*, 2004). Stark quervernetztes Kollagen kann durch Proteasen kaum abgebaut werden, wodurch überschüssiges Kollagen akkumuliert. Dieses Missverhältnis aus Kollagensynthese und -akkumulation fördert letztendlich die Entstehung von Fibrosen. Eine erhöhte LOX-Aktivität kann auch bei Erkrankungen wie der Sklerodermie oder der Arteriosklerose beobachtet werden (Chanoki *et al.*, 1995; Kagan *et al.*, 1981).

3. Fragestellungen der vorgestellten Arbeiten

Fibrilläres Kollagen Typ I ist der Hauptbestandteil der extrazellulären Knochenmatrix, das durch seine Struktur und mechanischen Qualitäten letztendlich Zugfestigkeit und Kompressionsfähigkeit des Knochengewebes gewährleistet (Fratzl *et al.*, 2004; Knott und Bailey, 1998). Insbesondere das alveoläre Knochengewebe, als ein wesentlicher Bestandteil des Parodonts, ist während der Mastikation hohen mechanischen Beanspruchungen ausgesetzt. Extrazelluläre Kollagenmodifikationen durch LOX und Prokollagen Proteinase sind eine entscheidende Voraussetzung für die Akkumulation einer unlöslichen, quervernetzten kollagenen Matrix und für die anschließende Matrixmineralisation (Kagan und Trackman, 1991; Prockop und Kivirikko, 1995; Yamauchi, 1996). Genaue Mechanismen der Interaktion zwischen der kollagenen Matrix und der Differenzierung osteogener Zellen, die für die Bildung von funktionellem Knochengewebe wesentlich sind, sind unklar.

Ein primäres Ziel der vorliegenden Originalarbeiten war es, die Bedeutung der post-translationalen extrazellulären kollagenmodifizierenden Enzyme, insbesondere der LOX sowie der PCP, BMP-1 und mTLD, für die Osteoblastendifferenzierung, der Matrixmineralisation und letztendlich für die Entstehung von funktionellem Knochengewebe zu untersuchen.

Bei der Spaltung des 50 kDa großen LOX-Proenzymts entsteht extrazellulär das 18 kDa große LOPP. Bis vor Kurzem wurde angenommen, dass LOPP nach Abspaltung dem Abbau im extrazellulären Raum unterliegt und keine weitere Funktion aufweist (Uzel *et al.*, 2001). In den vorliegenden Untersuchungen wurde die zelluläre Lokalisation der LOX sowie des LOPP analysiert und mit Hilfe von rekombinantem LOPP der zelluläre Einfluss und damit eine mögliche Funktionalität des LOPP aufgezeigt.

Des Weiteren wurden in den vorliegenden Arbeiten strukturelle kollagene Veränderungen der akkumulierten extrazellulären Matrix in Osteoblastenkulturen unter Verwendung spezifischer Inhibitoren der LOX-Aktivität (β -APN) und der LOX-Spaltprozesse (BMP-1-Inhibitor) untersucht.

Im Zuge von entzündlichen Erkrankungen des Knochengewebes wie der Parodontitis kommt es zur massiven Freisetzung von inflammatorischen Zytokinen wie dem Tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) (Page *et al.*, 1997; Pischon *et al.*, 2008). Im Rahmen der vorliegenden Arbeiten wurde untersucht, ob TNF- α die Regulation der posttranslationalen kollagenmodifizierenden Enzyme und damit die Matrixakkumulation beeinflusst, was für den entzündlichen Binde- und Stützgewebeabbau sowie für die anschließende Regeneration entscheidend sein kann.

4. Vorstellung der Originalarbeiten

- Hong H, *Pischon N, Santana RB, Palamakumbura AH, Babakhanlou Chase H, Gantz D, Guo Y, Uzel MI, Ma D, Trackman PC. Role for lysyl oxidase regulation in the control of normal collagen deposition in differentiating osteoblast cultures. *J Cell Physiol* 2004 (200):53-62
* Gemeinsame Erstautorenschaft
- Guo Y, *Pischon N, Palamakumbura AH, Trackman PC. Intracellular distribution of the lysyl oxidase propeptide in osteoblastic cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007 (292):C2095-2102
* Gemeinsame Erstautorenschaft
- Palamakumbura AH, Jeay S, Guo Y, Pischon N, Sommer P, Sonenshein GE, Trackman PC. The propeptide domain of lysyl oxidase induces phenotypic reversion of transformed cells. *J Biol Chem* 2004 (279): 40593-40600
- Pischon N, Babakhanlou-Chase H, Darbois L, Ho WB, Brenner MC, Kessler E, Palamakumbura AH, Trackman PC. A procollagen C-proteinase inhibitor diminishes collagen and lysyl oxidase processing but not collagen cross-linking in osteoblastic cultures. *J Cell Physiol* 2005 (203):111-117
- Pischon N, Darbois L, Palamakumbura AH, Kessler E, Trackman PC. Regulation of collagen deposition and lysyl oxidase by tumor necrosis factor- α in osteoblasts. *J Biol Chem* 2004 (279):30060-30065

Hong H, *Pischon N, Santana RB, Palamakumbura AH, Babakhanlou Chase H, Gantz D, Guo Y, Uzel MI, Ma D, Trackman PC. Role for lysyl oxidase regulation in the control of normal collagen deposition in differentiating osteoblast cultures. *J Cell Physiol* 2004 (200):53-62 *Gemeinsame Erstautorenschaft

Die posttranslationale extrazelluläre Kollagenbiosynthese ist für die Akkumulation von unlöslichen und quervernetzten Kollagen entscheidend. In dem vorliegenden Manuskript wurde die Regulation der extrazellulären kollagenmodifizierenden Enzyme, LOX, BMP-1 und mTLD, im Verlauf der Differenzierung von murinen Osteoblasten (MC3T3-E1 Zelllinie) untersucht. Außerdem wurde mittels spezifischer Hemmung der LOX-Aktivität (β -APN) die Bedeutung der LOX in der Kollagenakkumulation analysiert. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen eine Regulation der LOX-mRNA und Proteinexpression sowie –Aktivität im Verlauf der Osteoblastendifferenzierung. Die höchste LOX-mRNA Expression erfolgt dabei zeitlich vor dem maximalen LOX-Aktivitätsanstieg. Die LOX-Aktivität steigt vor der Akkumulation von Kollagen Typ I an. BMP-1 sowie mTLD werden demgegenüber konstant exprimiert. Die Hemmung der LOX-Aktivität mittels β -APN führt in differenzierenden Osteoblastenkulturen zur gestörten Kollagenakkumulation mit vergrößerten kollagenen Faserdurchmessern und erhöhter Löslichkeit. Die Daten zeigen erstmalig, dass die LOX spezifisch im Verlauf der Osteoblastendifferenzierung reguliert wird und für die Kontrolle der Kollagenakkumulation wesentlich ist.

Guo Y, *Pischon N, Palamakumbura AH, Trackman PC. Intracellular distribution of the lysyl oxidase propeptide in osteoblastic cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007 (292):C2095-2102 *Gemeinsame Erstautorenschaft

Das 50 kDa große LOX-Proenzym wird in der extrazellulären Matrix durch BMP-1, mTLD und mTLL gespalten, so dass das 32 kDa große aktive Enzym, LOX, sowie das 18 kDa große LOPP entstehen. In der vorliegenden Studie wurde die Lokalisation der verschiedenen molekularen LOX-Formen in proliferierenden und differenzierenden Osteoblasten mittels Immunfluoreszenz und Proteinanalyse untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass in Abhängigkeit von dem Differenzierungsstadium der Osteoblasten sowohl das aktive LOX-Enzym als auch das LOPP intrazellulär nachgewiesen werden kann. In proliferierenden Osteoblasten ist die LOX mit dem Nukleus und das LOPP mit dem endoplasmatischen Retikulum und dem Golgi-Apparat assoziiert. In differenzierenden Zellen zeigt sich demgegenüber eine Assoziation mit dem Tubulin-Netzwerk. Zukünftige Studien werden zeigen, ob die intrazelluläre LOX bzw. LOPP die Osteoblastenfunktion beeinflussen.

Palamakumbura AH, Jeay S, Guo Y, Pischon N, Sommer P, Sonenshein GE, Trackman PC. The propeptide domain of lysyl oxidase induces phenotypic reversion of transformed cells. J Biol Chem 2004 (279): 40593-40600

Studien weisen darauf hin, dass die LOX nicht nur eine kollagen- und elastinquervernetzende Funktion, sondern auch einen Einfluss auf den Erhalt eines normalen Zellphänotypes hat. Dabei wurde gezeigt, dass die Expression der LOX mit einer Reversion von transformierten Zellen in normale Zellphänotypen einhergeht. Suramin ist ein Medikament, das bei der Tumorbehandlung eingesetzt wird. Es ist bekannt, dass Suramin die LOX-Expression in *ras*-transformierten Zellen hochreguliert. In der vorliegenden Studie wurde die Bedeutung der LOX und insbesondere des LOPP für den Erhalt eines normalen Zellphänotypes untersucht. Die Daten zeigen, dass LOPP (und nicht wie angenommen die 32 kDa große LOX) die *ras*-abhängige Transformation von normalen Fibroblasten (NIH3T3 Zellen) in transformierte Zellen (RS485 Zellen) hemmt. Damit zeigen die Ergebnisse erstmalig, dass LOPP einen Einfluss auf Zellfunktionen wie die Zellzyklusprogression hat.

Pischon N, Babakhanlou-Chase H, Darbois L, Ho WB, Brenner MC, Kessler E, Palamakumbura AH, Trackman PC. A Procollagen C-proteinase inhibitor diminishes collagen and lysyl oxidase processing but not collagen cross-linking in osteoblastic cultures. *J Cell Physiol* 2005 (203):111-117

PCP spalten das globuläre C-Propeptid vom Prokollagen Typ I. Anschließend lagern sich die Tropokollagenmoleküle zu Kollagenfibrillen zusammen und werden durch die LOX-Aktivität enzymatisch quervernetzt. Neben der Abspaltung des C-terminalen Propeptids spalten die PCP das 50 kDa große LOX-Proenzym, so dass es zur Entstehung des aktiven LOX-Enzyms und damit zur Quervernetzung des Tropokollagens kommt. In dem vorliegenden Manuskript wurde die PCP-Aktivität experimentell mittels eines Inhibitors gehemmt, um die Bedeutung der PCP in der Regulation der Kollagenakkumulation in Osteoblastenkulturen zu untersuchen. Die Daten zeigen, dass der PCP-Inhibitor die Entstehung des aktiven LOX-Enzyms jedoch nicht die LOX-mRNA-Expression oder die Kollagenquervernetzung hemmt. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass möglicherweise einzelne LOX-Isoenzyme nicht durch den PCP-Inhibitor gehemmt werden und somit die Quervernetzung des Kollagen Typ I teilweise übernehmen. In differenzierenden Osteoblasten führte der PCP-Inhibitor zur verminderten Abspaltung des C-Propeptids vom Prokollagen Typ I. Die durch den Inhibitor bedingten Veränderungen der extrazellulären Kollagenmodifikation resultierten in der Akkumulation von fibrillären Kollagen mit erhöhten kollagenen Faserdurchmessern, was auf eine gestörte Fibrillenpolymerisation hindeutet. Die Ergebnisse zeigen, dass die PCP-Aktivität für eine regelrechte Kollagenakkumulation in Osteoblastenkulturen wesentlich ist. Möglicherweise kann in Zukunft bei Erkrankungen des Knochengewebes eine spezifische Regulation der PCP-Aktivität therapeutisch genutzt werden.

Pischon N, Darbois L, Palamakumbura AH, Kessler E, Trackman PC. Regulation of collagen deposition and lysyl oxidase by tumor necrosis factor- α in osteoblasts. *J Biol Chem* 2004 (279):30060-30065

Entzündliche Erkrankungen des Knochengewebes, wie z. B. die Parodontitis, sind mit der Freisetzung von inflammatorischen Mediatoren wie dem TNF- α assoziiert. In dem vorliegenden Manuskript wurde der Einfluss von TNF- α auf die extrazellulären Enzyme der Kollagenbiosynthese, insbesondere der LOX sowie der PCP, BMP-1 und mTLD, in Osteoblastenkulturen untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass TNF- α die Kollagenakkumulation nicht jedoch die Kollagen-mRNA-Expression und die Kollagensynthese hemmt. Es wurde außerdem eine konstante BMP-1- und mTLD-mRNA- und Proteinexpression unter TNF- α -Behandlung festgestellt. Dagegen führte TNF- α zur Hemmung der LOX-mRNA-Expression sowie der LOX-Proteinsynthese und der LOX-Aktivität und damit zur verminderten kollagenen Quervernetzung. Eine verminderte Akkumulation sowie Quervernetzung des Kollagen Typ I durch TNF- α begünstigt möglicherweise den Abbau extrazellulärer Knochenmatrix durch Proteinasen und stellt damit einen wesentlichen Mechanismus in der Pathogenese entzündlicher Erkrankungen dar.

5. Diskussion

Die mechanischen Eigenschaften des Knochengewebes beruhen entscheidend auf der Architektur der extrazellulären Matrix (Knott und Bailey, 1998). Fibrilläres Kollagen Typ I ist ein primärer Bestandteil der extrazellulären Matrix, und die mineralisierten kollagenen Fasern sind eine elementare Einheit der komplexen Knochenstruktur (Wassen *et al.*, 2000). Extrazelluläre posttranslationale Modifikationen des fibrillären Kollagen Typ I führen zur kollagenen Quervernetzung und sind damit für die Akkumulation einer funktionellen extrazellulären Knochenmatrix bedeutend (Knott und Bailey, 1998; Yamauchi und Katz, 1993; Yamauchi, 1996). Unterschiede in der posttranslationalen Kollagen Typ I Modifikation führen zu Adaptationen der Faserqualität und somit zu veränderten biomechanischen Knocheneigenschaften (Knott und Bailey, 1998). Störungen der kollagenen Quervernetzung führen zu massiver Verminderung der mechanischen Eigenschaften des Knochengewebes, reduzierter Mineraldichte, Knochendeformitäten und -frakturen wie es beim Ehlers-Danlos-Syndrom Typ IX, der Menke's Disease und beim Lathyrismus beobachtet werden kann (Geiger *et al.*, 1933; Opsahl *et al.*, 1982; Oxlund *et al.*, 1995).

Kollagene Quervernetzungen haben einen Einfluss auf den Mineralisationsprozess (Knott und Bailey, 1998; Yamauchi und Katz, 1993; Yamauchi, 1996), allerdings sind die regulatorischen Mechanismen weitgehend unbekannt. Insbesondere sind für die Bildung von funktionellem Knochengewebe wesentlichen Mechanismen der Zell-Matrix-Interaktionen unklar. Mit den vorliegenden Originalarbeiten wurde erstmalig gezeigt, dass die extrazellulären kollagenmodifizierenden Enzyme spezifisch im Zuge der Osteoblastendifferenzierung reguliert werden. Eine quervernetzte kollagene Matrix scheint für kontrollierte Zell-Matrix-Interaktionen und damit für die Zelldifferenzierung von Osteoblasten entscheidend. Eine Hemmung der posttranslationalen extrazellulären kollagenmodifizierenden Enzyme geht mit der Akkumulation einer unorganisierten und unstrukturierten kollagenen Matrix einher, die die Osteoblastendifferenzierung und Matrixmineralisation beeinträchtigt.

5.1. Expression und Regulation der extrazellulären kollagenmodifizierenden Enzyme im Verlauf der Osteoblastendifferenzierung

Die Osteoblastendifferenzierung wird in drei Phasen unterteilt, Phase der Proliferation, Phase der Matrixakkumulation und Phase der Matrixmineralisation, die durch die Expression spezifischer Genprodukte charakterisiert sind (Stein *et al.*, 1996) (Abbildung 5).

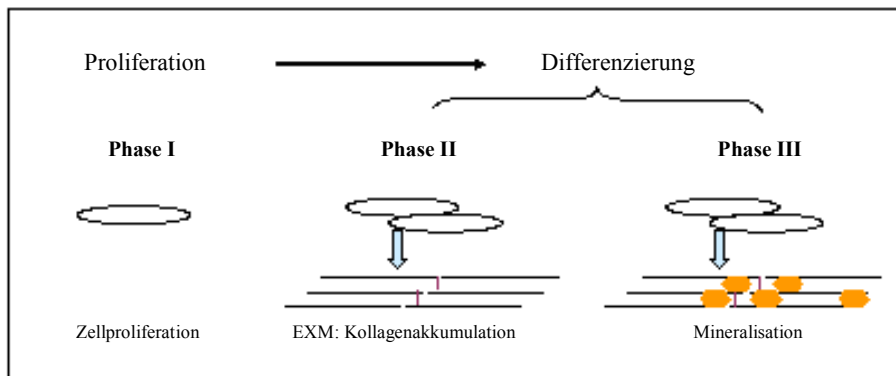


Abbildung 5: Phasen I-III der Osteoblastendifferenzierung.

EXM: Extrazelluläre Matrix

Vorliegende wie auch weitere Arbeiten zeigen, dass sowohl die Kollagen Typ I mRNA Expression als auch die Kollagensynthese in der frühen Phase der Osteoblastendifferenzierung stattfindet, während die Akkumulation von unlöslichem Kollagen später (ab dem 10 Tag in der Zellkultur) erfolgt (Franceschi und Iyer, 1992; Gerstenfeld *et al.*, 1988; Hong *et al.*, 2004). In der Osteoblastenkultur ist die Kollagenakkumulation mit einer gleichzeitigen Verminderung der Kollagen Typ I Genexpression gekoppelt (Hong *et al.*, 2004). Ähnliche Beobachtungen wurden nach der Behandlung der Osteoblasten mit Wachstumsfaktoren gemacht, wobei es nach Zusatz des Transforming Growth Factors-beta1 (TGF- β 1) zu einem signifikant höheren Anstieg der Kollagenakkumulation im Vergleich zur Kollagensynthese kam (Centrella *et al.*, 1992). In den vorliegenden Originalarbeiten konnte des Weiteren gezeigt werden, dass das pro-inflammatorische TNF- α primär die extrazelluläre Kollagenmodifikation und Kollagenakkumulation hemmte, ohne die osteoblastäre Kollagensynthese zu inhibieren (Pischon *et al.*, 2004). Diese Daten weisen darauf hin, dass in der Osteoblastendifferenzierung die posttranslationalen, extrazellulären Modifikationen einer spezifischen Kontrolle unterliegen und Mediatoren die extrazellulären Prozesse der Kollagenbiosynthese spezifisch regulieren (Hong *et al.*, 2004; Pischon *et al.*, 2004; Pischon *et al.*, 2005a; Trackman, 2005).

Im späteren Stadium der Osteoblastendifferenzierung und Matrixmineralisation kommt es zur zellulär kontrollierten Ablagerung von kristallinem Material (Boskey, 2003). Kollagen Typ I ist für die Initiierung der Mineralisation sowie für das Wachstum, die Proliferation und die Agglomeration der Mineralkristalle entscheidend (Boskey, 2003). Es wird angenommen, dass die Verteilung der kollagenen Quervernetzungen für die lokale Organisation der Mineralisationskristalle im mineralisierten Gewebe wichtig ist (Yamauchi und Katz, 1993; Yamauchi, 1996). Mit den vorliegenden Arbeiten konnte gezeigt werden, dass LOX, BMP-1 und mTLD in differenzierenden Osteoblastenkulturen (MC3T3-E1) exprimiert werden und LOX zeitlich spezifisch reguliert wird (Hong *et al.*, 2004). Die LOX-Expression in differenzierenden Osteoblasten ist von nachfolgenden Studien bestätigt worden (Atsawasuwan *et al.*, 2005; Turecek *et al.*, 2008). Vorliegende Untersuchungen zeigen, dass im Verlauf der Osteoblastendifferenzierung die LOX-Expression graduell bis hin zur Phase der Matrixmineralisation ansteigt (Hong *et al.*, 2004). Im Gegensatz zur LOX kann eine konstante Expression der PCP, BMP-1 und mTLD, im Verlauf der Osteoblastendifferenzierung beobachtet werden (Hong *et al.*, 2004). BMP-1 ist an der Spaltung und Aktivierung zahlreicher extrazellulärer Matrixproteine beteiligt (Kessler *et al.*, 2001; Rattenholl *et al.*, 2002; Uzel *et al.*, 2001). Eine kontinuierliche BMP-1-Expression ist möglicherweise für die Aufrechterhaltung grundlegender Spaltungsprozesse und damit Gewebshomöostase grundlegend (Hong *et al.*, 2004; Trackman, 2005).

Es wurde gezeigt, dass die reife 32 kDa LOX im Zytoplasma von mesenchymalen Zellen wie glatten Muskelzellen und Fibroblasten nachgewiesen werden kann (Li *et al.*, 1997; Nellaiappan *et al.*, 2000). Die vorliegenden Daten zeigen erstmalig eine Intrazellularität von 32 kDa LOX innerhalb von Osteoblasten (Hong *et al.*, 2004), was darauf hinweist, dass LOX neben seiner kollagenquervernetzenden Funktion im extrazellulären Raum möglicherweise auch intrazelluläre Zellfunktionen beeinflusst. Dabei konnte eine spezifische temporäre Expression der LOX in proliferierenden und differenzierenden Osteoblasten nachgewiesen werden (Guo *et al.*, 2007). In proliferierenden Osteoblasten ist LOX nukleär lokalisiert, während in differenzierenden Osteoblasten eine Assoziation mit dem Tubulin-Zytoskelett festgestellt werden kann, was auf eine zelluläre Beeinflussung im Verlauf der Zelldifferenzierung hindeutet (Guo *et al.*, 2007). In einer anderen Studie wurde gezeigt, dass neben der LOX auch LOXL-1 und LOXL-4 im Verlauf der Osteoblastendifferenzierung reguliert werden (Atsawasuwan *et al.*, 2005). Die Funktion und Regulation einzelner Isoenzyme in der osteoblastären Entwicklung ist jedoch unklar und sollte in weiterführenden Untersuchungen analysiert werden.

5.2. Expression und Bedeutung von Lysyloxidase-Spaltprodukten in der Osteoblastendifferenzierung

Es ist bekannt, dass freigesetzte Kollagenpropeptide nach der Abspaltung vom Prokollagen eine biologische Funktion aufweisen können (Aycock *et al.*, 1986; Shichiri und Hirata, 2001; van der Rest *et al.*, 1986; Weston *et al.*, 1994). Beispielsweise hat das durch die PCP-Aktivität freigesetzte Prokollagen Typ I Propeptid Einfluss auf die Zelladhäsion und Zellmigration und das Prokollagen Typ II Propeptid oder auch Chondrocalcin fördert die Mineralisation von Knorpelmatrix (van der Rest *et al.*, 1986). Ein weiteres Beispiel eines biologisch aktiven Propeptids ist das von Kollagen Typ XVIII freigesetzte Endostatin, das die Angiogenese hemmt (Shichiri und Hirata, 2001).

Bisher wurde angenommen, dass das LOX-Spaltprodukt, LOPP, dem Abbau durch Proteinasen im extrazellulären Raum unterliegt und keine eigenständige Funktion aufweist. Kollagene Propeptide fallen durch ihre Proteingröße und außergewöhnliche strukturelle Eigenschaften auf. Das 18 kDa große LOPP ist ein basisches, argininhaltiges und lysinfreies Peptid mit einem isoelektrischen Punkt von 12,5 (Palamakumbura *et al.*, 2004). Es wurde beschrieben, dass kleine basische Peptide in der Lage sein können, die Zellmembran ohne einen spezifischen Rezeptor zu passieren (Futaki *et al.*, 2002). Die vorliegenden Daten zeigen, dass LOPP nach Abspaltung vom Proenzym von den Osteoblasten aufgenommen wird (Guo *et al.*, 2007). Dabei konnte eine spezifische LOPP-Lokalisation im Verlauf der Osteoblastendifferenzierung festgestellt werden. In proliferierenden Osteoblasten ist das LOPP mit dem Golgi-Apparat und dem Nukleus assoziiert und in differenzierenden Osteoblasten bindet LOPP an das α -Tubulin-Netzwerk (Guo *et al.*, 2007). Tubulin ist für den Aufbau des Spindel-Apparates und somit für die Kontrolle der Zellmitose wichtig (Jordan, 2002). Es ist bisher nicht nachgewiesen, ob LOPP die Proliferation und Differenzierung von Osteoblasten beeinflusst, allerdings ist dies Gegenstand weiterführender Untersuchungen. Vorliegende Untersuchungen unter Verwendung eines rekombinanten LOPP zeigen jedoch, dass LOPP biologisch aktiv ist und in der Lage ist, den Zellzyklus zu beeinflussen (Palamakumbura *et al.*, 2004), was darauf hinweist, dass LOPP möglicherweise einen Einfluss auf die osteoblastäre Zellproliferation hat.

5.3. Konsequenzen der Inhibition der extrazellulären Kollagenmodifikation für die osteoblastäre Matrixakkumulation

Durch die PCP-Aktivität wird nicht nur das C-Propeptid vom Prokollagen I-III gespalten, sondern es kommt auch zur Abspaltung des LOPP und damit zur Aktivierung der LOX (Uzel *et al.*, 2001). In den vorliegenden Untersuchungen führte eine Hemmung der PCP-Aktivität zu einer Erhöhung von löslichen und geringer quervernetzten Kollagen in den Osteoblastenkulturen (Pischon *et al.*, 2005a). Außerdem führte die Behandlung der Osteoblastenkulturen mit β -APN, einem Lathyrogen und spezifischen Inhibitor der LOX-Aktivität, zu einer erhöhten Akkumulation von unstrukturiertem und geringer quervernetztem Kollagen (Hong *et al.*, 2004). Dabei wurde eine hohe Variabilität der kollagenen Fibrillendurchmesser mit deutlich erhöhten Fibrillendurchmessern beobachtet, was auf eine mangelhafte Fibrillenordnung und –struktur in der osteoblastären Matrix hindeutet (Hong *et al.*, 2004). In einer kürzlich publizierten Studie führte die LOX-Hemmung mittels β -APN in Osteoblastenkulturen zur Reduzierung der Quervernetzungen, Pyr und deH-DHLNL (Turecek *et al.*, 2008). Osteolathyrismus interferiert nicht nur mit der Expression von Kollagen und Proteoglykanen, sondern auch von zellulären Wachstumsfaktoren wie dem TGF- β (Ekholm *et al.*, 2000). Es wurde gezeigt, dass das Lathyrogen β -APN Osteocalcin, ein später Marker der Osteoblastendifferenzierung, hemmt (Turecek *et al.*, 2008). Die Daten weisen darauf hin, dass die Akkumulation einer organisierten und strukturierten kollagenen Matrix für die Osteoblastendifferenzierung und Matrixmineralisation entscheidend ist. Die vorliegenden Originalarbeiten zeigen, dass eine Hemmung der extrazellulären kollagenmodifizierenden Enzyme mittels spezifischer Inhibitoren Erkenntnisse über die Bedeutung der Enzyme in der Kontrolle der extrazellulären Kollagenbiosynthese liefert (Hong *et al.*, 2004; Pischon *et al.*, 2005b). Die spezifische Regulation der PCP und LOX könnte in Zukunft genutzt werden, um Spaltprozesse und Akkumulation des fibrillären Kollagens gezielt zu modulieren.

5.4. Rolle des inflammatorischen Zytokins Tumor necrosis factor-alpha in der Regulation der extrazellulären Kollagenmodifikation

TNF- α ist ein pro-inflammatorisches Zytokin, welches hauptsächlich von stimulierten Monozyten, Makrophagen und T-Lymphozyten gebildet wird und für die Pathogenese von entzündlichen Erkrankungen wie der Parodontitis von Bedeutung ist (Page *et al.*, 1997; Pischon *et al.*, 2008). TNF- α steigert im Knochengewebe die Osteoklastogenese und damit die

Knochenresorption (Bertolini *et al.*, 1986). TNF- α kann bei der Parodontitis in hohen Konzentrationen im entzündeten parodontalen Gewebe sowie im Serum nachgewiesen werden, was zum lokalen Binde- und Stützgewebeverlust führt und systemisch zur Entstehung chronischer Erkrankungen beiträgt (Joshi *et al.*, 2004; Page *et al.*, 1997; Pischon *et al.*, 2007).

Die vorliegenden Originalarbeiten zeigen erstmalig einen direkten Einfluss von TNF- α auf die Expression posttranslationaler kollagenmodifizierender Enzyme (Pischon *et al.*, 2004). Dabei zeigen die Daten, dass TNF- α die mRNA-Expression, die Proteinsekretion sowie die Enzymaktivität von LOX hemmt, was die Akkumulation einer unorganisierten extrazellulären Matrix mit reduzierter kollagener Quervernetzung begünstigt (Pischon *et al.*, 2004). Im Gegensatz dazu bleibt die Expression von BMP-1, mTLD und PCPE unter dem Einfluss von TNF- α in Osteoblastenkulturen konstant (Pischon *et al.*, 2004). Eine mangelnde posttranslationale Modifikation des Kollagen Typ I beeinflusst die Mineraldichte und Mineralkristallstruktur (Knott und Bailey, 1998). Die durch TNF- α induzierte Akkumulation von unstrukturiertem, geringer quervernetztem Typ I Kollagen begünstigt möglicherweise einen durch kollagenaseinduzierten Matrixabbau und damit den Knochenverlust in der Pathogenese entzündlicher Erkrankungen (Kagan, 1986a; Pischon *et al.*, 2004). Derzeit werden TNF- α -Antagonisten vermehrt z. B. in der Behandlung von entzündlichen Erkrankungen eingesetzt und es wurden in der Parodontalforschung positive Effekte der TNF- α -Antagonisten auf die Immunantwort und Hemmung des parodontalen Knochenverlustes verzeichnet (Assuma *et al.*, 1998; Di Paola *et al.*, 2007; Oates *et al.*, 2002). Inwieweit sich eine therapeutische Hemmung inflammatorischer Mediatoren mittels Biologika wie TNF- α -Antagonisten auf die Kollagenbiosynthese und Akkumulation einer funktionellen extrazellulären Knochenmatrix auswirkt, wird weiterführend untersucht.

6. Schlussfolgerung und Ausblick

Schlussfolgernd weisen die vorliegenden Untersuchungen auf eine präzise Regulation der posttranslationalen kollagenmodifizierenden Enzyme, insbesondere der LOX, im Verlauf der Osteoblastendifferenzierung hin. Eine quervernetzte kollagene Matrix ist für kontrollierte Zell-Matrix-Interaktionen und damit für die Zelldifferenzierung von Osteoblasten wesentlich. Eine Hemmung der posttranslationalen extrazellulären kollagenmodifizierenden Enzyme geht mit der Akkumulation einer unstrukturierten kollagenen Matrix einher, die die Osteoblastendifferenzierung und Matrixmineralisation beeinträchtigt. Eine kontinuierliche BMP-1- und mTLD-Expression scheint dagegen für die Aufrechterhaltung zahlreicher Spaltprozesse und damit für die Akkumulation einer funktionellen extrazellulären Matrix entscheidend zu sein.

Die vorliegenden Daten zeigen weiterhin, dass sich LOX sowie das Spaltprodukt LOPP an nukleäre und tubuläre Strukturen innerhalb der Osteoblasten bindet. Es ist bisher nicht nachgewiesen, ob LOPP die Proliferation und Differenzierung von Osteoblasten beeinflusst. Vorliegende Untersuchungen unter Verwendung eines rekombinanten LOPP zeigen jedoch, dass LOPP biologisch aktiv und in der Lage ist, das Zellwachstum zu beeinflussen. Vorarbeiten deuten auf eine Regulation der Osteoblastendifferenzierung durch LOPP hin. Die vorliegenden Originalarbeiten zeigen außerdem, dass eine spezifische Hemmung der extrazellulären kollagenmodifizierenden Enzyme die Akkumulation einer unstrukturierten osteoblastären Matrix begünstigt (Hong *et al.*, 2004; Pischon *et al.*, 2005b). Schließlich zeigen die Daten, dass inflammatorische Zytokine in der Lage sind, die posttranslationalen extrazellulären Prozesse der Kollagenbiosynthese spezifisch zu hemmen (Trackman, 2005). Möglicherweise kann eine gezielte Regulation der extrazellulären Enzyme in Zukunft genutzt werden, um Spaltprozesse und Akkumulation des fibrillären Kollagens zu modulieren und therapeutisch zu nutzen.

7. Zusammenfassung

Ein wesentlicher Bestandteil des Parodonts ist das alveoläre Knochengewebe, das einer hohen mastikatorischen Druckbelastung sowie funktionellen Anpassungen an metabolische und inflammatorische Reize unterliegt. Die durch Osteoblasten geförderte extrazelluläre Matrixakkumulation sowie die anschließende Matrixmineralisation sind für die Entstehung, das Remodeling und die Regeneration des alveolären Knochengewebes entscheidend. Posttranslationale extrazelluläre Prokollagenmodifikationen sind für die Akkumulation von quervernetztem und damit unlöslichem Kollagen verantwortlich. Die extrazelluläre Modifikation des Kollagens umfasst die Abspaltung der N- und C-terminalen Propeptide und die Konversion der Lysin- und Hydroxylysinreste in reaktive Aldehyde. Dies erfolgt im Wesentlichen durch die Enzyme Prokollagen C-Proteinase (PCP), Prokollagen N-Proteinase und Lysyloxidase (LOX). Bisher war unklar, wie die extrazellulären, kollagenmodifizierenden Enzyme im Zuge der Osteoblastendifferenzierung reguliert werden. Die vorliegenden Arbeiten zeigen, dass die Expression der Enzyme und insbesondere der LOX in differenzierenden Osteoblastenkulturen einer präzisen Regulation unterliegt. Im Gegensatz zur LOX scheint die Expression der PCP im Verlauf der Osteoblastendifferenzierung konstant zu sein.

Bei der Spaltung des 50 kDa großen Lysyloxidase-Proenzymts entsteht das 18 kDa große Propeptid (LOPP). Die vorgelegten Forschungsergebnisse weisen darauf hin, dass LOPP nach der Abspaltung vom LOX-Propeptid von den Osteoblasten aufgenommen wird und intrazellulär in differenzierenden Zellen an α -Tubulin bindet, was auf eine Funktionalität des LOPP im Verlauf der Osteoblastendifferenzierung hindeutet. Vorliegende Untersuchungen zeigen, dass rekombinantes LOPP in der Lage ist, die Progression des Zellzykluses zu beeinflussen.

In den vorliegenden Untersuchungen wurde des Weiteren gezeigt, dass sowohl spezifische Inhibitoren der Lysyloxidaseaktivität (β -APN) als auch der Lysyloxidasespaltungsprozesse (BMP-1-Inhibitor) zu massiven strukturellen kollagenen Veränderungen in Osteoblastenkulturen führen.

Im Zuge von entzündlichen Erkrankungen des Knochengewebes wie der Parodontitis kommt es zur massiven Freisetzung von inflammatorischen Zytokinen. Die Originalarbeiten zeigen, dass inflammatorische Zytokine wie TNF- α die Gen- und Proteinexpression sowie die Aktivität der LOX hemmen. Möglicherweise könnte eine gezielte Regulation der extrazellulären Enzyme zukünftig genutzt werden, um Spaltprozesse und die Akkumulation

des fibrillären Kollagens zu modulieren und im Zuge entzündlicher Erkrankungen des Knochengewebes therapeutisch zu nutzen.

8. Literaturverzeichnis

Assuma R, Oates T, Cochran D, Amar S, Graves D. IL-1 and TNF antagonists inhibit the inflammatory response and bone loss in experimental periodontitis. *J Immunol* 1998 (160):403-409.

Atsawasuwan P, Mochida Y, Parisuthiman D, Yamauchi M. Expression of lysyl oxidase isoforms in MC3T3-E1 osteoblastic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005 (327):1042-1046.

Aycock R, Raghov R, Stricklin G, Seyer J, Kang A. Post-transcriptional inhibition of collagen and fibronectin synthesis by a synthetic homolog of a portion of the carboxyl-terminal propeptide of human type I collagen. *J Biol Chem* 1986 (261):14355-14360.

Bertolini DR, Nedwin GE, Bringman TS, Smith DD, Mundy GR. Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation *in vitro* by human tumor necrosis factors. *Nature* 1986 (319):516-518.

Borel A, Eichenberger D, Farjanel J, Kessler E, Gleyzal C, Hulmes DJ, et al. Lysyl oxidase-like protein from bovine aorta. Isolation and maturation to an active form by bone morphogenetic protein-1. *J Biol Chem* 2001 (276):48944-48949.

Boskey AL. Mineral analysis provides insights into the mechanism of biomineralization. *Calcif Tissue Int* 2003 (72):533-536.

Centrella M, Casinghino S, Igotz R, McCarthy TL. Multiple regulatory effects by transforming growth factor-beta on type I collagen levels in osteoblast-enriched cultures from fetal rat bone. *Endocrinology* 1992 (131):2863-2872.

Chanoki M, Ishii M, Kobayashi H, Fushida H, Yashiro N, Hamada T, et al. Increased expression of lysyl oxidase in skin with scleroderma. *Br J Dermatol* 1995 (133):710-715.

Contente S, Kenyon K, Rimoldi D, Friedman RM. Expression of gene *rrg* is associated with reversion of NIH 3T3 cells transformed by LTR-*c-H-ras*. *Science* 1990 (249):796-798.

Csiszar K. Lysyl oxidases: a novel multifunctional amine oxidase family. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 2001 (70):1-32.

Csiszar K, Fong SF, Ujfalusi A, Krawetz SA, Salvati EP, Mackenzie JW, et al. Somatic mutations of the lysyl oxidase gene on chromosome 5q23.1 in colorectal tumors. *Int J Cancer* 2002 (97):636-642.

Di Paola R, Mazzon E, Muia C, Crisafulli C, Terrana D, Greco S, et al. Effects of etanercept, a tumour necrosis factor-alpha-antagonist, in an experimental model of periodontitis in rats. *Br J Pharmacol* 2007 (150):286-297.

Ekholm E, Ravanti L, Kähäri V, Paavolainen P, Penttinen R. Expression of extracellular matrix genes: Transforming growth factor (TGF)- β 1 and ras in tibial fracture healing of lathyristic rats. *Bone* 2000 (27):551-557.

Eyre DR (1981). Cross-link maturation in bone collagen. In: The chemistry and biology of mineralized connective tissues. A Veiss editor. New York: Elsevier, pp. 51-55.

Eyre DR, Dickson IR, Van Ness K. Collagen cross-linking in human bone and articular cartilage: age-related changes in the content of mature hydroxypyridinium residues. *J Biochem* 1988 (252):495-500.

Franceschi RT, Iyer B. Relationship between collagen synthesis and expression of the osteoblast phenotype in MC3T3-E1 cells. *J Bone Miner Res* 1992 (7):235-246.

Fratzl P, Gupta HS, Paschalis EP, Roschger P. Structure and mechanical quality of the collagen-mineral nano-composite in bone. *J Mater Chem* 2004 (14):2115-2123.

Futaki S, Nakase I, Suzuki T, Youjun Z, Sugiura Y. Translocation of branched-chain arginine peptides through cell membranes: flexibility in the spatial disposition of positive charges in membrane-permeable peptides. *J Biochem* 2002 (41):7925-7930.

Gacheru SN, Trackman PC, Shah MA, O'Gara CY, Spacciapoli P, Greenaway FT, et al. Structure and catalytic properties of copper in lysyl oxidase. *J Biol Chem* 1990 (265):19022-19027.

Geiger BJ, Steenbock H, Parsons HT. Lathyrism in the rat. *J Nutr* 1933 (6):427-442.

Gerstenfeld L, Chipman S, Kelly C, Hodgens K, Lee D, Landis W. Collagen expression, ultrastructural assembly, and mineralization in cultures of chicken embryo osteoblasts. *J Cell Biol* 1988 (106):979-989.

Giampuzzi M, Botti G, Cilli M, Gusmano R, Borel A, Sommer A, et al. Down-regulation of lysyl oxidase-induced tumorigenic transformation in NRK-49F cells characterized by constitutive activation of ras proto-oncogene. *J Biol Chem* 2000 (276):29226-29232.

Guo Y, Pischon N, Palamakumbura AH, Trackman P. Intracellular distribution of the lysyl oxidase propeptide in osteoblastic cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007 (292):2095-2102.

Hajnal A, Klemenzen R, Schafer R. Up-regulation of lysyl oxidase in spontaneous revertants of H-ras-transformed rat fibroblasts. *Cancer Res* 1993 (53):4670-4675.

Hamalainen ER, Kempainen R, Kuivaniemi H, Tromp G, Vaheri A, Pihlajaniemi T, et al. Quantitative polymerase chain reaction of lysyl oxidase mRNA in malignantly transformed human cell lines demonstrates that their low lysyl oxidase activity is due to low quantities of its mRNA and low levels of transcription of the respective gene. *J Biol Chem* 1995 (270):21590-21593.

Hong HH, Pischon N, Santana RB, Palamakumbura AH, Chase HB, Gantz D, et al. A role for lysyl oxidase regulation in the control of normal collagen deposition in differentiating osteoblast cultures. *J Cell Physiol* 2004 (200):53-62.

Hornstra I, Birge S, Starcher B, Bailey A, Mecham R, Shapiro S. Lysyl oxidase is required for vascular and diaphragmatic development in mice. *J Biol Chem* 2003 (278):14387-14393.

Huang Y, Dai J, Tang R, Zhao W, Zhou Z, Wang W, et al. Cloning and characterization of a human lysyl oxidase-like 3 gene (hLOXL3). *Matrix Biol* 2001 (20):153-157.

Ito H, Akiyama H, Iguchi H, Iyama K, Miyamoto M, Ohsawa K, et al. Molecular cloning and biological activity of a novel lysyl oxidase-related gene expressed in cartilage. *J Biol Chem* 2001 (276):24023-24029.

Jeay S, Pianetti S, Kagan H, GE S. Lysyl oxidase inhibits ras-mediated transformation by preventing activation of NF-kappa B. *Mol Cell Biol* 2003 (23):2251-2263.

Jordan MA. Mechanism of action of antitumor drugs that interacts with microtubules and tubulin. *Curr Med Chem AntiCancer Agents* 2002 (2):1-17.

Joshi KJ, Wand HC, Merchant AT, Rimm EB. Periodontal disease and biomarkers related to cardiovascular disease. *J Dent Res* 2004 (83):151-155.

Jourdan-Le Saux C, Le Saux O, Donlon T, Boyd CD, Csiszar K. The human lysyl oxidase-related gene (LOXL2) maps between markers D8S280 and D8S278 on chromosome 8p21.2-p21.3. *Genomics* 1998 (51):305-307.

Jourdan-Le Saux C, Tomsche A, Ujfalusi A, Jia L, Csiszar K. Central nervous system, uterus, heart, and leukocyte expression of the LOXL-3 gene, encoding a novel lysyl oxidase-like protein. *Genomics* 2001 (74):211-218.

Kadler KE, Hojima Y, Prockop DJ. Assembly of collagen fibrils de novo by cleavage of the type I pC-collagen with procollagen C-proteinase. Assay of critical concentration demonstrates that collagen self-assembly is a classical example of an entropy-driven process. *J Biol Chem* 1987 (262):15696-15701.

Kagan H. *Biology and Regulation of Extracellular Matrix: A Series*. 1986a Orlando: Academic Press.

Kagan H (1986b). Characterization and regulation of lysyl oxidase. In: *Biology and Regulation of Extracellular Matrix: A Series. Regulation of Matrix Accumulation*. RP Mecham editor. Orlando: Academic Press, pp. 321-398.

Kagan H, Trackman P. Properties and function of lysyl oxidase. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1991 (5):206-210.

Kagan HM, Raghavan J, Hollander W. Changes in aortic lysyl oxidase activity in diet-induced atherosclerosis in the rabbit. *Arteriosclerosis* 1981 (1):287-291.

Kenyon K, Contente S, Trackman PC, Tang J, Kagan HM, Friedman RF. Lysyl oxidase and *rrg* messenger RNA. *Science* 1991 (253):802.

Kenyon K, Modi WS, Contente S, Friedman RM. A novel human cDNA with a predicted protein similar to lysyl oxidase maps to chromosome 15q24-q25. *J Biol Chem* 1993 (268):18435-18437.

Kessler E, Takahara K, Biniaminov L, Brusel M, Greenspan D. Bone morphogenic protein-1: the type I procollagen C-proteinase. *Science* 1996 (271):360-362.

Kessler E, Fichard A, Chanut-Delalande H, Brusel M, Ruggier. Bone morphogenic protein-1 (BMP-1) mediates C-terminal processing of procollagen V homotrimer. *J Biol Chem* 2001 (276):27051-27057.

Khoshla S, Kleerekoper M (2003). Biochemical markers of bone turnover. In: *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*. M Favus editor. Chicago: The American society for bone and mineral research, pp. 166-172.

Kielty C, Grant M (2002). The collagen family: structure, assembly, and organization in the extracellular matrix. In: *Connective tissue and its heritable disorders*. I Wiley-Liss editor. Manchester, UK, pp. 159-221.

Kim MS, Kim SS, Jung ST, Park JY, Yoon HW, Ko J, et al. Expression and purification of enzymatically active forms of the human lysyl oxidase-like protein 4. *J Biol Chem* 2003 (278):52071-52074.

Kim Y, Boyd CD, Csiszar K. A new gene with sequence and structural similarity to the gene encoding human lysyl oxidase. *J Biol Chem* 1995 (270):7176-7182.

Kivirikko KI. Collagens and their abnormalities in a wide spectrum of diseases. *Ann Med* 1993 (25):113-126.

Kivirikko KI, Pihlajaniemi T. Collagen hydroxylases and the protein disulfide isomerase subunit of prolyl 4-hydroxylases. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 1998 (72):325-398.

Knott L, Bailey A. Collagen cross-links in mineralizing tissues: a review of their chemistry, function, and clinical relevance. *Bone* 1998 (22):181-187.

Krzyzosiak W, Shindo-Okada N, Teshima H, Nakajima K, Nishimura S. Isolation of genes specifically expressed in flat revertant cells derived from activated ras-transformed NIH 3T3 cells by treatment with azatyrosine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992 (89):4879-4883.

Kuivaniemi H, Korhonen R-M, Vaheri A, Kivirikko KI. Deficient production of lysyl oxidase in cultures of malignantly transformed human cells. *FEBS Lett*. 1986 (195):261-264.

Li W, Nellaiappan K, Strassmaier T, Graham L, Thomas K, Kagan H. Localization and activity of lysyl oxidase within nuclei of fibrogenic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997 (94):12817-12822.

Mäki J, Sormunen R, Lippo S, Kaarteenaho-Wiik R, Soininen R, Myllyharju J. Lysyl oxidase is essential for normal development and function of the respiratory system and for the integrity of elastic and collagen fibers in various tissues. *Am J Pathol* 2005 (167):927-936.

Mäki JM, Kivirikko KI. Cloning and characterization of a fourth human lysyl oxidase isoenzyme. *J Biochem* 2001 (355):381-387.

Mäki JM, Räsänen J, Tikkanen H, Sormunen R, Mälikallio K, Kivirikko KI, et al. Inactivation of the lysyl oxidase gene *Lox* leads to aortic aneurysms, cardiovascular dysfunction, and perinatal death in mice. *Circulation* 2002 (106):2503-2509.

Mercer JFB, Ambrosini L, Horton S, Gazeas S, Grimes A. Animal models of Menkes disease. *Adv Exp Biol Med* 1999 (448):97-108.

Nellaiappan K, Risitano A, Liu G, Nicklas G, Kagan H. Fully processed lysyl oxidase catalyst translocates from the extracellular space into nuclei of aortic smooth-muscle cells. *J Biol Chem* 2000 (79):576-582.

Oates T, Graves D, Cochran D. Clinical, radiographic and biochemical assessment of IL-1/TNF-alpha-antagonist inhibition of bone loss in experimental periodontitis. *J Clin Periodontol* 2002 (29):137-143.

Opsahl W, Zeronian H, Ellison M, Lewis D, Rucker R, Riggins R. Role of copper in collagen cross-linking and its influence on selected mechanical properties of chick bone and tendon. *J Nutr* 1982 (112):708-716.

Oxlund H, Barckman M, Ortoft G, Andreassen TT. Reduced concentrations of collagen cross-links are associated with reduced strength of bone. *Bone* 1995 (17):365S-371S.

Page CR, Offenbacher S, Schroeder HE, Seymour GJ, Kornman KS. Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. *Periodontol 2000* 1997 (14):216-248.

Palamakumbura A, Jeay S, Guo Y, Pischon N, Sommer P, Sonenshein G, et al. The propeptide domain of lysyl oxidase induces phenotypic reversion of ras-transformed cells. *J Biol Chem* 2004 (279):40593-40600.

Pischon N, Darbois LM, Palamakumbura AH, Kessler E, Trackman PC. Regulation of collagen deposition and lysyl oxidase by tumor necrosis factor-alpha in osteoblasts. *J Biol Chem* 2004 (279):30060-30065.

Pischon N, Babakhanlou-Chase H, Darbois L, Ho WB, Brenner MC, Kessler E, et al. A Procollagen C-proteinase inhibitor diminishes collagen and lysyl oxidase processing but not collagen cross-linking in osteoblastic cultures. *J Cell Physiol* 2005a (203):111-117.

Pischon N, Heng N, Bernimoulin JP, Kleber BM, Willich SN, Pischon T. Obesity, inflammation, and periodontal disease. *J Dent Res* 2007 (86):400-9.

Pischon N, Pischon T, Kröger J, Gulmez E, Kleber BM, Bernimoulin JP, et al. Association among rheumatoid arthritis, oral hygiene, and periodontitis. *J Periodontol* 2008 (79):979-986.

Prockop D, Kivirikko K. Collagens: molecular biology, diseases, and potentials for therapy. *Ann Rev Biochem* 1995 (64):403-434.

Puxkandl R, Zizak I, Paris O, Keckes J, Tesch W, Bernstorff S, et al. Viscoelastic properties of collagen: synchrotron radiation investigations and structural model. *Phil Trans R Soc Lond B* 2002 (357):191-197.

Rattenholl A, Pappano W, Koch M, Keene D, Kadler K, Sasaki T, et al. Proteinases of the BMP-1 family convert procollagen VII to mature anchoring fibril collagen. *J Cell Biol* 2002 (277):26372-26378.

Ren C, Yang G, Timme TL, Wheeler TM, Thompson TC. Reduced lysyl oxidase messenger RNA levels in experimental and human prostate cancer. *Cancer Res* 1998 (58):1285-1290.

Saito H, Papaconstantinou J, Sato H, Goldstein A. Regulation of a novel gene encoding a lysyl oxidase-related protein in cellular adhesion and senescence. *J Biol Chem* 1997 (272):8157-8160.

Selye H. Lathyrism. *Revue Canadienne de Biologie* 1957 (16):3-82.

Shichiri M, Hirata Y. Antiangiogenesis signals by endostatin. *FASEB* 2001 (15):1044-1053.

Shim H, Harris ZL. Genetic defects in copper metabolism. *J Nutr* 2003 (133):1527S-1531S.

Stein G, Lian J, Stein J, Van Wijnen J, Montecino M. Transcriptional control of osteoblast growth and differentiation. *Physiol Rev* 1996 (76):593-629.

Suzuki N, Labosky PA, Furuta Y, Hargett L, Dunn R, Fogo AB, et al. Failure of ventral body wall closure in mouse embryos lacking a procollagen C-proteinase encoded by BMP-1, a mammalian gene related to *Drosophila* tolloid. *Development* 1996 (122):3587-3595.

Trackman P, Bedell-Hogan D, Tang J, Kagan H. Post-translational glycosylation and proteolytic processing of a lysyl oxidase precursor. *J Biol Chem* 1992 (267):8666-8671.

Trackman P. Diverse biological functions of extracellular collagen processing enzymes. *J Cell Biochem* 2005 (96):927-937.

Turecek C, Fratzl-Zelman N, Rumpler M, Buchinger B, Spitzer S, Zoehrer R, et al. Collagen cross-linking influences osteoblastic differentiation. *Calcif Tissue Int* 2008 (82):392-400.

Uzel M, Scott I, Babakhanlou-Chase H, Palamakumbura A, Pappano W, Hong H, et al. Multiple bone morphogenic protein-1 related mammal metalloproteinases process pro-lysyl oxidase at the correct physiological site and control lysyl oxidase activation in mouse embryo fibroblast cultures. *J Biol Chem* 2001 (276):22537-22543.

Van der Rest M, Rosenberg L, Olsen B, Poole A. Chondrocalcin is identical with the C-propeptide of type II procollagen. *J Biochem* 1986 (237):923-925.

Van der Slot AJ, Zuurmond A-M, Van den Bogaerd AJ, Ulrich MMW, Middelkoop E, Boers W, et al. Increased formation of pyridinoline cross-links due to higher telopeptide lysyl hydroxylase levels is a general fibrotic phenomenon. *Matrix Biology* 2004 (23):251-257.

Wakasaki H, Ooshima A. Immunohistochemical localization of lysyl oxidase with monoclonal antibodies. *Lab Invest* 1990 (63):377-384.

Wassen MHM, Lammens J, Tekoppele JM, Sackers RJB, Liu Z, Verbout AJ, et al. Collagen structure regulates fibril mineralization in osteogenesis as revealed by cross-link patterns in calcifying callus. *J Bone Miner Res* 2000 (15):1176.

Weston S, Hulmes D, Mould A, Watson R, Humphries M. Identification of integrin alpha 2 beta 1 as cell surface receptor for the carboxyl-terminal propeptide of type I procollagen. *J Biol Chem* 1994 (269):20982-20986.

Yamauchi M, Katz EP. The post-translational chemistry and molecular packing of mineralizing tendon collagens. *Connect Tissue Res* 1993 (29):81-98.

Yamauchi M (1996). Collagen: The major matrix molecule in mineralized tissues. In: Calcium and phosphorus in health and disease. JJB Anderson and SC Garner editors. New York: CRC Press, pp. 127-141.

9. Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei meinem Mentor Herrn Professor Dr. Dr. Jean-Pierre Bernimoulin, ehemaliger Leiter der Abteilung für Parodontologie und Synoptische Zahnmedizin, Medizinische Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin, bedanken, der die Erstellung der Habilitation durch seine langjährige Unterstützung und Förderung ermöglicht hat. Sein fundiertes und motivierendes Engagement hat wesentlich zu meinem beruflichen und zu meinem persönlichen Werdegang beigetragen.

Herrn Professor Dr. Bernd-Michael Kleber, ehemaliger kommissarischer Leiter der Abteilung für Parodontologie und Synoptische Zahnmedizin, Medizinische Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin möchte ich für die freundliche Unterstützung bei der Weiterführung meiner Habilitation sehr danken.

Herrn Professor Dr. Andrej Kielbassa, Leiter der Abteilung Zahnerhaltungskunde und Parodontologie, Medizinische Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin möchte ich für die Unterstützung bei der Weiterführung und Fertigstellung der Habilitation herzlich danken.

Mein großer Dank gilt Herrn Professor Dr. Ralf Radlanski, Leiter der Abteilung Orale Strukturbiologie, Medizinische Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin, der mich stets unkompliziert und mit neuen Ideen bei meiner Arbeit in den letzten Jahren sehr unterstützt hat.

Gleichzeitig möchte ich mich bei Herrn Professor Philip Trackman, Abteilung für Orale iologie und Parodontologie, Boston Universität, USA für die langjährige Kooperation und wissenschaftlichen Diskussionen und Anregungen herzlich bedanken.

Bedanken möchte ich mich ferner bei meinen Doktoranden sowie allen Kooperationspartnern und Koautoren, die die Durchführung der hier beschriebenen Forschungsprojekte unterstützt haben.

Ich möchte mich besonders bei meinem Mann, PD Dr. Tobias Pischon, und unseren Kindern sowie meiner Familie für die Geduld und den Rückhalt bei dem Erstellen dieser Arbeit bedanken.

Erklärung

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde.
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden.
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.