



**Technische Universität München**

**Fakultät für Medizin**

**Klinik für Orthopädie und Sportorthopädie**

**Klinikum rechts der Isar**

**(Direktor: Prof. Dr. Rüdiger von Eisenhart-Rothe)**

**Der Einfluss von Glucosaminsulfat auf die Expression von  
Matrix-Metalloproteasen in Osteosarkomzellen *in vitro***

**Jörg David Ulrich**

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

**Doktors der Medizin**

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Jürgen Schlegel

Prüfer der Dissertation:

1. Prof. Dr. Rüdiger von Eisenhart-Rothe
2. apl. Prof. Dr. Dr. Hans Peter Rechl

Die Dissertation wurde am 17.01.2017 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 21.02.2018 angenommen.



# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>I</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>III</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Das Osteosarkom</b>	<b>1</b>
1.1.1 Diagnostik	2
1.1.2 Staging	4
1.1.3 Therapie	4
1.1.4 Prognose und Nachbehandlung	6
<b>1.2 Matrix-Metalloproteasen</b>	<b>7</b>
1.2.1 Regulation von Matrix-Metalloproteasen	9
1.2.2 Matrix-Metalloproteasen in Tumoren	10
1.2.3 Matrix-Metalloprotease 2 und 9	11
1.2.4 Matrix-Metalloprotease 3	12
1.2.5 Matrix-Metalloproteasen im Osteosarkom	12
<b>1.3 Glucosaminsulfat</b>	<b>13</b>
<b>1.4 Zielsetzung dieser Arbeit</b>	<b>15</b>
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>16</b>
<b>2.1 Zellkultur</b>	<b>16</b>
2.1.1 Humane Osteosarkomzelllinie MG-63	16
2.1.2 Humane Osteosarkomzelllinie SaOs-2	17
2.1.3 Stimulation der Zellen mit Glucosaminsulfat	18
2.1.4 Zellzählung	20
2.1.5 Zellviabilität	21
2.1.6 ALP-Färbung	22
<b>2.2 Molekularbiologische Methoden</b>	<b>22</b>
2.2.1 RNA-Isolation	22
2.2.2 cDNA-Synthese	25
2.2.3 Quantitative real-time Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)	27
<b>2.3 Proteinchemische Methoden</b>	<b>30</b>
2.3.1 Aceton-Fällung von Proteinen	31
2.3.2 Protein-Resuspension in <i>Cell Extraction Buffer</i>	31
2.3.3 Quantitative Proteinbestimmung	31

## Inhaltsverzeichnis

---

2.3.4	Zymographie	33
2.3.5	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	35
<b>2.4</b>	<b>Statistische Methoden</b>	<b>37</b>
<b>2.5</b>	<b>Materialien</b>	<b>38</b>
2.5.1	Puffer	38
2.5.2	Primer	38
2.5.3	Reagenzien und Kits	39
2.5.4	Verbrauchsmaterialien	40
2.5.5	Geräte und Software	40
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>42</b>
<b>3.1</b>	<b>Zellkultur</b>	<b>42</b>
3.1.1	Merkmale der unterschiedlichen Zelllinien	42
3.1.2	Zellviabilität mittels WST-Assay	43
<b>3.2</b>	<b>Proteinchemische und molekularbiologische Ergebnisse</b>	<b>45</b>
3.2.1	Zymographie	45
3.2.2	Quantitative real-time PCR (qPCR)	46
3.2.3	Enzyme-linkte Immunosorbent Assay (ELISA)	52
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>56</b>
<b>4.1</b>	<b>Diskussion der Methoden</b>	<b>56</b>
4.1.1	Auswahl der Zelllinien	56
4.1.2	Versuchsansatz und Zellkultur	56
4.1.3	Polymerase-Kettenreaktion und ELISA	58
<b>4.2</b>	<b>Einfluss von Glucosaminsulfat auf Matrix-Metalloproteasen</b>	<b>60</b>
4.2.1	Matrix-Metalloprotease 2	60
4.2.2	Matrix-Metalloprotease 3	62
4.2.3	Matrix-Metalloprotease 9	66
<b>4.3</b>	<b>Anregungen und Limitierungen</b>	<b>71</b>
<b>4.4</b>	<b>Ausblick</b>	<b>72</b>
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>75</b>
	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>77</b>
	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>78</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>79</b>
	<b>Publikationen</b>	<b>94</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>95</b>

## Abkürzungsverzeichnis

CT	Computertomographie
cDNA	Complementäre Desoxyribonukleinsäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ER	endoplasmatisches Retikulum
FKS	Fetales Kälberserum
g	Gramm
GlcN	Glucosamin
GlcS	Glucosaminsulfat
HA	Hyaluronsäure
MMP	Matrix-Metalloprotease
mRNA	messenger RNA
MRT	Magnetresonanztomographie
MT-MMP	membrane-type-MMPs
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
OS	Osteosarkom
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion
pg	Picogramm
PR	Projektionsradiographie
qRT-PCR	quantitative real-time PCR
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamid-Gelelektrophorese</i>
TIMP	<i>tissue inhibitors of metalloproteinases</i>
µg	Mikrogramm
µm	Mikrometer

**Tabelle 1:** Verwendete Abkürzungen



# 1. Einleitung

## 1.1 Das Osteosarkom

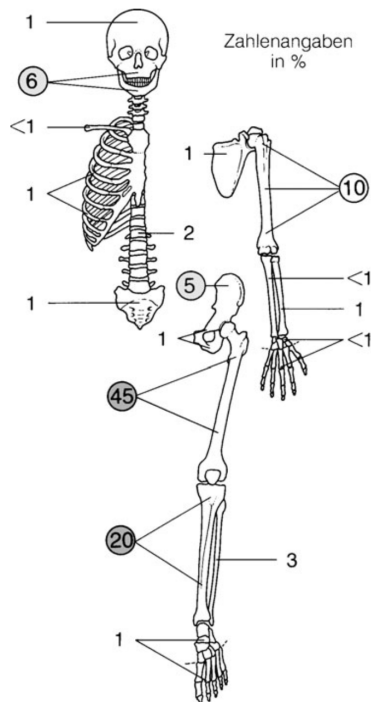
Das Osteosarkom (OS) ist der häufigste bösartige primäre Knochentumor des Menschen. In der Bundesrepublik Deutschland muss mit etwa 150-200 Neuerkrankungen pro Jahr gerechnet werden (Bielack et al. 2009). In Europa liegt die Inzidenz bei 2-5 Neuerkrankungen pro eine Million Einwohner und Jahr (Dahlin 1978, Schajowicz 1994). Bezüglich der Alters- und Geschlechtsverteilung findet sich bei Schajowicz (1994) und Dahlin (1986) ein Häufigkeitsgipfel zwischen dem 15. und 25. Lebensjahr. Insgesamt ist in der zweiten Lebensdekade mit 55% der Osteosarkome zu rechnen (ebd.). Ein zweiter relativer Altersgipfel ist um das 60. Lebensjahr herum zu erkennen, allerdings ist in diesem Alter davon auszugehen, dass die Tumoren auf dem Boden eines Morbus Paget (Price 1955, Huvos 1986) oder nach Bestrahlung von Karzinomen einer bestimmten Region (Huvos et al. 1985) entstanden sind. Das Verhältnis von Männern zu Frauen beträgt 3:2 (m : w).

Das konventionelle (medulläre) Osteosarkom kann grundsätzlich jeden Knochen des Skeletts befallen, bevorzugt tritt es aber metaphysär in den großen Röhrenknochen auf. Mit über 50% kommt es kniegelenksnah am häufigsten vor (Abbildung 1).

Die klinische Symptomatik des Osteosarkoms ist sehr uncharakteristisch. Beginnend mit intermittierenden lokalen Schmerzen, treten diese im weiteren Verlauf zum Teil dauerhaft auf. Außerdem kann es zur lokalen Schwellung und Überwärmung kommen. Die Dauer der Symptome bis zur Diagnose variieren stark zwischen einigen Wochen und mehreren Monaten (Campanacci 1999).

Leider werden die unspezifischen Schmerzen auch heute noch manchmal als sogenannte „Wachstumsschmerzen“ verkannt (Wittig et al. 2002). Erschwert wird die frühzeitige Diagnose außerdem durch die vor allem in der zweiten Lebensdekade relativ häufig vorkommenden kleineren Stoß-Traumata durch Sport- oder Spielunfälle, welche bei Patienten und auch beim Arzt zunächst kaum Verdacht auf eine maligne Erkrankung aufkommen lassen. Erst wenn der Schmerz länger anhält, wird heute wesentlich schneller an das Vorliegen eines Knochengeschwulstes gedacht. So dauert es im Schnitt

allerdings immer noch 4-8 Wochen bis von den ersten klinischen Symptomen die Diagnose „Osteosarkom“ gestellt wird (Freyschmidt et al. 2010).



**Abbildung 1:** Häufigkeitsverteilung des OS beim Menschen (Freyschmidt et al. 2010).



**Abbildung 2:** Röntgenbild des rechten Kniegelenks mit OS in „loco tipico“.

### 1.1.1 Diagnostik

Zur Diagnose eines Osteosarkoms steht nach klinischem Verdacht das Röntgenbild in zwei Ebenen an erster und wichtigster Stelle. Sichtbar werden im Falle eines Osteosarkoms häufig die für einen ansteigenden intraossären Druck typischen Zeichen wie Spikulae und das Codman-Dreieck (Campanacci 1999). Darüber hinaus können im Röntgenbild auch „Mottenfraß“-ähnliche Läsionen, Knochendestruktionen und Osteosklerose beobachtet werden (Miller 2008) (Abbildung 3).

Die Magnetresonanztomographie (MRT) spielt in der Diagnostik eine immer bedeutendere Rolle (Alyas et al. 2007). Der Nachweis einer möglichen Knochenmarkinvasion und die sehr gute Weichteildarstellung macht die MRT, trotz der geringeren Spezifität bezüglich der Unterscheidung zwischen benignen und malignen Raumforderungen, zu einem wichtigen Bestandteil der Osteosarkomdiagnostik (Erlemann 2010).

Zunächst bietet sich eine MRT des gesamten tumortragenden Knochens mit den angrenzenden Gelenken (Kompartiment-MRT) an, um etwaige Absiedlungen im



Knochen, sogenannte „*skip*“ lesions, also „Überspringer“-Metastasen (Enneking et al. 1975) zu detektieren. Dabei kann neben einer eventuellen Gefäß-Nerven-Beteiligung, gleichzeitig die genaue Tumorausdehnung und der Weichteilanteil, für eine meist folgende operative Tumoresektion bestimmt werden (Vieth et al. 2013).

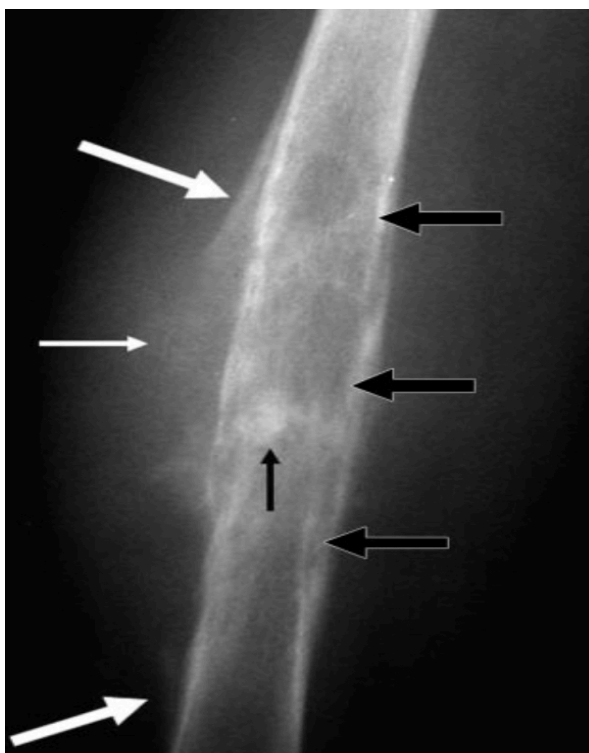
Ergänzend kann insbesondere zur Detektion von dezenter Kortikalisdestruktion, Visualisierung von Tumormatrix und Periostreaktion die Computertomographie (CT) zum Einsatz kommen (Krämer et al. 2014).

Sollte bereits im Röntgen der Verdacht auf einen malignen Prozess aufgekommen sein, ist spätestens nach positivem CT- oder MRT-Befund eine Biopsie zu veranlassen, um Material für die histopathologische Untersuchung zu erhalten.

Richtungsweisend für die histopathologische Diagnose eines Osteosarkoms ist das kombinierte Auftreten von Osteoid, Knochen und teilweise Knorpel (Freyschmidt et al. 2010). Je nach zellulärer Differenzierung kann nach Broders et al. (1939) ein *low-grade* und *high-grade* Osteosarkom unterschieden werden.

Dahlin und Coventry (1967) teilen das Osteosarkom nach der im Tumorgewebe vorherrschenden Zellform in ein Osteosarkom vom osteoblastischen, chondroblastischen und fibroblastischen Typ ein.

Allen Einteilungen gemein ist allerdings, dass für den klinischen Verlauf nicht nur Graduierung, sondern ebenso sehr Tumorgröße, Lokalisation und vor allem Metastasierung entscheidend sind (Klein et al. 2006).



**Abbildung 3:** Röntgenbild des Femur eines Osteosarkompatienten von lateral. Zu sehen sind ein Codman-Dreieck (große weiße Pfeile), periostale Unterbrechung (kleiner weißer Pfeil) und osteolytische Läsionen (große schwarze Pfeile). Außerdem findet sich tumorinduzierte Knochenneubildung (kleiner schwarzer Pfeil) (Miller 2008).

### 1.1.2 Staging

Ist die Diagnose gestellt, gewinnt im weiteren Verlauf das *Staging* an Bedeutung. Das Augenmerk wird hierbei auf eventuelle Metastasen im restlichen Körper gerichtet, da zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bereits 15-20% der Osteosarkompatienten manifeste Metastasen haben (Kaste et al. 1999, Meyers et al. 1997).

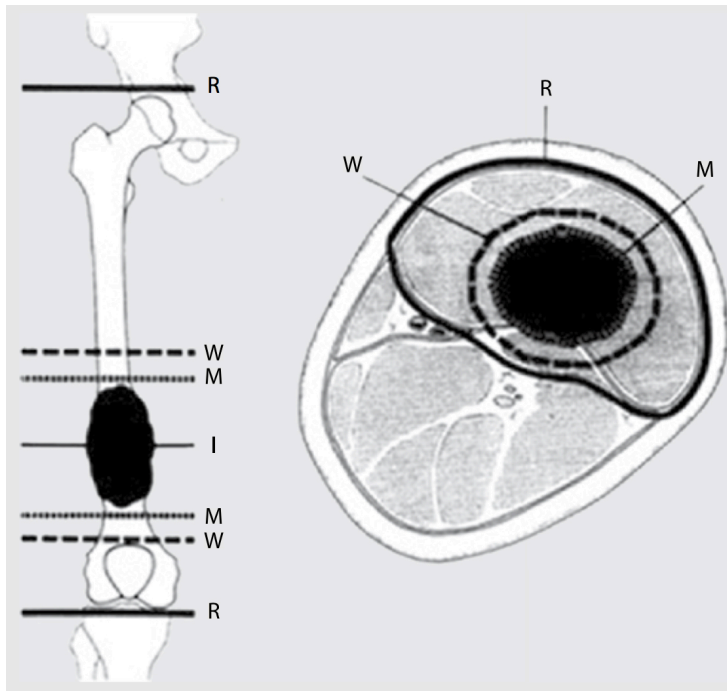
Die Fernmetastasierung findet in den meisten Fällen hämatogen statt, wobei die Lunge die häufigste Manifestation darstellt (Rechl et al. 2011). Selten kommt es auch zum Knochenbefall, weshalb zur weiteren Metastasensuche CT-Untersuchungen von Thorax, Abdomen und Becken angebracht sind (Hawkins et al. 2003).

Sowohl klinischer und labortechnischer Routineuntersuchung, als auch jeglicher radiologischen Modalität entgehen allerdings sogenannte Mikrometastasen, welchen jedoch insbesondere in Bezug auf die Therapie des Osteosarkoms eine große Bedeutung beigemessen wird (Bruland et al. 2005). Mikrometastasen spielen eine wichtige Rolle bei der Entstehung solider Metastasen und bestimmen deshalb das Gesamtüberleben von Osteosarkompatienten in hohem Maße (Strauss et al. 2010). Gerade weil deren Detektion bis jetzt nicht zuverlässig möglich ist, muss bei der Behandlung des Osteosarkoms ein multimodales Konzept der Standard sein (Luetke et al. 2014).

### 1.1.3 Therapie

Im Mittelpunkt der Therapie des Osteosarkoms steht nach wie vor die operative Tumoresektion, begleitet von neoadjuvanter und adjuvanter Chemotherapie. Dabei richten sich die unterschiedlichen Resektionsarten entsprechend der Einteilung nach Enneking et al. (1980) anhand ihrer Resektionsränder in intraläsionale, marginale, weite und radikale Resektion (Abbildung 4).

Beim Osteosarkom sollte nach Möglichkeit die weite chirurgische Tumoresektion im gesunden Gewebe angestrebt werden. Obwohl die extremitätenerhaltende Resektion („*limb salvage*“) von Patienten und deren Familien die am häufigsten gewünschte und damit auch durchgeführte Operation darstellt (Bielack et al. 2010), kann in ausgedehnten oder anatomisch kompliziert garteten Fällen im Sinne einer kurativen Therapie auch eine Amputation oder eine Exartikulation der tumortragenden Extremität nötig werden (Picci 2007).



**Abbildung 4:**  
Tumorchirurgische  
Resektionsränder von  
Knochentumoren;  
I intraläsional,  
M marginal, W weit,  
R radikal.  
(Enneking et al. 1980).

Die therapeutische Strategie, welche in der Regel nicht nur die Resektion, sondern auch die Rekonstruktion beinhaltet, sollte in enger Absprache mit dem Patienten insbesondere in Bezug auf Funktionalität, Lebenserwartung und Aktivitätsanspruch festgelegt werden (von Eisenhart-Rothe et al. 2011). Oberste Priorität hat aber insbesondere beim kurativen Behandlungsansatz immer das tumorradi-kale Vorgehen (Geller et al. 2010).

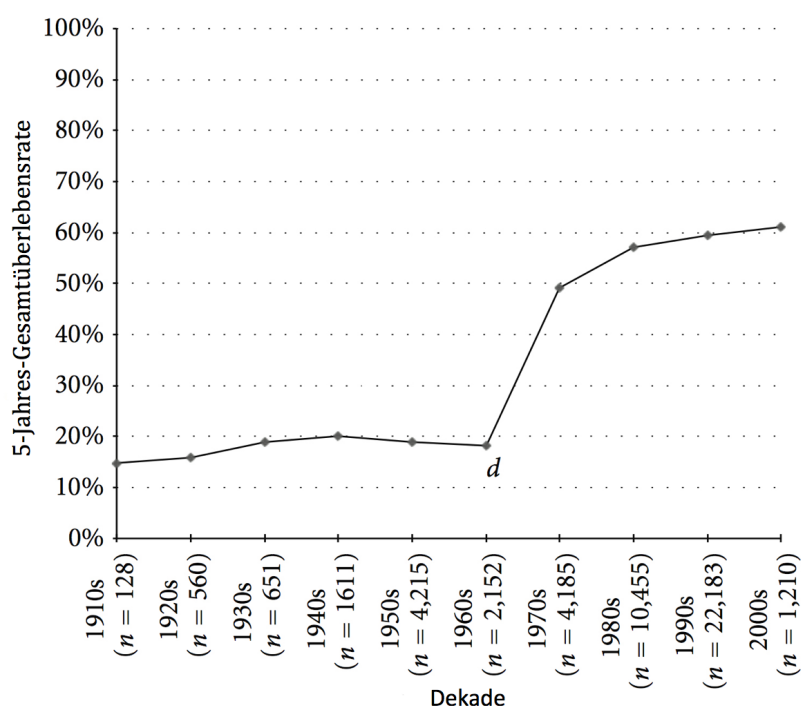
Zur Rekonstruktion kommen sowohl eine prothetische Versorgung, als auch biologische Verfahren wie autologe (zum Beispiel Fibulatransplantat) (Scaglioni et al. 2015) und allogene Transplantationen in Frage. Sind ein großer Weichteilanteil oder die Gefäß-Nerven-Bündel beteiligt, können vor allem bei jüngeren Patienten mit der Umkehrplastik nach Borggreve gute Ergebnisse erzielt werden (von Eisenhart-Rothe et al. 2011).

Die Chemotherapie stellt heute den zweiten wichtigen Pfeiler der Therapie dar und wird im europäischen Raum meist im Rahmen der COSS (Cooperative Osteosarkomstudie) bzw. der Nachfolgestudie EURAMOS (European and American Osteosarcoma Study Group) durchgeführt (Luetke et al. 2014). Dieses Therapieprotokoll sieht die neoadjuvante Gabe von 2 Zyklen Doxorubicin/Cisplatin und 4 Zyklen Hochdosis-Methotrexat (HDMTX) mit Leucovorin-Rescue vor. Die postoperative Fortführung der systemischen Therapie richtet sich nach dem Regressionsgrad des Tumors nach Salzer-Kuntschik et al. (1983) und wird bei gutem Ansprechen ( $\leq 10\%$  vitales Tumorgewebe)

unter Ergänzung von pegyliertem Interferon-alpha (IFN- $\alpha$ ) in obiger Weise fortgeführt oder im gegensätzlichen Fall ( $\geq 10\%$  vitales Tumorgewebe) verstärkend mit Ifosfamid/Etoposid modifiziert (Whelan et al. 2015). Patienten über 41 Jahre wird im Rahmen der EURO-BOSS (European Bone Over 40 Sarcoma Study) eine altersadaptierte Kombinationstherapie aus Adriamycin, Cisplatin und Ifosfamid empfohlen. Nach zunächst vielversprechenden Ergebnissen von Zulassungsstudien der immunmodulierenden Substanz Mifamurtid, muss sich dieses erst noch im klinischen Einsatz beweisen (Kager et al. 2014).

### 1.1.4 Prognose und Nachbehandlung

Während in der Vergangenheit die 5-Jahres-Überlebensrate trotz Amputation bei ca. 20% lag, werden heute unter extremitätenerhaltender Resektion und dem Einsatz von (neo-)adjuvanter Chemotherapie bei Kindern und Jugendlichen Werte um 70% erreicht (Allison et al. 2012).



**Abbildung 5:** 5-Jahres-Gesamtüberlebensrate von Osteosarkompatienten (Allison et al. 2012).

Als wichtigster prognosebestimmender Marker gilt neben dem Vorliegen von Metastasen, dem Grading und der vollständigen Resektion, das Ansprechen des Tumors auf die Chemotherapie (Jawad et al. 2011). In 30% der Fälle kommt es nach initialer Behandlung zum Wiederauftreten der Erkrankung, meist innerhalb der ersten zwei Jahre in Form von Lungen- oder Knochenmetastasen (von Eisenhart-Rothe et al. 2011). Dieser Tatsache Rechnung tragend, sollte besonders in den ersten zwei Jahren eine

intensivierte Nachsorge mittels Bildgebung (Röntgen-Thorax, CT-/MRT-Untersuchungen) erfolgen (Durr et al. 2014). Obwohl es durch immer intensivere Chemotherapie-Protokolle zu vermehrtem Absterben von Tumorzellen kommt, hat sich die Gesamtüberlebensrate nicht im selben Maße verlängert (Bacci et al. 2006). Neuere experimentelle Ansätze versuchen deshalb die relative Therapeutika-Resistenz des Osteosarkoms zu überwinden und noch spezifischere, effektivere Medikamente gegen Osteosarkomzellen zu finden. Große Bedeutung haben dabei Versuche, Wachstums- und Signalrezeptoren zu blockieren. Insbesondere aber auch Anstrengungen durch Veränderung von Faktoren der Mikro-Umwelt (microenvironment) von Tumorzellen das Wachstum von Osteosarkomzellen und deren Metastasierung zu hemmen nehmen an Bedeutung zu (Luetke et al. 2014). Gerade in dieser unmittelbaren Tumorzellumgebung spielen Matrix-Metalloproteasen (MMPs) eine zentrale Rolle. Diese ermöglichen es dem Tumor erst zu wachsen und zu metastasieren. Eine (medikamentöse) Einflussnahme auf diese Proteasen erscheint deshalb besonders vielversprechend (Bjornland et al. 2005).

## 1.2 Matrix-Metalloproteasen

Matrix-Metalloproteasen sind jüngst durch Untersuchungen an Tumorzellen wie dem Osteosarkom als therapeutisches Ziel in den Fokus der Wissenschaft gerückt. Erstmals wurden diese aber bereits vor über fünfzig Jahren durch Gross et al. beschrieben (Gross et al. 1962).

Sie bilden eine Unterfamilie aus zinkabhängigen Endopeptidasen und gehören damit zur *Metzincin*-Superfamilie. MMPs spielen eine zentrale Rolle beim Abbau extrazellulärer Matrix. Dadurch sind sie an physiologischen Umbauprozessen interzellulärer (Mikro-)Umwelt, wie sie bei entzündlichen Prozessen, der Wundheilung und der Entstehung von Krankheiten und Tumoren vorkommen, entscheidend beteiligt (Gialeli et al. 2011). Bis heute wurden 23 verschiedene humane MMPs beschrieben. Allen MMPs gemein ist der charakteristische Aufbau aus einem N-terminalen Signalpeptid, welches die Enzyme zum endoplasmatischen Retikulum führt und aus der Zelle schleust; einer Pro-Domäne, verantwortlich für die Latenz der Protease und einer katalytischen Domäne, welche das katalytisch aktive Zink-Ion enthält. Bis auf die beiden Matrilysine (MMP-7 und -28) und MMP-23 enthalten alle MMPs eine C-terminale hämopexin-ähnliche Domäne, die über einen flexiblen „Anker“ mit der katalytischen Domäne verbunden ist und modulierend auf die Substratspezifität wirkt (Hadler-Olsen et al. 2011).

MMPs werden als enzymatisch inaktive Zymogene (pro-MMPs) synthetisiert und sezerniert. Aktiviert werden sie durch die Verschiebung von Cystein (*cystein-switch*), welcher die Interaktion zwischen einem Cystein in der Pro-Domäne und dem  $Zn^{2+}$  im katalytischen Zentrum aufhebt und damit freigibt (Sternlicht et al. 2001). Durch Serinproteasen (zum Beispiel Plasmin), Furin (insbesondere bei MMP-2 und -9) und andere MMPs wird die Pro-Domäne über eine „Bait“-Region proteolytisch abgespalten und führt dadurch zur Destabilisierung und letztendlich zur Unterbrechung der  $Zn^{2+}$ -Cystein-Verbindung. Darüber hinaus kann diese  $Zn^{2+}$ -Cystein-Wechselwirkung auch durch nicht-proteolytische Veränderung des Cysteins der Pro-Domäne unterbrochen werden. Beides führt zur Aktivierung des Enzyms. In Frage dafür kommen zum Beispiel auch freie Sauerstoffradikale und allosterische Verschiebungen, die zu einer Autolyse der Pro-Domäne führen und schließlich zur Aktivierung der Matrix-Metalloprotease (Ra et al. 2007).

MMPs können auf verschiedene Weisen eingeteilt werden: Die gebräuchlichste und in gewisser Weise historisch gewachsene Form ist die Einteilung zum einen nach der Substratspezifität der MMPs und nach deren Lokalisation in der Zelle. Nach diesen Kriterien lassen sich MMPs in Gelatinasen, Kollagenasen, Stromelysine und membran-gebundene MMPs (MT-MMPs, *membrane-type-MMPs*) unterteilen (Woessner 2002).

Alternativ kann man MMPs auch anhand der Architektur ihrer Domänen, also dem strukturellen Aufbau einteilen und wird dadurch eher ihrer Komplexität gerecht: Man unterscheidet archetypische MMPs, Matrilysine, Gelatinasen und Furin-aktivierbare MMPs. Die archetypischen MMPs werden wiederum anhand ihrer Substratspezifität in Kollagenasen, Stromelysine und „Andere“ unterteilt (Abbildung 6).

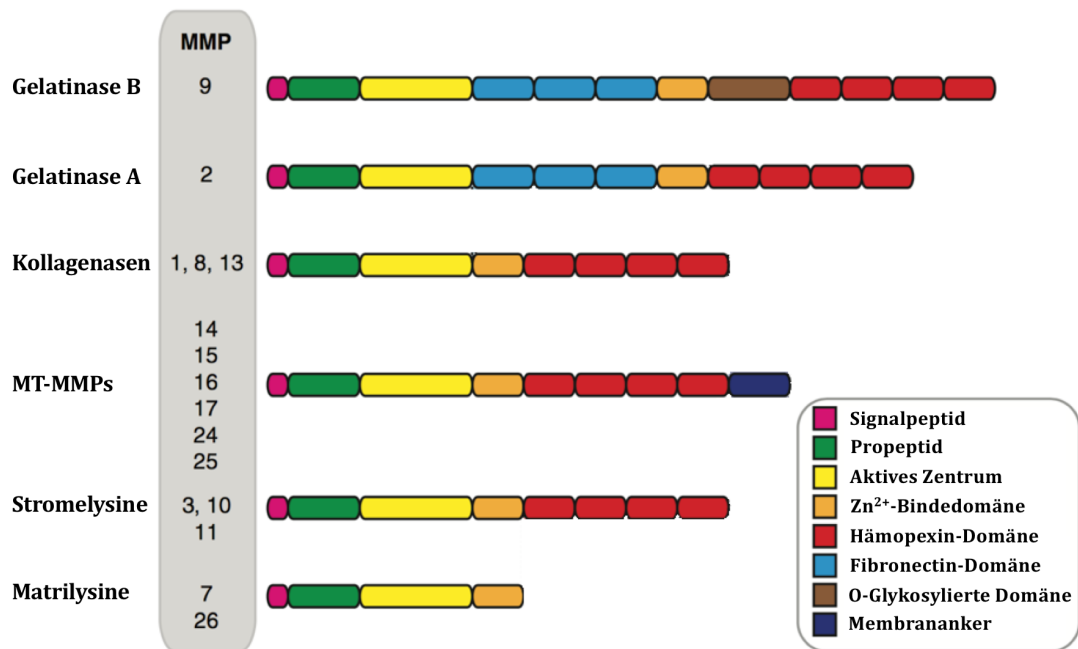


Abbildung 6: Schematischer Aufbau der Matrix-Metalloproteasen (Vandooren et al. 2013).

### 1.2.1 Regulation von Matrix-Metalloproteasen

Aufgrund ihrer enormen destruktiven Potenz werden MMPs streng auf mehreren Zellebenen reguliert: Zunächst findet eine Regulation der Genexpression statt. Hierbei findet meistens eine Koexpression durch verschiedene Stimuli wie Wachstumsfaktoren, Zytokine aber auch durch Glukokortikoide statt (Yan et al. 2007). Proteasen, welche noch nicht intrazellulär aktiviert wurden, werden als inaktive Enzyme (Zymogene) sezerniert und erst durch verschiedene Stimuli, wie zum Beispiel bei Kontakt mit bestimmten ECM-Bestandteilen, aktiviert (Ra et al. 2007). Des Weiteren scheint die sogenannte „Kompartimentalisierung“, also wo und in welcher Weise MMPs in das perizelluläre Umfeld abgegeben werden, einen nicht unbedeutenden Einfluss auf die Substratspezifität der Protease und damit auf deren Aktivität zu haben (Parks et al. 2004). Zu den wichtigsten endogenen Inhibitoren, vor allem von bereits aktiven MMPs, gehören zum Beispiel unspezifische Proteaseinhibitoren wie das alpha-2-Makroglobobulin und Proteine aus der Familie der *tissue inhibitors of metalloproteinases* (TIMPs) (Nagase et al. 2006). TIMPs (TIMP-1, -2, -3, -4) bilden mit MMPs einen 1:1-stöchiometrischen Komplex und inhibieren sie dadurch. Außerdem gibt es Hinweise, dass freie Sauerstoffradikale (ROS) beispielsweise bei inflammatorischen Prozessen und mechanischen Kräften auf die ECM, wie sie bei sehr schnellem Tumorwachstum vorkommen, eine modulierende Rolle spielen (Kessenbrock et al.

2010). Allgemein lässt sich sagen, dass ein Gleichgewicht von MMPs und ihren Inhibitoren, im besonderen Maße der TIMPs, in fast allen Geweben sowohl bei physiologischen (wie zum Beispiel Wundheilung und Gewebeumbau), als auch pathologischen (zum Beispiel Entzündungen, Arthrose, Tumorwachstum und Metastasierung) Prozessen zu beobachten ist (Lambert et al. 2004, Rohani et al. 2015).

### **1.2.2 Matrix-Metalloproteasen in Tumoren**

Während der Karzinogenese stehen Tumorzellen in regem Austausch mit der Mikroumwelt des Tumors, besonders mit der ECM und den mit ihr verbundenen Wachstumsfaktoren und Cytokinen, aber auch mit umgebenden Zellen wie Endothelzellen, Fibroblasten und Makrophagen (Deryugina et al. 2006). Insbesondere Migration und Invasion von Tumorzellen, Metastasierung und Angiogenese, also vier wichtige Kennzeichen maligner Tumoren hängen somit vom (tumor-)zellulären Umfeld ab und damit direkt von Matrix-Metalloproteasen und ihrem Einfluss auf Prozesse in der ECM und der Mikroumwelt eines Tumors (Murphy et al. 2008). Dabei scheint nicht nur die enzymatisch-aktive Komponente von MMPs für Tumorzellen eine Rolle bei der physischen Überwindung extrazellulärer Strukturen und der Basalmembran zu spielen, vielmehr geht man inzwischen davon aus, dass sie darüber hinaus über eine nicht-enzymatische Wirkung komplexe Stoffwechsel- und Signalwege der (Tumor-)Zelle beeinflussen (Shay et al. 2015).

Um ungehindert proliferieren zu können, setzen Tumorzellen üblicherweise physiologische Regulationsmechanismen außer Kraft. MMPs scheinen dabei in der Tumorumgebung eine entscheidende Rolle zu spielen und maßgeblich daran beteiligt zu sein, die Balance zwischen Wachstumshemmung und -förderung, pro- und anti-apoptotischen Faktoren zu stören (Kessenbrock et al. 2010).

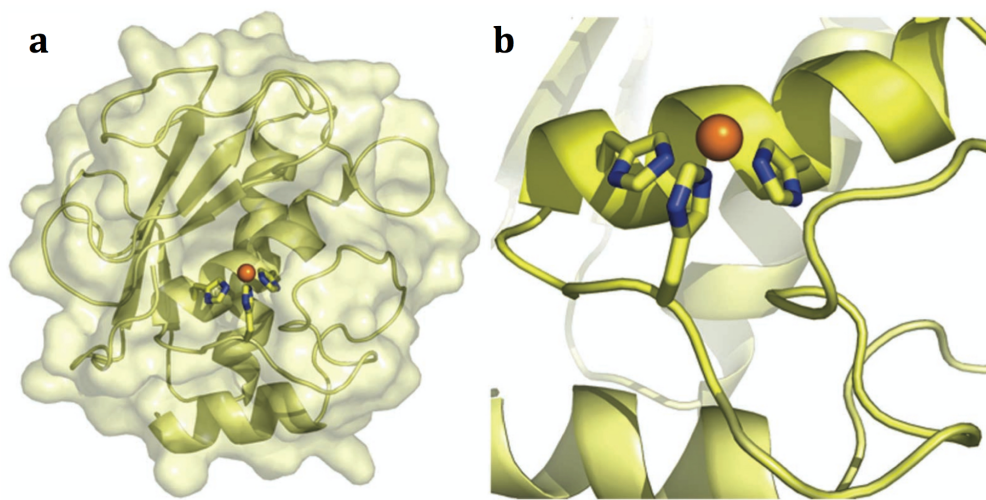
Nach wie vor sind die Heilungschancen einer Tumorerkrankung wesentlich von der Metastasierung des Primärtumors abhängig. Besonders durch Beteiligung an der Tumorangiogenese, welche sich nicht nur wachstumsfördernd auf den Tumor auswirkt, sondern auch für die Verbreitung von Tumorzellen in das Lymph- und Blutssystem sorgt, zeigen sich MMPs in hohem Maße mitverantwortlich (Weis et al. 2011).

So zeigte sich außerdem, dass MMPs durch Beteiligung an der Formung einer „prämetastatischen Nische“ den Weg für die Anlagerung zirkulierender Tumorzellen in entfernten Organen pflastern und somit deren Anlagerung erleichtern beziehungsweise überhaupt erst ermöglichen (Kaplan et al. 2005).



### 1.2.3 Matrix-Metalloprotease 2 und 9

Diese MMPs besitzen eine Fibronectin II-Domäne weswegen es ihnen möglich ist an Gelatine, also denaturiertes Kollagen, zu binden und diese zu spalten (Nissinen et al. 2014). Sie werden deshalb auch als Gelatinase A (MMP-2) und Gelatinase B (MMP-9) bezeichnet und gehören zu den verbreitetsten MMPs im Körper. Sie werden unter anderem von Fibroblasten, Endothelzellen, Osteoklasten, aber vor allem auch von den meisten Tumoren wie zum Beispiel dem Osteosarkom gebildet (Chintala et al. 1999). Beide Proteasen stehen in enger Verbindung zueinander, wobei MMP-2 wie andere MMPs von aktivem MMP-9 aktiviert wird.



**Abbildung 7: Schemazeichnung von MMP-9. (a)** MMP-9 in Sekundärstruktur mit semitransparenter Oberfläche. **(b)** Nahansicht des katalytischen Zentrums von MMP-9 mit  $Zn^{2+}$ -Molekül (orange), gebunden von drei Histidinketten (blau-gelb) (Sela-Passwell et al. 2012).

Zu ihren Substraten gehören unter anderen Kollagen IV, Laminin, Nidogen, Perlecan und Proteoglycane, welche als Hauptbestandteile der Basalmembran eine besondere Bedeutung haben (Somerville et al. 2003). Insbesondere bei oben genannten Faktoren, die Aggressivität und verringertes Überleben einer Tumorerkrankung ausmachen (Invasion, Angiogenese und Metastasierung), scheinen gerade diese beiden MMPs eine tragende Rolle zu spielen und sind deshalb Gegenstand intensiver Forschung (Farina et al. 2014). MMP-2 und -9 gewinnen zum einen als mögliches therapeutisch-pharmakologisches Ziel (Vandenbroucke et al. 2014), zum anderen als prognostischer Marker bei verschiedenen Tumorerkrankungen, insbesondere dem Osteosarkom und dem Colon-Karzinom immer mehr an Bedeutung (Li et al. 2014, Langers et al. 2012).

### 1.2.4 Matrix-Metalloprotease 3

MMP-3, auch Stromelysin-1 genannt, ist beim Umsatz verschiedener ECM-Bestandteile beteiligt und aktiviert insbesondere proMMP-9 durch proteolytische Abspaltung von dessen Pro-Domäne und beeinflusst das Zelladhäsionsprotein E-Cadherin (Fanjul-Fernández et al. 2010). MMP-3 wird von Fibroblasten und Endothelzellen, aber auch verschiedenen Tumorzelllinien, wie zum Beispiel dem Osteosarkom und dem Magenkarzinom, produziert. Auch wenn dessen Rolle noch nicht klar verstanden ist, scheint auch MMP-3, vor allem durch seinen nicht-proteolytischen Einfluss auf MMP-9, aber auch andere MMPs und das Zelladhäsionsmolekül E-Cadherin, einen großen Anteil an Progression und Metastasierung von Tumoren zu haben (Egeblad et al. 2002). Ähnlich wie für MMP-9 konnte auch für MMP-3 gezeigt werden, dass erhöhte Konzentrationen zum Beispiel beim Magenkarzinom in Zusammenhang mit einer schlechteren Überlebensrate stehen (Chang et al. 2014).

### 1.2.5 Matrix-Metalloproteasen im Osteosarkom

Wie eingangs bereits erwähnt, stellen Invasivität, schnelles Wachstum und vor allem die Metastasierung entscheidende lebenslimitierende Faktoren beim Osteosarkom dar. Herkömmliche Chemotherapeutika stoßen dabei offensichtlich an ihre Grenzen. So erscheint es nur logisch, MMPs mit ihrem großen Einfluss auf diese Prozesse in der Umgebung des Osteosarkoms, besser zu beleuchten und als mögliche pharmakologische Angriffspunkte in Betracht zu ziehen (Luetke et al. 2014).

Himmelstein et al. konnten bereits 1998 an bioptischen Präparaten zeigen, dass MMP-9 in kindlichen Osteosarkomzellen erhöht ist. Darauf folgend konnte ebenfalls an Biopsien aus Osteosarkomen eine Korrelation zwischen erhöhtem MMP-2 und -9 und einer schlechteren Prognose, erhöhter Metastasierungsrate und verstärkter Invasivität hergestellt werden (Benassi et al. 2001, Bjornland et al. 2005). Hinweise legen nahe, dass auch erhöhte MMP-Spiegel im Serum der Patienten bereits Rückschlüsse auf Invasivität und Metastasierung ermöglichen, bedürfen aber noch weiterer Untersuchungen (Yaman et al. 2008).

Auch *in vitro* zeigen Osteosarkomzelllinien wie MG-63 und SaOs-2 im Vergleich zu Osteoblasten eine erhöhte Expression an MMP-2 und -9 (Pautke et al. 2004). Für das Verhalten von MMP-3 im Osteosarkom können bezüglich der oben genannten Zelllinien nur Annahmen getroffen werden: Zum Beispiel lassen aber Untersuchungen an

Brustkrebszellen und dem malignen Melanom vermuten, dass es sich ähnlich den Matrix-Metalloproteasen 2 und 9 verhält und sich ebenfalls als prognostischer Marker, aber auch als mögliches pharmakologisches Ziel eignen könnte (Mendes et al. 2005) (Girouard et al. 2012). Eine vermehrte MMP-3-Expression konnte von Lin et al. bereits in Chondrosarkomzellen beobachtet werden und als therapeutischen Ansatzpunkt in diesen Zellen eine Beeinflussung von MMP-3 durch Glucosaminsulfat gezeigt werden (Lin et al. 2008).

### 1.3 Glucosaminsulfat

Glucosamin (2-amino-2-desoxy-D-Glucose), ein Amino-Monosaccharid (Aminozucker), ist wichtigster Bestandteil von Glykosaminoglykanen. Im Körper kommen diese hauptsächlich in robusten, faserigen und trotzdem elastischen Geweben wie zum Beispiel Knorpel und Herzklappen vor. Weitere Vertreter dieser Gruppe sind beispielsweise die Hyaluronsäure (HA) und das Chondroitinsulfat. In Verbindung mit Proteinen entstehen lang verzweigte sogenannte Proteoglykane, welche den Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix ausmachen.

Während Glucosamin im Körper aus Glucose hergestellt wird, findet in oralen Nahrungsergänzungsmitteln meistens strukturgleiches Glucosamin aus den Schalen von Krustentieren Verwendung. Es liegt dann vor allem als Salz in Form von Glucosaminsulfat, Glucosaminhydrochlorid oder N-Acetyl-Glucosamin vor (Anderson et al. 2005).

In einer wegweisenden präklinischen Studie konnten Quastel und Centro bereits 1953 in Mäusen mit Sarkom zeigen, dass GlcS das Tumorwachstum hemmt und das Gesamtüberleben der betroffenen Mäuse verlängert. Daran anknüpfend wurde in der prospektiven VITAL-Studie (VITamins And Lifestyle) herausgefunden, dass Patienten, die regelmäßig Glucosamin zu sich nehmen eine niedrigere Inzidenz und Mortalität für das Kolon- und Lungenkarzinom aufweisen (Satia et al. 2009).

Wie vor über 30 Jahren von D'Ambrosio et al. gezeigt werden konnte, spielt Glucosamin auch in Gelenken, sowohl in der Gelenksflüssigkeit (Synovia), also auch dem Gelenkknorpel eine wichtige Rolle und ist deshalb bei Pathologien im Gelenk wie zum Beispiel bei Arthrose ein entscheidender Faktor. Erste Versuche der Glucosamin-Supplementation schienen bereits früh erfolgversprechend zu sein (D'Ambrosio et al. 1981). In einer placebo-kontrollierten Langzeitstudie, konnte später eine

beschwerdelindernde, funktionsverbessernde und knorpelerhaltende Wirkung von Glucosaminsulfat, insbesondere bei der Kniegelenksarthrose festgestellt werden (Reginster et al. 2001, Kongtharvonskul et al. 2015). Trotz des noch nicht abschließend geklärten Wirkmechanismus von GlcS, hat es im Therapieschema der Arthrose als zweite Säule im Sinne eines langsam wirkenden Basistherapeutikums (SYSADO (Symptomatic Slow Acting Drugs For Osteoarthritis)) neben den schnell und symptomatisch wirksamen NSAIDs (Nonsteroidal anti-inflammatory Drugs) einen festen Platz eingenommen (Salazar et al. 2014). Begünstigt wird die weite Verbreitung sicher auch durch das äußerst günstige Nebenwirkungsprofil von Glucosaminsulfat, welchem bis heute keine Toxizität für Zellen nachgewiesen werden konnte (Kongtharvonskul et al. 2015).

Im Pathomechanismus der Arthrose spielen neben den Entzündungsmediatoren Interleukin-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$ , insbesondere auch Matrix-Metalloproteasen eine große Rolle. MMPs werden im Sinne eines begleitenden Entzündungsprozesses ebenfalls heraufreguliert, was zu Abbauprozessen am Knorpel führt und damit wesentlich an der Entstehung und Verschlechterung einer Arthrose beiträgt (Berenbaum 2013). Im Vergleich zu physiologischen Chondrozyten sind in arthrotischen Knorpelzellen MMP-2, -3 und -9 deutlich erhöht (Freemont et al. 1997, Jackson et al. 2014).

Es liegt daher nahe, dass der arthrose-hemmende Einfluss von Glucosaminsulfat auch auf die Hemmung von Matrix-Metalloproteasen zurückzuführen ist. *In vitro* konnten Dodge et al. erstmals zeigen, dass MMP-3 in humanen Chondrozyten durch Glucosaminsulfat signifikant gehemmt wird (Dodge et al. 2003). Daran anknüpfend, konnten Gouze et al. in ihrer Arbeit an murinen Chondrozyten ebenfalls eine Herabregulierung der MMP-3-Expression, darüber hinaus auch eine Hemmung der Expression von MMP-9 durch Glucosaminsulfat feststellen (Gouze et al. 2006).

Die hemmende Eigenschaft von GlcS auf Matrix-Metalloproteasen, insbesondere auf die Aktivität von MMP-2 und -9, konnte daraufhin *in vitro* auch in humanen Fibrosarkomzellen festgestellt und damit der Einfluss von GlcS auf Matrix-Metalloproteasen in malignen Tumorzellen nachgewiesen werden (Rajapakse et al. 2007).

## 1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Matrix-Metalloproteasen spielen eine große Rolle bei vielen physiologischen, aber vor allem auch pathologischen Vorgängen im menschlichen Körper. Insbesondere an der Entstehung von malignen Erkrankungen und Tumoren sind sie wesentlich beteiligt.

Das Osteosarkom gehört zu den Tumoren, die eine wesentliche MMP-Expressionssteigerung verzeichnen und deshalb auf dieser Ebene eventuell einen therapeutischen Angriffspunkt bieten könnten.

In der Literatur wird Glucosaminsulfat als vielversprechender Inhibitor von Matrix-Metalloproteasen beschrieben, allerdings wurde dessen Einfluss auf MMPs in Osteosarkomzellen bisher nicht untersucht.

Ziel dieser Arbeit war deshalb die Untersuchung des Einflusses von Glucosaminsulfat auf die Matrix-Metalloproteasen 2, 3 und 9 in den Osteosarkomzelllinien MG-63 und SaOs-2.

Zunächst sollte in der Kultur der Osteosarkomzelllinien MG-63 und SaOs-2 die für die Zellen tolerable Glucosaminsulfat-Konzentration identifiziert werden. In weiteren Schritten sollten mit Hilfe molekularbiologischer Methoden die MMP-Expressionen, der Einfluss von Glucosaminsulfat sowohl auf Genexpressionsebene, sowie Proteinebene untersucht werden. Nach statistischer Auswertung sollten die Ergebnisse unter Auseinandersetzung mit aktuellen Publikationen diskutiert und in den Kontext der Literatur eingeordnet werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Zellkultur

#### 2.1.1 Humane Osteosarkomzelllinie MG-63

Die Zellen der etablierten humanen Osteosarkomzelllinie MG-63 (ATCC®, CRL-1427) wurden von der Firma American Type Culture Collection (ATCC®, Manassas) käuflich erworben. Ursprünglich stammen die Zellen aus einem Osteosarkom eines 14-jährigen kaukasischen Jungen (Billiau et al. 1977).

##### 2.1.1.1 Kulturbedingungen & Passageprotokoll

Die Kultivierung erfolgte adhärent als Monolayer in T75-Kulturflaschen. Wie vom Herstellerprotokoll vorgeschlagen fand die Kultivierung im Inkubator bei 37°C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre (90%) mit einer CO<sub>2</sub>-Konzentration von 5% statt. Zur Kultivierung wurde modifiziertes Dulbecco's Modified Eagle Medium verwendet, welches sich folgendermaßen zusammensetzte:

Reagenz	Menge	Anteil
Dulbecco's Modified Eagle Medium	500 ml	
Fetales Kälberserum (FKS)	50 ml	10 %
L-Glutamin	5 ml	1 %
Vitaminmix	5 ml	1 %
Penicillin/Streptomycin	5 ml	1 U/ml, 1 µg/ml
HEPES-Puffer	10 ml	2 %

**Tabelle 2:** Zusammensetzung des Kulturmediums

Alle folgenden Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen auf einer Laminar-Flow-Werkbank erledigt. Für sämtliche Pipettierarbeiten wurden serologische Pipetten mit einer elektrischen Pipettierhilfe bzw. einfache Pipetten benutzt. Alle Arbeitsreagenzien wurden vor Beginn im Wasserbad auf 37°C erhitzt.

In oben genannte T75-Kulturflaschen wurden die Zellen in 10 ml Medium in einer Dichte von  $1,5 \cdot 10^4$  /  $\text{cm}^2$  ausgesät. Ein Mediumwechsel erfolgte alle 2 Tage und eine Passagierung bei Erreichen einer Konfluenz von 80-90 %.

Die Passagierung erfolgte wie im Folgenden beschrieben:

Nach Absaugen des verbrauchten Mediums, wurden die Zellen zunächst mit jeweils 5 ml phosphate buffered saline (PBS; w/o  $\text{Ca}_{2+}$ ; w/o  $\text{Mg}_{2+}$ ) zweimalig unter Schwenken der Kulturflasche gewaschen, um ein Verbleiben von Restmedium zu vermeiden. Nach dem letztmaligen Absaugen von PBS wurden 3 ml Trypsin/Ethylendiamintetraacetat (EDTA) hinzugefügt und die Kulturflasche dann für 3 Minuten bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert.

Die weitere Ablösung der Zellen durch das enzymatisch aktive Trypsin/EDTA wurde durch leichtes Beklopfen der Flasche unterstützt. Nach mikroskopischer Kontrolle der vollständigen Ablösung der Zellen, wurde das Trypsin/EDTA nach insgesamt maximal 10 Minuten durch die Zugabe von 7 ml Medium neutralisiert.

Die dadurch entstandene Zellsuspension wurde in ein 50 ml Falcon-Gefäß überführt und nach Abnahme von  $50 \mu\text{l}$  Zellsuspension zur Zellzählung (siehe unten), bei 250 G für 10 Minuten zentrifugiert.

Der Überstand des nach Zentrifugation entstandenen Zellpellets wurde abgezogen und verworfen und durch die der Zellzahl entsprechenden Menge frischen Mediums ersetzt und das Zellpellet darin resuspendiert. Diese Zellsuspension konnte dann für die Weiterkultur in T75-Flaschen beziehungsweise für die Stimulations-Versuche in 6er-Well-Platten verwendet werden.

### **2.1.2 Humane Osteosarkomzelllinie SaOs-2**

Die Zellen der etablierten humanen Osteosarkomzelllinie SaOs-2 wurden von der Firma DSMZ (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen, Braunschweig, Germany) käuflich erworben.

Diese Zelllinie wurde ursprünglich aus einem Operationspräparat eines 11-jährigen kaukasischen Mädchens entnommen und dann von Jørgen Fogh et al. erstmalig etabliert und *in vitro* kultiviert (Fogh 1975, Fogh et al. 1977).

#### **2.1.2.1 Kulturbedingungen & Passageprotokoll**

Analog zu den MG-63-Zellen wurden die SaOs-2-Zellen adhärent als Monolayer in T75-Kulturflaschen mit 10 ml Medium bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 90% und unter Beimischung von 5%  $\text{CO}_2$  kultiviert.

Abweichend zu oben genanntem Vorgehen, wurden in eine T75-Kulturflasche mit 10 ml Medium etwa  $1,25 \cdot 10^4$ /cm<sup>2</sup> SaOs-2-Zellen ausgesät. Das Medium wurde zwei Mal pro Woche gewechselt.

Die Vorgehensweise bei der Passagierung entsprach dem Vorgehen unter 2.1.1.1.

### **2.1.3 Stimulation der Zellen mit Glucosaminsulfat**

Aus oben beschriebenen Kulturen wurden Zellen zur Untersuchung mit verschiedenen Konzentrationen von Glucosaminsulfat im Medium in einer 6er-Well-Platte angesetzt. Alle folgenden Arbeiten wurden wiederum unter sterilen Bedingungen auf einer Laminar-Flow-Werkbank erledigt. Für sämtliche Pipettierarbeiten wurden serologische Pipetten mit einer elektrischen Pipettierhilfe beziehungsweise einfache Pipetten benutzt. Alle Arbeitsreagenzien wurden vor Beginn im Wasserbad auf 37°C erhitzt. Für die Stimulationsversuche wurden MG-63-Zellen der 60., 64. und 65. Passage und SaOs-2-Zellen der 23., 25. und 26. Passage verwendet.

#### **2.1.3.1 Adhäsionsphase**

Zum Adhärenieren der Zellen an der Platte wurde ein Kulturmedium mit der Zusammensetzung wie unter 2.1.1.1 beschrieben verwendet.

Pro Well einer 6er-Well-Platte wurden pro Well 200 000 Zellen der Zelllinie MG-63 ausgesät. In einem zweiten Ansatz wurde ebenfalls in einer 6er-Well-Platte die doppelte Anzahl SaOs-2-Zellen pro Well ausgebracht. Die Zellzahl von 400 000 SaOs-2-Zellen pro Well waren aufgrund einer niedrigeren Wachstumsgeschwindigkeit dieser Zelllinie notwendig.

Nach Hinzufügen von 3 ml Medium pro Well wurden die Zellen für 24 Stunden bei wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit einer CO<sub>2</sub>-Konzentration von 5% inkubiert.

#### **2.1.3.2 Stimulationsphase**

Nach der 24-stündigen Adhärenz- und Wachstumsphase wurden die Zellen zweimalig mit je 1 ml PBS / Well unter Schwenken gewaschen, um zu verhindern, dass sich bei den nachfolgenden Versuchen noch Reste von oben genanntem Medium in den Wells befinden. Nach dem zweiten Waschen wurde das PBS vollständig entfernt.

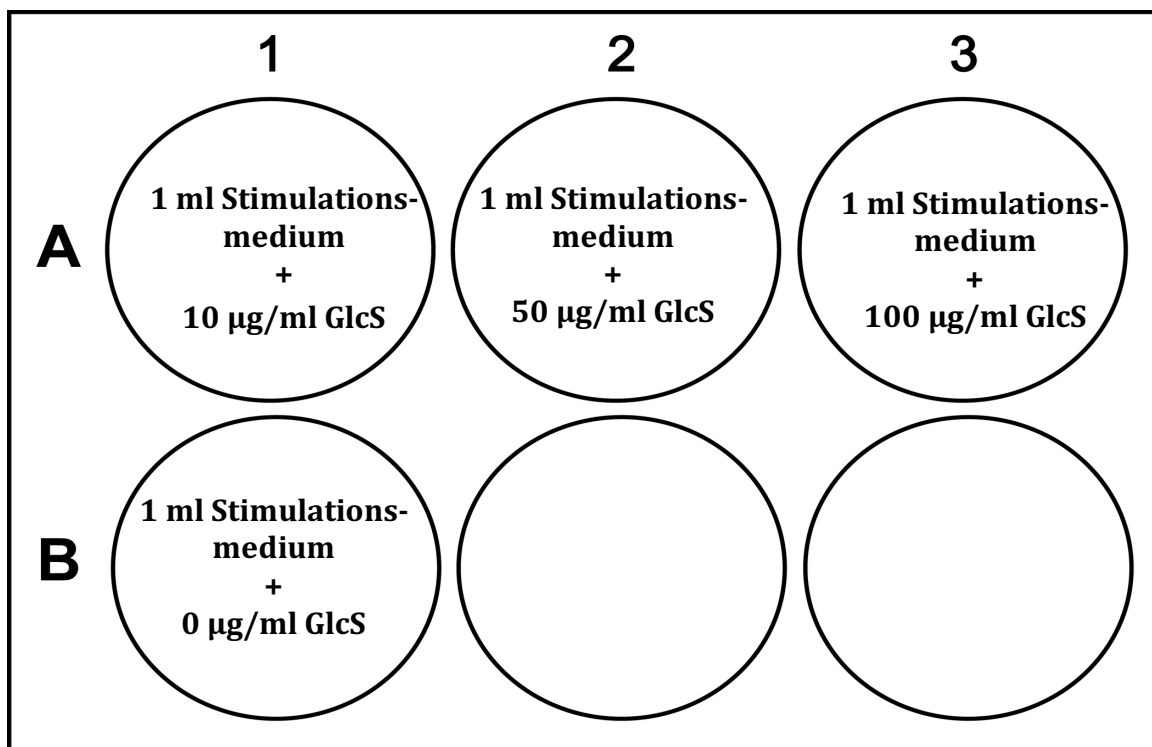
In die Wells A1-A3 wurden je 1 ml Stimulationsmedium und zusätzlich aufsteigende Konzentrationen von 10 µg/ml, 50 µg/ml und 100 µg/ml Glucosaminsulfat gegeben.



Well B1 bildete die Kontrolle mit 1 ml Stimulationsmedium ohne Zugabe von Glucosaminsulfat (Abbildung 8).

Reagenz	Menge	Anteil
Dulbecco's Modified Eagle Medium	500 ml	
Fetales Kälberserum (FKS)	50 ml	2 %
L-Glutamin	5 ml	1 %
Vitaminmix	5 ml	1 %
Penicillin/Streptomycin	5 ml	1 U/ml, 1 µg/ml
HEPES-Puffer	10 ml	2 %
Glucosaminsulfat		0 / 10 / 50 / 100 µg/ml

**Tabelle 3:** Zusammensetzung des Stimulationsmediums



**Abbildung 8:** Schemazeichnung einer 6er-Well-Platte mit Stimulationsansatz

In diesem Ansatz wurden die Zellen 42 Stunden bei wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit einer CO<sub>2</sub>-Konzentration von 5% inkubiert.

Nach 42 Stunden wurde die Inkubation beendet. Der Überstand aus den einzelnen Wells wurde vorsichtig abpipettiert und à 200 µl in sterile Eppendorf-Reaktionsgefäße zur späteren Verwendung aliquoutiert, auf Eis gelegt und anschließend bei -80 °C eingefroren.

Jedes Well wurde anschließend zweimalig mit PBS gewaschen, um die Neutralisierung der nachfolgenden Trypsin/EDTA-Lösung durch verbliebenes Medium zu verhindern.

Jedem Well wurden von der Trypsin/EDTA-Lösung 1 ml hinzugefügt. Danach folgte eine 3-minütige Inkubation bei 37°C und anschließendem leichten Beklopfen der Platten zur besseren Lösung der Zellen. Nach maximal 10 Minuten wurde die Trypsin/EDTA-Lösung durch das Hinzufügen von 2 ml Medium neutralisiert.

Die dadurch entstandene Zellsuspension wurde nach Entnahme von 50 µl zur Zellzählung, in 50 ml-Falcon-Gefäße gefüllt, um dann 10 Minuten bei 250 G zentrifugiert zu werden.

Das dadurch entstandene Zellpellet wurde nach vorsichtigem Abpipettieren des Überstands, weiter für die molekularbiologischen Versuche verwendet.

### **2.1.4 Zellzählung**

Zur Ermittlung der Zellzahlen wurde in allen Versuchen und während jeder Passagierung eine Neubauer-Zählkammer verwendet. Wie oben beschrieben, wurde von der entstandenen Zellsuspension 50 µl entnommen und mit 50 µl Trypanblau (1:1) vermischt.

Nach Benetzen beider Stege der Zählkammer mit destilliertem Wasser, wurde das Deckglas aufgeschoben. Das oben entstandene Gemisch wurde aufgetragen und durch die Kapillarkräfte zwischen beide Gläser eingebracht. Trypanblau kann die Membran intakter Zellen nicht durchdringen, weshalb sich diese vor blauem Hintergrund weiß abheben. Geschädigte Zellen färben sich auch im Zytoplasma blau, sodass hier eine erste Unterscheidung von intakten und nicht-intakten Zellen möglich ist. Nach Auszählung aller vier Quadranten konnte die Anzahl der intakten Zellen pro 1 ml mit folgender Formel errechnet werden:

$$\left( \frac{\text{Anzahl gezählter Zellen}}{4} \right) * \left( \frac{\text{Vol. Zellsuspension} + \text{Vol. Trypanblau}}{\text{Vol. Zellsuspension}} \right) * 10\,000$$

Dieses Ergebnis wurde dann mit dem entsprechenden Gesamtvolumen der Zellsuspension multipliziert.

### 2.1.5 Zellviabilität

Zur Ermittlung der Zytotoxizität von Glucosaminsulfat auf MG-63- bzw. SaOs-2-Zellen wurde ein WST-1-Assay-Testsystem (Roche®, Mannheim) verwendet. WST steht für *water soluble tetrazolinum*, also in wasserlösliches Tetrazolinum-Salz.

Der Test dient letztlich dem Nachweis einer intakten Atmungskette und somit dem Nachweis viabler Zellen. Das leicht rötliche WST-1 (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-Benzol-Disulfonat) wird durch die mitochondriale Succinat-Tetrazolium-Dehydrogenase in das dunkelrote Formazan umgewandelt und so im Medium sichtbar (Berridge et al. 1998).

Diese Farbänderung korreliert direkt mit der Anzahl der vitalen Zellen und kann photometrisch mittels eines Spektralphotometers bei einer Wellenlänge von 450 nm ( $A_{450} - A_{690}$ ) genau quantifiziert werden.

Zur Vorbereitung des Tests wurden in eine 48-Well-Platte sowohl MG-63-Zellen (20 000 Zellen / Well), als auch SaOs-2-Zellen (40 000 Zellen / Well) als Triplet mit je 0,5 ml Wachstumsmedium / Well unter gleichen Bedingungen wie der eigentliche Versuchsansatz (siehe Punkt 2.1.3) für 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimalig mit PBS gewaschen und im letzten Schritt das PBS wieder vollständig entfernt. Analog zu den Stimulationsversuchen (siehe 2.1.3) wurden nun 200 µl Stimulationsmedium mit den entsprechenden Konzentrationen an Glucosaminsulfat hinzu pipettiert.

Nach Ablauf der Inkubationszeit von 42 Stunden, wurden zu jedem Well 20 µl des WST-1-Reagenzes (1:10 Verdünnung) hinzugefügt und dann für weitere 2 Stunden inkubiert (95% Sauerstoff, 5% CO<sub>2</sub>). Die 48-Well-Platte wurde anschließend für eine Minute auf einen Schüttler gestellt. Zur Messung im Photometer war es nötig, den nun gefärbten Überstand in eine 96-Well-Platte zu transferieren.

Danach wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 450 nm ( $A_{450} - A_{690}$ ) mit einem Spektralphotometer gemessen.

### **2.1.6 ALP-Färbung**

Diese Methode wurde zur Unterscheidung der beiden Zellreihen MG-63 und SaOs-2, vor allem im Sinne einer Qualitätskontrolle der Zellreinheit in der Zellkultur, angewendet. Während SaOs-2-Zellen eine ausgeprägte Aktivität der Alkalischen Phosphatase (ALP) besitzen, ist diese in MG-63-Zellen kaum nachzuweisen (Pautke et al. 2004). Durch dieses Merkmal können beide Zelltypen sicher voneinander unterschieden und Kreuzkontaminationen beider Zellreihen erkannt und verhindert werden.

Bei der Färbung zum Nachweis von ALP in Zellen, wurde ein Testsystem bestehend aus 5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat (BCIP) und Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT) (Roche®, Mannheim) verwendet. BCIP ist ein chromogenes Substrat der ALP welches in Verbindung mit NBT zu einem nur schwer wasserlöslichen, blauen Indigo-Farbstoff umgesetzt wird. Dieser kann dann mikroskopisch nachgewiesen werden.

Für diese Färbung wurden die Zellen wie unter 2.1.3 kultiviert. Nach Beendigung der Inkubation wurden die Zellen zwei Mal für 5 Minuten mit PBS gewaschen, der Überstand abpipettiert und luftgetrocknet. Anschließend mit einem Gemisch aus Methanol (99%) und Ethanol (97,5%) (1:1, v:v) bedeckt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Der Überstand wurde abermals entfernt und anschließend die Platte bei Raumtemperatur getrocknet. Für die eigentliche Färbung wurden die Zellen zunächst mit TRIS-HCL (0,1 M, pH 7,0) benetzt und 10 Minuten bei Raumtemperatur rehydriert. In der Zwischenzeit wurde die BCIP/NBT-Lösung vorbereitet: Dazu wurde eine Tablette BCIP/NBT in ddH<sub>2</sub>O aufgelöst und gut gemischt.

Zur Färbung wurden die Zellen mit dieser Lösung bedeckt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur gefärbt. Zum Abstoppen der Reaktion wurde die Färbelösung entfernt und die Zellen mit 1 ml TRIS-HCL (0,1 M, pH 7,0) bedeckt. Nach diesen Schritten konnten die Zellen mikroskopiert werden.

## **2.2 Molekularbiologische Methoden**

### **2.2.1 RNA-Isolation**

Die RNA-Isolation aus den MG-63-Zellen und den SaOs-2-Zellen wurde mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen RNA-Extraktions-Kits „RNeasy Mini Kit®“ (Qiagen, Hilden) vorgenommen. Die RNA-Isolation dieses Kits basiert auf der von Chomczynski et al. beschriebenen Methode (Chomczynski et al. 1987).

Der Lysispuffer (RLT) enthält das stark denaturierende Guanidiniumthiocyanat und  $\beta$ -Mercaptoethanol zur Lyse der Zellen und Elimination von Enzymen wie zum Beispiel RNAsen.

Durch die Zugabe von Ethanol (98%) werden die Voraussetzungen geschaffen, dass sich die RNA optimal an eine Silicagel-Membran in den Säulen bindet, während andere Zellbestandteile wie zum Beispiel DNA, welche nicht an der Membran haften bleiben, durch verschiedene Waschpuffer ausgewaschen werden. Die genauen Zusammensetzungen der Lysis- und Waschpuffer sind nur dem Hersteller bekannt.

Voraussetzung für die Arbeit mit RNA ist eine möglichst RNase-freie Umgebung. Diese wurde durch vorbereitende Reinigungsmaßnahmen mit RNase-Away<sup>®</sup> erreicht. Zusätzlich wurde unter einem Luftabzug gearbeitet, der das Risiko einer Elimination der RNA durch RNase und eine Kontamination durch DNA oder Fremd-RNA weiter verringerte. Darüber hinaus wurden die weiteren Schritte unter Eiskühlung vorgenommen. Durch dieses Vorgehen konnte der RNA-Degradierung weiter vorgebeugt werden.

Wie das Herstellerprotokoll vorschreibt, wurde folgendermaßen vorgegangen:

Zunächst wurde das aus der Zellkultur gewonnene Zellpellet (siehe 2.1.3) mit 350  $\mu$ l der Pufferlösung RLT resuspendiert.

Diese Zellsuspension wurde zur weiteren Lyse und Homogenisierung in einen Qiashredder<sup>®</sup> (Qiagen, Hilden) pipettiert und für 2 Minuten auf höchster Geschwindigkeitsstufe zentrifugiert. Durch die Zentrifugation wird die Zellsuspension durch eine Biopolymer-Membran gedrückt, und damit eine gute Ausbeute und Homogenisierung des Lysats ermöglicht.

Zum homogenisierten Lysat wurde nun zu gleichen Teilen Ethanol 70% pipettiert und nach Durchmischung in die RNeasy<sup>®</sup>-Säule übertragen. Beim Zentrifugieren für 15 Sekunden bei 8000 G bindet die RNA an die Silicagel-Membran in der Säule.

Nach diesem Schritt ist besonders, aber nicht ausschließlich, die mRNA (messengerRNA) aus der Gesamt-RNA (siRNA, tRNA, etc.), in der Säule gebunden, da die Silicagel-Membran besonders selektiv für RNA ist, welche größer als 200 Nukleotide ist. Alle anderen Zellbestandteile sind im Durchfluss gesammelt.

Das Zelllysate der restlichen Zellbestandteile im Durchfluss wurde in 2 ml-Auffanggefäßen gesammelt, mittels Deckel verschlossen und zur späteren Verwendung für die proteinchemischen Methoden (siehe 2.3) zunächst auf Eis gestellt.

Das Auffanggefäß wurde durch ein Neues ersetzt und die RNeasy®-Säule mit samt der darin gebundenen RNA auf dieses aufgesetzt. Im weitergehenden Schritt wurden zunächst 700 µl des Waschpuffers RW1 auf die Membran pipettiert und anschließend zentrifugiert (15 Sekunden, 8000 G). Nach Verwerfen des Durchflusses wurden 500 µl eines weiteren Waschpuffers (RPE) in die Säule pipettiert und erneut nach vorigem Schema zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Im letzten Waschschrift wurden abermals 500 µl RPE-Puffer auf die Membran pipettiert. Dieses Mal im Anschluss jedoch für 2 Minuten bei 8000 G zentrifugiert.

Nach letztmaligem Waschen und Verwerfen des Durchlaufs, wurde die RNeasy®-Säule auf ein neues Auffanggefäß gesetzt und durch Zentrifugieren für eine Minute bei maximaler Geschwindigkeit, getrocknet. Im letzten Schritt wurde durch die Zugabe von 50 µl RNase-freien Wasser und anschließendem Zentrifugieren (1 Minute, 8000 G) die RNA eluiert.

Die so entstandenen Proben wurden auf Eis gestellt, zunächst der RNA-Quantifizierung und -Qualifizierung zugeführt (siehe unten) und dann bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren.

### **2.2.1.1 RNA-Quantifizierung und -Qualifizierung**

Zur Bestimmung der Menge und Qualität der extrahierten RNA, wurde die im Wasser gelöste RNA mit Hilfe eines NanoDrop®-Spektralphotometers mit zugehöriger Software untersucht. Das Gerät macht sich das Prinzip der optischen Dichte (OD) zunutze. RNA besitzt sein charakteristisches Absorptionsmaximum des Lichts bei einer Wellenlänge von  $A=260$  nm, während für Proteine dieser Wert bei  $A=280$  nm liegt. Mit oben genanntem Programm werden entsprechende Absorptionswerte direkt in eine RNA-Konzentration beziehungsweise Proteinkontamination umgerechnet und angezeigt.

Zur Messung wurden, nach Erfassung eines Leerwerts mit RNase-freiem Wasser, 2 µl der gelösten RNA jeder Probe auf die Probenvorrichtung des Gerätes pipettiert. Anschließend konnten in der Software die Menge und die Qualität der RNA abgelesen werden.

Am Quotienten der Absorptionsmaxima von 260 nm und 280 nm ( $A_{260/280}$ ) kann die Qualität bzw. Verunreinigung der RNA abgelesen werden. RNA mit einem  $A_{260/280}$ -Quotienten von  $\sim 2,0$  kann allgemein als „rein“ angesehen werden. Dieser Wert wurde bei allen Proben erreicht.

## 2.2.2 cDNA-Synthese

Zur Verwendung der extrahierten messenger RNA (mRNA) aus der Gesamt-RNA, einem Gemisch aus ribosomaler RNA (rRNA), transfer RNA (tRNA) und mRNA, für die nachfolgende quantitative Polymerase-Kettenreaktion (*engl. polymerase chain reaction, PCR*) war es notwendig diese zunächst in komplementäre DNA, sogenannte *complementary DNA* (cDNA) umzuschreiben. Dies geschieht mit Hilfe der reversen Transkription. Diese wurde mit dem käuflich erwerbbaaren QuantiTect®- Reverse-Transkriptions-Kit (Qiagen, Hilden) durchgeführt.

Zunächst wurden die Proben aufgetaut und auf Eis gelagert. Um vergleichbare Mengen an cDNA zu erhalten, wurden die verschiedenen RNA-Mengen aneinander angeglichen. Dies wurde durch das Hinzufügen von entsprechender Menge RNase-freien Wassers im ersten Schritt (siehe 2.2.2.1) erreicht, welches unten aufgeführtes Pipettierschema deutlich macht (Tabelle 4). Insgesamt sollte eine cDNA-Menge von 60 µl hergestellt werden, sodass für jede Probe drei Reaktionen notwendig waren. Insgesamt wurden immer vier Proben gleichzeitig bearbeitet.

Um möglicher RNA-Degradation vorzubeugen, wurden alle folgenden Pipettierschritte in RNase-freier Umgebung und auf Eis beziehungsweise in einem zuvor gekühlten Pipettierblock vorgenommen.

### 2.2.2.1 Elimination der genomischen DNA

Um sicher zu gehen, dass sich in der zuvor extrahierten RNA keine DNA befindet, wurde der eigentlichen cDNA-Synthese ein Schritt zur Elimination der genomischen DNA (gDNA) vorangestellt. Dieser Schritt ist ebenfalls im QuantiTect®-Reverse-Transkriptions-Kit (Qiagen, Hilden) enthalten.

Wie es das Herstellerprotokoll vorsieht, wurde im ersten Schritt die genomische DNA (gDNA) mit Hilfe des gDNA Wipeout Buffer x7 eliminiert.

Reagenz	Menge
gDNA Wipeout Buffer 7x	6 µl
Matrizen-RNA	Variabel (je nach RNA-Konzentration)
RNase-freies H <sub>2</sub> O	Variabel (je nach RNA-Konzentration)
Gesamtvolumen	42 µl

**Tabelle 4:** Pipettierschema für 3 Reaktionen der cDNA-Synthese einer Probe

Hierzu wurden in einem 200µl-Reaktionsgefäß 6 µl des gDNA Wipeout Buffer x7 mit der entsprechenden Menge Matrizen-RNA aus der RNA-Extraktion und der entsprechenden Menge RNase-freiem Wasser durch mehrmaliges auf- und abpipettieren gemischt. Danach wurden die Proben kurz bei 8000 G zentrifugiert um eventuell entstandene Luftblasen zu entfernen. Anschließend wurden die Proben im Thermocycler für 2 Minuten bei 42°C inkubiert, wobei die genomische DNA eliminiert wurde. Nach Beendigung der Inkubation wurden die Proben sofort auf Eis gestellt und verblieben dort für 7 Minuten.

### 2.2.2.2 Herstellung des Master Mixes

In der Zwischenzeit wurde der Mastermix in einem 0,6ml-Reaktionsgefäß für die eigentliche Reverse Transkription nach unten dargestelltem Schema hergestellt (Tabelle 5).

Die Quantiscript Reverse Transkriptase, der Quantiscript RT Buffer 5x und der RT Primer Mix wurden durch mehrmaliges auf- und abpipettieren und leichtem Beklopfen des Reaktionsgefäßes gemischt, kurz bei 8000 G zentrifugiert und schließlich bis zur Verwendung auf Eis gestellt.

Reagenz	Menge (inkl. Pipettierreseve)
Quantiscript Reverse Transkriptase	3,3 µl
Quantiscript RT Buffer 5x (enthält dNTPs)	13,2 µl
RT Primer Mix	3,3 µl
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>19,8 µl</b>

**Tabelle 5:** Mastermix für 3 Reaktionen der cDNA-Synthese einer Probe

Der verwendete Primer-Mix enthält sowohl Random-Primer, als auch Oligo-dT-Primer, die selektiv an den Poly-A<sup>+</sup>-Schwanz der RNA binden. Durch diese synthetisiert die multifunktional-enzymatisch arbeitende reverse Transkriptase zunächst RNA-abhängig ein RNA/DNA-Hybridmolekül. Der RNA-Anteil wird aber dann von der ihr eigenen RNase H abgebaut. Im Folgenden werden DNA-abhängig weitere cDNA-Stränge synthetisiert. Die für die cDNA-Synthese notwendigen „Bausteine“, die Nukleosidtriphosphate (dNTPs), sind im RT Buffer enthalten. Zum Schutze der noch nicht hybridisierten RNA-Matrize sind dem Ansatz noch verschiedene RNase-inhibitoren gegen RNase A, B und C beigefügt.



### 2.2.2.3 Reverse Transkription

Der Master Mix wurde nun nach unten aufgeführtem Schema in das 200 µl-Reaktionsgefäß mit der Matrizen-RNA überführt und in diesem durch Beklopfen des Reaktionsgefäßes und auf- und abpipettieren des Inhalts gemischt. Anschließend wurde abermals kurz bei 8000 G zentrifugiert, um eventuell entstandene Luftblasen zu entfernen.

Reagenz	Menge
Master Mix	18 µl
Matrizen-RNA	42 µl
<b>Gesamtvolumen (cDNA)</b>	<b>60 µl</b>

**Tabelle 6:** Reaktionsansatz zur reversen Transkription für 3 Reaktionen einer Probe

Nun wurden die Proben zurück in den Thermocycler gestellt. Das Protokoll sieht nun die Inkubation bei 42°C für 15 Minuten vor. Bei dieser Temperatur kann die Reverse Transkriptase optimal arbeiten. Am Ende dieses Schrittes werden die Proben für 3 Minuten auf 95°C erhitzt um die Reaktion zu stoppen und das Enzym zu deaktivieren. Nach Ende des Programms wurden die Proben auf Eis gestellt um abzukühlen, anschließend aliquotiert und bei -20°C eingefroren.

## 2.2.3 Quantitative real-time Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

### 2.2.3.1 Grundlagen

Mit der Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) können in kurzer Zeit sehr kleine Mengen DNA *in vitro* vervielfältigt werden (Saiki et al. 1985).

Zu einer Probe werden jeweils ein Gemisch aus Puffer, Nukleotiden, zwei Oligonukleotide mit definierter Sequenz (als Primer bezeichnet) und einer thermostabilen Polymerase (aus dem Bakterium *Thermus aquaticus*, Taq-Polymerase) gegeben. Diese bildet aus einzelnen Nukleotiden anhand einer Matrize einen DNA-Doppelstrang. Der Vervielfältigungs-Prozess besteht im Wesentlichen aus drei Einzelschritten in einem Zyklus, welcher 12-50 Mal wiederholt wird. Alle Schritte finden im StepOnePlus® PCR-System statt:

Initial wird das Gemisch auf 95°C erhitzt, dadurch werden die Wasserstoffbrücken zwischen den DNA-Strängen der Probe und der Primer aufgebrochen, damit die DNA-

Einzelstränge vorliegen (Denaturierung). Im nächsten Schritt wird die Temperatur wieder auf 55-65°C reduziert, was das Anlagern der Primer an die Einzelstränge ermöglicht (Annealing). Schließlich füllt die Taq™-Polymerase bei 72°C den komplementären Strang mit Nukleotiden auf (Elongation). Ein zur gesuchten Sequenz komplementärer DNA-Doppelstrang entsteht. Aufgrund der sich immer wiederholenden Zyklen, steigt die Anzahl der synthetisierten DNA-Stränge exponentiell an (Mullis et al. 1986, Haras et al. 1997).

Eine Methode, die es möglich macht, die DNA-Moleküle während ihrer Entstehung zu detektieren, stellt die quantitative real-time PCR (Echtzeit-PCR) nach dem TaqMan™-Prinzip dar. Hierbei wird zusätzlich zu den Primern ein weiteres Oligonukleotid, die sogenannte Sonde, die sequenzspezifisch (komplementär) zu dem zu amplifizierenden Genabschnitt ist, zum Reaktionsansatz hinzugefügt. Diese Sonde besitzt an ihrem 5'-Ende einen Reporterfarbstoff, einen sogenannten *Reporter* und an ihrem 3'-Ende einen Quencherfarbstoff, den sogenannten *Quencher* (Livak et al. 1995).

Die Sonde selbst ist an ihrem 3'-Ende durch einen Phosphatrest blockiert, sodass diese selbst nicht polymerisiert werden kann. Angeregt durch Licht einer spezifischen Wellenlänge fluoresziert der Reporter. Diese Lichtenergie wird aber durch die räumliche Nähe vom Quencher aufgenommen, sodass effektiv keine Lichtenergie detektierbar ist (sogenannte *fluorescent resonance energy transfer*, FRET) (Cardullo et al. 1988). Ist die gesuchte DNA im Ansatz enthalten, bindet der Primer und die Taq-Polymerase beginnt mit Hilfe ihrer 3'-5'-DNA-Polymerase-Tätigkeit den DNA-Strang zu verlängern. Trifft sie nun auf die zuvor gebundene Sonde, wird sie diese mit ihrer 5'-3'-Exonukleaseaktivität entfernen (Holland et al. 1991). Die räumliche Nähe zwischen Reporter und Quencher wird aufgehoben und der Reporter kann fluoreszieren, was wiederum in Echtzeit detektierbar ist.

Abhängig von der Menge des gesuchten Amplifikats steigt die Fluoreszenz in jedem Zyklus an. Für diese Arbeit wurden Sonden benutzt, die als Reporter FAM™ (5'-Ende) und als Quencher NFQ (*non fluorescent quencher*) besitzen.

Als Referenz-Gen (*housekeeping gene*) wurde die ubiquitär synthetisierte Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) benutzt. Es wird von jeder Zelle hergestellt und eignet sich daher gut als endogene Kontrolle (Dheda et al. 2004).

Die benötigten Puffer, Sonden und Primer werden von der Firma Applied Biosystems (Foster City, USA) als in sich kompatibles System angeboten und wurden als solches für die Versuche verwendet und nach unten aufgeführtem Schema (Tabelle 7) pipettiert.



Reagenz	Menge
TaqMan® Primer	1 µl
TaqMan® Fast Universal Mastermix (2x)	10 µl
Nuklease-freies H <sub>2</sub> O	7 µl
Gesamtvolumen	18 µl
<b>Applikation pro Well</b>	<b>18 µl</b>

**Tabelle 7:** PCR-Reaktionsansatz für 2 µg cDNA pro Well

### 2.2.3.2 Durchführung

Alle Arbeiten wurden nach vorheriger Reinigung mit RNase-Away® unter einer PCR-Werkbank erledigt. Allgemein wurde darauf geachtet, dass es zu keiner Verunreinigung durch Fremd-DNA oder -RNA kommen konnte (Kwok et al. 1989). Für jeden Pipettierschritt wurden neue Pipettenspitzen verwendet.

Alle Proben wurden als Triplet pipettiert um im Ergebnis eine höhere Genauigkeit zu erhalten. Darüberhinaus wurde für jeden Primer eine Wasserkontrolle mit 2 µl RNase-freiem Wasser angesetzt. Zunächst wurden alle Reagenzien und die cDNA aufgetaut und auf Eis gestellt. Nach kurzem Zentrifugieren der Reagenzien bei 8000 x g wurde der Mastermix pipettiert: Dazu wurden für 12 Proben pro Primer (4 Proben x 3), 14 µl TaqMan® Primer mit 140 µl TaqMan® Fast Universal Mastermix und 98 µl Nuklease-freiem Wasser in ein 0,6ml-Reaktionsgefäß pipettiert und durch beklopfen und anschließendem kurzem zentrifugieren bei 8000 x g vermischt. Nun wurden in eine 96-Well-Platte je 18 µl / Well des Mastermixes pipettiert. Im Anschluss daran wurden je Well 2 µl der zuvor gewonnenen cDNA hinzupipettiert. Die Platte dann mit einer selbstklebenden Folie verschlossen und abermals kurz in einer Plattenzentrifuge zentrifugiert. Zum Start der PCR wurde die Platte in die dafür vorgesehene Halterung im StepOnePlus® PCR System gestellt und das Programm gestartet. Es wurden 40 Zyklen durchgeführt (Tabelle 8).

Temperatur	Zeit	Arbeitsschritt
95°C	20 s	Aktivierung der TaqMan®-Polymerase
95°C	3 s	Denaturierung 
60°C	30 s	Annealing 

**Tabelle 8:** Reaktionsschritte der qPCR

### 2.2.3.3 Relative Quantifizierung

In dieser Arbeit sollte eine Bestimmung relativer Unterschiede gezielter DNA-Abschnitte zwischen stimulierten und unstimulierten Proben erfolgen. So wird das Verhältnis der Proben zueinander nach der  $\Delta\Delta$ -Ct-Methode (Delta-Delta-Ct) relativ quantifiziert. Die Expression des Zielgens wird hierbei in das Verhältnis zur Expression eines nicht regulierten ubiquitären Gens (housekeeping gene) gesetzt. Von beiden wird ein  $\Delta$ -Ct-Wert ermittelt und aus beiden der  $\Delta\Delta$ -Ct-Wert ausgerechnet. Um tatsächliche Expressionunterschiede zu ermitteln, werden die Werte in die Formel  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  eingesetzt (Livak et al. 2001).

Der Ct-Wert (*Cycles of threshold*) entspricht der Zykluszahl, bei der sich alle PCR-Reaktionen in der exponentiellen Phase befinden und sich das Fluoreszenzsignal gerade von der Hintergrundstrahlung absetzt. Je früher das geschieht, desto mehr Kopien des gesuchten Gens sind in der Probe enthalten. Um Störfaktoren, die möglicherweise das Transkript beeinflussen könnten zu minimieren wurde als endogene Kontrolle die Expression von GAPDH mitgemessen und die Ergebnisse darauf normiert.

## 2.3 Proteinchemische Methoden

Um die im Schritt der RNA-Isolation entstandenen Zellbestandteile im Durchfluss (siehe 2.2.1) in den antikörper-basierten Methoden (wie zum Beispiel dem *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*, ELISA) verwenden zu können, war es nötig zunächst die in diesem Zellsat enthaltenen Proteine zu isolieren und in geeignetem Puffer zu resuspendieren beziehungsweise im weiteren Verlauf auch deren Konzentration zu ermitteln.

### 2.3.1 Aceton-Fällung von Proteinen

Das bei der RNA-Isolation (siehe 2.1.1) gewonnene Zelllysate mit allen restlichen Bestandteilen der Zelle (außer der RNA) wurde zunächst jede Probe in ein 50ml-Falcon-Röhrchen überführt.

Nun wurden vier Teile eiskalten Acetons (99,5%) zum Zelllysate gegeben und kurz gevortext. Anschließend wurden die Proben für 30 Minuten auf Eis gestellt. Nach Ablauf der Zeit wurden die Proben für 15 Minuten bei Höchstgeschwindigkeit (5000 x g) bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert, anschließend das Pellet mit 100 µl kaltem Ethanol (98%) gewaschen, der Überstand wiederum vorsichtig abgegossen und im Folgenden kurz luftgetrocknet.

### 2.3.2 Protein-Resuspension in *Cell Extraction Buffer*

Das im vorigen Schritt (siehe 2.3.1) entstandene Proteinpellet musste zur Verwendung in den nachfolgenden Versuchen in einem geeigneten Puffer resuspendiert werden. Die besten Ergebnisse der Resuspension wurden mit einem abgewandelten *cell extraction buffer* (siehe 2.4.1.3) erzielt.

Auf jedes Pellet wurden zunächst 0,5 ml des *Cell Extraction Buffer* pipettiert und ca. 5 Minuten gevortext. Wenn sich das Pellet sichtbar gelöst hatte, wurde die komplette Suspension in ein 1,5ml-Reaktionsgefäß überführt und für 10 Minuten bei 13 000 x g und Raumtemperatur zentrifugiert, um sicherzugehen dass sich keine Präzipitate mehr in der Lösung befinden.

Im Anschluss wurde der Überstand vorsichtig abpipettiert und aliquotiert à 100 µl bei -80°C zur späteren Verwendung eingefroren.

### 2.3.3 Quantitative Proteinbestimmung

Zur quantitativen Proteinbestimmung wurde der Bicinchoninsäure-Assay (*assay = Nachweisverfahren, BCA*) nach Pierce® (Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA) verwendet.

Dieses Verfahren kombiniert die bekannte Reduktion von Cu<sup>2+</sup> zu Cu<sup>1+</sup> durch Proteine unter alkalischen Bedingungen (Gornall et al. 1949) mit der sehr sensitiven und spezifischen kolorimetrischen Messung des Cu<sup>1+</sup>-Komplexes mit Bicinchoninsäure (Smith et al. 1985) mit Hilfe eines Spektralphotometers.

Die genaue Proteinkonzentration kann allerdings nur mit einer unter gleichen Bedingungen wie die Proben hergestellten Standardkurve eines bekannten Proteins (hier Bovines Serum Albumin, BSA) gemessen werden. Das Herstellerprotokoll sieht dazu zunächst die Herstellung einer Verdünnungsreihe nach unten genanntem Schema vor (Tabelle 9). Zur Verdünnung wurde für alle Proben und die Standards der *Cell Extraction Buffer (CEB)* (siehe 2.4.1.3) verwendet, als Standard wurde mitgelieferte Lösung aus 2 mg/ml BSA verwendet, als *Stock* bezeichnet.

Reaktionsgefäß	Volumen CEB	Volumen BSA	Endkonzentration BSA
A	0 µl	300 µl Stock	2000 µl/ml
B	125 µl	375 µl Stock	1500 µl/ml
C	325 µl	325 µl Stock	1000 µl/ml
D	175 µl	175 µl aus B	750 µl/ml
E	325 µl	325 µl aus C	500 µl/ml
F	325 µl	325 µl aus E	250 µl/ml
G	325 µl	325 µl aus F	125 µl/ml
H	400 µl	100 µl aus G	25 µl/ml
I = blank	400 µl	0 µl	0 µl/ml

**Tabelle 9:** Verdünnungsreihe für die quantitative Proteinbestimmung

Weiter sieht das Protokoll die Mischung von Reagenz A (enthält Bicinchoninsäure) und Reagenz B (enthält Kupfersulfat) im Verhältnis 50:1 vor - nachfolgend als Arbeitsmischung bezeichnet.

Je eine Probe jedes Versuches (aus 2.3.2) wurde aufgetaut, für 10 Minuten bei Raumtemperatur und 10 000 x g zentrifugiert und anschließend je 25 µl in ein Well einer 96-Well-Platte pipettiert. Vom Standard wurde dieselbe Menge in dafür vorgesehene Wells gegeben. Alle Proben wurden als Dubletten aufgetragen. Um die Reaktion zu beginnen wurde in jedes Well 200 µl der Arbeitslösung pipettiert, für 30 Sekunden auf den Schüttler gestellt und dann für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Vor der Messung bei einer Wellenlänge von 560 nm im Spektralphotometer musste die Platte auf Raumtemperatur abkühlen.

### 2.3.4 Zymographie

Die Zymographie ist eine sensitive und weitverbreitete proteinchemische Methode zum Nachweis und semi-quantitativen Messung proteolytischer Enzyme wie zum Beispiel Matrix-Metalloproteasen (MMP) (Kleiner et al. 1994). Das Prinzip basiert auf der *Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamid-Gelelektrophorese* (SDS-PAGE), im Gegensatz zu dieser werden bei der Zymographie die Proteine allerdings nicht durch Erhitzen bei 95°C denaturiert.

Zusätzlich wird bei der Herstellung des Polyacrylamidgels das Substrat des gesuchten Enzyms hinzugemischt, um dann mit diesem zu polymerisieren. Im Falle von MMP-2 und MMP-9 ist dies Gelatine.

Bei der SDS-PAGE werden die Proteine durch das anionische Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) denaturiert. SDS lagert sich an die Proteine an und verleiht ihnen proportional zu ihrer Molekulargröße negative Ladungen. War die Wandergeschwindigkeit der Proteine zuvor abhängig von Ladung, Konformität und Größe des Moleküls, ist die nach Denaturierung nur noch von der Größe des Proteins und der Porengröße der Gelmatrix abhängig. Nach Ablauf der Elektrophorese kann dann anhand eines Proteinstandards die Größe der gesuchten Proteine in der Probe bestimmt werden. Die Renaturierung der Proteine erfolgt im Anschluss mit dem Detergenz Triton-X-100®. Die Aktivierung der Enzyme erfolgt durch Inkubation in einem für das gesuchte Enzym passenden Puffers.

Nach Färbung mit Coomassie®-Lösung (Fazekas de St Groth et al. 1963) entstehen in dem ansonsten tief blau gefärbten Gel, an den Stellen helle Banden, an denen das Enzym aktiv war (Hawkes et al. 2001). An der Größe der Banden ist die Aktivität des Enzyms direkt ablesbar.

Es wurde ein fertiges, kommerziell erwerbbares *Precast*-Gel mit 10% Polyacrylamid und 10% Gelatine verwendet. Vor Beginn der Methode wurden alle benötigten Puffer nach folgendem Schema hergestellt und bis zur Verwendung bei Raumtemperatur gelagert (Tabelle 10).

Pufferlösung	Zusammensetzung
Probenpuffer	Novex® Trix-Glycine SDS Sample Buffer (2x)
Laufpuffer	25 mM Tris-Puffer, 200 mM Glycin, 2,5 mM SDS gelöst in ddH <sub>2</sub> O
Renaturierungspuffer	50 mM Tris-Puffer, 5 mM Cl <sub>2</sub> , 200 mM NaCl gelöst in ddH <sub>2</sub> O mit 2,5% Triton-X-100®, pH 7,5
Entwicklungspuffer	wie Renaturierungspuffer, nur ohne Triton-X-100®
Färbelösung	0,5% Brillant Blue R-250®, 40% Methanol, 10% Essigsäure in ddH <sub>2</sub> O
Entfärbelösung	40 % Methanol, 10 % Essigsäure in ddH <sub>2</sub> O

**Tabelle 10:** Zusammensetzung der Zymographie-Puffer

Die resuspendierte Proteinlösung aus der Aceton-Proteinfällung (siehe 2.3.1) wurde aufgetaut und zunächst bei 13 000 x g für 10 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurden je 20 µl der Probe mit 7 µl Probenpuffer vermischt, kurz auf den Vortex®-Mixer gestellt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Als Standard und Positivkontrolle wurden 5 µl humaner MMP-9-Standard mit 15 µl Probenpuffer vermischt, gevortext und ebenso lange inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die Gele in die Vorrichtung eingespannt, in die Elektrophoresekammer gestellt und diese mit Laufpuffer gefüllt. Nun konnte mit der Befüllung der 12 Geltaschen (Wells) begonnen werden: Dazu wurde zunächst ein Well mit 20 µl Protein-Standard, das Folgende mit 20 µl der MMP-9-Standard-Mischung und alle Weiteren mit je 20 µl Probe bestückt.

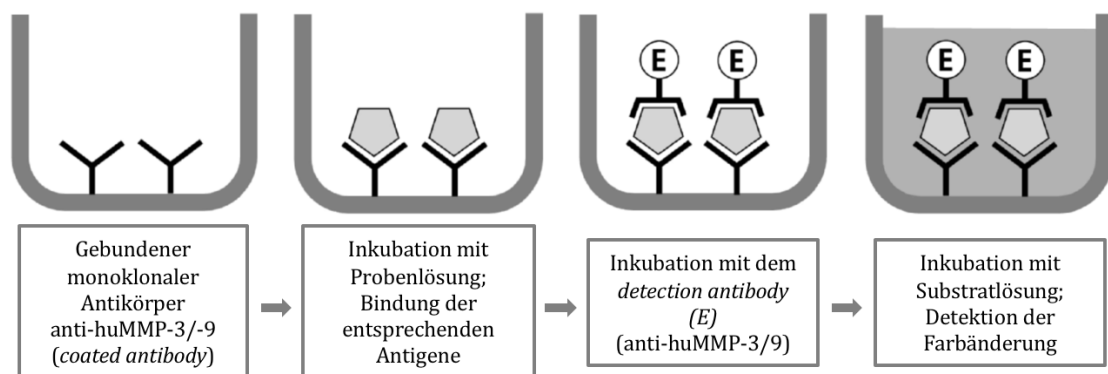
Nach der Elektrophorese mit Gleichstrom bei 100 V und 60 mA für 95 Minuten wurden die Gele aus der Einspannvorrichtung genommen, vorsichtig das Sammelgel mit einem Spatel entfernt und für 2 x 15 Minuten bei Raumtemperatur in Renaturierungspuffer geschwenkt. Anschließend wurden die Gele noch für weitere 15 Minuten in Entwicklungspuffer geschwenkt, bevor sie dann für 19 Stunden bei 37°C in diesem inkubiert wurden.

Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Gele dreimalig mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und anschließend für eine Stunde mit 0,5% Coomassie®-Lösung gefärbt, um danach mit der Entfärbelösung für 120 Minuten bei Raumtemperatur schwenkend entfärbt zu werden. Danach konnten die hellen Banden abgelesen werden und mit der Analysekamera fotografiert und ausgewertet werden.



### 2.3.5 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Der Enzyme-linked Immunosorbent Assay (*assay*, engl. Nachweisverfahren, ELISA) gehört zu den antikörperbasierten Nachweisverfahren. In dieser Arbeit wurde mit standardisierten ELISA-Kits für humanes MMP-3 und MMP-9 (Invitrogen™, Frederick, USA) gearbeitet. Bei diesen handelte es sich um ein sogenanntes Sandwich-ELISA. Hierbei sind monoklonale Antikörper bereits in die Wells der mitgelieferten 96-Well-Platten geheftet (*coated antibody*). Wird nun eine Lösung, die entsprechende Antigene beinhaltet, darauf pipettiert, binden diese nach einer entsprechenden Inkubationszeit an die Antikörper in der Platte. Nach einem Waschschrift werden alle nicht-gebundenen Bestandteile entfernt und ein weiterer monoklonaler Antikörper (biotynilierter Anti-huMMP-3 / Anti-huMMP-9) hinzu pipettiert und inkubiert. Dieser bindet wiederum an das entsprechende Antigen. Es entsteht ein Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex („Sandwich“). Durch ein weiteres Mal Waschen werden die überschüssigen Detektionsantikörper entfernt. Nun wird der enzymgekoppelte Antikörper (Streptavidin-HRP), der an den Detektionsantikörper bindet dazu gegeben. Nach Inkubation und Waschen, um alle ungebundenen Enzymantikörper zu entfernen, wird die Substratlösung passend zum Enzym hinzugefügt. Das Enzym setzt das Substrat um und produziert Farbe. Durch Hinzufügen einer Stop-Lösung, wird die Reaktion gestoppt und anschließend die Farbe mit einem ELISA-Reader bei 450 nm gemessen. Die Intensität der Farbe ist direkt proportional zur Konzentration des gesuchten Proteins (Yalow et al. 1960, Van Weemen et al. 1971) (Abbildung 9).



**Abbildung 9:** Schemazeichnung eines Sandwich-ELISA (Leng et al. 2008).

Zur Anwendung dieser Methode wurde die Proteinlösung des Zelllysats aufgetaut und bei 13 000 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Zuvor wurde entsprechend des

Protokolls vom Hersteller mit Hilfe des mitgelieferten *Standard Diluent Buffer* eine Verdünnungsreihe für die Standardkurve hergestellt (Tabelle 11) und entsprechend 50 µl/Well in die dafür vorgesehenen Wells pipettiert. Danach wurden gemäß der Anleitung des MMP-3-ELISA-Kits 50 µl der Probe in die Wells pipettiert. Beim MMP9-ELISA-Kit sollten die Proben zuvor verdünnt werden. Dies geschah im Verhältnis 1:1 mit dem mitgelieferte *Standard Dilution Buffer* (50 µl Probe : 50 µl *Standard Dilution Buffer*) (Tabelle 12). Sowohl die Standardkurve als auch die Proben selbst wurden als Dubletten aufgetragen.

Gefäß	Volumen Hu-MMP-3	Volumen Standard Diluent Buffer	Endkonzentration MMP-3
A	20 ng	1000 µl	20 ng/ml
B	200 µl aus A	200 µl	10 ng/ml
C	200 µl aus B	200 µl	5 ng/ml
D	200 µl aus C	200 µl	2,5 ng/ml
E	200 µl aus D	200 µl	1,25 ng/ml
F	200 µl aus E	200 µl	0,62 ng/ml
G	0 µl	200 µl	0 ng/ml

**Tabelle 11:** Verdünnungsreihe MMP-3-ELISA

Gefäß	Volumen Hu-MMP-9	Volumen <i>Standard Diluent Buffer</i>	Endkonzentration MMP-9
A	1500 pg	1000 µl	1500 pg/ml
B	300 µl aus A	300 µl	750 pg/ml
C	300 µl aus B	300 µl	375 pg/ml
D	300 µl aus C	300 µl	187,5 pg/ml
E	300 µl aus D	300 µl	93,8 pg/ml
F	300 µl aus E	300 µl	46,9 pg/ml
G	300 µl aus F	300 µl	23,5 pg/ml
H	0 µl	300 µl	0 pg/ml

**Tabelle 12:** Verdünnungsreihe MMP-9-ELISA

## 2.4 Statistische Methoden

Grundlage für die statistische Auswertung bildeten zum einen die Ergebnisse der relativen Quantifizierung aus der PCR, zum anderen die mittels ELISA bestimmten Proteinmengen. Um die verschiedenen Ergebnisse miteinander vergleichen zu können, wurde der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test für unverbundene Stichproben verwendet. Statistische Signifikanz wurde für  $p \leq 0,05$  angenommen.

Sämtliche statistische Auswertungen und Graphen wurden unter Zuhilfenahme der Software SPSS Statistics® Version 23 der Firma IBM ausgearbeitet.

## 2.5 Materialien

### 2.5.1 Puffer

#### 2.5.1.1 Tris-HCL

Um eine finale Tris-HCL Konzentration mit 0,1 M und pH 7,0 zu erhalten, wurden fünf Tabletten Natriumchlorid in 900 ml ddH<sub>2</sub>O aufgelöst. Daraufhin wurden 100 ml Tris-HCL 1 M hinzugefügt und die Lösung gut vermischt.

#### 2.5.1.2 Phosphate Buffered Saline (PBS)

Zur Herstellung der PBS-Lösung wurden 100 ml von Dulbecco's PBS (10x) (w/o Ca<sup>2+</sup>, w/o Mg<sup>2+</sup>) mit 1000 ml ddH<sub>2</sub>O vermischt und bis zur Verwendung bei 4°C gelagert.

#### 2.5.1.3 Cell Extraction Buffer (Extraktionspuffer)

Die Inhaltstoffe wurden sorgfältig vermischt und bis zur Verwendung bei Raumtemperatur gelagert.

Reagenz	Menge	Anteil
Tris-HCL	98 ml	
SDS (10%)	1 ml	0,1 %
Triton-X-100®	1 ml	1,0 %

**Tabelle 13:** Zusammensetzung des Cell Extraction Buffer

### 2.5.2 Primer

Folgende Primer wurden in der TaqMan® Gen-Expressionsanalyse (Applied Biosystems, USA) verwendet.

Target	Gen-Transkript	Gen-Code	TaqMan® Gene Expression Assay
MMP-2	MMP2	NM_00112789.1	Hs01548727_m1
MMP-3	MMP3	NM_002422.3	Hs00968305_m1
MMP-9	MMP9	NM_004994.2	Hs00234579_m1
Glycerinaldehyd-3-Phosphat	GAPDH	NM_002046.3	

**Tabelle 14:** Primerauswahl für die quantitative real-time PCR

### 2.5.3 Reagenzien und Kits

Einen Überblick über die verwendeten Reagenzien und Kits gibt Tabelle 15.

Reagenz / Kit	Hersteller
Aceton	Roth, Karlsruhe
BCA™ Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
Brillant Blau R250®	Roth, Karlsruhe
CaCl <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
DNase-, RNase-freies H <sub>2</sub> O	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Dulbecco's MEM (w/o Ca <sup>2+</sup> )	Biochrom, Berlin
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (10x) (w/o Ca <sup>2+</sup> , w/o Mg <sup>2+</sup> )	Biochrom, Berlin, Germany
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol 70 %	Apotheke TUM MRI, München
Ethanol 96 %	Apotheke TUM MRI, München
Ethanol 99.8 %	Apotheke TUM MRI, München
Fetal Bovines Serum	Biochrom, Berlin
Glucosaminsulfat	Vita Natura, Bonn
Glycin	Roth, Karlsruhe
HCl	Merck, Darmstadt
HEPES	Biochrom, Berlin
L-Glutamin	Biochrom, Berlin
MEM Vitamine (100x)	Biochrom, Berlin
Methanol	Merck, Darmstadt
MMP3-ELISA-Kit	Invitrogen, Frederick, USA
MMP9-ELISA-Kit	Invitrogen, Frederick, USA
MMP9-Proteinstandard	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
NaCl	Roth, Karlsruhe
Natronlauge	Merck, Darmstadt
NBT/BCIP Tabletten	Roche, Mannheim
Novex® Tris-Glycine SDS Sample Buffer (2x)	Invitrogen, Frederick, USA
Penicillin-Streptomycin	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Precast Zymography Gel	Bio-Rad, Hercules, USA
Proteinstandard (Precision Plus Protein St.)	Bio-Rad, Hercules, USA
Qiashredder®	Qiagen, Hilden
QuantiTect® Reverse Transcription Kit	Qiagen, Hilden
RNase Away®	Molecular Bioproducts, San Diego, USA
Rneasy® Mini Kit	Qiagen, Hilden
Salzsäure	Merck, Darmstadt
SDS	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Steriles Wasser (ddH <sub>2</sub> O)	Braun, Melsungen
TaqMan® Gene Expression Assays	Applied Biosystems, Foster City, USA
TaqMan® Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems, Foster City, USA

Tris-HCl, 1M, pH 7.0	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Tris-Puffer	Roth, Karlsruhe
Triton-X-100®	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Trypanblau (0,5%)	Biochrom, Berlin
Trypsin-EDTA Solution (1x)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
WST-1 Proliferations Kit	Roche, Mannheim
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA

**Tabelle 15:** Verwendete Reagenzien und Kits

## 2.5.4 Verbrauchsmaterialien

Für die Experimente wurden folgende Materialien verwendet:

Arbeitsmaterialien	Hersteller
0,6 ml Reaktionsgefäße	Biozym, Hess
1,5 ml Reaktionsgefäße	Biozym, Hess
2,0 ml Reaktionsgefäße (SafeLock Tube)	Eppendorf, Hamburg
15 ml Falconröhrchen	Greiner, Kremsmünster, Österreich
50 ml Falconröhrchen	Greiner, Kremsmünster, Österreich
Zellkulturflaschen 75 cm <sup>2</sup>	BD Biosciences, New Jersey, USA
Zellkulturplatten 6-,48-,96-Well	BD Biosciences, New Jersey, USA
Pipettenspitzen 10µl, 100µl, 1000 µl	Biozym, Hess
Klebefolie MicroAmp™	Applied Biosystems, Foster City, USA
Reaktionsplatte 96-Well MicroAmp™	Applied Biosystems, Foster City, USA
Neubauer®-Zählkammer	Marienfeld, Lauda-Köngshofen
Deckgläser	Menzel-Gläser, Braunschweig
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Elektrophoresekammer	Bio-Rad, Hercules, USA
Serologische Pipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml	Greiner, Kremsmünster, Österreich

**Tabelle 16:** Verwendete Verbrauchsmaterialien

## 2.5.5 Geräte und Software

Bei den Versuchen kamen folgende Geräte und Software zum Einsatz:

Gerät / Software	Hersteller
Analysekamera Fusion FX7	PeqLab, Erlangen
Analysemikroskop AxioVision Observer.Z1	Carl Zeiss, Oberkochen
Autoklav Varioclav	H+P Labortechnik AG, Oberschleißh.
Bildanalysesoftware AxioVision, V. 4.8.2.0	Carl Zeiss, Oberkochen
ELISA-Reader Ascent Software, Vers. 2.4.2	Thermo Fisher Sci., Rockford, USA
ELISA-Reader Multiskan Ascent	Thermo Fisher Sci., Rockford, USA
Feinwaage SBC 32	Scaltec, Heiligenstadt
Inkubator HERAccl® 150	Thermo Fisher Sci., Rockford, USA
Magnetrührer RET basic	IKA, Wilmington, USA

NanoDrop® 2000C	PeqLab, Erlangen
NanoDrop®-Software, Version 1.4.2	PeqLab, Erlangen
PCR-Werkbank captair bio	erlab, Val de Reuil, Frankreich
pH-Meter pH Level One	WTW, Weilheim
Pipetten Reference	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe elektrisch, easypet®	Eppendorf, Hamburg
Plattenzentrifuge Perfect Spin Plate	PeqLab, Erlangen
Plattformschüttler Polymax 1040	Heidolph, Schwabach
RNA-Werkbank	Berner, Elmshorn
Routinemikroskop Wilovert S	Hund, Wetzlar
SPSS®Statistics Version 23	IBM, Armonk, USA
Spülmaschine Mielabor G7783	Miele, Gütersloh
StepOnePlus® Real Time PCR System	Applied Biosystems, Foster City, USA
StepOnePlus® Software Version 2.2.2	Applied Biosystems, Foster City, USA
Sterile Werkbank Herasafe® HS12	Kendro, Langenselbold
Sterilisator ED115	Binder, Tuttlingen, Germany
Stromquelle EV200	PeqLab, Erlangen
Thermocycler PCR Express®	Thermo Hybaid, Ashford, USA
Tischzentrifuge Biofuge fresco	Heraeus, Osterode
Tischzentrifuge eppendorf miniSpin plus	Eppendorf, Hamburg
Vortex-Minishaker (MS2)	IKA, Wilmington, USA
Wasserbad SUB14	Grant Instruments, Cambridge, UK
Zentrifuge eppendorf Centrifuge 5804R	Eppendorf, Hamburg

**Tabelle 17:** Verwendete Geräte und Software

### 3. Ergebnisse

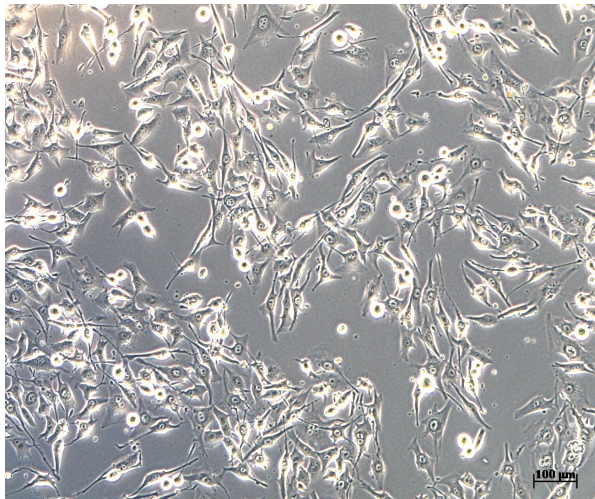
#### 3.1 Zellkultur

##### 3.1.1 Merkmale der unterschiedlichen Zelllinien

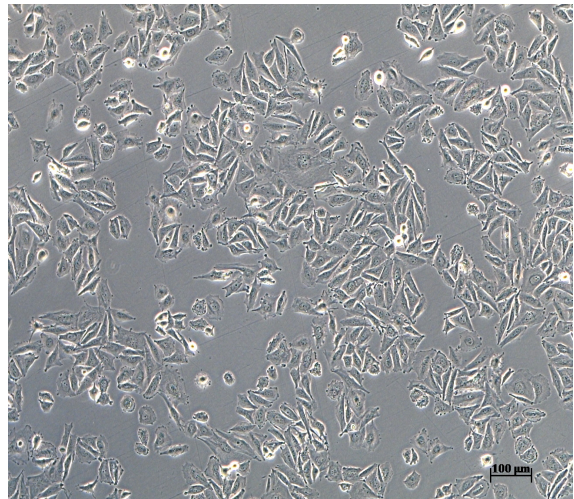
Sowohl die Zellen der Linie MG-63, als auch die der Linie SaOs-2, wurden während der Kultivierung der Stammkultur bei jeder Passagierung routinemäßig mikroskopiert und gezählt.

Zur Differenzierung, Charakterisierung und letztlich Identifizierung der verschiedenen Zelllinien wurden neben Morphologie in der Nativmikroskopie, die Generationszeit (Verdopplungszeit) und ihr ALP-Färbeverhalten untersucht.

Die mittlere Verdopplungszeit der MG-63-Zellen betrug 27,9 Stunden und zeigte keine ALP-Aktivität, während die mittlere Verdopplungszeit der SaOs-2-Zellen 46,3 Stunden betrug und eine starke ALP-Aktivität zeigte.



**Abbildung 10:** Nativmikroskopie von MG-63-Zellen in 10-facher Vergrößerung.



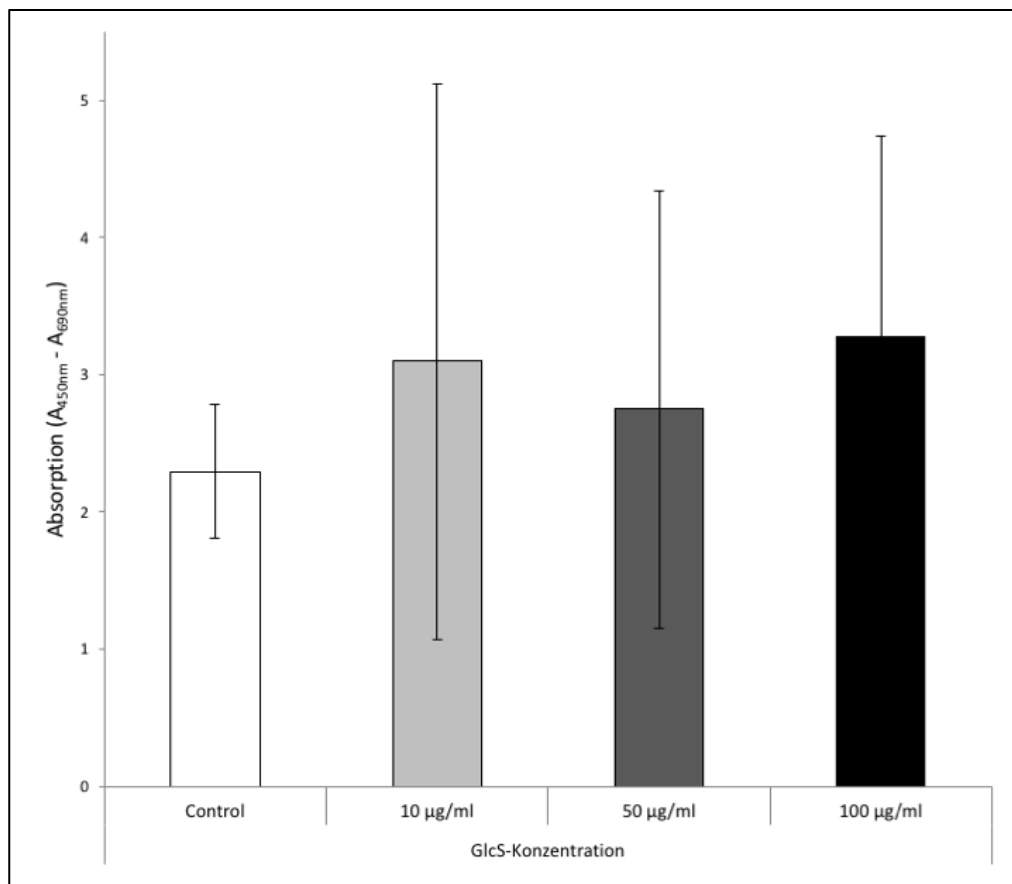
**Abbildung 11:** Nativmikroskopie von SaOs-2-Zellen in 10-facher Vergrößerung.



### 3.1.2 Zellviabilität mittels WST-Assay

#### 3.1.2.1 MG-63

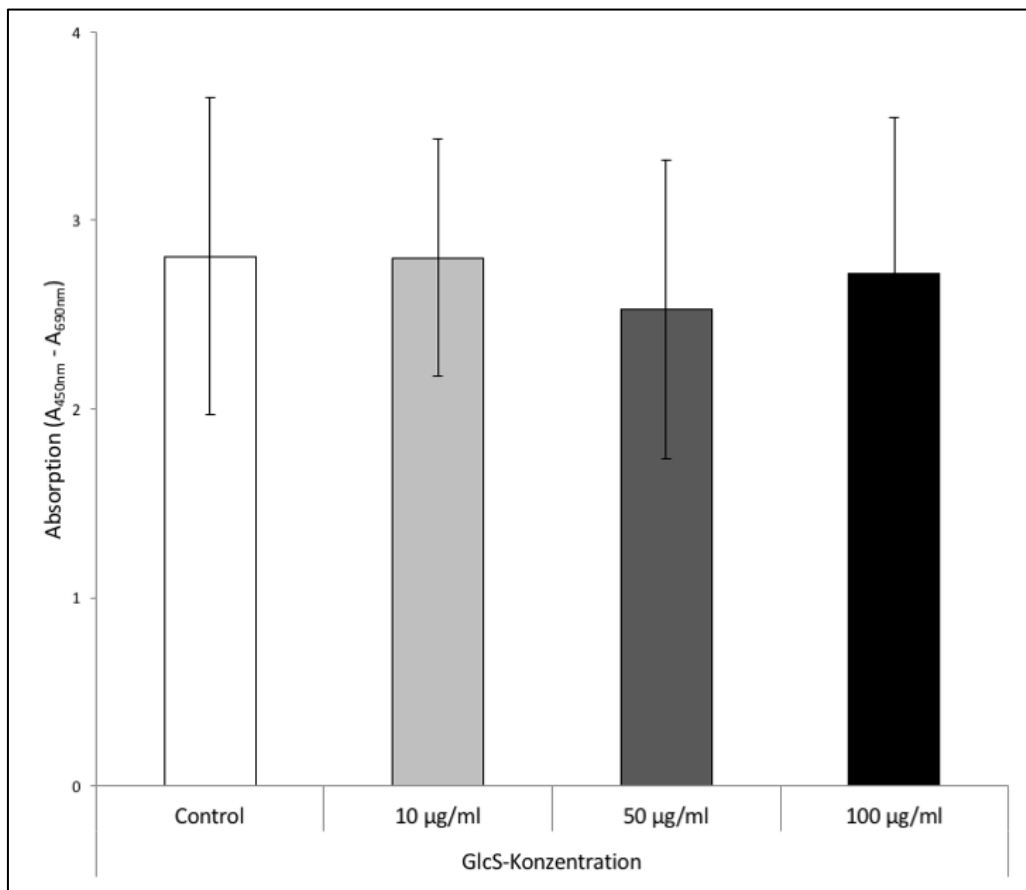
Gemessene Absorptionsunterschiede  $A_{450} - A_{690}$  im WST-Assay zeigen keinen zytotoxischen Effekt der Glucosaminsulfat-Konzentration von 10  $\mu\text{g/ml}$ , 50  $\mu\text{g/ml}$  und 100  $\mu\text{g/ml}$  auf MG-63-Zellen im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle.



**Abbildung 12:** Zellviabilität von MG-63-Zellen gemessen als Absorption  $A_{450} - A_{690}$  im WST-Assay

### 3.1.2.2 SaOs-2

Auch in der Kultur der SaOs-2 Zellen ließ sich mittels gemessener Absorption  $A_{450} - A_{690}$  im WST-Assay nachweisen, dass keine der angewandten GlcS-Konzentration eine zytotoxische Wirkung auf die Zellen hat. Es konnten in den stimulierten Proben, keine signifikante Veränderung im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden.



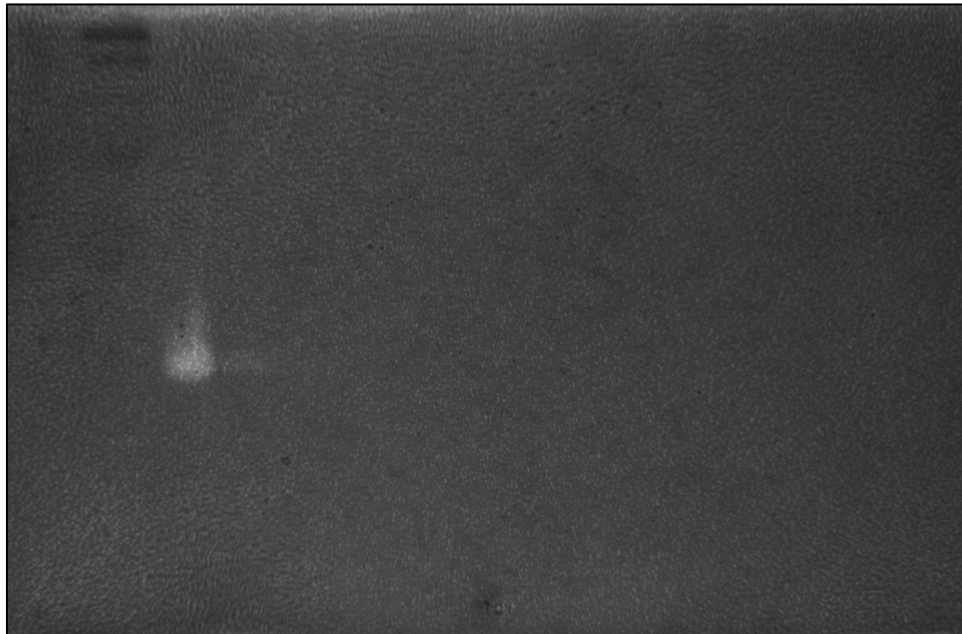
**Abbildung 13:** Zellviabilität von SaOs-2-Zellen gemessen als Absorption  $A_{450} - A_{690}$  im WST-Assay

## 3.2 Proteinchemische und molekularbiologische Ergebnisse

### 3.2.1 Zymographie

#### 3.2.1.1 MMP-2 und MMP-9 in SaOs-2 und MG-63-Zellen

Sichtbare Aktivität zeigte sich in den Versuchsansätzen mit MG-63- und SaOs-2-Zellen in beiden Fällen, weder in der unstimulierten Kontrolle, noch in jeglichem Stimulationsansatz. Einzig die zur Kontrolle der Methode mitgeführten rekombinanten MMP-2 und MMP-9 wurden in messbarem Maße sichtbar.



**Abbildung 14:** Exemplarische Zymographie für MMP-9 in SaOs-2-Zellen

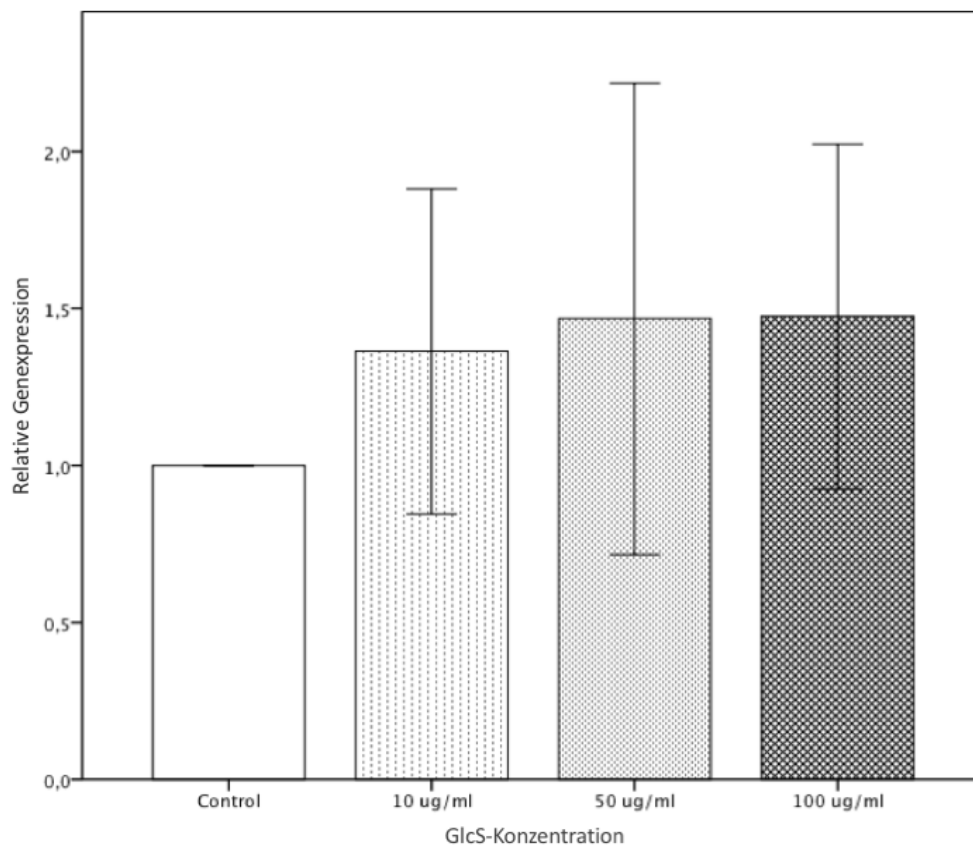
### 3.2.2 Quantitative real-time PCR (qPCR)

Es wurde die relative Genexpression der verschiedenen Matrix-Metalloproteasen im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle bestimmt und die Ergebnisse in Säulendiagrammen dargestellt.

Statistisch signifikante Ergebnisse ( $p \leq 0,05$ ) im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle sind mit einem \* markiert.

#### 3.2.2.1 MMP-2-Expression in MG-63-Zellen

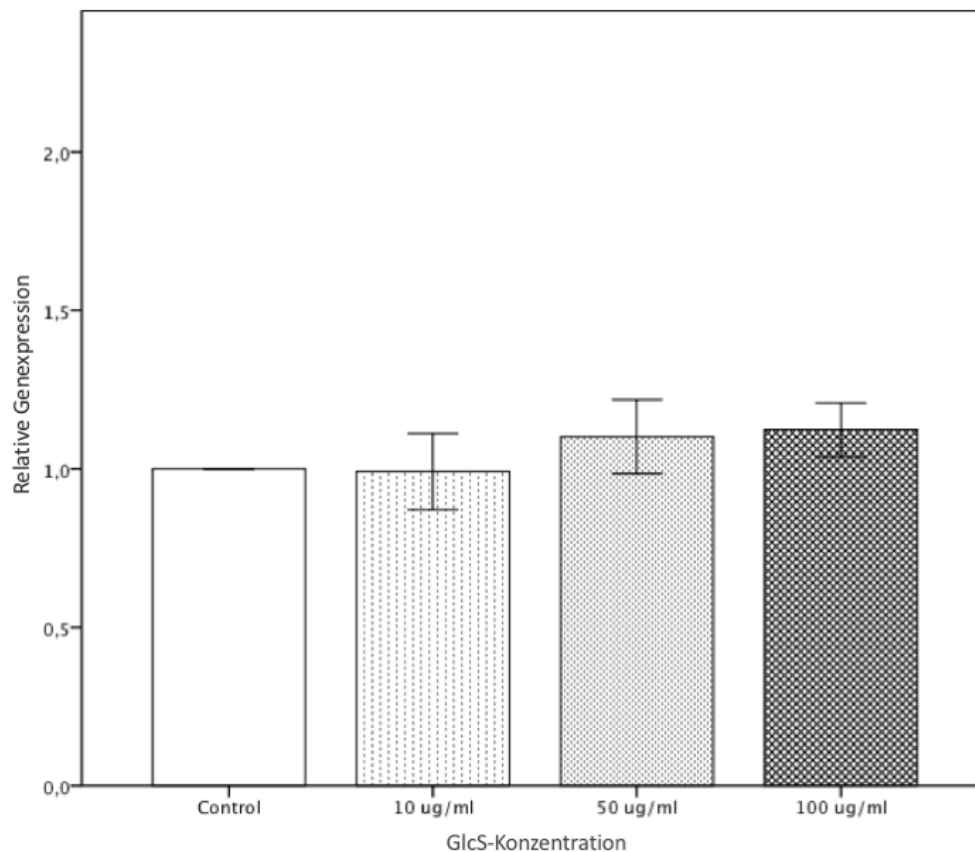
Die statistische Auswertung der MMP-2-Expression in MG-63-Zellen zeigt, trotz des Eindrucks einer Hochregulierung, keine signifikante Veränderung nach Stimulierung mit Glucosaminsulfat-Konzentrationen von 10  $\mu\text{g/ml}$  ( $p=0,35$ ), 50  $\mu\text{g/ml}$  ( $p=0,39$ ) und 100  $\mu\text{g/ml}$  ( $p=0,27$ ) im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle.



**Abbildung 15:** relative MMP-2-Expression in MG-63-Zellen

### 3.2.2.2 MMP-2-Expression in SaOs-2-Zellen

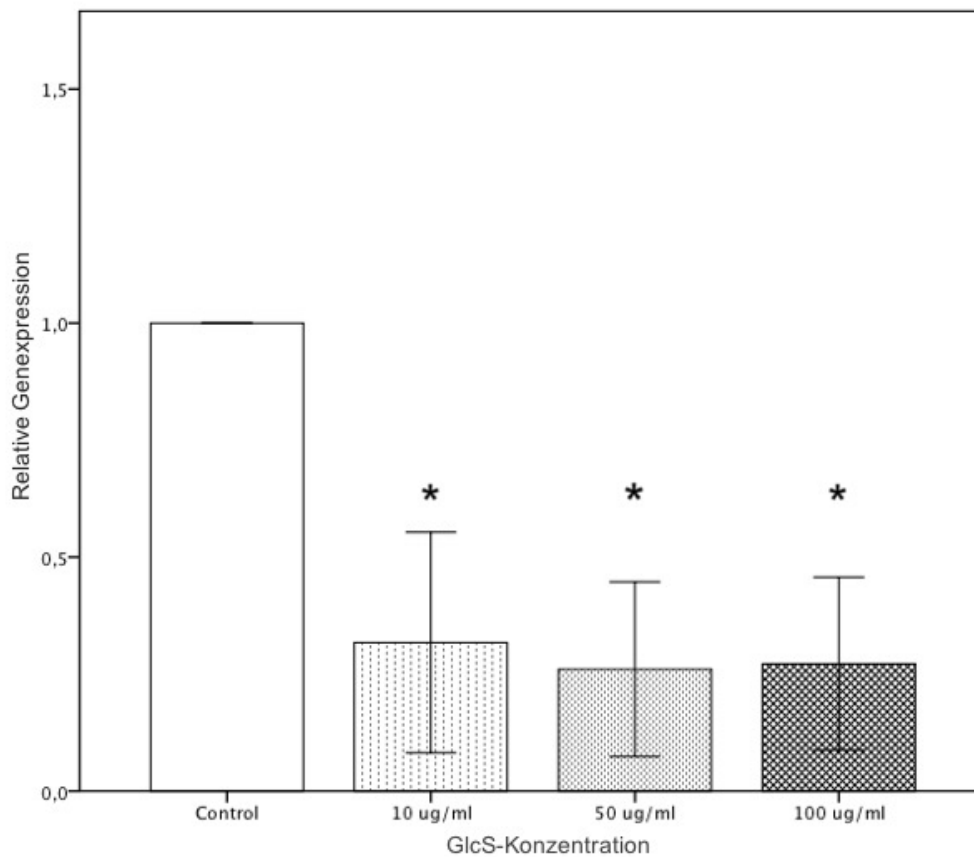
Auch in SaOs-2-Zellen kann keine signifikante Veränderung der MMP-2-Expression durch die verschiedenen GlcS-Konzentrationen von 10 µg/ml ( $p=0,91$ ), 50 µg/ml ( $p=0,27$ ) und 100 µg/ml ( $p=0,13$ ) im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle festgestellt werden.



**Abbildung 16:** relative MMP-2-Expression in SaOs-2-Zellen

### 3.2.2.3 MMP-3-Expression in MG-63-Zellen

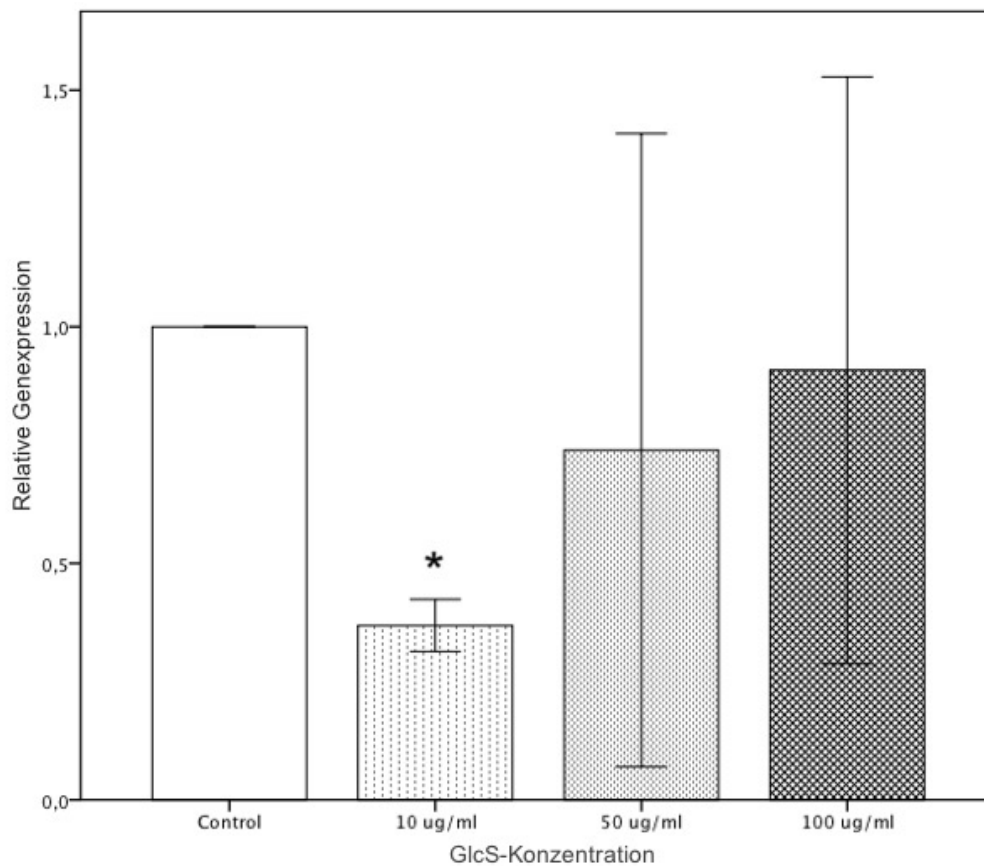
Im Gegensatz dazu wird die MMP-3-Expression in MG-63-Zellen signifikant durch Glucosaminsulfat gehemmt. Durch die niedrigste Glucosaminsulfatkonzentration von 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  kommt es zu einer Reduktion der MMP-3-Expression um etwa 68% ( $p=0,037$ ). Ebenso zeigt sich eine signifikante Hemmung der Expression um 74% bei 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  GlcS ( $p=0,021$ ) und bei einer Konzentration von 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  GlcS um 73% ( $p=0,021$ ).



**Abbildung 17:** relative MMP-3-Expression in MG-63-Zellen

### 3.2.2.4 MMP-3-Expression in SaOs-2-Zellen

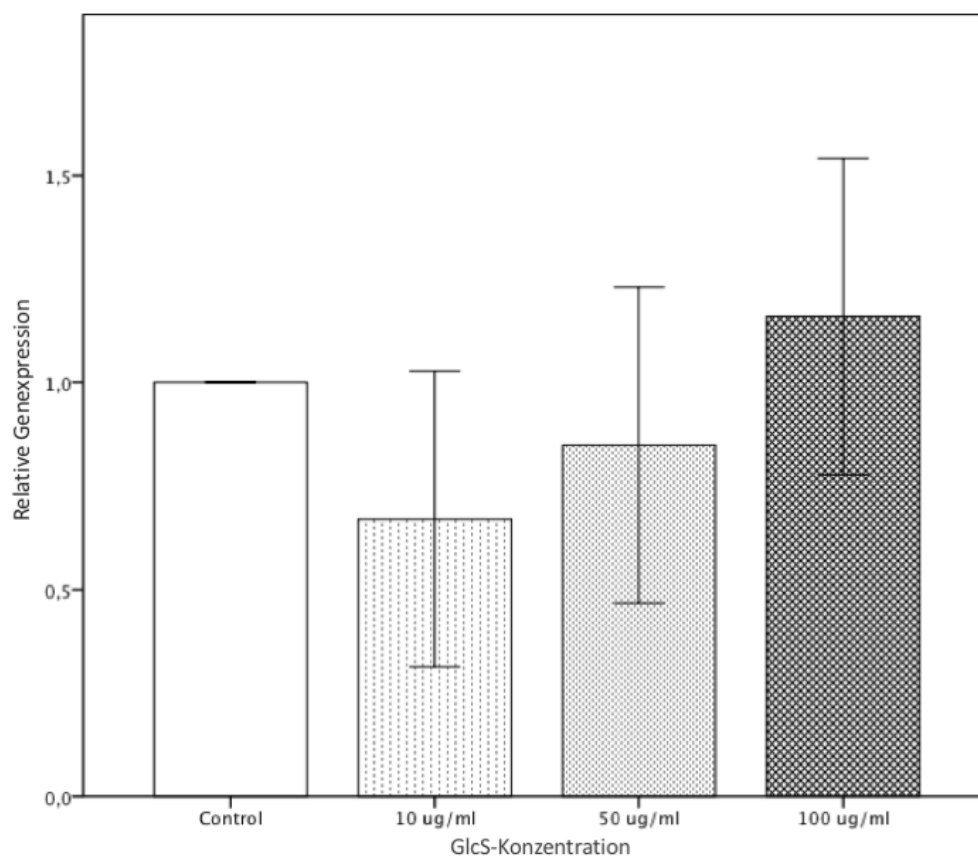
In SaOs-2-Zellen zeigt sich die MMP-3-Expression statistisch signifikant in der geringsten Konzentration um 63% herunterreguliert ( $p=0,003$ ). Bei der höheren Konzentration von 50  $\mu\text{g/ml}$ , ist ein Trend erkennbar, allerdings ohne statistische Signifikanz ( $p=0,57$ ). Kaum eine Hemmung der MMP-3-Expression sieht man hingegen bei der höchsten GlcS-Konzentration von 100  $\mu\text{g/ml}$  ( $p=0,82$ ).



**Abbildung 18:** relative MMP-3-Expression in SaOs-2-Zellen

### 3.2.2.5 MMP-9-Expression in MG-63-Zellen

Die MMP-9-Expression in der MG-63-Zellreihe wird in der geringsten GlcS-Konzentration von 10  $\mu\text{g/ml}$  mäßig, statistisch nicht signifikant, gehemmt ( $p=0,25$ ). Auch in diesem Versuchsansatz ist für die mittlere Konzentration eine Hemmung sichtbar, allerdings erreicht diese keine statistische Signifikanz ( $p=0,56$ ). Durch die Applikation der höchsten GlcS-Konzentration von 100  $\mu\text{g/ml}$ , zeigt sich die Expression von MMP-9 annähernd unbeeinflusst ( $p=0,55$ ).

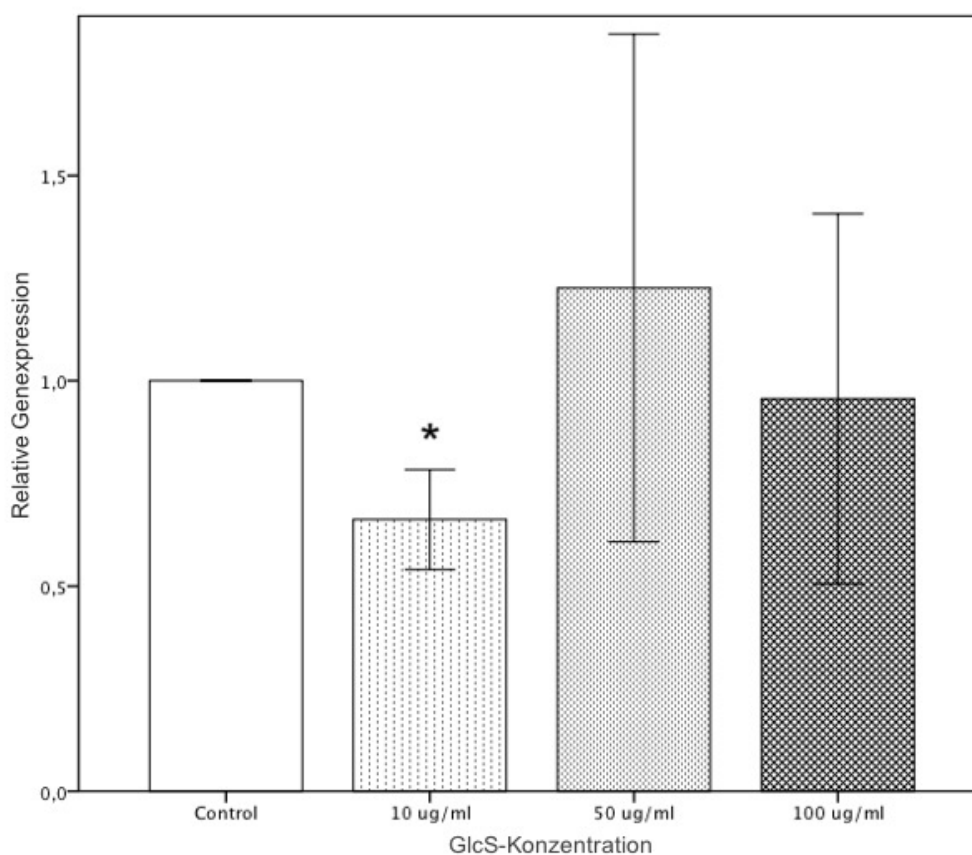


**Abbildung 19:** relative MMP9-Expression in MG-63-Zellen



### 3.2.2.6 MMP-9-Expression in SaOs-2-Zellen

In Analogie dazu zeigt die statistische Auswertung der MMP-9-Expression in SaOs-2-Zellen ein ähnliches Bild. Statistisch signifikant sind die MMP-9-Expressionswerte durch die niedrigste Konzentration von Glucosaminsulfat um 34% herunterreguliert ( $p=0,04$ ), während die Expression für die höhere Konzentration von 50  $\mu\text{g/ml}$  stark davon abweicht und gewisser Weise eine Heraufregulation von MMP-9 suggeriert, allerdings ohne dabei signifikant zu sein ( $p=0,59$ ). Ähnlich des Effekts in MG-63-Zellen, zeigt sich für die Konzentration von 100  $\mu\text{g/ml}$  kaum eine Expressionsveränderung ( $p=0,88$ ) im Vergleich zur unbeeinflussten Kontrolle.



**Abbildung 20:** relative MMP-9-Expression in SaOs-2-Zellen

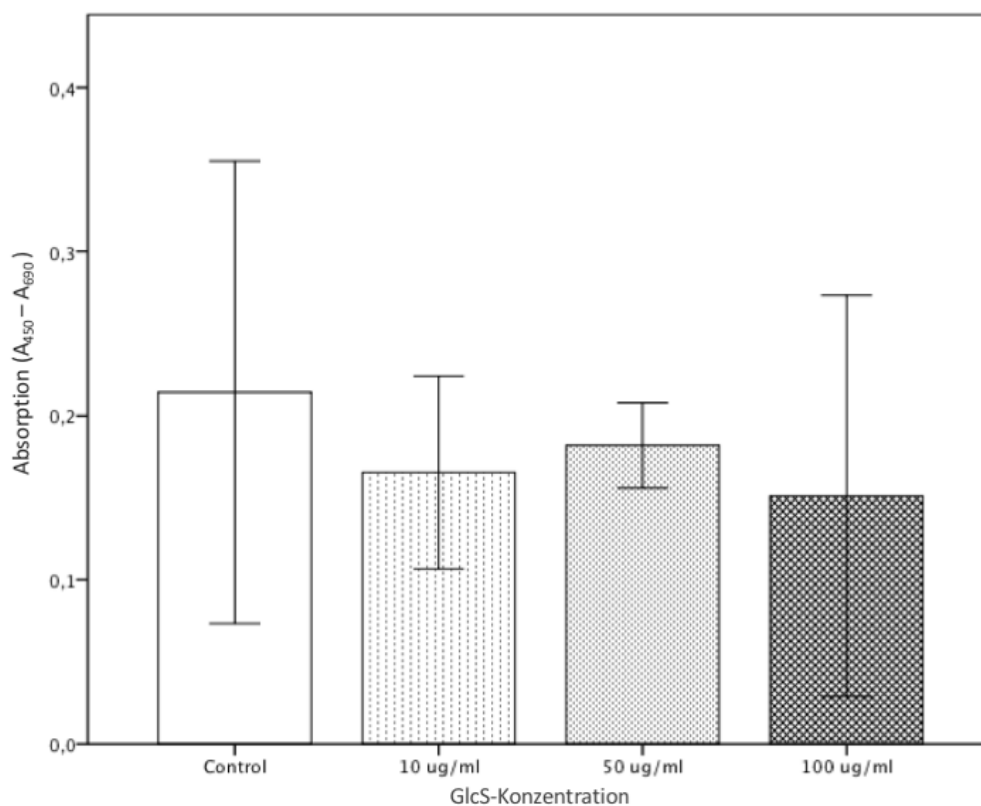
### 3.2.3 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Bestimmt wurden die Matrix-Metalloproteasen-Proteinmenge ausgedrückt als Absorptionsunterschiede  $A_{450} - A_{690}$  im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle. Die die Ergebnisse wurden in Säulendiagrammen dargestellt.

Statistisch signifikante Ergebnisse ( $p \leq 0,05$ ) im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle sind mit einem \* markiert.

#### 3.2.3.1 MMP-3-Proteinmenge in MG-63-Zellen

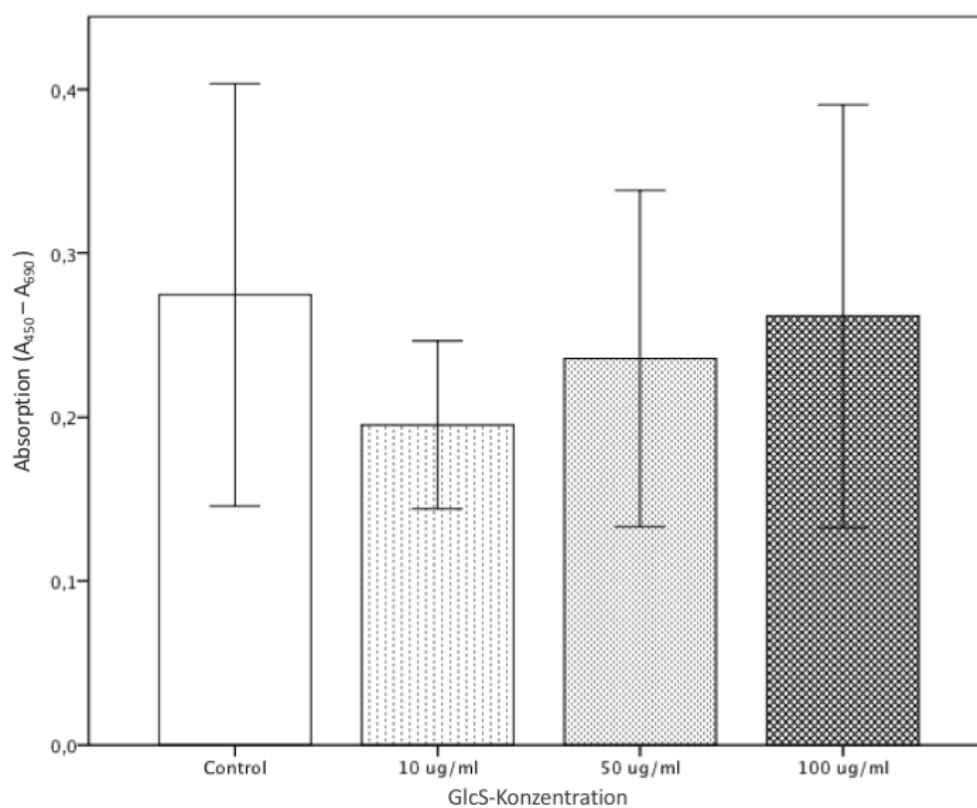
Während die MMP-3-Expression in MG-63-Zellen durch alle GlcS-Konzentrationen gehemmt wird, kann dies vom ELISA auf Proteinebene nicht durchgehend gezeigt werden. Lediglich bei höchster GlcS-Konzentration zeigt sich ein Trend zur Reduktion der MMP-3-Proteinmenge ( $p=0,59$ ). Bei niedrigster ( $p=0,62$ ) und mittlerer ( $p=0,73$ ) GlcS-Konzentration, zeigt sich die MMP-3-Menge nahezu unbeeinflusst.



**Abbildung 21:** MMP-3-Proteinmenge in MG-63-Zellen als Absorption  $A_{450} - A_{690}$  im ELISA

### 3.2.3.2 MMP-3-Proteinmenge in SaOs-2-Zellen

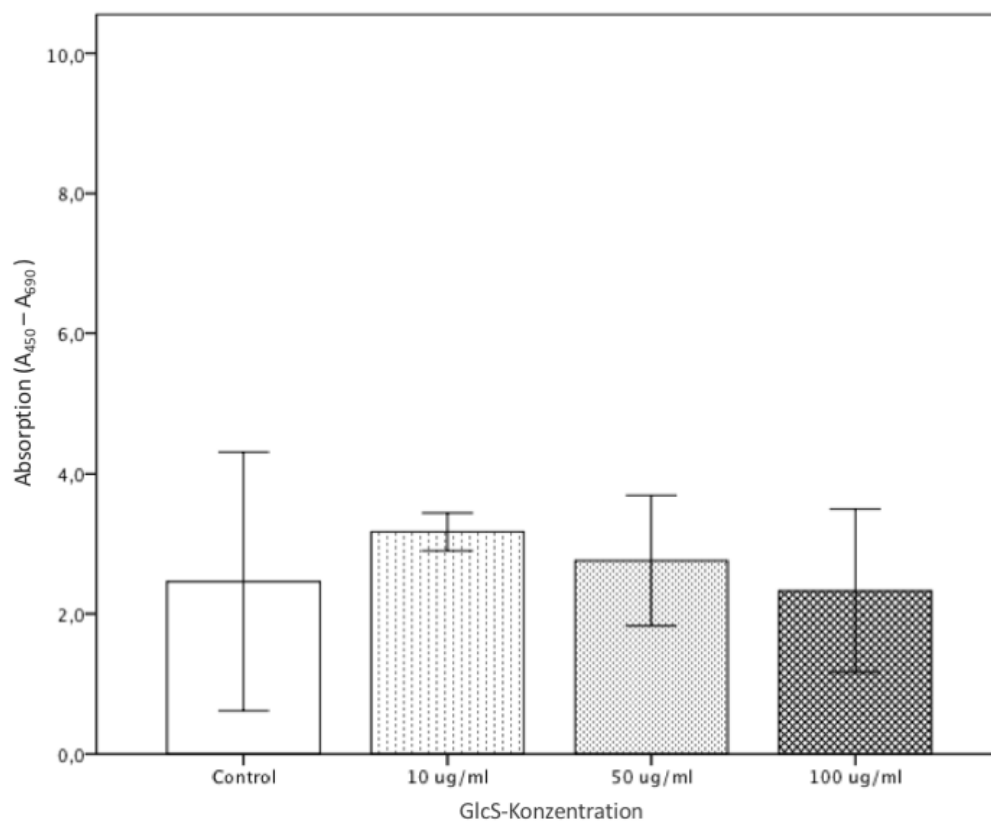
Die MMP-3-Menge in SaOs-2-Zellen ist, nach Hemmung mit 10 µg/ml Glucosaminsulfat, zwar stark (um 28%), aber nicht statistisch signifikant, verringert ( $p=0,40$ ). Die Proteinmengen nach Hemmung mit 50 beziehungsweise 100 µg/ml GlcS folgen dem Trend des MMP-3-Expressions-Musters und zeigen sich leicht vermindert, erreichen aber weder für 50 µg/ml ( $p=0,70$ ), noch 100µg/ml ( $p=0,91$ ) statistische Signifikanz.



**Abbildung 22:** MMP-3-Proteinmenge in SaOs-2-Zellen als Absorption  $A_{450} - A_{690}$  im ELISA

### 3.2.3.3 MMP-9-Proteinmenge in MG-63-Zellen

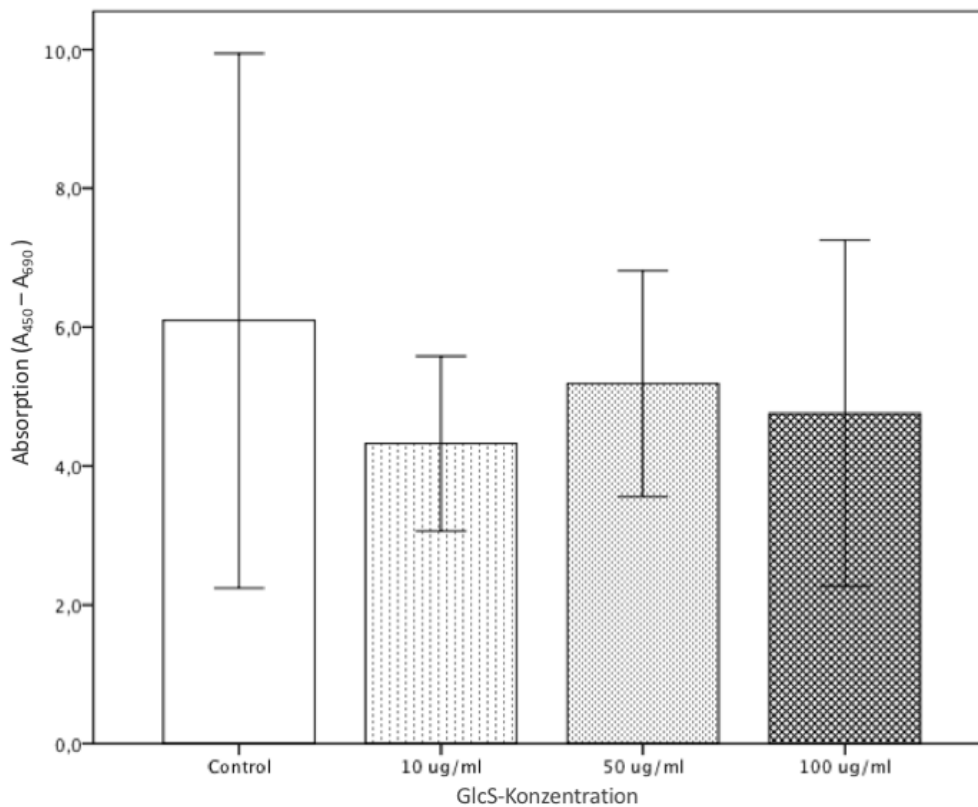
Auf Proteinebene erkennt man keine hemmende Wirkung auf MMP-9 in MG-63-Zellen. Die Proteinmengen bei 10  $\mu\text{g/ml}$  ( $p=0,58$ ) und 50  $\mu\text{g/ml}$  ( $p=0,82$ ) zeigen sich im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle leicht erhöht, ohne statistisch signifikant zu sein. Im Versuchsansatz mit der höchsten Konzentration GlcS wird keine signifikante MMP-9-Mengenänderung ( $p=0,92$ ) festgestellt.



**Abbildung 23:** MMP-9-Proteinmenge in MG-63-Zellen als Absorption A<sub>450</sub> - A<sub>690</sub> im ELISA

### 3.2.3.4 MMP-9-Proteinmenge in SaOs-2-Zellen

Ebenso wie die MMP-9-Expression in SaOs-2-Zellen, ist auch die Proteinmenge bei niedrigster GlcS-Konzentration ca. 29% niedriger als in der unstimulierten Kontrolle, allerdings nicht statistisch signifikant ( $p=0,52$ ). Eine Verringerung der MMP-9-Menge kann auch bei den Versuchen mit ansteigenden Konzentrationen festgestellt werden, wobei sowohl für 50  $\mu\text{g/ml}$  ( $p=0,74$ ), also auch 100  $\mu\text{g/ml}$  GlcS ( $p=0,64$ ) keine Signifikanz erreicht wird.



**Abbildung 24:** MMP-9-Proteinmenge in SaOs-2-Zellen als Absorption  $A_{450} - A_{690}$  im ELISA

## **4. Diskussion**

### **4.1 Diskussion der Methoden**

#### **4.1.1 Auswahl der Zelllinien**

Bei den Zelllinien MG-63 und SaOs-2 handelt es sich um etablierte, gut untersuchte humane Osteosarkom-Zelllinien. In der vorliegende Arbeit wurde speziell auf diese Zellen zurückgegriffen, da sie im Vergleich zu eigenen klinisch generierten Osteosarkomzellen durch käufliche Erwerbbarkeit eine quasi unendliche Verfügbarkeit bieten und bei geringerem materiellen und personellen Aufwand, vor allem reproduzierbare Ergebnisse erzielt werden können (Czekanska et al. 2012). Beide Zelllinien zeichnen sich, auch nach vielen Passagen, durch relativ geringe biologische Variabilität und große Konstanz hinsichtlich ihres Wachstumsverhaltens, der zellulären Beschaffenheit und ihres Expressionsmusters aus (Hausser et al. 2005). Darüber hinaus ist sowohl von MG-63, als auch von SaOs-2-Zellen bekannt, dass sie nicht nur in hohem Maße MMP-2 und MMP-9 (Pautke et al. 2004), sondern auch MMP-3 exprimieren (de Bart et al. 1995, Hilz et al. 2014). In eigenen Voruntersuchungen konnte dies bestätigt werden.

Diese Merkmale bildeten die Grundlage zur Untersuchung des Verhaltens von Matrix-Metalloproteasen auf die Stimulation mit Glucosaminsulfat.

#### **4.1.2 Versuchsansatz und Zellkultur**

Nach Etablierung der vom Hersteller empfohlenen Kulturbedingungen für die jeweiligen Zelllinien, wurden aus unterschiedlichen Passagen Zellen für die Versuche entnommen. Um dem Problem der Vermischung beziehungsweise der Kreuzkontamination vorzubeugen, wurden die Zelllinien immer zu verschiedenen Zeitpunkten und in räumlicher Trennung bearbeitet (Capes-Davis et al. 2010). Darüber hinaus wurden die Zellen aus den einzelnen Passagen mikroskopisch auf verschiedene Merkmale wie Größe und Morphologie, sowie zytochemisch auf alkalische Phosphatase untersucht (Pautke et al. 2004). Auf diese Weise konnte eine Vermischung der Zellen stets mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen und eine hohe Ergebnissicherheit gewährleistet werden.

In Anlehnung an den Versuchsaufbau der Arbeitsgruppe um Rajapakse et al., welche die Wirkung von Glucosaminsulfat auf die Fibrosarkomzelllinie HT1080 untersuchte,

wurden in unserer Studie die Osteosarkomzelllinien MG-63 und SaOs-2 den GlcS-Konzentrationen von 10 µg/ml, 50 µg/ml und 100 µg/ml ausgesetzt (Rajapakse et al. 2007). Im Gegensatz zu deren Studie entschieden wir uns bei den Stimulationsversuchen, auch wegen widersprüchlicher Aussagen in der Literatur, nicht für serum-freies Kulturmedium (Medium *ohne* fetales Kälberserum), sondern für serum-reduziertes Medium (2% FKS). Verschiedene Stoffwechselfvorgänge einer Zelle werden auch von FKS-Inhaltsstoffen beeinflusst (Rommelink et al. 1998). Für Matrix-Metalloproteasen ist die Studienlage allerdings ungenügend, sodass mit der Wahl von Medium mit 2% FKS versucht wurde, den fraglichen Einfluss von sehr hohen und fehlenden Anteilen FKS, auszugleichen.

Glucosamin (GlcN) als ungiftiges, gut untersuchtes und in der Arthrose-Basistherapie eingesetztes Nahrungsergänzungsmittel (Kongtharvonskul et al. 2015) bot sich für weitere Untersuchungen in Bezug auf Matrix-Metalloproteasen an. So konnte auch bei *in vitro* Studien sowohl an humanen Chondrozyten (Uitterlinden et al. 2006), als auch malignen Fibrosarkomzellen (Mendis et al. 2009) beim Einsatz verschiedener Konzentrationen von GlcN kein toxischer Effekt auf diese Zellen ausgemacht werden.

Auf Grund fehlender Studien zum Einfluss von GlcN auf die untersuchten Osteosarkomzelllinien, wurde in der vorliegenden Arbeit angenommen, dass die gewählten GlcS-Konzentrationen (10, 50 und 100 µg/ml) auch auf MG-63- und SaOs-2-Zellen keinen zytotoxischen Effekt ausüben. Zur Viabilitäts-Kontrolle wurden Parameter wie Wachstumsgeschwindigkeit, Zellzahl, Morphologie und als wichtigster Marker ein Zellviabilitäts-Assay (WST-Assay) durchgeführt. Alle untersuchten Merkmale und das Ergebnis des WST-Assays boten keinen Anlass eine Toxizität der gewählten GlcS-Konzentrationen auf MG-63 und SaOs-2-Zellen anzunehmen. Das ungestörte Wachstum der Zelllinien war Voraussetzung dafür, allein den Einfluss von GlcS auf die Expression von Matrix-Metalloproteasen untersuchen zu können und mögliche zelleigene, stressbedingte Faktoren auf deren Expression so gering wie möglich zu halten (Zaragoza et al. 2002).

### 4.1.3 Polymerase-Kettenreaktion und ELISA

In dieser Arbeit wurde die relative Hemmung der Genexpression von MMP-2, -3 und -9 durch Glucosaminsulfat im Vergleich zu einer unstimulierten Kontrolle mittels quantitativer real-time PCR untersucht. Zur Bestimmung der absoluten MMP-2-, -3-, und -9-Proteinmenge wurde ein ELISA durchgeführt. Sowohl für die PCR, als auch für den ELISA wurden dieselben Zellen beziehungsweise das Zelllysat aus jeweils einem Versuchsansatz verwendet. Für jede Zelllinie wurden jeweils drei Versuche durchgeführt.

Die untersuchten Matrix-Metalloproteasen wurden anhand ihrer Relevanz in Bezug auf das Osteosarkom ausgewählt: MMP-9 gilt als eine der wichtigsten und am besten untersuchten Matrix-Metalloproteasen beim Osteosarkom. Zusammen mit MMP-2 wird beiden Gelatinasen eine entscheidende Rolle bei der Umsetzung extrazellulärer Matrix und damit eine maßgebliche Beteiligung an der Invasivität und Metastasierung des Osteosarkoms zugeschrieben (Roomi et al. 2014, Wen et al. 2014, Wang et al. 2014). Ebenso scheint MMP-3 in verschiedenen Zellen eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung maligner Prozesse zu spielen (Yamashita et al. 2011, Chang et al. 2014).

Zum Nachweis von MMPs kommen verschiedene Methoden zum Einsatz. Am verbreitetsten ist sicherlich die Zymographie (Toth et al. 2012). Die Zymographie bietet als sensitives Nachweisverfahren den unbestreitbaren Vorteil, dass aktive von inaktiven MMPs unterschieden werden können. Demgegenüber stehen allerdings auch Nachteile, welche in dieser Arbeit besonders zum Tragen kamen. Die Zymographie ist im Vergleich zu PCR und ELISA sehr personal- und zeitaufwendig, vor allem da reproduktive und damit valide Ergebnisse erst nach langer Etablierung möglich sind (Zucker et al. 1994). Darüber hinaus werden MMP-TIMP-Komplexe nicht erfasst, was eine Detektion der Gesamt-MMP-Menge nicht möglich macht. Alle Ergebnisse werden zudem anhand eines aufgetragenen Standards ermittelt, welcher ebenfalls Ergebnisschwankungen unterliegt (Snoek-van Beurden et al. 2005).

Entscheidende Limitierung dieser Methode war in dieser Studie aber sicherlich die untere Nachweisgrenze der Zymographie von 32 pg MMP (Leber et al. 1997). Wie Vorversuche zeigten, reichte sie nicht aus, die Hemmung der untersuchten MMPs dieser Studie in geeigneter Weise nachzuweisen.

In dieser Arbeit überwogen deutlich die Vorteile der quantitativen real-time PCR in Kombination mit dem ELISA. Die quantitative real-time PCR ist in der Lage, anhand der



vorher ausgewählten Primer für die entsprechenden MMPs, sehr genau die mRNA-Menge der zu untersuchenden Matrix-Metalloprotease zu quantifizieren und damit die Expression beziehungsweise die Hemmung eines speziellen Gens zu untersuchen (Mackay et al. 2002). Es ist allerdings problematisch, allein von der mRNA-Menge auf die tatsächliche Menge des untersuchten Proteins in der Zelle zu schließen. Insbesondere da post-transkriptionale Modifikation letztendlich eine Bildung des Proteins verhindern oder verzögern kann (Bustin 2002). Um diesen Nachteil auszugleichen wurden die absoluten Proteinmengen von MMP-3 und -9 in den jeweiligen Zellen zusätzlich zur PCR mittels ELISA untersucht. Die Sensitivität der verwendeten Kits lag dabei deutlich höher ( $<10$  pg/ml für MMP-9 und  $<0,1$  ng/ml für MMP-3), als die der Zymographie. Verbunden mit relativ geringer Anwenderabhängigkeit, besserer Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit, überwogen hierbei deutlich die Vorteile (Boonham et al. 2014, Zucker et al. 1995).

Zusätzlich bietet die Kombination von qRT-PCR und ELISA höchstmöglichen Erkenntnisgewinn, da im Grunde der komplette Weg des Proteins, in diesem Falle der jeweiligen Matrix-Metalloprotease, nachvollziehbar gemacht wurde: Angefangen mit der Transkription, also der Bildung der mRNA gefolgt von der Translation, der Entwicklung des Proteins, konnte die Wirkung von Glucosaminsulfat auf die einzelnen Entstehungsschritte der MMPs untersucht werden.

Während Rajapakse et al. die Überstände der HT1080-Kultur für seine Versuche nutzte, wurden in dieser Arbeit, auch um der komplexen intrazellulären Proteinbildung und Speicherung gerecht zu werden, Zelllysate verwendet (Rajapakse et al. 2007). Die Wirkung von MMP-2, -3 und -9 ist sicherlich außerhalb der Zelle, an der ECM am größten (Farina et al. 2014). Es verdichten sich allerdings die Hinweise, dass neben der Produktion der MMPs in der Zelle, diese auch intrazellulär akkumuliert, aktiviert und modifiziert werden, weshalb in dieser Arbeit die Untersuchung der gesamten Zelle geboten war (Murphy et al. 2011, Fanjul-Fernández et al. 2010).

## 4.2 Einfluss von Glucosaminsulfat auf Matrix-Metalloproteasen

### 4.2.1 Matrix-Metalloprotease 2

In dieser Untersuchung konnte weder in MG-63-Zellen, noch in der Osteosarkomzelllinie SaOs-2 eine statistisch signifikante Beeinflussung der MMP-2-Expression durch Glucosaminsulfat festgestellt werden. Auch steigende GlcS-Konzentrationen bewirkten keine signifikante Änderung oder ließen einen Trend erkennen. Diese Ergebnisse decken sich mit Ergebnissen in anderen Publikationen: Scheint bei der Regulation fast aller MMPs die Kontrolle der Transkription eine wesentliche Rolle zu spielen, fassten schon Sternlicht et al. zusammen, dass dies bei MMP-2 nicht zuzutreffen scheint. Vielmehr scheint es fast unabhängig von äußeren Einflüssen ständig exprimiert zu werden und erst speziellen extrazellulären Regulationsmechanismen unterworfen zu sein (Sternlicht et al. 2001). Diese Vermutung bestätigt auch die Arbeitsgruppe von Roomi et al., welche unter anderem den Einfluss von MMP-induzierenden Substanzen wie TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$ , sowie MMP-hemmenden Substanzen wie Doxycyclin auf MMP-2 in Überständen der Kultur der Osteosarkomzelllinie U2OS untersuchten. MMP-2 erwies sich in der Zymographie, im Vergleich zum ebenfalls untersuchten MMP-9, auch in deren Versuchen als weniger beeinflussbar (Roomi et al. 2014). Auch in der Arbeitsgruppe um Fan et al. fand IL-1 $\beta$  zur Stimulation, allerdings von humanem arthrotischem Knorpel, Verwendung. In deren Beobachtung, blieb die MMP-2-Genexpression nach Stimulation mit IL-1 $\beta$  in verschiedenen Konzentrationen ebenfalls unverändert (Fan et al. 2005). Ergebnisse von Uitterlinden et al., welche *in vitro* gleichfalls mit humanem arthrotischen Knorpel arbeiteten, legen nahe, dass MMP-2 kaum beeinflussbar ist. Die Stimulation des Knorpels fand in deren Versuchsansatz mit Glucosaminsulfat in verschiedenen Konzentrationen statt. Dabei zeigte die Genexpression von MMP-2 keine signifikante Änderung im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (Uitterlinden et al. 2006). Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse von Rajapakse et al., bei deren Arbeit mit den Fibrosarkomzellen HT1080 konnten diese zymographisch zeigen, dass es unter Einfluss von ansteigenden GlcS-Konzentrationen zu einer signifikanten, dosisabhängigen Senkung der MMP-2-Proteinmenge und -aktivität in Zellkulturüberständen kommt (Rajapakse et al. 2007). Somit ist zumindest auf Proteinebene nicht von einer generellen Unhemmbarkeit von MMP-2 auszugehen. Die Genexpression wurde von dieser Arbeitsgruppe nicht untersucht.

Kultur- und Versuchsbedingungen, besonders aber natürlich der Zelltyp stellen darüber hinaus aber wohl ebenso entscheidende Faktoren dar. So fällt interessanter Weise auf, dass die Arbeitsgruppe um Rajapakse et al. die einzige unter den oben genannten ist, die bereits in der Kultur eine MMP-Stimulation mittels PMA vornimmt. Somit wurden generell alle MMPs auf ein höheres Ausgangslevel gehoben, was auch Einfluss auf deren Hemmbarkeit gehabt haben könnte. So wäre vorstellbar, dass eine Hemmung von MMP-2 erst ab einer gewissen Menge möglich sein könnte. Im Vergleich zur vorliegenden Arbeit, wurden darüber hinaus keine Zelllysate, sondern Zellkulturüberstände verwendet. Diese Tatsache macht denkbar, dass zur Regulation mancher MMPs (zum Beispiel MMP-2) wie von Parks et al. beschrieben, diese im Extrazellulärraum „kompartimentalisiert“ werden und eventuell nur dort von GlcS gehemmt werden können. Eine ständige MMP-2-Genexpression und eine intrazellulär erhöhte MMP-2-Proteinmenge stünden dazu nicht im Widerspruch (Parks et al. 2004).

In der Arbeit an MG-63- und HT1080-Zellen zeigten Teronen et al. ebenfalls eine Hemmung der Aktivität von MMP-2, allerdings durch Clodronat, einer potenten Substanz aus der Gruppe der Bisphosphonate. Auch in deren Versuchen wurden die Überstände für die Zymographie von PMA-stimulierten Zellen verwendet, was dem Versuchsaufbau von Rajapakse et al. sehr ähnelt und einen ähnlichen Hemmungsmechanismus vorstellbar macht. Den hemmenden Einfluss übte das Medikament dabei allerdings weniger über die Verringerung der extrazellulären MMP-2-Gesamtmenge aus. Vielmehr wurde gezeigt, dass durch Hemmung der Konversion des inaktiven Zymogens (proMMP-2) in das aktive Enzym (MMP-2), dessen Aktivität im Extrazellulärraum verringert wird und dadurch eine Hemmung von MMP-2 zustande kommt (Teronen et al. 2006). Der Einfluss des schwach potenten Bisphosphonates Alendronat auf die MMP-2-Expression und -Menge der Chondrosarkomzelllinie JJ012 war Gegenstand der Untersuchung von Lai et al.. Diese konnten zeigen, dass MMP-2 in diesen Zellen auf transkriptionaler, translationaler und posttranslationaler Ebene durch Alendronat gehemmt wird. Allerdings untersuchte auch diese Arbeitsgruppe die MMP-2-Menge und -Aktivität in den Zellkulturüberständen und nicht im Zelllysate. Über die tatsächlich gebildete Menge und die intrazelluläre MMP-2-Konzentration gibt diese Untersuchung deshalb keinen Aufschluss. Hinzu kommt, dass auch deren Publikation offen lässt, auf welcher Ebene der Einfluss der Regulation beziehungsweise die Hemmung am größten ist (Lai et al. 2007).

In der Zusammenschau lässt sich daher kein einheitliches Bild zur Regulation von MMP-2 zeichnen. Der Einfluss von GlcS auf die Expression von MMP-2 scheint zumindest in Zellen ohne vorige PMA-Stimulation und insbesondere in Osteosarkomzelllinien nur wenig bedeutsam zu sein, wie die Mehrzahl der Publikationen deutlich machten. Wie Lai et al. zeigten, ist die Hemmung der MMP-2-Expression nicht per se unmöglich, in welchem Maße und auf welche Art und Weise, bleibt hingegen im Ungewissen.

Die vorliegende Arbeit musste ebenso offen lassen, ob eventuell höhere GlcS-Konzentrationen oder eine längere Stimulation mit GlcS einen hemmenden Effekt auf die MMP-2-Expression in MG-63 und SaOs-2-Zellen gehabt hätten.

Allgemein klärungsbedürftig erscheint aber auch die Rolle und das Verhalten von MMP-2 beim Osteosarkom *in vivo* zu sein. Eine Beteiligung von MMP-2 an Progression, Invasivität und Metastasierung des Osteosarkoms ist stark anzunehmen, letztlich deutet sich ein Zusammenhang zwischen hoher MMP-2-Expression im Tumor und niedriger Überlebenswahrscheinlichkeit an, konnte aber bis heute nicht mit letzter Sicherheit bewiesen werden (Wen et al. 2014, Korpi et al. 2011, Uchibori et al. 2006). Weitere In-Vitro-Studien an Osteosarkomzellen zur Untersuchung der Regulation von MMP-2 sind sicherlich wünschenswert. Klinische Studien mit höheren Patienten- beziehungsweise Probenzahlen könnten darüberhinaus wichtige Informationen zum Einfluss von MMP-2 *in vivo* liefern und Rückschlüsse auf verschiedene Einflüsse auf Matrix-Metalloproteasen im Osteosarkom zulassen.

### **4.2.2 Matrix-Metalloprotease 3**

Ebenso wie die Matrix-Metalloprotease 2 ist auch MMP-3 an malignen Prozessen im Körper beteiligt. Insbesondere durch seine Fähigkeit Kollagen Typ IV, Laminin und andere Bestandteile der Basalmembran spalten zu können, leistet MMP-3 der Tumordinvasion und Metastasierung Vorschub (Biondi et al. 2000). Kusukawa et al. konnten diesen Zusammenhang zwischen Invasivität und erhöhter MMP-3-Konzentration in immunhistochemisch untersuchten Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle nachweisen (Kusukawa et al. 1996). Chang et al. fanden darüber hinaus heraus, dass Patienten mit Magenkarzinom und erhöhten Serum-MMP-3-Konzentrationen ein schlechteres Gesamtüberleben zeigen als Patienten mit niedrigem MMP3-Serumlevel (Chang et al. 2014). Die Hemmung des Tumorzellwachstums durch Reduzierung der MMP-3-Expression und -Menge erscheint vor diesem Hintergrund als

äußerst attraktiv. Eine kürzlich erschienene Publikation von Chesnokov et al. legt nahe, dass zum Beispiel Glucosamin durch Einfluss auf verschiedene Signalwege hemmend auf das Wachstum von Prostatakrebszellen wirkt (Chesnokov et al. 2014).

Wir konnten in der vorliegenden Studie zeigen, dass Glucosamin außerdem die Expression von MMP-3 in den Osteosarkomzelllinien MG-63 und SaOs-2 wirksam verringern kann. In der quantitativen real-time PCR zeigte sich eine signifikante Hemmung der MMP-3-Expression in MG-63-Zellen durch alle untersuchten GlcS-Konzentrationen. Interessanterweise konnte auch in SaOs-2-Zellen eine dosisunabhängige Suppression der MMP-3-Expression durch GlcS gezeigt werden. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit Ergebnissen verschiedener Publikationen.

So konnten Graeser et al. zeigen, dass die Genexpression von MMP-3 in der Chondrosarkomzelllinie SW1353 signifikant von verschiedenen Konzentrationen Glucosamin (100 – 500 µg/ml) gehemmt wird (Graeser et al. 2009). Damit bestätigten sie die Untersuchungen von Lin et al., welche ebenfalls einen signifikant hemmenden Einfluss von Glucosamin in den gewählten Konzentrationen von 100-500 µg/ml auf die Expression der Matrix-Metalloprotease 3 in dieser malignen Zelllinie zeigen konnten (Lin et al. 2008). Dass Glucosamin auch auf physiologische Zellen einen solchen Einfluss ausübt, konnte von Liu et al. anhand von humanen primären synovialen Fibroblasten gezeigt werden (Lu et al. 2008). Nicht unerwähnt bleiben sollten die Ergebnisse der Arbeitsgruppe um Nakamura et al.. Diese stellte fest, dass die MMP-3-Expression in Synovialzellen und Chondrozyten durch Glucosamin gehemmt wird, nicht aber in arthrotisch veränderten Knorpelzellen. Dies ist insofern interessant, dass im selben Zelltyp, je nach Zustand der Zelle, Glucosamin verschiedene Effekte erzielen kann und nicht regelhaft herunterregulierenden Einfluss auf MMPs haben muss (Nakamura et al. 2004). Diese Beobachtung steht allerdings im Gegensatz zu den Erkenntnissen, welche Dodge et al. publizierten. Deren Studie kann auch in arthrotischen Knorpelzellen, allerdings durch höhere GlcS-Konzentrationen, eine Hemmung der MMP-3-Expression herbeiführen (Dodge et al. 2003). Diese Beobachtungen bestätigten auch mehrere andere Publikationen. So konnte gezeigt werden, dass die MMP-3-Expression in arthrotischen Knorpelzellen von Meerschweinchen signifikant durch Glucosamin hemmbar sind (Taniguchi et al. 2012). Die Untersuchung von osteoarthrotisch geschädigten humanen Knorpelimplantaten lieferten sehr ähnliche Ergebnisse (Uitterlinden et al. 2006). Ebenso waren in einer in-vivo-Studie die Konzentrationen von

MMP-3 in Blutseren von Patienten mit Arthrose, welche mit einem Glucosamin-Präparat behandelt wurden, signifikant niedriger, als in der placebo-kontrollierten Vergleichsgruppe (Nakamura et al. 2007).

Die genannten Publikationen zusammenfassend, kann in Anbetracht der eigenen Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit, angenommen werden, dass sich die MMP-3-Genexpression in den Osteosarkomzelllinien MG-63 und SaOs-2 unter dem Einfluss von Glucosaminsulfat ähnlich wie bei den zuvor genannten Zelltypen verhält. Darüber hinaus konnte in dieser Studie die Auswirkung einer GlcS-Stimulation nicht nur auf transkriptionaler, sondern durch Untersuchung der MMP-3-Gesamtmenge mittels ELISA, auch auf translationaler Ebene gezeigt werden.

So zeigten die Ergebnisse des ELISA, dass sich die Proteinmengen von MMP-3 in beiden Zelllinien durchaus kongruent zur Genexpression verhalten.

In den Versuchen mit MG-63-Zellen konnte eine signifikante Expressions-Hemmung durch alle GlcS-Konzentrationen gezeigt werden. Mithilfe des ELISA konnte auch auf Proteinebene ein Trend zur Hemmung gezeigt werden, wobei allerdings keine Signifikanz erreicht wurde. Auch in den gleichartig behandelten SaOs-2-Zellen zeigten sich die Ergebnisse der MMP-3-Genexpressionshemmung durchgehend korrespondierend zu den Proteinwerten im ELISA. Sowohl die Herabregulierung der MMP-3-Expression, als auch die verringerte Proteinmenge wurden in dieser Zelllinie bei der geringsten GlcS-Konzentration nachgewiesen.

Diese Dissertation konnte Beobachtungen bestätigen, wonach MMP-3 hauptsächlich auf transkriptionaler Ebene reguliert wird (Murphy et al. 2008). Dafür spricht, dass sich eine Herabregulierung der Genexpression von MMP-3, auch in einer verringerten MMP-3-Proteinmenge niederschlägt und somit stark korreliert. Aus einem nicht vorhandenen mRNA-Transkript, kann im Ribosom kein Protein entstehen. Offen blieb in dieser Arbeit allerdings der genaue Signalweg über den Glucosaminsulfat auf die MMP-3-Expression wirkte. Verschiedene Publikationen legen allerdings nahe, dass auch in Osteosarkomzellen ähnlich wie zum Beispiel in Chondrosarkomzellen, Chondrozyten und Fibroblasten eine Hemmung des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B (nuclear factor kappa B) stattfindet, welcher wiederum großen regulatorischen Einfluss auf die Expression von MMP-3 hat (Graeser et al. 2009, Lu et al. 2008, Lin et al. 2008).

Ungewöhnlich erscheint in der vorliegenden Arbeit, dass die Hemmung von MMP-3 nicht abhängig von der gewählten Glucosaminsulfatdosis ist. Damit unterscheiden sich

die Ergebnisse dieser Studie wesentlich von denen von Lu et al., Lin et al. und Graeser et al., welche in ihren Untersuchungen eine Dosisabhängigkeit der MMP-3-Expressionshemmung feststellten. Dazu ist zu bemerken, dass von diesen Arbeitsgruppen zum einen deutlich höhere Konzentrationen GlcS verwendet wurden (100 – 1000 µg/ml) (Nakamura et al. 2004, Graeser et al. 2009). Zum anderen wurden wesentlich längere Inkubationszeiten (bis zu 72h) angewandt, welche durchaus Einfluss auf die Aufnahme von GlcS in die Zelle und damit dessen Wirksamkeit gehabt haben könnten (Lin et al. 2008). Eine Hemmung, nur auf niedrigster Konzentrationsstufe, wie in der vorliegenden Arbeit beobachtet, ließe sich auch mit unterschiedlichen Transportmechanismen in verschiedenen Zelltypen erklären. So geben Lu et al. zu bedenken, dass nicht eindeutig geklärt sei, wie Glucosamin in die Zelle gelange. Wahrscheinlich scheint die Aufnahme über den Glucosetransporter GLUT1 zu sein, denkbar wäre aber auch ein spezieller Glucosamintransporter (Lu et al. 2008). Zu dieser Unwägbarkeit kommt hinzu, dass auch die Kontrolle der GlcS-Aufnahme in die Zelle noch unklar ist. Vorstellbar wären kompetitive Mechanismen durch Glucose, aber auch eine Sättigung des Rezeptors beziehungsweise Transporters ab einer gewissen intrazellulären GlcS-Konzentration, womit die Aufnahme von Glucosamin in die Zelle gestoppt würde (Graeser et al. 2009). Damit wären Ergebnisse, wie sie in dieser Studie sowohl für MG-63-, als auch SaOs-2-Zellen gezeigt wurden, durchaus vereinbar. Eine Regulation im Sinne eines *feed-back*-Mechanismus, wie oben beschrieben, könnte in verschiedenen Zellarten durchaus unterschiedlich sein (Lin et al. 2008, Bond et al. 2015). Hinzu kommt, dass die Vergleichbarkeit der Studien zusätzlich dadurch erschwert wird, dass bei vielen oben genannten Studien IL-1 $\beta$  zur Stimulation der MMP-Expression und Simulation von arthrotischen Verhältnissen verwendet wurde. Inwiefern dies auch andere Rezeptoren und Transportmechanismen in Bezug auf die Wirksamkeit von Glucosamin auf die MMP-3-Hemmung beeinflusst hat, ist schwer zu beziffern (Graeser et al. 2009).

Wünschenswert wären mehr Studien zum Verhalten von MMP-3 in Osteosarkomzellen, vor allem zur besseren Einordnung der in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse zum Einfluss von Glucosaminsulfat auf MMP-3. Mit den oben genannten Einschränkungen, passen die vorliegenden Daten dieser Arbeit in den Kontext der Literatur, wobei weitere Untersuchungen, insbesondere zu den verschiedenen Transportmechanismen von GlcS und deren Regulation, erstrebenswert erscheinen.

### 4.2.3 Matrix-Metalloprotease 9

Im Gegensatz zum Einfluss von GlcS auf MMP-3, war eine Hemmung der MMP-9-Expression in MG-63-Zellen nur durch die niedrigste Konzentration von 10 µg/ml GlcS erkennbar. Höhere Konzentrationen von 50 µg/ml und 100 µg/ml GlcS zeigten diesen Effekt nicht und ließen die Expression von MMP-9 nahezu unbeeinflusst. Konnten in den vorangegangenen Untersuchungen an MMP-2 und -3 durchaus eine Kongruenz der MMP-Expression und der tatsächlichen MMP-Proteinmenge in der Zelle festgestellt werden, ließ sich dies für MMP-9 in MG-63-Zellen nicht zeigen. So war zum Zeitpunkt der Untersuchung die Expression von MMP-9 durch 10 µg/ml GlcS deutlich gehemmt, während sich die Proteinmenge im Vergleich zur Kontrolle nahezu unbeeinflusst zeigte. Auch in den anderen Konzentrationen konnten kaum Änderungen der MMP-9-Proteinmenge im Vergleich zu Kontrolle ausgemacht werden.

An dieser Stelle wurde der Vorteil der Verwendung zweier Methoden zur Untersuchung der verschiedenen Ebenen der Proteinbiosynthese deutlich. Auch in den höheren GlcS-Konzentrationen ist zwar ein Trend zur Hemmung der MMP-9-Expression erkennbar, welcher auf Proteinebene allerdings nicht nachvollziehbar ist. Der entscheidende Nachteil der quantitativen real-time PCR, nur eine Momentaufnahme der aktuellen mRNA-Transkription zeigen zu können kam bei dieser Untersuchung deutlich zum Tragen. Durch die Kombination der Methoden wurde dieser Nachteil in dieser Arbeit allerdings ausgeglichen und eine sinnvolle Einordnung der Ergebnisse erleichtert (Garibyan et al. 2013).

Bei der Beurteilung der Ergebnisse ist zu beachten, dass sich eine etwaige Hemmung der Expression im zeitlichen Verlauf noch nicht auf die Translation niedergeschlagen hätte haben können. Mit Verlängerung der Inkubationszeit, wäre eventuell auch eine Hemmung der MMP-9-Proteinmenge zu beobachten gewesen (Bustin 2002). Diese Vermutung kann auch durch Ergebnisse von Lin et al. bestätigt werden, welche für die Hemmung von Matrix-Metalloproteasen in Chondrosarkomzellen mit Glucosaminsulfat eine Inkubationsdauer von 72h wählten (Lin et al. 2008). Vor allem in Zusammenschau der Ergebnisse aus den Untersuchungen der anderen Matrix-Metalloproteasen, konnte aber zumindest für die MMP-9-Expression in MG-63-Zellen ein supprimierender Einfluss durch die geringste GlcS-Konzentration gezeigt werden.

Die Ergebnisse für die Osteosarkomzelllinie SaOs-2 unterstrichen diese Einschätzung: So konnte in SaOs-2-Zellen eine signifikante Hemmung der MMP-9-Expression unter



Einfluss der geringsten GlcS-Konzentration festgestellt werden. Korrespondierend dazu konnte in dieser niedrigsten Konzentration auch eine verringerte MMP-9-Proteinmenge festgestellt werden. Durch die höheren GlcS-Konzentrationen zeigten sich, analog zur Untersuchung von MMP-3, sowohl die MMP-9-Expression, als auch die MMP-9-Proteinmenge, in dieser Zelllinie unbeeinflusst.

Als wichtiger Bestandteil der vorliegenden Arbeit, konnte der Nachweis erbracht werden, dass MMP-9 in den untersuchten Zelllinien überhaupt hemmend beeinflussbar ist. In der Literatur herrscht zur Beeinflussbarkeit von MMP-9 in knochenverwandten malignen Zellen durchaus Uneinigkeit. Durch Roomi et al. konnte eine hemmende MMP-9-Beeinflussung zwar durch verschiedene Substanzen wie zum Beispiel Doxycyclin und Dexamethason gezeigt werden, allerdings verwendete diese Arbeitsgruppe die Osteosarkomzelllinie U2OS. Hinzu kommt, dass der Einfluss auf die MMP-9-Expression im Ungewissen blieb, da ausschließlich die MMP-Aktivität mittels Zymographie untersucht wurde (Roomi et al. 2014). Im selben Zelltyp konnte durch Cho et al. ebenfalls eine Hemmung von MMP-9 gezeigt werden. Dies erreichten sie sowohl transkriptional, also auch translational, durch Disulfiram, einem Arzneimittel, welches zur Entwöhnung bei Alkoholabhängigkeit angewendet wird (Cho et al. 2007). Bei deren Versuchen zeigte sich die MMP-9-Hemmung jedoch deutlich auf Kosten der Zellviabilität. Diesen Parameter blieben Roomi et al. schuldig, sodass deren Ergebnisse nicht unproblematisch einzuordnen sind. So musste offen bleiben, ob der jeweilige Einfluss der entsprechenden Substanz nur auf die Matrix-Metalloprotease-9 Einfluss ausübte, oder allgemein, durch Hemmung zellulärer Vorgänge beziehungsweise Toxizität der jeweiligen Substanz für die Zelle andere Regulationsmechanismen veränderte und auf diese Weise die MMP-9-Aktivität beeinflusst wurde. Ein Problem, welches insbesondere beim Versuch MMP-9-Hemmstoffe zu entwickeln, in der Vergangenheit bei vielen Arbeitsgruppen zu beobachten war (Marshall et al. 2015). In ähnlichem Versuchsaufbau wie in der vorliegenden Arbeit, untersuchten Uitterlinden et al. unter Ausschluss jeglicher Toxizität für die Zellen, den Einfluss von Glucosamin auf Chondrozyten aus arthrotischen Gelenken. Sie konnten in den verwendeten Glucosamin-Konzentrationen keinen hemmenden Effekt auf die Expression von MMP-9 feststellen, während wie oben bereits beschrieben, MMP-3 signifikant gehemmt wurde (Uitterlinden et al. 2006). An die Vielfalt der bereits erwähnten Studien bezüglich der Beeinflussung von MMP-9 anknüpfend, sollte erneut die Arbeit um Rajapakse et al.

Erwähnung finden. Diese Arbeitsgruppe stellte eine signifikante dosis-abhängige Hemmung von MMP-9 durch Glucosamin in Fibrosarkomzellen fest. So stimmen deren Ergebnisse mit der eigenen Beobachtung insofern überein, dass eine Hemmung von MMP-9 durch GlcS auch in Osteosarkomzellen zumindest vom Typ SaOs-2 durchaus möglich ist (Rajapakse et al. 2007). Allerdings konnte in den eigenen Ergebnissen eine Dosisabhängigkeit nicht beobachtet werden. Darüberhinaus konnte der Einfluss auf MG-63-Zellen letztlich aufgrund der fehlenden Signifikanz nicht vollständig aufgeklärt werden.

Auffällig ist, dass in oben genannten Studien, die eine starke Hemmung von MMP-9 zeigten, zuvor eine Stimulation mit PMA stattgefunden hatte. So wurde in diesen Arbeiten von einem künstlich erhöhtem Basislevel von MMP-9 ausgegangen und womöglich beeinflussende Effekte von beispielsweise Glucosamin auf die sensible Regulation der MMP-9-Expression verzerrt (Vandooren et al. 2013). Unter Bezugnahme auf die im vorigen Absatz diskutierten Punkte zur Aufnahme und Verarbeitung von GlcS in den Zellen, wurden womöglich erst durch die künstliche Hochregulation von MMP-9 durch PMA eventuell auch Mechanismen wie zum Beispiel der GLUT1-Transporter oder spezielle Transportregelkreise so beeinflusst, mehr Glucosaminsulfat in die Zelle zu transportieren um dann eine effektivere Hemmung von MMP-9 zu suggerieren (Lu et al. 2008, Lin et al. 2008). Für eine eventuelle Sättigung von Transportmechanismen spräche, dass die Hemmung sowohl in SaOs-2-, als auch MG-63-Zellen für MMP-9 übereinstimmend bei niedrigster GlcS-Konzentration am größten war. Die Komplexität der Regulation von Matrix-Metalloproteasen im Allgemeinen und der von MMP-9 im Speziellen, macht das Verständnis über die Einflussnahme auf diese Mechanismen schwierig. Rajapakse et al. konnten *in vitro* einen hemmenden Einfluss von Glucosamin auf NFκB nachweisen und erklärten damit auch die Hemmung von MMP-9 in Fibrosarkomzellen HT1080 (Rajapakse et al. 2007). Auch Kojima et al. konnten mit einem neu entwickelten Polyamid die Bindungsstelle für NFκB blockieren und damit die MMP-9-Expression in SaOs-2-Zellen *in vitro* hemmen (Kojima et al. 2014). So ist die Regulation von MMP-9 über NFκB, ähnlich wie bei MMP-2 und MMP-3, als ein wichtiger Faktor anzunehmen, allerdings als alleiniger Mechanismus eher unwahrscheinlich (Rajapakse et al. 2007, Lin et al. 2008). Weder konnte in dieser Arbeit eine gleich starke Hemmung aller Matrix-Metalloproteasen festgestellt werden, noch sind derart übereinstimmende Ergebnisse in der Literatur zu finden, sodass von vielfältigen

Regulations- und Interaktionsmechanismen, insbesondere bei MMP-9 auszugehen ist. Vandooren et al. machten in einem zusammenfassenden Überblick von Biochemie, Regulation und Wirkung von MMP-9 darauf aufmerksam, dass bis heute nur ein Teil der verschiedenen Regulationsmechanismen verstanden wurden. Als sehr wahrscheinlich gelten mehrere transkriptionale, posttranskriptionale und auf Ebene der microRNA angesiedelte Systeme, welche wiederum durch Cytokine, Hormone und je nach Zellart auch andere Einflüsse reguliert werden. Mit Ergebnissen in der vorliegenden Arbeit vereinbar sind Beobachtungen, wonach es auch für Matrix-Metalloproteasen spezielle posttranskriptionale Regulationsmechanismen gibt (Vandooren et al. 2013).

Wu et al. konnten zeigen, dass auch bereits gebildete mRNA durch RNA-bindende Proteine stabilisiert oder destabilisiert werden kann. Diese RNA kann somit translatiert werden, muss es aber nicht zwangsläufig, sodass eine Detektion von vorhandener mRNA via PCR nicht unbedingt aussagekräftig ist. Vielmehr ist auch der Nachweis des Proteins wichtig, da beide Prozesse zumindest teilweise voneinander unabhängig zu sein scheinen (Wu et al. 2012). Diese Annahme konnten wir in der vorliegenden Arbeit bestätigen. Darüber hinaus zeigten Hieronymus et al., dass spezielle Ribonukleinschutzkomplexe (*mRNP*), maßgeblich an der Weiterverwendung der mRNA beteiligt sind. Von dieser Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass bereits transkribierte mRNA frei im Cytosol der Zelle auftaucht und nicht zwangsläufig translatiert wird, sondern davor weiteren Kontrollmechanismen unterworfen zu sein scheint (Hieronymus et al. 2004). Diese Erkenntnisse bestätigend, konnten Föhling et al. für MMP-9 in Fibrosarkomzellen HT1080 nachweisen, dass sich die MMP-9-Proteinmenge innerhalb kürzester Zeit änderte, ohne dass eine Änderung der mRNA-Menge von MMP-9 beziehungsweise der MMP-9-Expression beobachtet wurde. Somit schienen Translation und Transkription zumindest teilweise beziehungsweise zeitweise voneinander entkoppelt zu sein. Der finale Auslösemechanismus für die Translation des Proteins blieb letztendlich unklar (Föhling et al. 2005). Die Einordnung der eigenen Ergebnisse gelang insofern schlüssig, dass sich in dieser Arbeit für den Einfluss von Glucosaminsulfat auf MMP-9 eben diese Inkongruenz zwischen Genexpression und Translation zeigte. Letztlich stehen sie damit im Einklang mit Ergebnissen der von Vandooren et al. zusammengefassten Untersuchungen (Vandooren et al. 2013). Der hemmende Einfluss von Glucosaminsulfat auf MMP-9, ist zumindest für SaOs-2-Zellen in der eigenen Untersuchung schlüssig gezeigt worden. Aber auch der Trend zur

Herunterregulierung von MMP-9 in MG-63-Zellen mit ausbleibender Wirkung auf die MMP-9-Proteinmenge, kann unter Zusammenschau der oben genannten Publikationen als wichtiges Ergebnis gewertet werden. Unterschiedliche Zellen zeigten verschiedenartige Reaktionen auf GlcS und bedienten sich unter Umständen auch unterschiedlicher Regulationsmechanismen für MMP-9. Dies zeigte sich in mehreren Studien eher als Regel, denn als Ausnahme (Vandooren et al. 2013).

### 4.3 Anregungen und Limitierungen

Nach Abschluss der Arbeiten und Auswertung der Ergebnisse dieser Studie können einzelne Punkte im Aufbau des Projekts besser beurteilt werden. Daraus ergeben sich durchaus Möglichkeiten zur Verbesserung zukünftiger Versuchsansätze.

In dieser Arbeit konnte je Zelllinie eine Stichprobenzahl von  $n=3$  herangezogen werden. So sind die gefundenen Ergebnisse statistisch sicher besser zu beurteilen, wenn diese Probenanzahl erhöht werden würde. So wäre durchaus vorstellbar, dass gezeigte Ergebnis-Trends bei höherer Probenanzahl statistisch signifikant werden würden und so eine andere Beurteilung und Interpretation der gefundenen Daten möglich gewesen wäre.

In Anbetracht neuerer Erkenntnisse bezüglich der Regulation und des Einflusses von verschiedenen Signalwegen auf die MMP-Expression und -Translation, erscheint es sinnvoll, diese noch intensiver zu untersuchen, um in diesem Zusammenhang die Rolle von Glucosaminsulfat besser verstehen zu können.

Trotz unveränderter Expressionswerte für MMP-2, wäre es auch für diese Matrix-Metalloprotease wünschenswert gewesen ein ELISA durchzuführen (Hadler-Olsen et al. 2011). Die Kenntnis der genauen MMP-2-Menge, ließe weitere Rückschlüsse auf dessen Regulation zu, vor allem im Vergleich mit den ELISA-Ergebnissen von MMP-3 und -9.

Zur weiteren Differenzierung des Einflusses von Glucosaminsulfat auf die Aktivität der untersuchten MMPs, wäre eine Zymographie der Zellüberstände und -lysate wünschenswert gewesen (Lisboa et al. 2013, Toth et al. 2012). Die für diese Methode nachweisbaren Konzentrationen an Matrix-Metalloproteasen wurden in unseren Versuchen allerdings nicht erreicht, sodass eine Konzentrierung beziehungsweise eine Sammlung von Material aus verschiedenen Versuchen oder eine künstliche Hochregulation der untersuchten MMPs nötig gewesen wäre. Der wesentlich höhere Zeit- und Personalaufwand, aber vor allem eine mögliche Beeinträchtigung der Ergebnisse durch unvorhersehbare Einflüsse auf die Zelllinien und damit die zu untersuchenden MMPs, standen dieser Methode entgegen (Vandooren et al. 2013).

Bereits in vorigen Abschnitten fand die Dauer der Stimulationsversuche als ein beeinflussender Faktor Erwähnung. Durchaus vorstellbar wäre, dass zum einen eine längere Kultur ohne Glucosaminsulfat, zum anderen aber auch eine längere

Stimulationsperiode, die Ergebnisse verändern könnte, da sich Effekte insbesondere auf transkriptionale Regulationsmechanismen zum Teil erst nach längerer Zeit einstellen könnten (Uitterlinden et al. 2006).

Stromazellen der ECM scheinen maßgeblich an der Bildung von MMP-2, -3 und -9 beteiligt zu sein. So gibt es neue Hinweise darauf, dass Tumorzellen durch bestimmte Signalprozesse Zellen der ECM erst zur Produktion von MMPs anregen und dadurch für ein Vielfaches der tumoreigenen MMP-Bildung verantwortlich zu sein scheinen (Stivarou et al. 2015). Ein Ausbau der vorliegenden Versuche dieser Arbeit, zum Beispiel im Sinne einer Etablierung einer Ko-Kultur von Fibroblasten mit den Osteosarkomzelllinien SaOs-2 und MG-63 wäre durchaus denkbar und könnte weitere Erkenntnisse über die MMP-Produktion im Allgemeinen und deren Hemmbarkeit durch Glucosaminsulfat bringen (Roomi et al. 2009). In einer solchen Ko-Kultur ließe sich weiterführend durch ein Zell-Migrations-Assay das tatsächliche Metastasierungspotenzial und die Invasivität von Zellen messen, aber natürlich auch das Potenzial einer möglichen Hinderung durch Glucosaminsulfat besser beziffern (Lai et al. 2007).

Abschließend wäre unter Ausschöpfung der größtmöglichen methodischen Bandbreite, durchaus eine immun-zytologische Untersuchung der Zellen vorstellbar, um die Mengenverteilung der entsprechenden MMPs in der Zelle sichtbar und semi-quantitativ messbar zu machen (Benassi et al. 2001).

## 4.4 Ausblick

Mit dem wachsenden Verständnis von Tumorerkrankungen wird Matrix-Metalloproteasen zunehmend eine Relevanz bei der Entstehung und Aufrechterhaltung maligner Krankheitsprozesse beigemessen. Vor allem als möglicher pharmakologisch-therapeutischer Angriffspunkt könnten sie zukünftig einen Pfeiler einer modernen Krebstherapie bilden.

Seit den Neunzigerjahren steigt die Zahl der Publikationen zu diesem Thema stetig, vor allem auch weil neue Erkenntnisse und fortschrittliche Methodik das Potenzial der MMP-Forschung erst deutlich haben werden lassen (Vandooren et al. 2013). Insbesondere der katalytische Abschnitt von Matrix-Metalloproteasen rückte früh als

pharmakologische Zielstruktur in den Fokus der Forschung. Damit verbunden war die Hoffnung, durch dessen Hemmung pathologische Prozesse im Körper aufhalten zu können (Radisky et al. 2015). Die Hemmung von MMPs verlief in klinischen Studien allerdings oft frustriert, vor allem auch weil es nicht gelang diese selektiv genug hemmen zu können und sich dadurch das Nebenwirkungsprofil als sehr unvorteilhaft herausstellte (Marshall et al. 2015).

Aktuelle Arbeiten sehen dagegen viel Potenzial in kleineren, selektiveren Hemmstoffen und in der weiteren Untersuchung der nicht-proteolytischen Funktionen, insbesondere von MMP-2, -3 und MMP-9. Mit der Idee der selektiveren Hemmung von MMPs, rücken aktuell antikörperbasierte Therapiemöglichkeiten in den Fokus der MMP-Forschung (Fields 2015, Sela-Passwell et al. 2012). Diese Versuche scheinen sehr vielversprechend zu sein, vor allem weil dadurch auch komplexe nicht-proteolytische Eigenschaften von MMPs als Signalmoleküle erfasst und gehemmt werden könnten (García-Pardo et al. 2015).

Eine weiteres Ziel gegenwärtiger Forschung ist es, die genetischen und epigenetischen Regulationsmechanismen von MMPs besser zu verstehen, um auch auf dieser Ebene im Sinne einer personalisierten, maßgeschneiderten Therapie eingreifen zu können (Chernov et al. 2011, Farias et al. 2012).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass Matrix-Metalloproteasen in Osteosarkomzellen durch Glucosaminsulfat hemmbar beziehungsweise beeinflussbar sind und bilden damit einen wichtigen Schritt auf dem komplexen Weg, Regulation und Interaktion zwischen MMPs und anderen Zellen besser zu verstehen, obwohl offen gelassen werden muss auf welchen Ebenen und in welcher Art und Weise dies geschieht. Gerade die Tatsache, dass Glucosaminsulfat in der Arthrotherapie bereits erfolgreich und praktisch nebenwirkungsfrei angewendet wird, macht den Ansatz, Glucosaminsulfat auch an malignen Zellen anzuwenden, so interessant. Bei jedweden anderen Therapiemöglichkeiten, wie zum Beispiel den oben erwähnten antikörperbasierten Therapieansätzen, sind wesentlich stärkere Nebenwirkungen zu erwarten. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich der größte Effekt bei der niedrigsten Glucosaminsulfatdosis. Untersuchungen um Biggee et al. zeigen, dass entsprechende Blut-Serumlevel bei oraler Substitution von GlcS durchaus erreicht werden können und somit ein adjuvanter klinischer Einsatz zu bestehenden Therapieschemata möglich und sinnvoll erscheint (Biggee et al. 2006).

Allgemein lässt sich sagen, dass in der Erforschung von Matrix-Metalloproteasen, vor allem als therapeutischem Angriffspunkt, sehr viel Potenzial liegt. Es ist davon auszugehen, dass insbesondere bei der Behandlung von malignen Tumorerkrankungen wie zum Beispiel dem Osteosarkom, aber auch bei chronisch entzündlichen Erkrankungen, immer selektivere, eventuell personalisierte Hemmstoffe von Matrix-Metalloproteasen eine sehr große Rolle spielen werden. Glucosamin könnte als freiverkäufliches und gut verträgliches Nahrungsergänzungsmittel, durch seine Eigenschaft die Expression von Matrix-Metalloproteasen zu hemmen, enormes Potenzial für den adjuvanten Einsatz in einer effektiven Krebstherapie bieten.



## 5. Zusammenfassung

Das Osteosarkom ist der häufigste primäre Knochentumor des Menschen, welcher vornehmlich in der Adoleszenz vorkommt. Aktuelle Therapieschemata sehen neben der chirurgischen Tumorresektion eine begleitende chemotherapeutische Behandlung vor. Durch diese teils sehr nebenwirkungsreiche (neo-)adjuvanten Therapiekonzepte kann das Gesamtüberleben der Tumorpatienten deutlich verbessert werden, allerdings haben Osteosarkompatienten insbesondere durch eine frühe (pulmonale) Metastasierung nach wie vor eine unzureichende Prognose. In diesem Zusammenhang scheinen Matrix-Metalloproteasen durch ihren großen Einfluss auf inter- und extrazelluläre Stoffwechselfvorgänge eine bedeutende Rolle zu spielen und sind Gegenstand intensiver wissenschaftlicher Auseinandersetzung, vor allem in Hinblick auf neue zielgerichtete und möglichst nebenwirkungsarme pharmakologisch-therapeutische Ansätze.

Glucosaminsulfat konnte als frei verkäufliches, nahezu nebenwirkungsfreies Nahrungsergänzungsmittel in der Vergangenheit bereits eine Wirkung auf Matrix-Metalloproteasen in verschiedenen Zellarten und im klinischen Einsatz zeigen. Seine Wirkung auf Osteosarkomzellen wurde allerdings bisher nicht beschrieben. In den Zellkulturversuchen der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Glucosaminsulfat auf die Matrix-Metalloproteasen-2, -3 und -9 in zwei etablierten Osteosarkomzelllinien, MG-63 und SaOs-2, *in vitro* untersucht.

Hierzu wurden zunächst Zellen beider Zelllinien für 24 Stunden kultiviert. Am Folgetag wurde das Medium durch frisches Medium mit verschiedenen Glucosaminsulfat-Konzentrationen von 0 µg/ml (Kontrolle), 10 µg/ml, 50 µg/ml und 100 µg/ml ersetzt und für 42 Stunden inkubiert. Mittels durchgeführtem WST-Zellviabilitätsassay konnte zunächst die Toxizität von Glucosaminsulfat auf die untersuchten Zelllinien ausgeschlossen werden. Hiernach erfolgte vergleichend zur unstimulierten Kontrolle die Ermittlung der relativen Genexpression von MMP-2, -3 und -9 mittels real-time PCR und die Bestimmung der Proteinmengen von MMP-3 und -9 unter Anwendung eines ELISA.

In beiden Zelllinien zeigte sich im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle die Genexpression von MMP-3 durch 10 µg/ml Glucosaminsulfat signifikant gehemmt. In den höheren Dosierungen von 50 µg/ml und 100 µg/ml GlcS konnte in MG-63-Zellen ebenfalls eine signifikante Hemmung nachgewiesen werden, während in der SaOs-2-Zelllinie bei einem Trend zur Hemmung die Signifikanz ausblieb. Ebenfalls in niedrigster GlcS-Konzentration (10 µg/ml) konnte in SaOs-2-Zellen eine deutliche Hemmung der Genexpression der Matrix-Metalloprotease-9 festgestellt werden, wohingegen in MG-63-Zellen durch diese Dosierung lediglich die Tendenz zur Hemmung beobachtet wurde. Steigende Glucosaminsulfat-Konzentrationen vermochten keinen Einfluss auf die MMP-9-Expression in beiden Zelllinien zu haben. Ähnlich hierzu verhielt sich die MMP-2-Expression in beiden Zelllinien, welche sich durch alle GlcS-Konzentrationen nahezu unbeeinflusst zeigte. Der Einfluss von Glucosaminsulfat auf die Proteinexpression erbrachte ähnliche Ergebnisse. Während bei einer GlcS-Konzentration von 10 µg/ml in SaOs-2-Zellen sowohl bei MMP-3 als auch MMP-9 ein deutlicher Trend zur Hemmung nachweisbar war, konnte dies in MG-63-Zellen nur bei MMP-3 gezeigt werden.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit erstmals gezeigt werden, dass Glucosaminsulfat die Gen- und Proteinexpression von Matrix-Metalloproteasen in Osteosarkomzellen *in vitro* hemmt ohne dabei toxisch auf die Zellen zu wirken.

Klinisch eingesetzt böte Glucosaminsulfat als frei verfügbares, sicheres und gut verträgliches Therapeutikum somit durchaus Potenzial die primäre Osteosarkomtherapie sinnvoll zu ergänzen und das Risiko der prognoselimitierenden (pulmonalen) Metastasierung zu minimieren. Weitergehende Untersuchungen *in vitro* und in präklinischen Modellen erscheinen vor diesem Hintergrund wünschens- und erstrebenswert.

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Häufigkeitsverteilung des OS beim Menschen.....	2
Abbildung 2: Röntgenbild des rechten Kniegelenks mit OS in „loco tipico“.....	2
Abbildung 3: Röntgenbild des Femur eines Osteosarkompatienten.....	3
Abbildung 4: Tumorchirurgische Resektionsränder von Knochentumoren.....	5
Abbildung 5: 5-Jahres-gesamtüberlebensrate von Osteosarkom-patienten.....	6
Abbildung 6: Schematischer Aufbau der Matrix-Metalloproteasen.....	9
Abbildung 7: Schemazeichnung von MMP-9.....	11
Abbildung 8: Schemazeichnung einer 6er-Well-Platte mit Stimulationsansatz.....	19
Abbildung 9: Schemazeichnung eines Sandwich-ELISA.....	35
Abbildung 10: Nativmikroskopie von MG-63-Zellen.....	42
Abbildung 11: Nativmikroskopie von SaOs-2-Zellen.....	42
Abbildung 12: Zellviabilität von MG-63-Zellen.....	43
Abbildung 13: Zellviabilität von SaOs-2-Zellen.....	44
Abbildung 14: Exemplarische Zymographie für MMP-9 in SaOs-2-Zellen.....	45
Abbildung 15: relative MMP-2-Expression in MG-63-Zellen.....	46
Abbildung 16: relative MMP-2-Expression in SaOs-2-Zellen.....	47
Abbildung 17: relative MMP-3-Expression in MG-63-Zellen.....	48
Abbildung 18: relative MMP-3-Expression in SaOs-2-Zellen.....	49
Abbildung 19: relative MMP9-Expression in MG-63-Zellen.....	50
Abbildung 20: relative MMP-9-Expression in SaOs-2-Zellen.....	51
Abbildung 21: MMP-3-Proteinmenge in MG-63-Zellen.....	52
Abbildung 22: MMP-3-Proteinmenge in SaOs-2-Zellen.....	53
Abbildung 23: MMP-9-Proteinmenge in MG-63-Zellen.....	54
Abbildung 24: MMP-9-Proteinmenge in SaOs-2-Zellen.....	55

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Abkürzungen.....	III
Tabelle 2: Zusammensetzung des Kulturmediums .....	16
Tabelle 3: Zusammensetzung des Stimulationsmediums .....	19
Tabelle 4: Pipettierschema für die cDNA-Synthese .....	25
Tabelle 5: Mastermix für die cDNA-Synthese.....	26
Tabelle 6: Reaktionsansatz zur reversen Transkription .....	27
Tabelle 7: PCR-Reaktionsansatz für 2 µg cDNA pro Well.....	29
Tabelle 8: Reaktionsschritte der qPCR.....	30
Tabelle 9: Verdünnungsreihe für die quantitative Proteinbestimmung.....	32
Tabelle 10: Zusammensetzung der Zymographie-Puffer .....	34
Tabelle 11: Verdünnungsreihe MMP-3-ELISA.....	36
Tabelle 12: Verdünnungsreihe MMP-9-ELISA.....	36
Tabelle 13: Zusammensetzung des Cell Extraction Buffer .....	38
Tabelle 14: Primerauswahl für die quantitative real-time PCR .....	38
Tabelle 15: Verwendete Reagenzien und Kits .....	40
Tabelle 16: Verwendete Verbrauchsmaterialien .....	40
Tabelle 17: Verwendete Geräte und Software.....	41

## Literaturverzeichnis

Allison, D. C., S. C. Carney, E. R. Ahlmann, A. Hendifar, S. Chawla, A. Fedenko, C. Angeles and L. R. Menendez (2012). "A meta-analysis of osteosarcoma outcomes in the modern medical era." *Sarcoma* **2012**: 704872.

Alyas, F., S. L. James, A. M. Davies and A. Saifuddin (2007). "The role of MR imaging in the diagnostic characterisation of appendicular bone tumours and tumour-like conditions." *European Radiology* **17**(10): 2675-2686.

Anderson, J. W., R. J. Nicolosi and J. F. Borzelleca (2005). "Glucosamine effects in humans: a review of effects on glucose metabolism, side effects, safety considerations and efficacy." *Food Chem Toxicol* **43**(2): 187-201.

Bacci, G., A. Longhi, M. Versari, M. Mercuri, A. Briccoli and P. Picci (2006). "Prognostic factors for osteosarcoma of the extremity treated with neoadjuvant chemotherapy." *Cancer* **106**(5): 1154-1161.

Benassi, M. S., G. Gamberi, G. Magagnoli, L. Molendini, P. Ragazzini, M. Merli, F. Chiesa, A. Balladelli, M. Manfrini, F. Bertoni, M. Mercuri and P. Picci (2001). "Metalloproteinase expression and prognosis in soft tissue sarcomas." *Ann Oncol* **12**(1): 75-80.

Berenbaum, F. (2013). "Osteoarthritis as an inflammatory disease (osteoarthritis is not osteoarthrosis!)." *Osteoarthritis Cartilage* **21**(1): 16-21.

Berridge, M. V. and A. S. Tan (1998). "Trans-plasma membrane electron transport: A cellular assay for NADH- and NADPH-oxidase based on extracellular, superoxide-mediated reduction of the sulfonated tetrazolium salt WST-1." *Protoplasma* **205**(1-4): 74-82.

Bielack, S., D. Carrle, P. G. Casali and E. G. W. Group (2009). "Osteosarcoma: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up." *Ann Oncol* **20**(Suppl 4): 137-139.

Bielack, S., H. Jürgens, G. Jundt, M. Kevric, T. Kühne, P. Reichardt, A. Zoubek, M. Werner, W. Winkelmann and R. Kotz (2010). *Osteosarcoma: The COSS Experience. Pediatric and Adolescent Osteosarcoma*. N. Jaffe, O. S. Bruland and S. Bielack, Springer US. **152**: 289-308.

Biggee, B. A., C. M. Blinn, T. E. McAlindon, M. Nuite and J. E. Silbert (2006). "Low levels of human serum glucosamine after ingestion of glucosamine sulphate relative to capability for peripheral effectiveness." *Ann Rheum Dis* **65**(2): 222-226.

Billiau, A., V. G. Edy, H. Heremans, J. Van Damme, J. Desmyter, J. A. Georgiades and P. De Somer (1977). "Human interferon: mass production in a newly established cell line, MG-63." *Antimicrob Agents Chemother* **12**(1): 11-15.

Biondi, M. L., O. Turri, S. Leviti, R. Seminati, F. Cecchini, M. Bernini, G. Ghilardi and E. Guagnellini (2000). "MMP1 and MMP3 Polymorphisms in Promoter Regions and Cancer." *Clin Chem* **46**(12): 2023-2024.

Bjornland, K., K. Flatmark, S. Pettersen, A. O. Aasen, O. Fodstad and G. M. Maelandsmo (2005). "Matrix metalloproteinases participate in osteosarcoma invasion." *J Surg Res* **127**(2): 151-156.

Bond, M. R. and J. A. Hanover (2015). "A little sugar goes a long way: The cell biology of O-GlcNAc." *J Cell Biol* **208**(7): 869-880.

Boonham, N., J. Kreuze, S. Winter, R. van der Vlugt, J. Bergervoet, J. Tomlinson and R. Mumford (2014). "Methods in virus diagnostics: from ELISA to next generation sequencing." *Virus Res* **186**: 20-31.

Broders, A., R. Hargrave and H. Meyerding (1939). "Pathologic features of soft tissue fibrosarcoma." *Surg Gynecol Obstet* **69**: 267-280.

Bruland, O. S., H. Hoifodt, G. Saeter, S. Smeland and O. Fodstad (2005). "Hematogenous micrometastases in osteosarcoma patients." *Clin Cancer Res* **11**(13): 4666-4673.

Bustin, S. (2002). "Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems." *J Mol Endocrinol* **29**(1): 23-39.

Campanacci, M. (1999). *Bone and soft tissue tumors clinical features, imaging, pathology and treatment*. Wien: Springer, 468-494.

Capes-Davis, A., G. Theodosopoulos, I. Atkin, H. G. Drexler, A. Kohara, R. A. MacLeod, J. R. Masters, Y. Nakamura, Y. A. Reid, R. R. Reddel and R. I. Freshney (2010). "Check your cultures! A list of cross-contaminated or misidentified cell lines." *Int J Cancer* **127**(1): 1-8.

- Cardullo, R. A., S. Agrawal, C. Flores, P. C. Zamecnik and D. E. Wolf (1988). "Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer." *Proc Natl Acad Sci USA* **85**(23): 8790-8794.
- Chang, W. J., Y. Du, X. Zhao, L. Y. Ma and G. W. Cao (2014). "Inflammation-related factors predicting prognosis of gastric cancer." *World J Gastroenterol* **20**(16): 4586-4596.
- Chernov, A. V. and A. Y. Strongin (2011). "Epigenetic regulation of matrix metalloproteinases and their collagen substrates in cancer." *Biomol concepts* **2**(3): 135-147.
- Chesnokov, V., B. Gong, C. Sun and K. Itakura (2014). "Anti-cancer activity of glucosamine through inhibition of N-linked glycosylation." *Cancer Cell Int* **14**: 45.
- Chintala, S. K. and J. S. Rao (1999). "Matrix metalloproteinases: Regulation and biological functions." *Proc Indian Acad Sci (Chemical Sciences)* **111**(1): 263-273.
- Cho, H. J., T. S. Lee, J. B. Park, K. K. Park, J. Y. Choe, D. I. Sin, Y. Y. Park, Y. S. Moon, K. G. Lee, J. H. Yeo, S. M. Han, Y. S. Cho, M. R. Choi, N. G. Park, Y. S. Lee and Y. C. Chang (2007). "Disulfiram suppresses invasive ability of osteosarcoma cells via the inhibition of MMP-2 and MMP-9 expression." *J Biochem Mol Biol* **40**(6): 1069-1076.
- Chomczynski, P. and N. Sacchi (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." *Anal Biochem* **162**(1): 156-159.
- Czekanska, E. M., M. J. Stoddart, R. G. Richards and J. S. Hayes (2012). "In search of an osteoblast cell model for in vitro research." *Eur Cell Mater* **24**: 1-17.
- D'Ambrosio, E., B. Casa, R. Bompani, G. Scali and M. Scali (1981). "Glucosamine sulphate: a controlled clinical investigation in arthrosis." *Pharmatherapeutica* **2**: 504-508.
- Dahlin, D. C. (1978). *Bone tumors*  
General aspects and data on 6 221 cases. Springfield, Ill., Thomas.
- Dahlin, D. C. and M. B. Coventry (1967). "Osteogenic sarcoma. A study of six hundred cases." *J Bone Joint Surg Am* **49**(1): 101-110.
- de Bart, A. C., P. H. Quax, C. W. Lowik and J. H. Verheijen (1995). "Regulation of plasminogen activation, matrix metalloproteinases and urokinase-type plasminogen activator-mediated extracellular matrix degradation in human osteosarcoma cell line MG63 by interleukin-1 alpha." *J Bone Miner Res* **10**(9): 1374-1384.

- Deryugina, E. and J. Quigley (2006). "Matrix metalloproteinases and tumor metastasis." *Canc Metastasis Rev* **25**(1): 9-34.
- Dheda, K., J. F. Huggett, S. A. Bustin, M. A. Johnson, G. Rook and A. Zumla (2004). "Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR." *Biotechniques* **37**(1): 112-114, 116, 118-119.
- Dodge, G. R. and S. A. Jimenez (2003). "Glucosamine sulfate modulates the levels of aggrecan and matrix metalloproteinase-3 synthesized by cultured human osteoarthritis articular chondrocytes." *Osteoarth Cartilage* **11**: 424-432.
- Durr, H. R., P. U. Tunn and Y. Bakhshai (2014). "[Surveillance in patients with bone sarcomas. When, how, and for how long?]." *Unfallchirurg* **117**(6): 523-527.
- Egeblad, M. and Z. Werb (2002). "New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression." *Nat Rev Cancer* **2**(3): 161-174.
- Enneking, W. F. and A. Kagan (1975). ""Skip" metastases in osteosarcoma." *Cancer* **36**(6): 2192-2205.
- Enneking, W. F., S. S. Spanier and M. A. Goodman (1980). "A system for the surgical staging of musculoskeletal sarcoma." *Clin Orthop Relat Res* **153**: 106-120.
- Erlemann, R. (2010). "[MRI morphology of bone tumors and tumor-like lesions]." *Radiologe* **50**(1): 61-80.
- Fahling, M., A. Steege, A. Perlewitz, B. Nafz, R. Mrowka, P. B. Persson and B. J. Thiele (2005). "Role of nucleolin in posttranscriptional control of MMP-9 expression." *Biochim Biophys Acta* **1731**(1): 32-40.
- Fan, Z., B. Bau, H. Yang, S. Soeder and T. Aigner (2005). "Freshly isolated osteoarthritic chondrocytes are catabolically more active than normal chondrocytes, but less responsive to catabolic stimulation with interleukin-1 $\beta$ ." *Arthritis Rheum* **52**(1): 136-143.
- Fanjul-Fernández, M., A. R. Folgueras, S. Cabrera and C. López-Otín (2010). "Matrix metalloproteinases: Evolution, gene regulation and functional analysis in mouse models." *BBA-Mol Cell Res* **1803**(1): 3-19.
- Farias, L. C., C. C. Gomes, M. C. Rodrigues, W. H. de Castro, J. C. T. Lacerda, E. F. e Ferreira and R. S. Gomez (2012). "Epigenetic regulation of matrix metalloproteinase expression in ameloblastoma." *BMC Clin Pathol* **12**(1): 1-6.



Farina, A. R. and A. R. Mackay (2014). "Gelatinase B/MMP-9 in Tumour Pathogenesis and Progression." *Cancers* **6**(1): 240-296.

Fazekas de St Groth, S., R. G. Webster and A. Datyner (1963). "Two new staining procedures for quantitative estimation of proteins on electrophoretic strips." *Biochim Biophys Acta* **71**: 377-391.

Fields, G. B. (2015). "New strategies for targeting matrix metalloproteinases." *Matrix Biology* **44-46**: 239-246.

Fogh, J., J. M. Fogh and T. Orfeo (1977). "One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice." *J Natl Cancer Inst* **59**(1): 221-226.

Fogh, J., Trempe G. (1975). "New human tumor cell lines." *Human Tumor Celles in vitro*: 115-159.

Freemont, A., V. Hampson, R. Tilman, P. Goupille, Y. Taiwo and J. Hoyland (1997). "Gene expression of matrix metalloproteinases 1, 3, and 9 by chondrocytes in osteoarthritic human knee articular cartilage is zone and grade specific." *Ann Rheum Dis* **56**(9): 542-549.

Freyschmidt, J., H. Ostertag and G. Jundt (2010). *Knochtumoren mit Kiefertumoren ; Klinik, Radiologie, Pathologie*. Berlin: Springer, 176-181

García-Pardo, A. and G. Opdenakker (2015). "Nonproteolytic functions of matrix metalloproteinases in pathology and insights for the development of novel therapeutic inhibitors." *Metalloproteinases In Medicine* **2**: 19-28.

Garibyan, L. and N. Avashia (2013). "Polymerase Chain Reaction." *J Invest Dermatol* **133**(3): e6.

Geller, D. S. and R. Gorlick (2010). "Osteosarcoma: a review of diagnosis, management, and treatment strategies." *Clin Adv Hematol Oncol* **8**(10): 705-718.

Gialeli, C., A. D. Theocharis and N. K. Karamanos (2011). "Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting." *FEBS Journal* **278**(1): 16-27.

Girouard, S. D., A. C. Laga, M. C. Mihm, R. A. Scolyer, J. F. Thompson, Q. Zhan, H. R. Widlund, C. W. Lee and G. F. Murphy (2012). "SOX2 contributes to melanoma cell invasion." *Lab Invest* **92**(3): 362-370.

Gornall, A. G., C. J. Bardawill and M. M. David (1949). "Determination of serum proteins by means of the biuret reaction." *J Biol Chem* **177**(2): 751-766.

Gouze, J. N., E. Gouze, M. P. Popp, M. L. Bush, E. A. Dacanay, J. D. Kay, P. P. Levings, K. R. Patel, J. P. Saran, R. S. Watson and S. C. Ghivizzani (2006). "Exogenous glucosamine globally protects chondrocytes from the arthritogenic effects of IL-1beta." *Arthritis Res Ther* **8**(6): R173.

Graeser, A.-C., K. Giller, H. Wiegand, L. Barella, C. Boesch Saadatmandi and G. Rimbach (2009). "Synergistic Chondroprotective Effect of  $\alpha$ -Tocopherol, Ascorbic Acid, and Selenium as well as Glucosamine and Chondroitin on Oxidant Induced Cell Death and Inhibition of Matrix Metalloproteinase-3—Studies in Cultured Chondrocytes." *Molecules* **15**(1): 27-39.

Gross, J. and C. M. Lapiere (1962). "Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay." *Proc Natl Acad Sci USA* **48**(6): 1014-1022.

Hadler-Olsen, E., B. Fadnes, I. Sylte, L. Uhlin-Hansen and J.-O. Winberg (2011). "Regulation of matrix metalloproteinase activity in health and disease." *FEBS Journal* **278**(1): 28-45.

Haras, D. and J. P. Amoros (1997). "[Polymerase chain reaction, cold probes and clinical diagnosis]." *Cahiers Santé* **4**(1): 43-52.

Hausser, H. J. and R. E. Brenner (2005). "Phenotypic instability of Saos-2 cells in long-term culture." *Biochem Biophys Res Commun* **333**(1): 216-222.

Hawkes, S. P., H. Li and G. T. Taniguchi (2001). "Zymography and reverse zymography for detecting MMPs, and TIMPs." *Methods Mol Biol* **151**: 399-410.

Hawkins, D. S. and C. A. Arndt (2003). "Pattern of disease recurrence and prognostic factors in patients with osteosarcoma treated with contemporary chemotherapy." *Cancer* **98**(11): 2447-2456.

Hieronymus, H. and P. A. Silver (2004). "A systems view of mRNP biology." *Genes Dev* **18**(23): 2845-2860.

Hilz, F. M., P. Ahrens, S. Grad, M. J. Stoddart, C. Dahmani, F. L. Wilken, M. Sauerschnig, P. Niemeyer, J. Zwingmann, R. Burgkart, R. von Eisenhart-Rothe, N. P. Sudkamp, T. Weyh, A. B. Imhoff, M. Alini and G. M. Salzmann (2014). "Influence of extremely low frequency, low energy electromagnetic fields and combined mechanical stimulation on chondrocytes in 3-D constructs for cartilage tissue engineering." *Bioelectromagnetics* **35**(2): 116-128.

Himmelstein, B. P., N. Asada, M. R. Carlton and M. H. Collins (1998). "Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) expression in childhood osseous osteosarcoma." *Med Pediatr Oncol* **31**(6): 471-474.

Holland, P. M., R. D. Abramson, R. Watson and D. H. Gelfand (1991). "Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase." *Proc Natl Acad Sci USA* **88**(16): 7276-7280.

Huvos, A. G. (1986). "Osteogenic sarcoma of bones and soft tissues in older persons. A clinicopathologic analysis of 117 patients older than 60 years." *Cancer* **57**(7): 1442-1449.

Huvos, A. G., H. Q. Woodard, W. G. Cahan, N. L. Higinbotham, F. W. Stewart, A. Butler and S. S. Bretsky (1985). "Postradiation osteogenic sarcoma of bone and soft tissues. A clinicopathologic study of 66 patients." *Cancer* **55**(6): 1244-1255.

Jackson, M. T., B. Moradi, M. M. Smith, C. J. Jackson and C. B. Little (2014). "Activation of matrix metalloproteinases 2, 9, and 13 by activated protein C in human osteoarthritic cartilage chondrocytes." *Arthritis Rheumatol* **66**(6): 1525-1536.

Jawad, M., M. Cheung, J. Clarke, L. Koniaris and S. Scully (2011). "Osteosarcoma: improvement in survival limited to high-grade patients only." *J Cancer Res Clin Oncol* **137**(4): 597-607.

Kager, L. and S. Bielack (2014). "[Chemotherapeutic concepts for bone sarcomas]." *Unfallchirurg* **117**(6): 517-522.

Kaplan, R. N., R. D. Riba, S. Zacharoulis, A. H. Bramley, L. Vincent, C. Costa, D. D. MacDonald, D. K. Jin, K. Shido, S. A. Kerns, et al. (2005). "VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche." *Nature* **438**(7069): 820-827.

Kaste, S. C., C. B. Pratt, A. M. Cain, D. J. Jones-Wallace and B. N. Rao (1999). "Metastases detected at the time of diagnosis of primary pediatric extremity osteosarcoma at diagnosis." *Cancer* **86**(8): 1602-1608.

Kessenbrock, K., V. Plaks and Z. Werb (2010). "Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment." *Cell* **141**(1): 52-67.

Klein, M. J. and G. P. Siegal (2006). "Osteosarcoma: anatomic and histologic variants." *Am J Clin Pathol* **125**: 555-581.

Kleiner, D. E. and W. G. Stetlerstevenson (1994). "Quantitative Zymography: Detection of Picogram Quantities of Gelatinases." *Anal Biochem* **218**(2): 325-329.

Kojima, T., X. Wang, K. Fujiwara, S. Osaka, Y. Yoshida, E. Osaka, M. Taniguchi, T. Ueno, N. Fukuda, M. Soma, Y. Tokuhashi and H. Nagase (2014). "Inhibition of Human Osteosarcoma Cell Migration and Invasion by a Gene Silencer, Pyrrole-Imidazole Polyamide, Targeted at the Human MMP9 NF- $\kappa$ B Binding Site." *Biol Pharma Bull* **37**(9): 1460-1465.

Kongtharvonskul, J., T. Anothaisintawee, M. McEvoy, J. Attia, P. Woratanarat and A. Thakkinstian (2015). "Efficacy and safety of glucosamine, diacerein, and NSAIDs in osteoarthritis knee: a systematic review and network meta-analysis." *Eur J Med Res* **20**(1): 24.

Korpi, J. T., J. Hagstrom, N. Lehtonen, J. Parkkinen, T. Sorsa, T. Salo and M. Laitinen (2011). "Expression of matrix metalloproteinases-2, -8, -13, -26, and tissue inhibitors of metalloproteinase-1 in human osteosarcoma." *Surg Oncol* **20**(1): e18-22.

Krämer, J. A., R. Gübitz, L. Beck, W. Heindel and V. Vieth (2014). "[Imaging diagnostics of bone sarcomas]." *Unfallchirurg* **117**(6): 491-500.

Kusukawa, J., H. Harada, I. Shima, Y. Sasaguri, T. Kameyama and M. Morimatsu (1996). "The significance of epidermal growth factor receptor and matrix metalloproteinase-3 in squamous cell carcinoma of the oral cavity." *Eur J Cancer B Oral Oncol* **32**(4): 217-221.

Kwok, S. and R. Higuchi (1989). "Avoiding false positives with PCR." *Nature* **339**(6221): 237-238.

Lai, T. J., S. F. Hsu, T. M. Li, H. C. Hsu, J. G. Lin, C. J. Hsu, M. C. Chou, M. C. Lee, S. F. Yang and Y. C. Fong (2007). "Alendronate inhibits cell invasion and MMP-2 secretion in human chondrosarcoma cell line." *Acta Pharmacol Sin* **28**(8): 1231-1235.

Lambert, E., E. Dasse, B. Haye and E. Petitfrere (2004). "TIMPs as multifacial proteins." *Crit Rev Oncol Hematol* **49**(3): 187-198.

Langers, A. M. J., H. W. Verspaget, L. J. A. C. Hawinkels, F. J. G. M. Kubben, W. van Duijn, J. J. van der Reijden, J. C. H. Hardwick, D. W. Hommes and C. F. M. Sier (2012). "MMP-2 and MMP-9 in normal mucosa are independently associated with outcome of colorectal cancer patients." *Br J Cancer* **106**(9): 1495-1498.

Leber, T. M. and F. R. Balkwill (1997). "Zymography: a single-step staining method for quantitation of proteolytic activity on substrate gels." *Anal Biochem* **249**(1): 24-28.

- Leng, S. X., J. E. McElhaney, J. D. Walston, D. Xie, N. S. Fedarko and G. A. Kuchel (2008). "ELISA and multiplex technologies for cytokine measurement in inflammation and aging research." *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **63**(8): 879-884.
- Li, H., K. Zhang, L. H. Liu, Y. Ouyang, J. Bu, H. B. Guo and T. Xiao (2014). "A systematic review of matrix metalloproteinase 9 as a biomarker of survival in patients with osteosarcoma." *Tumour Biol* **35**(6): 5487-5491.
- Lin, Y.-C., Y.-C. Liang, M.-T. Sheu, Y.-C. Lin, M.-S. Hsieh, T.-F. Chen and C.-H. Chen (2008). "Chondroprotective effects of glucosamine involving the p38 MAPK and Akt signaling pathways." *Rheumatol Int* **28**(10): 1009-1016.
- Lisboa, R. A., M. V. Andrade and J. R. Cunha-Melo (2013). "Zimography is an effective method for detection of matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) activity in cultured human fibroblasts." *Acta Cir Bras* **28**(3): 216-220.
- Livak, K., S. J. Flood, J. Marmaro, W. Giusti and K. Deetz (1995). "Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization." *Genome Res* **4**: 357-362.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." *Methods* **25**(4): 402-408.
- Lu, H.-T., Y.-C. Liang, M.-T. Sheu, H.-O. Ho, Y.-T. Lin, M.-S. Hsieh and C.-H. Chen (2008). "Disease-modifying effects of Glucosamine HCl involving regulation of metalloproteinases and chemokines activated by interleukin-1 $\beta$  in human primary synovial fibroblasts." *J Cell Biochem* **104**(1): 38-50.
- Luetke, A., P. A. Meyers, I. Lewis and H. Juergens (2014). "Osteosarcoma treatment – Where do we stand? A state of the art review." *Cancer Treat Rev* **40**(4): 523-532.
- Mackay, I. M., K. E. Arden and A. Nitsche (2002). "Real-time PCR in virology." *Nucleic Acids Res* **30**(6): 1292-1305.
- Marshall, D. C., S. K. Lyman, S. McCauley, M. Kovalenko, R. Spangler, C. Liu, M. Lee, C. O'Sullivan, V. Barry-Hamilton, H. Ghermazien, A. Mikels-Vigdal, C. A. Garcia, B. Jorgensen, A. C. Velayo, R. Wang, J. I. Adamkewicz and V. Smith (2015). "Selective Allosteric Inhibition of MMP9 Is Efficacious in Preclinical Models of Ulcerative Colitis and Colorectal Cancer." *PLoS One* **10**(5): e0127063.
- Mendes, O., H. T. Kim and G. Stoica (2005). "Expression of MMP2, MMP9 and MMP3 in breast cancer brain metastasis in a rat model." *Clin Exp Metastasis* **22**(3): 237-246.

Mendis, E., M. M. Kim, N. Rajapakse and S. K. Kim (2009). "The inhibitory mechanism of a novel cationic glucosamine derivative against MMP-2 and MMP-9 expressions." *Bioorg Med Chem Lett* **19**(10): 2755-2759.

Meyers, P. A. and R. Gorlick (1997). "Osteosarcoma." *Pediatr Clin North Am* **44**(4): 973-989.

Miller, T. T. (2008). "Bone Tumors and Tumorlike Conditions: Analysis with Conventional Radiography." *Radiology* **246**(3): 662-674.

Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn and H. Erlich (1986). "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51**: 263-273.

Murphy, G. and H. Nagase (2008). "Progress in matrix metalloproteinase research." *Mol Aspects Med* **29**(5): 290-308.

Murphy, G. and H. Nagase (2011). "Localizing matrix metalloproteinase activities in the pericellular environment." *FEBS Journal* **278**(1): 2-15.

Nagase, H., R. Visse and G. Murphy (2006). "Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs." *Cardiovasc Res* **69**(3): 562-573.

Nakamura, H., K. Masuko, K. Yudoh, T. Kato, T. Kamada and T. Kawahara (2007). "Effects of glucosamine administration on patients with rheumatoid arthritis." *Rheumatol Int* **27**(3): 213-218.

Nakamura, H., A. Shibakawa, M. Tanaka, T. Kato and K. Nishioka (2004). "Effects of glucosamine hydrochloride on the production of prostaglandin E2, nitric oxide and metalloproteinases by chondrocytes and synoviocytes in osteoarthritis." *Clin Exp Rheumatol* **22**(3): 293-299.

Nissinen, L. and V. M. Kahari (2014). "Matrix metalloproteinases in inflammation." *Biochim Biophys Acta* **1840**(8): 2571-2580.

Parks, W. C., C. L. Wilson and Y. S. Lopez-Boado (2004). "Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity." *Nat Rev Immunol* **4**(8): 617-629.

Pautke, C., M. Schieker, T. Tischer, A. Kolk, P. Neth, W. Mutschler and S. Milz (2004). "Characterization of osteosarcoma cell lines MG-63, Saos-2 and U-2 OS in comparison to human osteoblasts." *Anticancer Res* **24**(6): 3743-3748.

Picci, P. (2007). "Osteosarcoma (osteogenic sarcoma)." *Orphanet J Rare Dis* **2**: 6.

- Price, C. H. (1955). "Osteogenic sarcoma; an analysis of the age and sex incidence." *Br J Cancer* **9**(4): 558-574.
- Quastel, J. H. and A. Cantero (1953). "Inhibition of Tumour Growth by D-Glucosamine." *Nature* **171**(4345): 252-254.
- Ra, H.-J. and W. C. Parks (2007). "Control of Matrix Metalloproteinase Catalytic Activity." *Matrix Biol* **26**(8): 587-596.
- Radisky, E. S. and D. C. Radisky (2015). "Matrix metalloproteinases as breast cancer drivers and therapeutic targets." *Front Biosci* **20**: 1144-1163.
- Rajapakse, N., E. Mendis, M. M. Kim and S. K. Kim (2007). "Sulfated glucosamine inhibits MMP-2 and MMP-9 expressions in human fibrosarcoma cells." *Bioorg Med Chem* **15**(14): 4891-4896.
- Rechl, H., C. Kirchhoff, K. Wörtler, U. Lenze, A. Töpfer and R. Eisenhart-Rothe (2011). "Diagnostik von malignen Knochen- und Weichteiltumoren." *Der Orthopäde* **40**(10): 931-944.
- Reginster, J. Y., R. Deroisy, L. C. Rovati, R. L. Lee, E. Lejeune, O. Bruyere, G. Giacobelli, Y. Henrotin, J. E. Dacre and C. Gossett (2001). "Long-term effects of glucosamine sulphate on osteoarthritis progression: a randomised, placebo-controlled clinical trial." *Lancet* **357**(9252): 251-256.
- Rommelink, M., C. Decaestecker, F. Darro, D. Goldschmidt, M. Gebhart, J.-L. Pasteels, R. Kiss and I. Salmon (1998). "The in vitro influence of eight hormones and growth factors on the proliferation of eight sarcoma cell lines." *J Cancer Res Clin Oncol* **124**(3-4): 155-164.
- Rohani, M. G. and W. C. Parks (2015). "Matrix remodeling by MMPs during wound repair." *Matrix Biology* **44-46**(0): 113-121.
- Roomi, M. W., T. Kalinovsky, M. Rath and A. Niedzwiecki (2014). "In vitro modulation of MMP-2 and MMP-9 in pediatric human sarcoma cell lines by cytokines, inducers and inhibitors." *Int J Oncol* **44**(1): 27-34.
- Roomi, M. W., J. C. Monterrey, T. Kalinovsky, M. Rath and A. Niedzwiecki (2009). "Patterns of MMP-2 and MMP-9 expression in human cancer cell lines." *Oncol Rep* **21**(5): 1323-1333.
- Saiki, R. K., S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich and N. Arnheim (1985). "Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia." *Science* **230**(4732): 1350-1354.

- Salazar, J., L. Bello, M. Chávez, R. Añez, J. Rojas and V. Bermúdez (2014). "Glucosamine for Osteoarthritis: Biological Effects, Clinical Efficacy, and Safety on Glucose Metabolism." *Arthritis* **2014**: 432463.
- Salzer-Kuntschik, M., G. Dellinger, G. Beron and R. Sigmund (1983). "Morphological grades of regression in osteosarcoma after polychemotherapy - study COSS 80." *J Cancer Res Clin Oncol* **106** (Suppl): 21-24.
- Satia, J. A., A. Littman, C. G. Slatore, J. A. Galanko and E. White (2009). "Associations of herbal and specialty supplements with lung and colorectal cancer risk in the VITamins and Lifestyle study." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **18**(5): 1419-1428.
- Scaglioni, M. F., R. Y. Arzi, E. Gur, O. Ben Amotz, Y. Barnea, Y. Kollender, I. Meller, J. Bickels, S. Dadia and A. Zaretski (2015). "Free fibula reconstruction of distal tibial defects after sarcoma surgery." *Ann Plast Surg* **74**(6): 680-683.
- Schajowicz, F. (1994). *Tumors and Tumorlike Lesions of Bone: Pathology, Radiology, and Treatment*, Springer-Verlag.
- Sela-Passwell, N., R. Kikkeri, O. Dym, H. Rozenberg, R. Margalit, R. Arad-Yellin, M. Eisenstein, O. Brenner, T. Shoham, T. Danon, A. Shanzer and I. Sagi (2012). "Antibodies targeting the catalytic zinc complex of activated matrix metalloproteinases show therapeutic potential." *Nat Med* **18**(1): 143-147.
- Shay, G., C. C. Lynch and B. Fingleton (2015). "Moving targets: Emerging roles for MMPs in cancer progression and metastasis." *Matrix Biology* **44-46**(0): 200-206.
- Smith, P. K., R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson and D. C. Klenk (1985). "Measurement of protein using bicinchoninic acid." *Anal Biochem* **150**(1): 76-85.
- Snoek-van Beurden, P. A. and J. W. Von den Hoff (2005). "Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors." *Biotechniques* **38**(1): 73-83.
- Somerville, R. P., S. A. Oblander and S. S. Apte (2003). "Matrix metalloproteinases: old dogs with new tricks." *Genome Biol* **4**(6): 216.
- Sternlicht, M. D. and Z. Werb (2001). "How matrix metalloproteinases regulate cell behavior." *Annu Rev Cell Dev Biol* **17**: 463-516.
- Stivarou, T. and E. Patsavoudi (2015). "Extracellular molecules involved in cancer cell invasion." *Cancers* **7**(1): 238-265.



- Strauss, S. J., T. Ng, A. Mendoza-Naranjo, J. Whelan and P. H. Sorensen (2010). "Understanding micrometastatic disease and Anoikis resistance in ewing family of tumors and osteosarcoma." *Oncologist* **15**(6): 627-635.
- Taniguchi, S., J. Ryu, M. Seki, T. Sumino, Y. Tokuhashi and M. Esumi (2012). "Long-term oral administration of glucosamine or chondroitin sulfate reduces destruction of cartilage and up-regulation of MMP-3 mRNA in a model of spontaneous osteoarthritis in Hartley guinea pigs." *J Orthop Res* **30**(5): 673-678.
- Teronen, O., P. Heikkila, Y. T. Konttinen, M. Laitinen, T. Salo, R. Hanemaaijer, A. Teronen, P. Maisi and T. Sorsa (2006). "MMP inhibition and downregulation by bisphosphonates." *Ann N Y Acad Sci* **878**(1): 453-465.
- Toth, M., A. Sohail and R. Fridman (2012). Assessment of Gelatinases (MMP-2 and MMP-9) by Gelatin Zymography. *Metastasis Research Protocols*. M. Dwek, S. A. Brooks and U. Schumacher, Humana Press. **878**: 121-135.
- Uchibori, M., Y. Nishida, T. Nagasaka, Y. Yamada, K. Nakanishi and N. Ishiguro (2006). "Increased expression of membrane-type matrix metalloproteinase-1 is correlated with poor prognosis in patients with osteosarcoma." *Int J Oncol* **28**(1): 33-42.
- Uitterlinden, E. J., H. Jahr, J. L. Koevoet, Y. M. Jenniskens, S. M. Bierma-Zeinstra, J. Degroot, J. A. Verhaar, H. Weinans and G. J. van Osch (2006). "Glucosamine decreases expression of anabolic and catabolic genes in human osteoarthritic cartilage explants." *Osteoarthritis Cartilage* **14**(3): 250-257.
- Van Weemen, B. K. and A. H. W. M. Schuurs (1971). "Immunoassay using antigen—enzyme conjugates." *FEBS Lett* **15**(3): 232-236.
- Vandenbroucke, R. E. and C. Libert (2014). "Is there new hope for therapeutic matrix metalloproteinase inhibition?" *Nat Rev Drug Discov* **13**(12): 904-927.
- Vandooren, J., P. E. Van den Steen and G. Opdenakker (2013). "Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9): The next decade." *Crit Rev Biochem Mol Biol* **48**(3): 222-272.
- Vieth, V., J. Krämer, C. Stehling and W. Heindel (2013). "Knochtumoren aus der Sicht des Radiologen." *Der Onkologe* **19**(8): 635-641.
- von Eisenhart-Rothe, R., A. Toepfer, M. Salzmann, J. Schauwecker, H. Gollwitzer and H. Rechl (2011). "[Primary malignant bone tumors]." *Orthopäde* **40**(12): 1121-1142.

Wang, J., Q. Shi, T. X. Yuan, Q. L. Song, Y. Zhang, Q. Wei, L. Zhou, J. Luo, G. Zuo, M. Tang, T. C. He and Y. Weng (2014). "Matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) in osteosarcoma: review and meta-analysis." *Clin Chim Acta* **433**: 225-231.

Weis, S. M. and D. A. Cheresh (2011). "Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets." *Nat Med* **17**(11): 1359-1370.

Wen, X., H. Liu, K. Yu and Y. Liu (2014). "Matrix metalloproteinase 2 expression and survival of patients with osteosarcoma: a meta-analysis." *Tumour Biol* **35**(1): 845-848.

Whelan, J. S., S. S. Bielack, N. Marina, S. Smeland, G. Jovic, J. M. Hook, M. Krailo, J. Anninga, T. Butterfass-Bahloul, T. Böhling, et al. (2015). "EURAMOS-1, an international randomised study for osteosarcoma: results from pre-randomisation treatment." *Ann Oncol* **26**(2): 407-414.

Wittig, J. C., J. Bickels, D. Priebat, J. Jelinek, K. Kellar-Graney, B. Shmookler and M. M. Malawer (2002). "Osteosarcoma: a multidisciplinary approach to diagnosis and treatment." *Am Fam Physician* **65**(6): 1123-1132.

Woessner, J. F., Jr. (2002). "MMPs and TIMPs--an historical perspective." *Mol Biotechnol* **22**(1): 33-49.

Wu, X. and G. Brewer (2012). "The Regulation of mRNA Stability in Mammalian Cells: 2.0." *Gene* **500**(1): 10-21.

Yalow, R. S. and S. A. Berson (1960). "Immunoassay of endogenous plasma insulin in man." *J Clin Invest* **39**: 1157-1175.

Yaman, E., B. Yalcin, H. Utkan, A. Akbulut and O. Isikdogan (2008). "Prognostic Significance of Serum Matrix Metalloproteinase 9 (MMP-9) Levels in Patients with Sarcomas." *Int J Hematol* **18**(2): 79-84.

Yamashita, C. M., L. Dolgonos, R. L. Zemans, S. K. Young, J. Robertson, N. Briones, T. Suzuki, M. N. Campbell, J. Gauldie, D. C. Radisky, D. W. H. Riches, G. Yu, N. Kaminski, C. A. G. McCulloch and G. P. Downey (2011). "Matrix Metalloproteinase 3 Is a Mediator of Pulmonary Fibrosis." *Am J Pathol* **179**(4): 1733-1745.

Yan, C. and D. D. Boyd (2007). "Regulation of matrix metalloproteinase gene expression." *J Cell Physiol* **211**(1): 19-26.

Zaragoza, C., M. Balbin, C. Lopez-Otin and S. Lamas (2002). "Nitric oxide regulates matrix metalloprotease-13 expression and activity in endothelium." *Kidney Int* **61**(3): 804-808.

Zucker, S., R. M. Lysik, B. I. Dimassimo, H. M. Zarrabi, U. M. Moll, R. Crimson, S. P. Tickle and A. J. Docherty (1995). "Plasma assay of gelatinase B:Tissue inhibitor of metalloproteinase complexes in cancer." *Cancer* **76**(4): 700-708.

Zucker, S., P. Mancuso, B. DiMassimo, R. M. Lysik, C. Conner and C. L. Wu (1994). "Comparison of techniques for measurement of gelatinases/type IV collagenases: enzyme-linked immunoassays versus substrate degradation assays." *Clin Exp Metastasis* **12**(1): 13-23.

## Publikationen

### Posterpräsentation

#### **EMSOS 2014 – 27th Annual Meeting of the European Musculo-Skeletal Oncology Society (E.M.S.O.S.) (21.-23.05.2014 in Wien):**

Glucosamine sulphate reduces the expression of matrixmetalloproteinases as a mediator of invasion in osteosarcoma cells *in vitro*

*Pohlig F, Ulrich J, Lenze U, Schauwecker J, Mühlhofer H, von Eisenhart-Rothe R*

### Wissenschaftlicher Vortrag

#### **Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie (DKOU 2014), am 30.10.2014 in Berlin:**

Glucosaminsulfat reduziert die Matrixmetalloproteinasen-Expression von Osteosarkomzellen *in vitro*

*Ulrich J, Pohlig F, Lenze U, Schauwecker J, Lenze F, von Eisenhart-Rothe R*

### Wissenschaftliche Publikation

#### **BMC Complementary and Alternative Medicine (2016):**

Glucosamine sulfate suppresses the expression of matrix metalloproteinase-3 in osteosarcoma cells *in vitro*

*Pohlig F, Ulrich J, Lenze U, Mühlhofer H, Harrasser N, Suren C, Schauwecker J, Mayer-Kuckuk P, von Eisenhart-Rothe*

## Danksagung

Die vorliegende Dissertation entstand im Labor für Zellkultur der Klinik für Sportorthopädie und Orthopädie des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München. Ich bedanke mich bei Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Rüdiger von Eisenhart-Rothe für die Überlassung des Themas und die finanzielle Ermöglichung dieser Forschungsarbeit.

Ich bedanke mich außerdem bei Herrn Dr. med. Florian Pohlig für die ausgezeichnete und intensive Betreuung und Unterstützung während der laborexperimentellen Versuche, der Erstellung und Publikation dieser Arbeit.

Ganz herzlich bedanke ich mich beim gesamten Team des Labors für Zellkultur für die tolle kollegiale Zusammenarbeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre. Mein ganz besonderer Dank gilt hierbei Frau Jutta Tübel für die außerordentliche Unterstützung bei labortechnischen und wissenschaftlichen Fragen, stets hilfreichen und motivierenden Worten und die anregenden und konstruktiven Diskussionen.

Ich danke in besonderem Maße meinen Eltern, die es mir durch ihre finanzielle und emotionale Unterstützung erst ermöglicht haben, meinen Weg zu gehen und letztlich diese Arbeit zu verwirklichen.

Nicht zuletzt bedanke ich mich bei all meinen Freunden und meiner Familie für ihre Geduld und ihr Verständnis, vor allem aber für die tollen Gespräche und Diskussionen, welche wesentlich zur privaten Entlastung beigetragen haben.

Jörg David Ulrich