

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Institut für molekulare Zellbiologie

Direktorin: Prof. Dr. rer. physiol., Dr. h.c. Ulrike Beisiegel

Einfluss des Apolipoprotein E auf den Knochenstoffwechsel

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von

Rukiye Secer
aus Pinneberg

Hamburg, 2011

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 04.11.2011**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. J. Heeren

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Dr. U. Beisiegel

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: PD Dr. A. Niemeier

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	5
1.1. Lipoproteinstoffwechsel	5
1.1.1. Definition und Funktion	5
1.1.2. Einteilung der Lipoproteine	5
1.1.3. Apolipoproteine	6
1.1.4. Lipoprotein-Rezeptoren	8
1.1.5. Lipoproteinstoffwechsel	9
1.2. Apolipoprotein E	11
1.3. Metabolismus fettlöslicher Vitamine	12
1.3.1. Allgemeines	12
1.3.2. Vitamin D	13
1.3.3. Vitamin K	14
1.4. Der Knochen	15
1.4.1. Funktion des Knochens	15
1.4.2. Knochenstoffwechsel	16
1.4.3. Differenzierung von Osteoblasten	19
1.5. Signaltransduktion und LRP	22
1.6. ApoE und Knochen	23
2. Ziel der Arbeit	25
3. Material und Methoden	26
3.1. Material	26
3.1.1. Geräte	26
3.1.2. Chemikalien	26
3.1.3. Zelllinie	28
3.1.4. Mauslinie	28
3.2. Methoden	28
3.2.1. Serumanalysen ApoE defizienter Mäuse	28
3.2.2. Untersuchung primärer Osteoblasten aus ApoE defizienten Mäusen	29
3.2.3. In vitro Experimente mit humanen Mesenchymalen Stammzellen	32
4. Ergebnisse	35
4.1. Effekt der Isoformen ApoE 2, ApoE 3 und ApoE 4 auf die osteogene Differenzierung humaner mesenchymaler Stammzellen	35

4.1.1. Effekt von ApoE Isoformen auf mRNA Expression osteogener Differenzierungsmarker	35
4.1.2. ApoE Effekt auf die Proteinexpression osteogener Differenzierungsmarker	36
4.2. Gesamtcholesterin und Osteoblastenaktivität in ApoE defizienten Mäusen.....	42
4.2.1. Gesamtcholesterin Konzentration im Serum von Wildtyp und ApoE defizienten Mäusen.....	43
4.2.2. Osteoblastenaktivitätsmarker im Serum ApoE defizienter Mäuse.....	44
4.2.3. Untersuchung primärer Calvaria-Osteoblasten ApoE defizienter Mäuse	47
4.3. In vitro Mineralisierung ApoE defizienter primärer Osteoblasten.....	53
5. Diskussion.....	56
5.1. Effekt der ApoE Isoformen auf die Aktivität humaner Osteoblasten.....	56
5.2. Untersuchung der Osteoblastenaktivität in ApoE defizienten Mäusen	61
6. Zusammenfassung	66
7. Abkürzungsverzeichnis	67
8. Literaturverzeichnis	69
9. Anhang.....	86
9.1. Danksagung	86
9.3. Eidesstattliche Versicherung	87

1. Einleitung

1.1. Lipoproteinstoffwechsel

1.1.1. Definition und Funktion

Lipide gehören zu den hydrophoben Bestandteilen des Blutplasmas. Daher werden Lipide ebenso wie die fettlöslichen Vitamine A, D, E und K zur Vermittlung der Wasserlöslichkeit mit amphiphilen Proteinen, sogenannten Apolipoproteinen, assoziiert und in Form von Lipoproteinen (LP) transportiert. Das allen Lipoproteinen gemeinsame Strukturmodell beschreibt einen sphärischen Lipidkern, auf dessen Oberfläche die für jedes LP charakteristischen Apolipoproteine eingelagert sind. Die Apolipoproteine dienen nicht nur dem Transport der Lipide, sondern fungieren auch als Kofaktoren bestimmter Enzyme des Lipidstoffwechsels oder als Liganden für Zelloberflächenrezeptoren. Sie sind demnach entscheidend an der Aufnahme und dem Stoffwechsel der LP beteiligt. Basierend auf ihren physikochemischen Eigenschaften und ihrer Funktion lassen sich verschiedene LP-Klassen unterscheiden.

1.1.2. Einteilung der Lipoproteine

Die Einteilung der Lipoproteine erfolgt nach unterschiedlichen Trennverfahren, für welche die Größe, Apolipoprotein- und Lipidzusammensetzung der Partikel die Grundlage bilden. Sie können aufgrund ihrer unterschiedlichen Dichte durch präparative Ultrazentrifugation in sechs Gruppen eingeteilt werden, deren Bezeichnung ursprünglich in englischer Sprache geprägt wurde (Alaupovic 1972, Patsch 1974, Kostner 1976). Im deutschen Sprachraum ist es üblich, diese englische Bezeichnung einschließlich der jeweiligen Abkürzungen zu verwenden:

- "*Chylomicrons*" (CM)
- "*Very low density lipoproteins*" (VLDL)
- "*Intermediate density lipoproteins*" (IDL)
- "*Low density lipoproteins*" (LDL)
- "*High density lipoproteins*" (HDL)

Eine weitere Möglichkeit der Trennung stellt die Elektrophorese dar. Nach Auftrennung bilden sich im Wesentlichen drei Fraktionen, welche gleichzeitig die Grundlage für die Nomenklatur der zugehörigen Apolipoproteine bilden (Neubeck 1977, Winkler 1995). Die erste Fraktion entspricht der α -Fraktion. In ihr sind vornehmlich HDL-Partikel vertreten, die

folglich als α -Lipoproteine bezeichnet werden und die zugehörigen Strukturapolipoproteine als ApoA. In der β -Globulinfraktion wandern die LDL-Partikel als β -Lipoproteine mit. Ihr Hauptlipoprotein ist das ApoB 100. In der prä- β -Fraktion, welche der β -Fraktion vorgeschaltet ist, wandern die VLDL-Partikel mit. Ihre Apolipoproteine, das ApoC, und die im Anschluss entdeckten Apolipoproteine wurden dem Alphabet nach benannt. CM enthalten vornehmlich das ApoB 48. Sie wandern im elektrophoretischen Feld kaum und verharren an ihrer Auftragsstelle. (Handbuch der Stoffwechselstörungen, Schwandt und Parhofer Schattauer Verl., 3. Auflage, 2007; Georg Löffler 2007)

1.1.3. Apolipoproteine

Definitionsgemäß sind Apolipoproteine (Apo) Proteine, welche den Ort ihrer Synthese an Lipide gebunden verlassen. Ihre Hauptaufgabe besteht in der Stabilisierung von Lipidemulsionen und dem Transport von Lipiden im wässrigen Milieu. Strukturell lassen sie sich in zwei Gruppen einteilen:

I. Die Apolipoproteine der Gruppe A, E und C

Sie sind zum Teil wasserlöslich und können zwischen den LP-Partikeln ausgetauscht werden. Kennzeichnend für diese kleineren Moleküle sind amphiphile α -Helix Strukturen (Segrest 1992). Die hydrophoben Anteile ragen hierbei in den Lipidkern, wohingegen die hydrophilen Anteile die Löslichkeit des Partikels im umgebenden Blut vermitteln (Bresseur 1991). Die einzelnen LP sind in einem LP-Partikel in mehreren Kopien enthalten.

II. ApoB 100 und ApoB 48

ApoB bildet die zweite Gruppe und ist in freier Form praktisch wasserunlöslich. Strukturell weist ApoB breitflächige amphiphile β -Faltblattstrukturen auf, welche zu einer relativ festen Assoziation mit den LP-Partikeln führen, so dass das ApoB nicht zwischen LP-Partikeln ausgetauscht werden kann (Osterman 1984, Meredith 1988). Das ApoB 48 wird nur im Intestinum synthetisiert und entsteht nach Editierung der mRNA des ApoB 100 Gens durch eine Cytosindesaminase, dem ApoB editing complex-1 (apobec-1) (Scott 1989, Scott 1995). Ein Überblick über die Funktionen einiger Apolipoproteine und der zugehörigen LP ist in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1. Übersicht der wichtigsten Apolipoproteine und ihre Funktion im Lipoprotein-Stoffwechsel (*Handbuch der Stoffwechselstörungen, Schwandt und Parhofer Schattauer Verl., 3. Auflage, 2007*)

Apolipoproteine	Dichte-Klasse	Masse (kDa)	Konzentration [mg/l]	Funktion
ApoA I	HDL	28,5	1200 - 1400	Strukturprotein des HDL; Aktivierung der Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase (LCAT); Bindung an HDL-Rezeptoren
ApoA II	HDL	17	350 – 500	Man geht davon aus, dass ApoA II die hepatische Lipase aktiviert.
ApoA IV	CM	46	< 50	Aktivierung der LCAT
ApoA V	CM, VLDL, HDL	39	0,1 – 0,2	Bindung an LPL und damit Senkung der Plasmatriglycerid-Konzentration
ApoB 100	VLDL, LDL	550	700 - 900	Strukturprotein von LDL und VLDL; Beteiligung an der Cholesterin- und Triacylglyceridsekretion aus Leber und Darm; Bindung an LDL-Rezeptor; Aktivierung der Lysolecithin-Acyltransferase
ApoB 48	CM	265	< 50	Transport von Lipiden und lipidlöslichen Vitaminen aus dem Darm
ApoC I	CM, VLDL	6,5	50 – 80	Aktivierung der LCAT
ApoC II	CM, VLDL	8,8	30 – 70	Aktiviert die Lipoproteinlipase
ApoC III	CM, VLDL	11	1 – 20	Inhibierung der Lipoproteinlipase
ApoD	HDL3	29	80 – 100	Aktivierung und Stabilisierung der LCAT
ApoE	CM, VLDL, HDL	34	30 - 50	Vermittelt die Bindung der LP an Rezeptoren der LDL-R Genfamilie

1.1.4. Lipoprotein-Rezeptoren

Lipoproteinrezeptoren sind Transmembranrezeptoren. Sie vermitteln die Rezeptorvermittelte Endozytose von LP aus dem Blut durch Zellen, welche die Bestandteile der LP zur Aufrechterhaltung ihrer Funktion benötigen. Bereits in den 70er Jahren beschrieben, ist der *low density lipoprotein receptor* (LDL-R) am Besten charakterisiert (Brown und Goldstein 1979) und spielt eine wichtige Rolle in der Cholesterinhomöostase der Zelle. LDL-R wird in unterschiedlicher Dichte von allen Zellen des Körpers exprimiert. Zu den Liganden gehören ApoB 100 und ApoE. Diese binden mit unterschiedlicher Affinität an das aminoternale Ende des Rezeptors, bestehend aus sieben homologen, cysteinreichen Segmenten (Innerarity und Mahley 1978). Die Apolipoproteine vermitteln auf diese Weise die Aufnahme von LDL-Partikeln und Chylomikronen-Remnants (CR) durch die Zelle (Stefansson 1995, Herz 1995). Die Expression und Translokation des Rezeptors wird im wesentlichen über die in der Zelle enthaltene Menge an freiem Cholesterin reguliert (Brown 1986, Cuthbert 1989).

LDL-R stellt den Prototyp für eine Gruppe von LP-Rezeptoren dar, welche untereinander eine Strukturhomologie aufweisen und unter dem Namen der LDL-R Genfamilie zusammengefasst werden. Zu ihnen gehören unter anderem der VLDL-Rezeptor (Takahashi 1992), das *low density lipoprotein receptor related protein 1* (LRP1) (Herz 1988), das Megalin/ LRP2 (Saito 1994) sowie der ApoE Rezeptor2 (apoER2) (Kim 1996). Im Gegensatz zum LDL-R werden die anderen Mitglieder der Genfamilie nicht ubiquitär exprimiert und weisen neben ihrer Rolle im Lipoproteinstoffwechsel noch weitere Funktionen auf.

Der VLDL-R kommt vornehmlich an der luminalen Zellmembran von Endothelien des Muskel- und Fettgewebes und im ZNS vor. Da dieser Rezeptor in der Leber nur in geringem Umfang exprimiert wird, ist er vor allem an der extrahepatischen Aufnahme von triglyceridreichen LP beteiligt (Wyne 1996). Im ZNS steht dem VLDL-R ebenso wie dem apoER 2 eine wichtige Funktion als Rezeptor für Liganden, wie dem Reelin, zu, welche an der Migration und Differenzierung von Neuronen beteiligt sind (D'Arcangelo 1999, Howell 2000). Mausmodelle für VLDL und apoER2 Defizienz weisen eine Unterentwicklung des ZNS und daraus resultierende neurologische Defizite auf (Trommsdorf 1999).

LRP1 ist mit einem Molekulargewicht von 600 kDa um ein Vielfaches größer als der LDL-R. Es wird als Einzelstrang synthetisiert und im Golgi-Apparat durch eine Protease, dem Furin, in eine große (515kD) und eine kleine (85kD) Untereinheit gespalten, welche nicht kovalent miteinander verbunden in die Zellmembran transloziert werden (Herz 1990). LRP1 kommt im Gegensatz zum LDL-R zwar nicht ubiquitär vor, wird aber in vielen unterschiedlichen Geweben und Organen exprimiert. Im Rahmen des Lipoproteinstoffwechsels spielt LRP1 eine

wichtige Rolle in der ApoE vermittelten Aufnahme von CR und anderer ApoE haltiger Partikel. Daher exprimiert vor allem die Leber LRP1 in großen Mengen (Beisiegel 1989, 1991). Niemeier et al haben 2005 zudem eine vermehrte Expression von LRP1 und die darüber vermittelte Aufnahme von CR in Osteoblasten beschrieben. Neben der Versorgung mit Lipiden wird hierdurch auch die Versorgung der Osteoblasten mit Vitamin K gewährleistet. Vitamin K wird im Knochen zur γ -Carboxylierung bestimmter Proteine des Knochenstoffwechsels benötigt (Hauschka 1975, Price 1976).

Die LRP1 Expression in der Peripherie ist allerdings auch unabhängig von der Aufnahme der LP-Partikel von Bedeutung (Herz 2001). Verdeutlicht wird dies durch die Generierung LRP1 defizienter Mäuse, welche bereits an der Implantation der Embryonen scheitert (Herz 1992).

Es sind mittlerweile in verschiedenen Organsystemen Einflüsse von LRP1 durch Interaktionen mit bestimmten Signaltransduktionswegen beschrieben worden. In glatten Muskelzellen der Gefäße exprimiert, ist LRP1 an der Bildung und Instandhaltung der Gefäßwand beteiligt und scheint damit protektiv gegen die Entstehung der Arteriosklerose zu wirken (Boucher 2003). Hierbei sind unter anderem Interaktionen mit Wachstumsfaktoren, wie dem *transforming growth factor β* (TGF β), und dem *tissue plasminogen activator* (tPA) beschrieben worden (Huang 2003; Yepes 2003; Nassar 2004).

Megalin wurde 1982 als Heymann's Nephritis Antigen, das hauptverantwortliche Antigen bei der Entstehung der idiopathischen membranösen Glomerulonephritis beim Menschen beschrieben (Kerjascki und Farquar 1982). Es ist mit 600 kDa der größte Vertreter der LDL-R Genfamilie, zu der Megalin aufgrund seiner Strukturhomologie zum LRP gezählt wird. Trotz des weitgehend überlappenden Ligandenspektrums zum LRP besteht ein deutlicher Unterschied in der Gewebeverteilung beider Rezeptoren. Megalin wird vor allem von resorbierenden Epithelien exprimiert, so zum Beispiel im proximalen Tubulus der Niere. Hier dient es der Resorption kleinmolekularer Proteine, wie dem Vitamin D bindenden Protein (DBP). Eine Defizienz bei Mäusen resultiert u.a. in einem Vitamin D Mangel (Nykjaer 1999). Zudem ist bei diesen Mäusen eine Unterentwicklung des Frontalhirngewebes beschrieben worden (Willnow 1996). Megalin ist demnach wie das LRP nicht ausschließlich an der LP-Aufnahme, sondern auch an spezifischen Organfunktionen beteiligt.

1.1.5. Lipoproteinstoffwechsel

Im Lipoproteinstoffwechsel werden ein exogenes-, ein endogenes Transportsystem und der „Reverse Cholesterintransport“ (RCT) unterschieden.

Der exogene Lipoproteinstoffwechsel beschreibt den Weg der Nahrungslipide. Sie bestehen vornehmlich aus Triacylglyceriden, Cholesterin und Phospholipiden. Der relative Anteil der Lipidklassen hängt von der Nahrungszusammensetzung ab. Zur Verdauung der einzelnen Lipide werden verschiedene Enzyme in den Gastrointestinaltrakt sezerniert. Triacylglyceride werden durch die Lipasen des Magens und des Pankreas zu Mono- bzw. Diacylglyceriden und freien Fettsäuren hydrolysiert. Zur Spaltung der Cholesterinester dient die pankreatische Cholesterinesterase.

In Verbindung mit Gallensäuren lagern sich die hydrophoben Lipide im Darmlumen zu Mizellen zusammen und können in dieser Form von den Mukosazellen des Dünndarms aufgenommen werden. In den Dünndarmzellen findet eine Reveresterung des Cholesterins durch die Acyl-CoA-Cholesterin-Acyltransferase (ACAT) und die Resynthese der Triacylglyceride statt.

Zum weiteren Transport werden die aufgenommenen Lipide in den Mukosazellen mit Lipoproteinen zu Chylomikronen assoziiert. Das Lipoproteinmuster besteht bei neu synthetisierten Chylomikronen vor allem aus ApoB 48, ApoA I und ApoA IV. Die gebildeten Chylomikronen werden im Anschluss in die Lymphbahn geschleust und gelangen über den Ductus Thoracicus, also ohne die Leber zu passieren, in den Blutkreislauf. Im Kreislauf nehmen die Chylomikronen ApoC von den HDL Partikeln auf. Das ApoC vermittelt die Interaktion mit der endothelständigen Lipoproteinlipase (LPL), durch welche der Fettsäurekern hydrolysiert wird und die freien Fettsäuren von peripheren Geweben, z.B. Fett- und Muskelgewebe, aufgenommen werden können. Im weiteren Verlauf der Lipolyse findet ein weiterer Apolipoproteintransfer statt. Die CM nehmen mit wachsendem Cholesterinanteil im Kern vermehrt ApoE von den HDL auf und geben im Gegenzug ApoA I und ApoC wieder ab (Shimano 1994). Die hierbei entstehenden CM-Remnants (CR) werden dann ApoE vermittelt durch LRP1 und dem LDL-R in die Leber aufgenommen.

Im Hungerzustand werden die peripheren Gewebe von der Leber über den endogenen Lipoproteinstoffwechsel mit Triacylglyceriden, Cholesterin und Phospholipiden versorgt.

Die in der Leber neu synthetisierten oder bereits gespeicherten Lipide werden im Endoplasmatischen Reticulum mit ApoB 100 assoziiert und über sekretorische Vesikel in Form von VLDL in die Zirkulation überführt. In der Peripherie werden ApoE und ApoC auf die VLDL übertragen, von welchen letzteres für die Interaktion mit der LPL und damit der Hydrolyse des Triacylglyceridkerns verantwortlich ist. Nach abgeschlossener Hydrolyse entstehen VLDL-Remnants. Diese werden zu einem variablen Anteil erneut von der Leber

aufgenommen oder nach weiterer Hydrolyse über eine Intermediärstufe, den IDL, in cholesterinreiche LDL-Partikel überführt. Während dieser Umformung werden Apoproteine abgegeben, so dass die LDL nur noch ApoB 100 aufweisen. Im peripheren Gewebe wird mit der LDL-Aufnahme der Bedarf an Cholesterin, als Bestandteil von Zellmembranen und Ausgangsstoff verschiedener Hormone, gedeckt. Eine verstärkte Aufnahme weisen hier vor allem die Nebennierenrinde und die Leber auf.

Über den „Reversen Cholesterintransport“ wird im Gegenzug überschüssiges extrahepatisches Cholesterin zurück zur Leber transportiert, welches als einziges Organ Cholesterin durch die Bildung von Gallensäuren aus dem Körper eliminieren kann. Hierzu werden vom intestinalen Gewebe und der Leber lipidarme HDL-Vorläuferpartikel mit dem ApoA I als Strukturapolipoprotein und zusätzlich dem ApoA II (Leber) bzw. ApoA IV (Intestinum) beladen und in die Blutzirkulation geschwemmt. HDL-Partikel sind in der Lage freies Cholesterin von peripheren Zellen aufzunehmen, welche Cholesterin mittels bestimmter Zellmembranrezeptoren, wie dem *ATP binding cassette transporter A1* (ABCA1) ausschleusen. In den Partikeln wird das freie Cholesterin anschließend durch die LCAT nach Aktivierung durch ApoA I bzw. ApoA IV verestert. Die zirkulierenden HDL-Partikel geben die Cholesterinester sowohl über das Cholesterinester Transferprotein (CEPT) an VLDL und LDL-Partikel zur peripheren Versorgung als auch über den *scavenger-receptor BI* (SR-BI) an die Leber zum Abbau oder zur Speicherung weiter (Handbuch der Stoffwechselstörungen, Schwandt und Parhofer Schattauer Verl., 3. Auflage, 2007).

1.2. Apolipoprotein E

ApoE ist ein integrales Strukturprotein verschiedener Lipoproteinklassen. Es spielt als Bestandteil der triglyceridreichen Lipoproteine (TRL), CM und VLDL, im postprandialen Lipidstoffwechsel eine zentrale Rolle. In seiner Funktion als Bindungspartner vermittelt ApoE die Aufnahme der Lipidpartikel durch Mitglieder der LDL-Rezeptor Genfamilie (Mahley 1988). Die Endozytose der ApoE assoziierten Partikel erfolgt vor allem durch die Leber, können aber auch von anderen Geweben mit entsprechender Rezeptorexpression aufgenommen und metabolisiert werden.

Das humane ApoE Gen ist auf Chromosom 19q13.2 lokalisiert und durch einen Polymorphismus gekennzeichnet, welcher auf drei Allelen ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$, $\epsilon 4$) beruht (Zannis 1981). Die drei Hauptisoformen ApoE 2, ApoE 3 und ApoE 4 unterscheiden sich durch einen Aminosäureaustausch an Position 112 und 158 ihrer Aminosäurekette (Weisgraber 1981) und konsekutiv in ihrer Bindungsaffinität zu Lipoproteinrezeptoren. ApoE 4 weist hierbei die

stärkste und ApoE 2 die schwächste Affinität zur LDL-R Gen-Familie auf (Rall 1982). In der Gesamtbevölkerung ist ApoE 3 mit 77-78 % am häufigsten vertreten, gefolgt vom ApoE 4 mit 14-15% und ApoE 2 mit 7-8% (Cedazo-Minguez 2001). Die ApoE 3 Isoform entspricht damit zumindest von seiner Frequenz her dem Wildtyp.

Die ApoE Isoformen werden Aufgrund ihrer Rolle im Stoffwechsel mit der Pathogenese verschiedener Erkrankungen in Zusammenhang gebracht.

Bei homozygoten Trägern des ApoE 2 Gens ist das gehäufte Auftreten einer Typ III Hyperlipoproteinämie (HLP Typ III) beschrieben worden (Breslow 1982). HLP Typ III ist eine genetische Erkrankung des Lipidstoffwechsels, welche mit erhöhten Plasma Cholesterin und Triglyceridwerten einhergeht und damit vor allem zur Entstehung einer Atherosklerose und einer gestörten Glucosetoleranz führt (Morganroth 1975, Mahley 1995). Der Grund für die Anreicherung der Fette im Plasma liegt in einer Verminderung der ApoE abhängigen Aufnahme von CR und VLDL durch periphere Zellen- diese akkumulieren im Blut. Der Verminderten Aufnahme kann ein gestörtes Bindungsverhalten des ApoE 2 zum LDL-R oder eine ApoE Defizienz zu Grunde liegen (Schneider 1981, Ghiselli 1981). Obwohl der ApoE 2/2 Phänotyp pathognomonisch für die Entstehung zu sein scheint, erkranken lediglich ca. 4% der Genträger an HLP Typ III (Breslow 1982, Rall 1982). Demnach sind noch andere Einflussfaktoren an der Pathogenese beteiligt.

Dem ApoE 4 wird ebenso eine Rolle in der Entstehung der Alzheimer Erkrankung zugesprochen (Saunders 1993). Im Rahmen der Pathogenese ist hier unter anderem die Modulation eines Signaltransduktionweges, des *Wingless-Int pathways* (Wnt), beschrieben worden (De Ferrari et al 2007).

Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass ApoE neben seiner Funktion im Lipidstoffwechsel auch in andere Bereiche der Zellphysiologie Einfluss nehmen kann. So sind zum Beispiel, im Sinne einer Arteriosklerose präventiven Funktion, eine Modulation der inflammatorischen Reaktion durch Unterdrückung der Lymphozyten Aktivierung im Gefäßendothel (Hui 1980, Pepe 1986) oder ein antiproliferativer Effekt auf glatte Muskelzellen beschrieben worden (Ishigami 1998).

1.3. Metabolismus fettlöslicher Vitamine

1.3.1. Allgemeines

Vitamine sind essentielle Nahrungsbestandteile mit katalytischen bzw. regulatorischen Funktionen. Sie lassen sich in wasserlösliche und lipidlösliche Vitamine unterteilen.

Die Aufnahme der lipidlöslichen Vitamine A, D, E und K ist eng mit der Aufnahme von Lipiden aus dem Darmlumen verbunden, da sie mit diesen in den gebildeten Mizellen durch die Enterozyten aufgenommen werden.

Für die Vitamine A, D und E existieren Transportproteine wie das Retinol-Bindungsprotein (RBP), das Vitamin D-Bindungsprotein (DBP) und Afamin, welche den Transport der Vitamine im Blut vermitteln. Im Gegensatz dazu wird das Vitamin K vor allem an CM oder CR gekoppelt zu seinem Funktionsort befördert (Ichihashi 1992, Shearer 1974). Dem Vitamin D und Vitamin K können neben diversen anderen Aufgaben auch Funktionen im Rahmen des Knochenstoffwechsels zugeordnet werden.

1.3.2. Vitamin D

Das Vitamin D (Calziferol) gehört zur Gruppe der Steroide. Ergosterol (Vitamin D₂) und Cholecalciferol (Vitamin D₃) sind die wichtigsten Formen des Vitamin D. Die Leber ist in der Lage ein Provitamin D₃ (7-Dehydrocholesterin) aus Cholesterin zu synthetisieren, womit das Vitamin D₃ nicht im eigentlichen Sinne essentiell ist. Zur Bildung der aktiven Form wird das Provitamin zunächst in der Haut eingelagert und durch UV-Bestrahlung in Cholecalciferol umgewandelt. Dieses wird in der Leber zu 25-Hydroxycholecalciferol und in der Niere durch ein mitochondriales Enzym, der 1- α -Hydroxylase, an der ersten Position zu 1, 25-Dihydroxycholecalciferol (Calcitriol), dem Vitamin D₃, hydroxyliert.

Vitamin D₃ ist wesentlich an der Kalzium und Phosphat Homöostase beteiligt. Als Gegenspieler des von der Nebenschilddrüse sezernierten Parathormons (PTH) ist es für die Integrität des Skelettsystems essentiell. Die Synthese und Freisetzung des Vitamin D₃ in der Niere wird über PTH reguliert. Der aktive Metabolit des Vitamin D sorgt auf unterschiedlichen Ebenen für eine konstante Konzentration von Kalzium und Phosphat im Blut. Es steigert zum einen die intestinale Resorption und hemmt die renale Ausscheidung, zum anderen erhöht es durch Steigerung der Osteoblasten Aktivität die Einlagerung von Kalzium und Phosphat in den Knochen (Kraichely 1998).

Seinen Einfluss auf die Osteoblasten Aktivität und Differenzierung übt das Vitamin D₃ über den Vitamin-D₃-Rezeptor (VDR) aus. VDR ist ein 48 kD großer, Liganden aktivierter Transkriptionsfaktor mit Zinkfingerdomäne, welcher hochselektiv Vitamin D₃ bindet. Nach Aktivierung des VDR bildet sich ein heterodimerer Komplex mit dem *retinoid acid receptor* (RXR). Erst diese Komplexbildung macht es dem VDR möglich die so genannten *vitamin-D-responsive elements* (VDRE) in den Promotorregionen der entsprechenden Zielgene zu binden und damit ihre Transkription zu stimulieren (Kraichely 1998). Zu den Vitamin D

abhängigen Genen gehören unter anderem die einiger Matrixproteine, wie Osteocalcin, Osteopontin und Alkalische Phosphatase, aber auch Wachstums- bzw. Transkriptionsfaktoren wie TGF β , *insulin like growth factor-1* (IGF-1) und *core binding factor 1* (Cbfa1) (Gurlek 2002, Drissi 2002). Für Cbfa1 konnte bei der Osteocalcin Genexpression eine direkte Interaktion mit dem VDR-Rezeptorkomplex nachgewiesen werden, welche zur Rekrutierung transkriptioneller Koaktivatoren, wie p300, und Stabilisierung der VDR-VDRE Bindung führt (Paredes 2004).

Obwohl Vitamin D in den einzelnen Differenzierungsstadien die Osteoblasten Funktion auf unterschiedliche Weise beeinflusst, hat es in der Gesamtheit einen antiproliferativen und differenzierungsfördernden Effekt auf Osteoblasten (Gurlek 2001).

Der wichtige Einfluss des Vitamin D3 auf den Knochenstoffwechsel wird bei einer Vitamin D Mangelernährung oder ungenügender Sonnenexposition deutlich. Diese führt zu Krankheitsbildern, welche mit einer erheblichen Abnahme der Knochenfestigkeit und einer erhöhten Frakturrate einhergehen: der Rachitis bei Kindern und Osteomalazie bei Erwachsenen.

1.3.3. Vitamin K

Die Grundstruktur aller K-Vitamine bildet das Menadion (2-Methyl-1,4-Naphtochinon). Obwohl eine Vielzahl von Verbindungen mit Vitamin-K Wirksamkeit bekannt sind, sind für den menschlichen Stoffwechsel lediglich das Vitamin K1 und das Vitamin K2 von Bedeutung. Vitamin K1 (Phyllochinon) ist als Bestandteil des Photosyntheseapparates in Grünpflanzen enthalten und wird als solches hauptsächlich mit der Nahrung aufgenommen. Die von der Deutschen Gesellschaft für Ernährung empfohlene Tagesdosis Vitamin K beträgt für Erwachsene ca. 60-80 μ g/Tag.

Zur Versorgung mit Vitamin K2 (Menachinon) tragen neben der Aufnahme über die Nahrung, enthalten in Sojabohnen, auch Bakterien des menschlichen Darmtraktes bei, welche eine geringe Menge produzieren und im Intestinum freisetzen (Conly und Stein 1992).

Die K-Vitamine haben eine wichtige Funktion als Kofaktoren der γ -Glutamylcarboxylase. Diese ist für die posttranslationale Carboxylierung von Glutamylresten spezifischer Proteine, sogenannter *γ -carboxylglutamic acid-containing proteins* (glu-Proteine), zuständig. Die glu-Proteine werden durch die Carboxylierung in ihren aktivierten Zustand überführt und in dieser Form als gla-Proteine bezeichnet.

Zur Gruppe der gla-Proteine zählen die Gerinnungsfaktoren II, VII, IX, X, die Gerinnungshemmer, Protein C und Protein S, sowie einige wichtige Proteine des

Knochenstoffwechsels, welche ebenfalls Vitamin K abhängig carboxyliert werden (Soute 1992, Bandyopadhyay 2008). Unter diesen sind vor allem das Osteocalcin und das Matrix Gla-Protein zu nennen. Das Osteocalcin ist ein osteoblastenspezifisches (Hauschka 1975, Price 1988), Kalzium bindendes Protein. Es weist in seiner carboxylierten Form eine erhöhte Affinität zum Hydroxylapatit auf und spielt vermutlich eine wichtige Rolle im Rahmen der Knochenmineralisierung (Hauschka 1982). Es besteht eine enge Korrelation zwischen der Vitamin K Serumkonzentration und dem Anteil an carboxyliertem Osteocalcin im Serum, so dass der Anteil des carboxylierten Osteocalcins auch den Vitamin K Gehalt des Knochens widerspiegelt (Saupe 1993, Vermeer 1995).

Das Vitamin K hat über diesen Mechanismus und einer inhibitorischen Wirkung auf die Osteoclasten Aktivität (Hara 1993, Koshihara 2003) in der Therapie der postmenopausalen Osteoporose an Bedeutung gewonnen. In hohen Dosen verabreicht (ca. 45mg/Tag) konnte in Studien neben einer Erhöhung der carboxylierten Osteocalcin Menge auch eine Senkung der Frakturrate nachgewiesen werden. Die Untersuchung in Bezug auf eine mögliche Steigerung der Knochendichte (bone mineral density, BMD) bei den behandelten Probanden ergab in den einzelnen Studien allerdings kein eindeutiges Ergebnis (Plaza 2005, Kishimoto 2004).

1.4. Der Knochen

1.4.1. Funktion des Knochens

Knochen erfüllt im Organismus Aufgrund seiner Beschaffenheit und seiner metabolischen Aktivität unterschiedliche Funktionen. Neben einer stabilisierenden und protektiven Funktion weist der Knochen eine hohe metabolische Aktivität auf und ist maßgeblich an der Regulation des Mineralhaushaltes beteiligt.

Als Stützgewebe erhält er nicht nur die Form des menschlichen Körpers, sondern unterstützt als Ansatzpunkt für die Muskulatur auch die Bewegung. Die protektive Funktion erfüllt das Skelett in Bezug auf verschiedene Weichteilgewebe und Organe, wie z.B. Herz, Lunge und Gehirn.

Teile des Skelettsystems bieten darüber hinaus Raum für das Knochenmark. Das Knochenmark ist das wichtigste blutbildende Organ des Menschen. Neben dem Knochen sind zu einem sehr geringen Anteil nur die Leber und die Nieren zur Blutbildung befähigt. Beim Neugeborenen füllt das Knochenmark die Markhöhlen beinahe aller Knochen aus, während beim Erwachsenen das blutbildende Organ sich auf wenige platte Knochen, Wirbelkörper, den Beckenknochen und die distalen Anteile der langen Röhrenknochen der Extremitäten

beschränkt, in denen Zellen der erythrozytären, leukozytären und thrombozytären Zelllinie heranreifen.

Der übrige intraossäre Raum, welcher nicht durch blutbildendes Knochenmark ausgefüllt wird, enthält im Stroma im wesentlichen Adypocyten und wird daher als Fettmark bezeichnet. Über spezifische Funktionen des Fettmarks ist noch relativ wenig bekannt.

Im Rahmen seiner Aufgabe als Kalzium- und Phosphatdepot trägt der Knochen entscheidend zur Kalziumhomöostase bei. 99% des Kalziums und 80% des Phosphats im Organismus sind im Knochen gespeichert. Weiterhin enthält der Knochen essentielle Ionen wie Magnesium, Kalium und Carbonat.

Bei der Regulation der Serumkonzentration der einzelnen Mineralien werden insbesondere die Freisetzung von Kalzium und Phosphat aus dem Knochen und die Elimination durch die Niere genau reguliert. Zur Vermittlung zwischen den beteiligten Organen tragen verschiedene Hormone wie zum Beispiel das PTH, Calcitonin und Vitamin D3 bei.

PTH wird von Zellen der Nebenschilddrüse synthetisiert und bewirkt eine Steigerung der Kalziumkonzentration im Serum. Hierzu stimuliert es im Knochen den Abbau der extrazellulären Matrix durch Osteoclasten (Ma 2001), wobei Kalzium und Phosphat freigesetzt werden. In der Niere werden die Rückresorption von Kalzium und die Elimination von Phosphat gesteigert. Im Gegensatz dazu bewirken das Calcitonin aus den C-Zellen der Schilddrüse und das Vitamin D3 aus der Niere über eine Stimulation der Osteoblasten einen gesteigerten Einbau von Kalzium und Phosphat in den Knochen und besonders das Vitamin D3 eine vermehrte Kalzium- und Phosphatresorption im Intestinum (Löffler, G 2001).

1.4.2. Knochenstoffwechsel

Knochen setzt sich aus der extrazellulären Knochengrundsubstanz und den zellulären Bestandteilen zusammen. Die Grundsubstanz, auch als Matrix bezeichnet, enthält einen organischen (22%), einen anorganischen Anteil (70%) und Wasser (8%) (Augat 2006). Knochen ist ein metabolisch sehr dynamisches Gewebe, welches sich durch die Wechselwirkung mit dem systemischen Metabolismus in einem ständigen Umbauprozess befindet (Burr 2002, Ehrlich 2002). Diese Dynamik wird durch Knochen bildende Zellen, den Osteoblasten, und durch Knochen abbauende Zellen, den Osteoclasten, aufrechterhalten.

Knochen bildende Zellen gehen aus mesenchymalen Stammzellen (MSC) des Knochenmarks unter dem Einfluss spezifischer Differenzierungsstimuli hervor und entwickeln sich hierbei über Vorläuferstadien zu reifen Osteoblasten (Aubin 1998, Pittenger 1999). Sie befinden sich zunächst an den Oberflächen der Knochengrundsubstanz. Im Laufe der kontinuierlichen

Neubildung von Knochensubstanz werden die Osteoblasten in die Matrix eingebettet und ändern unter diesem Prozess ihre Funktion. Bereits in Knochensubstanz eingebettete ehemalige Osteoblasten werden als Osteozyten bezeichnet.

Osteozyten liegen innerhalb des Knochens in so genannten Knochenzellhöhlen (lacuna ossea) und stehen über feine Fortsätze miteinander in Verbindung. Sie haben im Vergleich zu Osteoblasten eine geringere metabolische Aktivität. Ihnen wird vor allem eine Funktion als mechanischer Sensor zugesprochen. In den Knochen eingebettet reagieren sie sehr sensitiv auf mechanische Belastung und geben zelluläre Signale an die metabolisch aktiven Zellen an der Knochenoberfläche und im Knochenmark weiter (Lanyon 1993, Aarden 1994). Es konnte für Osteozyten jedoch auch eine Beteiligung am Phosphatstoffwechsel nachgewiesen werden (Bonewald 2007).

Die Knochenbildung selbst beginnt mit der Produktion und Sekretion des organischen Anteils durch stimulierte Osteoblasten. Diese primär nicht mineralisierte extrazelluläre Matrix, auch als Osteoid bezeichnet, wird sekundär mineralisiert. Hierzu sekretieren die Osteoblasten Matrixvesikel mit den anorganischen Bestandteilen in den Extrazellulärraum (Anderson 2003).

Der organische Anteil der Knochensubstanz besteht zu 95% aus Kollagen und zu 5% aus nichtkollagenen Proteinen. Wie in Abbildung 1 dargestellt exprimieren und sezernieren Osteoblasten Kollagen bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt ihrer Differenzierung. Knochenkollagen besteht vorwiegend aus Kollagen Typ I, ein Fibrillen formendes Kollagen der Klasse I. Es bildet eine heterotrimere Struktur, die Tripel-Helix, aus zwei pro- α 1(I)- und einer pro- α 2(I)-Polypeptidkette. Diese Tripel-Helix wird im Verlauf der Synthese durch den Golgi-Apparat geschleust und nach weiterer Aufbereitung als Prokollagen durch Pinozytose in den Extrazellulärraum sezerniert. Prokollagenpeptidasen-C und -N spalten hier die terminalen Propeptide ab, woraufhin die Kollagenmoleküle spontan zu Fibrillen aggregieren. Kollagen wird entlang biomechanischer Kraftlinien angelagert und unterstützt auf diese Weise die spezifischen Funktionen jedes einzelnen Knochens.

Nach der Organisation der Kollagenmoleküle beginnt die Mineralisation des Knochens. Von Bedeutung für die Mineralisierung sind die nichtkollagenen Proteine wie Osteocalcin, Alkalische Phosphatase, Osteonectin, Knochenproteoglykan, und das *bone sialoprotein* (BSP), welche in unterschiedlicher Weise die Mineralisierung des Knochens initiieren und kontrollieren.

Die Mineralisierung des Osteoids geschieht durch Einlagerung der anorganischen Substanz aus den Matrixvesikeln, diese enthält zu 95% Hydroxylapatit ($\text{Ca}_{10}[\text{PO}_4]_6[\text{OH}]_2$) und zu 5%

Magnesium- (Mg), Natrium- (Na), Kalium- (K), Fluor- (F) und Chlor- (CL) Salze. Hierbei wird das Kollagenfasernetz durch Einlagerung von Hydroxylapatitkristallen zu einem widerstandsfähigen Kristallfilz vernetzt.

Die Aktivität der Osteoblasten ist eng mit der Aktivität knochenabbauender Osteoclasten verbunden. Diese auch als *coupling* bezeichnete Verknüpfung bedingt einen ausgewogenen Umbau von Knochensubstanz. Im Laufe des Lebens werden so bei einem gesunden Erwachsenen jährlich ungefähr 10% der Knochenmasse ersetzt.

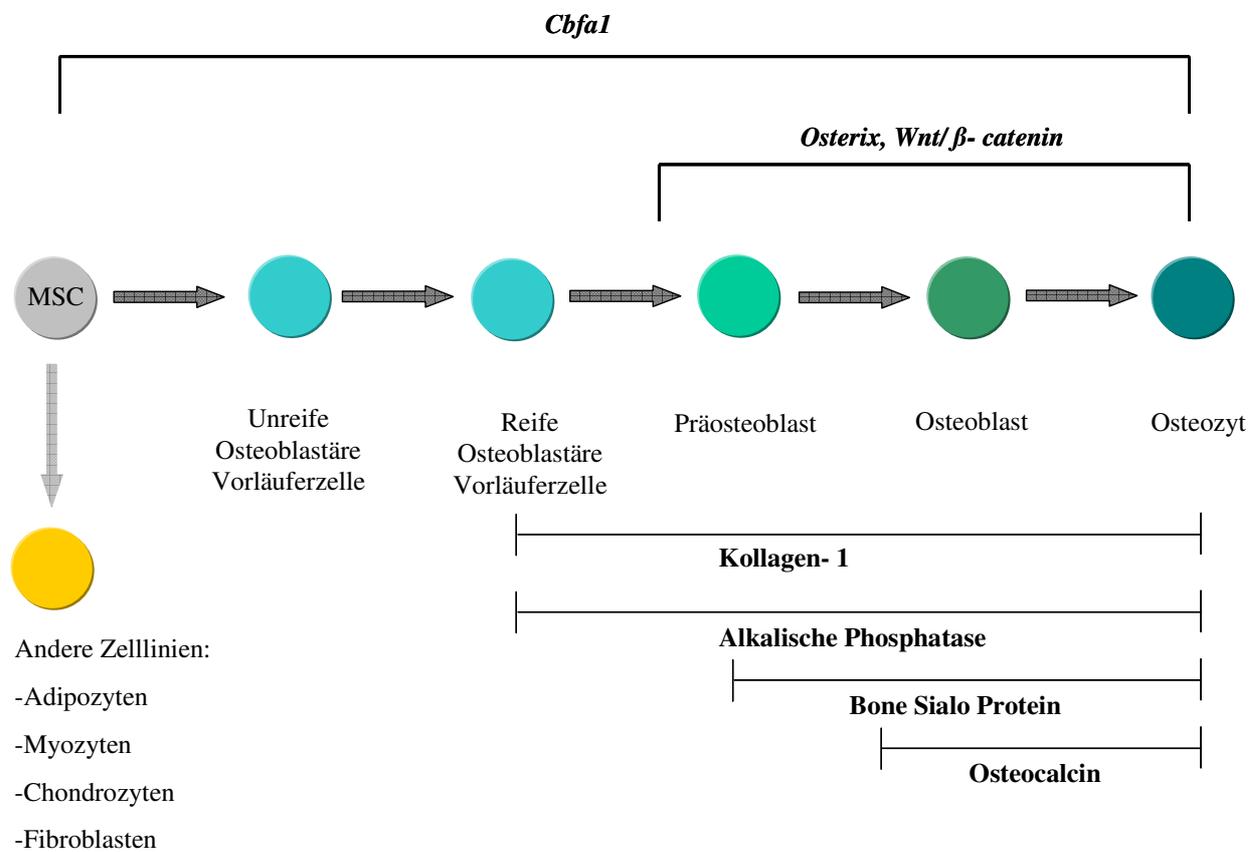
Ursachen für eine Steigerung des Knochenumbaus umfassen Knochenfrakturen, Knochenerkrankungen mit erhöhtem Knochenumsatz, mechanische Belastung und metabolische Veränderungen, welche vor allem den Ca-Wechsel betreffen.

Die katabolen Knochenzellen, Osteoclasten, entstammen der Monozyten-Makrophagen-Zelllinie und sind für die Knochenresorption verantwortlich. Sie befinden sich auf der Knochenoberfläche ebenso wie in sogenannten Howship'schen Resorptionslakunen. Die größte Anzahl von Osteoclasten befindet sich in Gebieten starker Knochenresorption, so z.B. in den Metaphysen der wachsenden Knochen und an Orten, an denen Reparaturvorgänge stattfinden. Osteoclasten sind mit 30 bis 100 µm Durchmesser verhältnismäßig große, mehrkernige Zellen, die bei gesunden Individuen üblicherweise bis zu 10 Kerne aufweisen. Bei pathologischen Veränderungen der Osteoclastenfunktion, wie z.B. beim M. Paget, könnten allerdings auch Zellen mit bis zu 100 Kernen entstehen.

Der genaue Mechanismus der Osteoclasten Aktivierung und Knochenresorption ist noch unklar. Bekannt ist jedoch, dass die erste Phase der Resorption durch Interleukin 1 initiiert wird (Boyce 1989). Weitere Osteoclasten stimulierende Stoffe sind Interleukin 6 (IL-6), Tumornekrosefaktor α (TNF α), Parathormon (PTH), *transforming growth factor* α (TGF α) und Vitamin D3. Als Inhibitoren der Osteoclasten Aktivität fungieren Calcitonin, γ -Interferon und TGF β . Zur Resorption des Knochens bilden aktivierte Osteoclasten proteolytische Enzyme und Wasserstoffionen, welche in einen abgeschlossenen Raum zwischen Knochenoberfläche und dem Bürstensaum der Osteoclasten freigesetzt werden und eine Lösung der Knochensubstanz bewirken.

Der Resorption von Knochensubstanz durch die Osteoclasten folgt die Phase der Reparatur, in der Osteoblastenvorläuferzellen rekrutiert werden und den Defekt durch Bildung von Knochensubstanz wieder ausfüllen. Die Phase der Defektfüllung dauert ungefähr 3 Monate. (Schiebler, T 2002).

Abbildung 1. Stadien der Osteogenen Differenzierung mit Darstellung der Einflussfaktoren und Expression osteoblastärer Markerproteine



1.4.3. Differenzierung von Osteoblasten

Die Differenzierung von Osteoblasten aus mesenchymalen Stammzellen des Knochenmarks unterliegt einem komplexen Zusammenspiel systemischer und lokaler Einflussfaktoren, welche über die Regulation verschiedener Mastergene und Signaltransduktionswege wirken (Aubin 1998; Pittenger 1999).

Zu den wichtigsten bekannten Mastergenen der osteoblastären Differenzierung gehören *Cbfa1* (Ducy 1997, Komori 1997) und *Osterix* (*Osx*) (Nakashima 2002).

1.4.3.1. *Cbfa1*

Cbfa1 oder *runx related transcription factor 2* (*Runx2*), für welches noch weitere Synonyme existieren, ist das humane Homolog zur *Runx*-Proteinfamilie der *Drosophila* (Ogawa 1993, Levanon 1994). Die *Runx*-Proteine zeichnen sich durch eine 128-Aminosäuren lange DNA-Bindungsstelle, der sogenannten *Runx*-Domäne, aus, welche im Laufe der Evolution bis zum Menschen konserviert wurde. Die Expression erfolgt bereits in einem sehr frühen Stadium der

Differenzierung und vermittelt die Bildung von osteochondrogenen Vorläuferzellen im Mesenchym (Ducy 1997, Fang und Hall 1997). Im weiteren Verlauf der Differenzierung nimmt die Expression von Cbfa1 in Osteoblasten kontinuierlich zu, wohingegen die hypertrophen Chondroblasten kaum noch Cbfa1 bilden. Die Expression von Cbfa1 bewirkt in den osteochondrogenen Vorläuferzellen demnach eine Weiterentwicklung in Richtung der osteoblastären Zelllinie.

In Osteoblasten stimuliert Cbfa1 neben der Differenzierung auch die Bildung der Matrixproteine Osteocalcin, Bone Sialoprotein, Kollagen 1 und Alkalische Phosphatase (Geoffroy 1995, Banerjee 1996, Harada 1999, Ducy 2000).

Cbfa1 selbst wird durch verschiedene Wachstumsfaktoren und Signaltransduktionswege reguliert.

Das *bone morphogenic protein-2* (BMP2), ein Mitglied der TGF β -Familie, erhöht die Cbfa1 Aktivität durch Bindung des BMP-Rezeptors 1A/1B. Infolge dieser Rezeptoraktivierung werden sogenannte SMADs phosphoryliert. SMAD 1, SMAD 5 und SMAD 8 werden nach Komplexbildung mit SMAD 4 in den nucleus transloziert und initiieren durch Bindung an die Promotorregion des Cbfa1 Gens seine Expression (Yamamoto 1997). Über denselben Signaltransduktionsweg wirkt auch TGF- β selbst. BMP2 und TGF- β wirken durch die erhöhte Expression von Cbfa1 vor allem in der Frühphase der Knochenbildung.

Im Gegensatz hierzu können das Parathormon (PTH) und der *fibroblast-growth-factor-2* (FGF2), zwei weitere wichtige Regulatoren des Knochenstoffwechsels, Cbfa1 auch direkt durch Phosphorylierung aktivieren (Xiao 2002, Krishnan 2003).

Einen inhibitorischen Einfluss auf die Expression hat im Gegenzug dazu der *tumor necrosis factor* (TNF), welcher die Ubiquitinierung über die Ligasen SMURF-1 und SMURF-2 vermittelt und damit den Abbau des Cbfa1 einleitet (Kaneki 2006).

Die enorme Bedeutung des Cbfa1 für die osteogene Differenzierung wurde vor allem durch die Generierung Cbfa1 defizienter Mäuse verdeutlicht. Homozygote Cbfa1 defiziente Mäuse entwickeln ein knorpeliges Skelett ohne den Nachweis einer Verknöcherung. Sowohl die enchondrale als auch die desmale Ossifikation bleibt aus. In der von Cbfa1 defizienten Tieren gebildeten Knorpelmatrix ist zudem die Vaskularisation und die Einwanderung von MSC gestört. Die Tiere sterben postnatal an einer Ateminsuffizienz, da bedingt durch die fehlende Verknöcherung der Rippen die Atemmechanik beeinträchtigt ist.

Bei der Untersuchung des Skeletts konnten lediglich unreife Osteoblasten nachgewiesen werden, welche die frühen osteoblastären Markerproteine Alkalische Phosphatase und Osteonectin nur in sehr geringen Mengen bilden und späte Markerproteine wie Osteopontin

und Osteocalcin gar nicht exprimieren. Eine Cbfa1 Defizienz lässt demnach die osteogene Differenzierung der MSC in einem sehr frühen Stadium arretieren (Komori 1997).

Bei heterozygoten Tieren kommt es ähnlich wie bei der Cleidocranialen Dysplasie des Menschen zu einer unvollständigen Verknöcherung des Schädelknochens und des Schlüsselbeins (Komori 1997, Otto 1997, Lou 2009).

Die Cleidocraniale Dysplasie beim Menschen beruht auf einer heterozygoten Mutation des Cbfa1 Gens auf Chromosom 6p21 und folgt einem autosomal dominantem Erbgang (Levanon 1994, Mundlos 1995). Sie zeichnet sich durch hypoplastische Claviculae, offene Fontanellen, Zahnfehlbildungen und Kleinwuchs aus (Jarvis und Keats 1974).

Eine Überexpression des Cbfa1 in Mäusen führt zu einer erhöhten Anzahl unvollständig ausgereifter Osteoblasten, welche verstärkt extrazelluläre Knochenmatrix produzieren. Der Mangel an ausgereiften Osteoblasten und Osteozyten führt allerdings zu einer verminderten Organisation des gebildeten Knochens und zusammen mit einer gesteigerten Osteoclasten Aktivität in der Gesamtheit zur Osteopenie und verstärkten Brüchigkeit des Knochens (Liu 2001, Geoffroy 2002). Eine gesteigerte Expression von Cbfa1 beeinträchtigt somit die finale Differenzierung der Osteoblasten.

1.4.3.2. Osterix

Osterix (Osx) ist neben Cbfa1 ein weiterer wesentlicher Transkriptionsfaktor für die Steuerung osteoblastärer Differenzierung. Nakashima et al. beschrieb 2002 erstmalig dieses DNA bindende Protein mit C-terminalen Zink Finger Domänen. Osx wurde unabhängig von der Ossifikationsform in allen Knochen bildenden Zellen nachgewiesen. Obwohl bisher noch keine direkte Interaktion zwischen Osx und Cbfa1 nachgewiesen werden konnte, scheint Osx in der Differenzierungskaskade nachgeschaltet zu sein und in Form eines finalen Differenzierungsstimulus zu wirken (Baek 2008). In Cbfa1 defizienten Mäusen konnte keine Expression von Osterix nachgewiesen werden, wohingegen in Osx defizienten Mäusen sowohl die Cbfa1 Expression als auch die Vaskularisation und MSC Einwanderung stattfindet, allerdings die Verknöcherung der Knorpelmatrix und die Expression später osteoblastärer Markerproteine ausbleibt (Nakashima 2002).

Über die exakten Wirkungsmechanismen und Interaktionspartner von Osx ist bisher wenig bekannt. Osx aktivierende Eigenschaften wurden für den *nuclear factor for activated T cells 2* (NFAT2) beschrieben, welcher dephosphoryliert durch Calcineurin mit Osterix den Kollagen 1 Promotor aktiviert (Koga 2005). Weitere positive Regulatoren der Osx Aktivität sind BMP2, der IGF-1 (Nakashima 2002, Yagi 2003, Celil 2005) und Cbfa1 (Nishio 2006).

Eine Überexpression von *Osx* in murinen Knochenmarksstammzellen bewirkt eine vermehrte Expression osteoblastärer Markerproteine wie Alkalische Phosphatase, Osteopontin, Osteocalcin und *bone sialoprotein* ohne die *Cbfa1* Expression zu steigern (Tu 2006).

1.5. Signaltransduktion und LRP

Neben den oben beschriebenen Transkriptionsfaktoren existieren eine Reihe von Signaltransduktionswegen, welche in unterschiedlicher Form die Differenzierung und Aktivität der Osteoblasten beeinflussen. Unter diesen hat besonders der *wingless* (Wnt)/ β -Catenin Signaltransduktionsweg einen entscheidenden Einfluss auf die osteogene Differenzierung (Westendorf 2004, Rawadi 2003, 2005).

Im Zentrum dieses Signaltransduktionsweges steht das Protein β -Catenin. Es ist im nicht aktivierten Zustand im Zytosol an einen Abbaukomplex bestehend aus *adenomatous poliposis coli* (APC), Axin und der Glykogen Synthase Kinase 3 (GSK3) gebunden (Kishida 1998, Hart 1998). Die Aktivierung des Signaltransduktionsweges führt zur Inhibition der GSK3 und zur Stabilisierung und Akkumulation von β -Catenin im Zytosol (Cardigan 1997, Huelsken 2002). Nach Translokation in den Nucleus bildet β -Catenin als Kofaktor einen Komplex mit den Transkriptionsfaktoren *T cell factor* und *lymphoid enhancer binding factor* (TCF/LEF) und stimuliert die Expression osteoblastärer Proteine wie z.B. Alkalische Phosphatase (Molenaar 1996, Behrens 1996, Rawadi 2003). Diese Signalkaskade wird durch Bindung von Proteinen der Wnt-Familie an Zelloberflächenrezeptoren aktiviert. Zu den Oberflächenrezeptoren gehören Frizzeld (Fz) und einige Lipoproteinrezeptoren. Fz bindet Wnt-Proteine direkt, wobei LRP 5/6 als Kofaktoren fungieren können (He 2004, Moon 2005, Hay 2005). Eine negative Regulation des Signaltransduktionsweges erfolgt über die Familie der *Frizzeld-related proteins* (sFRP) und *Wnt inhibitory factor1* (WIF-1) über eine Interaktion mit Fz, sowie durch Bindung von Dickkopf (Dkk-1,-2,-4) an die LRP- Rezeptoren (Mao 2001, Mao 2002).

Gong et al beschrieb 2002, dass „*loss of function*“ Mutationen des LRP5 Gens zum osteoporosis pseudoglioma Syndrom führen, welche mit einer erhöhten Frakturrate und einer erniedrigten Knochendichte einhergeht. Eine Aktivitätssteigerung durch „*gain of function*“ Mutationen resultieren in einer nachweisbaren Erhöhung der Knochendichte (Boyden et al 2002, Little et al 2002). Ebenso bewirkt die Reduktion negativer Regulationsmechanismen zum Beispiel durch LRP5/6 Mutationen, welche die Bindungsaffinität des Rezeptors zu Dkk-1 erniedrigt, eine Erhöhung der Knochenformationsrate (Boyden et al 2002, Van Wesenbeeck 2003, Ai 2005). Bei Mäusen mit erzeugter sFRP Defizienz konnte neben einer reduzierten

Apoptoserate der Osteoblasten ebenfalls eine erhöhte Knochenformationsrate nachgewiesen werden (Bodine 2004).

1.6. ApoE und Knochen

Der Knochen ist neben der Leber maßgeblich an der postprandialen Lipoproteinaufnahme beteiligt. Obwohl diese Fähigkeit in der Literatur häufig nur dem Knochenmark zugesprochen wird, wurde kürzlich anhand von Mausmodellen gezeigt, dass neben dem Knochenmark auch der Knochen *in vivo* eine erhebliche CR Aufnahmekapazität besitzt (Niemeier 2008). Die Aufnahme der CR in Osteoblasten erfolgt ApoE vermittelt (Lamon-Fava 1998).

Ein Grund für den hohen Bedarf der Osteoblasten an CR könnte neben der Versorgung mit Lipiden in gewissem Maße auch der Bedarf an Vitamin K sein. Vitamin K ist als Kofaktor an der Carboxylierung osteoblastärer Proteine beteiligt. Newman et al hat 2002 gezeigt, dass Vitamin K1 angereicherte CR *in vitro* von Osteoblasten aufgenommen werden und dadurch eine vermehrte Carboxylierung des exprimierten Osteocalcins erreicht wird. *In vitro* reichert sich Osteocalcin in den Mineralisierungszonen des Osteoids an und zeigt in seiner carboxylierten Form eine erhöhte Affinität zum Hydroxylapatit (Hauschka 1982, Gerstenfeld 1987). Zudem korreliert bei Frauen eine gesteigerte Serumkonzentration des untercarboxylierten Osteocalcins im positiven Sinne mit einer erhöhten Frakturrate (Szulc 1993). Die ApoE vermittelte Vitamin K Aufnahme ist demnach für die Knochengesundheit von besonderer Bedeutung.

Abgesehen von dieser „nutritiven“ Funktion scheint das ApoE allerdings auch selbst Effekte auf den Knochenstoffwechsel zu haben. Eine in der Literatur recht kontrovers diskutierte Annahme ist die Assoziation eines ApoE Genotyps, als prädisponierender Faktor, mit der Entstehung der Osteoporose und der damit verbundenen Erhöhung der Frakturrate unter gesteigertem Substanzverlust.

Es wurde hierzu unter anderem eine klinische Studie mit 284 postmenopausalen Japanerinnen durchgeführt. Die Gruppeneinteilung erfolgte gemäß der Phänotypisierung nach homozygotem oder heterozygotem ApoE 4 Genotyp und einer damit vergleichbaren Gruppe ohne Apo ϵ 4 Allel. Die Studie ergab eine verminderte Knochendichte der lumbalen Wirbelkörper in der Apo ϵ 4 Allel tragenden Gruppen und eine erhöhte Osteocalcin Serumkonzentration in der selbigen (Shikari 1997). Zu einem ähnlichen Ergebnis gelangten Kohlmeier et al bereits 1998. Hier ergab die Untersuchung von 219 Hämodialyse Patienten ein gehäuftes Auftreten von Frakturen bei Probanden, bei welchen das Apo ϵ 4 Allel nachgewiesen werden konnte. Schoofs et al (2004) und Zajckova et al. (2003) hingegen

konnten in entsprechenden Studien keine eindeutige Korrelation zwischen erhöhter Frakturrate beziehungsweise verminderter Knochendichte und dem ApoE 4 Genotyp feststellen. Obwohl sich eine Vielzahl von Studien mit dieser Fragestellung beschäftigt haben, sind in der Gesamtheit keine einheitlichen Ergebnisse zustande gekommen. Eine mögliche Erklärung wäre wohlmöglich, dass in der Vielzahl der Einflussfaktoren des Knochen sich in vivo nur schwer einzelne Effekte untersuchen lassen.

Dass es dennoch einen ApoE abhängigen Effekt auf den Knochenstoffwechsel geben könnte machen die Beobachtungen der Gruppe um Schilling et al. deutlich. Sie konnten nachweisen, dass zum einen ApoE von Osteoblasten in hohem Maße exprimiert wird und zum anderen ApoE defiziente Mäuse eine erhöhte Knochenformationsrate aufweisen (Schilling 2005). Diese Beobachtung scheint im Gegensatz zur eingangs dargestellten Funktion des ApoE, als Transportprotein von Vitamin K beladenen CR, zu stehen und macht deutlich, dass das ApoE selbst einen negativen Effekt auf die Osteoblastenfunktion ausübt. Ähnliche Effekte des ApoE wurden bereits im Zusammenhang mit anderen Zellsystemen beschrieben. So hat Caruso et al. 2006 einen Isoformspezifischen inhibitorischen Effekt des ApoE auf ein Neuronenzellsystem beschrieben, welcher über den Wnt/ β -Catenin Signaltransduktionsweg vermittelt wird. Ebenso wurde bereits von einem antiproliferativen Effekt durch Modulation des MAPKinase Signaltransduktionsweges in verschiedenen Zellsystemen berichtet (Ho 2001).

2. Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war, mit molekularbiologischen, biochemischen und zellbiologischen Ansätzen zu zeigen, ob ApoE im humanen und im murinen System einen möglichen inhibitorischen Effekt auf die Differenzierung und Aktivität von Osteoblasten besitzt. Zudem sollen isoformspezifische Unterschiede der einzelnen ApoE Isoformen untersucht werden.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Geräte

CO₂-Brutschrank APT Line CB der Firma Binder GmbH

Digitalkamera IXUS 65 der Firma Canon

ELISA-Reader MRX Microplate reader der Firma Dynatech Laboratories

Elektrophoresekammer Wide Mini-Sub Cell GT der Firma BioRad

Feinwaage BP 410S der Firma Sartorius

γ -Counter automatic gamma counter LKB-Wallac CliniGamma 1272 (Wallac, PerkinElmer, USA)

Mikroskope - Lichtmikroskop CKX31 der Firma Olympus

Photometer BioPhotometer der Firma Eppendorf

Pipettierhilfe Accujet der Firma Brand

Power Supply Power PAC 200 der Firma BioRad

Schüttler Unitron der Firma Infors HAT

Sicherheitswerkbank Klasse 2 Hera Safe der Firma Heraeus

Thermocycler TS der Firma Biometra

Thermomixer compact der Firma Eppendorf

UV-Detektor mit Digitalkamera Bachhofer Laboratoriumsgeräte BDA Digital Biometra

Vortexer REAX 2000 der Firma Heidolph

Wärmebad der Firma GFL

Wärmekasten der Firma Heraeus

Zählkammer von Neubauer

Zentrifugen - Tischzentrifuge Typ 1-15 K der Firma Sigma

Laborzentrifuge Rotana TRC der Firma Hettich

3.1.2. Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben alle Chemikalien in analytischer Reinheit Invitrogen, Merck, Serva, Sigma

1 α , 25 Dihydroxycholecalciferol der Firma Sigma

2- Mercaptophenol der Firma Serva

Albumin bovine Fraction der Firma Serva

Alkaline Buffer Solution 1,5M der Firma Sigma-Aldrich
AntifectN liquid der Firma Schülke Mayr
Aqua ad iniectabile der Firma Braun
Ascorbinsäure der Firma Merck
Collagenase Typ 1A from Clostridium histolyticum der Firma Sigma
Diethylether der Firma Roth
Dispase from Bacillus Polymyxa der Firma Invitrogen
DPBS der Firma Gibco (Invitrogen)
Ethidiumbromid der Firma Sigma
Fetal Bovine Serum Hyclone der Firma Perbio
Folin-Ciocalteu-Phenolreagenz der Firma Merck
Gla-type osetocalcin EIA Kit der Firma TaKaRa
Glycerol-2-phosphate der Firma Sigma
LE Agarose der Firma SaeKem
Marker 100 bp der Firma Invitrogen
Minimum essential medium alpha-Modifizierung der Firma Sigma
Mouse Osteocalcin IRMA Kit der Firma Immutopics
NucleoSpin RNA II der Firma Machrey-Nagel
Penicillin/Streptomycin der Firma Invitrogen
Phosphatase Substrate der Firma Sigma-Aldrich
P-Nitrophenol Standard Solution der Firma Sigma-Aldrich
p-Phenylendiamin (PPD) der Firma Merck
Undercarboxylated Osteocalcin EIA Kit der Firma TaKaRa

PCR-Reagenzien:

PCR-Primer der Firma MWG-Biotech AG

GAPDH: 452 bp

for 5`-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3`; rev 5`-TTC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3`

Collagen TypeI: 599 bp

for 5`-TGA CGA GAC CAA GAA CTG-3`; rev 5`-CCA TCC AAA CCA CTG AAA CC-3`

Osteocalcin: 310 bp

for 5`-CAT GAG AGC CCT CAC-3`; rev 5`-AGA GCG ACA CCC TAG AC-3`

Alkalische Phosphatase: 475 bp

for 5`-ACG TGG CTA AGA ATG TCA TC-3`; rev 5`-CTG GTA GGC GAT GTC CTT A-3`

10x PCR Buffer der Firma Invitrogen

MgCl₂ 50mM der Firma Invitrogen

dNTP's der Firma Invitrogen

Taq Polymerase der Firma Invitrogen

3.1.3. Zelllinie

Tert 20 (MK Justensen 2002 nature biotech)

PrimäreOB aus ApoE ko Mauslinie

3.1.4. Mauslinie

ApoE defiziente Mäuse und Wildtypmäuse der Linie C57bl6 (Jackson)

3.2. Methoden

3.2.1. Serumanalysen ApoE defizienter Mäuse

3.2.1.1. Blutentnahme und Serumgewinnung

Die Blutentnahmen erfolgten aufgrund der zirkadianen Rhythmik des Osteocalcins zu denselben Tageszeiten.

Die Mäuse wurden mit einer intraperitonealen Injektion von 150 bis 200µl Narkoselösung bestehend aus Ketanest und Rompun schlafen gelegt. Die Lösung wurde aus 1ml Rompun [2%], 2,3ml Ketanest [100mg/ml] und 10ml NaCL-Lösung hergestellt. Das Blut wurde nach Eröffnung des Thorax mit Hilfe einer Spritze aus dem linken Herzventrikel entnommen. Nach einer Gerinnungszeit von 10 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Blutproben bei 10.000 RPM in der Zentrifuge für 10 Minuten abesert. Das erhaltene Serum wurde dann bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert.

3.2.1.2. Bestimmung der Osteocalcin Serumkonzentration

Die Osteocalcin Messung erfolgte mit Hilfe des Mouse Osteocalcin IRMA-Kits der Firma Immutopics.

Den Herstellerangaben entsprechend wurden die Serumproben in einem Verhältnis von 1:11 mit der enthaltenen *sample diluent*- Lösung verdünnt. 25µl dieser Probenlösung wurden anschließend mit 200µl der Jod-125 markierten Zweitantikörperlösung in einem Gammacounterröhrchen vermischt. Nach Zugabe der Antikörper beschichteten Beads folgte eine Inkubationszeit von 18-21h bei Raumtemperatur auf einem Schüttler bei leichter Rotation.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden alle Proben jeweils drei Mal mit je 2ml Waschlösung gewaschen. Die Messung der Radioaktivität erfolgte im Gammacounter mit einer Messzeit von 1 min/Probe. Die endgültigen Probenkonzentrationen konnten anschließend anhand der im Kit enthaltenen Osteocalcin Standardreihe ermittelt werden.

3.2.1.3. Bestimmung der Alkalischen Phosphatase Aktivität im Serum

Die Alkalische Phosphatase Aktivität im Serum wurde anhand des Umsatzes von para-nitrophenol- phosphat (Sigma) als Substrat zu para-nitrophenol bestimmt.

Hierzu wurden anlehnend an die Herstellerangaben zunächst 40mg paranitrophenolphosphat (Sigma) in 10 ml destilliertem Wasser gelöst und anschließend mit der Alkaline Buffer Solution (Sigma; 2-Amino-2-methyl-1-propanol, 1,5mol/l, pH 10,3) in einem Verhältnis von 1:2 vermischt. Die Substratlösung wurde im Wasserbad auf 37°C erwärmt. 5µl Serum wurden mit 50µl der vorbereiteten Substratlösung für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 0,5ml 0,05M NaOH wurden 250 µl in eine Mikrotiterplatte überführt und im Photometer bei 405nm gemessen. Die entsprechende Standardreihe wurde mit p-nitrophenol (Sigma) erstellt. Die Aktivität wurde nach den Angaben des Herstellers in Sigma Units /ml angegeben, wobei 1 Sigma Unit einem Umsatz von 1µMol p-nitrophenol /h entspricht.

3.2.1.4. Gesamtcholesterin Bestimmung im Serum

Zur Bestimmung der Gesamtcholesterin Konzentration im Serum wurden die Serumproben zunächst mit PBS in einem Verhältnis von 1:50 verdünnt. 100 µl dieser Probenlösung wurden anschließend in eine 96 Well Platte überführt und mit 200µl Cholesterin Reagenz (Cholesterin CHOD-PAP) der Firma Roche versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 15 min. bei 37°C wurden die Extinktionen im Photometer bei einer Wellenlänge von 540 nm bestimmt. Die endgültigen Konzentrationen wurden anhand der mitgeführten Standardreihe aus Precipath L der Firma Roche ermittelt.

3.2.2. Untersuchung primärer Osteoblasten aus ApoE defizienten Mäusen

3.2.2.1. Isolierung primärer Osteoblasten und Kultivierung

Zur Isolierung von primären Osteoblasten wurden drei bis vier Tage Alte Neugeborene aus der ApoE defizienten Mauslinie verwendet.

Die Jungtiere wurden zunächst in einem Becherglas mit verdampfendem Diethyläther schlafen gelegt und anschließend in einem Bad aus Antifect-Lösung desinfiziert.

Die Osteoblasten wurden aus den Calvarien gewonnen, wobei lediglich die beiden an der Längsnaht liegenden parietalen Kalottenanteile verwendet wurden. Die Präparation der Schädelplatten erfolgte unter der sterilen Werkbank. Nachdem Blut und Geweberückstände vorsichtig entfernt wurden, wurden die Calvarien bis zum darauf folgenden Verdau in einem Falcon mit 50ml PBS auf Eis gelagert. Für den Verdau wurde eine Digestionslösung aus 50ml α -MEM Medium mit 50mg Kollagenase Typ 1A (Sigma) und 100mg Dispase 2 (Roche) hergestellt. Nach der sterilen Filtration mit Spritzenaufsatzfiltern (Porengröße von 0,2 μ m) wurde das Digestionsmedium im Wasserbad auf 37°C erwärmt.

Zu Beginn der Digestionsschritte wurde zunächst das PBS abgesaugt und die Calvarien mit 10ml des erwärmten Digestionsmediums übergossen. Das Falcon wurde anschließend im Orbitalshaker bei 37°C und 180 RPM für 10 Minuten geschüttelt. Der Überstand wurde bei den ersten zwei Durchläufen verworfen, so dass nur in den letzten drei die Überstände gesammelt wurden. Nach insgesamt fünf Durchläufen von je zehn Minuten wurde die gesammelte Zellsuspension über einen Cellstrainer (0,45 μ m) gefiltert und bei 1300RPM (Rotanta) für 5 Minuten abzentrifugiert. Das erhaltene Zellpellet wurde je nach erwarteter Zellzahl in einem oder zwei ml Zellkulturmedium (α -MEM mit 10% FBS und 1% PS) resuspendiert und anschließend die Zellzahl in einer Neubauerzählkammer bestimmt.

Je nach Experiment wurden die Zellen Wahlweise auf 6-well oder 12-well Zellkulturplatten mit einer Zelldichte von 7500 Zellen/ cm² aus gesetzt, wobei das Medium erst nach 24h und im weiteren alle drei Tage erneuert wurde. Die Zellen wurden in 1ml Medium auf 12-well Platten und in 2ml Medium auf 6-well Platten im Zellinkubator bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Sobald die kultivierten Zellen eine Konfluenz von circa 80% erreicht hatten (nach etwa drei bis vier Tage), wurde die Mineralisierung durch Anreicherung des Mediums mit 10mM β -Glycerophosphat (Sigma) und 0,01mg/ml Ascorbat (Merck) eingeleitet. Die Mineralisierung erstreckte sich über einen Zeitraum von 30 Tage, wobei im Abstand von drei Tagen das Induktionsmedium erneuert wurde. Das Ernten der Zellen und die Sammlung der Zellkulturüberstände erfolgte im Abstand von sechs Tagen (d0, d6, d12, d18, d24, d30). Die Probe an d0 wurde in Medium ohne Mineralisierungszusätze kultiviert und bereits nach drei Tagen geerntet. Die Lagerung der Proben erfolgte bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C.

3.2.2.2. Osteocalcin Konzentration im Zellkulturüberstand

Zur Bestimmung der Osteocalcin Konzentration wurde ebenfalls der Mouse Osteocalcin IRMA-Kit der Firma Immotopics verwendet.

Um zu gewährleisten, dass die Proben im messbaren Bereich bleiben, wurden die Proben an d0 und d6 unverdünnt, an d12 Probe 1:2 und die Proben an d18 bis d30 in einem Verhältnis von 1:4 mit der im Kit enthaltenen Verdünnungslösung vermischt und der Herstelleranleitung folgend gemessen.

Die endgültige Osteocalcin Konzentration wurde anhand der mitgeführten Osteocalcin Standardreihe rechnerisch ermittelt.

Die Bestimmung des Anteils an untercarboxyliertem und carboxyliertem Osteocalcin von der Gesamtmenge erfolgte Mittels Hydroxyapatit Waschung. Bei dieser Methode wird die erhöhte Bindungsaffinität des carboxylierten Osteocalcins zum Hydroxyapatit ausgenutzt, so dass während einer Inkubation mit Hydroxylapatit Kristallen das carboxylierte Osteocalcin aus dem Medium gebunden wird und im Überstand das untercarboxylierte Osteocalcin bestimmt werden kann. Hierzu wurden 100 μ des zu messenden Zellkulturüberstandes im Verhältnis von 1:2 mit einer Hydroxylapatit Lösung der Firma Sigma in einer Konzentration von 5 μ g/ μ l vermischt. Anschließend erfolgte die Inkubation der Suspension für 60 Minuten bei 4°C auf einem *end over end rotator* bei gleichmäßiger Rotation. Nach der Inkubation wurde der Hydroxyapatit Anteil der Suspension in einer Tischzentrifuge für 2 Minuten bei 10.000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand, welcher nach der Inkubation mit dem Hydroxyapatit das untercarboxylierte Osteocalcin enthält, wurde vorsichtig abgenommen und wie Eingangs beschrieben in dem Osteocalcin IRMA-Kit vermessen. Der Anteil an carboxyliertem Osteocalcin wurde rechnerisch als Differenz des untercarboxylierten zum Gesamtosteocalcin bestimmt.

3.2.2.3. Alkalische Phosphatase Aktivität im Zellkulturüberstand

Zur Messung der Alkalischen Phosphatase Aktivität im Zellkulturüberstand wurde die Herstelleranleitung in leicht abgewandelter Form angewendet.

10 μ l des Zellkulturüberstandes wurden mit 50 μ l Substratlösung, bestehend aus para-nitrophenolphosphat und Alkaline Buffer Solution im Verhältnis 1:2, für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 0,5ml 0,05N NaOH Lösung gestoppt. 250 μ l der Messlösung wurden anschließend in einer Mikrotiterplatte im Photometer bei einer Wellenlänge von 405nm gemessen. Die Aktivitätsbestimmung erfolgte anhand des von dem Hersteller angegebenen Standardverdünnungsschemas von para-nitrophenol (Sigma). Die Aktivität wurde anlehnend an die Herstellerangaben in Sigma Units /ml angegeben, wobei 1 Sigma Unit einem Umsatz von 1 μ Mol p-nitrophenol /h entspricht.

3.2.3. In vitro Experimente mit humanen Mesenchymalen Stammzellen

3.2.3.1. hMSC Tert20 Differenzierung und ApoE Induktion

Für die im Folgenden beschriebenen in vitro Experimente wurden humane Mesenchymale Stammzellen (hMSC) verwendet, welche durch retrovirale Transfektion der katalytischen Untereinheit von Telomerase immortalisiert wurden (hMSC-Tert). Die Zellen zeichnen sich durch eine weitgehend einheitliche Morphologie und einem normalen Karyotyp aus, welcher in Kultur keine Malignitätszeichen aufweist (Simonsen 2002). Die Zellen wurden in DMEM mit 10% FCS (GIBCO) und 1% Streptomycin/ Penicillin bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

Die Experimente für die Supplementierung mit den rekombinanten ApoE Isoformen wurden nach folgendem Schema durchgeführt:

Es wurden für jeden Datenpunkt jeweils drei Wells einer 6-well Zellkulturplatte mit einer Zelldichte von 2000 Zellen/cm² angesetzt.

Nach 24h wurden die Zellen mit PBS gewaschen und die osteoblastäre Differenzierung durch Zugabe von 10 nM 1,25-Dihydroxycholecalciferol in 2ml DMEM Medium eingeleitet. Die Differenzierung erfolgte insgesamt über einen Zeitraum von 6 Tagen. Die Datenpunkte umfassten d0, welcher als Basalwert ohne Vitamin D₃ kultiviert wurde, d6 mit der endgültigen Differenzierung unter Vitamin D₃ für 6 Tage und einen Datenpunkt an d6 für die jede der drei ApoE Isoformen. Die Zugabe der rekombinanten ApoE Isoformen, ApoE 2, E 3, E 4) erfolgte für die letzten 48h der Differenzierung (ab d4) in einer Konzentration von [10 µg/ml] pro Isoform in 1ml Medium.

An Tag 6 wurden die Überstände gesammelt, die Zellen geerntet und in der Kühlzentrifuge bei 2500 RPM und 4°C sedimentiert. Jeweils drei Proben der Zellkulturüberstände und der Zellpellets wurden für jeden Datenpunkt vereinigt und anschließend bei -20°C gelagert.

3.2.3.2. mRNA Isolation und cDNA Synthese

Die mRNA wurde aus einem Well einer 6-Wellplatte für jeden Datenpunkt mit dem NucleoSpin RNA II-Kit der Firma Machery-Nagel isoliert.

Zur c-DNA Synthese wurde 1µl der erhaltenen mRNA Lösung mit 1µl oligo dT, 1µl RNase Inhibitor und 2µl sterilem Wasser in einem Thermoblock für 10 Minuten bei 70°C erhitzt und anschließend auf Eis gelegt. Die Proben wurden nach Abkühlung kurz an zentrifugiert.

Indem darauf folgenden Schritt wurden der Lösung 4µl [5x] first strand buffer (Invitrogen), 2µl 0,1M DTT, 1µl dNTP-Mix mit einer Konzentration von [10mM/dNTP], 7µl steriles Wasser und 1µl MMLV zugegeben. Die Erhaltene Lösung wurde kurz durchmischt und

anschließend im Heizblock für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Zur Messung der cDNA Konzentration wurden 2µl der cDNA Lösung mit sterilem Wasser in einem Verhältnis von 1:100 verdünnt und in dem Tischphotometer vermessen. Alle Proben wurden im Anschluss mit Wasser im entsprechenden Verhältnis auf eine Konzentration von 1µg/µl c-DNA verdünnt um in die PCR einzugehen.

3.2.3.3. RT-PCR und Agarosegelelektrophorese

Die RT-PCR wurde mit spezifischen Primern für Osteocalcin (OCN), Alkalische Phosphatase (ALP), Kollagen1 (Col1) als Differenzierungsmarker und GAPDH als Ladekontrolle durchgeführt. Folgendes Pipettierschema wurde hierfür angewendet:

- 1µg Template [1µg/µl]
- + 2,5µl 10x PCR-Puffer (Invitrogen)
- + 1µl MgCl₂ [50mM]
- + 1µl dNTP's [10mM] (Invitrogen)
- + 17µl steriles Wasser
- + 1µl Primer for [20pmol]
- + 1 µl Primer rev [20pmol]
- + 0,5µl Taq-Polymerase (Invitrogen)

Für günstige Reaktionsbedingungen sorgte anschließend der Thermocycler mit folgenden Programmen für die einzelnen Primer:

GAPDH /OCN:

- 5min 95°C
- 30 sec. 95°C mit 40 Zyklen
- 30 sec. 65°C
- 30 sec. 72°C
- 7min 72°C

ALP/ COL1:

- 5min 95°C
- 30 sec. 95°C mit 40 Zyklen
- 30 sec. 60°C
- 60 sec. 72°C
- 7min 72°C

Von den PCR Produkten wurden unterschiedliche Mengen (GAPDH 6µl, ALP 15µl, OCN 10µl und Col1 10µl) mit 6x Loading Dye (Fermentas) versetzt und auf ein 1,5%iges Agarose

Gel aufgetragen. Als Größenmarker wurde der DNA Ladder-Mix der Firma Fermentas verwendet. Die Auftrennung erfolgte in TBE Puffer mittels Elektrophoresekammer bei 120mA für circa 1h. Nachfolgend wurden die Produkte durch eine Ethidiumbromid-Färbung [0,3‰] dargestellt und auf einem UV-Tisch mit Digitalkamera dokumentiert.

3.2.3.4. Gesamtzellprotein Isolation und Protein Bestimmung

Für die Gesamtzellprotein Isolation wurden die Zellpellets in 50mM Tris, pH8.0, 2mM CaCl₂ und 1% TritonX100 lysiert und in einer Eppendorf Tischzentrifuge 5 Minuten bei 4000 RPM sedimentiert. Der proteinhaltige Überstand wurde nachfolgend bei -20°C aufbewahrt.

Die Bestimmung des Gesamtzellproteins und des Proteingehaltes im Zellkulturüberstand erfolgte nach der Methode von Lowry (Lowry 1951).

Eingesetzt wurden hierbei jeweils 2µl der Zellprotein Lösung und 5µl des Kulturüberstandes. Die Proben wurden mit 0,1N NaOH Lösung auf 100µl aufgefüllt, mit 1ml Lowry-Lösung vermischt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 100µl 1:2 mit Bidest verdünntes Folinreagenz hinzugefügt und der Ansatz für 30 Minuten Dunkel gestellt. Die Messung der Proteinkonzentration erfolgte in einem Volumen von 300µl Probe in einer 96-well Platte im Photometer bei einer Wellenlänge von 760nm. Zur Erstellung einer Standardkurve wurde eine Verdünnungsreihe aus Bovine Albumin (Perbio) mitgeführt. Diese ermöglichte im Anschluss die Kalkulation der Proteinkonzentration Anhand der bekannten Albumin Konzentration.

3.2.3.5. Gla-/ Glu-Osteocalcin Bestimmung

Die OCN Konzentration wurde durch getrennte Messung des untercarboxylierten und carboxylierten Osteocalcins mit einem jeweils spezifischen Elisa-Kit der Firma TaKaRa bestimmt. Für die Messung sind 100µl Gesamtzellprotein [0,5mg/ml] und selbiges Volumen an Zellkulturüberstand mit einer Vorverdünnung von 1:10 eingesetzt worden. Die photometrische Messung erfolgte bei 450nm. Aus den erhaltenen Werten wurde nachträglich die Gesamt OCN Menge errechnet.

3.2.3.6. Bestimmung der Alkalischen Phosphatase Aktivität

Die Bestimmung der Alkalischen Phosphatase Aktivität wurde analog zu den Messungen aus dem Experiment mit den primären Osteoblasten durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.1. Effekt der Isoformen ApoE 2, ApoE 3 und ApoE 4 auf die osteogene Differenzierung humaner mesenchymaler Stammzellen

Einige klinische Studien zeigen, dass der ApoE 4 Genotyp mit einer erhöhten Frakturrate und vor allem einer Abnahme der Knochendichte einhergeht (Shiraki 1997, Sanada 1998, Kohlmeier 1999, Cauley 1999, Johnston 1999, Salomone 2000, Plujim 2002, Dieck 2002).

Eine Abnahme der Knochendichte kann unterschiedliche Ursachen haben. Sie kann z.B. aus einer erniedrigten Osteoblastenaktivität resultieren. Um zu untersuchen, ob das ApoE einen negativen Effekt auf die Differenzierung und Aktivität von Osteoblasten ausübt und ob dieser potentielle Effekt Isoform abhängig ist, wurden die nachfolgenden Experimente durchgeführt. Die immortalisierte humane mesenchymale Knochenmarksstammzelllinie hMSC-Tert20 wurde durch Zugabe von 1α ,25-Dihydroxycholecalciferol (Vitamin D3) für sechs Tage osteogen differenziert (Simonsen 2002). Ab dem vierten Tag der Differenzierung (d4) wurden dem Medium für die letzten 48 Stunden rekombinante ApoE Isoformen E 2, E 3 oder E 4 in einer Konzentration von 10 μ g/ml zugesetzt. Als Kontrolle wurden Zellen unter identischen Bedingungen, aber ohne ApoE Zugabe kultiviert.

4.1.1. Effekt von ApoE Isoformen auf mRNA Expression osteogener Differenzierungsmarker

Die osteogene Differenzierung wurde mittels RT-PCR durch die gesteigerte Expression osteogener Marker wie Col1, Alkalischer Phosphatase und Osteocalcin von Tag 0 (d0) bis Tag 6 (d6) der Differenzierung nachgewiesen (Owen 1990). Als Ladekontrolle auf den Agarosegelen der PCR-Produkte wurde GAPDH verwendet. Die Experimente wurden drei Mal mit vergleichbaren Ergebnissen wiederholt.

In Abbildung 2 ist für jedes untersuchte Gen exemplarisch jeweils ein Gel abgebildet. Col1 wird als früher osteogener Marker bereits an d0 der Differenzierung im Vergleich zu d6 in relativ hohem Maße exprimiert. Hier ist keine eindeutige Verminderung durch ApoE zu erkennen.

Die mRNA Expression der späteren osteogenen Differenzierungsmarker wie Osteocalcin und Alkalische Phosphatase werden im Verlauf der sechs Tage deutlich gesteigert. Sie werden durch die Zugabe der rekombinanten ApoE Isoformen unterschiedlich stark inhibiert. Die Osteocalcin Expression steigt von d0 (ganz links) nach d6 (ganz rechts) deutlich an.

Rekombinantes ApoE 2 und E 3 bewirken an d6 eine leichte Inhibition. Bei ApoE 4 ist der inhibitorische Effekt eindeutig am stärksten ausgeprägt.

In ähnlicher Weise wird die Alkalische Phosphatase Expression beeinflusst. Im Gegensatz zu den differenzierten Kontrollzellen an d6, ist bei den mit ApoE 4 inkubierten Zellen kein Signal und bei ApoE 2 und E 3 Inkubation an d6 lediglich ein schwaches Signal zu erkennen.

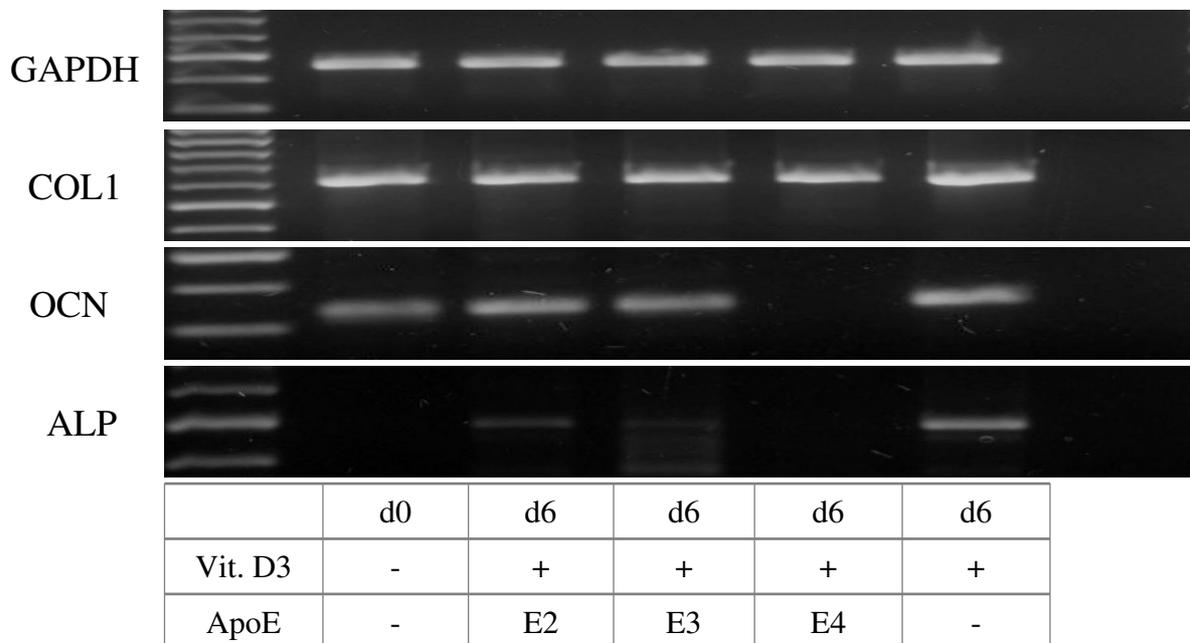


Abbildung 2

RT-PCR der osteogenen Differenzierungsmarker: Col1, Osteocalcin und Alkalische Phosphatase

hMSC-Tert20 Zellen vor (ohne Vit. D3= d0) und nach osteogener Differenzierung mit Vitamin D3 für 6 Tage (d6). Inkubation mit der ApoE 2, E 3 oder E 4 jeweils [10µg/ml] für die letzten 48 h der Differenzierung. Die Abbildung zeigt jeweils ein exemplarisches Gel von insgesamt 3 Wiederholungen.

4.1.2. ApoE Effekt auf die Proteinexpression osteogener Differenzierungsmarker

Nachfolgend wurde untersucht inwiefern sich der auf mRNA Ebene beobachtete Effekt der ApoE Isoformen in der Proteinexpression widerspiegelt. Dazu wurden im gleichen experimentellen Ansatz die Alkalische Phosphatase Aktivität und die Konzentrationen von untercarboxyliertem bzw. carboxyliertem Osteocalcin bestimmt. Die Abbildungen 2 bis 6 zeigen Mittelwerte mit Standardabweichungen aus jeweils acht unabhängigen Experimenten, wobei jeder einzelne Datenpunkt pro Experiment in Doppelwerten gemessen wurde. Die Konzentrationen von untercarboxyliertem (glu-OCN) und carboxyliertem (gla-OCN) Osteocalcin wurden aus Gesamtzellprotein und im Medium gemessen. Die Gesamtosteocalcin Konzentration wurde nachträglich rechnerisch bestimmt.

Abbildung 3 zeigt die intrazelluläre Osteocalcin Konzentration nach osteogener Differenzierung (d6) und im Vergleich dazu die Kulturen, welche im Verlauf der Differenzierung für die letzten 48 h mit rekombinantem ApoE 2, E 3, oder E 4 in einer

Konzentration von 10 µg/ml inkubiert wurden. Die intrazellulär gemessene Osteocalcin Konzentration wurde auf das entsprechende Gesamtzellprotein (GZP) normiert und ist in ng Osteocalcin pro mg GZP dargestellt.

Es zeigt sich intrazellulär eine unterschiedlich starke Inhibition der Proteinexpression durch die ApoE Isoformen. Nach der Differenzierung erfolgte eine signifikante Steigerung der Osteocalcin Konzentration von 14,2 (+/- 5,4) ng/mg GZP an d0 (weißer Balken) auf 25,3 (+/- 5,7) ng/mg GZP an d6 (grauer Balken). Eine signifikante Reduktion bewirkte die Zugabe von ApoE 4 (blauer Balken) auf Werte um 17,0 (+/- 5,3) ng/mg GZP ($p = 0,01$). Die Werte für ApoE 2 (roter Balken) und E 3 (grüner Balken) liegen im Mittel etwa in der gleichen Größenordnung, für ApoE 2 bei 18,5 (+/- 5,5) ng/mg GZP ($p = 0,04$) und für E 3 bei 18,2 (+/- 5,6) ng/mg GZP ($p = 0,03$).

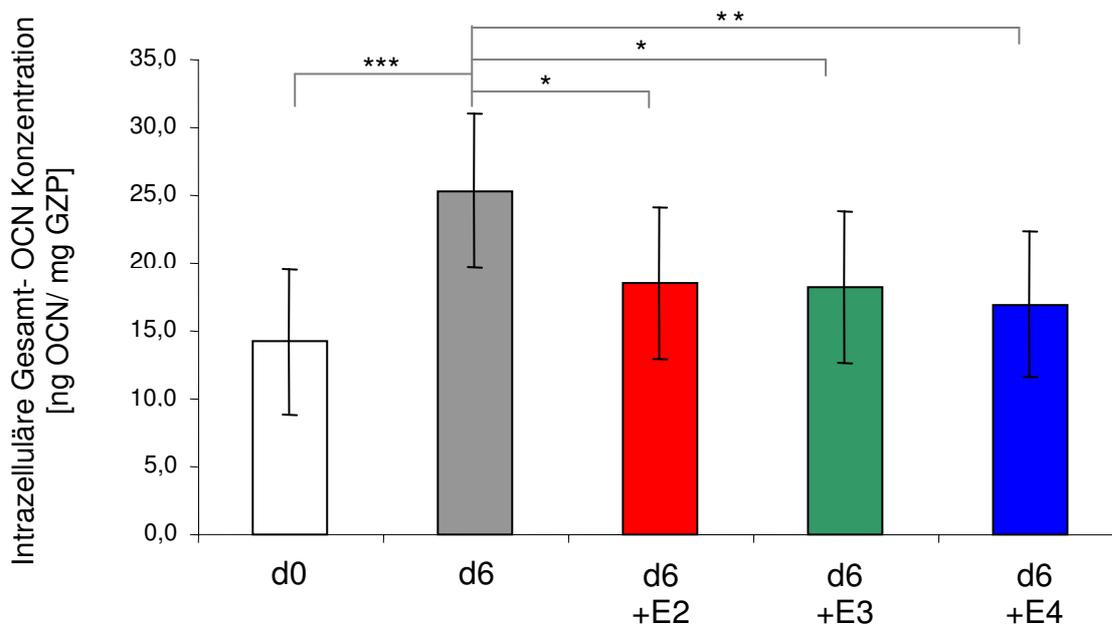


Abbildung 3

Intrazelluläre Osteocalcin Konzentration nach osteogener Differenzierung und unter Einfluss der Isoformen ApoE 2, E 3 und E 4

Inkubation von hMSC-Tert20 Zellen für 48 h mit jeweils 10 µg/ml ApoE 2, E 3 und E 4 nach osteogener Differenzierung mit Vitamin D3 für 6 Tage. Osteocalcin Konzentrationen sind jeweils auf das Gesamtzellprotein normiert und in ng Osteocalcin pro mg GZP dargestellt. Mittelwerte mit Standardabweichung aus acht unabhängigen Experimenten mit je einem Pool aus 3 Wells in Doppelwerten gemessen. Das Signifikanzniveau wurde mittels Student's T-test bestimmt: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,005$

Im selben experimentellen Ansatz wurde zudem der Carboxylierungsgrad des Osteocalcins bestimmt. Der Carboxylierungsgrad spielt eine Rolle in der Regulation der Knochenmineralisierung. Diese Messung dient der Verifizierung eines transkriptionell

inhibitorischen Effektes durch das ApoE. Da eine Inhibition der Osteocalcin Expression mit erniedrigten intrazellulären Konzentrationen von untercarboxyliertem Osteocalcin einhergehen würde.

In Abbildung 4 sind die intrazellulär gemessenen Konzentrationen von untercarboxyliertem (schraffierte Balken) und carboxyliertem Osteocalcin (gefüllte Balken) nebeneinander aufgetragen. Für das untercarboxylierte Osteocalcin ist von d0 (weiße Balken) nach d6 eine Steigerung von 6,6 (+/- 4,6) ng/mg GZP auf 15,9 (+/- 5,6) ng/mg GZP an d6 zu erkennen. Die Konzentrationen des carboxylierten Osteocalcins an diesen Differenzierungszeitpunkten zeigen keinen signifikanten Unterschied. Ebenso ist an d6 (graue Balken) die Konzentration von untercarboxyliertem Osteocalcin mit 15,9 (+/- 5,6) ng/mg GZP (schraffiert) deutlich höher als die des carboxylierten Osteocalcins mit 9,4 (+/- 3,0) ng/mg GZP (gefüllt). Im Vergleich dazu sind bei den ApoE induzierten Zellen die Verhältnisse umgekehrt. Die Konzentrationen des carboxylierten Osteocalcins sind für die drei Isoformen (gefüllte Balken) ApoE 2 (rot), E 3 (grün) und E 4 (blau) im Mittel nur geringgradig höher als die der Kontrollgruppe ohne ApoE (d6= grauer Balken). Trotz der relativ großen Standardabweichung lässt sich im Gegensatz dazu eine deutliche Reduktion der Konzentration von untercarboxyliertem Osteocalcin feststellen. Die Kontrollgruppe ohne ApoE weist hier nach 6 Tagen der Differenzierung im Mittel eine Konzentration um 15,9 (+/- 5,6) ng/mg GZP auf (grau-schraffiert). Durch Zugabe von ApoE 4 (blau-schraffiert) wird die Konzentration des untercarboxylierten Osteocalcins unter sonst identischen Bedingungen auf 7,1 (+/- 5,2) ng/mg GZP reduziert. ApoE 2 mit 8,4 (+/- 4,6) ng/mg GZP (rot-schraffiert) und ApoE 3 mit 8,0 (+/- 5,2) ng/mg GZP (grün-schraffiert) weisen etwas höhere Konzentrationen auf, sind aber im Vergleich zur Kontrollgruppe an d6 deutlich erniedrigt.

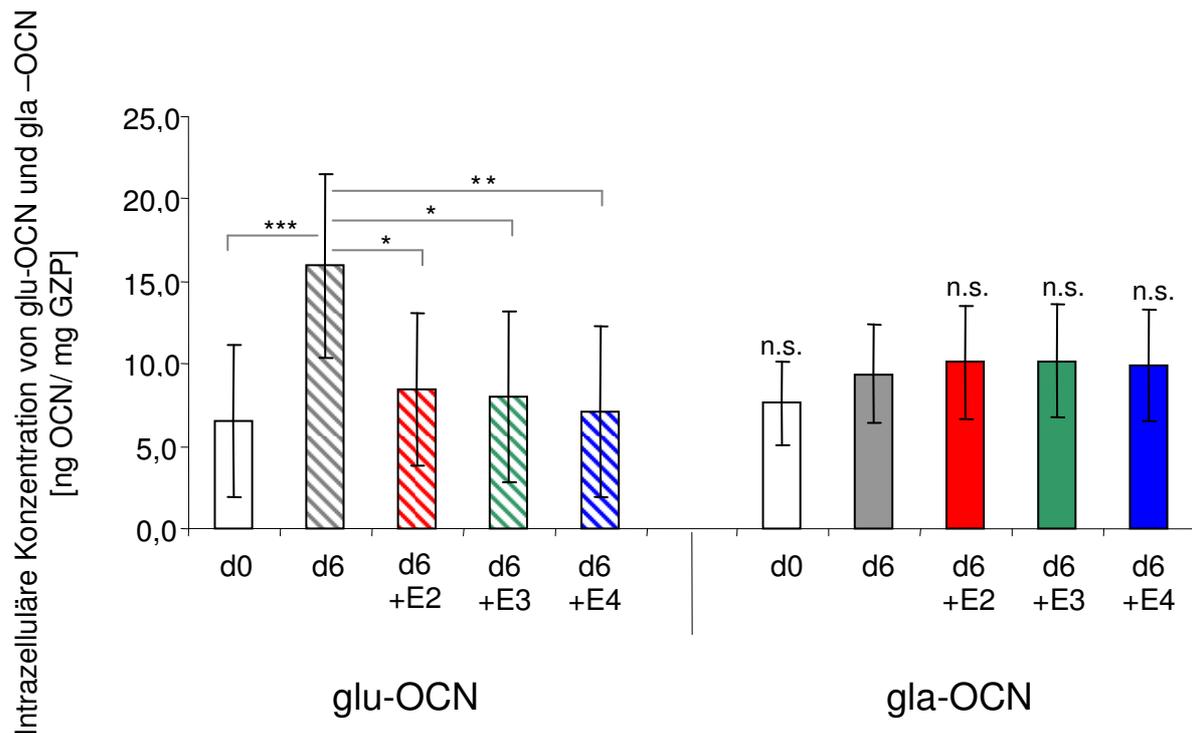


Abbildung 4

Intrazelluläre Konzentration von untercarboxyliertem (glu-OCN) und carboxyliertem (gla-OCN) Osteocalcin nach osteogener Differenzierung und unter Einfluss der Isoformen ApoE 2,E 3 und E 4

Inkubation von hMSC-Tert20 Zellen für 48 h mit jeweils 10 µg/ml ApoE 2,E 3 und E 4 nach osteogener Differenzierung mit Vitamin D3 für insgesamt 6 Tage. Die Konzentrationen des gla-OCN (gefüllte Balken) und glu-OCN (schraffierte Balken) sind jeweils auf das Gesamtzellprotein normiert und in ng Osteocalcin pro mg GZP dargestellt. Mittelwerte mit Standardabweichung aus acht unabhängigen Experimenten mit je einem Pool aus 3 Wells in Doppelwerten gemessen. Das Signifikanzniveau wurde mittels Student's T-test bestimmt: n.s.= nicht signifikant, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,005$

Im nächsten Schritt wurde die extrazelluläre Osteocalcin Konzentration im Zellkulturüberstand bestimmt. Diese gibt einen Hinweis darauf wie viel des exprimierten Osteocalcins letztendlich in den Extrazellulärraum gelangt und dort zur Knochenmineralisierung beitragen könnte.

Abbildung 5 zeigt nach einer Differenzierung von sechs Tagen mit Vitamin D3 die Gesamtosteocalcin Konzentration. Sie beträgt im Mittel an d0 34,1 (+/- 4,5) ng/ml Medium (weißer Balken) und 47,6 (+/- 9,9) ng/ml Medium (grauer Balken). Durch die Inkubation mit ApoE 4 (blauer Balken) sinkt die Osteocalcin Konzentration nach der Differenzierung auf 34,7 (+/- 3,9) ng/ml Medium ($p = 0,01$). Die mit ApoE 2 inkubierten Kulturen bildeten im Mittel 35,9 (+/- 6,9) ng OCN/ml Medium (roter Balken) ($p = 0,023$) und mit ApoE 3 40,2 (+/- 6,3) ng OCN/ml Medium (grüner Balken) ($p = 0,12$).

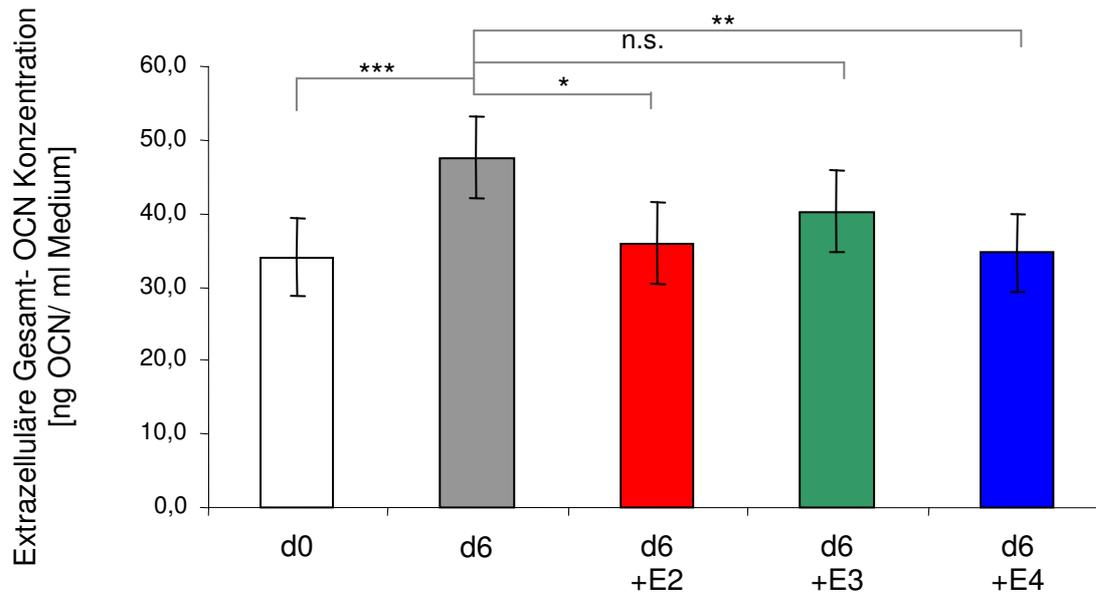


Abbildung 5

Extrazelluläre Osteocalcin Konzentration nach osteogener Differenzierung und unter Einfluss der Isoformen ApoE 2, E 3 und E 4

Inkubation von hMSC-Tert20 Zellen für 48 h mit jeweils 10 µg/ml ApoE 2, E 3 und E 4 nach osteogener Differenzierung mit Vitamin D3 für 6 Tage. Mittelwerte mit Standardabweichung aus acht unabhängigen Experimenten mit je einem Pool aus 3 Wells in Doppelwerten gemessen. Das Signifikanzniveau wurde mittels Student's T-test bestimmt: n.s.= nicht signifikant, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,005$

Auch im Medium wurde das Carboxyierungsverhältnis bestimmt. Abbildung 6 zeigt die Konzentrationen des untercarboxylierten Osteocalcins (schraffierte Balken) und carboxylierten Osteocalcins (gefüllte Balken). Im Medium steigt die Konzentration des untercarboxylierten Osteocalcins nach 6 Tagen Differenzierung von 10,3 (+/- 3,3) ng/ml Medium an d0 (weiß) auf 19,0 (+/- 6,3) ng/ml Medium an d6 (grau) ($p=0,006$). Im Gegensatz hierzu weist das carboxylierte Osteocalcin, wie bereits intrazellulär beobachtet, keine signifikanten Unterschiede zwischen diesen beiden Differenzierungszeitpunkten auf. Jedoch ist im Extrazellulärraum die Konzentration des carboxylierten Osteocalcins mit 28,6 (+/- 7,1) ng/ml Medium deutlich höher als die des untercarboxylierten Osteocalcins. Eine signifikante Reduktion des carboxylierten Osteocalcins auf 22,6 (+/- 2,2) ng/ml Medium wird lediglich durch das ApoE 4 erreicht ($p=0,05$). Sowohl ApoE 2 als auch ApoE 3 zeigen keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zum Tag 6 der Differenzierung ohne ApoE.

Die Konzentration des untercarboxylierten Osteocalcins sinkt durch die ApoE 4 (blau-schraffiert) Inkubation signifikant auf 12,1 (+/- 3,6) ng/ml Medium ($p=0,02$). Die beiden Isoformen ApoE 2 (rot-schraffiert) und ApoE 3 (grün-schraffiert) führen zu keiner

signifikanten Reduktion der Konzentration des untercarboxylierten Osteocalcins im Extrazellulärraum.

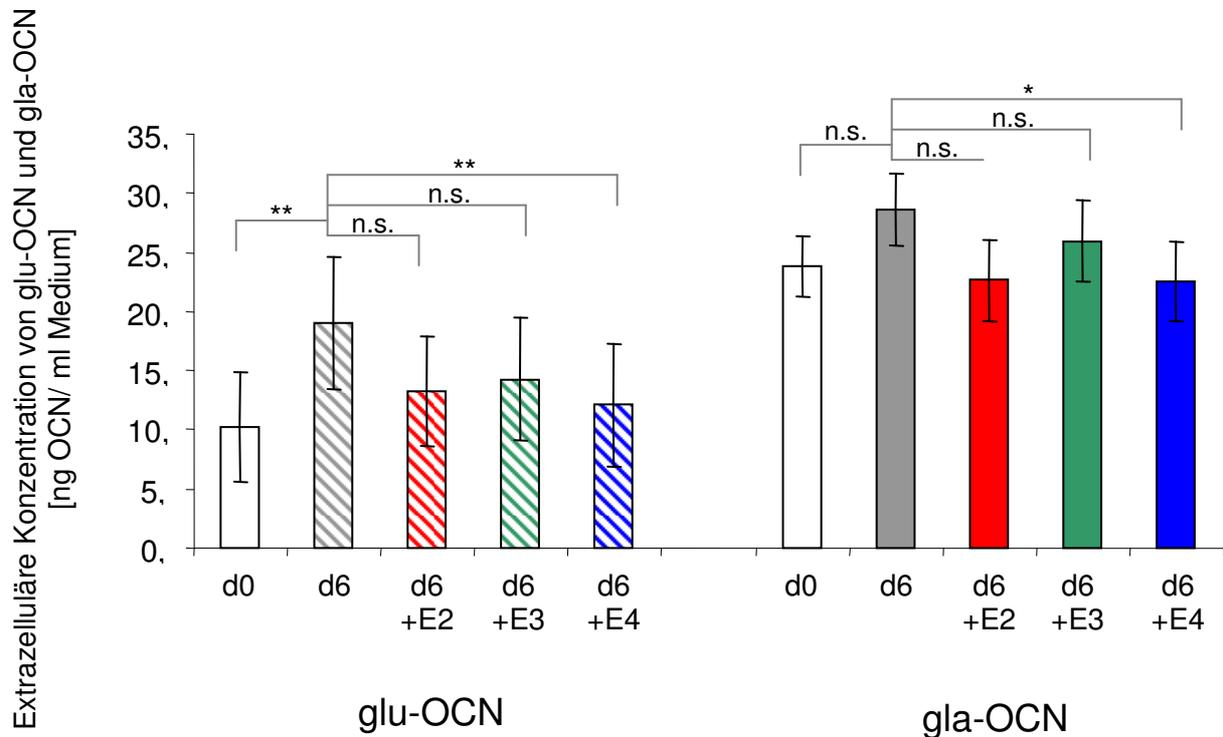


Abbildung 6

Extrazelluläre Konzentration von untercarboxyliertem (glu-OCN) und carboxyliertem Osteocalcin (gla-OCN) nach osteogener Differenzierung und unter Einfluss der ApoE Isoformen ApoE 2, E 3 und E 4

Inkubation von hMSC-Tert20 Zellen für 48 h mit jeweils 10 µg/ml ApoE 2, E 3 und E 4 nach osteogener Differenzierung mit Vitamin D3 für 6 Tage. Dargestellt sind die Konzentrationen von glu-OCN (schraffierte Balken) und gla-OCN (gefüllte Balken) in ng Osteocalcin pro ml Medium. Mittelwerte mit Standardabweichung ergeben sich aus acht unabhängigen Experimenten, wobei jede Probe aus einem Pool von 3 Wells besteht und in Doppelwerten gemessen wurde. Das Signifikanzniveau wurde mittels Student's T-test bestimmt: n.s. = nicht signifikant, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$

Als weiterer Marker osteogener Differenzierung wurde in denselben Experimenten die Alkalische Phosphatase Aktivität im Zellkulturüberstand bestimmt. In Abbildung 7 ist die extrazelluläre Alkalische Phosphatase Aktivität nach einer Differenzierung von 6 Tagen (grauer Balken= d6) und im Vergleich hierzu die Kulturen, welche für den Zeitraum der letzten 48 h mit den ApoE Isoformen ApoE 2 (rot), E 3 (grün) und E 4 (blau) inkubiert wurden, dargestellt.

Die Kontrollzellen ohne ApoE Zusatz weisen im Mittel eine Alkalische Phosphatase Aktivität von 2,1 (+/- 0,6) Sigma Units/ml Medium auf. Bei den mit ApoE inkubierten Kulturen ist die Aktivität bei allen drei Isoformen im Gegensatz zur Kontrolle an d6 in unterschiedlichem Umfang reduziert. Dabei ist der stärkste inhibitorische Effekt mit einem Abfall der Aktivität

an d6 auf 1,2 (+/- 0,5) Sigma Units/ ml Medium für das ApoE 4 (blauer Balken) zu verzeichnen ($p=0,01$). Die Zugabe von ApoE 2 (roter Balken) und ApoE 3 (grüner Balken) bewirken für die vorgegebene Konzentration und Dauer keine statistisch signifikante Reduktion der Alkalische Phosphatase Aktivität. Die Werte liegen für ApoE 2 bei 1,8 (+/- 0,4) Sigma Units/ ml Medium und für ApoE 3 bei 1,9 (+/- 0,5) Sigma Units/ ml Medium.

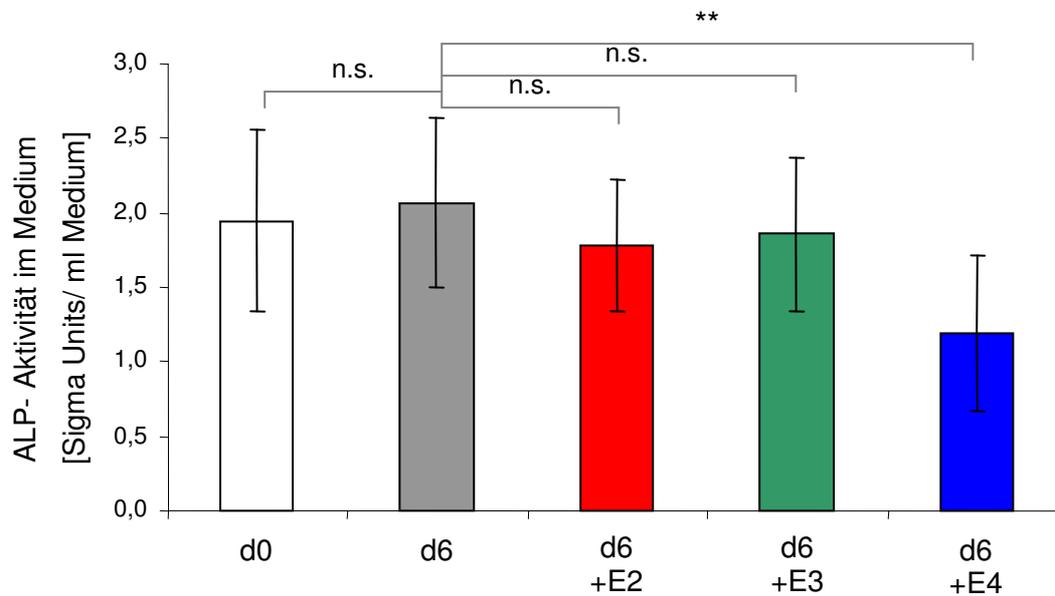


Abbildung 7

Alkalische Phosphatase Aktivität im Extrazellulärraum nach osteogener Differenzierung und unter Einfluss der Isoformen ApoE 2, E 3 und E 4

Inkubation von hMSC-Tert20 Zellen für 48 h mit jeweils 10 $\mu\text{g/ml}$ ApoE 2, E 3 und E 4 nach osteogener Differenzierung mit Vitamin D3 für 6 Tage. Mittelwerte mit Standardabweichung aus acht unabhängigen Experimenten mit je einem Pool aus 3 Wells in Doppelwerten gemessen. Die Aktivität ist gemäß der Angabe des Produktherstellers in Sigma Units/ml angegeben. Das Signifikanzniveau wurde mittels Student's T-test bestimmt: n.s. = nicht signifikant, * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$

4.2. Gesamtcholesterin und Osteoblastenaktivität in ApoE defizienten Mäusen

Entsprechend der Grundhypothese dieser Arbeit, dass ApoE die Osteoblastendifferenzierung und -aktivität inhibiert, könnte der Phänotyp ApoE defizienter Mäuse mit erhöhter Knochenformationsrate auf einer fehlenden Inhibition durch ApoE beruhen. Dies würde bedeuten, dass bei diesen Tieren die Osteoblastenaktivität im Vergleich zu Wildtyp Tieren gesteigert ist.

ApoE spielt eine zentrale Rolle im Lipidstoffwechsel. Eine Defizienz geht unter anderem mit einer Erhöhung der Gesamtcholesterinwerte im Plasma einher. Die Werte sind bei den ApoE defizienten Tieren in etwa um das fünf fache höher als bei Wildtyp Tieren (Piedrahita J.A.

1992). Normale Gesamtcholesterinwerte für Mäuse liegen bei normaler bis fettarmer Fütterung bei 60 mg/dl bei ApoE defizienten Tieren über 400 mg/dl (Plump 1992).

Zur Charakterisierung der ApoE defizienten Mäuse wurden im ersten experimentellen Ansatz in vergleichbaren Serumproben von Wildtyp und ApoE defizienten Mäusen die Gesamtcholesterinwerte und nachfolgend die Osteoblastenaktivitätsmarker, Osteocalcin und Alkalische Phosphatase, bestimmt. Im zweiten Ansatz wurde die Osteoblastenaktivität direkt anhand von primären Calvaria-Osteoblasten, isoliert aus ApoE defizienten und Wildtyp Mäusen, untersucht.

4.2.1. Gesamtcholesterin Konzentration im Serum von Wildtyp und ApoE defizienten Mäusen

In Abbildung 8 sind die Mittelwerte mit Standardabweichung für die Gesamtcholesterin Konzentrationen in Serumproben ApoE defizienter Mäuse im Vergleich zu Wildtyp Mäusen dargestellt. Es sind weibliche und männliche Tiergruppen jeweils im Alter von 15 und 30 Wochen untersucht worden.

ApoE defiziente Mäuse weisen unabhängig von Alter und Geschlecht ein deutlich höheres Gesamtcholesterin auf als die vergleichbaren Wildtyp Mäuse. Die männlichen ApoE defizienten Tiere weisen mit 15 Wochen Werte um 422,3 (+/- 64,1) mg/dl und mit 30 Wochen um 445,1 (+/- 63,8) mg/ml auf. Die vergleichbaren Wildtyp Tiere haben mit 15 Wochen Serumkonzentrationen um 82,5 (+/- 11,4) mg/dl und mit 30 Wochen um 70,3 (+/- 17,7) mg/dl. Auch bei den weiblichen Tieren ist zwischen den Genotypen ein deutlicher Unterschied zu erkennen. Bei den 15 Wochen alten Weibchen liegen die Serumkonzentrationen bei den ApoE defizienten Tieren bei 323,4 (+/- 36,0) mg/dl und bei den gleichaltrigen Wildtyptieren bei 70,9 (+/- 11,4) mg/dl. Gleiches gilt für die 30 Wochen alten Weibchen bei denen die ApoE defizienten Mäuse Werte um 327,7 (+/- 47,0) mg/dl und die Wildtyp Mäuse 61,1 (+/- 13,4) mg/dl aufweisen.

Es werden in der Gruppe der ApoE defizienten Mäuse, jedoch auch geschlechtsspezifische Unterschiede deutlich. So weisen die männlichen Tiere in beiden Altersgruppen im Mittel höhere Cholesterinwerte auf als die vergleichbaren Weibchen. Ein signifikanter Unterschied mit $p=0,01$ ist allerdings lediglich bei der 30 Wochen alten Tiergruppe zu messen.

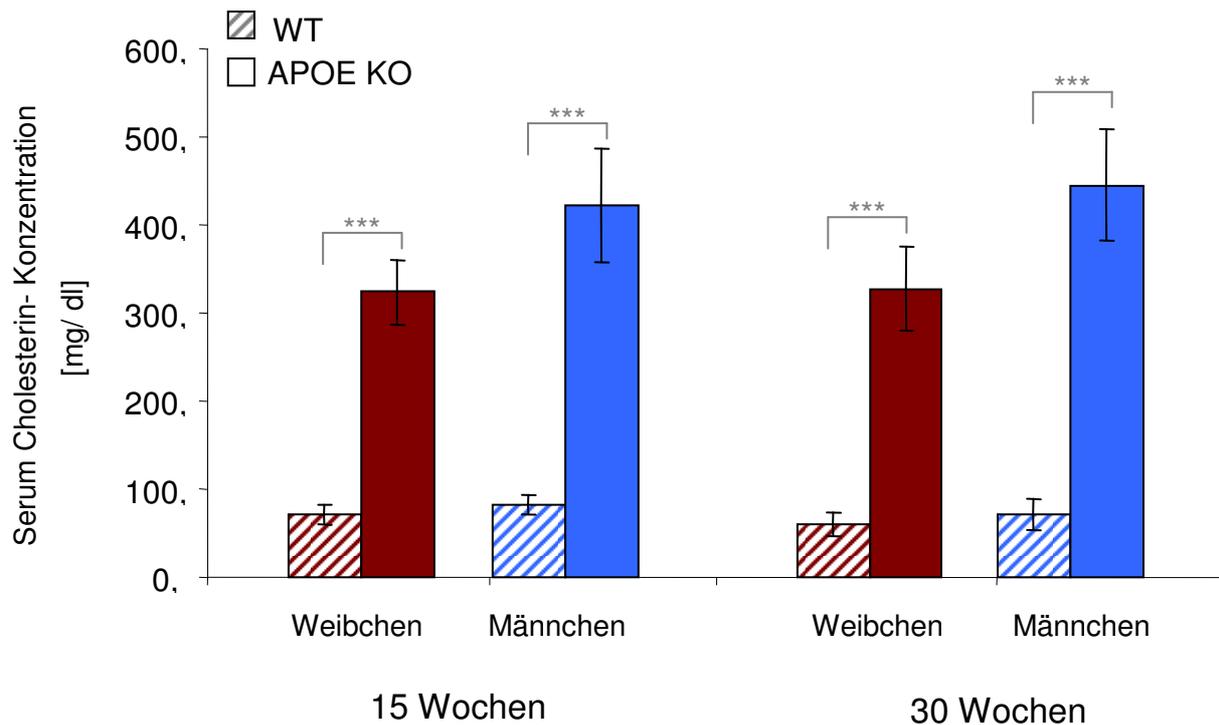


Abbildung 8

Serum Cholesterin Konzentration von ApoE defizienten (KO) und Wildtyp Mäusen (WT)

Vergleich von Weibchen und Männchen im Alter von 15 und 30 Wochen. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen in mg Cholesterin pro dl Serum von fünf bis sieben Tieren pro Gruppe. Die Blutentnahme erfolgte bei nicht gefasteten Tieren zur gleichen Tageszeit. Das Signifikanzniveau wurde mittels Student's T-test bestimmt: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,005$

4.2.2. Osteoblastenaktivitätsmarker im Serum ApoE defizienter Mäuse

In Abbildung 9 ist die Osteocalcin Konzentration im Serum ApoE defizienter Mäuse im Vergleich zu Wildtyp Mäusen jeweils im Alter von 15 und 30 Wochen für weibliche und männliche Tiergruppen dargestellt. Gezeigt werden Mittelwerte mit Standardabweichungen aus den einzelnen Tiergruppen, wobei jeder Datenpunkt in Doppelwerten bestimmt wurde. In den einzelnen Gruppen sind im Mittel fünf bis sieben Tiere enthalten.

Im Mittel ist in ApoE defizienten Mäusen (gefüllte Balken) die Osteocalcin Konzentration höher als in den jeweiligen Wildtyp Kontrollgruppen (schraffierte Balken). Der größte Unterschied ist bei den 30 Wochen alten Weibchen zu sehen, bei welchen die ApoE defizienten Mäuse Werte um 147 (+/- 21,7) ng/ml und die Wildtyp Tiere um 95,1 (+/- 8,9) ng/ml ($p \leq 0,005$) aufweisen. Der Unterschied bei 15 Wochen alten Weibchen erreicht mit $p = 0,38$ keine statistische Signifikanz. In den männlichen Tiergruppen weisen die 15 Wochen alten Mäuse mit Werten um 111,2 (+/- 17,8) ng/ml für Wildtyp Tiere und 147,6 (+/- 25,0) ng/ml für ApoE defiziente Tiere einen signifikanten Unterschied auf ($p = 0,03$). Hier ist bei den

30 Wochen alten, männlichen Tieren der Unterschied zwischen den Genotypen geringer und mit $p=0,1$ nicht signifikant.

Mit zunehmendem Alter sinken die Osteocalcin Konzentrationen bei den Wildtyp Weibchen von 140,6 ng/ml mit 15 Wochen auf 95,1 ng/ml mit 30 Wochen. Bei den ApoE defizienten Weibchen ist die Abnahme geringer, nämlich von 154,4 (+/- 16,5) ng/ml mit 15 Wochen auf 147 (+/- 21,7) ng/ml mit 30 Wochen. In der männlichen Tiergruppe ist der Unterschied zwischen den 15 und 30 Wochen Alten Tieren in der ApoE defizienten Gruppe größer als in der Wildtyp Gruppe. Insgesamt haben die männlichen Tiere beider Altersgruppen niedrigere Osteocalcin Serumkonzentrationen als die vergleichbaren Weibchen.

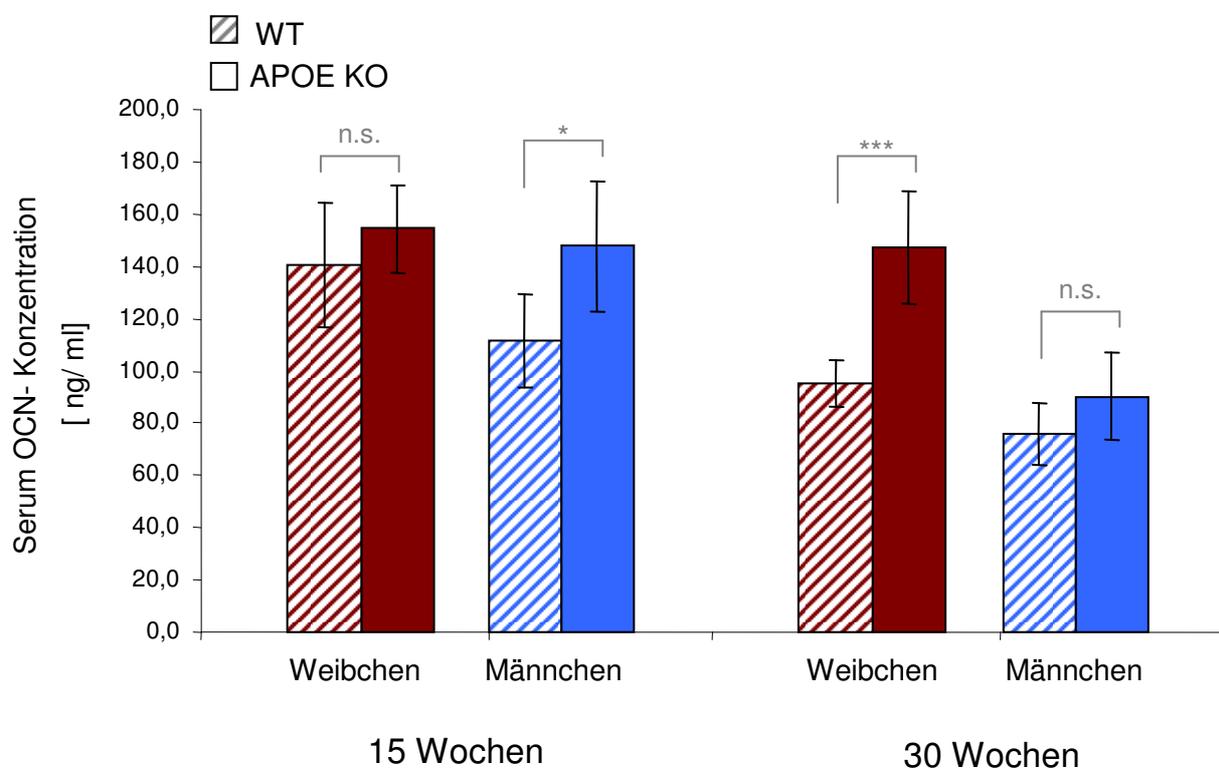


Abbildung 9

Osteocalcin (OCN) Konzentration im Serum ApoE defizienter Mäuse (ApoE KO) und den entsprechenden Wildtyp (WT) Vergleichsgruppen

Vergleich von Weibchen und Männchen im Alter von 15 und 30 Wochen. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen in ng Osteocalcin pro ml Serum von fünf bis sieben Tieren pro Gruppe. Die Blutentnahme erfolgte bei nicht gefasteten Tieren zu den gleichen Tageszeiten. Das Signifikanzniveau wurde mittels Student's T-test bestimmt: n.s.= nicht signifikant, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,005$

Abbildung 10 zeigt die Alkalische Phosphatase Aktivität im Serum von Wildtyp (schraffierte Balken) und ApoE defizienten (gefüllte Balken) Mäusen. Der deutlichste Unterschied mit einer Signifikanz von $p=0,001$ zeigt sich bei den 30 Wochen alten Weibchen, bei welcher die Alkalische Phosphatase in den Wildtyp Mäusen eine Aktivität von 2,5 (+/- 0,1) Sigma Units/

ml und in den entsprechenden ApoE defizienten Tieren von 3,2 (+/- 0,2) Sigma Units/ ml aufweist. Die 15 Wochen alten Wildtyp Weibchen weisen hingegen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen auf.

Bei den männlichen Tieren haben die Differenzen in beiden Altersgruppen in etwa die gleiche Größenordnung. Die 15 Wochen alten Wildtyp Männchen weisen Werte um 2,2 (+/- 0,2) Sigma Units/ ml auf. Die gleichaltrigen ApoE defizienten Mäuse liegen im Mittel mit 2,6 (+/- 0,2) Sigma Units/ ml etwas höher ($p= 0,007$). Die Differenz zwischen den männlichen Wildtyp und ApoE defizienten Mäusen im Alter von 30 Wochen ist mit $p= 0,009$ ebenfalls statistisch signifikant.

Des Weiteren zeigt sich, dass sowohl die ApoE defizienten als auch die Wildtyp Männchen in beiden Altersgruppen eine deutlich niedrigere Alkalische Phosphatase Aktivität als die vergleichbaren Weibchen aufweisen.

Mit zunehmendem Alter sinkt zudem bei beiden Genotypen die Alkalische Phosphatase Aktivität. Der Abfall ist bei den 15 Wochen alten Wildtyp Weibchen ($p= 0,00024$) stärker ausgeprägt als bei ApoE defizienten Weibchen. Bei den Männchen zeigt sich im Gegensatz hierzu bei den ApoE defizienten Tieren eine deutliche Abnahme mit $p= 0,02$. Der Unterschied bei den Wildtyp Männchen ist nicht statistisch signifikant.

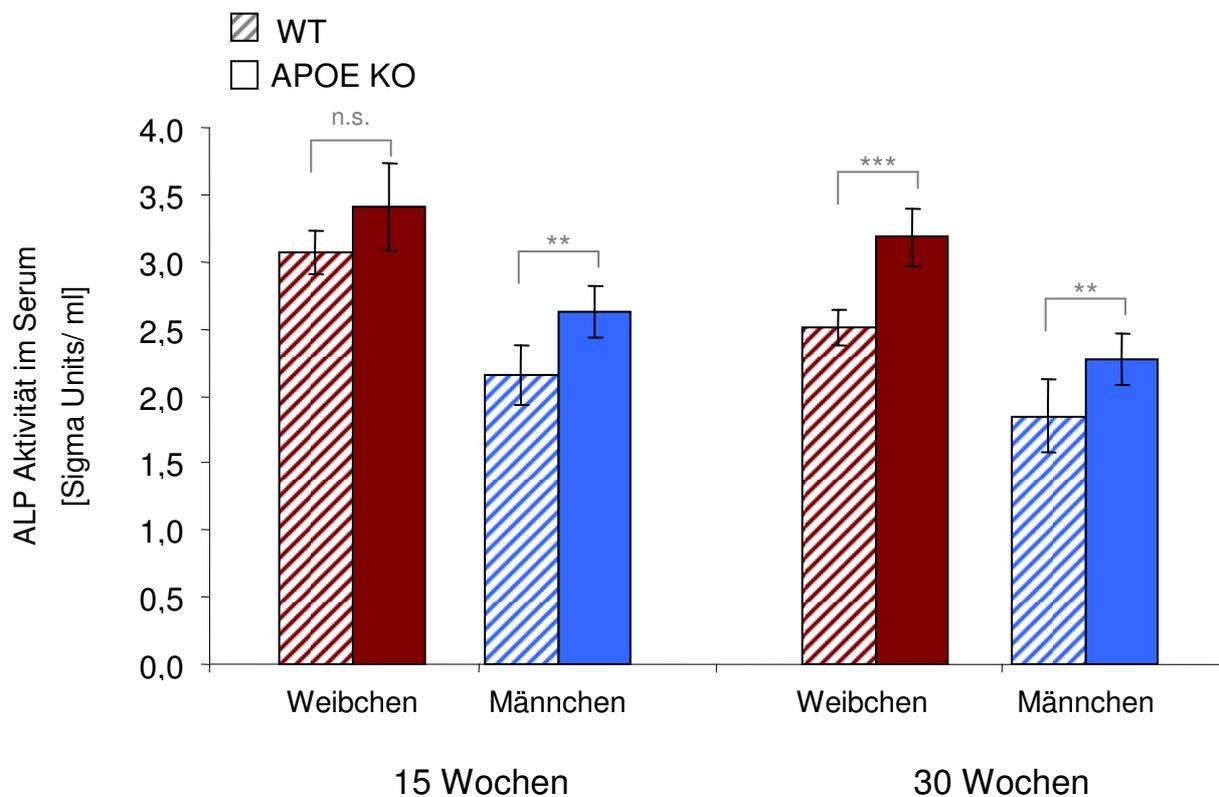


Abbildung 10

Alkalische Phosphatase (ALP) Aktivität im Serum ApoE defizienter Mäuse und den entsprechenden Wildtyp Vergleichsgruppen

Vergleich von Weibchen und Männchen im Alter von 15 und 30 Wochen. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen in Sigma Units pro ml Serum von fünf bis sieben Tieren pro Gruppe. Die Blutentnahme erfolgte bei nicht gefasteten Tieren zur gleichen Tageszeit. Das Signifikanzniveau wurde mittels Student's T-test bestimmt: n.s.= nicht signifikant, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, ***= $p \leq 0,005$

4.2.3. Untersuchung primärer Calvaria-Osteoblasten ApoE defizienter Mäuse

Sowohl die vorangehenden in vitro Untersuchungen an humanen Zellen unter Einfluss von exogenem ApoE, als auch die in vivo Untersuchungen an ApoE defizienten Mäusen geben bereits einen Hinweis darauf, dass ApoE inhibitorisch auf die Osteoblastenaktivität wirkt. Allerdings nehmen in vivo viele unterschiedliche Faktoren Einfluss auf die Osteoblastenfunktion, so dass aus den bisherigen Experimenten mit ApoE defizienten Tieren noch keine definitiven Rückschlüsse auf einen direkten Effekt von ApoE auf Osteoblasten gezogen werden können. Um einen möglichen Effekt des ApoE unabhängig von anderen physiologischen Einflüssen zu untersuchen, wurden primäre Osteoblastenkulturen aus ApoE defizienten und Wildtyp Mäusen angelegt. Die Isolierung der primären Osteoblasten erfolgte aus den Calvarien drei bis vier Tage alter Jungtiere. Die Zellen wurden in Mineralisierungsmedium, welches Ascorbat und β - Glycerophosphat enthält, für insgesamt 30 Tage in Kultur gehalten. Die Probenentnahme erfolgte jeweils im Abstand von sechs Tagen.

4.2.3.1. Expression osteoblastärer Markerproteine in primären Osteoblastenkulturen ApoE defizienter Mäuse

In Analogie zu den Experimenten mit humanen mesenchymalen Stammzellen wurden auch in diesem Ansatz die Alkalische Phosphatase Aktivität und Osteocalcin Konzentration in den Zellkulturüberständen gemessen. Die Alkalische Phosphatase Aktivität ist in Abbildung 11 dargestellt. Hier sind Mittelwerte mit Standardabweichung von vier unabhängigen Experimenten dargestellt, wobei jeder Datenpunkt pro Experiment in Doppelwerten bestimmt wurde.

In den kultivierten Wildtyp Osteoblasten nimmt die Alkalische Phosphatase Aktivität von Tag 0 der Differenzierung bis Tag 30 nur langsam zu (schraffierte Balken). Sie pendelt von Tag null bis Tag 24 zwischen 1,8 (+/- 0,3) und 4,7 (+/- 3,3) Sigma Units/ml und steigt an Tag 30 der Differenzierung mit 6,3 (+/- 5,8) Sigma Units/ml auf das dreifache des Ausgangswertes.

In den vergleichbaren ApoE defizienten Osteoblasten steigt die Alkalische Phosphatase Aktivität bereits zu früheren Differenzierungszeitpunkten stark an (gefüllte Balken). Die Differenzen zwischen beiden Genotypen sind im Zeitraum von Tag 12 bis Tag 24 statistisch signifikant. An Tag 12 der Differenzierung weisen ApoE defiziente Zellen bereits Werte um

14,4 (+/- 2,1) Sigma Units/ml Medium auf ($p=0,02$). Die Werte steigen im Verlauf weiter von 13,5 (+/- 4,8) Sigma Units/ml Medium an Tag 18 auf 20,9 (+/- 8,9) Sigma Units/ml Medium an Tag 24 ($p=0,002$) stetig an und werden an Tag 30 erneut geringer.

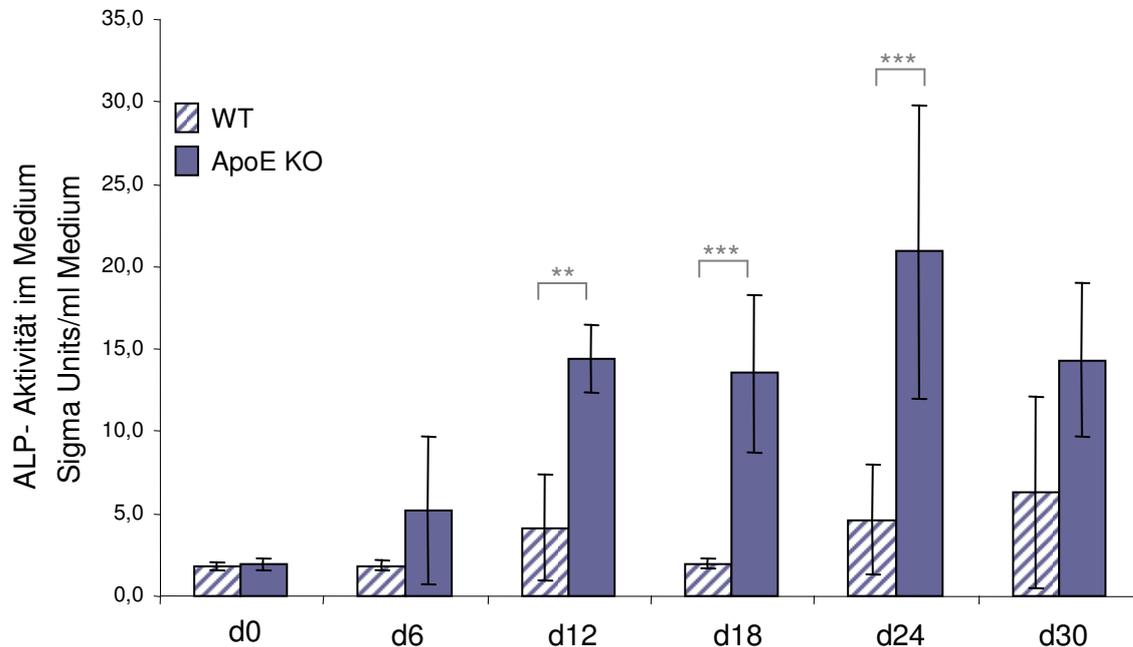


Abbildung 11

Alkalische Phosphatase (ALP) Aktivität im Zellkulturüberstand primärer Osteoblastenkulturen aus ApoE defizienten und Wildtyp Mäusen

Bestimmung der Alkalischen Phosphatase Aktivität im Medium primärer Osteoblastenkulturen aus ApoE defizienten Mäusen und vergleichbaren Wildtyp (WT) Tieren. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen gemäß der Hersteller Angaben in Sigma Units pro ml Medium aus vier unabhängigen Experimenten. Es sind in jedem Experiment jeweils 2 Wells pro Datenpunkt in Doppelwerten gemessen worden. Die Isolierung der primären Calvaria-Osteoblasten erfolgte aus drei bis vier Tage alten Jungtieren mit identischem genetischen Hintergrund (C57bl6). Das Signifikanzniveau wurde mittels Student's T-test bestimmt: * = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,01$, *** = $p \leq 0,005$

Die Messung der Osteocalcin Konzentration in denselben Proben, aus denen die in Abbildung 11 dargestellte Alkalische Phosphatase Aktivität bestimmt wurde, ergibt ein ähnliches Bild. Wie in Abbildung 12 dargestellt zeichnet sich in beiden Genotypen über den Differenzierungszeitraum von 30 Tagen eine stetige Zunahme der Osteocalcin Konzentration ab. Trotz der teilweise hohen Standardabweichungen resultiert auch hier ein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen zu den Zeitpunkten 12, 18, 24 und 30. Die Osteocalcin Konzentration steigt in den ApoE defizienten Kulturen von 21,2 (+/- 23,9) ng/ml Medium an Tag 6 auf 556,3 (+/- 156,5) ng/ml Medium an Tag 30 stetig an, wobei die vergleichbaren Wildtyp Osteoblasten lediglich einen Anstieg von 4,0 (+/- 2,5) ng/ml an Tag 6 auf 245,1 (+/- 72,1) ng/ml Medium an Tag 30 aufweisen.

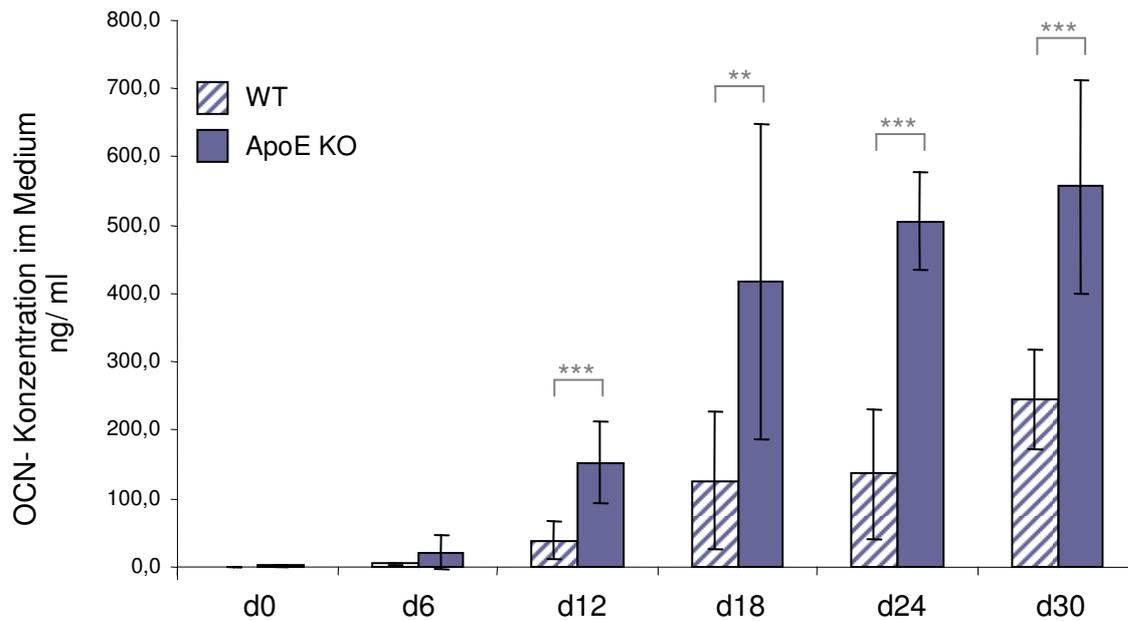


Abbildung 12

Osteocalcin (OCN) Konzentration im Zellkulturüberstand primärer Osteoblastenkulturen aus ApoE defizienten und Wildtyp Mäusen

Osteocalcin Konzentration im Medium primärer Osteoblastenkulturen aus ApoE defizienten Mäusen und vergleichbaren WT Tieren. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen in ng Osteocalcin pro ml Medium aus vier unabhängigen Experimenten. Es sind in jedem Experiment jeweils 2 Wells pro Datenpunkt in Doppelwerten gemessen worden. Die Isolierung der primären Calvaria Osteoblasten erfolgte aus drei bis vier Tage alten Jungtieren mit identischem genetischen Hintergrund (C57bl6). Das Signifikanzniveau wurde mittels Student's T-test bestimmt: * = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,01$, *** = $p \leq 0,005$

Im Serum weisen ApoE defiziente Mäuse einen geringeren Carboxylierungsgrad des Osteocalcins auf als Wildtyp Tiere, d.h. der relative Anteil an untercarboxyliertem Osteocalcin im Verhältnis zum carboxylierten Osteocalcin ist in ApoE defizienten Mäusen höher. Die Ursache dafür ist bisher unbekannt. Um zu untersuchen, ob es sich dabei um einen zellautonomen Effekt handelt, also ApoE defiziente Zellen primär weniger Osteocalcin carboxylieren, oder ob es sich um einen sekundär, systemischen Effekt handelt, durch den z.B. das carboxylierte Osteocalcin in ApoE defizienten Mäusen schneller wieder aus der Zirkulation verschwindet, habe ich den Carboxylierungsgrad in primären Osteoblastenkulturen aus ApoE defizienten Mäusen bestimmt und diesen mit Wildtyp Kulturen verglichen. Im Falle eines zellautonomen Effektes sollte in vitro das Verhältnis von untercarboxyliertem Osteocalcin zum carboxylierten zwischen den beiden Genotypen unterschiedlich sein.

Im Gegensatz zum humanen System existieren für die Maus bislang keine kommerziell erwerblichen immunologischen Tests, mit deren Hilfe zwischen untercarboxyliertem und carboxyliertem Osteocalcin differenziert werden kann. Daher habe ich mir zur Bestimmung des carboxylierten Osteocalcin Anteils die Eigenschaft zu nutze gemacht, dass untercarboxyliertes Osteocalcin Hydroxylapatit mit einer geringeren Affinität bindet. In den Zellkulturüberständen wurde das carboxylierte Osteocalcin Mittels einer Hydroxyapatit-Lösung herausgewaschen und das untercarboxylierte Osteocalcin im Überstand gemessen. Die Menge an carboxyliertem Osteocalcin konnte anschließend rechnerisch als Differenz zur Gesamtosteocalcin Menge bestimmt werden. Die Methode der Hydroxyapatit-Waschung wurde bereits unter anderem an humanen Seren angewendet (Merle et Delmas 1990, Price et al 1981). Für murine Proben gibt es bislang noch keine Methode zur Bestimmung des Carboxylierungsgrades. Um dennoch die Methode auf unsere murinen Proben übertragen zu können, wurden in Vorbereitung zu diesem Experiment mehrere Waschungen durchgeführt, um die sensitivste Hydroxylapatit Konzentration und weitere Rahmenbedingungen herauszuarbeiten, bei welcher eine relativ genaue Trennung der beiden Carboxylierungsformen des Osteocalcins zustande kommt (Daten nicht aufgeführt).

Abbildung 13 zeigt den Carboxylierungsgrad als Verhältnis von untercarboxyliertem zu carboxyliertem Osteocalcin. Dargestellt sind Mittelwerte aus jeweils zwei Datenpunkten für ApoE defiziente (gefüllte Balken) und Wildtyp (schraffierte Balken) Zellen an den Zeitpunkten, an denen der relative Unterschied für die Gesamtosteocalcin Konzentration zwischen den Genotypen am deutlichsten war, nämlich zwischen Tag 18 und Tag 30.

Das Verhältnis liegt bei den ApoE defizienten Zellen zu allen drei Zeitpunkten höher als bei den vergleichbaren Wildtyp Zellen. Es liegt bei den Wildtyp Zellen an Tag 18 bei 0,4 und an Tag 30 bei 0,7, wohingegen die ApoE defizienten Kulturen beinahe doppelt so viel untercarboxyliertes wie carboxyliertes Osteocalcin aufweisen. Daraus ergibt sich, dass die ApoE defizienten Osteoblasten im Vergleich zu den Wildtyp Zellen viel mehr untercarboxyliertes Osteocalcin haben.

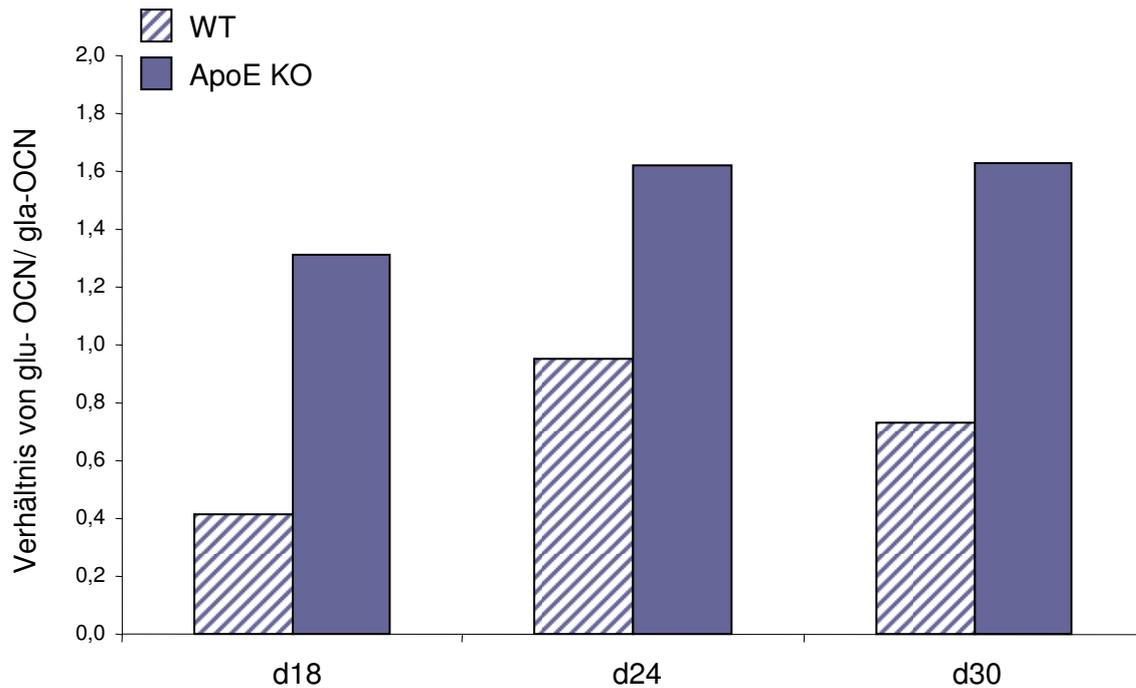


Abbildung 13

Verhältnis von untercarboxyliertem (glu-OCN) zu carboxyliertem (gla-OCN) Osteocalcin im Zellkulturüberstand primärer Osteoblastenkulturen aus ApoE defizienten und Wildtyp Mäusen

Dargestellt ist das Verhältnis von untercarboxyliertem zu carboxyliertem Osteocalcin im Medium primärer Osteoblastenkulturen aus ApoE defizienten Mäusen und vergleichbaren Wildtyp Tieren. In die Mittelwerte sind jeweils zwei Wells aus einem Experiment eingegangen, daher enthält die Abbildung keine Standardabweichung. Die Isolierung der primären Calvaria Osteoblasten erfolgte aus drei bis vier Tage alten Jungtieren mit identischem genetischen Hintergrund (C57bl6).

4.2.3.2. Osteocalcin Konzentration primärer Osteoblastenkulturen aus ApoE defizienten Mäusen unter dem Einfluss von exogenem ApoE

Wie in den vorangegangenen Experimenten gezeigt, bewirkt die ApoE Defizienz eine Steigerung der Osteoblastenaktivität. Diese drückt sich unter anderem in einer gesteigerten Expression des Osteocalcins in ApoE defizienten Zellen im Vergleich zu den Wildtyp Zellen aus. Ist dieser Effekt selektiv auf ein Fehlen des ApoE als negativer Regulator der Osteoblastenaktivität zurückzuführen, so sollte eine Reduktion der gesteigerten Aktivität ApoE defizienter Osteoblasten durch Rekonstitution von ApoE erzeugt werden können.

Hierzu wurden Osteoblastenkulturen aus ApoE defizienten und Wildtyp Mäusen angelegt und in Mineralisierungsmedium unter Zugabe von Ascorbat und β -Glycerophosphat für 18 Tage kultiviert. Ein Teil der Zellen wurde ab dem vierten Tag kumulativ mit rekombinantem ApoE 3 in einer Konzentration von 10 μ g/ml inkubiert.

Abbildung 14 zeigt die Osteocalcin Konzentration im Zellkulturüberstand ApoE defizienter Osteoblasten und vergleichbaren Wildtyp Zellen unter dem Einfluss von rekombinantem

ApoE 3 an Tag 6, Tag 12 und Tag 18 der Inkubation. Zur besseren Darstellung wurde eine logarithmische Skalierung gewählt.

Wie bereits im vorherigen Experiment gezeigt, weisen die ApoE defizienten Osteoblasten eine deutlich höhere Gesamtosteocalcin Konzentration auf als die Wildtyp Osteoblasten. Für die ApoE defizienten Zellen liegen die Werte an Tag 6 bei 27,5 (+/- 0,07) ng/ml Medium, an Tag 12 bei 202,2 (+/- 11,2) ng/ml Medium und an Tag 18 bereits bei 818,6 (+/- 0,56) ng/ml Medium. Im Vergleich hierzu wurde bei den Wildtyp Zellen die Osteocalcin Konzentration an Tag 6 mit 16,6 (+/- 0,88) ng/ml Medium, an Tag 12 mit 10,3 (+/- 6,77) ng/ml Medium und an Tag 18 mit 128,9 (+/- 15,91) ng/ml Medium bestimmt.

Durch Zugabe von rekombinantem ApoE 3 lassen sich bei beiden Genotypen die Gesamtosteocalcin Konzentrationen deutlich reduzieren. Die ApoE defizienten Zellen weisen nach ApoE 3 Inkubation Osteocalcin Konzentrationen von 2,3 (+/- 0,06) ng/ml Medium an Tag 6, von 1,7 (+/- 0,15) ng/ml Medium an Tag 12 und von 1,5 (+/- 0,73) ng/ml Medium an Tag 18 auf. Auch bei den Wildtyp Zellen ist unter der eingesetzten ApoE 3 Menge eine Reduktion der Osteocalcin Konzentration zu messen. Die Osteocalcin Konzentration liegt hier an Tag 6 bei 9,7 (+/- 0,69) ng/ml Medium, an Tag 12 bei 2,6 (+/- 0,2) ng/ml Medium und an Tag 18 bei 1,1 (+/- 0,00) ng/ml Medium. Es zeigt sich demnach durch die ApoE Inkubation eine deutliche Reduktion der Osteocalcin Konzentration in beiden Genotypen, wobei mit zunehmender Dauer der ApoE Inkubation der inhibitorische Effekt zunimmt.

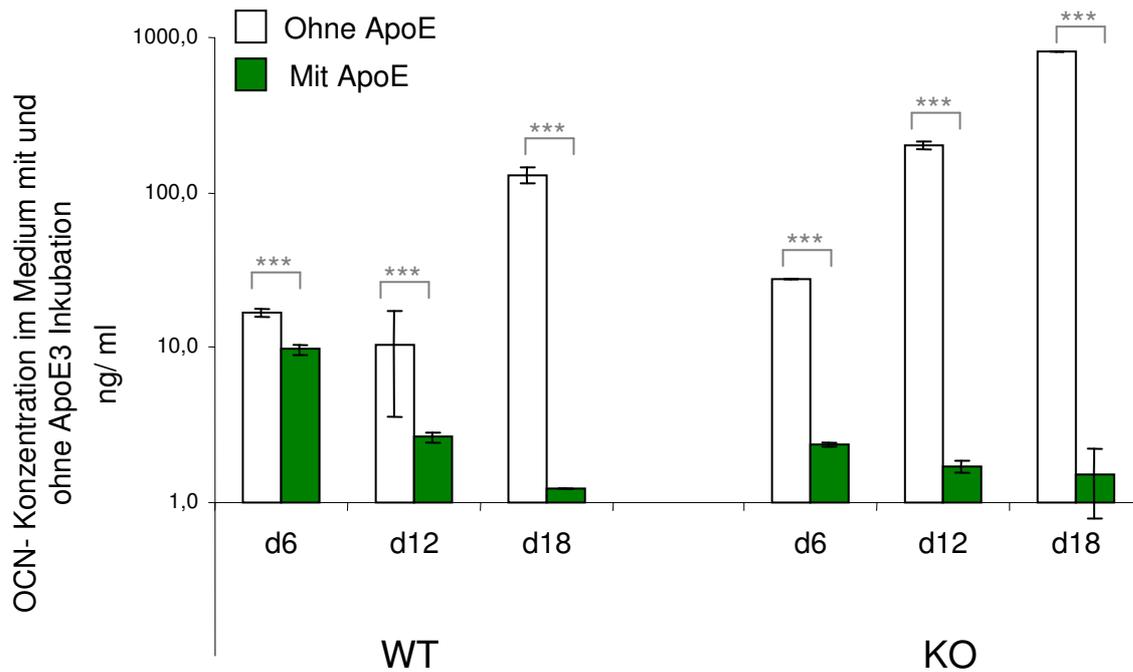


Abbildung 14

Osteocalcin Konzentration im Zellkulturüberstand von ApoE defizienten (KO) und Wildtyp (WT) Zellen unter dem Einfluss von rekombinantem ApoE 3

Dargestellt sind Osteocalcin Konzentrationen im Medium primärer Osteoblastenkulturen aus ApoE defizienten Mäusen und vergleichbaren Wildtyp Tieren vom 6. bis 18. Tag der Differenzierung. Die Auswertung erfolgte zur besseren Darstellung auf einer logarithmischen Skala. Die Kulturen wurden ab Tag vier der Differenzierung mit rekombinantem ApoE 3 in einer Konzentration von 10 µg/ml inkubiert. In die Mittelwerte sind jeweils zwei Wells aus einem Experiment eingegangen, welche jeweils in Doppelwerten bestimmt wurden. Die Isolierung der primären Calvaria-Osteoblasten erfolgte aus drei bis vier Tage alten Jungtieren mit identischem genetischen Hintergrund (C57bl6). Das Signifikanzniveau wurde mittels Student's T-test bestimmt: * = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,01$, *** = $p \leq 0,005$

4.3. In vitro Mineralisierung ApoE defizienter primärer Osteoblasten

Zur Klärung der Frage, ob die gesteigerte Osteoblastenaktivität durch die ApoE Defizienz auch zu einer vermehrten Knochenmineralisierung führt, wurde in einem weiteren Experiment das Mineralisierungsverhalten von ApoE defizienten Osteoblasten untersucht. Hierzu wurden die primären Calvaria-Osteoblasten in 12-Well Zellkulturplatten mit β -Glycerophosphat und Ascorbat für 30 Tage in Kultur gehalten. Mit Beginn der makroskopisch sichtbaren Bildung von extrazellulären Mineraldepots, zwischen Tag 12 und Tag 15, wurden die Osteoblasten der jeweiligen Genotypen zu den einzelnen Differenzierungszeitpunkten mit von Kossa-Lösung gefärbt. Bei dieser Färbung wird das im Kalziumphosphat enthaltene Kalzium durch Silbernitratlösung angefärbt. Für jeden Zeitpunkt wurden mindestens vier unabhängige Experimente mit jeweils zwei Wells pro Datenpunkt angesetzt.

Abbildung 15 zeigt jeweils zwei repräsentative Wells zu den einzelnen Differenzierungszeitpunkten an Tag 15, 18, 21, 24 und 30 nach Beginn der Inkubation mit Ascorbat und β -Glycerophosphat. Es ist deutlich zu erkennen, dass die ApoE defizienten Osteoblasten im Gegensatz zu den vergleichbaren Wildtyp Zellen früher und stärker mineralisieren. Bereits an Tag 15 ist bei den ApoE defizienten Zellen eine deutliche Mineralisierung zu erkennen, welche im Verlauf der weiteren Differenzierungszeitpunkte stetig zunimmt. Die Wildtyp Osteoblasten beginnen in etwa ab Tag 18 mit einer sichtbaren Mineralisierung, diese erreicht allerdings auch an den fortlaufenden Zeitpunkten nicht das Ausmaß der ApoE defizienten Osteoblasten.

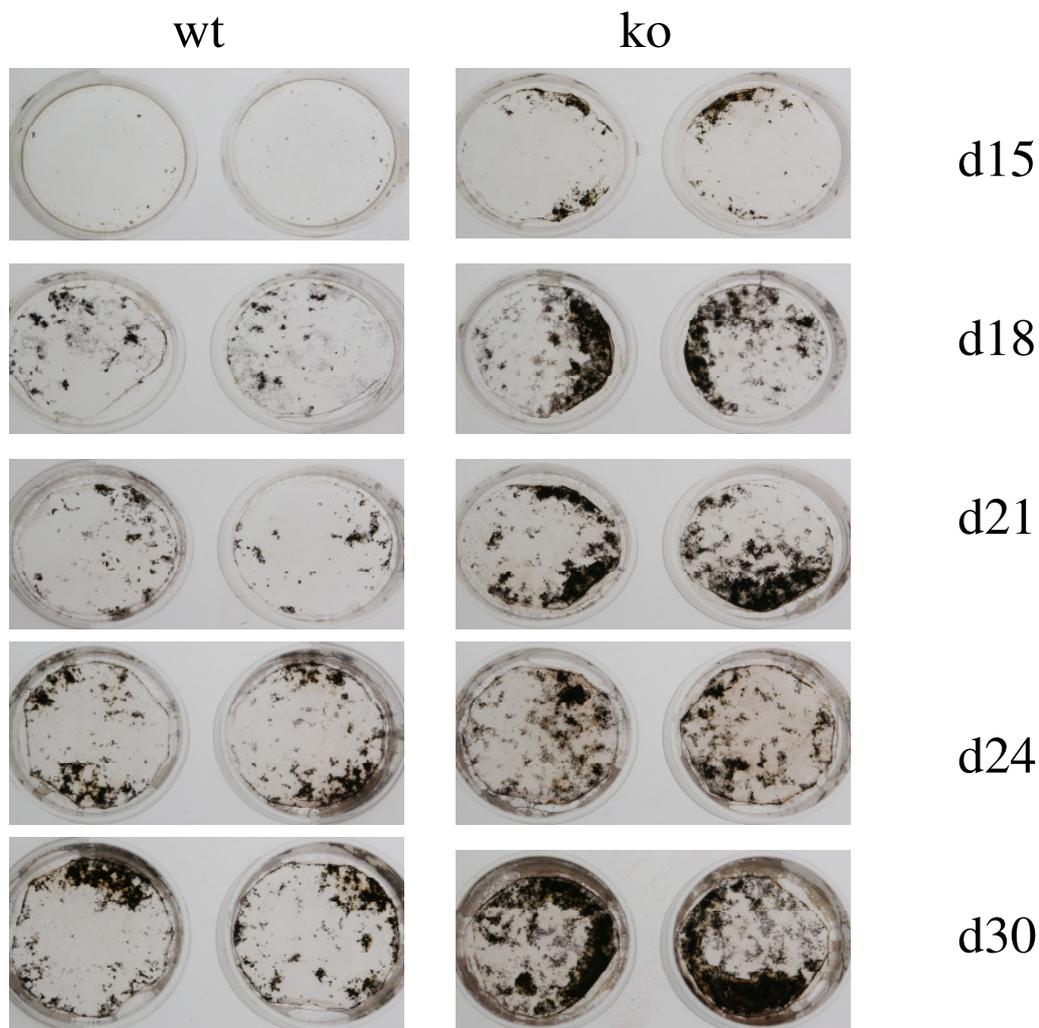


Abbildung 15

In vitro Mineralisierung primärer Calvaria-Osteoblasten aus ApoE defizienten Mäusen und im Vergleich aus Wildtyp Mäusen

Abgebildet sind in vitro mineralisierte primäre Calvaria Osteoblasten aus ApoE defizienten und im Vergleich aus Wildtyp Mäusen. Die Bilder sind exemplarisch aus mindestens vier unabhängigen Experimenten zusammengestellt. Die Mineralisierung erfolgte durch Zugabe von Ascorbat und β -Glycerophosphat für einen Zeitraum von 30 Tagen. Die Zellen wurden ab d15 im Abstand von drei Tagen mit von Kossa-Lösung gefärbt.

Die Isolierung der primären Calvaria Osteoblasten erfolgte aus drei bis vier Tage alten Jungtieren mit identischem genetischen Hintergrund (C57bl6)

5. Diskussion

5.1. Effekt der ApoE Isoformen auf die Aktivität humaner Osteoblasten

Im ersten experimentellen Ansatz konnte gezeigt werden, dass ApoE einen isoformspezifischen, inhibitorischen Effekt auf die Differenzierung und Aktivität humaner Osteoblasten ausübt.

Humane mesenchymale Stammzellen wurden durch Vitamin D3 Zugabe osteogen differenziert und für 48 Stunden mit den rekombinanten ApoE Isoformen ApoE 2, E 3 und E 4 inkubiert. Durch Bestimmung der mRNA und Protein Expression einzelner osteoblastärer Proteine sollte in diesem experimentellen Ansatz die Aktivität der Osteoblasten unter dem Einfluss der ApoE Isoformen untersucht werden.

Initial ist die mRNA Expression verschiedener Differenzierungsmarker, wie Coll1, Osteocalcin und Alkalische Phosphatase, untersucht worden. In dem gewählten Zeitfenster von sechs Tagen ist eine Steigerung der Expression des Osteocalcins und der Alkalischen Phosphatase zu erkennen, welche als eindeutiger Nachweis osteogener Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen zu werten ist (Owen 1990). Durch die Inkubation mit den rekombinanten ApoE Isoformen bleibt die Coll1 mRNA Expression unbeeinflusst, wohingegen die Osteocalcin mRNA Expression insbesondere durch ApoE 4 Inkubation reduziert wird und die mRNA der Alkalischen Phosphatase bei keiner der drei ApoE Inkubationen mehr nachzuweisen ist (Abb.2).

Auf Proteinebene zeigt die intrazelluläre Gesamtosteocalcin Konzentration im Verlauf der Differenzierung ebenfalls einen deutlichen Anstieg und wird durch alle ApoE Isoformen signifikant reduziert, ApoE 4 hat auch hier den stärksten inhibitorischen Effekt (Abb.3). Die einzelnen ApoE Isoformen inhibieren die Osteoblastenaktivität demnach unterschiedlich stark.

Ein Teil des Osteocalcins wird nach seiner Expression intrazellulär carboxyliert und aus der Zelle transportiert, ein weiterer Teil gelangt nicht oder nur teilweise carboxyliert in den Extrazellulärraum. Von welchen Faktoren dieser Prozess abhängt und welche Funktion das untercarboxylierte Osteocalcin im Extrazellulärraum erfüllt, ist bisher nicht vollständig bekannt. Das carboxylierte Osteocalcin weist im Extrazellulärraum eine erhöhte Affinität zum Hydroxyapatit auf, so dass eine regulatorische Funktion in Bezug auf die Mineralisierung der extrazellulären Matrix vermutet wird (Desbois und Karsenty 1995).

Zusammen mit der Bestimmung des untercarboxylierten und carboxylierten Osteocalcins im Intrazellulärraum weisen die Ergebnisse deutlich darauf hin, dass dem inhibitorischen Effekt

des ApoE auf die Osteoblastenaktivität eine Regulation auf transkriptioneller Ebene zu Grunde liegt. Ebenso lässt sich ein Einfluss auf die Carboxylierung des Osteocalcins und die Sekretion in den Extrazellulärraum ausschließen. Denn die ApoE Inkubation bewirkt sowohl eine Reduktion der mRNA Synthese, als auch der intrazellulären Konzentration des untercarboxylierten Osteocalcins, ohne dabei die intrazelluläre Menge des carboxylierten Osteocalcins zu beeinflussen (Abb.4). Im Medium wird die Gesamtosteocalcin Konzentration durch ApoE 4 Inkubation am stärksten reduziert. ApoE 2 senkt die Konzentration ebenfalls signifikant, wohingegen ApoE 3 keinen Effekt aufweist (Abb.5). Die Reduktion der Osteocalcin Genexpression durch das ApoE 4 ist demnach so stark, dass bedingt durch die intrazellulär stark verminderte Gesamtosteocalcin Konzentration auch die extrazelluläre Konzentrationen des untercarboxylierten und carboxylierten Osteocalcins beeinflusst werden (Abb.6). ApoE 2 und E 3 senken zwar die intrazelluläre Konzentration des untercarboxylierten Osteocalcins, dennoch ist die Menge ausreichend, um die extrazelluläre Konzentration des carboxylierten Osteocalcins im Vergleich zur Kontrolle normal zu halten. Bei den mit ApoE 2 inkubierten Zellen findet der Ausgleich durch eine verminderte Sekretion an untercarboxyliertem Osteocalcin statt. Dies macht einen Einfluss des ApoE auf die Sekretion des Osteocalcins in den Extrazellulärraum unwahrscheinlich.

In Bezug auf die Alkalische Phosphatase Aktivität im Medium konnte im Gegensatz zur mRNA Expression lediglich für das ApoE 4 eine signifikante Reduktion gemessen werden (Abb.7).

Im Gegensatz zu in vivo Untersuchungen, bietet der in vitro Ansatz zur Analyse eines möglichen ApoE Effektes auf die Osteoblastendifferenzierung und -aktivität den Vorteil, dass zum einen unter standardisierten Bedingungen gearbeitet werden kann und zum anderen komplexe Wechselwirkungen mit anderen physiologischen Effektoren ausgeschlossen sind.

Die verwendeten hMSC-Tert20 Zellen sind durch Überexpression von Telomerase immortalisiert (Simonsen 2002). Sie haben im Gegensatz zu anderen gebräuchlichen humanen osteogenen Zellen, welche in der Regel Tumorzellen sind, einen normalen Karyotyp und weisen somit physiologischere Merkmale auf.

Zur Einleitung der osteogenen Differenzierung ist eine Vitamin D3 Inkubation für 48 h ausreichend (Simonsen 2002). Das gewählte Zeitfenster von sechs Tagen entspricht einem späten Zeitpunkt der Differenzierung. Nachgewiesen wurde somit in diesem experimentellen Ansatz eher eine Inhibition der Osteoblastenaktivität als der eigentlichen osteogenen Differenzierung, da die Zellen zum Zeitpunkt der ApoE Inkubation bereits differenziert sind.

Die eingesetzte ApoE Konzentration von 10 µg/ml orientiert sich an der physiologischen Konzentration in humanem Serum von 30-50 µg/ml (Bohnet 1996). Folglich sind in vitro bereits deutliche Effekte mit einem Drittel der physiologischen ApoE Konzentration nachzuweisen.

Eine potentielle Bedeutung des ApoE Genotyps für den Knochenstoffwechsel wird in der Literatur kontrovers diskutiert.

Es existieren klinische Studien, welche sich mit der Frage beschäftigen, ob ein bestimmter ApoE Genotyp für die Entstehung der postmenopausalen Osteoporose oder generell für eine Verminderung der Knochendichte mit erhöhter Frakturneigung prädisponierend ist.

Shiraki et al. hat 1997 in einer Studie mit 284 postmenopausalen Japanerinnen im Alter von 47 bis 82 Jahren gezeigt, dass die Knochendichte der Lendenwirbelkörper bei homozygoten ApoE ε4 (n=6) Allelen im Gegensatz zu heterozygoten (n=61) und nicht ApoE ε4 Allelträgerinnen (n=217) signifikant erniedrigt ist.

Ebenso zeigten sich hier und in einer anderen Studie, in welcher ebenfalls eine verminderte Knochendichte für ApoE ε4 Allelträger nachgewiesen wurde, keine Unterschiede in der Knochenresorption der homozygoten ApoE ε4 Allelträger im Vergleich zu den anderen Gruppen. Die Knochenresorption wurde anhand von Knochenabbauprodukten im Serum und Urin bestimmt (Dick 2002). Dies bedeutet, dass sich der ApoE Effekt auf eine Reduktion der Osteoblastenaktivität beschränkt und keine Steigerung der Knochenresorption mit erhöhter Osteoclastenaktivität bedingt.

Ein ähnliches Ergebnis beschrieb Sanada et al 1998 in einer Gruppe von 320 postmenopausalen Japanerinnen. Die Einteilung der Gruppen erfolgte hier nach homozygoten bzw. heterozygoten ApoE ε2 Allelträgern (8,4%), nach homozygoten ApoE ε3 Allelträgern (70,3%) und nach heterozygoten bzw. homozygoten ApoE ε4 Allelträgern (20,7%). Die Untersuchung ergab ebenfalls eine erniedrigte Knochendichte in der Gruppe mit dem ApoE ε4 Allel, obwohl auch heterozygote ApoE ε4 Allelträger enthalten waren.

Der ApoE 4 Effekt scheint bei Frauen besonders nach der Menopause und dem damit verbundenen Östrogenabfall eine Rolle zu spielen. Bei prämenopausalen Frauen konnten keine signifikanten Unterschiede der Knochendichte von Hüftknochen und Lumbalwirbelkörpern zwischen den ApoE Isoformen gefunden werden. Bei peri- bzw. postmenopausalen Frauen aus demselben Kollektiv waren die Knochendichtewerte bei ApoE ε4 Allelträgern erniedrigt. Zudem wurde dieser Effekt bei einer frühzeitig begonnenen Hormonersatztherapie unter anderem mit Östrogenpräparaten wieder aufgehoben (Salamone 2000).

Bei Männern ist ebenfalls eine Korrelation von ApoE 4 und reduzierter Knochendichte in einer Altersgruppe von 65 bis 69 Jahren beschrieben worden (Pluijm 2002).

Die Manifestation des Knochendichteverlustes beschränkt sich ebenso wenig auf bestimmte Anteile des Skelettsystems. Es sind in den einzelnen Studien unterschiedliche Regionen des Skelettsystems untersucht worden. So fand Zajickowa et al. 2003 bei ApoE ϵ 4 Allelträgerinnen eine verminderte Knochendichte der lumbalen Wirbelkörper, jedoch konnte für die Hüfte keine Korrelation von erniedrigter Knochendichte und ApoE 4 nachgewiesen werden. Villarreal konnte hingegen in einer Studie in Wirbelkörpern keinen signifikanten Knochendichteverlust in Abhängigkeit vom ApoE Genotyp feststellen (Villarreal 2004).

Der ApoE 4 Genotyp geht weiterhin in einigen Fällen mit einer erhöhten Frakturnrate einher (Johnston 1999, Dick 2002). Diese kann auch unabhängig von einer messbaren Knochendichteminderung auftreten, so dass es eine Prädisposition für Frakturen durch das ApoE ϵ 4 Allel zu geben scheint. Bei weiblichen Probanden mit einer bereits bestehenden Osteoporose wurde eine Korrelation zwischen Frakturnrate und dem ApoE ϵ 4 Allel nachgewiesen. Diese Gruppe der ϵ 4 Allelträgerinnen zeigte im Vergleich zu den anderen ApoE Isoformen jedoch keine signifikante Minderung der Knochendichte der Hüftknochen und des Calcaneus. Eine erhöhte Sturzneigung war ebenfalls nicht nachweisbar (Cauley 1999).

Dass ApoE 2, welches nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit im Gegensatz zu ApoE 3 in vitro ebenfalls inhibitorisch auf die Aktivität humaner Osteoblasten wirkt, prädisponierend für Osteoporose sein könnte, zeigt die Studie von Kohlmeier et al 1999. Im Verlauf der Studie über vier Jahre konnte keine Korrelation zwischen einzelnen ApoE Isoformen und einer erhöhten Frakturnrate nachgewiesen werden, obwohl eine Tendenz zum ApoE 4 hin gegeben war. Zu Beginn der Studie hatten jedoch eine signifikante Menge an Probanden mit ApoE ϵ 2 und E ϵ 4 Allel in der Vergangenheit bereits Frakturen erlitten.

Im Gegensatz zu diesen Studien existieren jedoch ebenfalls Studien, welche keine Korrelation zwischen dem ApoE Genotyp und einer erniedrigten Knochendichte oder erhöhten Frakturnrate beschreiben.

Heikkinen et al 2000 hat in einer Gruppe von 464 caucasischen, postmenopausalen Frauen, von welchen ein Teil im Verlauf der Studie eine Hormonsubstitutionstherapie erhielt, nach fünf Jahren eine höhere Knochendichte bei Frauen mit einer Hormonsubstitutionstherapie messen können. Weder zu Beginn noch im Verlauf der Studie konnte jedoch eine Korrelation zwischen erniedrigter Knochendichte und einem der ApoE Genotypen nachgewiesen werden.

Zudem waren keine Unterschiede in der Serumkonzentration von Knochenformationsmarkern (OCN, bsALP, Col1) in Abhängigkeit vom ApoE Genotyp zu erkennen.

Die größte bisher durchgeführte Studie zu dieser Fragestellung wurde 2004 von Schoofs et al veröffentlicht und stammt aus der Rotterdam Studie. An dieser Studie nahmen 3297 Frauen und 2560 Männer im Alter von über 55 Jahren teil, welche über sieben Jahre beobachtet wurden. Bei über 800 Frakturen, welche im Verlauf in der gesamten Gruppe aufgetreten waren, konnte kein gehäuftes Auftreten von Frakturen und gesteigerter Knochendichteminderung bei ApoE ε4 Allel Trägern festgestellt werden.

In dieser Form sind weitere Studien veröffentlicht worden, in welchen unter Berücksichtigung verschiedener Bedingungen in Abhängigkeit vom ApoE Genotyp keine erhöhte Frakturrate und kein gesteigerter Knochendichteverlust nachgewiesen werden konnte (Efstathiadou 2004; von Mühlen 2001, Gerdes 2001, Beaven 2005, Sennels 2003, Zajikova 2003, Stulc 2000, Booth 2000, Heikkinen 2000).

Aus den klinisch epidemiologischen Studien resultiert zusammenfassend kein eindeutiges Bild, so dass sich die Frage stellt, ob ein inhibitorischer Effekt des ApoE auf die Differenzierung und Aktivität von Osteoblasten existiert und von welchen weiteren Faktoren dieser Abhängig sein könnte.

In der Übersicht der durchgeführten Studien fällt auf, dass vor allem Alter und Geschlecht der Probanden eine Rolle spielen. So werden ApoE spezifische Effekte vor allem bei postmenopausalen Frauen in höherem Alter beobachtet. Weiterhin sind ethnische Unterschiede von Bedeutung, welche unter anderem Differenzen in der ApoE Allelfrequenz, der Osteocalcin und der Vitamin K Serumkonzentrationen mit sich bringen (Beavan 2005). Eben diese Vielfalt der möglichen Wechselwirkungen erschweren den klinischen Nachweis eines selektiven Effektes der ApoE Genotypen auf den Knochenstoffwechsel.

Die Ergebnisse der in vitro Experimente dieser Doktorarbeit mit humanen Osteoblasten zeigen jedoch deutlich, dass ApoE einen zellautonomen, inhibitorischen Effekt auf die Osteoblastenaktivität ausübt. Dieser Effekt ist bei den einzelnen ApoE Isoformen unterschiedlich stark ausgeprägt, wobei ApoE 4 die stärkste inhibitorische Potenz aufweist. Die Tatsache, dass dieser Effekt in vivo nicht immer nachweisbar ist, liegt wahrscheinlich an der Komplexität der Situation in vivo, in der neben den oben beschriebenen Einflussfaktoren auch noch unbekannte Faktoren auf den Knochenstoffwechsel wirken, welche nicht in allen Studien gleichermaßen berücksichtigt wurden.

5.2. Untersuchung der Osteoblastenaktivität in ApoE defizienten Mäusen

Die Ergebnisse dieses experimentellen Abschnittes zeigen, dass eine ApoE Defizienz sowohl in vivo als auch in vitro zu einer Steigerung der Osteoblastenaktivität und folglich zu einer vermehrten Knochenmineralisierung führt. Zudem ist dieser Effekt in vitro durch Rekonstitution von ApoE 3 reversibel.

Anhand von ApoE defizienten Mäusen wurde untersucht, wie sich ein Fehlen des ApoE auf die Aktivität der Osteoblasten auswirkt.

In den initial durchgeführten Serumuntersuchungen ApoE defizienter Mäuse im Vergleich zu den Wildtypen wurden im Sinne einer Phänotypisierung die Serumcholesterinwerte bestimmt. Die gemessenen Konzentrationen waren in allen ApoE defizienten Tiergruppen im Vergleich zu den Wildtypen im Mittel um den Faktor fünf erhöht (Abb.8). Die gemessenen Konzentrationen sind mit den in der Literatur beschriebenen Werten vergleichbar, welche für Wildtypmäuse mit ca. 60 mg/dl und für ApoE defiziente Tiere mit über 400 mg/dl angegeben werden (Plump 1992).

In Bezug auf die Osteoblastenaktivität in ApoE defizienten Mäusen waren sowohl die Aktivität der Alkalischen Phosphatase als auch die Osteocalcinkonzentration im Serum erhöht.

Der Vergleich der 15 Wochen alten Tiere mit den 30 Wochen alten zeigt eine Abnahme der Alkalischen Phosphatase Aktivität und Osteocalcin Konzentration in den weiblichen Wildtypen mit zunehmendem Alter, wohingegen in den weiblichen ApoE defizienten Tieren eine altersbedingte Abnahme der Aktivitätsmarker nicht zu erkennen ist. Bei den männlichen Tieren weisen die 30 Wochen alten Mäuse beider Genotypen eine niedrigere Osteocalcin Konzentration als die vergleichbare, junge Tiergruppe auf. Für die Alkalische Phosphatase Aktivität ist hier nur bei den ApoE defizienten Tieren eine signifikante Abnahme zu erkennen.

Im Geschlechtervergleich weisen die männlichen Wildtypiere darüber hinaus mit 15 Wochen eine deutlich niedrigere Osteocalcin Konzentration und Alkalische Phosphatase Aktivität auf als die Weibchen. Bei den gleichaltrigen ApoE defizienten Tieren ist dieser Unterschied lediglich für die Alkalische Phosphatase Aktivität signifikant. In der 30 Wochen alten Tiergruppe sind die Konzentrationen beider Aktivitätsmarker bei den Männchen beider Genotypen niedriger als bei den Weibchen (Abb.9, 10).

Neben einer altersbedingten Aktivitätsabnahme sind demnach auch geschlechtliche Unterschiede von Bedeutung. Dieser Unterschied macht deutlich, dass der inhibitorische

Effekt des ApoE auf die Osteoblastenaktivität auch in Mäusen wahrscheinlich im Zusammenhang mit dem Einfluss von Geschlechts- und Wachstumshormonen steht.

Für die Serumanalyse wurden das Osteocalcin betreffend unterschiedliche Faktoren berücksichtigt. Die Osteocalcin Konzentration im Serum unterliegt, sowohl beim Menschen als auch bei Mäusen, einer tageszeitlichen Schwankung mit einem Abfall in den frühen Morgenstunden und einer erneuten Zunahme um die Mittagszeit bis in den frühen Abend, um in der Nacht erneut ein Maximum zu erreichen (Gundberg 1985). Die Serumgewinnung erfolgte daher für alle Tiere gegen 13.00 Uhr. Trotz dieser Tageszeitlichen Schwankung stellt die Osteocalcin Serumkonzentration einen sehr sensitiven Parameter der Osteoblastenaktivität dar (Eastell 1988).

Die Untersuchung unterschiedlicher Altersgruppen erfolgte, da der Knochenphänotyp ApoE defizienter Mäuse im Alter von 8 Monaten stärker ausgeprägt ist als im Alter von 3 Monaten (Schilling 2005).

Die Alkalische Phosphatase ist neben Osteocalcin einer der am häufigsten verwendeten Parameter zur Bestimmung der Osteoblastenaktivität (Risteli 1993; Garnero und Delmas 1996). Es konnten bisher vier Gene für die Alkalische Phosphatase identifiziert werden (Kam 1985; Millan 1986; Henthorn 1987; Millan und Manes 1988). Sie codieren für verschiedene Isoenzyme, welche gemäß dem Ort ihrer Synthese in intestinale ALP, Plazenta ALP, Keimzellen ALP und in die tissue *non specific ALP* (TNAP) unterteilt werden (Seargeant 1979, Moss 1982). Alle Isoenzyme sind Homodimere, welche durch die Hydrolyse von Phosphomonoestern die Freisetzung von Phosphationen bewirken (Fernley 1971).

Die TNAP wird im Knochen, in der Leber und in der Niere exprimiert (Weiss 1986) und macht beim Menschen etwa 95% der ALP Gesamtserumaktivität aus (Calvo 1996). Die TNAP lässt sich allerdings anhand bestimmter Kohlenwasserstoff Seitenketten in eine knochenspezifische ALP und in eine leberspezifische ALP unterscheiden, diese stellen demnach Isoformen des TNAP Isoenzymes dar (Miura 1994). Für das humane System ist es möglich mit den entsprechenden Antikörpern (AK) im Serum gezielt die knochenspezifische ALP Aktivität zu bestimmen. Im murinen System existieren bislang keine AK für die knochenspezifische ALP, so dass in diesem Experiment die Gesamtserumaktivität der ALP bestimmt wurde.

Um weiter zu untersuchen, ob die bei Mäusen *in vivo* beobachteten Effekte zellautonom bedingt sind oder in wesentlichem Ausmaß systemischen Einflüssen unterliegen, wurden im zweiten Teil dieses experimentellen Ansatzes *in vitro* Untersuchungen an primären Osteoblastenkulturen durchgeführt, welche einen deutlichen Vorteil bieten. Es kann zum

einen gezielt die knochenspezifische ALP gemessen und zum anderen unabhängig von hormonellen und altersbedingten Einflussfaktoren die Osteoblastenaktivität der ApoE defizienten Mäuse und der Wildtypiere bestimmt werden. Die gewonnenen Clavaria Osteoblasten wurden hierzu für einen Differenzierungszeitraum von 30 Tagen unter Zugabe von Ascorbat und β -Glycerophosphat in Kultur gehalten. Die Bestimmung der Aktivitätsmarker auf mRNA und Proteinebene erfolgte im Abstand von sechs Tagen. Die Ergebnisse dieser in vitro Experimente sind eindeutig. Die ApoE defizienten Zellen weisen im Vergleich zu Wildtypzellen auf mRNA Ebene mehr als zehn Mal so hohe Werte für Alkalische Phosphatase, Osteocalcin und Col1 auf (Bestimmung durch eine quantitative RT-PCR, Daten nicht gezeigt). Auf Proteinebene wurde die Aktivität der Alkalischen Phosphatase und die Osteocalcin Konzentration im Medium bestimmt. Auch hier wurden bei den ApoE defizienten Tieren stark erhöhte Werte für beide Aktivitätsmarker gemessen (Abb.11, 12). In Analogie zum humanen Zellsystem wurde in diesen Proben ebenfalls der Carboxylierungsgrad des Osteocalcins bestimmt. ApoE defiziente Zellen weisen zum einen im Vergleich zu den Wildtypzellen anteilig an der Gesamtosteocalcin Konzentration mehr untercarboxyliertes Osteocalcins auf, bilden aber aufgrund der weitaus höheren Gesamtosteocalcin Menge auch deutlich mehr carboxyliertes Osteocalcin (Abb.12).

Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass eine ApoE Defizienz gemessen an der Expression osteoblastärer Markerproteine mit einer gesteigerten Aktivität einhergeht. Es entfällt demnach mit der ApoE Defizienz ein negativer Regulator der Osteoblastenaktivität.

Unterstützt wird dies durch die Tatsache, dass die Zugabe von humanem ApoE 3 zu der ApoE defizienten Zellkultur eine Suppression der Alkalischen Phosphatase Aktivität und Osteocalcin Konzentration im Medium auf Wildtyp Niveaus bewirkt hat (Abb.14).

Das murine ApoE weist im Gegensatz zum Menschen keine Isoformen auf, jedoch ist es strukturell dem humanen ApoE 3 sehr ähnlich. Da das humane ApoE 3 zudem in der Lage ist im Vergleich zu den anderen Isoformen ApoE 2 und E 4 auch im murinen System die Aufnahme von LP Partikeln zu vermitteln, wurde in diesem Experiment ApoE 3 verwendet (Innerarity 1986).

Dass ApoE Defizienz auch zu einer vermehrten Mineralisierung des Extrazellulärums führt, konnte in einem weiteren Experiment gezeigt werden. Durch von Kossa Lösung färbt sich das im Hydroxylapatit enthaltene Kalzium an. In dem dargestellten Zeitraum von Tag 12 bis Tag 30 der Mineralisierung ist deutlich zu erkennen, dass die ApoE defizienten Zellen in vitro früher und stärker mineralisieren als vergleichbare Wildtypzellen (Abb.15).

Diese Ergebnisse können den Knochenphänotyp der ApoE defizienten Mäuse erklären.

ApoE defiziente Mäuse zeichnen sich durch eine erhöhte Knochenformationsrate aus, welche sich bei normaler Osteoblastenzellzahl und normaler Knochenresorptionsrate bildet, d.h. durch eine gesteigerte Osteoblastenaktivität (Schilling 2005).

Die Expression von ApoE wird im Verlauf der osteoblastären Differenzierung stark hoch reguliert. Ein Grund für die hohe ApoE Expression während der osteogenen Differenzierung könnte die notwendige Versorgung von Osteoblasten mit Vitamin K reichen CR sein, da ApoE die Aufnahme von Vitamin K beladenen CR durch Osteoblasten vermittelt (Newman 2002, Niemeier 2005).

In Osteoblasten fungiert Vitamin K als Kofaktor für die Carboxylierung von Osteocalcin.

Osteocalcin weist in seiner carboxylierten Form eine erhöhte Affinität zum Hydroxylapatit auf, so dass dem carboxylierten Osteocalcin ein positiver Effekt auf die Knochenmineralisierung zugesprochen wird (Hauschka 1982).

Ein verminderter Carboxylierungsgrad von Osteocalcin durch eine orale Antikoagulation mit Vitamin K Antagonisten führt zu einer erhöhten Frakturrate der proximalen Oberschenkelknochen (Vermeer 1991). Zudem ist eine überdurchschnittlich erhöhte Konzentration von untercarboxyliertem Osteocalcin bei postmenopausalen im Vergleich zu prämenopausalen Frauen prädisponierend für eine gesteigerte Knochenfrakturrate (Szulc 1993, Both 2003). Folglich scheint das carboxylierte Osteocalcin die Knochenmineralisierung zu fördern. Eine ApoE Defizienz, welche eine verminderte Vitamin K Zufuhr bedingen könnte, sollte demnach eigentlich über einen verminderten Carboxylierungsgrad des Osteocalcins eine niedrigere Knochenformationsrate aufweisen.

Im Gegensatz hierzu belegen Untersuchungen an Osteocalcin defizienten Mäusen, welche ähnlich wie ApoE defiziente Mäuse eine erhöhte Knochenformationsrate aufweisen, dass Osteocalcin ebenso einen inhibitorischen Effekt auf die Knochenformation haben könnte (Desbois 1995, Ducy 1996). Dass die unterschiedlichen Effekte des untercarboxylierten und carboxylierten Osteocalcins auf die Knochenmineralisierung für den inhibitorischen Effekt des ApoE auf die Aktivität der Osteoblasten eine bedeutende Rolle spielen ist meiner Einschätzung nach eher unwahrscheinlich, da die Osteoblasten bei gesteigerter Osteocalcin Konzentration auch eine vermehrte Mineralisierung zeigen. Der Knochenphänotyp ApoE defizienter Mäuse lässt sich demnach nicht vollständig über seine Funktion als Transportprotein für Vitamin K beladene Lipoproteine und der damit verbundenen Osteocalcin Carboxylierung erklären.

Vielmehr deuten meine Ergebnisse in Verbindung mit der Literatur darauf hin, dass ApoE unabhängig von seiner Funktion im Lipidstoffwechsel, auf zellulärer Ebene einen deutlichen, inhibitorischen Einfluss auf die Osteoblastenaktivität hat.

Der letztendliche Mechanismus der Inhibition bleibt bisher offen, ich vermute aber einen Effekt von ApoE auf eine Signaltransduktionskaskade, welche für die osteogene Differenzierung erforderlich ist.

Erste vorläufige Daten deuten auf eine ApoE vermittelte Inhibition der durch Wnt3a stimulierten Transkription LEF/TCF abhängiger Gene hin, d.h. eine Inhibition des Wnt/ β -Catenin Signaltransduktionsweges. Der Wnt/ β -Catenin Signaltransduktionsweg spielt während der osteoblastären Differenzierung eine bedeutende Rolle (Westendorf 2004, Raead 2005).

Die Möglichkeit, dass ApoE derartige regulatorische Mechanismen moduliert, wird durch die unterschiedlichen Funktionen seiner möglichen Interaktionspartner unterstützt. Hier ist vor allem die Gruppe der LRP Rezeptoren aus der LDL-Rezeptor Genfamilie von besonderer Bedeutung. LRP1, LRP5 und LRP6 binden ApoE und sind in verschiedene Signaltransduktionswege involviert. LRP5 und LRP6 fungieren unter anderem als Korezeptoren des Wnt/ β -Catenin Signaltransduktionsweges (Tamai 2000, Dale 1998).

Eine ApoE vermittelte Inhibition des *canonical wnt signaling* beschrieb Caruso et al. 2006 in einem Zellmodell humaner Neuronen. Untersucht wurde hier der inhibitorische Effekt von endogen exprimierten und exogen zugeführten ApoE Isoformen auf die Differenzierung von neuronalen Zellen über eine Inhibition des Wnt/ β -Catenin Signaltransduktionsweges. Auch in dieser Arbeit wurde der stärkste Effekt für das ApoE 4 nachgewiesen. ApoE2 und E3 schienen exogen nur einen relativ begrenzten Einfluss zu haben. Durch Generierung von LRP5 überexprimierenden Zellen, in welchen der inhibitorische Effekt von exogen zugeführtem ApoE 2 und E 3 gesteigert werden konnte, wurde eine Interaktion von ApoE mit dem LRP5 Rezeptor vermutet.

Demnach ist es gut vorstellbar, dass der in dieser Arbeit gezeigte inhibitorische Effekt des ApoE auf die Osteoblastenaktivität durch eine Interaktionen mit LRP-Rezeptoren über den Wnt/ β -Catenin Signaltransduktionsweg vermittelt wird. Die Aufklärung der molekularen Wirkungsmechanismen wird Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

6. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, die Arbeitshypothese, dass ApoE einen inhibitorischen Effekt auf die Osteoblastenaktivität hat, experimentell zu belegen.

Zu diesem Zweck wurde unter standardisierten Bedingungen die Aktivität humaner mesenchymaler Stammzellen unter dem Einfluss der ApoE Isoformen E 2, E 3 und E 4 untersucht.

Im humanen Zellsystem kann durch exogene ApoE Inkubation eine Verminderung der Osteoblastenaktivität erreicht werden, wobei deutliche Unterschiede in der inhibitorischen Potenz der einzelnen Isoformen vorhanden sind. Den stärksten Effekt weist das ApoE 4 auf.

Serumanalysen von Wildtyp und ApoE defizienten Mäusen sowie standardisierte in vitro Experimente mit primären Osteoblasten ApoE defizienter Mäuse ergeben klare Hinweise auf eine deutlich erhöhte Osteoblastenaktivität sowohl in vivo als auch in vitro. Zudem zeigte sich auch in vitro eine gesteigerte Mineralisierung der extrazellulären Matrix. Diese gesteigerte Aktivität kann durch Rekonstitution von ApoE in Osteoblastenkulturen aufgehoben werden.

Die hier gewonnenen Ergebnisse zeigen deutlich, dass ApoE einen inhibitorischen Effekt auf die Osteoblastenaktivität ausübt und auf zellulärer Ebene ein isoformspezifischer Unterschied mit maximalem Effekt des ApoE 4 vorhanden ist.

Diese Ergebnisse helfen zum einen den Knochenphänotyp ApoE defizienter Mäuse besser zu verstehen und zum anderen zeigen sie, dass einzelne ApoE Isoformen im humanen System, bedingt durch eine Minderung der Osteoblastenaktivität, durchaus zur Abnahme der Knochendichte und zur Osteoporoseentstehung beitragen können.

7. Abkürzungsverzeichnis

α -MEM	<i>alpha-minimum essential medium</i>
ABCA1	<i>ATP binding cassette transporter A1</i>
ACAT	Acyl-CoA-Cholesterin-Acyltransferase
ALP	Alkalische Phosphatase
APC	<i>adenomatous poliposis coli</i>
Apo	Apolipoprotein
apoER2	ApoE Rezeptor2
BMD	bone mineral density
BMP2	<i>bone morphogenic protein-2</i>
BSP	<i>bone sialoprotein</i>
Cbfa1	<i>core binding factor 1</i>
CEPT	Cholesterinester Transferprotein
CM	Chylomicron
Col1	Kollagen1
CR	<i>chylomicron remnant</i>
DBP	Vitamin D bindenden Protein
Dkk-1	Dickkopf
DMEM	<i>Dulbecco`s modified eagle medium</i>
dNTP	<i>deoxynucleotide triphosphate</i>
DTT	Dithiothreitol
FBS	<i>fetal bovine serum</i>
Fz	Frizzeld
gla-OCN	carboxyliertes Osteocalcin
glu-OCN	untercarboxyliertes Osteocalcin
GSK3	Glykogen Synthase Kinase 3
GZP	Gesamtzellprotein
HDL	<i>high density lipoprotein</i>
HLP	Hyperlipoproteinämie
IDL	<i>intermediate density lipoproteins</i>
IGF-1	<i>insulin like growth factor-1</i>
IL-6	Interleukin 6
kD	Kilodalton
KO	<i>knock out</i>

LCAT	Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
LDL-R	<i>very low density lipoprotein receptor</i>
LEF	<i>lymphoid enhancer binding factor</i>
LP	Lipoprotein
LPL	Lipoproteinlipase
LRP1	<i>low density lipoprotein receptor related protein 1</i>
MMLV	<i>moloney murine leukemia virus</i>
MSC	mesenchymalen Stammzellen
NFAT2	<i>nuclear factor for activated T cells 2</i>
OCN	Osteocalcin
Osx	Osterix
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PS	Penicillin/Spreptomycin
PTH	Parathormons
RCT	Reverse Cholesterintransport
RPM	<i>rounds per minute</i>
RXR	<i>retinoid acid receptor</i>
sFRP	<i>Frizzeld-related proteins</i>
SR-BI	<i>savenger-receptor BI</i>
TCF	<i>T cell factor</i>
TGF α	<i>transforming growth factor α</i>
TGF β	<i>transforming growth factor β</i>
TNF α	Tumornekrosefaktor α
tPA	<i>tissue plasminogen activator</i>
TRL	triglyceridreichen Lipoproteine
VDR	Vitamin-D3-Rezeptor
VDRE	<i>vitamin-D- responsive elements</i>
VLDL	<i>very low density lipoprotein</i>
WIF-1	<i>Wnt inhibitory factor1</i>
Wnt	<i>Wingless-Int pathways</i>
WT	Wildtyp

8. Literaturverzeichnis

- Aarden EM, Burger EH, Nijweide PJ. Function of osteocytes in bone. *J Cell Biochem.* 1994 Jul;55(3):287-299.
- Ai M, Holmen SL, Van Hul W, Williams BO, Warman ML. Reduced affinity to and inhibition by DKK1 form a common mechanism by which high bone mass-associated missense mutations in LRP5 affect canonical Wnt signaling. *Mol Cell Biol.* 2005 Jun;25(12):4946-4955.
- Alaupovic P, Lee DM, McConathy WJ. Studies on the composition and structure of plasma lipoproteins: distribution of lipoprotein families in major density classes of normal human plasma lipoproteins. *Biochim Biophys Acta.* 1972 Apr 18;260(4):689-707.
- Anderson HC. Matrix vesicles and calcification. *Curr Rheumatol Rep.* 2003 Jun;5(3):222-226.
- Aubin JE. Bone stem cells. *J Cell Biochem Suppl.* 1998;30-31:73-82.
- Augat P, Schorlemmer S. The role of cortical bone and its microstructure in bone strength. *Age Ageing.* 2006 Sep;35 Suppl 2:ii27-ii31.
- Baek WY, Lee MA, Jung JW, Kim SY, Akiyama H, de Crombrughe B, Kim JE. Positive regulation of adult bone formation by osteoblast-specific transcription factor osterix. *J Bone Miner Res.* 2008 Dec. 29.
- Bandyopadhyay PK. Vitamin K-dependent gamma-glutamylcarboxylation: an ancient posttranslational modification. *Vitam Horm.* 2008;78:157-184.
- Banerjee C, Hiebert SW, Stein JL, Lian JB, Stein GS. An AML-1 consensus sequence binds an osteoblast-specific complex and transcriptionally activates the osteocalcin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 May 14;93(10):4968-73.
- Beavan SR, Prentice A, Stirling DM, Dibba B, Yan L, Harrington DJ, Shearer MJ. Ethnic differences in osteocalcin gamma-carboxylation, plasma phylloquinone (vitamin K1) and apolipoprotein E genotype. *Eur J Clin Nutr.* 2005 Jan;59(1):72-81.
- Behrens J, von Kries JP, Kühl M, Bruhn L, Wedlich D, Grosschedl R, Birchmeier W. Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* 1996 Aug 15;382(6592):638-642.
- Beisiegel U, Weber W, Bengtsson-Olivecrona G. Lipoprotein lipase enhances the binding of chylomicrons to low density lipoprotein receptor-related protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991;88:8342-8346.

-
- Beisiegel U, Weber W, Ihrke G, Herz J, Stanley KK. The LDL-receptor-related protein, LRP, is an apolipoprotein E-binding protein. *Nature* 1989;341:162-164.
 - Bodine PV, Zhao W, Kharode YP, Bex FJ, Lambert AJ, Goad MB, Gaur T, Stein GS, Lian JB, Komm BS. The Wnt antagonist secreted frizzled-related protein-1 is a negative regulator of trabecular bone formation in adult mice. *Mol Endocrinol.* 2004 May;18(5):1222-1237.
 - Bohnet K, Pillot T, Visvikis S, Sabolovic N, Siest G. Apolipoprotein (apo) E genotype and apoE concentration determine binding of normal very low density lipoproteins to HepG2 cell surface receptors. *J Lipid Res.* 1996 Jun;37(6):1316-1324.
 - Bonewald LF. Osteocytes as dynamic multifunctional cells. *Ann N Y Acad Sci.* 2007 Nov;1116:281-290.
 - Booth SL, Tucker KL, Chen H, Hannan MT, Gagnon DR, Cupples LA, Wilson PW, Ordovas J, Schaefer EJ, Dawson-Hughes B, Kiel DP. Dietary vitamin K intakes are associated with hip fracture but not with bone mineral density in elderly men and women. *Am J Clin Nutr.* 2000 May;71(5):1201-1208.
 - Boucher P, Gotthardt M, Li WP, Anderson RG, Herz J. LRP: role in vascular wall integrity and protection from atherosclerosis. *Science.* 2003 Apr 11;300(5617):329-332.
 - Boyce BF, Aufdemorte TB, Garrett IR, Yates AJ, Mundy GR. Effects of interleukin-1 on bone turnover in normal mice. *Endocrinology* 1989 Sep;125(3):1142-1150.
 - Boyden LM, Mao J, Belsky J, Mitzner L, Farhi A, Mitnick MA, Wu D, Insogna K, Lifton RP. High bone density due to a mutation in LDL-receptor-related protein 5. *N Engl J Med.* 2002 May 16;346(20):1513-1521.
 - Brasseur R. Differentiation of lipid-associating helices by use of three-dimensional molecular hydrophobicity potential calculations. *J. Biol. Chem.* 1991 Aug 25;266(24):16120-16127.
 - Breslow JL, Zannis VI, SanGiacomo TR, Third JL, Tracy T, Glueck CJ. Studies of familial type III hyperlipoproteinemia using as a genetic marker the apoE phenotype E2/2. *J Lipid Res.* 1982 Nov;23(8):1224-1235.
 - Brown MS, Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science.* 1986 Apr 4;232(4746):34-47.
 - Brown, M. S., Goldstein, J. L. Receptor-mediated endocytosis: insights from the lipoprotein receptor system. *Proc. Nat. Acad. Sci USA.* 1979 Jul;76(7):3330-3337.

- Burr DB, Robling AG, Turner CH. Effects of biomechanical stress on bones in animals. *Bone* 2002 May;30(5):781–786.
- Calvo MS, Eyre DR, Gundberg CM. Molecular basis and clinical application of biological markers of bone turnover. *Endocr Rev.* 1996 Aug;17(4):333-368.
- Cardigan KM, Nusse R. Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev.* 1997 Dec 15;11(24):3286-3305.
- Caruso A, Motolese M, Iacovelli L, Caraci F, Copani A, Nicoletti F, Terstappen GC, Gaviraghi G, Caricasole A. Inhibition of the canonical Wnt signaling pathway by apolipoprotein E4 in PC12 cells. *J Neurochem.* 2006 Jul;98(2):364-371.
- Cauley JA, Zmuda JM, Yaffe K, Kuller LH, Ferrell RE, Wisniewski SR, Cummings SR. Apolipoprotein E polymorphism: A new genetic marker of hip fracture risk-The Study of Osteoporotic Fractures. *J Bone Miner Res.* 1999 Jul;14(7):1175-81.
- Cedazo-Minguez A., Cowburn RF. Apolipoprotein E: a major piece in the Alzheimer`s disease puzzle. *J Cell Mol Med* 2001 Jul-Sep;5(3):254-266.
- Celil AB, Campbell PG. BMP-2 and insulin-like growth factor-1 mediate Osterix (Osx) expression in human mesenchymal stem cells via MAPK and protein kinase D signalling pathways. *J Biol Chem* 2005 Sep 9;280(36):31353-31359.
- Conly J, Stein K. The production of menaquinones (vitamin K2) by intestinal bacteria and their role in maintaining coagulation homeostasis. *Prog. Food Nutr. Sci.* 1992 Oct-Dec;16(4):307-343.
- Cuthbert JA, Russell DW, Lipsky PE. Regulation of low density lipoprotein receptor gene expression in human lymphocytes. *J Biol Chem.* 1989 Jan 15;264(2):1298-1304.
- D'Arcangelo G, Homayouni R, Keshvara L, Rice DS, Sheldon M, Curran T. Reelin is a ligand for lipoprotein receptors. *Neuron.* 1999 Oct;24(2):471-479
- De Ferrari GV, Papassotiropoulos A, Biechele T, Wavrant De-Vrieze F, Avila ME, Major MB, Myers A, Sáez K, Henríquez JP, Zhao A, Wollmer MA, Nitsch RM, Hock C, Morris CM, Hardy J, Moon RT. Common genetic variation within the low-density lipoprotein receptor-related protein 6 and late-onset Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 May 29;104(22):9434-9439.
- Desbois C, Hagihara K, Pinero G, Boyce B, Bonadino J, Tseung KF, Goulet R, Goldstein S, Loyer E, Karsenty G. Increased bone formation in Osteocalcin deficient mice. *J Bone Miner Res.* 1995;10(Suppl 1):S139.
- Desbois C, Karsenty G. Osteocalcin Cluster: Implications for Functional Studies *Journal of Cellular Biochemistry.* 1995 Mar;57(3):379-383.

- Dick IM, Devine A, Marangou A, Dhaliwal SS, Laws S, Martins RN, Prince RL. Apolipoprotein E4 is associated with reduced calcaneal quantitative ultrasound measurements and bone mineral density in elderly women. *Bone*. 2002 Oct;31(4):497-502.
- Drissi H, Pouliot A, Koolloos C, Stein JL, Lian JB, Stein GS, van Wijnen AJ. 1,25-(OH)₂-vitamin D₃ suppresses the bone-related Runx2/Cbfa1 gene promoter. *Exp Cell Res*. 2002 Apr 1;274(2):323-333.
- Ducy P, Desbois C, Boyce B, Pinero G, Story B, Dunstan C, Smith E, Bonadio J, Goldstein S, Gundberg C, Bradley A, Karsenty G. Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature*. 1996 Aug 1;382(6590):448-452.
- Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell*. 1997 May 30;89(5):747-754.
- Ducy P. Cbfa1: a molecular switch in osteoblast biology. *Dev Dyn*. 2000 Dec;219(4):461-471
- Eastell R, Riggs BL. Diagnostic evaluation of osteoporosis. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 1988 Sep;17(3):547-571.
- Efstathiadou Z, Koukoulis G, Stakias N, Challa A, Tsatsoulis A. Apolipoprotein E polymorphism is not associated with spinal bone mineral density in peri- and postmenopausal Greek women. *Maturitas*. 2004 Jul 15;48(3):259-264.
- Ehrlich PJ, Noble BS, Jessop HL, Stevens HY, Mosley JR, Lanyon LE. The effect of in vivo mechanical loading on estrogen receptor alpha expression in rat ulnar osteocytes. *J Bone Miner Res*. 2002 Sep;17(9):1646-1655.
- Fang J, Hall BK. Chondrogenic cell differentiation from membrane bone periosteum. *Anat Embryol (Berl)*. 1997 Nov;196(5):349-62.
- Garnero P, Delmas PD. New developments in biochemical markers for osteoporosis. *Calcif Tissue Int*. 1996;59 Suppl 1:S2-9.
- Geoffroy V, Ducy P, Karsenty G. A PEBP2 alpha/AML-1-related factor increases osteocalcin promoter activity through its binding to an osteoblast-specific cis-acting element. *J Biol Chem*. 1995 Dec 29;270(52):30973-30979.
- Geoffroy V, Kneissel M, Fournier B, Boyde A, Matthias P. High bone resorption in adult aging transgenic mice overexpressing cbfa1/runx2 in cells of osteoblastic lineage. *Mol Cell Biol*. 2002 Sep;22(17):6222-6233.

- Gerdes LU, Vestergaard P, Hermann AP, Mosekilde L. Regional and hormone-dependent effects of apolipoprotein E genotype on changes in bone mineral in perimenopausal women. *J Bone Miner Res.* 2001 Oct;16(10):1906-1916.
- Gerstenfeld LC, Chipman SD, Glowacki J, Lian JB. Expression of differentiated function in mineralizing cultures of chicken osteoblasts. *Dev. Biol.* 1987 Jul;122(1):49-60.
- Ghiselli G, Schaefer EJ, Gascon P, Brewer HB Jr. Type III hyperlipoproteinemia associated with apolipoprotein E deficiency. *Science.* 1981 Dec 11;214(4526):1239-1241.
- Gong Y, Slee RB, Fukui N, Rawadi G, Roman-Roman S, Reginato AM, Wang H, Cundy T, Glorieux FH, Lev D, Zacharin M, Oexle K, Marcelino J, Suwairi W, Heeger S, Sabatakos G, Apte S, Adkins WN, Allgrove J, Arslan-Kirchner M, Batch JA, Beighton P, Black GC, Boles RG, Boon LM, Borrone C, Brunner HG, Carle GF, Dallapiccola B, De Paepe A, Floege B, Halfhide ML, Hall B, Hennekam RC, Hirose T, Jans A, Jüppner H, Kim CA, Keppler-Noreuil K, Kohlschütter A, LaCombe D, Lambert M, Lemyre E, Letteboer T, Peltonen L, Ramesar RS, Romanengo M, Somer H, Steichen-Gersdorf E, Steinmann B, Sullivan B, Superti-Furga A, Swoboda W, van den Boogaard MJ, Van Hul W, Vikkula M, Votruba M, Zabel B, Garcia T, Baron R, Olsen BR, Warman ML; Osteoporosis-Pseudoglioma Syndrome Collaborative Group. LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development. *Cell.* 2001 Nov 16;107(4):513-523.
- Gundberg CM, Markowitz ME, Mizruchi M, Rosen JF. Osteocalcin in human serum: a circadian rhythm. *J Clin Endocrinol Metab.* 1985 Apr;60(4):736-739.
- Gurlek A, Kumar R. Regulation of osteoblast growth by interactions between transforming growth factor-beta and 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2001;11(4):299-317.
- Gurlek A, Pittelkow MR, Kumar R. Modulation of growth factor/cytokine synthesis and signaling by 1alpha,25-dihydroxyvitamin D(3): implications in cell growth and differentiation. *Endocr Rev.* 2002 Dec;23(6):763-786.
- Handbuch der Stoffwechselstörungen, Schwandt und Parhofer Schattauer Verl., 3. Auflage, 2007
- Hara K, Akiyama Y, Ohkawa I, Tajima T. Effects of menatetrenone on prednisolone-induced bone loss in rats. *Bone.* 1993 Nov-Dec;14(6):813-818.

- Harada H, Tagashira S, Fujiwara M, Ogawa S, Katsumata T, Yamaguchi A, Komori T, Nakatsuka M. Cbfa1 isoforms exert functional differences in osteoblastic differentiation. *J Biol Chem* 1999 Mar 12;274(11):6972-6978.
- Hart MJ, de los Santos R, Albert IN, Rubinfeld B, Polakis P. Downregulation of beta-catenin by human Axin and its association with the APC tumor suppressor, beta-catenin and GSK3 beta. *Curr Biol* 1998 May 7;8(10):573-581.
- Hauschka PV, Carr SA. Calcium-dependent alpha-helical structure in osteocalcin. *Biochemistry*. 1982 May 11;21(10):2538-2547.
- Hauschka PV, Lian JB, Gallop PM. Direct identification of the calcium-binding amino acid, gamma-carboxyglutamate, in mineralized tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1975 Oct;72(10):3925-3929.
- Hay E, Faucheu C, Suc-Royer I, Touitou R, Stiot V, Vayssière B, Baron R, Roman-Roman S, Rawadi G. Interaction between LRP5 and Frat1 mediates the activation of the Wnt canonical pathway. *J Biol Chem*. 2005 Apr 8;280(14):13616-13623.
- He X, Semenov M, Tamai K, Zeng X. LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/beta-catenin signaling: arrows point the way. *Development*. 2004 Apr;131(8):1663-77.
- Heikkinen AM, Kröger H, Niskanen L, Komulainen MH, Ryyänen M, Parviainen MT, Tuppurainen MT, Honkanen R, Saarikoski S. Does apolipoprotein E genotype relate to BMD and bone markers in postmenopausal women?. *Maturitas*. 2000 Jan 15;34(1):33-41.
- Henthorn PS, Raducha M, Edwards YH, Weiss MJ, Slaughter C, Lafferty MA, Harris H. Nucleotide and amino acid sequences of human intestinal alkaline phosphatase: close homology to placental alkaline phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987 Mar;84(5):1234-1238.
- Herz J, Clouthier DE, Hammer RE. LDL receptor-related protein internalizes and degrades uPA-PAI-1 complexes and is essential for embryo implantation. *Cell*. 1992 Oct 30;71(3):411-421. Erratum in: *Cell*. 1993 May 7;73(3):428.
- Herz J, Hamann U, Rogne S, Myklebost O, Gausepohl H, Stanley KK. Surface location and high affinity for calcium of a 500-kd liver membrane protein closely related to the LDL-receptor suggest a physiological role as lipoprotein receptor. *EMBO J*. 1988 Dec 20;7(13):4119-4127.

- Herz J, Kowal RC, Goldstein JL, Brown MS. Proteolytic processing of the 600 kd low density receptor- related protein (LRP) occurs in a trans-Golgi compartment. *EMBO J.* Jun. 1990;9(6):1769-1776.
- Herz J, Qiu SQ, Oesterle A, DeSilva HV, Shafi S, Havel RJ. Initial hepatic removal of chylomicron remnants is unaffected but endocytosis is delayed in mice lacking the low density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 May 9;92(10):4611-4615
- Herz J, Strickland DK. LRP: a multifunctional scavenger and signaling receptor. *J Clin Invest.* 2001 Sep;108(6):779-784.
- Ho YY, Deckelbaum RJ, Chen Y, Vogel T, Talmage DA. Apolipoprotein E inhibits serum-stimulated cell proliferation and enhances serum-independent cell proliferation. *J Biol Chem.* 2001 Nov 16;276(46):43455-43462.
- Hodges SJ, Bejui J, Leclercq M, Delmas PD. Detection and measurement of vitamins K1 and K2 in human cortical and trabecular bone.. *J Bone Miner Res.* 1993 Aug;8(8):1005-1008.
- Howell BW, Herrick TM, Hildebrand JD, Zhang Y, Cooper JA. Dad1 phosphorylation sites relay positional signal during mouse brain development. *Curr Biol.* Jul 27- Aug 10 2000;10(15):877-885.
- Huang SS, Ling TY, Tseng WF, Huang YH, Tang FM, Leal SM, Huang JS. Cellular growth inhibition by IGFBP-3 and TGF-beta1 requires LRP-1. *FASEB J.* 2003 Nov;17(14):2068-2081.
- Huelsken J, Behrens J. The Wnt signaling pathway. *J Cell Sci.* 2002 Nov 1;115(Pt21):3077-3078.
- Hui DY, Harmony JA, Innerarity TL, Mahley RW. Immunoregulatory plasma lipoproteins. Role of apoprotein E and apoprotein B. *J Biol Chem.* 1980 Dec 25;255(24):11775-11781.
- Ichihashi T, Takagishi Y, Uchida K, Yamada H. Colonic absorption of menaquinone-4 and menaquinone-9 in rats. *J Nutr.* 1992 Mar;122(3):506-512.
- Innerarity TL et Mahley RW. Enhanced binding by cultured human fibroblasts of apo-E-containing lipoproteins as compared with low density lipoproteins. *Biochemistry.* 1978 Apr 18;17(8):1440-1447
- Ishigami M, Swertfeger DK, Granholm NA, Hui DY. Apolipoprotein E inhibits platelet-derived growth factor-induced vascular smooth muscle cell migration and proliferation by suppressing signal transduction and preventing cell entry to G1 phase. *J Biol Chem.* 1998 Aug 7;273(32):20156-20161.

- Jarvis JL, Keats TE. Cleidocranial dysostosis. A review of 40 new cases. *Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med.* 1974 May;121(1):5-16.
- Johnston JM, Cauley JA, Ganguli M. APOE 4 and hip fracture risk in a community-based study of older adults. *J Am Geriatr Soc.* 1999 Nov;47(11):1342-1345.
- Kam W, Clauser E, Kim YS, Kan YW, Rutter WJ. Cloning, sequencing, and chromosomal localization of human term placental alkaline phosphatase cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985 Dec;82(24):8715-8719.
- Kaneki H, Guo R, Chen D, Yao Z, Schwarz EM, Zhang YE, Boyce BF, Xing L. Tumor necrosis factor promotes Runx2 degradation through up-regulation of Smurf1 and Smurf2 in osteoblasts. *J Biol Chem.* 2006 Feb 17;281(7):4326-4333.
- Kerjaschki D, Farquar MG. The pathogenic antigen of Heymann nephritis is a glycoprotein of the renal proximal tubule brush border. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982 Sep;79(18):5557-5561.
- Kim DH, Iijima H, Goto K, Sakai H, Ishii H, Kim HJ, Suzuki H, Kondo H, Saeki S, Yamamoto TT. Human apolipoprotein E receptor 2: a novel lipoprotein receptor of low density lipoprotein receptor family predominantly expressed in brain. *J Biol Chem.* 1996 Apr 5;271(14):8373-8380.
- Kishida S, Yamamoto H, Ikeda S, Kishida M, Sakamoto I, Koyama S, Kikuchi A. Axin, a negative regulator of the wnt signaling pathway, directly interacts with adenomatous polyposis coli and regulates the stabilization of β -catenin. *J Biol Chem.* 1998 May 1;273(18):10823-10826.
- Kishimoto H. Vitamin K and bone quality. *Clin Calcium.* 2004 Apr;14(4):621-6.
- Koga T, Matsui Y, Asagiri M, Kodama T, de Crombrughe B, Nakashima K, Takayanagi H. NFAT and Osterix cooperatively regulate bone formation. *Nat Med.* 2005 Aug;11(8):880-885.
- Kohlmeier M, Saupe J, Schaefer K, Asmus G. Bone fracture history and prospective bone fracture risk of hemodialysis patients are related to apolipoprotein E genotype. *Calcif Tissue Int.* 1998 Mar;62(3):278-281.
- Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, Shimizu Y, Bronson RT, Gao YH, Inada M, Sato M, Okamoto R, Kitamura Y, Yoshiki S, Kishimoto T. Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell.* 1997 May 30;89(5):755-764.

- Koshihara Y, Hoshi K, Okawara R, Ishibashi H, Yamamoto S. Vitamin K stimulates osteoblastogenesis and inhibits osteoclastogenesis in human bone marrow cell culture. *J Endocrinol.* 2003 Mar;176(3):339-348.
- Kostner GM. Chemie und Struktur menschlicher Plasma- und Lymphlipoproteine. In: Schettler G, Greten H, Schlierf G, Seidl D (Hrsg). *Handbuch der Inneren Medizin.* Vol. VII/4. Heidelberg: Springer-Verlag 1976; 125-171
- Kraichely DM, MacDonald PN. Transcriptional activation through the vitamin D receptor in osteoblasts. *Front Biosci.* 1998 Aug 1;3:d821-833.
- Krishnan V, Moore TL, Ma YL, Helvering LM, Frolik CA, Valasek KM, Ducy P, Geiser AG. Parathyroid hormone bone anabolic action requires Cbfa1/Runx2-dependent signaling. *Mol Endocrinol.* 2003 Mar;17(3):423-35.
- Lamon-Fava S, Sadowski JA, Davidson KW, O'Brien ME, McNamara JR, Schaefer EJ. Plasma lipoproteins as carriers of phylloquinone (vitamin K1) in humans. *Am J Clin Nutr.* 1998 Jun;67(6):1226-1231.
- Lanyon LE. Osteocytes, strain detection, bone modeling and remodeling. *Calcif Tissue Int* 1993;53(Suppl 1):S102–6. S106–107.
- Levanon D, Negreanu V, Bernstein Y, Bar-Am I, Avivi L, Groner Y. AML1, AML2, and AML3, the human members of the runt domain gene-family: cDNA structure, expression, and chromosomal localization. *Genomics.* 1994 Sep 15;23(2):425-432.
- Little RD, Carulli JP, Del Mastro RG, Dupuis J, Osborne M, Folz C, Manning SP, Swain PM, Zhao SC, Eustace B, Lappe MM, Spitzer L, Zweier S, Braunschweiger K, Benchekroun Y, Hu X, Adair R, Chee L, FitzGerald MG, Tulig C, Caruso A, Tzellas N, Bawa A, Franklin B, McGuire S, Noguez X, Gong G, Allen KM, Anisowicz A, Morales AJ, Lomedico PT, Recker SM, Van Eerdewegh P, Recker RR, Johnson ML. A mutation in the LDL receptor-related protein 5 gene results in the autosomal dominant high-bone-mass trait. *Am J Hum Genet.* 2002 Jan;70(1):11-9. Epub 2001 Dec 3.
- Liu W, Toyosawa S, Furuichi T, Kanatani N, Yoshida C, Liu Y, Himeno M, Narai S, Yamaguchi A, Komori T. Overexpression of Cbfa1 in osteoblasts inhibits osteoblast maturation and causes osteopenia with multiple fractures. *J Cell Biol* 2001 Oct 1;155(1):157-166.
- Löffler, G (2001), *Basiswissen Biochemie*, 4. Auflage, Springer-Verlag, 493-495
- Lou Y, Javed A, Hussain S, Colby J, Frederick D, Pratap J, Xie R, Gaur T, van Wijnen AJ, Jones SN, Stein GS, Lian JB, Stein JL. A Runx2 threshold for the cleidocranial dysplasia phenotype. *Hum Mol Genet.* 2009 Feb 1;18(3):556-568.

- Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, Randall R J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951 Nov;193(1):265-275
- Ma YL, Cain RL, Halladay DL, Yang X, Zeng Q, Miles RR, Chandrasekhar S, Martin TJ, Onyia JE. Catabolic effects of continuous human PTH (1--38) in vivo is associated with sustained stimulation of RANKL and inhibition of osteoprotegerin and gene-associated bone formation. *Endocrinology.* 2001 Sep;142(9):4047-54.
- Mahley RW, Rall SC Jr. Type III hyperlipoproteinemia (dysbetalipoproteinemia): the role of apolipoprotein E in normal and abnormal lipoprotein metabolism. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, 7th ed. New York: McGraw-Hill, 1995:1953–1980.
- Mahley RW. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biologie. *Science* 1988 Apr 29;240(4852):622-630.
- Mao B, Wu W, Davidson G, Marhold J, Li M, Mechler BM, Delius H, Hoppe D, Stannek P, Walter C, Glinka A, Niehrs C. Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/beta-catenin signalling. *Nature.* 2002 Jun 6;417(6889):664-667.
- Mao B, Wu W, Li Y, Hoppe D, Stannek P, Glinka A, Niehrs C. LDL-receptor-related protein 6 is a receptor for Dickkopf proteins. *Nature.* 2001 May 17;411(6835):321-325.
- Meredith S, Matsushima T, Getz GS. A conserved substructure in apolipoprotein B. *Circulation* 1988;78:II-287.
- Merle B, Delmas PD. Normal carboxylation of circulating osteocalcin (bone Gla-protein) in Paget's disease of bone. *Bone Miner.* 1990 Nov;11(2):237-45.
- Millán JL, Manes T. Seminoma-derived Nagao isozyme is encoded by a germ-cell alkaline phosphatase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988 May;85(9):3024-3028.
- Millán JL. Molecular cloning and sequence analysis of human placental alkaline phosphatase. *J Biol Chem.* 1986 Mar 5;261(7):3112-3115. Erratum in: *J Biol Chem* 1991 Feb 25;266(6):4023.
- Miura M, Sakagishi Y, Hata K, Komoda T. Differences between the sugar moieties of liver- and bone-type alkaline phosphatases: a re-evaluation. *Ann Clin Biochem.* 1994 Jan;31 (Pt 1):25-30.
- Molenaar M, van de Wetering M, Oosterwegel M, Peterson-Maduro J, Godsave S, Korinek V, Roose , Destrée O, Clevers H. XTcf-3 transcription factor mediates beta-catenin induced axis formation in xenopus embryos. *Cell.* 1996 Aug 9;86(3):391-399.
- Moon RT. Wnt/beta-catenin pathway. *Sci STKE.* 2005 Feb 15;2005(271):cm1.

- Morganroth J, Levy RI, Fredrickson DS. The biochemical, clinical, and genetic features of type III hyperlipoproteinemia. *Ann Intern Med* 1975;82:158–174.
- Moss DW. Alkaline phosphatase isoenzymes. *Clin Chem*. 1982 Oct;28(10):2007-2016.
- Mundlos S, Mulliken JB, Abramson DL, Warman ML, Knoll JH, Olsen BR. Genetic mapping of cleidocranial dysplasia and evidence of a microdeletion in one family. *Hum Mol Genet*. 1995 Jan;4(1):71-75.
- Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, de Crombrughe B. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell*. 2002 Jan 11;108(1):17-29.
- Nassar T, Akkawi S, Shina A, Haj-Yehia A, Bdeir K, Tarshis M, Heyman SN, Higazi AA. In vitro and in vivo effects of tPA and PAI-1 on blood vessel tone. *Blood*. 2004 Feb 1;103(3):897-902.
- Neubeck W, Wieland H, Habenicht A, Müller P, Baggio G, Seidel D. Improved assessment of plasma lipoprotein patterns. III. Direct measurement of lipoproteins after gel- electrophoresis. *Clin Chem*. 1977 Jul;23(7):1296-1300
- Newman P, Bonello F, Wierzbicki AS, Lumb P, Savidge GF, Shearer MJ. The uptake of lipoprotein-borne phylloquinone (vitamin K1) by osteoblasts and osteoblast-like cells: role of heparan sulfate proteoglycans and apolipoprotein E. *J Bone Miner Res*. 2002 Mar;17(3):426-433.
- Niemeier A, Kassem M, Toedter K, Wendt D, Ruether W, Beisiegel U, Heeren J. Expression of LRP1 by human osteoblasts: a mechanism for delivery of lipoproteins and vitamin K1 to bone. *J Bone Miner Res*. 2005 Feb;20(2):283-293.
- Niemeier A, Niedzielska D, Secer R, Schilling A, Merkel M, Enrich C, Rensen PC, Heeren J. Uptake of postprandial lipoproteins into bone in vivo: impact on osteoblast function. *Bone*. 2008 Aug;43(2):230-237.
- Nishio Y, Dong Y, Paris M, O'Keefe RJ, Schwarz EM, Drissi H. Runx2-mediated regulation of the zinc finger Osterix/Sp7 gene. *Gene*. 2006 May 10;372:62-70.
- Nykjaer A, Dragun D, Walther D, Vorum H, Jacobsen C, Herz J, Melsen F, Christensen EI, Willnow TE. An endocytic pathway essential for renal uptake and activation of the steroid 25-(OH) vitamin D3. *Cell*. 1999 Feb 19;96(4):507-515.
- Ogawa E, Maruyama M, Kagoshima H, Inuzuka M, Lu J, Satake M, Shigesada K, Ito Y. PEBP2/PEA2 represents a family of transcription factors homologous to the products of the *Drosophila runt* gene and the human AML1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Jul 15;90(14):6859-6863

- Osterman D, Mora R, Kedzy FJ, Kaiser ET, Meredith SC. A synthetic amphiphilic β -strand tridecapeptide: a model for Apolipoprotein B. *J Am Chem Soc* 1994;106:6845-6847.
- Otto F, Thornell AP, Crompton T, Denzel A, Gilmour KC, Rosewell IR, Stamp GW, Beddington RS, Mundlos S, Olsen BR, Selby PB, Owen MJ. *Cbfa1*, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell*. 1997 May 30;89(5):765-771.
- Owen TA, Aronow M, Shalhoub V, Barone LM, Wilming L, Tassinari MS, Kennedy MB, Pockwinse S, Lian JB, Stein GS. Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. *J Cell Physiol*. 1990 Jun;143(3):420-430.
- Owen TA, Aronow MS, Barone LM, Bettencourt B, Stein GS, Lian JB. Pleiotropic effects of vitamin D on osteoblast gene expression are related to the proliferative and differentiated state of the bone cell phenotype: Dependency upon basal level of gene expression, duration of exposure, and bone matrix competency in normal rat osteoblast cultures. *Endocrinology*. 1991 Mar;128(3):1496-1504.
- Paredes R, Arriagada G, Cruzat F, Olate J, Van Wijnen A, Lian J, Stein G, Stein J, Montecino M. The *Runx2* transcription factor plays a key role in the $1\alpha,25$ -dihydroxy Vitamin D₃-dependent upregulation of the rat osteocalcin (OC) gene expression in osteoblastic cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2004 May;89-90(1-5):269-271.
- Patsch JR, Sailer S, Kostner G, Sandhofer F, Holasek A, Braunsteiner H. Separation of the main lipoprotein density classes from human plasma by rate-zonal ultracentrifugation. *J Lipid Res*. 1974 Jul;15(4):356-366.
- Pepe MG, Curtiss LK. Apolipoprotein E is a biologically active constituent of the normal immunoregulatory lipoprotein, LDL-In. *J Immunol*. 1986 May 15;136(10):3716-3723.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999 Apr 2;284(5411):143-147.
- Plaza SM, Lamson DW. Vitamin K₂ in bone metabolism and osteoporosis. *Altern Med Rev*. 2005 Mar;10(1):24-35.

- Pluijm SM, Dik MG, Jonker C, Deeg DJ, van Kamp GJ, Lips P. Effects of gender and age on the association of apolipoprotein E epsilon4 with bone mineral density, bone turnover and the risk of fractures in older people. *Osteoporos Int.* 2002 Sep;13(9):701-709.
- Plump AS, Smith JD, Hayek T, Aalto-Setälä K, Walsh A, Verstuyft JG, Rubin EM, Breslow JL. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell.* 1992 Oct 16;71(2):343-353.
- Price PA, Otsuka AA, Poser JW, Kristaponis J, Raman N. Characterization of a gamma-carboxyglutamic acid-containing protein from bone. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1976 May;73(5):1447-1451
- Price PA, Williamson MK, Lothringer JW. Origin of the vitamin K-dependent bone protein found in plasma and its clearance by kidney and bone. *Biol Chem.* 1981 Dec 25;256(24):12760-6.
- Rall SC Jr., Weisgraber KH, Innerarity TL, Mahley RW. Structural basis for receptor binding heterogeneity of apolipoprotein E from type III hyperlipoproteinemic subjects. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982 Aug;79(15):4696-4700.
- Rawadi G, Roman-Roman S. Wnt signalling pathway: a new target for the treatment of osteoporosis. *Expert Opin Ther Targets* 2005 Oct;9(5):1063-1077.
- Rawadi G, Vayssière B, Dunn F, Baron R, Roman-Roman S. BMP-2 controls alkaline phosphatase expression and osteoblast mineralization by a Wnt autocrine loop. *J Bone Miner Res.* 2003;18(10):1842-1853.
- Risteli L, Risteli J. Biochemical markers of bone metabolism. *Ann Med.* 1993 Aug;25(4):385-393.
- Saito, A.; Pietromonaco, S.; Loo, A. K.-C.; Farquhar, M. G. Complete cloning and sequencing of rat gp330/megalin, a distinctive member of the low density lipoprotein receptor gene family. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1994 Oct 11;91(21):9725-9729.
- Salamone LM, Cauley JA, Zmuda J, Pasagian-Macaulay A, Epstein RS, Ferrell RE, Black DM, Kuller LH. Apolipoprotein E gene polymorphism and bone loss: estrogen status modifies the influence of apolipoprotein E on bone loss. *J Bone Miner Res.* 2000 Feb;15(2):308-314.
- Sanada M, Nakagawa H, Kodama I, Sakasita T, Ohama K. Apolipoprotein E phenotype associations with plasma lipoproteins and bone mass in postmenopausal women. *Climacteric.* 1998 Sep;1(3):188-195.

- Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel D, George-Hyslop PH, Pericak-Vance MA, Joo SH, Rosi BL, Gusella JF, Crapper-MacLachlan DR, Alberts MJ, et al. Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology*. 1993 Aug;43(8):1467-1472.
- Saupe J, Shearer MJ, Kohlmeier M. Phylloquinone transport and its influence on gamma-carboxyglutamate residues of osteocalcin in patients on maintenance hemodialysis. *Am J Clin Nutr*. 1993 Aug;58(2):204-208
- Schiebler T, Schmidt W (2002) *Anatomie*. 8. Auflage, Springer, Heidelberg, 65-67
- Schilling AF, Schinke T, Münch C, Gebauer M, Niemeier A, Priemel M, Streichert T, Rueger JM, Amling M. Increased bone formation in mice lacking apolipoprotein E. *J Bone Miner Res*. 2005 Feb;20(2):274-282.
- Schneider WJ, Kovanen PT, Brown MS, Goldstein J L, Utermann G, Weber W, Havel R J, Kotite L, Kane JP, Innerarity TL, Mahley RW. Familial dysbetalipoproteinemia: abnormal binding of mutant apoprotein E to low density lipoprotein receptors of human fibroblasts and membranes from liver and adrenal of rats, rabbits, and cows. *J. Clin. Invest*. 1981 Oct;68(4):1075-1085.
- Schoofs MW, van der Klift M, Hofman A, van Duijn CM, Stricker BH, Pols HA, Uitterlinden AG. ApoE gene polymorphisms, BMD, and fracture risk in elderly men and women: the Rotterdam study. *J Bone Miner Res*. 2004 Sep;19(9):1490-1496.
- Scott J. A place in the world for RNA editing. *Cell*. 1995 Jun 16;81(6):833-836.
- Scott J. The molecular and cell biology of apolipoprotein-B. *Mol Biol Med*. 1989 Feb;6(1):65-80.
- Seargeant LE, Stinson RA. Evidence that three structural genes code for human alkaline phosphatases. *Nature*. 1979 Sep 13;281(5727):152-154.
- Segrest JP, Jones MK, De Loof H, Brouillette CG, Venkatachalapathi YV, Anantharamaiah GM. The amphipathic helix in the exchangeable apolipoproteins: a review of secondary structure and function. *J Lipid Res*. 1992 Feb;33(2):141-166.
- Sennels HP, Sand JC, Madsen B, Lauritzen JB, Fenger M, Jørgensen HL. Association between polymorphisms of apolipoprotein E, bone mineral density of the lower forearm, quantitative ultrasound of the calcaneus and osteoporotic fractures in postmenopausal women with hip or lower forearm fracture. *Scand J Clin Lab Invest*. 2003;63(4):247-258.
- Shearer MJ, McBurney A, Barkhan P. Studies on the absorption and metabolism of phylloquinone (vitamin K1) in man. *Vitam Horm*. 1974;32:513-542.

- Shimano H. Analysis on lipid metabolism and atherogenesis by transgenic technologie. *Tanpakushitsu Kakusan KOSO*.1994 Oct.;39(13):2211-2221.
- Shiraki M, Shiraki Y, Aoki C, Hosoi T, Inoue S, Kaneki M, Ouchi Y. Association of bone mineral density with apolipoprotein E phenotype. *J Bone Miner Res*. 1997 Sep;12(9):1438-1445.
- Simonsen JL, Rosada C, Serakinci N, Justesen J, Stenderup K, Rattan SI, Jensen TG, Kassem M. Telomerase expression extends the proliferative life-span and maintains the osteogenic potential of human bone marrow stromal cells. *Nat Biotechnol*. 2002 Jun;20(6):592-596.
- Soute BA, Ulrich MM, Watson AD, Maddison JE, Ebberink RH, Vermeer C. Congenital deficiency of all vitamin K-dependent blood coagulation factors due to a defective vitamin K-dependent carboxylase in Devon Rex cats. *Thromb Haemost*. 1992 Nov 10;68(5):521-525.
- Stefansson S, Chappell DA, Argraves KM, Strickland DK, Argraves WS. Glycoprotein 330/low density lipoprotein receptor-related protein-2 mediates endocytosis of low density lipoproteins via interaction with apolipoprotein B100. *J Biol Chem*. 1995 Aug 18;270(33):19417-19421.
- Stulc T, Ceska R, Horínek A, Stepán J. Bone mineral density in patients with apolipoprotein E type 2/2 and 4/4 genotype. *Physiol Res*. 2000;49(4):435-439.
- Szulc P, Chapuy MC, Meunier PJ, Delmas PD. Serum undercarboxylated osteocalcin is a marker of the risk of hip fracture in elderly women. *J Clin Invest*. 1993 Apr;91(4):1769-1774.
- Takahashi S, Kawarabayasi Y, Nakai T, Sakai J, Yamamoto T. Rabbit very low density lipoprotein receptor: a low density lipoprotein receptor-like protein with distinct ligand specificity. *PNAS* 1992 Oct. 1;Vol.89 no. 19 9252-9256
- Trommsdorff M, Gotthardt M, Hiesberger T, Shelton J, Stockinger W, Nimpf J, Hammer RE, Richardson JA, Herz J.Reeler/Disabled-like disruption of neuronal migration in knockout mice lacking the VLDL receptor and ApoE receptor 2. *Cell* 1999 Jun 11;97(6):689-701.
- Tu Q, Valverde P, Chen J. Osterix enhances proliferation and osteogenic potential of bone marrow stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006 Mar 24;341(4):1257-1265.
- Van Wesenbeeck L, Cleiren E, Gram J, Beals RK, Bénichou O, Scopelliti D, Key L, Renton T, Bartels C, Gong Y, Warman ML, De Vernejoul MC, Bollerslev J, Van Hul

- W. Six novel missense mutations in the LDL receptor-related protein 5 (LRP5) gene in different conditions with an increased bone density. *Am J Hum Genet.* 2003 Mar;72(3):763-771.
- Vermeer C, Jie KS, Knapen MH. Role of vitamin K in bone metabolism. *Annu Rev Nutr.* 1995;15:1-22.
 - Villarreal E, Bermúdez A. Polymorphisms of APO-E in Colombian women with osteoporosis: correlation with clinical and social risk variables. *Biomedica.* 2004 Mar;24(1):50-55.
 - von Mühlen DG, Barrett-Connor E, Schneider DL, Morin PA, Parry P. Osteoporosis and apolipoprotein E genotype in older adults: the Rancho Bernardo study. *Osteoporos Int.* 2001;12(4):332-335.
 - Weisgraber KH, Rall SC Jr., Mahley RW. Human E apoprotein. Cystein-arginine interchanges in amino acid sequence of the apo-E isoforms. *J Biol Chem* 1981 Sep 10;256(17):9077-9083.
 - Weiss MJ, Henthorn PS, Lafferty MA, Slaughter C, Raducha M, Harris H. Isolation and characterization of a cDNA encoding a human liver/bone/kidney-type alkaline phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986 Oct;83(19):7182-7186.
 - Westendorf JJ, Kahler RA, Schroeder TM. Wnt signaling in osteoblasts and bone diseases. *Gene.* 2004 Oct 27;341:19-39.
 - Willnow TE, Hilpert J, Armstrong SA, Rohlmann A, Hammer RE, Bruns DK, Herz J. Defective forebrain development in mice lacking gp330/megalin. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996 Aug 6;93(16):8460-8464.
 - Winkler K, Nauck M, Siekmeier R, März W, Wieland H. Determination of triglycerides in lipoproteins separated by agarose gel electrophoresis. *J of Lipid Res* 1995;361:1839-47
 - Wyne KL, Pathak K, Seabra MC, Hobbs HH. Expression of the VLDL receptor in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996 March;16(3):407-415.
 - Xiao G, Jiang D, Gopalakrishnan R, Franceschi RT. Fibroblast growth factor 2 induction of the osteocalcin gene requires MAPK activity and phosphorylation of the osteoblast transcription factor, Cbfa1/Runx2. *J Biol Chem.* 2002 Sep 27;277(39):36181-7.
 - Yagi K, Tsuji K, Nifuji A, Shinomiya K, Nakashima K, DeCrombrughe B, Noda M. Bone morphogenetic protein-2 enhances osterix gene expression in chondrocytes. *J. Cell. Biochem* 2003 Apr 15;88(6):1077-1083

- Yamamoto N, Akiyama S, Katagiri T, Namiki M, Kurokawa T, Suda T. Smad1 and smad5 act downstream of intracellular signalings of BMP-2 that inhibits myogenic differentiation and induces osteoblast differentiation in C2C12 myoblasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997 Sep 18;238(2):574-580.
- Yepes M, Sandkvist M, Moore EG, Bugge TH, Strickland DK, Lawrence DA. Tissue-type plasminogen activator induces opening of the blood-brain barrier via the LDL receptor-related protein. *J Clin Invest.* 2003 Nov; 112(10):1533-1540.
- Zajícková K, Zofková I, Hill M, Horínek A, Nováková A. Apolipoprotein E 4 allele is associated with low bone density in postmenopausal women. *J Endocrinol Invest.* 2003 Apr;26(4):312-315.
- Zannis VI, Just PW, Breslow JL. Human apolipoprotein E isoprotein subclasses are genetically determined. *Am J Hum Gen.* 1981 Jan;33(1):11-24.

9. Anhang

9.1. Danksagung

Für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung und die stets geduldige Unterstützung gilt mein besonderer Dank PD Dr. Andreas Niemeier, Herrn Walter Tauscher und Prof. Jörg Heeren.

Für die wissenschaftliche Betreuung und Bereitstellung der technischen und materiellen Voraussetzungen, die diese Arbeit ermöglichten, gebührt mein aufrichtiger Dank Prof. Dr. Dr. h.c. Ulrike Beisiegel.

Des Weiteren sei allen MitarbeiterInnen des Institutes für Molekulare Zellbiologie ganz herzlich gedankt.

9.2. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Rukiye Secer