



---

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

Dekan: Prof. Dr. Rudolf Arnold

Referent: Prof. Dr. D.B. Jones

Koreferent: PD Dr. Mengel

# 1 Inhalt

<b>1 Inhalt</b> .....	<b>3</b>
<b>2 Abkürzungen und Symbole</b> .....	<b>6</b>
<b>3 Einleitung</b> .....	<b>8</b>
3.1 Aufbau und Zusammensetzung des Knochens .....	9
3.2 Knochenzellen.....	9
3.3 Knochenumbau .....	10
3.4 Mechanotransduktion.....	11
3.5 Struktur der MAP-Kinase .....	12
3.6 Weitere Signalproteine.....	13
3.6.1 Proteinkinase C.....	13
3.6.2 Ras-Protein .....	15
3.6.3 Raf-Kinase.....	15
3.7 Intrazelluläre Signaltransduktionswege .....	16
3.7.1 ERK1/ERK2-Kinase Kaskade.....	16
3.7.1.1 Aktivierung über Rezeptor-Tyrosinkinasen.....	16
3.7.1.2 Aktivierung über PLC/PKC .....	18
3.7.1.3 Aktivierung über JAK/STAT-Signalweg.....	19
3.7.2 Jun-Kinase/Stress-aktivierte Protein-Kinase .....	19
3.7.3 p38-Kinase Kaskade.....	19
3.8 PI 3-Kinase und Integrine .....	21
3.9 Applikation der mechanischen Dehnung .....	22
3.10 „Osteoblast-Like Cells“ .....	24
3.11 Problemstellung.....	25
<b>4 Material und Methoden</b> .....	<b>27</b>
4.1 Material .....	27
4.1.1 Chemikalien.....	27
4.1.2 Inhibitoren .....	27
4.1.3 Aktivatoren .....	27
4.1.4 Antikörper.....	27
4.1.5 Zelllinien.....	27
4.1.6 Nährmedien .....	28
4.1.7 Apparaturen .....	28

4.1.8	Sonstige Materialien .....	28
4.2	Methoden.....	29
4.2.1	Zellkultur .....	29
4.2.1.1	Gewinnung von Osteoblasten durch die Auswaxsmethode .....	29
4.2.1.2	Trypsinieren der Zellen .....	30
4.2.1.3	Langzeitlagerung in Stickstoff .....	30
4.2.1.4	Aussetzen von Osteoblasten für die Dehnungsversuche.....	30
4.2.2	Versuchsdurchführung .....	31
4.2.2.1	Dehnung der Osteoblasten .....	31
	Aufbau der Polykarbonatplatten .....	32
	Aufbau und Funktion der Dehnungsapparatur ( <i>4-Point-Bending-Machine</i> ) ....	32
4.2.2.2	Herstellung der Zellextrakte.....	34
4.2.2.3	Quantitative Bestimmung der Proteine .....	35
4.2.2.4	Erstellen der Standard-Eichkurve .....	35
	Bestimmung der Proteinmenge in den unbekanntten Proben .....	36
4.2.2.5	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	36
	Herstellung von Trenngel und Sammelgel.....	37
	Probenvorbereitung und Gelelektrophorese.....	38
	Elektrophoretischer Proteintransfer: Western Blot .....	39
4.2.2.6	Immunochemischer Nachweis von ERK1 und ERK2 .....	41
	Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen .....	42
	Binden des Primärantikörpers .....	42
	Binden des Sekundärantikörpers.....	43
	Colorimetrischer Nachweis von Alkalischer Phosphatase.....	43
4.2.3	Modifikationen der verschiedenen ERK1/ERK2 Nachweise.....	44
4.2.3.1	Überprüfung des Einflusses des FCS-haltigen Mediums auf die Aktivierbarkeit von ERK1/ERK2 Osteoblasten.....	44
4.2.3.2	Effekt einer Stimulation mit <i>Epidermal Growth Factor</i> auf Osteoblasten .....	44
4.2.3.3	Nachweis von ERK1/ERK2 in mechanisch stimulierten Osteoblasten ..	45
4.2.3.4	Effekt einer Stimulation mit einem Phorbolster auf Osteoblasten .....	45
4.2.3.5	Effekt eines Proteinkinase C – Inhibitors auf mechanisch stimulierte Osteoblasten .....	46
4.2.3.6	Effekt der Stimulation mit Parathormon auf Osteoblasten .....	46

4.2.3.7	Effekt eines Phospholipase C – Inhibitors auf mechanisch stimulierte Osteoblasten .....	47
4.2.3.8	Effekt eines SERCA-Inhibitors auf mechanisch stimulierte Osteoblasten .....	47
4.2.3.9	Nachweis von ERK1/ERK2 in mechanisch stimulierten Tumorzellen (MG-63) .....	48
<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>49</b>
5.1	Arbeitsverlaufsübersicht .....	50
5.1.1	Überprüfung des Einflusses des FCS-haltigen Mediums auf die Aktivierbarkeit von ERK1/ERK2 in Osteoblasten .....	53
5.1.2	Effekt einer Stimulation mit Epidermal Growth Factor auf Osteoblasten .	54
5.1.3	Nachweis von ERK1/ERK2 in mechanisch stimulierten Osteoblasten .....	57
5.1.4	Effekt einer Stimulation mit einem Phorbolster auf Osteoblasten .....	61
5.1.5	Effekt eines Proteinkinase C – Inhibitors auf mechanisch stimulierte Osteoblasten .....	62
5.1.6	Effekt der Stimulation mit Parathormon auf Osteoblasten .....	66
5.1.7	Effekt eines Phospholipase C – Inhibitors auf mechanisch stimulierte Osteoblasten .....	68
5.1.8	Effekt eines SERCA-Inhibitors auf mechanisch stimulierte Osteoblasten	69
5.1.9	Nachweis von ERK1/ERK2 in mechanisch stimulierten Tumorzellen (MG-63) .....	73
<b>6</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>74</b>
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>93</b>
<b>8</b>	<b>Literatur</b> .....	<b>95</b>
<b>9</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>103</b>

## 2 Abkürzungen und Symbole

AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
BAPTA-AM	bis-Aminobromophenoxyethan-Tetraessigsäure-Tetraacetoxy-methylester
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
Cdc42	homologes Protein zum Gen 42 bei der Hefezellteilung ( <i>cell division cycle gen 42</i> )
Da	Dalton
DAG	Diacylglycerin
DDT	Dithiothreitol
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
E <sub>max</sub>	maximale Extinktion
ERK	<i>extracellular regulated kinase</i>
ET-18-OCH <sub>3</sub>	1-O-Octadecyl-2-O-methyl-rac-glycero-3-phosphorylcholin
FAK	Fokale Adhäsions-Kinase
FCS	<i>fetal calf serum</i>
GAP	<i>GTPase activating protein</i>
GDP	Guanindiphosphat
GEF	<i>guanine nucleotide exchange factor</i>
GPR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
Grb2	<i>growth factor receptor bound protein-2</i>
GTP	Guanintriphosphat
Ig	Immunglobulin
Il	Interleukin
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-trisphosphat
JaK	Januskinase
JNK	c-Jun-Kinase
mAK	monoklonaler Antikörper

MAP-K	<i>mitogen activated protein kinase</i>
MAPKAPK	<i>MAPK-activated protein kinase</i>
MAP-KK	<i>mitogen activated protein kinase kinase</i>
MEK	<i>mitogen activated ERK activating kinase</i>
MEKK	MEK-kinase
mRNA	messenger RNA
NBT	Nitroblau-Tetrazolium
NGIC-1	<i>Non-glycosidic indolocarbazole 1</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate buffered salt buffer</i>
PIP2	Phosphatidyl-inositol-4,5-bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
POBs	<i>primary bovine osteoblasts</i>
PVDF	Polyvinylidendifluorid
Rac	Mitglied der Ras Familie
Raf	eine MAP-KKK
RNA	ribonucleic acid
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor Tyrosinkinase
SAPK	stress-aktivierte Proteinkinase
SDS	Sodium-dodecylsulfat
SEK	SAPK-kinase
SERCA	<i>sarco-/endoplasmatic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase</i>
SOS	<i>Son of Sevenless</i> (ein GEF, der erstmals im Drosophila Gen <i>sev</i> beschrieben wurde)
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
T	Konzentration der Gelmatrix
TBS	<i>Tris buffered salt buffer</i>
TBST	<i>Tris buffered salt buffer-Tween</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TPA	Phorbol-12-myristate-13-acetate
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
ZR	Zytokinrezeptor

### 3 Einleitung

Mechanische Belastung beeinflusst die Regulation der Knochenmasse und -struktur. Eine erhöhte mechanische Belastung im physiologischem Rahmen verstärkt die Proliferations- und Differenzierungsleistung der Osteoblasten (Jones D.B. & Scholuebbbers J.G., 1989) und führt zu einer Zunahme der Knochendichte (Lanyon, 1996). Bei hyperphysiologischen Reizen kann es allerdings zu einer Degeneration der Knochenstruktur kommen (Jones *et al.*, 1995).

Der Berliner Chirurg Wolff stellte bereits 1869 „Das Gesetz der Transformation der Knochen“ (Wolff J., 1994) auf, indem er postulierte, daß Knochenbau durch mechanische Belastung mitbestimmt wird und mathematisch beschrieben werden kann. Obwohl heute bekannt ist, daß viele seiner Schlüsse fehlerhaft waren (Duncan & Turner, 1995), wurde seine Feststellung, daß sich die Knochenstruktur verändert, wenn sich das mechanische Umfeld verändert als „Wolffs Gesetz“ bekannt.

So kann man beispielsweise eine Abnahme der Knochendichte bei Menschen feststellen, die nicht der Schwerkraft ausgesetzt sind. Nach längerem Aufenthalt im Weltraum zeigen diese Personen eine verminderte Knochenneubildung (MOREY-HOLTON E.& Arnaud S.B., 1985) und eine Abnahme der zur Knochenneubildung erforderlichen Proteine (Caillot-Augusseau *et al.*, 1998). Eine erhöhte Knochenmasse findet man dagegen bei physikalisch aktiven Menschen (Wronski T.J. *et al.*, 1987).

Dies zeigt, das der Knochen mechanosensitiv auf physiologische Belastungsreize reagiert und zwar mit einer erhöhten Sytheserate von Matrixproteinen und einer erhöhten Mitoserate.



### 3.1 Aufbau und Zusammensetzung des Knochens

Knochen sind für die Formgebung und Fortbewegung des Körpers eine notwendige Voraussetzung. Der Knochen ist trajektoriell ausgerichtet und wird von Osteoblasten und Osteoklasten so auf- und abgebaut, daß sie sich den mechanischen Belastungen anpassen. Dazu ist ein Kommunikationssystem zwischen den Knochenzellen erforderlich. Knochen werden außerdem von Hormonen beeinflusst, die das Knochenwachstum kontrollieren und durch Änderungen der Einbau- und Freisetzungsrates von Calciumionen u.a. zur Konstanz des Calciumspiegels im Organismus beitragen.

Die extrazelluläre Matrix besteht zu zwei Dritteln aus anorganischem Knochenmineral, daß sich vorwiegend aus Calcium und Phosphat in Form von Calciumsalzen und Kristallen zusammensetzt, welches sehr dem Hydroxylapatit  $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$  ähnelt. Die Kristallform verleiht dem Knochen eine hohe Kompressionsfestigkeit.

Ein Drittel der extrazellulären Matrix besteht aus organischen Substanzen, die zu 90% aus Typ-I-Kollagen bestehen, dem der Knochen seine Zugfestigkeit verdankt. 10% der organischen Bestandteile setzen sich aus einer großen Zahl unterschiedlicher Proteine zusammen u.a. Chondroitinsulfat, Glykosaminoglykane und Osteocalcin, dem einzigen bisher bekannten exklusiv im Knochen produzierendem Protein.

### 3.2 Knochenzellen

Der Knochen besteht aus Zellen der Osteoblastenfamilie, zu denen Osteoblasten, Osteozyten und sog. „*Bone-Lining Cells*“ gehören.

Letztere machen 94% der Knochenoberfläche aus (Osteoblasten 5 % und Osteozyten 1%), sind aber, wie die Osteozyten, nicht aktiv an der Proteinsynthese oder energieverbrauchenden Prozessen beteiligt (Duncan & Turner, 1995). „*Bone-Lining Cells*“ und Osteozyten reagieren auf mechanische Belastung *in vivo* (Dodds *et al.*, 1993), und sind über gap-junctions miteinander verbunden (Cowin, 1998).

Die organischen Bestandteile der extrazellulären Matrix werden hauptsächlich von Osteoblasten gebildet, die ebenfalls über gap-junctions miteinander verbunden sind (Schirrmacher K. *et al.*, 1992; Bingmann *et al.*, 1994). Da die alleinige Stimulation von

aktiven Osteoblasten nicht ausreicht, um die Knochenmasse zu erhöhen, muß es eine Interaktion zwischen Dehnungsreiz, „*Bone-Lining Cells*“ und Osteoblasten geben (Duncan & Turner, 1995).

Mechanosensitive Zellen zeigen nach der Applikation von Dehnungsreizen eine erhöhte Konzentration an Second-messengern. Als Second-messenger dient z.B.: zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) oder Inositoltriphosphat (IP<sub>3</sub>), das zur Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern führt.

Jones und Bingmann konnten als Erstantwort in Osteoblasten eine erhöhte intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration nach mechanischer Dehnung nachweisen (Jones D.B. & Bingmann D., 1991).

### 3.3 Knochenumbau

Das Skelett stellt ein wichtiges Speicherorgan vor allem für Calcium und Phosphat dar. Die Konstanzhaltung des Serumcalciumspiegels ist eine lebensnotwendige Aufgabe, an der das Knochengewebe entscheidend beteiligt ist.

Neubildung und Differenzierung von Osteoblasten, sowie die Synthese und Sekretion der Matrixsubstanzen erfolgt unter dem Einfluß zahlreicher Hormone. Das wichtigste Hormon ist dabei das Parathormon (PTH). Dies Hormon besteht aus 84 Aminosäuren bei einem MW von 9500kDa, welches in der Nebenschilddrüse aus einem Prohormon durch Abspaltung eines N-terminalen Hexapeptids in seine wirksame Form umgewandelt wird. Dieses bewirkt im Magen-Darm-Trakt eine verstärkte Calciumresorption und in der Niere eine erhöhte Calciumreabsorption. PTH ist hauptsächlich am Knochenabbau beteiligt; aber in kleinen Dosen eingesetzt, kann es auch zu einem Anstieg der Knochenmasse beitragen (Tyson *et al.*, 1999). Im Knochen werden die Osteoklasten, die den Knochen abbauen und Calcium herauslösen, und die Osteoblasten, die Osteoid bilden und zum Knochenaufbau führen, sowie die Fibroblasten, die Kollagenfasern bilden, aktiviert. Damit stimuliert das Parathormon den Knochenumbau. PTH bewirkt in Rattenosteoblasten einen schnellen Anstieg des genregulatorischen Proteins c-fos (Clohisy *et al.*, 1992), welches die Differenzierung und Proliferation von Osteoblasten steuert (McCabe *et al.*, 1995). Außerdem kommt es bei gleichzeitiger Dehnung und PTH-Behandlung von Osteoblasten zu einer Umformung von „*Bone-Lining Cells*“ in aktive Osteoblasten (Turner *et al.*, 1998).

Calcitonin, das in den parafollikulären Zellen der Schilddrüse (sog. C-Zellen) gebildet wird, ist ein Antagonist zum Parathormon und hemmt die Aktivität der Osteoklasten, wobei gleichzeitig die Zahl der Osteoblasten zunimmt.

Osteoblasten verfügen außerdem über Rezeptoren für Steroidhormone wie Sexualhormone und Glukokortikoide, die die Knochenbildung zum Teil gegensätzlich beeinflussen. Glukokortikoidwirkungen führen zu einem rapiden Knochenverlust und zum klinischen Krankheitsbild der Osteoporose, das auch durch Interaktion mit der MAP-Kinase-Kaskade (s. Punkt 3.7.1) und nachfolgender Inhibierung der Proliferation der Osteoblasten auftreten kann (Hulley *et al.*, 1998). Weiterhin beeinflussen Wachstumshormone und Schilddrüsenhormone die Differenzierung und die Syntheseleistung der Osteoblasten.

Schließlich spielen ossäre Durchblutungsstörungen für die Knochenstruktur eine wesentliche Rolle. Eine arterielle Hyperämie führt zur Knochenresorption (Osteoporose), während eine venöse Stase eine verstärkte Knochenneubildung (Osteosklerose) bewirkt.

### **3.4 Mechanotransduktion**

Der Vorgang, durch den ein extrazellulärer Stimulus eine physiologische Antwort der Zelle hervorruft, wird Signaltransduktion genannt; ist dieser Stimulus ein mechanischer Reiz, nennt man dies Mechanotransduktion.

Extrazelluläre Stimuli können neben mechanischen Reizen auch Wachstumsfaktoren und Hormone sein.

Wenn nun spezielle Signale auf die Zelle einwirken, werden diese einzeln oder kombiniert über verschiedene Signal-Kaskaden verarbeitet. Das Ziel der Signale ist u.a. der Zellkern; hier kommt es zu Phosphorylierungen von genregulierenden Proteinen und schließlich zur Proliferation und Differenzierung der Zelle.

### 3.5 Struktur der MAP-Kinase

Die MAP-Kinasen („mitogen activated protein kinases“) sind Serin-/Threonin-Kinasen, die durch eine Vielzahl von extrazellulären Signalen aktiviert werden und diese Signale von der Zellmembran zum Zellkern vermitteln können; die Folge ist eine veränderte Differenzierungsleistung und Proliferationsrate der Zelle.

Als erste MAP-Kinase wurde im Frosch „*Xenopus laevis*“ die MAP-2-Protein Kinase beschrieben, die über den Insulinrezeptor stimuliert wird und als Substrat die ribosomale Protein S6-Kinase hat (Sturgill *et al.*, 1988).

Nachdem das Enzym geklont worden war, wurde das Gen als ERK (*extracellular regulated kinase*) bezeichnet (Boulton *et al.*, 1990). Heute kommen die Begriffe MAP-Kinase und ERK in der Literatur nebeneinander zur Anwendung, obwohl ERK eigentlich der Name einer bestimmten Gruppe von Isoformen (speziell ERK1 und ERK2) der MAP-Kinase-Familie ist. (In dieser Arbeit werden die Begriffe ERK1 und ERK2 zur Anwendung kommen.)

Als einzigartiges Merkmal von ERK1/2 kann ihre vollständige Aktivierung nur über die Phosphorylierung sowohl der Threonin- als auch der Tyrosin-Reste, welche nur durch eine einzige Aminosäure getrennt sind, erfolgen (Hipskind & Bilbe, 1998).

ERKs bestehen aus zwei Isoformen ERK 1 und ERK 2 mit einer Größe von je 44 kDa (ERK 1) und 42 kDa (ERK 2). Molekulare Studien von ERK1 und ERK2 zeigen bis zu 90 % homologe Aminosäuresequenzen (Seger & Krebs, 1995).

Die Aktivierung der ERKs ist das Ergebnis von mehreren Phosphorylierungsschritten in der sog. ERK-Kaskade (s. Punkt 3.7.1.1).

Die Substrate der ERKs sind Transkriptionsfaktoren des Zellkerns, sog. „*Early Response Genes*“, die sofort phosphoryliert werden, nachdem die ERKs in den Zellkern transloziert sind (Hefti *et al.*, 1997). Der erste in der Literatur beschriebene Transkriptionsfaktor, der als Substrat für ERK dient, war *c-Jun*. Das Hauptsubstrat der ERKs ist aber ELK-1 (Seger & Krebs, 1995). Weitere Studien zeigen in Osteoblasten eine Korrelation zwischen einer ERK- und *c-fos*-Aktivierung (Zhang *et al.*, 1995).

Das Muster der MAP-Kinase Kaskade ist nicht auf einen bestimmten extrazellulären Stimulus beschränkt; heute ist bekannt, dass mehrere Signalwege durch unterschiedliche Reize, wie z.B. durch mechanische Stimulierung, Phorbolster, Wachstumsfaktoren

oder „*Heat-Shock*“ verschiedene MAP-Kinasen aktiviert werden können. Diese Signalwege können an verschiedenen Knotenpunkten zusammenlaufen (Barinaga, 1995).

Eine Aktivierung der MAP-Kinase konnte auch bei Pflanzen, in den mechanisch gedehnten Blättern der *Alfalfa* („Luzerne“), nachgewiesen werden (Bogre *et al.*, 1996).

### 3.6 Weitere Signalproteine

#### 3.6.1 Proteinkinase C

Die Proteinkinase C (PKC) wurde zum zuerst vor 20 Jahren als Serin/Threonin-Kinase beschrieben (Dean, 1997).

Sie spielte zum ersten Mal in der Krebsforschung eine wichtige Rolle, als bekannt wurde, das der Tumor-Promoter Phorbol ester die PKC aktivierte. Hier konnte erstmalig eine Verbindung zwischen Signaltransduktion und Karzinogenese hergestellt werden.

Heute hat sich die PKC zu einer Familie mit 11 Proteinen ähnlicher biochemischer Eigenschaften entwickelt.

Die PKC Familie kann man in vier Gruppen folgendermaßen einteilen:

Die Isoformen der ursprünglich beschriebenen PKCs sind calciumabhängig und werden c-Isoformen (*conventional*) genannt. Die Isoformen der zweiten Gruppe sind calciumunabhängig und werden n-Isoformen (*novel*), die der dritten Gruppe a-Isoformen (*atypical*) genannt. Die vierte Gruppe wird „*eccentric*“ genannt; zu ihr gehört die bislang wenig erforschte PKC- $\mu$  (Newton, 1995).

Die katalytische Domäne enthält eine ATP-Bindungsregion und eine Substratbindungsstelle, die bei den verschiedenen Mitgliedern der PKC-Familie große Unterschiede aufweist.

In ihrer inaktiven Form liegt die Proteinkinase C als lösliches cytosolisches Protein vor. Die Aktivierung der c-PKC erfolgt in Anwesenheit von Calcium durch Bindung an das Diacylglycerin der Membraninnenseite, welches selbst als sog. second messenger durch Aktivierung einer Phospholipase C entstanden ist. Die n-PKC benötigen nur Diacylglycerin zu ihrer Aktivierung, während der Aktivierungsmechanismus der a-PKC calciumunabhängig ist (Dean, 1997). In der aktiven Form zeigen die PKCs einen

starken Anstieg ihrer Membranaffinität, welcher bei Aktivierung durch Diacylglycerin reversibel ist (Newton, 1995).

Typ		Isoform	Vorkommen
<b>Conventional (c)</b>	Calcium- und Phospholipid-abhängig	$\alpha$	Weitverbreitet
		$\beta$ I, $\beta$ II	Weitverbreitet Gehirn
		$\gamma$	
<b>Novel (n)</b>	Calciumunabhängig	$\delta$	Weitverbreitet
		$\epsilon$	Gehirn
		$\eta$	Herz, Haut,
		$\theta$	Lunge Skelettmuskel, Gehirn
<b>Eccentric</b>	Calciumunabhängig	$\mu$	Lunge, Epithel
<b>Atypical (a)</b>	Calciumunabhängig	$\zeta$	Weitverbreitet
		$\nu$ $\lambda$	Niere, Gehirn, Lunge

**Tabelle 1 Proteinkinase C Isoformen (Dean, 1997)**

Bei Aktivierung der PKC wird die Formation des Fokalkontaktes beeinflusst (Burrige *et al.*, 1988) und eine Änderung der Zytoskelettaggregation determiniert. Bei der Inhibition der PKC wird unter anderem die Fokalkontakt-Organisation verhindert.

Der Tumorpromoter Phorbol ester kann die c- und n-Isoformen der PKCs aktivieren, indem er an die Stelle des Diacylglycerins tritt. Anders als Diacylglycerin, wird Phorbol ester nicht vollständig metabolisiert und führt in den so behandelten Zellen zu einer verlängerten Aktivierung von Proteinkinase C (Newton, 1995). Da die Gruppe der a-PKC's weder durch  $Ca^{2+}$ , noch durch Phorbol ester aktiviert werden kann, bezeichnet Traub sie als calcium- und phorbol esterunabhängig (Traub *et al.*, 1997).

Mechanische Deformation in Osteoblasten führt zu einer Aktivierung der Phospholipase C, die eine PKC aktiviert (Jones D.B. & Bingmann D., 1991).

Die PKC verursacht, unter Umgehung des Ras-Proteins, eine direkte Aktivierung der Raf-Kinase (s. Abbildung 2)(Seger & Krebs, 1995; Kolch *et al.*, 1993).

### 3.6.2 Ras-Protein

In den letzten Jahren ist intensiv an den Ras-GTPasen geforscht worden, da aktivierte, mutierte Formen in 10-20% aller humanen Tumoren gefunden wurden (Macara *et al.*, 1996).

Die Ras-Proteine gehören zu der Gruppe der monomeren GTPasen.

Zwei Gruppen von Signalproteinen regulieren die Aktivität von Ras. Zum einen sind dies die GTPasen aktivierende Proteine (GAP). GAPs erhöhen die Hydrolysegeschwindigkeit von GTP und inaktivieren somit Ras. Zum anderen gibt es die *guanine nucleotide exchange factors* (GEF), die den Austausch von GDP zu GTP katalysieren und damit Ras aktivieren (Boguski & McCormick, 1993). In Zellen, die ein Ras-Onkogen beinhalten, ist dieses in dem GTP-gebundenem Stadium, als Folge einer defekten GTPase, geblockt. In diesem Zustand sendet Ras weiterhin, auch in Abwesenheit von stimulierenden Wachstumsfaktoren, Signale.

### 3.6.3 Raf-Kinase

Die Raf-Familie besteht aus drei Mitgliedern, c-Raf (oder Raf-1), B-Raf und A-Raf, die abhängig vom Zelltyp auftreten, aber alle an der ERK-Kaskade partizipieren. C-Raf wurde dabei als Hauptaktivator dieser Kaskade beschrieben (Daum *et al.*, 1994). Dieses Protein ist eine Serin/Threonin-Kinase mit einem Molekulargewicht von 70-75 kDa, das nach Stimulation mit Wachstumsfaktoren in einem Zeitraum von 2-3 Minuten aktiviert wird (Hipskind & Bilbe, 1998b).

Die Raf-Kinase ist „*downstream*“ vom Ras-Protein lokalisiert, und wird durch Ras anscheinend direkt über sein NH<sub>2</sub>-terminales Ende stimuliert. Diese Interaktion kann nicht direkt als Raf-Aktivierung bezeichnet werden, da Ras nur eine Lokalisierung von Raf an die Membran initiiert (s. Punkt 3.7.1.1), ohne die eine Aktivierung von Raf aber unmöglich ist (Mochly-Rosen, 1995).

Der genaue Mechanismus dieser Raf-Aktivierung liegt aber noch im Dunkeln (Seger & Krebs, 1995).

### 3.7 Intrazelluläre Signaltransduktionswege

In den vergangenen Jahren wurden in vielen Forschungsgruppen erhebliche Fortschritte bei der Aufklärung der Funktionsweise und Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden gemacht.

Bisher sind drei verschiedene MAP-Kinase-Kaskaden beschrieben worden.

#### 3.7.1 ERK1/ERK2-Kinase Kaskade

Die ERK1/ERK2-Kaskade spielt eine zentrale Rolle in der Signaltransduktion von der Zellmembran zum Zellkern.

Sie kann durch mehrere Signalwege aktiviert werden:

##### 3.7.1.1 Aktivierung über Rezeptor-Tyrosinkinasen

Die Rezeptoren der meisten Hormone und Wachstumsfaktoren sind transmembrane Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK) (Ullrich & Schlessinger, 1990). Die Rezeptor-Tyrosinkinasen besitzen eine extrazelluläre Domäne, an die sich die Liganden binden, und eine intrazelluläre katalytische Domäne mit spezifischer Tyrosinkinaseaktivität.

Lagern sich Wachstumsfaktoren wie EGF an die extrazelluläre Domäne des Rezeptors, so führt dies zu einer Rezeptor-Dimerisierung. Die Dimerisierung ist der Hauptmechanismus der Aktivierung enzymgebundener Rezeptoren mit transmembraner Domäne. Nach der EGF-Bindung werden spezifische Tyrosylreste des Rezeptors phosphoryliert und dienen dann als Bindungsstelle für das Adapter-Protein Grb2. Die Adapter-Proteine verfügen hierzu über eine sog. SH2-Domäne (*Src Homology Domain*), die ursprünglich in der viralen src-Kinase entdeckt wurde (Hefti *et al.*, 1997).

Grb2 bindet an das Protein SOS (*son of sevenless*) an der Membran, welches dann das G-Protein Ras durch Phosphorylierung von GDP zu GTP aktiviert (Vanderkuur *et al.*, 1997). Der nächste Schritt ist die Aktivierung der Serin/Threonin-Kinase Raf (MAP-KKK). Dieser Vorgang ist derzeit noch unklar. In der Literatur ist beschrieben, dass Raf durch eine Interaktion mit Ras zur Membran relokalisiert wird, und dort eine Ras-unabhängige Aktivierung von Raf stattfindet (Leevers *et al.*, 1994; Stokoe *et al.*, 1994).



Aktive Raf-Kinase phosphoryliert dann eine zweite Kinase, MEK (MAP-KK), die die Fähigkeit hat ERK1/2 sowohl an einem Threonin- als auch an einem Tyrosinrest zu phosphorylieren. Einmal aktiviert phosphoryliert ERK1/2 im Zellkern an Serin- oder Threoninresten verschiedene genregulatorische Proteine (Seeger & Krebs, 1995) (s. Punkt 3.5).

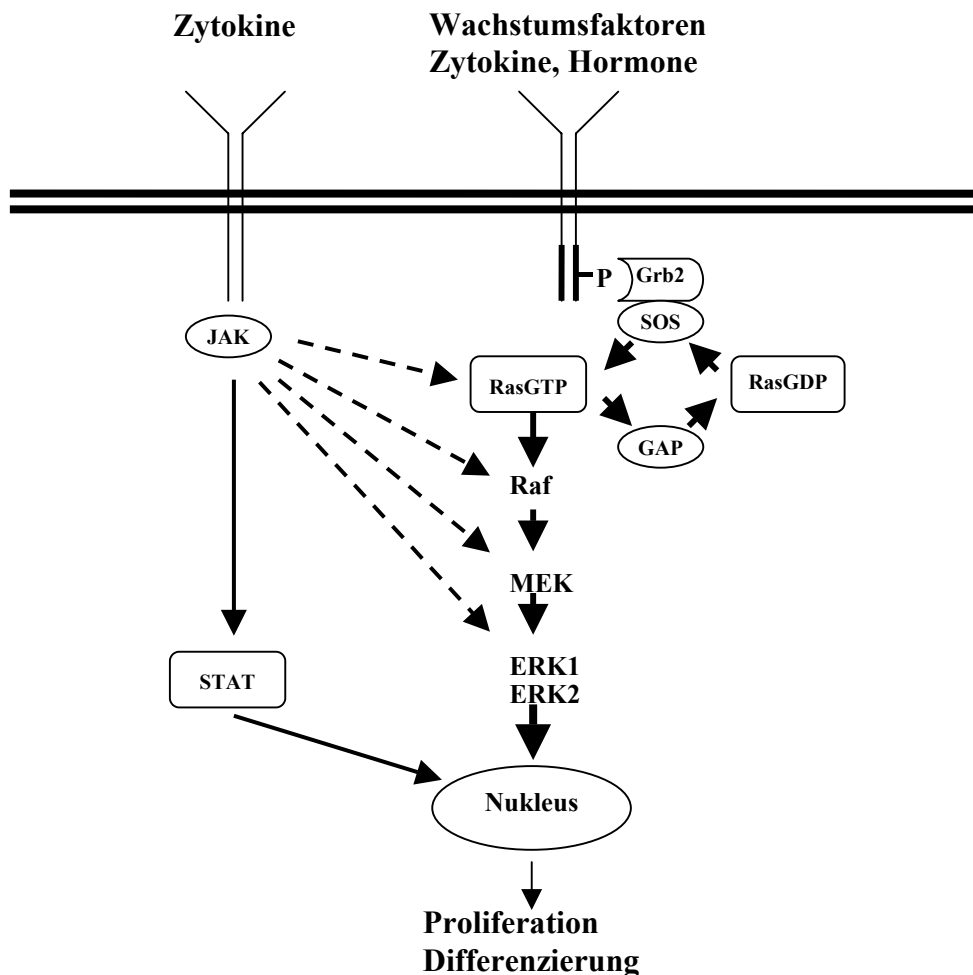


Abbildung 1 Intrazelluläre Signaltransduktionswege mit dem Ziel der ERK1/2-Aktivierung

Dargestellt sind zwei intrazelluläre Signaltransduktionswege, die zur Aktivierung der MAP-Kinase (ERK1/ERK2) führen und sowohl Zellproliferation, als auch eine veränderte Differenzierungsleistung der Zelle nach sich ziehen. Die MAP-Kinase kann durch Rezeptortyrosinkinase (RTKs) über die oben dargestellten Reize aktiviert werden (rechter Signalweg). Nach Phosphorylierung des Rezeptors bindet hier ein Adaptor-Protein (Grb2), das seinerseits an das sos-Protein bindet, welches dann das G-Protein Ras durch Phosphorylierung von GDP zu GTP aktiviert. Das Ras-Protein aktiviert die ERK-Kaskade (s. Text).

Die MAP-Kinase (ERK1/ERK2) kann auch durch eine über Zytokinrezeptoren (ZR) vermittelte Reaktion aktiviert werden (linker Signalweg) (Hefti *et al.*, 1997). Der Zytokinrezeptor aktiviert eine Januskinase, die entweder STAT anregt in den Zellkern zu translozieren, oder über Ras in die ERK-Kaskade eingreift bzw. direkt einzelne Komponenten dieser Kaskade aktiviert (s. Punkt 3.7.1.3).

(für Abkürzungen s. Punkt 2)

### 3.7.1.2 Aktivierung über PLC/PKC

Mechanische Stimulation von Osteoblasten führt zu einer sofortigen (80 ms) Aktivierung eines Membranenzym, der Phospholipase C (PLC) (Jones D.B. & Bingmann D., 1991; Jones D.B. *et al.*, 1991).

Bis heute sind 10 Phospholipase C – Isoformen beschrieben worden (Katan, 1998). Die Klassifizierung lautet PLC $\beta$ , PLC $\gamma$  und PLC $\delta$ , wobei 4 PLC $\beta$ –, 2 PLC $\gamma$ – und 4 PLC $\delta$ –Isoformen unterschieden werden (Lee & Rhee, 1995). PLC katalysiert die Spaltung des Membranlipids Phosphatidyl-Inositol-4,5-Bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) zu den sog. Second Messengern : Inositol-1,4,5-Trisphosphat (IP<sub>3</sub>)

Diacylglycerol (DAG)

IP<sub>3</sub> induziert die Freisetzung von Calciumionen aus intrazellulären Speichern, während DAG die Proteinkinase C aktiviert, die in die Signalkaskade zur Aktivierung von ERK1/2 eingreift. Diese Aktivierung verläuft (unter Umgehung des Ras-Proteins) durch eine direkte Phosphorylierung der Raf-Kinase (Kolch *et al.*, 1993; Seger & Krebs, 1995).

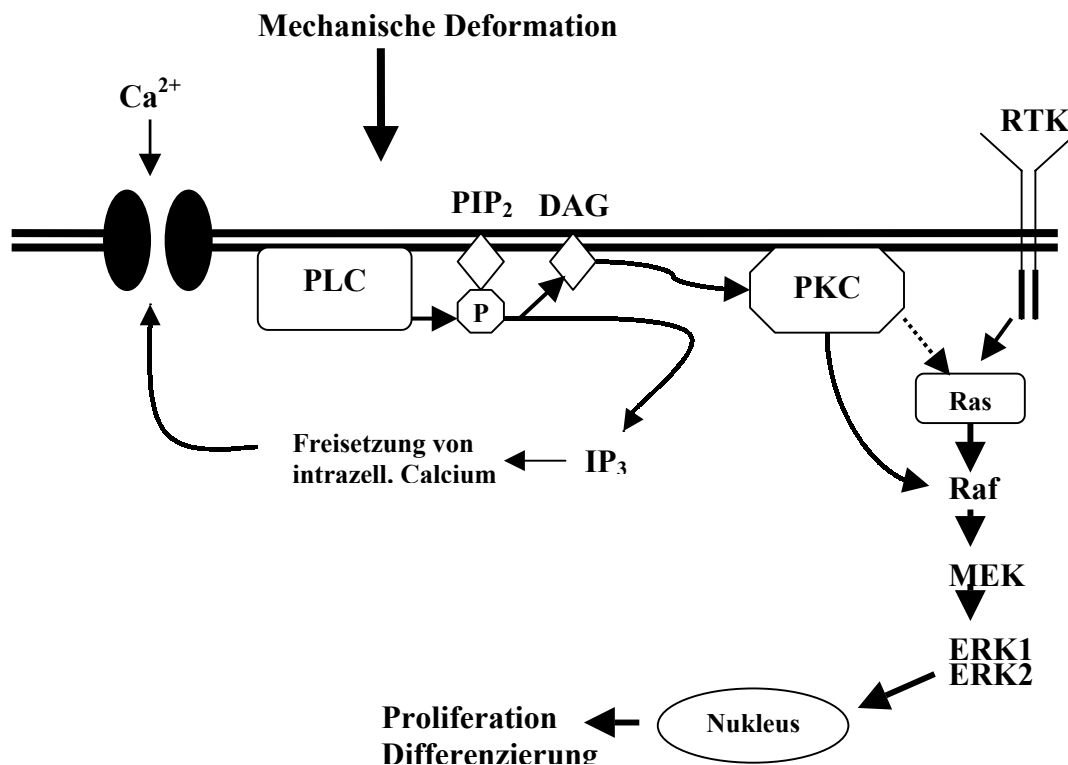


Abbildung 2 Möglicher intrazellulärer Signalweg über PLC nach mechanischer Deformation

Die MAP-Kinase-Aktivierung durch den extrazellulären Reiz der mechanischen Deformation erfolgt über die membranständige Phospholipase C. PLC katalysiert die Spaltung des Membranlipids (PIP<sub>2</sub>) zu den Second Messengern IP<sub>3</sub> und DAG. IP<sub>3</sub> induziert die Freisetzung von Calciumionen aus intrazellulären Speichern; DAG aktiviert die Proteinkinase C, die über die Raf-Kinase in die ERK-Kaskade eingreift (s Text).

### 3.7.1.3 Aktivierung über JAK/STAT-Signalweg

Die Rezeptoren dieser Familie liegen in monomerer Form vor. Die Bindung von Hormonen oder Zytokinen löst eine Dimerisierung des Rezeptors aus und aktiviert gleichzeitig die an den Rezeptor assoziierte tyrosinspezifische Januskinase (JAK; der römische Gott Janus hatte ein nach vorn und ein nach hinten blickendes Gesicht; JAKs haben zwei Proteinkinasedomänen). JAKs phosphorylieren spezifische Tyrosylreste der Rezeptoren. Die als STAT bezeichneten Transkriptionsfaktoren binden über SH2 Domänen an diese Tyrosylreste. Die STATs werden von den JAKs phosphoryliert, erlangen die Fähigkeit zur Dimerisierung und passieren den Zellkern, wo sie als Transkriptionsfaktoren spezifische Gene aktivieren (Hefti *et al.*, 1997).

Außerdem können die verschiedenen Subtypen der JAKs direkt in die ERK-Kaskade eingreifen (Barinaga, 1995) (s. Abbildung 1).

### 3.7.2 Jun-Kinase/Stress-aktivierte Protein-Kinase

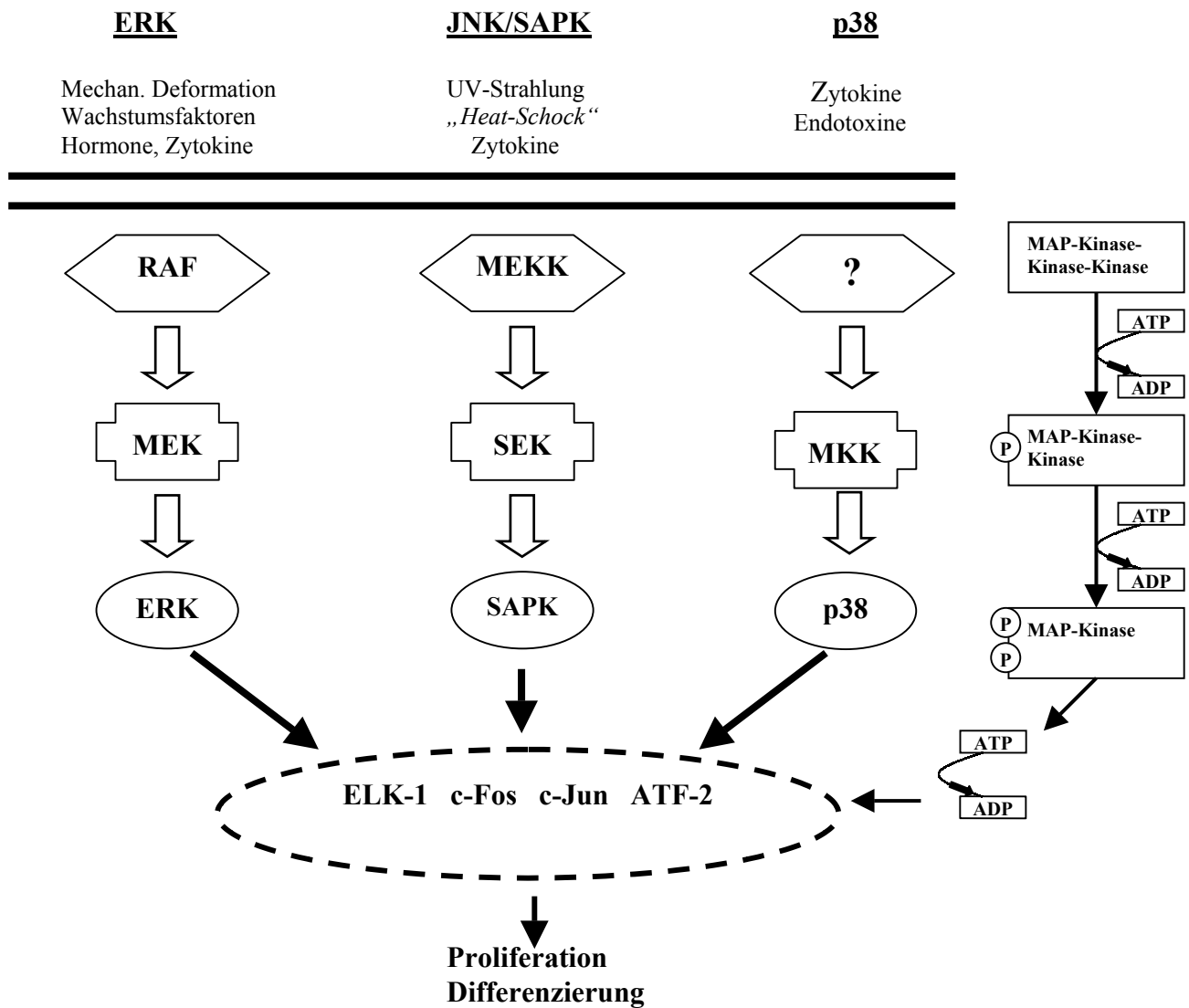
Sie JNK/SAPK Kaskade wird durch UV-Strahlung, „Heat-Shock“ und durch entzündlich ausgeschüttete Zytokine aktiviert (Kyriakis *et al.*, 1994).

Die Aktivierung dieser MAP-Kinasen erfolgt durch zwei kleine G-Proteine, Rac und Cdc42, welche MEKK aktiviert. Im nächsten Schritt phosphoryliert MEKK dann SEK/JNKK an Serin-Resten. Die aktivierte SEK/JNKK phosphoryliert schließlich JNK/SAPK, welches in Zellkern an das N-Terminale Ende des Transkriptionsfaktors c-Jun bindet und diesen an Serin-Resten phosphoryliert (Hipskind & Bilbe, 1998a) (s. Abbildung 3).

### 3.7.3 p38-Kinase Kaskade

Die p38-Kinase ist das jüngste Mitglied der MAP-Kinase Familie. Die Aktivierung erfolgt über entzündlich ausgeschüttete Zytokine, Endotoxine und osmotische Schwankungen.

Bis heute sind die „*upstream*“-Schritte in ihrer Aktivierung noch nicht klar definiert. „*Downstream*“ erfolgt die Aktivierung von p38 über eine Phosphorylierung von MKK3. Aktivierte p38-Kinase phosphoryliert im Zellkern den Transkriptionsfaktor ATF-2. Ein weiteres Ziel von p38 ist MAPKAPK2, die mit der Phosphorylierung und Aktivierung von „*Heat-Shock*“- Proteinen in Verbindung gebracht wird (Hipskind & Bilbe, 1998a) (s. Abbildung 3).



**Abbildung 3** Schematische Darstellung der drei MAP-Kinase-Kaskaden

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

(für Abkürzungen s. Punkt 2)

Molekulare Studien über die drei MAP-Kinase Familien zeigten zu 40-45% homologe Aminosäuresequenzen zwischen JNK/SAPK und der „klassischen“ MAP-Kinase (ERK) und 50% zwischen p38 und ERK (Kyriakis *et al.*, 1994).

Die Aktivierung aller drei MAP-Kinasen erfolgt nach folgenden Phosphorylierungsmustern: Thr-Glu-Tyr (TEY) für ERKs, Thr-Phe-Tyr (TPY) für JNK/SAPK und Thr-Gly-Tyr für p38 (Hefti *et al.*, 1997).

### **3.8 PI 3-Kinase und Integrine**

Die PI 3-Kinase ist ein Dimer, bestehend aus einer katalytischen Untereinheit von 110 kDa und einer regulatorischen Untereinheit von 85 kDa. Letztere besitzt zwei SH2-Domänen, mit denen die PI 3-Kinase im Rahmen einer Signalübertragung spezifische Wechselwirkungen mit anderen Signalproteinen eingehen kann. Die PI 3-Kinase phosphoryliert *in vitro* verschiedene Phosphatidylinositol-Derivate (unter anderem Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat in Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat). Bei Stimulation der Zellen mit einem Wachstumsfaktor kommt es zu einem raschen Anstieg der Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat-Konzentration. Im Zusammenhang damit wird eine Anlagerung der PI 3-Kinase an die Membran beobachtet (Liscovitch & Cantley, 1994).

Die PI 3-Kinase scheint außerdem in die belastungsinduzierte Aktivierung der MAP-Kinase involviert zu sein (Berk *et al.*, 1995).

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

Transmembrane EZM-Rezeptoren wie die Integrine sind sehr gute Mechanorezeptoren, da sie Aktin-assoziierte Proteine in fokaler Adhäsion versammeln und dabei die EZM mit dem Zytoskelett verbinden. Bei Dehnung der EZM werden so mechanische Signale

auf das Zytoskelett übertragen und biochemische Veränderungen in der Zelle bewirkt (Wang *et al.*, 1993).

Osteoblasten erzeugen bestimmte Integrin-Rezeptoren, wobei das Erzeugungsmuster vom Grad der Zelldifferenzierung abhängt (Grzesik, 1997).

Die Stimulation von Integrinen kann viele intrazelluläre Signalwege in Gang setzen, z.B. die Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) und der MAP-Kinase sowie den Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration (Rodan & Rodan, 1997).

### **3.9 Applikation der mechanischen Dehnung**

Die Kraft mit der die Osteoblasten mechanisch stimuliert werden, sollte zum einen genau definiert sein und zum anderen im physiologischen Rahmen liegen, um eine Übertragung auf die Bedingungen *in vivo* zu gewährleisten.

Interaktion mit der mechanischen Umgebung führt zu einer Adaptation von Gewebe, um hier auch mit nicht-spezialisierten Zellen die korrekte funktionelle Balance des Gewebes zu erhalten. Die optimale Funktionsweise dieser Systeme ist das Wechselspiel zwischen „Zusammenbruch“ bei zu großer mechanischer Belastung und dem „Aufbau“ bei physiologischer Belastung. Während die mechanische Belastung von Haut- oder Muskelzellen bis zu 150 % der Zellen betragen kann, liegt die physiologische mechanische Belastung im Knochen bei uniaxialen Dehnungswerten zwischen 0,3 % und 0,5 % (3000  $\mu$ Str-5000 $\mu$ Str) (Jones D.B. *et al.*, 1993).

Hyperphysiologische Dehnungsreize von mehr als 10000  $\mu$ Str resultieren in einer De-Differenzierung der Osteoblasten mit einer fibroblastenähnlichen Struktur (Jones D.B. *et al.*, 1991).

Als einer der Vorteile der Benutzung einer definierten Kraft, kann hier die genaue Reproduzierbarkeit der Kraft und somit der Ergebnisse, und der genaue Vergleich bei gleicher Dehnungsamplitude mit anderen Zell-Linien angeführt werden.

In der Literatur werden verschiedene Apparaturen zur Applikation mechanischer Reize auf Zellen beschrieben, außerdem gibt es Unterschiede in der Zellantwort bei uniaxialen und biaxialen Dehnungsreizen.

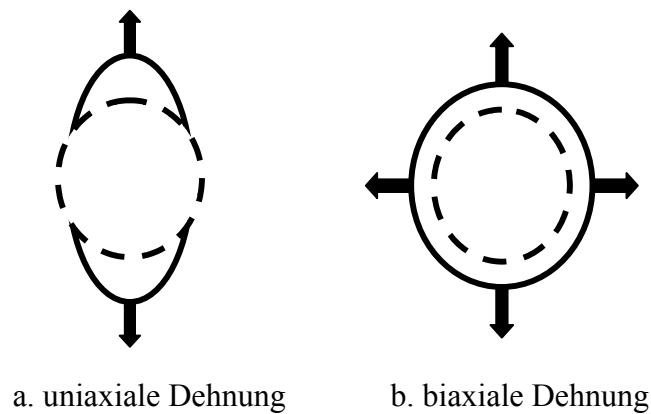
Winston beschrieb eine Maschine, bei der die Zellen einer biaxialen Dehnung unterworfen waren (Winston *et al.*, 1989). In dieser Apparatur wurden die Zellen auf

einer elastischen Scheibe ausgesetzt, die von der Unterseite hydrostatischem Druck (Gas oder Flüssigkeit) unterworfen wurde. Die Experimente mit dieser Versuchsanordnung konnten zwar ohne Probleme reproduziert werden, doch im Ergebnis konnten nur Aussagen über die Qualität gemacht werden und nicht über das Verhältnis einer definitiven Kraft auf die Zellen mit der Zellantwort.

Brighton verfeinerte dieses Modell zum Dehnen von Osteoblasten und konnte nun auch Aussagen über die Quantität der applizierten Kraft machen (Brighton C.T. *et al.*, 1991). Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Jones, welcher eine Erhöhung des intrazellulären Calcium-Spiegels innerhalb von 180 ms nach uniaxialer Dehnung der Osteoblasten mit 3000  $\mu$ Str (s. Punkt 4.2.2.1) und eine dehnungsinduzierte Aktivierung der Phospholipase C (PLC) fand (Jones D.B. & Scholuebbbers J.G., 1987; Jones D.B. & Scholuebbbers J.G., 1988) (Jones D.B. & Bingmann D., 1991) beschrieb Brighton aber eine Stimulation von Osteoblasten bei einem biaxialem Dehnungswert von 300  $\mu$ Str.

Der Grund für diese unterschiedlichen Ergebnisse könnte im Zytoskelett liegen, vorausgesetzt es verfügt über unter Spannung stehenden, elastischen Dehnungssensoren. Bei der Dehnung an einer Achse (uniaxial) wird die Zelle dünn und lang (s. Abbildung 4); das Zytoskelett ändert damit seine Gestalt und findet nach der Deformation seine alte Position wieder. Bei biaxialer Dehnung kommt es an beiden Achsen zu einer stärkeren Dehnung der elastischen Komponenten des Zytoskeletts und somit zu einer Aktivierung einer erhöhten Anzahl von Dehnungssensoren, als bei uniaxialer Dehnung (Jones D.B. *et al.*, 1993). In diesem Fall sind 200  $\mu$ Str einer biaxialen Dehnung äquivalent zu 3000 $\mu$ Str einer uniaxialen Dehnung (eigene Kommunikation mit Jones D.B. 1999).

Außerdem sind biaxiale Dehnungsreize nicht unproblematisch als physiologischer Vorgang auf den menschlichen Knochen übertragbar.



**Abbildung 4** Schematische Darstellung der unterschiedlichen Deformation von Zellen

Die Abbildung zeigt zwei verschiedene Möglichkeiten zur *in vitro* Deformation von Zellen mit a. uniaxialer und b. biaxialer Belastung (Duncan & Turner, 1995).

Die uniaxiale Deformation von Osteoblasten ist wegen der Ähnlichkeit zu der Situation im mineralisierten Knochen die am häufigsten benutzte Methode.

Eine weitere Möglichkeit mechanische Dehnungsreize auf Zellen zu übertragen, ist die Anwendung von Scherkräften.

Bei mechanischer Belastung von Knochengewebe, entsteht durch die Dehnung der Knochenzellen ein Flüssigkeitsfluß innerhalb der Canaliculae des Knochens (Fluid Flow), welcher Scherkräfte (*fluid shear-stress*) verursacht und damit die Knochenzellen stimuliert (Duncan & Turner, 1995).

In einigen Geweben ist die mechanische Stimulation über Fluid Flow bereits physiologisch vorhanden, z.B. in Verbindung mit Endothelzellen.

### 3.10 „Osteoblast-Like Cells“

Die Zellen, die für die Experimente benutzt wurden, sind aus dem Periost der metacarpalen Knochen von Rindern gewonnen worden. Sie werden im folgenden als Osteoblasten bezeichnet. Diese Zellen sind direkt aus den Perioststückchen ausgewachsen (s. Punkt 4.2.1); dabei kamen die innern Seiten des Periosts direkt auf der Kulturschale zu liegen (Jones D.B. *et al.*, 1991). Die Zellen wurden nicht gesplittet und passagiert. Die Zellkultur besteht zu 95% aus Osteoblasten, d.h. hier läßt sich



Osteopontin und Kollagen I nachweisen. Da auch zu einem geringem Anteil Fibroblasten vorkommen (weniger als 5%), werden die Zellen als „Osteoblastengleich“ bzw. im englischen Sprachgebrauch als „*Osteoblast-Like Cells*“ bezeichnet.

Im Verlauf dieser Arbeit wird aber weiterhin der Begriff der Osteoblasten zur Anwendung kommen.

### 3.11 Problemstellung

Das „Labor für Experimentelle Orthopädie und Biomechanik der Philipps-Universität Marburg“ bemüht sich u.a. um die Aufklärung der mechanoinduzierten Signalkaskadenaktivierung von Zellen. Hier kommen Knochenzellen, vor allem Osteoblasten und einige Osteosarkomzell-Linien zum Einsatz. Es ist bereits bekannt, daß mechanisch stimulierte Zellen mit einem Anstieg der intrazellulär lokalisierten MAP-Kinase (ERK1/2) reagieren. ERK1/2 wurde schon in mechanisch stimulierten Endothelzellen (Takahashi *et al.*, 1997), in Herzmyozyten (Sadoshima & Izumo, 1993; Yamazaki *et al.*, 1995) und in Chondrozyten (Mow *et al.*, 1999; Hung *et al.*, 2000) nachgewiesen. Es kann außerdem durch verschiedene Wachstumsfaktoren z.B. EGF über den Signalweg RTK-Grb2-Ras-Raf-Mek-ERK (Buday & Downward, 1993; Kumegawa M. *et al.*, 1983) aktiviert werden.

Im Labor für Experimentelle Orthopädie wurde erstmals eine Steigerung der Aktivität von ERK1/ERK2 in mechanisch stimulierten Osteoblasten (mit physiologischen Dehnungsreizen) nachgewiesen (s. unveröffentlichte Daten; Leitsch).

Die ERK1/2 – Aktivierung spielt also eine zentrale Vermittlerrolle des mitogenen Dehnungsreizes.

Unklar ist momentan, welche der oben beschriebenen Signalkaskaden durch mechanische Reize aktiviert wird und zur Aktivierung von ERK1/ERK2 führt.

Es wurden in o.g. Arbeitsgruppe bereits zahlreiche Untersuchungen zu „*Upstream-Events*“ der ERK1/2-Aktivierung durchgeführt, welche gemeinsam das Ziel verfolgen das Verständnis über die Natur des zellulären Mechanotransduktionsmechanismus zu verbessern und möglicherweise aufzuklären ( s. Punkt 3.9).

Es ist das Ziel dieser Arbeit herauszufinden welche Signalmoleküle zu einer ERK1/2-Aktivierung in Osteoblasten führen.

Ein etabliertes Verfahren zur spezifischen und sensitiven Bestimmung von Proteinen ist der immunologische Nachweis via Western-Blot.

Zur Aufklärung wurden vor allem Inhibitorexperimente durchgeführt, bei denen bestimmte Signalmoleküle „oberhalb“ der ERK1/2-Aktivierung blockiert wurden. Bei dem nachfolgenden Dehnungsreiz auf die Osteoblasten ließ sich nun ermitteln, ob weiterhin eine ERK1/2-Aktivierung auftrat (im Fall der ERK1/2-Aktivierung wäre das inhibierte Signalmolekül nicht für die Aktivierung verantwortlich).

Im Einzelnen kamen Inhibitoren für die Proteinkinase C und der Phospholipase C (mit ihren spezifischen Positivkontrollen), sowie ein SERCA-Inhibitor zur Anwendung. Die Auflistung der Inhibitorversuche und einiger „Nebenexperimente“ erfolgt unter den Punkten 4.2.3 und 5.

Der immunologische Nachweis im Western-Blot erfolgte in allen Fällen mittels eines monoklonalen Antikörpers, der spezifisch die aktiven Isoformen der MAP-Kinase ERK1/ERK2 erkennt.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Chemikalien

Ascorbinsäure	Wako, USA
Acrylamid	Serva
Ammoniumpersulfat	Merck
BCIP	Sigma
Bisacrylamid	Sigma
BSA (Albumin bovine Fraction V, standard grade, lyophil)	Boehringer
Calyculin A	Inc, USA
Complete-Mini Proteasen-Inhibitoren-Cocktail	Boehringer
Coomassie Brilliant Blue R-250	Serva
Coomassie Brilliant Blue G-250	Serva
L-Glutamin	Sigma
Mercaptoethanol	Merck
Molekulargewichtsstandard ( <i>SDS-Page broad range Standards</i> )	Bio Rad
NBT	Sigma
Penicillin	Boehringer
Streptomycin	Boehringer
TEMED	Serva
TRIS	Sigma
Triton-X 100	Merck
Trypsin	Sigma
Tween-20	Serva

Die zur üblichen Standardlaborausrüstung gehörenden Chemikalien wurden von den Firmen Merck, Roth und Sigma bezogen.

#### 4.1.2 Inhibitoren

ET-18-OCH <sub>3</sub>	Calbiochem, Kat.-Nr.:341207
NGIC-1	Calbiochem, Kat.-Nr.:481500
Thapsigargin	Molecular Probes, Kat.-Nr.:T-7458

#### 4.1.3 Aktivatoren

EGF ( <i>Epidermal-Growth-Factor</i> )	Calbiochem, Kat.-Nr.:324831
Parathormon	Sigma, Produkt-Nr.:P7399
TPA (Phorbol-12-myristat-13-acetat)	Calbiochem, Kat.-Nr.:524400

#### 4.1.4 Antikörper

Anti-activated MAP-Kinase (ERK1/ERK2)	Sigma, Produkt-Nr.:M8159
Mouse-IgG AP	Dako, Code-Nr.:D 0314

#### 4.1.5 Zelllinien

Primäre bovine Osteoblasten (POB)	(Jones D.B. <i>et al.</i> , 1993)
MG-63 (Osteosarkomzellen)	(Billiau <i>et al.</i> , 1977)

#### 4.1.6 Nährmedien

Ham's F-10	Biochrom KG
Earles Salzlösung	Biochrom KG
High Growth Enhancement Medium (modifiziertes DMEM)	Boehringer
Fötale Kälberserum (FCS)	Boehringer
	Chargenr. 14713902

Alle Nährmedien enthalten 10% FCS , 10 µg/ml Vitamin C-Phosphat, 2 mM L-Glutamin und je 50E/ml Penicillin/Streptomycin.

#### 4.1.7 Apparaturen

Cell-Counter (Coulter Counter ZM)	Coulter
Vier-Punkt-Dehnungsmaschine	Eigenentwicklung (Jones D.B. <i>et al.</i> , 1993)
Elektrophoreseapparatur	Bio Rad
Power-Supply (Modell 200)	Bio Rad
Western-Blot-Apparatur	Biometra

#### 4.1.8 Sonstige Materialien

PVDF-Membran (0,2 µm)	Bio Rad
Silikonstücke	med. Qualitätsgrad 55Shora A
Aquarium-Silikonkleber	Dow-Corning

Die zur üblichen Standardlaborausrüstung gehörenden Geräte und Materialien sind hier nicht aufgelistet.

## 4.2 Methoden

### 4.2.1 Zellkultur

#### 4.2.1.1 Gewinnung von Osteoblasten durch die Auswachsmethode

Primäre Osteoblasten wurden in Anlehnung an die Auswachsmethode von Jones (Jones D.B. *et al.*, 1991) präpariert.

Bei dieser Methode wachsen die Zellen aus Perioststückchen eines Rinderknochens, welcher vom örtlichen Schlachthof bezogen wurde. Als Quelle diente der Metacarpus eines 18-24 Monate alten Jungbullens 1-2 Stunden nach der Schlachtung.

Die folgenden Präparationsschritte wurden bei Raumtemperatur unter sterilen Bedingungen vorgenommen.

Vor der Präparation wurde die Oberfläche des Knochens (Muskelgewebe und Faszien) mit vergälltem Alkohol 70% versehen, bei einer Einwirkzeit des Alkohols von 15 min. Das klar vom Knochen abgegrenzte Muskelgewebe wurde mittels eines Skalpell abgetrennt. Weiteres dem Periost anhaftendem Fettgewebe und Faszien wurde vorsichtig, ohne das Periost zu verletzen, abpräpariert. Nach Spülung des freiliegenden Periosts mit sterilem PBS wurde es in 5mm breite Streifen geschnitten, abpräpariert und sofort in Earls-Salzlösung (ohne Antibiotika) gegeben. Das Periost-Earls-Gemisch wurde in einer Glasflasche mit Deckel 3 mal 10 min auf einem Überkopfschüttler bei 37°C gewaschen. Ein weiterer Waschschrift erfolgte unter gleichen Bedingungen für 20 min in einem Earls-Medium mit Antibiotika.

Die Perioststreifen wurden nun mit einem Skalpell auf eine Größe von ca. 5 x 5 mm geschnitten, zu je 9 Stückchen auf einer Zellkulturschale (mit der osteogenetischen Seite des Perioststückchens zum Plattenboden hin) ausgesetzt und mit 15 ml HiGEM bedeckt. Ein erster Mediumwechsel erfolgte nach 24 Stunden und weiterhin 1 mal pro Woche. Nach Erreichen der Konfluenz der Kultur nach 4 Wochen wurden die Zellen in den Experimenten verarbeitet, (s. Punkt 4.2.2.1) oder kryokonserviert (s. Punkt 4.2.1.3).

Material:	High Growth Enhancement Medium (HiGEM)
Earles Salzlösung:	3 ml 7,5 % NaHCO <sub>3</sub>
Antibiotika:	187500 IE/500 ml Streptomycin 250000 IE/500 ml Penicillin
PBS:	137mM NaCl, 2,7mM KCl, 10mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 2mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> in ddH <sub>2</sub> O lösen, pH auf 7,4 einstellen

#### 4.2.1.2 Trypsinieren der Zellen

Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen zwei mal mit PBS gewaschen und zur Ablösung von den Zellkulturschalen mit 2ml Trypsin (37°C vorgewärmt) 2 min bei 37°C inkubiert. Die Perioststückchen wurden entfernt, das Zell-Trypsin-Gemisch in einen mit 12 ml Hams F-10 Medium angereichertem Falcon-Tube gegeben und 10 min bei 500 x g zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in Hams F-10 Medium resuspendiert und die Zellen im *Coulter ZM Cell-Counter* gezählt.

Mit den Zellen der MG-63 Zell-Linie wurde genauso verfahren.

Die Zellen wurden nun in Experimenten weiterverarbeitet, oder zur Langzeitlagerung kryokonserviert.

Material:        Ham's F-10 Medium  
                  Trypsin 10% in PBS

#### 4.2.1.3 Langzeitlagerung in Stickstoff

Bei dem Verfahren der Langzeitlagerung wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff bei -196°C eingefroren.

Nach der Trypsinierung und Auszählung erfolgte die Fraktionierung der Zellen zu je 10 Millionen in einer Lösung von 10% DMSO in Hams F-10 Medium in 1,8 ml Kryo-Röhrchen. Diese wurden in einem mit Propanol angefülltem Kunststoffbehälter mit Deckel gegeben, und unverzüglich in einem -80 °C-Gefrierschrank heruntergekühlt. Die Abkühlung der Zellen erfolgte hier mit ca. 1 °C pro Minute. Nach 5 Stunden wurden die Zellen in den Stickstofftank überführt.

Material:        Ham's F-10 Medium  
                  DMSO  
                  Iso-Propanol

#### 4.2.1.4 Aussetzen von Osteoblasten für die Dehnungsversuche

Die Osteoblasten in den Kryo-Röhrchen wurden nach der Entnahme aus dem Stickstofftank ohne Zeitverzug in einem Wasserbad von 37°C aufgetaut, in einen Falcon-Tube mit 10 ml vorgewärmten Hams F-10 Medium gegeben, 10 min bei 500 x g zentrifugiert und das entstandene Zellpellet erneut in vorgewärmten Ham's F-10 Medium resuspendiert.

Danach erfolgte das Aussetzen der Zellen auf Zellkulturschalen in 15 ml Ham's F-10 Medium. Nach Erreichen der Konfluenz (1-2 Tage) wurden die Osteoblasten zum Ablösen trypsinisiert (s. Punkt 4.2.1.2).

Das Aussetzen der Zellen auf die Polykarbonatplatten erfolgte in 5 ml Hams F-10 Medium mit einer Dichte von 60.000 Zellen/cm<sup>2</sup> und anschließender Inkubation im Begasungsbrutschrank bei 37°C , 95 % Luft und 5% CO<sub>2</sub>. Die Konfluenz war nach 24 Stunden erreicht.

Es kommt zu einer Adhäsion der Zellen am Plattenboden, welche durch Adhäsionsproteine des Zytoskeletts, der sog. Integrine erreicht wird. Sie erkennen Adhäsionssegmente (RGD) aus Arginin, Glycin und Asparagin bei einer Reihe von Proteinen, z.B. Fibronectin. Da Fibronectin nur in geringem Maße von den Zellen selbst gebildet wird, erfolgt die exogene Zufuhr durch den Zusatz von FCS im Medium.

## **4.2.2 Versuchsdurchführung**

### **4.2.2.1 Dehnung der Osteoblasten**

Nach Überprüfung der Konfluenz der Osteoblasten auf den Polykarbonatplatten erfolgte 24 Stunden vor der Dehnung ein Mediumwechsel mit serumfreien Hams F-10 Medium. Dabei wurden die Zellen einmal mit 5 ml PBS gespült; es erfolgte die Zugabe von 5 ml FCS-freiem Medium und erneute Inkubation im Begasungsbrutschrank.

Das Vorhandensein von FCS im Medium führt bereits zu einer Aktivierung von ERK1/2; dies ist natürlich nicht erwünscht, da die Aktivierung der Osteoblasten durch Dehnung und nicht durch FCS erfolgen soll. Nach 24 Stunden im FCS-freien Medium zeigen die Osteoblasten keine Aktivierbarkeit mehr durch FCS. Da die Zellen durch das fehlende FCS keine Wachtstumsimpulse mehr erhalten, beginnen sie sich nach ca. 26 Stunden von den Platten abzulösen. Die Dehnung der Zellen muß also 24 Stunden nach Zugabe des FCS-freien Mediums erfolgen.

Zur Dehnung wurden die Polykarbonatplatten mit den Zellen aus dem Inkubator entnommen und in die Apparatur der „4-Punkt-Dehnungsmaschine“ eingespannt. Die Dehnung erfolgte bei 37 °C.

Material: Ham's F-10 Medium ohne FCS

## Aufbau der Polykarbonatplatten

Polykarbonat ist ein harter, thermostabiler, transparenter Kunststoff. Es zeichnet sich durch eine hohe elastische Deformierbarkeit aus, d.h. die Gitterbausteine werden nicht über das Maß der inneren elastischen Kräfte aus ihrer Gleichgewichtslage ausgelenkt.

Bei der Dehnung durch die Kraft des Hebelarms werden die oberen Schichten der Platte gedehnt, während die unteren gestaucht werden. In der Mitte liegt die „neutrale Faser“, die ihre ursprüngliche Länge beibehält.

Die Polykarbonatplatten, die in den Dehnungsversuchen zum Einsatz kamen haben die Maße 5 x 12,9 cm, bei einer Stärke von 2,93 mm. Auf der Oberfläche der Platten befindet sich ein quadratisches Feld von 20 cm<sup>2</sup> Fläche. Dieses Feld wird von 4 rechteckigen, auf ihrer Längsseite stehenden Silikonstückchen begrenzt, welche mit einem Silikonkleber dicht auf der Plattenoberfläche fixiert wurden. Nach diesem Vorgang wurden die Platten 24 Stunden an der Luft getrocknet und anschließend zum „Auslaugen“ überschüssigen Monomers 48 Stunden in ddH<sub>2</sub>O gewässert und schließlich bei 65 °C in einer Spülmaschine gespült. Zur Erzielung keimfreier Verhältnisse wurden die Platten gassterilisiert, oder alternativ 20 Minuten in 70% vergälltem Alkohol gewässert, unter der Sterilwerkbank getrocknet und mit sterilem PBS gewaschen. Diese Silikonkonstruktion wurde mit einem locker aufsitzendem, sterilen Glasdeckel versehen. Nun erfolgte das Aussetzen der Zellen in das quadratische Feld der Polykarbonatplatten (60000/cm<sup>2</sup>).

Material:            Aquarium-Silikonkleber (Dow Corning)  
                         Silikonmatten (med. Qualitätsgrad 55Shora A)  
                         Polykarbonatplatten (2,93 mm)  
                         Alkohol 70% vergällt

## Aufbau und Funktion der Dehnungsapparatur (*4-Point-Bending-Machine*)

Die „4-Punkt-Dehnungsmaschine“, welche von David Jones entwickelt wurde (Jones D.B. & Scholuebbbers J.G., 1987), ist eine Apparatur zum Dehnen von Zellen.

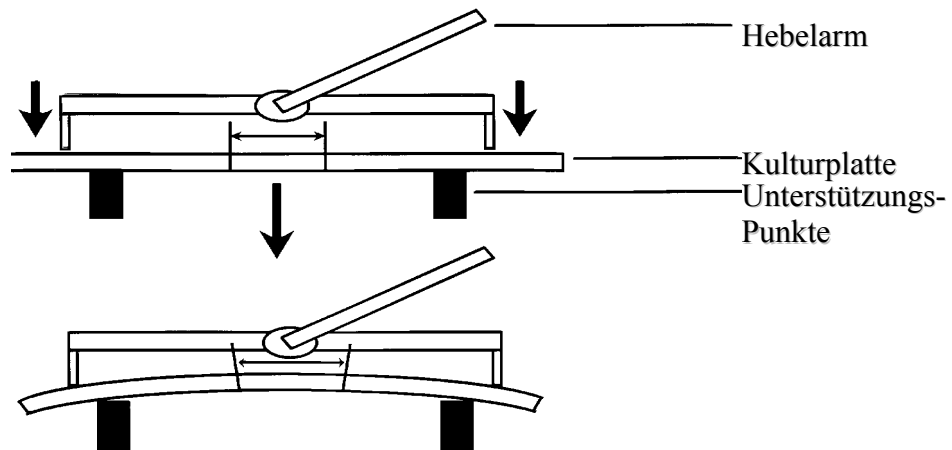
Dehnung (Strain) ist als eine Änderung in der Länge pro Längeneinheit definiert und ist dimensionslos. Ein „Strain“ bedeutet eine Längenänderung von 100 %. Im Fall einer Dehnung eines homogenen Materials, ist der Dehnungsbetrag an allen Punkten gleich.



$\varepsilon$  = Dehnung

$l$  = Länge

$$\varepsilon = \frac{\Delta l}{l}$$



**Abbildung 5 Funktionsweise der Vier-Punkt-Dehnungsmaschine**

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

Mit dieser Maschine wurde zum erstenmal eine Apparatur geschaffen, die

1. eine definierte und variabel verstellbare Deformierung an die Zellen weitergibt
2. an jedem Punkt der Polykarbonatplatten den gleichen Dehnungsbetrag aufweist.

Die Stärke der Dehnung auf der Plattenoberseite hängt von

- dem Abstand zwischen den Auflagepunkten
- der Stärke der Polykarbonatplatte
- dem Betrag der Ablenkung durch den Hebelarm ab.

Die Stärke der Dehnung kann durch folgende Formel berechnet werden (Jones D.B. *et al.*, 1993):

S = Strain

T = Stärke der Polykarbonatplatte in mm

D = Abstand der Auflagepunkte in mm

Y = Ablenkung des Hebelarms

$$S = \frac{4TY}{D^2 + 4Y^2}$$

Bei allen Experimenten wurden die Zellen mit einem Betrag von 4000 $\mu$ Strain mit 30 Zyklen / 1 Hertz gedehnt; dabei entsprechen 4000 $\mu$ Strain einer physiologischen Kraft, die äquivalent zu der uniaxialen Dehnung eines Knochens um 0,4% ist.

#### 4.2.2.2 Herstellung der Zellextrakte

Nach Dehnung der Osteoblasten wurden die Dehnungsschalen zu verschiedenen Zeiten bei 37°C im Begasungsbrutschrank inkubiert (je nach Versuchsanordnung). Nach der Inkubation wurde das Medium sofort entfernt und zum Abstoppen des Versuchs die Zellen mit 4°C PBS gespült und in Eiswasser gestellt. Das PBS wurde abgekippt und 1ml 4°C PBS hinzugegeben. Die Zellen wurden mit Zellschabern von der Oberfläche entfernt und mittels einer Pipette wurde das Zell-PBS-Gemisch in ein beschriftetes, vorgekühltes Eppendorf-Mikrolitergefäß gegeben, welches wiederum in Eiswasser gestellt wurde.

Die Zellen wurden zur Herstellung eines Zellpellets 10 Minuten bei 500 x g zentrifugiert; der Überstand wurde abgenommen und verworfen.

Vorraussetzung für die Herstellung der Extrakte ist die Lyse der Zellen und die Herstellung eines Homogenats bzw. die gleichmäßige Suspension der freigesetzten Zellkomponenten im Extraktionspuffer. Bei der mechanischen Zerkleinerung der Osteoblasten und unter der Einwirkung von Detergentien (Triton X-100) werden intrazelluläre Proteasen freigesetzt, welche die zu untersuchenden Proteine partiell spalten können. Um diese Gefahr auszuschalten werden dem Extraktionspuffer Protease-Inhibitoren zugesetzt.

Zu dem Zellpellet wurde 60 $\mu$ l Extraktionspuffer resuspendiert, im Vortex-Mischer kräftig gemischt, 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und erneut gemischt. Das Gemisch aus Proteinen und Zellfragmenten wurde 10 Minuten bei 2500 x g

zentrifugiert, um Zellkerne, Zytoskelett und DNA zu sedimentieren. Der Überstand wurde abgenommen und weiterverarbeitet, oder bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Material:	PBS
	Zellschaber
Extraktionspuffer:	20mM Imidazole-HCl pH 6,8
	100mM KCl
	1mM $\text{MgCl}_2$
	10mM EGTA
	10mM NaF
	1mM Na-Vanadate
	1mM Na-Molybdate
	1 $\mu\text{M}$ Calyculin A
	1% Triton X-100
	1 Tablette Complete-Mini Proteasen-Inhibitoren-Cocktail
	- 1 Tabl. für 10ml Extraktionslösung

#### 4.2.2.3 Quantitative Bestimmung der Proteine

Die quantitative Bestimmung der Proteine wurde durch eine sehr sensitive Standardmethode, der Proteinbestimmung nach Bradford (BRADFORD M.M., 1976) vollzogen. Der Nachweis beruht auf der spezifischen Bindung des Trimethylmethan-Farbstoffes Coomassie Brilliantblau G an Proteine. Der Farbstoff bindet über spezifische hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen bevorzugt an Argininreste (Compton & Jones, 1985). Die Nachweisgrenze der Bradford-Methode liegt im 1ml-Assay unter 1 $\mu\text{g}$  Protein (Read & Northcote, 1981).

#### 4.2.2.4 Erstellen der Standard-Eichkurve

Aus dem angesetztem Proteinstandard wurden **a** 5 $\mu\text{l}$  und **b** 10 $\mu\text{l}$  entnommen und mit ddH<sub>2</sub>O **a** 1:100 auf 500 $\mu\text{l}$  und **b** 1:10 auf 100 $\mu\text{l}$  verdünnt. Aus der 1:100 Verdünnung **a** wurde in je 2 parallele Eppendorf-Mikrolitergefäße pipettiert: 10  $\mu\text{l}$  (= 1 $\mu\text{g}$  Protein) 20 $\mu\text{l}$  (= 2 $\mu\text{g}$ ), 40 $\mu\text{l}$  (= 4 $\mu\text{g}$ ), 70  $\mu\text{l}$  (=7 $\mu\text{g}$ ) und 100  $\mu\text{l}$  (= 10  $\mu\text{g}$ ).

Aus der 1:10 Verdünnung **b** wurde entsprechend je 2 mal pipettiert: 15 $\mu\text{l}$  (= 15 $\mu\text{g}$  Protein) und 20  $\mu\text{l}$  (= 20  $\mu\text{g}$ ).

Alle Proben wurden auf 100  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O aufgefüllt und zusätzlich 2 Leerproben bestehend aus je 100  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O pipettiert. Zu jedem dieser 100  $\mu\text{l}$  Ansätze wurde 900  $\mu\text{l}$  Coomassie-Farbreagens pipettiert und gemischt.

In der Zeitspanne von 5min bis maximal 30min mußte die Extinktion im Photometer (bei  $\lambda = 595 \text{ nm}$ ) gemessen werden.

## Bestimmung der Proteinmenge in den unbekanntenen Proben

Aus den Proteinlösungen wurden je 3 kleine Meßproben von 1  $\mu\text{l}$ , 3  $\mu\text{l}$  und 5  $\mu\text{l}$  entnommen und mit ddH<sub>2</sub>O auf 100  $\mu\text{l}$  verdünnt, 900  $\mu\text{l}$  Coomassie-Farbreagens hinzugegeben und gemischt.

Von jedem Ansatz wurde, auch von Werten für Standard-Eichkurve, 300  $\mu\text{l}$  in 96er Mikrotiterplatten pipettiert, und die photometrische Messung bei einer Wellenlänge von 595nm zusammen mit den Werten für Standard-Eichkurve gestartet.

Anschließend wurde die Proteinkonzentration der Eichgeraden bestimmt.

Material:	Proteinstandard: 10% BSA in ddH <sub>2</sub> O lösen und in 1ml Aliquots bei -20°C lagern
	Coomassie-Farbreagenz: 0,01% Coomassie Brilliantblau G 250 in
	1,6 M Phosphorsäure und 0,8 M Ethanol
	unter Rühren 3 Std. bis ü.N. lösen, mit 1000ml ddH <sub>2</sub> O
	verdünnen und filtrieren
	Proteinproben
	Photometer

### 4.2.2.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei dieser Elektrophoresetechnik werden die Proteine denaturiert und es kommt durch hydrophobe Wechselwirkungen zu einer gleichmäßigen Beladung der Polypeptidketten mit den negativ geladenen SDS-(Natriumdodecylsulfat)Molekülen, wobei die Eigenladungen der Proteine überdeckt werden. Die so gebildeten SDS-Protein-Mizellen haben äquivalente Konformationen und gleiche Ladungsdichte pro Längeneinheit, bzw. ein konstantes Ladungs/Masse-Verhältnis. Wegen dieser Bedingungen besteht die Möglichkeit, die Proteine im elektrischen Feld auf ihrer Wanderungsstrecke zur Anode hin nur auf Grund ihrer Molekülgröße durch den Molekularsiebeffekt der Polyacrylamidmatrix aufzutrennen.

Zur Auftrennung der Protein-Fractionen fand die kontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (Laemmli, 1970) Anwendung, die sich durch eine Zweiteilung des Gels in eine großporige Sammelzone und eine feinporige Trennzone auszeichnet. Das Trenngel kann mit einheitlicher Porengröße (homogenes Trenngel) oder als in weiten Grenzen variierbarer Gradient mit zunehmender Acrylamidkonzentration in Laufrichtung (lineares Gradientengel)

gegossen werden. Da die Molekulargewichte der zu überprüfenden Proteine bekannt waren und je 42kDa und 44kDa betragen, kam in diesem Fall ein homogenes Trenngel mit T= 10% zur Anwendung, welches Proteine mit einem Molekulargewicht von 18-75 kDa anzeigt.

Die zugrunde liegende Vinyladditions-Polymerisationsreaktion wurde durch freie Radikale gestartet, welche bei der Wechselwirkung mit APS und dem tertiären aliphatischen Tetramethylethyldiamin (TEMED) entstanden. Aktivierte TEMED-Moleküle fungierten als Startradikale, indem sie mit den Acrylamidmonomeren reagierten und dadurch eine radikalische Kettenreaktion einleiteten.

Die Zuordnung der Proteinbanden zu ihrem Molekulargewicht erfolgte mit Hilfe parallel laufender Molekulargewichtsstandards.

#### Stammlösungen

Acryamid-Bis (30% T)	29,2g Acrylamid und 0,8g Bis in 100 ml ddH <sub>2</sub> O lösen, filtrieren, in dunkler Flasche bei 4°C 2 Monate stabil
APS (10%)	1g Ammoniumpersulfat in 10 ml ddH <sub>2</sub> O lösen, in kleinen Portionen bei -20°C 3 Monate stabil
Trenngelpuffer	Endkonz. im Gel: 375mM Tris-HCl, pH 8,8; 0,1% SDS 13,6g Tris und 0,3g SDS in 50 ml ddH <sub>2</sub> O lösen, mit 1 N HCl auf pH 8,8 einstellen, mit 100 ml ddH <sub>2</sub> O auffüllen, filtrieren und bei 6-8°C aufbewahren
Sammelgelpuffer	Endkonz. im Gel: 125mM Tris-HCl, pH 8,8; 0,1% SDS 3,0g Tris und 0,2g SDS in 50 ml ddH <sub>2</sub> O lösen, mit 5 N HCl auf pH 6,8 einstellen, mit 100 ml ddH <sub>2</sub> O auffüllen, filtrieren und bei 6-8°C aufbewahren

## Herstellung von Trenngel und Sammelgel

Nach Reinigung der Glasplatten und Abstandshalter erfolgte das Zusammensetzen der Gelgießform.

In einem Becherglas wurde 10 ml Trenngellösung 10% (für 2 Minigele) mit 33 µl APS und 8,3 µl TEMED versetzt und diese Lösung nach einmaligem Schwenken via Pasteurpipette zu gleichen Teilen in die Gelgießform eingefüllt (2/3 der Glasplatte). Das Gel wurde langsam bis zum Glasplattenrand mit ddH<sub>2</sub>O überschichtet. Die Polymerisation war abgeschlossen, wenn eine deutliche, optische Diskontinuität als Trennlinie zu erkennen war (25-30 Minuten bei RT).

Nach Entfernen des überschichteten Wassers erfolgte das Gießen des Sammelgels in gleicher Weise wie des Trenngels, hier aber mit 6 ml Sammelgellösung 5% (für 2 Minigele), 60 µl APS und 6 µl TEMED. Die Lösung wurde bis zum Rand der

Glasplatten auf das Trenngel aufgetragen und sofort mit einem gesäuberten und getrockneten Probenkamm, mit 5mm Abstand über dem Trenngel, versehen. Nach der Polymerisation (30-40 Minuten bei RT), wurde der Kamm vorsichtig herausgezogen, das Sammelgel mit ddH<sub>2</sub>O gespült und die Glasplatten in die Elektrodenapparatur eingespannt. Der Laufpuffer wurde in die innere und äußere Kammer der Apparatur gefüllt.

Trenngellösung (Konzentration T=10%)

Acrylamid-Bis (ml)	10,0
ddH <sub>2</sub> O (ml)	9,9
Trenngelpuffer (ml)	10,0

Sammelgellösung (Konzentration T=5%)

Acrylamid-Bis (ml)	1,76
ddH <sub>2</sub> O (ml)	3,2
Sammelgelpuffer (ml)	5

Laufpuffer	25mM Tris, 192mM Glycin, 0,1% SDS 3,0g Tris, 14,4g Glycin, 1,0g SDS in 1000 ml ddH <sub>2</sub> O lösen; pH stellt sich auf 8,8 ein
------------	--

## Probenvorbereitung und Gelelektrophorese

Nachdem die Konzentrationen der Proteinmengen in den Zell-Lysaten nach der Bradford-Methode bestimmt worden waren, erfolgte der Zusatz von Probenpuffer und Zell-Lysat im Verhältnis 1:1. Bromphenolblau im Probenpuffer diente als Indikator für die Wanderungsgeschwindigkeit der „vorderen leichten“ Proteine. Es wurden 50µg Protein pro Geltasche benötigt.

SDS-Probenpuffer	125 mM Tris-HCl, pH 6,8; 2 % SDS, 10 % Glycerin, 20 mM DDT, 1 mM EDTA, 0,01 % Bromphenolblau  1,5g Tris, 2g SDS, 10g Glycerin, 200µl EDTA aus 0,5M Stammlösung, 2 ml DDT aus 1 M Stammlösung in 50 ml ddH <sub>2</sub> O lösen und mit 1 N HCl auf pH 6,8 einstellen, 2 ml Bromphenolblau-Stammlösung (0,5 % in ddH <sub>2</sub> O) dazugeben, auf 100 ml ddH <sub>2</sub> O auffüllen
------------------	--

Die Proben wurden, zur Denaturierung der Proteine 5 Minuten bei 80°C im Wasserbad erhitzt und danach einzeln mit einer Hamilton-Spritze in die Taschen des Gels gefüllt, wobei die Spritze bis an den Boden der Proben tasche gebracht wurde, um die Lösung unter Zurückziehen der Spritze langsam, ohne Erzeugung von Verwirbelungen auszudrücken. Die Proben blieben auf Grund der höheren Dichte des Probenpuffers (wegen des zugegebenen Glycerins) auf dem Boden der Taschen.

Elektrophoresebedingungen	Minigelapparat (Laufstrecke bis 8 cm) Konstante Stromstärke von 30 mA bei einer Spannung von 50V Bei Eintritt des Bromphenolmarkers in das Trenngel 150V Stromquelle: Power-Supply Laufzeit: ca. 90 Minuten
---------------------------	---

Nachdem die Farbfront die untere Gelebene fast erreicht hatte, wurde die Stromquelle abgeschaltet, das Gel für den elektrophoretischen Proteintransfer zurechtgeschnitten und direkt 5 Minuten in Transferpuffer äquilibriert.

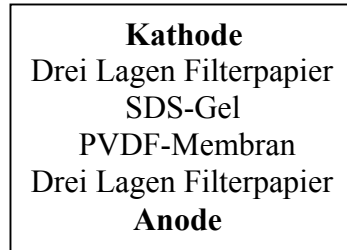
## Elektrophoretischer Proteintransfer: Western Blot

Bei dieser Technik werden die Proteine aus dem SDS-Gel durch Wanderung im elektrischen Feld vollständig auf eine immobilisierende, synthetische Membran übertragen, so daß ein genaues Abbild des Elektrophoresemusters entsteht (TOWBIN H. *et al.*, 1979).

Bei den Experimenten kam das *SemiDry-Blotting*-Verfahren zur Anwendung, bei dem der Gel-Membran-Sandwich zwischen zwei horizontal angeordneten Plattenelektroden zu liegen kommt. Die Puffermenge ist auf getränkte Filterpapiere zwischen den Elektroden und dem Transfersandwich begrenzt.

Die Membran befindet sich anodenseitig, da die mit negativer Nettoladung (SDS) versehenen Proteine zum Pluspol wandern. Als Transfermembran diente eine mikroporige ( $\varnothing$  0,2 $\mu$ m) PVDF-Membran (Bio-Rad). Auf Grund ihrer hydrophoben Oberfläche wurde die Membran zunächst einige Sekunden in Methanol aktiviert, mit ddH<sub>2</sub>O abgespült und ebenso wie das Gel 5 Minuten in Transferpuffer äquilibriert. Nachdem auch das auf membrangröße zurechtgeschnittene Filterpapier in

Transferpuffer getaucht wurde, sind die verwendeten Materialien in Form eines „Sandwichs“ (unter Vermeidung von Luftblaseneinschluß) übereinandergelegt worden.



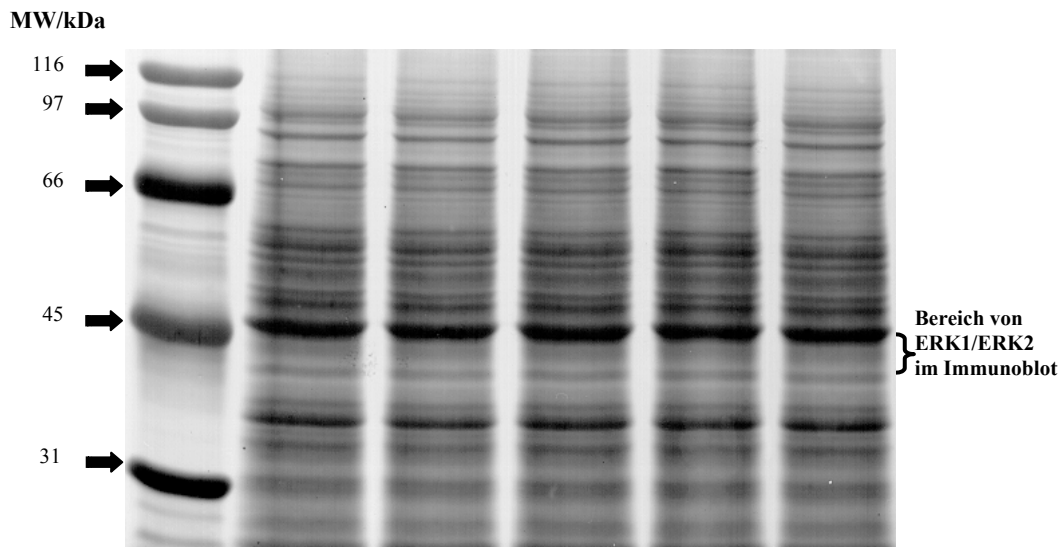
**Abbildung 6** Aufbau des „Transfersandwichs“

Der Blottingvorgang erfolgte innerhalb von 70 Minuten bei einer Stromstärke von 250 mA und einer Spannung von 20V.

Nach Abschluß des Transferprozesses wurde die Membran für 1 Minute in Coomassie-Farbreagenz angefärbt und anschließend zum Entfärben des blauen Hintergrundes 15 Minuten in Coomassie-Entfärbelösung ausgewaschen, wobei die dunkelblauen Banden des Proteinmusters sichtbar wurden.

Transferpuffer	25mM Tris, 192mM Glycin, 0,1% SDS 3,0g Tris, 14,4g Glycin, 1,0g SDS in 1000 ml ddH <sub>2</sub> O lösen; pH stellt sich auf 8,8 ein
Coomassie-Farbreagenz	40 ml Methanol, 2 ml Essigsäure, 0,2g Coomassie-Brilliantblau R-250 mit ddH <sub>2</sub> O auf 100 ml auffüllen und filtrieren
Coomassie-Entfärbelösung	50% Ethanol und 1% Essigsäure in ddH <sub>2</sub> O





**Abbildung 7** PVDF-Membran nach Coomassie-Färbung  
In der ersten Reihe Proteinstandard ( $\beta$ -Galaktosidase 116 kDa, Phosphorylase b 97 kDa, Serumalbumin 66 kDa, Ovalbumin 45 kDa, Karboanhydrase 31 kDa), in den übrigen Reihen Protein-Fractionen von gedehnten Osteoblasten nach elektrophoretischen Proteintransfer; in Höhe 44-42 kDa Proteinbanden, die im Immunoblot als MAP-Kinase-Banden (ERK1/ERK2) erscheinen werden.

#### 4.2.2.6 Immunchemischer Nachweis von ERK1 und ERK2

Proteine besitzen viele verschiedene antigene Determinanten, mit denen dagegen gerichtete Antikörper über entsprechende Bindungsstellen in Wechselwirkung treten können. Monoklonale Antikörper erkennen im Gegensatz zu polyklonalen Antikörpern nur eine einzige antigene Determinante.

Das Proteinblotting dient hauptsächlich der Identifizierung von Antigenen auf Blot-Membranen mit spezifischen Antikörpern.

In diesen Experimenten wird der immunologische Nachweis in zwei Stufen durchgeführt. Zunächst kommt es zu einer Bindung des unmarkierten Primärantikörpers (Anti-activated MAP-Kinase) an das Antigen, und in einem zweiten Schritt zu einer Bindung eines mit alkalischer Phosphatase (AP) konjugierten Antikörpers (Mouse-IgG) an den primären Antigen-Antikörper-Komplex. Der Vorteil dieses zweistufigen Verfahrens liegt in der Verstärkung des Signals, und damit einer Zunahme der Empfindlichkeit des Nachweises.

Das Anti-IgG-Alkalische-Phosphatase-Konjugat wurde schließlich über den colorimetrischen Nachweis von Alkalischer Phosphatase mit chromogenen Substraten auf der Blot-Membran nachgewiesen und in Form von spezifischen Banden sichtbar.

## Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen

Zur Vermeidung unspezifischer Hintergrundreaktionen müssen vor der Durchführung der Immunreaktionen unspezifische Bindungsstellen für die immunologischen Reagentien auf der Blot-Membran möglichst vollständig abgesättigt (blockiert) werden. Für diesen Arbeitsschritt wurde die PVDF-Membran nach Abschluß des Transferprozesses über Nacht bei Raumtemperatur auf einem Taumelschüttler in Blockierlösung inkubiert.

TBS (Tris-gepufferte Salzlösung): 8g NaCl, 0,2g KCl, 2g Tris  
In 800 ml ddH<sub>2</sub>O lösen, pH auf 7,4 einstellen und auf 1000 ml auffüllen  
Blockierlösung: 5% BSA und 0,1% Tween 20 in TBS lösen

## Binden des Primäantikörpers

Nach dem Blockierungsschritt wurde die Membran 3 Minuten in TBS gewaschen und mit einer Verdünnung des Primäantikörpers (Anti-activated MAP-Kinase) von 1:15000 in frisch angesetzter Blockierlösung 2 Stunden auf dem Taumelschüttler bei Raumtemperatur inkubiert.

Danach wurde die Membran 3 mal 10 Minuten in TBST gewaschen.

Material Primäantikörper: Anti-activated MAP-Kinase  
TBST: 0,1% Tween 20 in TBS

## Binden des Sekundärantikörpers

Der Sekundärantikörper Mouse-IgG AP (konjugiert mit Alkalischer Phosphatase) wurde mit einer Verdünnung von 1:1500 in TBST angesetzt. Inkubation und Waschschrte erfolgten äquivalent zu dem Vorgehen mit dem Primärantikörper.

Material              Sekundärantikörper: Mouse-IgG AP

## Colorimetrischer Nachweis von Alkalischer Phosphatase

Dieser Nachweis benutzt als chromogenes Substrat 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP) zusammen mit Nitroblau-Tetrazolium (NBT). Die alkalische Phosphatase (AP) katalysiert die Abspaltung des Phosphatrestes von BCIP und wandelt es in das entsprechende Indoxylderivat um. Dieses wird durch NBT oxidiert und dimerisiert zu dem tiefblauen, unlöslichen Farbniederschlag Indigo.

Die Membran wurde 5 Minuten in TBS gewaschen und sofort in Färbelösung inkubiert, wo sie unter leichter Bewegung bis zum Erreichen der ersten Farbsignale inkubiert wurde. Die Reaktion wurde durch Spülen der Membran in TBS mit 20 mM EDTA (Komplexierung der für die Enzymaktivität notwendigen  $Mg^{2+}$ -Ionen) abgestoppt.

Danach erfolgte das Trocknen und Photographieren bzw. Scannen der Membran.

Material              BCIP-Stammlösung: 0,5g BCIP in 10 ml 100% Dimethylformamid  
NBT-Stammlösung: 0,5g NBT in 10 ml 70% Dimethylformamid  
                            Diese Lösungen sind 1 Jahr bei 4°C stabil

AP-Puffer:            100 mM NaCl, 5 mM  $MgCl_2$ , 100 mM Tris  
                            5,48g NaCl, 0,48g  $MgCl_2$ , 12,1g Tris  
                            in 800 ml ddH<sub>2</sub>O lösen, pH auf 9,5 einstellen und auf 1000 ml  
                            auffüllen

Färbelösung:        66 µl NBT-Stammlösung mit  
                            10 ml AP-Puffer mischen und  
                            33 µl BCIP-Stammlösung hinzugeben  
                            Lösung innerhalb 30 Minuten benutzen

#### **4.2.3 Modifikationen der verschiedenen ERK1/ERK2 Nachweise**

In diesem Abschnitt erfolgt eine Beschreibung der einzelnen Telexperimente, die z.T. von dem oben beschriebenen Versuchsrahmen abweichen. Sie sind sowohl nach der zeitlichen Chronologie der Durchführung, als auch nach ihrer Zusammengehörigkeit geordnet. Vor der Benutzung eines neuen Inhibitors / Aktivators wurde eine Reihe von Vorversuchen geschaltet, welche der Ermittlung ihrer Wirkung bei unterschiedlichen Zeit- und Konzentrationsverhältnissen diente (Konzentrations-Zeit-Kurve).

##### **4.2.3.1 Überprüfung des Einflusses des FCS-haltigen Mediums auf die Aktivierbarkeit von ERK1/ERK2 Osteoblasten**

In diesem Experiment wurden die Zellen in der bekannten Dichte von 60.000/cm<sup>2</sup> auf Polycarbonatplatten ausgesetzt (s.Punkt 4.2.1.4) und wuchsen in 5 ml Medium mit 10% FCS innerhalb von 24 Stunden im Begasungsbrutschrank zur Konfluenz. Danach wurde das FCS-haltige Medium entfernt, die Platten mit vorgewärmten, sterilem PBS gewaschen und mit 5ml FCS-freiem Medium beschickt.

Die Zellen wurden nun zu den verschiedenen versuchsrelevanten Zeiten (s. Abbildung 8) im Begasungsbrutschrank inkubiert, dann jeweils 2 Schalen entnommen, wobei 1 Schale in der 4-Punkt-Dehnungsmaschine (s. Punkt 4.2.3.3) mechanisch gedehnt wurde und 1 Schale als Kontrolle diente. Nach erneuter Inkubation von 5 Minuten (maximal erwartete Aktivierung von ERK1/2 durch Dehnung) wurde die Reaktion mit PBS von 4°C abgestoppt und die Zellen lysiert.

##### **4.2.3.2 Effekt einer Stimulation mit *Epidermal Growth Factor* auf Osteoblasten**

Dieser Vorversuch mit dem „Hautwachstumsfaktor“ diente der Bereitstellung einer Positiv-Kontrolle für den Nachweis von ERK1/ERK2 in mechanisch stimulierten Osteoblasten. Da die optimale Konzentration schon bekannt war, wurde nur die Zeitdauer bis zur maximalen ERK1/ERK2 Aktivierung ermittelt. Die Konzentration an Wachstumsfaktor betrug 50 ng/ml Medium.

Zur Anpassung an die Versuchsverhältnisse für den Nachweis von ERK1/ERK2 in mechanisch stimulierten Osteoblasten, wurde auch dieser Versuch auf Dehnungsschalen durchgeführt. Das Aussetzen der Zellen erfolgte wie oben beschrieben.

Direkt nach Zugabe des Wachstumsfaktors wurden die Dehnungsschalen zur gleichmäßigen Verteilung geschwenkt und es erfolgte das Inkubieren mit folgenden Zeiten:

2min, 5min, 10min und in je 10 Minutenabschnitten bis 60 Minuten.

Nach der entsprechenden Inkubationszeit wurde der Versuch mit eiskaltem PBS abgestoppt und die Zellen lysiert.

#### **4.2.3.3 Nachweis von ERK1/ERK2 in mechanisch stimulierten Osteoblasten**

Dies ist eines der Hauptexperimente dieser Arbeit und folgt direkt der oben beschriebenen Versuchsanordnung.

Die jeweiligen Inkubationszeiten sind den beschrifteten Western-Blots im Ergebnisteil dieser Arbeit zu entnehmen.

#### **4.2.3.4 Effekt einer Stimulation mit einem Phorbolster auf Osteoblasten**

Als Phorbolster kam hier TPA (Phorbol-12-myristat-13-acetat) zum Einsatz.

Phorbolster sind Tumorpromotoren, welche an der Diacylglycerin-Bindungsstelle der Proteinkinase C angreifen (Newton, 1995) und eine starke Aktivierung der Proteinkinase C hervorrufen (s. Punkt 3.6.1 ).

TPA dient in dem Versuch „Effekt eines Proteinkinase C – Inhibitors auf mechanisch stimulierte Osteoblasten“ als Positiv-Kontrolle und wurde bei einer Zielkonzentration von 0,1µM 10 Minuten inkubiert (Jones D.B. & Bingmann D., 1991; Veldman *et al.*, 1998; Kozawa *et al.*, 1997). Nach der entsprechenden Inkubationszeit wurde der Versuch mit eiskaltem PBS abgestoppt und die Zellen lysiert.

#### 4.2.3.5 Effekt eines Proteinkinase C – Inhibitors auf mechanisch stimulierte Osteoblasten

Für diese Inhibitorexperimente kam NGIC-1 (*Non-Glycosidic indolocarbazole 1*) zum Einsatz. Dieser Inhibitor ist ein Derivat des Alkaloids Staurosporin, mit dem Vorteil, daß es im Gegensatz zu Staurosporin selektiv die Proteinkinase C inhibiert (Kleinschroth *et al.*, 1993).

Nach zahlreichen Experimenten zur Ermittlung der optimalen Konzentrationen und Inkubationszeiten, wurde der Inhibitor mit einer Konzentration von 0,75 µM eingesetzt. Da die Wirkung des Inhibitors auf Proteinkinase C in mechanisch stimulierten Osteoblasten nachgewiesen werden sollte, wurde der Inhibitor in der geeigneten Konzentration direkt auf die auf den Dehnungsschalen angewachsenen Zellen gegeben und 20 Minuten inkubiert. Danach erfolgte die Dehnung der Zellen in der Vier-Punkt-Dehnungsmaschine bei einer Temperatur von 37°C, mit 4000 µStrain, 30 Zyklen / 1 Hertz (s. Punkt 4.2.2.1). Nach erneuter Inkubation von 5 Minuten (maximal erwartete Aktivierung von ERK1/2 durch Dehnung) wurde die Reaktion mit PBS von 4°C abgestoppt und die Osteoblasten lysiert (s. Punkt 4.2.2.2).

In einem weiteren Versuch wurden die Zellen mit dem Inhibitor (0,75 µM) vorbehandelt, nach 20-minütiger Inkubation im Begasungsbrutschrank mit dem Phorbolster TPA (gleiche Konzentration wie Punkt 4.2.3.4) angeregt und erneut 10 Minuten inkubiert.

Danach erfolgte ebenfalls das Abstoppen der Reaktion mit PBS (4°C).

Dieser Versuch diente als Kontrolle der Funktionsfähigkeit des Inhibitors.

#### 4.2.3.6 Effekt der Stimulation mit Parathormon auf Osteoblasten

Das Parathormon ist ein Protein aus 84 Aminosäuren bei einem MW von 9500 kDa, welches in der Nebenschilddrüse aus einem Prohormon durch Abspaltung eines N-terminalen Hexapeptids in seine wirksame Form umgewandelt wird. Parathormon wird in Abhängigkeit von der Höhe des Serumkalziumspiegels ausgeschüttet (s. Punkt 3.3).

Parathormon dient in dem Versuch „Effekt eines Phospholipase C – Inhibitors auf mechanisch stimulierte Osteoblasten“ als Positiv-Kontrolle und wurde in diesem Zusammenhang bei einer Zielkonzentration von 50ng/ml 5 Minuten inkubiert.

#### 4.2.3.7 Effekt eines Phospholipase C – Inhibitors auf mechanisch stimulierte Osteoblasten

Diese Inhibitorexperimente erfolgten mit ET-18-OCH<sub>3</sub> (1-O-Octadecyl-2-O-methyl-rac-glycero-3-phosphorylcholin).

Dieser Inhibitor, auch bekannt als Edelfosin, ist ein Ether-Lipid, der zur Gruppe der „Alkyllysophospholipide“ (ALPs) gehört. Diese „ALPs“ zeigen selektiv antiproliferative Eigenschaften auf bestimmte Zellarten (Zhou *et al.*, 1996).

ET-18-OCH<sub>3</sub> inhibiert selektiv die phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C (Pi-PLC), ohne die phosphatidylcholin-spezifische PLC bzw. PLD zu inhibieren (Powis *et al.*, 1992).

Auch hier wurde in einigen Experimenten im Rahmen einer Konzentrations-Zeit-Kurve die optimalen Versuchsbedingungen ermittelt.

Da die Wirkung des Inhibitors auf Phospholipase C in mechanisch stimulierten Osteoblasten nachgewiesen werden sollte, wurde der Inhibitor in der geeigneten Konzentration (10 µM) direkt auf die auf den Dehnungsschalen angewachsenen Zellen gegeben und 20 Minuten inkubiert.

Die weitere Versuchsdurchführung erfolgte parallel zu Punkt 4.2.3.5.

In einem weiteren Versuch wurden die Zellen mit dem PLC-Inhibitor (10 µM) vorbehandelt, nach 20-minütiger Inkubation im Begasungsbrutschrank mit dem Parathormon (gleiche Konzentration wie Punkt 4.2.3.6) angeregt und erneut 5 Minuten inkubiert.

Danach erfolgte ebenfalls das Abstoppen der Reaktion mit PBS (4°C).

#### 4.2.3.8 Effekt eines SERCA-Inhibitors auf mechanisch stimulierte Osteoblasten

In diesem Versuch wurden die Zellen mit Thapsigargin vorbehandelt. Thapsigargin hemmt die Ausschüttung von Calcium-Ionen aus dem Endoplasmatischen Retikulum durch eine Blockade der Ca<sup>2+</sup>-ATPase (Berridge, 1993). Thapsigargin hat keinen Einfluß auf die Inositol-Phosphate und keinen signifikanten Effekt auf die Proteinkinase C (Won & Orth, 1995).

In diesem Experiment sollte der der Einfluß von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem Endoplasmatischem Retikulum auf die ERK1/ERK2 - Stimulierung nach Dehnung untersucht werden. Dafür wurde der Inhibitor mit einer Konzentration von  $5\mu\text{M}$  (Wiemann *et al.*, 1998) auf die mit Osteoblasten beladenen Dehnungsschalen gegeben.

Die weitere Versuchsdurchführung erfolgte parallel zu Punkt 4.2.3.5.

#### **4.2.3.9 Nachweis von ERK1/ERK2 in mechanisch stimulierten Tumorzellen (MG-63)**

Bei den Zellen der MG-63-Linie handelt es sich um humane Osteosarkomzellen (Billiau *et al.*, 1977), die durch wesentlich kürzeren Inkubationszeiten beim Anzüchten, sowie durch ihre ständige Verfügbarkeit Vorteile gegenüber den Osteoblasten aufweisen.

Die Durchführung dieses Experiments erfolgte bis auf die o.g. Unterschiede parallel zum „Nachweis von ERK1/ERK2 in mechanisch stimulierten Osteoblasten“ (s. Punkt 4.2.3.3).



## 5 Ergebnisse

Die folgenden Seiten zeigen die Ergebnisse des Immunoblottings nach dem Western-Blot-Verfahren. Nach Messung der Extinktion der Proteinlysate der Osteoblasten, und nachfolgender quantitativer Proteinbestimmung nach dem Bradford-Assay wurden je 50µg der einzelnen Proteinfractionen pro Lane des SDS-Gels bereitgestellt (Abweichungen von diesem Wert werden entsprechend angezeigt). Die im Western-Blot mitgeführten *Broad-Range-Marker* erlaubten die Zuordnung der Proteinbanden zu Molekulargewichtseinheiten. Die Molekulargewichte der beiden Isoformen der MAP-Kinase, ERK1 und ERK2, waren bekannt (ERK1=42kDa / ERK2=44kDa) und im Western-Blot unterhalb der Bande des Proteinstandards vom Ovalbumin (45kDa) zu finden. Um diese Banden möglichst zentral im Blot erscheinen zu lassen, kam in diesem Fall ein homogenes Trenngel mit einer Konzentration von T= 10% zur Anwendung.

In den anschließenden Immunoblots wurde ein Antikörper gegen ERK1/ERK2 (*Anti-activated MAP-Kinase*) verwendet.

Das optimale Ergebnis eines Western-Blots zeigt nach der Antikörperbehandlung, neben einer völlig blanken Membran, nur die klar abgegrenzten Banden des Antikörpersubstrates.

In einigen Vorversuchen war die Membran allerdings noch von Schatten (sog. Hintergrundreaktionen) weiterer Proteine im Lysat durchzogen. Die Lösung dieses Problems war im Arbeitsschritt vor der Antikörperzugabe zu finden. In diesem sog. Blockierungsschritt wurden unspezifische Bindungsstellen für die immunologischen Reagentien auf der Blot-Membran möglichst vollständig abgesättigt (blockiert). Zunächst wurden Konzentrationen der Komponenten für die Blockierlösung erhöht (BSA von 3% auf 5% und Tween 20 von 0,05% auf 0,1%). Nachdem nach dieser Maßnahme das Ergebnis im Western-Blot nur suboptimal ausfiel (nur leichter Rückgang der unerwünschten Hintergrundreaktion), wurde die Inkubationsdauer der Membran in Blockierlösung von 2 Stunden auf mindestens 8 Stunden bzw. „über Nacht“ erhöht. Danach zeigten sich die Antikörperblots nahezu „hintergrundfrei“ (s. Punkt 4.2.2.6).

## 5.1 Arbeitsverlaufsübersicht

### I. Grundlegende Arbeitsschritte

- Präparation des bovinen Knochens
- Gewinnen der primären Osteoblasten durch die Auswachsmethode (ca. 4-6 Wochen)
- Aussetzen der Osteoblasten für die Versuchsdurchführung

### II. Nebenexperimente

- Experimentelle Überprüfung des Einflusses des FCS-haltigen Mediums auf die ERK-Aktivierung in Osteoblasten zur Verhinderung falsch positiver Ergebnisse

*Fragestellung:* Ab welchem Zeitpunkt hat das FCS im serumhaltigen Medium nach Ersatz durch serumfreies Medium keinen Einfluß mehr auf die ERK-Aktivierung in Osteoblasten

*Ergebnis:* 3 Stunden nach Inkubation mit serumfreien Medium ist keine ERK-Aktivierung durch FCS-Einfluß mehr nachweisbar

- Effekt einer Stimulation mit dem Epidermal Growth Faktor auf Osteoblasten

*Fragestellung:* Bereitstellung einer Positiv-Kontrolle für den Nachweis der ERK-Aktivierung in mechanisch stimulierten Osteoblasten

*Ergebnis:* Osteoblasten zeigen nach Vorbehandlung mit EGF eine deutliche ERK-Aktivierung nach 10 Minuten

- Effekt der Stimulation mit einem Phorbol ester (TPA) auf Osteoblasten

*Fragestellung:* Bereitstellung einer Positiv-Kontrolle für das PKC-Inhibitorexperiment da Phorbol ester eine Aktivierung der PKC auslöst

*Ergebnis:* Deutliche ERK1/ERK2-Aktivierung 10 Minuten nach Inkubation

- Effekt der Stimulation mit Parathormon auf Osteoblasten

*Fragestellung:* Einfluß des Parathormons auf die ERK-Aktivierung und Bereitstellung einer Positiv-Kontrolle für das PLC-Inhibitorexperiment

*Ergebnis:* Deutliche Aktivierung von ERK1/2 durch das Parathormon

### III. Basisexperiment

- Mechanische Belastung der Osteoblasten mit der 4-Punkt-Dehnungsmaschine (4000 $\mu$ Strain/30 Zyklen/1 Hz)

*Fragestellung:* Ermittlung des Zeitpunktes der maximalen ERK-Aktivierung (das Vorliegen einer ERK-Aktivierung wurde bereits nachgewiesen / J. Leitsch unveröff. Daten)

- Überführung der Zellen in serumfreies Medium
- Dehnung der Osteoblasten
- Herstellung der Zellextrakte
- Quantitative Bestimmung der Proteine
- SDS-Polyacryamidgelelektrophorese
- Elektrophoretische Proteintransfer: Western Blot
- Immunchemischer Nachweis der beiden MAP-Kinase-Isoformen ERK1 und ERK2 mit dem Antikörper „*anti-activated-MAP-Kinase*“
- Colorimetrischer Nachweis der Bandenbildung auf der Membran

*Ergebnis:* deutliche Aktivierung von ERK1/ERK2 in einem Zeitraum von 2-10 Minuten nach Dehnung, mit einem Maximum nach 5 Minuten

- Mechanische Belastung von Osteosarkomzellen (MG-63) mit der 4-Punkt-Dehnungsmaschine (4000 $\mu$ Strain/30 Zyklen/1 Hz)

*Fragestellung:* Ermittlung einer ERK-Aktivierung

*Ergebnis:* deutliche Aktivierung von ERK1/ERK2 5 Minuten nach mechanischer Dehnung

### IV. Inhibitorexperimente

**Hauptfragestellung:** Über welchen Signalweg der Mechanotransduktion verläuft die ERK-Aktivierung nach mechanischer Belastung von Osteoblasten

- Effekt eines Proteinkinase C-Inhibitors auf mechanisch stimulierte Osteoblasten

*Fragestellung:* Inwieweit ist eine PKC an der ERK-Aktivierung beteiligt

- Inkubation des PKC-Inhibitors für 20 Minuten/Dehnung der Zellen/  
5 Minuten Inkubation (maximal erwartete ERK-Aktivierung)

*Ergebnis:* Nach Inhibitorbehandlung war kein ERK1/2-Signal mehr nachweisbar d.h.: die Aktivierung der ERK-Kaskade in mechanisch stimulierten Osteoblasten ist von einer aktivierten PKC abhängig

- Effekt eines Phospholipase C-Inhibitors auf mechanisch stimulierte Osteoblasten

*Fragestellung:* Nach dem Nachweis der PKC-abhängigen Aktivierung der ERK-Kaskade, sollte nun herausgefunden werden, ob die Aktivierung einer PKC von einer Phospholipase C hervorgerufen wird

- Inkubation des PLC-Inhibitors für 20 Minuten/Dehnung der Zellen/  
5 Minuten Inkubation (maximal erwartete ERK-Aktivierung)

*Ergebnis:* Das Ergebnis läßt die Aussage zu, daß es bei Applikation geringer Inhibitorkonzentrationen zu einer Abschwächung des ERK-Signals kommt. Allerdings wirkte der Inhibitor bei geringfügig höheren Konzentrationen zytostatisch bzw. zytotoxisch auf die Osteoblasten.

- Effekt eines SERCA-Inhibitors auf mechanisch stimulierte Osteoblasten

*Fragestellung:* Einfluß der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration auf die ERK1/2-Aktivierung nach Dehnung der Osteoblasten

- Inkubation des SERCA-Inhibitors für 30 Minuten/Dehnung der  
Zellen/5 Minuten Inkubation (maximal erwartete ERK-Aktivierung)

*Ergebnis:* Trotz Blockade der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration, kommt es nach Dehnung zu einer ERK1/2-Aktivierung, d.h.: die intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Konzentration hat damit keinen Einfluß auf die ERK1/2-Aktivierung

### 5.1.1 Überprüfung des Einflusses des FCS-haltigen Mediums auf die Aktivierbarkeit von ERK1/ERK2 in Osteoblasten

Wie bereits erwähnt, führt bereits das Vorhandensein von serumhaltigem Medium (bei einem Anteil von 10% FCS ) zu einem Anstieg der MAP-Kinase in Osteoblasten (s. Punkt 4.2.2.1). Dies ist in den beschriebenen Experimenten natürlich nicht erwünscht, da eine Reaktion von ERK1/ERK2 durch äußere Einflüsse (z.B.: Dehnung/Aktivatoren) untersucht werden soll. Alle laborinternen Dehnungsversuche wurden bislang erst nach 24-stündiger Inkubation mit FCS-freiem Medium durchgeführt, um falsch-positive Signale auszuschließen. Leider verloren einige Zellen, aufgrund fehlender Wachstumsimpulse durch das nicht vorhandene FCS nach ca. 26 Stunden ihre Adhäsion an der Polykarbonatplatte, was zu einer geringeren Zellzahl und Proteinausbeute führte. Die Experimente mußten also nach 24-stündiger Inkubation in einem engen Zeitrahmen durchgeführt werden. Dieser Versuch diente dem Nachweis, zu welchem Zeitpunkt nach Inkubation der Zellen mit FCS-freiem Medium keine Aktivierung von ERK1/ERK2 durch das (vorher vorhandene) FCS mehr zu erwarten ist.

Abbildung 8 zeigt das Ergebnis des Immunoblottings von Proteinfractionen in Osteoblasten nach Zugabe FCS-freien Mediums.

Die Lanes 1a,2a,3a,4a,5a,6a und 7a zeigen eine teilweise mehr oder weniger ausgeprägte Verstärkung in der Intensität im ERK1/ERK2-Signal, welches die ERK1/2-Aktivität nach mechanischer Belastung von Osteoblasten anzeigt. Die Lanes 1b,2b,3b,4b,5b,6b und 7b zeigen von links nach rechts, also mit fortschreitender Inkubationsdauer eine Abschwächung der Intensität der Banden. Während 1b noch ein stärkeres Signal als 1a hat, ist bei 4b ein stark abgeschwächtes und bei 5b,6b und 7b kein Signal mehr zu erkennen. Lane 8 mit dem Phorbolster TPA diente ebenso wie die a-Lanes als Positiv-Kontrolle, welche einen direkten Vergleich zu den Reihen mit FCS-freier Inkubation zuließen. Negativ-Kontrolle (*Base-Level*) ist Reihe 7b, mit der längsten Inkubationszeit FCS-freien Mediums.

Das Ergebnis zeigt, daß 3 Stunden nach Entfernung des für Zellen wachstumsaktiven FCS-haltigen Mediums im Austausch mit einem FCS-freien Medium keine Aktivierung von ERK1/ERK2 durch Anwesenheit von FCS erfolgt. Ab diesem Zeitpunkt ist es also möglich Experimente durchzuführen, welche die Veränderung der MAP-Kinase durch äußere Einflüsse analysieren sollen.

Wegen Laborinterner, konformer Versuchsaufbauten und möglichst gleicher reproduzierbarer Ergebnisse wurden die weiteren Experimente dieser Arbeit ebenfalls nach 24-stündiger Inkubation mit FCS-freiem Medium durchgeführt.

#### **5.1.2 Effekt einer Stimulation mit Epidermal Growth Factor auf Osteoblasten**

Es ist bekannt, dass eine Stimulierung von ERK1/ERK2 durch den Wachstumsfaktor EGF über den Signalweg der Rezeptor-Tyrosinkinasen und weiter über die Kaskade „Grb2-Ras-Raf-Mek-ERK“ (s. Punkt 3.7.1.1) möglich ist (Buday & Downward, 1993).

Dieses Experiment ist als Vorversuch einzustufen, da es Aufschluß über das Verhalten von ERK1/ERK2 in Osteoblasten, nach einer Stimulierung durch den *Epidermal Growth Factor* geben sollte. Ziel war es mit diesem Aktivator eine klar positive Antwort in den Western-Blot Auswertungen zu erhalten, um direkte Vergleiche zu den ERK1/ERK2-Aktivierungen der folgenden Experimente anstellen zu können.

Da die optimale Konzentration nach früheren laborinternen Experimenten schon bekannt war, wurde nun die Zeitdauer bis zur maximalen MAP-Kinase Freisetzung ermittelt. Die Konzentration an Wachstumsfaktor betrug 50 ng/ml Medium.

Abbildung 9 zeigt das Ergebnis des Immunoblottings nach Vorbehandlung der Zellen mit EGF und einem Anstieg der Inkubationszeiten von Lane 1 bis 8. 9 diente als Negativ-Kontrolle, dh. ohne Vorbehandlung der Zellen.

Das Experiment belegt, daß Osteoblasten nach Vorbehandlung mit EGF (50ng/ml Medium) ihr Maximum an ERK1/ERK2-Aktivierung nach 10 Minuten aufweisen.

Die Freisetzung ist nach 40 Minuten fast vollständig erloschen, steigt aber nach 60 Minuten wieder leicht an.

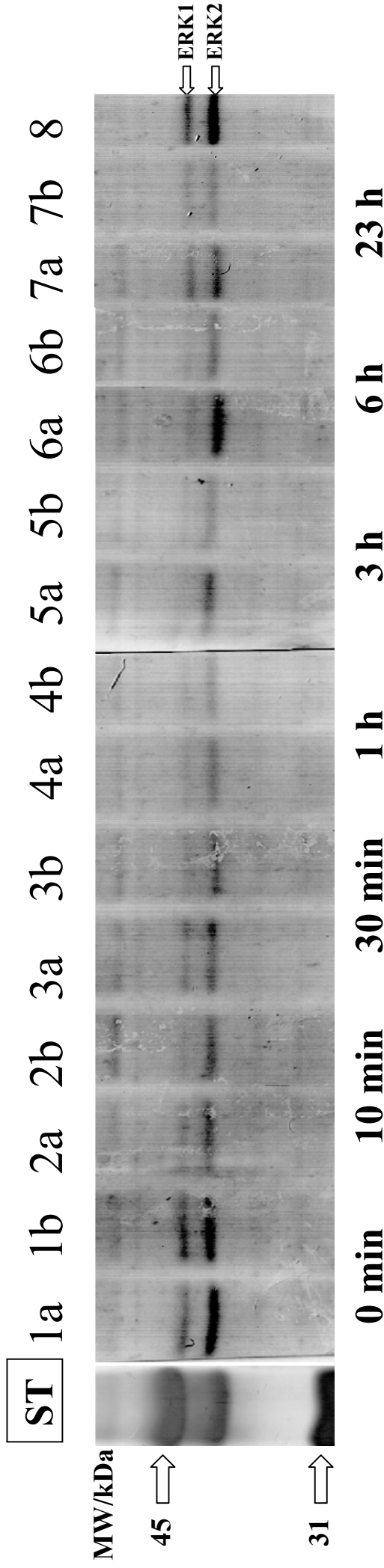


Abbildung 8. Immunoblot der Abhängigkeit der ERK1/ERK2-Aktivierung vom FCS-haltigen Medium

Detektion der Proteinfractionen mit monoklonalem Antikörper gegen ERK1/ERK2. Die Proteinmenge pro Geltasche betrug 50 µg.

Jeweils 2 nebeneinander liegende Lanes gehören zusammen (1a/1b) und zeigen links (a) den Zustand nach Inkubation mit FCS-freiem Medium und mechanischer

Dehnung (4-Punkt-Dehnungsmaschine) und rechts (b) nur Inkubation mit FCS-freiem Medium. Die Paare bezeichnen unterschiedliche Inkubationszeiten

(0min/10min/30min/1h/3h/6h/23h) mit FCS-freiem Medium. Äußerst links auf dem Blot befindet sich der Proteinstandard (ST) mit Ovalbumin im Bereich von

45kDa; rechts (8) die Positiv-Kontrolle mit dem Phorbolster TPA. Mit zunehmender Inkubationszeit nahm die Stärke der Intensität von ERK1 und ERK2 in den

b-Lanes (nur Inkubation) ab und war nach 3 Stunden kaum noch nachweisbar. Die vertikale Linie zwischen 4b und 5a entstand durch das Nebeneinanderlegen

und dem anschließenden Scannen zweier Miniblot-Membranen.

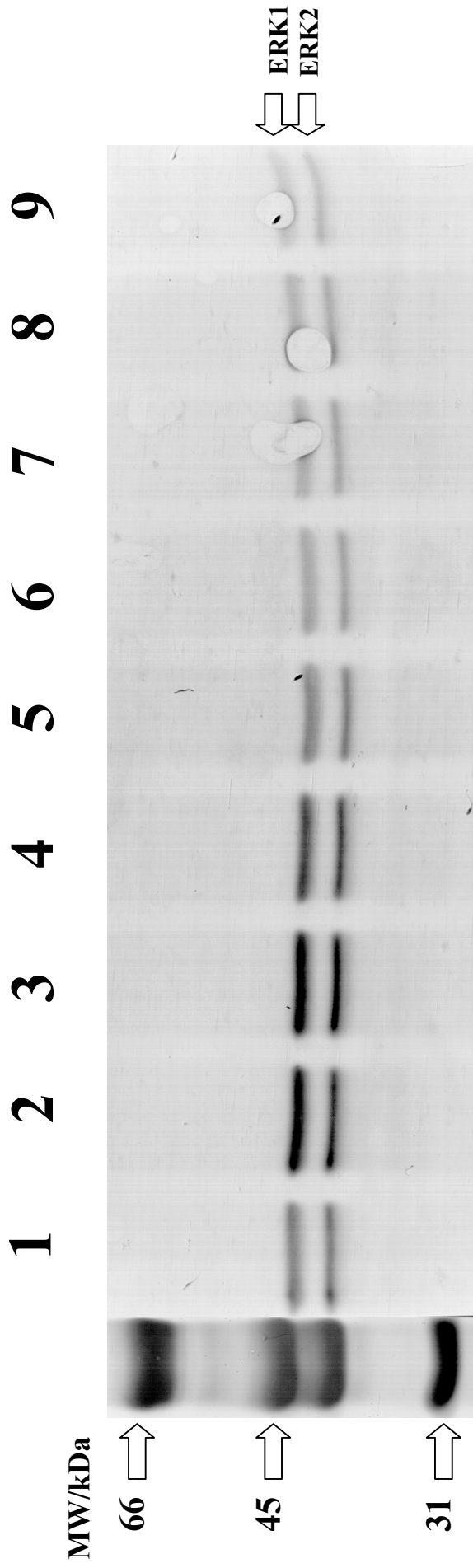


Abbildung 9 Immunoblot des Effektes einer EGF-Stimulation auf Osteoblasten

Detektion der Proteinfractionen mit monoklonalem Antikörper gegen MAP-Kinase. Die Proteinmenge pro Geltasche betrug 60 µg. Die Reihen 1-8 zeigen die Aktivität der beiden Isoformen der MAP-Kinase (ERK1/ERK2) nach Stimulation mit EGF in der Konzentration 50ng/ml Medium. Links befindet sich der Proteinstandard, mit drei im Ausschnitt enthaltenen Proteinbanden; 9 ist die Negativ-Kontrolle. Die rundenlichen Artefakte in 7, 8 und 9 sind Luftblasen, die beim Transfer der Proteine vom SDS-Gel auf die PVDF-Membran entstanden sind. Da mehr als 50% dieser Banden erkennbar ist, kann man dies als aussagekräftig bezeichnen.

Inkubationszeiten:	1	=	2 min	6	=	40 min
	2	=	5 min	7	=	50 min
	3	=	10 min	8	=	60 min
	4	=	20 min	9	=	Neg.-Kontrolle
	5	=	30 min			

Bereits nach 5 Minuten erkennt man verstärktes Signal, welches sein Maximum nach 10 Minuten erreicht, nach 20 Minuten leicht, nach 40 Minuten stark abfällt und bei der 60-Minuten-Bande wieder leicht ansteigt.  
Die Osteoblasten erreichen die maximale ERK-Aktivierung nach 10 Minuten.



### 5.1.3 Nachweis von ERK1/ERK2 in mechanisch stimulierten Osteoblasten

Es ist bekannt, daß Zellen auf mechanische Belastung mit biochemischen Veränderungen reagieren, welche sich z.B. in einer erhöhten Proliferationsrate widerspiegeln.

Es ist außerdem bekannt, daß stimulierte Zellen mit einer Aktivierung von ERK reagieren. ERK1/2 wurde schon in mechanisch stimulierten Endothelzellen (Takahashi *et al.*, 1997), in Herzmyozyten (Sadoshima & Izumo, 1993; Yamazaki *et al.*, 1995) und in Chondrozyten (Mow *et al.*, 1999; Hung *et al.*, 2000) nachgewiesen.

Im „Labor für Experimentelle Orthopädie und Biomechanik der Philipps-Universität Marburg“ wurde erstmals eine Steigerung der Aktivität in mechanisch stimulierten Osteoblasten nachgewiesen, die sich in einer erhöhten Aktivierung von ERK1/ERK2 äußerte (s. unveröffentlichte Daten; Leitsch). Außerdem wurden die Zellen erstmals, im Gegensatz zu anderen Arbeitsgruppen, mit einer definitiven Deformierung durch die 4-Punkt-Dehnungsmaschine (Jones D.B. & Scholuebbbers J.G., 1987) versetzt (s. Punkt 4.2.2.1).

Die folgenden Experimente, deren Ergebnisse in den Abbildungen 10 und 11a-11c dargestellt sind, sind von diesen vorherigen durch Modifikationen in der Inkubationszeit gekennzeichnet, um den Zeitpunkt der maximalen Aktivierung von ERK1/ERK2 aufzuzeigen.

Die Abbildungen 10 und 11a-c zeigen die Ergebnisse der Immunoblottings nach mechanischer Stimulation von Osteoblasten. Die Zeitpunkte der maximalen Aktivierung von ERK1 und ERK2 variieren leicht. In Abbildung 10, 11a und 11b ist dieser Zeitpunkt nach 5 Minuten, in Abbildung 11c bereits nach 3 Minuten Inkubationszeit erreicht. In den Blots erkennt man, daß schon ab 4 Minuten vor dem Maximalpunkt eine ansteigende Aktivierung der MAP-Kinase stattfindet, die sich nach diesem Punkt in einem Zeitraum von 15 Minuten wieder abschwächt.

Interessanterweise scheint es bei Vergleich der Intensität der Signale von ERK1 und ERK2 Abstufungen zu geben. In den Reihen 5-7 der Abbildung 10, sowie in den Reihen 2-4 der Abbildungen 11b und 11c erkennt man stärkere Signale bei ERK2 im Gegensatz zu ERK1.

Nach Vergleich weiterer Blots des Experiments, kann zusammenfassend gefolgert werden, daß die MAP-Kinase-Aktivierung in einem Zeitraum von 2-10 Minuten stattfindet, mit einem Aktivierungsmaximum nach 5 Minuten.

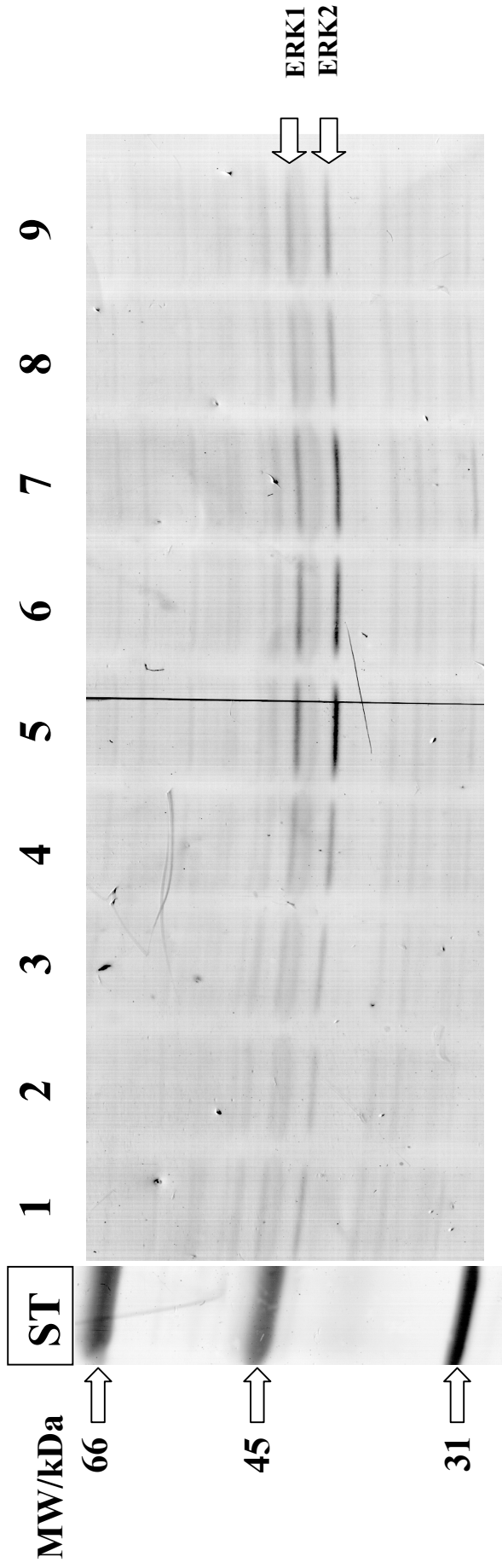


Abbildung 10 Immunoblot der mechanischen Stimulation von Osteoblasten

Detektion der Proteinfractionen mit monoklonalem Antikörper gegen ERK1 und ERK2. Die Proteinmenge pro Geltasche betrug 50 µg.

Die Reihen 1-8 zeigen die Aktivität der beiden Isoformen der MAP-Kinase (ERK1/ERK2) nach mechanischer Stimulation mit der

4-Punkt-Dehnungsmaschine und einer klar definierten Kraft von 4000µStrain/30 Zyklen/1Hz und unterschiedlichen Inkubationszeiten. Links befindet sich

der Proteinstandard, mit drei im Ausschnitt enthaltenen Proteinbanden; 9 ist die Negativ-Kontrolle. Die vertikale Linie in Reihe 5 entstand durch das

vorherige teilen der PVDF-Membran in zwei Hälften und dem späteren Scannen der Membranen, und diente dem rationalen Gebrauch der

Laborchemikalien während des Immunoblottings.

Inkubationszeiten:	1	=	30 sec	4	=	3 min	7	=	20 min
	2	=	1 min	5	=	5 min	8	=	60 min
	3	=	2 min	6	=	10 min	9	=	Neg.-Kontr.

Es ist ein signifikant verstärktes Signal nach 5 Minuten Inkubationszeit ( nach mechan. Stimulation) zu erkennen, welches nach 10 Minuten bzw 20 Minuten deutlich schwächer wird und nach 60 Minuten fast vollständig verschwunden ist.

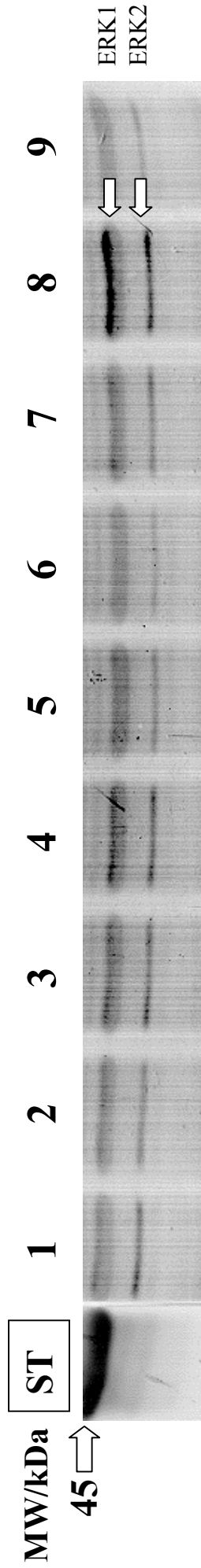


Abbildung 11a

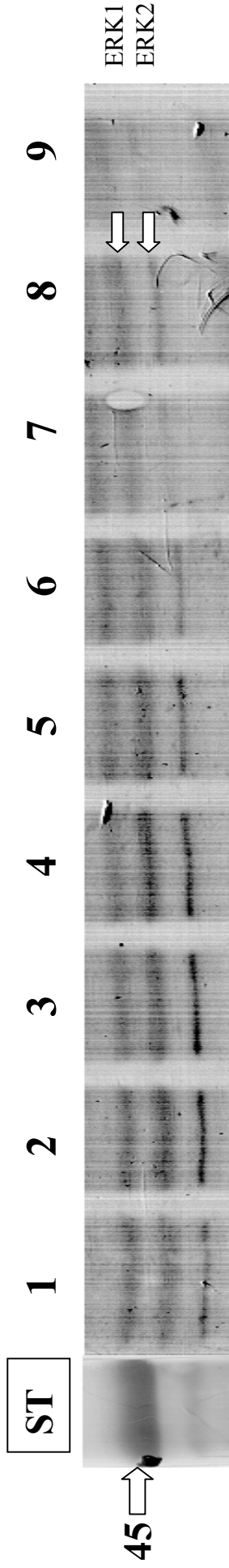


Abbildung 11b

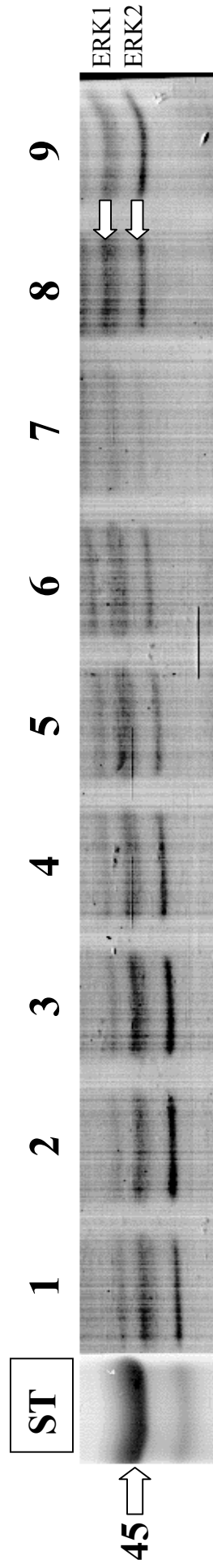


Abbildung 11c

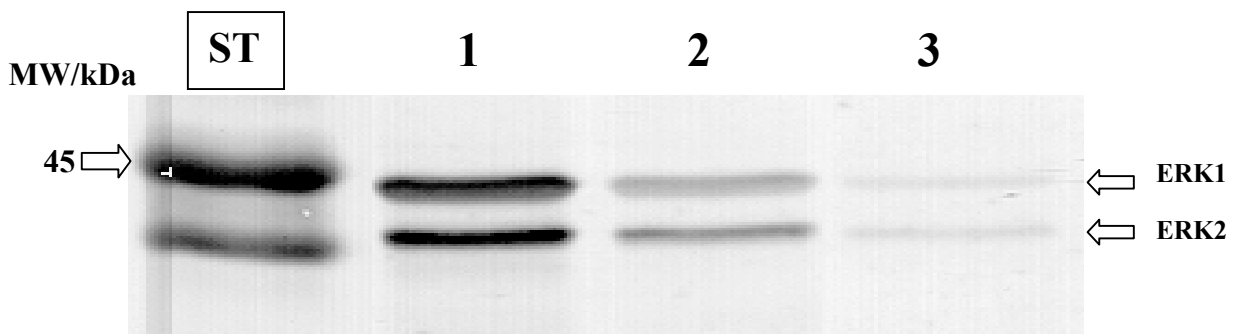
Abbildung 11a-c Immunoblots der mechanischen Stimulation von Osteoblasten (mit gleichen Versuchsbedingungen wie in Abbildung 10). Die Reihen 1-7 zeigen die Aktivität der beiden Isoformen der MAP-Kinase mit folgenden Inkubationszeiten von 1-7: 30 s, 1 min, 3 min, 5 min, 10 min, 20 min und 60 min. Links befindet sich der Proteinstandard, mit der Proteinbande von 45 kDa. Die Reihen 8 zeigen die jeweiligen Positiv-Kontrollen mit EGF mit den stark gefärbten Banden (die schwach gefärbte Bande in Abbildung 11b wurde als Folge einer Unstimmigkeit im Versuchsablauf interpretiert). Die Reihen 9 sind die ungefärbten Negativ-Kontrollen (mit Ausnahme von Abbildung 11c, welche vor allem die Aktivierung von ERK2 zeigt, die auf einen Fehler bei der Versuchsdurchführung zurückzuführen ist). Die Western-Blots zeigen ein maximales MAP-Kinase-Signal nach 5 Minuten (in Abbildung 11c schon nach 3 Minuten).

#### 5.1.4 Effekt einer Stimulation mit einem Phorbol ester auf Osteoblasten

Der hier zum Einsatz kommende Tumorpromotor TPA (Phorbol-12-myristat-13-acetat) löst über die Diacylglycerin-Bindungsstelle eine starke Aktivierung der Proteinkinase C (Newton, 1995) aus (s. Punkt 3.6.1, 4.2.3.4).

TPA dient in dem Versuch „Effekt eines Proteinkinase C – Inhibitors auf mechanisch stimulierte Osteoblasten“ als Positiv-Kontrolle und wurde bei einer Zielkonzentration von  $0,1\mu\text{M}$  10 Minuten inkubiert (Jones D.B. & Bingmann D., 1991).

Im Ergebnis (Abbildung 12) zeigt sich eine sehr starke Aktivierung von ERK1/2 durch TPA-Stimulierung (Bande 1), bei einer deutlichen Aktivierung durch mechanische Stimulation der Osteoblasten (Bande 2). TPA stellt also eine geeignete Positiv-Kontrolle für den Versuch „Effekt eines Proteinkinase C – Inhibitors auf mechanisch stimulierte Osteoblasten“ dar.



**Abbildung 12** Immunoblot mit Vergleich der ERK-Aktivierung durch TPA und mechan. Stimulierung

Detektion der Proteinfractionen mit monoklonalem Antikörper gegen MAP-Kinase. Die Proteinmenge pro Geltasche betrug  $50\mu\text{g}$ . Links befindet sich der Proteinstandard (ST), mit der Proteinbande von 45 kDa.

Die Reihen 1-3 zeigen die Aktivität der beiden Isoformen der MAP-Kinase (ERK1/ERK2) :

1 = Stimulation mit TPA ( $0,1\mu\text{M}$  10 Minuten)

2 = mechanische Stimulation mit der 4-Punkt-Dehnungsmaschine ( $4000\mu\text{Strain}/30$  Zyklen/1Hz)

3 = Negativ-Kontrolle (Osteoblasten ohne Stimulation)

Es ist ein deutlich gesteigertes MAP-Kinase-Signal bei TPA-Stimulation im Vergleich zur mechanischen Stimulation zu erkennen.

### 5.1.5 Effekt eines Proteinkinase C – Inhibitors auf mechanisch stimulierte Osteoblasten

Für diese Inhibitorexperimente kam NGIC-1 (*Non-Glycosidic indolocarbazole 1*) zum Einsatz (s. Punkt 4.2.3.5), welcher selektiv die Proteinkinase C inhibiert (Kleinschroth *et al.*, 1993).

Grundlage dieses Versuchs ist die Erkenntnis, dass die ERK1/ERK2 in mechanisch stimulierten Osteoblasten aktiviert wird (s. Punkt 5.1.3).

In diesem Experiment wurde die PKC durch den Inhibitor selektiv geblockt, so daß bei einem weiterhin positiven ERK-Signal durch Dehnung der Osteoblasten davon ausgegangen werden könnte, daß diese Aktivierung nicht durch PKC hervorgerufen wird (und umgekehrt bei einem negativen ERK-Signal).

Als Positiv-Kontrolle kam der starke PKC-Aktivator TPA (s. Punkt 5.1.4) zum Einsatz, der in einem weiterem Experiment ebenfalls mit dem PKC-Inhibitor geblockt werden sollte.

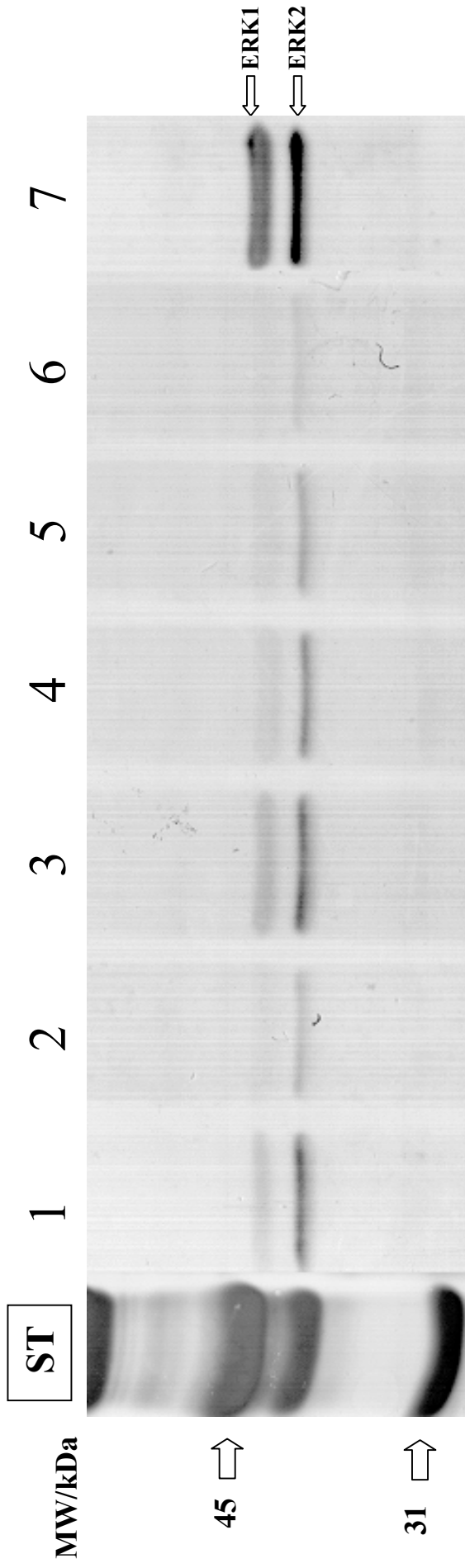
Im Ergebnis wurde eine Abhängigkeit der Aktivierung der ERK-Kaskade von der PKC-Aktivierung dargestellt.

Die Abbildungen 13-15 zeigen die Aktivität der beiden Isoformen der MAP-Kinase (ERK1/ERK2) nach der Behandlung mit dem PKC-Inhibitor mit unterschiedlichen Konzentrationen und nachfolgender Dehnung der Osteoblasten (Versuchsordnung s. Punkt 4.2.3.5).

Anhand der Intensität der Signale, läßt sich erkennen, daß die ERK-Aktivierung mit steigender Konzentration des PKC-Inhibitors abnimmt (Abbildung 13). Bei der Inhibitor-Konzentration von 0,75 µM ist schließlich keine MAP-Kinase-Aktivität gegenüber der Kontrolle mehr nachweisbar. In Abbildung 13 ist in der in Lane 7 gelegenen Kontrolle (Inhibierung und EGF-Stimulation) trotz Inhibitorbehandlung ein starkes Signal erkennbar, was sehr deutlich zeigt, daß die ERK-Aktivierung durch EGF (s. Punkt 3.7.1.1) über einen anderen, bereits bekannten Mechanismus, nämlich über die Aktivierung von Rezeptortyrosinkinasen, abläuft (Ullrich & Schlessinger, 1990) und nicht über den PKC-Mechanismus.

In einem weiteren Experiment (Abbildung 15) wurden die Osteoblasten zunächst auch inhibiert und dann mit dem Phorbolster TPA aktiviert (Versuchsordnung s. Punkt 4.2.3.5). Dies diente der Überprüfung der Funktionsfähigkeit des PKC-Inhibitors.

Das Ergebnis zeigte deutlich unterschiedliche Signalbanden der ERK1 und ERK2 Signalbanden (Lane 3). Während die ERK1-Bande nicht mehr nachweisbar ist, ist bei der ERK2-Bande kein Unterschied in der Aktivierung im Vergleich zur TPA-Stimulierung ohne Inhibierung (Lane 2) zu erkennen. Dies Ergebnis konnte in weiteren Experimenten reproduziert werden.



**Abbildung 13** Effekt eines PKC-Inhibitors auf die ERK 1/2-Aktivierung in mechanisch stimulierten Osteoblasten

Detektion der Proteinfractionen mit einem monoklonalen Antikörper gegen MAP-Kinase. Die Proteinmenge pro Geltasche betrug 50 µg.

Links befindet sich der Proteinstandard, mit zwei im Ausschnitt enthaltenen Proteinbanden. Die Reihen 1 und 2, sowie 4-7 zeigen die Aktivität der beiden Isoformen der MAP-Kinase (ERK1/ERK2) nach der Behandlung mit dem PKC-Inhibitor in den folgenden Konzentrationen (Versuchsordnung s. Punkt 4.2.3.5):

- 1 und 4 = PKC-Inhibitor (0,375µM/20 min) und mechan. Stimulation
- 2 und 5 = PKC-Inhibitor (0,525µM/20 min) und mechan. Stimulation
- 3 = Mechan. Stimulation ohne Inhibitor
- 6 = PKC-Inhibitor (0,75µM/20 min) und mechan. Stimulation
- 7 = PKC-Inhibitor (0,75µM/20 min) und EGF-Stimulation (50ng/ml)

In den Reihen 1 und 4 erkennt man ein ERK 1/2-Signal, das nur geringfügig schwächer ausfällt, als das in 3 bei mechan. Stimulation ohne Inhibitor. 2 und 5 zeigen schon ein deutlich geringeres Signal, als der Vergleich in 3, während sich ERK 1/2 in 6, bei höchster Inhibitorkonzentration nicht mehr nachweisen läßt. Die Kontrolle in 7 zeigt ein deutlich gesteigertes Signal.



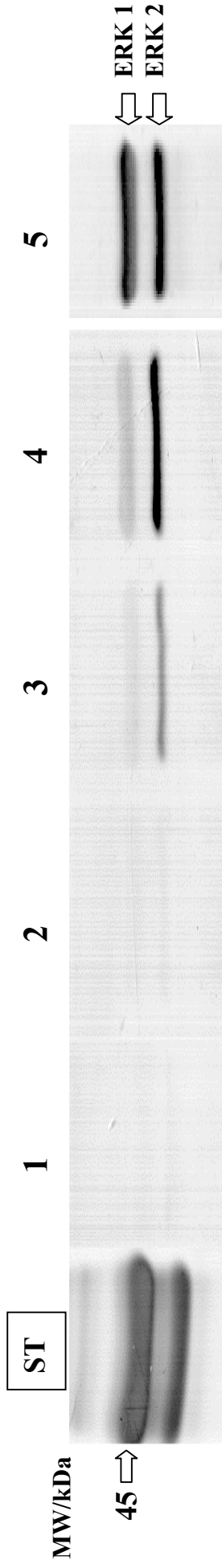


Abbildung 14 Effekt eines PKC-Inhibitors auf die ERK-Aktivierung in mechanisch stimulierten Osteoblasten

Detektion der Proteinfractionen mit einem monoklonalen Antikörper gegen ERK1 und ERK2. Die Proteinmenge pro Geltasche betrug 70 µg. (Weitere Beschreibung in Abbildung 13 und im Text)

- 1 = PKC-Inhibitor (0,75µM/20 min) und mechan. Stimulation
- 2 = Negativ-Kontrolle
- 3 = Mechan. Stimulation ohne Inhibitor
- 4 = PKC-Inhibitor (0,75µM/20 min) und EGF-Stimulation (50ng/ml)
- 5 = Positiv-Kontrolle mit TPA

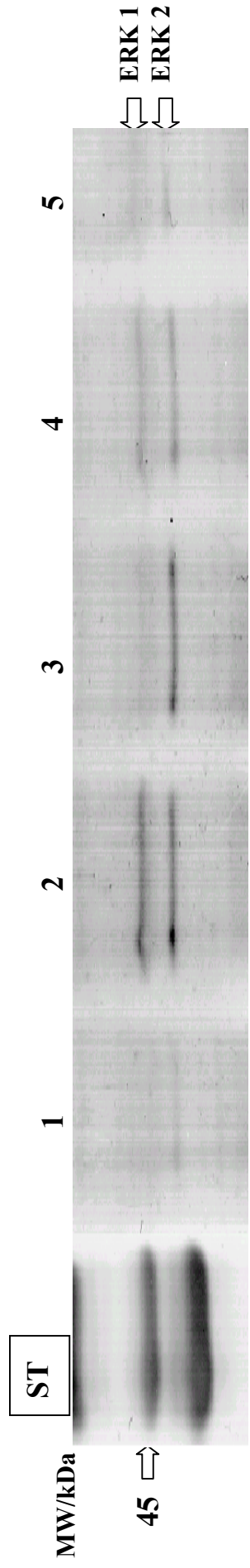


Abbildung 15 Effekt eines PKC-Inhibitors bei anschließender TPA-Stimulation auf die ERK-Aktivierung

Detektion der Proteinfractionen mit einem monoklonalen Antikörper gegen ERK1 und ERK2. Die Proteinmenge pro Geltasche betrug 45 µg (Weitere Beschreibung in Abbildung 13 und im Text)

- 1 = PKC-Inhibitor (0,75µM/20 min) und mechan. Stimulation
- 2 = Positiv-Kontrolle mit TPA
- 3 = PKC-Inhibitor (0,75µM/20 min) und TPA-Stimulation
- 4 = Mechan. Stimulation ohne Inhibitor
- 5 = Negativ-Kontrolle

Während in Lane 3 die ERK1-Bande nicht mehr nachweisbar ist, ist bei der ERK2-Bande kein Unterschied in der Aktivierung im Vergleich zur TPA-Stimulation ohne Inhibierung (Lane 2) zu erkennen.

### 5.1.6 Effekt der Stimulation mit Parathormon auf Osteoblasten

Das Parathormon ist ein Protein aus 84 Aminosäuren bei einem MW von 9500, welches in der Nebenschilddrüse aus einem Prohormon durch Abspaltung eines N-terminalen Hexapeptids in seine wirksame Form umgewandelt wird (s. Punkte 3.3 und 4.2.3.6).

Verschiedene Regionen des PTH-Peptids können Proteine innerhalb unterschiedlicher Kaskaden der Signaltransduktion aktivieren. So werden beispielsweise die ersten beiden Aminosäuren zur Aktivierung der Adenylat-Cyclase benötigt (Fujimori *et al.*, 1992).

Das Experiment sollte den Einfluß des Parathormons auf die Aktivierung von ERK1 und ERK2 aufzeigen. Es dient außerdem in dem Versuch „Effekt eines Phospholipase C – Inhibitors auf mechanisch stimulierte Osteoblasten“ als Positiv-Kontrolle.

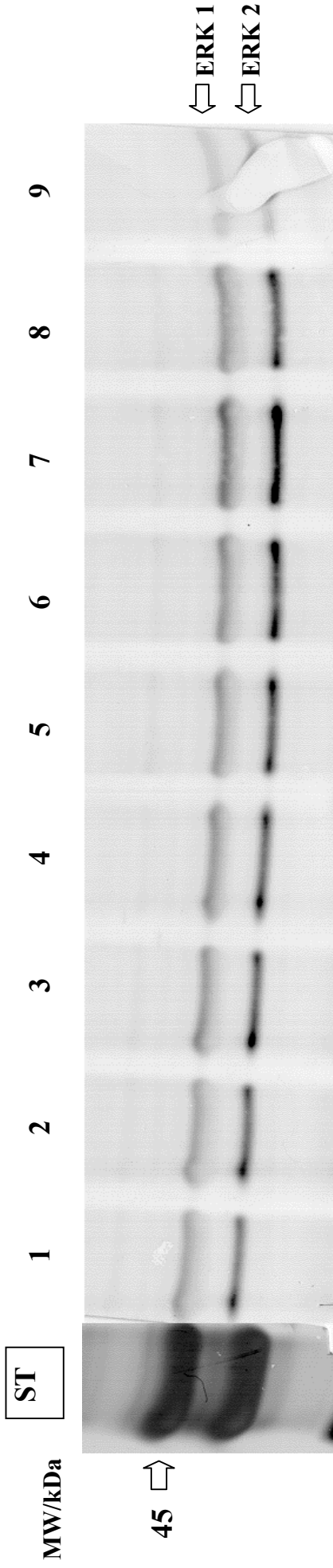
Zum Einsatz kam hier bovines Parathormon mit dem biologisch aktiven N-terminalen Peptidfragment 1-34 am N-terminal aktiven Ende (bPTH 1-34).

Das Parathormon wurde bei verschiedenen Zielkonzentrationen jeweils 1 und 5 Minuten inkubiert.

In Abbildung 16 ist zu erkennen, das bei allen eingesetzten Konzentrationen ERK-Signale zu erkennen waren, die sich bei der Inkubationszeit von 5 Minuten mit steigender Dosis verstärkten. Das Maximum der ERK-Aktivierung ist bei einer PTH-Konzentration von 50 ng/ml festzustellen.

Auf allen Fällen war das ERK2-Signal jeweils stärker ausgeprägt, als das von ERK1.

Das Ergebnis zeigt also auch, daß ERK1 und ERK 2 verschieden stark durch PTH aktiviert wird.



**Abbildung 16** Effekt der Stimulation mit Parathormon auf Osteoblasten

Detektion der Proteinfractionen mit einem monoklonalen Antikörper gegen ERK1 und ERK2. Die Proteinmenge pro Geltasche betrug 50 µg. Links befindet sich der Proteinstandard, mit der im Ausschnitt enthaltenen Proteinbande. Die Reihen 1-9 zeigen die Aktivität der beiden Isoformen ERK1/ERK2 nach der Behandlung mit dem Parathormon in den folgenden Konzentrationen:

- 1 = 1 ng/ml                      2 = 10 ng/ml                      3 = 50 ng/ml                      4 = 100 ng/ml                      1-4 = 1 min Inkubation
- 5 = 1 ng/ml                      6 = 10 ng/ml                      7 = 50 ng/ml                      5-7 = 5 min Inkubation
- 8 = mechan. Stimulation                      9 = Negativ-Kontrolle

Das runde Artefakt in 9 ist eine Luftblase, die beim Transfer der Proteine vom SDS-Gel auf die PVDF-Membran entstanden ist. Da mehr als 50% dieser Bande erkennbar ist, kann man dies als aussagekräftig bezeichnen.

1-4 zeigt bei einer Inkubationszeit von 1 Minute eine leichte ERK-Aktivierung, die bei gleichen Konzentrationen, aber 5-minütiger Inkubationszeit deutlich an Stärke zunimmt und ein Maximum an Aktivierung bei einer Konzentration von 50 ng/ml zu erkennen ist.

### 5.1.7 Effekt eines Phospholipase C – Inhibitors auf mechanisch stimulierte Osteoblasten

Diese Inhibitorexperimente erfolgten mit ET-18-OCH<sub>3</sub> (1-O-Octadecyl-2-O-methyl-rac-glycero-3-phosphorylcholin), welches selektiv die phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C (Pi-PLC) blockiert (Powis *et al.*, 1992) (s. Punkt 4.2.3.7).

Das Ergebnis dieses Inhibitorexperimentes läßt erkennen, daß die Aktivierung von ERK1/2 bei Konzentrationen des Inhibitors ab 1 µM abnimmt, und die geringste Aktivierung bei 10 µM erfolgt (Abbildungen 17 und 18).

In Abbildung 17 beginnt die Verringerung der Aktivierung erst ab einem Wert von 10 µM. Dies läßt sich mit der geringeren Proteinkonzentration in diesem Experiment von 40 µg (im Vergleich zu 70 µg Protein in den Experimenten der Abbildungen 18 und 19) und damit der geringeren Sensitivität erklären.

Inhibitorwerte von weniger als 1 µM zeigen keine Einschränkung in der ERK-Aktivierung und damit keinen Unterschied zu den Kontrollwerten der reinen mechanischen Stimulierung (s. Abbildung 18)

Bei der Auswahl des Parathormons als Positiv-Kontrolle des PLC-Inhibitor-Experiments ist davon ausgegangen worden, daß die in Punkt 5.1.6 bestätigte Aktivierung von ERK1/ERK2 durch das Parathormon über eine Aktivierung der membranständigen Phospholipase C (PLC) zustande kommt.

Bei dem Experiment in Abbildung 20 ist eine sehr starke Aktivierung der ERKs zu erkennen. Im hypothetischen Fall einer ERK-Aktivierung über PLC bzw. einer PLC-Aktivierung durch PTH sollten hier keine ERK-Banden erkennbar sein (s. Diskussion).

Ein weiterer Punkt für die Interpretation der PLC-Inhibitor-Experimente, ist die Beobachtung, daß während der Versuchsdurchführung Inhibitorkonzentrationen ab 20 µM zytostatisch bzw. bei noch höheren Konzentrationen zytotoxisch wirkten. Dies äußerte sich durch ein Ablösen der Osteoblasten von den Dehnungsschalen; bei 20 µM waren ca. 50% und bei 40 µM ca. 75% der Zellen abgelöst, während einer Inkubationszeit von 20 Minuten.

Bei einer Konzentration von 10 µM könnte also auch ein zytostatisches Verhalten der Osteoblasten eine Erklärung für die fehlende ERK-Aktivierung sein und als PLC-Inhibierung fehlgedeutet werden.

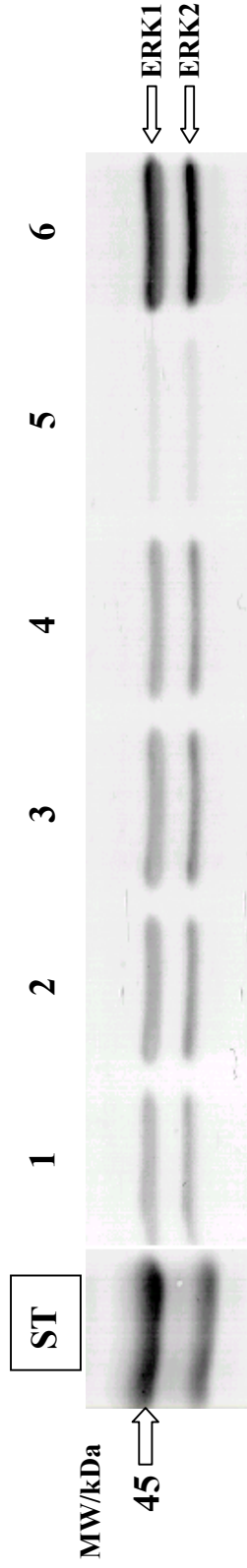
#### 5.1.8 Effekt eines SERCA-Inhibitors auf mechanisch stimulierte Osteoblasten

Als SERCA-Inhibitor kam hier Thapsigargin zur Anwendung. Thapsigargin ist ein Inhibitor der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase im Endoplasmatischen Retikulum (Berridge, 1993) (Versuchsdurchführung s. Punkt 4.2.3.8).

In diesem Experiment sollte der der Einfluß von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem Endoplasmatischem Retikulum auf die ERK1/ERK2-Stimulierung nach Dehnung untersucht werden.

Im Ergebnis dieses Western-Blots zeigt sich, das es trotz Thapsigargineinwirkung und nachfolgender mechanischer Stimulierung zu einer verstärkten ERK-Aktivierung kommt (Lanes 1+3). Der Inhibitor hat bei gleicher Konzentration, aber ohne mechanischen Reiz keinen nennenswerten Effekt auf diese Aktivierung (das Signal ist zwar etwas stärker als das der Negativ-Kontrolle in 6, jedoch erheblich schwächer als die Banden in 1+3 sowie bei rein mechanischer Stimulierung in 5).

Es kommt also trotz der durch Inhibitoreinsatz fehlenden Calciumionen aus dem Endoplasmatischen Retikulum zu einer ERK-Aktivierung. Somit liegt die Vermutung nahe, das die Aktivierung allein durch die mechanische Aktivierung hervorgerufen wird, und der Inhibitor bzw. die Calciumionen aus dem Endoplasmatischen Retikulum keinen Einfluß auf die ERK-Aktivierung haben.

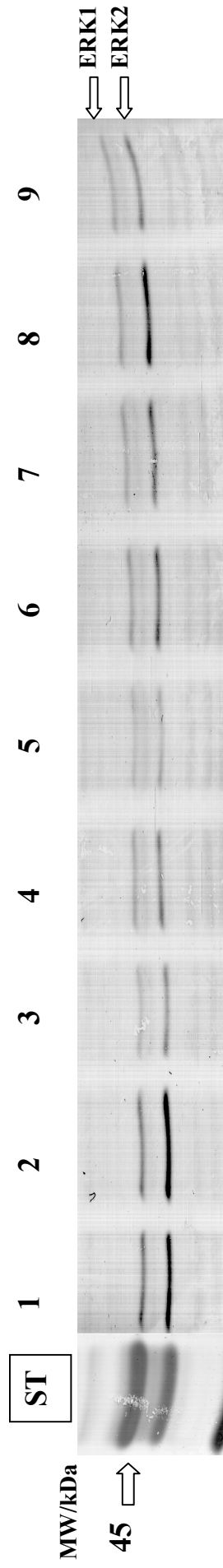


**Abbildung 17** Effekt eines PLC-Inhibitors auf mechanisch stimulierte Osteoblasten

Detektion der Proteinfractionen mit einem monoklonalen Antikörper gegen ERK1 und ERK2. Die Proteinmenge pro Geltasche betrug 40 µg. Links befindet sich der Proteinstandard, mit der im Ausschnitt enthaltenen Proteinbande. Die Reihen 1-4 zeigen die Aktivität von ERK1/ERK2 nach der Behandlung mit dem PLC-Inhibitor (ET-18-OCH<sub>3</sub>), 20-minütiger Inkubation und nachfolgender mechanischer Stimulation und 5 Minuten Inkubation. Der PLC-Inhibitor wurde in den folgenden Konzentrationen eingesetzt (Versuchsreihenfolge s. Punkt 4.2.3.7) :

1 = 10 µM    2 = 5 µM    3 = 2 µM    4 = 0,5 µM    5 = Negativ-Kontrolle    6 = TPA-Stimulation

Das Ergebnis zeigt ein schwächeres ERK1/2-Signal bei einer Inhibitor-Konzentration von 10 µM im Vergleich zu den geringer konzentrierten Proben (2-4). In 6 ist das erwartet starke Signal der TPA-Stimulation zu erkennen (s. Punkt 5.1.4).

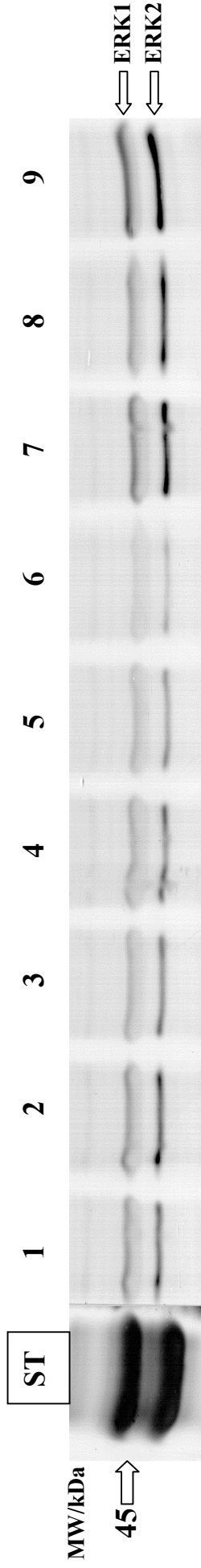


**Abbildung 18** Effekt eines PLC-Inhibitors auf mechanisch stimulierte Osteoblasten

Erklärung in Abbildung 17. Die Proteinmenge pro Geltasche betrug 70 µg. Inhibitorkonzentrationen :

1 = 0,1 µM    2 = 0,5 µM    3 = 1 µM    4 = 5 µM    5 = 10 µM    6-7 = 20 min Inkubation  
 8 = mechan. Stimulation    9 = Negativ-Kontrolle

In diesem Blot erkennt man, bei einer im Vergleich zu Abbildung 17 höheren Proteinkonzentration und somit einem stärker sensitiven Ergebnis, ein deutlich konzentrationsabhängig abfallendes ERK1/2-Signal während 20-minütiger Inkubation. Bei der maximalen Inhibitorkonzentration von 10 µM ist das Signal am schwächsten ausgeprägt. Bei einer Inkubationszeit von 120 Minuten und Inhibitorkonzentrationen von 0,5 µM bzw. 5 µM ist nur ein geringer Abfall des Signals im Vergleich zur rein mechanischen Stimulierung zu erkennen.



**Abbildung 19** Effekt eines PLC-Inhibitors auf mechanisch stimulierte Osteoblasten

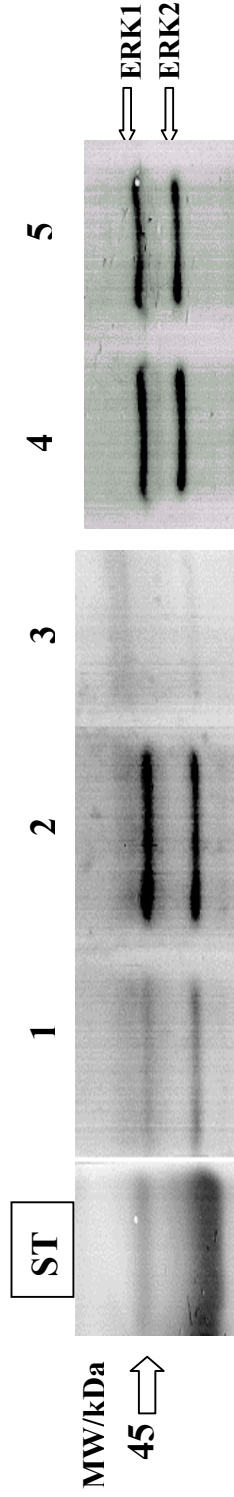
Erklärung in Abbildung 17. Die Proteinmenge pro Geltasche betrug 70 μg. Inhibitorkonzentrationen :

1 = 0,1 μM 2 = 0,5 μM 3 = 1 μM 4 = 5 μM 5 = 10 μM 1-5 = 20 min Inkubation

6 = Negativ-Kontrolle 7 = mechan. Stimulierung

8 = TPA-Stimulierung 9 = PTH-Stimulierung

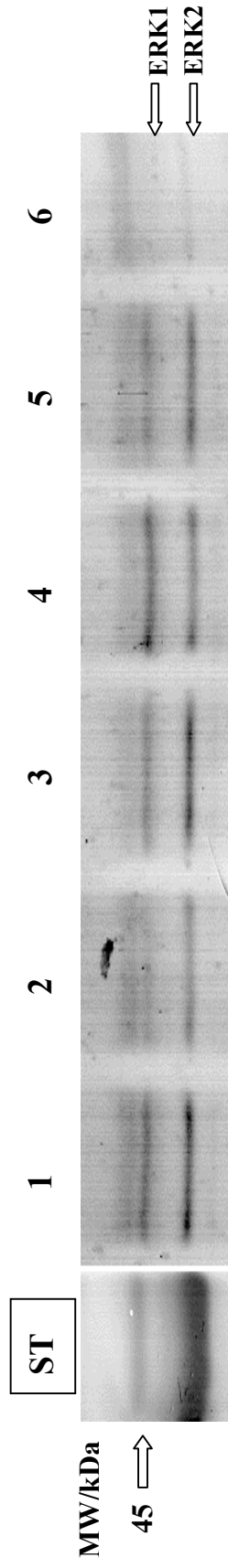
In diesem Blot erkennt man, bei einer im Vergleich zu Abbildung 17 höheren Proteinkonzentration und somit einem stärker sensitiven Ergebnis, ein deutlich konzentrationsabhängig abfallendes ERK1/2-Signal. Bei der maximalen Inhibitorkonzentration von 10 μM ist das Signal noch stärker ausgeprägt, als in der Negativ-Kontrolle (6). 7-9 zeigen die erwartet starken Signale von ERK1/ERK2.



**Abbildung 20** Effekt eines PLC-Inhibitors bei anschließender PTH-Stimulation auf die ERK1/2-Aktivierung

Detektion der Proteinfractionen mit einem monoklonalen Antikörper gegen ERK1 und ERK2. Die Proteinmenge pro Geltasche betrug 50 μg. Links befindet sich der Proteinstandard, mit der im Ausschnitt enthaltenen Proteinbande. In 1 (PLC-Inhibierung mit 10 μM und mechan. Stimulierung) erkennt man ein im Vergleich zum fehlenden Signal der Negativ-Kontrolle (3) schwach ausgeprägtes ERK1/2-Signal. Eine sehr starke ERK-Aktivierung zeigt sich in 2, sowie im Ausschnitt eines separaten Blots (4+5) (PLC-Inhibierung bei anschließender PTH-Stimulierung (s. Punkt 4.2.3.7)).





**Abbildung 21** Effekt eines SERCA-Inhibitors auf mechanisch stimulierte Osteoblasten

Detektion der Proteinfractionen mit einem monoklonalen Antikörper gegen ERK1 und ERK2. Die Proteinmenge pro Geltasche betrug 50 µg. Links befindet sich der Proteinstandard, mit der im Ausschnitt enthaltenen Proteinbande. Die Reihen 1-3 zeigen die Aktivität von ERK1/ERK2 nach der Behandlung mit dem SERCA-Inhibitor Thapsigargin, 30-minütiger Inkubation und nachfolgender mechanischer Stimulation und 5 Minuten Inkubation. Der Inhibitor wurde in einer Konzentration von 5 µM eingesetzt.

1 = Thapsigargin (5 µM 30 Minuten) und mechan. Stimulierung

2 = Thapsigargin (5 µM 30 Minuten) ohne mechan. Stimulierung

3 = Thapsigargin (5 µM 30 Minuten) und mechan. Stimulierung

4 = TPA-Stimulierung

5 = mechan. Stimulierung

6 = Negativ-Kontrolle

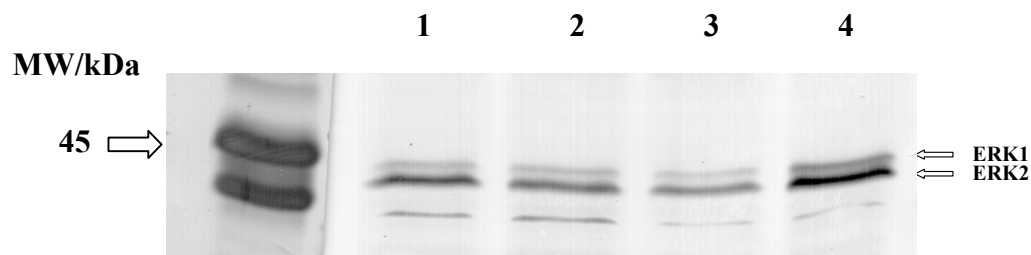
In 1+3 erkennt man ein verstärktes ERK1/2-Signal. Die Banden in 2 zeigen eine sehr schwache Intensität, die nur leicht über der der Negativ-Kontrolle liegen. TPA-Stimulierung (4) und die rein mechanische Stimulierung (5) zeigen die erwarteten starken Signale, während die Negativ-Kontrolle (6) signalfrei bleibt.



### 5.1.9 Nachweis von ERK1/ERK2 in mechanisch stimulierten Tumorzellen (MG-63)

In diesem Experiment sollte der Nachweis erbracht werden, ob die Zellen der MG-63 Osteosarkomzell-Linie (Billiau *et al.*, 1977) gleichermaßen wie die Osteoblasten eine Aktivierung von ERK1/ERK2 durch mechanische Stimulierung zeigen (s. Punkt 4.2.3.9).

Eine ERK1/ERK2-Aktivierung durch Wachstumsfaktoren konnte bereits nachgewiesen werden; hier wurde ERK2 jedoch stärker aktiviert, als ERK1 (Chaudhary & Avioli, 1997; Chaudhary & Avioli, 1998).



**Abbildung 22 Nachweis Von ERK1/ERK2 in mechanisch stimulierten Osteosarkomzellen (MG-63)**

**Detektion der Proteinfractionen mit einem monoklonalen Antikörper gegen ERK1 und ERK2. Die Proteinmenge pro Geltasche betrug 50 µg.**

**Links befindet sich der Proteinstandard, mit der im Ausschnitt enthaltenen Proteinbande. Die Reihen 1 und 2 zeigen die Aktivität von ERK1/ERK2 nach mechanischer Stimulierung (4000µStrain/30 Zyklen/1 Hz) und nachfolgender Inkubation.**

**1 = 5 min Inkubation            2 = 2,5 min Inkubation**  
**3 = Kontrolle                    4 = TPA-Stimulierung**

Bereits nach 2,5 minütiger Inkubation ist eine Aktivierung der ERKs zu erkennen (2), die nach 5 Minuten noch deutlich zunimmt (1). Lane 3 zeigt eine sehr stark ausgeprägte Negativ-Kontrolle; Lane 4 die auch für Osteoblasten typisch starken Signale der ERK-Aktivierung durch TPA-Stimulierung.

Es ist auffällig, das in diesem Dehnungsexperiment mit MG-63-Zellen ERK2 erheblich stärker aktiviert wird, als ERK1, was bei den Osteoblasten auch, allerdings nicht in diesem Ausmaß zu sehen war (s. Punkt 5.1.3).

## 6 Diskussion

Die Signalkaskaden der MAP-Kinase spielen eine wesentliche Rolle bei der Antwort von Osteoblasten auf eine Vielzahl aktiver extrazellulärer Reize.

MAP-Kinasen, d.h. ERKs, SAPKs,.. werden unter anderem durch mechanische Belastung, Wachstumsfaktoren, erhöhte intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und PKC-Aktivierung freigesetzt. Aktivierte MAP-Kinasen phosphorylieren genregulatorische Proteine mit der Folge einer veränderten Differenzierung und Proliferationsrate der Zelle. Bislang ist aber wenig darüber bekannt, wie der mechanische Stimulus in das intrazelluläre Signal der Genregulation umgeformt wird.

Wie sich mechanische und chemische Stimulierung oder Inhibierung boviner Osteoblasten auf die MAP-Kinase-Kaskade (hier speziell die Isoformen ERK1 und ERK2) auswirken und welche „*up-stream*“ liegenden Reaktionen dem vorausgehen, wurde im Vorangegangenen bereits dargestellt und soll nun unter verschiedenen Aspekten diskutiert werden.

Es ist bekannt, daß Zellen auf mechanische Belastung mit biochemischen Veränderungen reagieren, welche sich z.B. in einer erhöhten Proliferationsrate widerspiegeln.

Grundlage dieser Arbeit ist der von Jones und Scholübbbers entdeckte Anstieg der PLC innerhalb von wenigen Sekunden nach mechanischer Stimulation (Jones D.B. & Scholuebbbers J.G., 1987).

Es ist außerdem bekannt, daß stimulierte Zellen mit einem Anstieg der intrazellulär lokalisierten MAP-Kinase reagieren. Die Isoformen ERK1 und ERK2 wurden schon in mechanisch stimulierten Endothelzellen (Takahashi *et al.*, 1997), Herzmyozyten (Sadoshima & Izumo, 1993; Yamazaki *et al.*, 1995) und Chondrozyten (Hung *et al.*, 2000) nachgewiesen.

Im „Labor für Experimentelle Orthopädie und Biomechanik der Philipps-Universität Marburg“ wurde erstmals eine Steigerung der Aktivität in mechanisch stimulierten Osteoblasten nachgewiesen, die sich in einer erhöhten Aktivierung von ERK1 und ERK2 äußerte (s. unveröffentliche Daten; Leitsch,J). Außerdem wurden die Zellen erstmals, im Gegensatz zu anderen Arbeitsgruppen, mit einer definitiven und

physiologischen Kraft durch die 4-Punkt-Dehnungsmaschine (Jones D.B. *et al.*, 1993), d.h. mit einer 0,4 %igen uniaxialen Dehnung, versetzt.

Hier sollte ermittelt werden, in welchem genauen Zeitrahmen die Aktivierung der MAP-Kinase (speziell der Isoformen ERK1 und ERK2) stattfindet (Zeitpunkt der maximalen Aktivierung). Außerdem wurden neben den bovinen Osteoblasten auch humane Osteosarkomzellen der MG-63-Zell-Linie der mechanischen Dehnung unterworfen.

Hauptziel dieser Arbeit war es, zu ermitteln, welcher Weg bzw. welche Signalkaskaden innerhalb der Signaltransduktion für diese Aktivierung verantwortlich sind, um Rückschlüsse auf die Natur der Mechanotransduktion zu erlangen.

Diese Fragestellungen wurden anhand der ERK1/ERK2-Aktivität unter Benutzung des Western-Blot-Verfahrens mit dem Antikörper „*Anti-activated MAP-Kinase*“, der spezifisch diese aktiven Isoformen der MAP-Kinase erkennt, geklärt.

#### Vorexperimente:

In den vorgeschalteten Versuchen zur Ermittlung von geeigneten Positivkontrollen konnte jeweils eine Aktivierung von ERK1 und ERK2 festgestellt werden: durch Stimulierung mit EGF, TPA und Parathormon.

Das in Punkt 5.1.2 dargestellte Ergebnis zeigt ein biphasisches Verhalten der ERK1/ERK2-Aktivierung durch EGF nach 10 Minuten und erneut nach 60 Minuten.

Die Auslöser hierfür könnten ERK1 und ERK2 sein, die „*Upstream*“-Komponenten ihrer eigenen Kaskade phosphorylieren (Abbildung 24), was zu der Vermutung führt, daß nach Aktivierung der ERKs „*Feedback-Mechanismen*“ zum tragen kommen (Hefti *et al.*, 1997). Als Substrate für die ERKs wurden SOS, Raf-Kinase, MEK und auch der EGF-Rezeptor beschrieben (Seger & Krebs, 1995).

Während die Stimulierung mit EGF über Rezeptortyrosinkinasen und mit dem Phorbolster TPA über PKC bekannt ist, zeigte die ERK1/2-Aktivierung durch Parathormon interessante Ansätze in der Literatur.

Einerseits ist eine PTH-induzierte Proteinkinase A (PKA)-abhängige Inhibierung von ERK1/ERK2 in EGF-stimulierten Osteosarkomzellen (UMR-106) (Verheijen & Defize, 1995) beschrieben, aber auch eine ERK1/ERK2-Aktivierung durch PTH ohne EGF-Stimulation (Chaudhary & Avioli, 1998). Doch andere Autoren belegen, daß die Inhibierung durch PTH in vielen humanen Osteosarkomzell-Linien nicht stattfindet

(Hipskind & Bilbe, 1998a), und es bei PTH-Behandlung und folgender mechanischer Belastung von Osteoblasten zu einer Potenzierung der Zellantwort kommt (Carvalho *et al.*, 1994).

Andererseits kommt es zu einer PLC-Aktivierung in Osteosarkomzellen (UMR-106) durch bovines PTH (bPTH), ausgehend von einer erhöhten IP<sub>3</sub>-Produktion (Fujimori *et al.*, 1992) bzw. einer Aktivierung via spezieller PTH-Rezeptoren (PTH-related peptide related receptors / PTHR<sub>s</sub>) mit humanem PTH (hPTH) (Takasu *et al.*, 1999). Somit kommt es also durch PLC-Aktivierung zu einer Aktivierung von ERK1/ERK2 über den Signalweg PLC-PKC-Ras-ERK-Kaskade.

Außerdem konnte durch die Bindung von PTH an den Rezeptor in Osteoblasten eine Aktivierung von Proteinkinase A und C und ein Anstieg an intrazellulärem Calcium nachgewiesen werden (Partridge *et al.*, 1994).

Eine weitere Studie geht aufgrund einer erhöhten Hydrolyse von Phosphatidylcholin durch PTH-Stimulation in Osteosarkomzellen (UMR-106) von einer PLD-Aktivierung aus (Singh *et al.*, 1999).

In einem weiteren Vorversuch über den Einfluß von FCS im Nährmedium der Osteoblasten auf die ERK-Freisetzung konnte gezeigt werden, daß 3 Stunden nach Entfernung des für Zellen wachstumsaktiven FCS-haltigen Mediums im Austausch mit einem FCS-freien Medium keine ERK-Aktivierung durch Anwesenheit von FCS erfolgt. Ab diesem Zeitpunkt ist es also möglich Experimente durchzuführen, welche die Veränderung von ERK1/ERK2 durch äußere Reize analysieren sollen.

Für die Zielsetzung dieses Versuchs war daher eine Durchführung mit FCS geringerer Konzentration (0,5-1% FCS / um ein „*Deattachment*“ von den Polycarbonatplatten zu verhindern ohne ERK1/2 zu aktivieren) nicht mehr erforderlich, da bereits nach 3 Stunden mit der Versuchsdurchführung begonnen werden konnte (s. Punkt 5.1.1).

Das Ergebnis soll bei zukünftigen Versuchsreihen dieser Form eine schnellere Versuchsdurchführung und damit eine raschere Ergebnisfindung erlauben.

### Dehnungsexperimente:

Die Ergebnisse zeigten bei den bovinen Osteoblasten eine deutliche Aktivierung von ERK1/ERK2 in einem Zeitraum von 2-10 Minuten nach mechanischer Dehnung, mit einem Maximum nach 5 Minuten.

Nach Dehnung der Osteosarkomzellen (MG-63) konnte ebenfalls eine ERK1/2-Aktivierung festgestellt werden.

In anderen Studien wurden nach mechanischer Belastung verschiedener Zellarten ähnliche Ergebnisse erzielt.

Es sind Parallelen zu der Aktivierung in mechanisch stimulierten Herzmyozyten (Yamazaki *et al.*, 1995) erkennbar. Hier wurden die Zellen für 1 Minute einer für Muskelzellen physiologischen Dehnung von 20 % auf einer flexiblen Silikonscheibe unterworfen. Es wurde eine ERK1/ERK2-Aktivierung in einem Zeitraum von 2-60 Minuten festgestellt, bei einem Maximum nach 8 Minuten.

Sadoshima hat ebenfalls Herzmyozyten mechanischer Belastung unterworfen, und erhält bei gleichem Versuchsaufbau ähnliche Werte (Sadoshima & Izumo, 1993). Hier begann die ERK-Aktivierung 1 Minute nach Dehnung, der Peak der Aktivierung wurde nach 10 Minuten erreicht und nach 60-120 Minuten konnte keine ERK-Aktivität mehr nachgewiesen werden.

Takahashi hat bovine Endothelzellen über „*Fluid shear stress*“ (s. Punkt 3.9) in einer parallelwandigen Zellkammer mechanisch belastet (Takahashi *et al.*, 1997). Die maximale ERK1/ERK2-Aktivierung zeigte sich 10 Minuten nach Beginn der Belastung und endete nach 60 Minuten vollständig.

In Chondrozyten wurde eine fluid-flow induzierte Aktivierung von ERK1 und ERK2 festgestellt (Hung *et al.*, 2000). Die Aktivierung erfolgte innerhalb eines Zeitraumes von 5-15 Minuten nach Belastung.

Alle genannten Studien zeigen, dass die ERK-Aktivierung grundsätzlich nicht als eine unmittelbar auftretende Antwort nach Applikation des mechanischen Reizes auf die Zellen anzusehen ist, sondern ein längerdauernder Prozess ist.

Allerdings zeigen sich bei den direkt zugeführten Reizen, wie Dehnung (Osteoblasten und Myozyten), dass das erste ERK-Signal bereits früher (nach 1-2 Minuten) zu erkennen ist, während es nach flow-induziertem Reiz und erst nach 5 (Chondrozyten) bis 10 Minuten (Endothelzellen) auftritt.

Die Kraft, mit der die Osteoblasten mechanisch stimuliert werden, sollte zum einen vorher genau definiert sein und zum anderen im physiologischen Rahmen liegen.

Um direkte Vergleiche anstellen zu können, sollte möglichst bei allen Experimenten gleiche Versuchsaufbauten mit gleicher Dehnungsamplitude Voraussetzung sein.

Interessanterweise zeigte sich bei allen in dieser Arbeit durchgeführten Aktivierungsexperimenten (mit Ausnahme einiger Aktivierungsexperimente mit dem Phorbol ester) im Western-Blot ein stärkeres ERK2-Signal im Gegensatz zu ERK1. Diese Ergebnisse der Dominanz des ERK2-Signals sind konvergent zu Beobachtungen mit humanen Osteoblasten (Chaudhary & Avioli, 1998) und weiteren humanen Zell-Linien (Boulton & Cobb, 1991).

Es gibt verschiedene Möglichkeiten für eine Erklärung dieser Ergebnisse:

- Die Menge an freigesetztem ERK1 könnte geringer sein, als die von ERK2
- ERK1 könnte seine Menge aufgrund einer geringeren Halbwertszeit verringern
- ERK 1 könnte bei der Gelelektrophorese nicht vollständig renaturieren und somit seinen Betrag vermindern

Die physiologische Signifikanz des Unterschieds in der Aktivierung von ERK1 und ERK2 in Osteoblasten durch mechanische Stimulierung und Wachstumsfaktoren ist bis zu diesem Zeitpunkt unbekannt (Chaudhary & Avioli, 1998).

### Inhibitorexperimente:

Die Inhibitorexperimente wurden mit einem PKC-Inhibitor, einem PLC-Inhibitor und einem SERCA-Inhibitor durchgeführt (s. Ergebnisteil).

#### PKC-Inhibitor:

Das PKC-Inhibitor-Experiment zeigte das eine Proteinkinase C in die Aktivierung der ERK-Kaskade involviert ist.

Der Versuch wurde aufgrund der Erkenntnis durchgeführt, das ERK1 und ERK2 in mechanisch stimulierten Osteoblasten aktiviert werden. Jones entdeckte 1991, daß ein mechanischer Reiz in Osteoblasten zu einer Aktivierung der Phospholipase C führt (Jones D.B. & Scholuebbbers J.G., 1987; Jones D.B. & Scholuebbbers J.G., 1989), die

dann das Lipid PIP<sub>2</sub> zu IP<sub>3</sub> und DAG spaltet (s. Punkt 3.7.1.2). Während IP<sub>3</sub> Calciumionen aus intrazellulären Speichern freisetzt, aktiviert DAG die Proteinkinase C.

Unklar ist derzeit, ob die PKC für die ERK1/2-Aktivierung über die Signalkaskaden verantwortlich ist (PKC-Ras-Raf-MEK-ERK), oder ob sie direkt genregulatorische Proteine phosphorylieren kann und die ERK1/2-Aktivierung möglicherweise über einen anderen Signalweg bzw. Kaskade, wie der JAK/STAT-Signalweg (s. Punkt 3.7.1.3), verläuft.

Die Immunoblots zeigen, das ERK1/ERK2 nach Blockade der Proteinkinase C nicht freigesetzt wurde. Diese Reaktion war abhängig von der Konzentration des benutzten Inhibitors und zeigte eine maximale Blockade bei einer Inhibitorkonzentration von 0,75 µM (s. Punkt 5.1.5).

Somit konnte in diesem Teilabschnitt des Experimentes erstmals der Nachweis erbracht werden, das die ERK1/2-Aktivierung in mechanisch stimulierten Osteoblasten über den „*upstream*“ liegenden Prozeß einer aktivierten Proteinkinase C verläuft.

Die Abhängigkeit der ERK1/ERK2-Aktivierung von der PKC-Aktivierung konnte bereits in bovinen Endothelzellen nach mechanischer Belastung (Ikeda *et al.*, 1999b) und in humanen Osteosarkomzellen nach Aktivierung durch einen Phorbolster (Zhang *et al.*, 1995) gezeigt werden.

In einem weiteren Teilabschnitt des Experimentes konnte nach PKC-Inhibierung der Zellen und anschließender EGF-Stimulation eine deutliche Aktivierung von ERK1 und ERK2 festgestellt werden.

Dies Ergebnis zeigt, daß die ERK-Aktivierung durch EGF (s. Punkt 3.7.1.1) über einen anderen bereits bekannten Mechanismus, nämlich über den der Aktivierung von Rezeptortyrosinkinasen, abläuft (Ullrich & Schlessinger, 1990), und nicht über den PKC-Mechanismus. Wie in der Arbeit von Zhang festgestellt, erfolgt die ERK-Aktivierung durch PKC und EGF über zwei parallele Signalwege (Zhang *et al.*, 1995).

In einem weiteren Experiment wurden die Osteoblasten zunächst auch inhibiert und dann mit dem Phorbolster TPA aktiviert (s. Abbildung 15). Dieses Experiment diente der Überprüfung der Funktionsfähigkeit des PKC-Inhibitors, da Phorbolster PKCs aktivieren können (Newton, 1995).

Während die ERK1-Bande in diesem Experiment nicht mehr nachweisbar ist (also inhibiert wird), ist bei der ERK2-Bande kein Unterschied in der Aktivierung im Vergleich zur TPA-Stimulierung ohne Inhibierung zu erkennen. Dies Ergebnis konnte in weiteren Experimenten wiederholt werden.

Auch in anderen Studien konnte eine unterschiedliche Aktivierung von ERK1 und ERK2 festgestellt werden. Ikeda fand dies bei einem Inhibitorexperiment gegen die PI<sub>3</sub>-Kinase (s.u. Diskussion) bei belastungsinduzierten Endothelzellen (Ikeda *et al.*, 1999a).

Dies Ergebnis ist etwas ungewöhnlich, da sonst immer davon ausgegangen wurde, daß die beiden Isoformen der MAP-Kinase ERK1 und ERK2 in einer „gemeinsamen“ Kaskade, wenn auch nicht immer mit gleicher Konzentration (s.o. Diskussion) freigesetzt würden.

So könnte man annehmen, daß die beiden Isoformen entweder durch den PKC-Inhibitor unterschiedlich gehemmt, oder durch die TPA-Stimulierung unterschiedlich aktiviert würden. Da die TPA-Stimulierung in Vorversuchen gleichstarke ERK1/ERK2-Signale zeigte (s. Abbildung 12), und auch in den PKC-Inhibitor-Experimenten eine gleichstarke Abschwächung dieser Signale beschrieben war (s. Punkt 5.1.5), sind letztere Hypothesen auszuschließen.

Eine weitere Möglichkeit besteht darin, daß der Phorbolster (TPA) nicht die Bindungsstellen der Proteinkinase C angreift, sondern über einen anderen Mechanismus die Aktivierung von ERK1 und ERK2 hervorruft. Eine Aktivierung eines PKC-unabhängigen Signalwegs durch Phorbolster-Stimulation in Osteoblasten konnte bereits nachgewiesen werden (Rapuano & Bockman, 1997).

Eine Fehlfunktion des PKC-Inhibitors „NGIC-1“ liegt nicht vor, da dies konträr zu den oben beschriebenen Ergebnissen der vollständigen Inhibierung von ERK1 und ERK2 ist.

Die Annahme, daß der Inhibitor zytotoxisch auf die Zellen reagiert, kommt ebenfalls nicht in Frage, da sich die Zellen zum einen bei der Inhibitorkonzentration mit der stärksten Blockade von ERK1 und ERK2 und dreifacher Inkubationszeit weder von den Schalen ablösten, noch ihre Morphologie veränderten. Zum anderen konnte, wie oben



beschrieben, nach Inhibierung eine vollständige Aktivierung von ERK1 und ERK2 nach EGF-Stimulation erreicht werden (s. Abbildung 13).

Eine weitere Möglichkeit besteht darin, daß verschiedene Isoformen der Proteinkinase C für die Aktivierung der beiden Isoformen der MAP-Kinase ERK1 und ERK2 verantwortlich sind. TPA würde dann zwei unterschiedliche Isoformen der PKC aktivieren, welche ihrerseits je ERK1 oder ERK2 aktivieren. Der PKC-Inhibitor inhibierte in diesem Fall selektiv die Isoform der PKC, die für die Aktivierung von ERK1 verantwortlich wäre.

In diesem Zusammenhang gibt es bereits Studien, die eine bestimmte Isoform der PKCs, nämlich die PKC- $\epsilon$ , für die Aktivierung von ERK1 und ERK2 verantwortlich machen (Berk *et al.*, 1995; Traub *et al.*, 1997)(s.u. Diskussion). Es bestehen allerdings noch keine Erkenntnisse darüber, daß ERK1 und ERK2 von verschiedenen PKC-Isoformen aktiviert werden.

#### PLC-Inhibitor:

Es stellt sich nun die Frage, inwieweit die Phospholipase C Einfluß auf den Prozeß der PKC-Aktivierung und nachfolgend der ERK-Aktivierung hat.

Jones und Scholübers entdeckten einen Anstieg der PLC-Konzentration nach mechanischer Belastung von Osteoblasten mit der bekannten nachfolgenden Bildung von PIP<sub>2</sub> welches sich zu DAG und IP<sub>3</sub> spaltet. Während IP<sub>3</sub> Calcium-Ionen aus intrazellulären Speichern freisetzt, aktiviert DAG die Proteinkinase C, die die ERK-Kaskade aktiviert.

Es besteht allerdings die Möglichkeit, daß die PKC direkt durch einen mechanischen Reiz aktiviert wird, ohne den Signalweg PLC-PIP<sub>2</sub>-DAG bzw. beide PLC und PKC durch den mechanischen Reiz aktiviert werden.

Bei der Benutzung des PLC-Inhibitors ET-18-OCH<sub>3</sub> (Powis *et al.*, 1992) konnte nach mechanischer Belastung eine konzentrationsabhängige Verminderung der ERK1/ERK2-Aktivierung festgestellt werden (keine vollständige Inhibierung), welche bei einem Wert von 1  $\mu$ M begann und bei 10  $\mu$ M die stärkste Verminderung des Signals zeigte.

Dies Ergebnis zeigt, daß die ERK1/ERK2-Aktivierung in mechanisch stimulierten Osteoblasten möglicherweise über den „*upstream*“ liegenden Prozeß der aktivierten Phospholipase C verläuft.

Allerdings führt die Beobachtung, daß während der Durchführung der PLC-Inhibitor-Experimente Inhibitorkonzentrationen ab 20  $\mu\text{M}$  zytostatisch bzw. bei noch höheren Konzentrationen zytotoxisch wirkten, zu einer vorsichtigen Interpretation der Ergebnisse.

Bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  könnte also auch ein zytostatisches Verhalten der Osteoblasten eine Erklärung für die fehlende Aktivierung sein und als PLC-Inhibierung fehlgedeutet werden.

In einem weiteren Experiment, bei dem nach PLC-Inhibierung eine Stimulation mit Parathormon erfolgte, konnte eine sehr starke ERK-Aktivierung ermittelt werden, welche die Signalintensität bei alleiniger Benutzung des Parathormons deutlich übertraf. Im hypothetischen Fall einer ERK-Aktivierung über PLC bzw. einer PLC-Aktivierung durch PTH sollten hier keine ERK1/ERK2-Banden erkennbar sein; zumindest ähnlich schwache Banden, wie bei der höchsten PLC-Inhibitorkonzentration von 10  $\mu\text{M}$ .

Es liegt also die Vermutung nahe, daß entweder die ERK1/ERK2-Aktivierung durch PTH über einen anderen als über den Signalweg PLC-PKC-Ras-ERK-Kaskade läuft, oder daß PLC möglicherweise selbst nicht an der ERK-Aktivierung beteiligt ist.

Der Grund dafür könnte darin liegen, daß PTH nicht alleine die PLC, sondern auch die PKC aktiviert (s.o. Diskussion), wodurch es trotz PLC-Inhibitor zu einer Aktivierung von ERK1/ERK2 via PKC kommt.

Die sehr starke Signalintensität von ERK1/ERK2 könnte mit einer Potenzierung des Effekt des Parathormons durch den PLC-Inhibitor erklärt werden. Allerdings kann die Ursache dafür nicht gefunden werden.

Der Inhibitor ET-18-OCH<sub>3</sub> zeigte bereits humanen Adenokarzinomzellen eine Verminderung von ERK1/ERK2 (Zhou *et al.*, 1996). Bei dieser Inhibierung der durch EGF stimulierten Zellen hatte der Inhibitor keinen Einfluß auf die Bindung von EGF auf seine Rezeptoren, sondern er verhinderte die Bindung der Raf-Kinase an die Membran, die bekanntermaßen für die weiteren Phosphorylierungsschritte der ERK-Kaskade notwendig ist (s. Punkt 3.7.1).

Die Inhibierung von ERK1/ERK2 war also hier ein Effekt der fehlenden Raf-Kinase-Aktivierung.

SERCA-Inhibitor:

In diesem Inhibitorexperiment sollte der der Einfluß von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus dem Endoplasmatischem Retikulum auf die ERK1/ERK2-Stimulierung nach Dehnung untersucht werden.

Es kam der SERCA-Inhibitor Thapsigargin, der die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase im Endoplasmatischen Retikulum (Berridge, 1993) hemmt, zur Anwendung (s. Punkt 4.2.3.8). Der mechanische Reiz wurde also in einem  $\text{Ca}^{2+}$ -freien intrazellulären Milieu der Osteoblasten gesetzt.

Das Ergebnis zeigt, daß es trotz der durch Inhibitoreinsatz fehlenden Calciumionen aus dem Endoplasmatischen Retikulum zu einer ERK1/ERK2-Aktivierung durch mechanische Aktivierung der Osteoblasten kam.

Damit ist der Nachweis erbracht, daß die intrazellulär freigesetzten Calciumionen keinen Einfluß auf die ERK1/ERK2-Aktivierung haben.

Dieser Nachweis konnte bereits bei mechanisch stimulierten Endothelzellen geführt werden (Traub *et al.*, 1997). Andererseits kommt es bei einer erhöhten intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zu einer verstärkten ERK1/ERK2-Aktivierung (Hipskind & Bilbe, 1998a).

Im Gegensatz zu früheren Ergebnissen (Jones D.B. *et al.*, 1991) kommt es in neueren Experimenten des „Labors für Experimentelle Orthopädie und Biomechanik der Philipps-Universität Marburg“ nicht zu einer unmittelbaren Erhöhung der intrazellulären Calciumionenkonzentration, aber ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal tritt auf. Dies und das Ergebnis des SERCA-Inhibitorexperimentes sprechen möglicherweise dafür, daß nicht wie bisher angenommen, eine  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige c-PKC (*conventional* / s. Punkt 3.6.1), sondern eine calciumunabhängige PKC an der Aktivierung der ERK-Kaskade beteiligt ist.

Demnach handelt es sich hier bei den in Frage kommenden PKC-Isoformen nach Tabelle 1 (Dean, 1997) um die n-PKCs (*novell*), da bei dieser Gruppe die ERK-Aktivierung calciumunabhängig und phorbolsterabhängig verläuft.

Berk vermutet nach mechanischer Belastung von Endothelzellen über „*Fluid-shear-stress*“, daß eine calciumunabhängige PKC in die MAP-Kinase-Aktivierung (speziell die Isoformen ERK1 und ERK2) involviert ist (Berk *et al.*, 1995).

Für Traub ist die  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängige PKC- $\epsilon$  aus der Gruppe der n-PKC's für die Aktivierung von ERK1 und ERK2 in Endothelzellen verantwortlich (Traub *et al.*, 1997). Auch hier erfolgte die mechanische Belastung von Endothelzellen über „*Fluid-shear-stress*“, mit einem Maximum an ERK1/ERK2-Aktivität nach 10 Minuten. Durch die Behandlung der Zellen mit einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelator (BAPTA-AM), blieb die ERK1/2-Aktivierung unbeeinträchtigt. Mit isoformenspezifischen Antikörpern wurde hier nachgewiesen, dass in Endothelzellen die PKC-Isoformen  $\alpha$ ,  $\epsilon$  und  $\xi$  vorkommen, von denen nur die PKC- $\epsilon$  in der Gruppe der n-PKC's zu finden ist (s. Punkt 3.6.1).

Wenn die PKC- $\epsilon$  für die ERK1/2-Aktivierung auch in mechanisch deformierten Osteoblasten verantwortlich sein sollte, stellt sich die Frage, wie diese PKC-Isoform aktiviert wird.

Mechanische Deformation in Osteoblasten führt zu einer Aktivierung der Phospholipase C (Jones D.B. & Bingmann D., 1991). PLC katalysiert die Spaltung des Membranlipids Phosphatidyl-Inositol-4,5-Bisphosphat zu den sog. Second Messengern Inositol-1,4,5-Trisphosphat und Diacylglycerol. DAG aktiviert eine Proteinkinase C vom calciumabhängigen c-Typ.

PKC- $\epsilon$  kann ähnlich wie die Isoformen vom c-Typ durch Diacylglycerol aktiviert werden (Newton, 1995).

Desweiteren könnten Phosphatidyl-Inositol-4,5-Bisphosphat und Inositol-3,4,5-Trisphosphat für die Aktivierung von PKC- $\epsilon$  verantwortlich sein. Beide Membranlipide werden durch die PI 3-Kinase generiert (s. Punkt 3.8) und aktivieren selektiv die PKC-Isoformen der n-Gruppe, während sie wenig Einfluss auf die Isoformen der „klassischen“ c-Gruppe zeigen (Liscovitch & Cantley, 1994). Andere Studien zeigen, dass die Aktivierung von PKC- $\epsilon$  sowohl durch die PI 3-Kinase, als auch durch die Phospholipase C verlaufen kann; allerdings abhängig von der Zellspezifität und von der Art des zugeführten mechanischen Reizes (Moriya *et al.*, 1996).

Berk stellt anhand von Untersuchungen an mechanisch belasteten Endothelzellen („*Fluid-shear-stress*“) ein Modell auf, in dem sowohl calciumabhängige, als auch calciumunabhängige Signalwege involviert sind. Beide Signalwege sind über Integrinmatrix-Interaktionen miteinander verbunden (Berk *et al.*, 1995).

Hier sollte auch noch speziell auf die PI 3-Kinase (s. Punkt 3.8) im Zusammenhang mit der ERK-Aktivierung durch mechanische Stimulation eingegangen werden.

Ikeda stellte anhand von Inhibitorexperimenten an Endothelzellen fest, daß die PI 3-Kinase an der belastungsinduzierten („*Fluid-shear-stress*“) ERK1/2-Aktivierung beteiligt ist (Ikeda *et al.*, 1999a). Als PI 3-Kinase-Inhibitoren kamen hier Wortmannin, welcher je ERK1 und ERK2 teilweise und in unterschiedlicher Intensität inhibierte, und LY294002, der ERK1 komplett und ERK2 teilweise inhibierte, zum Einsatz. Dies zeigt, daß die belastungsinduzierte ERK1/2-Aktivierung an Endothelzellen zumindest teilweise von der PI 3-Kinase abhängig ist.

Die Spezifität der PI 3-Kinase in Verbindung mit den PKC-Isoformen der  $\alpha$ -Gruppe, insbesondere die PI 3-Kinase-Aktivität in Abhängigkeit der mechanischer Dehnung von Osteoblasten sollte in der Zukunft Gegenstand von weiteren Untersuchungen sein.

#### Integrine:

In verschiedenen Studien wurde gezeigt, das auch die Integrine (s. Punkt 3.8) an der Mechanotransduktion beteiligt sein können.

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

Schmidt stellte bei der mechanischen Belastung von U-2OS-Zellen fest, daß es zu einem Anstieg der Tyrosinphosphorylierung bzw. zur Aktivierung der MAP-Kinase kommt, verbunden mit einem Integrin-Clustering. Die Aktivierung der MAP-Kinase durch Integrine hängt von einem intakten Zytoskelett und der Anwesenheit zytoskelett-assoziiierter Signalmoleküle wie FAK ab (Schmidt *et al.*, 1998).

Die mechanische Belastung erfolgte über magnetische Mikrokörnchen mit einem Überzug von Integrinantikörpern. Diese Körnchen wurden zur mechanischen Reizung der Oberflächenrezeptoren auf den Zellen inkubiert und einem magnetischem Feld ausgesetzt.

Allerdings ist hier der Betrag der Belastung nicht an allen Punkten des Zellmonolayers gleich, was zu einem ungenauen Ergebnis führen könnte.

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

Integrine zeigen sich auch als Mechanorezeptoren in Endothelzellen. Mechanische Belastung angewandt auf Kapillar-Endothelzellen führt zur Organisation fokaler Adhäsionsherde und erhöht die Spannung des Zytoskeletts, über das Integrine mechanische Stimulation vermitteln (Salter *et al.*, 1997).

Shyy und Chien sind der Meinung, daß Integrine nach Belastung von Endothelzellen („*Fluid shear-stress*“) und von Herzmyozyten (Dehnung) folgendermaßen als Mechanotransduktoren reagieren (Shyy & Chien, 1997):

Durch das „*Clustering*“ (Quervernetzung und Zusammenlagerung der Integrin-Rezeptoren) kommt es zur Ansammlung von FAK und *Src*. Die Integrin-EZM-Interaktion induziert die Autophosphorylierung von FAK, diese Phosphorylierung unterstützt die Bindung von *Src* an FAK, *Src* phospholyliert FAK, so daß das „*Docking-Protein*“ *Grb2* gebunden werden kann. Dadurch wird die GTPase Ras stimuliert was zur Aktivierung von ERK und schließlich zur Gen-Expression führt.

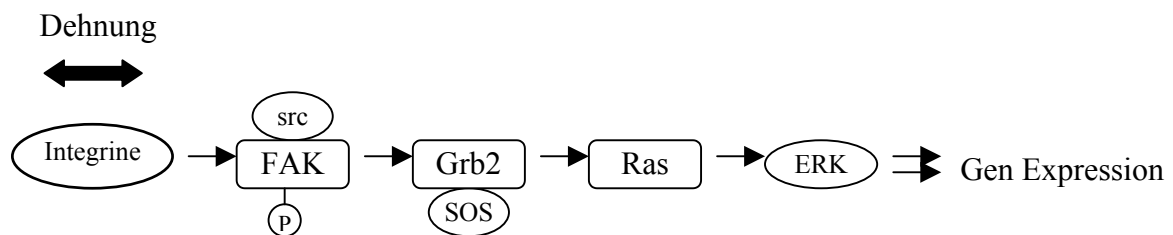


Abbildung 23 Möglicher Signalweg der Mechanotransduktion als Antwort auf mechanische Belastung in Endothelzellen und Herzmyozyten (modifiziert nach Shyy & Chien, 1997) Autophosphorylierung von FAK, diese Phosphorylierung unterstützt die Bindung von *Src* an FAK, *Src* phospholyliert FAK, so daß das „*Docking-Protein*“ *Grb2* gebunden werden kann. Dadurch wird die GTPase Ras stimuliert und ERK aktiviert.

Als weitere Möglichkeiten zur Aktivierung der ERKs werden Nicht-Rezeptortyrosinkinase (NRTKs) diskutiert (s. 3.7.1.3 und Abbildung 1). Über diesen Signalweg sollen Mitglieder der Januskinasefamilie (JAK) aktiviert werden, die Rezeptorsignale der Membran zunächst umformen, um dann weiter „*downstream*“ in der ERK-Kaskade zu operieren (Barinaga, 1995). Außerdem kommt es in Osteoblasten durch PTH-Stimulation zu einer Ausschüttung von Interleukin-6 mit nachfolgender Aktivierung besonders des JAK/STAT-Signalweges, aber auch der ERK-Kaskade (Bellido *et al.*, 1997). Desweiteren können Januskinasen über bestimmte Zytokinrezeptoren an der Membran direkt STAT-Isoformen durch Tyrosinphosphorylierung aktivieren, die dann für den Vorgang der Transkription in den Zellkern translozieren (Hefti *et al.*, 1997).

Die oben beschriebenen Experimente belegen, dass die ERK-Aktivierung von der Aktivierung der Proteinkinase C abhängig ist. Es stellt sich nun die Frage, ob ERK1 und ERK2 direkt durch PKC aktiviert wird, oder ob dies, wie häufig in der Literatur beschrieben, über den Signalweg der ERK-Kaskade Raf-MEK-ERK verläuft (Chaudhary & Avioli, 1998).

Der Beweis kann über die Inhibierung eines der „*Upstream*“-Komponenten der Kaskade, z.B. von MEK, erfolgen. Der Einsatz des MEK-Inhibitors PD98059 zeigte eine konzentrationsabhängige Inhibierung von ERK1 und ERK2, sowohl an durch IGF stimulierten Osteosarkomzellen (Zhang *et al.*, 1999), als auch an durch EGF stimulierten Epithelzellen von > 95% (Reiners *et al.*, 1998). Das heißt, dass die ERK-Aktivierung abhängig von MEK (MAP-Kinase-Kinase) ist und dass die ERK-Aktivierung wirklich innerhalb der Kaskade verläuft. Fraglich ist derzeit noch, ob das Ras-Protein auch Einfluß auf diese Kaskade hat, oder ob die PKC direkt Raf aktiviert (s. Punkt 3.6.1 und (Seeger & Krebs, 1995)). Dies Problem könnte in der Zukunft mit einem Ras-Inhibitorexperiment geklärt werden.

Im „Labor für Experimentelle Orthopädie und Biomechanik der Philipps-Universität Marburg“ finden zur Zeit ebenfalls Inhibitorexperimente mit dem MEK-Inhibitor PD98059 an mechanisch stimulierten Osteoblasten statt (s. unveröffentlichte Daten von Leitsch, J).

Bisher war in der Literatur bekannt, daß eine MAP-Kinase in Osteoblasten durch Wachstumsfaktoren aktiviert werden kann.

Diese neuen Ergebnisse zeigen, das die beiden Isoformen der MAP-Kinase ERK1 und ERK2 in Osteoblasten durch mechanische Belastung der Zellen aktiviert werden können.

Während die Signale ausgelöst durch Wachstumsfaktoren via Rezeptortyrosinkinasen über SHC-Grb2-SOS-Ras an die ERK-Kaskade weitergeleitet werden (Vanderkuur *et al.*, 1997), ist aus dieser Arbeit hervorgegangen, daß zumindest die Proteinkinase C in die Aktivierung der ERKs durch mechanische Belastung involviert ist. Desweiteren wurde geklärt, daß dieser Vorgang unabhängig von der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ist.

Nach der Ergebnisauswertung des Experimentes mit dem PLC-Inhibitor konnte nicht eindeutig geklärt werden, ob die Erstreaktion in den Osteoblasten nach mechanischer Belastung eine PLC-Aktivierung ist.

In den Studien von Jones (Jones D.B. & Scholuebbbers J.G., 1987) und Carvalho (Carvalho *et al.*, 1994) ist diese Erstreaktion nach mechanischer Belastung eine PLC-Aktivierung. Letzterer Autor benutzt für die Osteoblasten allerdings Dehnungskräfte von ca. 10.000  $\mu\text{Strain}$ , welche sich also nicht mehr im physiologischen, sondern schon im hyperphysiologischen Bereich befinden und somit die Interpretation der Ergebnisse mit Vorsicht betrachtet werden sollte.

Andererseits wird nach mechanischer Belastung von Herzmyozyten zwar ebenfalls eine Aktivierung von ERK1/ERK2 erreicht (Yamazaki *et al.*, 1995), doch hier wird eine direkte PKC-Aktivierung nach der mechanischen Belastung vermutet (Hefti *et al.*, 1997; Yamazaki *et al.*, 1995).

Zusammenfassend läßt sich folgendes festhalten:

Diese Arbeit konnte bezüglich der Mechanotransduktion in gedehnten Osteoblasten folgendes aufzeigen (s. Abbildung 24):

- Erstens ist in diesem Signalweg eine Proteinkinase C involviert.
- Zweitens benötigt diese Proteinkinase C keine erhöhte intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration.
- Drittens ist an diesem Signalweg möglicherweise eine Phospholipase C beteiligt, auch wenn dies konträr zum letztgenannten erscheint.



Grundsätzlich sind nun folgende Modelle bezüglich des Einflusses der PLC und PKC auf die Aktivierung von ERK1 und ERK2 denkbar:

- I.** Die Erstreaktion nach Dehnung der Zellen ist eine unmittelbare PLC-Aktivierung, welche weiter über eine  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige PKC in die ERK-Kaskade eingreift
- II.** Nach Dehnung der Zellen folgt die integrinvermittelte Aktivierung der PI 3-Kinase mit Aktivierung einer calciumunabhängigen PKC (möglicherweise die Isoform PKC- $\epsilon$ ), welche in die ERK-Kaskade eingreift (s.o. Serca-Inhibitor-Experiment und Literaturhinweise)
- III.** Der Erstreaktion nach Dehnung der Zellen folgt sowohl die Aktivierung einer calciumabhängigen PKC via PLC, als auch einer calciumunabhängigen PKC (eventuell PKC- $\epsilon$ ), welche möglicherweise über Integrinmatrix-Interaktionen miteinander verbunden sind (Berk *et al.*, 1995).
- IV.** Der Erstreaktion nach Dehnung der Zellen ist ein Integrin-Clustering mit Aktivierung der ERK-Kaskade über FAK-Grb2-Ras-ERK

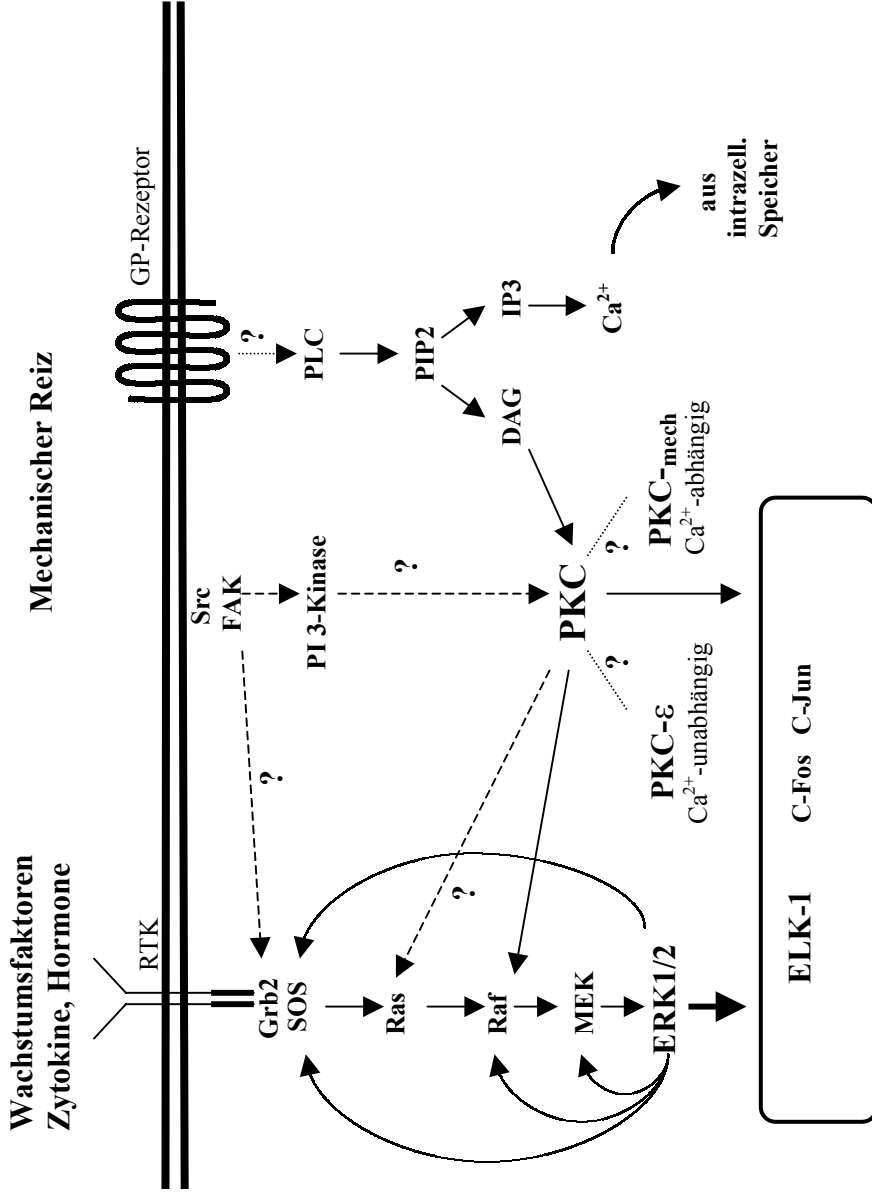


Abbildung 24 Schematische Darstellung über die mögl. Funktionsweise intrazellulärer Signaltransduktionswege (modifiziert nach Hefti *et al.*, 1997 und Barinaga, 1995)  
 Die Abbildung zeigt rechts den Signalweg in Osteoblasten, der durch Applikation eines mechanischen Reizes ausgelöst werden kann. Dieser Weg verläuft über PLC-PIP2 und kann über IP3 Ca<sup>2+</sup> aus intrazellulären Speichern freisetzen und entweder über DAG eine calciumabhängige PKC aktivieren, oder durch den mechanischen Reiz wird integrin- und PI 3-Kinase-vermittelt eine calciumunabhängige PKC (evtl. PKC-ε) aktiviert (Mitte). In beiden Fällen erfolgt die Aktivierung der ERK-Kaskade, entweder über das Ras-Protein, oder direkt über Raf. Möglicherweise kommt es direkt zu einer integrinvermittelten Aktivierung der ERK-Kaskade über FAK/Grb2/SOS. Der linke Signalweg wird durch Wachstumsfaktoren, Zytokine und Hormone an Rezeptortyrosinkinasen aktiviert, läuft über Grb2-SOS-ERK-Kaskade und endet in der Phosphorylierung von ERK1 und ERK2, bzw. der Phosphorylierung der Transkriptionsfaktoren im Zellkern. Es sind außerdem mögliche Feedback-Mechanismen von ERK1/ERK2 dargestellt, mit den Substraten MEK/Raf/SOS.

Es ist offensichtlich, daß die mechanische Stimulierung von Osteoblasten, aber auch eine Vielzahl extrazellulärer Stimuli essentiell für die Aktivierung von MAP-Kinase-Signalwegen und schließlich der Transkriptionsfaktoren im Zellkern ist. Wie gezeigt spielen PLC, PKC, sowie die einzelnen Komponenten der ERK-Kaskaden hier eine entscheidende Rolle.

Zukünftige Forschungsarbeiten sollten die Rolle der PLC in der Mechanotransduktion klären, d.h.: ist die PLC wirklich in die Erstreaktion nach mechanischer Belastung involviert.

Es muß mit PKC-Isoformspezifischen Antikörpern gezeigt werden, ob die PKC-  $\epsilon$  auch in Osteoblasten calciumunabhängig aktiviert werden kann. In Muskelzellen und Endothelzellen konnte dies bereits gezeigt werden (s.o. Diskussion).

Die Spezifität der PI 3-Kinase nach mechanischer Dehnung von Osteoblasten in Verbindung mit der Aktivierung von PKC-Isoformen der  $\eta$ -Gruppe sollte in der Zukunft ebenfalls Gegenstand von weiteren Untersuchungen sein (z.B.: Inhibitorexperimente gegen PI 3-Kinase).

Vielleicht ist aber auch eine ganz andere PKC verantwortlich. Dies könnte man mit dem Einsatz von spezifischen Inhibitoren der verschiedenen PKC-Isoformen ( $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig/unabhängig) klären.

Weiterer Aufklärungsbedarf besteht bei dem Einfluß der Integrine auf die ERK-Aktivierung.

In bezug auf die Aktivierung der ERK-Kaskade liegen die Feedback-Mechanismen der ERKs, die teilweise ungeklärten Effektoren der Ras-Familie, sowie die unklare Aktivierung der Raf-Kinase an der Membran noch im Dunkeln und sollten Ziel der weiteren Forschung sein.

Da die Versuchsaufbauten zur Zelldehnung bei Muskel- und Endothelzellen in den oben genannten Studien, bzw. der Osteoblasten mit unserer Methode verschieden sind, sollte geklärt werden, ob die unterschiedlichen Ergebnisse bezüglich der PLC-PKC-ERK-Aktivierung nicht nur zellspezifisch, sondern auch versuchsaufbauspezifisch sind.

Bei Folgearbeiten zu diesem Thema mit dem Western-Blot-Verfahren und anschließendem Antikörpernachweis sollte nicht nur eine qualitative, sondern auch eine quantitative Aussage bezüglich der Ergebnisse gemacht werden. Als quantitative Detektionsmethode ist hier das Verfahren der Densitometrie sehr hilfreich.

In bezug auf die Dehnungsvorgang der Osteoblasten mit der 4-Punkt-Dehnungsmaschine, sollten in der Zukunft noch weitere Experimente erfolgen, die eine Aussage darüber erlauben, bei welcher minimalen Dehnungskraft noch eine ERK-Aktivierung stattfindet bzw. ob diese aufzubringende Kraft noch eine physiologische, oder schon eine hypophysiologischen Dehnungskraft darstellt. Frühere Studien ergaben, das Osteoblasten *in vitro* nicht mehr auf Dehnungsreize von 300 $\mu$ Str reagieren (Jones D.B. *et al.*, 1991) und *in vivo* ebenfalls bei geringen Dehnungsamplituden eine geringe Aktivität zeigten (Lanyon L.E., 1984). Hyperphysiologische Dehnungsreize von 10000 $\mu$ Strain äußerten sich in einer De-Differenzierung der Osteoblasten sowie einer Veränderung der Zellmorphologie (Jones D.B. *et al.*, 1991).

Außerdem sollte ermittelt werden, ob die Zellen auf eine geringere Anzahl von Dehnungszyklen, als die 30 Zyklen wie in den oben beschriebenen Experimenten angewendet, reagieren.

Wie bereits deutlich wurde besteht der Komplex der Mechanotransduktion aus vielen einzelnen Signalwegen, die untereinander in Verbindung stehen und sich gegenseitig beeinflussen können (s. Abbildung 24).

Die momentan noch limitierten Kenntnisse über diese Mechanismen zeigen, daß zukünftig noch viele Faktoren bezüglich kinaseabhängiger Signalwege in Osteoblasten geklärt werden müssen.

## 7 Zusammenfassung

Die Applikation mechanischer Kräfte auf Zellen führt in einer Vielzahl von Zelltypen zu einer Steigerung der Proliferation und einer veränderten Differenzierungsleistung. Diese Kräfte sind der fundamentelle Faktor zur Regulation der Struktur und Funktion in den verschiedenen Geweben. Im Knochen stimuliert die mechanische Belastung einen Anstieg der Knochenmasse und spielt eine entscheidene Rolle in der Therapie der Osteoporose. Die Mechanismen der mechanisch stimulierten Signaltransduktion (Mechanotransduktion) sind in Osteoblasten größtenteils noch ungelöst.

Die Signalkaskaden der MAP-Kinase (*mitogen activated protein kinase*) spielen eine wesentliche Rolle bei der Antwort von Osteoblasten auf eine Vielzahl aktiver extrazellulärer Reize innerhalb des Knochens.

MAP-Kinasen werden unter anderem durch mechanische Belastung, Hormone und Wachstumsfaktoren stimuliert. Aktivierte MAP-Kinase phosphoryliert genregulatorische Proteine mit der Folge einer veränderten Differenzierung und Proliferationsrate der Zelle.

Die vorgelegte Untersuchung verfolgte das Ziel, darzustellen, wie sich mechanische und chemische Stimulation oder Inhibition boviner Osteoblasten auf ERK1 und ERK2, zwei Isoformen der MAP-Kinase, auswirken und welche „*up-stream*“ liegenden Reaktionen dem vorausgehen.

Grundlage dieser Arbeit ist der von Jones D.B. entdeckte Anstieg der PLC direkt nach mechanischer Stimulation von Osteoblasten mit einer definitiven, physiologischen Kraft.

Alle Nachweise erfolgten durch die Auftrennung der Proteine im Western-Blot-Verfahren mit anschließendem Immunoblot mittels eines Antikörpers gegen die Isoformen der MAP-Kinase (ERK1 und ERK2).

Nachdem bereits bekannt war, daß bovine Osteoblasten auf mechanische Stimulierung mit der 4-Punkt-Dehnungsmaschine (4000 $\mu$ str/30 Zyklen/1 Hz) mit einer Aktivierung von ERK1 und ERK2 reagieren, wurde mit weiteren Experimenten bestätigt, daß diese Aktivierung in einem Zeitraum von 2-10 Minuten nach Dehnung erfolgt, mit einem Maximum nach 5 Minuten.

Dehnungsexperimente der humanen Osteosarkom-Zelllinie MG-63 zeigten ebenfalls nach 5 Minuten eine Aktivierung von ERK1 und ERK2 .

Diese Aktivierung konnte in Osteoblasten auch nach Zugabe des Phorbolesters TPA, des Wachstumshormons EGF (*epidermal growth factor*) und des Parathormons nachgewiesen werden (Positivkontrollen der Inhibitorversuche).

Inwieweit die Proteinkinase C in die Aktivierung von ERK1/ERK2 involviert ist, zeigte sich nach Behandlung der Zellen mit einem PKC-Inhibitor und nachfolgender Dehnung. Es ließ sich eine konzentrationsabhängige Inhibierung von ERK1/ERK2 darstellen, somit erfolgt die Aktivierung von ERK1/ERK2 über die Proteinkinase C.

In weiteren Experimenten sollte der Einfluß des Membranlipids Phospholipase C, welche bekanntermaßen die „*downstream*“ liegende Komponente Proteinkinase C aktiviert, auf die Aktivierung von ERK1/ERK2 untersucht werden. Bei Behandlung der Osteoblasten mit einem spezifischen PiPLC-Inhibitor und nachfolgender Dehnung konnte keine vollständige Inhibierung, sondern ein abgeschwächtes ERK-Signal gezeigt werden. Dies beweist möglicherweise, daß der extrazelluläre Reiz der mechanischen Dehnung über die intrazellulär gelegene und membranständige Phospholipase C verläuft.

Schließlich wurde mittels eines Inhibitors der Calcium-ATPase des Endoplasmatischen Retikulums ein Einfluß der intrazellulären Calciumkonzentration auf die ERK-Aktivierung nach mechanischer Dehnung ausgeschlossen.

Eine Stimulation der Osteoblasten durch mechanische Deformation, die durch die ERK-Aktivierung angezeigt wurde, verläuft möglicherweise über die membranständige PLC, wobei die Proteinkinase C in diesem Signalweg involviert ist. Die intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Konzentration hat keinen Einfluß auf diese Aktivierung. Dies würde dafür sprechen, das eine calciumunabhängige Proteinkinase C beteiligt ist.

Die durch eine Reihe möglicher Signalkaskaden untereinander in Verbindung stehenden Signalwege können sich gegenseitig beeinflussen. Aufgrund dieser komplexen Zusammenhänge kann verständlicherweise eine vollständige Aufklärung über die Weiterleitung mechanischer Reize in Osteoblasten nur mit weiteren Untersuchungen erreicht werden.

## 8 Literatur

- BARINAGA M. (1995) Cell biology - 2 major signaling pathways meet at map-kinase. *Science* **269**, 1673-1673.
- BELLIDO T., BORBA V.Z., ROBERSON P. & MANOLAGAS S.C. (1997) Activation of the Janus kinase/STAT (signal transducer and activator of transcription) signal transduction pathway by interleukin-6-type cytokines promotes osteoblast differentiation. *Endocrinology* **138**, 3666-3676.
- BERK B.C., CORSON M.A., PETERSON T.E. & TSENG H. (1995) Protein kinases as mediators of fluid shear stress stimulated signal transduction in endothelial cells: a hypothesis for calcium-dependent and calcium-independent events activated by flow. *J.Biomech.* **28**, 1439-1450.
- BERRIDGE M.J. (1993) Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* **361**, 315-325.
- BILLIAU A., EDY V.G., HEREMANS H., VAN DAMME J., DESMYTER J., GEORGIADES J.A. & DE SOMER P. (1977) Human interferon: mass production in a newly established cell line, MG- 63. *Antimicrob.Agents Chemother.* **12**, 11-15.
- BINGMANN D., SCHIRRMACHER K. & JONES D.B. (1994) Signaling in bone - electrophysiological studies on cultured- cells derived from calvarial fragments of rats. *Cells And Materials* **4**, 275-285.
- BOGRE L., LIGTERINK W., HEBERLEBORS E. & HIRT H. (1996) Mechanosensors in plants. *Nature* **383**, 489-490.
- BOGUSKI M.S. & MCCORMICK F. (1993) Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature* **366**, 643-654.
- BOULTON T.G. & COBB M.H. (1991) Identification of multiple extracellular signal-regulated kinases (ERKs) with antipeptide antibodies. *Cell Regul.* **2**, 357-371.
- BOULTON T.G., YANCOPOULOS G.D., GREGORY J.S., SLAUGHTER C., MOOMAW C., HSU J. & COBB M.H. (1990) An insulin-stimulated protein kinase similar to yeast kinases involved in cell cycle control. *Science* **249**, 64-67.
- BRADFORD M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Analytical.Biochem.* **72**:248-254.
- BRIGHTON C.T., STRAFFORD B., GROSS S.B., LEATHERWOOD D.F., WILLIAMS J.L. & AND POLLACK S.R. (1991) The proliferative and synthetic response of isolated calvarial bone cells of rats to cyclic biaxial mechanical strain. *J.Bone Joint Surg.* **73A**, 320-331.

- BUDAY L. & DOWNWARD J. (1993) Epidermal growth factor regulates p21ras through the formation of a complex of receptor, Grb2 adapter protein, and Sos nucleotide exchange factor. *Cell* **73**, 611-620.
- BURRIDGE K., FATH K., KELLY T., NUCKOLLS G. & TURNER C. (1988) Focal adhesions - transmembrane junctions between the extracellular- matrix and the cytoskeleton. *Annual Review Of Cell Biology* **4**, 487-525.
- CAILLOT-AUGUSSEAU A., LAFAGE-PROUST M.H., SOLER C., PERNOD J., DUBOIS F. & ALEXANDRE C. (1998) Bone formation and resorption biological markers in cosmonauts during and after a 180-day space flight (Euromir 95). *Clin.Chem.* **44**, 578-585.
- CARVALHO R.S., SCOTT J.E., SUGA D.M. & YEN E.H.K. (1994) Stimulation of signal-transduction pathways in osteoblasts by mechanical strain potentiated by parathyroid-hormone. *Journal Of Bone And Mineral Research* **9**, 999-1011.
- CHAUDHARY L.R. & AVIOLI L.V. (1997) Activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 (ERK1 and ERK2) by FGF-2 and PDGF-BB in normal human osteoblastic and bone marrow stromal cells: differences in mobility and in-gel renaturation of ERK1 in human, rat, and mouse osteoblastic cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **238**, 134-139.
- CHAUDHARY L.R. & AVIOLI L.V. (1998) Identification and activation of mitogen-activated protein (MAP) kinase in normal human osteoblastic and bone marrow stromal cells: attenuation of MAP kinase activation by cAMP, parathyroid hormone and forskolin. *Mol.Cell Biochem.* **178**, 59-68.
- CLOHISY J.C., SCOTT D.K., BRAKENHOFF K.D., QUINN C.O. & PARTRIDGE N.C. (1992) Parathyroid hormone induces c-fos and c-jun messenger RNA in rat osteoblastic cells. *Mol.Endocrinol.* **6**, 1834-1842.
- COMPTON S.J. & JONES C.G. (1985) Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Anal.Biochem.* **151**, 369-374.
- COWIN S.C. (1998) On mechanosensation in bone under microgravity. *Bone* **22**, 119S-125S.
- DAUM G., EISENMANN-TAPPE I., FRIES H.W., TROPPEMAYER J. & RAPP U.R. (1994) The ins and outs of Raf kinases. *Trends.Biochem.Sci.* **19**, 474-480.
- DEAN, N. M. Protein Kinase C - A short summary. Insights- The newsletter of Signal Transduction 3, No.1, 1-2. 1997. Transduction Laboratories. (GENERIC)  
Ref Type: Magazine Article
- DODDS R.A., ALI N., PEAD M.J. & LANYON L.E. (1993) Early loading-related changes in the activity of glucose-6-phosphate- dehydrogenase and alkaline-phosphatase in osteocytes and periosteal osteoblasts in rat fibulae invivo. *Journal Of Bone And Mineral Research* **8**, 261-267.
- DUNCAN R.L. & TURNER C.H. (1995) Mechanotransduction and the functional response of bone to mechanical strain. *Calcif.Tissue Int.* **57**, 344-358.



- FUJIMORI A., CHENG S.L., AVIOLI L.V. & CIVITELLI R. (1992) Structure-function relationship of parathyroid hormone: activation of phospholipase-C, protein kinase-A and -C in osteosarcoma cells. *Endocrinology* **130**, 29-36.
- GRZESIK W.J. (1997) Integrins and bone--cell adhesion and beyond. *Arch.Immunol.Ther.Exp.(Warsz.)* **45**, 271-275.
- HEFTI M.A., HARDER B.A., EPPENBERGER H.M. & SCHAUB M.C. (1997) Signaling pathways in cardiac myocyte hypertrophy. *J.Mol.Cell Cardiol.* **29**, 2873-2892.
- HIPSKIND R.A. & BILBE G. (1998) MAP kinase signaling cascades and gene expression in osteoblasts [In Process Citation]. *Front.Biosci.* **3:D804-16**, D804-D816
- HULLEY P.A., GORDON F. & HOUGH F.S. (1998) Inhibition of mitogen-activated protein kinase activity and proliferation of an early osteoblast cell line (MBA 15.4) by dexamethasone: role of protein phosphatases. *Endocrinology* **139**, 2423-2431.
- HUNG C.T., HENSHAW D.R., WANG C.C., MAUCK R.L., RAIA F., PALMER G., CHAO P.H., MOW V.C., RATCLIFFE A. & VALHMU W.B. Mitogen-activated protein kinase signaling in bovine articular chondrocytes in response to fluid flow does not require calcium mobilization. *J.Biomech.2000.Jan.;33.(1.):73.-80.* **33**, 73-80.
- IKEDA M., KITO H. & SUMPIO B.E. (1999a) Phosphatidylinositol-3 kinase dependent MAP kinase activation via p21ras in endothelial cells exposed to cyclic strain. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **257**, 668-671.
- IKEDA M., TAKEI T., MILLS I., KITO H. & SUMPIO B.E. (1999b) Extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 activation in endothelial cells exposed to cyclic strain. *Am.J.Physiol.* **276**, H614-H622
- JONES D.B. & BINGMANN D. (1991) How do osteoblasts respond to mechanical stimulation? *Cells and Methods* **1**, 329-340.
- JONES D.B., LEIVSETH G., SAWADA Y., VAN DER SLOTEN J. & BINGMANN D. (1993) Application of homogenous, defined strains to cell cultures. In *Society for Experimental Biology Seminar Series 54:Biomechanics and Cells*. Eds F.Lyall & A.J.El Haj. Cambridge: Cambridge University Press. pp. 197-219.
- JONES D.B., NOLTE H., SCHOLUBBERS J-G., TURNER E. & VELTEL D. (1991) Biochemical signal transduction of mechanical strain in osteoblast-like cells. *Biomaterials* **12**, 101-110.
- JONES D.B. & SCHOLUEBBERS J.G. (1987) Evidence that phospholipase C mediates the mechanical stress effect in bone. *Calcif.Tiss.Int.* **41**, supp p4
- JONES D.B. & SCHOLUEBBERS J.G. (1988) Mechanical stress transduction in OB-like cells. In *Fortschritte der Osteologie in Diagnostik und Therapie*. Eds Heuck F.H.W. & Keck E. Springer-Verlag. pp. 382-389.

- JONES D.B. & SCHOLUEBBERS J.G. (1989) A role for PI-phospholipase C in the medium of mechanical stress in bone surface cells. *Calcif.Tiss.Int.* **44(supp)**, S-97;P6
- JONES D., LEIVSETH G. & TENBOSCH J. (1995) Mechano-reception in osteoblast-like cells. *Biochem.Cell Biol.* **73**, 525-534.
- KATAN M. (1998) Families of phosphoinositide-specific phospholipase C: structure and function. *Biochim.Biophys.Acta* **1436**, 5-17.
- KLEINSCHROTH J., HARTENSTEIN J., RUDOLPH C. & SCHACHTELE C. (1993) Non-glycosidic/non-aminoalkyl-substituted indolocarbazoles as inhibitors of protein-kinase-c. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **3**, 1959-1964.
- KOLCH W., HEIDECKER G., KOCHS G., HUMMEL R., VAHIDI H., MISCHAK H., FINKENZELLER G., MARME D. & RAPP U.R. (1993) Protein kinase C alpha activates RAF-1 by direct phosphorylation. *Nature* **364**, 249-252.
- KOZAWA O., SUZUKI A., TOKUDA H. & UEMATSU T. (1997) Prostaglandin F2alpha stimulates interleukin-6 synthesis via activation of PKC in osteoblast-like cells. *Am.J.Physiol.* **272**, E208-E211
- KUMEGAWA M., HIRAMATSU M., HATEKEYAMA K., YAJIMA T., KODAMA H., OSAKI T. & KURISU K. (1983) Effects of epidermal growth factor on Osteoblastic Cells in vitro. *Calc.Tiss.Int.* **35**:542-548,.
- KYRIAKIS J.M., BANERJEE P., NIKOLAKAKI E., DAI T.A., RUBIE E.A., AHMAD M.F., AVRUCH J. & WOODGETT J.R. (1994) The stress-activated protein-kinase subfamily of c-jun kinases. *Nature* **369**, 156-160.
- LAEMMLI U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- LANYON L.E. (1984) Functional strain as a determinant for bone remodeling. *Calcif.Tiss.Int.* **36**, 556-561.
- LANYON L.E. (1996) Using functional loading to influence bone mass and architecture - objectives, mechanisms, and relationship with estrogen of the mechanically adaptive process in bone. *Bone* **18**, S-S
- LEE S.B. & RHEE S.G. (1995) Significance of PIP2 hydrolysis and regulation of phospholipase C isozymes. *Curr.Opin.Cell Biol.* **7**, 183-189.
- LEEVERS S.J., PATERSON H.F. & MARSHALL C.J. (1994) Requirement for Ras in Raf activation is overcome by targeting Raf to the plasma membrane. *Nature* **369**, 411-414.
- LISCOVITCH M. & CANTLEY L.C. (1994) Lipid second messengers. *Cell* **77**, 329-334.
- MACARA I.G., LOUNSBURY K.M., RICHARDS S.A., MCKIERNAN C. & BARSAGI D. (1996) The Ras superfamily of GTPases. *FASEB J.* **10**, 625-630.

- MCCABE L.R., KOCKX M., LIAN J., STEIN J. & STEIN G. (1995) Selective expression of fos- and jun-related genes during osteoblast proliferation and differentiation. *Exp.Cell Res.* **218**, 255-262.
- MOCHLY-ROSEN D. (1995) Localization of protein kinases by anchoring proteins: a theme in signal transduction. *Science* **268**, 247-251.
- MOREY-HORTON E.& ARNAUD S.B. (1985) Spaceflight and calcium metabolism. *The.physiologist.* **28**:9-12.
- MORIYA S., KAZLAUSKAS A., AKIMOTO K., HIRAI S., MIZUNO K., TAKENAWA T., FUKUI Y., WATANABE Y., OZAKI S. & OHNO S. (1996) Platelet-derived growth factor activates protein kinase C epsilon through redundant and independent signaling pathways involving phospholipase C gamma or phosphatidylinositol 3-kinase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **93**, 151-155.
- MOW V.C., WANG C.C. & HUNG C.T. (1999) The extracellular matrix, interstitial fluid and ions as a mechanical signal transducer in articular cartilage. *Osteoarthritis.Cartilage.* **7**, 41-58.
- NEWTON A.C. (1995) Protein kinase C: structure, function, and regulation. *J.Biol.Chem.* **270**, 28495-28498.
- PARTRIDGE N.C., BLOCH S.R. & PEARMAN A.T. (1994) Signal transduction pathways mediating parathyroid hormone regulation of osteoblastic gene expression. *J.Cell Biochem.* **55**, 321-327.
- POWIS G., SEEWALD M.J., GRATAS C., MELDER D., RIEBOW J. & MODEST E.J. (1992) Selective inhibition of phosphatidylinositol phospholipase C by cytotoxic ether lipid analogues. *Cancer Res.* **52**, 2835-2840.
- RAPUANO B.E. & BOCKMAN R.S. (1997) Protein kinase C-independent activation of a novel nonspecific phospholipase C pathway by phorbol myristate acetate releases arachidonic acid for prostaglandin synthesis in MC3T3-E1 osteoblasts. *Prostaglandins* **53**, 163-186.
- READ S.M. & NORTHCOTE D.H. (1981) Minimization of variation in the response to different proteins of the Coomassie blue G dye-binding assay for protein. *Anal.Biochem.* **116**, 53-64.
- REINERS J.J.J., LEE J.Y., CLIFT R.E., DUDLEY D.T. & MYRAND S.P. (1998) PD98059 is an equipotent antagonist of the aryl hydrocarbon receptor and inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *Mol.Pharmacol.* **53**, 438-445.
- RODAN S.B. & RODAN G.A. (1997) Integrin function in osteoclasts. *J.Endocrinol.* **154 Suppl:S47-56**, S47-S56
- SADOSHIMA J. & IZUMO S. (1993) Mechanical stretch rapidly activates multiple signal transduction pathways in cardiac myocytes: potential involvement of an autocrine/paracrine mechanism. *EMBO J.* **12**, 1681-1692.

- SALTER D.M., ROBB J.E. & WRIGHT M.O. (1997) Electrophysiological responses of human bone cells to mechanical stimulation: evidence for specific integrin function in mechanotransduction. *J.Bone Miner.Res.* **12**, 1133-1141.
- SCHIRRMACHER K., SCHMITZ I., WINTERHAGER E., TRAUB O., BRÜMMER F., JONES & BINGMANN D. (1992) Characterizations of Gap Junctions between Osteoblast-like Cells in Culture. *Calcif.Tissue* **51**, 285-290.
- SCHMIDT C., POMMERENKE H., DURR F., NEBE B. & RYCHLY J. (1998) Mechanical stressing of integrin receptors induces enhanced tyrosine phosphorylation of cytoskeletally anchored proteins. *J.Biol.Chem.* **273**, 5081-5085.
- SEGER R. & KREBS E.G. (1995) The MAPK signaling cascade. *FASEB J.* **9**, 726-735.
- SHYY J.Y. & CHIEN S. (1997) Role of integrins in cellular responses to mechanical stress and adhesion. *Curr.Opin.Cell Biol.* **9**, 707-713.
- SINGH A.T., KUNNEL J.G., STRIELEMAN P.J. & STERN P.H. (1999) Parathyroid hormone (PTH)-(1-34), [Nle(8,18),Tyr34]PTH-(3-34) amide, PTH-(1-31) amide, and PTH-related peptide-(1-34) stimulate phosphatidylcholine hydrolysis in UMR-106 osteoblastic cells: comparison with effects of phorbol 12,13-dibutyrate. *Endocrinology* **140**, 131-137.
- STOKOE D., MACDONALD S.G., CADWALLADER K., SYMONS M. & HANCOCK J.F. (1994) Activation of Raf as a result of recruitment to the plasma membrane [see comments] [published erratum appears in Science 1994 Dec 16;266(5192):1792-3]. *Science* **264**, 1463-1467.
- STURGILL T.W., RAY L.B., ERIKSON E. & MALLER J.L. (1988) Insulin-stimulated MAP-2 kinase phosphorylates and activates ribosomal protein S6 kinase II. *Nature* **334**, 715-718.
- TAKAHASHI M., ISHIDA T., TRAUB O., CORSON M.A. & BERK B.C. (1997) Mechanotransduction in endothelial cells: temporal signaling events in response to shear stress. *J.Vasc.Res.* **34**, 212-219.
- TAKASU H., GUO J. & BRINGHURST F.R. (1999) Dual signaling and ligand selectivity of the human PTH/PTHrP receptor. *J.Bone Miner.Res.* **14**, 11-20.
- TOWBIN H., STAHELIN T. & GORDON J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **76**, 4350-4354.
- TRAUB O., MONIA B.P., DEAN N.M. & BERK B.C. (1997) PKC-epsilon is required for mechano-sensitive activation of ERK1/2 in endothelial cells. *J.Biol.Chem.* **272**, 31251-31257.

- TURNER C.H., OWAN I., ALVEY T., HULMAN J. & HOCK J.M. (1998) Recruitment and proliferative responses of osteoblasts after mechanical loading in vivo determined using sustained-release bromodeoxyuridine. *Bone* **22**, 463-469.
- TYSON D.R., SWARTHOUT J.T. & PARTRIDGE N.C. (1999) Increased osteoblastic c-fos expression by parathyroid hormone requires protein kinase A phosphorylation of the cyclic adenosine 3',5'- monophosphate response element-binding protein at serine 133. *Endocrinology* **140**, 1255-1261.
- ULLRICH A. & SCHLESSINGER J. (1990) Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* **61**, 203-212.
- VANDERKUR J.A., BUTCH E.R., WATERS S.B., PESSIN J.E., GUAN K.L. & CARTER-SU C. (1997) Signaling molecules involved in coupling growth hormone receptor to mitogen-activated protein kinase activation. *Endocrinology* **138**, 4301-4307.
- VELDMAN C.M., SCHLAPFER I. & SCHMID C. (1998) Prostaglandin E2 stimulates sodium-dependent phosphate transport in osteoblastic cells via a protein kinase C-mediated pathway. *Endocrinology* **139**, 89-94.
- VERHEIJEN M.H. & DEFIZE L.H. (1995) Parathyroid hormone inhibits mitogen-activated protein kinase activation in osteosarcoma cells via a protein kinase A-dependent pathway. *Endocrinology* **136**, 3331-3337.
- WANG N., BUTLER J.P. & INGBER D.E. (1993) Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton [see comments]. *Science* **260**, 1124-1127.
- WIEMANN M., BUSSELBERG D., SCHIRRMACHER K. & BINGMANN D. (1998) A calcium release activated calcium influx in primary cultures of rat osteoblast-like cells. *Calcif.Tissue Int.* **63**, 154-159.
- WINSTON F.K., MACARAK E.J., GORFIEN S.F. & THIBAUT L.E. (1989) A system to reproduce and quantify the biomechanical environment of the cell. *Journal Of Applied Physiology* **67**, 397-405.
- WOLFF J. (1994) Das Gesetz der transformation der Knochen. p.152. A.Hirschwald.Berlin.1892.
- WON J.G. & ORTH D.N. (1995) Role of inositol trisphosphate-sensitive calcium stores in the regulation of adrenocorticotropin secretion by perfused rat anterior pituitary cells [published erratum appears in *Endocrinology* 1996 Mar;137(3):1041]. *Endocrinology* **136**, 5399-5408.
- WRONSKI T.J., MOREY-HOLTON E.R., DOTY S.B. & MAESE A.C. & WALSH C.C. (1987) Histomorphometric analysis of rat skeleton following spaceflight. *Am.J.Physiol.* **252**, 252-255.

- YAMAZAKI T., KOMURO I., KUDOH S., ZOU Y., SHIOJIMA I., MIZUNO T., TAKANO H., HIROI Y., UEKI K. & TOBE K. (1995) Mechanical stress activates protein kinase cascade of phosphorylation in neonatal rat cardiac myocytes. *J.Clin.Invest.* **96**, 438-446.
- ZHANG W., DZIAK R.M. & ALETTA J.M. (1995) EGF-mediated phosphorylation of extracellular signal-regulated kinases in osteoblastic cells. *J.Cell Physiol.* **162**, 348-358.
- ZHANG W., LEE J.C., KUMAR S. & GOWEN M. (1999) ERK pathway mediates the activation of Cdk2 in IGF-1-induced proliferation of human osteosarcoma MG-63 cells. *J.Bone Miner.Res.* **14**, 528-535.
- ZHOU X., LU X., RICHARD C., XIONG W., LITCHFIELD D.W., BITTMAN R. & ARTHUR G. (1996) 1-O-octadecyl-2-O-methyl-glycerophosphocholine inhibits the transduction of growth signals via the MAPK cascade in cultured MCF-7 cells. *J.Clin.Invest.* **98**, 937-944.

## 9 Anhang

### **Danksagung**

Ich danke Herrn Prof. Dr. D.B. Jones für die Überlassung des Themas der vorgelegten Untersuchung, für Motivation und guten Rat.

Herrn Dr. Jochen Tenbosch danke ich für die sehr engagierte und freundschaftliche Betreuung der Dissertation. Viele Anregungen sind von seiner Seite in die Arbeit eingegangen.

Bei den Herren Jürgen Leitsch und Arndt Guntermann bedanke ich mich für die geduldige Einführung in die methodischen Grundlagen, auf denen die von mir durchgeführten Experimente beruhen.

Dankbarkeit gebührt auch den medizinisch-technischen Assistentinnen des Labors für experimentelle Orthopädie und Biomechanik, die jederzeit hilfreich zur Seite standen und eine sehr angenehme und auch heitere Arbeitsatmosphäre verbreiteten.

Ich bedanke mich besonders bei meinen Eltern, die mich erst zu der Aufnahme einer Doktorarbeit ermuntert haben.

Last but not least gilt mein größter Dank meiner Frau Petra. Sie hat nicht nur Korrektur gelesen, sondern half mir auch über die Stunden des Zweifels hinweg, in denen Untersuchungen nicht recht vorwärtsgehen wollten.

**Ehrenwörtliche Erklärung**

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

*Charakterisierung der mechanosensitiven Signaltransduktion in Osteoblasten anhand der Extrazellulär Regulierten Kinase / ERK*

im Labor für experimentelle Orthopädie und Biomechanik  
unter Leitung von Prof. Dr.D.B. Jones

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

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