

Aus der Orthopädischen Klinik und Poliklinik

der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. Maximilian Rudert

**Einfluss der Phosphodiesterase 10A auf cAMP-abhängige
Signalwege und deren Effekt auf osteogene Differenzierung und
Mechanotransduktion von mesenchymalen Stromazellen**

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Carolin Ege

aus Stuttgart

Würzburg, September 2023

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Regina Ebert

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Torsten Blunk

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 12.09.2023

Die Promovendin ist Ärztin

Meinen Eltern,
die mich immer unterstützt und motiviert haben.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1.Knochengewebe.....	1
1.2.Mesenchymale Stromazellen und deren osteogene Differenzierung	3
1.3.Mechanotransduktion	8
1.4.cAMP- und cGMP-abhängige Signalwege.....	12
1.5.Phosphodiesterasen.....	14
1.6.Osteoporose.....	19
1.7.Fragestellung.....	22
2. Material.....	23
2.1.Ethikvotum	23
2.2.Geräte	23
2.3.Verbrauchsmaterial	24
2.4.Chemikalien und Reagenzien	25
2.5.Kits.....	26
2.6.Verwendete Zellen bzw. Zelllinien	27
2.7.Verwendete Zellkulturmedien	27
2.7.1. hMSC-Medium.....	27
2.7.2. Osteogenes Differenzierungsmedium	28
2.7.3. hMSC-TERT-Medium	28
2.7.4. HEK293-Medium	28
2.8.Vektorkarten	29
2.8.1. Vektor pGL4.14.....	29
2.8.2. Vektor pGL4.29.....	29
2.8.3. Vektor pGL-AP1	30
2.8.4. Vektor pcDNA3.1	31
3. Methoden.....	32
3.1.Klonierung der Reporterkonstrukte.....	32
3.2.Expressionsklone.....	33
3.3.Zellbiologische Methoden.....	33

3.3.1. Zellkultur der humanen mesenchymalen Stromazellen.....	33
3.3.1.1. Zellisolation der hMSC	33
3.3.1.2. Zellkultur der hMSC.....	34
3.3.1.3. Zellzahlbestimmung der hMSC	34
3.3.1.4. Aussäen hMSC, osteogene Differenzierung und Stimulation	35
3.3.2. Zellkultur der HEK293-Zellen.....	35
3.3.3. Zellkultur hMSC-TERT und hMSC-TERT-AP-1.....	36
3.4. Alizarin Rot Färbung.....	36
3.5. Cyclic Stretching/mechanische Dehnung.....	37
3.5.1. Versuchsaufbau und Beschreibung des Bioreaktors	37
3.5.2. Ablauf der mechanischen Dehnung	38
3.6. Molekularbiologische Methoden.....	39
3.6.1. RNA-Isolierung.....	39
3.6.2. Herstellung von komplementärer Desoxyribonukleinsäure (cDNA)	40
3.6.3. Semi-quantitative Polymerase-Kettenreaktion - PCR.....	41
3.6.4. Agarosegelelektrophorese	44
3.6.5. Densitometrie.....	45
3.6.6. Real-time quantitative PCR (qPCR).....	45
3.7. Biochemische Methoden	47
3.7.1. Luciferase Reporter Assay-System	47
3.7.2. Bestimmung der Proteinkonzentration.....	48
3.8. Statistische Analyse.....	49
4. Ergebnisse	50
4.1. PDE10A Expression anhand von Mikroarray Daten und real-time PCR.....	50
4.2. Basaler Einfluss von Papaverin auf HEK293-CRE	52
4.3. Einfluss der Kombination von Papaverin und Forskolin auf HEK293-CRE-Zellen	55
4.4. Einfluss der PDE10A-Inhibition auf die osteogene Differenzierung der MSC.....	57
4.5. Einfluss der PDE10A Inhibition auf die Mineralisierung	63
4.6. Einfluss von PDE10A auf die Mechanotransduktion.....	65
4.6.1. Luciferasebestimmung bei gedehnten hMSC-TERT- und HEK293-Zellen.....	66
4.6.2. Analyse der Expression mechanoresponsiver Gene in hMSC-TERT-Zellen mit PDE10A Überexpression	68
5. Diskussion.....	70
5.1. Basaler Einfluss von Papaverin auf HEK293-CRE-Zellen	71

5.2. Einfluss der cAMP-abhängigen Signalwege und der Phosphodiesterase 10A auf osteogene Differenzierung von MSC	72
5.3. Phosphodiesterase 10A und Mechanotransduktion	74
5.4. Zusammenhang der PDE10A mit Alterungsprozessen und Krankheit.....	76
5.5. Interaktion von Phosphodiesterasen mit AKAPs, Zusammenhang mit Kompartimentierung	77
5.6. Ausblick.....	80
6. Zusammenfassung	81
7. Literaturverzeichnis	82
Appendix.....	91
I. Abkürzungsverzeichnis.....	
II. Abbildungsverzeichnis.....	
III. Tabellenverzeichnis.....	
IV. Ergänzende Materialien	
V. Danksagung.....	
VI. Eigene Veröffentlichung.....	

In dieser Arbeit wird aus Gründen der besseren Lesbarkeit das generische Maskulinum verwendet. Weibliche und anderweitige Geschlechteridentitäten werden dabei ausdrücklich mitgemeint, soweit es für die Aussage erforderlich ist.

1. Einleitung

1.1. Knochengewebe

Das Knochengewebe gehört zum Binde- und Stützgewebe des Körpers und formt in der Regel 210 abgrenzbare Knochen. Knochen haben eine schützende, sowie stützende Funktion, regulieren den Calciumstoffwechsel als Calciumreservoir und sind Ort der Blutbildung.

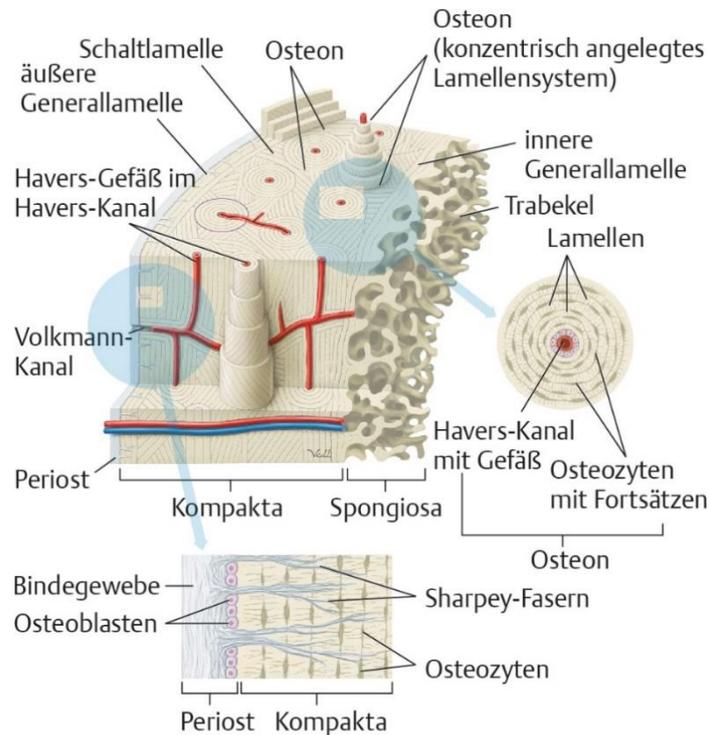
Zusammengesetzt wird das Knochengewebe aus 70-90 % anorganischen, mineralisierten Anteilen, bestehend aus 65 % Hydroxyapatitkristallen, zusätzlich Calciumcarbonat, Calciumhydrogenphosphat, Natrium- und Magnesiumionen und Fluoride; und zu 10-30 % aus organischen Anteilen. Der organische Anteil wird auch als Osteoid bezeichnet und besteht zu 90 % aus Kollagenfasern vom Typ I, der restliche Teil sind nicht-kollagene Proteine wie Osteocalcine, Glykoproteine, Proteoglykane, Albumin und Phosphoproteine (Young, 2003).

Man unterscheidet zwischen zwei Knochenformen: Geflecht- und Lamellenknochen. Bei der Knochenbildung entsteht zunächst der Geflechtknochen, dieser wird dann in Lamellenknochen umgewandelt. Der Lamellenknochen ist die überwiegende Form, er besteht aus zwei Schichten, der Substantia compacta, die die Wandung des Knochens bildet, und die Substantia spongiosa, die sich im Inneren des Knochens befindet und eine schwammartige Architektur zeigt. Äußerlich wird der Lamellenknochen vom Periost überzogen. Das Innere des Knochens, dazu gehören die Spongiosabälkchen und die Kompakta, werden von Endost überzogen.

Die Knochenmatrix der Kompakta besteht wiederum aus Untereinheiten, den sogenannten Osteonen. Diese sind zylindrisch geformt und orientieren sich an der Längsausrichtung des Knochens. In ihrer Mitte findet man den Havers-Kanal, um diesen Kanal liegen konzentrisch ausgerichtete Knochenlamellen, diese werden Speziallamellen genannt. In den Havers-Kanälen laufen Gefäße und Nervenfasern (siehe Abbildung 1). Die Osteone bilden den Ort, wo die Knochenzellen den Knochenumbau durchführen und

regulieren. Die Schaltlamellen füllen die Lücken zwischen den Osteonen und werden auch interstitielle Lamellen genannt.

Der größte Anteil der Knochenzellen besteht aus Osteozyten. Diese liegen zwischen den Schaltlamellen in Lakunen. Von dort verlaufen die dendritischen Ausläufer der Osteozyten innerhalb von Kanalikuli, womit sie über Gap Junctions in Verbindung mit anderen Knochenzellen treten können (Noble, 2008). Dies ist sehr wichtig, da das Knochengewebe einem ständigen Umbauprozess unterliegt, zwischen knochenabbauenden Aktionen der Osteoklasten und knochenaufbauenden Vorgängen der Osteoblasten. Dieser dynamische Prozess wird durch mechanische Belastung und durch verschiedene para- und endokrine Mechanismen (Sims and Gooi, 2008) wie beispielsweise durch die Metaboliten Parathormon, 1,25-Dihydroxy-Vitamin D₃ und diverse Wachstumsfaktoren reguliert, ebenso wie durch Zytokine (Ebeling and Akesson, 2001). Außerdem wurde durch Untersuchungen an Mäusen, denen entweder Osteoklasten oder Osteoblasten entfernt wurden, gezeigt, dass Knochenresorption auftritt, wenn Osteoblasten fehlen und umgekehrt, Knochenbildung tritt auf beim Fehlen von Osteoklasten (Corral et al., 1998). Eine weitere Rolle in der Knochenhomöostase spielen neuronale Zellen (Elefteriou, 2008), B-Lymphozyten (Horowitz and Lorenzo, 2007) und T-Lymphozyten (Gillespie, 2007).



Aus: Schünke M, Schulte E, Schumacher U. PROMETHEUS
LernAtlas der Anatomie. Illustrationen von Voll M und Wesker K. 5. Auflage.
Stuttgart: Thieme; 2018

Abbildung 1: Aufbau eines Lamellenknochens Aus „I care Anatomie Physiologie 2020“ Mit freundlicher Genehmigung des Georg Thieme Verlag nach Urheberrechts-Wissensgesellschafts-Gesetz https://www.thieme.de/statics/bilder/thieme/final/de/bilder/tw_pflegepaedagogik/Abb-5-11-Aufbau-des-Lamellenknochens.jpg

1.2. Mesenchymale Stromazellen und deren osteogene Differenzierung

Der Ursprung des Knochengewebes sind die Mesenchymalen Stromazellen (MSC). Mesenchymale Stromazellen sind nicht-hämatopoetische Stammzellen mit der Kapazität sich in unterschiedliche Zelltypen zu differenzieren.

Stammzellen, sind Zellen, die sich selbst erneuern können, indem sie die Fähigkeit behalten, zu proliferieren und zu differenzieren. Dies erfolgt, indem sich eine relativ undifferenzierte Zelle asymmetrisch teilt: in eine andere Stammzelle und in eine differenzierte Zelle. Der entscheidende Unterschied zwischen Proliferation und Selbsterneuerung ist also, dass bei der Selbsterneuerung mindestens eine Tochterzelle die gleiche Möglichkeit zur Entwicklung hat wie die Mutterzelle.

Man unterscheidet zwischen Embryonalstammzellen und adulten Stammzellen. Die embryonalen Stammzellen sind pluripotent, das bedeutet, sie können sich in (fast) jeden Zelltyp eines Organismus differenzieren. Sie haben also die breiteste Differenzierungskapazität und dienen dem Wachstum und Differenzierung in sämtliche Gewebe während der Embryonalentwicklung. Die adulten, bzw. somatischen Stammzellen sind multipotent, sie können sich zu verschiedenen Zellen innerhalb eines Gewebetypes differenzieren. Sie dienen der Regeneration im Erwachsenenalter (He et al., 2009). Durch die Stammzellen können sich bestimmte Gewebe reparieren oder rekonstruieren (Kolf et al., 2007, Bianco et al., 2008).

Ein Beispiel für die adulten, somatischen Stammzellen sind die mesenchymalen Stromazellen. Friedenstein et al. beschrieb diese Zellen erstmals als „nicht-hämatopoetische Stammzellen aus dem Knochenmark“, die sich fibroblastisch und in Kolonien entwickelten und daraufhin als CFU-F (engl. colony-forming unit fibroblasts) bezeichnet wurden. In weiteren Versuchen zeigte er außerdem, dass diese Zellen mesenchymal sein müssen, indem sie sich osteogen differenzieren ließen (Friedenstein et al., 1966). Erst später wurde von Caplan et al. der Begriff „mesenchymale Stammzelle“ eingeführt, indem sie zeigten, dass diese Zellen verschiedene Zelltypen bilden können, die sich aus dem Mesenchym entwickeln (Caplan, 1991). Das Mesenchym wiederum geht aus dem Mesoderm hervor, einem Keimblatt, welches während der Embryogenese entsteht. Pittenger et al. beschrieben 1999 dann das trilineare Potenzial der mesenchymalen Stammzellen sich in Fett, Knochen und Knorpel zu differenzieren (Pittenger et al., 1999). Mittlerweile wurde festgestellt, dass MSC aus dem Knochenmark in Osteozyten, Chondrozyten, Adipozyten und Myoblasten differenzieren können (Ranera et al., 2013, Gronthos et al., 1994, Muruganandan et al., 2009, Valtieri and Sorrentino, 2008) und es wurde von führenden Wissenschaftlern vorgeschlagen, MSC als „mesenchymale Stromazellen“ zu bezeichnen (Robey, 2017).

Es wurde außerdem erkannt, dass multipotente mesenchymale Stromazellen nicht nur im Knochenmark sondern in verschiedenen menschlichen Organen existieren (Crisan et al., 2008). Hierzu gehören die Plazenta (Igura et al., 2004), Zahnpulpa (Shi and Gronthos, 2003), Sehnen (De Bari et al., 2001, Bi et al., 2007), Fett, Skelettmuskulatur (Xu et al.,

2005), Nabelschnurblut (Rogers and Casper, 2004) und Fruchtwasser (Tsai et al., 2004). Da die MSC eine sehr heterogene Gruppe von Zellen sind, mit variierendem Differenzierungs- und Proliferationspotenzial, wurden von der „International Society for Cellular Therapy“ minimale Kriterien für die Charakteristika in vitro festgelegt: Erstens MSC müssen plastikadhärent sein. Zweitens sie müssen positiv für die spezifischen Oberflächenmarker CD73, CD90, CD105 sein, und negativ für CD14, CD34, CD45 und HLA-DR-Oberflächenmoleküle. Drittens müssen sie unter bestimmter Stimulation in vitro in Adipozyten, Chondrozyten und Osteoblasten differenzieren (Dominici et al., 2006).

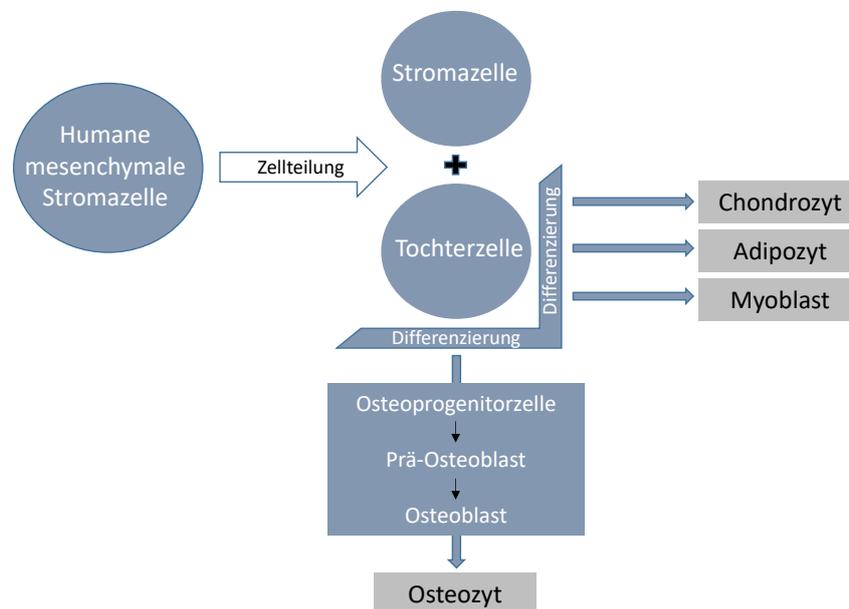


Abbildung 2: Darstellung der Differenzierungswege der humanen mesenchymalen Stromazellen (selbst erstellte Abbildung)

In Bezug auf diese Arbeit, wird im Folgenden näher auf die osteogene Differenzierung der mesenchymalen Stromazellen eingegangen.

Die klassische Methode, um die osteogene Differenzierung von MSC in Osteoblasten in vitro zu induzieren erfolgt durch die Zugabe von Dexamethason, Ascorbinsäure und β -Glycerophosphat zum Zellkulturmedium über 2-3 Wochen (Chamberlain et al., 2007). Dabei durchlaufen die mesenchymalen Stromazellen, ebenso wie in vivo, verschiedene Proliferations- und Differenzierungsphasen, um letztendlich die Knochensubstanz zu bil-

den, aus welcher im Organismus Knochen geformt wird. Die MSC werden zu Osteoprogenitor-Zellen, diese differenzieren in Prä-Osteoblasten und schlussendlich entwickeln sie sich in reife Osteoblasten. Die Osteoblasten haben im Knochen eine Lebensdauer von ungefähr drei Monaten. Dann gehen sie entweder in die Apoptose über oder werden in Osteoid eingelagert, wodurch sie zu Osteozyten werden (siehe Abbildung 2) (Uchihashi et al., 2013, Eriksen, 2010, Neve et al., 2011). Die Osteozyten bilden mit 90-95 Prozent den größten Anteil unter den Knochenzellen (Bonewald and Johnson, 2008). Die Osteoblasten sind verantwortlich für die Synthese und Mineralisierung von Knochen während der Knochenbildung und der Produktion und Aufrechterhaltung der skelettalen Architektur.

Über die Regulierung der osteogenen Differenzierung *in vivo* und *in vitro* herrscht noch Uneinigkeit zwischen verschiedenen Autoren und sie ist auch nur zum Teil verstanden. Dies hängt unter anderem damit zusammen, dass die *in vitro* Differenzierung nur ein 2D-Modell der dreidimensionalen Wirklichkeit darstellt. Bei der *in vivo* Differenzierung stehen die mesenchymalen Stromazellen in Wechselwirkungen mit etlichen anderen Zellen wie z.B. Epithelzellen oder Immunzellen, dies lässt sich aber nur schwierig nachstellen. Außerdem hängt die Regulierung und die Expression unterschiedlicher Gene offensichtlich damit zusammen, wie letztendlich differenziert wird, über welchen Zeitraum, welche Zellen benutzt werden, wie gemessen wird und zusätzlich spielt die Variabilität der Spender der mesenchymalen Stromazellen eine große Rolle.

Wie bereits beschrieben sind der Knochen und die osteogene Differenzierung sehr komplex und werden auf vielen verschiedenen Wegen beeinflusst. Ein Weg des Knochenaufbaus läuft über TGF- β -Rezeptoren, an welche die sog. osteogenen BMPs (engl. bone morphogenetic proteins) binden. Ein Weiterer ist der Wnt/Frizzled-Signalweg. Für diese Arbeit ein besonders wichtiger Signalweg läuft über die intermittierende Stimulation des Parathormonrezeptors Typ1 durch Parathormon und PTH-verwandte Peptide. Dies wiederum ist verbunden mit der Produktion der second messenger cAMP und cGMP, welche im Verlauf noch genauer beschrieben werden (Zhou et al., 2017).

Des Weiteren ist essentiell für die Regulierung der Osteogenese wahrscheinlich der Transkriptionsfaktor Cbfa1 (engl. core-binding factor α 1) (Ducy et al., 1997) der auch als

RUNX2 (engl. Runt-related transcription factor 2) bezeichnet wird (Yoshida et al., 2004), welcher zur sogenannten „runt domain gene family“ gehört. Die „runt domain“ ist eine Proteindomäne, welche entsprechend in *Drosophila* entdeckt wurde und als „*Drosophila* pair-rule gene runt“ benannt wurde. Diese „runt domain“ dient als DNA-Bindestelle und der Protein-Protein-Interaktion (Kania et al., 1990). Die genaue Rolle von RUNX2 ist noch unklar, jedoch konnte gezeigt werden, dass Mäuse mit fehlendem RUNX2 keinen Knochen bilden konnten und nur unreife Osteoblasten besaßen, ohne Produktion der spezifischen osteogenen Marker Osteocalcin und Osteopontin (Komori et al., 1997). Vermutlich reguliert RUNX2 die Expression von verschiedenen Osteoblasten-spezifischen Genen und spielt daher wahrscheinlich eine essentielle Rolle für die Osteogenese (Ducy et al., 1997).

RUNX2 wird auch als Hauptregulator für die Osteogenese bezeichnet. RUNX2 ist in Prä-Osteoblasten messbar, wird dann im Verlauf der Differenzierung in unreifen Osteoblasten hochreguliert und in reifen Osteoblasten wieder nach unten reguliert. Dies lässt darauf schließen, dass RUNX2 verantwortlich ist für die Induzierung der Differenzierung der MSC in unreife Osteoblasten. RUNX2 wird über die MAP-Kinasen (engl. mitogen-activated protein) phosphoryliert und dadurch aktiviert (Franceschi et al., 2003).

Auf transkriptioneller Ebene wird während des Stadiums der aktiven Proliferation das Gen Osteopontin exprimiert, da dieses Protein die Knochenmineralisation hemmt, sinkt dessen Expression direkt nach der Postproliferationsphase (Huang et al., 2004, Wei et al., 2017).

Nach Beendigung der Wachstumsphase der Osteoblasten werden weitere spezifische Gene exprimiert, dazu gehören die alkalische Phosphatase und Osteocalcin.

Osteocalcin wird in Osteoblasten nur in der Postproliferationsphase exprimiert, die maximale Expression erfolgt während der Mineralisierung, sowohl *in vivo* als auch *in vitro*, da Osteocalcin an Calcium und Hydroxyapatit bindet (Hauschka et al., 1989). Osteocalcin ist also ein Marker für reife Osteoblasten (Lian et al., 1989).

ALPL ist das Gen, welches für die alkalische Phosphatase codiert. Dieses Enzym kommt ubiquitär vor, zum Beispiel in Leber, Niere, Haut und wird auch im Knochen exprimiert,

wo es von Osteoblasten synthetisiert wird (Harris, 1990). Die alkalische Phosphatase initiiert die Knochenmineralisation indem sie freies Phosphat zur Verfügung stellt und wird daher in dieser Phase unter physiologischen Bedingungen maximal exprimiert (Bellows et al., 1991). Die alkalische Phosphatase gilt als früher Marker der Osteoblasten und ist hochspezifisch für deren knochenbildende Aktivität (Lian and Stein, 1995).

Die MSC bieten aufgrund ihrer bereits erwähnten Eigenschaften wie z.B. hohes Differenzierungspotenzial und schnelle Proliferation über einen längeren Zeitraum eine gute Quelle an Zellen für verschiedenste experimentelle Versuche.

Des Weiteren ist es auch möglich, die MSC mittels Telomerase Reverser Transkriptase zu immortalisieren, wodurch sie unlimitiert repliziert werden können, keine Seneszenz, keinen Zellzyklusarrest und keine Apoptose zeigen. Diese Zellen werden im Folgenden als sog. hMSC-TERT-Zellen bezeichnet und dienen wegen oben genannten Gründen als Modell für die mesenchymalen Stromazellen.

1.3. Mechanotransduktion

Die Mechanotransduktion bezeichnet die Umwandlung von physikalischen Reizen in biologische und biochemische Reaktionen. Diese Transduktion von mechanischen Signalen hat im Allgemeinen sowohl kurzfristige, also auch langfristige Folgen. Kurzfristig reguliert sie die Zellgestaltung, die Zellausbreitung und Migration. Langfristig steuert sie auch die Genexpression, Zelldifferenzierung, Proliferation bzw. Apoptose, und damit auch das Voranschreiten von Krankheiten wie Krebserkrankungen (Nelson and Bisell, 2006). Zu den möglichen Arten der mechanischen Stimulation gehören die Vibration, biophysikalische Kompression, Zugdehnung, Scherkräfte und hydrostatischer Druck (Haudenschild et al., 2009).

Der Mechanotransduktion vorangeschaltet ist die Mechanosensitivität. Diese beschreibt die Detektion mechanischer Reize wie Vibration oder Druck, indem beispielsweise lokale molekulare Änderungen der Krafteinwirkung zu Veränderungen von biochemischen Reaktionen führen. Die Festmachung der Änderungen geschieht meist rezeptorvermittelt (Vogel and Sheetz, 2006, Chen et al., 2017).

Die am stärksten mechanosensitiven Zellen des Knochens sind die Osteozyten, die wie bereits erwähnt in großer Zahl im Knochen vorkommen (Frost, 1987). Sie werden zwar in der mineralisierten Matrix eingebettet, behalten nichtsdestotrotz den Kontakt zu den benachbarten Zellen zu denen die Osteoblasten, andere Osteozyten und Endothelzellen gehören. Zum einen entsteht dieser Kontakt über die dendritischen Fortsätze der Osteozyten, die in den Kanalikuli verlaufen. Erreichen die Dendriten die anderen Zellen erfolgt die Kommunikation über Gap Junctions. Die Osteozyten wiederum werden stimuliert durch Bewegung der Flüssigkeit innerhalb der Kanalikuli, durch sogenannten „fluid shear stress“ (Mullender et al., 2004). Diese Scherkräfte bewirken in den Osteozyten einen Einstrom von extrazellulärem Ca^{2+} über spannungsgesteuerte und möglicherweise auch mechanosensitive Kanäle (Miyachi et al., 2000).

Zum anderen entsteht die Interaktion zu den anderen Zellen über die Sekretion von bestimmten Faktoren ins Knochenmark oder in den Blutkreislauf. Hierzu gehört zum Beispiel Sklerostin, welches in Abhängigkeit von mechanischer Belastung von den Osteozyten sezerniert wird. Das Gen SOST reagiert auf mechanische Belastung und dessen Produkt Sklerostin inhibiert den osteogenen WNT-Signalweg. Je geringer die einwirkenden physikalischen Kräfte sind, desto höher ist die Sklerostinsekretion und umgekehrt (Uda et al., 2017, Tu et al., 2012). Sprich bei einer verminderten bis ausbleibenden Sklerostinsekretion kommt es zu einer effektiven Knochenregeneration, eine starke Sklerostinsekretion führt wiederum dazu, dass keine Knochenbildung und keine Regeneration stattfinden können (Moester et al., 2010).

Außerdem reagieren die Knochenzellen auf mechanische Reize mit vermehrter Sekretion von Prostaglandin E₂, reguliert über die Freisetzung von ATP, und Stickstoffmonoxid, durch Stimulation der NO-Synthase (Sterck et al., 1998, Fan et al., 2004, Jee et al., 1990). Ein weiterer Regulator der Mechanotransduktion in den Osteozyten sind Signalwege, welche über Liganden-aktivierte Parathormon-Typ1-Rezeptoren (PTH1R) gesteuert werden und durch Parathormon und PTH-verwandte Peptide induziert werden (Maycas et al., 2015). Daraufhin werden beispielsweise cAMP-abhängige Signalwege über die Aktivierung der Adenylatzyklase und der Proteinkinase A beeinflusst. Auf den detaillierten Ablauf wird im Verlauf noch eingegangen.

Die wichtige Rolle der Osteozyten für die Mechanoresponsivität wurde erstmals in einer Evidenz-basierten Studie 2007 beschrieben. Hierbei wurden Mäuse untersucht, deren Osteozyten entfernt wurden. Diese Mäuse zeigten dysfunktionale Osteoblasten, sowie einen Verlust der Knochenmasse und Mikrofrakturen mit intrakortikaler Porosität (Tatsumi et al., 2007). Dies bedeutet wiederum, dass die Osteozyten die skelettale Homöostase und die Reaktion auf mechanische Belastung regulieren müssen, bzw. Osteozyten normalerweise die Aktivierung der Osteoklasten verhindern.

Neben den Osteozyten reagieren aber auch die Osteoblasten und die mesenchymalen Stromazellen auf mechanische Belastung (Ku et al., 2006).

Unlängst wurde herausgefunden, dass in Knochenzellen, beziehungsweise insbesondere in mesenchymalen Stromazellen der second messenger cAMP mechanisch ansprechbar ist. Die Umwandlung von mechanischen Signalen in MSC ist also cAMP-abhängig und wird unter anderem über die Adenylatzyklase 6 reguliert. Diese Signalwege stehen des Weiteren in Zusammenhang mit dem primären Zilium (Johnson et al., 2018). Das primäre Zilium ist ein alleinstehender, nur passiv beweglicher Zellfortsatz, also eine Ausstülpung der Zellmembran und existiert bei fast allen eukaryotischen Zellen. Das Gerüst des primären Zilium besteht aus Mikrotubuli. Es dient als Verbindungsglied zwischen intra- und extrazellulären Signalwegen und ist daher wichtig für zahlreiche zelluläre Vorgänge wie Gewebehomöostase, Regulierung und Wahrnehmung von physikalischen und chemischen Änderungen in der extrazellulären Umgebung. Im Knochen erfüllt das primäre Zilium zusätzlich eine mechanosensorische Rolle (Hoey et al., 2012).

Mit dem Ziel die bereits erwähnten cAMP-abhängigen Signalwege und insbesondere den Einfluss der Phosphodiesterase 10A auf die Mechanotransduktion zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene Zellarten und Zelllinien für die Versuche genutzt. Zum einen wurden hMSC-TERT-AP1 Zellen für die mechanischen Experimente genutzt, sowie HEK293-AP1 Zellen. Auf die Klonierung dieser Reporterkonstrukte und Etablierung der entsprechenden stabilen Zelllinien wird in einem späteren Kapitel eingegangen (siehe 3.1.). Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass durch zyklische Dehnung ein signifikanter Anstieg der Aktivatorprotein 1-vermittelten Luciferaseaktivi-

tät erreicht werden kann (Seefried et al., 2010). Das Aktivatorprotein 1 (AP1) ist ein unspezifischer Transkriptionsfaktor, welcher zusammengesetzt wird aus Genprodukten der Fos- und Jun-Familien. Diese Proteine wiederum werden verstärkt exprimiert, wenn ERK-Kinasen (engl. extracellular-signal regulated kinases) aktiviert werden, was zum Beispiel geschieht durch die Phosphorylierung der c-Jun-N-terminale Kinase (JNK). Letztendlich ist der Transkriptionsfaktor AP1 dann in der Lage, an die Promotorbindestellen von (unter anderem) mechanosensitiven Genen zu binden (Liedert et al., 2006).

Des Weiteren wurden die mechanoresponsiven Gene FOS und PTGS2 untersucht. Die Expression dieser Gene wird induziert durch mechanische Belastung. Diese wiederum wird vermittelt über den bereits erwähnten Transkriptionsfaktor AP1 und über den Transkriptionsfaktor CREB (engl. cAMP response element binding protein), die nach Aktivierung z.B. über Phosphorylierung an die Promotorregionen der PTGS2- und FOS-Gene binden. Diese Gene werden auch als sogenannte immediate-early genes bezeichnet. Der Name resultiert daher, dass sie in einem kurzen Zeitraum nach Eingehen eines Signals oder Reizes exprimiert werden (Ziouti et al., 2019a).

Die Mechanotransduktion und die dazugehörigen Signalwege sind deswegen von besonderer Wichtigkeit, da der menschliche Knochen auf mechanische Belastung mit ständigen Auf- und Abbauprozessen reagiert. Dieser fortwährende Prozess der Knochenumbauvorgänge wird auch „bone remodelling“ genannt. Bereits 1892 erkannte Wolff dies in seinem Gesetz der Transformation der Knochen, welches besagt, dass Knochen sich aufbaut und festigt, wenn er belastet wird und er bei Nicht-Belastung abgebaut wird. Über die alltägliche Belastung des Knochens wird die Knochenhomöostase und die Knochendichte reguliert, dies ist erforderlich, damit er die nötige Festigkeit und Stärke erlangt, um die einwirkenden Kräfte auch zu tragen.

In Bezug auf Alterung der Zellen gibt es keine Evidenz dafür, dass die Mechanosensitivität mit steigendem Alter abnehmen könnte (Klein-Nulend et al., 2002). Die Knochenzellen von osteoporotischen Patienten reagieren auf mechanische Belastung ebenfalls mit einem Anstieg von Prostaglandin E2 und NO, jedoch konnte gezeigt werden, dass die Zellen von osteoporotischem Knochen wohl beeinträchtigt sind in ihrer längerfristigen Reaktion auf mechanische Beanspruchung (Sterck et al., 1998).

1.4. cAMP- und cGMP-abhängige Signalwege

Wie bereits erwähnt spielen cAMP- und cGMP-abhängige Signalwege eine bedeutende Rolle in der Regulierung der Signalweiterleitung in der osteogenen Differenzierung sowie in der Mechanotransduktion (Doorn et al., 2012). Die Phosphodiesterasen sind ein wichtiger Bestandteil dieser Kaskade.

Zyklisches AMP (cAMP) und zyklisches GMP (cGMP) sind die Substrate der Phosphodiesterase 10A, auf welcher das Hauptaugenmerk in der vorliegenden Arbeit liegt. Zyklisches 3', 5'-Adenosinmonophosphat ist ein wichtiger sogenannter second messenger, der sowohl in Eukaryonten, also auch in Prokaryonten ubiquitär vorkommt (Botsford and Harman, 1992, Bolwell, 1995). Zyklisches AMP ist ein wichtiger intrazellulärer Botenstoff für die zelluläre Signaltransduktion. Die Signaltransduktion beschreibt einen Vorgang, bei welchem ein extrazelluläres Signal (also der first messenger wie Hormone oder Neurotransmitter) über Rezeptoren an der Plasmamembran in das Innere der Zelle geleitet wird, um dort dann eine spezifische zelluläre Reaktion hervorzurufen. Eine solche Reaktion könnte zum Beispiel die Auslösung von physiologischen und metabolischen Antworten durch die Aktivierung oder Hemmung bestimmter Proteine sein, aber auch die Regulation der Transkription bestimmter Zielgene (Sutherland and Rall, 1958).

Zyklisches AMP wird von Adenylatzyklasen synthetisiert (Linder and Schultz, 2008). Dies sind Transmembranenzyme, die sich in der Plasmamembran befinden und durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren aktiviert werden. Diese Rezeptoren bestehen aus sieben Transmembranhelices, woran ein extrazellulärer Ligand binden kann. Erfolgt diese Bindung kommt es zu einer Konformationsänderung der Helices, woraufhin eine Bindestelle für ein heterotrimeres G-Protein geschaffen wird. Das G-Protein besteht aus drei Untereinheiten: α , β und γ , wobei die letzten beiden genannten für die Verankerung des Trimers in der Membran verantwortlich sind.

Die α -Untereinheit des G-Proteins bindet an die nun geschaffene Bindestelle am Rezeptor, wodurch das G-Protein aktiviert wird und seine Konformation verändert. Das an die α -Untereinheit gebundene GDP dissoziiert ab und wird durch ein GTP ersetzt (Yeagle and Albert, 2003). Die nun aktive α -Untereinheit des G-Proteins kann unterschiedliche intrazelluläre Effektorproteine aktivieren, zum Beispiel wird so die Adenylatzyklase

durch stimulatorische G-Proteine aktiviert (Levitzki, 1988). Daraufhin katalysiert die Adenylatzyklase die Abspaltung von Pyrophosphat von ATP, sodass cAMP entsteht. Dieses cAMP nimmt eine zentrale Stelle für zelluläre Prozesse ein. Der Haupteffektor ist die cAMP-abhängige Proteinkinase A (Brostrom et al., 1970). Diese Proteinkinase hat viele verschiedene Funktionen, wobei hier nur ein kleiner Teil aufgezählt wird. Zum einen ist sie das Schlüsselenzym vieler Reaktionen im Intermediärstoffwechsel, reguliert teilweise die Hormonbiosynthese, aktiviert bestimmte Ionenkanäle und aktiviert den Transkriptionsfaktor CREB durch Phosphorylierung und Dimerisierung und stimuliert dadurch die Transkription cAMP-induzierbarer Gene (Mayr and Montminy, 2001). Zu diesen gehören beispielsweise die Zielgene FOS und JUN oder das bereits erwähnte RUNX2 und BMPR2 (engl. bone morphogenetic protein receptor 2), all diese unterstützen die Knochenformation und Frakturheilung (Impey et al., 2004, Zhou et al., 2017). Es gibt neben cAMP einen ähnlich aufgebauten weiteren second messenger: das zyklische 3', 5'-Guanosinmonophosphat, kurz cGMP. Dessen Synthese wird katalysiert durch die Guanylatzyklase aus Guanosintriphosphat (5'-GTP) (Hardman and Sutherland, 1969). Die Guanylatzyklase existiert in zwei verschiedenen molekularen Formen: Als lösliche, Häm-enthaltende Form, die sensitiv auf Stickstoffmonoxid (NO) (Moncada and Higgs, 1995) reagiert, und als Transmembranenzym, welches stimuliert wird durch natriuretische Peptide wie ANP (atriales natriuretisches Peptid) und BNP (engl. brain natriuretic peptide) (Chinkers et al., 1989, Waldman et al., 1984). Die wichtigste Zielstruktur des zyklischen GMP ist die Proteinkinase G (Pfeifer et al., 1999), welche zahlreiche physiologische Mechanismen vermittelt, wie zum Beispiel die Relaxierung der glatten Muskelzelle (Pfeifer et al., 1998).

1.5. Phosphodiesterasen

Die Hydrolyse und somit der Abbau der zyklischen Nukleotide wird katalysiert durch die Phosphodiesterasen, deren Aktivität erstmals 1962 von Butcher und Sutherland beschrieben wurde, kurz nach der Entdeckung der zyklischen Nukleotide (Butcher and Sutherland, 1962). Bei dem Abbau werden cAMP und cGMP in 5'-AMP- und 5'-GMP hydrolysiert, diese beiden Produkte besitzen jedoch nicht den gleichen biologischen Effekt. Die Aktivität der Phosphodiesterasen wird kurz- und langfristig reguliert als Antwort auf eine Vielzahl von Einflüssen wie Hormone, Neurotransmitter, Zytokine, Licht und oxidative Einflüsse (Francis et al., 2011).

Charakteristischerweise ähneln sich die Phosphodiesterasen in ihrem strukturellen Aufbau: Sie haben eine regulatorische NH₂-terminale Domäne und eine COOH-terminale C-Domäne, bestehend aus circa 250 Aminosäuren. Ungefähr zwischen 25-51 Prozent der Aminosäureabfolgen der C-Domänen sind identisch bei den verschiedenen Phosphodiesterasen, was jedoch nicht bedeutet, dass sie auch funktionelle Ähnlichkeiten haben (Francis et al., 2011). Die katalytische Domäne des Enzyms befindet sich in der Nähe des C-Terminus, die regulatorische Domäne hauptsächlich beim N-Terminus (Mehats et al., 2002). Die regulatorische Domäne enthält funktionelle Untereinheiten, wie Phosphorylierungsstellen, Bindungsstellen für Proteininhibitoren oder -aktivatoren, Dimerisierungsmotive und cAMP- bzw. cGMP-Bindestellen (Zoraghi et al., 2004).

Die Bindestelle für die zyklischen Nukleotide in den Phosphodiesterasen werden GAF-Domänen genannt, was die Abkürzung ist für cGMP-binding PDEs, Anabaena adenyl cyclase, and Escherichia coli FhIA. Diese Bezeichnung setzt sich aus den drei Proteinklassen zusammen, in denen diese Domänen entdeckt wurden: cGMP-spezifische Phosphodiesterasen, die Adenylatzyklasen aus dem Cyanobakterium Anabaena und dem Transkriptionsfaktor FhIA von E. coli (Zoraghi et al., 2004). Über diese zyklischen Nukleotidbindenden Domänen wird allosterisch die katalytische Aktivität der Enzyme reguliert. Mittlerweile sind 21 Gene im humanen Genom bekannt, die für Phosphodiesterasen codieren und mehr als 50 verschiedene PDE-Isoenzyme, die durch alternatives Spleißen und die Nutzung zahlreicher potentieller Transkriptionsstartstellen entstehen. Die Ex-

pression der PDE ist letztendlich abhängig vom Gewebe und dessen Differenzierung, jeder Zelltyp ist aber in der Lage verschiedene Arten der PDE zu exprimieren. Unterteilt werden können die Phosphodiesterasen in drei Gruppen anhand ihrer katalytischen Domäne:

Klasse I: kommt in Protozoen und Metazoen vor

Klasse II: kommt in Pilzen, Schleimpilzen und Amöben vor

Klasse III: ist vom β -Laktamase-Typ und kommt nur in den Phosphodiesterasen von *Dictyostelium discoideum* vor (Conti and Beavo, 2007).

Die erste Klasse wiederum kann bei Säugetieren anhand der Kinetik, Sequenzabfolge, Regulierung und der pharmakologischen Beschaffenheit in 11 weitere Unterfamilien eingeteilt werden (siehe Abbildung 3). Die Phosphodiesterasen 4, 7, 8 hydrolysieren selektiv nur cAMP, die PDE 5, 6, 9 sind selektiv für cGMP. Der Großteil der PDE, nämlich 1, 2, 3, 10 und 11 spalten beide zyklischen Nukleotide, allerdings mit unterschiedlicher Effizienz (Conti and Beavo, 2007). Für diese unterschiedliche regulatorische Beschaffenheit sind die verschiedenen N-terminalen Domänen der Phosphodiesterasen verantwortlich (Gross-Langenhoff et al., 2006), da diese Domänen assoziiert sind mit bestimmten Cofaktoren wie z.B. Kinasen, über welche die Gewebeexpression und subzelluläre Lokalisation der Phosphodiesterasen bestimmt wird (Scotland and Houslay, 1995).

EINLEITUNG

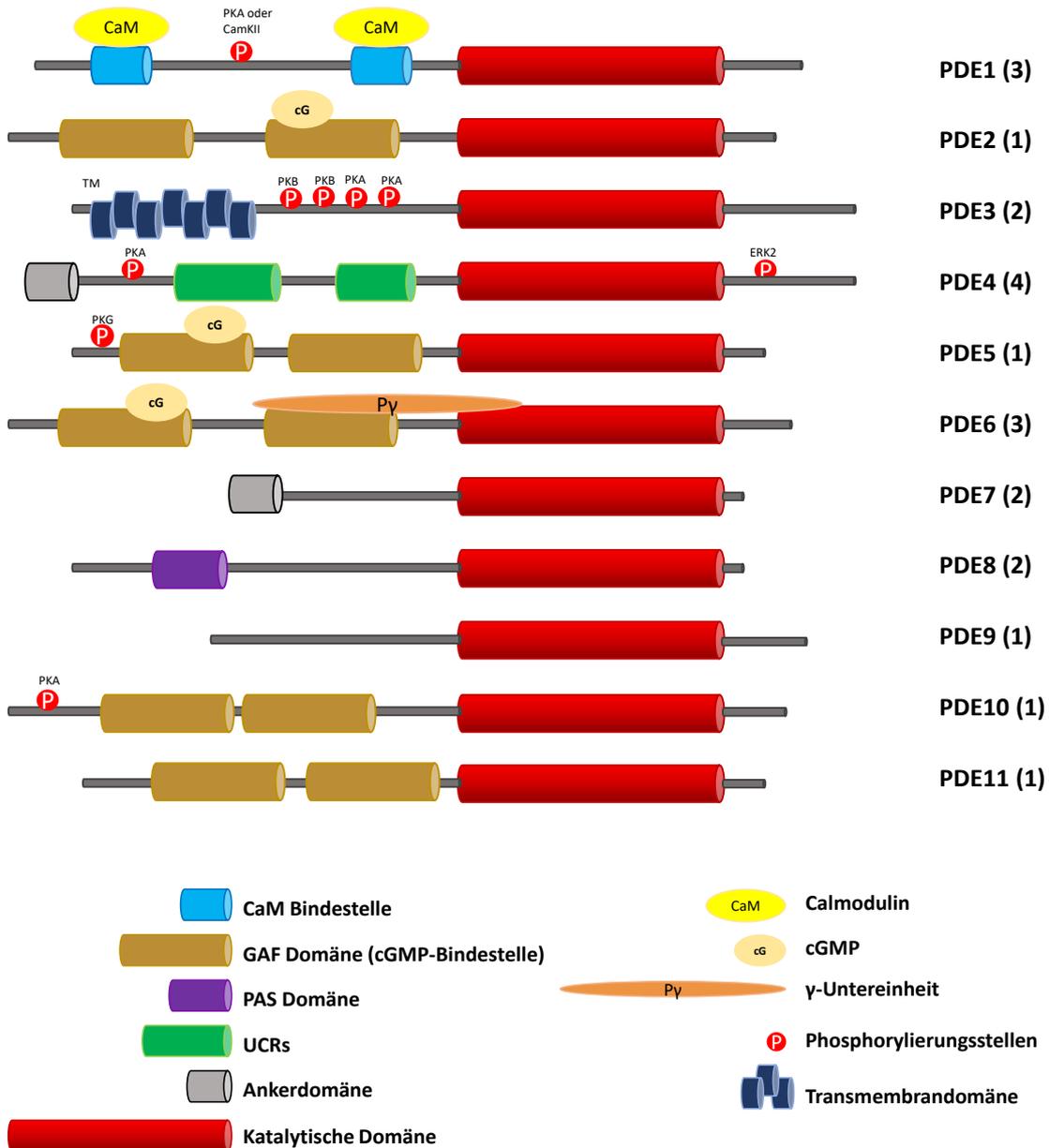


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Strukturen der 11 verschiedenen Phosphodiesterasen
Die Nummern in Klammern zeigen die Anzahl der Gene der zugehörigen Familie. Abkürzungen: CaM = Calmodulin, CamKII = calmodulin-regulated kinase II, cG = cGMP, ERK2 = extracellular-signal regulated kinase 2, Py = PDE γ Untereinheit, PKA = Proteinkinase A, PKB = Proteinkinase B, TM = Transmembrandomäne von PDE3, UCRs = upstream conserved regions, PAS = period ryl-hydrocarbon receptor nuclear translocator.

Modifiziert nach (Conti and Beavo, 2007)

Aufgrund ihrer Vielfalt, der unterschiedlichen Gewebeverteilung und der Breite der biologischen Funktionen, sind die Phosphodiesterasen ein mögliches Ziel für eine medikamentöse therapeutische Intervention. Weitverbreitet ist zum Beispiel der Einsatz von Phosphodiesterase-5-Inhibitoren zur Therapie der pulmonalen Hypertonie, da die PDE5

in der Lunge hoch exprimiert wird und über die Regulierung von cGMP die Kontraktion der glatten Muskulatur in den Gefäßen steuert. Eine hohe Expression der PDE5 findet sich außerdem im Corpus cavernosum des Penis, eine Hemmung dieser ist ein Angriffspunkt der Therapie der erektilen Dysfunktion (Croom and Curran, 2008, Hellstrom et al., 2003, Beavo, 1995). Des Weiteren wurde herausgefunden, dass Sildenafil, ein PDE5-Inhibitor, einen kardioprotektiven Effekt haben soll, wenn man es drei Tage nach einem Infarkt ereignis am Herzen über längere Zeit verabreicht. Möglicherweise könnte dies auch ein Angriffspunkt in der Therapie von fortgeschrittener Herzinsuffizienz sein (Chau et al., 2011). Die Vertreter der PDE5-Inhibitoren Sildenafil, Vardenafil und Tadalafil sind die Bekanntesten unter den Phosphodiesterasehemmern, jedoch gibt es beispielsweise auch PDE4-Inhibitoren (z.B. Roflumilast), die nach Inhalation einen antiinflammatorischen Effekt bei Patienten mit chronisch obstruktiver Lungenerkrankung zeigen (Singh et al., 2019). Zudem gibt es kleinere Studien, die einen Effekt des PDE4-Inhibitors Rolipram und der PDE5-Inhibitoren Avanafil und Sildenafil auf die Knochenaufrechterhaltung, -formation und die Frakturheilung beschreiben (Yao et al., 2007, Histing et al., 2011, Huyut et al., 2018)

In der folgenden Arbeit soll der Fokus vor allem auf der Phosphodiesterase 10A (PDE10A) liegen, diese wurde erstmals 1999 beschrieben (Fujishige et al., 1999a).

Über die Funktionen dieser Phosphodiesterase ist bisher nur recht wenig bekannt. Die Aminosäuresequenz der PDE10 beinhaltet 779 Aminosäuren, mit einer N-terminalen Sequenz, die vermutlich cGMP bindet. Die Aminosäure der katalytischen Domäne ist zu 16-47 Prozent identisch mit der Sequenz der anderen PDE-Familien (Fujishige et al., 1999b). Die PDE10A hydrolysiert sowohl cAMP als auch cGMP, hat jedoch eine höhere Affinität zu cAMP und eine höhere Effizienz mit cAMP als Substrat. Außerdem verhindert cGMP die Hydrolyse von cAMP und umgekehrt.

Es kann unterschieden werden zwischen drei Splicing-Varianten: PDE10A1 und A2, welche im menschlichen Körper gefunden wurden, und A3 welche bisher nur in Ratten identifiziert wurde (Coskran et al., 2006).

Lokalisiert ist die Familie der PDE10 vor allem in Gehirn, genauer im Striatum, Substantia nigra, Cerebellum, Thalamus, Hippocampus, Rückenmark und der Hypophyse. Aber auch

im Testis, cAMP spielt eine wichtige Rolle in der Spermatogenese (Sanborn et al., 1980), vermutlich ist die PDE10A über die Hydrolyse von cAMP auch in die Entwicklung der Spermatozyten involviert (Fujishige et al., 1999b, Goupil et al., 2016).

Des Weiteren ist die PDE10A nachweisbar in der Schilddrüse, in der gestreiften Muskulatur und im Herzmuskel (Bender and Beavo, 2006, Coskran et al., 2006). Neuere Erkenntnisse ergaben, dass die PDE10A ebenfalls in der Harnblase und der Niere lokalisiert ist (Coskran et al., 2006). Jedoch ist die Forschung hauptsächlich auf neurologische Studien fokussiert, wegen der überwiegenden Expression im Gehirn, und weil die Phosphodiesterase 10A vor allem assoziiert ist mit neurodegenerativen und psychiatrischen Krankheiten wie Chorea Huntington, Morbus Parkinson, Alzheimer Demenz, Schizophrenie und Angststörungen.

Papaverin, ein spezifischer PDE10A-Inhibitor, welcher natürlich vorkommt in der getrockneten Milch des Schlafmohns und weitere Inhibitoren werden bereits in vorklinischen Studien auf deren Wirksamkeit in der Therapie von Schizophrenie und Chorea Huntington getestet. Papaverin gilt hierbei als antipsychotische Alternative, die kognitive Defizite reduziert (Siuciak et al., 2006, Jankowska et al., 2019, Lee et al., 2019). Ähnliche Effekte werden vermutet für MP-10, ebenfalls ein selektiver Inhibitor der PDE10A. Sowohl Papaverin als auch MP-10 modulieren den striatalen Signalweg über Dopamin D1 direkt und Dopamin D2 indirekt, wodurch sie die Phosphorylierung von Glutamatrezeptoruntereinheiten im Striatum steuern. Dadurch sind die beiden Inhibitoren vermutlich in der Lage dopaminerge und glutamenerge Fehlfunktionen, wie sie in der Schizophrenie vorliegen, zu mildern (Grauer et al., 2009).

Neuere Studien lassen zudem vermuten, dass ein Inhibitor der PDE10A striatale Neuronen vor Degeneration schützt (Harada et al., 2017).

Ein weiterer Inhibitor der PDE10A-Aktivität ist Dipyridamol, dieser ist allerdings nur semi-selektiv und inhibiert außerdem die PDE5, PDE6, PDE7 und PDE8 (Bora et al., 2008).

1.6. Osteoporose

Osteoporose ist eine systemische Skeletterkrankung, die definiert ist durch eine niedrige Knochenmasse und einer mikroarchitektonischen Verschlechterung des Knochengewebes, mit daraus resultierendem Anstieg der Knochenfragilität und der Frakturneigung (Kanis, 1994, European Foundation of Osteoporosis, 1993). Von einer manifesten Osteoporose spricht man, wenn bereits Frakturen infolge der Osteoporose aufgetreten sind (Deutscher Verband Osteologie e.V. 2017 https://dv-osteologie.org/uploads/Leitlinie%202017/Finale%20Version%20Leitlinie%20Osteoporose%202017_end.pdf).

Der Zusammenhang zwischen der vorliegenden Arbeit und der Skeletterkrankung Osteoporose besteht darin, dass bei dieser möglicherweise eine Störung von cAMP-abhängigen Signalwegen, insbesondere der Phosphodiesterasen vorliegt, was wie bereits erwähnt, Einfluss nimmt auf die osteogene Differenzierung und Mechanotransduktion.

Die Osteoporose hat dem Dachverband Osteologie zufolge, welcher mehrere Studien aus Deutschland, Österreich und der Schweiz analysierte, eine hohe sozioökonomische Bedeutung, zumal sie in allen Populationen und allen Altersgruppen auftreten kann, jedoch vorwiegend bei postmenopausalen Frauen (National Institutes of Health, 2001).

Laut WHO 1994 wird eine Osteoporose als solche definiert, wenn der Knochenmineralgehalt einer DXA-Knochendichtemessung (engl. dual-energy x-ray absorptiometry) an der Lendenwirbelsäule und bzw. oder am proximalen Femur um mehr als 2,5 Standardabweichungen unterhalb des Mittelwerts einer 20-29-Jährigen liegt (Kanis, 1994). Diese Abweichung der Knochendichte wird als T-Score bezeichnet und in Standardabweichungen angegeben. Dieser T-Score kann auch auf Männer ab dem 50. Lebensjahr übertragen werden, jedoch bezieht er sich dann eben auf ein männliches Referenzkollektiv (Leslie et al., 2006).

Man kann die Osteoporose in zwei Formen unterteilen: die primäre und die sekundäre Osteoporose. Die primäre Osteoporose ist eine polygenetische Erkrankung, die gehäuft ab dem 40. Lebensjahr auftritt. Als Risikofaktoren gelten das Alter, genetische Prädisposition (Peacock et al., 2002), Bewegungsmangel und bei Frauen die Menopause. Daraus ergibt sich eine weitere Unterteilung der primären Osteoporose: in die postmenopau-

sale Osteoporose (Typ I), die senile Osteoporose (Typ II) und die idiopathische Osteoporose (häufigster Grund für Osteoporose bei jungen Männern, insgesamt aber selten) (Glaser and Kaplan, 1997, Giusti and Bianchi, 2015).

Die sekundäre Osteoporose wird hervorgerufen durch bestimmte Medikamente wie Glucocorticoide (sog. steroidinduzierte Osteoporose) oder durch bestimmte Erkrankungen wie primärer Hyperparathyreoidismus, Hypogonadismus, Zöliakie etc. (National Institutes of Health, 2001).

In dieser Arbeit soll der Fokus jedoch hauptsächlich auf der primären Osteoporose liegen, dessen größter Risikofaktor das Alter ist.

Osteoporotische Frakturen sind meist die Folge eines eher niedrigschwelligen Traumas, die Inzidenz der Frakturen wird aber zusätzlich noch erhöht durch zahlreiche Risikofaktoren. Als Wichtigster zählt hierzu die niedrige Knochenmasse (Hui et al., 1988). Prädiktoren für die geringe Knochenmasse sind das weibliche Geschlecht, Östrogenmangel, weiße Rasse, geringes Körpergewicht, positive Familienanamnese bezüglich Osteoporose, Rauchen und eine vorrangegangene Fraktur (National Institutes of Health, 2001). Im Gegensatz dazu geht Bewegung bzw. physikalische Aktivität im frühen Leben, mit starker Evidenz, mit einer höheren Knochenmasse und dadurch niedrigerem Risiko für eine osteoporotische Fraktur einher.

Die beiden Typen der primären Osteoporose lassen sich auch klinisch unterscheiden. Die postmenopausale Osteoporose ist vor allem gekennzeichnet durch Wirbelkörperbrüche, die senile Osteoporose durch Oberschenkelhalsfrakturen, Humerusfrakturen und Frakturen des distalen Radius. Generell ist die Osteoporose jedoch eine schleichende Erkrankung, die lange unerkannt bleibt, wenn überhaupt sich mit diffusen Rückenschmerzen zeigt, häufig bis zum Eintritt der ersten Fraktur. Oft handelt es sich um pathologische Frakturen, dies bedeutet, die Frakturen treten spontan auf ohne erkennbares Trauma. Diese Frakturen führen dann jedoch zu einer erhöhten Mortalität, vor allem kurz nach dem Frakturereignis und bis zu einem Jahr danach (Johnell et al., 2004). Die Patienten leiden unter einer deutlichen Abnahme der Lebensqualität, besonders bei hüftnahen Frakturen (Abrahamsen et al., 2009), zudem kommt es als Folge der Frakturen zu akuten und chronischen Schmerzen und funktionellen Einschränkungen

(Silverman et al., 2012). Des Weiteren bedeuten vor allem die Wirbelkörperfrakturen für die Gemeinschaft hohe Kosten und eine hohe ökonomische Belastung (Borgstrom et al., 2006).

Aufgrund dessen ist das große Ziel, die Osteoporose zu diagnostizieren und zu therapieren, bevor die erste Fraktur eintritt, bzw. nach der ersten Fraktur das Risiko für weitere Frakturen zu senken (Cosman et al., 2014).

Hierzu gibt der Dachverband Osteologie in den Leitlinien von 2017 und die National Osteoporosis Foundation Empfehlungen (Cosman et al., 2014). Zunächst sollten die Patienten auf das erhöhte Frakturrisiko hingewiesen werden. Sie sollten zu regelmäßiger körperlicher Aktivität animiert werden, wie beispielsweise angepasstes Krafttraining, um die Muskulatur zu kräftigen und die Knochenstabilität zu verbessern. Eine Immobilisation sollte unbedingt verhindert werden. Außerdem ist auf eine adäquate Aufnahme von Calcium (1000 mg/Tag) und Vitamin D (800 IE/Tag) zu achten. Falls dies über die Ernährung nicht möglich ist, können auch Supplemente eingenommen werden. Generell sollte Untergewicht wie auch Adipositas vermieden werden. Zusätzlich sollten Risikofaktoren für Stürze minimiert werden. Ein gemäßigter Alkoholkonsum und Beendigung des Rauchens sollte empfohlen werden.

Die medikamentöse Therapie der Osteoporose sollte spezifisch auf den Patienten abgestimmt werden, da es keine einheitliche Empfehlung diesbezüglich gibt und die Therapie abhängig ist vom Patientenalter, Frakturrisiko, Knochendichte u.ä. Die Effektivität der pharmakologischen Therapie ist am besten belegt bei Patientinnen mit postmenopausaler Osteoporose. Die Indikationen für die Therapie sind trotzdem breiter. Kurz zusammengefasst ist die medikamentöse Therapie bei einem T-Score mit größerer Negativität als -2,5 Standardabweichungen indiziert, bei einem 10-Jahres-Frakturrisiko von mehr als 30 Prozent bei Schenkelhals- und –Wirbelkörperfrakturen, bei postmenopausalen Frauen und Männer, die älter sind als 50 Lebensjahre mit niedriger Knochendichte und einem T-Score zwischen -1 und -2,5 und einem 10-Jahresfrakturrisiko von größer als 3%.

Zur Verfügung stehende Medikamente sind folgende: Bisphosphonate (z.B. Alendronat), Calcitonin, selektive Östrogenrezeptor-Modulatoren, Parathormon-Analoga (z.B. Teriparatid) und monoklonale Antikörper gegen RANKL, Ligand des Osteoklastenrezeptors (z.B. Denosumab).

Allgemein kann man sagen, dass alle Interventionen kosteneffektiv sind im Vergleich zu keiner Therapie bei postmenopausaler Osteoporose (Rahmani and Morin, 2009, Cosman et al., 2015).

1.7. Fragestellung

Das Ziel dieser Arbeit war es, herauszufinden, inwieweit im Besonderen die Phosphodiesterase 10A einen Einfluss nimmt auf die osteogene Differenzierung und die Mechanotransduktion von mesenchymalen Stromazellen und inwiefern sie dabei die cAMP-abhängigen Signalwege moduliert. Langfristig soll hiermit herausgefunden werden, welche Bedeutung die PDE10A auf altersinduzierte Krankheiten hat, wobei der Fokus zunächst auf der Osteoporose liegen soll.

Um dies zu erreichen, wurden experimentelle Versuche zunächst mit hMSC-TERT- und HEK293-Zellen als Modell für mesenchymale Stromazellen gemacht, da diese Zellen einfacher zur Verfügung stehen und im Falle der hMSC-TERT-Zellen durch Immortalisation mittels der Telomerase Reverse Transkriptase fast unlimitiert repliziert werden können und kaum Seneszenzzeichen zeigen.

Schließlich wurden Versuche dann auch mit den MSC selbst durchgeführt. Untersucht wurde der Einfluss des PDE10A-Inhibitors Papaverin auf die Zellen und auf deren mechanische Induzierbarkeit, sowieso auf die osteogene Differenzierung der MSC. Außerdem wurden weitere mechanische Versuche verwirklicht, zur Überprüfung des Effekts der Phosphodiesterase 10A.

2. Material

2.1. Ethikvotum

Für diese Arbeit ist ein Ethikvotum erforderlich mit folgender Antragsnummer: AZ-186/18

2.2. Geräte

Table 1: Liste der verwendeten Geräte mit Bezugsquelle

Absaugpumpe	KNF Neuberger GmbH, Freiburg
Autoclav VX-65	Systec GmbH, Linden
BioPhotometer D30	Eppendorf AG, Hamburg
CO ₂ -Inkubator HERAccl 240	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Fusion SL Vilber Lourmat	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
GloMax -Multi Detection Plate Reader	Promega GmbH, Madison, WI, USA
Kühlschrank -20 °C	Robert Bosch GmbH, Stuttgart
Kühlschrank 7 °C	Robert Bosch GmbH, Stuttgart
Kühlschrank -80 °C	Robert Bosch GmbH, Stuttgart
Luminometer Orion II Microplate	Berthold Detection Systems GmbH, Pforzheim
Mikroskop Wilovert	Helmut Hund GmbH, Wetzlar
Mikrowelle	Panasonic GmbH, Wiesbaden
PCR-Thermocycler peqSTAR	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Pipetten (0,5-10 µl)	Eppendorf AG, Hamburg
Pipetten (100-1000 µl)	ABIMED GmbH, Langenfeld
Pipetten (10-100 µl)	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettierhelfer accu-jet pro	Brand GmbH & Co KG, Wertheim
RealTime PCR-Thermocycler qTower ³ G	Analytik Jena AG, Jena
Sterilbank LaminAir HA 2472 GS	Heraeus Holding GmbH, Hanau

MATERIAL

Vortex MS2 Minishaker	IKA Works Inc., Staufen im Breisgau
Waage Scout II	OHAUS Europe GmbH, CH –Greifensee
Wasserbad GFL 1083	GFL, Burgwedel
Zählkammer Neubauer	Paul Marienfeld GmbH & Co.KG, Lauda Königshofen
Zentrifuge FugeOne Micro-Centrifuge	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Zentrifuge Mikro200	Hettich, Tuttlingen

2.3. Verbrauchsmaterial

Tabelle 2: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien mit Bezugsquelle

15 ml Röhrchen	Cellstar Tubes, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
50 ml Röhrchen	Cellstar Tubes, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Filterspitzen (DNase-, RNase-, DNA-, Py- rogenfrei 10 µl, 100 µl, 1250 µl)	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf
Glaspipetten (10, 20 ml)	Brand GmbH & Co KG, Wertheim
Mikroreaktionsgefäß (1,5, 2 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Multiwell-Platten (6-/24-Well-Platten)	Cellstar, Greiner Bio-One GmbH, Fricken- hausen
Pasteurpipetten (230 mm)	Kimble Chase, Rockwood, USA
PCR 8er Strips mit separatem Deckel- streifen, DNase-, RNasefrei	Biozym Biotech Trading GmbH, Wien
Pipettenspitzen (10, 200 µl)	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf
Pipettenspitzen (1000 µl)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Pipettenspitzen DNase-, RNasefrei (10, 100, 1000 µl)	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf

MATERIAL

qPCR 8er Strips weiß mit separatem Deckelstreifen, DNase-, RNasefrei	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
UV-Küvetten (220-1600 nm)	Eppendorf AG, Hamburg
Zellfilter (70 µm)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellkulturflaschen (25, 75 cm ²)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Zellkulturflaschen 150 cm ²	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellsieb (70 µm) EASYstrainer	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

2.4. Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 3: Liste der verwendeten Chemikalien und Reagenzien mit Bezugsquelle

100 DNA-Basenpaar-Marker	VWR International, Darmstadt
Agarose	Genaxxon Bioscience GmbH, Ulm
Alizarin Rot Farbstoff	Sigma-Aldrich GmbH, München
Ascorbinsäure (50 µg/ml)	Sigma-Aldrich GmbH, München
Dexamethason (100 nM)	Sigma-Aldrich GmbH, München
DMEM Zellkulturmedium (Dulbecco's modified eagle's Medium)	Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
DMSO (Dimethylsulfoxid)	PanReac AppliChem GmbH, Darmstadt
dNTP	Promega, Madison, WI, USA
Ethanol	PanReac AppliChem GmbH, Darmstadt
Forskolin	Sigma-Aldrich GmbH, München
Fötale Kälberserum (FCS)	Bio&Sell GmbH, Nürnberg
G418 (Geneticin)	PAA Laboratories, Linz, Österreich
GelRed	Genaxxon bioscience GmbH, Ulm
Gentamicin 50 µg/ml	Sigma-Aldrich GmbH, München
Hygromycin B 50 µg/ml	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

MATERIAL

Luciferase Reporter Assay-System (Luciferin 100 mg gelöst in 7,590 ml Puffer, Tricine 20 mM, EDTA 0,1 mM, ATP 5 mM)	Selbst hergestellter Puffer
Luciferin	PJK GmbH, Kleinbittersdorf
M-MLV Reverse Transkriptase	Promega, Madison, WI, USA
Oligo(dT)	Promega, Madison, WI, USA
Papaverin	Sigma-Aldrich GmbH, München
PBS (Phosphat-gepufferte Salzsäure)	PanReac AppliChem GmbH, Darmstadt
Penicillin 100 U/ml/Streptomycin 0,1 mg/ml	Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Pierce Luciferase Cell Lysis Buffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Pyruvat	Sigma-Aldrich GmbH, München
Roti-Quant	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
TRIS-Base (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-Base 10 mM, pH 7,5)	PanReac AppliChem GmbH, Darmstadt
Tris-Borat-EDTA-Puffer	PanReac AppliChem GmbH, Darmstadt
Trypanblau	Sigma-Aldrich GmbH, München
Trypsin-EDTA 0,05 %	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
β -2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich GmbH, München
β -Glycerophosphat (10 mM)	Sigma-Aldrich GmbH, München

2.5. Kits

Tabelle 4: Liste der verwendeten Kits mit Bezugsquelle

GoTaq qPCR Mix	Promega, Madison, WI, USA
NucleoSpin RNA II Kit	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren

2.6. Verwendete Zellen bzw. Zelllinien

Table 5: Beschreibung der primären Zellen und Zelllinien, welche für Versuche verwendet wurden

hMSC	5 verschiedene Spender: 1406, 1414, 1417, 1418, 1454 Das Verfahren wurde von der örtlichen Ethikkommission der Universität Würzburg genehmigt (186/18).
hMSC-TERT	Immortalisierte MSC
hMSC-TERT-AP1 (stabil)	hMSC-TERT mit pGL4.14 Vektor, in welchen AP1-Bindestelle kloniert wurde
hMSC-TERT-pcDNA (stabil)	hMSC-TERT mit Leervektor pcDNA
hMSC-TERT-PDE10A (stabil)	hMSC-TERT mit Vektor pcDNA, in welchen cDNA für Expression des Enzyms PDE10A kloniert wurde
HEK293-pGL (stabil)	HEK293-Zellen mit Leervektor pGL4.14
HEK293-CRE (stabil)	HEK293-Zellen mit Vektor pGL4.14, in welchen CRE-Bindestelle kloniert wurde
HEK293-AP1 (stabil)	HEK293-Zellen mit Vektor pGL4.14, in welchen AP1 Bindestelle kloniert wurde

2.7. Verwendete Zellkulturmedien

2.7.1. hMSC-Medium

DMEM F-12 (Dulbecco Modified Eagle Medium)	500 ml
Fötale Kälberserum	10 %
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	0,1 mg/ml
Ascorbat-2-Phosphat	50 µg/ml

2.7.2. Osteogenes Differenzierungsmedium

DMEM High Glucose (4,5 g/l)	500 ml
Fötales Kälberserum	10 %
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	0,1 mg/ml
Ascorbat-2-Phosphat	50 µg/ml
β-Glycerophosphat	10 mM
Dexamethason	100 nM

2.7.3. hMSC-TERT-Medium

DMEM F-12 (Dulbecco Modified Eagle Medium)	500 ml
Fötales Kälberserum	10 %
Gentamicin	50 µg/ml

2.7.4. HEK293-Medium

DMEM High Glucose	500 ml
Fötales Kälberserum	10 %
Pyruvat	1 mM
Hygromycin B	50 µg/ml

2.8. Vektorkarten

2.8.1. Vektor pGL4.14

In HEK293-Zellen wurde folgender Leervektor pGL4.14 eingebracht um stabil transfierte HEK293-Zellen zu generieren. Dieser ist ein Luciferase-Vektor und dient als Kontrollvektor.

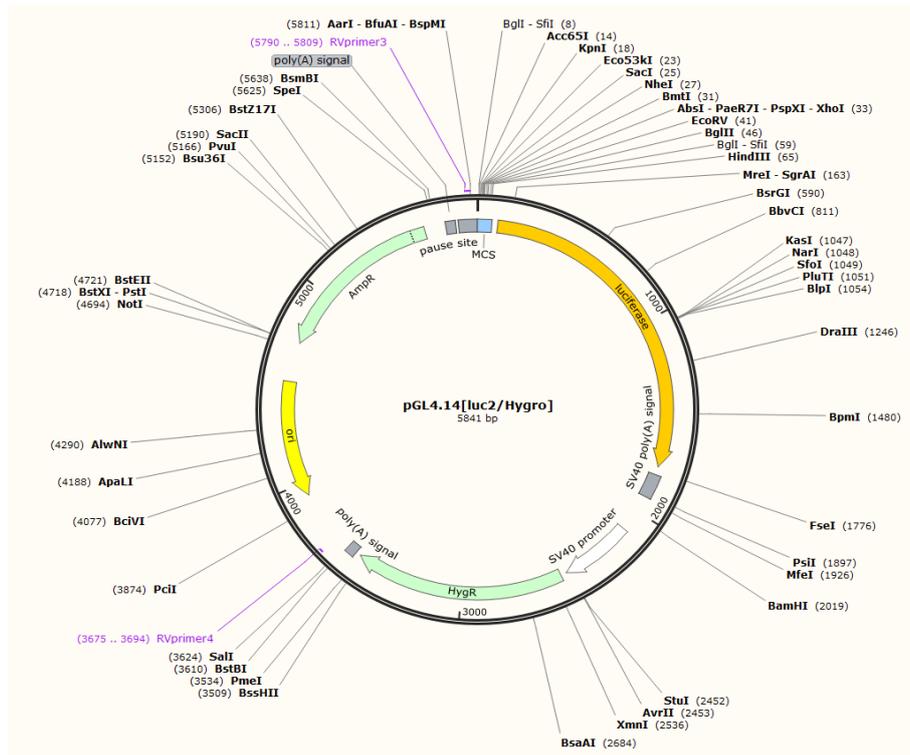


Abbildung 4: Vektorkarte des verwendeten Vektors pGL4.14

Die Sequenz wurde von Promega, Madison, WI, USA bezogen und die Vektorkarte mit der Software SnapGene erstellt. Das Plasmid enthält ein Hygromycin-Resistenzgen, welches der Selektion in Säugerzellen dient.

2.8.2. Vektor pGL4.29

Der Vektor pGL4.29 ist ebenfalls ein Luciferasevektor, dieser enthält drei Kopien des CRE-Elements, welche vor die codierende Sequenz der Luciferase des pGL4.14 eingebracht wurde, woraus sich der Vektor pGL4.29 ergab. Das CRE-Element ist eine spezifische Nukleotid-Sequenz der Abfolge TGACGTC in Promotoren, die vom Transkriptionsfaktor CREB (engl. cAMP response element binding protein) gebunden wird, was zu einer verstärkten Expression der entsprechenden Gene führt und man darüber beispielsweise dann cAMP messen kann.

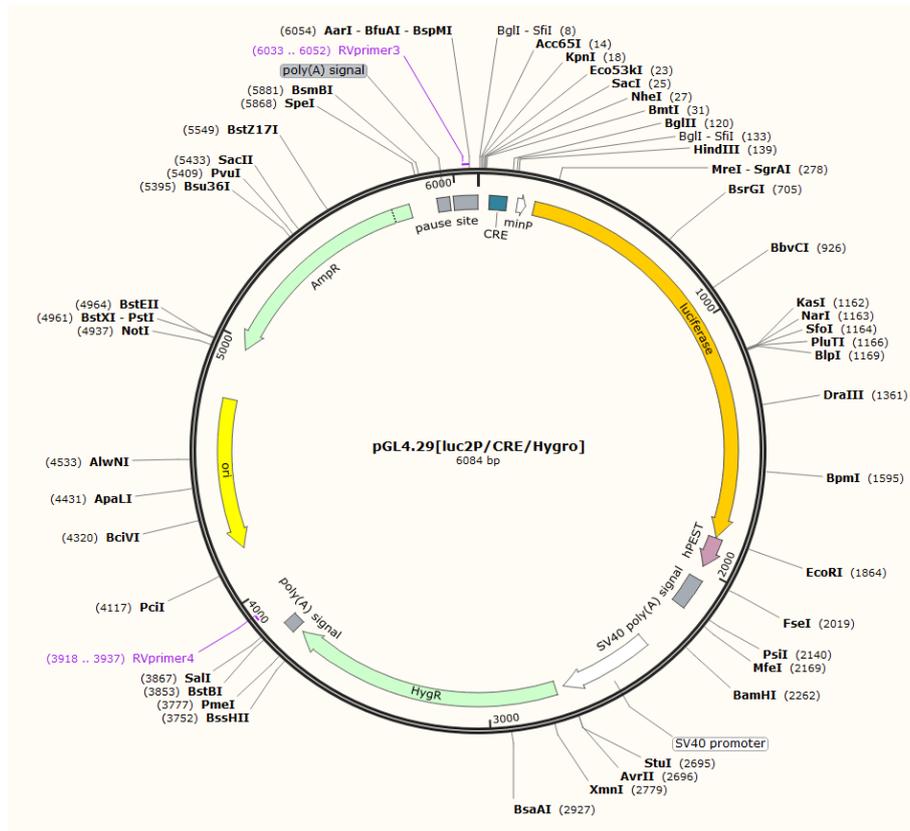


Abbildung 5: Vektorkarte des Vektors pGL4.29

Die Sequenz wurde von Promega, Madison, WI, USA bezogen und die Vektorkarte mit der Software SnapGene erstellt. Dieser Vektor enthält drei Kopien des CRE-Elements TGACGTC. Das Plasmid enthält ein Hygromycin-Resistenzgen, welches der Selektion dient.

2.8.3. Vektor pGL-AP1

Dieser Vektor besteht aus dem Vektor pGL4.14 (siehe Abbildung 4) plus folgende Sequenz, in welcher die Bindungssequenz für AP1 fett markiert ist:

For: ATC TGA CTC AGC ATG CAT GTG ACT CAG CTA
Rev: TAG CTG AGT CAC ATG CAT GCT GAG TCA GAT

2.8.4. Vektor pcDNA3.1

Der Leervektor pcDNA3.1 wurde in hMSC-TERT-Zellen stabil transfiziert, diente als Kontrolle für hMSC-TERT-Zellen und ist geeignet für die Überexpression in eukaryotischen Zellen mit CMV-Promotor.

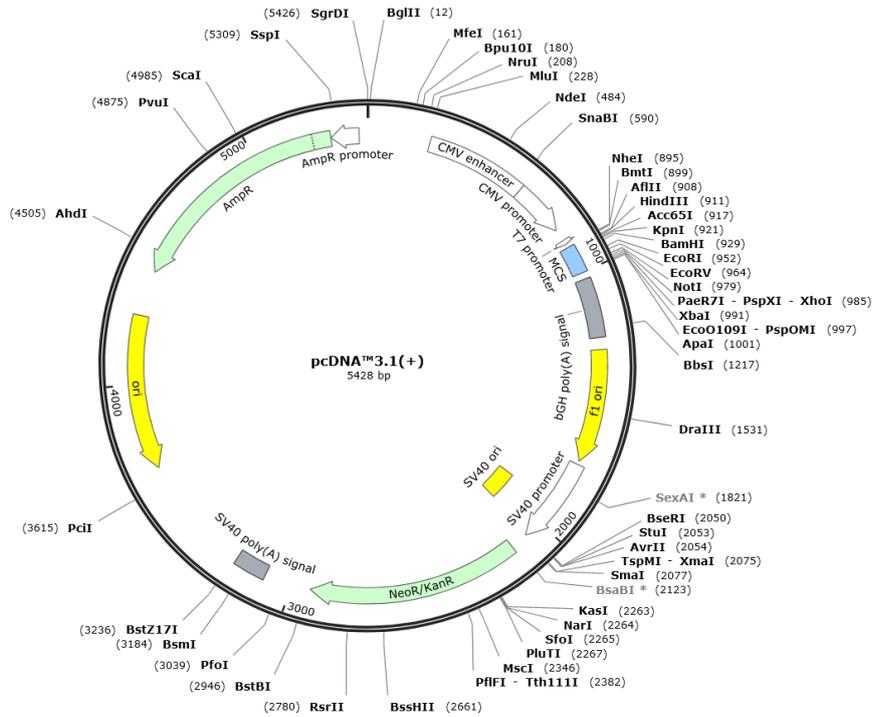


Abbildung 6: Vektorkarte des Vektors pcDNA3.1

Die Sequenz wurde von Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA bezogen und die Vektorkarte mit der Software SnapGene erstellt.

3. Methoden

3.1. Klonierung der Reporterkonstrukte

Zunächst wurden für verschiedene Versuche Reporterkonstrukte hergestellt, in denen ein Promotorelement vor ein Reporter gen kloniert wurde. Das Proteinprodukt des Reporters ist leicht zu messen. Man kann so Rückschlüsse auf die Expression verschiedener Gene ziehen, ohne dass eine mRNA, cDNA und schließlich eine PCR durchgeführt werden muss. Darüber hinaus sind die erhaltenen Ergebnisse einfach quantifizierbar und dadurch einfach zu vergleichen. Beispiele für Reportergene sind das *cat*-Gen, welches für das bakterielle Enzym Chloramphenicol Acetyltransferase codiert oder das *phoA*-Gen aus *E. coli*, das für die Alkalische Phosphatase codiert. Wir haben uns für Luciferase als Reporter gen entschieden, welches Luciferin, ein biolumineszentes Protein aus dem Leuchtkäfer *Photinus pyralis*, aus einer Vorstufe herstellt.

Hierzu wurden unter anderem eine Zelllinie aus humanen embryonalen Nierenzellen (HEK293-Zellen) verwendet. Im Zusammenhang mit den HEK293-Zellen wurden verschiedene Plasmide für funktionelle Analysen verwendet:

- a) Als Kontrolle wurde ein Minimalpromotor in dem Leervektor pGL4.14 verwendet.
- b) Zwei AP1-Bindungsstellen wurden subkloniert in den Luciferase-Reporter-Vektor pGL4.14 über XhoI und BamHI Restriktion um den Vektor pGL4.14-AP1 zu erhalten (Seefried et al., 2010).
- c) Außerdem wurde ein CRE enthaltendes-Oligonukleotid, an das der Transkriptionsfaktor CREB bindet, in den Leervektor pGL4.14 kloniert. Dieses Plasmid wurde käuflich erworben.

Diese Konstrukte wurden stabil in HEK293-Zellen transfiziert, was bedeutet, dass die Zellen beim Passieren das beinhaltete Vektorkonstrukt an die nachfolgenden Generationen weitergegeben wird. Dadurch dienen sie als vereinfachte Modelle für die im Folgenden erklärten Experimente.

Außerdem wurden die bereits erwähnten hMSC-TERT-Zellen verwendet. Diese Zellen stellen ein Modellsystem humaner mesenchymaler Stromazellen dar. Die Besonderheit

dieser Zellen ist, dass die Telomerase Reverse Transkriptase überexprimiert wird, wodurch die hMSC-TERT unlimitiert repliziert werden können, dadurch keinen Zellzyklusarrest oder Apoptose haben und kaum Seneszenzzeichen zeigen. Die erwähnten Reporterkonstrukte wurden ebenso zum gleichen bereits erwähnten Zweck stabil transkribiert.

Alle erwähnten Konstrukte und die stabilen Zellen wurden von der Arbeitsgruppe für die vorliegende Arbeit zur Verfügung gestellt.

3.2. Expressionsklone

Als Kontrolle der bereits erwähnten hMSC-TERT-Zellen dienten die hMSC-TERT-pcDNA-Zellen, die den Leervektor pcDNA enthalten.

Zusätzlich wurden in den Leervektor pcDNA die cDNA für die Expression des Enzyms PDE10A kloniert, wodurch man die so genannten hMSC-TERT-PDE10A erhält.

Diese Zellen wurden ebenfalls von der Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt.

3.3. Zellbiologische Methoden

3.3.1. Zellkultur der humanen mesenchymalen Stromazellen

3.3.1.1. Zellisolation der hMSC

Die primären humanen mesenchymalen Stromazellen wurden von verschiedenen Spendern aus dem Knochenmark nach einem standardisierten Protokoll isoliert (Noth et al., 2002). Das Knochenmark stammt aus den explantierten Hüftköpfen (Caput femoris) von Patienten, die eine elektive Hüftgelenksendoprothese in der Orthopädischen Klinik König-Ludwig-Haus Würzburg bekommen. Für die Verwendung der Zellen wurde das Einverständnis der Patienten eingeholt (Ethikvotum AZ-186/18). Die entnommene Spongiosa wurde zunächst mit hMSC-Zellkulturmedium allerdings ohne FCS gewaschen und anschließend bei 1200 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Dann wurde das entstandene Zellpellet wieder in frischem Medium ohne FCS resuspendiert und zusätzlich noch 4-mal gewaschen. Die so isolierten hMSC wurden mit einer Anfangszellzahl von 1×10^9 in einer Zellkulturflasche mit 175 cm² Größe ausgesät und kultiviert. Im folgenden Ergebnis- und

Diskussionsteil wird zur Vereinfachung der Bezeichnung der humanen mesenchymalen Stromazellen die Abkürzung MSC verwendet.

3.3.1.2. Zellkultur der hMSC

Die Zellkultivierung erfolgte in einem Brutschrank bei 37°C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂-Gehalt. Verwendet wurde das oben beschriebene hMSC-Zellkulturmedium, welches vor Gebrauch vorgewärmt wurde für einen möglichst schonenden Umgang mit den Zellen. Der Mediumwechsel fand alle 3-4 Tage statt. Bei einer Konfluenz des Zellrasens von 90 % wurden die Zellen im Verhältnis 1:3 gesplittet oder je nach Versuchsansatz ausgesät.

3.3.1.3. Zellzahlbestimmung der hMSC

Bei einer Konfluenz von circa 90 % erfolgte zunächst die Zellzahlbestimmung, um eine bestimmte Anzahl von Zellen pro Flächeneinheit aussähen zu können. Dazu mussten die Zellen zunächst abgelöst werden, indem sie erst mit PBS gewaschen wurden (Menge abhängig von Gefäßgröße), um alle Reste von Medium und FCS zu entfernen, und anschließend mit einer vorgewärmten Trypsin-Lösung bedeckt und für 10 Minuten inkubiert wurden. Nach der lichtmikroskopischen Kontrolle der Ablösung der Zellen, wurde die Zellsuspension dann in ein 50 ml-Röhrchen durch ein Zellsieb (70 µm) filtriert. Anschließend entnahm man 10 µl der Zellsuspension und vermischte diese mit 50 µl Trypanblau und 40 µl PBS. Von diesem Gemisch wurden circa 10 µl auf die Neubauer-Zählkammer gegeben und die Zellzahl noch lebender Zellen (nicht blau gefärbten Zellen) pro Quadrat ausgezählt. Anschließend wurde die Zellzahl nach folgender Gleichung bestimmt:

$$\text{Zellzahl pro ml} = \frac{\text{Anzahl der lebenden Zellen}}{\text{Anzahl der Quadrate}} \times 10^4 \times 2$$

3.3.1.4. Aussäen hMSC, osteogene Differenzierung und Stimulation

Für die spätere osteogene Differenzierung wurden die hMSC wie folgt ausgesät:

- a) in 5x 25 cm²-Zellkulturflaschen (für RNA-Isolierung), pro Flasche wurden hierzu 500.000 Zellen benötigt,
- b) in eine 6-Well-Platte (für Alizarin Rot Färbung), mit 200.000 Zellen pro Well.

Sobald die Zellen in den 25 cm²-Flaschen konfluent waren, meist nach einigen Tagen, erfolgte der Start der osteogenen Differenzierung und eventuell zusätzliche Stimulation mit Papaverin.

Für die osteogene Differenzierung wurde ein Differenzierungsmedium verwendet, welches im Unterschied zum normalen hMSC-Medium noch 4,5 g/l Glucose enthält. Zusätzlich wurden vor jedem Gebrauch die oben genannten Zusätze (siehe 2.7.2.) neu hinzu pipettiert, da diese eine begrenzte Haltbarkeit haben. Dadurch wurde die osteogene Differenzierung in Gang gesetzt.

Als Kontrolle des Tages Null wurde aus einer dieser fünf Zellkulturflaschen mit Hilfe eines Zellschabers die Zellen geerntet und anschließend daraus die RNA isoliert.

Eine weitere Flasche wurde als undifferenzierte Kontrolle behalten und nur im Wachstumsmedium ohne die Zusätze über 14 Tage weiter kultiviert. Eine weitere Flasche wurde ebenfalls nicht differenziert, aber mit Papaverin 10 µM stimuliert. Die zwei anderen Zellkulturflaschen wurden osteogen differenziert, eine davon zusätzlich mit Papaverin stimuliert. Die Differenzierung bzw. Stimulation erfolgte für 14 Tage, alle 3-4 Tage wurde das Medium inklusive aller Zusätze gewechselt.

3.3.2. Zellkultur der HEK293-Zellen

Für die Kultivierung der HEK293-Zellen wurde oben erwähntes HEK293-Zellkulturmedium verwendet. Die Zellen befanden sich in 75 cm²-Zellkulturflaschen.

Aufgrund der hohen Proliferationsrate der HEK293-Zellen, erfolgte die Passagierung der Zellen alle 3-4 Tage. Als erstes wurde das Zellkulturmedium abgesaugt, dann mit PBS gewaschen, um das übrige Serum/FCS restlos zu entfernen. Anschließend wurde der Zellrasen gleichmäßig mit der Trypsin-Lösung bedeckt. Die Abrundung und somit die Ablösung der Zellen wurde unter dem Lichtmikroskop kontrolliert und die Trypsinierung

mit Zellkulturmedium abgestoppt. Anschließend erfolgte das Splitten der Zellen im Verhältnis 1:6. Als letztes wurde Hygromycin B 50 µg/ml für die Selektion der stabil transfizierten Zellen hinzugegeben.

3.3.3. Zellkultur hMSC-TERT und hMSC-TERT-AP-1

hMSC-TERT Zellen sind mesenchymale Stromazellen, die mit Telomerase Reverser Transkriptase immortalisiert wurden. Sie zeigen eine hohe Proliferationsrate, verlieren dabei jedoch weder in vitro noch in vivo ihre Differenzierungskapazität (Simonsen et al., 2002, Abdallah et al., 2005). Sie wurden uns von der Gruppe von Moustapha Kassem (Odense, Dänemark) zur Verfügung gestellt.

Für die Kultivierung der Telomerase-immortalisierten MSC wurde ein hMSC-TERT-Medium verwendet. Die Zellen wurden circa 2-mal pro Woche im Verhältnis 1:4 gesplittet. Die hMSC-TERT-AP1 Zellen, die ein mechanoresponsives AP1-Luciferase-Reporterkonstrukt enthalten, wurden für die mechanischen Experimente genutzt, diese erhielten als Zellkulturzusatz Hygromycin, welches der Selektion der stabil transfizierten Zellen mit Hygromycin-Resistenzgen dient. Des Weiteren wurden hMSC-TERT-pcDNA-Zellen und hMSC-TERT-PDE10A-Zellen verwendet, diese erhielten zusätzlich G418 (Geneticin), welches der Selektion von Zellen mit Neomycin-Resistenzgen dient.

3.4. Alizarin Rot Färbung

Für die Detektion der osteogenen Differenzierung der MSC, anhand des Calciumhydrogenphosphats in der Extrazellulärmatrix wurde eine Färbung mit alkalischem Alizarin Rot S durchgeführt.

Zunächst wurde eine Lösung angesetzt von 1 % Alizarin Rot in 1 % verdünntem Ammoniak (0,35 g Alizarin Rot in 25 ml H₂O + 250 ml Ammoniak).

Dann wurden die Zellen mit PBS gewaschen, 10 min mit Methanol (-20 Grad Celsius) fixiert und anschließend mit destilliertem Wasser gewaschen. Danach erfolgte für 2 Minuten die Inkubation mit der Färbelösung und anschließend wurde 3-mal mit destilliertem Wasser gewaschen. Wenn sich das Wasser nicht mehr rot färbte, konnte die Platte an der Luft getrocknet werden. Anschließend wurde die Färbung unter dem Mikroskop bewertet.

3.5. Cyclic Stretching/mechanische Dehnung

3.5.1. Versuchsaufbau und Beschreibung des Bioreaktors

In mehreren Versuchsreihen wurden Zellen mechanisch mit Hilfe eines speziell dafür entwickelten Bioreaktors gedehnt, um deren Mechanosensitivität zu überprüfen.

Der Bioreaktor besteht aus mehreren Teilen: einem Computer, einer Messplatine, einem Messverstärker, einer Motorsteuerung und den Modulen für die Dehnung, wozu ein Kraftaufnehmer, ein linearer Schrittmotor und Fixierungsmöglichkeiten für die unterschiedlichen Gewebeproben gehören.

Der Reaktor ist mit einem Computer verbunden, welcher das Antriebsmodul steuert, und die Kräfte, die vom Kraftmesser während des Dehnungsprozesses registriert werden, aufzeichnet.

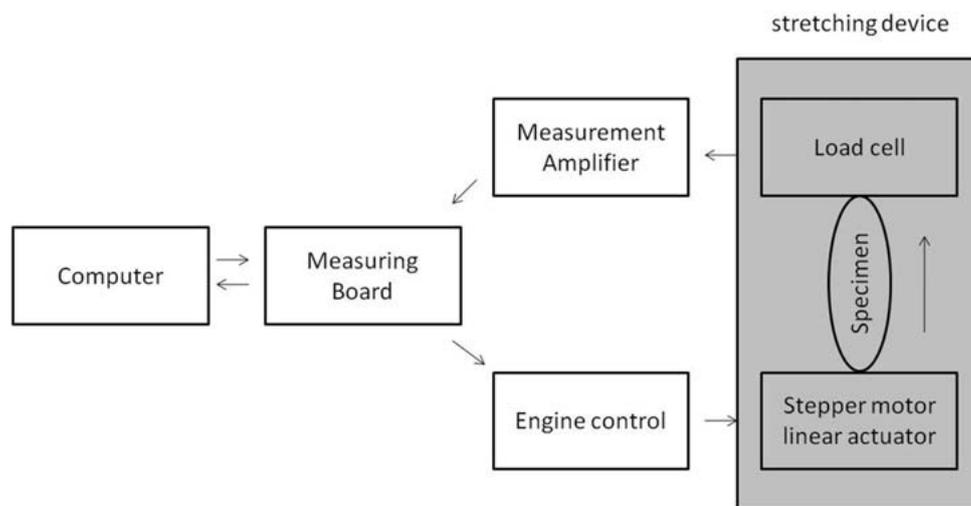


Abbildung 7: Schematische Darstellung des verwendeten Bioreaktors für die Dehnungsversuche. Aus dem Paper „a small scale cell culture system to analyze mechanobiology using reporter gene constructs and polyurethane dishes“ (Seefried et al., 2010) freundlicherweise zur Verfügung gestellt von den Autoren Seefried, Mueller-Deubert, Schwarz (unter der CC-BY-SA Lizenz).

Für die Dehnungsversuche werden Polyurethan-Platten verwendet mit 4 oder 24 Vertiefungen. Die Wandstärken und die Grundplattendicke sind unterschiedlich gewählt, sodass auf der gesamten von Zellen bewachsenen Fläche die annähernd gleiche Dehnung erfolgt (Seefried et al., 2010). Diese erlauben eine maximale Dehnung von circa 25 % bei 0,5 Hz und eine maximale Frequenz von 6 Hz bei 0,5 % Dehnung.

Der Bioreaktor und die PU-Platten wurden so konstruiert, dass eine Verwendung in einem konventionellen Inkubator unter Zellkulturbedingungen (37° C, 5 % CO₂, Luftfeuchtigkeit 95 %) möglich ist.

Des Weiteren gibt es eine individuell entwickelte Software, die den vollständigen Prozess der Stimulation sowieso die Datenerfassung durchführt. Über deren Nutzeroberfläche ist es möglich, verschiedenste Dehnungsprotokolle mit wechselnden Parametern wie z.B. variierende Amplitude oder Frequenz, o.ä. umzusetzen (Seefried et al., 2010).

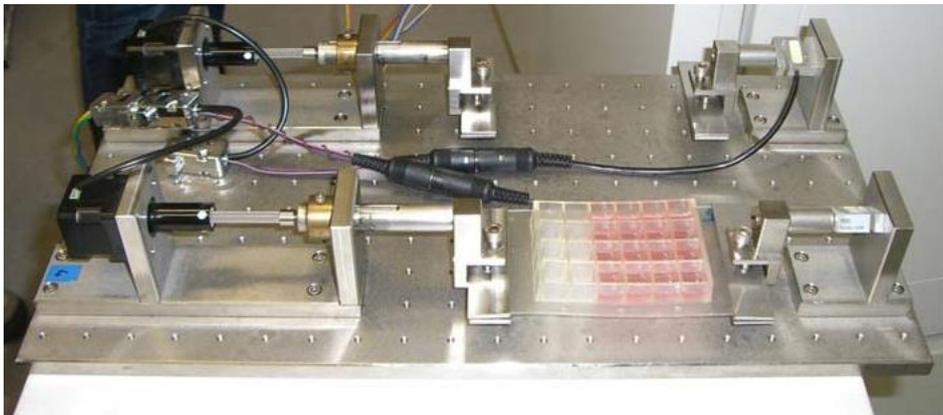


Abbildung 8: Fotografie von Bioreaktor für die Dehnungsversuche mit eingespannter PU-Platte. Aus dem Paper „a small scale cell culture system to analyze mechanobiology using reporter gene constructs and polyurethane dishes“ (Seefried et al., 2010) freundlicherweise zur Verfügung gestellt von den Autoren Seefried, Mueller-Deubert, Schwarz (unter der CC-BY-SA Lizenz).

3.5.2. Ablauf der mechanischen Dehnung

Für einen Dehnungsversuch wurden die Zellen zunächst auf dehnbare Polyurethan-Platten ausgesät, wo sie dann nach wenigen Stunden adhärirten. Pro Versuch erfolgte der Ansatz in 2-facher Ausführung, eine Platte wurde gedehnt und eine Platte wurde ungedehnt als Kontrolle mitgeführt. Die zyklische Dehnung erfolgte nach einem standardisierten Protokoll für 30 Minuten bei einer Frequenz von 1 Hz und einem Einfahrtsweg von 1,2 mm (entspricht 1 % Dehnung), unter Zellkulturbedingungen im Brutschrank bei 37°C und einem CO₂-Gehalt von 5 %. Anschließend wurden die Zellen, je nach Fragestellung, entweder nach 15 min oder 4 Stunden geerntet und die RNA wie oben beschrieben isoliert. Oder es wurde nach einer Ruhepause von 24 Stunden das Medium abgesaugt,

mit PBS gewaschen, 150 µl Cell Lysis Puffer darauf gegeben, umpipettiert in andere Gefäße und nach einmaligem Einfrieren die Luciferase und der Proteingehalt bestimmt.

Dieser Versuch wurde in verschiedenen Konstellationen mit verschiedenen Zellreihen durchgeführt.

3.6. Molekularbiologische Methoden

3.6.1. RNA-Isolierung

Grundsätzlich wurden für die Extraktion von RNA, sowie alle nachfolgenden Versuche mit RNA (Vermessung und Verdünnung von isolierter RNA, DNase I Verdau, Synthese von cDNA) die erforderlichen Vorsichtsmaßnahmen eingehalten, um eine Kontamination mit RNase zu unterbinden.

Die RNA-Isolierung wurde in der vorliegenden Arbeit mit dem NucleoSpin RNA II Kit anhand der Anleitung des Herstellers durchgeführt.

Die gesamte RNA wurde aus kultivierten Zellen extrahiert. Dazu wurden die Zellen zunächst lysiert, indem ein Mix aus dem beigefügten 350 µl RA1-Puffer und 3,5 µl β-Mercaptoethanol direkt auf den Zellrasen in die Zellkulturflasche gegeben wurde, nachdem das Zellkulturmedium abgesaugt wurde. Die lysierten Zellen wurden daraufhin mit einem Zellschaber abgeschabt und in ein steriles Mikroreaktionsgefäß überführt. Die Proben wurden dann mindestens über Nacht bei -20°C gelagert.

Um die Viskosität nach dem Auftauen zu reduzieren, wurde das Lysat filtriert und zentrifugiert. Als nächstes wurde die RNA-Bindung durch die Zugabe von 70 %-Ethanol vorbereitet. Das Lysat befand sich dabei in speziellen Mikroreaktionsgefäßen, welche eine Silica-Membran enthalten, an diese Membran binden die Ribonukleinsäuren. Anschließend wurde diese Membran entsalzt und getrocknet, woraufhin der DNase-Verdau der Nukleinsäuren erfolgte. Dazu wurde direkt auf die Membran ein Mix aus DNase und dem passenden Puffer für rDNase gegeben und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgten noch einige Wasch- und Trocknungsschritte, bis die RNA dann mit 40 µl RNase-freiem H₂O in ein Mikroreaktionsgefäß eluiert werden konnte.

Anschließend wurde die Konzentration der RNA mithilfe eines Photometers bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Dazu wurden 2 µl RNA-Probe mit 48 µl TRIS-Base (10 mM pH 7,2-7,5) vermischt. Als Leerprobe dienten 50 µl TRIS-Base.

3.6.2. Herstellung von komplementärer Desoxyribonukleinsäure (cDNA)

Da sich RNA nicht direkt durch den Einsatz einer PCR amplifizieren lässt (die bei der PCR verwendeten Polymerasen sind DNA-abhängig), muss die mRNA zunächst in die komplementäre, einzelsträngige DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Dazu wird eine M-MLV reverse Transkriptase (eine RNA-abhängige Polymerase) genutzt, welche in der Lage ist, bis zu 20000 Basenpaare zu transkribieren.

Die folgenden Vorgänge der cDNA-Synthese fanden alle unter RNase- und DNase-freien Bedingungen und, falls nicht anders angegeben, im Eisbad statt.

Wie oben beschrieben wurde zunächst photometrisch die Konzentration der RNA in der jeweiligen Probe bestimmt. Anschließend wurde das Volumen berechnet, welches 1µg RNA enthält. Dieses wurde mit destilliertem Wasser auf 17 µl Volumen aufgefüllt.

Dann wurden jeweils 1 µl Oligo (dT) 500 µg/ml als Primer hinzugefügt. Diese kurzen einzelsträngigen DNA-Sequenzen aus Thymidinnukleotiden binden spezifisch an den poly(A)-Schwanz der mRNA. An diese kurzen doppelsträngigen Bereiche wiederum kann die reverse Transkriptase binden. Nach Zentrifugation der Proben erfolgte das Annealing der Oligo(dT)-Primer an die mRNA durch Erhitzen der Proben auf 70 Grad Celsius für 5 Minuten im Thermocycler, anschließend wurden die Proben erneut auf Eis gelagert. Dann wurden pro Probe 5 µl 5x-Transpuffer, 1 µl M-MLV reverse Transkriptase 200 u/µl und 0,625 µl Desoxyribonukleosidtriphosphate 20 mM (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) und 0,375 µl Nuklease-freies Wasser hinzugefügt. Es folgte die reverse Transkription mit folgendem Schema: 42°C für eine Stunde, bei dieser Temperatur ist die reverse Transkriptase maximal aktiv und es erfolgt die eigentliche cDNA-Synthese, dann noch 95°C für 10 min, um das Enzym zu denaturieren, damit dies in weiteren Reaktionen nicht stört. Um eine Kontamination ausschließen zu können, wurde bei jeder cDNA-Synthese eine Negativ-Kontrolle ohne RNA-Zugabe hergestellt. In einer anschließenden PCR-Reaktion darf hier dann kein Amplifikat detektiert werden.

3.6.3. Semi-quantitative Polymerase-Kettenreaktion - PCR

Allgemeines Prinzip der PCR:

Seit Kary Mullis 1983 das Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion entwickelte, nimmt die PCR einen signifikanten Einfluss auf viele Bereiche der molekularen Wissenschaft. Die PCR (polymerase chain reaction) ermöglicht die exponentielle Amplifizierung sehr geringer Nukleinsäuremengen (Welch, 2012, Lorenz, 2012).

Der benötigte Reaktionsansatz enthält die zu vervielfältigende DNA, Nucleotide, genspezifische Primer, die DNA-abhängige Polymerase und einen passenden Puffer mit Magnesiumchlorid (dient als Cofaktor der Taq-Polymerase). Der Vorteil hierbei besteht darin, dass die Amplifizierung in Thermocyclern vollautomatisch stattfindet.

Dabei erhitzt der Thermocycler die Proben zunächst auf 95°C, wodurch die DNA denaturiert wird und die Doppelstränge sich auftrennen. Anschließend erfolgt das Annealing, also die Anlagerung genspezifischer Oligonukleotide, den sogenannten Primern, bei circa 50-65°C, je nach Primersequenz an die DNA. Die Primer lagern sich komplementär zu der DNA-Sequenz an, die doppelsträngigen Bereiche werden dann wiederum von der Polymerase erkannt. Diese doppelsträngigen Bereiche dienen als Startpunkt für die Polymerase und sie beginnt einen komplementären DNA-Strang zu synthetisieren, wobei die hinzugegebenen Nucleotide als Bausteine dienen. Diese Phase nennt man Elongation und findet bei circa 72°C statt. Die drei Phasen Denaturierung, Annealing und Elongation bilden einen Zyklus. Die Elongationszeit und die Anzahl der Zyklen richten sich nach der Länge und der Konzentration der zu amplifizierenden DNA.

Um mögliche Kontaminationen zu erkennen, wurde bei jeder PCR als Negativ-Kontrolle ein Ansatz ohne cDNA verwendet.

Tabelle 6: Schema der PCR

PCR-Schritt	Temperatur [°C]	Zeit	Zyklen
Initialisierung	95	4 min	1
Denaturierung	95	30 s	Abhängig von cDNA
Annealing	Primer-spezifisch	30 s	
Elongation	72	30 s	
Abkühlung	72	10 min	1
	12	unbegrenzt	

Auf die vorliegende Arbeit bezogen:

Nach dem die komplementäre DNA synthetisiert wurde, schloss sich zunächst eine 2:1 Verdünnung der cDNA mit H₂O an.

Anschließend erfolgte die Amplifizierung der cDNA mittels PCR. Dazu wurde zunächst das Housekeeping-Gen *EEF1α* untersucht und die Amplifikation mittels Agarosegelelektrophorese überprüft. War dies erfolgreich, folgte die PCR der Gene *RUNX2*, *ALPL*, *Osteocalcin* und *Osteopontin* (Bone Gamma-Carboxyglutamate Protein, *BGLAP*) und *Osteopontin* (Secreted Phosphoprotein 1, *SPP1*).

Folgender PCR-Ansatz pro Probe wurde genutzt:

dNTPs 0,5 µl (20 mM)

Primer sense 0,5 µl (50 pmol/µl) (Verdünnung 1:10 mit H₂O)

Primer antisense 0,5 µl (50 pmol/µl) (Verdünnung 1:10 mit H₂O)

Promega GoTaq-Polymerase 0,2 µl (1,25u)

5x GoTaq-Puffer 10 µl

MgCl₂ (1,5mM) abhängig von Primer

cDNA 2 µl

aufgefüllt mit H₂O auf ein Gesamtvolumen von 50 µl

METHODEN

Tabelle 7: Liste der verwendeten Primer bezogen von *biomers.net GmbH, Ulm*

Primer	Sequenz 5' → 3'	PCR- Produkt- größe	Annealing- temperatur [°C]	Zyklusanzahl	MgCl ₂ [μl]
Osteocalcin	For: ATG AGA GCC CTC ACA CTC CTC Rev: GCC GTA GAA GCG CCG ATA GGC	293 bp	62	35	2
Osteopontin	For: ACC CTT CCA AGT AAG TCC AA Rev: GTG ATG TCC TCG TCT GTA GC	352 bp	58	35	2
RUNX2	For: TCC GCA CCG ACA GCC CCA ACT T Rev: GAG ATT TGT GGG CCG GAG TGG ACG	237 bp	60	35	2
EEF1α	For: CTG TAT TGG ATT GCC ACA CG Rev: AGA CCG TTC TTC CAC CAC TG	350 bp	55	25	2

PDE10A	Sequenz vom Hersteller nicht verfügbar		55	45	6
---------------	--	--	----	----	---

Die verwendeten Primer und deren Bedingungen sind im Labor bereits etabliert.

3.6.4. Agarosegelelektrophorese

Nach Beendigung der PCR wurde die amplifizierte DNA auf ein bereits vorbereitetes 1 %iges-Agarosegel in TBE-Puffer aufgetragen.

Die Agarosegelelektrophorese ist ein sehr effektiver Weg, DNA Fragmente zwischen den Größen 100bp-25kb zu trennen. Da das Phosphat der DNA negativ geladen ist, wandert die DNA im elektrischen Feld zur positiven Anode. Die dabei zurückgelegte Wegstrecke ist negativ proportional zum Molekulargewicht der DNA.

Das Agarosegel wurde vorbereitet, indem 1 g Agarose mit 100ml TBE-Puffer durch Erhitzung in einem Mikrowellengerät aufgelöst wurde. Dann fügte man 8 µl des in Nucleotiddoppelstränge interkalierenden Farbstoffs GelRed hinzu und goss die Flüssigkeit in eine bereitgestellte Gelkammer mit externer Spannungsquelle. Nachdem das Gel ausgehärtet war, wurden die Proben in die entsprechenden Geltaschen gegeben, zur Bestimmung der Größe lief zusätzlich ein 100 bp DNA-Marker mit. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte im TBE-Bad bei 100 V für circa 40 Minuten.

Der 5x GoTaq-Puffer enthielt bereits einen Farbstoff, der die Lauffront der aufgetragenen Probe sichtbar macht. Unter UV-Licht können die DNA-Fragmente dann dargestellt werden. Die Photo-Dokumentation des Gels erfolgte mit dem Fusion SL von Vilber.

3.6.5. Densitometrie

Die densitometrische Auswertung der Agarosegele erfolgte mit dem Programm Image J, um Unterschiede zwischen den einzelnen Banden quantifizieren zu können. Dabei wurden die PCR-Produkt-Banden auf die Intensität der EEF1 α -PCR-Banden normiert.

3.6.6. Real-time quantitative PCR (qPCR)

Die real-time PCR dient wie die konventionelle PCR der Vervielfältigung von DNA-Fragmenten, zusätzlich können aber die PCR-Produkte schon während die PCR läuft detektiert werden, also in Echtzeit bzw. „real-time“. Diese Methode ist Fluoreszenz-basiert, da zusätzlich fluoreszierende Moleküle hinzugegeben werden, die spezifisch an doppelsträngige DNA binden (Whitcombe et al., 1999). Diese sogenannten Fluorophore werden zunächst durch kurzwelligeres Licht (<495 nm) angeregt, woraufhin sie dann höherwelligeres Licht (500-800 nm) abstrahlen. Diese Emission der Fluoreszenz wird pro PCR-Zyklus gemessen und steigt mit der Amplifikation an. Die Quantifizierung ist dadurch möglich, dass die Intensität der Fluoreszenz proportional zur Anzahl der Kopien der DNA ist. Für die Berechnung der Amplifizierung wird der sogenannte Ct-Wert (engl. Cycle threshold, Schwellenwert-Zyklus) herangezogen. Dieser Wert gibt den Zyklus an, indem die Fluoreszenz erstmals exponentiell und signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt. Je kleiner dieser Ct-Wert ist, desto höher ist die Menge an DNA mit gesuchter Ziel-Sequenz (Kubista et al., 2006).

Die qPCR ist wie die normale PCR auch ein dreistufiger thermischer Prozess: als erstes wird die DNA denaturiert, dann erfolgt das Primer-Annealing, danach wird das Fluoreszenz-Signal detektiert. Die cDNA-Synthese der Proben wurde wie oben beschrieben durchgeführt und 1:10 mit RNase-freiem Wasser verdünnt.

Tabelle 8: Standardbedingungen der qPCR

qPCR-Schritt	Temperatur [°C]	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	3 min	1
Denaturierung	95	10 s	Primer-spezifisch
Annealing	Primer-spezifisch	10 s	
Elongation	72	10 s	
Messung der Fluoreszenz			
Schmelzkurve	60-95	Alle 6 s	

Folgender Ansatz wurde pro Probe eingesetzt:

10 µl GoTaq-Mix

Primer sense 0,5 µl (50 pmol/µl) (Verdünnung 1:10 mit H₂O)

Primer antisense 0,5 µl (50 pmol/µl) (Verdünnung 1:10 mit H₂O)

2 µl cDNA (Verdünnung 1:10 mit H₂O)

aufgefüllt mit H₂O auf 18 µl

Der GoTaq-Mix enthält bereits die Taq-DNA-Polymerase, die erst nach einem zusätzlichen Denaturierungsschritt von 10 Minuten bei 95°C am Anfang aktiviert wird. Dadurch wird ein Heißstart aller Proben der qPCR ermöglicht.

Um eventuelle Kontaminationen zu detektieren wurde ein Ansatz ohne cDNA als Negativ-Kontrolle mitgeführt.

Pro Probe wurde der Ansatz 3-mal pipettiert und gemessen, um Fehlerquellen wie Pipettierungenauigkeiten zu reduzieren. Die Auswertung erfolgte mit dem Microsoft Office Excel Programm anhand der $\Delta\Delta C_t$ -Methode (Pfaffl, 2001).

Tabelle 9: Liste der verwendeten Primer für hMSC-TERT

Da die Primer von der Firma Qiagen GmbH sind, gibt es keine Angabe der Sequenzen

Primer	Annealing-temperatur [°C]	Effizienz
PTGS2	59	1,83
COX4I1	60	1,74
FOS	57	1,88

3.7. Biochemische Methoden

3.7.1. Luciferase Reporter Assay-System

Die HEK293-Zellen und die hMSC-Zellen sind für diesen Versuch stabil transfiziert worden, indem in deren Genom ein Plasmid, also Fremd-DNA integriert wurde, wie oben bereits beschrieben. Diese Fremd-DNA enthält den Luciferase-Reportervektor pGL4.14[luc2/Hygro]. Im Falle des pGL4.14-AP1-Vektors bedeutet dies, dass durch die Bindung von AP1 (bestehend aus JUN und FOS) an die AP1-Bindestelle, die codierende Sequenz der Luciferase stärker exprimiert wird. Durch die Luciferase wird in Anwesenheit von Sauerstoff, ATP und Mg^{2+} Luciferin in Oxyluciferin oxidiert, wobei ein Lichtblitz emittiert wird. Die Menge der exprimierten Luciferase kann durch die Messung der freigesetzten Biolumineszenz im Luminometer bei 562nm ermittelt werden und dient damit der Einschätzung der Funktionalität der Zellen, sowie der Quantifizierung der damit einhergehenden Gentranskription (Thorne et al., 2010). Zusätzlich wurden die Werte mit der vorliegenden Proteinmenge als Maß für die verwendete Zellzahl abgeglichen (siehe 3.7.2.)

Für die praktische Durchführung dieser Messung wurden die stabil transfizierten HEK293- und hMSC-TERT-Zellen nach deren Kultivierung und Behandlung geerntet und in 150 µl Reporter Lysis Buffer lysiert und anschließend eingefroren, um eine komplette Lyse zu gewährleisten. Jeweils immer 20 µl des Zelllysats wurden in 96-Wellplatten pipettiert um dann die Luciferaseaktivität zu bestimmen. Die Bestimmung fand dann mit

Hilfe des Luminometers statt, in welchem das Lysat automatisch mit 100 µl eines Luciferinpuffers versetzt wurde.

3.7.2. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit einem RotiQuant ProteinAssay. Dafür wurde entsprechend der Methode nach Bradford der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue g-250 verwendet. Dieser Farbstoff verschiebt durch Bindung an Proteine sein Absorptionsmaximum in saurer Lösung von 465 nm zu 595 nm. Letztere Absorption kann photometrisch erfasst werden. Die Absorption korreliert linear mit der Proteinkonzentration. Dazu wurden 12 µl der Probe und 200 µl des Bradford-Reagenz (1:5 verdünnt mit dH₂O) vermischt. Die Absorption wurde dann mit einem Multidetektionsgerät photometrisch bestimmt. Jedoch kann das Ausmaß der Farbreaktion je nach Temperatur und Reagenz-Verdünnung variieren, weshalb zur Konzentrationsbestimmung stets eine Kalibrierung notwendig ist. Hierfür wurde in diesem Fall als Protein BSA (bovines Serum Albumin) verwendet und eine Standardkurve erfasst. Dazu wurde 200 µl der Bradford-Reagenz mit dem Proteinstandard BSA in unterschiedlichen Konzentrationen (0, 200, 500, 1000, 1500, 2000 µg/ml) vermischt. Der Standard als auch die Probe mussten vor der Messung 10-15 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.

Der Gesamtproteingehalt konnte durch Vergleich mit der Standardkurve ermittelt werden.

Für die weitere Auswertung wurden die relativen Light Units (Ergebnisse der Luciferase-messung) genormt auf die gemessene Proteinkonzentration. Genutzt wurden die Daten von vier Wells und der Mittelwert ermittelt, um Messfehler und Pipettierungenauigkeiten zu reduzieren und damit die Genauigkeit zu erhöhen.

3.8. Statistische Analyse

Die statistischen Analysen wurden je nach Versuchsansatz anhand des Student's t-Test oder mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests berechnet. P-Werte kleiner als 0,05 wurden als signifikant anerkannt.

Die Luciferase-Aktivität pro Mikrogramm Protein wurde als Mittel der vier Messwerte normiert auf die jeweiligen Kontrollwerte.

Die quantitative PCR wurde ausgedrückt als Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten, die qPCR wurde drei Mal wiederholt. Die Werte wurden erhoben mit der $\Delta\Delta C_t$ -Methode und die Signifikanzen wurden ebenfalls mit dem Student's t-Test berechnet.

4. Ergebnisse

4.1. PDE10A Expression anhand von Mikroarray Daten und real-time PCR

In Vorarbeiten zu dieser Arbeit wurde eine Mikroarray Analyse- „(Affymetrix GeneChip Human Genome U133_Plus_2.0)“- durchgeführt, um die Genexpression von MSC aus gesunden Spendern mit den MSC von an Osteoporose erkrankten Spendern zu vergleichen ((Benisch et al., 2012) und weitere unpublizierte Daten). In die letztgenannte Gruppe wurde eingeschlossen, wer eine Oberschenkelhalsfraktur ohne große Krafteinwirkung erlitt, weitere Kriterien der primären Osteoporose waren ebenfalls Wirbelkörperfrakturen und fortgeschrittenes Alter.

Mittels Mikroarray ist es möglich, parallel die Expression mehrerer tausend Gene auf mRNA-Ebene nachzuweisen. Ein Gen, das offensichtlich unterschiedlich exprimiert wird, ist die Phosphodiesterase 10A. Unter Verwendung der identischen RNA Proben konnte dies durch die real-time PCR bestätigt werden. Die Abbildung zeigt deutlich, dass die Genexpression der Phosphodiesterase 10A signifikant höher ist in MSC von osteoporotischen Spendern als in den Kontroll-MSC.

ERGEBNISSE

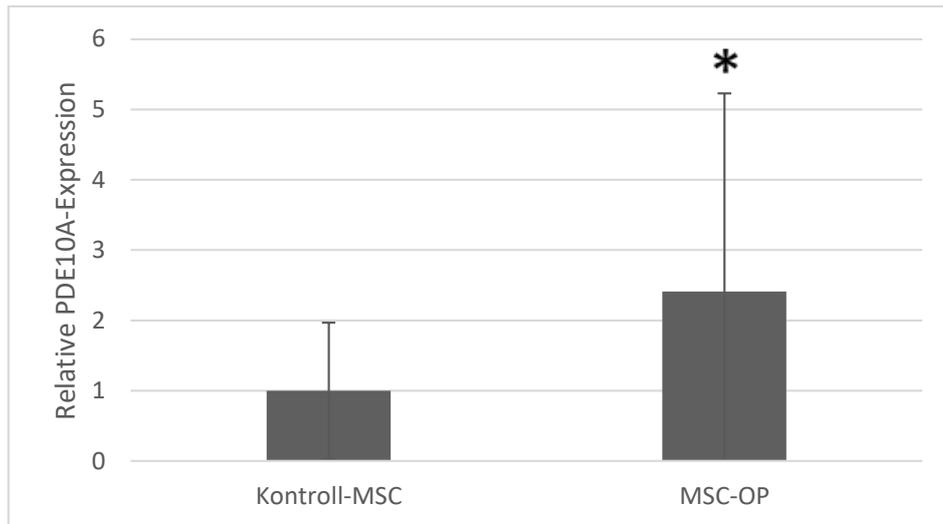


Abbildung 9: Real-time PCR: PDE10A Expression Vergleich Kontrollgruppe MSC und osteoporotische MSC (MSC-OP)

Signifikante Ergebnisse sind mit einem Sternchen markiert. Z-Score: 2.30965. p-Wert 0.02088. P-Werte unter 0,05 werden als signifikant erkannt (Student's t-Test). Es wurden 31 unabhängige Experimente durchgeführt, dargestellt ist die Standardabweichung.

Da die Erkenntnis, dass die Phosphodiesterase 10A in osteoporotischen MSC hochreguliert wird, neu und unerwartet ist, wurde die Expression in MSC aus zusätzlichen gesunden MSC und osteoporotischen Spendern mit der Expression in Telomerase-immortalisierten MSC (hMSC-TERT) und in HEK293-Zellen durch real-time PCR analysiert.

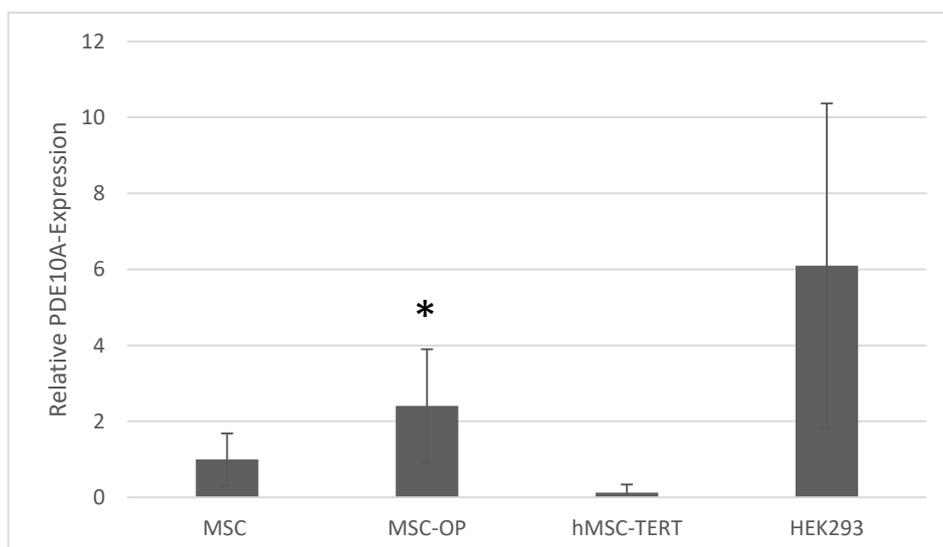


Abbildung 10: Expression der PDE10A in MSC, osteoporotischen MSC (MSC-OP), hMSC-TERT, HEK293
P-Werte unter 0,05 werden als signifikant erkannt (Mann-Whitney-U-Test). Es wurden drei bis acht unabhängige Experimente durchgeführt, dargestellt ist die Standardabweichung.

Die real-time PCR bestätigt, was auch die Mikroarray-Analyse bereits zeigte: die PDE10A ist in osteoporotischen MSC höher exprimiert im Vergleich zu den Kontroll-MSC. Da MSC-OP nicht ausreichend zu Verfügung stehen, wurde nach einer geeigneten Zellreihe für weitere Untersuchungen gesucht. hMSC-TERT eignen sich in diesem Fall nicht, denn wie die Abbildung zeigt, wird die PDE10A hier am geringsten exprimiert. Jedoch bieten sich HEK293-Zellen an, da hier die PDE10A-Expression sehr hoch ist, diese wurden also herangezogen, um mehr über die cAMP-abhängigen Signalwege und die Rolle der PDE10A herauszufinden.

4.2. Basaler Einfluss von Papaverin auf HEK293-CRE

Um die Bedeutung der PDE10A näher anzuschauen, lag in den folgenden beiden Ansätzen der Fokus auf der Untersuchung des zellulären Einflusses von Papaverin. Papaverin ist ein Inhibitor der Phosphodiesterase 10A und hemmt dadurch den Abbau des second messengers cAMP. Da die Isolation und Kultivierung von mesenchymalen Stromazellen aufwendig ist und MSC aus osteoporotischen Patienten auch nur begrenzt zur Verfügung stehen, hMSC-TERT-Zellen aber so gut wie keine PDE10A exprimieren, wurden in den beiden Versuchen HEK293-Zellen als Modell verwendet. Wie im vorausgehenden Versuch gezeigt werden konnte, verfügen die HEK293-Zellen ebenfalls über eine hohe Expression der PDE10A.

Zunächst galt es, durch Analyse der Luciferaseaktivität, zu überprüfen, welchen basalen Einfluss Papaverin auf die cAMP-Konzentration in HEK293-Zellen nimmt und wie Papaverin die Zellviabilität beeinflusst. Hierzu dienten die sogenannten HEK293-CRE-Zellen als Positivkontrolle, in welche zusätzlich drei CRE-Elemente vor die codierende Sequenz der Luciferase des pGL4.14 eingebracht wurde, was wiederum dem Vektor pGL4.29 entspricht, wie oben bereits beschrieben wurde. Das CRE-Element ist eine spezifische Nukleotid-Sequenz der Abfolge TGACGTC in Promotoren, die vom Transkriptionsfaktor CREB (engl. cAMP response element binding protein) gebunden wird, was zu einer verstärkten Expression der entsprechenden Gene führt. CREB muss allerdings erst selbst über einen cAMP-induzierten Signalweg aktiviert werden. Zum Vergleich wurden HEK293-pGL-Zellen verwendet, in welche der Leervektor pGL4.14 eingebracht wurde.

ERGEBNISSE

Die HEK293-Zellen wurden über 4 Tage unterschiedlichen Konzentrationen von Papaverin ausgesetzt (0,1 μM , 0,5 μM , 1 μM , 5 μM , 10 μM). Nach der Ernte und anschließendem Einfrieren wurde mittels Luciferase-Assay die Luciferaseaktivität bestimmt und die sich daraus ergebenden relative light units auf den Proteingehalt normiert, wodurch sich die Einheit RLU/ μg ergibt.

Der Proteingehalt, der nach Bradford bestimmt wurde (siehe 3.7.2), wurde auch alleine analysiert, um sicherzustellen, dass die HEK293-Zellen noch keinen Schaden genommen haben und alle intrazellulären Prozesse ausreichend funktionieren. Dies diente als zusätzliche Kontrolle neben weiteren Viabilitäts-Assays, die im Vorfeld stattfanden, um die grundsätzliche Verträglichkeit und Zellviabilität zu überprüfen.

Der stärkste Abfall der Proteinkonzentration konnte festgestellt werden bei einer Papaverinkonzentration von 0,1 μM und 10 μM , jedoch waren diese Unterschiede nicht signifikant. Es konnte aber gezeigt werden, dass die Zellen hohe Konzentrationen von Papaverin tendenziell schlechter vertragen, die Zellen bilden weniger Proteine, was wiederum für eine verminderte Stoffwechselaktivität spricht.

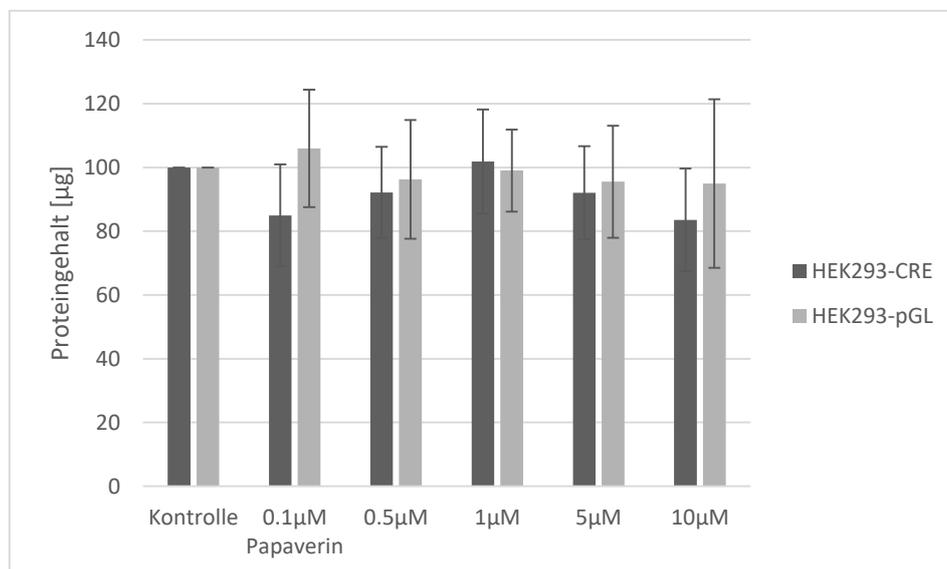


Abbildung 11: Proteingehalt der HEK293-Zellen unter Stimulation mit Papaverin
Erkennbar ist eine Abnahme des Proteingehalts der HEK293-pGL und der HEK293-CRE-Zellen, vor allem bei Papaverinkonzentrationen von 0,1 μM und 10 μM . Es wurden 10 unabhängige Experimente durchgeführt, dargestellt ist die Standardabweichung.

ERGEBNISSE

Im Anschluss wurde die Aktivität des CRE-Elements nach Inhibition von PDE10A durch Papaverin analysiert. Bezüglich der Luciferaseaktivität war eine signifikante Inhibition um etwa 20% zu erkennen zwischen den HEK293-CRE-Zellen, die mit 5 μM und mit 10 μM Papaverin stimuliert wurden verglichen mit der zugehörigen unstimulierten Kontrollgruppe (siehe Abbildung 12). Die Luciferaseaktivität bei den HEK293-pGL-Zellen sinkt ebenfalls, jedoch ist hierbei der Effekt nicht signifikant.

Auffallend und überraschend ist zudem, dass durch die Inhibition der PDE10A durch Papaverin die cAMP-Spiegel eigentlich steigen müssten und die CRE-Elemente stärker aktiviert werden müssen, jedoch zeigt sich hier das Gegenteil.

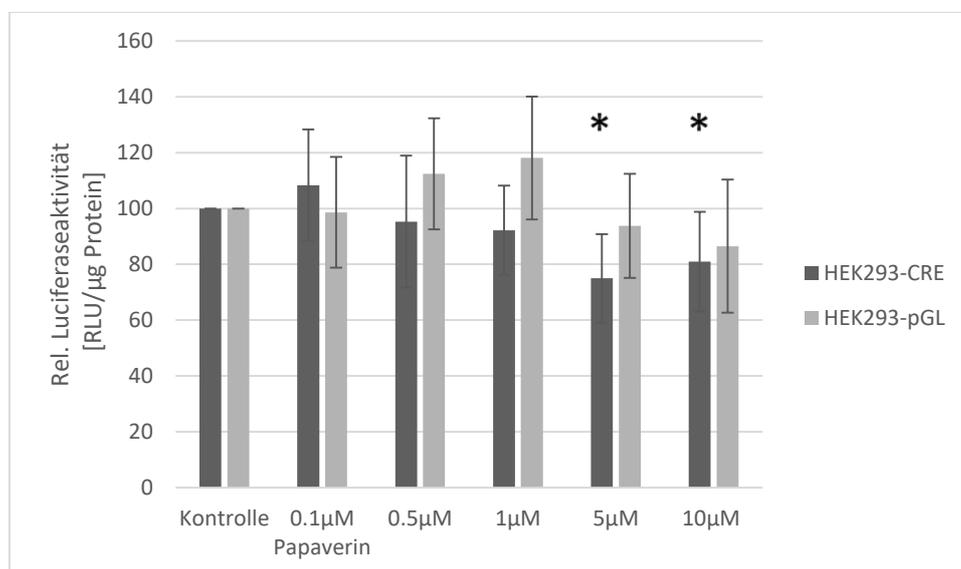


Abbildung 12: Luciferaseaktivität normiert auf den Proteingehalt in Abhängigkeit der Papaverinkonzentration

Ein signifikanter Unterschied ist erkennbar, zwischen den HEK293-CRE-Zellen stimuliert mit 5 und 10 μM Papaverin und der unstimulierten Kontrollgruppe, p -Werte unter 0,05 werden als signifikant erkannt (Student's t -Test). Es wurden sieben unabhängige Experimente durchgeführt, dargestellt ist die Standardabweichung.

4.3. Einfluss der Kombination von Papaverin und Forskolin auf HEK293-CRE-Zellen

Im nächsten Schritt sollte analysiert werden, welchen Einfluss eine Stimulation der Adenylatzyklase, also eine Erhöhung der cAMP-Spiegel, und eine gleichzeitige Inhibition von PDE10A, also eine Verhinderung der cAMP-Hydrolyse, auf die Aktivierung des CRE-Elements in HEK293-Zellen hat.

Hierzu wurden die Zellen zum einen wieder mit Papaverin (PDE10A-Inhibitor) stimuliert, zusätzlich wurde dann aber noch mit Forskolin behandelt. Forskolin ist ein Stimulator der Adenylatzyklase, welche zyklisches AMP (cAMP) synthetisiert. Wie bereits erwähnt verläuft die osteogene Differenzierung von MSC zum Teil auch über cAMP-abhängige Signalwege, wie es beispielsweise bei den Parathormonrezeptor-Signalwegen der Fall ist. Ziel war es nun, herauszufinden, wie sich die Luciferaseaktivität verändert, wenn zum einen die Phosphodiesterase 10A gehemmt wird, wie im vorherigen Versuch durch Papaverin, also der Abbau von cAMP gehemmt wird, und zusätzlich auch noch die Synthese von cAMP durch Forskolin verstärkt wird.

Es wurden erneut HEK293-pGL-Zellen verwendet im Vergleich zu den HEK293-CRE-Zellen, die stabil mit dem Plasmid transfiziert wurden, in das drei Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor CREB vor die codierende Sequenz der Luciferase kloniert wurde.

Ein Teil der Zellen wurden über 24 Stunden mit 10 μ M Forskolin stimuliert. Weitere Zellen wurden mit Forskolin und mit 10 μ M Papaverin stimuliert. Anschließend wurden sie hinsichtlich ihrer Luciferaseaktivität analysiert. Forskolin wird in DMSO gelöst, weswegen zusätzlich eine DMSO-Kontrolle angesetzt wurde.

Es ließ sich zeigen, dass ein signifikanter Anstieg der Aktivität um mehr als das Doppelte (Abbildung 13) besteht zwischen den HEK293-CRE-Zellen, die sowohl mit Forskolin (10 μ M) als auch mit der Kombination aus Forskolin und Papaverin behandelt wurden, verglichen mit der HEK293-CRE-Kontrollgruppe ohne weitere Behandlung. Insgesamt war die CRE-Aktivität nach der Behandlung mit der Kombination aus Forskolin und Papaverin signifikant um den Faktor 2,5 höher im Vergleich zur Aktivität nach Behandlung mit Forskolin alleine und es wurde ein additiver Effekt beobachtet.

ERGEBNISSE

Die HEK293-pGL-Zellen, die nur den Leervektor ohne das CRE-Element beinhalten, zeigen in keiner Gruppe eine Veränderung der Luciferaseaktivität durch Stimulation. Auch eine Behandlung mit dem Lösungsmittel für Forskolin, DMSO, zeigte weder einen Effekt auf die CRE-Aktivierung noch auf den Leervektor.

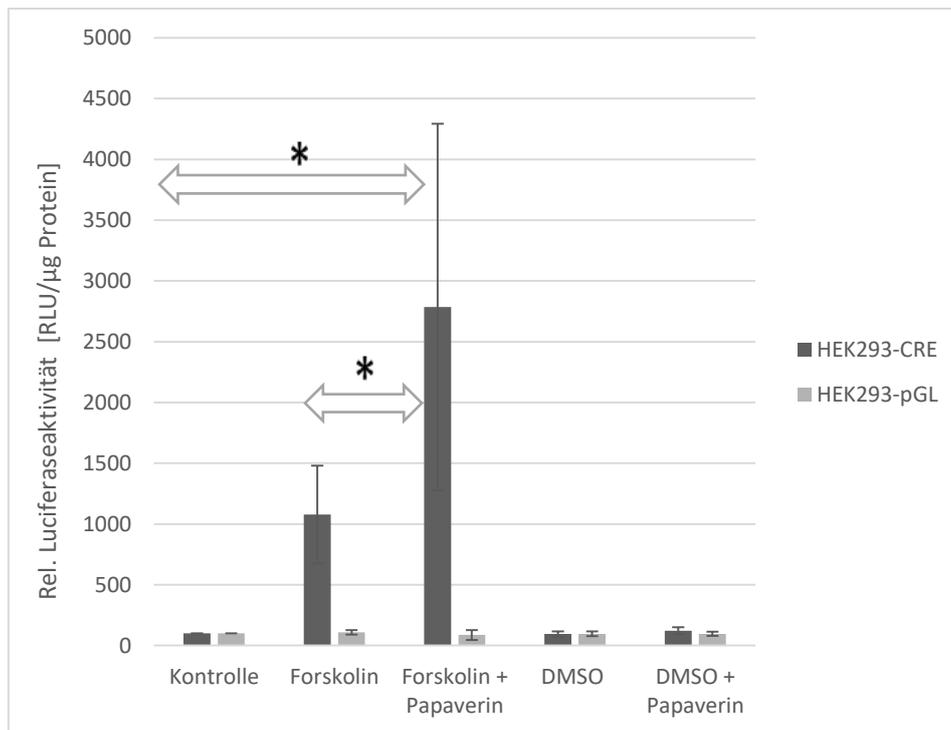


Abbildung 13: Einfluss der Kombination von Papaverin und Forskolin

Dargestellt ist die relative Luciferaseaktivität der HEK293-CRE- und der HEK293-pGL-Zellen, welche unterschiedlich mit Forskolin und/oder Papaverin stimuliert wurden. Es ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen den HEK293-CRE-Zellen stimuliert mit Forskolin und stimuliert mit Forskolin + Papaverin im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle. Außerdem ein signifikanter Anstieg der Luciferaseaktivität der HEK293-CRE-Zellen stimuliert mit Forskolin + Papaverin im Vergleich zur Stimulation nur mit Forskolin (Student's t-Test). Es wurden zehn unabhängige Experimente durchgeführt, dargestellt ist die Standardabweichung.

Ebenfalls wurde die Proteinkonzentration des HEK293-Zelllysats nach Bradford bestimmt und verglichen, um einen Rückschluss auf die Zellviabilität zu ziehen. Auch hier sind keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrollgruppe zu erkennen, allerdings zeigte sich wieder, dass die Zellen die Stimulation mit vor allem Forskolin und Papaverin nicht sonderlich gut vertragen und die Bildung der Proteine etwas eingeschränkt ist.

4.4. Einfluss der PDE10A-Inhibition auf die osteogene Differenzierung der MSC

In einem nächsten Schritt sollte nun überprüft werden, inwiefern der PDE10A-Inhibitor Papaverin die osteogene Differenzierung von mesenchymalen Stromazellen beeinflusst. Wie bereits erwähnt ist die osteogene Differenzierung der MSC abhängig vom second messenger cAMP. Hierzu wurde die Expression verschiedener osteogener Marker mittels PCR analysiert. Ausgewählt wurden die osteogenen Marker RUNX2, ALPL, Osteopontin (SPP1) und Osteocalcin (BGLAP).

Für diesen Zweck wurden die mesenchymalen Stromazellen über 14 Tage nach Aussaat kultiviert. Dabei wurde eine Probe osteogen differenziert und mit Papaverin 10 μ M stimuliert (MSC 14T. oD + Pap), eine weitere Probe nur osteogen differenziert (MSC 14T. oD). Zusätzlich wurden MSC kultiviert über 14 Tage ohne jegliche Behandlung (MSC 14T.), oder nur mit Papaverin 10 μ M stimuliert (MSC 14T. + Pap). Eine 5. Probe diente als Kontrollgruppe, diese wurde nicht weiter kultiviert stattdessen wurden die Zellen direkt an Tag Null geerntet und die RNA isoliert (MSC 0h Kontrolle).

Dieser Versuch wurde insgesamt mit den Stromazellen von fünf verschiedenen Spendern durchgeführt (MSC 1406, 1414, 1417, 1418, 1454).

Nach den 14 Tagen der Kultivierung wurden, wie oben beschrieben, die Zellen geerntet, die RNA isoliert und die cDNA synthetisiert. Anschließend wurden die MSC in einer RT-PCR auf die Expression der vier verschiedenen Gene RUNX2, ALPL, Osteopontin und Osteocalcin untersucht. Zusätzlich erfolgte immer noch eine PCR mit dem Haushaltsgen EEF1 α , welches in allen Körperzellen exprimiert wird, kaum reguliert wird und als Kontrolle einer erfolgreichen cDNA-Synthese und für die spätere Normierung in der densitometrischen Auswertung dient.

ERGEBNISSE

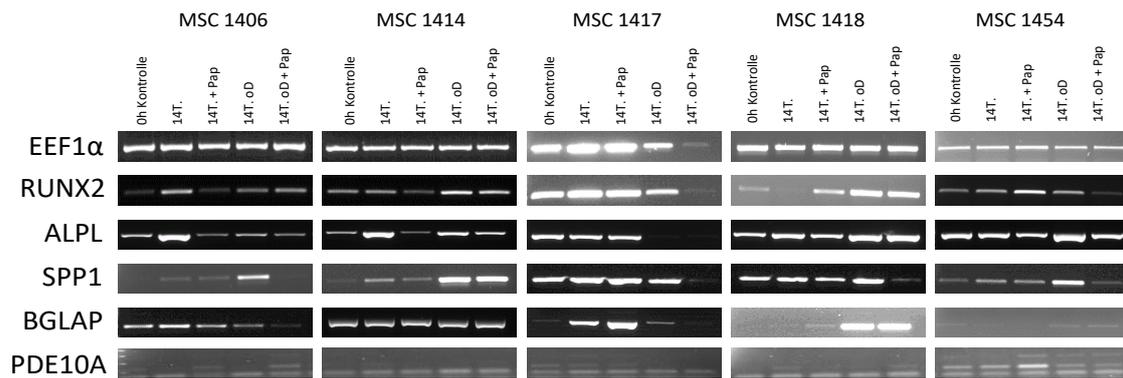


Abbildung 14: Agarosegele der RT-PCR mit den PCR-Produkten für EEF1 α , RUNX2, ALPL, SPP1 (Osteopontin), BGLAP (Osteocalcin) und PDE10A

Es wurden fünf unabhängige MSC-Spender analysiert. Oh Kontrolle = sofortige Ernte der Zellen ohne Kultivierung; 14T. = reine Kultivierung über 14 Tage; 14.T. + Pap = Kultivierung über 14 Tage und Stimulation mit Papaverin; 14T. + oD = osteogene Differenzierung über 14 Tage; 14T. oD + Pap = osteogene Differenzierung über 14 Tage plus Stimulation mit Papaverin.

Anhand der Bilder der Agarosegele ist zunächst erkennbar, dass die RNA intakt war und die cDNA-Synthese funktioniert hat, da bei jeder Probe das Haushaltsgen EEF1 α nachweisbar ist. Ebenfalls erfolgreich war die osteogene Differenzierung der mesenchymalen Stromazellen, da die osteogenen Marker in den dazugehörigen Proben, erhöht sind. Deutlich erkennbar am Beispiel des Spenders der MSC 1418, hier sind die Marker RUNX2, ALPL, Osteopontin und Osteocalcin deutlich erhöht, in den Proben die über 14 Tage osteogen differenziert wurden, im Vergleich zu den Proben, die ohne Stimulation über 14 Tage mitgeführt wurden.

Außerdem ist zu erkennen, dass der Einfluss von Papaverin wohl die osteogene Differenzierung abschwächt. Besonders eindrücklich erkennbar anhand des Markers RUNX2 der MSC 1417 und 1454, hier ist eine schwächere Expression des Gens erkennbar in der Probe, die osteogen differenziert wurde und mit Papaverin stimuliert wurde im Vergleich zur osteogenen Differenzierung ohne Papaverin, jedoch ist aufgrund der hohen Spendervariabilität das Ergebnis nicht immer kongruent.

Derselbe Effekt ist erkennbar bei dem Marker Osteopontin, der auch schwächer exprimiert wird in der Probe der MSC, die osteogen differenziert wurde und mit Papaverin stimuliert im Vergleich zur reinen osteogenen Differenzierung, vor allem bei den MSC 1406, 1418 und 1454. Bei den MSC 1417 ist der Effekt auch zu sehen, allerdings muss hier beachtet werden, dass das Housekeeping-Gen auch sehr schwach exprimiert ist.

ERGEBNISSE

Wohl hatte Papaverin außerdem einen Einfluss auf die undifferenzierten Zellen und schwächte insbesondere die Expression des Markers ALPL, aber auch von RUNX2 und teilweise von Osteopontin.

Im Anschluss sollte überprüft werden, ob und wie stark die oben verwendeten mesenchymalen Stromazellen die Phosphodiesterase 10A exprimieren, um daraus schließen zu können, ob ein Effekt von Papaverin auf die osteogene Differenzierung zu erwarten ist und mit der Phosphodiesterase zusammenhängt.

Dazu wurde die gleiche cDNA verwendet, wie in oben genanntem Versuch: ebenfalls eine 0-Stunden-Kontrolle, MSC Kultivierung für 14 Tage mit und ohne Stimulation durch Papaverin 10 μ M und die osteogene Differenzierung mit und ohne Papaverin.

Zu erkennen ist zunächst als unterste Bande eine Primerwolke, welcher man keine weitere Bedeutung zuschreiben kann. Des Weiteren sieht man, dass es zwei Transkriptvarianten gibt, welche beide mit diesem Primer nachgewiesen werden, jedoch unterscheiden sich die PCR-Produkte in ihrer Größe, weshalb teilweise nicht nur eine, sondern eine weitere Bande erkennbar ist. Das Expressionsmuster des Gens PDE10A in den unterschiedlich stimulierten MSC der verschiedenen Spender ist zwar nicht einheitlich, jedoch wird PDE10A in allen MSC exprimiert, wodurch eine Behandlung der MSC mit Papaverin sinnvoll erscheint. Die stärkste PDE10A Expression zeigt sich nach 14-tägiger Kultivierung unter Papaverinbehandlung bei den MSC1454. In allen übrigen Proben war PDE10A schwach exprimiert.

Für eine genauere Bestimmung der Unterschiede der Expression wurden die Agarosegele der PCR der jeweiligen Marker zusätzlich densitometrisch analysiert, mit Bezug auf das Haushaltsgen *EEF1 α* . Dabei ergab sich bei den Genen RUNX2 (siehe Abbildung 15) und Osteopontin (siehe Abbildung 16) eine signifikant abgeschwächte Expression der jeweiligen osteogenen Marker, in der Probe welche osteogen differenziert wurde und zusätzlich mit Papaverin stimuliert wurde, im Vergleich zu den osteogen differenzierten Zellen ohne Papaverinstimulation (hier als rote Linie markiert). Diese Papaverinbehandlung hat auch einen Effekt auf undifferenzierte Zellen, zwar ist der Unterschied zwischen den mesenchymalen Stromazellen, die über 14 Tage mit oder ohne Stimulation durch

ERGEBNISSE

Papaverin kultiviert wurden nicht signifikant, die reduzierte Expression ist bei dem Marker RUNX2 erkennbar. Jedoch ist bei beiden Diagrammen eine hohe Standardabweichung erkennbar, diese lässt sich mit der hohen Spendervariabilität der MSC erklären.

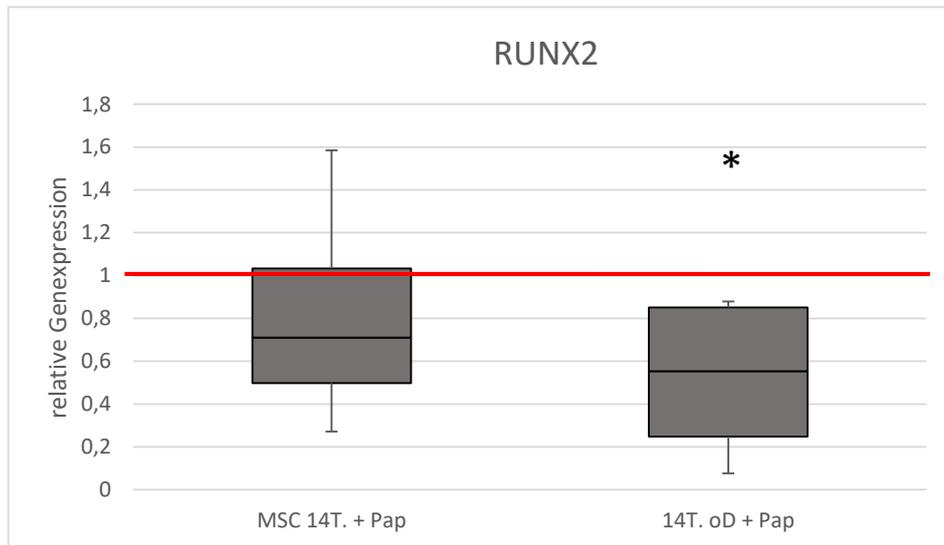


Abbildung 15: Effekt von Papaverin auf die relative Expression von RUNX2
Signifikant abgeschwächte Expression des osteogenen Markers RUNX2 bei Zellen mit osteogener Differenzierung und Papaverinbehandlung im Vergleich zur Gruppe ohne Papaverinbehandlung, dargestellt durch rote Linie. Kein signifikanter Effekt erkennbar auf undifferenzierte Zellen, aber Abschwächung der Genexpression. Normierung auf Haushaltsgen *EEF1 α* , Darstellung von Mittelwerten aus fünf Versuchsansätzen mit Fehlerbalken als Standardabweichung, Signifikanzen mit Sternchen * markiert bei p -Werten $< 0,05$ (Student's t-Test)

ERGEBNISSE

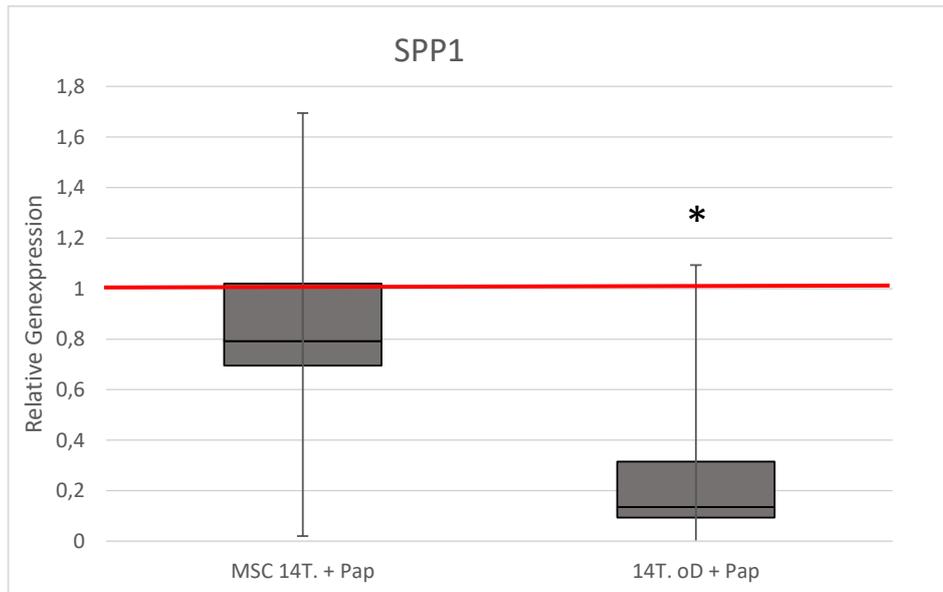


Abbildung 16: Effekt von Papaverin auf die relative Expression von Osteopontin (SPP1)
Signifikant abgeschwächte Expression des osteogenen Markers Osteopontin bei Zellen mit osteogener Differenzierung und Papaverinbehandlung im Vergleich zur Gruppe ohne Papaverinbehandlung, dargestellt durch rote Linie. Kein signifikanter Effekt erkennbar auf undifferenzierte Zellen, jedoch auch hier Abschwächung der Expression des Markers. Normierung auf Haushaltsgen *EEF1 α* , Darstellung von Mittelwerten aus fünf Versuchsansätzen mit Fehlerbalken als Standardabweichung, Signifikanzen mit Sternchen * markiert bei p -Werten $< 0,05$ (Student's t -Test)

Hinsichtlich des Markers ALPL zeigt sich jetzt sogar signifikant, dass Papaverin auch einen Einfluss auf undifferenzierte Zellen haben kann. Hierbei kann man einen signifikanten Effekt auf die MSC mit Papaverinbehandlung im Vergleich zu deren ohne Papaverinstimulation (markiert mit roter Linie) bestimmen. Jedoch sieht man keinen signifikanten Unterschied, zwischen den osteogen differenzierten Zellen mit und ohne Papaverinstimulation, nichtsdestotrotz ist eine abgeschwächte Expression erkennbar, gegebenenfalls ist hier eine höhere Versuchszahl oder ähnliches nötig.

ERGEBNISSE

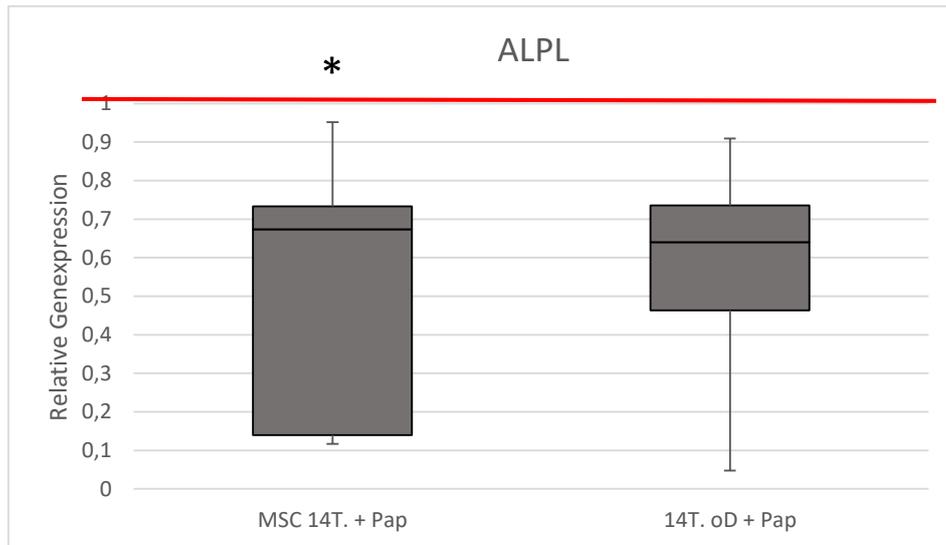


Abbildung 17: Effekt von Papaverin auf die relative Expression von ALPL

Signifikante Abschwächung der Expression von ALPL in den MSC, kultiviert über 14 Tagen, die eine Papaverinbehandlung erhielten aber nicht differenziert wurden, im Vergleich zur Probe ohne Papaverinstimulation, hier dargestellt durch rote Linie. Kein signifikanter Effekt von Papaverin auf differenzierte Zellen, Abschwächung der Expression bei differenzierten Zellen mit zusätzlicher Papaverinstimulation jedoch erkennbar. Normierung auf Haushaltsgen *EEF1 α* , Darstellung von Mittelwerten aus fünf Versuchsansätzen mit Fehlerbalken als Standardabweichung, Signifikanzen mit Sternchen * markiert bei p -Werten $< 0,05$ (Student's t -Test)

Bei der Expression von Osteocalcin zeigte sich kein signifikanter Unterschied. Weder im Vergleich der MSC, die kultiviert wurden über 14 Tage mit und ohne Papaverin, noch bei den osteogen differenzierten Zellen mit und ohne Papaverin. Jedoch ist bei letzteren eine gewisse abgeschwächte Expression von Osteocalcin erkennbar, hier jedoch mit großer Streubreite der Ergebnisse der Densitometrie.

ERGEBNISSE

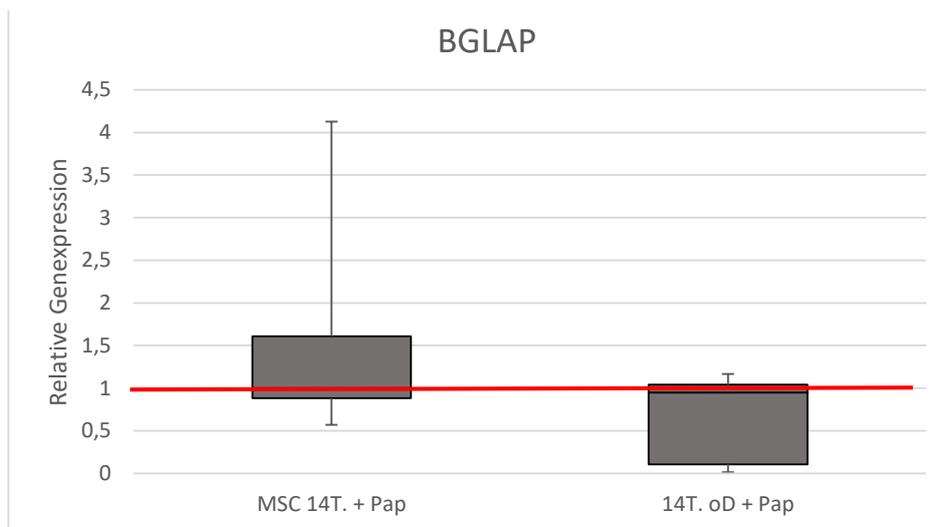


Abbildung 18: Effekt von Papaverin auf die relative Expression von Osteocalcin (BGLAP) Darstellung der MSC, die über 14 Tage mit Papaverin stimuliert wurden und MSC, die osteogen stimuliert wurden und gleichzeitig Papaverinbehandlung erhielten. Rote Linie markiert jeweils die entsprechende Kontrollprobe ohne Papaverinbehandlung. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Normierung auf Haushaltsgen *EEF1 α* , Darstellung von Mittelwerten aus fünf Versuchsansätzen mit Fehlerbalken als Standardabweichung.

4.5. Einfluss der PDE10A Inhibition auf die Mineralisierung

Um zu verifizieren, ob Papaverin die Mineralisierung inhibiert, erfolgte eine Alizarin Rot Färbung der differenzierten und undifferenzierten MSC.

Die mesenchymalen Stromazellen der fünf Spender wurden dafür zusätzlich auf 6-Well-Platten ausgesät und 14 Tage mit und ohne Papaverin (10 μ M) in Doppelwerten differenziert. Zusätzlich wurden undifferenzierte Zellen mit und ohne Papaverinbehandlung in Doppelwerten mitgeführt.

Anschließend wurden die Platten mittels Alizarin Rot angefärbt und makroskopisch und mikroskopisch betrachtet und fotografiert. Je dunkler dabei die Farbe, desto mehr Calciumphosphat der mineralisierten extrazellulären Matrix wurde angefärbt. Zunächst erkennbar ist, dass die Spender MSC 1417, 1418 und 1454 eine starke Mineralisierung zeigen im Vergleich zur nicht differenzierten Kontrolle. Es zeigte sich hier vor allem bei den Spendern der MSC 1418 und 1454 ein deutlicher Unterschied zwischen der osteogenen Differenzierung mit und ohne Papaverin. Papaverin, und somit die Inhibition der PDE10A hat die Mineralisierung verhindert. Die unterschiedliche Intensität der Farbe der jeweiligen Proben, die osteogen differenziert und mit Papaverin stimuliert wurden lässt sich

ERGEBNISSE

erklären durch das unterschiedliche Ausmaß der Hemmung. Bei den MSC 1417 ergibt sich der Eindruck, dass die Färbung nach der Papaverinbehandlung etwas weniger intensiv ist.

Bei den MSC der Spender 1406 und 1414 ist generell kein Unterschied in der Farbtintensität zwischen den einzelnen Ansätzen erkennbar, sodass davon auszugehen ist, dass diese beiden Spender insgesamt kein gutes Mineralisierungspotenzial zeigen.

Diese Beobachtungen lassen sich ebenfalls bei den mikroskopischen Bildern der mit Alizarin Rot gefärbten MSC machen.

Jedoch spielt auch hier wieder die Spendervariabilität eine große Rolle, weshalb die Ergebnisse nicht immer übereinstimmend sind.

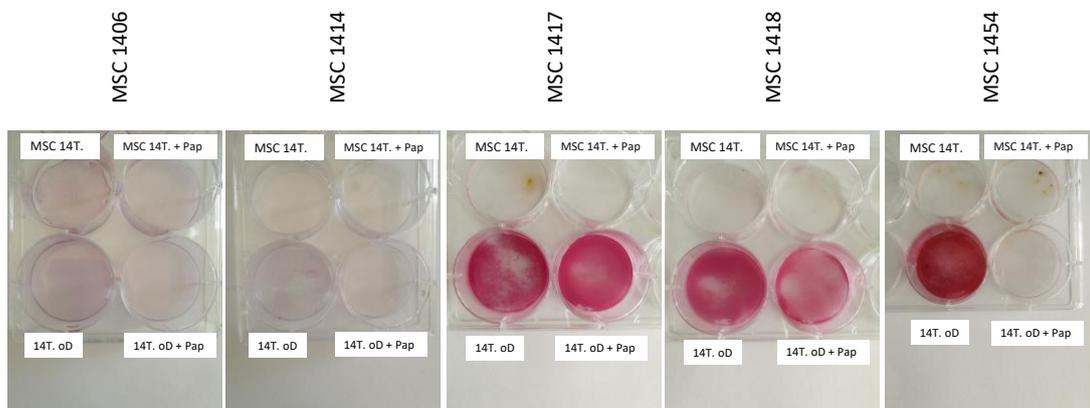


Abbildung 19: Effekt von Papaverin auf die Mineralisierung, makroskopische Darstellung der Alizarin Rot Färbung der MSC

Es wurden fünf unabhängige MSC Spender für 14 Tage osteogen mit und ohne Papaverinbehandlung differenziert, als Kontrolle dienten undifferenzierte Zellen mit und ohne Papaverinbehandlung.

Der Effekt von Papaverin ist nach 14 Tagen, v.a. in Probe MSC 1418 und 1454 erkennbar.

ERGEBNISSE

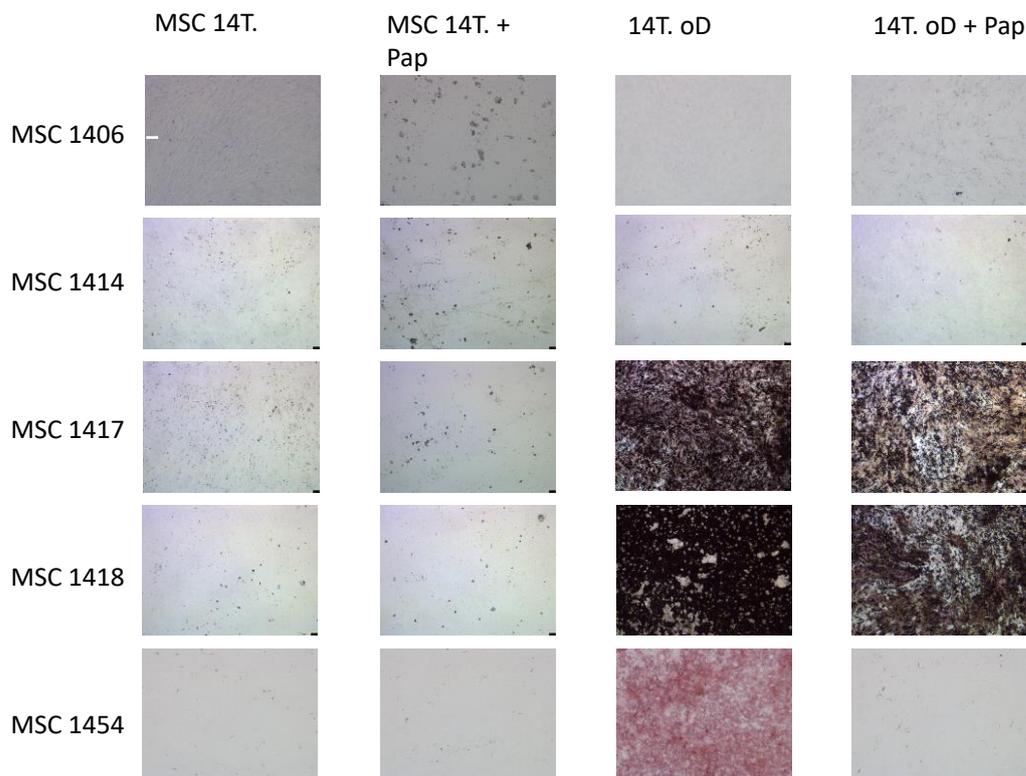


Abbildung 20: Effekt von Papaverin auf die Mineralisierung, mikroskopische Darstellung der Alizarin Rot Färbung der MSC

Nachweis des Effektes von Papaverin auf die Mineralisierung nach 14 Tagen, besonders gut erkennbar bei Spendern der MSC 1418 und 1454, etwas schwächer ausgeprägt bei Spender 1417. Repräsentative Aufnahmen sind gezeigt. Der weiße Maßstab Balken der Probe MSC 1406 nach 14 T. repräsentiert 100 μm .

4.6. Einfluss von PDE10A auf die Mechanotransduktion

Die Mechanotransduktion in skelettalen Vorläuferzellen ist abhängig von cAMP-abhängigen Signalwegen (Johnson et al., 2018). Das Ziel des folgenden Versuches ist also, zu überprüfen, inwiefern eine Hemmung der Phosphodiesterase 10A durch Papaverin, also eine Hemmung des Abbaus von cAMP einen Einfluss auf die Mechanosensitivität nimmt. Als Modell wurden erneut HEK293- und hMSC-TERT-Zellen herangezogen, da diese leichter verfügbar sind als mesenchymale Stromazellen. Die Zellen wurden mit Hilfe des oben erwähnten Bioreaktors durch Dehnung mechanisch stimuliert und anschließend wurde über zwei Verfahren die Mechanotransduktion überprüft.

4.6.1. Luciferasebestimmung bei gedehnten hMSC-TERT- und HEK293-Zellen

In einem ersten Ansatz wurden hMSC-TERT-AP1-Zellen und HEK293-AP1-Zellen herangezogen, welche mit dem Vektor pGL4.14-AP stabil transfiziert wurden. Wie durch die Arbeitsgruppe bereits beschrieben, konnte ein signifikanter Anstieg der AP1-vermittelten Luciferaseaktivität durch zyklische Dehnung beobachtet werden (Seefried et al., 2010). Dieses Phänomen dient hier der Überprüfung der Mechanoresponsivität der verschiedenen Zellen und vor allem welchen Effekt Papaverin auf diese ausübt.

Dazu wurden die HEK293-AP1-Zellen und die hMSC-TERT-AP1-Zellen auf 24-Well-Polyurethan-Platten ausgesät. Nach 24 Stunden der Kultivierung wurde ein Teil der HEK293-AP1-Zellen mit Papaverin 10 μ M stimuliert. Die hMSC-TERT-AP1-Zellen, die hier als Positivkontrolle für die mechanische Stimulation mitgeführt wurden, exprimieren PDE10A kaum, weswegen diese auch nicht mit Papaverin behandelt wurden.

Nach weiteren 24 Stunden erfolgte die zyklische Dehnung über 30 min (1 Hz, 1 %), wie bereits im Methodenteil beschrieben wurde. Anschließend folgte wieder eine Phase der Kultivierung über 24 Stunden, damit die Luciferase transkribiert werden und dann in Protein translatiert werden kann. Danach wurden die Zellen lysiert, umpipettiert und eingefroren, um eine vollständige Lyse zu garantieren. Später wurde dann die Luciferaseaktivität nach erneutem Auftauen mit Hilfe des Luminometers gemessen.

ERGEBNISSE

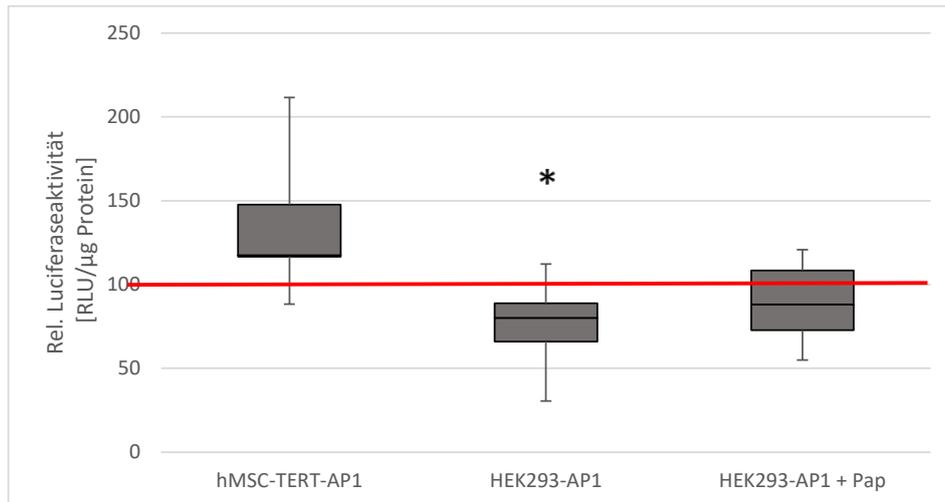


Abbildung 21: Luciferasemessung der zyklisch gedehnten Zellen hMSC-TERT-AP1, HEK293-AP1 mit und ohne Papaverin

Luciferaseaktivität genormt auf den Proteingehalt. Dargestellt ist eine Zunahme der Luciferaseaktivität der hMSC-TERT-AP1-Zellen nach Dehnung, zudem eine signifikante Abnahme der Luciferaseaktivität der HEK293-AP1-Zellen, welche durch Papaverinbehandlung wieder aufgehoben wird.

Alle Werte wurden normiert auf die Kontrollzellen ohne AP1-Element (hMSC-TERT-pGL bzw. HEK293-pGL-Zellen) verdeutlicht als rote Linie. Darstellung von Mittelwerten aus acht Messreihen mit Fehlerbalken als Standardabweichung, Signifikanzen mit Sternchen * markiert bei p -Werten $< 0,05$ (Student's t-Test)

Als Kontrolle dienten die gedehnten HEK293-pGL-Zellen, bei welchen bekannt ist, dass das pGL-Konstrukt nicht durch Mechanik stimulierbar ist. Ihr Wert wurde auf 100 normiert und diente als Bezugsgröße, im Diagramm als rote Linie hervorgehoben. Zu erkennen ist zum einen, dass die mechanische Dehnung einen Anstieg der Luciferaseaktivität der hMSC-TERT-AP1-Zellen bewirkt hat. Dies bedeutet, dass man generell davon ausgehen kann, dass die Dehnung mit Hilfe des Bioreaktors gemäß dem Protokoll ablief und funktioniert hat.

Des Weiteren ist eine unerwartete signifikante Abnahme der Luciferaseaktivität der gedehnten HEK293-AP1-Zellen dargestellt. Die signifikante Inhibition der AP1 Aktivität in den HEK293 Zellen wurde durch Papaverin aufgehoben. Jedoch besteht kein signifikanter Unterschied, zwischen den gedehnten HEK293-AP1-Zellen, die mit Papaverin stimuliert wurden und den gedehnten die keine Stimulation erfuhren.

4.6.2. Analyse der Expression mechanoresponsiver Gene in hMSC-TERT-Zellen mit PDE10A Überexpression

In einem nächsten Schritt sollte analysiert werden, inwiefern sich eine PDE10A Überexpression auf die Regulation mechanoresponsiver Gene in hMSC-TERT-Zellen auswirkt.

Hierfür wurden hMSC-TERT eingesetzt, die stabil mit einem pcDNA3.1-PDE10A Konstrukt transfiziert wurden, was bedeutet, dass die Vektoren nach Proliferation und Teilung der Zellen an nachfolgende Generationen weitergegeben werden. Als Kontrolle dienten hMSC-TERT-pcDNA3.1 Zellen, also hMSC-TERT ohne PDE10A Überexpression.

Die beiden Zelllinien wurden jeweils in ein Well einer 4-Well-PU-Platten ausgesät, pro Ansatz wurden identische PU-Platten vorbereitet: eine statische Kontrolle, welche nicht der zyklischen Dehnung ausgesetzt wurde und zwei Platten, welche gedehnt wurden. Die zyklische Dehnung erfolgte wieder nach Protokoll für 30 min (1 Hz, 1 %) mit Hilfe des Bioreaktors. Die Zellen der einen Platte wurden bereits 15 min nach der mechanischen Belastung geerntet, die andere Platte erst 4 Stunden nach der zyklischen Dehnung. Anschließend erfolgte die RNA-Isolierung und cDNA-Synthese sowie die Analyse der mechanoresponsiven Gene FOS und PTGS2 mittels qPCR. FOS und PTGS2 werden als „immediate-early genes“ bezeichnet, da sie bereits zum Teil nach 15 min mechanischer Belastung hochreguliert werden (Ziouti et al., 2019a). Dies ist auch der Grund, warum ein Teil der Zellen bereits 15 min nach erfolgter Dehnung geerntet wurde. Zur Überprüfung des späteren Expressionsmusters, wurden die Zellen der dritten PU-Platte erst nach 4 Stunden geerntet.

Als Haushaltsgen wurde COX4I1 (Cytochrome C Oxidase Subunit 4I1) amplifiziert, da bereits aus früheren Versuchen bekannt ist, dass dieses Gen nicht auf zyklische Dehnung anspricht.

In diesem Versuch (siehe Abbildung 22) ist zunächst erkennbar, dass die Zellen auf zyklische Dehnung ansprechen und eine Mechanotransduktion detektiert werden konnte, da sowohl PTGS2 als auch FOS in den hMSC-TERT-pcDNA3.1 Kontrollzellen nach 15 Minuten stärker exprimiert wurden im Vergleich zu ungedehnten Kontrollen (rote Linie). Eine Induktion der Expression wird bei PTGS2 auch nach 4 Stunden beobachtet. FOS hin-

ERGEBNISSE

gehen wird zu diesem Zeitpunkt nicht stärker exprimiert und es wird eher eine Herabregulation beobachtet. Die Mechanoresponsivität von PTGS2 und FOS und der zeitliche Verlauf der Expression wurden bereits von der Arbeitsgruppe im Vorfeld beschrieben. Durch eine Überexpression von PDE10A wird die Induktion von PTGS2 nach 15 Minuten und nach 4 Stunden, als auch von FOS nach 15 Minuten komplett aufgehoben und die Expression fällt auf das Niveau ungedehnter Zellen zurück (rote Linie). Allerdings sind diese Daten nicht signifikant (Student's t-Test) und es müssten weitere zusätzliche Untersuchungen durchgeführt werden, um diesen Trend zu untermauern.

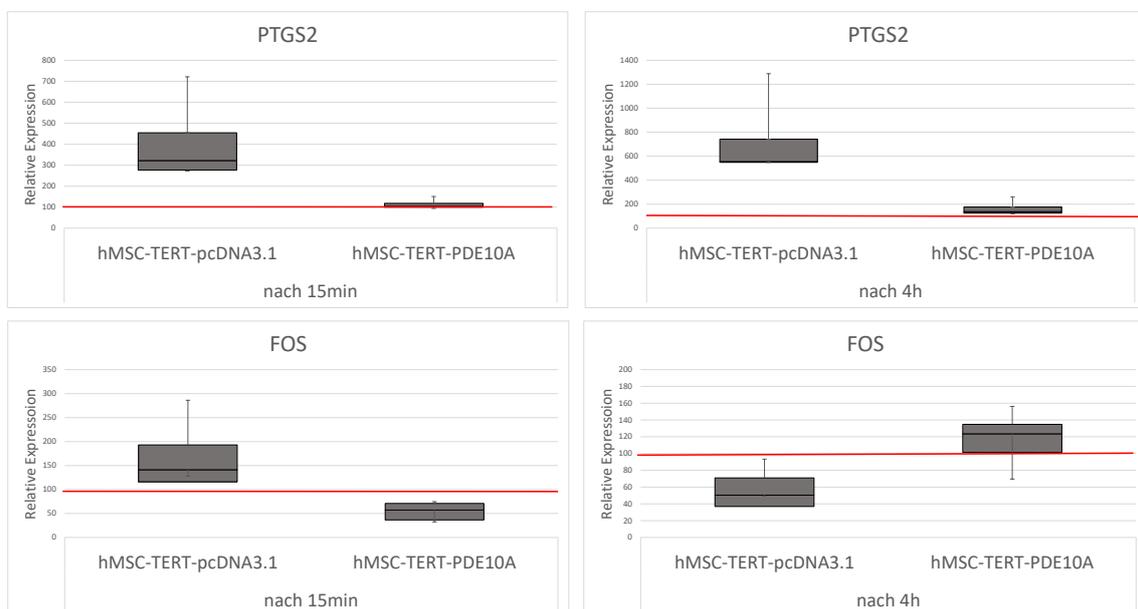


Abbildung 22: relative Expression von PTGS2 und FOS, Ergebnisse der qPCR

Alle Werte wurden nach der $\Delta\Delta C_t$ -Methode ausgewertet und auf das Haushaltsgen COX4I1 bezogen. Alle Zellen wurden 30 min mechanischer Belastung ausgesetzt und 15 min bzw. 4 h später geerntet. Rote Linie markiert ungedehnte Kontrolle. Darstellung von Mittelwerten aus vier Messreihen mit Fehlerbalken als Standardabweichung

5. Diskussion

Bisher war nicht viel bekannt über die Rolle der Phosphodiesterase 10A, nur deren Zusammenhang mit neurodegenerativen Erkrankungen stand im Fokus wissenschaftlicher Arbeiten. Erstmals wurde nun herausgefunden, dass die Phosphodiesterase 10A jedoch auch in humanen mesenchymalen Stromazellen des Knochens verstärkt exprimiert wird, und zusätzlich überexprimiert wird in mesenchymalen Stromazellen von osteoporotischen Patienten. Nun galt es herauszufinden, welche Aufgabe die Phosphodiesterase 10A in den zellulären Vorgängen des Knochens nimmt. Dazu wurde zunächst der PDE10A-Inhibitor Papaverin hinzugezogen, um zu überprüfen, welchen Einfluss dieser auf cAMP-abhängige Signalwege nimmt, um daraus wiederum auf die Funktion der PDE10A zu schließen. Für den Knochenstoffwechsel nimmt zudem die Mechanotransduktion eine wichtige Position ein, da sie verschiedenste Auf- und Umbauprozesse des Knochens induziert. Hierbei stellte sich die Frage, ob und inwiefern PDE10A die Mechanotransduktion beeinflusst und welche Auswirkungen beispielsweise eine Hemmung des Enzyms hat. Eine Hauptaufgabe der mesenchymalen Stromazellen ist die osteogene Differenzierung, auch hier war es Ziel der Arbeit, zu überprüfen, welche Rolle die Phosphodiesterase 10A in dieser Entwicklung nimmt.

Da die Erkenntnis, dass PDE10A auch in humanen mesenchymalen Stromazellen exprimiert wird zum aktuellen Stand neu ist, gibt es kaum vergleichbare Literatur. Was aber schon diskutiert wurde, ist der Einfluss von cAMP-abhängigen Signalwegen auf skelettale Vorläuferzellen und deren osteogene Differenzierung, sowie auf die Mechanotransduktion, also die Umwandlung von mechanischen Reizen in biochemische Signale. Diese Studien sollen die Grundlage für die folgende Diskussion bieten (Johnson et al., 2018).

5.1. Basaler Einfluss von Papaverin auf HEK293-CRE-Zellen

Wie schon erwähnt konnte in den HEK293-Zellen, ebenso wie in den MSC, eine Expression der PDE10A festgestellt werden. Nun galt es mehr über den basalen Einfluss von Papaverin, dem spezifischen PDE10A-Inhibitor, auf diese HEK293-Zellen, als Modell für MSC herauszufinden. Die HEK293-Zellen wurden verwendet, da in diesen Zellen die PDE10A-Expression hoch ist, in mesenchymalen Stromazellen eher niedrig und in den hMSC-TERT-Zellen ist fast keine PDE10A-Expression feststellbar. Am besten wäre es natürlich, die Versuche mit osteoporotischen hMSC mit hoher PDE10A-Expression durchzuführen, diese stehen allerdings nicht ausreichend zur Verfügung.

Für den Versuch wurde in diese HEK293-Zellen der Leervektor pGL4.14 eingebracht, welcher die codierende Sequenz der Luciferase enthält und somit die Luciferaseaktivität auf die Genexpression zurückschließen lässt.

In den HEK293-CRE-Zellen wurde vor die codierende Sequenz der Luciferase des pGL4.14 drei zusätzliche CRE-Elemente mit der Sequenz TGACGTC eingebracht. Dieses CRE-Element wird, wie bereits beschrieben, vom Transkriptionsfaktor CREB gebunden, und CREB wird wiederum aktiviert durch cAMP-induzierte Signalwege. Hemmt man nun mit Hilfe von Papaverin die Phosphodiesterase 10A, sprich man hemmt den Abbau von cAMP, steht mehr cAMP zur Verfügung, welches wiederum die Proteinkinase A aktiviert, welche dann den Transkriptionsfaktor CREB phosphoryliert und aktiviert, wodurch dieser an die CRE-Sequenz im Promotor der HEK293-CRE-Zellen binden kann. Eigentlich sollte dies dann in einer erhöhten Aktivität der Luciferase und wiederum in einer verstärkten Lumineszenz resultieren. Dies ist aber nicht der Fall gewesen, wie in Abschnitt 4.2. ersichtlich. Betrachtet man allerdings die Ergebnisse von Abschnitt 4.3., in welcher die HEK293-CRE-Zellen zusätzlich mit Forskolin stimuliert wurden, sieht man, dass hier nun die Luciferaseaktivität ansteigt. Forskolin ist ein Stimulator der Adenylatzyklase, wodurch vermehrt cAMP synthetisiert wird. Daraus kann man schließen, dass eine Hemmung der Phosphodiesterase 10A durch Papaverin erst dann messbar ist, wenn die Adenylatzyklase eine ausreichend hohe Aktivität zeigt, indem sie zusätzlich durch Forskolin stimuliert wird und genügend cAMP synthetisiert. Interessant wäre, die cAMP-Spiegel nach Papaverinbehandlung zu quantifizieren. Dies wurde versucht, dazu wurden

zwei unterschiedliche Assays verwendet, die Sensitivität war jedoch leider nicht ausreichend hoch.

Als Kontrolle dienten die HEK293-pGL-Zellen, die nur den Leervektor pGL4.14, ohne ein CRE-Element, enthalten. Diese zeigen dementsprechend auch keine Veränderung der Luciferaseaktivität durch Hemmung der PDE10A oder Stimulierung mit Forskolin.

5.2. Einfluss der cAMP-abhängigen Signalwege und der Phosphodiesterase 10A auf osteogene Differenzierung von MSC

Die Rolle von cAMP-abhängigen Signalwegen bezüglich der osteogenen Differenzierung von humanen mesenchymalen Stromazellen ist weiterhin nicht ganz klar, vor allem gibt es kaum Untersuchungen bezüglich der Funktion der Phosphodiesterase 10A in diesem Kontext.

Eine Forschungsgruppe fand heraus, dass in mesenchymalen Stromazellen und embryonalen Stromazellen eine Aktivierung der Adenylatzyklase durch Forskolin, was zu einer gesteigerten Synthese von cAMP führt, eine Hemmung der Mineralisierung und der osteogenen Differenzierung nach sich zieht. Im Gegensatz dazu, soll die Behandlung der MSC mit Forskolin bevor man das osteogene Differenzierungsmedium hinzugibt, das osteogene Potential steigern (Kao et al., 2012).

In anderen Experimenten wurde mit Hilfe eines Nagetier-Modells zum einen gezeigt, dass eine cAMP-abhängige Signalwirkung über die Proteinkinase A die osteogene Differenzierung sowie die Knochenformation hemmt (Siddappa et al., 2009). Die gleiche Forschungsgruppe berichtete allerdings zum anderen, dass hohe nicht-physiologische Konzentrationen des second messenger cAMP wiederum hilfreich seien für die osteogene Differenzierung von humanen mesenchymalen Stromazellen (Siddappa et al., 2008). Letztendlich schlossen sie dann aus ihren Ergebnissen, dass cAMP einen hemmenden sowie aktivierenden Einfluss nehmen kann auf die weitere Entwicklung der MSC im Sinne einer osteogenen Differenzierung und nicht allein die Konzentration von cAMP ausschlaggebend ist, sondern vielmehr die Dauer der Wirkung des second messenger (Siddappa et al., 2010).

DISKUSSION

Aus dieser Annahme heraus kann geschlossen werden, dass die Phosphodiesterase 10A eine entscheidende Rolle spielen muss. Um dies zu untersuchen, welchen Einfluss die Phosphodiesterase 10A auf die osteogene Differenzierung von mesenchymalen Stromazellen nimmt, wurden diese mit dem PDE10A-Hemmstoff Papaverin behandelt. Papaverin ist ein hoch spezifischer Hemmstoff von PDE10A (Jankowska et al., 2019, Lee et al., 2019). Wie oben beschrieben, konnten zytotoxische Effekte bei einer Konzentration von 10 μ M ausgeschlossen werden, weswegen diese für alle Versuche eingesetzt wurde.

Dazu wurden die MSC nach Kultivierung mit osteogenem Standardmedium über 14 Tage auf die Expression der osteogenen Marker RUNX2, ALPL, Osteopontin und Osteocalcin mithilfe einer PCR und Gelelektrophorese untersucht. In den Proben ohne Papaverin waren die osteogenen Marker nach osteogener Differenzierung wie erwartet erhöht. Es ließ sich jedoch zeigen, dass Papaverin einen hemmenden Einfluss auf die osteogene Differenzierung der MSC nimmt, besonders eindrücklich nachzuweisen bei dem Marker RUNX2. RUNX2 ist, wie unlängst bekannt, ein wichtiger Initiator der Osteogenese und besitzt als Transkriptionsfaktor eine direkte Bindestelle in der Promotorregion von Osteocalcin und kann dieses induzieren (Komori and Kishimoto, 1998). RUNX2 induziert ebenfalls die Expression von Osteopontin (Komori, 2019). Dies kann in diesem Versuch bestätigt werden, da die Expression von RUNX2 immer parallel verläuft mit der von Osteopontin und Osteocalcin.

Die osteogenen Marker wurden auch in den undifferenzierten Zellen auf niedrigem Niveau exprimiert, man weiß, dass es über die Zeit in konfluenten Kulturen von MSC auch zur spontanen osteogenen Differenzierung kommt, allerdings fällt diese dann deutlich schwächer aus als in den Zellen, die stimuliert wurden.

Das Phänomen, dass eine Inhibition der PDE10A die osteogene Differenzierung verschlechtert, zeigte sich ebenfalls im morphologischen Nachweis, welcher über eine Alizarin Rot Färbung der MSC erfolgte. Hier zeigte sich eine abgeschwächte Rotfärbung der differenzierten MSC mit Papaverin.

Papaverin hatte außerdem einen Einfluss auf undifferenzierte Zellen und schwächte die Expression des Markers ALPL.

Zwar waren die Ergebnisse nicht durchgängig signifikant, durch eine höhere Anzahl an Experimenten könnte sich dies allerdings verbessern lassen.

5.3. Phosphodiesterase 10A und Mechanotransduktion

Die Entwicklung der mesenchymalen Zellen, insbesondere die osteogene Differenzierung *in vivo* wird, wie schon erwähnt, unter anderem beeinflusst durch Mechanotransduktion. Bei dieser werden mechanische Kräfte, z.B. durch zyklische Dehnung wie oben beschrieben, über Integrine und Calciumkanäle, welche sich in der Zellmembran befinden und dem primären Zilium in biochemische Signale verwandelt. Dies führt letztendlich zu einer Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, die wiederum an DNA-Elemente wie z.B. die AP-1-Bindestelle vor mechanoresponsiven Genen binden. Es wurde bereits gezeigt, dass die Mechanotransduktion durch das primäre Zilium registriert wird und durch die Adenylatzyklase 6 und dem second messenger cAMP reguliert wird (Johnson et al., 2018). Nachgewiesen ist, dass beispielsweise der sog. „fluid shear stress“ unter anderem über cGMP in osteoblastären Zellen vermittelt wird, was wiederum zur Aktivierung von cGMP-abhängigen Proteinkinasen führt (Rangaswami et al., 2009). PDE10A ist im Abbau von cAMP involviert und in geringerem Ausmaß von cGMP, dadurch ergibt sich die Frage, ob die PDE10A auch mechanoresponsiv in humanen mesenchymalen Stromazellen reagiert.

Um dies von Grund auf herauszufinden, wurden erneut HEK293-Zellen als Modell herangezogen (siehe 4.6.1.). Da bekannt ist, dass HEK293-Zellen zwar mechanoresponsiv sind, jedoch keine spezifische Antwort zeigen, wurde eine AP1-Bindestelle in die HEK293-pGL4.14-Zellen kloniert. Diese AP1-Bindestelle ist zumindest in hMSC-TERT-Zellen nachweislich mechanisch ansprechbar (Seefried et al., 2010). Zu erwarten wäre daher, dass die AP-1-Bindestelle in HEK293-Zellen ebenfalls mechanisch aktiviert werden kann. Die durchgeführten Versuche zeigten dies allerdings nicht, die Luciferaseaktivität der HEK293-AP1-Zellen war nicht erhöht im Vergleich zu der Kontrolle der HEK293-pGL-Zellen. Ebenfalls abgeschwächt war die Luciferaseaktivität der HEK293-AP1-Zellen, die zusätzlich mit Papaverin stimuliert wurden, der Effekt war jedoch nicht ganz so stark. Eine signifikante Dehnung der Zellen hat stattgefunden, da die Luciferaseaktivität der

DISKUSSION

hMSC-TERT-AP1-Zellen, die auf derselben PU-Platte ausgesät waren, wie erwartet, erhöht war. Offensichtlich findet in den HEK293-Zellen keine Mechanotransduktion statt, zumindest keine, die über den AP1-Transkriptionsfaktor läuft.

Ein erkennbarer Unterschied zwischen den hMSC-TERT-AP1-Zellen und den HEK293-AP1-Zellen ist zumindest, dass erstere die Phosphodiesterase 10A im Vergleich zu den HEK293-Zellen kaum bis gar nicht exprimieren. Jedoch ist bereits aus weiteren Versuchen bekannt, dass die PDE10A-Genexpression, allenfalls in MSC mechanoresponsiv ist (Müller-Deubert et al., 2020). Dies lässt sich speziell in diesem Versuch allerdings nicht direkt bestätigen.

Zur weiteren Untersuchung des Zusammenhangs zwischen der Mechanotransduktion und der Phosphodiesterase 10A wurden stabil-transfizierte hMSC-TERT-Zellen zyklisch gedehnt (siehe 4.6.2). Dazu wurden die sog. hMSC-TERT-PDE10A-Zellen etabliert, in welche stabil der pcDNA3.1-Vektor mit der cDNA für das Enzym PDE10A transfiziert wurde. Die Expression des Proteins wurde mit Western Blot und Immunzytologie bestätigt, die Daten sind hier nicht gezeigt. Die genannten Zellen wurden ebenfalls gedehnt, anschließend erfolgte eine real-time PCR nach 15 min sowie nach 4 Stunden. Dafür wurde unter anderem die Expression der mechanoresponsiven Gene FOS und PTGS2 analysiert. Wie bereits bekannt, werden die immediate-early genes FOS und PTGS2 bereits früh nach mechanischer Belastung vermehrt exprimiert (Ziouti et al., 2019b). Dies war in der Kontrollgruppe der hMSC-TERT-pcDNA-Zellen auch zu erkennen. Viel spannender war aber die Beobachtung, dass in den hMSC-TERT-PDE10A-Zellen die mechanoresponsiven Gene deutlich weniger, zum Teil um ein Vielfaches schwächer exprimiert wurden, und das zu beiden Zeitpunkten (15 min und 4h). Die FOS-Expression war sogar in Bezug auf das Haushaltsgen COX4I1 schwächer exprimiert noch als in der ungedehnten Kontrolle. Wirkt also eine PDE10A Überexpression einer Expression von FOS oder PTGS2 durch mechanische Stimulation entgegen?

Mittlerweile wurde die Versuchsreihe fortgesetzt und man kam zu der Annahme, dass die Expression von FOS und PTGS2 abhängig vom second messenger cAMP ist. Es wurde beobachtet, dass die Expression der immediate-early genes FOS und PTGS2 4 Stunden

nach erfolgter mechanischer Dehnung, wie zu erwarten, sank, während die PDE10A Expression in diesen Zellen hochreguliert wurde, das heißt ein vermehrter Abbau von cAMP erfolgte (Müller-Deubert et al., 2020).

5.4. Zusammenhang der PDE10A mit Alterungsprozessen und Krankheit

Erstmals wurde mittels Mikroarray die signifikant erhöhte Expression der Phosphodiesterase 10A in mesenchymalen Stromazellen von osteoporotischen Patienten im Vergleich zu MSC von gesunden Patienten festgestellt. Diese krankheits- bzw. altersbezogene Expression ist bisher nicht bekannt gewesen. Bekannt ist allerdings, dass die Herunterregulierung von cAMP-abhängigen Signalwegen zusammenhängt mit Alterungsprozessen und altersabhängigen Krankheiten (Tam and Walford, 1980, Kelly, 2018). Berichte über altersabhängige Änderungen des cAMP-Spiegels im menschlichen Gewebe sind bisher recht selten, bereits herausgefunden wurde jedoch, dass beispielsweise in gealterten weißen Blutzellen die cAMP-Level niedriger sind, als in jungen reifen weißen Blutzellen (Tam and Walford, 1980). Außerdem wurde schon häufiger der Einfluss von cAMP-abhängigen Signalwegen auf Krankheiten im Gehirn beschrieben. Bei Patienten, die an der Huntington-Krankheit leiden, wurden erniedrigte cAMP-Niveaus im parietalen Cortex gemessen. Hier scheint auch die Phosphodiesterase 10A eine Rolle zu spielen, diese scheint zwar kompensatorisch durch die niedrigen cAMP-Level weniger exprimiert zu werden, dennoch zeigen PDE10A-Inhibitoren positive Effekte auf Defizite bezüglich Verhalten, Neurodegeneration und Elektrophysiologie im Tiermodell (Beaumont et al., 2016). Berichte über die Alzheimer-Demenz zeigen ebenfalls erniedrigte cAMP-Spiegel, allerdings im Hippocampus (Ohm et al., 1989), im Gegensatz dazu ist die Huntington-Krankheit assoziiert mit erhöhtem cAMP-Niveau im Hippocampus, wiederum, wie bereits erwähnt, mit erniedrigtem cAMP-Niveau im Cortex und Striatum. Man weiß mittlerweile, dass die PDE10A stark im Striatum exprimiert wird, weniger dafür im Hippocampus, therapeutische Interventionen im Sinne einer Inhibition der PDE10A sind also nur erfolgsversprechend für die Huntington-Krankheit, vermutlich nicht für die Alzheimer-Demenz (Kelly, 2018).

In dem auf den Mikroarray folgenden Bestätigungsversuch konnte gezeigt werden, dass in HEK293-Zellen die PDE10A-Expression ebenfalls deutlich erhöht ist. Aus der täglichen Laborarbeit ist bereits bekannt, dass diese HEK293-Zellen vergleichsweise schnell degenerieren und Seneszenzzeichen zeigen. Nun wäre die Frage, inwiefern sich jetzt einen Zusammenhang zwischen der PDE10A und einer frühen Zellalterung gibt, um dann möglicherweise auf die Pathophysiologie der bereits erwähnten Krankheiten wie Osteoporose oder die Huntington-Krankheit zu schließen. Dies lässt Raum für weitere zukünftige Forschungsarbeiten.

5.5. Interaktion von Phosphodiesterasen mit AKAPs, Zusammenhang mit Kompartimentierung

Wie bereits beschreiben, steht PDE10A auch in Zusammenhang mit neurodegenerativen Erkrankungen. Ein weiterer Aspekt, der hier zukünftig interessant werden könnte ist die Interaktion mit den sog. A-Kinase-Ankerproteinen, kurz AKAPs. Diese sind von zentraler Bedeutung, da die meisten Interaktionen von Kinasen und Phosphatasen über die Gerüstproteine AKAPs ablaufen. Diese binden beispielsweise die Proteinkinase A, Proteinkinase C oder auch Phosphodiesterasen und verankern diese in spezifischen subzellulären Domänen. Ein Beispiel dafür sind die Muskel-AKAPs, die in skelettalen und Herzmuskelzellen vorkommen und PDE4 binden und einen Komplex bilden mit der PKA und dem Ryanodinrezeptor, wie in folgender Abbildung dargestellt (Conti and Beavo, 2007).

DISKUSSION

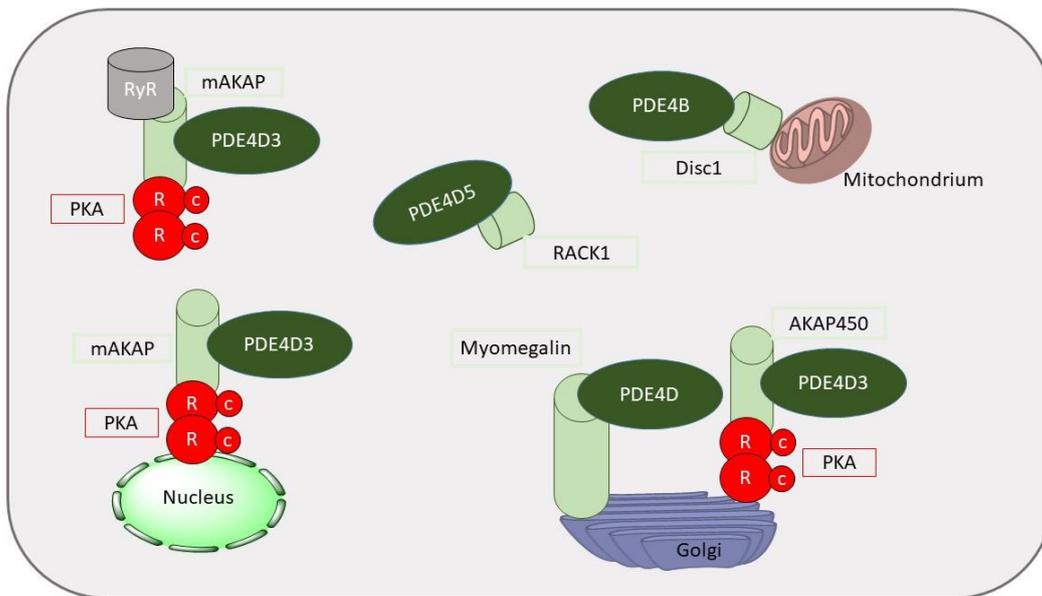


Abbildung 23: Schematische Darstellung der Interaktion von AKAPs mit PDE und PKA in einer Herzmuskelzelle. Modifiziert nach (Conti and Beavo, 2007). AKAPs sind hellgrün dargestellt, Phosphodiesterasen dunkelgrün, Kinasen rot. Hervorzuheben ist, wie im Text beschrieben, der Komplex aus Muskel-AKAP (mAKAP), PDE4D3, PKA und Ryanodinrezeptor (RyR).

Bei PDE4-defizitären Mäusen, führt ein Mangel in diesem makromolekularen Komplex zu einer spät-auftretenden dilatativen Kardiomyopathie (Lehnart et al., 2005).

Indem die AKAPs z.B. die PKA an verschiedene Zellkompartimente wie die Plasmamembran oder die äußere Mitochondrienmembran bindet, koordinieren die AKAPs auch cAMP-abhängige Signalwege, dieser Vorgang nennt sich Kompartimentierung. Bisher war nicht ganz klar, wie sich cAMP wiederum in der Zelle bewegt, mittlerweile wurde aber herausgefunden, dass cAMP nicht frei innerhalb der Zelle diffundiert, sondern auch an Proteine gebunden ist, hauptsächlich an die PKA. Dadurch haben die vergleichsweise langsam arbeitenden Phosphodiesterasen die Möglichkeit, nanometergroße Bereiche zu bilden, die annähernd frei von cAMP sind und in diesen Kompartimenten wird cAMP unterschiedlich durch die PDE reguliert (Bock et al., 2020). Diese Regulierung erfolgt dabei auf zwei verschiedenen Wegen. Zum einen durch strenge Steuerung des cAMP-Gradienten innerhalb der spezifischen Kompartimente, zum anderen versuchen die PDE zu verhindern, dass cAMP-Signale in die benachbarten Kompartimente diffundieren. Deutlich wurde dabei auch, dass mehr die Lokalisation der PDE in den subzellulären Domänen, als deren Konzentration entscheidend sind für ihre Funktion (Azevedo et al., 2014).

DISKUSSION

Festgestellt wurde nun ebenfalls, dass die bereits erwähnte cAMP-Kompartimentierung über AKPAs assoziiert ist mit Neurotransmission, also die Kommunikation zwischen Neuronen und Synapsen, Lernen und Erinnern. Eine Zerstörung dieser cAMP-Kompartimente hängt zusammen mit neurodegenerativen Erkrankungen wie der Alzheimer-Demenz (Poppinga et al., 2014).

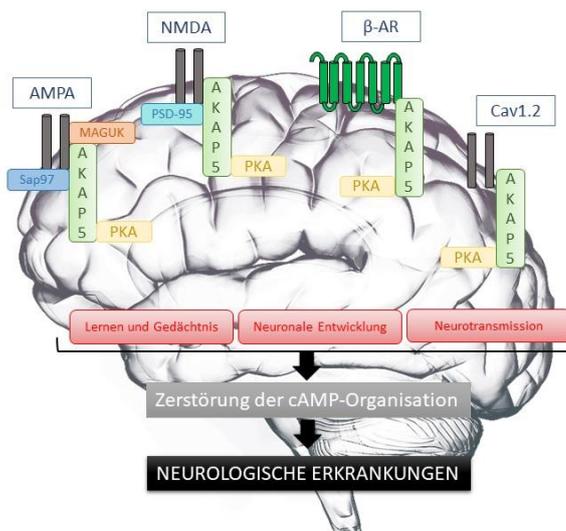


Abbildung 24: Schematische Darstellung der Kompartimentierung von cAMP in Neuronen und wie eine Zerstörung dieser assoziiert ist mit neurodegenerativen Erkrankungen. Modifiziert nach (Poppinga et al., 2014)

Bisher gibt es keine Erkenntnisse darüber, ob und welche spezifischen AKAPs es für die Phosphodiesterase 10A gibt, inwiefern molekulare Komplexe mit Proteinkinasen gebildet werden, und wo diese letztendlich verankert sind. Möglicherweise könnte man von der Pathophysiologie neurodegenerativer Erkrankungen durch die Zerstörung der cAMP-Kompartimente Schlüsse auf die von altersassoziierten Erkrankungen und Erkrankungen des Knochens ziehen. Dies könnte ein weiterer Ansatz sein für die zukünftige Forschung.

5.6. Ausblick

Eindrücklich erkennbar ist bereits in den frühen Zügen der Forschung an der Phosphodiesterase 10A, dass diese nicht nur wichtig ist in Bezug auf neurodegenerative Erkrankungen, sondern eine viel größere Rolle einnimmt.

Bereits jetzt lässt sich vermuten, dass die Phosphodiesterase 10A ein relevanter Modulator der osteogenen Differenzierung von skelettalen Vorläuferzellen ist. Die spezifische Inhibierung der PDE10A durch Papaverin verringert die osteogene Differenzierung und hemmt die Mineralisierung. Zudem legen die bereits erfolgten Untersuchungen nahe, dass die Expression der PDE10A mechanoresponsiv ist und Einfluss nimmt auf die Mechanotransduktion, besonders in Bezug auf die Regulierung durch immediate-early genes. Weitere zukünftige Nachforschungen werden sicherlich Erkenntnisse bringen, inwiefern die PDE10A relevant ist für die Aufrechterhaltung und Formation der Knochenmasse. Da bereits nachgewiesen ist, dass PDE10A in hohem Maße in mesenchymalen Stromazellen von osteoporotischen Patienten exprimiert wird, könnten diese Ergebnisse essentiell für den Umgang mit der Volkskrankheit Osteoporose werden. Insbesondere neue Formen der medikamentösen Therapie oder sogar Prävention wären denkbar.

6. Zusammenfassung

Humane mesenchymale Stromazellen sind in der Lage in osteogene Zellen zu differenzieren, und für diese osteogene Differenzierung ist mechanische Belastung ein relevanter Kostimulus. Mechanotransduktion hat zur Folge, dass second messenger wie cAMP und cGMP gebildet werden und sich die Ca^{2+} -Konzentration erhöht, welche wiederum Transkriptionsfaktoren aktivieren, die die Regulation von Genen osteogener Marker vermitteln. Die second messenger cAMP und cGMP werden abgebaut durch Phosphodiesterasen, jedoch ist die Rolle dieser Phosphodiesterasen während der osteogenen Differenzierung oder Mechanotransduktion weiterhin unklar.

Das Ziel dieser Arbeit war es, herauszufinden, inwieweit im Besonderen die Phosphodiesterase 10A einen Einfluss nimmt auf die osteogene Differenzierung und die Mechanotransduktion von mesenchymalen Stromazellen und inwiefern sie dabei die cAMP-abhängigen Signalwege moduliert. Langfristig soll hiermit herausgefunden werden, welche Bedeutung die PDE10A auf altersinduzierte Krankheiten hat, wobei der Fokus zunächst auf der Osteoporose liegen soll.

Um dies zu erreichen, wurden experimentelle Versuche zunächst mit HEK293- und hMSC-TERT-Zellen als Modell für mesenchymale Stromazellen durchgeführt, dann auch mit den mesenchymalen Stromazellen selbst. Untersucht wurde der Einfluss des PDE10A-Inhibitors Papaverin auf die Zellen und auf deren mechanische Induzierbarkeit, sowieso auf die osteogene Differenzierung der hMSC. Außerdem wurden weitere mechanische Versuche durchgeführt, zur Überprüfung des Effekts der Phosphodiesterase 10A.

Es wurde beobachtet, dass die Inhibierung von PDE10A mit Papaverin die osteogene Differenzierung und Mineralisierung vermindert. Außerdem gab es einen ersten Hinweis, dass eine Überexpression von PDE10A schwächenden Einfluss nimmt auf die Expression mechanoresponsiver Gene.

Nachfolgend auf diese Arbeit wurde erkannt, dass die Expression von mechanoresponsiven Genen durch die PDE10A-Inhibition unterdrückt wird.

7. Literaturverzeichnis

- ABDALLAH, B. M., HAACK-SØRENSEN, M., BURNS, J. S., ELSNAB, B., JAKOB, F., HOKLAND, P. & KASSEM, M. 2005. Maintenance of differentiation potential of human bone marrow mesenchymal stem cells immortalized by human telomerase reverse transcriptase gene despite [corrected] extensive proliferation. *Biochem Biophys Res Commun*, 326, 527-38.
- ABRAHAMSEN, B., VAN STAA, T., ARIELY, R., OLSON, M. & COOPER, C. 2009. Excess mortality following hip fracture: a systematic epidemiological review. *Osteoporos Int*, 20, 1633-50.
- AZEVEDO, M. F., FAUCZ, F. R., BIMPAKI, E., HORVATH, A., LEVY, I., DE ALEXANDRE, R. B., AHMAD, F., MANGANIELLO, V. & STRATAKIS, C. A. 2014. Clinical and Molecular Genetics of the Phosphodiesterases (PDEs). *Endocrine Reviews*, 35, 195-233.
- BEAUMONT, V., ZHONG, S., LIN, H., XU, W., BRADAIA, A., STEIDL, E., GLEYZES, M., WADEL, K., BUISSON, B., PADOVAN-NETO, F. E., CHAKROBORTY, S., WARD, K. M., HARMS, J. F., BELTRAN, J., KWAN, M., GHAVAMI, A., HÄGGKVIST, J., TÓTH, M., HALLDIN, C., VARRONE, A., SCHAAB, C., DYBOWSKI, J. N., ELSCHENBROICH, S., LEHTIMÄKI, K., HEIKKINEN, T., PARK, L., ROSINSKI, J., MRZLJAK, L., LAVERY, D., WEST, A. R., SCHMIDT, C. J., ZALESKA, M. M. & MUNOZ-SANJUAN, I. 2016. Phosphodiesterase 10A Inhibition Improves Cortico-Basal Ganglia Function in Huntington's Disease Models. *Neuron*, 92, 1220-1237.
- BEAVO, J. A. 1995. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. *Physiol Rev*, 75, 725-48.
- BELLOWS, C. G., AUBIN, J. E. & HEERSCHKE, J. N. 1991. Initiation and progression of mineralization of bone nodules formed in vitro: the role of alkaline phosphatase and organic phosphate. *Bone Miner*, 14, 27-40.
- BENDER, A. T. & BEAVO, J. A. 2006. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. *Pharmacol Rev*, 58, 488-520.
- BENISCH, P., SCHILLING, T., KLEIN-HITPASS, L., FREY, S. P., SEEFRIED, L., RAAIJMAKERS, N., KRUG, M., REGENSBURGER, M., ZECK, S., SCHINKE, T., AMLING, M., EBERT, R. & JAKOB, F. 2012. The transcriptional profile of mesenchymal stem cell populations in primary osteoporosis is distinct and shows overexpression of osteogenic inhibitors. *PLoS One*, 7, e45142.
- BI, Y., EHIRCHIOU, D., KILTS, T. M., INKSON, C. A., EMBREE, M. C., SONOYAMA, W., LI, L., LEET, A. I., SEO, B. M., ZHANG, L., SHI, S. & YOUNG, M. F. 2007. Identification of tendon stem/progenitor cells and the role of the extracellular matrix in their niche. *Nat Med*, 13, 1219-27.
- BIANCO, P., ROBEY, P. G. & SIMMONS, P. J. 2008. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell*, 2, 313-9.
- BOCK, A., ANNIBALE, P., KONRAD, C., HANNAWACKER, A., ANTON, S. E., MAIELLARO, I., ZABEL, U., SIVARAMAKRISHNAN, S., FALCKE, M. & LOHSE, M. J. 2020. Optical Mapping of cAMP Signaling at the Nanometer Scale. *Cell*, 182, 1519-1530.e17.
- BOLWELL, G. P. 1995. Cyclic AMP, the reluctant messenger in plants. *Trends Biochem Sci*, 20, 492-5.
- BONEWALD, L. F. & JOHNSON, M. L. 2008. Osteocytes, mechanosensing and Wnt signaling. *Bone*, 42, 606-15.
- BORA, R. S., GUPTA, D., MALIK, R., CHACHRA, S., SHARMA, P. & SAINI, K. S. 2008. Development of a cell-based assay for screening of phosphodiesterase 10A (PDE10A) inhibitors using a stable recombinant HEK-293 cell line expressing high levels of PDE10A. *Biotechnol Appl Biochem*, 49, 129-34.

LITERATURVERZEICHNIS

- BORGSTROM, F., ZETHRAEUS, N., JOHNELL, O., LIDGREN, L., PONZER, S., SVENSSON, O., ABDON, P., ORNSTEIN, E., LUNSSJO, K., THORNGREN, K. G., SERNBO, I., REHNBERG, C. & JONSSON, B. 2006. Costs and quality of life associated with osteoporosis-related fractures in Sweden. *Osteoporos Int*, 17, 637-50.
- BOTSFORD, J. L. & HARMAN, J. G. 1992. Cyclic AMP in prokaryotes. *Microbiol Rev*, 56, 100-22.
- BROSTROM, M. A., REIMANN, E. M., WALSH, D. A. & KREBS, E. G. 1970. A cyclic 3',5'-amp-stimulated protein kinase from cardiac muscle. *Adv Enzyme Regul*, 8, 191-203.
- BUTCHER, R. W. & SUTHERLAND, E. W. 1962. Adenosine 3',5'-phosphate in biological materials. I. Purification and properties of cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase and use of this enzyme to characterize adenosine 3',5'-phosphate in human urine. *J Biol Chem*, 237, 1244-50.
- CAPLAN, A. I. 1991. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*, 9, 641-50.
- CHAMBERLAIN, G., FOX, J., ASHTON, B. & MIDDLETON, J. 2007. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells*, 25, 2739-49.
- CHAU, V. Q., SALLOUM, F. N., HOKE, N. N., ABBATE, A. & KUKREJA, R. C. 2011. Mitigation of the progression of heart failure with sildenafil involves inhibition of RhoA/Rho-kinase pathway. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 300, H2272-9.
- CHEN, Y., JU, L., RUSHDI, M., GE, C. & ZHU, C. 2017. Receptor-mediated cell mechanosensing. *Mol Biol Cell*, 28, 3134-3155.
- CHINKERS, M., GARBERS, D. L., CHANG, M. S., LOWE, D. G., CHIN, H. M., GOEDEL, D. V. & SCHULZ, S. 1989. A membrane form of guanylate cyclase is an atrial natriuretic peptide receptor. *Nature*, 338, 78-83.
- CONTI, M. & BEAVO, J. 2007. Biochemistry and physiology of cyclic nucleotide phosphodiesterases: essential components in cyclic nucleotide signaling. *Annu Rev Biochem*, 76, 481-511.
- CORRAL, D. A., AMLING, M., PRIEMEL, M., LOYER, E., FUCHS, S., DUCY, P., BARON, R. & KARSENTY, G. 1998. Dissociation between bone resorption and bone formation in osteopenic transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 13835-40.
- COSKRAN, T. M., MORTON, D., MENNITI, F. S., ADAMOWICZ, W. O., KLEIMAN, R. J., RYAN, A. M., STRICK, C. A., SCHMIDT, C. J. & STEPHENSON, D. T. 2006. Immunohistochemical localization of phosphodiesterase 10A in multiple mammalian species. *J Histochem Cytochem*, 54, 1205-13.
- COSMAN, F., DE BEUR, S. J., LEBOFF, M. S., LEWIECKI, E. M., TANNER, B., RANDALL, S. & LINDSAY, R. 2015. Erratum to: Clinician's guide to prevention and treatment of osteoporosis. *Osteoporos Int*, 26, 2045-7.
- COSMAN, F., DE BEUR, S. J., LEBOFF, M. S., LEWIECKI, E. M., TANNER, B., RANDALL, S., LINDSAY, R. & NATIONAL OSTEOPOROSIS, F. 2014. Clinician's Guide to Prevention and Treatment of Osteoporosis. *Osteoporos Int*, 25, 2359-81.
- CRISAN, M., YAP, S., CASTEILLA, L., CHEN, C. W., CORSELLI, M., PARK, T. S., ANDRIOLO, G., SUN, B., ZHENG, B., ZHANG, L., NOROTTE, C., TENG, P. N., TRAAS, J., SCHUGAR, R., DEASY, B. M., BADYLAK, S., BUHRING, H. J., GIACOBINO, J. P., LAZZARI, L., HUARD, J. & PEAULT, B. 2008. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell*, 3, 301-13.
- CROOM, K. F. & CURRAN, M. P. 2008. Sildenafil: a review of its use in pulmonary arterial hypertension. *Drugs*, 68, 383-97.
- DE BARI, C., DELL'ACCIO, F., TYLZANOWSKI, P. & LUYTEN, F. P. 2001. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum*, 44, 1928-42.
- DOMINICI, M., LE BLANC, K., MUELLER, I., SLAPER-CORTENBACH, I., MARINI, F., KRAUSE, D., DEANS, R., KEATING, A., PROCKOP, D. & HORWITZ, E. 2006. Minimal criteria for defining

- multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8, 315-7.
- DOORN, J., SIDDAPPA, R., VAN BLITTERSWIJK, C. A. & DE BOER, J. 2012. Forskolin enhances in vivo bone formation by human mesenchymal stromal cells. *Tissue Eng Part A*, 18, 558-67.
- DUCY, P., ZHANG, R., GEOFFROY, V., RIDALL, A. L. & KARSENTY, G. 1997. *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell*, 89, 747-54.
- EBELING, P. R. & AKESSON, K. 2001. Role of biochemical markers in the management of osteoporosis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 15, 385-400.
- ELEFTERIOU, F. 2008. Regulation of bone remodeling by the central and peripheral nervous system. *Arch Biochem Biophys*, 473, 231-6.
- ERIKSEN, E. F. 2010. Cellular mechanisms of bone remodeling. *Rev Endocr Metab Disord*, 11, 219-27.
- EUROPEAN FOUNDATION OF OSTEOPOROSIS 1993. Consensus development conference: diagnosis, prophylaxis, and treatment of osteoporosis. *Am J Med*, 94, 646-50.
- FAN, X., ROY, E., ZHU, L., MURPHY, T. C., ACKERT-BICKNELL, C., HART, C. M., ROSEN, C., NANES, M. S. & RUBIN, J. 2004. Nitric oxide regulates receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin expression in bone marrow stromal cells. *Endocrinology*, 145, 751-9.
- FRANCESCHI, R. T., XIAO, G., JIANG, D., GOPALAKRISHNAN, R., YANG, S. & REITH, E. 2003. Multiple signaling pathways converge on the *Cbfa1/Runx2* transcription factor to regulate osteoblast differentiation. *Connect Tissue Res*, 44 Suppl 1, 109-16.
- FRANCIS, S. H., BLOUNT, M. A. & CORBIN, J. D. 2011. Mammalian cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular mechanisms and physiological functions. *Physiol Rev*, 91, 651-90.
- FRIEDENSTEIN, A. J., PIATETZKY, S., II & PETRAKOVA, K. V. 1966. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol*, 16, 381-90.
- FROST, H. M. 1987. Bone "mass" and the "mechanostat": a proposal. *Anat Rec*, 219, 1-9.
- FUJISHIGE, K., KOTERA, J., MICHIBATA, H., YUASA, K., TAKEBAYASHI, S., OKUMURA, K. & OMORI, K. 1999a. Cloning and characterization of a novel human phosphodiesterase that hydrolyzes both cAMP and cGMP (PDE10A). *J Biol Chem*, 274, 18438-45.
- FUJISHIGE, K., KOTERA, J. & OMORI, K. 1999b. Striatum- and testis-specific phosphodiesterase PDE10A isolation and characterization of a rat PDE10A. *Eur J Biochem*, 266, 1118-27.
- GILLESPIE, M. T. 2007. Impact of cytokines and T lymphocytes upon osteoclast differentiation and function. *Arthritis Res Ther*, 9, 103.
- GIUSTI, A. & BIANCHI, G. 2015. Treatment of primary osteoporosis in men. *Clin Interv Aging*, 10, 105-15.
- GLASER, D. L. & KAPLAN, F. S. 1997. Osteoporosis: Definition and Clinical Presentation. *Spine*, 22, 12S-16S.
- GOUPIL, S., MARECHAL, L., EL HAJJ, H., TREMBLAY, M. E., RICHARD, F. J. & LECLERC, P. 2016. Identification and Localization of the Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase 10A in Bovine Testis and Mature Spermatozoa. *PLoS One*, 11, e0161035.
- GRAUER, S. M., PULITO, V. L., NAVARRA, R. L., KELLY, M. P., KELLEY, C., GRAF, R., LANGEN, B., LOGUE, S., BRENNAN, J., JIANG, L., CHARYCH, E., EGERLAND, U., LIU, F., MARQUIS, K. L., MALAMAS, M., HAGE, T., COMERY, T. A. & BRANDON, N. J. 2009. Phosphodiesterase 10A inhibitor activity in preclinical models of the positive, cognitive, and negative symptoms of schizophrenia. *J Pharmacol Exp Ther*, 331, 574-90.
- GRONTHOS, S., GRAVES, S. E., OHTA, S. & SIMMONS, P. J. 1994. The STRO-1+ fraction of adult human bone marrow contains the osteogenic precursors. *Blood*, 84, 4164-73.

- GROSS-LANGENHOFF, M., HOFBAUER, K., WEBER, J., SCHULTZ, A. & SCHULTZ, J. E. 2006. cAMP is a ligand for the tandem GAF domain of human phosphodiesterase 10 and cGMP for the tandem GAF domain of phosphodiesterase 11. *J Biol Chem*, 281, 2841-6.
- HARADA, A., SUZUKI, K. & KIMURA, H. 2017. TAK-063, a Novel Phosphodiesterase 10A Inhibitor, Protects from Striatal Neurodegeneration and Ameliorates Behavioral Deficits in the R6/2 Mouse Model of Huntington's Disease. *J Pharmacol Exp Ther*, 360, 75-83.
- HARDMAN, J. G. & SUTHERLAND, E. W. 1969. Guanyl cyclase, an enzyme catalyzing the formation of guanosine 3',5'-monophosphate from guanosine triphosphate. *J Biol Chem*, 244, 6363-70.
- HARRIS, H. 1990. The human alkaline phosphatases: what we know and what we don't know. *Clin Chim Acta*, 186, 133-50.
- HAUDENSCHILD, A. K., HSIEH, A. H., KAPILA, S. & LOTZ, J. C. 2009. Pressure and distortion regulate human mesenchymal stem cell gene expression. *Ann Biomed Eng*, 37, 492-502.
- HAUSCHKA, P. V., LIAN, J. B., COLE, D. E. & GUNDBERG, C. M. 1989. Osteocalcin and matrix Gla protein: vitamin K-dependent proteins in bone. *Physiol Rev*, 69, 990-1047.
- HE, S., NAKADA, D. & MORRISON, S. J. 2009. Mechanisms of stem cell self-renewal. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 25, 377-406.
- HELLSTROM, W. J., GITTELMAN, M., KARLIN, G., SEGERSON, T., THIBONNIER, M., TAYLOR, T. & PADMA-NATHAN, H. 2003. Sustained efficacy and tolerability of vardenafil, a highly potent selective phosphodiesterase type 5 inhibitor, in men with erectile dysfunction: results of a randomized, double-blind, 26-week placebo-controlled pivotal trial. *Urology*, 61, 8-14.
- HISTING, T., MARCINIAK, K., SCHEUER, C., GARCIA, P., HOLSTEIN, J. H., KLEIN, M., MATTHYS, R., POHLEMANN, T. & MENGER, M. D. 2011. Sildenafil accelerates fracture healing in mice. *J Orthop Res*, 29, 867-73.
- HOEY, D. A., DOWNS, M. E. & JACOBS, C. R. 2012. The mechanics of the primary cilium: An intricate structure with complex function. *Journal of Biomechanics*, 45, 17-26.
- HOROWITZ, M. C. & LORENZO, J. A. 2007. B lymphocytes and the skeleton. *Ann N Y Acad Sci*, 1117, 82-93.
- HUANG, W., CARLSEN, B., RUDKIN, G., BERRY, M., ISHIDA, K., YAMAGUCHI, D. T. & MILLER, T. A. 2004. Osteopontin is a negative regulator of proliferation and differentiation in MC3T3-E1 pre-osteoblastic cells. *Bone*, 34, 799-808.
- HUI, S. L., SLEMENDA, C. W. & JOHNSTON, C. C., JR. 1988. Age and bone mass as predictors of fracture in a prospective study. *J Clin Invest*, 81, 1804-9.
- HUYUT, Z., BAKAN, N., YILDIRIM, S. & ALP, H. H. 2018. Effects of the Phosphodiesterase-5 (PDE-5) Inhibitors, Avanafil and Zaprinast, on Bone Remodeling and Oxidative Damage in a Rat Model of Glucocorticoid-Induced Osteoporosis. *Med Sci Monit Basic Res*, 24, 47-58.
- IGURA, K., ZHANG, X., TAKAHASHI, K., MITSURU, A., YAMAGUCHI, S. & TAKASHI, T. A. 2004. Isolation and characterization of mesenchymal progenitor cells from chorionic villi of human placenta. *Cytotherapy*, 6, 543-53.
- IMPEY, S., MCCORKLE, S. R., CHA-MOLSTAD, H., DWYER, J. M., YOCHUM, G. S., BOSS, J. M., MCWEENEY, S., DUNN, J. J., MANDEL, G. & GOODMAN, R. H. 2004. Defining the CREB regulon: a genome-wide analysis of transcription factor regulatory regions. *Cell*, 119, 1041-54.
- JANKOWSKA, A., ŚWIERCZEK, A., WYSKA, E., GAWALSKA, A., BUCKI, A., PAWŁOWSKI, M. & CHŁOŃ-RZEPA, G. 2019. Advances in Discovery of PDE10A Inhibitors for CNS-Related Disorders. Part 1: Overview of the Chemical and Biological Research. *Curr Drug Targets*, 20, 122-143.

LITERATURVERZEICHNIS

- JEE, W. S., MORI, S., LI, X. J. & CHAN, S. 1990. Prostaglandin E2 enhances cortical bone mass and activates intracortical bone remodeling in intact and ovariectomized female rats. *Bone*, 11, 253-66.
- JOHNELL, O., KANIS, J. A., ODEN, A., SERNBO, I., REDLUND-JOHNELL, I., PETTERSON, C., DE LAET, C. & JONSSON, B. 2004. Mortality after osteoporotic fractures. *Osteoporos Int*, 15, 38-42.
- JOHNSON, G. P., STAVENSCHI, E., EICHHOLZ, K. F., CORRIGAN, M. A., FAIR, S. & HOEY, D. A. 2018. Mesenchymal stem cell mechanotransduction is cAMP dependent and regulated by adenylyl cyclase 6 and the primary cilium. *J Cell Sci*, 131.
- KANIA, M. A., BONNER, A. S., DUFFY, J. B. & GERGEN, J. P. 1990. The Drosophila segmentation gene runt encodes a novel nuclear regulatory protein that is also expressed in the developing nervous system. *Genes Dev*, 4, 1701-13.
- KANIS, J. A. 1994. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis: synopsis of a WHO report. WHO Study Group. *Osteoporos Int*, 4, 368-81.
- KAO, R., LU, W., LOUIE, A. & NISSENSON, R. 2012. Cyclic AMP signaling in bone marrow stromal cells has reciprocal effects on the ability of mesenchymal stem cells to differentiate into mature osteoblasts versus mature adipocytes. *Endocrine*, 42, 622-36.
- KELLY, M. P. 2018. Cyclic nucleotide signaling changes associated with normal aging and age-related diseases of the brain. *Cell Signal*, 42, 281-291.
- KLEIN-NULEND, J., STERCK, J. G., SEMEINS, C. M., LIPS, P., JOLDERSMA, M., BAART, J. A. & BURGER, E. H. 2002. Donor age and mechanosensitivity of human bone cells. *Osteoporos Int*, 13, 137-46.
- KOLF, C. M., CHO, E. & TUAN, R. S. 2007. Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Res Ther*, 9, 204.
- KOMORI, T. 2019. Regulation of Proliferation, Differentiation and Functions of Osteoblasts by Runx2. *Int J Mol Sci*, 20.
- KOMORI, T. & KISHIMOTO, T. 1998. Cbfa1 in bone development. *Curr Opin Genet Dev*, 8, 494-9.
- KOMORI, T., YAGI, H., NOMURA, S., YAMAGUCHI, A., SASAKI, K., DEGUCHI, K., SHIMIZU, Y., BRONSON, R. T., GAO, Y. H., INADA, M., SATO, M., OKAMOTO, R., KITAMURA, Y., YOSHIKI, S. & KISHIMOTO, T. 1997. Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell*, 89, 755-64.
- KU, C. H., JOHNSON, P. H., BATTEN, P., SARATHCHANDRA, P., CHAMBERS, R. C., TAYLOR, P. M., YACOUB, M. H. & CHESTER, A. H. 2006. Collagen synthesis by mesenchymal stem cells and aortic valve interstitial cells in response to mechanical stretch. *Cardiovasc Res*, 71, 548-56.
- KUBISTA, M., ANDRADE, J. M., BENGTTSSON, M., FOROOTAN, A., JONAK, J., LIND, K., SINDELKA, R., SJOBACK, R., SJOGREEN, B., STROMBOM, L., STAHLBERG, A. & ZORIC, N. 2006. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med*, 27, 95-125.
- LEE, Y. Y., PARK, J. S., LEEM, Y. H., PARK, J. E., KIM, D. Y., CHOI, Y. H., PARK, E. M., KANG, J. L. & KIM, H. S. 2019. The phosphodiesterase 10 inhibitor papaverine exerts anti-inflammatory and neuroprotective effects via the PKA signaling pathway in neuroinflammation and Parkinson's disease mouse models. *J Neuroinflammation*, 16, 246.
- LEHNART, S. E., WEHRENS, X. H., REIKEN, S., WARRIER, S., BELEVYCH, A. E., HARVEY, R. D., RICHTER, W., JIN, S. L., CONTI, M. & MARKS, A. R. 2005. Phosphodiesterase 4D deficiency in the ryanodine-receptor complex promotes heart failure and arrhythmias. *Cell*, 123, 25-35.

- LESLIE, W. D., ADLER, R. A., EL-HAJJ FULEIHAN, G., HODSMAN, A. B., KENDLER, D. L., MCCLUNG, M., MILLER, P. D. & WATTS, N. B. 2006. Application of the 1994 WHO classification to populations other than postmenopausal Caucasian women: the 2005 ISCD Official Positions. *J Clin Densitom*, 9, 22-30.
- LEVITZKI, A. 1988. Transmembrane signalling to adenylate cyclase in mammalian cells and in *Saccharomyces cerevisiae*. *Trends Biochem Sci*, 13, 298-301.
- LIAN, J., STEWART, C., PUCHACZ, E., MACKOWIAK, S., SHALHOUB, V., COLLART, D., ZAMBETTI, G. & STEIN, G. 1989. Structure of the rat osteocalcin gene and regulation of vitamin D-dependent expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86, 1143-7.
- LIAN, J. B. & STEIN, G. S. 1995. Development of the osteoblast phenotype: molecular mechanisms mediating osteoblast growth and differentiation. *Iowa Orthop J*, 15, 118-40.
- LIEDERT, A., KASPAR, D., BLAKYTNY, R., CLAES, L. & IGNATIUS, A. 2006. Signal transduction pathways involved in mechanotransduction in bone cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 349, 1-5.
- LINDER, J. U. & SCHULTZ, J. E. 2008. Versatility of signal transduction encoded in dimeric adenylyl cyclases. *Curr Opin Struct Biol*, 18, 667-72.
- LORENZ, T. C. 2012. Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *J Vis Exp*, e3998.
- MAYCAS, M., ARDURA, J. A., DE CASTRO, L. F., BRAVO, B., GORTÁZAR, A. R. & ESBRIT, P. 2015. Role of the Parathyroid Hormone Type 1 Receptor (PTH1R) as a Mechanosensor in Osteocyte Survival. *J Bone Miner Res*, 30, 1231-44.
- MAYR, B. & MONTMINY, M. 2001. Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2, 599.
- MEHATS, C., ANDERSEN, C. B., FILOPANTI, M., JIN, S. L. C. & CONTI, M. 2002. Cyclic nucleotide phosphodiesterases and their role in endocrine cell signaling. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 13, 29-35.
- MIYAUCHI, A., NOTOYA, K., MIKUNI-TAKAGAKI, Y., TAKAGI, Y., GOTO, M., MIKI, Y., TAKANO-YAMAMOTO, T., JINNAI, K., TAKAHASHI, K., KUMEGAWA, M., CHIHARA, K. & FUJITA, T. 2000. Parathyroid hormone-activated volume-sensitive calcium influx pathways in mechanically loaded osteocytes. *J Biol Chem*, 275, 3335-42.
- MOESTER, M. J., PAPAPOULOS, S. E., LÖWIK, C. W. & VAN BEZOOIJEN, R. L. 2010. Sclerostin: current knowledge and future perspectives. *Calcif Tissue Int*, 87, 99-107.
- MONCADA, S. & HIGGS, E. A. 1995. Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide. *Faseb j*, 9, 1319-30.
- MULLENDER, M., EL HAJ, A. J., YANG, Y., VAN DUIN, M. A., BURGER, E. H. & KLEIN-NULEND, J. 2004. Mechanotransduction of bone cells in vitro: mechanobiology of bone tissue. *Med Biol Eng Comput*, 42, 14-21.
- MÜLLER-DEUBERT, S., EGE, C., KRUG, M., MEIßNER-WEIGL, J., RUDERT, M., BISCHOF, O., JAKOB, F. & EBERT, R. 2020. Phosphodiesterase 10A Is a Mediator of Osteogenic Differentiation and Mechanotransduction in Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells. *Stem Cells Int*, 2020, 7865484.
- MURUGANANDAN, S., ROMAN, A. A. & SINAL, C. J. 2009. Adipocyte differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells: cross talk with the osteoblastogenic program. *Cell Mol Life Sci*, 66, 236-53.
- NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH 2001. Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. *Jama*, 285, 785-95.
- NELSON, C. M. & BISSELL, M. J. 2006. Of extracellular matrix, scaffolds, and signaling: tissue architecture regulates development, homeostasis, and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 22, 287-309.

- NEVE, A., CORRADO, A. & CANTATORE, F. P. 2011. Osteoblast physiology in normal and pathological conditions. *Cell Tissue Res*, 343, 289-302.
- NOBLE, B. S. 2008. The osteocyte lineage. *Arch Biochem Biophys*, 473, 106-11.
- NOTH, U., OSYCZKA, A. M., TULI, R., HICKOK, N. J., DANIELSON, K. G. & TUAN, R. S. 2002. Multilineage mesenchymal differentiation potential of human trabecular bone-derived cells. *J Orthop Res*, 20, 1060-9.
- OHM, T. G., BOHL, J. & LEMMER, B. 1989. Reduced cAMP-signal transduction in postmortem hippocampus of demented old people. *Prog Clin Biol Res*, 317, 501-9.
- PEACOCK, M., TURNER, C. H., ECONS, M. J. & FOROUD, T. 2002. Genetics of osteoporosis. *Endocr Rev*, 23, 303-26.
- PFAFFL, M. W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 29, e45.
- PFEIFER, A., KLATT, P., MASSBERG, S., NY, L., SAUSBIER, M., HIRNEISS, C., WANG, G. X., KORTH, M., ASZODI, A., ANDERSSON, K. E., KROMBACH, F., MAYERHOFER, A., RUTH, P., FASSLER, R. & HOFMANN, F. 1998. Defective smooth muscle regulation in cGMP kinase I-deficient mice. *Embo j*, 17, 3045-51.
- PFEIFER, A., RUTH, P., DOSTMANN, W., SAUSBIER, M., KLATT, P. & HOFMANN, F. 1999. Structure and function of cGMP-dependent protein kinases. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 135, 105-49.
- PITTENGER, M. F., MACKAY, A. M., BECK, S. C., JAISWAL, R. K., DOUGLAS, R., MOSCA, J. D., MOORMAN, M. A., SIMONETTI, D. W., CRAIG, S. & MARSHAK, D. R. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284, 143-7.
- POPPINGA, W. J., MUNOZ-LLANCAO, P., GONZALEZ-BILLAULT, C. & SCHMIDT, M. 2014. A-kinase anchoring proteins: cAMP compartmentalization in neurodegenerative and obstructive pulmonary diseases. *Br J Pharmacol*, 171, 5603-23.
- RAHMANI, P. & MORIN, S. 2009. Prevention of osteoporosis-related fractures among postmenopausal women and older men. *Cmaj*, 181, 815-20.
- RANERA, B., REMACHA, A. R., ALVAREZ-ARGUEDAS, S., CASTIELLA, T., VAZQUEZ, F. J., ROMERO, A., ZARAGOZA, P., MARTIN-BURRIEL, I. & RODELLAR, C. 2013. Expansion under hypoxic conditions enhances the chondrogenic potential of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Vet J*, 195, 248-51.
- RANGASWAMI, H., MARATHE, N., ZHUANG, S., CHEN, Y., YEH, J. C., FRANGOS, J. A., BOSS, G. R. & PILZ, R. B. 2009. Type II cGMP-dependent protein kinase mediates osteoblast mechanotransduction. *J Biol Chem*, 284, 14796-808.
- ROBEY, P. 2017. "Mesenchymal stem cells": fact or fiction, and implications in their therapeutic use. *F1000Res*, 6.
- ROGERS, I. & CASPER, R. F. 2004. Umbilical cord blood stem cells. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 18, 893-908.
- SANBORN, B. M., HEINDEL, J. J. & ROBISON, G. A. 1980. The role of cyclic nucleotides in reproductive processes. *Annu Rev Physiol*, 42, 37-57.
- SCOTLAND, G. & HOUSLAY, M. D. 1995. Chimeric constructs show that the unique N-terminal domain of the cyclic AMP phosphodiesterase RD1 (RNPDE4A1A; rPDE-IVA1) can confer membrane association upon the normally cytosolic protein chloramphenicol acetyltransferase. *Biochem J*, 308 (Pt 2), 673-81.
- SEEFRIED, L., MUELLER-DEUBERT, S., SCHWARZ, T., LIND, T., MENTRUP, B., KOBER, M., DOCHEVA, D., LIEDERT, A., KASSEM, M., IGNATIUS, A., SCHIEKER, M., CLAES, L., WILKE, W., JAKOB, F. & EBERT, R. 2010. A small scale cell culture system to analyze mechanobiology using reporter gene constructs and polyurethane dishes. *Eur Cell Mater*, 20, 344-55.

LITERATURVERZEICHNIS

- SHI, S. & GRONTHOS, S. 2003. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *J Bone Miner Res*, 18, 696-704.
- SIDDAPPA, R., DOORN, J., LIU, J., LANGERWERF, E., ARENDS, R., VAN BLITTERSWIJK, C. & DE BOER, J. 2010. Timing, rather than the concentration of cyclic AMP, correlates to osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *J Tissue Eng Regen Med*, 4, 356-65.
- SIDDAPPA, R., MARTENS, A., DOORN, J., LEUSINK, A., OLIVO, C., LICHT, R., VAN RIJN, L., GASPAR, C., FODDE, R., JANSSEN, F., VAN BLITTERSWIJK, C. & DE BOER, J. 2008. cAMP/PKA pathway activation in human mesenchymal stem cells in vitro results in robust bone formation in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 7281-6.
- SIDDAPPA, R., MULDER, W., STEEGHS, I., VAN DE KLUNDERT, C., FERNANDES, H., LIU, J., ARENDS, R., VAN BLITTERSWIJK, C. & DE BOER, J. 2009. cAMP/PKA signaling inhibits osteogenic differentiation and bone formation in rodent models. *Tissue Eng Part A*, 15, 2135-43.
- SILVERMAN, S., VISWANATHAN, H. N., YANG, Y. C., WANG, A., BOONEN, S., RAGI-EIS, S., FARDELLONE, P., GILCHRIST, N., LIPS, P., NEVITT, M., PALACIOS GIL-ANTUNANO, S., PAVELKA, K., REVICKI, D., SIMON, J., MACARIOS, D. & SIRIS, E. S. 2012. Impact of clinical fractures on health-related quality of life is dependent on time of assessment since fracture: results from the FREEDOM trial. *Osteoporos Int*, 23, 1361-9.
- SIMONSEN, J. L., ROSADA, C., SERAKINCI, N., JUSTESEN, J., STENDERUP, K., RATTAN, S. I., JENSEN, T. G. & KASSEM, M. 2002. Telomerase expression extends the proliferative life-span and maintains the osteogenic potential of human bone marrow stromal cells. *Nat Biotechnol*, 20, 592-6.
- SIMS, N. A. & GOOI, J. H. 2008. Bone remodeling: Multiple cellular interactions required for coupling of bone formation and resorption. *Semin Cell Dev Biol*, 19, 444-51.
- SINGH, D., BEEH, K. M., COLGAN, B., KORNMANN, O., LEAKER, B., WATZ, H., LUCCI, G., GERACI, S., EMIROVA, A., GOVONI, M. & NANDEUIL, M. A. 2019. Effect of the inhaled PDE4 inhibitor CHF6001 on biomarkers of inflammation in COPD. *Respir Res*, 20, 180.
- SIUCIAK, J. A., CHAPIN, D. S., HARMS, J. F., LEBEL, L. A., MCCARTHY, S. A., CHAMBERS, L., SHRIKHANDE, A., WONG, S., MENNITI, F. S. & SCHMIDT, C. J. 2006. Inhibition of the striatum-enriched phosphodiesterase PDE10A: a novel approach to the treatment of psychosis. *Neuropharmacology*, 51, 386-96.
- STERCK, J. G., KLEIN-NULEND, J., LIPS, P. & BURGER, E. H. 1998. Response of normal and osteoporotic human bone cells to mechanical stress in vitro. *Am J Physiol*, 274, E1113-20.
- SUTHERLAND, E. W. & RALL, T. W. 1958. Fractionation and characterization of a cyclic adenine ribonucleotide formed by tissue particles. *J Biol Chem*, 232, 1077-91.
- TAM, C. F. & WALFORD, R. L. 1980. Alterations in cyclic nucleotides and cyclase-specific activities in T lymphocytes of aging normal humans and patients with Down's syndrome. *J Immunol*, 125, 1665-70.
- TATSUMI, S., ISHII, K., AMIZUKA, N., LI, M., KOBAYASHI, T., KOHNO, K., ITO, M., TAKESHITA, S. & IKEDA, K. 2007. Targeted ablation of osteocytes induces osteoporosis with defective mechanotransduction. *Cell Metab*, 5, 464-75.
- THORNE, N., INGLESE, J. & AULD, D. S. 2010. Illuminating insights into firefly luciferase and other bioluminescent reporters used in chemical biology. *Chem Biol*, 17, 646-57.
- TSAI, M. S., LEE, J. L., CHANG, Y. J. & HWANG, S. M. 2004. Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol. *Hum Reprod*, 19, 1450-6.
- TU, X., RHEE, Y., CONDON, K. W., BIVI, N., ALLEN, M. R., DWYER, D., STOLINA, M., TURNER, C. H., ROBLING, A. G., PLOTKIN, L. I. & BELLIDO, T. 2012. Sustained downregulation and local Wnt

- signaling are required for the osteogenic response to mechanical loading. *Bone*, 50, 209-17.
- UCHIHASHI, K., AOKI, S., MATSUNOBU, A. & TODA, S. 2013. Osteoblast migration into type I collagen gel and differentiation to osteocyte-like cells within a self-produced mineralized matrix: a novel system for analyzing differentiation from osteoblast to osteocyte. *Bone*, 52, 102-10.
- UDA, Y., AZAB, E., SUN, N., SHI, C. & PAJEVIC, P. D. 2017. Osteocyte Mechanobiology. *Curr Osteoporos Rep*, 15, 318-325.
- VALTIERI, M. & SORRENTINO, A. 2008. The mesenchymal stromal cell contribution to homeostasis. *J Cell Physiol*, 217, 296-300.
- VOGEL, V. & SHEETZ, M. 2006. Local force and geometry sensing regulate cell functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7, 265-75.
- WALDMAN, S. A., RAPOPORT, R. M. & MURAD, F. 1984. Atrial natriuretic factor selectively activates particulate guanylate cyclase and elevates cyclic GMP in rat tissues. *J Biol Chem*, 259, 14332-4.
- WEI, R., WONG, J. P. C. & KWOK, H. F. 2017. Osteopontin -- a promising biomarker for cancer therapy. *J Cancer*, 8, 2173-2183.
- WELCH, H. M. 2012. The polymerase chain reaction. *Methods Mol Biol*, 878, 71-88.
- WHITCOMBE, D., THEAKER, J., GUY, S. P., BROWN, T. & LITTLE, S. 1999. Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence. *Nat Biotechnol*, 17, 804-7.
- XU, Y., MALLADI, P., WAGNER, D. R. & LONGAKER, M. T. 2005. Adipose-derived mesenchymal cells as a potential cell source for skeletal regeneration. *Curr Opin Mol Ther*, 7, 300-5.
- YAO, W., TIAN, X. Y., CHEN, J., SETTERBERG, R. B., LUNDY, M. W., CHMIELZWSKI, P., FROMAN, C. A. & JEE, W. S. 2007. Rolipram, a phosphodiesterase 4 inhibitor, prevented cancellous and cortical bone loss by inhibiting endosteal bone resorption and maintaining the elevated periosteal bone formation in adult ovariectomized rats. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 7, 119-30.
- YEAGLE, P. L. & ALBERT, A. D. 2003. A conformational trigger for activation of a G protein by a G protein-coupled receptor. *Biochemistry*, 42, 1365-8.
- YOSHIDA, C. A., YAMAMOTO, H., FUJITA, T., FURUICHI, T., ITO, K., INOUE, K., YAMANA, K., ZANMA, A., TAKADA, K., ITO, Y. & KOMORI, T. 2004. Runx2 and Runx3 are essential for chondrocyte maturation, and Runx2 regulates limb growth through induction of Indian hedgehog. *Genes Dev*, 18, 952-63.
- YOUNG, M. F. 2003. Bone matrix proteins: their function, regulation, and relationship to osteoporosis. *Osteoporos Int*, 14 Suppl 3, S35-42.
- ZHOU, W., YU, L., FAN, J., WAN, B., JIANG, T., YIN, J., HUANG, Y., LI, Q., YIN, G. & HU, Z. 2017. Endogenous Parathyroid Hormone Promotes Fracture Healing by Increasing Expression of BMP2 through cAMP/PKA/CREB Pathway in Mice. *Cell Physiol Biochem*, 42, 551-563.
- ZIOUTI, F., EBERT, R., RUMMLER, M., KRUG, M., MÜLLER-DEUBERT, S., LÜDEMANN, M., JAKOB, F., WILLIE, B. M. & JUNDT, F. 2019a. NOTCH Signaling Is Activated through Mechanical Strain in Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells. *Stem Cells Int*, 2019, 5150634.
- ZIOUTI, F., EBERT, R., RUMMLER, M., KRUG, M., MÜLLER-DEUBERT, S., LÜDEMANN, M., JAKOB, F., WILLIE, B. M. & JUNDT, F. 2019b. NOTCH Signaling Is Activated through Mechanical Strain in Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells. *Stem Cells Int*, 2019, 5150634.
- ZORAGHI, R., CORBIN, J. D. & FRANCIS, S. H. 2004. Properties and functions of GAF domains in cyclic nucleotide phosphodiesterases and other proteins. *Mol Pharmacol*, 65, 267-78.

Appendix

I. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AKAP	A-Kinase-Ankerproteine
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
AP1	Aktivatorprotein 1
ATP	Adenosintriphosphat
BMP	Engl. bone morphogenetic proteins
BNP	Engl. brain natriuretic peptide, B-natriuretisches Peptid
Bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
Ca ²⁺	Ionisiertes Calcium
cAMP	Zyklisches 3'-5'-Adenosinmonophosphat
Cbfa1	Engl. core-binding factor α 1
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CFU-F	Engl. colony-forming unit fibroblasts
cGMP	Zyklisches 3'-5'-Guanosinmonophosphat
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CREB	Engl. cAMP response element binding protein
Ct-Wert	Engl. Cycle threshold, Schwellenwert-Zyklus
d.h.	das heißt
dH ₂ O	Destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid

APPENDIX

DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
dT	Desoxythymidin
DXA	Engl. dual-energy x-ray absorptiometry
EDTA	Ethylendiamintetraacetatsäure
EEF1 α	Eukaryotischer Translations- und Elongationsfaktor 1alpha
ERK-Kinasen	Engl. extracellular-signal regulated kinases
et al.	et alia, und andere
etc.	et cetera, und die übrigen
FCS	Fötale Kälberserum
GTP	Guanosintriphosphat
H ₂ O	Wasser
hMSC	Humane mesenchymale Stromazelle(n)
IE	Internationale Einheit
kb	Kilobase
MAPK	Engl. mitogen-activated protein kinase
Mg ²⁺	Ionisiertes Magnesium
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MP-10	(2-[4-(1-methyl-4-pyridin-4-yl-1H-pyrazol-3-yl)-phenoxy]methyl]-quinoline 3; PF-02545920)
MSC	Engl. Mesenchymal stem cells, mesenchymale Stromazellen
NO	Stickstoffmonoxid
PBS	Phosphatpuffer
PCR	Engl. polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion
PDE10A	Phosphodiesterase 10A
qPCR	Quantitative Polymerasekettenreaktion

APPENDIX

RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Engl. revolutions per minute
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymeraseket- tenreaktion
RUNX2	Engl. runt-related transcription factor 2
Taq	Thermus aquaticus (Bakterium)
TBE	TRIS Borat EDTA Puffer
TERT	Telomerase Reverse Transkriptase
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
u.ä.	und ähnlich
U/ml	Engl. units per millilitre
WHO	Engl. World Health Organization
z.B.	zum Beispiel

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau eines Lamellenknochens	3
Abbildung 2: Darstellung der Differenzierungswege der humanen mesenchymalen Stromazellen	5
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Strukturen der 11 verschiedenen Phosphodiesterasen	16
Abbildung 4: Vektorkarte des verwendeten Vektors pGL4.14	29
Abbildung 5: Vektorkarte des Vektors pGL4.29.....	30
Abbildung 6: Vektorkarte des Vektors pcDNA3.1.....	31
Abbildung 7: Schematische Darstellung des verwendeten Bioreaktors.....	37
Abbildung 8: Fotografie von Bioreaktor	38
Abbildung 9: Real-time PCR: PDE10A Expression Vergleich Kontrollgruppe MSC und osteoporotische MSC (MSC-OP).....	51
Abbildung 10: Expression der PDE10A in MSC, osteoporotischen MSC (MSC-OP), hMSC-TERT, HEK293	51
Abbildung 11: Proteingehalt der HEK293-Zellen unter Stimulation mit Papaverin	53
Abbildung 12: Luciferaseaktivität normiert auf den Proteingehalt in Abhängigkeit der Papaverinkonzentration	54
Abbildung 13: Einfluss der Kombination von Papaverin und Forskolin.....	56
Abbildung 14: Agarosegele der RT-PCR mit den PCR-Produkten für EEF1 α , RUNX2, ALPL, SPP1 (Osteopontin), BGLAP (Osteocalcin) und PDE10A	58
Abbildung 15: Effekt von Papaverin auf die relative Expression von RUNX2.....	60
Abbildung 16: Effekt von Papaverin auf die relative Expression von Osteopontin (SPP1).....	61
Abbildung 17: Effekt von Papaverin auf die relative Expression von ALPL.....	62
Abbildung 18: Effekt von Papaverin auf die relative Expression von Osteocalcin (BGLAP)	63
Abbildung 19: Effekt von Papaverin auf die Mineralisierung, makroskopische Darstellung der Alizarin Rot Färbung der MSC.....	64

APPENDIX

Abbildung 20: Effekt von Papaverin auf die Mineralisierung, mikroskopische Darstellung der Alizarin Rot Färbung der MSC.....	65
Abbildung 21: Luciferasemessung der zyklisch gedehnten Zellen hMSC-TERT-AP1, HEK293-AP1 mit und ohne Papaverin	67
Abbildung 22: relative Expression von PTGS2 und FOS, Ergebnisse der qPCR.....	69
Abbildung 23: Schematische Darstellung der Interaktion von AKAPs mit PDE und PKA.....	78
Abbildung 24: Schematische Darstellung der Kompartimentierung von cAMP in Neuronen	79

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Liste der verwendeten Geräte mit Bezugsquelle	23
Tabelle 2: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien mit Bezugsquelle	24
Tabelle 3: Liste der verwendeten Chemikalien und Reagenzien mit Bezugsquelle	25
Tabelle 4: Liste der verwendeten Kits mit Bezugsquelle	26
Tabelle 5: Beschreibung der primären Zellen und Zelllinien, welche für Versuche verwendet wurden	27
Tabelle 6: Schema der PCR.....	42
Tabelle 7: Liste der verwendeten Primer	43
Tabelle 8: Standardbedingungen der qPCR	46
Tabelle 9: Liste der verwendeten Primer für hMSC-TERT.....	47
Tabelle 10: Daten aus Luciferasemessung verrechnet mit der Proteinkonzentration (Bradford-Test) bezüglich des basalen Einflusses von Papaverin auf HEK293-CRE	97
Tabelle 11: Darstellung der Daten zum Einfluss der Kombination von Papaverin und Forskolin.....	98

IV. Ergänzende Materialien

a. Daten zum basalen Einfluss von Papaverin auf HEK293-CRE

Tabelle 10: Daten aus Luciferasemessung verrechnet mit der Proteinkonzentration (Bradford-Test) bezüglich des basalen Einflusses von Papaverin auf HEK293-CRE
P-Werte unter 0,05 werden als signifikant erkannt.

HEK293-CRE						
	Kontrolle	0.1 µM Papaverin	0.5 µM	1 µM	5 µM	10 µM
Mittelwert	100	108,37	95,33	92,14	74,96	80,99
Standardabweichung	0	19,95	23,64	16,04	15,87	17,89
MW/STAB in%	0	18,41	24,80	17,41	21,17	22,09
Student t-Test		0,31	0,62	0,24	0,01	0,01
HEK293-pGL						
	Kontrolle	0.1 µM Papaverin	0.5 µM	1 µM	5 µM	10µM
Mittelwert	100	98,62	112,43	118,11	93,79	86,52
Standardabweichung	0	19,88	19,91	22,08	18,68	23,86
MW/STAB in%	0	20,15	17,71	18,69	19,91	27,58
Student t-Test		0,87	0,15	0,10	0,45	0,15

APPENDIX

b. Daten zum Einfluss der Kombination von Papaverin und Forskolin auf HEK293-CRE-Zellen

*Table 11: Darstellung der Daten zum Einfluss der Kombination von Papaverin und Forskolin
P-Werte unter 0,05 werden als signifikant erkannt.*

HEK293-CRE					
	Kontrolle	Forsk. 10 µM	Forsk. + Papaverin 10 µM.	DMSO Kontrolle	DMSO + Papaverin
Mittelwert	100	1077,67	2784,77	95,66	122,27
Standardab- weichung	0	402,05	1507,68	20,58	29,28
MW/STAB in%	0	37,31	54,14	21,51	23,95
Student t-Test		1,95E-07	3,21E-04		0,32
HEK293-pGL					
	Kontrolle	Forsk. 10 µM	Forsk. + Papaverin 10 µM.	DMSO Kontrolle	DMSO + Papaverin
Mittelwert	100	108,57	86,90	96,20	96,50
Standardab- weichung	0	18,21	39,94	19,59	17,03
MW/STAB in%	0	16,78	45,97	20,36	17,65
Student t-Test		0,13	0,38		0,36

V. Danksagung

Folgend möchte ich mich gerne bei all jenen bedanken, die mich bei der Durchführung der Dissertation unterstützt und mich auf dem Weg dorthin begleitet haben.

Zuerst möchte ich mich bei Herrn Prof. Franz Jakob bedanken für die Möglichkeit an dieser interessanten Fragestellung am Orthopädischen Centrum für Muskuloskelettale Forschung arbeiten zu können.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Sigrid Müller-Deubert für die tolle Betreuung dieser Arbeit. Für Ihre Anleitung und Unterstützung bei allen Fragen rund um die experimentellen Arbeiten sowie für die Geduld im Schreibe- und Korrekturprozess der Promotionsarbeit. Vielen Dank für die große Hilfe und die schöne und konstruktive Zeit!

Außerdem möchte ich mich ganz herzlich bei Frau Melanie Krug bedanken, die mich ins Labor eingearbeitet hat und mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand in der Durchführung der Experimente und immer ein offenes Ohr für Fragen und Probleme hatte.

Des Weiteren möchte ich mich bei Frau Prof. Regina Ebert bedanken, die mich auch jederzeit im Labor unterstützt hat und vor allem gegen Ende der Promotionsarbeit durch Ihre aufwendige Korrektur noch den letzten Schliff verpasst hat.

Ein großes Dankeschön gilt natürlich auch dem gesamten Laborteam: vor allem Jutta Meißner-Weigl, Doris Schneider und Sabine Zeck. Ich wurde so herzlich aufgenommen und habe mich direkt wie ein Teil des Teams gefühlt. Ich bin sehr dankbar, für die Unterstützung und Hilfe im Labor, für die tolle Zusammenarbeit und auch für die positive Stimmung, wodurch ich immer große Freude hatte, ins Labor zu kommen. Dieses halbe Jahr war sehr bereichernd und ich werde es immer in sehr guter Erinnerung behalten.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Torsten Blunk für das Korreferat.

APPENDIX

Zuletzt möchte ich meiner Familie und meinen Freunden danken.

Meinen Eltern danke ich von Herzen für die Ermöglichung dieses Studiums, für Ihr Verständnis und Ihr Vertrauen und für den Rückhalt über all die Jahre. Auch meinem Bruder danke ich sehr, der mir nicht nur menschlich sondern auch wissenschaftlich vielfach weitergeholfen hat.

Meinen Freunden danke ich herzlichst, dass sie mich immer auf diesem Weg unterstützt haben, mich motiviert haben und emotional beigestanden sind.

VI. Eigene Veröffentlichung

Müller-Deubert S, Ege C, Krug M, Meißner-Weigl J, Rudert M, Bischof O, Jakob F, Ebert R. Phosphodiesterase 10A Is a Mediator of Osteogenic Differentiation and Mechanotransduction in Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells. *Stem Cells Int.* 2020 Jun 6;2020:7865484. doi: 10.1155/2020/7865484. PMID: 32587621; PMCID: PMC7294361.