



**Aktivierung des MEK5/ Erk5-Signalwegs durch inhibitorische Substanzen
des Mevalonatstoffwechsels**

**Activation of the MEK5/ Erk5 signalling pathway through inhibitory
substances of the mevalonate metabolism**

Dissertation zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades
der Graduate School of Life Sciences,
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,
Klasse Biomedizin

Vorgelegt von

Lucia Glück

aus

Würzburg

Würzburg, **2018**

Eingereicht am:

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzende/r: Herr Prof. Dr. med. Ralf C. Bargou

1. Betreuer: Herr Prof. Dr. rer. nat. Marc Schmidt

2. Betreuer: Herr Prof. Dr. med. Franz Jakob

3. Betreuer: Herr PD Dr. rer. nat. Roland Houben

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunden ausgehändigt am:

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	i
Abbildungsverzeichnis	iv
Tabellenverzeichnis	v
Abkürzungsverzeichnis	vi
1 Einleitung	1
1.1 Knochenhomöostase.....	1
1.1.1 Interaktion zwischen Endothel und Knochengewebe.....	5
1.1.2 Hormonelle Beeinflussung der Knochenhomöostase.....	5
1.1.3 Erkrankungen durch Störung des Knochenmetabolismus.....	6
1.2 Bisphosphonate.....	7
1.2.1 Aufbau und Wirkungsweise der Bisphosphonate.....	7
1.2.2 Klinische Anwendung und Nebenwirkungen von BP.....	10
1.2.3 Off-Target Effekte der Statine.....	11
1.3 Der MEK5/ Erk5-Signalweg.....	12
1.3.1 Wirkung der Statine über den MEK5/ Erk5-Signalweg.....	14
1.3.2 Der MEK5/ Erk5-Signalweg als möglicher Angriffspunkt der BP.....	14
1.4 Zielsetzung der Arbeit.....	15
2 Material	16
2.1 Verbrauchsmaterialien.....	16
2.2 Chemikalien und Reagenzien.....	16
2.3 Zellkulturmedien, Lösungsmittel und Zusätze.....	18
2.3.1 Zusammensetzung der Nährmedien.....	19
2.3.2 Lösung für Zellfärbung.....	19
2.4 Zellen.....	19
2.5 Puffer und Lösungen.....	20
2.5.1 Puffer für Western-Blot.....	20
2.5.2 Puffer für Lysate.....	21
2.6 Antikörper für Western-Blot.....	21
2.7 Transfektionsreagenzien und siRNAs.....	21
2.8 Primer.....	22
2.9 TaqMan-Sonden.....	23
2.10 Reagenziensätze („Kits“)......	23

2.11	Geräte	23
2.12	Software.....	24
3	Methoden	26
3.1	Zellkultur	26
3.1.1	Auftauen und Kultivieren von Endothelzellen	26
3.1.2	Kultur von MSC, Bestimmung der Zellzahl und Kryokonservierung	26
3.1.3	Osteogene Differenzierung und Nachweis mittels Alizarinrotfärbung	27
3.2	Stimulation der Zellen mit Bisphosphonaten	28
3.3	Erk5-Inhibition	29
3.4	siRNA-Transfektion	29
3.5	Genexpressionsanalysen mittels Western-Blot.....	30
3.5.1	Lyse der Zellen und Proteinbestimmung.....	30
3.5.2	SDS-PAGE	31
3.5.3	Proteintransfer	32
3.5.4	Proteindetektion.....	33
3.5.5	Immundetektion.....	33
3.5.6	Entfernen der Antikörper von Membranen („Strippen“).....	34
3.6	Genexpressionsanalysen in der quantitativen Real-Time-PCR	34
3.6.1	Lyse der Zellen für RNA-Lysate	34
3.6.2	RNA-Isolation und Konzentrationsbestimmung.....	34
3.6.3	Reverse Transkription oder cDNA-Synthese	35
3.6.4	Quantitative Real-Time-PCR	35
3.7	Statistische Analyse	36
4	Ergebnisse	38
4.1	Aktivierung von Erk5 durch Bisphosphonate	38
4.1.1	BP-induzierte Erk5-Aktivierung in Endothelzellen und MSC.....	38
4.1.2	Osteogene Differenzierung der MSC und Erk5-Aktivierung in OB.....	40
4.1.3	Nachweis der Erk5-Aktivierung mittels Inhibitor-Versuch.....	43
4.1.4	Vergleich der Erk5-Aktivierung zwischen kontinuierlicher und diskontinuierlicher Bisphosphonat-Stimulation	44
4.2	Aktivierung von Erk5 durch Knock-down von FDPS und Cdc42	45
4.2.1	Aktivierung von Erk5 durch FDPS Knock-down	46
4.2.2	Aktivierung von Erk5 durch Cdc42 Knock-down	48
4.3	Induktion knochenrelevanter Gene durch Erk5-Aktivierung	50

4.3.1	Geninduktion in MEK5D-infizierten HUVEC	51
4.3.2	Geninduktion durch Erk5-aktivierende Bisphosphonate	52
4.3.3	Bestätigung der Erk5-Abhängigkeit von INPP4B	56
4.3.4	Induktion der Gene in OB und deren Vorläuferzellen.....	57
5	Diskussion	59
5.1	Aktivierung des Erk5-Signalwegs durch Bisphosphonate.....	59
5.1.1	Abhängigkeit der Erk5-Aktivierung von Stärke der FDPS-Inhibition	59
5.1.2	Kleine G-Proteine als Vermittler zwischen Mevalonatweg und Erk5	62
5.1.3	Vermittlung Bisphosphonat-assoziiertes Effekte über Erk5.....	65
5.2	Einfluss der Bisphosphonate auf die Genexpression via Erk5.....	66
5.2.1	Aufgaben der ausgewählten Gene im Knochenstoffwechsel	67
5.2.2	Wirkung von Zol auf Geninduktion und Knochenstoffwechsel.....	68
5.3	Ausblick: Bisphosphonate in der Tumorthherapie	70
6	Zusammenfassung/ Summary.....	73
7	Literaturverzeichnis	77
8	Publikation	89
9	Lebenslauf	90
10	Danksagung.....	91
11	Eidesstattliche Erklärung.....	93

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Einflüsse auf die Knochenhomöostase	2
Abbildung 2: Differenzierungsprozesse der verschiedenen Knochenzellen	4
Abbildung 3: Chemische Struktur und Wirkung der Bisphosphonate auf Osteoklasten .	8
Abbildung 4: Molekulare Wirkungsweise verschiedener Bisphosphonatgruppen	10
Abbildung 5: Der MEK5/ Erk5-Signalweg	14
Abbildung 6: Erk5-Aktivierung in HUVEC durch verschiedene BP	39
Abbildung 7: Erk5-Aktivierung in MSC	40
Abbildung 8: Vergleich der Morphologie von MSC und Osteoblasten	41
Abbildung 9: Bestätigung der osteogenen Mineralisierung mittels Alizarinrotfärbung	41
Abbildung 10: Verminderte Basalaktivität und Erk5-Aktivierung in OB.....	42
Abbildung 11: Bestätigung der Zoledronat-induzierten Erk5-Aktivierung.....	44
Abbildung 12: Vergleich der kontinuierlichen zur diskontinuierlichen Zol-Stimulation	45
Abbildung 13: FDPS Knock-down in der qPCR sowie im Western-Blot.....	47
Abbildung 14: KLF2-Induktion und Erk5-Aktivierung durch FDPS Knock-down.....	48
Abbildung 15: Auswirkung des Cdc42 KD auf Aktivierung von Erk5 und KLF2/4	50
Abbildung 16: Geninduktion in MEK5D-infizierten HUVEC.....	52
Abbildung 17: Zoledronat-assoziierte Induktion der Gene im Zeitverlauf.....	54
Abbildung 18: Auswirkung der unterschiedlichen Kontrollen auf die Genexpression ..	55
Abbildung 19: Zoledronat-induzierte Genexpression nach 48 Stunden	56
Abbildung 20: Bestätigung von INPP4B als Erk5-abhängiges Gen	57
Abbildung 21: Induktion von PTHLH und INPP4B in Osteoblasten	58
Abbildung 22: Inhibition der FDPS durch verschiedene Bisphosphonate.....	61
Abbildung 23: Struktur-Bindungsbeziehungen zwischen Ris, Zol und FDPS	62
Abbildung 24: Mögliche Beeinflussung der Signalweiterleitung durch N-BP	64
Abbildung 25: Graphische Zusammenfassung	73
Abbildung 26: Graphical summary	75

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Verbrauchsmaterialien mit Vertrieb.....	16
Tabelle 2: Eingesetzte Chemikalien und Reagenzien mit Vertrieb	16
Tabelle 3: IUPAC-Namen der verwendeten Bisphosphonate	18
Tabelle 4: Verwendete Medien, Lösungsmittel und Zusätze mit Vertrieb	18
Tabelle 5: Verwendete Primärantikörper mit Vertrieb	21
Tabelle 6: Verwendete Sekundärantikörper mit Vertrieb.....	21
Tabelle 7: Verwendeten siRNAs mit Sequenz und Vertrieb	22
Tabelle 8: Verwendete Primer mit Sequenz und Vertrieb	22
Tabelle 9: Verwendete TaqMan-Sonden mit Vertrieb	23
Tabelle 10: Verwendete Reagenziensätze mit Vertrieb	23
Tabelle 11: Verwendete Geräte mit Vertrieb.....	23
Tabelle 12: Verwendeten Software mit Vertrieb	24
Tabelle 13: Eingesetzte Bisphosphonat-Konzentration	28
Tabelle 14: Funktion der im Array hochregulierten Gene im Knochenstoffwechsel.....	51
Tabelle 15: Wirkstärke und molekulare Eigenschaften der Bisphosphonatgruppen	60

Abkürzungsverzeichnis

Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
AK	Antikörper
ALP	Alkalische Phosphatase
AMP	Adenosin-Monophosphat
ANT	Adenin-Nukleotid-Translokase
AppCp	Adenosin-5'-(β,γ -dichloromethylen)-Triphosphat
Apppl	Triphosphorsäure-1-Adenosin-5'yl ester 3-(3-methylbut-3-enyl) ester
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriophosphat
BMP	<i>Bone morphogenic protein</i>
BP	Bisphosphonat
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
Cdc42	<i>Cell division control protein 42</i>
Clo	Clodronat
Ctrl	<i>Control</i> (Kontrolle)
cDNA	mittels Reverse Transkriptase synthetisierte copy DNA
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOUV	Deutscher Orthopäden- und Unfallchirurgenverband
DVO	Dachverband Osteologie
dNTP	Desoxynukleotid-Triphosphat
dsDNA	Doppelstrang-DNA
EC	<i>Endothelial cells</i> (dt. Endothelzellen)
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGM	<i>Endothelial growth medium</i>
ELB	<i>E1A lysis buffer</i>
Erk5	<i>Extracellular-signal-regulated kinase 5</i>
Eti	Etidronat
FCS	<i>Fetal calf serum</i> (dt. Fötales Kälberserum)
FDPS/ FPPS	Farnesyldiphosphatsynthetase/ Farnesylpyrophosphatsynthetase
FGFR3	<i>Fibroblast growth factor receptor 3</i>

FOSL1	<i>FOS-like antigen 1</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GGPPS	Geranylgeranyl-Pyrophosphat-Synthase
G-Protein	GTP-bindendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde(n)
HDL	<i>High density lipoprotein</i>
HEPES	2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethansulfonsäure
HMG-CoA-Reduktase	Hydroxymethylglutaryl-Coenzym A-Reduktase
HUVEC	<i>Human umbilical vein endothelial cells</i>
Iba	Ibandronat
INPP4B	<i>Inositol polyphosphate 4-phosphatase, Type B</i>
IPP	Isopentanylpyrophosphat
IUPAC	<i>International union of pure and applied chemistry</i>
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
KD	<i>Knock-down</i>
KLF 2/4	<i>Krüppel-like-factor 2/4</i>
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
LV	Leervektor
M	Molar
mA	Milliampere
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
M-CSF	<i>Macrophage colony-stimulating factor</i>
MEK5 (MAPKK)	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase 5</i>
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MSC	<i>Mesenchymal stem cells</i> (dt. mesenchymale Stammzellen)
N-BP	stickstoffhaltiges (Amino-) Bisphosphonat
NCBI	<i>National center for biotechnology information</i>
NFATc1	<i>Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 1</i>
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
<i>Non N-BP</i>	stickstofffreies Bisphosphonat
Opti-MEM	<i>Reduced serum medium</i>
OB	Osteoblasten
OC	<i>Osteoclasts</i> (Osteoklasten)
OCN	Osteocalcin
OPG	Osteoprotegerin
OPN	Osteopontin

Pam	Pamidronat
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
pg	Pikogramm
PTH	Parathormon
PTHrP/ PTHLH	<i>Parathyroid hormone-like hormone/ PTH-related protein</i>
PVDF	Polyvinylidendifluorid
qRT-PCR	quantitative <i>Real-Time</i> -PCR
RANKL	<i>Receptor activator of NF-κB ligand</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RTase	Reverse Transkriptase
Runx2	<i>Runt-related transcription factor 2</i>
Scr	<i>Scrambled</i> (hier: Kontroll-siRNA)
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
TBS	<i>Tris buffered saline</i> (Tris-HCL)
TBST	TBS mit Zusatz von Tween
TEMED	N,N,N,N-Tetraethylethylendiamin
TF	Transkriptionsfaktor
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
Tween	Polyoxyethylensorbitolmonolaurat
U/min	Umdrehungen pro Minute
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
Zol	Zoledronat
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar

1 Einleitung

1.1 Knochenhomöostase

Der Knochen ist ein vielseitiges Gewebe, das nicht nur als Grundstruktur des menschlichen Skeletts dient und innere Organe sowie Gehirn und Rückenmark schützt, sondern auch eine bedeutende Rolle als Mineraldepot und Regulator des Kalziumhaushalts spielt, indem es über 99 % des im Körper vorkommenden Kalziums speichert, bei Bedarf in die Blutbahn abgibt oder es aus ihr aufnimmt. Von besonderer Bedeutung ist außerdem das Knochenmark. Hier spielt sich die Hämatopoese ab, die Bildung von Blut- und Abwehrzellen (Huppelsberg und Walter 2003).

Von außen erscheint der Knochen aufgrund seiner Festigkeit als starres Gebilde, doch er unterliegt einem stetigen Umbau, der durch zahlreiche Faktoren beeinflusst wird (Harada und Rodan 2003). Auf diese Weise kann sich das Knochengewebe an wechselnde Bedingungen anpassen, die nicht nur während der Wachstumsphase im Kindes- und Jugendalter auftreten, sondern bis ins hohe Alter. So führt beispielsweise Immobilität zu einem erhöhten Knochenabbau, während sportliche Belastungen den Aufbau und die Festigkeit des Knochens fördern (Minaire 1989; Krølner und Toft 1983; Smith, JR. et al. 1981). Auch hormonelle, metabolische, nutritive und pharmakologische Einflüsse spielen für die Knochenhomöostase eine wichtige Rolle (Harada und Rodan 2003). Der Knochenmetabolismus unterliegt fein aufeinander abgestimmten Prozessen, deren Ungleichgewicht Pathologien zur Folge haben kann.

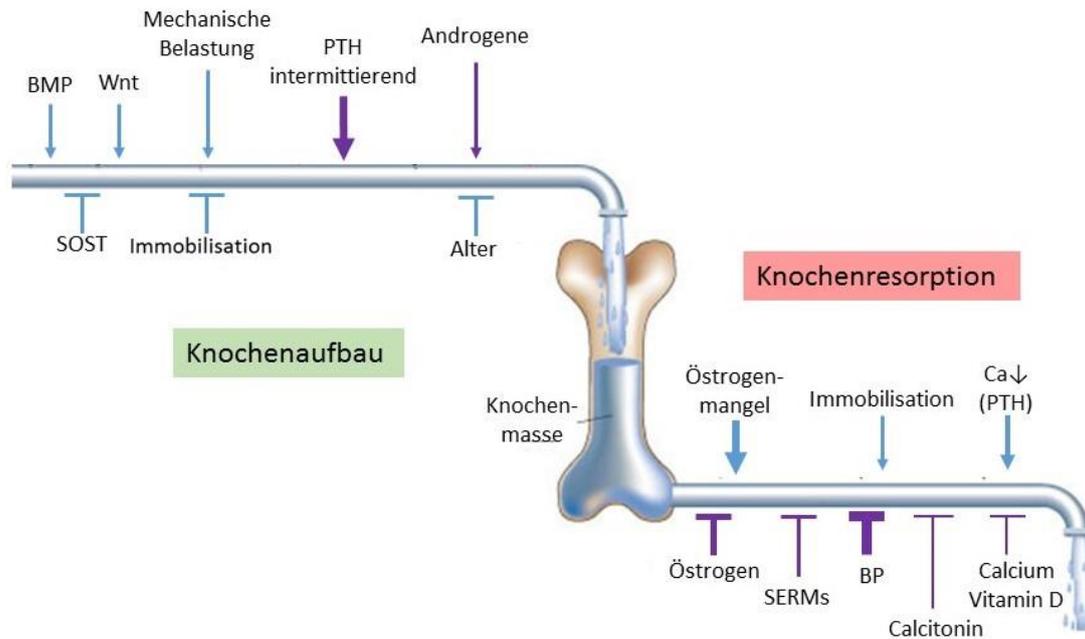


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Einflüsse auf die Knochenhomöostase
 Diese Graphik zeigt sowohl physiologische (blau), als auch pharmakologische (violett) Stimulantien und Inhibitoren des Knochenmetabolismus. Die relative Stärke des Einflusses entspricht, sofern bekannt, der Dicke der Pfeile. Abkürzungen: BMP: bone morphogenetic protein(s); BP: Bisphosphonat; PTH: Parathormon; SOST: Sklerostin; SERM: selective oestrogen-receptor modulator; Wnt: Wingless und Int1. Verändert nach Harada und Rodan (2003).

Für das Gleichgewicht zwischen Knochenaufbau und -abbau sind maßgeblich drei Zellarten zuständig. Man unterscheidet hierbei die Knochen aufbauenden Zellen (Osteoblasten) von Zellen, die Knochensubstanz abbauen (Osteoklasten) und Regulatoren der beiden Prozesse (Osteozyten).

Osteoklasten (OC) stammen von hämatopoetischen Stammzellen ab und sind spezialisierte, mehrkernige Makrophagen, die durch Fusion mehrerer Vorläuferzellen der Monozyten/ Makrophagen-Familie entstehen (Teitelbaum 2000) (Abbildung 2 A). Für ihre Differenzierung sind M-CSF (*macrophage colony-stimulating factor*) sowie RANKL (*receptor for activation of nuclear factor kappa B ligand*) von großer Bedeutung (Takahashi et al. 1999; Tsurukai et al. 2000). Beide Substanzen werden von Osteoblasten sezerniert, wie auch Osteoprotegerin (OPG), das als Gegenspieler von RANKL agiert (Burgess et al. 1999; Kostenuik und Shalhoub 2001). Nach erfolgreicher Differenzierung lagern sich die Osteoklasten an die Knochenmatrix an und verändern ihre Zellmorphologie: Sie bilden an der Knochen-zugewandten Seite einen Bürstensaum, in dem zahlreiche H⁺-ATPasen enthalten sind. Auf diese Weise wird ein saures Milieu

zwischen Osteoklast und Knochenoberfläche erzeugt, welches die Knochenmatrix aufzulösen vermag (Teitelbaum 2000; Blair et al. 1989). Dieser Prozess ist für den physiologischen Umbau des Knochens von großer Bedeutung, kann bei pathologischer Überaktivität jedoch zu schwerwiegenden Krankheiten führen.

Den Gegenpart zu den Osteoklasten spielen die Osteoblasten (OB). Sie sezernieren die Komponenten der extrazellulären Matrix, welche auch Knochengrundsubstanz oder Osteoid genannt wird. Osteoblasten differenzieren aus mesenchymalen Stammzellen, die auch Chondrozyten, Adipozyten und Myoblasten als Vorläuferzellen dienen (Harada und Rodan 2003) (Abbildung 2 B). Welche der genannten Zellen sich aus den Stammzellen entwickelt, hängt von verschiedenen Faktoren ab. Eine wichtige Rolle für die Differenzierung zu Osteoblasten spielt dabei der Transkriptionsfaktor RUNX2 (*Runt-related transcription factor 2*). Er ist ein zentraler Faktor für das osteogene *Commitment*, der im Zusammenspiel mit BMP (*bone morphogenic proteins*)- und Wnt (*Wingless* und *Int1*)-Signalwegen die Osteoblastogenese aktiviert (Lian et al. 2006; Bae et al. 2007) (siehe Abbildung 1 und Abbildung 2B). Eine erfolgreiche Differenzierung zu Osteoblasten kann man anhand verschiedener Marker feststellen. Zu den frühen Markerproteinen der Osteoblastogenese zählen die Alkalische Phosphatase (ALP) und Kollagen 1 (COL1). Beide Proteine sind wichtig für die Synthese der Knochenmatrix (Murshed et al. 2005). Reife Osteoblasten sezernieren zudem Regulatoren der Matrixmineralisierung wie Osteocalcin (OCN) oder Osteopontin (OPN) (Eriksen 2010).

Nach vollständiger Mineralisierung geht ein Großteil der Osteoblasten in Apoptose. Einige jedoch entwickeln sich zu Knochenwandzellen, die die Oberfläche des Knochens auskleiden, oder zu Osteozyten, welche als Regulatoren der Knochenhomöostase gelten (Eriksen 2010; Bonewald 2007). Letztere ändern ihre Zellform und bilden Fortsätze aus, über die sie ein Kommunikationsnetzwerk bilden. Auf diese Weise stehen sie in Kontakt mit Osteoblasten, dem Knochenmark und dem Gefäßendothel (Dallas et al. 2013; Veno et al. 2007). Dadurch können sie sowohl die Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen, als auch die Osteoklastogenese steuern (Suswillo et al. 2017; Burger et al. 2003)

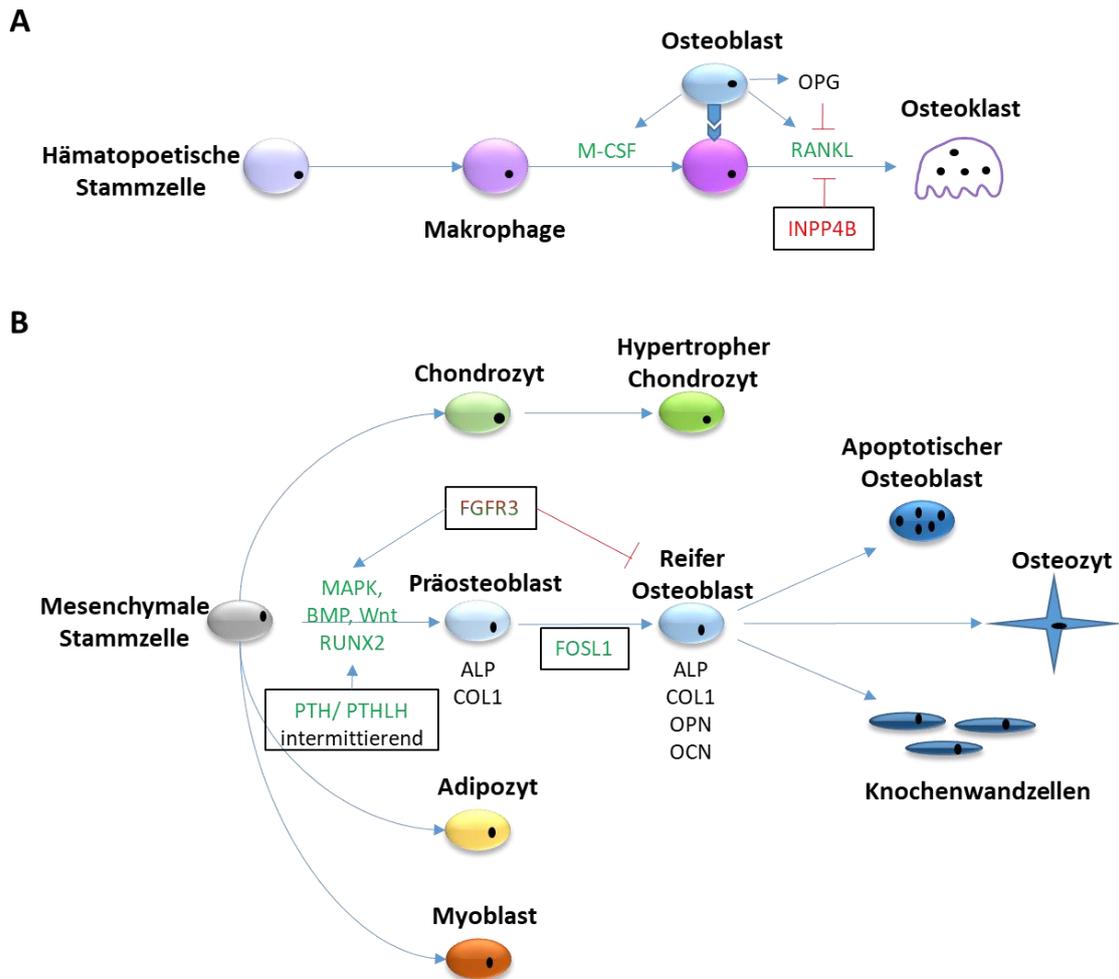


Abbildung 2: Differenzierungsprozesse der verschiedenen Knochenzellen
 Fördernde Einflüsse sind grün, hemmende rot gekennzeichnet. In Kästen sind Gene/ Hormone beschrieben, die Einflüsse auf Signalwege der Differenzierung ausüben. A) Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen aus dem Knochenmark zu Osteoklasten. M-CSF ist für das Überleben und die Proliferation von Makrophagen notwendig. Die Interaktion von RANKL (in Osteoblasten exprimiert) und RANK (auf Makrophagen) initiiert die Differenzierung von Makrophagen zu Osteoklasten und wird durch Osteoprotegerin (OPG) und INPP4B gehemmt. B) Osteoblasten entwickeln sich, wie auch Chondrozyten, Adipozyten und Myoblasten, aus mesenchymalen Stammzellen (MSC). Für die Osteoblastogenese sind der BMP- sowie der Wnt-Signalweg von Bedeutung. RUNX2 ist ein wichtiger Transkriptionsfaktor für die Differenzierung. PTH/ PTHrP und FGF3 fördern die Differenzierung von MSC zu (Prä-) Osteoblasten, wobei FGF3 gleichzeitig hemmend auf reife Osteoblasten wirkt (Su et al. 2009). Auch FOSL1 scheint ein wichtiger Faktor für die Osteoblastenreifung zu sein. Zudem sind die verschiedenen Markerproteine dargestellt: Alkalische Phosphatase (ALP) und Kollagen 1 (COL1) sind frühe Marker der Osteoblastogenese, Osteopontin (OPN) und Osteocalcin (OCN) sind späte Marker, da sie erst von reifen Osteoblasten sekretiert werden. Abbildung A nach Vacher (2013), Abbildung B nach Baron und Rawadi (2007) und Harada und Rodan (2003).

1.1.1 Interaktion zwischen Endothel und Knochengewebe

Das Endothel steht nicht nur in Kontakt mit Osteozyten, sondern spielt darüber hinaus eine bedeutende Rolle in der Entwicklung, Aufrechterhaltung und Erneuerung von Knochengewebe. Über das Endothel werden Sauerstoff, Nährstoffe, Hormone und weitere Botenstoffe zu den Knochenzellen transportiert, wodurch es essentiell für das Überleben des Gewebes, die Signalweiterleitung und Homöostase ist (Schmid et al. 1997). Doch hängen Endothel- und Knochenzellen noch enger zusammen als durch den Transport von Nähr- und Botenstoffen. So zeichnen sich Endothelzellen durch die Expression von M-CSF, RANKL und OPG aus, die für die Osteoklastendifferenzierung von Bedeutung sind und auch von Osteoblasten sezerniert werden (Collin-Osdoby et al. 2001; Clinton et al. 1992). Gleichzeitig beeinflussen sie die Osteoblastogenese über BMP-Signalwege (Matsubara et al. 2012; Bouletreau et al. 2002). Es wurden zudem spezifizierte Endothelien entdeckt, die für die Kopplung von Angiogenese und Osteogenese eine wichtige Rolle spielen und offenbar die Knochenstruktur beeinflussen (Kusumbe et al. 2014). Für einen weiteren spezifischen Endothel-Subtyp konnte gezeigt werden, dass durch ihn Zellen der Osteoblasten-Linie stimuliert werden. Zudem wiesen Mäuse mit mutiertem endothelialen Integrin $\beta 1$ ein signifikant reduziertes Knochenvolumen auf (Langen et al. 2017). Interessant ist auch der Zusammenhang zwischen Osteoporose und vaskulärer Kalzifizierung. Ye et al. (2016) zeigten in einer Metaanalyse, dass eine verminderte Knochendichte ein unabhängiger Risikofaktor für die Entwicklung einer Arteriosklerose bei alten Menschen ist. Gestützt wird diese These dadurch, dass OPG-defiziente Mäuse nicht nur an Osteoporose leiden, sondern zudem an arterieller Verkalkung (Min et al. 2000).

1.1.2 Hormonelle Beeinflussung der Knochenhomöostase

Auch Hormone sind für die Integrität von Endothel und Knochengewebe von großer Bedeutung. Eines, das durch seine komplexe Wirkung auf den Knochen hervorsticht, ist das Parathormon (PTH) mit seinem lokal wirkenden Faktor PTHLH/ PTHrP (*parathyroid hormone like hormone*, auch genannt *parathyroid related protein*). Bei intermittierender Gabe wird PTH und PTHLH ein fördernder Effekt auf die Osteoblastogenese zugeschrieben, indem RUNX2 vermehrt exprimiert und damit die Differenzierung von

mesenchymalen Stammzellen zu Osteoblasten vorangetrieben wird (Krishnan et al. 2003; Jilka 2007) (siehe Abbildung 2). Eine kontinuierliche Gabe führt hingegen zum vermehrten Abbau des Knochens (Ma et al. 2001).

Daneben haben Sexualhormone eine wichtige Funktion für den Knochenstoffwechsel. So wirken Androgene fördernd auf den Knochenaufbau, Östrogene hingegen hemmen den Knochenabbau, wodurch beide Hormone zu einer positiven Knochenbilanz beitragen. Nach der Menopause sinkt bei Frauen der Östrogenspiegel jedoch ab, womit der hemmende Effekt auf den Knochenabbau vermindert wird. Dieser Prozess trägt zur hohen Prävalenz der Osteoporose bei, die bei Frauen in der Postmenopause deutlich häufiger auftritt als bei Männern (RKI 2009).

1.1.3 Erkrankungen durch Störung des Knochenmetabolismus

Die fein aufeinander abgestimmten Prozesse, die einen gesunden Knochenmetabolismus gewährleisten, können durch zahlreiche Faktoren gestört werden. Zum einen können sich hormonelle Umstellungen negativ auswirken. Aber auch Mutationen in Genen, die am Knochenumsatz beteiligt sind sowie eine verminderte Aufnahme oder Metabolisierung wichtiger Stoffe wie Kalzium und Vitamin D können Pathologien des Knochens zur Folge haben.

In manchen Fällen führen die Knochenhomöostase beeinflussende Erkrankungen zu überschießendem Knochenwachstum, wie man es beim Krankheitsbild der Osteopetrose sehen kann. Häufig kommt es auch zu einer Verminderung der Knochenbildung, beziehungsweise erhöhtem Knochenabbau, wie im Fall der Osteoporose. Diese stellt ein weit verbreitetes Gesundheitsproblem dar und wird von der WHO als eine der bedeutendsten Krankheiten eingestuft (DOUV 2009). Der Erkrankung liegen eine verminderte Knochendichte sowie eine Verschlechterung der Mikroarchitektur des Knochens zugrunde. Dies führt zu einer erhöhten Frakturneigung schon bei geringer Belastung. Tritt aufgrund von osteoporotisch bedingtem Knochenschwund eine Fraktur auf, spricht man von „manifeste Osteoporose“ (DVO 2014). Die Prävalenz der Erkrankung beläuft sich bei Frauen im Alter von 50 - 64 Jahren auf 9 %, jedoch nimmt die Häufigkeit ab einem Alter von 65 Jahren auf 24,5 % zu, was mit dem verminderten Östrogenspiegel in der Postmenopause zusammenhängt. Bei

Männern liegt die Prävalenz im Mittel bei 5,2 %. Allerdings ist hier ein vergleichbarer Anstieg der Prävalenz im Alter nicht zu erkennen (RKI 2009). Die osteoporotischen Knochenbrüche führen zu Einschränkungen der Lebensqualität sowie zu einer erhöhten Mortalität: Innerhalb eines Jahres stirbt fast ein Viertel der betagten Patienten mit Oberschenkelfraktur. Zudem folgt für viele Patienten ein Leben in Pflegebedürftigkeit und sozialer Isolation (Minne et al. 2003). Doch neben der Osteoporose gibt es noch weitere Erkrankungen, die durch einen katabolen Knochenstoffwechsel gekennzeichnet sind. Dazu zählen die Osteopathien wie der Morbus Paget, welchen meist eine Fehlsteuerung der Osteoklastentätigkeit mit darauf folgendem Knochenabbau zugrunde liegt (Bartl et al. 2008).

Aufgrund der zahlreichen und oft schweren Erkrankungen, die Störungen der Knochenhomöostase zur Folge haben, wurden Therapien entwickelt, um diesen Pathologien entgegenzuwirken. Dazu zählen unter anderem Bisphosphonate, die gegen katabole Störungen des Knochenmetabolismus eingesetzt werden.

1.2 Bisphosphonate

Bisphosphonate (BP) wirken antiresorptiv auf den Knochenstoffwechsel, wodurch sie die Knochenmasse erhalten und die Mineralisierung steigern. Neuere Arbeiten zeigen zudem, dass gewisse anabole Wirkungen möglich sind (Gong et al. 2016). Bisphosphonate wurden bereits 1894 von dem deutschen Apotheker und Chemiker Theodor Salzer entdeckt und 1896 von Hans von Baeyer erstmals chemisch analysiert. Zunächst wurde die Substanz in der Textil- und Ölindustrie als Korrosionsschutzmittel und Komplexbildner eingesetzt (Petroianu 2011), bis in den 1960er Jahren der medizinische Nutzen der Bisphosphonate erkannt wurde (FLEISCH und BISAZ 1962). Die Substanzgruppe wurde seitdem stetig weiterentwickelt und wird heute gegen zahlreiche Krankheiten eingesetzt.

1.2.1 Aufbau und Wirkungsweise der Bisphosphonate

Chemisch sind Bisphosphonate Analoga des Pyrophosphats, bei denen der Sauerstoff der P – O – P-Bindung durch Kohlenstoff ersetzt wurde (P – C – P-Bindung, siehe

Abbildung 3 A). Diese Bindung ist chemisch stabil und resistent gegenüber chemischer sowie enzymatischer Hydrolyse (Dunstan et al. 2007).

Die pharmakologische Wirkungsweise der Bisphosphonate beruht unter anderem auf ihrer Anlagerung im Knochengewebe. Mit hoher Affinität lagern sie sich an die Resorptionslakunen arrodierter Knochenoberfläche im sauren Milieu unter den Osteoklasten und werden mittels Phagozytose von ihnen aufgenommen (Abbildung 3 B) (Sato et al. 1991; Thompson et al. 2006).

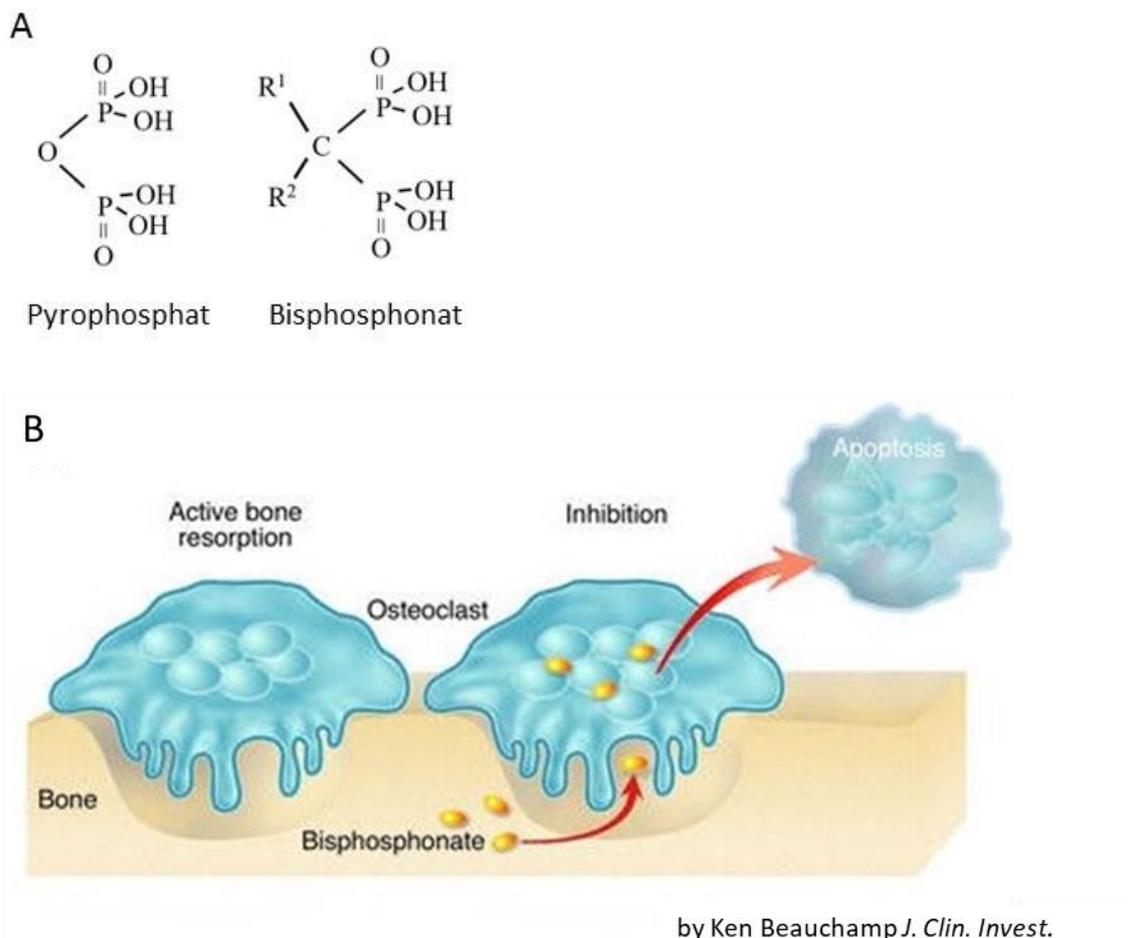


Abbildung 3: Chemische Struktur und Wirkung der Bisphosphonate auf Osteoklasten
 A) Chemische Struktur von Pyrophosphat und Grundstruktur der Bisphosphonate. B) Bisphosphonate (gelb) lagern sich durch Bindung an Knochenmineral in den Resorptionslakunen der Osteoklasten an. Diese lösen die gebundenen Bisphosphonate durch Ansäuerung und nehmen sie per Endozytose auf, was zu Funktionshemmung und Apoptose der Osteoklasten führt (Lindsay 2002).

Nach Aufnahme in die Zellen stören die Bisphosphonate deren Funktion durch Hemmung wichtiger Enzyme. Stickstofffreie Bisphosphonate (*non-N-BP*) der ersten Generation, wie Etidronat oder Clodronat, werden zu zytotoxischen, nicht

hydrolysierbaren ATP-Analoga (Adenosin-5'-(β,γ -dichloromethylen)-Triphosphat, kurz AppCp) metabolisiert. Diese hemmen die ANT (mitochondriale Adenin-Nukleotid-Translokase) und führen wahrscheinlich auf diese Weise den Zelltod der Osteoklasten herbei (Frith et al. 1997; Lehenkari et al. 2002) (siehe Abbildung 4).

Bisphosphonate der späteren Generationen, die Stickstoff in ihrer Struktur enthalten (N-BP, z.B. Pamidronat, Ibandronat und Zoledronat), besitzen hingegen einen zweifachen Wirkmechanismus. Einerseits hemmen sie FDPS (Farnesyl-Diphosphat-Synthase) und GGPPS (Geranylgeranyl-Pyrophosphat-Synthase) (van Beek et al. 1999; Guo et al. 2007). Beide Enzyme sind Teile des Mevalonatstoffwechsels. Durch ihren Wirkungsverlust fehlt die Prenylierung von Farnesyl- und Geranylgeranylpyrophosphat (Luckman et al. 2005). Auf diese Weise kommt es zu einer Fehlsteuerung der kleinen G-Proteine Cdc42, Rho, Rac, Ras und Rab, die eine bedeutende Rolle für die Signaltransduktion spielen und zahlreiche Prozesse wie die Organisation des Zytoskeletts oder Apoptose steuern (Coxon und Rogers 2003). Andererseits kommt es durch Hemmung der FDPS zur Anreicherung von IPP (Isopentenylpyrophosphat). IPP bildet in Verbindung mit AMP das zytotoxische ATP-Analogon Apppl (Triphosphorsäure-1-Adenosin-5'yl ester 3-(3-methylbut-3-enyl) ester). Wie auch durch die metabolisierten stickstofffreien Bisphosphonate hemmt Apppl die ANT und fördert damit die Apoptose der Osteoklasten (Mönkkönen et al. 2005) (siehe Abbildung 4).

Die Wirkungsweise der Bisphosphonate wurde bisher hauptsächlich auf die zellulären Vorgänge in Osteoklasten bezogen, doch möglicherweise beruht sie zudem auf der Aktivierung von Osteoblasten, wobei nicht gesichert ist, dass klinisch die notwendigen Konzentrationen im Gewebe erreichbar sind. So konnte gezeigt werden, dass stickstoffhaltige Bisphosphonate die Proliferation mesenchymaler Stammzellen aus dem Knochenmark fördern und ihre Differenzierung zu Osteoblasten veranlassen (Knoch et al. 2005; Im et al. 2004): Die Inhibition des Mevalonatstoffwechselwegs und verminderte Prenylierung kleiner G-Proteine fördert die Osteoblastogenese, indem BMP-2, VEGF, OCN, ALP und RUNX2 hochreguliert werden (Mo et al. 2012) (siehe Abbildung 4). Auch wenn klinisch relevante Effekte der Bisphosphonate auf andere Zellen oft angezweifelt werden, so gibt es doch eindeutige Hinweise darauf, dass Menschen, die in ihrem Leben über mehrere Jahre mit Bisphosphonaten behandelt

worden sind, länger leben. Theoretisch ließe sich das mit dem Einfluss auf die Prenylierung von Lamin A erklären, das mit der Alterung in Verbindung gebracht wird (Gordon et al. 2014; Peng et al. 2016; Bolland et al. 2010).

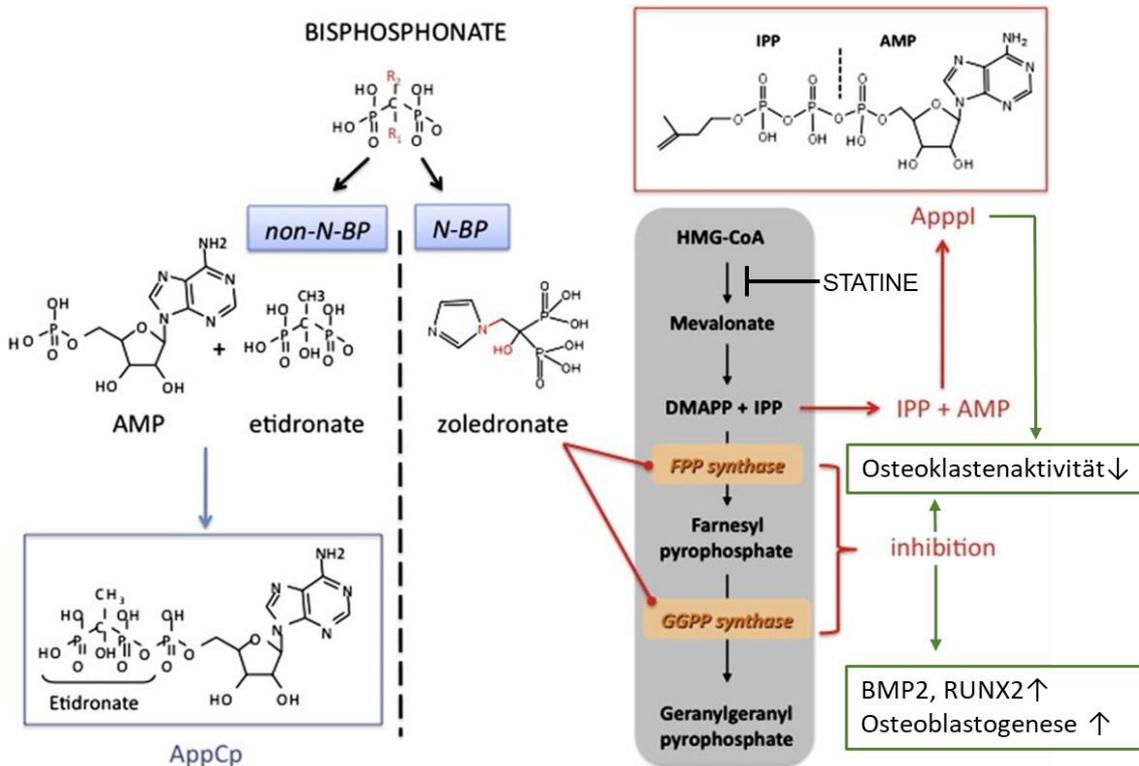


Abbildung 4: Molekulare Wirkungsweise verschiedener Bisphosphonatgruppen
 Bisphosphonate werden anhand der An- oder Abwesenheit eines Stickstoffatoms in ihrer R₂-Seitenkette eingeteilt: Stickstoffhaltige (N-BP) und stickstofffreie Bisphosphonate (non-N-BP). Non-N-BPs wie Etidronat werden zu nicht-hydrolysierbaren zytotoxischen ATP-Analoga (AppCp) metabolisiert. N-BPs wie Zoledronat hemmen, wie auch Statine, Schlüsselenzyme des Mevalonatstoffwechsels (Statine: HMG-CoA-Reduktase, N-BP: FPPS (Farnesylpyrophosphat-Synthase) und GGPPS (Geranylgeranyl-Pyrophosphat-Synthase)). Auf diese Weise kommt es zu einer fehlenden Prenylierung kleiner G-Proteine sowie einer Akkumulation von IPP (Isopentanylpyrophosphat), welches zum zytotoxischen ATP-Analogon Apppl umgewandelt wird. Dadurch wird die Osteoklastenaktivität vermindert und die Osteoblastogenese gefördert. Nach Clézardin (2011).

1.2.2 Klinische Anwendung und Nebenwirkungen von BP

Klinische Anwendung finden Bisphosphonate neben den Erkrankungen im Knochenstoffwechsel auch in anderen Bereichen. Zwar stellt die Osteoporose eines der wichtigsten Anwendungsgebiete dar, doch gewinnen auch weitere Bereiche an Bedeutung. Hierzu zählt beispielsweise die Onkologie. So werden Bisphosphonate gegen

die Skelettdestruktion beim Multiplen Myelom sowie bei Knochenmetastasen eingesetzt (Lee et al. 2017; Nooh et al. 2017). Des Weiteren werden Bisphosphonate beim komplexen regionalen Schmerzsyndrom („Morbus Sudeck“) eingesetzt, was eine Verbesserung der Symptomatik verspricht (Schott 1997). Auch in der Endoprothetik finden Bisphosphonate in der Prävention von Prothesenlockerung und zur Aufrechterhaltung der periprothetischen Knochendichte präklinische Anwendung, klinisch gibt es aber bisher weder eine Zulassung noch eine routinemäßige Verordnung (Bartl et al. 2008; Hilding und Aspenberg 2007).

Doch neben ihren nützlichen Effekten birgt die Therapie mit Bisphosphonaten auch zahlreiche Nebenwirkungen. Dazu zählen gastrointestinale Beschwerden, die bei 2 - 10 % der Patienten auftreten, sowie Akute-Phase-Reaktionen, die innerhalb von 24 Stunden nach erstmaliger intravenöser Gabe eines stickstoffhaltigen Bisphosphonats hervorgerufen werden können (FLEISCH 2003). Auch auf eine ausreichend gute Nierenfunktion muss vor der Applikation eines intravenösen Bisphosphonats geachtet werden, um ein akutes Nierenversagen zu vermeiden (Bartl et al. 2008). Als schwerste Nebenwirkung gilt die Bisphosphonat-assoziierte Kiefernekrose, welche vor allem unter hoch dosierter Langzeittherapie mit Zoledronat oder Pamidronat bei immunsupprimierten Tumorpatienten auftritt (Felsenberg et al. 2006). Die Applikation von Bisphosphonaten sollte daher unter strenger Indikationsstellung und Berücksichtigung des individuellen Gesundheitszustands erfolgen. Auch die Einnahmевorschriften sollten genau beachtet werden, um das Risiko für Nebenwirkungen zu reduzieren.

1.2.3 Off-Target Effekte der Statine

Neben den Bisphosphonaten gibt es jedoch noch weitere Medikamente, die sich durch ihre möglicherweise positive Wirkung auf den Knochen auszeichnen. Zu diesen zählen Statine, die ursprünglich als Lipidsenker konzipiert wurden und nach wie vor nur hierfür zugelassen sind und angewendet werden. Sehr lange wurden aufgrund eines ähnlichen Wirkungsmechanismus mögliche Effekte auf den Knochen diskutiert, aber die Studien lieferten inkonsistente Ergebnisse. In einer großen Metaanalyse (An et al., 2017) konnten nun doch einige signifikante Ergebnisse wie die Reduktion des

Gesamtfrakturrisikos und Erhöhung der Knochendichte in sehr großen Patientenpopulationen gezeigt werden. Diese positiven Effekte scheinen jedoch stärker auf Männer zu wirken als auf Frauen.

Darüber hinaus fördern einige Statine osteogene Signalwege *in vitro* indem sie, wie für Bisphosphonate bereits beschrieben, BMP-2, VEGF, RUNX2, ALP, OCN und OPG induzieren, während sie RANKL inhibieren. *In vivo* konnte bereits gezeigt werden, dass sie die Knochenbildung fördern, die Resorption und RANKL inhibieren, sowie fördernd auf ALP-Aktivität, BMP-Expression und OCN wirken (Cho et al. 2010; Maeda et al. 2004; Tsubaki et al. 2012; Li et al. 2003; Ayukawa et al. 2009). Statine greifen, wie auch stickstoffhaltige Bisphosphonate, in den Mevalonatstoffwechsel ein, indem sie das weiter *upstream* der FDPS liegende Schlüsselenzym, die Hydroxymethylglutaryl-CoenzymA-Reduktase (HMGCR) kompetitiv hemmen. Dadurch werden, wie auch durch die Hemmung der FDPS durch Bisphosphonate, die Folgeschritte für die Cholesterinbiosynthese unterbunden. Dies hat positive Auswirkungen auf das kardiovaskuläre System, jedoch werden noch weitere Funktionen mit Statinen in Verbindung gesetzt, die durch die Senkung des Cholesterinspiegels nicht ausreichend zu erklären sind. Diese umfassen neben dem oben diskutierten verminderten Frakturrisiko und einer erhöhten Knochendichte (An et al. 2017) unter anderem einen schützenden Effekt auf die endotheliale Zellfunktion, eine positive Wirkung auf das Immunsystem und die Stabilität arteriosklerotischer Plaques, eine Verminderung von Entzündungsreaktionen sowie eine Hemmung der Thrombozytenaggregation. Zudem schreibt man den Statinen einen günstigen Einfluss auf das zentrale Nervensystem, die Entwicklung von Demenz und Morbus Alzheimer zu (Liao und Laufs 2005; Fassbender et al. 2001; Kwak et al. 2003; Mo et al. 2012; Koh 2000). Einige der genannten Effekte werden auch dem MEK5/ Erk5-Signalweg zugeschrieben.

1.3 Der MEK5/ Erk5-Signalweg

Der MEK5/ Erk5-Signalweg spielt eine bedeutende Rolle in zahlreichen zellulären Funktionen. Erk5 (auch bekannt als BMK1 oder *mitogen-activated protein kinase*, kurz MAPK) wird durch eine übergeschaltete Kinase (*mitogen-activated protein kinase kinase*, kurz MAPKK oder MEK) phosphoryliert, die wiederum über mehrere

Zwischenschritte durch Wachstumsfaktoren, verschiedene Stresstimuli und Medikamente aktiviert werden kann (Hayashi und Lee 2004) (siehe Abbildung 5). Aus der Familie der MAPK sind vier Vertreter bekannt, welche unterschiedliche Funktionen in der Regulation zellulärer Prozesse wie Wachstum, Differenzierung und Apoptose zeigen. Dazu zählen neben Erk5 auch Erk1/2, JNK sowie p38. Nach der Aktivierung wandert Erk5 in den Zellkern und stimuliert Transkriptionsfaktoren wie MEF2C durch Phosphorylierung (Kato et al. 1997). Zusätzlich wird für Erk5 ein direkter Einfluss auf die Transkription postuliert. Die genauen Mechanismen, bei denen das Vorhandensein einer C-terminalen Domäne eine Rolle spielt, welche in anderen MAPK nicht vorhanden ist, sind dabei noch unzureichend erforscht (Kasler et al. 2000). Zwei wichtige Zielstrukturen stellen die *Krüppel-like-Faktoren* KLF2 und KLF4 dar. Es konnte gezeigt werden, dass durch deren Aktivierung Angiogenese, Migration und Inflammation vermindert sind (Ohnesorge et al. 2010; Parmar 2005; Dekker 2006). Diese Effekte sollen vor endothelialer Dysfunktion sowie Arteriosklerose bewahren (Jain et al. 2014). Die Bedeutung des Erk5-Signalwegs wird auch daran deutlich, dass Erk5-defiziente Mäuse aufgrund von kardiovaskulären und angiogenetischen Defekten schon in der Embryonalphase sterben (Sohn et al. 2002; Regan et al. 2002). Zudem wird dem Signalweg eine protektive Wirkung auf weitere Zielstrukturen, wie beispielsweise Nervenzellen zugeschrieben (Cavanaugh 2004; Finegan et al. 2009).

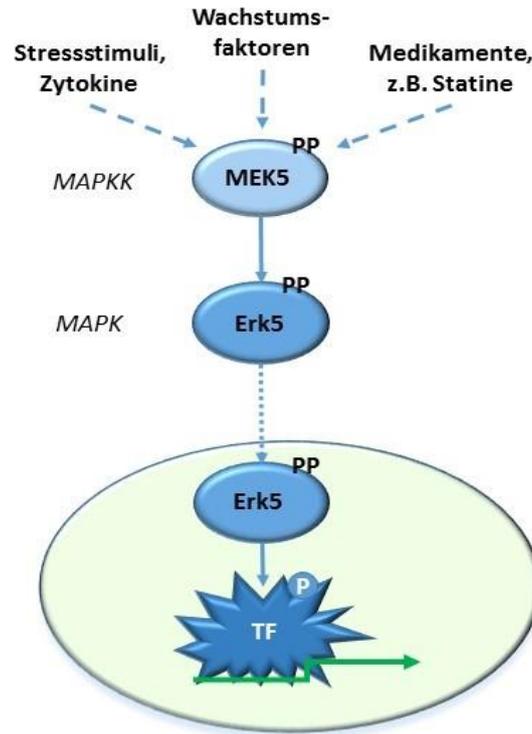


Abbildung 5: Der MEK5/ Erk5-Signalweg

Verschiedene Stressoren, Wachstumsfaktoren und Medikamente aktivieren über mehrere Zwischenschritte MEK5 (MAPKK). MEK5 phosphoryliert Erk5 (MAPK), welches in den Zellkern wandert und dort Transkriptionsfaktoren (TF) aktiviert. Angelehnt an Roberts et al. (2009).

1.3.1 Wirkung der Statine über den MEK5/ Erk5-Signalweg

Vergleicht man die vielseitigen Effekte der Statine mit den Funktionen des MEK5/ Erk5-Signalwegs, kann man viele Gemeinsamkeiten erkennen. Ohnesorge et al. (2010) untersuchten aus diesem Grund den Zusammenhang zwischen Statinen und dem oben beschriebenen Signalweg. Tatsächlich konnten sie zeigen, dass der MEK5/ Erk5-Signalweg eine Zielstruktur der Statine darstellt und durch diese aktiviert werden kann, wodurch einige ihrer Cholesterinsynthese-unabhängigen Effekte erklärt werden können.

1.3.2 Der MEK5/ Erk5-Signalweg als möglicher Angriffspunkt der BP

Statine und Bisphosphonate weisen einige Gemeinsamkeiten auf. Zum einen sind stickstoffhaltige Bisphosphonate, genau wie Statine, inhibitorische Substanzen des Mevalonatstoffwechsels. Zum anderen weisen sie zahlreiche off-Target Effekte auf, die den Wirkungen der Statine und dem Phänotyp des Erk5-Signalwegs ähneln. Neben ihren

antiresorptiven und osteoprotektiven Eigenschaften am Knochen werden den Bisphosphonaten auch antiangiogenetische, antiproliferative, antimigratorische sowie antitumoröse Eigenschaften zugeschrieben (Green und Clezardin 2002; Ohba et al. 2014; Clézardin 2011). Die genauen molekularen Mechanismen dieser Wirkungsweisen sind jedoch noch nicht gänzlich aufgeklärt. Des Weiteren identifizierte unsere Arbeitsgruppe in *Microarray*-Analysen unter konstitutiver Erk5-Aktivierung mittels MEK5D-transfizierter Zellen zahlreiche knochenrelevante Gene, deren Aktivierung mit der Wirkung der Bisphosphonate in Verbindung stehen könnte. Unter ihnen waren *parathyroid hormone-like-hormone* (PTH1H), *inositol polyphosphate 4-phosphatase type 2* (INPP4B), *fibroblast growth factor receptor 3* (FGFR3) sowie *Fos-like antigen 1* (FOSL1, auch als FRA1 bekannt). Ihre Wirkung auf den Knochen umfassen die Förderung der Osteoblastogenese, wie auch die Inhibition von Osteoklasten. Mutationen der jeweiligen Gene oder Studien an *Knock-out* Mäusen führen zu Phänotypen, die durch gestörte Knochenentwicklung gekennzeichnet sind, wie beispielsweise Brachydaktylie, verschiedene Formen der Skelettdysplasie, Osteoporose oder Osteopenie.

Es gibt demnach mehrere Anhaltspunkte dafür, dass der MEK5/ Erk5-Signalweg eine Bedeutung für die Wirkungsweise von Bisphosphonaten haben könnte.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Bisphosphonate sind als inhibitorische Substanzen des Mevalonatstoffwechsels schon lange bekannt, doch noch immer können einige Effekte nicht erklärt werden. Einen vielversprechenden Ansatz bietet dabei der MEK5/ Erk5-Signalweg. Ein Ziel dieser Arbeit ist demnach die Klärung der Frage, ob Erk5 durch Bisphosphonate aktiviert werden kann. Dazu sollen sowohl stickstofffreie Bisphosphonate als auch stickstoffhaltige Vertreter als Inhibitoren des Mevalonatstoffwechsels auf ihre aktivierende Wirkung überprüft werden.

Schließlich wird beabsichtigt, die knochenrelevanten Gene PTH1H, INPP4B, FGFR3 und FOSL1, die mittels *Microarray*-Analysen unserer Arbeitsgruppe identifiziert worden sind, auf eine Abhängigkeit von Erk5 zu untersuchen und einen möglichen Zusammenhang zur Wirkungsweise der Bisphosphonate zu zeigen.

2 Material

2.1 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 1: Verwendete Verbrauchsmaterialien mit Vertrieb

Bezeichnung	Vertrieb
Filterspitzen	Sarstedt
Filterspitzen, DNA-, DNase-, RNase frei	Biosphere
PCR-Gefäße <i>Multiply μ-Strip Pro-8-Kette</i>	Applied Biosystems
PCR-Folie	Applied Biosystems
PCR-Platte, 96 Loch	Applied Biosystems
Pipettenspitzen	Starlab
Serologische Pipetten	Cellstar Greiner Bio-One
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml), DNA-, DNase-, -RNase frei	Sarstedt
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Cellstar Greiner Bio-One
Zellschaber 16 cm	Sarstedt
Zellkulturflaschen (25 cm ² , 75 cm ² , 175 cm ²)	Cellstar Greiner Bio-One
Zellkulturschalen (3,5 cm, 6 cm, 10 cm)	BD Falcon
6-Loch-Zellkulturplatte	Cellstar Greiner Bio-One

2.2 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 2: Eingesetzte Chemikalien und Reagenzien mit Vertrieb

Chemikalie	Vertrieb
Acrylamid	Applichem
<i>Alizarin Red S</i>	Chroma Gesellschaft
APS	Sigma Aldrich
Amphotericin B	Sigma Aldrich
L-Ascorbat	Sigma Aldrich
BSA	Applichem

<i>Bradford</i> -Farbreagenz	BioRad
Bromophenolblau	Merck
β -Mercaptoethanol	Sigma Aldrich
Coumarinsäure	Sigma Aldrich
Dexamethason	Sigma Aldrich
DMSO	Serva und Merck
PBS	Biochrom
ECL	GE Healthcare
EDTA	Serva und Sigma Aldrich
EGM	Lonza Clonetics
Ethanol, absolut	Sigma Aldrich
Ethanol, vergällt, 70 %	Apotheke des Universitätsklinikums Würzburg
FCS	GE Healthcare
Gentamicin	Sigma Aldrich
Glycerol-2-phosphat	Sigma Aldrich
HEPES Natriumsalz	Sigma Aldrich
Isopropanol	Sigma Aldrich
Luminol	Sigma Aldrich
Magermilchpulver	Applichem
Methanol	Applichem
Natriumorthovanadat	Sigma
PBS	Gibco
Penicillin-Streptomycin Lösung, 100 x	Sigma Aldrich
<i>Ponceau S</i>	Serva und Fluka
Proteaseinhibitor	Roche
Salzsäure	Sigma Aldrich
SDS	Applichem
TEMED	Applichem
Tris	Applichem
Trypanblau	Sigma Aldrich

Tween-20	Sigma Aldrich
Wasser, vollentsalzt	Fresenius Kabi
Wasserstoffperoxid, 15 %	Applichem

Die in den Versuchen verwendeten Bisphosphonate sind in Tabelle 3 aufgeführt und wurden von Sigma Aldrich bezogen. Sie wurden mit einer Konzentration von 2 mg/ml in 1 x PBS angesetzt.

Tabelle 3: IUPAC-Namen der verwendeten Bisphosphonate

Handelsname	Chemische Verbindung
Clodronat	Dichloromethylen-Bisphosphonat
Etidronat	1-Hydroxyäthyliden-Bisphosphonat
Ibandronat (Bondronat)	[1-Hydroxy-3-(methylpentylamino)-propyliden]diphosphonsäure
Pamidronat	3-Amino-1-Hydroxypropyliden-Bisphosphonat
Zoledronat	[1-Hydroxy-2-(imidazol-1-yl)ethyliden]diphosphonsäure

2.3 Zellkulturmedien, Lösungsmittel und Zusätze

Tabelle 4: Verwendete Medien, Lösungsmittel und Zusätze mit Vertrieb

Bezeichnung	Vertrieb
DMEM/ F-12 mit L-Glutamin (3,2 g/l Glukose)	PAA Laboratories GmbH
DMEM + GlutaMaxx	Life technologies
DMEM <i>high glucose</i> (4,5 g/l) mit L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH
DMSO	Merck
DNase/RNase-freies Wasser	Gibco
EGM	Lonza Clonetics
FCS	GE Healthcare
M199	Promocell
Opti-MEM (<i>Reduced medium</i>)	Life technologies
PBS	Gibco

2.3.1 Zusammensetzung der Nährmedien

- Nährmedium für Endothelzellen („HUVEC-Mix“)
825 ml „HUVEC-Mix“ enthalten 550 ml M199 komplett (500 ml M199, 50 ml FCS (steril filtriert und Hitze inaktiviert), 300 µl Gentamicin (50 mg/ml), 30 µl Amphotericin B (250 µg/ml), 10 µl Liquemin® N 5.000 (Heparin von Roche)) und 275 ml EGM (Lonza Clonetics)
- Nährmedium für MSC
DMEM/ F-12 (1 : 1), GlutaMaxx, Penicillin/Streptomycin (1 : 100), Ascorbat (50 µg/ml), 10 % FCS
- Osteogenes Differenzierungsmedium
DMEM *high Glucose*, 10 % FCS, 10 mM β-Glycerophosphat, 100 nM Dexamethason, 50 µg/ml L-Ascorbat-2-Phosphat

2.3.2 Lösung für Zellfärbung

- 1 % Alizarinrot-S-Färbelösung
0,25 g *Alizarin Red S* (Alizarin sulfosaures Natrium) gemischt mit 25 ml destilliertem Wasser und 250 µl 25 % Ammoniak

2.4 Zellen

- *Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC)*
HUVEC sind aus menschlichen Nabelschnurvenen isolierte Primärzellen, die von Promocell bezogen wurden. Sie zeigen ein adhärentes Wachstum und bei Konfluenz Kontaktinhibition. Für die in dieser Arbeit vorliegenden Versuche wurden Zellen mit den Chargennummern 7022701 sowie 1082201.1 verwendet.
- *Mesenchymal Stem Cells (MSC)*
MSC sind Vorläuferzellen des Bindegewebes, die aus dem Knochenmark von Einzelspendern durch unsere Kooperationsmitarbeiter der AG Prof. Jakob des König-Ludwig-Hauses Würzburg isoliert und uns zur weiteren Verarbeitung übergeben wurden. Es handelte sich um Zellen der Chargennummern 1081, 1083 sowie 1100.

2.5 Puffer und Lösungen

2.5.1 Puffer für Western-Blot

- Minigel-Puffer A
Acrylamid 4K 30 % Lösung (Applichem)
- Laufgel-Puffer (Puffer B)
0,75 M Tris-HCl (pH 8,8), 0,2 % SDS in ddH_2O
- Sammelgel-Puffer (Puffer C)
0,25 M Tris-HCl (pH 6,8), 0,2 % SDS in ddH_2O
- 4x SDS-Probenpuffer (Lämmli)
8 % SDS, 40 % Glycerol, 250 mM Tris/HCL (pH 6,8), 0,1 % Bromphenolblau, 10 % β -Mercaptoethanol in ddH_2O

- Konzentration des Laufgels:

% Acrylamid	6 %	8 %
Puffer A	2 ml	2,66 ml
Puffer B	5 ml	5 ml
ddH_2O	3 ml	2,33 ml
10 % APS	100 μ l	100 μ l
Temed	4 μ l	4 μ l

- Sammelgel:

Puffer A	1 ml
Puffer B	5 ml
ddH_2O	4 ml
10 % APS	150 μ l
Temed	10 μ l

- 1 x Elektrophoresepuffer
25 mM Tris-HCl, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS in ddH_2O
- 1 x Blottingpuffer
25 mM Tris-HCl, 192 mM Glycin, 20 % Methanol in ddH_2O
- 1 x TRIS-gepufferte Kochsalzlösung (TBS)
20 mM Tris-HCl, 137 mM Natriumchlorid in ddH_2O , mit HCl auf pH 7,6 eingestellt
- 1 x TBS-Tween (TBS-T)
0,05 % Tween in 1x TBS
- Blockmilch
5 % Magermilchpulver in 1 x TBS-T

- Strippingpuffer
100 mM β -Mercaptoethanol, 2 % SDS, 62,5 mM Tris-HCl (pH 6.7) in ddH_2O

2.5.2 Puffer für Lysate

- E1A Lyse Puffer (ELB-Stocklösung)
150 mM Natriumchlorid, 50 mM HEPES (pH 7,5), 5 mM EDTA, 0,1 % NP-40 in ddH_2O
- ELB-Zellyse-Puffer (ELB+++)
20 mM Natrium- β -Glycerophosphat, 0,5 mM Natriumorthovanadat und 200 μ l *Complete* Proteaseinhibitor in 4,8 ml ELB-Stocklösung
- RLT-Zellyse-Puffer
143 mM β -Mercaptoethanol in Qiagen RLT Lysis Puffer

2.6 Antikörper für Western-Blot

Tabelle 5: Verwendete Primärantikörper mit Vertrieb

Primärantikörper	Cat#	Spezies	Verdünnung	Vertrieb
Polyklonaler Erk5/ Anti-BMK1-AK	07-039	Kaninchen	1 : 1.000	Upstate
Monoklonaler Anti-FDPS-AK (EPR4628)	GTX62782	Kaninchen	1 : 500	GeneTex
Monoklonaler Anti- α -Tubulin-AK (B-5-1-2)	T5168	Maus	1 : 10.000	Sigma

Tabelle 6: Verwendete Sekundärantikörper mit Vertrieb

Sekundärantikörper	Verdünnung	Vertrieb
Polyklonaler Anti-Kaninchen-AK	1 : 2.000	Transduction Laboratories
Polyklonaler Anti-Maus-AK	1 : 2.000	Transduction Laboratories

2.7 Transfektionsreagenzien und siRNAs

- Transfektionsreagenz
Oligofectamine (Life technologies)

- siRNAs

die verwendeten, in 20 µM Stock gelösten siRNAs sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 7: Verwendeten siRNAs mit Sequenz und Vertrieb

Gen	Strang	Sequenz (5' -> 3')	Vertrieb
Cdc42#15	Sense	CGAUGGUGCUGUUGGUAAtt	Qiagen
	Antisense	UUUACCAACAGCACCAUCGcc	
Cdc42#17	Sense	GAUUACGACCGCUGAGUUAtt	Qiagen
	Antisense	UAACUCAGCGGUCGUAAUCtg	
FDPS#8	Sense	GGGUGAAGGCGCUAUAUGAtt	Qiagen
	Antisense	UCAUAUAGGCCUUCACCCgg	
FDPS#10	Sense	GGUACAAAUCUAUUGUCAAtt	Qiagen
	Antisense	UUGACAAUAGAUUUGUACctc	
Kontroll-siRNA (Scr)	Sense	UUCUCCGAACGUGUCACGUdT	Qiagen
	Antisense	ACGUGACACGUUCGGAGAAdT	

2.8 Primer

Tabelle 8: Verwendete Primer mit Sequenz und Vertrieb

Gen	Strang	Sequenz (5'-> 3')	Vertrieb
GAPDH (Haushaltsgen)	Sense	CCACCCATGGCAATTCC	Sigma Aldrich
	Antisense	GATGGGATTTCCATTGATGACA	
Cdc42	Sense	TTTTACCAACAGCACCATCG	Sigma Aldrich
	Antisense	CCCGGTGGAGAAGCTGAG	
FDPS	Sense	TGTGACCGGCAAAATTGGC	Sigma Aldrich
	Antisense	GCCCGTTGCAGACACTGAA	
FGFR3	Sense	GCCAAGCCTGTCACCGTAG	Sigma Aldrich
	Antisense	CAGAAACTCCCGCAGGTTACC	
FOSL1	Sense	CAGGCGGAGACTGACAAACTG	Sigma Aldrich
	Antisense	TCCTTCCGGGATTTTGCAGAT	
INPP4B	Sense	GTCTGACAAGATACTCCAGCAC	Sigma Aldrich
	Antisense	GGGAATGTGACACCAGTCAAAA	
PTHLH	Sense	AAGGTGGAGACGTACAAAGAGC	Sigma Aldrich
	Antisense	CAGAGCGAGTTCGCCGTTT	

2.9 TaqMan-Sonden

Tabelle 9: Verwendete TaqMan-Sonden mit Vertrieb

Gen	Erkennungsnummer	Vertrieb
GAPDH (Haushaltsgen)	#Hs99999905_m1	Applied Biosystems
KLF2	#Hs00360439_g1	Applied Biosystems
KLF4	#Hs00358836_m1	Applied Biosystems

2.10 Reagenziensätze („Kits“)

Tabelle 10: Verwendete Reagenziensätze mit Vertrieb

Bezeichnung	Vertrieb
cDNA-Synthese-Kit <i>Reverse Transcription Kit Quanti Tect (10 pg – 1 µg)</i>	Qiagen
cDNA-Synthese-Kit <i>Transcriptor High Fidelity cDNA Synthese Kit (≥ 1 µg)</i>	Roche
RNA-Isolations-Kit <i>RNeasy Mini-Kit</i>	Qiagen

2.11 Geräte

Tabelle 11: Verwendete Geräte mit Vertrieb

Name	Vertrieb
Brutschrank Galaxy 170S	Eppendorf
Einbau-Gefrierschrank, GUD1445	Bosch
Feinwaage, BP110S	Sartorius
Feinwaage Scout	Ohaus
Gefrierschrank -20° C Premium/GSS3666	Liebherr
Gefrierschrank -80° C, U85515	New Brunswick Scientific
Gefrier-Kühlschrank-Kombination <i>Premium no-frost/KGN3446</i>	Liebherr
Heizblock SBH130DC	Stuart Equipment, Bibby Scientific Limited
Kühlschrank UKS 5000-2	Liebherr

Kühlschrank KTS1410	Liebherr
Mikroskope (Axiovert A1, Axiovert 35)	Carl Zeiss
Minizentrifuge, <i>MiniStar silverline</i>	VWR International
Monomixer M.-M., Desaga	Sarstedt
Multifuge Heraeus	Thermo Scientific
Multifunktionsreader, Infinite M200	Tecan Group Ltd
Neubauer Zählkammer	Fa. Brand
Pipetten 10 µl, 100 µl, 100 µl	Eppendorf
Pipettierhilfe <i>PipetBoy</i>	Integra Biosciences
<i>Realtime-PCR-System, Step One Plus</i>	Applied Biosystems Life Technologies
Spannungsgeber	BioRad Laboratories
Tischzentrifuge, 5424	Eppendorf
Tischzentrifuge gekühlt, 5427	Eppendorf
Vakuumpumpsystem <i>Vaccusafe</i>	Integral Biosystems
<i>Vortex Gene 2 G560E</i>	Scientific Industries
Wasserbad TW 12	Julabo

2.12 Software

Tabelle 12: Verwendeten Software mit Vertrieb

Software	Vertrieb
<i>Genecards</i>	http://www.genecards.org/
<i>GraphPad Prism 7, Scientific Software</i>	GraphPad
<i>i-control 1.10</i>	Tecan
<i>Magellan 7.1</i>	Tecan
<i>NCBI Blast</i>	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST
<i>NCBI Gene</i>	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene
<i>NCBI Pubmed</i>	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed
<i>Office Excel 2010</i>	Microsoft
<i>Office Word 2016</i>	Microsoft

<i>StepOne Software 2.3</i>	Applied Biosystems, Life technologies
-----------------------------	---------------------------------------

Zen 2011	Carl Zeiss
----------	------------

3 Methoden

3.1 Zellkultur

Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Sämtliche Arbeiten mit Zellkulturen wurden unter Verwendung steriler Medien und Verbrauchsmaterialien unter der Sterilbank durchgeführt.

3.1.1 Auftauen und Kultivieren von Endothelzellen

Vor dem Auftauen der Zellen wurden die Kulturgefäße mit Medium („HUVEC-Mix“) im Brutschrank bei 37 °C präinkubiert. Die in Flüssigstickstoff tiefgefrorenen HUVEC-Aliquots wurden im 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut und nach kurzem Mischen mit einer Pipette in die vorbereiteten Kulturschalen überführt. Dabei wurden 360.000 Zellen pro 10 cm Platte, 130.000 Zellen pro 6 cm Platte und 120.000 Zellen pro 6-Loch-Platte verwendet. Durch die Verdünnung mit dem Medium wird die Zerstörung der Zellen durch das zum Einfrieren notwendige Frostschutzmittel DMSO vermieden. Die Verteilung der Zellen in der Kulturschale erreichte man durch leichtes Schwenken der Platte. Im Anschluss wurden die mit Zellen beimpften Kulturschalen in den Brutschrank gelegt und konnten nach Adhärenz, welche in der Regel innerhalb von sechs Stunden erfolgte, entsprechend des Versuchsaufbaus weiter genutzt werden.

3.1.2 Kultur von MSC, Bestimmung der Zellzahl und Kryokonservierung

Die mesenchymalen Stammzellen wurden von humanen Spendern aus dem Knochenmark isoliert und in Passage 0 an uns weitergegeben. Die Entnahme und Weiterverarbeitung der Zellen wurden im Ethikvotum Nr. 84/01 genehmigt. Sobald die unter dem Mikroskop ermittelte Dichte von etwa 90 % erreicht war, konnte die Passagierung durchgeführt werden.

3.1.2.1 Passagieren der MSC

Das *Splitting* der MSC erfolgte bei einer Dichte von 80-90 %. Zunächst wurde das Medium abgesaugt und die Zellen in den 175 cm² Zellkulturflaschen zweimal mit 10 ml PBS (RT) gewaschen. Im Anschluss benetzte man die Zellen mit einer Trypsinlösung (0,05 % EDTA in 3 - 5 ml Trypsin) und stellte sie für fünf Minuten in den Brutschrank. Sobald sich die

Zellen mechanisch vom Grund der Kulturflasche lösen ließen, wurde die Trypsinlösung durch Zugabe von Kulturmedium abgesättigt. Daraufhin wurden die Zellen in Zentrifugenröhrchen überführt, fünf Minuten lang bei 1.100 U/min abzentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Zellpellet wurde durch Klopfen gelöst und in Medium resuspendiert. Die Zellen konnten nun zur weiteren Verarbeitung genutzt werden.

3.1.2.2 Bestimmung der Zellzahl mit der Neubauer Zählkammer

Zur Bestimmung der Zellzahl vermischte man 10 µl Zellsuspension im Verhältnis 1 : 1 mit Trypanblau und gab davon 10 µl in die Neubauer Zählkammer, wo die lebenden Zellen unter dem Mikroskop ausgezählt wurden. Die Zellzahl errechnet sich wie folgt:

$$Lz = \frac{R * 2 * 10^4 * a}{4}$$

- Lz Anzahl der lebenden Zellen
- R Summe der lebenden Zellen in den vier Eckquadraten
- 2 Verdünnungsfaktor
- 10⁴ Kammerfaktor
- a Menge des Lösungsvolumens
- 4 Anzahl der ausgezählten Eckquadrate

3.1.2.3 Kryokonservierung

Für die Kryokonservierung wurde ein spezielles Einfriermedium vorbereitet, welches aus 8 ml Nährmedium, 1 ml steril filtriertem FCS und 1 ml DMSO bestand. Dieses Medium wurde auf Eis gekühlt und zum Resuspendieren der Pellets verwendet. Jedes Kryoröhrchen wurde nun mit 1 ml Zellsuspension befüllt und fest verschraubt. Die Lagerung erfolgte zunächst in Styropor gebettet bei -80 °C, später wurden die Zellen in Flüssigstickstoff überführt.

3.1.3 Osteogene Differenzierung und Nachweis mittels Alizarinrotfärbung

Um die MSC osteogen zu differenzieren, wurden sie zunächst im herkömmlichen Medium kultiviert bis sie eine maximale Dichte erreicht hatten. Im Anschluss daran hielt man sie 14 Tage lang in osteogenem Medium. Zum Nachweis der erfolgreichen

Differenzierung diente die Alizarinrotfärbung, welche den Mineralisationsprozess in Osteoblastenkulturen nachweist. Der Farbstoff bildet mit dem Kalzium der extrazellulären Matrix einen Chelatkomplex, die Mineralisationskerne erscheinen dabei rot. Die Zellen wurden nach einmaligem Spülen mit PBS in eiskaltem Methanol zehn Minuten lang fixiert, anschließend mit destilliertem Wasser abgewaschen und zwei Minuten mit der Färbelösung inkubiert. Danach wurde die Färbelösung durch dreimaliges Waschen mit destilliertem Wasser entfernt und abgewartet bis es trocken war. Die mineralisierten Zellkerne stellten sich durch die dunkelrote Farbe dar.

3.2 Stimulation der Zellen mit Bisphosphonaten

Sobald die Zellen eine Dichte von 80 - 90 % erreicht hatten, konnte eine Stimulation mit Bisphosphonaten durchgeführt werden. Dazu vermischte man das jeweilige Bisphosphonat in einer Konzentration von 2 mg/ml mit dem entsprechenden Nährmedium für die Zellen. Die Endkonzentrationen lagen im μM Bereich und sind bei den jeweiligen Experimenten angegeben. Nach dem Absaugen des reinen Nährmediums wurde das mit Bisphosphonaten versetzte Medium auf die Zellen gegeben. Für die Kontrollen wurde zeitgleich ein Mediumwechsel mit reinem Nährmedium durchgeführt. Dabei wurden die 10 cm Schalen mit einer Gesamtmenge von 7,5 ml, die 6 cm Schalen mit 3,5 ml und die 6-Loch-Platten mit 3 ml versorgt. Zur Schonung der Zellen war darauf zu achten, eine möglichst kurze Zeit außerhalb des Brutschranks einzuhalten, vorgewärmtes Medium zu verwenden sowie das frische Medium vorsichtig über den Rand der Zellkulturplatte hinzuzufügen. In Tabelle 13 sind die Konzentrationen der Bisphosphonate sowie die entsprechende molare Masse aufgeführt:

Tabelle 13: Eingesetzte Bisphosphonat-Konzentration

Bisphosphonat	Konzentration	Mol
Clodronat	2 mg/ml	5,54 mM
Etidronat	2 mg/ml	8,00 mM
Pamidronat	2 mg/ml	7,17 mM
Ibandronat	2 mg/ml	5,86 mM
Zoledronat	2 mg/ml	6,89 mM

3.3 Erk5-Inhibition

Die Inhibition von Erk5 erfolgte mithilfe des Erk5-Inhibitors XMD8-92. Für den Versuch wurden vier verschiedene Konditionen betrachtet. Zunächst wurden 130.000 Zellen auf 6 cm Schalen ausgesät und nach 72 Stunden stimuliert. Dabei wurden zwei Kulturen mit dem Erk5-Inhibitor XMD8-92 45 Minuten lang mit einer Konzentration von 10 μM vorstimuliert, die anderen Zellen wurden lediglich mit Nährmedium versetzt. Von den nicht-vorstimulierten Kulturen stellte eine Schale die Negativkontrolle dar, bei der parallel zur Stimulation der anderen Kulturen nur das Medium gewechselt wurde. Analog dazu wurde eine Positivkontrolle angelegt, bei der das Medium mit 100 μM Zoledronat versetzt wurde. Um den Inhibitionserfolg erkennen zu können, wurde von den vorstimulierten Kulturen eine mit XMD8-92 und 100 μM Zoledronat versetztem Medium beimpft. Eine weitere Kultur stellte die Negativkontrolle für den Inhibitor dar und wurde bei der Stimulation nur mit XMD8-92 versetztem Medium inkubiert, um auszuschließen, dass der Inhibitor selbst einen nennenswerten Effekt auf die Zellen ausübt. Die Zellen wurden nach 24 bzw. 48 Stunden geerntet und zu Protein- oder RNA-Lysaten weiterverarbeitet.

3.4 siRNA-Transfektion

Die *small interfering RNA*, auch bekannt als *silencing RNA*, ist ein doppelsträngiges Molekül von etwa 21 - 23 bp Länge, das durch Transfektion in den Zellkern wandern und dort die mRNA Degradation von Genprodukten auslöst (*Knock-down*). Der Erfolg des *gene silencing* kann im Anschluss mittels Genexpressionsanalysen überprüft werden.

Die Transfektion von HUVEC mit siRNA erfolgte 24 Stunden nach Aussaat der Zellen, wobei die Konfluenz 80 - 90 % betragen sollte. Wichtig für die Transfektion ist steriles Arbeiten mit der Verwendung DNA-, DNase-, RNase-freier Reaktionsgefäße und Filterspitzen. Zunächst wurden 1,5 ml Reaktionsgefäße vorbereitet, jeweils mit A und mit B gekennzeichnete Gefäße für je einen Versuchsabschnitt. In Lösung A wurden 90 μl Opti-MEM mit 10 μl siRNA vermischt. Bei einer Stocklösung von 20 μM betrug die Endkonzentration der siRNA 200 nM. In Lösung B wurden 90 μl Opti-MEM mit 10 μl *Oligofectamine* versetzt. *Oligofectamine* ist ein Transfektionsreagenz, das stabile Komplexe mit der siRNA bildet und eine effektive Transfektion ins Innere der Zelle

ermöglicht. Um die Bedingungen für die Transfektion zu optimieren, wurde anstelle eines normalen Mediums ein reduziertes Medium verwendet (Opti-MEM). Beide Lösungen wurden zehn Minuten lang bei Raumtemperatur unter der Sterilbank stehen gelassen. Im Anschluss vermischte man jeweils eine Lösung B mit einer Lösung A und ließ diese weitere 30 Minuten unter der Sterilbank ruhen.

Nach etwa 20 Minuten wurden die Zellen aus dem Brutschrank geholt, zweimal mit vorgewärmtem Opti-MEM gewaschen und mit 800 µl des reduzierten Mediums benetzt. Bis zum Ablauf der 30 Minuten überführte man die Zellen wieder in den Brutschrank. Sobald die halbe Stunde vorbei war, wurden die 200 µl aus Lösung A + B auf die Zellen pipettiert. Damit eine gute Durchmischung stattfindet, sollten die Kulturschalen „gerockt“ werden, was einem schnellen Hin- und Herbewegen der Schalen entspricht. Die Zellen, versetzt mit allen für die Transfektion wichtigen Reagenzien, wurden nun in den Brutschrank gestellt. Nach vier Stunden wurde das Medium gewechselt (HUVEC-Mix bzw. MSC-Medium), um den Zellen genügend Nährstoffe für die nächsten Tage zur Verfügung zu stellen.

3.5 Genexpressionsanalysen mittels Western-Blot

Als Western-Blot oder Immunoblot bezeichnet man ein Verfahren, bei dem durch die Übertragung von Proteinen auf eine Trägermembran unter Verwendung Antikörper-basierter Färbemethoden eine semiquantitative Bestimmung der Konzentration an Zielproteinen durchgeführt werden kann.

3.5.1 Lyse der Zellen und Proteinbestimmung

Um unerwünschte Reaktionen zu vermeiden, wurden alle Schritte, die für die Lyse der Zellen notwendig sind, auf Eis und mit gekühlten Lösungen vollzogen.

Damit die Proteine während der Elektrophorese frei über das Gel laufen können, müssen diese zunächst aus der Zelle freigesetzt werden. Dafür verwendet man einen speziellen ELB-Zellysepuffer (ELB+++; siehe Kapitel 2.5.2). Abhängig von der Größe der Zellkulturschale wurden nach zweimaligem Waschen mit kaltem PBS 90 µl (6-Well) bis 180 µl (10 cm Schale) ELB-Zellysepuffer auf die Zellen gegeben. Durch Schwenken sollte erreicht werden, dass alle Zellen mit dem Lysepuffer in Kontakt kommen. Nun stellte

man die Schalen eine Stunde auf Eis, bevor die Zellen mittels Zellschaber abgekratzt und in gekühlte Reaktionsgefäße gefüllt wurden. Da man für den weiteren Verlauf nur die frei schwimmenden Proteine benötigte und nicht die restlichen Zellbestandteile, wurden die Reaktionsgefäße in einer auf 4 °C gekühlten Zentrifuge für Mikrogefäße bei 10.000 U/min zehn Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand (welcher die Proteine beinhaltet) wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, während das Zellpellet verworfen wurde.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mittels *Quick start Bradford protein assay dye reagent concentrate* (BioRad) mit Hilfe einer BSA-Standardreihe. Dabei wurde das Farbreagenz 1 : 5 verdünnt und in die Reaktionsgefäße vorgelegt, wobei das Endvolumen (Farbreagenz + Proteinprobe) 1 ml betragen sollte. Die Probenmengen (Standardreihe und Proteinproben jeweils 5 µl) wurden im Anschluss dazu pipettiert, gemischt und fünf Minuten im Dunkeln stehen gelassen. In dieser Zeit soll das Farbreagenz Komplexe mit den Seitenketten der Proteine bilden. Dadurch wird das Gleichgewicht von der ungebundenen (kationischen), roten Form des Farbstoffs, die ein Absorptionsmaximum von 470 nm hat, hin zur blauen, unprotonierten, anionische Form verschoben, wodurch sich auch das Absorptionsmaximum hin zu 595 nm verändert. Die photometrische Messung erfolgt nun durch die Zunahme der Absorption bei 595 nm gegenüber der des freien Farbstoffs, was ein Maß für die Proteinkonzentration darstellt. Für diese Messung wurden 200 µl von der Standardreihe und jeder Probe in eine 96-well Platte pipettiert und unter Ausschluss von Luftblasen, welche die Messung verfälschen können, in den *Tecan-Reader* eingelesen. Mithilfe des Programms *Magellan 7.1 – Bradford Standard* konnte eine genaue Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgen, die die Grundlage für die weiteren Schritte bildet.

3.5.2 SDS-PAGE

SDS-PAGE steht für *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, auf Deutsch Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese und wurde zur Analyse der Proteine verwendet. Voraussetzung für dieses Verfahren ist die 1 : 3-Vermischung der Proteinproben mit 4 x Lämmli-puffer (SDS). Dadurch wird die Eigenladung der Proteine überdeckt und zudem eine konstant negative Ladung erzeugt. Diese wiederum

ermöglicht es, dass die Proteine der Größe nach und ladungsunabhängig aufgetrennt werden und bei Anlegen von Spannung in eine Richtung durch das Gel wandern können. Die mit Lämmli-puffer versetzten Proben wurden nach dem Mischen zehn Minuten lang bei 99 °C im Heizblock aufgekocht und danach auf Eis gestellt. Der Acrylamidgehalt des Laufgels richtet sich dabei nach der Größe des zu detektierenden Proteins. Nach dem Befüllen der Elektrophoresekammer mit 1 x Elektrophoresepuffer wurde der Kamm aus dem Sammelgel gezogen und die damit erzeugten Taschen mit den Proben befüllt. Dabei ist es wichtig, eine Tasche mit einem Proteinstandard zu füllen, um die Größe der Proteinbanden abschätzen zu können. Leere Taschen wurden mit 1 x Lämmli-puffer befüllt, um einen gleichmäßigen Gellauf zu gewährleisten. Für den Gellauf wurde die Kammer an den Spannungsgeber angeschlossen und bei einem Gel bei 27 mA, bei zwei Gelen bei 50 mA für ca. 80 Minuten laufen gelassen.

3.5.3 Proteintransfer

Für den immunologischen Nachweis wurden die im Gel aufgetrennten Proteine im Nassblotverfahren auf eine Membran übertragen, je nach später verwendetem Antikörper entweder auf eine Nitrozellulosemembran (0,45 µM, Protran Whatman) oder auf eine vorab in 100 % Methanol aktivierte Polyvinylidifluorid-Membran (*Immobilon Westran clear signal*, Millipore). Pro Gel benötigte man zwei Schwämme, vier 3 mM-Chromatographie-Blottingpapiere (Gelblottingpapier von Whatman) und eine Membran. Alle Bestandteile wurden vor dem Zusammenbauen in Blottingpuffer getränkt. Zunächst legte man den Schwamm und zwei der Filterpapiere auf die Kathode. Darauf folgten das ebenfalls in Blottingpuffer äquilibrierte Laufgel sowie die Membran, die spiegelverkehrt und unter Ausschluss von Luftblasen auf die Blottingpapiere gelegt wurde. Nachdem die anderen beiden Filterpapiere auf die Membran gelegt wurden, sollten mit Hilfe einer Ausrolltechnik verbliebene Luftblasen beseitigt werden. Zuletzt schloss der zweite Schwamm die Apparatur ab, welche nun durch Druck der äußeren Platten zusammengehalten und in die Blottingkammer gestellt wurde. Diese wurde mit Blottingpuffer aufgefüllt und nach Zugabe eines Eisblocks (zum Schutz vor Überhitzung) bei 400 mA für 55 (ein Gel) bzw. 100 Minuten (zwei Gele) an den Spannungsgeber im 4 °C-Raum angelegt.

3.5.4 Proteindetektion

Nach dem Proteintransfer wurde die Membran nach kurzem Waschen in TBS ca. eine Minute lang in einer Lösung mit dem Farbstoff *Ponceau S* (0,1 % *Ponceau* in 5 % Essigsäure) geschwenkt, um durch die Rotfärbung der Proteinbanden eine gleichmäßige Proteinladung sowie eventuelle Luftblasen bestätigen bzw. erkennen zu können. Die Membran konnte im Anschluss mit Wasser wieder entfärbt werden.

3.5.5 Immundetektion

Nach dem Proteintransfer wurde die Membran kurz in TBS gewaschen und anschließend in 5 % Blockmilch eine Stunde lang bei Raumtemperatur unter stetigem Schwenken inkubiert, um unspezifische Bindungen zu lösen. Darauf folgte die Detektion der spezifischen Proteine immunologisch mittels Primärantikörper, welche in der entsprechenden Verdünnung in 5 % Blockmilch bzw. BSA angesetzt wurden und über Nacht bei 4 °C die Membran inkubierten.

Am nächsten Tag wurde die Membran viermal sieben Minuten lang mit TBS-T gewaschen, um unspezifisch gebundenen Antikörper zu entfernen. Im Anschluss daran wurde die Membran mit dem sich gegen den Primärantikörper richtenden Sekundärantikörper, der 1 : 2.000 in 1,7 %-iger Blockmilch verdünnt wurde, inkubiert. Analog zu den Primärantikörpern wurden auch hier durch Waschen mit TBS-T unspezifisch gebundene Antikörper entfernt. Diesmal wurde dreimal sieben Minuten mit TBS-T und einmal sieben Minuten mit TBS gewaschen.

Noch während der Waschschritte wurden 200 µl Luminol (aus 250 µM Stocklösung) und 88 µl Coumarinsäure (aus 90 µM Stocklösung) aufgetaut, welche mit 20 ml HCL/ Tris 0,1 M vermischt wurden und durch Hinzufügen einer HCL/ Tris-H₂O₂-Lösung (12 µl H₂O₂ aus 30 % Stocklösung in 20 ml Tris 0,1 M) als ECL-Reagenz dienten. Alternativ konnte fertiges ECL verwendet werden. Die Inkubationszeit betrug eine Minute. Die immunologisch aktivierten Proteinbanden konnten somit indirekt über die Peroxidase-Reaktion nach dem Prinzip der verstärkten Chemolumineszenz (*enhanced chemoluminescence*, ECL) durch Auflage von Röntgenfilmen (Super RX Fujifilm) nachgewiesen werden.

3.5.6 Entfernen der Antikörper von Membranen („Strippen“)

Durch diesen Schritt können Antikörper von Membranen entfernt werden, wodurch eine erneute Verwendung mit anderen Antikörpern möglich ist. Dazu wurde die Membran nach kurzem Waschen in TBS 30 Minuten lang bei 50 °C in *Stripping*-Puffer inkubiert und anschließend zweimal fünf Minuten mit TBS-T gewaschen. Nach einstündigem Blocken mit Blockmilch konnte die Membran mit neuen Primär- und Sekundärantikörpern inkubiert werden (Vorgehen siehe Immundetektion 3.5.5).

3.6 Genexpressionsanalysen in der quantitativen *Real-Time*-PCR

Die quantitative *Real-Time*-PCR (qRT-PCR) ist ein Verfahren zur Vervielfältigung von Nukleinsäuren, welche mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen quantitativ gemessen werden können. Dazu wird zunächst die RNA aus den Zellen isoliert, im Anschluss in DNA umgeschrieben (reverse Transkription) und mittels PCR amplifiziert.

3.6.1 Lyse der Zellen für RNA-Lysate

Im Gegensatz zu den Proteinlysaten können für die RNA-Lysate alle Schritte bei Raumtemperatur ablaufen. Zunächst wurde das Medium abgesaugt und die adhären Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Für die Lyse der Zellen benötigte man einen speziellen Lysepuffer, der aus RLT + β -Mercaptoethanol im Verhältnis 100 : 1 hergestellt wurde. Der RLT-Puffer lysiert durch seinen hohen Salzgehalt die Zellmembranen, während β -Mercaptoethanol Ribonukleasen eliminiert, welche im weiteren Verlauf einen RNA-Verdau verursachen könnten. Je nach Größe der Zellkulturschale wurden zwischen 350 μ l (6-Loch-Platte oder 6 cm-Schale) und 600 μ l (10 cm-Schale) auf die Zellen gegeben. Nach kurzem Einwirken wurden die Zellen mittels Zellschaber abgekratzt und in Reaktionsgefäße gefüllt. Diese konnten nun weggefroren oder direkt für die RNA-Isolation weiterverarbeitet werden.

3.6.2 RNA-Isolation und Konzentrationsbestimmung

Die RNA-Isolation erfolgte nach den Herstellerangaben mit dem *RNeasy-Mini-Kit* von Qiagen. Die Konzentration und Reinheit der isolierten RNA wurden anschließend mit dem *TECAN-Reader* und dem Programm *i-control 1.10* bestimmt. Die Lagerung der RNA-Proben erfolgte bei -80 °C.

3.6.3 Reverse Transkription oder cDNA-Synthese

Abhängig von der geringsten RNA-Konzentration wurde die cDNA-Synthese entweder mit dem *Reverse Transcription Kit Quanti Tect* von Qiagen (RNA-Menge 10 pg – 1 µg) oder dem *Transcriptor High Fidelity cDNA Synthese Kit* von Roche (RNA-Menge ≥ 1 µg) nach Herstellerangaben durchgeführt. Das Prinzip beruht auf dem Umschreiben einer RNA-Matrize in eine komplementäre DNA (cDNA), was durch das Enzym reverse Transkriptase (RTase), einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, erreicht wird. Zusätzlich benötigt man *Primer*, die an die RNA binden und von der RTase mit dNTPs entlang der Matrize in 5' - 3'-Richtung zu einer cDNA verlängert werden.

Die so entstandene cDNA wurde 1 : 10 mit DNA-, DNase-, RNase-freiem Wasser verdünnt und in dieser verdünnten Form in der *Real-Time-PCR* eingesetzt. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -20 °C.

3.6.4 Quantitative *Real-Time-PCR*

Das Prinzip der PCR beruht auf der Wiederholung der Reaktionsschritte Denaturierung, *Annealing* und Elongation. Zu Beginn erfolgt eine vollständige Denaturierung der doppelsträngigen DNA durch Erhitzen auf 95 °C. Im Anschluss daran wird die Reaktionslösung sehr schnell auf die *Annealing*-Temperatur von 60 °C abgekühlt. Nun können die *Primer* oder *TaqMan*-Sonden an ihre entsprechende Zielsequenz binden. Die gebundenen Oligonukleotide werden von einer DNA-abhängigen thermostabilen DNA-Polymerase in Anwesenheit freier Desoxynucleotid-Triphosphate (dNTPs) verlängert, was ebenfalls bei 60 °C durchgeführt wird (Elongation). Im Idealfall führt dies in jedem Zyklus zu einer Verdoppelung der durch die Oligonukleotide flankierten DNA-Abschnitte, was zu einer exponentiellen, selektiven Anreicherung dieser Sequenz führt.

3.6.4.1 Detektion der PCR-Produkte und Auswahl der *Primer*

Die Detektion der amplifizierten Genabschnitte erfolgt mithilfe von Fluoreszenzfarbstoffen, entweder sequenzunspezifisch (z.B. *SYBR Green*) oder sequenzspezifisch mittels fluoreszenzmarkierter Sonden (z.B. *TaqMan*-Sonden). In der vorliegenden Arbeit kamen für die Gene KLF2 und KLF4 jeweils *TaqMan*-Sonden mit dem *TaqMan Reaction Buffer* zum Einsatz, für PTHLH, INPP4, FGFR3, FOSL1, FDPS und Cdc42 wurde der *Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green QPCR Master Mix with low ROX* (Agilent

Technologies) verwendet. Das Haushaltsgen GAPDH wurde sowohl als *TaqMan*-Sonde als auch als *Primer* für den *SYBR Green Master Mix* eingesetzt.

Die Auswahl der *Primer* ist entscheidend für die Effektivität und Spezifität der PCR, sowie für die Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments. Die für diese Arbeit verwendeten *Primer* wurden von den Datenbanken *Primerbank* und *Primerdepot* ausgewählt und von Sigma Aldrich synthetisiert. Dabei ist zu beachten, dass sowohl zwischen einem *Primer*-Paar als auch innerhalb des Oligonukleotids keine komplementären Sequenzen existieren, da dies zu *Hairpin-Loops* bzw. Oligonukleotid-Dimeren führen und die Effektivität und Auswertbarkeit negativ beeinflussen kann. Um im Voraus mögliche Interaktionen zu detektieren, wurden die ausgewählten *Primer*-Sequenzen mittels *BLAST-Search* mit den entsprechenden Sequenzen auf dem Server des NCBI (*National center for biotechnology information*) überprüft. Hierdurch ist ein schneller Ähnlichkeitsvergleich der Oligonukleotidsequenzen mit den in der Gendatenbank enthaltenen Sequenzen möglich.

3.6.4.2 Durchführung

Vor Beginn des Pipettierens für die qPCR legte man in der *Software StepOnePlus* die wichtigsten Parameter fest. Zunächst galt es zu unterscheiden, ob es sich methodisch um eine PCR mit *TaqMan*-Sonden oder um *SYBR Green* handelt. Bei beiden Methoden wurden außerdem Anzahl und Anordnung der *Samples* (cDNA Proben) und *Targets* (Zielgene und Referenzgen) sowie die Anzahl der Wiederholungsmessungen (in diesem Fall Triplikate) festgelegt. Als Referenzgen wurde GAPDH eingesetzt, um die Genexpression durch Bezug auf ein konstant exprimiertes Haushaltsgen normieren zu können. Die genaue Menge der jeweiligen Reagenzien, welche sich nach Anzahl der Gene und *Samples* richtet, wurde mittels einer Excel-Vorlage ausgerechnet. Alle Pipettierschritte wurden unter möglichst hoher Sterilität unter der Sterilbank sowie unter Verwendung DNA-, RNase-, DNase-freier, 1,5 ml fassender Reaktionsgefäße durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit der zugehörigen *Software*.

3.7 Statistische Analyse

Die in der qRT-PCR generierten Daten wurden mithilfe des Statistikprogramms *GraphPad Prism 7* ausgewertet. Für den Vergleich zweier Werte, von denen einer als

Referenzgröße auf 1 gesetzt wurde, erfolgte eine Berechnung mittels *One-Sample T-Test*. Die Analyse zweier gruppiert angeordneter Werte wurde mithilfe multipler *T-Tests* durchgeführt. Der Vergleich mehrerer Werte mit dem Referenzwert erfolgte mittels Einweg-ANOVA und Multiplizitätskorrektur nach Dunnett. Als signifikant wurden Werte mit $p < 0,05$ gewertet mit einem Stern für $p < 0,05$, zwei Sternen für $p < 0,01$, drei Sternen für $p < 0,001$, und vier Sternen für $p < 0,0001$.

4 Ergebnisse

4.1 Aktivierung von Erk5 durch Bisphosphonate

Grundlage der ersten Versuche war, dass Bisphosphonate, analog zu Statinen, Inhibitoren des Mevalonatstoffwechselwegs sind. Da Statine bereits als Aktivatoren des MEK5/ Erk5-Signalwegs identifiziert werden konnten, lag die These nahe, dass dieser auch bei den stickstoffhaltigen Bisphosphonaten einen möglichen Funktionsweg darstellt. Es sollte daher zunächst untersucht werden, ob stickstoffhaltige Bisphosphonate, die durch Inhibition der FDPS in den Mevalonatstoffwechselweg eingreifen, im Gegensatz zu ihren nicht-stickstoffhaltigen Vertretern möglicherweise in der Lage sind Erk5-Aktivierung auszulösen.

4.1.1 BP-induzierte Erk5-Aktivierung in Endothelzellen und MSC

Als Vertreter der beiden Bisphosphonatgruppen wurden Clodronat und Etidronat als stickstofffreie Bisphosphonate sowie Pamidronat und Zoledronat als stickstoffhaltige Vertreter ausgewählt. Von den stickstoffhaltigen Bisphosphonaten inhibiert Pamidronat die FDPS am geringsten, Zoledronat hingegen gilt als stärkster Hemmer des Enzyms.

Für die ersten Versuche wurden HUVEC verwendet. In diesem Zelltyp konnte eine Erk5-Aktivierung mit Statinen bereits erfolgreich gezeigt werden (Ohnesorge et al. 2010). Aus diesem Grund sollten auch die ersten Versuche mit Bisphosphonaten in diesem Zelltyp erfolgen. Um die optimale Dosierung der Bisphosphonate herauszufinden, wurden Konzentrationen von 10, 50, 100 und 200 μM getestet. 24 Stunden nach der Stimulation wurden die Zellen lysiert und die Proteine im Western-Blot auf Erk5-Phosphorylierung hin untersucht. Eine Aktivierung von Erk5 äußert sich durch eine verzögerte Migration des phosphorylierten Erk5, die sich durch das Auftreten einer zusätzlichen Bande bei ca. 110 kDa äußert. Diesen *Shift* kann man deutlich bei Zoledronat ab einer Konzentration von 50 μM erkennen. Auch bei der Stimulation mit Pamidronat ist bei 50 μM eine Phosphorylierung zu sehen, die jedoch schwächer ausfällt als bei Zoledronat. Bei den sehr hohen Dosen (100 und 200 μM) konnte man jedoch auch vermehrt Apoptose der Zellen beobachten (Daten nicht gezeigt). Der Vergleich mit Clodronat und Etidronat, die selbst in hohen Konzentrationen keine Aktivierung von Erk5 hervorrufen, erlaubt den

Schluss, dass stickstoffhaltige, nicht aber stickstofffreie Bisphosphonate, eine Erk5-Aktivierung hervorrufen können (siehe Abbildung 6).

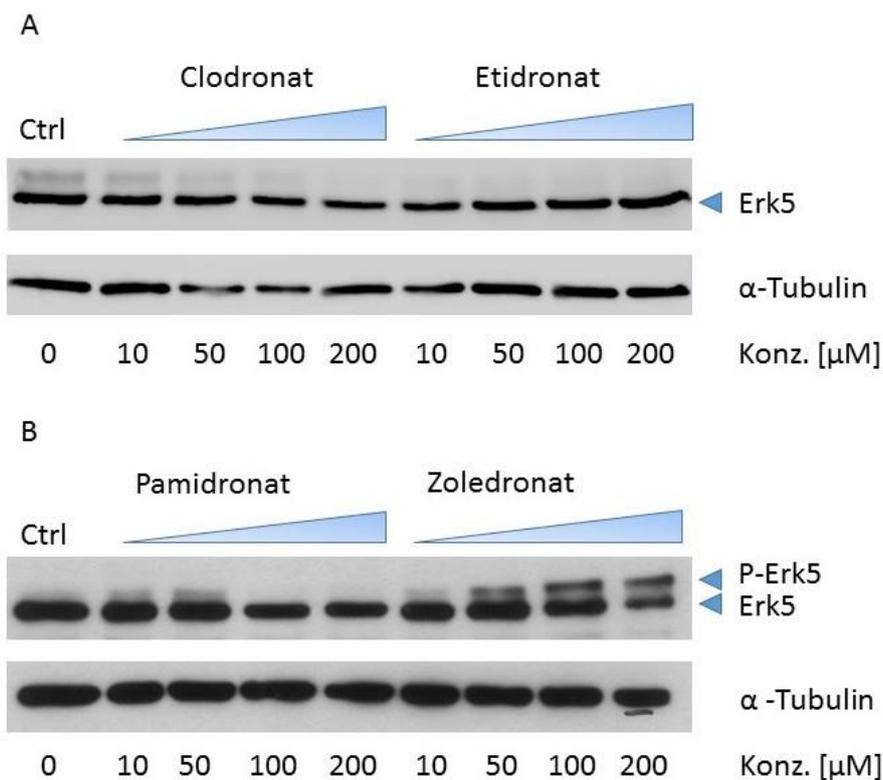


Abbildung 6: Erk5-Aktivierung in HUVEC durch verschiedene BP

Ergebnisse der Dosiskinetik von Clodronat, Etidronat, Pamidronat und Zoledronat. Clodronat und Etidronat erzeugen keine Erk5-Aktivierung, es ist nur die basale Erk5-Bande zu erkennen. Zoledronat führt hingegen ab einer Konzentration von 50 μM zu einem deutlichen Phosphorylierungsshift (doppelte Bande), auch Pamidronat zeigt eine leichte Phosphorylierung bei 50 μM. Die Zellen wurden 24 Stunden nach BP-Stimulation lysiert und die Proteine im Western-Blot eingesetzt. Der Versuch ist repräsentativ für n = 2 unabhängige Versuche. Als Ladekontrolle diente Tubulin.

Ein für den Knochenstoffwechsel interessanter Zelltyp sind die mesenchymalen Stammzellen als Vorläuferzellen der Osteoblasten. Sie wurden aus menschlichem Knochenmark isoliert und für unsere Versuche weiterverarbeitet. Im Western-Blot konnte auch in diesem Zelltyp eine starke Erk5-Aktivierung hervorgerufen werden, jedoch zeigten auch die Kontrolle sowie die stickstofffreien Bisphosphonate eine Basalaktivierung von Erk5. Ein deutlich über die basale Aktivierung hinausgehender *Shift* ist auch in diesem Zelltyp nur bei Zoledronat zu sehen (Abbildung 7). Im Rahmen dieses Versuchs wurde erstmals das stickstoffhaltige Bisphosphonat Ibandronat eingesetzt, das in seiner Potenz zwischen Pamidronat und Zoledronat liegt. Da es jedoch keine

weiterführenden Erkenntnisse mit sich brachte, wurde es für die Folgeversuche nicht weiter berücksichtigt. Es sollte jedoch versucht werden, die Problematik der Basalaktivität einzudämmen. Da wir die Ursache dieses Phänomens in der Multipotenz der Stammzellen vermuteten, erhofften wir uns durch die Differenzierung der Zellen eine Verminderung der basalen Aktivität.

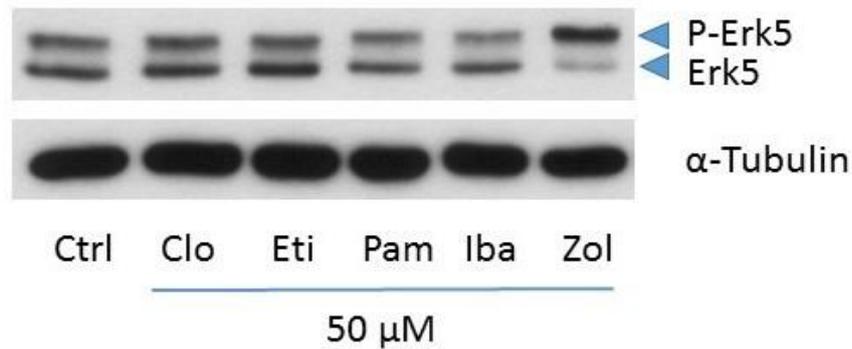


Abbildung 7: Erk5-Aktivierung in MSC

Auch in MSC kann, analog zu ECs, Erk5 aktiviert werden. Wie auch in den vorherigen Versuchen ist die Phosphorylierung bei Zoledronat am stärksten ausgeprägt. Auffällig ist jedoch eine Basalaktivität, die bei der Kontrolle wie auch den anderen BP im Western-Blot zum Vorschein kommt. Die Zellen wurden 24 Stunden nach Stimulation mit 50 µM BP lysiert und das Protein im Western-Blot eingesetzt. Die Abbildung ist repräsentativ für n = 3 unabhängige Versuche. Als Ladekontrolle diente Tubulin. Abkürzungen: Clo: Clodronat; Eti: Etidronat; Pam: Pamidronat; Iba: Ibandronat; Zol: Zoledronat

4.1.2 Osteogene Differenzierung der MSC und Erk5-Aktivierung in OB

Die Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen zu Osteoblasten (OB) beruht auf der Kultivierung der Zellen in osteogenem Medium für 14 Tage. Morphologisch veränderten sich die Zellen deutlich. Die zunächst spindelförmigen Zellen formierten sich zu einem dichten Zellrasen mit Sekretion einer kalzium- und phosphathaltigen extrazellulären Matrix (EZM) (Abbildung 8).

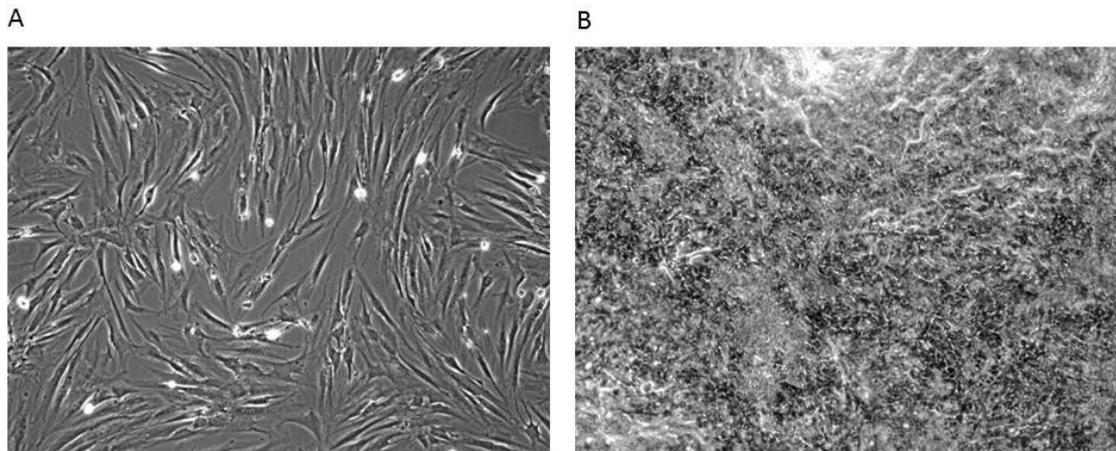


Abbildung 8: Vergleich der Morphologie von MSC und Osteoblasten

Die MSC erkennt man als spindelförmige, längliche Zellen (A). Nach Erreichen einer Dichte von ca. 90 % wurden die Zellen mithilfe von osteogenem Medium für 14 Tage zu Osteoblasten differenziert. Dabei verdichteten sich die Zellen und sekretierten Bestandteile für eine kalziumhaltige, knochentypische EZM (B).

Der Erfolg der Differenzierung wurde mithilfe der Alizarinrot-Färbung bestätigt. Durch die Bindung des Farbstoffs an die extrazelluläre Matrix kann der Mineralisationsprozess in den Osteoblasten nachgewiesen werden. Im vorliegenden Versuch hebt sich die starke Anfärbung der differenzierten Zellen deutlich von der blassen Kultur der undifferenzierten Zellen ab (Abbildung 9).

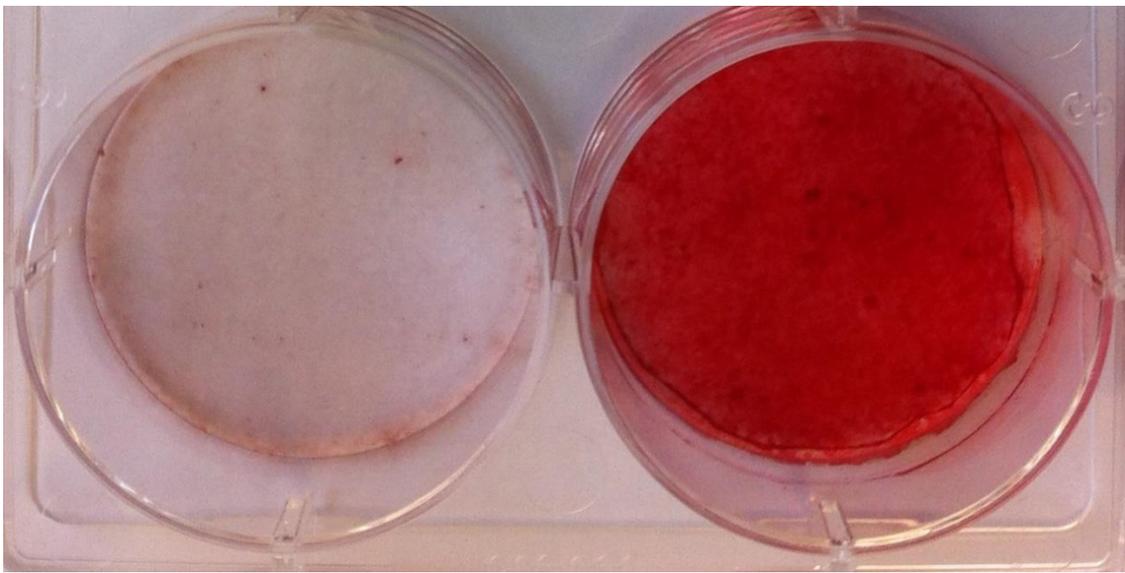


Abbildung 9: Bestätigung der osteogenen Mineralisierung mittels Alizarinrotfärbung

Links: MSC, behandelt mit Stammzellmedium. Da sich keine kalziumhaltige EZM ausgebildet hat, kann sich der Farbstoff nicht binden. Rechts: Mit Differenzierungsmedium behandelte und zu Osteoblasten differenzierte MSC. Der rote Farbstoff bindet an Strukturen der EZM, was eine Rotfärbung zur Folge hat. Die Zellen wurden 14 Tage im entsprechenden Medium gehalten, bevor die Färbung nach Protokoll erfolgte.

Um zunächst die Auswirkungen der Differenzierung auf die Basalaktivität der Zellen zu untersuchen, wurden im Western-Blot unbehandelte MSC und Osteoblasten gegenübergestellt (Abbildung 10 A). Hierbei kann man erkennen, dass die Basalaktivierung durch die Differenzierung nicht gänzlich verhindert werden konnte, jedoch eine Verminderung zu sehen ist. Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine Zoledronat-induzierte Erk5-Aktivierung auch in Osteoblasten erfolgt. Die differenzierten Zellen wurden mit 100 μ M Zoledronat stimuliert und nach 24 Stunden geerntet. Der P-Erk5-*Shift* ist deutlich zu erkennen (Abbildung 10 B).

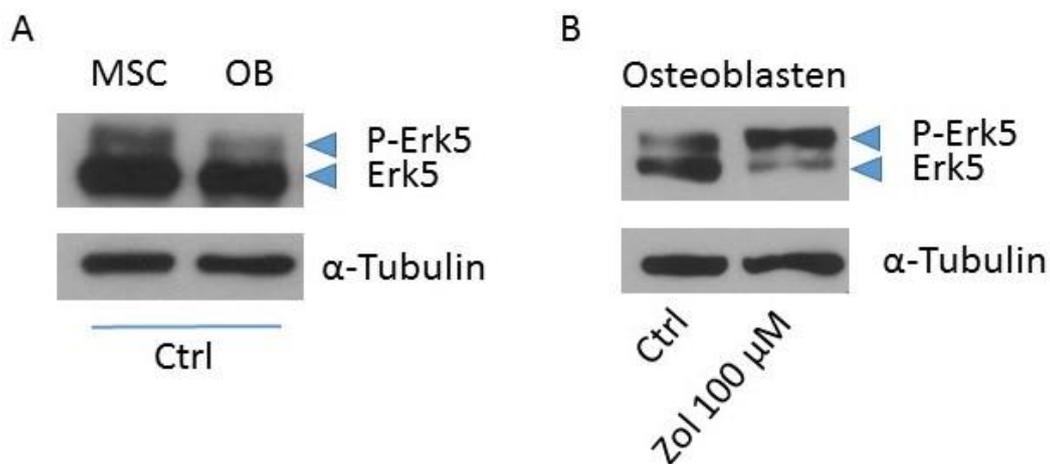


Abbildung 10: Verminderte Basalaktivität und Erk5-Aktivierung in OB

A) Im Vergleich der unbehandelten MSC mit den zu Osteoblasten (OB) differenzierten Zellen ist zwar noch immer eine Basalaktivität erkennbar, jedoch ist diese bei den differenzierten Zellen abgeschwächt. B) Auch in OB ist ein deutlicher Shift zur phosphorylierten Erk5-Bande erkennbar. Die Kinase kann demnach auch in den differenzierten Zellen aktiviert werden. Die Stimulation der Zellen erfolgte mit 100 μ M Zoledronat für 24 Stunden. Die Versuche sind repräsentativ für $n = 1$ (A) bzw. $n = 2$ (B) Versuche, als Ladekontrolle diente Tubulin.

In der Zusammenschau der Ergebnisse wird deutlich, dass Erk5 durch das am stärksten wirkende Bisphosphonat Zoledronat sowohl in Endothelzellen, als auch in Osteoblasten und deren Vorläuferzellen aktiviert wird. Die erste Hypothese der Arbeit konnte damit bestätigt werden. Zudem wurde die Problematik der Basalaktivierung in Stammzellen erkennbar, welche durch eine erfolgreiche Differenzierung der Zellen zu Osteoblasten gemindert werden konnte.

4.1.3 Nachweis der Erk5-Aktivierung mittels Inhibitor-Versuch

Um sicherzustellen, dass es sich bei der durch Zoledronat hervorgerufenen Phosphorylierung um die Aktivierung von Erk5 handelt, wurde versucht, mittels eines spezifischen Inhibitors für Erk5, XMD8-92, die Aktivität der Kinase zu hemmen und damit die von Zoledronat hervorgerufene Phosphorylierung zu unterbinden. Die Zoledronat-Stimulation wurde mit 100 μ M durchgeführt und die Lyse der Zellen erfolgte nach 32 Stunden. Die Ergebnisse im Western-Blot zeigen, dass eine durch Zoledronat hervorgerufene Erk5-Aktivierung durch XMD8-92 verhindert wird. Um den Inhibitionserfolg auch funktionell auf RNA-Ebene darzustellen, wurden die Erk5-abhängigen Gene KLF2 und KLF4 mittels *Real-Time*-PCR quantifiziert (Abbildung 11). In der vorliegenden Grafik sind jeweils vier Versuche für KLF2 und KLF4 zusammengefasst. Im Vergleich zur Negativkontrolle zeigt die Positivkontrolle eine starke Aktivierung von KLF2 mit einer durchschnittlich knapp 20-fachen und von KLF4 mit einer fast 70-fachen Induktion. Beide Positivkontrollen weisen Signifikanz auf und sind ein weiterer Beleg für die Zoledronat-induzierte Erk5-Aktivierung. Dass die Induktion der Erk5-abhängigen Gene durch den Inhibitor XMD8-92 unterbunden wird, unterstreicht die entscheidende Rolle von Erk5 in der Signaltransduktion für die Expression dieser Gene. Die reine Inhibitor-Inkubation zeigt keinen auffälligen Effekt auf RNA-Ebene. Verglichen mit der Positivkontrolle, weisen die mit XMD8-92 behandelten Zellen sowohl für KLF2, als auch für KLF4 Signifikanz auf.

Durch die Inhibition von Erk5 mittels XMD8-92 konnten wir sicherstellen, dass es sich bei der durch Zoledronat aktivierten Bande tatsächlich um phosphoryliertes Erk5 handelt.

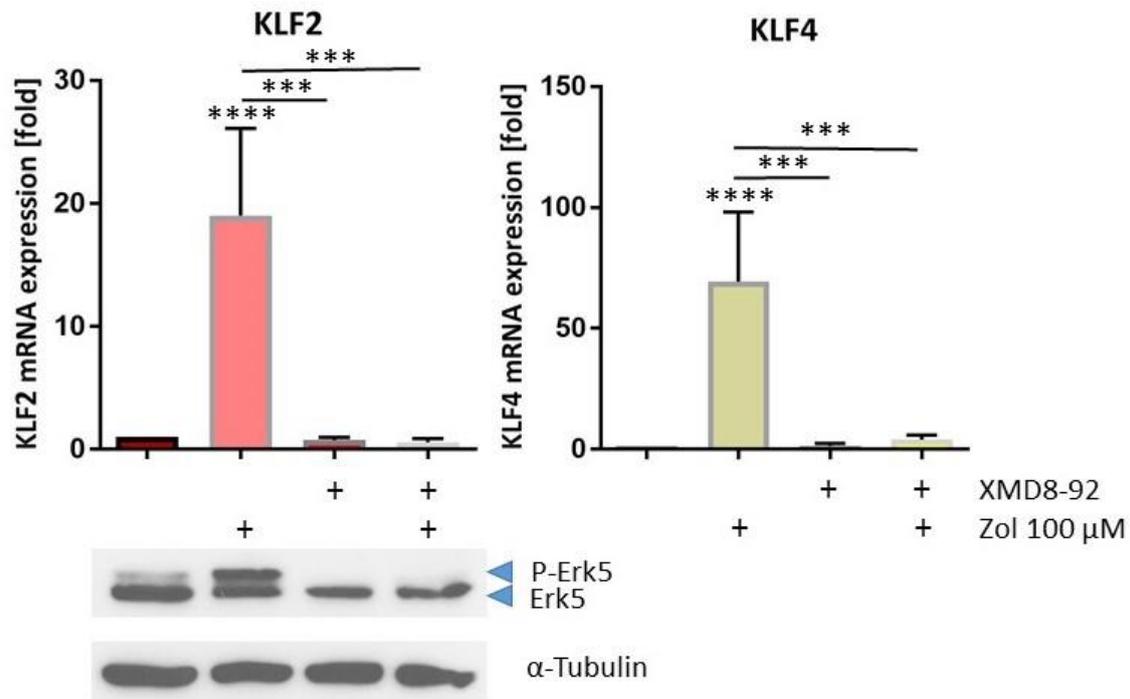


Abbildung 11: Bestätigung der Zoledronat-induzierten Erk5-Aktivierung

Die durch Zoledronat (Zol) hervorgerufene Erk5-Aktivierung konnte erfolgreich mit Hilfe des Erk5-Inhibitors XMD8-92 unterdrückt werden. Die Ergebnisse zeigen die Induktion und XMD8-92-vermittelte Repression der Zol-abhängigen mRNA-Expression der Erk5-abhängigen Gene KLF2 und KLF4 nach 32 Stunden Stimulation. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SD von $n = 4$ unabhängigen qRT-PCR Experimenten. Die statistische Analyse erfolgte mittels Einweg-ANOVA und Multiplizitätskorrektur nach Dunnett. Auch im Western-Blot konnte die Zol-induzierte Erk5-Phosphorylierung sowie die Repression durch XMD8-92 bestätigt werden. Der Western-Blot steht stellvertretend für $n = 2$ unabhängige Experimente.

4.1.4 Vergleich der Erk5-Aktivierung zwischen kontinuierlicher und diskontinuierlicher Bisphosphonat-Stimulation

Da nicht nur die Konzentrationsunterschiede der Bisphosphonate, sondern auch die Dauer der Exposition eine Rolle für die Aktivierung von Erk5 spielen, wurden zwei Zeitversuche unternommen. Dafür stimulierte man HUVEC mit 100 μ M Zoledronat, wobei in einem Zeitversuch nach drei Stunden das mit Bisphosphonat versetzte Medium wieder abgesaugt und durch reines Nährmedium ersetzt wurde. Dieser Versuchsaufbau soll die therapeutische Bisphosphonat-Gabe nachahmen, welche pulsatil verabreicht wird. Bei dem zu vergleichenden Zeitversuch hingegen blieb Zoledronat – wie auch in den vorherigen Versuchen gehandhabt – bis zum Zeitpunkt der Lyse auf den Zellen. Für die Zeitversuche gab es zwei Kontrollen, nach einer Stunde und nach 48 Stunden. Von den dauerhaft stimulierten Zellen wurden zwei Lysate nach einer und nach zwei

Stunden genommen, nach vier, acht, 16, 24 und 48 Stunden wurden parallel die Zellen von dem Versuch mit kontinuierlicher und dem mit Kurzzeit-Stimulation geerntet. Betrachtet man nun die Erk5-Phosphorylierungsbanden im Western-Blot, so kann man ab acht Stunden nach Stimulation bei beiden Versuchen eine Erk5-Aktivierung erkennen. Diese ist bei dem Versuch mit kontinuierlicher Stimulation jedoch etwas stärker ausgeprägt als bei der dreistündigen Stimulation. Nach 16 Stunden ist bei beiden Versuchen eine etwa gleich starke Bande zu sehen, jedoch unterscheiden sich die Phosphorylierungen in den späteren Zeitpunkten deutlich: Während bei der kontinuierlichen Stimulation der *Shift* bis zu 48 Stunden in ähnlich starker Ausprägung erhalten bleibt, kann man die Erk5-Aktivierung bei der dreistündigen Stimulation bereits nach 24 Stunden kaum noch erkennen (siehe Abbildung 12). Aufgrund dieser Tatsache wurden die Zellen in den folgenden Versuchen mit der kontinuierlichen Methode behandelt.

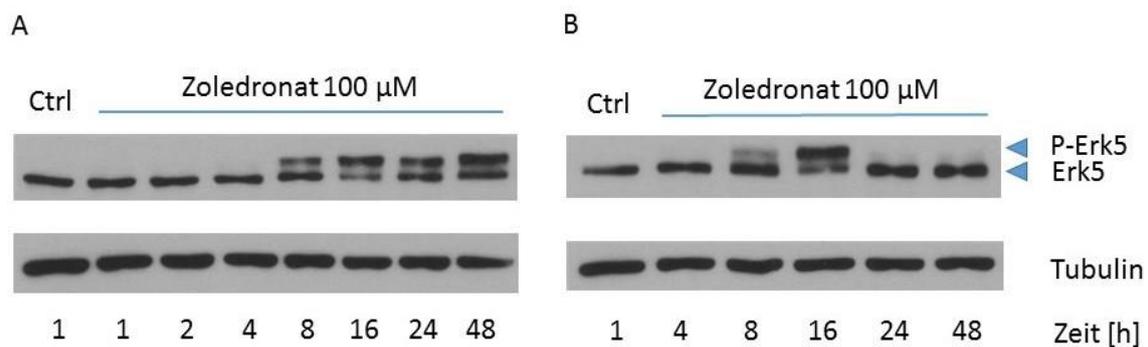


Abbildung 12: Vergleich der kontinuierlichen zur diskontinuierlichen Zol-Stimulation
Bei der kontinuierlichen Stimulation bleibt die Erk5-Phosphorylierung bis zu späten Lyse-Zeitpunkten erhalten (A). Wird Zoledronat nach einer dreistündigen Stimulation wieder entfernt, lässt die Wirkung nach etwa 24 Stunden wieder nach (B). Die Zellen wurden mit 100 µM Zol stimuliert, nach den jeweiligen Zeitpunkten lysiert und der Proteinüberstand im Western-Blot eingesetzt. Die Ergebnisse stehen für n = 2 (A) bzw. n = 1 (B) Experimente.

4.2 Aktivierung von Erk5 durch *Knock-down* von FDPS und Cdc42

Die FDPS wird von stickstoffhaltigen Bisphosphonaten gehemmt, was für die Aktivierung von Erk5 von Bedeutung zu sein scheint. Der Funktionsverlust des Enzyms führt zur fehlenden Prenylierung kleiner G-Proteine, zu denen unter anderem Cdc42 zählt. Im Folgenden wurde daher untersucht, wie sich ein durch *Knock-down* hervorgerufener Funktionsverlust der genannten Proteine auf die Aktivierung von Erk5 auswirkt.

4.2.1 Aktivierung von Erk5 durch FDPS *Knock-down*

Stickstoffhaltige Bisphosphonate wie Zoledronat hemmen die FDPS und können Erk5 aktivieren. Daher sollte untersucht werden, ob eine Inaktivierung des Gens durch siFDPS *Knock-down* ebenfalls einen aktivierenden Effekt auf Erk5 zur Folge hat.

Für den Versuch wurden zunächst HUVEC mit verschiedenen siRNAs gegen FDPS transfiziert. Die Auswahl der passenden siRNA stellt einen entscheidenden Faktor für den Erfolg des *Knock-downs* dar. Von den getesteten siRNAs kristallisierten sich zwei heraus, gekennzeichnet als siFDPS#8 und #10, die signifikant einen sehr guten *Knock-down* aufwiesen und für die folgenden Versuche als *Pool* eingesetzt wurden. Ein weiterer wichtiger Faktor für den Erfolg der Genausschaltung ist der optimale Zeitpunkt des Erntens. Da nicht genau bekannt ist, nach welcher Zeitspanne die transfizierten siRNAs mit den Genprodukten intervenieren, wurde ein Zeitversuch durchgeführt, bei dem nach 24, 48, 72 und 96 Stunden die Zellen lysiert wurden. Dieser Versuch wurde zudem doppelt angelegt, um sowohl RNA- als auch Protein-Lysate herstellen zu können. In drei unabhängigen Versuchen konnte hierbei ein hoch signifikanter *Knock-down* der FDPS gezeigt werden, welcher nach 24 Stunden mit durchschnittlich 80 % am stärksten ausgeprägt ist. Da auf RNA-Ebene der Erfolg der FDPS-Ausschaltung bestätigt werden konnte, sollte dieser nun auch auf Proteinebene gezeigt werden. Im Zeitversuch ist hierbei zu erkennen, dass es zu einem Verlust der Phosphorylierung der FDPS bei den siFDPS-transfizierten Zellen kommt, welche bei den Kontrollen noch vorhanden ist. Dieses Ergebnis spricht für einen Funktionsverlust der FDPS und damit für einen erfolgreichen *Knock-down* auch auf Proteinebene (siehe Abbildung 13).

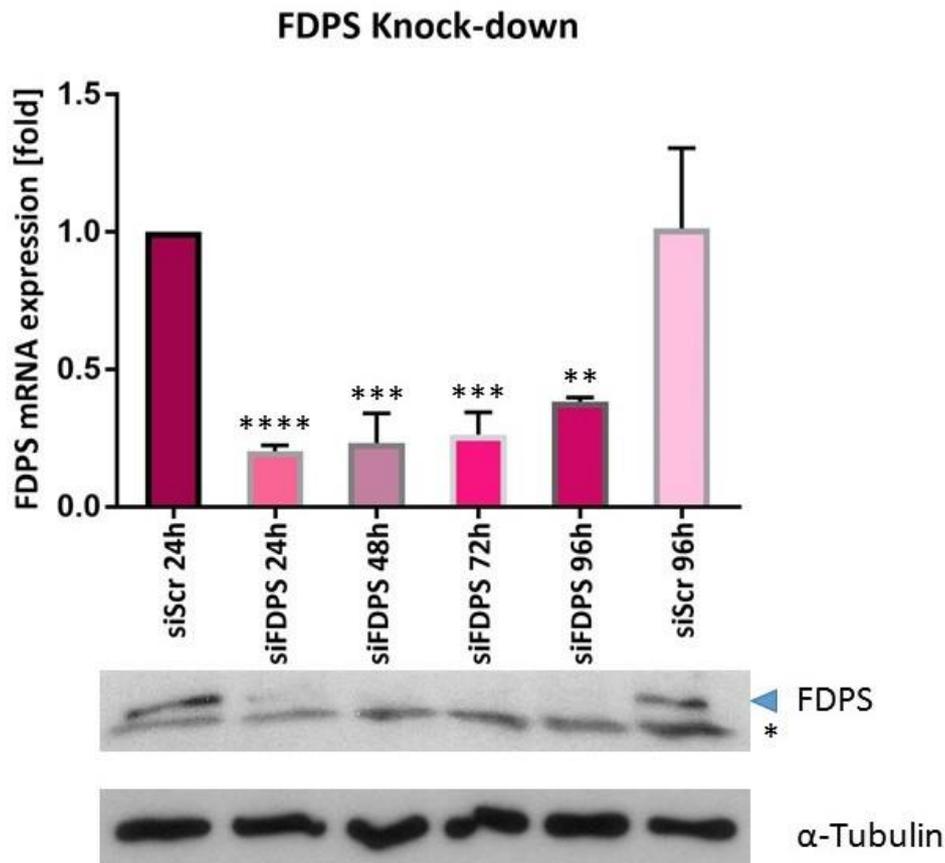


Abbildung 13: *FDPS* Knock-down in der qPCR sowie im Western-Blot
Mittels *siFDPS* konnte die Aktivität der Synthese signifikant herabreguliert werden, was nicht nur in der qRT-PCR, sondern auch im Western-Blot bestätigt werden konnte. Bei beiden Kontrollen (*siScrambled*, kurz *siScr*) nach 24 sowie nach 96 Stunden ist die *FDPS* auf Proteinebene anhand einer Bande bei ca. 40 kDa erkennbar. Durch den Knock-down kommt es jedoch zu einem Verlust dieser Bande und damit der Synthese, was auch in der qPCR signifikant für alle Zeitpunkte gezeigt werden konnte. Die Ergebnisse der qRT-PCR beruhen auf $n = 3$ unabhängigen Experimenten, der Western-Blot repräsentiert ein einmaliges Experiment. Die Bande unterhalb von *FDPS* wurde als unspezifisch gewertet (*). Die statistische Analyse der qRT-PCR-Daten erfolgte mittels Einweg-ANOVA und Multiplizitätskorrektur nach Dunnett. Der *FDPS* Knock-down ist zu allen Zeitpunkten signifikant.

Nun stellte sich die Frage, ob - analog zu stickstoffhaltigen Bisphosphonaten - durch den mit *siRNA* herbeigeführten *FDPS* *Knock-down* ebenfalls eine Erk5-Aktivierung hervorgerufen werden kann. Dieser Frage wurde zunächst auf RNA-Ebene nachgegangen, indem der *FDPS* *Knock-down* in Hinblick auf die Aktivierung der Erk5-abhängigen Gene *KLF2* und *KLF4* untersucht wurde. Die Expression von *KLF4* zeigte sich hierbei variabel und ohne Signifikanz (nicht gezeigt). Jedoch konnte eine signifikante Induktion von *KLF2* im Vergleich von vier Experimenten festgestellt werden. Auch mittels Western-Blot sollte untersucht werden, ob durch *FDPS* *Knock-down* eine Erk5-

Aktivierung nachgewiesen werden konnte. Tatsächlich ließ sich nach 24-stündigem *Knock-down* eine leichte Phosphorylierung erkennen (siehe Abbildung 14).

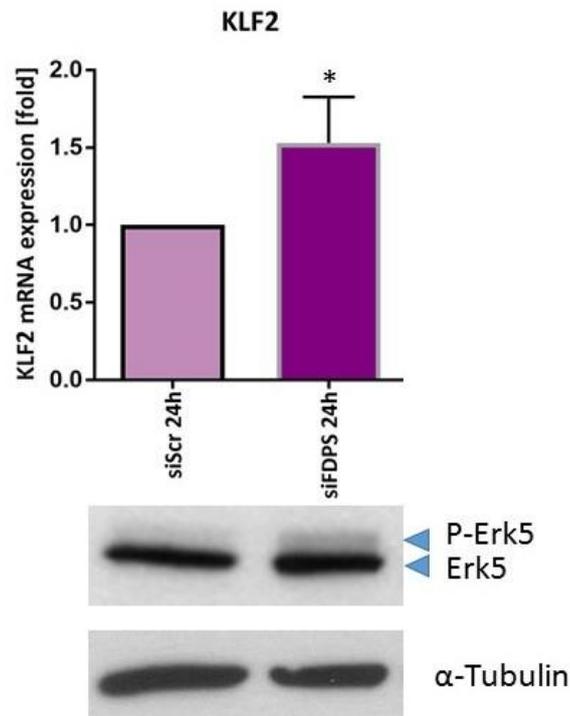


Abbildung 14: *KLF2*-Induktion und *Erk5*-Aktivierung durch *FDPS* *Knock-down*
 Durch Herabregulierung der *FDPS* kann das *Erk5*-abhängige Gen *KLF2* induziert werden (qPCR-Ergebnisse). Auch auf Proteinebene konnte eine Aktivierung von *Erk5* gezeigt werden (Western-Blot, repräsentativ für $n = 3$ unabhängige Experimente). Der *Knock-down* erfolgte für 24 Stunden, bevor die Zellen lysiert wurden. Die statistische Analyse qRT-PCR-Ergebnisse beruht auf $n = 4$ unabhängigen Experimenten und wurde mittels One-Sample T-Test berechnet.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Inaktivierung der *FDPS* durch siRNA-Transfektion bei sehr guter *Knock-down*-Qualität eine Aktivierung von *Erk5* sowohl auf RNA, als auch auf Proteinebene hervorrufen konnte.

4.2.2 Aktivierung von *Erk5* durch *Cdc42* *Knock-down*

Durch die Inaktivierung der *FDPS* durch N-BP fehlt die Prenylierung von kleinen G-Proteinen wie *Cdc42*, wodurch diese nicht mehr aktiviert werden können. Daher sollten die Auswirkungen einer siRNA-vermittelten *Cdc42*-Inaktivierung auf *Erk5* untersucht werden. In folgenden Versuchen wurde zunächst die Qualität der zum *Knock-down* eingesetzten siRNAs getestet und im Anschluss die Auswirkungen auf *Erk5* sowie *Erk5*-

abhängige Zielgenexpression (KLF2 und KLF4) analysiert. Die Lyse der Zellen erfolgte nach 72 Stunden.

Um den optimalen *Knock-down* zu eruieren, wurden zunächst vier verschiedene siRNAs getestet. Aufgrund unterschiedlich guter *Knock-down*-Ergebnisse entschieden wir uns für einen *Pool* aus siCdc42#15 und #17, mit dem ein hoch signifikanter *Knock-down* gezeigt werden konnte, wie in Abbildung 15 zu erkennen ist. Bei der Expressionsanalyse der Erk5-abhängigen Gene KLF2 und KLF4 ergab sich eine Induktion beider Gene, welche sich in n = 4 Versuchen bei KLF2 im Mittel auf etwa zehnfach, bei KLF4 auf knapp dreifach belief. Auch mittels Western-Blot wurde die Auswirkung der Ausschaltung von Cdc42 auf Erk5 untersucht. Hierbei konnte eine Phosphorylierung der Kinase gezeigt werden, wie in Abbildung 15 zu erkennen ist. Es konnte somit bestätigt werden, dass die Inaktivierung von Cdc42 eine Aktivierung von Erk5 hervorruft.

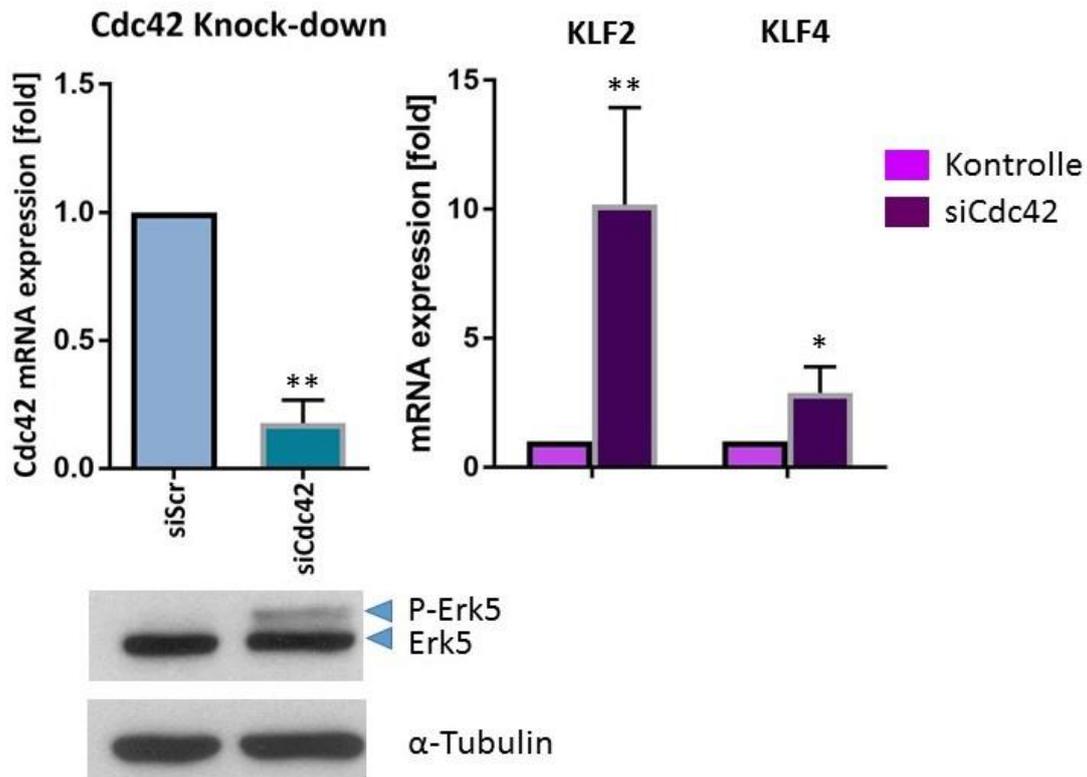


Abbildung 15: Auswirkung des Cdc42 KD auf Aktivierung von Erk5 und KLF2/4
 Der effiziente und signifikante Knock-down des kleinen G-Proteins Cdc42 führt sowohl zu einer Aktivierung von Erk5 (siehe Western-Blot, repräsentativ für $n = 2$ Experimente) als auch zu einer Induktion der Erk5-abhängigen Gene KLF2 und KLF4. Der Knock-down erfolgte für 72 Stunden, bevor die Zellen lysiert wurden. Die statistische Analyse der qRT-PCR-Ergebnisse erfolgte für $n = 4$ unabhängige Experimente mittels One-Sample T-Test (Knock-down) bzw. multiple T-Tests (Induktion von KLF2 und KLF4). Alle Werte weisen im Vergleich zur Kontrolle Signifikanz auf.

4.3 Induktion knochenrelevanter Gene durch Erk5-Aktivierung

In früheren Versuchen konnte unsere Arbeitsgruppe mit Hilfe von *Microarray*-Analysen zeigen, dass durch konstitutive Erk5-Expression in MEK5D-infizierten HUVEC zahlreiche Gene induziert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die detektierten Gene mit den Datenbanken *Genecards* und *NCBI Gene* sowie Pubmed auf ihre Bedeutung im Knochenstoffwechsel untersucht. Hierbei identifizierten wir PTHLH, INPP4B, FGFR3 und FOSL1 als proteincodierende Gene, die eine besondere Rolle in der Knochenhomöostase spielen und auf beeinflussende Faktoren untersucht worden sind (siehe Tabelle 14).

Tabelle 14: Funktion der im Array hochregulierten Gene im Knochenstoffwechsel
PTHLH, *INPP4B*, *FGFR3* und *FOSL1* mit Zusammenfassung ihrer wichtigsten Funktionen (Quelle: NCBI Entrez Gene Geninformation) im Knochenstoffwechsel. *x-up* steht für den Faktor der Induktion der im Array hochregulierten Gene.

Gen	x-up	Funktion im (Knochen-) Stoffwechsel
PTHLH	10,58	Das durch dieses Gen kodierte Protein reguliert Zellwachstum, -differenzierung, -migration und -überleben. Es spielt zudem eine Rolle im epithelialen Kalziumtransport und ist oft Auslöser der malignen Hyperkalzämie. Des Weiteren gilt PTHLH als Regulator der endochondralen Knochenentwicklung und ist ein wirkungsvoller Inhibitor der durch Osteoklasten hervorgerufenen Knochenresorption. Eine durch Mutationen dieses Gens hervorgerufene Erkrankung ist die Brachydaktylie Typ E und E2.
INPP4B	2,56	INPP4B kodiert eine Phosphatase, die eine Rolle im Phosphatidylinositol-Signalweg spielt. INPP4B reguliert negativ die Osteoklastogenese: Die Abwesenheit des Proteins wirkt stimulierend auf das Kalziumsignal und den Transkriptionsfaktor NFATC1 in Osteoklasten. Zudem konnte in <i>Knock-out</i> - Mäusen eine gesteigerte Osteoklastendifferenzierung mit folglich verminderter Knochenmasse beobachtet werden. In Genanalysen konnte weiterhin eine Genlokalisierung auf Chromosom 4 des Menschen gefunden werden, die in Verbindung mit Knochendichte steht.
FGFR3	2,24	FGFR3 kodiert eine Tyrosinkinase, die als Zelloberflächenrezeptor für Fibroblasten-Wachstumsfaktoren dient. Das Gen ist wichtig für Knorpel- und Knochenentwicklung und spielt zudem eine Rolle für Zellproliferation, Differenzierung und Apoptose sowie den Vitamin D-Metabolismus. Mutationen führen zu Kraniosynostose und verschiedenen Formen von Skelettdysplasie.
FOSL1	2,65	FOSL1, auch bekannt als Fra1, kodiert ein Protein, das als Transkriptionsfaktor Zellproliferation, -differenzierung und -transformation reguliert und wirkt u. a. über den MAPK-Signalweg. <i>Knock-out</i> -Mäuse leiden unter Osteopenie und reduzierter Knochenbildung, was die Bedeutung dieses Gens für den Knochenmetabolismus hervorhebt.

4.3.1 Geninduktion in MEK5D-infizierten HUVEC

MEK5D ist ein Aktivator von Erk5 und induziert nach Infektion eine kontinuierliche Erk5-Expression. Auf diese Weise können Erk5-abhängige Gene detektiert und die Ergebnisse

der *Microarray*-Analysen nachvollzogen werden. Die Versuche wurden mittels *Real-Time*-PCR durchgeführt. Schließlich konnte gezeigt werden, dass alle Gene durch kontinuierliche Erk5-Aktivierung vermehrt exprimiert werden und PTHLH sowie INPP4B dabei Signifikanz aufweisen (Abbildung 16). Die Ergebnisse beruhen auf der Auswertung von sechs unabhängigen Experimenten.

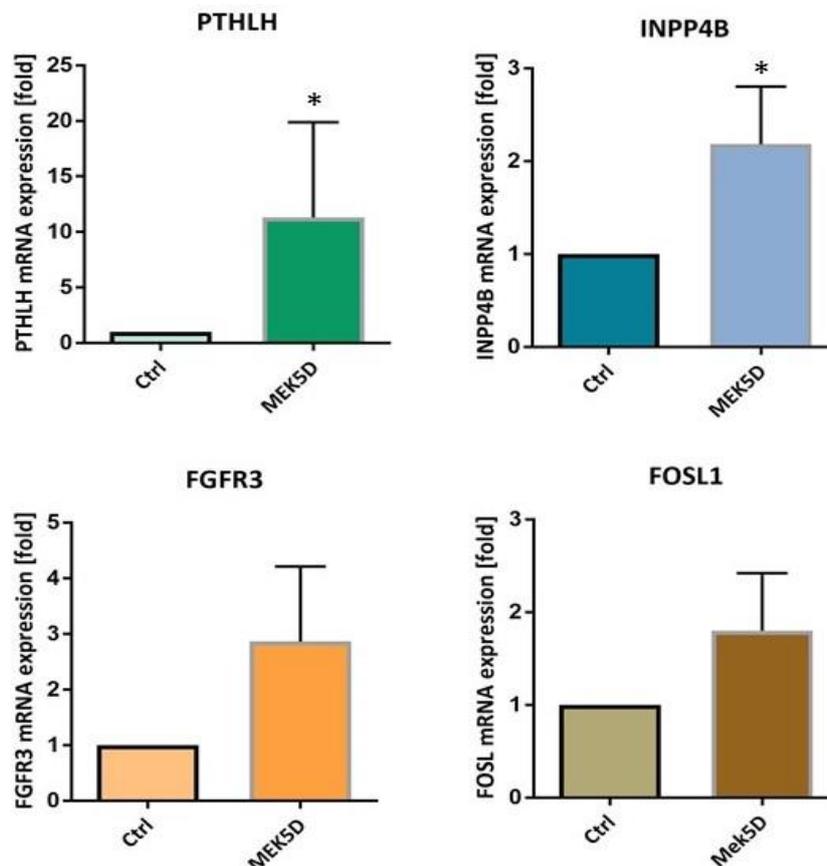


Abbildung 16: Geninduktion in MEK5D-infizierten HUVEC

Die Gene PTHLH, INPP4B, FGFR3 und FOSL1 konnten durch MEK5D-infizierte HUVEC aktiviert werden. Damit konnten die Ergebnisse der *Microarray*-Analysen bestätigt werden. Die statistische Analyse der qRT-PCR Ergebnisse erfolgte anhand von $n = 6$ unabhängigen Experimenten mittels *One-Sample T-Test* und weist für PTHLH sowie INPP4B Signifikanz auf.

4.3.2 Geninduktion durch Erk5-aktivierende Bisphosphonate

Nachdem die Genexpression mittels MEK5D-infizierter HUVEC gezeigt werden konnte, stellte sich die zentrale Frage, ob auch durch Erk5-aktivierende Bisphosphonate eine entsprechende Induktion hervorgerufen werden kann. Um zudem den optimalen Zeitpunkt der Induktion herauszufinden, wurden Zeitversuche angelegt, bei denen mit Zoledronat stimulierte HUVEC nach acht, 16, 24 und 48 Stunden geerntet wurden. Zwei

Kontrollen wurden nach acht und nach 48 Stunden lysiert. Auch verschiedene Zoledronatkonzentrationen mit 50 μM und 100 μM sowie die Gegenüberstellung der kontinuierlichen und der diskontinuierlichen Bisphosphonatexposition wurden getestet. Die Ergebnisse der Zeitversuche mit 50 μM bzw. 100 μM Zoledronat ergaben insgesamt ähnliche Werte, jedoch fielen die Induktionen der Gene bei mit 100 μM Zoledronat stimulierten Zellen etwas stärker aus als bei der Stimulation mit 50 μM und zeigten zudem eine höhere Stabilität (Daten mit 100 μM -Stimulation aus $n = 3$ Experimenten siehe Abbildung 17, Daten der 50 μM -Stimulation nicht gezeigt). Auch im Vergleich der kontinuierlichen Stimulation der Zellen mit 100 μM Zoledronat mit der dreistündigen Stimulation wurden ähnliche Ergebnisse festgestellt. Die Stärke der Geninduktion bei diskontinuierlicher Stimulation fiel insgesamt etwas schwächer aus und ließ nach längerer Stimulationsdauer nach (Daten nicht gezeigt).

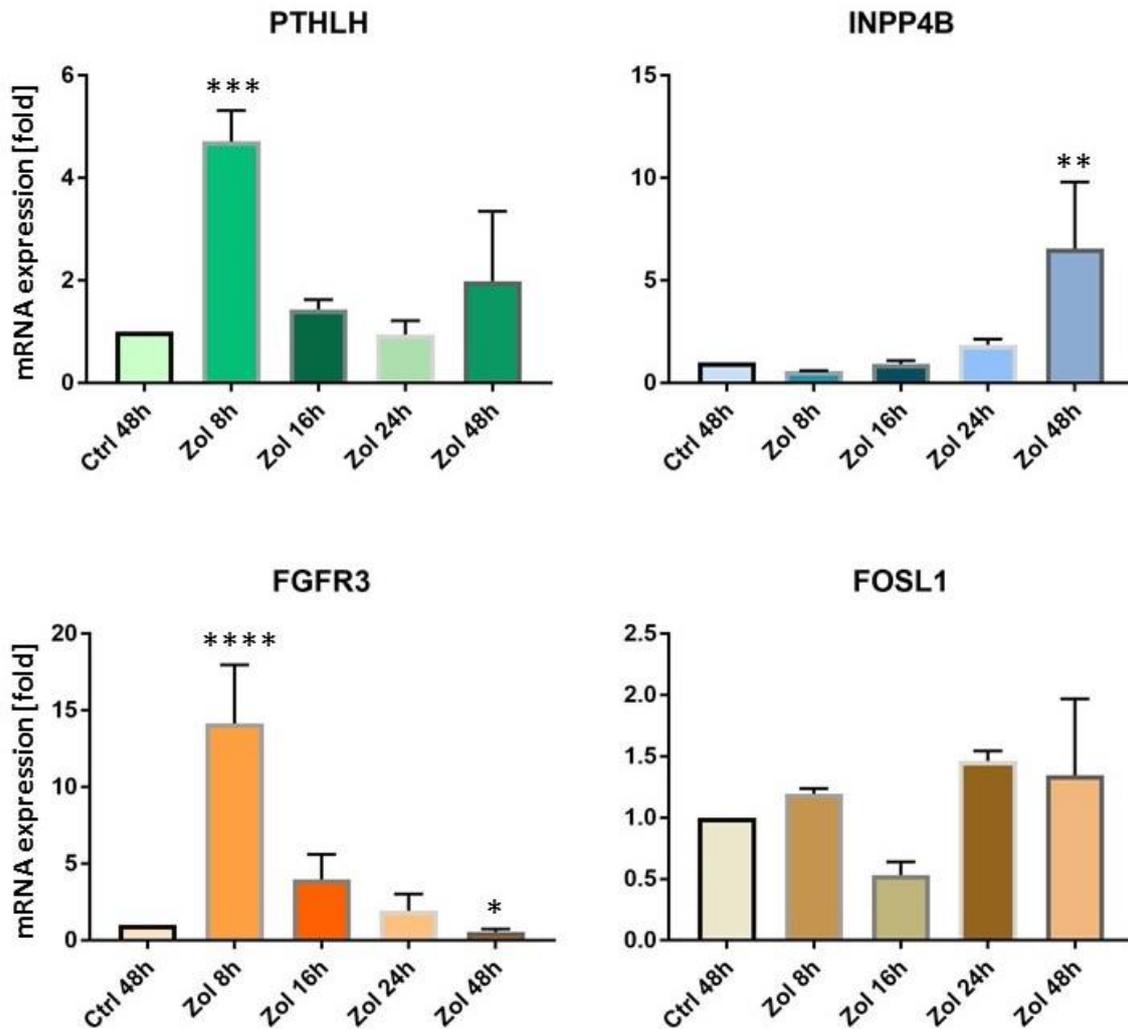


Abbildung 17: Zoledronat-assoziierte Induktion der Gene im Zeitverlauf

Die Expressionen der Gene PTHLH, INPP4B, FGFR3 und FOSL1 wurden anhand von $n = 3$ unabhängigen Experimenten ermittelt und mittels Einweg-ANOVA gegen die 48 Stunden-Kontrolle gerechnet. Die Multiplizitätskorrektur erfolgte nach Dunnett. Die Induktion der Gene fällt dabei sehr unterschiedlich aus und zeigt bei PTHLH und FGFR3 ein frühes Maximum, bei INPP4B einen Peak nach 48 Stunden und bei FOSL1 keine starken Veränderungen.

Betrachtet man Abbildung 17, so kann man für die verschiedenen Gene unterschiedliche Verläufe beobachten: Bei PTHLH gibt es nach acht Stunden einen *Peak*, wobei die Expression bis zum 24-Stundenwert stark abnimmt, um danach wieder leicht anzusteigen. INPP4B verhält sich dem gegenüber anders. Die Expression steigt kontinuierlich an und erreicht nach 48 Stunden den höchsten Wert. Die Induktion von FGFR3 im Zeitverlauf ist wiederum PTHLH ähnlich, doch ist in diesem Fall kein Anstieg nach 48 Stunden zu erkennen. FOSL1 zeigt insgesamt keine starke Reaktion auf

Zoledronat, die Werte sinken nach acht Stunden ab, steigen nach 24 Stunden aber wieder leicht an.

Die stark erhöhte Expression mancher Gene zu frühen Zeitpunkten ist erstaunlich. Aufgrund starker Abweichungen wurden in Abbildung 17 nur die 48 Stunden-Kontrollen verwendet und die acht Stunden-Kontrollen nicht berücksichtigt. Es stellte sich die Frage, ob eine Seruminduktion ursächlich sein könnte. Zur Klärung dieser Frage wurde im Zuge des diskontinuierlichen Zeitversuchs in einem Einzelexperiment eine weitere Kontrolle nach acht Stunden lysiert, bei der parallel zur Stimulation der anderen Kulturen mit Bisphosphonaten kein Mediumwechsel stattgefunden hatte. Auffällig war bei diesem Versuch, dass die Werte der Kontrollen, die zeitgleich nach acht Stunden geerntet, aber einmal mit und einmal ohne Mediumwechsel behandelt wurden, stark voneinander abwichen. Die Werte der Kontrollen ohne Mediumwechsel ähnelten dabei den 48 Stunden-Kontrollwerten. Nur auf INPP4B scheint der Effekt des Mediums weniger Einfluss zu nehmen, da sich die Kontrollwerte nach acht und nach 48 Stunden nur geringfügig voneinander unterscheiden (Abbildung 18).

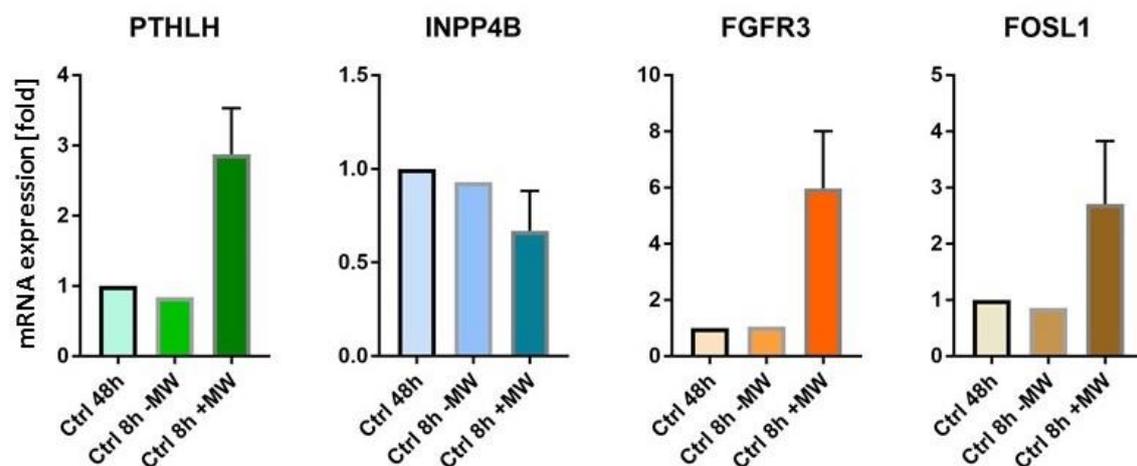


Abbildung 18: Auswirkung der unterschiedlichen Kontrollen auf die Genexpression
 Vergleicht man die beiden acht Stunden-Kontrollen mit der 48 Stunden-Kontrolle, wird deutlich, dass bei PTHLH, FGFR3 und FOSL1 allein der Wechsel des Mediums einen Effekt auf die Geninduktion zu haben scheint: Während die acht Stunden-Kontrollen ohne Mediumwechsel (-MW) den 48 Stunden-Kontrollen in etwa entsprechen, zeigen die acht Stunden-Kontrollen mit Mediumwechsel (+MW) bei den genannten Genen eine deutliche Induktion. Nur für INPP4B ist keine Medium-assoziierte Induktion zu verzeichnen. Die statistische Analyse der Daten repräsentiert $n = 1 - 3$ unabhängige Experimente und erfolgte mittels Einweg-ANOVA mit Dunnett-Korrektur.

Aufgrund der vermuteten Medium-assoziierten Induktion wurden die 48 Stunden-Kontrollen als verlässlichere Bezugsgröße angesehen. Um den Effekt von Zoledronat auf die Induktion der Gene PTHLH, INPP4B, FGFR3 und FOSL1 ohne den Effekt des Mediums noch einmal deutlich zu machen, sind in Abbildung 19 die 48-Stundenwerte zusammengefasst.

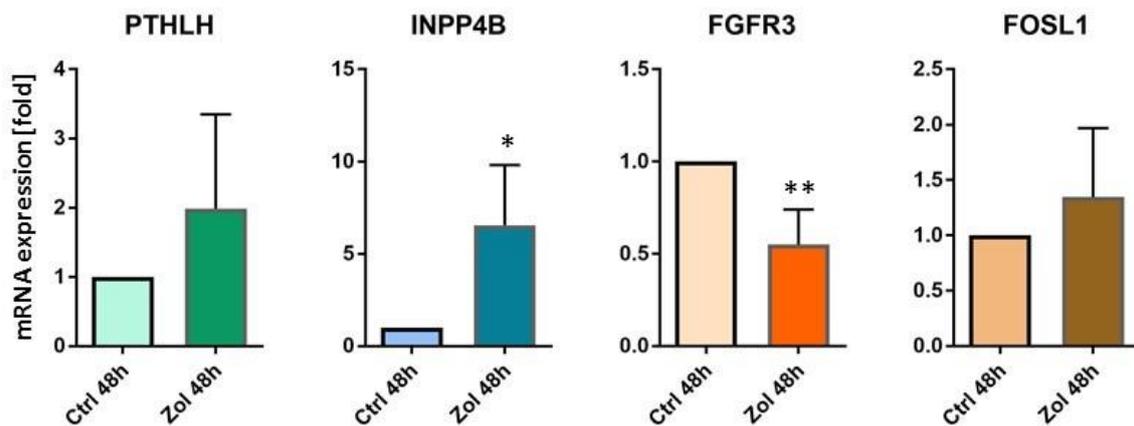


Abbildung 19: Zoledronat-induzierte Genexpression nach 48 Stunden

Da die 48-Stundenwerte als die aussagekräftigsten eingestuft werden, sind sie hier noch einmal zusammengefasst. Für PTHLH, INPP4B und FOSL1 kann man eine Induktion beobachten, bei FGFR3 eine leichte Repression. Die Werte von INPP4B und FGFR3 sind zudem signifikant. Die statistische Analyse erfolgte mittels One-Sample T-Test ($n = 3$).

Hierbei wird deutlich, dass nach 48 Stunden nur bei PTHLH und INPP4B eine eindeutige Induktion hervorgerufen wird, die für INPP4B signifikant ist. Aus diesem Grund wurden in den Folgeversuchen FGFR3 und FOSL1 nicht weiter berücksichtigt.

4.3.3 Bestätigung der Erk5-Abhängigkeit von INPP4B

Da INPP4B als einziges der vier Gene vom Mediumwechsel weitgehend unbeeinflusst bleibt und eine stabile Induktion bei Zoledronat-Stimulation aufweist, sollte die Erk5-Abhängigkeit des Induktionserfolgs mittels Inhibitor-Versuch bestätigt werden. Die Zoledronat-Stimulation erfolgte mit 100 μ M für 32 Stunden. Obwohl im Zeitversuch die höchste INPP4B-Induktion nach 48 Stunden gezeigt wurde, musste die Stimulationszeit aufgrund der hohen Toxizität der Kombination von XMD8-92 und Zoledronat verkürzt werden (Daten nicht gezeigt). Die Induktion von INPP4B wurde anhand von vier unabhängigen Experimenten mittels *Real-Time*-PCR-Analysen gemessen. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die durch Zoledronat hervorgerufene INPP4B-Induktion durch

Erk5-Inhibition mittels XMD8-92 verhindert wird (Abbildung 20). Auf diese Weise wurde bewiesen, dass die Induktion von INPP4B Zoledronat-induziert und Erk5-abhängig ist.

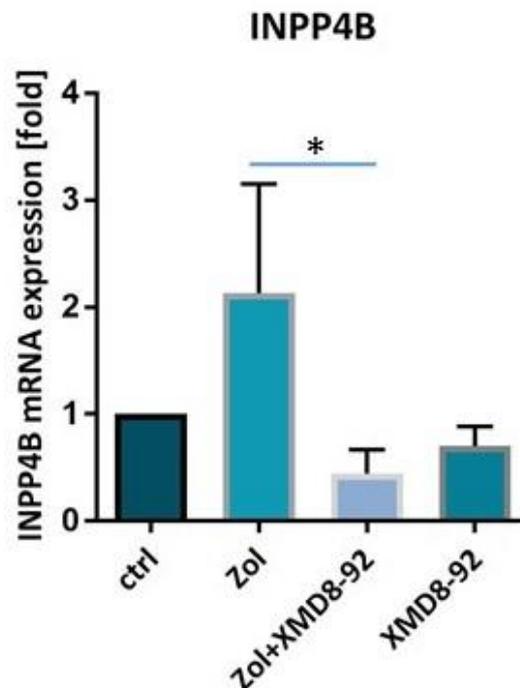


Abbildung 20: Bestätigung von INPP4B als Erk5-abhängiges Gen
INPP4B kann durch Zoledronat induziert werden. Durch den Erk5-Inhibitor XMD8-92 wird die Induktion jedoch unterbunden. Dies beweist, dass für die Induktion von INPP4B durch Zoledronat die Aktivierung von Erk5 notwendig ist. Zudem ist die durch XMD8-92 hervorgerufene Inhibition der Zoledronat-induzierten Genexpression signifikant. Die Zellen wurden 32 Stunden stimuliert. Für die statistische Analyse der $n=4$ Experimente wurde die Einweg-ANOVA mit Multiplizitätskorrektur nach Dunnett angewendet.

4.3.4 Induktion der Gene in OB und deren Vorläuferzellen

Da die mesenchymalen Stammzellen als Vorläuferzellen des Bindegewebes und der Osteoblasten einen für den Knochenstoffwechsel wichtigen Zelltyp darstellen, versuchte man durch diesen Zelltyp eine Induktion der knochenrelevanten Gene zu erreichen. Die Ergebnisse zeigten jedoch sehr variable Werte, die keine klaren Aussagen über die Induktion der Gene zuließen (Daten nicht gezeigt). Da es sich bei Stammzellen um nicht ausgereifte Zellen handelt, die in ihrer Funktion noch sehr vielseitig sind, ist eine Interpretation der Ergebnisse schwierig. Der Versuch wurde daher nach der Differenzierung der MSC zu Osteoblasten wiederholt. Die Stimulation der Zellen erfolgte mit 100 μ M Zoledronat und die Lyse nach 48 Stunden. Da PTHLH und INPP4B in den Vorversuchen am deutlichsten induziert waren, wurde in diesem Versuch ihre

Expression untersucht. Auch hier konnte für beide Gene eine deutliche Induktion hervorgerufen werden, wobei INPP4B Signifikanz aufweist. Für PTHLH wurden drei, für INPP4B vier unabhängige Experimente zusammengefasst. Somit konnte gezeigt werden, dass die Geninduktion durch Zoledronat nicht nur in Endothelzellen, sondern auch in Osteoblasten hervorgerufen werden kann (siehe Abbildung 21).

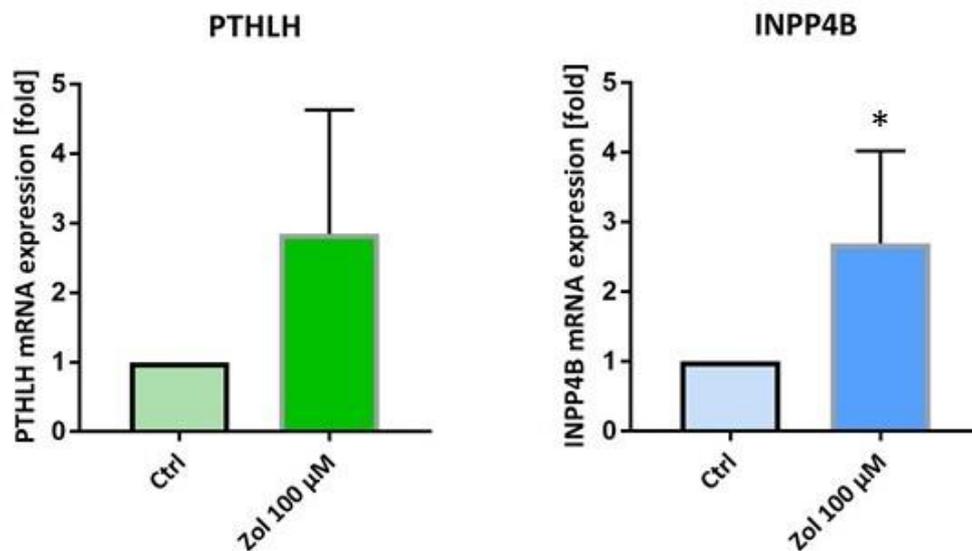


Abbildung 21: Induktion von PTHLH und INPP4B in Osteoblasten

Beide Gene sind gegenüber der Kontrolle deutlich induziert, INPP4B weist Signifikanz auf. Die Zellen wurden mit 100 µM Zoledronat stimuliert und nach 48 Stunden geerntet. Die statistische Analyse erfolgte bei $n = 3 - 4$ unabhängigen Experimenten mittels One-Sample T-Test.

5 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit konnten wir wichtige Erkenntnisse über die Wirkungsweise der Bisphosphonate gewinnen. Wir untersuchten ihren Einfluss auf den MEK5/ Erk5-Signalweg und die Bedeutung der FDPS als Zielprotein der stickstoffhaltigen Bisphosphonate sowie das kleine G-Protein Cdc42 als indirekter Aktivator von Erk5 und potenzielles Bindeglied zwischen Mevalonatstoffwechsel und MEK5/ Erk5-Signalweg. Zudem stimuliert Erk5 durch seinen Einfluss auf Transkriptionsfaktoren die Induktion zahlreicher Gene, die unter anderem bedeutend für den Knochenstoffwechsel sind und in vorliegender Arbeit auf ihre Abhängigkeit von Bisphosphonaten geprüft wurden.

Die Ergebnisse sollen zum besseren Verständnis der Wirkungsweise dieser vielseitig klinisch eingesetzten Arzneimittelgruppe beitragen und als Basis für weitere Forschung dienen.

5.1 Aktivierung des Erk5-Signalwegs durch Bisphosphonate

Die Hypothese, dass Bisphosphonate den Erk5-Signalweg aktivieren können, konnte in dieser Arbeit eindeutig bestätigt werden (siehe Kapitel 4.1). Damit wurde neben den Statinen eine weitere Medikamentengruppe identifiziert, die durch Inhibition des Mevalonatstoffwechsels eine Aktivierung des MEK5/ Erk5-Signalwegs hervorruft.

Die Aktivierung von Erk5 konnte nicht nur in Endothelzellen (Abbildung 6), sondern auch in Osteoblasten und deren Vorläuferzellen, den mesenchymalen Stammzellen, gezeigt werden (Abbildung 7 und Abbildung 10). Große Unterschiede in der Fähigkeit, Erk5 zu phosphorylieren, gab es jedoch zwischen den verschiedenen Vertretern der verwendeten Bisphosphonate.

5.1.1 Abhängigkeit der Erk5-Aktivierung von Stärke der FDPS-Inhibition

Die Phosphorylierung von Erk5 konnte zunächst im Western-Blot gezeigt werden. Hierbei fiel auf, dass das stickstoffhaltige Bisphosphonat Zoledronat in allen getesteten Zelltypen ab einer Konzentration von 50 μ M einen deutlichen *Shift* hervorrief, der für eine Phosphorylierung von Erk5 spricht. Die Stimulation mit Pamidronat führte ebenfalls zu einer Aktivierung, während die stickstofffreien Bisphosphonate Clodronat und Etidronat keinerlei Auswirkungen auf Erk5 zeigten. Diese Ergebnisse sprechen dafür,

dass das Stickstoffatom in der Struktur der Bisphosphonate für die Aktivierung des MEK5/ Erk5-Signalwegs von Bedeutung ist, die durch die höhere Affinität dieses *Compounds* zur FDPS zu begründen ist.

Doch scheint es nicht nur der Stickstoff zu sein, der für die Wirkungsunterschiede der Bisphosphonate verantwortlich ist. Auch zwischen den verschiedenen Vertretern der N-BP gibt es große Unterschiede in der Potenz der Osteoklastenhemmung. Diese reicht von 100-fach bis 20.000-fach im Gegensatz zu den stickstofffreien Vertretern, die eine 1- bis 10-fache Potenz aufweisen (Ebetino et al.) siehe Tabelle 15.

*Tabelle 15: Wirkstärke und molekulare Eigenschaften der Bisphosphonatgruppen
Die chemischen Gruppen und das Vermögen, die FDPS zu inhibieren, stehen in engem Zusammenhang mit der relativen Potenz der Bisphosphonate. Angelehnt an Bartl et al. (2008).*

Chemische Gruppe	Vertreter	Relative Potenz	Hemmung der FDPS
Non-N-BP	Etidronat,	1	Nein
	Clodronat	10	Nein
N-Amino-BP	Pamidronat	100	Ja
Am Stickstoff substituierte Amino-BP	Ibandronat	10.000	Ja
N-BP mit Heterozyklen	Zoledronat	20.000	Ja

In einer Studie von Dunford et al. (2001) konnte gezeigt werden, dass die chemische Struktur für die Fähigkeit, die FDPS zu inhibieren, von großer Bedeutung ist. Sie untersuchten verschiedene Bisphosphonate auf die Stärke der FDPS-Hemmung (Abbildung 22). Dabei zeigten Clodronat und Etidronat keinen signifikanten inhibitorischen Effekt auf das Enzym, selbst in hohen Konzentrationen. Die beiden Vertreter der ersten Generation weisen kein Stickstoffatom in ihrer Struktur auf und im Vergleich auch eine niedrige Wirkstärke. Das stickstoffhaltige Bisphosphonat Pamidronat erzeugte hingegen eine Inhibition auf ca. 60 % Restaktivität, während Zoledronat, dessen Stickstoffatom in einem Heterozyklus eingebunden ist, sogar zu einem fast vollständigen Funktionsverlust der Synthase führte. Die FDPS katalysiert die Bildung von FPP (Farnesylpyrophosphat) aus IPP (Inositolpyrophosphat) und GPP (Geranylpyrophosphat). Für das sehr potente N-BP Risendronat konnte gezeigt werden, dass es kompetitiv und nicht-kompetitiv die Bindung der Ausgangssubstrate IPP und GPP

an die FDPS hemmt, wodurch die Synthese von FPP unterbunden wird (Kavanagh et al. 2005). Ohne diesen Schritt unterbleibt die Prenylierung kleiner G-Proteine, was weitreichende Auswirkungen auf die Zellfunktionen und damit auch die Wirkung der Bisphosphonate hat.

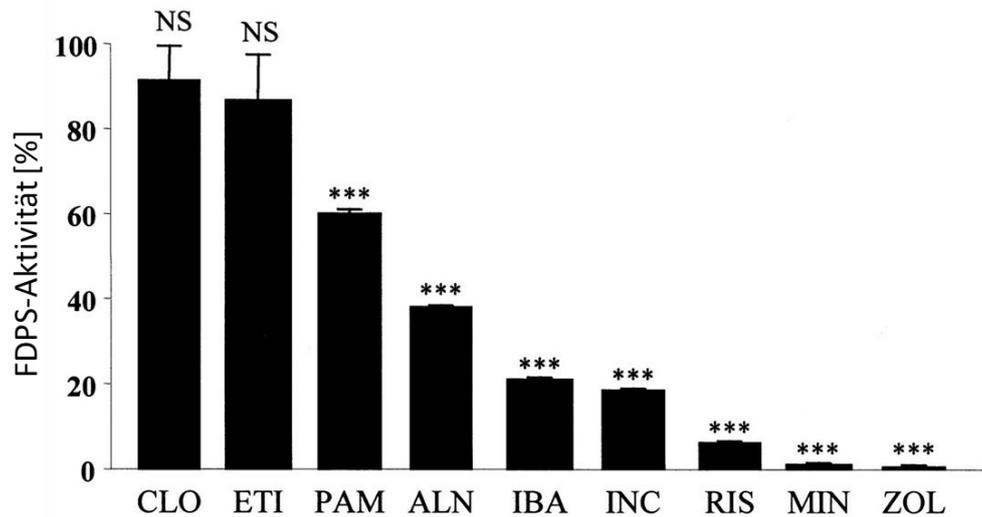


Abbildung 22: Inhibition der FDPS durch verschiedene Bisphosphonate

Die Abbildung zeigt die Syntheseaktivität der FDPS in bakteriellen Lysaten, die mit 0,1 μM BP zehn Minuten lang präinkubiert wurden, bevor [^{14}C] IPP-Enzymsubstrat zur Messung der Restaktivität hinzugegeben wurde (BP reagieren nicht mit IPP, dieses wird jedoch von der FDPS katalysiert). Clodonat (CLO) und Etidronat (ETI) sind Vertreter der non-N-BP, Pamidronat (PAM), Alendronat (ALN), Ibandronat (IBN), Incadronat (INC), Risendronat (RIS), Minodronat (MIN) und Zoledronat (ZOL) sind Vertreter der N-BP (nach Dunford et al. 2001).

Setzt man die Ergebnisse der Studie von Dunford et al. nun in Bezug zur relativen Wirkstärke der verschiedenen Bisphosphonate, kann man daraus ableiten, dass die Potenz der FDPS-Hemmung für die Wirkstärke der Bisphosphonate von großer Bedeutung ist.

Der Grund, weshalb nun gerade Zoledronat eine so starke FDPS-Inhibition hervorruft, scheint im Zusammenhang mit der Affinität des Bisphosphonats zur FDPS zu stehen. Diese wiederum ist von der chemischen Struktur der R^2 -Seitenkette abhängig. So konnte gezeigt werden, dass schon kleine Unterschiede in der Seitenkette eine Verminderung der Anziehung des Bisphosphonats zur FDPS zur Folge haben (Dunford et al. 2001). Für diese Affinität ist zum einen das Vorhandensein des Stickstoffatoms von Bedeutung. Speziell für Zoledronat sowie Risendronat, ein weiteres sehr potentes N-BP (siehe Abbildung 22), konnte gezeigt werden, dass die Seitenkette an einen Komplex aus

Magnesiumionen, Phosphat-Sauerstoffgruppen, Aspartat-Resten und Wassermolekülen gebunden ist, was zu einer sehr festen Bindung führt (Kavanagh et al. 2005) (Abbildung 23). Des Weiteren stärken hydrophobe Interaktionen die Affinität zur FDPS, und auch der pH-Wert ist von Bedeutung, da er die Ionisierung der Phosphat- und funktionellen R²-Gruppen beeinflusst (Ebetino et al.).

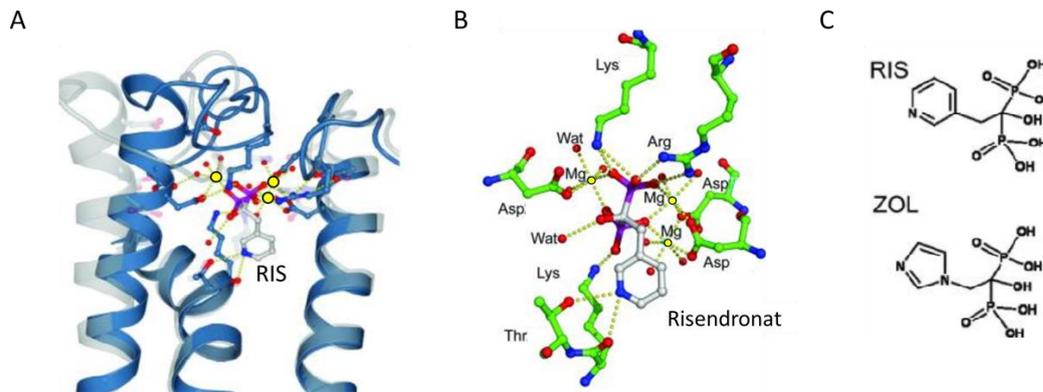


Abbildung 23: Struktur-Bindungsbeziehungen zwischen Ris, Zol und FDPS

A) Spezifische polare Interaktionen von Risendronat (RIS, mittig) mit Mg²⁺ (gelb) und der FDPS (blau) sowie der Apo-Domäne (grau). B) Genaue räumliche Bindung von Risendronat an die FDPS. Drei Mg²⁺ Ionen (gelb) vermitteln die Interaktion zwischen Phosphat und Aspartat-Resten. C) Chemische Strukturen von RIS und Zoledronat (ZOL). (Adaptiert nach Kavanagh et al. 2005)

Zusammenfassend kann man sagen, dass Zoledronat aufgrund seiner chemischen Eigenschaften eine sehr hohe Affinität zur FDPS besitzt, wodurch das Enzym höchst effektiv gehemmt wird. Die Inhibition der FDPS scheint für die Aktivierung des MEK5/Erk5-Signalwegs von großer Bedeutung zu sein. Über welche Zwischenschritte es nun zur Phosphorylierung von Erk5 kommt, ist noch Gegenstand der Forschung.

5.1.2 Kleine G-Proteine als Vermittler zwischen Mevalonatweg und Erk5

Es wurde nun schon für zwei Arzneimittelgruppen, die inhibitorisch in den Mevalonatsyntheseweg eingreifen, eine Aktivierung von Erk5 nachgewiesen. Beiden gemeinsam ist, dass durch die Hemmung wichtiger Enzyme des Mevalonatstoffwechsels die Farnesylierung und Geranylierung kleiner G-Proteine der Rho- und Ras-Familien weiter *downstream* unterbunden wird. Zur Rho-Familie gehören unter anderem Cdc42, Rac und Rho, die einem Zyklus zwischen inaktiver Guanodin-Diphosphat (GDP)-Bindung und aktiver Guanodin-Triphosphat (GTP)-Bindung unterliegen. Diesen Proteinen werden

vielseitige Effekte für verschiedene Zellfunktionen, wie Signaltransduktion, die Organisation des Zytoskeletts oder Apoptose zugeschrieben (Prendergast et al. 1994; Perezsala und Mollinedo 1994). Für die Frage, inwiefern kleine G-Proteine den Erk5-Signalweg beeinflussen, ist es zum einen wichtig, die Folgen der fehlenden Prenylierung zu verstehen, zum anderen den Einfluss der G-Proteine auf intrazelluläre Signalkaskaden, insbesondere den Erk5-Signalweg.

Die Studienlage zu den Auswirkungen der inhibierten posttranslationalen Modifikation kleiner G-Proteine auf die Signaltransduktion ist kontrovers. Zunächst liegt die Vermutung nahe, dass eine fehlende Prenylierung der G-Proteine eine Modulation der Proteine zur Folge hat, welche zu einer Hemmung der Signaltransduktion führt. Es wurde jedoch auch gezeigt, dass ohne posttranslationale Modifikation eine unangemessene Stimulation von Signalwegen resultieren kann. Diese ist auf die Anreicherung von unprenylierten, aber aktiven GTPasen zurückzuführen, was zu einer Aktivierung der *downstream*-Signalkaskade führen und eine Schädigung der Zellen zur Folge haben kann (Dunford et al. 2006). Möglich ist auch, dass die Anreicherung zu einem negativen Effekt auf die Signaltransduktion führt. So zeigten Lerner et al. (1995), dass mithilfe des Farnesyltransferase-Inhibitors FT-277 die onkogene Signalweiterleitung von Ras durch Akkumulation inaktiver Ras/ Raf-Komplexe im Zytoplasma unterbunden werden konnte. Die möglichen Folgen der fehlenden Prenylierung von kleinen G-Proteinen wurden von Coxon et al. (2006) in Abbildung 24 zusammengefasst.

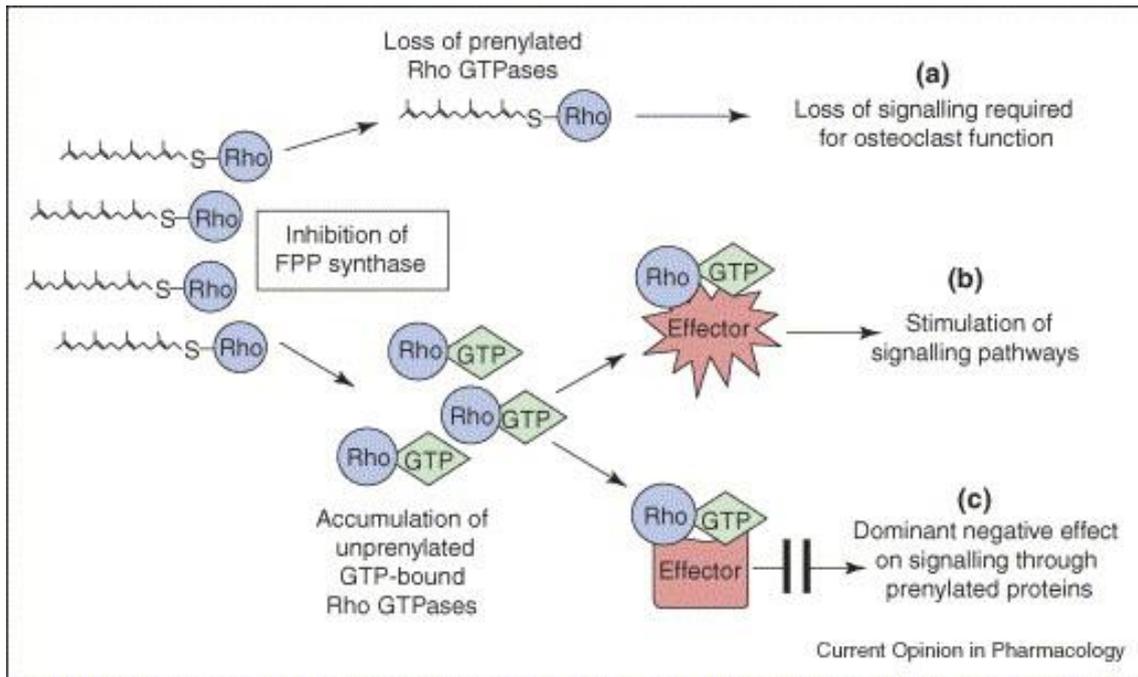


Abbildung 24: Mögliche Beeinflussung der Signalweiterleitung durch N-BP

(a) Durch Inhibition der FPPS verringern N-BP die Menge an prenylierten Proteinen, was zu einer verminderten Signalweiterleitung führen könnte. Alternativ könnte eine Akkumulation von GTP-gebundenen unprenylierten GTPasen entweder (b) zu einer unangemessenen Aktivierung der downstream liegenden Signalwege führen oder (c) einen dominant negativen Effekt auf die Signalweiterleitung haben, indem Zielproteine in inaktiven zytosolischen Komplexen eingebunden werden. Diese Effekte sind auch für andere GTPasen als die Rho-Familie denkbar, was noch Gegenstand der Forschung ist (Coxon et al. 2006).

Das Ausbleiben der Prenylierung kleiner G-Proteine kann die Signalweiterleitung also unterschiedlich beeinflussen. Welche Signalwege nun auf welche Art beeinflusst werden, ist komplex und birgt zahlreiche offene Fragen. Doch erst kürzlich konnten Zuo et al. (2015) einen Zusammenhang zwischen Cdc42-Inaktivierung und Erk5-Phosphorylierung herstellen. Die Herabregulierung von Cdc42 mittels siRNA hatte eine Aktivierung von Erk5 zur Folge. Auch die kleinen G-Proteine RhoA und Rac1 wurden auf eine Erk5-Aktivierung untersucht, konnten jedoch durch *Knock-down* keine Phosphorylierung auslösen. RhoA *Knock-down* führte sogar zu einer leichten Herabregulierung von phosphoryliertem Erk5.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine Erk5-Aktivierung durch Cdc42 *Knock-down* nachgewiesen werden. Im Western-Blot zeigt sich eine deutliche Phosphorylierung von Erk5 72 Stunden nach der Transfektion, KLF2 und KLF4 sind in der qPCR deutlich erhöht (Abbildung 15). Da Cdc42 Erk5 negativ reguliert, führt eine Herabregulierung des Gens zur Aktivierung von Erk5. Verbindet man dieses Ergebnis mit den möglichen Wirkungen,

die durch fehlende Prenylierung der kleinen G-Proteine hervorgerufen werden können, wäre zu vermuten, dass es im Fall von Cdc42 zu einer verminderten Signalweiterleitung durch Verlust prenylierter Proteine oder zu einer negativen Beeinflussung des Signalwegs kommt (vgl. Abbildung 24 a oder c). Okamoto et al. postulierten nach Behandlung von Mesotheliomzellen mit Zoledronat eine Verminderung der membrangebundenen, funktionellen Form von Cdc42 bei gleichzeitig erhöhter Gesamtmenge des Proteins (Okamoto et al. 2014). Scheinbar im Gegensatz dazu stehen Ergebnisse von Dunford et al. (2006), die nach Behandlung von Makrophagen und Osteoklasten-ähnlichen Zellen mit N-BP vermehrt aktives Cdc42 nachweisen konnten. Ob diese aktiven, aber unprenylierten Proteine jedoch funktionstüchtig sind und mit den nachgeschalteten Signalwegen angemessen interagieren können, ist fraglich. Möglicherweise beruhen die kontroversen Ergebnisse auch darauf, dass die G-Proteine in verschiedenen Zelltypen unterschiedlich reguliert werden. Da in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass eine Stimulation von Endothelzellen und Osteoblasten durch Zoledronat Erk5 aktiviert, und gleichzeitig eine Erk5-Aktivierung in Endothelzellen durch Cdc42 *Knock-down* hervorgerufen werden konnte, ergibt sich ein weiterer Hinweis darauf, dass die fehlende Prenylierung in genannten Zelltypen eine Modifikation des Proteins mit einer fehlenden oder negativen Signalweiterleitung zur Folge hat.

Betrachtet man die anderen G-Proteine, könnte ein Ausbleiben der Prenylierung zu ähnlichen oder anderen Effekten führen und Signalwege weiter *downstream* unterschiedlich beeinflussen. Für Rac konnte beispielsweise ein analoger Mechanismus wie für Cdc42 identifiziert werden: Die Behandlung von Makrophagen mit N-BP führte zu einem Anstieg von aktivem, GTP-gebundenem Rac, was eine Aktivierung der MAP-Kinase p38 zur Folge hatte (Dunford et al. 2006). Andere Studien haben wiederum gezeigt, dass Mevastatin Lipopolysaccharid-induzierte Aktivierung von Rac in Monozyten hemmt, allerdings keine Wirkung auf die Rac-Aktivierung alleine hat (Patel und Corbett 2003).

5.1.3 Vermittlung Bisphosphonat-assoziiertes Effekte über Erk5

Neben ihren antiresorptiven Eigenschaften werden den Bisphosphonaten unter anderem antiangiogenetische sowie antimigratorische Funktionen zugeschrieben

(Clézardin et al. 2005). Die genauen molekularen Mechanismen, wie Bisphosphonate diese Wirkungen entfalten, waren bislang noch nicht vollständig geklärt. Einen interessanten Ansatz bietet der MEK5/ Erk5-Signalweg. Es ist bekannt, dass die vielseitigen Effekte der Statine teilweise über diesen Signalweg vermittelt werden (Ohnesorge et al. 2010). Nachdem die Aktivierung von Erk5 durch Bisphosphonate gezeigt werden konnte, ist zu vermuten, dass einige ihrer Effekte ebenfalls über den MEK5/ Erk5-Signalweg vermittelt werden. Gefestigt wird diese Vermutung dadurch, dass auch die Erk5-abhängigen Transkriptionsfaktoren KLF2 und KLF4 durch Zoledronat induzierbar waren (Abbildung 11). Damit können Effekte wie Verminderung von Angiogenese, Migration und Inflammation, die man KLF2 und KLF4, aber auch Bisphosphonaten und Statinen zuordnet, erklärt werden. Auch für die den Bisphosphonaten zugeschriebenen antitumorösen Eigenschaften kann unter anderem ihre antiangiogenetische Wirkung verantwortlich sein. Diese wurde von Wood et al. (2002) aufgezeigt und ist möglicherweise durch die Aktivierung des MEK5/ Erk5-Signalwegs zu erklären.

Zudem induzieren Bisphosphonate womöglich die Osteoblastogenese durch Aktivierung von BMP2, RUNX2 und weiteren Faktoren. Da gezeigt werden konnte, dass eine Aktivierung von Erk5 nicht nur zu einer Induktion von KLF4, sondern von zahlreichen weiteren Genen führt (vgl. *Microarray*-Analysen von Ohnesorge et al.), besteht die Möglichkeit, dass auch diese Effekte durch Erk5-vermittelte Geninduktion erklärt werden können.

5.2 Einfluss der Bisphosphonate auf die Genexpression via Erk5

Mittels *Microarray*-Analysen hat unsere Arbeitsgruppe die Regulierung zahlreicher Gene detektiert, die durch konstitutive Erk5-Expression beeinflusst wurden. Dabei handelt es sich um 172 hochregulierte und 67 herabregulierte Gene. In Hinblick auf ihre Funktion lassen sie sich verschiedenen Gruppen zuordnen, wie beispielsweise Zellmigration- und Motilität, G-Protein-Signalwirkung, Regulierung von Blutdruck und Vasodilatation oder Inflammation (Ohnesorge et al. 2010). Die Ergebnisse unterstützen den protektiven Phänotyp des Erk5-Signalwegs. Doch erstaunlicherweise wurden auch einige knochenrelevante Gene entdeckt. Zu ihnen zählen Gene, die für die Differenzierung von

Osteoblasten von Bedeutung sind (PTHLH, FGFR3, FOSL1) sowie solche, die Knochenresorption durch Inhibition der Osteoklastenreifung stören (INPP4B). Die Ergebnisse der *Microarray*-Analysen konnten experimentell bestätigt werden, indem durch konstitutive Erk5-Expression mittels MEKD-infizierter HUVEC erneut eine Induktion der genannten Gene gezeigt wurde, wobei die Werte für PTHLH sowie INPP4B Signifikanz aufwiesen (Abbildung 16). Die Höhe der Geninduktion entsprach dabei in etwa den im *Microarray* erhobenen Werten (vgl. Tabelle 14).

5.2.1 Aufgaben der ausgewählten Gene im Knochenstoffwechsel

Die ausgewählten Gene beeinflussen den Knochenstoffwechsel sehr unterschiedlich. Während PTHLH, FGFR3 und FOSL1 eher fördernd auf die Osteoblastogenese wirken, hemmt INPP4B die Osteoklastenreifung. Jedoch ist auch diese Unterscheidung nicht ganz eindeutig. So wurde gezeigt, dass FGFR3 zwar die Differenzierung von MSC zu (Prä-) Osteoblasten durch Aktivierung von RUNX2 und der MAPK p38 fördert, gleichzeitig aber die Matrixmineralisierung über Erk1/2 hemmt und damit eine verminderte Knochenmasse zur Folge hat. Zudem führt FGFR3 zu einer vermehrten Differenzierung und gesteigerten resorptiven Funktion der Osteoklasten – sowohl direkt, als möglicherweise auch indirekt durch die Regulation von Osteoblasten (Su et al. 2009; Pannier et al. 2010). Die Auswahl dieses Gens als mögliche Unterstützung einer osteoanabolen Wirkung von Bisphosphonaten ist demnach kritisch anzusehen.

Auch PTHLH zeigt, je nach Dauer und Zeitpunkt der Exposition, unterschiedliche Wirkungen. Eine intermittierende Gabe führt zu einer vermehrten Expression von RUNX2 und fördert damit die Osteoblastogenese. Erst kürzlich wurde mit Abaloparatid ein Analogon entwickelt, das die anabolen Effekte fördert. Es weist 76 % Homologie zu PTHLH und 41 % Homologie zu PTH auf und konnte in Phase 3 der Zulassungsstudien eine deutliche Zunahme der Knochendichte im Gegensatz zur Placebo-Gruppe sowie eine leichte Verbesserung gegenüber dem PTH-Analogon Teriparatid zeigen (Miller et al. 2016). Gleichzeitig hat PTHLH einen inhibitorischen Effekt auf die Proliferation differenzierter Osteoblasten mittels Cyclin D1 (Datta et al. 2007) und eine kontinuierliche Gabe führt zum vermehrten Abbau des Knochens (Ma et al. 2001).

Des Weiteren beeinflussen Veränderungen der Transkriptionsfaktoren der FOS-Familie die Knochenbildung. So konnte gezeigt werden, dass die Differenzierung von Osteoblasten durch FOSL1 erhöht ist, nicht aber deren Proliferation. Zudem war *in vitro* eine gesteigerte Osteoklastogenese zu verzeichnen. Eine Überexpression von FOSL1 führt zu einer vermehrten Knochenbildung und -masse, was auf eine erhöhte Anzahl reifer Osteoblasten zurückgeführt wird. *Knock-out*-Mäuse leiden hingegen an Osteopenie (Jochum et al. 2000).

Ein primär die Osteoklastogenese beeinflussendes Gen ist INPP4B. Es wird als wichtiger Modulator der Knochenmasse angesehen, indem es RANKL hemmt und somit die Differenzierung der Osteoklasten vermindert (Vacher 2013). Im Rahmen dieser Arbeit konnte nicht nur die Erk5-Abhängigkeit des Gens (Kapitel 4.3.3), sondern auch eine Induktion in Osteoblasten gezeigt werden (Abbildung 21). Es wäre weiterhin ein interessanter Ansatz, die Geninduktion in Osteoklasten hervorzurufen. Vacher (2013) konnte bereits zeigen, dass eine stabile Expression von nativem INPP4B in RAW-Zellen, welche zu reifen Osteoklasten differenzieren können, eine verminderte Differenzierung und folglich eine geringere Anzahl reifer Osteoklasten zur Folge hatte. Damit bestätigte die Arbeitsgruppe Ergebnisse von Ferron et al. (2011), die INPP4B als negativen Regulator der Osteoklastogenese identifizierten und auch *in vivo* eine verstärkte Osteoklastogenese bei INPP4B-defizienten Mäusen zeigen konnten.

5.2.2 Wirkung von Zol auf Geninduktion und Knochenstoffwechsel

Nun stellte sich die Frage, ob auch stickstoffhaltige Bisphosphonate wie Zoledronat durch ihre Erk5-Aktivierung die ausgewählten Gene beeinflussen können. Mit Hilfe von Zeitversuchen sollte der ideale Zeitpunkt für die Aktivierung des jeweiligen Gens gefunden werden. Jedoch kann man die Geninduktion zu frühen Zeitpunkten aufgrund der vermuteten Seruminduktion nicht sicher dem Effekt von Zoledronat zuordnen. Für die frühzeitige Geninduktion verantwortlich sein könnte das im Zellkulturmedium für HUVEC enthaltene FCS, welches Wachstumsfaktoren enthält. VEGF gilt beispielsweise als Stimulus für den MEK5/ Erk5-Signalweg (Roberts et al. 2009). Analog zur Beeinflussung von Erk5 zeigten Cohen-Saidon et al. (2009), dass Erk2 durch EGF stimuliert wird. Die phosphorylierte MAPK kann durch Aktivierung von

Transkriptionsfaktoren die Genexpression beeinflussen. Auf diesem Weg wäre es möglich, dass manche Gene durch das im Nährmedium enthaltene FCS beeinflusst werden. Der vermutete Effekt des Serums scheint jedoch nur kurzfristig zu wirken, da man eine Abnahme der Induktion von den teils überschießenden acht und 16 Stundenwerten hin zu späteren Zeitpunkten sehen kann (Abbildung 17). Aus diesem Grund sind die 48 Stundenwerte als die verlässlichsten einzustufen.

Hierbei ist zu erkennen, dass Zoledronat PTHLH etwa zweifach induzieren kann. Zwar fiel die Induktion von PTHLH durch Zoledronat schwächer aus als durch MEK5D, dies ist jedoch durch die länger andauernde und konstitutive Erk5-Aktivierung durch MEK5D erklärbar. Mo et al. (2012) fassten zusammen, dass die Osteoblastogenese unter anderem durch eine vermehrte Expression von RUNX2, VEGF und Osteocalcin gefördert wird. Auch PTHLH entfaltet seine knochenbauende Wirkung über eine Induktion von RUNX2, Osteocalcin und VEGF (Gortázar et al. 2006; García-Martín et al. 2014). Da Zoledronat PTHLH induziert, kann man daraus ableiten, dass mögliche osteoanabole Effekte des stickstoffhaltigen Bisphosphonats unter anderem über dieses Gen vermittelt werden könnten.

INPP4B zeigt nach 48 Stunden Zoledronat-Stimulation sogar eine stärkere Induktion als durch MEK5D-Infektion. Dieses Ergebnis kann dafür sprechen, dass die 48-stündige Stimulation einen optimalen Zeitpunkt darstellt, der bei der Dauer der MEK5D-getriggerten Induktion schon überschritten war. Möglich ist aber auch, dass durch Zoledronat weitere Faktoren beeinflusst werden, die eine gesteigerte Expression von INPP4B zur Folge haben. Mit INPP4B konnte ein durch Zoledronat stark induziertes und Erk5-abhängiges Gen identifiziert werden. Von diesem Gen ist eine negative Wirkung auf die Osteoklastendifferenzierung durch Inhibition von RANKL bekannt. Demnach ist die Induktion von INPP4B womöglich ein weiterer Mechanismus, über den Zoledronat seine antiresorptiven Eigenschaften vermittelt.

FGFR3 und FOSL1 wiederum zeigten im Vergleich mit den anderen Genen eine schwächere Expression bei Zoledronat-Stimulation, FGFR3 sogar eine leichte Repression. FGFR3 ist auch in seiner Funktion schwierig zuzuordnen. Das Gen wirkt sowohl fördernd als auch hemmend auf die Osteoblastogenese. Es konnte durch konstitutive Erk5-Aktivität vermehrt exprimiert werden, in unseren Versuchen aber

nicht sicher von Zoledronat induziert werden. Dies führt zu der Vermutung, dass Zeitpunkt und molekularer Angriffspunkt eine bedeutende Rolle für die Wirkung von FGFR3 spielen. Diese Schlussfolgerung sowie die duale Wirkungsweise als positiver sowie negativer Regulator in der endochondralen Ossifikation beschrieben auch Pannier et al. (2010). Möglicherweise geschieht die Induktion bereits zu einem frühen Zeitpunkt, zu dem die Seruminduktion den Effekt überdeckt oder zu einem späteren Zeitpunkt, der in den Versuchen nicht mehr berücksichtigt wurde. FOSL1 wiederum konnte durch Zoledronat induziert werden. Dieses Gen wirkt, anders als PTHLH und FGFR3, nicht auf die Proliferation, dafür aber auf die Differenzierung der Osteoblasten und fördert damit die Knochenmasse. Dieser Effekt scheint für die Wirkung von Zoledronat jedoch eine untergeordnete Rolle zu spielen, wenn man beachtet, dass FOSL1 nur leicht und nicht signifikant von Zoledronat induziert werden konnte.

Zusammenfassend lassen die Daten die Spekulation zu, dass die Wirkung von Zoledronat durch die Aktivierung des MEK5/ Erk5-Signalwegs und die damit verbundene Induktion knochenrelevanter Gene, insbesondere PTHLH und INPP4B, verstärkt wird oder teilweise darauf beruht. Damit wurde ein weiterer wichtiger Mechanismus entdeckt, über den stickstoffhaltige Bisphosphonate mutmaßlich ihre Wirkung entfalten, sofern entsprechende Konzentrationen *in vivo* erreicht werden. Es gilt jedoch auch zu beachten, dass die Stimulation von Endothelzellen oder Osteoblasten mit sehr hohen Zoledronat-Konzentrationen und langer Stimulationszeit eine vermehrte Apoptose zur Folge haben. Dies mag bei Osteoklasten oder Tumorzellen ein erwünschter Effekt sein (vgl. Rachner et al. 2010), sollte in Hinblick auf eine mögliche osteoanabole Funktion jedoch kritisch bewertet werden. In diesem Zusammenhang ist eine Weiterentwicklung der Substanzen von großer Bedeutung, um die Aufnahme in die Zellen zu verbessern sowie eine hohe Effektivität schon bei geringeren und weniger toxischen Konzentrationen zu erreichen.

5.3 Ausblick: Bisphosphonate in der Tumorthherapie

Bisphosphonate werden aufgrund ihrer antiresorptiven sowie möglichen osteoanabolen Effekte hauptsächlich für Krankheiten des Knochenstoffwechsels eingesetzt, spielen jedoch auch in der Tumorthherapie eine wichtige Rolle: Sie hemmen die

Metastasenbildung im Knochen durch gesteigerte Apoptose sowie Verhinderung der Anheftung von Tumorzellen an *lining cells*, aktive Osteoblasten und die extrazelluläre Matrix (van der Pluijm et al. 1996) und finden auch bei hämatologischen Tumorerkrankungen wie dem Multiplen Myelom Anwendung. Zudem sind sie wirksam gegen Tumorwachstum und weitere Tumor-assoziierte Beschwerden. Ein Beispiel dafür ist der Brustkrebs, das häufigste Karzinom der Frau. Es konnte gezeigt werden, dass Zoledronat die Zellproliferation in Östrogenrezeptor-negativen MDA-MB-231-Zellen hemmt und zugleich die Apoptose durch Aktivierung von Caspase 1 und 3 induziert (Rachner et al. 2010). Zudem mindern Bisphosphonate im metastasierten Stadium nicht nur die Häufigkeit pathologischer Frakturen, sondern auch Knochenschmerzen, Episoden von Hyperkalzämie sowie die Notwendigkeit von Bestrahlungen oder Operationen (Verdijk et al. 2007; Pavlakis et al. 2005; Brown und Coleman 2001). Es ist weiterhin bekannt, dass Mutationen des Tumorsuppressors p53, die in mehr als der Hälfte der menschlichen Tumoren zu finden sind, die Aktivität des Mevalonatwegs signifikant hochregulieren. Inhibitoren des Mevalonatstoffwechsels können diesen Effekt jedoch unterdrücken. So konnte gezeigt werden, dass Statine das Tumorzellwachstum in p53-mutierten Tumoren reduzieren (Freed-Pastor et al. 2012). Auch Bisphosphonate könnten eine entsprechende Wirkung auf das Tumorzellwachstum ausüben. Es wurde bereits nachgewiesen, dass Zoledronat das Expressionslevel von p53 in Mesotheliomzellen steigert und damit dem mutationsbedingten Verlust des Tumorsuppressors entgegenwirkt (Okamoto et al. 2013). Außerdem induziert das stickstoffhaltige Bisphosphonat Apoptose und S-Phase Arrest p53-unabhängig (Okamoto et al. 2012). Auch für Statine wird durch die Hemmung der HMG-CoA-Reduktase eine tumorspezifische Apoptose postuliert (Wong et al. 2002). Diese Effekte, die sowohl Statine, als auch N-BP zeigen, werden unter anderem durch die Inhibition der Geranylgeranylierung von Rho-Proteinen hervorgerufen (Konstantinopoulos et al. 2007). Zusätzlich zur p53- und Apoptose-Induktion beeinflussen Bisphosphonate die Immunantwort durch Aktivierung von Lymphozyten. So konnte gezeigt werden, dass Zoledronat $\gamma\delta$ T-Zellen sowie *natural killer* (NK)-Zellen induziert, die eine starke Zytotoxizität gegen epitheliale Tumoren aufweisen. Dabei ist zu beachten, dass die Aktivierung der NK-Zellen möglicherweise im Zusammenhang mit

einer schweren Nebenwirkung der Bisphosphonate steht, der Kiefernekrose (Kabelitz et al. 2007; Nussbaumer et al. 2011). Eine weitere Möglichkeit, über die antitumoröse Eigenschaften vermittelt werden, ist die antiangiogenetische Eigenschaft der Bisphosphonate, die von Wood et al. (2002) für Zoledronat gezeigt wurde und im Zusammenhang mit der Aktivierung des MEK5/ Erk5-Signalwegs steht.

Der Einsatz der Bisphosphonate in der Tumorthherapie ist demnach ein wichtiges Feld, auf dem es noch viele interessante Fragen zu klären gibt. Durch das Aufzeigen des MEK5/ Erk5-Signalwegs als Angriffspunkt stickstoffhaltiger Bisphosphonate öffnen sich neue Wege, über die die antitumorösen Effekte der Bisphosphonate vermittelt werden könnten. In den *Microarray*-Analysen unserer Arbeitsgruppe wurden neben den knochenrelevanten Genen auch zahlreiche Gene mit antitumorösen Eigenschaften entdeckt. Zu ihnen zählen neben KLF2 und KLF4 auch ADAMTS1 (*ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif 1*) sowie CD44. So konnte für KLF2 bereits gezeigt werden, dass eine Zoledronat-Behandlung von MCF-7-Tumorzellen zu einer Hochregulation des mutmaßlich antitumorösen Gens führt, während der Proliferationsmarker Ki-67 herabreguliert wurde (Ebert et al. 2012). ADAMTS1 weist, wie auch KLF2 und KLF4, antiangiogenetische Aktivität auf, ist mit inflammatorischen Prozessen assoziiert und wird als antimetastatisch bezeichnet (Kelwick et al. 2015). CD44, ein wichtiges Gen für Zelladhäsion und -migration, das unter anderem mit Osteopontin und Kollagen interagiert, spielt ebenfalls eine Rolle für Tumormetastasen und die Aktivierung von Lymphozyten (*Genecards*). *Knock-out*-Mäuse weisen einen Phänotyp mit stark erhöhtem tumorösen Potenzial auf (Schmits et al. 1997), was auf die antitumorösen Eigenschaften dieses Gens hinweist.

Die genannten Gene sind nur Beispiele dafür, dass es noch zahlreiche weitere Möglichkeiten gibt, über die Wirkungen von Bisphosphonaten oder Statinen durch die Aktivierung des MEK5/ Erk5-Signalwegs erklärt werden können und dürfen als Anreiz für weitere Forschungen angesehen werden.

6 Zusammenfassung/ Summary

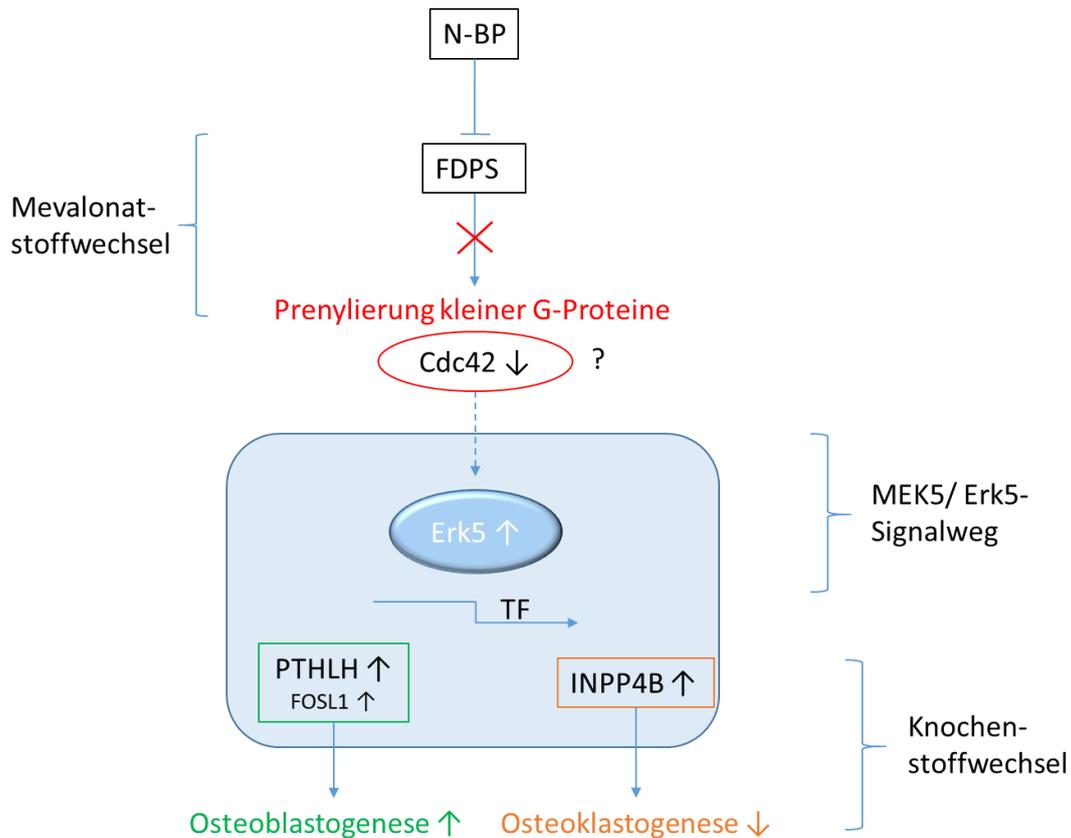


Abbildung 25: Graphische Zusammenfassung

Stickstoffhaltige Bisphosphonate (N-BP) hemmen die FDPS als wichtiges Enzym des Mevalonatstoffwechsels. Dadurch wird die Prenylierung kleiner G-Proteine wie Cdc42 unterbunden, was über mehrere Zwischenschritte eine Aktivierung des MEK5/ Erk5-Signalwegs zur Folge hat. Erk5 beeinflusst die Expression zahlreicher Gene, unter anderem INPP4B als Hemmer der Osteoklastogenese oder PTHLH und FOSL1 als Förderer der Osteoblastogenese.

Die Osteoporose ist eine Erkrankung, die durch verminderte Dichte und erhöhte Fragilität des Knochens gekennzeichnet ist. Sie zählt zu den häufigsten Erkrankungen weltweit und geht mit erheblicher Einschränkung der Lebensqualität und erhöhter Mortalität einher. Eine Behandlungsmöglichkeit dieses schwerwiegenden Krankheitsbilds ist die Therapie mit Bisphosphonaten. Diese hemmen mit ihren antiresorptiven Eigenschaften den Knochenabbau und fördern vermutlich gleichzeitig den Knochenaufbau. Obwohl schon lange die Wirkungsweise der Bisphosphonate erforscht wird, ist noch nicht sicher geklärt, wie beispielsweise osteoanabole oder antitumoröse Effekte vermittelt werden. Einen Erklärungsansatz bietet der MEK5/ Erk5-Signalweg. Diesem werden unter anderem antiangiogenetische, antiinflammatorische

und antiproliferative Eigenschaften zugesprochen. In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass Statine Erk5 und Erk5-abhängige Gene aktivieren können. Statine wiederum inhibieren ebenfalls den Mevalonatstoffwechsel, jedoch weiter *upstream* als Bisphosphonate. Da Statine zudem osteoanabole Effekte aufweisen, lag die These nahe, dass auch Bisphosphonate ihre Wirkung über den MEK5/Erk5-Signalweg vermitteln könnten. Die These konnte im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden: Stickstoffhaltige, nicht aber stickstofffreie Bisphosphonate aktivieren Erk5 sowohl in Endothelzellen als auch in Osteoblasten. Es gilt jedoch zu bedenken, dass eine Weiterentwicklung der Substanzen mit verbesserter Aufnahme in die Zelle zur Vermeidung von Apoptose-Induktion anzustreben ist.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass ein *Knock-down* der FDPS, dem Angriffspunkt der Bisphosphonate im Mevalonatstoffwechsel, ebenfalls eine Erk5-Phosphorylierung zur Folge hat. Durch Inhibition der FDPS wird die Prenylierung kleiner G-Proteine wie Cdc42 unterbunden, was eine veränderte Funktion der Proteine zur Folge hat. Ein *Knock-down* von Cdc42 mittels siRNA führt wiederum zu einer Aktivierung von Erk5. Auf diese Weise wurde nicht nur ein neuer Wirkungsweg der Bisphosphonate identifiziert, sondern auch ein möglicher Aktivierungsmechanismus der MEK5/ Erk5-Signalkaskade aufgedeckt.

Erk5 wandert nach seiner Aktivierung in den Zellkern und beeinflusst dort die Genexpression. Im Rahmen dieser Arbeit wurden knochenrelevante Gene identifiziert, die durch Zoledronat-Stimulation induziert werden konnten. Zu diesen zählen INPP4B, das die Osteoklastogenese inhibiert, und PTHLH sowie FOSL1, welche die Osteoblastogenese fördern. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Aktivierung des MEK5/ Erk5-Signalwegs durch Zoledronat eine Geninduktion zur Folge hat, die sowohl die osteoanabole Wirkung unterstützt, als auch die katabolen Effekte hemmt. Auf diese Weise konnte neben den bereits bekannten Wirkungswegen der Bisphosphonate ein neuer identifiziert werden, der auch einen möglichen Ansatz für weitere, bisher ungeklärte Effekte von Bisphosphonaten darstellt.

Summary

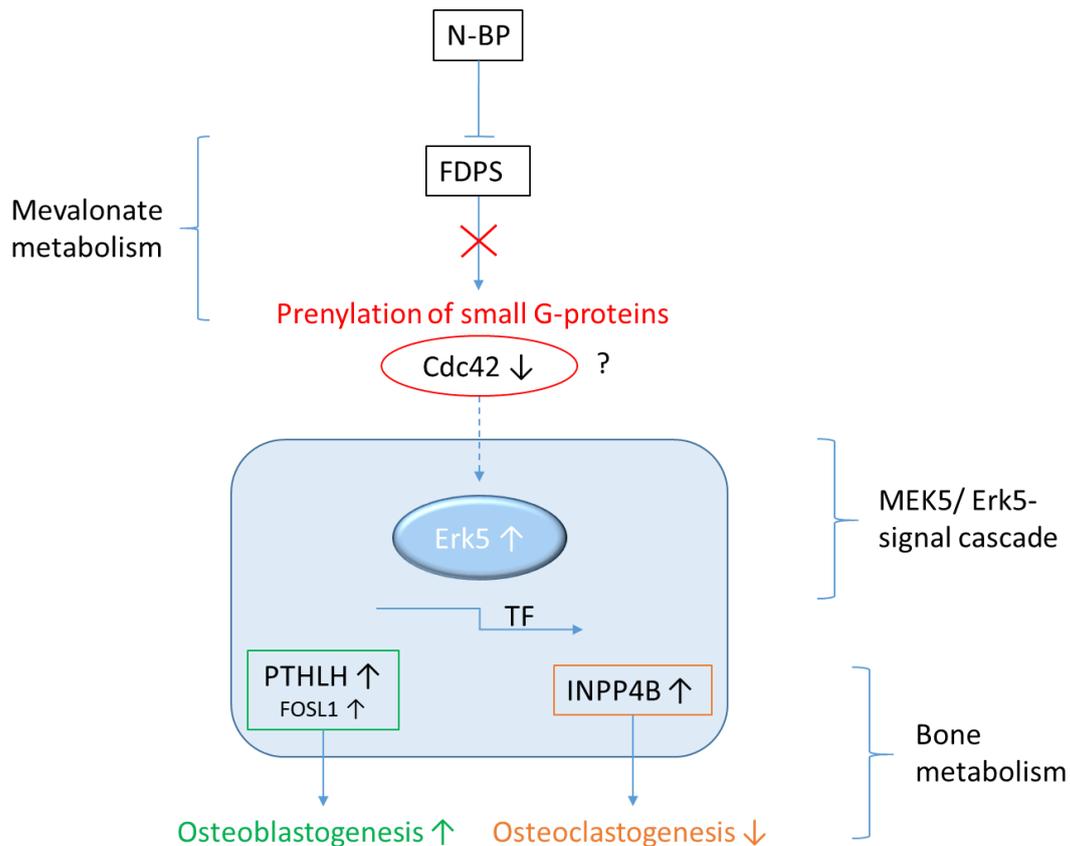


Abbildung 26: Graphical summary

Nitrogen-containing bisphosphonates (N-BP) inhibit the FDPS which is an important enzyme of the mevalonate metabolism and provides the prenylation of small G-proteins like Cdc42. Suppression of protein prenylation leads – through several intermediate steps – to an activation of the MEK5/ Erk5 signal cascade. Erk5 affects the expression of various genes like INPP4B which is an inhibitor of osteoclastogenesis or PTHLH and FOSL1 which support osteoblastogenesis.

Osteoporosis is a disease characterised by decreased bone density and increased fragility. It is one of the most frequent diseases worldwide and leads to a considerable reduction in quality of life and increased mortality. One option to treat this severe illness is a therapy based on bisphosphonates. These drugs inhibit bone resorption while possibly stimulating bone formation. Although a lot of research has been done to elucidate the cellular mechanisms of bisphosphonates, it remains unclear how they might mediate for instance osteoanabolic or antitumor effects. One possible explanation offers the MEK5/ Erk5 signal cascade which has been implicated in the regulation of anti-angiogenic, anti-inflammatory and anti-proliferative effects. Previous studies have shown that statins can activate Erk5 as well as Erk5-dependent

genes. Moreover, statins inhibit, like bisphosphonates, the mevalonate pathway further upstream. In addition, statins show osteoanabolic effects which led to the assumption that bisphosphonates might mediate some of their effects by the MEK5/ Erk5 signal cascade as well. Within this thesis, we confirmed this assumption by revealing that nitrogen-containing, but not non-nitrogen-containing bisphosphonates activate Erk5 in endothelial cells as well as osteoblasts. But we have to be aware of the need to optimize the substances to gain a better uptake into the cells and to avoid apoptosis.

Furthermore, it has been shown that a knock-down of the FDPS, which is the molecular target of bisphosphonates in the mevalonate pathway, induced a phosphorylation of Erk5 as well. Inhibition of FDPS suppresses the prenylation of small G-proteins such as Cdc42 which leads to a modified function of the proteins. A knock-down of Cdc42 by siRNA in turn leads to activation of Erk5. Thus, it has not only been identified a new molecular target of bisphosphonates, but also a possible activation mechanism of the MEK5/ Erk5 signal cascade.

After its activation, Erk5 migrates to the nucleus to influence gene expression. Within this thesis we identified zoledronic acid to induce bone relevant genes such as INPP4B which inhibits osteoclastogenesis and PTHLH or FOSL1 which support osteoblastogenesis. Thus, the activation of the MEK5/ Erk5 signal cascade by zoledronic acid induces gene induction which might support anabolic and inhibit catabolic effects in bone. Like this, a new molecular mechanism of action has been identified which might represent a new approach to understand effects of bisphosphonates that have not been explained thus far.

7 Literaturverzeichnis

An, T.; Hao, J.; Sun, S.; Li, R.; Yang, M.; Cheng, G.; Zou, M. (2017): Efficacy of statins for osteoporosis: a systematic review and meta-analysis. In: *Osteoporos Int*, S. 28–47. DOI: 10.1007/s00198-016-3844-8.

Ayukawa, Yasunori; Yasukawa, Eisuke; Moriyama, Yasuko; Ogino, Yoichiro; Wada, Hiroko; Atsuta, Ikiru; Koyano, Kiyoshi (2009): Local application of statin promotes bone repair through the suppression of osteoclasts and the enhancement of osteoblasts at bone-healing sites in rats. In: *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* 107 (3), S. 336–342. DOI: 10.1016/j.tripleo.2008.07.013.

Bae, Jong-Sup; Gutierrez, Soraya; Narla, Radhika; Pratap, Jitesh; Devados, Rajitha; van Wijnen, Andre J. et al. (2007): Reconstitution of Runx2/Cbfa1-null cells identifies a requirement for BMP2 signaling through a Runx2 functional domain during osteoblast differentiation. In: *J. Cell. Biochem.* 100 (2), S. 434–449. DOI: 10.1002/jcb.21039.

Baron, Roland; Rawadi, Georges (2007): Targeting the Wnt/ β -Catenin Pathway to Regulate Bone Formation in the Adult Skeleton. In: *Endocrinology* 148 (6), S. 2635–2643. DOI: 10.1210/en.2007-0270.

Bartl, R.; Bartl, C.; Gradinger, R. (2008): Einsatz der Bisphosphonate in der Orthopädie und Unfallchirurgie. In: *Orthopäde* 37 (6), S. 595–614. DOI: 10.1007/s00132-008-1280-Y.

Blair, H. C.; Teitelbaum, S. L.; Ghiselli, R.; Gluck, S. (1989): Osteoclastic bone resorption by a polarized vacuolar proton pump. In: *Science* 245 (4920), S. 855. DOI: 10.1126/science.2528207.

Bolland, Mark J.; Grey, Andrew B.; Gamble, Greg D.; Reid, Ian R. (2010): Effect of Osteoporosis Treatment on Mortality: A Meta-Analysis. In: *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 95 (3), S. 1174–1181. DOI: 10.1210/jc.2009-0852.

Bonewald, Lynda F. (2007): Osteocytes as dynamic multifunctional cells. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 1116, S. 281–290. DOI: 10.1196/annals.1402.018.

Bouletreau, Pierre J.; Warren, Stephen M.; Spector, Jason A.; Peled, Ziv M.; Gerrets, Rene P.; Greenwald, Joshua A.; Longaker, Michael T. (2002): Hypoxia and VEGF up-regulate BMP-2 mRNA and protein expression in microvascular endothelial cells: implications for fracture healing. In: *Plastic and reconstructive surgery* 109 (7), S. 2384–2397.

Brown, Janet E.; Coleman, Robert E. (2001): The role of bisphosphonates in breast cancer: The present and future role of bisphosphonates in the management of patients with breast cancer. In: *Breast Cancer Research* 4 (1), S. 24–29. DOI: 10.1186/bcr413.

Burger, Elisabeth H.; Klein-Nulend, Jenneke; Smit, Theo H. (2003): Strain-derived canalicular fluid flow regulates osteoclast activity in a remodelling osteon - a proposal. In: *Bone Cell and Tissue Mechanics* 36 (10), S. 1453–1459. DOI: 10.1016/S0021-9290(03)00126-X.

Burgess, Teresa L.; Qian, Yi-xin; Kaufman, Stephen; Ring, Brian D.; Van, Gwyneth; Capparelli, Charles et al. (1999): The Ligand for Osteoprotegerin (OPGL) Directly Activates Mature Osteoclasts. In: *The Journal of Cell Biology* 145 (3), S. 527–538.

Cavanaugh, J. E. (2004): Role of extracellular signal regulated kinase 5 in neuronal survival. In: *European Journal of Biochemistry* 271 (11), S. 2056–2059. DOI: 10.1111/j.1432-1033.2004.04131.x.

Cho, Young-Eun; Alcantara, Ethel; Kumaran, Santhy; Son, Kun-Ho; Sohn, Ho-Yong; Lee, Jong-Hwa et al. (2010): Red yeast rice stimulates osteoblast proliferation and increases alkaline phosphatase activity in MC3T3-E1 cells. In: *Nutrition Research* 30 (7), S. 501–510. DOI: 10.1016/j.nutres.2010.06.011.

Clézardin, Philippe (2011): Bisphosphonates' antitumor activity: An unravelled side of a multifaceted drug class. In: *Skeletal Complications of Cancer including Abstracts from the 10th International Conference on Cancer-Induced Bone Disease 10th International Conference on Cancer-Induced Bone Disease* 48 (1), S. 71–79. DOI: 10.1016/j.bone.2010.07.016.

Clézardin, Philippe; Ebetino, Frank H.; Fournier, Pierrick G.J. (2005): Bisphosphonates and Cancer-Induced Bone Disease: Beyond Their Antiresorptive Activity. In: *Cancer Res* 65 (12), S. 4971. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-0264.

Clinton, S. K.; Underwood, R.; Hayes, L.; Sherman, M. L.; Kufe, D. W.; Libby, P. (1992): Macrophage colony-stimulating factor gene expression in vascular cells and in experimental and human atherosclerosis. In: *The American Journal of Pathology* 140 (2), S. 301–316.

Cohen-Saidon, Cellina; Cohen, Ariel A.; Sigal, Alex; Liron, Yuvalal; Alon, Uri (2009): Dynamics and Variability of ERK2 Response to EGF in Individual Living Cells. In: *Molecular Cell* 36 (5), S. 885–893. DOI: 10.1016/j.molcel.2009.11.025.

Collin-Osdoby, P.; Rothe, L.; Anderson, F.; Nelson, M.; Maloney, W.; Osdoby, P. (2001): Receptor activator of NFkappa B and osteoprotegerin expression by human microvascular endothelial cells, regulation by inflammatory cytokines, and role in human osteoclastogenesis. In: *J Biol Chem* (276), S. 20659–20672.

Coxon, F. P.; Rogers, MJ. (2003): The role of prenylated small GTP-binding proteins in the regulation of osteoclast function. In: *Calcif Tissue Int.* DOI: 10.1007/s00223-002-2017-2.

Coxon, Fraser P.; Thompson, Keith; Rogers, Michael J. (2006): Recent advances in understanding the mechanism of action of bisphosphonates. In: *Respiratory/Musculoskeletal* 6 (3), S. 307–312. DOI: 10.1016/j.coph.2006.03.005.

- Dallas, Sarah L.; Prideaux, Matthew; Bonewald, Lynda F. (2013): The Osteocyte: An Endocrine Cell ... and More. In: *Endocrine Reviews* 34 (5), S. 658–690. DOI: 10.1210/er.2012-1026.
- Datta, Nabanita S.; Pettway, Glenda J.; Chen, Chen; Koh, Amy J.; McCauley, Laurie K. (2007): Cyclin D1 as a Target for the Proliferative Effects of PTH and PTHrP in Early Osteoblastic Cells. In: *J Bone Miner Res* 22 (7), S. 951–964. DOI: 10.1359/jbmr.070328.
- Dekker, R. J. (2006): KLF2 provokes a gene expression pattern that establishes functional quiescent differentiation of the endothelium. In: *Blood* 107 (11), S. 4354–4363. DOI: 10.1182/blood-2005-08-3465.
- DOUV (2009): Zahlen zur Häufigkeit der Osteoporose. Deutscher Orthopäden- und Unfallchirurgen-Verband. Online verfügbar unter http://www.dov-online.de/verband/presse_detail.php?id=223.
- Dunford, J. E.; Rogers, M. J.; Ebetino, F. H.; Phipps, R. J.; Coxon, F. P. (2006): Inhibition of protein prenylation by bisphosphonates causes sustained activation of rac, Cdc42 and rho GTPases. In: *J Bone Miner Res*, S. 684–694. DOI: 10.1359/jbmr.060118.
- Dunford, James E.; Thompson, Keith; Coxon, Fraser P.; Luckman, Steven P.; Hahn, Frederick M.; Poulter, C. Dale et al. (2001): Structure-Activity Relationships for Inhibition of Farnesyl Diphosphate Synthase in Vitro and Inhibition of Bone Resorption in Vivo by Nitrogen-Containing Bisphosphonates. In: *J Pharmacol Exp Ther* 296 (2), S. 235.
- Dunstan, Colin R.; Felsenberg, Dieter; Seibel, Markus J. (2007): Therapy Insight: the risks and benefits of bisphosphonates for the treatment of tumor-induced bone disease. In: *Nat Clin Prac Oncol* 4 (1), S. 42–55. DOI: 10.1038/ncponc0688.
- DVO, Dachverband Osteologie (2014): Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Osteoporose bei Männern ab dem 60. Lebensjahr und bei postmenopausalen Frauen. Leitlinie des Dachverbands der Deutschsprachigen Wissenschaftlichen Osteologischen Gesellschaften e.V. Leitlinie des Dachverbands der Deutschsprachigen Wissenschaftlichen Osteologischen Gesellschaften e.V.
- Ebert, Regina; Zeck, Sabine; Meissner-Weigl, Jutta; Klotz, Barbara; Rachner, Tilman D.; Benad, Peggy et al. (2012): Krüppel-like factors KLF2 and 6 and Ki-67 are direct targets of zoledronic acid in MCF-7 cells. In: *Bone* 50 (3), S. 723–732. DOI: 10.1016/j.bone.2011.11.025.
- Ebetino, Frank H.; Hogan, Anne-Marie L.; Sun, Shuting; Tsoumpra, Maria K.; Duan, Xuchen; Triffitt, James T. et al.: The relationship between the chemistry and biological activity of the bisphosphonates. In: *Bone* 49 (1), S. 20–33. DOI: 10.1016/j.bone.2011.03.774.
- Eriksen, Erik Fink (2010): Cellular mechanisms of bone remodeling. In: *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders* 11 (4), S. 219–227. DOI: 10.1007/s11154-010-9153-1.

- Fassbender, K.; Simons, M.; Bergmann, C.; Stroick, M.; Lütjohann, D.; Keller, P. et al. (2001): Simvastatin strongly reduces levels of Alzheimer's disease β -amyloid peptides A β 42 and A β 40 in vitro and in vivo. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (10), S. 5856–5861. DOI: 10.1073/pnas.081620098.
- Felsenberg, D.; Hoffmeister, B.; Amling, M. (2006): Kiefernekrosen nach hoch dosierter Bisphosphonattherapie. In: *Deutsches Ärzteblatt*, S. 2681–2682.
- Ferron, Mathieu; Boudiffa, Maya; Arsenault, Michel; Rached, Mohamed; Pata, Monica; Giroux, Sylvie et al. (2011): Inositol Polyphosphate 4-Phosphatase B as A Regulator of Bone Mass in Mice and Human. In: *Cell metabolism* 14 (4), S. 466–477. DOI: 10.1016/j.cmet.2011.08.013.
- Finegan, Katherine G.; Wang, Xin; Lee, Eun-Ju; Robinson, Andrew C.; Tournier, Cathy (2009): Regulation of neuronal survival by the extracellular signal-regulated protein kinase 5. In: *Cell death and differentiation* 16 (5), S. 674–683. DOI: 10.1038/cdd.2008.193.
- FLEISCH, H. (2003): Bisphosphonates in osteoporosis. In: *European Spine Journal* 12 (Suppl 2), S142-S146. DOI: 10.1007/s00586-003-0622-z.
- FLEISCH, H.; BISAZ, S. (1962): Isolation from urine of pyrophosphate, a calcification inhibitor. In: *The American journal of physiology* 203, S. 671–675.
- Freed-Pastor, William A.; Mizuno, Hideaki; Zhao, Xi; Langerod, Anita; Moon, Sung-Hwan; Rodriguez-Barrueco, Ruth et al. (2012): Mutant p53 disrupts mammary tissue architecture via the mevalonate pathway. In: *Cell* 148 (1-2), S. 244–258. DOI: 10.1016/j.cell.2011.12.017.
- Frith, Julie C.; Mönkkönen, Jukka; Blackburn, G. Michael; Russell, R. Graham G.; Rogers, Michael J. (1997): Clodronate and Liposome-Encapsulated Clodronate Are Metabolized to a Toxic ATP Analog, Adenosine 5'-(β,γ -Dichloromethylene) Triphosphate, by Mammalian Cells In Vitro. In: *J Bone Miner Res* 12 (9), S. 1358–1367. DOI: 10.1359/jbmr.1997.12.9.1358.
- García-Martín, A.; Ardura, J. A.; Maycas, M.; Lozano, D.; López-Herradón, A.; Portal-Núñez, S. et al. (2014): Functional Roles of the Nuclear Localization Signal of Parathyroid Hormone-Related Protein (PTHrP) in Osteoblastic Cells. In: *Molecular Endocrinology* 28 (6), S. 925–934. DOI: 10.1210/me.2013-1225.
- Gong, Xue; Yu, Wanlu; Zhao, Hang; Su, Jiansheng; Sheng, Qing (2016): Skeletal Site-specific Effects of Zoledronate on in vivo Bone Remodeling and in vitro BMSCs Osteogenic Activity. In: *Scientific Reports* 7, S. 36129. DOI: 10.1038/srep36129.
- Gordon, Leslie B.; Massaro, Joe; D'Agostino, Ralph B.; Campbell, Susan E.; Brazier, Joan; Brown, W. Ted et al. (2014): Impact of Farnesylation Inhibitors on Survival in Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome. In: *Circulation* 130 (1), S. 27–34. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.008285.

- Gortázar, A. R. de; Alonso, V.; Alvarez-Arroyo, M. V.; Esbrit, P. (2006): Transient Exposure to PTHrP (107-139) Exerts Anabolic Effects through Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 in Human Osteoblastic Cells In Vitro. In: *Calcified Tissue International* 79 (5), S. 360–369. DOI: 10.1007/s00223-006-0099-y.
- Green, Jonathan R.; Clezardin, Philippe (2002): Mechanisms of bisphosphonate effects on osteoclasts, tumor cell growth, and metastasis. In: *American journal of clinical oncology* 25 (6 Suppl 1), S3-9.
- Guo, Rey-Ting; Cao, Rong; Liang, Po-Huang; Ko, Tzu-Ping; Chang, Tao-Hsin; Hudock, Michael P. et al. (2007): Bisphosphonates target multiple sites in both cis- and trans-prenyltransferases. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (24), S. 10022–10027. DOI: 10.1073/pnas.0702254104.
- Harada, Shun-ichi; Rodan, Gideon A. (2003): Control of osteoblast function and regulation of bone mass. In: *Nature* 423 (6937), S. 349–355. DOI: 10.1038/nature01660.
- Hayashi, Masaaki; Lee, Jiing-Dwan (2004): Role of the BMK1/ERK5 signaling pathway. Lessons from knockout mice. In: *J Mol Med* 82 (12), S. 800–808. DOI: 10.1007/s00109-004-0602-8.
- Hilding, Maria; Aspenberg, Per (2007): Local peroperative treatment with a bisphosphonate improves the fixation of total knee prostheses: a randomized, double-blind radiostereometric study of 50 patients. In: *Acta orthopaedica* 78 (6), S. 795–799. DOI: 10.1080/17453670710014572.
- Huppelsberg, Jens; Walter, Kerstin (Hg.) (2003): *Kurzlehrbuch Physiologie*. 2. Aufl.: Thieme.
- Im, Gun-Il; Qureshi, Sheeraz A.; Kenney, Jennifer; Rubash, Harry E.; Shanbhag, Arun S. (2004): Osteoblast proliferation and maturation by bisphosphonates. In: *Biomaterials* 25 (18), S. 4105–4115. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2003.11.024.
- Jain, M. K.; Sangwung, P.; Hamik, A. (2014): Regulation of an Inflammatory Disease. Kruppel-Like Factors and Atherosclerosis. In: *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 34 (3), S. 499–508. DOI: 10.1161/ATVBAHA.113.301925.
- Jilka, Robert L. (2007): MOLECULAR AND CELLULAR MECHANISMS OF THE ANABOLIC EFFECT OF INTERMITTENT PTH. In: *Bone* 40 (6), S. 1434–1446. DOI: 10.1016/j.bone.2007.03.017.
- Jochum, W.; David, J. P.; Elliott, C.; Wutz, A.; Plenk, H., JR; Matsuo, K.; Wagner, E. F. (2000): Increased bone formation and osteosclerosis in mice overexpressing the transcription factor Fra-1. In: *Nature medicine* 6 (9), S. 980–984. DOI: 10.1038/79676.
- Kabelitz, Dieter; Wesch, Daniela; He, Wei (2007): Perspectives of $\gamma\delta$ T Cells in Tumor Immunology. In: *Cancer Res* 67 (1), S. 5. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-3069.

- Kasler, Herbert G.; Victoria, Joseph; Duramad, Omar; Winoto, Astar (2000): ERK5 Is a Novel Type of Mitogen-Activated Protein Kinase Containing a Transcriptional Activation Domain. In: *Molecular and Cellular Biology* 20 (22), S. 8382–8389.
- Kato, Y.; Kravchenko, V. V.; Tapping, R. I.; Han, J.; Ulevitch, R. J.; Lee, J. D. (1997): BMK1/ERK5 regulates serum-induced early gene expression through transcription factor MEF2C. In: *The EMBO Journal* 16 (23), S. 7054–7066. DOI: 10.1093/emboj/16.23.7054.
- Kavanagh, Kathryn L.; Guo, Kunde; Dunford, James E.; Wu, Xiaoqiu; Knapp, Stefan; Ebetino, Frank H. et al. (2005): The molecular mechanism of nitrogen-containing bisphosphonates as antiosteoporosis drugs. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (20), S. 7829–7834. DOI: 10.1073/pnas.0601643103.
- Kelwick, Richard; Desanlis, Ines; Wheeler, Grant N.; Edwards, Dylan R. (2015): The ADAMTS (A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs) family. In: *Genome Biology* 16 (1), S. 113. DOI: 10.1186/s13059-015-0676-3.
- Knoch, F. von; Jaquiere, C.; Kowalsky, M.; Schaeren, S.; Alabre, C.; Martin, I. et al. (2005): Effects of bisphosphonates on proliferation and osteoblast differentiation of human bone marrow stromal cells. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2005.04.059.
- Koh, Kwang Kon (2000): Effects of statins on vascular wall: vasomotor function, inflammation, and plaque stability. In: *Cardiovasc Res* 47 (4), S. 648. DOI: 10.1016/S0008-6363(00)00146-2.
- Konstantinopoulos, Panagiotis A.; Karamouzis, Michalis V.; Papavassiliou, Athanasios G. (2007): Post-translational modifications and regulation of the RAS superfamily of GTPases as anticancer targets. In: *Nature reviews. Drug discovery* 6 (7), S. 541–555. DOI: 10.1038/nrd2221.
- Kostenuik, P. J.; Shalhoub, V. (2001): Osteoprotegerin: a physiological and pharmacological inhibitor of bone resorption. In: *Current pharmaceutical design* 7 (8), S. 613–635.
- Krishnan, Venkatesh; Moore, Terry L.; Ma, Yanfei L.; Helvering, Leah M.; Frolik, Charles A.; Valasek, Kathleen M. et al. (2003): Parathyroid Hormone Bone Anabolic Action Requires Cbfa1/Runx2-Dependent Signaling. In: *Molecular Endocrinology* 17 (3), S. 423–435. DOI: 10.1210/me.2002-0225.
- Krølner, Bjørn; Toft, Birte (1983): Vertebral Bone Loss: An Unheeded Side Effect of Therapeutic Bed Rest. In: *Clin Sci* 64 (5), S. 537. DOI: 10.1042/cs0640537.
- Kusumbe, Anjali P.; Ramasamy, Saravana K.; Adams, Ralf H. (2014): Coupling of angiogenesis and osteogenesis by a specific vessel subtype in bone. In: *Nature* 507 (7492), S. 323–328. DOI: 10.1038/nature13145.

Kwak, Brenda R.; Mulhaupt, Flore; Mach, François (2003): Atherosclerosis: anti-inflammatory and immunomodulatory activities of statins. In: *Autoimmunity Reviews* 2 (6), S. 332–338. DOI: 10.1016/S1568-9972(03)00049-1.

Langen, Urs H.; Pitulescu, Mara E.; Kim, Jung Mo; Enriquez-Gasca, Rocio; Sivaraj, Kishor K.; Kusumbe, Anjali P. et al. (2017): Cell-matrix signals specify bone endothelial cells during developmental osteogenesis. In: *Nature cell biology* 19 (3), S. 189–201. DOI: 10.1038/ncb3476.

Lee, Oi Lin; Horvath, Noemi; Lee, Cindy; Joshua, Doug; Ho, Joy; Szer, Jeff et al. (2017): Bisphosphonate guidelines for treatment and prevention of myeloma bone disease. In: *Intern Med J* 47 (8), S. 938–951. DOI: 10.1111/imj.13502.

Lehenkari, Petri P.; Kellinsalmi, Maarit; Napankangas, Juha P.; Ylitalo, Kari V.; Monkkonen, Jukka; Rogers, Michael J. et al. (2002): Further insight into mechanism of action of clodronate: inhibition of mitochondrial ADP/ATP translocase by a nonhydrolyzable, adenine-containing metabolite. In: *Molecular Pharmacology* 61 (5), S. 1255–1262.

Lerner, Edwina C.; Qian, Yimin; Blaskovich, Michelle A.; Fossum, Renae D.; Vogt, Andreas; Sun, Jiazhi et al. (1995): Ras CAAX Peptidomimetic FTI-277 Selectively Blocks Oncogenic Ras Signaling by Inducing Cytoplasmic Accumulation of Inactive Ras-Raf Complexes. In: *Journal of Biological Chemistry* 270 (45), S. 26802–26806. DOI: 10.1074/jbc.270.45.26802.

Li, Xudong; Cui, Qianjun; Kao, Chinghai; Wang, Gwo-Jaw; Balian, Gary (2003): Lovastatin inhibits adipogenic and stimulates osteogenic differentiation by suppressing PPAR γ 2 and increasing Cbfa1/Runx2 expression in bone marrow mesenchymal cell cultures. In: *Bone* 33 (4), S. 652–659. DOI: 10.1016/S8756-3282(03)00239-4.

Lian, Jane B.; Stein, Gary S.; Javed, Amjad; van Wijnen, Andre J.; Stein, Janet L.; Montecino, Martin et al. (2006): Networks and hubs for the transcriptional control of osteoblastogenesis. In: *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders* 7 (1), S. 1–16. DOI: 10.1007/s11154-006-9001-5.

Liao, James K.; Laufs, Ulrich (2005): PLEIOTROPIC EFFECTS OF STATINS. In: *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45 (1), S. 89–118. DOI: 10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095748.

Lindsay, Robert (2002): Modeling the benefits of pamidronate in children with osteogenesis imperfecta. In: *The Journal of Clinical Investigation* 110 (9), S. 1239–1241. DOI: 10.1172/JCI17051.

Luckman, Steven P.; Hughes, David E.; Coxon, Fraser P.; Russell, R. Graham G.; Rogers, Michael J. (2005): Nitrogen-Containing Biphosphonates Inhibit the Mevalonate Pathway and Prevent Post-Translational Prenylation of GTP-Binding Proteins, Including Ras. In: *J Bone Miner Res* 20 (7), S. 1265–1274. DOI: 10.1359/jbmr.2005.20.7.1265.

- Ma, Y. L.; Cain, R. L.; Halladay, D. L.; Yang, X.; Zeng, Q.; Miles, R. R. et al. (2001): Catabolic effects of continuous human PTH (1--38) in vivo is associated with sustained stimulation of RANKL and inhibition of osteoprotegerin and gene-associated bone formation. In: *Endocrinology* 142 (9), S. 4047–4054. DOI: 10.1210/endo.142.9.8356.
- Maeda, Toyonobu; Matsunuma, Ayako; Kurahashi, Izuru; Yanagawa, Toru; Yoshida, Hiroshi; Horiuchi, Noboru (2004): Induction of osteoblast differentiation indices by statins in MC3T3-E1 cells. In: *J. Cell. Biochem.* 92 (3), S. 458–471. DOI: 10.1002/jcb.20074.
- Matsubara, Hidenori; Hogan, Daniel E.; Morgan, Elise F.; Mortolock, Douglas P.; Einhorn, Thomas A.; Gerstenfeld, Louis C. (2012): Vascular Tissues Are a Primary Source of BMP2 Expression during Bone Formation Induced by Distraction Osteogenesis. In: *Bone* 51 (1), S. 168–180. DOI: 10.1016/j.bone.2012.02.017.
- Miller, PD.; Hattersley, G.; Riis, B.; al, et (2016): Effect of abaloparatide vs placebo on new vertebral fractures in postmenopausal women with osteoporosis: A randomized clinical trial. In: *JAMA* 316 (7), S. 722–733. DOI: 10.1001/jama.2016.11136.
- Min, H.; Morony, S.; Sarosi, I.; Dunstan, C. R.; Capparelli, C.; Scully, S. et al. (2000): Osteoprotegerin reverses osteoporosis by inhibiting endosteal osteoclasts and prevents vascular calcification by blocking a process resembling osteoclastogenesis. In: *The Journal of experimental medicine* 192 (4), S. 463–474.
- Minaire, P. (1989): Immobilization osteoporosis: a review. In: *Clin Rheumatol.* (Suppl 2), Suppl 2:95-103. Online verfügbar unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2667875>.
- Minne et al. (2003): Evidenzbasierte Therapie der Osteoporose. In: *Dtsch med Wochenschr* 128 (30), S. 1618. DOI: 10.1055/s-2003-40931.
- Mo, Huanbiao; Yeganehjoo, Hoda; Shah, Anureet; Mo, Warren K.; Soelaiman, Ima Nirwana; Shen, Chwan-Li (2012): Mevalonate-suppressive dietary isoprenoids for bone health. In: *The Journal of Nutritional Biochemistry* 23 (12), S. 1543–1551. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2012.07.007.
- Mönkkönen, Hannu; Auriola, Seppo; Lehenkari, Petri; Kellinsalmi, Maarit; Hassinen, Ilmo E.; Vepsäläinen, Jouko; Mönkkönen, Jukka (2005): A new endogenous ATP analog (Apppl) inhibits the mitochondrial adenine nucleotide translocase (ANT) and is responsible for the apoptosis induced by nitrogen-containing bisphosphonates. In: *British Journal of Pharmacology* 147 (4), S. 437–445. DOI: 10.1038/sj.bjp.0706628.
- Murshed, Monzur; Harmey, Dympna; MillÄjn, JosÄ© Luis; McKee, Marc D.; Karsenty, Gerard (2005): Unique coexpression in osteoblasts of broadly expressed genes accounts for the spatial restriction of ECM mineralization to bone. In: *Genes & Development* 19 (9), S. 1093–1104. DOI: 10.1101/gad.1276205.
- Nooh, Anas; Zhang, Yu Ling; Sato, Daisuke; Rosenzweig, Derek H.; Tabariès, Sébastien; Siegel, Peter et al. (2017): Intra-tumor delivery of zoledronate mitigates metastasis-

induced osteolysis superior to systemic administration. In: *Journal of Bone Oncology* 6, S. 8–15. DOI: 10.1016/j.jbo.2017.01.001.

Nussbaumer, Oliver; Gruenbacher, Georg; Gander, Hubert; Thurnher, Martin (2011): DC-like cell-dependent activation of human natural killer cells by the bisphosphonate zoledronic acid is regulated by $\gamma\delta$ T lymphocytes. In: *Blood* 118 (10), S. 2743. DOI: 10.1182/blood-2011-01-328526.

Ohba, Tetsuro; Cates, Justin M.M.; Cole, Heather A.; Slosky, David A.; Haro, Hirotsuka; Ichikawa, Jiro et al. (2014): Pleiotropic effects of bisphosphonates on osteosarcoma. In: *Bone* 63, S. 110–120. DOI: 10.1016/j.bone.2014.03.005.

Ohnesorge, N.; Viemann, D.; Schmidt, N.; Czymai, T.; Spiering, D.; Schmolke, M. et al. (2010): Erk5 Activation Elicits a Vasoprotective Endothelial Phenotype via Induction of Kruppel-like Factor 4 (KLF4). In: *Journal of Biological Chemistry* 285 (34), S. 26199–26210. DOI: 10.1074/jbc.M110.103127.

Okamoto, S.; Jiang, Y.; Kawamura, K.; Shingyoji, M.; Tada, Y.; Sekine, I. et al. (2014): Zoledronic acid induces apoptosis and S-phase arrest in mesothelioma through inhibiting Rab family proteins and topoisomerase II actions. In: *Cell Death & Disease* 5 (11), e1517. DOI: 10.1038/cddis.2014.475.

Okamoto, Shinya; Jiang, Yuanyuan; Kawamura, Kiyoko; Shingyoji, Masato; Fukamachi, Toshihiko; Tada, Yuji et al. (2013): Zoledronic Acid Produces Combinatory Anti-Tumor Effects with Cisplatin on Mesothelioma by Increasing p53 Expression Levels. In: *PLoS ONE* 8 (3), e60297. DOI: 10.1371/journal.pone.0060297.

Okamoto, Shinya; Kawamura, Kiyoko; Li, Quanhai; Yamanaka, Makako; Yang, Shan; Fukamachi, Toshihiko et al. (2012): Zoledronic Acid Produces Antitumor Effects on Mesothelioma Through Apoptosis and S-Phase Arrest in p53-Independent and Ras prenylation-Independent Manners. In: *Journal of Thoracic Oncology* 7 (5), S. 873–882. DOI: 10.1097/JTO.0b013e31824c7d43.

Pannier, Stéphanie; Mugniery, Emilie; Jonquoy, Aurélie; Benoist-Lasselín, Catherine; Odent, Thierry; Jais, Jean-Philippe et al. (2010): Delayed bone age due to a dual effect of FGFR3 mutation in Achondroplasia. In: *Bone* 47 (5), S. 905–915. DOI: 10.1016/j.bone.2010.07.020.

Parmar, K. M. (2005): Integration of flow-dependent endothelial phenotypes by Kruppel-like factor 2. In: *Journal of Clinical Investigation* 116 (1), S. 49–58. DOI: 10.1172/JCI24787.

Patel, Tushar R.; Corbett, Siobhan A. (2003): Mevastatin suppresses lipopolysaccharide-induced Rac activation in the human monocyte cell line THP-1. In: *Surgery* (134), S. 306–311. DOI: 10.1067/msy.2003.241.

Pavlakís, Nick; Schmidt, Robert L.; Stockler, Martin R. (2005): Bisphosphonates for breast cancer. In: *Cochrane Database of Systematic Reviews* (3). DOI: 10.1002/14651858.CD003474.pub2.

- Peng, Jing; Liu, Yong; Chen, Long; Peng, Kun; Xu, Zhao; Zhang, Dagang; Xiang, Zhou (2016): Bisphosphonates can prevent recurrent hip fracture and reduce the mortality in osteoporotic patient with hip fracture: A meta-analysis. In: *Pakistan Journal of Medical Sciences* 32 (2), S. 499–504. DOI: 10.12669/pjms.322.9435.
- Perezsala, D.; Mollinedo, F. (1994): Inhibition of Isoprenoid Biosynthesis Induces Apoptosis in Human Promyelocytic HL-60 Cells. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 199 (3), S. 1209–1215. DOI: 10.1006/bbrc.1994.1359.
- Petroianu, G. A. (2011): Pharmacist Theodor Salzer (1833-1900) and the discovery of bisphosphonates. In: *Die Pharmazie* 66 (10), S. 804–807. Online verfügbar unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22026164>.
- Prendergast, G. C.; Davide, J. P.; deSolms, S. J.; Giuliani, E. A.; Graham, S. L.; Gibbs, J. B. et al. (1994): Farnesyltransferase inhibition causes morphological reversion of ras-transformed cells by a complex mechanism that involves regulation of the actin cytoskeleton. In: *Molecular and Cellular Biology* 14 (6), S. 4193–4202. DOI: 10.1128/MCB.14.6.4193.
- Rachner, Tilman D.; Singh, Shiv K.; Schoppet, Michael; Benad, Peggy; Bornhäuser, Martin; Ellenrieder, Volker et al. (2010): Zoledronic acid induces apoptosis and changes the TRAIL/OPG ratio in breast cancer cells. In: *Cancer Letters* 287 (1), S. 109–116. DOI: 10.1016/j.canlet.2009.06.003.
- Regan, Christopher P.; Li, Wei; Boucher, Diane M.; Spatz, Stephen; Su, Michael S.; Kuida, Keisuke (2002): Erk5 null mice display multiple extraembryonic vascular and embryonic cardiovascular defects. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (14), S. 9248–9253. DOI: 10.1073/pnas.142293999.
- RKI (2009): Prävalenz von Osteoporose. Robert Koch-Institut. Online verfügbar unter https://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Gesundheitsberichterstattung/GBEDownloadsB/Geda09/Osteoporose.pdf?__blob=publicationFile.
- Roberts, Owain Llŷr; Holmes, Katherine; Müller, Jürgen; Cross, Darren A.E.; Cross, Michael J. (2009): ERK5 and the regulation of endothelial cell function. In: *Biochim. Soc. Trans.* 37 (6), S. 1254–1259. DOI: 10.1042/BST0371254.
- Sato, M.; Grasser, W.; Endo, N.; Akins, R.; Simmons, H.; Thompson, D. D. et al. (1991): Bisphosphonate action. Alendronate localization in rat bone and effects on osteoclast ultrastructure. In: *The Journal of Clinical Investigation* 88 (6), S. 2095–2105. DOI: 10.1172/JCI115539.
- Schmid, J.; Wallkamm, B.; Hammerle, C. H.; Gogolewski, S.; Lang, N. P. (1997): The significance of angiogenesis in guided bone regeneration. A case report of a rabbit experiment. In: *Clinical oral implants research* 8 (3), S. 244–248. Online verfügbar unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9586469>.
- Schmits, R.; Filmus, J.; Gerwin, N.; Senaldi, G.; Kiefer, F.; Kundig, T. et al. (1997): CD44 regulates hematopoietic progenitor distribution, granuloma formation, and

- tumorigenicity. In: *Blood* (6), S. 2217–2233. Online verfügbar unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9310473>.
- Schott, G. D. (1997): Bisphosphonates for pain relief in reflex sympathetic dystrophy? In: *Lancet (London, England)*. Online verfügbar unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9343496>.
- Smith, E. L., JR.; Reddan, W.; Smith, P. E. (1981): Physical activity and calcium modalities for bone mineral increase in aged women. In: *Med Sci Sports Exerc.* (13(1)), S. 60–64. Online verfügbar unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7219137>.
- Sohn, Sue J.; Sarvis, Briana K.; Cado, Dragana; Winoto, Astar (2002): ERK5 MAPK Regulates Embryonic Angiogenesis and Acts as a Hypoxia-sensitive Repressor of Vascular Endothelial Growth Factor Expression. In: *Journal of Biological Chemistry* 277 (45), S. 43344–43351. DOI: 10.1074/jbc.M207573200.
- Su, Nan; Sun, Qidi; Li, Can; Lu, Xiumin; Qi, Huabing; Chen, Siyu et al. (2009): Gain-of-function mutation in FGFR3 in mice leads to decreased bone mass by affecting both osteoblastogenesis and osteoclastogenesis. In: *Human Molecular Genetics* 19 (7), S. 1199–1210. DOI: 10.1093/hmg/ddp590.
- Suswillo, R. F.; Javaheri, B.; Rawlinson, S. C.; Dowthwaite, G. P.; Le Lanyon; Pitsillides (2017): Strain uses gap junctions to reverse stimulation of osteoblast proliferation by osteocytes. DOI: 10.1002/cbf.3245.
- Takahashi, Naoyuki; Udagawa, Nobuyuki; Suda, Tatsuo (1999): A New Member of Tumor Necrosis Factor Ligand Family, ODF/OPGL/TRANCE/RANKL, Regulates Osteoclast Differentiation and Function. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 256 (3), S. 449–455. DOI: 10.1006/bbrc.1999.0252.
- Teitelbaum, Steven L. (2000): Bone Resorption by Osteoclasts. In: *Science* 289 (5484), S. 1504. DOI: 10.1126/science.289.5484.1504.
- Thompson, Keith; Rogers, Michael J.; Coxon, Fraser P.; Crockett, Julie C. (2006): Cytosolic entry of bisphosphonate drugs requires acidification of vesicles after fluid-phase endocytosis. In: *Molecular Pharmacology* 69 (5), S. 1624–1632. DOI: 10.1124/mol.105.020776.
- Tsubaki, Masanobu; Satou, Takao; Itoh, Tatsuki; Imano, Motohiro; Yanae, Masashi; Kato, Chisato et al. (2012): Bisphosphonate- and statin-induced enhancement of OPG expression and inhibition of CD9, M-CSF, and RANKL expressions via inhibition of the Ras/MEK/ERK pathway and activation of p38MAPK in mouse bone marrow stromal cell line ST2. In: *Molecular and Cellular Endocrinology* 361 (1–2), S. 219–231. DOI: 10.1016/j.mce.2012.05.002.
- Tsurukai, T.; Udagawa, N.; Matsuzaki, K.; Takahashi, N.; Suda, T. (2000): Roles of macrophage-colony stimulating factor and osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis. In: *Journal of bone and mineral metabolism* 18 (4), S. 177–184. Online verfügbar unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10874596>.

Vacher, Jean (2013): Inpp4b is a novel negative modulator of osteoclast differentiation and a prognostic locus for human osteoporosis. In: *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1280 (1), S. 52–54. DOI: 10.1111/nyas.12014.

van Beek, Ermond; Pieterman, Elsbet; Cohen, Louis; Löwik, Clemens; Papapoulos, Socrates (1999): Farnesyl Pyrophosphate Synthase Is the Molecular Target of Nitrogen-Containing Bisphosphonates. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 264 (1), S. 108–111. DOI: 10.1006/bbrc.1999.1499.

van der Pluijm, G.; Vloedgraven, H.; van Beek, E.; van der Wee-Pals, L.; Löwik, C.; Papapoulos, S. (1996): Bisphosphonates inhibit the adhesion of breast cancer cells to bone matrices in vitro. In: *Journal of Clinical Investigation* 98 (3), S. 698–705.

Veno, P. A.; Nicoletta, D. P.; Kalajzic, J.; Rowe, D. W.; Bonewald, L. F.; Dallas, SL. (2007): Dynamic imaging in living calvaria reveals the motile properties of osteoblasts and osteocytes and suggests heterogeneity of osteoblasts in bone. In: *J Bone Miner Res* (22(suppl)), S. 13.

Verdijk, R.; Franke, H. R.; Wolbers, F.; Vermes, I. (2007): Differential effects of bisphosphonates on breast cancer cell lines. In: *Cancer Letters* 246 (1–2), S. 308–312. DOI: 10.1016/j.canlet.2006.03.011.

Wong, W. W. L.; Dimitroulakos, J.; Minden, M. D.; Penn, L. Z. (2002): HMG-CoA reductase inhibitors and the malignant cell: the statin family of drugs as triggers of tumor-specific apoptosis. In: *Leukemia* 16 (4), S. 508–519. DOI: 10.1038/sj.leu.2402476.

Wood, Jeanette; Bonjean, Karine; Ruetz, Stephan; Bellahcene, Akeila; Devy, Laetitia; Foidart, Jean Michel et al. (2002): Novel antiangiogenic effects of the bisphosphonate compound zoledronic acid. In: *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 302 (3), S. 1055–1061. DOI: 10.1124/jpet.102.035295.

Ye, Chenyi; Xu, Mingyuan; Wang, Shengdong; Jiang, Shuai; Chen, Xi; Zhou, Xiaoyu et al. (2016): Decreased Bone Mineral Density Is an Independent Predictor for the Development of Atherosclerosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. In: *PLoS ONE* 11 (5), e0154740. DOI: 10.1371/journal.pone.0154740.

Zuo, Yufeng; Wu, Yuexiu; Wehrli, Bret; Chakrabarti, Subrata; Chakraborty, Chandan (2015): Modulation of ERK5 is a novel mechanism by which Cdc42 regulates migration of breast cancer cells. In: *Journal of cellular biochemistry* 116 (1), S. 124–132. DOI: 10.1002/jcb.24950.

8 Publikation

Eine Auswahl der in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse schafft zusammen mit weiteren Resultaten von Christian Adam der AG Prof. Schmidt sowie unseren Kooperationspartnern Prof. Jakob und PD Dr. Ebert die Grundlage für ein *Paper* mit dem Titel „*The MEK5/ERK5 MAPK cascade is an effector pathway of bone-sustaining bisphosphonates that regulates osteogenic differentiation and mineralisation*“. Aktuell ist der bei der Zeitschrift *Bone* eingereichte Artikel in Revision und soll aller Voraussicht nach in Kürze veröffentlicht werden.

Die Ergebnisse wurden zudem im Rahmen des international anerkannten Kongresses EORS (*European Orthopaedic Research Society*) im September 2017 in München vorgestellt. Aufgrund des großen Interesses wurde mir die Präsentation der Daten in Form eines Kurzvortrags ermöglicht. Zudem ist das *Abstract* im eCM (*Eur Cell Mater*) Journal veröffentlicht worden.

9 Lebenslauf

10 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit motiviert und unterstützt haben.

Für die Vergabe des Promotionsthemas, die ausgezeichnete Betreuung sowie die Bereitstellung aller notwendigen Materialien danke ich Herrn Prof. Dr. Marc Schmidt, der stets ein zuverlässiger Ansprechpartner war und dessen hochqualifizierte Unterstützung in Planung und Durchführung zum Gelingen der Arbeit beitrug.

Zudem möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Matthias Goebeler bedanken, der mit großem Interesse die Forschung in der Hautklinik unterstützt und damit wichtige Voraussetzungen für die Promotion geschaffen hat. In diesem Zuge danke ich auch der *Graduate School of Life Sciences* für das strukturierte Programm, die interessanten Angebote und die umfangreiche Unterstützung.

Ganz großer Dank geht an Christian Adam, der mich nicht nur im Labor eingearbeitet hat, sondern mir während der ganzen Arbeit mit seinen breiten wissenschaftlichen und technischen Kenntnissen zur Seite stand. Danke für die Hilfsbereitschaft und Geduld!

Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. Franz Jakob und PD Dr. Regina Ebert für die Unterstützung und wissenschaftliche Expertise, die Bereitstellung wichtiger Materialien und für die gute Zusammenarbeit.

Auch möchte ich Roland für die Mitbetreuung der Arbeit danken sowie Helga für ihre Hilfestellung im Labor und Maike für die freundschaftliche Unterstützung im Forschungsalltag und darüber hinaus.

Ein besonderer Dank geht außerdem an meine Familie und meinen Freund Michael für ihre uneingeschränkte Unterstützung, die Motivation und das Vertrauen.

11 Eidesstattliche Erklärung

Affidavit

I hereby confirm that my thesis entitled “The activation of the MEK5/ Erk5 signalling pathway through inhibitory substances of the mevalonate metabolism“ is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and/ or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Place, Date

Signature

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „Aktivierung des MEK5/ Erk5-Signalwegs durch inhibitorische Substanzen des Mevalonatstoffwechsels“ eigenständig, das heißt insbesondere selbstständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ort, Datum

Unterschrift