

**Aus der orthopädischen Klinik und Poliklinik
König-Ludwig-Haus
Der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. Maximilian Rudert**

**Interaktion der Schlüsselenzyme der Mineralisierung (AP, ENPP1, AnkH,
PHOSPHO1) im Phosphatstoffwechsel *in vitro***

**Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

vorgelegt von

Laurent Momper

aus Ettelbruck

Würzburg, Juli 2019



Referent: Univ. -Prof. Dr. med. Franz Jakob

Korreferent: Univ. -Prof. Dr. med. habil. Martin Faßnacht-Capeller

Berichterstatter: Univ. -Prof. Dr. med. Ralf Barglou

Dekan: Professor Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 17. Juni 2020

Der Promovend ist Arzt

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Hypophosphatasie	1
1.2 Zusammenspiel von TNSALP, ENPP1 und ANKH bei der Knochenmineralisierung	4
1.3 Gewebe-unspezifische alkalische Phosphatase (TNSALP)	6
1.3.1 Substrate der TNSALP	9
1.4 Ectonucleotide Pyrophosphatase/Phosphodiesterase (ENPP1)	11
1.5 Ankylosis, progressive human Homolog (ANKH)	13
1.6 Der Mevalonat-Pathway	15
1.7 Ziel der Arbeit	21
2. Material und Methoden	22
2.1 Material	22
2.1.1 Geräte	22
2.1.2 Verbrauchbares	24
2.1.3 Chemikalien	25
2.1.4 Kits	27
2.1.5 Enzyme	27
2.1.6 Primer	27
2.1.7 Material für Gelelektrophorese	29
2.1.8 Sonstiges	30
2.2 Methoden	31
2.2.1 Zellkultur	31
2.2.1.1 Verwendete Zellen: humane mesenchymale Stammzellen und SAOS	31
2.2.1.2 Zellversorgung	32
2.2.1.3 Differenzierungsversuche unter Stimulation mit PPi, PPADS und β - γ meATP	33
2.2.1.4 Expositionsversuche mit PPADS und β - γ meATP	34
2.2.1.5 Expositionsversuche mit Probenecid	35
2.2.1.6 Zellzahlbestimmung	36
2.2.1.7 Apoptose-Messung	36
2.2.2 Enzymaktivitätsmessungen	37

2.2.2.1 Enzymassay der alkalischen Phosphatase (AP)	37
2.2.2.2 Aktivitätsmessung von ENPP1	39
2.2.3 Zytologische Färbungen	42
2.2.3.1 Alizarin-Rot-Färbung	42
2.2.3.2 Alkalische Phosphatase Färbung	43
2.2.3.3 Ölrotfärbung	43
2.2.4 Methoden zur RNA-Expressionsanalyse	44
2.2.4.1 RNA- Isolation und Aufreinigung	44
2.2.4.2 RNA- Konzentrationsbestimmung	45
2.2.4.3 cDNA-Synthese	46
2.2.4.4 Polymerase-Ketten Reaktion	47
2.2.4.5 Gelelektrophorese	49
3. Ergebnisse	50
3.1 Osteogene Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen unter Stimulation mit Pyrophosphat	50
3.2 Enzymaktivitätsmessung der alkalischen Phosphatase in SAOS2 im Verlauf der Zeit	56
3.3 Einfluss von PPi, PLP, Probenecid, Vitamin D3 auf die Enzymaktivität der alkalischen Phosphatase	57
3.4 Stimulation von SAOS2-Zellen mit Probenecid für 48 Stunden und Auswirkungen auf die alkalische Phosphatase	61
3.4.1 Enzymaktivitätsmessung	61
3.4.2 PCR von ALP, ANKH und ENPP1	62
3.4.3 Apoptose-Messung von SAOS2 nach 48 h Probenecid-Stimulation	62
3.5 Effekte einer Kurzzeitbehandlung mit Zoledronat bei humanen Stammzellen	63
3.6 ENPP1-Aktivitätsmessung mit PPADS und β - γ Methylentriphosphat als Hemmsubstanzen	65
3.7 Osteogene Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen unter ENPP1 Inhibition	67
3.8 24 Stunden Stimulation von SAOS-Zellen und humanen Stammzellen mit ENPP1 Inhibitoren	72
4. Diskussion	75
4.1 Stimulation der HMCS mit PPi- Auswirkungen auf zytologischer und genomischer Ebene	75

4.1.1 Die Einflüsse der osteogenen Differenzierung und PPi auf die PCR Analyse	75
4.1.2 Allgemeines	88
4.2 Einflüsse von PPi, PLP, Probenecid und Vitamin D auf die Aktivität der TNSALP	89
4.3 Einflüsse von Probenecid Stimulation über 48 Stunden auf die TNSALP	90
4.4 Einflüsse von Zoledronat auf die Genexpression von TNSALP, ENPP1 und ANKH	91
4.5 Auswirkungen von PPADS und β - γ meATP auf ENPP1 und die Mineralisierung	92
4.6 Schlussfolgerung	95
5. Zusammenfassung	96
6. Literaturverzeichnis	98

1. Einleitung

Die Bildung von Knochen bei Wirbeltieren ist ein Prozess, der durch verschiedene Enzyme und Metabolite in einem streng geregelten System bewerkstelligt wird [1, 2]. Krankheiten wie Hypophosphatasie sind das Resultat einer Entgleisung dieses Systems, insbesondere des Zusammenspiels von TNSALP, ENPP1 und ANKH und des Metaboliten PPI (s. 1.1). Deswegen ist es von großer medizinischer Relevanz, diese Prozesse soweit möglich in ihrer gesamten Komplexität näher zu erforschen.

1.1 Hypophosphatasie

Die Hypophosphatasie ist eine genetische Erkrankung die sich hauptsächlich durch eine Beeinträchtigung der Knochenmineralisation zeigt [3]. Die Erstbeschreibung erfolgte im Jahr 1948 durch Rathbun bei einem dreiwöchigen Kleinkind das den Folgen der Erkrankung, vor allem rachitisartigen Knochendeformitäten und Krampfanfälle, später erlag [4, 5].

Der Schweregrad der Erkrankung kann sehr unterschiedlich sein und wurde als direkt mit dem Alter des Patienten bei Beginn der Erkrankung assoziiert beschrieben [4]. Dadurch lässt die Krankheit sich in 6 Gruppen aufteilen, je nach Zeitpunkt der ersten Symptommanifestation [3]. Prinzipiell geht ein früher Beginn mit einem gravierenderen Verlauf einher [4].

Der genetische Defekt betrifft die gewebe-unspezifische alkalische Phosphatase (TNSALP) im chromosomalen Genlocus 1p36.1, die durch Punktmutationen ihre Funktion einbüßt [6, 7]. Bis dato (Januar 2019) sind über 383 unterschiedliche Mutationen in der von E. Mornet gepflegten „Tissue Nonspecific Alkaline Phosphatase Gene Mutations Database“ registriert, sie sind aber nur teilweise vollständig funktionell charakterisiert (http://www.sesep.uvsq.fr/03_hypo_mutations.php). Der Schweregrad der Erkrankung wiederum hängt von der Mutation und dem dadurch resultierenden Verlust an restlicher Enzymaktivität ab [8].

Form / Schweregrad	Manifestation
<ul style="list-style-type: none"> • Perinatal-fetale schwere Form 	Schwerste Verlaufsform mit <ul style="list-style-type: none"> - ausgeprägter Hypomineralisation - Knochendeformitäten - Störungen des Kalzium/Phosphatmetabolismus - Krampfanfälle - sekundäre Lungenhypoplasie Prognose intrauterin oder perinatal infaust
<ul style="list-style-type: none"> • Perinatal-fetale milde Form 	Auffällig <ul style="list-style-type: none"> - pränatal durch Achsverbiegung der langen Röhrenknochen - postnatal durch geringe bis keine Symptome Langzeitprognose unklar
<ul style="list-style-type: none"> • Infantile Form 	Manifestation im Säuglingsalter mit <ul style="list-style-type: none"> - ausgeprägten Rachitiszeichen - prämatüre Kraniosynostose - Irritierbarkeit, Krampfanfälle, Schluckstörungen -Nephrokalzinose Prognose meist innerhalb eines Jahres infaust
<ul style="list-style-type: none"> • Kindliche Form 	Manifestation typischerweise nach einem Jahr <ul style="list-style-type: none"> - Kleinwuchs, Gedeihstörungen - Zeichen einer Rachitis - Auffälligkeiten in Bewegungsabläufen - chronische Schmerzen der unteren Extremitäten - vorzeitiger Zahnverlust - Appetitlosigkeit, Übelkeit, Verdauungsprobleme
<ul style="list-style-type: none"> • Adulte Form 	Manifestation typischerweise im mittleren Lebensalter <ul style="list-style-type: none"> -Osteomalazie, Chondrokalzinose, Osteoarthropathie, Ermüdungsfrakturen - Nackensteifigkeit, Pseudomeningismus - milde Rachitis im Kindesalter
<ul style="list-style-type: none"> • Odontohypophosphatasie 	Manifestation durch <ul style="list-style-type: none"> - vorzeitiger Zahnverlust - ausgeprägter Karies Skelettbeteiligung fehlt meist

Tab. 1 Einteilung der Hypophosphatasie nach Schweregraden, modifiziert nach Beck et al. 2003 [3]

Die Inzidenz der Erkrankung wird auf 1:100 000 geschätzt, jedoch lässt sich eine genaue Aussage nur schwer treffen, da aufgrund der schwierigen Diagnosestellung, besonders bei leichteren Fällen, eine hohe Dunkelziffer zu erwarten ist [3]. Bei mäßigen bis leichten Krankheitssymptomen wird die Inzidenz anhand molekular-genetischer Schätzungen auf weit häufigere 1:6370 in Europa betitelt [9]. Bei diesen Formen wurden auch dominante Vererbungsformen dokumentiert, was sowohl den leichteren Verlauf als auch das häufigere Auftreten erklärt. Autosomal dominante Formen werden häufig durch Mutationen verursacht, die eine dominant negative Wirkung auf der Proteinebene bewirken [5]. Tatsächlich wurden bei unterschiedlich schwer betroffenen Patienten gleiche Mutationen als rezessives oder dominantes Vererbungsmuster dokumentiert und bei den Eltern einiger Patienten mit schwerer rezessiver Form der Hypophosphatasie wurden nachträglich in der genetischen Analyse leichte dominante Formen der Erkrankung diagnostiziert [10]. Letztlich ist eine Korrelation von Genotyp und Phänotyp bei der Hypophosphatasie zum Teil möglich, insbesondere die Unterscheidung zwischen schwerem, moderatem und mildem Verlauf [3, 10, 11].

Die Diagnose erweist sich öfters als schwierig, da die Bandbreite der Symptome sehr groß ist und es unter den verschiedenen Formen der Krankheit nicht selten zu Überschneidungen in der Krankheitsmanifestation kommt [8]. Dazu kommt, dass die Hypophosphatasie von anderen Erkrankungen des Skelettsystems abgegrenzt werden muss. Differenzialdiagnostisch kommen hier abhängig vom Alter des Betroffenen, vor allem Rachitis, Osteoporose, Osteogenesis imperfecta, Morbus Paget, Achondroplasie, Parodontose und Knochentumoren in Betracht [8].

Eine kurative Therapie ist für Patienten mit HPP noch nicht möglich. Es gibt aber erste Erfolge klinischer Studien zur Enzymsubstitution bei lebensbedrohlich erkrankten Kindern und auch erste Daten für Heranwachsende und Erwachsene [12-15]. Noch immer jedoch beruhen die derzeitig routinemäßig im klinischen Alltag verwendeten therapeutischen Maßnahmen im Moment auf der symptomatischen Behandlung [8]. Dazu gehören die Lebensqualitätsverbesserung durch entzündungshemmende Medikamente wie nicht-steroidale Antirheumatika, phosphatarmer Diät, sportliche Betätigungen zur Stärkung des Knochenmetabolismus oder auch gezielte interventionelle Eingriffe wie

zum Beispiel neurochirurgische Eingriffe bei chronisch erhöhtem Hirndruck infolge vorzeitiger Verknöcherung der Schädelnähte [8].

1.2 Zusammenspiel von TNSALP, ENPP1 und ANKH bei der Knochenmineralisierung

Die Knochenmineralisierung ist ein genauestens geregelter Prozess, bei dem verschiedene Enzyme und Substrate in einem engen Gleichgewicht miteinander interagieren.

Der Ossifikationsprozess beginnt nach aktueller Kenntnis in den sogenannten Matrixvesikeln, Membranausstülpungen abstammend von Chondrozyten und Osteoblasten [16-18]. Hier verbindet sich Phosphat mit Kalzium in einem ersten Mineralisierungsschritt zu Hydroxylapatit [17, 19]. Mit der Ruptur der Vesikel beginnt der zweite Schritt, bei dem das Hydroxylapatit sich in der Matrix deponiert und die Grundsubstanz der Knochenstruktur bildet [17, 19].

Eine wesentliche Rolle scheint dabei den Phosphatasen zuzukommen [19]. Die TNSALP (Tissue Non-specific Alkaline Phosphatase) gilt dabei, zusammen mit ENPP1 (Ectonucleotide Pyrophosphatase/Phosphodiesterase) und ANKH (ankylosis, progressive human homolog) als zentrale Regulierungseinheit von inorganischem Pyrophosphat (PPi), einem potenten Mineralisierungshemmer [17, 19]. Dies zeigt sich unter anderem im Krankheitsbild der Hypophosphatasie, wo aufgrund eines Defektes der TNSALP abnorme PPi Konzentrationen erreicht werden, welche mit der Mineralisierungsstörung in Verbindung gebracht werden [8, 16]. Des Weiteren konnten anhand von Mausmutanten in Abwesenheit von den Phosphatasen TNSALP und PHOSPHO1 extreme Mineralisierungsdefizite bis hin zur völligen Abwesenheit von mineralisiertem Gewebe nachgewiesen werden [19].

Die Bildung von Hydroxylapatit unterliegt zu einem wesentlichen Teil dem Gleichgewicht von Pyrophosphat, einem effektiven Hemmer der Ossifikation, und Phosphat, einem Grundbaustein von Hydroxylapatit [16, 17, 19]. Die Generierung von Phosphat aus Pyrophosphat erfolgt über die alkalische Phosphatase durch hydrolytische Spaltung [16, 17, 19]. Dieses Enzym arbeitet in enger Kollaboration mit dem

extrazellulären Enzym Enpp1, welches Pyrophosphat aus ATP generiert und ANKH, einem transmembranären Kanal, der PPi aus der Zelle in die Matrix schleust [17, 20]. Enpp1 und ANKH kommt demnach die Bereitstellung des Substrates für die TNSALP zu [17]. TNSALP katalysiert die Weiterprozessierung zu Phosphat [17]. TNSALP und ENPP1 wurden beide sowohl in der Zellmembran als auch in den Matrixvesikeln nachgewiesen, wogegen ANKH nach aktuellem Wissensstand nur in der Zellmembran vorkommt [17]. Eine schematische Darstellung zeigt die Abb.1.

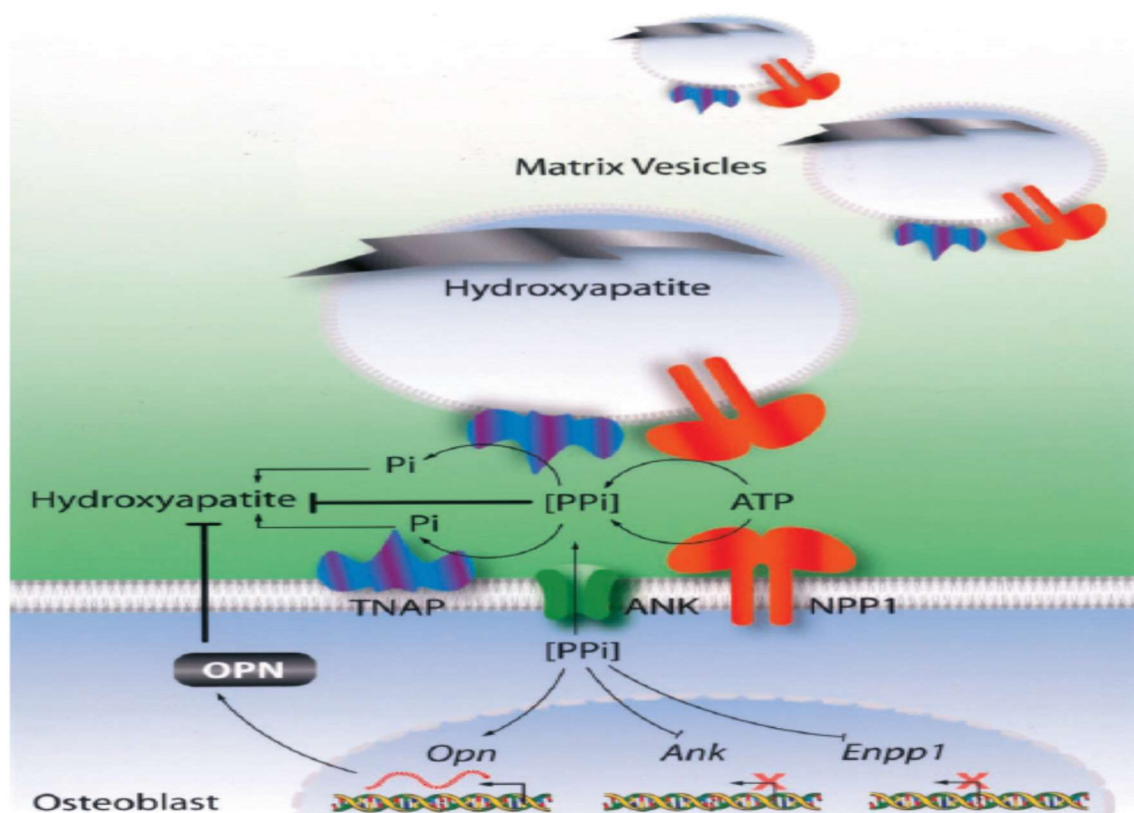


Abb.1: Zusammenspiel von TNSALP, ENPP1 und ANKH bei der Knochenmineralisierung sowie Einfluss von PPi auf die Bildung von Hydroxyapatit (entnommen aus Harmey et al. 2004 [17]). Mit Erlaubnis von Elsevier COPYRIGHT 2004

Bei einem Überangebot von PPi erfolgt die Inhibierung der Ossifikation nicht nur direkt [21], sondern auch indirekt auf genetischer Ebene über eine Überexpression von Osteopontin (OPN), einem Glycoprotein mit ebenfalls hemmenden Eigenschaften auf die Hydroxyapatitbildung [17]. Des Weiteren hemmt PPi auf intrazellulärer Ebene die Expression von ANKH und ENPP1 [17].

Ein Minderangebot von PPi wird dementsprechend mit einer überschüssigen Verknöcherung, die bis zur Ossifikation des Weichteilgewebes gehen kann, assoziiert [17, 21].

1.3 Gewebe-unspezifische alkalische Phosphatase (TNSALP)

Die alkalische Phosphatase (AP), oder auch orthophosphorische Monoester Phosphohydrolase genannt [22], wurde erstmals von Robison im Jahre 1932 mit der Kalzifikation der Knochen in Verbindung gebracht [23].

Es existieren mindestens vier wesentliche Isoformen des Enzyms; die germinale, die plazentare, die intestinale und die gewebe-unspezifische alkalische Phosphatase (TNSALP), die vor allem in Leber, Niere und Knochengewebe existiert, allerdings ubiquitär vorkommt [22]. Die exakte Funktion der verschiedenen alkalischen Phosphatasen ist bis heute nicht vollständig verstanden [22, 24]. Sie wiederum werden mittlerweile als eigene Subgruppe einer Enzym-Superfamilie, zu denen unter anderem auch die Cofaktor-unabhängigen Phosphoglycerat-Mutasen gehören angesehen, die alle strukturelle Ähnlichkeiten aufweisen [24].

Die verschiedenen Isoformen sind, bis auf wenige Ausnahmen homodimerische Enzyme bei denen jedes aktive Zentrum drei Metallionen, zwei Zinkionen und ein Magnesiumion besitzt [24]. Das Ektoenzym ist via Glycosylphosphatinositol an die Zellmembran gebunden [25]. Unterscheiden lassen sie sich durch enzymespezifische Eigenschaften wie Inhibitor-Spezifität, Hitzestabilität oder Denaturierung durch Urea [26].

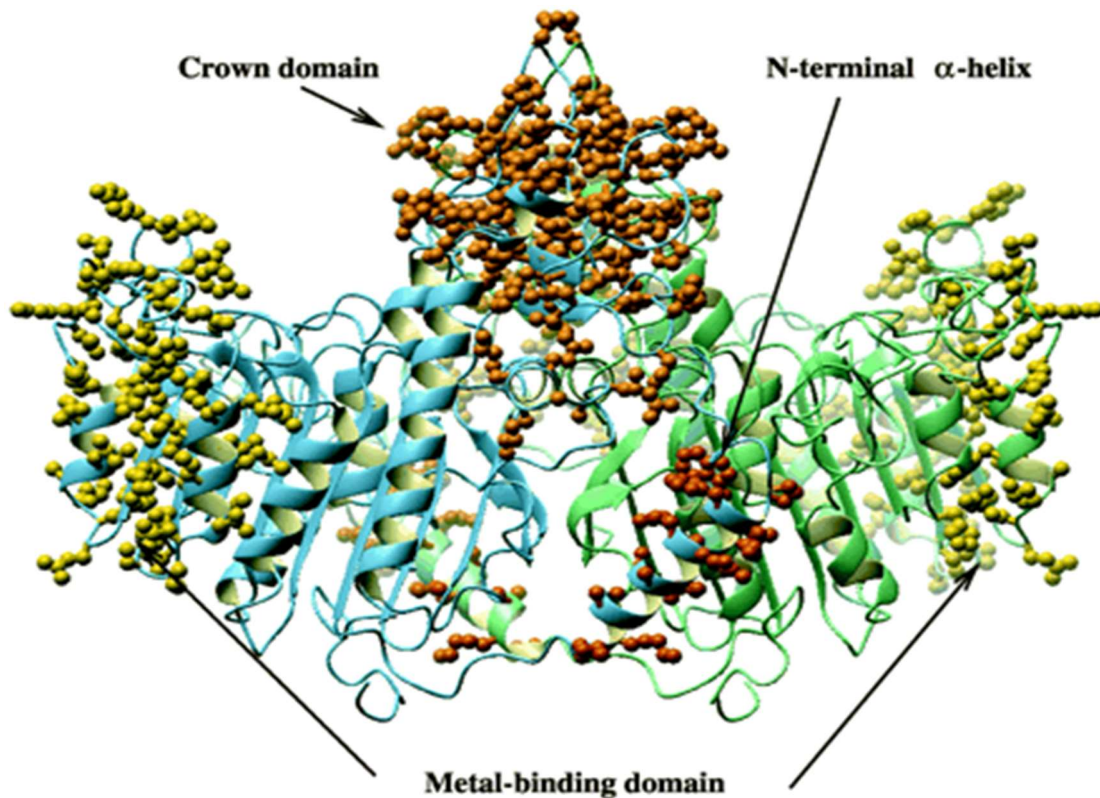


Abb.2: Kristallstruktur der humanen placentären Isoform der alkalischen Phosphatase mit den Metallionen in den aktiven Zentren der 2 Monomere (blau und grün) und der Kronendomäne (braun) sowie der N-terminalen Helix (rot) [27] Die placentäre Form ist zu 74% homolog mit der TNSALP (Abbildung aus Mornet et al 2001) [28]. Mit Erlaubnis der American Society for Biochemistry and Molecular Biology (ASBMB)

Im Jahre 1989 gelang es Weiss et al. bei Patienten mit schwerer Hypophosphatasie eine erniedrigte Aktivität der TNSALP in Fibroblasten bei normaler RNA-Expression nachzuweisen [29]. Zehn Jahre später stellten Fedde, K.N. et al. fest, dass Mäuse mit Knock-out der alkalischen Phosphatase die metabolischen Symptome und Skelettdefekte der Hypophosphatasie bei Kindern aufwiesen [30]. Dadurch war die Beteiligung der TNSALP am Kalzifizierungsprozess und Knochenmetabolismus anzunehmen. 2001 kartographierte Mornet et al. die Mutationen bei Hypophosphatasie der alkalischen Phosphatase anhand des Modells der placentären alkalischen Phosphatase und zeigte so eine enge Verbindung des Krankheitsbildes der Hypophosphatasie und ihren verschiedenen Schweregraden mit unterschiedlichen Mutationen und dadurch bedingten Funktionsverlusten der TNSALP [28].

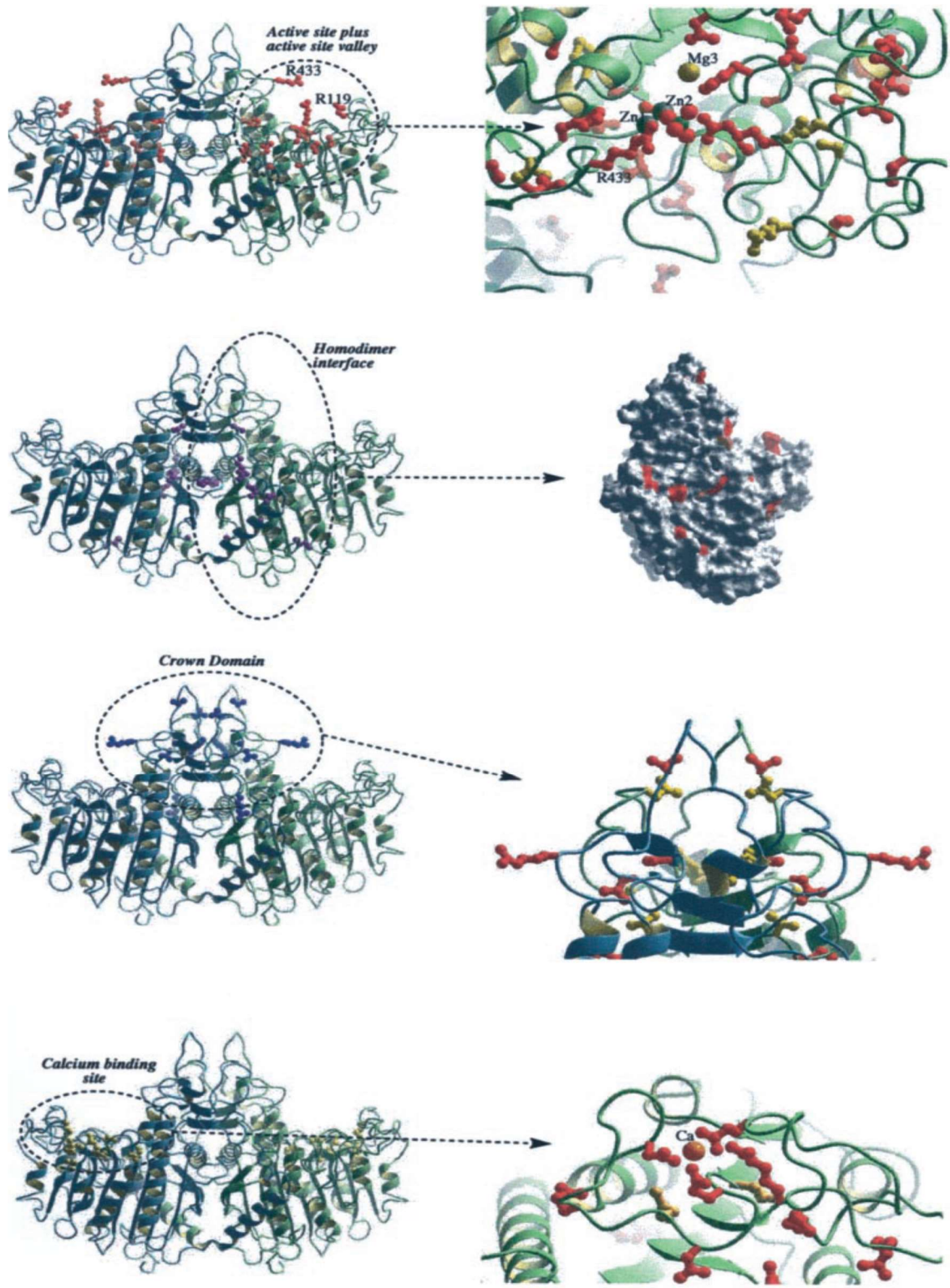


Abb.3: Darstellung der TNSALP auf PLAP-Struktur Basis mit links den affektierten Bereichen bei der Hypophosphatasie: aktives Zentrum und Umgebung (rot), Homodimere Zwischenlücke (violett), Kronendomäne (blau) und kalziumbindendes Zentrum (gelb) mit rechts jedesmal den möglichen Mutationen, unterteilt in schwere –(rot) und leichte (gelb) Verlaufsmutationen. Abbildung aus Mornet et al. 2001 [28]. Mit Erlaubnis der American Society for Biochemistry and Molecular Biology (ASBMB)

1.3.1 Substrate der TNSALP

Bei Patienten mit Hypophosphatasie kann man erhöhte Werte von Pyridoxal 5'-Phosphat (PLP) und Pyrophosphat (PPi) im Serum sowie Phosphoethanolamin (PEA) in Serum und Urin messen [16, 31, 32]. Die dephosphorylierte Form von PLP, Pyridoxal (PL) ist normalerweise unauffällig, kann aber bei sehr schweren Verläufen erniedrigt sein [6, 33, 34]. Dadurch liegt nahe, dass PLP, PPi und PEA Substrate der TNSALP darstellen könnten [6, 28].

- Pyridoxal 5'-Phosphat (PLP)

Pyridoxalphosphat oder auch Vitamin B₆ ist durch seine Vielseitigkeit mit das wichtigste Coenzym im Stoffwechsel der Aminosäuren und so auch unerlässlich für den Stoffwechsel der neuronalen Mediatoren [35]. Um im Gehirn allerdings die Bluthirnschranke passieren zu können muss es zuerst von der TNSALP zu Pyridoxal dephosphoryliert werden um dann intrazellulär wieder in das benötigte Coenzym PLP umgewandelt zu werden [33, 34]. Bei der Hypophosphatasie gewinnt es dadurch an Bedeutung, da durch den relativen intrazellulären Mangel, bedingt durch den Enzymdefekt, die Synthese verschiedener neuronaler Botenstoffe wie vor allem GABA, Dopamin, Serotonin, Glycin und Histamin nur eingeschränkt stattfinden kann [33]. Vermutlich können so die als Vitamin B₆ responsiv beschriebenen cerebralen Anfälle bei schwer betroffenen HPP-Patienten, aber auch Konzentrationsstörungen, Ängstlichkeit oder auch Depressivität zumindest teilweise erklärt werden [36, 37].

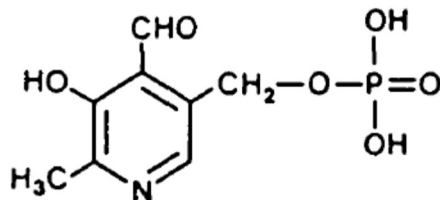


Abb. 4: Strukturformel von Pyridoxal 5'-Phosphat. Bildauszug aus der Arbeit von Whyte MP, Endocrine Reviews 1994 [16], mit Erlaubnis von Oxford University Press.

- Anorganisches Pyrophosphat (PPi)

Zusammen mit Kalzium ist Phosphat der Hauptbestandteil des anorganischen Knochenanteiles. Es kommt in unterschiedlichen Formen in den Zellen im menschlichen Körper vor [35]. Eine davon ist das Pyrophosphat, das eine besondere Rolle im Knochenmineralisierungsstoffwechsel spielt [38]. PPi wird unter anderem durch Hydrolyse durch ENPP1 aus ATP unter Bildung von AMP gewonnen, kann aber auch bei der Aktivierung von Fett- oder Aminosäuren und der Biosynthese von Carbaylphosphat anfallen [35].

Beim Knochenstoffwechsel fällt PPi eine ambivalente Rolle zu. Einerseits wird es von der TNSALP zum organischen Phosphat (Pi) hydrolysiert und kann so in den Matrixvesikeln mit Kalzium unter Bildung von Hydroxyapatit zur Mineralisierung der Knochen beitragen [38]. Andererseits ist es in der Pyrophosphatform ein effektiver Hemmer eben dieser Assoziation von Kalzium und anorganischem Phosphat und wirkt so als Inhibitor der Knochenmineralisierung [17]. Im Falle der Hypophosphatasie ist der Abbau von PPi zu Pi gestört und führt so zu einer unphysiologischen Hemmung der Kalzifizierung wodurch sich vermutlich die typischen osteomalazie- und rachitisähnlichen Symptome der Krankheit erklären lassen [38].

Des Weiteren geht man davon aus, dass die anfallenden Pyrophosphatkristalle durch Ansammlung/Ablagerung zu einer chronischen immuninduzierten Inflammation in Gelenken und Knochen führen [39].

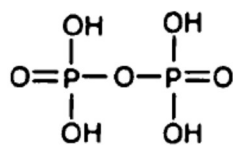


Abb. 5: Strukturformel von Pyrophosphat. Bildauszug aus der Arbeit von Whyte MP, Endocrine Reviews 1994 [16], mit Erlaubnis von Oxford University Press.

- Phosphoethanolamin (PEA)

Obwohl Phosphoethanolamin bei Hypophosphatasiepatienten erhöht ist, besteht bis heute noch kein gesicherter Nachweis einer Beteiligung an der Pathogenese der Hypophosphatasie. Vielmehr ist ein Anstieg der Urin- und Serumwerte von PEA auch bei anderen Knochenerkrankungen zu verzeichnen

und so ist PEA auch als pathognomischer Marker der Erkrankung nicht ausschließlich verwertbar [16]. Der Grund für den Anstieg der Werte ist noch nicht hinreichend geklärt, allerdings geht man davon aus, dass dies durch einen vermehrten Abbau der Proteinankereinheiten auf Phosphatidylinositol-Glycan-Basis bedingt sein könnte [16].

Weiterhin gibt es Berichte über eine mögliche epileptogene Wirkung von PEA bei Hypophosphatasiepatienten [30].

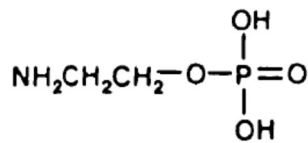


Abb.6: Strukturformel von Phosphoethanolamin. Bildauszug aus der Arbeit von Whyte MP, Endocrine Reviews 1994 [16], mit Erlaubnis von Oxford University Press.

1.4 Ectonucleotide Pyrophosphatase/Phosphodiesterase (ENPP1)

Die Ectonucleotide Pyrophosphatase/Phosphodiesterase gehört zu der Familie der Nukleotid Pyrophosphatasen/Phosphodiesterasen, auch als NPPs oder PC-1 bekannt [20]. Das korrespondierende Gen besteht aus 25 Exons und ist auf Chromosom 6 lokalisiert [20]. Zusammen mit sechs anderen Enzymen gehört das Klasse II transmembranäre Glycoprotein zu den Katalysatoren der Hydrolyse von 5'-Phosphodiester in Nukleotiden [40]. Ein weiteres Mitglied der Enzymfamilie ist ENPP2, das mit dem karzinogenen- sowie metastasierenden Potential von RAS-transformierten Zellen (G-Protein RAS; Rat Sarcoma) in Verbindung gebracht wird [41].

Die Tertiärstruktur von ENPP1 ist bis dato nicht komplett entschlüsselt. Zwar sind die intrazellulären und katalytischen Domänen oberflächlich bekannt, doch sind die nicht-katalytischen Ektodomänen nicht gänzlich erforscht [42].

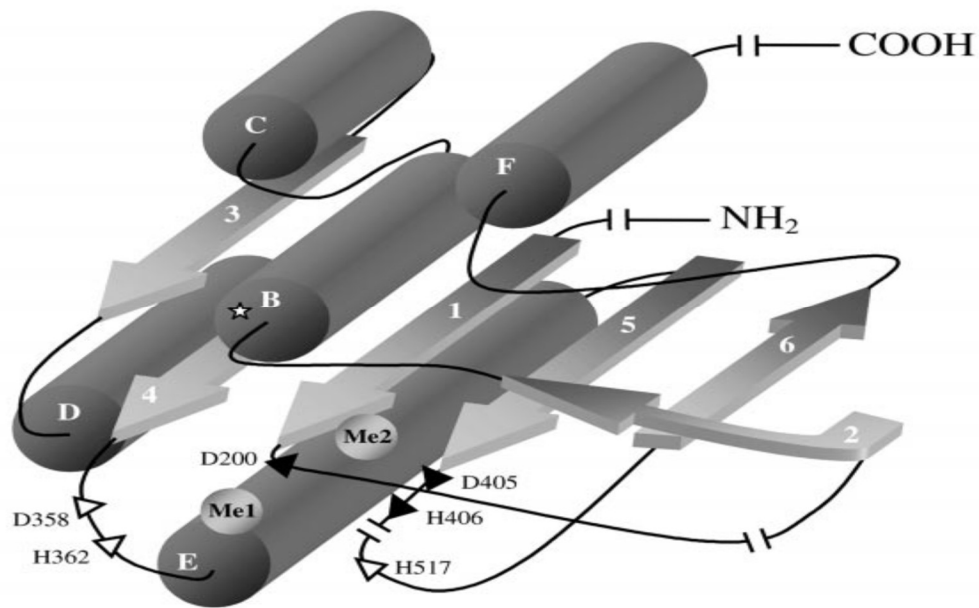


Abb. 7: Strukturmodell des katalytischen Zentrums von NPPs; es handelt sich bei dem Beispiel um die Sekundärstruktur von NPP1 der Maus. Abbildung aus Gijsbers et al, 2001 [43]. Mit Erlaubnis der American Society for Biochemistry and Molecular Biology (ASBMB)

Lokalisiert ist ENPP1 in den Matrixvesikeln verschiedenster Gewebe, vor allem jedoch in Knorpel und Knochen [20]. Die Rolle von ENPP1 in der Knochenmineralisation ist die Hydrolyse von PPi aus ATP [44]. Bei einer reduzierten ENPP1 Enzym-Aktivität durch Mutationen, resultiert eine unkontrollierte Mineralisation nicht nur in Knorpelgewebe [20], sondern auch in Gewebe das prinzipiell nicht an den Knochenmineralisationsprozess gebunden ist. So wird auch die idiopathische infantile arterielle Kalzifikation mit einem Funktionsverlust des Enzyms in Verbindung gebracht [45]. Tatsächlich liegt das Gleichgewicht zwischen Kalzium und Phosphat in extrazellulärer Flüssigkeit der spontanen Kristallisationsättigung sehr nahe [45]. So kommt der Inhibierungsfunktion von ENPP1 durch die Bereitstellung von PPi eine besondere Bedeutung auch ausserhalb des Knochenstoffwechsels zu [45]. In ENPP1 Knock-out Mäuseversuchen, auch als tiptoe walking mice bekannt, konnte man eine spontane Entwicklung eben dieser unkontrollierten Knorpel-, und Gelenkverkalkung in Form von progressiver intervertebraler Ankylose, peripherer Gelenkhyperostose und artikulärer Knorpelverkalkung beobachten [1].

Des Weiteren wird bei einer ENPP1-Überfunktion eine negative Insulinrezeptor-Modulation vermutet, die zu einer systemischen Insulinresistenz führt [40]. Bei

übergewichtigen Patienten konnte eine erhöhte ENPP1-Expression im Fettgewebe festgestellt werden [40]. Die resultierende Insulinresistenz betrifft dabei nach neueren Erkenntnissen nicht nur Muskel und Leber, sondern auch das Fettgewebe [40]. Der Wirkungsmechanismus wird mit einer Modulation durch physikalische Interaktion mit der α -Untereinheit des Insulinrezeptors sowie einer Inhibierung der β -Untereinheit durch ENPP1 erklärt [40].

1.5 Ankylosis, progressive human Homolog (ANKH)

Der transmembranäre Kanal ANK (Ankylosis, progressive) wurde erstmals im Jahr 2000 bei der Maus mit dem Krankheitsbild einer generalisierten progressiven Ankylose (progressive Ankylosis) assoziiert [2, 46]. Hierbei handelt es sich um eine progressive Versteifung der Gelenke, bedingt durch Ablagerung von Hydroxyapatitkristallen im Knorpel und der Synovia der Gelenke mit nachfolgender Entzündungsreaktion und Knorpelerosion [46]. Die Versteifung der Gelenke wird schlussendlich durch fusionierende Osteophyten bedingt [46].

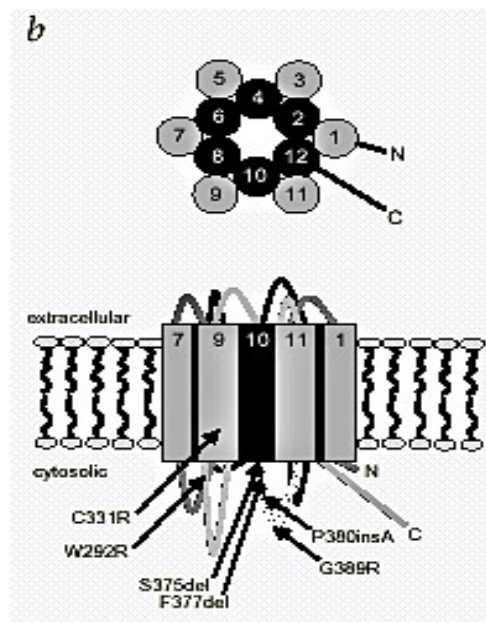


Abb.8: Bildauszug aus der Arbeit von Prof. Dr. P. Nürnberg [47].

Die Abbildung zeigt die schematische Darstellung des ANKH Kanals nach heutigem Verständnis mit 12 konsekutiven Helices. Die hellgrauen Strukturen stellen die hydrophoben Helices dar, welche mit der Zellmembran interagieren, die Schwarzen demnach die, die den inneren Teil des Kanales, bestehend aus 6 Helices, darstellen. Mit Erlaubnis der Nature Publishing Group COPYRIGHT 2001

Die Lokalisation wird auf dem Chromosom 5p15 vermutet [48]. Die genaue Struktur des Proteins ist aktuell noch nicht komplett bekannt, aus diversen Forschungsberichten ergibt sich allerdings eine große Beständigkeit der Gensequenz (bis zu 82%) unter vielen Wirbeltieren wie Mensch, Maus, Zebrafisch, u.a [47, 48]. Es handelt sich nach aktuellen Erkenntnissen wahrscheinlich um ein transmembranäres Kanalprotein bestehend aus 492 Aminosäuren, das je nach Hypothese aus 10-12 konsekutiven Helices besteht [2, 46, 47].

Die Sequenzanalyse von ANK zeigt im kodierenden Bereich eine alternierende Hydrophobie der konsekutiven Helices [46, 47]. Dies lässt darauf schließen dass es sich bei den hydrophoben Anteilen um die Strukturen handelt, die mit der Zellmembran interagieren, während die restlichen Strukturen das Innere des Kanals bilden [47]. Letztere sind nach aktuellem Verständnis demnach so angeordnet, dass die stärker polarisierten Stellen zum Zellinneren gerichtet sind [47]. Somit resultiert ein positives Potential, welches an der Kanalöffnung im Zellinneren am stärksten ausgeprägt ist [47]. Dies könnte relevant sein, um die Funktion dieses Kanals besser nachvollziehen zu können.

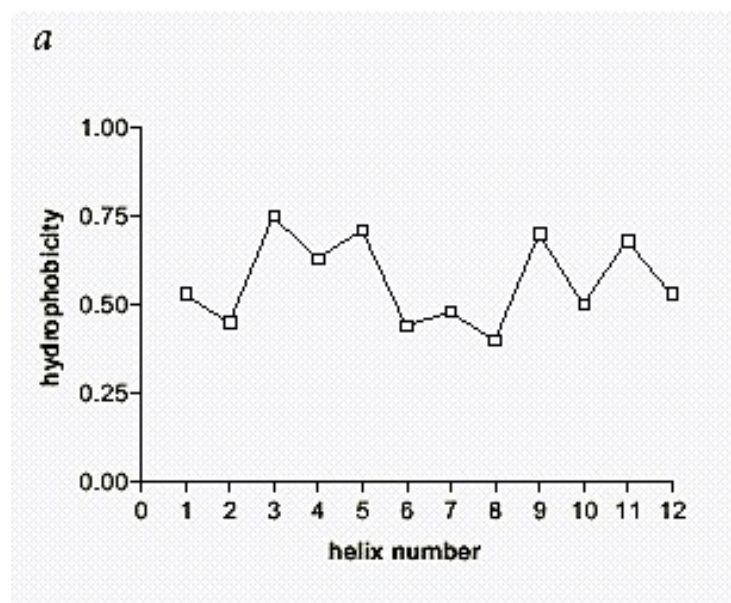


Abb.9: Bildauszug aus der Arbeit von Prof. Dr. P.Nürnberg [47]

Dargestellt ist die globale Hydrophobie der Helices, welche sich mit einer deutlichen Alternierung zeigt. Mit Erlaubnis der Nature Publishing Group COPYRIGHT 2001

Aktuell wird ANK, sowie die Variante beim Menschen ANKH (Ankylosis, progressive human Homolog) als transmembranärer Transporter von Pyrophosphat gesehen, der den positiv geladenen Metaboliten zum Zelläusseren befördert [2, 46-48]. Diese Theorie wird unterstützt durch den Nachweis, dass die Präsenz von ANK die extrazelluläre Konzentration von PPi erhöht [2]. Erhöhte intrazelluläre Werte von PPi konnten in Zellen beobachtet werden, die einen genetischen Defekt im Bereich des Genlokus von ANKH auf Chromosom 5p aufwiesen [46]. Des Weiteren legen verschiedene Untersuchungen nahe, dass einige Krankheiten mit pathologischen Depositionen von Kristallen aus PPi oder Hydroxyapatit im Gewebe, sowie mit Knochenmineralisierungsstörungen mit einem Defekt des Transporters einhergehen [46-48].

Beim Menschen wird das Protein unter anderem mit Mineralisierungspathologien wie der autosomal dominant vererbten Form von Kraniometaphysealer Dysplasie (Craniomethaphyseal Displasia, CMD) [47], sowie der ebenfalls autosomal dominant vererbten Krankheit Calcium Pyrophosphate Dihydrate Deposition Disease (CPPD) in Verbindung gebracht [48]. Hierbei kommt es, durch Punktmutationen im Bereich der Domänen der inneren Kanalhelicis, wahrscheinlich zu einer Funktionsstörung des Kanals [47]. Allerdings sind die Theorien im Bereich der Pathophysiologie noch relativ divergent [2, 46-48]. Unklar bleibt, ob ANKH neben PPi noch andere Metaboliten transportiert [46].

1.6 Der Mevalonat-Pathway

Die tierische Zelle hat einen natürlichen Bedarf an verschiedenen Substanzen, die dem Aufbau der Zelle dienen. So fungiert zum Beispiel Cholesterin als Baustein der Zellmembran [35]. Cholesterin wird in 30 enzymatischen Reaktionen aus Acetyl über den Mevalonat- Pathway hergestellt [35, 49].

Die Bedeutung des Mevalonat-Pathway resultiert nicht zuletzt aus der Erkenntnis, dass Zwischenprodukte wie Isopentenylpyrophosphat die Grundstufe zu sehr vielen verschiedenen zellinternen Syntheseprozessen sind [35, 49-51]. Das heutige Wissen basiert maßgeblich auf den Arbeiten von Joseph L. Goldstein und Michael S. Brown, die hierfür 1985 den Nobelpreis erhielten. In den letzten Jahren wurden mehrere Endprodukte

identifiziert, die ihren Ursprung im Mevalonat-Pathway finden [50]. Abhängig vom Zeitpunkt der Einschleusung in neue Synthesewege handelt es sich hierbei um sterole (ausgehend von Cholesterol) und nicht-sterole (ausgehend von Isoprenlipiden) Produkte [49].

Die Biosynthese der Isoprenlipide erfolgt durch Coenzym A aktiviertes Acetyl (Acetyl-CoA) [35]. Dieses wird in einem ersten Schritt zu Acetoacetyl-CoA synthetisiert und in zwei weiteren über β -Hydroxy- β -Methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) zu Mevalonat weiterprozessiert [35]. Über drei weitere Schritte wird Mevalonat erst anhand von Pyrophosphat aktiviert und schliesslich zu Isopentenylpyrophosphat synthetisiert [35] (s. Abb.10).

Die Reduzierung von HMG-CoA zu Mevalonat wird von der HMG-CoA Reduktase katalysiert und gilt als der Geschwindigkeit bestimmende Schritt der Cholesterinsynthese [35, 50]. Tatsächlich stellt die HMG-CoA-Reduktase eines der am meisten regulierten Enzyme in der Natur dar [50], hier setzen die meisten hemmenden und induzierenden Regelmechanismen an [35, 50, 51].

Diese Regulierung geschieht auf mindestens drei verschiedenen Ebenen. Einerseits inhibiert Cholesterin über das Sterolregulationselement 1 (SRE-1) die Transkription der Enzyme auf Genebene und somit die Expression der mRNA [52]. Bei den regulierten Genen handelt es sich hauptsächlich um die HMG-CoA-Reduktase und Synthase, sowie um den LDL-Rezeptor [35, 50].

Andererseits agiert ein zusätzlicher Mechanismus direkt auf die HMG-CoA-Reduktase selbst. So fördert Cholesterin den Abbau des Enzyms im endoplasmatischen Retikulum und verringert so seine Halbwertszeit [35, 53]. Interessant ist weiterhin, dass die Aktivität desselben Enzyms von einer AMP-aktivierten Proteinkinase abhängig ist, welche wiederum von AMP oder ADP stimuliert wird [35, 50]. Diese inaktiviert die HMG-CoA-Reduktase durch Phosphorylierung. Hierdurch wird bei Energiemangel die Cholesterinsynthese gedrosselt [35].

Letztendlich unterliegt die zellinterne Synthese aber auch äusserlichen Einflüssen auf die Zelle. Da Cholesterin zu einem bedeutenden Teil auch exogen zugeführt wird, muss die

Zelle ihre eigene Produktion daran anpassen [35, 50]. Dies wird durch die Expression und Einbau in die Zellmembran des LDL Rezeptors reguliert [50].

Isopentenylpyrophosphat wird in fünf weiteren Schritten durch kontinuierliche Rekombination sukzessiv zu Cholesterin prozessiert [35]. Zuerst wird durch Kombination von Isopentenylpyrophosphat und seinem Isomer Dimethylallylpyrophosphat Geranylpyrophosphat hergestellt [35]. Durch Transferierung eines weiteren Isopentenylpyrophosphat entsteht Farnesylpyrophosphat, wovon schliesslich zwei zu Squalen kondensieren [35]. Cholesterin entsteht schlussendlich über weitere 22 Teilreaktionen aus dem Squalen [35].

Aus Cholesterin entstehen schlussendlich Steroidhormone und Gallensäuren [35]. Aber auch die Nebenprodukte dieser Synthesen sind wichtige Metabolite für den Organismus. Hier handelt es sich unter anderem um Sterole, Dolichole, Ubiquinone, Isoprenoide und Carotenoide [49, 50]. Diese fungieren als N-Glycosydierung von Proteinen (Dolichole), tragen zum Elektronentransport in den Mitochondrien bei (Ubiquinone), verankern Proteine in der Zellmembran (Isoprenoide) und fangen freie Radikale ab (Carotenoide) [49].

Seit der Erkenntnis über die weitreichende Bedeutung des Mevalonat Pathways gibt es zahlreiche Optionen hier therapeutisch und prophylaktisch einzugreifen.

So hat beispielsweise die Entdeckung von Pilzmetaboliten wie Mevinolin oder Compactin, potenten Hemmstoffen der HMG-Reduktase, die Therapiemöglichkeiten in der Medizin erweitert [54]. Derivate dieser Metabolite werden seither als Statine unter anderem wirkungsvoll in der Bekämpfung von Hypercholesterinämie eingesetzt [35] und zeigen sich protektiv bei kardiovaskulären Erkrankungen [49].

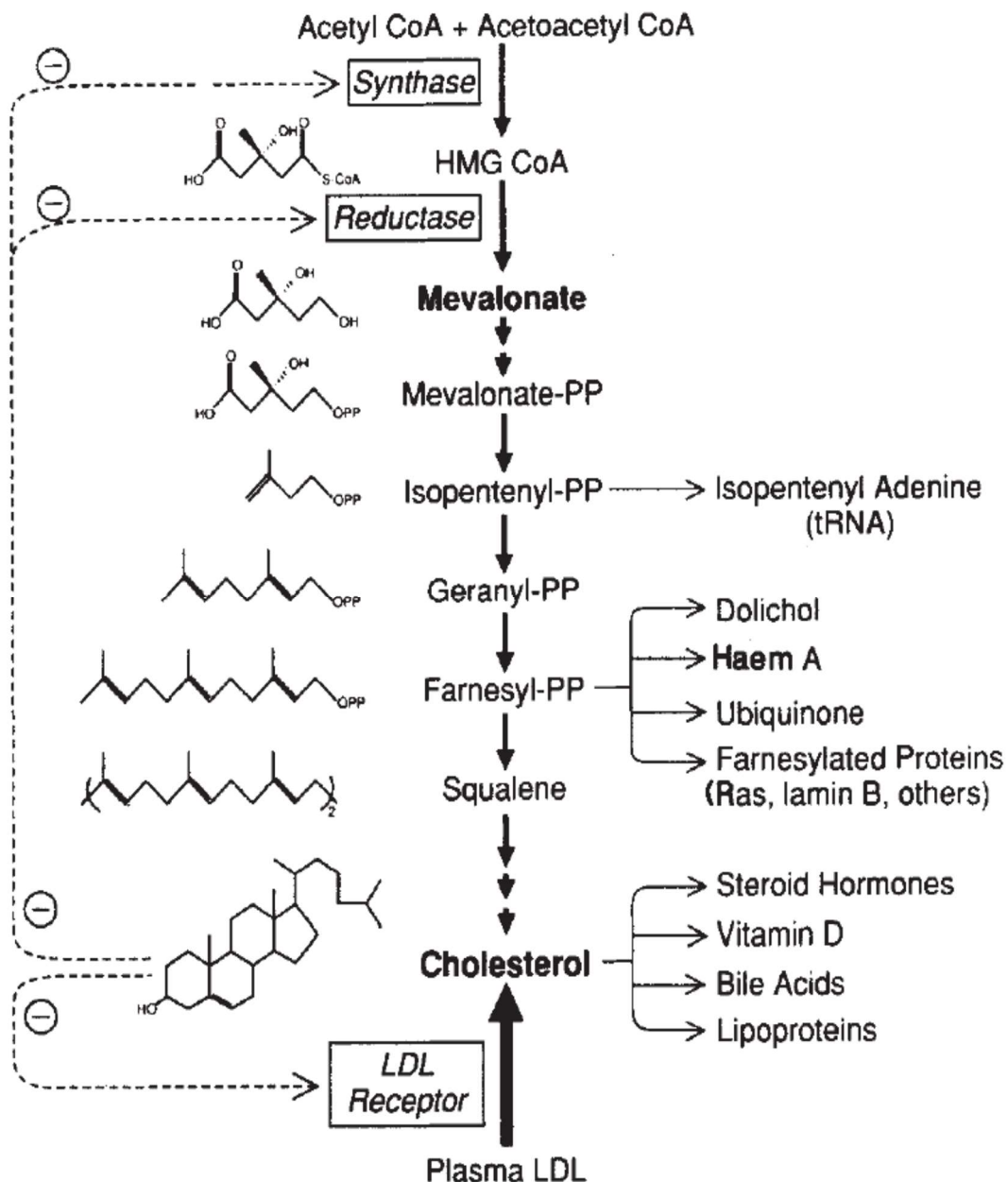


Abb.10: Schematische Darstellung des Mevalonatpathway mit den wichtigsten regulatorischen Enzymen: HMG-CoA Synthase sowie Reduktase und der LDL-Rezeptor, wodurch die Eigensynthese sowohl an die eigene Produktion selbst als auch an die exogene Zufuhr per LDL angepasst werden kann. Auszug aus der Arbeit von Goldstein und Brown, 1990 [50]. Mit Erlaubnis von Springer Nature COPYRIGHT 1990

Der Mevalonatzyklus scheint auch in verschiedenen essentiellen Prozessen von Tumoren eine Rolle zu spielen. Die Zellteilung ist Ras/Rho-abhängig und wird von Statinen durch Inhibierung der Farnesylierung von Proteinen verlangsamt [55]. Des Weiteren wirken

Statine zytostatisch auf Leukämiezellen durch Inhibierung der Isoprenoidproduktion [56].

Von größerer Wichtigkeit im Kontext dieser Arbeit sind allerdings die Auswirkungen der Manipulation des Mevalonatzyklus auf den Knochenstoffwechsel und die Differenzierung von Stammzellen und deren osteogenem Differenzierungspotential.

Bisphosphonate werden in der heutigen Medizin vor allem in der Osteoporosetherapie eingesetzt [57]. Nach ihrer molekularen Wirkungsweise können die Bisphosphonate in zwei Gruppen eingeteilt werden: PPI-ähnliche Metabolite sowie Clodronat, und die potenteren nitrogehaltigen Isoprenoid-Analoga wie Zoledronat [58]. Aufgenommen wird der Wirkstoff vorwiegend durch die Osteoklasten, die die Bisphosphonate aus dem Knochen lösen, wo sie durch ihre Affinität zu Hydroxyapatit abgelagert werden (Abb.11) [59]. Über die Hemmung der Enzyme Farnesyl und Geranylgeranyldiphosphat-Synthasen greifen diese in den Mevalonatzyklus ein und inhibieren somit die Farnesylierung wichtiger Enzyme, vor allem kleiner GTPasen [60]. Dies bewirkt durch Inhibierung der Prenylierung (Farnesylierung, Geranylgeranylierung) von Ras/Rho-Proteinen vor allem in Osteoklasten eine Reduzierung der Zellproliferation, eine Schwächung des Zytoskeletts und die Einleitung der Apoptose und somit einer Reduzierung der Knochenresorption [58, 60]. In höheren Konzentrationen können hiervon auch andere Zellen, unter anderem Osteoblasten, betroffen sein [57].

Die Wirkung von Zoledronat ist abhängig von Dosis und Wirkzeit. Tatsächlich unterstützt zum Beispiel eine Zoledronatbehandlung von osteogenen Stammzellen im μM Bereich über einen Zeitraum von 3-6 Stunden die osteogene Differenzierung, während eine Exposition über 2-3 Tage zur Apoptose der Zellen führt [61].

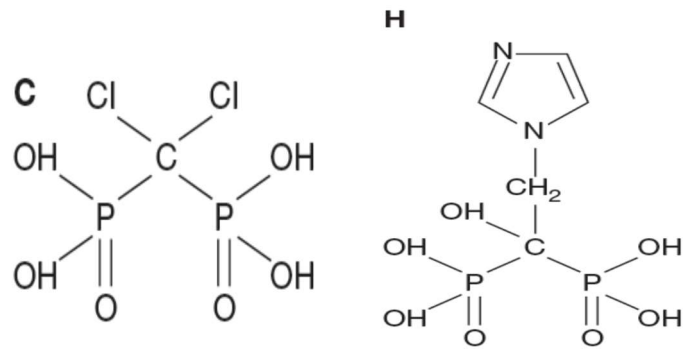


Abb.11: Strukturformel von (C) Clodronat und (H) Zoledronat. Auszug aus der Arbeit von Colin R. Dunstan et al. [59]. Mit Erlaubnis von Springer Nature COPYRIGHT 2007

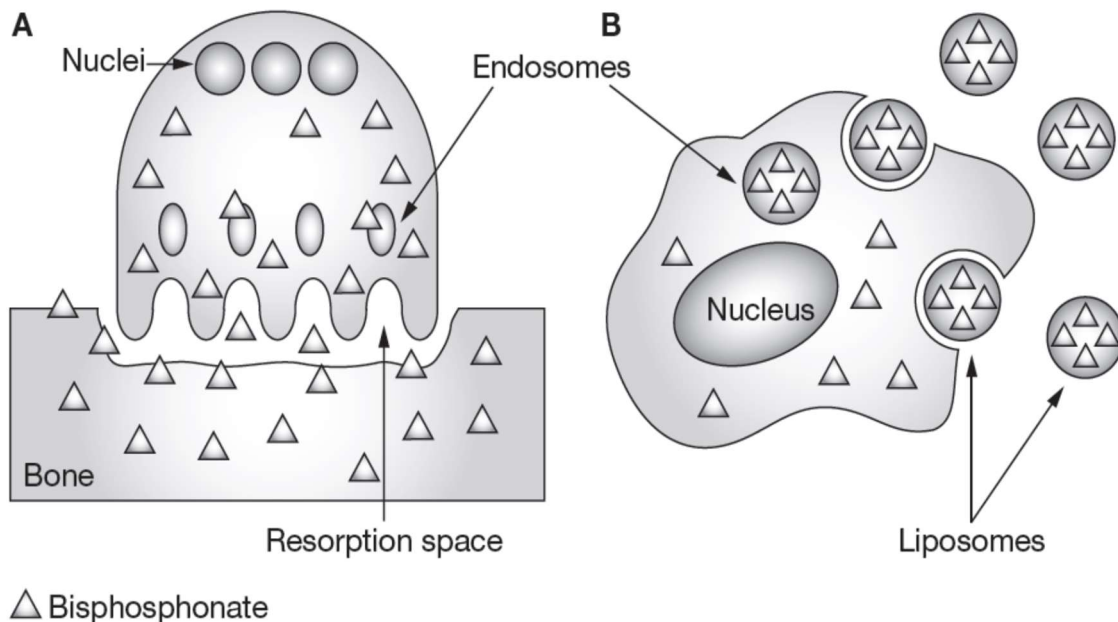


Abb.12: Wirkungsweise der Bisphosphonate: Die Moleküle binden an das Knochenmaterial und werden von den Osteoklasten aus dem Knochen gelöst (A). Ein anderer Aufnahmeweg besteht über Liposome wo sie per Phagozytose von Makrophagen aufgenommen werden (B). Auszug aus der Arbeit von Colin R. Dunstan et al. [59]. Mit Erlaubnis von Springer Nature COPYRIGHT 2007

Des Weiteren zeigen Bisphosphonate *in vitro* antiangiogene Effekte welche vermutlich zu deren antitumorösen Wirkung sowie zu den typischen Nebenwirkungen wie der Kieferosteonekrose beitragen könnten [61, 62]. Letztere wurde vor allem nach einer längeren, hochdosierten Therapie mit Bisphosphonaten beschrieben [59].

Die verschiedenen Auswirkungen von Bisphosphonaten auf den Metabolismus der Zelle deuten die Komplexität des Mevalonatzyklus an. Auch in der Literatur wächst die Evidenz für seine Involvierung in multiplen Synthesewegen (s.o.). Im Rahmen dieser Arbeit sind besonders die Regulierung der Funktionalität verschiedener Proteine der Osteogenese, Differenzierung und Apoptose interessant [61, 63]. Dadurch nimmt der Mevalonatzyklus auch eine wichtige Stellung in osteopathologischen Fragestellungen ein.

1.7 Ziel der Arbeit

Mit Hilfe der Untersuchungen in dieser Arbeit soll versucht werden, das komplexe Zusammenspiel der verschiedenen Enzyme und deren Substraten näher zu erforschen.

Bei dieser Arbeit sollen die Einflüsse von PPi auf die osteogene und adipogene Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen makroskopisch, mikroskopisch sowie auf die Expression verschiedener osteogener Marker (ANKH, ALP, ENPP1, Osteocalcin (OC) und Osteopontin (OP)) untersucht werden.

Unsere Hypothese war, dass die Veränderungen der Konzentrationen von Phosphaten aus dem purinergen Stoffwechsel und dem Mevalonat-/Isoprenoidstoffwechsel im zellulären Mikromillieu das osteogene Verhalten Mesenchymaler Vorläuferzellen beeinflusst. Hierbei sollte die Konzentration von PPi direkt oder indirekt durch Beeinflussung von Enzymen oder Kanälen verändert werden. Es sollten dabei PPi-Zugabe selbst, Hemmung des Enzyms ENPP1 und Hemmung der ATP-freisetzenden Kanäle zum Einsatz kommen.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Gerät	Hersteller
AxionCam MRC	Zeiss, Jena
Biofuge pico	Heraeus Holding GmbH, Hanau
BioPhotometer 6131	Eppendorf AG, Hamburg
Brutschrank	Heraeus Holding GmbH, Hanau
dNTP set	peQLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Electrophoresis power supply EU243	PeQlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Elektrophoresekammern	PeQlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Gelkammern	PeQlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Heizblock MR 3001	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Heraeus Lamin Air HA 2472 GS	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Herasafe	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Herasafe KS	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Kamera	Canon Deutschland GmbH, Krefeld
Kühlzentrifuge Biofuge fesco	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Megafuge 1.0	Heraeus Sepatech GmbH, Osterode
Mikroskop Axiowert 25	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena
Mikroskop Wilovert®	Helmut Hund, Wetzlar
Mikrowelle SHARPR-613	Sharp Electronics (Europe) GmbH, Hamburg
Mikroplate-reader Tecan Sunrise ELISA reader	TECAN, Crailsheim
Mixer Uzusio VTX-3000	A.Hartenstein Gesellschaft für Labor- und Medizintechnik GmbH, Würzburg
Multipipette	Eppendorf AG, Hamburg

Orion II Microplate Luminometer	Berthold Detection Systems GmbH, Pforzheim
pH-Meter pH540 GLP	WTW GmbH, Weilheim
PCR-Maschine Thermocycler MJ Research PTC-200	Biozym Diagnostic GmbH, Hessisch Oldendorf
PCR-Maschine Thermocycler Primus	MWG-Biotech, Ebersberg
PCR-Maschine Thermocycler Primus 25	peQLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Pipetboy	Brand Health GmbH, Frankfurt am Main
Pipetboy accu-jet® pro	Brand Health GmbH, Frankfurt am Main
Pipette Eppendorf research 0,1-0,25 µl	Eppendorf, Hamburg
Sonopuls	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin
Spannungsgerät E835; 300V-500mA	Consort, Turnhout, Belgien
Spannungsgerät Model 200/2.0 Power Supply	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Spannungsgerät Pharmacia LKB-ECPS 3000/150	GE Healthcare, München
UV-Tisch für Agarose-Gelfotos	LTF Labortechnik, Wasserburg/Bodensee
Waage Ohaus	Waagen Scout, Renchen
Wasserbad GFL 1083	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Zentrifuge für PCR-Tubes Sprout	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf

2.1.2 Verbrauchbares

Verbrauchbares	Hersteller
DMEM/Hams F12 (1:1)	Biochrom AG, Berlin
DMEM/Hams F12 (1:1)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
DMEM High Glucose (4,5g/l) w L-Glutamine	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Falcon Röhrchen (25ml, 50ml)	Greiner bio-one, Essen
Fetales Kälber Serum (FCS)	Biochrom AG, Berlin
Kulturflaschen (25cm ² , 75 cm ² 175 cm ²)	Biochrom AG, Berlin
McCoy's 5A modified Medium w2,2g/l NaHCO ₃	Biochrom AG, Berlin
Microliter Syringues	Hamilton Messtechnik GmbH, Höchst
Mikropipetten 0,5-10µl	Eppendorf AG, Hamburg
Mikropipetten 10-100 µl	Greiner Bio-one, Essen
Mikropipetten 100-1000 µl	Greiner Bio-one, Essen
PBS Dulbecco w/o Ca ²⁺ , w/o Mg ²⁺	Biochrom, Berlin
peqGOLD 100 bb DNA Leiter	peQLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
peqGOLD 1 kb DNA Leiter	peQLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
PCR SoftTubes (0,2ml)	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Reactions Tubes	Greiner bio-one, Essen
UVette®	Eppendorf, Hamburg
Zellabkratzer (24cm, 30cm)	Biochrom, Berlin
6-well Platten	Greiner Bio-one, Essen

2.1.3 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Agarose peqGOLD Universal	peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Alizarin red S	Chroma-Gesellschaft Schmidt&Co., Stuttgart
Ascorbat	Sigma-Aldrich GmbH, München
Chloroform (Dichloromethan)	Sigma-Aldrich GmbH, München
DEPC-H ₂ O	Carl Roth GmbH&Co.KG, Karlsruhe
Dexamethasone	Sigma-Aldrich GmbH, München
DMSO	AppliChem, via Hartenstein GmbH, Würzburg
dNTP	peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Ethanol	Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich GmbH, München
GoTaq® Flexi Puffer (5x)	Promega GmbH, Mannheim
HCl	Carl Roth GmbH&Co.KG, Karlsruhe
HPLC-H ₂ O	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Hygromycin B	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
IBMX (3-isobutyl-1-methylxanthine)	Sigma-Aldrich GmbH, München
Indomethacin	Sigma-Aldrich GmbH, München
Insulin	Sigma-Aldrich GmbH, München
Isopropanol	Carl Roth GmbH & Co. Kg, Karlsruhe
Methanol	Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt
MgCl ₂	Promega GmbH, Mannheim
MMLV-Puffer (5x)	Promega GmbH, Mannheim
NaCl	AppliChem, via Hartenstein GmbH, Würzburg
Natronlauge 2M	Carl Roth GmbH&Co.KG, Karlsruhe
Oligo-dT Primer	peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen

Paraformaldehyd (4%)	Merck KGaA, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Phosphoethanolamin	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, München
Probenecid	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, München
Pyridoxalphosphat	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, München
Pyrophosphat	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, München
Pyridoxalphosphat-6-azophenyl-2',4'-disulfid Säure	Sigma-Aldrich GmbH, München
Reaktionspuffer S (10x)	peQLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
ROTI®-Quant (5x)	Carl Roth GmbH&Co. KG, Karlsruhe
Thymidin 5' monophosphat p-nitrophenylester	Sigma-Aldrich GmbH, München
Tris	AppliChem, via Hartenstein GmbH, Würzburg
Trypsin-EDTA	PAA Laboratories GmbH, Linz, Österreich
Tryptan blue	Sigma-Aldrich GmbH, München
Trizol® REAGENT	Invitrogen, Lifetechnologies.com
Zoledronat	Novartis Pharma GmbH, Nürnberg
β- Glycerophosphat	Sigma-Aldrich GmbH, München
β-Mercaptoethanol	Sigma-Adrich GmbH, München
β-γ Methylentriphosphat	Sigma-Aldrich GmbH, München

2.1.4 Kits

Alkaline Phosphatase Kit	Sigma-Aldrich GmbH, München
NucleoSpin® RNA II	Macherey-Nagel GmbH, Düren

2.1.5 Enzyme

MMLV-Reverse Transkriptase (200 U/μl)	Promega GmbH, Mannheim
GoTaq® DNA-Polymerase (5U/μl)	Promega GmbH, Mannheim
Taq-Dna-Polymerase (5U/μl)	peQLab Biotechnologie GmbH, Erlangen

2.1.6 Primer

Primer	Sense	antisense	Länge [bp]	T _A [°C]	MgCl ₂ [μl]	Taq
--------	-------	-----------	---------------	------------------------	---------------------------	-----

Haushaltsgene

EF1α	AGGTGATTATCCTGA ACCATCC	AAAGGTGGATAGT CTGAGAAG	234	55	2	
EEF1A 1	CTGTATTGGATTGCC ACACG	AGACCGTTCTTCCA CCACTG	369	54	2	PL
EEF1A 1	CTGTATTGGATTGCC ACACG	AGACCGTTCTTCCA CCACTG	369	54	2	Pro

Adipogene Primer

LPL	GAGATTTCTCTGTAT GGCACC	CTGCAAATGAGAC ACTTTCTC	276	51	1	PL
FABP4	AACCTTAGATGGGGG TGTCC	ATGCGAACTTCAGT CCAGGT	177	60	2	PL
PPAR _γ 2	GCTGTTATGGGTGAA ACTCTG	ATAAGGTGGAGAT GCAGGCTC	351	61	4	PL

Osteogene Primer

OC	ATGAGAGCCCTCACA CTC CTC	GCCGTAGAAGCGC CGATA GGC	293	60	0	PL
OP	ACCCTTCCAAGTCCAA	GTGATGTCCTTGTA GC	400	58	0	PL

CBFA1	TCCGCACCGACA ACT T	CGTCCACTCCAATC TC	240	60	1	PL
DMP1	TAACCTGCTTTACATT C	TGCTGGACATTACA CTT	223	44	2	PL
PHEX	AAGCTGGACCAAGCA ACACT	TGGGGGTAGAGTC TGGTGTC	325	57	2	PL
BSP	AATGAAAACGAAGAA AGCG AAG	ATCATAGCCTACGT AGCCT TGT	450	54	0	PL
SOST	CAGGCGTTCATGATG C	TACTCGGACATTG GTC	155	60	2	PL
ALP	GCTGAACAGGAACAA CGTGA	AGACTGCGCCTGG TAGTTGT	441	57	2	PL
ALP	TGGAGCTTCAGAAGC TCAAC ACCA	ATCTCGTTGTCTGA GTACCA GTCC	483	51	3	Pro
ENPP1	AAAGTTGCAAAGGTC GCTGT	TGGATACAATCCG GTGACAA	491	55	2	PL
ENPP1	AAAGTTGCAAAGGTC GCTGT	TGGATACAATCCG GTGACAA	491	55	6	Pro
ANKH	AAAGCCGTCCTGTGTATG GT	CAGGGATGATGTCGTG AATG	412	55	2	PL
ANKH	AAAGCCGTCCTGTGTATG GT	CAGGGATGATGTCGTG AATG	412	55	4	Pro

Anmerkung:

- PL: Taq von peQLab Biotechnologie GmbH, Erlangen

-Pro: Taq von Promega GmbH, Mannheim

Bedeutung der Primerabkürzungen sowie in Klammern der Hersteller

EF1 α (Biomers): Elongation Factor 1 alpha

EEF1A1 (Biomers): Eucariotic Elongation Factor 1 Alpha 1

LPL (Biomers): Lipoproteinlipase

FABP4 (Biomers): Fatty Acid Binding Protein 4

PPAR γ 2 (Biomers): Peroxisome Proliferator-Activated Receptors
Gamma 2

OC (Operon):	Osteocalcin
OP (Biomers):	Osteopontin
CBFA1 (Biomers):	Core Binding Factor Alpha 1
DMP1 (Eurofins MWG Operon):	Dentin Matrix acidic Phosphoprotein 1
PHEX (Eurofins MWG Operon):	Phosphate regulating Endopeptidase homolog, X-linked
BSP (Biomers):	Bone morphogenic Protein
SOST (Biomers):	Sclerostin
ALP (Biomers):	Alkalische Phosphatase
ALP (Operon):	Alkalische Phosphatase
ENPP1 (Eurofins MWG Operon):	Ectonucleotide Pyrophosphatase/Phosphodiesterase
ANKH (Eurofins MWG Operon):	Ankylosis, progressive Homolog

2.1.7 Material für Gelelektrophorese

-Ladepuffer für Gelelektrophorese	6,85 M Glycerol 1 mM EDTA 4,6 mM Xylencyanoblau 3,7 mM Bromophenolblau ad 50 ml ddH ₂ O
-10x TBE-Puffer für Gelelektrophorese	890 mM Tris 890 mM Borsäure 20 mM EDTA (pH 8,0) ad 1l ddH ₂ O

2.1.8 Sonstiges

-PBS + Proteaseinhibitor (25:1)

8,0 g/l Natriumchlorid
0,2 g/l Kaliumchlorid
1,4 g/l Dinatriumhydrogenphosphat
0,27 g/l Kaliumhydrogenphosphat
ad 1000 ml ddH₂O

25:1 mit Complete EDTA-free Protease-Inhibitor-Cocktail (1 Tablette/2ml H₂O)
Roche GmbH (Mannheim)

-1M Tris

Für 200 ml:

24,22g Tris base
160 ml ddH₂O
pH unter dem Abzug mit rauchender HCl einstellen
pH=8.0 » 8.4ml HCl

Anschliessend Auffüllen des Volumens auf 200ml mit ddH₂O

Zur Erstellung von 200mM Tris pH8.0, 1% Triton wurde die hergestellte Stocklösung (1mM) 1:5 mit ddH₂O verdünnt und mit Triton versetzt.

Für 100 ml:

1,0 ml Triton
20 ml 1M Tris pH 8.0
79 ml ddH₂O

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Verwendete Zellen: humane mesenchymale Stammzellen und SAOS

Für die Experimente wurden zwei verschiedene Zelllinien verwendet. Einerseits die humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC) sowie die Osteosarkomzelllinie SAOS.

- hMSC: Die Stammzellen wurden aus frischen Hüftköpfen isoliert. Diese stammten von Patienten die sich einer chirurgischen Hüftkopfresektion im Orthopädiezentrum des König-Ludwig Hauses Würzburg, zum Beispiel im Rahmen einer Hüftkopfprothesenimplantation, unterzogen (Ethikvotum: Ethik 06/30/2010 auf der Basis 84/2001). Die zeitnah isolierten Zellen wurden anschliessend in 175 cm² Zellkulturflaschen ausgesät. Bis zur Konfluenz verblieben die Zellen unter regelmäßigem Mediumwechsel in diesen Flaschen. Dann konnten sie für die jeweiligen Versuche erst abgelöst und neu verteilt werden.

Die hMSCs sind multipotente Zellen die sich unter den richtigen Bedingungen in verschiedene Richtungen entwickeln können. Neben den Differenzierungswegen zu Chondrozyten oder Myozyten waren in diesen Experimenten erstens die adipogene, aber vor allem die osteogene Differenzierung von Bedeutung. Das Standardmedium zur Zellversorgung war DMEM-Hams F12 Medium. Als Zusätze wurden auf 500 ml Medium 50 ml FCS, 5ml Penicillin/Streptomycin und 500 µl Ascorbat hinzugefügt.

- SAOS: Bei den Zellen handelt es sich um SAOS, eine Osteosarkom Zelllinie (ATCC-Nr.: HTB-85) [64]. Damit sind die SAOS eine Krebszelllinie und somit immortalisiert. Die Handhabung gleicht jener der hMSCs. Unterschiede gibt es allerdings in puncto benötigtes Medium und Zeitpunkt der Ablösung und Neuverteilung. Tatsächlich wurden die verwendeten SAOS-Zellen wegen ihrem spontanen Differenzierungspotential bereits bei einer maximalen Konfluenz von 60-80% gesplittet. Das Standardmedium zur Zellversorgung war das Mc

Coy's 5A modified Medium w2,2g/l NaCO_3 . Als Zusätze wurden auf 500 ml Medium 50ml FCS und 5ml Penicillin/Streptomycin hinzugefügt.

2.2.1.2 Zellversorgung

Die Zellen wurden in einem Brutschrank bei 37°C und 5% CO_2 kultiviert. Jegliche Manipulation wurde unter sterilen Bedingungen an der sterilen Werkbank durchgeführt.

Der Mediumwechsel fand alle 3-4 Tage statt. Nach Absaugen des verbrauchten Mediums wurde das Neue hinzugegeben. Dabei hing die Menge im Allgemeinen vom jeweiligen Flaschenkaliber respektiv vom Well ab. Prinzipiell füllte man in 25 cm^2 Flaschen 5 ml, 75 cm^2 Flaschen 17 ml, 175 cm^2 Flaschen 25 ml und in ein Well 3 ml Medium ein. Das jeweilige Medium wurde erst im Wasserbad auf Zimmertemperatur erhitzt um den schonenden Umgang mit den Zellen zu gewährleisten.

- hMSC: Die Versuche mit mesenchymalen Stammzellen wurden in 25 cm^2 Flaschen und in 6-well Platten ausgeführt. Die Heranzüchtung der Zellen fand in 175 cm^2 Flaschen statt.
Vom wiederholten Ablösen mit EDTA-Trypsin und erneutem Aussähen wurde bei hMSCs abgesehen da dadurch eine vorzeitige Alterung der Zellen zustande kam. Nach dem ersten Ablösen aus den ersten 175 cm^2 Züchtungsflaschen wurden die Zellen in aller Regel in die definitiven Behältnisse für die Versuche überführt. Dadurch bestand der Unterhalt dieser Zellen zumeist alleinig aus dem 3-4 tägigen Mediumwechsel.

- SAOS: Die Versuche mit den Zellen der SAOS-Zelllinie wurden in 25 cm^2 Flaschen und in 6-well Platten ausgeführt. Die Heranzüchtung der Zellen fand in 75 cm^2 Flaschen statt.
Im Gegensatz zu den hMSCs wurden die SAOS-Zellen regelmäßig gesplittet. Das verbrauchte Medium wurde abgesaugt und nach

einmaligem Spülen mit PBS die Zellen mit EDTA-Trypsin von den jeweiligen Flaschen gelöst. Nachdem unter dem Mikroskop der sichtbare Beweis für die Ablösung zu erkennen war, wurde die enzymatische Reaktion durch Zugabe von FCS-haltigem Medium gestoppt. Nach einer Überführung in ein 50ml-Falconröhrchen folgte die Zentrifugation von 5 min bei 1200 Umdrehungen/Minute. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen in 20 ml neuem Medium resuspendiert und danach auf die neuen Flaschen im gewünschten Verhältnis (normalerweise 1:4) verteilt. Dafür wurden 5 ml Resuspension in jede Flasche pipettiert. Bei 75cm² waren davor schon 12ml Medium vorgelegt worden.

2.2.1.3 Differenzierungsversuche unter Stimulation mit PPi, PPADS und β - γ meATP

In einem Teil der Versuche wurden die hMSCs einer osteogenen Differenzierung unterzogen und dabei verschiedenen ausgewählten Substanzen (PPi, PPADS, β - γ meATP) ausgesetzt. Durchgeführt wurde der Versuch in 25 cm² Flaschen sowie in 6-wells.

Die parallel zu den Differenzierungen angelegte Kontrolle bestand aus Zellen, die die Standardbehandlung mit DMEM/Hams F12 Medium zusätzlich

- FCS (50ml / 500ml Medium),
- Penicillin/Streptomycin (5ml / 500ml Medium),
- Ascorbat (500 μ l / 500ml Medium)

mit oder ohne Zusatzsubstanz erhalten haben.

Die osteogene Differenzierung erfolgte anhand des DMEM High Glucose Medium zusätzlich

- FCS (50ml / 500ml Medium),
- Penicillin/Streptomycin (5ml / 500ml Medium),
- Ascorbat (500 μ l / 500ml Medium).

- β -Glycerophosphat (5ml / 500ml Medium) und
- Dexamethason (50 μ l / 500 ml Medium)

wurden beim Mediumwechsel stets frisch dazugegeben.

Die adipogene Differenzierung erfolgte anhand des DMEM High Glucose Medium

zusätzlich

- FCS (50ml / 500ml Medium),
- Penicillin/Streptomycin (5ml / 500ml Medium).
- IBMX (3-isobutyl-1-methylxanthine) (500 μ l/500mlMedium),
- Insulin (500 μ l / 500 ml Medium),
- Dexamethason (500 μ l / 500 ml Medium) sowie
- Indomethacin (500 μ l / 500 ml Medium)

wurden beim Mediumwechsel stets frisch dazugegeben.

Die adipogene Differenzierung wurde nur im Differenzierungsversuch mit PPi durchgeführt. Bei PPADS und β - γ meATP wurde allein die osteogene Differenzierung betrachtet.

Die Stimulierungsversuche erstreckten sich über 4 Wochen mit einer intermediären Ernte nach 2 Wochen, wobei die Zellen geerntet und zur RNA-Extraktion und histochemischen Färbungen verwendet wurden. Dabei wurden die Zellen bei jedem Mediumwechsel mit PPi (1 μ M) bei dem einen Versuch, respektiv mit PPADS (25 μ M) und β - γ meATP (100 μ M) bei dem Anderen belastet.

2.2.1.4 Expositionsversuche mit PPADS und β - γ meATP

Sowohl hMSC als auch SAOS wurden für diese Versuche verwendet. Die Zellen wurden dabei in 25 cm² Flaschen 24 Stunden PPADS 50 μ M oder β - γ meATP 300 μ M exponiert und anschließend zur RNA-Extraktion geerntet.

Verwendet wurde für

- hMSC das DMEM /Hams F12 Medium mit
 - FCS (50ml / 500ml Medium),
 - Penicillin/Streptomycin (5ml/500mlMedium),
 - Ascorbat (500µl / 500ml Medium)
- SAOS das McCoy's 5A modified Medium mit
 - FCS (50ml / 500ml Medium)
 - Penicillin/Streptomycin (5ml/500ml Medium)

2.2.1.5 Expositionsversuche mit Probenecid

Sowohl hMSCs als auch SAOS wurden für diese Versuche verwendet. Die Zellen wurden dabei in 25 cm² Flaschen 48 Stunden Probenecid 1,25mM exponiert und anschließend zur RNA-Extraktion und AP-Aktivitätsmessung geerntet.

Verwendet wurde für

- hMSC das DMEM /Hams F12 Medium mit
 - FCS (50ml / 500ml Medium),
 - Penicillin/Streptomycin (5ml / 500ml Medium),
 - Ascorbat (500µl / 500ml Medium)

mit

- SAOS das McCoy's 5A modified Medium
 - FCS (50ml / 500ml Medium)
 - Penicillin/Streptomycin (5ml/500ml Medium)

2.2.1.6 Zellzahlbestimmung

Da es für die meisten Versuche von Bedeutung war, die exakte Zellzahl zu wissen die ausgesät wurde, soll die Methode nicht unerwähnt bleiben. In der Tat, eine Gleichbehandlung der einzelnen Versuchelemente fängt mit dem Aussäen einer approximativ gleichen Zellzahl für jede Flasche respektiv jedes Well an.

Hierzu wurden aus der gut durchmischten Zellsuspension vor dem Aussäen 50µl Zellen mit 50µl Trypitanblaulösung in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß vermischt.

Die Neubauer-Zählkammer wurde erst mit Ethanol 70% gereinigt und mit einem Deckglas versehen. Nachdem man sich vergewissert hatte dass das Deckglas durch den Kapillareffekt ausreichend haftete, pipettierte man in eine Hälfte circa 10µl Zellsuspension. Unter dem 10x Objektiv des Mikroskops wurden nun die Zellen in den 4 großen Quadraten gezählt und anschliessend der Mittelwert dieser Werte genommen.

Dann wurde der Wert mit dem Verdünnungsfaktor (2) und dem Faktor für das Volumen der Neubauer Zählkammer (10^4) multipliziert.

Formel: $(\text{Mittelwert der gezählten Zellen}) \cdot 2 \cdot 10^4 = \text{Zellzahl /ml}$

Tote Zellen waren anhand der offensichtlichen Blaufärbung zu erkennen, was sich durch ihre folgliche Membranpermeabilität ergab, und wurden daher nicht mitgezählt

Hiermit konnte jetzt berechnet werden, wieviel Zellsuspension in die einzelnen Flaschen und Wells pipettiert werden musste um eine gewisse Zellzahl zu erreichen.

2.2.1.7 Apoptose-Messung

Um auszuschliessen dass der Unterschied zwischen den mit Probenecid behandelten und den unbehandelten Zellen ein Resultat eines Absterbens dieser Zellen war, wurde eine Apoptose-Messung durchgeführt.

Der Test beruht auf einer Messung der Caspase-Aktivität in einem Zellenverband. Die zugegebene Substanz, das Caspase-Substrat Caspase-Glo 3/7 wird demnach von den Caspasen gespalten und Aminoluciferin wird freigesetzt. Dieses wiederum ist ein Substrat für die Luziferase, welches am Luminometer eine Luciferasereaktion provoziert. Das freigesetzte Licht kann dann gemessen werden. Dementsprechend ist das Leuchten umso stärker ausgeprägt, je mehr Zellen in der Apoptose sind [65].

Zur Durchführung wurden die Zellen in einer sterilen 96well-Platte ausgesät. Pro Well waren 1000 Zellen vorgesehen. Nach einer 48h-Stimulation mit Probenecid wurden dann 100µl Caspase-Substrat in Puffer hinzugefügt. Unter dem Luminometer wurde dann schliesslich das Resultat gemessen.

2.2.2 Enzymaktivitätsmessungen

2.2.2.1 Enzymassay der alkalischen Phosphatase (AP)

Dieser Versuch wird benutzt um die Aktivität der alkalischen Phosphatase in einer Zellpopulation zu bestimmen.

Die Zellen wurden in 6-Well ausgehäutet um sie am Tag der Konfluenz für den Versuch zu ernten. Zuerst wurden die Zellen mittels Zellschaber in 300µl eiskaltem PBS (0 °C) mit Protease-Inhibitor (im Verhältnis 1:25) abgekratzt und in 1,5ml Tubes überführt. Der Protease-Inhibitor verhindert die Degradation der Proteine der Zellen nach dem Aufbrechen durch Serin- und Cysteinproteasen. Um die Zellmembran aufzubrechen und die intrazellulären Proteine zu erhalten und vom Zellschrott zu trennen, werden die Zellen zuerst mittels Sonopuls bei 80% der Stärke sonifiziert und anschließend in der Kühlzentrifuge bei 4°C und 10 000 U/min für 10 min abzentrifugiert. Vom Überstand werden 150µl in ein für die Messung spezifisches Messgefäß gegeben. Die Messungen der Proben erfolgten durch das Klinische Labor des König-Ludwig-Hauses.

Der zweite Teil des Versuches bestand in der Normierung der Aktivitätswerte anhand einer Proteinkonzentrationsbestimmung der einzelnen Proben. Anhand von Roti®-Quant, verdünnt 1:5 in ddH₂O, und BSA wurde eine Standardreihe angelegt indem 200µl pro Well Roti®-Quant und 0µl, 0,4µl, 1µl, 2µl, 3µl, 4µl BSA in jeweils 2 Wells gefüllt wurden. Anschließend wurden 200µl Roti®-Quant pro Well vorgelegt und pro Probe jeweils in 2 Wells eine bestimmte Menge des restlichen Überstandes pipettiert. Durch die Doppelbestimmung wurde die Genauigkeit der Messung erhöht. Die jeweilige Menge von zugegebenem Überstand variierte je nach Proteingehalt zwischen 1µl und 4µl, damit der beobachtete Farbumschlag immer innerhalb der Standardreihe blieb. Die Messung erfolgte schlussendlich mit einem Photometer bei 620 nm. Anhand dieser Werte konnte dann die eigentliche Proteinbestimmung der einzelnen Proben rechnerisch bestimmt werden. Das entgültige Ergebnis konnte nach der Miteinbeziehung der Aktivitätsbestimmung in U/µg Protein bestimmt werden.

Der Versuch basiert auf dem Stoff Coomassie Brilliant-Blue G250, der bei Proteinkontakt seinen Zustand von kationisch nach anionisch ändert und so einen Farbumschlag provoziert (Gebrauchsanweisung Roti®-Quant, Roth).

Eine Abwandlung des Experimentes bestand darin, die direkte Wirkung einer Substanz auf die alkalische Phosphatase zu bestimmen. Normalerweise dient dieser Versuch nämlich dazu, die Auswirkungen einer Zellstimulation mit einer Substanz auf das besagte Enzym zu untersuchen.

Man kann aber auch unbehandelte Zellen ernten, sonifizieren und anschliessend die zu untersuchende Substanz in der benötigten Konzentration in die Messröhrchen dazugeben. Eine dementsprechende Anpassung des hinzugegebenen sonifizierten Überstandsvolumens, um 150µl Endvolumen zu erreichen, ist vorausgesetzt.

2.2.2.2 Aktivitätsmessung von ENPP1

Der Zweck dieses Experimentes bestand darin sowohl die jeweilige Aktivität von ENPP1 zu messen, sowie den Effekt der Hemmsubstanzen von ENPP1, PPADS und β - γ meATP zu beobachten. Die Durchführung wurde nach dem in der Publikation von Chen-Ni Chin et al. [66], beschriebenen Prinzip durchgeführt.

Bei diesem Versuch wurden je nach Verfügbarkeit sowohl hMSC als auch SAOS-2 und HEK-293 verwendet. Letztere wurden freundlicherweise laborintern zur Verfügung gestellt sodass eine eigene Betreuung der Zellen nicht nötig war. Es handelt sich um Humane embryotische Nierenzellen (Human Embryonic Kidney) mit einem adhärenen Wachstum.

Zur Vorbereitung der Proben wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschliessend mit 1ml Trypsin-EDTA bei 37°C in 5 Minuten abgelöst. Das Überführen in ein Falcon mit Zellkulturmedium stoppte die Enzymreaktion ab. Es folgte eine erste Zentrifugation mit 1200 U/min für 5 min. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen zur ersten Waschung mit PBS resuspendiert. Die zweite Zentrifugation und Waschung entsprachen der Ersten. Nach der zweiten Waschung folgte eine erneute Zentrifugation bei 1200 U/min für 5 min. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Pellet, abhängig von seiner Größe in 300-500 μ l 200 mM Tris, pH 8.0; 1% Triton durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren lysiert, in Eppendorf-Reaktionsgefäße transferiert und auf Eis gelagert.

Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 2000 U/min und Raumtemperatur wurde vom Überstand eine Proteinkonzentrationsbestimmung durchgeführt. Zum Verfahren der Konzentrationsbestimmung, siehe Punkt 2.2.1.2 Enzymassay der alkalischen Phosphatase (AP).

Mit der Proteinkonzentrationsbestimmung wurde das benötigte Proteinüberstand-Volumen bestimmt um auf 200 μ l Reaktionsvolumen je nach Verfügbarkeit 100 μ g oder 200 μ g Protein zu erhalten.

-Positivkontrolle

Die benötigte Menge Protein wurde anschliessend mit PBS/Protease-Inhibitor Lösung (1:25) auf 192µl aufgefüllt und mit 8µl Substrat (Thymidine 5' monophosphat p-nitrophenyl ester) auf 200 µl aufgefüllt.

-Negativkontrollen

> Negativkontrolle ohne Protein

Es wurden PBS/Protease-Inhibitor Lösung 192µl mit 8µl Substrat auf 200µl aufgefüllt

>Negativkontrolle ohne Substrat

Es wurde die für 100µg benötigte Menge Protein auf 200µl mit PBS/Protease- Inhibitor aufgefüllt.

-Inhibierungsproben mit PPADS / β - γ meATP

Pro Zellreihe wurden für jeden Inhibitor 3 Konzentrationen ausgetestet (jeder Versuch n=3). Dabei wurde die einzusetzende Menge Protein mit der entsprechenden Menge Inhibitor am Ende mit PBS/Protease-Inhibitor auf 192µl aufgefüllt:

Menge Inhibitor

-Für PPADS: 25µM » 10µl von 500µM in 200µl
 50µM » 20µl von 500µM in 200µl
 100µM » 40µl von 500µM in 200µl

-Für β - γ meATP: 50µM » 3,3µl von 3mM in 200µl
 100µM » 6,6µl von 3mM in 200µl
 300µM » 20µl von 3mM in 200µl

Im Endeffekt sah das Pipettierschema für alle verwendeten Zellproben für die Inhibierungsproben folgendermaßen aus:

Für PPADS

PPADS [c]	PPADS [μ l]	Protein [c]	PBS/PI (auffüllen auf)	ENPP1- Substrat
25 μ M	10 μ l	100 μ g	182 μ l	8 μ l
50 μ M	20 μ l	100 μ g	172 μ l	8 μ l
100 μ M	40 μ l	100 μ g	152 μ l	8 μ l

Für β - γ meATP

β - γ meATP [c]	β - γ meATP [μ l]	Protein [c]	PBS/PI (auffüllen auf)	ENPP1- Substrat
50 μ M	3,3 μ l	100 μ g	182 μ l	8 μ l
100 μ M	6,6 μ l	100 μ g	172 μ l	8 μ l
300 μ M	20 μ l	100 μ g	152 μ l	8 μ l

Dabei mussten folglich zu pipettierende Menge an Protein und PBS/PI in Bezug auf Proteinkonzentration im Überstand der extrahierten Proteine aufeinander abgestimmt werden. Für jede Inhibitorkonzentration und Zelle wurde der Ansatz dreifach angesetzt.

Das Substrat für ENPP1 wird am Ende des Pipettiervorgangs in einer bestimmten Reihenfolge dazugegeben, die verinnerlicht werden muss. Damit beginnt nämlich die eigentliche Reaktion und der Abbruch der Reaktion nach einer Stunde sollte möglichst der gleichen Reihenfolge entsprechen.

Die Reaktion wurde gemäß Publikation bei 37°C im Hitzeblock ablaufen lassen. Hier war in dem Moment auch eine Lichtexposition verhindert, da PPADS sich durch Lichteinwirkung desintegriert.

Das Experiment beruht auf dem Prinzip, dass das Substrat, Thymidine-5'-monophosphat p-nitrophenyl ester von ENPP1 hydrolysiert wird. Diese Substanz hat dann eine gelbliche Farbe, die bei 405 nm messbar ist.

Nach einer Stunde Laufzeit beendete man die Reaktion mit Zugabe von 20 μ l 1M NaOH.

Von jeder Probe wurden nun 100 μ l in eine 96well Platte pipettiert und im Photometer bei 405nm gemessen.

Die Auswertung der Daten ermöglicht es die Aktivitätsabnahme respektiv –Zunahme des Enzyms relativ zur nativen Aktivität darzustellen.

2.2.3 Zytologische Färbungen

Alle Färbungen wurden unter dem Lichtmikroskop bei gleicher Vergrößerung beobachtet. Veränderungen konnten aus logistischen Gründen leider nicht mittels Lichtspektrumsanalyse objektiviert werden.

2.2.3.1 Alizarin-Rot-Färbung

Diese Färbung dient dem Nachweis der Mineralisierung der Zellen im Rahmen der osteogenen Differenzierung.

Die 1%ige Färbelösung an sich bestand aus 0,25g Alizarin-Red S (Alizarin sulfosaures Natrium), das in 25 ml destilliertem H₂O und 250 μ l 25%igem Ammoniak aufgelöst wurde.

Für die Färbung wurden die Zellen erst mit PBS gewaschen und nach dem Absaugen vom PBS 10 Minuten lang mit eiskaltem Methanol (0°C) fixiert. Anschliessend wurde nach erneutem Absaugen mit destilliertem H₂O das restliche Methanol abgewaschen und die Zellen für 2 Minuten mit der Färbelösung inkubiert. Dann hat man mit destilliertem H₂O die überschüssige Färbelösung entfernt und das Deckglas feucht in Glycerinegelatine eingebettet. Unter dem Resultat wurde das Ergebnis dann begutachtet und photographiert.

2.2.3.2 Alkalische Phosphatase Färbung

Die Expression der alkalischen Phosphatase konnte man anhand des Alkaline Phosphatase, Leukocyte Kit No. 86C von SIGMA farblich darstellen.

Für die Fixierungslösung gab man zu 2,5 ml Citrate Solution 6,5 ml Aceton in eine Glasflasche. Anschliessend kamen noch 800µl 37% Formaldehydlösung hinzu. Die Lösung wurde im Kühlschrank bei 2-8°C bis zu 4 Wochen aufbewahrt und bei Gebrauch auf Raumtemperatur aufgewärmt.

Der erste Schritt bei der Färbung war die Herstellung der Färbungslösung. Pro well vermischte man in einem frischen Reaktionsgefäß 20 µl FBB-Alkaline Solution und 20 µl Sodium Nitrite Solution und ließ die Mischung 2 Minuten inkubieren. Danach gab man die Diazoniumsalzlösung in ein mit Alufolie abgedunkeltes Falconröhrchen mit 900 µl destilliertes H₂O. Anschliessend pipettierte man noch 20 µl Naphtol-AS-BI Alkaline Solution zur verdünnten Diazoniumsalzlösung.

Zur Fixierung saugte man das Medium gründlich von den Zellen. Dies war wichtig, weil hier keine Waschung mit PBS erfolgte. Für 30 Sekunden inkubierte man jetzt die Zellen mit der Fixierungslösung. Dann wurde 3 Mal mit destilliertem H₂O abgewaschen.

Anschliessend inkubierte man 15 Minuten lang jedes Well mit 900 µl Fixierungslösung wobei die Färbung vor direktem Lichteinfluss bewahrt werden musste. Nach Ablauf der Zeit wurde die Färbung abgesaugt und das Deckglas in Glyceringelatine eingebettet um unter dem Mikroskop ausgewertet werden zu können.

2.2.3.3 Ölrotfärbung

Die Ölrotfärbung ist eine Fettfärbung, die die Fettvakuolen der Zellen rot anfärbt und so ein Zeichen für eine adipogene Differenzierung ist.

Zur Herstellung der Färbelösung wurde erst eine Stammlösung angelegt indem 0,5g Oilred O in 100 ml 99% Isopropanol gelöst wurden. Diese

verdünnte man dann zu einer 0,3% Gebrauchslösung indem man 6 Teile Stammlösung mit 4 Teilen destilliertem H₂O vermischte und 24 h stehen ließ. Nach Filtrieren war die Gebrauchslösung 4 Wochen haltbar.

Zum Anfärben der Zellkerne verwendete man die Hämalaun- Färbelösung. Diese wurde hergestellt indem man 1 g Hämatoxylin in 1 l bidestilliertem H₂O, bei Bedarf unter Erhitzung, löste und anschliessend 0,2 g Natriumiodat hinzugab. Dann wurden noch unter Umschütteln 50 g Kaliumaluminiumsulfat hinzugegeben. Nach der Zugabe von 50g Chloralhydrat wurde mit 1g Zitronensäure der Farbumschlag von Rot zu Violett herbeigeführt. In einer Glasflasche aufbewahrt lässt sich diese Färbelösung lange aufbewahren.

Für die Zellfärbung spülte man die Zellen einmal mit PBS und fixierte sie anschließend mit 4% Paraformaldehyd. Dann wurde noch einmal mit destilliertem H₂O nachgespült und 10 Minuten mit der Oilred-Färbelösung inkubieren gelassen. Nach erneutem Spülen mit destilliertem H₂O färbte man nun die Zellkerne, indem man die Hämalaun-Färbung für 1 Minute auf die Zellen gab. Anschliessend wurden die Proben mit Leitungswasser abgewaschen und in Glyceringelatine eingebettet und unter dem Mikroskop ausgewertet.

2.2.4 Methoden zur RNA-Expressionsanalyse

2.2.4.1 RNA- Isolation und Aufreinigung

Die Isolation der RNA aus den osteogen differenzierten Zellen erfolgte anhand von TRIZOL®Reagent Invitrogen um eine vollständigere Lyse trotz Kalkkruste zu gewährleisten. Zur Aufreinigung sowie Isolation bei nicht osteogenen Differenzierungsversuchen wurde das Kit Total RNA Isolation, Nucleo Spin RNA II (Macherey-Nagel, Düren) gemäß Handbuch verwendet.

Wegen der verwendeten flüchtigen Giftstoffe war die Extraktion nur unter dem Giftabzug möglich.

Der erste Schritt bestand im Absaugen des Kulturmediums der Zellen aus den Flaschen. In eine 25cm² Flasche wurden 1ml Trizol pipettiert und die Zellen anschliessend mit einem Zellschaber abgetragen. Die Suspension wurde in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Pipette sowie Zellschaber wurden über Nacht zum ausdampfen unter der Hood belassen. An dieser Stelle war eine Lagerung bei -80°C einige Monate möglich. Nach 5-minütiger Inkubation wurden 200µl Chloroform dazugegeben und anschliessend 15 Sekunden mithilfe des Vortex homogenisiert. Nach einer weiteren Inkubation von 2-3 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Reaktionsgefäße bei 4°C und 4500 U/min 15 Minuten zentrifugiert. Von der provozierten Phasentrennung wurde die erste obere, wässrige Phase in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben. Der Rest wurde im halogenhaltigen organischen Abfall entsorgt und die Reaktionsgefäße zum Abdampfen über Nacht unter dem Abzug gelassen. Mit 500µl Isopropanol bewirkte man die RNA-Fällung aus der wässrigen Phase. Optional war an dieser Stelle die Lagerung über Nacht bei -20°C möglich. Auf eine 10-minütige Inkubation folgte eine neue Zentrifugation bei 4°C und 4500 U/min für 10 Minuten. Der Überstand wurde in die halogenhaltigen organischen Abfälle verworfen und der RNA Kit von Invitrogen angehängt. Hierzu wurde das erhaltene Pellet so schnell wie möglich in 350µl LysisPuffer mit 3,5 µl β-Mercaptoethanol resuspendiert und gemäß Handbuch aufgereinigt. Schlussendlich wurde die RNA in 60µl RNasefreiem H₂O eluiert und bei -20°C gelagert.

2.2.4.2 RNA- Konzentrationsbestimmung

Bevor man zur cDNA-Synthese vorschreiten konnte musste zuerst die RNA-Konzentration gemessen werden. Dazu wurden 2µl isolierte RNA in 48µl ddH₂O verdünnt und zum Messen in eine Kunststoff-Küvette gegeben. Zur Messung im Eppendorf BioPhotometer 6131 wurden im Modus

ssRNA die Einstellungen zur Dilution (2µl Probe und 48µl Diluent) bestätigt. Zum Nullabgleich wurde die zur Dilution verwendete Substanz bei den eingestellten Bedingungen gemessen. Die so erhaltenen Messwerte gaben die RNA-Konzentration dann in µg/µl an. Drei Werte waren ausser dem Messwert noch von besonderer Bedeutung. Zum einen sollte das Verhältnis der Extinktionswerte bei 260nm und 280nm $E_{260/280}$ möglichst zwischen 1,8 und 2 liegen. Dann sollte, um eine möglichst aussagekräftige Messung zu erhalten, der Wert der Extinktion bei 260nm E_{260} sich zwischen 0,1 und 1,0 befinden. Schlussendlich war bei der Extraktionsmethode mit Trizol noch der Extinktionswert bei 320nm E_{320} wichtig, denn dieser gab Aufschluss über eine mögliche Phenolkontamination der Probe, was in der folgenden cDNA-Synthese durch Proteinkoagulationen zu Problemen geführt gehabt haben könne. Dieser Wert sollte somit möglichst niedrig gehalten werden.

2.2.4.3 cDNA-Synthese

Nachdem die RNA Konzentration bestimmt wurde, konnte die cDNA Synthese folgen. Diese bestand aus zwei Schritten:

- Zuerst wurden 2µg RNA zusammen mit 1µl Oligo-dT und RNase-freiem H₂O in ein PCR-Tube pipettiert und 10 Minuten bei 70°C inkubiert. Dies hatte zur Folge dass die Oligo-dTs sich an den RNA-Strang haften konnten und nachher so als Initiator der Reversen Transkriptase fungieren. Um zu gewährleisten, dass diese Anhaftung erhalten blieb war es wichtig die Tubes unmittelbar nach der Erhitzung auf Eis zu konservieren.
- Im zweiten Schritt wurden dann 7µl eines angelegten Mixes zugefügt, der pro Tube 5µl 5xReverse-Transkriptase-Puffer, 0.625µl dNTPs, 0.375µl H₂O und 1µl MMLV-Reverse Transkriptase enthielt. Daraufhin wurden die PCR-Tubes noch einmal in der PCR-Maschine eine Stunde auf 42°C erhitzt und am

Ende während 10 Minuten bei 94°C die Inaktivierung des Enzyms herbeigeführt.

Anschliessend konnte das Produkt noch verdünnt werden, um eine möglichst effiziente Ausbeute der RNA-Extraktion zu ermöglichen. Eine 2-fache Verdünnung auf 1µg umgeschriebene RNA /Tube war üblich, aber auch eine 4-fache Verdünnung auf 0.5µg umgeschriebene RNA/Tube war noch PCR-tauglich.

2.2.4.4 Polymerase-Ketten Reaktion

Um herauszufinden, welche Gene in einer Zellpopulation wie stark exprimiert werden bedarf es einer Reaktion, die Kary Banks Mullis im Jahr 1983 erfand und für die er 10 Jahre später den Nobelpreis für Chemie erhalten hat.

Dank des Bakteriums *Thermus aquaticus* und seiner hitzeresistenten Taq-Polymerase ist die Grundlage für die Polymerase – Ketten Reaktion gelegt. Diese ist im Wesentlichen eine zyklische Abfolge einer Grundreaktion. Diese besteht aus 3 Elementen:

- Das Erste ist die Denaturierung des DNA-Stranges, da dieser aufgebrochen werden muss um eine Replikation zu ermöglichen. Dazu wird bei einer kurzzeitigen Erhöhung der Temperatur auf 94°C die cDNA in zwei Einzelstränge zerlegt.
- Es schliesst sich die Annealing-Phase an, wo sich die Primer an die DNA heften und so den für sie spezifischen Bereich für die Taq-Polymerase kennzeichnen.
Diese Phase ist sehr spezifisch. Hier unterscheiden sich die einzelnen Primer hinsichtlich Annealing-Temperatur voneinander.
- In der Polymerisierungsphase stellt die Taq-Polymerase nun, den Primern folgend, aus dNTPs einen komplementären Strang dieses Bereiches her.

Hier unterscheiden sich die Primer noch einmal indirekt voneinander. Je nachdem wie groß der zu transkribierende

Bereich ist braucht die Taq-Polymerase länger. Man geht von 1000 BasePairs pro Minute als Arbeitstempo des Enzyms aus.

Dieser Zyklus wiederholt sich nun 20-40 mal, je nach Primer und nachzuweisendem Genprodukt. Je höher die Zyklenzahl umso öfter arbeitet das Enzym, was zu einer exponentiellen Vermehrung des Produktes führt, bis es zu einer sogenannten Sättigungskurve kommt, die möglichst vermieden werden soll, da zu diesem Zeitpunkt kein zuverlässiger Vergleich der einzelnen Samples mehr möglich ist.

Der Vorteil der PCR besteht in der extrem hohen Sensitivität. Theoretisch kann man eine einzige Kopie eines Genes nachweisen, eine genügend hohe Zyklenzahl vorausgesetzt [67, 68].

Der PCR-Ansatz wurde stets wie folgt pipettiert:

- Für die Taq-Polymerase von peQLab:

39.3µl H₂O (variabel)

5µl 10xPuffer

0.5µl dNTP

0.5µl Primer (sense)

0.5µl Primer (antisense)

2µl MgCl₂ (variabel)

0.2µl Taq-Polymerase

- Für die Taq-Polymerase von Promega:

29.3µl H₂O (variabel)

10µl 5xGreen Puffer

0.5µl dNTP

1µl Primer (sense)

1µl Primer (antisense)

6µl MgCl₂ (variabel)

0.2µl Taq-Polymerase

Die Menge an $MgCl_2$ unterscheidet sich von einem Primer zum anderen. Diese Divergenzen müssen dann über eine Anpassung der Mengen an zugegebenem Wasser ausgeglichen werden.

Pro PCR-Tube wurden $2\mu l$ cDNA verwendet.

Neben den eigentlichen Samples wurde auch eine Negativprobe in den PCR-Vorgang mit hineingenommen. Hierbei handelte es sich um ein PCR-Tube in den statt $2\mu l$ cDNA die gleiche Menge HPLC H_2O hineingegeben wurde. Dies hatte als Sinn einen falsch-positiven Ausschlag der PCR zu erkennen und somit eine ungewollte Kontamination der PCR durch fremde DNA auszuschliessen.

2.2.4.5 Gelelektrophorese

Um das Produkt der PCR und somit das Resultat der Untersuchung sichtbar zu machen trug man die fertige PCR schlussendlich auf ein Agarosegel auf und setzte es unter Spannung. Das Gel wurde durch Auflösen von 1,5g Agarose in 100ml 0.5x TBE-Puffer hergestellt. Zur Beschleunigung der Auflösung wurde der Puffer in einer Mikrowelle so lange erhitzt bis das Pulver sich im Puffer gelöst hatte. Um die DNA sichtbar zu machen war es notwendig dem Gel $20\mu l$ Ethidiumbromid hinzuzufügen. Dieses setzte sich in der DNA fest und machte sie so unter UV-Licht sichtbar.

Damit man die Proben nachher auftragen konnte, musste man anhand von Kämmen im Gel Taschen hinterlassen wo diese hineinpipettiert wurden.

Je nach verwendeter Taq-Polymerase musste man vor dem Auftragen das Produkt noch mit dem Glycerinhaltigen Probenpuffer vermischen. Bei der Taq-Polymerase war dieser schon im Puffer mitinbegriffen. Der mitaufgetragene Marker sorgte dafür, dass später die Identifizierung des erwarteten Produkts anhand seiner Größe möglich war. Durch ihre Trägheit und Sperrigkeit wanderten große DNA-Fragmente langsamer unter der angelegten Spannung zum Pluspol. Die jeweilige Spannung betrug zwischen 60-120 V maximal.

3. Ergebnisse

3.1 Osteogene Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen unter Stimulation mit Pyrophosphat

Der gedankliche Ansatz dieses Experimentes war, die Auswirkungen einer Pyrophosphat (PPi)-Stimulation auf die osteogene Differenzierung an sich, sowie im Speziellen auf die nicht Gewebe-spezifische alkalische Phosphatase zu beobachten. Zur Dokumentation wurden sowohl auf zytologischem Niveau die Differenzierung mit Alizarin-Rot Färbung, ALP-Färbung und Ölrot-Färbung (2.2.3.1-2.2.3.3) begutachtet als auch auf RNA Ebene mittels PCR (s.2.2.3.4) veranschaulicht.

Die Stammzellen wurden jedesmal nach 2, respektiv 4 Wochen geerntet und ausgewertet. Die Ölrot-Färbung wurde allerdings nur bei den 2-Wochen Ernten durchgeführt.

Alizarin-Rot Färbung

- 2 Wochen

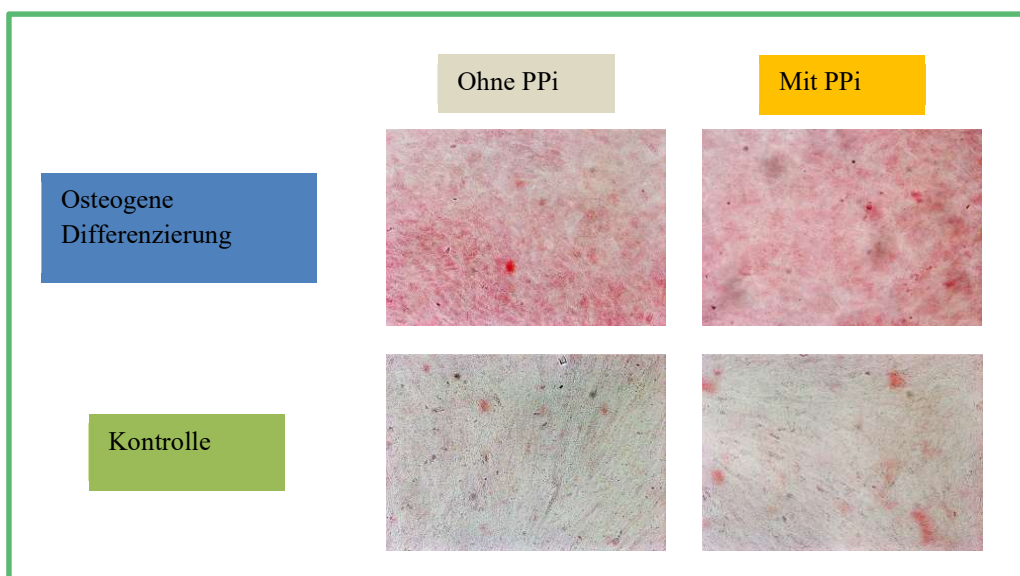


Abb.13: Alizarinfärbung nach 2 Wochen osteogener Differenzierung der MSCs mit/ohne PPi Stimulation mit Kontrolle

- 4 Wochen

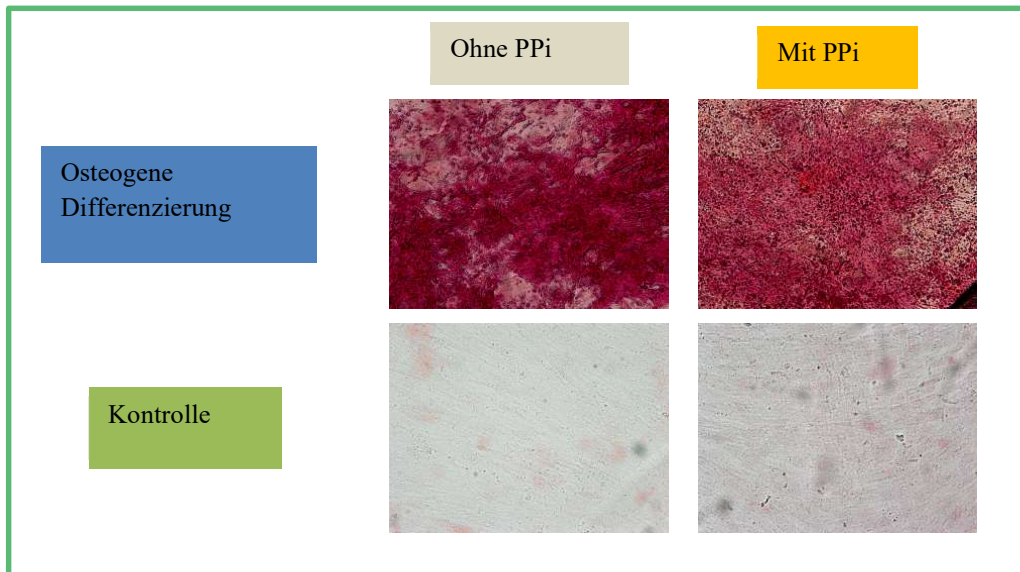


Abb.14: Alizarinfärbung nach 4 Wochen osteogener Differenzierung der MSCs mit/ohne PPI Stimulation mit Kontrolle

Diese Färbung führt die Mineralisierung der Zellen vor Augen indem sie die von den osteogen differenzierten Zellen gebildete Calciumphosphatsalze rot anfärbt. Durch diese Methode werden auch Mikrokristalle sichtbar, die normalerweise für das Lichtmikroskop nicht erfassbar wären [69].

Die Färbungen nach 2 Wochen lassen einen leichten Unterschied zwischen osteogener Differenzierung und Kontrolle erkennen, die typische Anfärbung der Kristalle fehlt aber noch weitestgehend. Diese sind erst nach 4 Wochen eindeutig zu erkennen. Ein klarer Unterschied zwischen den Zellen, die eine Stimulation mit Pyrophosphat hatten und jenen ohne, ist weder nach 2, noch nach 4 Wochen zu beobachten.

ALP-Färbung

- 2 Wochen

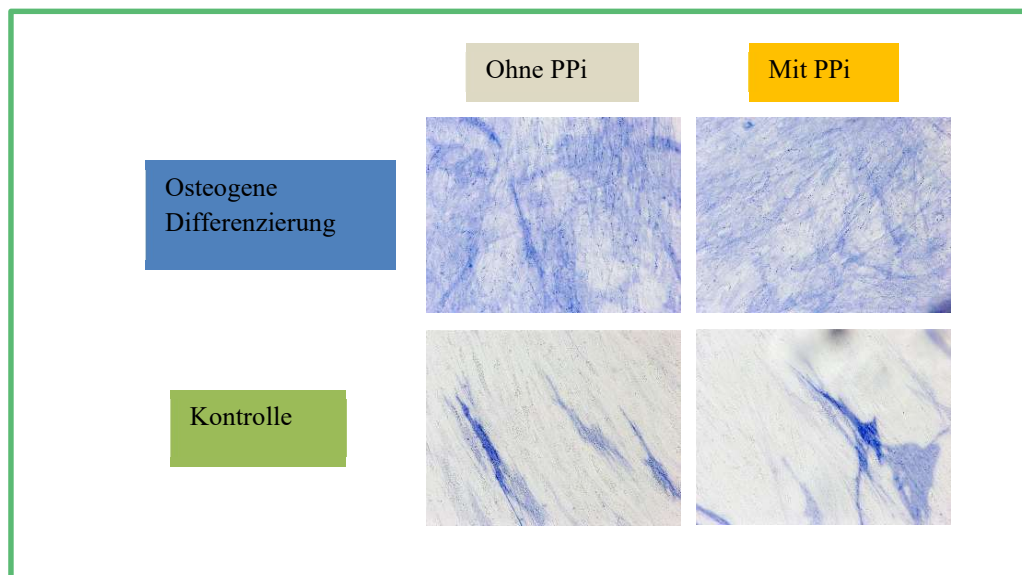


Abb.15: ALP-Färbung nach 2 Wochen osteogener Differenzierung der MSCs mit/ohne PPI Stimulation mit Kontrolle

- 4 Wochen

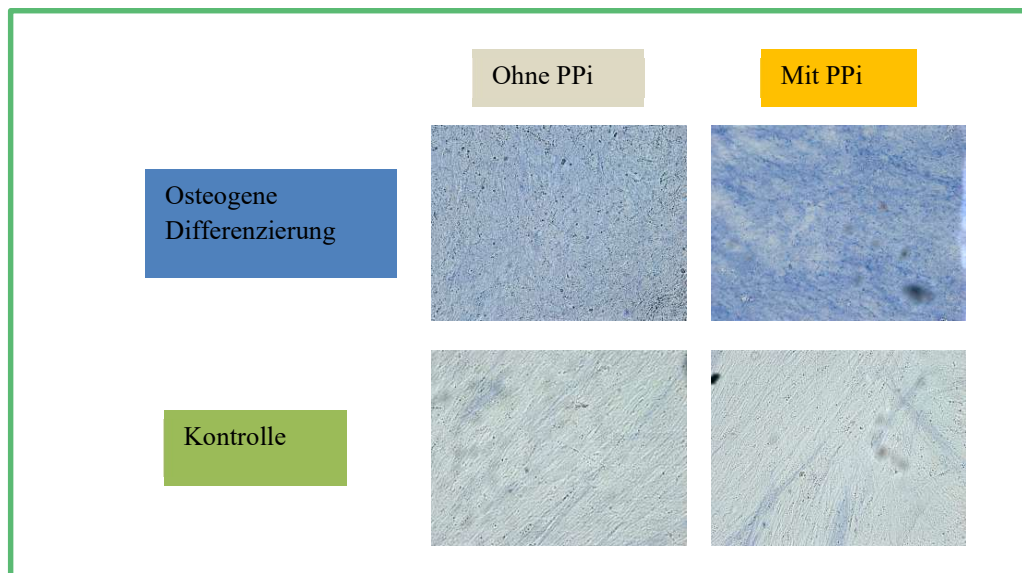


Abb.16: ALP-Färbung nach 4 Wochen osteogener Differenzierung der MSCs mit/ohne PPI Stimulation mit Kontrolle

Im Gegensatz zur Alizarinrotfärbung zeigen sich bei der ALP-Färbung die Unterschiede zwischen differenzierten und nicht-differenzierten Zellen schon nach 2 Wochen. Obwohl auch in der Kontrolle einige wenige angefärbte Zellen zu erkennen sind, ist der Unterschied doch selbstdarstellend. Nach 4 Wochen verschwindet bei der osteogenen

Differenzierung der klare Umriss der gefärbten Zellen wegen der für den Farbstoff schwer zu durchdringenden Kalkschicht, die sich in der Alizarinfärbung gezeigt hat. Auch in dieser Färbung bleibt ein Unterschied zwischen mit Pyrophosphat behandelten und unbehandelten Zellen nicht erkennbar.

Ölrot-Färbung

- 2 Wochen

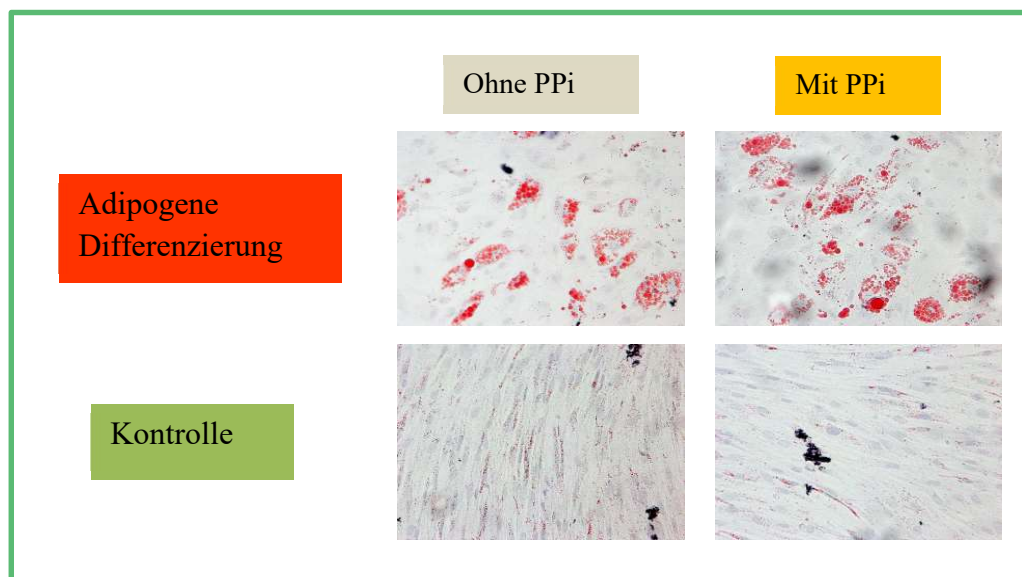


Abb.17: Ölrot-Färbung nach 2 Wochen adipogener Differenzierung der MSCs mit/ohne PPI Stimulation mit Kontrolle (n=3)

Auch bei der adipogenen Differenzierung zeigt sich die Differenzierung, hier mit den rot gefärbten Lipidtröpfchen im Zytosol. Eine ganz leichte Anfärbung der Kontrolle ist zu verzeichnen, aber der Unterschied ist dennoch prägnant. Ein Unterschied zwischen stimulierten und nicht-stimulierten Zellen ist bei dieser Färbung ebenso wenig zu erkennen.

PCR – 2 Wochen

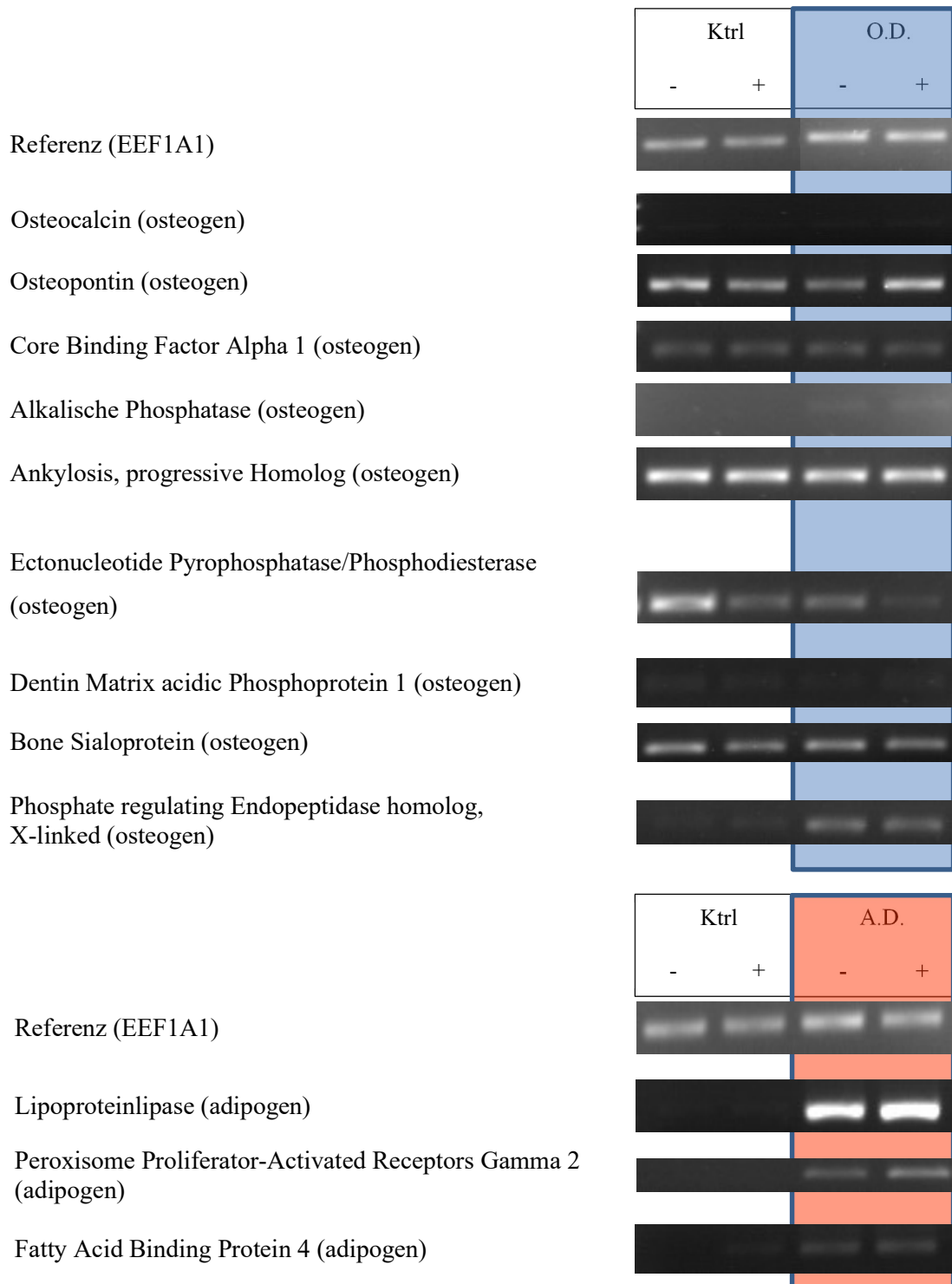
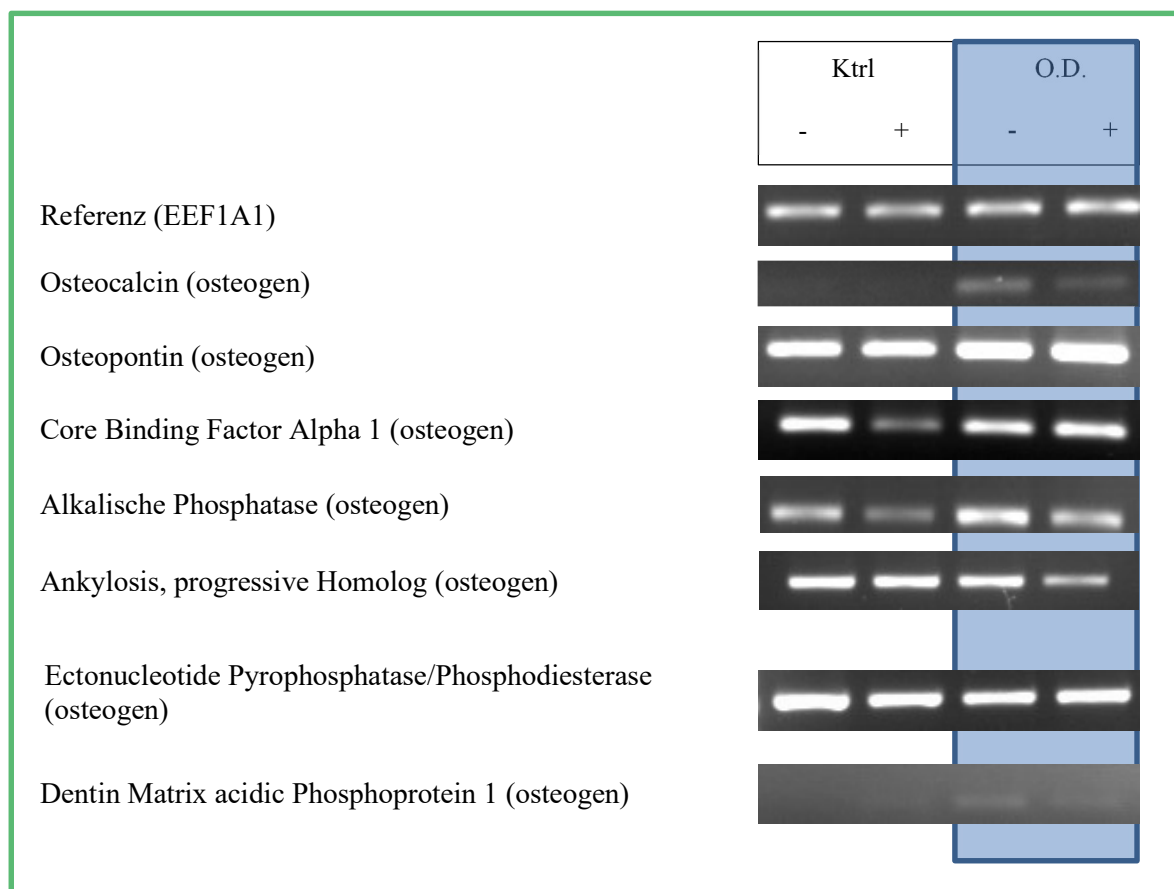


Abb. 18: PolyChain Reaktion der einzelnen osteogenen und adipogenen Marker bei osteogen (gekennzeichnet mit O.D.) und adipogen (gekennzeichnet A.D.) differenzierten Zellen mit (gekennzeichnet +) und ohne (gekennzeichnet -) Pyrophosphat Stimulation (1µM) mit den jeweiligen Kontrollen (gekennzeichnet Ktrl) nach 2 Wochen (n=3)

Auf Genexpressionsebene ist bei der osteogenen Differenzierung nach 2 Wochen kein eindeutiger Trend festzustellen. Die Hochregulation bei PHEX ließ sich nicht bestätigen. Während der Auswertung der Experimente ist eine sehr große Variabilität der Expression der verschiedenen Gene aufgefallen. Sowohl in der Kontrolle als auch in der osteogenen Differenzierung unterschieden sich die Genexpressionen der einzelnen Chargen von hMSCs teilweise erheblich voneinander, was einen Vergleich extrem schwierig machte. In der adipogenen Differenzierung hingegen zeigt sich ein homogenes Bild der Hochregulation der untersuchten adipogenen Markergene in den differenzierten Zellen. Dies wird auch in den anderen Experimenten bestätigt. Ein reproduzierbarer Unterschied zwischen mit Pyrophosphat behandelten und unbehandelten Zellen ist weder in der osteogenen, noch in der adipogenen Differenzierungsreihe nachweisbar. Bemerkenswert ist, dass ENPP1 offenbar im Rahmen der osteogenen Differenzierung herunterreguliert wurde, während die PHEX-Expression anstieg.

PCR – 4 Wochen



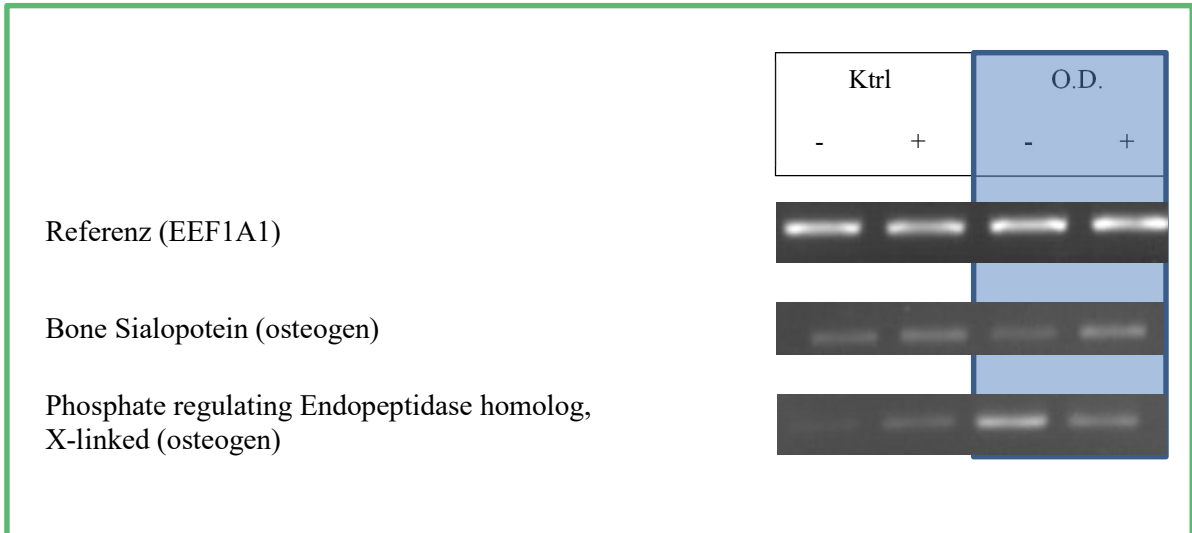


Abb. 19: PCR der einzelnen osteogenen Marker bei osteogen (gekennzeichnet mit O.D) differenzierten Zellen mit (gekennzeichnet +) und ohne (gekennzeichnet -) Pyrophosphat Stimulation mit den jeweiligen Kontrollen (gekennzeichnet Ktrl) nach 4 Wochen (n=3)

Auch nach 4 Wochen ist keine reproduzierbare Zu- oder Abnahme der osteogenen Gene zu beobachten. Eine Beeinflussung der Genexpression unter PPi - Einfluss lässt sich nicht verzeichnen.

Zusammenfassend bietet sich ein komplexes Bild einer zytologisch offensichtlichen osteogenen und adipogenen Differenzierung. Allerdings zeigt sich im Gegensatz dazu, abgesehen von den adipogenen Markern, eine wenig ausgeprägte Genexpressionsänderung in den untersuchten Markergenen. Eine wesentliche Beeinflussung der osteogenen respektiv adipogenen Differenzierung durch PPi ist aus diesen Experimenten nicht ersichtlich.

3.2 Enzymaktivitätsmessung der alkalischen Phosphatase in SAOS2 im Verlauf der Zeit

Nachdem man bei den SAOS2 P62 eine drastische Aktivitätsverringern der alkalischen Phosphatase zu verzeichnen hatte, wurden die Daten der Kontrollen bei den darauffolgenden Experimenten mit SAOS2 systematisch gesammelt und schlussendlich gegenübergestellt. Dabei gab es 2 voneinander unabhängige Populationen, die allerdings aus technischen Gründen nicht länger als Passage 29 verfolgt werden konnten.

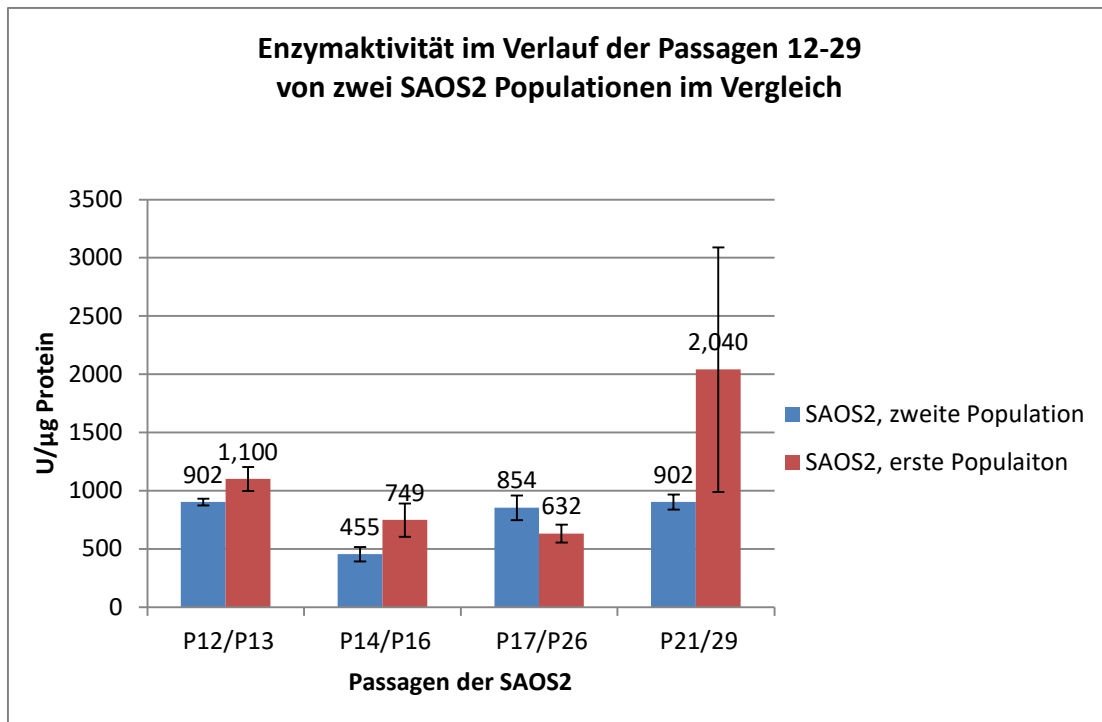


Abb.24: Enzymaktivitätsmessung der alkalischen Phosphatase in SAOS2 Zelllinien im Verlauf der Zeit. In Rot die erste Population mit den entsprechenden gemessenen Passagen und in Blau die zweite ausgewertete Population (n=3)

In der Darstellung verzeichnete man für die erste Population eine leichte Diminution der Enzymaktivität bis zur Passage 26. Die beobachtete Erhöhung in Passage 29 ist allerdings aufgrund einer großen Fehlerbelastung nur beschränkt verwertbar.

Die zweite Population verringert die Aktivität bis Passage 14, erhöht sie dann aber wieder leicht bis Passage 21.

Zusammenfassend sieht man eine leichte Enzymaktivitätsabnahme in den ersten Passagen, die allerdings in den später gemessenen Passagen wieder zunimmt. Eine komplette Aktivitätsabnahme wie bei den SAOS P62 ist nicht zu verzeichnen.

3.3 Einfluss von PPI, PLP, Probenecid, Vitamin D3 auf die Enzymaktivität der alkalischen Phosphatase

Als Versuchszellen wurde hier die SAOS-Zelllinie verwendet. Der Versuch wurde so angelegt, dass die Messungen zwei verschieden oft gesplittete, sprich gealterte SAOS-Populationen verglichen. Die Population bei Passage 10 wurde nachfolgend als „neu“ bezeichnet und die Passage 62 als „alt“.

Die Zellen wurden für 24 Stunden mit dem jeweiligen Substrat inkubiert und anschliessend geerntet um der AP-Aktivitätsmessung zugeführt werden zu können (s.2.2.2.1).

Die ausgewerteten Dateien wurden in einem Diagramm dargestellt.

Enzymaktivität der alkalischen Phosphatase bei Metabolitenstimulation über 24 h in SAOS2

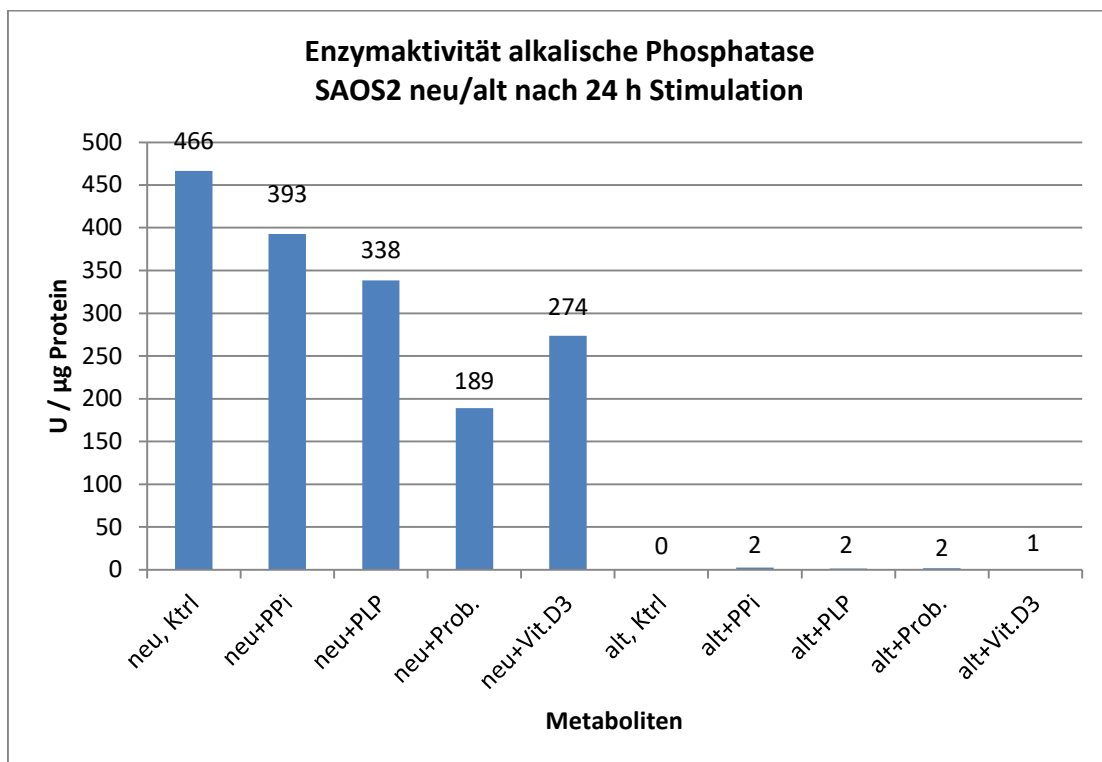


Abb.20: Diagrammdarstellung der Aktivität der alkalischen Phosphatase bei SAOS2 P10 verschiedenen Alters (P.10 vs P62) nach 24 Stunden Stimulation mit Pyrophosphat(PPi, 1µM), Pyridoxalphosphat (PLP, 1µM), Probenecid (Prob., 1,25mM) und Vitamin D3 (Vit.D3, 100 nM) mit jeweils der entsprechenden Kontrolle (n=1)

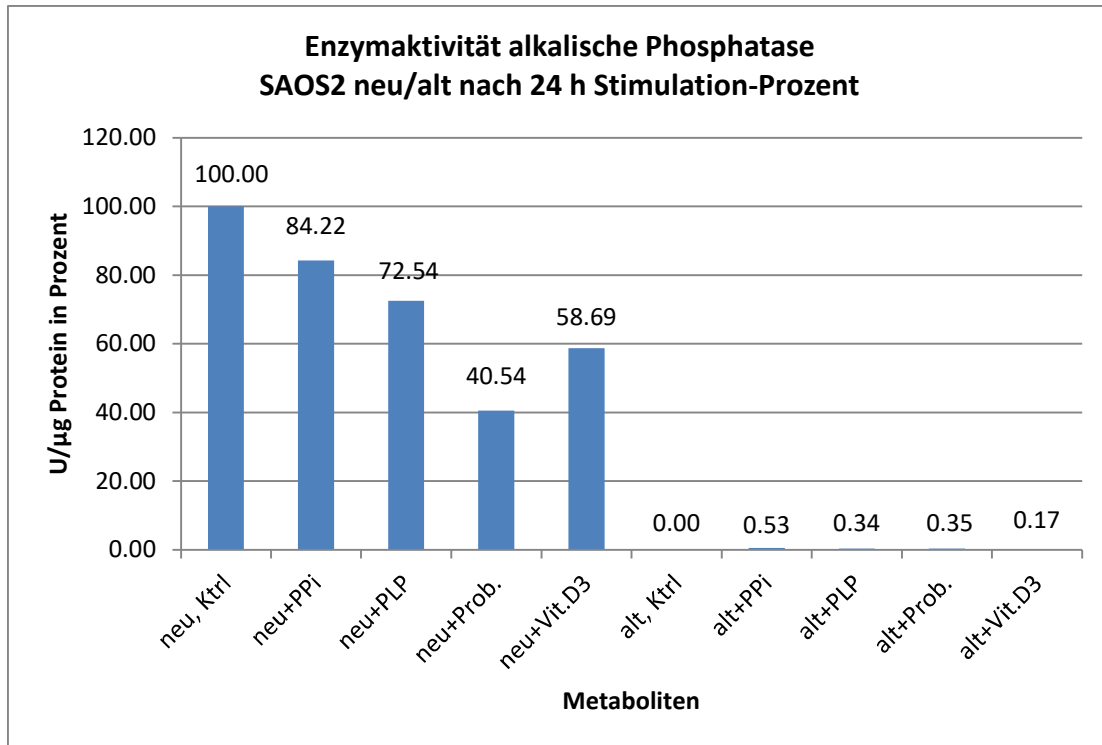


Abb.21: Darstellung der Aktivität der alkalischen Phosphatase in Prozent (n=1)

Das Diagramm zeigt neben einer starken Abnahme der AP-Aktivität bei der älteren SAOS-Population auch eine deutliche Hemmung der Enzymaktivität unter Probenecid und Vitamin D3 bei der jüngeren Generation.

Als Konsequenz auf dieses Experiment wurden die darauffolgenden Wiederholungen nur noch mit der Population der Passage 10 angesetzt und die AP-Aktivität der Zellen wurde in regelmäßigen Abständen gemessen, um eine eventuelle Abnahme der AP-Aktivität im Laufe der Alterung dokumentieren zu können.

Das Experiment wurde mit den SAOS2 wiederholt, diesmal bei Passage 14.

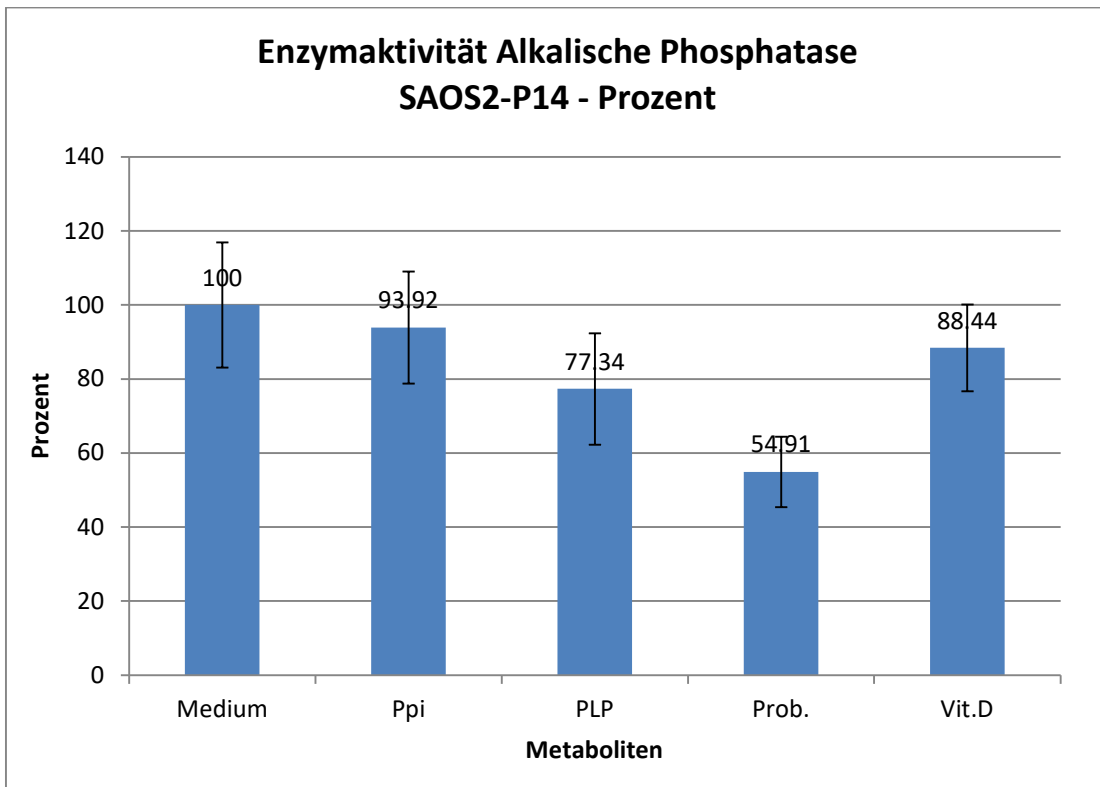
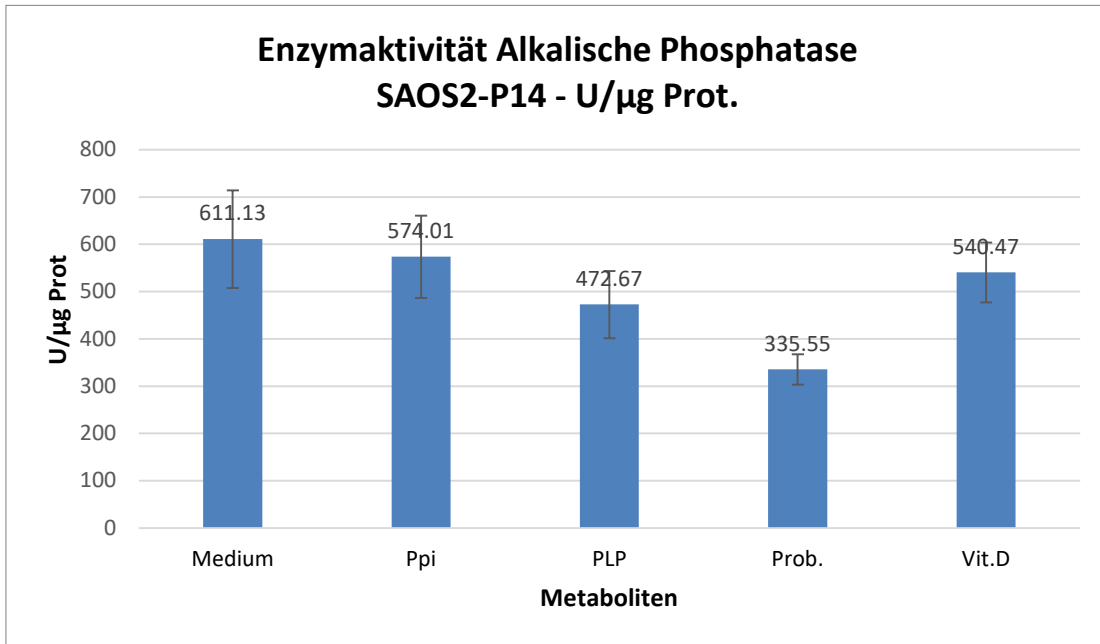


Abb.23: Diagrammdarstellung der Aktivität der alkalischen Phosphatase bei SAOS2P14 nach 24 Stunden Stimulation mit Pyrophosphat (Ppi, 1 μ M), Pyridoxalphosphat (PLP, 1 μ M), Probenecid (Prob., 1,25mM) und Vitamin D3 (Vit.D3, 100nM) mit jeweils der entsprechenden Kontrolle (n=3)

Auch bei diesem Versuch ist ein ähnliches Resultat zu beobachten. Die Enzymaktivitätsverringering bei Pyridoxalphosphat $1\mu\text{M}$ und Probenecid $1,25\text{mM}$ entsprechen denen aus dem vorherigen Versuch erwarteten Werten, wobei die Hemmung bei Pyrophosphat $1\mu\text{M}$ und Vitamin D3 100nM weniger intensiv ausfällt wie bei den SAOS2 P10.

3.4 Stimulation von SAOS2-Zellen mit Probenecid für 48 Stunden und Auswirkungen auf die alkalische Phosphatase

Um die beobachtete Aktivitätsverminderung der alkalischen Phosphatase unter Probenecid $1,25\text{mM}$ -Behandlung zu untersuchen wurde sowohl eine Enzymaktivitätsbestimmung nach 48 Stunden als auch eine PCR-Untersuchung von ALP, ANKH und ENPP1 durchgeführt.

3.4.1 Enzymaktivitätsmessung

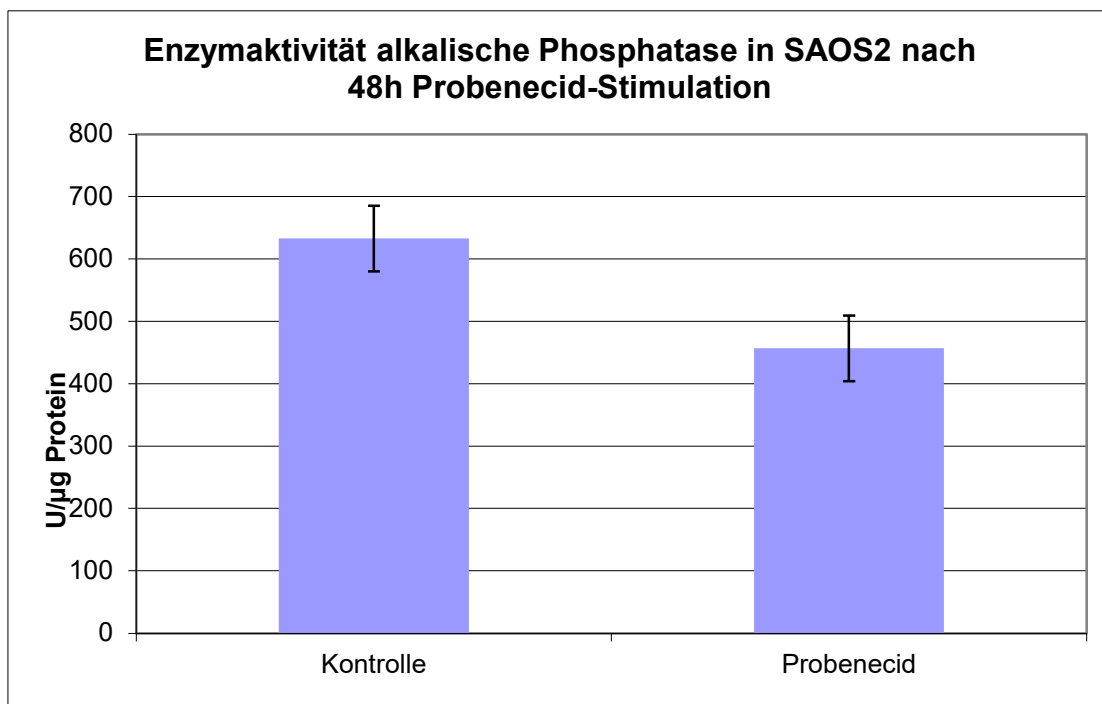


Abb.25: Enzymaktivitätsmessung der alkalischen Phosphatase in SAOS2 Zellen nach 48 h Probenecid-Stimulation (n=3)

Nach 48 Stunden Probenecid 1,25mM Stimulation beobachtete man eine signifikative Abnahme der Enzymaktivität in SAOS2 Zellen.

3.4.2 PCR von ALP, ANKH und ENPP1

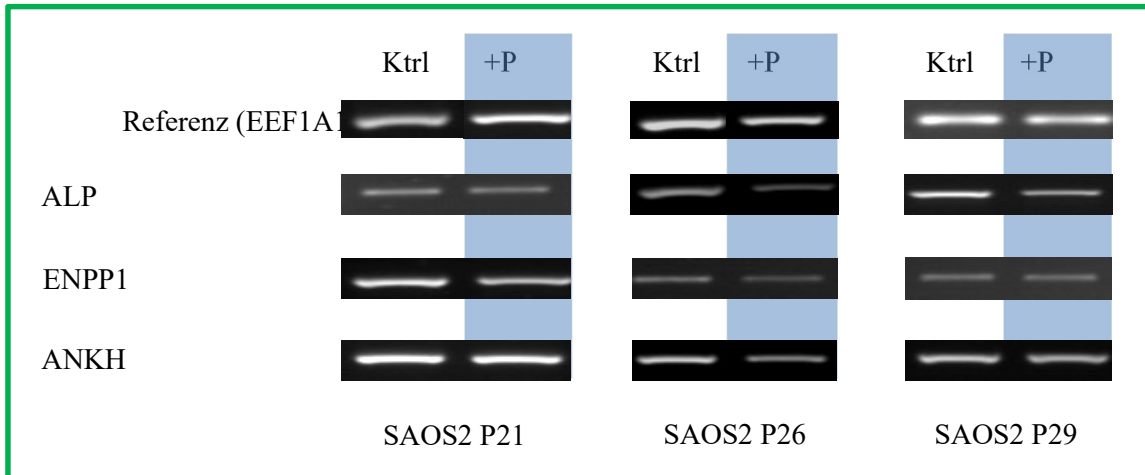


Abb.26: PCR-Analyse der Gene ALP, ENPP1 und ANKH von 3 SAOS2 Chargen nach 48 h Probenecid-Stimulation (gekennzeichnet +P) mit entsprechender Kontrolle (gekennzeichnet Ktrl)

Nach einer Stimulation mit Probenecid für 48 Stunden konnte man bei allen 3 Versuchen eine leichte Verringerung der ALP- und ENPP1 Expression erkennen. Für ANKH waren die Ergebnisse nicht kohärent.

3.4.3 Apoptose-Messung von SAOS2 nach 48 h Probenecid-Stimulation

Um auszuschliessen dass die verzeichnete Verringerung der Aktivität nicht auf einen Verlust an Zellen durch apoptotische Vorgänge zurück zu führen ist, wurde im Anschluss eine Apoptose-Messung (s.2.2.1.6) durchgeführt.

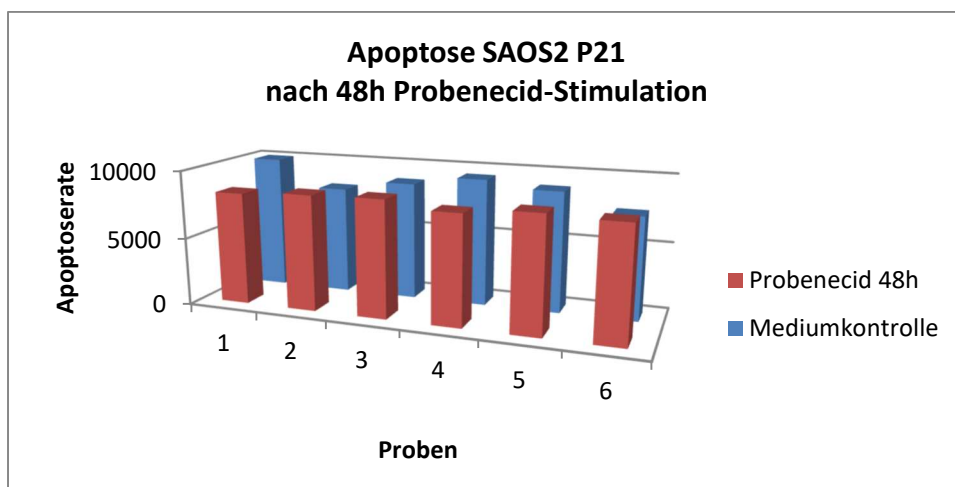


Abb. 27: Apoptoserate von SAOS2 P21 Zellen nach 48 h Probenecid-Stimulation mit Mediumkontrolle

Eine signifikative Erhöhung der Apoptoserate war im Vergleich zur Mediumkontrolle nach 48 Stunden Probenecid-Stimulation nicht zu beobachten.

3.5 Effekte einer Kurzzeitbehandlung mit Zoledronat bei humanen Stammzellen

Da Zoledronat einen bedeutenden Einfluss auf die osteogene Differenzierung hat [63, 70], stellte sich die Frage wie die Expression von ALP, ENPP1 und ANKH nach einer Exposition von 3 Stunden mit anschließender osteogener Differenzierung reagieren.

Der Versuch der Zoledronat“dusche“, einer kurzzeitigen Exposition der Zellen von 3-6 Stunden mit anschließender Differenzierung über 2, respektive 4 Wochen, wurde nicht selbst durchgeführt. Hierfür wurde die konservierte RNA respektive cDNA von früheren Versuchen, mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. Jakob und dessen Arbeitsgruppe, zur Auswertung herangezogen [61, 71].

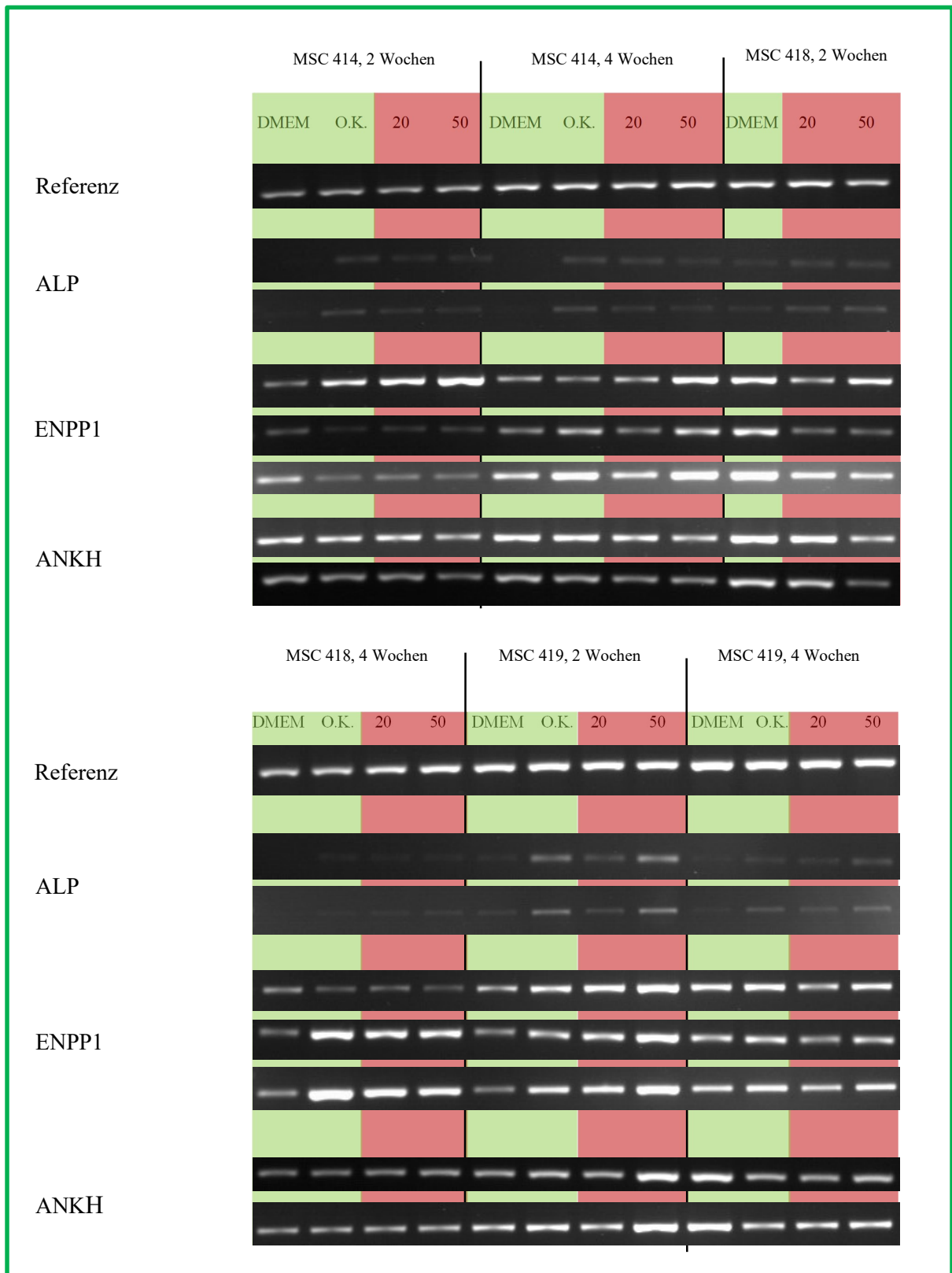


Abb. 28: PCR-Auswertung von ALP, ENPP1 und ANKH bei osteogen Differenzierten Zellen mit 20μM sowie 50 μM Zoledronat (gekennzeichnet: 20; 50) sowie den zugehörigen Mediumkontrollen (gekennzeichnet: DMEM) und osteogenen Kontrollen (gekennzeichnet: O.K.) Bei den MSC 418, 2 Wochen konnte aus technischen Gründen eine osteogen differenzierte Kontrolle nicht beigefügt werden.

In der PCR findet man einerseits eine Hochregulation von ALP sowohl in der osteogenen Kontrolle als auch in der Zoledronat Stimulation. Einen signifikanten Unterschied zwischen osteogener Kontrolle und mit Zoledronat behandelten Zellen sieht man jedoch nicht.

Bei ENPP1 sind die Ergebnisse widersprüchlicher. Bei den MSCs 414 2 Wochen, 418 2 Wochen Differenzierungen präsentiert sich eine leichte Abnahme der Genexpression verglichen mit der Kontrolle. Bei allen anderen bleibt die Expression konstanter oder nimmt sogar zu (419 2 Wochen).

Bei ANKH werden keine signifikanten Veränderungen verzeichnet.

3.6 ENPP1-Aktivitätsmessung mit PPADS und β - γ Methyltriphosphat als Hemmsubstanzen

Um den Effekt einer ENPP1 Suppression zu veranschaulichen wurden die Substanzen PPADS und β - γ Methyltriphosphat als Hemmsubstanzen identifiziert [72]. Um den Effekt zu belegen, wurde eine ENPP1-Aktivitätsmessung (s.2.2.2.2) mit verschiedenen Zelltypen und Substanzkonzentrationen von PPADS und β - γ Methyltriphosphat durchgeführt. Bei den Zelltypen handelte es sich um humane mesenchymale Stammzellen, SAOS-Zellen und HEK-293.

Die Resultate wurden anhand von Diagrammen veranschaulicht.

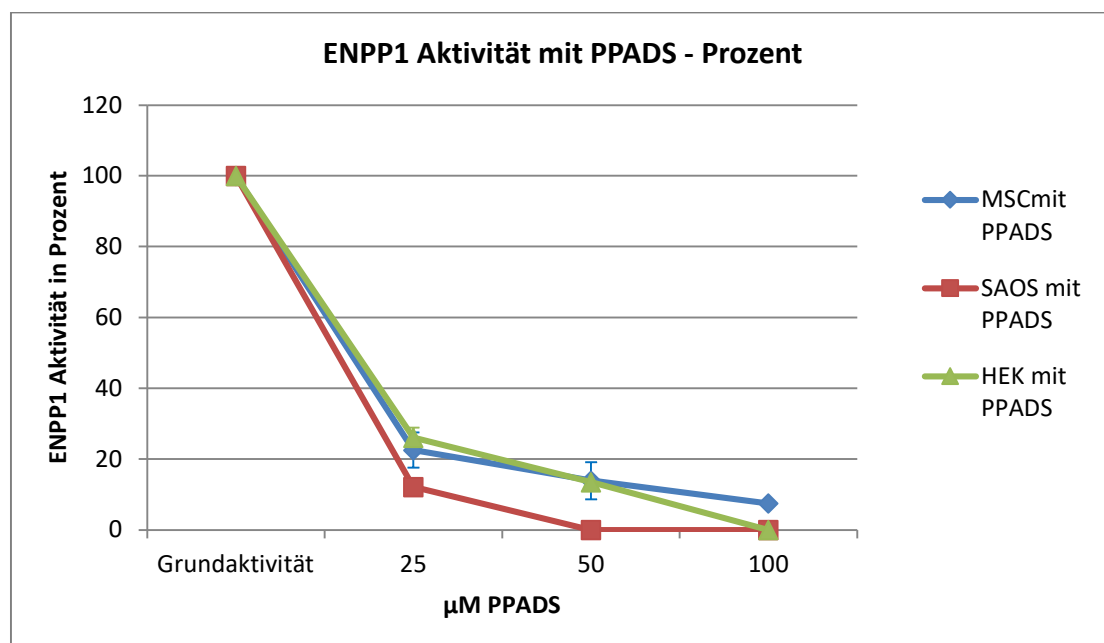


Abb.29: Aktivitätsmessung von ENPP1 bei Hinzufügen von verschiedenen Konzentrationen von PPADS

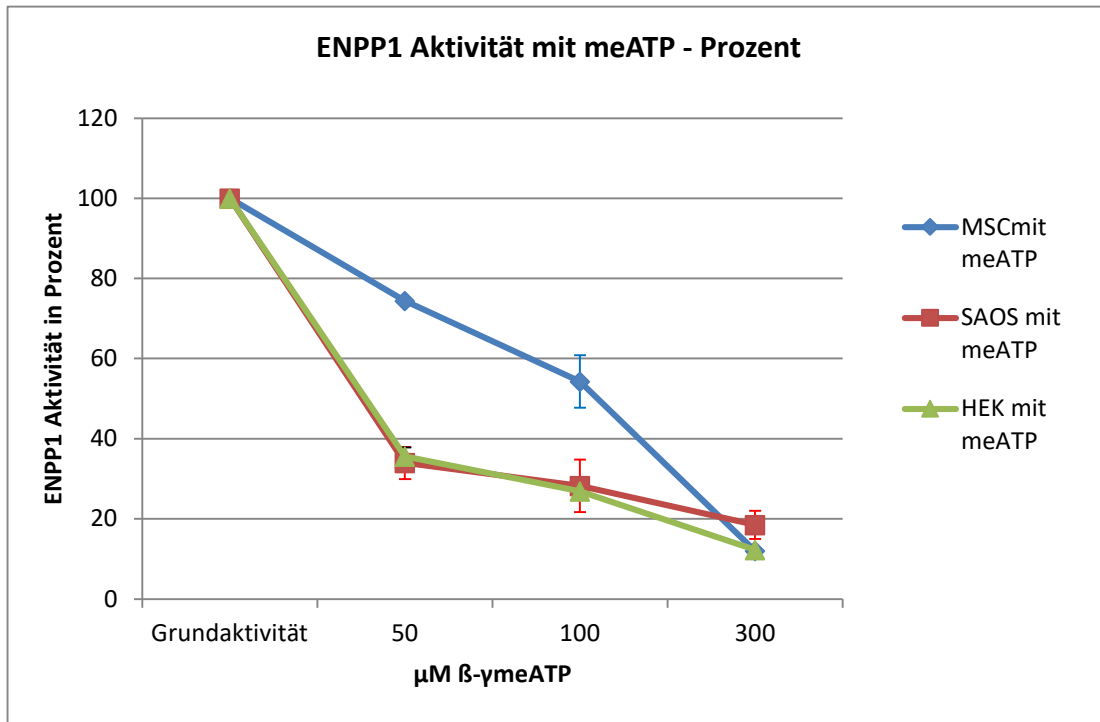


Abb. 30: Aktivitätsmessung von ENPP1 bei Hinzufügen von verschiedenen Konzentrationen von β - γ Methylentriphosphat

Sowohl bei Hinzugabe von PPADS als auch bei β - γ Methylentriphosphat wurde eine signifikante Abnahme der ENPP1- Grundaktivität gemessen. Bei PPADS ist die Aktivität bei der niedrigsten getesteten Konzentration von 25 μ M schon bei allen verwendeten Zellen auf einen Wert um 20% gesunken. Somit ist PPADS ein offensichtlich potenterer Hemmstoff als β - γ Methylentriphosphat, der für das gleiche Inhibierungsergebnis Konzentrationen bis zu 300 μ M benötigt.

Nachdem das Resultat weitere 2 Mal bestätigt worden war, konnten sowohl PPADS als auch β - γ Methylentriphosphat als Hemmstoffe von ENPP1 den Differenzierungsversuchen mit mesenchymalen Stammzellen und Versuchen zur RNA-Extraktion nach 24 Stunden PPADS respektiv β - γ Methylentriphosphat Stimulation zugeführt werden.

3.7 Osteogene Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen unter ENPP1 Inhibition

In diesem Experiment galt die Aufmerksamkeit den Auswirkungen einer Inhibition des Enzyms ENPP1 mit PPADS und β - γ Methylentriphosphat auf die osteogene Differenzierung von humanen mesenchymalen Stammzellen. Dabei wurde sowohl eine zytologische Auswertung als auch eine Genexpressionsanalyse anhand PCR-Methode zur Dokumentation verwendet.

Die erste Ernte erfolgte nach 2 Wochen und die Zweite nach 3 Wochen und 4 Tagen.

Zytochemische Färbung und Auswertung

Wellübersicht – 2 Wochen

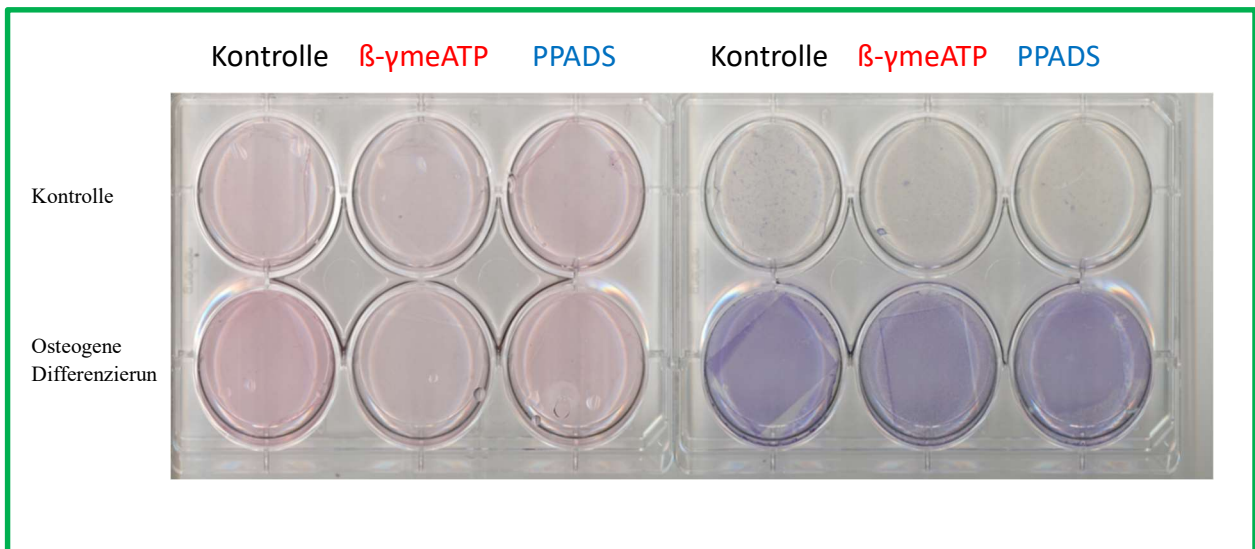


Abb.31: Wellübersicht der osteogenen Differenzierung der MSCs unter ENPP1-Inhibition nach 2 Wochen. Links: Alizarin-Rot S Färbung, rechts: ALP-Färbung

Wellübersicht - 3 Wochen 4 Tage



Abb. 32: Wellübersicht der osteogenen Differenzierung der MSCs unter ENPP1-Inhibition nach 3 Wochen 4 Tage. Rechts: Alizarin-Red S Färbung, links: ALP-Färbung. Der Pfeil markiert den schwächer ausfallenden Mineralisierungsbeginn unter β - γ Methylentriphosphat.

Nach 2 Wochen osteogener Differenzierung zeigt sich in der ALP- Färbung ein deutlicher Unterschied zwischen den differenzierten Zellen und der Kontrolle. Bei der Alizarin-Rot S Färbung ist der Unterschied nicht bis nur minimal vorhanden. Makroskopisch lässt sich bei keiner der zwei Färbungen ein Unterschied zwischen ENPP1 Inhibition und Kontrolle feststellen.

Die zweite Ernte musste wegen Zellablösungen von den Deckgläsern nach 3 Wochen und 4 Tagen vorgezogen werden. Ursprünglich war die Ernte nach 4 Wochen geplant. Diese Komplikation trat des Öfteren während dem Prozess der osteogenen Differenzierung auf.

Man ging davon aus, dass das Ablösen eine Reaktion der Zellen auf den schweren Kalkmantel war. Besonders betroffen sind die osteogen differenzierten Kontrollen sowohl in der ALP- als auch in der Alizarin- Färbung, sowie die osteogene PPADS Stimulation in der ALP-Färbung.

Die ALP-Färbung hat bei den osteogen differenzierten Zellen nach 3 Wochen 4 Tagen noch an Intensität zugenommen. Die Differenzierung lässt sich nach 3 Wochen 4 Tagen auch in der Alizarin Red S Färbung von der Kontrolle abgrenzen. Eindrucksvoll sind die dunkelrot angefärbten Areale von wo die Mineralisierung der Zellen ihren Lauf nimmt. Ein Unterschied zwischen PPADS und β - γ Methylentriphosphat ist in dieser Färbung zu

erkennen. Während Kontrolle und PPADS bereits sichtbar mit der Mineralisierung angefangen haben, ist bei β - γ Methyltriphosphat Behandlung zwar wohl ein Mineralisierungsbeginn (Pfeil), doch ein etwas verzögerter Verlauf zu beobachten.

Alizarin Red S – 2 Wochen

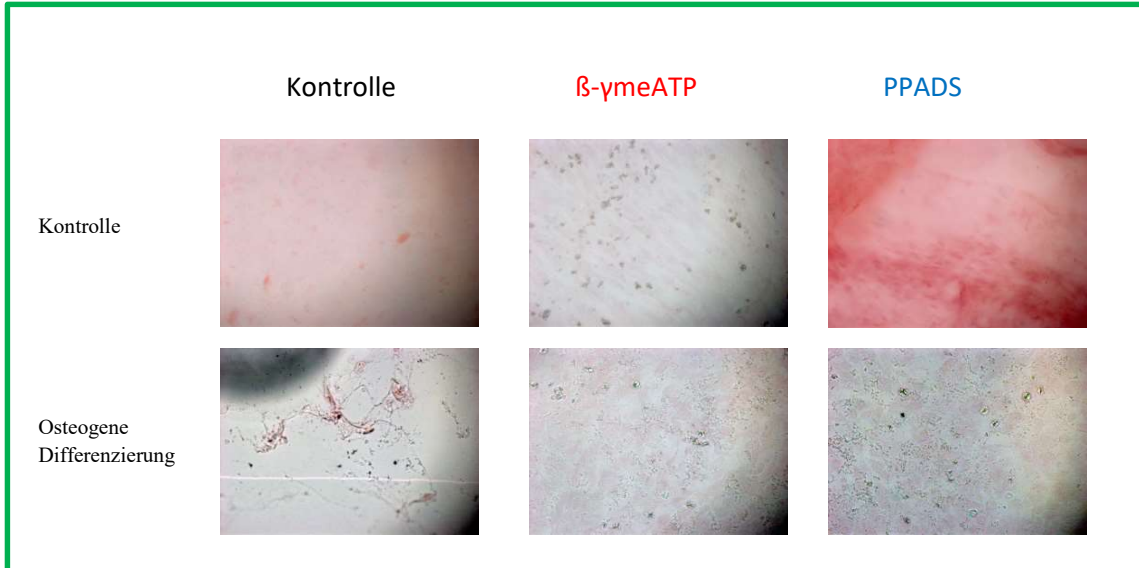


Abb.33: Auswertung der osteogenen Differenzierung der MSCs unter ENPP1 Inhibition nach 2 Wochen. Alizarin Rot S - Färbung

Alizarin Rot S – 3 Wochen 4 Tage



Abb.34: Auswertung der osteogenen Differenzierung der MSCs unter ENPP1 Inhibition nach 3 Wochen 4 Tagen. Alizarin Rot S - Färbung

Auch unter mikroskopischer Vergrößerung lässt sich in der Alizarin-Red S – Färbung nach 2 Wochen noch kein bedeutender Unterschied zwischen osteogener Differenzierung und Kontrolle feststellen. Dieser lässt sich erst nach 3 Wochen 4 Tagen beobachten, allerdings muss hier bei der Auswertung die Tatsache der Zellablösung beachtet werden. Der beobachtete Unterschied zwischen PPADS und β - γ Methylentriphosphat nach 3 Wochen 4 Tagen ist zwar auch mikroskopisch erkennbar, ein direkter Vergleich mit der osteogen differenzierten Kontrolle ist allerdings nicht möglich.

ALP-Färbung – 2 Wochen

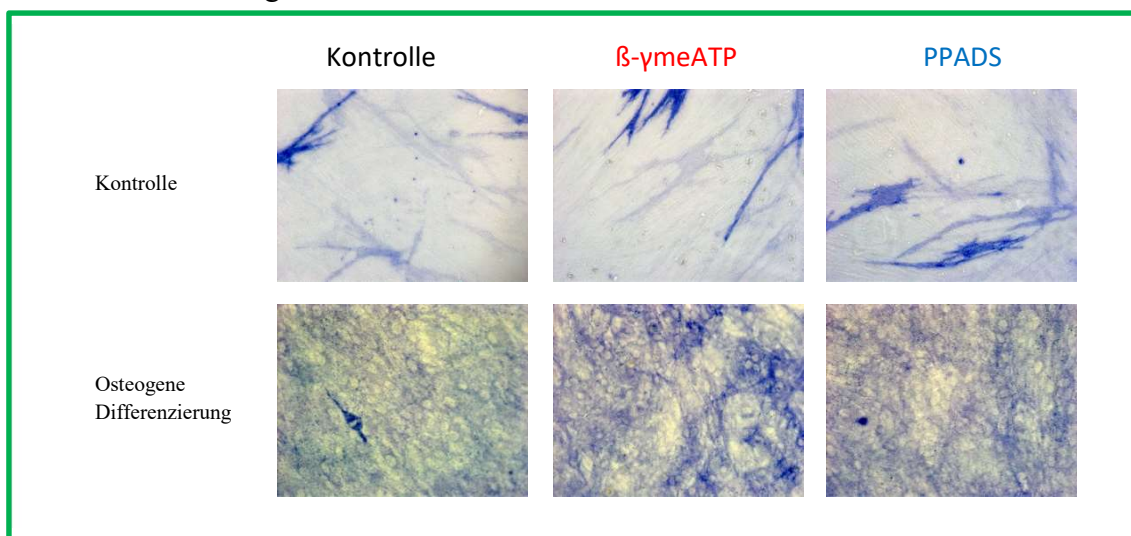


Abb. 35: Auswertung der osteogenen Differenzierung der MSCs unter ENPP1 Inhibition nach 2 Wochen. ALP - Färbung

ALP-Färbung – 3 Wochen 4 Tage

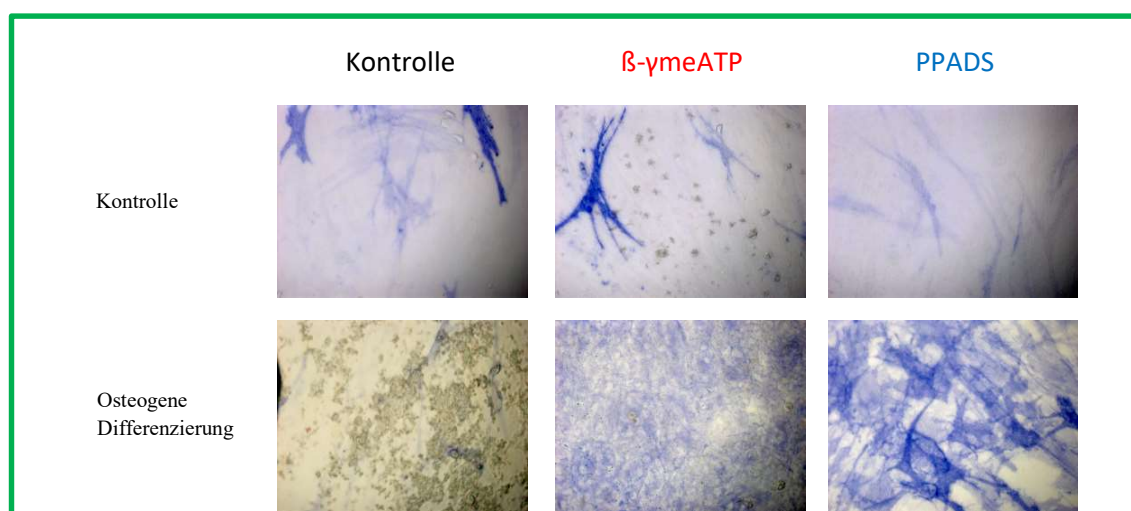


Abb. 36: Auswertung der osteogenen Differenzierung der MSCs unter ENPP1 Inhibition nach 3 Wochen 4 Tagen. ALP – Färbung

Die ALP-Färbung lässt schon nach 2 Wochen eine Abgrenzung zwischen Kontrolle und Differenzierung zu. Unter dem Mikroskop ist nach 2 Wochen kein Unterschied zwischen osteogener Kontrolle, PPADS und β - γ Methyltriphosphat Stimulation zu erkennen.

Nach 3 Wochen 4 Tagen besteht das Problem der Zellablösung in der osteogenen Kontrolle sowie der osteogenen PPADS Stimulation. Dadurch lässt sich hier keine oder eine weniger ausgeprägte Anfärbung antreffen. Bei der osteogenen Kontrolle kann man trotzdem die Mineralisierung beobachten.

Insgesamt deutet sich gegenüber der β - γ Methyltriphosphat Stimulation eine verstärkte Mineralisierung auf Zellniveau durch die Hemmung von ENPP1 unter PPADS an.

PCR-Auswertung

Nach 2 Wochen, respektiv nach 3 Wochen und 4 Tagen wurde auch RNA für die Genexpressionsanalyse anhand PCR aus MSCs isoliert. Der Fokus lag auf den Enzymen ALP und ENPP1 sowie auf dem Membrankanal ANKH.

PCR-Auswertung – 2 Wochen

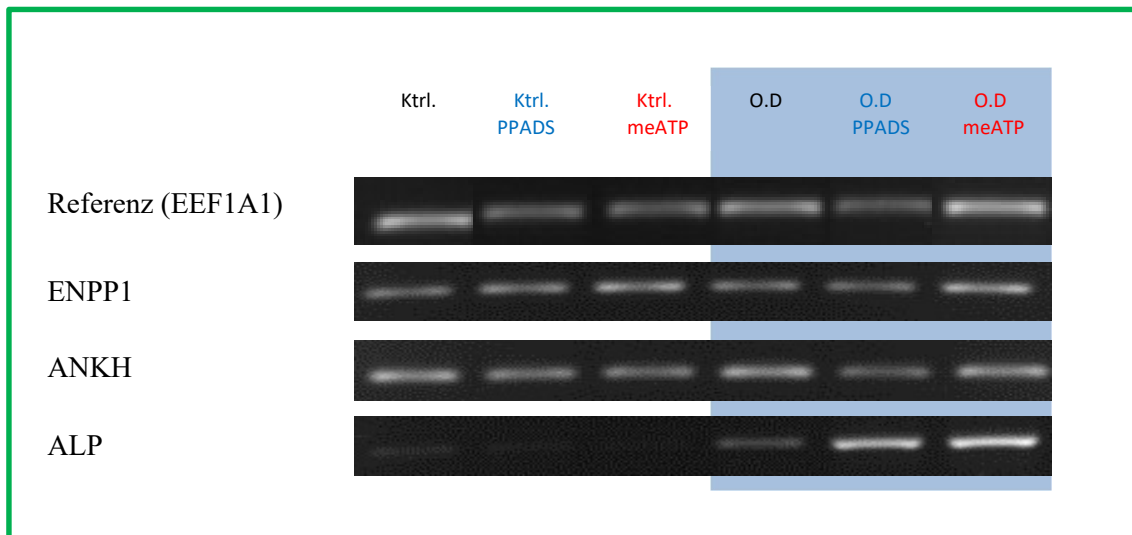


Abb.37: PCR- Darstellung osteogene Differenzierung von MSCs unter ENPP1- Inhibierung nach 2 Wochen

PCR-Auswertung – 3 Wochen 4 Tage

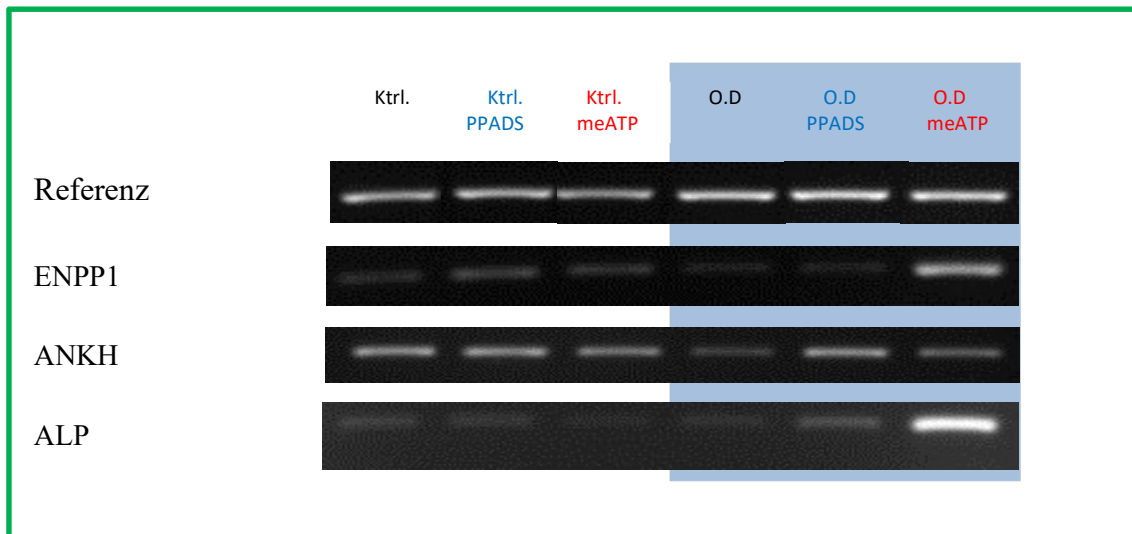


Abb.38: PCR- Darstellung osteogene Differenzierung von MSCs unter ENPP1- Inhibierung nach 3 Wochen 4 Tage

In der PCR-Auswertung nach 2 Wochen erkennt man bis auf einen Anstieg der ALP-Expression bei der osteogenen Differenzierung keine signifikativen Veränderungen. Bei 3 Wochen 4 Tagen hingegen erhöht sich neben der ALP auch die Regulation von ENPP1 bei der osteogenen Differenzierung unter β - γ Methyltriphosphat Stimulation. Bei ALP ist der Anstieg deutlicher ausgeprägt als bei ENPP1, und es besteht im Gegensatz zu den Ergebnissen nach 2 Wochen eine Differenz zwischen der Stimulation mit PPADS und β - γ Methyltriphosphat; die Expression der osteogenen Differenzierung unter PPADS-Stimulation ist eher rückläufig im Vergleich zu der 2 Wochen Analyse, wogegen der Wert der osteogenen Differenzierung unter β - γ Methyltriphosphat Stimulation zunimmt.

3.8 24 Stunden Stimulation von SAOS-Zellen und humanen Stammzellen mit ENPP1 Inhibitoren

Um die kurzfristige Auswirkung der ENPP1 Substrat-Antagonisten PPADS und β - γ Methyltriphosphat auf die Genexpression der Zellen zu untersuchen, wurden humane Stammzellen und SAOS-Zellen für 24 Stunden mit den Inhibitoren inkubiert. Danach

wurde die RNA extrahiert und für die PCR-Analyse in cDNA umgeschrieben und weiterverwendet.

MSC

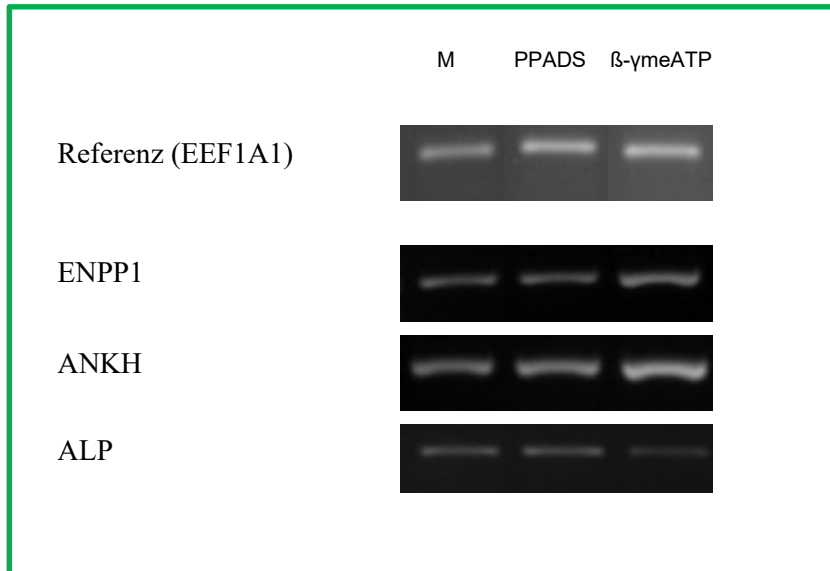


Abb.39: PCR- Darstellung 24 h Stunden Stimulation von MSCs mit ENPP1-Inhibitoren (n=4)

SAOS

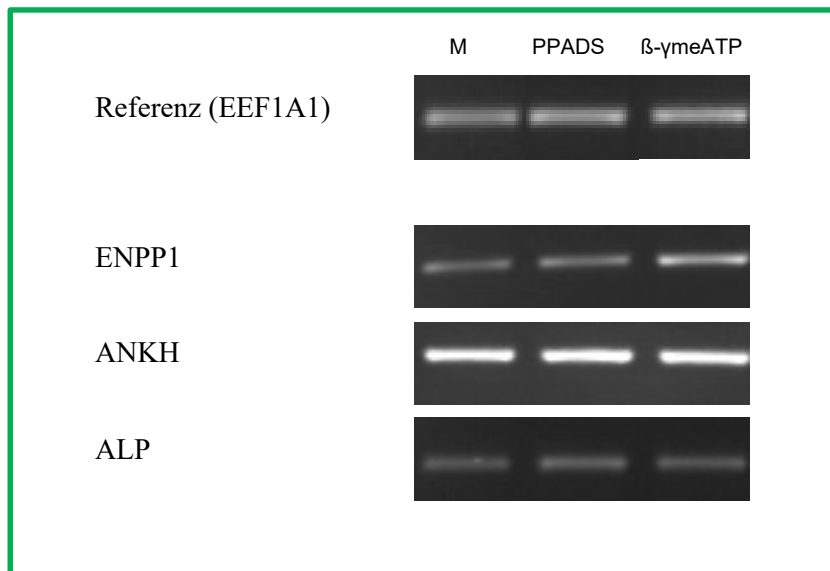


Abb.40: PCR- Darstellung 24 h Stunden Stimulation von SAOS mit ENPP1-Inhibitoren (n=3)

Bei den PCR-Auswertungen fällt sowohl bei den SAOS-Zellen als auch den MSCs einerseits eine Steigerung der ANKH- und ENPP1-Expression bei β - γ Methyltriphosphat im Vergleich zu der Kontrolle und der Stimulation mit PPADS auf, wobei die ANKH- Überexpression bei den SAOS-Zellen nicht ganz so deutlich ist.

Andererseits wird auch eine Reduktion der ALP-Expression bei der β - γ Methyltriphosphat Behandlung deutlich.

Insgesamt betrachtet sind die Ergebnisse bei den mesenchymalen Stammzellen besser zu beobachten als bei der SAOS-Zelllinie.

4. Diskussion

4.1 Stimulation der HMCS mit PPi- Auswirkungen auf zytologischer und genomischer Ebene

In dem ersten Experiment wurde die Auswirkung von Pyrophosphat auf die osteogene und adipogene Differenzierung von humanen mesenchymalen Stammzellen untersucht. Während die osteogene Differenzierung mittels Alizarin Rot und ALP-Färbung teilweise schon nach 2 Wochen nachgewiesen werden konnte (s. Abb.14, 15), blieb die erwartete Suppression der osteogenen Differenzierung unter PPi – Behandlung aus. Auch auf Genexpressionsebene konnte eine Suppression der osteogenen Marker, insbesondere der TNSALP, entweder nicht nachgewiesen oder nicht reproduziert werden (Abb.18, 19). Dies entspricht nicht der allgemeinen Annahme, dass eine übermäßige Exposition von PPi die Knochenmineralisation über Inhibierung der Hydroxyapatit Deposition effektiv hemmt [31, 45, 73, 74].

Die Gründe hierfür können vielfältig sein. Während bei den PCR Ergebnissen sicherlich methodische Gründe (Ungenauigkeiten beim Pipettieren sowie Aufbereitung der DNA u.a.) in Betracht gezogen werden müssen, kommen für die zytologischen Ergebnisse auch andere Faktoren hinzu. Eine Vermutung ist, dass eventuell die TNSALP-Aktivität der Zellen gereicht hat, um das hinzugegebene PPi zu hydrolysieren. Das Nachstellen der Mineralisierungsbedingungen in vitro könnte dadurch erschwert werden, dass das Microenvironment in unmittelbarer Nähe der Zelloberfläche ganz andere Konzentrationen der Reaktionspartner erfordert, die man nur durch z.B. Knockdown oder Überexpression der jeweiligen beteiligten Enzyme erreichen könnte. Das Ausbleiben von Änderungen auf der Ebene der Genexpression ist dann eine logische Konsequenz.

4.1.1 Die Einflüsse der osteogenen Differenzierung und PPi auf die PCR Analyse

Verschiedene Genexpressionsmuster lassen sich für bestimmte Gene mit Prozessen wie der osteogenen Differenzierung in Verbindung bringen. In diesem Abschnitt sollen die verwendeten sogenannten osteogenen Marker vorgestellt und das jeweilige Resultat diskutiert werden.

ALP, ANKH und ENPP1

Die drei Proteine ALP, ANKH und ENPP1 wurden in den Kapiteln 1.3, 1.4 und 1.5 vorgestellt. Der Schwerpunkt ihrer Katalysierungsarbeit liegt in der Homöostase von Pyrophosphat (s. Kap. 1.2). Dadurch wird der Mineralisationshemmer PPi zu organischem Phosphat prozessiert und so zusammen mit Hydroxylapatit in die Mineralisierung der Extrazellulärmatrix eingeschleust [17].

Bei einer osteogenen Differenzierung wird in anderen Arbeiten eine Erhöhung der Expression von ALP während der frühen Phasen des Differenzierungsvorganges berichtet [75-81]. Dies konnte in diesem Experiment nur andeutungsweise beobachtet werden. Nach Frank et al. erreichte die ALP-Expression ihre höchsten Werte innerhalb der ersten Woche um anschliessend abzufallen, während die Mineralisierung zunahm [78]. Dies wurde auch von Strauss et al. beobachtet [80]. Alvarez Perez et al. spricht dagegen von einer Erhöhung während der Periode von Tag 7 bis 21 der osteogenen Differenzierung. Von einer Abnahme während der Mineralisierung wird hier nicht berichtet [77]. Vor diesem Hintergrund war der Analysezeitpunkt für dieses Gen möglicherweise ungünstig gewählt, da nach 2 Wochen womöglich die Expression wieder deutlich niedrigere Werte erreicht hat. Eine Beeinflussung der Expression durch PPi wird unter diesen Umständen ebenfalls schwierig zu beurteilen.

Die beiden zusätzlichen Enzyme der Phosphathomöostase ENPP1 und ANKH werden ebenfalls mit der osteogenen Differenzierung in Verbindung gebracht. Eine Beteiligung an der Mineralisierung geht bei ENPP1 aus verschiedenen genetischen Krankheitsbildern hervor, die mit einer Verringerung der ENPP1 Aktivität einhergehen. Hierzu gehören pathologische Verkalkungen von Ligamenten [82] und Gefäßen [45]. Auch bei ANKH weisen genetische Mutationen mit dem resultierenden Phänotyp auf eine Beteiligung im Mineralstoffwechsel hin [46-48].

Nam et al. zeigte im Zusammenhang mit einer ENPP1 Minderexpression eine Hemmung der Differenzierung zu Osteoblasten [83]. Allerdings wird keine Überexpression des Enzyms während der Differenzierung angegeben, sondern der

fehlende Übergang von Präosteoblasten zu Osteoblasten bei verringerter ENPP1-Expression. Kaur et al. stellten hier allerdings bei osteogener Differenzierung von Mesenchymalen Stammzellen der Ratte eine Abnahme der Expression nach 14 Tagen fest [84]. Dies findet sich auch in der PCR-Analyse nach 2 Wochen im Rahmen dieser Arbeit wieder, was für eine Differenzierung der Zellen zu Osteoblasten sprechen könnte (Abb. 18). Auch findet man eine leichte Abnahme der Genexpression unter PPI Behandlung, sowohl bei der Kontrolle als auch bei der osteogenen Differenzierung.

ANKH erreicht nach Kirsch et al. seine maximale Expression nach 3 Tagen Differenzierung [85]. Hier wird eine signifikante Abnahme von osteogenen Markern und der Mineralisierung bei einer Osteoblasten Zelllinie mit verminderter ANKH-Aktivität festgestellt [85]. Wie bei ALP ist hier der Zeitpunkt der Analyse wahrscheinlich ungünstig gewählt.

Langjährige Erfahrungen mit der in vitro osteogenen Differenzierung aus dem Labor der Orthopädischen Klinik sprechen dafür, dass der Prozess der osteogenen Differenzierung und das Ausmaß der Mineralisierung nicht immer kongruent verlaufen. Einige so genannte osteogene Marker werden in der Phase des Übergangs vom Osteoblasten zum Osteozyten wieder vermindert exprimiert, die ALP gehört sicher dazu. Neben der interindividuellen Schwankungsbreite der Donor-Zellen kommt auch hinzu, dass die 2D-Zellkultur die Verhältnisse nur ungenügend widerspiegelt. Aus den hier diskutierten Experimenten kann jedoch festgestellt werden, dass der Versuch, die PPI-Konzentrationen zu modulieren keine wesentlichen Interaktionen zwischen den hauptsächlich an der PPI-Homöostase beteiligten Enzymen erkennen lässt. Möglicherweise kommt den Veränderungen der mineralisierungshemmenden Peptide z.B. von Osteopontin, Osteocalcin und FGF23 eine größere Bedeutung in der Modulation der Mineralisierung zu, wie im Folgenden zu diskutieren sein wird.

Osteocalcin (OC)

OC, oder Bone Gla Protein, wird von Osteoblasten sekretiert und findet sich in relevanter Konzentration in der extrazellulären Knochenmatrix in seiner γ -carboxylierten Form [86]. Diese bindet an Hydroxylapatit, wogegen die uncarboxylierte Form als hormoneller Botenstoff auf den Glucosestoffwechsel der Zellen Einfluss nimmt [86, 87]. OC nimmt im erwachsenen Knochen bis zu 2% aller Proteine in der Extrazellulärmatrix ein [88]. Vitamin D3 nimmt über eine entsprechende Bindungsstelle im Promoter Einfluss auf die Expression des zugehörigen Genes; Yoon et al. zufolge ist dieser Stimulus positiv [89], neueren Ergebnissen zufolge allerdings über indirekten Weg hemmend [90]. Über ein weiteres responsives Element im Promoter nimmt die Regulation über Osteoblast-specific transcription factors (Osf2/Cbfa1) Einfluss [91].

OC wird im späten Stadium des Osteoblasten/Osteozyten sekretiert und schließlich beim Übergang zum reifen Osteoblasten herunterreguliert [76, 79]. Somit wird das Gen kurz vor der Phase der Mineralisierung verstärkt exprimiert; Nakamura et al. beschreibt eine Erhöhung der OC Genexpression nach 2 Wochen in vitro [79]. Das nicht-kollagene Protein verfügt über negativ-regulatorische Einflüsse auf die Knochenproduktion, die allerdings eher als Steuerung der Verknöcherung und nicht als Blockade zu verstehen sind [92, 93].

OC wird heutzutage als regulatorisches Protein der Mineralisierung verstanden und seine Sekretion geht dieser voraus [79]. Nakamura et al. belegte darüber hinaus die Möglichkeit, OC als Marker der osteogenen Differenzierung zu verwenden [79]. Tatsächlich wird OC als einer der spezifischsten Marker der Entwicklung zum Osteoblasten gesehen [80, 94-96].

Die Resultate dieser Arbeit zeigen nach 2 Wochen keine Erhöhung der OC Expression bei den Zellen unter osteogener Differenzierung gegenüber der nicht differenzierten Kontrolle (Abb.18). Nach 4 Wochen zeigt sich eine erhöhte Expression unter osteogener Differenzierung. Auch ein Unterschied zwischen PPI- behandelten Zellen und osteogener Kontrolle ist zu vermerken (Abb.19). Diese Zunahme würde für einen erhöhten Knochenstoffwechsel sprechen [88].

Eine verminderte Expression von OC bei der osteogenen Differenzierung unter PPI Behandlung könnte auch auf eine verspätete Differenzierung zu Osteoblasten hindeuten. Dies wäre eventuell zurückzuführen auf die verminderte Expression von ENPP1 nach 2 Wochen (s.o.) wie schon von Nam et al. beschrieben [83].

Der Zeitpunkt der beobachteten Erhöhung der Expression ist laut Nakamura et al. sowie Cameron et al. eher spät [76, 79], während anderen Berichten zufolge ähnliche Verlaufsmuster beobachtet wurden [77, 97]. Auch die fehlende Expression bei der Kontrolle ist bei dem Osteoblasten spezifischen Protein nachvollziehbar.

Die Verminderung der Expression unter PPI könnte daher auf einen verminderten Knochenumsatz hindeuten, oder aber als reflektorische Herabregulierung von OC, um weniger dessen hemmenden Eigenschaften ausgesetzt zu sein. Dies könnte dazu beitragen, auch in einem Umfeld mit PPI der dadurch zustande kommenden Mineralisationshemmung entgegenzuwirken. Angesichts der fehlenden Mineralisationsstörungen unter PPI Behandlung auf zytochemischem Niveau (Abb.13, 14, 15, 16), könnte dies einen Kompensationsmechanismus darstellen.

Core-binding factor subunit alpha 1 (CBFA1)

Bei CBFA1 (core-binding factor subunit alpha1), oder auch RUNX2 (Runt-related transcription factor 2) genannt, handelt es sich um ein zellinternes Nuklearprotein der Familie der Runt/CBFA Transkriptionsfaktoren [95]. Es wird nach aktuellem Wissenstand als zentraler Transkriptionsfaktor im Prozess der osteogenen Differenzierung gesehen [91]. Das Protein erhöht die Expression der meisten von Osteoblasten exprimierten Gene und steuert die Differenzierung von Osteoblasten [98]. Hierzu gehören u.a. OC, wo es im Promoter an ein OSE2 (osteoblast-specific cis-acting element) bindet und somit die Expression positiv beeinflusst [86, 91], sowie Osteopontin (OP) [99] und COL1A1 (Kollagen Typ 1) [76]. Somit trägt das Protein neben der Differenzierung auch zur Aufrechterhaltung der Osteoblastenfunktionen bei [95].

Auch wurde die Erhöhung der Expression von CBFA1 während der osteogenen Differenzierung als zeitgleich mit OC und OP beschrieben [79].

Die Expression von CBFA1 gilt als essentiell für die Osteoblastendifferenzierung, Schwankungen im Verlauf der osteogenen Zellreifung sind im Normalfall nicht in relevantem Ausmaß vorhanden [98].

In den PCR Untersuchungen konnte nach 2 Wochen osteogener Differenzierung kein Unterschied zwischen Kontrolle und MSCs im Differenzierungsmedium festgestellt werden. Dies deckt sich mit den Informationen aus der Literatur, da es vor allem an späteren Zeitpunkten der Differenzierung zusammen mit OC und OP hochreguliert wird. Nakamura et al. berichtet zwar von einer relativ frühzeitigen Erhöhung der mRNA ab Tag 6 der Differenzierung, allerdings fällt diese auch wieder zusammen mit der Expression von OC und OP [79]. Nach 4 Wochen zeigt sich allerdings kein wesentlicher Unterschied. Eine verringerte Expression unter PPI-Zugabe bei der Kontrolle ließ sich unter osteogener Differenzierung nicht beobachten. Hieraus kann man zumindest schließen, dass das osteogene Commitment auch unter den gegebenen Bedingungen prinzipiell erhalten bleibt. Die Präsenz von CBFA1 bei der Kontrolle spricht wiederum dafür, dass prinzipiell ein osteogenes Commitment vorliegt (s.o.). Die fehlende Mineralisierung und fehlende OC-Expression sprechen dafür, dass nachgeordnete osteogene Signalkaskaden für die weitere osteogene Reifung der Zellen noch nicht stattgefunden haben. Die Beobachtung kann dafür stehen, dass die Stammzellen teilweise spontan in ein osteogenes Commitment eintreten.

Die verminderte Expression von CBFA1 unter PPI im Kontrollmedium könnte darauf hindeuten, dass dieses niedrige Niveau eines spontanen Commitment vermindert wird, eine Aussage, die gezielt zu überprüfen bliebe. Im Nachhinein wäre dies ein relativ bedeutsamer Befund, wenn man annähme, dass eine überhöhte Konzentration von PPI das osteogene Commitment bereits zu Beginn verhindert.

Bone Sialoprotein (BSP) und Osteopontin (OP)

BSP gehört zusammen mit OP zu den Sialoproteinen. Sie stellen 8-12% der extrazellulären nicht-kollagenösen Proteine in der Knochenmatrix dar [100]. Zusammen unter anderem mit Dentin Matrix Protein 1 (DMP1) werden sie heute zu den SIBLING (Small Integrin-Binding Ligand Interacting Glycoproteins)-Proteinen gezählt, die zu den nicht-kollagenösen Extrazellulärproteinen der Knochenmatrix gehören und hier Schlüsselrollen in der Knochenbildung übernehmen [101, 102]. Herring und Kent konnten BSP zum ersten Mal im Jahre 1972 aus bovinem Kortikalknochen isolieren [93]. In späteren Arbeiten kristallisierte sich dann heraus, dass es sich bei diesem Experiment, anders als bis dahin angenommen, um zwei Proteine handelte, die ähnliche Eigenschaften aufweisen: BSP und OP [99, 103, 104]. Beide sind stark phosphorylierte und sulfatierte Glycoproteine [105]. Die Phosphorylierung hat eine Auswirkung auf die Bindungsaktivität an der Extrazellulärmatrix [93, 106]. Für Osteopontin weiß man, dass Polypeptide aus diesem Protein Substrate für die Dephosphorylierung durch die AP darstellen und den Mineralisierungsvorgang wesentlich beeinflussen [107].

BSP

Die Expression von BSP limitiert sich auf mineralisiertes Gewebe, Gewebazonen mit Mineralisierungspotential, sowie hypertrophe Knorpelzellen [108]. Eine Erhöhung der Genexpression von BSP findet man vor allem bei einer de novo Synthese von Knochenmaterial [108]. Die Regulierung der Expression erfolgt unter anderem über das Osteoblasten „Master“-gen (cis Ganss et al. [93]) CBFA1, das auch hier über eine entsprechende Promotorregion im Genom verfügt (c.f. Kapitel CBFA1) [91].

Nach aktuellem Wissensstand besteht die Möglichkeit, dass BSP im Knochenstoffwechsel multiple Aufgaben übernimmt.

Einerseits übernimmt BSP eine Adhäsionsfunktion zwischen Zellen und der extrazellulären Matrix [109], so dass dementsprechend ein begünstigendes Potential für Knochenmetastasen besteht, besonders bei Brustkrebs und dem hier entstehenden Mikrokalk [93, 110-113]. Auch bei Osteomyelitis mit *Staphylococcus aureus* gibt es Hinweise, dass die adhesiven Fähigkeiten eine entscheidende Rolle bei der Bakterienadhäsion spielen [114].

Andererseits wird eine regulierende Funktion bei der Bildung von Hydroxyapatit diskutiert, wobei BSP sogar die Initiierungseinheit darstellen könnte [115]. Auch eine Unterstützung der Mineralisierung durch Induktion der Differenzierung von Präosteoblasten zu Osteoblasten konnte nachgewiesen werden [116]. Unterstützt wird diese Theorie dadurch, dass BSP vor allem bei fertigen Osteoblasten und Zonen mit erhöhtem Knochenmetabolismus, sowie in späten osteogenen Differenzierungsphasen, exprimiert wird [93, 117, 118].

In dieser Arbeit zeigte sich weder nach 2 Wochen, noch nach 4 Wochen eine signifikante, reproduzierbare Steigerung der Expression dieses Proteins. Da der mikroskopische Phänotyp der Zellen unter osteogener Differenzierung auf eine erfolgte Mineralisierung hindeutet, ist dieses Ergebnis eher untypisch. Ein Erklärungsversuch liegt darin, dass, wie Catelas et al. zeigten, die Genexpression von Zellen nicht nur von ihrem Medium, sondern auch von ihrer physischen Umgebung abhängig ist [81]. Da BSP an der Bildung der Extrazellulärmatrix und der Integration des Osteoblasten in diese maßgeblich beteiligt ist, könnte dies einen Einfluss auf die Expression haben. Möglicherweise hat dies später in der frühzeitigen Ablösung verschiedener Zellen von den Zellkulturschalen Ausdruck gefunden (s. 3.6.).

Andererseits müssen auch die unterschiedlichen Expressionen verschiedener Gene zwischen verschiedenen MSC-Spendern berücksichtigt werden. Auch hier berichten verschiedene Arbeiten über signifikante Unterschiede [78, 81]. Hier ist allerdings zu vermerken, dass die globale Tendenz der Expression unter osteogener Differenzierung weitestgehend dem gleichen Trend folgt [78, 81, 119]. Isoliert betrachtet ist die verminderte Expression von BSP ein Indiz dafür, dass die Zellen sich am Zeitpunkt der PCR-Analyse zumindest nicht komplett zu Osteoblasten differenziert haben. Dies steht allerdings in Konflikt mit der

teilweise starken Mineralisierung der osteogen differenzierten Zellen, zu der Osteoblasten benötigt werden.

OP

Osteopontin, oder auch SPP-1 wird vor allem im Knochen, aber auch in der Niere produziert [97, 120]. Allerdings wird OP darüber hinaus in geringeren Konzentrationen nahezu ubiquitär exprimiert [99]. Dabei fällt auf, dass das Protein auffällig oft an luminalen epithelialen Oberflächen zu finden ist und hierdurch wahrscheinlich wichtig für die Kommunikation der Zelle mit dem externen Umfeld ist [120].

Es handelt sich um ein circa 34 kDa großes Protein, das im Laufe der Synthese mehrfach posttranslational modifiziert wird [99]. Die multiplen Möglichkeiten zur Phosphorylierung, Glycosylierung und Sulphatierung erlauben es, das Protein an unterschiedlichen Lokalisationen an die entsprechenden Bedürfnisse anzupassen [99].

Osteopontin wird mit der Initialisierung von Hydroxyapatitkristallen und so mit der Mineralisierung der Extrazellulärmatrix in Verbindung gebracht [77, 96].

Die Regulierung der Expression erfolgt einerseits durch das Osteogenese Regulatorgen CBFA1 (s.o.) über das entsprechende Promoterelement [91]. Andererseits kommt auch 1,25 Dihydroxyvitamin D₃ eine positive Regulierung der Expression des Proteins zu [121].

In der Literatur wird angenommen, dass phosphoryliertes Osteopontin einen hemmenden Einfluss auf die Bildung von Hydroxyapatit hat [99, 122-125].

Rezente Erkenntnisse haben ergeben, dass OP selbst wahrscheinlich ein Substrat der TNSALP ist; diese ist in die Regulierung der Phosphorylierung von Osteopontin involviert [126]. Auch erkannte man, dass wahrscheinlich eine komplexe Wechselwirkung existiert zwischen unter anderem den Konzentrationen von P_{PPi}/P_i, der phosphorylierten und unphosphorylierten Form von Osteopontin (p-OP, OP), den 3 Enzymen TNSALP/ENPP1/ANKH und POSPHO1 [127]. Yadav et al. zufolge stimuliert P_{PPi} die Expression von Spp1,

was wiederum zu einem Anstieg von p-OP führt und in eine Hemmung der Bildung von Hydroxyapatit mündet [127] (s. Abb.41).

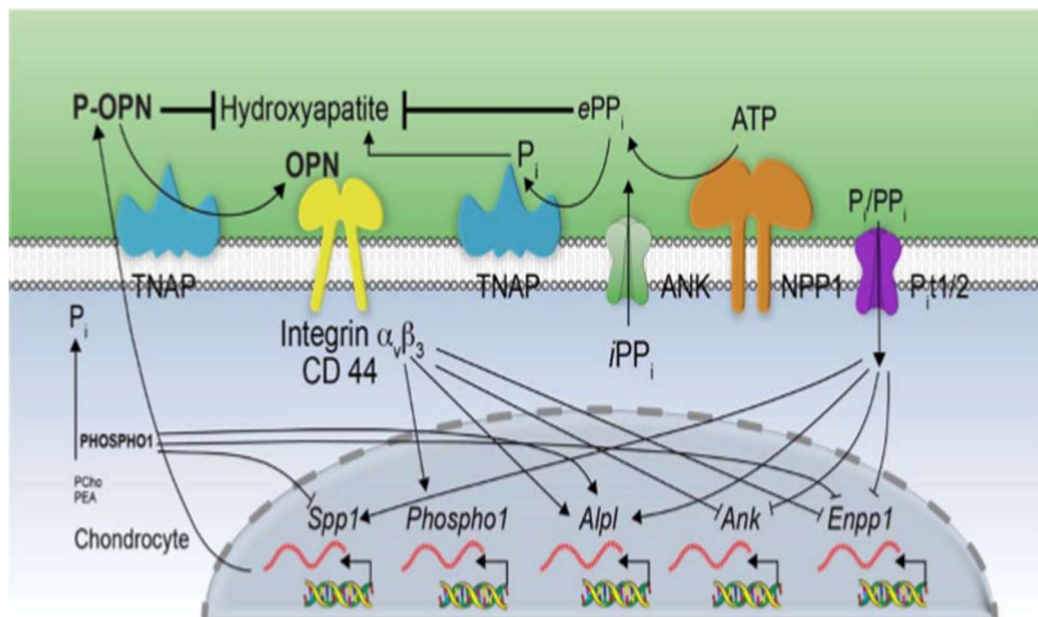


Abb. 41: Die komplexe Zusammenwirkung zwischen Osteopontin(hier OPN), phosphoryliertem Osteopontin (p-OPN), TNSALP (TNAP), ENPP1 (NPP1), ANKH (ANK) und Phospho1. Übernommen aus der Arbeit von Yadav et al. 2014 [127]. Mit freundlicher Genehmigung von John Wiley and Sons , COPYRIGHT 2014

Auch in anderen Systemen wie den Nierentubuli scheint das Protein eine Mineralisierung und die damit verbundenen Calcium-Oxalatverbindungen zu unterbinden [123]. Allerdings muss erwähnt werden, dass eine Übertragung dieser Erkenntnisse auf das Knochengewebe aufgrund der starken posttranslationalen Veränderungen von OP nur bedingt möglich ist (s.o.).

Des Weiteren wird vermutet, dass OP über das $\alpha_v\beta_3$ Integrin Einfluss auf die Adhäsions- und Migrationseigenschaften der Zelle nimmt [99, 128].

Es wird für die Expression des Proteins ein biphasischer Verlauf während der osteogenen Differenzierung beschrieben, bei dem die erste Erhöhung der Expression in der frühen Differenzierung stattfindet, und die Zweite nach der Initialisierung der Mineralisation in der späten Differenzierungsphase [80, 81, 99]. Oftmals wird Osteopontin allerdings als Marker für die späte Mineralisierungsphase betrachtet [97, 98]. Bei Yoon et al. fällt zudem auf, dass OP nach der späten Erhöhungsphase abfällt [97].

Nach 2 Wochen zeigt OP in dieser Arbeit zwei relative Erhöhungen der Expression. Einmal im Kontrollmedium ohne PPi Behandlung, sowie unter osteogener Differenzierung mit PPi Behandlung. Während die Erhöhung der OP

Expression unter PPI Aktivität durchaus mit den Berichten von Yadav et al. vereinbar ist, stellt die erhöhte Expression in der Kontrollpopulation ein unerwartetes Ergebnis dar, allenfalls das bereits oben diskutierte osteogene Commitment könnte hierfür eine Erklärung liefern.

Nach 4 Wochen ist ein minimaler Unterschied zwischen osteogener Differenzierung und Mediumkontrolle erkennbar, bei ersterer besteht eine leichte Hochregulation. Auch hier bietet sich ein Bild der Expression eines osteogenen Markers in der Kontrollpopulation. Die Zykluszahl der PCR-Analyse erscheint in diesem Fall zu hoch gewählt, was zu einer Beeinträchtigung der Interpretationsmöglichkeiten führt. Gegebenfalls könnte eine Kontamination vorliegen bei insgesamt nur niedrig exprimierten Genen. Wäre es dementsprechend zu einer Kontamination gekommen, könnte die Expression nachvollziehbar sein. Unter PPI- Behandlung wäre die Osteopontin Expression auch im Kontrollmedium gestiegen. Insgesamt ist bei allen Interpretationsversuchen zu bedenken, dass eine wesentliche Änderung des Einflusses von Osteopontin auf die Mineralisierung auf der Proteinebene durch Dephosphorylierung reguliert wird, was durch die hier verwendeten Methoden nicht wirklich zu erfassen ist, sich aber relevant auf das Ergebnis der Mineralisierung auswirken kann.

Dentin Matrix Protein 1 (DMP1)

Dentin Matrix Protein 1 (DMP1) oder auch AG-1, gehört zusammen mit OP und BSP zu den Proteinen der SIBLINGS-Familie [101] (s.BSP/OP). DMP1 ist nicht spezifisch für Knochen. Vielmehr wird es in mehreren Zellen aus mineralisierten Geweben, unter anderem auch in Zähnen, wo es ursprünglich entdeckt wurde, exprimiert [129].

Als Mitglied der SIBLING-Familie [101] nimmt DMP1 Einfluss auf die Mineralisation, enchondrale und intramembranöse Verknöcherung sowie auf die Dentinogenese [75, 129, 130]. Es existieren in der Knochenmatrix verschiedene Isoformen, die eine unterschiedliche Wirkung auf die Bildung von

Hydroxylapatit haben [131]. Die Isoformen entstehen wahrscheinlich durch proteolytische Spaltung durch PHEX (Phosphate regulating Endopeptidase Homolog, X-linked) [101]. Andere Autoren sehen das Bone Morphogenic Protein 1 (BMP1) als entsprechenden Katalysator an [132]. Gericke et al. gehen davon aus, dass das Protein je nach proteolytischer Prozessierung, Phosphorylierung (Tartaix et al.) [131, 133], aber auch Gewebelokalisation einen anderen Einfluss auf den Hydroxylapatit Haushalt hat. So übernimmt laut Tartaix et al. die nicht-phosphorylierte Form von DMP1 eine fördernde Aufgabe bei der Hydroxylapatit-Nukleation, während eine Phosphorylierung mit 29.7 Phosphate/mol zu einer effektiven Hemmung von Hydroxylapatit führt [133].

D'Souza et al. haben in ihrer Arbeit beobachtet, dass die Expression von DMP1 während der Entwicklung von Odontoblasten erst anstieg, um dann mit Mineralisierungsbeginn wieder abzunehmen. Des Weiteren haben sie festgestellt, dass in Osteoblasten eine ähnliche Entwicklung zu beobachten war [134]. Auch bei Cameron et al. beginnt die DMP1-Expression in der späteren Differenzierungsphase ab 14 Tagen [76].

In der vorliegenden Arbeit zeigt DMP-1 nach 2 Wochen keine Expressionsveränderung zwischen Kontrolle und osteogener Differenzierung, was mit den Berichten in der Literatur vereinbar ist [76, 134]. Ein Unterschied in der Genexpression von DMP1 zwischen Behandlung mit und ohne PPi ist im Rahmen dieser Arbeit auch nicht zu verzeichnen.

Nach 4 Wochen ist erwartungsgemäß eine leichte Erhöhung der Expression unter osteogener Differenzierung zu verzeichnen. Des Weiteren fällt eine Abnahme der Expression bei der osteogenen Differenzierung unter PPi- Behandlung auf. Diese ist schwierig zu interpretieren, da das Verhältnis der vorliegenden Isoformen von DMP-1 nicht bekannt ist. Wird DMP1 vorrangig als mineralisationshemmendes Protein interpretiert, könnten ähnliche Rückschlüsse wie bei OC (s.o.) gezogen werden, wo eine Minderepression des Gens eine Gegenregulation auf die Mineralisationshemmung durch PPi darstellen könnte. Betrachtet man allerdings die DMP-1 Expression als eine heterogene Coexistenz mehrerer Isoformen mit unterschiedlichen Auswirkungen auf die Mineralisierung, wäre eine Analyse der genaueren Zusammensetzung des extrazellulären Proteingemischs unabdingbar.

Immerhin bliebe die Arbeitshypothese zu testen, ob PPi die Reifung von Osteoblasten zum Osteozyten hemmt, da DMP-1 als ein Marker des Übergangs zum Osteozyten gilt [135].

PHEX

PHEX (Phosphate regulating Endopeptidase Homolog, X-linked) oder PEX wurde im Rahmen von Nachforschungen über HYP (X-linked hypophosphatemic rickets) entdeckt und mit dieser Erkrankung in enge Verbindung gebracht [136]. Es gehört zu den Zink-Metalloendopeptidasen, ist ein membranassoziiertes Glycoprotein und kommt vor allem in mineralisiertem Gewebe vor [101, 137, 138]. Die Bindung an die Zellmembran erfolgt über ASARM (Acidic Serine Aspartate Rich MEPE associated motif), wobei MEPE (Matrix Extracellular Phosphoglycoprotein) zu der SIBLING-Familie gehört [138]. Es ist anzunehmen dass das Protein eine entscheidende Rolle während der osteogenen Differenzierung von Zellen übernimmt [137].

Des Weiteren wurde eine Verbindung zwischen PHEX und dem Osteomalazie-Phänotyp von an HYP-erkrankten Mäusen festgestellt [139]. Miao et al. vermuten, dass PHEX indirekt auf die Mineralisation Einfluss nimmt, indem es die Synthese und Deposition von Knochenmatrixproteinen reguliert; möglicherweise übt es eine modulierende Wirkung auf die Mineralisierung aus, indem es die proteolytische Regulationskaskade für FGF23 in Gang setzt, dessen Peptide ebenfalls mineralisationshemmend wirken [139].

Darüber hinaus gibt es Hinweise darauf, dass PHEX Einfluss auf den Energiestoffwechsel hat [140].

In der Literatur wird das Protein als Marker des reifen Osteoblasten angesehen [141].

Die Expression im Knochengewebe wird ab dem Zeitpunkt der Mineralisierung beschrieben; bei der Entwicklung von Mäusen war dies ab Tag 15 der Embryo-Entwicklung der Fall [142].

In dieser Arbeit konnte sich die osteogene Differenzierung in Punkto PHEX-Expression schon nach 2 Wochen klar von der Kontrolle abheben. Einen Unterschied gab es mit oder ohne PPI- Behandlung zu diesem Zeitpunkt nicht. Dieser ist allerdings nach 4 Wochen zu beobachten.

Die Expression von PHEX spricht einerseits für eine Präsenz von reifen Osteoblasten, andererseits wird in der Literatur hiermit auch eine bevorstehende Mineralisation in Verbindung gebracht [141]. Letzteres konnte in vitro bestätigt werden.

Bei der Expression von PHEX muss erwähnt werden, dass die Ergebnisse nicht reproduzierbar waren, so dass die Aussagekraft eingeschränkt ist.

4.1.2 Allgemeines

Frank et al. veranschaulichten mit ihrer Arbeit die große Heterogenität der humanen Stammzellen in punkto Genexpression [78]. Wenngleich die Tendenz der Expressionsveränderungen unter osteogener Differenzierung für die Gene gleich bleibt, stellen diese Unterschiede in der Genexpression eine beträchtliche Herausforderung beim Vergleich verschiedener Stammzellkulturen dar. Dadurch sind Ähnlichkeiten in Genexpressionsmuster weniger offensichtlich zu erkennen und beeinträchtigen somit die Reproduzierbarkeit der Experimente.

Global kann man festhalten, dass die Mineralisierung in dieser Arbeit auch auf dem Niveau der Genexpression als Folge der Induktion osteogener Differenzierung nachvollziehbar ist. Dies wird gestützt durch die Unterschiede die sich in der Alizarin-, respektive in der ALP-Färbung darstellen.

Ein nachvollziehbarer Effekt unter PPI- Behandlung konnte auf genregulatorischer Ebene bei der Mehrzahl der untersuchten Gene nicht sicher festgestellt werden. Da diese Ergebnisse jedoch nur bedingt reproduzierbar waren, blieben die wenigen Hinweise auf Regulation durch exogene Zugabe von PPI durch eine Erhöhung der n-Zahlen für die einzelnen Experimente zu belegen oder zu falsifizieren.

4.2 Einflüsse von PPI, PLP, Probenecid und Vitamin D auf die Aktivität der TNSALP

Neben den Langzeitauswirkungen von PPI auf die osteogene Differenzierung von Stammzellen, wurden auch die kurzfristigen Effekte über 24h auf die Enzymaktivität untersucht. Derartige Experimente wurden auch unter PLP und Vitamin D geführt, die eine Rolle in der osteogenen Differenzierung und dem Mineralisationsprozess einnehmen [16, 143]. Probenecid wurde als Hemmer des Ionenkanals ANKH [46] ins Experiment aufgenommen, um so die Auswirkungen auf die Aktivität von TNSALP zu untersuchen.

Bis auf die Minderung der Aktivität unter Probenecid sind die beobachteten erniedrigten Enzymaktivitäten zwar im Trend reproduzierbar, aber nicht signifikant. Dem Resultat dieser Untersuchung nach zu urteilen, würde eine Suppression des ANKH Kanales und die damit zusammenhängende Erhöhung des intrazellulären PPI-Gradienten einen hemmenden Einfluss auf die TNSALP Enzymaktivität haben. Die Ergebnisse sind immerhin insoweit interpretierbar, als eine Hemmung des ANKH-Kanals dazu führen sollte, dass intrazellulär eine erhebliche Anreicherung von Phosphaten des Mevalonatstoffwechsels stattfinden sollte, insbesondere auch PPI, da es nicht mehr in das Zellkulturmedium abgegeben werden kann. Dies akkumulierte PPI gelangt entsprechend dem Vorgehen bei der Zellpräparation in den Versuchsansatz und kann auf diese Weise zu einer Hemmung der effektiv gemessenen AP-Aktivität führen. Damit ist auch auf indirekte Weise bewiesen, dass eine Hemmung des ANKH-Kanals zu einer Reduktion der extrazellulären PPI-Konzentration führen sollte [71].

Die nur minimale Enzymaktivität der älteren SAOS Population könnte an einer Entdifferenzierung der Krebszelllinie liegen. Diese könnte zu einer Minderexpression und damit zu einer erniedrigten Enzymaktivität führen.

Eine systematische Analyse der Evolution der Enzymaktivität im Laufe der Zellalterung erfolgte mit einer neuen SAOS-Zellreihe. Hier konnte in der Tat eine abnehmende Aktivität festgestellt werden.

Dieses Ergebnis könnte die Theorie unterstützen, dass die Abnahme der TNSALP Expression im Laufe einer Entdifferenzierung der Zellen erfolgte. Das Ergebnis ist auch

wichtig für die Laborarbeit insofern, als man nunmehr genau über die Zeitpunkte und die Problematik weiß, wenn dieses Zellsystem für Analysen rund um die TNSALP verwendet wird.

Bei dem zweiten Experiment verblieb eine restliche TNSALP Aktivität, wahrscheinlich aufgrund einer kürzeren Experimentlaufdauer. Eine zusätzliche Beobachtung war, dass die Zellen sich mit zunehmender Passage schneller teilten. Die in der Kultur entstehenden Veränderungen wurden nach ihrer erklärenden Charakterisierung in die Interpretation der Ergebnisse und in das Setting der Experimente mit einbezogen.

4.3 Einflüsse von Probenecid Stimulation über 48 Stunden auf die TNSALP

Um die beobachtete Aktivitätsminderung von TNSALP unter Probenecid zu verdeutlichen und auch auf genetischer Ebene zu studieren wurde der Versuch über einen längeren Zeitraum durchgeführt.

Es zeigte sich sowohl die erwartete Hemmung der Enzymaktivität von TNSALP, als auch auf dem Niveau der Genregulation eine Verminderung sowohl der Expression von TNSALP als auch von ENPP1. Diese Beobachtung wäre teilweise mit den Vorstellungen der Literatur über die Zusammenarbeit der Enzyme ANKH, TNSALP und ENPP1 zu erklären (s. Kap.1.2) [17]. Die intrazelluläre P_i-Konzentration steigt infolge der Inhibierung des ANKH-Kanals, was zu einer Drosselung der Transkription von ENPP1, aber auch von ANKH führt [127]. Wie auch bei den oben diskutierten anderen Veränderungen der Genexpression bliebe die Signifikanz der beschriebenen Ergebnisse durch eine Erhöhung der n-Zahl zu konsolidieren. Da Probenecid als Uricosuricum für die Therapie im Menschen zugelassen ist, wäre Zurückhaltung angezeigt, bei Patienten mit Hypophosphatasie dieses Medikament einzusetzen, da es zu einer weiteren Reduktion der ALPL Expression führen könnte.

Eine Verringerung der TNSALP-Aktivität aufgrund von Apoptose der Zellen konnte ausgeschlossen werden. In der Arbeit von Frau Graser wird ausserdem diskutiert, dass der hemmende Einfluss tatsächlich vom Probenecid und nicht von anderen Substanzen

wie dem Lösungsmittel herkommen könnte, was einen zusätzlichen Faktor der Interpretation der Ergebnisse ins Spiel bringt [144].

4.4 Einflüsse von Zoledronat auf die Genexpression von TNSALP, ENPP1 und ANKH

Der Knochenstoffwechsel ist nicht nur abhängig von exogenem oder an der Zellmembran prozessiertem PPI, sondern u.a. auch von PPI als endogenem Endprodukt des Mevalonat Pathway [35].

Durch die kurzzeitige und langdauernde Behandlung mit hohen respektive niedrigen Konzentrationen an Zoledronat sollte eine Inhibierung des Mevalonat Pathways erreicht, und die Effekte auf die osteogene Differenzierung untersucht werden.

Einen reproduzierbaren Effekt auf die Expression von TNSALP, ANKH und ENPP1 erreicht die Behandlung mit dem Bisphosphonat in dieser Arbeit nicht. Es bleibt anzumerken, dass eine detaillierte Analyse sich angesichts der heterogenen Referenz-PCR als schwierig erweist. Eine neuere Arbeit aus dem Labor der Orthopädischen Klinik in Zusammenarbeit mit WissenschaftlerInnen aus der Hautklinik zeigt jetzt, dass Zoledronat eine ERK5-Aktivierung bewirken kann, die einen erheblichen Beitrag zur osteogenen Differenzierung leistet, was bisher nicht bekannt war [63]. In Zusammenschau mit den hier erzielten Daten spricht Vieles dafür, dass die Effekte auf die Mineralisierung zwar messbar und relevant sind [71], dass aber ein Teil der seinerzeit berichteten Ergebnisse auch auf die Aktivierung von ERK5 zurückgeführt werden muss [63].

Die Hemmung des Mevalonat Pathway mit Zoledronat hat somit nicht nur drei, sondern vier Effekte, solche die stromabwärts in der Hemmung der Farnesylyl synthase liegen und in eine reduzierte oder fehlende Prenylierung von Proteinen münden, solche die stromaufwärts der Hemmung liegen und zur Akkumulation von Phosphatderivaten führen, die dann vermehrt aus der Zelle ausgeschleust werden und nicht zuletzt Effekte, die durch Anhäufung des Addukts APPPi entstehen und in Apoptose münden können und letztlich auch die ERK5-Aktivierung [63, 145]. Die Arbeiten von Ebert et al. zeigen, dass bei der Behandlung von Osteoblasten eine erhöhte Mineralisierung zustande kommt, was in den klinischen Studien mit Zoledronat möglicherweise gleichzusetzen ist mit der

nachgewiesenen Erhöhung der „mineral apposition rate“ [61]. Wenn vermehrt PPI in diesem Zusammenhang aus der Zelle ausgeschleust wird, würde dieses bei ausreichend verfügbarer AP-Aktivität in eine vermehrte Mineralisierung münden. Die hier gezeigten Experimente demonstrieren, dass diese Vorgänge jedenfalls kurzfristig keine Änderung der Genexpression der in die Mineralisierung involvierten Enzyme bewirken.

4.5 Auswirkungen von PPADS und β - γ meATP auf ENPP1 und die Mineralisierung

Der erste Schritt in diesem Experiment war die objektive Beurteilung des Hemmpotentials der beiden ENPP1-Inhibitoren PPADS (Pyridoxalphosphat-6-azophenyl-2',4'-disulfid Säure) und β - γ meATP (β - γ Methyltriphosphat) auf das Enzym. Hierbei konnte eine signifikante Hemmung festgestellt werden. Die beiden Substanzen unterscheiden sich allerdings in der Potenz. Bei 25 μ M PPADS liegt die restliche Enzymaktivität von ENPP1 noch bei 20%. Um das gleiche Hemmpotential unter β - γ meATP zu erreichen, wird hier die 4-bis 12fache Konzentration benötigt (s. Kap. 3.5). β - γ meATP wird als kompetitiver Inhibitor von Ecto-ATPasen gesehen. Die Methylengruppe in der Phosphodiesterbrücke gibt dem Molekül eine relative Resistenz gegenüber der Hydrolyse durch das Enzym (Joseph et al. [146]).

PPADS ist sowohl ein ineffektiver Inhibitor der Purinoceptoren P2Y₁ und P2X [147, 148], als auch ein potenter Inhibitor von ENPP1 [149].

In einem zweiten Schritt wurden die Auswirkungen von PPADS und β - γ meATP auf die osteogene Differenzierung analysiert.

Angesichts der frühen Zellablösung und der nur einmaligen Durchführung ist eine Auswertung des Experiments erschwert, in der Tendenz weisen die Ergebnisse auf eine Modulation der Mineralisierung durch die ENPP1-Hemmstoffe hin, insbesondere unter β - γ meATP. Es können allerdings aus dem einmaligen Versuch keine ernsthaften Rückschlüsse gezogen werden.

Es stellt sich jedoch theoretisch die Frage nach dem Grund der in diesem Experiment unterschiedlichen Mineralisierungshemmung. Obwohl PPADS sich als potenterer Hemmstoff herausgestellt hat, findet sich die unter β - γ meATP beobachtete starke Reduktion der Mineralisierung bei PPADS nicht.

Einerseits besteht die Möglichkeit verschiedener Wirkmechanismen. Zwar bewirken PPADS und β - γ meATP beide eine Hemmung der ENPP1- Funktion, doch sind es unterschiedliche Moleküle. Die Wirkung von PPADS auf ENPP1 ist noch ungenügend beschrieben, allerdings gibt es Berichte über den Wirkmechanismus an P2 Rezeptoren; hier bestehen Hinweise darauf, dass die inhibitorische Wirkung von PPADS auf eine allosterische nicht-kompetitive Hemmung zurückzuführen ist [148]. Hierdurch wird die Signalkaskade der G-Protein gekoppelten ATP-Rezeptoren (P2Y) und Liganden gesteuerten Ionenkanäle (P2x) empfindlich gestört [150].

Die Hemmung von ecto-ATPasen (eNPPasen und eNTPDasen (ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolases)) durch β - γ meATP ist hingegen untersucht [146]. Ein Unterschied zu PPADS lässt sich auf dem Gebiet der P2 Rezeptoren ermitteln. Hier übernimmt β - γ meATP eine agonistische Funktion [146]. Diese Tatsache deutet darauf hin, dass die beiden Substanzen zwar einen ähnlichen Effekt erzielen was ENPP1 angeht, die Wirkmechanismen jedoch verschieden sind.

Auch ein Unterschied in der Selektivität steht zur Debatte. Durch Hemmung oder Aktivierung zusätzlicher Enzyme könnte dies zu einer veränderten Wirkung bei der Mineralisation beitragen.

In der PCR-Analyse zeigt sich nach 2 Wochen eine Zunahme der Expression von ENPP1 unter β - γ meATP Behandlung. Die Expression von ALP ist zu diesem Zeitpunkt in der osteogen differenzierten Kontrolle zwar sichtbar, allerdings relativ niedrig. Unter PPADS und β - γ meATP in der osteogenen Differenzierung sieht man hier eine deutliche Hochregulation. Hier deutet sich schon ein Unterschied gegenüber der osteogenen Kontrolle an. Zum Zeitpunkt der Analyse beginnt die Down-Regulation von ALP (s. Kap. 4.1.1), die bei der osteogenen Differenzierung unter ENPP1-Inhibition noch nicht stattgefunden hat.

Die Veränderungen der ENPP1-Expression werden bei der zweiten Analyse nach 3 Wochen 4 Tage deutlicher (s. Kap. 3.6. PCR-Auswertung). Unter der osteogenen Kontrolle ist eine deutliche Zunahme der Expression unter β - γ meATP Behandlung zu sehen. Zu diesem Zeitpunkt hat sich auch ein deutlicher Expressionsunterschied der TNSALP zwischen β - γ meATP und PPADS Behandlung gezeigt. Da die TNSALP-Expression zu diesem Zeitpunkt der osteogenen Differenzierung eigentlich weitgehend

herunterreguliert sein müsste (s. Kap. 4.1.1), kann die fehlende Downregulierung dieses Gens unter β - γ meATP Behandlung einen Hinweis auf einen großen Impakt auf den Metabolismus der osteogenen Differenzierung darstellen.

Die ANKH Expression zeigt sich in den verschiedenen Experimenten nicht signifikant verändert.

Eine Erhöhung der ENPP1- Expression erscheint während einer Inhibition per se als sinnvoll. Als Gegenregulation für das inhibierte Enzym reagiert die Zelle mit einer erhöhten de novo Synthese. Die Hochregulation von ALP wäre in diesem Zusammenhang ähnlich zu verstehen. Durch den Mangel an PPi aufgrund einer verminderten ENPP1-Aktivität kommt es schlussendlich, mangels Substrat für ALP, zu einem Pi-Mangel. Dies versucht die Zelle mit einer gesteigerten Synthese von ALP zu kompensieren. Dies könnte auch ein Hinweis darauf sein, dass der PPi Mangel unter β - γ meATP bedeutender ist als unter PPADS. Hypothetisch könnte man davon ausgehen, dass die Mineralisierung mangels Substrat für die TNSALP inhibiert wird, als Folge einer mangelhaften Hydroxylapatit Synthese. Die Hemmung unter β - γ meATP wäre in dem Fall eventuell auch auf andere Synthesewege ausgebreitet, was aufgrund seines allosterischen kompetitiven Hemmungsmechanismus nicht auszuschliessen ist.

Es gibt darüber hinaus Hinweise darauf, dass ENPP1 die Differenzierung von Osteoblasten reguliert [83]. So gesehen könnte die verminderte Mineralisierung unter β - γ meATP Ausdruck einer verzögerten osteogenen Differenzierung sein. Die spät erhöhte TNSALP-Expression nach 3 Wochen 4 Tage unter β - γ meATP Behandlung könnte diese Theorie unterstützen, da dieses Enzym als früher Marker der osteogenen Differenzierung gilt (s. Kap. 4.1.1).

Nach dem Schema von Yadav et al. (s. Kap. 4.1.1) [127] scheint der Mechanismus der Gegenregulation für ENPP1 erklärbar zu sein. Durch die verringerte PPi Konzentration fällt die Transkriptioninhibition weg, was in einer gesteigerten Expression resultiert. PPi steigert weiterhin die Expression von TNSALP, eine Verringerung müsste demnach in einer Steigerung der ALP-Expression resultieren. Erkennbar wäre dies in der PCR-Analyse nach 24 Std unter β - γ meATP Behandlung, sowie dezent unter PPADS.

Die Langzeitauswirkungen der β - γ meATP-Behandlung auf die osteogene Differenzierung und auf die Expression von ALP sind mit dem Schema allein so nicht

erklärbar. Hier müssten ein oder mehrere Regelmechanismen mit betroffen sein. Auch die für die unterschiedlichen Auswirkungen auf die osteogene Differenzierung der Zellen unter Behandlung mit PPADS und β - γ meATP sind allein auf die ENPP1-Inhibition nicht zurückzuführen. Eventuell könnten die P2X-, und besonders die G-gekoppelten P2Y Enzyme, hier eine Rolle übernehmen. Hier wäre auf jeden Fall Anlass für weitere Nachforschungen gegeben, die im Rahmen dieser Arbeit nicht erfasst werden konnten.

4.6 Schlussfolgerung

Die Knochenformation, sowie die osteogene Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen unterliegt einem empfindlichen Gleichgewicht.

Die Arbeit hat gezeigt, dass die verwendeten Zellen auf exogene Einflüsse wie zum Beispiel erhöhte PPI-Zufuhr mit einer veränderten Genexpression oder Genfunktion reagieren. Diese veränderten Genexpressionen anhand der durchgeführten *in vitro* Experimenten objektiv zu bewerten und auf die Situation *in vivo* zu übertragen, gestaltete sich jedoch als schwierig.

Einerseits zeigten die verwendeten Stammzellen eine sehr hohe Spendervariabilität auf, was einen direkten Vergleich der verschiedenen Genexpressionsanalysen erschwerte. Eine Reproduktivität und mit ihr die Aussagekraft der Experimente ist hierdurch öfters wesentlich beeinträchtigt worden. Dem ist nur mit einer Erhöhung der Anzahl der Spender und der Experimente zu begegnen oder durch Verwendung genetischer Mausmodelle, die entsprechende Enzyme überexprimieren oder durch Knockout einen Mangel aufweisen. Die Komplexität der verschiedenen Facetten der (Gen-) Regulationsmöglichkeiten ist andererseits auf der Ebene der Homöostase der Phosphatderivate im Microenvironment und konsekutiv auf der Ebene der Genregulation enorm und kann sekundär auch die ganze Palette der Rezeptoren des Purinergen Signalling involvieren, wenn es zum vermehrten oder verminderten Umsatz von ATP kommt. Im Zellinneren kommt der Mevalonat-Stoffwechsel als weiterer Modulator hinzu, der über die spezifischen Kanäle mit dem Microenvironment um die Zelle herum in Verbindung steht.

Das Zusammenspiel dieser Komponenten ist noch nicht abschließend erforscht, wovon regelmäßige neue Erkenntnisse auf diesem Gebiet zeugen (z.B. Yadav et al. 2014) [127].

Letztlich bleiben viele Fragen offen bezüglich des genauen Ablaufs der osteogenen Differenzierung, aber auch speziell in der Pathophysiologie zahlreicher Krankheiten, welche ein Ungleichgewicht der Komponenten des Knochenmetabolismus beinhalten. Die Arbeit zeigt hiermit auch den großen Bedarf an Forschung, der auf dem Gebiet des Knochenstoffwechsels trotz vieler rezenter Erkenntnisse weiterhin besteht.

5. Zusammenfassung

Die Enzyme TNSALP (Tissue Non-Specific Alkaline Phosphatase), ENPP1 (Ectonucleotide Pyrophosphatase/Phosphodiesterase 1) und ANKH (Ankylosis, progressive human homolog) bilden zusammen eine zentrale Regulierungseinheit für den Pyrophosphat (PPi)-Stoffwechsel der Zelle [17, 19].

Störungen dieses genau geregelten Prozesses resultieren in schwerwiegenden Erkrankungen, wie z.B. bei der Hypophosphatasie [3]. Dieser meist autosomal rezessiv vererbten Erkrankung liegt eine durch genetische Mutationen beeinträchtigte Funktion der TNSALP zugrunde, wodurch sich die PPi-Konzentration im Microenvironment der Zelle erhöht. Diese kann im Knochengewebe zu schweren Mineralisierungsstörungen führen [17, 19].

Andere Krankheiten, mit erniedrigten PPi-Konzentrationen, werden mit pathologischen Verkalkungen in verschiedensten Geweben in Verbindung gebracht [1, 47]. Diese gehen unter anderem auf genetische Defekte von ENPP1 zurück [1].

Auch der Mevalonat-Pathway trägt zur Komposition des Microenvironments bezüglich der Homöostase von Phosphaten bei [35, 50]. Hier bestehen auch medizinisch relevante Einflussmöglichkeiten, zum Beispiel durch Bisphosphonate, bei der sogenannten Volkskrankheit Osteoporose.

In dieser Arbeit wurden die Auswirkungen einer PPi-Belastung auf die *in vitro* Mineralisierung von Mesenchymalen Stammzellen untersucht, wobei Modulatoren der

Enzymaktivität für ALP und ENPP1 und der Aktivität des PPI-Kanals ANKH sowie des Mevalonatstoffwechsels zum Einsatz kamen (PPI, Pyridoxalphosphat (PLP), Probenecid, Vitamin D, PPADS (Pyridoxalphosphat-6-azophenyl-2',4'-disulfid Säure) und β - γ meATP (β - γ Methyltriphosphat)).

Die Resultate zeigen, dass die Modulation der PPI-Konzentration bei der osteogenen Differenzierung von hMSCs *in vitro* keine eindeutigen Effekte bewirkt. Geringe Änderungen des Genexpressionsmusters sind letztlich nicht auszuschliessen, blieben jedoch aufgrund der hohen Spendervariabilität durch eine erhöhte Anzahl von Experimenten zu beweisen.

Diese Arbeit zeigt insgesamt eine unerwartet geringe Auswirkung einer exogenen und endogenen Modulation der PPI-Konzentration sowohl mit Blick auf die rein physikalischen Phänomene der Mineralisierung, als auch mit Blick auf die untersuchte Genregulation der wichtigsten beteiligten Proteine, was möglicherweise die hohe Kompensationskapazität der Systeme unter physiologischen Bedingungen reflektiert. Untersuchungen auf proteomischer Ebene, besonders mit Blick auf die Prozessierung von Polypeptiden mit Mineralisierungs-modulierender Wirkung würden möglicherweise genaueren Einblick vermitteln.

Eine genauere Untersuchung der Einflüsse von ENPP1 erscheint für die Zukunft vielversprechend. Allerdings treten hier, besonders auch durch die verwendeten Hemmstoffe der ENPP1, die Phänomene der Vernetzung des Stoffwechsels der Phosphate (inklusive ATP und seiner Metabolite) mit dem Purinergen Signalling deutlich zutage. Diese Vernetzung generiert durch ihre Komplexität sowohl klinisch als auch zellbiologisch/biochemisch erhebliche Interpretationsprobleme, die zukünftige Arbeiten auflösen müssen. Dabei sollte besondere Aufmerksamkeit auf zwei für HPP-PatientInnen klinisch in Zukunft potentiell bedeutsame Ergebnisse gelegt werden, die möglicherweise ungünstigen Auswirkungen einer Therapie mit Probenecid auf die ALPL Expression und die Steigerung der ALPL Expression unter Hemmstoffen des Enzyms ENPP1.

Keywords: Hypophosphatasie, TNSALP, ENPP1, ANKH, PPI, PPADS, β - γ meATP

6. Literaturverzeichnis

1. Harmey, D.e.a., *Concerted Regulation of Inorganic Pyrophosphate and Osteopontin by Akp2, Enpp1, and Ank*. American Journal of Pathology, 2004. **164**: p. 1199-1209.
2. Kyle A. Gurley, R.J.R., David M. Kingsley, *Biochemical and Genetic Analysis of ANK in Arthritis and Bone Disease*. The American Journal of Human Genetics, 2006. **79**: p. 1017-1029.
3. Beck, C., *Hypophosphatasia*. Klin Padiatr, 2009: p. 219-226.
4. Lam, e.a., *A Case of Perinatal Lethal Form of Hypophosphatasia; and Review of Literatures*. HK J Paediatr, 2006. **11**: p. 341-346.
5. Di Mauro, S.e.a., *Kinetic characterization of Hypophosphatasia Mutations with Physiological Substrates*. Journal of Bone and Mineral Research, 2002. **17**: p. 1383-1391.
6. al., W.M.e., *Alkaline phosphatase: placental and tissue-nonspecific isoenzymes hydrolyze phosphoethanolamine, inorganic pyrophosphate, and pyridoxal 5'-phosphate Substrate accumulation in carriers of hypophosphatasia corrects during pregnancy*. J Clin Invest, 1995(95): p. 1440-1445.
7. MP, W., *Hypophosphatasia In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly S, Eds The metabolic and molecular basis of inherited disease*. New York: Mc Graw-Hill. 1995: p. 4095-4111.
8. Beck, C., *Hypophosphatasie - aktuelle Diagnostik und Therapie*. Journal für Mineralstoffwechsel, 2009. **16**: p. 116-122.
9. Mornet, e.a., *A molecular-based estimation of the prevalence of hypophosphatasia in the European population*. Annals of human Genetics, 2011. **75**: p. 439-445.
10. Mornet, e.a., *Hypophosphatasia: The Mutations in the Tissue-Nonspecific Alkaline Phosphatase Gene*. Human Mutation, 2000. **15**: p. 309-315.
11. Etienne Mornet, A.T., Christelle Domingues, Annika Dufour, Emmanuelle Benaloun, Nicole Lavaud, Fabienne Wallon, Nathalie Rousseau, Carole Charle, Mihelaiti Guberto, Christine Muti, Brigitte Simon-Bouy, *Hypophosphatasia: a genetic-based nosology and new insights in genotype-phenotype correlation*. European Journal of Human Genetics, 2020.
12. Bowden SA, F.B., *Profile of asfotase alfa in the treatment of hypophosphatasia: design, development, and place in therapy*. Drug Des Devel Ther., 2018(12): p. 3147-3161.
13. Kishani PS, R.E., Arundel P, Bishop N, Dahir K, Fraser W, Harmatz P, Linglart A, Munns CF, Nunes ME, Saal HM, Seefried L, Ozono K, *Monitoring guidance for patients with hypophosphatasia treated with asfotase alfa*. Mol Genet Metab, Sep. 2017(122(1-2)): p. 4-17.
14. MP., W., *Hypophosphatasia: Enzyme Replacement Therapy Brings New Opportunities and Challenges*. J. Bone Miner Res, Apr. 2017. **32(4)**: p. 667-675.
15. MP, W., *Hypophosphatasia: An overview For 2017*. Bone, Sep. 2017. **102**: p. 15-25.
16. Whyte, M.P., *Hypophosphatasia and the Role of Alkaline Phosphatase in Skeletal Mineralization*. Endocrine reviews, 1994. **15**: p. 439-461.
17. Dymrna Harmey, L.H., Sonoko Narisawa, Kirsten A. Johnson, Robert Terkeltaub, José Luis Millán, *Concerted Regulation of Inorganic Pyrophosphate and osteopontin by Akp2, Enpp1 and Ank*. American Journal of Pathology, 2003. **164**, No. 4: p. 1199-1209.
18. S. Y. Ali, S.W.S., H.C. Anderson, *Isolation and Characterization of Calcifying Matrix Vesicles from Epiphyseal Cartilage*. Proceedings of the National Academy of Sciences, November 1970. **67**, No.3: p. 1513-1520.

19. Manisha C Yadav, A.M.S.S., Sonoko Narisawa, Carmen Huesa, Marc D McKee, Colin Farquharson, José Luis Millán, *Loss of Skeletal Mineralization by the Simultaneous Ablation of PHOSPHO1 and Alkaline Phosphatase Function: A Unified Model of the Mechanisms of Initiation of Skeletal Calcification*. Journal of Bone and Mineral Research, 2011. **26**, No2: p. 286-297.
20. Zhang, Y., *Investigation of the role of ENPP1 and TNAP genes in chondrocalcinosis*. Rheumatology, 2007. **46**: p. 586-589.
21. Terkeltaub, R.A., *Inorganic Pyrophosphate Generation and Disposition in Pathophysiology*. American journal of Physiology - Cell Physiology, 2001. **281**: p. C1-C11.
22. Michael J. McKenna, T.A.H., Howard H. Sussman, *Comparison of Human Alkaline Phosphatase Isoenzymes*. Biochemical Journal, 1979. **181**: p. 67-73.
23. Yong, J.M., *Origins of serum alkaline phosphatase*. Journal of Clinical Pathology, 1967. **20**: p. 647-653.
24. Millán, J.L., *Alkaline Phosphatases; Structure, substrate specificity and functional relatedness to other members of a large superfamily of enzymes*. Purinergic signaling 2006. **2**: p. 335-341.
25. Orimo, H., *The Mechanism of Mineralization and the role of alkaline Phosphatase in Health and Disease*. Journal of Nippon Medical School, 2010. **77**: p. 4-12.
26. Fishman, W.H., *Perspectives on Alkaline Phosphatase Isoenzymes*. American Journal of Medicine, 1974. **56**: p. 617-650.
27. Le Du, M.H., *Crystal Structure of Alkaline Phosphatase from Human Placenta at 1.8 Å Resolution*. The Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**: p. 9158–9165.
28. Mornet, e.a., *Structural Evidence for a Functional Role of Human Tissue Nonspecific Alkaline Phosphatase in Bone Mineralization*. The Journal of Biological Chemistry, 2001. **33**(17): p. 31171–31178.
29. Weiss, M., *First identification of a gene defect for hypophosphatasia: evidence that alkaline phosphatase acts in skeletal mineralization*. Connective Tissue Research, 1989. **21**: p. 99-104.
30. Fedde, K.N., *Alkaline Phosphatase Knock-Out Mice Recapitulate the Metabolic and Skeletal Defects of Infantile Hypophosphatasia*. Journal of Bone and Mineral Research, 1999. **14**: p. 2015-2026.
31. R. G. G. RUSSELL, S.B., A. DONATH, D. B. MORGAN, H. FLEISCH, *Inorganic Pyrophosphate in Plasma in Normal Persons and in Patients with Hypophosphatasia, Osteogenesis Imperfecta, and Other Disorders of Bone*. The Journal of Clinical Investigation, 1971. **50**: p. 961-969.
32. Russell, *Excretion of inorganic pyrophosphate in hypophosphatasia*. Lancet, 1965. **2**: p. 461-464.
33. Clayton, P.T., *B6-responsive disorders: A model of vitamin dependency*. J Inherit Metab Dis, 2006. **29**: p. 317-326.
34. Micheal P. Whyte, J.D.M., Kenton N. Fedde, F. Sessions Cole, Edward R.B. McCabe and Stephen P. Coburn, *Perinatal Hypophosphatasia: Tissue Levels of Vitamin B6 Are Unremarkable Despite Markedly Increased Circulating Concentrations of Pyridoxal-5'-Phosphate*. J. Clin. Invest., 1988. **81**: p. 1234-1239.
35. Löffler, P., Heinrich, ed. *Biochemie & Pathobiochemie*. Vol. 8. 2007, Springer Verlag.
36. Clayton, P.T., *B6-responsive disorders: A model of vitamin dependency*. Journal of Inherited Metabolic Disease, 2005. **29**: p. 317-326.
37. Graser S., M.B., Schneider D., Klein-Hitpass L., Jakob F., Hofmann C., *Overexpression of tissue-nonspecific alkaline phosphatase increases the expression of neurogenesis*

- differentiation markers in the human SH-SY5Y neuroblastoma cell line.* Bone, October 2015. **79**: p. 150-161.
38. Anderson, H.C.e.a., *Sustained osteomalacia of long bones despite major improvement in other Hypophosphatasia-related mineral deficits in tissue nonspecific alkaline phosphatase/nucleotide pyrophosphatase phosphodiesterase 1 double-deficient mice.* American Journal of Pathology, 2005. **166**: p. 1711-1720.
 39. Beck, C., *How can calcium pyrophosphate crystals induce inflammation in hypophosphatasia or chronic inflammatory joint diseases?* Rheumatology International, 2009. **29**: p. 229-238.
 40. Pan, W., *Metabolic Consequences of ENPP1 overexpression in adipose tissue.* American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism, 2011. **301**: p. E901-E911.
 41. Suk Woo Nam, T.C., Young-Sik Kim, Andrew McMarlin, Elliott Schiffmann, Lance A. Liotta, and M.L. Stracke, *Autotaxin (NPP-2), a Metastasis-enhancing Motogen, Is an Angiogenic Factor.* Cancer Research, 2001. **61**: p. 6938-6944.
 42. Gijsbers, R., *Functional characterization of the non-catalytic ectodomains of the nucleotide pyrophosphatase/ phosphodiesterase NPP1.* Biochemical Journal, 2003. **371**: p. 321-330.
 43. Gijsbers, R., *Structural and Catalytic Similarities between Nucleotide Pyrophosphatases/phosphodiesterases and Alkaline Phosphatases.* The Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(January 12): p. 1361-1368.
 44. Stefan C, J.S., Bollen M., *NPP-type ectophosphodiesterases: unity in diversity.* Trend Biochem Sci, 2005. **30**: p. 542-50.
 45. Rutsch, F.e.a., *PC-1 Nucleoside Triphosphate Pyrophosphate Deficiency in Idiopathic Infantile Arterial Calcification.* American Journal of Pathology, 2001. **158**(2): p. 543-554.
 46. Andrew M. Ho, M.D.J., David M. Kingsley, *Role of the Mouse ank Gene in Control of Tissue Calcification and Arthritis.* Science, 2000. **289**: p. 265-270.
 47. Peter Nürnberg, H.T., David Chandler et al., *Heterozygous mutations in ANKH, the human ortholog of the mouse progressive ankylosis gene, result in craniometaphyseal dysplasia.* Nature Genetics, May 2001. **28**: p. 37-41.
 48. Charlene J. Williams, Y.Z., Andrew Timms et al., *Autosomal Dominant Familial Calcium Pyrophosphate Dihydrate Deposition Disease is caused by mutation in the Transmembrane Protein ANKH.* American Journal of Human Genetics, 2002. **71**: p. 985-991.
 49. Behzad Yeganeh, E.W., Sudharsana R. Ande, Pawan Sharma, Adel Rezaei Moghadam, Martin Post, Darren H. Freed, Mohammad Hashemi, Shahla Shojaei, Amir A. Zeki, Saeid Ghavami, *Targeting the mevalonate cascade as a newtherapeutic approach in heart disease, cancer and pulmonary disease.* Pharmacology & Therapeutics, 2014. **143**: p. 87-110.
 50. Joseph L. Goldstein, M.S.B., *Regulation of the mevalonate Pathway.* Nature Genetics, 1990. **343**: p. 425-430.
 51. James W. Clendening, A.P., Paul C. Boutros et al., *Dysregulation of the mevalonate pathway promotes transformation.* Proceedings of the National Academy of Sciences, August 24, 2010. **107 No. 34**: p. 15051-15056.
 52. Timothy F. Osborne, J.L.G., *5' end of hmg CoA reductase gene contains sequences responsible for cholesterol-mediated inhibition of transcription.* Cell, 1985. **42**(1): p. 203-212.
 53. Gregorio Gil, J.R.F., Daniel J. Chin et al., *Membrane-bound domain of HMG CoA reductase is required for sterol-enhanced degradation of the enzyme.* Cell, 1985. **41**(1): p. 249-258.

54. A.W. Alberts, J.C., G. Kuron, V. Hunt, J. Huff, C. Hoffman, J. Rothrock et al., *Mevinolin: a highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1980. **77 No.7**: p. 3957-3961.
55. Bouterfa H.L., S.V., *Inhibition of Ras farnesylation by lovastatin leads to downregulation of proliferation and migration in primary cultured human glioblastoma cells*. Anticancer Research, 2000. **20(4)**: p. 2761-2771.
56. Lewis K.A., H.S.A.H.R.J., *Lovastatin alters the isoprenoid biosynthetic pathway in acute myelogenous leukemia cells in vivo*. Leuk Res, 2005. **29(5)**: p. 527-33.
57. Beiqing Pan, A.N.F., Luen Bik To et al., *The Nitrogen-Containing Bisphosphonate, Zoledronic Acid, Influences RANKL Expression in Human Osteoblast-Like Cells by Activating TNF-Converting Enzyme*. Journal of Bone and Mineral Research, 2004. **19(1)**: p. 147-154.
58. Rogers, M.J., *New insights into the molecular mechanisms of action of bisphosphonates*. Current Pharmaceutical Design, 2003. **9(32)**: p. 2643-2658.
59. Dunstan Colin R., F.D., Seibel Markus J., *Therapy Insight: the risks and benefits of bisphosphonates for the treatment of tumor-induced bone disease*. Nature Clinical Practice, 2007. **4(1)**: p. 42-55.
60. Coxon Fraser P., e.a., *Protein Geranylgeranylation Is Required for Osteoclast Formation, Function, and Survival: Inhibition by Bisphosphonates and GGTI-298*. Journal of Bone and Mineral Research, 2000. **15(8)**: p. 1467-1476.
61. Ebert R, Z.S., Krug R, Meissner-Weigl J, Schenider D, Seefried L, Eulert J, Franz Jakob, *Pulse treatment with Zoledronic acid causes sustained commitment of bone marrow derived mesenchymal stem cells for osteogenic differentiation*. Bone, May 2009. **44(858-864)**.
62. Fournier Pierrick, B.S., Filleur Stéphanie, Gugliemi Julien, Cabon Florence, Colombel Marc, Clézardin Philippe, *Bisphosphonates Inhibit Angiogenesis in Vitro and Testosterone-stimulated Vascular Regrowth in the Ventral Prostate in Castrated Rats*. Cancer Research, 2002. **62(6538-6544)**.
63. Adam C, G.L., Ebert R, Goebeler M, Jakob F, Schmidt M., *The MEK5/ERK5 mitogen-activated protein kinase cascade is an effector pathway of bone-sustaining bisphosphonates that regulates osteogenic differentiation and mineralization*. Bone, Jun 2018. **111**: p. 49-58.
64. ATCC. *Cell Biology SAOS-2*. [Product Description]; Available from: <http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/Default.aspx?ATCCNum=HTB-85&Template=cellBiology>.
65. Promega, C. *Caspase-Glo® 3/7 Assay Systems*. Available from: <http://www.promega.com/~media/Files/Resources/Protocols/Technical%20Bulletins/101/Caspase-Glo%203%207%20Assay%20Protocol.pdf>.
66. Chin et al, C.-N., *Evidence that inhibition of Insulin receptor signaling activity by PC-1/ENPP1 is dependent on its enzyme activity*. European Journal of Pharmacology, 2009. **606**: p. 17-24.
67. La Roche Ltd, F.H.-. *PCR - Eine ausgezeichnete Methode*. Available from: http://www.roche.com/pages/facetten/pcr_d.pdf.
68. Dr. Wittke, D.G.P. *Polymerase Kettenreaktion*. Available from: http://www.mlhb.de/fileadmin/user_upload/Fachinfo/Laborinfo/Polymerase-Kettenreaktion_PCR_200405.pdf.
69. Hernando, P.M., *Alizarin red s staining as a screening test to detect calcium compounds in synovial fluid*. Arthritis & Rheumatism American College of Rheumatology, 2005. **26(2)**: p. 191-200.

70. Prof.Dr. Jakob, F., *Pulse treatment with zoledronic acid causes sustained commitment of bone marrow derived mesenchymal stem cells for osteogenic differentiation*. *Bone*, 2009. **44**: p. 858-864.
71. Ebert R, M.-W.J., Zeck S, Määttä J, Auriola S, Coimbra de Sousa S, Mentrup B, Graser S, Rachner TD, Hofbauer LC, Jakob F, *Probenecid as a sensitizer of bisphosphonate-mediated effects in breast cancer cells*. *Molecular Cancer*, 2014. **13**:265.
72. Slegers, H., *Ecto-nucleotide pyrophosphatase modulates the purinoceptor-mediated signal transduction and is inhibited by purinoceptor antagonists*. *British Journal of Pharmacology*, 2000. **130**: p. 139-145.
73. Lovisa Hessle, K.A.J., H. Clarke Anderson, Sonoko Narisawa, Adnan Sali, James W. Goding, Robert Terkeltaub, and José Luis Millán, *Tissue-nonspecific alkaline phosphatase and plasma cell membrane glycoprotein-1 are central antagonistic regulators of bone mineralization* *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2002. **99**(14): p. 9445-9449.
74. KRISTEN JOHNSON, A.M., YING CHEN, KENNETH PRITZKER, JAMES GODING, ROBERT TERKELTAUB, *Matrix Vesicle Plasma Cell Membrane Glycoprotein-1 Regulates Mineralization by Murine Osteoblastic MC3T3 Cells*. *Journal of bone and Mineral Research*, 1999. **14**(6): p. 883-892.
75. Lunguo Xia, z.Z., Lei Chen, Wenjie Zhang, Deliang Zeng, Xiuli Zhang, Jiang Chang, Xinquan Jiang, *Proliferation and osteogenic Differentiation of Human periodontal Ligament Cells on Akermanite and β -TCP Bioceramics*. *European Cells and Minerals*, 2011. **22**: p. 68-83.
76. Kate Cameron, P.T., Chaman Chander, Tom Buckland, Charlie Campion, Brendon Noble, *Directed osteogenic differentiation of Human mesenchymal Stem/Precursor Cells on Silicate substituted Calcium Phosphate*. *J Biomed Mater Res Part A*, 2013. **101**:A: p. 13-22.
77. Marco A. Alvarez Perez, V.G., Valentina Cirillo, Luigi Ambrosio, *In vitro mineralization and bone osteogenesis in poly(ϵ -caprolactone)/gelatin nanofibers*. *J Biomed Mater Res Part A*, 2012. **100A**: p. 3008-3019.
78. Oliver Frank, M.H., Marcel Jakob, Andrea Barbero, Dirk Schäfer, Igor Bendik, Walter Dick, Michael Heberer, and Ivan Martin, *Real-Time Quantitative RT-PCR Analysis of human Bone Marrow Stromal Cells during osteogenic Differentiation In Vitro*. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2002. **85**: p. 737-746.
79. Akifumi Nakamura, Y.D., Ph.d., Manabu Akahane, M.D., Ph.D., Hajime Ogushi, M.D., Ph.D. Hiroshi Nakajima, M.D., Ph.D. Hiroyuki Funaoka, M.S., and Yoshinori Takakura, M.D., Ph.D., *Osteocalcin Secretion as an early Marker of In Vitro osteogenic Differentiation of Rat Mesenchymal Stem Cells*. *Tissue Engineering: Part C*, 2009. **15**, **Number 2**: p. 169-180.
80. P. Günter Strauss, E.I.C., Jörg Schmidt, Volker Erfle, *Gene Expression during Osteogenic Differentiation in Mandibular Condyles in Vitro*. *The Journal of Cell Biology*, 1990. **110**: p. 1369-1378.
81. Isabelle Catelas, N.S., Benjamin M. Wu, James C.Y. Dunn, Sam Helgerson, and Bill Tawil, *Human Mesenchymal Stem Cell Proliferation and Osteogenic Differentiation in Fibrin Gels in Vitro*. *Tissue Engineering*, August 2006. **12**(8): p. 2385-2396.
82. Tasuku Saito, Y.S., Michiko Hori, Manabu Taguchi, Takashi Igarashi, Seiji Fukumoto, Toshiro Fujitab, *A patient with hypophosphatemic rickets and ossification of posterior longitudinal ligament caused by a novel homozygous mutation in ENPP1 gene*. *Bone*, 2011. **49**: p. 913-916.

83. Hwa Kyung nam, J.L., Yan Li, Andrew Kragor, Nan E. Hatch, *Ectonucleotide/Phosphodiesterase-1 (ENPP1) Protein Regulates Osteoblast Differentiation*. The Journal of Biological Chemistry, 2011. **286**(39059-39071).
84. Gagandeep Kaur, M.T.V., Jay D. Potts, Esmail Jabbari, Tara Sabo. Attwood, Quian Wang, *Regulation of osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells on 2D nanorod substrates*. Biomaterials, 2010. **31**(7): p. 1732-1741.
85. Thorsten Kirsch, H.J.K., Feffrey A. Winkles, *Progressive Ankylosis Gene (ank) Regulates Osteoblast Differentiation*. Cells Tissues Organs, 2009. **189**: p. 158-162.
86. Alexander N. Kapustin, C.M.S., *Osteocalcin: A Novel Vascular Metabolic and osteoinductive Factor*. Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology; Journal of the American Heart Association, August 12 2014. **31**: p. 2169-2171.
87. Anna idelevich, Y.R., Efrat Monsonego-Ornan, *Bone Gla Protein Increases HIF-1 α -Dependent Glucose Metabolism and Induces Cartilage and Vascular Calcification*. Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology; Journal of the American Heart Association, 2011. **31**: p. e55-e71.
88. A.J.Celeste, V.R., J.L.Buecker, R.Kriz, E.A. Wang and J.M. Wozney, *Isolation of the human gene for bone gla protein utilizing mouse and rat cDNA clones*. the EMBO Journal, 1986. **5 No. 8**: p. 1885-1890.
89. Yoon KG, R.S., Buenaga FR, Rodan GA, *Characterization of the rat osteocalcin gene: stimulation of promoter activity by 1, 25 dihydroxyvitamin D3*. Biochemistry, 1988. **27**: p. 8521-8526.
90. Rui Zhang, P.D., Gerard Karstenty, *1,25 Dihydroxyvitamin D3 Inhibits Osteocalcin Expression in Mouse through an Indirect Mechanism*. The Journal of Biological Chemistry, 1997. **272**: p. 110-116.
91. Patricia Ducy, R.Z., Valérie Geoffroy, Amy L. Ridall, Gérard Karsenty, *Osf2/Cbfa1: A Transcriptional Activator of Osteoblast Differentiation*. Cell, 1997. **89**: p. 747-754.
92. Patricia Ducy, C.D., Brendan Boyce, Gerald Pinero, Beryl Story, Colin Dunstan, Erica Smith, Jeffrey Bonadio, Steven Goldstein, Caren Gundberg, Allan Bradley, Gerard Karsenty, *Increased bone formation in osteocalcin deficient mice*. Nature, 1996. **382**: p. 448-452.
93. B. Ganss, R.H.K., J. Sodek, *Bone sialoprotein*. Critical Reviews in Oral Biology&Medicine; International and American Association for Dental Research, 1999. **10**(1): p. 79-98.
94. Bjorn R. Olsen, A.M.R., Wenfang Wang, *Bone Development*. Annual Review of Cell and Developmental biology, 2000. **16**: p. 191-220.
95. Patricia Ducy, C.D., Brendan Boyce, Gerald Pinero, Beryl Story, Colin Dunstan, Erica Smith, Jeffrey Bonadio, Steven Goldstein, Caren Gundberg, Allan Bradley, Gerard Karsenty, *Cbfa1: A Molecular Switch in Osteoblast Biology*. Developmental Dynamics, 2000. **219**: p. 461-471.
96. George R. Beck, J., Brad Zerler, and Elizabeth Moran, *Phosphate is a specific signal for induction of osteopontin gene expression* Proceedings of the National Academy of Sciences, 2000. **97 No.15**: p. 8352-8357
97. Kyonggeun Yoon, R.B., Gideon A. Rodan, *Tissue specificity and developmental expression of rat osteopontin*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1987. **148, No.3**: p. 1129-1136.
98. zhong-Liang Deng, K.A.S., Ni Tang, Wen-Xin Song, Jinyong Luo, Xiaoji Luo, Jin Chen, Erwin Bennett, Russell Reid, David Manning, Anita Xue, Anthony G. Montag, Hue H. Luu, Rex C. Haydon, Tong-Chuan He, *Regulation of osteogenic differentiation during skeletal development*. Frontiers in Bioscience, 2008. **13**: p. 2001-2021.
99. J.Sodek, B.G., M.D. McKnee, *Osteopontin*. Critical Reviews in Oral Biology&Medicine; International and American Association for Dental Research, 2000. **11**(3): p. 279-303.

100. Larry W. Fisher, S.W.W., Louis V. Avioli, John D. Termine, *Matrix Sialoprotein of Developing Bone*. The Journal of Biological Chemistry, 1983. **258 No. 20**: p. 12723-12727.
101. Chunlin Qin, J.C.B., Richard G. Cook, Ralph S. Orkiszewski, James P. Malone, Arthur Veis, William T. Butler, *Evidence for the Proteolytic Processing of Dentin Matrix Protein 1*. The Journal of Biological Chemistry, 2003. **278, No.36**(September 5): p. 34700-34708.
102. XinLi ZHU, C.L., Jack M. FERRIER, Jaro SODEK, *Evidence of ectokinase-mediated phosphorylation of osteopontin and bone sialoprotein by osteoblasts during bone formation in vitro*. Biochemical Journal, 1997. **323**: p. 637-643.
103. Ahnders Franzén, D.H., *Isolation and characterization of two sialoproteins present only in bone calcified matrix*. Biochemical Journal, 1985. **232**: p. 715-724.
104. Charles W. Prince, T.O., William T. Butler, Milan Tomana, Ajit S. Bhowan, Meera Bhowan, Ralph Schrohenloher, *Isolation, Characterization and Biosynthesis of a Phosphorylated Glycoprotein from Rat Bone*. The Journal of Biological Chemistry, 1987. **262, No.6**(Issue of February 25): p. 2900-2907.
105. Jinkun Chen, H.F.T., Jaro Sodek, *Regulation of Bone Sialoprotein and Osteopontin mRNA Expression by Dexamethasone and 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ in Rat Bone Organ Cultures*. Connective Tissue Research, 1996. **34, No.1** (41-51).
106. Elisabeth Larsson, B.L., Dick Heinegård, *Synthesis and Function of an O-Phosphorylated Peptide Corresponding to the Cell Adhesion Sequence of Bone Sialoprotein (BSP)*. Acta Chemica Scandinavia, 1993. **47**: p. 565-569.
107. Narisawa S, Y.M., Millán JL., *In vivo overexpression of tissue-nonspecific alkaline phosphatase increases skeletal mineralization and affects the phosphorylation status of osteopontin*. Journal of Bone and Mineral Research, 2013. **7**: p. 1587-98.
108. Jinkun Chen, H.S.S., Jeffrey L. Wrana, Shirley Reimers, Johannes N.M. Heersche, Jaro Sodek, *Localization of Bone Sialoprotein (BSP) Expression to Sites of Mineralized Tissue Formation in Fetal Rat Tissues by In Situ Hybridization*. Matrix, 1991. **11**: p. 133-143.
109. Martha J. Somerman, L.W.F., Ruth A. Foster, John J. Sauk, *Human Bone Sialoprotein I and II Enhance Fibroblast Attachment in Vitro*. Calcified Tissue International, 1988. **43**: p. 50-53.
110. Bellahcène A., A.N., Clause N., Tagliabue E., Fisher LW., Kerr JM., Castronovo V., *Detection of Bone Sialoprotein in human breast cancer tissue and cell lines at both protein and messenger ribonucleic acid levels*. Journal of Technical Methods and Pathology, 1996. **75**(2): p. 203-210.
111. Bellahcène, A., Kroll, M., Liebens, F., and Castronovo, V., *Bone Sialoprotein expression in primary human breast cancer is associated with bone metastases development*. Journal of Bone and Mineral Research, 1996. **11**: p. 665-670.
112. Akeila Bellahcène, S.M., Rosaria Bufalino, Louis Moreau and Vincent Castronovo, *Expression of bone sialoprotein in primary human breast cancer is associated with poor survival*. International Journal of Cancer, 1996. **69**: p. 350-353.
113. A. Bellahcène, M.-P.M., and V. Castronovo, *Expression of Bone Sialoprotein, a Bone Matrix Protein, in Human Breast Cancer*. Cancer Research, 1994. **54**: p. 2823-2826.
114. Åke Oldberg, A.F., Dick Heinegård, *The Primary Structure of a Cell-binding Bone Sialoprotein*. The Journal of Biological Chemistry, 1988. **263, No.36**: p. 19439-19432.
115. Chen J., S., Sodek J., *Developmental expression of bone sialoprotein mRNA in rat mineralized connective tissues*. Journal of Bone and Mineral Research, 1992. **7**: p. 987-997.

116. H.-Y. Zhou, H.T., R. Fujisawa, M. Mizuno, Y. Kuboki, *Stimulation by Bone Sialoprotein of Calcification on Osteoblast- Like MC3T3-E1 Cells*. *Calcified Tissue International*, 1995. **56**: p. 403-407.
117. Paolo Bianco, L.W.F., Marian F. Young, John D. Termine, Pamela Gehron Robey, *Expression of Bone Sialoprotein (BSP) in developing Human Tissues*. *Calcified Tissue International*, 1990. **49**: p. 421-426.
118. J. Chen, M.D.M., A. Nanci, J. Sodek, *Bone Sialoprotein mRNA expression and ultrastructural localization in fetal porcine calvarial bone: comparisons with osteopontin*. *Histochemical Journal*, 1994. **26**: p. 67-78.
119. Jonathan A.R. Gordon, C.E.T., Arthur V. Sampaio, T. Michael Underhill, Graeme K. Hunter, Harvey A. Goldberg, *Bone Sialoprotein expression enhances osteoblast differentiation and matrix mineralization in vitro*. *Bone*, 2007. **41**: p. 462-473.
120. Lawrence F. Brown, B.B., Livingston Van De Water, Ageliki Papadopoulos-Sergiou, Carole A. Perruzzi, Eleanor J. Manseau, Harold F. Dvorak, Donald R. Senger, *Expression and Distribution of Osteopontin in Human Tissues: Widespread Association with Luminal Epithelial Surfaces*. *Molecular Biology of the Cell*, 1992. **3**: p. 1169-1180.
121. Masaki Noda, R.L.V., Ann Marie Craig, Jean Prahl, Hector F. DeLuca, David T. Denhardt, *Identification of a DNA sequence responsible for binding of the 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor and 1,25-dihydroxyvitamin D3 enhancement of mouse secreted phosphoprotein 1 (Spp-1 or Osteopontin) gene expression*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1990. **87**: p. 9995-9999.
122. A.L. Boskey, M.M., W. Ullrich, S.B. Doty, W.T. Butler, C.W. Prince, *Osteopontin-hydroxyapatite interactions in vitro: inhibition of hydroxyapatite formation and growth in a gelatin-gel*. *Bone and Mineral*, 1993. **22**: p. 147-159.
123. Jeffrey A. Wesson, R.J.J., Marrilda Mazzali, Anne M. Beshensky, Susan Stietz, Ceci Giachelli, Lucy Liaw, Charles E. Alpers, William G. Couser, Jack G. Kleinman, Jeremy Hughes, *Osteopontin is a critical Inhibitor of Calcium Oxalate Crystal Formation and Retention in Renal Tubules*. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2003. **14**: p. 139-147.
124. William N. Addison, D.L.M., Jeffrey J. Gray, Marc D. McKee, *Phosphorylation-Dependent Inhibition of Mineralization by Osteopontin ASARM Peptides Is Regulated by PHEX Cleavage*. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2010. **25**, **No.4**: p. 695-705.
125. Susan A. Steitz, M.Y.S., Marc D. McKee, Lucy Liaw, Manuela Almeida, Hsueh Yang, Cecilia M. Giachelli, *Osteopontin Inhibits Mineral Deposition and Promotes Regression of ectopic Calcification*. *American Journal of Pathology*, 2002. **161**, **No.6**: p. 2035-2046.
126. Sonoko Narisawa, M.C.Y., José Luis Millán, *In Vivo Overexpression of Tissue-Nonspecific Alkaline Phosphatase Increases Skeletal Mineralization and affects the Phosphorylation Status of Osteopontin*. 2013.
127. Manisha C. Yadav, P., Carmen Huesa, PhD., Sonoko Narisawa, PhD., Marc F. Hoylaerts, PhD., Alain Moreau, PhD., Colin Farquharson, PhD., José Luis Millán, PhD., *Ablation of Osteopontin Improves the Skeletal Phenotype of Phospho1^{-/-} Mice; OR: Ablation of Spp1 ameliorates the scoliosis in Phospho 1^{-/-} Mice*. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2014.
128. Lucy Liaw, M.P.s., Elaine W. Raines, Russel Ross, David A. Cheresch, Stephen M. Schwartz, Cecilia M. Giachelli, *The Adhesive and Migratory Effects of Osteopontin Are Mediated via Distinct Cell Surface Integrins*. *Journal of Clinical Investigation*, 1995. **95**: p. 713-724.
129. Mary MacDougall, T.T.G., Xinghong Luan, Darrin Simmons, Jinkun Chen, *Identification of a Novel Isoform of Mouse Dentin Matrix Protein 1: Spatial Expression in Mineralized Tissues*. *Journal of Bone and Mineral Research*, 1998. **13**, **No. 3**: p. 422-431.

130. Anne George, B.S., Philip A.L. Simonian, Arthur Veis, *Characterization of a Novel Dentin Matrix Acidic Phosphoprotein; Implications for Induction of Biomineralization*. The Journal of Biological Chemistry, 1993. **168**, No. **17**(June 15): p. 12624-12630.
131. A. Gericke, C.Q., Y. Sun, R. Redfern, D. Redfern, Y. Fujimoto, H. Taleb, W.T. Butler, A.L. Boskey, *Different Forms of DMP1 Play Distinct Roles in Mineralization*. Journal of Dental Research, 2010. **89**(4): p. 355-359.
132. Barry M. Steiglitz, M.A., Karthikeyan Narayanan, Anne George, Daniel S Greenspan, *Bone Morphogenetic Protein-1/Tolloid-like Proteinases Process Dentin Matrix Protein-1*. The Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**, No. **2**(January 9): p. 980-986.
133. Pilippe H. Tartaix, M.D., Anne George, Larry W. Fisher, William T. Butler, Chunlin Qin, Erdjan Salih, Melin Tan, Yukiji Fujimoto, Lyudmila Spevak, Adele L. Boskey, *In Vitro Effects of Dentin Matrix Protein-1 on Hydroxyapatite Formation Provide Insights into in Vivo Functions*. The Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**, No. **18**(April 30): p. 18115-18120.
134. R.N. D'Souza, A.C., G. Sunavala, J. Alvarez, T. Ohshima, A.B. Kulkarni, M. MacDougall, *Gene Expression Patterns of Murine Dentin Matrix Protein 1 (DMP1) and Dentin Sialophosphoprotein (DSPP) Suggest Distinct Developmental Funstions In Vivo*. Journal of Bone and Mineral Research, 1997. **12**, No **12**: p. 2040-2049.
135. Sarah L. Dallas, M.P., Lynda F. Bonewald, *The Osteocyte: An Endocrine Cell...and More*. Endocrine Reviews, 2013. **34**(5): p. 658-690.
136. F. Francis, S.H., B. Korn, R. Reinhardt, P. de Jong, A. Poustka, H. Lehrach, P.S.N. Rowe, J.N. Goulding, T. Summerfield, R. Mountford, A.P. Read, E. Popowska, E. Pronicka, K.E. Davies, J.L.H. O'Riordan, M.J. Econs, T. Nesbitt, M.K. Drezner, C. Oudet, S.Pannetier, A. Hanauer, T.M. Strom, A. Meindl, B. Lorenz, M. Cagnoli, K.L. Mohnike, J. Murken, T. Meitinger, *A gene (PEX) sitch homologies to endopeptidases is mutated in patients with X-linked hypophosphatemic rickets*. Nature Genetics, 1995. **11**: p. 130-136.
137. Rong Guo, L.D.Q., *Cloning and Sequencing of Human PEX from a Bone cDNA Library: Evidence for Its Developmental Stage-Specific Regulation in Osteoblasts*. Journal of Bone and Mineral Research, 1997. **12**, No. **7**: p. 1009-1017.
138. Rowe, P.S.N., *The Wrickkened Pathways Of FGF23, MEPE and PHEX*. Critical Reviews in Oral Biology&Medicine, 2012. **15**(5): p. 264-281.
139. Dengshun Miao, X.B., Dibyendu Panda, Marc D. McKee, Andrew C. Karapalis, David Goltzman, *Osteomalacia in Hyp Mice Is Associated with Abnormal Phex Expression and with Altered Bone Matrix Protein Expression and Deposition*. Endocrinology, 2000. **142**, No.**2**: p. 926-939.
140. Valentin David, A.M., [...], Peter S.N. Rowe, *ASARM peptides: PHEX-dependent and -independent regulation of serum phosphate*. American Journal of Physiology - Renal Physiology, 2011. **300**(3): p. F783-F791.
141. Brigitte Ecarot, M.D., *1,25-(OH)₂D₃ Down-Regulates Expression of Phex, a Marker of the Mature Osteoblast*. Endocrinology, 1999. **140**, No.**3**: p. 1192-1199.
142. Andréa Frota Ruchon, M.M., Géraldine Siegfried, Harriet S. Tenenhouse, Luc DesGroseillers, Philippe Crine, Guy Boileau, *Pex mRNA Is Localized in Developing Mouse Osteoblasts and Odontoblasts*. The Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 1998. **46**(4): p. 459-468.
143. S.Christodoulou, T.G., A.Ververidis, G.Drosos *Vitamin D and Bone Disease*. BioMed Research International, 2012. **2013**.
144. Graser, S., *Analyse der gewebeunspezifischen Alkalischen Phosphatase in neuronalen Zellen*. 2012, Orthopädische Klinik König-Ludwig-Haus Würzburg.

145. Hannu Mönkkönen, P.D.O., Johanna Kuokanen, Jukka Mönkkönen, Seppio Auriola, Ingunn Holen, *Zoledronic acid-induced IPP/Apppl production in vivo*. Life Sciences, 2007. **81**(13): p. 1006-1070.
146. Sheldon M. Joseph, M.A.P., Ronald J. Przybylski, George A. Dubyak, *Methylene ATP analogs as modulators of extracellular ATP metabolism and accumulation*. British Journal of Pharmacology, 2004. **142**: p. 1002-1014.
147. Steven J. Charlton, C.A.B., Gary A. Weisman, John T. Turner, Laurie Erb, Michael R. Boarder, *PPADS and suramin as anagonists at cloned P_{2Y}- and P_{2U}- purinoceptors*. British Journal of Pharmacology, 1996. **118**: p. 704-710.
148. Li, C., *Novel Mechanism of Inhibition by the P2 Receptor Antagonist PPADS of ATP-Activated Current in Dorsal Root Ganglion Neurons*. Journal of Neurophysiology, 2000. **83, No.5**: p. 2533-2541.
149. Bert Grobben, P.C., Dirk Roymans, Edgard L. Esmans, Harry Van Onckelen, Herman Slegers, *Ecto-nucleotide pyrophosphatase modulates the purinoceptor-mediated signal transduction and is inhibited by purinoceptor antagonists*. British Journal of Pharmacology, 2000. **130**: p. 139-145.
150. Gregory D. Funk, R.K., Carmen Walsh, Janusz Lipski, Allison M. Comer, Majorie A. Parkis, Gary D. Housley, *P2 Receptor Excitation of Rodent Hypoglossal Motoneuron Activity In Vitro and In Vivo: a Molecular Physiological Analysis*. The Journal of Neuroscience, 1997. **17**(16): p. 6325-6337.

