Analyse der Expression und Modifikation von Proteintyrosinkinasen der FAK (Focal Adhesion Kinase) - Familie in osteoblastischen Zellen der Ratte (*Rattus norvegicus*) und des Menschen (*Homo sapiens*)

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades des Fachbereichs Biologie der Universität Hamburg

> vorgelegt von Andrea Schröder aus Gütersloh

Hamburg 2003

Genehmigt vom Fachbereich Biologie der Universität Hamburg Auf Antrag von Herrn Professor Dr. med. G. Delling

Zweitgutachter der Dissertation: Herr Professor Dr. L. Renwrantz

Tag der Disputation: 10.01.2003

Hamburg, den 24.02.2003

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I-IV
A. Zusammenfassung	1
B. Einleitung	3
B.1. Biologie des Osteoblasten	3
B.1.1. Stadien der Osteoblastendifferenzierung	3
B.1.2. Funktion des Osteoblasten im Knochen	3
B.1.3. Regulation der Zellfunktion durch lokale und systemische Faktoren	5
B.1.4. Das Osteosarkom	10
B.2. Die Proteintyrosinkinase Focal Adhesion Kinase (FAK)	11
B.2.1. Entdeckung der FAK-Familie	11
B.2.2. Struktur von FAK und Pyk2	12
B.2.3. Bisheriger Erkenntnisstand zur FAK-Funktion im Knochen	13
B.2.4. Die Rolle von FAK und Pyk2 in Tumoren	14
B.3. Ziel dieser Arbeit	16
C. Materialien und Methoden	17
C.1. Materialien	17
C.1.1. Chemikalien	17
C.1.2. Zellkulturmaterialien	17
C.1.3. Materialien für Proteinanalysen	19
C.1.4. Materialien für immunologische und chemische Färbungen	
C.1.5. Materialien für Nukleinsäureanalysen	
C.1.6. Großgeräte	
C.2. Methoden	
C.2.1. Zellkulturmethoden	
C.2.1.1. Isolierung von Knochenmarks-Stromazellen und Zellen der primären Spor	1-
giosa aus Rattenfemura	
C.2.1.2. Kultivierung von Zellinien	
C.2.1.3. Kultivierung von humanen Osteoblasten aus Spongiosaproben	
C.2.1.4. Trypsinieren der Zellen zur Passagierung	
C.2.1.5. Stimulation von mesenchymalen Zellen mit osteogenem Medium	

L

C.2.1.6. Kryokonservierung von Zellen	29
C.2.1.7. Fixieren von Zellen	29
C.2.1.8. Behandlung von Zellen mit PDGF, PTH und/oder Inhibitoren	30
C.2.1.9. Adhäsion von Zellen auf verschiedenen Matrices	30
C.2.1.10. Lysieren von Zellen zur Proteinisolierung	31
C.2.1.11 Transfektion	31
C.2.2. Methoden zur Proteinanalyse	32
C.2.2.1. Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen	32
C.2.2.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	32
C.2.2.3. Western-Blot	33
C.2.2.4. Immunnachweis von Proteinen auf Nitrocellulosemembranen	33
C.2.2.5. Quantitative Auswertung der Western-Blots	34
C.2.3. Immunologische und chemische Färbungen	34
C.2.3.1. Von-Kossa-Färbung	34
C.2.3.2. Alkalische-Phosphatase-Färbung	35
C.2.3.3. Phalloidin-Färbung	35
C.2.3.4. Immunfluoreszenz-Färbung	35
C.2.3.5. Immunhistochemische Färbung mit dem APAAP-System	36
C.2.4. Methoden zur Nukleinsäureanalyse	36
C.2.4.1. RNA-Isolierung	36
C.2.4.2. RNA-Konzentrationsbestimmung	37
C.2.4.3. Kontrolle der RNA-Qualität im Agarosegel	37
C.2.4.4. Kontrolle der DNA-Degradation über Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	38
C.2.4.5. Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR)	38
C.2.4.6. Reverse Transkription der RNA in cDNA	39
C.2.4.7. Extraktion von PCR-Produkten aus Agarosegelen	40
C.2.4.8. Klonierung von PCR-Produkten	40
C.2.4.9. Plasmidisolierung	40
C.2.4.10. Real-Time-PCR	41
D. Ergebnisse	43
D.1. Auswahl des Zellsystems und Charakterisierung der isolierten Zel-	-
len	43
D.1.1. Auswahl des Zellsystems	43
D.1.2. Charakterisierung der isolierten Zellen im Hinblick auf ihren Entwicklung	5 8-

status	. 44
D.1.2.1. Alkalische Phosphatase-Aktivität und Matrix-Kalzifizierung	. 44
D.1.2.2. Expression von Markern der Osteoblastenlinie auf mRNA-Ebene	. 46
D.1.2.3. Veränderung des Phänotyps bei Stimulation der Zellen mit osteogenem Me-	
dium	. 46
D.1.3. Expression und subzelluläre Lokalisation von FAK	. 49
D.2. Analyse der FAK-Modifikation im Rahmen der PDGF- bzw. PTH-	
Signaltransduktion im etablierten Zellsystem	. 50
D.2.1. Autophosphorylierung von FAK nach PDGF- bzw. PTH-Stimulation	. 50
D.2.2. Expression der Rezeptoren für PDGF bzw. PTH in den untersuchten Zellen.	. 53
D.2.3. Analyse der die FAK-Autophosphorylierung regulierenden Signalmoleküle	. 54
D.2.3.1. PDGF-Signaltransduktion	. 54
D.2.3.2. PTH-Signaltransduktion	. 59
D.2.4. Subzelluläre Lokalisation von FAK nach Stimulation der Zellen mit PDGF	
bzw. PTH	. 63
D.2.5. Einfluß des Zytoskeletts auf die PDGF-Signaltransduktion zu FAK	. 64
D.3. Analyse der Expression und Funktion von FAK und Pyk2 in hoch-	
malignen Osteosarkomen	. 66
D.3.1. Qualitative Untersuchung der FAK- und Pyk2-Expression in Osteoblasten	
und hochmalignen Osteosarkomen	. 66
D.3.2. Auswahl der Vergleichszellen	. 70
D.3.3. Analyse der FAK- und Pyk2-Expression auf mRNA-Ebene	. 71
E. Diskussion	. 78
E.1. Analyse des Zellsystems	. 78
E.2. Analyse der Signaltransduktion nach PDGF- bzw. PTH-Stimulation	
in den charakterisierten Zellen	82
E.3. Analyse der Expression von FAK und Pyk2 in hochmalignen Osteo-	
sarkomen und normalen humanen Osteoblasten	91
F A Aushlialz	. 71
	. 74
r. Literatur	. 96
G. Anhang	105
C 1 Datan day untarguation Ostaagankama und Narmalnyahan	105

G.2. Plasmidkarte Klonierungsvektor pCR2.1	
H. Abkürzungen	
Danksagung	
Lebenslauf	

A. Zusammenfassung

Die Proteintyrosinkinase FAK ist maßgeblich an der integrinvermittelten Signaltransduktion in verschiedenen Zelltypen beteiligt. Sie nimmt aber auch eine besondere Stellung im Rahmen der Signaltransduktion, die durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren bzw. Rezeptor-Tyrosinkinasen ausgelöst wird, ein. Die Bedeutung von FAK und der ihr homologen Tyrosinkinase Pyk2 im Osteoblasten wurde bisher nur in geringem Umfang untersucht. Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit geklärt werden, welche Stellung FAK in der durch PDGF (Platelet Derived Growth Factor) bzw. PTH (Parathyroidhormon) induzierten Signaltransduktion in osteoblastischen Zellen einnimmt. Hierzu wurde ein Zellsystem etabliert, das die parallele Untersuchung von sehr frühen Vorläufern der osteoblastischen Linie (*str-Zellen*) und einer Population von Präosteoblasten/Osteoblasten (*psp-Zellen*) erlaubt.

Es stellte sich hierbei heraus, daß in den str-Zellen zwar die PDGF-, nicht aber die PTH-Stimulation eine Autophosphorylierung, also Aktivierung, von FAK hervorruft. In den differenzierteren psp-Zellen können beide Stimuli FAK aktivieren. Dieses Phänomen beruht nicht auf der mRNA-Expression der Rezeptorgene. Die Expression aller drei Rezeptoren ist in den str-Zellen erhöht gegenüber den psp-Zellen.

Die Analyse der Signaltransduktionswege vom PDGF-Rezeptor zu FAK zeigte, daß in beiden Zelltypen die durch PDGF generierten Signale über PI3K (Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase), nicht aber über PKC (Proteinkinase C) vermittelt werden. Die direkte Aktivierung von PKC über PMA (Phorbol-12-Myristyl-14-Acetat) ruft allerdings in den str-Zellen eine FAK-Aktivierung hervor. Dies zeigt, daß FAK in diesen Zellen durch PKC aktiviert werden kann, diese Kinase aber in der PDGF-vermittelten Signaltransduktion zu FAK keine Rolle spielt. In den psp-Zellen ruft PMA eine nur schwache Aktivierung von FAK hervor. Dies weist daraufhin, daß PKC in den psp-Zellen auch in anderen Signaltransduktionswegen keinen Einfluß auf FAK ausübt.

Die Analyse der PTH-induzierten FAK-Aktivierung zeigte, daß die Signale in den psp-Zellen über PKA (Proteinkinase A) und nicht über PKC zu FAK vermittelt werden. Die direkte Stimulierung von PKA über Forskolin zeigte, daß auch diese in den str-Zellen keine FAK-Aktivierung hervorrief. In den psp-Zellen hingegen wurde nach Forskolin-Stimulation sogar ein stärkerer Anstieg der FAK-Autophosphorylierung beobachtet als durch PTH. Diese Ergebnisse zeigen, daß in den str-Zellen FAK nicht in die PTHvermittelte Signaltransduktion involviert ist und auch gegen die Stimulation durch PKA Genehmigt vom Fachbereich Biologie der Universität Hamburg Auf Antrag von Herrn Professor Dr. med. G. Delling

Zweitgutachter der Dissertation: Herr Professor Dr. L. Renwrantz

Tag der Disputation: 10.01.2003

Hamburg, den 24.02.2003

Genehmigt vom Fachbereich Biologie der Universität Hamburg Auf Antrag von Herrn Professor Dr. med. G. Delling

Zweitgutachter der Dissertation: Herr Professor Dr. L. Renwrantz

Tag der Disputation: 10.01.2003

Hamburg, den 24.02.2003

unempfindlich reagiert. In den psp-Zellen hingegen rufen sowohl die Stimulation mit PTH als auch die direkte Aktivierung von PKA eine FAK-Aktivierung hervor.

Auch das Zytoskelett und die subzelluläre Lokalisation von FAK scheinen von Bedeutung für die PDGF-vermittelte Signaltransduktion zu sein: die Beeinträchtigung der Neuformation von Aktinfasern durch CytochalasinD reduziert die nach PDGF-Stimulation beobachtete FAK-Autophosphorylierung stark. Weiterhin konnte nach PDGF-Gabe eine Lokalisationsveränderung von FAK beobachtet werden: in unstimulierten Zellen ist FAK eher perinukleär lokalisiert, nach PDGF-Gabe hingegen über das gesamte Plasma verteilt und in den Fokalkontakten in der Peripherie der Zellen lokalisiert. Dies legt den Schluß nahe, daß FAK durch ein intaktes Zytoskelett in die Fokalkontakte geleitet wird, um dort mit anderen Signalproteinen in Kontakt zu treten.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die Expression von FAK und Pyk2 in hochmalignen Osteosarkomen im Vergleich zu normalen humanen Osteoblasten untersucht. Es zeigte sich hierbei, daß sowohl normale Osteoblasten als auch Tumorosteoblasten eine distinkte FAK- und Pyk2-Expression auf Proteinebene aufweisen. Die quantitative mRNA-Analyse über Real-Time-PCR zeigte, daß die FAK-Expression in den Osteosarkomen den normalen Osteoblasten enspricht, die Pyk2-Expression jedoch im Tumor herunterreguliert ist. Ähnliche Ergebnisse wurden bereits für das Prostatakarzinom veröffentlicht.

In dieser Arbeit wurde erstmals die Einbindung von FAK in die PDGF- bzw. PTHvermittelte Signaltransduktion in osteoblastischen Zellen analysiert. Es ergab sich hierbei das Grundgerüst für ein Signaltransduktionsmodell, das durch erweiterte Analysen vervollständigt werden sollte. Ebenso wurden erste Anhaltspunkte für die Bedeutung von FAK und Pyk2 in hochmalignen Osteosarkomen gewonnen. Die weitere Analyse der Signaltransduktion von FAK und Pyk2 besonders in inasiven Tumorosteoblasten könnte eine Basis für neue Therapieansätze darstellen.

B. Einleitung

B.1. Biologie des Osteoblasten

B.1.1. Stadien der Osteoblastendifferenzierung

Osteogene Zellen entstehen aus multipotenten mesenchymalen Stammzellen. Belegt wird die osteogene Differenzierung dieser Zellen durch das Potential von Stromazellklonen in vivo und in vitro ein vollständiges Knochenorgan zu bilden (Aubin et al. 1993). Weiterhin sind die multipotenten Stammzellen in der Lage, in verschiedene weitere Zellarten zu differenzieren. Es ist noch nicht genau geklärt, welche Faktoren im Verlauf der Differenzierung zu welchem Zeitpunkt auf die Zellen einwirken. Es ist aber bekannt, daß Glukokortikoide (Grigoriadis et al. 1988) und die Bone Morphogenic Proteins (Knochenmorphogenese-Proteine, BMPs) (Katagiri et al. 1990) die Osteoblastenentwicklung fördern. Die frühste Stufe der osteoblastären Linie stellt der Osteoprogenitor dar, der hauptsächlich im Knochenmark und im Periost vorliegt (Lian et al. 1999). Der Osteoprogenitor besitzt ein limitiertes Selbsterneuerungs- und ein hohes proliferatives Potential (Aubin and Liu 1996). Während der proliferativen Phase üben besonders mitogene Wachstumsfaktoren wie FGF oder PDGF (s.u.) Einfluß auf die Zellen aus (Lian et al. 1999). Die nächste Differenzierungsstufe ist der Präosteoblast. Er liegt im Knochen in nächster Nähe zu den matrixproduzierenden Osteoblasten. Gesteuert durch verschiedene Transkriptionsfaktoren wird der Übergang vom proliferierenden Präosteoblasten zum postproliferativen Osteoblasten, der eine kuboidale Form annimmt und die Knochenmatrix sezerniert, induziert (Stein et al. 1996). Der aktive Osteoblast ist zudem an seiner starken Alkalischen-Phosphatase-Aktivität zu erkennen. Im Gegensatz zum aktiv sezernierenden kubischen Osteoblasten sind Bone Lining Cells abgeflachte, nicht aktive Osteoblasten, die auf Umbau-inaktiven Knochenoberflächen lokalisiert sind (Lian et al. 1999). Osteoblasten können aber auch in die von ihnen sezernierte Matrix eingebettet werden und die terminal differenzierten Osteozyten bilden. Diese sind ruhende Zellen, die aber nicht metabolisch inert sind, sondern in Form eines kommunizierenden Netzwerkes den gesamten Knochen durchspannen und untereinander über ihre Zellfortsätze verbunden sind (Civitelli et al. 1993).

B.1.2. Funktion des Osteoblasten im Knochen

Osteoblasten sind für den Aufbau des Knochens verantwortlich, während Osteoklasten die Matrix abbauen. Im Normalfall wird hier ein Gleichgewicht (*Remodeling*) aufrechterhalten, das im pathologischen Zustand außer Kontrolle geraten kann. Osteoklasten entstam-

men der hämatopoetischen Linie und entstehen durch Fusion von einkernigen Vorläuferzellen der Monozytenlinie (Hattersley et al. 1991). Sie besitzen im Normalfall vier bis 20 Zellkerne. Die der Knochenoberfläche aufliegenden Osteoklasten bilden an der Zellunterseite ein Resorptionskompartiment. Begrenzt wird das Kompartiment durch die sog. *sealing zone* (Verschluß-Zone) der Osteoklasten, in der die transmembranalen Integrine an bestimmte Sequenzen der Knochenmatrixproteine (RGD-Sequenz) binden. Über den Bürstensaum (*ruffled border*) des Osteoklasten werden in das Resorptionskompartiment hydrolytische Enzyme abgegeben. Durch die Absonderung von Protonen wird zusätzlich der pH-Wert herabgesetzt, wodurch die anorganischen Bestandteile der Matrix herausgelöst und anschließend die organischen Bestandteile enzymatisch zersetzt werden (Baron 1999; Hayase et al. 1997; Jee 1983).

Im Skelettgesunden sind die Funktionen von Osteoklasten und Osteoblasten zeitlich und räumlich voneinander abhängig (*Coupling*). Da der Osteoblast Rezeptoren für Zytokine, Parathryoidhormon, Vitamin D₃ und Östrogen aufweist, ist er maßgeblich an der Regulation des Remodelings beteiligt. Außerdem sind osteoblastische Stromazellen eine der Hauptquellen für *Colony Stimulating Factors* (Kolonie-stimulierende Faktoren, CSFs) und Interleukin-6 (IL-6), die auf die Osteoklastogenese einwirken und potente Stimulatoren der Knochenresorption sind (Lian et al. 1999). Ein kürzlich identifizierter wichtiger Regulationsmechanismus wird ebenfalls von Osteoblasten gesteuert. Der membranständige ODF (Osteoklasten-Differenzierungs-Faktor) auf Osteoblasten bindet an den Rezeptor RANK auf den Osteoklasten und induziert damit deren Differenzierung und Aktivierung. Gleichzeitig kann durch den löslichen, von Osteoblasten sezernierten Faktor OPG (Osteoprotegerin) diese Stimulation eingeschränkt werden (Simonet et al. 1997).

Die vom Osteoblasten synthetisierte Matrix besteht zu 90% aus Kollagen TypI, aber auch zu geringen Mengen aus Kollagen Typ III, IV und X. Auch exogene Proteine, wie Albumin oder α 2-HS-Glykoprotein finden sich in der Knochenmatrix und machen den Großteil der nicht-kollagenen Proteine aus. Die vom Osteoblasten sezernierten nicht-kollagenen Proteine lassen sich in vier Gruppen aufteilen: 1) Proteoglykane, 2) Glykoproteine, 3) glykosylierte Anheftungsproteine und 4) γ -carboxylierte (gla)-Proteine. Proteoglykane sind für die Integrität der Matrix verantwortlich und bilden das Grundgerüst aus. Glykoproteine des Knochens sind u.a. die Alkalische Phosphatase, deren Funktion noch nicht genau bekannt ist, der aber eine Funktion in der Spaltung von Pyrophosphat zugeschrieben wird, und Osteonektin, das an der Knochenzellproliferation und der Anlagerung von Hydroxylapatit in die Knochenmatrix beteiligt ist. Glykosylierte Anheftungsproteine des Knochens sind u.a. Fibronektin, Vitronektin, Thrombospondin, Osteopontin und Bone Sialoprotein. Alle diese Proteine besitzen RGD (Arg-Gly-Asn)-Sequenzen, die als Erkennungssequenz für die transmembranalen Integrine dienen, die die Anheftung der Knochenzellen und damit ihre geordnete Funktion koordinieren. Gla-Proteine des Knochens sind Matrix-Gla-Protein, Osteokalzin und Protein S. Die posttranslationale Modifikation dieser Proteine mit Dicarboxy-Glutamyl-Resten unterstützt die Bindung von Kalzium in die Knochenmatrix (Lian et al. 1999).

Zellen der Osteoblastenlinie, vornehmlich die Osteozyten und die Bone Lining Cells stehen miteinander über Zellfortsätze in Kontakt. Es wird angenommen, daß dieses Netzwerk im ganzen Knochen, vermittelt durch interstitielle Flüssigkeit, als Mechanosensor dient und damit das Remodeling an die jeweiligen Anforderungen adaptiert (Burger and Klein-Nulen 1999).

B.1.3. Regulation der Zellfunktion durch lokale und systemische Faktoren

Das Remodeling des Knochens wird durch systemische Hormone und lokale Faktoren reguliert. Diese nehmen Einfluß auf die Proliferation und Differenzierung von undifferenzierten Zellen, führen Zellen an ihre Bestimmungsorte und regulieren deren Funktion. Im Knochen sind unter den lokalen Faktoren besonders Wachstumsfaktoren und Zytokine von Bedeutung, die größtenteils von den Osteoblasten, seltener von Stromazellen oder Zellen des Immun- und hämatologischen Systems produziert werden (Lian et al. 1999).

Unter den Peptid-Wachstumsfaktoren sind im Knochen die *Insulin-like Growth Factors* I und II (Insulin-ähnliche Wachstumsfaktoren, IGFs) die am besten untersuchten. *In vitro* steigern die IGFs die Kollagen- und Matrix-Synthese und die Proliferation von Zellen der Osteoblastenlinie (Hock et al. 1988). Zusätzlich vermindern IGFs die Expression der Matrix-Metalloproteinase-13 (MMP-13, Kollagenase-3) und damit die Degradation der Extrazellulären Matrix (Canalis et al. 1995).

Aus der *Transforming Growth Factor* (Transformierender Wachstumsfaktor, TGF)-β-Familie werden in Knochenzellen die Faktoren TGF-β1, TGF-β2 und TGF-β3 exprimiert (Canalis et al. 1993). TGFs stimulieren die Bildung von Osteoblasten aus Vorläuferzellen und haben ebenfalls einen direkten stimulatorischen Einfluß auf die Kollagensynthese. Zusätzlich vermindern TGFs die Knochenresorption durch Stimulierung der Osteoklasten-Apoptose (Centrella et al. 1991). Weiterhin werden aus der TGF-β-Familie die *Bone* *Morphogenic Proteins* (Knochenmorphogenese-Proteine, BMPs) exprimiert, die als osteoinduktive Faktoren die enchondrale Knochenbildung induzieren und auch eine bedeutende Rolle während der Frakturheilung spielen (Wozney et al. 1988).

Aus der Familie der *Fibroblast Growth Factors* (Fibroblasten-Wachstumsfaktor, FGF) werden acidic FGF (saurer FGF, aFGF) und basic FGF (basischer FGF, bFGF) im Knochen exprimiert. Sie haben angiogenes Potential, daher wird ihnen eine Bedeutung in der Neovaskularisation und in der Wundheilung zugesprochen. Weiterhin stimulieren beide Faktoren die Osteoblastenproliferation, was in einer größeren matrixproduzierenden Zellpopulation und damit einer Zunahme der Knochenmasse resultiert (Canalis et al. 1988). bFGF hat keinen direkten stimulatorischen Einfluß auf die Matrixproduktion, wirkt sogar inhibierend auf die Kollagen-Transkription. Im Gegensatz dazu steigert bFGF die Expression der MMP-13 (Nakamura et al. 1995).

Platelet-Derived Growth Factor (Plättchen-generierter Wachstumsfaktor, PDGF) wird als Homo- oder Heterodimer aus den PDGF-A- und PDGF-B-Genprodukten gebildet. Im Osteoblasten werden beide Gene exprimiert (Rydziel et al. 1994). PDGF stimuliert die Proliferation der Osteoblasten und nimmt damit indirekt positiven Einfluß auf die Knochenmatrixbildung. Auch PDGF hat keinen direkten Einfluß auf die differenzierte Osteoblastenfunktion, sondern inhibiert akut die Apposition neuer Matrix (Hock and Canalis 1994). PDGF-BB wirkt zudem stimulierend auf die Osteoklastenzahl und auf die Expression von MMP-13.

Eine Vielzahl von Zytokinen, so z.B. Interleukin-1, -4, -6, -11, *Granulocyte/Macrophage-Colony-Stimulating-Factor* (Granulozyten/Makrophagen-Kolonien-stimulierender Faktor, GM-CSF) und Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) haben Einfluß auf die Umbauprozesse im Knochen. Im Allgemeinen stimulieren sie die Zahl und die Aktivierung von Osteoklasten und damit die Knochenresorption (Manolagas and Jilka 1995).

Unter den systemischen Hormonen nimmt vor allem das Parathyroidhormon (PTH) starken Einfluß auf die Zellen des Knochens, da es maßgeblich an der Kalzium-Homöostase im Körper beteiligt ist und der Knochen den wichtigsten Kalziumspeicher des Körpers darstellt. Interessanterweise wirkt PTH stimulierend auf den Knochenabbau, wenn es permanent gegeben wird (Ogino et al. 1995). Bei intermittierenden Dosen PTH (z.B. 1x täglich) wird aber eine Zunahme der Knochensubstanz beobachtet (Hara et al. 1997).

Weitere systemische Hormone, wie z.B. 1,25-Dihydroxy-VitaminD₃ (VitD₃) oder Calcitonin (CT) wirken auf den Knochen ein. VitD₃ stimuliert die Differenzierung und Fusion der Osteoklastenvorläufer und damit die Resorption (Roodman et al. 1985). CT hingegen wirkt transient inhibitorisch auf die osteoklastäre Knochenresorption ein (Wener et al. 1972). Im folgenden Text werden die Signalwirkungen von PDGF, PTH und Fibronektin erklärt, deren Einfluß auf den Osteoblasten in dieser Arbeit näher untersucht wurde.

Platelet Derived Growth Factor (PDGF):

Die PDGF-Isoformen üben ihre Wirkung auf die Zielzellen durch die Aktivierung zweier strukturell ähnlicher Rezeptortyrosinkinasen (PDGF-R α und PDGF-R β) aus, die nach der Bindung des dimeren Liganden ebenfalls dimerisieren. Dabei bindet PDGF-A nur an den α -Rezeptor, PDGF-B hingegen kann sowohl den α - als auch den β -Rezeptor binden (Heldin and Westermark 1999). Beide Rezeptortypen transduzieren mitogene Signale in die Zielzellen (Heldin and Westermark 1999) und können die intrazelluläre Kalzium-Konzentration erhöhen (Diliberto et al. 1992). Hierbei unterscheiden sich allerdings die Isoformen in ihrer Potenz. PDGF übt weiterhin einen antiapoptotischen Effekt auf die Zielzellen aus (Yao and Cooper 1995).

Als Konsequenz der Rezeptordimerisierung erfolgt eine Autophosphorylierung, wodurch die Kinaseaktivität der Rezeptoren gesteigert wird. Zusätzlich werden durch die autophosphorylierten Aminosäurereste außerhalb der Kinasedomäne Bindungsstellen für SH2-Domänen anderer Signalproteine gebildet. Zu diesen Proteinen gehören u.a. die Enzyme Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase (PI3K), Phospholipase C- γ (PLC- γ), Kinasen der Src-Familie, die Tyrosin-Phosphatase SHP-2 und ein GTPase-aktivierendes Protein (GAP) für Ras. Aber auch nicht-enzymatische Adapterproteine wie Grb2, Shc oder Crk verbinden den Rezeptor mit stromabwärts gelegenen Signalmolekülen (Heldin and Westermark 1999). In Swiss-3T3-Fibroblasten wird auch die zytoplasmatische Tyrosinkinase FAK nach PDGF-Stimulierung phosphoryliert, und zwar abhängig von der Aktivierung der PI3-Kinase (Saito et al. 1996). Die verschiedenen Signaltransduktionswege, die zu einer veränderten Genexpression führen sind im folgenden Schema dargestellt:



Abb. B.1.: Signaltransduktionswege, die durch Aktivierung des PDGF-Rezeptors ausgelöst werden können (Quelle: http://transpath.gbf.de/).

Parathyroidhormon (PTH):

Das kalziumregulierende Parathyroidhormon bindet an einen G-Protein gekoppelten Rezeptor. Es handelt sich hierbei um einen Rezeptortyp, der die Zellmembran siebenmal durchspannt (seven transmembrane pass) und der mit seinem extrazellulären N-Terminus den Liganden bindet. Intrazellulär, entweder am C-Terminus oder an weiteren zytoplasmatischen Domänen, bindet der Rezeptor Proteine mit GTPase-Aktivität (G-Proteine). Diese wiederum verbinden den Rezeptor mit verschiedenen stromabwärts gelegenen Signaltransduktionswegen. Im Falle von PTH sind die Effektormoleküle Proteinkinase A (PKA), Proteinkinase C (PKC) und Inositol-Trisphosphat (IP3), das wiederum die Mobilisierung von Kalzium aus intrazellulären Speichern veranlaßt (Morris and Bilezikian 1996). Die Serin/Threonin-Kinasen PKA und PKC nehmen über CREB bzw. über den MAPK-Signalweg Einfluß auf die Veränderung der Genexpression. Die Signaltransduktionswege nach PTH-Stimulierung sind im folgenden Schema zusammengefaßt:



Abb. B.2.: Signaltransduktionswege, die durch Aktivierung des PTH-Rezeptors ausgelöst werden können (verändert nach (Morris and Bilezikian 1996)).

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren können aber auch andere Signaltransduktionswege aktivieren, wie z.B. nach Bindung von Fluoroaluminat, einem osteogenen Agens, das in Zellkultur hauptsächlich die Proteine Cas, FAK und Pyk2 aktiviert (Freitas et al. 2002).

Fibronektin:

Fibronektin vermittelt seine Signale in den meisten Zellarten über das $\alpha_5\beta_1$ -Integrin. Integrine sind die Hauptrezeptoren der Zellen für die Extrazelluläre Matrix (Clark and Brugge 1995). Es handelt sich hierbei um heterodimere, transmembranale Glykoproteine, die sich aus einer α - und einer β -Untereinheit zusammensetzen. Die Integrin-Ligandenbindung führt zur Formation von Fokalkontakten (*Focal Adhesions*), in denen sich die Integrine mit intrazellulären zytoskelettalen Komplexen und Aktinbündeln verbinden (Gumbiner 1993; Pavalko and Otey 1994). Es handelt sich aber nicht um bloße Verankerungspunkte, vielmehr werden in den Fokalkontakten komplexe Signale generiert. Die zytoplasmatischen Domänen der Integrine haben selbst keine Enzymaktivität (Sastry and Horwitz 1993). Auf die Integrin-Ligandenbindung folgend wird aber die zytoplasmatische Proteintyrosinkinase FAK autophosphoryliert, kann an die Kinase Src binden und wird dadurch an weiteren Tyrosinresten phosphoryliert (Calalb et al. 1996). Über diese Phosphotyrosinreste kann FAK wiederum an verschiedene andere Signalmoleküle binden und löst damit verschiedene Signaltransduktionskaskaden aus, die im folgenden Schema zusammengefaßt sind:



Abb. B.3.: Signaltransduktionswege, die durch Integrin-Ligandenbindung ausgelöst werden können (aus (Longhurst and Jennings 1998)).

B.1.4. Das Osteosarkom

Alle im Knochen vorhandenen Zellformen können entarten und zu einer Tumorentstehung führen, wobei sich die Klassifizierung nach dem Ursprungsgewebe bzw. dem histologischen Erscheinungsbild richtet. Bösartige Knochentumoren breiten sich in andere Gewebe aus und bilden dort Metastasen. Gutartige Tumore bleiben örtlich begrenzt und wachsen im Regelfall langsam, können aber auch zur lokalen Funktionsbeeinträchtigung führen (Fechner and Mills 1993; Miller and Hoffer 2001).

Das von maligne entarteten Osteoblasten hervorgerufene Osteosarkom tritt hauptsächlich bei Kindern und Jugendlichen auf (85% der Patienten sind jünger als 30 (Fechner and Mills 1993)) und befällt vorzugsweise den gelenknahen Bereich der langen Röhrenknochen, häufig in der Nähe des Kniegelenks. Das Osteosarkom ist ein sehr schnellwachsender Tumor, der häufig über die Grenzen des Knochens hinaus wächst und Metastasen verursacht. Bei Fernmetastasen in der Lunge, die trotz der heutzutage stark verbesserten Chemotherapiekonzepte auftreten, führt die Erkrankung in ca. 30% der Fälle zum Tode (Bielack et al. 1988). Von den verschiedenen bekannten Formen des Osteosarkoms ist das hochmaligne zentrale Osteosarkom das aggressivste. Mehr als 90% der Osteosarkome gehören zu diesem hochmalignen intramedullären Typ (Fechner and Mills 1993). Im Röntgenbild erscheint das Osteosarkom als entweder lytisch oder sklerotisch, meist aber als gemischt lytisch-sklerotische Läsion. Histologisch läßt sich das Osteosarkom durch die eindeutig anaplastischen Zellkerne (unregelmäßige Größe und Form) und den hohen Grad an Osteoid (unkalzifizierte Matrix) definieren. Mit der Einbettung in das Tumorosteoid haben die Osteosarkomzellen die Tendenz, kleiner zu werden und weniger Pleomorphismen aufzuzeigen. Das Tumorosteoid zeigt eine starke Variabilität im Kalzifizierungsgrad. Durch diesen Kalzifizierungsgrad wird auch das röntgenologische Erscheinungsbild (sklerotisch oder lytisch) bestimmt. Die ursprüngliche Knochenmatrix kann dem Tumorosteoid als Gerüst dienen, das fokal erhalten bleibt und auf das die Tumormatrix aufgelagert wird (Fechner and Mills 1993).

B.2. Die Proteintyrosinkinase *Focal Adhesion Kinase* (FAK)

B.2.1. Entdeckung der FAK-Familie

FAK wurde erstmals unter der Bezeichnung "pp120" 1991 von Guan et al. als ein 120kDa-Protein beschrieben, das nach der Adhäsion von NIH-3T3-Fibroblasten auf Fibronektin phosphoryliert wird und in Fokalkontakten zusammen mit β_1 -Integrinen lokalisiert ist (Guan et al. 1991). Fokalkontakte stellen die Verbindung zwischen dem Zytoskelett und der extrazellulären Matrix über die transmembranalen Integrine dar. 1992 wurde dann von Schaller et al. ein 125kDa-Protein beschrieben, das in normalen Hühnerembryozellen nach der Transformation der Zellen mit dem Rous-Sarcoma-Virus-kodierten Onkoprotein v-Src (Swanstrom et al. 1983) eines der am stärksten phosphorylierten Proteine der Zellen darstellt (Schaller et al. 1992). Es handelt sich um dasselbe Protein, das von Guan et al. (Guan et al. 1991) beschriebenen und nachfolgend als <u>Focal A</u>dhesion <u>K</u>inase (FAK) bezeichnet wurde.

Durch alternatives Spleißen der FAK-mRNA entsteht ein negativer Regulator von FAK, FRNK (*FAK-related non kinase*), der die Lokalisation von FAK an den Fokalkontakten und damit die adäquate Wirkweise verhindert (Richardson and Parsons 1996). Dieser Regulator wird z.B. in Fibroblasten von Hühnern durch einen Promotor exprimiert, der stromabwärts der Kinasedomäne in einem Intron liegt (Schaller et al. 1993). Weitere alternative Spleißformen von FAK sind zwar bekannt, aber noch nicht eingehend untersucht worden (Burgaya and Girault 1996; Kanner et al. 1994).

Im Jahr 1995 wurde zeitgleich durch drei verschiedene Gruppen ein mit FAK hochhomologes 112kDa-Protein entdeckt, das als Pyk2 (Lev et al. 1995), CAKβ (Sasaki et al. 1995) bzw. RAFTK (Avraham et al. 1995) bezeichnet wurde. Obwohl Pyk2 C-terminal Konsensussequenzen für die Paxillinbindung enthält (AS 875-894 und AS 985-999) (Li and Earp 1997), wurde sowohl endogen als auch exogen exprimiertes Pyk2 nur schwach in Fokalkontakten nachgewiesen (Sasaki et al. 1995), wohingegen die autonom exprimierte Cterminale Domäne an Fokalkontakten nachgewiesen werden kann (Schaller and Sasaki 1997).



B.2.2. Struktur von FAK und Pyk2

FAK und Pyk2 beinhalten eine zentrale Kinasedomäne, die von großen C- und Nterminalen Bereichen flankiert wird. Die beiden Proteine besitzen, im Gegensatz zu vielen anderen Proteintyrosinkinasen, keine SH (Src-Homologie)2- oder SH3-Domänen (Pawson et al. 1993) und keinen Myristylsäurerest wie c-Src (Schultz et al. 1985). Die prolinreichen Sequenzen im C-terminalen Bereich der Proteine binden SH3-Domänen anderer Signalmoleküle, die phosphorylierten Tyrosinreste binden selektiv SH2-Domänen (Pawson et al. 1993). Der Tyrosinrest 397 von FAK wird als erste Reaktion bei Anheftung auf die extrazelluläre Matrix phosphoryliert (Autophosphorylierungsstelle) und bindet im phosphorylierten Zustand an c-Src, PI3-Kinase und Shc (Barberis et al. 2000; Calalb et al. 1995; Chen et al. 1996). Shc wiederum kann die Adaptermoleküle Grb2 und Sos binden und damit den MAP-Kinase-Signalweg aktivieren; Grb2 kann aber auch direkt an den phosphorrylierten Tyrosinrest 925 von FAK binden (Shen and Guan 2001). Die Tyrosinreste 576/577 innerhalb der Kinasedomäne ermöglichen im phosphorylierten Zustand erst die vollständige Kinaseaktivität von FAK (Calalb et al. 1995). Die prolinreichen Sequenzen im C-Terminus binden CAP (involviert in Verbindung von Integrin- mit MAP-Kinase-Signalen (Finkelstein and Shimizu 2000)) und p130^{CAS} (bindet Adaptermoleküle Crk / Nck (McCarty 1998)) bzw. Graf (*GTPase regulator associated with* FAK (Hildebrand et al. 1996)). Die C-terminale F.A.T. (*Eocal Adhesion Targeting*)-Sequenz bindet an Paxillin und Talin (Hildebrand et al. 1993) und ermöglicht so die Lokalisation von FAK an Fokal-kontakten. Die im N-Terminus enthaltene Band 4.1-Sequenz (Girault et al. 1999) bindet an zytoplasmatische Bereiche von Transmembranproteinen (Chen et al. 2001). Für Pyk2 nimmt man eine ähnliche Verteilung der funktionellen Domänen an, wobei die C-terminalen Paxillin-Bindesequenzen anscheinend im Gesamtprotein von anderen Sequenzen überdeckt und damit ihre Funktion vermindert wird (Sasaki et al. 1995; Schaller and Sasaki 1997).

B.2.3. Bisheriger Erkenntnisstand zur FAK-Funktion im Knochen

Die Tyrosinkinase FAK wurde in Osteoblasten bisher meist im Zusammenhang mit der integrinvermittelten Signaltransduktion nach Adhäsion der Zellen auf der Extrazellulären Matrix oder nach mechanischer Zugwirkung untersucht. So wurde z.B. beschrieben, daß die Adhäsion von Osteoblasten auf verschiedenen Materialien eine unterschiedlich starke Phosphorylierung von FAK hervorruft (Sommerfeldt et al. 2001), oder daß die Adhäsion in Bezug auf ihre FAK-Aktivierung auf Titan vergleichbar mit der auf Fibronektin ist, was einen interessanten Befund für die Verwendung von Endoprothesen darstellt (Krause et al. 2000). Eine weitere Gruppe stellte fest, daß Osteoblasten auf artefiziellem Hydroxylapatit zwar schneller adhärieren, auf Titan aber mehr Fokalkontakte und phosphoryliertes FAK aufwiesen, also mobiler sind (Okumura et al. 2001). Eine interessante Erkenntnis war weiterhin, daß Osteoblasten von Osteoporosepatienten schlechter auf der Extrazellulären Matrix anheften als normale Osteoblasten, was sich in einer mangelnden FAK-Phosphorylierung wiederspiegelte (Perinpanayagam et al. 2001). Der Zusammenhang der Adhäsion mit der Osteoblastendifferenzierung wurde auch von verschiedenen Gruppen untersucht. So zeigten Takeuchi et al. (Takeuchi et al. 1997), daß die Adhäsion von Osteoblasten auf Kollagen die reduzierte Expression des TGFβ-Rezeptors und damit die Stimulation der Differenzierung bedingt. Dieses Phänomen war abhängig von der FAK-Phosphorylierung. Weiterhin zeigte sich in einer anderen Arbeit, daß Osteopontin über FAK die vermehrte Expression der Alkalischen Phosphatase reguliert, was ebenfalls auf eine Beteiligung von FAK an der Osteoblastendifferenzierung hinweist (Liu et al. 1997).

Cheng et al. beschrieben, daß die Überexpression des $\alpha_v\beta_3$ -Integrins zu einer vermehrten Proliferation aber zur verminderten Expression von Osteoblasten-Differenzierungsmarkern führt. Die FAK-Expression blieb unverändert (Cheng et al. 2001).

Verschiedene Arbeiten untersuchten den Einfluß von FAK auf die Mechanotransduktion im Knochen, die bisher noch nicht genau geklärt werden konnte. Durch Anlegen einer mechanischen Zugwirkung wurde die FAK-Phosphorylierung gesteigert (Toma et al. 1997) und eine Assoziation von FAK mit Src konnte nachgewiesen werden (Moalli et al. 2001). Wozniak et al. beobachteten auf die mechanische Zugwirkung hin eine Bildung von Plaques, in denen zwar Integrine und FAK, nicht aber Vinculin oder Talin – typische Proteine des Fokalkontaktes – enthalten waren. An diesen Stellen war eine deutliche Matrixbildung und –mineralisierung zu beobachten (Wozniak et al. 2000).

FAK wurde auch im Zusammenhang mit der BMP-Signaltransduktion untersucht. So konnte gezeigt werden, daß die BMP-Smad-Signalkaskade abhängig von der FAK-vermittelten Integrin-Adhäsion ist und daß die Anwendung von FAK-Antisense-Oligonukleotiden die Aktivierung von Smad6 durch BMP-2 verhindert (Suzawa et al. 2002; Tamura et al. 2001).

Eine weitere Arbeit beschäftigte sich mit der Bedeutung von FAK auf die Invasion von Tumorzellen und ergab, daß die durch Rho vermittelte Aktivierung von FAK nach niedrigen Dosen Lysophosphatidylsäure (LPA) essentiell für den invasiven Phänotyp von Tumorzellen ist (Matsumoto et al. 2001).

Auch das Wachstumshormon, daß einen starken Einfluß auf das Remodeling des Knochens ausübt, löst eine FAK-Phosphorylierung nach der Rezeptor-Aktivierung aus (Takahashi et al. 1999).

Die Beteiligung von FAK an der Signalwirkung von Fluoroaluminat (FA), einem knochenanabolen Agens, wurde eingehend untersucht. Es zeigte sich, daß FA eine Phosphorylierung von FAK, aber auch von Pyk2, verursacht, die sich mit der Adhäsion der Zellen auf Kollagen potenziert. Auch der ERK-Signalweg wird durch FA aktiviert, was nicht unbedingt von FAK abhängig ist (Caverzasio et al. 1997; Freitas et al. 2002; Jeschke et al. 1998; Susa 1999).

B.2.4. Die Rolle von FAK und Pyk2 in Tumoren

Tumorzellen zeichnen sich besonders durch die Fähigkeit zum adhäsionsunabhängigen Wachstum aus, das durch Onkogene vermittelt wird. In Tumorzellen wurde eine erhöhte FAK-Expression nachgewiesen, die mitverantwortlich für das adhäsionsunabhängige Wachstum des Tumors sein kann (Brunton et al. 1997). Für diese Überexpression wird eine Amplifikation des FAK-Gens diskutiert (Agochiya et al. 1999).

1993 beschrieben Weiner et al. erstmals FAK im Zusammenhang mit metastasierenden Tumoren (Weiner et al. 1993). In dieser Studie wurden auf Transkriptionsebene 49 verschiedene Gewebeproben untersucht, und zwar immer paarweise neoplastische und die korrespondierenden normalen Gewebe. Dabei wurde eine gesteigerte FAK-Expression in einem von 8 adenomatösen Geweben, in 17 von 20 invasiven Tumoren und in allen 15 metastasierenden Tumoren detektiert (Weiner et al. 1993). In einer weiteren Studie testeten Weiner et al. 1994 verschiedene primäre high- und low-grade Sarkome im Hinblick auf deren Expression von Proteintyrosinkinasen (Weiner et al. 1994). Die Studie ergab, daß FAK in vielen Sarkomen exprimiert wurde, die Expression aber besonders in einigen metastasierenden Leiomyosarkomen hochreguliert war (Weiner et al. 1994).

In einer weiteren Studie bestätigten sich diese Ergebnisse (Owens et al. 1995): Die Expression von FAK wurde in Tumoren und in den entsprechenden Normalgeweben desselben Patienten getestet, wobei 100% der invasiven und metastasierenden Colonkarzinome und 88% der Mammakarzinome eine signifikant erhöhte FAK-Expression aufwiesen. Weiterhin zeigten alle untersuchten Sarkome im Vergleich zu gutartigen und nicht-invasiven mesenchymalen Proben eine gesteigerte FAK-Expression (Owens et al. 1995). Fundiert durch weitere, aus den Untersuchungen anderer Tumorentitäten gewonnene Ergebnisse (Glukhova et al. 1995; Owens et al. 1996; Tremblay et al. 1996), faßt Kornberg (Kornberg 1998) die Rolle von FAK im Tumor wie folgt zusammen: Zellen, die FAK überexprimieren, haben das Potential umgebende Gewebe zu invadieren und Metastasen zu setzen. Dabei spielen die spezifischen Eigenschaften von FAK eine entscheidende Rolle: FAK kann die Apoptose von Zellen verhindern, indem es diese von Adhäsionssignalen der extrazellulären Matrix unabhängig macht (Ilic et al. 1998) und weiterhin essentiell für die Migration von Tumorzellen ist (Ilic et al. 1995). Sicher ist jedoch auch, daß allein durch die Überexpression von FAK kein transformierter Phänotyp erzeugt wird. Damit ist FAK nicht als Onkogen im engeren Sinne zu betrachten, sondern erleichtert bereits transformierten Zellen die Möglichkeit zur Invasion und Metastasierung (Kornberg 1998).

Durch die Überexpression von Pyk2 in Fibroblasten und in Myeolomzellen nach Stimulation mit Dexamethason kommt es zur Induktion der Apoptose (Chauhan et al. 1999; Xiong and Parsons 1997). Im Gegensatz dazu ist FAK wichtig für das Überleben der Zellen (Frisch et al. 1996). Die Untersuchungen von Du et al. veranschaulichen, daß ein ausgewogenes Gleichgewicht von Pyk2 und FAK wichtig ist, um über die Regulation des Zytoskelettes den Fokalkontakt-Umbau und die Zellmorphologie zu erhalten (Du et al. 2001). Eine Gleichgewichtsverschiebung von Pyk2 und FAK wurde bei der Entstehung des Prostatakarzinoms beobachtet (Stanzione et al. 2001). Die FAK-Expression war erhöht, während eine starke Verminderung der Pyk2-Expression beobachtet wurde. Neben der negativen Korrelation der Pyk2-Expression mit der Prostatakarzinom-Progression konnte eine Beteiligung von Pyk2 an der Pathogenese des Kaposi-Sarkoms (Liu et al. 1997), an der Invasion von Brustkrebszellen (Zrihan-Licht et al. 2000), an cerebralen Metastasen (Ludwig et al. 2000) und im Zusammenhang mit der chronischen myeloiden Leukämie (Wu et al. 2000) gefunden werden. Auch nicht transformierte Osteoblasten exprimieren Pyk2 und eine Aktivierung nach Stimulation eines G-Protein gekoppelten Rezeptors durch Fluoroaluminat ist ebenfalls nachgewiesen worden (Freitas et al. 2002; Jeschke et al. 1998).

B.3. Ziel dieser Arbeit

Die Proteintyrosinkinase FAK wurde seit ihrer Erstbeschreibung 1991 mit einer steigenden Zahl verschiedener Signaltransduktionswege in Verbindung gebracht und wird folglich seit einiger Zeit als intrazellulärer Knoten- bzw. Verknüpfungspunkt der verschiedenen Signale diskutiert. Über die Funktion von FAK in Osteoblasten, die einer Vielzahl von lokalen und systemischen Faktoren ausgesetzt sind, war bisher abgesehen von ihrer Funktion bei der Osteoblastenadhäsion wenig bekannt. Daher sollte die FAK-Aktivierung und -Lokalisation nach verschiedenen Stimuli, die unterschiedliche Rezeptortypen aktivieren, untersucht werden. Hierzu wurden PDGF, PTH und Fibronektin ausgewählt, die eine bedeutende Funktion im Knochen haben. Gleichzeitig sollten die Signaltransduktionswege identifiziert werden, die durch die differenziellen Stimuli zur Phosphorylierung von FAK und damit zur Signalvernetzung führen.

FAK wird auch eine bedeutende Rolle in der Kanzerogenese bzw. der malignen Entartung von Tumorzellen beigemessen. Es sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob FAK in osteoblastischen Osteosarkomen exprimiert wird, ob eine Überexpression von FAK vorliegt und ob FAK einen direkten Einfluß auf das Migrations- und Invasionsverhalten von Osteosarkomzellen aufweist.

C. Materialien und Methoden

C.1. Materialien

C.1.1. Chemikalien

Die im folgenden nicht gesondert aufgeführten oder gekennzeichneten Chemikalien wurden im Reinheitsgrad *pro analysi* von den Firmen Sigma (München), Merck (Darmstadt), Riedel de Haen (Seelze), Roth (Karlsruhe) oder Serva (Heidelberg) bezogen.

C.1.2. Zellkulturmaterialien

Medien und Zusätze:	
MEM Alpha Medium (α-MEM)	Gibco, Karlsruhe
RPMI 1640 Medium (RPMI)	Gibco, Karlsruhe
McCoy's 5A Medium (McCoy's)	Gibco, Karlsruhe
Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium (DMEM)	Gibco, Karlsruhe
Iscove's modifiziertes Dulbecco's Medium (IMEM)	Gibco, Karlsruhe
Optimem1 Transfektionsmedium	Gibco, Karlsruhe
Amphothericin B	Gibco, Karlsruhe
Ascorbinsäurephosphat	Sigma, München
β-Glycerolphosphat	Sigma, München
Albumin aus Rinderserum (BSA)	Sigma, München
Dexamethason	Sigma, München
Fötales Rinderserum (FBS)	Gibco, Karlsruhe
Gentamycin	Sigma, München
Penicillin/Streptomycin	Sigma, München
Phosphatpuffer (PBS, pH 7,4)	Gibco, Karlsruhe
10x Trypsin (2,5%)	Sigma, München
10x Trypsin-EDTA (0,5%)	Sigma, München

7 1	
101	110100.

Name	Medium	Beschreibung	Bezugsquelle / Referenz
HOS-58	IMEM	humane Osteosarkom-Zellinie	Siggelkow et al., 1998 (zur Verfü-
		-hohe Alkalische Phosphatase-Aktivität	gung gestellt von H. Siggelkow)
		-Formation von mineralisierter Matrix	
		-PIH-sensitive Adenylatzyklase	
MG-63	α-ΜΕΜ	humane Osteosarkom-Zellinie-	ATCC (American Type Culture
		-niedrige Alkalische Phosphatase-Aktivität	Collection, Manassas, VA; Nr.
		-keine PTH-sensitive Adenylatzyklase	CRL-1427)
		-keine Formation von mineraliserter Matrix	
OHS-4	RPMI	humane Osteosarkom-Zellinie	Fournier et al., 1991 (zur Verfü-
		-hohe Alkalische Phosphatase-Aktivität	gung gestellt von B. Fournier)
		-Formation von mineralisierter Matrix	
		-PTH-sensitive Adenylatzyklase	
SAOS-2	McCoy's	humane Osteosarkom-Zellinie	DSMZ (Deutsche Sammlung von
		-sehr hohe Alkalische Phosphatase-Aktivität	Mikroorganismen und Zellkulturen
		-Formation von mineralisierter Matrix	CmbH Haidalbarg: Nr. ACC 242)
		-PTH-sensitive Adenylatzyklase	Gillon, Heidelberg, NI. ACC 243)
U-2 OS	McCoy's	humane Osteosarkom-Zellinie	ATCC (American Type Culture
		-sehr hohe Alkalische Phosphatase-Aktivität	Collection, Manassas, VA; Nr.
		-Formation von mineralisierter Matrix	HTB-96)
		-PTH-sensitive Adenylatzyklase	

Wachstumsfaktoren, Hormone, Matrices, Proteinkinase-Inhibitoren und -Akitvatoren:

Calphostin C	Biomol, Hamburg
Cytochalasin D	Biomol, Hamburg
Fibronektin (Ratte)	Gibco, Karlsruhe
Forskolin	Biomol, Hamburg
GF103209X	Biomol, Hamburg
H-89	Biomol, Hamburg
"human Platelet-Derived Growth Factor" (PDGF)	R&D, Wiesbaden
LY294002	Biomol, Hamburg
Parathyroidhormon (PTH)	Bachem, Heidelberg
Phorbol-12-myristyl-13-acetat (PMA)	Sigma, München

Verbrauchsmaterialien: 15ml- und 50ml-Zentrifugenröhrchen 25cm²- und 75cm²-Zellkulturflaschen 175cm²-Zellkulturflaschen 6-Well-Multiwell-Plates (6-Wells) 3,5cm- und 10cm-Plastikpetrischalen Eppendorf-Reaktionsgefäße Glas-Pasteurpipetten Mikropipetten-Spitzen Plastik-Einwegpipetten Zellschaber

BD Falcon, Erembodegem, BE BD Falcon, Erembodegem, BE Nunc, Wiesbaden Nunc, Wiesbaden BD Falcon, Erembodegem, BE Eppendorf, Hamburg Roth, Karlsruhe Eppendorf, Hamburg BD Falcon, Erembodegem, BE

C.1.3. Materialien für Proteinanalysen

Protease- und Phosphatase-Inhibitoren: Complete Protease Inhibitor Tabletten Phosphatase Inhibitor Cocktail II

Konzentrationsbestimmung der Proteine:

DC Protein Assay

Roche Diagnostics, Mannheim Sigma, München

BioRad, München

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) / Western-Blot:				
Natrium-Dodecylsulfat (SDS)	Sigma, München			
Acrylamid/Bisacrylamid (30%/0,8%)	Roth, Karlsruhe			
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma, München			
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma, München			
Benchmark Molekulargewichts-Standard	Gibco, Karlsruhe			
Protran Nitrocellulose-Membran	Schleicher&Schuell, Dassel			
Restore Western Blot Stripping Buffer	Pierce/Perbio, Bonn			

Antikörper:

Primärantikörper:

Name	Spezifität	Hergestellt in	Bezugsquelle
FAK mAb	Focal Adhesion Kinase	Maus	BD Transduction
(250µg/ml)			Lab./Pharmingen,
			Hamburg
FAK pAb	Focal Adhesion Kinase	Kaninchen	Santa Cruz Biotechno-
(200µg/ml)			logy, Heidelberg
FAK-pY397 (BioSource)	phosphorylierte Auto-	Kaninchen	BioSource Interna-
(430µg/ml)	phosphorylierungsstelle		tional, Nivelles, BE
	(Tyrosinrest 397) von		
	FAK		
FAK-pY397 (Upstate)	phosphorylierte Auto-	Kaninchen	Upstate Biotechnology/
(Antiserum, keine Kon-	phosphorylierungsstelle		Biomol, Hamburg
zentrationsangabe)	(Tyrosinrest 397) von		
	FAK		
Pyk2 mAb	Proline Rich Tyrosine	Maus	BD Transduction
(250µg/ml)	Kinase 2		Lab./Pharmingen,
			Hamburg
Pyk2-pY402	phosphorylierte Auto-	Kaninchen	BioSource Interna-
(490µg/ml)	phosphorylierungsstelle		tional, Nivelles, BE
	(Tyrosinrest 402) von		
	Pyk2		
Aktin mAb (200µg/ml)	Aktin	Maus	Boehringer, Mannheim

Sekundärantikörper:

Name	Spezifität	Hergestellt in	Bezugsquelle
Anti-Mouse-HRP	Meerrettichperoxidase-	Ziege	Promega, Mannheim
(Antiserum, keine Kon-	gekoppelter Anti-Maus-		
zentrationsangabe)	Antikörper		
Anti-Rabbit-HRP	Meerrettichperoxidase-	Ziege	Promega, Mannheim
(Antiserum, keine Kon-	gekoppelter Anti-		
zentrationsangabe)	Kaninchen-Antikörper		

Name	Spezifität	Hergestellt in	Bezugsquelle
Anti-Maus Z412	Brückenantikörper für	Kaninchen	DAKO, Hamburg
(1,8mg/ml)	immunhistochemische		
	Färbungen		
Anti-Kaninchen M737	Brückenantikörper für	Maus	DAKO, Hamburg
(1,8mg/ml)	immunhistochemische		
	Färbungen		
APAAP Mouse mono-	Alkalische-	Maus	DAKO, Hamburg
clonal	Phosphatase-		
(100µg/ml)	gekoppelter Anti-		
	Alkalische Phosphata-		
	se-Antikörper		
FITC-Rabbit-Anti-	FITC-gekoppelter Anti-	Kaninchen	DAKO, Hamburg
Mouse (2,7mg/ml)	Maus-Antikörper		
FITC-Goat-Anti-Mouse	FITC-gekoppelter Anti-	Ziege	DAKO, Hamburg
(500µg/ml)	Maus-Antikörper		
Alexa568 Goat-Anti-	Alexa568-gekoppelter	Ziege	Molecular Pro-
Rabbit	Anti-Kaninchen-		bes/MoBiTec, Göttin-
(2mg/ml)	Antikörper		gen
Alexa488 Donkey-Anti-	Alexa488-gekoppelter	Esel	Molecular Pro-
Rabbit	Anti-Kaninchen-		bes/MoBiTec, Göttin-
(2mg/ml)	Antikörper		gen

Detektion der Antikörper-Reaktion beim Immunnachweis:

ECL Detection System	Amersham Biosci., Freiburg
Roentoroll HC Röntgenentwickler	Tetenal, Norderstedt
Superfix MRP Röntgenfixierer	Tetenal, Norderstedt
Hyperfilm ECL Röntgenfilme	Amersham Biosci., Freiburg

C.1.4. Materialien für immunologische und chemische Färbungen

von-Kossa- / Alkalische Phosphatase (APase)-Färbung:

Silbernitrat	Sigma, München
Alkalische Phosphatase-Färbungs-Kit	Sigma, München
Eukit, xylolhaltiges Eindeckmedium	Kindler, Freiburg

Glycergel, wässriges Eindeckmedium	DAKO, Hamburg
Immunfluoreszenz-Färbungen:	
Slow Fade Antifade Kit	MolecularProbes/MoBiTec,
	Göttingen
Normales Ziegenserum (NGS)	Sigma, München
Propidium-Iodid	Sigma, München
Phalloidin-TRITC	Fluka, München
Immunhistochemische Färbungen:	
Saponin	Sigma, München
SIGMA FAST Fast Red TR/Naphthol AS-MX Tabletten	Sigma, München
Dako Pen Fettstift	DAKO, Hamburg
C.1.5. Materialien für Nukleinsäureanalysen	
RNA-Isolierung:	
RNAlater RNA-Stabilisierungslösung	Qiagen, Hilden

ici (i indici ici (i i bidombier dingstobulig	Qiugen, militen
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
QiaShredder	Qiagen, Hilden
RNase free DNaseI	Qiagen, Hilden
UVetten RNase-freie UV-Küvetten	Eppendorf, Hamburg
QiaShredder RNase free DNaseI UVetten RNase-freie UV-Küvetten	Qiagen, Hilden Qiagen, Hilden Eppendorf, Hamburg

RT-PCR, cDNA-Synthese und PCR:Titan One Tube RT-PCR KitRoche Diagnostics, MannheimReady-to-Go You-Prime First-Strand BeadsAmersham Biosci., FreiburgTaq PCR Core KitQiagen, Hilden

<u>Real-Time-PCR:</u> QuantiTect SYBR Green PCR Kit

<u>Gelextraktion:</u> QIAquick Gelextraction Kit Qiagen, Hilden

Qiagen, Hilden

Klonierung:

Original TA Cloning Kit

Plasmid-Isolierung:

Plasmid Mini / Midi Kit

Transfektion:

Lipofectamin2000

Qiagen, Hilden

Invitrogen, Paisley, UK

Restriktionsenzyme:

Name	Bezugsquelle	Puffer	Erkennungssequenz	Temperatur
EcoRI	NEB, Frankfurt	EcoRI	G/AATTC	37°C

Oligonukleotide:

Name	Spezies	Sequenz	Quelle	Tm	Amplifikat
				[°C]*	[bp]
FAK2up	human	5'-ACC TCA GCT AGT GAC GTA TGG-3'	GenBank	64	299
FAK2low	human	5'-CGG AGT CCC AGG ACA CTG TG-3'	L05186	66	
Pyk1up	human	5'-CAG CAG TAC GCC TCG CTC AG-3'	GenBank	66	299
Pyk1low	human	5'-TCA GCC TCT GCT AGG GAT GAG-3'	U33284	66	
GAPDHup	human	5′-TGA TGA CAT CAA GAA GGT GG-3′	GenBank	58	245
GAPDHlow	human	5'-TTT CTT ACT CCT TGG AGG CC-3'	M33197	60	
PTHRup	Ratte	5'-GGT GCT TGC CAC TAA GCT TC-3'	GenBank	62	300
PTHRlow	Ratte	5'-ACT TCG TGC TTT GCG CTT G-3'	M77184	58	
PDGFRaup	Ratte	5'-TGA AAG CCA CGT CAG AAC TG-3'	GenBank	60	300
PDGFRalow	Ratte	5'-GAA GCC TTT CTC GTG AAC AG-3'	Z14118	60	
PDGFRβup	Ratte	5'-CTC TGG CAC CTA TAC TTG CA-3'	GenBank	60	300
PDGFRβlow	Ratte	5'-CGC TTC TGA CAC CTT CAC A-3'	Z14119	58	

* Tm berechnet nach der "2(A+T) + 4(G+C)"-Regel

GenBank: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/

GeneFisher Primer Selection: http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/genefisher/

Alle Oligonukleotide wurden von Invitrogen, Paisley, UK bezogen.

Invitrogen, Paisley, UK

Name	Vektor	Insert	Quelle
HA-FAK	pcDNA3	humane full-length FAK-	(Xu et al. 1998) (zur Verfügung
		cDNA mit HA-Tag	gestellt von W.Cance)
pPyk2	pCR2.1	Pyk2-PCR-Produkt, human	diese Arbeit
GAPDHshort	pCR2.1	GAPDH-PCR-Produkt	zur Verfügung gestellt von S.
			Loges, Hämatologie, UKE
pPTHR	pCR2.1	PTHR-PCR-Produkt, Ratte	diese Arbeit
		(PTH-Rezeptor)	
pPDGFRα	pCR2.1	PDGFRα-PCR-Produkt, Ratte	diese Arbeit
		(PDGF-Rezeptor α)	
pPDGFRβ	pCR2.1	PDGFRβ-PCR-Produkt, Ratte	diese Arbeit
		(PDGF-Rezeptor β)	

Plasmide:

C.1.6. Großgeräte

Gerät	Bezeichnung	Firma
Zellkultur-Sterilbank	HeraSafe	Heraeus Instruments, Hanau
Invers-Mikroskop	IX 50	Olympus, Hamburg
Digitalkamera	DP10	Olympus, Hamburg
Zentrifuge (15/50ml), nicht	GS-6 Centrifuge	Beckman, Krefeld
gekühlt		
Zentrifuge (1,5/2ml), gekühlt	Avanti 30 Centrifuge	Beckman, Krefeld
Zellkultur-Inkubator	BBD 6220	Heraeus Instruments, Hanau
ELISA-Reader	Versamax tunable Microplate	Molecular Devices, München
	Reader	
Drehrad	Stuart Scientific Blood Tube	Merck, Darmstadt
	Rotator SB1	
SDS-PAGE-Apparatur	Protean II Xi Cell	BioRad, Hamburg
Western-Blot-Apparatur	Trans Blot Cell	BioRad, Hamburg
Kühlgerät	WK 500 Lauda	Merck, Darmstadt
Spannungsgeber 1	Power Pac 300	BioRad, Hamburg
Spannungsgeber 2	Model 200/2.0 Power Supply	BioRad, Hamburg

Gerät	Bezeichnung	Firma
Röntgenfilm-	Optimax Typ TR	MS Laborgeräte, Heidelberg
Entwicklermaschine		
Fluoreszenz-Mikroskop	Axiophot 2	Zeiss, Jena
Konfokales Lasermikroskop	IX 70 / Fluoview	Olympus, Hamburg
Gewebe-Zerkleinerer	Ultra-Turrax T25	Wilke&Witzel, Hamburg
Photometer	UV/VIS Spectrometer	Perkin Elmer, Überlingen
	Lambda Bio 10	
PCR-Gerät	GeneAmp PCR System 9700	Applied Biosystems, Weiter-
		stadt
Real-Time-PCR-Gerät	Light Cycler	Roche Diagnostics, Mann-
		heim

C.2. Methoden

C.2.1. Zellkulturmethoden

C.2.1.1. Isolierung von Knochenmarks-Stromazellen und Zellen der primären Spongiosa aus Rattenfemura

Für die beschriebenen Versuche wurden als Primärzellen Knochenmarks-Stromazellen (im Folgenden bezeichnet als "str") und Zellen der primären Spongiosa (im Folgenden bezeichnet als "psp"), die ein Gemisch von Präosteoblasten und Osteoblasten darstellen, verwendet. Diese wurden aus den Femura von vier Wochen alten, männlichen CD-Ratten (Charles River, Sulzfeld) nach Genehmigung des Studienprotokolls durch die örtliche Ethikkommission für Veterinärmedizin und nach den "Principles of laboratory animal ca-re" (NIH-Publication PUBLIC LAW 99-158, November 20, 1985 "ANIMALS IN RESE-ARCH") isoliert.



Dazu wurden pro Durchgang 10 Tiere mit CO₂ euthanasiert und die Femura unter antiseptischen Bedingungen herauspräpariert. Die Knochen wurden dabei in Transportmedium gesammelt. Zunächst wurden Bindegewebe und Sehnen unter der Sterilarbeitsbank mit sterilen Tupfern von den Knochen entfernt und anschließend die Metaphysen (m) mit dem Skalpell abgetrennt. Auch das proximale Gelenk wurde abgetrennt und verworfen, die Diaphysen (d) wurden in PBS (pH 7,4) aufbewahrt. Anschließend wurden die Metaphysen in 1x Trypsin (0,25%) in PBS, pH 7,4 (12,5ml / 10 Tiere) zerkleinert und in ein 50ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Die Suspension wurde dann für 1min gevortext und anschließend 1h bei 37°C im Wasserbad inkubiert, wobei sie alle 15min für 30sec gevortext

In der Zwischenzeit wurde das Knochenmark aus den Diaphysen mit Hilfe einer 20ml-Spritze mit PBS (pH 7,4) ausgespült. Das ausgespülte Knochenmark wurde in ein 50ml-Zentrifugenröhrchen überführt und die Zellen durch Zentrifugieren bei 400x g für 15 min sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 2ml Standardmedium resuspendiert. Die Suspension wurde auf 40ml aufgefüllt und in eine 175cm²-Zellkulturflasche gegeben. Die Zellen wurden bei 37°C, 5% CO₂ und 95% H₂O über Nacht inkubiert. Am ersten Tag nach der Isolierung erfolgte der erste Mediumwechsel, danach wurde alle 5 Tage das Medium gewechselt.

Die Metaphysenzellen wurden nach Beendigung der Inkubation aus dem Wasserbad entfernt und der Suspension wurde 1Vol. Standardmedium zugesetzt. Nach dem Mischen der Suspension durch 15sec Vortexen wurden die Zellen und die Knochenstückchen durch Zentrifugieren bei 400x g für 15min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 10ml Standardmedium durch 15sec Vortexen resuspendiert. Die Suspension wurde durch ein steriles Metall-Zellsieb (Porengröße 200µm) gegossen. Das Resuspendieren und Filtrieren wurde insgesamt dreimal wiederholt. Die Filtrate wurden vereinigt und in eine 175cm²-Zellkulturflasche überführt. Die Zellen wurden bei 37°C, 5% CO₂ und 95% H₂O über Nacht inkubiert. Auch hier erfolgte der erste Mediumwechsel am ersten Tag nach der Isolierung, danach wurde alle 5 Tage das Medium gewechselt. Für die Versuche wurde nur die 1. Passage verwendet.

Transportmedium:	500ml α-MEM	
	50ml FBS	
	100U/ml Penicillin / 100µg/ml Streptomycin	
	100µg/ml Amphotericin B	
	2,5µg/ml Gentamycin	
Standardmedium:	500ml α-MEM	
	50ml FBS	
	100U/ml Penicillin / 100µg/ml Streptomycin	

C.2.1.2. Kultivierung von Zellinien

Zellinien wurden im Allgemeinen aus kryokonservierten Aliquots verwendet. Zum Auftauen der Zellen wurde ein 1ml-Aliquot im 37°C-Wasserbad rasch aufgetaut und anschließend unter der Sterilarbeitsbank in 10ml Medium überführt. Die Suspension wurde in eine 75cm²-Zellkulturflasche überführt und bei 37°C, 5% CO₂ und 95% H₂O über Nacht inkubiert. Am ersten Tag nach dem Auftauen wurde ein Mediumwechsel vorgenommen, um tote Zellen zu entfernen. Danach wurde alle 5 Tage das Medium gewechselt.

Medien: 500ml des entsprechenden Grundmediums (s. Tabelle in C.1.2.) 10% FBS 100U/ml Penicillin / 100µg/ml Streptomycin

C.2.1.3. Kultivierung von humanen Osteoblasten aus Spongiosaproben

Die Spongiosaproben wurden zuerst von Knorpel und Fett befreit. Dann wurden die Proben in ca. 5x5x5 mm große Stücke zerteilt, die jeweils einzeln weiterbehandelt wurden. Die Proben wurden in ein steriles Röhrchen überführt und mit wenig (2-3ml) PBS (pH 7,4) bedeckt. Anschließend wurde der Knochen mit einer Schere so weit wie möglich zerkleinert und dann mehrmals mit PBS (pH 7,4) gewaschen, bis kein Blut mehr im Puffer zu sehen war. Die Suspension wurde in eine 75cm²-Zellkulturflasche überführt, mit 15ml Medium bedeckt und die Knochenstückchen in der Mitte der Flasche plaziert. Der erste Mediumwechsel wurde frühestens nach drei Tagen vorgenommen. Anschließend wurde alle 5 Tage das Medium gewechselt. Verwendet wurden hier nur die Passagen 1 und 2.

Medium: 500ml DMEM

10% FBS 25mg Ascorbinsäure-Phosphat 100U/ml Penicillin / 100µg/ml Streptomycin 5ml 200mM L-Glutamin ⇒ in 40ml Aliquots bei -20°C lagern

C.2.1.4. Trypsinieren der Zellen zur Passagierung

Die Zellen wurden bei ca. 95% Konfluenz zur Passagierung eingesetzt. Dazu wurde das Medium mit einer Vakuumpumpe entfernt und die Zellen zweimal mit PBS (pH 7,4) gewaschen. Anschließend wurde 1x Trypsin-EDTA (0,05%) in PBS (pH 7,4) aufpipettiert, und zwar pro 175cm²-Flasche 8ml bzw. pro 75cm²-Flasche 4ml. Die Zellen wurden anschließend für ca. 5min bei 37°C inkubiert. Dabei wurde der Ablösevorgang der Zellen im Mikroskop kontrolliert. Nach vollendetem Ablösen der Zellen wurde 1Vol. des entsprechenden Zellkulturmediums mit FBS zugefügt und die Zellen abgespült und suspendiert. Die Suspension wurde in ein 50ml-Zentrifugenröhrchen überführt und die Zellen durch Zentrifugieren bei 100x g für 10min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in einer entsprechenden Menge Zellkulturmedium resuspendiert. Anschließend wurde die Suspension auf neue Zellkulturbehälter verteilt. Dabei sollten ca. 10 000 Zellen pro cm² ausgesät werden.
C.2.1.5. Stimulation von mesenchymalen Zellen mit osteogenem Medium

Um die Differenzierung von mesenchymalen Zellen zu Osteoblasten zu gewährleisten benötigen diese den Zusatz bestimmter Substanzen. Diese wurden ihnen in Form des osteogenen Mediums (Jaiswal et al. 1997) alle 3-4 Tage zugesetzt.

Osteogenes Medium: 500ml MEM-alpha-Medium

50ml FBS, 100U/ml Penicillin / 100 μ g/ml Streptomycin 100nM Dexamethason 10mM β -Glycerolphosphat, 50 μ M Ascorbinsäurephosphat \Rightarrow 40ml-Aliquots bei -20°C aufbewahren

C.2.1.6. Kryokonservierung von Zellen

Zur Kryokonservierung von Zellen wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA (0,05%) abgelöst (siehe C.2.1.3.). Zwischen 1,5 und $2,5x10^6$ pelletierten Zellen (je nach Zellgröße) wurden dann in 1ml des entsprechenden Kryomediums resuspendiert und in ein Kryoröhrchen überführt. Anschließend wurden sie langsam in Ethanol auf -70°C abgekühlt, kurzfristig bei –70°C inkubiert und dann in flüssigen Stickstoff überführt.

Kryomedium: 90% entspr. Medium + 10% DMSO

C.2.1.7. Fixieren von Zellen

Zellen, die für immunhistochemische, histochemische oder Immunfluoreszenz-Färbungen herangezogen werden sollten, wurden auf sterilen Deckgläschen in 6-Well-Kulturschalen kultiviert. Bei Erreichen von 80-90% Konfluenz wurde das Medium von den Zellen entfernt und diese zweimal mit PBS (pH 7,4) gewaschen. Dann wurden 2ml des entsprechenden Fixierpuffers (siehe unten) aufpipettiert und die Zellen für 10min inkubiert. Für die von-Kossa-Färbung wurden die Zellen anschließend zweimal mit H₂O dest., für die anderen Färbungen mit PBS (pH 7,4) gewaschen.

Fixierpuffer:

von-Kossa-/APase-Färbung:

25ml Citratpuffer 65ml Aceton 8ml 37% Formaldehyd Citratpuffer: 18mM Zitronensäure 9mM Natriumcitrat 12mM Natriumchlorid pH 3,6 Immunhistochemie/-fluoreszenz: eiskaltes Methanol oder 3,7% Formaldehyd in PBS (pH 7,4)

C.2.1.8. Behandlung von Zellen mit PDGF, PTH und/oder Inhibitoren

Um den Einfluß von PDGF, PTH und/oder bestimmten Inhibitoren auf die Zellen zu testen, wurden diese in den entsprechenden Konzentrationen in serumfreiem Medium verdünnt. Die Zellen wurden vor der Behandlung 24h mit Minimalmedium inkubiert.

Zuerst wurden die Inhibitorenlösungen auf die Zellen aufpipettiert und für 30min bei 37°C präinkubiert. Anschließend wurde die PDGF- bzw. PTH-Lösung zugefügt. Die Zellen wurden dann für die weiteren, dem Versuch entsprechenden Zeiträume bei 37°C inkubiert und anschließend lysiert (siehe C.2.1.7.)

Serumfreies Medium: entsprechendes Grundmedium + 0,1% BSA Minimalmedium: entsprechendes Grundmedium 1% (w/v) BSA

100U/ml Penicillin / 100µg/ml Streptomycin

C.2.1.9. Adhäsion von Zellen auf verschiedenen Matrices

Die Zellen wurden bis zur Konfluenz herangezogen. Am Versuchstag wurde das Medium entfernt, die Zellen 2x mit PBS (pH 7,4) gewaschen und pro 175cm²-Flasche 8ml bzw. pro 75cm²-Flasche 4ml Versene aufpipettiert. Die Zellen wurden so lange bei 37°C inkubiert, bis sie sich ablösten und Einzelzellen zu erkennen waren. Die Zellsuspension wurde mit Medium + 2% BSA abgespült und bei 100x g für 10min pelletiert. Das Zellpellet wurde 2x in Medium + 2% BSA gewaschen, dann in 50ml Medium + 2% BSA resuspendiert und 1h bei 37°C zur Regeneration der Zellen in Suspension inkubiert. Während dessen wurden die vorbereiteten, mit den entsprechenden Matrixmolekülen beschichteten 6Wells oder Petrischalen 2x vorsichtig mit PBS (pH 7,4) gewaschen. Nach der Inkubation wurden die Zellen wieder pelletiert, in der entsprechenden Menge Medium + 0,1% BSA resuspendiert und auf die beschichteten Oberflächen verteilt. Es folgte eine Inkubation für verschiedene Zeiträume bei 37°C und zuletzt das Fixieren bzw. Lysieren der Zellen.

Serumfreies Medium: entsprechendes Grundmedium + 2% bzw. 0,1% BSA

C.2.1.10. Lysieren von Zellen zur Proteinisolierung

Die zu lysierenden Zellen wurden auf Eis überführt und zweimal mit eiskaltem PBS (pH 7,4) gewaschen. Anschließend wurde eine entsprechende Menge Hunter-Lysispuffer aufpipettiert und die Zellen mit diesem Puffer für 30min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem Zellschaber aus den Kulturgefäßen entfernt und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Suspension wurde 15sec gevortext und anschließend weitere 15min auf Eis inkubiert. Zuletzt wurden die Lysate durch Zentrifugation bei 15000x g und 4°C für 5min gereinigt, der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und das Pellet verworfen. Die Lysate wurden entweder sofort verwendet oder bei –70°C aufbewahrt.

Hunter-Lysispuffer (nach Schlaepfer et al. 1998):

	50mM HEPES, pH 7,4
	150mM Natriumchlorid
	10% (v/v) Glycerin
	1,5mM Magnesiumchlorid
	1% (v/v) Triton-X100
	1% (w/v) Natrium-Deoxycholat
	0,1% (w/v) Natrium-Dodecylsulfat
	\Rightarrow 10ml-Aliquots bei –20°C aufbewahren
frisch zugeben (10ml):	1 Tablette Complete Mini Protease Inhibitor
	100ul Phosphatase Inhibitor Cocktail II

C.2.1.11. Transfektion

Die Transfektionsreaktionen wurden in 6-Well-Kulturschalen durchgeführt. Pro Well wurden 500µl der entsprechenden DNA-Verdünnung (3-5µg) und 500µl der entsprechenden Verdünnung von *Lipofectamin2000* (LF, 5-15µl) in Optimem1-Transfektionsmedium angesetzt. Die DNA- und LF-Verdünnungen wurden für jeden Versuchsaufbau ausgetestet. Die Lösungen wurden invertiert und 5min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Anschließend wurden die DNA- und LF-Lösungen vereinigt, invertiert und 20min bei RT inkubiert. Die zu transfizierenden Zellen wurden einmal mit Optimem1 gewaschen und dann die Transfektionslösung langsam auf die Zellen aufgetropft. Zuletzt wurden noch 500µl Optimem1 zugefügt, damit die Zellen nicht austrocknen. Die Zellen wurden nach 24-72h Inkubation bei 37°C zur weiteren Untersuchung eingesetzt.

C.2.2. Methoden zur Proteinanalyse

C.2.2.1. Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

Zur Protein-Konzentrationsbestimmung der Zellysate wurde der DC (Detergent Compatible) Protein Assay verwendet.

Dazu wurde zuerst eine BSA-Verdünnungsreihe der Konzentrationen 1,2; 1,0; 0,8; 0,6; 0,4 und 0,2 μ g/ml hergestellt. Von diesen Standards wurden je 5 μ l in eine Mikrotiterplatte pipettiert. Als Leerwert wurden 2 μ l des Hunter-Lysispuffers und als Nullkontrolle 2 μ l H₂O dest. verwendet. Anschließend wurden je 2 μ l jedes zu bestimmenden Zellysates auf die Mikrotiterplatte aufgetragen. Dabei bei allen Proben eine Doppelbestimmung.

Für je eine Mikrotiterplatte wurde dann die Färbelösung A' aus 3ml des Reagenz A und 60ml des Reagenz S hergestellt. Von dieser Lösung wurden mit einer Multipette (Eppendorf, Hamburg) jeweils 25µl zu jeder Probe pipettiert. Anschließend wurden jeweils 200µl des Reagenz B zupipettiert, die Mikrotiterplatte in den ELISA-Reader überführt und kurz durch Rütteln der Platte im Gerät gemischt. Die Proben wurden für 15min bei RT inkubiert und anschließend die Absorption bei 750nm im gemessen.

Von der Extinktion der Proben wurde durch die zum Gerät gehörende Software (SoftMax pro, Version 3.0, Molecular Devices) zuerst die Extinktion des Leerwertes abgezogen, anschließend der Mittelwert der beiden Ergebnisse gebildet und dann die Proteinkonzentration anhand der BSA-Eichkurve bestimmt.

C.2.2.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteingemischen wurde die diskontinuierliche Gelelektrophorese in Polyacrylamidgelen nach Laemmli (Laemmli, 1970) in einer 16x16cm großen Laufkammer benutzt. Die Polyacrylamidkonzentration im Trenngel betrugt dabei 6% und im Sammelgel 3%. Das Trenngel wurde in die mit Ethanol gereinigte Kammer gefüllt und anschließend ca. 30min der Polymerisierung bei RT überlassen. Dabei wurde eine plane Oberfläche des Gels durch vorsichtiges Überschichten mit H₂O dest. gewährleistet. Anschließend wurde der Probenkamm mit 15 Öffnungen eingesetzt und das Sammelgel eingefüllt. Dieses wurde für mindestens 2h bei RT und dann über Nacht bei 4°C inkubiert.

Es wurden pro Proteinprobe jeweils 50 μ g Gesamtprotein aufgetragen, die mit 25 μ l 4x Probenauftragspuffer (siehe C.2.2.3) versetzt und auf 100 μ l mit H₂O dest. aufgefüllt wurden. Das Gemisch wurde dann für 5min bei 95°C inkubiert, kurz bei RT und 15000x g abzentrifugiert und anschließend auf das Gel aufgetragen. Alternativ wurden die aus der Immunpräzipitation resultierenden Proben aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte im Normalfall über Nacht bei konstanter Stromstärke von 15mA pro Gel.

Trenngel (1 Gel): 19,8ml H₂O dest. 9ml Trenngelpuffer 7,2ml Acrylamid/Bisacrylamid (30%/0,8%) 22,5µl TEMED 225µl APS Trenngelpuffer: 1,5M TrisBase, pH 8,8 0,4% Natrium-Dodecylsulfat

Sammelgel (1 Gel): 7,9ml H₂O dest.

Iml Sammelgelpuffer
100μl einer 10% (w/v) Natrium-Dodecylsulfat-Lösung
Iml Acrylamid/Bisacrylamid (30%/0,8%)
10μl TEMED
25μl APS
Sammelgelpuffer: 1,25M TrisBase, pH 6,8

C.2.2.3. Western-Blot

Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden im Naßblotverfahren auf eine Nitrocellulosemembran überführt. Dafür wurden die Membran und das Gel zuvor in Transferpuffer angefeuchtet und dann nach Herstelleranweisung in die Blotapparatur eingesetzt. Der Transfer erfolgte anschließend bei 400mA und 14°C für 3h in Transferpuffer.

Transferpuffer: 28,8g Glycin 6,025g TrisBase 3200ml H₂O dest. 800ml Methanol pH 8,3

C.2.2.4. Immunnachweis von Proteinen auf Nitrocellulosemembranen

Nach erfolgtem Naßblot wurden die Membranen für mindestens 2h, normalerweise aber über Nacht, in 5% (w/v) BSA in TBST-Puffer inkubiert. Anschließend wurde der primäre Antikörper in der anfangs ausgetesteten Verdünnung in TBST-Puffer aufgetragen und für 1h bei RT inkubiert. Nach Entfernen der Lösung und dreimaligem Waschen der Membran für je 15min in TBST-Puffer wurde der entsprechende Sekundärantikörper in der ausgetesteten Verdünnung aufgetragen. Auch danach wurde die Membran nach einer Inkubationsphase von 1h dreimal für je 15min mit TBST-Puffer gewaschen.

Anschließend wurden pro Membran je 2ml von Reagenz 1 und Reagenz 2 des ECL-Detection-Systems gemischt und auf die Membran aufpipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 1min wurde die Membran in Cellophanfolie verpackt und in einer Expositionskammer mit Klebeband fixiert. In der Dunkelkammer wurde für verschiedene Zeiten (meist 5-60sec) ein Röntgenfilm auf die Membran aufgelegt und dieser dann in einer Röntgenfilm-Entwicklermaschine entwickelt.

10x TBST-Puffer: 87g Natriumchlorid
 12g TrisBase
 auf 1000ml mit H₂O dest. auffüllen
 ⇒ 1x TBST-Puffer: 200ml 10x TBST-Puffer auf 2000ml auffüllen
 pH 8,0
 1ml Tween20 zugeben

C.2.2.5. Quantitative Auswertung der Western-Blots

Die aus den Western-Blot-Experimenten hervorgegangenen Röntgenfilme wurden mit Hilfe des Durchlichtscanners Vista-S6 (UMAX) eingescannt und mit dem Programm Multi-Analyst, Version 1.1 (BioRad) ausgewertet. Dabei wurde die Schwärzung der Banden als optische Dichte bestimmt. Bei der Phosphorylierungsanalyse wurde dann der Wert für das phosphorylierte Protein durch den des normalen Proteins geteilt. Bei der Expressionsanalyse wurde der Wert für das untersuchte Protein durch den des Haushaltsgenprodukts Aktin geteilt.

C.2.3. Immunologische und chemische Färbungen

C.2.3.1. Von-Kossa-Färbung

In der von-Kossa-Färbung wird kalzifizierte extrazelluläre Matrix mit Silbernitrat braunschwarz angefärbt.

Dazu wurden die luftgetrockneten, fixierten Zellen pro Deckgläschen mit 700 μ l 6% (w/v) Silbernitrat in H₂O dest. überschichtet. Nach einer Inkubation von 10min im UV-Licht wurde die Färbelösung mit Wasser abgespült. Die gefärbten Zellen wurden anschließend luftgetrocknet und mit Eukit auf einem Objektträger fixiert.

C.2.3.2. Alkalische-Phosphatase-Färbung

Zuerst wurde aus den Komponenten des Kits die Färbelösung hergestellt. Dazu wurden 1ml Sodium Nitrite Solution und 1ml FRV/FBB Alkaline Solution durch invertieren gemischt und 2min bei RT inkubiert. Anschließend wurde diese Mischung in 45ml H₂O dest. gegeben und zuletzt 1ml Naphtol AS-Bi Alkaline Solution zugefügt.

Die zu färbenden Präparate wurden 15min in der Färbelösung inkubiert und dann 2min in H₂O dest. gewaschen. Nach einer Hämatoxylin-Kernfärbung wurden die gefärbten Präparate mit Immunomount eingedeckt.

C.2.3.3. Phalloidin-Färbung

Vom Phalloidin-TRITC wurde eine 1mg/ml-Stammlösung in DMSO angelegt, daraus wurde mit PBS (pH 7,4) eine 50µg/ml-Arbeitslösung hergestellt.

Die formaldehydfixierten Zellen wurden vor der Färbung mit 0,1% Triton X-100 in PBS (pH 7,4) für 30min bei RT permeabilisiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS (pH 7,4) wurden 200µl der Phalloidin-TRITC-Arbeitslösung aufpipettiert. Die Zellen wurden bei RT für 40min mit dieser Lösung inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen wurden die Präparate mit dem Slow Fade Antifade Kit eingedeckt. Alternativ wurde diese Prozedur als Gegenfärbung an die Immunfluoreszenz-Färbung angeschlossen.

C.2.3.4. Immunfluoreszenz-Färbung

Die methanolfixierten Zellen wurden vor der Färbung zuerst zweimal mit PBS (pH 7,4) gewaschen und dann für 15min bei RT mit 0,1% Triton X-100 in PBS (pH 7,4) permeabilisiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS (pH 7,4) gewaschen. Danach wurde der in AK-Puffer verdünnte Primärantikörper (pro Deckgläschen 200µl) aufgetragen und für 60min bei 37°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für je 5min in PBS (pH 7,4) (bei Bedarf + 0,1% Tween20 zur Minderung der Oberflächenspannung) wurde der Sekundärantikörper aufgetragen und für 30min bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Zuletzt wurden die Präparate wieder dreimal mit Waschpuffer gewaschen und dann mit dem Slow Fade Antifade Kit eingedeckt.

AK-Puffer:
$$2\%$$
 (w/v) BSA 3% (v/v) NGSin PBS (pH 7,4) \Rightarrow zuerst BSA in PBS (pH 7,4) lösen, durch Faltenfilter filtrieren,
dann NGS zugeben \Rightarrow in 10ml Aliquots bei -20°C aufbewahren

C.2.3.5. Immunhistochemische Färbung mit dem APAAP-System

Die methanolfixierten Zellen wurden für 20min mit Blockingpuffer bei RT inkubiert. Anschließend wurden sie zweimal mit PBS (pH 7,4) gewaschen und dann der in V-Puffer verdünnte Primärantikörper (200µl pro Deckgläschen) aufgetragen. Nach 30min Inkubation bei RT wurde überschüssiger Primärantikörper abgewaschen und die Zellen zweimal mit PBS (pH 7,4) gewaschen.

Im Falle von monoklonalen Primärantikörpern wurde anschließen der Brückenantikörper Z412 aufgetragen, im Falle von polyklonalen Primärantikörpern aus dem Kaninchen der Brückenantikörper M737. Beide waren in V-Puffer im Verhältnis 1:50 verdünnt worden und wurden für 30min auf den Schnitten belassen. Nach erneutem zweimaligem Waschen mit PBS (pH 7,4) wurde auf die mit polyklonalem Primärantikörper inkubierten Schnitte zusätzlich noch der Brückenantikörper Z412 (1:50 verdünnt in V-Puffer) für 30min aufgetragen. Danach wurden alle Schnitte wieder gleich behandelt, nämlich zweimal mit PBS (pH 7,4) gewaschen und anschließend für 30min mit dem APAAP-Konjugat (1:50 verdünnt in V-Puffer) inkubiert.

In der Zwischenzeit wurde die Substratlösung angesetzt. Dafür wurden je eine Puffertablette und eine Färbetablette in 1ml H₂O dest. gelöst. Jeweils 200 μ l wurden auf jedes Deckgläschen aufpipettiert und nach 25min durch mehrmaliges waschen mit PBS (pH 7,4) wieder entfernt. Die Zellkerne wurden mit Hämatoxilin gegengefärbt.

Blockingpuffer:	0,1g BSA
	0,05g Saponin
	in 100ml PBS (pH 7,4) lösen und in 10ml Aliquots bei -20°C lagern
	frisch pro 10ml zugeben: 500µl NGS
V-Puffer:	1% (w/v) BSA in RPMI 1640 Medium

C.2.4. Methoden zur Nukleinsäureanalyse

C.2.4.1. RNA-Isolierung

Bei RNA-Isolierung aus kultivierten Zellen wurden die Zellen in RNAlater Stabilisierungslösung resuspendiert. Zur RNA-Isolierung wurde das RNeasy Mini Kit verwendet. Für einen Ansatz (eine Säule) wurden dabei maximal $1x10^7$ Zellen bzw. 30mg Gewebe eingesetzt. Alle Arbeitsschritte wurden bei RT durchgeführt.

Für die RNA-Isolierung wurde das Material zuerst lysiert und in Gegenwart eines stark denaturierenden Guanidin-Isothiocyanat-Puffers, der eventuell vorhandene RNasen zerstört, homogenisiert (QiaShredder). Für eine adäquate Bindung der RNA an die Silica-GelMembran wurd die Probe mit Ethanol versetzt und auf die Säule gegeben. Die Gesamt-RNA bindet selektiv an das Säulenmaterial, alle Kontaminationen wurden ausgewaschen. Zusätzlich wurde auf der Säule ein DNaseI-Verdau durchgeführt, wodurch die gesamte Probe von DNA befreit wurde. Eine Gesamt-RNA-Probe hoher Reinheit wurde zuletzt in $2x30\mu$ l H₂O eluiert und bei –70°C gelagert.

C.2.4.2. RNA-Konzentrationsbestimmung

Die RNA-Lösung wurde im Verhältnis 1:100 mit RNase-freiem H₂O dest. verdünnt und in eine UVette gefüllt. Die Absorption wurde bei 260nm gemessen und gegen H₂O als Nullwert abgeglichen. Die Konzentration wurde anhand der Formel

$$C_{RNA} [\mu g/ml] = 40 \cdot A_{260nm} \cdot 100$$

errechnet, wobei C für Konzentration und A für Absorption steht.

C.2.4.3. Kontrolle der RNA-Qualität im Agarosegel

Für die Herstellung eines Agarosegels wurden 0,8g Agarose in 100ml TBE-Puffer gegeben und in der Mikrowelle aufgekocht, bis die Agarose gelöst war. Anschließend wurde der Lösung unter Rühren 5µl einer 10mg/ml Ethidiumbromidlösung zugefügt. Nachdem die Agaroselösung auf ca. 60°C abgekühlt war, wurde sie in einen vorbereiteten Gelrahmen der benötigten Größe gegossen. Nachdem die Agarose erhärtet war, wurde der Gelrahmen in eine mit TBE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer überführt; dabei wurde das Gel komplett mit TBE-Puffer bedeckt.

1µg der RNA wurde mit 2µl Gelladepuffer gemischt und diese Lösung in die Taschen des Agarosegels gefüllt. Der Gellauf erfolgte bei 40mA. Nach abgeschlossenem Gellauf wurde das Gel im UV-Licht ausgewertet. Bei intakter Gesamt-RNA sollten zwei Banden zu sehen sein, und zwar repräsentieren diese die 18S- bzw. 28S-rRNA, die eine Molekulargröße von 1,9 bzw. 5,0kb besitzen. Idealerweise sollte die 28S-Bande ca. doppelt so deutlich sein wie die 18S-rRNA-Bande.

10x TBE-Puffer: 108g TrisBase
55g Borsäure
9,3g EDTA
auf 11 mit H₂O dest. auffüllen und 1:10 vor Gebrauch verdünnen

C.2.4.4. Kontrolle der DNA-Degradation über Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Um zu testen, ob die gesamte DNA durch die DNaseI-Behandlung degradiert wurde, kann eine PCR mit der RNA als Vorlage durchgeführt werden. Wenn Amplifikate entstehen, ist noch DNA in der Probe vorhanden und diese muß einer weiteren DNaseI-Behandlung unterzogen werden. Entstehen keine Amplifikate, so ist die RNA-Probe DNA-frei und kann für die RT-PCR eingesetzt werden. Die Komponenten der PCR-Reaktion werden in entsprechenden sterilen Reaktionsgefäßen zusammengestellt und im PCR-Gerät den unten aufgeführten Reaktionsbedingungen unterzogen. Im folgenden ist ein Standard-PCR-Protokoll angefügt, daß für verschiedene Applikationen während dieser Arbeit verwendet wurde.

PCR-Ansatz:	lμg	RNA
	5μl	10x PCR-Puffer
	10µl	Q-Solution
	1µl	dNTP-Mix (jeweils 10mM)
	0,5µl	jedes Oligonukleotids (10µM)
	0,25µl	Taq-Polymerase
	Xμl	H_2O (auffüllen auf 50 μ l)

Reaktionsbedingungen:	3min	95°C	erste Denaturierung
	1 min	95°C	Denaturierung
30 Zyklen	1min	$X^{\circ}C$	Annealing (Oligonukleotid-abhängig)
	1 min	72°C	Elongation
	5min	72°C	letzte Elongation

C.2.4.5. Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR)

Um zu untersuchen, ob ein bestimmtes Transkript in der isolierten RNA enthalten ist, wird eine PCR durchgeführt, der eine Reverse Transkription der RNA in cDNA vorangeht. So kann die Expression eines bestimmten Genes in den untersuchten Zellen nachgewiesen werden. Die Reaktion wird in einem Schritt ("one-step"), also in einem Reaktionsgefäß durchgeführt, um Kontaminationen zu vermeiden. Die Komponenten wurden in einem entsprechenden sterilen Reaktionsgefäß gemischt und den angegebenen Reaktionsbedingungen unterzogen.

RT-PCR-Ansatz:Master-Mix1:
$$2\mu$$
ljedes Oligonukleotids (10 μ M) 4μ ldNTP-Mix (jeweils 10mM) 2μ lDTT (100mM) 10μ lH₂OMaster-Mix2: 14μ lH₂O 10μ l10x RT-PCR-Puffer 1μ lEnzym-Mix (AMV-Reverse Transkriptase und Expand High
Fidelity) $\Rightarrow 20\mu$ l Master-Mix1 in das Reaktionsgefäß geben $\Rightarrow 1\mu$ g RNA zufügen $\Rightarrow 25\mu$ l Master-Mix2 zugeben $\Rightarrow Reaktionsgemisch abzentrifugieren$

Reaktionsbedingungen:		30min	50°C	Reverse Transkription
		5min	95°C	erste Denaturierung
	ſ	30sec	95°C	Denaturierung
10 Zyklen	ł	30sec	Х°С	Annealing (Oligonukleotid-abhängig)
		1 min	68°C	Elongation
	ſ	1 min	95°C	Denaturierung
30 Zyklen	$\left\{ \right.$	1 min	Х°С	Annealing (Oligonukleotid-abhängig)
	l	2min	68°C	Elongation
		7min	68°C	letzte Elongation

C.2.4.6. Reverse Transkription der RNA in cDNA

Um das Expressionsmuster der RNA in der Real-Time-PCR zu untersuchen, mußte diese zuvor in cDNA umgeschrieben werden. Dazu wurden 5µg Gesamt-RNA auf 29µl mit H₂O verdünnt, zuerst für 10min bei 65°C und anschließend 2min bei 0°C inkubiert. Die verdünnte RNA wurden zu den Beads im Reaktionsgefäß gegeben und 0,2µg Random Hexamer-Oligonukleotide zupipettiert. Die Mischung wurde 1min bei RT inkubiert. Anschließend wurde sie kurz gemischt, abzentrifugiert und für 1h bei 37°C inkubiert. Die cDNA wurde bei –20°C gelagert.

C.2.4.7. Extraktion von PCR-Produkten aus Agarosegelen

Um die im Agarosegel aufgetrennten PCR-Produkte zu isolieren, wurde der QiaQuick Gelextraction Kit verwendet. Die Agarosegel-Stückchen werden zuerst bei 50°C in einem Puffer gelöst, der den für die DNA-Bindung an die Silica-Gel-Membran idealen pH-Wert (\leq 7,5) besitzt. Dieser wird durch den enthaltenen Indikator angezeigt. Die DNA bindet so selektiv an die Membran und alle Verunreinigungen wie Agarose, Nukleotide, Oligonukleotide etc. werden durch spezielle Waschpuffer entfernt. Die reine DNA wird anschließend mit 30µl H₂O dest. eluiert, 2µl davon im Agarosegel kontrolliert und die DNA möglichst sofort zur Klonierung eingesetzt.

C.2.4.8. Klonierung von PCR-Produkten

Für die Real-Time-PCR (s. 2.4.10) war es notwendig, als Kontrolle für die Standardverdünnungsreihe die PCR-Produkte der spezifischen Oligonukleotide in einen Plasmidvektor zu klonieren, um größere Mengen dieser DNA-Fragmente in *E.coli*-Bakterien herzustellen. Hierzu wurde das Original TA-Cloning Kit verwendet. Dieses Kit baut darauf auf, dass die Taq-Polymerase sequenzunspezifisch ein Desoxyadenosin (A) an das 3'-Ende des PCR-Produkts anhängt. Der in dem Kit enthaltene linearisierte pCR2.1-Vektor besitzt einfache 3'-Desoxythymidin (T)-Überhänge, sodaß diese T- und A-Überhänge selektiv von dem Enzym T4-DNA-Ligase verbunden werden (4°C; Ü/N). Nach erfolgter Ligation des PCR-Amplifikats mit dem Vektor wurden *E.coli*-DH5 α - oder INV α F'-Zellen mit diesem Konstrukt transformiert und auf LB-Selektions-Medium mit Ampicillin (150mg/l) kultiviert.

C.2.4.9. Plasmidisolierung

Sowohl für die Kontrolle der Transformation als auch für die Isolierung von kloniertem PCR-Produkt in größeren Mengen war es notwendig, Plasmide aus *E.coli*-Bakterien aufzureinigen. Dazu wurde das Qiagen Plasmid Mini oder Midi Kit verwendet. Hier wird die Methode der modifizierten alkalischen Lyse angewendet, der eine Bindung der Plasmid-DNA an Anionen-Austauscher-Säulen folgt. Diese Bindung erfolgt unter niedrigen Salzund pH-Bedingungen. Verunreinigungen wie RNA, Proteine oder Farbstoffe werden unter mittleren Salzkonzentrationen ausgewaschen und die reine Plasmid-DNA anschließend unter hohen Salzkonzentrationen eluiert. Das Eluat wird zuletzt durch eine Isopropanol-Fällung aufkonzentriert und entsalzt.

C.2.4.10. Real-Time-PCR

Die Methode der Real-Time PCR dient zur quantitativen Messung von PCR-Produkten, um eine Aussage über die Ausgangskonzentration einer bestimmten mRNA zu erhalten. Dazu wird der PCR-Reaktion der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I zugefügt, der im ungebundenen Zustand eine nur geringe Eigenfluoreszenz besitzt, die durch Bindung an die kleine Furche des DNA-Doppelstrangs deutlich meßbar erhöht wird. Die Fluoreszenz wird nach jedem Elongationsschritt der PCR gemessen, so daß die Zunahme des Amplifikats in jedem Zyklus der PCR analysiert werden kann. Zur Charakterisierung der entstandenen PCR-Produkte wird am Anschluß an die PCR-Reaktion eine Schmelzkurve erstellt, bei der der Reaktionsansatz langsam von 60°C auf 95°C erhitzt und die Fluoreszenzabnahme kontinuierlich gemessen wird. Während Dimere der Oligonukleotide bei ca. 75-80°C schmelzen hat das Amplifikat einen Schmelzpunkt bei ca. 85-95°C, so daß Verunreinigungen erkannt werden können.

Haushaltsgen:

Um eine Quantifizierung des untersuchten Transkripts zu ermöglichen, muß dessen Konzentration mit der eines unregulierten Haushaltsgens verglichen werden. Hierzu wurde in diesem Fall GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) herangezogen.

Standardreihen:

Zur relativen Quantifizierung jedes untersuchten Transkripts wurde eine Verdünnungsreihe des Zielgens benötigt. Dazu wurde das klonierte PCR-Produkt der verwendeten Oligonukleotide als Standard herangezogen. Von diesen Plasmiden wurden Verdünnungsreihen hergestellt, ausgehend von einer Konzentration von $1\mu g/\mu l$ in 10er-Stufen bis 10^{-8} . Für die Standardreihe verwendet wurden im Allgemeinen die Konzentrationen 10^{-5} bis 10^{-8} . Die Verdünnungsstufen wurden jeweils in einer Doppelbestimmung eingesetzt.

Reaktionsansatz: 10μl QuantiTect MasterMix 2μl Primer A 2μl Primer B 4μl H₂O

Je 18µl des Mastermixes wurden auf die vorgekühlten Kapillaren verteilt und anschließend je 2µl cDNA zugefügt, dabei wurden für jede Probe zwei Ansätze vorbereitet (Doppelbe-

stimmung). Die Kapillaren wurden verschlossen und anschließend in den gekühlten Adaptoren in eine Mikrozentrifuge überführt und für 5sec bei 10 000x g abzentrifugiert, sodaß das Reaktionsgemisch in den unteren Teil der Glaskapillare transferiert wurde. Zuletzt wurden die Glaskapillaren in das Rondell des Light Cycler Instruments gestellt, dieses im Gerät befestigt und der Deckel geschlossen.

Das Standard-Laufprotokoll beinhaltete die folgenden Schritte:

1) Initiale Denaturierung/HotStart-Aktivierung (15min 95°C)
 2) Amplifizierung des Zielbereiches

 15sec 94°C
 20-30sec X°C (Oligonukleotid-spezifisch)
 15sec 72°C
 3) Schmelzkurve (60-90°C in 0,1°C/sec-Schritten)
 4) Kühlen des Instrumentes (40°C)

Die Daten wurden nach beendetem Lauf in Microsoft Excel übertragen und ausgewertet. Dabei wurde über die Verdünnungsreihe die Konzentration des Transkriptes errechnet und diese in Relation zu der Konzentration des Haushaltsgenes der jeweiligen Probe gesetzt um die DNA-Mengen zu normieren.

D. Ergebnisse

D.1. Auswahl des Zellsystems und Charakterisierung der isolierten Zellen D.1.1. Auswahl des Zellsystems

Zu Beginn dieser Arbeit wurde zuerst ein Zellsystem gesucht, in dem Osteoblasten verschiedener Entwicklungsstadien parallel analysiert werden können. Es empfahlen sich hierzu die langen Röhrenknochen von jungen Ratten, die sich noch im Wachstum befinden. Um die Zellisolierung zu standardisieren, wurden immer die Femura der Tiere herangezogen. Die Expression von FAK in Osteoblasten ist bereits 1997 von Toma et al. (Toma et al. 1997) beschrieben worden, wurde aber in den verwendeten Knochen per Immunhistochemie überprüft. Die Knochen wurden dazu in 4% Formaldehyd fixiert und in Paraffin eingebettet. An den daraus gewonnenen Mikrotomschnitten wurden die Färbungen mit einem monoklonalen Anti-FAK-Antikörper durchgeführt, deren Ergebnisse in Abbildung D.1. dargestellt sind.



Abb. D.1.: Immunhistochemische Färbung von Paraffinschnitten der Rattenfemura mit Anti-FAK-Antikörper. APAAP-Methode; Anti-FAK-Antikörper: 2,5µg/ml; A: 25fache, B: 100fache Vergrößerung.

Die Abbildungen zeigen, daß FAK sowohl in den Trabekeln aufliegenden, kubischen Osteoblasten (Abbildung A, große Pfeile), als auch in Osteoblasten und Präosteoblasten der primären Spongiosa (Abbildung B, große Pfeile) exprimiert wird. Außerdem ist ebenfalls eine FAK-Expression in einem kleinen Teil der Knochenmarkszellen (Abbildung A, kleine Pfeile) zu verzeichnen. Für die in den weiteren Versuchen verwendeten "str"-Zellen wurden die Knochenmarks-Stromazellen kultiviert, für die "psp"-Zellen die Zone

der primären Spongiosa. Dadurch wurde ein Vergleich von zwei verschiedenen Entwicklungsstadien der Osteoblasten-Linie angestrebt.

D.1.2. Charakterisierung der isolierten Zellen im Hinblick auf ihren Entwicklungsstatus

Aus der Lokalisation der isolierten Zellen im langen Röhrenknochen konnte der ungefähre Entwicklungsstatus abgeleitet werden. Um diesen genauer zu bestimmen, wurden die Enzymaktivität der Alkalischen Phosphatase und die Matrix-Kalzifizierung der Osteoblastenkulturen über histochemische Färbungen und die mRNA-Expression der Gene für Alkalische Phosphatase, Osteokalzin und Kollagen TypI über RT-PCR untersucht.

D.1.2.1. Alkalische Phosphatase-Aktivität und Matrix-Kalzifizierung

Zuerst wurden Zellen der ersten Passage auf Deckgläschen kultiviert und nach Erreichen 95% iger Konfluenz mit 4% Formaldehyd fixiert. Anschließend wurden sie den oben beschriebenen Färbungen unterzogen, deren Ergebnisse die Abbildungen D.2. und D.3. zeigen.



Abb. D.2.: Alkalische Phosphatase-Färbung der kultivierten Zellen. A;B;D: 100fache Vergrößerung; C: 200fache Vergrößerung. A/C: Phasenkontrast-Aufnahme; B/D: ohne Phasenkontrast.



Abb. D.3.: Von-Kossa-Färbung der kultivierten Zellen. A/B: 100 fache Vergrößerung.

Die Abbildungen zeigen, daß die str-Zellen Alkalische Phosphatase-negativ sind. Ein Großteil der psp-Zellen allerdings weist eine deutliche rote, also positive, Färbung auf. Eine positive Reaktion kalzifizierter Matrix mit der von-Kossa-Färbung würde sich durch eine braunschwarze Anfärbung zeigen. Aus Abbildung D.3. geht hervor, daß beide Zellarten unter Kurzzeit-Kultivierung (1Woche) mit dem Standardmedium keine kalzifizierte Matrix bilden können.

D.1.2.2. Expression von Markern der Osteoblastenlinie auf mRNA-Ebene

Um spezifische Marker der Osteoblastendifferenzierung auf mRNA-Ebene in den isolierten Zellen nachzuweisen, wurde zuerst aus konfluenten Zellen Gesamt-RNA isoliert und die darin enthaltene mRNA dann durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Anschließend wurde mit der cDNA als Template eine PCR durchgeführt und zwar jeweils mit Oligonukleotiden gegen Osteokalzin, Alkalische Phosphatase, Kollagen TypI und GAPDH als Positivkontrolle bzw. Konzentrationsvergleich. Die Ergebnisse sind in Abbildung D.4. dargestellt.



Abb. D.4.: RT-PCR mit Oligonukleotiden gegen Osteokalzin, Alkalische Phosphatase, Kollagen TypI und GAPDH. *: 300bp. OC: Osteokalzin; AP: Alkalische Phosphatase; K1: Kollagen TypI; GAPDH: Glycerinaldehyd-Phosphat-Dehydrogenase.

In allen PCR-Reaktionen sollte sich ein 299 bzw. 300bp großes Amplifikat bilden. Es zeigte sich, daß die psp-Zellen auf mRNA-Ebene Osteokalzin sehr schwach exprimieren, wohingegen die str-Zellen kein Osteokalzin-PCR-Produkt zeigten. Die Alkalische Phosphatase wurde in str-Zellen stärker exprimiert als in psp-Zellen. Kollagen TypI zeigte in den psp-Zellen wiederum eine stärkere Bande als in den str-Zellen. Die GAPDH-RT-PCR zeigt, daß in beiden Proben vergleichbare RNA-Mengen enthalten waren.

D.1.2.3. Veränderung des Phänotyps bei Stimulation der Zellen mit osteogenem Medium

Um das Proliferations- und Differenzierungspotential der verwendeten Primärkulturen zu untersuchen, wurden die Zellen mit osteogenem Medium (Jaiswal et al. 1997) stimuliert und nach 1, 2 bzw. 3 Wochen fixiert. Die Zellen wurden dann der Färbung auf Alkalische Phosphatase-Aktivität und der von-Kossa Färbung unterzogen. Die Ergebnisse charakteristischer Färbungen sind in den Abbildungen D.5. und D.6. dargestellt.



Abbildung D.5.: Alkalische Phosphatase-Aktivität und Matrix-Kalzifizierung der mit osteogenem Medium stimulierten str-Zellen. Obere Reihe: Alkalische Phosphatase-Färbung (AP); untere Reihe: von-Kossa-Färbung (vK). Alle Abbildungen: 100fache Vergrößerung.



Abbildung D.6.: Alkalische Phosphatase-Aktivität und Matrix-Kalzifizierung der mit osteogenem Medium stimulierten psp-Zellen. Obere Reihe: Alkalische Phosphatase-Färbung (AP); untere Reihe: von-Kossa-Färbung (vK). Alle Abbildungen: 100fache Vergrößerung.

Die Abbildungen zeigen, daß nach einer Woche Stimulation mit osteogenem Medium noch keine Alkalische Phosphatase-Aktivität in den str-Zellen zu beobachten war. Nach zwei Wochen allerdings bildeten sich erste kleine Zellknötchen ("*bone nodules*"), in denen sich Zellen mit aktiver Alkalischer Phosphatase anhäuften. Diese Knötchen waren nach drei Wochen deutlich größer und auch die Zellen im nahen Umfeld waren angefärbt.

Ähnliches war bei der von-Kossa-Färbung auf Matrix-Kalzifizierung zu beobachten. Nach einer Woche Stimulation war die Matrix der Zellen noch unkalzifiziert. Nach zwei Wochen zeigten sich erste Nodules mit kalzifizierter Matrix. Nach drei Wochen waren auch diese Nodules wesentlich größer und stark kalzifiziert.

Die psp-Zellen zeigten nach einer Woche die höchste Alkalische Phosphatase-Aktivität. Die Zellen begannen nach zwei Wochen Stimulation kalzifizierte Matrix zu produzieren, was sich nach drei Wochen noch weiter verstärkte. An Stellen der Kalzifizierung waren weniger Zellen zu sehen, die dort wahrscheinlich in Apoptose gegangen sind.

Die psp-Zellen zeigten im Gegensatz zu den str-Zellen den beobachteten Phänotyp gleichmäßig über die Zellpopulation verteilt, wohingegen die str-Zellen nur einzelne Nodules bildeten, die den osteoblastischen Phänotyp repräsentierten.

D.1.3. Expression und subzelluläre Lokalisation von FAK

Um die subzelluläre Lokalisation von FAK in den untersuchten Zellen zu bestimmen, wurden diese zur Immunfluoreszenzfärbung mit einem polyklonalen Anti-FAK-Antikörper $(4\mu g/ml)$ herangezogen. Es wurden für 60min auf Fibronektin bzw. Poly-L-Lysin adhärierte Zellen verglichen. Als Sekundärantikörper wurde ein FITC-markierter Anti-Kaninchen-Antikörper $(40\mu g/ml)$ verwendet. Die Ergebnisse sind in Abbildung D.7. dargestellt.



Abb.D.7.: Immunfluoreszenzfärbung der Zellen mit einem polyklonalen Anti-FAK-Antikörper (4µg/ml). Alle Abbildungen wurden in 400facher Vergrößerung aufgenommen.

Die Färbungen beider Zellarten zeigen, daß FAK bei Adhäsion auf Fibronektin im Randbereich der Zellen in den Fokalkontakten (Pfeile) lokalisiert ist. Die Adhäsion auf Poly-L-Lysin hingegen unterstützt zwar die Adhäsion, stimuliert aber nicht die Integrine und löst damit auch keine FAK-Aktivierung aus. Hier zeigt sich eine diffuse Verteilung von FAK im Zytoplasma mit bevorzugt perinukleärer Lokalisation (Pfeil).

Bei den in C und D abgebildeten Zellen wurde das Zytoskelett zusätzlich mit Phalloidin-TRITC gegengefärbt. Aufgrund der Stärke dieser Färbung kommt es zur Überlagerung der beiden Farbstoffe, so daß der Zellkern gelb erscheint.

D.2. Analyse der FAK-Modifikation im Rahmen der PDGF- bzw. PTH-Signaltransduktion im etablierten Zellsystem

D.2.1. Autophosphorylierung von FAK nach PDGF- bzw. PTH-Stimulation

Nach der Etablierung und Charakterisierung des in D.1. beschriebenen Zellsystems sollte untersucht werden, inwieweit die Proteintyrosinkinase FAK in die Signaltransduktion, die durch PDGF (Platelet Derived Growth Factor) bzw. PTH (Parathyroidhormon) ausgelöst wird, involviert ist.

Dazu wurden die Zellen 24 Stunden ohne Serum inkubiert und anschließend mit PDGF bzw. PTH für 30, 60 und 90min stimuliert. Die aus den stimulierten Zellen gewonnenen Proteinlysate wurden in einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt und auf Nitrocellulosemembranen übertragen. Die Immundetektion erfolgte sukzessive mit einem Antikörper gegen am Tyrosinrest 397 autophosphoryliertes FAK (FAK397pY) bzw. gegen Gesamt-FAK. Die Phosphorylierung von Proteinen an Tyrosin-, aber auch an Serin- oder Threoninresten stellt einen ubiquitären Aktivierungsmechanismus bei Signalproteinen dar. Die Autophosphorylierung des Tyrosinrestes 397 von FAK ist das erste Ereignis in der FAK-Aktivierung. Zur Auswertung wurde in sämtlichen im Folgenden dargestellten Experimenten der Quotient aus autophosphoryliertem und Gesamt-FAK (FAK397pY/FAK) herangezogen.

Für jede Fragestellung wurden mehrere unabhängige Versuche durchgeführt, wobei neue Zellpräparationen verwendet wurden. Die reproduzierten Ergebnisse sind hier dargestellt. Es wurden ebenfalls zu Beginn der Versuchsreihe für jede untersuchte Substanz (PDGF, PTH, Inhibitoren) verschiedene Konzentrationen ausgetestet. Im Falle der Inhibitoren wurden Konzentrationen zwischen der 10- und 100-fachen IC₅₀-Konzentration verwendet.

Teilweise wurden zwei unabhängige Experimente für eine Abbildung verwendet. Wenn dabei Schwankungen im Nullwert auftragen, wurden die Nullwerte beider Experimente abgebildet. Waren die Nullwerte vergleichbar, wurde nur einer abgebildet. Die Schwankungen im Nullwert lassen sich darauf zurückführen, daß für alle Experimente Primärzellen verwendet wurden.

Der Verlauf der Autophosphorylierung von FAK nach PDGF- bzw. PTH-Stimulation in str- bzw. in psp-Zellen ist in den Abbildungen D.8. und D.9. dargestellt.



Abb. D.8.: Western-Blot-Analyse der Autophosphorylierung von FAK in str-Zellen nach PDGF- bzw. PTH-Stimulation. Blots oben: an Tyrosinrest 397 autophosphoryliertes (FAK397pY) FAK; Blots unten: Gesamt-FAK; Diagramm: Quotient aus autophosphoryliertem und Gesamt-FAK.

Konzentrationen: PDGF: 10ng/ml; PTH: 10⁻⁸M; FAK397pY-pAb: 0,22µg/ml; FAK-pAb: 1µg/ml; Anti-Rabbit-HRP: 1:5000.





Konzentrationen: PDGF: 10ng/ml; PTH: 10⁻⁸M. FAK397pY-pAb: 0,22µg/ml; FAK-pAb: 1µg/ml; Anti-Rabbit-HRP: 1:5000.

In den str-Zellen ist eine siebenfache Steigerung der FAK-Autophosphorylierung nach 30min Stimulation mit PDGF zu beobachten. Nach 60min wurde sogar eine Steigerung der Phosphorylierung auf das achtfache beobachtet. Eine Stimulation mit PTH jedoch scheint in den wenig differenzierten str-Zellen die Grundphosphorylierung von FAK nicht zu steigern.

In den psp-Zellen ruft PDGF ebenfalls eine, wenn auch leicht verzögerte, Steigerung der FAK-Autophosphorylierung hervor: Nach 90min ist eine Verdreifachung der Autophosphorylierung zu beobachten. PTH bewirkt in den psp-Zellen nach 60min einen Anstieg der Phosphorylierung am Tyrosinrest 397 um das Zweifache.

D.2.2. Expression der Rezeptoren für PDGF bzw. PTH in den untersuchten Zellen

Aufgrund des unterschiedlichen Verhaltens der beiden Zelltypen in Bezug auf ihre Reaktion auf die PDGF- bzw. PTH-Stimulation stellte sich die Frage, ob dies durch eine unterschiedliche Expression der Rezeptoren für diese Substanzen bedingt wird.

Dies wurde über quantitative Real-Time-PCR (genaue Erklärung der Methode siehe Abschnitt D.3.) überprüft, deren Ergebnisse in Abbildung D.10. dargestellt sind.



Abb. D.10.: Quantitative Real-Time-PCR mit str- bzw. psp-cDNA. Vergleich der Expression jedes Rezeptors in den beiden Zellarten. Die Ergebnisse wurden über die Expression des Haushaltsgens GAPDH (Glycerinaldehyd-Phosphat-Dehydrogenase) normiert.

In beiden Zellarten wird die PDGF α -Rezeptor-mRNA am stärksten exprimiert Alle drei Rezeptor-mRNAs werden in den str-Zellen stärker exprimiert als in den psp-Zellen, nämlich jeweils ca. um den Faktor 10.

D.2.3. Analyse der die FAK-Autophosphorylierung regulierenden Signalmoleküle

Für die Analyse der PDGF- bzw. PTH-vermittelten Signaltransduktion in den untersuchten Zellen sollte als nächstes geklärt werden, welche Signalmoleküle die FAK-Autophosphorylierung regulieren. Dazu wurden Inhibitoren eingesetzt, die selektiv die Funktion bestimmter Kinasen blockieren. Bleibt nach dieser Inhibition die FAK-Autophosphorylierung aus, so ist davon auszugehen, daß das inhibierte Signalmolekül die Phosphorylierung von FAK induziert.

D.2.3.1. PDGF-Signaltransduktion

In verschiedenen anderen Zellarten wurde die PDGF-vermittelte Signaltransduktion bereits detailierter aufgeklärt als in Osteoblasten, wobei sich herausstellte, daß u.a. die beiden Enzyme Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase (PI3K) und Proteinkinase C (PKC) eine entscheidende Rolle in der Weiterleitung der Signale spielen.

Daher wurde über den PI3K-Inhibitor LY294002 (LY) und die PKC-Inhibitoren Calphostin C (CC) bzw. GF109203X (GFX) überprüft, ob diese Kinasen auch in dem hier untersuchten zellulären Zusammenhang stromaufwärts von FAK liegen.

Die Ergebnisse der entsprechenden Experimente sind in den Abbildungen D.11. und D.12. dargestellt.





Abb. D.11.: Analyse der Signaltransduktion zu FAK nach PDGF-Stimulation in str-Zellen. Blots oben: an Tyrosinrest 397 autophosphoryliertes (FAK397pY) FAK; Blots unten: Gesamt-FAK; Diagramm: Quotient aus autophosphoryliertem und Gesamt-FAK. Das Schema oben verdeutlicht den Versuchsablauf. <u>Konzentrationen:</u> PDGF: 10ng/ml; LY: 50µM; CC: 1µM. FAK397pY-pAb: 0,22µg/ml; FAK-pAb: 1µg/ml; Anti-Rabbit-HRP: 1:5000.



Abb. D.12.: Analyse der Signaltransduktion zu FAK nach PDGF-Stimulation in psp-Zellen. Blots oben: an Tyrosinrest 397 autophosphoryliertes (FAK397pY) FAK; Blots unten: Gesamt-FAK; Diagramm: Quotient aus autophosphoryliertem und Gesamt-FAK.

Konzentrationen: PDGF: 10ng/ml; LY: 100μM; CC: 0,5μM; GFX: 0,5μM. FAK397pY-pAb: 0,22μg/ml; FAK-pAb: 1μg/ml; Anti-Rabbit-HRP: 1:5000.

Durch die abgebildeten Inhibitorversuche stellte sich heraus, daß in den str-Zellen die PDGF-vermittelte FAK-Autophosphorylierung zwar teilweise durch LY, nicht aber durch CC inhibiert werden kann.

Entsprechende Ergebnisse lieferten auch die Experimente mit psp-Zellen: Hier wurde durch die zusätzliche Verwendung des PKC-Inhibitors GFX das durch CC ermittelte Ergebnis verifiziert. In beiden Zelltypen wird die PDGF-vermittelte FAK-Autophosphorylierung also durch PI3K, nicht aber durch PKC induziert.

Die psp-Zellen scheinen empfindlicher mit der Inhibition der FAK-Phosphorylierung auf die PI3K-Blockade zu reagieren. Hier wird der maximale Wert auf ein Sechstel reduziert, wobei es sich um eine vollständige Inhibition handelt. In den str-Zellen erfolgt durch die LY-Präinkubation nur eine Reduktion der FAK-Aktivierung um die Hälfte.

Der Phorbolester PMA (Phorbol-12-Myristyl-14-Acetat) stimuliert die Kinase PKC direkt, wodurch überprüft werden sollte, ob eine PKC-Stimulation prinzipiell dazu in der Lage ist, eine FAK-Autophosphorylierung auszulösen. Die Ergebnisse für die FAK-Phosphorylierung nach PMA-Stimulation verglichen mit PDGF sind in den Abbildungen D.13. und D.14. dargestellt.



Abb. D.13.: Analyse der FAK-Phosphorylierung nach PMA-Stimulation in str-Zellen. Blots oben: an Tyrosinrest 397 autophosphoryliertes (FAK397pY) FAK; Blots unten: Gesamt-FAK; Diagramm: Quotient aus autophosphoryliertem und Gesamt-FAK. Das Schema oben verdeutlicht den Versuchsablauf.

Konzentrationen: PDGF: 10ng/ml; PMA: 0,02µM. FAK397pY-pAb: 0,22µg/ml; FAK-pAb: 1µg/ml; Anti-Rabbit-HRP: 1:5000.





Konzentrationen: PDGF: 10ng/ml; PMA: 0,1µM. FAK397pY-pAb: 0,22µg/ml; FAK-pAb: 1µg/ml; Anti-Rabbit-HRP: 1:5000.

Aus Abbildung D.13. geht hervor, daß PMA in str-Zellen eine FAK-Autophosphorylierung auslöst. In den psp-Zellen steigt durch die PMA-Behandlung die FAK-Autophosphorylierung nur leicht über den Wert der unbehandelten Zellen an.

D.2.3.2. PTH-Signaltransduktion

Die durch PTH und dessen G-Protein-gekoppelten Rezeptor initiierte Signaltransduktion wurde in Osteoblasten bereits detailiert untersucht, jedoch war bisher nicht bekannt, daß auch die Proteintyrosinkinase FAK durch PTH aktiviert wird, wie in dieser Arbeit für die psp-Zellen gezeigt wurde. Da im Verlauf der PTH-Signalkaskade die beiden Kinasen PKA und PKC aktiviert werden, sollte nun durch spezifische Inhibitoren untersucht werden, ob eins dieser beiden Enzyme die FAK-Autophosphorylierung reguliert. Dazu wurden der PKA-Inhibitor H-89 und der PKC-Inhibitor Calphostin C (CC) eingesetzt. Die Ergebnisse dieser Inhibitor-Experimente sind in den Abbildungen D.15. und D.16. dargestellt.



Abb. D.15.: Analyse der Signaltransduktion zu FAK nach PTH-Stimulation in str-Zellen. Blots oben: an Tyrosinrest 397 autophosphoryliertes (FAK397pY) FAK; Blots unten: Gesamt-FAK; Diagramm: Quotient aus autophosphoryliertem und Gesamt-FAK. Das Schema oben verdeutlicht den Versuchsablauf.

2

1,8 1,6 1,4

0,6

0,4

0,61

Null psp

0,5

psp PDGF 30



1,81

psp PDGF 90

0,5

CytD+PDGF30

CytD+PDGF60

CytD+PDGF90

Konzentrationen: PDGF: 10ng/ml; H-89: 5µM; CC: 1µM. FAK397pY-pAb: 0,22µg/ml; FAK-pAb: 1µg/ml; Anti-Rabbit-HRP: 1:5000.



1,26

psp PDGF 60

Konzentrationen: PTH: 10⁻⁸M; CC: 1µM; H-89: 0,1µM. FAK397pY-pAb: 0,22µg/ml; FAK-pAb: 1µg/ml; Anti-Rabbit-HRP: 1:5000.

Wie in Abbildung D.8. gezeigt, hat PTH in den str-Zellen keinen deutlichen Effekt auf die FAK-Autophosphorylierung. Die Präinkubation der Zellen mit H-89 bewirkt aber einen Rückgang der FAK-Phosphorylierung nach 90min PTH-Inkubation. Die Anwendung des PKC-Inhibitors CC bewirkt eine leichte Steigerung der FAK-Aktivierung.

In den psp-Zellen kann die durch PTH ausgelöste FAK-Autophosphorylierung durch CC leicht vermindert, aber nicht bis auf den Nullwert abgesenkt werden. Die Präinkubation mit H-89 hingegen bewirkt eine Verminderung der FAK-Aktivierung auf den Wert der unbehandelten Zellen.

Die Substanz Forskolin aktiviert die Kinase PKA direkt über Interaktion mit der katalytischen Untereinheit. Anhand dieser Verbindung sollte überprüft werden, ob eine PKA-Aktivierung eine Steigerung der FAK-Autophosphorylierung hervorrufen kann. Die Ergebnisse der Forskolin-Stimulation sind in Abbildung D.17. und D.18. dargestellt.





Abb. D.17.: Analyse der FAK-Phosphorylierung nach Forskolin-Stimulation in str-Zellen. Blots oben: an Tyrosinrest 397 autophosphoryliertes (FAK397pY) FAK; **Blots unten:** Gesamt-FAK; **Diagramm:** Quotient aus autophosphoryliertem und Gesamt-FAK. Das Schema oben verdeutlicht den Versuchsablauf. <u>Konzentrationen:</u> PTH: 10⁻⁸M; Forskolin: 5μM. FAK397pY-pAb: 0,22μg/ml; FAK-pAb: 1μg/ml; Anti-Rabbit-HRP: 1:5000.



Abb. D.18.: Analyse der FAK-Phosphorylierung nach Forskolin-Stimulation in psp-Zellen. Blots oben: an Tyrosinrest 397 autophosphoryliertes (FAK397pY) FAK; Blots unten: Gesamt-FAK; Diagramm: Quotient aus autophosphoryliertem und Gesamt-FAK.

Konzentrationen: PTH: 10⁻⁸M; Forskolin: 10µM. FAK397pY-pAb: 0,22µg/ml; FAK-pAb: 1µg/ml; Anti-Rabbit-HRP: 1:5000.

In den str-Zellen löste Forskolin, wie PTH, keine Steigerung der FAK-Autophosphorylierung aus. In den psp-Zellen konnte durch Forskolin eine FAK-Aktivierung hervorgerufen werden. FAK scheint in diesen Zellen also durch PKA stimulierbar zu sein.

D.2.4. Subzelluläre Lokalisation von FAK nach Stimulation der psp-Zellen mit PDGF bzw. PTH

Nicht nur die Phosphorylierung, sondern auch die Lokalisation von Signalmolekülen ist von entscheidender Bedeutung für die Signaltransduktion. Einige Signalmoleküle müssen z.B. an die Zellmembran transloziert werden, um dort mit anderen zu interagieren.

Die FAK-Lokalisation wurde in PDGF- bzw. PTH-stimulierten Zellen über Immunfluoreszenz-Färbungen untersucht. Autophosphoryliertes FAK wurde mit einem polyklonalen Antikörper nachgewiesen und das Zytoskelett mit Phalloidin-TRITC sichtbar gemacht. Die Ergebnisse sind in Abbildung D.19. dargestellt.



Abb. D.19.: Subzelluläre Lokalisation von autophosphoryliertem FAK nach PDGF- bzw. PTH-Stimulation. FAK397pY-pAb: 1:100 (keine Konzentration angegeben); Phalloidin-TRITC: 0,2µg/ml.

In unstimulierten psp-Zellen ist FAK perinukleär konzentriert, in PDGF-stimulierten Zellen verteilt es sich über das gesamte Plasma und lokalisiert auch in den Fokalkontakten. In PTH-stimulierten Zellen ist ähnliches zu beobachten, wobei zusätzlich eine Schrumpfung der Zellen eintritt.

D.2.5. Einfluß des Zytoskeletts auf die PDGF-Signaltransduktion zu FAK

In den meisten Fällen ist die Integrität des Zytoskeletts von entscheidender Bedeutung für viele Signaltransduktionsereignisse. Da aktiviertes FAK in den Fokalkontakten lokalisiert ist, die an der Regulation des Zytoskeletts beteiligt sind, sollte überprüft werden, ob durch die Beeinträchtigung der Neuformation von Aktinfasern durch CytochalasinD eine Veränderung der Wirkung von PDGF auf die FAK-Autophosphorylierung beobachtet werden kann.

Dazu wurden die Zellen zuerst für 30min mit CytochalasinD präinkubiert und anschließend mit PDGF stimuliert. Die Ergebnisse der Western-Blot-Analyse dieser Proben sind in Abbildung D.20. dargestellt.



Abb. D.20.: Western-Blot-Analyse der Autophosphorylierung von FAK in str-Zellen nach Cytochalasin-D-Behandlung und anschließender PDGF-Stimulation. Blots oben: an Tyrosinrest 397 autophosphoryliertes (FAK397pY) FAK; Blots unten: Gesamt-FAK; Diagramm: Quotient aus autophosphoryliertem und Gesamt-FAK.

Konzentrationen: PDGF: 10ng/ml; CytochalasinD: 5µM. FAK397pY-pAb: 0,22µg/ml; FAK-pAb: 1µg/ml; Anti-Rabbit-HRP: 1:5000.




Konzentrationen: PDGF: 10ng/ml; CytochalasinD: 5µM. FAK397pY-pAb: 0,22µg/ml; FAK-pAb: 1µg/ml; Anti-Rabbit-HRP: 1:5000.

Die oben abgebildeten Experimente zeigen deutlich, daß die Präinkubation mit CytochalasinD die durch PDGF hervorgerufene FAK-Aktivierung in beiden Zelltypen eliminieren kann.

Für PTH konnte dieses Experiment nicht etabliert werden. Aufgrund des sowohl durch CytochalasinD als auch durch PTH induzierten Schrumpfens der Zellen konnte nicht genügend Proteinlysat gewonnen werden.

D.3. Analyse der Expression von FAK und Pyk2 in hochmalignen Osteosarkomen

Auch in Krebserkrankungen spielt die Signaltransduktion eine entscheidende Rolle. Hier sind meist ein oder mehrere Signalwege durch z.B. Überexpression, Ausfall oder veränderte Aktivierung der normalen Kontrolle entzogen und ermöglichen so das unkontrollierte Wachstum der Zellen (Neoplasie) und die Ausbreitung in andere Gewebe (Metastasierung).

Das aggressive Osteosarkom entsteht aus maligne entarteten Osteoblasten. FAK und Pyk2 wurden in den letzten Jahren mehrfach im Zusammenhang mit Tumorentstehung und Metastasierung beschrieben, wobei besonders die Gleichgewichtsverschiebung der FAKund Pyk2-Expression eine entscheidende Rolle spielte. Daher sollte in diesem Teil der Arbeit die Expression von FAK und Pyk2 im Osteosarkom qualitativ und quantitativ untersucht werden.

D.3.1. Qualitative Untersuchung der FAK- und Pyk2-Expression in Osteoblasten und hochmalignen Osteosarkomen

Zur Untersuchung der FAK- und Pyk2-Expression in Osteoblasten und hochmalignen Osteosarkomen wurden formalinfixierte und paraffineingebettete Präparate zur Immunhistochemie mit einem monoklonalen bzw. polyklonalen Anti-FAK-Antikörper eingesetzt. In Abbildung D.22. bis D.24. sind die Ergebnisse dieser Färbungen dargestellt. Eine Beschreibung des Materials befindet sich im Anhang.



Abb. D.22.: Immunhistochemische Färbung von Osteosarkom-Paraffinschnitten mit monoklonalem
Anti-FAK-Antikörper. APAAP-Methode; Anti-FAK-Antikörper: 2,5µg/ml; AB: OS6; C/D: OS1; E: OS2;
F: OS3. C: 25 fache, A/F: 100fache, B/D/E: 200fache Vergrößerung.

Abbildung D.22.A zeigt deutlich die FAK-Expression in Tumorzellen mit anaplastischen Zellkernen, wohingegen Abbildung D.22.B. eine FAK-Expression in aktiven, den Trabekeln aufliegenden Tumorzellen darstellt. Aber auch zwischen den Trabekeln liegende und in die Tumormatrix eingebettete Zellen wiesen eine positive Reaktion mit dem FAK-Antikörper auf (Abbildung D.22.C./D./E.). Zu beachten ist die starke FAK-Expression, die in vielen um ein Gefäß liegenden Tumorzellen auftritt (Abbildung D.22.F.).



Abb. D.23.: Immunhistochemische Färbung von Osteosarkom-Paraffinschnitten mit monoklonalem Anti-Pyk2-Antikörper. APAAP-Methode; Anti-Pyk2-Antikörper: 5µg/ml; A/B: OS1; C: OS3; D: OS4. A/C: 200fache Vergrößerung; B/D: 100fache Vergrößerung.

In Abbildung D.23.A. ist deutlich zu sehen, daß Pyk2 sowohl in den Endothelzellen der Gefäße, aber auch in den gefäßumgebenden Zellen exprimiert wird. Abbildung D.23.B./D. zeigen, daß auch die matrixbildenden Tumorosteoblasten Pyk2 exprimieren, wobei eine perinukleäre Konzentration des Proteins zu beobachten ist. In Abbildung D.23.C. ist deutlich zu erkennen, daß auch Osteoklasten eine distinkte Pyk2-Expression zeigen, wie bereits aus der Literatur bekannt war.



Abb. D.24.: Immunhistochemische Färbung von Osteosarkom- und Beckenkammbiopsie-Paraffinschnitten mit polyklonalem Anti-FAK- bzw. Anti-Pyk2-Antikörper. APAAP-Methode; beide Antikörper: 4µg/ml; A-C: FAK pAb; D-F: Pyk2 pAb; A/D: OS1; B/C: OB8; E/F: OB7. A/B/D: 100fache Vergrößerung; C/E/F: 200fache Vergrößerung.

Abbildung D.24. zeigt, daß FAK in den Osteosarkomtumorzellen (A) und in den Osteoblasten der Beckenkammbiopsie (B/C) gleich stark exprimiert wird. Abbildung D.24.D zeigt hingegen eine sehr schwache Pyk2-Expression in den Osteosarkomzellen verglichen mit einer deutlich stärkeren Pyk2-Expression in den normalen Osteoblasten der Beckenkammbiopsie (E/F).

D.3.2. Auswahl der Vergleichszellen

Da im Rahmen dieser Arbeit osteoblastische Osteosarkome des Menschen untersucht wurden, sollten normale humane Osteoblasten als Vergleichzellen herangezogen werden. Diese Zellen wurden aus nicht-pathologischen Spongiosaproben, wie sie z.B. bei einer Endoprothesenoperation anfallen, kultiviert. Zum Nachweis des osteoblastischen Phänotyps wurde ein Teil der Zellen mit osteogenem Medium stimuliert und anschließend der Färbung auf Alkalische Phosphatase-Aktivität und der von-Kossa-Färbung unterzogen. Charakteristische Ergebnisse sind in Abbildung D.25. dargestellt:



Abb. D.25.: Alkalische Phosphatase- und von-Kossa-Färbung der stimulierten normalen humanen Osteoblasten.

Die beiden Osteoblasten-Populationen zeigen ein vergleichbares zeitliches Auftreten der beiden Osteoblastenmarker. Nach einer Woche ist die Alkalische-Phosphatase-Aktivität am höchsten, was die Annahme, daß es sich um differenzierte Osteoblasten handelt, bestätigt. Die Aktivität nimmt nach zwei bzw. drei Wochen Stimulation ab. Die Färbung, die nach 3 Wochen in der OB4-Zellpräparation zu beobachten war, läßt sich mikroskopisch als Einlagerung von Farbstoff in die von den Osteoblasten sezernierte Matrix erklären. Die Osteoblasten selbst wiesen keine Enzymreaktion auf. Der Test auf Matrixkalzifizierung zeigte bei beiden Chargen einen deutlichen Anstieg nach zwei bzw. drei Wochen. Da nur differenzierte Osteoblasten dazu in der Lage sind, kalzifizierte Matrix zu bilden, waren die Zellen als solche charakterisiert und wurden als Vergleichszellen herangezogen.

D.3.3. Analyse der FAK- und Pyk2-Expression auf mRNA-Ebene

Mit Hilfe der quantitativen Real-Time-PCR wurde die mRNA-Expression von FAK und Pyk2 in 9 Osteosarkomen, 5 Osteosarkom-Zellinien und 6 normalen humanen Osteoblasten-Populationen verglichen. Die elektrophoretisch aufgetrennte Gesamt-RNA einiger Proben, die in cDNA umgeschrieben wurde, ist in Abbildung D.26. dargestellt.



Abb. D.26.: Gesamt-RNA-Proben für die Real-Time-PCR. M: Marker. 1: OB3; 2-5: OB1; 6: OB6; 7: U2OS; 8: OHS-4; 9: MG-63; 10: HOS-58; 11: Saos-2.

Es wurden jeweils 5µl der Gesamt-RNA aufgetragen. Es zeigen sich Schwankungen in der RNA-Ausbeute, die dadurch ausgeglichen wurden, daß immer die gleiche absolute Menge Gesamt-RNA (5µg) für die cDNA-Synthese eingesetzt wurde.

Im Folgenden sind beispielhaft die Ergebnisse eines Real-Time-PCR-Laufes für FAK dargestellt. Abbildung D.27. zeigt den Verlauf der Amplifikation der PCR-Produkte.



Abb. D.27.: Amplifikation von FAK. Dargestellt ist die Fluoreszenzzunahme der Proben über der Zykluszahl.

Aus dem Verlauf der Amplifkationskurven der Standardverdünnungsreihe (FAK 10^{-5} bis $10^{-8} \ \mu g/\mu l$) wurde die Standardkurve ermittelt, anhand derer die Konzentrationen der unbekannten Proben bestimmt wurden. Die Standardkurve ist in Abbildung D.28. dargestellt.



Abb. D.28.: Aus der Standard-Verdünnungsreihe ermittelte Standardkurve. Dargestellt ist die Zykluszahl über der log-Konzentration der Standards.

Im direkten Anschluß an die PCR-Reaktion wurden die Amplifikate durch Erhitzen von 55 auf 95°C geschmolzen und die Abnahme der SYBR-Green-Fluoreszenz kontinuierlich über den gesamten Vorgang aufgenommen. Dies wurde anschließend graphisch in der Schmelzkurve dargestellt, die Abbildung D.29. zeigt.



Abb. D.29.: Schmelzkurve der PCR-Produkte. Dargestellt ist -df/dt über der Temperatur in °C.

In Abbildung D.30. ist die Schmelzkurve der Negativkontrolle (H_2O statt DNA) dargestellt. Der Schmelzpunkt liegt hier deutlich unter dem der Proben, was anzeigt, daß es sich um unspezifische Produkte bzw. Oligonukleotid-Dimere handelt. Dieser Peak der Schmelzkurve fehlt dagegen bei den Proben, was darauf hinweist, daß sich hier keine Oligonukleotid-Dimere gebildet haben.



Abb. D.30.: Schmelzkurve der Negativkontrolle. Dargestellt ist -df/dt über der Temperatur in °C.

Die PCR-Proben können nach Beendigung der Reaktion aus den Kapillaren zurückgewonnen und zur Agarose-Gelelektrophorese eingesetzt werden, was eine weitere Analyse auf spezifische Amplifikation erlaubt. Die elektrophoretische Auftrennung der Proben des abgebildeten Laufs zeigt Abbildung D.31.



Abb.D.31.: Agarose-Gelelektrophorese der Real-Time-PCR-Produkte. M:100bp-Marker, *: 300bp; 1,2: FAK E-5; 3,4: FAK E-6; 5,6: FAK E-7; 7: FAK E-8; 8,9: mesenchymale Stammzellen (MSC); 10,11: OS7; 12,13: OS8; 14,15: OS-Zellinie U2OS; 16,17: OS-Zellinie MG-63; 18,19: OS-Zellinie OHS-4; 20,21: OS-Zellinie HOS-58; 22,23: OS11; 24,25: OS10; 26,27: OS9; 28,29: OB2. 30,31: H₂O.

Auf diesem Gel sieht man die erwartete Bande bei einer Größe von 300bp. Darüber ist ein diffuses Signal zu sehen, das wahrscheinlich vom SYBR Green I in der Probe verursacht wurde. Das Signal unterhalb der Bande besteht aus überschüssigen Oligonukleotiden. Aufgrund dieser gelelektrophoretischen Analyse und der schwankenden Werte wurden die Ergebnisse für die MSC (mesenchymale Stammzellen) aus der Auswertung ausgeschlossen. Zudem sieht man deutlich, dass sich in der Negativkontrolle (30;31) keine 300bp-Bande gebildet hat.

Die Schnittpunkte der Amplifikationskurven der Proben mit der Standardkurve ("*crossing points*") wurden durch die Light-Cycler-Software berechnet, woraus sich die Konzentration der Proben ergab. Dabei wurde immer aus mindestens zwei Bestimmungen der Mittelwert errechnet und anschließend der Wert für die FAK-Expression durch den der GAPDH-Expression geteilt, um Schwankungen in der cDNA-Konzentration auszugleichen.

Probenart	Probe	FAK / GAPDH
kryokonservierte Osteosarkome	OS 10	0,0285
	OS 12	0,0080
	OS 7	0,0118
	OS 8	0,0245
	OS 9	0,0661
	OS 11	0,0143
kultivierte Osteosarkome	OS 13	0,0235
	OS 14	0,0300
	OS 15	0,0482
	OS 16	0,0003
kryokonservierte Spongiosa	OB 1	0,0182
kultivierte Osteoblasten	OB 2 Spongiosa	0,0231
	OB 2 Kortikalis + Spongiosa	0,0339
	OB 3	0,0188
	OB 4	0,0247
	OB 6	0,0252
Osteosarkom-Zellinien	U2OS	0,0657
	OHS4	0,0821
	MG63	0,0454
	HOS58	0,1085
	Saos2	0,0334

Die Ergebnisse der Rechnung sind in Tabelle D.1. dargestellt.

Tab.D.1.: Ergebnisse der quantitativen Real-Time-PCR. Angegeben ist der Quotient der Werte für FAK und GAPDH.

Aus den Werten der vier Probengruppen (kryokonservierte Osteosarkome, kulturexpandierte Osteosarkome, normale Osteoblasten, Osteosarkom-Zellinien) wurde jeweils der Mittelwert errechnet und dieser graphisch mit Standardabweichung in Abbildung D.32. dargestellt:



Abb.D.32.: Ergebnisse der Real-Time-PCR gegen FAK. kryo. OS: kryokonservierte Osteosarkome; ZK-OS: Osteosarkome aus Zellkultur; OS-ZL: Osteosarkom-Zellinien; nhOB: normale humane Osteoblasten. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte der Quotienten aus FAK und GAPDH für die einzelnen Gruppen mit Standardabweichung.

Sowohl die kryokonservierten Osteosarkome als auch die kulturexpandierten Osteosarkomzellen unterscheiden sich in ihrer FAK-mRNA-Expression nicht von normalen humanen Osteoblasten. Die Osteosarkom-Zellinien zeigen eine ca. dreifach erhöhte FAK-Expression auf mRNA-Ebene verglichen mit allen anderen untersuchten Zelltypen.

Anschließend wurde auch die Pyk2-Expression in den verschiedenen Zellarten über Real-Time-PCR untersucht. Die gewonnenen Daten sind in Tabelle D.x. dargestellt. Ausgewertet wurden die Ergebnisse für 7 Osteosarkome, 4 Osteoblastenpopulationen und 5 Osteosarkomzellinien.

Probenart	Probe	Pyk2 / GAPDH
kryokonservierte Osteosarkome	OS 10	0,0016
	OS 12	0,0014
	OS 7	0,0014
	OS 8	0,0012
	OS 9	0,0028
kultivierte Osteosarkome	OS 13	0,00067
	OS 14	0,00083
kultivierte Osteoblasten	OB 2 Spongiosa	0,0022
	OB 2 Kortikalis + Spongiosa	0,0019
	OB 3	0,0010
	OB 4	0,0013

Probenart	Probe	Pyk2 / GAPDH
Osteosarkom-Zellinien	U2OS	0,0014
	OHS4	0,0014
	MG63	0,00092
	HOS58	0,0013
	Saos2	0,00064

Tab.D.2.: Ergebnisse der quantitativen Real-Time-PCR. Angegeben ist der Quotient der Werte für Pyk2 und GAPDH.

Abbildung D.33. zeigt die Mittelwerte der vier Probengruppen mit Standardabweichung.



Abb.D.33.: Ergebnisse der Real-Time-PCR gegen Pyk2. kryo. OS: kryokonservierte Osteosarkome; ZK-OS: Osteosarkome aus Zellkultur; OS-ZL: Osteosarkom-Zellinien; nhOB: normale humane Osteoblasten. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte der Quotienten aus Pyk2 und GAPDH für die einzelnen Gruppen mit Standardabweichung.

Die Pyk2-Expression der kryokonservierten Osteosarkome ist vergleichbar mit der Expression in normalen humanen Osteoblasten. In den kultivierten Osteosarkomzellen ist die Pyk2-mRNA-Expression im Vergleich zu den normalen Osteoblasten um die Hälfte vermindert, in den permanenten Osteosarkomzellinien um ein Viertel des Wertes der Normalzellen.

E. Diskussion

Über die Funktion der Proteintyrosinkinase FAK (Focal Adhesion Kinase), die in anderen Zellen bereits als Koordinationspunkt verschiedener Signaltransduktionswege beschrieben wurde, war in osteoblastischen Zellen bisher wenig bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Zellsystem aus Rattenfemura etabliert und charakterisiert, das eine Untersuchung früher und später Differenzierungsstadien der Osteoblastenlinie im Hinblick auf die FAK-Signaltransduktion erlaubt.

Die hier dargestellten Ergebnisse zeigen, daß FAK in den frühen Osteoblastenvorläufern in die durch PDGF (Platelet Derived Growth Factor) vermittelte Signaltransduktion involviert ist und über das Enzym PI3K (Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase) reguliert wird. In den differenzierteren Osteoblasten konnte dieser Signaltransduktionsweg ebenfalls nachgewiesen werden. Zusätzlich zu diesem Enzym scheint auch die Integrität des Zytoskeletts von entscheidender Bedeutung für die FAK-Aktivierung zu sein. In den differenzierten Osteoblasten wird FAK auch, im Gegensatz zu den undifferenzierten Zellen, durch PTH (Parathyroidhormon) aktiviert, was durch die Kinase PKA (Proteinkinase A) reguliert wird.

Weiterhin wurde im Rahmen dieser Arbeit die Expression von FAK und der ihr homologen Proteintyrosinkinase Pyk2 (Proline Rich Tyrosine Kinase2) in Osteosarkomen untersucht, wodurch erste Anhaltspunkte dafür erlangt wurden, daß das Expressionsgleichgewicht dieser beiden Kinasen in den Tumoren gegenüber dem Vergleichsgewebe verändert ist.

E.1. Analyse des Zellsystems

Bei der Etablierung eines Zellsystems ist die Entscheidung zwischen Primärzellen und immortalisierten Zellinien für das Studiendesign zu überdenken. Primärzellen haben den Vorteil, daß durch die Kurzzeitkultivierung eine Veränderung des Phänotyps durch Mutation, Dedifferenzierung, Seneszenz oder Überwuchern durch andere Zelltypen weitgehend eliminiert werden kann. Nachteilig bei Primärzellen ist aber, daß Mischkulturen nicht ausgeschlossen werden können und meist nur mit größerem Aufwand Zellmengen für umfangreiche biologische Assays gewonnen werden können. Immortalisierte Zellinien werden meist durch Transfektion eines Zellklons mit Onkogenen (z.B. T-Antigen des SV-40 Virus) hergestellt, bzw. aus Tumoren isoliert. Es wird so ein relativ stabiler Phänotyp gewonnen, daher können die Zellen vielfach passagiert und vermehrt werden. Es besteht aber die Gefahr der Adaptation der Zellen an die *in vitro* Gegebenheiten und des Verlusts von *in*

vivo Eigenschaften (Majeska 1996). Oft handelt es sich bei Onkogenen auch um für die Signaltransduktion wichtige Gene, sodaß eine starke Veränderung der Gegebenheiten in diesen Zellen angenommen werden muß.

Für die im ersten Teil dieser Arbeit durchgeführten Studien sollten Zellen verschiedener osteoblastischer Differenzierungsstadien herangezogen werden. Da die meisten osteoblastischen Zellinien einen späten osteoblastischen Phänotyp darstellen und aus Osteosarkomen, also maligne entarteten osteoblastischen Tumoren, isoliert wurden, wurde ein Zellsystem aus Primärzellen etabliert.

Es gibt zwei Wege, Zellen für die Zellkultur zu gewinnen, und zwar die proteolytische Spaltung von Geweben und die Explantatkultur. Bei der ersten Methode macht man sich die Spaltung der extrazellulären Matrix und die Freisetzung der Zellen durch proteolytische Enzyme zunutze, bei der zweiten Methode werden kleine Stücke des betreffenden Organs in Kultur gebracht, wobei die Zellen langsam auswachsen können (Majeska 1996). Für die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zellen wurden verschiedene Bereiche von Femura junger Ratten isoliert (Onyia et al. 1997). Der metaphysäre Bereich, der die Wachstumszone und daher viele Präosteoblasten und Osteoblasten beinhaltet, wurde mit dem proteolytischen Enzym Trypsin behandelt und die so isolierten Zellen (primäre <u>Sp</u>ongiosazellen, "psp") kultiviert. Aus dem diaphysären Bereich der Femura wurde das Knochenmark, das u.a. Osteoblasten-Vorläufer enthält, isoliert und als Explantatkultur kultiviert (Knochenmarks-<u>Str</u>omazellen, "str").

In der Literatur wird die Identifikation von Osteoblastenvorläufern allgemein als schwierig dargestellt, da es keine verlässlichen Kriterien und Marker gibt, die einzelnen Stadien strikt voneinander zu trennen (Aubin and Herbertson 1998). Als "Stromazellen" des Knochenmarks wird die adhärente Zellfraktion bezeichnet, die bei Langzeitkultivierung von Knochenmark *in vitro* bestehen bleibt (Dexter 1982). Diese enthält mesenchymale und epitheliale Zellen, aber auch Makrophagen. Mit Hilfe von Differenzierungsmedium, das physiologische Mengen an Glukokortikoid, anorganischem Phosphat und Ascorbinsäure enthält, ist es möglich, die Differenzierung von mesenchymalen Zellen zu Osteoblasten und Osteozyten *in vitro* zu stimulieren (Bellows et al. 1986). Ähnliche Beobachtungen wurden bereits für Stromazellen beschrieben (Maniatopoulos et al. 1988). Die hierbei entstehenden osteogenen Knötchen (*bone nodules*) werden als Index für die Zahl der in den Kulturen enthaltenen Osteoprogenitoren gewertet (Aubin and Herbertson 1998).

Im nächsten Schritt der Etablierung sollte der Phänotyp der Zellen in Bezug auf osteoblastische Marker bestimmt werden. Hierzu wurden zuerst biochemische und histologische Marker (Alkalische Phosphatase-Aktivität und kalzifizierte Matrix) herangezogen. Konfluente Zellen beider Zellarten zeigten keine spontane Matrixkalzifizierung bei Kurzzeitkultivierung (1 Woche). In den str-Zellen konnte keine Alkalische Phosphatase-Aktivität beobachtet werden, wohingegen die psp-Zellen eine deutliche Färbung, also aktive Alkalische Phosphatase, aufwiesen.

Nach der Stimulation mit osteogenem Medium zeigten die str-Zellen über drei Wochen hinweg die Bildung von *bone nodules*, die Alkalische Phosphatase-positiv waren und kalzifizierte Matrix bildeten. In den psp-Zellen konnte ein ähnlicher Verlauf beobachtet werden, wobei dieser Phänotyp nicht auf einzelne *bone nodules* beschränkt war, sondern in der gesamten Kultur zu beobachten.

Die Expression verschiedener Osteoblastenmarker wurde weiterhin über RT-PCR untersucht. Hierbei zeigte sich, daß sowohl die str- als auch die psp-Zellen Alkalische Phosphatase auf mRNA-Ebene exprimieren. In den str-Zellen kommt es aber anscheinend noch nicht zur Translation oder nicht zur Aktivierung des Enzyms, wie durch die Färbungen angezeigt wurde. Das Enzym Alkalische Phosphatase ist zwar einer der am häufigsten verwendeten Osteoblastenmarker, es wird aber auch von zahlreichen anderen Zelltypen wie hypertrophen Chondrozyten (Wuthier and Register 1984) und Adipozyten (Beresford et al. 1993) exprimiert. Daher eignet es sich nicht als alleiniges Charakterisierungsmerkmal des osteoblastischen Phänotyps. Ein zweiter biochemischer Indikator für Osteoblastenaktivität ist die Produktion von Knochenmatrixmolekülen wie Kollagen TypI (Marks et al. 1989). Auch dieser Marker wurde auf mRNA-Ebene über RT-PCR in beiden Zelltypen nachgewiesen, wobei die psp-Zellen eine stärkere Expression zeigten. Zusätzlich wurde auch die Expression des nicht-kollagenen Knochenmatrixmoleküls Osteokalzin (Fleet and Hock 1994) untersucht. In den str-Zellen konnte keine Osteokalzin-mRNA nachgewiesen werden, die psp-Zellen exprimierten wenig Osteokalzin-mRNA.

Unter Berücksichtigung der gewonnenen Ergebnisse können die verwendeten Zellen in das folgende, aus verschiedenen Quellen (Aubin 1998; Bruder et al. 1997) modifizierte Schema eingeordnet werden:



Abb. E.1.: Einordnung der verwendeten Zellen in die Osteoblasten-Linie anhand der untersuchten Marker (Aubin 1998; Bruder et al. 1997).

Bei den str-Zellen handelt es sich offensichtlich um eine Mischpopulation, die Zellen mit dem Phänotyp des Osteoprogenitors bzw. Präosteoblasten enthält. Die psp-Zellen repräsentieren relativ einheitlich den differenzierteren Osteoblasten-Phänotyp.

Anschließend sollte überprüft werden, ob die beiden Zelltypen FAK exprimieren und wo die Kinase subzellulär lokalisiert ist. Dazu wurden für 60min auf Fibronektin bzw. Poly-L-Lysin adhärierte Zellen herangezogen. Beide Zellarten zeigten bei Adhäsion auf Fibronektion eine deutlich positive Färbung mit dem FAK-Antikörper in der Zellperipherie und perinukleär. Bei der Adhäsion auf Poly-L-Lysin, das zwar die Adhäsion verstärkt, nicht aber die Integrine aktiviert, ist nur die perinukleäre Lokalisation von FAK zu beobachten. Dies weist darauf hin, daß auch in den hier untersuchten Zellen FAK mit aktivierten Integrinen in Fokalkontakten kolokalisiert (Schaller et al. 1992).

E.2. Analyse der Signaltransduktion nach PDGF- bzw. PTH-Stimulation in den charakterisierten Zellen

Bei der Betrachtung der hier dargestellten Ergebnisse ist es wichtig zu bedenken, daß es sich um Primärzellen handelt, in denen immer sowohl Schwankungen in der Zellphysiologie als auch in der Zusammensetzung der Zellpopulation mit einbezogen werden müssen. Daher wurde auch auf eine statistische Auswertung der Ergebnisse verzichtet. Die hier dargestellten Ergebnisse zeigen Tendenzen an, die in mehreren Versuchsdurchläufen reproduziert wurden. Primärzellen in Zellkultur spiegeln aber eher die Gegebenheiten *in vivo* wieder als Zellinien, da letztere durch die Transfektion mit Onkogenen verändert wurden, die nicht selten die Signaltransduktion der Zellen beeinflussen und die Untersuchung bestimmter Signalwege so erschweren oder unmöglich machen kann.

Zudem handelt es sich hier um die Analyse von Phosphorylierungsunterschieden, die sehr empfindlich auf Milieuveränderungen reagieren. Durch die neu entwickelten Phosphorylierungsstellen-spezifischen Antikörper kann der Phosphorylierungsstatus eines Proteins genauer untersucht werden, wohingegen vorher nur eine Analyse der Gesamtphosphorylierung des Proteins möglich war.

PDGF induziert eine FAK-Autophosphorylierung sowohl in den str- als auch in den psp-Zellen

Der Wachstumsfaktor PDGF wurde ursprünglich aus Blutplättchen isoliert, aber nach und nach auch in verschiedenen anderen Zellen, u.a. in Knochenzellen, nachgewiesen. Es wird angenommen, daß PDGF sowohl als systemischer als auch als lokaler Proliferationsfaktor wirkt (Canalis and Rydziel 1996). PDGF löst im Knochen eine Steigerung der Zellreplikation, eine Inhibition der differenzierten Osteoblastenfunktion (Kollagensynthese, Matrixapposition), aber auch eine gesteigerte Knochenresorption aus (Canalis and Rydziel 1996). Die Einbindung von FAK in die Kontrolle der Proliferation in osteoblastischen Zellen sollte in diesem Abschnitt untersucht werden.

Die Stimulation der str-Zellen mit PDGF führt zu einer Steigerung der Autophosphorylierung von FAK um das siebenfache nach 30min bzw. um das achtfache nach 60min. In den psp-Zellen ruft PDGF ebenfalls eine, wenn auch leicht verzögerte, Steigerung der FAK-Autophosphorylierung hervor: Nach 90min ist eine Verdreifachung der Autophosphorylierung zu beobachten. Eine Stimulation der FAK-Autophosphorylierung nach PDGF-Gabe wurde in verschiedenen anderen Zellsystemen beschrieben. So beobachteten Rosenfeldt et al. eine verstärkte Formation von Fokalkontakten und eine Aktivierung von FAK und c-Src nach der PDGF-Stimulation von embryonalen Mausfibroblasten (Rosenfeldt et al. 2001). Hauck et al. beschrieben eine Aktivierung der Migration von glatten Gefäßmuskelzellen nach PDGF-Stimulation, die mit einer FAK-Aktivierung einherging und durch die Überexpression des FAK-Inhibitors FRNK eliminiert werden konnte. Hier wurde zusätzlich beobachtet, daß die Überexpression von FRNK einen Komplex zerstört, der in unbehandelten Zellen FAK und den PDGFβ-R enthält. Auch wenn keine direkte Interaktion von FAK mit dem PDGF-Rezeptor vorliegt, so ist doch für die Funktionalität räumliche Nähe notwendig (Hauck et al. 2000). Auch in fibroblastischen Swiss3T3-Zellen wurde eine Aktivierung von FAK durch PDGF beobachtet, die unabhängig von ERKs (extracellular signal regulated kinases) ist (Leopoldt et al. 2000). In Glioblastomzellen löst PDGF eine MAPK (mitogen activated protein kinase)-Aktivierung aus, die durch den Tumorsuppressor PTEN (Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10) unterdrückt werden kann. Bei der Analyse des Signaltransduktionsweges stellte sich heraus, daß PTEN hier eine Dephosphorylierung von FAK verursacht (Gu et al. 1998).

In den beschriebenen Studien wurden jeweils nur Zellen eines bestimmten Differenzierungsstadiums untersucht, nicht wie in der vorliegenden Arbeit frühe und späte Stadien eines Phänotyps. Es war zu erwarten, daß beide Zellarten auf PDGF reagieren, da sie proliferative Differenzierungsstadien der Osteoblastenlinie repräsentieren und PDGF ein Mitogen für mesenchymale Zellen ist (Canalis et al. 1989). Die Beteiligung von FAK an der PDGF-Signalweiterleitung ist ein Indiz für die Rolle dieser Kinase an der Proliferationskontrolle der untersuchten Zellen.

In beiden Zellarten wird die FAK-Aktivierung nach PDGF-Stimulation über PI3K, nicht über PKC koordiniert

In den str-Zellen kann die PDGF-vermittelte FAK-Aktivierung durch einen PI3K-Inhibitor, aber nicht durch einen PKC-Inhibitor vermindert werden. In den psp-Zellen zeigen sich ähnliche Ergebnisse, wobei die FAK-Autophosphorylierung hier durch den PI3K-Inhibitor komplett geblockt werden konnte und ein zweiter PKC-Inhibitor die Ergebnisse des ersten verifizierte.

Ähnliche Signaltransduktionswege wurden bereits für PDGF in anderen Zellsystemen beschrieben. So löst die PDGF-Stimulation auch in glatten Gefäßmuskelzellen eine FAK- Phosphorylierung aus, die durch Wortmannin, einen weiteren spezifischen PI3K-Inhibitor, eliminiert werden kann. Ein weiterer Versuch in diesem Zusammenhang zeigte, daß ein mutierter PDGFβ-Rezeptor, der nicht mehr mit der PI3K interagieren kann, ebenfalls keine FAK-Autophosphorylierung induzieren kann (Saito et al. 1996). Eine konträre Beobachtung beschrieben Cospedal et al. für glatte Gefäßmuskelzellen: Hier konnten die beiden PI3K-Inhibitoren Wortmannin und LY294002 die durch PDGF ausgelöste FAK-Autophosphorylierung nicht inhibieren (Cospedal et al. 1999).

Die Ergebnisse von Saito et al. wurden auch von verschiedenen anderen Studien bestätigt. So untersuchten Salazar und Rozengurt die durch PDGF ausgelöste Signaltransduktion in fibroblastischen Swiss3T3-Zellen. PDGF löst eine Assoziation von FAK mit c-Src aus, die durch die Autophosphorylierung von FAK initiiert wird. Diese Assoziation ist sowohl von PI3K als auch von der Integrität des Zytoskeletts abhängig (Salazar and Rozengurt 1999). Zent et al. untersuchten die Kontraktilität von Mesangialzellen in einem dreidimensionalen Kollagengel. Hierbei stellten sie fest, daß PDGF eine Kontraktion der Zellverbände auslöst, die mit einer FAK-Aktivierung einhergeht. Diese FAK-Autophosphorylierung läßt sich wiederum durch Wortmannin, einen PI3K-Inhibitor, eliminieren (Zent et al. 1998). PDGF scheint also PI3K und FAK nicht nur innerhalb der Proliferationskontrolle zu aktivieren, sondern involviert diese beiden Kinasen auch in die Regulation weiterer zellphysiologischer Vorgänge.

Es existieren aber auch Signaltransduktionswege, innerhalb derer zwei verschiedene Kinasen die Phosphorylierung von FAK induzieren. Eine solche Regulation konnte von Kadi et al. bei der Depolymerisierung von Mikrotubuli beobachtet werden, die eine verstärkte Adhäsion der Zellen auf der extrazellulären Matrix auslöste. Diese Aktivierung ließ sich nicht nur durch einen PI3K-Inhibitor, sondern auch durch einen PKC-Inhibitor unterdrücken (Kadi et al. 2002). FAK wird in hämatopoietischen Vorläuferzellen ebenfalls PKCabhängig reguliert, und zwar im Zusammenhang mit der Stimulation der Zellen durch das Chemokin SDF-1 (Wang et al. 2000). Für die PDGF-vermittelte Signaltransduktion gibt es in der Literatur keine Daten zur PKC-abhängigen Stimulation von FAK und die in dieser Arbeit gewonnenen Daten sprechen gegen eine Beteiligung von PKC.

Eine PI3K-abhängige Weiterleitung von PDGF-Signalen wurde auch in der osteoblastischen Zellinie MC3T3-E1 beobachtet. Nach der Stimulation der Zellen mit PDGF konnte eine Aktivierung und Translokation der Kinase Akt/PKB in den Nukleus beobachtet werden. Die Präinkubation mit dem PI3K-Inhibitor LY294002 eliminierte sowohl die Aktivierung als auch die Translokation von Akt/PKB, ebenso wurde der Übergang in die S-Phase des Zellzyklus verhindert. Die PI3K-vermittelte Aktivierung und Translokation von Akt/PKB ist also ein wichtiger Schritt in der durch PDGF induzierten Zellproliferation (Borgatti et al. 2000).

Die subzelluläre Lokalisation von FAK nach PDGF-Stimulation sowie der Einfluß von CytochalasinD auf die FAK-Autophosphorylierung weisen auf eine wichtige Rolle der Zytoskelett-Integrität im Rahmen der Signaltransduktion hin

In unstimulierten psp-Zellen ist das autophosphorylierte FAK-Protein um den Nukleus lokalisiert, in PDGF-stimulierten Zellen verteilt es sich über das Zytoplasma und läßt sich auch in Fokalkontakten nachweisen. Die Präinkubation mit CytochalasinD kann die durch PDGF beobachtete FAK-Autophosphorylierung in beiden Zelltypen aufheben.

Die Anwendung von CytochalasinD hat bereits in einigen verschiedenen Studien gezeigt, daß die Integrität des Aktin-Zytoskeletts für die FAK-Aktivierung von entscheidender Bedeutung ist (Burridge et al. 1992; Sinnett-Smith et al. 1993; Tu et al. 2001). FAK ist mit dem Aktin-Zytoskelett über die beiden Fokalkontakt-Proteine Paxillin (Tachibana et al. 1995) und Talin (Chen et al. 1995) verbunden. Eine mögliche Hypothese ist, daß die an der Signaltransduktion verschiedener Stimuli beteiligten Moleküle diese Signale vernetzen dann über Talin und Paxillin eine Weiterleitung an FAK ermöglichen (Zachary and Rozengurt 1992).

PTH stimuliert nur in den psp-Zellen eine Autophosphorylierung von FAK

Das Peptidhormon PTH ist essentiell für die Kalziumhomöostase im Körper. Es reguliert den Kalziumhaushalt durch direkte Wirkung auf die Zielorgane Knochen (Kalziumfreisetzung) und Niere (Kalziumreabsorption) und durch indirekte Wirkung auf den Gastrointestinaltrakt (Fitzpatrick and Bilezikian 1996). Auf zellulärer Ebene hat PTH aber eine doppelte Wirkung auf den Knochen: bei kontinuierlicher Gabe ruft es eine Steigerung der Knochenresorption über die Osteoklasten hervor, wobei die intermittierende (z.B. 1x/Tag) PTH-Behandlung einer Steigerung der Knochenmasse durch eine Steigerung der Osteoblastenproliferation und Differenzierung hervorruft (Karaplis and Goltzman 2000).

In den str-Zellen ruft PTH keine FAK-Autophosphorylierung hervor. In den psp-Zellen hingegen bewirkt PTH nach 60min einen Anstieg der Phosphorylierung am FAK-Tyrosinrest 397 auf das Doppelte.

Eine mögliche Erklärung für diesen Unterschied könnte die Adenylatzyklase liefern, die nur in differenzierten Osteoblasten von PTH aktiviert wird, cAMP zu produzieren. Hof-

stetter et al. charakterisierten verschiedene klonale Zellinien, die durch retrovirale Immortalisierung aus Rattencalvarien gewonnen wurden. Dabei zeigten zwei Zellinien, obwohl sie aus der selben Zellpopulation isoliert wurden, unterschiedliche Merkmale: IRC10/30*myc1*-Zellen exprimierten Alkalische Phosphatase, zeigten eine PTH-induzierbare cAMP-Produktion, synthetisierten große Mengen Kollagen TypI und exprimierten OsteokalzinmRNA. Diese Zellinie ist also mit den in dieser Arbeit untersuchten psp-Zellen vergleichbar. Die zweite Zellinie, IRC10/30-*myc3*, exprimiert keine Alkalische Phosphatase, zeigte keine PTH-induzierbare cAMP-Produktion und exprimierte nur rund ein Drittel des Kollagen TypI der *myc1*-Zellinie (Hofstetter et al. 1991). Diese Merkmale entsprechen wiederum den hier untersuchten str-Zellen. In einer weiteren Studie von Fried et al. zeigten sich vergleichbare Ergebnisse in zwei Zellinien, die aus Knochenmarksstroma etabliert wurden (Fried et al. 1993).

Aufgrund der Literatur kann also postuliert werden, daß in den str-Zellen, im Gegensatz zu den psp-Zellen, keine Adenylatzyklase-Aktivierung durch PTH erfolgt. Die hier gewonnenen Ergebnisse weisen daraufhin, daß FAK stromabwärts in der Adenylatzyklase-Kaskade aktiviert wird, da in den str-Zellen keine FAK-Aktivierung durch PTH beobachtet werden konnte.

Die in den psp-Zellen beobachtete FAK-Aktivierung durch PTH wird über PKA koordiniert

Die PTH-vermittelte Signaltransduktion in osteoblastischen Zellen wurde bereits eingehend untersucht (Morris and Bilezikian 1996), allerdings nicht im Zusammenhang mit der Proteintyrosinkinase FAK. Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse zeigen, daß in den psp-Zellen eine FAK-Autophosphorylierung durch PTH ausgelöst werden kann. Die Vermutung, daß die PTH-stimulierbare Adenylatzyklase (Fried et al. 1993; Hofstetter et al. 1991) eine Rolle spielt, bestätigt sich durch die hier durchgeführte Analyse der PTHvermittelten Signaltransduktion zu FAK: Die Präinkubation mit dem PKC-Inhibitor führt nur zu einer leichten Einschränkung der FAK-Autophosphorylierung nach PTH-Stimulation. Eine Reduktion auf den Wert der unbehandelten Zellen wird hingegen mit dem PKA-Inhibitor H-89 erreicht. Diese Ergebnisse implizieren, daß PKC nur am Rande, PKA aber maßgeblich in die FAK-Aktivierung nach PTH-Stimulation involviert ist.

Diese Ergebnisse unterstützen die oben aufgestellte Hypothese. Die Aktivierbarkeit von FAK scheint von der PTH-Stimulierbarkeit der Adenylatzyklase abzuhängen, die wiederum stromabwärts die Proteinkinase PKA aktiviert. Durch den PKA-Inhibitor H-89 kann die PTH-vermittelte FAK-Autophosphorylierung eliminiert werden. FAK scheint also in den psp-Zellen unterhalb von PKA in der PTH-Signaltransduktionskaskade zu stehen. In den str-Zellen kommt es zwar nicht zu einer direkten Aktivierung von FAK durch PTH, eine Inkubation mit H-89 reduziert aber trotzdem die basal vorhandene FAK-Autophosphorylierung. Eine mögliche Erklärung hierfür ist die Beteiligung von PKA an der Signaltransduktion weiterer Stimuli zu FAK. Außerdem könnte die Spezifität des Inhibitors H-89 eine Erklärung liefern: Um die Kinasen PKC, MLCK oder CaMKII zu inibieren wird die 1000fache Menge des Inhibitors benötigt wie für die Inhibition von PKA. Allerdings reicht schon die 10fache Menge aus, um auch die Kinase PKG zu inhibieren. Über die Interaktion von FAK und PKG ist in der Literatur noch nicht viel bekannt, es könnte sein, daß die reduzierte FAK-Phosphorylierung durch PKG verursacht und über H-89 inhibiert wurde.

Die direkte Stimulation von PKA über Forskolin ruft nur in den psp-Zellen eine FAK-Aktivierung hervor

Die Stimulation mit Forskolin, das direkt die Kinase PKA aktiviert, ruft in den str-Zellen ebensowenig eine FAK-Autophosphorylierung hervor wie PTH. In den psp-Zellen kann die PTH-vermittelte FAK-Aktivierung durch Forskolin nachgeahmt werden.

Diese Beobachtung unterstützt weiter die oben dargestellten Ergebnisse dieser Arbeit: FAK liegt in der Signaltransduktionskaskade unterhalb von PKA und wird nur durch eine PTH-induzierbare Adenylatzyklase phosphoryliert. Da diese in den str-Zellen nicht vorliegt, war hier auch keine PKA-vermittelte FAK-Aktivierung zu erwarten.

Die unterschiedliche Reaktion der beiden Zellarten ist nicht auf die Expression des PTH-Rezeptors zurückzuführen

Es stellte sich als nächstes die Frage, ob diese unterschiedliche Reaktion von str- und psp-Zellen auf eine differentielle Expression des PTH-Rezeptors zurückzuführen ist. Die quantitative Real-Time-PCR ergab aber, daß alle drei Rezeptoren (PTH-R, PDGF α -R und PDGF β -R) in den str-Zellen um den Faktor 10 verstärkt gegenüber den psp-Zellen exprimiert werden.

In der Studie von Yu et al. zeigte sich, daß die PDGF-Rezeptor-Expression auf mRNA-Ebene bis zum Erlangen des differenzierten Osteoblasten-Phänotyps ansteigt und dann mit dem Beginn der Matrixproduktion wieder abnimmt (Yu et al. 1997). Aubin et al. beobachteten jedoch weder Expression des PDGF α -R noch des PTH-R auf mRNA-Ebene in Osteoprogenitoren. Die PDGF α -R-mRNA konnte erst ab dem Stadium des Präosteoblasten, die PTH-R-mRNA erst ab dem differenzierten Osteoblasten nachgewiesen werden (Aubin et al. 1995).

Es müssen weitere Proben aus verschiedenen Zellchargen getestet werden, um eine statistische Aussage treffen zu können. Die gegensätzlichen Ergebnisse dieser Arbeit und der Literatur können teilweise mit dem geringen Probenumfang (fünf cDNA-Proben aus einer Zellcharge) dieser Untersuchung erklärt werden. Zudem ist aber noch anzumerken, daß in der Publikation von Aubin et al. die Methode der Poly(A)-PCR mit anschließender Hybridisierung angewendet wurde, die in ihrer Genauigkeit nicht mit der hier verwendeten Real-Time-PCR vergleichbar ist. In der Studie wurden außerdem Zellen aus Rattencalvarien verwendet, die eine andere Zusammensetzung der Zellkulturen aufweisen können als die aus dem Knochenmark isolierten Zellen der Osteoblastenlinie.

Wird PKC in den Zellen direkt durch PMA stimuliert, so ruft dies nur in den str-Zellen eine FAK-Aktivierung hervor

Der Phorbolester PMA, der die Kinase PKC direkt aktiviert, ruft in den str-Zellen sogar eine stärkere FAK-Aktivierung (Faktor 16) hervor als die PDGF-Stimulation (Faktor 8). In den psp-Zellen hingegen wird die FAK-Autophosphorylierung nur um den Faktor 1,2 gesteigert.

Eine ähnliche Beobachtung wie in dieser Arbeit für die str-Zellen gemacht wurde, wurde bereits für mit Neuropeptiden stimulierte Swiss 3T3-Zellen beschrieben: Inaktivierung von PKC über verschiedene Methoden konnte die FAK-Autophosphorylierung nach Bombesin-Stimulation nicht blocken, obwohl eine Inkubation der Zellen mit PKC-Aktivatoren zu einem Anstieg der FAK-Aktivierung führte (Sinnett-Smith et al. 1993).

Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung ist, daß in den str-Zellen PKC die Signalweiterleitung von verschiedenen anderen Stimuli an FAK induziert, in diesen undifferenzierten Zellen also eine zentrale Rolle in der Signalverknüpfung einnimmt, aber nicht an der PDGF-Signaltransduktion beteiligt ist. PKC ist z.B. maßgeblich an der Regulation der Proliferation und Chemotaxis beteiligt, die durch extrazelluläres Kalzium über den *Calcium sensing Receptor* CasR in osteoblastischen MC3T3-E1-Zellen ausgelöst wird. Hier reguliert PKC die Weiterleitung des Signals von der Phospholipase C beta an die Phospholipase C gamma (Godwin and Soltoff 2002).

Die Ergebnisse implizieren, daß PKC in den weiter entwickelten psp-Zellen keine zentrale Rolle in der Signaltransduktion zu FAK einnimmt: Die PKC-Inhibitoren können die FAK- Phosphorylierung nicht vermindern und eine direkte Aktivierung von PKC führt zu keiner Aktivierung von FAK. Daher ist anzunehmen, daß PKC und FAK in diesen Zellen nicht gemeinsam an Signaltransduktionsereignissen beteiligt sind.

Zusammenfassende Bewertung der gewonnenen Ergebnisse:

Durch die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse zeigte sich, daß osteoblastische Zellen verschiedener Differenzierungsstadien ähnliche Wege für die Weiterleitung von PDGF-Signalen verwenden. In beiden Zellarten konnte eine Beteiligung von PI3K bei der FAK-Autophosphorylierung nachgewiesen werden. PKC scheint an diesem Signaltransduktionsweg unbeteiligt zu sein. Zusätzlich wurde eine wichtige Rolle für die Integrität des Zytoskeletts in diesem Zusammenhang identifiziert. Die PTH-vermittelte Signaltransduktion zeigte jedoch in den beiden Zellarten Unterschiede: die wenig differenzierten str-Zellen reagieren nicht mit einer FAK-Aktivierung auf die PTH-Stimulation, im Gegensatz zu den differenzierten psp-Zellen. In den psp-Zellen scheint die Kinase PKA die Signale vom PTH-Rezeptor an FAK weiterzuleiten. Eine direkte Aktivierung von PKA führte in den str-Zellen ebenfalls zu keiner FAK-Autophosphorylierung, wodurch sich die Vermutung ergab, daß in diesen Zellen die Adenylatzyklase nicht an einer FAK-Aktivierungskaskade beteiligt ist.

Die gewonnenen Ergebnisse liefern erste Hinweise auf die Beteiligung von FAK an der Signaltransduktion von Reagenzien, die auf die Proliferation und Differenzierung von Osteoblasten wirken. Bisher wurde im Osteoblasten hauptsächlich die Einbindung von FAK in die integrinvermittelte Signaltransduktion bei der Adhäsion (Sommerfeldt et al. 2001) und Mechanotransduktion (Toma et al. 1997) untersucht. Nur sehr wenige Studien beschäftigten sich mit FAK im Zusammenhang mit anderen Stimuli wie BMPs (*Bone Morphogenic Proteins*) (Suzawa et al. 2002; Tamura et al. 2001), Wachstumshormon (Takahashi et al. 1999) oder Fluoridverbindungen (Caverzasio et al. 1997).

Die Faktoren PDGF und PTH sind wichtig für die Proliferation und die differenzierte Funktion von Zellen der Osteoblastenlinie. Daß FAK in die durch diese Stimuli ausgelöste Signaltransduktion involviert ist, weist darauf hin, daß diese Kinase in Osteoblasten eine wichtige Stellung in der Signalweiterleitung einnimmt. Osteoblasten sind einer Vielzahl von lokalen und systemischen Faktoren ausgesetzt, daher wäre es interessant den Einfluß weiterer Faktoren auf diese Kinase zu testen und auch zu überprüfen, ob FAK hier eine Art Verknüpfungs- bzw. Koordinationspunkt darstellt (vgl. Ausblick).





Abb. E.2.: Schematische Zusammenfassung der in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse in Bezug auf die Signaltransduktion zu FAK in str- und psp-Zellen.

AC: Adenylatzyklase; cAMP: zyklisches Adenosinmonophosphat; ECM: Extrazelluläre Matrix; FAK: Focal Adhesion Kinase; FK: Fokalkontakt; G: G-Protein; PDGF: Platelet Derived Growth Factor; PI3K: Phospha-tidyl-Inositol-3-Kinase; PKA: Proteinkinase A; PKC: Proteinkinase C; PTH: Parathyroidhormon.

E.3. Analyse der Expression von FAK und Pyk2 in hochmalignen Osteosarkomen und normalen humanen Osteoblasten

FAK und Pyk2 können auf Proteinebene sowohl in normalen Osteoblasten als auch in Tumorosteoblasten nachgewiesen werden, wobei Pyk2 im Osteosarkom schwächer exprimiert wird

Die immunhistochemische Färbung hat deutlich gezeigt, daß FAK in den Tumorzellen verschiedener Osteosarkome exprimiert wird. Eine besonders konzentrierte Expression findet sich um einige Blutgefäße herum. Pyk2 wird ebenfalls sowohl in den Endothelzellen als auch in gefäßumgebenden Tumorzellen exprimiert. Auch matrixbildende Tumorosteoblasten exprimieren Pyk2, wobei eine perinukleär verstärkte Lokalisation beobachtet werden konnte. Bei der vergleichenden Färbung von Osteosarkomen und Beckenkammbiopsien zeigte sich, daß FAK in vergleichbarer Intensität in den verschiedenen Proben exprimiert wird. Pyk2 allerdings wurde nur schwach im Osteosarkom exprimiert, verglichen mit den Osteoblasten der Beckenkammbiopsie, die im gleichen Versuchsdurchlauf gefärbt wurden. Aufgrund dieser unterschiedlichen Ergebnisse wurde zusätzlich eine Expressionsanalyse auf mRNA-Ebene durchgeführt.

Auf mRNA-Ebene zeigen die Tumorosteoblasten keine unterschiedliche FAK-Expression verglichen mit den normalen Osteoblasten

Kryokonservierte, kultivierte Osteosarkome und normale Osteoblasten weisen die gleiche Menge FAK-mRNA auf, lediglich die Osteosarkom-Zellinien zeigen eine um den Faktor 3 verstärkte FAK-Expression auf mRNA-Ebene.

1993 wurde erstmals von Weiner et al. eine Studie durchgeführt, in der auf mRNA-Ebene die FAK-Expression in 49 Gewebeproben, darunter Tumoren und die entsprechenden Normalgewebe, untersucht wurde (Weiner et al. 1993). Dabei wurde eine erhöhte FAK-Expression in einem von 8 adenomatösen Geweben, in 17 von 20 invasiven Tumoren und in allen 15 metastatischen Tumoren detektiert. In 6 Normalgewebe-Proben war keine FAK-mRNA nachweisbar. Es wurde daher die Hypothese aufgestellt, daß eine FAK-Überexpression mit einer veränderten Signaltransduktion in den Tumoren einhergeht und FAK hierbei eine zentrale Rolle spielt (Weiner et al. 1993).

In einer weiteren Studie in diesem Zusammenhang untersuchten Weiner et al. die Expression verschiedener Tyrosinkinasen in humanen Tumoren, basierend auf der Tatsache daß eine große Gruppe von Onkogenen zu dieser Proteinfamilie gehört. FAK konnte hauptsächlich in hochmalignen und metastatischen Tumoren der glatten Muskulatur nachgewiesen werden, was einen weiteren Hinweis auf die Beteiligung dieser Kinase an der Ausbildung des invasiven Phänotyps gibt (Weiner et al. 1994).

Die vergleichende Analyse von 26 Ovarkarzinomen und 10 Normalgewebeproben in Bezug auf ihre FAK-Proteinexpression zeigte, daß in den Tumorproben eine vierfach erhöhte FAK-Expression vorliegt. Auch Ovarkarzinom-Zellinien zeigten eine dreifach erhöhte Expression der Kinase im Vergleich mit dem Normalgewebe. Hierbei konnte allerdings keine Korrelation mit dem Malignitätsgrad hergestellt werden (Judson et al. 1999).

Veröffentlichung der ersten Jahre, in denen FAK im Zusammenhang mit der Tumorentstehung untersucht wurde, konzentrierten sich hauptsächlich auf die quantitative Überexpression von FAK in Tumoren (Cance et al. 2000; Glukhova et al. 1995; Han et al. 1997; McCormack et al. 1997; Owens et al. 1995; Owens et al. 1996; Slack et al. 2001; Tremblay et al. 1996). Es wurde hierfür eine FAK-Genamplifikation als Ursache diskutiert (Agochiya et al. 1999).

In neueren Studien wird zunehmend auch der Aktivierungsstatus von FAK bzw. die mit FAK verbundene Signaltransduktion analysiert. Besonders gut untersucht ist hierbei die EGF-vermittelte Signaltransduktion in Krebszellen. Brunton et al. etablierten ein in vitro Zellsystem, in dem aus einem Kolonadenom eine adenomatöse Zellinie (AA/C1) und durch Karzinogen-Behandlung eine Karzinomzellinie (AA/C1/SB10) entwickelt und untersucht wurden. Die Expression des EGF-Rezeptors und die FAK-Expression waren in der Karzinomlinie deutlich erhöht gegenüber der Adenomlinie, wohingegen die Expression und Aktivierung der Kinase c-Src vergleichbar waren. In den Karzinomzellen induzierte EGF in vitro eine Basalmembraninvasion, die von einer Aktivierung von c-Src und FAK begleitet war (Brunton et al. 1997). Im Gegensatz dazu stellten Lu et al. fest, daß die EGF-Stimulation einer Reihe von EGF-Rezeptor-überexprimierenden Karzinomzellinien zu einer Dephosphorylierung und damit zu einer Deaktivierung von FAK führte. Diese Deaktivierung allein war ausreichend für das Ablösen der Zellen von der extrazellulären Matrix, gesteigerte Motilität, Invasivität und Metastasierungstendenz. Die FAK-Phosphorylierung wurde bei einer Readhäsion der Zellen auf der Matrix wiederhergestellt. Zudem konnte eine verminderte FAK-Aktivierung in Tumoren von Nacktmäusen nachgewiesen werden, die eine intakte autokrine Regulation des EGF-Rezeptors hatten (Lu et al. 2001). In dieser Studie wurden Mammakarzinom-, orale Plattenepithel-Karzinom-, epidermoide Karzinomund Prostatakarzinomzellen untersucht.

Wie durch diese verschiedenen Studien gezeigt wurde, kann die Entstehung bzw. die maligne Entartung von Tumoren nicht einheitlich mit einer FAK-Überexpression oder einer verstärkten FAK-Aktivierung korreliert werden. Es gibt vielmehr sehr unterschiedliche Befunde für unterschiedliche Tumoren. In den hier untersuchten Tumoren scheint keine Veränderung der FAK-Expression im Vergleich zu den Normalzellen vorzuliegen.

Die verstärkte Expression von FAK in den Osteosarkom-Zellinien könnte damit erklärt werden, daß Zellinien aus maligne transformierten Tumorzellen isoliert werden oder aus Normalzellen durch Transformation mit Onkogenen hergestellt werden und ein hohes proliferatives Potential aufweisen. Die Proliferation von Zellen geht wiederum mit einem Ablösen der Zellen von der extrazellulären Matrix einher, an dem FAK maßgeblich beteiligt ist.

Die Pyk2-Expression scheint in den Osteosarkomen im Vergleich zu normalen Osteoblasten herunterreguliert zu sein

Die Expressionsanalysen für Pyk2 zeigten, daß die Transkription des Pyk2-Gens in den Osteosarkomen im Vergleich mit den normalen humanen Osteoblasten vermindert ist. Dieses Bild zeigte sich nur in den Osteosarkomen in Zellkultur, nicht in den kryokonservierten Osteosarkomen. Eine mögliche Erklärung hierfür ist der hohe Anteil an hämatopoetischen Zellen im kryokonservierten Gesamttumormaterial, die bekanntermaßen viel Pyk2 exprimieren (Avraham and Avraham 1997). In den Zellkulturen befinden sich hauptsächlich osteoblastische Zellen, was durch Standardfärbungen nachgewiesen wurde (Daten nicht abgebildet).

Eine Pyk2-Expression in negativer Korrelation zum gesteigerten Malignitätsgrad wurde bereits im Prostatakarzinom beschrieben (Stanzione et al. 2001), woraufhin Pyk2 sogar als "Onko-Suppressor" bezeichnet wurde. Dieses Phänomen läßt sich mit der Beobachtung erklären, daß Pyk2 den programmierten Zelltod (Apoptose) induzieren kann (Chauhan et al. 1999; Pandey et al. 1999; Pandey et al. 1999; Susa 1999).

In einer weiteren Studie zeigte sich, daß die *in vitro* Überexpression von Pyk2 in verschiedenen fibroblastischen und epithelialen Zellinien Apoptose auslösen kann (Xiong and Parsons 1997) und daß durch den Verlust von Pyk2 eine Arte Resistenz gegen die Apoptose ausgebildet wird.

Die Untersuchungen von Du et al. veranschaulichen, daß ein ausgewogenes Gleichgewicht von Pyk2 und FAK wichtig ist, um durch die Regulation des Aktin-Zytoskelettes den Fokalkontaktumbau und die Zellmorphologie zu erhalten (Du et al. 2001). Eine Gleichgewichtsverschiebung von Pyk2 und FAK wurde bei der Entstehung des Prostatakarzinoms beobachtet (Stanzione et al. 2001). Die FAK-Expression war erhöht, während eine starke Verminderung der Pyk2-Expression beobachtet wurde. Neben der negativen Korrelation der Pyk2-Expression mit der Prostatakarzinom-Progression konnte eine Beteiligung von aktiviertem Pyk2 an der Pathogenese des Kaposi-Sarkoms (Liu et al. 1997), an der Invasion von Brustkrebszellen (Zrihan-Licht et al. 2000), an cerebralen Metastasen (Ludwig et al. 2000) und im Zusammenhang mit der chronischen myeloiden Leukämie (Wu et al. 2000) gefunden werden. Auch nicht transformierte Osteoblasten exprimieren Pyk2 und eine Aktivierung nach Stimulation eines G-Protein gekoppelten Rezeptors durch Fluoroaluminat ist ebenfalls nachgewiesen worden (Freitas et al. 2002; Jeschke et al. 1998).

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Daten weisen darauf hin, daß das FAK / Pyk2-Expressionsgleichgewicht in den Osteosarkomzellen im Vergleich zu normalen Osteoblasten verändert ist. Die FAK-Expression scheint unverändert im Tumor, wohingegen die Pyk2-Expression herunterreguliert wird.

E.4. Ausblick

Das in dieser Arbeit etablierte und charakterisierte Zellsystem ermöglichte die Untersuchung verschiedener primärer Osteoblastenstadien in Zellkultur. Um die gewonnenen Ergebnisse bezüglich der PDGF- bzw. PTH-vermittelten Signaltransduktion zu FAK zu erweitern, wäre es sinnvoll, Co-Immunpräzipitationen durchzuführen. Hierüber könnte Aufschluß über die Interaktion der verschiedenen Signalproteine untereinander gewonnen werden. Es könnte z.B. untersucht werden, ob FAK direkt mit PKA interagiert oder ob noch andere Signalmoleküle zwischengeschaltet sind. Außerdem wäre es interessant zu überprüfen, ob durch die Kombination der verschiedenen Stimuli eine Potenzierung der FAK-Signale erreicht werden kann. Dies würde darauf hinweisen, daß FAK einen zentralen Koordinationspunkt verschiedener Stimuli darstellt.

Die im Rahmen der Arbeit gewonnenen Ergebnisse weisen darauf hin, daß in Osteosarkomen die Pyk2-Expression im Vergleich zu normalen Osteoblasten verringert ist. Um dies weiter zu bestätigen sollten vergleichbare Studien mit einem größeren Probenumfang durchgeführt werden. Weiterhin wäre es interessant zu überprüfen, welchen Einfluß die *in vitro* Überexpression von FAK und Pyk2 durch Transfektion von Expressionsplasmiden auf die Zellphysiologie von Tumor- und Normalzellen hat. Im Gegenzug ist es ebenfalls möglich, FAK und Pyk2 *in vitro* auszuschalten bzw. zu reduzieren und zwar über Antisense-RNA (Green et al. 1986), Antisense-Oligonukleotide (Ridyard and Sanders 2001) oder RNA-Interference (Elbashir et al. 2001). Der Einfluß auf zellphysiologische Vorgänge wie die Proliferation, Migration oder Invasion kann über verschiedene bekannte Assays nachgewiesen werden (BrdU-Inkorporation bzw. modifizierte *Boyden Chambers*).

Neben der reinen Expressionsanalyse sollte auch überprüft werden, ob ein veränderter Aktivierungsstatus der Proteine FAK und Pyk2 in Tumoren vorliegt. Die Studie von Weiner weist daraufhin, daß die PDGF-Signaltransduktion in Tumoren eine wichtige Stellung einnimmt (Weiner et al. 1994). Daher wäre es sehr interessant, beide Teile der Arbeit miteinander zu verknüpfen und die PDGF- bzw. PTH-vermittelte Signaltransduktion in Osteosarkomen zu untersuchen.

Abschließend betrachtet wurden in dieser Arbeit wichtige grundlegende Erkenntnisse über die FAK-Signaltransduktion in Osteoblasten und die Expression von FAK und Pyk2 in Osteosarkomen gewonnen, die auf eine zentrale Stellung der Kinase in der osteoblastischen Signalverarbeitung hinweisen.

F. Literaturverzeichnis

- Agochiya, M., V. G. Brunton, et al. (1999). "Increased dosage and amplification of the focal adhesion kinase gene in human cancer cells." <u>Oncogene</u> **18**(41): 5646-53.
- Aubin, J. E. (1998). "Advances in the osteoblast lineage." Biochem Cell Biol 76(6): 899-910.
- Aubin, J. E. and A. Herbertson (1998). Osteoblast lineage in experimental animals. <u>Marrow stromal cell</u> <u>culture</u>. J. N. Beresford and M. E. Owen. Cambridge, Cambridge University Press: 88-110.
- Aubin, J. E. and F. Liu (1996). The osteoblast lineage. <u>Principles of bone biology</u>. J. P. Bilezikian, L. G. Raisz and G. A. Rodan. San Diego, Academic Press: 51-68.
- Aubin, J. E., F. Liu, et al. (1995). "Osteoblast and chondroblast differentiation." Bone 17(2 Suppl): 77S-83S.
- Aubin, J. E., K. Turksen, et al. (1993). Osteoblastic cell lineage. <u>Cellular and Molecular Biology of Bone</u>. M. Noda. New York, Academic: 1-45.
- Avraham, S. and H. Avraham (1997). "Characterization of the novel focal adhesion kinase RAFTK in hematopoietic cells." <u>Leuk Lymphoma</u> 27(3-4): 247-56.
- Avraham, S., R. London, et al. (1995). "Identification and characterization of a novel related adhesion focal tyrosine kinase (RAFTK) from megakaryocytes and brain." J Biol Chem 270(46): 27742-51.
- Barberis, L., K. K. Wary, et al. (2000). "Distinct roles of the adaptor protein Shc and focal adhesion kinase in integrin signaling to ERK." J Biol Chem 275(47): 36532-40.
- Baron, R. (1999). Anatomy and Ultrastructure of Bone. <u>Primer on the Metabolic Bone Diseases and</u> <u>Disorders of Mineral Metabolism</u>. M. J. Favus. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins.
- Bellows, C. G., J. E. Aubin, et al. (1986). "Mineralized bone nodules formed in vitro from enzymatically released rat calvaria cell populations." <u>Calcif Tissue Int</u> 38(3): 143-54.
- Beresford, J. N., S. E. Graves, et al. (1993). "Formation of mineralized nodules by bone derived cells in vitro: a model of bone formation?" <u>Am J Med Genet</u> **45**(2): 163-78.
- Bielack, S., C. Purfürst, et al. (1988). "Primäre Chemotherapie des Osteosarkoms." <u>Monatschrift</u> <u>Kinderheilkunde</u> **136**: 559.
- Borgatti, P., A. M. Martelli, et al. (2000). "Translocation of Akt/PKB to the nucleus of osteoblast-like MC3T3-E1 cells exposed to proliferative growth factors." <u>FEBS Lett</u> **477**(1-2): 27-32.
- Bruder, S. P., M. C. Horowitz, et al. (1997). "Monoclonal antibodies reactive with human osteogenic cell surface antigens." <u>Bone</u> 21(3): 225-35.
- Brunton, V. G., B. W. Ozanne, et al. (1997). "A role for epidermal growth factor receptor, c-Src and focal adhesion kinase in an in vitro model for the progression of colon cancer." <u>Oncogene</u> 14(3): 283-93.
- Burgaya, F. and J. A. Girault (1996). "Cloning of focal adhesion kinase, pp125FAK, from rat brain reveals multiple transcripts with different patterns of expression." <u>Brain Res Mol Brain Res</u> 37(1-2): 63-73.
- Burger, E. H. and J. Klein-Nulen (1999). "Responses of bone cells to biomechanical forces in vitro." <u>Adv</u> <u>Dent Res</u> **13**: 93-8.
- Burger, E. H. and J. Klein-Nulend (1999). "Mechanotransduction in bone--role of the lacuno-canalicular network." <u>Faseb J</u> 13(Suppl): S101-12.
- Burridge, K., C. E. Turner, et al. (1992). "Tyrosine phosphorylation of paxillin and pp125FAK accompanies cell adhesion to extracellular matrix: a role in cytoskeletal assembly." <u>J Cell Biol</u> 119(4): 893-903.

- Calalb, M. B., T. R. Polte, et al. (1995). "Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase at sites in the catalytic domain regulates kinase activity: a role for Src family kinases." <u>Mol Cell Biol</u> 15(2): 954-63.
- Calalb, M. B., X. Zhang, et al. (1996). "Focal adhesion kinase tyrosine-861 is a major site of phosphorylation by Src." <u>Biochem Biophys Res Commun</u> 228(3): 662-8.
- Canalis, E., M. Centrella, et al. (1988). "Effects of basic fibroblast growth factor on bone formation in vitro." J Clin Invest 81(5): 1572-7.
- Canalis, E., T. L. McCarthy, et al. (1989). "Effects of platelet-derived growth factor on bone formation in vitro." <u>J Cell Physiol</u> **140**(3): 530-7.
- Canalis, E., J. Pash, et al. (1993). "Skeletal growth factors." Crit Rev Eukaryot Gene Expr 3(3): 155-66.
- Canalis, E. and S. Rydziel (1996). Platelet-Derived Growth Factor and the Skeleton. <u>Principles of bone</u> <u>biology</u>. J. P. Bilezikian, L. G. Raisz and G. A. Rodan. San Diego, Academic Press: 619-626.
- Canalis, E., S. Rydziel, et al. (1995). "Insulin-like growth factors inhibit interstitial collagenase synthesis in bone cell cultures." <u>Endocrinology</u> 136(4): 1348-54.
- Cance, W. G., J. E. Harris, et al. (2000). "Immunohistochemical analyses of focal adhesion kinase expression in benign and malignant human breast and colon tissues: correlation with preinvasive and invasive phenotypes." <u>Clin Cancer Res</u> 6(6): 2417-23.
- Caverzasio, J., G. Palmer, et al. (1997). "Mechanism of the mitogenic effect of fluoride on osteoblast-like cells: evidences for a G protein-dependent tyrosine phosphorylation process." <u>J Bone Miner Res</u> 12(12): 1975-83.
- Centrella, M., T. L. McCarthy, et al. (1991). "Transforming growth factor-beta and remodeling of bone." J Bone Joint Surg Am **73**(9): 1418-28.
- Chauhan, D., T. Hideshima, et al. (1999). "RAFTK/PYK2-dependent and -independent apoptosis in multiple myeloma cells." <u>Oncogene</u> 18(48): 6733-40.
- Chen, H. C., P. A. Appeddu, et al. (1996). "Phosphorylation of tyrosine 397 in focal adhesion kinase is required for binding phosphatidylinositol 3-kinase." J Biol Chem 271(42): 26329-34.
- Chen, H. C., P. A. Appeddu, et al. (1995). "Interaction of focal adhesion kinase with cytoskeletal protein talin." J Biol Chem 270(28): 16995-9.
- Chen, R., O. Kim, et al. (2001). "Regulation of the PH-domain-containing tyrosine kinase Etk by focal adhesion kinase through the FERM domain." <u>Nat Cell Biol</u> **3**(5): 439-44.
- Cheng, S. L., C. F. Lai, et al. (2001). "Bone mineralization and osteoblast differentiation are negatively modulated by integrin alpha(v)beta3." J Bone Miner Res 16(2): 277-88.
- Civitelli, R., E. C. Beyer, et al. (1993). "Connexin43 mediates direct intercellular communication in human osteoblastic cell networks." J Clin Invest **91**(5): 1888-96.
- Clark, E. A. and J. S. Brugge (1995). "Integrins and signal transduction pathways: the road taken." <u>Science</u> **268**(5208): 233-9.
- Cospedal, R., H. Abedi, et al. (1999). "Platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB) regulation of migration and focal adhesion kinase phosphorylation in rabbit aortic vascular smooth muscle cells: roles of phosphatidylinositol 3-kinase and mitogen- activated protein kinases." <u>Cardiovasc Res</u> 41(3): 708-21.
- Dexter, T. M. (1982). "Stromal cell associated haemopoiesis." J Cell Physiol Suppl 1: 87-94.

- Diliberto, P. A., G. W. Gordon, et al. (1992). "Platelet-derived growth factor (PDGF) alpha receptor activation modulates the calcium mobilizing activity of the PDGF beta receptor in Balb/c3T3 fibroblasts." J Biol Chem 267(17): 11888-97.
- Du, Q. S., X. R. Ren, et al. (2001). "Inhibition of PYK2-induced actin cytoskeleton reorganization, PYK2 autophosphorylation and focal adhesion targeting by FAK." <u>J Cell Sci</u> 114(Pt 16): 2977-87.
- Elbashir, S. M., J. Harborth, et al. (2001). "Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells." <u>Nature</u> **411**(6836): 494-8.
- Fechner, R. E. and S. E. Mills, Eds. (1993). <u>Tumors of the bones and joints</u>. Atlas of Tumor Pathology. Washington, D.C., Armed Forces Institute of Pathology.
- Finkelstein, L. D. and Y. Shimizu (2000). "Role of phosphoinositide 3-kinase and the Cbl adaptor protein in coupling the alpha4beta1 integrin to mitogen-activated protein kinase signalling." <u>Biochem J</u> 345 Pt 2: 385-92.
- Fitzpatrick, L. A. and J. P. Bilezikian (1996). Actions of Parthyroid Hormon. <u>Principles of bone biology</u>. J. P. Bilezikian, L. G. Raisz and G. A. Rodan. San Diego, Academic Press: 339-346.
- Fleet, J. C. and J. M. Hock (1994). "Identification of osteocalcin mRNA in nonosteoid tissue of rats and humans by reverse transcription-polymerase chain reaction." J Bone Miner Res **9**(10): 1565-73.
- Freitas, F., M. Jeschke, et al. (2002). "Fluoroaluminate stimulates phosphorylation of p130 Cas and Fak and increases attachment and spreading of preosteoblastic MC3T3-E1 cells." <u>Bone</u> **30**(1): 99-108.
- Fried, A., D. Benayahu, et al. (1993). "Marrow stroma-derived osteogenic clonal cell lines: putative stages in osteoblastic differentiation." <u>J Cell Physiol</u> 155(3): 472-82.
- Frisch, S. M., K. Vuori, et al. (1996). "Control of adhesion-dependent cell survival by focal adhesion kinase." J Cell Biol 134(3): 793-9.
- Girault, J. A., G. Labesse, et al. (1999). "The N-termini of FAK and JAKs contain divergent band 4.1 domains." <u>Trends Biochem Sci</u> 24(2): 54-7.
- Glukhova, M., V. Koteliansky, et al. (1995). "Adhesion systems in normal breast and in invasive breast carcinoma." <u>Am J Pathol</u> **146**(3): 706-16.
- Godwin, S. L. and S. P. Soltoff (2002). "Calcium-sensing receptor-mediated activation of phospholipase Cgamma1 is downstream of phospholipase C-beta and protein kinase C in MC3T3-E1 osteoblasts." <u>Bone</u> 30(4): 559-66.
- Green, P. J., O. Pines, et al. (1986). "The role of antisense RNA in gene regulation." <u>Annu Rev Biochem</u> 55: 569-97.
- Grigoriadis, A. E., J. N. Heersche, et al. (1988). "Differentiation of muscle, fat, cartilage, and bone from progenitor cells present in a bone-derived clonal cell population: effect of dexamethasone." <u>J Cell</u> <u>Biol</u> 106(6): 2139-51.
- Gu, J., M. Tamura, et al. (1998). "Tumor suppressor PTEN inhibits integrin- and growth factor-mediated mitogen-activated protein (MAP) kinase signaling pathways." <u>J Cell Biol</u> 143(5): 1375-83.
- Guan, J. L., J. E. Trevithick, et al. (1991). "Fibronectin/integrin interaction induces tyrosine phosphorylation of a 120-kDa protein." <u>Cell Regul</u> 2(11): 951-64.
- Gumbiner, B. M. (1993). "Proteins associated with the cytoplasmic surface of adhesion molecules." <u>Neuron</u> **11**(4): 551-64.

- Han, N. M., R. Y. Fleming, et al. (1997). "Overexpression of focal adhesion kinase (p125FAK) in human colorectal carcinoma liver metastases: independence from c-src or c-yes activation." <u>Ann Surg</u> <u>Oncol</u> 4(3): 264-8.
- Hara, M., Y. M. Liu, et al. (1997). "Positive chronotropic actions of parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide are associated with increases in the current, I(f), and the slope of the pacemaker potential." <u>Circulation</u> 96(10): 3704-9.
- Hattersley, G., J. A. Kerby, et al. (1991). "Identification of osteoclast precursors in multilineage hemopoietic colonies." <u>Endocrinology</u> 128(1): 259-62.
- Hauck, C. R., D. A. Hsia, et al. (2000). "Focal adhesion kinase facilitates platelet-derived growth factor-BBstimulated ERK2 activation required for chemotaxis migration of vascular smooth muscle cells." J <u>Biol Chem</u> 275(52): 41092-9.
- Hauck, C. R., C. K. Klingbeil, et al. (2000). "Focal adhesion kinase functions as a receptor-proximal signaling component required for directed cell migration." <u>Immunol Res</u> 21(2-3): 293-303.
- Hayase, Y., Y. Muguruma, et al. (1997). "Osteoclast development from hematopoietic stem cells: apparent divergence of the osteoclast lineage prior to macrophage commitment." <u>Exp Hematol</u> 25(1): 19-25.
- Heldin, C. H. and B. Westermark (1999). "Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor." <u>Physiol Rev</u> **79**(4): 1283-316.
- Hildebrand, J. D., M. D. Schaller, et al. (1993). "Identification of sequences required for the efficient localization of the focal adhesion kinase, pp125FAK, to cellular focal adhesions." <u>J Cell Biol</u> 123(4): 993-1005.
- Hildebrand, J. D., J. M. Taylor, et al. (1996). "An SH3 domain-containing GTPase-activating protein for Rho and Cdc42 associates with focal adhesion kinase." <u>Mol Cell Biol</u> 16(6): 3169-78.
- Hock, J. M. and E. Canalis (1994). "Platelet-derived growth factor enhances bone cell replication, but not differentiated function of osteoblasts." <u>Endocrinology</u> 134(3): 1423-8.
- Hock, J. M., M. Centrella, et al. (1988). "Insulin-like growth factor I has independent effects on bone matrix formation and cell replication." <u>Endocrinology</u> 122(1): 254-60.
- Hofstetter, W., H. L. Guenther, et al. (1991). "Establishment and characterization of two immortalized cell lines of the osteoblastic lineage." J Bone Miner Res 6(6): 609-22.
- Ilic, D., E. A. Almeida, et al. (1998). "Extracellular matrix survival signals transduced by focal adhesion kinase suppress p53-mediated apoptosis." J Cell Biol 143(2): 547-60.
- Ilic, D., Y. Furuta, et al. (1995). "Reduced cell motility and enhanced focal adhesion contact formation in cells from FAK-deficient mice." <u>Nature</u> 377(6549): 539-44.
- Jaiswal, N., S. E. Haynesworth, et al. (1997). "Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro." J Cell Biochem 64(2): 295-312.
- Jee, W. S. S. (1983). The Skeletal Tissues. <u>Histology, cell and tissue biology</u>. L. Weiss. New York, Elsevier Biomedical: 200-255.
- Jeschke, M., G. J. Standke, et al. (1998). "Fluoroaluminate induces activation and association of Src and Pyk2 tyrosine kinases in osteoblastic MC3T3-E1 cells." J Biol Chem **273**(18): 11354-61.
- Judson, P. L., X. He, et al. (1999). "Overexpression of focal adhesion kinase, a protein tyrosine kinase, in ovarian carcinoma." <u>Cancer</u> 86(8): 1551-6.

- Kadi, A., V. Berthet, et al. (2002). "[Involvement of FAK, PI3-K and PKC in cell adhesion induced by microtubule disruption]." <u>Bull Cancer</u> 89(2): 227-33.
- Kanner, S. B., A. Aruffo, et al. (1994). "Lymphocyte antigen receptor activation of a focal adhesion kinaserelated tyrosine kinase substrate." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> 91(22): 10484-7.
- Karaplis, A. C. and D. Goltzman (2000). "PTH and PTHrP effects on the skeleton." <u>Rev Endocr Metab</u> <u>Disord</u> 1(4): 331-41.
- Katagiri, T., A. Yamaguchi, et al. (1990). "The non-osteogenic mouse pluripotent cell line, C3H10T1/2, is induced to differentiate into osteoblastic cells by recombinant human bone morphogenetic protein-2." <u>Biochem Biophys Res Commun</u> 172(1): 295-9.
- Kornberg, L. J. (1998). "Focal adhesion kinase and its potential involvement in tumor invasion and metastasis." <u>Head Neck</u> 20(8): 745-52.
- Krause, A., E. A. Cowles, et al. (2000). "Integrin-mediated signaling in osteoblasts on titanium implant materials." J Biomed Mater Res 52(4): 738-47.
- Leopoldt, D., H. F. Yee, Jr., et al. (2000). "Tyrosine phosphorylation of p125(Fak), p130(Cas), and paxillin does not require extracellular signal-regulated kinase activation in Swiss 3T3 cells stimulated by bombesin or platelet-derived growth factor." J Cell Physiol 183(2): 208-20.
- Lev, S., H. Moreno, et al. (1995). "Protein tyrosine kinase PYK2 involved in Ca(2+)-induced regulation of ion channel and MAP kinase functions." <u>Nature</u> 376(6543): 737-45.
- Li, X. and H. S. Earp (1997). "Paxillin is tyrosine-phosphorylated by and preferentially associates with the calcium-dependent tyrosine kinase in rat liver epithelial cells." J Biol Chem 272(22): 14341-8.
- Lian, J. B., G. S. Stein, et al. (1999). Bone Formation: Osteoblast Lineage Cells, Growth Factors, Matrix Proteins, and the Mineralization Process. <u>Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of</u> <u>Mineral Metabolism</u>. M. J. Favus. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins: 14-29.
- Liu, Y. K., T. Uemura, et al. (1997). "Osteopontin involvement in integrin-mediated cell signaling and regulation of expression of alkaline phosphatase during early differentiation of UMR cells." <u>FEBS</u> <u>Lett</u> 420(1): 112-6.
- Liu, Z. Y., R. K. Ganju, et al. (1997). "Cytokine signaling through the novel tyrosine kinase RAFTK in Kaposi's sarcoma cells." <u>J Clin Invest</u> 99(7): 1798-804.
- Longhurst, C. M. and L. K. Jennings (1998). "Integrin-mediated signal transduction." <u>Cell Mol Life Sci</u> 54(6): 514-26.
- Lu, Z., G. Jiang, et al. (2001). "Epidermal growth factor-induced tumor cell invasion and metastasis initiated by dephosphorylation and downregulation of focal adhesion kinase." <u>Mol Cell Biol</u> **21**(12): 4016-31.
- Ludwig, H. C., R. Akhavan-Shigari, et al. (2000). "Expression of focal adhesion kinase (p125 FAK) and proline-rich tyrosine kinase 2 (PYK2/CAKb) in cerebral metastases, correlation with VEGF-R-, ecNOS III-labelling and morphometric data." <u>Anticancer Res</u> 20(3A): 1419-24.
- Majeska, R. J. (1996). Culture of Osteoblastic Cells. <u>Basic Principles of Bone Biology</u>. J. P. Bilezikian, L. G. Raisz and G. A. Rodan. San Diego, Academic Press.: 1229-1237.
- Maniatopoulos, C., J. Sodek, et al. (1988). "Bone formation in vitro by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats." <u>Cell Tissue Res</u> **254**(2): 317-30.
- Manolagas, S. C. and R. L. Jilka (1995). "Bone marrow, cytokines, and bone remodeling. Emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis." <u>N Engl J Med</u> 332(5): 305-11.
- Marks, S. C., Jr., S. Mackowiak, et al. (1989). "Proliferation and differentiation of osteoblasts in osteopetrotic rats: modification in expression of genes encoding cell growth and extracellular matrix proteins." <u>Connect Tissue Res</u> 21(1-4): 107-13.
- Matsumoto, Y., K. Tanaka, et al. (2001). "Small GTP-binding protein, Rho, both increased and decreased cellular motility, activation of matrix metalloproteinase 2 and invasion of human osteosarcoma cells." Jpn J Cancer Res **92**(4): 429-38.
- McCarty, J. H. (1998). "The Nck SH2/SH3 adaptor protein: a regulator of multiple intracellular signal transduction events." <u>Bioessays</u> **20**(11): 913-21.
- McCormack, S. J., S. E. Brazinski, et al. (1997). "Activation of the focal adhesion kinase signal transduction pathway in cervical carcinoma cell lines and human genital epithelial cells immortalized with human papillomavirus type 18." <u>Oncogene</u> 15(3): 265-74.
- Miller, S. L. and F. A. Hoffer (2001). "Malignant and benign bone tumors." <u>Radiol Clin North Am</u> **39**(4): 673-99.
- Moalli, M. R., S. Wang, et al. (2001). "Mechanical stimulation induces pp125(FAK) and pp60(src) activity in an in vivo model of trabecular bone formation." <u>J Appl Physiol</u> 91(2): 912-8.
- Morris, S. A. and J. P. Bilezikian (1996). Signal Transduction in Bone Physiology: Messenger Systems for Parathyroid Hormone. <u>Principles of Bone Biology</u>. J. P. Bilezikian, L. G. Raisz and G. A. Rodan. San Diego, Academic Press: 1203-1215.
- Nakamura, T., K. Hanada, et al. (1995). "Stimulation of endosteal bone formation by systemic injections of recombinant basic fibroblast growth factor in rats." <u>Endocrinology</u> 136(3): 1276-84.
- Ogino, K., D. Burkhoff, et al. (1995). "The hemodynamic basis for the cardiac effects of parathyroid hormone (PTH) and PTH-related protein." <u>Endocrinology</u> **136**(7): 3024-30.
- Okumura, A., M. Goto, et al. (2001). "Substrate affects the initial attachment and subsequent behavior of human osteoblastic cells (Saos-2)." <u>Biomaterials</u> 22(16): 2263-71.
- Onyia, J. E., B. Miller, et al. (1997). "Proliferating cells in the primary spongiosa express osteoblastic phenotype in vitro." <u>Bone</u> **20**(2): 93-100.
- Owens, L. V., L. Xu, et al. (1995). "Overexpression of the focal adhesion kinase (p125FAK) in invasive human tumors." <u>Cancer Res</u> 55(13): 2752-5.
- Owens, L. V., L. Xu, et al. (1996). "Focal adhesion kinase as a marker of invasive potential in differentiated human thyroid cancer." <u>Ann Surg Oncol</u> **3**(1): 100-5.
- Pandey, P., S. Avraham, et al. (1999). "Activation of p38 mitogen-activated protein kinase by PYK2/related adhesion focal tyrosine kinase-dependent mechanism." J Biol Chem 274(15): 10140-4.
- Pandey, P., S. Avraham, et al. (1999). "Bcl-xL blocks activation of related adhesion focal tyrosine kinase/proline-rich tyrosine kinase 2 and stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal protein kinase in the cellular response to methylmethane sulfonate." J Biol Chem 274(13): 8618-23.
- Pavalko, F. M. and C. A. Otey (1994). "Role of adhesion molecule cytoplasmic domains in mediating interactions with the cytoskeleton." <u>Proc Soc Exp Biol Med</u> 205(4): 282-93.
- Pawson, T., P. Olivier, et al. (1993). "Proteins with SH2 and SH3 domains couple receptor tyrosine kinases to intracellular signalling pathways." <u>Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci</u> 340(1293): 279-85.
- Perinpanayagam, H., R. Zaharias, et al. (2001). "Early cell adhesion events differ between osteoporotic and non- osteoporotic osteoblasts." <u>J Orthop Res</u> 19(6): 993-1000.

- Richardson, A. and T. Parsons (1996). "A mechanism for regulation of the adhesion-associated proteintyrosine kinase pp125FAK." <u>Nature</u> **380**(6574): 538-40.
- Ridyard, M. S. and E. J. Sanders (2001). "Inhibition of focal adhesion kinase expression correlates with changes in the cytoskeleton but not apoptosis in primary cultures of chick embryo cells." <u>Cell Biol</u> <u>Int</u> 25(3): 215-26.
- Roodman, G. D., K. J. Ibbotson, et al. (1985). "1,25-Dihydroxyvitamin D3 causes formation of multinucleated cells with several osteoclast characteristics in cultures of primate marrow." <u>Proc Natl</u> <u>Acad Sci U S A</u> 82(23): 8213-7.
- Rosenfeldt, H. M., J. P. Hobson, et al. (2001). "EDG-1 links the PDGF receptor to Src and focal adhesion kinase activation leading to lamellipodia formation and cell migration." <u>Faseb J</u> **15**(14): 2649-59.
- Rydziel, S., S. Shaikh, et al. (1994). "Platelet-derived growth factor-AA and -BB (PDGF-AA and -BB) enhance the synthesis of PDGF-AA in bone cell cultures." <u>Endocrinology</u> **134**(6): 2541-6.
- Saito, Y., S. Mori, et al. (1996). "Phosphatidylinositol 3-kinase activity is required for the activation process of focal adhesion kinase by platelet-derived growth factor." <u>Biochem Biophys Res Commun</u> 224(1): 23-6.
- Salazar, E. P. and E. Rozengurt (1999). "Bombesin and platelet-derived growth factor induce association of endogenous focal adhesion kinase with Src in intact Swiss 3T3 cells." <u>J Biol Chem</u> 274(40): 28371-8.
- Sasaki, H., K. Nagura, et al. (1995). "Cloning and characterization of cell adhesion kinase beta, a novel protein-tyrosine kinase of the focal adhesion kinase subfamily." J Biol Chem 270(36): 21206-19.
- Sastry, S. K. and A. F. Horwitz (1993). "Integrin cytoplasmic domains: mediators of cytoskeletal linkages and extra- and intracellular initiated transmembrane signaling." <u>Curr Opin Cell Biol</u> **5**(5): 819-31.
- Schaller, M. D., C. A. Borgman, et al. (1992). "pp125FAK a structurally distinctive protein-tyrosine kinase associated with focal adhesions." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> 89(11): 5192-6.
- Schaller, M. D., C. A. Borgman, et al. (1993). "Autonomous expression of a noncatalytic domain of the focal adhesion- associated protein tyrosine kinase pp125FAK." <u>Mol Cell Biol</u> 13(2): 785-91.
- Schaller, M. D. and T. Sasaki (1997). "Differential signaling by the focal adhesion kinase and cell adhesion kinase beta." J Biol Chem 272(40): 25319-25.
- Schlaepfer, D. D., C. R. Hauck, et al. (1999). "Signaling through focal adhesion kinase." <u>Prog Biophys Mol</u> <u>Biol</u> 71(3-4): 435-78.
- Schlaepfer, D. D., K. C. Jones, et al. (1998). "Multiple Grb2-mediated integrin-stimulated signaling pathways to ERK2/mitogen-activated protein kinase: summation of both c-Src- and focal adhesion kinaseinitiated tyrosine phosphorylation events." <u>Mol Cell Biol</u> 18(5): 2571-85.
- Schultz, A. M., L. E. Henderson, et al. (1985). "Amino terminal myristylation of the protein kinase p60src, a retroviral transforming protein." <u>Science</u> 227(4685): 427-9.
- Shen, T. and J. Guan (2001). "Differential regulation of cell migration and cell cycle progression by FAK complexes with Src, PI3K, Grb7 and Grb2 in focal contacts." <u>FEBS Lett</u> **499**(1-2): 176-81.
- Simonet, W. S., D. L. Lacey, et al. (1997). "Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density." <u>Cell</u> 89(2): 309-19.

- Sinnett-Smith, J., I. Zachary, et al. (1993). "Bombesin stimulation of p125 focal adhesion kinase tyrosine phosphorylation. Role of protein kinase C, Ca2+ mobilization, and the actin cytoskeleton." J Biol Chem 268(19): 14261-8.
- Slack, J. K., R. B. Adams, et al. (2001). "Alterations in the focal adhesion kinase/Src signal transduction pathway correlate with increased migratory capacity of prostate carcinoma cells." <u>Oncogene</u> 20(10): 1152-63.
- Sommerfeldt, D. W., K. J. McLeod, et al. (2001). "Differential phosphorylation of paxillin in response to surface-bound serum proteins during early osteoblast adhesion." <u>Biochem Biophys Res Commun</u> 285(2): 355-63.
- Stanzione, R., A. Picascia, et al. (2001). "Variations of proline-rich kinase Pyk2 expression correlate with prostate cancer progression." <u>Lab Invest</u> 81(1): 51-9.
- Stein, G. S., J. B. Lian, et al. (1996). Mechanisms regulating osteoblast proliferation und differentiation. <u>Principles of Bone Biology</u>. J. P. Bilezikian, L. G. Raisz and G. A. Rodan. San Diego, Academic Press: 69-86.
- Susa, M. (1999). "Heterotrimeric G proteins as fluoride targets in bone (review)." <u>Int J Mol Med</u> 3(2): 115-26.
- Suzawa, M., Y. Tamura, et al. (2002). "Stimulation of Smad1 transcriptional activity by Ras-extracellular signal-regulated kinase pathway: a possible mechanism for collagen- dependent osteoblastic differentiation." J Bone Miner Res 17(2): 240-8.
- Swanstrom, R., R. C. Parker, et al. (1983). "Transduction of a cellular oncogene: the genesis of Rous sarcoma virus." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> 80(9): 2519-23.
- Tachibana, K., T. Sato, et al. (1995). "Direct association of pp125FAK with paxillin, the focal adhesiontargeting mechanism of pp125FAK." J Exp Med **182**(4): 1089-99.
- Takahashi, M. O., Y. Takahashi, et al. (1999). "Growth hormone stimulates tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase (p125(FAK)) and actin stress fiber formation in human osteoblast- like cells, Saos2." <u>Biochem Biophys Res Commun</u> 263(1): 100-6.
- Takeuchi, Y., M. Suzawa, et al. (1997). "Differentiation and transforming growth factor-beta receptor downregulation by collagen-alpha2beta1 integrin interaction is mediated by focal adhesion kinase and its downstream signals in murine osteoblastic cells." J Biol Chem 272(46): 29309-16.
- Tamura, Y., Y. Takeuchi, et al. (2001). "Focal adhesion kinase activity is required for bone morphogenetic protein--Smad1 signaling and osteoblastic differentiation in murine MC3T3-E1 cells." <u>J Bone Miner</u> <u>Res</u> 16(10): 1772-9.
- Toma, C. D., S. Ashkar, et al. (1997). "Signal transduction of mechanical stimuli is dependent on microfilament integrity: identification of osteopontin as a mechanically induced gene in osteoblasts." J Bone Miner Res 12(10): 1626-36.
- Tremblay, L., W. Hauck, et al. (1996). "Focal adhesion kinase (pp125FAK) expression, activation and association with paxillin and p50CSK in human metastatic prostate carcinoma." Int J Cancer 68(2): 164-71.
- Tu, L. C., C. K. Chou, et al. (2001). "Protein kinase C-mediated tyrosine phosphorylation of paxillin and focal adhesion kinase requires cytoskeletal integrity and is uncoupled to mitogen-activated protein kinase activation in human hepatoma cells." J Biomed Sci 8(2): 184-90.

- Wang, J. F., I. W. Park, et al. (2000). "Stromal cell-derived factor-1alpha stimulates tyrosine phosphorylation of multiple focal adhesion proteins and induces migration of hematopoietic progenitor cells: roles of phosphoinositide-3 kinase and protein kinase C." <u>Blood</u> 95(8): 2505-13.
- Weiner, T. M., E. T. Liu, et al. (1993). "Expression of focal adhesion kinase gene and invasive cancer." Lancet 342(8878): 1024-5.
- Weiner, T. M., E. T. Liu, et al. (1994). "Expression of growth factor receptors, the focal adhesion kinase, and other tyrosine kinases in human soft tissue tumors." <u>Ann Surg Oncol</u> 1(1): 18-27.
- Wener, J. A., S. J. Gorton, et al. (1972). "Escape from inhibition or resorption in cultures of fetal bone treated with calcitoninand parathyroid hromone." <u>Endocrinology</u> 90(3): 752-9.
- Wozney, J. M., V. Rosen, et al. (1988). "Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities." <u>Science</u> 242(4885): 1528-34.
- Wozniak, M., A. Fausto, et al. (2000). "Mechanically strained cells of the osteoblast lineage organize their extracellular matrix through unique sites of alphavbeta3-integrin expression." J Bone Miner Res 15(9): 1731-45.
- Wu, C. J., X. F. Yang, et al. (2000). "Detection of a potent humoral response associated with immuneinduced remission of chronic myelogenous leukemia." J Clin Invest 106(5): 705-14.
- Wuthier, R. E. and T. C. Register (1984). Role of alkaline phosphatase, a polyfunctional enzyme, in mineralizing tissues. <u>The Chemistry and Biology of Mineralized Tissues</u>. W. T. Butler. Birmingham, Ebsco Media: 113-124.
- Xiong, W. and J. T. Parsons (1997). "Induction of apoptosis after expression of PYK2, a tyrosine kinase structurally related to focal adhesion kinase." <u>J Cell Biol</u> **139**(2): 529-39.
- Xu, L. H., X. Yang, et al. (1998). "The COOH-terminal domain of the focal adhesion kinase induces loss of adhesion and cell death in human tumor cells." <u>Cell Growth Differ</u> 9(12): 999-1005.
- Yao, R. and G. M. Cooper (1995). "Requirement for phosphatidylinositol-3 kinase in the prevention of apoptosis by nerve growth factor." <u>Science</u> 267(5206): 2003-6.
- Yu, X., S. C. Hsieh, et al. (1997). "Temporal expression of PDGF receptors and PDGF regulatory effects on osteoblastic cells in mineralizing cultures." <u>Am J Physiol</u> 272(5 Pt 1): C1709-16.
- Zachary, I. and E. Rozengurt (1992). "Focal adhesion kinase (p125FAK): a point of convergence in the action of neuropeptides, integrins, and oncogenes." <u>Cell</u> **71**(6): 891-4.
- Zent, R., M. Ailenberg, et al. (1998). "Tyrosine kinase cell signaling pathways of rat mesangial cells in 3dimensional cultures: response to fetal bovine serum and platelet- derived growth factor-BB." <u>Exp</u> <u>Cell Res</u> 240(1): 134-43.
- Zrihan-Licht, S., Y. Fu, et al. (2000). "RAFTK/Pyk2 tyrosine kinase mediates the association of p190 RhoGAP with RasGAP and is involved in breast cancer cell invasion." <u>Oncogene</u> **19**(10): 1318-28.

G. Anhang

G.1. Daten der untersuchten Osteosarkome und Normalproben

Bezeichnung	Beschreibung	Geschl.	Alter	Lokalisation	Methoden
OS1	hochmalignes osteoblastisches OS	w	18	Humerus	IH
OS2	hochmalignes osteoblastisches OS	m	16	Femur	IH
OS3	hochmalignes osteoblastisches OS	m	19	Humerus	IH
OS4	hochmalignes polymorphzelliges OS	w	15	Femur	IH
OS5	multifokales metachrones OS	m	52	BWK7	IH
OS6	überwiegend osteoblastisches OS	m	43	Femur	IH
OS7	hochmalignes polymorphzelliges OS	m	5	Femur	PCR
OS8	hochmalignes polymorphzelliges OS	w	18	Femur	PCR
OS9	hochmalignes OS	m	26	Fibula	PCR
OS10	hochmalignes osteoblastisches OS	m	13	Tibia	PCR
OS11	hochmalignes chondrobl. OS	w	14	Tibia	PCR
OS12	hochmalignes osteoblastisches OS	w	9	Femur	PCR
OS13	hochmalignes OS	w	16	Fibula	ZK, PCR
OS14	hochmalignes OS	m	20	Fibula	ZK, PCR
OS15	hochmalignes OS	m	34	Mandibula	ZK, PCR
OS16	hochmalignes OS	w	17	Tibia	ZK, PCR
OB1	Spongiosa	n.b.	n.b.	Wirbelkörper	ZK, PCR
OB2	Spongiosa/Kortikalis	m	50	Hüftkopf	ZK, PCR
OB3	Spongiosa	w	72	n.b.	ZK, PCR
OB4	Spongiosa	n.b.	n.b.	n.b.	ZK, PCR
OB6	Spongiosa	m	50	n.b.	ZK, PCR
OB7	Beckenkamm-Biopsie	w	84	Becken	IH
OB8	Beckenkamm-Biopsie	w	65	Becken	IH
HOS58	Osteosarkom-Zellinie				ZK, PCR
MG-63	Osteosarkom-Zellinie				ZK, PCR
OHS4	Osteosarkom-Zellinie	1			ZK, PCR
Saos-2	Osteosarkom-Zellinie	1			ZK, PCR
U-2 OS	Osteosarkom-Zellinie	1			ZK, PCR

Tab. G.1.: Verwendetes Material für die Osteosarkom-Studie.

OS: Osteosarkom; OB: Osteoblasten; m: männlich; w: weiblich; n.b.: nicht bekannt; IH: Immunhistochemie; PCR: Real-Time-PCR; ZK: Zellkultur.

G.2. Plasmidkarte Klonierungsvektor pCR2.1



Abb. G.1.: Plasmidkarte des verwendeten Klonierungsvektors pCR2.1.

H. Abkürzungen

Ab	Antikörper
Abb.	Abbildung
AP/APase	Alkalische Phosphatase
APAAP	Alkalische Phosphatase Anti Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
BMP	Bone Morphogenic Protein
BSA	Bovines Serumalbumin
°C	Grad Celcius
CAKβ	Cell Adhesion Kinase β
cDNA	komplementäre DNA
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
CSF	Colony Stimulating Factor
СТ	Calcitonin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamin-Tetraacetat
FAK	Focal Adhesion Kinase
F.A.T.	Focal Adhesion Targeting
FBS	Fötales Rinderserum
FGF	Fibroblast Growth Factor
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FRNK	FAK-related non kinase
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
GAP	GTPase-aktivierendes Protein
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HRP	Meerrettich-Peroxidase
IGF	Insulin-like Growth Factor
IL	Interleukin

IP3	Inositol-Trisphosphat	
1	Liter	
М	Mol	
m	Meter	
mAb	monoklonaler Antikörper	
MEM	Minimal Essential Medium	
mRNA	messenger RNA	
OC	Osteokalzin	
ODF	Osteoklasten-Differenzierungsfaktor	
OPG	Osteoprotegerin	
pAb	polyklonaler Antikörper	
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung	
PCR	Polymerase-Kettenreaktion	
PDGF	Platelet Derived Growth Factor	
РІЗК	Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase	
РКА	Proteinkinase A	
РКС	Proteinkinase C	
PLC	Phospholipase	
PMA	Phorbol-12-Myristyl-14-Acetat	
psp	Zellen der primären Spongiosa	
РТН	Parathyroidhormon	
pY	phosphorylierter Tyrosinrest	
Pyk2	Proline Rich Tyrosine Kinase2	
-R	-Rezeptor	
RAFTK	Related Adhesion Focal Tyrosine Kinase	
RANK	Receptor Activator of NF-kB	
RGD	Arginin-Glycin-Asparaginsäure	
RNA	Ribonukleinsäure	
RT	Raumtemperatur	
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-PCR	
SDS	Natrium-Dodecylsulfat	
sec	Sekunde	
SH	Src-Homologie	
str	Knochenmarks-Stromazellen	

Tab.	Tabelle
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF	Transforming Growth Factor
TNF	Tumor-Nekrosefaktor
TRITC	Tetramethylrodamin-Isothiocyanat
U	Units, Einheiten
UV	ultraviolett
vK	von Kossa
VitD ₃	Dihydroxy-Vitamin D ₃
Vol.	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn **Professor Dr. Delling** für die Bereitstellung des interessanten Themas und des Arbeitsplatzes am Zentrum für Biomechanik innerhalb des DFG-Graduiertenkollegs. Durch die interdisziplinäre Zusammenarbeit wurden mir über meine Forschungstätigkeit hinaus auch interessante Einblicke in die Pathologie und den klinischen Alltag ermöglicht.

Bei Herrn **Professor Dr. Renwrantz** möchte ich mich für die kritische Durchsicht meiner Manuskripte und die bereitwillige Übernahme des Gutachtens meiner Dissertation bedanken.

Frau **Dr. Edelgard Kaiser** danke ich besonders für die Betreuung meiner praktischen Arbeit. Ihr Engagement bezüglich der Weiterentwicklung des Themas und ihre kritische Betrachtung der Fortschritte auf diesem Gebiet haben zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Abteilung für Osteopathologie für die Unterstützung bei der Durchführung der immunhistochemischen Färbungen bedanken.

Bei meinen Kollegen im Zentrum für Biomechanik möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit bedanken. Hierbei gilt mein besonderer Dank Frau Dr. Manuela Wülling für die zahlreichen fachlichen und fachübergreifenden Diskussionen, Frau Ulrike Larsen für die Unterstützung im Labor und Frau Regina Deiwick für die Übernahme zahlreicher bürokratischer Lasten.

Mein Dank gilt ebenfalls Herrn **Dr. Stefan Marotzki** aus der Abteilung für Toxikologie für die großzügige Bereitstellung des Light Cycler Instruments.

Bei der Hansestadt Hamburg, der Deutschen Forschungsgemeinschaft und der Deutschen Krebshilfe / Mildred Scheel Stiftung möchte ich mich für die Unterstützung meiner Forschungsarbeiten bedanken.

Von ganzem Herzen möchte ich mich bei meinen Eltern Heinz und Christa, meiner Schwester Stefanie und meiner Tante Brigitte für ihre liebevolle, emotionale und auch finanzielle Unterstützung bedanken, ohne die mir weder das Studium noch die Doktorarbeit möglich gewesen wären. Meinen lieben Freunden Ralf Winter, Birgit Baumgarth, Cordula Müldner, Nadine Flemming, Caren Wegener und Stefanie Schröder danke ich ebenfalls ganz herzlich für die Unterstützung während des Studiums, der Diplomarbeit, der Doktorarbeit und vor allem im Leben außerhalb der Uni.

Allen denen, die ich im Eifer des Gefechts vergessen haben sollte: "DANKE!"

Andrea Schröder

geboren am 15.03.1974 in Gütersloh

	STUDIUM		
Oktober 1993 bis März 1998	Studium Diplom-Biologie, Universität Bielefeld		
02.11.1995	Diplom-Vorprüfung		
März 1998 bis März 1999	Diplomarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie/Gentechnologie		
	der Universität Bielefeld		
12.03.1999	Abschluß Diplomprüfung		
16.03.1999-14.08.2002	Dissertation am Zentrum für Biomechanik/Abteilung		
	Osteopathologie des Universitätskrankenhauses Eppendorf,		
	Hamburg		
	Promotion im Fachbereich Biologie/Arbeitsbereich Zoologie der		
	Universität Hamburg		
	Stipendien und Förderungen		
1999-2001	Stipendium der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) im		
	Rahmen des Graduiertenkollegs 476		
2002	Förderung durch die Deutsche Krebshilfe/Mildred Scheel-		
	Stiftung		
	Schulbildung		
1980 – 1993	Grundschule, Gymnasium, Allgemeine Hochschulreife		

WISSENSCHAFTLICHE ARBEITEN

• A. Schröder, G. Delling, E. Kaiser:

"Modification of the Non-Receptor Protein Tyrosine Kinases FAK (Focal Adhesion Kinase) and PYK2 (Proline Rich Tyrosine Kinase 2) in Response to Dexamethasone-, PDGF-, PTH-Stimulation and Fibronectin Engagement in Osteoblastic Cells"

J Bone Miner Res 2000 (15, Suppl.1): M210.

• A. Schröder, G. Delling, E. Kaiser:

"Coactivation of FAK After Hormone- and Growth Factor-Treatment in Osteoblastic Cells"

J Bone Miner Res 2001 (16, Suppl.1): SA217.

• A. Schröder, G. Delling, E. Kaiser:

"Untersuchungen zur Expression von Proteintyrosinkinasen der FAK (Focal Adhesion Kinase)-Familie in Osteosarkomen"

Der Pathologe, akzeptiert