

**Expression und Regulation von BMP 2, 4, 5,
Osteocalcin, Bone Sialo Protein und Alkalischer
Phosphatase in primären
Osteoblasten-Zellkulturen und Leukozyten
von Patienten mit Hypo- und Hyperphosphatasie**

DISSERTATION

Regine Ortlepp

**Expression und Regulation von BMP 2, 4, 5,
Osteocalcin, Bone Sialo Protein und Alkalischer
Phosphatase in primären
Osteoblasten-Zellkulturen und Leukozyten
von Patienten mit Hypo- und Hyperphosphatasie**

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

**Vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena**

Von Regine Ortlepp

Geboren am 15.02.1978 in Friedrichroda

Gutachter

1.....

2.....

3.....

Tag der öffentlichen Verteidigung:.....

Abkürzungsverzeichnis

AK	Altersklassen
ALK	Aktivin Like Kinase
AP	Alkalische Phosphatase
AT	Annealing Temperatur
ATP	Adenosintriphosphat
BMD	Bone Mineral Density
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BMPR	Bone Morphogenetic Protein Rezeptor
Bp	Basenpaare
BSP	Bone Sialo Protein
Cbfa1	Core Binding Protein a1
cDNA	copy Desoxyribonukleinsäure
CED	Camurati Engelmann Disease
E	extrazellulär
FCS	Fetales Kälberserum
FAK	Fokale Adhäsionskinase
FGF	Fibroblasten Growth Factor
FKHR	Forkhead
FOP	Fibrodysplasia Ossificans Progressiva
HCDJ	Hyperostosis deformans juvenilis
IGF	Insulin Like Growth Factor
IHH	Indian Hedgehog
IL	Interleukin
nHPI	Hypophosphatasie
M	Mutter
MAPK	Mitogen Aktivierte Proteinkinase
NB	Normalbereich
N	nach
NP	Normalpersonen
OB	Osteoblasten
OC	Osteocalcin
ON	Osteonectin
OP	Osteopontin
OPG	Osteoprotegerin
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PGE	Prostaglandin E
PLP	Pyridoxalphosphat
PTH	Parathormon
Rh	Recombinant human
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Real Time
RXR	Retinoid-X-Rezeptor
SF	Serumfrei
SHH	Sonic Hedgehog
SIP	Smad Interacting Protein
STH	Somatotropes Hormon
TGFβ	Transforming Growth Factor beta

THPI	Transiente Hyperphosphatasie
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TNSALP	Tissue Nonspecific Alkaline Phosphatase
V	vor
VDR	Vitamin D Rezeptor
VDRE	Vitamin D Responsive Element

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	01-02
Inhaltsverzeichnis.....	03-05
1.0 Zusammenfassung.....	06-07
2.0 Einleitung.....	08-28
2.1 Bone Morphogenetic Protein.....	08-14
2.2 Mediatoren des Knochenstoffwechsels.....	14-17
2.3 Transkriptionsfaktoren des Knochenstoffwechsels.....	18
2.4 Einfluss von mechanischem Stress auf die Knochenstruktur.....	19
2.5 Marker des Knochenstoffwechsels.....	19-23
2.6 Erkrankungen des Knochenstoffwechsels.....	23-26
2.7 Therapie mit Bisphosphonaten.....	26-27
2.8 Die humane Osteosarkomzelllinie Saos2.....	27-28
3.0 Zielstellung.....	29
4.0 Material und Methoden.....	30-43
4.1 Probanden.....	30-32
4.2 Leukozyten aus peripherem Blut.....	32
4.3 Zellkultur.....	33-36
4.3.1 Osteosarkomzelllinie Saos2.....	33-35
4.3.2 Osteoblastenzellkultur.....	35-36
4.4 Darstellung der Aktivität der Alkalischen Phosphatase.....	36-37
4.5 Mikroskopie.....	37
4.6 RNA-Isolierung.....	38
4.7 cDNA-Synthese.....	38-39
4.8 Polymerase-Kettenreaktion.....	39-41
4.9 Auftrennung PCR-Produkte durch Agarosegel-Elektrophorese.....	41-42
4.10 Videogestützte Auswertung.....	42
4.11 Prinzip der Datenanalyse.....	42-43
4.12 Datenanalyse.....	43

5.0	Ergebnisse.....	44-71
5.1	Expression von Bone Morphogenetic Proteins(BMP) in peripheren Leukozyten.....	44
5.1.1	Expression von BMP in peripheren Leukozyten der Normalpersonen.....	44-45
5.1.2	Expression von BMP in peripheren Leukozyten der Patienten mit Hyperostosis Corticalis Deformans Juvenilis.....	45-48
5.1.3	Expression von BMP in peripheren Leukozyten der Patienten mit Transienter Hyperphosphatasie (THPI).....	48
5.1.4	Expression von BMP in peripheren Leukozyten des Patienten mit Hypophosphatasie (nHPI).....	49-50
5.2	Untersuchungen an humanen primären osteoblastären Zellen.....	50-65
5.2.1	Etablierung der primären Osteoblastenkulturen.....	50-53
	a) Morphologie und Wachstum der osteoblastären Zellen.....	50-52
	b) Nachweis der Aktivität der Alkalischen Phosphatase in osteoblastären Zellen.....	53
5.2.2	Untersuchungen zur Gen-Expression primärer Osteoblasten-Kulturen der Normalpersonen und des nHPI-Patienten.....	54-57
5.2.3	Inkubationsversuche.....	58-66
	a) Expression osteoblastärer Zellen der Normalpersonen und des nHPI-Patienten unter Vitamin D3 (1-25-OH D3).....	58-59
	b) Expression osteoblastärer Zellen der Normalpersonen und des nHPI-Patienten unter rekombinantem humanen BMP2 (rhBMP2) und der extrazellulären Domäne des BMPRIA (eALK3).....	59-62
	c) Expression osteoblastärer Zellen der Normalpersonen und des nHPI-Patienten unter Vitamin D3 (1-25-OH D3), rekombinantem humanen BMP2 (rhBMP2) und der extrazellulären Domäne des BMPRIA (eALK3).....	62-66
5.3	Untersuchungen an der Humanen Osteosarkomzelllinie Saos2.....	66-70
5.3.1	Nachweis der Aktivität der Alkalischen Phosphatase der Saos2-Zellen.....	66
5.3.2	Untersuchungen zur Gen-Expression in Saos2-Zellen.....	67-68

5.3.3	Inkubationsversuche.....	69-70
	a) Expression der Saos2-Zellen unter Vitamin D3 (1-25-OH D3).....	69
	b) Expression der Saos2-Zellen unter rekombinantem humanen BMP2 (rhBMP2) und der extrazellulären Domäne des BMPRIA (eALK3).....	69-70
	c) Expression der Saos2-Zellen unter Vitamin D3 (1-25-OH D3), rekombinantem humanen BMP2 (rhBMP2) und der extrazellulären Domäne des BMPRIA (eALK3).....	70-71
6.0	Diskussion.....	72-90
7.0	Schlussfolgerung.....	91-92
8.0	Literaturverzeichnis	
	Anhang	

1.0 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden isolierte humane periphere Leukozyten von gesunden Personen, als auch von Patienten mit Störungen des Knochenstoffwechsels auf die Expression von Genen des Bone Morphogenetic Protein-Systems untersucht. Patienten die an der HCDJ, bzw. an der THPI leiden weisen im Serum eine stark erhöhte, der nHPI-Patient eine erniedrigte Aktivität der Alkalischen Phosphatase (Apges, APbone, Ostase) auf. Es bestand bei allen drei Krankheitsbildern eine erhöhte Expression (Faktor 2-281) der BMP2-, BMP4-, BMP5- und BMPRIA-mRNA. Bei Kindern der präpubertalen Wachstumsphase als auch HCDJ-Patienten ist ein erhöhter Knochen-Umsatz bekannt. Beide Gruppen zeigten eine besonders hohe Expression der BMP2- und BMP5-mRNA. Leukozyten von Personen ohne gesteigerten Knochen-Umsatz z.B. Normalpersonen mit abgeschlossener Skelettentwicklung exprimierten vermehrt die BMP4-mRNA. Obwohl die Mutter der HCDJ-Patientin klinisch unauffällig war, wiesen ihre Leukozyten sehr hohe Expressionen der BMP-Gene, besonders der BMP2- (Faktor 16) und BMP5-mRNA (Faktor 48) auf. Diese Veränderungen sprechen am ehesten für die Anlagenschaft einer krankheitsverursachenden Mutation. Unter der Bisphosphonat-Therapie der an HCDJ erkrankten Tochter stieg die Expression der BMP-Gene an und entfernte sich weiter von den altersentsprechenden Normwerten, wobei es zu einem Angleich der BMP-Expression an die Expressionswerte der Mutter kam. Patienten mit einer Transienten Hyperphosphatasie (THPI) sind durch eine Erhöhung der Aktivität der Alkalischen Phosphatase, ohne klinisches oder röntgenologisches Korrelat charakterisiert. Eine vermehrte Expression der BMP-Gene in peripheren Leukozyten muss also nicht unweigerlich eine Veränderung der Knochenstruktur mit sich führen. Es wurde zusätzlich eine primäre Knochenzellkultur aus Knochenproben des nHPI-Patienten und gesunder Probanden angelegt. Die osteoblastären Zellen gesunder Probanden exprimierten die BSP1I-, OC-, AP-, BMP2-, BMP4- und BMP5-mRNA und befanden sich im Stadium der beginnenden Mineralisation. Die Hypophosphatasie äußert sich klinisch durch eine Mineralisationsstörung mit einem rachitisähnlichen Bild. Die Patientenzellen wiesen eine hohe Expression der Alkalischen Phosphatase bei fehlender Enzymaktivität, eine verspätete Zell-Konfluenz und daraus resultierend eine reduzierte Osteocalcin-Expression auf. Die in dieser Arbeit untersuchte Osteosarkomzelllinie Saos2 war durch eine ausgeprägt hohe Aktivität der Alkalischen Phosphatase bei fehlender Expression der OC-mRNA und Unfähigkeit

zur Mineralisation charakterisiert. Saos2-Zellen wiesen im Vergleich zu osteoblastären Zellen der Normalpersonen eine niedrige BMP4-Expression auf, die auch in den osteoblastären Zellen des nHPI-Patienten nachweisbar war. Das osteoinduktive BMP4 schien in der Osteoblastenkultur parallel zu der OC-mRNA reguliert zu sein. Unter 1-25-OH D3 zeigten osteoblastäre Zellen der Normalpersonen einen Anstieg der BMP4-mRNA, der den Saos2-Zellen, als auch den osteoblastären Zellen des nHPI-Patienten fehlte. Die veränderte Regulation von BMP4 und Osteocalcin könnte u.a. eine Ursache für eine gestörte Mineralisation sein. Die Saos2-Zellen mit einer hohen Aktivität der AP wiesen im Vergleich zu osteoblastären Zellen der Normalpersonen eine niedrige, die Zellen des nHPI-Patienten mit reduzierter AP-Aktivität eine hohe Expression der BMP5-mRNA auf. Eine direkte Regulation der BMP5-mRNA durch die AP, bzw. der AP durch die BMP5-mRNA konnte nicht nachgewiesen werden. In den peripheren Leukozyten des nHPI-Patienten fiel die erhöhte Expression der untersuchten BMP-Gene unter der Bisphosphonat-Therapie ab. Es kam zu einer Besserung der Knochenstruktur und damit des Krankheitsbildes, obwohl die Aktivität der Alkalischen Phosphatase im Serum weiter abfiel. Ein Anstieg der Expression der BMP4- und OC-mRNA und damit ein Hinweis auf eine bessere Knochenformation konnte unter der Inkubation der Patientenzellen mit 1-25-OH D3 und rhBMP2, bzw. eAlk3 erreicht werden. Man konnte schlussfolgern, dass keine generelle Störung des Couplings zwischen 1-25-OH D3 und dem BMP-System vorlag. Die bisher durchgeführten Arbeiten stellen die Basis für weiterführende Untersuchungen dar. Aufgrund der hohen Heterogenität der osteoblastären Kulturen ist es notwendig, die bisherigen Ergebnisse in Studien mit höheren Fallzahlen zu bestätigen. Hilfreich wäre die Einbeziehung weiterer Erkrankungen des Knochenstoffwechsels in die Osteoblastenkultur. Weiterführend ist die Inkubation dieser Zellen mit Bisphosphonaten und die Analyse der sich daraus entwickelnden Genexpression interessant. Neue Daten weisen darauf hin, dass das Cbfa1 und Osteoprotegerin wesentlich in den Knochenstoffwechsel und somit auch in die Regulation zwischen Osteoblasten und Osteoklasten eingreifen. Der BMP4-Promotor beinhaltet eine Bindungsstelle für Cbfa1. Knock-out-Mäuse für Cbfa1 exprimieren die AP- nicht aber die OC-mRNA. Eine Expressionsanalyse weiterer Gene wäre in der Zukunft notwendig. Hierbei könnte z.B. die DNA-Chip-Technologie zum Einsatz kommen.

2.0 Einleitung

2.1 Bone Morphogenetic Protein

Geschichte: 1965 konnte Urist erstmals zeigen, dass demineralisierte Knochenmatrix eine knocheninduzierende Wirkung in nicht knöchernem Gewebe von Tieren aufwies. Die relativ säureresistenten, trypsinlabilen, wasserunlöslichen, nicht kollagenen Proteine, die dafür verantwortlich gemacht wurden, erhielten die Bezeichnung Bone Morphogenetic Proteins (Maiti SK und Singh GR 1998, Küsswetter W und Teschner M 1999).

Einteilung: Die BMP's gehören zu der großen Gruppe der Zytokine der Transforming Growth Faktor β -Superfamilie (TGF β), der auch das TGF β , die Aktivine und die Müller'sche Inhibitorische Substanz (MIS) angehören. Mehr als 20 verschiedene BMP's sind heute bekannt und werden in drei Hauptklassen eingeteilt. (Tab. 01)

Tab. 01
Einteilung der BMP-Gruppe (Wozney JMPHD 2002)

Klasse	BMP
I	BMP2, 4
II	BMP5, 6, 7(Osteogenic Protein 1), 8
III	BMP3

Molekulare Struktur: Die BMP's unterliegen nach der Translation einem Reifungsprozess, aus dem ein aktives Dimer mit einer Zystin-Verknüpfung im Kerngebiet entsteht. Es besteht die Möglichkeit, dass sich heteromere Kombinationen der BMP's bilden. Einige dieser Kombinationen, z.B. BMP2/7 oder BMP4/7, zeigten in Tierversuchen eine höhere spezifische Aktivität, als ihre Monomere (Wozney JMPHD 2002).

BMP-Rezeptoren: Die BMP-Rezeptoren gehören zu der Gruppe der transmembranären Serin-Threonin-Kinase-Rezeptoren. Der BMP-Rezeptor II ist eine aktive Kinase, die nach der Bindung des BMP's, durch Phosphorylierung den BMP-Rezeptor I aktiviert. Zur Zeit sind sieben verschiedene BMP-Rezeptoren des Types I

(Aktivin Rezeptor Like Kinase, ALK) bekannt. Sie können in drei Untergruppen eingeteilt werden. (Tab. 02)

Tab. 02
Untergruppen der BMP-Rezeptoren (Fujii M et al. 1999).

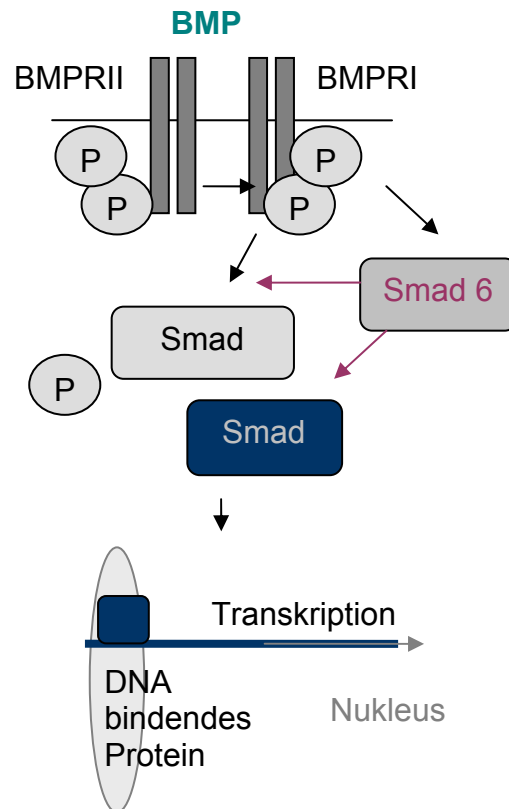
Untergruppe	BMP-Rezeptor	Funktion
I	BMPRIA (ALK3) BMPRIIB (ALK6)	ALK3 und 6 Bindung von BMP-Protein zusammen mit BMPRII
II	ALK1 ALK2	Ligand nicht bekannt Ligand BMP7
III	ALK4, 5 ALK7	Ligand TGF β , Aktivin Ligand nicht bekannt

Die lösliche extrazelluläre Domäne des BMPRIA (sBMPR, eALK3), die nicht transmembranär verankert ist, bindet freies BMP und hemmt dessen Wirkung (Natsume T et al. 1997, Ten Dijke P et al. 1993).

Signalkaskade: Nach Bindung der BMP's an den Rezeptor wird eine Signaltransduktionskaskade ausgelöst. (Abb. 01)

Die Rezeptor-Kinase des BMP-Rezeptors Typ II führt zur Phosphorylierung des BMPRI, welcher die „Rezeptor-regulierten-Smads“(R-Smad) 1,5 und 8 aktiviert. Sind die R-Smad's durch die Rezeptor-Kinase phosphoryliert binden sie eine weitere Untergruppe, die Common mediator Smads (C-Smad, Smad 4). Die nun entstandenen Heteromere translozieren in den Kern und binden direkt an die DNA, bzw. an DNA bindende Proteine. Hier regulieren sie die Transkription der Zielgene. Eine letzte Untergruppe der Smads stellen die inhibitorischen Smads (I-Smad) dar, die gleichermaßen durch die Bindung des BMP's an den Rezeptor und die Stimulierung der Fokalen-Adhäsions-Kinase (FAK) aktiviert werden. Ein Vertreter ist das Smad 6, welches mit Smad 1 und Smad 5 um die Bindung am BMP-Rezeptor IB und das Smad 4 konkurriert. Sie stellen einen Feedback- Mechanismus der BMP's dar (Yamaguchi A et al. 2000, Sakou T et al. 1999).

Abb. 01
Signaltransduktionskaskade der BMP's



Während I-Smads intrazellulär das BMP-Signal blockieren, finden sich außerhalb der Zellen Moleküle die die BMP's mit hoher Affinität binden und die BMP-Wirkung antagonisieren. Zu ihnen zählen Noggin, Chordin, Gremlin und Follistatin. BMP1 ist eine Metalloprotease, die wiederum den BMP-Noggin-Komplex zu spalten vermag. Die BMP's stimulieren die Expression von Noggin und bilden damit einen negativen Feedback. Die Hedgehog-Gen-Familie beinhaltet zwei, für die Regulation der BMP-Expression, wichtigen Gene. Mäuse mit einer Null-Mutation des Sonic Hedgehog-Gens (Shh-Gen) weisen ein fast vollständiges Fehlen des Skelettes auf. Shh ist fähig in Extremitätenknospen von Hühnern die Expression von BMP2 zu stimulieren. So erhöht sich die Aktivität der AP und die Expression des Osteocalcins. Das zweite wichtige Gen dieser Gruppe ist das Indian Hedgehog (Ihh). Es zeigt in Knockout-Mäusen Störungen der Reifung und Differenzierung der perichondralen Zellen zu osteoblastären Zellen. Damit entstehen bevorzugt Mängel in der enchondralen Ossifikation. Ihh wird unter der Heilung einer Fraktur vermehrt exprimiert (Yamaguchi A et al. 2000).

Knochenneubildung: Knochenneubildung und die Regeneration des Knochens werden durch die Wirkung der BMP's auf die Stammzellen, Vorläuferzellen und Osteoblasten reguliert. BMP2, 4, 5, 6, 7 und 9 gehören zu den osteoinduktiven Faktoren. Sie können unabhängig von vorhandenen Osteoprogenitorzellen durch aktive Rekrutierung, Proliferation und Differenzierung pluripotenter Wirtszellen Knochen induzieren. Die Differenzierung der mesenchymalen induzierbaren Stammzelle in einen Präosteoblasten soll durch BMP's beeinflusst sein. Die folgenden Schritte der Differenzierungskaskade regulieren die mitogen wirksamen Polypeptidfaktoren der Knochenmatrix (z.B. TGF β , PDGF, IGF, FGF). Entsteht eine Fraktur, so werden aus der Knochenmatrix und den zerstörten Zellen BMP's und Mitogene freigesetzt. In den ersten drei Tagen sammeln sich mesenchymale Vorläuferzellen in dem Frakturspalt und proliferieren. BMP's induzieren den Beginn der osteoblastären Differenzierung. Ab dem 14. Tag können Chondroblasten und Osteoblasten nachgewiesen werden. Während der Knochenformation und Frakturheilung findet man eine erhöhte Expression an BMP-Rezeptoren (Küsswetter W und Teschner M 1999, Solheim E 1998).

Embryonale Entwicklung: In der embryonalen Entwicklung spielen die BMP's eine entscheidende Rolle. Ihr Aufgabengebiet umfasst die Entwicklung von Organen, die gleichzeitig epitheliale und mesodermale Gewebe enthalten. Beispiele dafür sind die Entwicklung der Niere, Lunge, Leber, Haut, Haare, Zähne und des Nervensystems (Hogan BLM 1996). Für eine normale Entwicklung des Skelettes sind die BMP's genauso wichtig, wie das gegenregulierende BMP hemmende System (Wozney JMPHD 2002, Lyons KM et al. 2000, Pereira RC et al. 2000). Die BMP's wirken während der Entwicklung als Differenzierungs- und Proliferationsfaktoren für Osteoprogenitorzellen sowie als Morphogene, die Strukturformationen des Knochens aufbauen (Küsswetter W und Teschner M 1999). Die Züchtung von Mäusen, die einzelne BMP-Gene nicht exprimieren (Knock-out-Mäuse), erbrachte neue Erkenntnisse (Wozney JMPHD 2002, Hogan BLM 1996). (Tab. 03)

Entwickelt sich neuer Knochen in embryonalem Gewebe von Säugetieren, so zeichnet sich in jeder Entwicklungsphase ein bestimmtes Muster der BMP-Expression ab. (Tab. 04)

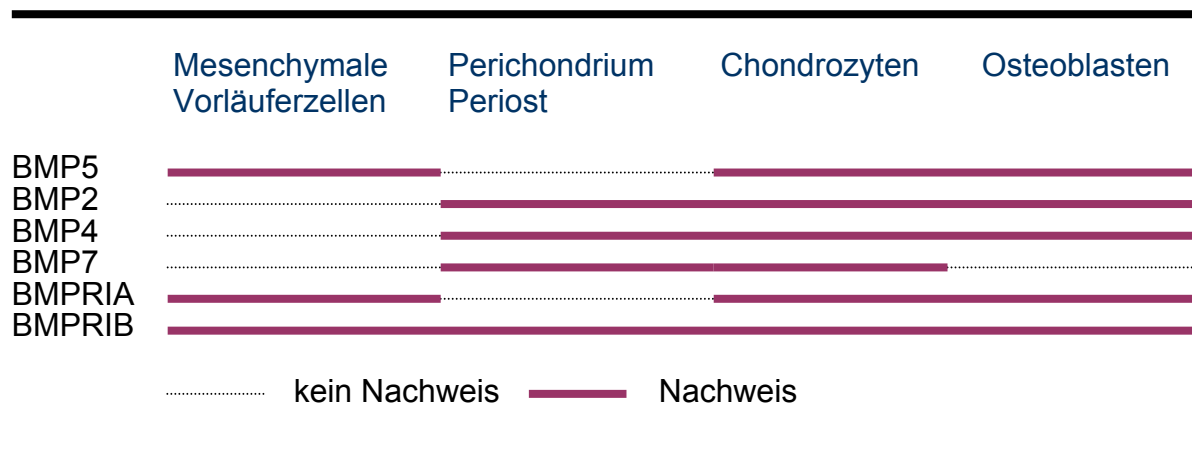
Während die Expression von BMP2 und BMP7 im Laufe der Entwicklungsphasen konstant hoch bleibt, erreicht die BMP4-Expression in der Phase der

Knochenmatrixbildung ihren Gipfel. Anschließend wird in der Mineralisationsphase die BMP5-mRNA vermehrt exprimiert. Die Expression der GDF5-mRNA läuft bevorzugt an den Stellen des Perichondriums ab, an denen später das Gelenk entstehen wird. Das entspricht den Experimenten mit Knock-out-Mäusen, die bei Defekten im GDF5-Gen zu kurze Gliedmaßen aufwiesen (Anderson HC et al. 2000, Yamaguchi A et al. 2000, Yeh L et al. 2000, Yazaki Y et al. 1998).

Tab. 03
Skelettanomalitäten bei Knock-out-Mäusen der BMP-Gene

Gen	Knock-out-Mäuse
BMP2	Absterben vor Entwicklung Skelett
BMP4	Absterben vor Entwicklung Skelett, bei vorhandenem BMPRI kann die Anwesenheit von BMP2 den Verlust an BMP4 ausgleichen
BMP5	Störung Entwicklung Skelett, Wachstum, Frakturheilung
BMP7	Gliedmaßendefekte, Defekte an Augen, Nieren
GDF5	Gliedmaßendefekte
BMP3	erhöhte Knochendichte, vermutlich Störung der osteoblastären Differenzierung und Proliferation
Noggin	Abnormalitäten Skelett, Gelenkdefekte

Tab. 04
Faktoren des BMP-Netzwerkes in Zellen der embryonalen Entwicklung des Skelettes



Klinische Anwendung: Rekombinantes humanes BMP2 und BMP7 stellen potente Faktoren dar, die für die Therapie von Knochendefekten und Erkrankungen des Zahnhalteapparates sowie zur Steigerung der periprothetischen Knochenneubildung von Bedeutung sind. Die Gene von BMP2 und BMP7 sind auf dem Chromosom 20 lokalisiert (Hahn GV et al. 1992).

Implantiert man im Tierexperiment inaktivierte demineralisierte Knochenmatrix als Trägermaterial für rhBMP2 in große Knochendefekte, so erreicht man eine knöcherne Fusion der Frakturrenden (Groeneveld EHJ und Burger EH 2000). Wird rhBMP2 in das Knochenmark verabreicht, so erreicht man wesentlich schneller eine Knochenbildung, da jetzt mesenchymale Zellen und osteogene Progenitorzellen rascher zur Verfügung gestellt werden. Unter diesen Bedingungen können große Mengen an Alkalischer Phosphatase (b-AP) und Osteocalcin im neu entstehenden Knochen nachgewiesen werden (Chikazu D et al. 2002, Maiti SK und Singh GR 1998, Wang EA et al. 1990). Die Zeit bis zur Entwicklung von neuem Knochen ist von der lokalen Konzentration des BMP's abhängig. Bei einer niedrigen Dosierung entsteht über die enchondrale Ossifikation eine geringe Menge an Knochen. Unter hohen Dosen kann man feststellen, dass parallel zur enchondralen Ossifikation, eine direkte Ossifikation über Geflechtknochen stattfindet und der Zeitraum bis zur Knochenbildung verkürzt ist. Ein Unterschied in der Knochenstruktur konnte nicht nachgewiesen werden (Groeneveld EHJ und Burger EH 2000, Küsswetter W und Teschner M 1999). Eine überschießende Knochenbildung wurde erreicht, wenn sehr hohe Dosen von rhBMP2 verwendet wurden (Groeneveld EHJ und Burger EH 2000). Im Vergleich dazu, muss rhBMP5 höher dosiert werden, um einen ähnlichen knochen-induzierenden Effekt zu erreichen. RhBMP2 induziert sowohl die Chemotaxis, Mitose und Differenzierung von osteogenen Zellen, als auch die Formation der Osteoklasten und Aktivierung reifer Osteoklasten (Maiti SK und Singh GR 1998).

Obwohl BMP3 in hoher Konzentration im Knochen zu finden ist, weist das rhBMP3 keine osteoinduktive Potenz auf. Möglicherweise spielt es als Inhibitor der Knocheninduktion eine Rolle (Wozney JPhD 2002).

Die BMP's sind aber nicht nur im Knochen zu finden. Sie zirkulieren im Blut. Ihre Blutlevel sind durch Radio-Immuno-Assays nachweisbar. Gesunde erwachsene Personen weisen Werte von 14-18 ng/ml auf. Erhöhte Werte findet man bei Kindern im Wachstum (20-72 ng/ml) und Patienten mit Morbus Paget (über 250 ng/ml) (Maiti

SK und Singh GR 1998, Urist MR und Hudak RT 1984). Eine therapeutische Applikation von rhBMP in die Blutbahn ist aufgrund der kurzen Halbwertszeit nicht möglich. Obwohl in Tierexperimenten die Implantation von BMP ausreicht um neuen Knochen zu bilden, stellt sich noch immer die Frage, welche weiteren Faktoren in den Knochenstoffwechsel involviert sind und sich gegenseitig beeinflussen (Küsswetter W und Teschner M 1999, Wozney JMPHD 2002).

2.2 Mediatoren des Knochenstoffwechsels

Das Knochengewebe unterliegt verschiedenen Regulationsmechanismen, an denen Vitamin D3 und andere körpereigene Hormone und Mediatoren (Parathormon, Kalzitinin, Östrogen, Androgen, Kortikosteroide, Schilddrüsenhormone, Somatotropes Hormon, Vitamin A) teilhaben. Außer diesem exokrinen System, bestehen weiter para- und autokrine Regulationsmechanismen. Die para- und autokrinen Mediatoren der Knochenmatrix wirken vor allem mitogen. Das bedeutet, dass sie die Proliferation vorhandener Osteoprogenitorzellen regulieren. Osteoblasten produzieren unter anderem IGF1 und IGF2 (Insulin like growth factor), PGE2 (Prostaglandin E2), Interleukin 1, 3, 6, 8, 11, BMP-2, -4, -6, -7, TGF β 1 und β 2 und FGF2 (Fibroblast growth factor 2). Sie besitzen Rezeptoren für Parathormon, Östrogen, Androgen, Glukokortikoide, 1-25-OH D3, Retinoide, Prostaglandin, IGF-1 und -2, FGF, TGF β , BMP, PDGF-a und -b, IL-1, -3, -4 und -11 (Raisz LG und Rodan GA 1998, Niethard FU et al. 1997, Christenson RH 1997, Byers PD 1994). Ein für die embryonale Entwicklung und Formation des reifen Knochens entscheidender Transkriptionsfaktor ist das von Osteoblasten gebildete Cbfa1 (Core binding factor a 1), der auch als RUNX2 bezeichnet wird.

Vitamin D3: Im 17. Jahrhundert entdeckten Whistler, Glisson und DeBoot bei Kindern aus stark industrialisierten Städten eine Erkrankung, die mit Deformierungen des Skelettsystems und hypotoner Muskulatur einherging. Die ursprünglich als englische Krankheit und heute als VitaminD-Mangel-Rachitis bezeichnete Knochenstoffwechselstörung resultiert aus einem Mangel an dem fettlöslichen Vitamin D3 (1-25-OH D3) aufgrund unzureichender Sonnenlicht-Einwirkung und daraus resultierender verminderter Vitamin-D-Synthese. Häufig liegt zusätzlich ein Kalzium-Mangel vor. Obwohl Vitamin D den Namen Vitamin trägt ist seine Wirkweise den Hormonen zuzuordnen.

Das 7-Dehydrocholesterol wird unter Einwirkung des Sonnenlichtes und der Körpertemperatur in der Haut in Vitamin D₃ umgewandelt. Ein Komplex aus Vitamin D₃ und dem Vitamin D bindenden Protein gelangt in die dermalen Kapillaren. Vitamin D₃ wird weiterhin im Dünndarm aus der Nahrung (Leber, Ei) aufgenommen. Es gelangt in die Leber, wo es durch die 25-Hydroxylase zu 25-OH D₃ umgewandelt wird. Erkrankungen der Leber und des Dünndarmes reduzieren den Blutspiegel von Vitamin D₃ und 25-OH D₃. Die renale 1-alpha-Hydroxylase des proximalen Tubulus bildet die eigentlich biologisch aktive Form, das 1-25-Dihydroxyvitamin D₃ (1-25-OH D₃). Neben der renalen Form der 1-alpha-Hydroxylase existieren noch weitere den Vitamin-D-Stoffwechsel modifizierende Faktoren. Zu ihnen zählen die Hydroxylasen der Haut, des Knochens und aktivierter Makrophagen.

Ein reduzierter Kalzium-Spiegel im Blut führt in den Zellen der Nebenschilddrüse zur Ausschüttung von Parathormon (PTH). Aus dem Anstieg von PTH und dem damit verbundenen Abfall der Phosphatkonzentration im Blut resultiert die Aktivierung der renalen 1-alpha-Hydroxylase. Östrogen, Prolaktin und Somatotropes Hormon (STH) steigern direkt und indirekt über IGF1 die Produktion der 1-alpha-Hydroxylase. Der Tumor Nekrose Faktor alpha, ein proinflammatorisches Zytokin, aktiviert den Transkriptionsfaktor NFkappaB, der an den Promotor der renalen 1-alpha-Hydroxylase bindet und deren Expression vermindert. 1-25-OH D₃ hemmt über eine Rückkopplung die 1-alpha-Hydroxylase sowie die Ausschüttung von PTH.

1-25-OH D₃ und 25-OH D₃ werden durch Hydroxylasen und Oxidasen rasch in verschiedene Metabolite abgebaut und als wasserlösliche Säuren ausgeschieden (Ebert R et al. 2003, Holick MF und Adams JS 1998, Norman AW und Hurwitz S 1993). In den Zellen verschiedener Gewebe, z.B. Knochen (Osteoblasten, Osteozyten, Osteoklasten), Niere, Darm, Haut, Pankreas, Nebenschilddrüse, Magen, Gonaden, Hirn, Thymus, Monozyten, T- und B-Lymphozyten kann der Rezeptor für 1-25-OH D₃ (VDR) nachgewiesen werden. Das 1-25-OH D₃ bindet im Zytoplasma den nukleären Rezeptor (VDR), gelangt als Komplex aus dem VDR, dem 1-25-OH D₃ und dem stabilisierenden akzessorischen Protein Retinoid-X-Rezeptor (RXR) in den Zellkern und interagiert mit spezifischen DNA-Domänen, dem Vitamin D Responsive Element (VDRE), wobei die Transkription verschiedener Gene reguliert wird. Es induziert unter anderem die Expression von Osteocalcin (OC), Osteopontin (OP), Calbindin-28K und der Alkalischen Phosphatase (AP). Die Expression von PTH und Kollagen wird gehemmt (Monier-Faugere MC et al. 1998, Kerner SA et al.

1989). Ein davon unabhängiger Signalweg führt bei Gabe von 1-25-OH D3 innerhalb von 3–5 min zur Öffnung spannungsabhängiger Kalziumkanäle der Plasmamembran und darauffolgend zur Aktivierung der Proteinkinase A, bzw. C. Diesen Effekt konnte Nemere in vitro an der intestinalen Mukosa und Osteoblasten nachweisen.

Das Hormon 1-25-OH D3 spielt eine entscheidende Rolle in der Formation und Mineralisation des Knochens und der neuromuskulären Übertragung. Es beeinflusst die Resorption und den Transport des Kalziums aus dem Darm, der Niere und des Knochens. Knock-out-Mäuse, deren VDR defekt ist, entwickeln Wachstumsretardierungen, fehlerhaften Knochenaufbau, Alopezie, sowie einen sekundären Hyperparathyroidismus. Sie weisen einen gesteigerten Knochenumbau auf, der sich in einer hohen Expression der Knochenmatrixproteine und der Metalloproteinasen äußert (Graedler F et al. 2003). 1-25 OH D3 spielt als Differenzierungsfaktor in verschiedenen Geweben, wie z.B. dem Knochen, dem Immunsystem und der Haut eine Rolle. Im Knochen unterstützt es die Bildung der Osteoblasten und Osteoklasten aus den unreifen Vorläuferzellen des Knochenmarkes (Liu P et al. 1999). Während es die Differenzierung induziert, hemmt es die Proliferation der Zellen. Inkubiert man unreife osteoblastäre Zellen fetaler Ratten mit Vitamin D3 so hemmt es die Proliferation und damit die Bildung der extrazellulären Matrix und abhängig davon die Mineralisation und Reifung des Knochens.

Vitamin D3 führt zur Aktivierung von vorhandenen reifen Osteoblasten und stimuliert die Knochenformation nach erfolgter Resorption durch Osteoklasten (Erben RG et al. 1997, Thavarajah M et al. 1993, Owen T et al. 1991).

Anwendungsgebiete von 1-25-OH D3 und synthetischer Analoga sind die Therapie der Vitamin-D-Mangel-Rachitis im Kindesalter, der Osteomalazie, der renalen Osteopathie (Hemmung der reaktiven PTH-Ausschüttung) und der Psoriasis (Hemmung der Proliferation der Keratinozyten). Eine Überdosierung führt zur Organcalcinose, wobei die Niere (Nephrocalcinose) besonders gefährdet ist. Viele Länder, einschließlich der USA, setzen derzeit ihren Milchprodukten Vitamin D2, bzw. D3 zu, um die Entwicklung der Rachitis bei Kindern zu verhindern. (Holick MF und Adams JS 1998, Karow T und Lang R 1999). Auch die in Deutschland hergestellten künstlichen Säuglingsnahrungen sind mit Vitamin D im Sinne einer Basissupplementierung angereichert. Zusätzlich wird in der BRD bei Säuglingen und Kleinkindern eine tägliche Verabreichung von 400-500 IE Vitamin D in Tablettenform zur Vermeidung einer Vitamin-D-Mangel-Rachitis empfohlen. Eine Vitamin-D-

Stoßtherapie mit ultrahohen Vitamin-D-Dosen in mehr-monatlichen Abständen wird wegen des erhöhten Risikos von Nephrocalcinosen nicht mehr durchgeführt.

TGF β (Transforming growth factor β): TGF β gehört in die große Gruppe der TGF β -Zytokin-Familie. Es bindet an die Rezeptoren ALK4 und 5 wobei eine Smad-Protein (Smad 2 und 3) abhängige Signalkaskade folgt.

Hohe Expressionslevel an TGF β sind während der Entwicklung des Knorpels, der enchondralen und desmalen Ossifikation sowie in der Haut zu finden. Es agiert als Wachstums- und Differenzierungsfaktor in diesen Geweben. TGF β wird durch Osteoblasten gebildet und in der Knochenmatrix gespeichert. Die Freisetzung von in der Knochenmatrix deponierten TGF β erfolgt durch die osteoklastäre Resorption des Knochens. Unter niedrigen Konzentrationen bewirkt es die Chemotaxis der osteoklastären mononukleären Vorläuferzellen. Unter hohen Konzentrationen hemmt es die Osteoklasten, wobei es eine Steigerung der Expression des Osteoprotegerins bewirkt. Es führt im Periost frakturierten Knochens sowie in Resorptionslakunen zur Proliferation und Differenzierung der mesenchymalen Vorläuferzellen und Osteoblasten. Es ist nicht zur ektopen Knochenbildung fähig, da unter der Präsenz von TGF β die volle Differenzierung der osteoblastären Vorläuferzellen, selbst unter dem Einfluß von Vitamin D3 nicht möglich ist. Diffundiert das TGF β von der Resorptionslakune weg, erfolgt anschließend die endgültige Reifung neuer Osteoblasten und der Aufbau neuen Knochens ist möglich (Liu P et al. 1999). Eine Überexpression von TGF β führt zu Osteoporose und gesteigertem Knochenumbau. TGF β stimuliert die Bildung von Kollagen Typ I, nicht kollagener Matrixproteine und PGE2. Es hemmt die Aktivität der Alkalischen Phosphatase (AP) und Prokollagenase. Die Camurati-Engelmann Erkrankung (CED) eine autosomal dominant vererbte, progressive, durch Hyperostose und Sklerose der Diaphysen der langen Röhrenknochen charakterisierte Erkrankung ist mit Störungen im TGF β Signalweg assoziiert (Raisz LG und Rodan GA 1998, Dickinson ME et al. 1990). Kürzlich konnten bei CED-Patienten Mutationen im TGF β 1Gen nachgewiesen werden (Hogan BLM 1996, Janssens K et al. 2003).

Die therapeutische Anwendung von TGF β ist durch immunsuppressive Eigenschaften limitiert.

2.3 Transkriptionsfaktoren des Knochenstoffwechsels

Cbfa1: Cbfa1 ist ein Osteoblasten-spezifischer Transkriptionsfaktor, der an das DNA-cis-acting Element OSE2 bindet. OSE2 befindet sich u.a. in dem Promotor des Osteocalcin-Gens und nach neuesten Studien auch des BSP-Genes.

Cbfa1 agiert als Differenzierungsfaktor der Osteoblasten während der embryonalen Entwicklung und außerdem als Transkriptionsfaktor während der Knochenformation, spezieller der Knochenmatrixbildung durch reife Osteoblasten. Weiterhin ist es für das Coupling zwischen Osteoblasten und Osteoklasten verantwortlich. Obwohl der Promotor der BMP2 und BMP4-Gene Cbfa1 bindet, führt eine Mutation an der Bindungsstelle zu keiner signifikanten Störung der Expression dieser Gene (Geoffroy V et al 2003, Hay E et al. 2001, Kobayashi H et al. 2000, Helvering LM et al. 2000). Knock-out-Mäuse des Cbfa1-Gens weisen ein Fehlen der kompletten desmalen und enchondralen Ossifikation auf, obwohl unreife Osteoblasten und Osteoklasten nachweisbar sind. Dabei exprimieren die Osteoblasten die AP-, aber nicht OPG-, bzw. OC-mRNA. Die Mäuse versterben an einer Ateminsuffizienz. Postnatale Defekte des Cbfa1-Gens führen zu einer Osteopenie, bei Vorhandensein von reifen Osteoblasten (Ducy P et al. 1999). Aus der heterozygoten Mutation des Cbfa1-Gens resultiert beim Menschen die Erkrankung Cleidocraniale Dysplasie, die mit Defekten der Klavikula, des Schädels, der Zähne und einer Osteoporose einhergeht.

Humane Osteoklasten besitzen den Rezeptor RANK, der einen von humanen Osteoblasten gebildeten Liganden das RANKL bindet. Eine erhöhte Cbfa1-Expression führt zur Steigerung des Couplingfaktors RANKL und der Kollagenase 3, so dass die Knochenresorption aktiviert wird. Damit sind Osteoblasten in der Lage die Resorption des Knochens zu stimulieren. Cbfa1 stimuliert in vitro die Osteoklastendifferenzierung (Geoffroy V et al. 2003). Abhängig von der Mineralisationsphase und der Einwirkung von 1-25-OH D3 und TGF β bilden humane Osteoblasten Osteoprotegerin (OPG), das RANKL komplexiert und unwirksam macht. In Phasen der geringen Mineralisation überwiegt die Bildung des OPG's, im Laufe der Knochenreifung die des RANKL's. 1-25-OH D3 führt zur gesteigerten Expression des OPG's. (Jahr H et al. 2003, Thirunavukkarasu K et al. 2001). Patienten mit Osteoporose weisen eine hohe Ratio von RANKL/OPG auf [Abdallah BM et al. 2003, Grimaud E et al. 2003]. Die Expression des Cbfa1/RUNX2-Gens wird durch den Transkriptionsfaktor TWIST und BMP7, sowie Vitamin D3 reguliert (Yousfi M et al. 2003).

2.4 Einfluss von mechanischem Stress auf die Knochenstruktur

Unterliegt das Knochengewebe mechanischem Stress, reagiert es mit Umbauvorgängen. Mechanischer Stress des Knochens führt über die Mitogen aktivierte Proteinkinase (MAPK) und ERK2 zu einer Phosphorylierung von Cbfa1 und zu einer Steigerung der Transkriptionsaktivität desselben (Yousfi M et al. 2003, Geoffroy V et al. 2002, Ziros PG et al. 2002, Ducy P et al. 1999, Quack I et al. 1999, Ducy P et al. 1997, Komori T et al. 1997). Unabhängig von den Mediatoren bestehen noch andere Regulationsmechanismen des Knochens auf mechanische Belastung. Darunter zählt die Regulation der Expression der AP- und OC- mRNA durch Zell-Zell- und Zell-Knochenmatrix-Kontakte. Die Aktivierung der Fokalen-Adhäsions-Kinase (FAK) durch die Interaktion des Integrins der Plasmamembran osteoblastärer Zellen (bes. Osteozyten) mit dem Kollagen der Knochenmatrix bewirkt einen Expressionsanstieg der AP-mRNA. Ein Defekt der FAK in einer Mauszelllinie führt zu einem verminderten Anstieg der AP-mRNA und einer reduzierten Ansprechbarkeit der Osteoblasten auf rhBMP2 (Tamura Y et al. 2001). Es konnten druckempfindliche Ionenkanäle in Fibroblasten und osteoblastären Zellen nachgewiesen werden.

Eine Krafteinwirkung auf den Knochen erhöht die lokale Produktion von PGE₂ durch osteoblastäre Zellen, welches zu einer Aktivierung der Formation und Resorption des Knochens führt. Unter der Therapie mit Indometazin, einem Inhibitor der Synthese von PGE₂, kann ein reduzierter Knochenumbau beobachtet werden.

Weiterhin soll das Mikroenvironment der Osteozyten bei der Kommunikation der Zellen untereinander eine Rolle spielen, wobei die extrazelluläre Flüssigkeit durch die kristallinen Poren fließt und durch eine Ionenumverteilung eine elektrische Spannung entsteht (Raisz LG und Rodan GA 1998, Byers PD 1994).

Bei mangelnder mechanischer Belastung verschiebt sich die Relation von Knochenaufbau und Knochenabbau zu Gunsten von Abbauvorgängen, so dass eine Demineralisierung des Knochens (Inaktivitätsosteoporose) entsteht.

2.5 Marker des Knochenstoffwechsels

Aussagen zur Aktivität des Knochenstoffwechsels können verschiedene Knochenmarker liefern. Es wird hierbei zwischen Markern des Knochenaufbaus (Alkalische Phosphatase, Bone Sialo Protein II, Osteocalcin, Prokollagen) und Knochenabbau (Hydroxyprolin, Deoxypyridinium Cross-links,

Galactosylhydroxylysin, Saure Phosphatase) unterschieden. Nach therapeutischen Interventionen sind Veränderungen der Resorptionsmarker durchschnittlich nach 1-3 Monaten und der Formationsmarker nach 6-9 Monaten nachweisbar (Christenson RH 1997, Niethard FU et al. 1997, Schönau E et al. 1996).

Alkalische Phosphatase: Zu den wesentlichen Markern des Knochenmetabolismus gehört die auch im Serum nachweisbare Alkalische Phosphatase (AP).

Sie kann in Untergruppen eingeteilt werden. Die Gesamt-AP (Apges) setzt sich aus der gewebeunspezifischen (Leber, Knochen, Niere), der intestinalen und der plazentaren AP zusammen. Durch neuere Nachweisverfahren, wie der Immunoassay und der ELISA-Test, können knochenspezifische Alkalische Phosphatasen (APbone und Ostase) im Serum und in Knochenkulturmedien direkt bestimmt werden. Diese weisen eine geringere Kreuzreaktion zu Erkrankungen der Leber und der Niere auf.

Die gewebeunspezifischen AP's unterscheiden sich in ihrer mRNA aufgrund unterschiedlicher Anordnung von Exonen und dem darauffolgenden differentiellen alternativen Splicing. Das Gen des gewebeunspezifischen Isoenzym befindet sich auf dem Genlokus 1p36.1-p34 (Matsuura S et al. 1990, Weiss MJ et al. 1988). Der Promoter des AP-Gens beinhaltet ein Response-Element das den Transkriptionsfaktor Forkhead (FKHR) zu binden vermag. FKHR reguliert in der Leber den Glukosestoffwechsel und führt nach Hatta zu einer Förderung der Osteoblastenreifung und Knochenformation, welche mit einem Anstieg der AP vergesellschaftet ist (Hatta M et al. 2002). Die Präsenz von BMP und damit von Smad-Proteinen führt zu einer Steigerung der gewebeunspezifischen AP-Transkription. Transkriptionsfaktoren die mit dem Smad interagieren, z.B. Smad-interacting protein 1 (SIP1), binden an den AP-Promotor und sind in der Lage die Expression der AP, die durch BMP und Smad 1, bzw. Smad 5 aktiviert wurde, zu unterdrücken (Tylzanowski P et al. 2001, Weiss MJ et al. 1988).

Die APbone befindet sich zunächst als tetrameres Glycoprotein mit einem Glycan-Phosphatidyl-Inositol-Anker in der Plasmamembran der Osteoblasten und wird von dort in das Serum freigesetzt. Die Halbwertszeit der Serum-AP beträgt 1-2 Tage, weshalb kein zirkadianer Rhythmus besteht. Der Abbau erfolgt durch die Leber. Die Aufgabe der AP im Knochenstoffwechsel ist noch nicht vollständig geklärt, wobei sie wesentlich am Knochenaufbau und der Mineralisation der Knochenmatrix beteiligt ist. Hohe Konzentrationen an AP sind mit einem Abfall des anorganischen

Pyrophosphates, einem Hemmstoff der Mineralisation, vergesellschaftet. Diese Hydrolyse des Pyrophosphates und die Freisetzung von PO_4^{-3} aus organischem Phosphat zur Bildung von Kalzium-Phosphat fördern die Mineralisation. Das AP-Molekül soll Kalzium binden und als Kalzium-ATPase wirksam sein (Zhou H et al. 1994). In Experimenten, die in vivo, als auch in vitro durchgeführt wurden, konnte eine signifikante Korrelation zwischen dem Remodeling des Knochens, speziell der Knochenformation (Kollagenproduktion, Zahl der Osteoblasten, Kalziumbilanz, Mineralisation) und dem Anstieg der Serum-AP festgestellt werden. Die Beurteilung des Patientengutes im Sinne des Zuwachses oder des Verlustes an Knochenmasse und des damit verbundenen Frakturrisikos ist mittels einzelner Knochenmarker nicht möglich. Durch die gleichzeitige Messung verschiedener Knochenmarker kann jedoch eine gewisse Aussage über die Ratio von Knochenan- und -abbau getroffen werden. Besonders aktive Umbauvorgänge im Knochen, wie sie unter dem Wachstum von Kindern oder auch der postmenopausalen Osteoporose auftreten, führen zur Steigerung der Serum-APbone und weiterer Knochenmarker. Während die Kinder an Knochenmasse gewinnen, kommt es bei Osteoporose-Patienten zu einem Verlust an Knochenmasse. Eine High-Bone-Turnover Osteoporose, wie sie in der ersten Phase der postmenopausalen Osteoporose beobachtet wird, kann also ebenso mit einer APbone-Erhöhung verbunden sein. Somit kann die Serum-AP nicht isoliert als ein Marker der Knochenformation betrachtet werden. Auf der anderen Seite eignet sich aufgrund des Couplings von Knochenresorption und Knochenformation die Bestimmung der APbone zur Therapiekontrolle einer antiresorptiven Therapie, z.B. beim Einsatz von Bisphosphonaten.

Die Bestimmung der APbone weist eine starke Sensitivität und nur geringe individuelle Schwankungen aufgrund der fehlenden zirkadianen Rhythmik auf, so dass die Messung gut reproduzierbar ist und keine tageszeitabhängigen Kontrollen nötig sind (Raisz LG und Rodan GA 1998, Christiansen C et al. 1998, Christenson RH 1997, Kress BC 1997, Schönau E et al. 1996, Mundy GR 1995).

Es lässt sich schlussfolgern, dass sich die Messung der Serum-APbone in Kombination mit der Messung weiterer Knochenmarker und der Bestimmung der Knochendichte (Mineral Bone Density / BMD), ggf. ergänzt durch eine Knochenbiopsie gut geeignet ist, um knochenspezifische metabolische Veränderungen aufzudecken, deren Verlauf zu verfolgen und die Therapie zu überwachen.

Bone Sialo Protein II: Das Bone Sialo Protein II (BSP II) ist ein glykosyliertes, sulfatiertes Phosphoprotein, welches 12 % der nicht kollagenen Proteine des Knochens ausmacht. Es ist spezifisch und befindet sich ausschließlich in mineralisiertem Bindegewebe. Durch seine Glutaminsäurereste und das Arginin–Glycin–Aspartat–Motiv (RGD) hat es die Möglichkeit Zelloberflächenintegrine und Hydroxyapatit zu binden. BSP II wird durch Osteoblasten zeitgleich mit dem Osteocalcin und der Mineralisation gebildet. Weiterhin sind hypertrophe Chondrozyten, Osteocyten und Osteoklasten in der Lage BSP II zu bilden. Anhand seines Molekulaufbaus liegt die Vermutung nahe, dass das BSP II als Nukleator der Hydroxyapatitkristalle dienen könnte. Es ist mit der Kollagenmatrix assoziiert und schon vor der Mineralisation in der Matrix nachweisbar. BSP II ist weiterhin in der Lage normale und auch Tumorzellen durch das RGD-Motiv an der Knochenoberfläche zu binden. Die BSP II-mRNA weist eine hohe basale Expression auf. Cbfa1, als osteoblastenspezifischer Transkriptionsfaktor, bindet wahrscheinlich an den BSP II–Promotor und reguliert dessen Expression. Ein weiterer, die BSP II-Wirkung modulierender Transkriptionsfaktor, ist der NF- κ B (Su M et al. 2003, Yousfi M et al. 2003, Ganss B et al. 1999, Nefussi JR et al. 1997, Kasugai S et al. 1992).

Osteocalcin: Das Osteocalcin (OC) wird von Osteoblasten, Odontoblasten und Megakaryozyten gebildet. Nach der Transkription werden die Glutaminsäurereste, Vitamin K und CO₂ abhängig, carboxyliert. Das fertige Molekül enthält drei Gamma–Carboxy–Glutaminsäure–Reste (Gla). Es wird in der extrazellulären Matrix vor allem des adulten Knochens gespeichert und ist neben dem BSP II eine Hauptkomponente der nicht kollagenen Proteine des Knochens. Mittels der Gla–Reste bindet OC Kalzium und Hydroxyapatit. Knock-out-Mäuse des OC-Gens weisen Störungen in der Formation des Knochens auf. Das OC–Gen befindet sich auf dem Chromosom 1q25–q31. Cbfa1 bindet an den OC-Promotor und fördert die Expression der OC-mRNA (Yousfi M et al. 2003, Mitchell BD et al. 2000, Monier-Faugere MC et al. 1998, Christenson RH 1997, Ducy P et al. 1997). Die OC-Expression wird weiterhin durch TGF β , PTH und Vitamin D3 reguliert, wobei das Vitamin D–Responsive–Element (VDRE) im OC–Promotor nachweisbar ist. Variationen im VDR–Gen führen zu Veränderungen der Expression des OC's (Morrison NA et al. 1992, Kerner SA et al. 1989). Die Messung des Serum–OC's spiegelt, ähnlich wie die der APbone, die Aktivität der Umbauvorgänge des Knochens wieder. Es wird als

Knochenumsatzmarker bewertet. Osteocalcin wird einerseits von den Osteoblasten gebildet, wobei die Serumkonzentration mit der Neusynthese der Knochenmatrix korreliert (Schönau E et al. 1996). Andererseits wird es während der Knochenresorption aus der Knochenmatrix freigesetzt und führt zur Chemotaxis der osteoklastären Vorläuferzellen. OC ist im Serum instabil. Es liegen verschiedene Fragmente vor. Kontrollen von Serumwerten sind nur bedingt aussagekräftig, da OC im Serum einen ausgeprägten zirkadianen Rhythmus sowie eine kurze Halbwertszeit aufweist. Die OC-Expression verläuft linear zu ansteigendem Kalzium und Phosphat im Serum, sowie zur steigenden Wachstumsrate und Mineralisation. Einen steilen OC-Anstieg im Serum findet man bei Kindern und Jugendlichen in Phasen starken Wachstums sowie bei Patienten mit Morbus Paget, bzw. in der Menopause. Einen Abfall des Serumspiegels kann man unter der antiresorptiven Therapie mit Bisphosphonaten beobachten (Gavaia PJ et al. 2003, Christiansen C et al. 1998, Raisz LG und Rodan GA 1998, Lian JB et al. 1998, Carter SD et al. 1996).

2.6 Erkrankungen des Knochenstoffwechsels

Hypophosphatasie (Rathbun Syndrom): Die Hypophosphatasie ist eine seltene (1:100 000) vererbte Erkrankung die mit einer starken Minderung der Aktivität der AP im Serum und in verschiedenen Geweben, einer gestörten Mineralisation des Knochens sowie rachitisähnlichen Symptomen einhergeht. Es sind vor allem die unspezifischen alkalischen Gewebosphosphatasen erniedrigt (Knochen-, Leber-, Nierenphosphatasen). Es werden je nach klinischem Manifestationsalter drei Verlaufsformen unterschieden. (Tab. 05)

Tab. 05
Formen der Hypophosphatasie (Macey HB 1940)

Form	Alter	Symptom
Infantile Form Spätingfantile Form [nach Igbokwe 1985, homozygot für Allel H(I)]	Perinatal Innerhalb von 6 Monaten	Beide Formen zeigen eine fehlerhafte Verkalkung des Hirnschädels, Kraniosynostosen, verkrümmte und verkürzte Röhrenknochen, Weichheit des Brustkorbs, Ausfall der Milchzähne, Gedeihstörungen, infauste Prognose
Juvenile Form [heterozygot für Allele H©/H©, bzw. H©/H(I)]	Manifest nach dem 12. Lebensmonat	Rachitiszeichen, Minderwuchs, Obstipation
Adulte Form [heterozygot für Allele H© oder H(I), bzw. dominante Vererbung]	Jugendliche, Erwachsene	Deformitäten, Osteoporose, Knochenschmerzen, ektope Verkalkungen, Frakturen und Monoarthritis

Eine weniger schwerwiegende Form ist die Odontohypophosphatasie, die vor allem durch Defekte des Zahnschmelzes mit vermehrter Kariesneigung und frühzeitigem Zahnverlust charakterisiert ist. Sie beruht ebenfalls auf einer pathologischen Herabsetzung der AP-Aktivität (Whyte MP et al. 1996, Sitzmann FC 1995).

Das Gen der Alkalischen Phosphatase liegt auf dem Chromosom 1p36.1-p34. Igbokwe benannte 1985 drei für die Hypophosphatasie verantwortlichen Allele, H(N), H© und H(I) (Tab. 05). Es konnte bis heute ein großes Spektrum an unterschiedlichen Mutationen im Gen der gewebeunspezifischen Alkalischen Phosphatase (TNSALP) für dieses Krankheitsbild verantwortlich gemacht werden (Spentchian M et al. 2003). Diese Beobachtung bildet die Grundlage zur Erklärung der Vielgestaltigkeit der Erkrankung der einzelnen Patienten (Fedde KN et al. 1996). Whyte beschrieb jedoch auch Erkrankungsfälle der infantilen Form der Hypophosphatasie in denen keine Abnormalität in der AP-Genregion nachweisbar war. Als mögliche Ursachen wurden hierbei Störungen von Faktoren diskutiert, die die Expression und histochemische Aktivität der AP-mRNA beeinflussen (Whyte MP 1990). Die schwere infantile Hypophosphatasie ist autosomal rezessiv erblich, d.h. das Vorliegen von 2 Mutationen im AP-Gen, meist im Sinne einer Compounded-Heterozygotie führt zu dieser Form. Die dominanten erblichen Formen verlaufen meist leichter und resultieren zumeist aus nur einer schweren Mutation im AP-Gen. Jedoch sind auch bei mildereren Formen autosomal rezessive Erbgänge beschrieben,

die aus dem gleichzeitigen Vorkommen einer „schweren“ und einer „milden“ Mutation im AP-Gen resultieren, so auch bei dem in dieser Arbeit einbezogenen Patienten.

Die Röntgenbefunde zeigen ein rachitisches Bild wobei besonders Ossifikationsdefekte der Metaphysen bestehen. Phosphoethanolamin und anorganisches Pyrophosphat, zwei Substrate der Alkalischen Phosphatase, zeigen deutlich erhöhte Werte im Urin und Serum. Das anorganische Pyrophosphat gilt als ein Inhibitor der Mineralisation und kann somit für die Symptome der Hypophosphatasie mit verantwortlich gemacht werden (Wolff C und Zabransky S 1982). Zur Diagnostik von heterozygot erkrankten Personen ist die Gabe von kleinen Mengen an Pyridoxin möglich. Pyridoxin wird zu Pyridoxalphosphat (PLP) umgewandelt, welches wiederum ein Substrat der AP darstellt. Ein erhöhter Serumwert konnte bei allen Formen der Hypophosphatasie nachgewiesen werden (Whyte MP 1988). Die Hypophosphatasie wird vor allem symptomatisch therapiert (Orthopädie, Physiotherapie). Die Gabe von Bisphosphonaten kann bei mildereren Krankheitsverläufen zu einer Besserung der Symptome und Erhöhung der Knochendichte führen, so auch bei dem in diese Untersuchungen einbezogenen Patienten. Erklärbar wird dies durch die Herabsetzung der Knochenumsatzgeschwindigkeit und des Knochenabbaus. Ineffektiv ist die Gabe von Phosphat und Kalzium sowie die Therapie mit Vitamin D. Unter der Kombinations-Therapie von Calcium und Vitamin D besteht die Gefahr der Nephrocalcinose (Weinstein RS und Whyte MP 1981).

Transiente Hyperphosphatasie: Die transiente Hyperphosphatasie ist durch eine selbstlimitierende Erhöhung der APges im Serum charakterisiert. Bei Untersuchung der AP-Subklassen findet sich eine deutliche Erhöhung der knochenspezifischen AP (APbone, Ostase). Es fehlen röntgenologische Korrelate. Die Patienten sind symptomfrei. Zumeist wird die Transiente Hyperphosphatasie zufällig im Rahmen von Laborkontrollen nach akuten Gastroenteritiden diagnostiziert.

Hyperostosis Corticalis Deformans Juvenilis (HCDJ): Die HCDJ (OMIM 239000) ist eine seltene autosomal rezessiv vererbte generalisierte Knochenerkrankung, die erstmals von Bakwin und Eiger 1956 als Familiäre Osteoektasie mit Makrokranium beschrieben wurde (Bakwin H und Eiger MS 1956). Die HCDJ ist durch eine generalisierte progressive Hyperostose mit vermehrter Fraktur-Neigung bei massiv

gesteigertem Knochenumbau charakterisiert. Es entwickelt sich eine progrediente Verdickung der langen Röhrenknochen sowie ein Minderwuchs und Muskelschwäche. Aufgrund von Hyperostosen der Schädelbasis mit Einmauerung des N. acusticus resultiert ein Verlust des Hörvermögens bereits im Kleinkindalter. Schädeldach und Gesichtsschädel weisen ebenfalls Hyperostosen auf, so dass ein ossärer Makrocephalus mit „Löwengesicht“ resultiert. Die geistige Entwicklung ist unauffällig. Histologisch findet man einen gesteigerten endostalen Umbau mit schmaler Trabekelstruktur und deutlicher Rarefizierung der Spongiosa und Entkalkung. Man findet eine diffuse fibroblastäre Reaktion mit untypischen hypertrophen Osteoblasten (Roth AJ et al. 1996). Biochemisch ist die HCDJ durch einen deutlich gesteigerten Bone Turnover (Erhöhung Knochenumsatzes) mit exzessiv erhöhter AP im Serum charakterisiert. Die HCDJ wird in der Literatur deshalb auch als Chronische Idiopathische Hyperphosphatasie, Familiäre Idiopathische Hyperphosphatasie, Osteoektasie mit Hyperphosphatasie, hereditäre Knochendysplasie mit Hyperphosphatasämie oder als Juveniler Morbus Paget bezeichnet (Whalen JP et al. 1997, Singer F et al. 1994, Spindler A et al. 1992, Cosich N et al. 1991, Horwith M et al. 1976, Caffey JP 1973).

2.7 Therapie mit Bisphosphonaten

Die Bisphosphonate Etidronsäure, Clodronsäure und Pamidronsäure gleichen in ihrem Aufbau und ihren physikochemischen Eigenschaften dem Pyrophosphat. Pyrophosphat hemmt im Knochen die Komplexbildung von Kalzium mit Phosphatresten und die Hydroxyapatitbildung. Es hemmt die Aktivität der Osteoklasten und die Auflösung der vorhandenen Hydroxyapatitkristalle.

In gesundem Knochengewebe führt die von den Osteoblasten gebildete AP zu einer Spaltung des Pyrophosphates und hebt die Hemmung der Mineralisation und Osteoklastenaktivität auf. Die Bisphosphonate können durch die AP nicht gespalten werden. Sie führen zu einer verlängerten Inhibition der Osteoklasten.

Eine Dauertherapie bewirkt einen gegenteiligen Effekt und führt zu einer Demineralisation des Knochens und möglichen Spontanfrakturen. Es sollten regelmäßige Therapiepausen erfolgen. Indikationen für Bisphosphonate sind der Morbus Paget, Prävention und Behandlung von heterotopen Ossifikationen, Tumorbedingte Hyperkalzämie und Osteolyse, sowie die Osteoporose. Die nur gering lipophilen Bisphosphonate werden schlecht aus dem Darm aufgenommen und bilden

mit Kalzium, Eisen und Magnesium aus der Nahrung schwerlösliche Komplexe. Sie werden unverändert renal ausgeschieden. Nur ein geringer Teil wird im Knochen gebunden und sehr langsam während der Resorption des Knochens freigegeben (HWZ von 1-10 Jahren). Knochen mit erhöhtem Turnover nimmt vermehrt Bisphosphonate in inhomogener Verteilung auf und setzt wegen seiner gesteigerten Resorptionsaktivität diese schneller frei (Lin JH 1996, Kuschinsky G et al. 1993). Der Therapie-Effekt ist wesentlich kürzer als die HWZ (Adami S und Zamberlan N 1996). Die Kontrolle der Krankheitsaktivität und der Bisphosphonat-Therapie erfolgt durch die Bestimmung der Serumaktivität der APges und der Knochenspezifischen Alkalischen Phosphatase (APbone, Ostase). Bei vorhandenen Lebererkrankungen sollte bevorzugt die knochenspezifische AP bestimmt werden (Woitge HW et al. 2000).

2.8 Die humane Osteosarkomzelllinie Saos2

Die Etablierung von Zelllinien aus Tumorzellen vereinigt zwei wichtige Eigenschaften. Im Gegensatz zu primären Zellen ist die Kapazität der Zellteilung unbegrenzt. Zusätzlich exprimieren sie wichtige spezifische Gene des Ursprungsgewebes.

Die Osteosarkomzelllinie Saos2 ist eine Zelllinie mit osteoblastären Eigenschaften, die knochenspezifische Proteine produziert und ähnlich den primären osteoblastären Zellen auf Einflussfaktoren reagiert. Eine wichtige Eigenschaft der primären osteoblastären Zellen ist die Fähigkeit mineralisierte Matrix zu bilden. Saos2-Zellen sind in der Lage kalzifizierte Knochenmatrix in einem Diffusion Chamber zu produzieren. Die Mineralisation der Knochenmatrix ist u.a. abhängig von der Expression und Bildung der Alkalischen Phosphatase (AP). Saos2-Zellen produzieren große Mengen an diesem Enzym (4-6 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ Protein/min).

Die Bildung der AP ist von der Zelldichte abhängig, wobei das Maximum unter der Konfluenz der Zellen erreicht wird. Diese Steigerung der Expression der AP-mRNA spricht für die Möglichkeit der Reifung der Osteosarkomzellen während der Kultur.

Saos2-Zellen reagieren auf Parathormon mit der vermehrten Bildung der cyclischen Adenylatzyklase. Osteocalcin ist wie bereits beschrieben ein knochenspezifischer Marker, der ausschließlich von Zellen aus Knochen gebildet wird und eine Rolle in der Mineralisation der Matrix spielt. Einige Saos2-Zellklone zeigen jedoch keine Expression von Osteocalcin. Nur die Osteocalcin produzierenden Klone scheinen in der Lage zu sein mineralisierte Matrix zu bilden. Saos2 - Zellen weisen Rezeptoren

für 1-25-OH D3 auf. Mit Zunahme der Zelldichte fällt die Anzahl der Rezeptoren/Zelle ab. 1-25-OH D3 führt in osteoblastären Zellen zu einem Anstieg der Expression des Osteocalcins und der Alkalischen Phosphatase. Diese Reaktion ist bei den Saos2–Zellen nicht nachweisbar. Weiterhin konnten Osteonectin (ON) und Bone Sialo Protein (BSP) im Medium der Saos2 - Zellen nachgewiesen werden (Anderson HC et al. 2002, Siggelkow H et al. 1998, Mahonen A et al. 1989, Rodan SB et al. 1987). Die Osteosarkomzellen bilden BMP1, BMP2, BMP3, BMP4, BMP5, BMP6 und BMP7. Die osteoinduktive Kapazität des Mediums der Saos2–Zellen soll aus der Bildung von BMP1, BMP3, BMP4 und BSP resultieren (Anderson HC et al. 2002, Guo W et al. 1999, Raval P et al. 1996, Anderson HC et al. 1995).

3.0 Zielstellung

Bone Morphogenetic Proteins (BMP's) als Mitglieder der TGF β -Zytokin-Familie sind einerseits wesentlich an der normalen Knochenentwicklung und Frakturheilung, andererseits auch an pathologischen Knochenentwicklungs-Störungen, die zu definierten humanen Erkrankungen führen, beteiligt. Krankheits-verursachende Veränderungen der BMP-Expression wurden erstmalig bei der autosomal dominant erblichen Fibrodysplasia Ossificans progressiva (FOP) nachgewiesen. Die FOP ist eine seltene genetisch bedingte Erkrankung, die durch embryonale Ossifikationsstörungen (angeborene Anomalien der Großzehen, Finger und Wirbelkörper) und intermittierend verlaufende ektope Knochenbildung in der quergestreiften Muskulatur, insbesondere nach leichten Traumen, charakterisiert ist. Lymphoblastoide Zellen und Fibroblasten-ähnliche Zellen von Patienten mit FOP exprimieren vermehrt die BMP4-mRNA (Shafritz AB et al. 1996). Die Hypothese einer kausalen Beteiligung von BMP4 wird anhand des Befundes einer erhöhten Expression des BMP4-Rezeptors in Zellen von FOP-Patienten bekräftigt (Lanchoney TF et al. 1998). Maiti und Singh konnten feststellen, dass Kinder in der Wachstumsphase und Morbus Paget Patienten im peripheren Blut BMP-Level aufwiesen, die vom Normbereich abwichen (Maiti SK und Singh GR 1998, Urist MR und Hudak RT 1984). Die Untersuchung weiterer generalisierter Knochenerkrankungen auf Veränderungen im BMP-System ermöglicht einen Einblick in das komplexe Regulationssystem des Knochens. Im Rahmen der eigenen Untersuchungen sollen Patienten einbezogen werden, die sowohl eine erhöhte als auch verminderte Aktivität der Alkalischen Phosphatase (AP) im Serum sowie Veränderungen an der Knochenstruktur zeigen. Untersucht werden isolierte humane periphere Leukozyten von gesunden und erkrankten Personen auf die Expression der Gene des BMP-Systems. Zum Nachweis direkter Effekte an menschlichem Knochen wird die Expression der Gene des BMP-Systems sowie der osteoblastären Marker Alkalische Phosphatase (AP), Bone Sialo Protein II (BSPII) und Osteocalcin (OC) in osteoblastären Zellen der humanen Knochenzell-Kultur von gesunden Probanden, sowie von einem Hypophosphatasiepatienten und der Osteosarkomzelllinie Saos2 bestimmt. Die Inkubation der Zellen mit rhBMP2, dem löslichen BMP-Rezeptor IA (eALK3) und Vitamin D3 (1-25-OH D3) sowie die darauffolgende Expressionsanalyse sollen Aufschluss über das Coupling der einzelnen Faktoren geben.

4.0 Material und Methoden

4.1 Probanden

In die Untersuchungen wurden insgesamt 6 Patienten ($n_{\text{Pat}} = 6$) und zum Vergleich 20 Probanden ($n_{\text{Kontr}} = 20$) einbezogen, so dass sich eine Gesamtzahl von 26 ($n_{\text{Gesamt}} = 26$) untersuchten Personen ergab.

Die Patienten waren paraklinisch durch Veränderungen der Aktivität der Alkalischen Phosphatase charakterisiert: eine verminderte (Hypophosphatasie) oder eine erhöhte Aktivität (Hyperphosphatasie) der Alkalischen Phosphatase (APges) sowie der Knochenspezifischen Alkalischen Phosphatase (APbone, Ostase). (Tab 06)

Tab. 06

Patienten mit Hyperphosphatasie (Transitorische Hyperphosphatasie-THPI, Idiopathische Hyperphosphatasie=Hyperostosis Corticalis Deformans Juvenilis/HCDJ) und Hypophosphatasie (nHPI)

Erkrankung	Altersklasse	APges [NB 1-2,85 $\mu\text{mol/lxs}$]		Therapie Bisphosphonat/12 Wochen
		Beobachtungszeitraum 12 Mo vorher	nachher	
THPI	I: 2-12 J	188,9	9,27	-
THPI	II: 13-23 J	17,4	3,2	-
HCDJ	I: 2-12 J	80	25	15 mg Pamidronat
HCDJ	II: 13-23 J	17	9	30 mg Pamidronat
HCDJ	III: 24-50 J	20,2	9,9	45 mg Pamidronat
nHPI	III: 24-50 J	< 1,5	< 1,5	1 mg Ibandronat

Während des Untersuchungszeitraums wechselte die Bestimmungsmethode der Knochen-spezifischen Alkalischen Phosphatase. Zu Beginn konnte bei jedem Patienten die APbone (Analyse der Knochenspezifischen Alkalischen Phosphatase durch Laboreigenen Test) bestimmt werden. Diese wurde im Verlauf durch die Ostase (kommerzieller ELISA) ersetzt. Beide Subtypen an AP wiesen vergleichbare Relationen zu der APges auf, so dass sichergestellt werden konnte, dass die

Veränderungen der APges hauptsächlich (>90%) aus den Veränderungen der Knochenspezifischen Alkalischen Phosphatase resultierten.

Patientenbeschreibung: Der Patient H.P. (geb.1971) erlitt im Frühjahr 1999 eine Schenkelhals-Fraktur rechts. Daraus resultierte die Abklärung einer Knochenstoffwechselerkrankung. Es fanden sich eine deutlich erniedrigte Alkalische Phosphatase und Knochendichte sowie ein erhöhter Pyridoxalphosphat-Wert im Serum. Im Serum befanden sich das Kalzium, PTH und Vitamin D im Normbereich. Es konnte der molekulargenetische Nachweis einer Hypophosphatasie des juvenilen Typs erfolgen. Es fanden sich 2 verschiedene krankheitsverursachende Mutationen im AP-Gen (OMIM 171760) im Sinne einer Compounded-Heterozygotie. Die Mutation E174K ist relativ häufig bei Patienten mit milder Hypophosphatasie, die Mutation M278V wurde bisher nicht beschrieben und ist eher als eine schwerwiegende Mutation einzuschätzen. (Tab. 07)

Tab. 07

Laborparameter und Mutationen des Patienten H.P. mit Juveniler Hypophosphatasie

Laborparameter	Wert	Normbereich
Gesamt-AP	0,14-0,18 µmol/lxs	1,0-2,85 µmol/lxs
Ostase	1,95 µg/l	8-16,6 µg/l
Pyridoxalphosphat	70,0 ng/ml	5-20 ng/ml
Knochendichte: LWS	0,73	T-Score-3,3 SD
Schenkelhals	0,67	T-Score-3,1 SD
Mutationen im AP (TNSAP)-Gen	Exon 6: E174K Exon 9: M278V	

Patientenbeschreibung: Die Patientin D.P. (geb. 1976) ist das zweite Kind nicht verwandter Eltern. Seit dem Kleinkindalter wurden progressive Verdickungen und Deformitäten der langen Röhrenknochen, Knochenbrüche und craniofaciale Hyperostosen beobachtet. Die Laboruntersuchungen zeigten die typischen biochemischen Befunde der HCDJ mit massiver Erhöhung der Alkalischen Phosphatase. Eine von 1985-1990 durchgeführte Calcitonin-Behandlung (Miacalcic/Sandoz, 3x0,7ml i.m./Woche) bewirkte eine signifikante Reduktion der

Alkalischen Phosphatase von 200 auf 120 mmol/lxs. Klinisch nahm die Progression der Erkrankung ab. Wegen einer erneuten Progression der Erkrankung und dem Auftreten von Knochenschmerzen wurde von Februar 1996 bis Oktober 1999 eine Therapie mit dem Bisphosphonat Pamidronat (Aredia/Ciba) in einer Dosierung von 15-30 mg i.v. in 4 bis 12 wöchentlichen Abständen durchgeführt. Als Indikation zur erneuten Medikamentengabe galt ein Wiederanstieg der AP um 25% im Vergleich zur letzten Voruntersuchung. Biochemisch konnte eine hochsignifikante Verminderung des erhöhten Knochenumbaus erzielt werden. Die Alkalische Phosphatase im Serum verminderte sich von 120 auf 15 $\mu\text{mol/lxs}$ (altersentsprechender Normbereich 1-3 $\mu\text{mol/lxs}$) als Zeichen einer deutlich rückläufigen Hyperphosphatasie (Tab 06). Während vor der Pamidronat-Behandlung bei Knochenbiopsien ein generalisiert vorliegender unreifer instabiler Geflechtknochen auffällig war, fanden sich unter der Bisphosphonat-Therapie Knocheninseln mit reiferem Knochen lamellärer Struktur. Das Allgemeinbefinden der Patientin verbesserte sich, die Knochenschmerzen verschwanden, eine progressive Einmauerung der N. optici mit den Folgen von Optikusatrophie und Visusverlust konnte bisher verhindert werden.

4.2 Leukozyten aus peripherem Blut

Zum Vergleich der Expression verschiedener Gene in peripheren Leukozyten wurde die cDNA von 17 Normalpersonen und 6 Patienten aus dem Blut isoliert.

Für die Auswahl der Patienten waren das Alter, die jeweilige Erkrankung und die aktuelle Therapie mit Bisphosphonaten entscheidend.

Der Probandenpool wurde in **3 Altersklassen** unterteilt.

Altersklasse :	I:	2-12 Jahre (n=7)
	II:	13-23 Jahre (n=9)
	III:	24-50 Jahre (n=8)

Um den Effekt einer i.v. Bisphosphonat-Therapie auf die peripheren Blutzellen zu untersuchen, erfolgten die Blutentnahmen jeweils vor der Infusionstherapie und 24 Stunden danach.

Isolierung von Leukozyten

Aus mit Antikoagulantien (Heparin, EDTA) versetzten Monovetten (Einsender), wurde jeweils 1 ml peripheres Blut mit 5 ml Erythrozytenlysepuffer (Qiagen) gemischt und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Nach der Zentrifugation (10 min, 400xg, 4 °C) und der Entfernung des Überstandes musste das Zellpellet in 2 ml des Erythrozytenlysepuffers resuspendiert und der Zentrifugationsvorgang wiederholt werden. Es erfolgte anschließend eine Aufnahme in 3 ml des Erythrozytenlysepuffers, eine Aufteilung in kleine Portionen und eine kurze Zentrifugation. Nach Entnahme des Überstandes konnten die isolierten Leukozytenproben bei einer Temperatur von minus 80 °C gelagert werden.

4.3 Zellkultur

4.3.1 Osteosarkomzelllinie Saos2

Es wurde die Osteosarkomzelllinie Saos-2 (ATCC HTB 85) verwendet. Die Zellen lagerten bei minus 196 °C in flüssigem Stickstoff, in einem Einfriermedium aus 70 % DMEM (3,7 g/l NaHCO₃; 1g/l Glucose; kein Glutamin; Gibco BRL), 20 % fetalem Kälberserum (FCS, Greiner) und 10 % DMSO (SIGMA). Die Zellsuspension wurde bei 50°C aufgetaut, in ein Röhrchen (50 ml, Falcon) gegeben und innerhalb von zehn Minuten durch langsames Zugeben von 10 ml DMEM (1 ml/min) verdünnt. Nach der Zentrifugation (5 min, 1000 U/min, 21 °C) wurde der Überstand entfernt und das Zellpellet in 3 ml DMEM resuspendiert. Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen (25 cm², Greiner) gegeben und im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂) bis zu einem konfluenten Zellrasen kultiviert. Der Mediumwechsel fand zweimal wöchentlich statt. Der Überstand der Flaschen wurde abgesaugt und die Zellen mit PBS (Phosphate Buffered Saline; 8 g NaCl; 0,2 g KCl; 0,2 g KH₂PO₄; 1,15 g Na₂HPO₄; Gibco BRL) gewaschen. Nach Entnahme des Puffers konnten die Zellen mittels 2 ml Trypsin (0,05 % Trypsin / 0,02 % EDTA-Lösung, Gibco BRL) vom Boden der Kulturflasche abgelöst werden. Diese Reaktion musste nach 5 min durch 4 ml DMEM abgestoppt werden. Nach der Zentrifugation (5 min, 1000 U/min, 21 °C) der entstandenen Zellsuspension, wurde der Überstand verworfen und die Zellen in 3 ml DMEM resuspendiert.

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 50 µl Zellsuspension in 20 ml Isoton 2 (Counter) gegeben und mittels eines Zellzählgerätes (Coulter Counter Z1) die Zellzahl/ml bestimmt, die sich aus dem Mittelwert von drei Messungen zusammensetzte. Für einen Inkubationsversuch wurden 8 Zellkulturflaschen (25 cm², Greiner) angelegt. In jede Flasche wurden 1x 10⁶ Zellen in DMEM + 10% FCS ausgesät. Nach 24 h im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂) konnte der Wechsel zu einem FCS-freien Medium vorgenommen werden. In einem Intervall von 48 h „hungerten“ die Osteosarkomzellen aus und sprachen besser auf die nachfolgende Inkubation an. Die Zellen wurden mit dem rekombinanten humanen Knochenmorphogenese Faktor (rekombinantes humanes Bone Morphogenetic Protein 2, rhBMP2), der extrazellulären Domäne des BMP-Rezeptors IA (eALK3) und Vitamin D3 (Vitamin D3, 1 alpha, 25-Dihydroxy-, Calbiochem) inkubiert. (Tab. 08)

Das rhBMP2, sowie die extrazelluläre Domäne des BMP-Rezeptors IA wurde dankenswerterweise von Dr. Peter Hortschansky (Hans Knöll Institut für Naturstoff-Forschung, Jena) zur Verfügung gestellt.

Tab. 08

Inkubationsschema Osteosarkomzelllinie Saos2 und Osteoblastenzellkultur

Flasche	rhBMP2	eAlk3	Vitamin D3
1	x	x	x
2	500 ng/ml	x	x
3	x	x	4,2 ng/ml
4	500 ng/ml	x	4,2 ng/ml
5	x	200 ng/ml	x
6	500 ng/ml	200 ng/ml	x
7	x	200 g/ml	4,2 ng/ml
8	500 ng/ml	200 ng/ml	4,2 ng/ml

Die Inkubation erfolgte über 72 h, in einem serumfreien Milieu.

Darauf folgte die Entnahme des Überstandes, sowie eine Spülung des Zellrasens mit 2,5 ml PBS-Puffer. Die Inkubation mit 1 ml Trypsin führte zur Ablösung der Zellen vom Flaschenboden. Die Wirkung des Trypsins wurde durch die Zugabe von 2 ml DMEM abgestoppt. Der Zentrifugation (5 min, 1000 U/min, 21 °C) folgte die

Abnahme des Überstandes. Die Weiterverarbeitung des entstandenen Zellpellets erfolgte mittels RNA-Isolierung, cDNA Synthese, PCR, Gel-Elektrophorese und Densitometrie. (s. 4.6-4.12)

4.3.2 Osteoblastenzellkultur

Für die Untersuchungen an der Knochenzellkultur des Patienten mit Hypophosphatasie (nHPI) wurden zum Vergleich Knochenzellkulturen von 2 Normalpersonen herangezogen. Zu den Auswahlkriterien der Probanden zählte ein, den Altersklassen entsprechendes Lebensalter, sowie ein normaler Knochenstoffwechsel (normale Alkalische Phosphatase im peripheren Blut).

Knochenzellkulturen wurden von Probanden der Altersklasse III (24-50 Jahre) angelegt. Das Material zur Knochenzellkultur wurde aus Biopsaten der Wirbelsäule, des Beckenkammes bzw. des Femurschaftes gewonnen. Eine Mindestgröße von 1 cm x 0,5 cm war festgelegt. Der überwiegende Teil der Knochenstücke sollte Spongiosa enthalten. Für den Transport wurde ein spezielles Medium (RPMI-Medium, Biochrom, 25 mM HEPES, Merck) verwendet. Zur Kultivierung der osteoblastären Zellen eignete sich, unter Zusatz von Gentamycin (1 U/µg/ml, Ratiopharm), L-Glutamin (200 mM stabilisiert, 15 µl / 2,5 ml, Biochrom) und 10 % FCS, das DMEM. Unter Verwendung einer Knochenmarkpunktions-Nadel wurden gleich große Stanzbiopsate aus der Spongiosa des Operationsmaterials entnommen. Um Fett und Blut zu entfernen, wurden die Biopsate einem intensiven Spülen in PBS-Puffer unterzogen. Wiesen die Knochenstücke eine weiße Farbe auf, konnten jeweils 4 Stanzzylinder pro Well, in fünf 4-Well-Schalen (NuncTMSurface) verteilt und in 500 µl DMEM + 10 % FCS + Glutamin pro Well, bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert werden. Mit einem Skalpell erfolgte eine weitere Zerkleinerung der Knochenstücke in der Schale, die zu einer Adhärenz der Biopsate am Boden führte. Nach einer Kulturzeit von 7 Tagen wurde der erste Halbmediumwechsel vorgenommen. Während der weiteren Kultur wurde wöchentlich die Hälfte des Mediums gewechselt. Zeigte sich in den Kulturschalen ein konfluenter Zellrasen, so konnten die Zellen geerntet und nachfolgend inkubiert werden.

Die Grundlagen zur Kultur osteoblastärer Zellen konnten dankenswerterweise im Labor für Gastroenterologie / Endokrinologie, Zentrum Innere Medizin, Georg August-Universität Göttingen, unter der Leitung von Frau Dr. Heide Siggelkow erlernt werden.

Der Überstand der Kulturschalen wurde entnommen und 500 µl PBS-Puffer über den Zellrasen gegeben. Nach Entnahme des Puffers konnten die Zellen mittels 100 µl Trypsin vom Boden der Kulturschale abgelöst werden. Diese Reaktion wurde durch 200 µl DMEM abgestoppt. Nach der Zentrifugation (5 min, 1000 U/min, 21°C) der entstandenen Zellsuspension, wurde der Überstand verworfen und die Zellen in 1 ml DMEM resuspendiert. Darauf folgte die Bestimmung der Zellzahl. Hierbei wurden 10 µl der Zellsuspension und 10 µl Trypanblau (0,5%) gemischt und in eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Die Auszählung von 2 gegenüberliegenden Quadranten, die Multiplikation der erreichten Zahl mit 10^4 und die Division durch zwei, erbrachte die Zellzahl/ml. Darauffolgend konnten Zellen (1×10^4 Zellen/ml), für die Bestimmung der Aktivität der Alkalischen Phosphatase, auf Objektträger zentrifugiert werden (50 µl der Zellsuspension, 3 min, 1000 U/min, Zytocentrifuge).

Für die Inkubation waren zwei 4-Well-Schalen notwendig. Es wurden 1×10^4 Zellen/well in DMEM + 10 % FCS + Glutamin ausgesät. Nach einer Kultur von 24 h im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂) konnte der Wechsel in ein FCS-freies Medium vorgenommen werden. In einem Intervall von 48 h „hungerten“ die osteoblastären Zellen aus und sprachen besser auf die nachfolgende Inkubation an.

Die Zellen wurden mit rhBMP2, eALK3 und Vitamin D3 inkubiert. (Tab. 08)

Die Inkubation erfolgte über 72 h, in einem serumfreien Milieu. Die durch Trypsin vom Boden der Kulturschale gelösten Zellen wurden durch Zentrifugation von DMEM getrennt (s. 4.3.1). Die Weiterverarbeitung des entstandenen Zellpellets erfolgte mittels RNA-Isolierung, cDNA Synthese, PCR, Gel-Elektrophorese und Densitometrie. (s. 4.6-4.12)

4.4 Darstellung der Aktivität der Alkalischen Phosphatase

Zur histologischen Darstellung der Aktivität der Alkalischen Phosphatase wurde die Färbung nach Gerdes in abgewandelter Form eingesetzt. Dabei mussten die, auf den Objektträger zentrifugierten Zellen innerhalb von 30 Minuten verarbeitet werden. Die fünfminütige Fixierung der Zellen in Aceton (Merck Art.Nr.14) ging der Färbung voraus. Ihr folgte ein Spülvorgang in TBS (0,05 M Tris, 0,15 M NaCl, pH 9,7).

Auf die Herstellung der einzelnen Lösungen (Tab. 09) folgte die Mischung von 175 ml der ersten Lösung (TBS) und 62,5 ml der zweiten Lösung.

In die Natriumnitrit-Lösung (Lösung 3) konnte nun 500 µl Neufuchsin (Lösung 4) gegeben werden. Bei einer einminütigen Reaktion dieser zweiten Mischung sollte

eine Blasenbildung beobachtet werden. Die erste und die zweite Mischung wurden nun zusammengegeben, darauffolgend konnte die Lösung 5 zugesetzt werden und der pH-Wert mittels 2 N HCl auf 8,8 eingestellt werden. Nach Filtration der Endlösung wurden die Objektträger gefärbt. Die Reaktion wurde mikroskopisch kontrolliert und die erste Rotfärbung der Positiv-Kontrolle Saos2 abgewartet. Es schloss sich ein Spülvorgang in TBS an.

Zur Kernfärbung wurde die Gegenfärbung mit Hämalaun nach Meyer durchgeführt.

Dabei mussten 1 g Hämatoxylin (Merck 104302); 0,2 g NaJO₃ (Merck 6525), 50 g Kalialaun (Merck 507 A 95744) in 1000 ml destillierten Wasser gelöst werden. Danach wurden 50 g Chloralhydrat (Merck 2425) und 1 g Zitronensäure (Merck 244) zugegeben. Alle Substanzen wurden vor Einsatz einzeln gelöst und filtriert.

Anschließend wurden die Präparate kurz in die Lösung getaucht und nachfolgend 5-10 min in Leitungswasser gespült. Die fertig gefärbten Objektträger wurden in Kaisers Glyceringelatine (Merck 9242) eingedeckt.

Tab. 09

Färbung nach Gerdes in abgewandelter Form, histologische Darstellung der Aktivität der Alkalischen Phosphatase, Lösungen 1-5

Lösung	Menge	Stoff	Hersteller
1	1,21 g	Trishydroxymethyl-amino-methan	Merck 8382
	5,85 g	NaCl	Sigma
	1 l	destilliertes Wasser	
2	21 g	Propandiol	Merck 801464
	1 l	destilliertes Wasser	
3	50 mg	Natriumnitrit	Merck 102 F-0220
	1250 µl	destilliertes Wasser	
4	5 g	Neufuchsin	Merck 4040
	100 ml	2N HCl	Merck
5	125 mg	Naphtol-As-Bi-Phosphat	Sigma N 2250
	1500 µl	DMF	Merck 3034

4.5 Mikroskopie

Während der Anzucht der Zellen wurden lichtmikroskopische Kontrollen mit einem Umkehrmikroskop (Nicon, Eclipse TE 200) durchgeführt.

4.6 RNA-Isolierung

An die Aufarbeitung der Zellkultur und der Leukozyten bis zu einem Zellpellet, schloss sich die Isolierung der mRNA mittels dem RNeasy Total RNA-Isolations Kit (Qiagen) an. Der erste Schritt bestand in der Zugabe von 500 µl Lysepuffer, der aus 495 µl RLT-Puffer und 5 µl β-Mercaptoethanol (Sigma) bestand. Es folgte eine zehnmünütige Inkubation auf Eis. Das entstandene Lysat wurde in den lila Filtereinsatz (Qia Shredder) gegeben und 2 Minuten bei 14000 U/min zentrifugiert. Dabei wurden Zelltrümmer zurückgehalten. Anschließend wurden dem Zentrifugat 500 µl Ethanol (70 %) zugegeben und nach gutem Mischen in den rosafarbenen Filtereinsatz überführt. Es schloss sich eine Zentrifugation von 15 Sekunden bei 10000 U/min an. Dabei wurde die RNA selektiv in der Filtermatrix zurückgehalten. Nach der Verwerfung des entstandenen Eluates wurden 500 µl RW1-Waschpuffer in den Filtereinsatz gegeben. Es folgte eine Inkubation von 10 Minuten, sowie die Zentrifugation von 15 Sekunden bei 10000 U/min. Das Eluat wurde verworfen und 300 µl RPE-Waschpuffer zugefügt. Es folgte eine Zentrifugation von 2 Minuten bei 10000 U/min. Dieser Vorgang wurde einmal wiederholt. Der letzte Schritt bestand darin, die isolierte mRNA mittels 50 µl RNase-freiem Wassers durch eine Zentrifugation von 1 Minute bei 10000 U/min aus dem Filtereinsatz zu lösen und in ein neues Reaktionsgefäß (Eppendorf) zu überführen. Die Lagerung der mRNA erfolgte bei minus 80 °C.

4.7 cDNA-Synthese

Um die cDNA aus der isolierten mRNA herzustellen bedurfte es einer anfänglichen Erwärmung von 8,5 µl mRNA für 5 Minuten auf 65 °C. Hiermit konnte sichergestellt werden, dass Sekundärstrukturen aufgelöst waren. Darauf folgte die Zugabe von 11,5 µl Reaktionslösung : 4 µl 5x Reaktionspuffer (250 mM Tris-HCl, pH 8,3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂, Gibco BRL), 2 µl DTT (0,1 M, Gibco BRL), 1 µl oligo-dT (0,2 mg/ml, Roche), 1 µl Random Hexamer Primer (3,2 µg/20 µl), 2 µl dNTP-Stammlösung (2,5 mM ATP, dCTP, dGTP, dTTP, NEB); 0,5 µl Rnasin (40 U/µl, Gibco BRL), 1 µl M-MLV Reverse Transkriptase (200 U/µl, Gibco BRL). Nach einer Inkubation von 10 Minuten bei Raumtemperatur, schloss sich eine weitere Inkubation von 60 Minuten bei 37 °C an. Die Inaktivierung der Reversen Transkriptase bei 95 °C

über 8 Minuten beendete die cDNA-Synthese. Die Lagerung der cDNA erfolgte bei minus 20 °C.

4.8 Polymerase-Kettenreaktion

Zu Beginn des Ansetzens der Polymerase-Kettenreaktion wurden die Primer vorbereitet. (Tab. 10) Mittels der unten aufgeführten Gleichung konnte die Menge des einzusetzenden destillierten Wassers ausgerechnet werden, indem die lyophilisierten Primer (Gibco BRL) gelöst wurden.

Optische Dichte

$$\frac{\text{Optische Dichte}}{0,2 \times \text{Anzahl der Basenpaare}} = \text{ml DEPC-Wasser}$$

Anschließend wurde eine 1:1 Mischung des ersten und zweiten Primers hergestellt.

Tab. 10
Nukleotid-Sequenz der Primer 01 und 02, Annealingtemperatur (AT)

Primer 01/02	Sequenz	bp	AT
β-Aktin	CGGGAAATCGTGCGTGACAT	20	60,1°C
β-Aktin	GAAC TTTGGGGGATGCTCGC	20	60,2°C
BMP2	TCATAAAACCTGCAACAGCCACATCG	26	63,9°C
BMP2	GCTGTACTAGCGACACCCAC	20	51,9°C
BMP4	ACTGGTCCACCACAATGTGACACG	24	62,5°C
BMP4	GCTGAAGTCCACATAGAGCGAGTG	24	59°C
BMP5	GGAGACAATCATGTTCACTCCAG	23	54,8°C
BMP5	CCGAGATAACTGTATGCGACGAG	23	57,5°C
BMP-RIA	CGAAAAAGTGGCGGTGAAAG	20	56,9°C
BMP-RIA	CACCCTGGTATTCAAGGGCA	20	56,9°C
BSPII	CCAACGAAAGCCATGACCAC	20	57,4°C
BSPII	GGCCTTGTATGCACCATTCA	20	55,5°C
OC	CATGAGAGCCCTCACA	16	58°C
OC	AGAGCGACACCCTAGAC	17	58°C
AP	ACGTGGCTAAGAATGTCATC	20	55°C
AP	CTGGTAGGCGATGTCCTTA	19	55°C

Bevor 1 µl cDNA in ein Eppendorfhütchen vorgelegt werden konnte, wurde der Reaktionsmix für alle Proben angesetzt. Dabei war darauf zu achten, dass das Enzym Taq-Polymerase erst zum Schluss dem Reaktionsansatz zugegeben werden durfte. Es wurde 1 µl der zuvor gewonnenen cDNA vorgelegt. Dazu wurden 24 µl PCR-Reaktionsmix zugegeben. (Tab. 11)

Tab. 11
Zusammensetzung des Reaktionsmixes für die PCR

Menge	Stoff	Hersteller
18,3 µl	DEPC-Wasser	
2,5 µl	10x PCR-Puffer	Qiagen
1 µl	Primer (10 µM)	Gibco BRL
2µ l (Endkonz.: 200 µM)	dNTPs (2,5 mM each)	NEB
0,2 µl (Endkonz.: 1 U)	Taq-Polymerase (5 U/µl)	Qiagen

Zur quantitativen Bestimmung von BMP2, 4, 5 und BMPRIA in den Leukozytenpräparaten wurde eine kompetitive PCR durchgeführt. Dabei konkurrierte die in der cDNA enthaltene spezifische cDNA (z.B. BMP2) mit einem DNA-Molekül, das ebenfalls die Primerbindungsstellen für BMP2 enthielt, allerdings zu einem PCR-Produkt anderer Größe führte. (Tab. 12)

Da die Konzentration des DNA-Moleküls, das als BMP-Kompetitorfragment bezeichnet wird, bekannt war, konnte mittels einer Verdünnungsreihe die Konzentration der BMP2-cDNA, in der zu untersuchenden Probe bestimmt werden.

Das Kompetitorfragment (1 µl) musste nach dem Reaktionsmix zugegeben werden. Um ein Volumen von 25 µl während der PCR aufrechtzuerhalten, musste der Mikroliter des Kontrollfragmentes bei den 18,3 µl DEPC-Wasser des Reaktionsmixes abgezogen werden.

Die cDNA Menge jeder einzelnen Probe wurde nicht bestimmt. Um diesen Fehler und weitere Ungenauigkeiten im Pipettiervorgang zu kontrollieren, erforderte es den Einsatz eines externen Standards (β Aktin), welcher in einer vergleichbaren Menge in jeder Zelle exprimiert wird.

Tab. 12
Basenpaar-Anzahl (bp) Kompetitor und spezielle cDNA

Gen	Kompetitor	cDNA
β-Aktin	541 bp	712 bp
BMP 2	501 bp	671 bp
BMP 4	236 bp	346 bp
BMP 5	161 bp	305 bp
BMPRIA	290 bp	441 bp

Zur Polymerase-Kettenreaktion in TRIO-Thermoblöcken (Biometra) wurden folgende Programme verwendet. (Tab. 13)

Tab. 13
PCR-Programme

Gen	Beginn	Denaturation	Annealing	Elongation	Ende	Zyklen
β-Aktin	95°C/3min	95°C/30sec	60,5°C/30sec	72°C/20sec	72°C/5min	28
BMP2	95°C/3min	95°C/30sec	60°C/30sec	72°C/30sec	72°C/5min	34
BMP4	95°C/3min	95°C/30sec	61°C/30sec	72°C/30sec	72°C/5min	29
BMP5	95°C/3min	95°C/30sec	58°C/30sec	72°C/30sec	72°C/5min	34
BMPRIA	95°C/3min	95°C/30sec	58°C/30sec	72°C/25sec	72°C/5min	34
AP	94°C/2min	94°C/30sec	55°C/45sec	72°C/30sec	72°C/7min	33
BSP	95°C/3min	95°C/30sec	62°C/20sec	72°C/40sec	72°C/5min	34
OC	94°C/2min	94°C/30sec	58°C/45sec	72°C/30sec	72°C/7min	33

4.9 Auftrennung von PCR-Produkten durch Agarosegel-Elektrophorese

Es wurden 2 g Agarose (Gibco BRL) in 100 ml 1x TBE-Puffer (10x TBE: 162,2 g Tris Base; 27,8 g Borsäure; EDTA (Na₂, 2x H₂O); 1000 ml DEPC-Wasser; pH8) bei 90 Watt für 20 Minuten aufgekocht. Die Lösung musste anschließend auf 60 °C abkühlen, bevor 2 µl Ethidiumbromid (Roth) zugefügt werden konnten.

Es folgte die Füllung der, mit Kämmen vorbereiteten Gelträger. Das auspolymerisierte Gel wurde nun in die Gelkammer eingesetzt und mit 1x TBE-Puffer bedeckt. Nach der vorsichtigen Entnahme der Kämmen konnte mit der Überführung

des PCR-Produktes in die Geltaschen begonnen werden. Es wurde eine Lösung aus 5 µl PCR-Probe und 15 µl PCR-Puffer (10 mM Tris-HCL, 1 mM Na₂-EDTA; 0,1 % SDS; 30 % Glycerin; 0,0025 % Bromphenolblau; DEPC-Wasser; pH8) in die Geltaschen geladen. In die erste Tasche wurde nach Beendigung des Ladevorgangs 1 kb DNA-Längenstandard (Gibco BRL) pipetiert. Der folgende Gellauf bei 100 V wurde beendet, als 2/3 des Gels von der Bromphenolblau-Bande durchlaufen waren.

4.10 Videogestützte Auswertung

Voraussetzung der videogestützten Auswertung waren ein UV-Illuminator, eine Videokamera mit Schutzkabine, sowie das E.A.S.Y.-Software-Paket (Herolab).

Das Gel wurde auf den UV-Illuminator gelegt, über den Computerbildschirm konnten Tiefenschärfe und Helligkeit der Banden eingestellt werden. Es folgte das Einfrieren des Bildes auf dem Bildschirm, sowie die Rahmung der zu analysierenden Bereiche. Die Intensität der Bande wurde gemessen. Durch die Auftrennung des 1 kb-DNA-Längenmarkers (1018 bp-75 bp) im Agarosegel war eine Kontrolle der Größe des erwünschten Amplifikationsproduktes bzw. des Kompetitorfragmentes möglich.

4.11 Prinzip der Datenanalyse

Analyse der kompetitiven PCR

Für eine quantitative Aussage über die eingesetzte Menge cDNA war es erforderlich, die Bandenintensität der cDNA mit der des Kompetitorfragment zu vergleichen.

Zeigte sich ein Umschlagpunkt mit identischer Intensität, so konnte man davon ausgehen, dass die cDNA in gleicher Konzentration, wie das Kompetitorfragment vorlag. Es wurde ein externer Standart (β-Aktin), mit konstanter Expression in der Zelle, verwendet. Der Quotient aus der gemessenen Menge cDNA des untersuchten BMP's und der Konzentration der cDNA des β-Aktins ergab einen Wert, der unabhängig von der cDNA Menge des β-Aktins der einzelnen Proben war.

Analyse der PCR der Zellkulturproben

Die Auswertung der nicht-kompetitiven PCR basierte auf dem Ausmessen der Intensität der Banden im E.A.S.Y. - Programm. Die zu untersuchten Genprodukte wurden im Doppelversuch, β-Aktin im dreifachen Ansatz, bestimmt.

Die weitere Verwendung der im E.A.S.Y. - Programm gemessenen Rohdaten erforderte eine Umrechnung nach folgender Formel:

$$[\text{EXP} ([x - 110974] / 6580)] = y$$

Der erhaltene Wert steht für die eingesetzten mRNA-Moleküle (y). Die umgerechneten Werte wurden auf den externen Standard β -Aktin bezogen.

(s. 4.8)

4.12 Datenanalyse

Leukozytenexpressionsmuster

Der letzte Schritt der Auswertung bestand darin, die Werte der Patientengruppe mit den Daten der Normalpersonen zu vergleichen. Nachdem die Ergebnisse der Normalpersonen zu einem Mittelwert zusammengefasst wurden, konnte der Quotient aus dem Patientenwert und dem Mittelwert gebildet werden.

Es war nun möglich die Patientendaten, in Bezug auf die Normalpersonen, zu vergleichen. Festgelegt wurde, dass eine Wertung, also die Abweichung von der Norm, eine Veränderung um den Faktor 2 verlangte. Der Faktor 2 stellte einen empirischen Schätzwert dar. Dieses Vorgehen reduzierte den Einfluss von Fehlern, die während des Bearbeitungs- und Auswertevorgangs entstanden.

Knochenzellkultur

Um den Effekt der Inkubation darstellen zu können, wurde ein Quotient aus den Werten der inkubierten zu den nicht inkubierten Zellen gebildet.

Es bestand die Festlegung, dass ein Inkubationseffekt ab dem Faktor 2, als ein solcher gewertet werden darf.

5.0 Ergebnisse

5.1 Expression von Bone Morphogenetic Proteins (BMP) in peripheren Leukozyten

In den peripheren Leukozyten konnte in Voruntersuchungen sowohl die mRNA von BMP1, 2, 4, 5, 6, 8, als auch die des BMP-Rezeptors IA (BMPRIA) nachgewiesen werden. Die mRNA von BMP7 und des BMP-Rezeptors II wurde in peripheren Leukozyten nicht exprimiert. Weiterhin kristallisierten sich deutliche Expressionsunterschiede der peripheren Leukozyten von Patienten mit Knochenstoffwechselstörungen und Normalpersonen heraus. Besonders große Abweichungen zeigten die Gene BMP2, 4, 5 und BMPRIA. Aufgrund dessen wurden diese vier Gene in dieser Arbeit zur näheren quantitativen Bestimmung herangezogen. Die Expression wurde mittels eines externen Standards (β -Aktin) normiert und durch die kompetitive PCR quantitativ bestimmt. Die Expressionswerte der Patienten wurden mit den Werten der gesunden Probanden des gleichen Alters normiert. Es wurden drei verschiedene Altersklassen (AK) untersucht und auf die Altersklasse I Bezug genommen. (Tab. 14)

Tab. 14
Einteilung der Altersklassen

Altersklasse	Jahre
I	2-12 (n=7)
II	13-23 (n=9)
III	24-50 (n=8)

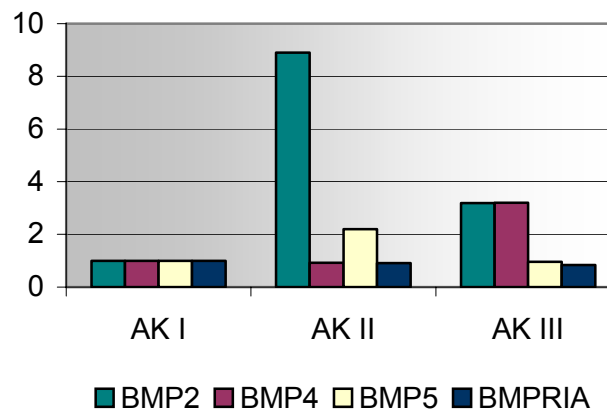
5.1.1 Expression von BMP in peripheren Leukozyten der Normalpersonen

Es wurde die Expression der BMP-Gene unterschiedlicher Altersklassen miteinander verglichen. Bei den Probanden der Altersklasse II konnte, im Vergleich zu den Personen der Altersklasse I ein Anstieg der Expression der mRNA von BMP2, sowie

von BMP5 verzeichnet werden. Dieser Effekt erwies sich bei den Normalpersonen der Altersklasse 3 als rückläufig. BMP4 dagegen stieg erst in der Altersklasse III der gesunden Probanden an. Die Expression der mRNA des BMPRIA zeigte keine Unterschiede in den einzelnen Altersklassen. (Abb. 02)

Abb. 02

Vergleich der Expression der BMP2-, BMP4-, BMP5-, BMPRIA- mRNA, der Normalpersonen dreier Altersklassen, bezogen auf die AKI
(AK I: 2-12 Jahre, AKII: 13-23 Jahre, AKIII: 24-50 Jahre)

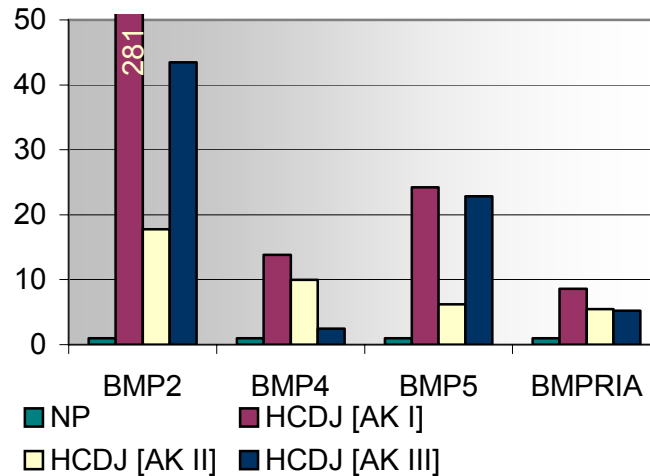


5.1.2 Expression von BMP in peripheren Leukozyten der Patienten mit Hyperostosis Corticalis Deformans Juvenililis (HCDJ)

Im folgenden wird der Expressionsunterschied zwischen den HCDJ-Patienten und den Normalpersonen beschrieben. Die Expression der BMP-Gene konnte vor und nach der Therapie mit Bisphosphonaten kontrolliert werden. Es wurde die Einteilung in drei Altersklassen (AKI, AKII, AKIII) berücksichtigt. Die Patienten der AKI-III wiesen im Vergleich zu Normalpersonen eine deutlich erhöhte Expression der mRNA von BMP2, BMP4, BMP5 und BMPRIA auf. In der AKI und AKIII zeigten die Gene von BMP2 und BMP5 eine besonders hohe Expression. Der HCDJ-Patient der AKII wies eine geringere Erhöhung der BMP2- und BMP5-Expression auf. (Abb. 03)

Abb. 03

Vergleich der Expression der BMP2-, BMP4-, BMP5-, BMPRIA-mRNA der Normalpersonen (NP) und der HCDJ-Patienten, bezogen auf die Normalpersonen (AKI: 2-12 Jahre, AKII: 13-23 Jahre, AKIII: 24-50 Jahre)



Therapierte man HCDJ-Patienten mit Bisphosphonaten so erreichte man in den peripheren Leukozyten einen Expressionsanstieg der BMP5-mRNA. Im Unterschied zu dem jüngeren Patienten stieg in den Leukozyten der HCDJ-Patientin der AKIII zusätzlich die Expression der BMP4- und BMPRIA-mRNA an. Die Expression wich noch deutlicher von den Werten der Normalpersonen ab. (Abb. 04 , Abb. 04a)

Abb. 04

Vergleich der Expression der BMP2-, BMP4-, BMP5-, BMPRIA-mRNA der HCDJ-Patientin der Altersklasse III, vor (HCDJv) und nach (HCDJn) der Therapie mit Bisphosphonaten, bezogen auf Normalpersonen (NP), (AKIII: 24-50 Jahre)

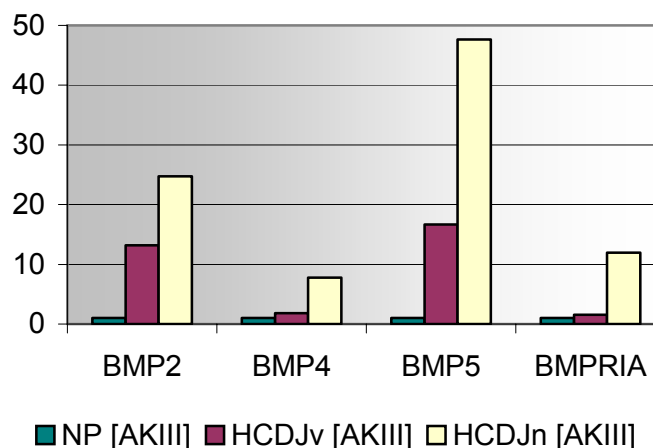
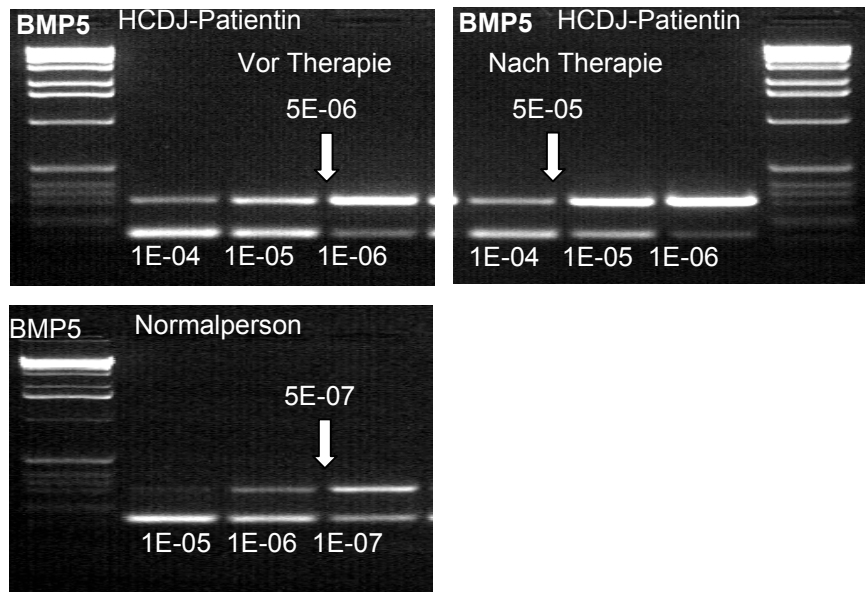


Abb. 04a

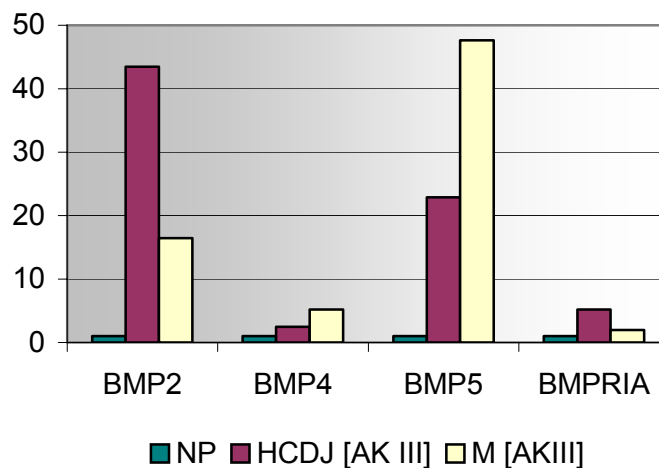
Nachweis der BMP5-mRNA mittels kompetitiver PCR, einer Normalperson und der HCDJ-Patientin vor und nach erfolgter Bisphosphonat-Therapie (AKIII: 24-50 Jahre)



Untersuchte man die klinisch gesunde Mutter (AKIII) der HCDJ-Patientin (AKIII), so konnte man feststellen, dass auch sie alle untersuchten Gene im Vergleich zu Normalpersonen (AKIII) verstärkt exprimierte. Wie ihre Tochter exprimierte sie die BMP2- und BMP5-mRNA in besonders hohem Maße. Sie zeigte eine höhere Expression der BMP4- und BMP5-mRNA als ihre Tochter. Anders herum verhielt es sich bei der Expression der BMP2- und BMPRIA-mRNA, die bei der Tochter stärker von der Norm abwich. (Abb. 05)

Abb. 05

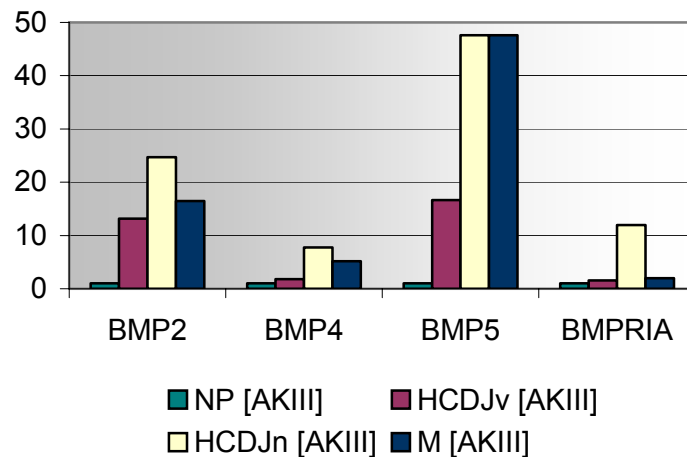
Vergleich der Expression der BMP2-, BMP4-, BMP5-, BMPRIA-mRNA der Normalpersonen (NP), der HCDJ-Patientin und der Mutter (M) der HCDJ-Patientin, bezogen auf die Normalpersonen (AKIII: 24-50 Jahre)



Nach erfolgter Bisphosphonat-Therapie der an HCDJ erkrankten Tochter (AKIII) näherte sich die Expression ihrer Leukozyten den Werten der gesunden Mutter an. Als einziger Unterschied zur Expression der Mutter blieb eine höhere Expression der mRNA des BMPRIA. (Abb. 06)

Abb. 06

Vergleich der Expression der BMP2-, BMP4-, BMP5-, BMPRIA-mRNA der HCDJ-Patientin, vor (HCDJv) und nach (HCDJn) der Therapie mit Bisphosphonaten und der Mutter, bezogen auf Normalpersonen (NP) (AKIII: 24-50 Jahre)



5.1.3 Expression von BMP in peripheren Leukozyten der Patienten mit Transienter Hyperphosphatasie (THPI)

Die Patienten mit einer transienten Hyperphosphatasie (THPI) wiesen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung eine erhöhte Aktivität der Alkalischen Phosphatase (Apges, APbone, Ostase) im Serum auf und zeigten im zeitlichen Verlauf über 4-12 Wochen ohne Therapie eine vollständige Normalisierung. Es standen Patienten aus zwei Altersgruppen (AKI, AKII) zur Verfügung. Die peripheren Leukozyten von Patienten mit einer THPI exprimierten im Vergleich zu Normalpersonen ihres Alters vermehrt die BMP2-, BMP4-, BMP5- und BMPRIA-mRNA. Während der Remissionsphase stieg die Expression der BMP4-, BMP5- und BMPRIA-mRNA an, die der BMP2-mRNA reagierte nicht. Es zeigte sich ein weiteres Abweichen der Expression der BMP-Gene von den Werten der Normalpersonen.

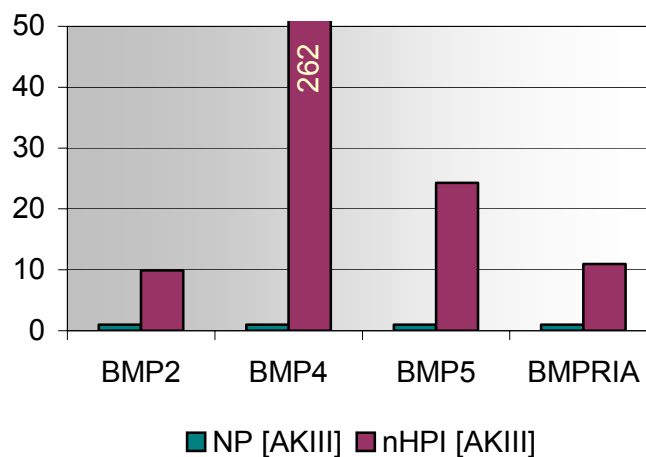
5.1.4 Expression von BMP in peripheren Leukozyten des Patienten mit Hypophosphatasie (nHPI)

Patienten mit der Erkrankung der Hypophosphatasie (nHPI) sind im Vergleich zu den bisher beschriebenen Patienten durch eine verringerte Aktivität der Alkalischen Phosphatase (APges, APbone, Ostase) im Serum charakterisiert. Der Patient und die Kontrollen entsprachen der Altersklasse der 24-50-jährigen Probanden (AKIII).

Es konnte in den peripheren Leukozyten im Vergleich zu Normalpersonen eine vermehrte Expression der BMP2-, BMP4-, BMP5- und BMPRIA-mRNA nachgewiesen werden. Einen besonders hohen Expressionswert zeigte die BMP4- und BMP5-mRNA. (Abb. 07)

Abb. 07

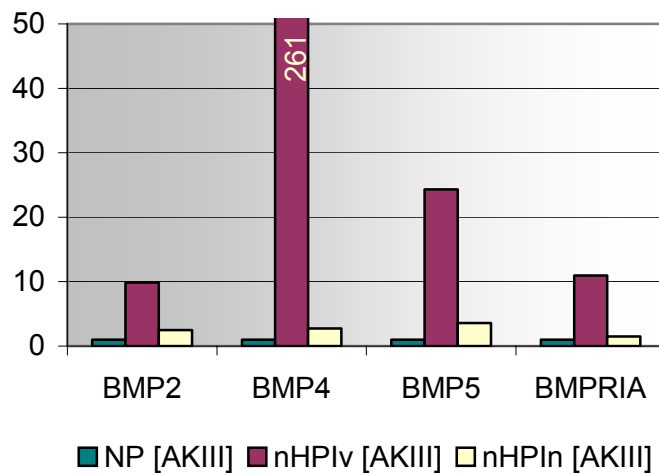
Vergleich der Expression der BMP2-, BMP4-, BMP5-, BMPRIA-mRNA der Normalpersonen und des nHPI-Patienten, bezogen auf die Normalpersonen (NP) (AKIII: 24-50 Jahre)



Unter der Therapie mit Bisphosphonaten sanken die erhöhten Expressionen der BMP2-, BMP4-, BMP5- und BMPRIA-mRNA ab und näherten sich den Werten der Normalpersonen der zugehörigen Altersklasse an. (Abb. 08)

Abb. 08

Vergleich der Expression der BMP2-, BMP4-, BMP5-, BMPRIA-mRNA des nHPI-Patienten (AKIII) vor (nHPIv) und nach der Bisphosphonat-Therapie (nHPIIn), bezogen auf Normalpersonen (NP), (AKIII: 24-50 Jahre)



5.2 Untersuchungen an humanen primären osteoblastären Zellen

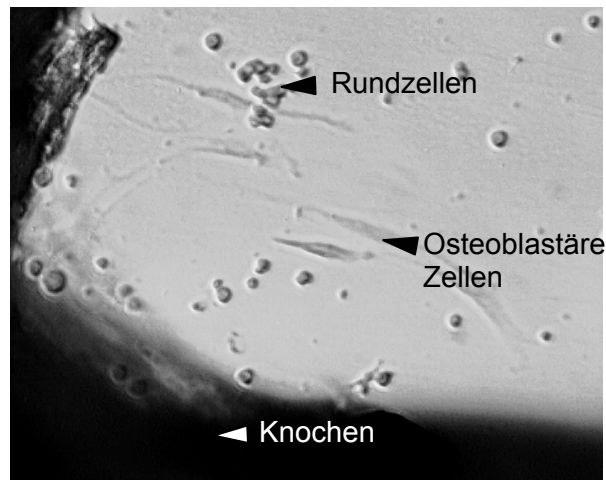
5.2.1 Etablierung der primären Osteoblastenkulturen

a) Morphologie und Wachstum der osteoblastären Zellen

Nach durchschnittlich 5 Tagen konnten die ersten mesenchymalen Zellen in dem Ansatz der Knochenzell-Kultur nachgewiesen werden. Die Zellen befanden sich an den Spongiosastückchen. Sie zeigten ein spindelzelliges Aussehen. In der Umgebung der Knochenproben konnten Fetttropfen, sowie Zellen mit rundem Erscheinungsbild beobachtet werden, die sich bis zum 7.Tag zurückbildeten. Das Ausmaß der Proliferation dieser Rundzellen hatte Einfluß auf das Wachstum der Spindelzellen. So konnte festgestellt werden, dass bei einer hohen Zelldichte der Rundzellen eine frühere, sowie schnellere Proliferation der osteoblastären Zellen stattfand. (Abb. 09)

Abb. 09

Darstellung einzelner osteoblastärer Zellen außerhalb des Knochenstückes mit Adhärenz am Boden von NUNC-Schalen, zusätzlich Rundzellen



Nach 10-12 Tagen kleideten Spindelzellen netzartig Knochenvorsprünge und Zwischenräume der Spongiosabälkchen aus. Weiterhin konnte beobachtet werden, dass die anfänglich einzelnen Zellen sich teilten und langsam zu Gruppen konfluieren, die mit Zellausläufern untereinander verbunden waren. (Abb. 10a-c)

Abb. 10a

Darstellung eines Knochenstückes aus dem spindelförmige Zellen (osteoblastäre Zellen) netzartig auswachsen und den Boden der Kulturschale (NUNC) bedecken



Abb. 10b

Darstellung eines Ausschnittes der Abb. 10a, spindelförmige Zellen wachsen in einem netzartigen Verband aus dem Knochenstück

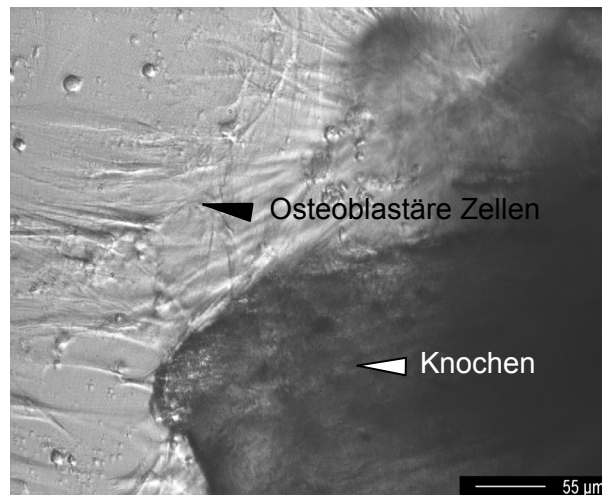
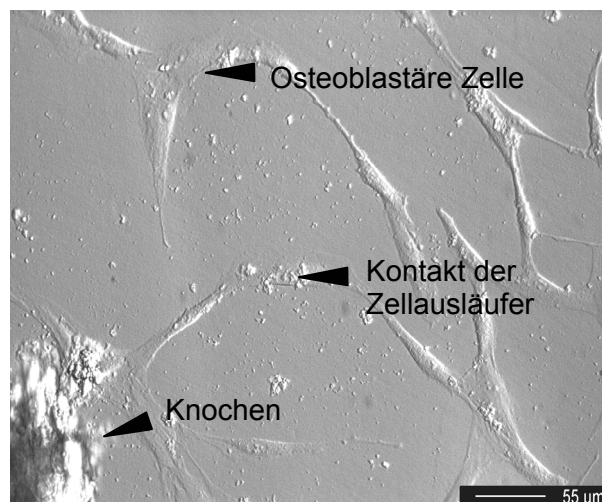


Abb. 10c

Darstellung eines Ausschnittes der Abb. 10b, spindelförmige Zellen wachsen aus dem Knochen heraus und weisen Zell-Zell-Kontakte auf



Zwischen den Knochenzell-Kulturen des Patienten mit Hypophosphatasie und denen der Normalpersonen bestand ein Unterschied in der Zeit, die zur Ausbildung der Konfluenz der Zellen notwendig war. Die osteoblastären Zellen des Patienten benötigten 72 Tage, die der Personen mit einem normalen Knochenstoffwechsel durchschnittlich nur 30 Tage, bis ein gleichmäßiger Zellrasen auf dem Boden der Schalen nachweisbar wurde. Die Morphe der Patientenzellen zeigte keine Auffälligkeiten. Rundzellen waren vorhanden.

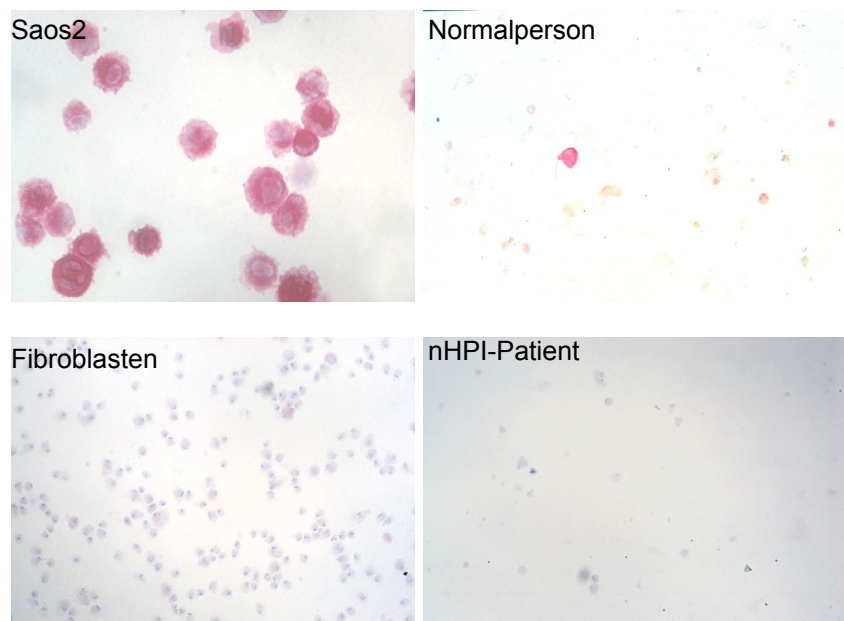
b) Nachweis der Aktivität der Alkalischen Phosphatase in osteoblastären Zellen

Zur Charakterisierung der spindelförmigen Zellen kam die Färbung nach Gerdes (abgewandelt) zur Anwendung. Hiermit konnte qualitativ anhand der Rotfärbung der Zellen die Aktivität der Alkalischen Phosphatase nachgewiesen werden. Als Positiv-Kontrolle der Zellfärbung wurde die humane Osteosarkomzelllinie Saos2, als Negativ-Kontrolle eine humane Hautfibroblastenzelllinie verwendet.

Die Sarkomzellen wiesen eine starke Färbbarkeit aller Zellen als Zeichen einer hohen AP-Aktivität auf. Die Hautfibroblastenkultur zeigte keine deutlich gefärbten Zellen, wobei lediglich eine leichte Rottönung weniger Zellen (0,5%) nachweisbar war. In den osteoblastären Kulturen der Normalpersonen ließen sich ein Teil der Zellen deutlich anfärben. Sie glichen in der Intensität den Saos2-Zellen. Daneben fanden sich nur leicht oder nicht angefärbte Zellen. Die Anzahl stark positiver Zellen schwankte von 2-14%. Die osteoblastären Zellen des an Hypophosphatasie erkrankten Patienten wiesen, trotz vorhandener AP-mRNA, übereinstimmend mit der erniedrigten AP-Aktivität im Serum keine Anfärbbarkeit auf. (Abb. 11)

Abb. 11

Färbung nach Gerdes (abgewandelt), Darstellung osteoblastärer Zellen mit unterschiedlicher Aktivität der Alkalischen Phosphatase, Positiv-Kontrolle Saos2-Zellen, Negativ-Kontrolle humane Hautfibroblastenzelllinie



5.2.2 Untersuchungen zur Gen-Expression primärer Osteoblasten-Kulturen

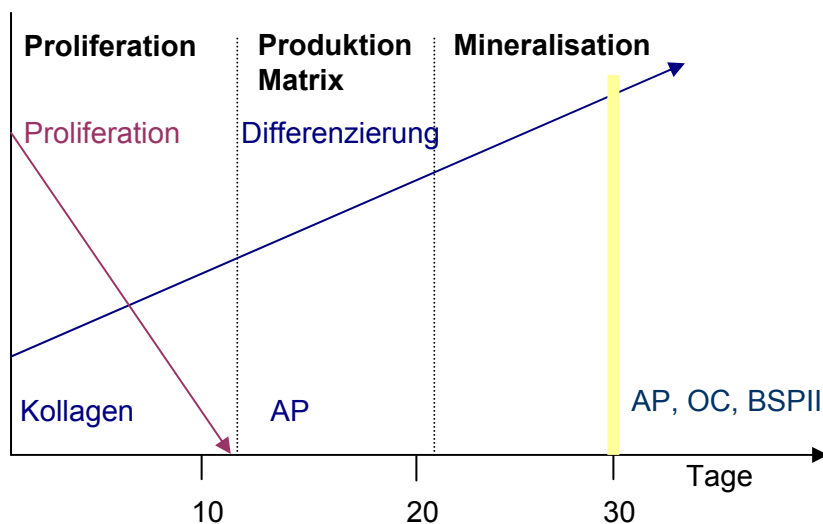
Es wurden Osteoblastenkulturen zweier gesunder Probanden und eines Patienten mit Hypophosphatasie (nHPI) untersucht, die mit der humanen Osteosarkomzelllinie Saos2 verglichen wurden. Im Unterschied zu den Untersuchungen der peripheren Leukozyten wurde bei den osteoblastären Zellen nicht nur die mRNA von BMP2, BMP4 und BMP5 einbezogen, sondern auch die der knochenspezifischen Proteine Bone Sialo Protein II (BSPII) und Osteocalcin (OC), sowie die der Alkalischen Phosphatase (AP). In peripheren Leukozyten konnte weder bei Normalpersonen, noch bei den Patienten eine Expression dieser drei zusätzlichen Gene nachgewiesen werden.

Basale Expression osteoblastärer Zellen der Normalpersonen

Die osteoblastären Zellen exprimierten die knochenspezifischen Proteine Bone Sialo Protein II (BSPII) und Osteocalcin (OC), sowie die Alkalische Phosphatase (AP). Sie befanden sich zum Zeitpunkt der Ernte im Stadium der frühen Mineralisation. (Abb. 12)

Abb. 12

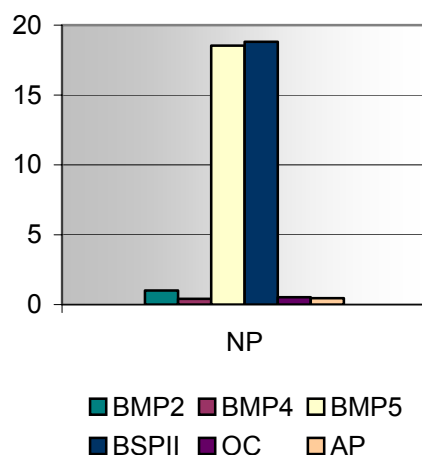
Entwicklungsstadien der osteoblastären Zelle, Ernte in dieser Arbeit im frühen Mineralisationsstadium am 30. Tag (Diagramm abgewandelt, Stein GS et al. 1990)



Osteoblastäre Zellen der Normalpersonen exprimierten unter serumfreien und serumhaltigen Bedingungen die mRNA der Gene BMP2, BMP4, BMP5. Die Zellen aus dem serumfreien Milieu wiesen bezogen auf die BMP2-mRNA eine besonders hohe Expression der BMP5- und BSPII-mRNA auf. (Abb. 13)

Abb. 13

Vergleich der Expression der BMP2-, BMP4-, BMP5-, BSPII-, OC- und AP-mRNA der osteoblastären Zellen der Normalpersonen, bezogen auf die BMP2-mRNA, serumfreies Milieu



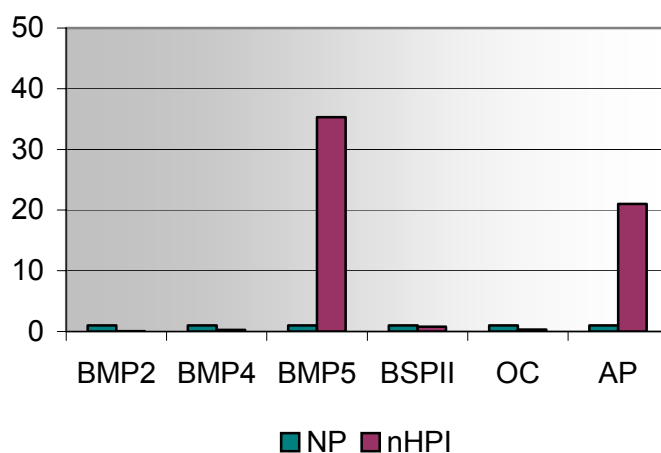
Basale Expression osteoblastärer Zellen des nHPI-Patienten

Die osteoblastären Zellen des Hypophosphatasie-Patienten aus dem serumfreien Milieu exprimierten die BMP2-, BMP4-, BMP5-, BSPII-, OC- und AP-mRNA.

Sie wiesen im Vergleich zu den Zellen der gesunden Probanden eine höhere Expression der BMP5- und AP-mRNA auf. Dagegen exprimierten sie die BMP2-, BMP4- und OC-mRNA in geringeren Maßen. (Abb. 14)

Abb. 14

Vergleich der Expression der BMP2-, BMP4-, BMP5-, BSPII-, OC- und AP-mRNA der osteoblastären Zellen der Normalpersonen (NP) und des Hypophosphatasie-Patienten (nHPI), bezogen auf die Normalpersonen, serumfreies Milieu

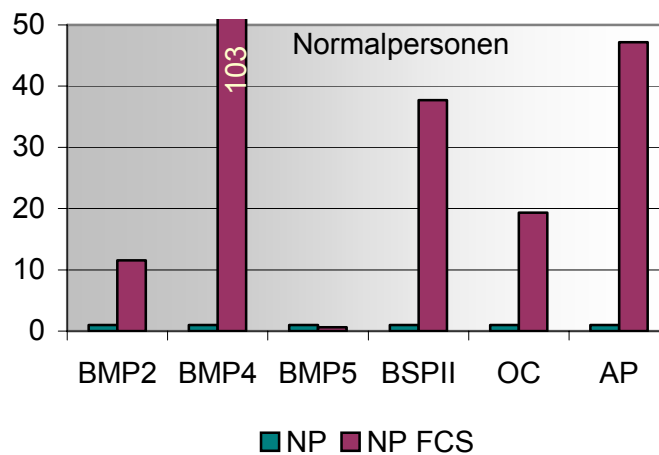


Basale Expression osteoblastärer Zellen der Normalpersonen und des nHPI-Patienten unter FCS

Die primären osteoblastären Zellen der Normalpersonen die mit FCS in Berührung kamen reagierten im Vergleich zu den Zellen aus dem serumfreien Milieu mit einer erhöhten Expression besonders der BMP4-mRNA, aber auch der BMP2-, BSPII-, OC- und AP-mRNA. Die Expression der BMP5-mRNA änderte sich nicht. (Abb. 15)

Abb. 15

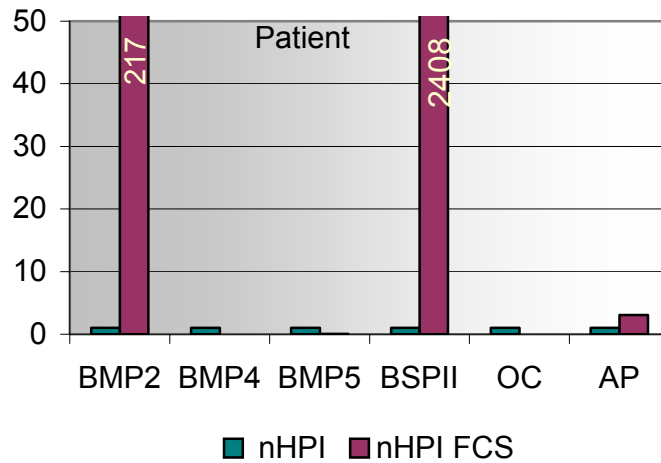
Vergleich der Expression der BMP2-, BMP4-, BMP5-, BSPII-, OC- und AP-mRNA der osteoblastären Zellen der Normalpersonen aus serumfreiem (NP) und serumhaltigen (NP FCS) Milieu, bezogen auf das serumfreie Milieu



Vergleich man die Expression der untersuchten Gene der osteoblastären Zellen des Patienten mit Hypophosphatasie unter dem Einfluss von FCS mit den Patientenzellen, die aus einem serumfreien Milieu entstammten, so stellte man fest, dass die Expression der BMP2-, BSPII-, und der AP-mRNA unter FCS anstieg. Die Expression der BMP4-, BMP5- und OC-mRNA fiel ab. (Abb. 16)

Abb. 16

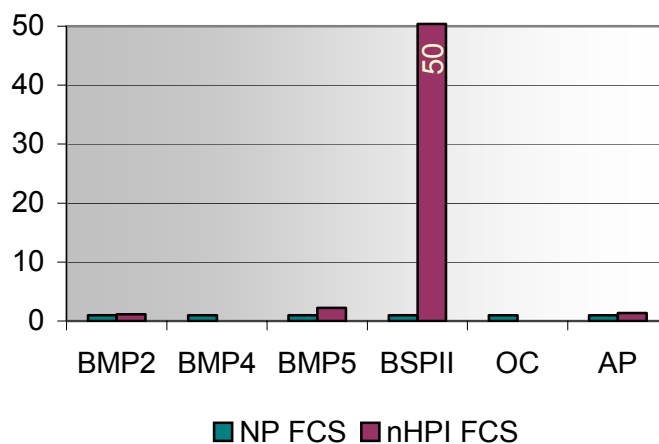
Vergleich der Expression der BMP2-, BMP4-, BMP5-, BSPII-, OC- und AP-mRNA der osteoblastären Zellen des Hypophosphatasie-Patienten aus serumfreien (nHPI) und serumhaltigen (nHPIFCS) Milieu, bezogen auf das serumfreie Milieu



Untersuchte man osteoblastäre Zellen des Hypophosphatasiepatienten unter FCS haltigen Bedingungen fiel auf, dass im Vergleich zu den Zellen der Normalpersonen die Expression der BMP2-mRNA im Normbereich lag. Die Expression der BMP4-mRNA verblieb aber unter dem Normwert. Während die Expression der AP- und BMP5-mRNA sich den Werten der Normalpersonen näherte, stieg die der BSPII-mRNA an. Die Expression der OC-mRNA blieb weiter stark erniedrigt. (Abb. 17)

Abb. 17

Vergleich der Expression der BMP2-, BMP4-, BMP5-, BSPII-, OC- und AP-mRNA der osteoblastären Zellen der Normalpersonen (NP FCS) und des Hypophosphatasie-Patienten (nHPI FCS), bezogen auf die Normalpersonen, serumhaltiges Milieu (FCS)



5.2.3 Inkubationsversuche

Die osteoblastären Zellen wurden mit 1-25-OH D3 (Cholecalciferol; 4,2ng/ml), rekombinatem humanen BMP2 (rhBMP2; 500 ng/ml) und der extrazellulären Domäne des BMPRIA (eALK3; 200 ng/ml) inkubiert.

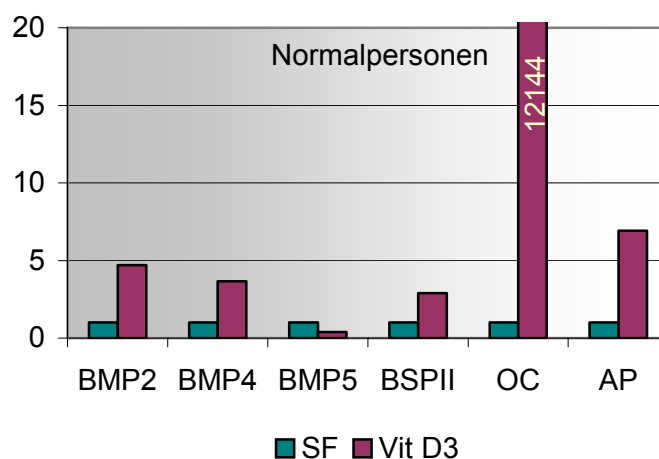
a) Expression osteoblastärer Zellen der Normalpersonen und des nHPI-Patienten unter Vitamin D3 (1-25-OH D3)

Inkubierte man osteoblastäre Zellen von Normalpersonen mit 4,2ng/ml Vitamin D3 über 72h, so konnte man im Vergleich zu den nicht inkubierten Zellen einen Anstieg der Expression der BMP2-, BMP4-, BSPII-, OC- und AP-mRNA nachweisen.

In besonders hohem Maße wurde die OC-mRNA unter der Vitamin D3-Zugabe exprimiert. Die Expression der BMP5-mRNA fiel ab. (Abb. 18)

Abb. 18

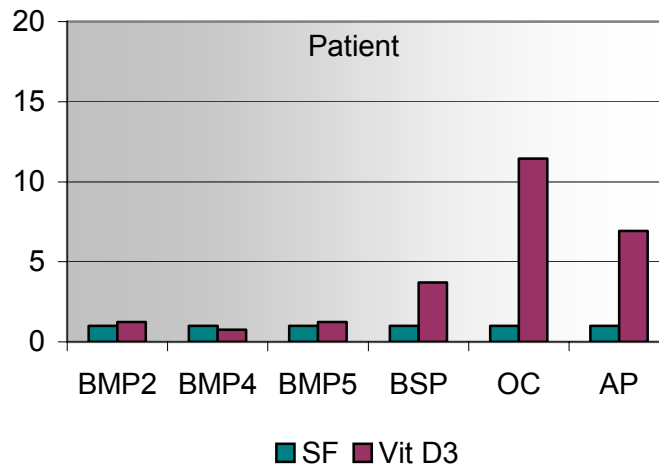
Vergleich der Expression der BMP2-, BMP4-, BMP5-, BSPII-, OC- und AP-mRNA der osteoblastären Zellen der Normalpersonen vor und nach Inkubation mit Vitamin D3 (4,2ng/ml), bezogen auf die osteoblastären Zellen vor Inkubation (SF), serumfreies Milieu



Insgesamt zeigten die Patientenzellen im Vergleich zu den osteoblastären Zellen der Normalpersonen unter der Inkubation mit Vitamin D3 geringere Ausprägungen der Expressionsveränderungen. Sie reagierten auf die Zugabe von 1-25-OH D3 mit einem Anstieg der Expression der mRNA der knochenspezifischen Gene BSPII und OC, sowie der Alkalischen Phosphatase. Es konnte der stärkste Expressionsanstieg bei der OC-mRNA nachgewiesen werden. Die Expression der BMP-mRNA änderte sich unter dem Einfluß von Vitamin D3 nicht. (Abb. 19)

Abb. 19

Vergleich der Expression der BMP2-, BMP4-, BMP5-, BSPII-, OC- und AP-mRNA der osteoblastären Zellen des Hypophosphatasiepatienten vor und nach Inkubation mit Vitamin D3 (4,2ng/ml), bezogen auf die osteoblastären Zellen vor Inkubation (SF), serumfreies Milieu



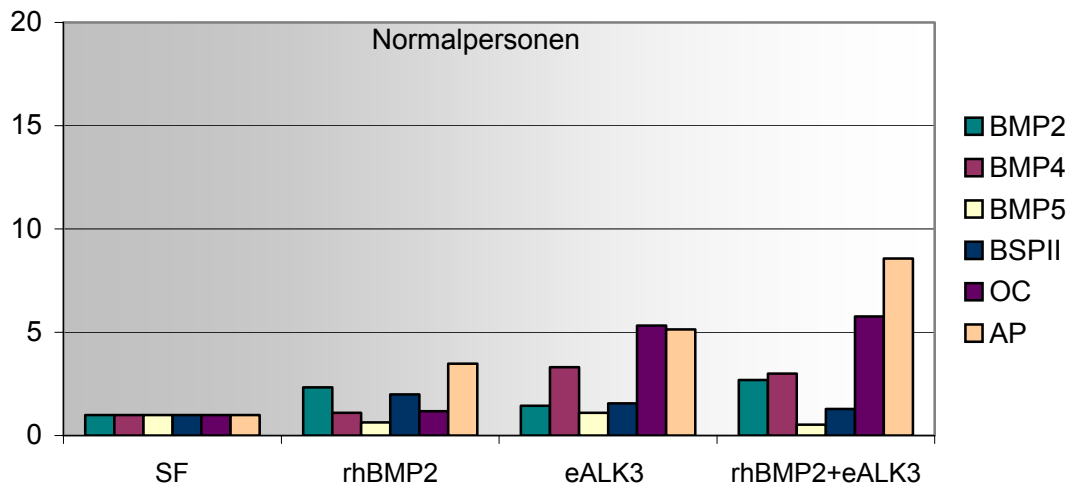
b) Expression osteoblastärer Zellen der Normalpersonen und des nHPI-Patienten unter rekombinantem humanen BMP2 (rhBMP2) und der extrazellulären Domäne des BMPRIA (eALK3)

Die Inkubation der osteoblastären Zellen von Normalpersonen mit 500ng/ml rhBMP2 über 72h führte im Vergleich zu nicht inkubierten osteoblastären Zellen zu einem geringen Expressionsanstieg der BMP2-, BSPII- und AP-mRNA. Die Expression der BMP4-, BMP5- und OC-mRNA änderte sich unter der Inkubation mit rhBMP2 nur unwesentlich. Die Zugabe von 200ng/ml eALK3, der extrazellulären Domäne des BMP-Rezeptors IA, über 72h auf die osteoblastären Zellen der Normalpersonen führte im Vergleich zu den nicht inkubierten osteoblastären Zellen zu einem ebenfalls geringen Expressionsanstieg der BMP4-, OC- und AP-mRNA. Die Expression der BMP2-, BMP5- und BSPII-mRNA reagierte auf die Inkubation mit eALK3 nicht.

Die Inkubation mit der Kombination aus rhBMP2 und eALK3 veränderte die Expression der osteoblastären Zellen der Normalpersonen in stärkerem Maße. Im Vergleich zu den osteoblastären Zellen die nicht inkubiert wurden, wiesen die inkubierten Zellen höhere Expressionslevel der BMP2-, BMP4-, OC- und AP-mRNA auf. Die AP-mRNA reagierte mit dem stärksten Expressionsanstieg. Die Expression der BMP5- und der BSPII-mRNA änderte sich nicht. (Abb. 20)

Abb. 20

Vergleich der Expression der BMP2-, BMP4-, BMP5-, BSPII-, OC- und AP-mRNA der osteoblastären Zellen der Normalpersonen vor und nach Inkubation mit rhBMP2 (500ng/ml) und eALK3 (200ng/ml), bezogen auf die osteoblastären Zellen vor Inkubation (SF), serumfreies Milieu



Die osteoblastären Zellen des Hypophosphatasiepatienten reagierten auf die Inkubation mit rhBMP2 mit einem Anstieg der Expression der BMP2-mRNA und einem Expressionsabfall der BMP5-, BSPII- und AP-mRNA. Die Expression der BMP4- und OC-mRNA änderte sich unter rhBMP2 nicht. Inkubierte man die osteoblastären Zellen des Hypophosphatasiepatienten mit der extrazellulären Domäne des BMP-Rezeptors IA (eALK3), so stieg im Vergleich zu den nicht inkubierten Patientenzellen die Expression der BSPII- und AP-mRNA an.

Während die Expression der BMP2-mRNA keine Reaktion auf eALK3 zeigte, sank die Expression der BMP4-, BMP5- und OC-mRNA ab. Kombinierte man rhBMP2 mit eALK3 so konnte bei der Inkubation der osteoblastären Zellen des Hypophosphatasiepatienten im Vergleich zu den nicht inkubierten Patientenzellen ein Abfall der Expression der BMP2, BMP4-, BMP5- und BSPII-mRNA festgestellt werden. Ausschließlich die AP-mRNA zeigte einen Anstieg der Expression, der aber eine viel geringere Intensität aufwies, als unter der Inkubation mit eALK3 allein. Das Osteocalcin reagierte auf diese Kombination mit keiner Expressionsveränderung. (Abb. 21a, 21b)

Abb. 21a

Vergleich der Expression der BMP2-, BMP4-, BMP5-, BSPII-, OC- und AP-mRNA der osteoblastären Zellen des Hypophosphatasie-Patienten vor und nach Inkubation mit rhBMP2 (500ng/ml) und eALK3 (200ng/ml), bezogen auf die osteoblastären Zellen vor Inkubation (SF), serumfreies Milieu

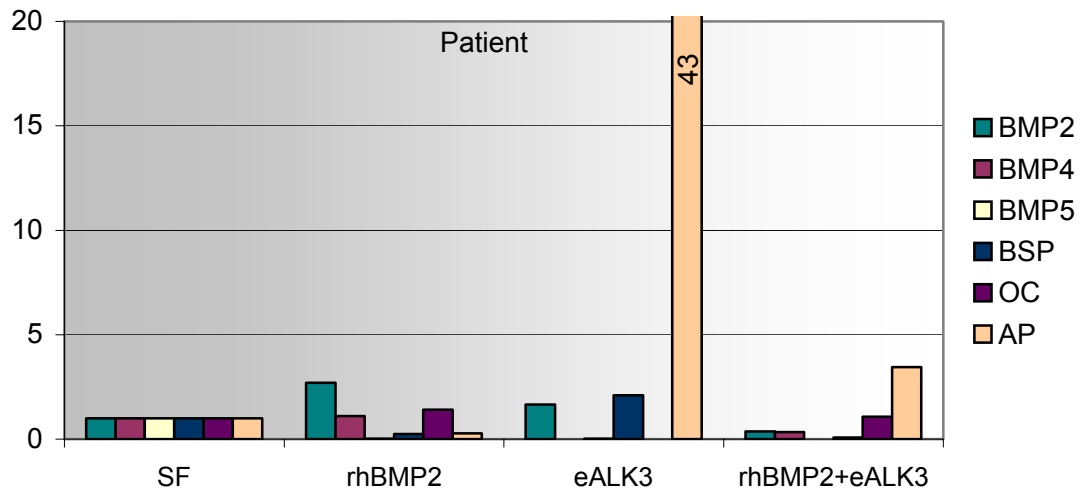
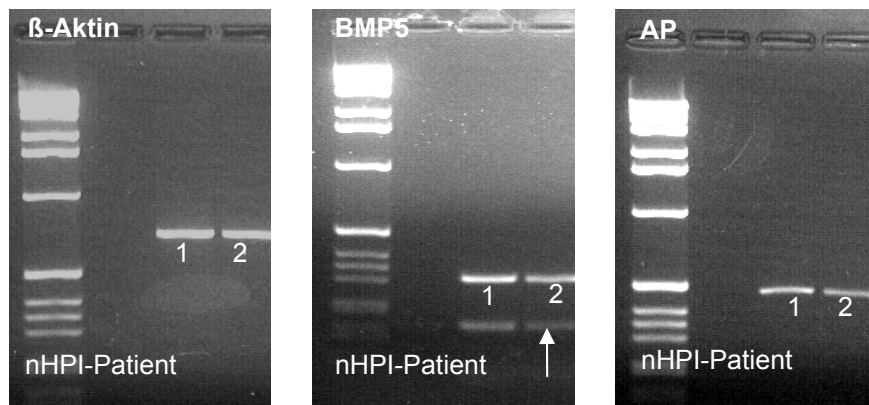


Abb. 21b

Elektrophorese des PCR-Produktes der β -Aktin-, BMP5- und AP-mRNA vor (1) und nach (2) der Inkubation mit rhBMP2, der osteoblastären Zellen des Hypophosphatasie-Patienten (nHPI), Pfeil = Verunreinigung mit Kompetitorfragment



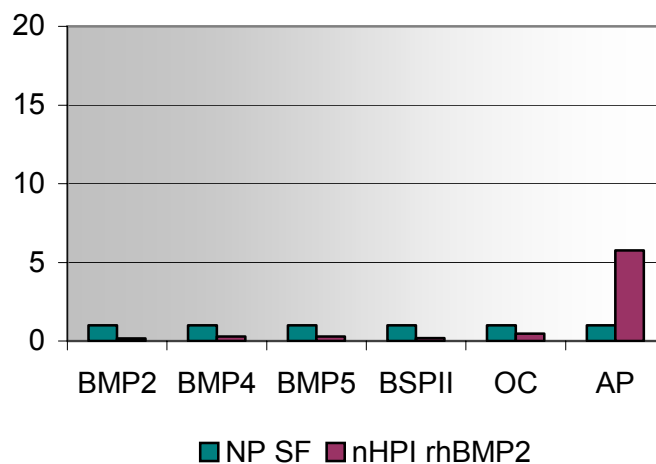
Nicht inkubierte osteoblastäre Zellen des Hypophosphatasie-Patienten exprimierten im Vergleich zu Zellen von Normalpersonen die BMP5- und AP-mRNA in erhöhtem, die BMP2-, BMP4- und OC-mRNA in erniedrigtem Maße. Die Expression der BSPII-mRNA befand sich im Normbereich.

Die Reaktionen auf das rhBMP2 führten letzten Endes zu einer Senkung der erhöhten Expression der BMP5-mRNA unter den Expressionswert der nicht inkubierten Zellen der Normalpersonen und einer Annäherung des Expressionslevels

der AP-mRNA an den Bereich der gesunden Probanden. Die Expression der BSPII-mRNA sank unter den Wert der Normalpersonen ab. (Abb. 22)

Abb. 22

Vergleich der Expression der BMP2-, BMP4-, BMP5-, BSPII-, OC- und AP-mRNA der osteoblastären Zellen des Hypophosphatasiepatienten (nHPI) nach Inkubation mit rhBMP2 (500ng/ml), bezogen auf die osteoblastären Zellen der Normalpersonen vor Inkubation (SF)

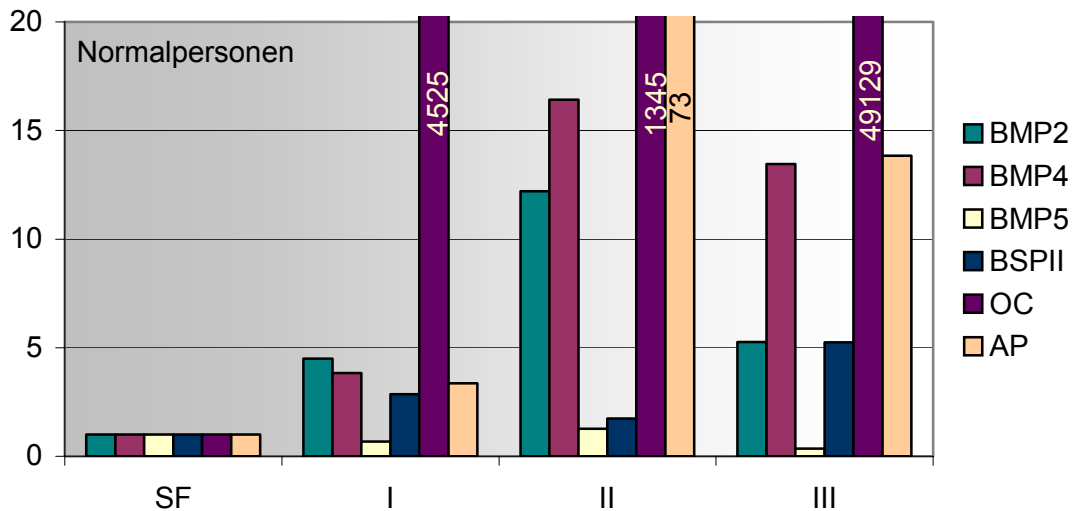


c) Expression osteoblastärer Zellen der Normalpersonen und des nHPI-Patienten unter Vitamin D3 (1-25-OH D3), rekombinatem humanen BMP2 (rhBMP2) und der extrazellulären Domäne des BMPRIA (eALK3)

Die Inkubation mit Vitamin D3 und rhBMP2 führte in den osteoblastären Zellen zu einem Expressionsanstieg der BMP2-, BMP4-, BSPII-, OC- und AP-mRNA. Ein besonders hoher Anstieg der Expression konnte bei der OC-mRNA verzeichnet werden. Die Expression der BMP5-mRNA zeigte keine Reaktion. Aus der Zugabe von Vitamin D3 und eALK3 resultierte in den osteoblastären Zellen der Normalpersonen im Vergleich zu nicht inkubierten Zellen ein Expressionsanstieg der BMP2-, BMP4-, OC- und AP-mRNA. Die Expression der BMP5- und BSPII-mRNA änderte sich nicht. Wurden die osteoblastären Zellen der Normalpersonen mit einer Kombination aus Vitamin D3, rhBMP2 und eALK3 inkubiert (Tab.15), so stieg die Expression der BMP2-, BMP4-, BSPII-, OC- und AP-mRNA. Die Expression der BMP5-mRNA fiel unter diesen Inkubationsbedingungen ab. (Abb. 23a,b)

Abb. 23a

Vergleich der Expression der BMP2-, BMP4-, BMP5-, BSPII-, OC- und AP-mRNA der osteoblastären Zellen der Normalpersonen vor und nach Inkubation mit Vitamin D3 (4,2ng/ml), rhBMP2 (500ng/ml) und eALK3 (200ng/ml) (s.Tab. 15), bezogen auf die osteoblastären Zellen vor Inkubation (SF), serumfreies Milieu



Tab. 15
Inkubationsschema

	1-25-OH D3	rhBMP2	eAlk3
I	4,2 ng/ml	500 ng/ml	x
II	4,2 ng/ml	x	200 ng/ml
III	4,2ng/ml	500 ng/ml	200 ng/ml

In allen Inkubationen die 4,2ng/ml Vitamin D3 enthielten konnte im Vergleich zu den nicht inkubierten osteoblastären Zellen der Normalpersonen ein starker Expressionsanstieg der OC-mRNA nachgewiesen werden. (Abb. 23b)

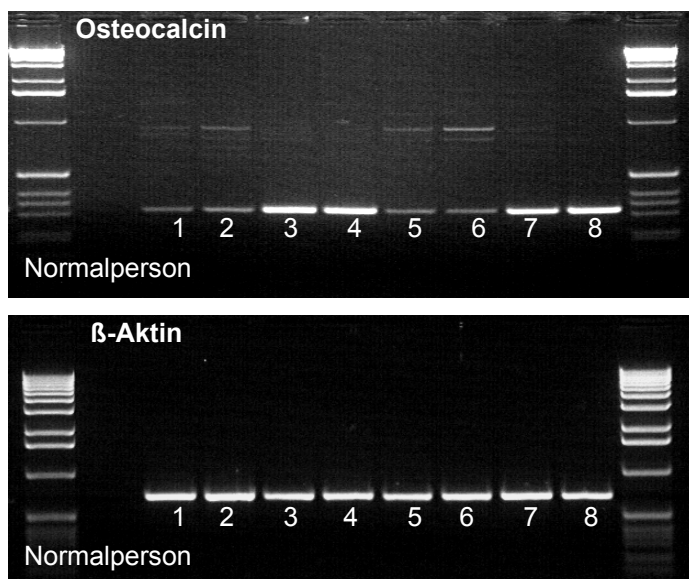


Abb. 23b

Osteocalcin- und β -Aktin-mRNA, Elektrophorese des PCR- Produktes der osteoblastären Zellen der Normalpersonen unter der Inkubation mit :

- 1: Kontrolle serumfrei
- 2: rhBMP2
- 3: Vit D3 (4,2ng/ml)
- 4: rhBMP2 (500ng/ml) + Vit D3
- 5: eALK3 (200ng/ml)
- 6: eALK3 + rhBMP2
- 7: eALK3 + Vit D3
- 8: rhBMP2 + eALK3 + Vit D3

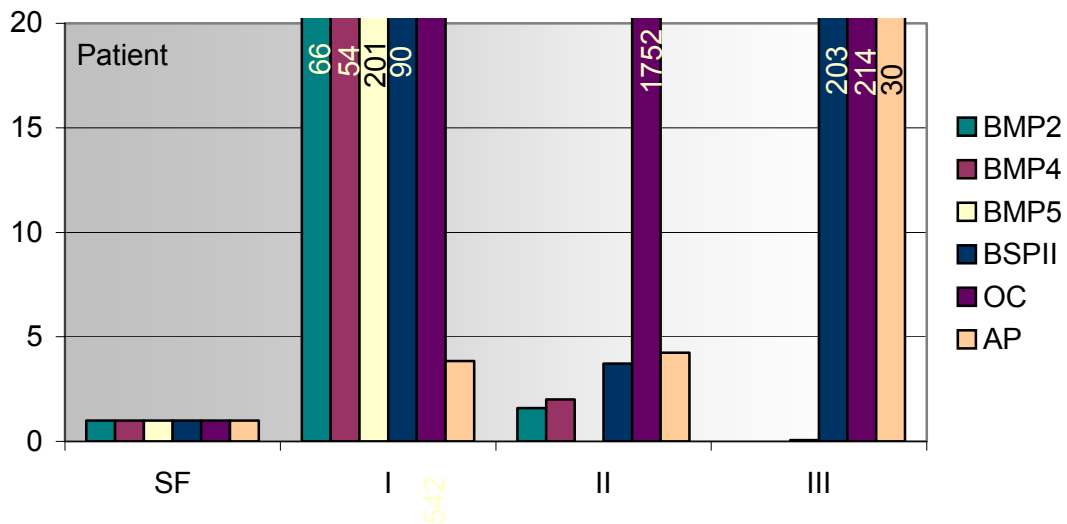
Kombinierte man das Vitamin D3 mit dem rhBMP2 und inkubierte damit die Zellen des Hypophosphatasiepatienten, so konnte man im Vergleich zu den nicht inkubierten Patientenzellen einen sehr starken Expressionsanstieg der BMP2-, BMP4-, BMP5-, BSPII- und OC-mRNA feststellen. RhBMP2 schwächte die Reaktion des Osteocalcins auf Vitamin D3 nicht ab. Die Expression der AP-mRNA stieg in geringerem Maße an. Fügte man anstelle von rhBMP2, eALK3 zu dem Vitamin D3, so fiel, im Vergleich zur Kombination von Vitamin D3 und rhBMP2, ein niedrigerer Expressionsanstieg der BMP2-, BMP4- und BSPII-mRNA auf. Eine Ausnahme stellte die AP-mRNA dar, die in gleichem Maße, wie unter Vitamin D3 plus rhBMP2 anstieg. Während die Expression der OC-mRNA noch wesentlich stärker, als unter der Kombination Vitamin D3 plus rhBMP2 anstieg, fiel die der BMP5-mRNA ab.

Verwendete man eine Kombination von Vitamin D3, rhBMP2 und eALK3 und inkubierte damit die osteoblastären Zellen des Hypophosphatasiepatienten, so fielen im Vergleich zu den nicht inkubierten Patientenzellen die Expressionen der BMP2-, BMP4- und BMP5-mRNA ab. Vitamin D3 allein führte zu keiner Expressionsänderung der mRNA der BMP's. Die Kombination von rhBMP2 und eAlk3 bewirkte einen Abfall der Expression der untersuchten BMP-mRNA.

Obwohl die Kombination von rhBMP2 und eAlk3 im Vergleich zu den nicht inkubierten Patientenzellen ausschließlich zu einer erhöhten Expression der AP-mRNA führte, konnte ein potenzierender Effekt, durch die Dreifachkombination mit Vitamin D3, nicht nur auf die Expression der AP-mRNA nachgewiesen werden, sondern auch auf die Expression der BSPII- und OC-mRNA. (Abb. 24)

Abb. 24

Vergleich der Expression der BMP2-, BMP4-, BMP5-, BSPII-, OC- und AP-mRNA der osteoblastären Zellen des Hypophosphatasiepatienten vor und nach Inkubation mit Vitamin D3 (4,2ng/ml), rhBMP2 (500ng/ml) und eALK3 (200ng/ml) (s.Tab. 15), bezogen auf die osteoblastären Zellen vor Inkubation (SF), serumfreies Milieu



Tab. 15
Inkubationsschema

	1-25-OH D3	rhBMP2	eAlk3
I	4,2 ng/ml	500 ng/ml	x
II	4,2 ng/ml	x	200 ng/ml
III	4,2 ng/ml	500 ng/ml	200 ng/ml

Aus der Zugabe von Vitamin D3 plus rhBMP2 zu den Patientenzellen resultierte, dass im Vergleich zu den nicht inkubierten Zellen der Normalpersonen der Expressionswert der osteoblastären Zellen des Hypophosphatasiepatienten sowohl der BMP5-, BSPII-, OC- und AP-mRNA, als auch der BMP2- und BMP4-mRNA einen erhöhten Wert aufwies. Die Inkubation der Patientenzellen mit Vitamin D3 allein änderte an der Expression der BMP5-mRNA im Vergleich zu den nicht inkubierten Patientenzellen nichts. Gab man rhBMP2 für 72 Stunden auf diese Zellen, sank der Expressionslevel. Die BMP5-mRNA der osteoblastären Zellen des Hypophosphatasiepatienten zeigte aber unter der Kombination von Vitamin D3 und rhBMP2 einen Anstieg der Expression um den Faktor 201. Daraus resultierte, dass sich der Expressionswert der BMP5-mRNA noch weiter von dem der nicht inkubierten osteoblastären Zellen der Normalpersonen entfernte. Der Expressionswert der AP-mRNA entfernte sich unter der Inkubation mit Vitamin D3 und rhBMP2 ebenfalls von dem Normwert. Inkubierte man die osteoblastären Zellen

des Hypophosphatasiepatienten mit Vitamin D3 und eALK3, so exprimierten diese im Vergleich zu den nicht inkubierten Zellen der Normalpersonen die BMP2-, BMP4- und BMP5-mRNA in geringerem Maße. Der Expressionswert der BSP1I-, OC- und AP-mRNA lag über dem der nicht inkubierten Zellen der Normalpersonen. Unter der Dreierkombination aus Vitamin D3, rhBMP2 und eALK3 exprimierten die osteoblastären Zellen des Hypophosphatasiepatienten im Vergleich zu nicht inkubierten osteoblastären Zellen der Normalpersonen geringere Mengen an BMP2- und BMP4-mRNA. Die Expression der BMP5-mRNA zeigte nur noch einen leicht erhöhten Wert. Im Unterschied dazu exprimierten die Patientenzellen die BSP1I-, OC- und AP-mRNA in einem erhöhten Ausmaß.

5.3 Untersuchungen an der Humanen Osteosarkomzelllinie Saos2

5.3.1 Nachweis der Aktivität der Alkalischen Phosphatase in Saos2-Zellen

Zur Charakterisierung der spindelförmigen Zellen kam die Färbung nach Gerdes (abgewandelt) zur Anwendung. Hiermit konnte qualitativ anhand der Rotfärbung der Zellen die Aktivität der Alkalischen Phosphatase nachgewiesen werden. Als Positiv-Kontrolle der Zellfärbung wurde die humane Osteosarkomzelllinie Saos2, als Negativ-Kontrolle eine humane Hautfibroblastenzelllinie verwendet.

Die Sarkomzellen wiesen eine starke Färbbarkeit aller Zellen als Zeichen einer hohen AP-Aktivität auf.

5.3.2 Untersuchungen zur Gen-Expression der Saos2-Zellen

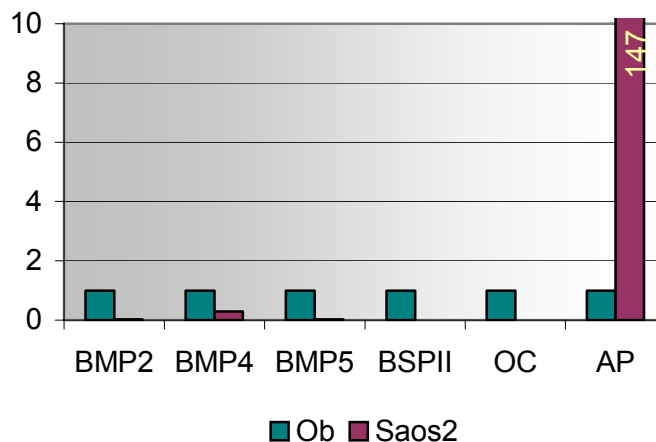
Es wurde die Expression der BMP2-, BMP4-, BMP5-, AP-, BSPII- und OC-mRNA in den Zellen der humanen Osteosarkomzelllinie untersucht und mit den Ergebnissen der osteoblastären Zellen verglichen.

Basale Expression der Saos2-Zellen

Humane Osteosarkomzellen der Zelllinie Saos2 exprimierten in einem serumfreien Milieu die BMP2-, BMP4-, BMP5- und AP-mRNA. Im Vergleich zu primären osteoblastären Zellen von gesunden Probanden exprimierten die Osteosarkomzellen vermehrt die AP-mRNA. Die Expression der BMP-Gene lag unter dem Wert der primären osteoblastären Zellen, die der BSPII- und OC-mRNA war in den Osteosarkomzellen nicht nachweisbar. (Abb. 25)

Abb. 25

Vergleich der Expression der BMP2-, BMP4-, BMP5-, BSPII-, OC- und AP-mRNA der primären osteoblastären Zellen (Ob) und der Zellen der humanen Osteosarkomzelllinie Saos2, bezogen auf die primären osteoblastären Zellen, serumfreies Milieu

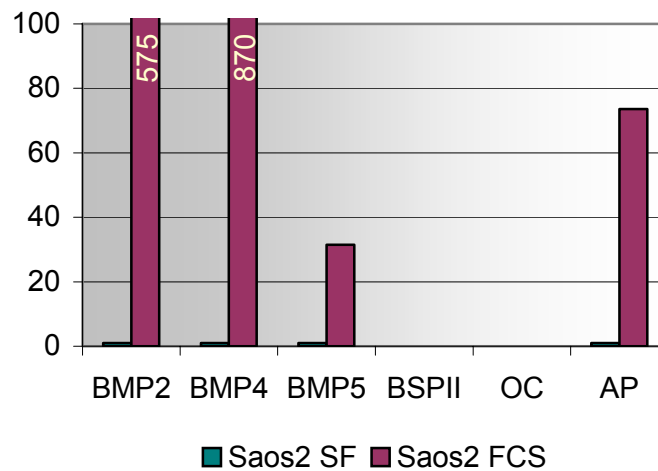


Basale Expression der Saos2-Zellen unter FCS

Unter der Zugabe von FCS in das Medium der Osteosarkomzellen, stieg die Expression der BMP-mRNA stark an. Auch die bereits im serumfreien Milieu hohe Expression der AP-mRNA wies einen Anstieg auf. (Abb. 26)

Abb. 26

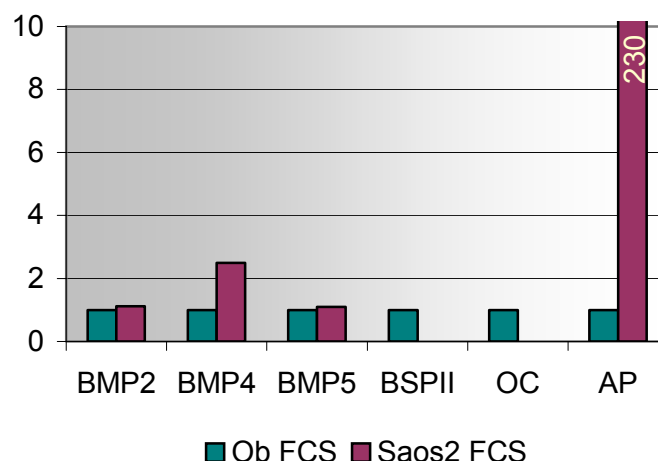
Vergleich der Expression der BMP2-, BMP4-, BMP5-, BSPII-, OC- und AP-mRNA der Zellen der humanen Osteosarkomzelllinie Saos2 aus serumfreien (SF) und serumhaltigen (FCS) Milieu, bezogen auf das serumfreie Milieu



Die Osteosarkomzellen reagierten intensiver auf die Zugabe von FCS, als die primären osteoblastären Zellen der Normalpersonen. Die Expression der BMP4-mRNA stieg um den Faktor 870 an. Primäre osteoblastäre Zellen wiesen einen Anstieg um den Faktor 103 auf. Daraus resultierte, dass die Osteosarkomzellen, die im serumfreien Milieu zwar einen niedrigeren Expressionswert der BMP4-mRNA aufwiesen, nach der Zugabe von FCS aber mehr BMP4-mRNA als die primären osteoblastären Zellen exprimierten. Die Expression der BMP2- und BMP5-mRNA in den Osteosarkomzellen verhielt sich ähnlich. Die unter serumfreien Bedingungen niedrigeren Expressionswerte näherten sich unter der Zugabe von FCS den Werten der primären osteoblastären Zellen an. Die AP-Expression blieb erhöht. (Abb. 27)

Abb. 27

Vergleich der Expression der BMP2-, BMP4-, BMP5-, BSPII-, OC- und AP-mRNA der primären osteoblastären Zellen (Ob) und der Zellen der humanen Osteosarkomzelllinie Saos2, bezogen auf die primären osteoblastären Zellen, serumhaltiges Milieu



5.3.3 Inkubationsversuche

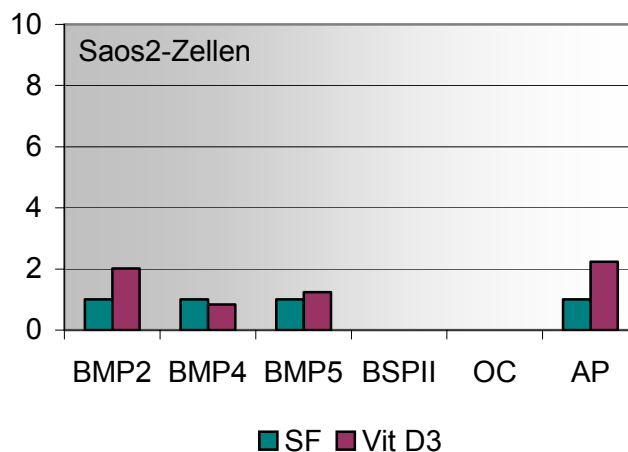
Die humane Osteosarkomzelllinie Saos2 wurde mit 1-25-OH D3 (Cholecalciferol; 4,2ng/ml), rekombinantem humanen BMP2 (rhBMP2; 500 ng/ml) und der extrazellulären Domäne des BMPRIA (eALK3; 200 ng/ml) inkubiert.

a) Expression der Saos2-Zellen unter Vitamin D3 (1-25-OH D3)

Die Inkubation der Osteosarkomzelllinie Saos2 mit Vitamin D3 führte im Vergleich zu den nicht inkubierten Osteosarkomzellen zu einem Anstieg der Expression der BMP2- und AP-mRNA um den Faktor 2. (Abb. 28)

Abb. 28

Vergleich der Expression der BMP2-, BMP4-, BMP5-, BSPII-, OC- und AP-mRNA der Zellen der humanen Osteosarkomzelllinie Saos2 vor und nach Inkubation mit Vitamin D3 (4,2ng/ml), bezogen auf die Osteosarkomzellen vor Inkubation (SF), serumfreies Milieu



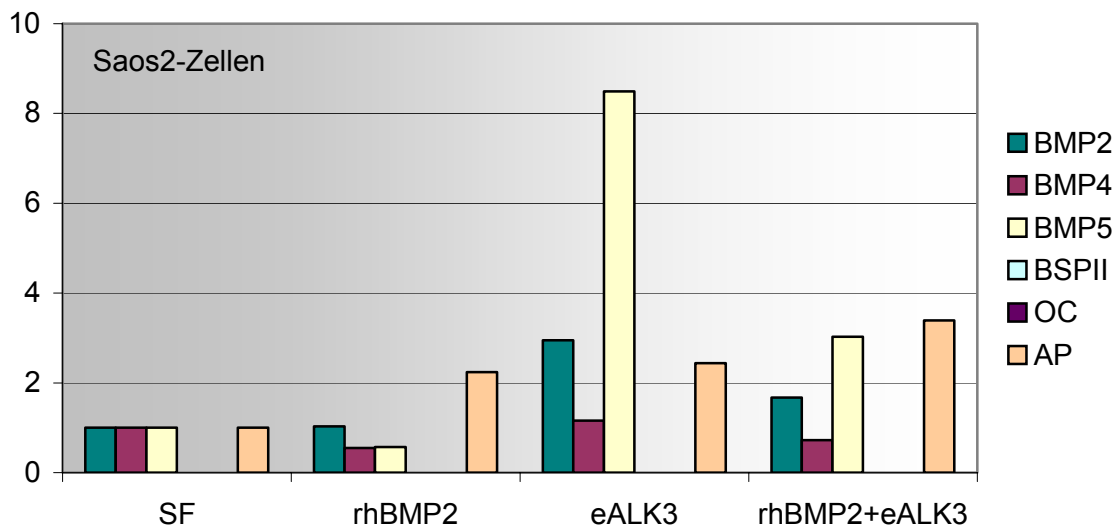
b) Expression der Saos2-Zellen unter rekombinantem humanen BMP2 (rhBMP2) und der extrazellulären Domäne des BMPRIA (eALK3)

Inkubierte man die Osteosarkomzelllinie Saos2 mit rhBMP2 so erhöhte sich im Vergleich zu den nicht inkubierten Osteosarkomzellen die Expression der AP-mRNA. Die Inkubation mit der extrazellulären Domäne des BMP-Rezeptors IA (eALK3) führte zum Expressionsanstieg der BMP2-, BMP5- und AP-mRNA. Die Inkubation mit der Kombination von rhBMP2 und eALK3 führte im Vergleich zu den nicht inkubierten Osteosarkomzellen zu einem Expressionsanstieg der BMP2-, BMP5- und AP-mRNA. Dieser Effekt konnte bereits unter der Inkubation mit eALK3 allein festgestellt werden. Einziger Unterschied bestand in der geringeren Expressionserhöhung der

BMP5-mRNA unter der zusätzlichen Gabe von rhBMP2. Die Osteosarkomzellen wiesen unter der Inkubation mit rhBMP2, bzw. eALK3 keine Expressionsveränderung der BMP4-mRNA auf. (Abb. 29)

Abb. 29

Vergleich der Expression der BMP2-, BMP4-, BMP5-, BSPII-, OC- und AP-mRNA der Zellen der humanen Osteosarkomzelllinie Saos2 vor und nach Inkubation mit rhBMP2 (500ng/ml) und eALK3 (200ng/ml), bezogen auf die Osteosarkomzellen vor Inkubation (SF), serumfreies Milieu



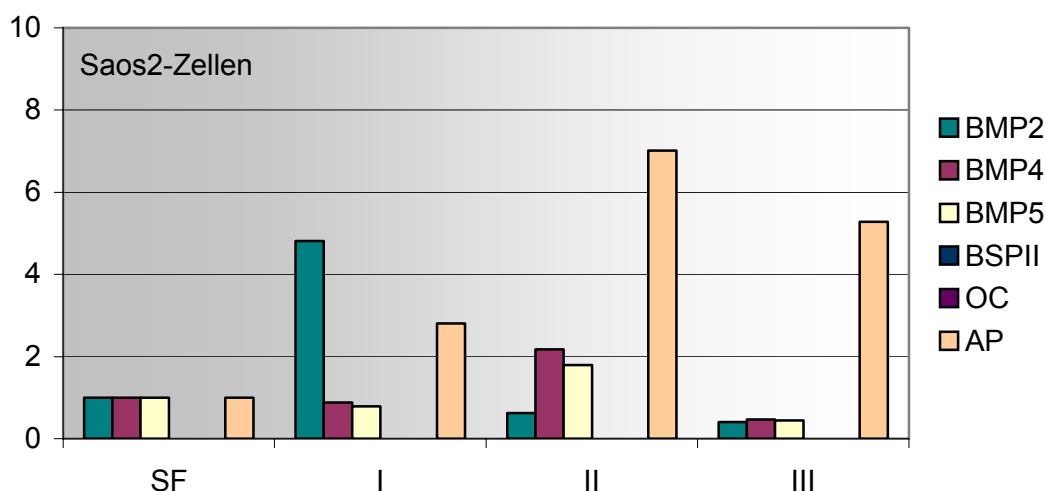
c) Expression der Saos2-Zellen unter Vitamin D3 (1-25-OH D3), rekombinantem humanen BMP2 (rhBMP2) und der extrazellulären Domäne des BMPRIA (eALK3)

Kombinierte man Vitamin D3 und rhBMP2 und fügte diese Inkubationslösung zum Medium der Osteosarkomzellen, so zeigte sich eine Reaktion der Expression der untersuchten Gene, die dem Effekt der Inkubation mit Vitamin D3 allein entsprach. Wieder stiegen im Vergleich zu nicht inkubierten Osteosarkomzellen die BMP2- und die AP-mRNA in ihrer Expression an. Obwohl die Inkubation mit rhBMP2 als Einzelsubstanz keine Erhöhung der Expression der BMP2-mRNA auszulösen vermochte, zeigte sich unter der Kombination beider Substanzen ein potenziertes Anstieg der Expression der BMP2-mRNA. Die Osteosarkomzellen wiesen einen Anstieg der Expression der AP-mRNA unter der Inkubation mit Vitamin D3 auf, der aber durch zusätzliches rhBMP2 nicht reduziert wurde. Kombinierte man Vitamin D3 mit der extrazellulären Domäne des BMP-Rezeptors IA (eALK3) und inkubierte damit die Osteosarkomzellen, so konnte ein Expressionsanstieg der BMP4- und AP-mRNA im Vergleich zu den nicht inkubierten Osteosarkomzellen nachgewiesen werden.

Unter der Inkubation mit Vitamin D3, rhBMP2 und eALK3 konnte ein Abfall der Expression der BMP-mRNA nachgewiesen werden. Auffällig war, dass die Inkubation der Osteosarkomzellen mit Vitamin D3 oder der Kombination aus Vitamin D3 und rhBMP2 zu einem Expressionsanstieg der BMP2-mRNA führte und bei der Inkubation mit Vitamin D3 und eALK3, sowie bei der Zugabe von allen drei Substanzen einen Expressionsabfall aufwies. Die Expression der mRNA der Alkalischen Phosphatase der Osteosarkomzellen stieg bei der Inkubation mit der Kombination aller drei Substanzen noch über den Wert, der unter der Inkubation mit Vitamin D3 entstand. (Abb. 30)

Abb. 30

Vergleich der Expression der BMP2-, BMP4-, BMP5-, BSP1I-, OC- und AP-mRNA der Zellen der humanen Osteosarkomzelllinie Saos2 vor und nach Inkubation mit Vitamin D3 (4,2ng/ml), rhBMP2 (500ng/ml) und eALK3 (200ng/ml) (s.Tab. 15), bezogen auf die Osteosarkomzellen vor Inkubation (SF), serumfreies Milieu



Tab. 15
Inkubationsschema

	1-25-OH D3	rhBMP2	eAlk3
I	4,2 ng/ml	500 ng/ml	x
II	4,2 ng/ml	x	200 ng/ml
III	4,2 ng/ml	500 ng/ml	200 ng/ml

6.0 Diskussion

Periphere Leukozyten erwiesen sich als ein gut zugängliches Probenmaterial, das sich durch eine einfache und schnelle Entnahme, sowie die unkomplizierte wiederholbare Untersuchung zu Beginn der Diagnosestellung und nach der Besserung des klinischen Bildes, bzw. vor und nach erfolgter Bisphosphonat-Therapie auszeichnete. In dieser Arbeit wurden isolierte humane periphere Leukozyten von 18 gesunden und 6 erkrankten Personen mit Störungen des Knochenstoffwechsels (HCDJ, THPI, nHPI) auf die Expression der Gene BMP2, BMP4, BMP5 und BMPRIA untersucht. Bone Morphogenetic Proteine (BMP) zirkulieren im Blut. Ihre Blutlevel sind durch Radio-Immuno-Assays nachweisbar. Gesunde erwachsene Personen weisen Werte von 14-18 ng/ml auf. Erhöhte Werte findet man bei Kindern im Wachstum (20-72 ng/ml) und Patienten mit Morbus Paget (> 250 ng/ml) (Maiti SK und Singh GR 1998, Urist MR und Hudak RT 1984). Eine erhöhte Expression der BMP-Gene in Zellen wachsender Kinder wurde von Solheim und Küsswetter beschrieben (Küswetter W und Teschner M.1999, Solheim E 1998). Kinder durchlaufen zwei Wachstumsschübe, einen während der ersten 12 Monate, den zweiten im Vorfeld der Pubertät mit durchschnittlich 12 Jahren. Die erste der drei untersuchten Altersklassen beinhaltete Kinder nach dem ersten Wachstumsschub. In der Klasse II (AKII, 13-23 Jahre) befanden sich die Kinder in dem präpubertalen Wachstum, während die Skelettentwicklung der dritten Altersklasse (AKIII, 24-50 Jahre) abgeschlossen war. Die peripheren Leukozyten der Kinder im Wachstum exprimierten vermehrt BMP2- und BMP5-mRNA. Knockout-Mäuse denen das BMP2-Gen fehlt sterben noch vor der Entwicklung des Skelettes. Ist das BMP5-Gen defekt entstehen Störungen der Skelettentwicklung, des Wachstums und der Frakturheilung (Wozney J M PhD 2002, Hogan BLM 1996). Die abgeschlossene Skelettentwicklung führte zu einem Anstieg der BMP4-Expression und einem Abfall der BMP2- und BMP5-Expression.

Patienten die an der HCDJ, bzw. an der THPI litten wiesen im Serum, im Vergleich zu Normalpersonen eine stark erhöhte, der nHPI-Patient eine erniedrigte Aktivität der Alkalischen Phosphatase (Apges, APbone, Ostase) auf. Patienten mit erhöhter, als auch mit erniedrigter Serum-AP-Aktivität exprimierten die untersuchten BMP-Gene im Vergleich zu Normalpersonen in stark erhöhtem Maße.

Es wurden 3 Patienten mit HCDJ untersucht. Die peripheren Leukozyten wiesen im Vergleich zu den Normalpersonen eine erhöhte Expression der BMP2-, BMP4-, BMP5- und BMPRIA-mRNA auf. HCDJ-Patienten leiden unter einem massiv gesteigerten Knochenumbau und weisen eine hohe Aktivität der Alkalischen Phosphatase auf. Kinder während eines Wachstumsschubs (AKII) und diese Patienten (AKI-III) zeigten besonders hohe Expressionen der BMP2- und BMP5-mRNA, die auf aktive Umbauvorgänge im Knochen hinweisen könnten. Entsprechend war rhBMP2 in der Lage die Aktivität der Alkalischen Phosphatase in osteoblastären Zellen *in vitro* zu stimulieren (Lai CF und Cheng SL 2002).

Die Patienten der zweiten Altersklasse wiesen geringere Abweichungen ihrer Expression gegenüber den Normalpersonen ihres Alters auf. Dies war darauf zurückzuführen, dass schon die gesunden Kinder der AKII, die sich im Wachstumsschub befanden, hohe Expressionen der BMP2- und BMP5-mRNA aufwiesen. Aus dem selben Grund wich die BMP4-Expression der AKIII weniger stark von der der Normalpersonen ab, die in dieser Altersgruppe eine hohe BMP4-mRNA Expression zeigten.

Die Therapie mit Bisphosphonaten führte im Langzeitverlauf zu einer Besserung des klinischen Bildes. Es konnte eine hochsignifikante Verminderung des erhöhten Knochenumbaus und eine Verminderung der Aktivität der Alkalischen Phosphatase im Serum von 120 auf 15 $\mu\text{mol/lxs}$ (altersentsprechender Normbereich 1-3 $\mu\text{mol/lxs}$) als Zeichen einer deutlich rückläufigen Hyperphosphatasie gewertet werden (Seidel J et al. 1998, Seidel J und Abendroth A 1996, Seidel J und Kauf E 1996). Die Expression der BMP-Gene aller drei Patienten wich unter der Therapie noch deutlicher von den Werten der Normalpersonen ab. Besonders die Expression der BMP5-mRNA stieg weiter an. Die Reaktion der BMP-Gene auf das Bisphosphonat wies darauf hin, dass kein direkter Zusammenhang zwischen der hohen Aktivität der Alkalischen Phosphatase und der hohen Expression der BMP-Gene bei diesem Krankheitsbild besteht. Weitere unbekannte Faktoren müssen in diesem defekten Regulationssystem eine Rolle spielen. Die HCDJ ist genetisch heterogen. Etwa 2/3 der Patienten weisen Mutationen im Osteoprotegerin (OPG)-Gen auf (Chong B et al. 2003). Die Indexpatientin D.P. zeigte jedoch keine Mutation im OPG-Gen, so dass bei ihr wahrscheinlich eine andere genetische Ursache vorliegt. Da die Mutter der Patientin ähnliche Veränderungen im Expressionsmuster von Faktoren des BMP-Netzwerkes zeigte, kann angenommen werden, dass sie eine Konduktorin für die

Erkrankung der Patientin darstellt. Während sie klinisch gesund war, wiesen ihre Leukozyten sehr hohe Expressionen der BMP-Gene, vor allem der BMP2- und BMP5-mRNA auf. Ihr Knochenstoffwechsel ist jedoch in der Lage den Gendefekt zu kompensieren. Ihre Leukozyten exprimierten die BMP4- und BMP5-mRNA stärker als die der erkrankten Tochter. Eine verbesserte Struktur des Knochens und ein Abfall der stark erhöhten Aktivität der Alkalischen Phosphatase unter der Therapie mit Bisphosphonaten führte in den peripheren Leukozyten der HCDJ-Patientin zu einem Expressionsmuster, das sich dem der gesunden Mutter annäherte. Es verblieb in den Leukozyten der erkrankten Tochter im Vergleich zu denen der Mutter eine auffällig hohe Expression der BMPRIA-mRNA.

Die Expressionswerte der peripheren Leukozyten der zwei Patienten mit THPI verhielten sich ähnlich denen der HCDJ-Patienten. Die beiden Krankheitsbilder haben eine deutlich erhöhte Aktivität der knochenspezifischen Alkalischen Phosphatase gemeinsam. THPI-Patienten weisen weder ein klinisches noch röntgenologisches Korrelat auf. Der häufig im Rahmen von Laborwertkontrollen gefundene Enzymanstieg ist selbstlimitierend. Trotzdem exprimierten die Leukozyten dieser Kinder vermehrt die untersuchten Gene des BMP-Systems. Eine Erhöhung der Expression der BMP2- und BMP5-mRNA muss also nicht unweigerlich mit schweren Veränderungen der Knochenstruktur einhergehen. Obwohl bei diesen Patienten keine chronische Erkrankung des Knochens vorlag, stieg während der Remission die Expression der BMP4-, BMP5- und BMPRIA-mRNA an und entfernte sich weiter von den Werten der gleichaltrigen gesunden Probanden. Diese Reaktion auf eine absinkende AP-Aktivität konnte schon bei den HCDJ-Patienten festgestellt werden.

Die Leukozyten des Hypophosphatasiepatienten exprimierten im Vergleich zu gleichaltrigen Normalpersonen vermehrt die BMP2-, BMP4-, BMP5- und BMPRIA-mRNA. Patienten mit einer erhöhten Aktivität der Alkalischen Phosphatase (HCDJ, THPI), als auch dieser Patient mit einer defekten AP (nHPI) exprimierten in ihren peripheren Leukozyten die BMP5-mRNA in besonders hohen Maßen. Im Gegensatz zu den HCDJ-Patienten fiel eine hohe Expression der BMP4-mRNA auf.

Untersuchte man Leukozyten des mit Bisphosphonat therapierten Hypophosphatasiepatienten so konnte man feststellen, dass die Expression der BMP-Gene absank und sich den Werten der gleichaltrigen Normalpersonen näherte. Die Leukozyten der HCDJ-Patienten reagierten genau gegensätzlich. Die Expression

der BMP-Gene stieg weiter an. Bisphosphonate wirken direkt auf die Expression der AP-mRNA und bremsen den Knochenabbau. Sie setzen den Knochenumsatz herab. Beide Patientengruppen wiesen einen Aktivitätsabfall der AP auf. Ihre Knochendichte und Knochenstruktur verbesserte sich unter der Bisphosphonat-Therapie. Trotzdem reagierten die peripheren Leukozyten gegensätzlich. Eine mögliche Erklärung für den Abfall der BMP-Expression in den Leukozyten des Hypophosphatasiepatienten könnte die Herabsetzung des Knochenabbaus und damit der reduzierte Bedarf an AP sein. Eine mögliche Regulation der AP-Expression durch die BMP-Gene würde dann zum Abfall dieser führen. Eine Langzeittherapie mit Bisphosphonaten könnte eine Reduktion der Mineralisation durch Hemmung der AP verursachen.

Die Untersuchung der Leukozyten von Patienten mit Störungen im Knochenstoffwechsel zeigte, dass ein verändertes Expressionsmuster des BMP-Systems vorlag, welches auf die Therapie mit Bisphosphonaten reagierte.

Die Erkrankung Hypophosphatasie (nHPI) ist eine generalisierte Störung des Knochenstoffwechsels. Die Untersuchung von primären osteoblastären Zellen war deshalb naheliegend. Für die Untersuchungen an der Knochenzellkultur des Patienten mit Hypophosphatasie (nHPI) wurden zum Vergleich Knochenzellkulturen von 2 Normalpersonen herangezogen. Nach Jonsson ist der Phänotyp der osteoblastären Zellen unabhängig von dem Geschlecht und dem Alter der Probanden, sowie der Isolationsstelle der Knochenproben. Unabhängig davon bildeten Knochenproben älterer Personen weniger Zellen, als die von jüngeren (Jonsson KB et al. 1999). Um vergleichbare Daten zu erhalten entstammten die Spongiosaprobe aus Knochen von Probanden, die ausschließlich der Altersklasse III (24-50 Jahre) angehörten. Nach Chavassieux unterliegen humane primäre Osteoblasten-Kulturen aus Spongiosastücken einer ausgeprägten Varianz. Zellkulturen osteoblastärer Zellen enthalten eine Vielzahl unterschiedlicher Zelltypen (Chavassieux PM et al. 1990). Es können mesenchymale multipotente Vorläuferzellen, Osteoprogenitorzellen und reife differenzierte Osteoblasten enthalten sein. Zusätzlich findet man in den nicht mit Kollagenase behandelten Kulturen Rundzellen, die dem hämatopoetischen Zellpool angehören (Jonsson KB et al. 1999). Nach Yamamoto ist die osteogene Aktivität einer Knochenzellkultur höher je mehr Spongiosa und damit osteoblastäre Zellen und ihre Vorläufer in den Proben enthalten sind (Yamamoto T et al. 1991). In dieser Arbeit fiel ein Zusammenhang zwischen der Anzahl der Rundzellen und dem Ausmaß der Proliferation der

Spindelzellen auf. Es ist notwendig die Rahmenbedingungen der Kultur so konstant wie möglich zu halten. Dies beinhaltet auf der einen Seite das Alter der Probanden, aber auch die Anzahl der Passagen und die Kulturbedingungen (Jonsson KB et al. 1999, Siggelkow H et al. 1998, Chavassieux PM et al. 1990). In Hinsicht der notwendigen Kulturzeit gibt es in der Literatur kontroverse Meinungen. Quarles konnte einen zeitabhängigen Charakter der Expression der AP nachweisen, der unabhängig von der Zelldichte war (Quarles LD et al. 1992). In dieser Arbeit wurden die osteoblastären Zellen im Stadium der Konfluenz geerntet. Hay beschrieb eine Abhängigkeit der Expression der knochenspezifischen Marker von dem Zell-Zell-Kontakt und spezieller von den Cadherinen (Hay E et al. 2000). Die Einschätzung der Konfluenz durch Inspektion birgt die subjektive Meinung des Betrachters (Jonsson KB et al. 1999). Die osteoblastären Zellen gesunder Spender erreichten die Konfluenz nach einem Zeitraum von durchschnittlich 30 Tagen. Um an Genauigkeit zu gewinnen hätte man alle Zellen nach 30 Tagen im Stadium der Konfluenz ernten müssen. Ein Problem stellte der Hypophosphatasie-Patient dar. Seine osteoblastären Zellen wiesen eine viel geringere Teilungsrate als die Zellen der gesunden Probanden auf. Eine Konfluenz konnte erst nach 72 Tagen beobachtet werden. Die Patientenzellen exprimierten nach 72 Tagen den Phänotyp, den die Zellen der Normalpersonen nach 30 Tagen erreicht hatten. Eine Kultivierung von gesunden osteoblastären Zellen über 72 Tage hätte eine Ausdifferenzierung zur Folge gehabt, bei der die Expression der AP-mRNA nicht mehr und die der Osteocalcin-mRNA nur in geringen Mengen nachweisbar gewesen wäre (Stein GS et al. 1990). Es konnten keine morphologischen Auffälligkeiten der osteoblastären Zellen des Hypophosphatasiepatienten festgestellt werden.

Die Färbung nach Gerdes (abgewandelt) stellte die Aktivität der AP in den Spindelzellen dar. Als Positivkontrolle der Zellfärbung wurde die humane Osteosarkomzelllinie Saos2, als Negativkontrolle eine humane Hautfibroblastenzelllinie verwendet. Die Sarkomzellen wiesen eine starke Färbbarkeit aller Zellen als Zeichen einer hohen AP-Aktivität auf. Die Hautfibroblasten zeigten keine deutlich gefärbten Zellen, wobei lediglich eine leichte Rottönung weniger Zellen (0,5%) nachweisbar war. In den osteoblastären Kulturen der Normalpersonen ließen sich ein Teil der Zellen deutlich anfärben. Sie glichen in der Intensität den Saos2-Zellen. Daneben fanden sich nur leicht oder nicht angefärbte Zellen. Die Anzahl stark positiver Zellen schwankte von 2-14%, was eine Ursache für die starke Varianz der

Osteoblasten-Kultur darstellen könnte. Aubin beschrieb eine ausgeprägte Heterogenität der osteoblastären Zellen, wobei morphologisch identische Zellen eine differente Expression aufwiesen (Aubin JE et al. 1995). Danach wäre es günstiger die Phänotypen an sich und die Reaktion der osteoblastären Zellen auf Mediatoren des Knochenstoffwechsels zu vergleichen, als ausschließlich die Expressionslevel, die von Individuum zu Individuum, als auch von Zelle zu Zelle stark schwankten.

Die Erkrankung Hypophosphatasie ist durch eine reduzierte Aktivität der Alkalischen Phosphatase (Apges, APbone, Ostase) im Serum gekennzeichnet. Die osteoblastären Zellen des an Hypophosphatasie erkrankten Patienten wiesen, trotz vorhandener AP-mRNA, übereinstimmend mit der erniedrigten AP-Aktivität im Serum keine Anfärbarkeit auf.

Im Unterschied zu den Untersuchungen der peripheren Leukozyten wurde bei den osteoblastären Zellen nicht nur die mRNA von BMP2, BMP4 und BMP5 einbezogen, sondern auch die der knochenspezifischen Proteine Bone Sialo Protein II (BSP II) und Osteocalcin (OC), sowie die der Alkalischen Phosphatase (AP). Es stellte sich die Frage, ob die in den Leukozyten gefundenen Expressionsunterschiede zwischen den Normalpersonen und dem Patienten sich auch in Knochenzellen widerspiegeln würden. Osteoblasten entwickeln sich aus multipotenten mesenchymalen Vorläuferzellen. Während ihrer Entwicklungsstadien exprimieren die osteoblastären Zellen verschiedene Gene, die für die Proliferation, Matrixbildung und die Mineralisation der ausgereiften Matrix notwendig sind. Um Zellen der Knochenzellkultur vergleichen zu können muss ein einheitlicher Phänotyp bestehen. In dieser Arbeit exprimierten die Zellen der Normalpersonen nach der Konfluenz der primären Kultur, durchschnittlich am 30. Tag die AP-, OC-, BSP II-, BMP2-, BMP4- und BMP5-mRNA. Sie befanden sich nach Stein in dem Stadium der beginnenden Mineralisation (Delannoy P et al. 2001, Rickard DJ et al. 1996, Aubin JE et al. 1995, Stein GS et al. 1990). In dieser Phase exprimieren osteoblastäre Zellen nicht nur die nicht kollagenen Matrixproteine BSP II und OC, sondern auch BMP-Gene. Nach Yeh exprimieren osteoblastäre Zellen von fetalen Ratten während ihrer Entwicklungsstadien die BMP-Gene in einer bestimmten Sequenz. Während die Expression der BMP2- und BMP7-mRNA unter der Differenzierung konstant hoch bleibt, erreicht BMP4 die höchste Expression während der Formation der Matrix. Die Expression der BMP5-mRNA steigt in der Phase der Mineralisation an (Yeh L et al. 2000, Solheim E 1998). In dieser Arbeit wurden die Zellen im Stadium der

beginnenden Mineralisation geerntet. Die BMP-Expression stimmte mit der von Yeh beschriebenen Sequenz der BMP-Gene überein. Im Vergleich zur Expression der BMP2- und BMP4-mRNA zeigte die der BMP5-mRNA einen höheren Wert. Die Expression der BMP4-mRNA lag unter der konstant hohen Expression der BMP2-mRNA.

Die Expression der osteoblastären Zellen des Hypophosphatasie-Patienten zeigte im Vergleich zu den Zellen der Normalpersonen seines Alters Differenzen. Die osteoblastären Zellen, die im Laufe der Knochenzellkultur gezüchtet wurden, entstammten einem Zeitraum in dem der Patient keiner Bisphosphonat-Therapie unterlag. Die Hypophosphatasie äußert sich klinisch durch eine Mineralisationsstörung mit einem rachitisähnlichen Bild. Damit vereinbar war eine verminderte Expression der OC-mRNA in osteoblastären Zellen des Patienten, wobei die Expression der BSP-III-mRNA sich im Normbereich befand. BSP-III ist noch vor der Mineralisation in der Matrix an Kollagen gebunden nachweisbar.

Nach Stein erscheint in osteoblastären Zellen fetaler Ratten die Expression der AP-mRNA nach der Beendigung der Proliferation der osteoblastären Zellen (Stein GS et al. 1990). Obwohl keine AP-Aktivität in den osteoblastären Zellen mittels der Färbung nach Gerdes (abgewandelt) nachweisbar war (s. 5.2.1.b), wiesen die Zellen des an Hypophosphatasie erkrankten Patienten eine überdurchschnittlich hohe Expression der AP-mRNA auf. Ihre Proliferation war ausgeprägt reduziert. Ein Zell-Zell-Kontakt wurde erst spät nach 72 Tagen erreicht. Der Abfall der AP-mRNA und die Zell-Zell-Kontakte sind aber notwendig für die Differenzierung in reife, Osteocalcin exprimierende Osteoblasten (Hay E et al. 2000, Stein GS et al. 1990).

Wie schon in den peripheren Leukozyten konnte eine besonders hohe Expression der BMP5-mRNA nachgewiesen werden. Im Unterschied zu den Leukozyten exprimierten die Knochenzellen des Patienten die BMP2- und BMP4-mRNA geringer als die Zellen der Normalpersonen. Die Erhöhung der Expression der BMP2- und BMP4-mRNA war etwas Leukozyten-spezifisches. Die peripheren Leukozyten unterliegen einem anderen Mikromilieu und damit anderen Regulationssystemen. Es ist bekannt, dass viele Faktoren auf das BMP-System wirken. Dazu zählen u.a. Interleukine, TNFalpha und Wachstumsfaktoren (IGF, bFGF). Die primären osteoblastären Zellen wurden unter serumfreien Bedingungen untersucht. Leukozyten befinden sich in dem Serum. Untersuchte man osteoblastäre Zellen des Hypophosphatasiepatienten unter FCS haltigen Bedingungen fiel auf, dass im

Vergleich zu den Zellen der Normalpersonen die Expression der BMP2-mRNA im Normbereich lag. Die Expression der BMP4-mRNA verblieb aber unter dem Normwert. Die alleinige Zugabe von FCS reichte nicht aus um den Expressionsunterschied zu den Leukozyten auszugleichen.

Nach Yeh steigt in osteoblastären Zellen die Expression der BMP4-mRNA unter der Matrixreifung und die der BMP5-mRNA unter der Mineralisation an (Yeh L et al. 2000). Die fehlende Aktivität der Alkalischen Phosphatase und die geringe Expression von Osteocalcin tragen zur Störung der Mineralisation bei, wobei möglicherweise eine Gegenregulation durch die Stimulation der Expression der BMP5-mRNA in den osteoblastären Zellen des Hypophosphatasiepatienten vorliegen könnte. BMP2 und BMP4 verhielten sich entgegengesetzt zu BMP5. Raval beschrieb bei humanen Osteosarkomzelllinien einen osteoinduktiven Effekt von BMP4 und einen gegenteiligen Effekt von BMP5.

Unter der Auswertung der PCR der BMP5-Banden fiel eine zweite Bande differenter Größe auf. Nach Analyse der Bande bestand der Verdacht auf eine Verunreinigung der Proben mit dem BMP5-Kompetitorfragment. Auch die Ergebnisse der Expressionsanalyse der BMP2- und BMP4-mRNA sollten kritisch betrachtet werden, da die osteoblastären Zellen des nHPI-Patienten nur geringe Mengen an BMP2- und BMP4-mRNA produzierten, das die Auswertung erschwerte.

Die Zugabe von FCS auf die osteoblastären Zellen der Normalpersonen führte zu einer Aktivierung der Differenzierung. Mit dem Anstieg der Expression der Knochenmarker AP, BSP11 und Osteocalcin stieg die Expression der BMP2- und BMP4-mRNA an, wobei die der BMP5-mRNA keine Reaktion zeigte.

Die osteoblastären Zellen des Hypophosphatasie-Patienten zeigten unter der Zugabe von FCS einen Expressionsanstieg der BMP2-, BSP11- und AP-mRNA. Die Patientenzellen wiesen in einem serumfreien Milieu sehr niedrige Level an OC- und BMP4-mRNA auf, die im Gegensatz zu Zellen von Normalpersonen nicht auf die Zugabe von FCS reagierten. Die Differenzierung der osteoblastären Zellen des Hypophosphatasiepatienten blieb unter FCS und einer weiteren Erhöhung der AP-Expression aus. Die Expression der BMP5-mRNA fiel ab.

Um die Regulation der Expression der Markergene unter Einfluß osteogener Faktoren zu testen, wurden Inkubationsversuche durchgeführt.

Die osteoblastären Zellen wurden mit 1-25-OH D3 (Cholecalciferol; 4,2ng/ml), rekombinantem humanen BMP2 (rhBMP2; 500 ng/ml) und der extrazellulären Domäne des BMPRIA (eALK3; 200 ng/ml) inkubiert.

Die anfängliche rhBMP2-Konzentration von 100ng/ml wurde erhöht, da erst ab 500ng/ml ein Inkubationseffekt in allen Zellkulturen nachgewiesen werden konnte.

Die Inkubation mit allen 3 Wirkstoffen zeigte im serumhaltigen Milieu nur geringe nicht auswertbare Effekte. Es wurde deshalb ein serumfreies Medium verwendet.

1-25-OH D3 greift in die Vorgänge der Formation und Mineralisation von Knochengewebe ein. Knock-out-Mäuse mit defektem Vitamin-D-Rezeptor (VDR) entwickeln Wachstumsretardierungen und einen fehlerhaften Knochenaufbau. Sie weisen eine besonders hohe Rate an Knochenumbauvorgängen auf.

Die in dieser Arbeit untersuchten osteoblastären Zellen entstammten aus dem Knochen eines Patienten, der eine gestörte Mineralisation und rachitisähnliche Symptome aufwies. Es war naheliegend diese Zellen im Vergleich zu Normalpersonen auf ihre Reaktion auf 1-25-OH D3 zu untersuchen.

Vitamin D3 ist in der Lage die Expression der AP- und OC-mRNA zu regulieren. Dieser Effekt ist abhängig von dem Zellkultursystem, der basalen Expression der AP- und OC-mRNA und damit dem Differenzierungsstadium der Zellen (Lian JB und Stein GS 1993, Owen T et al. 1991). Die Inkubation von humanen Knochenmarkstromazellen und osteoblastären Zellen mit 1-25-OH D3 führt zu einem Anstieg der Expression der OC-mRNA. Die parenterale Applikation von 1-25-OH D3 bewirkt einen Anstieg des Osteocalcins im Serum (Liu P et al. 1999, Takiguchi T et al. 1998, Erben RG et al. 1997, Thavarajah M et al. 1993).

In dieser Arbeit führte die Inkubation mit 1-25-OH D3 in den humanen osteoblastären Zellen der gesunden Probanden und des Hypophosphatasie-Patienten zu einem Expressionsanstieg der AP-, OC- und BSPII-mRNA. Ein besonders hoher Anstieg konnte bei der OC-mRNA verzeichnet werden. In der Literatur werden unterschiedliche Reaktionen der Expression der AP-mRNA auf 1-25-OH D3 beschrieben. Jonsson beschrieb einen signifikanten Anstieg der Expression der AP-mRNA in humanen osteoblastären Zellen unter der Inkubation mit 100nM 1-25-OH D3 für 72h, der auch in dieser Arbeit nachweisbar war. Andere Autoren wie Yamamoto beschrieben keinen Effekt von 1-25-OH D3 auf die Expression der AP-mRNA (Jonsson KB et al. 1999, Yamamoto T et al. 1991, Mahonen A et al. 1990).

Der Expressionsanstieg der AP-mRNA in osteoblastären Zellen aus der Spongiosa könnte darauf hinweisen, dass die in dieser Arbeit geernteten Zellen noch nicht vollständig ausdifferenziert waren. Marie beschrieb die Tatsache, dass osteoblastäre Zellen, die ausdifferenziert sind keine Reaktion der AP-mRNA auf 1-25-OH D3 zeigen (Jonsson KB et al. 1999, Rickard DJ et al. 1996, Marie PJ et al. 1989). Der Expressionsanstieg der OC- und AP-mRNA ist auf das Vorhandensein einer Bindungsstelle zurückzuführen. Sie wird als Vitamin D-Responsive-Element (VDRE) bezeichnet und liegt in der Enhancer-Region des OC- und AP-Promotors (Morrison NA et al. 1992, Owen T et al. 1991, Kerner SA et al. 1989).

Ein weiterer für die Mineralisation nicht unwichtiger Faktor des Knochenstoffwechsels ist das BSP II. Es wird zeitgleich mit Osteocalcin und der Mineralisation gebildet. Auf 1-25-OH D3 reagierte die BSPII-mRNA wie die OC-mRNA mit einem Expressionsanstieg. In dem Promotor des BSPII-Gens wird eine Bindungsstelle für den osteoblastenspezifischen Transkriptionsfaktor Cbfa1 vermutet, der unter dem Einfluß von 1-25-OH D3 und rhBMP2 steht.

Als mögliche Ursache für das gute Ansprechen der OC-Expression der osteoblastären Zellen des Hypophosphatasie-Patienten könnte die stark reduzierte Proliferation der Patientenzellen angenommen werden. Polypeptide die während der Proliferation gebildet werden (c-jun, c-fos, Proto-Onkogene) binden an eine AP-1 Bindungsstelle die benachbart zu dem VDRE liegt. Die Ansprechbarkeit von Zellen gegenüber 1-25-OH D3 soll nach Stein von der Proliferation der Zellen abhängig sein, so dass während der Proliferation Osteocalcin nicht nachweisbar und auch nicht durch 1-25-OH D3 stimulierbar ist.

1-25-OH D3 führte in den osteoblastären Zellen der gesunden Probanden weiterhin zu einer Stimulation der Expression der BMP2- und BMP4-mRNA. BMP2 und BMP4 sollen einen osteoinduktiven Charakter aufweisen und zur Differenzierung der osteoblastären Zellen beitragen (Anderson HC et al. 2002, Pereira RC et al. 2000, Raval P et al. 1996). Die Zugabe von FCS, als auch von 1-25-OH D3 führte zu einem Anstieg der Expression der BMP2-, BMP4-, BSPII-, AP- und Osteocalcin-mRNA.

Es ist schwieriger die Wirkung von 1-25-OH D3 auf die BMP-mRNA der osteoblastären Zellen nachzuvollziehen. Bis heute ist nicht bekannt durch welche Signalkaskaden eine Veränderung der Expression der BMP-Gene durch 1-25-OH D3 möglich ist. So konnte Faucheux einen stimulierenden Effekt von 1-25-OH D3 auf die BMP3-mRNA feststellen. Er diskutierte einen direkten Effekt auf den Promotor oder

auf Transkriptionsfaktoren die die Expression der BMP3-mRNA regulieren. Er stellte fest, dass der stimulierende Effekt von 1-25-OH D3 abhängig von der Proteinsynthese war. Es ist bekannt, dass Wachstumsfaktoren die BMP-mRNA stabilisieren (Faucheux C et al. 1999). TGF β induziert Smad3, dass mit Proteinen die den VDR aktivieren im Kern Komplexe bildet. Solch ein Zusammenspiel konnte für Smad 1 und Smad 5 und damit für die BMP's nicht nachgewiesen werden (Yanagisawa J et al. 1999). Nach Yeh exprimieren osteoblastäre Zellen von fetalen Ratten die BMP5-mRNA in der Phase der Mineralisation. Das war auch in dieser Arbeit nachweisbar. Stiegen aber unter FCS und 1-25-OH D3 die Mineralisationsparameter OC und BSP-II an, fiel die Expression der BMP5-mRNA, während die der BMP2- und BMP4-mRNA anstieg.

Die Regulation der BMP-Gene der osteoblastären Zellen des Patienten durch die Zugabe von Vitamin D3 war nicht möglich. Eine Veränderung der Expression der BMP-Gene unter 1-25-OH D3 schien nicht eine Voraussetzung für den Expressionsanstieg der OC-, BSP-II- und AP-mRNA zu sein, der in den Patientenzellen und den osteoblastären Zellen der Normalpersonen erfolgte. Eine direkte Reaktion der BMP-mRNA auf den Anstieg der Expression der Knochenmarker blieb aus. Das Coupling 1-25-OH D3 und dem BMP-System schien in den Patientenzellen gestört.

Eine Reihe von BMP's können rekombinant hergestellt werden. In dieser Arbeit wurde ein funktionelles BMP2 verwendet, dass eine hochaffine Interaktion mit der Ektodomäne des BMP-Rezeptors IA (eAlk3) aufwies. In der Literatur werden verschiedene und widersprüchliche Effekte von rhBMP2 in In-vitro-Kulturen beschrieben. Ursächlich dafür sind u.a. die unterschiedlichen Kultursysteme.

Mesenchymale Vorläuferzellen aus dem Knochenmark von Ratten und Mäusen reagierten auf die Zugabe von rhBMP2 mit Differenzierung in Osteoprogenitorzellen und weiter in reife Osteoblasten (Yamaguchi A et al. 2000, Kawasaki K et al. 1998).

Die Inkubation mit 500ng/ml rhBMP2 führte nach Kawasaki in humanen osteoblastären Zellen aus Knochenbiopsien zu einem Anstieg der Aktivität der AP. Osteocalcin reagierte auf das rhBMP2 nicht. Nach Lecanda führte die Inkubation humaner osteoblastärer Zellen mit rhBMP2 zu einem Anstieg der Expression der AP-, BSP- und OC-mRNA, wobei die Proliferation der Zellen reduziert war (Lai CF und Cheng SL 2002, Hay E et al. 2001, Hay E et al. 2000, Kessler S et al. 2000, Yamaguchi A et al. 2000, Kawasaki K et al. 1998, Lecanda FA et al. 1997). Nach

Centrella verändert rhBMP2 das Bindungsprofil von TGF β und führt über die Aktivierung des Typ I Rezeptors zu einer Reduktion der Proliferation und einem Anstieg der AP- und Kollagen-Expression (Centrella M et al. 1995).

In dieser Arbeit konnte ein Expressionsanstieg der BSP-II- und AP-mRNA unter dem Einfluß von 500ng/ml rhBMP2 in osteoblastären Zellen der Normalpersonen beobachtet werden. Vergleichbar mit den Daten von Kawasaki reagierte die Expression der OC-mRNA nicht auf rhBMP2. Hay berichtete weiter über die Stimulation der Cbfa1 Bildung durch rhBMP2. Cbfa1 bindet wahrscheinlich an den BSP-II-Promotor und führt zu einer gesteigerten Expression von BSP (Yousfi M et al. 2003). Cbfa1 ist bei der Knochenformation, speziell der Knochenmatrixbildung und dem Coupling zwischen dem Osteoblasten und Osteoklasten beteiligt (Kobayashi H et al. 2000).

Die Patientenzellen wiesen unter der Inkubation mit rhBMP2 einen Expressionsabfall der AP-mRNA auf. Die Aktivierung der Expression der BSP-II-mRNA durch rhBMP2 konnte in Zellen des Hypophosphatasiepatienten nicht nachgewiesen werden. Defekte des Cbfa1-Gens führen zu einer Osteopenie mit teilweise unreifen Osteoblasten, die die AP-mRNA, nicht aber die OC-mRNA exprimieren. Das spricht dafür, dass in vivo Cbfa1 nicht nur für die regelrechte Expression der BSP-II-mRNA mit verantwortlich ist, sondern indirekt auch für die Expression der OC-mRNA (Hay E et al. 2001, Hay E et al. 2000). Ducy beschreibt die Bindung des Cbfa1 an den OC-Promotor (OSE2) (Ducy P et al. 1997). Trotzdem führt die Inkubation der osteoblastären Zellen mit rhBMP2 zwar zu einem Anstieg von Cbfa1 aber zu keinem Expressionsanstieg der OC-mRNA. Die osteoblastären Patientenzellen wiesen eine sehr niedrige Expression der OC-mRNA auf.

Nach Pereira inhibiert BMP2 die Expression der BMP4- und BMP2-mRNA, wobei sich vermehrt Smad6 ansammelt (Pereira RC et al. 2000). Im Gegensatz zu den Untersuchungen Pereiras stieg die Expression der BMP2-mRNA unter rhBMP2 in den osteoblastären Zellen der Normalpersonen und des Patienten an. Die Expression der BMP4-mRNA reagierte nicht. Die Expression der BMP4-mRNA verläuft parallel mit der Differenzierung osteoblastärer Zellen. In dieser Arbeit fiel vor allem eine Beziehung der Expression der BMP4-mRNA und OC-mRNA auf. RhBMP2 änderte die BMP4- und OC-Expression nicht. Unter der Inkubation mit rhBMP2 fiel die ursprünglich extrem hohe Expression der BMP5-mRNA der osteoblastären Zellen des Hypophosphatasiepatienten ab, während die anfänglich niedrige Expression der

BMP2-mRNA anstieg. Obwohl die osteoblastären Zellen des Hypophosphatasiepatienten unter FCS ebenfalls einen Anstieg der BMP2-mRNA und einen Abfall der BMP5-mRNA zeigten, stieg in diesem serumhaltigen Milieu die Expression der BSPII- und AP-mRNA an. Würde man die anfänglich hohe Expression der BMP5-mRNA als eine direkte Gegenregulation interpretieren, so müsste ein Abfall des Mineralisationsparameter BSPII und AP unter rhBMP2 zu einem weiteren Anstieg der Expression der BMP5-mRNA führen.

Von der Zugabe der Ektodomäne des BMP-Rezeptors IA (eAlk3) erwartete man eine Antagonisierung des BMP-Effektes. Aktives BMP2 und BMP4 weisen eine hohe Bindungskapazität auf. In der Mauszelllinie MC3T3-E1 konnte Natsume einen Abfall der AP-Aktivität nach der Inkubation mit eAlk3 nachweisen. Die in das Medium sezernierten BMP's wurden von eAlk3 gebunden. Die in Knochenmarkstromazellen (ST2) induzierte Differenzierung der Zellen durch rxBMP4 konnte durch die Zugabe von eAlk3 blockiert werden (Natsume T et al. 1997). Van der Horst bestätigte den inhibitorischen Effekt des löslichen BMP-Rezeptors IA auf die Aktivität der AP in Zellen einer Mauszelllinie (Horst vd G et al. 2002).

In dieser Arbeit führte die Inkubation der osteoblastären Zellen mit eAlk3 zu einem Expressionsanstieg der BMP4-, OC- und AP-mRNA. BMP4 soll in der Osteoinduktion eine entscheidende Rolle spielen. Grundsätzlich war festzustellen, dass eine hohe BMP4-Expression mit einer hohen Expression der AP- und OC-mRNA einherging. Während unter rhBMP2 die Expression der BMP4-mRNA nicht anstieg, führte die Inkubation mit eAlk3 zu einer Steigerung der Expression der BMP4- und mit ihr der OC-mRNA. Nach Pereira reguliert BMP2 die Expression der BMP2- und BMP4-mRNA herunter. Die Komplexbildung des in das Medium sezernierten BMP2's durch eAlk3 könnte zur gesteigerten Expression von BMP4 beigetragen haben (Pereira RC et al. 2000). Widersprüchlich dazu stieg die Expression der BMP2-mRNA unter rhBMP2 an. BSPII reagierte auf eAlk3 nicht.

Die osteoblastären Zellen des Hypophosphatasiepatienten reagierten genau gegensätzlich. Die Inkubation mit eAlk3 führte zu einem starken Expressionsabfall der BMP4- und OC-mRNA. Wieder wurden diese beiden Gene parallel reguliert. Die Expression der BMP5-mRNA fiel im Unterschied zu den osteoblastären Zellen der Normalpersonen ab. Die Expression der BSPII-mRNA stieg an. Ausschließlich die Expression der AP-mRNA stieg vergleichbar mit den Reaktionen der osteoblastären Zellen der Normalpersonen an.

Die Ratio von rhBMP2 und eAlk3 war 2:1. Unter einer Inkubation mit beiden Komponenten würde man einen geringen rhBMP2-Effekt erwarten. Dies traf in dieser Arbeit nicht zu. Die Expression der osteoblastären Zellen der Normalpersonen änderte sich wie unter eAlk3 allein. Die Expression der AP-mRNA wurde durch die Zugabe von rhBMP2 und eAlk3 weiter potenziert. Der einzige Unterschied bestand darin, dass das zusätzliche rhBMP2 zu einem Expressionsanstieg der BMP2-mRNA führte. Auffällig war, dass das BSP11 nicht auf das zusätzliche rhBMP2 reagierte. Ausgenommen die Reaktion der BSP11-mRNA, reagierten die humanen osteoblastären Zellen auf beide Komponenten unabhängig. Eine Komplexierung von rhBMP2 und eAlk3 erschien fraglich. Es stellte sich die Frage welches BMP der lösliche BMP-Rezeptor im Medium gebunden hatte. Gegen die Annahme, dass es BMP2 sein könnte, sprach, dass unter der Kombination mit rhBMP2 die Expression der BMP4-mRNA nicht abfiel. Ob in dem Medium der osteoblastären Zellen eine Komplexierung von rhBMP2 und eAlk3 stattgefunden hat konnte nicht sicher nachgewiesen werden. Es erschien möglich, dass der BMP-Rezeptor IA ein anderes höher affines BMP gebunden hatte.

Inkubierte man die Patientenzellen mit rhBMP2 und eAlk3 so reagierte die BMP4- und die OC-mRNA wie unter eAlk3 allein nicht. Die BMP5-mRNA fiel unter rhBMP2, eALK3 und der Kombination aus beiden in den Patientenzellen stark ab. Sie wies in einem serumfreien Milieu einen sehr hohen Expressionswert auf. Eine direkte Inhibition der Effekte der Einzelsubstanzen rhBMP2 und eAlk3 durch Kombination der beiden konnte auch in den Patientenzellen nicht nachgewiesen werden.

Es stellte sich die Frage warum die osteoblastären Zellen des Hypophosphatasiepatienten auf rhBMP2 und eAlk3 entgegengesetzt zu den Zellen der Normalpersonen reagierten. Stieg in den Zellen der Normalpersonen die BSP11-mRNA an, fiel diese bei den Patientenzellen ab. Während unter eAlk3 in den Zellen der gesunden Probanden die BMP4- und OC-mRNA vermehrt exprimiert wurde, sank die Expression in den Patientenzellen. Zusätzlich fiel die BMP5-mRNA in den osteoblastären Zellen des Hypophosphatasiepatienten stark ab. Ihr Wert war im serumfreien Milieu im Vergleich zu den Normalpersonen stark erhöht.

Unter 1-25-OH D3 plus rhBMP2 und 1-25-OH D3 plus rhBMP2 plus eAlk3 konnten die gleichen Expressionsveränderungen wie unter 1-25-OH D3 allein nachgewiesen werden. Yamaguchi, Henriksen und Takawa konnten in Zelllinien und humanen osteoblastären Zellen einen Anstieg der OC-Expression unter der Inkubation mit

rhBMP2 und 1-25-OH D3 nachweisen (Henriksen Z et al. 2003, Kawasaki K et al. 1998, Takiguchi T et al. 1998, Takuwa Y et al. 1991, Yamaguchi A et al. 1991). Takiguchi und Kawasaki beschrieben einen inhibitorischen Effekt von rhBMP2 auf die 1-25-OH D3 induzierte Expression der OC-mRNA. Die alleinige Inkubation mit rhBMP2 führte zu keiner Osteocalcinbildung. In gleicher Weise reagierten die in dieser Arbeit untersuchten humanen osteoblastären Zellen der Normalpersonen. RhBMP2 reduzierte nicht nur den Effekt von 1-25-OH D3 auf Osteocalcin, sondern auch auf die AP. Der inhibitorische Effekt von eAlk3 auf die Expression von BSPII zeigte sich auch unter 1-25-OH D3 plus eAlk3.

Unter rhBMP2 fiel in den Patientenzellen die BSPII- und AP-mRNA ab, während die OC-mRNA nicht reagierte. Wie bei den Normalpersonen reagierten die osteoblastären Zellen des Patienten auf die Kombination von 1-25-OH D3 und rhBMP2 mit einem Anstieg dieser drei Gene, der wahrscheinlich auf das zusätzliche 1-25-OH D3 zurückzuführen war. In den Patientenzellen reduzierte das rhBMP2 den 1-25-OH D3 Effekt auf die OC-Expression nicht. Obwohl die BMP-Gene der Patientenzellen nicht auf 1-25-OH D3 allein reagierten, führte die Kombination von 1-25-OH D3 mit rhBMP2 zu einem starken Anstieg der Expression. Allein durch den rhBMP2-Effekt konnte diese Reaktion nicht erklärt werden. Man konnte schlussfolgern, dass keine generelle Störung des Couplings zwischen 1-25-OH D3 und dem BMP-System bei dem Patienten vorlag. Den gegenteiligen Effekt auf die BMP-Gene löste die Inkubation der Patientenzellen mit 1-25-OH D3, rhBMP2 und zusätzlich eAlk3 aus. Alle drei BMP-Gene (BMP2, BMP4, BMP5) fielen in ihrer Expression ab. Diese Reaktion konnte schon unter rhBMP2 und eAlk3 nachgewiesen werden. Wieder führte 1-25-OH D3 zu einem Expressionsanstieg der Knochenmarker. Die Inhibition der BMP4- und OC-Expression durch eAlk3 in den Patientenzellen konnte durch die Zugabe von 1-25-OH D3 aufgehoben werden.

Es stellte sich die Frage, ob es eine Inkubationskombination gab, die eine Annäherung der Expression der Patientenzellen an die Werte der nicht inkubierten osteoblastären Zellen der gesunden Probanden erreichte. Bisphosphonate wirken direkt auf die Expression der AP-mRNA und bremsen den Knochenabbau. Sie setzen den Knochenumsatz herab. Sie führen zu einem Aktivitätsabfall der AP. Die Knochendichte und Knochenstruktur verbessert sich unter der Bisphosphonat-Therapie. Leukozyten von einem mit Bisphosphonat therapierten Patienten wiesen einen Abfall der vor der Therapie erhöhten Expression der BMP2-, BMP4-, BMP5-

und BMPRIA-mRNA auf. Osteoblastäre Zellen des selben Patienten exprimierten vor der Therapie im Vergleich zu den Zellen der Normalpersonen sehr niedrige Level an BMP2- und BMP4-mRNA. Übereinstimmend mit den Leukozyten wiesen sie eine hohe Expression der BMP5-mRNA auf. Von einer Therapie würde man also einen Anstieg der erniedrigten BMP2-, BMP4- und OC-mRNA, sowie einen Abfall der erhöhten BMP5- und AP-mRNA erwarten.

Die Inkubation mit 1-25-OH D3 war die einzige Lösung, die zum Anstieg des erniedrigten Osteocalcins führte. Damit war ein Anstieg von BSPII und der AP verbunden. Es kam zu keinem Expressionsabfall der BMP5- und AP-mRNA.

Aus der Inkubation mit rhBMP2 allein resultierte eine Annäherung der basalen Expression der BMP5- und AP-mRNA an die Expressionswerte der nicht inkubierten Zellen der Normalpersonen. Die Expression der BSPII-mRNA aber fiel unter den Wert der Normalpersonen, die mRNA von BMP2, BMP4 und OC verblieb sehr niedrig exprimiert. Die niedrige Expression der BMP4- und OC-mRNA unter rhBMP2 wiesen auf eine weiterhin gestörte Knochenformation hin.

Gab man zu dem rhBMP2 Vitamin D3 in die Inkubationslösung, so erreichte man bei den osteoblastären Zellen des Hypophosphatasiepatienten den gegenteiligen Effekt. Alle untersuchten Gene stiegen im Vergleich zu den nicht inkubierten Patientenzellen in ihrer Expression an. Im Vergleich zu nicht inkubierten Zellen von Normalpersonen entfernte sich der Expressionswert der BMP5- und AP-mRNA noch weiter von dem Normwert. Der Anstieg der BMP4- und OC-mRNA könnte sich auf das Krankheitsbild vorteilhaft auswirken. Eine Dauertherapie mit 1-25-OH D3 ist aufgrund von Nephrokalzinosen bei Erkrankungen ohne Vitamin D3 Mangel nicht zu empfehlen. Der in dieser Arbeit untersuchte Hypophosphatasiepatient wies einen normalen Vitamin D3-, PTH- und Kalziumspiegel auf (Woitge HW et al. 2000).

Die Inkubation der osteoblastären Patientenzellen mit den Kombinationen, die eALK3 enthielten, führten zu einem Expressionsabfall der BMP5-mRNA. Ihre Expression näherte sich dem Wert der nicht inkubierten Zellen der Normalpersonen. Im Gegensatz dazu stieg die Expression der AP-mRNA unter dem Einfluß von eALK3 weiter an und entfernte sich von den Expressionswerten der nicht inkubierten Zellen der Normalpersonen. Die Expression des osteoinduktiven BMP4 und des Osteocalcins sank noch weiter unter den Normwert.

Eine weitere Möglichkeit humane osteoblastäre Zellen zu untersuchen stellten die transformierten Zelllinien dar. Ihr Vorteil ist die Untersuchung der Zellen unabhängig

von aktuellen Spendern und den Passagen. In dieser Arbeit wurde die humane Osteosarkomzelllinie Saos2 untersucht. In Tumorzellen ist die Proliferation von der Differenzierung entkoppelt. Die Osteosarkomzellen sind in der Lage bei aktiver Proliferation weiter zu differenzieren und in dem Stadium der Konfluenz ihre höchste Expression der AP-mRNA zu erreichen. Die Saos2-Zellen exprimierten die BMP2-, BMP4-, BMP5- und AP-mRNA. In der Literatur sind Zellklone beschrieben, die Osteocalcin bilden (Siggelkow H et al. 1998). Die Saos2-Zellen in dieser Arbeit wiesen keine Expression von Osteocalcin und BSP II auf. Nach H. Siggelkow wären diese Klone nicht zur Mineralisation befähigt. Die Osteosarkomzellen wiesen mit den osteoblastären Zellen des Hypophosphatasiepatienten Gemeinsamkeiten auf. Die Bildung einer funktionstüchtigen mineralisierten Matrix war in den osteoblastären Zellen des Patienten und in den Saos2-Zellklone gestört. Während die Patientenzellen nicht in der Lage waren eine aktive Alkalische Phosphatase, trotz hoher AP-mRNA Expression, zu bilden, konnte eine hoch aktive Alkalische Phosphatase in den Saos2-Zellen nachgewiesen werden (Färbung nach Gerdes, abgewandelt). Die Expression der AP-mRNA und auch die Aktivität der AP allein sind aber keine Marker für eine osteogene Aktivität der Zellen (Yamamoto T et al. 1991). Die osteoinduktiven Eigenschaften der Saos2-Zellen sollten nach Raval besonders auf die Expression der BMP1-, BMP3- und BMP4-mRNA zurückzuführen sein. Die nicht osteoinduktive Zelllinie U2OS exprimierte im Vergleich zu den Saos2-Zellen vermehrt die BMP5-mRNA (Anderson HC et al. 2002, Raval P et al. 1996). Die Saos2-Zellen wie auch die Patientenzellen exprimierten die BMP2- und BMP4-mRNA in geringeren Maßen als die osteoblastären Zellen von Normalpersonen. Unterschiede bestanden in der Expression der BMP5-mRNA, die in den Tumorzellen eine geringere Expression zeigte. Es wäre möglich, dass die BMP5-mRNA in osteoblastären Zellen mit niedriger Aktivität der Alkalischen Phosphatase (nHPI-Patient) in großen und in Saos2-Zellen mit sehr hoher Aktivität in niedrigen Mengen exprimiert wird. Dagegen sprach, dass periphere Leukozyten von HCDJ-Patienten mit hoch aktiver AP eine sehr hohe Expression an BMP5-mRNA zeigten. Dabei musste man berücksichtigen, dass die Ergebnisse der peripheren Leukozyten nicht ohne weiteres mit den osteoblastären Zellen verglichen werden konnten. In den osteoblastären Zellen der Normalpersonen konnte man feststellen, dass die Expression der BMP5-mRNA unter keiner Inkubationslösung gemeinsam mit der AP-Expression anstieg. Das traf im Allgemeinen auch auf die osteoblastären Zellen des

nHPI-Patienten zu, wobei die Inkubation mit 1-25-OH D3 plus rhBMP2 zu einem starken Anstieg der BMP5-Expression und einem geringen Anstieg der AP-Expression führte. Aus der Zugabe von rhBMP2 in das Medium der Patientenzellen resultierte ein gemeinsamer Abfall der Expression der BMP5- und AP-mRNA. Bei den Sarkomzellen fiel auf, dass die Expression der BMP5-mRNA unter den meisten Inkubationen mit der AP-Expression parallel anstieg, bzw. ihre Expression sich nicht veränderte. Ein direkter Zusammenhang der Expression der BMP5-mRNA und der AP-mRNA konnte nicht nachgewiesen werden.

Die Osteosarkomzellen reagierten intensiver auf die Zugabe von FCS, als die primären osteoblastären Zellen der Normalpersonen. Die Expression der BMP4-mRNA stieg um den Faktor 870 an. Primäre osteoblastäre Zellen wiesen einen Anstieg um den Faktor 103 auf. Daraus resultierte, dass die Osteosarkomzellen, die im serumfreien Milieu zwar einen niedrigeren Expressionswert der BMP4-mRNA aufwiesen, nach der Zugabe von FCS aber mehr BMP4-mRNA als die primären osteoblastären Zellen exprimierten. Eine Gemeinsamkeit bestand darin, dass beide Zellarten auf FCS mit einem starken Anstieg der Expression der BMP4-mRNA reagierten. Den Patientenzellen fehlte dieser BMP4-Anstieg.

Die humane Osteosarkomzelllinie Saos2 wurde wie die primären Knochenzellkulturen mit 1-25-OH D3 (Cholecalciferol; 4,2ng/ml), rekombinantem humanen BMP2 (rhBMP2; 500 ng/ml) und der extrazellulären Domäne des BMPRIA (eALK3; 200 ng/ml) inkubiert. Die Reaktion der Osteosarkomzellen auf die Inkubation mit Vitamin D3 zeigte eine geringere Intensität, als die unter dem Einfluss von FCS. Zusammenfassend konnte man feststellen, dass die Expression der mRNA der Alkalischen Phosphatase, wie bei den primären osteoblastären Zellen der Normalpersonen unter allen Inkubationen anstieg. Ihr Expressionswert lag unabhängig von den Inkubationen über dem der primären osteoblastären Zellen der Normalpersonen. Obwohl nach Mahonen und Sergi die Saos2-Zellen einen Rezeptor für Vitamin D3 (VDR) besitzen, konnten sie keine Reaktion der OC-mRNA auf 1-25-OH D3 feststellen (Mahonen A et al. 1989, Rodan SB et al. 1987). In Osteosarkomzellen soll der Effekt von 1-25-OH D3 abhängig von der basalen Expression des Osteocalcins sein (Kawasaki K et al. 1998, Owen T et al. 1991). In dieser Arbeit konnte weder eine basale noch eine durch 1-25-OH D3 ausgelöste Expression der OC-mRNA nachgewiesen werden. Viridi beschrieb einen inhibitorischen Effekt von 1-25-OH D3 auf die Expression der BMP2-mRNA in Saos2-

Zellen. Die Bildung von BMP4 sollte nicht beeinflusst sein (Viridi AS et al. 1998). In dieser Arbeit führte 1-25-OH D3 zu einem gegenteiligen Effekt. Die Expression der BMP2-mRNA wurde hoch reguliert, wobei die Expression der BMP4-mRNA wie bei Viridi unverändert blieb. Unter der Inkubation mit rhBMP2 und eAlk3 verhielten sich die Saos2-Zellen anders, als osteoblastäre Zellen. Unter rhBMP2 fehlte der Expressionsanstieg der BMP2-mRNA, unter eAlk3 der der BMP4-mRNA. Auffällig war, dass der BMP4-Anstieg schon unter Vitamin D3 fehlte. In den Osteosarkomzellen konnte der Expressionsanstieg der BMP4-mRNA nur unter der Inkubation von Vitamin D3 mit eALK3 und FCS nachgewiesen werden.

Auch den osteoblastären Zellen des nHPI-Patienten fehlte der BMP4-Anstieg unter Vitamin D3 und eAlk3. BMP4 schien aber in der Osteoblasten-Kultur parallel zu der OC-mRNA reguliert zu sein. Osteocalcin ist notwendig für eine Mineralisation der Matrix. Die Patientenzellen, als auch die Saos2-Zellen wiesen eine geringe, bzw. keine Expression der OC-mRNA auf.

Auch in dem Versuchsablauf der Saos2-Zellen schien eine Komplexierung des rhBMP's durch das zusätzliche eAlk3 unwahrscheinlich. Die Expression der Saos2-Zellen unter rhBMP2 plus eAlk3 entsprach der unter der Inkubation mit eAlk3 allein.

Unter der Kombination von 1-25-OH D3 und rhBMP2 zeigte sich eine Reaktion der Expression der untersuchten Gene, die dem Effekt der Inkubation mit Vitamin D3 allein entsprach. Das konnte auch in osteoblastären Zellen der Normalpersonen nachgewiesen werden.

Aufgrund ihrer Immortalität und objektiven Wiederholbarkeit boten sich die Osteosarkomzellen als Untersuchungsobjekt an. Anhand der Ergebnisse konnte man schlussfolgern, dass die Saos2-Zellen nicht vollständig mit primären osteoblastären Zellen vergleichbar waren. Die gefundenen Unterschiede v.a. der Reaktion der BMP5-mRNA konnten viele Ursachen haben. So weisen Tumorzellen z.B. eine Entkopplung der Proliferation und der Differenzierung auf. In osteoblastären Zellen verläuft aber die Proliferation und die Differenzierung in einer speziellen Sequenz, wobei die Proliferation die Differenzierung hemmt. Die Saos2-Zellen wiesen in dieser Arbeit eine hohe Aktivität der AP und eine hohe Proliferationsrate auf. Die osteoblastären Zellen des nHPI-Patienten zeigten den genau gegenteiligen Charakter.

7.0 Schlussfolgerung

In dieser Arbeit wurden isolierte humane periphere Leukozyten von gesunden Personen, als auch von Patienten mit Störungen des Knochenstoffwechsels auf die Expression von Genen des Bone Morphogenetic Protein-Systems untersucht. Patienten die an der HCDJ, bzw. an der THPI leiden weisen im Serum eine stark erhöhte, der nHPI-Patient eine erniedrigte Aktivität der Alkalischen Phosphatase (Apges, APbone, Ostase) auf. Es bestand bei allen drei Krankheitsbildern eine erhöhte Expression (Faktor 2-281) der BMP2-, BMP4-, BMP5- und BMPRIA-mRNA. Bei Kindern der präpubertalen Wachstumsphase als auch HCDJ-Patienten ist ein erhöhter Knochen-Umsatz bekannt. Beide Gruppen zeigten eine besonders hohe Expression der BMP2- und BMP5-mRNA. Leukozyten von Personen ohne gesteigerten Knochen-Umsatz z.B. Normalpersonen mit abgeschlossener Skelettentwicklung exprimierten vermehrt die BMP4-mRNA. Obwohl die Mutter der HCDJ-Patientin klinisch unauffällig war, wiesen ihre Leukozyten sehr hohe Expressionen der BMP-Gene, besonders der BMP2- (Faktor 16) und BMP5-mRNA (Faktor 48) auf. Diese Veränderungen sprechen am ehesten für die Anlagenschaft einer krankheitsverursachenden Mutation. Unter der Bisphosphonat-Therapie der an HCDJ erkrankten Tochter stieg die Expression der BMP-Gene an und entfernte sich weiter von den altersentsprechenden Normwerten, wobei es zu einem Angleich der BMP-Expression an die Expressionswerte der Mutter kam. Patienten mit einer Transienten Hyperphosphatasie (THPI) sind durch eine Erhöhung der Aktivität der Alkalischen Phosphatase, ohne klinisches oder röntgenologisches Korrelat charakterisiert. Eine vermehrte Expression der BMP-Gene in peripheren Leukozyten muss also nicht unweigerlich eine Veränderung der Knochenstruktur mit sich führen. Es wurde zusätzlich eine primäre Knochenzellkultur aus Knochenproben des nHPI-Patienten und gesunder Probanden angelegt. Die osteoblastären Zellen gesunder Probanden exprimierten die BSP11-, OC-, AP-, BMP2-, BMP4- und BMP5-mRNA und befanden sich im Stadium der beginnenden Mineralisation. Die Hypophosphatasie (nHPI) äußert sich klinisch durch eine Mineralisationsstörung mit einem rachitisähnlichen Bild. Die Patientenzellen wiesen eine hohe Expression der Alkalischen Phosphatase bei fehlender Enzymaktivität, eine verspätete Zell-Konfluenz und daraus resultierend eine reduzierte Osteocalcin-Expression auf. Die in dieser Arbeit untersuchte Osteosarkomzelllinie Saos2 war durch eine ausgeprägt hohe Aktivität der Alkalischen Phosphatase bei fehlender Expression der OC-mRNA

und Unfähigkeit zur Mineralisation charakterisiert. Saos2-Zellen wiesen im Vergleich zu osteoblastären Zellen der Normalpersonen eine niedrige BMP4-Expression auf, die auch in den osteoblastären Zellen des nHPI-Patienten nachweisbar war. Das osteoinduktive BMP4 schien in der Osteoblastenkultur parallel zu der OC-mRNA reguliert zu sein. Unter 1-25-OH D3 zeigten osteoblastäre Zellen der Normalpersonen einen Anstieg der BMP4-mRNA, der den Saos2-Zellen, als auch den osteoblastären Zellen des nHPI-Patienten fehlte. Die veränderte Regulation von BMP4 und Osteocalcin könnte in den Saos2-Zellen, als auch in den osteoblastären Zellen des nHPI-Patienten u.a. eine Ursache für eine gestörte Mineralisation sein. Die Saos2-Zellen mit einer hohen Aktivität der AP wiesen im Vergleich zu osteoblastären Zellen der Normalpersonen eine niedrige, die Zellen des nHPI-Patienten mit reduzierter AP-Aktivität eine hohe Expression der BMP5-mRNA auf. Eine direkte Regulation der BMP5-mRNA durch die AP, bzw. der AP durch die BMP5-mRNA konnte nicht nachgewiesen werden. In den peripheren Leukozyten des nHPI-Patienten fiel die erhöhte Expression der untersuchten BMP-Gene unter der Bisphosphonat-Therapie ab. Es kam zu einer Besserung der Knochenstruktur und damit des Krankheitsbildes, obwohl die initial schon reduzierte Aktivität der Alkalischen Phosphatase im Serum weiter abfiel. Ein Anstieg der Expression der BMP4- und OC-mRNA und damit ein Hinweis auf eine bessere Knochenformation konnte unter der Inkubation der Patientenzellen mit 1-25-OH D3 und rhBMP2, bzw. eAlk3 erreicht werden. Man konnte schlussfolgern, dass keine generelle Störung des Couplings zwischen 1-25-OH D3 und dem BMP-System vorlag. Die bisher durchgeführten Arbeiten stellen die Basis für weiterführende Untersuchungen dar. Aufgrund der hohen Heterogenität der osteoblastären Kulturen ist es notwendig, die bisherigen Ergebnisse in Studien mit höheren Fallzahlen zu bestätigen.

8.0 Literaturverzeichnis

- Abdallah BM, Stilgren LS, Nissen N, Kassern M, Joergensen HRI, Abrahamsen B. 2003. Detection and quantification of RANKL and Osteoprotegerin gene expression by Real Time PCR in iliac bone from elderly patients with osteoporosis and osteoarthritis [Abstract P-123]. 30 th European Symposium on Calcified Tissues. Rom.
- Adami S, Zamberlan N. 1996. Adverse effects of bisphosphonates. A comparative review. *Drug-Saf*, 14(3): 158-70.
- Anderson HC, Hodges PT, Aguilera XM, Missana L, Moylan PE. 2000. Bone morphogenetic protein (BMP) localization in developing human and rat growth plate, metaphysis, epiphysis, and articular cartilage. *J Histochem Cytochem*, 48(11): 1493-502.
- Anderson HC, Hsu HH, Raval P, Hunt TR, Schwappach JR, Morris DC, Schneider DJ. 1995. The mechanism of bone induction and bone healing by human osteosarcoma cell extracts. *Clin Orthop*, 313: 129-34.
- Anderson HC, Reynolds PR, Hsu HHT, Missana L, Masuhara K, Moylan PE, Roach HI. 2002. Selective synthesis of bone morphogenetic proteins-1, -3, -4 and bone sialoprotein may be important for osteoinduction by Saos-2 cells [Abstract]. *J Bone Miner Metab*, 20(2): 73-82.
- Aubin JE, Liu F, Malaval L, Gupta AK. 1995. Osteoblast and Chondroblast Differentiation. *Bone*, 17(2):77-83.
- Bakwin H, Eiger MS. 1956. Fragile bones and macrocranium. *J Pediat*, 49: 558-564.
- Byers PD. 1994. Histological features of connective tissues. In: Salisbury JR, Woods CG and Byers PD, Hrsg. *Disease of Bones and Joints*. Chapman & Hall medical, 476-507.
- Caffey JP. 1973. Familial hyperphosphatasemia with ateliosis and hypermetabolism of growing membranous bone: review of the clinical, radiographic and chemical features. In: Kaufmann HJ, Hrsg. *Progress in Pediatric Radiology: Intrinsic Disease of Bones*. Vierte Aufl Basel: Karger S (pub), 438-468.
- Carter SD, Cromwell GL, Combs TR, Colombo G, Fanti P. 1996. The determination of serum concentrations of osteocalcin in growing pigs and its relationship to end-measures of bone mineralization. *J-Anim-Sci*, 74(11): 2719-29.
- Centrella M, Casinghino S, Kim J, Pham T, Rosen V, Wozney J, McCarthy TL. 1995. Independent changes in Type I and Type II receptors for transforming growth factor beta induced by bone morphogenetic protein 2 parallel expression of the osteoblast phenotype. *Mol Cell Biol*, 15(6): 3273-81.
- Chavassieux PM, Chenu C, Valentin-Opran A, Merle B, Delmas PD, Hartmann DJ, Saez S, Meunier PJ. 1990. Influence of Experimental Conditions on Osteoblast Activity in Human Primary Bone Cell Cultures. *J Bone Miner Res*, 5(4): 337-343.

- Chikazu D, Li X, Kawaguchi H, Sakuma Y, Voznesensky OS, Adams DJ, Xu M, Hoshio K, Katavic V, Herschman HR, Raisz LG, Pilbeam CC. 2002. Bone morphogenetic protein 2 induces cyclo-oxygenase 2 in osteoblasts via a Cbfa1 binding site: role in effects of bone morphogenetic protein 2 in vitro and in vivo. *J Bone Miner*, 17(8): 1430-40.
- Chong B, Hegde M, Fawcner M, Simonet S, Cassinelle H, Coker M, Kanis J, Seidel J, Tau C, Tuysuz B, Yuksel B, Love D. 2003. International Hyperphosphatasia Collaborative Group : Idiopathic hyperphosphatasia and TNFRSF11B mutations : relationships between phenotype and genotype. *J Bone Miner*, 18(12): 2095-104.
- Christenson RH. 1997. Biochemical markers of bone metabolism: an overview. *Clin Biochem*, 30(8): 573-93.
- Christiansen C, Hassager C, Riis BJ. 1998. Biochemical Markers of Bone Turnover. In: Avioli LV, Krane SM, Hrsg. *Metabolic Bone Disease*. San Diego, California, USA: Academic Press, 313-325.
- Cosich N, Long F, Wong R, Topliss DJ, Stockigt JR. 1991. Post partum hypercalcemia in hereditary hyperphosphatasia (juvenile Pagets disease). *J Endocrinol Invest*, 14: 591-597.
- Dickinson ME, Kobrin MS, Silan CM, Kingsley DM, Justice MJ, Miller DA, Ceci JD, Lock LF, Lee A, Buchberg AM, Siracusa LD, Lyons KM, Derynck R, Hogan BLM, Copeland NG, Jenkins NA. 1990. Chromosomal localization of seven members of the murine TGF-beta superfamily suggests close linkage to several morphogenetic mutant loci. *Genomics*, 6: 505-520.
- Delannoy P, Lemonnier J, Hay E, Modrowski D, Marie PJ. 2001. Protein kinase C-dependent upregulation of N-cadherin expression by phorbol ester in human calvaria osteoblasts. *Exp Cell Res*, 269(1): 154-61.
- Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. 1997. *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell*, 89: 747-754.
- Ducy P, Starbuck M, Priemel M, Shen J, Pinero G, Geoffroy V, Amling M. 1999. Karsenty G: A *Cbfa1*-dependent genetic pathway controls bone formation beyond embryonic development. *Genes Dev*, 13: 1025-1036.
- Ebert R, Jovanovic M, Schneider D, Adamski J, Jakob F. 2003. Downregulation of human 25-dihydroxyvitamin D₃ 1alpha-hydroxylase promoter activity by NFKappaB via multiple NFKappaB response elements [Abstract P-153]. 30 th European Symposium on Calcified Tissues. Rom.
- Erben RG, Scutt AM, Miao D, Kollenkirchen U, Haberey M. 1997. Short-Term Treatment of Rats with High Dose 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ Stimulates Bone Formation and Increases the Number of Osteoblast Precursor Cells in Bone Marrow. *Endocrinology*, 138(11): 4629-4635.
- Faucheux C, Bareille R, Amedee J, Triffitt JT. 1999. Effect of 1,25(OH)₂D₃ on Bone Morphogenetic Protein-3 mRNA Expression. *J Cell Biochem*, 73: 11-19.

- Fedde KN, Michell MP, Henthorn PS, Whyte MP. 1996. Aberrant properties of alkaline phosphatase in patient fibroblasts correlate with clinical expressivity in severe forms of hypophosphatasia. *J Clin Endocrinol Metab*, 81(7): 2587-94.
- Fujii M, Takeda K, Imamura T, Aoki H, Sampath TK, Enomoto S, Kawabata M, Kato M, Ichijo H, Miyazono K. 1999. Roles of Bone Morphogenetic Protein Type I Receptors and Smad Proteins in Osteoblast and Chondroblast Differentiation. *Mol Biol Cell*, 10(11): 3801-3813.
- Ganss B, Kim RH, Sodek J. 1999. Bone sialoprotein. *Crit Rev Oral Biol Med*, 10(1): 79-98.
- Gavaia PJ, Simes DC, Ortiz JB, Sarasquete MC, Cancela ML. 2003. Simultaneous detection of osteocalcin and matrix GLA protein in developmental stages of zebra fish [Abstract P-438]. 30 th European Symposium on Calcified Tissues. Rom.
- Geoffroy V, Branger S, Laplanche JL, Vernejoul Mcde. 2003. Identification of polymorphisms in the RUNX2/Cbfa1 gene and association with bone mineral density and fractures [Abstract P-369]. 30 th European Symposium on Calcified Tissues. Rom.
- Geoffroy V, Kneissel M, Fournier B, Boyde A, Matthias P. 2002. High bone resorption in adult aging transgenic mice overexpression Cbfa1/Runx2 in cells of osteoblastic lineage. *Molec Cell Biol*. 22: 6222-6233.
- Graedler F, Zeitz U, Moeller G, Erben RG, Adamski J. 2003. Gene expression profiling reveals new functions of Vitamin D [Abstract P-177]. 30 th European Symposium on Calcified Tissues. Rom.
- Grimaud E, Soubigou L, Couillaud S, Passuti N, Redini F, Gouin F, Heymann D. 2003. Osteoprotegerin (OPG) / Receptor activator of NF-KB Ligand (RANKL) balance in pathologic osteolysis : RT-PCR study and serum analysis [Abstract P-7]. 30 th European Symposium on Calcified Tissues. Rom.
- Groeneveld EHJ, Burger EH. 2000. Bone Morphogenetic proteins in human bone regeneration. *Eur J Endocrinol*, 142: 9-21.
- Guo W, Gorlick R, Ladanyi M, Meyers PA, Huvos AG, Bertino JR, Healy JH. 1999. Expression of bone morphogenetic proteins and receptors in sarcomas. *Clin Orthop*, 365:175-83.
- Hahn GV, Cohen RB, Wozney JM, Levitz CL, Shore EM, Zasloff MA, Kaplan FS. 1992. A bone morphogenetic protein subfamily: chromosomal localization of human genes for BMP5, BMP6, and BMP7. *Genomics*, 14(3): 759-62.
- Hatta M, Daitoku H, Matsuzaki H, Deyama Y, Yoshimura Y, Suzuki K, Matsumoto A, Fukamizu A. 2002. Regulation of alkaline phosphatase promotor activity by forkhead Transcription factor FKHR. *Int J Mol Med*, 9(2): 147-52.

- Hay E, Lemonnier J, Fromigue O, Marie PJ. 2001. Bone morphogenetic protein-2 promotes osteoblast apoptosis through a Smad-independent, protein kinase C-dependent signaling pathway. *J Biol Chem*, 276(31): 29028-36.
- Hay E, Lemonnier J, Modrowski D, Lomri A, Lasmoles F, Marie PJ. 2000. N- and E-cadherin mediate early human calvaria osteoblast differentiation promoted by bone morphogenetic protein-2. *J Cell Physiol*, 183(1): 117-28.
- Helvering LM, Sharp RL, Ou X, Geiser AG. 2000. Regulation of the promoters for the human bone morphogenetic protein 2 and 4 genes. *Gene*, 256(1-2): 123-38.
- Henriksen Z, Sorensen OH, Jorgensen NR. 2003. Dexamethasone and BMP-2 induce a more differentiated osteoblast phenotype in human bone marrow derived stromal cells [Abstract P-73]. 30 th European Symposium on Calcified Tissues. Rom.
- Hogan BLM. 1996. Bone morphogenetic proteins in Development. *Current Opinion in Genetics & Development*, 6 (4): 432-438.
- Holick MF, Adams JS. 1998. Vitamin D Metabolism and Biological Function. In: Avioli LV, Krane SM, Hrsg. *Metabolic Bone Disease*. San Diego, California, USA: Academic Press, 123-163.
- Horst vd G, v Bezooijen RL, Deckers MM, Hoogendam J, Visser A, Lwik CW, Karperien M. 2002. Differentiation of murine preosteoblastic KS483 cells depends on autocrine bone morphogenetic protein signaling during all phases of osteoblast formation. *Bone*, 31(6): 661-9.
- Horwith M, Nunez EA, Krook L, Viteri F, Torun B, Mena E, Suh SM, Eisenberg E, MacIntyre I, Whalen JP. 1976. Hereditary bone dysplasia with hyperphosphatasemia. Response to synthetic human calcitonin. *Clin Endocrinol*, 5 (Suppl): 341s-352s.
- Ishidou Y, Kitajima I, Obama H, Maruyama I, Murata F, Imamura T, Yamada N, ten Dijke P, Miyazono K, Sakou T. 1995. Enhanced expression of Type I receptors for bone morphogenetic proteins during bone formation. *J Bone Miner Res*, 10(11): 1651-9.
- Jahr H, Eiken M, Eerden BCJ vd, Weinans H, Verhaar JAN, Pols HAP, Leeuwen JPTMv. 2003. Dynamic regulation of RANKL and OPG expression during human osteoblast differentiation: relation with mineralization [Abstract P-168]. 30 th European Symposium on Calcified Tissues. Rom.
- Janssens K, ten Dijke P, Ralston SH, Bergmann C, Hul vW. 2003. Transforming growth factor-beta 1 mutations in Camurati-Engelmann disease lead to increased signaling by altering either activation or secretion of the mutant protein. *J Biol Chem*, 278(9): 7718-24.

- Jonsson KB, Frost A, Nilsson O, Ljunghall S, Ljunggren Ö. 1999. Three isolation techniques for primary culture of human osteoblast-like cells. *Acta Orthop Scand*, 70(4): 365-373.
- Karow T, Lang R. 1999. Vitamin D-Stoffwechsel. In: Karow T, Lang R, Hrsg. *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. Bergisch-Gladbach: Karow Verlag, 501-502.
- Kasugai S, Nagata T, Sodek J. 1992. Temporal Studies on the Tissue Compartmentalization of Bone Sialoprotein (BSP), Osteopontin (OPN), and SPARC Protein During Bone Formation In Vitro. *J Cell Physiol*, 152: 467-477.
- Kawasaki K, Aihara M, Honmo J, Sakurai S, Fujimaki Y, Sakamoto K, Huimaki E, Wozney JM, Yamaguchi A. 1998. Effects of Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 on Differentiation of Cells Isolated from Human Bone, Muscle and Skin. *Bone*, 23(3): 223-231.
- Kerner SA, Scott RA, Pike JW. 1989. Sequence elements in the human osteocalcin gene confer basal activation and inducible response to hormonal vitamin D3. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86(12): 4455-9.
- Kessler S, Kastler S, Mayr-Wohlfart U, Puhl W, Günther K-P. 2000. Stimulation primärer Osteoblastenkulturen mit rh-TGF- β , rh-bFGF, rh-BMP 2 und rx-BMP 4 in einem In-vitro-Modell. *Orthopädie*, 29: 107-111.
- Kobayashi H, Gao Yh, Ueta C, Yamaguchi A, Komori T. 2000. Multilineage differentiation of Cbfa1-deficient calvarial cells in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*, 273(2): 630-6.
- Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, Shimizu Y, Bronson RT, Gao Y.H, Inada M, Sato M, Okamoto R, Kitamura Y, Yoshiki S, Kishimoto T. 1997. Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblast. *Cell*, 89: 755-764.
- Kress BC. 1997. Bone alkaline phosphatase in normal and disease process. In: Schmidt-Gayk H, Blind E, Roth H-J, Hrsg. *Calcium Regulating Hormones and Markers of Bone Metabolism: Measurement and Interpretation*. Heidelberg: Clin Lab Publications, 171-181.
- Küsswetter W, Teschner M. 1999. Gentechnisch induziertes Knochenwachstum. *Deutsches Ärzteblatt*, 28-29(29): 1517-1521.
- Kuschinsky G, Lüllmann H, Mohr K. 1993. Bisphosphonate. In: Kuschinsky G, Hrsg. *Kurzes Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*. 13`te Aufl Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 439-440.
- Lai CF, Cheng SL. 2002. Signal transductions induced by bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor-beta in normal human osteoblastic cells. *J Biol Chem*, 277(18): 15514-22.

- Lanchoney TF, Olmsted EA, Shore EM, Gannon FA, Rosen V, Zasloff MA, Kaplan FS. 1998. Characterization of bone morphogenetic protein 4 receptor in fibrodysplasia ossificans progressiva. *Clin Orthop*, 346: 38-45.
- Lecanda FA, Avioli LV, Cheng SL. 1997. Regulation of bone matrix protein expression and induction of differentiation of human osteoblasts and human bone marrow stroma cells by bone morphogenetic protein-2. *J Cell Biochem*, 67(3): 386-96.
- Lian JB, Stein GS. 1993. The developmental stages of osteoblast growth and differentiation exhibit selective responses of genes to growth factors (TGF beta 1) and hormones (vitamin D and glucocorticoids). *J Oral Implantol*, 19(2): 95-105, 136-7.
- Lian JB, Stein GS, Stein JL, Wijnen AJV. 1998. Osteocalcin gene promotor : unlocking the secrets for regulation of osteoblast growth and differentiation. *J Cell Biochem Suppl*, 30-31: 62-72.
- Lin JH. 1996. Bisphosphonates: a review of their pharmacokinetic properties. *Bone*, 18(2): 75-85.
- Liu P, Oyajobi BO, Russell RGG, Scutt A. 1999. Regulation of Osteogenic Differentiation of Human Bone Marrow Stromal Cells : Interaction between transforming growth factor- β and 1,25(OH) $_2$ Vitamin D $_3$ in vitro. *Calcif Tissue Int*, 65: 173-180.
- Lyons KM, Bahamonde ME, Engstrand T, Daluiski A, Rosen V. 2000. BMP3 is an essential regulator of bone formation in vivo [Abstract]. *International Conference Bone Morphogenetic Proteins. J Bone Joint Surg Am*, 83-A (1): 1-78.
- Macey HB. 1940. Multiple pseudofractures: report of a case. *Proc Staff Meet Mayo Clinic*, 15: 789-791.
- Mahonen A, Pirskanen A, Keinänen R, Mäenpää PH. 1989. Effect of 1,25 (OH) $_2$ D $_3$ on its receptor mRNA levels and osteocalcin synthesis in human osteosarcoma cells. *Biochim Biophys Acta, Elsevier*, 1084: 30-37.
- Mahonen A, Pirskanen A, Keinänen R, Mäenpää PH. 1990. Effect of 1,25(OH) $_2$ D $_3$ on its receptor mRNA levels and osteocalcin synthesis in human osteosarcoma cells. *Biochem Biophys Acta*, 1048: 30-37.
- Maiti SK, Singh GR. 1998. Bone morphogenetic proteins – Novel regulators of bone formation. *Indian J Exp Biol*, 36: 237-244.
- Marie PJ, Lomri A, Sabbagh A, Basle M. 1989. Culture and behavior of osteoblastic cells isolated from normal trabecular bone surfaces. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, 25(4): 373-380.

- Matsuura S, Kishi F, Kajii T. 1990. Characterization of a 5'-flanking region of the human liver/bone/kidney alkaline phosphatase gene: two kinds of mRNA from a single gene. *Biochem Biophys Res Commun*, 168(3): 993-1000.
- Mitchell BD, Cole SA, Bauer RL, Iturra SJ, Rodriguez EA, Blange J, MacCluer JW, Hixson JE. 2000. Genes influencing variation in serum osteocalcin concentrations are linked to markers on chromosomes 16q and 20q. *J Clin Endocrinol Metab*, 85(4): 1362-6.
- Monier - Faugere MC, Langub MC, Malluche HH. 1998. Bone Biopsies : a modern Approach. In: Avioli LV, Krane SM, Hrsg. *Metabolic Bone Disease*. San Diego, California, USA: Academic Press, 237-273.
- Morrison NA, Yeoman R, Kelly PJ, Eisman JA. 1992. Contribution of trans-acting factor alleles to normal physiological variability: vitamin D receptor gene polymorphisms and circulating osteocalcin. *Proc Nat Acad Sci*, 89: 6665-6669.
- Mundy GR. 1995. Factors regulating bone resorbing and bone forming cells. In: Mundy RG, Hrsg. *Bone remodeling and its disorders*. London: Martin Dunitz Verlag, 1-59.
- Natsume T, Tomita S, Iemura S, Kinto N, Yamaguchi A, Ueno N. 1997. Interaction between Soluble Type I Receptor for Bone Morphogenetic Protein and Bone Morphogenetic Protein-4. *J Biol Chem*, 272(17): 11535-11540.
- Nefussi JR, Brama G, Modrowski D, Oboeuf M, Forest N. 1997. Sequential Expression of Bone Matrix Proteins During Rat Calvaria Osteoblast Differentiation and Bone Nodule Formation In Vitro. *J Histochem Cytochem*, 45(4): 493-503.
- Niethard FU, Pfeil J, Weber M. 1997. Etiology and pathogenesis of spondylolytic spondylolisthesis. *Orthopade*, 26(9): 750-4.
- Norman AW, Hurwitz S. 1993. The Role of the Vitamin D Endocrine System in Avian Bone Biology. *J Nutr*, 123: 310-316.
- Owen T, Aronow SM, Barone LM, Bettencourt B, Stein GS, Lian JB. 1991. Pleiotropic effects of Vitamin D on osteoblast gene expression are related to the proliferative and differentiated state of the bone cell phenotype: Dependency upon basal levels of gene expression, duration of exposure, and bone matrix competency in normal rat osteoblast cultures. *Endocrinology*, 128(3): 1496-1504.
- Pereira RC, Rydzial S, Canalis E. 2000. Bone Morphogenetic Protein-4 regulates its own Expression in cultured osteoblasts. *J Cell Physiol*, 182: 239-246.
- Quack I, Vonderstrass B, Stock M, Aylsworth AS, Becker A, Brueton L, Lee PJ, Majewski F, Mulliken JB, Suri M, Zenker M, Mundlos S, Otto F. 1999. Mutation analysis of core binding factor A1 in patients with cleidocranial dysplasia. *Am J Hum Genet*, 65: 1268-1278.

- Quarles LD, Yohay DA, Lever LW, Caton R, Wenstrup RJ. 1992. Distinct proliferative and differentiated stages of murine MC3T3-E1 cells in culture : an in vitro model of osteoblast development. *J-Bone Mineral Res*, 7(6): 683-92.
- Raisz LG, Rodan GA. 1998. Embryology and Cellular Biology of Bone. In: Avioli LV, Krane SM, Hrsg. *Metabolic Bone Disease*. San Diego, California, USA: Academic Press, 1-21.
- Raval P, Hsu HH, Schneider DJ, Sarras MP Jr, Masuhara K, Bonewald LF, Anderson HC. 1996. Expression of bone morphogenetic proteins by osteoinductive and non-osteoinductive human osteosarcoma cells. *J Dent Res*, 75(7): 1518-23.
- Rickard DJ, Kassem M, Hefferan TE, Sarkar G, Spelsberg TC, Riggs BL. 1996. Isolation and Characterization of Osteoblast Precursor Cells from Human Bone Marrow. *J Bone Mineral Res*, 11(3): 312-324.
- Rodan SB, Imai Y, Thiede MA, Wesolowski G, Thompson D, Bar-Shavit Z, Shull S, Mann K, Rodan GA. 1987. Characterization of a Human Osteosarcoma Cell Line (Saos-2) with Osteoblastic Properties. *Cancer Research*, 47: 4961-4966.
- Roth AJ, Abendroth K, Seidel J, Neubert H, Venbrocks R. 1996. Management of primary idiopathic hyperphosphatasemia with calcitonin. *International Orthopaedics (SICOT)*, 20: 58-60.
- Sakou T, Onishi T, Yamamoto T, Nagamine T, Sampath TK, Ten Dijke P. 1999. Localization of Smads, the TGF-beta family intracellular signaling components during endochondral ossification. *J Bone Miner Res*, 14(7): 1145-52.
- Schönau E, Erhard U, Rauch F, Stabrey A. 1996. A new model of growth prediction ? In: Schönau E, Hrsg. *Paediatric osteology: New developments in diagnostics and therapy*. Amsterdam: Elsevier Science BV, 251-257.
- Seidel J, Abendroth K, Kauf E, Grübner I. 1996. Hyperostosis deformans juvenilis/HCDJ-Treatment with calcitonin and bisphosphonate. *Medgen*, 1: 52.
- Seidel J, Abendroth K, Müller A, Franke S, Vogt S, Neumann S, Bellstedt K, Schubert K, Kauf E. 1998. Hyperostosis corticalis deformans juvenilis/HCDJ-Ergebnisse nach 2,5 jähriger Pamidronat-Therapie. *Osteologie*, 7: 69-70.
- Seidel J, Kauf E, Bellstedt K, Abendroth K, Müller A, Vogt S, Neumann R, Mentzel HJ, Kentouche K, Roth AJ. 1996. Hyperostosis deformans juvenilis/HCDJ : Eine progredient verlaufende angeborene Knochenerkrankung mit excessiv erhöhtem Knochenumbau-Ergebnisse nach Calcitonin- und Pamidronat-Therapie. *Monatszeitschrift Kinderheilkunde*, 144(1): 95.
- Shafritz AB, Shore EM, Gannon FH, Zasloff MA, Taub R, Muenke M, Kaplan FS. 1996. Overexpression of an osteogenicmorphogen in fibrodysplasia ossificans progressiva. *NEJM*, 335: 555-561.

- Siggelkow H, Niedhart C, Kurre W, Ihbe A, Schulz A, Atkinson MJ, Hübner M. 1998. In vitro differentiation potential of a new human osteosarcoma cell line (HOS 58). *Differentiation*, 63: 81-91.
- Singer F, Siris E, Shane E, Dempster D, Lindsay R, Parisien M. 1994. Hereditary hyperphosphatasia : 20 year follow-up and response to disodium etidronate. *J Bone Miner Res*, 9: 733-738.
- Sitzmann FC. 1995. Kongenitale Hypophosphatasie. In: Sitzmann FC, Hrsg. Pädiatrie. Stuttgart: Hippokrates Verlag, 97.
- Solheim E. 1998. Growth factors in bone. *International Orthopaedics (SICOT)*, 22: 410-416.
- Spentchian M, Merrien Y, Herasse M, Dobbie Z, Glaser D, Holder SE, Ivarsson SA, Kostiner D, Mansour S, Norman A, Roth J, Stipoljev F, Taillemite JL, Smagt vdJJ, Serre JL, Simon-Bouy B, Taillano A, Mornet E. 2003. Severe hypophosphatasia: Characterization of fifteen novel mutations in the ALPL gene. *Hum Mutat*, 22(1): 105-6.
- Spindler A, Berman A, Mautalen C, Ubios J, Santini AE. 1992. Chronic idiopathic hyperphosphatasia: report of a case treated with pamidronat and a review of the literature. *J Rheum*, 19: 642-645.
- Stein GS, Lian JB, Owen TA. 1990. Relationship of cell growth to the regulation of tissue-specific gene expression during osteoblast differentiation. *The FASEB Journal*, 4: 3111-3123.
- Su M, Mantovani R, Sodek J. 2003. NF-Y mediated transcription of bone sialoprotein gene [Abstract P-433]. 30 th European Symposium on Calcified Tissues. Rom.
- Takiguchi T, Kobayashi M, Suzuki R, Yamaguchi A, Isatsu K, Nishihara T, Nagumo M, Hasegawa K. 1998. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 stimulates osteoblast differentiation and suppresses matrix metalloproteinase-1 production in human bone cells isolated from mandibulae. *J Periodontal Res*, 33(8): 476-85.
- Takuwa Y, Ohse C, Wang EA, Wozney JM, Yamashita K. 1991. Bone morphogenetic protein-2 stimulates alkaline phosphatase activity and collagen synthesis in cultured osteoblastic cells, MC3T3-E1. *Biochem Biophys Res Commun*, 174(1): 96-101.
- Tamura Y, Takeuchi Y, Suzawa M, Fukumoto S, Kato M, Miyazono K, Fujita T. 2001. Focal adhesion kinase activity is required for bone morphogenetic protein-Smad1 signaling and osteoblastic differentiation in murine MC3T3-E1 cells. *J Bone Miner Res*, 16(10): 1772-9.
- Ten Dijke P, Ichijo H, Franzen P, Schulz P, Saras J, Toyoshima H, Heldin CH, Miyazono K. 1993. Activin receptor-like kinases : a novel subclass of cell-surface receptors with predicted serine/threonine kinase activity. *Oncogene*, 8(10): 2879-87.

- Thavarajah M, Evans DB, Kanis JA . 1993. Differentiation of heterogeneous phenotypes in human osteoblast cultures in response to 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Bone*, 14(5): 763-7.
- Thirunavukkarasu K, Miles RR, Halladay DL, Yang X, Galvin RJ, Chandrasekhar S, Martin TJ, Onyia JE. 2001. Stimulation of Osteoprotegerin(OPG) gene expression by transforming growth factor-beta (tgf-beta) mapping of the OPG promotor region that mediates tgf-beta effects. *J Biol Chem*, 276(39): 36241-50.
- Tylzanowski P, Verschueren K, Huylebroeck D, Luyten FP. 2001. Smad-interacting protein 1 is a receptor of liver/bone/kidney alkaline phosphatase transcription in bone morphogenetic protein induced osteogenic differentiation of C2C12 cells. *J Biol Chem*, 276(43): 40001-7.
- Urist MR, Hudak RT. 1984. Radioimmunoassay of bone morphogenetic protein in serum: a tissue-specific parameter of bone metabolism. *Proc Soc Exp Biol Med*, 176(4): 472-5.
- Virdi AS, Cook LJ, Oreffo ROC, Triffitt JT. 1998. Modulation of Bone Morphogenetic Protein-2 and Bone Morphogenetic Protein-4 Gene Expression in osteoblastic cell lines. *Cellular molecular Biology*, 44(8): 1237-1246.
- Wang EA, Rosen V, Alessandro JSD, Bauduy M, Cordes P, Harada T, Israel DI, Hewick RM, Kerns KM, Lapan P, Luxenberg DP, McQuaid D, Moutsatsos JK, Nove J, Wozney JM. 1990. Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87: 2220-2224.
- Weinstein RS, Whyte MP. 1981. Heterogeneity of adult hypophosphatasia : report of severe and mild cases. *Arch Intern Med*, 141: 727-731.
- Weiss MJ, Cole DE, Ray K, Whyte MP, Lafferty MA, Mulivor RA, Harris H. 1988. A missense mutation in the human liver/bone/kidney alkaline phosphatase gene causing a lethal form of hypophosphatasia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 85(20): 7666-9.
- Whalen JP, Horwith M, Krook L, MacIntyre I, Mena E, Viteri J, Torun B, Nunez EA . 1997. Calcitonin treatment in hereditary bone dysplasia with hyperphosphatasemia: a radiographic and histologic study of bone. *Am J Roentgen*, 129: 29-35.
- Whyte MP. 1988. Personal Communication. St. Louis: 7/21/1988
- Whyte MP. 1990. Personal Communication. St. Louis: 12/5/1990
- Whyte MP, Walkenhorst DA, Fedde KN, Henthorn PS, Hill CS: 1996. Hypophosphatasia: levels of bone alkaline phosphatase immunoreactivity in serum reflect disease severity. *J Clin Endocrinol Metab*, 81(6): 2142-8.

- Woitge HW, Oberwittler H, Heichel S, Grauer A, Ziegler R, Seibel MJ. 2000. Short- and Long-Term Effects of Ibandronate Treatment on Bone Turnover in Paget Disease of Bone. *Clinical Chemistry*, 46(5): 684-690.
- Wolff C, Zabransky S. 1982. Hypophosphatasia congenita letalis. *Europ J Pediat*, 138: 197-199.
- Wozney JMPHD. 2002. Overview of Bone Morphogenetic Proteins. *Spine*, 27(16): 2-8.
- Yamaguchi A, Komori T, Suda T. 2000. Regulation of Osteoblast Differentiation mediated by Bone Morphogenetic Proteins, Hedgehogs, and Cbfa1. *Endocr Rev*, 21(4): 393-411.
- Yamaguchi A, Katagiri T, Ikeda T, Wozney JM, Rosen V, Wang EA, Kahn AJ, Suda T, Yoshiki S. 1991. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 stimulates osteoblastic maturation and inhibits myogenic differentiation in vitro. *J Cell Biol*, 113(3): 681-7.
- Yamamoto T, Ecarot B, Glorieux FH. 1991. In Vivo Osteogenic Activity of Isolated Human Bone Cells. *J Bone Mineral Res*, 6(1): 45-51.
- Yanagisawa J, Yanagi Y, Masuhiro Y, Suzawa M, Watanabe M, Kashiwagi K, Toriyabe T, Kawabata M, Miyazono K, Kato S. 1999. Convergence of transforming growth factor- β and vitamin D signaling pathways on SMAD transcriptional coactivators. *Science*, 283: 1317-1321.
- Yang LJ, Jin Y. 1990. Immunohistochemical observations on bone morphogenetic protein in normal and abnormal conditions. *Clin Orthop*, 257: 249-56.
- Yazaki Y, Matsunaga S, Onishi T, Nagamine T, Origuchi N, Yamamoto T, Ishidou Y, Imamura T, Sakou T. 1998. Immunohistochemical localization of bone morphogenetic proteins and the receptors in epiphyseal growth plate. *Anticancer Res*, 18 (4A): 2339-44.
- Yeh L, Unda R, Lee JC. 2000. Osteogenic protein-1 differentially regulates the mRNA expression of bone morphogenetic proteins and their receptors in primary cultures of osteoblasts. *J Cell Physiol*, 185(1): 87-97.
- Yousfi M, Lasmoles F, Kern B, Marie PJ. 2003. TWIST inactivation reduces Cbfa1/RUNX2 expression and DNA binding to the osteocalcin promoter in osteoblasts [Abstract P-390]. 30 th European Symposium on Calcified Tissues. Rom.
- Zhou H, Choong P, McCarthy R, Chou ST, Martin TJ, NG KW. 1994. In Situ Hybridization to Show Sequential Expression of Osteoblast Gene Markers During Bone Formation in Vivo. *J Bone Mineral Res*, 9(9): 1489-1499.

Literaturverzeichnis

Ziros PG, Gil A-PR, Georgakopoulos T, Habeos I, Kletsas D, Basdra EK, Papavassiliou AG. 2002. The bone-specific transcriptional regulator Cbfa1 is a target of mechanical signals in osteoblastic cells. *J Biol Chem*, 277: 23934-23941.

Anhang

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Ortlepp
Vorname: Regine
Geburtsdatum: 15.02.1978
Geburtsort: Friedrichroda
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung:

1984 - 1988 Grundschole Georgenthal
1988 - 1991 Polytechnische Oberschule
Georgenthal
1991 - 1996 Gleichense Gymnasium Ohrdruf
Abschluss: Abitur
Note: sehr gut (1,3)

Hochschulbildung:

10/1996 – 11/2003 Friedrich-Schiller-Universität Jena
Studiengang: Humanmedizin
Famulaturen: Neurologie, Neuropädiatrie,
Allgemeinmedizin, Pädiatrie
09/1999 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Note: gut
seit 04/2000 Dissertation an der Klinik für Kinderheilkunde
der FSU Jena
04/2000 – 03/2001 Promotionsstipendium des Ministeriums für
Wissenschaft, Forschung und Kunst
10/2002 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Note: gut

10/2002 - 09/2003	Praktisches Jahr
10/2002 - 02/2003	Kreiskrankenhaus Rudolstadt, Innere Medizin
02/2003 - 05/2003	HELIOS Klinikum Erfurt, Neurologie
05/2003 - 09/2003	HELIOS Klinikum Erfurt, Chirurgie
11/2003	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung Note: sehr gut
2/2004 – 9/2004	Ärztin im Praktikum Klinikum Fulda
Seit 10/2004	Assistenzärztin für Neurologie Klinikum Fulda

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. F. Zintl für die Überlassung des Themas und für seinen wissenschaftlichen und organisatorischen Beistand, durch den die Arbeit möglich wurde.

Ebenso danke ich meinem Betreuer Herrn Dr. Joachim Clement der mein Ansprechpartner für Fragen aus dem Bereich Molekulargenetik war und mich in der praktischen Umsetzung der Versuche stets unterstützt hat.

Des weiteren danke ich meinem Betreuer Herrn PD Dr. med. Jörg Seidel der mich in Fragen der klinischen Humangenetik und organisatorischen Fragen unterstützt hat.

Herrn Prof. Dr. med. K. Höffken aus der Klinik für Innere Medizin II der Friedrich-Schiller-Universität in dessen Onkologischen Forschungslabor die Untersuchungen durchgeführt wurden, danke ich für die großzügige Kooperation.

Weiterhin möchte ich mich für die finanzielle Unterstützung meiner Arbeit durch den Verbund für klinische Forschung des Klinikums der Friedrich-Schiller-Universität Jena und Herrn Prof. Dr. H. Sauer bedanken.

Ein herzlicher Dank gilt insbesondere den Mitarbeiterinnen des Onkologischen Forschungslabor der Klinik für Innere Medizin II der Friedrich-Schiller-Universität Dana Hüttig, Anja Waldau, Conny Jörke und Heike Wahner, die mich stets durch wertvolle Ratschläge und ihre praktische Hilfe unterstützt haben.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist, ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind, mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

Prof. Dr. F. Zintl, Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, Klinikum der Friedrich-Schiller-Universität Jena

Prof. Dr. K. Höffken, Fachabteilung Innere Medizin II, Klinikum der Friedrich-Schiller-Universität Jena

Prof. Dr. H. Sauer, Verbund für klinische Forschung, Klinikum der Friedrich-Schiller-Universität Jena

PD Dr. J. Seidel, Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, Klinikum der Friedrich-Schiller-Universität Jena

Dr. J. Clement, Onkologisches Forschungslabor, Fachabteilung Innere Medizin II, Klinikum der Friedrich-Schiller-Universität Jena

Frau Dr. H. Siggelkow, Fachabteilung Innere Medizin, Georg August Universität Göttingen

Dr. P. Hortschansky, Hans Knöll Institut für Naturstoff-Forschung, Jena

M. Coker, Klinik für Pädiatrie, Edge University, Izmir, Türkei

T. Cundy, University of Auckland Hospital, Auckland, Neuseeland

D. Hüttig, A. Waldau, C. Jörke, H. Wahner, Medizinisch Technische Assistentinnen, Onkologisches Forschungslabor, Fachabteilung Innere Medizin II, Klinikum der Friedrich-Schiller-Universität Jena,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder eine andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.