

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Fakultät für Medizin

Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie des Klinikums rechts der Isar

# **Der Effekt von Insulin auf primäre humane Osteoblasten *in vitro***

Alexander Tobias Haug

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. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Prof. Dr. Dr. M. van Griensven

2. Prof. Dr. R. von Eisenhart-Rothe

3. Prof. Dr. A. B. Imhoff

Die Dissertation wurde am 18.02.2015 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Humanmedizin am 06.04.2016 angenommen

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>4</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>8</b>
1.1 Die diabetische Knochenkrankheit .....	8
1.2 Knochen .....	10
1.2.1 Knochenfunktion und -aufbau .....	10
1.2.2 Modeling und Remodeling .....	11
1.2.3 Differenzierung der Osteoblasten .....	13
1.2.4 Knochenmatrix.....	16
1.3 Diabetes mellitus.....	19
1.3.1 Epidemiologie .....	19
1.3.2 Folgeerkrankungen des Diabetes mellitus .....	21
1.4 Knochen als endokrines Organ .....	23
1.5 Transforming Growth Factor- $\beta$ .....	24
1.6 Problemstellung .....	27
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>28</b>
2.1 Geräte .....	28
2.2 Verbrauchsmaterial .....	28
2.3 Software .....	29
2.4 Osteoblastenkulturmedium .....	30
2.5 Osteoblastendifferenzierungsmedium .....	31
2.6 Isolierung primärer humaner Osteoblasten.....	32
2.7 Allgemeine Zellkultur .....	34
2.8 Stimulationsexperimente .....	35
2.9 Sulforhodamin-B-Färbung.....	40
2.10 MTT-Zytotoxizitätstest.....	41
2.11 Photometrische Bestimmung der Konzentration der alkalischen Phosphatase ....	42
2.12 Alizarin-Rot-Färbung.....	44
2.13 Von-Kossa-Färbung.....	46
2.14 Isolation von RNA .....	47
2.14.1 RNA-Isolation aus Spongiosa.....	48
2.14.2 RNA-Isolation aus Zellen .....	49
2.14.3 RNA-Isolation.....	50
2.15 Herstellung einer cDNA .....	52
2.16 PCR.....	53
2.17 Statistik .....	55
<b>3 Ergebnisse.....</b>	<b>57</b>

3.1	Messung der TGF- $\beta$ -Serumspiegel von Typ-2-Diabetikern.....	57
3.2	Zytotoxizitätstests .....	58
3.3	TGF- $\beta$ -Synthese.....	58
3.3.1	Insulin-abhängige Synthese der aktiven Form von TGF- $\beta$ .....	58
3.3.2	Insulin-abhängige Synthese der Gesamtmenge von TGF- $\beta$ .....	59
3.3.3	Insulin-abhängige TGF- $\beta$ -Synthese im zeitlichen Verlauf.....	60
3.4	AP-Aktivität.....	63
3.5	Kalzifizierungsversuche.....	65
3.5.1	Alizarin-Rot-Färbungen.....	65
3.5.2	Von-Kossa-Färbungen .....	67
3.6	Genexpressionsanalysen von Osteoblasten <i>in vitro</i> .....	67
3.6.1	Ergebnisse RT-PCR Alkalische Phosphatase <i>in vitro</i> .....	68
3.6.2	Ergebnisse RT-PCR Osteoprotegerin <i>in vitro</i> .....	69
3.6.3	Ergebnisse RT-PCR Osteopontin <i>in vitro</i> .....	70
3.6.4	Ergebnisse RT-PCR Osteonectin <i>in vitro</i> .....	71
3.6.5	Ergebnisse RT-PCR Versican <i>in vitro</i> .....	72
3.6.6	Ergebnisse RT-PCR Biglykan <i>in vitro</i> .....	73
3.6.7	Ergebnisse RT-PCR Fibromodulin <i>in vitro</i> .....	74
3.6.8	Ergebnisse RT-PCR Osteocalcin <i>in vitro</i> .....	75
3.6.9	Ergebnisse RT-PCR RUNX2 <i>in vitro</i> .....	76
3.6.10	Ergebnisse RT-PCR ATF4 <i>in vitro</i> .....	77
3.6.11	Ergebnisse RT-PCR SATB2 <i>in vitro</i> .....	78
3.6.12	Ergebnisse RT-PCR STAT1 <i>in vitro</i> .....	79
3.6.13	Genexpressionsanalysen von Decorin und Fibronectin <i>in vitro</i> .....	80
3.7	Genexpressionsanalysen von Patientenspongiosa .....	80
3.7.1	Ergebnisse RT-PCR Osteoblastendifferenzierungsfaktoren.....	80
3.7.2	Ergebnisse RT-PCR Komponenten der EZM.....	81
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>83</b>
4.1	Interpretation der Effekte von supraphysiologischen Insulinkonzentrationen auf die Osteoblastenfunktion <i>in vitro</i> .....	83
4.2	Interpretation der Genexpressionsanalysen <i>in vitro</i> .....	86
4.3	Interpretation der Genexpressionsanalysen <i>in vivo</i> .....	90
4.4	Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Patienten.....	92
4.5	Therapeutische Chancen und Ausblick.....	93
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>95</b>
<b>6</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>97</b>
	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>98</b>
	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>100</b>

# Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
ALK	Activin Receptor-Like Kinase
AP	Alkalische Phosphatase
ATF4	Activating Transcription Factor 4
BMD	Knochendichte (Bone Mineral Density)
BMI	Body-Mass-Index
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BMU	Basic Multicellular Unit
bp	Basenpaar/e
BSP2	Bone Sialoprotein 2
C	Celsius
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cm	Zentimeter
cm <sup>2</sup>	Quadratcentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
Co-SMAD	Common-Mediator SMAD (small body size mothers against decapentaplegic)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dH <sub>2</sub> O	(destilliertes) Wasser
DM 1/2	Diabetes mellitus Typ 1/2
DM	Diabetes mellitus
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
E	Extinktion
EZM	Extrazelluläre Matrix

---

EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ERK	Extracellular-Signal Regulated Kinase
Esp	Gen der OST-PTP
FoxO1	Forkhead Box O1
g	Gramm bzw. Erdbeschleunigung
HbA1c	glykiertes Hämoglobin A1
HCl	Chlorwasserstoff
HDL	High Density Lipoprotein
HOXA2	Homeobox A2
IGF	Insulin-like Growth Factor
IR	Insulinrezeptor
IRS	Insulin-Rezeptor-Substrat
I-SMAD	Inhibitorisches SMAD
JNK	JUN N-terminal Kinase
kg	Kilogramm
KrdI	Klinikum rechts der Isar
l	Liter
LAP	Latenz-assoziierten Peptid
LDL	Low Density Lipoprotein
LTBP	Latentes TGF- $\beta$ -bindendes Protein
MAPK	Mitogen-activated Protein Kinase
MEM	Minimum Essential Medium
mg	Milligramm
Mg <sup>2+</sup>	Magnesium
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mRNA	messenger RNA
MSC	Mesenchymale Stammzelle
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NaOH	Natriumhydroxid
ng	Nanogramm

nm	Nanometer
nM	Nanomolar
OC	Osteocalcin
OSE	Osteoblast-Specific Element
OST-PTP	Osteotesticular Protein Tyrosine Phosphatase
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PET	Positronenemissionstomografie
phOb	primärer humaner Osteoblast
PI3K	Phosphoinositol-3-Kinase
pNpp	4- Nitrophenylphosphatdisodiumsalzhexahydrat
PTH	Parathormon
PTP1B	Protein Tyrosine Phosphatase 1B
RANK(L)	Receptor Activator of NF-kappa-B (Ligand)
rhTGF- $\beta$	rekombinantes humanes TGF- $\beta$
RNA	Ribonukleinsäure
R-SMAD	Rezeptor-reguliertes SMAD
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase- Polymerase Chain Reaction
RUNX2	Runt Related Transcription Factor 2
S	Svedberg
SATB2	SATB Homeobox 2
SBE-SEAP	SMAD-binding Element- Secreted Alkaline Phosphatase Reporter Gene
SDS	Natriumdodecylsulfat
SLRP	Small Leucine-Rich Proteoglycan
SRB	Sulforhodamin-B
STAT1	Signal Transducer and Activator of Transcription 1
Taq(-Polymerase)	Thermus aquaticus (-Polymerase)
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor beta
TGF $\beta$ RI	TGF- $\beta$ -Rezeptor I
Tris Base	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
T $\beta$ RE	TGF- $\beta$ -responsive Element

---

TβRI/II	TGF-β-Rezeptor I/II
U	Einheiten (Units)
V	Volt
WHO	World Health Organization
WP	Well-Platte
WT	Wildtyp

# 1 Einleitung

## 1.1 Die diabetische Knochenkrankheit

Diabetes mellitus (DM) ist mit einer Reihe von Spätfolgen und Komplikationen assoziiert, welche das Knochengewebe betreffen. Diabetes mellitus Typ 1 (DM 1) verringert das Längenwachstum bei Jugendlichen in der Pubertät [Salerno et al., 1997] und führt zu einer verringerten Knochendichte. Bei Typ-2-Diabetikern kommt es jedoch paradoxerweise zu einer Erhöhung der Knochendichte [Vestergaard, 2007]. Sowohl der Typ-2-Diabetes (DM 2) als auch der DM 1 führen zu einem erhöhten Frakturrisiko [Bonds et al., 2006, de Liefde et al., 2005, Forsen et al., 1999, Ivers et al., 2001, Janghorbani et al., 2006, Nicodemus et al., 2001, Ottenbacher et al., 2002, Schwartz, 2003, Schwartz et al., 2001a, Strotmeyer et al., 2005, Vestergaard, 2007, Vestergaard et al., 2005] und einer verschlechterten Knochenheilung nach Frakturen aufgrund eines verringerten Knochenregenerationspotenzials [Bibbo et al., 2001, Cozen, 1972, Loder, 1988, Retzepi et al., 2010]. Die Gesamtheit dieser pathologischen Veränderungen des diabetischen Knochens werden als „diabetic bone disease“ bezeichnet [Retzepi et al., 2010]. Die Mehrzahl der Autoren bestätigt die Entwicklung von Knochen-spezifischen Veränderungen im Rahmen des DM. Allerdings ist zu erwähnen, dass einige Studien zu abweichenden Ergebnissen gelangen. So finden sich in der Literatur teilweise widersprüchliche Ergebnisse bezüglich der Assoziation von DM 2 und dem Frakturrisiko. Exemplarisch muss hier die „Rotterdam Studie“ [van Daele et al., 1995] genannt werden, welche für diabetische Frauen kein erhöhtes Risiko nicht-vertebraler Frakturen feststellt, wohingegen dies aber in einer weiteren großen Studie festgestellt wurde [Schwartz et al., 2001a]. Dieser Umstand ist vermutlich dem heterogenen Aufbau der verschiedenen Studien geschuldet, sowie der Komplexität der Spätfolgen des DM und deren Berücksichtigung in der Auswertung, sowie der teilweise kleinen Probandenzahl mancher Studien. Die konfundierenden Faktoren, welche die Untersuchung eines Zusammenhangs von DM 2 und einer Frakturwahrscheinlichkeit erschweren, sind u.a. die diabetische Retinopathie, Polyneuropathie und Adipositas.

Typ-1-Diabetiker zeigen eine deutlich niedrigere Knochendichte gegenüber gesunden Probanden. Paradoxerweise zeigt das Knochengewebe von Typ-2-Diabetikern, auch nach Berücksichtigung des Body-Mass-Index (BMI) und des Alters, eine erhöhte Knochendichte



(BMD) [Schwartz et al., 2001b, Vestergaard, 2007]. Dies ist möglicherweise auf die gegensätzlichen Insulinkonzentrationen zurückzuführen, d.h. Hypoinsulinämie bei Typ-1-DM vs. über Jahrzehnte bestehende Hyperinsulinämie bei Typ-2-DM, die sich allmählich zu einem relativen Insulinmangel entwickelt [Retzepi et al., 2010, Thrailkill et al., 2005].

Die Abnahme der Knochendichte bei Typ-1-Diabetikern nimmt aufgrund der verbesserten Therapie der Grunderkrankung und der dadurch deutlich gestiegenen Lebenserwartung an Bedeutung zu. Die ätiopathogenetischen Ursachen liegen wohl in einer Veränderung des Remodelings des Knochengewebes. Dabei kommt es zu einer Verschiebung der Aktivität zu Ungunsten der Osteoblasten, welche im Remodelingprozess für den Wiederaufbau bzw. Umbau des Knochengewebes verantwortlich sind [Krakauer et al., 1995, McCabe, 2007]. Während also die Knochenresorption durch die Osteoklastenpopulation nicht oder nur unwesentlich verändert ist, wird die Aktivität der Osteoblasten gehemmt [Kemink et al., 2000, Olmos et al., 1994, Pedrazzoni et al., 1989]. Tiermodelle mit experimentell induziertem Diabetes untermauern diese Auffassung [Goodman et al., 1984, Horcajada-Molteni et al., 2001, Krakauer et al., 1995, Shires et al., 1981, Verhaeghe et al., 1990].

Zusätzlich zu einer Veränderung der Knochendichte, führt DM zu einer Veränderung der Mikroarchitektur von Knochengewebe. Diese Veränderungen zeichnen sich im Rattenmodell des Streptozotocin-induzierten Diabetes durch eine verschlechterte Vernetzung der Trabekel, erhöhte Porosität und ein niedrigeres Knochenkristall-Knochenmark-Verhältnis aus [Hou et al., 1991, Suzuki et al., 2003]. Weiterhin ist die Kalziumkristall-Synthese und -einlagerung [Einhorn et al., 1988], sowie die Kollageneinlagerung in die Matrix verschlechtert [Spanheimer et al., 1988, Verhaeghe et al., 1994]. Diese Aspekte wirken sich in diabetischen Tiermodellen negativ auf die Belastbarkeit des diabetischen Knochens aus [Dixit et al., 1980, Einhorn et al., 1988].

DM führt zu einer verzögerten Kallusbildung und damit zu einer verlängerten Frakturheilungsdauer [Bibbo et al., 2001, Cozen, 1972, Loder, 1988]. Loder et al. beschreiben eine um 87% verlängerte Frakturheilung bei Diabetikern gegenüber Nicht-Diabetikern [Loder, 1988]. Eine weitere Studie, welche retrospektiv die Heilung und Wundheilungsstörungen von Calcaneusfrakturen untersuchte, zeigte, dass Diabetes mit einem um den Faktor 3,4 erhöhten relativen Risiko für Wundheilungsstörungen gegenüber der gesunden Kontrollgruppe einhergeht. Im Vergleich zu diesen Ergebnissen betrug das relative Risiko für die Entwicklung einer Wundheilungsstörung bei offenen Frakturen 2,8 in dieser Studie [Folk et al., 1999].

Weniger eindeutig sind die Ergebnisse klinischer Studien, welche sich mit dem Erfolg von Implantaten bei Diabetikern befassen. Es wird ein erhöhtes Risiko einer fehlerhaften endoossären Implantation dentaler Implantate beschrieben [Morris et al., 2000, Moy et al., 2005]. Andere Autoren beschreiben aber keinen Zusammenhang zwischen Diabetes und dem Fehlschlagen dentaler Implantationen [Smith et al., 1992]. Präklinische Studien, welche die peri-implantäre Osteointegration im Sinne eines Remodeling-Prozesses untersuchten, stellten einen verschlechterten Knochen-Implantat-Kontakt bei Streptozotocin-induziertem Diabetes im Rattenmodell fest [Giglio et al., 2000, Iyama et al., 1997, Nevins et al., 1998, Siqueira et al., 2003].

## **1.2 Knochen**

### **1.2.1 Knochenfunktion und -aufbau**

Die Knochen sind Bestandteil des muskuloskelettalen Systems, welches die Fortbewegung erlaubt. Dabei müssen Knochen einerseits starr sein, um als Hebel dienen zu können, andererseits elastisch, um die auf das Skelett wirkenden Kräfte abfedern zu können, und möglichst leicht, um eine ökonomische Fortbewegung zu erlauben. Die Elastizität des Knochengewebes erlaubt die Absorption von Energie. Übersteigen die auf den Knochen wirkenden Kräfte die Fähigkeit, sich reversibel zu verformen, so entstehen Mikrobrüche in der Knochenstruktur. Dies ist ein Abwehrmechanismus und verhindert die vollständige Fraktur des Knochens. Die Grundlage für diese Fähigkeiten liegt in der Architektur des Knochens und dessen Zusammensetzung [Seeman, 2008]. So sind die langen Röhrenknochen, wie zum Beispiel das Femur, so konstruiert, dass sie besonders widerstandsfähig gegenüber Biegungs-, Scher- und Zugkräften sind [Zebaze et al., 2007].

Auf molekularer Ebene kann man vereinfachend sagen, dass Kollagen-Typ-I die Hauptkomponente der organischen Knochenmatrix ist. Es ermöglicht die Absorption von Energie. In die organische Matrix wird Kalzium, hauptsächlich in Form von Hydroxyapatit-Kristallen, eingelagert und so die notwendige Steifigkeit erzeugt. Dabei ist das den spezifischen Belastungen des Knochens angepasste Verhältnis von Steifigkeit und der Fähigkeit zur reversiblen Deformation entscheidend für die Funktionen des Knochens. Ist die anorganische Komponente dabei übermäßig hoch, so zeichnet sich dieser Knochen zwar durch besonders hohe Festigkeit aus, allerdings führt die relativ verminderte Fähigkeit zur

Absorption von kinetischer Energie zu einer erhöhten Frakturwahrscheinlichkeit. Dies lässt sich gut an den Auswirkungen der Osteogenesis imperfecta beobachten. Bei dieser Erkrankung kommt es zur autosomal dominanten Vererbung einer Punktmutation des Typ-I-Kollagens. Dieses wird dadurch in seiner Funktion gestört und die Patienten erleiden besonders häufig Knochenbrüche [Bou-Gharios et al., 2008].

Die Organisation der anorganischen und organischen Matrix untereinander ist für die Stabilität des Knochens von entscheidender Rolle. Besonders die Art und Weise wie die Kalzium-Kristalle an die Kollagen-Fibrillen binden, ist von besonderer Bedeutung. Die nicht-kollagenen Bestandteile der organischen Matrix, welche sich interfibrillär anordnen, spielen bei der Organisation der Knochenmatrix ebenfalls eine herausragende Rolle.

Knochengewebe ist außerdem an der Regulation der Homöostase im menschlichen Organismus beteiligt. So dienen die Knochen als Speicher für lebensnotwendige Elemente wie Kalzium, welches in engen Grenzen gehalten werden muss, um das Funktionieren des Organismus auf molekularer Ebene zu erlauben. Weiterhin ist das Knochengewebe an der Regulation des Säure-Basen-Haushalts beteiligt.

Im Kontext dieser Arbeit ist eine Funktion des Knochengewebes von entscheidender Bedeutung: Die Rolle als endokrines Organ. Die genauen Zusammenhänge und molekularen Mechanismen sind noch nicht besonders eingehend erforscht. Allerdings sind gerade im letzten Jahrzehnt zu dieser eher unbekanntem Funktion des Knochengewebes verschiedene Meilensteine der Forschung veröffentlicht worden [Ferron et al., 2010, Hwang et al., 2009, Kanazawa et al., 2011, Lee et al., 2007] (siehe Kapitel 1.4).

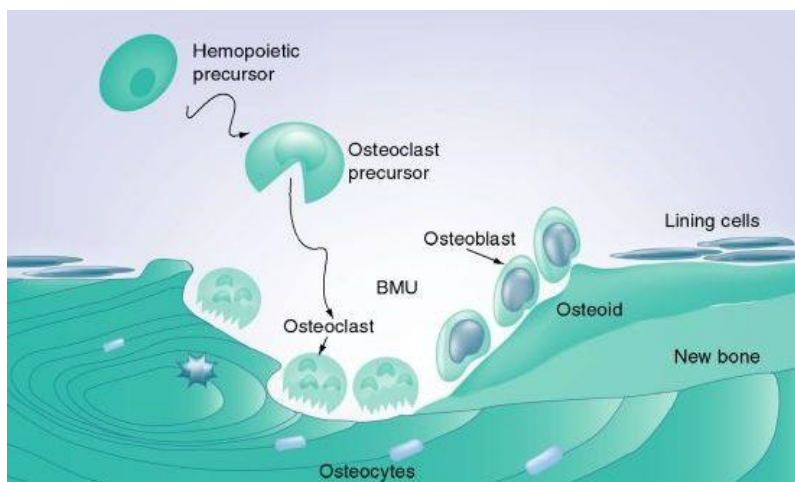
## **1.2.2 Modeling und Remodeling**

Das Knochenmodeling bezeichnet die Knochenbildung. Während das Ziel des Modelings und Remodelings in der Wachstumsphase das Erreichen einer möglichst soliden Knochenstruktur ist, liegt die Aufgabe des Remodelings im Erwachsenenalter hauptsächlich in der Optimierung der Knochenbeanspruchbarkeit, bei gleichzeitiger Minimierung der Knochenmasse. Knochengewebe wird nur dort gebildet wo es gebraucht wird. Es passt sich im Rahmen der genetischen Vorgaben und der Umwelteinflüsse lebenslang durch Umbau den einwirkenden Kräften an [Seeman, 2008]. Die Fähigkeit des Knochens, sich stetig zu erneuern, sich an veränderte Belastungen anzupassen und Schäden in seiner Struktur zu

reparieren, verschlechtert sich, wie viele andere regenerative Prozesse, mit zunehmendem Alter [Seeman, 2009].

In diesem stetigen Umbauprozess stehen sich zwei Zellpopulationen gegenüber, welche über die Zusammenarbeit in funktionellen Einheiten, den sogenannten Basic Multicellular Units (BMUs), dieses Remodeling verwirklichen. Die Speerspitze dieser BMUs sind die Osteoklasten, die knochenspezifischen Makrophagen, welche die Knochensubstanz als ersten Schritt des Remodelings resorbieren (Abbildung 1-1). Dabei werden in die Knochenmatrix eingelagerte Zytokine, wie zum Beispiel Transforming Growth Factor beta (TGF- $\beta$ ), freigesetzt, die eine entscheidende Rolle bei der Steuerung dieses Prozesses spielen.

Im zweiten Schritt des Remodelings bauen die Osteoblasten, von mesenchymalen Stammzellen abstammende knochenspezifische Zellen, die Knochensubstanz wieder auf und organisieren die Knochenmatrix neu (Abbildung 1-1). Dabei sezernieren sie Kollagen-Typ-1, andere wichtige Bestandteile der organischen Matrix und Zytokine, die in die entstehende Knochenmatrix eingelagert werden und in einem neuen Remodelingzyklus wieder freigesetzt werden.



**Abbildung 1-1: Der Aufbau der basic multicellular units (BMU).** [Gogakos et al., 2009]

Osteozyten gehen aus Osteoblasten hervor und sind die letzte Differenzierungsstufe dieser Zellreihe. Im Zuge des Remodelingprozesses „mauern“ sich einige Osteoblasten in die synthetisierte Matrix ein und differenzieren schließlich zu Osteozyten. Die Bereiche in denen sich die Osteozyten befinden, werden als Lakunen bezeichnet (Abbildung 1-1). Diese Zellen sind untereinander durch zahlreiche Zellfortsätze vernetzt. Über diese Verbindungen kommunizieren die Osteozyten miteinander und den Osteoblast Lining Cells des Endosts

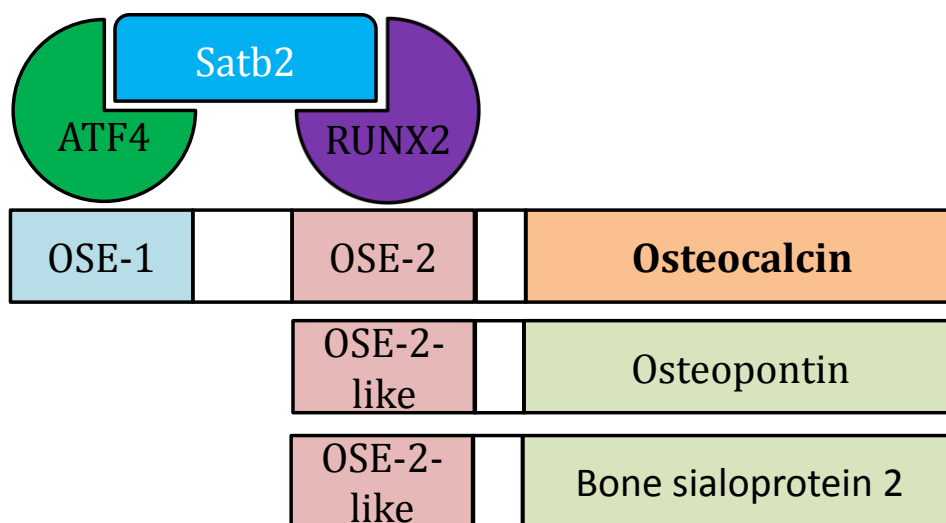
und Periosts. Diese Osteoblast Lining Cells dienen als zelluläre Reserve und von ihnen geht das Remodeling aus. Osteozyten sind an der Aufrechterhaltung der Knochenstabilität beteiligt und dienen als Mechanotransduktoren, d.h. sie wandeln mechanische Reize, die bei Belastung auf den Knochen auftreten, in chemische Reize um und sind damit wichtige Steuerelemente des Modelings und Remodelings [Seeman, 2008]. Dies wird deutlich bei genetischen Funktionseinschränkungen der Osteozyten [Clark et al., 2005, Tatsumi et al., 2007]. Eine zentrale Rolle bei der Induktion des Remodelingvorgangs spielt vermutlich die Apoptose dieses Zelltyps. Der Untergang der Osteozyten führt zur Aktivierung einer Signalkaskade, welches die Osteoklastogenese aktiviert [Clark et al., 2005]. So locken Osteozyten die BMUs zu den Stellen des Knochens, welche Remodeling benötigen.

### 1.2.3 Differenzierung der Osteoblasten

Osteoblasten stammen von mesenchymalen Vorläuferzellen ab. Reife Osteoblasten sind für die Produktion von Knochenmatrix und deren Organisation verantwortlich. Für die Steuerung der Differenzierung zu matrixproduzierenden Osteoblasten ist ein Netzwerk interagierender Transkriptionsfaktoren zuständig. Der zentrale Transkriptionsfaktor in der Regulation dieses Differenzierungsprozesses ist der Runt Related Transcription Factor 2 (**RUNX2**). Dieser wird, aufgrund seiner herausragenden Rolle im osteoblastären Differenzierungsprozess, als „master gene of osteoblast differentiation“ bezeichnet [Schinke et al., 2008]. Ducy et al. identifizierten zuerst das Osteoblast-Specific Element 2 (OSE-2), ein Promotorelement im knochenspezifischen *Osteocalcin-2* [Ducy et al., 1995] und anschließend durch Klonierungs- und Transfektionsexperimente Runx2 als aktivierenden Transkriptionsfaktor dieses Promotorelements in Osteoblasten [Ducy et al., 1997]. OSE-ähnliche Elemente sind auch in den Promotorregionen anderer wichtiger Gene zu finden, wie zum Beispiel *Kollagen-1a1*, *Bone Sialoprotein 2* und *Osteopontin* (Abbildung 1-2). Die Zielgene von RUNX2 sind entscheidende Komponenten der organischen Matrix. Die Wichtigkeit dieses Transkriptionsfaktors in der osteoblastären Differenzierung wird durch die Auswirkungen von Mutationen dieses Gens während der Entwicklung des Organismus deutlich. Die kleidokranielle Dysplasie ist eine autosomal-dominante Erbkrankheit, welche mit Hypoplasie oder Aplasie des Schlüsselbeins, offenliegenden Fontanellen, Kleinwuchs und weiteren skelettalen Veränderungen einhergeht. Die Ursache dieser Erkrankung sind verschiedene Mutationen des *RUNX2* [Mundlos et al., 1997, Otto et al., 1997]. RUNX2 ist nicht nur für die embryonale Entwicklung des Skeletts essenziell, sondern lebenslang an der

Regulation der Osteoblastenfunktion beteiligt. Die gentechnische Verringerung der Expressionsaktivität von *Runx2* durch eine negativ-dominante Form des *Runx2* führt im Mausmodell zur Entwicklung von Osteopenie bei gleichbleibender Osteoblastenzahl. Dies ist durch eine verlangsamte Knochenumbaurate zu erklären und spiegelt die zentrale Rolle von Runx2 in der postnatalen Regulation der Osteoblasten *in vivo* wider [Ducy et al., 1999]. RUNX2 wird selbst durch Transkriptionskontrolle oder durch Interaktion mit anderen Faktoren reguliert.

Activating Transcription Factor 4 (ATF) ist ein Transkriptionsfaktor, der sowohl die Knochenbildung durch Osteoblasten, als auch die Knochenresorption durch Osteoklasten reguliert. Eine Schlüsselfunktion von ATF4 ist die Transkriptionskontrolle von *Osteocalcin*. Die Bindungsstelle für ATF4 in der Promotorregion des *Osteocalcin*, OSE-1, liegt neben der Bindungsstelle für Runx2 (OSE-2) [Ducy et al., 1997]. SATB Homeobox 2 (Satb2) dient hierbei als Adaptermolekül zwischen Atf4 und Runx2. Dieser Komplex ermöglicht die ausreichende *Osteocalcin*-Transkription für die Aufrechterhaltung der Osteoblastenfunktion (Abbildung 1-2). Während die Expression von *Runx2* in der frühen und der frühen späten Phase des Differenzierungsprozesses von Osteoblasten entscheidend ist, ist Atf4 der zentrale Transkriptionsfaktor der letzten Schritte des osteoblastären Differenzierungsprozesses und steuert die Funktion der Osteoblasten [Dobrevá et al., 2006]. Des Weiteren reguliert Atf4 die Synthese von Typ-I-Kollagen, der Hauptkomponente der organischen Knochenmatrix [Yang et al., 2004].



**Abbildung 1-2: Schematische Darstellung der Interaktion der osteoblastären Differenzierungsfaktoren.** Ein weiterer wichtiger Knotenpunkt im transkriptionellen Netzwerk, welches die Skelettentwicklung und osteoblastäre Differenzierung reguliert, ist das oben bereits

erwähnte **Satb2**. Dieses Molekül reguliert mehrere Osteoblasten-spezifische Zielgene. So inhibiert es *Hoxa2*, ein Gen, welches die Knochenbildung inhibiert [Kanzler et al., 1998], und bindet an die zwei wichtigsten Transkriptionsfaktoren der osteoblastären Entwicklung, Atf4 und Runx2. Die Interaktion mit Atf4 und Runx2 führt zu einer erhöhten Aktivität der genannten Bindungspartner von Satb2. Satb2 reguliert durch Bindung an die entsprechenden Promotorelemente die *Bone Sialoproteine* und das *Osteocalcin* auf transkriptioneller Ebene. Dazu bindet es im Fall von *Osteocalcin* nicht direkt an den Promotor, sondern bildet zuerst mit Runx2 einen Transkriptionskomplex [Dobrev et al., 2006]. Die Auswirkungen eines Funktionsverlustes von *SATB2* auf die Entwicklung des Skeletts beim Menschen lassen sich bei Patienten mit Gaumenspalten beobachten. Eine Translokationsmutation von *SATB2* kann zur Entwicklung einer Gaumenspalte führen [FitzPatrick et al., 2003]. Bei Knock-out-Mäusen konnte gezeigt werden, dass die Abwesenheit von *Satb2* die Knochenbildung und Mineralisation verzögert, sowie die Genexpression verschiedener Zielgene dereguliert [Dobrev et al., 2006].

Signal Transducer and Activator of Transcription 1 (**Stat1**) ist ein Transkriptionsfaktor, der im Rahmen der osteoblastären Differenzierung die Translokation von Runx2 in den Nukleus durch Interaktion mit diesem inhibiert. Dies geschieht im Zytoplasma. Bindet Stat1 an Runx2, so führt dies zu einer Konformationsänderung von Runx2. Dadurch könnte die Kernlokalisationssequenz funktionell ausgeschaltet werden und der Transport von Runx2 in den Nukleus somit verhindert werden. Dies führt zu einer verringerten Aktivität des zentralen Transkriptionsfaktors der Differenzierung von Osteoblasten. *Stat1*-Knock-out-Mäuse zeigen eine verstärkte Osteoblastendifferenzierungsrate und eine erhöhte Osteoklastogenese. Dabei überwiegen wohl die Effekte auf die Osteoblasten, sodass es zu einer erhöhten Knochendichte bei diesen Modellen kommt. Weiterhin ist im Kontext dieser Arbeit interessant, dass Bone Morphogenetic Protein 2 (BMP2) die Dissoziation von Runx2 von Stat1 bewirkt [Kim et al., 2003]. Dieser Effekt ist vermutlich auf die Interaktion von Runx2 und den unter BMP2-Stimulation induzierten SMADSs 1/5/8 zurückzuführen. Die Interaktion dieser TGF- $\beta$ /BMP-Signaling-Effektoren mit RUNX2 scheint für die RUNX2-abhängigen Prozesse im Rahmen der osteoblastären Differenzierung von herausragender Bedeutung zu sein [Zhang et al., 2000].

### 1.2.4 Knochenmatrix

Die Matrix des Knochengewebes besteht aus der anorganischen und der organischen Matrix. Die anorganische Matrix besteht zum großen Teil aus Kalzium, welches in Form von Hydroxyapatitkristallen ( $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ ) organisiert ist. Die Funktion der anorganischen Matrix ist es, dem Knochen Steifigkeit zu verleihen. Die organische Matrix besteht aus verschiedenen Proteinen, Proteoglykanen und Glykoproteinen, Zytokinen und Wachstumsfaktoren. Die wichtigste Komponente der organischen Matrix wird vom Typ-I-Kollagen gebildet. Es macht 90% der organischen Matrix aus und verleiht dem Knochen Zugfestigkeit [Horne et al., 2008, Seeman, 2008].

**Kollagen-Typ-I** ist ein fibrillär organisiertes Protein. Die Kollagensynthese wird von verschiedenen Zytokinen, Wachstumsfaktoren und Hormonen reguliert. Eine tragende Rolle spielt hierbei der TGF- $\beta$ -Signalweg. Typ-I-Kollagen wird als Propeptid von den Osteoblasten sezerniert und anschließend durch die Proteasen zum reifen Kollagenprotein geschnitten [Canty et al., 2004]. Hydroxyapatitkristalle lagern sich an die Kollagen-Typ-I-Fibrillen an. Dabei ist für die physiologischen Eigenschaften des Knochengewebes als Stütz- und Fortbewegungsorgan die Organisation dieser Einlagerung entscheidend. Die Aminosäuresequenz der Kollagen-Typ-I-Proteine besteht aus Glycin-X-Y-Wiederholungen. Diese Sequenz führt zur Bildung einer Tripel-Helix, welche aus je 2  $\alpha 1$ -Kollagenketten und einer  $\alpha 2$ -Kollagenkette besteht. Die Anordnung in der Tripel-Helix erfolgt dabei allein durch die Interaktion hydrophober und hydrophiler Aminosäuren. Kollagen-Typ-I-Ketten werden untereinander durch die Lysinoxidase verbunden. Die Quervernetzung trägt wesentlich zur Belastbarkeit des Kollagens und damit des Knochens bei [Bou-Gharios et al., 2008]. Die herausragende Funktion des Typ-I-Kollagens wird ersichtlich anhand einer heterogenen Gruppe von Kollagen-Typ-I-Gendefekten, welche sich klinisch zum Beispiel in Form der Osteogenesis imperfecta manifestieren. Patienten, die unter dieser seltenen genetischen Erkrankung leiden, haben unter normalerweise alltäglichen Beanspruchungen des Skeletts eine stark erhöhte Wahrscheinlichkeit, Knochenbrüche zu erleiden. Es wurden mehr als 150 Mutationen der *Prokollagene  $\alpha 1$*  und  *$\alpha 2$*  beschrieben. Dabei haben Gendefekte, welche zwar normale Mengen, aber strukturell veränderte Kollagenketten zur Folge haben, die größten Auswirkungen auf das klinische Bild der Osteogenesis imperfecta. Dabei ist bemerkenswert, dass selbst Mutationen, die die Bildung einer Tripel-Helix und die Sekretion dieser in die extrazelluläre Matrix (EZM) gestatten, mit einer sehr hohen Frakturneigung einhergehen [Marini et al., 2007]. Die Grundlage der stark reduzierten mechanischen Belastbarkeit des



Knochens sind scheinbar unbedeutende Abweichungen in der Struktur des Typ-I-Kollagens, welche zu einer pathologischen Organisation der Kollagene zueinander und zur restlichen EZM führen.

Die fertigen Kollagen-Typ-I-Fibrillen werden mit Hilfe anderer Proteine, vor allem Proteoglykanen der extrazellulären Matrix, in diese streng organisiert eingelagert. **Versican** ist ein Proteoglykan, das vor allem in sich entwickelndem Knochen von Bedeutung ist. Augenscheinlich reichert sich Versican in den Bereichen an, welche im Prozess der chondralen Ossifikation schließlich zu funktionellem Knochengewebe werden. Versican wird in den frühen Phasen der Osteoidbildung exprimiert und schnell wieder abgebaut. Dabei werden Chondroitinfragmente in der Matrix freigesetzt [Robey et al., 1993]. Im Zusammenhang mit dieser Arbeit ist die Funktion weiterer Proteoglykane im

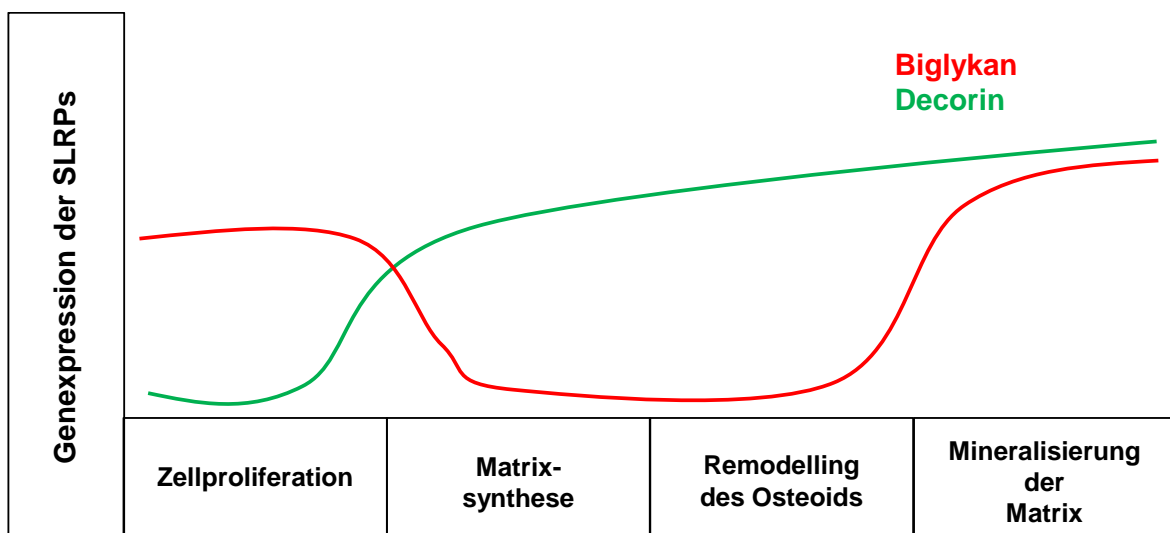


Abbildung 1-3: Phasenabhängige Expression der SLRPs während der Knochenbildung.

Knochengewebe, insbesondere der Small Leucine-Rich Proteoglycans (SLRPs), hervorzuheben. Zu den SLRPs gehören **Decorin** und **Biglykan**, welche sich durch eine Leucin-reiche Aminosäuresequenz in ihrem Proteinkern strukturell sehr ähnlich sind. Diese strukturelle Ähnlichkeit beruht vermutlich auf der Entwicklung aus einem evolutionären Vorläufergen [Fisher et al., 1991]. Diese Proteine werden bereits von Präosteoblasten exprimiert und zeigen ein spezifisches Expressionsmuster im Knochen. Die SLRPs sind in der EZM des Knochens hoch angereichert [Waddington et al., 2003]. Biglykan wird verstärkt in direkter Nähe zu Osteoblasten angetroffen und, im Gegensatz zu Decorin, auch noch von Osteozyten exprimiert [Bianco et al., 1990].

Decorin und Biglykan beeinflussen *in vitro* die Knochenzellendifferenzierung und deren Proliferation. Dabei ist die Expression der SLRPs in der Bildung von Osteoid und dessen

anschließender Mineralisierung phasenabhängig (Abbildung 1-3). Auffällig ist dabei, dass beide Proteine in den frühen Phasen ihrer phasenspezifischen Expression mit Dermatansulfatketten substituiert sind und in den späten Phasen ihrer Expression Chondroitinsulfatketten dominieren. Dies eröffnet die Möglichkeit für die Funktion der SLRPs direkt oder indirekt als Signalmoleküle die Proliferation von Osteoblasten zu regulieren. Es ist bemerkenswert, dass Decorin und Biglykan TGF- $\beta$  binden und dessen Bioaktivität wahrscheinlich maßgeblich beeinflussen. Dabei erhöht die Abspaltung der Glykosaminoglykanketten, Dermatansulfat- oder Chondroitinsulfatketten, die Interaktionswahrscheinlichkeit der SLRPs mit TGF- $\beta$  und damit wohl die Modulation dessen Aktivität in der Knochenmatrix [Hildebrand et al., 1994]. Über diese Interaktion ist eine Regulation der osteoblastären Zellproliferation möglich. Bisher konzentrierten sich die Untersuchungen der Interaktion der SLRPs mit TGF- $\beta$  hauptsächlich auf Decorin, da es durch TGF- $\beta$ -Inhibition bzw. Modulation eine anti-fibrotische Wirkung zeigte [Border et al., 1992, Kolb et al., 2001]. Grundsätzlich ist die genaue Wirkung der Interaktion der SLRPs mit TGF- $\beta$  modellabhängig und hängt wohl stark von den Einflüssen des Microenvironments ab [Waddington et al., 2003]. Exemplarisch konnte *in vitro* bei murinen Osteoblasten-ähnlichen MC3T3-E1 Zellen eine erhöhte Bioaktivität von TGF- $\beta$  nach Interaktion mit Decorin gezeigt werden [Takeuchi et al., 1994].

Die SLRPs interagieren mit Kollagenfibrillen und ermöglichen die Fibrillogenese. Sie beeinflussen entscheidend die Bildung des Typ-I-Kollagen-Netzwerkes und die Einlagerung der Hydroxyapatitkristalle in die entstehende Osteoidmatrix [Waddington et al., 2003]. Decorin und Biglykan können eine hufeisenförmige Struktur annehmen, in der das Innere direkt in Interaktion mit den Kollagenfibrillen treten kann [Weber et al., 1996]. Dabei zeigen glykosylierte Formen der SLRPs höhere Bindungsaffinität zum Kollagen-Typ-I [Schonherr et al., 1995]. Die SLRPs interagieren zudem mit den Hydroxyapatitkristallen und bestimmen deren Bildung, Wachstum, Größe und Aufbau mit [Waddington et al., 2003].

Die Effekte der beiden SLRPs auf das Knochengewebe *in vivo* ließen sich unter anderem am Mausmodell darstellen. *Biglykan*-Knock-out-Mäuse entwickelten, auf Grundlage einer Störung der regelgerechten Kollagen-I-Synthese, eine Osteoporose und erreichten nie die Knochenmasse der unveränderten Wildtyp-Kontrollen [Ameys et al., 2002, Corsi et al., 2002]. Patienten mit Turner-Syndrom, bei denen ein X-Chromosom, und damit auch das auf diesem Chromosom befindliche *Biglykan* fehlt, sind minderwüchsig, wohingegen Patienten

mit einem zusätzlichen X-Chromosom abnorm lange Extremitäten haben (Klinefelter's-Syndrom) [Vetter et al., 1993].

**Osteocalcin** ist ein klassischer Marker der späten osteoblastären Differenzierung und das häufigste nicht-kollagene Protein der Knochenmatrix. Osteocalcin ist maßgeblich an der Regulation der Knochenbildung, der Regulation des Glukosemetabolismus und der Insulinsekretion des Pankreas beteiligt [Lee et al., 2007, Neve et al., 2012].

### **1.3 Diabetes mellitus**

Diabetes mellitus kann als Gruppe von Stoffwechselerkrankungen beschrieben werden, welche als wesentliches Merkmal zu Hyperglykämie führen. Diese kann zum einen auf eine Insulinsekretionsdefizienz, verminderte Insulinwirkung in der Peripherie oder beides zurückzuführen sein. Dabei muss der Diabetes als eine Facette des metabolischen Syndroms gesehen werden. Als metabolisches Syndrom bezeichnet man folgende Symptomkonstellation: Hypertonie, Glukoseintoleranz, erhöhte Low-Density-Lipoprotein-(LDL), Cholesterin und Triglyzeridwerte, gleichzeitig erniedrigte High-Density-Lipoprotein (HDL)-Werte, Adipositas, erhöhte Suszeptibilität für kardiovaskuläre Erkrankungen. Dieses Syndrom entwickelt sich vermutlich auf Grundlage der in der Pathogenese entstehenden peripheren Insulinresistenz [Molitch et al., 2002]. Die chronische Hyperglykämie bei DM 2 führt schließlich zur Schädigung, Funktionsstörungen und zum Versagen verschiedener Organsysteme. Besonders die Augen, Nieren, Nerven, das Herz und die Blutgefäße sind betroffen [Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 2002]. Die wichtigsten und mit Abstand häufigsten Diabetes-Typen sind die Typen 1 und 2. Diese Arbeit befasst sich mit den Auswirkungen des DM 2 auf den Knochen.

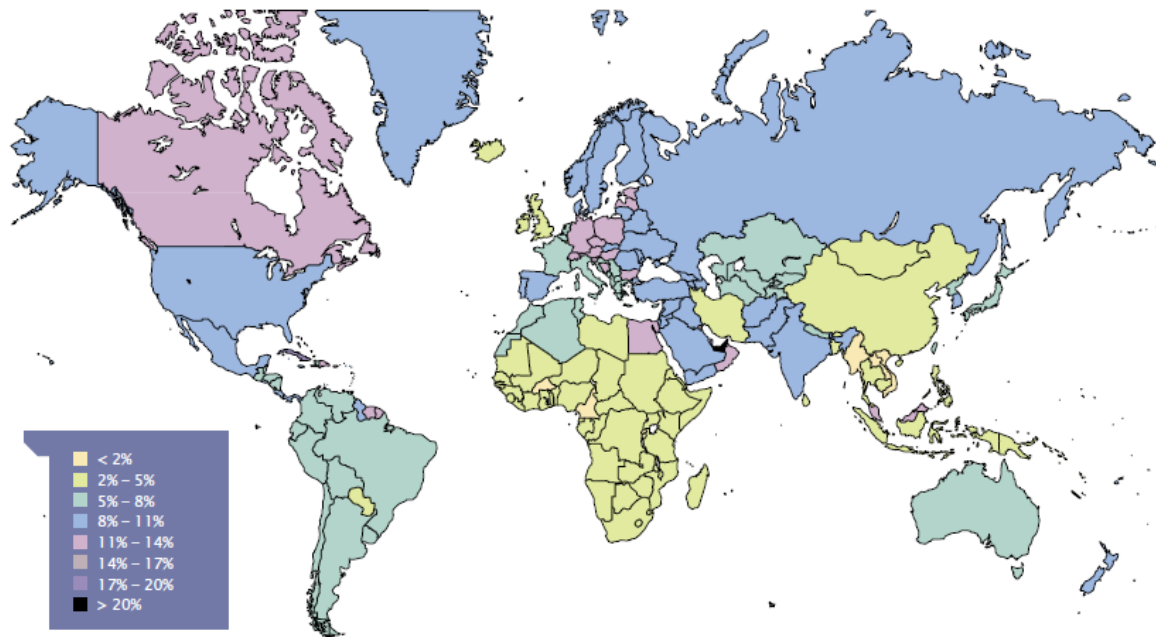
#### **1.3.1 Epidemiologie**

DM ist eine ernstzunehmende Erkrankung mit einer hohen, stetig steigenden Prävalenz [Wild et al., 2004]. Die Gründe dafür sind vielfältig. Zum einen nimmt die Weltbevölkerung stetig zu, gleichzeitig steigt die Lebenserwartung, zum anderen hat sich der Lebensstil in den letzten 200 Jahren mit der Industrialisierung und der damit verbundenen Urbanisierung stark verändert. Die Bewohner der westlichen Industrienationen und zunehmend auch der Rest der Welt sind vermehrt adipös und körperliche Aktivität rückt immer mehr in den

Hintergrund. Verbunden mit der steigenden Prävalenz von DM ist der Anstieg der durch diese chronische Erkrankung bedingten Mortalität weltweit. Ein großes Problem bei der Untersuchung der Mortalität von DM ist, dass die vielfältigen Folgeerkrankungen, welche den Tod des Patienten bedingen können, in vielen Studien nicht der Grunderkrankung DM zugerechnet werden [Fuller et al., 1983, Morrish et al., 2001]. Zu nennen sind hier kardiovaskuläre Erkrankungen, wie die koronare Herzkrankheit, die periphere arterielle Verschlusskrankheit und die diabetische Nephropathie.

Eine realistische Einschätzung der World Health Organization (WHO) für das Jahr 2000 beschreibt eine Mortalität von 7,5 Millionen Diabetikern im Jahr 2000 weltweit. Dabei wurden 4,6 Millionen Tode durch andere, nicht dem Diabetes zurechenbare Ursachen bedingt. 2,9 Millionen Menschen verstarben im Jahr 2000 an den direkten Folgen dieser Erkrankung. Dies sind 5,2% der Gesamtmortalität für das Jahr 2000 weltweit. Die höchsten Mortalitätsraten bedingt durch DM zeigen Nordamerika (8,5%) sowie die arabische Halbinsel (9%) (Abbildung 1-4). Interessant ist weiterhin der Umstand, dass 75% aller Todesfälle von Diabetikern in der Altersgruppe unter 35 Jahren auf den DM zurückzuführen sind und in der Altersgruppe 35-64 noch über 59%. DM belegt nach diesen Einschätzungen den 5. Platz der Todesursachen weltweit nach den Infektionskrankheiten, kardiovaskulären Erkrankungen, Krebserkrankungen und Unfällen. Diese Ergebnisse sind umso erstaunlicher, da es sich um eher konservative Schätzungen handelt [Roglic et al., 2005]. Dynamische Risikofaktoren, wie Adipositas und körperliche Aktivität bzw. Inaktivität, wurden vorsichtshalber als konstant angesehen.

Die Anzahl der Diabetiker wird sich weltweit nach Berechnungen der WHO und der International Diabetes Federation bis 2030 verdoppeln. Das heißt konkret: Nach Angaben der WHO von 171 Millionen Diabetikern im Jahre 2000 auf 366 Millionen im Jahr 2030 [Diabetes Atlas committee, 2003, Wild et al., 2004].



**Abbildung 1-4: Die geschätzte Prävalenz von DM 2 im Jahr 2025 weltweit.** [Diabetes Atlas committee, 2003]

Dabei basieren diese Schätzungen ausschließlich aus dem zu erwartenden demographischen Wandel für diesen Zeitraum. Aspekte, welche die altersbezogene Prävalenz erhöhen, wie die Zunahme von Adipositas, werden nicht berücksichtigt. Dies könnte bedeuten, dass der Anstieg der Prävalenz von DM 2 für die nahe Zukunft deutlich stärker sein wird.

### 1.3.2 Folgeerkrankungen des Diabetes mellitus

Eine klinisch wichtige Folgeerkrankung des DM ist die diabetische Nephropathie. Diabetes ist mittlerweile in Europa und den USA die wichtigste Ursache für die Entwicklung einer terminalen Niereninsuffizienz. Diese Entwicklung hängt mit der steigenden Prävalenz des Diabetes und der längeren Lebenserwartung zusammen. 20-30% aller Typ-1- und Typ-2-Diabetiker entwickeln eine terminale Niereninsuffizienz, wobei Typ-2-Diabetiker weniger gefährdet sind. Die Wahrscheinlichkeit, dass Typ-1-Diabetiker eine terminale Niereninsuffizienz entwickeln, liegt bei > 75% nach 20 Jahren. Das Frühzeichen der Nephropathie ist die Mikroalbuminurie ( $\geq 30$  mg/ Tag). Von einer klinisch manifesten Nephropathie spricht man ab  $\geq 300$  mg Albumin/ Tag. Diese entwickelt sich über einen Zeitraum von 10-15 Jahren und führt unbehandelt zu einer stetigen, aber individuell stark variierenden Abnahme der glomerulären Filtrationsrate. Albuminurie ist weiterhin ein wichtiger Marker für das kardiovaskuläre Risiko von Typ-1- und Typ-2-Diabetikern. Das Risiko eine Niereninsuffizienz zu entwickeln, kann durch adäquate Diabetestherapie stark

verringert werden. Im Vordergrund steht hier die glykämische Kontrolle. Die meisten Diabetespatienten leiden außerdem unter Hypertonie. Im Allgemeinen ist der Diabetes mellitus Typ 1 und 2 mit einem erhöhten Plasmavolumen, erhöhtem peripheren Gefäßwiderstand und niedriger Reninaktivität assoziiert. Während beim Typ-1-Diabetes die diabetische Nephropathie ursächlich für die Entwicklung einer Hypertonie ist, entwickelt sich die Hypertonie bei Typ-2-Diabetikern im Rahmen des metabolischen Syndroms. Eine konsequente antihypertensive Therapie ist in der Lage, den progressiven Abfall der glomerulären Filtrationsrate deutlich zu verzögern. So führt eine adäquate antihypertensive Therapie bei Typ-1-Diabetikern zu einer Abnahme der Mortalität von 94% auf 45% und einer Verringerung der Dialyse bzw. Transplantationspflicht von 73% auf 31% nach 16 Jahren klinisch manifester Nephropathie [Molitch et al., 2002].

Die renale Osteodystrophie ist eine Gruppe metabolischer Knochenkrankheiten, welche bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz auftritt. Dabei kann diese Erkrankung durch einen erhöhten oder zu niedrigem Knochenumsatz gekennzeichnet sein. Die Ursache der renalen Osteodystrophie ist meistens ein sekundärer Parathyreoidismus. Zu den Erkrankungen dieser Krankheitsgruppe mit niedrigem Knochenumsatz zählen die aplastische Knochenkrankheit und die renal bedingte Osteomalazie. Der meist vorhandene sekundäre Hyperparathyreoidismus führt zu erhöhten PTH-Serumspiegeln und zur Erhöhung klassischer Knochenmarker, wie Osteocalcin und dem C-Peptid des Typ-I-Kollagens [Coen et al., 1998]. Die renale Osteodystrophie liefert ein weiteres Beispiel wie DM den Knochen negativ beeinflussen kann. Die renale Osteodystrophie tritt besonders häufig bei diabetischen Dialysepatienten auf [Pei et al., 1993]. Im terminalen Stadium der diabetischen Nephropathie kommt es schließlich zur völligen Niereninsuffizienz. Die einzig verbleibende Therapieoption, welche die Lebensqualität des Patienten verbessern kann, ist die Nierentransplantation. Allerdings wurde gezeigt, dass die lebensverlängernde Nierentransplantation sich negativ auf den Knochen auswirken kann. Patienten mit einer transplantierten Niere haben ein erhöhtes Frakturrisiko [Vautour et al., 2004] und mittels Technetium-PET konnte eine verringerte Osteoblastenaktivität bei Osteodystrophiepatienten nachgewiesen werden [So et al., 1998].

## 1.4 Knochen als endokrines Organ

Eine bislang unterschätzte Funktion des Knochens ist seine Einbindung in systemische Regulationsmechanismen des menschlichen Organismus, insbesondere des Energiestoffwechsels. Dabei scheint das Knochengewebe nicht nur als Informationsempfänger, sondern vor allem als Regulator verschiedener systemisch relevanter Stoffwechselwege zu agieren. Hervorzuheben ist hier die Rolle des Knochens im Insulin- und Glukosemetabolismus.

Osteoblasten verfügen über funktionelle Insulinrezeptoren. *In vitro* stimuliert Insulin unter anderem die Kollagen-Typ-I-Synthese [Kream et al., 1985]. Insulin-Signaling im Osteoblasten dient neben diesen knochen-spezifischen Funktionen vermutlich außerdem als Verbindung zwischen Knochenremodeling und der Regulation des systemischen Glukosemetabolismus. Dies wird durch Osteocalcin ermöglicht, ein von Osteoblasten sezerniertes Protein, welches durch Decarboxylierung aktiviert wird. Diese Decarboxylierung wird durch das durch die Osteoklasten produzierte saure Milieu ermöglicht [Ferron et al., 2010]. In einem Femurfrakturmodell mit diabetischen BB-Wistar-Ratten, welche schnell eine Hypoinsulinämie durch Destruktion der  $\beta$ -Zellen des Pankreas entwickeln, konnte der Einfluss von lokal appliziertem Insulin auf die Frakturheilung gezeigt werden. Dieses Rattenmodell zeichnet sich durch eine enge Homologie zum humanen DM 1 aus. Dabei scheint in diesem Modell Insulin die verschiedenen Phasen der Frakturheilung positiv zu beeinflussen [Gandhi et al., 2005]. Im Mausmodell wirkt Osteocalcin nicht nur lokal auf den Knochen selbst, sondern wirkt als systemisches Hormon. In seinem decarboxylierten Zustand induziert Osteocalcin die Proliferation der  $\beta$ -Zellen des Pankreas, regt diese zur Ausschüttung von Insulin an und erhöht die Insulinsensitivität der Zielorgane des Insulins. Osteocalcin hat in diesem Modell einen Gegenspieler in Form einer der intrazellulären Tyrosinphosphatase Osteotesticular Protein Tyrosine Phosphatase (OST-PTP) [Lee et al., 2007]. Das entsprechende *ESP* ist ein womöglich funktionsloses Pseudogen beim Menschen [Cousin et al., 2004]. Allerdings scheint PTP1B, eine Tyrosinphosphatase des menschlichen Organismus, die Tyrosinkinaseaktivität des Insulinrezeptors im Sinne einer Inhibition zu regulieren. Insulin-Signaling erhöht als positives Feedback die Aktivität des Osteocalcins und beeinflusst so die Glukosehomöostase durch Erhöhung der Knochenresorption durch die Osteoklasten [Ferron et al., 2010]. Bei Mäusen, die defizient für die osteoblastären Insulinrezeptoren sind, wurde die Bedeutung des Insulin-Signalings der Osteoblasten für die systemische Energiehomöostase deutlich. Die Mäuse entwickelten

wenige Wochen post partum eine Hyperglykämie bei einem insuffizienten Insulinerumspiegel und einer pathologischen Glukosetoleranz. Diese Veränderungen waren auf eine verringerte Anzahl der Inselzellen,  $\beta$ -Zellmasse,  $\beta$ -Zellproliferation und eine niedrige intrazelluläre Insulinmenge zurückzuführen. Insulin-Signaling führt durch Herunterregulation des Transkriptionsfaktors *Forkhead Box O1 (FoxO1)* zur funktionellen Inhibition von Osteoprotegerin. Dadurch kommt es zur erhöhten Knochenresorption durch Osteoklasten. Das von den aktivierten Osteoklasten produzierte saure Milieu im Knochen führt wiederum zur Decarboxylierung von Osteocalcin [Ferron et al., 2010]. Zusammenfassend kann man sagen, dass die Osteoblasten Osteocalcin synthetisieren, parakrin sezernieren und die Osteoklasten, durch die Schaffung eines sauren Milieus, die Decarboxylierung, also die Aktivierung dieses Hormons, herbeiführen.

Im menschlichen Organismus scheint Osteocalcin ähnliche Effekte zu haben. Hier korreliert bei Typ-2-Diabetikern der Serumosteocalcinspiegel negativ mit dem Nüchternblutzucker, HbA1c, Stammfettsucht und Insulinresistenz [Kanazawa et al., 2011]. Dies ist vermutlich auf stimulierende Effekte auf die Insulinsekretion des Osteocalcins durch die  $\beta$ -Zellen des Pankreas und eine erhöhte Insulinsensitivität zurückzuführen [Hwang et al., 2009]. Zudem scheint Osteocalcin die Sekretion von Adiponectin zu induzieren [Kanazawa et al., 2009].

## 1.5 Transforming Growth Factor- $\beta$

TGF- $\beta$  ist ein im menschlichen Organismus ubiquitär vorkommendes Zytokin, welches eine entscheidende Rolle von der Embryogenese bis zur Proliferation, Differenzierung und Funktion unterschiedlicher Zelltypen spielt. Es gibt 3 Isoformen dieses Zytokins. Im Knochengewebe ist TGF- $\beta_1$  die vorherrschende Isoform. Da es sowohl Osteoblasten, als auch Osteoklasten beeinflusst, ist TGF- $\beta_1$  direkt an der Steuerung von Knochenresorption und des Remodelings beteiligt [Janssens et al., 2005]. TGF- $\beta$  ist der Namensgeber einer umfassenden Superfamilie von Zytokinen [Massague, 1990]. Die Hauptquellen von TGF- $\beta_1$  sind die Thrombozyten (20 mg/kg) und das Knochengewebe (200  $\mu$ g/kg) [Assoian et al., 1983].

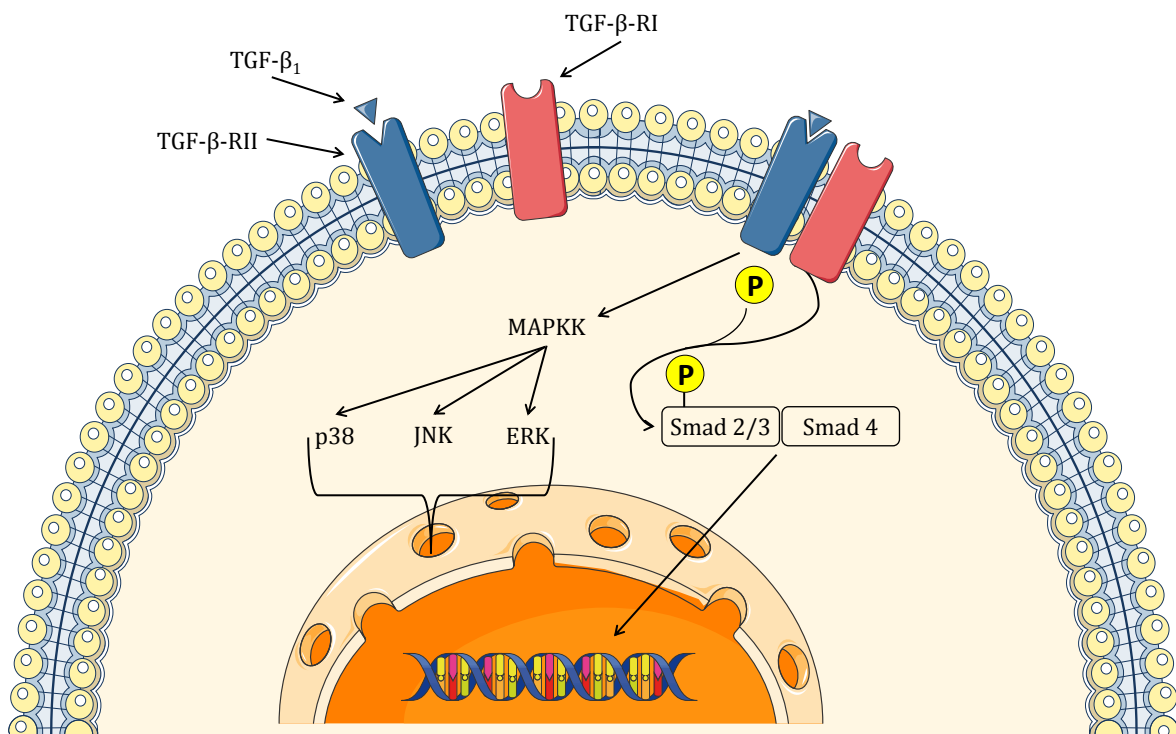
TGF- $\beta_1$  geht aus einem Vorläufermolekül hervor. Erst durch post-translationale Modifikation entsteht die biologisch aktive Form. Das Vorläufermolekül besteht aus einem Signalpeptid, einem Latenz-assoziierten Peptid (LAP) und dem eigentlichen TGF- $\beta_1$ -Peptid. Osteoblasten sezernieren einen Teil des TGF- $\beta_1$  in Form von Large Latent Complexes.



TGF- $\beta_1$  wird in den meisten Zellen an die sogenannten latenten TGF- $\beta$ -bindende Proteine (LTBPs) gebunden und dadurch biologisch inaktiv. Diese LTBPs sind an der Einlagerung des TGF- $\beta$  in die Knochenmatrix beteiligt [Dallas et al., 1995]. Eine Besonderheit des Knochengewebes ist es, dass der Hauptanteil des sezernierten TGF- $\beta$  nicht an LTBPs gebunden sezerniert wird, statt dessen werden sie hauptsächlich als Small Latent Komplexes sezerniert [Janssens et al., 2005]. Erst das Ablösen des LAP durch proteolytische Spaltung erlaubt es TGF- $\beta_1$  seine Funktion zu erfüllen [Annes et al., 2003]. Im Knochen scheint das von den Osteoklasten, im Rahmen des Remodelingprozesses, geschaffene saure Milieu die nicht-kovalente Bindung zwischen dem LAP und Tgf- $\beta_1$  zu lösen und so das Zytokin freizusetzen [Oreffo et al., 1989].

Es gibt 2 Rezeptortypen, welche das Signal des TGF- $\beta$  durch ihre zytoplasmatische Serin/Threonin-Kinase intrazellulär weiterleiten. Die Typ-II-Rezeptoren binden zuerst das TGF- $\beta$ -Molekül und aktivieren anschließend durch Phosphorylierung einen Typ-I-Rezeptor, welche auch als Activin Receptor-Like Kinases (ALK) bezeichnet werden. Im Knochengewebe ist ALK5 (= TGF $\beta$ RI) der einzige bekannte funktionelle Typ-I-Rezeptor für TGF- $\beta$ . Dieser heterodimere Rezeptorkomplex leitet nun das Signal intrazellulär fort. Im kanonischen TGF- $\beta$  Signalweg kommt es zur Phosphorylierung eines SMAD-Proteins durch diesen Rezeptorkomplex. Man unterscheidet nach ihrer Funktion: Rezeptor-regulierte SMADs (R-SMADs), Common-Mediator SMADs (Co-SMADs) und inhibitorische SMADs (I-SMADs). Die R-SMADs 2 und 3 sind die Proteine, die durch den Typ-I-Rezeptor aktiviert werden. Zusammen mit dem SMAD4, dem einzig bekannten Co-SMAD, bilden sie einen Komplex, der in den Nucleus transloziert und die Gentranskription im Nucleus steuern kann [Janssens et al., 2005]. Die I-SMADs 6 und 7 haben einen inhibitorischen Effekt auf das Signaling der TGF- $\beta$ -Superfamilie [Imamura et al., 1997, Shi et al., 2003]. Neben dem kanonischen TGF- $\beta$ -Signalweg werden eine Vielzahl der TGF- $\beta$ -induzierten Effekte in

Zielzellen durch andere intrazelluläre Signalwege wie JNK, ERK und MAPK bedingt [Janssens et al., 2005] (Abbildung 1-5).



**Abbildung 1-5: Schematische Darstellung der TGF- $\beta$ -Signaltransduktionswege.** Abbildung modifiziert nach Janssens, 2005 [Janssens et al., 2005].

TGF- $\beta_1$  ist von herausragender Bedeutung während des Modelings und Remodelings des Knochengewebes. TGF- $\beta_1$  dient der chemotaktischen Rekrutierung von osteoblastären Vorläuferzellen, induziert deren Proliferation, frühe Differenzierung und stimuliert die Bildung Knochenmatrix-bildender Proteine *in vivo* und *in vitro*. Allerdings sind die Ergebnisse *in vitro* stark abhängig vom verwendeten Modell, dem Zelltyp sowie der zur Stimulation verwendeten TGF- $\beta$ -Konzentration [Massague, 1990]. Die Ergebnisse von *in vivo* Tiermodellen machen die Schlüsselrolle von TGF- $\beta$  im Knochen deutlich. Die Erschaffung von Knockout-Tiermodellen praktisch aller am TGF- $\beta$ -Signaling beteiligten Proteine führen zu schwerwiegenden Veränderungen des Knochens [Janssens et al., 2005]. So zeigen *Tgfb1*-Knockout-Mäuse starke Veränderung des Knochens: Das Verhältnis von Mineraleinlagerung zur organischen Matrix ist niedriger, die Osteoblastenzahl ist im spongiosen Knochen stark vermindert, das Verhältnis von Knochenaufbau zur Resorption verschoben und die Knochen sind weniger belastbar [Geiser et al., 1998]. Zusätzlich kommt es in einem ähnlichen Modell von *Tgfb1*-Knockout-Mäusen zu einem Abfall der alkalischen Phosphatase (AP) und der Reife von Kollagenen [Atti et al., 2002]. Bei einem weiteren

murinen Modell mit *Tgfb2*-Knockout-Mäusen kommt es gar zu einer ganzen Reihe von skelettalen Fehlbildungen [Sanford et al., 1997].

## 1.6 Problemstellung

Aus dem in der Einleitung Beschriebenen wird klar, dass der Knochen, durch seine sich herausbildende Funktion als endokrines Organ, an der Entstehung des Diabetes mellitus Typ 2 beteiligt zu sein scheint. Durch die grundlegende Bedeutung des TGF- $\beta$ -Signalings für den Knochenmetabolismus ist TGF- $\beta$  ein Kandidat als Mediator der endokrinen Funktionen des Knochens. Das Ziel dieser Arbeit ist es, die Effekte zweier Symptome des DM 2, die transiente Hyperinsulinämie und die Hyperglykämie, auf primäre humane Osteoblasten (phOBs) *in vitro* zu untersuchen. Dabei soll ermittelt werden, ob TGF- $\beta$  als Mediator möglicher Veränderungen der Osteoblastenfunktion und Genexpression, nach Stimulation mit supraphysiologischen Insulinkonzentrationen, fungiert. Schließlich werden diese *in vitro*-Genexpressionsanalysen mit der Genexpression im spongiösen Knochen von Typ-2-Diabetikern verglichen, um einen Vergleich mit der Situation *in vivo* zu ermöglichen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Geräte

*Tabelle 2.1—1: Auflistung der für diese Arbeit benötigten Geräte.*

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>
Eppendorf Mastercycler S	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Feinwaage	Kern, Ballingen-Frommern, Deutschland
FLUOstar Omega	BMG Labtech, Offenburg, Deutschland
Inkubator HERAccl 150	Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold, Deutschland
Lichtmikroskop Axiovert 40C	Zeiss, München, Deutschland
NanoDrop®	Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold, Deutschland
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland
PowerPac Basic Power Supply	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Sterilwerkbank, MSC Advantage	Thermo Scientific, Langenselbold, Deutschland
Wasserbad inkl. Thermostat	Memmert, Schwabach, Deutschland
Wide Mini-Sub Cell GT Cell	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Zentrifugen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

### 2.2 Verbrauchsmaterial

*Tabelle 2.2—1: Auflistung der für diese Arbeit benötigten Verbrauchsmaterialien.*

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>
20 ml Spritzen	B. Braun

Chirurgische Handschuhe (steril)	Sempermed, Wien, Österreich
Ethanol 70%ig	Apotheke KrdI
Multiwellplatten	PAA Lab. GmbH, Pasching, Österreich
Pasteurpipetten 150 mm + 230 mm, glas	Neo Lab, Heidelberg, Deutschland
PCR-Reaktionsgefäße Multiply® - Strip	SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland
Pipetten 2,5, 5; 10, 25 ml	SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Polypropylenröhrchen (= Falcon Tube) 15 + 50 ml	SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäße 0,5; 1,5; 2 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Sterilfilter 0,22 µm	SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturflaschen, steril 75 und 175 cm <sup>2</sup>	PAA Lab. GmbH, Pasching, Österreich
Zellkulturschalen 10 cm <sup>2</sup>	PAA Lab. GmbH, Pasching, Österreich
Zellschaber, 20 mm Lamelle	PAA Lab. GmbH, Pasching, Österreich

## 2.3 Software

*Tabelle 2.3—1: Auflistung der für diese Arbeit benötigten Software.*

Material	Hersteller
EndNote X7	Thomson Reuters, New York, USA
Microsoft Excel 2013	Microsoft Corporation, Redmond, USA
GraphPad Prism 5.01	GraphPad Software Inc., La Jolla, USA
ImageJ 1.42q	National Institute of Health, USA
Intas Image Software	Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland
OMEGA Software für FLUOstar V1.10	BMG Labtech, Offenburg, Deutschland

## 2.4 Osteoblastenkulturmedium

**Tabelle 2.4—1: Materialien für die Herstellung des Osteoblastenkulturmediums.**

Material	CAS-Nummer	Hersteller	Bestellnummer
MEM mit L-Glutamin		PAA	E15-825
Ham's F-12 mit L-Glutamin		PAA	E15-817
Dulbecco's PBS (1x) ohne Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup>		PAA	H15-002
Fetal Bovine Serum "GOLD" (bei 56°C für 30 min hitzeinaktiviert)		PAA	A15-151
Penicillin/ Streptomycin		PAA	P11-010
L-Ascorbinsäure-2-Phosphat-Sesquimagnesium-Hydrat	113170-55-1	Sigma	A8960
β-Glycerolphosphat-Dinatriumsalz-Hydrat	154804-51-0	Sigma	G9891

Zur Herstellung einer 50 µM L-Ascorbat-2-Phosphat-Vorratslösung werden 128 mg der Ausgangssubstanz in 10 ml PBS gelöst, anschließend steril filtriert und aliquotiert und bei -20°C gelagert. Bei der Herstellung einer 50 µM β-Glycerolphosphat-Vorratslösung werden 108 mg der Ausgangssubstanz verwendet. Das weitere Vorgehen entspricht dem der Herstellung der L-Ascorbat-2-Phosphat-Vorratslösung. 500 ml MEM und 500 ml Ham's-F-12 werden gemischt. Anschließend werden 100 ml FCS/1, 10 ml Penicillin/Streptomycin/1 und jeweils 1 ml der L-Ascorbat-2-Phosphat- und der β-Glycerolphosphat-Vorratslösung/1 hinzugefügt. Schließlich werden die Bestandteile durch mehrmaliges Schütteln miteinander vermischt.

**Tabelle 2.4—2: Zusammensetzung des Osteoblastendifferenzierungsmediums.**

Substanz	Konzentration/Anteil
FCS	10%
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	0,1 mg/ml
β-Glycerolphosphat	50 µM
L-Ascorbat-2-Phosphat	44 µM

## 2.5 Osteoblastendifferenzierungsmedium

**Tabelle 2.5—1: Materialien für die Herstellung des Osteoblastendifferenzierungsmediums.**

Material	CAS-Nummer	Hersteller	Bestellnummer
MEM mit L-Glutamin		PAA	E15-825
Ham's F-12 mit L-Glutamin		PAA	E15-817
Dimethylsulfoxid (DMSO)	67-68-5	Roth	4720.2
Dexamethason	50-02-2	Sigma	D4902-100MG
Fetal Bovine Serum "GOLD" (bei 56°C hitzeinaktiviert)		PAA	A15-151
Penicillin/ Streptomycin		PAA	P11-010
L-Ascorbinsäure-2-Phosphat-Sesquimagnesium-Hydrat	113170-55-1	Sigma	A8960
$\beta$ -Glycerolphosphat-Dinatriumsalz-Hydrat	154804-51-0	Sigma	G9891
HEPES	7365-45-9	Sigma	H4034-25G
Kalziumchlorid-Dihydrat	10035-04-8	Sigma	C3881-500G
D-Mannitol	69-65-8	Sigma	M4125-100G

Das MEM- und Ham's-F-12-Medium werden miteinander gemischt, sodass sich ein Verhältnis von 1:1 ergibt. Anschließend werden 1,08 g  $\beta$ -Glycerolphosphat, 29 mg L-Ascorbat-2-Phosphat, 1,43 g HEPES und 114 mg  $\text{CaCl}_2$  in jeweils 20 ml des Mediums gelöst und steril filtriert. Die so entstandenen Lösungen werden, zusammen mit 10 ml FCS und der Penicillin/Streptomycin-Lösung, jeder Mediumflasche (500 ml) hinzugefügt. Anschließend werden 39 mg Dexamethason in 1 ml DMSO gelöst und von dieser Lösung 100  $\mu\text{l}$ /500 ml des herzustellenden Osteoblastendifferenzierungsmediums beigelegt.

Die Glukosekonzentration dieses Osteoblastendifferenzierungsmediums beträgt 1,4 g Glukose pro Liter Medium. Bei der Hälfte des für die Versuche *in vitro* verwendeten Differenzierungsmediums wurde diesem zusätzlich 3,1 Glukose/l hinzugefügt, so dass sich eine Endkonzentration von 4,5 g Glukose/l ergibt. Um die Osmolarität auszugleichen, wurde dem Differenzierungsmedium mit nur 1,4 g Glukose ca. 3,1 g Mannitol/l Medium

hinzugefügt. In den Experimenten wurden die phObs mit Insulin stimuliert. Die Konzentration Humaninsulin 320 µl pro Liter Osteoblastendifferenzierungsmedium entspricht einer Insulinkonzentration von 1 mM.

**Tabelle 2.5—2: Zusammensetzung des Osteoblastendifferenzierungsmediums.**

Substanz	Konzentration/Anteil
Dexamethason	10 nM
FCS	10%
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	0,1 mg/ml
β-Glycerolphosphat	10 mM
L-Ascorbat-2-Phosphat	200 µM
HEPES	12,5 mM
CaCl <sub>2</sub>	1,5 mM

## 2.6 Isolierung primärer humaner Osteoblasten

**Tabelle 2.6—1: Materialien für die Isolation von phObs.**

Material	CAS-Nummer	Hersteller	Bestellnummer
Luer		Medicon	31.04.02
Pinzette (chirurgisch)		Medicon	06.07.14
Dulbecco's PBS (1x) ohne Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup>		PAA	H15-002
Kollagenase-Typ-II		Biochrome AG	C2-22

Die hier verwendeten humanen Femurköpfe wurden im Rahmen von Operationen zum Ersatz pathologisch veränderter Hüftköpfe durch eine Endoprothese in der Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie des Klinikums rechts der Isar entfernt. Zeitnah nach der Entfernung des Knochengewebes wurde dieses an das Forschungslabor der Experimentellen Unfallchirurgie übergeben. Die Einverständniserklärungen der Patienten zur Probenentnahme sowie ein durch die Ethikkommission der Technischen Universität München genehmigter Ethikantrag liegen vor.

Aus dem Femurkopf werden mit Hilfe eines Luers Spongiosafragmente (Durchmesser 3-5 mm) aus dem Gewebe gelöst. Diese werden nun auf zuvor mit PBS gefüllten 50 ml



Polypropylenröhrchen verteilt. Zu dem mit Knochengewebsfragmenten und PBS gefüllten Röhrchen werden nun weitere 10–20 ml PBS hinzugefügt. Anschließend wird der Behälter verschlossen und der Inhalt mehrmals geschwenkt, damit sich Knochenmarkszellen und andere „unerwünschte“ Bestandteile auswaschen. Der PBS-Überstand wird mittels einer Pasteurpipette entfernt und durch 20-30 ml neues PBS ersetzt. Durch erneutes Schwenken des Röhrchens und Absaugen der entstehenden Suspension wird der Auswaschvorgang fortgesetzt. Diese Schritte werden so lange wiederholt, bis die Spongiosafragmente eine elfenbeinähnliche Farbe erhalten. Anschließend wird das restliche, schließlich klare PBS abgesaugt und eine 0,7%ige Kollagenase-Typ-II-Lösung hergestellt. Dabei orientiert sich die herzustellende Menge dieser Lösung am Volumen der aus dem Femurkopf entfernten Fragmente. Dabei gilt: Geschätzte Spongiosaprobe[n]menge [ml] = herzustellende Menge Kollagenaselösung [ml]. Dazu werden 0,7 mg dieses Enzyms in 1 ml PBS gelöst, darauf folgend steril filtriert und dem Röhrchen mit Knochenfragmenten hinzugefügt. Dieses wird nun, unter häufigem Schwenken, in einem Wasserbad bei 37°C für 1 Stunde inkubiert. Der Kollagenaselösungsüberstand wird dann in ein weiteres steriles 50 ml Röhrchen transferiert und für 10 min bei 650 g zentrifugiert. Während der Zentrifugation werden die nach der Kollagenase-Verdauung zurückgebliebenen Knochenstückchen je nach Probenmenge in 1-2 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen transferiert, mit 25 ml Osteoblastenkulturmedium gefüllt und anschließend bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach Beendigung des Zentrifugationsprozesses wird die verbliebene Flüssigkeit durch vorsichtiges Absaugen entfernt. Das am Boden des Röhrchens befindliche Zellpellet wird anschließend in 25 ml Osteoblastenkulturmedium resuspendiert und ebenfalls in 1-2 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen transferiert. Am nächsten Tag erfolgt ein sorgfältiger Mediumwechsel, wobei nach Möglichkeit die Knochenfragmente in den Zellkulturflaschen nicht bewegt werden sollten. Danach erfolgt der Mediumwechsel zweimal wöchentlich.

Eine Bestätigung des osteoblastischen Phänotyps der isolierten Zellen erfolgte durch Ermittlung der AP-Aktivität, Von-Kossa- und Alizarin-Rot-Färbung, sowie durch den Nachweis charakteristischer Knochenmarker (u.a. Osteocalcin).

## 2.7 Allgemeine Zellkultur

**Tabelle 2.7—1: Materialien für die Durchführung der allgemeinen Zellkultur.**

Material	CAS-Nummer	Hersteller	Bestellnummer
Dulbecco's PBS (1x) ohne Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup>		PAA	H15-002
Trypsin-EDTA (1x)		PAA	L11-002
Zellkulturflaschen 175 cm <sup>2</sup>		SPL	71175

Erreichen die Zellkulturen eine Dichte von 80-90%, werden diese auf neue Zellkulturflaschen (oder ggf. andere Zellkulturbehälter) übertragen, um eine möglichst hohe Anzahl von Zellen eines Spenders zu erhalten. Der Prozess der Passagierung beginnt mit dem Absaugen des auf den Zellen befindlichen Mediums und dem anschließenden Ersetzen davon mit 20 ml PBS, um die restlichen Mediumbestandteile und vor allem das darin befindliche Serum zu entfernen, da Bestandteile des verwendeten Serums möglicherweise die Aktivität des Trypsins hemmen könnten. Nach einer kurzen Einwirkzeit wird das PBS wieder entfernt. Es werden nun 1-2 ml EDTA/Trypsin auf die Zellen gegeben. Nach ca. 5-7 min Inkubation bei 37°C im Inkubator, werden die Zellkulturflaschen am Seitenrand beklopft, um die noch adhärenen Zellen von der Oberfläche der Kulturflasche zu lösen. Unter einem Lichtmikroskop wird die Vollständigkeit der Zellablösung überprüft werden, bevor man das noch auf den Zellen ruhende Trypsin mit Hilfe von 10 ml des Serum-haltigen Osteoblastenkulturmediums inaktiviert. So entsteht eine Zellsuspension, welche in ein Polypropylenröhrchen übertragen wird. Diese wird nun für 10 min bei 650 g zentrifugiert. Nach Beendigung des Zentrifugationsvorganges erkennt man am Boden des Röhrchens ein Zellpellet. Nach dem Entfernen des Überstandes wird dieses nun mit Hilfe einer Pasteurpipette und 10 ml Osteoblastenkulturmedium resuspendiert bis eine homogene Zellsuspension vorliegt. Diese Suspension wird nun zu gleichen Anteilen auf 3 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen transferiert und anschließend pro Flasche 20 ml Osteoblastenkulturmedium hinzugefügt. Die Zellkulturflaschen werden im Inkubator bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> aufbewahrt.

## 2.8 Stimulationsexperimente

**Tabelle 2.8—1: Materialien für die Durchführung der Stimulationsexperimente.**

Material	CAS-Nummer	Hersteller	Bestellnummer
Trypan-Blau-Lösung 0,5%ig		BIOCHROM AG	L 6323
Insulin (Actrapid® FlexPen® 100 I.E./ml)		Novo Nordisk Pharma GmbH	
rhTGF- $\beta$		Peptotech	
SB 431542-Hydrat	301836-41-9	Sigma	S4317-5MG
D-Glukose	50-99-7	Sigma	G8270-1KG

Für den *in-vitro*-Teil dieser Arbeit wurden phObs, nach Erreichen einer ausreichenden Zellzahl in der Zellkultur, auf geeignete Zellkulturbehälter ausplattiert (Tabelle 2.8—2). Dabei wurden Osteoblasten in Passage 3-4 verwendet, um eine hohe Reinheit der Kulturen sicherzustellen. Das Vorgehen beim Ausplattieren für *in-vitro*-Experimente entspricht dem des oben erwähnten Passagierens (siehe Kapitel 2.7). Allerdings wird vor der Verteilung der gelösten Zellen auf neue Zellkulturbehälter die Zellzahl unter Verwendung einer Neubauer-Zählkammer bestimmt, um immer die gleiche Zelldichte verwenden zu können und so die Vergleichbarkeit zwischen den durchgeführten Versuchen zu gewährleisten. Dazu wird nach der Resuspendierung der trypsinisierten Zellen (siehe Kapitel 2.7), 20  $\mu$ l der gewonnenen Zelllösung und 20  $\mu$ l Trypan-Blau-Lösung miteinander vermischt. Anschließend erfolgt die Zellzählung mit Hilfe einer zuvor vorbereiteten Neubauer-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop. Tote Zellen unterscheiden sich von vitalen Zellen durch eine Blaufärbung. Unter Rücksichtnahme dieses Ergebnisses erfolgt nun das Ausplattieren. Die Zelldichte der für die Versuche *in vitro* ausplattierten phObs beträgt 10.000 Zellen/cm<sup>2</sup>.

Zur Sicherstellung der vollständigen Adhäsion der Zellen wird erst 24 Stunden nach dem Ausplattieren mit dem Versuch begonnen, in dem die erste Stimulation mit Differenzierungsmedium (siehe Kapitel 2.5) und den zu verwendenden Zusätzen erfolgt.

Diese sind im Einzelnen:

1. Kein Zusatz zum Differenzierungsmedium (Kontrollen)
2. TGF- $\beta$  (5 ng/ml)
3. Insulin (5 mM) und selektiver Activin Receptor-Like Kinases Inhibitor SB431542 (5  $\mu$ M)

Die verwendeten Insulinkonzentrationen (0, 2,5, 5, 10, 20, 50 mM) richteten sich nach der Fragestellung der Versuche (Tabelle 2.8—2).

Diese Bedingungen wurden weiterhin mit 2 verschiedenen Glukosekonzentrationen kombiniert: 1,4 g/l und 4,5 g/l.

Die Stimulationsdauer richtete sich nach der Fragestellung (Tabelle 2.8—2). So wurde die TGF- $\beta$ -Sekretion durch die Osteoblasten nach Stimulation mit den verschiedenen Insulinkonzentration nach 4 Tagen Stimulation gemessen und die beobachteten Ergebnisse zusätzlich im zeitlichen Verlauf untersucht (Messpunkte nach 2, 4, 6 Tagen). Die Untersuchung der AP-Aktivität erfolgte über 15 Tage, da diese stark abhängig ist von der fortschreitenden Differenzierung der Osteoblasten. Die Einlagerung von Hydroxyapatit-Kristallen und Kalziumverbindungen in die Osteoidmatrix (Mineralisierung) wurde mit Hilfe der Von-Kossa- und Alizarin-Rot-Färbung untersucht. Dazu wurden phObs mit und ohne Insulin (5 mM) für 21 Tage mit Osteoblastendifferenzierungsmedium stimuliert. Die lange Stimulationsdauer ist erfahrungsgemäß erforderlich um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten. Der Mediumwechsel erfolgte in jedem Versuchsaufbau alle 3 Tage, um die Zellen keinem erhöhten Stress auszusetzen.

Im Einzelnen ergab dies für die verschiedenen Stimulationsversuche folgende Kombinationen:

**Tabelle 2.8—2: Details der Stimulationsversuche**

d = Tag/e, \* = Kombination mit den Glukosekonzentrationen 1,4 g/l und 4,5 g/l, MTT = 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid, WP = Wellplatte, TGF- $\beta$  = Transforming Growth Factor beta

Versuch	Zellkultur -behälter	Insulinkonzentrationen [mM]	Stimulations -dauer [d]
MTT-Zytotoxizitätstest (3.2)	48-WP	0, 2,5, 5, 10, 20, 50	1
Insulin-abhängige Synthese der aktiven Form/ Gesamtmenge von TGF- $\beta$ (3.3.1, 3.3.2)	96-WP	0, 2,5, 5, 10, 20, 50 *	4
Insulin-abhängige TGF- $\beta$ -Synthese im zeitlichen Verlauf (3.3.3)	96-WP	0, 5, 20 *	1, 2, 3, 4
AP-Aktivität (3.4)	96-WP	5 *	3, 9, 15
Kalzifizierungsversuche (3.5)	48-WP	5 *	21
Genexpressionsanalysen von Osteoblasten <i>in vitro</i> (3.6)	Petri- Schale	5 *	7

Die TGF- $\beta$ -Isoformen 1-3 binden spezifisch an einen Typ-I-Rezeptor (ALK5). Das hier zur Messung der von den Osteoblasten sezernierten TGF- $\beta$ -Menge verwendete MFB-11-Reporterzell Bioassay zeichnet sich durch eine hohe Sensitivität und Spezifität für die TGF- $\beta$  Isoformen 1-3 aus. Es erlaubt die Untersuchung der TGF- $\beta$ -Konzentration im Mediumüberstand der untersuchten Zellen oder Patientenserum. Dabei zeichnet sich dieses Assay durch eine hohe Zuverlässigkeit im Bereich von 1 pg/ml bis 10 ng/ml aus. Bei den hierbei verwendeten MFB-11-Reporterzellen handelt es sich um Zellen einer murinen Fibroblastenzelllinie, welche mit einem SBE-SEAP-Plasmid transfiziert wurde. Diese Zellen mesenchymalen Ursprungs stammen von TGF- $\beta$ -Knock-Out-Mäusen (*Tgfb*  $^{-/-}$ ) und sind somit nicht in der Lage selbst TGF- $\beta$  zu sezernieren. Falls der zu untersuchende Mediumüberstand eine bestimmte Menge TGF- $\beta$  beinhaltet, so bindet Smad3 an das SMAD Binding Element und induziert so die Expression des SEAP-Proteins. Dieses wird in das die Reporterzellen umgebende Medium abgegeben und kann photometrisch gemessen werden.

Dabei stehen in dem oben genannten TGF- $\beta$ -Konzentrationsbereich SEAP-Sekretion und TGF- $\beta$ -Konzentration im zu untersuchenden Überstand in linearen Zusammenhang [Tesseur et al., 2006].

**Tabelle 2.8—3: Materialien für die Durchführung der TGF- $\beta$ -Konzentrationsmessung.**

Material	CAS-Nummer	Hersteller	Bestellnummer
HCl-Lösung 1 M		MERCK	1.09057.1000
NaOH-Lösung 1 M	1310-73-2	Roth	K021.1
DMEM 4,5 g/l Glukose, mit L-Glutamin, ohne Phenol-Rot		PAA	E15-877
Hygromycin B	31282-04-9	Roth	CP13.1
Dulbecco's PBS (1x) ohne Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup>		PAA	H15-002
DMEM 4,5 g/l Glukose, ohne L-Glutamin, mit Phenol-Rot		PAA	E15-009
Fetal Bovine Serum "GOLD" (bei 56°C hitzeinaktiviert)		PAA	A15-151
Penicillin/ Streptomycin		PAA	P11-010
Glutamin	56-85-9	PAA	P21-004

Zur Vorbereitung werden die MFB-11-Reporterzellen mit Hilfe von 37°C warmen DPBS aufgetaut und anschließend bei 600 g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand nach dem Zentrifugieren wird entfernt, die Zellen in 37°C warmen Medium (DMEM mit 10% FCS) resuspendiert und in Zellkulturflaschen überführt und bis zum Start des eigentlichen Versuchs kultiviert. Für die TGF- $\beta$ -Konzentrationsmessung werden die Zellen mit einer Zelldichte von  $4 \times 10^4$  Zellen / Well in 96-Wellplatten überführt (als Medium dient hierzu DMEM mit 10% FCS).

Um die Menge des gesamten TGF- $\beta$  zu ermitteln, muss eine Säurebehandlung vor der TGF- $\beta$ -Konzentrationsmessung erfolgen. Nur so werden latente TGF- $\beta$ -Moleküle durch dieses Assay messbar. Dazu werden zunächst 30  $\mu$ l/Well des zu untersuchenden Mediumüberstandes in eine neue 96-Wellplatte übertragen. Durch Zugabe von 3  $\mu$ l 1 M Salzsäurelösung/Well werden latente TGF- $\beta$ -Moleküle aktiviert und dadurch messbar. Nach einer Inkubation von 10 min bei Raumtemperatur, wird die zuvor hinzugefügte Salzsäure

durch eine äquimolare Natronlauge­lösung inaktiviert (3,12 µl/Well). Der so vorbehandelte Überstand kann nun wie der unbehandelte weiterverwendet werden.

Anschließend wird das auf den MFB-11-Reporterzellen befindliche Medium durch Absaugen entfernt und wird durch eine Lösung bestehend aus farblosem DMEM (ohne Phenol-Rot) und Hygromycin B (1000:1) hergestellt. Bei dem verwendeten Hygromycin B handelt es sich um ein Antibiotikum. Dieses dient der Selektion der Reporterzellen. Das so hergestellte Medium kann nun auf die MFB-11-Zellen übertragen werden. Dabei werden lediglich 70 µl/Well bei Verwendung einer 96-Wellplatte benötigt. Anschließend wird dieses Medium durch 30 µl des zu untersuchenden Überstands/Patientenserums ergänzt. Nach einer Inkubationszeit von 24-48 Stunden im Inkubator bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kann die Konzentration des SEAP-Proteins photometrisch erfasst werden. Dabei entsprechen die Einstellungen des FLUOstar Omega plate readers (Wellenlänge 405 nm, Standardkurve siehe Kapitel 2.11) denen der photometrischen Bestimmung der Konzentration der alkalischen Phosphatase. Wurde der Überstand zuvor mit Salzsäure behandelt, so wird die Gesamtkonzentration des vorliegenden TGF-β erfasst. Sollte dies nicht zuvor geschehen sein, so wird ausschließlich die Konzentration des in aktiver Form vorliegenden TGF-β gemessen.

## 2.9 Sulforhodamin-B-Färbung

Diese Untersuchungsmethode erlaubt einen Rückschluss auf die Menge der vorhandenen Proteinmenge. Da die Proteinmenge in Relation zur Zellzahl steht, weil die Zellen diese Proteine zuvor produziert haben müssen, erlaubt diese Methode schließlich den Bezug der Untersuchungsergebnisse (z.B. AP-Aktivität) auf die Zellzahl. Mit Hilfe einer Standardkurve wird die relative Zellzahl errechnet, auf die sich die meisten photometrischen Ergebnisse dieser Arbeit beziehen.

**Tabelle 2.9—1: Materialien für die Durchführung der Sulforhodamin-B-Färbung.**

Material	CAS-Nummer	Hersteller	Bestellnummer
Methanol $\geq 99,9\%$	67-56-1	Roth	4627.1
Sulforhodamin-B-Natriumsalz	3520-42-1	Sigma	S9012-1G
Essigsäure (99,8%) dH <sub>2</sub> O	64-19-7	Sigma	695084-1L
Trizma base (minimum 99,9%)	77-86-1	Sigma	T1503-500G
Dulbecco's PBS (1x) ohne Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup>		PAA	H15-002

Zur Herstellung einer 1%igen Essigsäurelösung werden zunächst 10 ml 99,8%iger Essigsäurelösung mit 990 ml destilliertem Wasser vermischt. Zur Herstellung einer 0,4%igen Sulforhodamin-B-Färbung werden 200 mg Sulforhodamin-B-Natriumsalz in 50 ml 1% Essigsäurelösung gelöst. Zur Herstellung einer 10 mM Tris-Puffer-Lösung werden 1,21 g Trizma base in einem Liter dH<sub>2</sub>O gelöst.

Das auf den zu untersuchenden Zellen befindliche Medium wird entfernt und die Zellen darauf folgend mit PBS gewaschen. Anschließend werden die Zellen mit Hilfe von Methanol fixiert und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Im nächsten Schritt wird das Methanol durch die Sulforhodamin-B-Lösung (SRB) ersetzt. Dabei werden bei einer 96-Wellplatte 50  $\mu\text{l}$  dieser Lösung pro Well benötigt. Es folgt die Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur und unter ständigem Schwenken. Nachdem die Inkubationszeit beendet ist, wird die SRB-Lösung entfernt. Im Anschluss wird fünfmal mit einer 1%igen Essigsäurelösung gewaschen. Dadurch wird gewährleistet, dass nur noch gebundener Farbstoff in den Wells vorhanden ist. Dieser wird nun mit Hilfe einer 10 mM Tris-Puffer-Lösung gelöst. Dabei werden bei



Verwendung einer 96-Wellplatte 100 µl des Puffers pro Well hinzugefügt. Die Konzentration des gelösten SRBs kann im nächsten Schritt photometrisch erfasst werden. Die Absorption wird bei einer Wellenlänge von 565 nm und 690 nm gemessen (Abbildung 2-1).

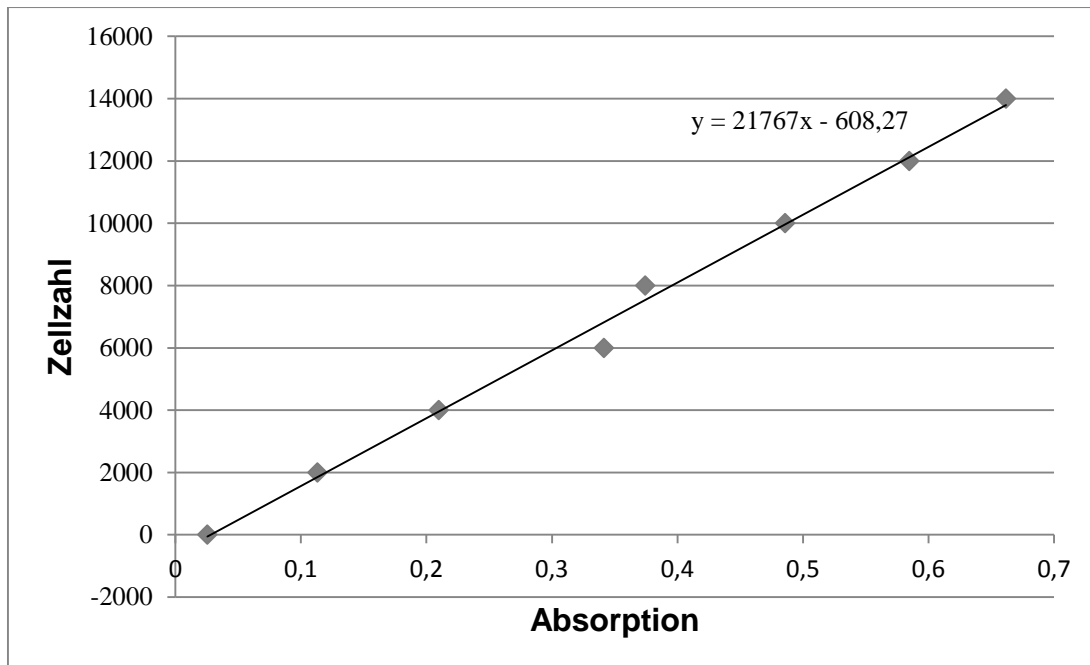


Abbildung 2-1: Standardkurve zur Ermittlung der relativen Zellzahl anhand SRB-Färbung.

## 2.10 MTT-Zytotoxizitätstest

3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) ist ein gelbes Tetrazoliumsalz, das von lebenden Zellen mittels Enzymen der mitochondrialen Atmungskette zu blau-violetter Formazan reduziert wird. Bei Zellschädigung geht diese Fähigkeit verloren und es findet keine Blaufärbung der Kulturen statt. In dieser Arbeit diente der MTT-Test der Untersuchung des möglichen zytotoxischen Effektes der zur Stimulation der phOb verwendeten Insulinkonzentrationen.

**Tabelle 2.10—1: Materialien für die Durchführung des MTT-Zytotoxizitätstests.**

Material	CAS-Nummer	Hersteller	Bestellnummer
Thiazolylblau-Tetrazoliumbromid	296-93-1	Roth	4022.1
DMSO	67-68-5	Roth	4720.2
Natriumdodecylsulfat (SDS)	151-21-3	Roth	2326
Essigsäure	64-19-7	Roth	3738.4
Dulbecco's PBS ohne Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup>		Sigma	D8537

Zuerst wird eine MTT-Vorratslösung (12 mM) hergestellt. Dazu werden 50 mg Thiazolylblau in 10 ml PBS gelöst und anschließend steril filtriert. Diese Lösung kann bei 4°C im Dunkeln gelagert werden. Im nächsten Schritt wird eine einfach konzentrierte MTT-Lösung (1,2 mM) hergestellt. Dazu wird 1 ml der MTT-Vorratslösung in 9 ml DPBS gelöst. Als letzte Vorbereitung wird eine Solubilisierungslösung durch das Lösen von 5 g SDS in 49,7 ml DMSO und anschließender Zugabe von 0,3 ml Essigsäure hergestellt.

Die Osteoblasten werden für diesen Versuch auf 48-Wellplatten ausplattiert. Als ersten Schritt des eigentlichen MTT-Tests entfernt man das auf den zu untersuchenden Osteoblastenkulturen befindliche Medium und wäscht sie einmalig mit PBS. Schließlich werden 250 µl der einfach konzentrierten MTT-Lösung in jedes Well pipettiert. Die zu untersuchenden Osteoblasten werden nun bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach 2 Stunden wird der Überstand entfernt und 250 µl der Solubilisierungslösung jedem Well hinzugefügt und für 5-10 min geschwenkt. Zuletzt werden 3 mal 100 µl auf eine 96-Wellplatte übertragen und die Extinktion für die Wellenlängen 570 und 690 nm gemessen. Folgende Formel liefert die Viabilität in % der unbehandelten Positivkontrolle:  $(\text{Probe } E_{570} - E_{690}) / (\text{Positivkontrolle } E_{570} - E_{690}) * 100$ .

## 2.11 Photometrische Bestimmung der Konzentration der alkalischen Phosphatase

Die alkalische Phosphatase ist ein wichtiger Marker der Osteoblastenfunktion. Die AP ist essenziell für die Mineralisierung des Osteoids durch die Osteoblasten.

**Table 2.11—1: Materialien für die Durchführung der AP-Konzentrationsmessung.**

<b>Material</b>	<b>CAS-Nummer</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Bestellnummer</b>
Glycin	56-40-6	Sigma	G7126-100G
Tris-Base	77-86-1	Sigma	T1503-500G
MgCl <sub>2</sub> -Hexahydrat	7791-18-6	Sigma	M2670-100G
dH <sub>2</sub> O	7732-18-5		
4-Nitrophenylphosphat-Dinatriumsalz-Hexahydrat	333338-18-4	Sigma	N46645-5G
Natrium-Acetat-Trihydrat	6131-90-4	Sigma	S8625-250G
Dulbecco's PBS (1x) ohne Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup>		PAA	H15-002

Zur Herstellung einer 100 mM AP-Puffer-Lösung werden als erstes 1,88 g Glycin, 6,06 g Tris-Base und 101,5 mg MgCl<sub>2</sub> in 0,5 l dH<sub>2</sub>O gelöst. Anschließend wird diese Lösung auf einen pH-Wert von 10,5 eingestellt. Zur Herstellung einer AP-Substratlösung werden 2 mg 4-Nitrophenylphosphatdisodiumsalzhexahydrat pro ml benötigter AP-Puffer-Lösung in eben dieser gelöst.

Die eigentliche Untersuchung wird an auf Wellplatten ausplattierten Osteoblasten durchgeführt. Pro Well werden bei einer 96-Wellplatte 100 µl der Substratlösung benötigt. Zunächst wird das auf den Zellen befindliche Medium entfernt und mit PBS gespült. Anschließend fügt man die 100 µl Substratlösung hinzu. Um später einen Blindwert ermitteln zu können, werden ebenfalls mehrere nicht mit Zellen versehene Wells mit dieser Lösung gefüllt. Nach gelblicher Verfärbung des Substrats, in der Regel nach 2 Stunden, erfolgt die photometrische Messung des chromogenen Substrats. Dabei wird der Zeitpunkt der Messung so gewählt, dass untereinander zu vergleichende Versuche zu gleichen Zeitpunkten ausgewertet werden. Die photometrische Messung der Extinktion des Farbstoffes erfolgt mit Hilfe des FLUOstar Omega Plate Readers bei einer Wellenlänge von

405 nm. Dieser gibt mit Hilfe einer Standardkurve der AP-Aktivität Aufschluss über die Konzentration des untersuchten Enzyms (Abbildung 2-2).

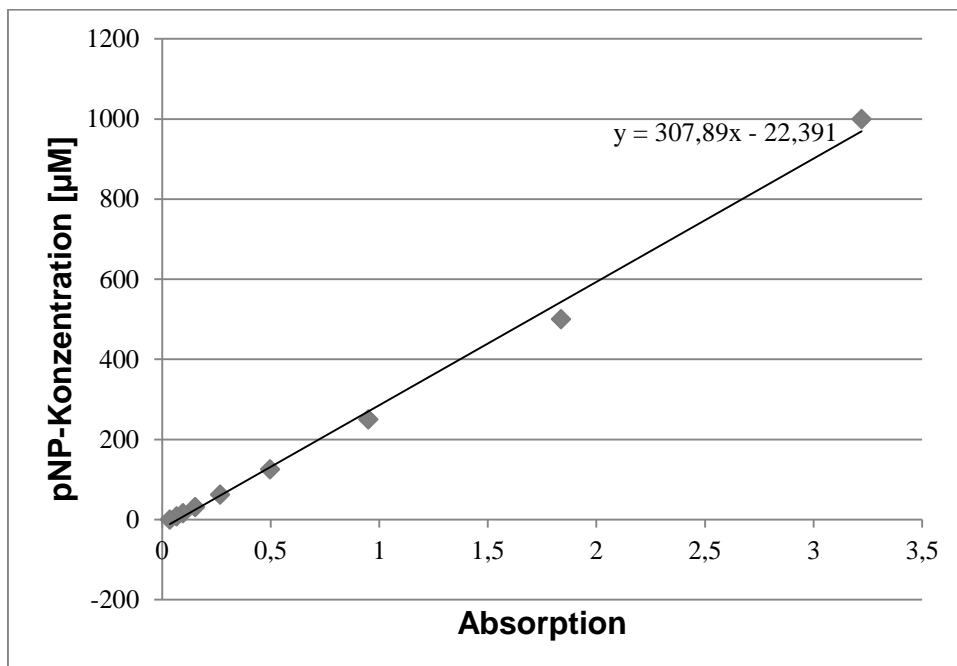


Abbildung 2-2: Standardkurve AP-Konzentrationsmessung.

## 2.12 Alizarin-Rot-Färbung

Die Alizarin-Rot-Färbung stellt die mineralisierte Matrix dar. Der Farbstoff bindet dazu Kalzium im Sinne eines Chelatbildungsprozesses. Im Gegensatz zur Von-Kossa-Färbung, ist die Alizarin-Rot-Färbung allerdings lichtmikroskopisch in der Regel nicht so differenziert, kann aber durch Lösen quantitativ mittels photometrischer Messung nachgewiesen werden.

Tabelle 2.12—1: Materialien für die Durchführung Alizarin-Rot-Färbung.

Material	CAS-Nummer	Hersteller	Bestellnummer
Alizarin Rot S	130-22-3	Sigma	A5533-25G
Cetylpyridiniumchlorid-Monohydrat	6004-24-6	Sigma	C9002
Ethanol 99,9%	64-17-5	KrdI	
Dulbecco's PBS (1x) ohne Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup>		PAA	H15-002

Als erstes werden 200 mg Alizarin Rot S in 40 ml Wasser gelöst. Dies ergibt eine 0,5%ige Alizarin-Rot-Farblösung. Danach wird eine 10%ige Cetylpyridiniumchlorid-Lösung hergestellt, indem 10 g Cetylpyridiniumchlorid in 100 ml Wasser gelöst werden.

Zunächst wird das Medium von den Zellen, welche für diesen Versuch in 48-Wellplatte ausplattiert wurden, entfernt und einmal mit PBS gewaschen. Anschließend werden diese mit 99,9%igem Ethanol bedeckt und für 1 Stunde bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Dieser Prozess führt zu einer Fixierung der zu untersuchenden Zellen. Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit Wasser sind diese für die eigentliche Färbung vorbereitet. Die Zellen werden mit einer 0,5%igen Alizarin-Rot-Lösung benetzt und für 10 min auf einen Schwenkinkubator gestellt. Dabei werden 200  $\mu\text{l}$ /Well bei Verwendung einer 48-Wellplatte verwendet. Im Anschluss an die Inkubationszeit werden die Zellen viermal mit Wasser gewaschen, um überschüssige Alizarin-Rot-Lösung zu entfernen. Dabei werden zwischen den Waschvorgängen fünfminütige Inkubationspausen bei Raumtemperatur durchgeführt. Schließlich werden 150  $\mu\text{l}$  der Cetylpyridiniumchloridlösung in jedes Well pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 20 min ist der Farbstoff im Überstand gelöst und wird auf eine 96-Wellplatte übertragen. Dies erlaubt die photometrische Bestimmung der Extinktion. Die für Alizarin Rot spezifische Wellenlänge liegt bei 562 nm. Mit Hilfe einer Standardkurve kann nun die Alizarin-Rot-Konzentration berechnet werden (Abbildung 2-3).

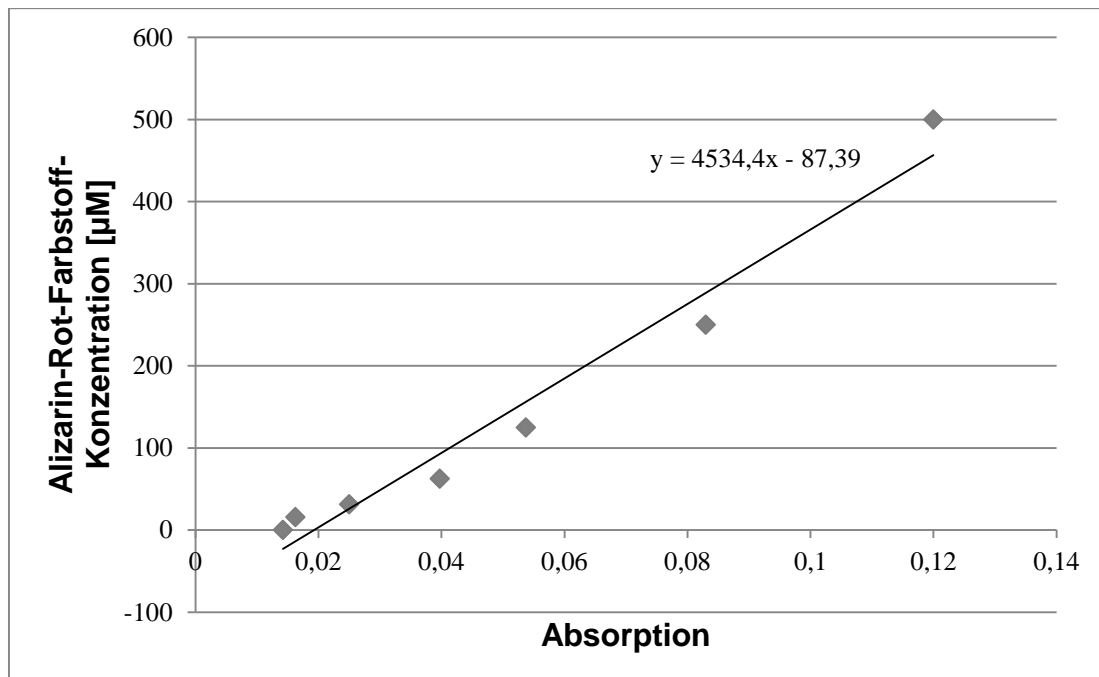


Abbildung 2-3: Alizarin-Rot-Standardkurve.

## 2.13 Von-Kossa-Färbung

Die Färbung nach von Kossa erlaubt die Untersuchung der Mineralisierung des von den phObs gebildeten Osteoids. Dabei reagiert das Silbernitrat mit dem anorganischen Phosphat der gebildeten Hydroxyapatit-Kristalle. Die anorganische Matrix wird durch diese Färbung braun bis schwarz angefärbt.

**Tabelle 2.13—1: Materialien für die Durchführung der Von-Kossa-Färbung.**

Material	CAS-Nummer	Hersteller	Bestellnummer
Silbernitrat	7761-88-8	Merck	1015120025
dH <sub>2</sub> O	7732-18-5		
Natriumcarbonat	497-19-8	Sigma	S2127-500G
Formaldehyd (37%)	50-00-0	MERCK	818708
Natriumthiosulfat-Anhydrat	7772-98-7	Sigma	13481-25KG-H
Ethanol 99,9%	64-17-5	Apotheke KrdI	
Dulbecco's PBS (1x) ohne Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup>		PAA	H15-002

Zuerst wird eine 3%ige Silbernitratlösung hergestellt, indem 30 g Silbernitrat in einem Liter destilliertem Wasser gelöst werden. Anschließend werden 50 g Natriumcarbonat in 250 ml Formaldehyd (37%) vollständig gelöst und mit destilliertem Wasser bis zu einem totalen Volumen von 1 Liter aufgefüllt. Außerdem werden 50 g Natriumthiosulfat in einem Liter destilliertem Wasser gelöst.

Zunächst wird das auf den Zellen befindliche Medium entfernt und die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Anschließend werden die Zellen mit 99,9%igem Ethanol bedeckt und bei -20°C gelagert. Nach der Fixierung werden die Zellen erneut dreimal mit dH<sub>2</sub>O gewaschen. Im nächsten Schritt werden die zu untersuchenden Zellen mit der hergestellten Silbernitratlösung bedeckt. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei Raumtemperatur unter ständigem Schwenken, wird die Silbernitratlösung wieder entfernt und dreimal mit destilliertem Wasser gewaschen. Anschließend wird zu den Zellen die vorbereitete Natriumcarbonat-Formaldehydlösung gegeben. Diese sollte unter ständigem Schwenken für 2 min auf den Zellen verweilen. Danach erfolgt ein erneuter Waschvorgang mit Wasser. Zuletzt erfolgt die Zugabe der Natriumthiosulfatlösung. Nach einer Inkubationszeit von

5 min, sollte die Kalzifizierung der extrazellulären Matrix lichtmikroskopisch feststellbar sein.

## 2.14 Isolation von RNA

*Tabelle 2.14—1: Materialien für die Durchführung der RNA-Isolation.*

Material	CAS-Nummer	Hersteller	Bestellnummer
Diethylpyrocarbonat	1609-47-8	Sigma	D5758-25ML
dH <sub>2</sub> O	7732-18-5	KrdI	
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	77-88-1	Sigma	T87602-3KG
Borsäure	10043-35-3	Sigma	B0252-1KG
Ethylendiamintetraacetat(EDTA)- Dinatriumsalz-Dihydrat	60-00-4	Sigma	E5134-500G
peqGold Universal Agarose	9012-36-6	peqLab	35-1020
Ethidiumbromid	1239-45-8	Sigma	E1385-5ML
Bromphenolblau	115-39-9	Sigma	114391
Glycerol	58-81-5	Sigma	G8773-500ML
pUC 19 DNA-Größenmarker		ROTH	X901.1
TriFast		peqLab	30-2020
Chloroform	67-66-3	MERCK	102395
Isopropanol	67-63-0	KrdI	

Als erstes wird 1 ml Diethylpyrocarbonat (DEPC) in einem Liter dH<sub>2</sub>O bei 37°C gelöst. Diese DEPC-H<sub>2</sub>O-Lösung wird anschließend autoklaviert und aliquotiert. Im zweiten Schritt wird ein Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE-Puffer) hergestellt. Dazu werden 540 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan, 275 g Borsäure und 37,3 g EDTA in fünf Litern dH<sub>2</sub>O gelöst. Anschließend wird der pH-Wert auf 8,4 eingestellt. Dieser TBE-Puffer liegt als 10fach konzentrierte Lösung vor. Um einen 1fach konzentrierten Puffer zu erhalten, werden 100 ml des 10fach-TBE-Puffers mit 900 ml dH<sub>2</sub>O gemischt. Für die abschließende Überprüfung der RNA-Integrität wird ein 1,5%iges Agarosegel benötigt. Dazu werden 1,5 g Agarose zu 100 ml 1fach konzentriertem TBE-Puffer hinzugefügt. Diese Bestandteile werden nun mit Hilfe einer Mikrowelle erhitzt bis sich die Agarose vollständig im TBE-Puffer löst. Nach dem Abkühlen unter 60°C fügt man dem Gemisch 7 µl Ethidiumbromid

hinzu und diese so hergestellte Flüssigkeit wird in eine vorbereitete Gelkammer gegossen, in der sich bereits ein Gelkammerrechen befindet. Dann wird ein 5fach konzentrierter PCR-Ladepuffer hergestellt. Dazu werden 25 ml TBE-Puffer 10fach konzentriert, 5 ml Glycerol und 20 ml dH<sub>2</sub>O vermischt. Anschließend werden in der so entstehenden Lösung 3 mg Bromphenolblau gelöst und das Endprodukt aliquotiert. Die hergestellten Aliquot sind nun über einen längeren Zeitraum bei -20°C lagerfähig.

### 2.14.1 RNA-Isolation aus Spongiosa

Die zu untersuchenden Knochengewebsproben wurden im Rahmen von Operationen der Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie des Klinikums rechts der Isar entnommen. Die Einverständniserklärungen der Patienten sowie ein durch die Ethikkommission der Technischen Universität München genehmigter Ethikantrag liegen vor. Es wurde eine DM 2- (N=10) und eine nicht-diabetische Gruppe (N=11) gebildet. Die Diagnose DM 2 wurde als gesichert angesehen, falls eines der folgenden Kriterien zutrifft: 1) bereits vorher diagnostizierter DM 2 (unter Therapie), 2) Nüchternglukosespiegel  $\geq 126$  mg/dl oder 3) Blutglukosespiegel  $\geq 200$  mg/dl bei nicht bekanntem Diabetes. Ausschlusskriterien für den Einschluss waren: potenzielle Ursachen einer sekundären Osteoporose, d.h. Neoplasien, Infektion, Nieren- oder Leberinsuffizienz, Organtransplantation, Malabsorptionssyndrom, Hyper(para)thyreoidismus und die Gabe von Glukokortikoiden und anderen Immunsuppressiva. Zusätzlich wurden alle Patienten mit klinisch stark ausgeprägter Mikro- und Makroangiopathie sowie fortgeschrittener diabetischer Nephropathie (Kreatinin-clearance  $< 30$  ml/min) von der Rekrutierung ausgeschlossen. Die weiteren Patientencharakteristika sind in Tabelle 2.14—2 beschrieben.

**Tabelle 2.14—2: Patientencharakteristika.** Abkürzungen: m = männlich, w = weiblich, UE = untere Extremität, OE = obere Extremität, R = Rumpf, BMI = Body Mass Index

	Kontrollen	DM 2
N	11	10
Geschlecht	m	5
	w	5
Alter [Jahre]	49,1	64,8
Lokalisation Fraktur	UE	7
	OE	1
	R	2



BMI (kg/m <sup>2</sup> )	24,5	31,9
Blutglukosekonzentration (mg/dl)	98	153,6
Diabetestherapie	Metformin	7
	Insulin	2
	Insulin + Metformin	1

Sofern keine Möglichkeit besteht, die Spongiosaproben sofort nach Entnahme zur RNA-Isolation zu verwenden, werden diese in flüssigem Stickstoff bis zur zeitnahen Weiterverarbeitung gelagert. Die Proben werden in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschließend werden diese in einem zuvor mit TRIFAST (dient hier der RNasen-Inaktivierung) behandelten Mörser zermahlen. Dabei werden, abhängig vom Volumen der Spongiosastückchen, 1000-1500 µl TRIFAST hinzugefügt. Um eine möglichst niedrige Temperatur während dieses Arbeitsschrittes zu gewährleisten, wird ab und an etwas flüssiger Stickstoff in die Mörserschale gegeben. Dies dient ebenfalls der Verringerung der Degradierung der zu extrahierenden RNA. Es ergibt sich ein TRIFAST-Knochengewebsgemisch welches nun in ein frisches 1,5 ml Eppendorf-Gefäß übertragen werden kann. Die folgenden Schritte entsprechen den Arbeitsschritten der RNA-Isolation aus Zellen (siehe Kapitel 2.14.3).

### 2.14.2 RNA-Isolation aus Zellen

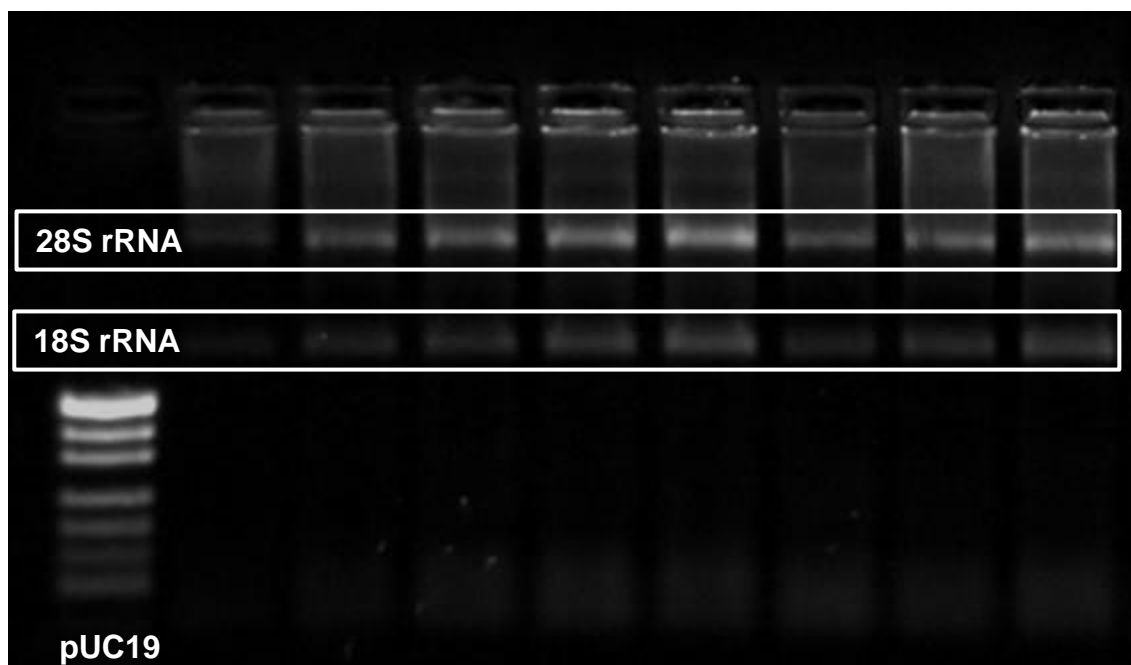
Zu Beginn des eigentlichen Isolationsvorgangs wird zunächst der Überstand von den Zellen entfernt. Anschließend wird bei Kultivierung in einer Petrischale mit einem Durchmesser von 100 mm 1 ml TRIFAST auf die zu verarbeiteten Zellen gegeben. Die Zellen werden für 15 min bei -80°C gelagert, um eine vollständige Zellyse zu gewährleisten. Eine kurzzeitige Lagerung der so behandelten Zellen bei -80°C bis zur weiteren Verwendung ist möglich. Anschließend werden die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers vom Boden des Zellkulturbehälters abgekratzt. Die so entstehende Zellysatsuspension wird in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß übertragen.

### 2.14.3 RNA-Isolation

Im nächsten Schritt werden 100 µl Chloroform/ 500 µl verwendetes TRIFAST in das Eppendorf-Gefäß hinzugefügt und das Gemisch für 15 Sekunden gevortext. Dies dient der Isolierung der RNA von anderen Zellbestandteilen. Nach einer Inkubationszeit von 10 min bei Raumtemperatur werden die Proben bei 14 000 g und 4°C für 10 min zentrifugiert. Während dem Zentrifugationsvorganges werden 250 µl Isopropanol/ 500 µl TRIFAST in neue 1,5 ml Eppendorf-Gefäße überführt und eisgekühlt. Nach dem Zentrifugationsschritt sind die Zellbestandteile getrennt, wobei die RNA gelöst in Chloroform als oberste Schicht als durchsichtige Flüssigkeit zu erkennen ist. Diese wird nun in die mit Isopropanol gefüllten Eppendorf-Gefäße überführt und auf Eis für 10 min inkubiert. Von nun an werden die Proben immer auf Eis gelagert. Es folgt eine weitere Zentrifugation bei den oben genannten Einstellungen. Dies dient der Präzipitation der RNA. Nach diesem Arbeitsschritt befindet sich ein in der Regel erkennbares RNA-Pellet am Boden des zentrifugierten Behälters. Im Anschluss wird der durchsichtige Überstand durch Pipettieren entfernt. Nun werden 1 ml 70%iges Ethanol hinzugefügt und das Eppendorf-Gefäß erneut bei 14 000 g und 4°C für 10 min zentrifugiert. Dieser Arbeitsschritt dient dem Waschen der RNA. Das Ethanol kann nach Beendigung der Zentrifugation entfernt werden und der gleiche Waschvorgang wird mit 70%igem Ethanol wiederholt. Schließlich entfernt man den Ethanolüberstand erneut und lässt das Eppendorf-Gefäß für 10-15 min offen stehen. Dies erlaubt die Verdunstung des restlichen Ethanols. Die isolierte RNA liegt nun in Lösung mit DEPC-H<sub>2</sub>O vor und kann bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert werden.

Zur Messung der RNA-Konzentration wurde ein NanoDrop verwendet. Dazu werden 2 µl der hergestellten RNA-DEPC-H<sub>2</sub>O-Lösung auf das Fußplättchen des NanoDrop pipettiert und anschließend der Arm mit Armplättchen heruntergeklappt. Es bildet sich eine Flüssigkeitssäule zwischen Arm- und Fußplättchen aus. Das Gerät misst die Absorption von Nukleinsäuren, in diesem Fall der RNA, sowie über Bestimmung des Absorptionsverhältnisses die Reinheit der RNA. Mittels der gemessenen Absorptionswerte bei 260 nm und der entsprechenden Software kann die RNA quantifiziert werden. Bei 230 nm werden Verunreinigungen mit Phenolen und bei 280 nm Verunreinigungen mit Proteinen erfasst. Die vom NanoDrop ermittelten 260/280- und 230/280-Quotienten sollten Werte von 1,8-2 bzw. 2,0-2,2 annehmen. Ist dies der Fall, so kann die RNA im nächsten Schritt auf ihre Intaktheit überprüft werden.

Die mit Hilfe des NanoDrop ermittelte RNA-Konzentration wird nun benötigt, um das zu verwendende Volumen der RNA-Lösung zu ermitteln. Pro Probe werden 0,5 µg RNA zur Überprüfung der Intaktheit der RNA benötigt. Das ermittelte Volumen, in dem 0,5 µg RNA gelöst sind, wird nun mit einer entsprechenden Menge PCR-Ladepuffer gemischt, sodass das Endvolumen 10 µl beträgt. Anschließend wird in die erste Geltasche des zuvor vorbereiteten 1,5%igen Agarosegels 2 µl des DNA-Größenmarkers pUC19 geladen und dann 10 µl des vorbereiteten RNA-PCR-Ladepuffergemischs in die folgenden Geltaschen geladen. Legt man nun einen elektrischen Strom mit einer Gleichspannung von 90 V über das Gel, so wandert die RNA aufgrund ihres negativ geladenen Rückgrates in Richtung Positivpol. Dabei hängt die Wanderungsgeschwindigkeit von der Größe des wandernden Moleküls ab. Es erfolgt also eine Auftrennung der RNA-Moleküle nach Größe, welche mit Hilfe des DNA-Größenmarkers bestimmt werden kann. Nach 40 min ist die Gelelektrophorese beendet und das Gel kann nun ausgewertet werden. Dazu wird das Gel mit UV-Licht bestrahlt und das in doppelsträngige RNA-Abschnitte interkalierte Ethidiumbromid wird nun sichtbar. Ist die untersuchte RNA intakt, so zeigt sich ein typisches Bild bestehend aus 2 RNA-Banden. Diese entsprechen der 28S und 18S (S = Svedberg) ribosomalen RNA.



**Abbildung 2-4: RNA Integrity Check.** Die Integrität der isolierten RNA wird anhand der Darstellung der 28S und 18S (S = Svedberg) ribosomalen RNA überprüft. Mit Hilfe des DNA-Größenmarkers pUC19 kann die Größe der jeweilige Bande identifiziert werden.

## 2.15 Herstellung einer cDNA

*Tabelle 2.15—1: Materialien für die Herstellung einer cDNA*

Material	Hersteller	Bestellnummer
First Strand cDNA Synthesis Kit, beinhaltet:	Fermentas	K1612
1. Oligo (dT) <sub>18</sub> Primer		
2. Random Hexamer Primer		
3. 5fach Reaktionspuffer		
4. Ribolock <sup>TM</sup> RNase Inhibitor (20 U/μl)		
5. 10 mM dNTP Mix		
6. M-MuLV Reverse Transkriptase (20 U/μl)		

Zuerst wird das Volumen der RNA-DEPC-H<sub>2</sub>O-Lösung errechnet, das 2 μg RNA enthält. Diese RNA-Menge dient der Herstellung einer komplementären DNA (cDNA). Anschließend wird die RNA-Probe zusammen mit 1 μl Oligo (dT)<sub>18</sub> Primer und 1 μl Random Hexamer Primer in ein Nuklease-freies PCR-Eppendorf-Gefäß pipettiert und auf Eis gekühlt. Nun wird das bisher verwendete Volumen mit DEPC-H<sub>2</sub>O zu einem Endvolumen von 11 μl ergänzt. Die so vorbereitete Probe wird anschließend gevortext, kurz zentrifugiert und in die Platte des Thermocyclers gestellt. Mithilfe des Thermocyclers wird nun die Probe für 5 min auf 65°C erhitzt und schließlich bis zur weiteren Verwendung auf Eis gekühlt. Nun werden die restlichen Bestandteile des cDNA-Kits in folgender Reihenfolge hinzugefügt: 1. 4 μl 5fach Reaktionspuffer, 2. 1 μl RiboLock<sup>TM</sup> RNase Inhibitor (20 U/μl), 3. 2 μl 10 mM dNTP Mix und 4. 2 μl M-MuLV Reverse Transkriptase. Diese Komponenten sollten praktischerweise als Mastermix während der ersten Temperierung im Thermocycler bei 65°C vorbereitet werden. Das Endvolumen des so hergestellten Gemischs beträgt 20 μl pro Probe. Anschließend wird die Probe im Thermocycler temperiert, nämlich anfangs für 5 min bei 25°C, anschließend für 1 Stunde bei 37°C und zuletzt für 5 min bei 70°C. Schließlich wird die nun cDNA enthaltende Probe auf 4°C heruntergekühlt und kann bei -80°C gelagert werden.

## 2.16 PCR

**Tabelle 2.16—1: Materialien für die Durchführung einer PCR.**

<b>Material</b>	<b>CAS- Nummer</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Bestellnummer</b>
einfach konzentrierter TBE-Puffer			
peqGold Universal Agarose	9012-36-6	peqLab	35-1020
Ethidiumbromid	1239-45-8	Sigma	E1385-5 ML
Taq-Polymerase 1000 U Kit, bestehend aus:		Axon	22466
		Labortechnik	
1. Taq-Polymerase			
2. 10fach Reaktionspuffer, magnesiumfrei			
3. Magnesiumchloridlösung 25 mM			
dNTP-Mix 10 mM je Nukleotid		Axon	24478
		Labortechnik	
PCR-Ladepuffer			
pUC 19 DNA-Größenmarker		ROTH	X901.1

**Tabelle 2.16—2: Primerliste der untersuchten Zielgene**

AP = Alkalische Phosphatase, RUNX2 = Runt Related Transcription Factor 2, ATF4 = Activating Transcription Factor 4, SATB2 = SATB Homeobox 2, STAT1 = Signal Transducer and Activator of Transcription 1, BSP2 = Bone Sialoprotein 2

Primer	Vorwärtssequenz	Rückwärtssequenz	NM-Nummer	Annealing-Temperatur [°C]	Volumen cDNA-Lösung [µl]	Zyklen	Produkt [bp]
β-Actin	CGA CAA CGG CTC CGG CAT GT	GCA CAG TGT GGG TGA CCC CG	NM_001101.3	64	2	35	461
AP	ACGTGGCTAAGAATG TCATC	CTGGTAGGCGATGTC CTTA	NM_001127501.2	58	4	35	476
Osteoprotegerin	CCGGAAACAGTGAAT CAACTC	AGGTTAGCATGTCCA ATGTG	NM_002546.3	59	4	40	313
Osteopontin	CTCCATTGACTCGAA CGACTC	CGTCTGTAGCATCAG GGTACTG	NM_000582	61	6	40	257
Osteonectin	AGCACCCCATGACG GGTA	GGTCACAGGTCTCGA AAAAGC	NM_003118	60	6	40	105
Versican	AATGCCGTCTGCAGG GTGCC	GGCCGCAAGCGACTG TTCCT	NM_004385.4	64	4	35	306
Biglykan	CGCCTCGTGTCTCTGC TGGC	GCGGATGCGGTTGTC GTGGA	NM_001711.4	64	4	35	501
Fibromodulin	ACAACAACCTGACCC GGATGCC	AGCACCTGCAGCTTG GAGAAGTTC	NM_002023.3	64	6	40	553
Osteocalcin	CACTCCTCGCCCTATT GGC	GCCTGGGTCTCTTCAC TACCT	NM_000711	62	4	35	138
RUNX2	ATGCGTATTCCCGTA GATCCGA	GGTGGTCGGCGATGA TCTC	NM_004348	60	10	45	286
ATF4	TCCCCCTTCGACCAGT CGGG	TTCTGGGAGATGGCC AATTGGGT	NM_001675.2	65	4	35	387
SATB2	AGGGCCAGTGTGTCC CAAGCT	TGCTGGAGGCCGAGG AGACC	NM_001172509.1	65	6	35	241
STAT1	CCCTCAGAGGCCGCT GGTCT	GCCGCCAGACTGCCA TTGGT	NM_007315.3	65	3	35	222
Decorin	CCAGTGTGCCCTTCC GCTG	GGCGTGTGGCCAGA GAGCC	NM_001920.3	63	3	35	653
Fibronectin	CCCCATTCCAGGACA CTTCTG	GCCCACGGTAACAAC CTCTT	NM_002026	60	6	40	203
BSP2	TGACTCATCCGAAGA AAATGGAG	CTGGATTGCAGCTAA CCCTGT	NM_004967.3	61	6	40	202

Von der hergestellten cDNA-Lösung (siehe Kapitel 2.15) wird ein bestimmtes Volumen in ein PCR-Eppendorf-Gefäß pipettiert und auf Eis gelagert. Anschließend wird ein RT-PCR-Mastermix hergestellt. Dieser besteht aus je 1 µl des verwendeten forward (sense) Primer und dem entsprechenden reverse (antisense) Primer, 2 µl Mg<sup>2+</sup>-freiem Reaktionspuffer, 2 µl 25 mM Magnesiumchloridlösung, 0,5 µl dNTP-Mix und 0,1 µl Taq-DNA-Polymerase. Die Summe der verwendeten Volumina wird von 20 µl subtrahiert und die errechnete Differenz mit DEPC-H<sub>2</sub>O bis zu einem Endvolumen von 20 µl aufgefüllt. Der hergestellte Mastermix kann nun zur Probe gegeben werden und wird anschließend im Thermocycler 30-40 Syntheszyklen durchlaufen, sodass die Reaktion im exponentiellen Teil gemessen werden kann. Vor dem eigentlichen Beginn der PCR, gekennzeichnet durch das mehrmalige Durchlaufen eines temperaturabhängigen Zyklus, wird die Probe für 5 min auf 95°C erhitzt. Jeder Zyklus besteht aus einer Denaturierungsphase bei 95°C, in der die cDNA-Stränge voneinander getrennt werden, einer Annealing-Phase, in der der Primer bei einer Primerspezifischen Temperatur an die Ziel-DNA bindet und einer Synthesephase des mRNA-Klons bei 72°C. Jeder dieser Zyklusabschnitte dauert abhängig von der Länge der Produkte 30-40 Sekunden. Nach Abschluss von 30-40 Zyklen, wird die Probe noch für 10 min bei einer Temperatur von 72°C gehalten und schließlich auf 4°C heruntergekühlt.

Den zu untersuchenden Proben und einer gleich behandelten Negativkontrolle (d.h. anstatt der cDNA-Probe wird RNase-freies Wasser in der PCR verwendet) werden nun 8 µl PCR-Ladepuffer hinzugefügt. 10 µl dieser Mischung und 2 µl des DNA-Größenmarkers pUC19 werden nun in die jeweiligen Geltaschen des zuvor vorbereiteten 1,5%igen Agarosegels geladen. Die Auftrennung erfolgt bei einer Gleichspannung von 90V und läuft 35-40 min.

Das fertig gelaufene PCR-Gel wird nun densitometrisch analysiert. Hintergrund ist, dass das interkalierte Ethidiumbromid unter UV-Bestrahlung fotografisch erfasst werden kann und das so entstehende digitale Bild mit Hilfe des Programms ImageJ analysiert wird. Dabei wird die Lichtintensität der jeweiligen Bande auf den entsprechenden Wert eines house-keeping-Gens (β-Actin) und die Belichtungszeit normalisiert.

## 2.17 Statistik

Die Auswertung der generierten Daten erfolgte mittels GraphPad Prism 5.01. Für Daten mit zwei unabhängigen Datengruppen wurde ein Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Für Daten mit mehr als zwei unabhängigen Datengruppen wurden ein One-Way Anova Test, ein

Kruskal-Wallis-Test (unter Annahme einer nicht parametrischen Verteilung der Daten) und ein Dunn's-Test durchgeführt. Als Konfidenzintervall wurde 95% festgelegt. Als statistisch signifikanter p-Wert gilt ein Wert kleiner als 0,05. In den grafischen Darstellung der Ergebnisse ist die statistische Signifikanz der untersuchten Bedingungen gegenüber der Kontrolle als \* dargestellt. Dabei gilt (Tabelle 2.17—1):

**Tabelle 2.17—1: Interpretation der grafischen Darstellung der statistischen Signifikanz.**

ns = nicht signifikant

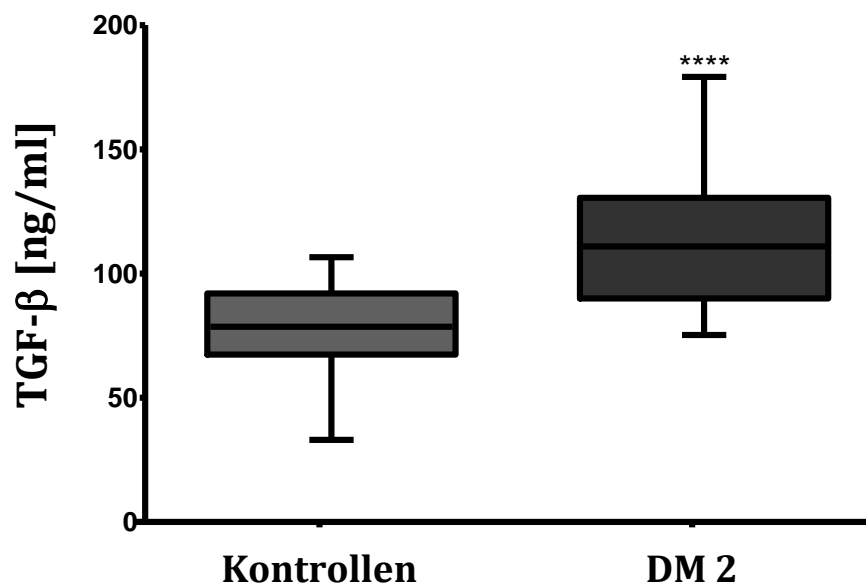
p-Wert	Darstellung
< 0,0001	*****
< 0,001	***
< 0,01	**
< 0,05	*
> 0,05	(ns)



### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Messung der TGF- $\beta$ -Serumspiegel von Typ-2-Diabetikern

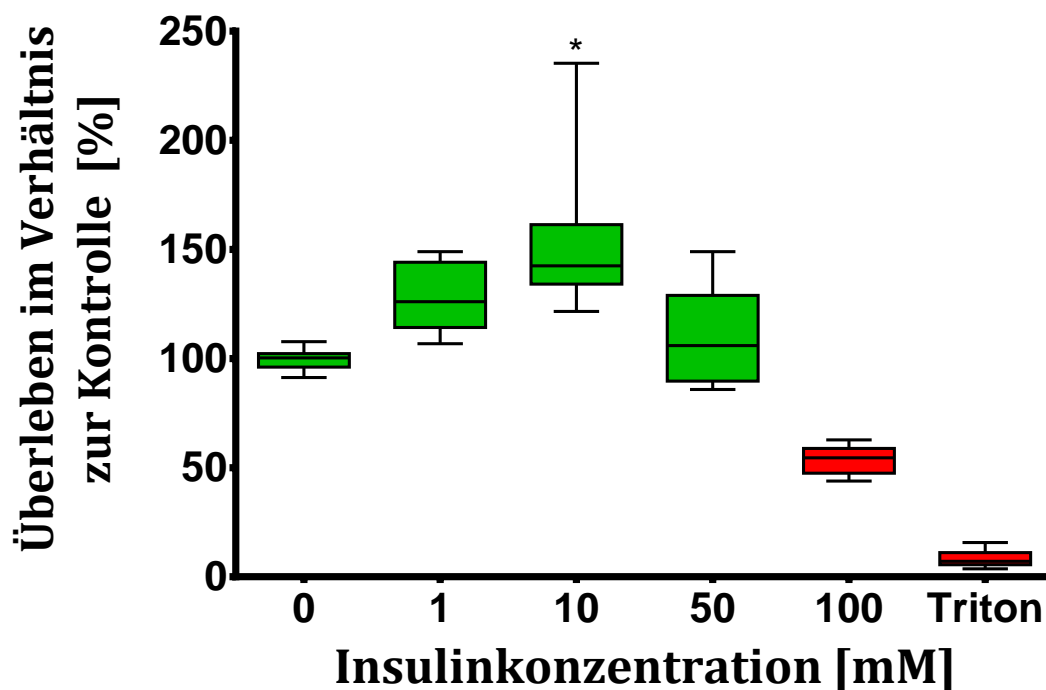
Serumproben von Typ-2-Diabetikern und Nicht-Diabetikern wurden präoperativ entnommen und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Proben von Typ-2-Diabetikern zeigten hierbei eine um ca. 40% statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ) höhere TGF- $\beta$ -Konzentration gegenüber der Kontrollgruppe (Abbildung 3-1).



**Abbildung 3-1: TGF- $\beta$ -Serumspiegel von Typ-2-Diabetikern (DM 2) im Vergleich mit nicht-diabetischen Kontrollen.** Die statistische Analyse der Daten erfolgte mittels des Mann-Whitney-U-Tests (\*\*\*\* $p < 0,0001$ ). Für jede Gruppe gilt:  $N=10$ ,  $n=4$ .

## 3.2 Zytotoxizitätstests

Um die Zytotoxizität der zur Stimulation der Osteoblastenkulturen verwendeten supraphysiologischen Insulinkonzentrationen auszuschließen, wurden phOb mit verschiedenen Insulinkonzentrationen stimuliert und nach 24 Stunden ein MTT-Test durchgeführt. Dieser ergab, dass die geplanten Insulinkonzentrationen für die Stimulation der Zellkulturen nicht zytotoxisch sind ( $p < 0,05$ ). Die Zugabe von 0,1% Triton führte erwartungsgemäß zum Absterben der so behandelten phObs (Abbildung 3–2).



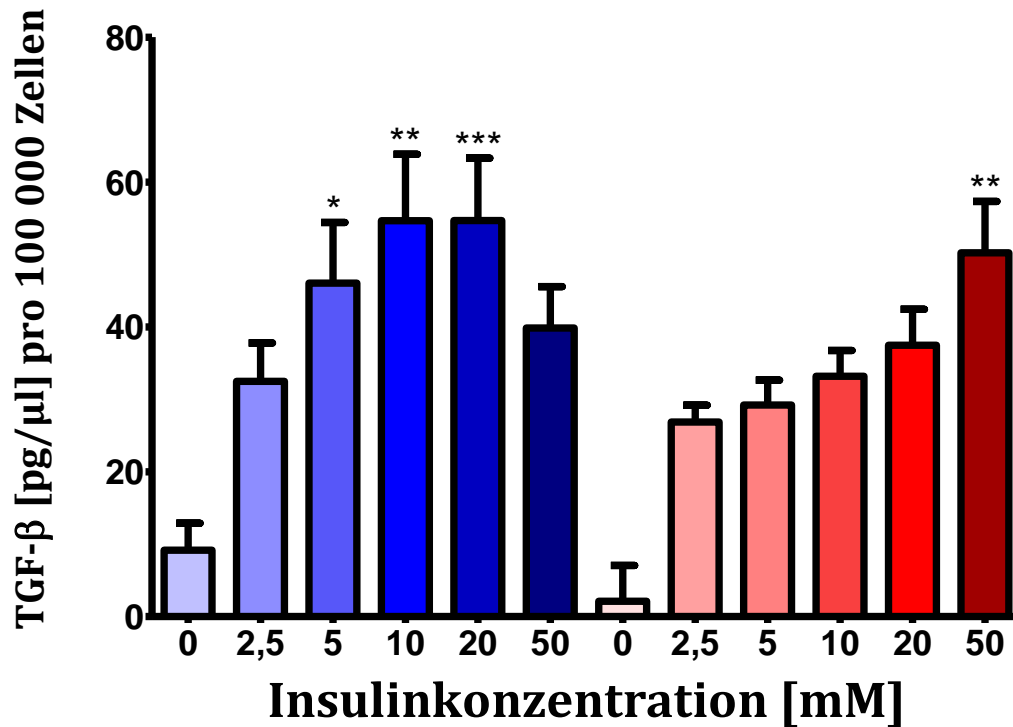
**Abbildung 3-2: Die Viabilität mit Insulin stimulierter Osteoblasten im Verhältnis zu den unbehandelten Kontrollen in %.** Die statistische Analyse der Daten erfolgte mittels des Kruskal-Wallis-Tests und anschließendem Dunn's-Test (\* $p = 0,0418$  gegenüber der unbehandelten Kontrolle). Die Ergebnisse für die Insulinkonzentrationen 1-50 mM sind außerdem hoch signifikant gegenüber der Positivkontrolle Triton, wobei gilt:  $p < 0,001$ .  $N = 2$ ,  $n = 4$

## 3.3 TGF- $\beta$ -Synthese

### 3.3.1 Insulin-abhängige Synthese der aktiven Form von TGF- $\beta$

Osteoblasten wurden mit 6 verschiedenen Konzentrationen Insulin (0, 2,5, 5, 10, 20, 50 mM) und 2 verschiedenen Glukosekonzentrationen (1,4 g/l u. 4,5 g/l) stimuliert. Nach vier Tagen wurde die Menge des von den Zellen sezernierten TGF- $\beta$  gemessen. Mit steigender Insulinkonzentration ist ein Anstieg der sezernierten Menge TGF- $\beta$  festzustellen. Für die

Kombinationen 1,4 g/l Glukose und 5, 10, 20 mM Insulin, sowie die Kombination 4,5 g/l und 50 mM Insulin, ergab die statistische Auswertung  $p < 0,05$  (Abbildung 3-3).

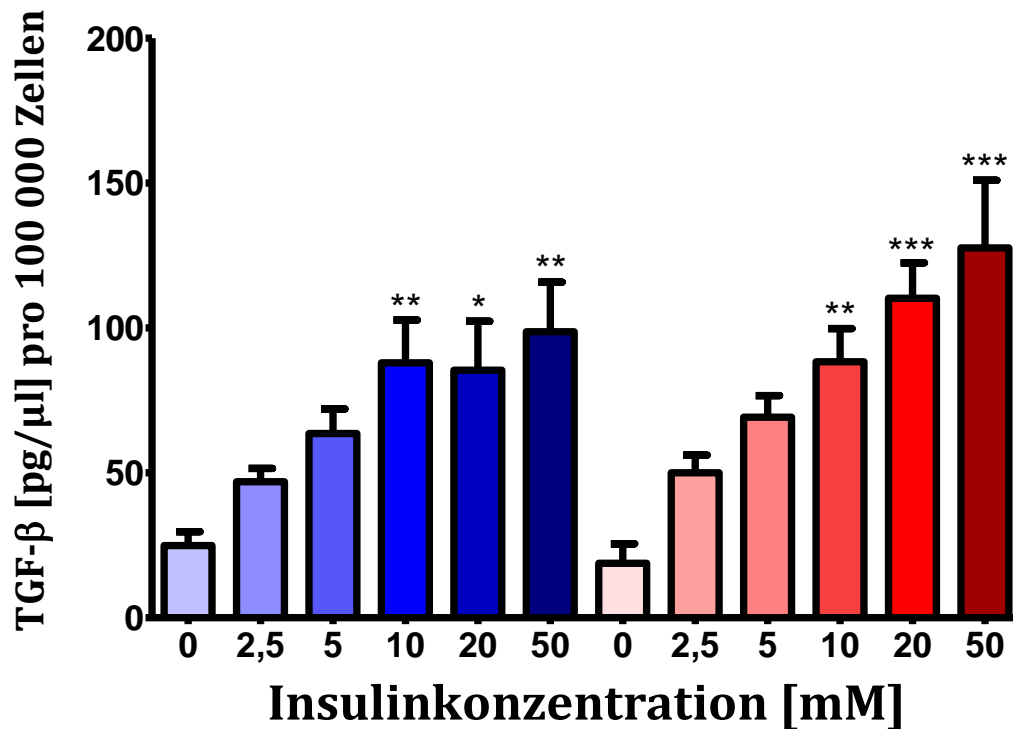


**Abbildung 3-3: TGF-β-Konzentration (aktiv) im Mediumüberstand mit Insulin stimulierter phObs.** Die blauen Balken stellen dabei die Ergebnisse der mit 1,4 g/l Glukose stimulierten phObs und die roten Balken die Ergebnisse der mit 4,5 g/l Glukose stimulierten phObs dar. Die statistische Analyse der Daten erfolgte mittels des Kruskal-Wallis-Tests und anschließendem Dunn's-Test (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  gegenüber den unbehandelten Kontrollen mit 0 mM Insulin).  $N=3$ ,  $n=4$ .

### 3.3.2 Insulin-abhängige Synthese der Gesamtmenge von TGF-β

Der Versuchsaufbau entspricht dem des oben beschriebenen Versuchs. Um die totale TGF-β-Konzentration zu messen, wurde das Medium vor der Messung mit Salzsäurelösung behandelt. Mit steigender Insulinkonzentration ist ein Anstieg der sezernierten Menge TGF-β erkennbar. Die statistische Auswertung ergab eine statistische Signifikanz für die

Kombination beider Glukosekonzentrationen (1,4 u. 4,5 g/l) und 10, 20, 50 mM Insulin (Abbildung 3-4).

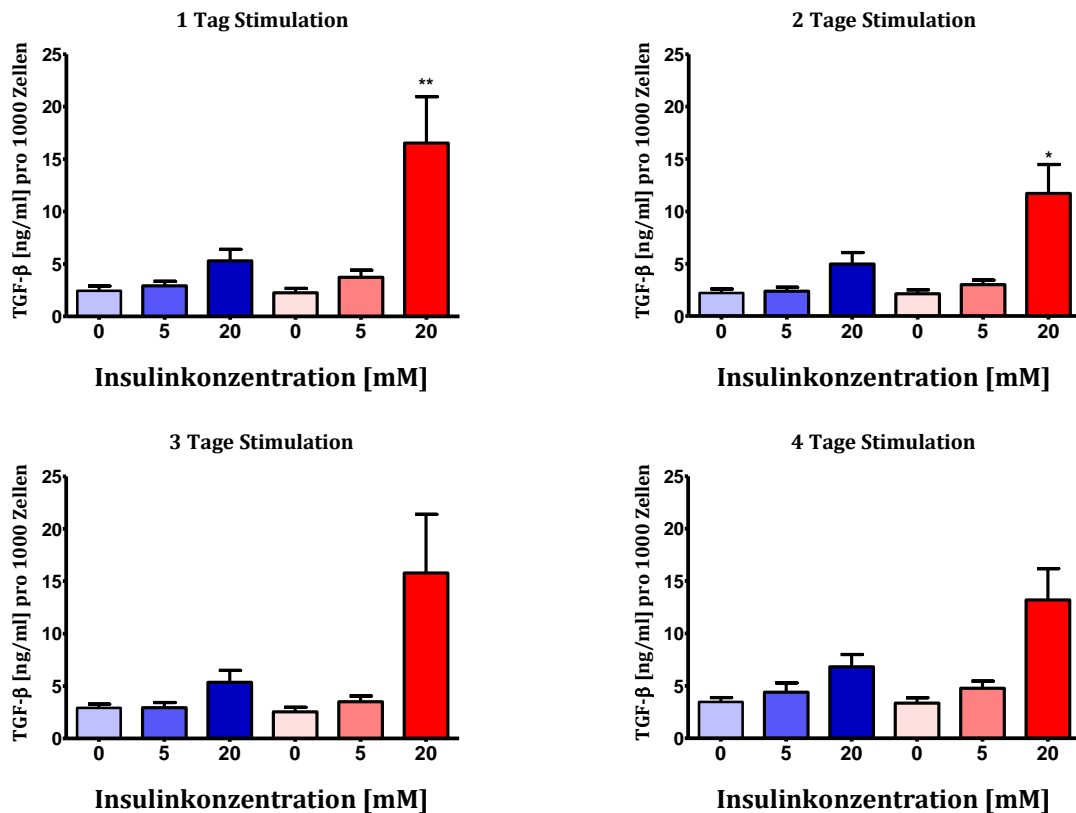


**Abbildung 3-4: TGF-β-Konzentration (total) im Mediumüberstand mit Insulin stimulierter phObs.** Die blauen Balken stellen dabei die Ergebnisse der mit 1,4 g/l Glukose stimulierten phObs und die roten Balken die Ergebnisse der mit 4,5 g/l Glukose stimulierten phObs dar. Die statistische Analyse der Daten erfolgte mittels des Kruskal-Wallis-Tests und anschließendem Dunn's-Test (\*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001 gegenüber den unbehandelten Kontrollen mit 0 mM Insulin). N=3, n=4.

### 3.3.3 Insulin-abhängige TGF-β-Synthese im zeitlichen Verlauf

Um mögliche Schwankungen in der TGF-β-Synthese in der frühen Phase der Insulinstimulation zu untersuchen, wurden in diesem Experiment die zu untersuchenden Zellen mit drei verschiedenen Insulinkonzentrationen (0, 5, 20 mM) sowie zwei verschiedenen Glukosekonzentrationen (1,4 u. 4,5 g/l) stimuliert, um anschließend nach einem, zwei, drei und vier Tagen ausgewertet zu werden. Es zeigte sich eine insulinkonzentrationsabhängige TGF-β-Sekretion durch die Osteoblasten, wobei die

Veränderungen im zeitlichen Verlauf minimal sind (Abbildung 3-5).



**Abbildung 3-5: TGF- $\beta$ -Konzentration (aktiv) im Mediumüberstand mit Insulin stimulierter phObs im zeitlichen Verlauf.** Die blauen Balken stellen dabei die Ergebnisse der mit 1,4 g/l Glukose stimulierten phObs und die roten Balken die Ergebnisse der mit 4,5 g/l Glukose stimulierten phObs dar. Die statistische Analyse der Daten erfolgte mittels des Kruskal-Wallis-Tests und anschließendem Dunn's-Test (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  gegenüber den unbehandelten Kontrollen mit 0 mM Insulin).  $N=5$ ,  $n=4$

Neben diesem Versuchsaufbau, welcher gezielt die kurzfristigen Effekte einer Stimulation der Osteoblasten mit Insulin untersuchen sollte, erfolgte eine Stimulation der phObs mit Insulin über 6 Tage. In der grafischen Darstellung der Ergebnisse wird ein Anstieg der TGF- $\beta$ -Konzentration im Medium abhängig von der zugegebenen Insulinkonzentration

ersichtlich. Dabei ist die TGF- $\beta$ -Sekretion durch die Osteoblasten bei der höheren Glukosekonzentration tendenziell höher (Abbildung 3-6).

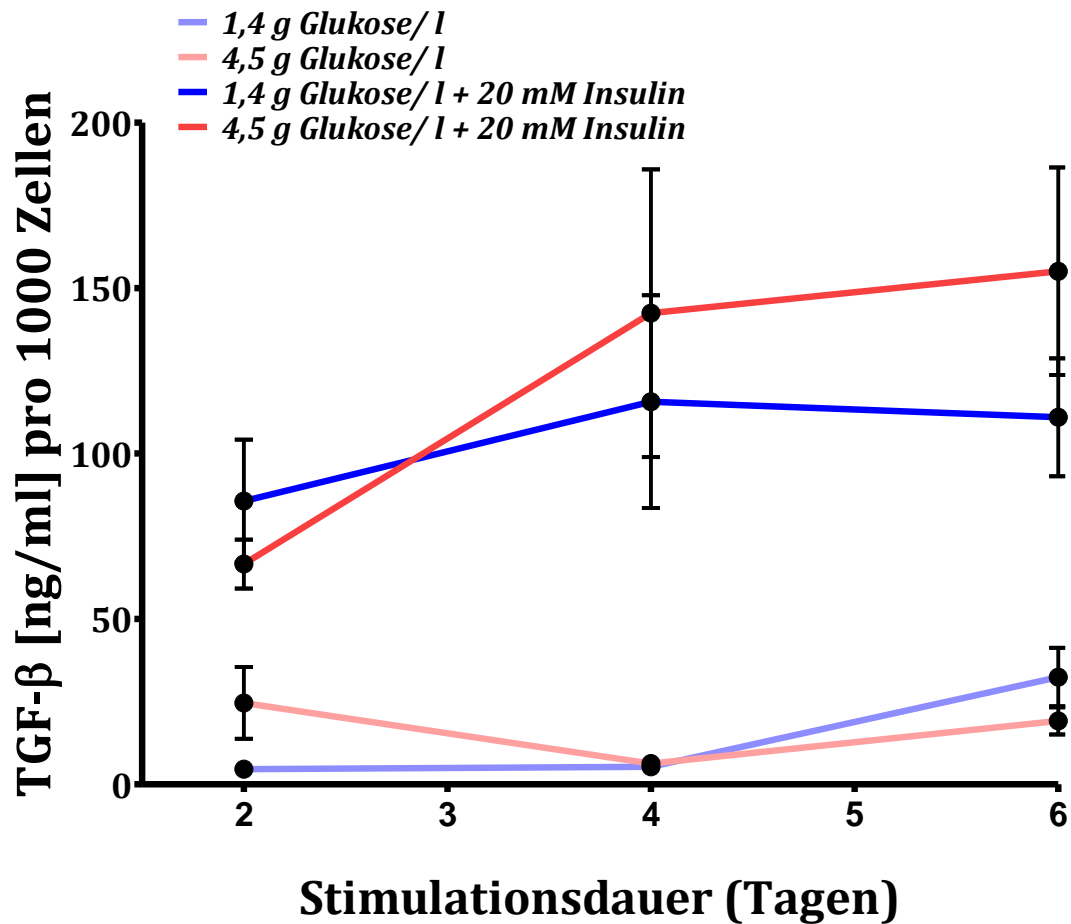
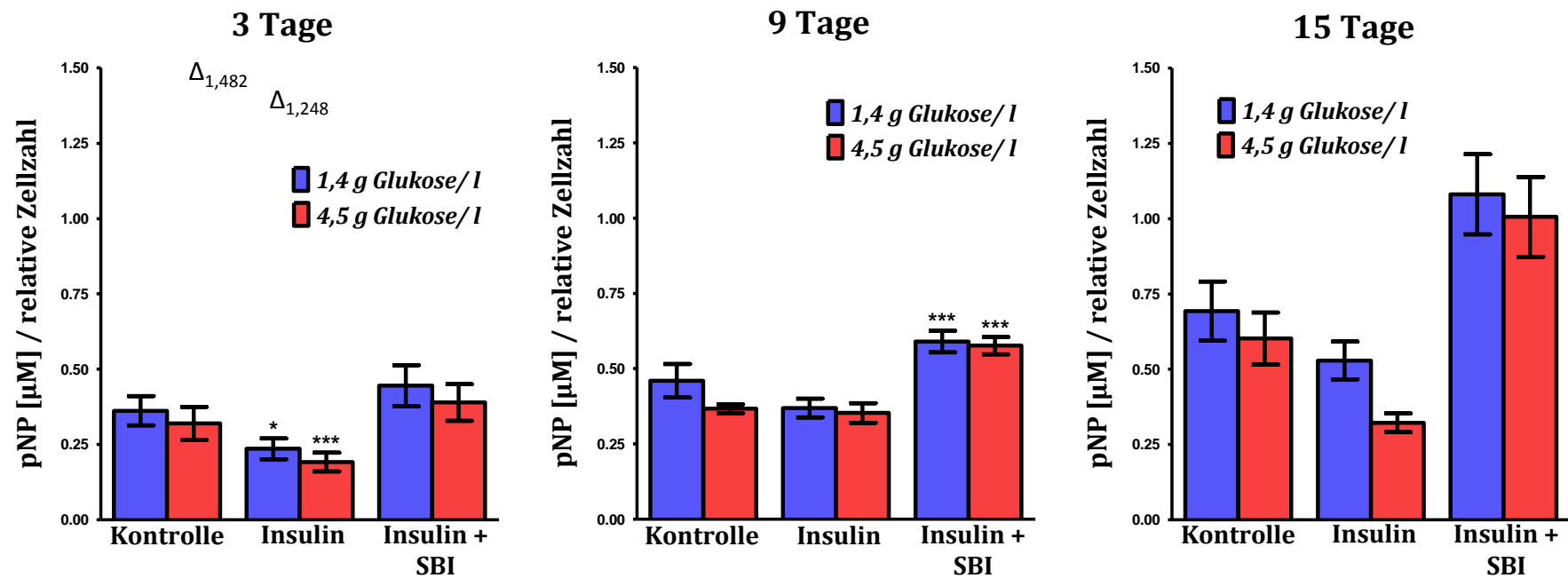


Abbildung 3-6: TGF- $\beta$ -Konzentration (aktiv) im Mediumüberstand mit Insulin stimulierter phObs im zeitlichen Verlauf. Die statistische Analyse der Daten erfolgte mittels des Kruskal-Wallis-Tests und anschließendem Dunn's-Test. N=3 n= 4

### 3.4 AP-Aktivität

Um den Einfluss von Insulin auf die Aktivität der alkalischen Phosphatase der phObs zu untersuchen, wurde die Aktivität dieses Enzyms untersucht. Im Anschluss daran wurde ein Teil der zu untersuchenden Zellen mit 5 mM Insulin und 2 verschiedenen Glukosekonzentrationen (1,4 g/l, 4,5 g/l) stimuliert. Des Weiteren wurde mit Hilfe des selektiven ALK-Inhibitors SB431542 bei gleichzeitiger Stimulation mit 5 mM Insulin der TGF- $\beta$ -Signalweg blockiert.

Die mit Insulin stimulierten Osteoblasten zeigten im Verlauf von 15 Tagen eine Abnahme der AP-Aktivität gegenüber den Kontrollen. Dabei zeichnet sich ein stärkerer Abfall der AP-Konzentration bei den Osteoblastenkulturen ab, welche mit 4,5 g/l Glukose stimuliert wurden. Als statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ) erwies sich dieser Effekt nach Insulingabe allerdings nur am Messpunkt 3 Tage. Das Blockieren des TGF- $\beta$ -Signalweges mittels ALK-Inhibitor SB431542 zeigte einen gegensätzlichen Effekt. Dabei war der Anstieg für diese Mediumzusammensetzung für die Messung am 9. Tag statistisch signifikant (Abbildung 3-7).



**Abbildung 3-7: AP-Aktivität von phObs nach 3, 9 und 15 Tagen Stimulation.** SBI = ALK-Inhibitor SB431542.  $\Delta$  = Extremwerte. Die statistische Analyse der Daten erfolgte mittels des Kruskal-Wallis-Tests und anschließendem Dunn's-Test (\* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$  gegenüber den unbehandelten Kontrollen mit 0 mM Insulin). N=5, n= 8.

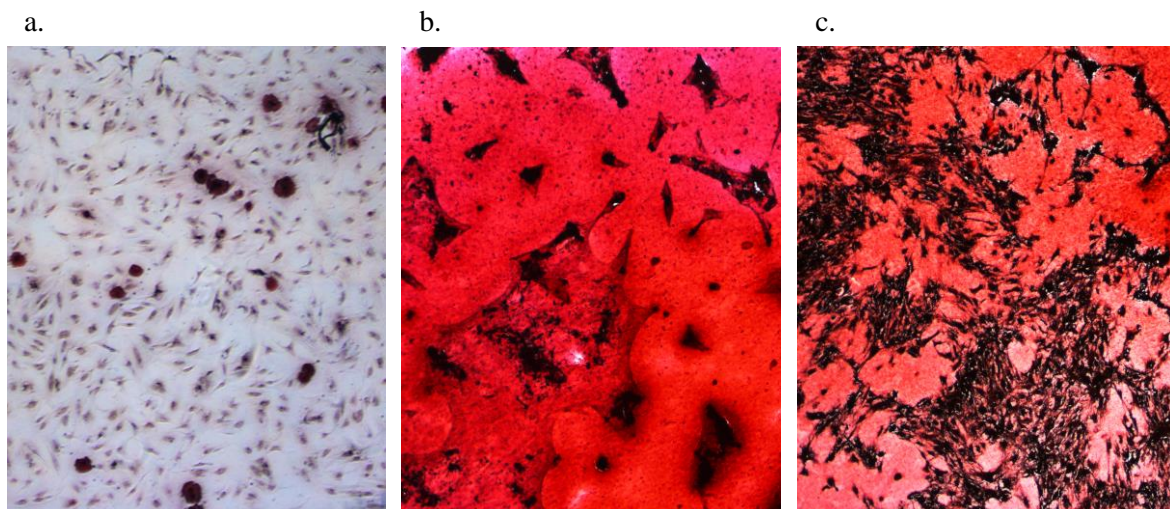


## 3.5 Kalzifizierungsversuche

Die Einlagerung von Hydroxyapatit-Kristallen und Kalzium in die Osteoidmatrix wurde mit Hilfe der Von-Kossa- und Alizarin-Rot-Färbung untersucht. Dazu wurden phObs mit und ohne Insulin (5 mM) für 21 Tage mit Osteoblastendifferenzierungsmedium stimuliert.

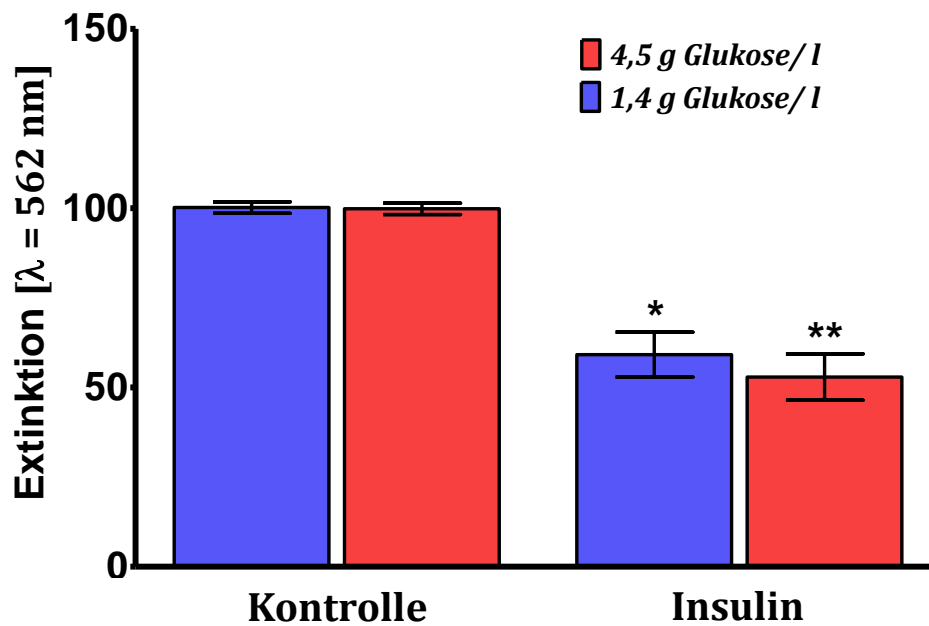
### 3.5.1 Alizarin-Rot-Färbungen

Lichtmikroskopisch wurden nur wenige Unterschiede zwischen den 4 Bedingungen festgestellt. Ein Unterschied ergab sich durch die Beobachtung einer erhöhten Osteoblastenzahl nach Stimulation mit Insulin. Die mit Insulin stimulierten phObs erschienen morphologisch kleiner und besonders spindelförmig verglichen mit den ohne Insulin kultivierten phObs (Abbildung 3-8).



**Abbildung 3-8: Alizarin-Rot-Färbung der stimulierten Osteoblasten- Lichtmikroskopische Aufnahmen in 40facher Vergrößerung. Stimulationsdauer 21 Tage.** a. Ohne Stimulation mit Differenzierungsmedium b. Differenzierungsmedium ohne Insulin c. Stimulation mit Differenzierungsmedium und 5 mM Insulin. N=4, n=2.

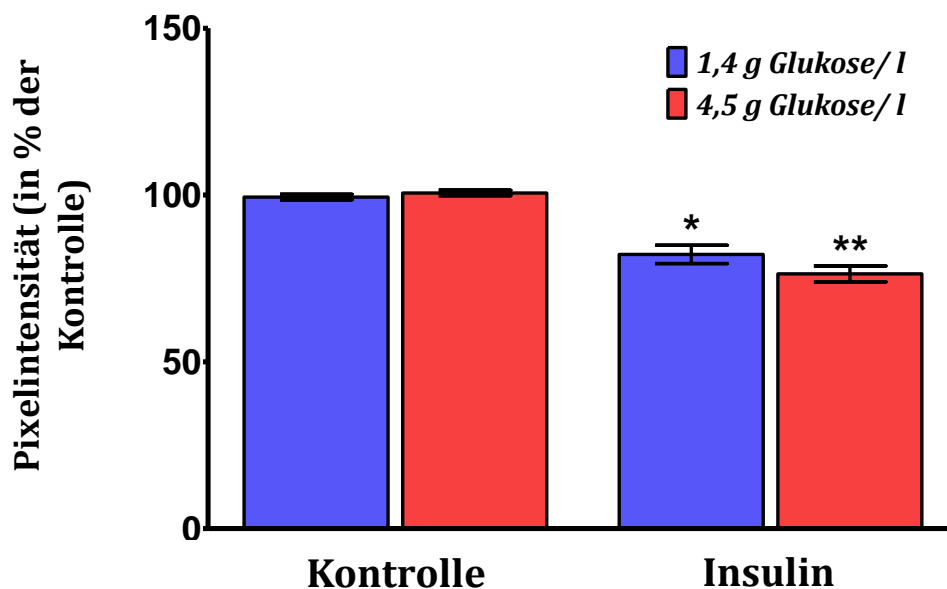
Die photometrische Auswertung der Alizarin-Rot-Färbung ergab eine um mehr als 40% niedrigere Kalzifizierung der Osteoblastenkulturen nach Stimulation mit 5 mM Insulin für 21 Tage ( $p < 0.05$ ) (Abbildung 3-9).



**Abbildung 3-9: Alizarin-Rot-Färbung- Auswirkungen der Stimulation mit Insulin (5 mM) auf phObs.** Die statistische Analyse der Daten erfolgte mittels des Kruskal-Wallis-Tests und anschließendem Dunn's-Test (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  gegenüber den unbehandelten Kontrollen mit 0 mM Insulin).  $N=4$ ,  $n=2$ .

### 3.5.2 Von-Kossa-Färbungen

Lichtmikroskopisch wurden keine wesentlichen Unterschiede nach Von-Kossa-Färbung festgestellt (nicht gezeigt). Die densitometrische Auswertung der Von-Kossa-Färbungen zeigt allerdings eine um ca. 20% niedrigere Kalzifizierung der Osteoblastenkulturen nach Stimulation mit 5 mM Insulin für 21 Tage ( $p < 0.05$ ) (Abbildung 3-10).



**Abbildung 3-10: Von-Kossa-Färbung- Auswirkungen der Stimulation mit Insulin (5 mM) auf phObs.** Die statistische Analyse der Daten erfolgte mittels des Kruskal-Wallis-Tests und anschließendem Dunn's-Test (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  gegenüber den unbehandelten Kontrollen mit 0 mM Insulin).  $N=4$ ,  $n=2$ .

### 3.6 Genexpressionsanalysen von Osteoblasten *in vitro*

Um den Einfluss von Insulin auf die Genexpression von Osteoblasten zu untersuchen, wurden die vorbereiteten Kulturen mit folgenden Substanzen, welche dem Differenzierungsmedium hinzugegeben wurden, für 7 Tage stimuliert:

1. Kein Zusatz zum Differenzierungsmedium (Kontrollen)
2. Insulin (5 mM)
3. TGF- $\beta$  (5 ng/ml)
4. Insulin 5 mM und selektiver Activin Receptor-Like Kinases Inhibitor SB431542 (5  $\mu$ M)

Diese Bedingungen wurden weiterhin mit 2 verschiedenen Glukosekonzentrationen kombiniert: 1,4 g/l und 4,5 g/l.

### 3.6.1 Ergebnisse RT-PCR Alkalische Phosphatase *in vitro*

Die Auswertung der RT-PCR-Ergebnisse ergab für die *Alkalische Phosphatase* nach Stimulation mit 5 mM Insulin eine tendenziell niedrigere Genexpression auf transkriptioneller Ebene als die Kontrollen. Nach Stimulation der phObs mit TGF- $\beta$ , ergab die densitometrische Analyse der RT-PCR-Produktbanden eine über 90% niedrigere Genexpression gegenüber den Kontrollen ( $p < 0,05$ ) (Abbildung 3-11).

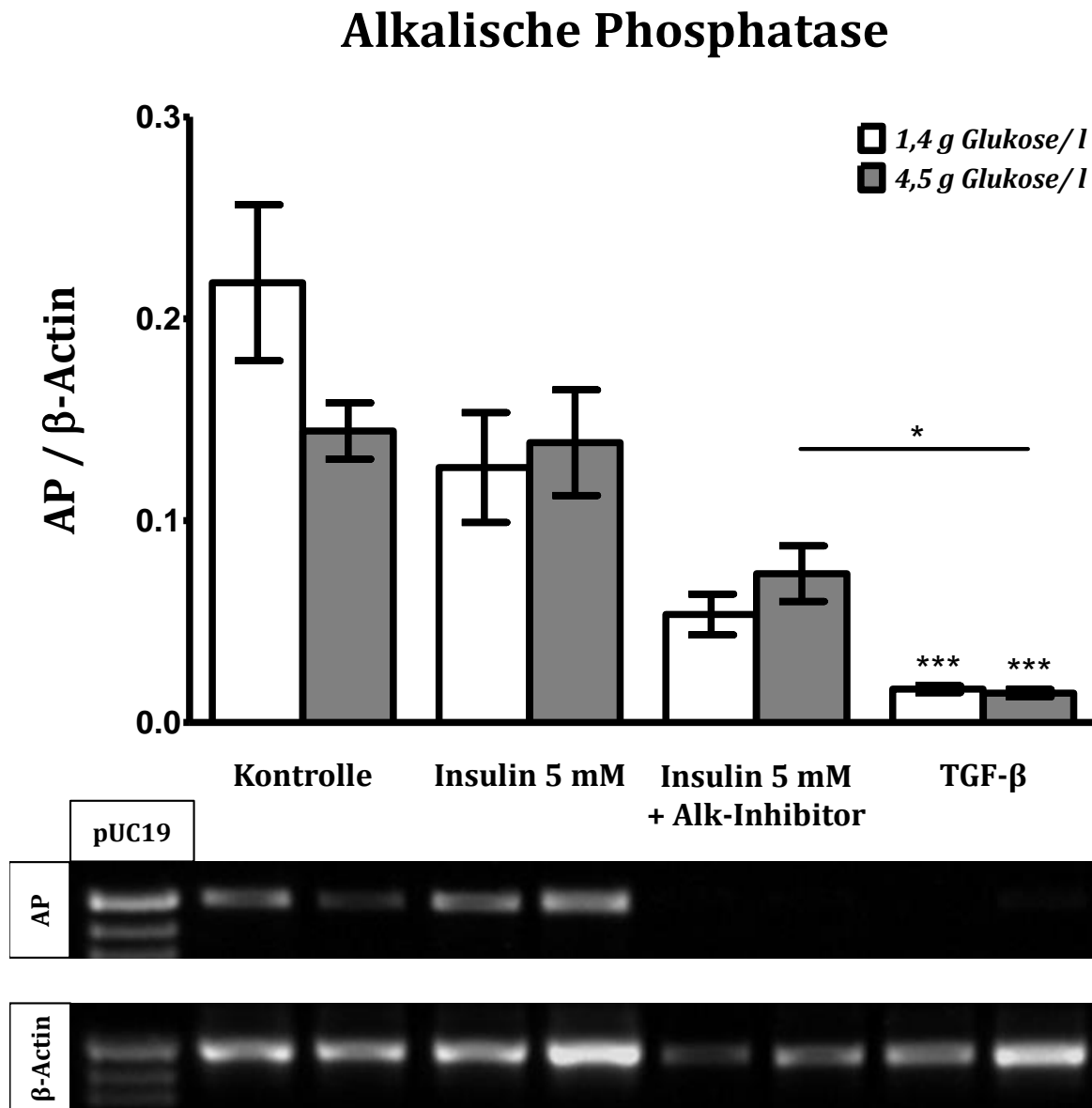
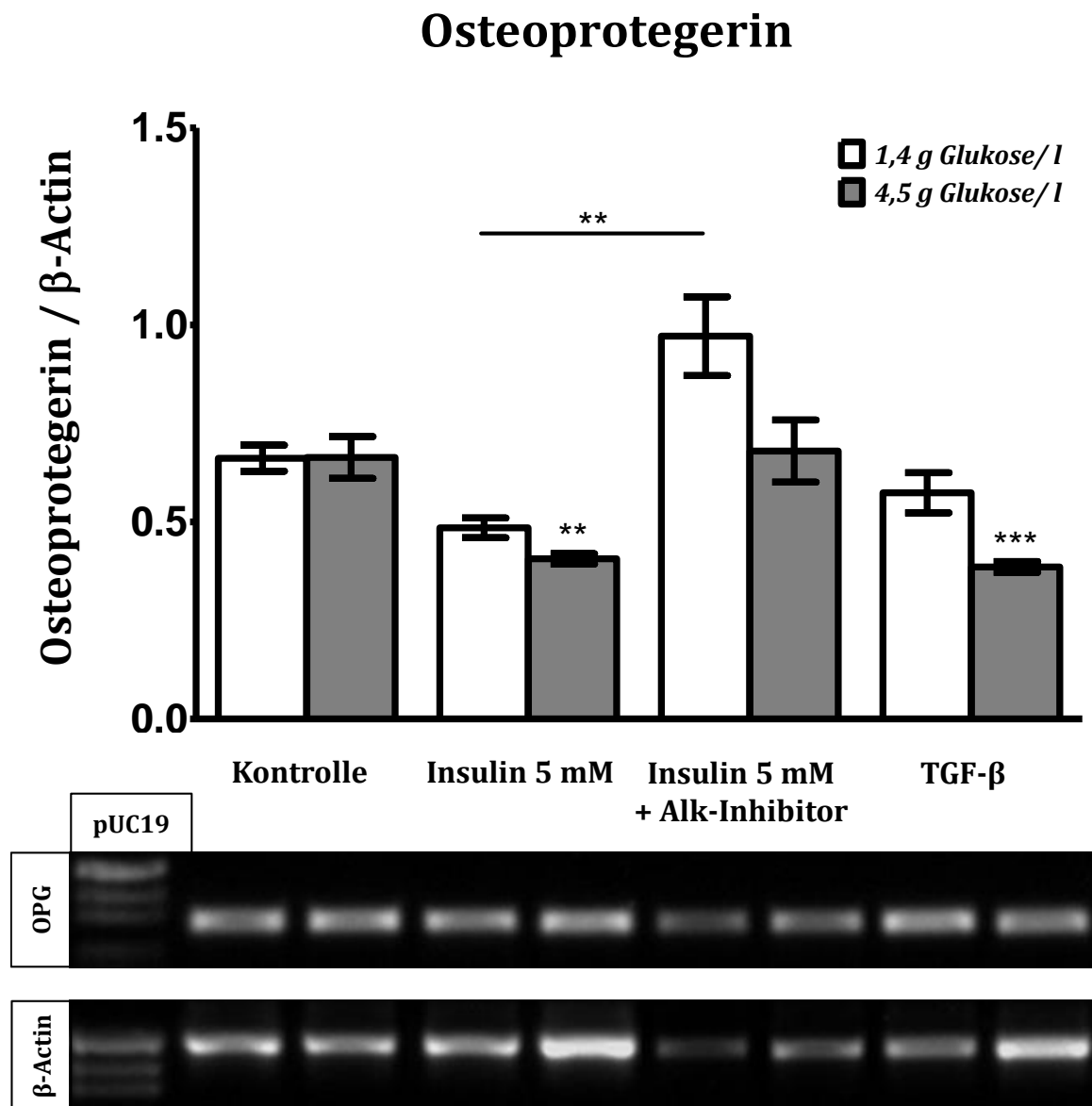


Abbildung 3-11: Genexpressionsanalyse *Alkalische Phosphatase in vitro*.

Die statistische Analyse der Daten erfolgte mittels des Kruskal-Wallis-Tests und anschließendem Dunn's-Test (\* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$  gegenüber den unbehandelten Kontrollen mit 0 mM Insulin, falls nicht anders gekennzeichnet).  $N=3$ ,  $n \geq 4$ .

### 3.6.2 Ergebnisse RT-PCR Osteoprotegerin *in vitro*

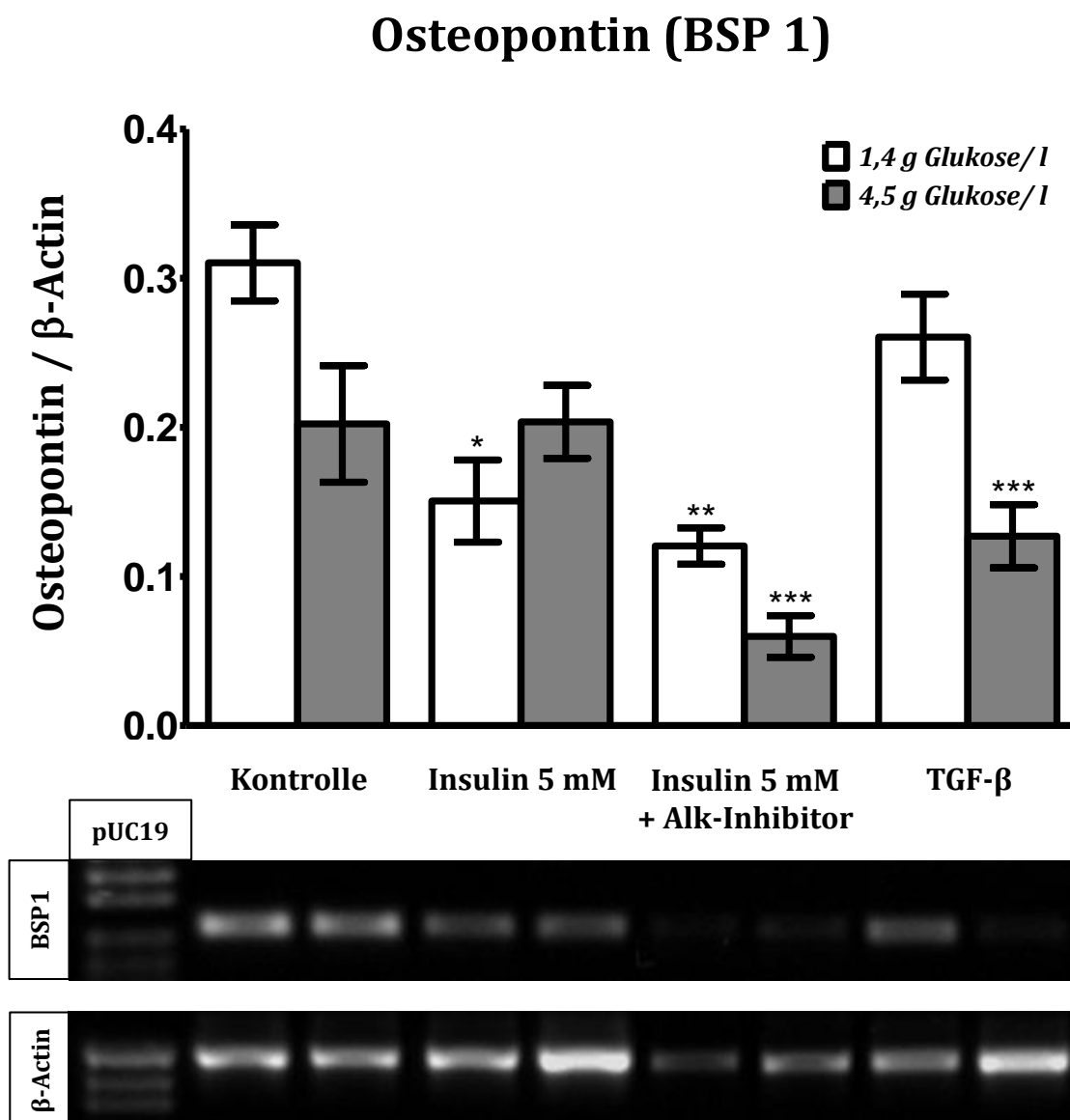
Die Osteoblastenkulturen, die mit 5 mM Insulin stimuliert wurden, zeigten eine um mehr als 30% niedrigere Genexpression von *Osteoprotegerin* gegenüber den Kontrollen. Ähnliche Veränderungen konnten nach Stimulation der phOb mit TGF- $\beta$  beobachtet werden. In beiden Fällen erwiesen sich die Ergebnisse unter erhöhter Glukosekonzentration (4,5 g Glukose/l) als statistisch signifikant. Die zusätzliche Gabe des ALK-Inhibitors SB431542 zum, im Differenzierungsmedium befindlichen, Insulin (5 mM) ergab einen Anstieg gegenüber den Kontrollen (Abbildung 3-12).



**Abbildung 3-12: Genexpressionsanalyse *Osteoprotegerin in vitro*.** Die statistische Analyse der Daten erfolgte mittels des Kruskal-Wallis-Tests und anschließend dem Dunn's-Test (\*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  gegenüber den unbehandelten Kontrollen mit 0 mM Insulin, falls nicht anders gekennzeichnet).  $N=3$ ,  $n \geq 4$ .

### 3.6.3 Ergebnisse RT-PCR Osteopontin *in vitro*

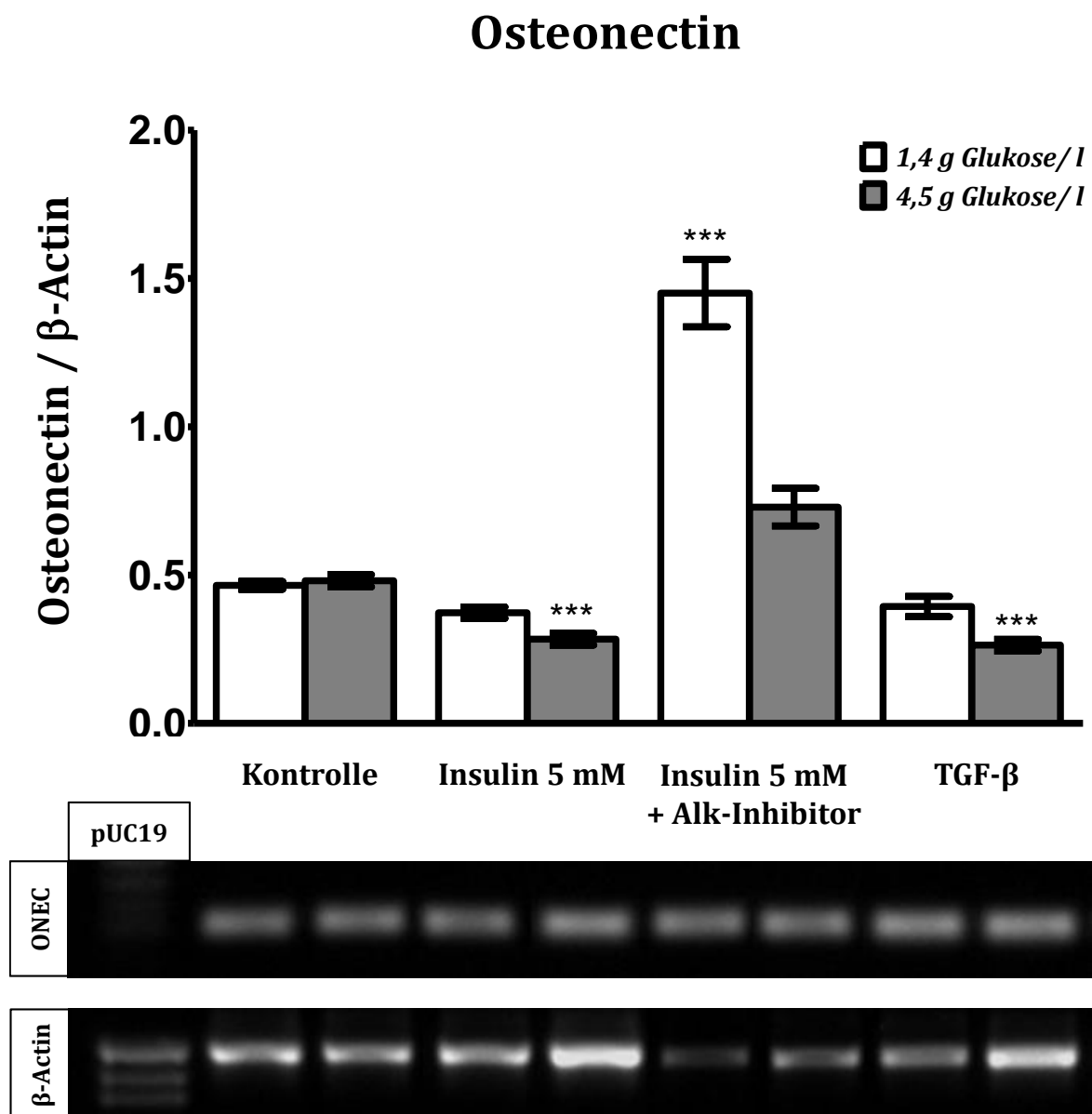
Die Ergebnisse der RT-PCR für *Osteopontin* (*BSP1*) zeigten eine um 50% niedrigere Genexpression als die Kontrollen für die mit Insulin stimulierten Osteoblasten. Nach Stimulation der phObs mit TGF- $\beta$  und Glukosekonzentration 4,5 g/l ergab die Untersuchung der Genexpression von *Osteopontin* eine statistisch signifikante Abnahme um mehr als 60% gegenüber der Kontrolle. Die mit einer Kombination bestehend aus 5 mM Insulin und dem ALK-Inhibitor SB431542 stimulierten phObs zeigten eine gegenüber den Kontrollen statistisch signifikante Herunterregulation der Genexpression von *Osteopontin* um 60% (Abbildung 3-13).



**Abbildung 3-13: Genexpressionsanalyse *Osteopontin in vitro*.** Die statistische Analyse der Daten erfolgte mittels des Kruskal-Wallis-Tests und anschließend dem Dunn's-Test (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  gegenüber den unbehandelten Kontrollen mit 0 mM Insulin).  $N=3$ ,  $n \geq 4$ .

### 3.6.4 Ergebnisse RT-PCR Osteonectin *in vitro*

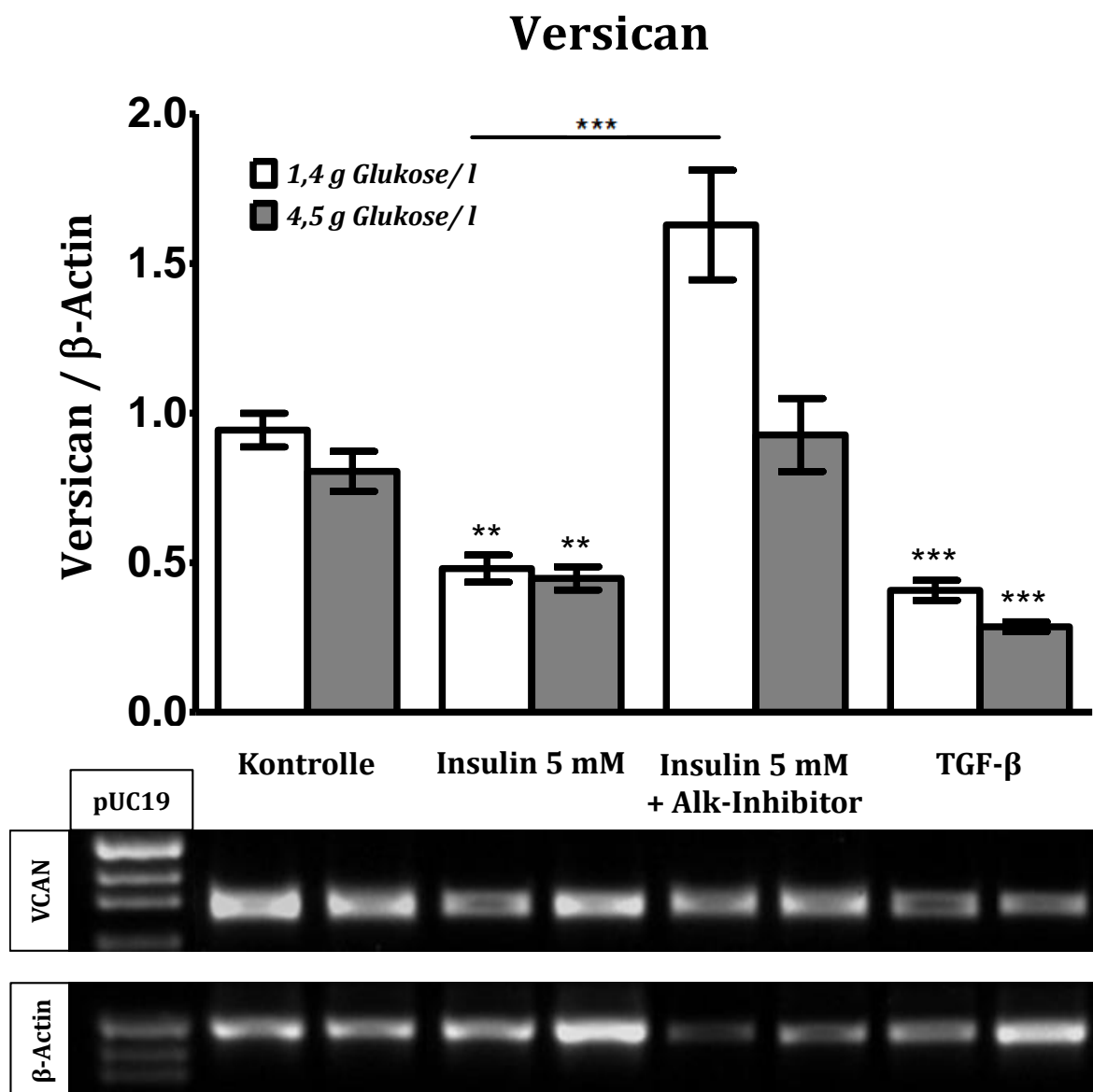
Die Untersuchung von *Osteonectin* ergab eine statistisch signifikante, um bis zu 35% niedrigere, Genexpression gegenüber der Kontrolle nach Stimulation der phObs mit 5 mM Insulin, als auch nach Stimulation mit TGF- $\beta$ . Nach Gabe des ALK-Inhibitors SB431542 zusätzlich zu Insulin (5 mM), ergab die densitometrische Analyse eine statistisch signifikante ( $p < 0,05$ ) Hochregulation um 220% (1,4 g Glukose/l) bzw. 57% (4,5 g Glukose) der Genexpression von *Osteonectin* (Abbildung 3-14).



**Abbildung 3-14: Genexpressionsanalyse *Osteonectin in vitro*.** Die statistische Analyse der Daten erfolgte mittels des Kruskal-Wallis-Tests und anschließendem Dunn's-Test (\*\*\*) $p < 0,001$  gegenüber den unbehandelten Kontrollen mit 0 mM Insulin).  $N=3$ ,  $n \geq 4$ .

### 3.6.5 Ergebnisse RT-PCR Versican *in vitro*

Die Untersuchung von *Versican* ergab eine statistisch signifikant niedrigere Genexpression gegenüber der Kontrolle nach Stimulation der phObs mit 5 mM Insulin, als auch nach Stimulation mit TGF- $\beta$ . Nach Gabe des ALK-Inhibitors SB431542 zusätzlich zum im verwendeten Differenzierungsmedium befindlichen Insulin (5 mM), ergab die densitometrische Analyse eine gegenüber der nicht behandelten Kontrolle statistisch nicht signifikante Hochregulation der Genexpression von *Versican* (Abbildung 3-15).

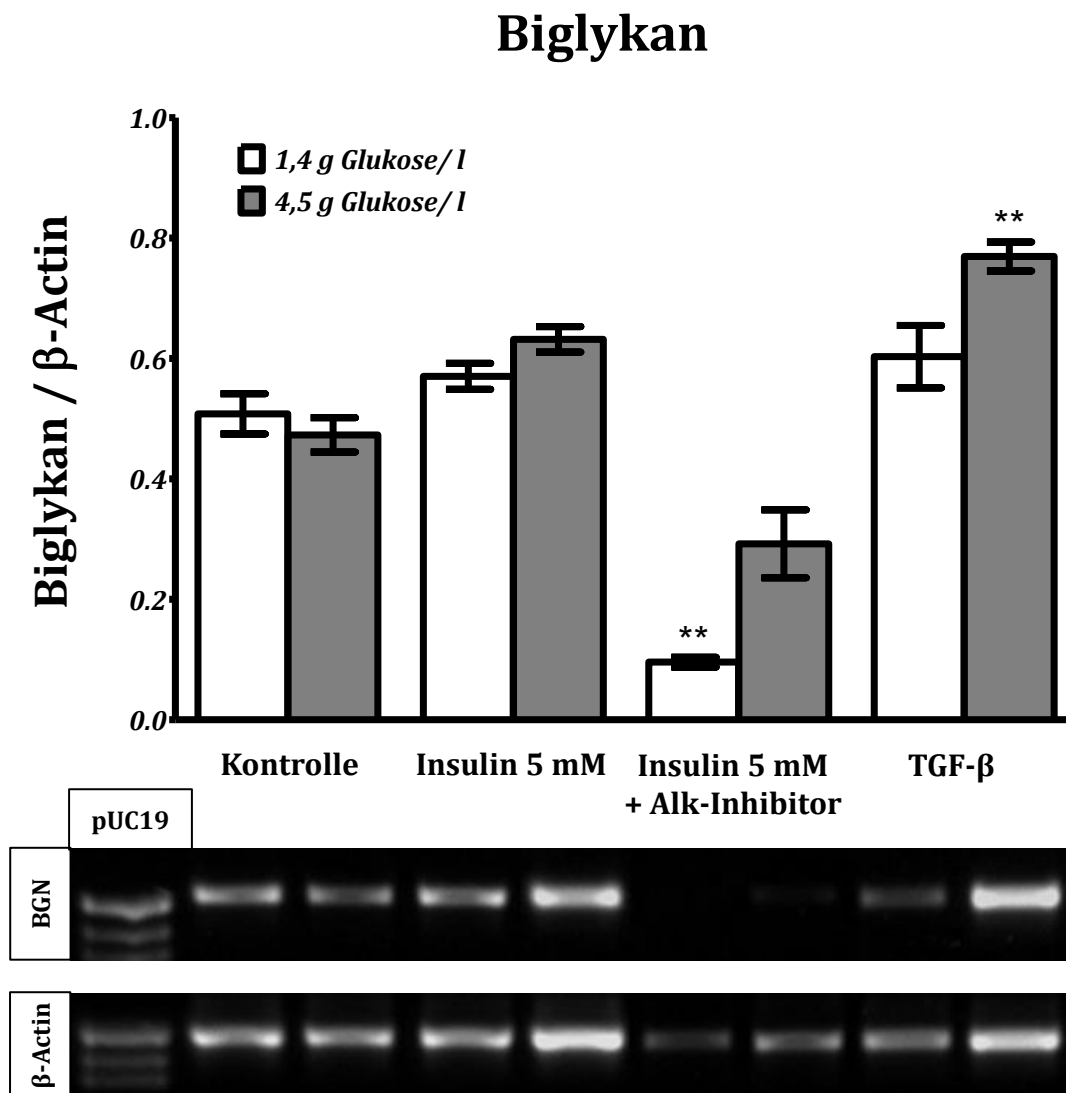


**Abbildung 3-15: Genexpressionsanalyse *Versican in vitro*.** Die statistische Analyse der Daten erfolgte mittels des Kruskal-Wallis-Tests und anschließendem Dunn's-Test (\*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001 gegenüber den unbehandelten Kontrollen mit 0 mM Insulin, falls nicht anders gekennzeichnet). N=3, n $\geq$ 4.



### 3.6.6 Ergebnisse RT-PCR Biglykan *in vitro*

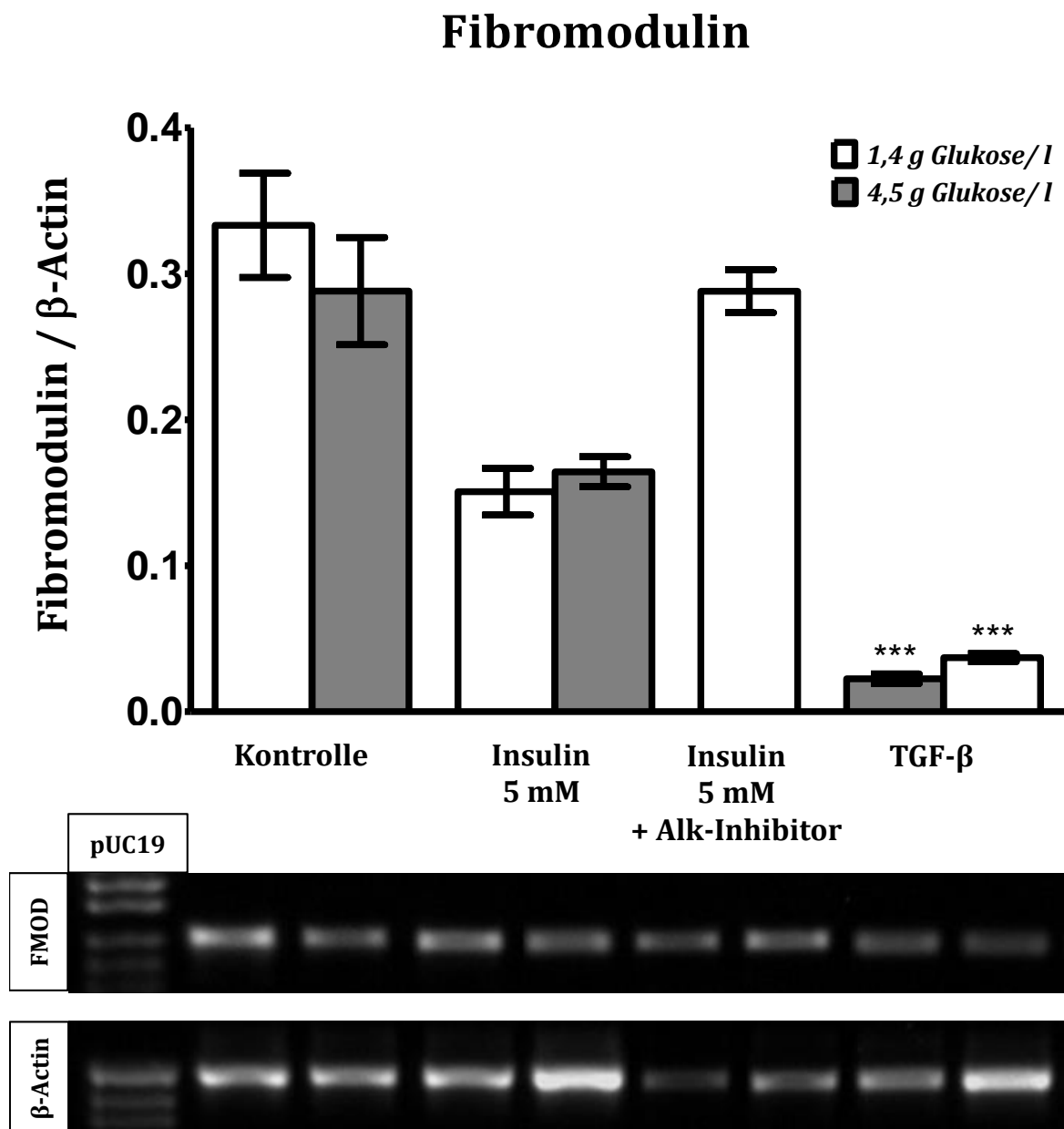
Die Auswertung der RT-PCR-Ergebnisse für *Biglykan* ergab nach Stimulation mit 5 mM Insulin eine tendenziell erhöhte Genexpression. Allerdings sind diese Ergebnisse gegenüber der Kontrolle statistisch nicht signifikant. Hingegen zeigt sich nach Stimulation mit 5 mM Insulin und gleichzeitiger Gabe des ALK-Inhibitors SB431542, eine deutliche, statistisch signifikante Herunterregulation gegenüber den Kontrollen. Nach Stimulation der phObs mit TGF- $\beta$ , ergab die densitometrische Analyse der RT-PCR-Produktbanden eine statistisch signifikante Erhöhung der Genexpression gegenüber den Kontrollen (Abbildung 3-16).



**Abbildung 3-16: Genexpressionsanalyse *Biglykan in vitro*.** Die statistische Analyse der Daten erfolgte mittels des Kruskal-Wallis-Tests und anschließend dem Dunn's-Test (\*\* $p < 0,01$  gegenüber den unbehandelten Kontrollen mit 0 mM Insulin).  $N=3$ ,  $n \geq 4$ .

### 3.6.7 Ergebnisse RT-PCR Fibromodulin *in vitro*

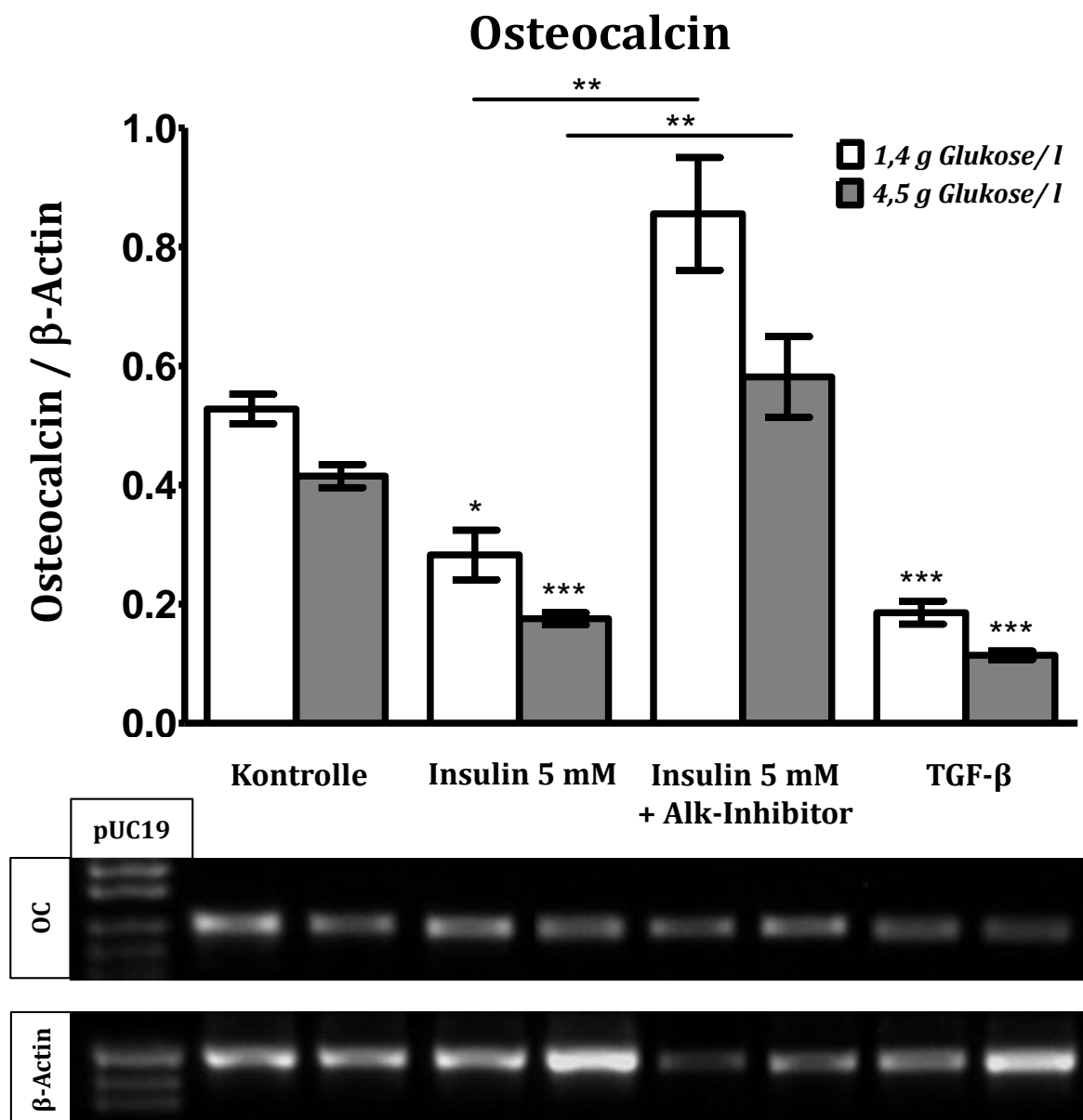
Die densitometrische Untersuchung der Ergebnisse der RT-PCR für *Fibromodulin* zeigte eine um mehr als 50% niedrigere Transkriptionsaktivität als die Kontrollen für die mit Insulin stimulierten Osteoblasten. Bei diesen Ergebnissen zeigte sich allerdings keine statistische Signifikanz. Nach Stimulation der phObs mit TGF- $\beta$  ergab die Untersuchung der Genexpression von *Fibromodulin* eine Abnahme um mehr als 90% gegenüber den Kontrollen. Dieses Ergebnis ergab eine hohe statistische Signifikanz ( $p < 0,001$ ) gegenüber den dabei verwendeten osteoblastären Kontrollen (Abbildung 3-17).



**Abbildung 3-17: Genexpressionsanalyse *Fibromodulin in vitro*.** Die statistische Analyse der Daten erfolgte mittels des Kruskal-Wallis-Tests und anschließendem Dunn's-Test (\*\* $p < 0,001$  gegenüber den unbeeideten Kontrollen mit 0 mM Insulin).  $N=3$ ,  $n \geq 4$ .

### 3.6.8 Ergebnisse RT-PCR Osteocalcin *in vitro*

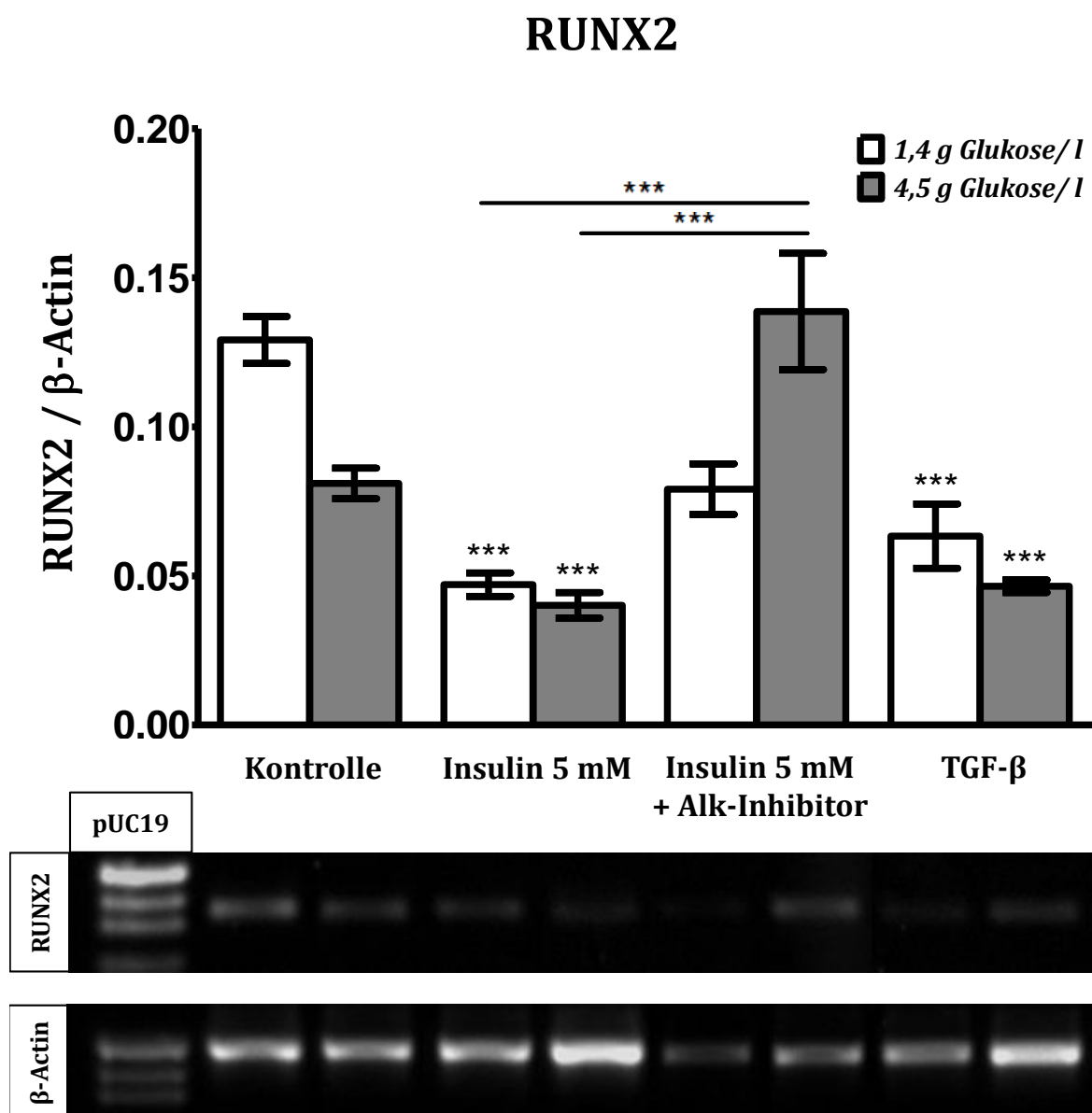
Die Untersuchung von *Osteocalcin* mittels RT-PCR zeigte eine Abnahme um mehr als 70% der Genexpression gegenüber den Kontrollen nach Stimulation der phObs mit Insulin. Die Osteoblastenkulturen, welche mit TGF- $\beta$  behandelt wurden, zeigten eine Abnahme der Genexpression um 70-80%. Außerdem war eine deutliche Zunahme der Genexpression von *Osteocalcin*, nach Blockieren des TGF- $\beta$ -Signalweges mit Hilfe des ALK-Inhibitors SB431542, zu beobachten (Abbildung 3-18).



**Abbildung 3-18: Genexpressionsanalyse *Osteocalcin in vitro*.** Die statistische Analyse der Daten erfolgte mittels des Kruskal-Wallis-Tests und anschließend dem Dunn's-Test (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  gegenüber den unbehandelten Kontrollen mit 0 mM Insulin, falls nicht anders gekennzeichnet).  $N=3$ ,  $n \geq 4$ .

### 3.6.9 Ergebnisse RT-PCR *RUNX2* *in vitro*

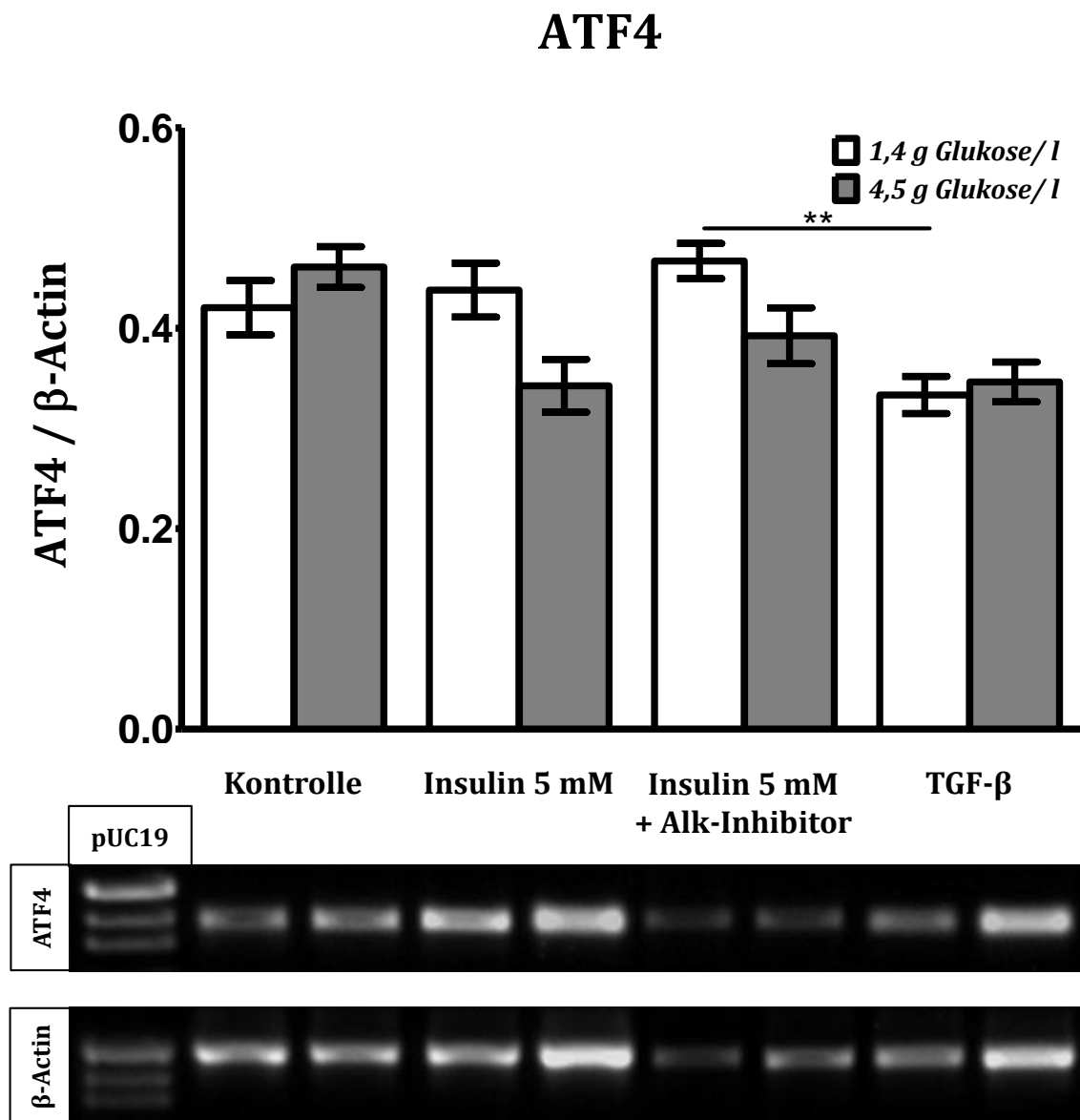
Nach Stimulation der phObs wurde die Genexpression von *RUNX2* mittels RT-PCR untersucht. Die Osteoblastenkulturen, welche mit 5 mM Insulin stimuliert wurden, zeigten eine mehr als 65% niedrigere Genexpression von *RUNX2* gegenüber den Kontrollen. Ähnliche Veränderungen konnten nach Stimulation der phObs mit TGF- $\beta$  beobachtet werden ( $p < 0,05$ ). Die zusätzliche Gabe des ALK-Inhibitors SB431542 ergab für die Glukosekonzentration 4,5 g/l einen diskreten Anstieg gegenüber den Kontrollen. Gegenüber den nur mit 5 mM Insulin stimulierten phObs ist dieser Anstieg statistisch signifikant ( $p < 0,001$ ) (Abbildung 3-19).



**Abbildung 3-19: Genexpressionsanalyse *Runx2* *in vitro*.** Die statistische Analyse der Daten erfolgte mittels des Kruskal-Wallis-Tests und anschließendem Dunn's-Test (\*\*\*) $p < 0,001$  gegenüber den unbehandelten Kontrollen mit 0 mM Insulin, falls nicht anders gekennzeichnet).  $N=3$ ,  $n \geq 4$ .

### 3.6.10 Ergebnisse RT-PCR ATF4 *in vitro*

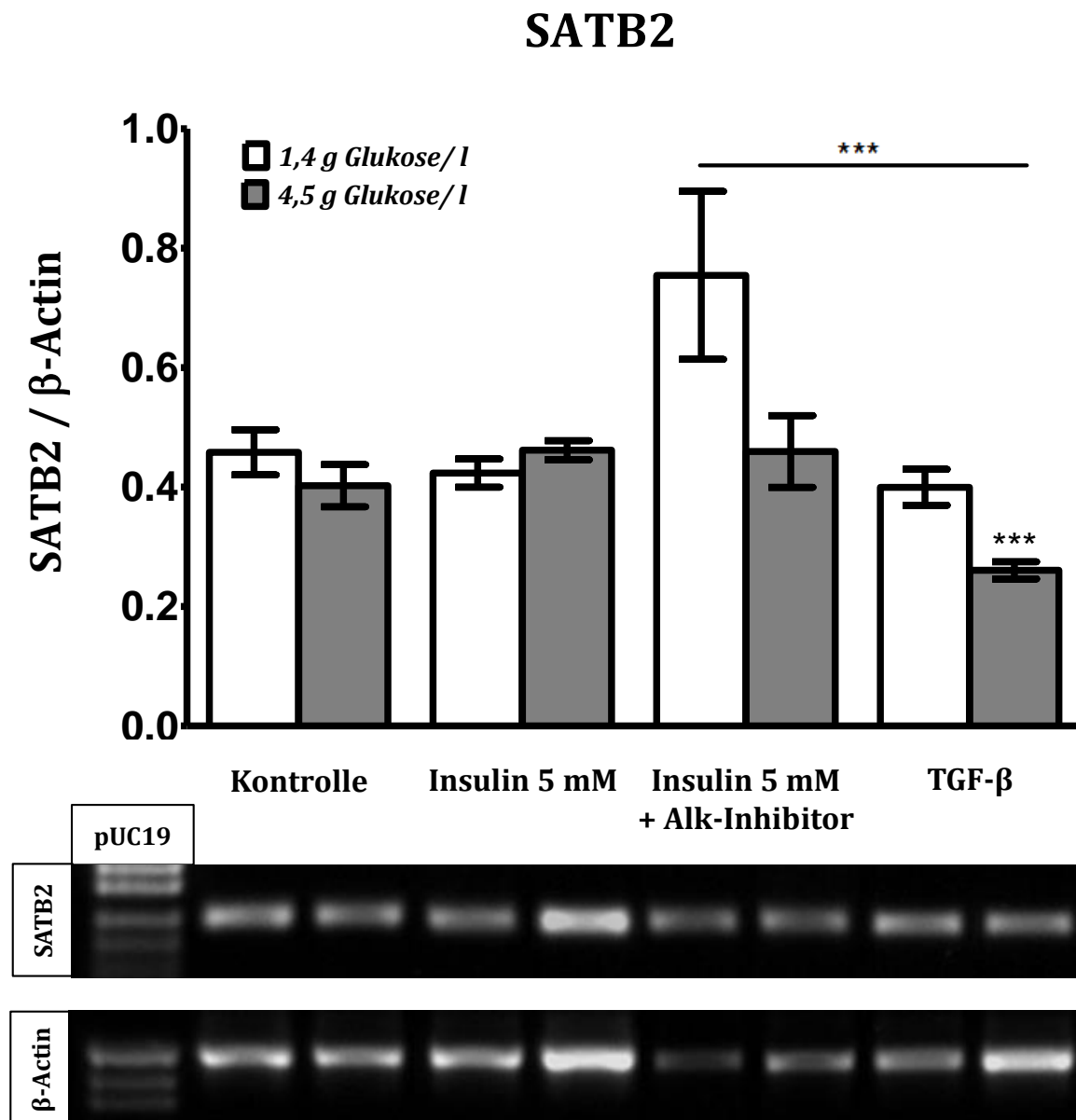
Die RT-PCR-Untersuchung von *ATF4* zeigte keine statistische Signifikanz für die untersuchten Stimulationsbedingungen gegenüber den Kontrollen. Allerdings zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Genexpression nach Stimulation mit dem ALK-Inhibitor SB431542 und TGF- $\beta$ . Dabei wurde eine Zunahme der Transkriptionsaktivität nach Blockierung des TGF- $\beta$ -Signalweges um mehr als 40% gegenüber den phObs, welche nur mit TGF- $\beta$  stimuliert wurden (Abbildung 3-20).



**Abbildung 3-20: Genexpressionsanalyse ATF4 *in vitro*.** Die statistische Analyse der Daten erfolgte mittels des Kruskal-Wallis-Tests und anschließendem Dunn's-Test (\*\* $p < 0,01$  gegenüber den unbehandelten Kontrollen mit 0 mM Insulin, falls nicht anders gekennzeichnet).  $N=3$ ,  $n \geq 4$ .

### 3.6.11 Ergebnisse RT-PCR *SATB2 in vitro*

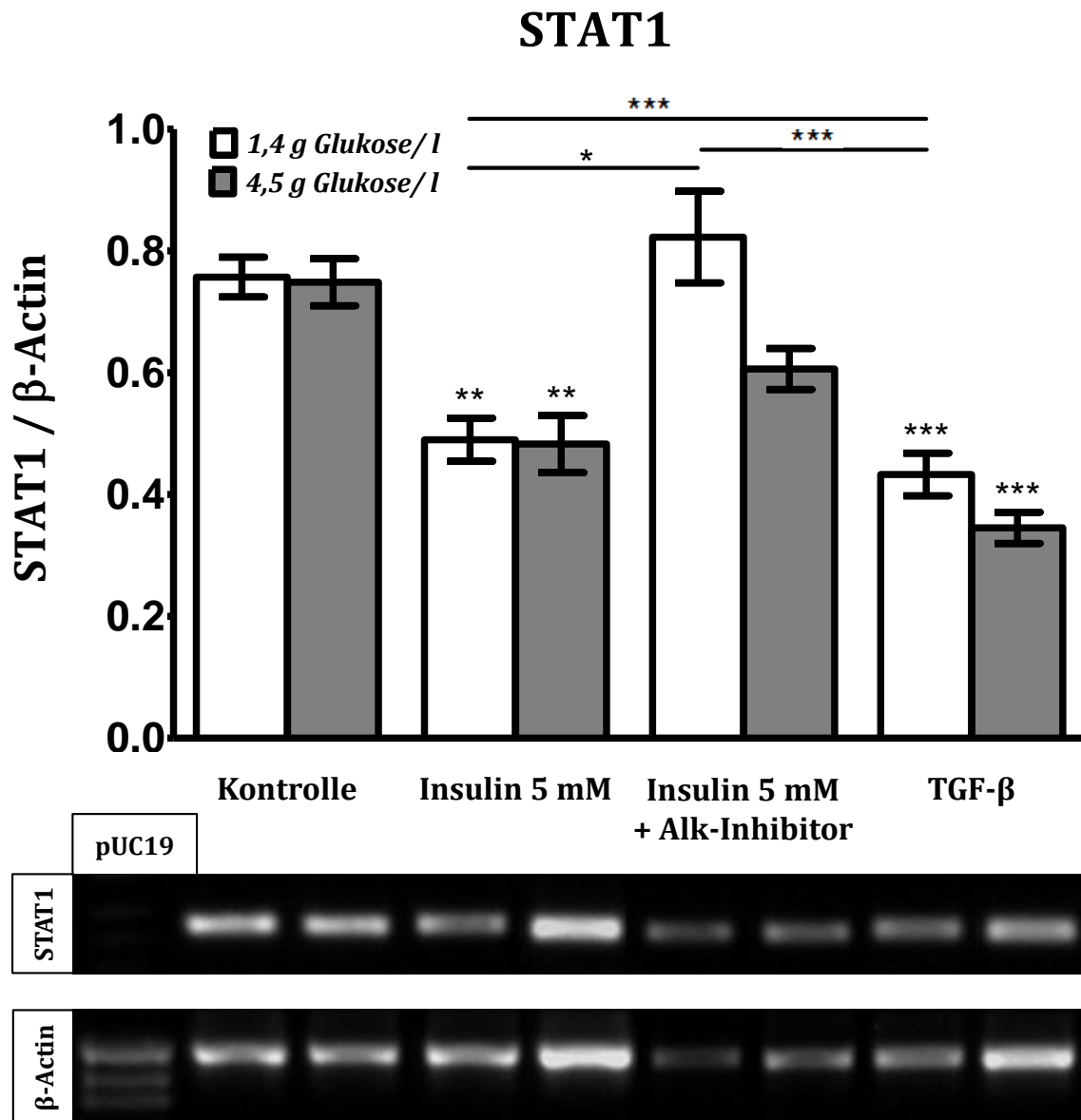
Die densitometrische Analyse der RT-PCR zeigte keine relevanten Veränderungen auf die Genexpression von *SATB2* durch Insulin. Nach Stimulation der Osteoblastenkulturen mit TGF- $\beta$  war eine statistisch signifikante Abnahme der Transkription von *SATB2* gegenüber den Kontrollen zu beobachten. Nach Blockieren des TGF- $\beta$ -Signalweges mit Hilfe des ALK-Inhibitors SB431542 zeigte sich eine erhöhte Genexpression (Abbildung 3-21).



**Abbildung 3-21: Genexpressionsanalyse *SATB2 in vitro*.** Die statistische Analyse der Daten erfolgte mittels des Kruskal-Wallis-Tests und anschließend dem Dunn's-Test (\*\* $p < 0,001$  gegenüber den unbehandelten Kontrollen mit 0 mM Insulin, falls nicht anders gekennzeichnet).  $N=3$ ,  $n \geq 4$ .

### 3.6.12 Ergebnisse RT-PCR *STAT1 in vitro*

Die densitometrische Untersuchung der Ergebnisse der RT-PCR für *STAT1* zeigte eine um mehr als 35% niedrigere Genexpression als die Kontrollen für die mit Insulin stimulierten Osteoblasten. Dieser Effekt konnte, mit einer Abnahme der Genexpression um 45% gegenüber den Kontrollen, noch deutlicher nach Stimulation mit TGF- $\beta$  beobachtet werden. Für die Stimulationsbedingung Insulin 5 mM mit ALK-Inhibitor SB431542 und 1,4 g/l Glukose ergab sich eine Tendenz zur Zunahme der Genexpression (Abbildung 3-22).



**Abbildung 3-22: Genexpressionsanalyse *STAT1 in vitro*.** Die statistische Analyse der Daten erfolgte mittels des Kruskal-Wallis-Tests und anschließendem Dunn's-Test (\*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001 gegenüber den unbehandelten Kontrollen mit 0 mM Insulin, falls nicht anders gekennzeichnet). N=3, n $\geq$ 4.

### **3.6.13 Genexpressionsanalysen von Decorin und Fibronectin *in vitro***

Die Genexpressionsuntersuchung von *Decorin* und *Fibronectin* ergab keine statistisch signifikanten Unterschiede gegenüber den Kontrollen (Daten nicht gezeigt).

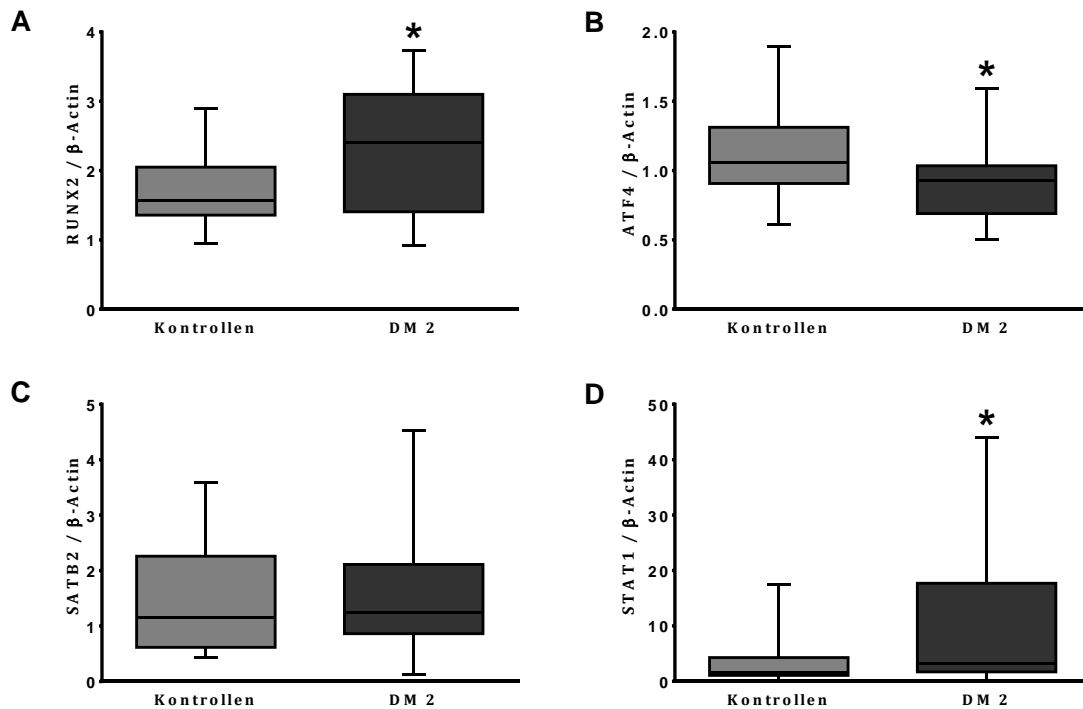
## **3.7 Genexpressionsanalysen von Patientenspongiosa**

Um den Einfluss von DM 2 auf die Genexpression auf mRNA-Ebene in spongiösem Knochen zu untersuchen und so den Vergleich der *in-vitro*-Ergebnisse mit der Situation *in vivo* zu ermöglichen, wurden konventionelle RT-PCR durchgeführt. Dabei wurde eine Diabetikergruppe mit einer nicht-diabetischen Kontrollgruppe verglichen (siehe Kapitel 2.14.1). Die weiteren Patientencharakteristika sind in Tabelle 2.14—2 beschrieben.

### **3.7.1 Ergebnisse RT-PCR Osteoblastendifferenzierungsfaktoren**

Die Untersuchung der Genexpression auf mRNA-Ebene von *RUNX2* ergab eine um 54% erhöhte Genexpression bei Typ-2-Diabetikern gegenüber den nicht-diabetischen Kontrollen. Die Genexpression von *ATF4* zeigte hingegen einen Abfall der Transkriptionsaktivität um 13% bei der diabetischen Patientengruppe. Die Genexpression von *SATB2* scheint bei der Diabetikergruppe nicht wesentlich verändert zu sein, wohingegen *STAT1* bei Typ-2-Diabetikern im Vergleich zur nicht-diabetischen Kontrollgruppe signifikant um 96% ansteigt (Abbildung 3-23).

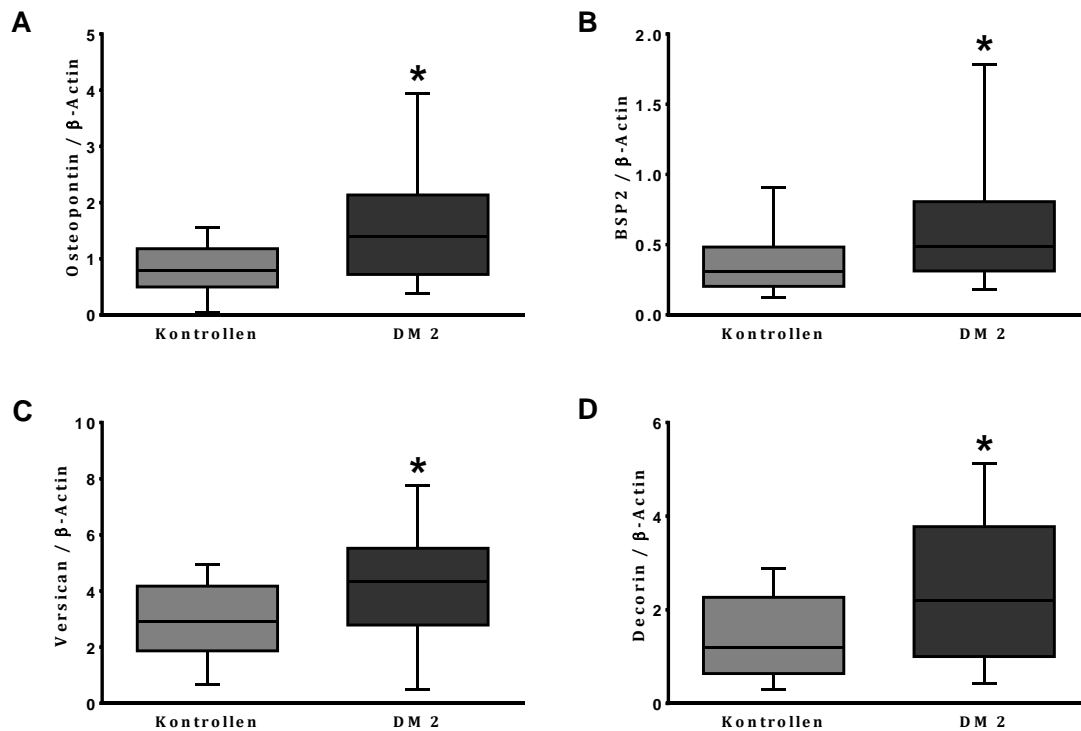




**Abbildung 3-23: Genexpressionsanalyse von Osteoblastendifferenzierungsfaktoren *in vivo*– Vergleich von Diabetikern und Nicht-Diabetikern.** Die Genexpressionsanalysen erfolgten mittels konventioneller RT-PCR, Gelelektrophorese und anschließender semi-quantitativer densitometrischer Analyse. Die statistische Analyse der Daten erfolgte mittels des Mann-Whitney-U-Tests. Die Ergebnisse sind als „Box and Whiskers“ dargestellt (min bis max) ( $N \geq 10$ ,  $n \geq 2$ ).  $p < 0,05$  wird als \* dargestellt. **A. RUNX2** ( $p = 0,0262$ ), **B. ATF4** ( $p = 0,0288$ ), **C. SATB2** ( $p = 0,3886$ ), **D. STAT1** ( $p = 0,0194$ ).

### 3.7.2 Ergebnisse RT-PCR Komponenten der EZM

Die Genexpressionsuntersuchung von *Osteopontin* zeigte eine Erhöhung um 76% bei der Diabetikergruppe im Vergleich zur nicht-diabetischen Kontrollgruppe. *Bone Sialoprotein 2* (*BSP2*) und *Versican* zeigten eine Erhöhung der Genexpression von mehr als 50% bei Diabetikern gegenüber der Kontrollgruppe und die Transkription war für *Decorin* um 85% bei Typ-2-Diabetikern erhöht.



**Abbildung 3-24: Genexpressionsanalyse der von Osteoblasten synthetisierten EZM-Bestandteile im *in vivo*– Vergleich von Diabetikern und Nicht-Diabetikern.** Die Genexpressionsanalysen erfolgten mittels konventioneller RT-PCR, Gelelektrophorese und anschließender semi-quantitativer densitometrischer Analyse. Die statistische Analyse der Daten erfolgte mittels des Mann-Whitney-U-Tests. Die Ergebnisse sind als „Box and Whiskers“ dargestellt (min bis max) ( $N \geq 10$ ,  $n \geq 2$ ).  $p < 0,05$  wird als \* dargestellt. **A. Osteopontin** ( $p = 0,0091$ ), **B. BSP2** ( $p = 0,0270$ ), **C. Versican** ( $p = 0,0468$ ), **D. Decorin** ( $p = 0,0336$ ).

## 4 Diskussion

Im Zuge dieser Arbeit wurden neue Erkenntnisse über die Auswirkungen von Insulin auf phObs gewonnen. Der Hintergrund dieser Arbeit ist die Entwicklung einer kompensatorischen Hyperinsulinämie, die in der Pathogenese des metabolischen Syndroms zum klinisch manifesten Diabetes mellitus Typ 2 bei vielen Patienten über Jahre die Manifestation der Krankheit hinauszögert. In diesem Kontext sollte der Einfluss von Insulin auf phObs untersucht werden, um so Rückschlüsse auf die diabetische Knochenkrankheit zu erhalten. Im Nachfolgenden werden die Ergebnisse dieser Dissertation diskutiert. Dabei erfolgt zunächst eine kritische Auseinandersetzung mit den Ergebnissen der Stimulation der phObs mit supraphysiologischen Insulinkonzentrationen *in vitro*. Anschließend folgt die Erörterung der Ergebnisse der durchgeführten Genexpressionsanalysen, insbesondere soll die Interpretation des möglichen Zusammenhangs der *in vitro* und der *in vivo* gewonnenen Genexpressionsergebnisse im Zusammenhang mit der diabetischen Knochenkrankheit erfolgen. Zuletzt wird Übertragbarkeit der *in-vitro*-Ergebnisse auf den Patienten erörtert. Weiterhin soll der Wert der hier vorgestellten Ergebnisse im Hinblick auf die Grenzen des verwendeten Systems beurteilt werden, sowie ein Ausblick über die therapeutischen Chancen, die sich aus dieser Arbeit ergeben, erfolgen.

### 4.1 Interpretation der Effekte von supraphysiologischen Insulinkonzentrationen auf die Osteoblastenfunktion *in vitro*

Um die Effekte supraphysiologischer Insulinkonzentration auf phObs untersuchen zu können, wurden zunächst Zytotoxizitätstests durchgeführt. Die Insulinkonzentrationen, mit denen die Zellkulturen stimuliert werden sollten, wurden so hoch gewählt, dass die stetige Präsenz ausreichend supraphysiologischer Spiegel von humanem Insulin gewährleistet war. Die Auswertung des MTT-Tests ergab keine negativen Effekte auf die in dieser Studie verwendeten Osteoblastenkulturen. Dies war Voraussetzung für die Verwendung der hohen Insulinkonzentrationen für die folgenden Stimulationsexperimente. Nur so konnte der Zytotoxizitätsaspekt als verzerrende Variable ausgeschlossen werden.

Aus der Literatur wird ersichtlich, dass erst in den letzten Jahren die Rolle des Knochens als endokrin hochaktives Organ verstärkt wahrgenommen wird [Fukumoto et al., 2009]. Osteoblasten exprimieren funktionelle Insulinrezeptoren (IR). Dabei scheint die Expression der Isoformen dieser Tyrosinkinase-Rezeptoren abhängig vom Differenzierungsgrad der Osteoblasten zu sein. Während osteoblastäre Vorläuferzellen hauptsächlich IR-A exprimieren, verschiebt sich während des Differenzierungsprozesses zum reifen Osteoblasten das IR-B/IR-A mRNA-Verhältnis zugunsten des IR-B [Avnet et al., 2012]. Studien zeigten, dass Osteoblasten-ähnliche Zellen nach Stimulation mit Insulin mit einer vermehrten Kollagensynthese [Kream et al., 1985, Pun et al., 1989] und einer vermehrten Glukoseaufnahme reagieren [Hahn et al., 1988, Ituarte et al., 1989]. Damit können die Osteoblasten zu den peripheren Zielorganen des Insulins hinzugefügt werden. Die anabolischen Effekte des Insulins scheinen nach lokaler Anwendung auch einen positiven Einfluss auf die Knochenheilung zu haben [Gandhi et al., 2005]. Nach Stimulation der Osteoblastenkulturen mit Insulin konnte im Rahmen dieser Arbeit ein insulinkonzentrationsabhängiger Anstieg der osteoblastären TGF- $\beta$ -Sekretion in das Medium nachgewiesen werden. Dies konnte im zeitlichen Verlauf über 6 Tage bestätigt werden. Außerdem bewirkte die Stimulation der Osteoblasten einen Abfall der AP-Aktivität, einem anerkannten Osteoblastenfunktionsmarker, und eine verringerte Mineralisierung der EZM. Die Untersuchung der AP-Genexpression mittels RT-PCR ergab einen trendweisen Abfall gegenüber den unbehandelten Kontrollen und deckt sich somit mit den Beobachtungen des AP-Aktivitätsabfalls. Die Sekretion von TGF- $\beta$  durch primäre Osteoblasten *in vitro* nach Insulinstimulation ist bisher nicht beschrieben worden und wirft die Frage nach dem zugrundeliegenden Mechanismus auf.

Die Interpretation der Effekte von Insulin auf Osteoblasten wird durch die enge Verflechtung des Insulin- und des Insulin-like Growth Factor (IGF)-Signalwegs erschwert. In rangniederen Tieren gibt es diese Unterscheidung gar nicht. Der gemeinsame IGF/IR kontrolliert hier die Lebensdauer und Aspekte der Reproduktion [Tissenbaum et al., 1998]. In Säugetieren ist dies differenziert, so reguliert Insulin vor allem metabolische Funktionen und IGF steuert grundlegende Prozesse wie Wachstum und Entwicklung. Allerdings ist aufgrund der hohen Homologie der beiden Hormone nicht klar, ob die Unterschiede in deren Funktion in Wirbeltieren tatsächlich in der Struktur der Moleküle begründet ist, oder sich die funktionellen Unterschiede durch eine gewebsspezifische Expressierung ergeben [Kim et al., 2002]. So konvergieren beide Insulin- und IGF-Signale auf dem Insulin-Rezeptor-Substrat (IRS) [Hamann et al., 2012]. Das IRS vermittelt somit intrazelluläre Signale des

Insulins. Bemerkenswert an den Ergebnissen dieser Arbeit ist, dass der durch das Insulin verursachte Abfall der AP-Aktivität durch die Blockierung des TGF- $\beta$ -Signalwegs antagonisierbar ist. Der dazu verwendete Inhibitor hemmt ALK4, -5 (=T $\beta$ RI) und -7 [Inman et al., 2002], und führt so zum vollständigen Blockieren des TGF- $\beta$ -Signalwegs. Bei gleichzeitiger Gabe von Insulin und des SB-Inhibitors, wurde ein Wiederanstieg der AP-Aktivität über das Level der Kontrollen beobachtet. Zusätzlich ergab die alleinige Stimulation mit TGF- $\beta$  ein sehr ähnliches AP-Aktivitätsmuster wie nach Insulinstimulation. Die gleichzeitige Gabe von Insulin und TGF- $\beta$  ergab ein ähnliches Ergebnis, sodass hier nicht von einem unabhängigen synergistischem Effekt ausgegangen werden kann (Daten nicht gezeigt). Dies kann so interpretiert werden, dass die Insulinstimulation zuerst eine TGF- $\beta$  Sekretion in das Mikromilieu der Osteoblasten bedingt und durch das endogene TGF- $\beta$  eine Aktivierung des TGF- $\beta$ -Signalwegs ausgelöst wird. Diese reaktive Sekretion von TGF- $\beta$  als Reaktion auf den Insulinstimulus durch die Osteoblasten und die folgenden Genexpressionsveränderungen können als autokrine Feedback-Schleife interpretiert werden. Bei Präadipozyten zeigte sich, dass die Zugabe von TGF- $\beta$  die Phosphorylierung von IRS-1, als wichtigem Mediator des Insulin- und IGF-1-Signalings, nach Stimulation mit Insulin vermindert ist. Ein Grund dafür könnte sein, dass TGF- $\beta$  die durch Insulin induzierte Assoziation von p85, einer regulatorischen Untereinheit der Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K), und IRS-1 inhibiert [Gagnon et al., 1998]. Diese Assoziation ist ein entscheidender Knotenpunkt in der Signalkaskade des Insulin-Signalwegs. Gleichzeitig kam es zu einer Verdoppelung der Insulinbindung an der Zelloberfläche, sodass die Autoren auch eine Inhibition der Kinaseaktivität des IR als möglich erachten. Weiterhin wurde gezeigt, dass die Kultivierung der Präadipozyten auf Fibronectin-beschichteten Platten einen ähnlich inhibierenden Effekt auf das Insulin-Signaling hat. Fibronectinexpression wird von TGF- $\beta$  induziert, ist aber nur eine Komponente der EZM, sodass die Autoren daraus schließen, dass die von TGF- $\beta$  induzierte endogene EZM stärker inhibierend wirken kann [Gagnon et al., 1998]. In p85<sup>-/-</sup> mesenchymalen Stammzellen (MSCs), Vorläuferzellen der Osteoblasten, kommt es im Vergleich zu Wildtyp (WT)-MSCs zu einer Verringerung der AP-Aktivität, einer verringerten Genexpression von *Osteocalcin* auf mRNA-Ebene und einer verringerten Mineralisierung [Wu et al., 2011]. Diese Beobachtungen bei MSCs sind mit den Ergebnissen dieser Arbeit kongruent. So bewirkt, zusätzlich zu dem oben besprochenen AP-Aktivitätsabfall, die Stimulation der hier verwendeten Osteoblasten mit Insulin auch eine verminderte Mineralisierung der Matrix und es kommt zu einer verringerten Genexpression von *Osteocalcin* auf mRNA-Ebene, die nach Blockieren des TGF- $\beta$ -Signalwegs wieder

hergestellt werden kann. Des Weiteren ist das Differenzierungspotenzial in der hier zitierten Studie in Richtung Osteoblasten nach Zugabe von BMP2 in den p85<sup>-/-</sup> MSCs verringert [Wu et al., 2011]. Dies geht konform mit den Beobachtungen der verringerten mRNA-Expression von RUNX2, bei gleichzeitig erhöhter Expression von Stat1 im Rahmen dieser Arbeit.

Die Reaktion einer erhöhten endogenen TGF- $\beta$ -Sekretion durch die Osteoblasten nach Insulinstimulation kann somit als Schutzmechanismus der Osteoblasten interpretiert werden. Dabei sezernieren die Osteoblasten das TGF- $\beta$  im Sinne eines negativen Feedbacks, um das vermehrte Insulin-Signaling zu bremsen. Als weiteren Effekt verursacht das, von den Osteoblasten in das Mikromilieu, freigesetzte TGF- $\beta$  mit dem starken Insulinstimulus eine Veränderung der Genexpressionsmuster.

## 4.2 Interpretation der Genexpressionsanalysen *in vitro*

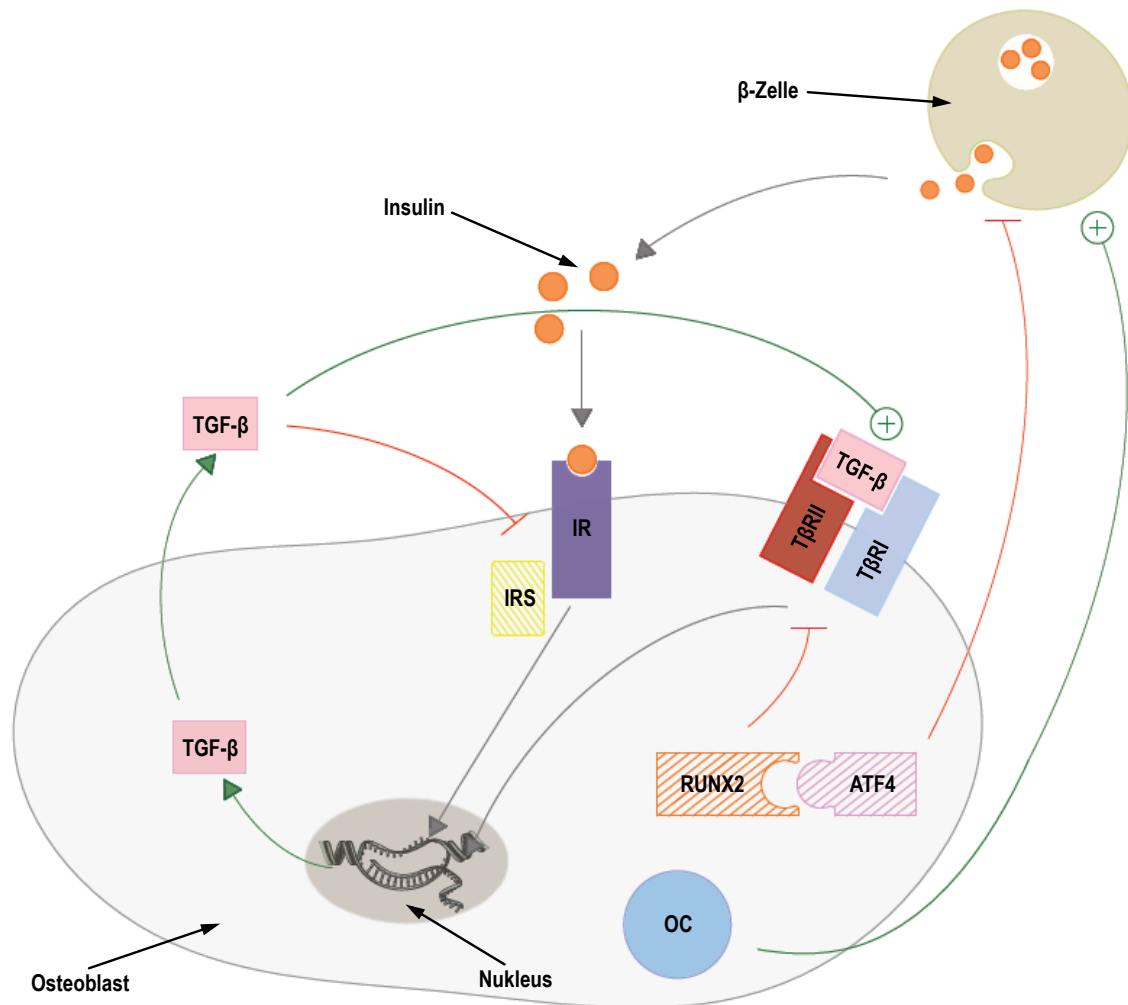
Um den Einfluss des nach Insulinstimulus autokrin sezernierten TGF- $\beta$  auf die Genexpression der Osteoblasten zu untersuchen, wurden konventionelle RT-PCRs durchgeführt und analysiert. Dazu wurden die Osteoblastenkulturen mit Insulin, rhTGF- $\beta$  und einer Kombination bestehend aus Insulin und dem TGF- $\beta$ -Signalweginhibitor SB431542 stimuliert. Weiterhin wurden diese Bedingungen mit 2 Glukosekonzentrationen kombiniert. Da die Stimulation mit verschiedenen Glukosekonzentrationen nur tendenzielle, statistisch nicht signifikante Ergebnisse zeigte, wird auf dies hier nicht näher eingegangen, ist aber der Vollständigkeit wegen aus dem Ergebnisteil ersichtlich. Eine mögliche Erklärung für die ausbleibenden oder nur sehr geringen Unterschiede zwischen den zwei verwendeten Glukosekonzentrationen könnte sein, dass bereits die niedrigere Glukosekonzentration (1,4 g/l) einen maximalen Stimulus hinsichtlich der Genexpression für die Osteoblasten darstellt.

Insulinstimulation führte im Rahmen dieser Studie zu einem Abfall der Genexpression von *Osteoprotegerin*. Dies wird durch die Aktivierung der Insulinsignalkaskade, die zu einer verringerten Genexpression des Transkriptionsfaktors *FoxO1* führt, erklärt [Ferron et al., 2010]. Osteoprotegerin ist ein Abfangrezeptor für RANKL. RANKL, wie das Osteoprotegerin, wird von Osteoblasten gebildet und führt im Knochen durch die Aktivierung des RANK-Signalwegs zur erhöhten Osteoklastenaktivität.

Osteopontin gehört zu den Bone Sialoproteinen. In der Promotorregion des *Osteopontin* liegt eine OSE-2-ähnliche Sequenz. Diese steht unter der Kontrolle von Runx2, dem wichtigsten Transkriptionsfaktor der osteoblastären Differenzierung. *RUNX2* ist weiterhin ein Zielgen des TGF- $\beta$ -Signalwegs. In mesenchymalen Stammzellen zeigte sich, dass Runx2 wiederum essenziell für das T $\beta$ RE-abhängige [Lee et al., 2000]. Vermutlich geschieht dies durch die physische Interaktion von RUNX2 mit den Downstream der TGF- $\beta$ -Rezeptoren liegenden Smads [Hanai et al., 1999]. In dieser Studie zeigte sich ein Abfall der Genexpression auf mRNA-Ebene sowohl von *RUNX2*, als auch von *Osteopontin*. Der Abfall der *Osteopontin*-Expression ist vermutlich durch den Abfall von RUNX2 bedingt, dass seinerseits unter der Kontrolle des TGF- $\beta$ -Signalwegs steht und gleichzeitig mit diesem interagiert. In diesem Kontext wurde auch die Genexpression von *ATF4*, *SATB2* und *STAT1* untersucht, die wie *RUNX2* an der Regulation der osteoblastären Differenzierung beteiligt sind. Während die Genexpression von *ATF4* und *SATB2* nach Insulinstimulation nicht wesentlich verändert zu sein scheint, kommt es zu einem deutlichen Abfall von *STAT1*. STAT1 ist ein Inhibitor von RUNX2. Die verringerte Genexpression von *STAT1* kann so erklärt werden, dass hier kompensatorisch eine Verringerung der Genexpression des RUNX2-Inhibitors *STAT1* stattfindet, um die Osteoblastenfunktion aufrecht zu erhalten.

In der Promoterregion des *T $\beta$ RI* liegt eine Bindungsstelle für Runx2. Erhöhtes Runx2-Angebot führt zu einer erhöhten T $\beta$ RI-Expression [Ji et al., 1998]. Die Abnahme der Genexpression von *RUNX2* könnte in diesem Kontext die hier beobachtete erhöhte Sekretion von TGF- $\beta$  erklären. Ist die Menge von RUNX2 auch auf Proteinebene verringert, so könnte dies zu einer verringerten Transkription des *T $\beta$ RI* führen und so das physiologische TGF- $\beta$ -Signaling der Osteoblasten abschwächen. Als Reaktion auf die Deprivation dieses Wachstumssignals reagiert der Osteoblast mit einer erhöhten endogenen Sekretion von TGF- $\beta$ , um so diesen Signalsensitivitätsverlust auszugleichen. Die oben abgehandelte

hypothetische autokrine Hemmung der Insulinkaskade durch TGF- $\beta$  wäre in diesem Fall ein paralleler Effekt (Abbildung 4-1).



**Abbildung 4-1: Schematische Darstellung der Verflechtungen des Osteoblasten in die Regulation des systemischen Energiestoffwechsels.** IR=Insulinrezeptor, IRS=Insulin-Rezeptor-Substrat, TGF- $\beta$ =Transforming Growth Factor beta, T $\beta$ R=TGF- $\beta$ -Rezeptor, RUNX2= Runt Related Transcription Factor 2, ATF4= Activating Transcription Factor 4, OC=Osteocalcin

Die von den Osteoblasten gebildete organische Matrix ist nicht nur als Baustein des Knochens zu sehen, die die Hydroxyapatitkristalle einbindet und so zu den mechanischen Eigenschaften beiträgt [Gorski, 2011]. Über die Bestandteile der EZM und Zell-Matrix-Kontakte kommuniziert der Osteoblast mit seiner Umgebung. Biglykan und Fibromodulin binden TGF- $\beta$  durch Bindung an eine Kernsequenz und Kollagen-Typ-I [Hildebrand et al., 1994, Schonherr et al., 1995]. Diese Proteinsequenz zeigt eine hohe strukturelle Ähnlichkeit zu Decorin, das durch Bindung die Bioaktivität von TGF- $\beta$  an dessen Rezeptoren erhöht [Takeuchi et al., 1994]. Somit ist eine Bioaktivitätsmodulierung von TGF- $\beta$  auch für Biglykan denkbar. Die Untersuchung der Genexpression von *Biglykan* ergab einen Anstieg



der Genexpression nach Insulinstimulation, der nach der Stimulation der Osteoblasten mit TGF- $\beta$  in Kombination mit 4,5 g/l Glukose statistisch signifikant war. Nach Blockieren des TGF- $\beta$ -Signalwegs konnte ein starker Abfall der Genexpression von *Biglykan* beobachtet werden. Ein möglicher Mechanismus ist in glatten Gefäßmuskelzellen beschrieben, bei denen nach TGF- $\beta$ -Stimulation über die Aktivierung des MAP-Kinasen-Signalwegs, d.h. die Phosphorylierung von ERK und p38, SMAD2 phosphoryliert wird und so die Synthese von Biglykan erhöht wird [Burch et al., 2010]. Vor dem Hintergrund, dass Biglykan mit TGF- $\beta$  physisch interagiert und möglicherweise dessen Bioaktivität modulieren kann, wirft dies die Frage auf, ob die hier erhöhte Synthese von Biglykan eine Reaktion auf die erhöhte endogene TGF- $\beta$ -Produktion durch die Osteoblasten im Sinne eines negativen Feedbacks ist. In der Tat zeigten Ruoslahti et al., dass die Synthese von Biglykan unter der Kontrolle von TGF- $\beta$  steht [Ruoslahti et al., 1991]. Der genaue Mechanismus besteht weder aus einer Veränderung der Promoteraktivität, noch aus einer Veränderung der Stabilität der zytoplasmatischen Biglykan-mRNA, sondern besteht vermutlich aus einer nukleären post-transkriptionellen Regulation [Ungefroren et al., 1996]. In diesem Fall käme zur hier beschriebenen Veränderung der Genexpression auf mRNA-Ebene dieser Mechanismus hinzu.

Im Gegensatz zur erhöhten Genexpression von *Biglykan* zeigte die Genexpression von *Fibromodulin* einen Abfall nach Stimulation mit Insulin, der nach alleiniger Stimulation mit TGF- $\beta$  deutlicher war. *Versican*, ein weiteres Proteoglykan, das im Aufbau von Knochen eine wichtige Rolle zu spielen scheint, zeigte ebenfalls einen Abfall der Genexpression nach Stimulation mit Insulin. Der Effekt scheint auch TGF- $\beta$ -abhängig zu sein, da der Effekt durch die gleichzeitige Zugabe von Insulin und dem TGF- $\beta$ -Signalweg-Inhibitor umkehrbar ist.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen weiterhin einen hochsignifikanten Abfall der Genexpression von *Osteocalcin* sowohl nach alleiniger Stimulation mit Insulin, als auch nach Gabe von rhTGF- $\beta$  in humanen Osteoblasten. Nach gleichzeitiger Gabe des TGF- $\beta$ -Signalweg-Inhibitors und Insulin zu den Osteoblastenkulturen konnte dieser Genexpressionsabfall verhindert werden. Osteocalcin hat im Organismus skelettale und extra-skelettale Effekte. Die Effekte auf den Knochen bestehen einerseits aus einer Regulation der BMUs, somit des Remodelings, und andererseits aus der Regulation der Mineralisierung der Knochenmatrix. Osteocalcin ist zudem ein sehr sensibler Marker der Knochenbildung und dessen Serumspiegel reflektiert das Ausmaß der Osteoblastenaktivität *in vivo* [Neve et al., 2012]. Dies geht konform mit dem hier aufgezeigten Funktionsverlust

der Osteoblasten. Neben den knochenspezifischen Funktionen des Osteocalcins wird immer ersichtlicher, dass dieses Molekül eine wichtige Rolle in der Regulation des systemischen Insulin- und damit Energiestoffwechsels hat. Diese Bedeutung zeigte sich in Mausmodell, in dem die osteoblastären Insulinrezeptoren ausgeschaltet wurden. Dies führte zu einer Abnahme der pankreatischen Insulinsekretion durch Beeinträchtigung der  $\beta$ -Zellmasse und  $\beta$ -Zellproliferation [Ferron et al., 2010]. Übereinstimmend mit diesen Beobachtungen korrelierte der Serumosteocalcinspiegel von Typ-2-Diabetikern negativ mit dem Nüchternblutzucker, HbA1c, Stammfettsucht und Insulinresistenz [Kanazawa et al., 2011]. Der im *in-vitro*-Teil dieser Doktorarbeit beobachtete Abfall der *Osteocalcin*-Expression, nach Stimulation der Osteoblasten mit Insulin, kann, übertragen auf die Situation *in vivo*, als negatives Feedback des überschüssig vorhandenen Insulins zum Pankreas interpretiert werden. Dies bestätigt die Idee einer Regulation der Insulinsekretion durch eine Kommunikationsachse zwischen den  $\beta$ -Zellen des Pankreas und den Osteoblasten über Osteocalcin als Hormon. Interessant wäre in diesem Kontext zu untersuchen, ob eine vollständige funktionelle Ausschaltung des Insulinsignalwegs zu einem gegenteiligen Effekt auf die Genexpression des *Osteocalcins*, d.h. einen Anstieg über das Level der Kontrollen, und die endogene TGF- $\beta$ -Sekretion hat. Da das vollständige Aufheben des TGF- $\beta$ -Signalwegs den beobachteten Anstieg der *Osteocalcin*-Transkription rückgängig macht und die alleinige Stimulation mit rhTGF- $\beta_1$  einen ähnlichen Transkriptionsabfall wie nach alleiniger Insulinstimulation bedingt, ist TGF- $\beta$  auch hier als Mediator dieses Insulineffektes auf Osteoblasten naheliegend.

### 4.3 Interpretation der Genexpressionsanalysen *in vivo*

Um die Vergleichbarkeit der *in vitro* gewonnenen Ergebnisse mit der aus klinischer Sicht relevanten Situation im Organismus eines Typ-2-Diabetikers zu untersuchen, wurde schließlich die Genexpression wichtiger Gene in Patientenspongiosa mittels PCR untersucht. DM 2 ist durch eine versiegende bzw. erloschene Insulinsekretion des endogenen Pankreas gekennzeichnet. Daraus ergibt sich eine gegensätzliche Situation: Die Situation ist *in vivo* durch eine Hypoinsulinämie gekennzeichnet, wohingegen im Rahmen dieser Arbeit *in vitro* eine „Hyperinsulinämie“ simuliert wurde.

Es zeigte sich keine statistisch signifikante Veränderung der *Osteocalcin*-Expression auf mRNA-Level. Allerdings könnte dieses Ergebnis irreführend sein, da wie bereits erörtert die

biologische Aktivität dieses Proteins, insbesondere die Regulation des Energiestoffwechsels und die damit verbundenen Effekte auf die  $\beta$ -Zellen des Pankreas betreffend, post-translational durch  $\gamma$ -(De-)Carboxylierung von Glutamatresten gesteuert wird [Neve et al., 2012]. Interessanterweise zeigte sich in diesem Kontext ein deutlicher Abfall der Genexpression von *ATF4* bei Typ-2-Diabetikern im Vergleich zur nicht-diabetischen Kontrollgruppe. Das von Osteoblasten produzierte ATF4 scheint ebenfalls an der Regulation des systemischen Glukosemetabolismus beteiligt zu sein. Im Mausmodell zeigten Yoshizawa et al., dass *Atf4* die Insulinsekretion des Pankreas und die Insulinsensitivität der peripheren Zielorgane Leber, Fett und Muskel verringert. Die Autoren sehen dabei die Inhibition der Bioaktivität des Osteocalcins durch die Expression von *Atf4* als möglichen zugrunde legenden Mechanismus der beobachteten Effekte [Yoshizawa et al., 2009]. Der in dieser Studie beobachtete deutliche Abfall der Genexpression kann hier als Mechanismus im Organismus des Typ-2-Diabetikers gesehen werden, um die Insulinsekretion anzuregen, die allerdings bereits erloschen ist. Da *Atf4* nicht nur an der Regulation des Energiestoffwechsels beteiligt, sondern gleichzeitig von herausragender Rolle bei der Knochenbildung zu sein scheint [Yang et al., 2004], liefert der beobachtete Genexpressionsabfall von *ATF4* einen neuen Ansatzpunkt für die weitere Erforschung der molekularbiologischen Ursachen der diabetischen Knochenkrankheit.

Als weitere essenzielle osteoblastäre Transkriptionsfaktoren wurden *RUNX2*, *SATB2* und *STAT1* untersucht. Während die Transkription von *SATB2* bei Diabetikern nicht wesentlich verändert zu sein scheint, wird ein deutlicher Genexpressionsanstieg von *RUNX2* und *STAT1* bei Diabetes mellitus Typ 2 ersichtlich. Dies steht im Gegensatz zu dem *in vitro* nach Insulinstimulation beobachteten Genexpressionsabfall dieser Transkriptionsfaktoren. Diese Ergebnisse deuten auf einen tiefgreifenden Einfluss des Diabetes mellitus Typ 2 auf den Differenzierungsprozess der Knochenzellen *in vivo* hin und könnten eine Rolle in der Ätiopathogenese der diabetischen Knochenkrankheit spielen. Dabei ist zu berücksichtigen, dass die Knochenproben im Rahmen der Frakturbehandlung entnommen wurden und das Gewebe durch den initiierten Wundheilungsprozess sicherlich beeinflusst ist. Weiterhin stellt die Entnahme dieser Patientenproben zu einem unstandardisierten Zeitpunkt eine Momentaufnahme dar. Diese Punkte sind der Machbarkeit der Probengewinnung von Patienten geschuldet.

Des Weiteren wurde die Patientenspongiosa auf Veränderungen der Genexpression auf transkriptioneller Ebene entscheidender Komponenten der EZM untersucht. Hierbei zeigte

sich ein Anstieg der Genexpression der Bone Sialoproteine *Osteopontin* und *BSP2* bei Diabetes mellitus Typ 2 im Vergleich zu der nicht-diabetischen Kontrollgruppe. Bezogen auf *Osteopontin* steht dies im Gegensatz zum Abfall der Genexpression nach Insulinstimulation von Osteoblastenkulturen *in vitro*. Interessanterweise wird, wie bereits angesprochen, die Transkription dieser Proteine durch Runx2 reguliert [Ducy et al., 1997]. Der beschriebene Anstieg der Transkription von *RUNX2* führt *in vivo* zu einer vermehrten Genexpression der Bone Sialoproteine. Diese Proteine inhibieren die Mineralisierung der Knochenmatrix, sind an der Rekrutierung von Osteoklasten und der Organisation der Matrix beteiligt [Bianco et al., 1991, Boskey et al., 2002]. Außerdem zeigte sich im Rahmen dieser Studie, dass Versican und Decorin Proteoglykane, die am Modeling- und Remodelingprozess beteiligt sind [Waddington et al., 2003], gleichfalls eine erhöhte Genexpression auf mRNA-Ebene zeigen. Decorin ist zudem an der Modulierung der Bioaktivität von TGF- $\beta$  beteiligt [Hildebrand et al., 1994].

#### 4.4 Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Patienten

Die hier dargestellten Ergebnisse, sei es der *in-vitro*- als auch der *in-vivo*-Teil, zeigen Limitationen auf. Im Folgenden werden einige kritisch angesprochen.

Ein wesentlicher Teil dieser Arbeit ist die Beobachtung einer endogenen TGF- $\beta$ -Produktion durch humane Osteoblasten nach Stimulation mit supraphysiologischen Insulinkonzentrationen *in vitro*. Zusätzlich wurden Osteoblasten *in vitro* mit rhTGF- $\beta$  stimuliert um die Effekte auf die Genexpression mit den Effekten einer Insulinstimulation vergleichen zu können. Hier stellt sich ein wesentliches Problem der Untersuchung der Funktionen von TGF- $\beta$  auf Zellen dar. Es scheint so zu sein, dass derartige Untersuchungen stark abhängig vom verwendeten Modell, dem Zelltyp sowie der zur Stimulation verwendeten Konzentration des TGF- $\beta$  sind [Massague, 1990]. Das Zellkulturmodell ist ein etabliertes Verfahren für Studien an phObs *in vitro*. Beim Studium der in dieser Dissertation eingeflossenen Literatur fällt auf, dass die überwiegende Mehrzahl der zitierten Publikationen des für dieses Projekt relevanten Wissens durch Tiermodelle oder nicht-humane, immortalisierte Zelllinien erlangt wurde. Hier liegt ein Vorteil der verwendeten phObs. Diese sind aus menschlichem Gewebe isoliert, wurden auf ihren osteoblastischen Phänotyp getestet und entsprechen somit am ehesten den Osteoblasten *in vivo*. Es handelt sich allerdings um Monokulturen. Das Zusammenspiel zwischen den verschiedenen

Zellpopulation *in vivo* kann so nicht untersucht werden. Ob die Osteoblasten so auf supraphysiologische Konzentrationen von Insulin reagieren wie sie es im *in-vitro*-Teil dieser Arbeit getan haben, ist nicht sicher zu beantworten. Ausgesprochen relevant für die medizinische Forschung ist aber allein der Umstand, dass humane Osteoblasten auf einen starken Insulinstimulus mit den beschriebenen Effekten reagieren können.

Bezüglich der Genexpressionsuntersuchungen in der Situation des DM 2 *in vivo* sind diese als Zwischenergebnis zu betrachten, das besonderen Wert durch den Vergleich mit den Ergebnissen *in vitro* gewinnt. Obwohl diese Ergebnisse hohe Signifikanz zeigen, sind für umfassendere Untersuchungen sicherlich größere Patientengruppen zu rekrutieren. Wie bereits diskutiert, ist zu berücksichtigen, dass die Knochenproben im Rahmen der Frakturbehandlung entnommen wurden. Durch den nach dem Trauma initiierten Knochenheilungsprozess ist das hier abgebildete Genexpressionsprofil von Knochen diabetischer Patienten sicherlich zu einem gewissen Maße beeinflusst. Idealerweise fände die Entnahme von Patientenspongiosa aus unaffektiertem Knochengewebe statt. Dies ist aber aus ethischen Gründen schwierig umsetzbar. So liefert die Probenentnahme bei elektiven Eingriffen wie z.B. der Implantation von Totalendoprothesen am Hüftgelenk nicht vollkommen unaffektiertes Knochengewebe, da i.d.R. der Grund für die Implantation eine fortgeschrittene Arthrose mit ossärer Affektion ist.

## 4.5 Therapeutische Chancen und Ausblick

Die hier vorgestellten Ergebnisse ergeben mit den Ergebnissen der Literatur zu den Verflechtungen des Diabetes mellitus Typ 2 und dem Knochenstoffwechsel ein klares Bild:

1. Der Knochen ist ein Angriffspunkt für die Therapie des DM 2 als systemische Erkrankung und dessen Folgeerkrankung, der diabetischen Knochenkrankheit.
2. Es gibt keinen zugelassenen TGF- $\beta$ -Inhibitor für die Therapie beim Menschen. Ob in Zukunft ein solcher Wirkstoff für die systemische Therapie entwickelt werden sollte, ist skeptisch zu betrachten, da dieses Zytokin ubiquitär im menschlichen Organismus vorkommt und organspezifisch ganz unterschiedliche, teilweise dramatische Auswirkungen hat.
3. Hingegen ist die herausragende Rolle des TGF- $\beta$  bei der Knochenbildung und der Heilung von Frakturen ein vielversprechender Ansatz. Dies wird durch neuere Entwicklungen in der unfallchirurgisch/orthopädischen Frakturbehandlung bestätigt.

So wird zum Beispiel bereits an mit BMPs (Mitglieder der TGF- $\beta$ -Superfamilie) beschichteten Endoprothesen gearbeitet [Liu et al., 2010, Schmidmaier et al., 2006, Schmidmaier et al., 2007].

4. Die hier beschriebenen Auswirkungen von Insulin auf Osteoblasten könnten ganz ähnlich, vor allem durch lokale Applikation genutzt werden. Denkbar ist die Entwicklung von Insulinsignalweg-modulierenden Substanzen, die bei der Frakturbehandlung angewendet werden könnten.

Letztendlich muss in der medizinischen Forschung ein handfestes, relevantes Problem den Anstoß für biotechnologisch/pharmazeutische Neuerungen geben. Der DM 2 ist eine hochrelevante Erkrankung mit hunderten Millionen betroffenen Patienten weltweit. Das Problem der diabetischen Knochenkrankheit ist hingegen subtiler, weniger auffällig und es wird im klinischen Alltag vernachlässigt, obwohl das vermehrte Wahrnehmen dieser Diabetesfolgeerkrankung große Chancen bietet. Durch die hormonelle Achse zwischen dem Knochen und dem Pankreas, sowie den peripheren Zielorganen des Insulins, ergeben sich hier Möglichkeiten für innovative Entwicklungen in der pharmazeutischen Therapie des DM 2.

## 5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von Insulin auf primäre humane Osteoblasten *in vitro* zu untersuchen und die Ergebnisse mit den Auswirkungen des Diabetes mellitus Typ 2 *in vivo* zu vergleichen. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Stimulation von phObs mit Insulin *in vitro* zu einer verringerten metabolischen Funktion führte. Die negativen Veränderungen der Osteoblastenfunktion bestanden aus dem Abfall der AP-Aktivität und der verringerten Mineralisierung der Matrix. Dieser Funktionsverlust stand mit einer insulinkonzentrationsabhängig erhöhten, endogenen Ausschüttung von TGF- $\beta$  in Zusammenhang. Es zeigte sich eine auffallende Ähnlichkeit zwischen den beobachteten Effekten auf die Osteoblastenfunktion nach alleiniger Insulinstimulation und nach alleiniger Stimulation mit rhTGF- $\beta$ . Das Umkehren der Effekte nach Inhibition des TGF- $\beta$ -Signalwegs legt nahe, dass die reaktive endogene TGF- $\beta$ -Sekretion ursächlich für viele der bei den in Osteoblasten beobachteten negativen Auswirkungen auf die Osteoblastenfunktion war. Insulin und die daraus folgende endogene TGF- $\beta$ -Sekretion führten weiterhin zu tiefgreifenden Genexpressionsveränderungen. Diese betrafen nach der Insulinstimulation *in vitro* wichtige Bestandteile der EZM und osteoblastäre Transkriptionsfaktoren. Beispielsweise waren die Transkriptionsfaktoren *RUNX2*, *SATB2* und *STAT1* nach der Insulinstimulation signifikant herunter reguliert. Dies könnte eine wesentliche Rolle in der Ätiopathogenese des als diabetische Knochenkrankheit beschriebenen Syndroms spielen. Zusätzlich zeigten sich Veränderungen in der transkriptionellen Genexpression wichtiger Komponenten der EZM, die als Auswirkung der Genexpressionsveränderungen der Transkriptionsfaktoren beschriebenen Veränderungen interpretiert werden können. Besonders auffällig war hierbei ein erheblicher, statistisch signifikanter Abfall der Genexpression auf mRNA-Ebene von *Osteoprotegerin*, *Versican* und *Osteocalcin*, wohingegen es zu einer erhöhten Expression von *Biglykan* kam. Die Veränderungen der Genexpression nach Insulinstimulation waren den Genexpressionsveränderungen nach Zugabe von exogenem rhTGF- $\beta$  sehr ähnlich. Auch diese Veränderungen nach alleiniger Insulinstimulation konnten durch die gleichzeitige Inhibition des TGF- $\beta$ -Signalwegs aufgehoben werden, sodass die beobachteten Effekte vermutlich auf die erhöhte endogene TGF- $\beta$ -Synthese der phObs zurückzuführen ist.

In den weiteren Versuchen zeigten sich entgegengesetzte Genexpressionsmuster im Knochen von Typ-2-Diabetikern *in vivo*, im Vergleich zu mit Insulin stimulierten Osteoblasten *in vitro*. Dies wird dadurch erklärt, dass der DM 2 im Gegensatz zu den hier beschriebenen *in-vitro*-Experimenten durch eine Hypoinsulinämie gekennzeichnet ist. Dabei stellt die Hypoinsulinämie die Endstrecke des DM 2, die im komplexen System des Organismus u.a. durch jahrelange periphere Insulinresistenz und die temporäre reaktive Hyperinsulinämie entsteht, dar. Dies ist *in vitro* nur unzureichender Weise zu simulieren. Der Abfall der Genexpression von *ATF4* *in vivo* bei der untersuchten Diabetikergruppe und die erhöhten TGF- $\beta$ -Serumspiegel unterstützen die Idee einer hormonellen Regulation des Energiehaushalts durch Knochenzellen, auch wenn das Patientenkollektiv hinsichtlich der Genexpressionsanalysen im Knochen vergleichsweise klein war.

Die hier beschriebenen Ergebnisse zeigen eine mögliche biomolekulare Grundlage für die diabetische Knochenkrankheit bei Typ-2-Diabetikern auf. Gleichzeitig liefern diese Ergebnisse neue Ansatzpunkte für innovative Entwicklungen zur Behandlung des DM 2 und zur Verbesserung der Frakturbehandlung in der unfallchirurgisch/orthopädischen Versorgung.



## 6 Danksagung

Als erstes danke ich Herrn Prof. Dr. rer. nat. Andreas K. Nüssler für die Einführung in das kritische wissenschaftliche Arbeiten und Denken, sowie die fortwährende persönliche Unterstützung auf allen Ebenen. Diese Arbeit wäre ohne seine großzügige Unterstützung gar nicht möglich gewesen. Ganz herzlich möchte ich auch Frau Dr. sc. hum. Sabrina Ehnert für die initiale Einführung in das praktische wissenschaftliche Arbeiten und die stetige Mahnung zum kritischen Hinterfragen danken.

Herzlichst bedanken möchte ich mich auch bei den Kollegen der Klinik Herrn PD Dr. med. Thomas Freude, Dr. med. Stefan Pscherer und Dr. med. Karl Braun. Sie halfen mir bei der Einordnung der Ergebnisse in das große Ganze und motivierten mich in schwierigen Momenten.

Ich danke dem gesamten Laborteam mit den zahlreichen Doktoranden vor mir und Frau Dr. rer. nat. Claudine Seeliger. Herausheben möchte ich hier Frau Marina Unger und Herrn Fritz Seidl. Ich bedanke mich bei Frau Unger für die stetige und fortwährende technische Unterstützung und Einführung in die organisatorischen Abläufe der experimentellen Unfallchirurgie. Herrn Seidl danke ich für die sprachliche und organisatorische Unterstützung, die weit über die Anforderung eines Koordinators für Forschung und Lehre reicht. Ich bedanke mich im Voraus bereits für die Unterstützung in der Fortführung meiner Forschungsarbeit und bin einer fruchtbaren Zusammenarbeit sicher.

Ich bedanke mich bei Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Peter Biberthaler und den Kollegen der Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie des Klinikums rechts der Isar für die Unterstützung und die Bereitstellung sehr guter Rahmenbedingungen für diese Arbeit.

Ganz besonders möchte ich Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. biol. hum. Martijn van Griensven danken. Er hat die Betreuung meiner Arbeit übernommen als Herr Prof. Nüssler das Siegfried-Weller-Institut in Tübingen übernommen hat und war seitdem eine ausgesprochene Unterstützung und Inspiration im Rahmen einer exzellenten Zusammenarbeit. Auf die Fortführung dieser andauernden sehr produktiven und erfolgreichen Zusammenarbeit freue ich mich bereits.

Abschließend danke ich meiner lieben Familie für die Unterstützung auf jeder Ebene. Ohne ihre kontinuierliche Motivation wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Der Aufbau der basic multicellular units (BMU).....	12
Abbildung 1-2: Schematische Darstellung der Interaktion der osteoblastären Differenzierungsfaktoren.....	14
Abbildung 1-3: Phasenabhängige Expression der SLRPs während der Knochenbildung.....	17
Abbildung 1-4: Die geschätzte Prävalenz von DM 2 im Jahr 2025 weltweit.....	21
Abbildung 1-5: Schematische Darstellung der TGF- $\beta$ -Signaltransduktionswege.....	26
Abbildung 2-1: Standardkurve zur Ermittlung der relativen Zellzahl anhand SRB-Färbung.....	41
Abbildung 2-2: Standardkurve AP-Konzentrationsmessung.....	44
Abbildung 2-3: Alizarin-Rot-Standardkurve.....	45
Abbildung 2-4: RNA Integrity Check.....	51
Abbildung 3-1: TGF- $\beta$ -Serumspiegel von Typ-2-Diabetikern (DM 2) im Vergleich mit nicht-diabetischen Kontrollen.....	57
Abbildung 3-2: Die Viabilität mit Insulin stimulierter Osteoblasten im Verhältnis zu den unbehandelten Kontrollen in %.....	58
Abbildung 3-3: TGF- $\beta$ -Konzentration (aktiv) im Mediumüberstand mit Insulin stimulierter phObs.....	59
Abbildung 3-4: TGF- $\beta$ -Konzentration (total) im Mediumüberstand mit Insulin stimulierter phObs.....	60
Abbildung 3-5: TGF- $\beta$ -Konzentration (aktiv) im Mediumüberstand mit Insulin stimulierter phObs im zeitlichen Verlauf.....	61
Abbildung 3-6: TGF- $\beta$ -Konzentration (aktiv) im Mediumüberstand mit Insulin stimulierter phObs im zeitlichen Verlauf.....	62
Abbildung 3-7: AP-Aktivität von phObs nach 3, 9 und 15 Tagen Stimulation.....	64
Abbildung 3-8: Alizarin-Rot-Färbung der stimulierten Osteoblasten- Lichtmikroskopische Aufnahmen in 40facher Vergrößerung. Stimulationsdauer 21 Tage.....	65
Abbildung 3-9: Alizarin-Rot-Färbung- Auswirkungen der Stimulation mit Insulin (5 mM) auf phObs.....	66
Abbildung 3-10: Von-Kossa-Färbung- Auswirkungen der Stimulation mit Insulin (5 mM) auf phObs.....	67
Abbildung 3-11: Genexpressionsanalyse Alkalische Phosphatase in vitro.....	68
Abbildung 3-12: Genexpressionsanalyse Osteoprotegerin in vitro.....	69
Abbildung 3-13: Genexpressionsanalyse Osteopontin in vitro.....	70
Abbildung 3-14: Genexpressionsanalyse Osteonectin in vitro.....	71

---

<b>Abbildung 3-15: Genexpressionsanalyse Versican in vitro. ....</b>	<b>72</b>
<b>Abbildung 3-16: Genexpressionsanalyse Biglykan in vitro. ....</b>	<b>73</b>
<b>Abbildung 3-17: Genexpressionsanalyse Fibromodulin in vitro.....</b>	<b>74</b>
<b>Abbildung 3-18: Genexpressionsanalyse Osteocalcin in vitro.....</b>	<b>75</b>
<b>Abbildung 3-19: Genexpressionsanalyse Runx2 in vitro. ....</b>	<b>76</b>
<b>Abbildung 3-20: Genexpressionsanalyse ATF4 in vitro. ....</b>	<b>77</b>
<b>Abbildung 3-21: Genexpressionsanalyse SATB2 in vitro.....</b>	<b>78</b>
<b>Abbildung 3-22: Genexpressionsanalyse STAT1 in vitro.....</b>	<b>79</b>
<b>Abbildung 3-23: Genexpressionsanalyse von Osteoblastendifferenzierungsfaktoren in vivo– Vergleich von Diabetikern und Nicht-Diabetikern. ....</b>	<b>81</b>
<b>Abbildung 3-24: Genexpressionsanalyse der von Osteoblasten synthetisierten EZM-Bestandteile im in vivo– Vergleich von Diabetikern und Nicht-Diabetikern.....</b>	<b>82</b>
<b>Abbildung 4-1: Schematische Darstellung der Verflechtungen des Osteoblasten in die Regulation des systemischen Energiestoffwechsels. ....</b>	<b>88</b>

# Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 2.1—1: Auflistung der für diese Arbeit benötigten Geräte.....</b>	<b>28</b>
<b>Tabelle 2.2—1: Auflistung der für diese Arbeit benötigten Verbrauchsmaterialien..</b>	<b>28</b>
<b>Tabelle 2.3—1: Auflistung der für diese Arbeit benötigten Software. ....</b>	<b>29</b>
<b>Tabelle 2.4—1: Materialien für die Herstellung des Osteoblastenkulturmediums.....</b>	<b>30</b>
<b>Tabelle 2.4—2: Zusammensetzung des Osteoblastendifferenzierungsmediums. ....</b>	<b>30</b>
<b>Tabelle 2.5—1: Materialien für die Herstellung des Osteoblastendifferenzierungsmediums.....</b>	<b>31</b>
<b>Tabelle 2.5—2: Zusammensetzung des Osteoblastendifferenzierungsmediums. ....</b>	<b>32</b>
<b>Tabelle 2.6—1: Materialien für die Isolation von phObs. ....</b>	<b>32</b>
<b>Tabelle 2.7—1: Materialien für die Durchführung der allgemeinen Zellkultur. ....</b>	<b>34</b>
<b>Tabelle 2.8—1: Materialien für die Durchführung der Stimulationsexperimente. ....</b>	<b>35</b>
<b>Tabelle 2.8—2: Details der Stimulationsversuche .....</b>	<b>37</b>
<b>Tabelle 2.8—3: Materialien für die Durchführung der TGF-<math>\beta</math>- Konzentrationsmessung. ....</b>	<b>38</b>
<b>Tabelle 2.9—1: Materialien für die Durchführung der Sulforhodamin-B-Färbung..</b>	<b>40</b>
<b>Tabelle 2.10—1: Materialien für die Durchführung des MTT-Zytotoxizitätstests.....</b>	<b>42</b>
<b>Tabelle 2.11—1: Materialien für die Durchführung der AP-Konzentrationsmessung. .....</b>	<b>43</b>
<b>Tabelle 2.12—1: Materialien für die Durchführung Alizarin-Rot-Färbung. ....</b>	<b>44</b>
<b>Tabelle 2.13—1: Materialien für die Durchführung der Von-Kossa-Färbung. ....</b>	<b>46</b>
<b>Tabelle 2.14—1: Materialien für die Durchführung der RNA-Isolation. ....</b>	<b>47</b>
<b>Tabelle 2.14—2: Patientencharakteristika.....</b>	<b>48</b>
<b>Tabelle 2.15—1: Materialien für die Herstellung einer cDNA.....</b>	<b>52</b>
<b>Tabelle 2.16—1: Materialien für die Durchführung einer PCR.....</b>	<b>53</b>
<b>Tabelle 2.16—2: Primerliste der untersuchten Zielgene .....</b>	<b>54</b>
<b>Tabelle 2.17—1: Interpretation der grafischen Darstellung der statistischen Signifikanz.....</b>	<b>56</b>

# Literaturverzeichnis

Ameye, L., Young, M.F.

Mice deficient in small leucine-rich proteoglycans: novel in vivo models for osteoporosis, osteoarthritis, Ehlers-Danlos syndrome, muscular dystrophy, and corneal diseases. *Glycobiology*. 12 (2002) 107R-116R

Annes, J.P., Munger, J.S., Rifkin, D.B.

Making sense of latent TGFbeta activation. *J Cell Sci*. 116 (2003) 217-224

Assoian, R.K., Komoriya, A., Meyers, C.A., Miller, D.M., Sporn, M.B.

Transforming growth factor-beta in human platelets. Identification of a major storage site, purification, and characterization. *J Biol Chem*. 258 (1983) 7155-7160

Atti, E., Gomez, S., Wahl, S.M., Mendelsohn, R., Paschalis, E., Boskey, A.L.

Effects of transforming growth factor-beta deficiency on bone development: a Fourier transform-infrared imaging analysis. *Bone*. 31 (2002) 675-684

Avnet, S., Perut, F., Salerno, M., Sciacca, L., Baldini, N.

Insulin receptor isoforms are differently expressed during human osteoblastogenesis. *Differentiation*. 83 (2012) 242-248

Bianco, P., Fisher, L.W., Young, M.F., Termine, J.D., Robey, P.G.

Expression and localization of the two small proteoglycans biglycan and decorin in developing human skeletal and non-skeletal tissues. *J Histochem Cytochem*. 38 (1990) 1549-1563

Bianco, P., Fisher, L.W., Young, M.F., Termine, J.D., Robey, P.G.

Expression of bone sialoprotein (BSP) in developing human tissues. *Calcif Tissue Int*. 49 (1991) 421-426

Bibbo, C., Lin, S.S., Beam, H.A., Behrens, F.F.

Complications of ankle fractures in diabetic patients. *Orthop Clin North Am*. 32 (2001) 113-133

Bonds, D.E., Larson, J.C., Schwartz, A.V., Strotmeyer, E.S., Robbins, J., Rodriguez, B.L., Johnson, K.C., Margolis, K.L.

Risk of fracture in women with type 2 diabetes: the Women's Health Initiative Observational Study. *J Clin Endocrinol Metab*. 91 (2006) 3404-3410

Border, W.A., Noble, N.A., Yamamoto, T., Harper, J.R., Yamaguchi, Y., Pierschbacher, M.D., Ruoslahti, E.

Natural inhibitor of transforming growth factor-beta protects against scarring in experimental kidney disease. *Nature*. 360 (1992) 361-364

- Boskey, A.L., Spevak, L., Paschalis, E., Doty, S.B., McKee, M.D.  
Osteopontin deficiency increases mineral content and mineral crystallinity in mouse bone.  
*Calcif Tissue Int.* 71 (2002) 145-154
- Bou-Gharios, G., de Crombrughe, B.  
Type I Collagen Structure, Synthesis, and Regulation.  
In: "Principles of Bone Biology", Bilezikian, J.P., Raisz, L.G., Martin, T.J. (Hrsg.) Elsevier Academic Press, San Diego, CA, USA, 2008 3rd Auflage, 285-318
- Burch, M.L., Yang, S.N., Ballinger, M.L., Getachew, R., Osman, N., Little, P.J.  
TGF-beta stimulates biglycan synthesis via p38 and ERK phosphorylation of the linker region of Smad2.  
*Cell Mol Life Sci.* 67 (2010) 2077-2090
- Canty, E.G., Lu, Y., Meadows, R.S., Shaw, M.K., Holmes, D.F., Kadler, K.E.  
Coalignment of plasma membrane channels and protrusions (fibripositors) specifies the parallelism of tendon.  
*J Cell Biol.* 165 (2004) 553-563
- Clark, W.D., Smith, E.L., Linn, K.A., Paul-Murphy, J.R., Muir, P., Cook, M.E.  
Osteocyte apoptosis and osteoclast presence in chicken radii 0-4 days following osteotomy.  
*Calcif Tissue Int.* 77 (2005) 327-336
- Coen, G., Ballanti, P., Bonucci, E., Calabria, S., Centorrino, M., Fassino, V., Manni, M., Mantella, D., Mazzaferro, S., Napoletano, I., Sardella, D., Taggi, F.  
Bone markers in the diagnosis of low turnover osteodystrophy in haemodialysis patients.  
*Nephrol Dial Transplant.* 13 (1998) 2294-2302
- Corsi, A., Xu, T., Chen, X.D., Boyde, A., Liang, J., Mankani, M., Sommer, B., Iozzo, R.V., Eichstetter, I., Robey, P.G., Bianco, P., Young, M.F.  
Phenotypic effects of biglycan deficiency are linked to collagen fibril abnormalities, are synergized by decorin deficiency, and mimic Ehlers-Danlos-like changes in bone and other connective tissues.  
*J Bone Miner Res.* 17 (2002) 1180-1189
- Cousin, W., Courseaux, A., Ladoux, A., Dani, C., Peraldi, P.  
Cloning of hOST-PTP: the only example of a protein-tyrosine-phosphatase the function of which has been lost between rodent and human.  
*Biochem Biophys Res Commun.* 321 (2004) 259-265
- Cozen, L.  
Does diabetes delay fracture healing?  
*Clin Orthop Relat Res.* 82 (1972) 134-140
- Dallas, S.L., Miyazono, K., Skerry, T.M., Mundy, G.R., Bonewald, L.F.  
Dual role for the latent transforming growth factor-beta binding protein in storage of latent TGF-beta in the extracellular matrix and as a structural matrix protein.  
*J Cell Biol.* 131 (1995) 539-549
- de Liefde, I.I., van der Klift, M., de Laet, C.E., van Daele, P.L., Hofman, A., Pols, H.A.  
Bone mineral density and fracture risk in type-2 diabetes mellitus: the Rotterdam Study.  
*Osteoporos Int.* 16 (2005) 1713-1720

Diabetes Atlas committee 2003. Diabetes Atlas 2003. *In*: Gan, D. (ed.). Brussels, Belgium: International Diabetes Federation.

Dixit, P.K., Ekstrom, R.A.

Decreased breaking strength of diabetic rat bone and its improvement by insulin treatment. *Calcif Tissue Int.* 32 (1980) 195-199

Dobrevá, G., Chahrour, M., Dautzenberg, M., Chirivella, L., Kanzler, B., Farinas, I., Karsenty, G., Grosschedl, R.

SATB2 is a multifunctional determinant of craniofacial patterning and osteoblast differentiation.

*Cell.* 125 (2006) 971-986

Ducy, P., Karsenty, G.

Two distinct osteoblast-specific cis-acting elements control expression of a mouse osteocalcin gene.

*Mol Cell Biol.* 15 (1995) 1858-1869

Ducy, P., Starbuck, M., Priemel, M., Shen, J., Pinero, G., Geoffroy, V., Amling, M., Karsenty, G.

A *Cbfa1*-dependent genetic pathway controls bone formation beyond embryonic development.

*Genes Dev.* 13 (1999) 1025-1036

Ducy, P., Zhang, R., Geoffroy, V., Ridall, A.L., Karsenty, G.

*Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation.

*Cell.* 89 (1997) 747-754

Einhorn, T.A., Boskey, A.L., Gundberg, C.M., Vigorita, V.J., Devlin, V.J., Beyer, M.M.

The mineral and mechanical properties of bone in chronic experimental diabetes.

*J Orthop Res.* 6 (1988) 317-323

Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus

Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus.

*Diabetes Care.* 25 (2002) s5-s20

Ferron, M., Wei, J., Yoshizawa, T., Del Fattore, A., DePinho, R.A., Teti, A., Ducy, P., Karsenty, G.

Insulin signaling in osteoblasts integrates bone remodeling and energy metabolism.

*Cell.* 142 (2010) 296-308

Fisher, L.W., Heegaard, A.M., Vetter, U., Vogel, W., Just, W., Termine, J.D., Young, M.F. Human biglycan gene. Putative promoter, intron-exon junctions, and chromosomal localization.

*J Biol Chem.* 266 (1991) 14371-14377

FitzPatrick, D.R., Carr, I.M., McLaren, L., Leek, J.P., Wightman, P., Williamson, K., Gautier, P., McGill, N., Hayward, C., Firth, H., Markham, A.F., Fantes, J.A., Bonthron, D.T.

Identification of SATB2 as the cleft palate gene on 2q32-q33.

*Hum Mol Genet.* 12 (2003) 2491-2501

Folk, J.W., Starr, A.J., Early, J.S.

Early wound complications of operative treatment of calcaneus fractures: analysis of 190 fractures.  
J Orthop Trauma. 13 (1999) 369-372

Forsen, L., Meyer, H.E., Midthjell, K., Edna, T.H.  
Diabetes mellitus and the incidence of hip fracture: results from the Nord-Trondelag Health Survey.  
Diabetologia. 42 (1999) 920-925

Fukumoto, S., Martin, T.J.  
Bone as an endocrine organ.  
Trends Endocrinol Metab. 20 (2009) 230-236

Fuller, J.H., Elford, J., Goldblatt, P., Adelstein, A.M.  
Diabetes mortality: new light on an underestimated public health problem.  
Diabetologia. 24 (1983) 336-341

Gagnon, A.M., Chabot, J., Pardasani, D., Sorisky, A.  
Extracellular matrix induced by TGFbeta impairs insulin signal transduction in 3T3-L1 preadipose cells.  
J Cell Physiol. 175 (1998) 370-378

Gandhi, A., Beam, H.A., O'Connor, J.P., Parsons, J.R., Lin, S.S.  
The effects of local insulin delivery on diabetic fracture healing.  
Bone. 37 (2005) 482-490

Geiser, A.G., Zeng, Q.Q., Sato, M., Helvering, L.M., Hirano, T., Turner, C.H.  
Decreased bone mass and bone elasticity in mice lacking the transforming growth factor-beta1 gene.  
Bone. 23 (1998) 87-93

Giglio, M.J., Giannunzio, G., Olmedo, D., Guglielmotti, M.B.  
Histomorphometric study of bone healing around laminar implants in experimental diabetes.  
Implant Dent. 9 (2000) 143-149

Gogakos, A.I., Cheung, M.S., Bassett, J.H.D., Williams, G.R.  
Bone signaling pathways and treatment of osteoporosis.  
Expert Review of Endocrinology & Metabolism. 4 (2009) 639-650

Goodman, W.G., Hori, M.T.  
Diminished bone formation in experimental diabetes. Relationship to osteoid maturation and mineralization.  
Diabetes. 33 (1984) 825-831

Gorski, J.P.  
Biom mineralization of bone: a fresh view of the roles of non-collagenous proteins.  
Front Biosci. 16 (2011) 2598-2621

Hahn, T.J., Westbrook, S.L., Sullivan, T.L., Goodman, W.G., Halstead, L.R.  
Glucose transport in osteoblast-enriched bone explants: characterization and insulin regulation.  
J Bone Miner Res. 3 (1988) 359-365



- Hamann, C., Kirschner, S., Gunther, K.P., Hofbauer, L.C.  
Bone, sweet bone-osteoporotic fractures in diabetes mellitus.  
*Nat Rev Endocrinol.* (2012)
- Hanai, J., Chen, L.F., Kanno, T., Ohtani-Fujita, N., Kim, W.Y., Guo, W.H., Imamura, T., Ishidou, Y., Fukuchi, M., Shi, M.J., Stavnezer, J., Kawabata, M., Miyazono, K., Ito, Y.  
Interaction and functional cooperation of PEBP2/CBF with Smads. Synergistic induction of the immunoglobulin germline Calpha promoter.  
*J Biol Chem.* 274 (1999) 31577-31582
- Hildebrand, A., Romaris, M., Rasmussen, L.M., Heinegard, D., Twardzik, D.R., Border, W.A., Ruoslahti, E.  
Interaction of the small interstitial proteoglycans biglycan, decorin and fibromodulin with transforming growth factor beta.  
*Biochem J.* 302 ( Pt 2) (1994) 527-534
- Horcajada-Molteni, M.N., Chanteranne, B., Lebecque, P., Davicco, M.J., Coxam, V., Young, A., Barlet, J.P.  
Amylin and bone metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats.  
*J Bone Miner Res.* 16 (2001) 958-965
- Horne, W.C., Duong, L.T., Sanjay, A., Baron, R.  
Regulating Bone Resorption: Targeting Integrins, Calcitonin Receptor, and Cathepsin K.  
In: "Principles of Bone Biology", Bilezikian, J.P., Raisz, L.G., Martin, T.J. (Hrsg.) Elsevier Academic Press, San Diego, CA, USA, 2008 3rd Auflage
- Hou, J.C., Zernicke, R.F., Barnard, R.J.  
Experimental diabetes, insulin treatment, and femoral neck morphology and biomechanics in rats.  
*Clin Orthop Relat Res.* (1991) 278-285
- Hwang, Y.C., Jeong, I.K., Ahn, K.J., Chung, H.Y.  
The uncarboxylated form of osteocalcin is associated with improved glucose tolerance and enhanced beta-cell function in middle-aged male subjects.  
*Diabetes Metab Res Rev.* 25 (2009) 768-772
- Imamura, T., Takase, M., Nishihara, A., Oeda, E., Hanai, J., Kawabata, M., Miyazono, K.  
Smad6 inhibits signalling by the TGF-beta superfamily.  
*Nature.* 389 (1997) 622-626
- Inman, G.J., Nicolas, F.J., Callahan, J.F., Harling, J.D., Gaster, L.M., Reith, A.D., Laping, N.J., Hill, C.S.  
SB-431542 is a potent and specific inhibitor of transforming growth factor-beta superfamily type I activin receptor-like kinase (ALK) receptors ALK4, ALK5, and ALK7.  
*Mol Pharmacol.* 62 (2002) 65-74
- Ituarte, E.A., Halstead, L.R., Iida-Klein, A., Ituarte, H.G., Hahn, T.J.  
Glucose transport system in UMR-106-01 osteoblastic osteosarcoma cells: regulation by insulin.  
*Calcif Tissue Int.* 45 (1989) 27-33
- Ivers, R.Q., Cumming, R.G., Mitchell, P., Peduto, A.J.  
Diabetes and risk of fracture: The Blue Mountains Eye Study.  
*Diabetes Care.* 24 (2001) 1198-1203

- Iyama, S., Takeshita, F., Ayukawa, Y., Kido, M.A., Suetsugu, T., Tanaka, T.  
A study of the regional distribution of bone formed around hydroxyapatite implants in the tibiae of streptozotocin-induced diabetic rats using multiple fluorescent labeling and confocal laser scanning microscopy.  
*J Periodontol.* 68 (1997) 1169-1175
- Janghorbani, M., Feskanich, D., Willett, W.C., Hu, F.  
Prospective study of diabetes and risk of hip fracture: the Nurses' Health Study.  
*Diabetes Care.* 29 (2006) 1573-1578
- Janssens, K., ten Dijke, P., Janssens, S., Van Hul, W.  
Transforming growth factor-beta1 to the bone.  
*Endocr Rev.* 26 (2005) 743-774
- Ji, C., Casinghino, S., Chang, D.J., Chen, Y., Javed, A., Ito, Y., Hiebert, S.W., Lian, J.B., Stein, G.S., McCarthy, T.L., Centrella, M.  
CBFa(AML/PEBP2)-related elements in the TGF-beta type I receptor promoter and expression with osteoblast differentiation.  
*J Cell Biochem.* 69 (1998) 353-363
- Kanazawa, I., Yamaguchi, T., Tada, Y., Yamauchi, M., Yano, S., Sugimoto, T.  
Serum osteocalcin level is positively associated with insulin sensitivity and secretion in patients with type 2 diabetes.  
*Bone.* 48 (2011) 720-725
- Kanazawa, I., Yamaguchi, T., Yamamoto, M., Yamauchi, M., Kurioka, S., Yano, S., Sugimoto, T.  
Serum osteocalcin level is associated with glucose metabolism and atherosclerosis parameters in type 2 diabetes mellitus.  
*J Clin Endocrinol Metab.* 94 (2009) 45-49
- Kanzler, B., Kuschert, S.J., Liu, Y.H., Mallo, M.  
Hoxa-2 restricts the chondrogenic domain and inhibits bone formation during development of the branchial area.  
*Development.* 125 (1998) 2587-2597
- Kemink, S.A., Hermus, A.R., Swinkels, L.M., Lutterman, J.A., Smals, A.G.  
Osteopenia in insulin-dependent diabetes mellitus; prevalence and aspects of pathophysiology.  
*J Endocrinol Invest.* 23 (2000) 295-303
- Kim, J.J., Accili, D.  
Signalling through IGF-I and insulin receptors: where is the specificity?  
*Growth Horm IGF Res.* 12 (2002) 84-90
- Kim, S., Koga, T., Isobe, M., Kern, B.E., Yokochi, T., Chin, Y.E., Karsenty, G., Taniguchi, T., Takayanagi, H.  
Stat1 functions as a cytoplasmic attenuator of Runx2 in the transcriptional program of osteoblast differentiation.  
*Genes Dev.* 17 (2003) 1979-1991
- Kolb, M., Margetts, P.J., Sime, P.J., Gauldie, J.  
Proteoglycans decorin and biglycan differentially modulate TGF-beta-mediated fibrotic responses in the lung.

Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 280 (2001) L1327-1334

Krakauer, J.C., McKenna, M.J., Buderer, N.F., Rao, D.S., Whitehouse, F.W., Parfitt, A.M.  
Bone loss and bone turnover in diabetes.  
Diabetes. 44 (1995) 775-782

Kream, B.E., Smith, M.D., Canalis, E., Raisz, L.G.  
Characterization of the effect of insulin on collagen synthesis in fetal rat bone.  
Endocrinology. 116 (1985) 296-302

Lee, K.S., Kim, H.J., Li, Q.L., Chi, X.Z., Ueta, C., Komori, T., Wozney, J.M., Kim, E.G.,  
Choi, J.Y., Ryoo, H.M., Bae, S.C.  
Runx2 is a common target of transforming growth factor beta1 and bone morphogenetic  
protein 2, and cooperation between Runx2 and Smad5 induces osteoblast-specific gene  
expression in the pluripotent mesenchymal precursor cell line C2C12.  
Mol Cell Biol. 20 (2000) 8783-8792

Lee, N.K., Sowa, H., Hinoi, E., Ferron, M., Ahn, J.D., Confavreux, C., Dacquin, R., Mee,  
P.J., McKee, M.D., Jung, D.Y., Zhang, Z., Kim, J.K., Mauvais-Jarvis, F., Ducy, P.,  
Karsenty, G.  
Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton.  
Cell. 130 (2007) 456-469

Liu, Y., Wu, G., de Groot, K.  
Biomimetic coatings for bone tissue engineering of critical-sized defects.  
J R Soc Interface. 7 Suppl 5 (2010) S631-647

Loder, R.T.  
The influence of diabetes mellitus on the healing of closed fractures.  
Clin Orthop Relat Res. (1988) 210-216

Marini, J.C., Forlino, A., Cabral, W.A., Barnes, A.M., San Antonio, J.D., Milgrom, S.,  
Hyland, J.C., Korkko, J., Prockop, D.J., De Paepe, A., Coucke, P., Symoens, S., Glorieux,  
F.H., Roughley, P.J., Lund, A.M., Kuurila-Svahn, K., Hartikka, H., Cohn, D.H., Krakow,  
D., Mottes, M., Schwarze, U., Chen, D., Yang, K., Kuslich, C., Troendle, J., Dagleish, R.,  
Byers, P.H.  
Consortium for osteogenesis imperfecta mutations in the helical domain of type I collagen:  
regions rich in lethal mutations align with collagen binding sites for integrins and  
proteoglycans.  
Hum Mutat. 28 (2007) 209-221

Massague, J.  
The transforming growth factor-beta family.  
Annu Rev Cell Biol. 6 (1990) 597-641

McCabe, L.R.  
Understanding the pathology and mechanisms of type I diabetic bone loss.  
J Cell Biochem. 102 (2007) 1343-1357

Molitch, M.E., DeFronzo, R.A., Franz, M.J., Keane, W.F., Mogensen, C.E., Parving, H.H.,  
Steffes, M.W.  
Diabetic Nephropathy.  
Diabetes Care. 25 (2002) s85-s89

- Morris, H.F., Ochi, S., Winkler, S.  
Implant survival in patients with type 2 diabetes: placement to 36 months.  
*Ann Periodontol.* 5 (2000) 157-165
- Morrish, N.J., Wang, S.L., Stevens, L.K., Fuller, J.H., Keen, H.  
Mortality and causes of death in the WHO Multinational Study of Vascular Disease in Diabetes.  
*Diabetologia.* 44 Suppl 2 (2001) S14-21
- Moy, P.K., Medina, D., Shetty, V., Aghaloo, T.L.  
Dental implant failure rates and associated risk factors.  
*Int J Oral Maxillofac Implants.* 20 (2005) 569-577
- Mundlos, S., Otto, F., Mundlos, C., Mulliken, J.B., Aylsworth, A.S., Albright, S., Lindhout, D., Cole, W.G., Henn, W., Knoll, J.H., Owen, M.J., Mertelsmann, R., Zabel, B.U., Olsen, B.R.  
Mutations involving the transcription factor CBFA1 cause cleidocranial dysplasia.  
*Cell.* 89 (1997) 773-779
- Neve, A., Corrado, A., Cantatore, F.P.  
Osteocalcin: Skeletal and extra-skeletal effects.  
*J Cell Physiol.* (2012)
- Nevins, M.L., Karimbux, N.Y., Weber, H.P., Giannobile, W.V., Fiorellini, J.P.  
Wound healing around endosseous implants in experimental diabetes.  
*Int J Oral Maxillofac Implants.* 13 (1998) 620-629
- Nicodemus, K.K., Folsom, A.R.  
Type 1 and type 2 diabetes and incident hip fractures in postmenopausal women.  
*Diabetes Care.* 24 (2001) 1192-1197
- Olmos, J.M., Perez-Castrillon, J.L., Garcia, M.T., Garrido, J.C., Amado, J.A., Gonzalez-Macias, J.  
Bone densitometry and biochemical bone remodeling markers in type 1 diabetes mellitus.  
*Bone Miner.* 26 (1994) 1-8
- Oreffo, R.O., Mundy, G.R., Seyedin, S.M., Bonewald, L.F.  
Activation of the bone-derived latent TGF beta complex by isolated osteoclasts.  
*Biochem Biophys Res Commun.* 158 (1989) 817-823
- Ottenbacher, K.J., Ostir, G.V., Peek, M.K., Goodwin, J.S., Markides, K.S.  
Diabetes mellitus as a risk factor for hip fracture in mexican american older adults.  
*J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 57 (2002) M648-653
- Otto, F., Thornell, A.P., Crompton, T., Denzel, A., Gilmour, K.C., Rosewell, I.R., Stamp, G.W., Beddington, R.S., Mundlos, S., Olsen, B.R., Selby, P.B., Owen, M.J.  
Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development.  
*Cell.* 89 (1997) 765-771
- Pedrazzoni, M., Ciotti, G., Pioli, G., Girasole, G., Davoli, L., Palummeri, E., Passeri, M.  
Osteocalcin levels in diabetic subjects.  
*Calcif Tissue Int.* 45 (1989) 331-336

Pei, Y., Hercz, G., Greenwood, C., Segre, G., Manuel, A., Saiphoo, C., Fenton, S., Sherrard, D.  
Renal osteodystrophy in diabetic patients.  
Kidney Int. 44 (1993) 159-164

Pun, K.K., Lau, P., Ho, P.W.  
The characterization, regulation, and function of insulin receptors on osteoblast-like clonal osteosarcoma cell line.  
J Bone Miner Res. 4 (1989) 853-862

Retzepi, M., Donos, N.  
The effect of diabetes mellitus on osseous healing.  
Clin Oral Implants Res. 21 (2010) 673-681

Robey, P.G., Fedarko, N.S., Hefferan, T.E., Bianco, P., Vetter, U.K., Grzesik, W., Friedenstein, A., Van der Pluijm, G., Mintz, K.P., Young, M.F., et al.  
Structure and molecular regulation of bone matrix proteins.  
J Bone Miner Res. 8 Suppl 2 (1993) S483-487

Roglic, G., Unwin, N., Bennett, P.H., Mathers, C., Tuomilehto, J., Nag, S., Connolly, V., King, H.  
The burden of mortality attributable to diabetes: realistic estimates for the year 2000.  
Diabetes Care. 28 (2005) 2130-2135

Ruoslahti, E., Yamaguchi, Y.  
Proteoglycans as modulators of growth factor activities.  
Cell. 64 (1991) 867-869

Salerno, M., Argenziano, A., Di Maio, S., Gasparini, N., Formicola, S., De Filippo, G., Tenore, A.  
Pubertal growth, sexual maturation, and final height in children with IDDM. Effects of age at onset and metabolic control.  
Diabetes Care. 20 (1997) 721-724

Sanford, L.P., Ormsby, I., Gittenberger-de Groot, A.C., Sariola, H., Friedman, R., Boivin, G.P., Cardell, E.L., Doetschman, T.  
TGFbeta2 knockout mice have multiple developmental defects that are non-overlapping with other TGFbeta knockout phenotypes.  
Development. 124 (1997) 2659-2670

Schinke, T., Karsenty, G.  
Transcriptional Control of Osteoblast Differentiation and Function.  
In: "Principles of Bone Biology", Bilezikian, J.P., Raisz, L.G., Martin, T.J. (Hrsg.) Elsevier Academic Press, San Diego, CA, USA, 2008 3rd Auflage, 109-119

Schmidmaier, G., Lucke, M., Schwabe, P., Raschke, M., Haas, N.P., Wildemann, B.  
Collective review: bioactive implants coated with poly(D,L-lactide) and growth factors IGF-I, TGF-beta1, or BMP-2 for stimulation of fracture healing.  
J Long Term Eff Med Implants. 16 (2006) 61-69

Schmidmaier, G., Schwabe, P., Wildemann, B., Haas, N.P.  
Use of bone morphogenetic proteins for treatment of non-unions and future perspectives.  
Injury. 38 Suppl 4 (2007) S35-41

Schönherr, E., Witsch-Prehm, P., Harrach, B., Robenek, H., Rauterberg, J., Kresse, H.  
Interaction of biglycan with type I collagen.  
*J Biol Chem.* 270 (1995) 2776-2783

Schwartz, A.V.  
Diabetes Mellitus: Does it Affect Bone?  
*Calcif Tissue Int.* 73 (2003) 515-519

Schwartz, A.V., Sellmeyer, D.E., Ensrud, K.E., Cauley, J.A., Tabor, H.K., Schreiner, P.J.,  
Jamal, S.A., Black, D.M., Cummings, S.R.  
Older women with diabetes have an increased risk of fracture: a prospective study.  
*The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 86 (2001a) 32-38

Schwartz, A.V., Sellmeyer, D.E., Ensrud, K.E., Cauley, J.A., Tabor, H.K., Schreiner, P.J.,  
Jamal, S.A., Black, D.M., Cummings, S.R.  
Older women with diabetes have an increased risk of fracture: a prospective study.  
*J Clin Endocrinol Metab.* 86 (2001b) 32-38

Seeman, E.  
Modeling and Remodeling- The Cellular Machinery Responsible for the Gain and Loss of  
Bone's Material and Structural Strength.  
In: "Principles of Bone Biology", Bilezikian, J.P., Raisz, L.G., Martin, T.J. (Hrsg.) Elsevier  
Academic Press, San Diego, CA, USA, 2008 3rd Auflage, 3-28

Seeman, E.  
Bone modeling and remodeling.  
*Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 19 (2009) 219-233

Shi, Y., Massague, J.  
Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus.  
*Cell.* 113 (2003) 685-700

Shires, R., Teitelbaum, S.L., Bergfeld, M.A., Fallon, M.D., Slatopolsky, E., Avioli, L.V.  
The effect of streptozotocin-induced chronic diabetes mellitus on bone and mineral  
homeostasis in the rat.  
*J Lab Clin Med.* 97 (1981) 231-240

Siqueira, J.T., Cavalher-Machado, S.C., Arana-Chavez, V.E., Sannomiya, P.  
Bone formation around titanium implants in the rat tibia: role of insulin.  
*Implant Dent.* 12 (2003) 242-251

Smith, R.A., Berger, R., Dodson, T.B.  
Risk factors associated with dental implants in healthy and medically compromised patients.  
*Int J Oral Maxillofac Implants.* 7 (1992) 367-372

So, Y., Hyun, I.Y., Lee, D.S., Ahn, C., Chung, J.K., Kim, S., Lee, M.C., Lee, J.S., Koh, C.S.  
Bone scan appearance of renal osteodystrophy in diabetic chronic renal failure patients.  
*Radiat Med.* 16 (1998) 417-421

Spanheimer, R.G., Umpierrez, G.E., Stumpf, V.  
Decreased collagen production in diabetic rats.  
*Diabetes.* 37 (1988) 371-376

Strotmeyer, E.S., Cauley, J.A., Schwartz, A.V., Nevitt, M.C., Resnick, H.E., Bauer, D.C., Tylavsky, F.A., de Rekeneire, N., Harris, T.B., Newman, A.B.  
Nontraumatic fracture risk with diabetes mellitus and impaired fasting glucose in older white and black adults: the health, aging, and body composition study.  
*Arch Intern Med.* 165 (2005) 1612-1617

Suzuki, K., Miyakoshi, N., Tsuchida, T., Kasukawa, Y., Sato, K., Itoi, E.  
Effects of combined treatment of insulin and human parathyroid hormone(1-34) on cancellous bone mass and structure in streptozotocin-induced diabetic rats.  
*Bone.* 33 (2003) 108-114

Takeuchi, Y., Kodama, Y., Matsumoto, T.  
Bone matrix decorin binds transforming growth factor-beta and enhances its bioactivity.  
*J Biol Chem.* 269 (1994) 32634-32638

Tatsumi, S., Ishii, K., Amizuka, N., Li, M., Kobayashi, T., Kohno, K., Ito, M., Takeshita, S., Ikeda, K.  
Targeted ablation of osteocytes induces osteoporosis with defective mechanotransduction.  
*Cell Metab.* 5 (2007) 464-475

Tesseur, I., Zou, K., Berber, E., Zhang, H., Wyss-Coray, T.  
Highly sensitive and specific bioassay for measuring bioactive TGF-beta.  
*BMC Cell Biol.* 7 (2006) 15

Thraillkill, K.M., Lumpkin, C.K., Jr., Bunn, R.C., Kemp, S.F., Fowlkes, J.L.  
Is insulin an anabolic agent in bone? Dissecting the diabetic bone for clues.  
*Am J Physiol Endocrinol Metab.* 289 (2005) E735-745

Tissenbaum, H.A., Ruvkun, G.  
An insulin-like signaling pathway affects both longevity and reproduction in *Caenorhabditis elegans*.  
*Genetics.* 148 (1998) 703-717

Ungefroren, H., Krull, N.B.  
Transcriptional regulation of the human biglycan gene.  
*J Biol Chem.* 271 (1996) 15787-15795

van Daele, P.L., Stolk, R.P., Burger, H., Algra, D., Grobbee, D.E., Hofman, A., Birkenhager, J.C., Pols, H.A.  
Bone density in non-insulin-dependent diabetes mellitus. The Rotterdam Study.  
*Ann Intern Med.* 122 (1995) 409-414

Vautour, L.M., Melton, L.J., 3rd, Clarke, B.L., Achenbach, S.J., Oberg, A.L., McCarthy, J.T.  
Long-term fracture risk following renal transplantation: a population-based study.  
*Osteoporos Int.* 15 (2004) 160-167

Verhaeghe, J., Suiker, A.M., Einhorn, T.A., Geusens, P., Visser, W.J., Van Herck, E., Van Bree, R., Magitsky, S., Bouillon, R.  
Brittle bones in spontaneously diabetic female rats cannot be predicted by bone mineral measurements: studies in diabetic and ovariectomized rats.  
*J Bone Miner Res.* 9 (1994) 1657-1667

Verhaeghe, J., van Herck, E., Visser, W.J., Suiker, A.M., Thomasset, M., Einhorn, T.A., Faierman, E., Bouillon, R.  
Bone and mineral metabolism in BB rats with long-term diabetes. Decreased bone turnover and osteoporosis.  
*Diabetes*. 39 (1990) 477-482

Vestergaard, P.  
Discrepancies in bone mineral density and fracture risk in patients with type 1 and type 2 diabetes--a meta-analysis.  
*Osteoporos Int*. 18 (2007) 427-444

Vestergaard, P., Rejnmark, L., Mosekilde, L.  
Relative fracture risk in patients with diabetes mellitus, and the impact of insulin and oral antidiabetic medication on relative fracture risk.  
*Diabetologia*. 48 (2005) 1292-1299

Vetter, U., Vogel, W., Just, W., Young, M.F., Fisher, L.W.  
Human decorin gene: intron-exon junctions and chromosomal localization.  
*Genomics*. 15 (1993) 161-168

Waddington, R.J., Roberts, H.C., Sugars, R.V., Schonherr, E.  
Differential roles for small leucine-rich proteoglycans in bone formation.  
*Eur Cell Mater*. 6 (2003) 12-21; discussion 21

Weber, I.T., Harrison, R.W., Iozzo, R.V.  
Model structure of decorin and implications for collagen fibrillogenesis.  
*J Biol Chem*. 271 (1996) 31767-31770

Wild, S., Roglic, G., Green, A., Sicree, R., King, H.  
Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030.  
*Diabetes Care*. 27 (2004) 1047-1053

Wu, X., Chen, S., Orlando, S.A., Yuan, J., Kim, E.T., Munugalavadla, V., Mali, R.S., Kapur, R., Yang, F.C.  
p85alpha regulates osteoblast differentiation by cross-talking with the MAPK pathway.  
*J Biol Chem*. 286 (2011) 13512-13521

Yang, X., Matsuda, K., Bialek, P., Jacquot, S., Masuoka, H.C., Schinke, T., Li, L., Brancorsini, S., Sassone-Corsi, P., Townes, T.M., Hanauer, A., Karsenty, G.  
ATF4 is a substrate of RSK2 and an essential regulator of osteoblast biology; implication for Coffin-Lowry Syndrome.  
*Cell*. 117 (2004) 387-398

Yoshizawa, T., Hinoi, E., Jung, D.Y., Kajimura, D., Ferron, M., Seo, J., Graff, J.M., Kim, J.K., Karsenty, G.  
The transcription factor ATF4 regulates glucose metabolism in mice through its expression in osteoblasts.  
*J Clin Invest*. 119 (2009) 2807-2817

Zebaze, R.M., Jones, A., Knackstedt, M., Maalouf, G., Seeman, E.  
Construction of the femoral neck during growth determines its strength in old age.  
*J Bone Miner Res*. 22 (2007) 1055-1061



Zhang, Y.W., Yasui, N., Ito, K., Huang, G., Fujii, M., Hanai, J., Nogami, H., Ochi, T., Miyazono, K., Ito, Y.  
A RUNX2/PEBP2alpha A/CBFA1 mutation displaying impaired transactivation and Smad interaction in cleidocranial dysplasia.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 97 (2000) 10549-10554