

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Klinik für Unfallchirurgie
des Klinikums rechts der Isar

**Warum manche Patienten nicht auf eine BMP2 oder
BMP7 Therapie ansprechen:
mögliche Inhibierung der Signalkaskade durch die TGF- β -
bedingte Aktivierung von Histondeacetylasen via SnoN**

Jian Zhao

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigter Dissertation

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E.J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Andreas K. Nüssler,
Eberhard-Karls- Universität Tübingen
2. Univ.-Prof. Dr. Peter. Biberthaler

Die Dissertation wurde am 10.01.2013 bei der Technischen Universität
München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 17.07.2013
angenommen

Gewidmet meinen lieben Eltern Qinglin Zhao und Yibing Tang

Abstract

Bone Morphogenic Proteins (BMPs) play a key role in bone formation. Thus, topical application of recombinant human (rh) BMP 2 or BMP 7 could significantly improve critical fracture healing. However, 22 to 36 % of the patients, often with chronic inflammation, do not respond to this kind of therapy. There are hints that the resulting systemic increase in Transforming Growth Factor (TGF) β might be responsible for this effect. Therefore, the aims of this project are to analyze the influence of TGF- β on BMP-signaling in human osteoblasts and to identify possible regulatory mechanisms. Primary osteoblasts were isolated from femur heads of patients undergoing total hip replacement. The patients' informed consent forms and the decision of the ethics commission are available. The activation of the Smad 1-dependent signal transduction was determined through the use of an adenoviral reporter assay (Ad 5-BRE-Luc). Furthermore, the expression of proteins involved in the signaling (Smad 1, -4, -5, -8, TGF- β Receptors I and II) and their regulators (e.g. Smad 6, -7, Noggin, Sklerostin, Bambi, Ski, SnoN, Smurf I and II) on the level of mRNA and proteins was analyzed by RT-PCR and Western blot. The Histone-deacetylase (HDAC) activity was determined by a fluorescence-based assay.

The application of 5 ng/ml rhTGF- β completely blocks the signal transduction of the tenfold amount of rhBMP 2 or rhBMP 7. This was accompanied by a reduced expression of TGF- β -R I and TGF- β -R II, so that less BMPs were able to bind to the osteoblasts. At the same time, expression of SnoN, known to recruit HDACs, was increased. The measurement of the HDAC activity confirmed its increase in osteoblasts after the treatment with TGF- β , which could influence the BMP-signaling at the transcription-level. The addition of the HDAC inhibitor valproic acid completely abolished the TGF- β -dependent inhibition of the BMP-signaling.

Our results show that already a small amount of TGF- β effectively blocks the BMP-signaling in osteoblasts. As a possible mechanism we postulate an increase of SnoN, which, by increasing the HDAC activity, reduces the expression of the receptors that are mandatory for the signaling. Thus, an analysis of the patients' TGF- β -serum-levels might provide reliable information in order to make a prediction on the fracture healing of patients receiving rhBMP 2 or rhBMP 7 therapy.

Zusammenfassung

Bone Morphogenic Proteins (BMPs) spielen beim Knochenaufbau eine entscheidende Rolle. So konnte durch die topische Applikation von rekombinanten humanen (rh) BMP 2 oder BMP 7 die Frakturheilung bei Patienten signifikant verbessert werden. Allerdings sprechen 22 bis 36 % der Patienten, die häufig an chronischen Entzündungen leiden, auf diese Art der Therapie nicht an. Es gibt Hinweise darauf, dass der damit verbundene systemische Anstieg von Transforming Growth Factor (TGF)- β für dieses Versagen der Therapie verantwortlich sein könnte. Die Ziele dieser Arbeit sind deshalb die Untersuchung des Einflusses von TGF- β auf das BMP-Signaling sowie die Identifizierung möglicher Regulationsmechanismen. Humane Osteoblasten wurden aus Femurköpfen von Patienten, welche eine Femurkopfprothese erhalten haben, isoliert. Die Einverständniserklärungen der Patienten sowie ein Ethikvotum liegen vor. Die Aktivierung der Smad 1-abhängigen Signaltransduktion von rhBMP 2 oder rhBMP 7 wurden mittels eines adenoviralen Reporterassays (Ad 5-BRE-Luc) bestimmt. Darüber hinaus wurde die Expression der am Signaling beteiligten Proteine (Smad 1, -4, -5, -8, TGF- β Rezeptoren I und II) und ihrer Regulatoren (z.B. Smad 6, -7, Noggin, Sklerostin, Bambi, Ski, SnoN, Smurf I und II) auf mRNA- und Proteinebene bestimmt. Die densitometrische Auswertung erfolgte mittels computergestützter Software (ImageJ).

Die Gabe von 5 ng/ml rhTGF- β konnte die Signaltransduktion der zehnfachen Menge von rhBMP 2 oder rhBMP 7 vollständig inhibieren. Diese Inhibierung ging einher mit einer verminderten Expression der TGF- β Rezeptoren I (Alk 1) und II, wodurch weniger BMP 2 oder BMP 7 an die Osteoblasten binden und ihr Signal übermitteln können. Gleichzeitig wurde das regulatorische Protein SnoN verstärkt exprimiert. Die Expression weiterer regulatorischer Proteine wurde allerdings nicht durch die Anwesenheit von TGF- β beeinflusst. SnoN ist dafür bekannt, die Aktivität der Histon-Deacetylasen (HDAC) zu induzieren und könnte somit auf der Transkriptionsebene das BMP-Signaling beeinflussen. Die Gabe des HDAC-Inhibitors Valproinsäure konnte die TGF- β -bedingte Inhibierung des BMP-Signalings vollständig aufheben.

Somit zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass bereits eine geringe Menge TGF- β das BMP-Signaling in Osteoblasten effektiv verhindern kann. Als möglicher Mechanismus wird SnoN postuliert, welches durch eine vermehrte HDAC-Aktivität die Expression der für das Signaling benötigten Rezeptoren reduziert. Somit könnte die Analyse des TGF- β -Serumwerte

der Patienten eine zuverlässige Vorhersage für die Therapie mit rhBMP 2 oder rhBMP 7 liefern.

Abkürzungsverzeichnis

°C.....	Grad Celsius
%.....	Prozent
µl.....	Mikroliter
µm.....	Mikrometer
µg.....	Mikrogramm
µM.....	Mikromolar
ActR	Activin-Rezeptor
Ad 5-BRE-Luc	Adenovirus 5- BMP Response Element-Luciferase
Alk.....	Activine-like kinase
ALP	Alkalische Phosphatase
AMH.....	Anti-Müllerian hormone
APS.....	Ammonium Persulfate
Bambi	BMP and activin bound protein
BMP	Bone Morphogenic Protein
BMPR.....	BMP-Rezeptor
BRE.....	Bone Morphogenic Protein Response Element
BSA	bovines Serumalbumin
caAlk 5	constitutive active alkaline-like kinase 5
CAPS.....	N-cyclohexyl-3-aminopropanesulfonic acid
Cat-No	Katalognummer
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cm ²	Quadratcentimeter
Co-Smad.....	Common partner Smad

CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CT.....	Computertomographie
D.....	Day
Da.....	Dalton
DEPC.....	Diethylpyrocarbonate
ddH ₂ O.....	destilliertes Wasser
DMSO.....	Dimethylsulfoxid
DNA.....	Desoxyribonukleinsäure
dNTP.....	Desoxynukleotidtriphosphat
DOC.....	Deoxycholic Acid
EDTA.....	Ethylendiamintetraacetat
ECL.....	Elektrochemiluminescence
Erk.....	extracellular-signal-regulated kinase
FCS.....	Fetales Kälberserum
g.....	Gramm
g.....	Vielfaches der Erdanziehungskraft
GABA.....	γ-Aminobuttersäure
GDF.....	Growth and differentiation hormone
h.....	Stunde
H ₂ O.....	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HDAC.....	Histone Deacetylase-Complex
HRP.....	horseradish peroxidase
I-Smad.....	Inhibitory Smad
JNK.....	c-Jun N-terminale Kinase
kDa.....	kilodalton
L.....	Liter

MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MEM	Minimum Essential Medium
Mg	Magnesium
mg	Milligramm
min.....	Minute
MIS	Müllerianinhibiting substance
ml.....	Milliliter
mM	Millimolar
MRI	Klinikum München Rechts der Isar
MRT	Magnetresonanztomographie
MSC	mesenchymale Stammzelle
N-CoR	nuclear receptor corepressor
NFATc.....	nuclear factor of activated T-cells
ng.....	Nanogramm
nm.....	Nanometer
NP 40.....	Nonidet P 40
ns	nicht signifikant
NSAID.....	Nichtsteroidales Antirheumatikum
OC	Osteocalcin
OSCAR.....	osteoclast-associated receptor
OSS.....	Osteoblastenkultur aus Spongiosafragmenten
OSÜ.....	Osteoblastenkultur aus Kollagenaseüberstand
OP.....	Osteogenic protein-1
PAVK	Periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS.....	Phosphatgepufferte Salzlösung
PDGF.....	Platelet-derived growth factor
pNP.....	4-Nitrophenol

RANKL	Receptor Activator for Nuclear Factor κ B Ligand
rhBMP	rekombinante humane BMP
RIPA	Radio Immuno Precipitation Assay
RLU	relative light unit
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
R-Smad	Regulatory Smad
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse transkriptase Polymerasekettenreaktion
RUNX 2	runt-related transcription factor 2
s. o.	siehe oben
s. u.	siehe unten
Sara	Smad anchor for receptor activation
SDS	Sodium Dodecylsulphate
ShcA	src-homology Protein A
Ski	Sloan-klettering retrovirus oncogene homologue
SMA	spinal muscular atrophy
Smad	SMA- and MAD-related proteins
Smurf	Smad-ubiquitin-regulatory factor
SnoN	Ski-related novel protein N
STAT 3	signal transducer and activator of transcription
TAK 1	TGF- β activated kinase-1
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	Tris Buffered Saline
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGF- β	Transforming Groth Factor β
TGF- β R	Transforming Groth Factor β Rezeptor

TGF- β R I.....TGF- β Typ-II-Rezeptor I
TGF- β R II.....TGF- β Typ-II-Rezeptor II
TRISTrishydroxymethyl-aminomethan
UVultraviolett
VVolt

Inhaltsverzeichnis

Abstract	3
Zusammenfassung	4
1 Einleitung	14
1.1 Überblick über Knochenaufbau und Funktion	14
1.1.1 Knochenfunktion	14
1.1.2 Knochenaufbau	14
1.1.3 Knochengrundsubstanz	14
1.1.4 Knochenzellen	15
1.2 Überblick über die Knochenfraktur und den Frakturheilungsprozess	15
1.2.1 Frakturdefinition und Mechanismen	16
1.2.2 Klinische Symptome und Diagnostik	16
1.2.3 Frakturbehandlung	16
1.2.4 Knochenheilungsprozess	17
1.2.5 Knochenheilungsstörung	19
1.3 Die Transforming growth factor-Familie	19
1.3.1 Bone morphogenetic proteins (BMPs)	20
1.3.2 TGF- β - und BMP-Rezeptoren und Signaltransduktion	21
1.4 Regulatorische Proteine im BMP-Signaling	22
1.4.1 Bambi (BMP and activin bound protein)	22
1.4.2 Smad 6/7	23
1.4.3 Smurf 1/2 (Smad-ubiquitin-regulatory factor)	23
1.4.4 Sara (Smad anchor for receptor activation)	23
1.4.5 Ski/SnoN (Sloan-klettering retrovirus oncogene homologue/ Ski-related novel protein N)	24
1.5 TGF- β und BMP-Interaktion mit dem MAPK-Pathway	26
1.6 Zielsetzung	26
2 Material und Methoden	27
2.1 Kulturmedium der Osteoblasten	27
2.1.1 Benötigte Materialien	27
2.1.2 Herstellung des Kulturmediums	28
2.2 Isolierung der primären humanen Osteoblasten	28
2.2.1 Benötigte Materialien	28

2.2.2	Durchführung	29
2.3	Kultivierung der primären humanen Osteoblasten.....	30
2.3.1	Benötigte Materialien	30
2.3.2	Mediumwechsel	30
2.3.3	Passagierung.....	30
2.4	Zählung und Ausplattierung der Zellen.....	31
2.4.1	Benötigte Materialien	31
2.4.2	Durchführung	32
2.5	Proteinmessung mit Lowry-Test	32
2.5.1	Benötigte Materialien	32
2.5.2	Standardkurve.....	33
2.5.3	Durchführung	33
2.5.4	Auswertung	33
2.6	Proteinisolation mit RIPA- (Radio Immuno Precipitation assays) Buffer.....	34
2.6.1	Benötigte Materialien	34
2.6.2	Herstellung der RIPA-Lösung.....	35
2.6.3	Durchführung	35
2.7	Infizierung der Osteoblasten mit einem Adeno-Virus	35
2.7.1	Benötigte Materialien	35
2.7.2	Herstellung von Viruspartikeln	36
2.7.3	Ad 5-BRE-LUC.....	36
2.7.4	Infizierung der Osteoblasten	36
2.8	Luciferase-Assay	37
2.8.1	Benötigte Materialien	37
2.8.2	Durchführung	37
2.9	Western Blot.....	38
2.9.1	Benötigte Materialien	38
2.9.2	Lösungen	39
2.9.3	Liste der Antikörper	41
2.9.4	Durchführung	42
2.9.5	Densitometrische Analyse der Western Blot Ergebnis	47
2.10	RNA-Isolation mit Trifast	47
2.10.1	Benötigte Materialien	47

2.10.2	Lösungen	48
2.10.3	Durchführung der RNA-Isolation	48
2.11	cDNA Synthese	50
2.11.1	Benötigte Materialien	50
2.11.2	Durchführung	50
2.12	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	52
2.12.1	Benötigte Materialien	52
2.12.2	Reaktionsmechanismus	52
2.12.3	Verwendete Primer	52
2.12.4	Durchführung	54
2.12.5	Densitometrische Analyse der PCR Gele.....	56
2.13	Viabilitätsmessung mit Alamar-Blue	56
2.13.1	Benötigte Materialien	56
2.13.2	Durchführung	56
2.13.3	Auswertung	56
2.14	Messung der Histon deacetylase complex (HDAC)-Aktivität-Messung	56
2.14.1	Benötigte Materialien	57
2.14.2	Lösungen	57
2.14.3	Reaktionsmechanismus	58
2.14.4	Durchführung	58
2.14.5	Datenanalyse	58
2.15	Statistische Auswertung	59
3	Ergebnisse	59
3.1	BMP 2 und BMP 7 aktivieren den Smad 1/5/8-Signalweg in humanen Osteoblasten und dieser Effekt ist bei beiden Proteinen nach 72 h statistisch signifikant.....	59
3.2	PCR-Analyse von mit BMP 2, BMP 7 und TGF- β_1 stimulierten Zellen.....	60
3.2.1	Ergebnis Gen-Expression Smad 1	61
3.2.2	Ergebnis Gen-Expression Smad 2	62
3.2.3	Ergebnis Gen Expression Smad 3	63
3.2.4	Ergebnis Gen-Expression Smad 4	64
3.2.5	Ergebnis Gen-Expression Smad 5	65
3.2.6	Ergebnis Gen-Expression Smad 6	66
3.2.7	Ergebnis Gen-Expression Smad 7	67
3.2.8	Ergebnis Gen-Expression ALK-1	68

3.2.9	Ergebnis Gen-Expression ALK-2	69
3.2.10	Ergebnis Gen-Expression ALK-3	70
3.2.11	Ergebnis Gen-Expression ALK-5	71
3.2.12	Ergebnis Gen-Expression ALK-6	72
3.2.13	Ergebnis Gen-Expression TGF- β Rezeptor II.....	73
3.2.14	Ergebnis Gen-Expression Bambi	74
3.2.15	Ergebnis Gen-Expression Sara.....	75
3.2.16	Ergebnis Gen-Expression Smurf 1	76
3.2.17	Ergebnis Gen-Expression Smurf 2.....	77
3.2.18	Ergebnis Gen-Expression Ski.....	78
3.2.19	Ergebnis Gen-Expression SnoN.....	79
3.3	Western Blot-Analyse der mit BMP 2, BMP 7 und TGF- β_1 stimulierten Zellen	80
3.3.1	Ergebnis Proteinexpression p-Smad 1/5/8 (phospho-Smad 1/5/8)	81
3.3.2	Ergebnis Proteinexpression p-p 42/44 (phospho-p 42/44).....	82
3.3.3	Ergebnis Proteinexpression p-p 38 (phospho-p 38)	83
3.3.4	Ergebnis Proteinexpression TGF- β -R (TGF- β Rezeptor).....	84
3.3.5	Ergebnis Proteinexpression SnoN.....	85
3.4	Valproinsäure in einer Höchstkonzentration von 200 μ M zeigt keine Toxizität in Osteoblasten.....	85
3.5	Die Aktivierung des Smad 1/5/8 Signalings wird durch TGF- β_1 inhibiert, aber dieser Effekt wird von der Valproinsäure beseitigt.....	86
3.6	Die HDAC-Aktivität wird durch die Stimulation mit TGF- β_1 hochreguliert und durch dieValproinsäure inhibiert	88
3.7	Western Blot-Analyse mit Langzeitpräsenz von TGF- β_1 (4 Tage, 8 Tage, 12 Tage, 16 Tage).....	89
4	Diskussion.....	92
5	Ausblick	103
6	Abbildungsverzeichnis.....	104
7	Tabellenverzeichnis	107
8	Literaturverzeichnis	108
9	Lebenslauf.....	118
10	Danksagung.....	120

1 Einleitung

1.1 Überblick über Knochenaufbau und Funktion

1.1.1 Knochenfunktion

Das Knochengewebe ist eines der härtesten Gewebe des menschlichen Organismus [1, S. 198]. Zusammen mit dem Knorpelgewebe bildet der Knochen den Stützapparat des Körpers [2, S. 46]. Außerdem dienen der Schädelknochen und die Wirbelkörper zum Schutz des zentralen Nervensystems, während das knöcherne Becken und der Thorax die inneren Organe schützen. Gleichzeitig ist der Knochen der Hauptspeicherort für Kalzium (99 %) und ab der Geburt spielt der Knochen eine wichtige Rolle bei der Blutneubildung [1, S. 198].

1.1.2 Knochenaufbau

Die Außenfläche und die innere Oberfläche der Knochen werden als Periost beziehungsweise als Endost bezeichnet. Das Periost besteht aus einem äußeren, mit Blutgefäßen und Nerven versorgten, Stratum fibrosum und einem inneren Stratum osteogenicum. Das Endost grenzt diese Kanäle vom Knochen ab [3, S. 49].

Zwischen Endost und Periost befindet sich das Knochengewebe. Makroskopisch kann man die Spongiosa (Knochenbälkchen) und die Kortikalis (Kompakta) unterscheiden [3, S. 49]. Die Spongiosa liegt in der Nähe der Gelenkfläche. Die Struktur der Spongiosa entspricht der Verteilung der Kräfte, die durch den Knochen geleitet werden, weshalb die Belastung der Knochen besser verteilt ist. Im Gegensatz dazu, liegt die Kortikalis gelenkfern und verfügt über einen hohen Verdichtungsgrad [4, S. 133]. Beide Strukturen sind für die große Druck-, Zug-, Biege- und Verdrehungsfestigkeit unserer Knochen verantwortlich [3, S. 49].

Die beiden wichtigsten Bestandteile des Knochens sind die Knochengrundsubstanz und die Knochenzellen [3, S. 49].

1.1.3 Knochengrundsubstanz

Die menschliche Knochengrundsubstanz setzt sich zusammen aus der organischen und der anorganischen Matrix. Die anorganische Matrix besteht hauptsächlich aus

Hydroxylapatit und Mineralien. Hydroxylapatit ist ein Komplexsalz, das aus Kalzium (35 %), Phosphat (50 %), Karbonaten (7 %) und weiteren Mineralien besteht. Die organische Substanz kann in ungeformte und geformte Komponenten unterteilt werden: die Hauptbestandteile der ungeformten Komponenten sind Proteoglykane und adhäsive Glykoproteine. Die Glykoproteine bestehen unter anderem aus Osteokalzin, Osteonektin und Osteopontin. Die geformte Komponente wird hauptsächlich aus Kollagen-I-Fasern gebildet [5, S. 50].

1.1.4 Knochenzellen

Es gibt insgesamt 4 Klassen von Zellen in den menschlichen Knochen.

- Die Progenitorzellen sind mesenchymale Stammzellen mit einem hohen Differenzierungspotenzial. Sie befinden sich während des gesamten Lebens im Periost und im Endost [5, S. 50].

- Die Osteoblasten befinden sich hauptsächlich auf der Knochenoberfläche. Ihr Aussehen ist meist epithelartig, kubisch und apiko-basal. Sie bilden und sezernieren die Sekrete der organischen Knochengrundsubstanzen. In den Zellen gibt es zahlreiche raue endoplasmatische Retikulare und viele Golgi-Felder, die außerdem an der Proteinsynthese beteiligt sind, weshalb die Osteoblasten das Auf- und Umbauzentrum für das Knochengewebe darstellen [5, S. 50].

- Die Osteozyten sind enddifferenzierte Osteoblasten. Sie liegen in den Knochenhöhlen und sind von der Knochensubstanz umgeben. Die Osteozyten verfügen über zahlreiche Fortsätze, die in die Knochenhöhle laufen und durch Gap-Junction miteinander verbunden sind. Die Osteozyten sind auch für den Erhalt der Knochengrundsubstanzen verantwortlich [5, S. 50].

- Die Osteoklasten sind vielkernige Riesenzellen, die sich aus der Fusion eingewanderter Monozyten bilden. Sie befinden sich in den Howship-Lakunen. Durch ihr hohes Gehalt an Mitochondrien und Lysosomen bauen sie die Knochenmatrix ab [5, S. 50].

1.2 Überblick über die Knochenfraktur und den Frakturheilungsprozess

1.2.1 Frakturdefinition und Mechanismen

Eine Knochenfraktur ist eine Kontinuitätsunterbrechung des Knochens durch eine Belastung, die über seine Elastizitätsgrenze hinausgeht. Die Frakturen lassen sich aufgrund ihres Entstehungsmechanismus in die vier folgenden Arten unterteilen: Direkte Frakturen, indirekte Frakturen, pathologische Frakturen und Ermüdungsfrakturen. Direkte Frakturen werden durch eine äußere Gewalteinwirkung hervorgerufen, und der Knochen bricht direkt an der Stelle, auf die diese Kraft einwirkt. Indirekte Frakturen werden durch eine Drehung, eine Biegung, eine Stauchung oder einen Abriss verursacht. Die Knochenbruchstelle befindet sich nicht am Ort der Gewalteinwirkung, sondern in gewisser Entfernung zu dieser. Pathologische Frakturen werden ohne adäquates Trauma (z .B. nur durch geringe äußere Gewalt) im pathologischen, abgeschwächten Knochen ausgelöst (z.B. Osteoporose, lokale Knochentumore oder Metastasen). Ermüdungsfrakturen entstehen durch eine langfristige am gleichen Ort einwirkende Belastung eines Knochens [6, S. 288-289].

1.2.2 Klinische Symptome und Diagnostik

Die Symptome einer Fraktur hängen von der Frakturstelle und dem Frakturmechanismus ab. Klinisch wird zwischen den sicheren und den unsicheren Frakturzeichen unterschieden. Zu den unsicheren Frakturzeichen gehören die sogenannten Entzündungszeichen, wie zum Beispiel Überwärmung, Rötung, Schmerzhaftigkeit, Funktionsverlust und eventuell auch Hämatombildung. Zu den sicheren Frakturzeichen gehören die Dislokation wie zum Beispiel eine Achsenfehlstellung, abnorme Beweglichkeit, ein Knirschen der Bruchstelle und erkennbare Knochenfragmente bei offenen Frakturen. Beim Vorliegen der unsicheren Frakturzeichen kann eine Röntgenuntersuchung der betroffenen Extremität und der benachbarten Gelenke auf 2 Ebenen (a.p. und seitlich) durchgeführt werden. Beim Vorliegen sicherer Frakturzeichen sollte hingegen auf jeden Fall eine Röntgenuntersuchung durchgeführt werden. Wenn unsichere Frakturzeichen vorliegen, oder eine spezifische Fragestellung über den OP-Plan beantwortet werden soll, sollte eine CT-Untersuchung durchgeführt werden. Weichteilverletzungen, die durch eine Fraktur entstanden sind, können ganz gut mit Hilfe einer MRT-Untersuchung dargestellt werden [6, S. 294-295].

1.2.3 Frakturbehandlung

Das Ziel der Frakturbehandlung ist die möglichst schnelle Wiederherstellung der Knochenkontinuität und der Knochenfunktion, sowie der Gelenkbeweglichkeit. Die drei Grundprinzipien der Frakturbehandlung sind die Reposition, die Retention und die Rehabilitation.

- Die Reposition bezeichnet die Wiederherstellung der korrekten anatomischen Struktur des Knochens. Um dieses Ziel zu erreichen, werden viele verschiedene Methoden verwendet, die alle nach dem Zug- bzw. dem Gegenzugprinzip funktionieren. Nach jeder Reposition müssen die Durchblutung, die Sensibilität und die Motorik der betroffenen Extremitäten kontrolliert und eine Röntgenaufnahme gemacht werden.

- Das Hauptziel der Retention ist die möglichst schmerzfreie Ruhigstellung des repositionierten Knochens, um den Knochenheilungsprozess überhaupt erst zu ermöglichen. Die Retention wird beibehalten, bis die Knochenbruchlinien verschwunden sind, was mindestens ungefähr 4- 6 Wochen dauert. Wenn der Knochen zu lange ruhig gestellt wird, besteht die Gefahr einer eingeschränkten Beweglichkeit der benachbarten Gelenke. Deswegen wird der Knochen durch operative Retention möglichst schnell stabilisiert, damit die Rehabilitation zu einem möglichst frühen Zeitpunkt begonnen werden kann.

- Die Rehabilitation bezeichnet die Wiederherstellung der Gelenkbeweglichkeit und der Knochenfunktion durch verschiedene Nachbehandlungsmaßnahmen. Am Ende der Rehabilitation müssen die betroffenen Knochen und Gelenke unter Bewegung und unter Belastung wieder stabil sein [6, S. 296-297].

1.2.4 Knochenheilungsprozess

Selbst in gesunden Knochen findet ständig ein Knochenumbau statt: Die Osteoblasten bilden neue Knochensubstanzen und Knochenzellen, während die Osteoklasten sie wieder abbauen. Dieser Vorgang ist im gebrochenen Knochen besonders ausgeprägt. Durch zahlreiche Induktoren werden die Osteoblasten und die Osteoklasten aktiviert, um die Knochenheilung zu beschleunigen. Es gibt drei zentrale Grundsätze, die bei der Behandlung von Knochenbrüchen befolgt werden müssen: erstens muss jederzeit eine ungestörte Durchblutung der gebrochenen Knochen gewährleistet sein, zweitens muss eine adäquate Reposition und Ruhigstellung der Fraktur durchgeführt werden, und drittens

muss ein ausreichender Kontakt der einzelnen Knochenfragmente hergestellt werden [6, S. 295].

Verschiedene Induktoren können die Knochenheilung fördern: bis zum heutigen Tage wurden bereits zahlreiche Wachstumsfaktoren, Matrixproteine (z.B. Osteocalcin, Osteogenin, Bone Morphogenetic Proteins (BMPs)) und Interleukine entdeckt, die diese Funktion erfüllen. Innerhalb dieser Vielzahl von Faktoren spielen die BMPs eine zentrale Rolle [6, S. 295], denn sie werden heutzutage klinisch auf Frakturebene angewendet, um die Knochenheilung zu verbessern [7].

Nach einer Frakturen werden insgesamt 2 Arten der Knochenheilung beobachtet .

Die direkte Knochenheilung: Bei einem engen Kontakt der einzelnen Fragmente und bei guter Durchblutung heilt der Knochen ohne Kallusbildung. Wenn zwei Knochenfragmente eng miteinander verbunden sind, wandern die Osteone von einem Fragment zum anderen und induzieren eine ausreichende Frakturheilung. Durch verschiedene Zytokine im Blut werden die Osteoblasten und Osteoklasten aktiviert, um diesen Vorgang zu beschleunigen [6, S. 295].

Die indirekte Knochenheilung: In diesem Prozess verläuft die Knochenheilung durch Kallusbildung. Man kann diese Kallusbildung in vier Phasen unterteilen: (Abbildung 2)

1. Initiale Verletzungsphase: An der Frakturstelle entsteht ein Hämatom (Abbildung 2a).
2. Entzündungsphase (3 - 14 Tage): Im Hämatom vollzieht sich eine Entzündungsreaktion zu der zahlreiche Fibroblasten wandern und wo sich der bindegewebeartige Kallus herausbildet (Abbildung 2b).
3. Phase der Kallushärtung (einige Wochen bis mehrere Monate): Die Fibroblasten differenzieren sich zu Knochengewebe, aus dem der knöcherne Kallus entsteht (Abbildung 2c).
4. Remodelling-Phase (1 - 2 Jahre): In dieser Phase bildet sich die richtige Knochenstruktur auf der Frakturebene aus, Die Gefäßversorgung wird hergestellt, und der überschüssige Kallus wird abgebaut [6, S. 295] (Abbildung 2d).

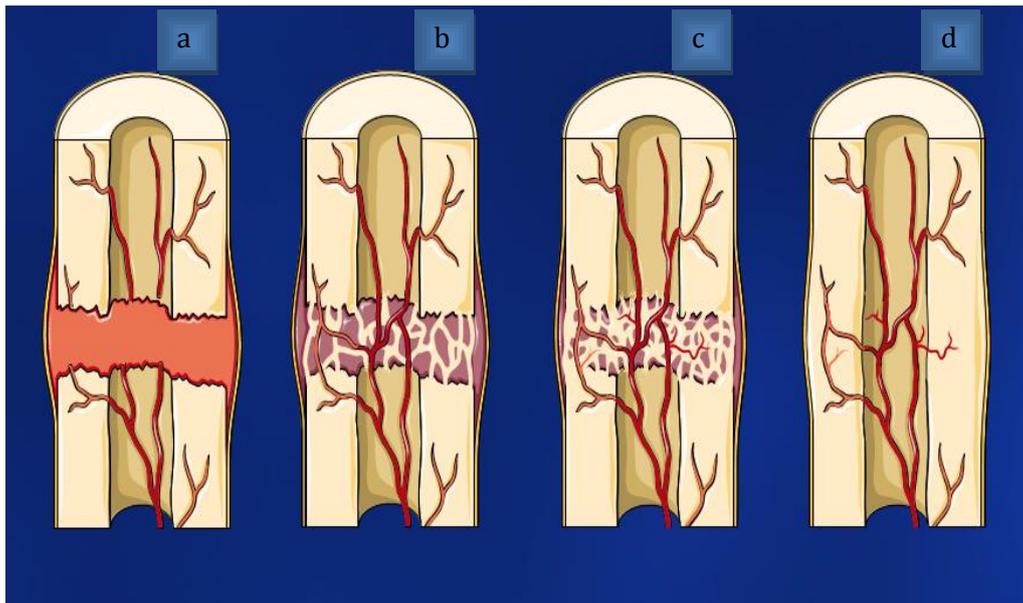


Abbildung 1: Indirekte Knochenheilung (Quelle: www.servier.de/medicalart)

1.2.5 Knochenheilungsstörung

Wenn die weiter oben erwähnten drei zentralen Voraussetzungen (gute Durchblutung, Reposition und Kontakt) nicht erfüllt sind, wird die Geschwindigkeit der Knochenheilung entscheidend beeinträchtigt. Während die schlechte Reposition der Fraktur und ein nicht ausreichender Kontakt der verschiedenen Knochenfragmente untereinander mechanische Ursachen sind, zählt die mangelhafte Blutversorgung zu den biologischen Ursachen. Durch viele Grunderkrankungen (z.B. Leberzirrhose, Diabetes mellitus, Arteriosklerose, PAVK), schwere Weichteil- oder Blutgefäßverletzungen oder durch Infektionen wird die Blutversorgung beeinträchtigt. Außerdem spielen die Einnahme bestimmter Medikamente (Steroide, NSAID) sowie der Nikotin- und/oder Alkoholabusus eine wichtige Rolle für die Geschwindigkeit der Knochenheilung. All diese Faktoren führen zu einer inadäquaten Ausschüttung von Zytokinen, die die Knochenheilung beeinflussen. Die Störungen der Knochenheilung lassen sich in delayed-union und non-union unterteilen: Als delayed-union wird die verspätete Knochenheilung nach 6 Monaten, als non-union, oder auch Pseudoarthrose, die fehlende Knochenverbindung nach 6 Monaten, bezeichnet. Darüber hinaus wird zwischen hypertropher und atropher Pseudoarthrose unterschieden [8, S. 306-307]. Im klinischen Alltag werden häufig bei einer Tibiapseudoarthrose BMPs verwendet, um die Knochenheilung zu induzieren [7].

1.3 Die Transforming growth factor-Familie

1.3.1 Bone morphogenetic proteins (BMPs)

Die BMPs gehören zur Transforming growth Factor- β (TGF- β)-Familie. Die TGF- β -Familie besteht aus insgesamt 33 Proteinen, wie z.B. TGF- β s, activins und inhibins, nodal, myostatin und Müllerian-inhibiting substance (MIS) [9, S. 29-43]. Mehr als 12 dieser 33 Proteine gehören zu den BMPs. Die BMPs können ihrerseits wiederum in verschiedene Untergruppen unterteilt werden: Zu nennen wären an dieser Stelle die BMP 2/4-Gruppe, die BMP 5/6/7/8-Gruppe (OP-1 [Osteogenic protein-1] Gruppe), die growth and differentiation factor (GDF-5/6/9) -Gruppe sowie die BMP 9/10-Gruppe [9, S. 29-43, 10]. Fast alle genannten Proteine induzieren die Formation von Knochen- und Knorpelgewebe. Allerdings stimuliert die GDF-5/6/9-Gruppe das knorpel- oder tendon-ähnliche Gewebe, nicht jedoch das Knorpelgewebe. Innerhalb der verschiedenen BMPs und GDFs induzieren BMP 2, BMP 6 und BMP 9 die höchste Aktivität der alkalischen Phosphatase sowie die höchste Expression von Osteocalcin in Osteoblasten (C3H10 T $\frac{1}{2}$ cells) [11].

Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) wurden aufgrund ihrer endochondralen Knochenformation entdeckt [12]. Während des Embryonalstadiums kontrollieren die BMPs die Neurogenese und die Hämatopoiese und lösen die Formation des Somits aus [13]. Nach der Geburt spielen die BMPs eine wichtige Rolle bei der Herstellung von TGF- β .

Transforming growth factor- β (TGF- β) ist ein Protein, das die Zellproliferation und -differenzierung kontrolliert [14]. Aufgrund dieser Funktion spielt es eine wichtige Rolle bei Tumorerkrankungen [14], Lebererkrankungen, Herzerkrankungen [15] und Diabetes [16]. TGF- β ist ein sekretorisches Protein und besitzt drei Isoforme (TGF- β_1 , TGF- β_2 und TGF- β_3). Die TGF- β s gehören somit zur Transforming growth factor- β -Familie.

TGF- β ist zurzeit das Zytokin mit der höchsten Konzentration (200 $\mu\text{g}/\text{kg}$) im menschlichen Knochen. Daher spielt es bei der Knochenformation eine zentrale Rolle [17]. Die menschlichen Osteoblasten und Osteoklasten produzieren alle drei TGF- β -Isoforme (TGF- β_1 , TGF- β_2 und TGF- β_3), die in ihrer latenten Form in der Knochenmatrix gespeichert werden [18, 19]. TGF- β wird durch die Versauerung der Osteoklasten in der Resorptionslakuna [20] aktiviert, um die Knochenformation zu induzieren [21]. Allerdings ist TGF- β auch an vielen inflammatorischen Reaktionen

beteiligt: Patienten mit langzeitiger Leberzirrhose weisen eine höhere Konzentration von TGF- β auf [22]. Dieser Effekt wurde auch bei Menschen mit chronischer Niereninsuffizienz und zahlreichen anderen fibrotischen Erkrankungen beobachtet [23, 24]. Von allen drei Isoformen weist TGF- β_1 die stärksten chemotaktischen Effekte auf die humanen Osteoblasten auf [25].

1.3.2 TGF- β - und BMP-Rezeptoren und Signaltransduktion

Es existieren insgesamt 2 Typen von Rezeptoren: Serine/Threonine Kinase Rezeptoren bei der Signaltransduktion von Proteinen aus der TGF- β -Superfamilie, die Typ-I- und die Typ-II-Rezeptoren genannt werden [26]. In Säugetieren sind bisher 5 Typ-II-Rezeptoren und 7 Typ-I-Rezeptoren identifiziert worden. Zu den Typ-II-Rezeptoren gehören die Activin Typ-II-A- und Typ-II-B-Rezeptoren, ActR-II und ActR-IIB, der TGF- β Typ-II-Rezeptor, der BMP Typ-II-Rezeptor und der AMH Typ-II-Rezeptor [27]. Die Typ-II Rezeptoren sind ständig aktive Kinasen, die die Typ-I-Rezeptoren bei der Ligandbindung phosphorylieren können. Die 7 Typ-I-Rezeptoren sind die activin receptor-like kinase (ALK) -1 bis -7. BMPs binden ALK-1, -2, -3, und ALK-6, TGF- β s und Activins binden ALK-4 und ALK-5 [28], und ALK-7 ist zuständig für Signaltransduktion von Nodal [29].

Ligand	TGF- β	BMP	Activin
Typ-II-Rezeptor	TGF- β R-II	BMP R-II, ActR-II, ActR-IIB,	ActR-II, ActR-IIB,
Typ-I-Rezeptor	Alk-5, Alk-4	Alk-1, Alk-2, Alk-3, Alk-6	Alk-5, Alk-4
Phosphorylierte Smads	Smad 2/3	Smad 1/5/8	Smad 2/3

Tabelle 1 : Überblick über die TGF- β - und BMP-Rezeptoren

Die Aktivierung von Typ-II-Rezeptoren führt zu einer Phosphorylierung der Typ-I-Rezeptoren, also der ALKs. ALKs transduzieren die Signale zu Smad-Proteinen im Zytosol. Bis heute wurden 8 Smad-Proteine identifiziert, die in die folgenden drei Klassen eingeteilt werden: Rezeptor-regulatorische Smads (R-Smads), common-partner Smads (Co-Smads), und inhibitorische Smads (I-Smads). Smad 1, Smad 5 und Smad 8 sind R-Smads und werden von den BMPs durch Phosphorylierung aktiviert. Smad 2 und 3 werden von TGF- β und Activin ebenfalls durch Phosphorylierung aktiviert [30]. Smad 4 ist ein Co-Smad beim TGF- β /activin und BMP-Signaling. Smad 6 und 7 sind I-Smads. Smad 6 inhibiert vermehrt das BMP-Signaling, wobei Smad 7 die beiden Signalings

gleichermaßen hemmt. Nach ihrer Aktivierung bilden Smad 1/5/8 und Smad 2/3 zusammen mit Smad 4 Komplexe, die zum Zellkern transportiert werden, um die Zielgenexpression zu regulieren [30]. Die Signal-Kaskade von Smad 1/5/8 und Smad 2/3 kann von mehreren regulatorischen Proteinen durch verschiedene Mechanismen inhibiert oder aktiviert werden. Alle regulatorischen Proteine werden in der folgenden Abbildung dargestellt:

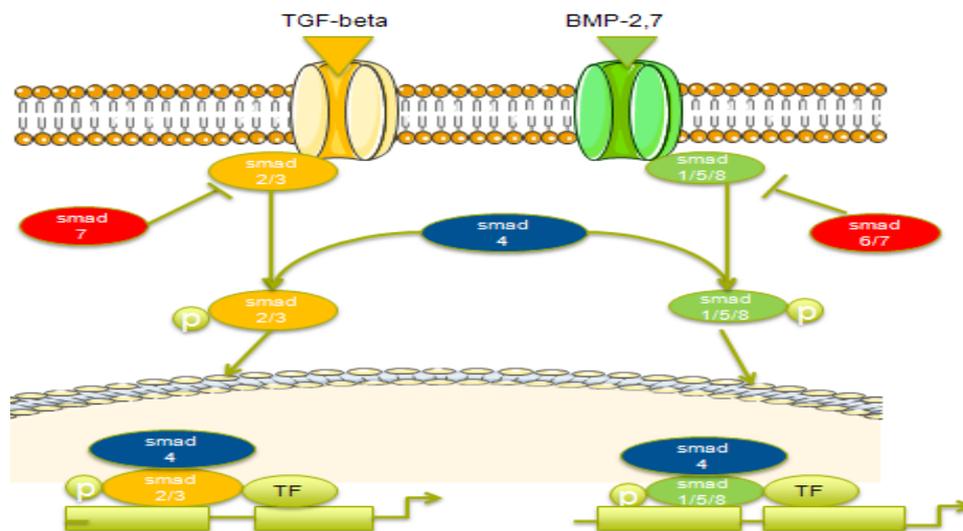


Abbildung 2 : Signaltransduktion von BMP 2,BMP 7 und TGF-β

1.4 Regulatorische Proteine im BMP-Signaling

BMPs werden von vielen strukturell unterschiedlichen Antagonisten und Agonisten reguliert und zahlreiche extrazelluläre und intrazelluläre Faktoren inhibieren die BMP-Aktivität. Diese Inhibition kann die folgenden Ursachen haben: 1) Anwesenheit negativer Non-signaling Pseudorezeptoren auf der Membran; 2) Hemmung des Kontakts von BMP-BMP-Rezeptoren durch extrazelluläre Antagonisten; 3) Blockade des BMP-Signalings durch inhibitorische Smads; 4) Blockade des BMP-Signalings durch intrazelluläre Proteine, die die Smads binden; und 5) Ubiquitinierung und proteasomale Degradation der BMP-Signaling Effektoren [31].

1.4.1 Bambi (BMP and activin bound protein)

Der Pseudorezeptor BMP and activin bound protein (Bambi) ist ein transmembranäres Glykoprotein mit ähnlichen extrazellulären Domänen wie Typ-I-TGF-β- und BMP-Rezeptoren. Bambi verbindet die Typ-I-A- und Typ-I-B-BMP-Rezeptoren ohne direkten

Kontakt mit TGF- β und BMP. Dadurch werden die BMP-Rezeptoren durch Bambi inhibiert [31]. Während der Embryogenese wird Bambi zusammen mit BMP 4 exprimiert und ist von zentraler Bedeutung für die BMP Aktion in der Embryo-Dorsalisation [32]. Bambi wird auch in terminal differenzierten Ostoblasten exprimiert und seine Transkription wird von TGF- β , BMPs und Wnt kontrolliert [33].

1.4.2 Smad 6/7

Smad 6 und Smad 7 (I-Smads) liegen hauptsächlich im Zellkern, aber bei hoher BMP Aktivität können sie sich auch im Zytoplasma befinden. Ein I-Smad bindet an die intrazelluläre Domäne des BMP-Rezeptors I und hemmt somit die Phosphorylierung der R-Smads (1/5/8) und die Bildung des R-Smad-Co-Smad-Komplexes, [34] wobei Smad 6 spezifischer für das BMP-Signaling ist, als Smad 7 [35]. Smad 6 wiederum bindet Smad 1 und hemmt somit die Formation des Smad 1-Smad 4-Komplexes [36], während Smad 7 die Ubiquitination und Degradation von TGF- β und BMP-Rezeptoren via Komplexbildung mit dem Protein Smurf (siehe 1.4.3) fördert und somit Phosphorylierung der R-Smads inhibiert [26].

1.4.3 Smurf 1/2 (Smad-ubiquitin-regulatory factor)

Das BMP-Signaling wird ebenfalls durch das ubiquitin-vermittelte proteasomale System gesteuert. Die Ubiquitin-Proteasome sind wichtig für die Kontrolle vieler biologischer Prozesse, wie z.B. des Zellzyklus, der Signaltransduktion und der Gentranskription. Hierbei spielen 3 Enzyme eine wichtige Rolle bei der Bildung des Ubiquitin-Protein-Komplexes: Ubiquitin aktivierende Enzyme (E1), Ubiquitin konjugierende Enzyme (E2) und Ubiquitin-Ligasen (E3) [37]. Die Spezifität der Ubiquitination wird vom Enzym E3 festgelegt, weil E3 die Spezifität des Substrats und der Proteindegradation mit Hilfe der 26 S-Proteasome definiert. Der Smad-ubiquitination regulatory factor (Smurf 1) und Smurf 2 sind Smad-spezifische E3 Ubiquitin-Ligasen, die Smad 1, -5, -6 und -7 binden können [38]. Smurf 1 befindet sich hauptsächlich im Zellkern und wird zum Zytoplasma und weiter zur Zellmembran transportiert, wenn es proteasomal die Typ-I-TGF- β und BMP-Rezeptoren, Smad 1 und Smad 5 abbaut [39]. Außerdem kann Smurf 1 die Interaktion der I-Smads mit den Typ-1-Rezeptoren verstärken [40]. Smurf 1 kann auch RUNX 2 binden und fördert den Komplex, der von Smad 6 und RUNX 2 gebildet wird [41].

1.4.4 Sara (Smad anchor for receptor activation)

Sara ist ein Protein, welches mit Typ-I- und Typ-II-Rezeptoren und den Smads interagieren kann. Sara befindet sich hauptsächlich im Zytoplasma und bindet das nicht aktivierte Smad 2 und den Rezeptor-Komplex. Sara bildet eine Brücke zwischen dem Rezeptor und Smad 2 und fördert somit die Phosphorylierung von Smad 2 durch Typ-I-Rezeptoren [42]. Die stabile Interaktion von Sara mit nicht-phosphoryliertem Smad 2 kann ebenfalls den Transport von Smad 2 zum Zellkern hemmen [43]. Sara bindet dann das Phosphatidylinositol-3-Phosphat, was dazu führt, dass Smad 2 wahrscheinlich an der Innenseite der Plasmamembran binden kann [42].

1.4.5 Ski/SnoN (Sloan-klettering retrovirus oncogene homologue/ Ski-related novel protein N)

Wenn das BMP-Signaling aktiviert ist, binden phosphorylierte R-Smads 1/5/8 das Smad 4 und transportieren es in den Zellkern [30]. Der nukleare Smad-Komplex reguliert die Transkription der BMP-Zielgene durch die Bindung GCCG-, CAGA- oder GC-reicher DNA-Sequenzen in der Promotorregion der Gene, welche durch das BMP-Signaling aktiviert werden. Durch die Interaktion von Transkriptionsaktivatoren oder -repressoren wird dieser Prozess gefördert oder gehemmt. C-Ski und SnoN sind solche Transkriptionsrepressoren [31].

Ski ist ein nukleares Onkoprotein, das eine wichtige Rolle bei der Hemmung von TGF- β spielt. SnoN ist Ski strukturell ähnlich [44]. Eine Überexpression von Ski beseitigt das durch TGF- β gehemmte Zellwachstum. Daher weisen manche Tumorzelllinien höherreguliertes Ski auf [45]. Die Bildung des Komplexes von Smad 2/3 und Smad 4 wird ebenfalls durch Ski inhibiert [44]. Ski kann auch das BMP-Signaling in Xenopus- und Mammalia-Zellen inhibieren, obwohl seine Affinität den Smads 1/5/8 relativ schwach ist [46]. Ski kann das TGF- β und das BMP-Signaling mit Hilfe folgender Mechanismen regulieren: 1) Stabilisierung des Smad-Komplexes auf der DNA-Ebene, um den Zugang der neu aktivierten Smads zur Smad-bindenden Region zu versperren, 2) Hemmung der Bindung des Smads mit den Transkriptionsaktivatoren, sowie 3) Rekrutierung nuklearer Co-Repressoren und des Histone Deacetylase Komplexes (Histone Deacetylase Complex; HDAC) [47].

Regulation des BMP Signalings

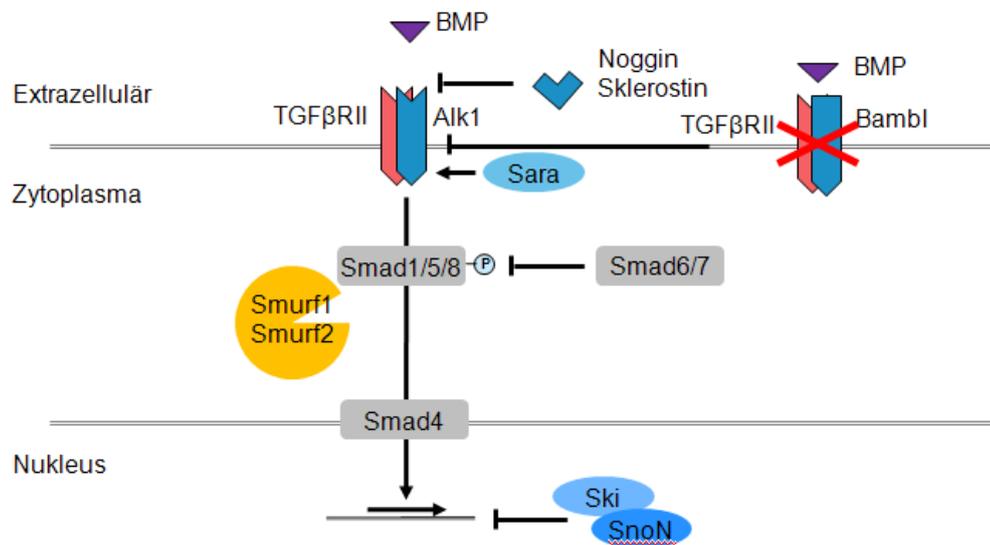


Abbildung 3 : Überblick über die regulatorischen Proteine im BMP-Signaling

Wie bereits weiter oben erwähnt wurde, besteht eine wichtige Funktion von Ski und SnoN in der Rekrutierung von Histon Deacetylasen. Eukaryotische DNA wird im Zellkern komprimiert. Diese Komprimierung wird von spezifischen Proteinen durchgeführt. Die DNA-Proteinkomplexe im Zellkern werden als Chromatin bezeichnet. Die Histone sind ihrerseits eine wichtige Klasse dieser Proteine. Es gibt insgesamt 5 verschiedene Typen von Histonen, und zwar H1, H2A, H2B, H3 und H4. H2A, H2B, H3 und H4 können zusammen ein Histon-Oktamer bilden, um das sich in einer und zwei Drittel Linkswindungen ein langes Stück der DNA-Doppelhelix windet. Auf diese Art und Weise entsteht ein Nukleosom. Die DNA-Stücke, die zwischen den beiden Nukleosomen liegen, werden als Linker-DNA bezeichnet. H1 und die Linker-DNA bilden zusammen eine dicke Faser, die als Solenoid bezeichnet wird. Der N-Terminus der Histone eines Oktamers ragt aus diesem Komplex hervor und kann durch die Acetylierung, die Phosphorylierung und die Methylierung reguliert werden. Der Grad der Acetylierung ist von höchster Relevanz in Bezug auf die Transkriptionsaktivität. Die Acetylierung induziert die Eröffnung der Chromatinstruktur und das Zusammenbinden der Transkriptionsfaktoren und der Promotoren. Histon-Deacetylase und Histon-Acetyltransferase sind zwei Enzyme, die die Acetylierung regulieren. Die Chromatin-

Acetylierung markiert den Beginn der Transkription, während die Deacetylierung ein Gen-Silencing anzeigt [48]. Viele Chemikalien können die Aktivität der Histone Deacetylase inhibieren; unter anderem die Valproinsäure, die in der Medizin zur Behandlung von Epilepsie eingesetzt wird [49].

1.5 TGF- β und BMP-Interaktion mit dem MAPK-Pathway

Der MAPK-Signalweg (Mitogen-activated protein Kinase) umfasst eine Reihe mehrstufiger Signaltransduktionswege, die eine zentrale Rolle bei der Regulierung der Embryogenese, des Zellwachstums, der Zelldifferenzierung und des Zelltodes spielen. Die Signalwege bestehen aus mindestens 3 Kinasen (MAP-3K, MAP-2K und MAP-K), die nacheinander aktiviert (also phosphoryliert) werden. Dieser Prozess wird auch als Phosphorylierungskaskade bezeichnet [50]. Es gibt 3 verschiedene MAPK-Signalwege, nämlich Erk-1/2 (p 42/44), JNK 1/2/3 und p 38/MAPKs. Viele Studien zeigen, dass eine Interaktion zwischen den MAPK-Signalwegen und BMP/TGF- β besteht, die z.B. durch eine Phosphorylierung der Linker-Region der Smad-Proteine zustande kommen kann [51]. BMP und TGF- β aktivieren ebenfalls MAPK-Signalwege: So phosphorylieren z.B. TGF- β ShcA Proteine, um einen Erk-1/2 Signalweg zu aktivieren [52] und um durch die Erzeugung reaktiver Oxygenarten p38 in Keratinozyten zu induzieren [53].

1.6 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit besteht in der Untersuchung des Einflusses von TGF- β auf BMP 2 und -7. Wie bereits weiter oben erwähnt wurde, induzieren BMPs die Differenzierung und die Aktivierung von Osteoblasten und fördern das Knochenwachstum. Daher werden BMP 2 und BMP 7 auch klinisch verwendet, um die Frakturheilung zu beschleunigen. Allerdings erzielen die BMPs bei einigen Patienten nicht die gewünschten Effekte. Da TGF- β das Zytokin mit der höchsten Konzentration in den menschlichen Knochen ist, spielt es wahrscheinlich beim Knochenstoffwechsel eine zentrale Rolle. TGF- β hat eine ähnliche Signaltransduktion wie BMP 2 und -7. Darüber hinaus verfügen beide Proteine über die gleichen regulatorischen Mechanismen. Daher besteht das Ziel dieser Arbeit in der Suche nach Crosstalks zwischen den beiden Signalings in den Osteoblasten. Zu diesem Zweck werden die Osteoblasten zuerst ausschließlich mit BMP 2 und BMP 7 stimuliert. Danach wird der beste Zeitpunkt für die Protein- und die RNA-Isolation bestimmt und beide Isolationen werden durchgeführt. Die Veränderungen der gesamten Smad-Proteine und der TGF- β und BMP Rezeptoren sowie der regulatorischen Proteine

in beiden Signalings werden mit Hilfe eines Western Blots und RT-PCR identifiziert. Wenn ein oder mehrere Proteine nach der Stimulation mit TGF- β hoch- oder herunterreguliert sind, werden diese Proteine gezielt inhibiert oder aktiviert, um zu prüfen, ob der Effekt von TGF- β dadurch beseitigt werden kann.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass in dieser Arbeit die folgenden Ziele verfolgt werden sollen:

- a) Untersuchung der Veränderung der Smad-Proteine und der TGF- β und BMP Rezeptoren auf Gen- und Protein-Ebene nach der Stimulation mit BMP 2 und -7 sowie nach der Stimulation mit BMP 2 und -7 sowie mit TGF- β_1 .
- b) Untersuchung der Veränderungen der regulatorischen Proteine (Bambi, Sara, Smad 6, Smad 7, Smurf 1, Smurf 2, Ski und SnoN) auf der Gen-Ebene nach der Stimulation mit BMP 2 und 7 sowie nach der Stimulation mit BMP 2 und -7 sowie mit TGF- β_1 .
- c) Hemmung oder Aktivierung jener regulatorischer Proteine (Bambi, Sara, Smad 6, Smad 7, Smurf 1, Smurf 2, Ski und SnoN), die durch die TGF- β_1 Stimulation reguliert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Kulturmedium der Osteoblasten

2.1.1 Benötigte Materialien

MEM with EARLE's Salts 500 ml	PAA E 15-024
HAM'S F-12 500 ml	PAA E 15-016
FCS 2*50 ml	PAA A 15-151
Penicillin/Streptomycin 2*5 ml	PAA P 11-010
Penicillin 10000 Einheiten/ml Streptomycin 10 mg/ml	
Sterilfilter für Flüssigkeiten: Millex® GP Filter Unit 0,22 μ m	SLG 033 RB
L-Ascorbat-2-Phosphate 2*0.5 ml	Sigma A 8960

Herstellung: 128 mg L-Ascorbat-2-Phosphat werden in 10 ml PBS gelöst.

Die L-ascorbat-2-Phosphat-Lösung werden mit dem Sterilfilter filtriert
Die 10 ml Lösung werden in 20 Aliquote zu je 0,5 ml aufgeteilt, wobei jedes Aliquot für 500 ml Osteoblastenmedium bestimmt ist.
Die restlichen Aliquots werden bei -20 °C eingefroren.

β-Glycerolphosphat 2*0,5 ml

Sigma G 9891

Herstellung: 108 mg β-Glycerolphosphate werden in 10ml PBS gelöst
Die β-Glycerolphosphat-Lösung wird in 20 Aliquote zu je 0,5 ml aufgeteilt und jedes Aliquot ist für 500 ml Osteoblastenmedium bestimmt.
Die restlichen Aliquots werden bei -20 °C eingefroren.

2.1.2 Herstellung des Kulturmediums

Jeweils 1 Flasche MEM-EARLE und 1 HAM's F-12 Medium 500 ml werden unter eine sterile Zellbank gestellt. Die Flüssigkeit wird von einer Flasche zur anderen überführt und wieder zurückgeleitet. Dieser Vorgang wird mehrmals wiederholt, bis der Inhalt der beiden Flaschen gut miteinander vermischt ist. Danach werden 5 ml Penicillin/Streptomycin mit 0,5 ml β-Glycerolphosphat und 0,5 ml L-Ascorbat-2-Phosphat zusammengesüttet. In einem nächsten Schritt wird die dabei entstandene Mischung steril gefiltert und zum Osteoblastenmedium hinzugegeben. Danach werden noch 50 ml FCS hinzugegeben. Schließlich muss die gesamte Flüssigkeit erneut durch Schwenkung vermischt werden.

2.2 Isolierung der primären humanen Osteoblasten

2.2.1 Benötigte Materialien

Sterile Luer-Zange

Sterile Filter für Flüssigkeit: Millex® GP Filter Unit 0,22 µm

SLG 033 RB

3* 175 cm² Zellkulturflasche

PAA 71175

Dulbecco's PBS (1X) ohne Ca²⁺ und Mg²⁺

PAA H 15-002

Kollagenase II

Sigma C 2-22

0,7 mg Kollagenase werden in 1 ml PBS aufgelöst. Die Konzentration der Kollagenaselösung beträgt 0,7 %.

2.2.2 Durchführung

Die humanen Osteoblasten stammen aus operativ entfernten Hüftköpfen, die durch eine Hüftkopfprothese ersetzt wurden. Die Patienten wurden im Vorfeld über die Probenentnahme aufgeklärt. Darüber hinaus wurde ein Ethikantrag von der Ethikkommission der Technischen Universität München genehmigt.

Als Vorbereitung werden das Osteoblastenmedium und PBS für 15 bis 20 min in ein Wasserbad gelegt. Zuerst wird die sterile Zellbank mit 70 % igem Ethanol desinfiziert und gründlich gereinigt. Anschließend wird die Transportbox unter die Zellbank gestellt, geöffnet und der Hüftkopf auf die Zellkulturschale gelegt. Danach wird ein 50 ml fassendes Falcon-Röhrchen (Röhrchen A) geöffnet und mit 20 ml PBS befüllt. In einem nächsten Schritt werden die sterilen Handschuhe angezogen und der Hüftkopf mit der sterilen Luer-Zange in kleine Fragmente zerteilt. Daraufhin werden die Fragmente in das präparierte Falcon-Röhrchen gelegt. Danach wird das Röhrchen A vollständig mit PBS befüllt und die Knochenfragmente werden durch Schwenkung gewaschen. Nun wird das PBS abgesaugt. Dieser Waschvorgang wird mehrmals wiederholt, bis die Knochenfragmente keine Blutreste mehr aufweisen. Dann wird der Überstand mit einer serologischen Pipette entfernt. Die Fettblase auf der Oberfläche wird zuerst aspiriert. Nach der Spülung wird das Volumen des Knochens geschätzt und danach eine 0,7%iger Kollagenase-II-Lösung vorbereitet, deren Menge dem Volumen des analysierten Knochens entspricht. Danach wird diese Kollagenase-II-Lösung steril filtriert, und in die Röhrchen mit den Knochenfragmenten pipettiert. In einem nächsten Schritt müssen die Röhrchen bei 37°C in einem Wasserbad 1 Stunde lang inkubiert werden. Alle 15 min müssen die Röhrchen geschwenkt werden, damit sich die Zellen aus dem Knochenfragment herauslösen. Danach wird der Überstand in ein neues Röhrchen (Röhrchen B) überführt und das Röhrchen A 2 mal mit PBS gewaschen. Der Überstand wird nun wieder in das Röhrchen B gefüllt. Das Röhrchen A wird seinerseits in eine 175 cm² große Zellkulturflasche überführt, mit 25 ml Osteoblastenmedium aufgefüllt und mit OSS (Osteoblastenkultur aus Spongiosafragmenten) gekennzeichnet. Das Röhrchen B wird nun zentrifugiert (650 g, 10 min, 20 °C ohne Bremse). Danach wird der Überstand verworfen. Das Pellet wird in 10 ml Osteoblastenmedium resuspendiert und danach werden jeweils 5 ml dieses Mediums in 2 neue Zellkulturflaschen aufgeteilt. Im nächsten Schritt werden die beiden Flaschen bis zur 25 ml-Marke mit Osteoblastenmedium befüllt und mit OSÜ (Osteoblastenkultur aus Kollagenaseüberstand) beschriftet. Die 3

Zellkulturflaschen werden bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Am nächsten Tag wird zum ersten Mal das Medium gewechselt. Danach erfolgt der Mediumwechsel ca. alle 3 - 5 Tage.

Zellen, die aus dem Kollagenase-Überstand stammen, werden auf der Zellkulturflasche mit OSÜ gekennzeichnet. Zellen, die aus den Knochenfragmenten herauswachsen, werden mit OSS gekennzeichnet. Die 3 Flaschen werden schließlich noch mit P 0, was Passage 0 bedeutet, gekennzeichnet.

2.3 Kultivierung der primären humanen Osteoblasten

2.3.1 Benötigte Materialien

Dulbecco 's PBS ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺	PAA H 15-002
Trypsin /EDTA (1 x)	PAA L 11-002
Trypsin 2,5 mg/ml	
175 cm ² Zellflasche	PAA 71175
Osteoblastenkulturmedium (siehe Kapitel 2.1)	

2.3.2 Mediumwechsel

Der Mediumwechsel wird alle 3 - 5 Tage durchgeführt. Zuerst werden das Osteoblastenkulturmedium und das PBS für 15 - 20 min in einem 37°C warmen Wasserbad aufgewärmt. In der Zwischenzeit wird die Zellbank mit 70 % igem Alkohol desinfiziert und die Dichtigkeit und die Viabilität der Osteoblasten unter dem Mikroskop kontrolliert. Im nächsten Schritt wird die Flasche unter die Zellbank gestellt und das alte Medium abgesaugt. Nun wird die Zellflasche 1mal mit 10 ml sterilem PBS gewaschen, das danach ebenfalls abgesaugt wird. Schließlich wird das neue warme Medium in die Zellkulturflasche gefüllt und weiter bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert.

2.3.3 Passagierung

Vor jedem Mediumwechsel wird die prozentuale Dichtigkeit der mit Zellen bedeckten Fläche mit Hilfe des Lichtmikroskops geschätzt: Bei einer Dichtigkeit von ca. 95 % erfolgt die Passagierung der Zellen.

Zur Vorbereitung werden das Medium und das PBS wieder in einem 37 °C warmen Wasserbad für 15 - 20 min erwärmt. Danach wird die Zellbank mit 70%igem Alkohol desinfiziert. Zuerst wird das alte Medium abgesaugt und verworfen. Danach wird die Zellflasche 1mal mit 10 ml sterilem PBS gewaschen und das PBS abgesaugt. Dann werden 2 ml Trypsin/EDTA in die Flasche gegeben, die den gesamten Boden bedecken. Nun werden die Zellflaschen bei 37°C, 5 % CO₂ für 5 - 7 min inkubiert. Durch leichtes Klopfen werden die adhärenen Zellen gelöst. Nach der mikroskopischen Untersuchung werden 5 ml Osteoblastenmedium in jede Zellflasche gegeben, um den toxischen Effekt von Trypsin /EDTA zu inhibieren. Dabei wird der gesamte Boden der Zellflasche mehrmals mit diesem Medium gespült, damit keine Zellen bei der Passagierung verloren gehen. Nach der Spülung wird dieses Medium in ein Falcon-Röhrchen gegeben und 10 min bei 650 g bei RT (Raumtemperatur) zentrifugiert. Danach werden der Überstand abgesaugt, 3 neue Zellflaschen unter die Zellbank gestellt, das Pellet in 15 ml Osteoblastenmedium resuspendiert und jeweils 5 ml dieses Mediums in jede neue Zellflasche gegeben. Danach wird jede Flasche bis zur 25 ml-Marke mit Osteoblastenmedium aufgefüllt. Dies bedeutet, dass die aktuelle Passage der Zellen gleich die vorherige Passage plus 1 ist. Schließlich werden die Passage und die Zelltypen (OSÜ oder OSS) auf die 3 Flaschen geschrieben und diese Flaschen erneut bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert.

2.4 Zählung und Ausplattierung der Zellen

2.4.1 Benötigte Materialien

Dulbecco´s PBS ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺	PAA H 15-002
Trypsin /EDTA (1 x)	PAA L 11-002
Trypsin 2,5 mg/ml	
Trypan Blue 0,5 % 100 ml	Biochrom L 6323
Arbeitskonzentration: 0,125 %	
Herstellung: 0,75 ml Trypan Blue 0,5 % Stock werden mit 2,25 ml PBS gemischt, danach auf 2 Eppendorf-Röhrchen zu je 1,5 ml aufgeteilt und bei RT gelagert.	
Ethanol 70 %	MRI Apotheke
Neubauer Zählkammer	LO (Labor Optik)

2.4.2 Durchführung

Die Osteoblasten mit der Passage 2 oder 3 werden ausplattiert und danach für die Durchführung von Versuchen verwendet. Zuerst wird die Zellzahl grob geschätzt. Eine volle Zellflasche enthält ungefähr 1 bis 1,5 Millionen Osteoblasten. Nun durchlaufen die Osteoblasten eine ganz normale Passagierung bis die Resuspendierung der Zellen (siehe Kapitel 2.3). Die Neubauer Zählkammer und das Deckglas werden mit 70%igem Ethanol gereinigt und fixiert. Dann wird der Überstand der Zellen gründlich gemischt und schließlich 10 µl dieses Überstandes herausgenommen. Diese 10 µl werden mit 10 µl Trypan-Blue in einer Konzentration von 0,125 % gemischt. 10 µl dieser Mischung werden in jede Zellkammer pipettiert. Danach werden die Zellen in 4 Zählungsgittern gezählt und der Mittelwert n errechnet.

Gesamtzahl der Zellen = $n * 2 * \text{Volumen des Zellenüberstandes} * 10^4$

Schließlich werden die Zellen nach dem Versuch auf einer 6-Well-Platte, einer 12-Well-Platte oder auf einer Zellschale ausplattiert. Normalweise sollen auf jeden cm^2 Oberfläche 15000 Zellen gegeben werden. Somit müssen für eine 6-Well-Platte ungefähr 100000 Zellen ausplattiert werden, während auf einer Zellschale ungefähr 1000000 Zellen ausplattiert werden müssen.

2.5 Proteinmessung mit Lowry-Test

2.5.1 Benötigte Materialien

Bovine Serum Albumine (BSA) Sigma A 4503

Alle Aliquote können bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ konserviert werden.

2 % Na-K-Tartrate-Lösung Sigma 228729

Herstellung: 2 g Na-K-Tartrat werden in 100 ml ddH₂O gelöst und in dunklen Flaschen bei RT gelagert.

1 % CuSO₄* 6 H₂O Lösung Sigma 31293

Herstellung: 1 g CuSO₄* 6 H₂O wird in 100 ml ddH₂O gelöst und in dunklen Flaschen bei Raumtemperatur gelagert.

1 M NaOH Merck 109137

2 % Na₂CO₃ Lösung Sigma S 2127

Herstellung: 20 g Na₂CO₃ werden in 900 ml ddH₂O und 100 ml 1 M NaOH gelöst und bei RT gelagert.

Folin Reagent

Sigma 47641

2.5.2 Standardkurve

50 mg BSA werden in 5 ml ddH₂O mit einer Konzentration von 10 µg/µl gelöst. Diese Lösung wird daraufhin mit ddH₂O verdünnt. Danach werden 7 verschiedene BSA-Lösungen mit einer jeweiligen Konzentration von 10 µg/µl, 8 µg/µl, 6 µg/µl, 4 µg/µl, 2 µg/µl, 1 µg/µl und 0 µg/µl hergestellt. Diese Lösungen werden als Standard BSA Konzentrationen bezeichnet.

BSA Stock Lösung	10 µg/µl	8 µg/µl	6 µg/µl	4 µg/µl	2 µg/µl	1 µg/µl	0 µg/µl
10 µg/µl BSA Stock	1000 µl	800 µl	600 µl	400 µl	200 µl	100 µl	0 µl
ddH ₂ O	0 µl	200 µl	400 µl	600 µl	800 µl	900 µl	1000 µl

Tabelle 2: Herstellung der BSA Standardkurve

2.5.3 Durchführung

Zuerst werden die Lösung A und die Lösung B vorbereitet. Die Lösung A hat ein Volumen von 2 ml und besteht aus 20 µl 2 % Na-K-Tartrate Lösung, 20 µl 1 % CuSO₄ Lösung und 1,96 ml Na₂CO₃ Lösung. Die Lösung B hat ein Volumen von 1,5 ml und besteht aus 500 µl Folin Reagent und 1000 ml ddH₂O. In einem nächsten Schritt werden zuerst 2 µl von jeder Standard BSA in Triplikaten auf eine 96-Well-Platte pipettiert, und danach werden 2 µl der Probe in Triplikaten auf eine 96-Well-Platte pipettiert. Danach werden pro Well 150 µl der Lösung A hinzugegeben. Durch Schwenkung wird die Platte bei Raumtemperatur für 10 min inkubiert, und danach werden pro Well 30 µl der Lösung B in jedes Well pipettiert und durch Schwenkung bei Raumtemperatur für 1-2 Stunden inkubiert. Schließlich wird die Extinktion bei 750 nm gemessen.

2.5.4 Auswertung

Zunächst werden die Mittelwerte der 3mal bestimmten Absorption jedes Standard BSA-Wertes errechnet und diese Werte mit Microsoft Excel in einem Punktdiagramm in ihrem Verhältnis zu den entsprechenden BSA-Konzentrationen eingetragen, wobei die BSA-

Konzentration auf der Abszisse und die Extinktion auf der Ordinate vermerkt ist. Danach wird eine lineare Ausgleichsgerade des Punktdiagrammes errechnet, deren Y-Achsenabschnitt der Mittelwert der bei 0 µg/µl Standard BSA gemessenen Extinktionen (Blindwert) ist. Dann wird der Mittelwert (y) der 3mal gemessenen Absorption der Probe berechnet.

Proteinkonzentration der Probe = (y-Blindwert) / Ausgleichsgerade.

Abb. 5 zeigt ein Beispiel eines solchen Punktdiagramms.

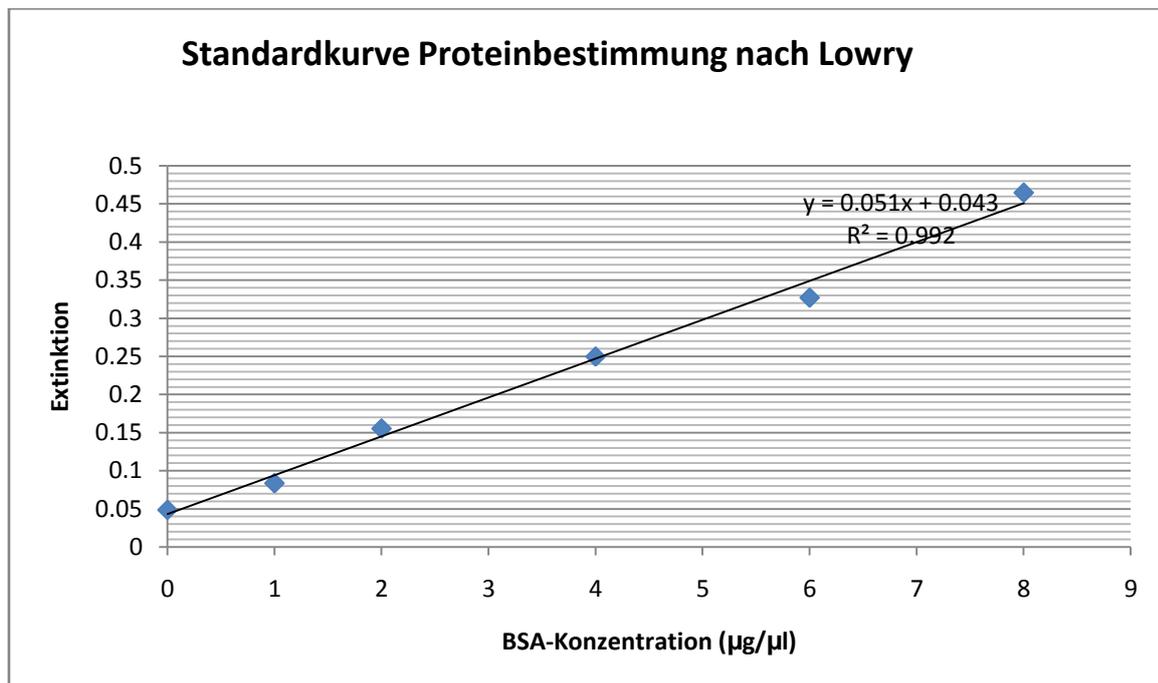


Abbildung 4 : Beispiel einer BSA-Standardkurve

Mit Hilfe dieser Angaben kann nun die Proteinkonzentration der Probe errechnet werden:

$$x = \frac{y - 0,043}{0,051}$$

Dabei ist x die gemessene Konzentration in der Probe, und y der Mittelwert der Extinktion.

2.6 Proteinisolation mit RIPA- (Radio Immuno Precipitation assays) Buffer

2.6.1 Benötigte Materialien

Tris-Base

Sigma T 1503

NaCl	Sigma 71379
Nonidet P 40 (NP 40)	Sigma 74385
DOC (Deoxycholic acid)	Sigma D 2510
EDTA	Roth 8040.2
Protease inhibitor complete mini Tablette	Roche 11836170001
Zellschaber	PAA 90020

2.6.2 Herstellung der RIPA-Lösung

Es wird RIPA Buffer um die Zellen zu lösen und Proteine zu gewinnen. Zuerst wird die RIPA Stock-Lösung hergestellt: 0,121 g Tris-Base, 0,58 g NaCl, 500 µl NP-40, 0,3 g DOC und 0,372 g EDTA werden in 50 ml H₂O gelöst und mit Hilfe eines pH-Meters auf einen pH-Wert von 7,6 normalisiert. Dann wird ddH₂O bis zum Gesamtvolumen von 100 ml aufgefüllt. Die Lösung kann zu je 50 ml aliquotiert und bei -20°C gelagert werden. Zu der RIPA-Arbeitslösung muss noch eine Protease inhibitor complete mini-Tablette für jeweils 50 ml RIPA-Lösung hinzugegeben und darin gelöst werden. Dann kann die Lösung mit Hilfe eines Eppendorf-Röhrchens zu jeweils 1.5 ml aliquotiert und bei -20°C gelagert werden.

2.6.3 Durchführung

Zuerst wird der Überstand von allen Platten abgesaugt. Danach wird die RIPA-Arbeitslösung in die Platten gegeben. Für eine 6-Well-Platte sind 75 µl RIPA-Arbeitslösung pro Well ausreichend, während für eine 75 cm² Zellflasche 500 µl RIPA-Lösung genügen. Danach werden die Platte oder die Zellflasche für 15 min bei -80°C gekühlt und die Zellen mit einem Zellschaber eingesammelt. Nun wird der Zellüberstand in das sterile Eppendorf-Röhrchen gefüllt und mit Hilfe eines Lowry-Tests die darin befindliche Proteinkonzentration gemessen. Die Probe kann bei -80°C über eine längere Zeit gelagert werden.

2.7 Infizierung der Osteoblasten mit einem Adeno-Virus

2.7.1 Benötigte Materialien

HEK 293 T-Zellen

bereitgestellt von Prof. S. Dooley

HEK 293 T-Medium

500 ml DMEM (High Glucose)

50 ml FCS

Hitzeinaktivierung: 30 min bei 56 °C

5 ml Penicillin/Streptomycin

5 ml L-Glutamin

Viren

bereitgestellt von Prof. S. Dooley

Ad 5- BRE-Luc bei -80 °C inkubieren

Osteoblastenkulturmedium

2.7.2 Herstellung von Viruspartikeln

Die HEK 293 T-Zellen werden in 175 cm² Zellkulturflaschen bis zu einer Konfluenz von ca. 70 % kultiviert. Dabei muss ein Mediumwechsel durchgeführt werden, um die Zellen mit 10 ml frischem HEK 293 T-Medium zu bedecken. Danach werden 500 µl Virus-Suspension hinzu pipettiert. 24 h und 48 h später werden jeweils 5 ml Medium in diese Flasche gegeben. Nach 5 Tagen in Kultur wird der pH-Indikator des Mediums gelb sein (saurer PH-Wert). Die HEK293T-Zellen nehmen eine kugelige Form an und lösen sich als Zellverbände ab. Wenn sich alle Zellen abgelöst haben, wird die gesamte Suspension in ein 50 ml Falconröhrchen überführt und bei -80°C eingefroren. Die Zell-Virus-Suspension wird noch 2mal bei RT aufgetaut und dann wieder eingefroren, damit die Zellen von dem Virus gelöst sind. Die Suspension wird aliquotiert, bevor sie eingefroren wird.

2.7.3 Ad 5-BRE-LUC

Das BMP Response Element (BRE) spielt die gleiche Rolle wie der Promotor, der sich an die phosphorylierten Smad 1/4 bindet und die Transkription aktiviert [54]. Luciferase wird gebildet, wenn die Smad 1/4 phosphorylieren, also wenn die Smad 1/5/8 durch BMPs aktiviert werden.

2.7.4 Infizierung der Osteoblasten

Zuerst müssen die Osteoblasten auf einer 12-Well-Platte 525.000 Zellen pro Well ausplattiert werden und bei 37°C, 5 % CO₂ bis zu einer Dichtigkeit von 95 % inkubiert werden. Das alte Medium wird abgesaugt und ein Gemisch aus Viren und Osteoblasten-Medium mit einer Konzentration von 50 µl/ml hergestellt. Danach werden 250 µl des Gemischs in jedes Well pipettiert und zusätzlich 250 µl Osteoblastenmedium (mit oder ohne BMPs, TGFs) als Stimulationsmedium hinzugegeben. Die Zellen werden bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert.

2.8 Luciferase-Assay

2.8.1 Benötigte Materialien

Luciferase Assay System	PROMEGA E 1500
1 Gefäß Luciferase-Substrat	
10 ml Luciferase Assay Puffer	
30 ml Zell-Kultur-Lysis-Reagenz 5 x	
Zellschaber	PAA 90020

2.8.2 Durchführung

Die zu untersuchenden Zellen werden zuerst mit Viren infiziert. (siehe Kapitel 2.7) Danach werden das Luciferase-Substrat und der Luciferase Assay Puffer miteinander vermischt und die Mischung aliquotiert. In einem weiteren Schritt wird die Zell-Kultur-Lysis-Reagenz 5 x 5 mal mit ddH₂O verdünnt und 30 µl dieser Flüssigkeit in jedes Well pipettiert. Damit eine vollständige Lyse der Zellen erfolgen kann, werden die Zellkulturplatten für 24 h bei -80°C eingefroren.

Die Platte wird am nächsten Tag aus dem Gefrierschrank genommen und auf Eis aufgetaut. Der Überstand an Zelllysaten wird mit einem Zellschaber eingesammelt. Das gesamte Zelllysate wird in Eppendorf-Röhrchen überführt und 10 min bei 14000 g und 4°C zentrifugiert. 10 µl des Zelllysats werden jedes Well einer 48-Well-Platte pipettiert. Zum Schluss werden 40 µl Substrat-Lösung pro Well hinzugegeben und mehrmals die Lumineszenz im Plate Reader gemessen. Diese Lumineszenz-Messung wird entsprechend den Hinweisen des Herstellers mit Hilfe des Steady-Glo Luciferase Assay Systems (Promega, Madison, USA) durchgeführt. 2 µl des Zelllysats werden in Triplikaten in

eine 96-Well-Platte pipettiert. Mit Hilfe eines Lowry-Tests wird die Proteinkonzentration bestimmt.

2.9 Western Blot

2.9.1 Benötigte Materialien

TRIS (hydroxymethyl) aminomethan	Sigma T 87602-3 KG
EDTA	Sigma E 5134-500 G
Glycerol	Sigma-Aldrich G 7893-500 ML
Sodium Dodecyl Sulfat (SDS)	Sigma-Aldrich L 3771-100 G
Brom Phenol Blue	Sigma-Aldrich 114391-5 G
2-Mecaptoethanol	Sigma-Aldrich M 6250-100 ML
Glycin	Sigma-Aldrich G 8898-500 G
Ammonium Persulfat	Sigma-Aldrich A 3678-25 G
Nitrocellulose Membran	Roth 160508
Ponceau S	Roth 5938.1
Whatmann-Papier	Roth
NaCl	Sigma-Aldrich 71379-5 KG
Tween-20	Sigma-Aldrich P 1378-1 L
Luminol	Sigma-Aldrich 09253-5 G
P-Coumaric Acid	Sigma-Aldrich C 9008-25 G
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich 41639-500 MI
30 % H ₂ O ₂ -Lösung	Sigma-Aldrich H 1009100 ML

Acrylamide-Bisacrylamide-Lösung (37.5:1)	Roth H5171
N,N,N',N'-TEMED	Sigma-Aldrich T 9281-25 ML
Isopropanol	Apotheke 1 l
Milchpulver mit niedrigem Fettgehalt	Saliter
CAPS	Applichem A 3997,0100
PageRuler Prestained Protein Ladder	Fermentas SM 0671
Dicke Glasplatte mit Spacer (1,5 mm)	BioRad
Dünne Glasplatte	BioRad
Casting stand	BioRad
Kammer (10 Wells)	BioRad
Kammer (15 Wells)	BioRad
Gel running-System (Mini Protean 4)	BioRad
Dry-Blotting-System	BioRad
Stromspannungsgerät	BioRad

2.9.2 Lösungen

1,5 M TRIS (pH = 8,8): 181,7 g TRIS (für die Elektrophorese) werden in ungefähr 900 ml H₂O gelöst und mit HCl auf einen pH-Wert von 8,8 eingestellt. Dann wird das komplette Volumen bis zur 1 l-Marke mit ddH₂O gefüllt und bei 4 °C gelagert.

300 mM Lämmi Loading Buffer (5 x): 6 ml 1 M TRIS (pH= 6,8) werden mit 10 ml 99 % Glycerol, 200 µl 500 mM EDTA, 2 g SDS, 10 mg Brom Phenol Blue und 2,5 ml β-Mercaptoethanol vermischt und bis zur 20 ml-Marke mit ddH₂O befüllt. Dann kann die Mischung zu je 1-2 ml aliquotiert und bei -20 °C gelagert werden.

1 M Elektrophoresepuffer (5 x): 72 g Glycin, 15 g TRIS (für die Elektrophorese) und 5 g SDS werden in ddH₂O gelöst, bis zum Gesamtvolumen von 1 l befüllt und bei 4 °C gelagert.

Elektrophoresepuffer (1 x): 200 ml Elektrophoresepuffer (5 x) werden mit 800 ml ddH₂O verdünnt und bei 4 °C gelagert.

0.4 M TRIS (pH = 6,8): 60,6 g TRIS (für die Elektrophorese) werden in 900 ml ddH₂O gelöst und mit HCl auf einen pH-Wert von 6,8 eingestellt. Dann wird das komplette Volumen bis zur 1 l-Marke mit ddH₂O gefüllt und bei 4 °C gelagert.

10 % APS-Lösung: 2 g Ammonium-Persulfat werden in 20 ml ddH₂O gelöst und aliquotiert. Die Aliquots werden bei -20 °C gelagert.

10 % SDS-Lösung: 2 g SDS werden in 20 ml ddH₂O gelöst und bei RT gelagert.

0,25 M TRIS CAPS (5 x): 36,34 g TRIS (hydroxymethyl) aminomethan und 44,26 g CAPS werden in 1000 ml ddH₂O gelöst und bei RT gelagert.

20 % Anodenpuffer: 100 ml TRIS CAPS (5 x) werden mit 75 ml Methanol vermischt und mit ddH₂O bis zum Volumen von 500 ml aufgefüllt. Die Mischung wird bei RT gelagert.

Kathodenpuffer: 100 ml TRIS CAPS (5 x) werden mit 5 ml 10 % SDS vermischt und mit ddH₂O bis zum Volumen von 500 ml aufgefüllt. Die Mischung wird bei RT gelagert.

Ponceau S Lösung: 0,2 g Ponceau S Lösung werden in 200 ml 1 % Ethansäure gelöst und bei RT gelagert.

TRIS Buffered Saline (TBS (10 x)): 12,1 g TRIS (für die Elektrophorese) und 87,66 g NaCl werden in 800 ml ddH₂O gelöst und mit HCl auf einen pH-Wert von 7,6 eingestellt bis zur 1 l-Marke mit ddH₂O aufgefüllt und bei RT gelagert.

10 % Tween-20 Lösung: 100 ml Tween-20 (100 %) werden mit 900 ml H₂O vermischt und bei RT gelagert.

TBS-T Washing Buffer: 100 ml TRIS Buffered Saline (10 x) TBS und 10 ml 10 % Tween-20 Lösung werden mit 900 ml ddH₂O verdünnt und bei RT gelagert.

100 mM TRIS (pH= 8,5): 12,1 g TRIS (für die Elektrophorese) werden in 800 ml ddH₂O gelöst und mit HCl auf einen pH-Wert von 8,5 eingestellt, mit ddH₂O bis zum Volumen von 1 l befüllt und bei RT gelagert.

250 mM Luminol Stock Lösung: 0,88 g Luminol werden in 20 ml DMSO gelöst und zu je 200 µl aliquotiert. Die Aliquots werden anschließend bei -20 °C gelagert werden.

90 mM p-Coumaric Acid Stock Lösung: 0,15 g p-Coumaric Acid werden in 10 ml DMSO gelöst und zu je 90 µl aliquotiert und bei -20 °C bis zu ihrer späteren Nutzung gelagert.

200 mM NaOH: 200 ml 1 M NaOH werden mit 800 ml H₂O vermischt.

5 % Blocking Lösung: 25 g Milchpulver mit niedrigem Fettgehalt werden in 500 ml ddH₂O gelöst.

2.9.3 Liste der Antikörper

Erster Antikörper	Firma	Produkt-Nr.	Entsprechender zweiter Antikörper	Proteingröße
p-Smad 2/3	Santa Cruz Biotechnology	SC- 11769	Anti-Rabbit	55 - 60 kDa
TGF-β Rezeptor	Santa Cruz Biotechnology	SC-398	Anti-Rabbit	53 kDa
phospho-p 42/ 44	Cell Signaling Technology	# 4370	Anti-Rabbit	44,42 kDa
phospho-p 38	Cell Signaling Technology	# 4511	Anti-Rabbit	43 kDa
SnoN	Santa Cruz Biotechnology	SC- 133119	Anti-Mouse	77 kDa
GAPDH	Santa Cruz Biotechnology	SC- 25778	Anti-Rabbit	37 kDa

Tabelle 3: Primäre Antikörper für den Western Blot

2.9.4 Durchführung

Zu beantwortende Fragen:

1. Welche Acrylamid/Bisacrylamid-Konzentration muss für das Experiment gewählt werden? Die Konzentration hängt von der Größe der zu untersuchenden Proteine und der Trennungseffizienz ab. Tabelle 4 zeigt diesen Zusammenhang:

(Bis-) acrylamid-Konzentration	6 %	8 %	10 %	12 %	15 %
Trennungseffizienz (kDa)	50 - 200	30 - 95	20 - 80	12 - 40	10 - 43

Tabelle 4: Zusammenhang zwischen der Acrylamid-Konzentration und der Trennungseffizienz

2. Wie dicht ist das Gel?
 - a. Für ein Gel mit 1 mm Dichtigkeit müssen 6 ml Mischung des Trenngels vorbereitet werden
 - b. Für ein Gel mit 1,5 mm Dichtigkeit müssen 9 ml Mischung des Trenngels vorbereitet werden
3. Wie viele Gele werden benötigt?

Die Gele können bei 4°C bis zu 5 Tage lang benutzt werden (wenn sie zusammen mit nassem Papier in einer Plastiktüte eingewickelt werden)

Vorbereitung der Gele

Zuerst muss die Glassplatte mit 70%igem Alkohol gereinigt werden. Vor der Mischung der Gele, werden die Gießkammern vorbereitet: (siehe Abb. 6)

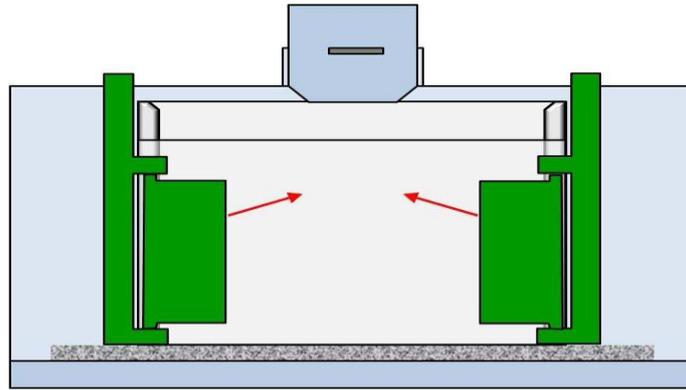


Abbildung 5 : Aufbau der Gießkammer

Nach dem Aufbau der Gießkammern kann das Trenngel nach den Angaben (für 1,5 mm Dichtigkeit), der folgenden Tabelle zusammengemischt werden.

(Bis-) acrylamid-Konzentration	6 %	8 %	10 %	12 %	14 %	16 %
ddH ₂ O (ml)	7,4	6,7	6,1	5,5	4,8	4,2
1, 5M TRIS (pH= 8,8) (ml)	3,2	3,2	3,2	3,2	3,2	3,2
40 % Acrylamid/Bisacrylamid (ml)	1,9	2,6	3,2	3,8	4,5	5,1
10 % SDS-Lösung (µl)	127,5	127,5	127,5	127,5	127,5	127,5
TEMED (µl)	12,8	12,8	12,8	12,8	12,8	12,8
10 % APS-Lösung (µl)	127,5	127,5	127,5	127,5	127,5	127,5

Tabelle 5 : Volumen der einzelnen Komponenten des Trenngels

Das Gel muss sofort nachdem es zusammengemischt wurde, in die Kammer gegossen werden. Bis das Trenngel polymerisiert, wird es mit Isopropanol bedeckt, um einen „Smiling-Effekt“ zu verhindern. Nach der Polymerisierung wird das Isopropanol entfernt und das Sammelgel entsprechend der in der folgenden Tabelle (für 1,5 mm Dichtigkeit) aufgeführten Vorgaben hinzugegeben.

(Bis-) acrylamid-Konzentration	3 %
ddH ₂ O	2,0 ml
0,4 M TRIS (pH=6,8)	0,8 ml
40 % Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung	0,2 ml
10 % SDS-Lösung	30,0 µl
TEMED	3,0 µl

10 % APS-Lösung	30,0 µl
-----------------	---------

Tabelle 6: Volumen der einzelnen Komponenten des Sammelgels

Das Gel muss sofort nachdem es zusammengemischt wurde, in die Kammer gegossen werden. Darüber hinaus muss ein Kamm ins Gel platziert werden, damit die Geltaschen entstehen, in die das spätere Proteingemisch hineinpipettiert wird. Nach der Herstellung der Gele muss genügend Elektrophoresepuffer (1 x) vorbereitet werden (450 ml für eine einmalige Elektrophorese). Nach der Polymerisation des Sammelgels muss der Kamm vorsichtig entfernt werden und jede Tasche mit Elektrophoresepuffer gewaschen werden.

Probenvorbereitung

Zuerst muss das Volumen der zu beladenden Proben pro Well festgelegt werden:

- Das Volumen für 15-Well-Gele darf 20 µl nicht überschreiten.
- Das Volumen für 10-Well-Gele sollte nicht größer als 25 µl sein.

Die zu beladenden Proben müssen wie folgt zusammengesetzt sein:

- 30 - 50 µg Proteine
- Auffüllung bis zu einem Volumen von 20 µl mit ddH₂O
- 4 oder 5 µl Lämmli-Ladepuffer (5 x) (abhängig vom Gesamtvolumen)
- Wenn die Probentaschen leer sind, werden sie mit ddH₂O und Lämmli-Ladepuffer in den indizierten Konzentrationen aufgefüllt, um einen Smiling-Effekt der Gele zu verhindern.

Die Proben werden gut vermischt (Vortex) und für 10 min bei 99 °C denaturiert und auf das Gel geladen. Danach werden ebenfalls 4 - 5 µl Marker (Molekulargewichtsmarker) auf das Gel geladen. Schließlich wird eine Spannung angelegt und die Proteine entsprechend ihrer Größe aufgetrennt.

Durchlauf der Western Blot-Gele

Zuerst wird die Verbindung der Elektroden gesichert und bei 200 Volt eine Proteinauftrennung durchgeführt. Die Dauer dieses Durchlaufs hängt von der (Bis-) acrylamid-Konzentration und der erwünschten Trennungseffizienz ab (Für ein 10 % Gel reichen ungefähr 45 min aus.). Normalerweise sollte der Durchlauf der Gele gestoppt werden, bevor die Front (Brom Phenol Blue) das Gel verlässt.

Transfer auf die Nitrozellulosemembran – Semi-Dry-Proteintransfer

Zuerst muss mit Handschuhen genügend Whatman-Papier und Nitrozellulosemembran auf die entsprechende Größe des Gels zurechtgeschnitten werden. Danach werden zwei kleine Container für den Anoden- und den Kathodenpuffer vorbereitet. Daraufhin wird die Laufkammer abgebaut. Als nächstes werden zwei Whatman-Papiere in Anodenpuffer getränkt und auf ein Blottinggerät gelegt. Dann wird das Gel auf ein nasses Whatman-Papier transportiert und die Nitrozellulosemembran in den Kathodenpuffer getränkt und ebenfalls auf das Gel gelegt. Schließlich werden 2 Whatman-Papiere mit Kathodenpuffer getränkt und auf die Nitrozellulosemembran gelegt.



Abbildung 6: Aufbau der Blotting-Schicht

Nun wird mit einer Pasteur-Pipette über die Blotting-Schicht gerollt, um alle Luftblasen zu entfernen. Danach werden die Elektroden bei einem Blotting von konstant 250 mA gestartet. Die Dauer des Proteintransfers auf die Membran hängt von der gleichzeitigen zu transferierenden Proteinmenge der unterschiedlichen Gele ab:

- a. 1 Gel 30 min
- b. 2 Gele 50 min
- c. 3 Gele 70 min
- d. 4 Gele 90 min

Kontrolle des Proteintransfers mit Ponceau S

Zuerst werden die Blottingschichten entfernt und die Membran in einem kleinen Container gelagert. Dann wird die Membran mit Ponceau S Lösung bedeckt und 1-5 min bei RT inkubiert. Danach wird die Membran kurz mit Wasser gewaschen

um das Ponceau S wieder zu entfernen. Nun werden die Markerbänder beschriftet und die Membran mit einem Skalpell abgeschnitten.

Antikörper-Inkubation

Zuerst werden 5 % Milchpulver ohne Fett im TBS-T-Puffer als Blocking Buffer vorbereitet. Die Membran wird mit Blocking Buffer bedeckt und 1 Stunde bei RT geschwenkt, um die nicht-spezifische Bindung des Antikörpers an die Membran so niedrig wie möglich zu halten. Dann wird die Membran mit TBS-T gewaschen, um den restlichen Blocking Buffer zu entfernen. Nun wird die Membran mit primären Antikörpern inkubiert.

a. Der Verdünnungsfaktor hängt von der Aktivität des Antikörpers ab.

Verdünnung im Verhältnis 1:1000 mit 1 % Milchpulver ohne Fett in TBS-T oder mit 5 % BSA in TBS-T. (Zuerst muss das Datenblatt für die Antikörper überprüft werden!)

b. Die Inkubationszeit ist bevorzugt über Nacht bei 4°C

Danach wird der primäre Antikörper in einem Falcon-Röhrchen wiedergewonnen und bei 4°C gelagert. Nun wird die Membran 3mal für 10 min mit TBS-T gewaschen und mit einem entsprechenden 2'-Antikörper-Mouse/Rabbit/Goat bei Raumtemperatur für 2 Stunden inkubiert.

Daraufhin muss das ausreichende Volumen der sekundären Antikörper-Lösung vorbereitet werden:

i. HRP (horseradish peroxidase) markierte Antikörper gegen verschiedene Arten primärer Antikörper (Mouse, Rabbit, usw.; +4 °C; gelbe Decke)

ii. 1:10.000 Verdünnung der sekundären Antikörper in TBS-T.

Dann wird die Membran 3mal während 10 min mit TBS-T gewaschen.

Entwicklung der Membran

Herstellung der Entwicklungslösung

a. Lösung A

i. 2,5 ml 100 mM TRIS (pH = 8,5)

ii. 25 µl 250 mM Luminol Stock Lösung

- iii. 11 µl 90 mM p-Coumaric Acid Stock Lösung
- b. Lösung B
 - i. 2,5 ml 100 mM TRIS (pH=8,5)
 - ii. 2 µl 30 % H₂O₂ Lösung

Die Membran wird mit ECL-Lösung bedeckt und für 1 - 2 min bei RT inkubiert. Danach wird die Membran auf die Zellophanfolie gelegt und alle Lichtquellen mit Ausnahme des Rotlichts werden ausgeschaltet. Als nächstes wird ein Röntgenfilm auf die Membran gelegt. (Die Dauer der Auflage ist dabei abhängig von der Signalstärke.) Als nächstes wird der Film in einer Entwicklungslösung für 1 min inkubiert und 1 min lang mit Wasser gewaschen, um die Entwicklungslösung abzuwaschen. Dann wird die Membran für 1 min in die Fixier-Lösung gelegt und erneut für 1 min mit H₂O gewaschen. Nun wird der Film getrocknet und beschriftet.

2.9.5 Densitometrische Analyse der Western Blot Ergebnis

Die densitometrischen Analyse der Ergebnisse des Western Blots wurde mit Hilfe der Software ImageJ durchgeführt. Die gemessenen Werte wurden anschließend auf die densitometrischen Werte des korrespondierenden GAPDH-Ergebnisses der untersuchten Protein-Probe normalisiert.

2.10 RNA-Isolation mit Trifast

2.10.1 Benötigte Materialien

Trifast	Peqlab 30-2020
Chloroform	Roth 6340.1
Isopropanol	Apotheke MRI
70 % Ethanol	Apotheke MRI
Diethylpyrocarbonate (DEPC)	Sigma D 5758
TRIS (hydroxymethyl) aminomethan	Sigma T 87602-3 KG
Borsäure	Sigma B 7901

Glycerol	Sigma G 5516
Guanidinhydrochlorid	SigmaRT G 4505
100 % Ethanol	Apotheke MRI
SDS (Sodiumdodecylsulfat)	SigmaRT L 3771
Zellschaber	PAA 90020

2.10.2 Lösungen

0,1 % DEPC H₂O: 1 ml DEPC-H₂O wird in 1 l ddH₂O gelöst und bei 37°C für 1 Stunde inkubiert. Danach wird die Lösung autoklaviert und bei RT vor der Verwendung abgekühlt.

10 x TBE: 540 g TRIS-aminomethan, 275 g Borsäure und 37,3 g EDTA werden in 5 l H₂O gelöst und auf einen pH-Wert von 8,3 eingestellt.

PCR-Ladungsbuffer (5 x): 1 mg Bromphenol Blue/Cyanblue wird in 25 ml 10 x TBE, 5 ml Glycerol und 20 ml H₂O gelöst und bei 4°C oder bei -20°C gelagert.

1,0 % SDS-Lösung: 1 g SDS wird in 100 ml ddH₂O gelöst.

Guanidinhydrochlorid-Lösung: 14,32 g Guanidinhydrochlorid wird in 500 ml 70%igem Ethanol gelöst.

2.10.3 Durchführung der RNA-Isolation

Für die RNA-Isolation sollen ca. 1.000.000 Osteoblasten in einer Schale ausplattiert und kultiviert werden, bis die Zellen den gesamten Boden bedecken. Danach wird das Medium von den Zellen abgesaugt und Trifast auf die Zellen gegeben.

- a. 500 µl / 25 cm² Flasche
- b. 1000 µl / 75 cm² Flasche oder 1 Schale
- c. 1500 µl / 175 cm² Flasche

Die Schale wird bei -80°C 1 Stunde lang inkubiert, auf Eis gestellt und danach aufgetaut. Die Zelllysate werden mit dem Zellschaber gesammelt und in ein steriles Eppendorf-

Röhrchen überführt. Nun werden 200 µl Chloroform in das Röhrchen gegeben und mit den Zelllysaten vermischt (15 S Vortexe). Danach wird diese Mischung 5 - 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Röhrchen wird bei 14.000 g und 4°C für 10 min zentrifugiert. Während der Zentrifugierung werden 500 µl Isopropanol in ein frisches Eppendorf-Röhrchen gefüllt.

Nach der Zentrifugierung wird die obere, klare, wässrige Phase, die RNA enthält, in ein frisches, mit Isopropanol gefülltes, Eppendorf-Röhrchen gegeben. Die RNA wird mit dem Isopropanol vermischt und 10 min auf Eis inkubiert. Danach wird die gesamte Mischung bei 14.000 g und 4°C 10 min lang zentrifugiert. Am Boden des Eppendorf-Röhrchens befindet sich die präzipitierte RNA. Der Isopropanol-Überstand wird vorsichtig entfernt.

Das RNA-Pellet wird nun mit 1 ml 70%igem Ethanol gewaschen und bei 14.000 g und 4°C 10 min lang zentrifugiert. Dieser Vorgang wird 2mal durchgeführt. Nach dem letzten Waschgang wird das Ethanol abgeschöpft und das Pellet mit 50 µl DEPC-H₂O resuspendiert. Danach wird das Eppendorf-Röhrchen für 10 - 15 min unverschlossen auf Eis liegen gelassen, damit das restliche Ethanol zu verdunsten kann.

Quantifizierung der RNA

Mittels Photometrie wird die Konzentration der im DEPC-H₂O enthaltenen RNA gemessen. Hierzu muss zunächst der Blindwert des H₂O eingestellt werden. Zuerst werden 1,5 µl DEPC-H₂O auf die Messprobe pipettiert und danach im aufgerufenen Programm die `Blind`-Taste gedrückt. Daraufhin wird der Blindwert automatisch eingestellt. Als nächstes wird die Option `Nucleic Acid` ausgewählt und 1,5 µl des RNA-DEPC-H₂O werden auf die Messprobe pipettiert und gemessen. Die RNA-Konzentration und das 260 / 280 Verhältnis werden notiert.

Integritätskontrolle der RNA

Zuerst muss das Agarosegel vorbereitet werden: Dazu werden 1,5 g Agarose in 100 ml TBE (1 x) gegeben und in der Mikrowelle gelöst. Danach werden 3 µl Ethidiumbromid zum Gel hinzugegeben, und das flüssige Gel in die Gelkammer gegossen. Danach wird sofort ein Kamm ins Gel platziert. Zur Integritätsprüfung

werden 0,5 µg RNA benötigt. Anhand der RNA-Konzentration wird das Volumen der benötigten RNA errechnet und genau diese Menge an RNA in ein steriles Röhrchen pipettiert. Das Gesamtvolumen wird mit DEPC-H₂O befüllt, so dass nur noch 10 µl freibleiben. Danach werden 7 µl PCR Loading Buffer (5 x) dazugegeben. Nachdem das Gel polymerisiert ist, wird der Kamm herausgezogen und das Gel in die Laufkammer gestellt. In die erste Gelkammer wird 1 µl Marker pipettiert. Danach werden die Proben auf das Gel geladen. Das Gel wird für 40 min einer Gleichspannung von 90 V ausgesetzt, wobei die Probe vom Negativ- zum Positivpol verläuft. Die Ethidiumbromide interkalieren zwischen der RNA und der DNA und sind im UV-Licht sichtbar. Intakte RNA ist an der Tatsache zu erkennen, dass auf dem Gel deutlich zwei Bänder, das 18 s- und das 28 s-Band, zu sehen sind. Abbildung 9 zeigt ein Beispiel solcher Bänder von 4 Proben.

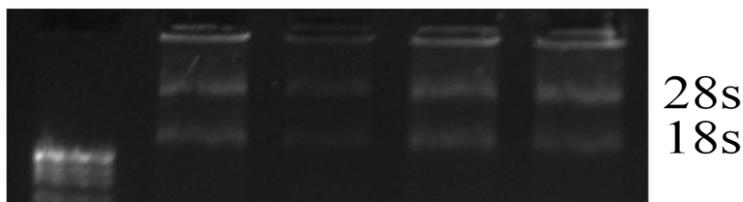


Abbildung 7 : Beispiel einer intakten RNA.

Links befindet sich der Größenmarker in Form der scharf begrenzbarer Bänder

2.11 cDNA Synthese

2.11.1 Benötigte Materialien

First Strand cDNA Synthesis Kit

Fermentas K 1611

0,1 % DEPC-H₂O

2.11.2 Durchführung

Zuerst wird ein first Strand cDNA Synthesis Kit von -20 °C und die RNAs von -80°C aufgetaut. Die einzelnen Komponenten der Kits werden kurz zentrifugiert und zusammen mit der RNA auf Eis gelegt. Normalweise werden 2 - 4 µg RNA für die cDNA-Umschreibung benötigt. Anhand der gemessenen RNA-Konzentration wird das Volumen des RNA-DEPC-H₂O errechnet und in RNA-freie Röhrchen pipettiert. Für jede Probe

werden 1 µl Oligo Primer und 1 µl Random Hexamer Primer in die Röhrehinzugeben und mit DEPC-H₂O bis zum Gesamtvolumen von 11 µl gefüllt. Die gesamte Mischung wird als A-Komponente bezeichnet.

A-Komponente (für jede Probe)	Volumen	Menge
Gesamte RNA	variabel	2 bis 4 µg
Oligo (dT) ₁₈ Primer	1,00 µl	2,5 µmol
Random Hexamer Primer	1,00 µl	2,5 µmol
DEPC-H ₂ O	bis 11,0 µl aufgefüllt	

Tabelle 7: A-Komponente-Liste

Danach werden die Proben für 5 min bei 65°C in einen Thermocycler (Eppendorf) gestellt. Nach diesem Vorgang wird die Temperatur automatisch auf 4°C heruntergekühlt. Währenddessen kann der B-Komponente Mastermix vorbereitet werden. N ist die Zahl der Proben.

B-Komponente	Volumen / Röhren	Gesamtvolumen (Mastermix)
5 x Reaktionspuffer	4 µl	4 * (N+1) µl
RiboLock™ RNA Inhibitor (20 U/µl)	1 µl	1 * (N+1) µl
10 mM dNTP Mix	2 µl	2 * (N+1) µl
M-MuLV Reverse Transkriptase (20 U/µl)	2 µl	2 * (N+1) µl
Gesamt	9 µl	9 * (N+1) µl

Tabelle 8: B-Komponente-Liste

9 µl der B-Komponente werden in einem abgekühlten Eppendorf-Röhren bis auf ein Gesamtvolumen von 20 µl eingestellt.

Zuerst werden im Thermocycler die Gefäße 60 min lang bei 37°C inkubiert. Danach wird durch die Inkubation des Gefäßes für 5 min bei 70°C die Reverse Transkriptase aktiviert. Diese Reaktion wird durch das Abkühlen des Gefäßes auf 4°C gestoppt. Die

synthetisierte cDNA wird mit DECP-H₂O 10-fach verdünnt und darf nun für die RT-PCR-Analyse benutzt werden. Die Intaktheit und Menge der geladenen cDNA wird mittels PCR unter Benutzung des Primers für β -Aktin überprüft.

2.12 Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

2.12.1 Benötigte Materialien

Taq DNA Polymerase	Axon Labortechnik 22466
Reaktionspuffer B	Axon Labortechnik 22466
MgCl ₂	Axon Labortechnik 22466
PCR Grade Nucleotide Mix (dNTPs)	Axon Labortechnik 24478

2.12.2 Reaktionsmechanismus

Die PCR wird verwendet, um eine spezifische Region der DNA-Sequenz zu amplifizieren. Diese Methode basiert auf Temperaturwechsel und besteht aus mehreren Zyklen wiederholter Reaktionen die zur enzymatischen Replikation der DNA führen. Die gesamte PCR besteht aus 20 - 40 Zyklen, wobei jeder Zyklus aus drei Schritten besteht, die bei verschiedenen Temperaturen ablaufen: Der erste Schritt ist die Denaturierung, der zweite die Primerhybridisierung und der dritte die DNA-Synthese. Bei der Denaturierung wird die doppelsträngige DNA durch hohe Temperatur (95°C) in zwei Einzelstränge aufgespalten. Während der Primerhybridisierung bindet sich der Primer mit der komplementären Sequenz der beiden Einzelstränge zusammen. Während dieses Schrittes ist die Temperatur primerspezifisch und liegt normalerweise zwischen 52°C und 65°C. Bei der DNA-Synthese wird die thermostabile DNA-Polymerase bei ca. 72°C aktiviert und fördert die Verlängerung der Primer am freien 3'-OH-Ende mit Verwendung von dNTPs. Der gesamte Verlauf eines PCR-Zyklus wird in Abbildung 13 dargestellt:

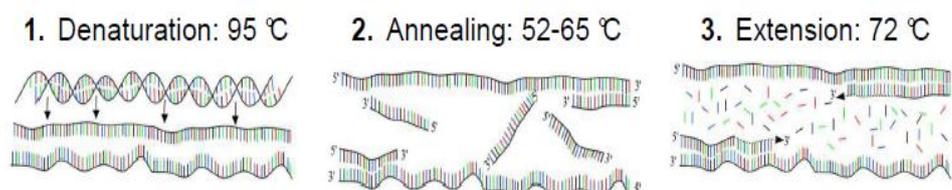


Abbildung 8: Ablauf eines PCR-Zyklus

2.12.3 Verwendete Primer

Gen	GenBank Accession	Forward Primer	Reverse Primer	Glühtemperatur (°C)	Amplicon (bp)
Alk-1	NM_000020.1	GCT CAG ACA CGA CAA CAT CC	ATT GCG GCT CTT GAA GTC G	60	256
Alk-2	NM_001616.2	CTT GCA TTG CTG ACT TTG G	CCA ATT TCC TCC TCA AAT GG	60	253
Alk-3	NM_004329	CAC TGC CCC CTG TTG TCA TAG	ATC CTG TTC CAA ATC ACG ATT GT	57	179
Alk-5	NM_004612.1	TGT TGG TAC CCA AGG AAA GC	AAC ATC GTC GAG CAA TTT CC	60	287
Alk-6	NM_001203	CTT TTG CGA AGT GCA GGA AAA T	TGT TGA CTG AGT CTT CTG GAC AA	58	130
TGF- β R II	NM_3242.3	ATG CTG CTT CTC CAA AGT GC	AGG TTG AAC TCA CGT TCT GC	58	258
Smad 1	NM_005450	CAA CGG AGT AAC TGT GTC ACC	ATT CGC TGT GTC TTG GAA CC	60	259
Smad 2	NM_00100365	CAA ACC AGG TCT CTT GAT GG	GAG GCG GAA GTT CTG TTA GG	60	259
Smad 3	NM_005902.2	GGA GAA ATG GTG CGA GAA GG	GAA GGC GAA CTC ACA CAG C	60	258
Smad 4	NM_005359.3	TGA ATC CAT ATC ACT ACG AAC	CAG GCT GAC TTG TGG AAG	60	294
Smad 5	NM_005903.5	AAC CTG AGC CAC AAG AAC	GGC TGG GAA TTA TCT TGA CC	60	245
Smad 6	U59914	GGC AAA CCC ATA GAG ACA	GGT AGC CTC CGT TTC AGT	60	123

		CAA	GTA		
Smad 7	NM_005904.1	TTC GGA CAA CAA GAG TCA GC	AAG CCT TGA TGG AGA AAC C	60	201
Bambi	NM_012342.2	GGA TCG CCA CTC CAG CTA C	TGG TGT CCG TGA AAG CTG TA	58	603
Sara	NM_007324.2	TGG TTT GCT GAT GGG ATC TT	TTC CAA CAG GAC TTC CAA CC	58	196
Smurf 1	NM_020429.1	CAG CAT CAA GAT CCG TCT GA	GCA TAG ATC CAA ACG CTG GT	58	325
Smurf 2	NM_022739.3	AGA CTG GTG TGA GCA CAT GG	CAC TTG CTG TTG CTG TTG GT	58	239
Ski	NM_003036.3	TCC GCG TGT ACC ACG AGT GC	AGC AGG ATG TAG GCC CGC CA	60	208
SnoN	NM_005414.3	GCC ACG AAC TTT TCC TCA AA	GCT GGG GTG TAA AAA TGA ATG	58	493

Tabelle 9: Liste der verwendeten Primer

2.12.4 Durchführung

Das Volumen der zu untersuchenden cDNA liegt normalerweise zwischen 2 und 10 µl. Zuerst werden die cDNA-Proben und die negative Kontrolle (DEPC-H₂O) bei 4°C in RNase-freie Röhrchen überführt. Danach wird anhand der Anzahl der Proben N ein PCR-Mastermix errechnet und in ein anderes Eppendorf-Röhrchen pipettiert. Dieser Mastermix setzt sich wie folgt zusammen:

Anzahl der Proben: N, Volumen der cDNA: X µl

Reagenzien	Volumen pro Röhrchen	Gesamtvolumen(Master Mix)
Reaktionspuffer	2,00 µl	2 * (N+2) µl
MgCl ₂	2,00 µl	2 * (N+2) µl

Forward-Primer (5 mM)	1,00 µl	1 * (N+2) µl
Reverse-Primer (5 mM)	1,00 µl	1 * (N+2) µl
PCR Grade Nucleotide Mix (dNTPs)	0,50 µl	0.5 * (N+2) µl
Taq DNA Polymerase	0,10 µl	0.1 * (N+2) µl
PCR Grade Wasser	13,4-X µl	(13.4-X) * (N+2) µl
Gesamtvolumen	20-X µl	(20-X) * (N+2) µl

Tabelle 10: Liste der Komponenten des PCR Mastermix

Nach der Herstellung des Mastermix wird dieses Röhrchen gemischt und jeweils 20 µl des Mastermix in jedes Röhrchen pipettiert, die cDNA enthalten. Dabei muss die Pipettenspitze nach jeder Probe gewechselt werden, um eine Kontamination der Proben zu vermeiden. Danach werden die Bedingungen für die thermischen Zyklen (siehe Tabelle 12) durchlaufen und alle Proben werden in den Thermocycler gestellt. Schließlich beginnt die PCR.

Zyklenschritt	Dauer	Temperatur	Zylen
Initiale Denaturierung	5 min	95°C	1
Denaturierung	45 sek	95 °C	30 - 40
Primerhybridisierung	45 sek	52 - 65 °C	
DNA Synthese	45 sek	72 °C	
Letzte DNA Synthese	5 min	72 °C	1
Inkubation	eventuell über Nacht	4 °C	1

Tabelle 11 Bedingungen der PCR-Zyklen

Wenn das Agarosegel für die Elektrophorese vorbereitet ist (siehe Kapitel 2.10.3), werden die gesamten Proben mit 7 µl PCR Loading Buffer (siehe Kapitel 2.10.2) vermischt und kurz zentrifugiert. Danach wird das Agarosegel in die Laufkammer gestellt. In die erste Tasche werden 3 µl Marker pipettiert. Ab der zweiten Tasche werden die einzelnen Proben auf das Gel geladen. Das Gel wird für 40 min einer Gleichspannung

von 90 V ausgesetzt, wobei die Probe vom Negativ- zum Positivpol verläuft. Danach wird das Gel unter UV-Belichtung fotografiert.

2.12.5 Densitometrische Analyse der PCR Gele

Das zu untersuchende Gel wird 5mal mit unterschiedlicher Belichtungszeit fotografiert und mit der Software ImageJ densitometrisch analysiert. Die gemessenen Werte werden dann auf die densitometrischen Werte des β -Aktin-PCR-Gels der untersuchten cDNA normalisiert.

2.13 Viabilitätsmessung mit Alamar-Blue

2.13.1 Benötigte Materialien

Alamar Blue Reagent

Biozol BZL 00727

2.13.2 Durchführung

Zuerst müssen die Kontrollen für den Versuch festgelegt werden.

- a. Positivkontrolle: nicht stimulierte Zellen
- b. Blindkontrolle: nur Medium, keine Zellen enthalten.

Zuerst werden die Osteoblasten in eine 96-Well-Platte ausplattiert und kultiviert. Die Osteoblasten werden nach den Versuchen stimuliert. Danach wird Alamar-Blue-Lösung mit 1/10 des Volumens des Zellmediums zu jeder Probe hinzugegeben. Danach wird die Platte bei 37°C, 5 % CO₂ für 1 - 2 h inkubiert. Schließlich wird die Fluoreszenzintensität der Platte gemessen.

2.13.3 Auswertung

F_b: Wert der Blindkontrolle

F_p: Wert der Positivkontrolle

F_s: Wert der stimulierten Zellen

Überlebensrate der stimulierten Zellen: $(F_s - F_b) / (F_p - F_b) * 100 \%$

2.14 Messung der Histon deacetylase complex (HDAC)-Aktivität-Messung

2.14.1 Benötigte Materialien

SensoLyte 520 HDAC Activity Assay Kit * Fluorimetric*	ANA SPEC
- Komponente A HDAC 520 Substrat	25 mM in DMSO, 40 µl
- Komponente B Deacetyliertes 520 Standard	25 mM in DMSO, 10 µl
- Komponente C HeLa Nuclear Extract	4 mg Protein / ml, 15 µl
- Komponente D Assay Buffer	20 ml
- Komponente E Trichostatin A (HDAC-Inhibitor)	300 µM in DMSO, 100 µl
- Komponente F HDAC-Entwickler (10 x)	0.5 ml
- Komponente G Zell-Lysepuffer	20 ml

Osteoblasten

Osteoblastenkulturmedium

2.14.2 Lösungen

HDAC-Substrat-Lösung

25 mM HDAC-Substrat (Komponente A) werden im Verhältnis 1:100 im Osteoblastenkulturmedium verdünnt. Dabei sind 40 µl des verdünnten HDAC-Substrats ausreichend, um eine Reaktion zu erzeugen. Für jedes Experiment wird eine neue Substratlösung vorbereitet.

HDAC-Inhibitor-Lösung

300 µM Trichostatin A (Komponente A) wird im Verhältnis 1:60 im Osteoblastenkulturmedium verdünnt. 10 µl dieser Lösung sind ausreichend um eine Reaktion zu erzeugen.

HDAC-Entwickler-Lösung (1 x)

HDAC-Entwickler (10 x) (Komponente F) wird im Verhältnis 1:10 in kaltem Zell-Lysepuffer verdünnt. Danach werden 300 µM Trichostatin A (Komponente E) im Verhältnis 1:150 in dieser Entwickler-Lösung (1 x) verdünnt. (Die Endkonzentration des Trichostatins in der Entwicklerlösung beträgt 2 µM). Für jedes Assay sind 50 µl dieser Entwicklerlösung notwendig.

2.14.3 Reaktionsmechanismus

Ein acetyliertes Substrat wird mit Proben, die HDAC beinhalten, inkubiert. Die Deacetylierung des Substrats sensibilisiert es gegenüber dem HDAC-Entwickler und erzeugt die grüne Fluoreszenz, die mit Hilfe eines Fluoreszenz-Readers festgestellt werden kann.

2.14.4 Durchführung

Die Osteoblasten werden in einer 96-Well-Platte ausplattiert. Wenn eine Dichtigkeit von 100 % erreicht wurde, werden die Osteoblasten entsprechend des Protokolls stimuliert. Danach wird das Osteoblastenkulturmedium durch 40 µl HDAC-Substratlösung (250 µM HDAC-Substrat) ausgetauscht und es werden die folgenden Kontrollen durchgeführt.

Die positive Kontrolle enthält Substratlösung ohne Stimulation

Die Inhibitor-Kontrolle enthält Trichostatin A und Substratlösung

Die Baseline-Kontrolle enthält Medium ohne Substrat. Dieses Medium soll am Ende der Inkubation entfernt und durch ein Medium, das Entwicklerlösung und Substrat enthält, ersetzt werden.

Die Stimulationskontrolle enthält das Stimulationsmedium ohne Substrat. Dieses Medium soll am Ende der Inkubation entfernt und durch ein Medium, das Entwicklerlösung und Substrat enthält, ersetzt werden.

Alle Kontrollen werden bis zum Volumen von 50 µl mit Osteoblastenmedium gefüllt. In einem nächsten Schritt werden die Zellen bei 37°C während der gewünschten Expositionsperiode inkubiert. Danach wird die Deacetylierung durch die Zugabe von 50 µl HDAC Inhibitor / Entwickler-Lösung pro Well beendet. Die gesamte Platte wird gründlich gemischt und zusätzlich während 15 min bei RT inkubiert. Schließlich wird das Fluoreszenzsignal bei Ex / Em= 490 nm / 520 nm gemessen.

2.14.5 Datenanalyse

Der Fluoreszenzwert der Baseline-Kontrolle ist die Fluoreszenz für den Hintergrund. Der Hintergrundwert wird von den Werten der anderen Wells, die mit Substrat gefüllt sind,

abgezogen werden. Alle Werte sollen in Relativen Fluoreszenz-Einheiten (Relative Fluoreszenz Units; RFU) ausgedrückt werden.

2.15 Statistische Auswertung

Für die statistische Analyse von zwei Testbedingungen wird ein t-Test durchgeführt. Bei drei oder mehr Testbedingungen wird die statistische Auswertung mittels eines Kruskal-Wallis-Tests vorgenommen. Wenn der p-Wert $< 0,05$ ist, wird er als statistisch signifikant angesehen.

3 Ergebnisse

3.1 BMP 2 und BMP 7 aktivieren den Smad 1/5/8-Signalweg in humanen Osteoblasten und dieser Effekt ist bei beiden Proteinen nach 72 h statistisch signifikant

Um den optimalen Zeitpunkt für die RNA- und die Protein-Isolation nach der Stimulation mit BMP 2 und BMP 7 zu bestimmen, wurden die Osteoblasten und mit dem Ad 5-BRE-Luc-Virus infiziert. Danach wurden die Zellen mit BMP 2 und BMP 7 in Osteoblastenkulturmedium für 24, 48, 72 und 96 Stunden stimuliert und danach ein Luciferase-Assay durchgeführt. Als Kontrolle dienten jene mit Ad 5-BRE-Luc infizierten Osteoblasten, die nicht stimuliert worden waren. Danach wurde die Proteinkonzentration bestimmt und die beim Luciferase-Assay bestimmte RLU (Relative Luminescence Units) wurde auf die Proteinkonzentration normalisiert. Insgesamt wurden 3 Patienten untersucht. Die Konzentration von BMP 2 und BMP 7 betrug 50 ng/ml

Smad1 Reporter Assay

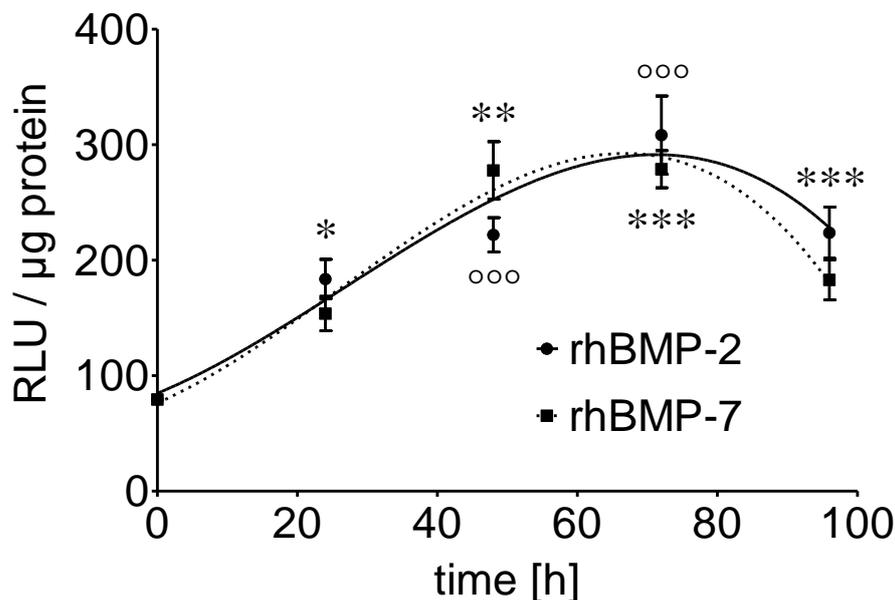


Abbildung 9: Auswirkung von BMP 2 und -7 auf mit dem Ad 5-BRE-Luc-Virus infizierte Osteoblasten nach 24 h (D1), 48 h (D2), 72 h (D3) und 96 h (D4) Stimulation.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ im Vergleich zur unbehandelten Zellen im Falle des rhBMP 2.

° $p < 0.05$; °° $p < 0.01$; °°° $p < 0.001$ im Vergleich zur unbehandelten Zellen im Falle des rhBMP 7.

Im Gegensatz zur Kontrolle, stieg die RLU nach der Stimulation signifikant ($p < 0.001$) und erreichte sowohl bei BMP 2 als auch bei BMP 7 nach 72 Stunden Stimulation ihr höchstes Niveau. Dies bedeutet, dass sich die aktivierten Smad 1/5/8 bei der Stimulation mit BMP 2 und -7 sich zu diesem Zeitpunkt am signifikantesten von den nicht stimulierten Zellen unterschieden. Somit war der beste Zeitpunkt für die RNA- und Protein-Isolation 72 Stunden nach dem Beginn der Stimulation.

3.2 PCR-Analyse von mit BMP 2, BMP 7 und TGF- β_1 stimulierten Zellen

Die Osteoblasten wurden mit 50 ng/ml rhBMP 2 oder rhBMP 7 mit oder ohne Anwesenheit von 5 ng/ml TGF- β_1 behandelt. Als Kontrolle dienten die Osteoblasten ohne Behandlung. Nach 72 Stunden (siehe Kapitel 3.1) wurde die mRNA aus den Zellen isoliert und die RT-PCR mit den in Tabelle 9 aufgelisteten Primern durchgeführt. Insgesamt wurden 4 Patienten untersucht.

3.2.1 Ergebnis Gen-Expression Smad 1

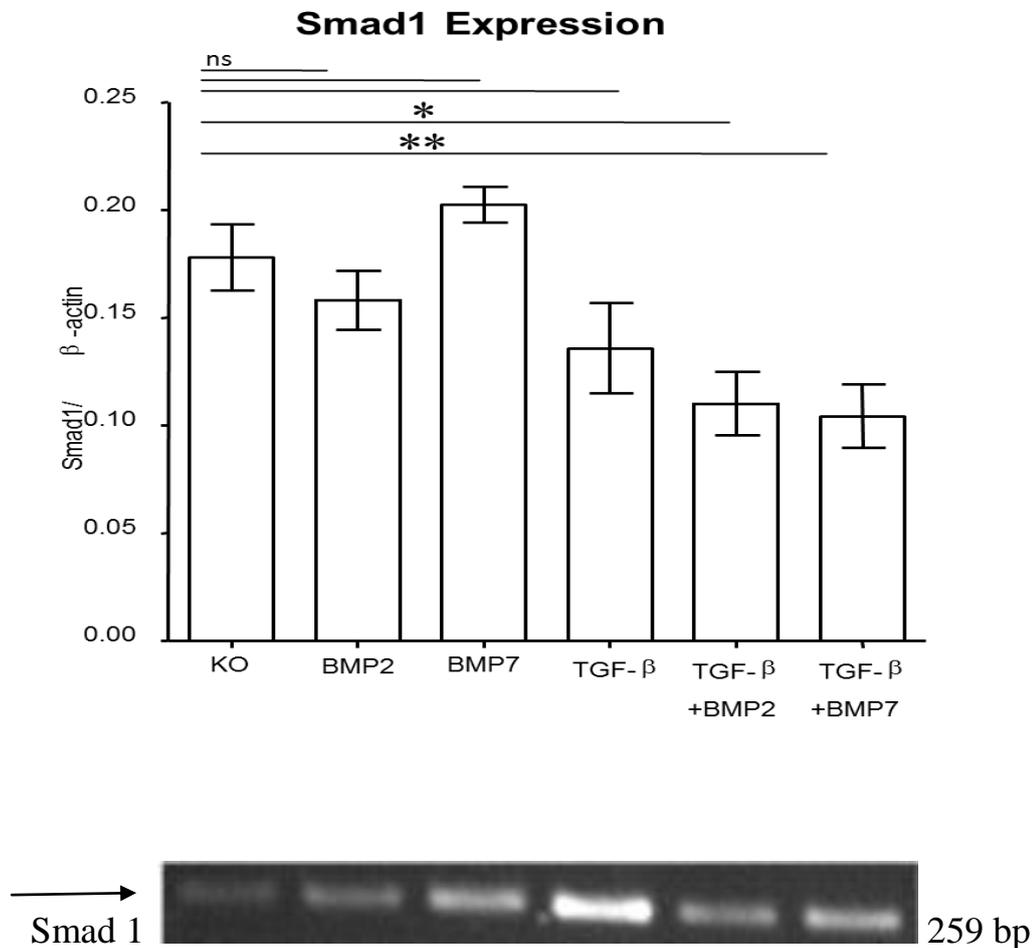


Abbildung 10: Densitometrische Analyse der Expression von Smad 1 (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns: nicht signifikant)

Die densitometrische Analyse zeigt keine signifikante Veränderung der Genexpression von Smad 1 nach der Behandlung mit BMP 2 und -7 sowie der alleinigen Behandlung mit TGF- β_1 an. Allerdings lässt die Genexpression nach Behandlung mit BMP 2 und TGF- β_1 im Gegensatz zur Kontrolle signifikant ($p < 0.05$) nach. Der gleiche Effekt wurde auch nach der Behandlung mit BMP 7 und TGF- β_1 im Vergleich zur Kontrolle ($p < 0.01$) beobachtet. Die Genexpression nach der Stimulation mit BMP 2 und TGF- β_1 im Vergleich zur Stimulation mit BMP 2 Stimulation allein, sowie mit BMP 7 und TGF- β_1 im Gegensatz zur Stimulation mit BMP 7 allein zeigt auch den Trend zur Abnahme, aber diese beiden Effekte sind statistisch nicht signifikant.

3.2.2 Ergebnis Gen-Expression Smad 2

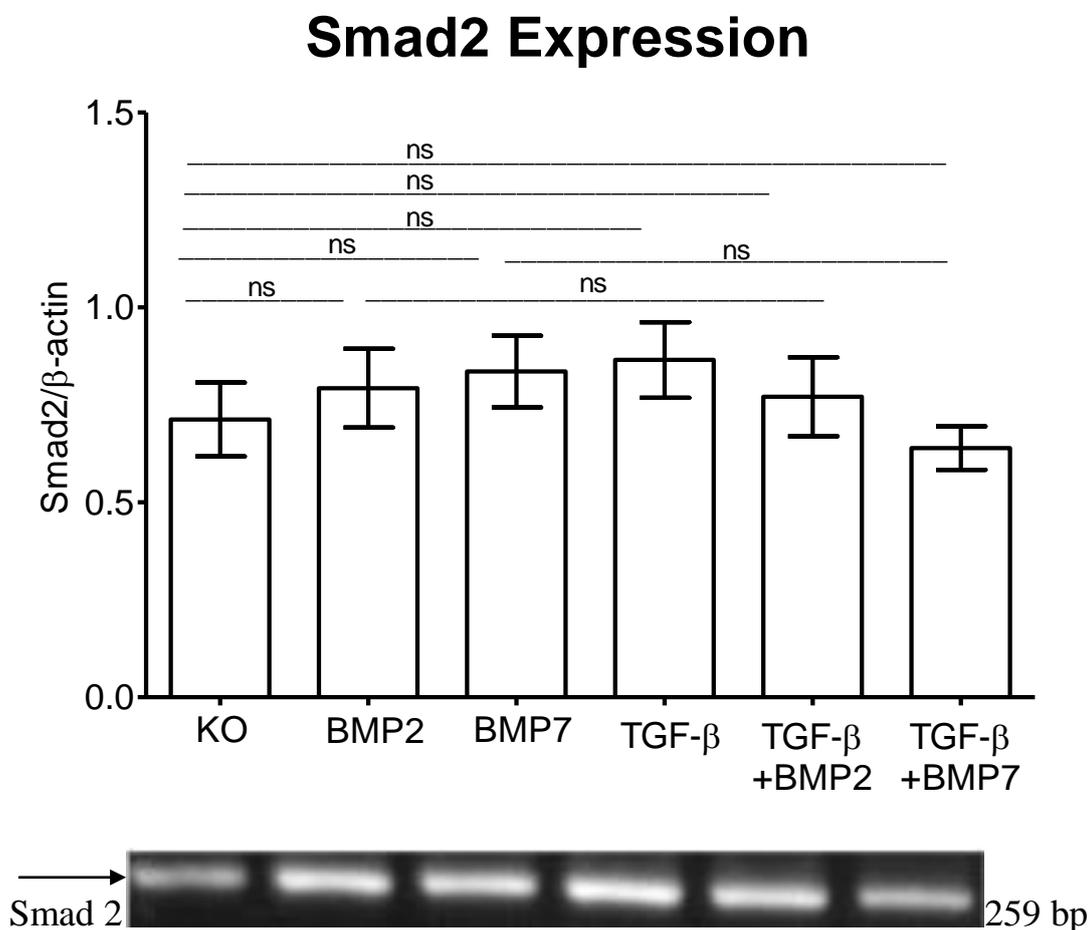


Abbildung 11: Densitometrische Analyse der Expression von Smad 2 (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns: nicht signifikant)

Die desitometrische Analyse zeigt keine signifikante Steigerung oder Verringerung der Genexpression von Smad 2 nach den unterschiedlichen Behandlungen an.

3.2.3 Ergebnis Gen Expression Smad 3

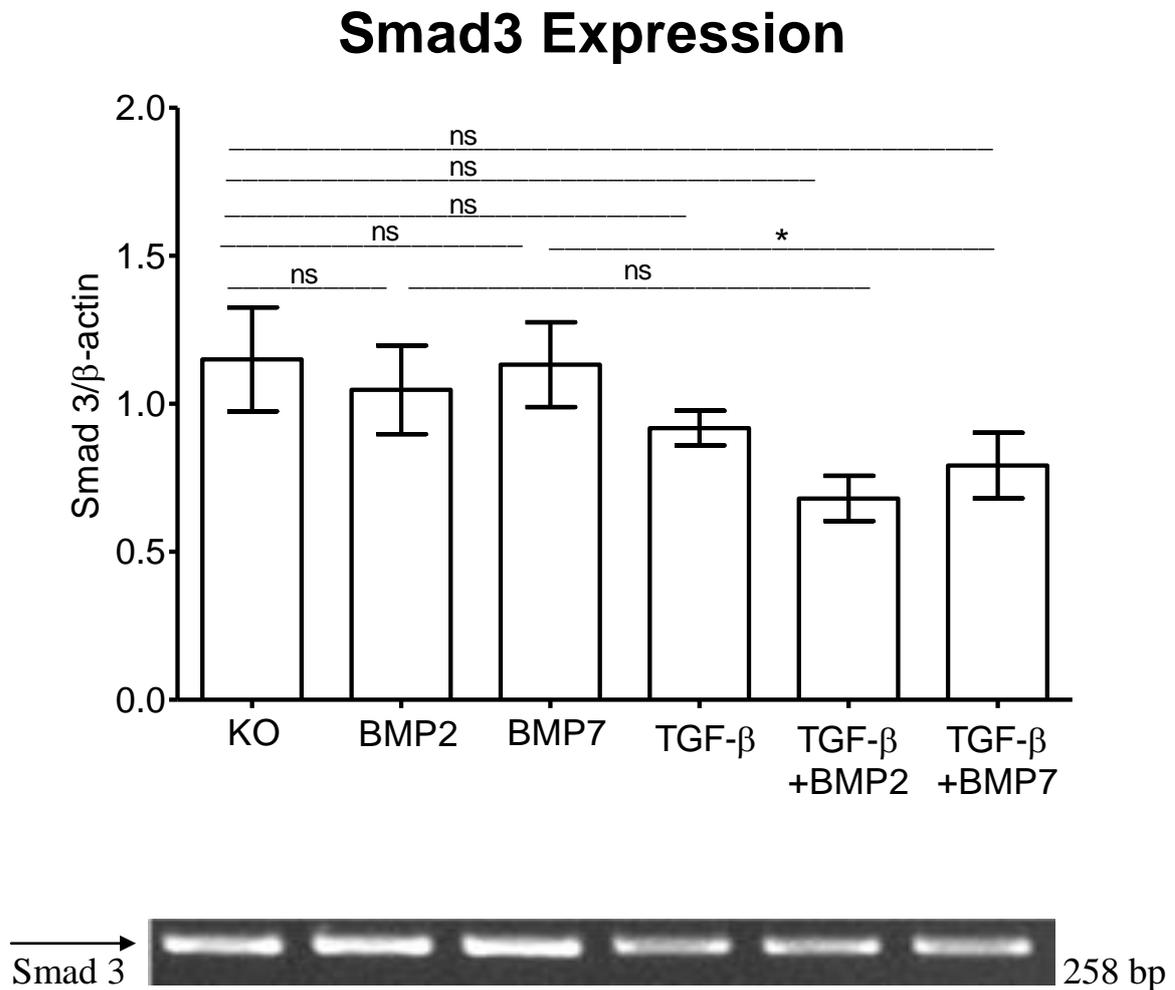


Abbildung 12: Densitometrische Analyse der Expression von Smad 3 (* p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001; ns: nicht signifikant)

Die densitometrische Analyse zeigt keine signifikante Steigerung oder Verringerung der Genexpression von Smad 3 nach den unterschiedlichen Behandlungen an. Die Genexpression von Zellen nach der Behandlung mit TGF-β₁ und BMP 7 im Gegensatz zur Behandlung mit BMP 7 allein ist signifikant (p < 0.05) herunterreguliert.

3.2.4 Ergebnis Gen-Expression Smad 4

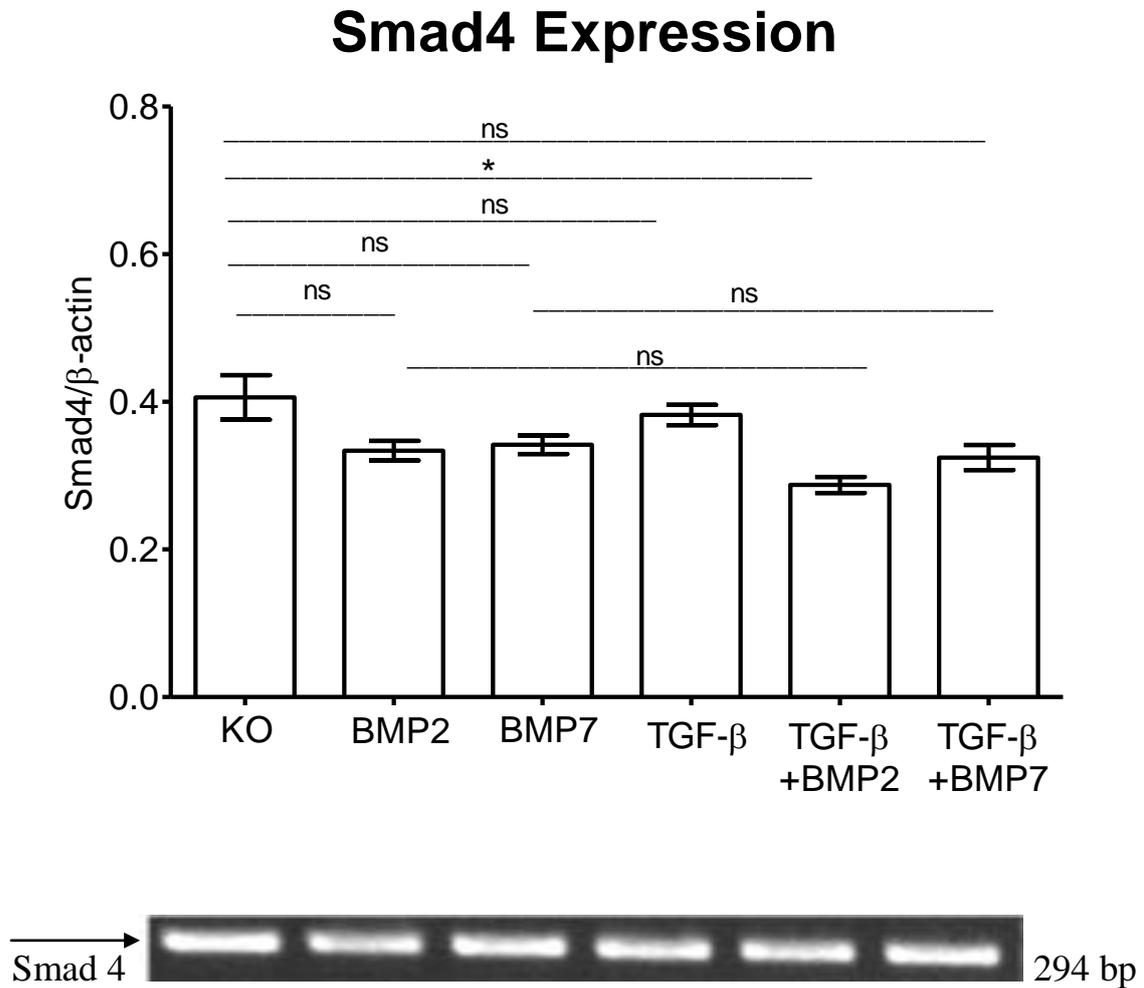


Abbildung 13: Densitometrische Analyse der Expression von Smad 4 (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns: nicht signifikant)

Die densitometrische Analyse zeigt keine wesentliche Steigerung oder Verringerung der Genexpression von Smad 4 an. Nur eine signifikante Abnahme ($p < 0.05$) der Genexpression nach der Behandlung mit BMP 2 und TGF- β_1 im Vergleich zur Kontrolle ist zu beobachten.

3.2.5 Ergebnis Gen-Expression Smad 5

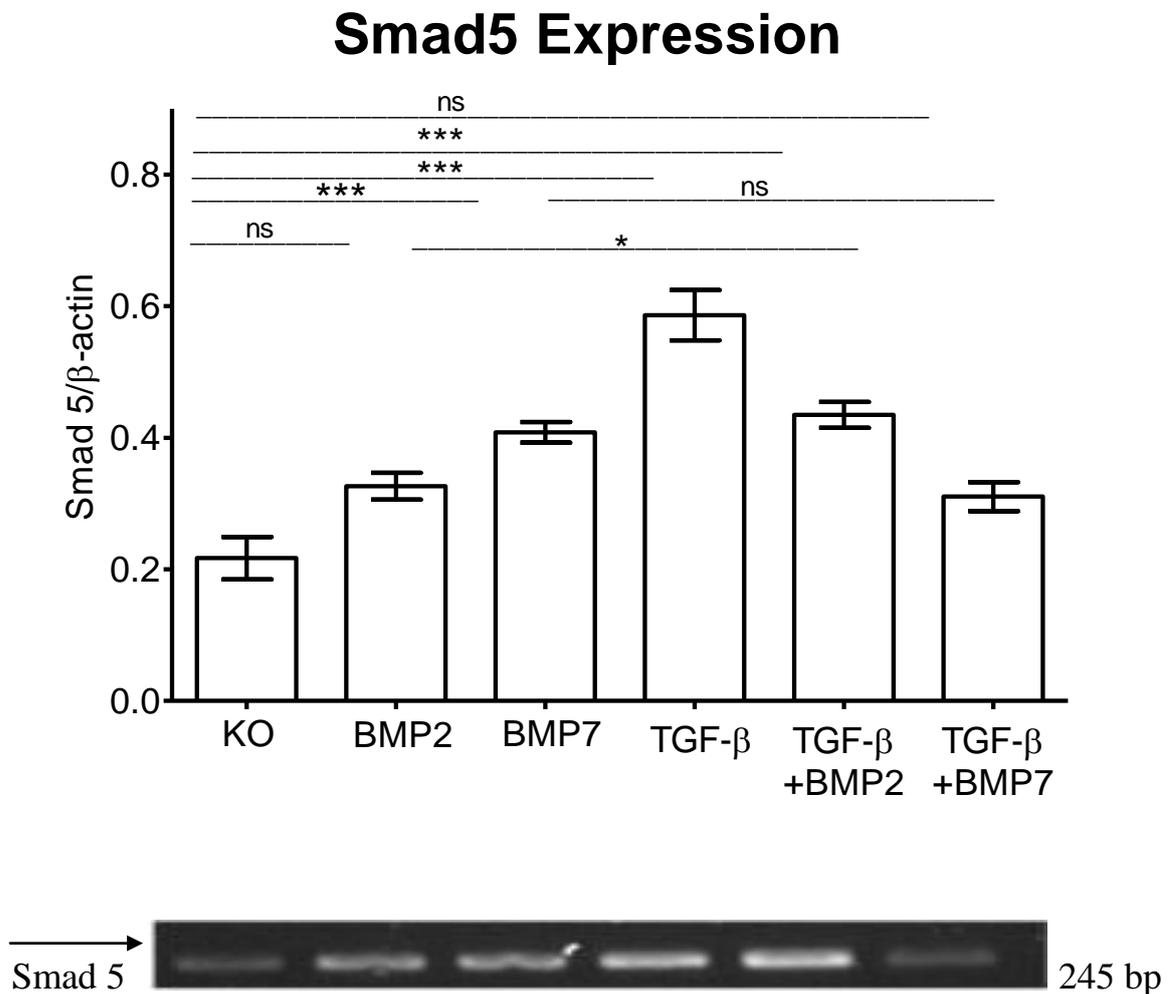


Abbildung 14: Densitometrische Analyse der Expression von Smad 5 (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns: nicht signifikant)

Die densitometrische Analyse zeigt eine signifikante Zunahme der Genexpression von Smad 5 nach der Behandlung mit BMP 7 allein ($p < 0.001$), mit TGF- β_1 allein ($p < 0.001$) und mit BMP 2 und TGF- β_1 ($p < 0.001$) an. Die Genexpression nach der Behandlung mit BMP 7 und TGF- β_1 im Vergleich zur Behandlung mit BMP 7 allein zeigt einen Trend zur Herunterregulierung der Genexpression von Smad 5 an. Der Effekt ist allerdings nicht statistisch signifikant. Darüber hinaus steigt die Genexpression von Behandlung mit BMP 2 und TGF- β_1 im Vergleich zur Behandlung mit BMP 2 allein signifikant ($p < 0.05$) an.

3.2.6 Ergebnis Gen-Expression Smad 6

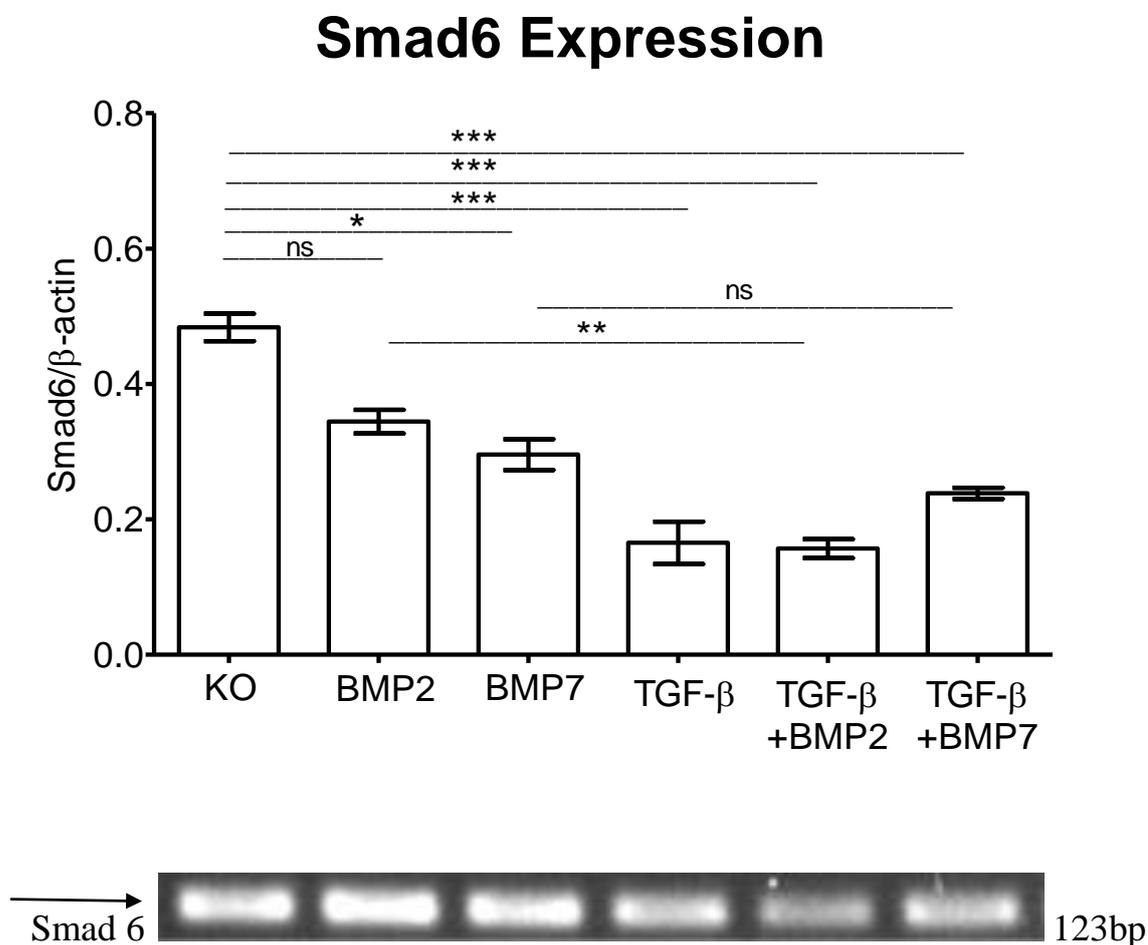


Abbildung 15: Densitometrische Analyse der Expression von Smad 6 (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns: nicht signifikant)

Die densitometrische Analyse zeigt eine signifikante Verringerung der Genexpression von Smad 6 nach der Stimulation mit BMP 7 ($p < 0.05$), mit TGF- β_1 ($p < 0.001$), mit BMP 2 und TGF- β_1 ($p < 0.001$) sowie mit BMP 7 und TGF- β_1 ($p < 0.001$) im Vergleich zur Kontrolle an. Nach der Behandlung mit TGF- β_1 und BMP 7 im Vergleich zur BMP 7 allein zeigt sich hingegen ein Trend zur Abnahme der Genexpression von Smad 6. Dieser Effekt ist aber statistisch nicht signifikant. Nach der Behandlung mit TGF- β_1 und BMP 2 zeigt sich im Vergleich zur Behandlung mit BMP 2 allein eine signifikante Abnahme ($p < 0.01$) der Genexpression von Smad 6.

3.2.7 Ergebnis Gen-Expression Smad 7

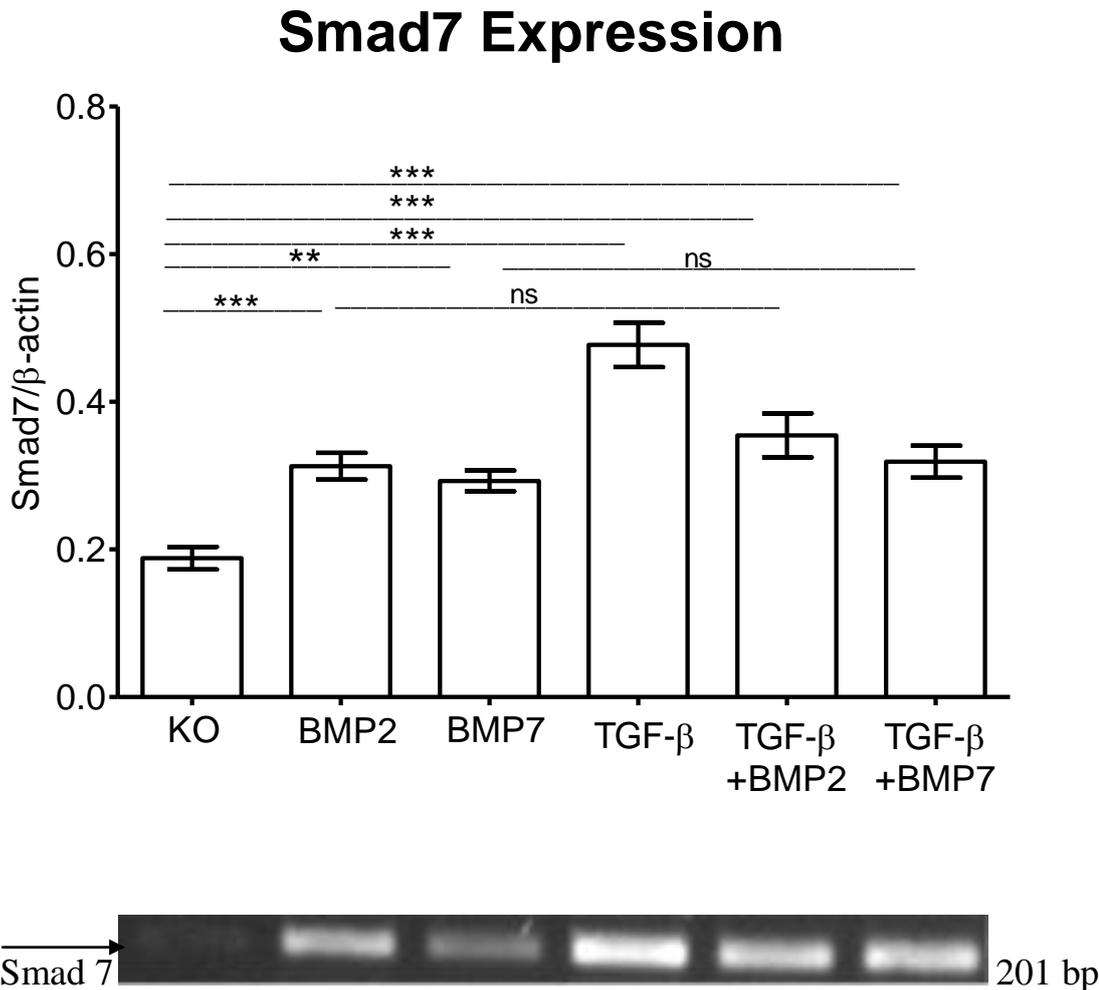


Abbildung 16: Densitometrische Analyse der Expression von Smad 7 (* p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001; ns: nicht signifikant)

Die densitometrische Analyse zeigt eine signifikante Steigerung der Genexpression von Smad 7 nach der Behandlung mit BMP 2 (p < 0.001), mit BMP 7 (p < 0.01), mit TGF-β₁ (p < 0.001), mit BMP 2 und TGF-β₁ (p < 0.001), sowie mit BMP 7 und TGF-β₁ (p < 0.001) im Vergleich zur Kontrolle an. Die Genexpression von Smad 7 nach der Behandlung mit BMP 2 und TGF-β₁ im Vergleich zur Behandlung mit BMP 2 allein, sowie nach der Behandlung mit BMP 7 und TGF-β₁ im Vergleich zur Behandlung mit BMP 7 allein zeigt einen Trend zur Steigerung der Genexpression von Smad 7 an. Allerdings ist dieser Effekt nicht statistisch signifikant.

3.2.8 Ergebnis Gen-Expression ALK-1

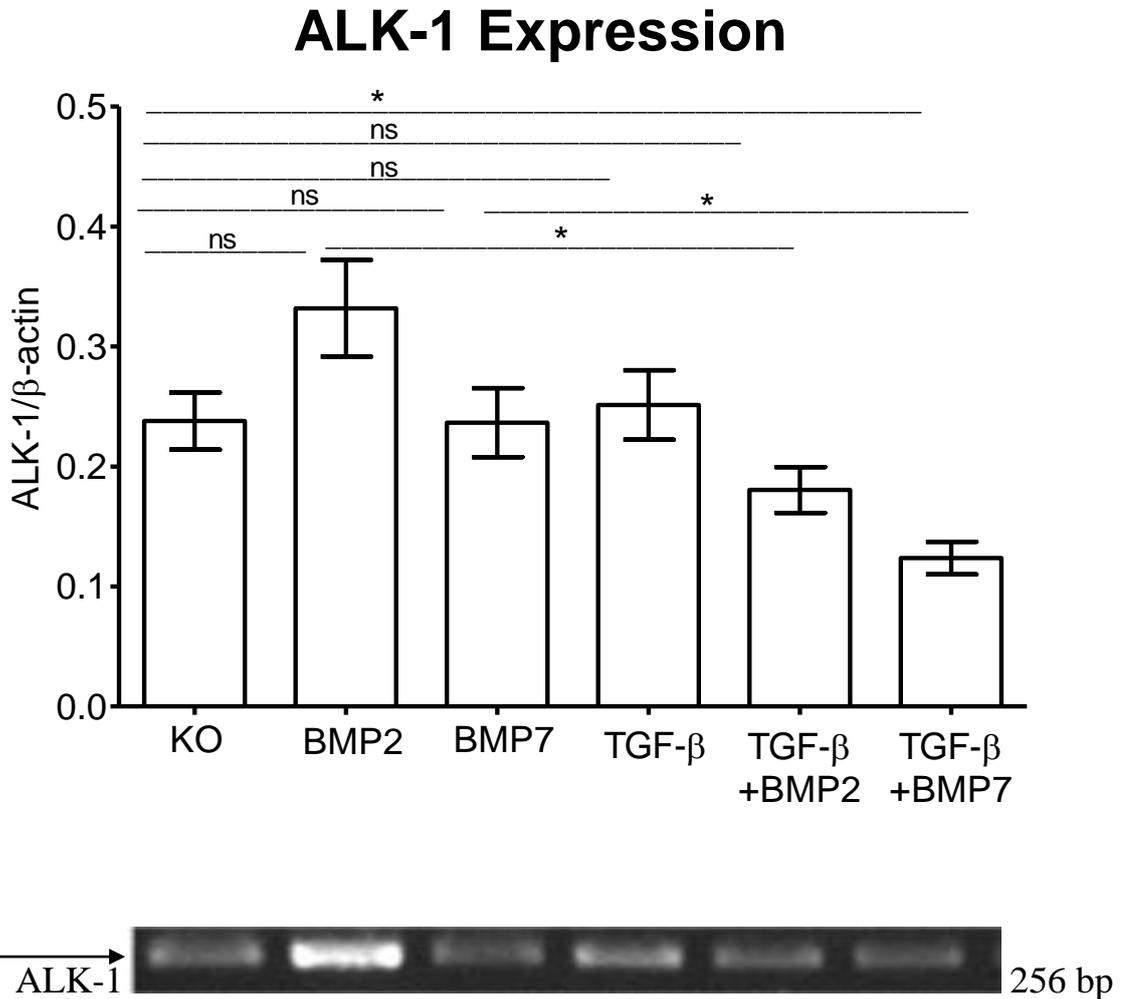


Abbildung 17: Densitometrische Analyse der Expression von ALK-1 (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns: nicht signifikant)

Die densitometrische Analyse zeigt eine signifikante ($p < 0.05$) Abnahme der Genexpression von ALK-1 nach der Behandlung mit TGF- β_1 und BMP 2 im Vergleich zur Behandlung mit BMP 2 allein, sowie nach der Behandlung mit TGF- β_1 und BMP 7 im Gegensatz zur Behandlung mit BMP 7 allein an. Im Vergleich zur Kontrolle ist die Genexpression von ALK-1 nach der Behandlung mit TGF- β_1 und BMP 7 ebenfalls signifikant ($p < 0.05$) verringert.

3.2.9 Ergebnis Gen-Expression ALK-2

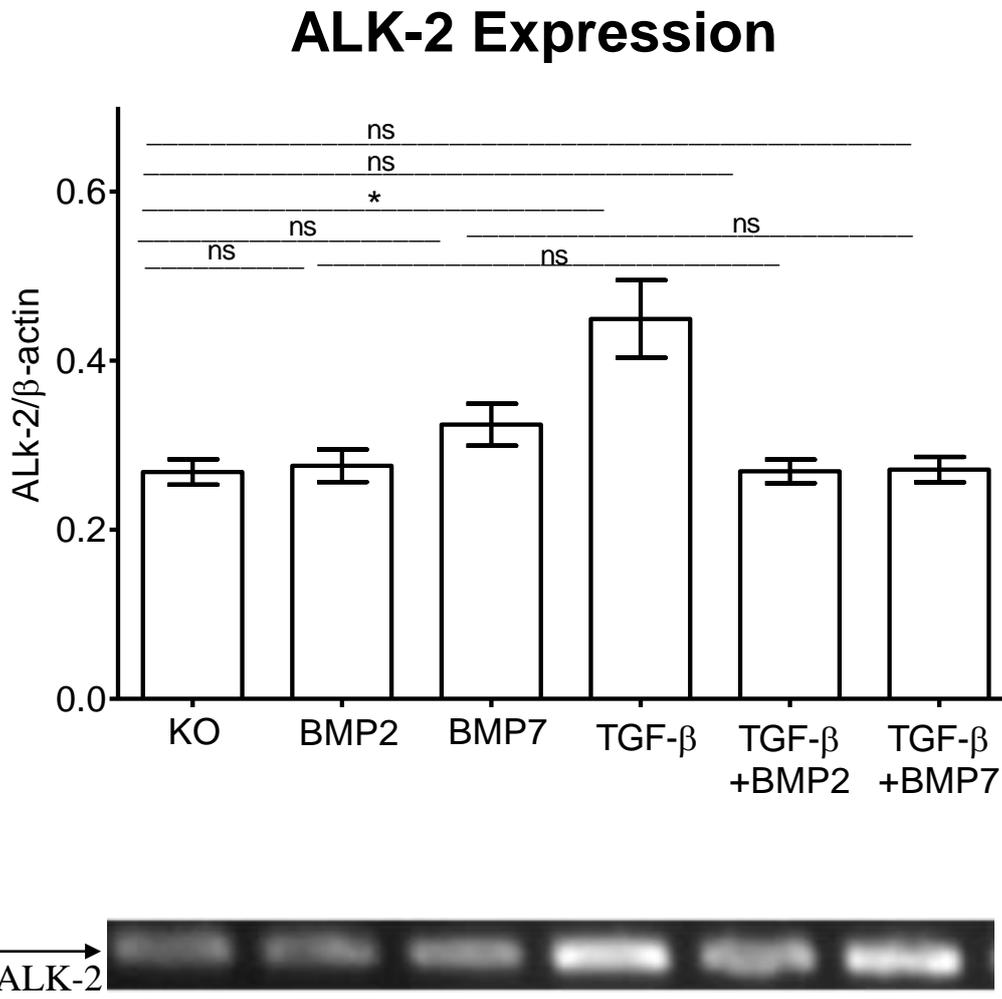


Abbildung 18: Densitometrische Analyse der Expression von ALK-2 (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns: nicht signifikant)

Die densitometrische Analyse zeigt eine signifikante Zunahme ($p < 0.05$) der Genexpression von ALK-2 nach der Behandlung mit TGF- β_1 im Vergleich zur Kontrolle an.

3.2.10 Ergebnis Gen-Expression ALK-3

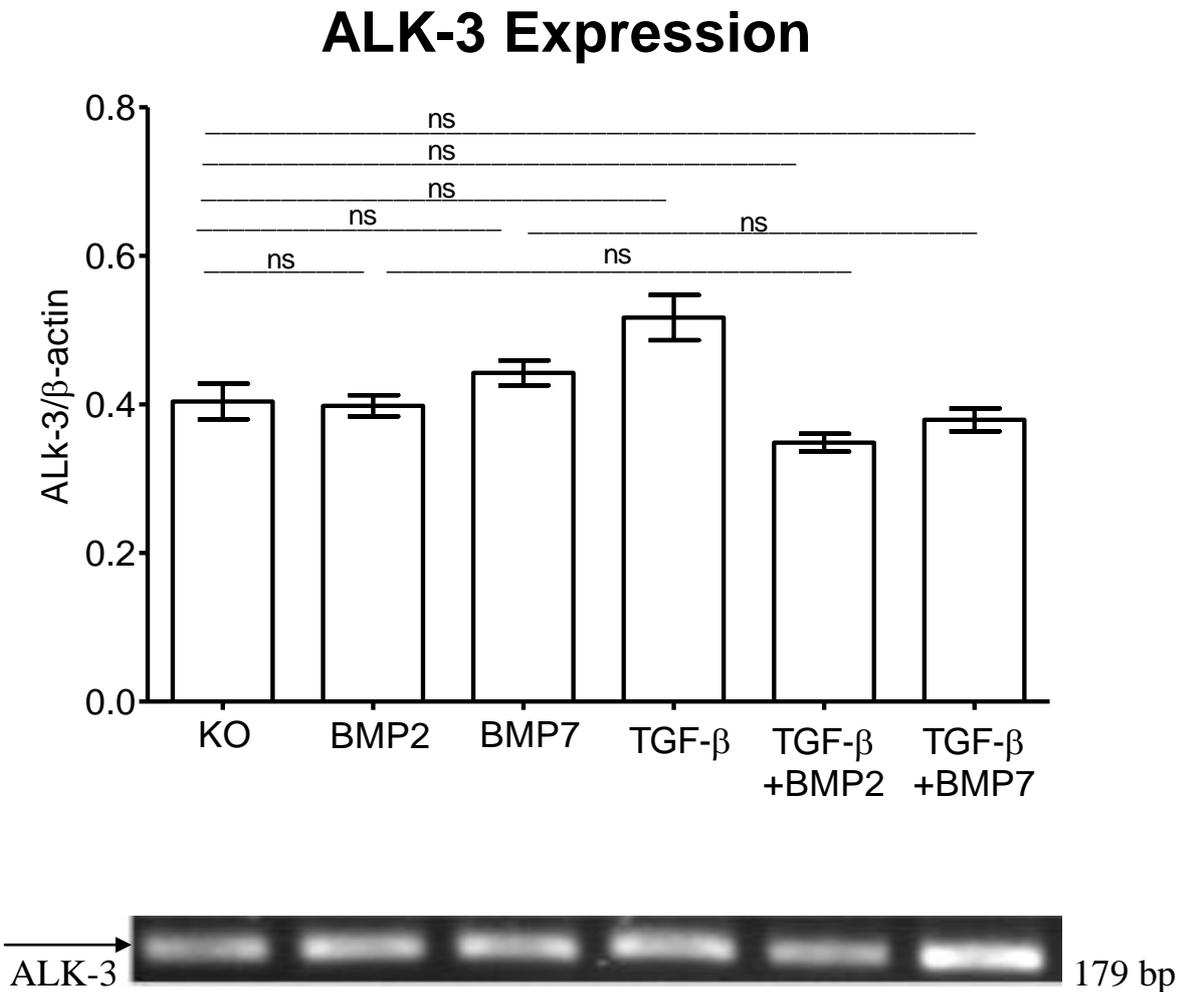


Abbildung 19: Densitometrische Analyse der Expression von ALK-3 (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns: nicht signifikant)

Die densitometrische Analyse zeigt eine signifikante ($p < 0.01$) Steigerung der Genexpression von ALK-3 nach der Behandlung mit TGF- β_1 im Vergleich zur Kontrolle an.

3.2.11 Ergebnis Gen-Expression ALK-5

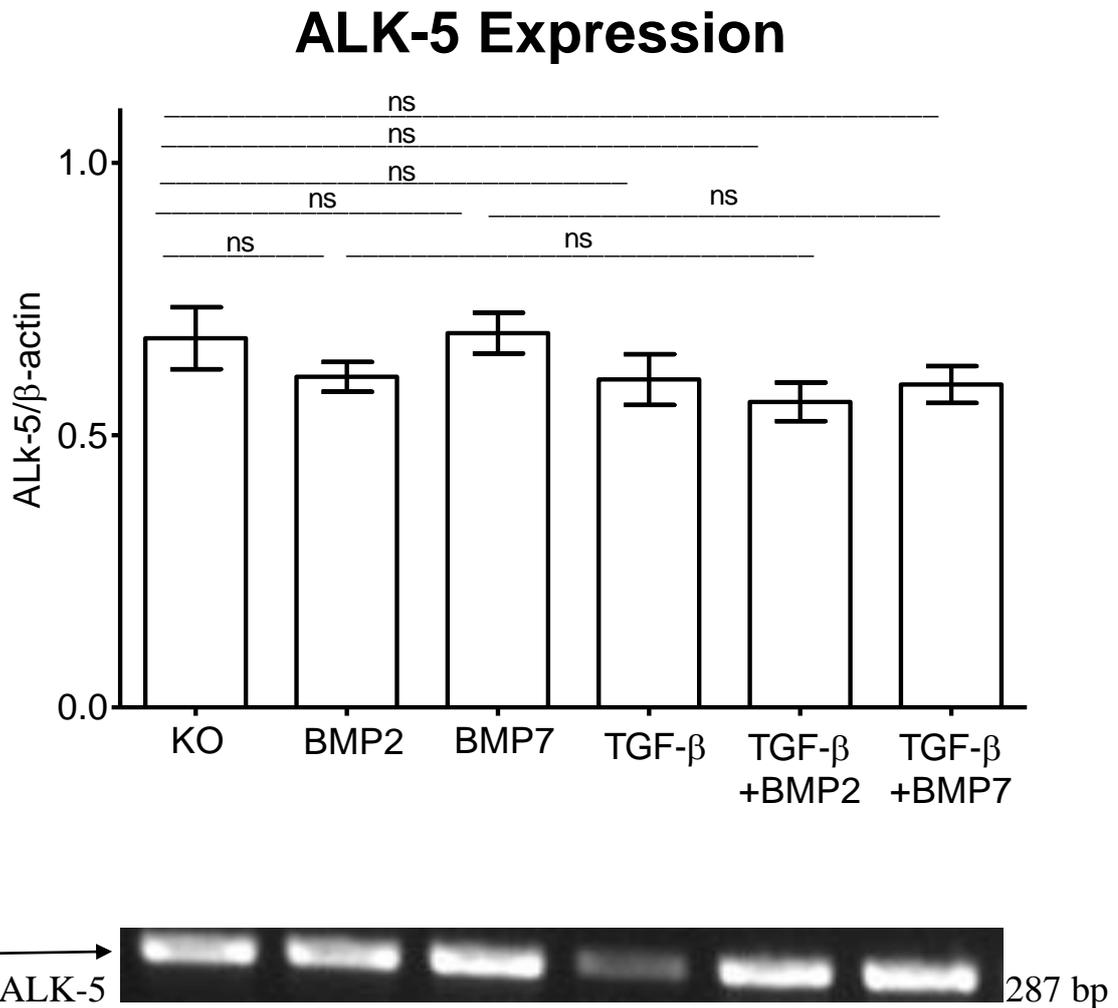


Abbildung 20: Densitometrische Analyse der Expression von ALK-5 (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns: nicht signifikant)

Die densitometrische Analyse zeigt keine signifikante Steigerung oder Verringerung der Genexpression von ALK-5 nach der Stimulation an.

3.2.12 Ergebnis Gen-Expression ALK-6

ALK-6 Expression

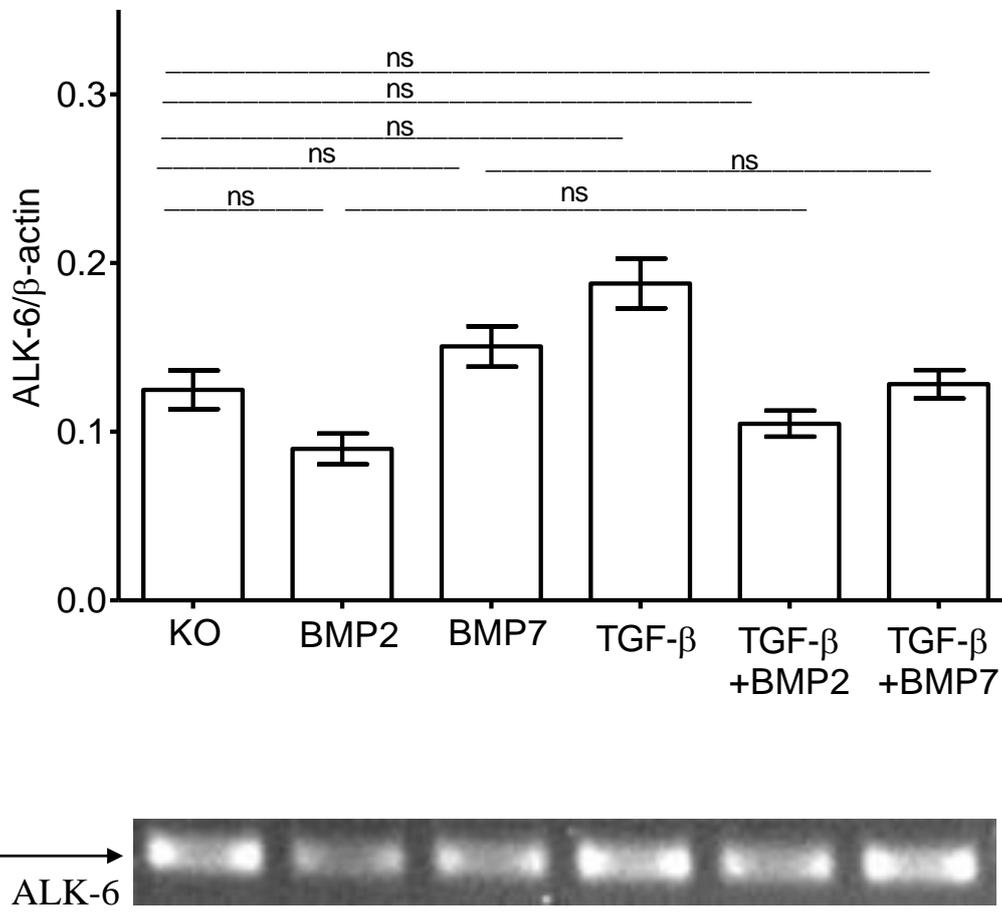


Abbildung 21: Desitometrische Analyse der Expression von ALK-6 (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns: nicht signifikant)

Die desitometrische Analyse zeigt einen Trend zur Verringerung der Genexpression von ALK-6 nach der Behandlung mit TGF- β_1 und BMP 7 im Vergleich zur Behandlung mit BMP 7 allein an. Der Effekt ist aber statistisch nicht signifikant.

3.2.13 Ergebnis Gen-Expression TGF- β Rezeptor II

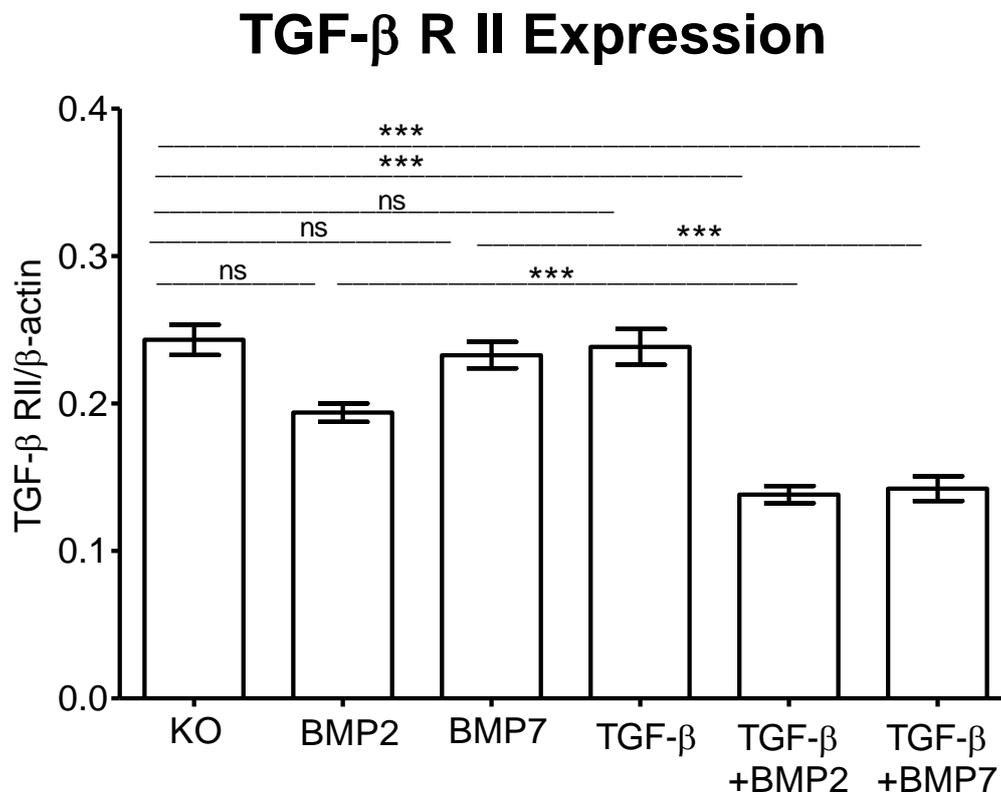


Abbildung 22: Densitometrische Analyse der Expression des TGF- β Rezeptors II (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns: nicht signifikant)

Die densitometrische Analyse zeigt eine signifikante Verringerung ($p < 0.001$) der Genexpression des TGF- β Rezeptors II nach der Behandlung mit TGF- β_1 und BMP 2 im Vergleich zur Behandlung mit BMP 2, sowie mit TGF- β_1 und BMP 7 im Vergleich zur Behandlung mit BMP 7 allein an. Im Gegensatz zur Kontrolle ist die Genexpression auch nach der Behandlung mit TGF- β_1 und BMP 2 und sowie mit TGF- β_1 und BMP 7 signifikant ($p < 0.001$) reduziert.

3.2.14 Ergebnis Gen-Expression Bambi

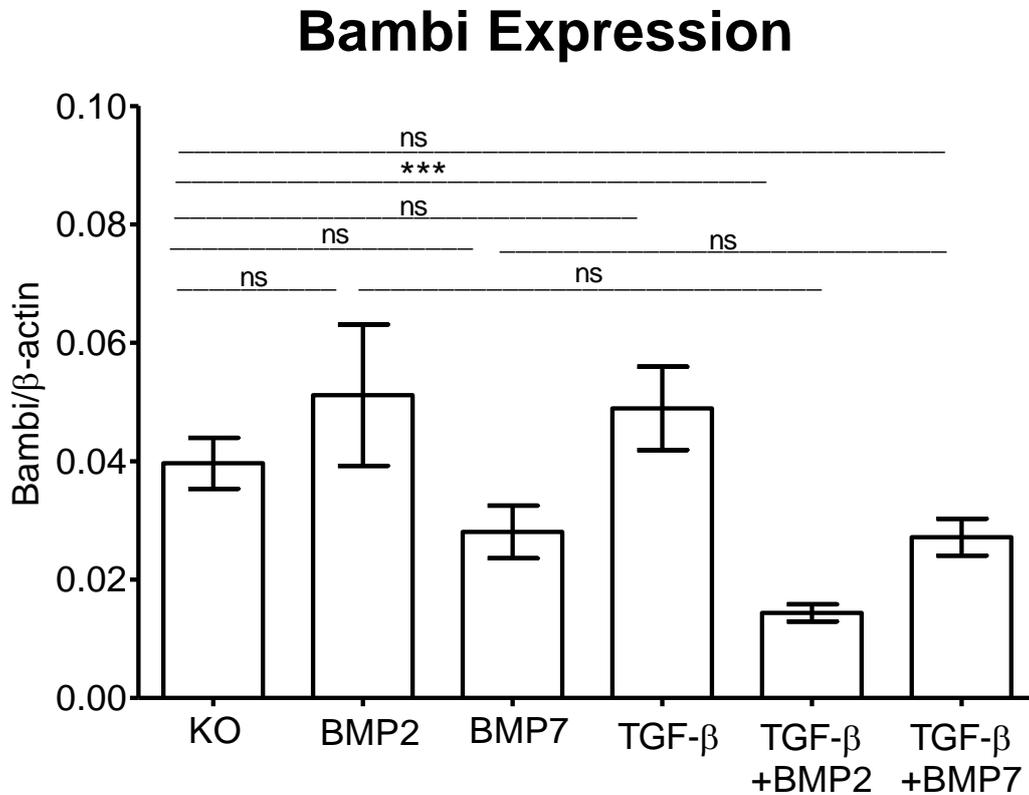


Abbildung 23: Densitometrische Analyse der Expression von Bambi (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns: nicht signifikant)

Die densitometrische Analyse zeigt eine signifikante Abnahme ($p < 0.001$) der Genexpression von Bambi nach der Behandlung mit TGF- β_1 und BMP 2 im Vergleich zur Kontrolle an.

3.2.15 Ergebnis Gen-Expression Sara

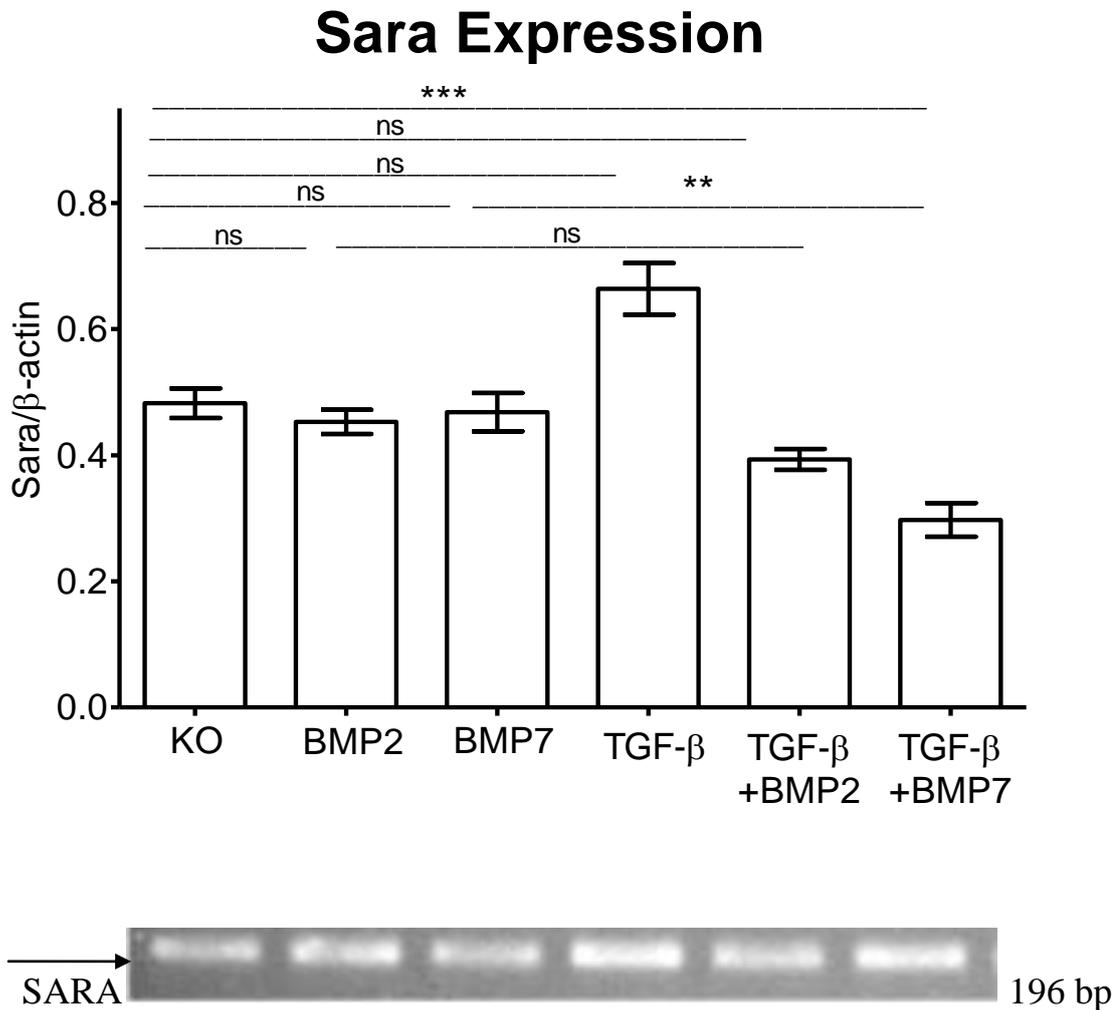


Abbildung 24: Densitometrische Analyse der Expression von Sara (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns: nicht signifikant)

Die densitometrische Analyse zeigt eine signifikante Abnahme der Genexpression von SARA nach der Stimulation mit TGF- β_1 und BMP 7 im Vergleich zur Stimulation mit BMP 7 allein ($p < 0.01$) und der Kontrolle ($p < 0.001$) an.

3.2.16 Ergebnis Gen-Expression Smurf 1

Smurf 1 Expression

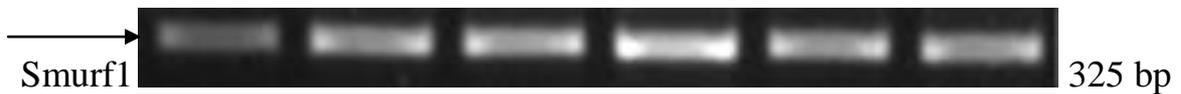
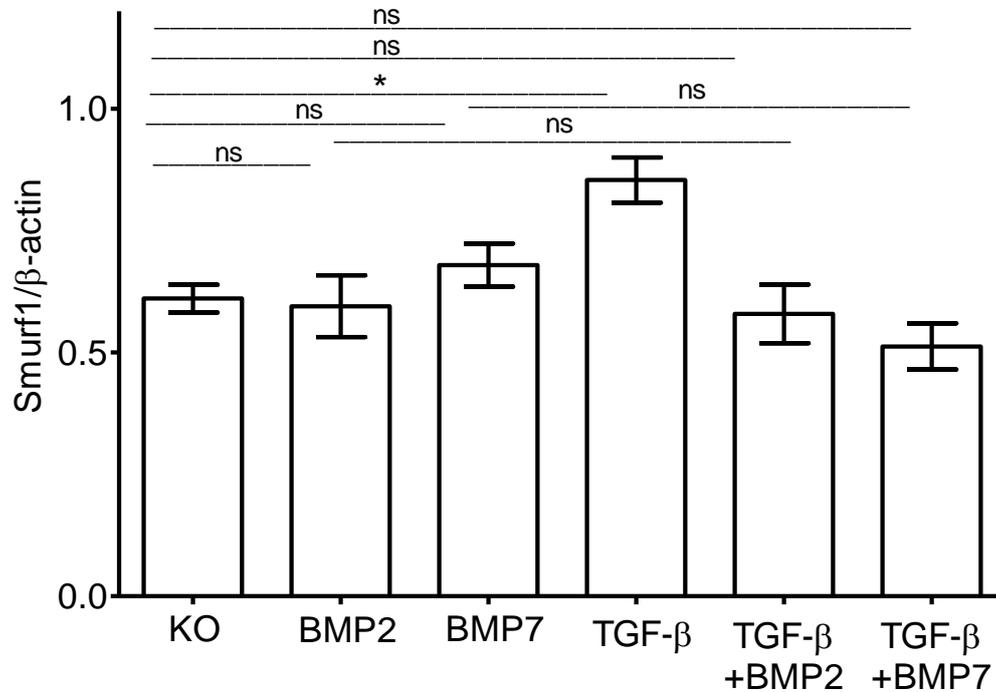


Abbildung 25: Densitometrische Analyse der Expression von Smurf 1 (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns: nicht signifikant)

Die densitometrische Analyse zeigt eine signifikante Steigerung ($p < 0.05$) der Genexpression von Smurf 1 nach der Stimulation mit TGF- β_1 im Vergleich zur Kontrolle an.

3.2.17 Ergebnis Gen-Expression Smurf 2

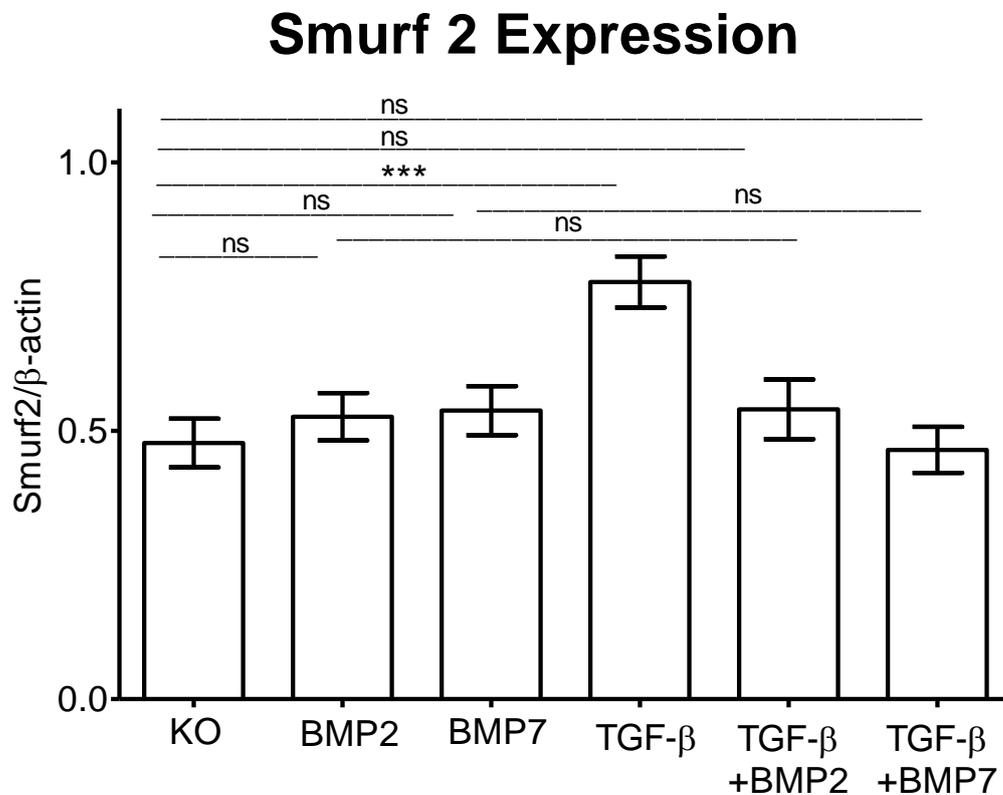


Abbildung 26: Desitometrische Analyse der Expression von Smurf 2 (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns: nicht signifikant)

Die desitometrische Analyse zeigt eine signifikante Steigerung ($p < 0.001$) der Genexpression von Smurf 2 nach der Stimulation mit TGF- β_1 im Vergleich zur Kontrolle an.

3.2.18 Ergebnis Gen-Expression Ski

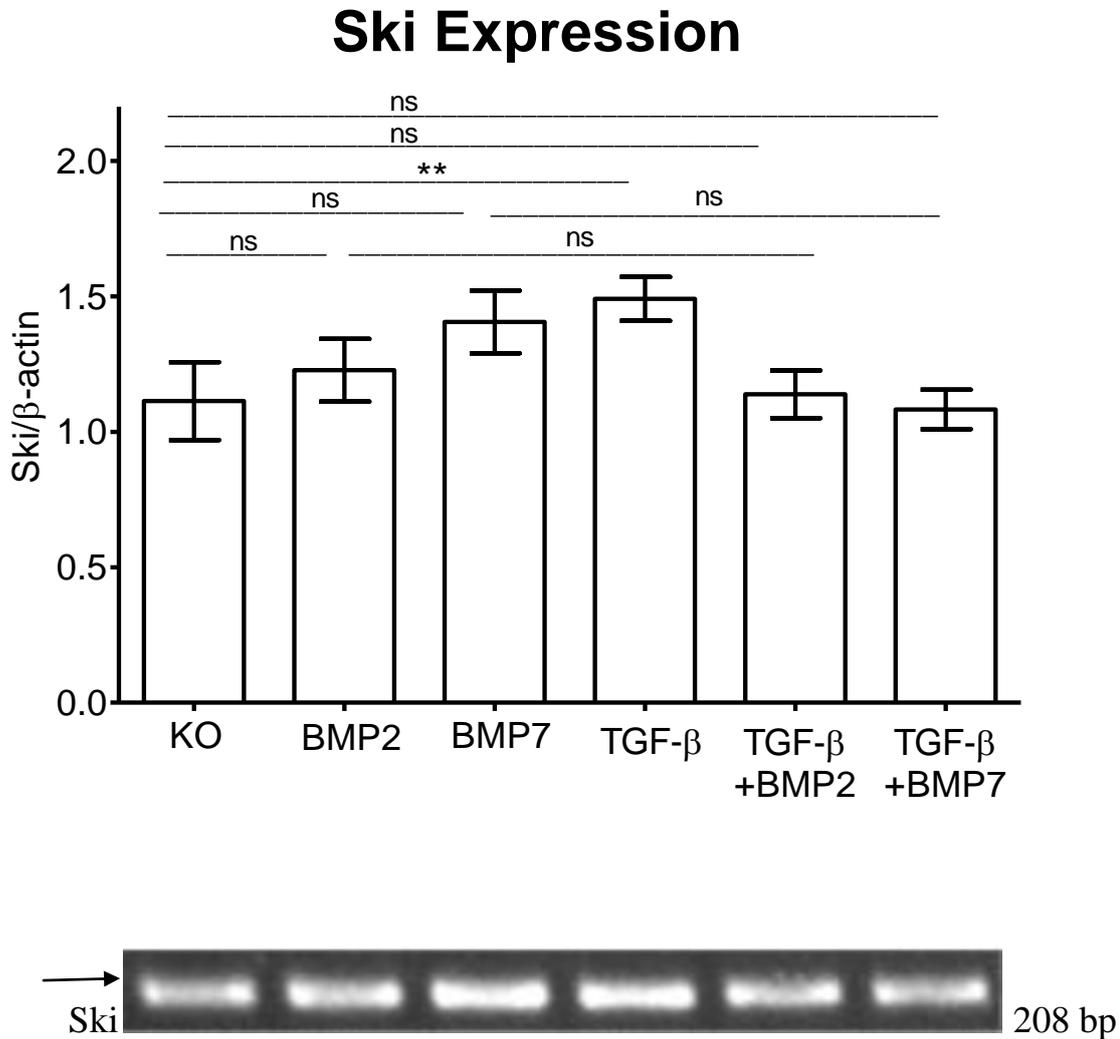


Abbildung 27: Densitometrische Analyse der Expression von Ski (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns: nicht signifikant)

Die densitometrische Analyse zeigt eine signifikante Steigerung ($p < 0.01$) der Genexpression von Ski nach der Stimulation mit TGF- β_1 im Vergleich zur Kontrolle an.

3.2.19 Ergebnis Gen-Expression SnoN

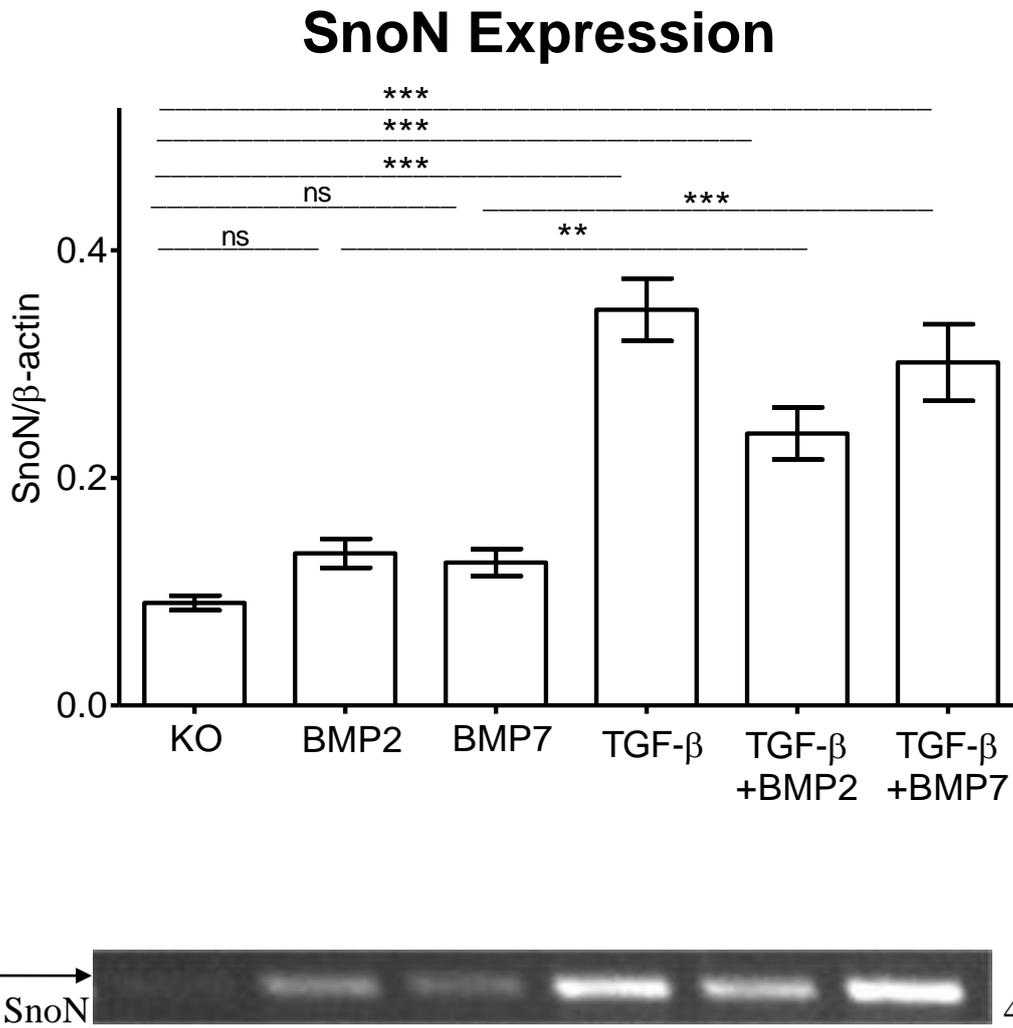


Abbildung 28: Densitometrische Analyse der Expression von SnoN (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns: nicht signifikant)

Die densitometrische Analyse zeigt eine signifikante Zunahme ($p < 0.01$) der Genexpression von SnoN nach der Zugabe von TGF- β_1 und BMP 2 im Vergleich zur Zugabe von BMP 2 allein an. Der gleiche signifikante Effekt ($p < 0.001$) wurde auch nach der Stimulation von TGF- β_1 und BMP 7 im Gegensatz zur Stimulation von BMP 7 allein festgestellt. Im Vergleich zur Kontrolle ist die Zunahme der Genexpression nach der Behandlung mit TGF- β_1 , mit BMP 2 und TGF- β_1 und mit BMP 7 und TGF- β_1 auch statistisch signifikant ($p < 0.001$). Dabei erhöht die Behandlung mit BMP 2 und BMP 7 allein im Gegensatz zur Kontrolle auch die Genexpression von SnoN mäßig. Dieser Effekt ist aber nicht statistisch signifikant.

3.3 Western Blot-Analyse der mit BMP 2, BMP 7 und TGF- β_1 stimulierten Zellen

Somit wurden die Osteoblasten mit 50 ng/ml rhBMP 2 oder rhBMP 2 mit oder ohne Anwesenheit von 5 ng/ml TGF- β_1 behandelt. Als Kontrolle dienten die Osteoblasten ohne Stimulation. Nach 72 Stunden (siehe Kapitel 3.1) wurden die Proteine für den Western Blot extrahiert. Danach wurden die Membrane mit den in Tabelle 3 aufgeführten Antikörpern inkubiert und später entwickelt. Insgesamt wurden 4 Patienten untersucht.

3.3.1 Ergebnis Proteinexpression p-Smad 1/5/8 (phospho-Smad 1/5/8)

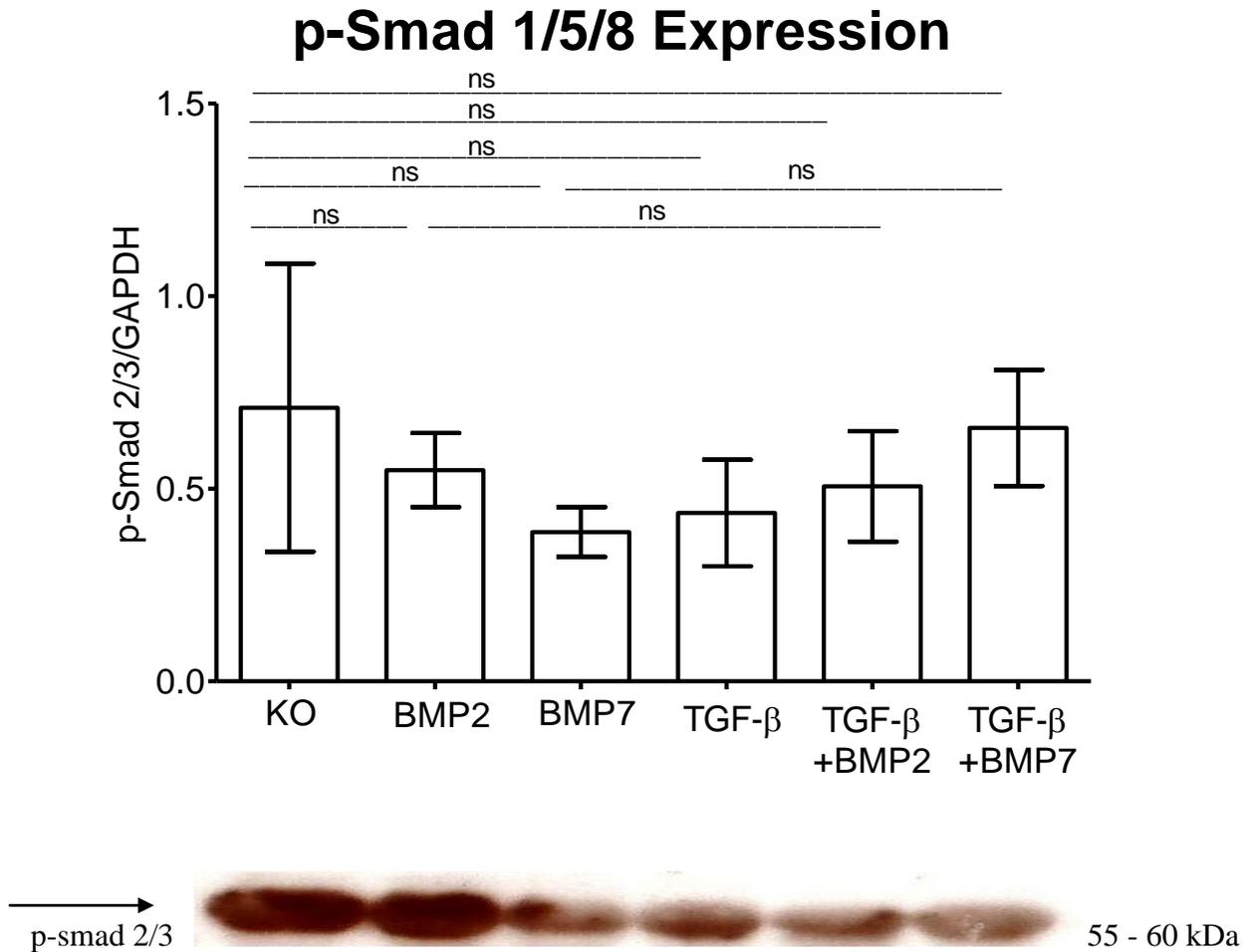


Abbildung 29: Densitometrische Analyse der Proteinexpression der p-Smad 1/5/8 (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns: nicht signifikant)

Die desitometrische Analyse zeigt einen Trend zur Herunterregulierung der Proteinexpression des p-Smad 1/5/8 nach der Behandlung mit TGF- β_1 im Vergleich zur Kontrolle an. Außerdem ist ein Trend zur Verringerung der Proteinexpression nach der Behandlung mit TGF- β_1 und BMP 2 im Vergleich zur Behandlung mit BMP 2 allein festzustellen. Diese beiden Effekte sind aber statistisch nicht signifikant.

3.3.2 Ergebnis Proteinexpression p-p 42/44 (phospho-p 42/44)

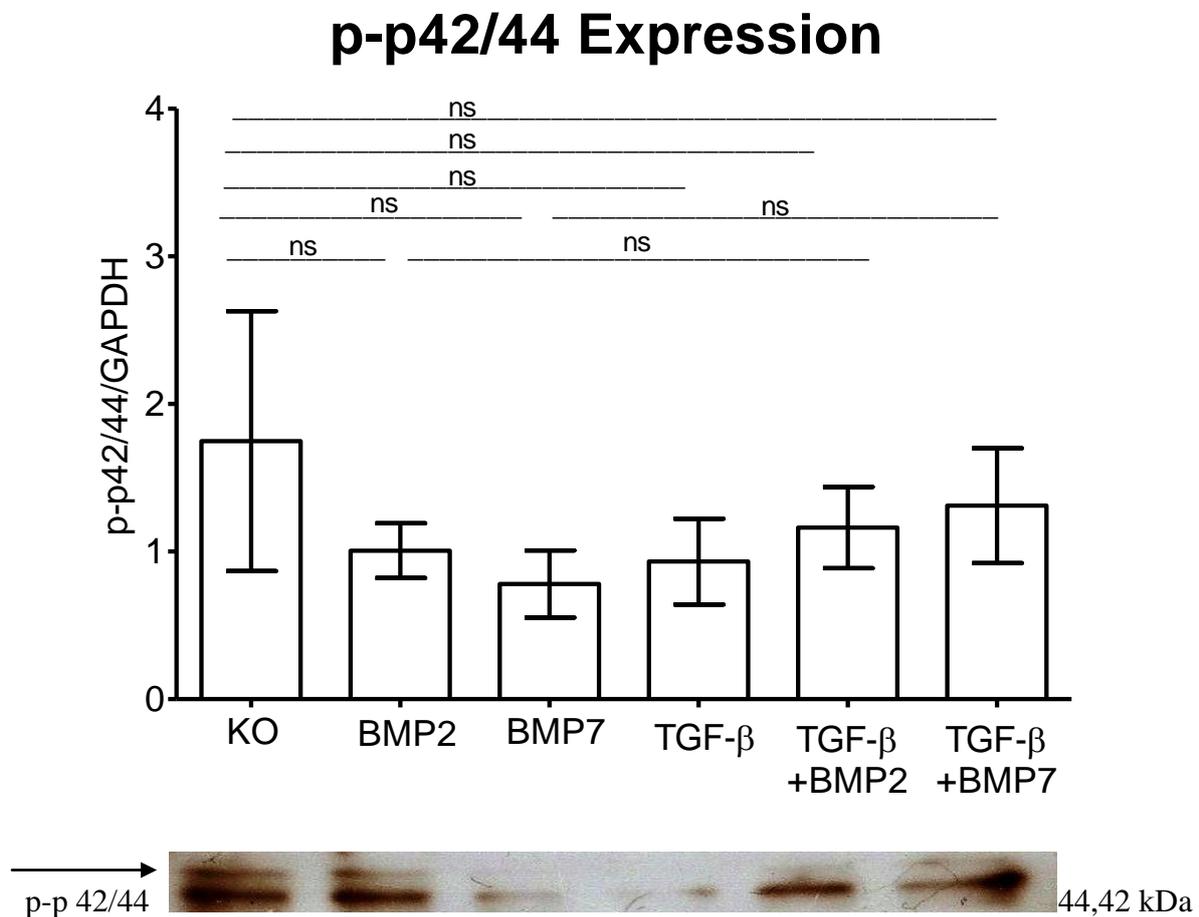


Abbildung 30: Densitometrische Analyse der Proteinexpression von p-p 42/44 (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns: nicht signifikant)

Die desitometrische Analyse zeigt keine wesentliche Hoch-oder Herunterregulierung der Proteinexpression von p-p 42/44 an.

3.3.3 Ergebnis Proteinexpression p-p 38 (phospho-p 38)

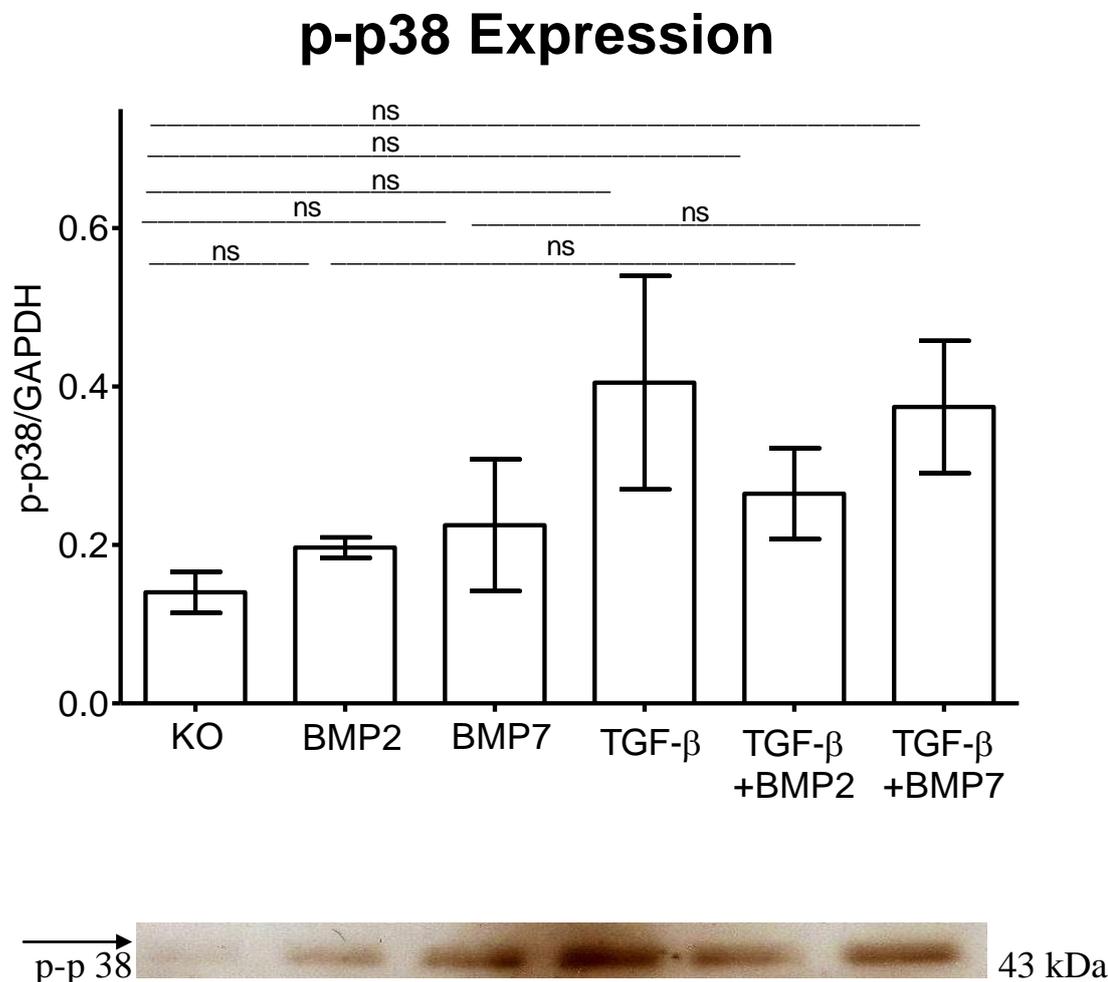


Abbildung 31: Densitometrische Analyse der Proteinexpression von p-p 38 (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns: nicht signifikant)

Die densitometrische Analyse zeigt einen Trend zur Höherregulierung der Expression des Proteins p-p 38 nach der Behandlung mit TGF- β_1 , mit TGF- β_1 und BMP 2 sowie mit TGF- β_1 und BMP 7 im Vergleich zur Kontrolle an. Dieser Effekt ist aber statistisch nicht signifikant. Die Proteinexpression von p-p 38 nach der Behandlung mit TGF- β_1 und BMP 2 zeigt im Vergleich zur Behandlung mit BMP 2 allein, sowie nach der Behandlung mit TGF- β_1 und BMP 7 im Vergleich zur Behandlung mit BMP 7 allein einen Trend zur Höherregulierung an. Dieser Effekt ist aber ebenfalls statistisch nicht signifikant.

3.3.4 Ergebnis Proteinexpression TGF- β -R (TGF- β Rezeptor)

TGF- β -R Expression

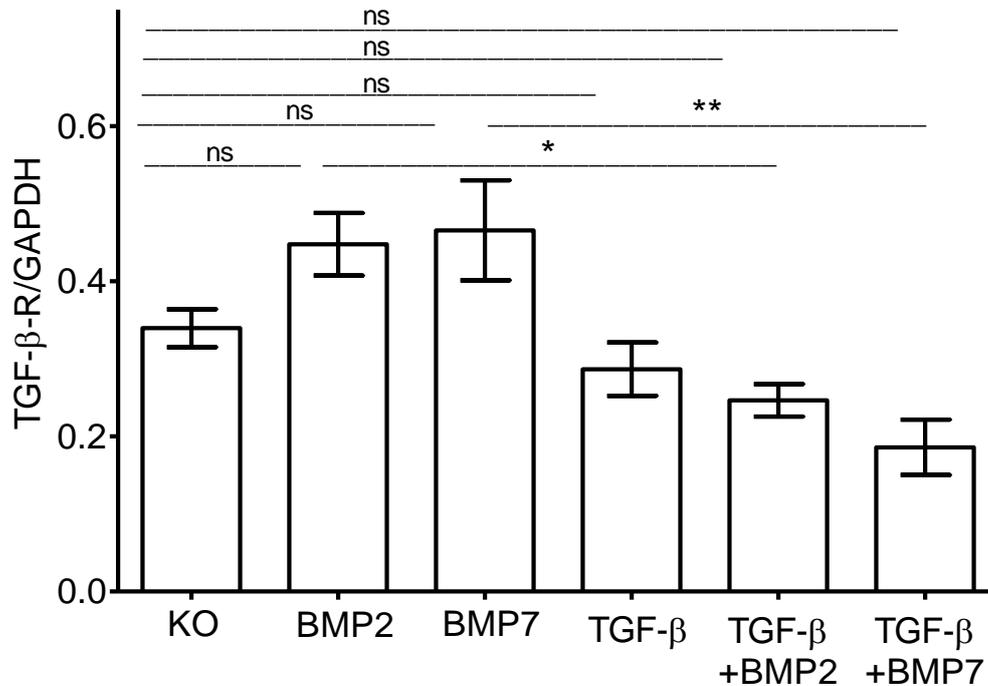


Abbildung 32: Densitometrische Analyse der Proteinexpression des TGF- β Rezeptors (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns: nicht signifikant)

Die densitometrische Analyse zeigt eine signifikante Verringerung ($p < 0.05$) der Proteinexpression von TGF- β -R nach der Behandlung mit TGF- β_1 und BMP 2 im Vergleich zur Behandlung mit BMP 2 allein an. Darüber hinaus nimmt die Proteinexpression von TGF- β -R nach der Behandlung mit TGF- β_1 und BMP 7 im Gegensatz zur Behandlung mit BMP 7 allein signifikant ($p < 0.01$) ab.

3.3.5 Ergebnis Proteinexpression SnoN

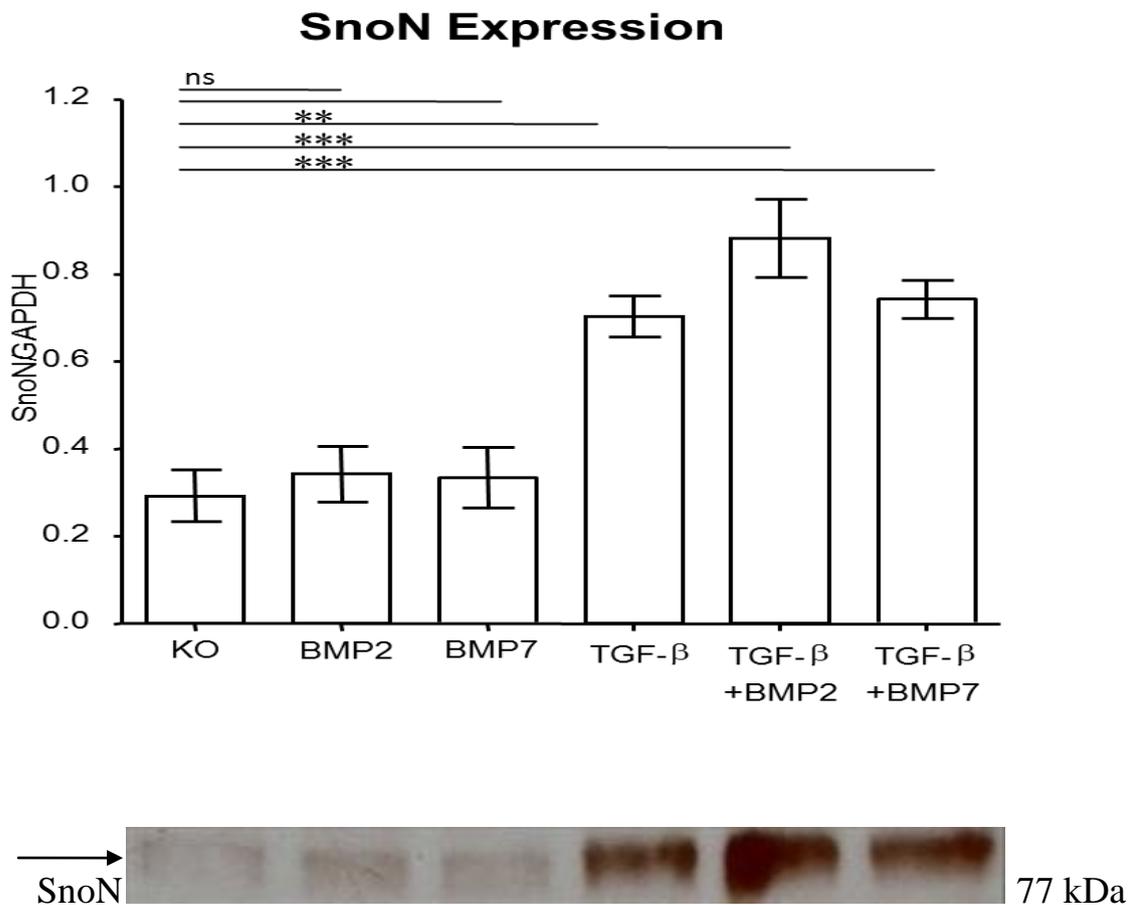


Abbildung 33: Densitometrische Analyse der Proteinexpression von SnoN (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns: nicht signifikant)

Die densitometrische Analyse zeigt eine signifikante Hochregulierung ($p < 0.01$) der Genexpression von SnoN nach der Zugabe von TGF- β_1 im Vergleich zur Kontrolle an. Zusätzlich ist die Proteinexpression nach der Stimulation mit TGF- β_1 und BMP 2 sowie mit TGF- β_1 und BMP 7 im Vergleich zur Kontrolle signifikant ($p < 0.001$) hochreguliert.

3.4 Valproinsäure in einer Höchstkonzentration von 200 μM zeigt keine Toxizität in Osteoblasten

Wie in Kapitel 3.2.19 beschrieben wurde, ist die Expression von SnoN nach der Zugabe von TGF- β_1 im Vergleich zur Stimulation mit BMP 2 und BMP 7 allein und im Vergleich zur Kontrolle hochreguliert. Eine der wichtigsten Funktionen von SnoN ist die HDAC-Rekrutierung. Valproinsäure ist hingegen ein bekannter HDAC-Inhibitor. Um den Hemmungseffekt von SnoN durch die TGF- β_1 -Stimulation identifizieren zu können,

wurden die Osteoblasten mit Valproinsäure inkubiert. Daher ist die höchste Valproinsäure-Konzentration, die keine toxische Wirkung in den Osteoblasten induziert, für die Inkubation von großer Bedeutung. Um die Toxizität der Valproinsäure zu testen, wurden die Osteoblasten für 3, 6, 9 und 12 Tage mit verschiedenen Konzentrationen (200 μM , 100 μM , 50 μM , 25 μM , 12,5 μM , 6,25 μM und 3,125 μM) dieser Säure inkubiert. Als Kontrolle dienten jene Osteoblasten, die nicht mit Valproinsäure inkubiert worden waren. Nach der Inkubation wurde eine Viabilitätsmessung mit Alamar-Blue (siehe Kapitel 2.13) durchgeführt und die Überlebensrate der Zellen mit jener der Kontrolle verglichen. Insgesamt wurden 3 Patienten untersucht.

	3 Tage Tox-Test	6 Tage Tox-Test	9 Tage Tox-Test	12 Tage Tox-Test
200 μM	97 %	142,91 %	80,72 %	91,02 %
100 μM	97 %	116,83 %	86,77 %	97,29 %
50 μM	93 %	114,37 %	88,84 %	112,72 %
25 μM	94 %	109,60 %	97,07 %	115,43 %
12,5 μM	98 %	89,01 %	92,08 %	108,03 %
6,25 μM	96 %	89,65 %	110,88 %	106,83 %
3,125 μM	100 %	81,01 %	109,95 %	107,64 %
0 μM	100 %	100 %	100 %	100 %

Tabelle 12: Die Überlebensrate nach der Inkubation mit Valproinsäure in unterschiedlicher Konzentration

Die Tabelle zeigt, dass nach einer Inkubation mit Valproinsäure von 3, 6, 9 und 12 Tagen Dauer in einer Konzentration von maximal 200 μM mehr als 80% der Zellen überleben. Daher hat die Valproinsäure in einer Konzentration von 200 μM keine wesentliche toxische Wirkung auf die Osteoblasten.

3.5 Die Aktivierung des Smad 1/5/8 Signalings wird durch TGF- β_1 inhibiert, aber dieser Effekt wird von der Valproinsäure beseitigt

Zur Bestätigung der Aktivierung von SnoN nach der Stimulation mit TGF- β_1 , wurde eine wichtige Funktion von SnoN, die HDAC-Rekrutierung, durch eine Inkubation mit Valproinsäure gehemmt. Um zu prüfen, ob die Inhibition des Smad 1/5/8-Signalings durch TGF- β_1 eliminiert wurde, wurden die Osteoblasten mit dem Ad 5-BRE-Luc-Virus infiziert und mit BMP 2, BMP 7, BMP 2 und TGF- β_1 , BMP 7 und TGF- β_1 , sowie mit BMP 2 und TGF- β_1 plus 200 μ M Valproinsäure und schließlich mit BMP 7 und TGF- β_1 plus 100 μ M Valproinsäure im Osteoblastenkulturmedium behandelt. Als Kontrolle dienten jene Zellen, die ausschließlich mit Ad 5-BRE-Luc infiziert worden waren. Nach 72 Stunden wurde ein Smad 1-Reporter-Assay durchgeführt. Alle Messungen wurden als Prozentsatz des Durchschnittes der Kontrollmessungen berechnet. 3 Patienten wurden untersucht. Die Konzentration von BMP 2 und BMP 7 betrug 50 ng/ml, während jene von TGF- β_1 bei 5 ng/ml lag.

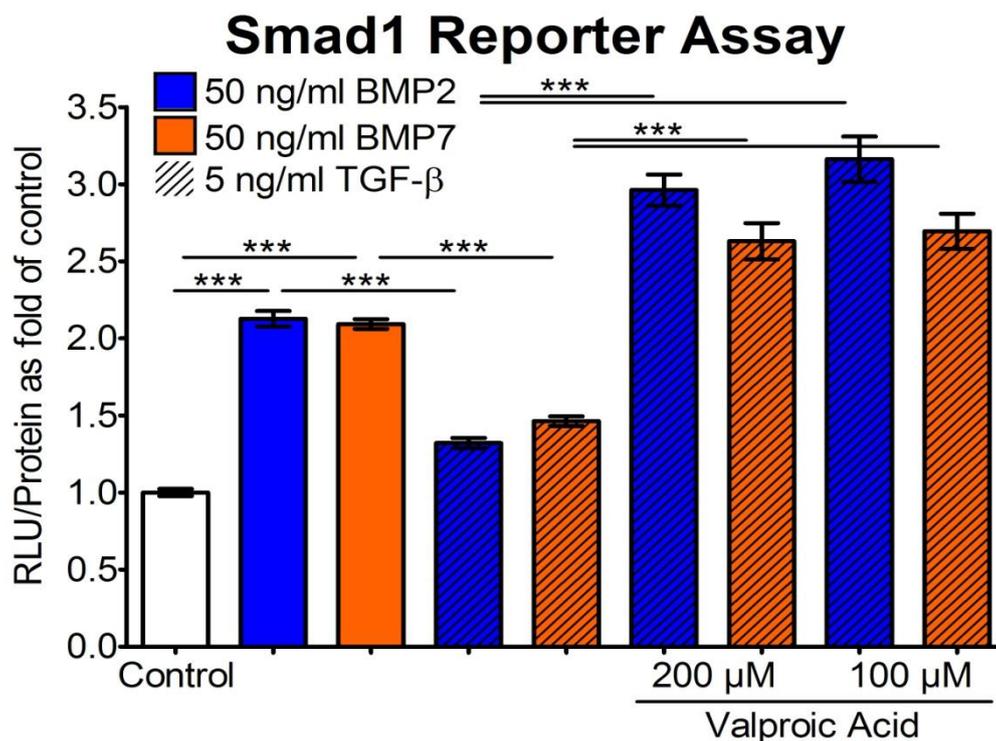


Abbildung 34: Inhibition von TGF- β_1 durch eine, von BMP 2- und BMP 7 vermittelte, Smad 1/5/8-Signaltransduktion in primären humanen Osteoblasten und die Beseitigung dieses Effekts durch Valproinsäure (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns: nicht signifikant)

Es zeigt sich, dass nach der Behandlung mit BMP 2 und BMP 7 im Vergleich zur Kontrolle der Smad 1/5/8-Signalweg signifikant ($p < 0.001$) aktiviert wurde. Die

gleichzeitige Behandlung mit TGF- β_1 inhibiert jedoch die von Smad 1/5/8 vermittelte Signaltransduktion von BMP 2 und BMP 7 signifikant ($p < 0.001$). Diese Inhibition wurde nach der Inkubation mit Valproinsäure nicht nur signifikant ($p < 0.001$) herunterreguliert, sondern es wurde sogar mehr Smad 1/5/8 aktiviert als nach der Behandlung mit BMP 2 oder mit BMP 7 allein.

3.6 Die HDAC-Aktivität wird durch die Stimulation mit TGF- β_1 hochreguliert und durch die Valproinsäure inhibiert

Zum Nachweis der Hochregulierung von SnoN nach der Stimulation mit TGF- β_1 , wurde eine wichtige Funktion dieses Proteins, nämlich die HDAC-Rekrutierung, untersucht. Dafür wurde die HDAC-Aktivität direkt gemessen. Die Osteoblasten wurden jeweils mit TGF- β_1 allein, sowie mit TGF- β_1 und Valproinsäure inkubiert. Als Kontrolle dienten die Osteoblasten ohne Stimulation. Dann wurde auf der Platte eine Messung der HDAC-Aktivität (siehe Kapitel 2.14) vorgenommen. Insgesamt wurden 4 Patienten untersucht.

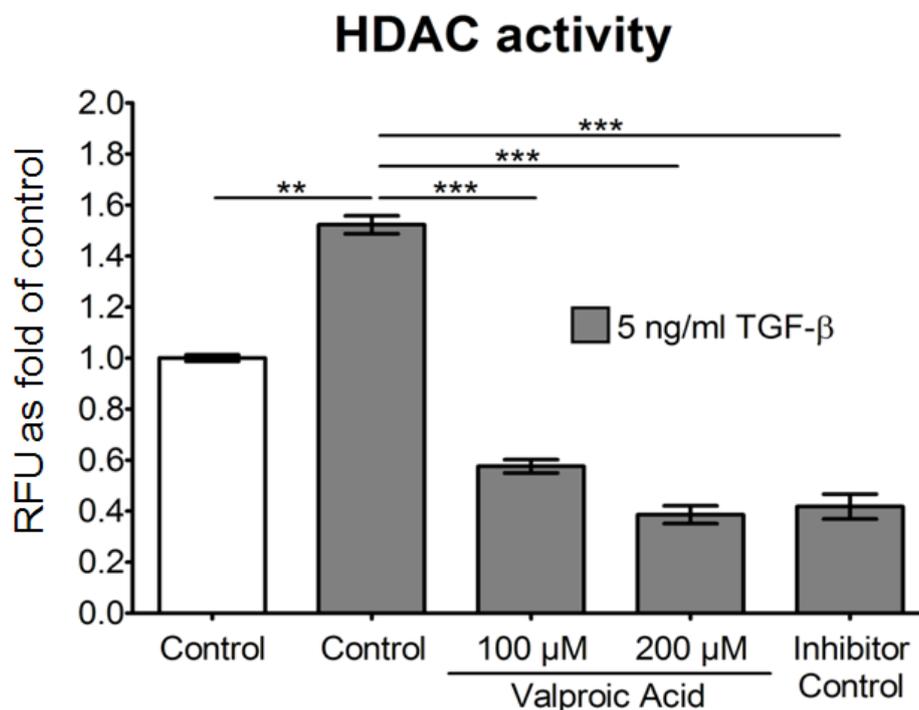


Abbildung 35: Messung der HDAC-Aktivität von Osteoblasten bei einer Inkubation mit TGF- β_1 allein sowie mit TGF- β_1 und Valproinsäure (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns: nicht signifikant)

Diese Abbildung zeigt eine signifikante Hochregulierung ($p < 0.01$) der HDAC-Aktivität nach der Behandlung mit TGF- β_1 im Vergleich zur Kontrolle. Nach der Zugabe von Valproinsäure in einer Konzentration von 100 μM und 200 μM wurde dieser Effekt aber im Gegensatz zur Behandlung mit TGF- β_1 signifikant ($p < 0.001$) beseitigt.

3.7 Western Blot-Analyse mit Langzeitpräsenz von TGF- β_1 (4 Tage, 8 Tage, 12 Tage, 16 Tage)

Um die chronische Wirkung von TGF- β auf die Osteoblasten zu identifizieren, wurden Osteoblasten mit 2,5 ng/ml und mit 5 ng/ml TGF- β_1 stimuliert. Als Kontrolle dienten die Osteoblasten ohne Stimulation. Die Dauer der Stimulation betrug dabei 4, 8, 12 und 16 Tage. Danach wurden die Proteine isoliert und ein Western Blot durchgeführt. Die Membrane wurden in den Antikörpern mit p-Smad 2/3 und TGF- β R inkubiert und die Signale mit Röntgenfilmen entwickelt. Danach wurden die Filme densitometrisch analysiert. Insgesamt wurden 2 Patienten untersucht.

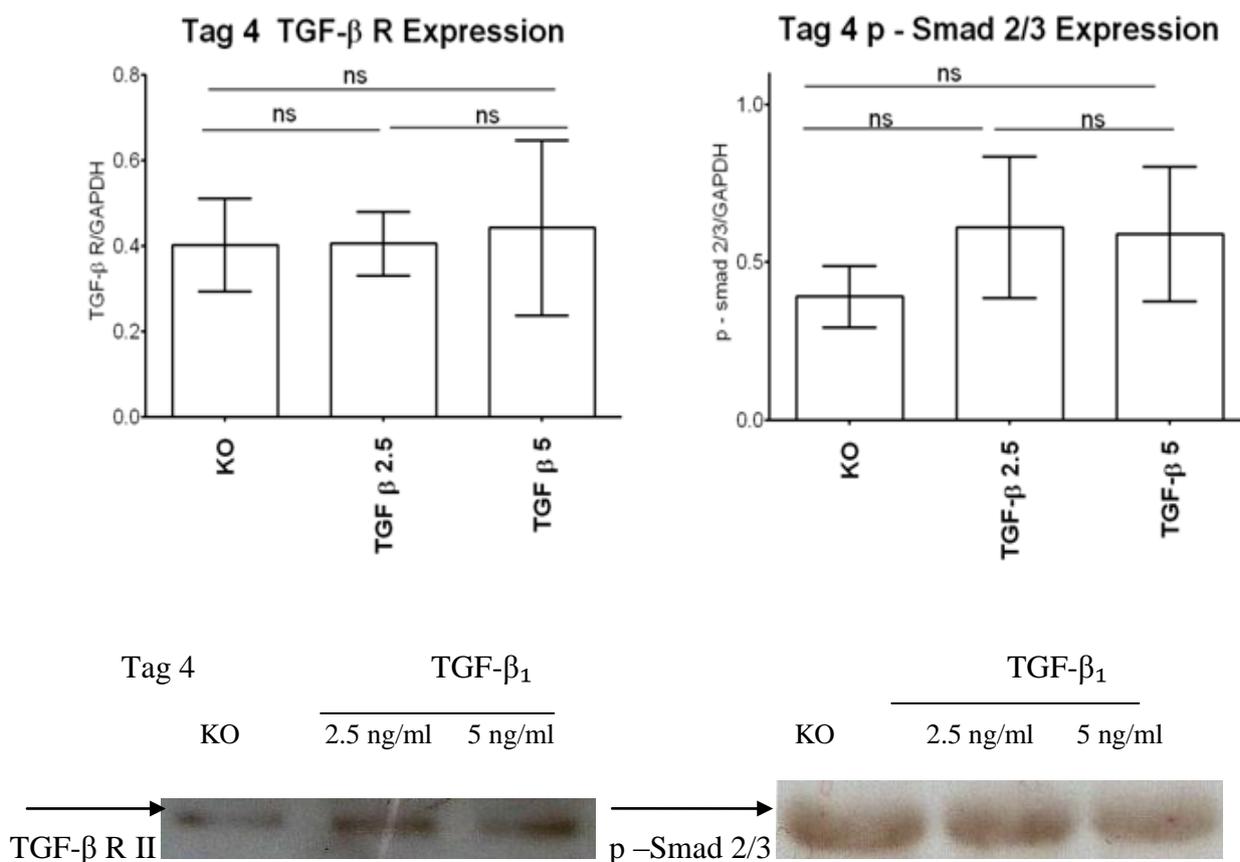


Abbildung 36: Densitometrische Analyse der Proteinexpression von TGF- β R und p-Smad 2/3 nach 4 Tagen Stimulation mit TGF- β_1 in einer Konzentration von 2,5 ng/ml beziehungsweise 5 ng/ml (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns: nicht signifikant)

Die desitometrische Analyse zeigt keine wesentliche Veränderung der Proteinexpression von TGF- β R sowie einen Trend zur Hochregulierung von p-Smad 2/3 nach einer Stimulation von 4 Tagen mit TGF- β_1 im Vergleich zur Kontrolle in beiden Konzentrationen an. Dieser Effekt lässt sich aber nicht statistisch signifikant nachweisen.

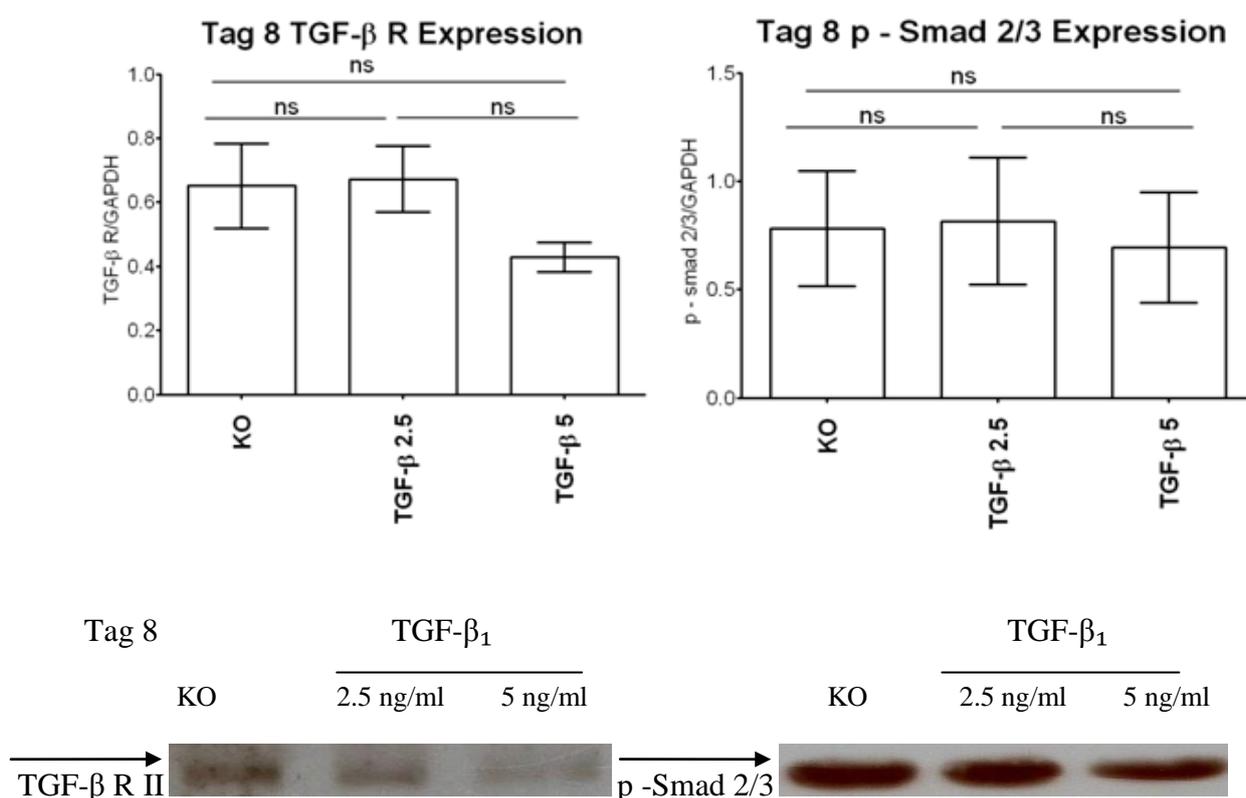


Abbildung 37: Densitometrische Analyse der Proteinexpression von TGF- β R und p-Smad 2/3 nach 8 Tagen Stimulation mit TGF- β_1 in einer Konzentration von 2,5 ng/ml beziehungsweise von 5 ng/ml (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns: nicht signifikant)

Die desitometrische Analyse zeigt einen Trend zur Herunterregulierung der Proteinexpression von TGF- β R nach 8 Tagen Stimulation in einer Konzentration von 5 ng/ml im Vergleich zur Kontrolle und keine wesentliche Veränderung der Expression von p-Smad 2/3 in beiden Konzentrationen. Dieser Effekt ist aber statistisch nicht signifikant.

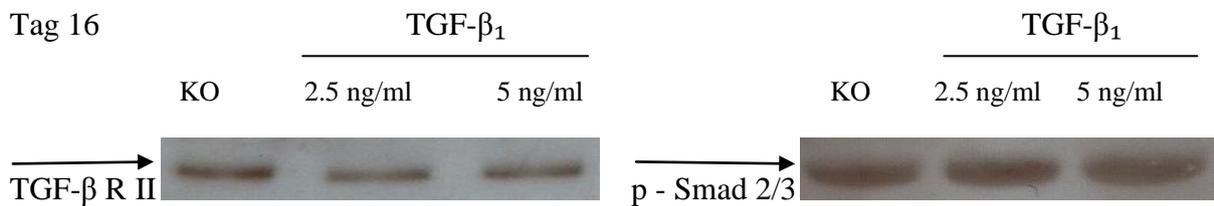
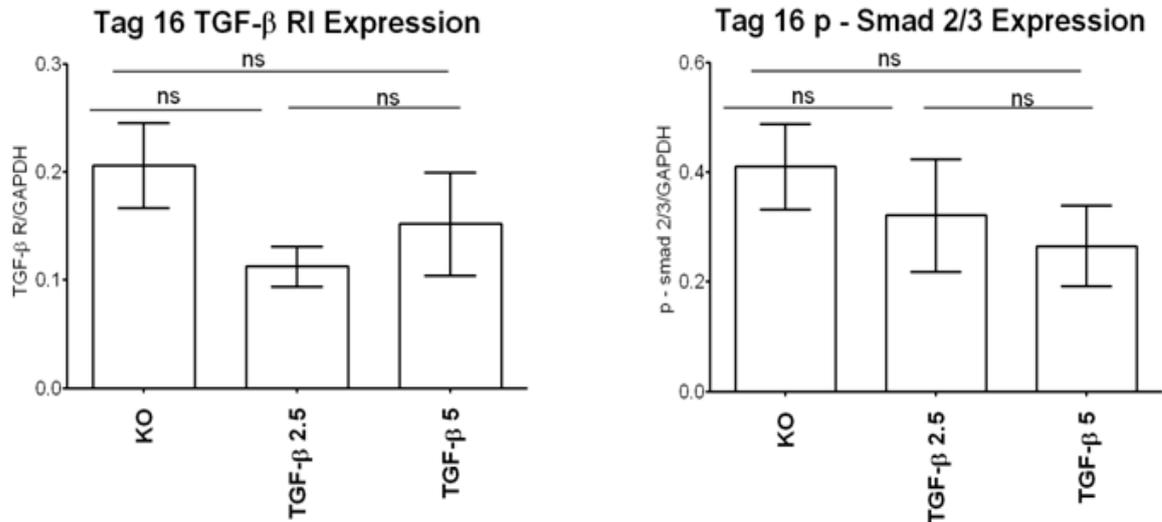


Abbildung 39: Densitometrische Analyse der Proteinexpression von TGF-β R und p-Smad 2/3 nach 12 Tagen Stimulation mit TGF-β₁ in einer Konzentration von 2,5 ng/ml beziehungsweise von 5 ng/ml (* p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001; ns: nicht signifikant)

Die desitometrische Analyse zeigt einen Trend zur Herunterregulierung von TGF-β R und von p-Smad 2/3 nach 16 Tagen Stimulation im Vergleich zur Kontrolle in beiden Konzentrationen. Die beiden Resultate sind aber statistisch nicht signifikant.

4 Diskussion

In dieser Studie wurde die Beeinflussung von TGF-β durch das BMP 2- und BMP 7-Signaling untersucht. Zuerst wurden die regulatorischen Proteine identifiziert, die durch TGF-β reguliert werden, und die Möglichkeit ihrer Inhibierung näher untersucht.

Im Jahre 1965 entdeckte Marshall R. Urist das Prinzip der sogenannten Knocheninduktion. Dieser Theorie zufolge verfügt die Knochenmatrix über jene Erreger, die die Neubildung der Knochen fördern können, wenn sie auf der extraskeletalen Seite implantiert werden. Urist und seine Kollegen haben diesen Faktor identifiziert und ihn „bone morphogenetic protein (BMP)“ [55] getauft. Bis zum heutigen Tage sind ungefähr

20 strukturell relevante BMPs entdeckt worden. All diese BMPs sind Teil der transforming growth factor- β (TGF- β) -Superfamilie. BMP besitzt die Fähigkeit, die Knochenbildung in vivo [56] und die Differenzierung von Osteoblasten in vitro [57] zu stimulieren. BMP 2 fördert die Expression von osteoblastischen Markern wie zum Beispiel die Aktivität der Alkalischen Phosphatase (ALP) sowie von Osteocalcin (OC) und von Osteopontin in den Knochenmarkstammzellen der Maus [58]. BMP 2 induziert die ALP-Aktivität und die OC-Produktion in Zelllinien von Präosteoblasten [59]. Daher spielen die BMPs eine zentrale Rolle im Knochenheilungsprozess. Im Falle eines Traumas werden BMPs verwendet, um die Reparatur der Fraktur zu beschleunigen und delayed union und non union Frakturen zu behandeln. Klinische Forschungen über lange Applikationen im Rahmen eines Knochenbruchs belegen die Wirksamkeit der Applikation von rhBMPs im Rahmen der Behandlung offener Tibiafrakturen [60], distaler Tibiafrakturen [61] und bei non-union Brüchen des Kahnbeins [62]. Im Jahre 2008 wurden bereits mehr als 1,6 Milliarden US-Dollar für Knochenimplantate und Substitutionen ausgegeben; 20 % davon allein für die Frakturbehandlung. Momentan sind nur 2 BMP-Produkte, nämlich rhBMP 2 (INFUSE, Medtronic) und rhBMP 7 (OP-1, Stryker) für den klinischen Einsatz verfügbar [7]. Aber trotz des positiven Effekts des BMPs auf die Knochenheilung, ist die flächendeckende Nutzung von BMPs aufgrund hoher Kosten, von Nebenwirkungen, wie z.B. vertebrale Osteolyse, ektopische Knochenformation, Radikulitis oder zervikale Weichteilschwellung, und einer relativ hohen Versagensrate eingeschränkt. Bis zu 36 % der Patienten sprechen nämlich nicht auf eine BMP-Therapie an [63, 64].

TGF- β gehört ebenfalls zu den „bone morphogenic proteins“ und wird von Knochenzellen sekretiert. Daher ist der Knochen einer der größten Speicher für alle drei TGF- β -Isoforme (TGF- β_1 , TGF- β_2 , TGF- β_3). In der Knochenmatrix steht TGF- β allerdings nur in seiner latenten Form zur Verfügung, die nach Bedarf während der Knochenresorption von den Osteoklasten aktiviert wird. Der grundsätzliche Bedarf an TGF- β bei der Knochenbildung wurde auch bei in-vitro-Untersuchungen bestätigt. Es wurde gezeigt, dass TGF- β_1 die Proliferation und die osteogenetische Differenzierung von Knochenmarkstammzellen fördern kann [65]. TGF- β -Isoforme werden während der frühen Periode der Knochenheilung aktiv exprimiert [66, 67]. In vivo zeigt sich bei TGF- β_1 -Knockout-Mäusen eine 30%ige Verminderung der Tibialänge und eine Reduktion der Mittelknochen [68]. Eine exogene TGF- β -Applikation zeigt hingegen eine positive

Wirkung in Bezug auf die Knochenreparatur im Tiermodell, wie zum Beispiel im Falle der Tibiafraktur bei Mäusen [69] oder bei Hasen [70]. Allerdings existieren Konflikte in Bezug auf die Effekte des TGF- β -Signalings auf die Knochenbildung. In den Calvarial-Osteoblasten fetaler Mäuse inhibiert TGF- β die Expression der osteoblastischen Proteine [71] und in verschiedenen Osteoblastentypen unterbindet TGF- β die Vermehrung der Osteocalcin-Synthese [72]. In vivo weisen transgenetische Mäuse mit TGF- β_2 -Überexprimierung unter Kontrolle eines Osteocalcin-Promotoren einen osteoporose-ähnlichen Phänotypen auf [73]. Außerdem unterdrückt TGF- β die RUNX 2-Funktion durch die Aktivierung von Klasse-II-Histone-Deacetylasen durch Smad 3 [74] und die Maturation osteoblastischer mesenchymaler Stammzellen [28]. In den Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe sind wir bereits auf einen Konflikt zwischen TGF- β und der Proliferation sowie der Differenzierung von Osteoblasten gestoßen. Einerseits fördert TGF- β die Proliferation von Osteoblasten, andererseits sinkt die Aktivität der alkalischen Phosphatase in Osteoblasten mit chronischer Präsenz von TGF- β . Diese Beobachtung lässt auf eine erhöhte Anzahl von Osteoblasten mit verminderter Funktion schließen. Gleichzeitig inhibiert TGF- β die Bildung mineralisierter Matrix. Diese Inhibition wird jedoch durch den TGF- β -Inhibitor teilweise aufgehoben [75]. In vivo haben wir ebenfalls herausgefunden, dass die Patienten mit chronischen inflammatorischen Krankheiten wie zum Beispiel Leberzirrhose oder kardiale Fibrose ein 3 - 5 mal erhöhtes TGF- β -Niveau aufweisen und interessanterweise eine verminderte Knochendichtigkeit besitzen.

BMP und TGF- β gehören zur gleichen Superfamilie, nämlich der TGF- β Superfamilie, und beide Proteine induzieren das Signaling durch Smad-Proteine und werden durch die gleichen regulatorischen Proteinen kontrolliert. Beide Proteine interagieren um die Proliferation von humanen Knochenmarkstammzellen und die osteogenetische Differenzierung zu modulieren [76]. TGF- β hat gegensätzliche Effekte auf die Differenzierung von Osteoblasten, die durch BMP 2 induziert werden [77]. In mesangialen Zellen und Epithelialzellen im proximalen Tubulus zeigen BMP 7 und TGF- β auch den entgegengesetzten Effekt [78, 79]. Die primären Ziele meiner Arbeit bestehen darin, die Gründe für die hohe Versagensrate herauszufinden und eventuelle Verbesserungsmöglichkeiten für die BMP-Therapie aufzuzeigen. Die Interaktion zwischen TGF- β und BMP sowie der biphasische Effekt von TGF- β auf die Osteoblasten und die Knochenbildung weisen darauf hin, dass der mögliche Grund für das Versagen der BMP-Therapie der inhibitorische Effekt des zirkulierenden TGF- β ist.

In dem Versuch, der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurde, wurden primäre humane Osteoblasten verwendet, die aus operativ entfernten und durch eine Hüftkopfprothese ersetzten Hüftköpfen stammen. Um die Versuche mit einer homogenen Population primärer Osteoblasten durchführen zu können, wurden die Zellen bis zu Passage 3 oder 4 unter der Bedingung der Osteoblastenkultur kultiviert und expandiert. In den ersten Untersuchungen sollte das Signaling von BMP 2 und BMP 7 identifiziert werden. Daher wurde das Signaling mittels adenoviraler Reporterassays exakt überprüft. Dabei wurden die Osteoblasten 24 Stunden, 48 Stunden, 72 Stunden und 96 Stunden lang stimuliert und die Zellen jeweils mit dem Ad 5-BRE-Luciferase-Virus infiziert. Die infizierten Zellen zeigten nach der Stimulation mit BMP 2 und -7 eine erhöhte Aktivität. Somit konnte zweifelsfrei bewiesen werden, dass die Aktivierung des Smad 1/5/8-Signalweges in humanen Osteoblasten durch BMP 2 und -7 erfolgt. Die Aktivität der BMPs erreicht ihr höchstes Niveau nach einer Stimulation von 72 Stunden. Dies bedeutet, dass der optimale Zeitpunkt für die RNA- und Protein-Isolation 72 Stunden nach dem Beginn der Stimulation ist.

In einem weiteren Experiment sollte der Einfluss des TGF- β_1 auf das BMP-Signaling in primären humanen Osteoblasten überprüft werden. Es zeigte sich, dass durch eine zusätzliche Inkubation mit nur zu 1/10 konzentriertem TGF- β_1 , das durch BMP 2 und durch BMP 7 induzierte Smad 1/5/8-abhängige Signaling signifikant inhibiert werden konnte. Somit führt eine dauerhafte Stimulation mit TGF- β_1 zu einer reduzierten Expression von Genen, die durch BMP 2 und BMP 7 induziert wurden, sowie von Proteinen in primären humanen Osteoblasten und inhibiert damit die fördernde Wirkung dieser BMPs bei der Knochenbildung.

Um die Interaktion zwischen BMP 2, BMP 7 und TGF- β_1 in primären humanen Osteoblasten zu untersuchen, wurde das Niveau der Genexpression von Smad 1-5 und der Rezeptoren (Alk-1, -3, -5, -6, TGF- β RII) sowie der regulatorischen Proteine (inhibitorische Smads, also Smad 6, und Smad 7, sowie Smurf 1, Smurf 2, Sara, Bambi, Ski und SnoN) bestimmt, die am BMP- oder am TGF- β -Signaling beteiligt sind. Durch die Präsenz von TGF- β_1 werden die für BMP 2 und BMP 7 relevanten Faktoren Smad 1, Alk-1 und TGF- β -R-II herunterreguliert. Die Herunterregulierung von Alk-1 und TGF- β -R-II spricht dafür, dass eine geringere Anzahl von Rezeptoren auf der Zelloberfläche für BMP 2 und -7 zuständig ist, weshalb sich weniger Rezeptoren mit Smad 1/5/8 in Zytosol

binden und weniger Smad-Proteine aktiviert werden. Die Herunterregulierung von Alk-1 und TGF- β -R-II spielt eine zentrale Rolle bei der Inhibierung des BMP-Signalings. In Mamma-Ca-Zellen inhibiert eine kinase-inaktive TGF- β -R-II das BMP 2-Signaling [80]. Eine ähnliche Wirkung wurde auch in mesenchymalen Stammzellen beobachtet. Durch ALK-1 und ALK-2 RNA-Silencing wurde die Transduktion des BMP-9-Signalings gehemmt [81]. Die Unterdrückung von Smad 1 durch die Co-Stimulation mit TGF- β ₁ könnte den Mangel an Smad 1/4-Signaling in jenen Zellen, die mit BMP 2 und BMP 7 behandelt wurden, erklären. Diesem Ergebnis entspricht auch die Verminderung der Expression der TGF- β -Rezeptoren. Die Genexpression des I-Smads 7 wird durch die Stimulation mit TGF- β ₁ und BMP 2 sowie mit BMP 7 hochreguliert. Smad 7 fördert den Abbau der aktivierten TGF- β - und BMP-Rezeptoren und inhibiert die Phosphorylierung der R-Smads mit Hilfe des Smurf-Proteins [26]. Seine Hochregulierung ist eine Rückkopplung der Aktivierung des TGF- β - und des BMP-Signalings. Interessanterweise ist nach der Stimulation mit TGF- β ₁ der I-Smad 6 herunterreguliert. Dieses Phänomen spricht für eine Verstärkung des Smad 1/4-Signalings, denn Smad 6 bindet das aktivierte Smad 1 und verhindert somit seine Komplexbildung mit dem Co-Smad 4 [82]. Aber selbst wenn Smad 1 herunterreguliert wird, besitzt Smad 6 keinen Angriffspunkt für die Hemmung des BMP-Signalings mehr. Die anderen Smad-Proteine und TGF- β -Rezeptoren werden durch eine Stimulation mit BMP oder TGF- β ₁ nicht signifikant verändert.

Darüber hinaus wurde das Niveau der Proteinexpression von p-Smad 2/3 und TGF- β -R untersucht. Die Proteinexpression von TGF- β -R wird auch nach der Stimulation mit TGF- β ₁ im Vergleich zur Stimulation mit BMP 2 und -7 allein unterdrückt. Dieses Ergebnis bestätigte die Herunterregulierung von TGF- β -R-II und ALK-1 auf der Proteinebene. Darüber hinaus reduziert sich die Expression von p-Smad 2/3 auf Proteinebene durch die Präsenz von TGF- β ₁. Dieser Effekt kann auch auf eine negative Rückkopplung der Zellen nach der TGF- β -Stimulation durch die Höherregulation von Smad 7 zurückgeführt werden [26]. In einer anderen Zelllinie wurde herausgefunden, dass Smad 7 die Phosphorylierung von Smad 2 inhibiert [83]

Zusätzlich zum Smad-Signaling und dem Non-Smad-Signaling wird auch das BMP und TGF- β ₁-Signaling aktiviert. Diese Signalings umfassen die Signalwege von p 38 und der Erk-MAPK Kinase (p 42/p44) und könnten daher eine zentrale Rolle bei der Proliferation

und der Differenzierung von Osteoblasten einnehmen. Daher wurden auch die Erk-MAPK Kinase und p 38 auf der Proteinebene mit Hilfe eines Western Blots untersucht. Das Erk-Protein (p-p 42/44) verändert sich nicht signifikant durch die Stimulation mit BMP und TGF- β_1 . Allerdings wird p 38 durch die Anwesenheit von TGF- β_1 höherreguliert. Innerhalb des p 38 Signalings scheint TAK-1 ein wichtiger Faktor zu sein. Es wird durch BMP 2 und BMP 4 aktiviert und führt zur MKK 3/6-induzierten p38 MAP Kinase-Aktivierung [84]. Die gezielte Hemmung der TAK-1 Gene bei Mäusen induziert einen Defekt im intraembryonalen Gefäßsystem. Derselbe Effekt wurde auch bei Smad 5-null-Mäusen beobachtet [85]. Dieser Effekt zeigt, dass TAK-1 eventuell wichtig für die Smad-Aktivierung und die Signaltransduktion von BMP sein könnte. In vivo induziert die konditionelle Deletion von TAK-1 in Chondrozyten die Chondrodysplasie und eine Gelenkabnormalität. Eine ähnliche Wirkung wurde bei Mäusen mit defektem BMP-Signaling beobachtet [86]. Diese Studie weist darauf hin, dass die p38 MAP Kinase bei der Knochenbildung eine Rolle spielt. Aber die Art und Weise auf die BMP und TGF- β das MAPK Signaling aktivieren, muss noch intensiv erforscht werden.

Darüber hinaus wurden die gesamten regulatorischen Faktoren des BMP und TGF- β Signalings untersucht. Smurf 1 und -2 sind E3 Ubiquitin-Ligasen, die degradieren und die Smad 1/5/8-Proteine abbauen [37, 38]. Die Expressionen dieser beiden Faktoren wird durch die Stimulation von BMP 2, BMP 7 oder TGF- β_1 nicht signifikant beeinflusst. Sara fördert das TGF- β Signaling durch eine Verstärkung der Smad 2/3-Phosphorylierung [42]. Die Expression dieses Proteins wird durch die zusätzliche Behandlung mit TGF- β_1 im Vergleich zur Behandlung mit BMP 2 und 7 allein herunterreguliert. Bambi ist seinerseits ein Pseudo-TGF-Rezeptor [31], so dass BMP und TGF- β zwar Bambi binden, aber kein Signaling aktivieren können. Die Expression von Bambi ist durch die Anwesenheit von TGF- β_1 herunterreguliert, was eigentlich für eine Verstärkung des BMP 2 und BMP 7-Signalings spricht. Ski und SnoN hemmen die BMP- und TGF- β Signalings durch die direkte Inhibierung von Komplexbildungen zwischen Smad 4 und Smad 1/5/8 sowie Smad 2/3 [44]. Außerdem stabilisieren diese beiden Proteine den Smad-Komplex auf der DNA, um den neu stimulierten Smads den Zugang zur Smad-bindenden Region zu versperren. Weiterhin verhindern Ski und SnoN die Bindung von Smads mit Transkriptionsaktivatoren. Zusätzlich antagonisieren diese beiden Proteine auf der Transkriptionsebene durch die Rekrutierung von Nuklearen Co-Repressoren (N-CoR) und des Histone Deacetylase Komplexes (HDAC) [47]. Die Genexpression von Ski ist

durch BMP 2, BMP 7 oder TGF- β_1 nicht in erheblichem Maße signifikant beeinträchtigt. Die Genexpression von SnoN ist hingegen durch BMP 2 und BMP 7 mäßig erhöht, und die Zugabe von TGF- β_1 erhöht die SnoN-Genexpression dramatisch. Dieser Effekt wurde auch auf der Proteinebene mit Hilfe eines Western Blots beobachtet. Daher wird davon ausgegangen, dass SnoN durch die TGF- β Stimulation höherreguliert wird und die BMP 2- und -7-Signalings inhibiert.

Wie bereits weiter oben erwähnt wurde, ist SnoN aufgrund seiner Rekrutierung von N-CoR und HDAC ein bekannter Inhibitor des BMP und des TGF- β Signaling. HDAC ist ein Enzym, das durch eine vermehrte Deacetylierung der Histone die Gen-Transkription unterdrückt [48]. Dieser Effekt soll daher durch die HDAC-Inhibierung untersucht werden, um zu sehen, ob die inhibitorische Wirkung von TGF- β auf das BMP-Signaling auf diese Art und Weise beseitigt wird. Valproinsäure ist eines der bekanntesten anti-epileptischen Medikamente: klinisch wird sie sehr häufig als generalisiertes Mittel gegen epileptische Anfälle [49] und im Rahmen ihres Off-Label-Uses als anti-kanzerogenes Medikament verwendet [87]. Valproinsäure blockiert die Natrium- und Kalziumkanäle sowie die GABA-Transaminase bei gleichzeitiger Steigerung der GABA-Synthese, Sie ist zwar kein Induktor, aber ein starker Hemmstoff für Cytochrom P450-Enzyme [49] und sie ist auch als HDAC-Inhibitor bekannt. Um die maximale Dosierung der Valproinsäure im Verhältnis zu HDAC ohne toxischen Effekt auf die Osteoblasten zu induzieren, wurde ein Toxizitätstest für die Valproinsäure durchgeführt. Dieser Test kam zu dem Ergebnis, dass die Valproinsäure-Konzentration von 100 μ M und 200 μ M keine toxische Wirkung auf die Osteoblasten hat.

Danach wurde die HDAC-Aktivität bei einer Stimulation mit TGF- β analysiert. Die HDAC-Aktivität erhöhte sich in mit TGF- β_1 behandelten humanen Osteoblasten, was für eine verminderte Expression von Smad 1, Smad 6, Alk-1 und TGF- β -R-II sprechen könnte. Die HDAC wird effektiv durch eine Inkubation mit 100 μ M und 200 μ M Valproinsäure blockiert. Als Kontrolle für den Inhibitor wurde Trichostatin verwendet, da diese Substanz ebenfalls die HDAC-Aktivität hemmt.

Mit dem Ziel der Beseitigung des inhibitorischen Effekts von TGF- β wurden die Adenovirus-Luciferase-Assays mit einer Stimulation mit BMP 2, BMP 7 und TGF- β_1 wiederholt und die Osteoblasten mit 100 μ M und 200 μ M Valproinsäure inkubiert, die mit TGF- β_1 behandelt wurde. Die Ergebnisse zeigen, dass der von TGF- β_1 abhängige

inhibitorische Effekt vollständig durch die Valproinsäure in beiden Konzentrationen neutralisiert wird. Interessanterweise verstärkt die zusätzliche Valproinsäure in beiden Konzentrationen sogar das Smad 1/4-Signaling im Vergleich zur Stimulation mit BMP 2 und BMP 7 allein. HDAC spielt eine zentrale Rolle bei der Kontrolle der Skeletogenese, denn es reguliert die Maturation und die Funktion sowohl der Osteoblasten als auch der Osteoklasten. Im menschlichen Körper existieren insgesamt 18 verschiedene HDACs [88]. HDAC 1 kommt ausschließlich in Progenitorzellen von Osteoblasten vor, während HDAC 4 und HDAC 6 nur in reifen Osteoblasten exprimiert werden. HDAC 3 und HDAC 7 kommen hingegen in jeder Form von Osteoblasten vor [89, 90]. Diese HDACs binden viele Transkriptionsfaktoren wie zum Beispiel RUNX 2 und die Smads [74, 89]. Die gezielte Hemmung verschiedener HDACs stimuliert die Maturation von Osteoblasten in vitro. Die Inhibierung von HDAC 4 oder HDAC 5 durch RNAi beseitigt die durch TGF- β vermittelte Repression des Osteocalcin-Promotors, verstärkt die Mineralisierung der Osteoblasten [74] und erhöht die acetylierte Menge von RUNX 2 [91]. Die RNAi Inhibierung von HDAC 3 beschleunigt ebenfalls die Expression von Osteocalcin und die Mineralisierung der Matrix [90]. Insgesamt führt die individuelle HDAC-Inhibition zu einer Differenzierung der Osteoblasten, aber jedes HDAC spielt seine eigene Rolle in diesem Prozess. Viele Studien haben darüber hinaus nachgewiesen, dass die allgemeine Inhibierung der HDAC-Aktivität durch kleine molekulare Inhibitoren die Maturation der Osteoblasten fördern kann. Der Einsatz von HDAC-Inhibitoren (Trichostatin A, Valproinsäure, Natriumbutyrat) kann die Produktion alkalischer Phosphatase und die Matrixmineralisierung der Knochenzellen in vitro erhöhen [91-94]. HDAC-Inhibitoren induzieren auch die Expression von Osteopontin und RANKL in Osteoblasten [95, 96], aktivieren ERKs und stimulieren die osteoblastische Differenzierung multipotenter Knochenmarkstammzellen [94, 97]. Alle diese Studien zeigen eine Förderung der Differenzierung der Osteoblasten durch HDAC-Inhibitoren.

Über die Art und Weise auf die die HDAC die Osteoklasten kontrollieren, ist leider bis zum heutigen Tage nur wenig bekannt, HDAC 1 regelt NFATc und OSCAR, die Promotoren wichtiger Gene der Osteoklasten. Mittels STAT3 reguliert HDAC1 die Expression dieser Gene und hemmt die Differenzierung der Osteoklasten [98]. Im Vergleich zur Förderung der Maturation von Osteoblasten in vitro, unterdrücken die HDAC-Inhibitoren die Viabilität und die Differenzierung der Osteoklasten [93].

Valproinsäure ist einer der allgemeinen HDAC-Inhibitoren, deren fördernder Effekt auf das Smad 1/4 Signaling eine neue Möglichkeit für die Knochenheilung von Traumapatienten bietet. Allerdings fehlen bis zum heutigen Tage immer noch Daten in vivo und die genaue Wirkung der Valproinsäure ist nach wie vor unbekannt. Einige Studien in vivo zeigen allerdings, dass eine Langzeitbehandlung mit Valproinsäure Osteopenie und Osteoporose induziert, und das Frakturrisiko von Patienten mit Epilepsie erhöht [99]. In vitro reduziert eine solche Behandlung das Collagen und das Osteonectin in SMA-Zellen [100]. Aber der Mechanismus, durch den die Valproinsäure den Knochenverlust induziert, ist nicht bekannt, weil weitere Faktoren, wie zum Beispiel die unzureichende Einnahme von Vitamin D oder von Calcium oder zu geringe körperliche Aktivität ebenfalls eine zentrale Rolle spielen. Darüber hinaus zeigen andere Studien, dass die HDAC-Inhibitoren die Expression von Östrogen-Rezeptoren im Mamma-Karzinom [101] und in den Osteoblasten [102] unterdrücken. Somit verhindern die HDAC-Inhibitoren wahrscheinlich die Knochenbildung durch eine verminderte Sensitivität für hormonelle Stimuli.

Bei Patienten mit chronischen inflammatorischen Krankheiten wie zum Beispiel Leberfibrose, Leberzirrhose, Herzfibrose, chronischem Nierenversagen oder Fibrose eines anderen Gewebes wurde festgestellt, dass der TGF- β Wert im Serum ständig erhöht ist [23, 103, 104]. Daher wird es interessant sein zu beobachten, wie sich eine chronische Anwesenheit von TGF- β auf das BMP-Signaling auswirkt. Osteoblasten wurden für jeweils 4, 8, 12 und 16 Tage mit TGF- β_1 in einer Konzentration von 2,5 $\mu\text{g/l}$ und 5 $\mu\text{g/l}$ stimuliert und ein Western Blot für den TGF- β Rezeptor und den p-Smad 2/3 durchgeführt. Die Expression von TGF- β -R bleibt auch nach einer Stimulation von 4 Tagen unverändert. Nach 8 Tagen ist bei der Stimulation mit 5 $\mu\text{g/l}$ TGF- β_1 eine Abnahme der Expression von TGF- β -R festzustellen. Nach 12 und nach 16 Tagen geht die Expression von TGF- β -R mit der Stimulation von TGF- β_1 in beiden Konzentrationen zurück. Dieser Verlauf zeigt, dass bei einer chronischen Präsenz von TGF- β_1 die Proteinexpression von TGF- β -R herunterreguliert wird. Die exprimierten Proteine können wiederum nur wenig TGF- β mit ihren Rezeptoren auf der Zelloberfläche binden und nur wenige Signalings aktivieren. Dies ist eine negative Rückkopplung und ein Selbstschutzmechanismus der menschlichen Osteoblasten gegen TGF- β . Bei der Expression von p-Smad 2/3 ist nach 4 Tagen Stimulation mit TGF- β in beiden Konzentrationen eine Hochregulierung zu beobachten. Nach 8 und nach 12 Tagen

Stimulation bleibt die Expression unverändert, während sie nach 16 Tagen herunterreguliert wird. Dieses Ergebnis lässt sich gut mit der Expression von TGF- β -R verknüpfen. Nach 4 Tagen Stimulation bleibt das Niveau der Expression von TGF- β -R unverändert. Dies führt zu folgender Regel: Je höher die Konzentration von TGF- β , desto mehr Smad 2/3 wird phosphoryliert und aktiviert. Nach einer Stimulation von 8 und von 12 Tagen geht die TGF- β -R-Expression erst herunter, denn obwohl TGF- β in Osteoblasten über einen längeren Zeitraum existent ist, verändert sich die Expression von p-Smad 2/3 im Laufe der Zeit nicht in einem signifikanten Maße. Nach einer Stimulation von 16 Tagen befindet sich die Expression von TGF- β -R auf einem dermaßen niedrigen Niveau, dass die Zahl der p-Smads 2/3 ebenfalls abnimmt. Unsere Experimente haben bereits gezeigt, dass TGF- β bei der Inhibierung von BMP 2 und BMP 7 eine zentrale Rolle spielt. Daher könnte TGF- β ein wichtiger Störfaktor sein, der bei einigen Traumatpatienten für das Versagen der Therapie mit BMP 2 und BMP 7 verantwortlich ist. Klinisch wurde auch von unseren Arbeitengruppen beobachtet, dass die Patienten mit Leberzirrhose oder mit chronischem Nierenversagen eine verminderte Knochendichtigkeit aufweisen. Deshalb muss überlegt werden, ob es bereits Sinn macht, vor der BMP-Therapie den TGF- β Wert im Serum grundsätzlich mit Hilfe eines Screenings zu untersuchen. Mit Hilfe dieses Screenings können jene Patienten mit einem relativ niedrigen TGF- β -Wert im Serum die BMP-Therapie erhalten, um das vorhersagbare Versagen der Therapie zu vermeiden. Aber bei welchem Expressionsniveau von TGF- β ein effizienter Cut-Off angesetzt werden muss, um einen maximalen Nutzen im Verhältnis zu den Kosten des Screenings zu erreichen, ist immer noch umstritten. Unsere Arbeitsgruppe hat herausgefunden, dass das TGF- β Niveau bei Patienten mit Leberzirrhose 3 - 5 mal höher ist, als das der restlichen Bevölkerung. Andere Arbeitsgruppen haben bestätigt, dass bei Frauen mit idiopathischer Osteoporose deutlich erhöhte Werte der TGF- β_3 -Isoforme im Serum nachweisbar sind und ab einer Konzentration von 2 ng/ml im Serum das Osteoporoserisiko 4 - 6mal höher ist, als bei der restlichen Bevölkerung. Allerdings konnten keine erhöhte Werte für TGF- β_1 nachgewiesen werden [105]. Daher sind weitere intensive und aussagekräftige Studien nötig.

Trotz der zahlreichen positiven Effekte der Verwendung von BMP 2 und BMP 7 als Zusatz oder als Autograft bei Patienten mit einer Fraktur, wurden auch ein paar negative Wirkungen bekannt, wie z.B. Infektionen, Schmerzen, Morbidität des Donors,

heterotopische Knochenformation und immunologische Reaktionen [63, 64]. In unseren Experimenten beseitigt die Zugabe von Valproinsäure nicht nur die inhibitorische Wirkung von TGF- β_1 auf BMP 2 und BMP 7, sondern er fördert sogar das Smad 1/4 Signaling. Mit dieser Entdeckung kann tatsächlich eine Verbesserung der Therapiestrategie von BMP 2 und BMP 7 in Angriff genommen werden, weil Valproinsäure klinisch häufig als anti-epileptisches Medikament verwendet wird. Wenn die Valproinsäure als Unterstützung der Therapie mit BMP 2 und BMP 7 verwendet werden kann, wird die Signaltransduktion von BMP 2 und BMP 7 viel stärker sein. Dieser Effekt führt zu einer vermehrten Knochenbildung, die durch die Stimulation mit BMP 2 und BMP 7 aktiviert wird. Daher wird die Effizienz der Therapie mit BMP 2 und BMP 7 deutlich höher sein als zuvor. Außerdem profitieren aufgrund der Verstärkung des BMP-Signalings viele Patienten von dieser Therapie. Darüber hinaus wäre es sogar vorstellbar, dass Valproinsäure eventuell als Monotherapie eingesetzt werden kann, denn in den menschlichen Knochen existierten endogene BMP-Proteine, die im Falle eines Knochendefektes aktiviert werden. Der Einsatz von Valproinsäure wird die Wirkung von BMP verstärken und die Defektheilung beschleunigen. Valproinsäure ist viel günstiger als die Therapie mit BMP 2 und BMP 7 und verursacht außerdem weniger der oben erwähnten Probleme, die die Therapie mit BMP 2 und BMP 7 kennzeichnen. Aber Valproinsäure ist selbst ein unspezifischer HDAC-Inhibitor und die menschlichen Knochen bestehen nicht nur aus Osteoblasten. Das Verhalten des Knochengewebes nach der HDAC-Inhibierung ist weiterhin unbekannt. Valproinsäure ist ein Cytochrom P 450-Inhibitor, dessen klinischer Einsatz den Abbau vieler Medikamente hemmt [49]. Die pharmakokinetische Interaktion zwischen der Valproinsäure und den Medikamenten scheint eventuell ein Problem darzustellen. Allerdings hat die Valproinsäure viele unerwünschte Nebenwirkungen, wovon die wichtigsten Teratogenität und Leberschäden sind [49, S. 371]. Deswegen muss diese Substanz noch weiterhin intensiv untersucht werden bevor sie in größerem Umfang verwendet werden kann. Insgesamt fehlen allerdings noch aussagekräftige Daten in vivo.

5 Ausblick

Zum Abschluss soll an dieser Stelle noch ein Ausblick über mögliche weitere Forschungen zur Bestätigung dieser Theorien und zur Verbesserung der Therapie mit BMP 2 und BMP 7 dargestellt werden.

Um die Rolle der Valproinsäure in den menschlichen Knochen besser verstehen zu können, würde sich zunächst ein Mausmodell zur Untersuchung der Wirkung der Valproinsäure im Rahmen der Frakturbehandlung eignen. Dabei wird die Knochendichtigkeit gemessen und die Geschwindigkeit der Knochenheilung beurteilt. Die Valproinsäure könnte entweder als Ergänzung zur Therapie mit BMP 2 und BMP 7 eingesetzt oder bei Mäusen als Monotherapie angewendet werden. Aus pharmakologischer Sicht könnte auch überprüft werden, welche Nebenwirkungen der lokale Einsatz von Valproinsäure hat. In Bezug auf die Verwendung von Valproinsäure als Monotherapie könnte auch untersucht werden, welche Vorteile und welche Nachteile die Valproinsäure im Vergleich zur Therapie mit BMP 2 und BMP 7 hat. Da die Valproinsäure ebenfalls klinisch angewendet wird, besteht hier eine ausgezeichnete Möglichkeit, die Übertragbarkeit aus humanen Osteoblasten gewonnenen Daten auf den Menschen in-vivo zu übertragen.

Den vorgestellten Ergebnissen zufolge scheint die Wirkung von TGF- β ein wichtiger Faktor zu sein, der für das Versagen der Therapie mit BMP 2 und BMP 7 verantwortlich ist. Um überprüfen zu können, ob ein grundsätzliches Screening von TGF- β notwendig ist, um eine höhere Effizienz der BMP-Therapie zu erzielen, müssen aber zuerst klinische Studien durchgeführt werden, um den Kosten-Nutzen-Faktor dieser Screeninguntersuchung bewerten zu können.

6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Indirekte Knochenheilung (Quelle: www.servier.de/medicalart).....	19
Abbildung 2 : Signaltransduktion von BMP 2,BMP 7 und TGF- β	22
Abbildung 3 : Überblick über die regulatorischen Proteine im BMP-Signaling	25
Abbildung 4 : Beispiel einer BSA-Standardkurve.....	34
Abbildung 5 : Aufbau der Gießkammer	43
Abbildung 6: Aufbau der Blotting-Schicht.....	45
Abbildung 7: Beispiel einer intakten RNA.....	50
Abbildung 8: Ablauf eines PCR-Zyklus	52
Abbildung 9: Auswirkung von BMP 2 und -7 auf mit dem Ad 5-BRE-Luc-Virus infizierte Osteoblasten nach 24 h (D1), 48 h (D2), 72 h (D3) und 96 h (D4) Stimulation.	60
Abbildung 10: Densitometrische Analyse der Expression von Smad 1 (* p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001; ns: nicht signifikant).....	61
Abbildung 11: Densitometrische Analyse der Expression von Smad 2 (* p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001; ns: nicht signifikant).....	62
Abbildung 12: Densitometrische Analyse der Expression von Smad 3 (* p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001; ns: nicht signifikant).....	63
Abbildung 13: Densitometrische Analyse der Expression von Smad 4 (* p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001; ns: nicht signifikant).....	64
Abbildung 14: Densitometrische Analyse der Expression von Smad 5 (* p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001; ns: nicht signifikant).....	65
Abbildung 15: Densitometrische Analyse der Expression von Smad 6 (* p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001; ns: nicht signifikant).....	66
Abbildung 16: Densitometrische Analyse der Expression von Smad 7 (* p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001; ns: nicht signifikant).....	67
Abbildung 17: Densitometrische Analyse der Expression von ALK-1 (* p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001; ns: nicht signifikant).....	68
Abbildung 18: Densitometrische Analyse der Expression von ALK-2 (* p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001; ns: nicht signifikant).....	69
Abbildung 19: Densitometrische Analyse der Expression von ALK-3 (* p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001; ns: nicht signifikant).....	70

Abbildung 20: Densitometrische Analyse der Expression von ALK-5 (* p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001; ns: nicht signifikant).....	71
Abbildung 21: Desitometrische Analyse der Expression von ALK-6 (* p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001; ns: nicht signifikant).....	72
Abbildung 22: Densitometrische Analyse der Expression des TGF-β Rezeptors II (* p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001; ns: nicht signifikant)	73
Abbildung 23: Densitometrische Analyse der Expression von Bambi (* p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001; ns: nicht signifikant).....	74
Abbildung 24: Densitometrische Analyse der Expression von Sara (* p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001; ns: nicht signifikant).....	75
Abbildung 25: Desitometrische Analyse der Expression von Smurf 1 (* p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001; ns: nicht signifikant).....	76
Abbildung 26: Desitometrische Analyse der Expression von Smurf 2 (* p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001; ns: nicht signifikant).....	77
Abbildung 27: Densitometrische Analyse der Expression von Ski (* p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001; ns: nicht signifikant).....	78
Abbildung 28: Densitometrische Analyse der Expression von SnoN (* p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001; ns: nicht signifikant).....	79
Abbildung 29: Densitometrische Analyse der Proteinexpression der p-Smad 2/3 (* p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001; ns: nicht signifikant)	81
Abbildung 30: Densitometrische Analyse der Proteinexpression von p-p 42/44 (* p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001; ns: nicht signifikant)	82
Abbildung 31: Densitometrische Analyse der Proteinexpression von p-p 38 (* p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001; ns: nicht signifikant)	83
Abbildung 32: Densitometrische Analyse der Proteinexpression des TGF-β Rezeptors (* p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001; ns: nicht signifikant)	84
Abbildung 33: Densitometrische Analyse der Proteinexpression von SnoN (* p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001; ns: nicht signifikant)	85
Abbildung 34: Inhibition von TGF-β ₁ durcheine, von BMP 2- und BMP 7 vermittelte, Smad 1/5/8-Signaltransduktion in primären humanen Osteoblasten und die Beseitigung dieses EffektsdurchValproinsäure (* p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001; ns: nicht signifikant)	87
Abbildung 35: Messung der HDAC-Aktivität von Osteoblasten bei einer Inkubation mit TGF-β ₁ allein sowie mit TGF-β ₁ und Valproinsäure (* p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001; ns: nicht signifikant).....	88

Abbildung 36: Densitometrische Analyse der Proteinexpression von TGF- β R und p-Smad 2/3 nach 4 Tagen Stimulation mit TGF- β_1 in einer Konzentration von 2,5 ng/ml beziehungsweise 5 ng/ml (* p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001; ns: nicht signifikant).....	89
Abbildung 37: Densitometrische Analyse der Proteinexpression von TGF- β R und p-Smad 2/3 nach 8 Tagen Stimulation mit TGF- β_1 in einer Konzentration von 2,5 ng/ml beziehungsweise von 5 ng/ml (* p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001; ns: nicht signifikant).....	90
Abbildung 38: Densitometrische Analyse der Proteinexpression von TGF- β R und p-Smad 2/3 nach 12 Tagen Stimulation mit TGF- β_1 in einer Konzentration von 2,5 ng/ml beziehungsweise von 5 ng/ml (* p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001; ns: nicht signifikant).....	91
Abbildung 39: Densitometrische Analyse der Proteinexpression von TGF- β R und p-Smad 2/3 nach 12 Tagen Stimulation mit TGF- β_1 in einer Konzentration von 2,5 ng/ml beziehungsweise von 5 ng/ml (* p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001; ns: nicht signifikant).....	92

7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 : Überblick über die TGF- β - und BMP-Rezeptoren	21
Tabelle 2: Herstellung der BSA Standardkurve.....	33
Tabelle 3: Primäre Antikörper für den Western Blot.....	41
Tabelle 4: Zusammenhang zwischen der Arylamid-Konzentration und der Trennungseffizienz	42
Tabelle 5 : Volumen der einzelnen Komponenten des Trenngels	43
Tabelle 6: Volumen der einzelnen Komponenten des Sammelgels.....	44
Tabelle 7: A-Komponente-Liste	51
Tabelle 8: B-Komponente-Liste	51
Tabelle 9: Liste der verwendeten Primer	54
Tabelle 10: Liste der Komponenten des PCR Mastermix	55
Tabelle 11 Bedingungen der PCR-Zyklen	55
Tabelle 12: Die Überlebensrate nach der Inkubation mit Valproinsäurein unterschiedlicher Konzentration.....	86

8 Literaturverzeichnis

1. Aumüller, G , Aust, G, Doll, A , Engele, J , Kirsch, J , Mense, S , Reißig, D , Salvetter, J , Schmidt, W , Schmitz, F , Schulte, E , Spanel-Borowski, K , Wolff, W , Wurzinger, L.J. , Zilch, H.G. (Ed.): Anatomie Duale Reihe. 1 edition. Stuttgart: 2007 Georg Thieme Verlag; 2006.
2. Aumüller, G , Aust, G , Doll, A , Engele, J , Kirsch, J , Mense, S , Reißig, D , Salvetter, J , Schmidt, W , Schmitz, F , Schulte, E , Spanel-Borowski, K , Wolff, W , Wurzinger, L.J. , Zilch H.G. (Ed.): Anatomie Duale Reihe. 1 edition. Stuttgart: 2007 Thieme Verlag; 2006.
3. Aumüller, G , Aust, G , Doll, A , Engele, J , Kirsch, J , Mense, S , Reißig, D , Salvetter, J , Schmidt, W , Schmitz, F , Schulte, E , Spanel-Borowski, K , Wolff, W , Wurzinger, L.J. , Zilch, H.G. (Ed.): Anatomie Duale Reihe. 1 edition. Stuttgart: 2007 Thieme Verlag; 2006.
4. Niethard, F. U. , Pfeil, J , Biberthaler, P. (Ed.): Orthopädie und Unfallchirurgie Duale Reihe. 6 edition. Stuttgart: 2003, 2009 Georg Thieme Verlag KG; 2009.
5. Aumüller, G , Aust, G , Doll, A , Engele, J , Kirsch, J , Mense, S , Reißig, D , Salvetter, J , Schmidt, W , Schmitz, F , Schulte, E , Spanel-Borowski, K , Wolff, W , Wurzinger, L.J. , Zilch, H.G. (Ed.): Anatomie Duale Reihe. 1 edition. Stuttgart: 2007 Thieme Verlag; 2006.
6. Niethard, F.U. , Pfeil, J , Biberthaler, P. (Ed.): Orthopädie und Unfallchirurgie Duale Reihe. 6 edition. Stuttgart: 2003, 2009 Georg Thieme Verlag KG; 2009.
7. Argintar, E , Edwards, S , Delahay, J: Bone morphogenetic proteins in orthopaedic trauma surgery. Injury 2010.
8. Niethard, F. U., Pfeil, J, Biberthaler, P. (Ed.): Orthopädie und Unfallchirurgie Duale Reihe. 6 edition. Stuttgart: 2003, 2009 Georg Thieme Verlag KG; 2009.
9. Derynck, R Miyazono, K: The TGF- β Family. 1 edition: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2008.
10. Kawabata, M , Imamura, T , Miyazono, K: Signal transduction by bone morphogenetic proteins. Cytokine Growth Factor Rev 1998, 9(1):49-61.
11. Cheng, H , Jiang, W , Phillips, F.M. , Haydon, R.C. , Peng, Y , Zhou, L , Luu, H.H. , An, N , Breyer, B , Vanichakarn, P , Szatkowski, J.P. , Park, J.Y. , He, T.C. : Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). J Bone Joint Surg Am 2003, 85-A(8):1544-1552.
12. Chen, D , Zhao, M , Mundy, G.R.: Bone morphogenetic proteins. Growth Factors 2004, 22(4):233-241.

13. Kishigami, S , Mishina, Y: BMP signaling and early embryonic patterning. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005, 16(3):265-278.
14. Blobe, G.C. , Schiemann, W.P. , Lodish, H.F.: Role of transforming growth factor beta in human disease. *N Engl J Med* 2000, 342(18):1350-1358.
15. Mallat, Z , Tedgui, A: The role of transforming growth factor beta in atherosclerosis: novel insights and future perspectives. *Curr Opin Lipidol* 2002, 13(5):523-529.
16. Fischetti, F , Candido, R , Toffoli, B , Durigutto, P , Bernardi, S , Carretta, R , Tedesco, F , Fabris, B: Innate immunity, through late complement components activation, contributes to the development of early vascular inflammation and morphologic alterations in experimental diabetes. *Atherosclerosis* 2011.
17. Bonewald, L.F. , Dallas, S.L.: Role of active and latent transforming growth factor beta in bone formation. *J Cell Biochem* 1994, 55(3):350-357.
18. Erlebacher, A , Filvaroff, E.H. , Ye, J.Q., Derynck, R: Osteoblastic responses to TGF-beta during bone remodeling. *Mol Biol Cell* 1998, 9(7):1903-1918.
19. Robey, P.G. , Young, M.F. , Flanders, K.C. , Roche, N.S. , Kondaiah, P , Reddi, A.H. , Termine, J.D. , Sporn, M.B. , Roberts, A.B.: Osteoblasts synthesize and respond to transforming growth factor-type beta (TGF-beta) in vitro. *J Cell Biol* 1987, 105(1):457-463.
20. Pfeilschifter, J , Bonewald, L , Mundy, G.R.: Characterization of the latent transforming growth factor beta complex in bone. *J Bone Miner Res* 1990, 5(1):49-58.
21. Noda, M , Camilliere, J.J.: In vivo stimulation of bone formation by transforming growth factor-beta. *Endocrinology* 1989, 124(6):2991-2994.
22. Gressner, A.M. , Weiskirchen, R , Breitkopf, K , Dooley S: Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. *Front Biosci* 2002, 7:d793-807.
23. Border, W.A. , Noble, N.A.: Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. *N Engl J Med* 1994, 331(19):1286-1292.
24. Ketteler, M , Noble, N.A. , Border, W.A.: Increased expression of transforming growth factor-beta in renal disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1994, 3(4):446-452.
25. Lind, M: Growth factor stimulation of bone healing. Effects on osteoblasts, osteomies, and implants fixation. *Acta Orthop Scand Suppl* 1998, 283:2-37.
26. Shi, Y , Massague, J: Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 2003, 113(6):685-700.

27. Miyazono, K , Kusanagi, K , Inoue, H: Divergence and convergence of TGF-beta/BMP signaling. *J Cell Physiol* 2001, 187(3):265-276.
28. Maeda, S , Hayashi, M , Komiya, S , Imamura, T , Miyazono, K: Endogenous TGF-beta signaling suppresses maturation of osteoblastic mesenchymal cells. *EMBO J* 2004, 23(3):552-563.
29. Wang, H , Tsang, B.K.: Nodal signalling and apoptosis. *Reproduction* 2007, 133(5):847-853.
30. Miyazawa, K , Shinozaki, M , Hara, T , Furuya, T , Miyazono, K: Two major Smad pathways in TGF-beta superfamily signalling. *Genes Cells* 2002, 7(12):1191-1204.
31. Gazzo, E , Canalis, E: Bone morphogenetic proteins and their antagonists. *Rev Endocr Metab Disord* 2006, 7(1-2):51-65.
32. Onichtchouk, D , Chen, Y.G. , Dosch, R , Gawantka, V , Delius, H , Massague, J , Niehrs, C: Silencing of TGF-beta signalling by the pseudoreceptor BAMBI. *Nature* 1999, 401(6752):480-485.
33. Kalajzic, I , Staal, A , Yang, W.P. , Wu, Y , Johnson, S.E. , Feyen, J.H. , Krueger, W , Maye, P , Yu, F , Zhao, Y , Kuo, L , Gupta, R.R. , Achenie, L.E. , Wang, H. W. , Shin, D. G. , Rowe, D. W. : Expression profile of osteoblast lineage at defined stages of differentiation. *J Biol Chem* 2005, 280(26):24618-24626.
34. Fujii, M , Takeda, K , Imamura, T , Aoki, H , Sampath, T.K. , Enomoto, S , Kawabata, M , Kato, M , Ichijo, H , Miyazono, K: Roles of bone morphogenetic protein type I receptors and Smad proteins in osteoblast and chondroblast differentiation. *Mol Biol Cell* 1999, 10(11):3801-3813.
35. Gazzo, E , Minetti, C : Potential drug targets within bone morphogenetic protein signaling pathways. *Curr Opin Pharmacol* 2007, 7(3):325-333.
36. Tsiologiannis, E , Polyzois, I , Oak Tang, Q , Pavlou, G , Tsiroidis, E , Heliotis, M: Targeting bone morphogenetic protein antagonists: in vitro and in vivo evidence of their role in bone metabolism. *Expert Opin Ther Targets* 2009, 13(1):123-137.
37. Hershko, A , Ciechanover, A: The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 1998, 67:425-479.
38. Zhang, Y , Chang, C , Gehling, D.J. , Hemmati-Brivanlou, A , Derynck, R: Regulation of Smad degradation and activity by Smurf2, an E3 ubiquitin ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, 98(3):974-979.
39. Miyazono, K , Maeda, S , Imamura, T: BMP receptor signaling: transcriptional targets, regulation of signals, and signaling cross-talk. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005, 16(3):251-263.

40. Murakami, G , Watabe, T , Takaoka, K , Miyazono, K , Imamura, T: Cooperative inhibition of bone morphogenetic protein signaling by Smurf1 and inhibitory Smads. *Mol Biol Cell* 2003, 14(7):2809-2817.
41. Zhao, M , Qiao, M , Oyajobi, B.O. , Mundy, G.R. , Chen, D: E3 ubiquitin ligase Smurf1 mediates core-binding factor alpha1/Runx2 degradation and plays a specific role in osteoblast differentiation. *J Biol Chem* 2003, 278(30):27939-27944.
42. Tsukazaki, T , Chiang, T.A. , Davison, A.F. , Attisano, L , Wrana J.L.: SARA, a FYVE domain protein that recruits Smad2 to the TGFbeta receptor. *Cell* 1998, 95(6):779-791.
43. Xu, L , Chen, Y.G. , Massague, J: The nuclear import function of Smad2 is masked by SARA and unmasked by TGFbeta-dependent phosphorylation. *Nat Cell Biol* 2000, 2(8):559-562.
44. Luo, K: Negative regulation of BMP signaling by the ski oncoprotein. *J Bone Joint Surg Am* 2003, 85-A Suppl 3:39-43.
45. Reed, J.A. , Lin, Q , Chen, D , Mian, I.S. , Medrano, E.E.: SKI pathways inducing progression of human melanoma. *Cancer Metastasis Rev* 2005, 24(2):265-272.
46. Wang, W , Mariani, F.V. , Harland, R.M. , Luo, K: Ski represses bone morphogenic protein signaling in *Xenopus* and mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, 97(26):14394-14399.
47. Suzuki, H , Yagi, K , Kondo, M , Kato, M , Miyazono, K , Miyazawa, K: c-Ski inhibits the TGF-beta signaling pathway through stabilization of inactive Smad complexes on Smad-binding elements. *Oncogene* 2004, 23(29):5068-5076.
48. Rassow, J , Hauser, K , Netzker, R , Deutzmann, R, (Ed.): *Biochemie Duale Reihe*. 1 edition. Stuttgart: 2006 Georg Thieme Verlag KG; 2006.
49. Herdegen, T , Böhm, R , Cimin-Bredée, N , Culman, J , Gohlke, P , Ley, L , Luippold, G , Ufer, M , Wätzig, V (Ed.): *Kurzlehrbuch Pharmakologie und Toxikologie*. 1 edition. Stuttgart. New York: Georg Thieme Verlag; 2008.
50. Pearson, G , Robinson, F , Beers Gibson, T , Xu, B.E. , Karandikar, M , Berman, K , Cobb, M.H.: Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* 2001, 22(2):153-183.
51. Guo, X , Wang, X.F.: Signaling cross-talk between TGF-beta/BMP and other pathways. *Cell Res* 2009, 19(1):71-88.
52. Lee, M.K. , Pardoux, C , Hall, M.C. , Lee, P.S. , Warburton, D , Qing, J , Smith, S.M. , Derynck, R: TGF-beta activates Erk MAP kinase signalling through direct phosphorylation of ShcA. *EMBO J* 2007, 26(17):3957-3967.

53. Chiu, C , Maddock, D.A. , Zhang, Q , Souza, K.P. , Townsend, A.R. , Wan, Y: TGF-beta-induced p38 activation is mediated by Rac1-regulated generation of reactive oxygen species in cultured human keratinocytes. *Int J Mol Med* 2001, 8(3):251-255.
54. Katagiri, T , Imada, M , Yanai, T , Suda, T , Takahashi, N , Kamijo, R: Identification of a BMP-responsive element in Id1, the gene for inhibition of myogenesis. *Genes Cells* 2002, 7(9):949-960.
55. Urist, M.R.: A morphogenetic matrix for differentiation of bone tissue. *Calcif Tissue Res* 1970:Suppl:98-101.
56. Wang, E.A. , Rosen, V , D'Alessandro, J.S. , Bauduy, M , Cordes, P , Harada, T , Israel, D.I. , Hewick, R.M. , Kerns, K.M. , LaPan, P , Deborah, P , Luxemberg, D.M. , Ioannis, K , Moutsatsos, J.N. , John, M.W., : Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990, 87(6):2220-2224.
57. Katagiri, T , Yamaguchi, A , Ikeda, T , Yoshiki, S , Wozney, J.M. , Rosen, V , Wang, E.A. , Tanaka, H , Omura, S , Suda, T: The non-osteogenic mouse pluripotent cell line, C3H10T1/2, is induced to differentiate into osteoblastic cells by recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Biochem Biophys Res Commun* 1990, 172(1):295-299.
58. Rickard, D.J. , Sullivan, T.A. , Shenker, B.J. , Leboy, P.S. , Kazhdan, I: Induction of rapid osteoblast differentiation in rat bone marrow stromal cell cultures by dexamethasone and BMP-2. *Dev Biol* 1994, 161(1):218-228.
59. Schindeler, A , Morse, A , Peacock, L , Mikulec, K , Yu, N.Y. , Liu, R , Kijumnuayporn, S , McDonald, M.M. , Baldock, P.A. , Ruys, A.J. , Little, D.G.: Rapid cell culture and pre-clinical screening of a transforming growth factor-beta (TGF-beta) inhibitor for orthopaedics. *BMC Musculoskelet Disord* 2010, 11:105.
60. Govender, S , Csimma, C , Genant, H. K. , Valentin-Opran, A , Amit, Y , Arbel, R , Aro, H , Atar, D , Bishay, M , Borner, M.G. , Chiron, P , Choong, P , Cinats, J , Courtenay, B , Feibel, R , Geulette, B , Gravel, C , Haas, N , Raschke, M , Hammacher, E , Van der Velde, D , Hardy, P , Holt, M , Josten, C , Ketterl, R.L. , Lindeque, B , Lob, G , Mathevon, H , McCoy, G , Marsh, D , Miller, R , Munting, E , Oevre, S , Nordsletten, L , Patel, A , Pohl, A , Rennie, W , Reynders, P , Rommens, P.M. , Rondia, J , Rossouw, W.C. , Daneel, P.J. , Ruff, S , Ruter, A , Santavirta, S , Schildhauer, T.A. , Gekle, C , Schnettler, R , Segal, D , Seiler, H , Snowdowne, R.B. , Stapert, J , Taglang, G , Verdonk, R , Vogels, L , Weckbach, A , Wentzensen, A , Wisniewski , T,: Recombinant human bone morphogenetic protein-2 for treatment of open tibial fractures: a prospective, controlled, randomized study of four hundred and fifty patients. *J Bone Joint Surg Am* 2002, 84-A(12):2123-2134.

61. Desmyter, S , Goubau, Y , Benahmed, N , de Wever, A , Verdonk, R: The role of bone morphogenetic protein-7 (Osteogenic Protein-1) in the treatment of tibial fracture non-unions. An overview of the use in Belgium. *Acta Orthop Belg* 2008, 74(4):534-537.
62. Bilic, R , Simic, P , Jelic, M , Stern-Padovan, R , Dodig, D , van Meerdervoort, H.P. , Martinovic, S , Ivankovic, D , Pecina, M , Vukicevic, S: Osteogenic protein-1 (BMP-7) accelerates healing of scaphoid non-union with proximal pole sclerosis. *Int Orthop* 2006, 30(2):128-134.
63. Leach, J , Bittar, R.G. : BMP-7 (OP-1) safety in anterior cervical fusion surgery. *J Clin Neurosci* 2009, 16(11):1417-1420.
64. Shimer, A.L. , Oner, F.C. , Vaccaro A.R.: Spinal reconstruction and bone morphogenetic proteins: open questions. *Injury* 2009, 40 Suppl 3:S32-38.
65. Fierro, F.A. , Kalomoiris, S , Sondergaard, C.S. , Nolte, J.A.: Effects on Proliferation and Differentiation of Multipotent Bone Marrow Stromal Cells Engineered to Express Growth Factors for Combined Cell and Gene Therapy. *Stem Cells* 2011.
66. 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(3):513-520.
67. Gerstenfeld, L.C. , Cullinane, D.M. , Barnes, G.L. , Graves, D.T. , Einhorn, T.A.: Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *J Cell Biochem* 2003, 88(5):873-884.
68. Joyce, M.E. , Jingushi, S , Bolander, M.E.: Transforming growth factor-beta in the regulation of fracture repair. *Orthop Clin North Am* 1990, 21(1):199-209.
69. Srouji, S , Blumenfeld, I , Rachmiel, A , Livne, E: Bone defect repair in rat tibia by TGF-beta1 and IGF-1 released from hydrogel scaffold. *Cell Tissue Bank* 2004, 5(4):223-230.
70. Ozkan, K , Eralp, L , Kocaoglu, M , Ahishali, B , Bilgic, B , Mutlu, Z , Turker, M , Ozkan, F.U. , Sahin, K , Guven, M: The effect of transforming growth factor beta1 (TGF-beta1) on the regenerate bone in distraction osteogenesis. *Growth Factors* 2007, 25(2):101-107.
71. Harris, S.E. , Bonewald, L.F. , Harris, M.A. , Sabatini, M , Dallas, S , Feng, J.Q. , Ghosh-Choudhury, N , Wozney, J , Mundy, G.R.: Effects of transforming growth factor beta on bone nodule formation and expression of bone morphogenetic protein 2, osteocalcin, osteopontin, alkaline phosphatase, and type I collagen mRNA in long-term cultures of fetal rat calvarial osteoblasts. *J Bone Miner Res* 1994, 9(6):855-863.

72. Ingram, R.T. , Bonde, S.K. , Riggs, B.L. , Fitzpatrick, L.A. : Effects of transforming growth factor beta (TGF beta) and 1,25 dihydroxyvitamin D3 on the function, cytochemistry and morphology of normal human osteoblast-like cells. *Differentiation* 1994, 55(2):153-163.
73. Erlebacher, A , Derynck, R: Increased expression of TGF-beta 2 in osteoblasts results in an osteoporosis-like phenotype. *J Cell Biol* 1996, 132(1-2):195-210.
74. Kang, J.S. , Alliston, T , Delston, R , Derynck, R: Repression of Runx2 function by TGF-beta through recruitment of class II histone deacetylases by Smad3. *EMBO J* 2005, 24(14):2543-2555.
75. Ehnert, S , Baur, J , Schmitt, A , Neumaier, M , Lucke, M , Dooley, S , Vester, H , Wildemann, B , Stockle, U , Nussler, A.K. : TGF-beta1 as possible link between loss of bone mineral density and chronic inflammation. *PLoS One* 2010, 5(11):e14073.
76. Fromigue, O , Marie, P.J. , Lomri, A: Bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor-beta2 interact to modulate human bone marrow stromal cell proliferation and differentiation. *J Cell Biochem* 1998, 68(4):411-426.
77. Spinella-Jaegle, S , Roman-Roman, S , Faucheu, C , Dunn, F.W. , Kawai, S , Gallea, S , Stiot, V , Blanchet, A.M. , Courtois, B , Baron, R , Rawadi, G: Opposite effects of bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor-beta1 on osteoblast differentiation. *Bone* 2001, 29(4):323-330.
78. Luo, D.D. , Phillips, A , Fraser, D: Bone morphogenetic protein-7 inhibits proximal tubular epithelial cell Smad3 signaling via increased SnoN expression. *Am J Pathol* 2010, 176(3):1139-1147.
79. Wang, S , Hirschberg, R: Bone morphogenetic protein-7 signals opposing transforming growth factor beta in mesangial cells. *J Biol Chem* 2004, 279(22):23200-23206.
80. Dumont, N , Arteaga, C.L.: A kinase-inactive type II TGFbeta receptor impairs BMP signaling in human breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2003, 301(1):108-112.
81. Luo, J , Tang, M , Huang, J , He, B.C. , Gao, J.L. , Chen, L , Zuo, G.W. , Zhang, W , Luo, Q , Shi, Q , Zhang, B.Q. , Bi, Y , Luo, X , Jiang, W , Su, Y , Shen, J , Kim, S.H. , Huang, E , Gao, Y , Zhou, J.Z. , Yang, K , Luu, H.H. , Pan, X , Haydon, R.C. , Deng, Z.L. , He, T.C. : TGF beta/BMP type I receptors ALK1 and ALK2 are essential for BMP9-induced osteogenic signaling in mesenchymal stem cells. *J Biol Chem* 2010, 285(38):29588-29598.
82. Hata, A , Lagna, G , Massague, J , Hemmati-Brivanlou, A: Smad6 inhibits BMP/Smad1 signaling by specifically competing with the Smad4 tumor suppressor. *Genes Dev* 1998, 12(2):186-197.

83. Hayashi, H , Abdollah, S , Qiu, Y , Cai, J , Xu, Y.Y. , Grinnell, B.W. , Richardson, M.A. , Topper, J.N. , Gimbrone, M.A.Jr. , Wrana, J.L. , Falb, D: The MAD-related protein Smad7 associates with the TGFbeta receptor and functions as an antagonist of TGFbeta signaling. *Cell* 1997, 89(7):1165-1173.
84. Shibuya, H , Iwata, H , Masuyama, N , Gotoh, Y , Yamaguchi, K , Irie, K , Matsumoto, K , Nishida, E , Ueno, N: Role of TAK1 and TAB1 in BMP signaling in early *Xenopus* development. *EMBO J* 1998, 17(4):1019-1028.
85. Jadrich, J.L. , O'Connor, M.B. , Coucouvanis, E : The TGF beta activated kinase TAK1 regulates vascular development in vivo. *Development* 2006, 133(8):1529-1541.
86. Shim, J.H. , Greenblatt, M.B. , Xie, M , Schneider, M.D., Zou, W , Zhai, B , Gygi, S , Glimcher, L.H.: TAK1 is an essential regulator of BMP signalling in cartilage. *EMBO J* 2009, 28(14):2028-2041.
87. Machado, M.C. , Bellodi-Privato, M , Kubrusly, M.S. , Molan, N.A., Tharcisio, T , Jr., de Oliveira, E.R. , D'Albuquerque, L.A.: Valproic acid inhibits human hepatocellular cancer cells growth in vitro and in vivo. *J Exp Ther Oncol* 2011, 9(2):85-92.
88. Venter, J.C., Adams, M.D., Myers, E.W., Li, P.W., Mural, R.J., Sutton, G.G., Smith, H.O., Yandell, M, Evans, C.A., Holt, R.A., Gocayne, J.D., Amanatides, P, Ballew, R.M., Huson, D.H., Wortmann, J.R., Zhang, Q , Kodira, C.D., Zheng, X.H., Chen, L , Skupskim, M , Subramanian, G , Thomas, P.D., Zhang, J , Gabor Miklos, G.L. , Nelson, C , Broder, S , Clark, A.G. , Nadeau, J , McKusick, V.A. , Zinder, N , Levine, A.J. , Roberts, R.J. , Simon, M , Slayman, C, Hunkapiller, M , Bolanos, R , Delcher, A , Dew, I , Fasulo, D , Flanigan, M , Florea, L , Halpern, A , Hannenhalli, S , Kravitz, S , Levy, S , Mobarry, C , Reinert, K , Remington, K , Abu-Threideh, J , Beasley, E , Biddick, K , Bonazzi, V , Brandon, R , Cargill, M , Chandramouliswaran, I , Chrlab, R , Chaturvedi, K , Deng, Z , Di Francesco, V , Dunn, P , Eilbeck, K , Evangelista, C , Gabrielian, A.E. , Gan, W , Ge, W , Gong, F , Gu, Z , Gong, F , Gu, Z , Guan, P , Heiman, T.J. , Higgins, M.E. , Ji, R.R , Ke, Z , Ketchun, K.A. , Lai, Z , Lei, Y , Li, Z , Li, J , Liang, Y , Lin, X , Lu, F , Merkulov, G.V. , Milshina, N , Moore, H.M. . Naik, A. K. , Narayan, V.A. , Neelam, B , Nusskern, D , Rusch, D.B. , Salzberg, S , Shao, W , Shue, B , Sun, J , Wang, Z , Wang, A , Wang, X , Wang, J , Wei, M , Wides, R , Xiao, C , Yan, C , Yao, A , Ye, J , Zhan, M , Zhang, W , Zhang, H , Zhao, Q , Zheng, L , Zhong, F , Zhong, W , Zhu, S , Zhao, S , Gilbert, D , Baumhueter, S , Spier, G , Carter, C , Cravchik, A , Woodage, T , Ali, F , An, H , Awe, A , Baldwin, D , Baden, H , Barnstead, M , Baroow, I , Beeson, K , Busam, D , Carver, A , Center, A , Cheng, M.L. , Curry, L , Danaher, S , Davenport, L , Desilets, R , Dietz, S , Dodson, K , Doup, L , Ferriera, S , Garg, N , Gluecksmann, A , Hart, B , Haynes, J , Haynes, C , Heiner, C , Hladun, S , Hostin, D , Houck, J , Howland, T , Ibegwan, C , Johnson, J , Kalush, F , Kline, L , Koduru, S, Love , A , Mann, F , May, D , McCawley, S , McIntosh, T ,

- McMullen, I , Moy, M , Moy, L , Murphy, B , Nelson, K , Pfannkoch, C , Pratts, E , Puri, V, Qureshi, H , Reardon, M , Rodriguez, R , Rogers, Y.H. , Romblad, D , Ruhfei, B , Scott, R , Sitter, C , Smallwood, M , Stewart, E , Strong, R , Suh, E , Thomas, R , Tint, N.N. , Tse, S , Vech, C , Wang, G , Wetter, J , Williams, S , Williams, M , Windsor, S , Winn-Deen, E , Wolfe, K , Zaveri, J , Zaveri, K , Abril, J.F. , Guigo, R , Campbell, M.J. , Sjolander, K.V. , Karlak, B , Kejariwal, A , Mi, H , Lazareva, B , Hatoon, T , Narechania, A , Diemer, K , Muruganujan, A , Guo, N , Sato, S , Bafna, V , Istrail, S , Lippert, R , Schwartz, R , Walenz, B , Yooseph, S , Allen, D , Basu, A , Baxendale, J , Blick, J , Caminha, M , Carnes-Stine, J , Caulk, P , Chiang, Y.H. , Coyne, M , Dahlke, C , Mays, A , Dombroski, M , Donnelly, M , Ely, D , Esparham, S , Fosler, C , Gire, H , Glanowski, S , Glasser, K , Glodek, A , Gorokhov, M , Graham, K , Gropman, B , Harris, M , Heil, J , Henderson, S , Hoover, J , Jennings, D , Jordan, C , Jordan, J , Kasha, J , Kagan, L , Kraft, C , Levitsky, A , Lewis, M , Liu, X , Lopez, J , Ma, D , Majoros, W , McDaniel, J , Murphy, S , Newman, M , Nguyen, T , Nguyen, N , Nodell, M , Pan, S , Peck, J , Peterson, M , Rowe, W , Sanders, R , Scott, J , Simpson, M , Smith, T , Sprague, A , Stockwell, T , Turner, R , Venter, E , Wang, M , Wen, M , Wu, D , Xia, A , Zandieh, A , Zhu, X : The sequence of the human genome. *Science* 2001, 291(5507):1304-1351.
89. Westendorf, J.J., Zaidi, S.K. , Cascino, J.E., Kahler, R, van Wijnen, A.J., Lian, J.B., Yoshida, M , Stein, G.S. , Li, X: Runx2 (Cbfa1, AML-3) interacts with histone deacetylase 6 and represses the p21(CIP1/WAF1) promoter. *Mol Cell Biol* 2002, 22(22):7982-7992.
90. Schroeder, T.M. , Kahler, R.A. , Li, X , Westendorf, J.J.: Histone deacetylase 3 interacts with runx2 to repress the osteocalcin promoter and regulate osteoblast differentiation. *J Biol Chem* 2004, 279(40):41998-42007.
91. Jeon, E.J. , Lee, K.Y. , Choi, N.S. , Lee, M.H. , Kim, H.N. , Jin, Y.H. , Ryoo, H.M. , Choi, J.Y. , Yoshida, M , Nishino, N, Oh, B.C. , Lee, K.S. , Lee, Y.H., Bae, S.C.: Bone morphogenetic protein-2 stimulates Runx2 acetylation. *J Biol Chem* 2006, 281(24):16502-16511.
92. Schroeder, T.M. , Westendorf, J.J. : Histone deacetylase inhibitors promote osteoblast maturation. *J Bone Miner Res* 2005, 20(12):2254-2263.
93. Iwami, K , Moriyama, T: Effects of short chain fatty acid, sodium butyrate, on osteoblastic cells and osteoclastic cells. *Int J Biochem* 1993, 25(11):1631-1635.
94. de Boer, J, Licht, R, Bongers, M, van der Klundert, T, Arends, R, van Blitterswijk, C: Inhibition of histone acetylation as a tool in bone tissue engineering. *Tissue Eng* 2006, 12(10):2927-2937.
95. Fan, X, Roy, E.M., Murphy, T.C., Nanes, M.S. , Kim, S , Pike, J.W. , Rubin, J: Regulation of RANKL promoter activity is associated with histone remodeling in murine bone stromal cells. *J Cell Biochem* 2004, 93(4):807-818.

96. Sakata, R , Minami, S , Sowa, Y , Yoshida, M , Tamaki, T : Trichostatin A activates the osteopontin gene promoter through AP1 site. *Biochem Biophys Res Commun* 2004, 315(4):959-963.
97. Chen, T.H. , Chen, W.M. , Hsu, K.H. , Kuo, C.D. , Hung, S.C. : Sodium butyrate activates ERK to regulate differentiation of mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2007, 355(4):913-918.
98. Kim, K, Lee, J, Kim, J.H., Jin, H.M. , Zhou, B , Lee, S.Y. , Kim, N : Protein inhibitor of activated STAT 3 modulates osteoclastogenesis by down-regulation of NFATc1 and osteoclast-associated receptor. *J Immunol* 2007, 178(9):5588-5594.
99. Guo, C.Y. , Ronen, G.M. , Atkinson, S.A. : Long-term valproate and lamotrigine treatment may be a marker for reduced growth and bone mass in children with epilepsy. *Epilepsia* 2001, 42(9):1141-1147.
100. Fuller, H.R. , Man, N.T. , Lam le , T , Shamanin, V.A. , Androphy, E.J., Morris, G.E.: Valproate and bone loss: iTRAQ proteomics show that valproate reduces collagens and osteonectin in SMA cells. *J Proteome Res* 2010, 9(8):4228-4233.
101. Reid, G , Metivier, R , Lin, C.Y., Denger, S , Ibberson, D , Ivacevic, T , Brand, H , Benes, V, Liu, ET , Gannon, F: Multiple mechanisms induce transcriptional silencing of a subset of genes, including oestrogen receptor alpha, in response to deacetylase inhibition by valproic acid and trichostatin A. *Oncogene* 2005, 24(31):4894-4907.
102. Pinzone, J.J. , Stevenson, H , Strobl, J.S. , Berg, P.E.: Molecular and cellular determinants of estrogen receptor alpha expression. *Mol Cell Biol* 2004, 24(11):4605-4612.
103. Fedulov, A.V. , Ses, T.P. , Gavrisheva, N.A. , Rybakova, M.G. , Vassilyeva, J.G., Tkachenko, S.B. , Kallner, A , MacMillan, J.C. : Serum TGF-beta 1 and TNF-alpha levels and cardiac fibrosis in experimental chronic renal failure. *Immunol Invest* 2005, 34(2):143-152.
104. Leask, A: TGFbeta, cardiac fibroblasts, and the fibrotic response. *Cardiovasc Res* 2007, 74(2):207-212.
105. Grainger, D.J. , Percival, J , Chiano, M , Spector, T.D.: The role of serum TGF-beta isoforms as potential markers of osteoporosis. *Osteoporos Int* 1999, 9(5):398-404.

9 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Jian Zhao

Geburtsdatum: 04.06.1986

Geburtsort: Xiangtan in Hunan Provinz

Familienstand: ledig

Schulische Ausbildung:

1992 – 1998	Grundschule in Xiangtan City
1998 – 2001	Mittelschule in Xiangtan City
2001 – 2004	Oberstufe von Mittelschule in Xiangtan No.1 Middle School

Studium:

2004 - 2006	Studium an der Tongji Medical College from Huazhong University of Science and Technology Studienfach: Humanmedizin
2006	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Ludwig – Maximilians – Universität zu München
08 / 2008	1. Staatsexam, Note: 2.5 (gut)
08 / 2011	Beginn des praktischen Jahres
11 / 2012	2. Staatsexam, Note: 2 (gut)

Stipendium:

9 - Monate - 1/2 - Stipendium aus Mitteln des Bayerischen Staates von 05.2010 bis 01.2011
10 – Monate - Stipendium aus Mitteln des Bayerischen Staates von 04.2011 bis 01.2012

Zusatzqualifikation:

Fremdsprachen :Deutsch und Englisch flüssig in Wort ,Sprechen und Schrift

Promotion:

Promotion in Klinik für Unfallchirurgie des Klinikums rechts der Isar an TU München

Doktorvater: Prof. Dr. Andreas. K . Nüssler

Promotionsthema: Einfluss der TGF- β auf BMP 2, -7 signaling in primären humanen Osteoblasten

Kongressbeteiligung und Vorträge:

15. Chirurgische Forschungstage 2011 in Dresden - Preisträgersitzung

Vortrag: Why do some patients not respond to a BMP 2 and BMP 7 therapy: possible inhibition of the signaling cascade by TGF- β induced activation of histone-deacetylases via SnoN

Deutsche Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie 2011 in Berlin

Vortrag: Warum sprechen manche Patienten nicht auf eine BMP 2 und BMP 7 Therapie an: mögliche Inhibierung des Signalkaskade durch TGF- β -bedingte Aktivierung von Histondeacetylases via SnoN

Publikation:

Why do some patients not respond to a BMP-2 and BMP-7 therapy: possible inhibition of the signaling cascade in primary human osteoblasts by TGF- β induced activation of histone-deacetylases via SnoN

Sabrina Ehnert, Jian Zhao*, Stefan Pscherer, Thomas Freude, Steven Dooley, Andreas Kolk, Ulrich Stöckle, Andreas K Nussler and Robert Hube*

Manuskript, BMC Medicine 09 / 2012 publiziert

Gleichberechtigte Erstautorschaft

10 Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. A. K. Nüssler für die Chance, dieses Projekt in der von ihm geführten Forschungsgruppe unter hervorragenden experimentellen Bedingungen und immer wieder besonderer Unterstützung anzufertigen.

Weiterhin bedanke ich mich besonders bei Dr. sc. hum. Sabrina Ehnert für ihre perfekte und ausgezeichnete Betreuung im Rahmen dieser Arbeit

Außerdem bedanke ich mich bei Dr. Liliana Schyschka, Claudine Seeliger und Marina Unger für die Anleitung und Betreuung während der praktischen Durchführung meiner Versuche.

Schließlich gilt mein Dank Dr. Thomas Freude und Dr. Markus Neumaier für die klinische Unterstützung des benötigten OP-Materials.

Mein Dank geht ebenfalls an die Klinik für Unfallchirurgie des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München sowie deren ehemaligen Leiter Herrn Univ.-Prof. Ulrich Stöckle, in der ich meine Arbeit durchführen durfte.