Universitätsklinikum Ulm
Institut für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik
Zentrum für Muskuloskelettale Forschung
Direktorin: Prof. Dr. Anita Ignatius

Interaktion zwischen dem ER- und dem Wnt/β-Catenin-Signalweg in der Mechanotransduktion

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Humanbiologie (Dr. biol. hum.)
der Medizinischen Fakultät
der Universität Ulm

vorgelegt von
Liane Wagner
geboren in Aalen

Ulm 2011

Amtierender Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. vet. Anita Ignatius

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Rolf Brenner

Tag der Promotion: 06. Mai 2011

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 1
1.1 Knochenremodeling 1
1.1.1 Knochenzellen 2
1.1.2 Osteoporose 2
1.2 Bedeutung des mechanischen Reizes für das Knochenremodeling 4
1.2.1 Mechanotransduktion 4
1.2.2 Mechanotransduktion und Osteoporose 6
1.3 Prostaglandine und ihre Bedeutung im Knochenstoffwechsel 7
1.4 ER-Signaltransduktionswege 9
1.4.1 Bedeutung von Östrogenen und ihren Rezeptoren für den Knochen 9
1.4.2 ER-Signaltransduktion 10
1.4.3 ER-Signaltransduktionswege in der Mechanotransduktion 12
1.5 Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionsweg 13
1.5.1 Bedeutung des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs für die Regulation der Knochenmasse 13
1.5.2 Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionskaskade 14
1.5.3 Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionsweg in der Mechanotransduktion 15
1.6 Interaktion zwischen dem ER- und dem Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionsweg 16
1.7 Ziel der Arbeit 18
2. Material und Methoden 20
2.1 Material 20
2.1.1 Zellen 20
2.1.2 Zellkulturmedien 20
2.1.3 Oligonukleotide (Primer) 21
2.1.4 Kits 23
2.1.5 Lösungen und Puffer 24
2.1.6 Chemikalien 25
2.1.7 Restriktionsenzyme 27
2.1.8 Antikörper 28
2.1.9 Geräte 28
2.1.10 Sonstige Verbrauchsmaterialien 31
2.2 Methoden 33

2.2.1 Zellkultur 33
2.2.1.1 Isolierung und Zellkultur muriner primärer osteoblastärer Zellen 33
2.2.1.2 Aussaat der Zellen in Silikonschalen (Monolayer) 33
2.2.1.3 Bestimmung der Zellviabilität 34
2.2.1.4 Differenzierung der Zellen 34
2.2.1.5 Chemische Stimulation der Zellen 35
2.2.1.6 Mechanische Stimulation der Zellen 35
2.2.2 Genexpressionsanalyse 35
2.2.2.1 Gesamt-RNA-Isolierung 36
2.2.2.2 cDNA-Synthese 36
2.2.2.3 Standard-PCR 37
2.2.2.4 *Real-Time* RT-PCR 37
2.2.2.5 Agarose-Gelelektrophorese 38
2.2.2.6 Herstellung der Standard-DNA für die *Real-Time* RT-PCR 39
2.2.2.7 Herstellung der Agar-Platten und des LB-Mediums 39
2.2.2.8 Klonierungsreaktion und Transformation der Bakterien 40
2.2.2.9 Bakterienkultur 40
2.2.2.10 Isolierung der Plasmid-DNA 40
2.2.2.11 Linearisierung des Plasmids 41
2.2.3 Transfektion 41
2.2.3.1 In-vitro-Transfektion von MC3T3-E1-Zellen 42
2.2.3.2 Bestimmung der Luciferaseaktivität 42
2.2.4 Western-Blot und Immundetektion 42
2.2.5 Indirekte Doppel-Immunfluoreszenz 43
2.2.6 Mikroarray-Untersuchungen 44
2.2.7 Statistik 45
3. Ergebnisse 46
3.1 Differenzierung und mechanische Stimulation primärer osteoblastärer Zellen 46
3.1.1 Expression von mit dem ER- und dem Wnt/β-Catenin-Signalweg assoziierten Genen im Kultivierungsverlauf 46
3.1.2 Expression von über den ER- und den Wnt/β-Catenin-Signalweg regulierten Genen nach mechanischer Stimulation 49
3.1.3 Zusammenfassung der Ergebnisse 50

3.2 Einfluss von Modulatoren des ER- und des Wnt/β-Catenin-Signalwegs und mechanischer Stimulation auf die Expression früh responsiver Gene 51
3.2.1 Einfluss spezifischer Aktivatoren des ER- und des Wnt/β-Catenin-Signalwegs und mechanischer Stimulation auf die Ptgs-2- und die Tnfrsf-11b-Expression in primären osteoblastären Zellen 51
3.2.2 Einfluss spezifischer Aktivatoren des ER- und des Wnt/β-Catenin-Signalwegs und mechanischer Stimulation auf die Ptgs-2-Expression in murinen mesenchymalen Stammzellen (C3H10T1/2) 53
3.2.3 Zusammenfassung der Ergebnisse 54
3.2.4 Einfluss von Modulatoren des ER- und des Wnt/β-Catenin-Signalwegs und mechanischer Stimulation auf die Ptgs-2-Expression in MC3T3-E1-Zellen 55
3.2.5 Einfluss spezifischer Aktivatoren des ER- und des Wnt/β-Catenin-Signalwegs und mechanischer Stimulation auf die Expression weiterer am Knochenremodeling beteiligter Gene 59
3.2.6 Einfluss von E2 auf die Expression früh responsiver Gene nach mechanischer Stimulation unter hormonfreien Bedingungen 61
3.2.7 Zusammenfassung der Ergebnisse 63
3.3 Einfluss physiologischer Aktivatoren des ER- und des Wnt/β-Catenin-Signalwegs auf die Cox-2-Proteinexpression und die β-Catenin-Aktivität 64
3.3.1 Einfluss von E2 bzw. Wnt-3a und mechanischer Stimulation auf die Cox-2-Proteinexpression in MC3T3-E1-Zellen 64
3.3.2 Einfluss von E2 bzw. Wnt-3a und mechanischer Stimulation auf die β-Catenin-Aktivität in MC3T3-E1-Zellen 65
3.3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse 67
3.4 Weitere Untersuchungen an primären osteoblastären Zellen aus Mauskalvarien, C3H10T1/2- und MC3T3-E1-Zellen zum ER- und Wnt/β-Catenin-Signalweg 67
3.4.1 Esr-1- und Ctnnb-1-Expression 67
3.4.2 Einfluss von Wnt-3a und mechanischer Stimulation auf TopFlash-transfizierte MC3T3-E1-Zellen 68
3.4.3 Einfluss von E2 und Wnt-3a auf die Lokalisation von ERα und β-Catenin im Nukleus von MC3T3-E1-Zellen 70
3.4.4 Zusammenfassung der Ergebnisse 71
4. Diskussion 72
4.1 Differenzierung und mechanische Stimulation primärer osteoblastärer Zellen 72

4.1.1 Expression von mit dem ER- und dem Wnt/β-Catenin-Signalweg assoziierten Genen im Kultivierungsverlauf 72
4.1.2 Expression von über den ER- und den Wnt/β-Catenin-Signalweg regulierten Genen nach mechanischer Stimulation 75
4.2 Einfluss von Modulatoren des ER- und des Wnt/β-Catenin-Signalwegs und mechanischer Stimulation auf die Expression früh responsiver Gene 76
4.2.1 Einfluss spezifischer Aktivatoren des ER- und des Wnt/β-Catenin-Signalwegs und mechanischer Stimulation auf die Ptgs-2-Expression 76
4.2.2 Einfluss spezifischer Inhibitoren des ER- und des Wnt/β-Catenin-Signalwegs und mechanischer Stimulation auf die Ptgs-2-Expression 79
4.2.3 Einfluss physiologischer Aktivatoren und Inhibitoren des ER- und des Wnt/β-Catenin-Signalwegs und mechanischer Stimulation auf die Ptgs-2-Expression 81
4.2.4 Einfluss physiologischer Aktivatoren des ER- und des Wnt/β-Catenin-Signalwegs und mechanischer Stimulation auf die Expression weiterer am Knochenremodeling beteiligter Gene 82
4.3 Einfluss physiologischer Aktivatoren des ER- und des Wnt/β-Catenin-Signalwegs auf die Cox-2-Proteinexpression und die β-Catenin-Aktivität 84
4.3.1 Einfluss von E2 bzw. Wnt-3a und mechanischer Stimulation auf die Cox-2-Proteinexpression in MC3T3-E1-Zellen 84
4.3.2 Einfluss von E2 bzw. Wnt-3a und mechanischer Stimulation auf die β-Catenin-Aktivität in MC3T3-E1-Zellen 85
4.4 Weitere Untersuchungen an osteoblastären Zellen zum ER- und Wnt/β-Catenin-Signalweg 86
4.4.1 Einfluss von Wnt-3a und mechanischer Stimulation auf TopFlash-transfizierte MC3T3-E1-Zellen 86
4.4.2 Einfluss von E2 und Wnt-3a auf die Lokalisation von ERα und β-Catenin im Nukleus von MC3T3-E1-Zellen 88
5. Zusammenfassung der vorliegenden Arbeit 90
6. Literaturverzeichnis 92
Danksagung 108

Abkürzungsverzeichnis

µ	Mikro
µε	*microstrain*
µM	Mikromolar
2-D	zweidimensional
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
A	Ampere
AA	Arachidonsäure
AC	*adenylate cyclase*
Akt	*thymoma viral proto-oncogene*
Alpl	*alkaline phosphatase liver/bone/kidney*
AP1	*activator protein 1*
APC	*adenomatous polyposis coli*
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	destilliertes Wasser
BCA	*bicinchoninic acid*
BMP	*bone morphogenetic protein*
BMU	*basic multicellular units*
Bp	Basenpaare
BRB	*biometric research branch*
BSA	bovines Serumalbumin
c-Src	*cellular sarcoma protein*
C3H10T1/2	murine mesenchymale Stammzelllinie
Ca^{2+}	Calcium^{2+}
CaM	*calmodulin*
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	(komplementäre) Desoxyribonukleinsäure
Cebpb	*CCAAT/enhancer binding protein, beta*
CIMC	*conditionally immortalized murine calvaria*
cm^2	Quadratzentimeter
CO_2	Kohlendioxid
Cox-2	Cyclooxygenase-2
$cPLA_2$	*cytosolic phospholipase A_2*

Creb-1	*cAMP responsive element binding protein 1*
Ctnnb-1	*catenin (cadherin associated protein), beta 1*
Cyr-61	*cysteine rich protein 61*
DAG	Diacylglycerol
Dkk-1	Dickkopf-1
Dmp-1	*dentin matrix protein 1*
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
Dsh	*dishevelled*
DTT	Dithiotreitol
E2	17-β-Östradiol
E	Endostatin
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	*epidermal growth factor*
eNos	*endothelial nitric oxide synthase*
ER	*estrogen receptor*
ERE	*estrogen responsive element*
ERK1/2	*extracellular signal regulated protein kinase 1/2*
Esr-1	*estrogen receptor* α
Esr-2	*estrogen receptor* β
FAK	fokale Adhäsionskinase
FBS	fetales bovines Serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Fos	*FBJ osteosarcoma oncogene*
Frat-1	*frequently rearranged in advanced T-cell lymphomas 1*
FSS	*fluid shear stress*
Fzd	*frizzled*
g	Gramm
Gapdh	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GF	*growth factor*
Gja-1	*gap junction protein, alpha 1 (connexin-43)*
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GSK3	Glycogen Synthase Kinase 3
h	Stunde(n)

HCl	Chlorwasserstoff (Salzsäure)
hFOB	humane fetale Osteoblasten
hOB	humane Osteoblasten-ähnliche Zellen
HRP	*horseradishperoxidase*
HSP	Hitzeschockprotein
HUVEC	*human umbilical-vein endothelial cells*
Hz	Hertz
Ibsp	*integrin-binding sialoprotein*
ICI	*imperial chemical industries*
IGF	*insulin-like growth factor*
Il	Interleukin
iNos	*inducible nitric oxide synthase*
IP_3	Inositoltrisphosphat
IZKF	Interdisziplinäres Zentrum für Klinische Forschung
Jun	*jun oncogene*
K	Kontrolle
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
Krm	Kremen
LB	Luria Bertani
Lef-1	*lymphoid enhancer binding factor 1*
LiCl	Lithiumchlorid
LRP5/6	*low-density lipoprotein receptor-related protein 5/6*
mA	Milliampere
MAPK	*mitogen-activated protein kinase*
MC3T3-E1	murine präosteoblastäre Zelllinie
MEK	*mitogen-activated protein kinase extracellular signal regulated protein kinase*
MEM	*minimal essential medium*
MG63	humane Osteosarkomzellen
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter

MMTV	*mouse mammary tumor virus*
mRNA	*messenger* Ribonukleinsäure
MSC	mesenchymale Stammzelle
Myc	*myelocytomatosis oncogene*
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NFκB	*nuclear factor κB*
Nfil-3	*nuclear factor, interleukin 3, regulated*
nM	Nanomolar
nm	Nanometer
NO	*nitric oxid*
Opg	Osteoprotegerin
OPPG	Osteoporose-Pseudoglioma-Syndrom
Osx	Osterix
OVX	ovarektomiert
p300/CBP	*p300 and cAMP response element binding protein*
p	Pico
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PG	Prostaglandin
PGES	Prostaglandin Synthase
PI3K	*phosphoinositide 3-kinase*
PKA	cAMP-abhängige Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
Ptgs-2	*prostaglandin-endoperoxidase synthase 2 (cyclooxygenase-2)*
PTH	Parathormon
R	Rezeptor
Raf	*rat fibrosarcoma serin/threonine protein kinase*
Rank	*receptor-activator of NFκB*
Rankl	*receptor-activator of NFκB-ligand*
Ras	*rat sarcoma oncogene*
ROS17/2.8	*rat osteosarcoma cells*
RT	*reverse transcriptase*

Runx-2	*runt-related transcription factor 2*
S	mechanische Stimulation
s	Sekunde(n)
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SERM	*selective estrogen receptor modulators*
sFRP	*secreted frizzled-related protein*
SIBLING	*small integrin binding ligand N-linked glycoprotein*
SMAD	*small mother against decapentaplegic*
SMRT/NCoR	*silencing mediator of retinoid and thyroid receptors and nuclear receptor corepressor*
SOC	*super optimal broth*
SOST	Sklerostin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	*tris buffered saline*
Tcf	*T-cell factor*
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF	*transforming growth factor*
TNF	Tumornekrosefaktor
Tnfrsf-11b	*tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b (osteoprotegerin)*
Tnfsf-11	*tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 11 (rankl)*
TR	*Texas red*
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
u.a.	unter anderem
U	*unit(s)*
UMR-106	*rat osteosarcoma cell line*
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
V	Volt
w/v	Gewicht pro Volumen
WIF	Wnt-inhibierende Faktoren
Wisp	*wnt-1 inducible signaling pathway protein*
Wnt	*wingless-type MMTV integration site family*
WT	Wildtyp

X-Gal	*5-bromo-4-chloro-3-indolyl β-D-galactopyranoside*

1. Einleitung

1.1 Knochenremodeling

Das Knochenremodeling ist ein physiologischer Prozess, bei dem kontinuierlich alter Knochen abgebaut und durch neugebildeten ersetzt wird. Verschiedene Knochenzellen (siehe Kapitel 1.1.1) agieren dabei in enger zeitlicher und räumlicher Abfolge und bilden sogenannte *basic multicellular units* (BMU) [45, 75]. Normalerweise befinden sich der Knochenabbau und der Knochenaufbau im Gleichgewicht. Ein Ungleichgewicht kann zu osteopenischen Erkrankungen wie zum Beispiel zu Osteoporose (siehe Kapitel 1.1.2) führen. Das Knochenremodeling ist beeinflussbar durch zahlreiche Faktoren, wie zum Beispiel durch Wachstumsfaktoren, Steroidhormone, mechanische Belastung und das Alter. Einen Eindruck über die Faktoren, die zur physiologischen Homöostase des Knochens beitragen, vermittelt die Abbildung 1.1.

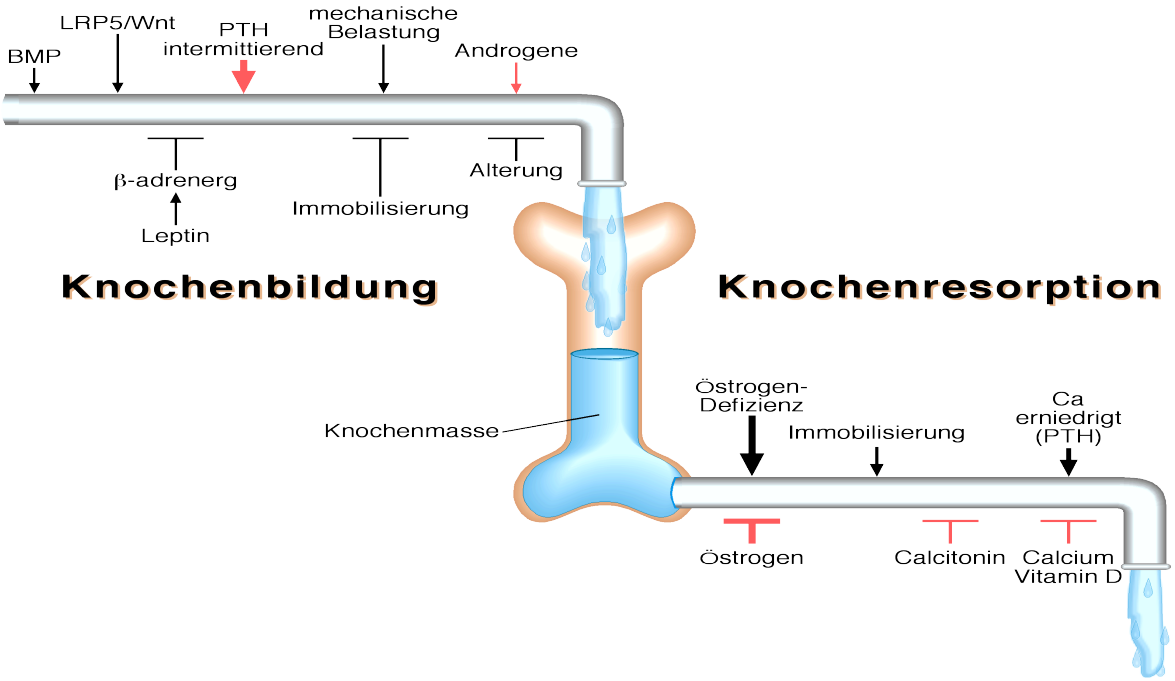


Abbildung 1.1

Übersicht der Einflussfaktoren auf die Knochenhomöostase nach Harada & Rodan [59].

Die physiologischen Stimulatoren und Inhibitoren sind schwarz und die pharmakologischen lila, der relative Einfluss wird durch die Dicke der Pfeile dargestellt.

BMP, *bone morphogenetic protein;* Ca, Calcium; LRP5, *low-density lipoprotein receptor-related protein 5*; PTH, Parathormon; Wnt, zusammengesetzte Abkürzung aus *wingless* und *integration-1*.

1.1.1 Knochenzellen

Der Knochen setzt sich aus drei Zelltypen zusammen, den knochenabbauenden Osteoklasten, den knochenbildenden Osteoblasten und den Osteozyten.

Osteoklasten entstehen aus myeloischen Vorläuferzellen im Knochenmark und entwickeln sich im Verlauf der Osteoklastogenese zu mehrkernigen Osteoklasten, die den Abbau mineralisierter Knochensubstanz bewirken. Osteoblasten entstehen aus mesenchymalen Vorläuferzellen und entwickeln sich unter dem Einfluss von Transkriptionsfaktoren wie *runt-related transcription factor 2* (Runx-2) und *osterix* (Osx) in Gegenwart von Parathormon (PTH), Vitamin D, Östrogen und Zytokinen zu funktionsfähigen Osteoblasten. Sie synthetisieren das Hauptprotein der Knochenmatrix, Typ I Kollagen, sowie weitere Knochenproteine wie zum Beispiel Osteokalzin, Osteonektin, Osteopontin und *bone sialoprotein*. Sie sezernieren Wachstumsfaktoren wie zum Beispiel *transforming growth factor* (TGF), *bone morphogenetic protein* (BMP) und *insulin-like growth factor* (IGF), die in der Knochenmatrix gespeichert werden [60], und mineralisieren neu gebildete Knochenmatrix mittels mit alkalischer Phosphatase angereicherter Matrix-Vesikel. Mit zunehmendem Knochenanbau werden Osteoblasten in den mineralisierten Knochen eingebaut und wandeln sich in Osteozyten um [1].

Durch das Opg/Rankl/Rank-System können Osteoblasten die Reifung und Aktivität von Osteoklasten steuern [132]. Osteoblasten produzieren, stimuliert durch PTH-Ausschüttung aus der Nebenschilddrüse, *receptor-activator of NFκB-ligand* (Rankl), der an den *receptor-activator of NFκB* (Rank) auf der Zelloberfläche von Osteoklasten-Vorläufern bindet. Die Bindung von Rankl an Rank führt zur Differenzierung von Osteoklasten-Vorläufern zu Präosteoklasten, die dann zu Osteoklasten ausreifen. Durch die verstärkte Entstehung und Aktivität von Osteoklasten kommt es einerseits zu einer vermehrten Knochenresorption, andererseits kann unter dem Einfluss von Östrogen der Rankl-Antagonist Osteoprotegerin (Opg) von Osteoblasten synthetisiert werden, sodass die Osteoklasten-Aktivität gehemmt wird.

1.1.2 Osteoporose

Bei der Osteoporose besteht ein Ungleichgewicht zwischen Knochenresorption und Knochenformation mit einem relativen Überwiegen des Knochenabbaus, so dass eine verminderte Knochendichte resultiert [149]. Patienten mit Osteoporose haben einen porösen, instabilen Knochen und leiden an Knochenfrakturen.

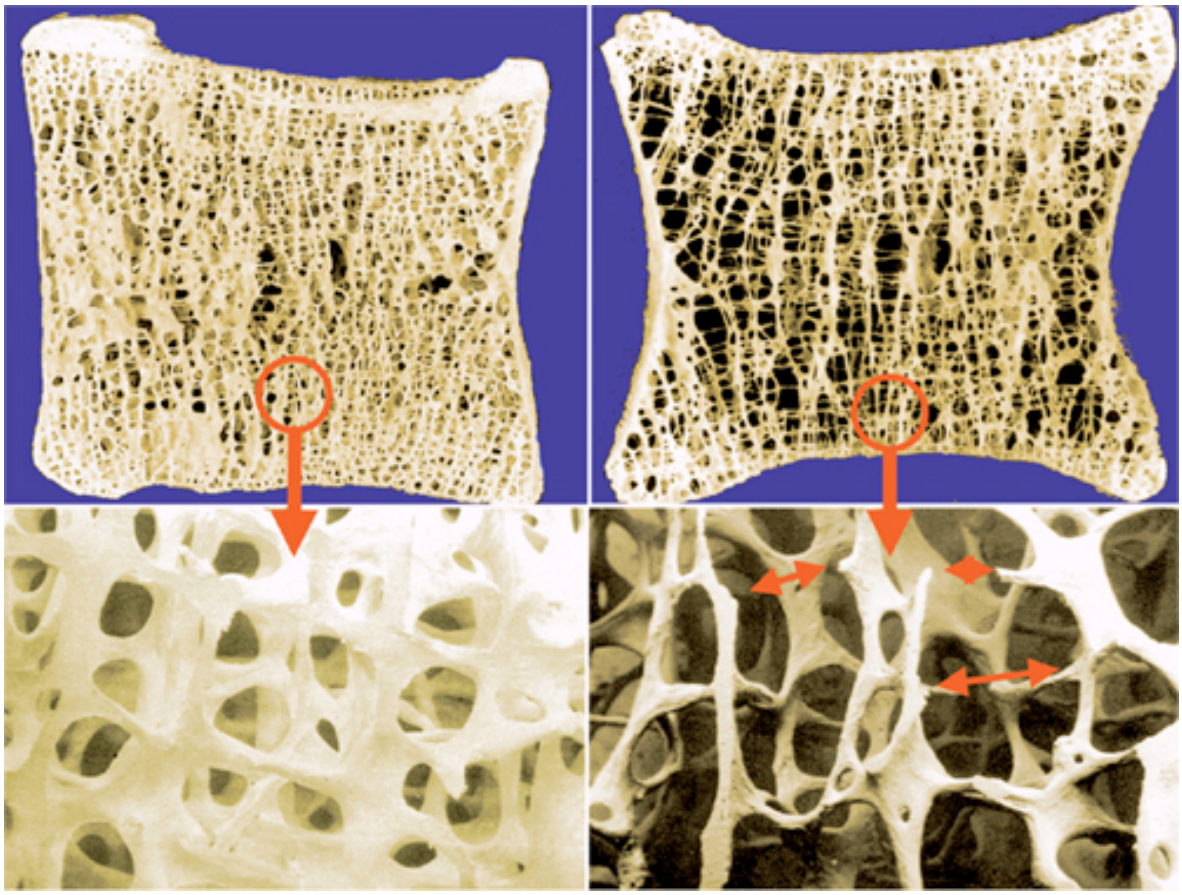


Abbildung 1.2

Gesunde und osteoporotische Knochenstruktur im Vergleich (Quelle: www.orthopaedie-finkewitz.de). Ausschnitt eines gesunden Wirbelkörpers mit dichten und gut verkalkten Knochenbälkchen (links) und eines osteoporotischen Wirbelkörpers (rechts) mit Verminderung der Dichte, was die mechanischen Eigenschaften des Wirbelkörpers schwächt.

Die Abbildung 1.2 zeigt die Struktur eines gesunden Wirbels (links) im Vergleich zu der eines osteoporotischen Wirbels (rechts). Im gesunden Wirbelkörper ist die tragende Struktur viel dichter, im osteoporotischen ist das feine Knochengerüst stark ausgedünnt. Der kranke Knochen ist so weniger widerstandsfähig gegen mechanische Belastungen und bricht viel leichter.

Die Osteoporose wird unterteilt in die primäre und die sekundäre Osteoporose. Zur wesentlich häufigeren primären Osteoporose zählt u.a. die postmenopausale Osteoporose. Die Hauptursache für ihre Ausprägung ist vor allem eine Abnahme des Östrogenspiegels nach der Menopause. Der rapide Rückgang des Östrogenspiegels führt zu makrostrukturellen Veränderungen insbesondere der trabekulären Knochenstrukturen. Mikrostrukturell wird eine vermehrte Anzahl von BMU beobachtet, wobei gleichzeitig die gesteigerte knochenabbauende Tätigkeit der Osteoklasten durch die zur Knochenneubildung befähigten Osteoblasten nicht ausgeglichen wird. Die Effekte des

Östrogenmangels auf Knochenwachstum und Remodeling wurden in ovarektomierten (OVX) Ratten untersucht. Turner et al. [163] beobachteten in OVX-Ratten, dass Östrogen sowohl die Knochenbildung direkt erhöhen als auch die Knochenresorption reduzieren kann. Es wird vermutet, dass die Erhöhung der trabekulären Knochendichte durch Östrogen von dem Östrogenrezeptor (ER) α abhängt [67, 110]. Durch Östrogenbehandlung lässt sich postmenopausaler Knochenverlust vorbeugen [102]. Die sekundäre Osteoporose entsteht bei Vorliegen anderer Grunderkrankungen, Einnahme bestimmter Medikamente oder Immobilisation.

1.2 Bedeutung des mechanischen Reizes für das Knochenremodeling

1.2.1 Mechanotransduktion

Wolff stellte schon 1892 einen Zusammenhang zwischen dem Umbau des trabekulären Knochens und mechanischer Belastung fest (Wolffsches Gesetz) [172]. Die von Frost [46-48] aufgestellte Mechanostattheorie besagt, dass innerhalb eines physiologischen Intervalls (1500-5000 μ*strain* (με)) knochenspezifische Prozesse optimal stimuliert werden. Eine mechanische Überbelastung (größer als 10000 με) oder Unterbelastung (kleiner als 1000 με) führt zu pathologischen Reaktionen des Knochens. Frost beschrieb außerdem, dass Hormone die Effekte der mechanischen Belastung erhöhen oder vermindern können.
Die Umwandlung mechanischer Reize in eine Zellantwort nennt man Mechano-transduktion. Vogel [167] gliedert die Mechanotransduktion in drei Abschnitte: Erkennen einer Veränderung des mechanischen Ist-Zustandes (Mechanorezeption), Konvertierung der wirkenden Kraft in ein biochemisches Signal (Signaltransduktion zum Kern) und eine mechanisch-induzierte Antwort (Gen- bzw. Proteinexpression). Über Zell-Zell-Kanäle (*gap junctions*), deren Anzahl unter mechanischem Einfluss steigt, können die Signale in die Nachbarzellen weitergeleitet werden [4, 27]. Die Signalwege und ihre Schlüsselmoleküle, welche die Antwort der Osteoblasten auf mechanischen Stress dirigieren, sind in der Abbildung 1.3 zusammengefasst.

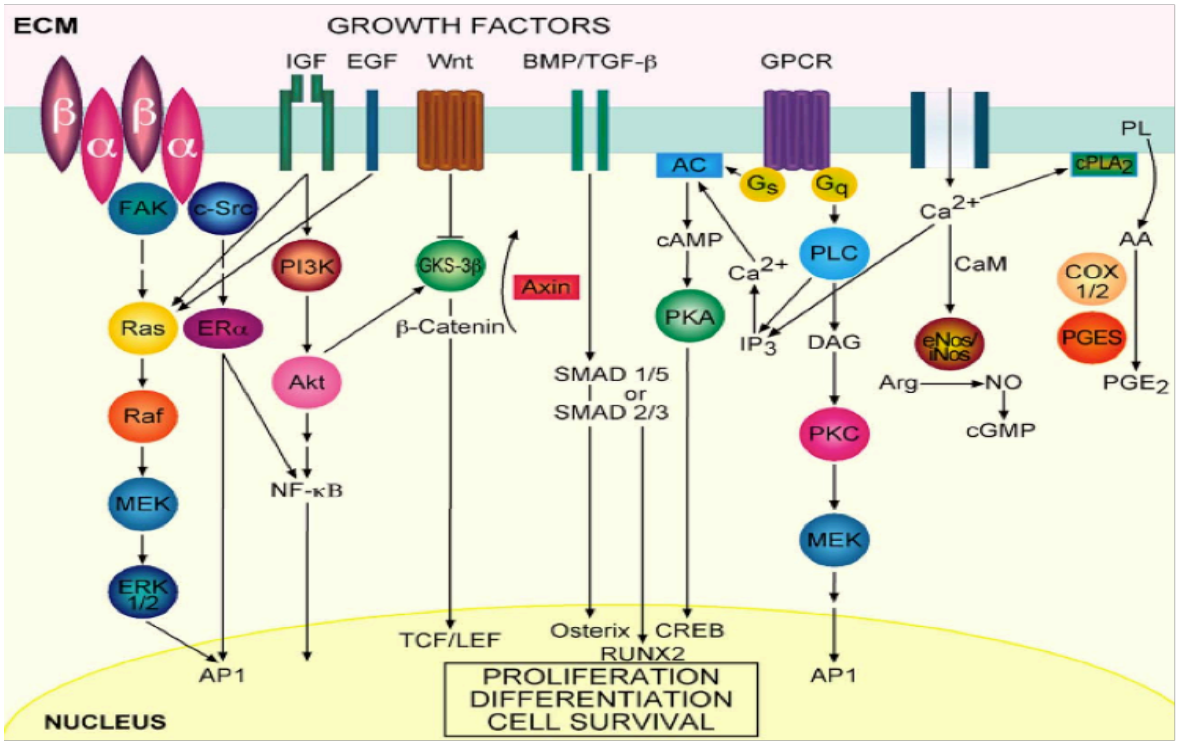


Abbildung 1.3

Übersicht der an der Mechanotransduktion beteiligten Faktoren nach Liedert et al. [99].

AA, *arachidonic acid*; AC, *adenylate cyclase*; Akt/PKB, *akutely transforming/protein kinase B*; AP1, *activator protein 1*; BMP, *bone morphogenetic protein*; CaM, *calmodulin*; COX1/2, *cyclooxygenase 1/2*; CREB, *cAMP response element binding protein*; c-Src, *tyrosine protein kinase*; DAG, *diacylglycerol*; EGF, *epidermal growth factor*; eNos, *endothelial nitric oxide synthase*; ERα, *estrogen receptor α*; ERK1/2, *extracellular signal regulated protein kinase 1/2*; FAK, *focal adhesion kinase*; GPCR, *seven-transmembrane-domain G-protein-coupled receptor*; G_q, *protein with αq subunit;* G_s, *stimulatory G-protein*; GSK-3β, *glycogen synthase kinase-3β*; IGF, *insulin-like growth factor*; iNos, *inducible nitric oxide synthase*; IP_3, *inositol trisphosphate*; LEF, *lymphoid enhancer-binding factor*; MEK, *mitogen-activated protein kinase extracellular signal regulated protein kinase*; NF-κB, *nuclear factor-κB*; PGE_2, *prostaglandin* E_2; PGES, *prostaglandin synthase*; PI3K, *phosphoinositide 3-kinase*; PKA, *protein kinase A*; PKC, *protein kinase C*; PL, *phospholipid*; PLC, *phospholipase C*; Raf, *rat fibrosarcoma serin/threonine protein kinase*; Ras, *rat sarcoma monomeric GTP-binding protein*; SMAD, *small mother against decapentaplegic*; TCF, *T-cell factor*; TGF-β, *transforming growth factor-β*; Wnt, *wingless/integration-1*.

Integrine dienen als Mechanorezeptoren. Sie interagieren mit Kinasen wie zum Beispiel der fokalen Adhäsionskinase (FAK) und der Tyrosinproteinkinase (c-Src), die zur Ras/Raf-MEK-abhängigen Phosphorylierung von extrazellulär-regulierten Proteinkinasen (ERK1/2) führen. Der durch diesen Signaltransduktionsweg aktivierte Transkriptionsfaktor AP1 (c-Jun/c-Fos-Heterodimer) moduliert die Expression mechanosensitiver Gene wie zum Beispiel *FBJ osteosarcoma oncogene* (c-Fos) oder Cyclooxygenase-2 (Cox-2) [168].

Mechanische Belastung führt zu einer Hochregulation der Expression von

Wachstumsfaktoren, wie zum Beispiel IGF-1 und IGF-2, epidermaler Wachstumsfaktor (EGF), TGF-β und BMP [69, 114]. Diese Wachstumsfaktoren induzieren die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)/ Proteinkinase B (Akt)-, Mitogen-aktivierbare Proteinkinase (MAPK)-, und *small mother against decapentaplegic* (SMAD)-Signaltransduktionswege [40, 69]. Der BMP-2-aktivierte Signalweg führt zum Beispiel zur Expression von osteogenen Haupttranskriptionsfaktoren wie zum Beispiel Osx und Runx-2 [97].

Ebenfalls bekannt ist, dass mechanische Stimulation spannungssensitive Calciumkanäle aktiviert, wodurch der Eintritt von extrazellulärem Ca^{2+} in das Zellzytoplasma erleichtert wird. Weitere Freisetzung von intrazellulärem Ca^{2+} und Stickstoffmonooxid (NO)-Synthese sind die Folge. Die Aktivierung der zytosolischen Phospholipase A_2 ($cPLA_2$) führt zu einer Freisetzung von Arachidonsäure (AA) aus der Zellmembran. Cox-2 katalysiert den ersten Schritt in der Umwandlung von AA in biologisch aktives Prostaglandin (PG) (siehe Kapitel 1.3), um u.a. die stimulierenden Effekte von Östrogen und mechanischer Belastung auf die Knochenbildung zu vermitteln [29, 43].

Nach mechanischem Stress wird Ca^{2+} nicht nur durch die Aktivierung von Ionenkanälen, sondern auch über die Aktivierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) freigesetzt. G-Proteine veranlassen die Rekrutierung und Aktivierung der Phospholipase C (PLC), welche die *second messenger* Diacylglycerol (DAG) und 1,4,5-Inositoltrisphosphat (IP_3) freisetzt. IP_3 wiederum induziert einen Anstieg an intrazellulärem Ca^{2+}. Die Aktivierung bestimmter GPCR stimuliert die Proteinkinase A (PKA), die das *cAMP responsive element binding protein* (CREB) phosphoryliert, ein Transkriptionsfaktor, der am Cox-2-Promotor binden kann [122].

Neben weiteren Signaltransduktionswegen wird auch der *wingless-type mouse mammary tumor virus (MMTV) integration site family* (Wnt)/β-Catenin-Signaltransduktionsweg, ein wichtiger Modulator in der Knochenentwicklung, durch mechanische Einflüsse verändert (siehe Kapitel 1.5.3).

1.2.2 Mechanotransduktion und Osteoporose

In verschiedenen Studien wird darauf hingewiesen, dass bei einer postmenopausalen Osteoporose mit niedrigem Östrogenspiegel eine gestörte Mechanotransduktion vorliegen kann. So wurde zum Beispiel in einer In-vitro-Studie von Neidlinger-Wilke et al. [118] beschrieben, dass Osteoblasten von osteoporotischen Spendern im Vergleich zu normalen Spendern eine verminderte mechanische Induzierbarkeit ihrer Aktivitäten zeigten. Verma

et al. [166] stellten bei Patienten mit Osteoporose eine veränderte Knochenmarkzusammensetzung fest. Im osteoporotischen Knochen ist der Anteil an adipogenem Gewebe erhöht. Es wird angenommen, dass der Prozess der Proliferation und der Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen (MSC) zu Osteozyten oder Adipozyten sowohl durch molekulare Faktoren als auch durch mechanische Reize beeinflusst wird. MSC von postmenopausalen osteoporotischen Frauen zeigten gegenüber gesunden eine differentielle Aktivierung des in der Mechanotransduktion involvierten MAPK-Signalwegs [140]. Dies könnte u.a. eine verminderte Antwort auf mechanische Reize erklären. In einer In-vivo-Studie von Tou et al. [162] wurde gezeigt, dass OVX kombiniert mit mechanischer Entlastung zu einem schnelleren und stärkeren Knochenverlust führte als OVX oder Entlastung allein. Eine Nichtbelastung des Knochens wird demnach mit einem erhöhten postmenopausalen Osteoporoserisiko assoziiert.

Zwei Signaltransduktionswege, deren Störung zu Osteoporose führen kann, und die auch bei der Mechanotransduktion eine wichtige Rolle spielen, sind der ER- und der Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionsweg. Diese beiden Signaltransduktionswege werden in den Kapiteln 1.4 und 1.5 näher erläutert.

1.3 Prostaglandine und ihre Bedeutung im Knochenstoffwechsel

Prostaglandine (PG) spielen eine wichtige Rolle beim Knochenremodeling als lokale Regulatoren der Knochenresorption und der Knochenformation. Der Haupteffekt der PG liegt in einer Stimulation der Knochenresorption, indem sie die Rankl-Expression in Osteoblasten erhöhen und so die Rankl-induzierte Differenzierung von Osteoklasten-Vorläufern zu Osteoklasten verstärken. Auf die Knochenformation haben PG biphasische Effekte: in relativ geringer Konzentration stimulieren sie Proliferation und Differenzierung von Osteoblasten in-vitro, während sie in hoher Konzentration die osteoblastäre Kollagensynthese hemmen. Durch die Anwesenheit von Wachstumsfaktoren und systemischen Hormonen können die Effekte moduliert werden. In verschiedenen Zellkulturstudien [119, 133] konnte nachgewiesen werden, dass insbesondere PGE2 die Knochenformation und die Knochenresorption sowohl stimulieren als auch inhibieren kann.

Die Prostaglandin-Synthese erfolgt aus der Arachidonsäure. Im Arachidonsäurestoffwechsel (Abbildung 1.4) stellt die Cyclooxygenase das geschwindigkeitsbestimmende Schlüsselenzym dar.

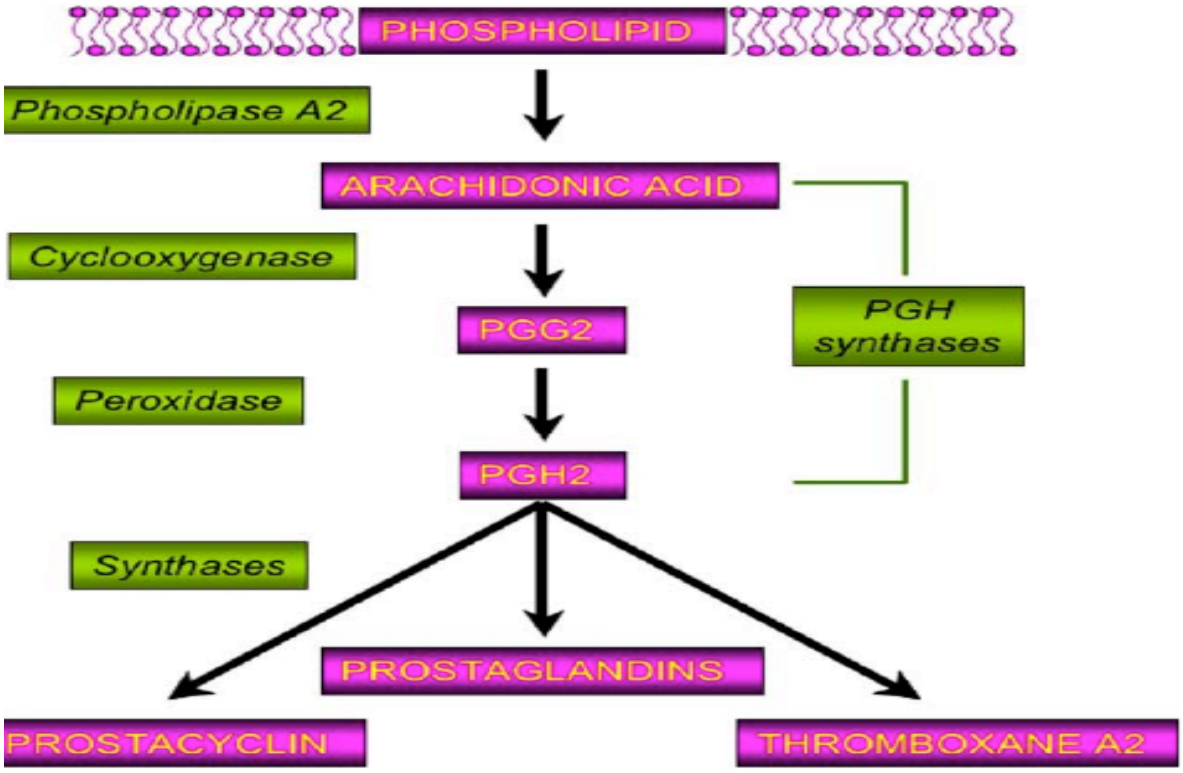


Abbildung 1.4

Schematische Darstellung des Cyclooxygenasewegs [98].

Die Phospholipase A2 setzt aus Phospholipiden Arachidonsäure frei. Diese wird durch die Cyclooxygenase zu Prostaglandin (PG) G2 und die Peroxidase zu PGH2 umgewandelt. Gewebespezifische Synthasen verwandeln PGH2 zu weiteren Prostaglandinen und Thromboxan A2.

Es sind zwei Isoenzyme der Cyclooxygenase bekannt - Cyclooxygenase-1 (Cox-1) und Cyclooxygenase-2 (Cox-2). Beide Enzyme katalysieren eine Bisoxygenase-Reaktion, bei der Arachidonsäure zu Prostaglandin (PG) G2 oxidiert wird, und eine Peroxidase-Reaktion, bei der PGG2 zu PGH2 reduziert wird. Gewebespezifische Synthasen wandeln PGH2 zu PGD2, PGE2, PGF2, PGI2 (Prostazyklin) oder Thromboxan A2 um. Cox-1 und Cox-2 gleichen sich in ihrer Primärstruktur. Obwohl diese Isoformen die gleiche Reaktion katalysieren und sich in ihrer Substratspezifität und Kinetik ähnlich sind, gibt es Unterschiede im Vorkommen und der Verteilung. Cox-1 ist ein konstitutiv exprimiertes Enzym, welches in fast allen Geweben und in Thrombozyten vorkommt. Es ist hauptsächlich für die physiologische Bereitstellung von PG verantwortlich. In den meisten Knochengeweben und Zellen konnte eine mRNA- und Proteinexpression von Cox-1 detektiert werden [36, 131]. Cox-2 wird im gesunden Gewebe fast nicht exprimiert und kann durch Acetylsalicylsäure (Aspirin), andere nicht-steroidale Antiphlogistika, sowie durch spezifische Cox-2-Blocker gehemmt werden. Cox-2 ist an der Regulation

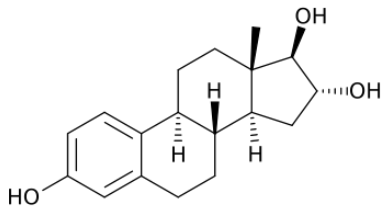
physiologischer und pathologischer Knochenprozesse beteiligt, wie zum Beispiel aktiviertes Knochenremodeling, Knochenneubildung und Knochenfrakturheilung. In Knochenzellen ist Cox-2 ein transient exprimiertes Enzym, dessen Expression durch Wachstumsfaktoren, Hormone, Zytokine, Entzündungsmediatoren und mechanische Belastung rasch induziert werden kann [130]. Forwood et al. [43] publizierten den Beweis, dass die Cox-2-abhängige PG-Synthese für die Knochenbildung durch mechanische Belastung entscheidend ist. Die mechanisch-induzierte Knochenbildung, hervorgerufen durch Vier-Punkt-Biegung von Rattentibien, wurde komplett durch einen nicht-spezifischen Cox-Inhibitor, und teilweise durch einen spezifischen Cox-2-Inhibitor verhindert. Weitere Studien [11, 77, 107] zeigten, dass Cox-2 eines der frühen Gene ist, das durch mechanische Belastung induziert wird und dessen mRNA-Expression im Knochen und in Knochenzellen hochreguliert wird. Eine Studie von Alam et al. [3] zeigte, dass Cox-2-defiziente Mäuse kein funktionelles Cox-2 benötigten, um auf mechanische Stimulation zu reagieren. Dieser Widerspruch kann einerseits durch die Expression von Cox-1 erklärt werden, andererseits wird deutlich, dass die Rolle von Cox-1 und Cox-2 in der Mechanotransduktion noch weiter untersucht werden sollte.

Im Gewebe des Hundes und in Mauszellen wurde eine weitere Cyclooxygenaseform, Cox-3, identifiziert [26, 148]. Es handelt sich hierbei vermutlich um eine Splicevariante des Cox-1-Gens. Die Rolle von Cox-3 beim Menschen ist noch unklar und ob Effekte, die nicht durch Cox-1 oder Cox-2 zu erklären sind, auf Cox-3 zurückzuführen sind, bleibt Gegenstand weiterer Forschungen.

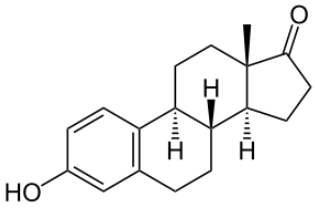
1.4 ER-Signaltransduktionswege

1.4.1 Bedeutung von Östrogenen und ihren Rezeptoren für den Knochen

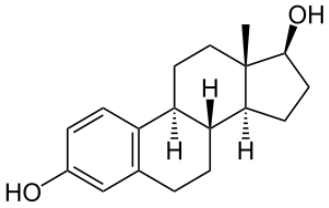
Östrogene, zu welchen Östriol, Östron und 17-β-Östradiol (Abbildung 1.5) gehören, sind C-18-Steroid-Derivate von Cholesterol und werden vorwiegend in den Eierstöcken und in der Plazenta, aber auch im Hoden, in der Nebennierenrinde und durch Aromatisierung von Testosteron im Fettgewebe gebildet.



Östriol



Östron



17-β-Östradiol

Abbildung 1.5
Strukturformel der natürlich auftretenden Östrogene [14, 125].

Östrogene spielen eine wichtige Rolle in der Regulation des Wachstums und der Funktion verschiedener reproduktiver Gewebe. Zusätzlich beeinflussen Östrogene nichtreproduktive Organe wie zum Beispiel die Knochen. Östrogene kontrollieren Proliferation und Differenzierung von Präosteoblasten und Präosteoklasten, die Aktivität von reifen Osteoblasten und Osteoklasten, die Entwicklung von MSC entweder zu Osteoblasten oder Adipozyten, die Produktion von Knochen-resorbierenden Zytokinen und Wachstumsfaktoren durch Osteoblasten und die Produktion von angiogenen Faktoren [137]. Östrogene haben direkten Einfluss auf die Bildung, Lebensdauer und auf die Aktivität sowohl von Osteoblasten [106] als auch von Osteoklasten [68, 178]. Sie können die Apoptose in Osteoblasten inhibieren und in Osteoklasten stimulieren [86].
Die Östrogen-Wirkung erfolgt über zwei nukleäre Rezeptoren, den Östrogenrezeptor ERα und ERβ. Beide Östrogenrezeptoren werden in Osteoblasten [85], Osteoklasten [127] und Osteozyten [161] exprimiert. Eine ERα-Hochregulation bei der Entwicklung des osteoblastären Phänotyps [19] und eine ER-Interaktion mit dem osteoblastären Transkriptionsfaktor Runx-2 [108] konnte in weiteren Studien festgestellt werden. Die zwei Rezeptortypen zeigen im Knochen eine differentiell regulierte Genexpression [116]. ERα erhöht die Knochenbildung und unterdrückt die Knochenresorption [158], während ERβ vermutlich die ERα-Aktivität moduliert [83].

1.4.2 ER-Signaltransduktion

Durch Bindung von Östrogenen an ihre Rezeptoren wird die Transkription von Zielgenen aktiviert. Drei genomische und ein nicht-genomischer Signaltransduktionsweg/e (Abbildung 1.6) sind bis jetzt bekannt, welche die biologischen Effekte der Östrogenrezeptoren vermitteln [57].

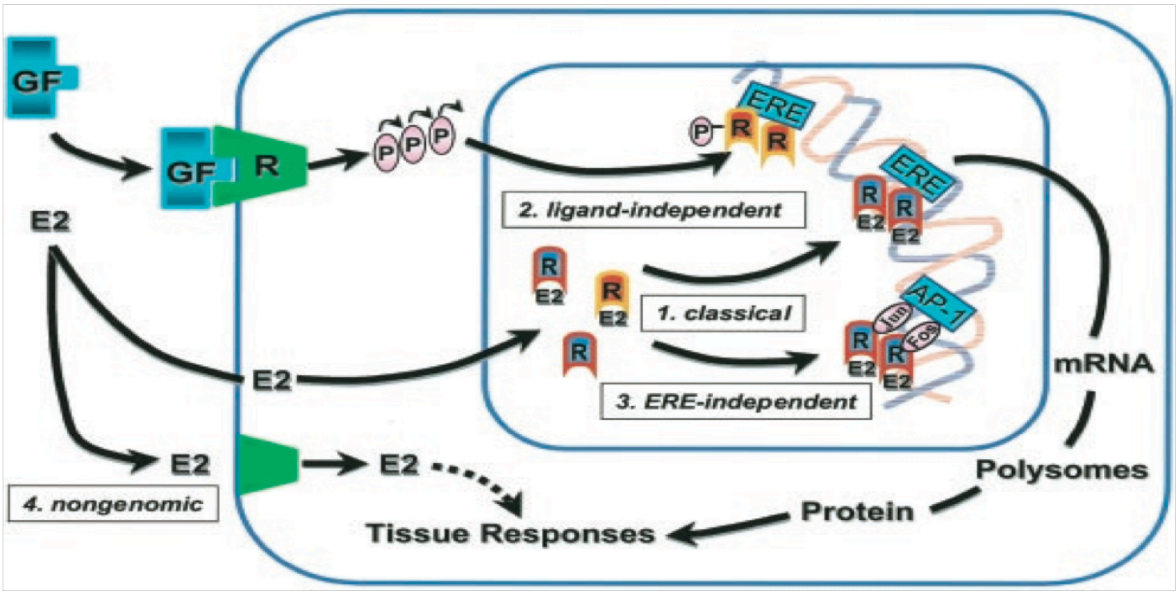


Abbildung 1.6

Schema genomischer und nicht-genomischer Östrogenwirkungen über verschiedene Signalwege [57].
AP-1, *activator protein 1*; E2, Östrogen; ERE, *estrogen responsive element*; GF, *growth factor*; Jun/Fos, DNA-gebundene Transkriptionsfaktoren; mRNA, *messenger* Ribonukleinsäure; R, Rezeptor.

Der erste (1.) klassische Mechanismus basiert auf einer ligandenabhängigen Aktivierung des ER. In seiner physiologisch inaktiven Form kann der ER im Zellkern an das Hitzeschockprotein (HSP) 90 assoziiert sein, das den Rezeptor bis zur Hormonbindung stabilisiert [135, 142]. Die Bindung eines Liganden führt zur Dissoziation des ER-HSP 90 Komplexes und zur Phosphorylierung des Rezeptors. Eine Konformationsänderung des Rezeptors ermöglicht die Bildung von Homo- bzw. Heterodimeren und die Interaktion mit Coregulatoren (Coaktivatoren, Corepressoren) und Transkriptionsfaktoren. Die so entstandenen Dimere interagieren über ein doppeltes Zinkfingermotiv mit *estrogen responsive element* (ERE) in der Promotorregion östrogensensitiver Gene.

Wachstumsfaktoren wie zum Beispiel EGF oder IGF-1 können ERα liganden-unabhängig (2.) aktivieren [151]. Die Phosphorylierung des ER führt zur Rezeptordimerisierung und Bindung an ERE-enthaltene Promotoren der Zielgene.

Bei der ERE-unabhängigen (3.) Signalübertragung können ER direkt Transkriptionsfaktoren hemmen oder aktivieren [54]. Zum Beispiel können E2-ER-Komplexe die Transkription von Genen verändern, die responsive Elemente wie zum Beispiel AP-1-Bindestellen enthalten.

Neben der klassischen genomischen Wirkungsweise von Östrogenen gibt es noch nicht-genomische (4.) Wirkmechanismen [169]. Diese Effekte werden über membranständige

Östrogenrezeptoren vermittelt. Die Bindung von Östrogen an den membranständigen ER führt zur Aktivierung von G-Proteinen. Verschiedene Untersuchungen gehen der Frage nach, ob die beschriebenen Effekte von Östrogen im Knochen von genomischen und ER-vermittelten und/oder von nicht-genomischen Wirkmechanismen ausgehen.

1.4.3 ER-Signaltransduktionswege in der Mechanotransduktion

In-vivo-Studien [52, 84] zeigten, dass Östrogene und mechanische Belastung postmenopausal die trabekuläre Knochendichte stärker erhöhen als Östrogene allein. Auch in-vitro zeigte sich eine additive Wirkung von Östrogen und mechanischer Belastung zum Beispiel auf die PGE2- und NO-Produktion in primären humanen Osteoblasten [12] und auf die Proliferation in Rattenosteoblasten [33]. Damien et al. [32] und Jessop et al. [74] erkannten, dass ein funktioneller ERα für eine adäquate Antwort der Knochenzellen auf mechanische Belastung von Bedeutung ist. Eine Abhängigkeit der ERα-Expression von der Östrogenkonzentration wurde in Untersuchungen von Hoyland et al. [67] ersichtlich. Eine höhere ERα-Expression durch Östrogengabe könnte zu einer stärkeren Antwort der Knochenzellen auf mechanische Belastung führen mit dem Ergebnis einer höheren Knochendichte. Lee et al. [96] stellten beim Vergleich von $ER\alpha^{+/+}$-Mäusen mit $ER\alpha^{-/-}$-Mäusen fest, dass die defizienten Mäusen kaum mechanisch-induzierten Knochenanbau zeigten. Die aus den $ER\alpha^{-/-}$-Mäusen isolierten Osteoblasten wiesen im Vergleich zu den Zellen aus den Wildtyp-Mäusen keinen Anstieg der Zellproliferation nach mechanischer Belastung auf. ERβ konnte im Gegensatz zu ERα nicht die beeinträchtigte Mechanoresponsivität kompensieren. Zaman et al. [179] beschrieben, dass durch Inhibition des ERα durch selektive Östrogenrezeptormodulatoren (SERM), wie zum Beispiel ICI 182,780, die durch Östrogen und mechanische Belastung stimulierte Proliferation von Knochenzellen abgeschwächt werden konnte. ICI 182,780 ist ein Östradiolderivat mit einer langen hydrophoben Seitenkette an der 7-alpha-Kette (Abbildung 1.7).

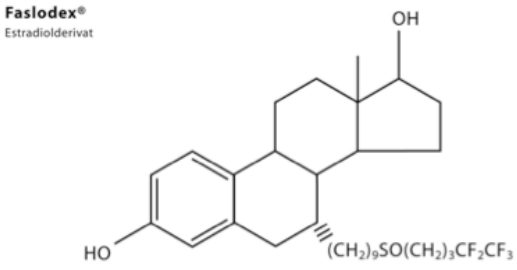


Abbildung 1.7

Strukturformel des selektiven Östrogenrezeptorantagonisten ICI 182,780 [66].

Seine rein antiöstrogene Wirkung hat einen im Vergleich zu anderen SERM unterschiedlichen Mechanismus. ICI 182,780 blockiert den ERα und verhindert dessen Dimerisierung, hierdurch erfolgt die Degradation des ER mit daraus resultierender Reduktion des zytosolischen ER-Gehalts [123, 126]. ICI 182,780 galt lange Zeit als reiner Östrogenrezeptorantagonist, bis eine agonistische Wirkung von ICI 182,780 über nicht-klassische Rezeptoren nachgewiesen wurde. Zum Beispiel wirken die Antagonisten Tamoxifen und ICI 182,780 als Agonisten am G-Protein-gekoppelten Rezeptor GPR30, der die Östrogenwirkung über intrazelluläre Signalübertragung vermittelt [41, 169].

1.5 Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionsweg

1.5.1 Bedeutung des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs für die Regulation der Knochenmasse

Die Wnt-Familie besteht aus hochkonservierten cysteinreichen sezernierten Glykoproteinen und gehört zu den wichtigsten Signalmolekülen während der Entwicklung und im adulten Organismus. In Vertebraten sind bisher 19 Wnt-homologe Gene bekannt. Die Wnt-Gene werden in einer großen Anzahl in Geweben und Organen exprimiert und koordinieren verschiedene Zellprozesse. Im Knochen hemmen die Wnt-Glykoproteine die Osteoklastogenese und fördern die Differenzierung, Proliferation und Matrixmineralisation von Osteoblasten, indem sie die Apoptose der Osteoblasten verhindern.

Die Entdeckung, dass das Osteoporose-Pseudoglioma-Syndrom (OPPG), eine schwere Form der Osteoporose im Menschen, durch eine *loss-of-function* Mutation im Corezeptor der Wnt-Proteine, *low-density lipoprotein receptor-related protein* 5 (LRP5), verursacht wird [53], lieferte den ersten Hinweis auf die Bedeutung des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs in der Knochenentwicklung und im Knochenerhalt. Kato et al. [81] generierten daraufhin LRP5-defiziente Mäuse, die einen Phänotyp entwickelten, der den Phänotyp in Patienten mit OPPG ähnelte. Eine aktivierende (*gain-of-function*) Mutation im LRP5-Gen (G171V) führte zu einer gesteigerten osteoblastären Knochenformation und ging mit einer stark erhöhten Knochendichte (Osteosklerose) einher [21, 104].

Der Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionsweg nimmt demnach eine entscheidende Rolle in der Regulation der Knochenmasse ein. Spezifische Veränderungen dieses Signalwegs können entweder zu einer Erniedrigung oder Erhöhung der Knochenmasse führen.

1.5.2 Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionskaskade

Zur Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs interagieren Wnt-Glykoproteine mit 7-Transmembranrezeptoren der *Frizzled* (Fzd)-Familie und ihren Corezeptor LRP5/6 auf der Zelloberfläche (Abbildung 1.8).

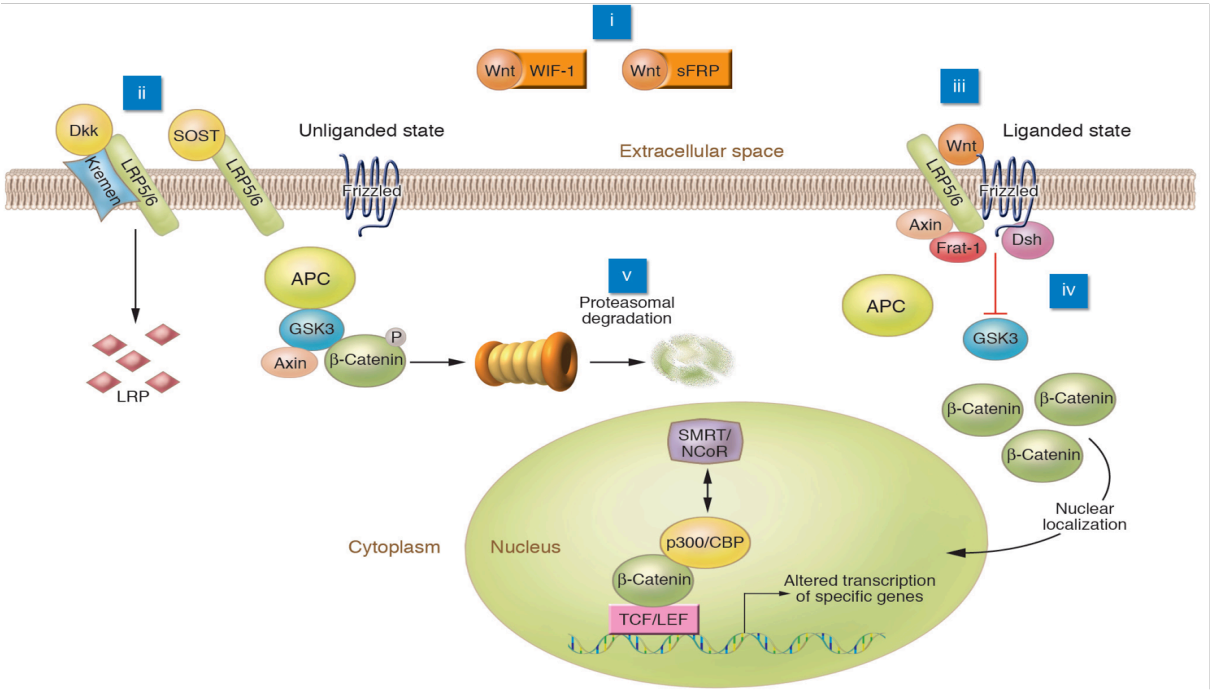


Abbildung 1.8

Überblick über den Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionsweg nach Krishnan et al. [88].

Ohne die Bindung von Wnt-Molekülen an *Frizzled*-Rezeptoren und ihre Corezeptoren LRP5/6 wird intrazelluläres β-Catenin in einem Komplex mit GSK3, Axin und APC gebunden und für die Degradierung in Proteasomen markiert. Dkk/Kremen-Proteine und SOST wirken dabei als Antagonisten, die die Wnt-Signalübertragung verhindern. Durch die Bindung von Wnt-Proteinen an *Frizzled*-Rezeptoren und LRP-Corezeptoren wird eine Signalkaskade induziert, die dazu führt, dass der β-Catenin-Degradationskomplex aus Axin, APC, GSK3 dissoziiert. β-Catenin wird nicht phosphoryliert und akkumuliert in der Zelle. Durch die Bindung von β-Catenin an TCF/LEF-Transkriptionsfaktoren im Zellkern werden Corepressoren SMRT/NCoR durch Coaktivatoren p300/CBP verdrängt und die Transkription von Zielgenen aktiviert. Mögliche pharmakologische Angriffspunkte sind mit i-v gekennzeichnet.

APC, *adenomatous polyposis coli*; Dkk, Dickkopf; Dsh, *dishevelled*; Frat-1, *frequently rearranged in advanced T-cell lymphomas 1;* GSK3, *glycogen synthase kinase 3*; LEF, *lymphoid enhancer-binding factor*; LRP5/6, *low-density lipoprotein receptor-related protein 5/6;* p300/CBP, *p300 and cAMP response element binding protein*; sFRP, *secreted frizzled-related protein;* SMRT/NCoR, *silencing mediator of retinoid and thyroid receptors and nuclear receptor corepressor*; SOST, Sklerostin; TCF, *T-cell factor*; WIF-1, *Wnt inhibitory factor* 1; Wnt, *wingless/integration-1*.

Die Corezeptoren aktivieren das Protein *dishevelled* (Dsh), welches wiederum inhibierend auf die Glycogen Synthase Kinase 3 (GSK3) und destabilisierend auf den

Multiproteinkomplex bestehend aus dem Tumor-Suppressor Protein APC, dem Protein Axin und Frat-1, einwirkt. Die Phosphorylierung und damit der Abbau von β-Catenin unterbleiben. β-Catenin kann im Zytoplasma akkumulieren und in den Zellkern wandern. Dort interagiert es mit Transkriptionsfaktoren der Tcf/Lef-Familie und aktiviert die Transkription der Wnt-Zielgene wie zum Beispiel Cox-2.

Durch die Interaktion von Wnt mit Wnt-inhibierenden Faktoren (WIF) und löslichen Fzd-ähnlichen Proteinen (sFRP) oder der Interaktion von LRP5/6 mit Dickkopf/Kremen oder SOST (Sklerostin) kann die Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs verhindert werden. Die Phosphorylierung von β-Catenin durch einen Komplex aus den Proteinen Axin, APC und GSK3 führt zum enzymatischen Abbau von β-Catenin. Eine Hemmung der β-Catenin-Aktivität konnte auch durch Verwendung des Inhibitors Endostatin in *human umbilical-vein endothelial cells* (HUVEC) beobachtet werden [58].

Der Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionsweg ist an verschiedenen Stellen für pharmakologische Zwecke manipulierbar (Abbildung 1.8). So können zum Beispiel kleine Moleküle oder Peptide die Interaktion von Wnt mit WIF oder sFRP inhibieren (i) oder die Interaktion von Dickkopf (Dkk) mit LRP kann durch Antikörper unterbunden werden (ii). Derzeit ist über Fzd-Rezeptoren, welche die Knochenmasse beeinflussen, noch wenig bekannt. Dennoch könnte man sich vorstellen, in Zukunft Agonisten dieser Rezeptoren zu entwickeln (iii). Als potentieller GSK3-Inhibitor (iv) wurde Lithium entdeckt [30]. Es wird zur Behandlung von manisch-depressiven Erkrankungen eingesetzt. Für die Krebstherapie ist die Weiterentwicklung der GSK3-Inhibitoren von Bedeutung, da Mutationen des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs mit verschiedenen Krebsformen in Verbindung gebracht werden. Die Entwicklung von Protease-Inhibitoren (v), die an der Degradation von β-Catenin über den Ubiquitin/Proteasomen-Signaltransduktionsweg beteiligt sind, bleibt eine Herausforderung aufgrund ihrer Spezifität.

1.5.3 Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionsweg in der Mechanotransduktion

Durch In-vitro- und In-vivo-Studien wurde bekannt, dass der Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionsweg durch mechanische Belastung aktiviert werden kann. Norvell et al. [120] entdeckten, dass *fluid shear stress* (FSS) die Phosphorylierung der GSK3β und Akt fördert, und somit der Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionsweg induziert wird. In weiteren In-vitro-Studien wurden Wnt/β-Catenin-Zielgene wie Runx-2 [182] und Cyr-61 [150] entdeckt, die durch mechanische Reize reguliert werden. Belastungexperimente an MC3T3-E1-Zellen zeigten eine erhöhte Expression von Wnt-10b, Sfrp-1, Cyclin D1,

Fzd-2, Wisp-2 und Connexin-43 [139]. Lau et al. [93] fanden heraus, dass durch FSS die Gene Wnt-1, Wnt-3a, Wnt-5a, Lrp-5, Ctnnb-1, Lef-1 und Axin in C57BL/6J-Osteoblasten hochreguliert wurden, nicht aber in C3H/HeJ-Osteoblasten. Die β-Catenin-Aktivität war in den C57BL/6J-Zellen im Vergleich zu den C3H/HeJ-Zellen signifikant erhöht. Dies lässt vermuten, dass sich die verschiedenen osteogenen Zellen in ihrer Antwort auf mechanische Stimulation in Bezug auf eine Hochregulation des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs unterscheiden. In TOPGAL-Mäusen, welche ein β-Galaktosidase-Gen unter der Kontrolle eines Lef/Tcf/β-Catenin ansprechbaren Promotors besitzen, wurde der kanonische Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionsweg während der Knochenentwicklung im fötalen und neonatalen Mausskelett in Chondrozyten, Osteoblasten und Osteozyten aktiviert [61]. Außerdem konnte durch mechanische Belastung der Osteoblasten in-vitro die Wnt-Signalübertragung induziert werden. Sawakami et al. [144] wiesen nach, dass insbesondere LRP5 für die osteogene Antwort des Osteoblasten auf mechanische Belastung notwendig ist. Die untersuchten LRP5-defizienten Mäuse zeigten im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrolltieren einen reduzierten Knochenanbau nach mechanischer Belastung. Eine verstärkte Sensitivität hinsichtlich der Reaktion auf mechanische Belastung konnte in einem In-vivo-Modell mit transgenen Mäusen mit der Mutation LRP5-G171V gezeigt werden [76].

1.6 Interaktion zwischen dem ER- und dem Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionsweg

Durch verschiedene Untersuchungen konnten Interaktionen zwischen dem ER- und dem Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionsweg auf verschiedenen Ebenen festgestellt werden (Abbildung 1.9.).

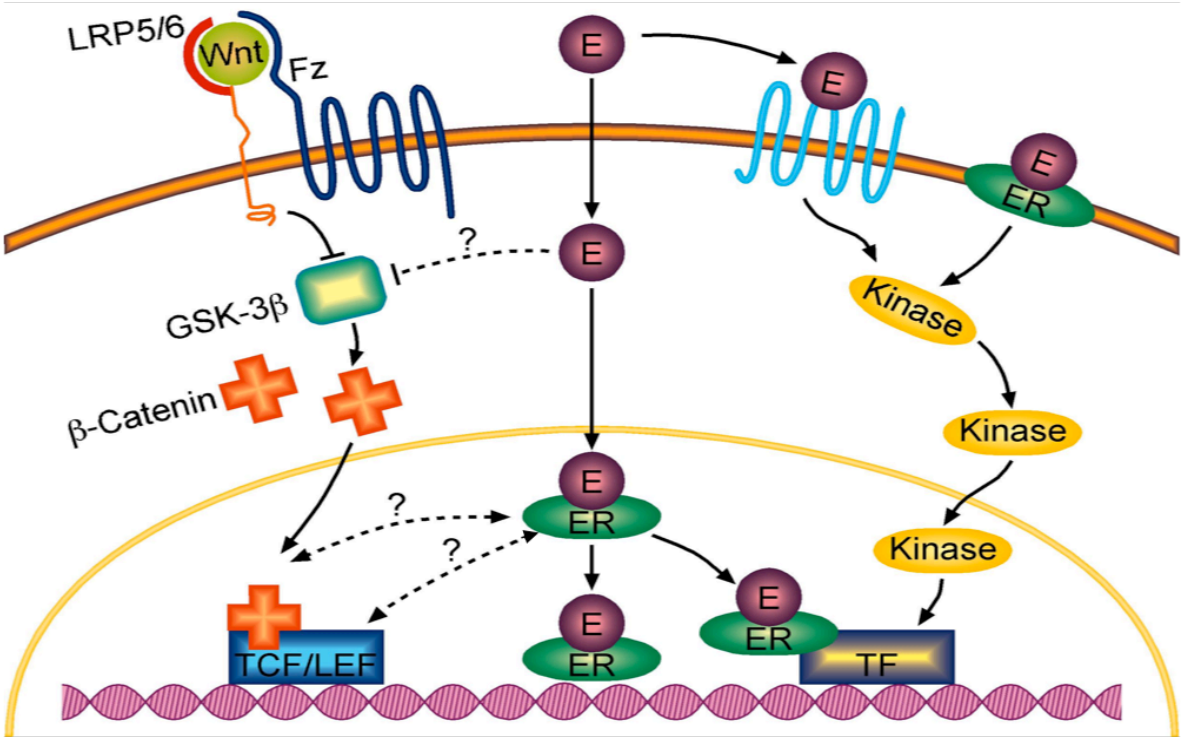


Abbildung 1.9

Mögliche Interaktionen zwischen dem ER- und dem Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionsweg (Zeichnung von Patrizia Horny, Institut für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik, Ulm).

Potentielle Interaktionen zwischen dem ER- und dem Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionsweg werden in den unterschiedlichsten Geweben vermutet. Kouzmenko et al. [87] konnten mit Hilfe eines transgenen Drosophila-Modells, welches humanes GFP-markiertes ERα allein oder zusammen mit β-Catenin/Armadillo-Mutanten exprimiert, zeigen, dass ERα mit β-Catenin in-vivo assoziieren kann. Immunpräzipitationen ließen ausserdem die Assoziation zwischen ERα und β-Catenin mit ERE- und Tcf/Lef-Bindungsstellen enthaltenen Zielpromotoren vermuten. Die ERα-Expression oder die direkte Östrogen-Gabe verstärkte noch die für eine abnormale Wnt/β-Catenin-Aktivität typische ausgeprägte Augendegeneration in den Armadillo-Mutanten. Weitere Veröffentlichungen konnten darstellen, dass die ERα-Expression mit der nukleären Lokalisation von β-Catenin einhergeht [145] und dass die β-Catenin-Signalübertragung auch für die Östrogeneffekte im Uterus verantwortlich ist [64]. In primären Neuronen konnte Östradiol die GSK3β-Aktivität und die β-Catenin-abhängige Transkription aktivieren [164, 165]. Tcf-1 und Tcf-4 sind fähig, ER zu binden und differentiell ihre Transkriptionsaktivität zu regulieren [39]. Während Tcf-1 die liganden-abhängige ER-Aktivität stimuliert, antagonisiert Tcf-4 die ER/E2-Funktion. ERα

wiederum kann in Brustkrebszellen durch seine Wirkung auf die β-Catenin-vermittelte Tcf/Lef-Transkription des Osteopontin-Promotors als Aktivator oder Repressor der Transkription fungieren [39]. In den präosteoblastären CIMC-4-Zellen führte 17-β-Östradiol zu einer erhöhten Expression an β-Catenin und bewirkte dessen Migration in den Nukleus [25]. In den präosteoblastären MC3T3-E1-Zellen bewirkte Östren eine Stimulation der Wnt-Expression und eine Repression der Dkk-1-Produktion [5]. Armstrong et al. [8] wiesen nach, dass die Funktionalität des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs bei der frühen Antwort der Knochenzellen auf mechanische Belastung durch die Gegenwart von Östrogen und ERα modifiziert werden kann. Die Inhibition des ERα durch den ER-Modulator ICI 182,780 oder eine Defizienz an ERα verminderte die Aktivität des durch Lithiumchlorid oder mechanische Belastung aktivierten Wnt/β-Catenin-Signalwegs. In den aus ERα-defizienten Mäusen isolierten osteoblastären Zellen war außerdem die Anzahl der für den Wnt-Signalweg relevanten Gene stark reduziert. Eine kürzlich erschienene Studie von Sunters et al. [156] beschreibt eine von Wnt-Liganden und Corezeptoren unabhängige β-Catenin-Aktivierung, welche über IGF-IR-Aktivierung, PI3K-abhängige Akt-Phosphorylierung und GSK3β-Inhibition vermittelt wird. Diese Signalkaskade soll von ERα, Src-Aktivität und der Signalübertragung via NO und PG abhängig sein.

Es existieren nur wenige Studien zur Interaktion zwischen dem ER- und dem Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionsweg in der Mechanotransduktion im Knochen. Untersuchungen, die diese Interaktion aufklären, sind wichtig, um neue Therapien zum Beispiel gegen postmenopausale Osteoporose zu entwickeln.

1.7 Ziel der Arbeit

Eine Vielzahl von Signalwegen und Faktoren spielen bei der Entstehung der Osteoporose eine Rolle, u. a. der ER-, der Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionsweg sowie mechanische Belastung.

Die Bedeutung des ER- und des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs in der Mechanotransduktion und deren Interaktion ist allerdings noch weitgehend unklar.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten im Einzelnen folgende Fragen beantwortet werden:

1. Wie verändert sich die Expression von mit dem ER- und dem Wnt/β-Catenin-Signalweg assoziierten Genen in primären osteoblastären Zellen aus Mauskalvarien während der Differenzierung?

2. Ist die Expression von über den ER- und den Wnt/β-Catenin-Signalweg regulierten Genen durch mechanische Stimulation beeinflussbar?
3. Wie wird die Expression von Cox-2 und weiterer Zielgene über die Interaktion des ER- mit dem Wnt/β-Catenin-Signalweg in murinen primären osteoblastären Zellen, in präosteoblastären MC3T3-E1-Zellen und in mesenchymalen C3H10T1/2-Zellen reguliert?
4. Welchen Einfluss hat mechanische Belastung auf die Regulation der Expression dieser Gene?

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zellen

Murine primäre osteoblastäre Zellen

Murine primäre osteoblastäre Zellen wurden aus den Kalvarien von neonatalen C57BL/6-Mäusen, die im universitären Tierforschungszentrum gezüchtet wurden, isoliert.

MC3T3-E1-Zellen

Die von den Kalvarien-Zellen embryonaler C57BL/6-Mäuse abgeleitete, präosteoblastäre Zelllinie MC3T3-E1 wurde von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH in Braunschweig (Deutschland) bezogen.

C3H10T1/2-Zellen

Bei den verwendeten C3H10T1/2-Zellen handelt es sich um eine funktional MSC-ähnliche Zelllinie mit Fibroblasten-ähnlicher Morphologie, deren Klon Nr. 8 im Jahr 1972 von Reznikoff et al. [136] aus C3H Maus-Embryozellen isoliert wurde. Diese Zellen wurden käuflich bei der American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) erworben.

2.1.2 Zellkulturmedien

Alle Zellen wurden in α-MEM mit entsprechenden Zusätzen kultiviert (Tabelle 2.1). Für die murinen primären osteoblastären Zellen wurde das FBS zusätzlich für 30 min bei 56 °C inaktiviert.

Tabelle 2.1 Zellkulturmedien

Zusätze im Expansionsmedium	
Penicillin/Streptomycin	100 U/ml, 100 µg/ml
L-Glutamin	2 mM
FBS	10%
Zusätze im Differenzierungsmedium	
Penicillin/Streptomycin	100 U/ml, 100 µg/ml
L-Glutamin	2 mM
FBS	10%
β-Glycerophosphat	10 mM

Ascorbat-2-Phosphat	0,2 mM

Einfriermedium	
FBS	20%
L-Glutamin	1% (2 mM)
DMSO	10%

LB-Medium/LB-Agar	
Aqua dest.	
Luria Broth Base	25 g/l
NaCl	1%
Ampicillin	50 µg/ml
Select Agar	15 g/l

2.1.3 Oligonukleotide (Primer)

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Thermo Fisher Scientific (Ulm, Deutschland) bzw. MWG (Ebersberg, Deutschland) bezogen.

Tabelle 2.2 Oligonukleotide

Zielgen (murin)	Primersequenz
β-Actin	links: 5′-TGA AGT GTG ACG TTG ACA TCC-3′ rechts: 5′-CTT CTG CAT CCT GTC AGC AA-3′
Alpl	links: 5′-GCT GAT CAT TCC CAC GTT TT-3′ rechts: 5′-GAG CCA GAC CAA AGA TGG AG-3′
Cebpb	links: 5′-AAC CTG GAG ACG CAG CAC-3′ rechts: 5′-AGC TGC TCC ACC TTC TTC TG-3′
Creb-1	links: 5′-AGG CAG CAA GAG AAT GTC GT-3′ rechts: 5′-TTT CAA GCA CTG CCA CTC TG-3′
Ctnnb-1	links: 5′-GAT TCG AAA CCT TGC CCT TT-3′ rechts: 5′-GTC GTG GAA TAG CAC CCT GT-3′
Cyr-61	links: 5′-TCC TCT GTG TCC CCA AGA AC-3′ rechts: 5′-CAA ACC CAC TCT TCA CAG CA-3′

Dmp-1	links: 5′-AGT GAG GAG GAC AGC CTG AA-3′ rechts: 5′-CTG AGG CTC TCG TTG GAC TC-3′
Esr-1	links: 5′-TCC GGC ACA TGA GTA ACA AA-3′ rechts: 5′-CCA GGA GCA GGT CAT AGA GG-3′
Esr-2	links: 5′-GAG TAG CCG GAA GCT GAC AC-3′ rechts: 5′-TCT TCA AAA TCA CCC AGA CC-3′
Fos	links: 5′-CCA GTC AAG AGC ATC AGC AA-3′ rechts: 5′-ATG ATG CCG GAA ACA AGA AG-3′
Gapdh	links: 5′-ACC CAG AAG ACT GTG GAT GG-3′ rechts: 5′-GGA TGC AGG GAT GAT GTT CT-3′
Gja-1	links: 5′-TGG GTA CAA GCT GGT CAC TG-3′ rechts: 5′-TAA TTC GCC CAG TTT TGC TC-3′
Ibsp	links: 5′-GAA GCA GGT GCA GAA GGA AC-3′ rechts: 5′-GAA ACC CGT TCA GAA GGA CA-3′
Il-6	links: 5′-TCC TTC CTA CCC CAA TTT CC-3′ rechts: 5′-GCC ACT CCT TCT GTG ACT CC-3′
Jun	links: 5′-AAA ACC TTG AAA GCG CAA AA-3′ rechts: 5′-GCT TAA GCT GTG CCA CCT GT-3′
Lef-1	links: 5′-TCA TCA CCT ACA GCG ACG AG-3′ rechts: 5′-TGA CAT CTG ACG GGA TGT GT-3′
Myc	links: 5′-CCC CAA GGT AGT GAT CCT CA-3′ rechts: 5′-TCG TCT GCT TGA ATG GAC AG-3′
Nfil-3	links: 5′-CCA TGG GTC CAC TAG CAA CT-3′ rechts: 5′-CTT GCC CAC TAC ACC CTC AT-3′
Ptgs-2	links: 5′-AAG GGT GTC CCT TCA CTT CT-3′ rechts: 5′-CAT TGA TGG TGG CTG TTT TG-3′
Tnfrsf-11b	links: 5′-CTG CCT GGG AAG AAG ATC AG-3′ rechts: 5′-GCT CGA TTT GCA GGT CTT TC-3′
Tnfsf-11	links: 5′-ATC ATG AAA CAT CGG GAA GC-3′ rechts: 5′-CTT GGG ATT TTG ATG CTG GT-3′
Wisp-1	links: 5′-CCC CTA CAA GTC CAA GAC CA-3′ rechts: 5′-AGG TTG CAG AAG CAA GCA TT-3′

2.1.4 Kits

Tabelle 2.3 Kits

Bezeichnung	Verwendung	Hersteller/Vertrieb	Ort
BCA Protein Assay Kit	Protein-konzentrations-bestimmung	Perbio Science, Pierce	Bonn, Deutschland
(Dual-) Luciferase Reporter Assay Kit	Transfektion	Promega	Madison, USA
FuGENE Transfection Kit (HD)	Transfektion	Roche	Indianapolis, USA
Halt Protease Inhibitor Cocktail	Zelllyse	Perbio Science, Pierce	Bonn, Deutschland
HotStarTaq Master Mix Kit	PCR	Qiagen	Hilden, Deutschland
Omniscript RT Kit	cDNA-Synthese	Qiagen	Hilden, Deutschland
Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG	*Real-Time* RT-PCR	Invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
Qiafilter Plasmid Midi Kit	Plasmid-Isolierung	Qiagen	Hilden, Deutschland
RNase Free DNase Set	RNA-Isolierung (DNA-Abbauenzym)	Qiagen	Hilden, Deutschland
RNeasy Mini Kit mit Qia Shredder	RNA-Isolierung	Qiagen	Hilden, Deutschland
SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate System	Immundetektion	Perbio Science, Pierce	Bonn, Deutschland
TOPO TA Cloning Kit	Klonierung	Invitrogen	Karlsruhe, Deutschland

2.1.5 Lösungen und Puffer

Tabelle 2.4 Lösungen und Puffer

Bezeichnung	Verwendung	Zusammensetzung
Ammoniumpersulfat-(APS)-Lösung	SDS-PAGE	10% (w/v)
Anodenpuffer	SDS-PAGE	25 mM Tris 192 mM Glycin, pH 8,3 20% Methanol (v/v)
Antikörper-verdünnungspuffer	Western-Blot	8 ml 10 x TBS 1% BSA (w/v) 0,04 ml Tween-20 72 ml Aqua dest.
Kathodenpuffer	SDS-PAGE	25 mM Tris 192 mM Glycin, pH 8,3 0,1% SDS (w/v)
Kollagenverdaulösung	Isolation muriner primärer osteoblastärer Zellen	α-MEM 0,1% Kollagenase Typ IA (w/v) 0,2% Dispase (w/v) sterilfiltrieren
Lysepuffer	RNA-Isolierung	RLT-Puffer (Qiagen) 143 mM 2-Mercaptoethanol (1%)
Nachsättigungslösung	Western-Blot	15 ml 10 x TBS 3% BSA (w/v) 0,1% Tween-20 (v/v) 135 ml Aqua dest.
RIPA-Puffer (Thermo Scientific)	Zelllyse	25 mM Tris-HCl, pH 7,6 150 mM NaCl 1% Nonidet P-40 1% Sodiumdeoxycholate 0,1% SDS
Sammelgelpuffer	SDS-PAGE	0,5 M Tris-HCl, pH 6,8
SDS-Lösung	SDS-PAGE	20% (w/v)
SDS-Probenpuffer	SDS-PAGE	125 mM Tris-HCl, pH 6,8

		8,5% Glycerin (v/v) 1% SDS (w/v)
TAE-Puffer	Agarose-Gelelektrophorese	40 mM Tris-HCl, pH 8,0 1 mM EDTA
TBS-Puffer	Western-Blot	200 mM Tris-HCl, pH 7,5 1,5 M NaCl
Trenngelpuffer	SDS-PAGE	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8
Tween-20-Lösung	Western-Blot	10% (v/v)
Waschpuffer	Western-Blot	50 ml 10 x TBS 0,5 ml Tween-20 450 ml Aqua dest.

2.1.6 Chemikalien

Tabelle 2.5 Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller/Vertrieb	Ort
α-MEM F 0925	Biochrom	Berlin, Deutschland
α-MEM 41061 (phenolrotfrei)	Invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
β-Glycerophosphat (Dinatriumsalz)	Sigma	Deisenhofen, Deutschland
2-Mercaptoethanol	Fluka	Buchs, Schweiz
17-β-Östradiol	Calbiochem	Darmstadt, Deutschland
Agarose	Invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
Albumin Fraktion V (BSA)	Serva	Heidelberg, Deutschland
Ammoniumpersulfat	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Ampicillin	Sigma	Deisenhofen, Deutschland
Ascorbat-2-Phosphat (Sesquimagnesium Salz)	Sigma	Deisenhofen, Deutschland
Basenpaarleiter (100 bp)	Gibco BRL	Karlsruhe, Deutschland
Basenpaarleiter (5000 bp)	Applichem	Darmstadt, Deutschland
Bromphenolblau	Roth	Karlsruhe, Deutschland
ColorBurst Electrophoresis Marker	Sigma	Missouri, USA

Dispase	Roche	Indianapolis, USA
Dkk-1, *Recombinant Mouse*	R&D Systems	Wiesbaden, Deutschland
DMSO	Serva	Heidelberg, Deutschland
DNase	Sigma	Deisenhofen, Deutschland
DTT	Roth	Karlsruhe, Deutschland
EDTA	Merck	Darmstadt, Deutschland
Endostatin, *Recombinant Mouse, Pichia pastoris*	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Ethanol absolut	Merck	Darmstadt, Deutschland
Ethanol vergällt	Merck	Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid	Serva	Heidelberg, Deutschland
FBS A15-101	PAA Laboratories	Pasching, Österreich
FBS A15-119 (*charcoal stripped* bzw. kohlebehandelt, hormonfrei)	PAA Laboratories	Pasching, Österreich
Fluoromount-G	Beckman Coulter	Fullerton, USA
FopFlash-Vektor	Upstate	Hamburg, Deutschland
Fungizone	Gibco BRL	Karlsruhe, Deutschland
Glycerin	Merck	Darmstadt, Deutschland
Glycin	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
H89	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
HCl	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
Hefeextrakt	Gibco BRL	Karlsruhe, Deutschland
ICI 182,780	Biozol Diagnostica	Eching, Deutschland
Kollagenase Typ IA	Sigma	Deisenhofen, Deutschland
L-Glutamin	Biochrom	Berlin, Deutschland
Ladepuffer (6 x)	Sigma	Deisenhofen, Deutschland
Lithiumchlorid	Sigma	Deisenhofen, Deutschland
Luria Broth Base	Invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
Methanol	Merck	Darmstadt, Deutschland
NaCl	Riedel-de Haen	Seelze, Deutschland
NaOH	Merck	Darmstadt, Deutschland
Para-Formaldehyd	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland

PBS	PAA Laboratories	Pasching, Österreich
Penicillin/Streptomycin	Gibco BRL	Karlsruhe, Deutschland
Random-Hexamer-Primer	Roche Diagnostics	Mannheim, Deutschland
RIPA-Puffer	Thermo Scientific	Rockford, USA
RNasin Ribonuklease Inhibitor	Promega	Madison, USA
Rotiphorese Gel 30	Roth	Karlsruhe, Deutschland
SDS	Fluka	Buchs, Schweiz
Select Agar	Gibco BRL	Karlsruhe, Deutschland
Silikon ELM4641A	Wacker	München, Deutschland
Silikonvernetzer ELM4641B	Wacker	München, Deutschland
TEMED	Upstate	Karlsruhe, Deutschland
TopFlash-Vektor (Tcf-Reporterplasmid)	Upstate	Hamburg, Deutschland
Tris	Merck	Darmstadt, Deutschland
Triton X-100	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Trypanblau	Sigma	Deisenhofen, Deutschland
Trypsin/EDTA (10 x) 0,05%/0,02% (w/v)	Biochrom	Berlin, Deutschland
Tween-20	Riedel-de Haen	Seelze, Deutschland
Wnt-3a, *Recombinant Mouse*	R&D Systems	Wiesbaden, Deutschland

2.1.7 Restriktionsenzyme

Alle verwendeten Restriktionsenzyme wurden von Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) bezogen.

Tabelle 2.6 Restriktionsenzyme

Restriktionsenzym	Puffer	Spezifität
Bgl II	3	5´-A↓GATCT-3´
EcoR I	3	5´-G↓AATTC-3´
Nco I	3	5´-C↓CATGG-3´

2.1.8 Antikörper

Tabelle 2.7 Primäre Antikörper

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller/Vertrieb	Ort
β-Actin	Kaninchen, monoklonal	1:1000	Cell Signaling, New England Biolabs	Frankfurt, Deutschland
Anti-β-Catenin	Kaninchen, polyklonal	1:100	Millipore	Schwalbach, Deutschland
Anti-*Active*-β-Catenin	Maus, monoklonal	1:1000	Millipore	Schwalbach, Deutschland
Anti-Cox-2	Kaninchen, polyklonal	1:1000	Zytomed	Berlin, Deutschland
Anti-Phospho-β-Catenin	Kaninchen, polyklonal	1:1000	Cell Signaling, New England Biolabs	Frankfurt, Deutschland
ERα	Schaf, polyklonal	1:30	Abcam	Cambridge, USA

Tabelle 2.8 Sekundäre Antikörper

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller/Vertrieb	Ort
Anti-Kaninchen-IgG-HRP-gekoppelt	Ziege, polyklonal	1:10000	Perbio Science	Bonn, Deutschland
Anti-Kaninchen-IgG-TR	Ziege, polyklonal	1:100	Abcam	Cambridge, USA
Anti-Maus-IgG-HRP-gekoppelt	Ziege, polyklonal	1:10000	Millipore	Schwalbach, Deutschland
Anti-Schaf-IgG-FITC	Kaninchen, polyklonal	1:100	Abcam	Cambridge, USA

2.1.9 Geräte

Tabelle 2.9 Geräte

Bezeichnung	Modellbezeichnung	Hersteller/Vertrieb	Ort
Brutschrank	Hera Cell 240	Heraeus	Hanau, Deutschland

Digitale CCD-Kamera	CoolSNAP EZ	Photometrics	Tucson, USA
DNA-Workstation	UV Cleaner UVC/T-AR	Kisker	Steinfurt, Deutschland
Feinwaage	MC1 Analytic AC 120 S	Sartorius	Göttingen, Deutschland
Geldokumentations-gerät	Fusion SL	Vilber Lourmat Deutschland GmbH	Eberhardzell, Deutschland
Gelelektrophorese-kammer	Horizon 11-14	Life Technologies GmbH	Karlsruhe, Deutschland
Heizblock	Thermomixer 5436	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
iCycler	Optical Module	Bio-Rad	München, Deutschland
Kühlzentrifuge	5417 R	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Laminar Flow	HB 2460	Holten	Allerod, Dänemark
Luminometer	Centro LB 960 DLReady	Berthold Technologies	Bad Wildbad, Deutschland
Magnetrührer	RCT basic	IKA Labortechnik	Staufen, Deutschland
Mikroskop 1	IX 70	Olympus	Hamburg, Deutschland
Mikroskop 2	Axio Observer	Zeiss	Oberkochen, Deutschland
Mikrotiterplatten-Reader zur Absorp-tionsmessung	Infinite 200 i-Control (RNA/DNA) Magellan (Protein)	Tecan	Grödig/Salzburg, Deutschland
PCR-Gerät	Biometra Thermocycler	Biozym	Hess. Oldendorf, Deutschland
Real-Time RT-PCR	StepOnePlus	Applied Biosystems	Darmstadt, Deutschland
SDS-PAGE-Kammer	Mini-Protean 3 Cell	Bio-Rad	München, Deutschland
Spektralphotometer	Ultrospec Plus	Pharmacia LKB	Freiburg, Deutschland

Transfer-Kammer	Semi-Dry Blotting Unit V20-SDB (700-7156)	VWR International GmbH	Darmstadt, Deutschland
Vakuumpumpe	Laboxact	KNF Neuberger GmbH	Freiburg, Deutschland
Wärmeinkubator	Function Line	Heraeus	Hanau, Deutschland
Wärmeschüttler	SM-30	EB Labortechnik	Hechingen, Deutschland
Wasserbad	1012	GFL	Burgwedel, Deutschland
Zellstimulations-geräte		Eigenbau	Ulm, Deutschland
Zentrifuge 1	Biofuge 13	Heraeus	Hanau, Deutschland
Zentrifuge 2	UniCen FR	Herolab	Wiesloch, Deutschland

Zellstimulationsgerät

Zur Applikation zyklischer uniaxialer Reize in unterschiedlichen Frequenzen und Dehnungsamplituden wurde in unserer Arbeitsgruppe ein Zellstimulationsgerät (Abbildung 2.1) entwickelt [117]. In dieses Gerät werden zellbesiedelte Silikonschalen (Abbildung 2.2) eingespannt und in ihrer Längsachse gedehnt. Durch die Auswahl des jeweiligen Exzenters wird die Dehnungsamplitude festgelegt. Die Rotationsgeschwindigkeit der Exzenter und damit die Dehnungsfrequenz werden am Motor eingestellt. Für die Dauer der mechanischen Stimulation wird das Dehnungsgerät mit den eingesetzten Silikonschalen in den Brutschrank eingebracht und die Proben bei 37 °C, 5% CO_2 inkubiert.

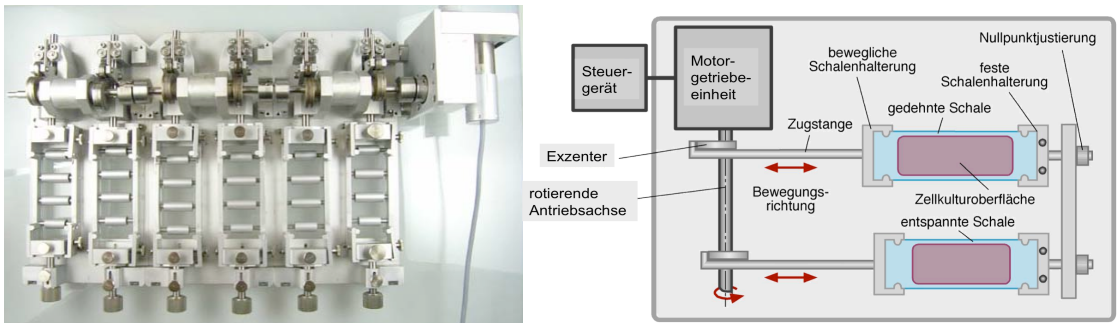


Abbildung 2.1

Zelldehnungsapparatur zur Applikation uniaxialer Reize auf die Zellen (Foto von Herbert Schmitt bzw. Zeichnung von Patrizia Horny, Institut für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik, Ulm).

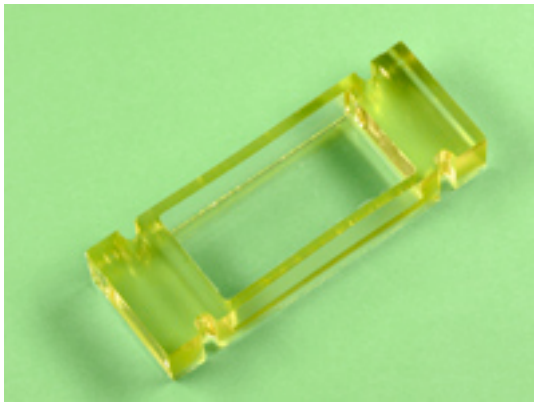


Abbildung 2.2

Silikonschalen für 2D-Monolayerkultur (Foto von Herbert Schmitt, Institut für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik, Ulm).

2.1.10 Sonstige Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2.10 Sonstige Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller/Vertrieb	Ort
BD Falcon	Becton Dickinson GmbH	Heidelberg, Deutschland
BD Plastipak Spritzen	Becton Dickinson GmbH	Heidelberg, Deutschland
Deckgläser	Thermo Fisher Scientific	Dreieich, Deutschland
Einmal-Skalpelle	Aesculap AG	Tuttlingen, Deutschland
Eppendorf *Research* Pipetten 2, 10, 100, 200, 1000 µl	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Eppendorf Spitzen 2, 10, 100, 200, 1000 µl	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Gewebekulturplatten mit	Nunc	Wiesbaden, Deutschland

12, 24, 96 Vertiefungen		
Hyperfilm ECL	Amersham	Freiburg, Deutschland
Kanülen (20 Gauge)	Braun	Melsungen, Deutschland
Magnetrührstäbchen	Brand	Wertheim, Deutschland
Nitrozellulose-Membran	Bio-Rad	München, Deutschland
Objektträger	Thermo Fisher Scientific	Dreieich, Deutschland
Reaktionsgefäße	Brand	Wertheim, Deutschland
Spritzenvorsatzfilter 0,2 µ Porengröße	Renner GmbH	Dannstadt, Deutschland
Stripetten 5-50 ml	Corning Costar GmbH	Bodenheim, Deutschland
Whatman Filterpapier 3 mm	Whatman	Maidstone, Großbritannien
Zellkulturflaschen 25, 75, 175 cm^2	Nunc	Wiesbaden, Deutschland

2.2 Methoden

2.2.1. Zellkultur

Die Zellen (2.1.1) wurden im Expansionsmedium bei 37 °C, 5% CO_2 und gesättigter Luftfeuchtigkeit kultiviert. Das Kulturmedium wurde zweimal die Woche gewechselt. Mit Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen mit 0,05% Trypsin/0,02% EDTA abgelöst und im Verhältnis 1:4 gesplittet.

2.2.2.1 Isolierung und Zellkultur muriner primärer Osteoblasten

Das Ziel war die Gewinnung Osteoblasten-ähnlicher Zellen nach einer von Mikuni-Takagaki [112] veröffentlichten Methode. In neugeborenen Mäusen ist die Mineralisierung des Knochens noch nicht vollständig abgeschlossen. Folglich können die enthaltenen Knochenzellen durch einen enzymatischen Verdau der Matrix gewonnen werden.

Die jungen Mäuse wurden dekaptiert und vor der Präparation zur Desinfektion kurz in 80% Alkohol getaucht. Mit der Schere wurde über dem Hinterhauptsloch die Haut eingeschnitten und die Haut mit der Pinzette bis zur Nasenwurzel abgezogen. Anschließend wurde die Nasenwurzel mit der Pinzette festgehalten und mit der Schere zwei Schnitte vom Hinterhauptsloch bis zu den Augen durchgeführt. So ließ sich das Schädeldach hochklappen und abtrennen. Mit dem Skalpell konnten weitere Teile, die nicht zum Schädeldach gehören, entfernt werden. Die Schädeldächer wurden in einem 50-ml-Falconröhrchen in eiskaltem PBS gesammelt. Nach der Präparation wurde das PBS entfernt, 10 ml Kollagen-Verdaulösung hinzugegeben und der Ansatz für 10 min bei 37 °C geschüttelt. Der Überstand mit der Zellsuspension des ersten Verdauschrittes wurde vorsichtig abgenommen und verworfen, 10 ml Verdaulösung zur Schädelsuspension hinzugefügt und für den zweiten Verdau 10 min bei 37 °C geschüttelt. Die Verdauschritte zwei bis fünf wurden zusammengefügt, die gesammelte Zellsuspension mit einem Spritzenvorsatzfilter filtriert und bei 1200 Upm für 6 min zentrifugiert. Die Zellen wurden im Expansionsmedium resuspendiert und in einer Dichte von ca. 15.000 Zellen/cm^2 ausgesät. Am folgenden Tag wurde ein Medienwechsel durchgeführt, um tote Zellen zu entfernen.

2.2.1.2 Aussaat der Zellen in Silikonschalen (Monolayer)

Für Dehnungsversuche im zweidimensionalen (2D) Monolayer wurden die Silikonschalen (Abbildung 2.2) mindestens eine Woche lang mit Expansionsmedium (Tabelle 2.1)

präinkubiert. Nach der Isolierung der Zellen mittels Trypsin-Behandlung aus den Zellkulturflaschen wurden die Zellen abzentrifugiert (1000 Upm, 6 min bei allen nachfolgenden Zentrifugationsschritten, wenn nicht anders angegeben), das Zellpellet in PBS resuspendiert und die Zellzahl mittels Trypanblaufärbung bestimmt. Pro vorkonditionierte Silikonschale wurden 200.000 Zellen in 5 ml Expansionsmedium ausgesät. Das der benötigten Zellzahl entsprechende Volumen der Zellsuspension wurde abzentrifugiert, das Zellpellet in Expansionsmedium sorgfältig resuspendiert und die Zellsuspension in die Silikonschalen pipettiert.

2.2.1.3 Bestimmung der Zellviabilität

Zur Ermittlung der Viabilität müssen lebende Zellen von toten Zellen unterschieden und deren genaue Zellzahlen bestimmt werden. Durch Zugabe von Trypanblau zur Zellsuspension konnte diese Unterscheidung optisch vorgenommen werden, da der Farbstoff Trypanblau nicht durch die intakte Membran lebender Zellen eindringen kann, so dass nur tote und damit lysierte Zellen angefärbt wurden. Lebende Zellen erschienen dadurch hell, während tote Zellen blau gefärbt waren. Zur Zellzählung wurden jeweils gleiche Volumina Trypanblau und ein Aliquot der Zellsuspension gemischt (10 µl Trypanblau mit 10 µl der Zellsuspension) und sofort mit Hilfe einer Neubauerkammer am Mikroskop 1 ausgezählt. Zur Bestimmung der Zellkonzentration wurde folgende Gleichung verwendet: Zellzahl/ml = ∑gezählte Zellen : 4 (Anzahl der ausgezählten Quadrate) x 2 (Verdünnungsfaktor) x 10.000 (Kammerfaktor). Zur Berechnung der Gesamtzellzahl musste zusätzlich noch das Gesamtvolumen der Zellsuspension berücksichtigt werden. Die Viabilität errechnete sich nach folgender Gleichung: % lebende Zellen = Zahl lebender Zellen/Gesamtzellzahl (lebende + tote Zellen) x 100.

2.2.1.4 Differenzierung der Zellen

Die ausgesäten murinen primären osteoblastären Zellen wurden im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO_2 bis zu 28 Tage kultiviert. Um eine osteogene Differenzierung zu induzieren, erhielten die Zellen ab dem 4. Versuchstag, an dem sie in der Regel zu 70-80% konfluent waren, Differenzierungsmedium (Tabelle 2.1). Das Kulturmedium wurde zweimal die Woche ausgetauscht.

2.2.1.5 Chemische Stimulation der Zellen

Die Zellen (2.1.1) wurden im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO_2 5 Tage lang kultiviert. Zur chemischen Stimulation wurden die Zellkulturen am 5. Versuchstag 3 h mit Agonisten bzw. 3,5 h mit Antagonisten vor der Applikation mechanischer Belastung inkubiert. 17-β-Östradiol (10 nM) wurde zur Aktivierung des ER-Signaltransduktionswegs verwendet. ICI 182,780 (100 nM) diente als ER-Antagonist. Um den Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionsweg zu aktivieren, wurden die Zellen sowohl mit Lithiumchlorid (10 mM) als auch mit dem physiologischen Aktivator Wnt-3a (3 nM) behandelt. Endostatin (0,5 μM) und der physiologische Wnt-Antagonist Dkk-1 (18 nM) wurden zur Inhibition des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs eingesetzt. Als Proteinkinase A-Inhibitor diente H89 (5 μM; 2,5 h). Kontrollzellkulturen wurden parallel mit dem entsprechenden Volumen an Vehikel behandelt.

2.2.1.6 Mechanische Stimulation der Zellen

Die mechanische Stimulation erfolgte am Differenzierungstag bzw. am Tag der chemischen Stimulation. 24 h vor der mechanischen Stimulation wurde die FBS-Konzentration auf 2% reduziert. Bei den hormonfreien Versuchen wurde 48 h vor der mechanischen Stimulation das phenolrothaltige Expansionsmedium durch phenolrotfreies α-MEM mit 10%-igem kohlebehandeltem, hormonfreiem FBS ersetzt. 24 h später wurde das Medium gegen phenolrotfreies α-MEM mit 0,25%-igem BSA ausgetauscht. In allen Versuchsblöcken wurde die mechanische Stimulation der Zellen bei einer Dehnung von 10.000 με (1%), einer Frequenz von 1 Hz und über eine Dauer von 30 bzw. 90 min durchgeführt. Der Versuchsabbruch erfolgte sofort nach der mechanischen Stimulation.

2.2.2 Genexpressionsanalyse

Um Veränderungen in der Quantität der mRNA nach mechanischer Stimulation festzustellen, wurde die Gesamt-RNA der Proben aus den Zellen isoliert und mittels reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Mit diesen cDNA-Proben wurden quantitative *Real-Time* RT-PCR-Analysen durchgeführt. Für den Nachweis der Genexpression wurden für jedes Zielgen spezifische Oligonukleotide (Primer; Tabelle 2.2) auf Basis publizierter Sequenzen (PubMed Datenbank) mit Hilfe eines speziellen Computerprogramms (Primer3 V.04.0, Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, USA) entworfen. Diese Primer wurden in der *Real-Time* RT-PCR eingesetzt, um das jeweilige Zielgen zu amplifizieren. Die Expression des jeweiligen Zielgens wurde

mit Hilfe einer Standardkurve quantifiziert. Für die Erstellung einer Standardkurve wurde eine Verdünnungsreihe mit der Plasmid-DNA, welche die zu amplifizierende Sequenz des jeweiligen Zielgens enthielt, in Zehnerpotenzen mit einer Startkonzentration von 1 µg in 10 µl hergestellt. Die quantifizierte Expression des Zielgens wurde auf die analog ermittelte Expression des *Housekeeping*-Gens Gapdh (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) normiert. Die Plasmid-DNA wurde durch Klonierung der gewünschten Zielgensequenz in einen pCR4-TOPO-Vektor, anschließende Transformation kompetenter *E.coli* Bakterien, Vermehrung und nach Isolierung und enzymatischer Linearisierung erhalten. Zusätzlich wurde eine Sequenzanalyse der Plasmid-DNA durchgeführt, um die Übereinstimmung der einklonierten Zielgensequenz mit bekannten Datenbanksequenzen zu bestätigen.

2.2.2.1 Gesamt-RNA-Isolierung

Die Zellen wurden bei Versuchsabbrüchen einmal mit PBS gewaschen und dann mittels eines Zellschabers in frischem RLT-Puffer mit 2-Mercaptoethanol aufgenommen und eingefroren. Die weitere Aufarbeitung der RNA erfolgte bei Raumtemperatur mit Hilfe des RNeasy Mini Kits nach den Anweisungen des Herstellers. Die Zellen wurden zunächst mit Hilfe einer Qia-Shredder-Säule lysiert. Die Zelllysate wurden anschließend für die Affinitätsbindung an die Silica-Gel-Membranen der RNeasy-Affinitäts-Säulen mit dem gleichen Probenvolumen an 70%-igem Ethanol versetzt. Nach einer 15-minütigen DNase-Inkubation und mehreren Waschschritten wurde die Gesamt-RNA mit RNase-freiem Wasser von der Säule eluiert, die Quantität und die Qualität der RNA bei 260 nm/280 nm photometrisch bestimmt und die RNA anschließend bei -80 °C gelagert.

2.2.2.2 cDNA-Synthese

Zur Untersuchung der Expression von Genen mittels PCR wurde die mRNA als Matrize für die Synthese einer komplementären DNA (cDNA) benutzt, die gegenüber einem Abbau in Lösung stabiler ist als die mRNA. Für die Synthese wurde das Enzym Reverse Transkriptase verwendet, welches eine RNA-abhängige DNA-Polymeraseaktivität besitzt. Oligo-dT-Primer und *Random*-Hexamer-Primer dienten als Startpunkt für die cDNA-Synthese. Für die Synthese von cDNA aus 1 µg RNA in einem 20 µl-Ansatz wurde der Omniscript RT Kit verwendet. Zuerst wurde die RNA-Lösung (1 µg RNA in RNase-freiem Aqua dest.) mit Wasser auf ein Volumen von 12 µl aufgefüllt und dann 5 min bei 65 °C im PCR-Gerät denaturiert. Zum Reaktionsansatz wurden 2 µl Reaktionspuffer

(zehnfache Konzentration), 2 µl dNTPs (5 mM), 1 µl RNase Inhibitor (1:4 Verdünnung mit einfachem Reaktionspuffer: 10 U/µl; Stammlösung: 40 U/µl), 1 µl Oligo-dT-Primer (0,1 mM), 1 µl *Random*-Hexamer-Primer (1 mM) und 1 µl Omniscript (4 U) pipettiert und sorgfältig gemischt. Die cDNA-Synthese erfolgte im PCR-Gerät zuerst 60 min bei 37 °C, dann weitere 60 min bei 42 °C.

2.2.2.3 Standard-PCR

Die Standard-Polymerase-Kettenreaktion diente der semiquantitativen Messung der Expression eines Zielgens und der Amplifikation von Zielgensequenzen als Ausgangspunkt für Klonierungsreaktionen. Für die Synthese wurde der HotStarTaq Master Mix Kit nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Dazu wurden cDNA (ca. 100 ng), Primer-Mix (0,5 µM) und 10 µl PCR-Mix zusammenpipettiert, mit Aqua dest. auf ein Gesamtvolumen von 20 µl aufgefüllt und in das PCR-Gerät eingesetzt. Das PCR-Protokoll des Biometra Thermocycler startete mit einer initialen Enzymaktivierung von 15 min bei 95 °C, darauf folgten 32 Zyklen mit den Schritten Denaturierung 1 min, 95 °C, Primer-Annealing 45 s, 60 °C und Elongation 1 min, 72 °C. Abschließend wurde eine finale Extension für 15 min bei 72 °C durchgeführt.

2.2.2.4 *Real-Time* RT-PCR

Das Prinzip der *Real-Time* RT-PCR beruht auf der Quantifizierung des PCR-Produktes über die mit der Menge des PCR-Produktes proportionale Zunahme des DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoffs (SYBR Green) während der einzelnen PCR-Zyklen. Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe der Standard-cDNA, die zusammen mit den zu untersuchenden Proben amplifiziert wurde. Um die Konzentration der Zielgen-DNA in den Proben zu bestimmen, wurde diese stets auf das *Housekeeping*-Gen Gapdh normiert. Für die *Real-Time* RT-PCR wurde der Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG Kit nach Angaben des Herstellers verwendet. Nach Mischen der Mastermix-Lösung wurden 23 µl des Mastermixes pro *Well* vorgelegt und 2 µl der bis zu 1:10 verdünnten unbekannten cDNA-Probe, Standard-cDNA oder Aqua dest. hinzupipettiert, wobei alle Proben und die Standard-cDNA in Doppelbestimmungen aufgetragen wurden. Für die *Real-Time* RT-PCR im iCycler wurde das in Tabelle 2.11 beschriebene Protokoll eingesetzt.

Tabelle 2.11 Ablauf der quantitativen Expressionsanalyse mittels *Real-Time* RT-PCR (iCycler)

Schritt	Zyklenzahl	Temperatur	Dauer
1. Initiale Denaturierung	1	95 °C	2 min
2. Denaturierung/Annealing/	38	95 °C	30 s
Elongation		60 °C	50 s
3. Terminale Denaturierung	1	95 °C	1 min
4. Terminale Elongation	1	60 °C	1 min
5. Erstellung der Schmelzkurve	76	60 °C	8 s
6. Ende		15 °C	Ende

Für die *Real-Time* RT-PCR im Applied Biosystems StepOnePlus wurde das in Tabelle 2.12 beschriebene Protokoll eingesetzt.

Tabelle 2.12 Ablauf der quantitativen Expressionsanalyse mittels *Real-Time* RT-PCR (Applied Biosystems StepOnePlus)

Schritt	Zyklenzahl	Temperatur	Dauer
Schritt 1	1	50 °C	2 min
	1	95 °C	2 min
Schritt 2	40	95 °C	15 s
		60 °C	1 min
Schmelzkurve	1	95 °C	15 s
		60 °C	1 min
		+ 0,3 °C Schritte	15 s
		bis 95 °C	

2.2.2.5 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine Methode, mit der negativ geladene DNA-Moleküle durch Anlegen eines elektrischen Feldes nach ihrer Größe aufgetrennt werden können. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode verwendet, um Produkte der Standard-PCR, der *Real-Time* RT-PCR und aufgereinigte Plasmid-DNA auf ihre Größe und Reinheit zu überprüfen. Für PCR-Produkte, deren Größe zwischen 80 und 250 bp lag, wurde ein 2%-iges Agarose-Gel hergestellt, die ca. 4000 bp große Plasmid-DNA wurde in einem 1%-igem Agarose-Gel untersucht. Dafür wurden 2 g bzw. 1 g Agarose abgewogen und mit 100 ml TAE-Puffer in der Mikrowelle für 3 min erhitzt, bis die Agarose vollständig gelöst war. Nach einem ersten Abkühlen der Agarose-Lösung wurde Ethidiumbromid in einer

Endkonzentration von 0,1 µg/ml zugegeben. Die Agarose wurde dann nach Einsetzen des gewünschten Gelkamms luftblasenfrei in den Gelschlitten gegossen. Nach vollständigem Gelieren wurde der Gelkamm entfernt und der Gelschlitten mit dem Gel in die Elektrophoresekammer eingesetzt. Die Elektrophoresekammer wurde mit TAE-Puffer gefüllt, so dass das Gel vollständig mit TAE-Puffer bedeckt war. Die Proben wurden mit 6-fachem Ladepuffer versetzt und nach vorsichtigem Auftragen von 10 µl Probenvolumen in die Geltaschen bei Elektrophoresebedingungen von 110 V für 30-60 min aufgetrennt. Die DNA-Banden konnten unter UV-Licht mit einem Geldokumentationsgerät detektiert werden.

2.2.2.6 Herstellung der Standard-DNA für die *Real-Time* RT-PCR

Mit Hilfe des TOPO TA Cloning Kits wurde die cDNA der einzelnen Zielgene, die mit Hilfe spezifischer Primerpaare durch PCR amplifiziert wurde, in einen Plasmid-Vektor (pCR4-TOPO) eingefügt. Die isolierte Plasmid-Vektor-DNA konnte dann als Standard für die *Real-Time* RT-PCR verwendet werden. Das Plasmid, in das das spezifische Amplifikationsprodukt kloniert wurde, enthielt ein Ampicillin-Resistenzgen. Bakterien, die das Plasmid aufgenommen hatten, wurden gegen Ampicillin resistent und konnten auf ampicillinhaltigem Nährboden wachsen. Die Plasmid-DNA der positiven Klone wurde nach ihrer Vermehrung und Isolierung mittels Sequenzanalyse durch die Firma GATC Biotech in Konstanz kontrolliert. Anschließend wurde das Plasmid durch ein spezifisches Restriktionsenzym, welches das enthaltene Insert nicht schneidet, linearisiert und als Standard in einem Konzentrationsbereich von 0,0001-100.000 pg/µl für die *Real-Time* RT-PCR eingesetzt.

2.2.2.7 Herstellung der Agar-Platten und des LB-Mediums

Für die Herstellung des LB-Mediums wurden 25 g Luria Broth Base mit 1 l destilliertem Wasser (pH 7,0) gemischt und autoklaviert. Nach Abkühlen des Mediums wurde das Antibiotikum (50 µg/ml) zur selektiven Anreicherung der Ampicillin-resistenten Bakterienklone zugegeben. Für die Herstellung der Agarplatten wurde zu dem gleichen Ansatz noch Select-Agar (15 g/l) zugegeben und der warme, noch flüssige Agar wurde unter der Sterilbank in sterile Petrischalen gegossen, die bis zur vollständigen Gelierung und Trocknung leicht geöffnet blieben.

2.2.2.8 Klonierungsreaktion und Transformation der Bakterien

Für jeden Ansatz wurde das entsprechende PCR-Produkt nach Angaben des Herstellers in den pCR4-TOPO-Vektor kloniert. Pro Ansatz wurde 1 µl PCR-Produkt, 1 µl TOPO-Vektor (pCR4-TOPO), 1 µl Salzlösung und 2 µl steriles Wasser zu einem Reaktionsansatz pipettiert und vorsichtig gemischt. Danach erfolgte eine Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur. Für die sich anschließende Transformation wurde der Reaktionsansatz auf Eis gestellt oder über Nacht bei -20 °C gelagert. Die Transformation des kompetenten *E.coli* Bakterienstammes (Top10 One Shot Chemical Competent *E.coli*) erfolgte ebenfalls nach dem Protokoll des Herstellers. Für die Transformation wurde der kompetente *E.coli* Bakterienstamm vorsichtig auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe von 2 µl des Transformationsansatzes zu dem Bakterienstamm und vorsichtigem Mischen erfolgte die Transformation der Zellen mittels Hitzeschock für 30-45 Sekunden bei 42 °C im Heizblock. Der Ansatz wurde anschließend sofort auf Eis überführt und mit 250 µl SOC-Medium für 1 h bei 37 °C und 200 Upm geschüttelt. Danach wurden 50 µl und 200 µl der transformierten Bakterien auf vorgewärmten, ampicillinhaltigen LB-Agar-Platten mit einem sterilen Drigalskispatel ausplattiert. Die Ansätze wurden im Wärmeschrank bei 37 °C über Nacht inkubiert.

2.2.2.9 Bakterienkultur

Die erfolgreich transformierten Bakterien wurden weiter vermehrt, indem von jeder LB-Platte eine Kolonie gepickt und in ein Röhrchen mit 5 ml LB-Medium überführt wurde. Die Kulturen wurden für ca. 8 h bei 37 °C und 250 Upm geschüttelt. Um die Klonierung zu überprüfen, wurde mit den zugehörigen Primerpaaren eine Standard-PCR mit 1 µl Bakteriensuspension durchgeführt und das Reaktionsprodukt auf einem Agarosegel aufgetrennt. Positive Vorkulturen wurden in 100 ml LB-Medium in Erlenmeyerkolben überführt und für 12-16 h bei 37 °C und 250 Upm inkubiert. Aus diesen Bakterien wurde anschließend die Plasmid-DNA isoliert.

2.2.2.10 Isolierung der Plasmid-DNA

Isolierung der Plasmide erfolgte mit Hilfe des Plasmid Midi Kits nach Protokoll des Herstellers mit Hilfe der Affinitätsbindung über eine Säule. Die Bakterienkulturen wurden abzentrifugiert, der Überstand dekantiert und die Bakterien mit dem Puffersystem des Herstellers resuspendiert, lysiert und neutralisiert. Das Lysat wurde filtriert und die Plasmid-DNA an Affinitätssäulen gebunden. Nach einem Waschschritt wurde die DNA

eluiert und mit Isopropanol präzipitiert. Das DNA-Pellet wurde in Aqua dest. aufgenommen. Zur Quantifizierung und Überprüfung der Reinheit wurde die erhaltene DNA im Mikrotiterplatten-Reader zur Absorptionsmessung bei 260 nm und 280 nm gemessen.

2.2.2.11 Linearisierung des Plasmids

Für die Verwendung der Plasmid-DNA als Standardreihe in der *Real-Time* RT-PCR musste die Plasmid-DNA zuvor mittels geeigneter Restriktionsenzyme (Tabelle 2.6) linearisiert werden. Die Restriktionsenzyme wurden dabei so ausgewählt, dass das Insert nicht geschnitten wurde. Für die Restriktion wurden 10 µg Plasmid-DNA mit 2 µl Restriktionsenzym (10 U/µl), und 2 µl Reaktionspuffer (zehnfach) gemischt und mit Aqua dest. auf 20 µl Endvolumen aufgefüllt. Der Reaktionsansatz wurde 1 h bei 37 °C inkubiert und das Enzym für weitere 10 min bei 65 °C hitzeinaktiviert.

2.2.3 Transfektion

Die Transfektion beschreibt das Einschleusen fremder DNA mittels physikalischer oder biochemischer Verfahren in eukaryontische Zellen. In der vorliegenden Arbeit wurde ein chemisches Verfahren, die Lipofektion, angewendet. Bei der Lipofektion werden Plasmide, die das gewünschte Gen enthalten, mit Hilfe von Liposomen in eukaryontische Zellen eingebracht. Diese Methode ist für Funktionsanalysen von bestimmten Genabschnitten mit Hilfe von Reporterplasmiden geeignet. In der vorliegenden Arbeit wurde als quantitatives Reportersystem der (Dual-) Luciferase Reporter Assay Kit nach Angaben des Herstellers verwendet. Als Reporterplasmid diente der TopFlash-Vektor (1 µg pro Ansatz), der Bindungsstellen für den über den Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionsweg aktivierbaren Transkriptionsfaktor Tcf enthält. Nur durch die Bindung des entsprechenden Transkriptionsfaktors an die entsprechende Bindungsstelle der Promoterregion im Reportervektor wird das nachgeschaltete Reportergen aktiviert. Als Negativkontrolle wurde der FopFlash-Vektor (1 µg pro Ansatz) verwendet, ein Thymidinkinase-Luciferase-Reporter, der mutierte Tcf-Bindungsstellen enthält. Als Reportergen diente das Enzym Firefly-Luciferase, das indirekt die Promotoraktivität des Reportervektors anzeigt. Als interne Kontrolle wurde pro Ansatz noch 0,1 µg des pRL-SV40-Vektors transfiziert, welcher ein Renilla-Luciferase-Gen trägt.

2.2.3.1 In-vitro-Transfektion von MC3T3-E1-Zellen

Nach dreitägiger Kultivierung der Zellen in Silikonschalen mit Expansionsmedium erfolgte die Transfektion mit dem FuGENE Transfektionsreagenz (HD) nach dem Protokoll des Herstellers. Je Transfektionsansatz waren 250 µl serumfreies Medium, 10 µl FuGENE-Reagenz und insgesamt 1,1 µg DNA der Reportergenkonstrukte enthalten. Die Transfektionsansätze wurden tropfenweise den Zellen zugegeben. Die mechanische Stimulation der Zellen wurde am zweiten Tag nach der Transfektion bzw. 24 h nach der Serumreduktion auf 2% durchgeführt. Vor der mechanischen Stimulation wurden die Zellen 3 h mit Wnt-3a (3 nM) zur Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs behandelt. Sofort nach Stimulationsende wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen, in 400 µl Reporter Lysis Puffer aufgenommen, auf Trockeneis überführt und nach dem Auftauen für 2 min bei 12.000 x g und 4 °C zentrifugiert.

2.2.3.2 Bestimmung der Luciferaseaktivität

Die Proben wurden mit Hilfe des (Dual-) Luciferase Reporter Assay Kits nach Anleitung des Herstellers aufgearbeitet und die Luciferaseaktivitäten im Luminometer gemessen. Dazu wurden die Zellen lysiert, Zellbestandteile abzentrifugiert und der Überstand in 96-*Well*-Platten pipettiert. Im Luminometer wurden die Luciferase-Assay-Reagenzien automatisch hinzugefügt und die Aktivität der Luciferasen über die Intensität der Lumineszenz gemessen. Die Firefly-Luciferaseaktivität wurde auf die Renilla-Luciferaseaktivität normalisiert.

2.2.4 Western-Blot und Immundetektion

Nach erfolgter chemischer und mechanischer Stimulation der Zellen wurde das Zellkulturmedium abgenommen und die Zellen mit eisgekühltem PBS gespült. Anschließend wurden in jede Silikonschale 150 µl RIPA-Puffer, gemischt mit 15 µl Halt Protease Inhibitor Cocktail, gegeben und die Zellen mit einem Zellschaber vom Untergrund abgelöst. Die Zellsuspension wurde in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß transferiert und mehrfach mit einer 22-Gauge-Kanüle geschert. Es folgte eine 6-minütige Zentrifugation bei 2000 x g und 4 °C. Anschließend wurde der wässrige Überstand vom Pellet getrennt und für die spätere Proteinkonzentrationsanalyse eingefroren.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte photometrisch mit Hilfe des BCA Protein Assay Kits. Zum Erstellen einer Standardkurve dienten in aufsteigender Konzentration (25/125/250/500/750/1000 µg/ml) mit 1 x RIPA-Puffer verdünnte BSA-

Proben (BSA-Stammlösung: 1 mg/ml). Die Analyse erfolgte mit dem Mikrotiterplatten-Reader der Firma Tecan und dem dafür vorgesehenen Software-Programm Magellan.

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte unter denaturierenden Bedingungen mittels diskontinuierlicher SDS-PAGE nach der Methode von Laemmli [91]. 10%-ige Trenngele und 5%-ige Sammelgele wurden verwendet. Die zu analysierenden Proben wurden mit 10-fach konzentriertem SDS/DTT-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95 °C gekocht. 10 µg Protein je Tasche wurde auf die Gele aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Stromstärke von 15 mA für 2-2,5 h bei 4 °C in Elektrophoresepuffer. Die Proteingele wurden anschließend auf Nitrozellulose-Membranen im *Semi-Dry*-Verfahren [90] bei 80 V für 60 min geblottet. Anschließend wurden die Membranen für 2 h oder über Nacht bei 4 °C in Nachsättigungslösung eingelegt, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Die Membranen wurden dann entweder über Nacht bei 4 °C oder für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur mit Primärantikörpern (Tabelle 2.7), die mit Antikörperverdünnungspuffer verdünnt wurden, leicht schüttelnd inkubiert. Bei den Primärantikörpern handelte es sich um Antikörper gegen Cox-2 oder β-Catenin (aktive und phosphorylierte Form). Nach drei Waschschritten wurden HRP-gekoppelte Sekundärantikörper (Tabelle 2.8) mit Antikörperverdünnungspuffer verdünnt und die Membranen für eine weitere Stunde darin inkubiert. Drei weitere Waschschritte folgten, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen.

Der Protein-Antikörperkomplex konnte mit Hilfe des SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate Systems nach Angaben des Herstellers durch Exposition der Membranen sowohl auf lichtsensitiven ECL-Hyperfilmen als auch mit dem Geldokumentationsgerät detektiert werden. β-Actin diente als Kontrolle zur Normalisierung der Proteinmenge.

2.2.5 Indirekte Doppel-Immunfluoreszenz

Die indirekte Doppel-Immunfluoreszenz diente dem Nachweis der Lokalisation von ERα bzw. β-Catenin im Nukleus nach Stimulation der Zellen mit E2 (10 nM) bzw. Wnt-3a (3 nM). Hierzu wurden 150.000 Zellen in einem 35 mm-*Well* in 10%-igem FBS-haltigem α-MEM ausgesät. Am darauffolgenden Tag wurde das Medium zu phenolrotfreiem 0,25%-igem BSA-haltigem serumfreien α-MEM gewechselt. Die chemische Stimulation der auf Deckgläschen adhärent angezogenen MC3T3-E1-Zellen erfolgte über 3,5 h. Vor Beginn der Immunlokalisation wurden die Zellen 5 min mit 4%-igem Para-Formaldehyd fixiert. Anschließend wurden die Zellen durch eine 5-minütige Inkubation mit 0,05%

Triton X-100 permeabilisiert, damit die Antikörper (Tabellen 2.7 und 2.8) in die Zellen gelangen können. Zur Absättigung wurden die Zellen 10 min mit Glycin (100 mM) in PBS behandelt. Es folgte die Inkubation mit dem ersten primären Antikörper gegen ERα für 60 min. Nach der Inkubation mit dem Antikörper wurden die Deckgläschen 3 x 5 min in PBS gewaschen und anschließend mit dem Sekundärantikörper Anti-Kaninchen-IgG-TR für 60 min inkubiert. Nach einem weiteren Waschgang von 3 x 5 min in PBS wurden die Zellen mit dem zweiten primären Antikörper Anti-β-Catenin benetzt, anschließend wieder gewaschen und mit dem Sekundärantikörper Anti-Schaf-IgG-FITC für 60 min inkubiert. Von den verdünnten Antikörpern wurden pro Deckglas 100 µl verwendet. Die Inkubationsschritte erfolgten in einer Feuchtkammer. Nach weiterem Waschen in PBS 3 x 5 min wurden die Deckgläschen kurz in Aqua dest. von den Salzkristallen befreit und die Rückseite der Deckgläschen vorsichtig mit einem fusselfreien Papiertuch getrocknet. Es wurde ein kleiner Tropfen Fluoromount-G auf einen Objektträger gegeben und das feuchte Deckgläschen vorsichtig mit den Zellen nach unten darauf gelegt, um Lufteinschlüsse zu vermeiden. Die Lagerung der Objektträger erfolgte in einer Aufbewahrungsmappe unter Lichtausschluss bei 4 °C. Zur Analyse der gefärbten Zellen wurde Mikroskop 2 mit dem geeigneten Filtersatz, die digitale CCD-Kamera vom Typ CoolSNAP EZ und die Software MetaMorph (Leica Mikrosysteme, Wetzlar, Deutschland) verwendet. Die Bildverarbeitung erfolgte mit dem Program ImageJ (Office of Research Services/National Institutes of Health, Bethesda, USA) und Photoshop CS4 (Adobe Systems, München, Deutschland).

2.2.6 Mikroarray-Untersuchungen

Anders als bei den herkömmlichen Methoden der Expressionsanalyse (*Real-Time* RT-PCR, Northern-Blot) können mit der Mikroarray-Technologie die Expressions-veränderungen aller Gene eines Organismus zeitgleich betrachtet werden.

Die Zellen wurden bei Versuchsabbruch einmal mit PBS gewaschen, in RLT-Puffer mit 2-Mercaptoethanol aufgenommen und bei -80 °C eingefroren. Die totale RNA wurde unter Einsatz des RNeasy Mini Kits isoliert. Die einzelnen Schritte der RNA-Extraktion erfolgten nach dem Qiagen-Protokoll, wobei die Elimination möglicher DNA-Reste über einen DNasen-Verdau vorgenommen wurde. Die photometrische Quantifizierung und Qualitätsüberprüfung der isolierten mRNA wurde im Mikrotiterplatten-Reader zur Absorp-tionsmessung durchgeführt. 5 µg mRNA aus differenzierten bzw. undifferenzierten, belasteten bzw. unbelasteten murinen primären osteoblastären Zellen und mRNA aus mit

oder ohne E2 bzw. Wnt-3a behandelten mechanisch-stimulierten bzw. unstimulierten MC3T3-E1-Zellen wurden für die Mikroarray-Untersuchungen bereitgestellt.
Die Mikroarray-Untersuchungen nach Affymetrix (Santa Clara, USA) [103] wurden von Dr. rer. nat. Karlheinz Holzmann am Interdisziplinären Zentrum für Klinische Forschung (IZKF) der Universität Ulm durchgeführt und basieren auf folgenden Einzelschritten. Die mRNA wurde in cDNA umgeschrieben. Unter Einsatz der doppelsträngigen cDNA wurde eine Biotin-markierte cRNA synthetisiert mit Hilfe des *one-cycle target labeling* Protokolls nach Angaben des Herstellers. Danach erfolgte die Hybridisierung mit je 15 µg cRNA auf *Mouse* 430 Affymetrix GeneChip Arrays. Die Chips wurden mit einem Affymetrix GeneChip Scanner 3000 gescant und die erhaltenen Bilder mit der Software GCOS1.4 (Affymetrix, Santa Clara, USA) analysiert. Transkriptomanalysen wurden mit den *Biometric Research Branch (BRB)-ArrayTools* durchgeführt.

2.2.7 Statistik

Unabhängige Experimente wurden drei- bis viermal in doppelten Kulturansätzen durchgeführt. Die mittels *Real-Time* RT-PCR ermittelte Expression der ausgewählten Gene wurde immer zuerst auf die Expression des *Housekeeping*-Gens Gapdh normiert. Um die Veränderung der Genexpression zwischen differenzierten bzw. stimulierten Ansätzen und Kontrollansätzen zu berechnen, wurde der Quotient der Genexpression der differenzierten bzw. stimulierten Proben und der zugehörigen Kontrollen gebildet.
Für die statistische Überprüfung des Effekts der Differenzierung, des mechanischen Stimulationseffekts und des Effekts der Agonisten bzw. Antagonisten auf die Genexpression der Zellen wurde der Student's t-Test verwendet. Die Nullhypothese nahm den Wert 1 an, falls kein Unterschied in der Genexpression von differenzierten bzw. stimulierten Ansätzen und Kontrollansätzen war. Bei einem p-Wert von $\leq 0{,}05$ wurde die Nullhypothese abgelehnt. In den Diagrammen wurden signifikante Ergebnisse jeweils mit einem Sternchen (*) markiert.

3. Ergebnisse

3.1 Differenzierung und mechanische Stimulation primärer osteoblastärer Zellen

3.1.1 Expression von mit dem ER- und dem Wnt/β-Catenin-Signalweg assoziierten Genen im Kultivierungsverlauf

Primäre osteoblastäre Zellen aus Mauskalvarien wurden unmittelbar am Tag 5 nach Kultivierung in Expansionsmedium und am Tag 7, 14, 21 und 28 nach Kultivierung in Differenzierungsmedium hinsichtlich der Veränderung der relativen Expression von Genen des ER- und des Wnt/β-Catenin-Signalwegs mittels Mikroarray-Analyse (Tabelle 3.1.) und quantitativer *Real-Time* RT-PCR (Tabelle 3.1, Abbildung 3.1) untersucht. In der Tabelle 3.1 ist die x-fache Veränderung der relativen Mikroarray-Genexpression der gemessenen quantitativen *Real-Time* RT-PCR-Genexpression nach Differenzierung gegenübergestellt. Die Expression vom Tag 5 wurde mit der Expression differenzierterer Zellen am Tag 28 verglichen.

Das Protoonkogen Fos und das *gap junction protein* Gja-1 waren nach Differenzierung kaum verändert. Eine deutliche Expressionserhöhung konnte bei dem osteoblastären Markergen Alpl, welches die alkalische Phosphatase kodiert, festgestellt werden. Eine deutliche Expressionserniedrigung zeigte das Gen Ptgs-2, welches die Cyclooxygenase-2 (Cox-2) kodiert. Eine erhöhte Expression gegenüber Tag 5 zeigten die Gene Tnfrsf-11b (Osteoprotegerin), Ctnnb-1 (β-Catenin), Esr-1 (ERα) und Esr-2 (ERβ).

Tabelle 3.1 Mikroarray- und quantitative *Real-Time* RT-PCR-Daten (qRT-PCR) nach Differenzierung primärer osteoblastärer Zellen aus Mauskalvarien

Zeit-punkt	Gensymol	Name	x-fache Veränderung der relativen Genexpression nach Differenzierung	
			Array	qRT-PCR
d28	Fos	*FBJ osteosarcoma oncogene*	0,6	1,1
	Alpl	*alkaline phosphatase liver/bone/kidney*	5,5	15,4
	Ptgs-2	*prostaglandin-endoperoxidase synthase 2 (cyclooxygenase-2)*	0,1	0,3
	Tnfrsf-11b	*tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b (osteoprotegerin)*	1,2; 1,3	2,7
	Gja-1	*gap junction protein, alpha 1 (connexin-43)*	0,4; 0,7	1
	Ctnnb-1	*catenin (cadherin associated protein), beta 1*	1; 1,1	1,6
	Esr-1	*estrogen receptor 1*	1,2; 1; 0,9	1,9
	Esr-2	*estrogen receptor 2*	1	1,6

Im Kultivierungsverlauf stieg die Expression des osteoblastären Markergens Alpl signifikant an und erreichte eine ca. 15,4-fache Erhöhung im Vergleich zur Expression der

weniger differenzierten Zellen am Tag 5. Die Expression des Gens Ptgs-2 (Cox-2) nahm im Kultivierungsverlauf stetig ab. Die Expression des Gens Tnfrsf-11b nahm während der Differenzierung signifikant zu und erreichte eine ca. 2,7-fache Erhöhung im Vergleich zur Expression der weniger differenzierten Zellkulturen am Tag 5. Die Expression des Gens Gja-1 war zu Beginn der Differenzierung noch signifikant um das ca. 1,8-fache erhöht, nahm dann tendenziell an den Kultivierungstagen 14, 21 und 28 wieder auf das Expressionsniveau der weniger differenzierten Proben ab. Am Tag 21 der Differenzierung war die Expression des Gens Ctnnb-1 signifikant um das ca. 2-fache und am Tag 28 nur noch signifikant um das ca. 1,6-fache erhöht im Vergleich zu den weniger differenzierten Zellkulturen am Tag 5. Das Gen Ctnnb-1 zeigte somit eine tendenzielle Abnahme seiner Expression im Verlauf der Differenzierung. Die Expression des Gens Esr-1 wurde nach Induktion der Differenzierung signifikant erhöht und erreichte am Tag 21 der Differenzierung eine signifikante maximale ca. 5-fache Expressionserhöhung, die gegenüber den weniger differenzierten Zellkulturen am Tag 7 und 14 signifikant war. Die Expression des Gens Esr-2 war an allen Zeitpunkten der Differenzierung gegenüber den weniger differenzierten Zellkulturen am Tag 5 signifikant erhöht und unterschied sich im Verlauf der Differenzierung nicht signifikant.

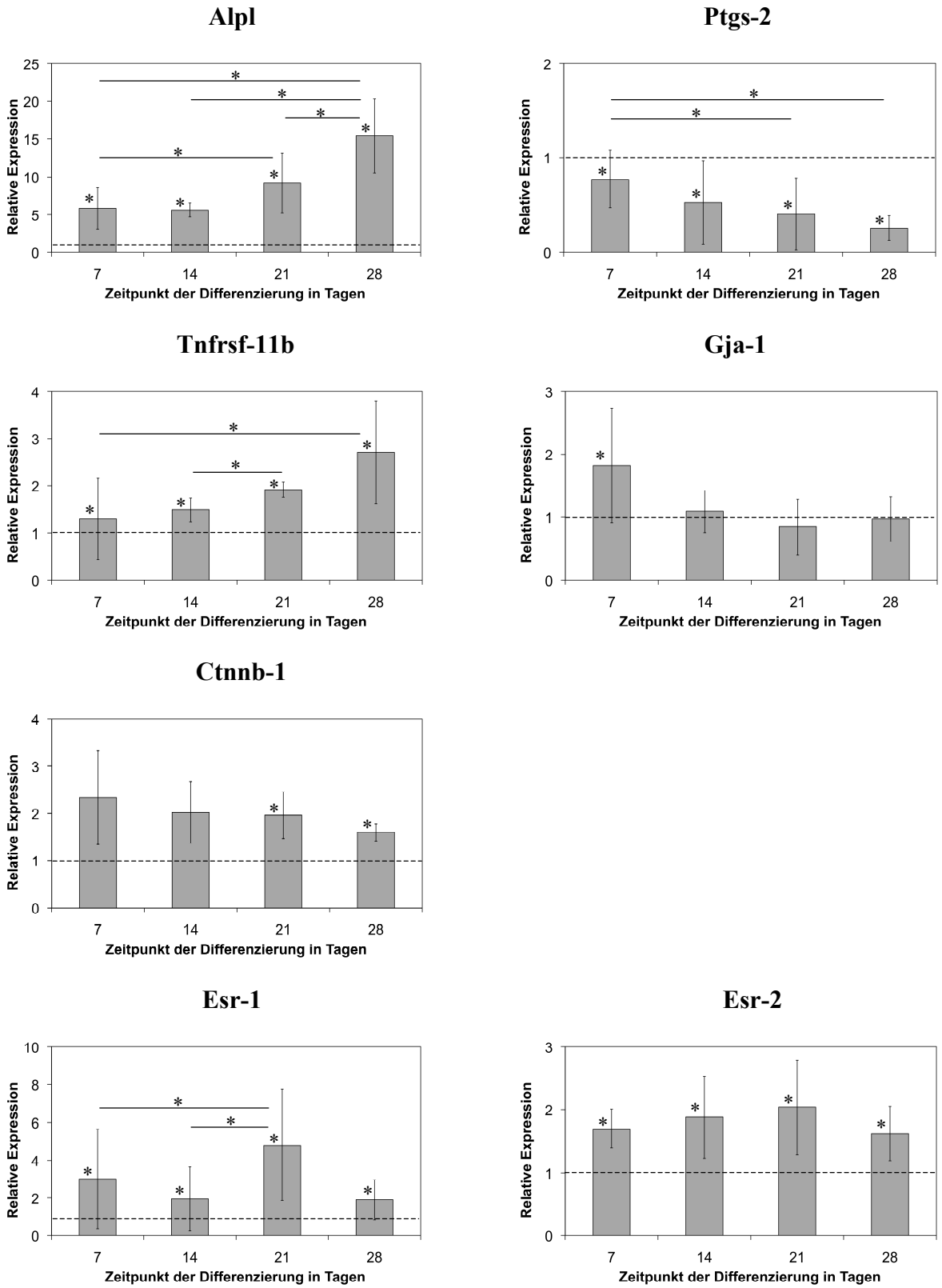


Abbildung 3.1

Quantitative Expressionsanalyse von mit dem ER- und dem Wnt/β-Catenin-Signalweg assoziierten Genen im Kultivierungsverlauf. Dargestellt ist die Expression der Gene Alpl, Ptgs-2, Tnfrsf-11b, Gja-1, Ctnnb-1, Esr-1 und Esr-2. Primäre osteoblastäre Zellen aus Mauskalvarien wurden für 5 Tage im Expansionsmedium und anschließend für 2 (7), 9 (14), 16 (21) und 23 (28) Tage im Differenzierungsmedium kultiviert. Die Genexpression wurde mittels *Real-Time* RT-PCR bestimmt. Zur Normalisierung wurde die

Expression des *Housekeeping*-Gens Gapdh verwendet und anschließend der Quotient der Genexpression der differenzierten Probe und der undifferenzierten Kontrolle am Tag 5 gebildet (gestrichelte Kontrolllinie = 1). n=3-4, * : $p \leq 0,05$.

3.1.2 Expression von über den ER- und den Wnt/β-Catenin-Signalweg regulierten Genen nach mechanischer Stimulation

Die Effekte mechanischer Stimulation auf die Expression von über den ER- und den Wnt/β-Catenin-Signalweg regulierten Genen wurden im Zeitverlauf der Kultivierung muriner primärer osteoblastärer Zellen im Differenzierungsmedium mittels Mikroarray (Tabelle 3.2.) untersucht und mittels quantitativer *Real-Time* RT-PCR (Tabelle 3.2, Abbildung 3.2) verifiziert.

Die Analysen zeigten, dass die Genexpression von Fos und Ptgs-2 sowohl am Tag 5 als auch am Tag 28 nach mechanischer Stimulation der Zellen erhöht war, wobei die Expression in den differenzierteren Zellen am Tag 28 höher als in den weniger differenzierten Zellen am Tag 5 war. Das Gen Tnfrsf-11b wurde am Tag 5 hochreguliert und am Tag 28 der Differenzierung herunter.

Tabelle 3.2 Mikroarray- und quantitative *Real-Time* RT-PCR-Daten (qRT-PCR) nach mechanischer Stimulation primärer osteoblastärer Zellen aus Mauskalvarien

Zeit-punkt	Gensymol	Name	x-fache Veränderung der relativen Genexpression nach mechanischer Stimulation	
			Array	qRT-PCR
d5	Fos	*FBJ osteosarcoma oncogene*	1,2	2,1
	Ptgs-2	*prostaglandin-endoperoxidase synthase 2 (cyclooxygenase-2)*	1,4; 1,3	1,8
	Tnfrsf-11b	*tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b (osteoprotegerin)*	1,3; 1,2	1,5
d28	Fos	*FBJ osteosarcoma oncogene*	1,9	3,2
	Ptgs-2	*prostaglandin-endoperoxidase synthase 2 (cyclooxygenase-2)*	2,0; 2,0	2,0
	Tnfrsf-11b	*tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b (osteoprotegerin)*	0,8; 0,9	0,6

Im Kultivierungsverlauf war die Expression des Gens Ptgs-2 nach mechanischer Stimulation der Zellen an allen Kultivierungstagen signifikant um das ca. 2-fache im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollen erhöht. Nach mechanischer Stimulation der Zellen war das Gen Tnfrsf-11b am Tag 5 der Kultivierung signifikant um das ca. 1,5-fache erhöht. Im Vergleich dazu nahm die Tnfrsf-11b-Expression unter mechanischen Einfluss am Tag 14, 21 und 28 der Kultivierung signifikant ab.

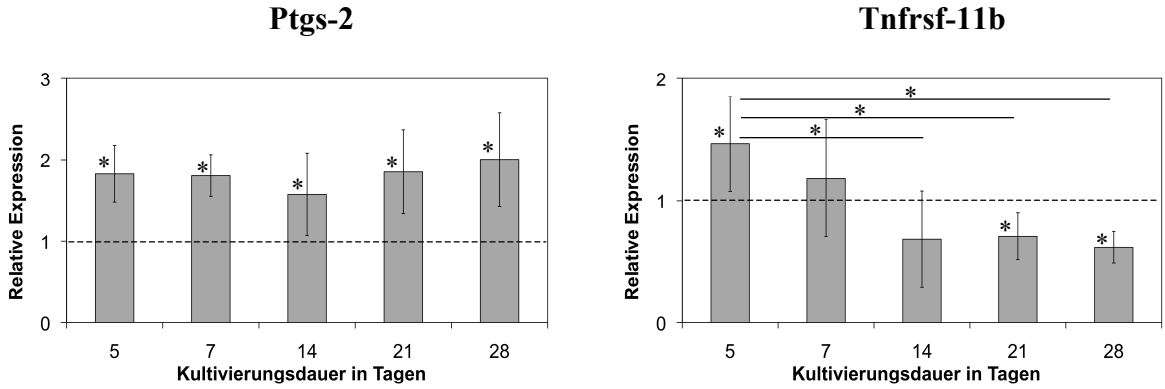


Abbildung 3.2

Quantitative Expressionsanalyse von über den ER- und den Wnt/β-Catenin-Signalweg regulierten Genen nach mechanischer Stimulation. Dargestellt ist die Expression der Gene Ptgs-2 und Tnfrsf-11b. Primäre osteoblastäre Zellen aus Mauskalvarien wurden für 5 Tage im Expansionsmedium (5) und anschließend für 2 (7), 9 (14), 16 (21) und 23 (28) Tage im Differenzierungsmedium kultiviert. Die mechanische Stimulation erfolgte einmalig (30 min, 1 Hz, 10.000 με) am entsprechenden Kultivierungstag. Die Genexpression wurde mittels *Real-Time* RT-PCR bestimmt. Zur Normalisierung wurde die Expression des *Housekeeping*-Gens Gapdh verwendet und anschließend der Quotient der Genexpression der mechanisch-stimulierten Probe und der unstimulierten Kontrolle gebildet (gestrichelte Kontrolllinie = 1). n=3-4, * : $p \leq 0{,}05$.

3.1.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

In den primären osteoblastären Zellen aus Mauskalvarien konnte während der Differenzierung eine signifikante Erhöhung der Expression der Gene Alpl und Tnfrsf-11b und eine signifikante Erniedrigung des Gens Ptgs-2 festgestellt werden. Des Weiteren wurde das Gen Gja-1 am Tag 7, Ctnnb-1 an den Tagen 21 und 28, die Gene Esr-1 und Esr-2 zu jedem Zeitpunkt der Differenzierung signifikant induziert. Während die Expression der Gene Esr-2 und Ctnnb-1 nur tendenzielle Veränderungen der Genexpression über den Zeitverlauf der Differenzierung hinweg zeigten, erreichte die Expression des Gens Esr-1 am Tag 21 der Differenzierung ihren Maximalwert.

Die Expression der untersuchten Gene Ptgs-2 und Tnfrsf-11b konnte zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Kultivierung mittels mechanischer Belastung beeinflusst werden. Eine signifikante Expressionserhöhung des Gens Ptgs-2 durch mechanische Belastung konnte an allen Tagen der Kultivierung nachgewiesen werden. Die Expression des Gens Tnfrsf-11b war am Tag 5 durch mechanische Belastung signifikant erhöht. Eine signifikante Erniedrigung der Genexpression konnte bei Tnfrsf-11b in den differenzierteren Zellen am Tag 21 und 28 festgestellt werden.

3.2 Einfluss von Modulatoren des ER- und des Wnt/β-Catenin-Signalwegs und mechanischer Stimulation auf die Expression früh responsiver Gene

Um den Einfluss der Interaktion des ER- und des Wnt/β-Catenin-Signalwegs auf die Expression früh responsiver Gene nach mechanischer Belastung in-vitro zu untersuchen, wurden murine osteoblastäre und mesenchymale Zellen mit spezifischen Aktivatoren und Inhibitoren des ER- und des Wnt/β-Catenin-Signalwegs inkubiert und mechanisch stimuliert. Die quantitative Analyse der Genexpression erfolgte über *Real-Time* RT-PCR.
Als Beispiel eines früh responsiven Gens, welches über beide Signalwege moduliert wird, wurde Ptgs-2, welches die Cyclooxygenase-2 (Cox-2) kodiert, näher untersucht. Cox-2 katalysiert den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in der Prostaglandinsynthese, die Umwandlung von Arachidonsäure zu Prostaglandin H2. Als Schlüsselenzym ist es im Knochenstoffwechsel sowohl an der Osteoklastogenese als auch an der Knochenbildung, Frakturheilung und Mechanotransduktion beteiligt.

3.2.1 Einfluss spezifischer Aktivatoren des ER- und des Wnt/β-Catenin-Signalwegs und mechanischer Stimulation auf die Ptgs-2- und die Tnfrsf-11b-Expression in primären osteoblastären Zellen

Die mittels *Real-Time* RT-PCR ermittelte relative Ptgs-2-Expression in den primären osteoblastären Zellen aus Mauskalvarien, nach Aktivierung des ER-Signalwegs mit 17-β-Östradiol (E2) bzw. des Wnt/β-Catenin-Signalwegs mit Lithiumchlorid (LiCl) ohne bzw. mit mechanische/r Belastung, ist in der Abbildung 3.3 dargestellt.
Mechanische Stimulation (S) resultierte in einer signifikanten Erhöhung der Ptgs-2-Expression (2,7-fach). Die Behandlung der Zellen mit E2, dem physiologischen ER-Signalwegaktivator, erhöhte ebenfalls die Ptgs-2-Expression signifikant. Im Vergleich dazu führte zusätzliche mechanische Stimulation zu einer signifikanten Erniedrigung der Ptgs-2-Expression um 50%. Die Zugabe von LiCl, ein Wnt/β-Catenin-Signalwegaktivator, resultierte in einem tendenziellen ca. 3-fachen Anstieg der Ptgs-2-Expression. Zusätzliche mechanische Belastung führte zu einer signifikanten Aufhebung der durch LiCl induzierten erhöhten Ptgs-2-Expression. E2- und LiCl-Zugabe führte zu einer signifikanten 5-fachen Ptgs-2-Expressionserhöhung. Zusätzliche Applikation mechanischer Belastung führte zu einer signifikanten Erniedrigung der durch beide Signalwegaktivatoren induzierten erhöhten Ptgs-2-Expression.

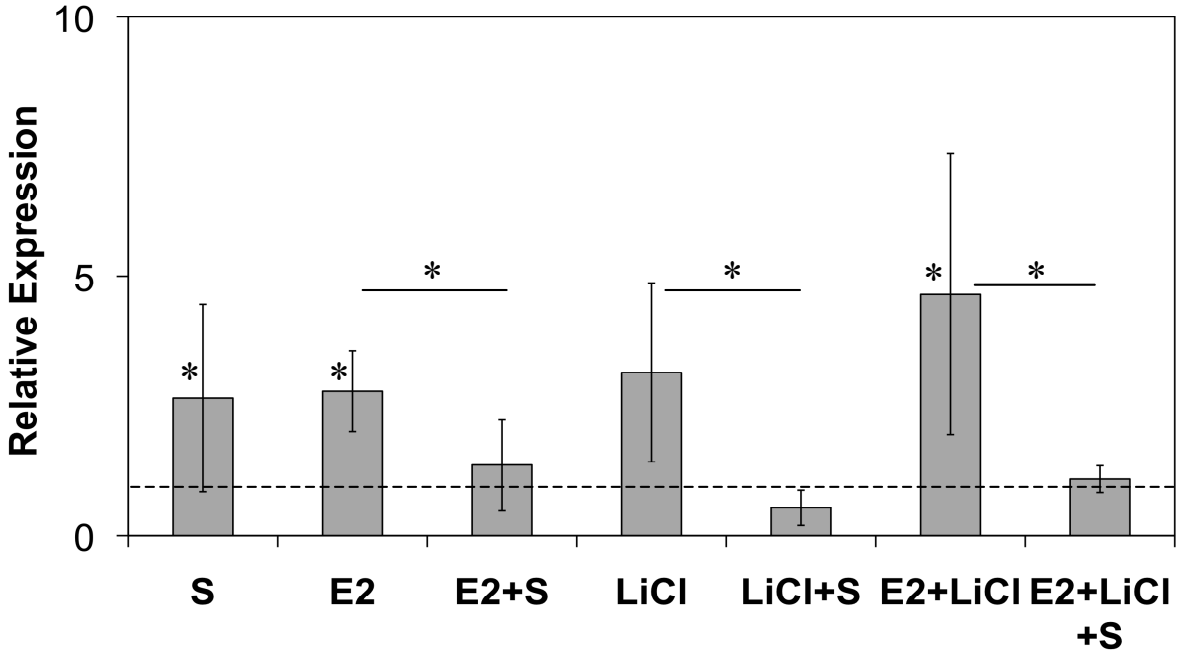


Abbildung 3.3

Quantitative Analyse der relativen Ptgs-2-Expression unter Einfluss spezifischer Aktivatoren und mechanischer Belastung in primären osteoblastären Zellen aus Mauskalvarien. Dargestellt ist die relative Ptgs-2-Expression ohne bzw. nach mechanische/r Stimulation (S) in Anwesenheit des ER-Agonisten 17-β-Östradiol (E2) und des Wnt/β-Catenin-Agonisten Lithiumchlorid (LiCl). E2 (10 nM) und LiCl (10 mM) wurden 3 h vor der mechanischen Stimulation zu den Kontrollen und den mechanisch zu stimulierenden Zellen gegeben. Die mechanische Stimulation erfolgte über eine Dauer von 30 min, bei einer Frequenz von 1 Hz und einer Amplitude von 10.000 με. Die Genexpression wurde mittels *Real-Time* RT-PCR bestimmt. Zur Normalisierung wurde die Expression des *Housekeeping*-Gens Gapdh verwendet und anschließend der Quotient der Genexpression der stimulierten Probe und der unstimulierten Kontrolle gebildet (gestrichelte Kontrolllinie = 1). n=3-4, * : $p \leq 0{,}05$.

Die quantitative Expressionsanalyse eines weiteren früh responsiven Gens, Tnfrsf-11b, zeigte ein ähnliches Ergebnis (Abbildung 3.4). Dieses Gen kodiert das Zytokin Osteoprotegerin (Opg), welches an der Osteoklastogenese beteiligt ist.

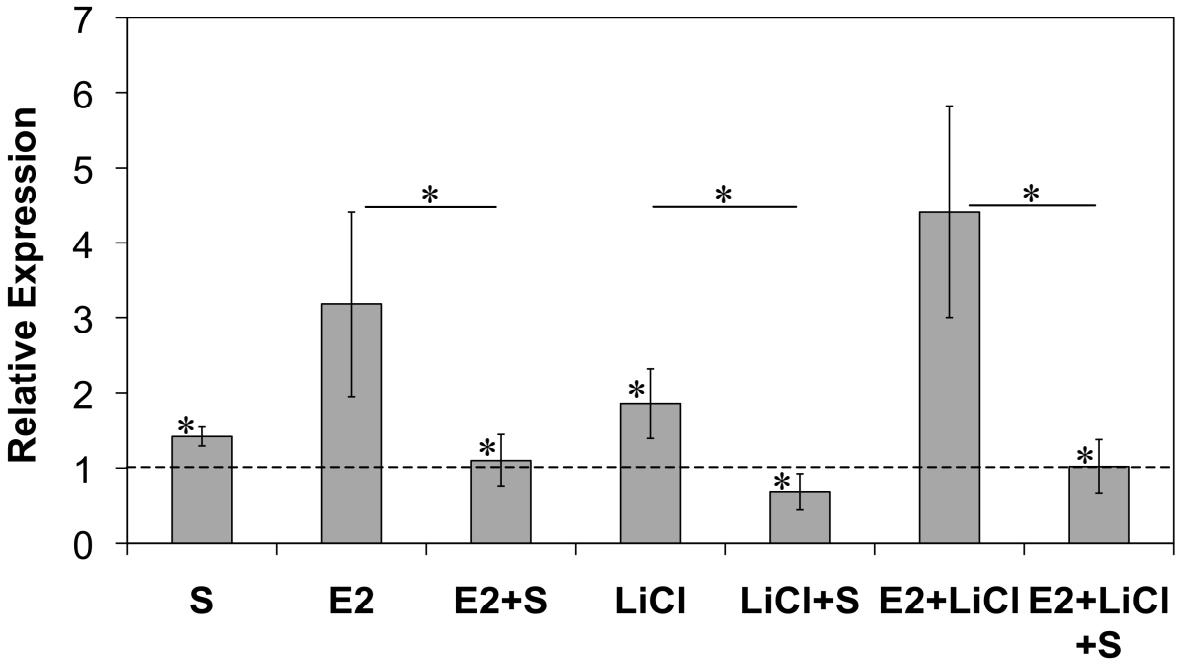


Abbildung 3.4

Quantitative Analyse der relativen Tnfrsf-11b-Expression unter Einfluss spezifischer Aktivatoren und mechanischer Belastung in primären osteoblastären Zellen aus Mauskalvarien. Dargestellt ist die relative Tnfrsf-11b-Expression ohne bzw. nach mechanische/r Stimulation (S) in Anwesenheit des ER-Agonisten E2 und des Wnt/β-Catenin-Agonisten LiCl. E2 (10 nM) und LiCl (10 mM) wurden 3 h vor der mechanischen Stimulation zu den Kontrollen und den mechanisch zu stimulierenden Zellen gegeben. Die mechanische Stimulation erfolgte über eine Dauer von 30 min, bei einer Frequenz von 1 Hz und einer Amplitude von 10.000 με. Die Genexpression wurde mittels *Real-Time* RT-PCR bestimmt werden. Zur Normalisierung wurde die Expression des *Housekeeping*-Gens Gapdh verwendet und anschließend der Quotient der Genexpression der stimulierten Probe und der unstimulierten Kontrolle gebildet (gestrichelte Kontrolllinie = 1). n=3-4, * : $p \leq 0,05$.

3.2.2 Einfluss spezifischer Aktivatoren des ER- und des Wnt/β-Catenin-Signalwegs und mechanischer Stimulation auf die Ptgs-2-Expression in murinen mesenchymalen Stammzellen (C3H10T1/2)

Die relative Ptgs-2-Expression, nach Behandlung der murinen mesenchymalen Stammzellen C3H10T1/2 mit den Aktivatoren des ER- und des Wnt/β-Catenin-Signalwegs und anschließender mechanischer Belastung, wurde mittels *Real-Time* RT-PCR bestimmt (Abbildung 3.5.).

Wie erwartet konnte auch in den murinen mesenchymalen Stammzellen eine erhöhte Ptgs-2-Expression (1,6-fach) sofort nach mechanischer Stimulation beobachtet werden. Diese mechanisch-induzierte Expressionserhöhung wurde durch LiCl-Zugabe signifikant reduziert. Durch Aktivierung des ER-Signalwegs blieb sowohl die mechanisch-induzierte

Ptgs-2-Expression als auch die Ptgs-2-Basalexpression unverändert. Durch zusätzliche LiCl-Zugabe erhöhte sich die Basalexpression signifikant um das ca. 2-fache. Die Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signalwegs führte wie erwartet zu einer signifikanten ca. 2,2-fachen Hochregulation des Wnt/β-Catenin-Zielgens Ptgs-2. Zusätzliche Dehnung der Zellen reduzierte diesen Effekt signifikant. Die durch die Aktivatoren induzierte signifikant erhöhte Ptgs-2-Expression wurde durch gleichzeitige Applikation von mechanischer Belastung signifikant reduziert.

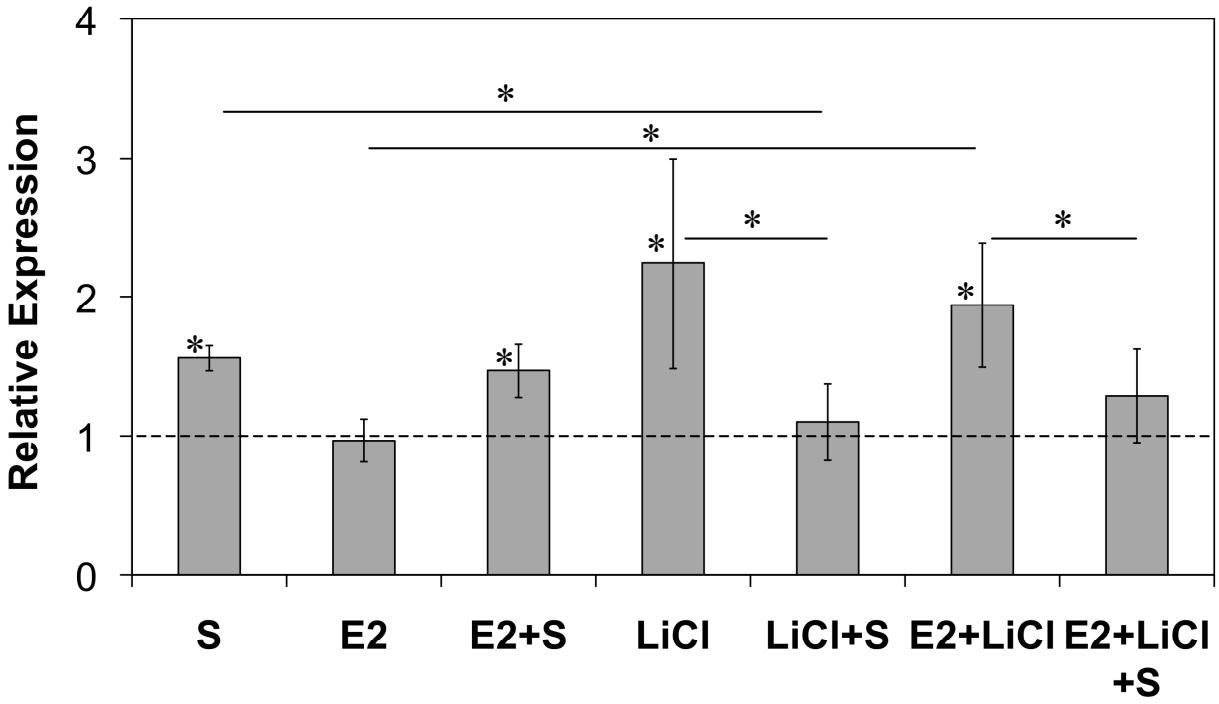


Abbildung 3.5

Quantitative Analyse der relativen Ptgs-2-Expression unter Einfluss spezifischer Aktivatoren und mechanischer Belastung in C3H10T1/2-Zellen. Dargestellt ist die relative Ptgs-2-Expression ohne bzw. nach mechanische/r Stimulation (S) in Anwesenheit des ER-Agonisten E2 und des Wnt/β-Catenin-Agonisten LiCl. E2 (10 nM) und LiCl (10 mM) wurden 3 h vor der mechanischen Stimulation zu den Kontrollen und den mechanisch zu stimulierenden Zellen gegeben. Die mechanische Stimulation erfolgte über eine Dauer von 30 min, bei einer Frequenz von 1 Hz und einer Amplitude von 10.000 με. Die Genexpression wurde mittels *Real-Time* RT-PCR bestimmt. Zur Normalisierung wurde die Expression des *Housekeeping*-Gens Gapdh verwendet und anschließend der Quotient der Genexpression der stimulierten Probe und der unstimulierten Kontrolle gebildet (gestrichelte Kontrolllinie = 1). n=3-4, * : $p \leq 0,05$.

3.2.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

In den primären osteoblastären Zellen aus Mauskalvarien und in den murinen mesenchymalen Stammzellen C3H10T1/2 stieg nach mechanischer Belastung die Expression des mechanosensitiven Gens Ptgs-2 wie erwartet signifikant an. In den

Primärzellkulturen führte die Behandlung der Zellen mit dem Aktivator des ER-Signalwegs, E2, zu einer signifikanten Hochregulation der Ptgs-2-Expression. Diese wurde durch eine zusätzliche mechanische Stimulation vermindert. Die Inkubation der C3H10T1/2-Zellen mit E2 hatte weder einen Effekt auf die Basalexpression von Ptgs-2, noch veränderte sich der mechanisch-induzierte Effekt durch Aktivierung des ER-Signalwegs signifikant. Sowohl in den primären osteoblastären Zellen als auch in den murinen mesenchymalen Stammzellen führte die Zugabe von LiCl, ein Aktivator des Wnt/β-Catenin-Signalwegs, wie erwartet zu einer Erhöhung der Ptgs-2-Expression. Eine zusätzliche mechanische Belastung hatte die Herunterregulation der Ptgs-2-Expression zur Folge. Die Behandlung der Zellen mit beiden Signalwegaktivatoren, E2 und LiCl, erhöhte die Ptgs-2-Expression. Die zusätzliche Applikation mechanischer Belastung führte zur signifikanten Erniedrigung der durch die Aktivatoren induzierten erhöhten Ptgs-2-Expression.

3.2.4 Einfluss von Modulatoren des ER- und des Wnt/β-Catenin-Signalwegs und mechanischer Stimulation auf die Ptgs-2-Expression in MC3T3-E1-Zellen

Der Einfluss der Modulatoren des ER- und des Wnt/β-Catenin-Signalwegs und mechanischer Stimulation auf die Ptgs-2-Expression in MC3T3-E1-Zellen ist in der Abbildung 3.6 dargestellt.

Wie erwartet führte mechanische Belastung (S) zu einer signifikanten Erhöhung der Ptgs-2-Expression (1,8-fach). Die Aktvierung des ER-Signalwegs durch Behandlung der Zellen mit E2 veränderte die Ptgs-2-Expression nicht signifikant. Zusätzliche mechanische Stimulation erhöhte jedoch die Ptgs-2-Expression signifikant um das ca. 7,2-fach. E2 führte also zu einer Sensibilisierung des mechanisch-induzierten Effekts. An der mechanischen Regulation der Ptgs-2-Expression ist laut Literatur die Proteinkinase A beteiligt. Zur Verifizierung, ob der sensibilisierende Effekt von der Interaktion mechanisch-induzierter Signalwege mit dem E2-aktivierten ER-Signalweg abhängig ist, wurde die Ptgs-2-Expression unter der Zugabe des Proteinkinase A-Inhibitors H89, E2 und mechanischer Belastung untersucht. Tatsächlich wurde der mechanosensibilisierende Effekt durch H89 signifikant aufgehoben. Folglich war der mechanosensibilisierende Effekt von der mechanisch-induzierten Proteinkinase A abhängig. Weiterhin ist in der Abbildung 3.6 dargestellt, dass durch die Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signalwegs nach Zugabe von LiCl ein signifikanter 14-facher Expressionsanstieg des Wnt/β-Catenin-Zielgens Ptgs-2 resultierte. Zusätzliche mechanische Belastung führte auch in diesen

Zellen zu einer Aufhebung der LiCl-induzierten erhöhten Ptgs-2-Expression. Die Aktivierung sowohl des ER- als auch des Wnt/β-Catenin-Signalwegs durch Zugabe beider Aktivatoren, E2 und LiCl, erhöhte die Ptgs-2-Expression signifikant um das ca. 2,5-fache. Der durch LiCl resultierende Anstieg wurde folglich durch E2 reduziert. Bei E2- und LiCl-Zugabe in Kombination mit mechanischer Belastung kam es zu einer signifikanten Aufhebung der Ptgs-2-Expression im Vergleich zur Ptgs-2-Expression in den mechanisch-stimulierten Zellen ohne Aktivatoren, in den mit E2 behandelten mechanisch-stimulierten Zellen und in den mit LiCl behandelten Zellen.

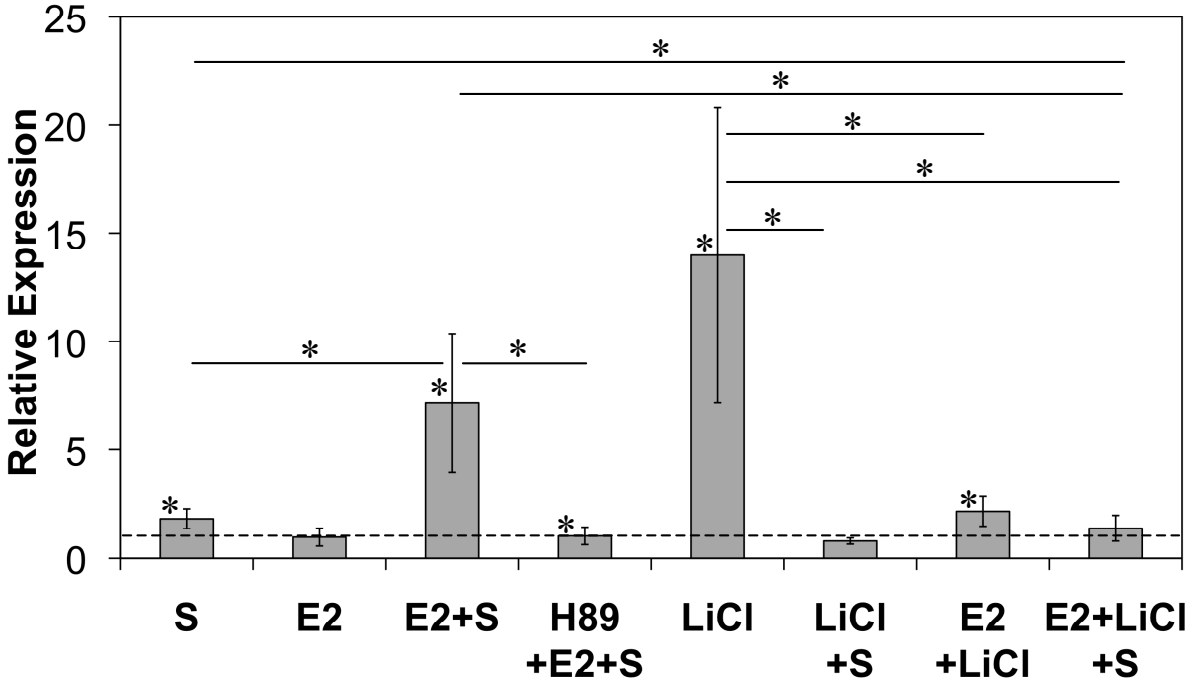


Abbildung 3.6

Quantitative Analyse der Ptgs-2-Expression unter Einfluss von Modulatoren des ER- und des Wnt/β-Catenin-Signalwegs und mechanischer Belastung in MC3T3-E1-Zellen. Dargestellt ist die relative Ptgs-2-Expression ohne bzw. nach mechanische/r Stimulation (S) in Anwesenheit des ER-Agonisten E2, des Wnt/β-Catenin-Agonisten LiCl und des Proteinkinase A-Inhibitors H89. E2 (10 nM) und LiCl (10 mM) wurden 3 h, H89 (5 μM) 2,5 h vor der mechanischen Stimulation zu den Kontrollen und den mechanisch zu stimulierenden Zellen gegeben. Die mechanische Stimulation erfolgte über eine Dauer von 30 min, bei einer Frequenz von 1 Hz und einer Amplitude von 10.000 με. Die Genexpression wurde mittels *Real-Time* RT-PCR bestimmt. Zur Normalisierung wurde die Expression des *Housekeeping*-Gens Gapdh verwendet und anschließend der Quotient der Genexpression der stimulierten Probe und der unstimulierten Kontrolle gebildet (gestrichelte Kontrolllinie = 1). n=3-4, * : $p \leq 0,05$.

Zur Aufklärung der Interaktion der Signalwege mit mechanischer Belastung wurden neben Belastungsexperimenten mit den Signalwegaktivatoren noch zusätzlich Experimente unter Verwendung spezifischer Inhibitoren durchgeführt. ICI 182,780 (ICI, Abbildung 3.7)

wurde zur Inhibition des ER-Signalwegs eingesetzt und Endostatin (E, Abbildung 3.8) als Inhibitor des Wnt/β-Catenin-Signalwegs.

Die Zugabe von ICI 182,780, ein spezifischer ER-Antagonist, hatte weder einen signifikanten Effekt auf die Ptgs-2-Expression der nicht mechanisch-stimulierten MC3T3-E1-Zellen, noch veränderte sich nach dessen Zugabe die mechanisch-induzierte Ptgs-2-Expression signifikant. Der sensibilisierende Effekt durch E2 und mechanische Belastung konnte durch Inhibition des ER-Signalwegs mit ICI signifikant aufgehoben werden.

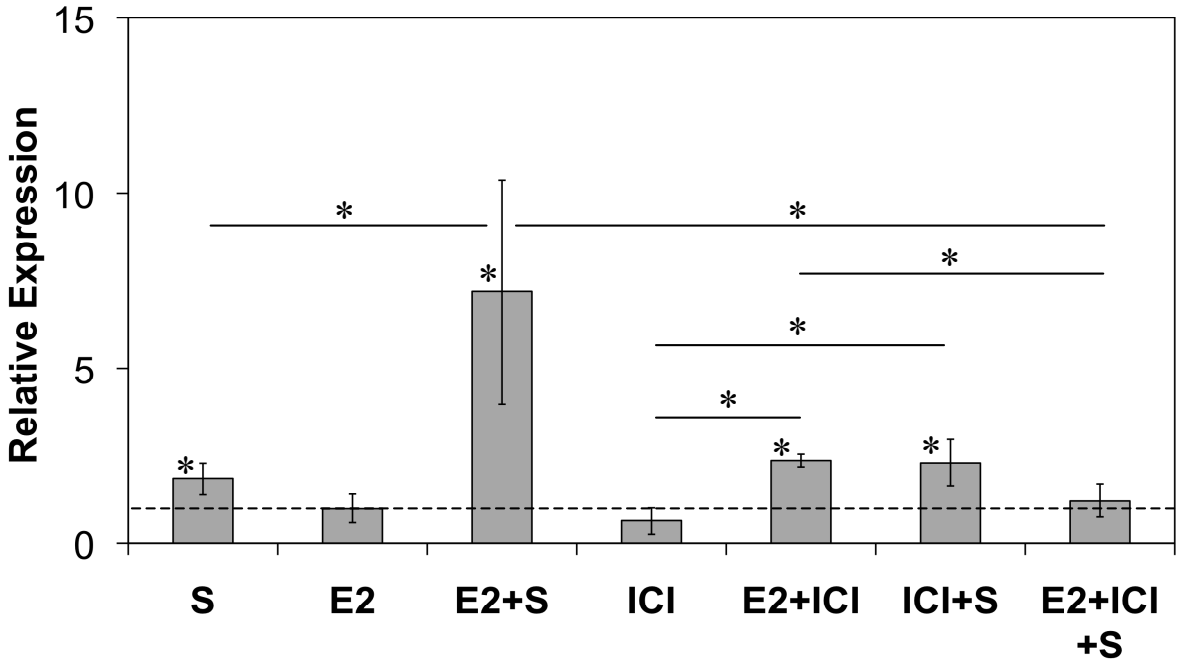


Abbildung 3.7

Quantitative Analyse der Ptgs-2-Expression unter Einfluss von Modulatoren des ER-Signalwegs und mechanischer Belastung in MC3T3-E1-Zellen. Dargestellt ist die relative Ptgs-2-Expression ohne bzw. nach mechanische/r Stimulation (S) in Anwesenheit des ER-Agonsiten E2 und des ER-Antagonisten ICI 182,780 (ICI). E2 (10 nM) und ICI (100 nM) wurden 3 h bzw. 3,5 h vor der mechanischen Stimulation zu den Kontrollen und den mechanisch zu stimulierenden Zellen gegeben. Die mechanische Stimulation erfolgte über eine Dauer von 30 min, bei einer Frequenz von 1 Hz und einer Amplitude von 10.000 με. Die Genexpression wurde mittels *Real-Time* RT-PCR bestimmt. Zur Normalisierung wurde die Expression des *Housekeeping*-Gens Gapdh verwendet und anschließend der Quotient der Genexpression der stimulierten Probe und der unstimulierten Kontrolle gebildet (gestrichelte Kontrolllinie = 1). n=3-4; * : $p \leq 0,05$.

Endostatin (E), ein Inhibitor des Wnt/β-Catenin-Signalwegs, regulierte die Ptgs-2-Expression signifikant herunter. E-Zugabe zu den mechanisch-stimulierten Zellen führte zu keiner signifikanten Veränderung des mechanisch-induzierten Effekts. Die Expressions-erhöhung des Wnt/β-Catenin-Zielgens Ptgs-2 durch LiCl wurde durch Inhibition des Wnt/β-Catenin-Signalwegs mit E wie erwartet signifikant aufgehoben. Die Expressions-

erniedrigung, welche durch die Behandlung der Zellen mit LiCl in Kombination mit mechanischer Belastung vermittelt wurde, konnte durch E signifikant erhöht werden. Die durch E allein bzw. die durch E in Kombination mit LiCl induzierte Herunterregulation der Ptgs-2-Expression wurde durch zusätzliche mechanische Belastung signifikant aufgehoben.

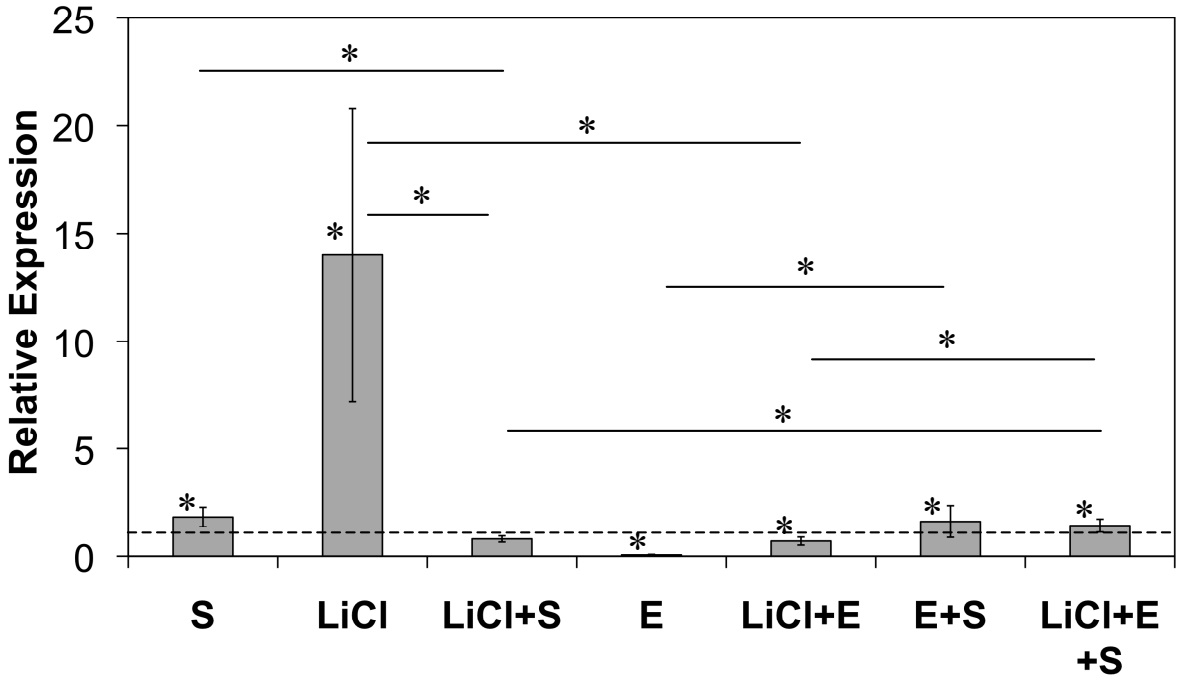


Abbildung 3.8

Quantitative Analyse der Ptgs-2-Expression unter Einfluss von Modulatoren des Wnt/β-Catenin-Signalwegs und mechanischer Belastung in MC3T3-E1-Zellen. Dargestellt ist die relative Ptgs-2-Expression ohne bzw. nach mechanische/r Stimulation (S) in Anwesenheit des Wnt/β-Catenin-Agonisten LiCl und des Wnt/β-Catenin-Antagonisten Endostatin (E). LiCl (10 mM) und E (0,5 μM) wurden 3 h bzw. 3,5 h vor der mechanischen Stimulation zu den Kontrollen und den mechanisch zu stimulierenden Zellen gegeben. Die mechanische Stimulation erfolgte über eine Dauer von 30 min, bei einer Frequenz von 1 Hz und einer Amplitude von 10.000 με. Die Genexpression wurde mittels *Real-Time* RT-PCR bestimmt. Zur Normalisierung wurde die Expression des *Housekeeping*-Gens Gapdh verwendet und anschließend der Quotient der Genexpression der stimulierten Probe und der unstimulierten Kontrolle gebildet (gestrichelte Kontrolllinie = 1). n=3-4; * : $p \leq 0,05$.

Die mit LiCl erhaltenen Ergebnisse (Abbildung 3.6) konnten zum Teil mit dem physiologischen Aktivator des Wnt/β-Catenin-Signalwegs, Wnt-3a (Wnt) und dem physiologischen Inhibitor Dkk-1 (Dkk) verifiziert werden (Abbildung 3.9). Während Wnt-3a-Zugabe zu einer signifikanten Hochregulation der Ptgs-2-Expression um das ca. 2,6-fache führte, hob Wnt-3a in Kombination mit mechanischer Belastung die erhöhte Ptgs-2-Expression signifikant auf. Die Behandlung der Zellen mit Dkk-1 ergab keine signifikante

Veränderung der Ptgs-2-Expression. Die durch Wnt-3a induzierte erhöhte Ptgs-2-Expression reduzierte sich wie erwartet durch Inhibition des Wnt/β-Catenin-Signalwegs mit Dkk-1 signifikant. Dkk-1-Zugabe und mechanische Stimulation führte zu einer leichten, aber signifikanten höheren Ptgs-2-Expression im Vergleich zur Hochregulation durch alleinige mechanische Belastung. Dieser stimulierende Effekt durch Dkk-1-Zugabe auf mechanische Belastung konnte auch in Anwesenheit von Wnt-3a beobachtet werden.

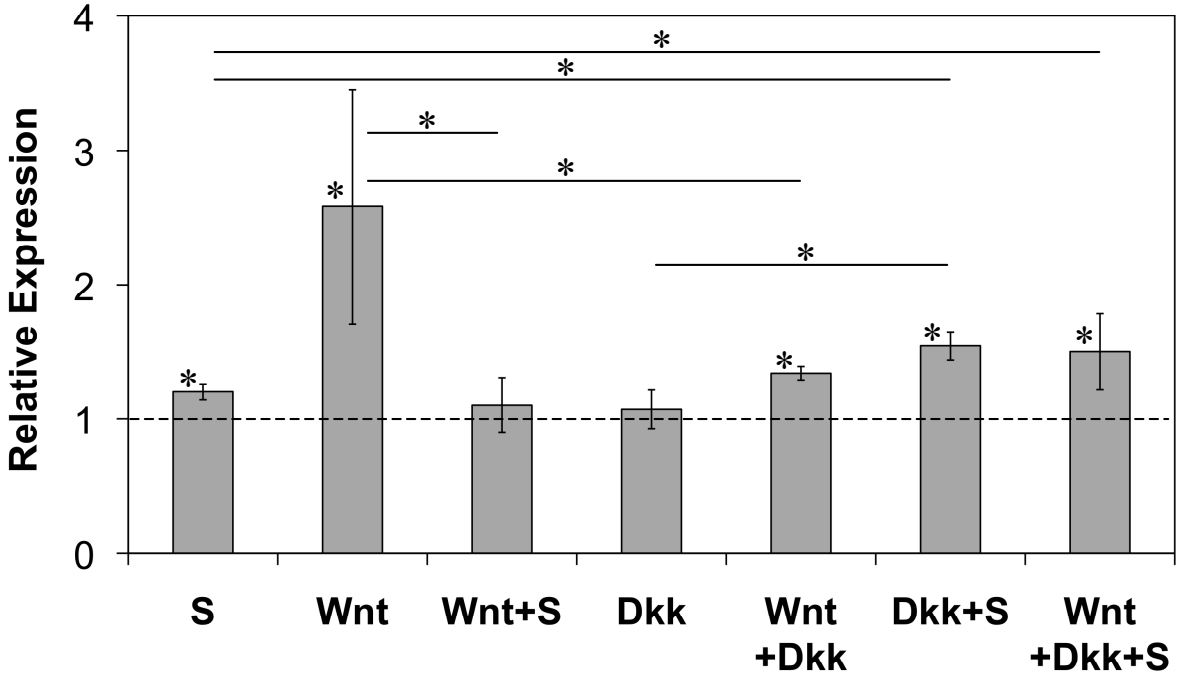


Abbildung 3.9

Quantitative Analyse der Ptgs-2-Expression unter Einfluss von Modulatoren des Wnt/β-Catenin-Signalwegs und mechanischer Belastung in MC3T3-E1-Zellen. Dargestellt ist die relative Ptgs-2-Expression nach bzw. ohne mechanische/r Stimulation (S) in Anwesenheit des physiologischen Wnt/β-Catenin-Agonisten Wnt-3a (Wnt) und des physiologischen Wnt/β-Catenin-Antagonisten Dkk-1 (Dkk). Wnt (3 nM) und Dkk (18 nM) wurden 3 h bzw. 3,5 h vor der mechanischen Stimulation zu den Kontrollen und den mechanisch zu stimulierenden Zellen gegeben. Die mechanische Stimulation erfolgte über eine Dauer von 30 min, bei einer Frequenz von 1 Hz und einer Amplitude von 10.000 με. Die Genexpression wurde mittels *Real-Time* RT-PCR bestimmt. Zur Normalisierung wurde die Expression des *Housekeeping*-Gens Gapdh verwendet und anschließend der Quotient der Genexpression der stimulierten Probe und der unstimulierten Kontrolle gebildet (gestrichelte Kontrolllinie = 1). n=3-4, * : $p \leq 0,05$.

3.2.5 Einfluss spezifischer Aktivatoren des ER- und des Wnt/β-Catenin-Signalwegs und mechanischer Stimulation auf die Expression weiterer am Knochenremodeling beteiligter Gene

Zur Identifikation weiterer über beide Signalwege und mechanische Belastung regulierter Gene wurden Mikroarray-Analysen mit mRNA aus mit E2 bzw. Wnt-3a behandelten

(un)belasteten MC3T3-E1-Zellen durchgeführt. Als Kontrolle wurde mRNA aus mit Vehikel behandelten und (un)belasteten Zellen eingesetzt.

Die Tabelle 3.3 fasst die mittels *Real-Time* RT-PCR verifizierten relativen Expressionen ausgewählter Zielgene zusammen, die eine wichtige Rolle im Knochenstoffwechsel spielen. Es zeigte sich, dass die Expression dieser Gene durch die Aktivierung des ER- bzw. des Wnt/β-Catenin-Signalwegs und zusätzliche mechanische Belastung differentiell reguliert werden.

Tabelle 3.3 Genexpressionsanalysen von MC3T3-E1-Zellen nach mechanischer Belastung (S) und Aktivierung des ER- oder des Wnt/β-Catenin-Signalwegs

Gensymbol	Name	Relative Genexpression nach		
		S	E2+S	Wnt-3a+S
Myc	*myelocytomatosis oncogene*	1,4	1,5	1
Lef-1	*lymphoid enhancer binding factor 1*	2,3	0,6	1,7
Ctnnb-1	*catenin (cadherin-associated protein), beta 1*	1,6	0,9	1,5
Fos	*FBJ osteosarcoma oncogene*	1,7	2,7	1,1
Jun	*jun oncogene*	1,6	1	1,6
Cebpb	*CCAAT/enhancer binding protein, beta*	1,4	0,8	1,8
Creb-1	*cAMP responsive element binding protein 1*	1,5	0,7	1,6
Nfil-3	*nuclear factor, interleukin 3, regulated*	2	4,4	1,3
Cyr-61	*cysteine rich protein 61*	1,6	1,2	1,4
Wisp-1	*wnt-1 inducible signaling pathway protein 1*	1,7	1,6	2
Il-6	*interleukin 6*	1,4	2,6	1,4
Tnfsf-11	*tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 11 (rankl)*	1,6	2,4	0,7
Tnfrsf-11b	*tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b (osteoprotegerin)*	1,5	1,3	1,1
Ibsp	*integrin-binding sialoprotein*	1,9	1,5	1,2
Alpl	*alkaline phosphatase, liver/bone/kidney*	1,5	0,6	1,2
Dmp-1	*dentin matrix protein 1*	1,6	1,1	2,3

Myc (*myelocytomatosis oncogene*), Lef-1 (*lymphoid enhancer binding factor 1*), Ctnnb-1 *(catenin (cadherin-associated protein), beta 1)*, Fos (*FBJ osteosarcoma oncogene*), Jun (*jun oncogene*), Cebpb (*CCAAT/enhancer binding protein, beta*), Creb-1 (*cAMP responsive element binding protein 1*) und Nfil-3 (*nuclear factor, interleukin 3, regulated*) sind Transkriptionsfaktoren. AP-1 (Fos/Jun), Cebpb und Creb-1 fungieren als funktionelle Transkriptionsfaktoren für die Hochregulation des Gens Ptgs-2 als Antwort auf mechanische Belastung. Die Gene Cyr-61 (*cysteine rich protein 61*), Wisp-1 (*wnt-1 inducible signaling pathway protein 1*), Il-6 (*interleukin 6*), Tnfsf-11 (*rankl*) und Tnfrsf-11b (*osteoprotegerin*) sind Modulatoren, die wichtig für die Funktion der Osteoblasten bzw. der Osteoklasten sind. Ibsp *(integrin-binding sialoprotein)*, Alpl *(alkaline phosphatase)* und Dmp-1 *(dentin matrix protein 1)* gehören zu den osteogenen Differenzierungsmarkern.

Eine Erhöhung des mechanischen Reizes durch E2 konnte am Beispiel der Fos-Expression gezeigt werden. Fos-Proteine dimerizieren mit Jun-Proteinen, um das Aktivator Protein-1 (AP-1) zu bilden. Das AP-1-Dimer Fos/Jun reguliert unterschiedliche Untergruppen von Zielgenen. Deren Genprodukte regulieren wiederum unterschiedliche Aspekte der Zellfunktion wie zum Beispiel Proliferation und osteogene Differenzierung. Es fiel weiterhin auf, dass die Expression des Transkriptionsfaktors Nfil-3 durch E2-Zugabe und mechanischer Stimulation hochreguliert wurde. Eine Sensibilisierung des mechanischen Effekts durch E2 zeigte sich auch für die beiden Regulatorgene der Osteoklastogenese Il-6 und Tnfsf-11 (Rankl). Rankl wird von Osteoblasten sezerniert, und fördert durch die Bindung an seinen Rezeptor Rank die Bildung und Differenzierung von Osteoklasten. Rankl kann durch das von Osteoblasten sezernierte Osteoprotegerin (Opg, Tnfrsf-11b) antagonisiert werden. Die mechanisch-induzierte Expressionserhöhung des Transkriptions-faktors des Wnt-Signalwegs Lef-1 wurde nach E2-Zugabe herunterreguliert. Nach Aktivierung des Wnt-Signalwegs reguliert Lef-1 zusammen mit Ctnnb-1, welches für β-Catenin kodiert, die Expression Wnt-sensitiver Gene im Zellkern. Die mechanisch-induzierte Expressionserhöhung von β-Catenin wurde ebenfalls durch E2 herunterreguliert. Eine Erhöhung des mechanischen Effekts durch Wnt-3a konnte zum Beispiel bei Dmp-1, welches das Dentin Matrixprotein 1 kodiert, festgestellt werden. Das mechanosensitive Dmp-1 wird hauptsächlich in Zellen von mineralisierenden Geweben, wie Osteoblasten, Osteozyten und hypertrophen Chondrozyten gebildet und spielt eine wesentliche Rolle als terminaler Osteoblastenmarker bei der Osteoblastenreifung und der Mineralisation.

3.2.6 Einfluss von E2 auf die Expression früh responsiver Gene nach mechanischer Stimulation unter hormonfreien Bedingungen

Um festzustellen, ob die mechanisch-induzierte Expression der früh responsiven Gene Ptgs-2 und Fos unter hormonfreien gegenüber nicht-hormonfreien Bedingungen in den MC3T3-E1- und C3H10T1/2-Zellen verändert ist, wurden folgende experimentelle Konditionen geändert:

48 Stunden vor der mechanischen Belastungsphase wurde das phenolrothaltige durch phenolrotfreies Expansionsmedium ersetzt. Statt dem üblichen fötalen bovinen Serum, das geringe Mengen an Hormonen enthalten kann, wurde 10%-iges kohlebehandeltes, hormonfreies Serum verwendet. 24 Stunden später wurde auf Medium mit 0,25%-igem bovinen Serumalbumin gewechselt, um serumfrei zu arbeiten.

Die mit dem hier beschriebenen Versuchsdesign erhaltenen Ergebnisse bezüglich der Ptgs-2-Expression in den MC3T3-E1-Zellen (Abbildung 3.10) unter Einfluss des ER-Signalwegaktivators E2 und mechanischer Belastung stehen im Einklang mit den Ergebnissen aus Kapitel 3.2.4. Zusätzlich wurde noch die Expression des früh responsiven Gens Fos untersucht. Hier hatte E2 einen mechanosensitivierenden Effekt auf die Fos-Expression.

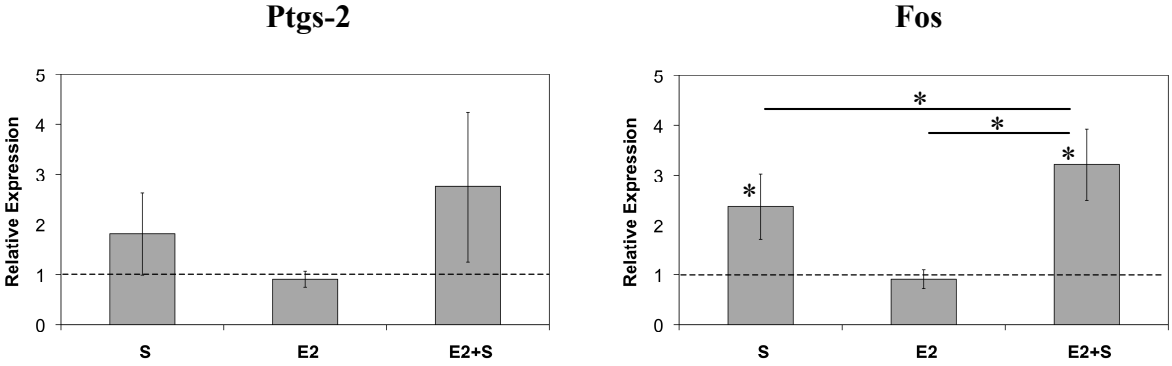


Abbildung 3.10

Quantitative Expressionsanalyse der Gene Ptgs-2 und Fos unter Einfluss des ER-Signalwegaktivators E2 und mechanischer Belastung in MC3T3-E1-Zellen. Dargestellt ist die relative Ptgs-2- und Fos-Expression ohne bzw. nach mechanische/r Stimulation (S) in Anwesenheit des ER-Agonisten E2 unter serumfreien Bedingungen. E2 (10 nM) wurde 3 h vor der mechanischen Stimulation zu den Kontrollen und den mechanisch zu stimulierenden Zellen gegeben. Die mechanische Stimulation erfolgte über eine Dauer von 30 min, bei einer Frequenz von 1 Hz und einer Amplitude von 10.000 με. Die Genexpression wurde mittels *Real-Time* RT-PCR bestimmt. Zur Normalisierung wurde die Expression des *Housekeeping*-Gens Gapdh verwendet und anschließend der Quotient der Genexpression der stimulierten Probe und der unstimulierten Kontrolle gebildet (gestrichelte Kontrolllinie = 1). n=3, * : $p \leq 0{,}05$.

In den C3H10T1/2-Zellen (Abbildung 3.11) wurde die Ptgs-2-Expression nach mechanischer Stimulation um das ca. 2-fache, die Fos-Expression um das ca. 4,7-fache erhöht. Durch die Zugabe von E2 wurde die mechanisch-induzierte Expressionserhöhung nicht signifikant verändert. Unter den gleichen Versuchsbedingungen konnte in diesen Zellen kein mechanosensibilisierender Effekt von E2 weder auf die Ptgs-2-Expression noch auf die Fos-Expression festgestellt werden.

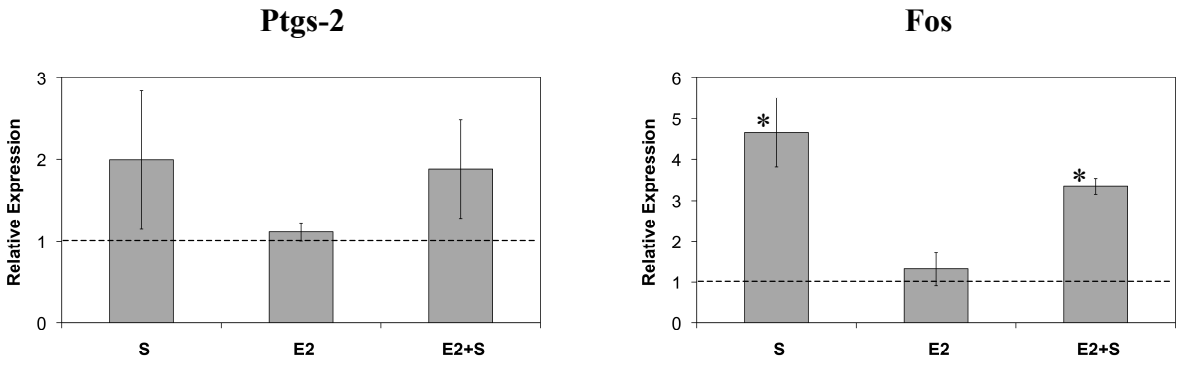


Abbildung 3.11

Quantitative Expressionsanalyse der Gene Ptgs-2 und Fos unter Einfluss des ER-Signalwegaktivators E2 und mechanischer Belastung in C3H10T1/2-Zellen. Dargestellt ist die relative Ptgs-2- und Fos-Expression ohne bzw. nach mechanische/r Stimulation (S) in Anwesenheit des ER-Agonisten E2 unter serumfreien Bedingungen. E2 (10 nM) wurde 3 h vor der mechanischen Stimulation zu den Kontrollen und den mechanisch zu stimulierenden Zellen gegeben. Die mechanische Stimulation erfolgte über eine Dauer von 30 min, bei einer Frequenz von 1 Hz und einer Amplitude von 10.000 με. Die Genexpression wurde mittels *Real-Time* RT-PCR bestimmt. Zur Normalisierung wurde die Expression des *Housekeeping*-Gens Gapdh verwendet und anschließend der Quotient der Genexpression der stimulierten Probe und der unstimulierten Kontrolle gebildet (gestrichelte Kontrolllinie = 1). n=3, * : $p \leq 0{,}05$.

3.2.7 Zusammenfassung der Ergebnisse

Wie erwartet erhöhte sich die Ptgs-2-Expression in den MC3T3-E1-Zellen durch mechanische Belastung signifikant. In den unstimulierten Zellkulturen veränderte die Behandlung der Zellen mit dem physiologischen ER-Signalwegaktivator E2 die Ptgs-2-Expression nicht signifikant. Jedoch führte E2-Zugabe zu den mechanisch-stimulierten Zellen zu einer deutlich erhöhten Ptgs-2-Expression und somit zu einer Mechanosensibilisierung der Zellen. Auch unter hormonfreien Bedingungen konnte ein mechanosensibilisierender Effekt durch E2-Zugabe auf die Expression früh responsiver Gene wie zum Beispiel Fos beobachtet werden. Durch die Zugabe von ICI 182,780, ein Inhibitor des ER-Signalwegs, oder des Proteinkinase A-Inhibitors H89 wurde der sensibilisierende Effekt von E2 auf die mechanisch-induzierte Ptgs-2-Expression in den MC3T3-E1-Zellen aufgehoben. Der mechanosensibilisierende Effekt beruht demnach auf der Interaktion des ER-Signalwegs mit mechanisch-induzierten Signalwegen. Erwartungsgemäß erhöhte die Zugabe der Wnt/β-Catenin-Signalwegaktivatoren LiCl oder Wnt-3a die Expression des Wnt/β-Catenin-Zielgens Ptgs-2. Eine zusätzliche mechanische Stimulation der mit LiCl bzw. Wnt-3a behandelten Zellen resultierte jedoch in einer signifikanten Herunterregulation der Ptgs-2-Expression. Die mit LiCl behandelten mechanisch-belasteten Zellen zeigten ausserdem eine Aufhebung des mechano-

sensitivierenden Effekts in Anwesenheit von E2. Die Inhibitoren des Wnt/β-Catenin-Signalwegs, Endostatin und Dkk-1, blockierten die Erniedrigung der Ptgs-2-Expression in den mit LiCl bzw. Wnt-3a behandelten mechanisch-stimulierten Zellen.
Weitere für das Knochenremodeling wichtige Zielgene zeigten eine differentielle Regulation ihrer Expression nach Aktivierung des ER- bzw. Wnt/β-Catenin-Signalwegs und mechanischer Stimulation.

3.3 Einfluss physiologischer Aktivatoren des ER- und des Wnt/β-Catenin-Signalwegs und mechanischer Stimulation auf die Cox-2-Proteinexpression und die β-Catenin-Aktivität

3.3.1 Einfluss von E2 bzw. Wnt-3a und mechanischer Stimulation auf die Cox-2-Proteinexpression in MC3T3-E1-Zellen

Um die quantitativ-ermittelte mRNA-Expression von Ptgs-2 (Cox-2) mit der Proteinexpression zu vergleichen, wurden Western-Blot-Analysen durchgeführt (Abbildung 3.12).
Als Kontrolle diente der Nachweis von β-Actin, um sicherzustellen, dass in jeder Probe die gleiche Menge an Gesamtprotein enthalten war. Durch die Zugabe der Aktivatoren des ER- und des Wnt/β-Catenin-Signalwegs und mechanischer Belastung konnten unterschiedlich starke Cox-2-Proteinexpressionen mittels Western-Blot detektiert werden.
Die mechanisch-stimulierten unbehandelten MC3T3-E1-Zellen (S) zeigten wie erwartet eine stärkere Cox-2-Proteinexpression im Vergleich zu den unstimulierten unbehandelten Kontrollzellen (K). Die Aktivierung des ER-Signalwegs durch E2-Behandlung der Zellen führte zu keiner stärkeren Cox-2-Proteinexpression im Vergleich zu den Kontrollzellen (K). Die Cox-2-Proteinexpression wurde durch E2 und zusätzliche mechanische Belastung (E2+S) verstärkt im Vergleich zur Cox-2-Proteinexpression der unbehandelten (K), nur mechanisch-stimulierten (S) oder nur mit E2 inkubierten (E2) Zellen. Eine Zugabe von Wnt-3a resultierte in einer stärkeren Expression des Proteins Cox-2 im Vergleich zur Cox-2-Proteinexpression der Kontrollzellen (K). Eine zusätzliche mechanische Belastung (Wnt-3a+S) führte zu einer deutlich schwächeren Cox-2-Proteinexpression im Vergleich zur Cox-2-Proteinexpression der Zellen, die nicht stimuliert (K), nur mechanisch-stimuliert (S) oder nur mit Wnt-3a inkubiert wurden.

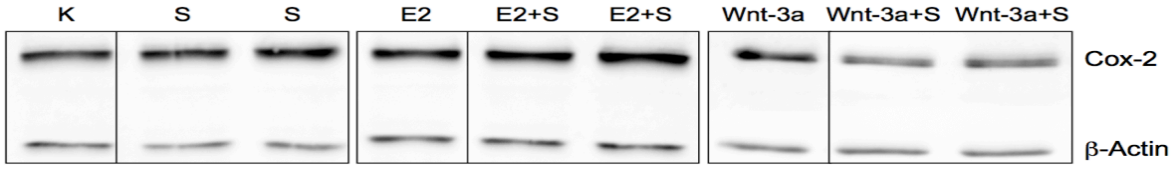


Abbildung 3.12

Semiquantitativer Nachweis der Cox-2-Proteinexpression von MC3T3-E1-Zellen mittels Western-Blot. Dargestellt ist die Proteinexpression von Cox-2 (ca. 70 kDa) ohne und nach mechanische/r Belastung (S; 1,5 h, 1 Hz, 10.000 με) in Anwesenheit von E2 (10 nM) und Wnt-3a (3 nM); β-Actin (45 kDa) wurde als *Housekeeping*-Gen verwendet.

3.3.2 Einfluss von E2 bzw. Wnt-3a und mechanischer Stimulation auf die β-Catenin-Aktivität in MC3T3-E1-Zellen

Zum Nachweis inwiefern die Aktivierung des ER-, des Wnt/β-Catenin-Signalwegs und mechanische Stimulation mit der Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung von β-Catenin zusammenhängt wurden weitere Western-Blot-Analysen durchgeführt. Die Phosphorylierung von β-Catenin wurde mit dem Anti-Phospho-β-Catenin-Antikörper, der phosphoryliertes (inaktives) β-Catenin detektiert, untersucht. Die Dephosphorylierung von β-Catenin wurde mit einem Anti-*Active*-β-Catenin-Antikörper nachgewiesen, der aktives β-Catenin detektiert. Die ermittelte β-Catenin-Proteinaktivität nach Zugabe der Modulatoren E2, Wnt-3a und nach mechanischer Belastung ist in der Abbildung 3.13 dargestellt.

Mechanische Stimulation (S) führte zu einer Abnahme an phosphoryliertem (Phospho-) β-Catenin im Vergleich zu den Kontrollzellen (K). Durch die Zugabe der Signalwegaktivatoren E2 bzw. Wnt-3a wurde der ER- bzw. Wnt/β-Catenin-Signalweg aktiviert, wodurch die Höhe an Phospho-β-Catenin ebenfalls verringert wurde. Die gleichzeitige Zugabe beider Signalwegaktivatoren (E2+Wnt) führte zu einer Abnahme an Phospho-β-Catenin im Vergleich zu den Kontrollzellen (K) und den mechanisch-stimulierten Zellen (S) ohne Aktivatoren. Durch Kombination der Aktivatoren mit mechanischer Belastung (Wnt+S; E2+Wnt+S) nahm die Höhe an Phospho-β-Catenin noch stärker ab.

Wie erwartet führte mechanische Belastung (S) zu einem Anstieg an aktivem β-Catenin im Vergleich zu den Kontrollzellen (K). Auch die Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signaltransduktionswegs durch Wnt-3a-Zugabe hatte eine Erhöhung von aktivem β-Catenin zur Folge. Der Anstieg an aktivem β-Catenin in den mechanisch-stimulierten Zellen wurde durch Wnt-3a-Zugabe (Wnt+S) noch verstärkt. Die gleichzeitige Behandlung

der Zellen mit E2 und Wnt-3a (E2+Wnt) ging mit einer Erhöhung an aktivem β-Catenin einher, die durch Kombination mit mechanischer Belastung (E2+Wnt+S) allerdings nicht verstärkt wurde.

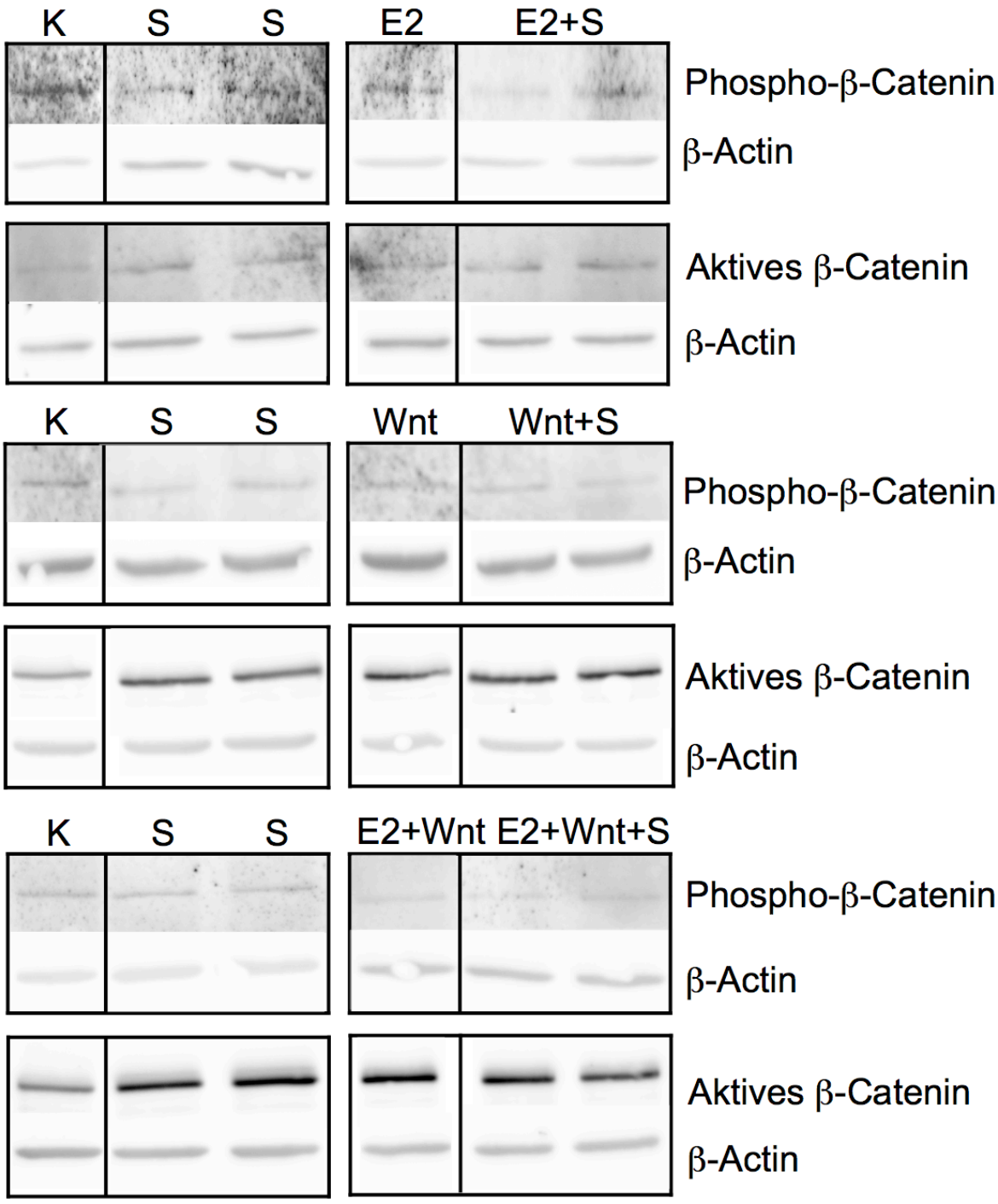


Abbildung 3.13

Semiquantitativer Nachweis der β-Catenin-Aktivität von MC3T3-E1-Zellen mittels Western-Blot. Dargestellt ist phosphoryliertes (inaktives) und nicht-phosphoryliertes (aktives) β-Catenin (92 kDa) ohne bzw. nach mechanische/r Belastung (S; 1,5 h, 1 Hz, 10.000 με.) in Anwesenheit von E2 (10 nM) und Wnt-3a (3 nM); β-Actin (45 kDa) diente als *Housekeeping*-Gen.

3.3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

Mittels Western-Blot konnten die *Real-Time* RT-PCR-Expressionen des Gens Ptgs-2 (Cox-2) auf Proteinebene verifiziert werden. Durch mechanische Belastung, Aktivierung des ER- und/oder des Wnt/β-Catenin-Signalwegs nahm die Höhe an phosphoryliertem (inaktivem) β-Catenin ab. Durch zusätzliche mechanische Stimulation der mit Wnt-3a bzw. mit beiden Aktivatoren behandelten Zellen wurde noch weniger Phospho-β-Catenin detektiert. Die Applikation mechanischer Belastung, Wnt-3a allein bzw. in Kombination mit E2 hatte einen Anstieg an aktivem β-Catenin zur Folge. Der mechanisch-induzierte Anstieg an aktivem β-Catenin wurde durch Zugabe von Wnt-3a noch verstärkt.

3.4 Weitere Untersuchungen an primären osteoblastären Zellen aus Mauskalvarien, C3H10T1/2- und MC3T3-E1-Zellen zum ER- und Wnt/β-Catenin-Signalweg

3.4.1 Esr-1- und Ctnnb-1-Expression

Um die Expression der Gene Esr-1 und Ctnnb-1 in den murinen primären osteoblastären und in den mesenchymalen Zellen näher zu untersuchen, wurde nach Aufbereitung der RNA sowie reverser Transkription eine semiquantitative Standard-PCR durchgeführt. Das Gelelektrophoresebild (Abbildung 3.14a) zeigt die Expression der Gene Esr-1 und Ctnnb-1 in den Zellen.

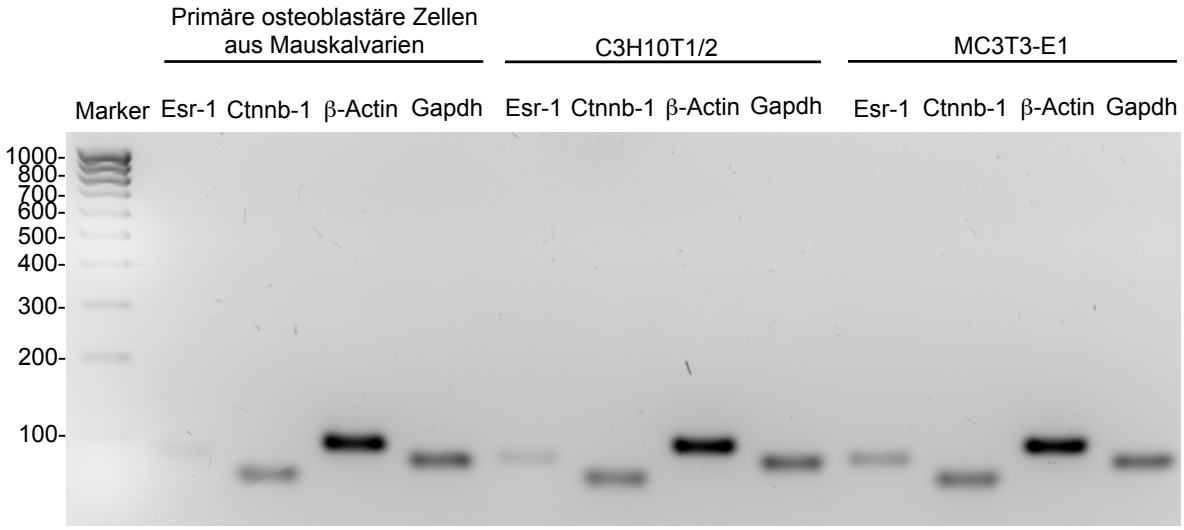


Abbildung 3.14a

Semiquantitative Expressionsanalyse der Gene Esr-1 und Ctnnb-1 in primären osteoblastären Zellen aus Mauskalvarien, C3H10T1/2- und MC3T3-E1-Zellen. Nach Isolierung der mRNA des 5. Kultivier-

ungstags und Synthese der cDNA wurde eine Standard-PCR durchgeführt. Für die Amplifikation wurden die spezifischen Primer Esr-1 und Ctnnb-1 eingesetzt. β-Actin und Gapdh dienten als *Housekeeping*-Gene. Größe der Amplifikationsprodukte: 84 kb, 68 kb, 98 kb, 81 kb.

Mittels *Real-Time* RT-PCR-Analyse (Abbildung 3.14b) konnte die Expression quantifiziert werden. Das Gen Esr-1 wurde in den MC3T3-E1-Zellen signifikant höher als in den C3H10T1/2-Zellen bzw. tendenziell höher als in den primären osteoblastären Zellen aus Mauskalvarien exprimiert. Die Expression des Gens Ctnnb-1 war in den MC3T3-E1-Zellen signifikant niedriger als in den primären osteoblastären Zellen aus Mauskalvarien und den C3H10T1/2-Zellen.

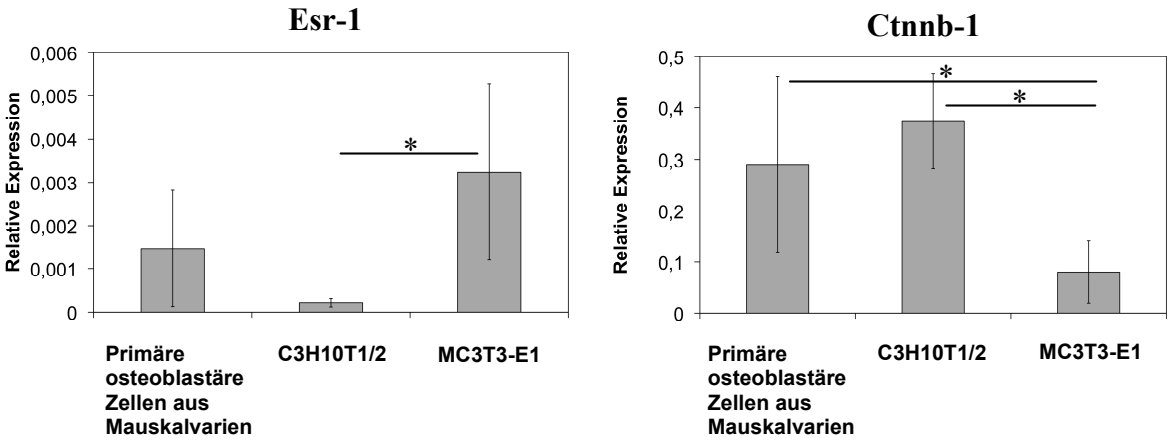


Abbildung 3.14b

Quantitative Expressionsanalyse der Gene Esr-1 und Ctnnb-1 in primären osteoblastären Zellen aus Mauskalvarien, C3H10T1/2- und MC3T3-E1-Zellen. Die Zellen wurden für 5 Tage im Expansionsmedium kultiviert. Die Genexpression wurde mittels *Real-Time* RT-PCR bestimmt. Zur Normalisierung wurde die Expression des *Housekeeping*-Gens Gapdh verwendet. n= 4, * : $p \leq 0,05$.

3.4.2 Einfluss von Wnt-3a und mechanischer Stimulation auf TopFlash-transfizierte MC3T3-E1-Zellen

Um den Effekt mechanischer Belastung auf die Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signalwegs auf Transkriptionsebene zu untersuchen, wurden MC3T3-E1-Zellen mit dem Wnt-induzierbaren Tcf-Luciferase-Reporterkonstrukt TopFlash transfiziert, mit Wnt-3a behandelt und mechanisch-stimuliert (Abbildung 3.15).

Der TopFlash-Vektor enthält vor einem c-Fos-Minimalpromotor drei Kopien einer Tcf-Bindungsstelle für den über den Wnt/β-Catenin-Signalweg aktivierbaren Transkriptionsfaktor Tcf. Durch Bindung des Transkriptionsfaktors an die entsprechende Bindungsstelle in der Promotorregion im Reportervektor wird das nachgeschaltete Reportergen

(Luciferase) aktiviert. Dessen Aktivität, und somit die Aktivität des Wnt/β-Catenin-Signalwegs, lässt sich aufgrund der Luciferase-Lumineszenz messen. Als Negativkontrolle diente der FopFlash-Vektor, ein Luciferase-gekoppeltes Reporterkonstrukt mit mutierten, inaktiven Tcf-Bindungsstellen, an die Tcf nicht binden kann.

Die TopFlash-transfizierten Zellen zeigten nach mechanischer Belastung eine signifikante Erhöhung der Reportergenaktivität. Die Tcf-vermittelte Transkription des Luciferasegens war ebenfalls in den Wnt-3a-behandelten TopFlash-transfizierten Zellen signifikant um das ca. 1,7-fache erhöht. Zellen, die mit den mutierten Reporterkonstrukt FopFlash transfiziert worden waren, zeigten erwartungsgemäß nach Wnt-3a-Zugabe keine erhöhte Luciferase-aktivität und damit keine gesteigerte Transkription von Zielgenen des Wnt/β-Catenin-Signalwegs. Die durch Wnt-3a induzierte Proteinaktivität konnte durch Applikation mechanischer Belastung signifikant aufgehoben werden.

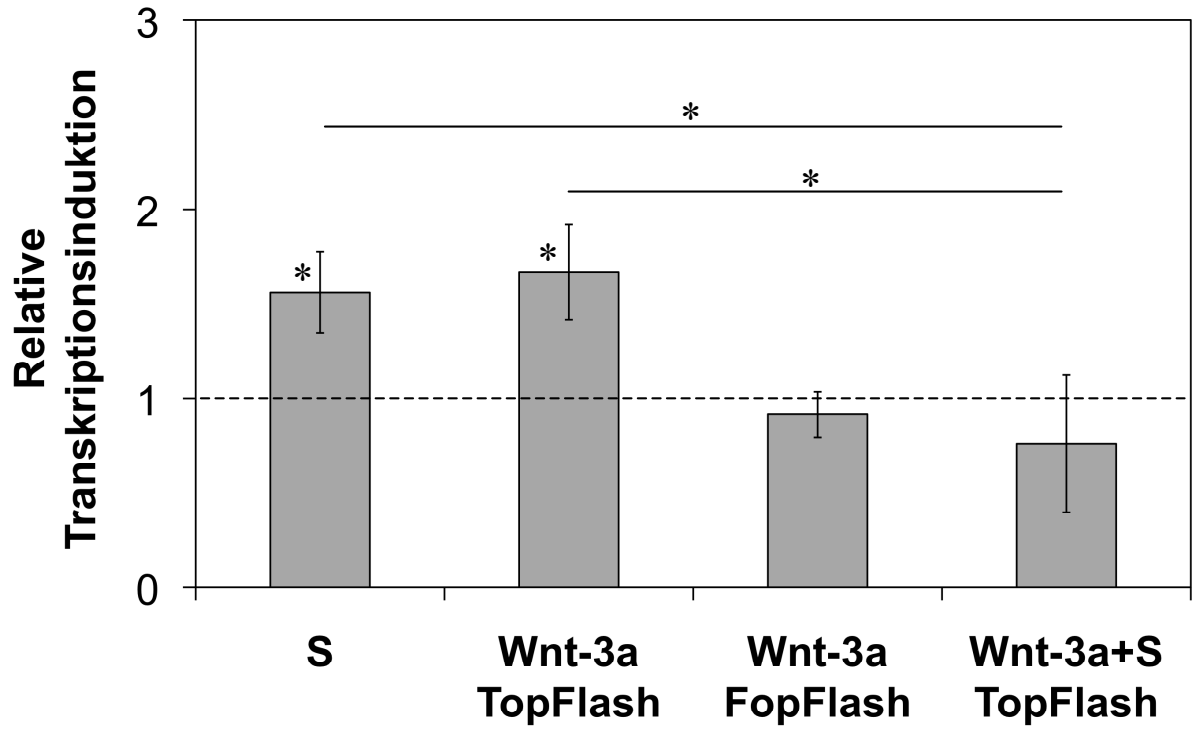


Abbildung 3.15

Quantitative Analyse der Tcf-vermittelten Luciferasetranskription. TopFlash-transfizierte MC3T3-E1-Zellen wurden am Tag 5 der Kultivierung 3 h mit Wnt-3a inkubiert und anschließend mechanisch-stimuliert (S; 1,5 h, 1 Hz, 10.000 με). Die Firefly-Luciferaseaktivität wurde auf die Renilla-Luciferaseaktivität normalisiert und anschließend der Quotient der stimulierten Probe und der unstimulierten Kontrolle gebildet (gestrichelte Kontrolllinie = 1). Der FopFlash-Vektor mit mutierten Tcf-Bindungsstellen wurde als Negativkontrolle verwendet. n=3-4, * : $p \leq 0{,}05$.

3.4.3 Einfluss von E2 und Wnt-3a auf die Lokalisation von ERα und β-Catenin im Nukleus von MC3T3-E1-Zellen

Für eine funktionelle Interaktion zwischen zwei Proteinen ist es notwendig, dass sich beide Proteine im selben subzellulären Kompartiment aufhalten. Der Nachweis der Lokalisation von ERα und β-Catenin erfolgte nach Zugabe von E2 und Wnt-3a in den MC3T3-E1-Zellkulturen über indirekte Doppel-Immunfluoreszenz (Abbildung 3.16).

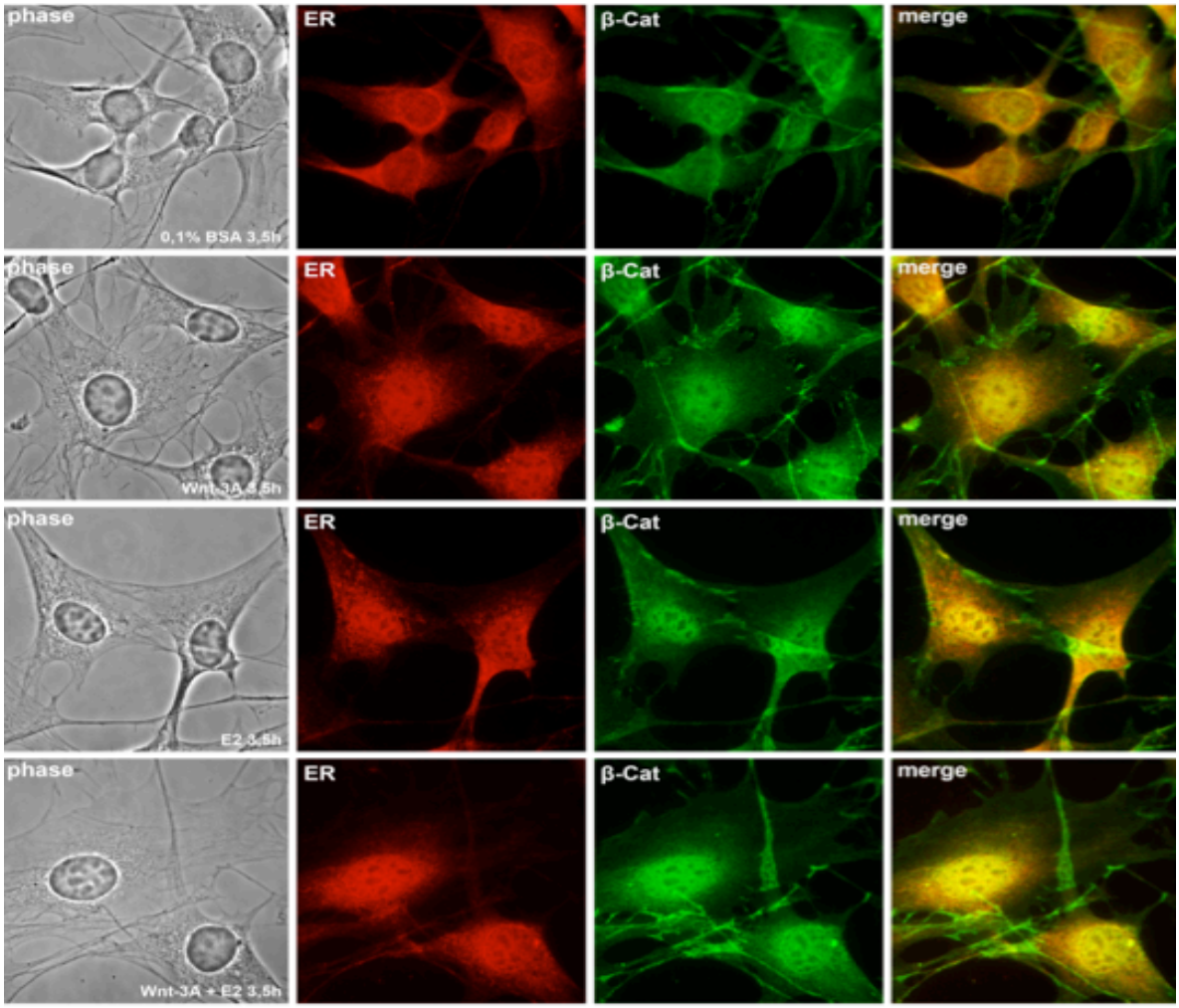


Abbildung 3.16

Immunhistologischer Nachweis der Lokalisation von ERα und β-Catenin im Nukleus von MC3T3-E1-Zellen nach Stimulation mit Wnt-3a und E2. Die Immunfluoreszenz wurde nach 3,5-stündiger Stimulation mit Wnt-3a (3 nM) und/oder E2 (10 nM) durchgeführt. Das konfokalmikroskopische Bild zeigte, dass ERα und β-Catenin unstimuliert hauptsächlich perinukleär lokalisiert waren. ERα und β-Catenin zeigten bei Stimulation entweder mit Wnt-3a, E2 oder mit beiden Aktivatoren gleichzeitig eine nukleäre Verteilung. *Merge* stellt eine Überlagerung der Aufnahmen dar.

Die Translokation von ERα und β-Catenin aus dem Zytoplasma in den Zellkern konnte sowohl nach Aktivierung des ER-Signalwegs mit E2 als auch nach Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signalwegs mit Wnt-3a oder nach gleichzeitger Aktivierung beider Signalwege gezeigt werden. Das vorwiegend perinukleäre Fluoreszenzsignal von ERα und β-Catenin in den Kontrollen wurde infolge der 3,5-stündigen Stimulation mit den Aktivatoren zu einer hauptsächlich nukleären Fluoreszenz, was durch Überlagerung der Einzel-fluoreszenzen in besonderem Maße deutlich wurde.

3.4.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Beim Vergleich der primären osteoblastären Zellen aus Mauskalvarien, C3H10T1/2- und MC3T3-E1-Zellen wurde eine differentielle Esr-1- und Ctnnb-1-Expression festgestellt. Interessanterweise war in den MC3T3-E1-Zellen die Expression des Gens Esr-1 höher und die des Gens Ctnnb-1 signifikant niedriger als in den primären osteoblastären Zellen aus Mauskalvarien und den C3H10T1/2-Zellen.

TopFlash-transfizierte MC3T3-E1-Zellen wiesen eine verstärkte Aktivierung der Tcf-vermittelten Transkription nach mechanischer Belastung bzw. nach Wnt-3a-Zugabe ohne Belastung auf. Diese Wnt-3a-induzierte Erhöhung der Transkriptionsinduktion wurde durch Applikation mechanischer Belastung aufgehoben.

Immunhistologisch konnte die Kolokalisation von ERα und β-Catenin im Nukleus von MC3T3-E1-Zellen nach Behandlung entweder mit E2 bzw. Wnt-3a oder beiden Signalwegaktivatoren gleichzeitig nachgewiesen werden.

4. Diskussion

4.1. Differenzierung und mechanische Stimulation primärer osteoblastärer Zellen

4.1.1. Expression von mit dem ER- und dem Wnt/β-Catenin-Signalweg assoziierten Genen im Kultivierungsverlauf

In der vorliegenden Arbeit wurden primäre osteoblastäre Zellen aus Mauskalvarien im Kulturmedium mit Zusatz von Ascorbat-2-Phosphat und β-Glycerophosphat osteogen über eine Kultivierungsdauer von 28 Tagen differenziert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Differenzierung wurde die Veränderung der relativen Expression von mit dem ER- und dem Wnt/β-Catenin-Signalweg assoziierten Genen mittels Mikroarray-Analyse (Tabelle 3.1.) untersucht und mittels quantitativer *Real-Time* RT-PCR (Tabelle 3.1 und Abbildung 3.1) verifiziert.

Die Expression des Protoonkogens Fos war am Tag 28 der Differenzierung im Vergleich zu Tag 5 kaum verändert. Eine gleichbleibende Fos-Expression weist daraufhin, dass Fos für die Proliferation und die Differenzierung der Osteoblasten wichtig ist. Ein Fos-Defizienz hatte eine Abnahme der Osteoblastendifferenzierung zur Folge [37], eine Fos-Überexpression führte zu Osteosarkombildung [70].

Die alkalische Phosphatase (Alpl), ein Schlüsselenzym bei der Knochenmineralization, zeigte eine signifikant zunehmende erhöhte Expression im Verlauf der Kultivierung. Dies läßt auf differenziertere Zellen am Tag 28 der Differenzierung im Vergleich zum Tag 5 schließen. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit anderen Studien [10, 16, 70, 181], in denen von einem Anstieg der Alpl-Expression während der Differenzierung osteoblastärer Zellen berichtet wurde.

Die Ptgs-2-Expression verminderte sich bei Differenzierung der Zellen signifikant. Ptgs-2, kodiert die Cyclooxygenase-2 (Cox-2), ein Enzym, das die Oxidation von Arachidonsäure zu Prostaglandin (PG) H2 katalysiert. Prostaglandine spielen als Mediatoren im Knochenremodeling eine wichtige Rolle, da sie sowohl die Knochenbildung als auch die Knochenresorption regulieren [62]. In einer Studie von Yoshida et al. [174] wurde beschrieben, dass eine durch Cox-2 erhöhte PGE2-Produktion die Differenzierung von osteoblastären Zellen inhibieren kann. Eine Herunterregulation der Ptgs-2-Expression in differenzierteren osteoblastären Zellen erscheint somit als physiologisch sinnvoll.

Die Expression des Gens Tnfrsf-11b, welches das Protein Osteoprotegerin (Opg), ein Schlüsselfaktor der Osteoklastenregulation kodiert, nahm über den gesamten

Kultivierungsverlauf hinweg signifikant zu. Dies steht im Einklang mit einer Studie von Thomas et al. [160], in der beschrieben wurde, dass die Opg-mRNA-Expression während der Matrixproduktion und der Reifung anstieg und in der Mineralisationsphase erhöht blieb. Dies lässt darauf schließen, dass Opg auch für die Regulation der Osteoblasten-differenzierung und der terminalen Reifung wichtig sein kann. Opg-defiziente Mäuse entwickelten eine schwere Osteoporose [23], wohingegen Opg-Überexpression zu Osteopetrose und einer niedrigen Osteoklastenanzahl führte [124], sowie zu einer Förderung der präosteoblastäre Differenzierung zu reifen Osteoblasten [175]. In Opg-exprimierenden Zellen war die Alpl-Expression signifikant höher, was darauf hinweist, dass Opg auch eine Rolle bei der Matrixreifung in Präosteoblasten spielt [175].

Die Expression des *gap junction* Gens Gja-1 (Connexin-43) war nur am Tag 7 der Kultivierung erhöht. Im weiteren Differenzierungsverlauf unterschied sie sich nicht mehr von der Expression der weniger differenzierten Zellen am Tag 5. Dies lässt vermuten, dass Connexin-43 für die osteoblastäre Reifung wichtig ist. Eine Defizienz führte zu einer beeinträchtigten intramembranösen Knochenbildung und einer geringeren Expression an osteoblastären Markergenen, wie zum Beispiel Type I Kollagen, Osteopontin und Osteokalzin [95].

Die Expression des am Wnt/β-Catenin-Signalweg beteiligten Gens Ctnnb-1 (β-Catenin) war am Tag 28 tendenziell niedriger als am Tag 7. Dies lässt einen Einfluss des Wnt/β-Catenin-Signalwegs insbesondere zu Beginn des Reifungsprozesses der osteoblastären Zellen vermuten. Hill und Day et al. [35, 63] postulieren, dass die quantitative Veränderung von β-Catenin in osteoblastären Vorläuferzellen als eine Art molekularer Schalter für die osteogene Weiterentwicklung dient. Während der verschiedenen Phasen der Osteoblastendifferenzierung wird die β-Catenin-Expression in den Zellen streng reguliert [38]. Eine besonders hohe Wnt/β-Catenin-Signalwegaktivität ist für die Initiation der Osteoblastendifferenzierung wichtig. Dieser Befund wird dadurch bestätigt, dass durch die Überexpression von β-Catenin der frühe osteoblastäre Differenzierungsmarker Alpl in mesenchymalen Stammzellen induziert wurde [81, 134]. Die Wnt/β-Catenin-Aktivierung ist somit entscheidend für die Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen zu Osteoblasten (frühe Differenzierung) [13, 55]. Eine Herunterregulation des Wnt/β-Catenin-Signalwegs wird für die Induktion der terminalen Osteoblastendifferenzierung und Matrixmineralisation benötigt [6, 17].

Die Esr-1 (ERα)-Expression war in den differenzierteren Zellen am Tag 21 signifikant höher im Vergleich zu den weniger differenzierten Zellen am Tag 7 und 14. Die Esr-2

(ERβ)-Expression veränderte sich im Verlauf der Kultivierung nicht signifikant. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit einer Studie von Wiren et al. [171]. Die Autoren beschrieben, dass die ERα-Expression von in Differenzierungsmedium kultivierten Osteoblastenkulturen aus Rattenkalvarien während der Matrixreifung anstieg und während der Mineralisation wieder abnahm. Die ERβ-Expression wurde im Verlauf der Differenzierung relativ konstant exprimiert. Eine Studie von Arts et al. [9]. zeigte gegenüber der vorliegenden Arbeit Unterschiede im Expressionsverlauf von ERβ. Hier wurde in Dexamethason-behandelten immortalisierten humanen osteoblastären Kulturen eine Erhöhung der ERβ-Expression über eine Kultivierungsdauer von bis zu 21 Tagen festgestellt. Die Unterschiede können durch die Verwendung unterschiedlicher Zellmodelle, das Alter der Osteoblastenspender oder eine unterschiedliche Behandlung der Zellen, um die Differenzierung zu induzieren, erklärt werden. Eine Überexpression von ERα und ERβ führte zu einer Induktion der Osteoblastendifferenzierung und bestätigt einen Einfluss dieser Moleküle auf die Differenzierung [92].

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die steigende Expression des Gens Alpl darauf hinweist, dass über die Kultivierungsdauer eine Differenzierung der murinen primären osteoblastären Zellen stattgefunden hat. Da die Expression des Schlüsselenzyms der PG-Synthese, Cox-2, im Verlauf der Differenzierung stetig abnahm, kann vermutet werden, dass eine erhöhte PG-Produktion auf die Differenzierung hemmend wirkt. Die über den Differenzierungsverlauf hinweg ansteigende Opg-Expression weist daraufhin, dass Opg für die präosteoblastäre Differenzierung und die terminale Reifung wichtig ist. Die gleichbleibende Expression der Gene Fos und Gja-1 lässt annehmen, dass diese Gene für die Proliferation und die Reifung des Osteoblasten wichtig sind. Die tendenziell abnehmende Expression von β-Catenin über den Differenzierungsverlauf hinweg zeigt, dass der Wnt/β-Catenin-Signalweg insbesondere für die frühe Zelldifferenzierung entscheidend zu sein scheint. Die Östrogenrezeptoren ERα und ERβ wurden differentiell während der Differenzierung exprimiert. Die deutlich höhere ERα-Expression in differenzierteren Zellen weist auf eine Rolle von ERα während der Matrixreifung hin. Die gleichbleibend erhöhte ERβ-Expression zeigt eine Beteiligung von ERβ am osteoblastären Reifungsprozess.

4.1.2 Expression von über den ER- und den Wnt/β-Catenin-Signalweg regulierten Genen nach mechanischer Stimulation

Der mechanische Stimulus ist ein wichtiger Faktor für den Erhalt der Knochenmasse. Mechanische Stimulation von Zellen beeinflusst ihre Proliferation, Differenzierung und Orientierung [71]. Die entscheidenden Prozesse dafür sind die Mechanorezeption, die Mechanotransduktion und die daraus resultierende Expressionsveränderungen bestimmter Gene der Zellen.

Um den Einfluss mechanischer Belastung auf die Expression von über den ER- und den Wnt/β-Catenin-Signalweg regulierten Genen zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Differenzierung zu analysieren, wurden die osteoblastären Zellen in Silikonschalen ausgesät, mit Ascorbat-2-Phosphat und β-Glycerophosphat osteogen differenziert und am Tag 5, 7, 14, 21 und 28 der Kultivierung einmalig für 30 min, mit 1% und 1 Hz mechanisch stimuliert. In der vorliegenden Arbeit wurde der Schwerpunkt auf die Veränderung der relativen Expression der früh responsiven Gene Fos, Ptgs-2 und Tnfrsf-11b gelegt.

Die Expression des Protoonkogens Fos konnte als interne Kontrolle zur Validierung des Stimulationsmodells verwendet werden, da die Expressionserhöhung des Gens Fos in osteoblastären Zellen nach mechanischer Stimulation bereits in verschiedenen Studien festgestellt wurde [94, 129].

Mittels Mikroarray-Analyse (Tabelle 3.2) und *Real-Time* RT-PCR (Tabelle 3.2, Abbildung 3.2) konnte am Tag 28 der Differenzierung im Vergleich zu Tag 5 nach mechanischer Stimulation eine höhere Fos- und Ptgs-2-Expression festgestellt werden. Dies deutet daraufhin, dass reifere im Vergleich zu jüngeren Osteoblasten sensitiver auf mechanische Belastung reagieren. Dies steht im Einklang mit einer Studie von Mikuni-Takagaki et al. [113], die zeigte, dass verschiedene Knochenzellpopulationen unterschiedlich auf mechanische Belastung reagieren.

In den weniger differenzierten Zellen am Tag 5 konnte nach mechanischer Stimulation eine erhöhte Expression des Gens Tnfrsf-11b (Opg) festgestellt werden. Saunders et al. [143] berichteten von einer signifikant erhöhten Opg-Expression relativ zur Rankl-Expression in humanen Osteoblasten durch eine 2-stündige mechanische Belastung und eine anschließende einstündige Inkubationszeit. Kadow-Romacker et al. [79] hingegen konnten eine Erniedrigung der Opg-Expression nach 5-minütiger Stimulation von osteoblastären Zellen beobachten. Im Vergleich zur Expressionserhöhung am Tag 5 waren die Tnfrsf-11b-Expressionen am Tag 14, 21 und 28 signifikant niedriger. Eine andere

Arbeitsgruppe [176] untersuchte ebenfalls den Zusammenhang zwischen dem Differenzierungszustand der Zelle und der Induzierbarkeit von Tnfrsf-11b nach mechanischer Stimulation. Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit stellte sie unter Bedingungen, welche die osteogene Differenzierung induzieren, eine erhöhte Opg-Expression nach mechanischer Belastung fest. Allerdings wurden andere Zellen (C2C12-Mausmyoblasten) untersucht und ein anderes Stimulationsdesign (24 h, 48 h, 10%, 0,5 Hz) gewählt.

Abschließend bleibt festzuhalten, dass die Fos- und die Ptgs-2-Expression nach mechanischer Stimulation in den differenzierteren stimulierten Zellen am Tag 28 im Vergleich zu den weniger differenzierten stimulierten Zellen am Tag 5 erhöht war, was auf eine höhere Mechanosensitivität reiferer Zellen hinweist. Die Tnfrsf-11b-Expression war in den weniger differenzierten stimulierten Zellen erhöht und in den differenzierteren stimulierten Zellen erniedrigt. Dies lässt vermuten, dass die Expression der über den ER- und den Wnt/β-Catenin-Signalweg regulierten Gene Fos, Ptgs-2 und Tnfrsf-11b mittels mechanischer Stimulation in Abhängigkeit vom Differenzierungszustand der Zelle unterschiedlich reguliert wird.

4.2 Einfluss von Modulatoren des ER- und des Wnt/β-Catenin-Signalwegs und mechanischer Stimulation auf die Expression früh responsiver Gene

4.2.1 Einfluss spezifischer Aktivatoren des ER- und des Wnt/β-Catenin-Signalwegs und mechanischer Stimulation auf die Ptgs-2-Expression

Um den Einfluss der Interaktion des ER- und des Wnt/β-Catenin-Signalwegs auf die Regulation der frühen Zellantwort auf mechanische Belastung zu untersuchen, wurden primäre osteoblastäre Zellen aus Mauskalvarien, murine mesenchymale C3H10T1/2-Zellen und murine präosteoblastäre MC3T3-E1-Zellen mit Signalwegaktivatoren inkubiert und anschließend mechanisch stimuliert. Als *Read-out* wurde die relative Expression des früh responsiven Gens Ptgs-2 gewählt, da es sowohl über den Wnt/β-Catenin-Signalweg induzierbar ist [56] als auch durch E2 über den ER-Signalweg hochreguliert werden kann [155].

Als Aktivator des ER-Signalwegs wurde 17-β-Östradiol (E2) eingesetzt. E2 ist ein physiologisches Östrogen, dass mit höher Affinität an Östrogenrezeptoren auf sowohl osteoblastären als auch osteoklastären Zellen bindet und direkt auf den Knochen wirkt [159].

In den primären osteoblastären Zellen aus Mauskalvarien, den MC3T3-E1- und in den C3H10T1/2-Zellen konnte nach 1%-iger mechanischer Belastung eine erhöhte Ptgs-2-Expression festgestellt werden (Abbildung 3.3, 3.5, 3.6). Dieses Ergebnis steht im Einklang mit Studien [77, 82, 128], in denen beschrieben wurde, dass die Applikation von Dehnung auf Osteozyten und Osteoblasten die Expression früh responsiver Gene, einschließlich der Transkriptionsfaktoren Fos und Ptgs-2, induziert. Ogasawara et al. [122] stellten außerdem eine zeitabhängige Induktion der Cox-2-mRNA-Expression in MC3T3-E1-Zellen fest. Weiterhin wiesen sie daraufhin, dass die Hochregulation der Cox-2-mRNA-Expression auch von der Stärke der mechanischen Belastung abhing.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass E2-Zugabe zu den primären osteoblastären Zellen aus Mauskalvarien eine erhöhte Ptgs-2-Expression zur Folge hatte (Abbildung 3.3.). In den MC3T3-E1-Zellen konnte beobachtet werden, dass die mechanisch-induzierte Ptgs-2-Expression signifikant durch die Zugabe von E2 verstärkt wurde (Abbildung 3.6.). Das heißt E2 sensibilisierte diese Zellen für mechanische Belastung. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit einer Studie von Yeh et al. [173], in der berichtet wurde, dass sowohl E2 als auch nur mechanische Belastung die Fos- und Ptgs-2-Expression in humanen Osteosarkomzellen (MG63) induzierte. Die durch Belastung induzierte Fos- und Ptgs-2-Expression wurde durch Behandlung der MG63 Zellen mit E2 noch erhöht. Joldersma et al. [78] und Bakker et al. [12] beschrieben einen mechanosensitivierenden Effekt von E2 auf die Prostaglandin-Produktion in Knochenzellen von älteren Frauen und osteoporotischen Spendern. Da die alleinige E2-Behandlung der sowohl belasteten als auch unbelasteten humanen Knochenzellen weder die Cox-1- noch die Cox-2-mRNA-Expression beeinflusste, vermuten Joldersma et al. [78], dass E2 die Mechanosensitivität von Knochenzellen über den Prostaglandin-Signalweg unabhängig von der Ptgs-2-Expression moduliert. Desweiteren postulieren die Autoren, dass die mechanisch-induzierte Cox-2-mRNA-Expression in Knochenzellen von Serumfaktoren unabhängig ist. Diese Annahme konnte in der vorliegenden Arbeit durch Untersuchung der Expression der Gene Ptgs-2 und Fos unter serumfreien Bedingungen bestätigt werden (Abbildung 3.10). Beide Gene zeigten auch unter serumfreien Bedingungen eine erhöhte Expression nach mechanischer Stimulation, welche durch E2-Zugabe noch erhöht wurde.

Zur Verifizierung, ob der sensibilisierende Effekt von der Interaktion des durch E2-aktivierten ER-Signalwegs mit mechanisch-induzierten Signalwegen abhängig war, wurde die Ptgs-2-Expression unter Zugabe von H89, E2 und mechanischer Belastung untersucht

(Abbildung 3.6). Mit H89 konnte in früheren Studien festgestellt werden, dass die mechanisch-induzierte Ptgs-2-Expression in MC3T3-E1-Zellen von der Aktivität der Proteinkinase A abhängig war [168]. In den hier verwendeten MC3T3-E1-Zellkulturen konnte durch die Zugabe des Proteinkinase A-Inhibitors der mechanosensibilisierende Effekt aufgehoben werden. Dieser Effekt war folglich von der mechanisch-induzierten Proteinkinase A abhängig.

Da eine ausreichende ERα-Expression für die Induktion des Signalwegs vorhanden sein muss, wurde die Esr-1 (ERα)-Expression in den primären osteoblastären Zellen aus Mauskalvarien, den C3H10T1/2- und den MC3T3-E1-Zellen untersucht (Abbildung 3.14a, b). Die Esr-1-Expression war in den MC3T3-E1-Zellen tendenziell höher als in den primären osteoblastären Zellen aus Mauskalvarien bzw. signifikant höher als in den C3H10T1/2-Zellen. Verschiedene Studien haben eine ERα-mRNA-Expression in Osteosarkomzelllinien aus Ratte [34], Maus [157] und Mensch [72], in Kalvarienzellen aus Ratte [16], in Osteoblasten aus Kaninchen und Mensch, und in Chondrozyten [89] bestätigt. Eine unterschiedliche ERα-Expression zwischen den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Zellen könnte u.a. die höhere Mechanosensibilität der MC3T3-E1-Zellen erklären. Die Vermutung, dass das relative ERα-Expressionsniveau die Antwort der Zellen auf Östrogen bestimmt, wurde bereits in anderen Studien postuliert [57, 110]. Veränderungen im ERα-Expressionsniveau können die Interaktionen zwischen ER und Transkriptionsfaktoren wie zum Beispiel AP-1 oder Coaktivatoren/Corepressoren beeinflussen. Veränderungen in der Zusammensetzung dieser Trankriptionsfaktoren können entweder zu einer Hoch- oder Herunterregulation der Genexpression führen [17]. Die ER-Aktivität selbst und nicht die alleinige Anwesenheit von E2 verleiht den Knochenzellen die Fähigkeit auf mechanische Stimulation zu antworten [74]. Diese Annahme wird durch den Phänotyp eines Mann mit einer ER-Nullmutation und einem erhöhten Östrogenspiegel unterstützt [152]. Eine von der Konzentration des Liganden abhängigen ERα-Induktion und eine Abnahme der von Ligand und Rezeptor abhängigen Signaltransduktion mit zunehmenden Spenderalter wird von Ankrom et al. [7] postuliert. In Mäusen führte Ovarektomie zu einer reduzierten ER-Expression im trabekulären Knochen [101]. Zaman et al. [180] konnten eine unterschiedliche ERα-Expression in Osteozyten aus verschiedenen Regionen der Rattenulna und eine Korrelation zwischen mechanischer Belastung und dem ERα-Proteingehalt feststellen.

Als Aktivator des Wnt/β-Catenin-Signalwegs wurde Lithiumchlorid (LiCl) eingesetzt. LiCl aktiviert den Wnt/β-Catenin-Signalweg durch Inhibition der GSK3β-Aktivität. Die

Phosphorylierung von β-Catenin durch GSK3β und damit der Abbau von β-Catenin unterbleiben. β-Catenin kann im Zytoplasma akkumulieren und in den Zellkern wandern. Dort interagiert es mit Transkriptionsfaktoren der Tcf/Lef-Familie und aktiviert die Transkription der Wnt-Zielgene [170]. Wie erwartet, führte die Behandlung der primären osteoblastären Zellen aus Mauskalvarien, der C3H10T1/2- und MC3T3-E1-Zellen mit dem Wnt/β-Catenin-Aktivator LiCl zu einer Hochregulation der Ptgs-2-Expression; diese wurde durch zusätzliche mechanische Belastung aufgehoben (Abbildung 3.3, 3.5, 3.6). Ein mechanosensitivierender Effekt durch LiCl konnte somit nicht nachgewiesen werden, aber eine Aufhebung der erhöhten Ptgs-2-Expression nach mechanischer Belastung in Kombination mit LiCl-Behandlung der Zellen. Im Gegensatz dazu wurde in einer In-vitro-Studie von Robinson et al. [139] ein synergistischer Effekt auf die Expression von Wnt/β-Catenin-Zielgenen in MC3T3-E1-Zellen in Anwesenheit von Aktivatoren des Wnt/β-Catenin-Signalwegs nachgewiesen. Dieser Unterschied könnte u.a. auf die unterschiedliche Belastungsperiode (5 h) und -stärke (3400 με), die Konzentration des GSK3β-Inhibitors (5 μM) oder das Stimulationssystem (FX-3000 Flexercell) zurückzuführen sein. Im Vergleich zur Expression der mechanisch-stimulierten Zellen ohne Aktivator stellten Robinson et al. [139] nur eine geringe oder keine Hochregulation der Expression von Wnt/β-Catenin-Zielgenen in mit Wnt/β-Catenin-Aktivatoren behandelten Zellen fest. Im Gegensatz dazu war in der vorliegenden Arbeit die Ptgs-2-Expression nach Zugabe des Aktivators LiCl höher exprimiert als nach alleiniger mechanischer Stimulation der Zellen.
In der vorliegenden Arbeit konnte außerdem beobachtet werden, dass abhängig von der Belastungssituation die beiden Aktivatoren E2 und LiCl eine spezifische Wirkung auf die Ptgs-2-Expression hatten. So führte in den unbelasteten MC3T3-E1-Zellen die Aktivierung des ER-Signalwegs durch E2-Zugabe zu einer Herunterregulation der durch LiCl induzierten erhöhten Ptgs-2-Expression, in den belasteten MC3T3-E1-Zellen hob LiCl den mechanosensibilisierenden Effekt von E2 auf (Abbildung 3.6).

4.2.2 Einfluss spezifischer Inhibitoren des ER- und des Wnt/β-Catenin-Signalwegs und mechanischer Stimulation auf die Ptgs-2-Expression

Zur Aufklärung der Interaktion zwischen dem ER-, dem Wnt/β-Catenin-Signalweg und mechanischer Belastung wurden Experimente mit spezifischen Inhibitoren des ER- und des Wnt/β-Catenin-Signalwegs durchgeführt. Zur Inhibition des ER-Signalwegs wurde der ER-Ligand ICI 182,780 eingesetzt. Laut Literatur führte ICI zu einer Herunterregulation des ERα, was eine komplette Aufhebung der Östrogenwirkung zur Folge haben kann [65].

In der vorliegenden Arbeit konnte durch Einsatz dieses spezifischen ER-Antagonisten der mechanosensibilisierende Effekt von E2 auf die Ptgs-2-Expression in MC3T3-E1-Zellen blockiert werden. Die mechanisch-induzierte Ptgs-2-Expression wurde durch den ER-Antagonisten nicht signifikant verändert (Abbildung 3.7). Dieses Ergebnis steht im Einklang mit einer Studie von Yeh et al. [173], in der von einer Inhibition des sensibilisierenden Effekts von E2 auf die mechanische Induktion der Gene Fos und Cox-2 durch ICI berichtet wurde. Die Induktion der Gene durch Scherbelastung blieb trotz ICI-Zugabe unverändert. Eine Beteiligung des ligandenabhängigen ER-Signalwegs am mechanosensibilisierenden Mechanismus kann vermutet werden. Diese Vermutung steht im Einklang mit einer Studie von Armstrong et al. [8], die zeigte, dass die frühe Antwort von Knochenzellen auf mechanische Belastung von der Expression des ERα abhängig ist. Die ERα-Expression wird durch den Liganden E2 reguliert, das heißt bei geringen Mengen an E2 ist auch die Menge an funktionellen ERα begrenzt und somit können selbst hohe Belastungen nicht mehr in eine adäquate osteogene Antwort umgewandelt werden. Verschiedene weitere Studien weisen daraufhin, dass ERα eine wichtige Rolle bei der Knochenbildung und Adaptation als Antwort auf mechanische Belastung in-vivo und in-vitro spielt. So zeigten zum Beispiel Damien et al. [32], dass mechanische Belastung die Osteoblasten-Proliferation über ERα in männlichen und weiblichen Mäusen stimulierte. Lee et al. [96] fanden heraus, dass die durch Belastung induzierte kortikale Knochenbildung in $ER\alpha^{-/-}$-Mäusen nur ein Drittel der Knochenbildung in $ER^{+/+}$-Mäusen entsprach. Osteoblastäre Zellen aus $ER\alpha^{-/-}$-Mäusen zeigten eine unzureichende Antwort auf mechanische Belastung [74]. Aguirre et al. [2] wiesen nach, dass die mechanisch-induzierte ERK-Aktivierung durch eine ERα-/ERβ-Defizienz oder den ER-Antagonist ICI in osteozytären und osteoblastären Zellen verhindert wurde. Zudem wird vermutet, dass die Östrogenrezeptoren nicht nur als ligandenabhängige Mediatoren von Östrogeneffekten eine Rolle spielen, sondern auch an der Mechanotransduktion in Osteozyten und Osteoblasten in einer liganden-unabhängigen Weise beteiligt sind [2].

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Inhibition des Wnt/β-Catenin-Signalwegs Endostatin verwendet (Abbildung 3.8). Mittels Experimenten an Xenopus-Embryonen und kultivierten Säugetierzellen konnten durch Hanai et al. [58] festgestellt werden, dass Endostatin die GSK3β-unabhängige Degradation von β-Catenin, ein Schlüsselmediator des Wnt/β-Catenin-Signalwegs, auslöst. In einer Studie von Lau et al. [93] wurde beschrieben, dass die Behandlung von murinen osteoblastären Kalvarienzellen (C57BL/6J) mit Endostatin die durch Belastung induzierte Hochregulation der β-Catenin-mRNA-

Expression und die erhöhte Proteinaktivität, sowie die stress-induzierte Proliferation reduzierte. In der vorliegenden Arbeit konnte festgestellt werden, dass sowohl die durch LiCl induzierte erhöhte Ptgs-2-Expression als auch deren Herunterregulation durch mechanische Belastung durch Inhibition des Wnt/β-Catenin-Signalwegs mit Endostatin signifikant aufgehoben wurde. Dies bedeutet, dass Ptgs-2 ein Gen ist, dass über den Wnt/β-Catenin-Signalweg und durch die Interaktion dieses Signalwegs mit weiteren mechanisch-induzierten Signalwegen reguliert wird.

4.2.3 Einfluss physiologischer Aktivatoren und Inhibitoren des ER- und des Wnt/β-Catenin-Signalwegs und mechanischer Stimulation auf die Ptgs-2-Expression

Die Ptgs-2-Expressionsveränderungen unter Einfluss von LiCl und Endostatin konnten durch Experimente mit dem physiologischen Aktivator Wnt-3a und dem physiologischen Inhibitor des Wnt/β-Catenin-Signalwegs, Dkk-1, verifiziert werden (Abbildung 3.9).

Wnt-Glykoproteine können an spezifische Fzd-Membranrezeptoren und Corezeptoren LRP5/6 binden und über die Akkumulation von β-Catenin im Nukleus die Tcf-abhängige Transkription und somit den Wnt/β-Catenin-Signalweg aktivieren [115]. Eine Inhibition des Wnt/β-Catenin-Signalwegs erfolgt über Antagonisten, wie zum Beispiel Dickkopf(Dkk)-Proteine [50]. Sie vermindern die Anzahl an LRP5/6 an der Zelloberfläche durch Interaktion mit Transmembranproteinen der Kremen(Krm)-Familie. Der gebildete LRP-Dkk-Krm-Komplex wird endozytiert und proteolytisch abgebaut.

In der vorliegenden Arbeit zeigten die mit Wnt-3a behandelten Zellen eine höhere Ptgs-2-Expression als mechanisch-stimulierte Zellen ohne physiologischen Aktivator. Die kombinierte Behandlung der Zellen mit Wnt-3a und mechanischer Belastung hebte die erhöhte Ptgs-2-Expression auf. Diese Ergebnisse weisen daraufhin, dass mechanisch-induzierte Signalwege der Wnt/β-Catenin-induzierten Ptgs-2-Expression entgegenwirken. In einer Studie von Chowdhury et al. [28] wurde beschrieben, dass mechanische Belastung Cytokin-sensitiven Signalwegen in Chondrozyten entgegenwirken kann. Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit beobachteten Robinson et al. [139], dass mechanische Stimulation und die Behandlung von MC3T3-E1-Zellen mit Wnt-3a-konditionierten Medium eine synergistische Hochregulation der Ptgs-2-Expression verursachten. Interessanterweise hatten besonders hohe Konzentrationen an Wnt-3a wieder eine Herunterregulation der Ptgs-2-Expression zur Folge.

In der vorliegenden Arbeit hatte die Behandlung der Zellen mit Dkk-1 keinen signifikanten Effekt auf die Ptgs-2-Expression. Der Wnt/β-Catenin-Signalweg scheint unter den in der

vorliegenden Arbeit verwendeten Versuchsbedingungen an der Regulation der Basalexpression des Gens Ptgs-2 nicht beteiligt zu sein. Die durch Wnt-3a induzierte erhöhte Ptgs-2-Expression wurde mit Dkk-1 vermindert. Der Wnt/β-Catenin-Signalweg wurde somit durch den physiologisch vorkommmenden Wnt-Antagonist wie erwartet inhibiert. Die Applikation mechanischer Belastung in Anwesenheit von Dkk-1 resultierte in einer leichten, aber signifikant höheren Expression im Vergleich zur Ptgs-2-Expression ohne Zugabe von Dkk-1. Dieser stimulierende Effekt wurde durch Wnt-3a nicht beeinflusst, und lässt vermuten, dass Dkk-1 einen von Wnt-3a unabhängigen Effekt auf die mechanische Regulation der Ptgs-2-Expression hat. Dies steht im Einklang mit Studien von Case et al. [24] und Sunters et al. [156], in denen beschrieben wurde, dass Dkk-1 in murinen Kalvarienzellen (CIMC-4) und in Osteosarkomzellen der Ratte (UMR-106) nicht die durch Belastung induzierte Transkription am Wnt/LRP5-Zielgenpromotor blockierte.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass der ER-, der Wnt/β-Catenin-Signalweg und mechanische Belastung interagieren, um die Expression von Ptgs-2 zu modulieren. Dabei hatte die Aktivierung des ER-Signalwegs einen mechanosensibilisierenden Effekt auf die Ptgs-2-Expression in den mechanisch-stimulierten MC3T3-E1-Zellen zur Folge, die Interaktion des Wnt/β-Catenin-Signalwegs mit mechanisch-induzierten Signalwegen führte hingegen zu einer Aufhebung der durch die Wnt/β-Catenin-Aktivatoren hochregulierten Ptgs-2-Expression.

4.2.4 Einfluss physiologischer Aktivatoren des ER- und des Wnt/β-Catenin-Signalwegs und mechanischer Stimulation auf die Expression weiterer am Knochenremodeling beteiligter Gene

Um festzustellen, ob der ER- bzw. der Wnt/β-Catenin-Signalweg und mechanische Belastung auch bei der Regulation weiterer am Knochenremodeling beteiligter Gene eine Rolle spielen, wurden Mikroarray-Analysen mit RNA aus mechanisch-belasteten und mit E2 bzw. Wnt-3a behandelten MC3T3-E1-Zellen durchgeführt. Die Mikroarray-Expressionen wurden mittels *Real-Time* RT-PCR-Analysen verifiziert (Tabelle 3.3). Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zeigten, dass E2, Wnt-3a und mechanische Belastung über ihre Signalwege die Transkription weiterer wichtiger am Knochenremodeling beteiligter Zielgene regulieren. Zu diesen Zielgenen zählen u.a. Proliferationsmarker (Myc), an der mechanischen Regulation von Cox-2 beteiligte Transkriptionsfaktoren (Cebpb, Creb-1, Fos), osteogene Differenzierungmarker (Alpl,

Dmp-1, Ibsp) und Modulatoren der Osteoklastendifferenzierung (Opg, Rankl, Il-6). In der vorliegenden Arbeit konnte am Beispiel der Expression der Gene Fos, Rankl und Il-6 ein sensibilisierender Effekt des mechanischen Reizes nach Aktivierung des ER-Signalwegs angenommen werden. Eine Sensibilisierung durch Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signalwegs konnte zum Beispiel beim Dmp1-Gen vermutet werden. Auch in der Literatur ist beschrieben, dass die aufgeführten Beispielgene mechanosensitiv sind und durch E2 bzw. Wnt-3a reguliert werden. Fos-Proteine sind Teil des Transkriptionskomplexes AP-1. Elemente des AP-1-Komplexes wurden in Promotorregionen einiger mechanosensitiver und steroidregulierter Gene, welche in Knochenwachstum und Mineralisation involviert sind, gefunden. In der vorliegenden Arbeit und anderen Studien konnte gezeigt werden, dass Knochenzellen auf mechanische Belastung mit einer erhöhten Fos-mRNA-Expression antworteten [42, 121]. Ein schneller Anstieg der Fos- und Jun-mRNA-Expression wurde auch nach Östrogenbehandlung beobachtet [153]. In einer Studie von Björnstrom et al. [15] wurde beschrieben, dass Fos- und Jun-Proteine durch E2 induzierbar sind und dass durch deren Interaktion mit Östrogenrezeptoren verschiedene Gene wie zum Beispiel das IGF-I- oder Kollagenase-Gen aktiviert werden können.

Rankl ist ein Zytokin aus der TNF-Familie, das an Makrophagen bindet und deren Differenzierung zu Osteoklasten über den Rezeptor Rank stimuliert [22]. In primären osteoblastäre Zellen aus Mauskalvarien konnte die Rankl-Expression durch Scherstress induziert werden [111]. Bord et al. [20] beobachteten bei mit E2-behandelten Osteoblasten einen Anstieg der Rankl-Expression, der mit längerer Inkubationszeit abfiel.

Die Hauptfunktion von Il-6 besteht in der Fähigkeit Osteoklasten-Vorläuferzellen zu stimulieren [141]. In einer Studie von Liebgiebel et al. [100] wird postuliert, dass Il-6 ein mechanosensitives Zytokin ist und ein Schlüsselfaktor bei der biomechanischen Kontrolle des Knochenremodelings. Die Produktion des osteoresorptiven Faktors Il-6 konnte in Osteoblasten durch E2 inhibiert werden [49, 80]. Die Hemmung der Il-6-Produktion durch E2, basiert auf der Protein-Protein-Interaktion zwischen ER und Transkriptionsfaktoren wie zum Beispiel NFκB und Cebp [109]. Eine indirekte Wirkung von Östrogen auf die Osteoklastenresorption wird vermutet.

Dmp-1 gehört zu der SIBLING (*small integrin binding ligand N-linked glycoprotein*)-Familie zellulärer Matrixproteine, die u.a. Osteopontin, *bone sialoprotein* und Dentinsialophosphoprotein einschließen. Dmp-1 spielt eine entscheidende Rolle bei der durch Osteozyten vermittelten Antworten auf mechanische Belastung, vermutlich durch seine Rolle als Regulator der Mineralisation [51, 138]. Eine Antagonisierung der Tcf/β-

Catenin-Signalübertragung in MC3T3-E1-Zellen blockierte die Wnt-11-vermittelte Expression des Gens Dmp-1 und erniedrigte die Mineralisation [44].
Abschließend bleibt festzuhalten, dass die untersuchten am Knochenremodeling beteiligten Gene differentiell über den ER-, Wnt/β-Catenin-Signalweg und mechanische Stimulation reguliert werden, und dass beide Signalwege den mechanisch-induzierten Effekt modulieren können. Weitere Experimente sind notwendig um zu klären, wie diese Gene über die untersuchten Signalwege in osteoblastären Zellen reguliert werden.

4.3 Einfluss physiologischer Aktivatoren des ER- und des Wnt/β-Catenin-Signalwegs und mechanischer Stimulation auf die Cox-2-Proteinexpression und die β-Catenin-Aktivität

4.3.1 Einfluss von E2 bzw. Wnt-3a und mechanischer Stimulation auf die Cox-2-Proteinexpression in MC3T3-E1-Zellen

Die Expressionsveränderungen des Gens Ptgs-2 (Cox-2) durch Aktivierung des ER- oder des Wnt/β-Catenin-Signalwegs ohne/nach mechanische(r) Stimulation wurden mittels Western-Blot-Analysen auf Proteinebene untersucht (Abbildung 3.12).
Mechanische Stimulation erhöhte wie erwartet die Cox-2-Proteinexpression, durch zusätzliches E2 wurde das Cox-2-Protein noch verstärkt exprimiert. Ogasawara et al. [122] konnten in MC3T3-E1-Zellen eine zeitabhängige Induktion des Cox-2-Proteins feststellen, mit einer maximalen Proteinexpression nach 6-stündiger Scherbelastung. In C57BL/6J-Osteoblasten beobachteten Lau et al. [93] und in MSC Sen et al. [147] eine durch Belastung induzierte erhöhte Cox-2-Proteinexpression.
E2-Behandlung der MC3T3-E1-Zellen ohne zusätzliche mechanische Stimulation führte zu keiner stärkeren Cox-2-Proteinexpression. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit einer Studie von Secreto et al. [146], in der von keinen signifikanten E2-Effekten auf die Cox-2-Proteinexpression in humanen Osteoblasten-ähnlichen Zellen (hOB) berichtet wurde. In der humanen monozytären Tumorzelllinie U937 wurde hingegen die Cox-2-Proteinexpression in Abhängigkeit von der E2-Konzentration verstärkt [105].
Die Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signalwegs hatte wie erwartet eine erhöhte Cox-2-Proteinexpression zur Folge. Die Aufhebung der quantitativ-ermittelten Wnt-3a-induzierten Expression von Cox-2 durch mechanische Belastung korrelierte mit einer erniedrigten Cox-2-Proteinexpression in den Wnt-3a-behandelten mechanisch-stimulierten Zellen. Lysate aus Wnt-3a-exprimierenden murinen Gebärmutterhalszellen (C57MG)

zeigten eine verstärkte Cox-2-Proteinexpression [56]. Eine Behandlung von C57MG-Zellen [56] oder MC3T3-E1-Zellen [120] mit dem Wnt/β-Catenin-Signalwegaktivator LiCl resultierte in einem Anstieg der Cox-2-Proteinexpression.

4.3.2 Einfluss von E2 bzw. Wnt-3a und mechanischer Stimulation auf die β-Catenin-Aktivität in MC3T3-E1-Zellen

Weitere Western-Blot-Analysen wurden durchgeführt, um einen möglichen Einfluss der Aktivierung des ER- bzw. des Wnt/β-Catenin-Signalwegs und mechanischer Belastung auf den Phosphorylierungszustand und damit auf die Aktivität des im Wnt/β-Catenin-Signalweg zentralen Signalmoleküls β-Catenin zu untersuchen (Abbildung 3.13).

Mechanische Belastung der MC3T3-E1-Zellen erhöhte die Menge an aktivem β-Catenin im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollzellen. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit einer Studie von Lau et al. [93], in der von einem signifikanten Anstieg an β-Catenin in C57BL/6J-Osteoblasten nach 30-minütiger mechanischer Stimulation berichtet wurde.

Durch mechanische Stimulation nahm die Menge an phosphorylierten β-Catenin im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollzellen ab. Lau et al. [93] konnten im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit keine signifikante Menge an phosphorylierten β-Catenin weder in den unstimulierten noch in den mechanisch-stimulierten Zellen nachweisen. In einer Studie von Case et al. [24] wurde in CIMC-4-Zellen eine durch Dehnung induzierte Erhöhung an aktivem β-Catenin innerhalb 60 min nach Beginn der mechanischen Stimulation beobachtet, die allerdings nach 3 h wieder auf das Basalproteinniveau absank. In UMR-106-Zellen stellten Sunters et al. [156] eine belastungabhängige Erhöhung an aktivem β-Catenin fest. Jansen et al. [73] hingegen stellten einen durch Dehnung induzierte Inhibition des Wnt/β-Catenin-Signalwegs fest, welche sich in einer Erniedrigung der zytosolischen und nukleären β-Catenin-Menge äußerte. Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit wurden in dieser Studie mineralisierende Osteoblasten und nicht präosteogene Zellen untersucht.

Nach Aktivierung des ER-Signalwegs durch E2 konnte weder in den unbelasteten noch in den belasteten Zellen mehr aktives β-Catenin detektiert werden als in den Kontrollzellen ohne E2. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit einer Studie von Armstrong et al. [8], in der berichtet wurde, dass sich nach 3-stündiger Behandlung von Osteosarkomzellen aus der Ratte (ROS17/2.8) mit 10 nM E2 keine Veränderung der Höhe an aktivem β-Catenin zeigte. In einer Studie von Chandar et al. [25] hingegen führte eine 6-stündige Behandlung von ROS17/2.8-Zellen mit E2 (10^{-11} M) zu einem Anstieg an β-Catenin. Nach weiteren 18 h konnte eine Abnahme und nach insgesamt 48 h ein zweiter Anstieg beobachtet

werden. Diese Diskrepanz könnte auf die Dauer der E2-Behandlung der Zellen und auf die unterschiedlichen E2-Konzentrationen zurückzuführen sein.
In den hier untersuchten MC3T3-E1-Zellen wurde die aktive Form von β-Catenin als Antwort auf Wnt-3a-Stimulation vermehrt detektiert. Die mechanisch-induzierte Menge an aktivem β-Catenin wurde durch Wnt-3a-Zugabe noch erhöht. Ein signifikanter Anstieg an aktivem β-Catenin nach Behandlung osteoblastärer Zellen mit Wnt-3a oder LiCl konnte auch in anderen Studien beobachtet werden [6, 8, 24, 156]. Armstrong et al. [8] berichteten von einer Erhöhung an aktivem β-Catenin in ROS17/2.8-Zellen und in primären murinen Osteoblastenkulturen, sowohl durch Dehnung (10 min, 30 min, 1 h, 3 h) als auch durch LiCl-Behandlung (3 h) dieser Zellen. Nach 24 h war die aktive β-Catenin-Menge wieder auf das Basalniveau der Kontrollzellen abgesunken. Auch in CIMC-4-Zellen konnte ein signifikanter Anstieg an aktivem β-Catenin nach Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signalwegs mit Wnt-3a oder LiCl beobachtet werden [24].
Nach gleichzeitiger Aktivierung beider Signalwege sowohl in den unbelasteten als auch belasteten Zellen konnte eine Erhöhung an aktivem β-Catenin gegenüber des nachgewiesenen aktivem β-Catenin in den unstimulierten Kontrollzellen festgestellt werden. Die Ergebnisse zeigen, dass die Aktivität von β-Catenin unter dem Einfluss der Signalwege geändert wird. Hierbei stellt mechanische Belastung einen zusätzlichen Regulationsmechanismus dar.

Abschließend ist festzuhalten, dass die mittels *Real-Time* RT-PCR ermittelten Expressionsveränderungen des Gens Ptgs-2 (Cox-2) nach Aktivierung des ER- bzw. Wnt/β-Catenin-Signalwegs und mechanischer Belastung auf Proteinebene bestätigt werden konnten. Außerdem konnte gezeigt werden, dass mechanische Stimulation, Wnt-3a allein oder in Kombination mit E2 einen Anstieg an aktivem β-Catenin verursachte.

4.4 Weitere Untersuchungen an osteoblastären Zellen zum ER- und Wnt/β-Catenin-Signalweg

4.4.1 Einfluss von Wnt-3a und mechanischer Belastung auf TopFlash-transfizierte MC3T3-E1-Zellen

Die Interaktion des Wnt/β-Catenin-Signalwegs mit mechanischer Belastung wurde zusätzlich auf Transkriptionsebene untersucht, indem MC3T3-E1-Zellen mit dem Tcf-Reporterplasmid TopFlash und dem FopFlash-Vektor mit mutierten, inaktiven Tcf-

Bindungsstellen transfiziert, mit Wnt-3a behandelt und mechanisch stimuliert wurden (Abbildung 3.15).

Mechanische Stimulation oder die Inkubation der TopFlash-transfizierten Zellen mit Wnt-3a führte zu einer signifikant erhöhten Aktivität der Tcf-vermittelten Transkription des Luciferasegens. Das bedeutet, dass hier der Wnt/β-Catenin-Signalweg signifikant induziert wurde. Wie erwartet, konnte in den Zellen, die mit dem FopFlash-Reportergenkonstrukt transfiziert wurden, der Wnt/β-Catenin-Signalweg durch Wnt-3a-Zugabe nicht aktiviert werden.

Eine spezifische Induktion der Tcf-β-Catenin-abhängigen Transkription als Antwort auf mechanische Belastung [156] oder auf eine Wnt-Signalwegaktivierung durch Aktivatoren konnte auch in Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen [6, 18, 24, 120] beobachtet werden. In einer Studie von Armstrong et al. [8] wurde zum Beispiel berichtet, dass die mechanische Stimulation von ROS17/2.8-Zellen die Menge an aktivem β-Catenin erhöht, dessen Akkumulation in den Nukleus stimuliert und die Tcf/Lef-abhängige Transkription steigerte. In einer Studie von Case et al. [24] wurde davon berichtet, dass die Lumineszenz des Wnt-responsiven Elements WRE in der Anwesenheit von LiCl erhöht wurde und nach Dehnung die Aktivität signifikant abnahm. Dies steht im Einklang mit der vorliegenden Arbeit, in der die Aufhebung der Wnt-3a-induzierten Tcf-vermittelten Transkription des Luciferasegens durch mechanische Belastung postuliert wird.

Die Aufhebung der durch Wnt-3a erhöhten Ptgs-2-Expression durch mechanische Belastung der MC3T3-E1-Zellen hängt vermutlich von der Tcf/Lef-Bindungsstelle ab. Norvell et al. [120] stellten in MC3T3-E1-Zellen fest, dass Tcf und β-Catenin direkt mit einem Tcf-Bindungselement im Cox-2-Promotor interagieren können. In murinen Chondrozyten konnte nachgewiesen werden, dass die Ptgs-2-Transkription über Lef-1 und β-Catenin reguliert wird [177]. Der Cox-2-Promotor besitzt hierfür zwei potentielle Lef-1/Tcf-1- und vier potentielle Tcf-4-Bindungsstellen, die über das Programm rVISTA 2.0 (http://rvista.dcode.org) und der "TRANSFAC professional V 10.2 library" (0.8 *matrix similarity*) bestimmt werden konnten. Ausserdem enthält der Cox-2-Promotor noch potentielle regulatorische Elemente wie Transkriptionsfaktorbindestellen für CRE, NFκB, C/EBP und AP-1, die für die Vermittlung der Antwort auf mechanische Belastung verantwortlich sind [122].

4.4.2 Einfluss von E2 und Wnt-3a auf die Lokalisation von ERα und β-Catenin im Nukleus von MC3T3-E1-Zellen

Der Einfluss von E2 und Wnt-3a auf die Lokalisation von ERα und β-Catenin in MC3T3-E1-Zellen konnte mittels indirekter Doppel-Immunfluoreszenz dargestellt werden (Abbildung 3.16).

In den unbehandelten Kontrollzellen konnte eine perinukleäre Lokalisation von ERα und β-Catenin beobachtet werden. Nach Behandlung der Zellen mit E2 oder Wnt-3a wurde sowohl ERα als auch β-Catenin in den Nukleus transloziert. E2 beeinflusste auch die Lokalisation von β-Catenin bzw. Wnt-3a die Lokalisation von ERα. Dabei konnte kein Intensitätsunterschied in der Fluoreszenz zwischen der durch E2 oder Wnt-3a induzierten ERα- bzw. β-Catenin-Färbung festgestellt werden. Bei gleichzeitiger Stimulation der Zellen mit E2 und Wnt-3a war die Immunfärbung im Nukleus deutlich stärker im Vergleich zur Immunfärbung der entweder mit E2 oder mit Wnt-3a behandelten Zellen.

Auch in anderen Studien [31, 57, 180] konnte festgestellt werden, dass sobald ER durch E2 aktiviert wird, dieser in den Nukleus transloziert und als ligandenabhängiger Transkriptionsfaktor wirkt. Ebenfalls bekannt ist, dass die Aktivierung des Wnt-Signalwegs die Kernlokalisation von aktivem β-Catenin stimuliert [24, 154].

Die Beobachtung, dass E2 eine Rolle in der Regulation und Translokation von β-Catenin in osteoblastäre Zellen spielt, wurde auch in einer Studie von Chandar et al. [25] postuliert. Die Autoren berichteten von einem Anstieg in der β-Catenin-Fluoreszenz nach 24-stündiger E2-Behandlung von ROS17/2.8-Zellen. Das meiste β-Catenin befand sich dabei zunächst im Zytoplasma und in den perinukleären Regionen. Nach 48-stündiger E2-Behandlung konnte β-Catenin signifikant im Nukleus vieler ROS17/2.8-Zellen nachgewiesen werden. Die Autoren vermuten, dass der Anstieg an β-Catenin während der E2-Behandlung das Ergebnis entweder eines direkten Genexpressionsanstiegs oder einer Stabilisierung des zytosolischen β-Catenins durch Inhibiton der GSK-Aktivität ist. Armstrong et al. [8] stellten hingegen in ROS17/2.8-Zellen keine Veränderung des aktiven β-Catenin durch E2-Behandlung innerhalb 48 h fest. Die Beobachtung von Armstrong et al. [8], dass eine 3-stündige Behandlung der Zellen mit einem Wnt/β-Catenin-Signalwegaktivator zu einer im Nukleus konzentrierten ERα- und β-Catenin-Färbung führte, steht wieder im Einklang mit dem Ergebnis der vorliegenden Arbeit. In ERα-defizienten Zellen hatte LiCl-Behandlung keinen Einfluss auf die Fluoreszenzintensität des aktivierten β-Catenin [8].

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zeigten, dass die Aktivierung des ER- bzw. des Wnt/β-Catenin-Signalwegs zu einer Translokation sowohl von ERα als auch von β-Catenin in den Nukleus führte. Die Aktivierung beider Signalwege gleichzeitig hatte eine Kolokalisation von ERα und β-Catenin in den Nukleus zur Folge.

Weitere Untersuchungen sind notwendig, um eine mögliche Interaktion zwischen ERα und β-Catenin zu klären. Zum Beispiel könnte eine Immunpräzipitation mit einem Anti-β-Catenin-Antikörper und eine anschließende Detektion mit einem ER-Antikörper nach Western-Blotting eine mögliche Interaktion der beiden Moleküle in der Signaltransduktion zeigen.

5. Zusammenfassung der vorliegenden Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Interaktion des Östrogenrezeptor (ER)-Signalwegs und des *wingless-type mouse mammary tumor virus (MMTV) integration site family* (Wnt)/β-Catenin-Signalwegs in der Regulation der frühen Zellantwort auf mechanische Belastung in osteoblastären Zellen zu untersuchen.

Die Genexpressionsveränderungen im Verlauf der Differenzierung ohne und nach mechanischer Stimulation von mit dem ER- und dem Wnt/β-Catenin-Signalweg assoziierten Genen konnte dargestellt werden. So zeigten zum Beispiel die Gene Alpl (alkalische Phosphatase) und Tnfrsf-11b (Osteoprotegerin) eine ansteigende Expression, das Gen Ptgs-2 (Cyclooxygenase-2) eine abnehmende Expression im Verlauf der Differenzierung. Die Ergebnisse weisen auf eine differentielle Regulation der Gene während den verschiedenen Stadien der Differenzierung hin, wobei der Differenzierungszustand auch die mechanische Antwort der Zelle beeinflusst. Die Expressionsanalysen zeigten, dass die Expression der Gene Fos und Ptgs-2 in den differenzierteren Zellen höher als in den weniger differenzierten war. Dies lässt vermuten, dass reifere Zellen sensibler auf mechanische Belastung reagieren.

Die Interaktion zwischen dem ER-, dem Wnt/β-Catenin-Signalweg und mechanischer Belastung konnte am Beispiel des früh responsiven Gens Ptgs-2 dargestellt werden. Mechanische Belastung führte zu einer schnellen Hochregulation der Ptgs-2-Expression in den primären osteoblastären aus Mauskalvarien, den C3H10T1/2- und den MC3T3-E1-Zellen. In den MC3T3-E1-Zellen konnte die mechanisch-induzierte Hochregulation der Expression durch die Zugabe des physiologischen ER-Signalwegaktivators, 17-β-Östradiol (E2), im Sinne eines Mechanosensitizers verstärkt werden. Die Inhibition des ER-Signalwegs durch den ER-Antagonist *imperial chemical industries* (ICI) 182,780 zeigte, dass der mechanosensibilisierende Effekt vermutlich durch den ligandenabhängigen ER-Signalweg vermittelt wird. In Hinblick auf die Wnt/β-Catenin-Signalübertragung konnte festgestellt werden, dass Lithiumchlorid (LiCl), ein Aktivator des Wnt/β-Catenin-Signalwegs, und Wnt-3a, der physiologische Wnt/β-Catenin-Aktivator, die Ptgs-2-Expression stimulierten. Dieser Effekt konnte durch Endostatin (E), ein Inhibitor des Wnt/β-Catenin-Signalwegs, oder durch Applikation mechanischer Belastung aufgehoben werden. Mechanisch-induzierte Signalwege scheinen somit dem Wnt/β-Catenin-Signalweg entgegenzuwirken. Die durch Dickkopf-1 (Dkk-1), ein physiologischer Wnt/β-Catenin-Signalweginhibitor, signifikant verstärkte mechanisch-induzierte Expressionserhöhung des Gens Ptgs-2 schien nicht durch Wnt-3a-Zugabe beeinflussbar zu sein. Dies lässt vermuten, dass Dkk-1 einen Wnt-3a-

unabhängigen Effekt auf die mechanisch-induzierte Ptgs-2-Expression hat. Die Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signalwegs führte außerdem zur Aufhebung des sensitivierenden Effekts von E2 auf die mechanisch-induzierte Antwort der belasteten MC3T3-E1-Zellen. Durch Aktivierung des ER-Signalwegs in den unbelasteten MC3T3-E1-Zellen wurde hingegen die durch LiCl-induzierte Ptgs-2-Expressionserhöhung verringert. Dies weist daraufhin, dass die Wirkung der Aktivatoren auf die Ptgs-2-Expression von der jeweiligen Belastungssituation abhängig sein kann.

Desweiteren konnte festgestellt werden, dass MC3T3-E1-Zellen eine höhere ERα-Expression und eine niedrigere β-Catenin-Expression haben im Vergleich zu den primären osteoblastären Zellen aus Mauskalvarien und den C3H10T1/2-Zellen. Dies könnte einen Einfluss auf die Zellantwort nach mechanischer Stimulation haben.

Eine differentielle Regulation über den ER- oder den Wnt/β-Catenin-Signalweg und mechanische Belastung zeigten weitere am Knochenremodeling beteiligte Gene.

Mittels Western-Blot-Analyse konnte dargestellt werden, dass die quantitativ-ermittelten Ptgs-2-mRNA-Expressionsveränderungen nach E2- oder Wnt-3a-Zugabe und mechanischer Stimulation mit der Expression des Proteins Cyclooxygenase-2 korrelierten. Ausserdem hatte mechanische Stimulation, Wnt-3a-Zugabe oder die gleichzeitige Zugabe der Aktivatoren E2 und Wnt-3a einen Anstieg an aktivem bzw. eine Abnahme an phosphoryliertem β-Catenin zur Folge. Die mechanisch-induzierte aktive β-Catenin-Menge wurde durch Wnt-3a noch zusätzlich erhöht. Folglich wurde die β-Catenin-Aktivität durch mechanische Stimulation, Aktivierung der Signalwege und deren Interaktion verändert.

Mittels Transfektionsexperimenten mit einem Wnt-induzierbaren Tcf-Luciferase-Reporter-konstrukt (TopFlash) konnte dargestellt werden, dass die Aufhebung der Wnt-3a-induzierten Ptgs-2-Expression nach mechanischer Belastung vermutlich von der Tcf-Bindungsstelle in der Promotorregion des Ptgs-2-Gens abhängig ist.

Mittels indirekter Doppel-Immunfluoreszenz konnte die Kolokalisation von ERα und β-Catenin im Nukleus nach Aktivierung des ER- und des Wnt/β-Catenin-Signalwegs gezeigt werden. Dies lässt eine Interaktion dieser Moleküle vermuten.

Die durchgeführten Untersuchungen der vorliegenden Arbeit lassen vermuten, dass die Interaktion des ER-Signalwegs mit dem Wnt/β-Catenin-Signalweg einen wichtigen Mechanismus zur Regulation der Genexpression als Antwort auf verschiedene Belastungssituationen darstellt.

6. Literaturverzeichnis

1. Aarden EM, Burger EH, Nijweide PJ: Function of osteocytes in bone. J Cell Biochem 55: 287-299 (1994)

2. Aguirre JI, Plotkin LI, Gortazar AR, Millan MM, O'Brien CA, Manolagas SC, Bellido T: A novel ligand-independent function of the estrogen receptor is essential for osteocyte and osteoblast mechanotransduction. J Biol Chem 282: 25501-25508 (2007)

3. Alam I, Warden SJ, Robling AG, Turner CH: Mechanotransduction in bone does not require a functional cyclooxygenase-2 (COX-2) gene. J Bone Miner Res 20: 438-446 (2005)

4. Alford AI, Jacobs CR, Donahue HJ: Oscillating fluid flow regulates gap junction communication in osteocytic MLO-Y4 cells by an ERK1/2 MAP kinase-dependent mechanism small star, filled. Bone 33: 64-70 (2003)

5. Almeida M, Chen J, Han L, Vertino A, Peng H, Kousteni S, Manolagas S: Potentiation of wnt signaling by activation of the nongenotropic function of the estrogenreceptor in osteoblastic cells. J Bone Miner Res 18: 77 (2003)

6. Almeida M, Han L, Bellido T, Manolagas SC, Kousteni S: Wnt proteins prevent apoptosis of both uncommitted osteoblast progenitors and differentiated osteoblasts by beta-catenin-dependent and -independent signaling cascades involving Src/ERK and phosphatidylinositol 3-kinase/AKT. J Biol Chem 280: 41342-41351 (2005)

7. Ankrom MA, Patterson JA, d'Avis PY, Vetter UK, Blackman MR, Sponseller PD, Tayback M, Robey PG, Shapiro JR, Fedarko NS: Age-related changes in human oestrogen receptor alpha function and levels in osteoblasts. Biochem J 333 (Pt 3): 787-794 (1998)

8. Armstrong VJ, Muzylak M, Sunters A, Zaman G, Saxon LK, Price JS, Lanyon LE: Wnt/beta-catenin signaling is a component of osteoblastic bone cell early responses to load-bearing and requires estrogen receptor alpha. J Biol Chem 282: 20715-20727 (2007)

9. Arts J, Kuiper GG, Janssen JM, Gustafsson JA, Lowik CW, Pols HA, van Leeuwen JP: Differential expression of estrogen receptors alpha and beta mRNA during differentiation of human osteoblast SV-HFO cells. Endocrinology 138: 5067-5070 (1997)

10. Aubin JE: Regulation of osteoblast formation and function. Rev Endocr Metab Disord 2: 81-94 (2001)

11. Bakker AD, Klein-Nulend J, Burger EH: Mechanotransduction in bone cells proceeds via activation of COX-2, but not COX-1. Biochem Biophys Res Commun 305: 677-683 (2003)

12. Bakker AD, Klein-Nulend J, Tanck E, Albers GH, Lips P, Burger EH: Additive effects of estrogen and mechanical stress on nitric oxide and prostaglandin E2 production by bone cells from osteoporotic donors. Osteoporos Int 16: 983-989 (2005)

13. Bennett CN, Longo KA, Wright WS, Suva LJ, Lane TF, Hankenson KD, MacDougald OA: Regulation of osteoblastogenesis and bone mass by Wnt10b. Proc Natl Acad Sci U S A 102: 3324-3329 (2005)

14. Beyer W: Lehrbuch der Organischen Chemie. 735-740, 742-748 (2004)

15. Bjornstrom L, Sjoberg M: Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. Mol Endocrinol 19: 833-842 (2005)

16. Bodine PV, Henderson RA, Green J, Aronow M, Owen T, Stein GS, Lian JB, Komm BS: Estrogen receptor-alpha is developmentally regulated during osteoblast differentiation and contributes to selective responsiveness of gene expression. Endocrinology 139: 2048-2057 (1998)

17. Bodine PV, Komm BS: Wnt signaling and osteoblastogenesis. Rev Endocr Metab Disord 7: 33-39 (2006)

18. Boland GM, Perkins G, Hall DJ, Tuan RS: Wnt 3a promotes proliferation and suppresses osteogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells. J Cell Biochem 93: 1210-1230 (2004)

19. Bonnelye E, Aubin JE: Differential expression of estrogen receptor-related receptor alpha and estrogen receptors alpha and beta in osteoblasts in vivo and in vitro. J Bone Miner Res 17: 1392-1400 (2002)

20. Bord S, Ireland DC, Beavan SR, Compston JE: The effects of estrogen on osteoprotegerin, RANKL, and estrogen receptor expression in human osteoblasts. Bone 32: 136-141 (2003)

21. Boyden LM, Mao J, Belsky J, Mitzner L, Farhi A, Mitnick MA, Wu D, Insogna K, Lifton RP: High bone density due to a mutation in LDL-receptor-related protein 5. N Engl J Med 346: 1513-1521 (2002)

22. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL: Osteoclast differentiation and activation. Nature 423: 337-342 (2003)

23. Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C, Scully S, Tan HL, Xu W, Lacey DL, Boyle WJ, Simonet WS: osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. Genes Dev 12: 1260-1268 (1998)

24. Case N, Ma M, Sen B, Xie Z, Gross TS, Rubin J: Beta-catenin levels influence rapid mechanical responses in osteoblasts. J Biol Chem 283: 29196-29205 (2008)

25. Chandar N, Saluja R, Lamar PC, Kolman K, Prozialeck WC: P53 and beta-catenin activity during estrogen treatment of osteoblasts. Cancer Cell Int 5: 24 (2005)

26. Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KL, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS, Simmons DL: COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. Proc Natl Acad Sci U S A 99: 13926-13931 (2002)

27. Cherian PP, Cheng B, Gu S, Sprague E, Bonewald LF, Jiang JX: Effects of mechanical strain on the function of Gap junctions in osteocytes are mediated through the prostaglandin EP2 receptor. J Biol Chem 278: 43146-43156 (2003)

28. Chowdhury TT, Arghandawi S, Brand J, Akanji OO, Bader DL, Salter DM, Lee DA: Dynamic compression counteracts IL-1beta induced inducible nitric oxide synthase and cyclo-oxygenase-2 expression in chondrocyte/agarose constructs. Arthritis Res Ther 10: R35 (2008)

29. Coetzee M, Haag M, Claassen N, Kruger MC: Stimulation of prostaglandin E2 (PGE2) production by arachidonic acid, oestrogen and parathyroid hormone in MG-63 and MC3T3-E1 osteoblast-like cells. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 73: 423-430 (2005)

30. Cohen Y, Chetrit A, Sirota P, Modan B: Cancer morbidity in psychiatric patients: influence of lithium carbonate treatment. Med Oncol 15: 32-36 (1998)

31. Collingwood TN, Urnov FD, Wolffe AP: Nuclear receptors: coactivators, corepressors and chromatin remodeling in the control of transcription. J Mol Endocrinol 23: 255-275 (1999)

32. Damien E, Price JS, Lanyon LE: The estrogen receptor's involvement in osteoblasts' adaptive response to mechanical strain. J Bone Miner Res 13: 1275-1282 (1998)

33. Damien E, Price JS, Lanyon LE: Mechanical strain stimulates osteoblast proliferation through the estrogen receptor in males as well as females. J Bone Miner Res 15: 2169-2177 (2000)

34. Davis VL, Couse JF, Gray TK, Korach KS: Correlation between low levels of estrogen receptors and estrogen responsiveness in two rat osteoblast-like cell lines. J Bone Miner Res 9: 983-991 (1994)

35. Day TF, Guo X, Garrett-Beal L, Yang Y: Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis. Dev Cell 8: 739-750 (2005)

36. de Brum-Fernandes AJ, Laporte S, Heroux M: Expression of prostaglandin endoperoxide synthase-1 and prostaglandin endoperoxide synthase-2 in human osteoblasts. Biochem Biophys Res Commun 198: 955-960 (1994)

37. Demiralp B, Chen HL, Koh AJ, Keller ET, McCauley LK: Anabolic actions of parathyroid hormone during bone growth are dependent on c-fos. Endocrinology 143: 4038-4047 (2002)

38. Eijken M, Meijer IM, Westbroek I, Koedam M, Chiba H, Uitterlinden AG, Pols HA, van Leeuwen JP: Wnt signaling acts and is regulated in a human osteoblast differentiation dependent manner. J Cell Biochem 104: 568-579 (2008)

39. El-Tanani M, Fernig DG, Barraclough R, Green C, Rudland P: Differential modulation of transcriptional activity of estrogen receptors by direct protein-protein interactions with the T cell factor family of transcription factors. J Biol Chem 276: 41675-41682 (2001)

40. Farhadieh RD, Gianoutsos MP, Yu Y, Walsh WR: The role of bone morphogenetic proteins BMP-2 and BMP-4 and their related postreceptor signaling system (Smads) in distraction osteogenesis of the mandible. J Craniofac Surg 15: 714-718 (2004)

41. Filardo EJ, Thomas P: GPR30: a seven-transmembrane-spanning estrogen receptor that triggers EGF release. Trends Endocrinol Metab 16: 362-367 (2005)

42. Fitzgerald J, Hughes-Fulford M: Mechanically induced c-fos expression is mediated by cAMP in MC3T3-E1 osteoblasts. FASEB J 13: 553-557 (1999)

43. Forwood MR: Inducible cyclo-oxygenase (COX-2) mediates the induction of bone formation by mechanical loading in vivo. J Bone Miner Res 11: 1688-1693 (1996)

44. Friedman MS, Oyserman SM, Hankenson KD: Wnt11 promotes osteoblast maturation and mineralization through R-spondin 2. J Biol Chem 284: 14117-14125 (2009)

45. Frost HM: Dynamics of bone remodelling. In: Bone Biodynamics 315-333 (1964)

46. Frost HM: Bone "mass" and the "mechanostat": a proposal. Anat Rec 219: 1-9 (1987)

47. Frost HM: From Wolff's law to the mechanostat: a new "face" of physiology. J Orthop Sci 3: 282-286 (1998)

48. Frost HM, Ferretti JL, Jee WS: Perspectives: some roles of mechanical usage, muscle strength, and the mechanostat in skeletal physiology, disease, and research. Calcif Tissue Int 62: 1-7 (1998)

49. Girasole G, Jilka RL, Passeri G, Boswell S, Boder G, Williams DC, Manolagas SC: 17 beta-estradiol inhibits interleukin-6 production by bone marrow-derived stromal cells and

osteoblasts in vitro: a potential mechanism for the antiosteoporotic effect of estrogens. J Clin Invest 89: 883-891 (1992)

50. Glass DA, 2nd, Bialek P, Ahn JD, Starbuck M, Patel MS, Clevers H, Taketo MM, Long F, McMahon AP, Lang RA, Karsenty G: Canonical Wnt signaling in differentiated osteoblasts controls osteoclast differentiation. Dev Cell 8: 751-764 (2005)

51. Gluhak-Heinrich J, Ye L, Bonewald LF, Feng JQ, MacDougall M, Harris SE, Pavlin D: Mechanical loading stimulates dentin matrix protein 1 (DMP1) expression in osteocytes in vivo. J Bone Miner Res 18: 807-817 (2003)

52. Going S, Lohman T, Houtkooper L, Metcalfe L, Flint-Wagner H, Blew R, Stanford V, Cussler E, Martin J, Teixeira P, Harris M, Milliken L, Figueroa-Galvez A, Weber J: Effects of exercise on bone mineral density in calcium-replete postmenopausal women with and without hormone replacement therapy. Osteoporos Int 14: 637-643 (2003)

53. Gong Y, Slee RB, Fukai N, Rawadi G, Roman-Roman S, Reginato AM, Wang H, Cundy T, Glorieux FH, Lev D, Zacharin M, Oexle K, Marcelino J, Suwairi W, Heeger S, Sabatakos G, Apte S, Adkins WN, Allgrove J, Arslan-Kirchner M, Batch JA, Beighton P, Black GC, Boles RG, Boon LM, Borrone C, Brunner HG, Carle GF, Dallapiccola B, De Paepe A, Floege B, Halfhide ML, Hall B, Hennekam RC, Hirose T, Jans A, Juppner H, Kim CA, Keppler-Noreuil K, Kohlschuetter A, LaCombe D, Lambert M, Lemyre E, Letteboer T, Peltonen L, Ramesar RS, Romanengo M, Somer H, Steichen-Gersdorf E, Steinmann B, Sullivan B, Superti-Furga A, Swoboda W, van den Boogaard MJ, Van Hul W, Vikkula M, Votruba M, Zabel B, Garcia T, Baron R, Olsen BR, Warman ML: LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development. Cell 107: 513-523 (2001)

54. Gottlicher M, Heck S, Herrlich P: Transcriptional cross-talk, the second mode of steroid hormone receptor action. J Mol Med 76: 480-489 (1998)

55. Gregory CA, Gunn WG, Reyes E, Smolarz AJ, Munoz J, Spees JL, Prockop DJ: How Wnt signaling affects bone repair by mesenchymal stem cells from the bone marrow. Ann N Y Acad Sci 1049: 97-106 (2005)

56. Haertel-Wiesmann M, Liang Y, Fantl WJ, Williams LT: Regulation of cyclooxygenase-2 and periostin by Wnt-3 in mouse mammary epithelial cells. J Biol Chem 275: 32046-32051 (2000)

57. Hall JM, Couse JF, Korach KS: The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling. J Biol Chem 276: 36869-36872 (2001)

58. Hanai J, Gloy J, Karumanchi SA, Kale S, Tang J, Hu G, Chan B, Ramchandran R, Jha V, Sukhatme VP, Sokol S: Endostatin is a potential inhibitor of Wnt signaling. J Cell Biol 158: 529-539 (2002)

59. Harada S, Rodan GA: Control of osteoblast function and regulation of bone mass. Nature 423: 349-355 (2003)

60. Hauschka PV, Mann KG, Price PA, Termine JD: Nomenclature recommendations: Bone proteins and growth factors. Coll Relat Res 6: 453-454 (1986)

61. Hens JR, Wilson KM, Dann P, Chen X, Horowitz MC, Wysolmerski JJ: TOPGAL mice show that the canonical Wnt signaling pathway is active during bone development and growth and is activated by mechanical loading in vitro. J Bone Miner Res 20: 1103-1113 (2005)

62. Hikiji H, Takato T, Shimizu T, Ishii S: The roles of prostanoids, leukotrienes, and platelet-activating factor in bone metabolism and disease. Prog Lipid Res 47: 107-126 (2008)

63. Hill TP, Spater D, Taketo MM, Birchmeier W, Hartmann C: Canonical Wnt/beta-catenin signaling prevents osteoblasts from differentiating into chondrocytes. Dev Cell 8: 727-738 (2005)

64. Hou X, Tan Y, Li M, Dey SK, Das SK: Canonical Wnt signaling is critical to estrogen-mediated uterine growth. Mol Endocrinol 18: 3035-3049 (2004)

65. Howell A, Downey S, Anderson E: New endocrine therapies for breast cancer. Eur J Cancer 32A: 576-588 (1996)

66. Howell A, Osborne CK, Morris C, Wakeling AE: ICI 182,780 (Faslodex): development of a novel, "pure" antiestrogen. Cancer 89: 817-825 (2000)

67. Hoyland JA, Baris C, Wood L, Baird P, Selby PL, Freemont AJ, Braidman IP: Effect of ovarian steroid deficiency on oestrogen receptor alpha expression in bone. J Pathol 188: 294-303 (1999)

68. Hughes DE, Dai A, Tiffee JC, Li HH, Mundy GR, Boyce BF: Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF-beta. Nat Med 2: 1132-1136 (1996)

69. Hughes-Fulford M: Signal transduction and mechanical stress. Sci STKE 2004: RE12 (2004)

70. Ibaraki K, Termine JD, Whitson SW, Young MF: Bone matrix mRNA expression in differentiating fetal bovine osteoblasts. J Bone Miner Res 7: 743-754 (1992)

71. Ignatius A, Blessing H, Liedert A, Kaspar D, Kreja L, Friemert B, Claes L: [Effects of mechanical strain on human osteoblastic precursor cells in type I collagen matrices]. Orthopade 33: 1386-1393 (2004)

72. Ikegami A, Inoue S, Hosoi T, Kaneki M, Mizuno Y, Akedo Y, Ouchi Y, Orimo H: Cell cycle-dependent expression of estrogen receptor and effect of estrogen on proliferation of synchronized human osteoblast-like osteosarcoma cells. Endocrinology 135: 782-789 (1994)

73. Jansen JH, Eijken M, Jahr H, Chiba H, Verhaar JA, van Leeuwen JP, Weinans H: Stretch-induced inhibition of Wnt/beta-catenin signaling in mineralizing osteoblasts. J Orthop Res 28: 390-396 (2010)

74. Jessop HL, Suswillo RF, Rawlinson SC, Zaman G, Lee K, Das-Gupta V, Pitsillides AA, Lanyon LE: Osteoblast-like cells from estrogen receptor alpha knockout mice have deficient responses to mechanical strain. J Bone Miner Res 19: 938-946 (2004)

75. Jilka RL: Biology of the basic multicellular unit and the pathophysiology of osteoporosis. Med Pediatr Oncol 41: 182-185 (2003)

76. Johnson ML: The high bone mass family--the role of Wnt/Lrp5 signaling in the regulation of bone mass. J Musculoskelet Neuronal Interact 4: 135-138 (2004)

77. Joldersma M, Burger EH, Semeins CM, Klein-Nulend J: Mechanical stress induces COX-2 mRNA expression in bone cells from elderly women. J Biomech 33: 53-61 (2000)

78. Joldersma M, Klein-Nulend J, Oleksik AM, Heyligers IC, Burger EH: Estrogen enhances mechanical stress-induced prostaglandin production by bone cells from elderly women. Am J Physiol Endocrinol Metab 280: E436-442 (2001)

79. Kadow-Romacker A, Hoffmann JE, Duda G, Wildemann B, Schmidmaier G: Effect of mechanical stimulation on osteoblast- and osteoclast-like cells in vitro. Cells Tissues Organs 190: 61-68 (2009)

80. Kassem M, Harris SA, Spelsberg TC, Riggs BL: Estrogen inhibits interleukin-6 production and gene expression in a human osteoblastic cell line with high levels of estrogen receptors. J Bone Miner Res 11: 193-199 (1996)

81. Kato M, Patel MS, Levasseur R, Lobov I, Chang BH, Glass DA, 2nd, Hartmann C, Li L, Hwang TH, Brayton CF, Lang RA, Karsenty G, Chan L: Cbfa1-independent decrease in osteoblast proliferation, osteopenia, and persistent embryonic eye vascularization in mice deficient in Lrp5, a Wnt coreceptor. J Cell Biol 157: 303-314 (2002)

82. Kawata A, Mikuni-Takagaki Y: Mechanotransduction in stretched osteocytes-temporal expression of immediate early and other genes. Biochem Biophys Res Commun 246: 404-408 (1998)

83. Ke HZ, Brown TA, Qi H, Crawford DT, Simmons HA, Petersen DN, Allen MR, McNeish JD, Thompson DD: The role of estrogen receptor-beta, in the early age-related bone

gain and later age-related bone loss in female mice. J Musculoskelet Neuronal Interact 2: 479-488 (2002)

84. Kohrt WM, Snead DB, Slatopolsky E, Birge SJ, Jr.: Additive effects of weight-bearing exercise and estrogen on bone mineral density in older women. J Bone Miner Res 10: 1303-1311 (1995)

85. Komm BS, Terpening CM, Benz DJ, Graeme KA, Gallegos A, Korc M, Greene GL, O'Malley BW, Haussler MR: Estrogen binding, receptor mRNA, and biologic response in osteoblast-like osteosarcoma cells. Science 241: 81-84 (1988)

86. Kousteni S, Bellido T, Plotkin LI, O'Brien CA, Bodenner DL, Han L, Han K, DiGregorio GB, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS, Roberson PK, Weinstein RS, Jilka RL, Manolagas SC: Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen or androgen receptors: dissociation from transcriptional activity. Cell 104: 719-730 (2001)

87. Kouzmenko AP, Takeyama K, Ito S, Furutani T, Sawatsubashi S, Maki A, Suzuki E, Kawasaki Y, Akiyama T, Tabata T, Kato S: Wnt/beta-catenin and estrogen signaling converge in vivo. J Biol Chem 279: 40255-40258 (2004)

88. Krishnan V, Bryant HU, Macdougald OA: Regulation of bone mass by Wnt signaling. J Clin Invest 116: 1202-1209 (2006)

89. Kusec V, Virdi AS, Prince R, Triffitt JT: Localization of estrogen receptor-alpha in human and rabbit skeletal tissues. J Clin Endocrinol Metab 83: 2421-2428 (1998)

90. Kyhse-Andersen J: Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polycrylamide to nitrocellulose. Journal of Biochemical and Biophysical Methods 10: 203-209 (1984)

91. Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685 (1970)

92. Lambertini E, Penolazzi L, Aguiari G, del Senno L, Pezzetti F, Sollazzo V, Piva R: Osteoblastic differentiation induced by transcription factor decoy against estrogen receptor alpha gene. Biochem Biophys Res Commun 292: 761-770 (2002)

93. Lau KH, Kapur S, Kesavan C, Baylink DJ: Up-regulation of the Wnt, estrogen receptor, insulin-like growth factor-I, and bone morphogenetic protein pathways in C57BL/6J osteoblasts as opposed to C3H/HeJ osteoblasts in part contributes to the differential anabolic response to fluid shear. J Biol Chem 281: 9576-9588 (2006)

94. Lean JM, Mackay AG, Chow JW, Chambers TJ: Osteocytic expression of mRNA for c-fos and IGF-I: an immediate early gene response to an osteogenic stimulus. Am J Physiol 270: E937-945 (1996)

95. Lecanda F, Warlow PM, Sheikh S, Furlan F, Steinberg TH, Civitelli R: Connexin43 deficiency causes delayed ossification, craniofacial abnormalities, and osteoblast dysfunction. J Cell Biol 151: 931-944 (2000)

96. Lee K, Jessop H, Suswillo R, Zaman G, Lanyon L: Endocrinology: bone adaptation requires oestrogen receptor-alpha. Nature 424: 389 (2003)

97. Lee MH, Kwon TG, Park HS, Wozney JM, Ryoo HM: BMP-2-induced Osterix expression is mediated by Dlx5 but is independent of Runx2. Biochem Biophys Res Commun 309: 689-694 (2003)

98. Li L, Pettit AR, Gregory LS, Forwood MR: Regulation of bone biology by prostaglandin endoperoxide H synthases (PGHS): a rose by any other name. Cytokine Growth Factor Rev 17: 203-216 (2006)

99. Liedert A, Kaspar D, Blakytny R, Claes L, Ignatius A: Signal transduction pathways involved in mechanotransduction in bone cells. Biochem Biophys Res Commun 349: 1-5 (2006)

100. Liegibel UM, Sommer U, Tomakidi P, Hilscher U, Van Den Heuvel L, Pirzer R, Hillmeier J, Nawroth P, Kasperk C: Concerted action of androgens and mechanical strain shifts bone metabolism from high turnover into an osteoanabolic mode. J Exp Med 196: 1387-1392 (2002)

101. Lim SK, Won YJ, Lee HC, Huh KB, Park YS: A PCR analysis of ERalpha and ERbeta mRNA abundance in rats and the effect of ovariectomy. J Bone Miner Res 14: 1189-1196 (1999)

102. Lindsay R, Hart DM, Aitken JM, MacDonald EB, Anderson JB, Clarke AC: Long-term prevention of postmenopausal osteoporosis by oestrogen. Evidence for an increased bone mass after delayed onset of oestrogen treatment. Lancet 1: 1038-1041 (1976)

103. Lipshutz GS, Castro DJ, Saxton RE, Haugland RP, Soudant J: Evaluation of four new carbocyanine dyes for photodynamic therapy with lasers. Laryngoscope 104: 996-1002 (1994)

104. Little RD, Carulli JP, Del Mastro RG, Dupuis J, Osborne M, Folz C, Manning SP, Swain PM, Zhao SC, Eustace B, Lappe MM, Spitzer L, Zweier S, Braunschweiger K, Benchekroun Y, Hu X, Adair R, Chee L, FitzGerald MG, Tulig C, Caruso A, Tzellas N, Bawa A, Franklin B, McGuire S, Nogues X, Gong G, Allen KM, Anisowicz A, Morales AJ, Lomedico PT, Recker SM, Van Eerdewegh P, Recker RR, Johnson ML: A mutation in the LDL receptor-related protein 5 gene results in the autosomal dominant high-bone-mass trait. Am J Hum Genet 70: 11-19 (2002)

105. Lu B, Jiang YJ, Choy PC: 17-Beta estradiol enhances prostaglandin E2 production in human U937-derived macrophages. Mol Cell Biochem 262: 101-110 (2004)

106. Majeska RJ, Ryaby JT, Einhorn TA: Direct modulation of osteoblastic activity with estrogen. J Bone Joint Surg Am 76: 713-721 (1994)

107. Matsumoto T, Nakayama K, Kodama Y, Fuse H, Nakamura T, Fukumoto S: Effect of mechanical unloading and reloading on periosteal bone formation and gene expression in tail-suspended rapidly growing rats. Bone 22: 89S-93S (1998)

108. McCarthy TL, Clough ME, Gundberg CM, Centrella M: Expression of an estrogen receptor agonist in differentiating osteoblast cultures. Proc Natl Acad Sci U S A 105: 7022-7027 (2008)

109. McDonnell DP, Norris JD: Analysis of the molecular pharmacology of estrogen receptor agonists and antagonists provides insights into the mechanism of action of estrogen in bone. Osteoporos Int 7 Suppl 1: S29-34 (1997)

110. McDougall KE, Perry MJ, Gibson RL, Colley SM, Korach KS, Tobias JH: Estrogen receptor-alpha dependency of estrogen's stimulatory action on cancellous bone formation in male mice. Endocrinology 144: 1994-1999 (2003)

111. Mehrotra M, Saegusa M, Wadhwa S, Voznesensky O, Peterson D, Pilbeam C: Fluid flow induces Rankl expression in primary murine calvarial osteoblasts. J Cell Biochem 98: 1271-1283 (2006)

112. Mikuni-Takagaki Y, Kakai Y, Satoyoshi M, Kawano E, Suzuki Y, Kawase T, Saito S: Matrix mineralization and the differentiation of osteocyte-like cells in culture. J Bone Miner Res 10: 231-242 (1995)

113. Mikuni-Takagaki Y, Suzuki Y, Kawase T, Saito S: Distinct responses of different populations of bone cells to mechanical stress. Endocrinology 137: 2028-2035 (1996)

114. Mikuni-Takagaki Y: Mechanical responses and signal transduction pathways in stretched osteocytes. J Bone Miner Metab 17: 57-60 (1999)

115. Miller JR: The Wnts. Genome Biol 3: REVIEWS3001 (2002)

116. Monroe DG, Secreto FJ, Spelsberg TC: Overview of estrogen action in osteoblasts: role of the ligand, the receptor, and the co-regulators. J Musculoskelet Neuronal Interact 3: 357-362; discussion 381 (2003)

117. Neidlinger-Wilke C, Wilke HJ, Claes L: Cyclic stretching of human osteoblasts affects proliferation and metabolism: a new experimental method and its application. J Orthop Res 12: 70-78 (1994)

118. Neidlinger-Wilke C, Stalla I, Claes L, Brand R, Hoellen I, Rubenacker S, Arand M, Kinzl L: Human osteoblasts from younger normal and osteoporotic donors show differences in proliferation and TGF beta-release in response to cyclic strain. J Biomech 28: 1411-1418 (1995)

119. Norrdin RW, Jee WS, High WB: The role of prostaglandins in bone in vivo. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 41: 139-149 (1990)

120. Norvell SM, Alvarez M, Bidwell JP, Pavalko FM: Fluid shear stress induces beta-catenin signaling in osteoblasts. Calcif Tissue Int 75: 396-404 (2004)

121. Nose K, Shibanuma M: Induction of early response genes by hypergravity in cultured mouse osteoblastic cells (MC3T3-E1). Exp Cell Res 211: 168-170 (1994)

122. Ogasawara A, Arakawa T, Kaneda T, Takuma T, Sato T, Kaneko H, Kumegawa M, Hakeda Y: Fluid shear stress-induced cyclooxygenase-2 expression is mediated by C/EBP beta, cAMP-response element-binding protein, and AP-1 in osteoblastic MC3T3-E1 cells. J Biol Chem 276: 7048-7054 (2001)

123. Ohmichi M, Tasaka K, Kurachi H, Murata Y: Molecular mechanism of action of selective estrogen receptor modulator in target tissues. Endocr J 52: 161-167 (2005)

124. Ominsky MS, Stolina M, Li X, Corbin TJ, Asuncion FJ, Barrero M, Niu QT, Dwyer D, Adamu S, Warmington KS, Grisanti M, Tan HL, Ke HZ, Simonet WS, Kostenuik PJ: One year of transgenic overexpression of osteoprotegerin in rats suppressed bone resorption and increased vertebral bone volume, density, and strength. J Bone Miner Res 24: 1234-1246 (2009)

125. Onken D: Steroide - Zur Chemie und Anwendung. 20f (1971)

126. Osborne CK, Wakeling A, Nicholson RI: Fulvestrant: an oestrogen receptor antagonist with a novel mechanism of action. Br J Cancer 90 Suppl 1: S2-6 (2004)

127. Oursler MJ, Osdoby P, Pyfferoen J, Riggs BL, Spelsberg TC: Avian osteoclasts as estrogen target cells. Proc Natl Acad Sci U S A 88: 6613-6617 (1991)

128. Pavalko FM, Norvell SM, Burr DB, Turner CH, Duncan RL, Bidwell JP: A model for mechanotransduction in bone cells: the load-bearing mechanosomes. J Cell Biochem 88: 104-112 (2003)

129. Peake MA, Cooling LM, Magnay JL, Thomas PB, El Haj AJ: Selected contribution: regulatory pathways involved in mechanical induction of c-fos gene expression in bone cells. J Appl Physiol 89: 2498-2507 (2000)

130. Pilbeam CC, Kawaguchi H, Hakeda Y, Voznesensky O, Alander CB, Raisz LG: Differential regulation of inducible and constitutive prostaglandin endoperoxide synthase in osteoblastic MC3T3-E1 cells. J Biol Chem 268: 25643-25649 (1993)

131. Plant MH, Laneuville O: Characterization of a novel transcript of prostaglandin endoperoxide H synthase 1 with a tissue-specific profile of expression. Biochem J 344 Pt 3: 677-685 (1999)

132. Preisinger E: RANK/RANK-Ligand/OPG: Ein neuer Therapieansatz in der Osteoporosebehandlung. J Miner Stoffwechs 14: 144-145 (2007)

133. Raisz LG, Pilbeam CC, Fall PM: Prostaglandins: mechanisms of action and regulation of production in bone. Osteoporos Int 3 Suppl 1: 136-140 (1993)

134. Rawadi G, Vayssiere B, Dunn F, Baron R, Roman-Roman S: BMP-2 controls alkaline phosphatase expression and osteoblast mineralization by a Wnt autocrine loop. J Bone Miner Res 18: 1842-1853 (2003)

135. Renoir JM, Radanyi C, Faber LE, Baulieu EE: The non-DNA-binding heterooligomeric form of mammalian steroid hormone receptors contains a hsp90-bound 59-kilodalton protein. J Biol Chem 265: 10740-10745 (1990)

136. Reznikoff CA, Brankow DW, Heidelberger C: Establishment and characterization of a cloned line of C3H mouse embryo cells sensitive to postconfluence inhibition of division. Cancer Res 33: 3231-3238 (1973)

137. Rickard DJ, Subramaniam M, Spelsberg TC: Molecular and cellular mechanisms of estrogen action on the skeleton. J Cell Biochem Suppl 32-33: 123-132 (1999)

138. Rios HF, Ye L, Dusevich V, Eick D, Bonewald LF, Feng JQ: DMP1 is essential for osteocyte formation and function. J Musculoskelet Neuronal Interact 5: 325-327 (2005)

139. Robinson JA, Chatterjee-Kishore M, Yaworsky PJ, Cullen DM, Zhao W, Li C, Kharode Y, Sauter L, Babij P, Brown EL, Hill AA, Akhter MP, Johnson ML, Recker RR, Komm BS, Bex FJ: Wnt/beta-catenin signaling is a normal physiological response to mechanical loading in bone. J Biol Chem 281: 31720-31728 (2006)

140. Rodriguez JP, Rios S, Fernandez M, Santibanez JF: Differential activation of ERK1,2 MAP kinase signaling pathway in mesenchymal stem cell from control and osteoporotic postmenopausal women. J Cell Biochem 92: 745-754 (2004)

141. Roodman GD: Interleukin-6: an osteotropic factor? J Bone Miner Res 7: 475-478 (1992)

142. Sanchez ER: Hsp56: a novel heat shock protein associated with untransformed steroid receptor complexes. J Biol Chem 265: 22067-22070 (1990)

143. Saunders MM, Taylor AF, Du C, Zhou Z, Pellegrini VD, Jr., Donahue HJ: Mechanical stimulation effects on functional end effectors in osteoblastic MG-63 cells. J Biomech 39: 1419-1427 (2006)

144. Sawakami K, Robling AG, Ai M, Pitner ND, Liu D, Warden SJ, Li J, Maye P, Rowe DW, Duncan RL, Warman ML, Turner CH: The Wnt co-receptor LRP5 is essential for skeletal mechanotransduction but not for the anabolic bone response to parathyroid hormone treatment. J Biol Chem 281: 23698-23711 (2006)

145. Scholten AN, Creutzberg CL, van den Broek LJ, Noordijk EM, Smit VT: Nuclear beta-catenin is a molecular feature of type I endometrial carcinoma. J Pathol 201: 460-465 (2003)

146. Secreto FJ, Grover A, Pacurari M, Rice MB, Kantorow M, Bidwai AP, Blaha JD, Keeting PE: Estrogen potentiates the combined effects of transforming growth factor-beta and tumor necrosis factor-alpha on adult human osteoblast-like cell prostaglandin E2 biosynthesis. Calcif Tissue Int 73: 565-574 (2003)

147. Sen B, Styner M, Xie Z, Case N, Rubin CT, Rubin J: Mechanical loading regulates NFATc1 and beta-catenin signaling through a GSK3beta control node. J Biol Chem 284: 34607-34617 (2009)

148. Shaftel SS, Olschowka JA, Hurley SD, Moore AH, O'Banion MK: COX-3: a splice variant of cyclooxygenase-1 in mouse neural tissue and cells. Brain Res Mol Brain Res 119: 213-215 (2003)

149. Shoback D: Update in osteoporosis and metabolic bone disorders. J Clin Endocrinol Metab 92: 747-753 (2007)

150. Si W, Kang Q, Luu HH, Park JK, Luo Q, Song WX, Jiang W, Luo X, Li X, Yin H, Montag AG, Haydon RC, He TC: CCN1/Cyr61 is regulated by the canonical Wnt signal and plays an important role in Wnt3A-induced osteoblast differentiation of mesenchymal stem cells. Mol Cell Biol 26: 2955-2964 (2006)

151. Smith CL: Cross-talk between peptide growth factor and estrogen receptor signaling pathways. Biol Reprod 58: 627-632 (1998)

152. Smith EP, Boyd J, Frank GR, Takahashi H, Cohen RM, Specker B, Williams TC, Lubahn DB, Korach KS: Estrogen resistance caused by a mutation in the estrogen-receptor gene in a man. N Engl J Med 331: 1056-1061 (1994)

153. Spelsberg TC, Subramaniam M, Harris SA, Oursler MJ, Schuchard M, Landers JP, Punkay N: Nuclear Proto-oncogenes as Regulatory Genes and as Marker Genes for Steroid Action in All Target Tissues. CRC Press, Boca Raton, FL 19-63 (1992)

154. Spencer GJ, Utting JC, Etheridge SL, Arnett TR, Genever PG: Wnt signalling in osteoblasts regulates expression of the receptor activator of NFkappaB ligand and inhibits osteoclastogenesis in vitro. J Cell Sci 119: 1283-1296 (2006)

155. Stossi F, Barnett DH, Frasor J, Komm B, Lyttle CR, Katzenellenbogen BS: Transcriptional profiling of estrogen-regulated gene expression via estrogen receptor (ER) alpha or ERbeta in human osteosarcoma cells: distinct and common target genes for these receptors. Endocrinology 145: 3473-3486 (2004)

156. Sunters A, Armstrong VJ, Zaman G, Kypta RM, Kawano Y, Lanyon LE, Price JS: Mechano-transduction in osteoblastic cells involves strain-regulated estrogen receptor alpha-mediated control of insulin-like growth factor (IGF) I receptor sensitivity to Ambient IGF, leading to phosphatidylinositol 3-kinase/AKT-dependent Wnt/LRP5 receptor-independent activation of beta-catenin signaling. J Biol Chem 285: 8743-8758 (2010)

157. Suzuki S, Koga M, Takaoka K, Ono K, Sato B: Effects of retinoic acid on steroid and vitamin D3 receptors in cultured mouse osteosarcoma cells. Bone 14: 7-12 (1993)

158. Syed F, Khosla S: Mechanisms of sex steroid effects on bone. Biochem Biophys Res Commun 328: 688-696 (2005)

159. Takano-Yamamoto T, Rodan GA: Direct effects of 17 beta-estradiol on trabecular bone in ovariectomized rats. Proc Natl Acad Sci U S A 87: 2172-2176 (1990)

160. Thomas GP, Baker SU, Eisman JA, Gardiner EM: Changing RANKL/OPG mRNA expression in differentiating murine primary osteoblasts. J Endocrinol 170: 451-460 (2001)

161. Tomkinson A, Gevers EF, Wit JM, Reeve J, Noble BS: The role of estrogen in the control of rat osteocyte apoptosis. J Bone Miner Res 13: 1243-1250 (1998)

162. Tou JC, Foley A, Yuan YV, Arnaud S, Wade CE, Brown M: The effect of ovariectomy combined with hindlimb unloading and reloading on the long bones of mature Sprague-Dawley rats. Menopause 15: 494-502 (2008)

163. Turner RT, Vandersteenhoven JJ, Bell NH: The effects of ovariectomy and 17 beta-estradiol on cortical bone histomorphometry in growing rats. J Bone Miner Res 2: 115-122 (1987)

164. Varea O, Arevalo MA, Garrido JJ, Garcia-Segura LM, Wandosell F, Mendez P: Interaction of estrogen receptors with insulin-like growth factor-I and Wnt signaling in the nervous system. Steroids (2009)

165. Varea O, Garrido JJ, Dopazo A, Mendez P, Garcia-Segura LM, Wandosell F: Estradiol activates beta-catenin dependent transcription in neurons. PLoS One 4: e5153 (2009)

166. Verma S, Rajaratnam JH, Denton J, Hoyland JA, Byers RJ: Adipocytic proportion of bone marrow is inversely related to bone formation in osteoporosis. J Clin Pathol 55: 693-698 (2002)

167. Vogel V: Mechanotransduction involving multimodular proteins: converting force into biochemical signals. Annu Rev Biophys Biomol Struct 35: 459-488 (2006)

168. Wadhwa S, Choudhary S, Voznesensky M, Epstein M, Raisz L, Pilbeam C: Fluid flow induces COX-2 expression in MC3T3-E1 osteoblasts via a PKA signaling pathway. Biochem Biophys Res Commun 297: 46-51 (2002)

169. Wehling M, Schultz A, Losel R: Nongenomic actions of estrogens: exciting opportunities for pharmacology. Maturitas 54: 321-326 (2006)

170. Westendorf JJ, Kahler RA, Schroeder TM: Wnt signaling in osteoblasts and bone diseases. Gene 341: 19-39 (2004)

171. Wiren KM, Chapman Evans A, Zhang XW: Osteoblast differentiation influences androgen and estrogen receptor-alpha and -beta expression. J Endocrinol 175: 683-694 (2002)

172. Wolff J: Das Gesetz der Transformation der Knochen. Berlin: Verlag von August Hirschwald (1892)

173. Yeh CR, Chiu JJ, Lee CI, Lee PL, Shih YT, Sun JS, Chien S, Cheng CK: Estrogen augments shear stress-induced signaling and gene expression in osteoblast-like cells via estrogen receptor-mediated expression of beta1-integrin. J Bone Miner Res 25: 627-639 (2010)

174. Yoshida K, Shinohara H, Haneji T, Nagata T: Arachidonic acid inhibits osteoblast differentiation through cytosolic phospholipase A2-dependent pathway. Oral Dis 13: 32-39 (2007)

175. Yu H, de Vos P, Ren Y: Overexpression of osteoprotegerin promotes preosteoblast differentiation to mature osteoblasts. Angle Orthod 81: 102-108 (2011)

176. Yu HC, Wu TC, Chen MR, Liu SW, Chen JH, Lin KM: Mechanical stretching induces osteoprotegerin in differentiating C2C12 precursor cells through noncanonical Wnt pathways. J Bone Miner Res 25: 1128-1137 (2010)

177. Yun K, Im SH: Lef1 regulates COX-2 transcription in chondrocytes. Biochem Biophys Res Commun 364: 270-275 (2007)

178. Zallone A: Direct and indirect estrogen actions on osteoblasts and osteoclasts. Ann N Y Acad Sci 1068: 173-179 (2006)

179. Zaman G, Cheng MZ, Jessop HL, White R, Lanyon LE: Mechanical strain activates estrogen response elements in bone cells. Bone 27: 233-239 (2000)

180. Zaman G, Jessop HL, Muzylak M, De Souza RL, Pitsillides AA, Price JS, Lanyon LL: Osteocytes use estrogen receptor alpha to respond to strain but their ERalpha content is regulated by estrogen. J Bone Miner Res 21: 1297-1306 (2006)

181. Zhang X, Aubin JE, Inman RD: Molecular and cellular biology of new bone formation: insights into the ankylosis of ankylosing spondylitis. Curr Opin Rheumatol 15: 387-393 (2003)

182. Ziros PG, Gil AP, Georgakopoulos T, Habeos I, Kletsas D, Basdra EK, Papavassiliou AG: The bone-specific transcriptional regulator Cbfa1 is a target of mechanical signals in osteoblastic cells. J Biol Chem 277: 23934-23941 (2002)

Danksagung

Herzlichen Dank sagen möchte ich:

Frau Prof. Dr. med. vet. Anita Ignatius für die Möglichkeit der Promotion am Institut für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik, für die Überlassung des Themas dieser Arbeit, Ihre Unterstützung, sowie für die Begutachtung meiner Doktorarbeit.

Herrn Prof. Dr. med. Rolf Brenner für die Übernahme des zweiten Gutachtens.

Frau Dr. rer. nat. Astrid Liedert für Ihre stets aufgeschlossene, freundliche und hilfsbereite Betreuung.

Herrn Lian Hu und Frau Nadine Todt für Ihre kompetenten Ratschläge, Zeit und Geduld.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik für die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Meiner Familie und meinen Freunden, die immer für mich da waren.