

Institut für Osteologie und Biomechanik  
Zentrum für experimentelle Medizin  
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

**Untersuchung der Rolle von Rptp $\zeta$  sowie von Rsk2 bei der  
molekularen Pathogenese des Osteosarkoms**

**Dissertation**

Zur Erlangung der Würde des Doktorgrades  
an der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften

Fachbereich Chemie  
der Universität Hamburg

vorgelegt von  
Christina Baldauf  
aus Würzburg

Hamburg, 2015

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Thorsten Schinke

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Elke Oetjen

Tag der Disputation: 12.02.2016

Datum der Freigabe: 03.03.2016

Für meine geliebte Familie

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1	Das Skelettsystem.....	1
1.2	Knochenzellen.....	2
1.2.1	Osteoblasten.....	2
1.2.2	Osteozyten und Belegzellen .....	3
1.2.3	Osteoklasten.....	4
1.3	Knochenumbau.....	4
1.4	Knochenkrankheiten.....	5
1.5	Das Osteosarkom.....	7
1.5.1	Allgemeine Informationen.....	7
1.5.2	Pathogenese .....	8
1.5.3	Mausmodelle .....	9
1.6	Die Rolle der Tyrosinphosphorylierung in der Tumorbiologie .....	12
1.6.1	Reversible Tyrosinphosphorylierung.....	12
1.6.2	Tumorsuppressorfunktion von Protein-Tyrosinphosphatasen (PTPs) .....	12
1.6.3	Die Rezeptor-Proteintyrosinphosphatase Rptpζ .....	13
1.7	Aufgabenstellung.....	15
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>16</b>
2.1	Material .....	16
2.1.1	Mausmodelle .....	16
2.1.2	Zelllinien und primäre Zellen .....	17
2.2	Methoden .....	17
2.2.1	Präparation von Mäusen .....	17
2.2.2	Radiologische Untersuchungen .....	18
2.2.3	Histologische Untersuchungen.....	18
2.2.3.1	Unentkalkte Knochenhistologie .....	18
2.2.3.2	Von Kossa/van Gieson-Färbung.....	18
2.2.3.3	Toluidinblau-Färbung .....	19
2.2.4	Molekularbiologische Methoden .....	19
2.2.4.1	Isolierung genomischer DNA aus Mausschwanzbiopsien .....	19
2.2.4.2	Genotypisierung .....	19
2.2.4.3	Gerichtete Mutagenese.....	20
2.2.4.4	DNA-Sequenzierung .....	21
2.2.4.5	Transformation von kompetenten Bakterien.....	21
2.2.4.6	Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien (Miniprep, Maxiprep) .....	21
2.2.4.7	Isolierung von RNA aus Gewebe und Zellen.....	22
2.2.4.8	cDNA-Synthese .....	22
2.2.4.9	qRT-PCR .....	22
2.2.4.10	Microarray-Genchip-Analyse.....	23
2.2.5	Zellbiologische Methoden .....	24
2.2.5.1	Generierung primärer Osteoblastenkulturen .....	24
2.2.5.2	Generierung primärer Osteoklastenkulturen.....	25

2.2.5.3	Generierung muriner Osteosarkom-Zelllinien .....	25
2.2.5.4	Stimulation/Behandlung von Zellen .....	25
2.2.5.5	Mineralisationsanalyse .....	26
2.2.5.6	BrdU-Inkorporationsanalyse .....	26
2.2.5.7	Wachstumskurven .....	27
2.2.5.8	Zellzyklusanalyse mittels Propidiumiodid .....	27
2.2.5.9	Transfektion.....	28
2.2.6	Proteinanalytische Methoden .....	28
2.2.6.1	Immunfluoreszenz .....	28
2.2.6.2	Isolierung von Proteinen .....	29
2.2.6.3	Konzentrationsbestimmung von Proteinen .....	29
2.2.6.4	SH2-Profilung mittels Far-Western Blot Analyse .....	29
2.2.7	Statistische Verfahren .....	30
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>31</b>
3.1	Bestimmung des <i>Ptprz1</i> -Expressionsprofils.....	31
3.2	Untersuchung des Einflusses von Rptp $\zeta$ auf die Osteosarkom-Entstehung in <i>Trp53</i> -heterozygoten Mäusen .....	32
3.3	Histologische Analyse der Osteosarkome .....	33
3.4	Charakterisierung <i>Trp53</i> -heterozygoter OS-Zelllinien mit hetero- bzw. homozygoter <i>Ptprz1</i> -Deletion.....	34
3.4.1	Osteogene Differenzierung der OS-Zelllinien.....	35
3.4.2	Proliferationsverhalten und Tyrosinphosphorylierungsstatus der OS-Zelllinien .....	36
3.4.3	Effekt von Midkine auf die Proliferation der OS-Zelllinien.....	37
3.5	Untersuchung der Rolle von Rptp $\zeta$ im c-Fos-induzierten Osteosarkom.....	38
3.6	Untersuchung der Rolle von Rptp $\zeta$ im humanen Osteosarkom .....	39
3.6.1	<i>PTPRZ1</i> -Expression in primären human Osteoblasten und human OS-Zelllinien .....	39
3.6.2	Analyse von <i>PTPRZ1</i> -Mutationen in humanen Osteosarkomen .....	40
3.7	Untersuchung der Rolle von Rsk2 im c-Fos-induzierten Osteosarkom .....	42
3.7.1	Genexpressionsanalysen <i>c-fos</i> -transgener Osteosarkome mit bzw. ohne <i>Rsk2</i> -Defizienz.....	42
3.7.2	Proliferationsanalysen <i>c-fos</i> -transgener OS-Zelllinien mit bzw. ohne <i>Rsk2</i> -Defizienz .....	44
3.7.3	Untersuchung eines Mitose-Defekts in <i>c-fos</i> -transgenen <i>Rsk2</i> -defizienten Zelllinien .....	45
3.7.3.1	Quantitative Analyse polynukleärer Zellen .....	45
3.7.3.2	Bestimmung des DNA-Gehalts .....	47
3.7.3.3	Visualisierung der Mitose-Phase mittels Immunfluoreszenz .....	48
3.7.4	Analyse des Effekts von BI-D1870 auf <i>c-fos</i> -transgene Zelllinien.....	49
3.7.4.1	Proliferationsanalysen <i>c-fos</i> -transgener OS-Zellen in Anwesenheit von BI-D1870 .....	49
3.7.4.2	Untersuchung des Auftretens mehrkerniger polyploider Zellen in <i>c-fos</i> -transgenen Zelllinien in Anwesenheit von BI-D1870.....	50
3.7.5	Analyse des Effekts von BI-D1870 auf die humane OS-Zelllinie U2OS .....	52
3.7.5.1	Proliferationsanalysen von U2OS Zellen in Anwesenheit von BI-D1870.....	52
3.7.5.2	Untersuchung des Auftretens mehrkerniger sowie mitotischer polyploider U2OS Zellen in Anwesenheit von BI-D1870.....	53
3.8	Analyse des Effekts von BI-D1870 auf das Proliferationsverhalten <i>Trp53</i> -heterozygoter OS-Zelllinien mit hetero-bzw. homozygoter <i>Ptprz1</i> -Deletion .....	55

---

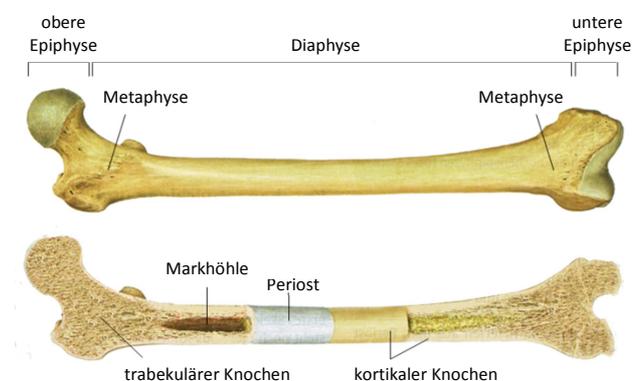
<b>4</b>	<b>DISKUSSION UND AUSBLICK .....</b>	<b>56</b>
4.1	Die Rolle von Rptp $\zeta$ als Osteoblasten-spezifischer Tumorsuppressor im Osteosarkom .....	56
4.1.1	Einfluss von Rptp $\zeta$ auf die Osteosarkom-Entstehung im <i>Trp53</i> -Mausmodell .....	56
4.1.2	Die Rolle von Rptp $\zeta$ im humanen Osteosarkom .....	62
4.2	Die Rolle von Rsk2 bei der c-Fos-induzierten Osteosarkom-Entstehung .....	64
4.2.1	Expressionsanalysen deuten auf einen Mitose-Block in <i>c-fos</i> -transgenen <i>Rsk2</i> -defizienten Osteosarkomen hin.....	65
4.2.2	Proliferations- und Mitose-Defekt in <i>c-fos</i> -transgenen <i>Rsk2</i> -defizienten OS-Zelllinien .....	66
4.2.3	Rsk2 als potentielles Zielmolekül zur Eliminierung von Osteosarkomzellen durch Induktion der mitotischen Katastrophe .....	67
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>69</b>
<b>6</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>71</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>73</b>
<b>8</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>84</b>
8.1	Material .....	84
8.1.1	Geräte .....	84
8.1.2	Verbrauchsmaterial .....	84
8.1.3	Chemikalien und Substanzen.....	85
8.1.4	Kits .....	88
8.1.5	Enzyme und Proteine.....	89
8.1.6	Antikörper und andere Farbstoffe.....	89
8.1.7	Oligonukleotide .....	89
8.1.7.1	Primer für die Genotypisierung .....	89
8.1.7.2	Primer für qRT-PCR.....	90
8.1.7.3	Mutagenese-Primer.....	90
8.1.7.4	Primer für die Sequenzierung.....	90
8.1.8	TaqMan® Gene Expression Assays .....	90
8.1.9	Plasmide.....	91
8.1.10	Bakterien .....	91
8.1.11	Puffer und Lösungen.....	91
8.1.12	Bakterien- und Zellkulturmedien.....	93
8.2	Sicherheit und Entsorgung .....	95
8.3	Abkürzungsverzeichnis .....	97
<b>9</b>	<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>99</b>
<b>11</b>	<b>EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG .....</b>	<b>100</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Skelettsystem

Entgegen der gängigen Vorstellung, der Knochen sei ein starres Gerüst, simpel in seiner Architektur und zu keiner Wandlung fähig, ist er tatsächlich ein stoffwechselaktives Gewebe, das durch enorme Komplexität und Dynamik gekennzeichnet ist und daher eine Anpassung an wechselnde mechanische Beanspruchungen ermöglicht. Das menschliche Skelett besteht in seiner Gesamtheit aus etwa 200 Knochen und wird beim gesunden Menschen durch stetige Umbauvorgänge ca. alle 10 Jahre erneuert (Cohen 2006). Neben der Stützfunktion für den Körper hat das Skelettsystem eine Reihe weiterer Eigenschaften. So dient es als Bewegungsapparat, bietet Schutz für innere Organe und enthält das Knochenmark, in dem die Zellen des Blut- und Immunsystems gebildet werden. Des Weiteren dient es als Reservoir für essentielle Mineralien wie Calcium und Phosphat und ist in Zusammenarbeit mit der Niere an der Aufrechterhaltung des Mineral- und Säure-Basen-Haushaltes beteiligt (Zaidi 2007).

Entsprechend ihrer Funktion und Belastungsmodalität haben Knochen unterschiedliche Formen. Röhrenknochen, wie etwa der Humerus (Oberarmknochen) oder der Femur (Oberschenkelknochen) befinden sich an den Extremitäten und bestehen charakteristischerweise aus einem langen Schaft (Diaphyse), der sich an den Enden aufweitet (Metaphyse) und in die eigentlichen Endstücke (Epiphysen) übergeht (Abb. 1). Zwischen Epi- und Metaphyse befindet sich bei Heranwachsenden die sog. Epiphysenfuge (Wachstumsfuge), die bei abgeschlossenem Längenwachstum verknöchert. Weiterhin unterscheidet man platte Knochen, zu denen die Calvaria (Schädeldach) zählt, sowie kurze Knochen, Sesambeine und luftgefüllte Knochen. Die Wirbelkörper werden den sog. unregelmäßigen Knochen zugeordnet (Schiebler 2004).



**Abb. 1: Allgemeiner Aufbau eines Röhrenknochens.** Das Bild zeigt den Femur eines Erwachsenen. Dargestellt sind die anatomischen Abschnitte (Epi-, Meta-, Diaphyse) sowie der strukturelle Aufbau mit dem äußeren kortikalen Knochen und dem inneren trabekulären Knochen. Zu sehen ist außerdem die Markhöhle für das Knochenmark sowie die Knochenhaut (Periost). Angepasst nach Bley et al. 2015; mit freundlicher Genehmigung des Thieme Verlags.

Knochen besitzt eine poröse Struktur, die aus Zellen, Gefäßen und Knochenmatrix aufgebaut ist. Morphologisch unterscheidet man zwei Arten von Knochen: Den äußeren kortikalen Knochen, der dicht gepackt ist, und den inneren trabekulären Bereich, dessen kleine Knochenstrukturen ein leichtes aber dennoch stabiles netzwerkartiges Geflecht bilden (Abb. 1). Die Knochenmatrix setzt sich zu 25 % aus Wasser, zu 30 % aus organischen Materialien und zu 45 % aus anorganischen Stoffen zusammen. Hauptanteil des anorganischen Materials bilden Calcium und Phosphat in Form von Hydroxylapatit-Kristallen ( $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]_3\text{Ca}(\text{OH})_2$ ). Das organische Material besteht zu 95 % aus Kollagen I, den übrigen Anteil machen Proteoglykane und Glykoproteine wie z.B. Osteocalcin, Osteopontin und Bone Sialoprotein aus (Green 1994; Robey 2008). An dieser Stelle sei als weitere Funktion des Knochens sein Einfluss auf den Energiestoffwechsel erwähnt. So wirkt beispielsweise Osteocalcin über die Regulation der Insulinproduktion auf den Glukose- und Fettmetabolismus (Lee et al. 2007).

Während der Entwicklung, im Wachstum oder nach Brüchen kann die Bildung von Knochen auf verschiedene Arten verlaufen. Eine Möglichkeit ist die Knochenbildung direkt aus embryonalem Bindegewebe, dem Mesenchym. Diese als desmale Ossifikation bezeichnete Art der Knochenbildung ist für die Entstehung von platten Knochen verantwortlich. Die meisten Knochen des Körpers werden jedoch durch die sog. chondrale Ossifikation gebildet, bei der der Knochen indirekt über eine Zwischenstufe aus Knorpel gebildet wird. Diese Art der Knochenbildung ist unter anderem für die Formation von Röhrenknochen, deren Längenwachstum sowie für die Heilung nach Frakturen verantwortlich. Das Dickenwachstum von Knochen erfolgt durch die sog. appositionelle Ossifikation. Hier wird Knochengewebe an bereits vorhandenen Knochen angelagert (Junqueira und Carneiro 2004).

## **1.2 Knochenzellen**

Die Knochenzellen steuern mit 2 % einen kleinen Anteil zur organischen Knochenmasse bei, bewerkstelligen jedoch den gesamten Knochenauf- und Umbau (Netter 2001). Im Folgenden soll ein Überblick über die Zelltypen des Knochens gegeben werden.

### **1.2.1 Osteoblasten**

Gebildet wird der Knochen von Osteoblasten, die aus mesenchymalen Vorläuferzellen hervorgehen. Da weitere Zelltypen wie Adipozyten, Chondrozyten, Fibroblasten und Myoblasten gleichen Ursprungs sind, spielen die Signale diverser Zytokine sowie die Aktivierung spezifischer Transkriptionsfaktoren eine wichtige Rolle, um die gerichtete osteogene Differenzierung zu

gewährleisten (Bianco et al. 2001). Die mesenchymale Vorläuferzelle differenziert über den sog. Prä-Osteoblasten zum reifen Osteoblast, wobei die Transkriptionsfaktoren RUNX2 (*Runt-related transcription factor 2*), OSX (Osterix) und ATF4 (*Activating transcription factor 4*) sowie die Wachstumsfaktoren FGFs (*Fibroblast Growth Factors*) und BMPs (*Bone Morphogenetic Proteins*) von entscheidender Bedeutung sind. Des Weiteren gibt es diverse endokrine und parakrine Faktoren wie Vitamin D<sub>3</sub>, Parathormon (PTH) und Östrogen, die die Differenzierung und Aktivität der Osteoblasten regulieren (Ducy et al. 1997; Jilka et al. 1999; Nakashima et al. 2002; Cohen 2006; Karsenty et al. 2009). Reife Osteoblasten haben eine charakteristische kuboidale Form mit stark basophilem Zytoplasma. Sie schließen sich zu Gruppen von bis zu mehreren hundert Zellen (sog. *Clustern*) zusammen und sezernieren eine als Osteoid bezeichnete extrazelluläre nicht-mineralisierte Protein Matrix, die vorwiegend aus Typ I Kollagen sowie weiteren nicht-kollagenen Proteinen (z.B. Osteocalcin und Alkalische Phosphatase) besteht. Etwa 2-3 Wochen nach Bildung des Osteoids reift die organische Matrix durch Einlagerung von Calciumphosphat in Form von Hydroxylapatit zu fertig mineralisiertem Knochen (Karsenty 2003). Am Ende seiner Aktivität geht der Osteoblast entweder in die Apoptose oder er differenziert weiter zu einem Osteozyt bzw. zu einer Knochenbelegzelle (Bellido 2014).

### 1.2.2 Osteozyten und Belegzellen

Osteozyten sind terminal differenzierte Osteoblasten, die in die mineralisierte Knochenmatrix eingemauert sind. Mit 90-95 % repräsentieren sie den Großteil aller Knochenzellen. Morphologisch zeichnen sich die Zellen durch neuronartige zelluläre Fortsätze aus, die mit den Ausläufern benachbarter Osteozyten über offene Zell-Zellkontakte (*gap junctions*) in Kontakt treten (Bonewald 2011). Dieses osteozytäre Netzwerk dient als Mechanosensor, der durch Umwandlung physikalischer in biochemische Signale eine koordinierte Anpassung auf veränderte Druck-, Zug-, oder Scherkräfte ermöglicht (Turner et al. 1994). Über die zellulären Fortsätze stellt der Osteozyt außerdem eine direkte Verbindung zu anderen Knochenzellen sowie zu Blutgefäßen her. So spielt er auch eine wichtige Rolle bei der Regulation der Knochenformation, indem er bei verminderter mechanischer Beanspruchung über das vom ihm sezernierte Protein Sclerostin die Osteoblastenaktivität hemmt (Knothe et al. 2004; Poole et al. 2005). Des Weiteren produziert er das Hormon FGF23, welches in der Niere die Exkretion von Phosphat fördert. Da der Phosphatspiegel die Entstehung von Hydroxylapatit-Kristallen maßgeblich beeinflusst, ist der Osteozyt folglich auch an der Regulation der Mineralisierung beteiligt (Fukumoto und Martin 2009).

Als weitere Zellen der Osteoblasten-Linie seien die Belegzellen erwähnt - flache Zellen, die in einer Einzelschicht die gesamte ruhende Knochenoberfläche bedecken. Die Funktion dieser Zellen ist

noch nicht abschließend geklärt, wobei der Schutz der Knochenoberfläche eine wichtige Aufgabe darstellt. Außerdem wird vermutet, dass sie eine spezifische Rolle bei der Kopplung von Knochenformation und Resorption haben (Crockett et al. 2011).

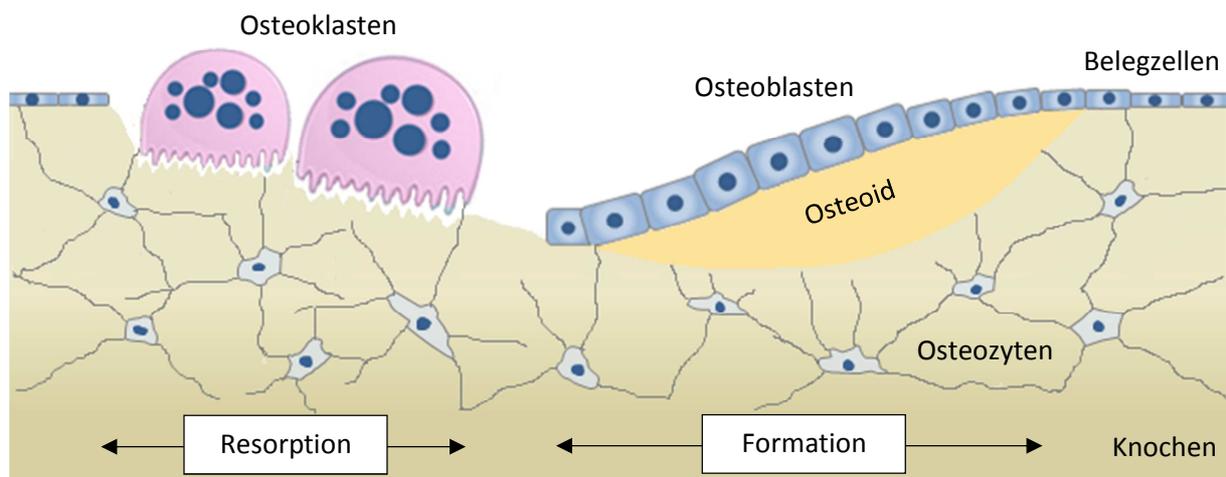
### 1.2.3 Osteoklasten

Die Gegenspieler der Osteoblasten sind die Osteoklasten - die einzigen Zellen des Körpers, die in der Lage sind, Knochen zu resorbieren. Osteoklasten besitzen mehrere große Zellkerne und entstehen durch Fusion mononukleärer hämatopoetischer Vorläuferzellen der Monozyten-Makrophagen-Linie. Die Osteoklastogenese ist ein komplexer Prozess, bei dem Hormone wie PTH und Vitamin D, lokale und systemische Faktoren wie M-CSF (*Macrophage colony-stimulating factor*) und RANKL (*Receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand*) sowie Transkriptionsfaktoren wie c-FOS (*FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog*) und NF $\kappa$ B (*Nuclear Factor Kappa  $\beta$* ) eine Schlüsselrolle spielen (Teitelbaum 2000; Boyle et al. 2003; Zhang et al. 2000). Um aktiv zu werden, heften sich die reifen Osteoklasten über Integrine an die Knochenoberfläche an und bilden die sog. *sealing zone* (Vaananen et al. 2000). Hierdurch entsteht ein abgeschlossenes Kompartiment, in dem die spätere Knochenresorption stattfindet (Resorptionslakune). Zusätzlich kommt es an dieser Kontaktfläche durch Auffaltungen der Plasmamembran (*ruffled membrane*) zur Oberflächenvergrößerung des Osteoklasten, der nun Protonen (über eine H<sup>+</sup>-ATPase) und Chloridionen (über den Clc-7 Kanal) sowie lysosomale Enzyme in die Resorptionslakune ausschüttet. Die gebildete Salzsäure führt zur Ansäuerung des Kompartiments auf einen pH-Wert von 4-5. Dieses saure Milieu bewirkt einerseits die Auflösung des Hydroxylapatits und somit die Freisetzung der organischen Matrix. Andererseits aktiviert es die sezernierten Enzyme (v.a. Cathepsin K), die die freigelegten organischen Bestandteile der Matrix abbauen (Gowen et al. 1999). Die entstehenden Abbauprodukte wie Calcium, Phosphat und Kollagenfragmente werden letztlich vom Osteoklasten aufgenommen und in die Zirkulation abgegeben (Nesbitt und Horton 1997). Nach abgeschlossener Resorption geht der Osteoklast entweder in die Apoptose oder wandert zum nächsten Degradationsort weiter.

## 1.3 Knochenumbau

Zur Erhaltung eines stabilen und funktionsfähigen Skelettsystems unterliegt dieses einem stetigen Umbau, wobei kontinuierlich alter Knochen durch Neuen ersetzt wird (Abb. 2). Dieser als *Remodeling* bezeichnete Mechanismus dient in erster Linie dazu Strukturschäden, die durch alltägliche Beanspruchungen und Bewegungen entstehen, zu reparieren und somit auf wechselnde Beanspruchungen der Knochen zu reagieren (Martin und Seeman 2008). Beim Erwachsenen werden

etwa 10 % der Knochenmasse pro Jahr ersetzt (Cohen 2006). Hierfür müssen Knochenresorption und Knochenformation sowohl quantitativ als auch räumlich und zeitlich aufeinander abgestimmt sein. Dies bedarf eines komplexen Kontroll- und Regulationssystems, bei dem neben neuroendokrinen Mechanismen auch lokale und systemische Faktoren eine Rolle spielen (Crockett et al. 2011). Als wichtiger lokaler Signalweg sei das RANKL-OPG-System zur Kontrolle der Osteoklasten erwähnt. So fördert das von Osteoblasten sezernierte Zytokin RANKL über die Bindung an den Rezeptor RANK, der auf der Oberfläche monozytärer Osteoklasten-Vorläuferzellen vorkommt, die vermehrte Differenzierung zu Osteoklasten. Als Gegenspieler kann der Osteoblast ebenfalls das sog. Osteoprotegerin (OPG) sezernieren. Dieses lösliche Protein arbeitet als „Fangrezeptor“ für RANKL und hat folglich einen negativen Einfluss auf die Knochenresorption. Umgekehrt können auch die Osteoklasten die Aktivität der Osteoblasten regulieren (Khosla 2001). So sezernieren Osteoklasten beispielsweise die Faktoren Cardiotrophin-1 oder Sphingosin-1-Phosphat, welche die Differenzierung und das Überleben von Osteoblasten begünstigen und damit die Knochenbildung stimulieren (Walker et al. 2008; Pederson et al. 2008; Keller et al. 2014; Sims und Martin 2015) .



**Abb. 2: Schematische Darstellung des Knochenumbaus.** Der Knochenumbau erfolgt in einer komplexen, streng regulierten Abfolge von Resorptions- und Formationschritten. Mehrkernige Osteoklasten bauen mineralisierten Knochen ab. Am Grunde der Resorptionslunke formieren sich anschließend Osteoblasten und füllen diese mit Osteoid auf, das später durch Ablagerung von Calciumphosphat mineralisiert. Diejenigen Osteoblasten, die durch die niedergelegte Knochenmatrix eingebettet werden, differenzieren zu Osteozyten. Knochenbelegzellen, die ebenfalls aus Osteoblasten hervorgehen, besiedeln die nicht im Umbau befindliche Knochenoberfläche.

## 1.4 Knochenkrankheiten

Wie wichtig das fein regulierte Gleichgewicht zwischen Knochenresorption und Knochenformation für den gesunden Organismus ist, zeigt die Tatsache, dass jede Verschiebung dieser Balance zu erheblichen Veränderungen der Stabilität des Knochens oder auch zu einer Störung der Mineralhomöostase führen kann. Überwiegt beispielsweise die Resorption gegenüber der Formation,

so zeigt sich mit konsekutiver Abnahme der Knochenmasse das Krankheitsbild der Osteoporose, welches mit erhöhter Fraktur­neigung einhergeht und die häufigste Erkrankung des Knochens darstellt (WHO 1994). Im entgegengesetzten Fall (übermäßige Formation) kommt es zu einer Zunahme der Knochenmasse, was im Allgemeinen als Osteosklerose bezeichnet wird (de Vernejoul 2008). Dem Krankheitsbild der hereditären Osteopetrose („Marmorknochenkrankheit“) liegt eine Unterfunktion der Osteoklasten zugrunde. Die dadurch bedingte ungerichtete Anhäufung von Knochenmatrix führt zur Bildung von mechanisch minderwertigem Knochen, wodurch die Patienten trotz der größeren Knochendichte ein erhöhtes Frakturrisiko aufweisen (Stark und Savarirayan 2009). Eine weitere durch Fehlregulation des Knochenstoffwechsels bedingte Erkrankung ist die Osteodystrophia deformans (Morbus Paget). Hierbei handelt es sich um die zweithäufigste Knochenerkrankung, welche durch lokal erhöhte Knochenumbauvorgänge mit dem Risiko von Verformungen, chronischen Schmerzen und Frakturen charakterisiert ist. Der Primärdefekt liegt wahrscheinlich in einer erhöhten Knochenresorption, wodurch die Knochenformation kompensatorisch gesteigert wird (Tan und Ralston 2014). Neben Veränderungen der Knochenmasse gibt es auch Krankheiten, bei denen die Mineralisation des Knochens betroffen ist. So kommt es bei der Osteomalazie zur Anreicherung nicht-mineralisierter Matrix mit der Folge von Knochenschmerzen und Deformitäten. Die Ursache ist meist ein Vitamin-D-Mangel (Wolff et al. 2008).

Einen vergleichsweise geringen Anteil an den Erkrankungen des Skelettsystems stellen die Knochentumoren dar. Man unterscheidet benigne (gutartige) von malignen (bösartigen) Knochentumoren. Primäre Tumoren, die direkt vom Knochengewebe ausgehen, sind selten. Viel häufiger sind sekundäre Knochentumoren, also Tumorabsiedlungen einer anderen Krebserkrankung (Metastasen). Bei etwa 80 % der Knochenmetastasen ist der Ursprung in einem Prostata-, Mama-, Bronchial- oder Nierenzellkarzinom zu finden (Roodman 2004). Die WHO-Klassifikation unterteilt die primären Knochentumoren im Wesentlichen nach der Tumormatrix, die von den jeweiligen Tumorzellen gebildet wird (Fletcher 2002, Tab. 1).

**Tab. 1: WHO-Klassifikation der Knochentumoren.**

Gruppe	benigne	semimaligne	maligne
<b>knochenbildende Tumoren</b>	Osteom Osteoidosteom Osteoblastom	malignes Osteoblastom	Osteosarkom
<b>Knorpelbildende Tumoren</b>	Chondrom Osteochondrom Chondroblastom chondromyxoides Fibrom		Chondrosarkom
<b>Bindegewebstumoren</b>	Histiozytom, Lipom	demoplastisches Fibrom	Fibrosarkom malignes Histozytom Liposarkom Leiomyosarkom

<b>Knochenmarkstumoren</b>		Ewing-Sarkom malignes Lymphom Myelom
<b>Tumorartige Läsionen</b>	solitäre Knochenzyste eosinophiles Granulom Myositis ossificans brauner Tumor bei Hyperparathyreoidismus	
<b>Riesenzelltumor</b>		Osteoklastom
<b>andere Tumoren</b>		Chordom Neurofibrom
<b>Metastasen</b>		

## 1.5 Das Osteosarkom

### 1.5.1 Allgemeine Informationen

Das Osteosarkom (OS) ist der häufigste primäre maligne Tumor des Skelettsystems. Er manifestiert sich vorwiegend im Kindes- und Jugendalter, wobei der Altersgipfel zwischen dem 10. und 19. Lebensjahr liegt (Ottaviani und Jaffe 2010). Trotz einer geringen Inzidenz von 4-5 Fällen je 1 Million Einwohner pro Jahr zählt das Osteosarkom zu den häufigsten Krebs-assoziierten Todesfällen in der pädiatrischen Altersgruppe (Rosenberg et al. 2013; Botter et al. 2014). Ein weiterer Altersgipfel ist um das 60. Lebensjahr beschrieben, wobei dieser jene Osteosarkome umfasst, die nach einer prädisponierenden Erkrankung (z.B. Morbus Paget) oder nach einer Bestrahlung entstehen (Huvos 1986; Mirabello 2009). Die Tumoren können grundsätzlich im gesamten Skelettsystem lokalisiert sein, kommen jedoch vorzugsweise in den Metaphysen der Röhrenknochen vor. So treten ca. 60 % der Fälle im Kniegelenkbereich, also im distalen Femur und in der proximalen Tibia, auf. Auch der hüftgelenknahe Femur, der proximale Humerus sowie das Becken werden vielfach betroffen. Das Vorkommen in der Wirbelsäule oder im Gesichtsschädel ist mit weniger als 10 % vergleichsweise gering (Nathrath et al. 2011). Neben einer lokalen Schwellung stellen zunehmende, oft als belastungsabhängig empfundene Schmerzen das führende Symptom dar (Widhe und Widhe 2000).

Die Zellen des Osteosarkoms sind hochgradig polymorph und durch die Produktion von Osteoid bzw. mineralisierter Knochenmatrix gekennzeichnet. Anhand der histologisch vorherrschenden Tumorzellart wird der Tumor in das osteoblastische (50 %), chondroblastische (25 %) oder fibroblastische (25 %) Osteosarkom eingeteilt (Dahlin und Unni 1977; Klein und Siegal 2006). Der exakte zelluläre Ursprung des Osteosarkoms ist nach wie vor noch nicht eindeutig geklärt. Es wird diskutiert, dass sich die transformierten Zellen entweder von mesenchymalen Stammzellen oder Osteoblasten-Vorläuferzellen ableiten (Mutsaers und Walkley 2014).

Charakteristisch für das Osteosarkom ist ein schnelles und invasives Wachstum mit einer frühzeitigen Entwicklung von Fernmetastasen. Diese betreffen in erster Linie die Lunge (80 %), können aber auch das Skelett, Lymphknoten oder andere Organe befallen (Link et al. 2002; Bielack et al. 2002). Die primäre Metastasierung korreliert mit einer deutlich schlechteren Prognose. Dies ist insofern relevant, als dass bei etwa 20 % der Patienten bereits bei Diagnosestellung manifeste Metastasen vorliegen. Darüber hinaus geht man auch bei Patienten, die initial frei von Metastasen erscheinen, in 80-90 % von einer bereits erfolgten Mikrometastasierung aus (Kaste et al. 1999; Kager et al. 2003; Nathrath et al. 2011).

Die Therapie des Osteosarkoms besteht derzeit in der radikalen Resektion der Tumoren sowie einer zentralisierten prä- und postoperativen Chemotherapie. Während vor 1970 die alleinige operative Tumorentfernung nur in 10-15 % der Fälle zu einer Langzeitheilung führte, konnte die 5-Jahres-Überlebensrate durch die Anfang der 1980er Jahre eingeführte ergänzende Chemotherapie auf 60-70 % angehoben werden. Seit Mitte der 1980er Jahre gab es allerdings keine wesentlichen Fortschritte für eine Heilung dieser Tumorerkrankung, weshalb die Prognose beim Osteosarkom heutzutage nach wie vor schlecht ist (Rosen et al. 1982; Anninga et al. 2011; Allison et al. 2012). Die Identifizierung neuer krankheitsspezifischer Zielmoleküle zur Entwicklung neuer Therapieansätze ist daher von zentraler Bedeutung.

### **1.5.2 Pathogenese**

Die Frage, ob sich die gängige Mehrschritthypothese der malignen Transformation auch auf die Pathogenese des Osteosarkoms anwenden lässt, ist Gegenstand vieler genetischer Untersuchungen (Botter et al. 2014). Diese Hypothese besagt, dass die Karzinogenese ein mehrstufiger Prozess ist, der durch die Akkumulation mehrerer Mutationen bedingt ist (Vogelstein und Kinzler 1993). Genetische Veränderungen wie Punktmutationen, chromosomale Rearrangements (Translokation, Inversion, Deletion) sowie Amplifikationen können zur Überexpression und Aktivierung von Onkogenen bzw. zur Suppression und Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen führen. Die klare Identifizierung einer definierten Abfolge genetischer Veränderungen, wie im Falle der Pathogenese des Kolonkarzinoms (Vogelstein et al. 1988), ist für das Osteosarkom bisher nicht gelungen. Der Grund dafür ist, dass das Osteosarkom im Vergleich zu vielen anderen Tumoren durch eine große inter- und intratumorale Heterogenität sowie einem hohen Ausmaß an genomischer Instabilität gekennzeichnet ist (Stephens et al. 2011; Martin et al. 2012).

Nichtsdestotrotz konnten mittels genomweiten Genexpressions- und Sequenzanalysen sowie Proteinexpressionsanalysen an humanen Osteosarkom-Geweben mehrere relevante Gene identifiziert werden, die mit der Entstehung und Progression von Osteosarkomen assoziiert sind.

Einige Kandidatengene sind in Tab. 2 gelistet. Neben dem Onkogen *c-Fos*, das in einer Vielzahl von Osteosarkom-Geweben überexprimiert wird, sind vor allem Tumorsuppressorgene, die bei der Regulation des Zellzyklus (*TP53*, *RB1*) sowie dem Erhalt der DNA-Stabilität (*RECQL4*) beteiligt sind, von großer Bedeutung. So können in etwa 80 % sporadisch entstandener Osteosarkome sowie in 53 % etablierter Osteosarkom-Zelllinien genetische Veränderungen im *TP53*-Gen identifiziert werden (Chen et al. 2014; Ottaviano et al. 2010). Die Bedeutung von *TP53* im Osteosarkom wird zudem dadurch unterstrichen, dass bei Patienten des Li-Fraumeni Syndroms, die eine inaktivierende Keimbahnmutation in einem Allel des *TP53*-Gens tragen, eine nachgewiesene Prädisposition für eine Osteosarkom-Entstehung vorliegt (Srivastava et al. 1990). Ebenso kommt es beim familiären Retinoblastom (Funktionsverlust des *RB1*-Gens) sowie beim Rothmund-Thomson Syndrom (Funktionsverlust des *RECQL4*-Gens) zu einem vermehrten Auftreten von Osteosarkomen (Hansen et al. 1985; Wang et al. 2003).

Tab. 2: Ausgewählte häufig mutierte Tumorsuppressorgene und Onkogene im humanen Osteosarkom.

Gen	Name	Genlocus	Mutations-häufigkeit	Referenz
<b>Tumorsuppressoren</b>				
<i>TP53</i>	<i>Tumor protein 53</i>	17p13.1	80-90 %	Chen et al. 2014
<i>RB1</i>	<i>Retinoblastoma 1</i>	13q14.2	10-39 %	Toguchida et al. 1989 Chen et al. 2014
<i>RECQL4</i>	<i>RecQ protein-like 4</i>	8q24.4	<5 %	Lonardo et al. 1997 Colombo et al. 2014
<i>PTEN</i>	<i>Phosphatase and tensin homologue</i>	10q23.3	44 %	Freeman et al. 2008
<i>CDKN2B (P15)</i>	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor p15</i>	9p21	5-21 %	Tsuchiya et al. 2000
<i>CDKN2A (P16)</i>	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor p16</i>	9p21	keine Angaben	Hou et al. 2006
<b>Onkogene</b>				
<i>c-Fos</i>	<i>FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homologue</i>	14q24.3	40-61 %	Wu et al. 1990 Gamberi et al. 1998
<i>CDK4</i>	<i>Cyclin-dependent kinase 4</i>	12q14	8 %	Wei et al. 1999
<i>MDM2</i>	<i>MDM2 p53 binding protein homologue</i>	12q15	3-25 %	Lonardo et al. 1997
<i>MYC</i>	<i>V-MYC myelocytomatosis viral oncogene homologue</i>	8q21.4	7-10%	Chen et al. 2014
<i>PRIM1</i>	<i>Primase DNA polypeptide 1</i>	12q13	41 %	Yotov et al. 1999
<i>TWIST</i>	<i>Twist homologue 1</i>	7p21	14 %	Entz-Werle et al. 2005

### 1.5.3 Mausmodelle

Seitdem Rudolf Jaenisch 1974 die erste genetisch veränderte Maus generierte, haben sich transgene bzw. gendefiziente Mausmodelle für neue Erkenntnisgewinne in der Tumorbologie bewährt (Jaenisch und Mintz 1974). Sie eignen sich u.a. sehr gut zur Identifizierung von *Driver*-Mutationen, die essentiell für eine maligne Transformation sind, sowie zur Untersuchung konsekutiver Schritte der Tumorentwicklung. Auch für das Osteosarkom wurden diverse murine Modelle entwickelt, um die

Pathomechanismen besser zu verstehen. Im Folgenden sollen die in dieser Arbeit verwendeten Tiermodelle vorgestellt werden.

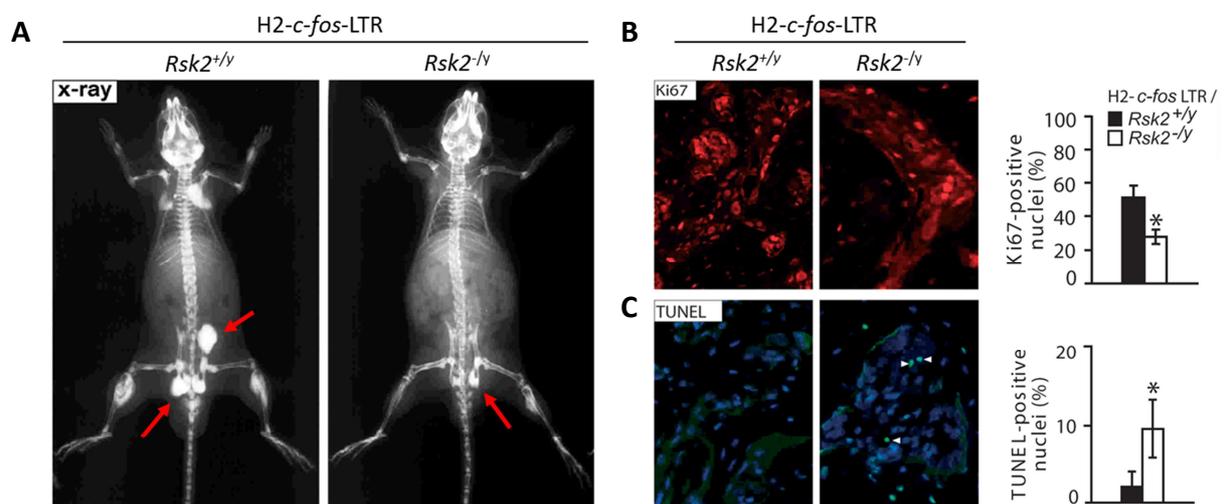
Ein Modell, das sich gut zur Untersuchung der molekularen Pathogenese des Osteosarkoms eignet, ist das *Trp53*-defiziente Mausmodell. *Trp53* ist das murine Homolog zum humanen *TP53*-Gen. Es stellt das am häufigsten mutierte Tumorsuppressorgen im Osteosarkom dar und liegt zudem in ca. 50 % aller menschlichen Tumoren verändert vor (Muller und Vousden 2013). Die zentrale Rolle dieses Gens bzw. des Genprodukts p53 liegt in der Regulierung des Zellzyklus. So induziert p53 bei DNA-Schäden entweder einen Zellzyklusarrest sowie DNA-Reparaturmechanismen oder es leitet die Apoptose der betroffenen Zelle ein (Levine 2009). Mäuse mit einer homozygoten Keimbahndeletion des *Trp53*-Gens entwickeln im Alter von 6-8 Monaten in 75 % der Fälle Lymphome, die zum Tod der Tiere führen. Dahingegen weisen Tiere, bei denen nur ein *Trp53*-Allel deletiert ist, aufgrund einer geringeren Prädisposition für Lymphome eine längere Lebensspanne sowie ein deutlich breiteres Tumorspektrum auf. Hierbei werden neben diversen Weichteilsarkomen auch Osteosarkome diagnostiziert (Harvey et al. 1993; Jacks et al. 1994).

Laut der Mehrschrittthypothese müssen immer mehrere Gendefekte vorliegen, damit sich ein Tumor manifestiert. Aufgrund der Beteiligung von *TP53*-Mutationen an der Pathogenese zahlreicher untersuchter Tumoren, eignet sich das *Trp53*-defiziente Mausmodell zur Identifizierung weiterer Kandidatengene (*Bystander*-Mutationen), die zu einer Tumormanifestation beitragen (Wunder et al. 2005).

Als weiteres Osteosarkom-Modell wurden Mäuse herangezogen, die den Transkriptionsfaktor *c-fos* überexprimieren. c-Fos ist ein Hauptbestandteil des heterodimeren AP-1 Komplexes, der eine wichtige Rolle bei der Regulation von Zellproliferation, Differenzierung und Apoptose spielt (Shaulian und Karin 2001). Auch bei der Regulation der Knochenhomöostase nimmt c-Fos eine Schlüsselfunktion ein (Wagner 2002). So ist dieser Faktor essentiell für die Differenzierung von Osteoklasten, hat aber auch einen entscheidenden Einfluss auf die Transformation von Osteoblasten (Jochum et al. 2002). Dies zeigt sich darin, dass eine Überexpression von *c-Fos* in 40-61 % aller humanen Osteosarkome gefunden wurde (Wu et al. 1990; Gamberi et al. 1998). Zudem korreliert die Expressionsrate mit höheren histologischen Graden und daher mit einer höheren Malignität der Erkrankung (Franchi et al. 1998; Papachristou et al. 2003). In Analogie dazu entwickeln Mäuse, die *c-fos* unter Kontrolle des MHC Klasse I Promotors H2K (*H2-c-fos-LTR*) exprimieren, bereits wenige Wochen nach Geburt Osteosarkome und eignen sich daher als gutes Krankheitsmodell. Die Tumoren

manifestieren sich mit einer Penetranz von 100 % und können alle Knochen des Skelettsystems betreffen (Rüther et al. 1987; Grigoriadis et al. 1993).

Das Transformationspotential von c-Fos wird maßgeblich durch posttranslationale Modifikation bestimmt. So konnte *in vitro* gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von c-Fos durch die Kinasen ERK (*Extracellular-signal regulated kinase*) und Rsk2 (*Ribosomal Protein S6 Kinase 2*) die Stabilität und damit die transformierende Aktivität des Proteins moduliert (Chen et al. 1996). Rsk2 ist eine Serin/Threonin Kinase, die eine zentrale Schaltstelle im MAP-Kinase-Signalweg (MAP *mitogen-activated protein*) ist und neben c-Fos eine Vielzahl nukleärer Substrate wie CREB (*cAMP response element-binding protein*), Histon H3 oder auch p53 phosphoryliert (Anjum und Blenis 2008). Nachdem die *in vitro* Versuche bereits eine entscheidende Rolle von Rsk2 bei der Regulation der Zelltransformation vermuten ließen, bestätigten darauffolgende *in vivo* Analysen, dass die c-Fos-abhängige Osteosarkom-Progression in Abwesenheit von Rsk2 deutlich beeinträchtigt ist. So war die Größe der c-Fos-induzierten Tumoren bei Tieren mit zusätzlicher *Rsk2*-Defizienz drastisch reduziert und die transformierten Zellen im Tumorgewebe zeigten eine verminderte Proliferations- sowie eine erhöhte Apoptoserate (Abb. 3; David et al. 2005). Da die *Rsk2*-Deletion vorwiegend Einfluss auf die Tumorlast und nicht auf die Tumorzinzidenz hat, eignet sich das *c-fos*-transgene Mausmodell mit zusätzlicher *Rsk2*-Defizienz hervorragend zur Studie der Osteosarkom-Progression.

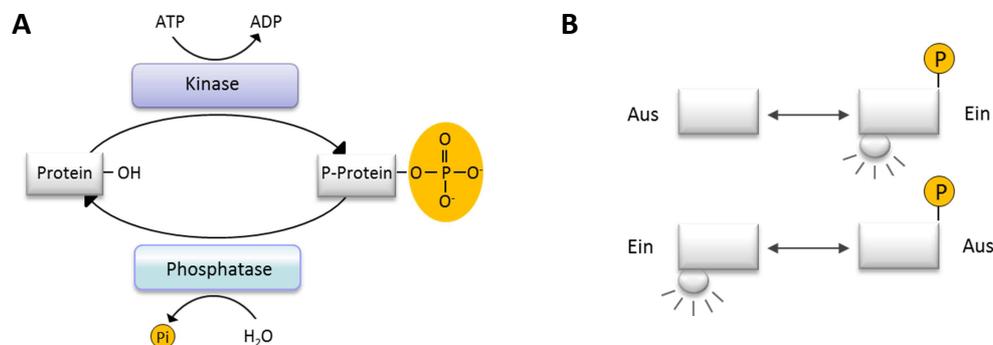


**Abb. 3: Einfluss der *Rsk2*-Deletion auf die Osteosarkom-Progression *c-fos*-transgener Mäuse (A)** Kontaktradiographische Aufnahmen erbrachten, dass die Größe der c-Fos-induzierten Osteosarkome bei Mäusen mit zusätzlicher *Rsk2*-Defizienz deutlich reduziert war (gekennzeichnet durch rote Pfeile). In diesen Tumoren konnten mittels Ki67- und TUNEL-Färbung (B, C) eine verminderte zelluläre Proliferation (signifikant reduzierter Anteil Ki67-positiver Zellen) sowie ein erhöhter Apoptoseindex (signifikant erhöhter Anteil TUNEL-positiver Zellen; gekennzeichnet durch weiße Pfeile in den Fluoreszenzaufnahmen) nachgewiesen werden (David et al. 2005).

## 1.6 Die Rolle der Tyrosinphosphorylierung in der Tumorbioogie

### 1.6.1 Reversible Tyrosinphosphorylierung

In Signaltransduktionsprozessen wird die Aktivität der beteiligten Proteine maßgeblich durch die reversible Übertragung von Phosphatgruppen (Phosphorylierung/Dephosphorylierung) reguliert. Reversible Phosphorylierungsvorgänge nehmen somit eine Schlüsselrolle in nahezu allen zellulären Prozessen wie Zellproliferation, Differenzierung, Zell-Zell-Kommunikation oder Apoptose ein. Der Phosphorylierungsstatus eines Proteins unterliegt daher einer strengen Kontrolle, der durch die fein regulierte Aktivität von Kinasen und Phosphatasen gesteuert wird (Abb. 4A). Proteinkinasen katalysieren dabei die kovalente Bindung einer Phosphatgruppe an einen Aminosäurerest des Substratproteins. Als Gegenspieler katalysieren die Phosphatasen die Dephosphorylierung, indem sie die Phosphatgruppe durch hydrolytische Spaltung wieder entfernen. Proteinphosphorylierungen treten in der Regel an Serin-, Threonin- oder Tyrosinresten auf, wobei das Verhältnis in eukaryotischen Zellen 90 : 10 : 0,05 beträgt (Mann et al. 2002). Als Konsequenz der Anwesenheit einer Phosphatgruppe kommt es in dem betroffenen Protein zu einer Konformationsänderung, wodurch dieses entweder aktiviert oder inaktiviert wird (Abb. 4B). Auf diese Weise werden zelluläre Signale weitergeleitet, verstärkt, umgeleitet oder abgeschaltet.



**Abb. 4: Reversible Proteinphosphorylierung.** (A) Proteinkinasen katalysieren die kovalente Bindung einer Phosphatgruppe ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) von einem Adenosintriphosphat (ATP) Molekül an eine Hydroxylgruppe (-OH) einer Serin-, Threonin- oder Tyrosinseitenkette des Substratproteins. Chemisch handelt es sich um die Bildung eines Phosphorsäureesters. Als Gegenspieler katalysieren die Phosphatasen die Dephosphorylierung. Dies geschieht durch Hydrolyse der Phosphoesterbindung. (B) Phosphorylierung wirkt als molekularer Schalter, der die Aktivität eines Proteins entweder ein- oder ausschaltet.

### 1.6.2 Tumorsuppressorfunktion von Protein-Tyrosinphosphatasen (PTPs)

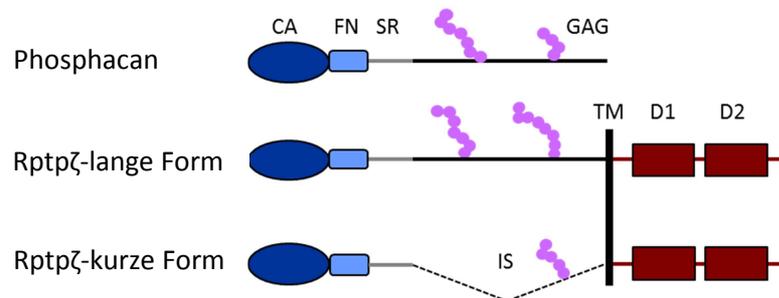
Ein genau abgestimmtes Wechselspiel zwischen Proteinkinasen und Phosphatasen ist insbesondere für die Regulation der Zellproliferation essentiell. Daher liegt es nahe, dass Störungen bzw. Verschiebungen dieses dynamischen Gleichgewichts mit der Entstehung und Progression von

Tumoren assoziiert sind. In diesem Kontext ist vor allem die Phosphorylierung an Tyrosinresten von Bedeutung. Auch wenn der Anteil an tyrosinphosphorylierten Proteinen nur 0,05-0,1 % der Gesamtyrosinphosphorylierung einer Zelle ausmacht, werden genetische Veränderungen in Protein-Tyrosinkinassen (PTKs) und Protein-Tyrosinphosphatasen (PTPs) mit der Pathogenese diverser Karzinome und Sarkome assoziiert (Vetter et al. 2002; Ostmann et al. 2006; Julien et al. 2011). Da viele Wachstumsfaktoren über die Aktivierung der Tyrosinphosphorylierung die Zellproliferation fördern, ist es nicht verwunderlich, dass aktivierende Mutationen in PTKs die malignen Transformationsprozesse begünstigen. Sie gelten demnach als Onkogene (Blume-Jensen und Hunter 2001). Als Gegenspieler zu den PTKs fungieren die meisten PTPs als Tumorsuppressoren. So konnte eine Inaktivierung von PTP-Genen durch somatische Mutationen, inaktivierende Promotor-methylierungen sowie durch den Verlust eines Allels (LOH, *Loss of heterozygosity*) in einer Reihe humaner Tumoren nachgewiesen werden (Tonks 2006; Julien et al. 2011). Unter anderem wurde für die Rezeptor-Proteintyrosinphosphatase  $\zeta$  (Rptp $\zeta$ ) eine Tumorsuppressorfunktion beschrieben. *In vitro* Experimente in Prostatakarzinom-Zelllinien erbrachten, dass die shRNA-vermittelte Repression des entsprechenden Gens das Migrations- und Invasionspotential dieser Zellen erhöhte. Darüber hinaus konnte mittels Injektion dieser Zelllinien in Nacktmäuse gezeigt werden, dass der Verlust von Rptp $\zeta$  mit einer verstärkten Metastasierung einhergeht (Diamantopoulou et al. 2010). Inwiefern Rptp $\zeta$  auch bei der Pathogenese des Osteosarkoms von Bedeutung sein könnte, soll im Folgenden erläutert werden.

### 1.6.3 Die Rezeptor-Proteintyrosinphosphatase Rptp $\zeta$

Rptp $\zeta$  gehört zur Gruppe der „Cystein-basierten Klasse I-Phosphatasen“ der PTP-Superfamilie. Das kodierende Gen – *PTPRZ1* – ist beim Menschen auf dem Chromosom 7 (7q31.3) lokalisiert (Ariyama et al. 1995). Durch Alternatives Splicing der entsprechenden prä-mRNA werden 3 Isoformen generiert (Abb. 5). So unterscheidet man eine sezernierte Form, genannt Phosphacan, und zwei transmembrane Rezeptorformen (lange und kurze Rptp $\zeta$ -Variante). Die lange Rptp $\zeta$ -Variante (*full length form*) umfasst 2307 Aminosäuren, was einem Molekulargewicht von etwa 250 kDa entspricht. Charakteristisch für die Klasse der Rptps enthält dieses Protein in seiner intrazellulären Region 2 Phosphatasedomänen (D1 und D2), von denen allerdings nur die membranständige Domäne D1 volle katalytische Aktivität aufweist. Der extrazelluläre Teil besteht aus einer N-terminalen Carboanhydrase-ähnlichen Domäne (CA) gefolgt von einer Fibronektin Typ III-ähnlichen Sequenzwiederholung (FN), einer Spacerregion (SR) und einer langen *Intervening Sequence* (IS), die bei der kurzen transmembranen Variante fehlt. Charakteristischerweise ist die IS-Domäne stark mit Glycosaminoglycan-Seitenketten (GAGs) modifiziert. So handelt es sich bei der sezernierten Rptp $\zeta$ -

Form (Phosphacan), die ausschließlich die extrazelluläre Region umfasst, um das am häufigsten vorkommende Proteoglykan im Gehirn (Barnea et al. 1994; Nishiwaki et al. 1998; Lamprianou et al. 2011).



**Abb. 5: Schematische Darstellung der Rptp $\zeta$ -Isoformen.** Dargestellt ist die Domänenstruktur der durch alternatives Splicing generierten Rptp $\zeta$ -Varianten. CA: Carboanhydrase-ähnlichen Domäne; FN: Fibronektin Typ III-ähnliche Sequenzwiederholung; SR: Spacerregion; IS: *Intervening Sequence*; TM: Transmembrandomäne; D1+D2: Phosphatase-Domänen; GAG: Glycosaminoglycan-Seitenketten. Aus den Primärstrukturen lassen sich ohne posttranslationale Modifikationen folgende Molekulargewichte errechnen: Phosphacan: 175 kDa, Rptp $\zeta$ -lange Form: 250 kDa, Rptp $\zeta$ -kurze Form: 165 kDa (Garwood et al. 2003).

*PTPRZ1* wurde erstmalig in Zellen des zentralen Nervensystems entdeckt, wobei die stärkste Expression in Astrozyten und Oligodendrozyten nachgewiesen wurde (Krueger und Saito 1992; Faissner et al. 2006). Die Analyse *Ptprz1*-defizienter Mäuse lässt auf eine Rolle von Rptp $\zeta$  bei der Entwicklung und Differenzierung von Oligodendrozyten schließen (Harroch et al. 2002).

Im Jahr 2008 konnte von unserer Arbeitsgruppe erstmalig die Relevanz von Rptp $\zeta$  für den Knochenstoffwechsel aufgezeigt werden (Schinke et al. 2008). So erbrachte eine Affymetrix-Genchipanalyse von sich differenzierenden primären murinen Osteoblasten, dass *Ptprz1* im Verlauf der Mineralisierung eines der am stärksten induzierten Gene ist. Weiterhin zeigten semi-quantitative Expressionsanalysen, dass Osteoblasten die kurze transmembrane Variante von Rptp $\zeta$  exprimieren. Daraufhin wurde der Knochenphänotyp *Ptprz1*-defizienter Mäuse analysiert. Ein drastischer skelettaler Phänotyp ließ sich hierbei nicht identifizieren - die Tiere zeigten eine moderate Osteopenie im Alter von 52 Wochen. Allerdings ergaben sich äußerst interessante Erkenntnisse aus *ex vivo* Zellkulturexperimenten. So konnte in den primären Osteoblasten *Ptprz1*-defizienter Mäuse *in vitro* eine wesentlich stärkere Proliferationsrate als in den entsprechenden Wildtypkulturen nachgewiesen werden. Weiterhin führte die Transfektion eines Rptp $\zeta$  Expressionsplasmids in der osteoblastären Zelllinie MC3T3-E1 zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion der Zellproliferation. Rptp $\zeta$  stellt demnach einen negativen Regulator der Osteoblastenproliferation dar.

## 1.7 Aufgabenstellung

Das Osteosarkom ist zwar ein seltener, aber dennoch ein äußerst aggressiver Tumor, an dem heutzutage immer noch mehr als 30 % der vorwiegend jugendlichen Patienten versterben. Das zentrale Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung molekularer Ursachen der Tumorentstehung, die für die Entwicklung neuer potentieller Ansätze der Osteosarkom-Therapie von Bedeutung sein könnten. Dies sollte im Wesentlichen anhand von zwei Aufgabenstellungen analysiert werden.

1. Rptp $\zeta$  ist ein Membranprotein, das *in vitro* einen hemmenden Einfluss auf die Osteoblastenproliferation hat. Hieraus ergab sich die Hypothese, dass Rptp $\zeta$  als Tumorsuppressor fungiert und dessen Abwesenheit bzw. Inaktivierung die Entstehung von Osteosarkomen begünstigt. Da in den *Ptprz1*-defizienten Mäusen bis zum Alter von 50 Wochen jedoch keine skelettalen Tumoren beobachtet werden konnten, stellte sich die Frage, ob – gemäß der oben beschriebenen Mehrschritthypothese – mehrere Gendefekte vorliegen müssen, damit sich eine auf *Ptprz1*-Defizienz beruhende Osteosarkom-Bildung manifestiert. Demnach wurde die putative Tumorsuppressorfunktion von Rptp $\zeta$  durch gezielte Kombination einer *Ptprz1*-Defizienz mit einer heterozygoten *Trp53*-Deletion am Mausmodell überprüft.
2. c-Fos ist ein Transkriptionsfaktor, der im humanen Osteosarkom verstärkt exprimiert wird. Auch eine Überexpression in Mäusen führt zur Entwicklung von Osteosarkomen. Bei gleichzeitiger Deletion von *Rsk2*, einer Kinase, zu deren Zielmolekülen c-Fos zählt, ist das Osteosarkom-Wachstum allerdings deutlich gestört. Ziel dieser Arbeit war daher die Untersuchung des zellulären und molekularen Mechanismus, dem die pro-onkogene Rolle von *Rsk2* bei der c-Fos-induzierten Osteosarkom-Entwicklung zugrunde liegt. Zudem wurde analysiert, ob der protektive Effekt der genetischen Inaktivierung von *Rsk2* durch eine pharmakologische Inhibition reproduziert werden kann. *Rsk2* könnte somit ein vielversprechendes therapeutisches Zielprotein zur Behandlung von Osteosarkomen darstellen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

Alle verwendeten Geräte, Materialien, Chemikalien, Kits, Enzyme, Antikörper, Oligonukleotide, Plasmide und Bakterien sind, wenn nicht explizit aufgeführt, dem Anhang (Kapitel 8.1) zu entnehmen. Dort sind ebenfalls die Zusammensetzungen der verwendeten Puffer und Lösungen sowie Zellkulturmedien beschrieben.

#### 2.1.1 Mausmodelle

In dieser Arbeit wurden verschiedene Mausmodelle eingesetzt und je nach Fragestellung miteinander verpaart. Die Haltung der Tiere erfolgte in den Räumlichkeiten der Zentralen Versuchstierhaltung (VTH) des UKE bei einem 12 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus. Nahrung und Wasser stand *ad libitum* zur Verfügung. Die Organentnahmen wurden von der Tierschutzkommission des UKE und der Behörde für Soziales, Familie, Gesundheit und Verbraucherschutz der Freien und Hansestadt Hamburg genehmigt (Genehmigungsnummer Org#529).

**Tab. 3: Verwendete Mausmodelle.**

Mausmodell	Genotyp	Beschreibung	Quelle	Genetischer Hintergrund
<i>Trp53</i> -defiziente Mäuse	<i>Trp53</i> <sup>-/-</sup>	Jacks et al. 1994	Jackson Laboratory (Maine, USA)	C57Bl6/J
<i>Ptprz1</i> -defiziente Mäuse	<i>Ptprz1</i> <sup>-/-</sup>	Harroch et al. 2000 Schinke et al. 2008	Dr. Sheila Harroch (Institut Pasteur, Paris, FRA)	
<i>c-fos</i> transgene Mäuse	<i>c-fostg</i> (H2- <i>c-fos</i> -LTR)	Rüther et al. 1989 David et al. 2005	Dr. Jean-Pierre David (UKE Hamburg, DE)	
<i>Rsk2</i> -defiziente Mäuse	<i>Rsk2</i> <sup>Δy</sup>	Yang et al. 2004 David et al. 2005	Dr. Jean-Pierre David (UKE Hamburg, DE)	
<i>Mdk</i> -defiziente Mäuse	<i>Mdk</i> <sup>-/-</sup>	Nakamura et al. 1998 Liedert et al. 2014	Dr. Takashi Muramatsu (Aichi Gakuin University, Aichi, JPN)	
C57Bl6/J Wildtyp Mäuse	WT	Black et al. 1998	Zentrale Versuchstierhaltung des UKE	

Für die Analysen *c-fos*-transgener bzw. *c-fos*-transgener Mäuse mit zusätzlicher *Rsk2*-Defizienz wurden ausschließlich männliche Tiere verwendet.

## 2.1.2 Zelllinien und primäre Zellen

Die Kultivierung von Zellen erfolgte standardmäßig bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und 100 % rH.

**Tab. 4: Verwendete Zelllinien und primäre Zellen.**

Zelllinien/ primäre Zellen	Beschreibung	Quelle	Kultivierung
U2OS	Humane Osteosarkom-Zelllinie	ATCC #HTB-96 (Rockville, USA)	Mc Coy's 5A Medium 10 % FKS; 100 U/ml Penicillin/Streptomycin
SaOS-2	Humane Osteosarkom-Zelllinie	ATCC #HTB-85 (Rockville, USA)	Mc Coy's 5A Medium 20 % FKS; 100 U/ml Penicillin/Streptomycin
<i>c-fostg</i>	Murine Osteosarkom-Zelllinie	Eigens generiert aus isolierten Osteosarkomen	a-MEM mit 2,2 g/l NaHCO <sub>3</sub> ; 10 % FKS; 100 U/ml Penicillin/Streptomycin
<i>c-fostg/Rsk2<sup>ly</sup></i>	Murine Osteosarkom-Zelllinie		
<i>Trp53<sup>+/-</sup>/Ptprz1<sup>+/-</sup></i>	Murine Osteosarkom-Zelllinie		
<i>Trp53<sup>+/-</sup>/Ptprz1<sup>-/-</sup></i>	Murine Osteosarkom-Zelllinie		
Primäre murine Osteoblasten	Primärkultur	Generiert aus Schädeldächern 3-5 Tage alter C57BL/6 Mäuse	+ 50 µg/ml Ascorbinsäure + 10 mM β-Glycerophosphat
Primäre Osteoklasten	Primärkultur	Generiert aus dem Knochenmark 12 Wochen alter C57BL/6 Mäuse	+ 10 nM Vitamin-D3 + 20 ng/ml M-CSF + 40 ng/ml msRANKL
Primäre humane Osteoblasten	Primärkultur	PromoCell #C-12720 (Heidelberg, DE)	<i>Ready to use</i> Osteoblasten Wachstums- bzw. Mineralisierungsgsmedium (PromoCell)

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Präparation von Mäusen

Die zu analysierenden Mäuse wurden zunächst mit einem 80 % CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> Gasmisch narkotisiert, bevor die eigentliche Tötung durch reines CO<sub>2</sub> Gas eingeleitet wurde. Eine erfolgreiche Euthanasie wurde durch das Ausbleiben des Zwischenzehenreflexes an der Hintergliedmaße verifiziert. Die Mäuse wurden sogleich gewogen, der Bauchraum eröffnet und aus dem Herzen Blut entnommen. Zur Bestätigung des Genotyps wurde außerdem ein Stück der Schwanzspitze abgenommen. Für ausgewählte Versuche wurden einzelne Gewebe präpariert, sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur RNA-Isolation (Kapitel 2.2.4.7) bei -80°C gelagert. Nach Entfernung aller Organe wurden die Mäuse gehäutet, die Skelette auf einer Korkplatte gestreckt und für 48 h in 3,5 % Formafix-Lösung fixiert. Anschließend wurden die Skelette bis zur weiteren Verarbeitung in 80 % Ethanol gelagert. Die Isolierung primärer Knochentumoren zur Etablierung von Osteosarkom-Zelllinien (Kapitel 2.2.5.3) erfolgte stets an unfixiertem Gewebe.

## **2.2.2 Radiologische Untersuchungen**

Für kontaktradiografische Untersuchungen wurden fixierte sowie unfixierte Mausskelette auf einer Röntgenkassette platziert und für 2 s bei 35 kV im Kontakt-Röntgenapparat (Faxitron Xray) belichtet. Die Entwicklung der Röntgenfilme erfolgte mithilfe eines automatischen Entwicklersystems (Protec). Zur detaillierten dreidimensionalen Darstellung von Osteosarkomen wurden die betroffenen Knochen mittels Mikro-Computertomographie ( $\mu$ CT, Scano Medical) analysiert.

## **2.2.3 Histologische Untersuchungen**

### **2.2.3.1 Unentkalkte Knochenhistologie**

Für histologische Untersuchungen von Osteosarkomen wurden diese aus den fixierten Skeletten präpariert und in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Die Entwässerung erfolgte im Autotechnikon: 2 x 60 min 70 % EtOH, 3 x 60 min 80 % EtOH, 3 x 60 min 96 % EtOH, 4 x 60 min 100 % EtOH. Zur weiteren Behandlung wurden die nicht entkalkten Tumoren für jeweils 24 h in den Infiltrationslösungen-I und II inkubiert und anschließend in Acrylat eingebettet. Dies erfolgte mittels Gießlösung in Glasgefäßen. Nach Aushärten der Blöcke bei 4°C wurden diese aus den Glasbehältern geschlagen und angeschliffen. Am Rotationsmikrotom wurden 4  $\mu$ m dicke Schnitte angefertigt, die auf Chromalaun-Gelatine beschichtete Objektträger gezogen und mit Strecklösung benetzt wurden. Die Schnitte wurden anschließend über Nacht bei 60°C getrocknet und konnten nun gefärbt werden.

### **2.2.3.2 Von Kossa/van Gieson-Färbung**

Zum Nachweis einer mineralisierten Matrix im Tumorgewebe wurden die histologischen Schnittpräparate nach von Kossa/van Gieson gefärbt. In dieser Färbung erscheint mineralisierter Knochen schwarz, Osteoid und Bindegewebe werden rot sowie Muskeln und Erythrozyten gelb dargestellt. Zum Herauslösen des Kunststoffes aus den Acrylatschnitten wurden diese in 2-Methoxyethylacetat (3 x 5 min) entplastiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe bewässert (EtOH 100 %, EtOH 96 %, EtOH 80%, EtOH 70%, EtOH 50%). Anschließend wurden die Schnitte nach folgendem Protokoll gefärbt: Von Kossa-Färbelösung (5 min), laufendes Leitungswasser (10 min), Sodaformollösung (5 min), laufendes Leitungswasser (10 min), Natriumthiosulfatlösung (5 min), laufendes Leitungswasser (10 min), van Gieson-Färbelösung (20 min). Danach wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und nach jeweils 3 x 5 min Inkubation in Xylol mit DPX eingedeckt.

### 2.2.3.3 Toluidinblau-Färbung

Zur Differenzierung zellulärer sowie intrazellulärer Strukturen im Tumorgewebe wurden die Schnittpräparate mit Toluidinblau angefärbt. Dieser Farbstoff stellt basophile Gewebestandteile (z.B. Nukleinsäuren und Proteoglykane) in unterschiedlichen Blautönen dar, wodurch eine gute Gewebisdifferenzierung ermöglicht wird. Die Vor- und Nachbehandlung der Schnitte verlief analog zu der von Kossa/van Gieson-Färbung (Kapitel 2.2.3.2). Der Färbeprozess erfolgte durch eine 30-minütige Inkubation in Toluidin-Färbelösung.

## 2.2.4 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.4.1 Isolierung genomischer DNA aus Mausschwanzbiopsien

Zur Genotypisierung von Mäusen wurde genomische DNA mittels Phenol-Chloroform-Extraktion isoliert. Hierfür wurde ein kleines Stück der Schwanzspitze neonataler Mäuse, welche zuvor von Tierpflegern der VTH abgenommen worden waren, mit 750 µl Biopsie-Lysis-Puffer (inklusive 0,7 mg/ml Proteinase K) versetzt und für mindestens 2 h bei 55°C inkubiert. Dieser Ansatz wurde anschließend mit gleichem Volumen gebrauchsfertiger Phenol-Chloroform-Lösung vermischt. Nach 10 min Zentrifugation bei 13000 rpm wurde die obere wässrige Phase in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt und mit gleichem Volumen Isopropanol vermischt. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt unter den oben aufgeführten Bedingungen. Das entstandene DNA-Pellet wurde nach Dekantieren des Überstandes mit 70 % EtOH gewaschen und erneut für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und nach vollständigem Verdampfen des Ethanols konnte das DNA-Pellet in 50 µl TE-Puffer aufgenommen werden.

### 2.2.4.2 Genotypisierung

Die Genotypisierung von Mauslinien erfolgte mittels Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) nach Mullis et al. (1986). Als Ausgangsmaterial diente genomische DNA, die aus Schwanzbiopsien der Mäuse isoliert wurde (Kapitel 2.2.4.1). Die Primer zur Identifikation der Genotypen sind unter 8.1.7.1 aufgeführt. Reaktionsansätze und -bedingungen der entsprechenden PCRs sind in Tab. 5 dargestellt. Zur DNA-Amplifikation wurde die *DreamTaq*-Polymerase der Firma Thermo Fisher Scientific eingesetzt. Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Abhängig von der erwarteten Produktgröße wurden 1-2,5 %ige Agarosegele verwendet. Die DNA wurde im Gel mittels Ethidiumbromid (500 ng/µl) sichtbar gemacht.

Tab. 5: PCR-Reaktionsansätze und –bedingungen.

<b>Reaktionsansatz</b>	<b><i>c-fos</i></b>	<b><i>Mdk</i></b>	<b><i>Ptprz1</i></b>	<b><i>Rsk2</i></b>	<b><i>Trp53</i></b>
10x Puffer	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
dNTPs [10 mM/dNTP]	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
Primer for [2 pM]	8 µl	8 µl	8 µl	8 µl	8 µl
Primer rev 1 [2 pM]	8 µl	8 µl	8 µl	8 µl	8 µl
Primer rev 2 [2 pM]	-	-	-	-	8 µl
DMSO	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl
Polymerase [5U/µl]	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl
genomische DNA	1,5 µl	1,5 µl	1,5 µl	1,5 µl	1,5 µl
H <sub>2</sub> O	25,5 µl	25,5 µl	25,5 µl	25,5 µl	17,5 µl
Gesamtvolumen	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
<b>Reaktionsbedingungen</b>					
Initiale Denaturierung	94°C 4 min	94°C 2min	94°C 2min	94°C 4min	94°C 4min
Denaturierung	94°C 30s	94°C 45s	94°C 45s	94°C 30s	94°C 30s
Hybridisierung	58°C 45s	58°C 45s	58°C 45s	58°C 45s	52°C 45s
Elongation	72°C 2min	72°C 1min	72°C 1min	72°C 2min	72°C 2min
Finale Elongation	72°C 10min	72°C 10min	72°C 10min	72°C 10min	72°C 10min
Zyklen	38	38	38	38	38
Erwartetes Produkt (bp)	600	400 (WT) 650 (KO)	400 (WT) 650 (KO)	230 (WT) 320 (KO)	450 (WT) 650 (KO)

### 2.2.4.3 Gerichtete Mutagenese

Die Herstellung von Rptpζ Mutanten erfolgte mittels gerichteter Mutagenese unter Verwendung des *QuikChange Lightning Multi Site-Directed Mutagenesis Kits* (Stratagene). Diese PCR-basierte Methode ermöglicht das gezielte Einführen von Punktmutationen in DNA-Sequenzen zur Generierung von Aminosäure-Substitutionen. Als Matritze für die Mutagenese-PCR (Tab. 6) diente das Expressionsplasmid pRK5-Rptpζ. Durch die Amplifizierung mit spezifischen Primern (Kapitel 8.1.7.3), die den gewünschten Nukleotidaustausch enthielten, konnten die entsprechenden Mutationen in das Konstrukt eingeführt werden. Die parentale, nicht mutierte DNA-Matritze wurde anschließend durch Zugabe der Endonuklease Dpn1 spezifisch abgebaut und das mutierte Plasmid nach Herstellerangaben in superkompetente *E. coli* XL1-Blue Zellen transformiert. Die transformierten Bakterien wurden auf Ampicillin-haltigem LB-Agar selektiert und die Plasmid-DNA gemäß Kapitel 2.2.4.6 präpariert. Mittels Sequenzierung (Kapitel 2.2.4.4 und 8.1.7.4) der Plasmide wurde schließlich die Korrektheit der eingeführten Punktmutation verifiziert. Nach dieser Methode wurden die mutierten Rptpζ Proteine C1073S (C/S Mutante) und G1076V (G/V Mutante) generiert.

**Tab. 6: Reaktionsansatz und –bedingungen der Mutagenese PCR.**

Reaktionsansatz			
10x QuickChange Lightning Multi reaction buffer	2,5 µl		
QuickSolution	1 µl		
dNTP Mix [10 mM/dNTP]	1 µl		
Mutagenese Primer [2 pM]	5 µl		
QuickChange Lightning Multi enzyme blend	1 µl		
Plasmid-DNA	x µl (100 ng)		
H <sub>2</sub> O	ad 25 µl		
Reaktionsbedingungen			
PCR-Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (min:s)	Zyklen
Schritt 1	95	2:00	1
Schritt 2	95	00:20	30
	55	00:30	
Schritt 3	65	00:30	1
	65	00:15	

#### 2.2.4.4 DNA-Sequenzierung

DNA-Sequenzierungen wurden mittels Kettenabbruchmethode nach Sanger von der Firma Seqlab durchgeführt. Hierzu wurde folgender Ansatz vorbereitet: 1,2 µg Plasmid-DNA bzw. 22,5 µg PCR-Produkt, 30 pmol Sequenzierprimer (Kapitel 8.1.7.4), 4,5 mM Tris (pH 8,5), ad 15 µl H<sub>2</sub>O. Die Analyse der Chromatogramme erfolgte mithilfe der *Bioedit* Software.

#### 2.2.4.5 Transformation von kompetenten Bakterien

Die Transformation chemisch kompetenter *E.coli* TOP10 Bakterien (Thermo Fischer Scientific) erfolgte mittels Hitzeschock. Hierzu wurden die Bakterien zunächst mit 20-100 ng Plasmid-DNA für 30 min auf Eis inkubiert. Dieser Ansatz wurde für 30 s auf 42°C erhitzt (Hitzeschock) und dann für 5 min auf Eis abgekühlt. Nach Anzucht in 250 µl SOC Medium für 60 min bei 37°C wurden die Bakterien auf Ampicillin-haltigen LB-Agarplatten (100 µg/ml) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

#### 2.2.4.6 Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien (Miniprep, Maxiprep)

Für die Isolierung von Plasmid-DNA im Miniprep Format wurde das *QIAprep Spin® Miniprep Kit* (Qiagen) verwendet. Hierfür wurde zunächst eine Einzelkolonie transformierter *E.coli* Bakterien von der Anzuchtplatte in 5 ml LB-Medium (versetzt mit 100 µg/ml Ampicillin) überführt und über Nacht unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Nach Zentrifugation der Bakterien bei 13000 rpm konnte aus dem entstandenen Bakterien-Pellet die Plasmid-DNA nach Herstellerangaben präpariert werden. Die

Isolierung größerer Plasmid-DNA-Mengen erfolgte aus 100 ml Kulturen mittels *EndoFree® Plasmid Maxi Kit* (Quiagen) gemäß Angaben des Herstellers.

#### **2.2.4.7 Isolierung von RNA aus Gewebe und Zellen**

Die Isolierung von RNA aus Geweben erfolgte mittels *TRIzol® Reagent* (Invitrogen). Hierfür wurden die Gewebe (ca. 50-100 mg) zunächst in 1 ml Trizol Reagenz mithilfe eines Ultra Turrax (IKA®-Werke) homogenisiert. Dieser Ansatz wurde anschließend gründlich mit 300 µl Chloroform vermischt und für 10 min bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert. Die obere Phase wurde sogleich in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt, mit gleichem Volumen Isopropanol vermennt und erneut unter den genannten Bedingungen zentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstandes wurde das RNA-Pellet mit 70 % EtOH in DEPC-H<sub>2</sub>O gewaschen und erneut zentrifugiert. Das RNA-Pellet wurde schließlich getrocknet und je nach Größe in 10-100 µl RNase-freiem Wasser resolubilisiert. Die Konzentration und Reinheit der RNA wurde per NanoDrop Spektrophotometer (Thermo Fisher Scientific) bestimmt. Bis zur weiteren Verwendung wurde die RNA bei -80°C gelagert.

Zur Isolierung von RNA aus kultivierten Zellen wurde das RNA-Isolationskit *NucleoSpin® RNA II* (Macherey-Nagel) gemäß Herstellerangaben verwendet. Die RNA wurde in 40 µl H<sub>2</sub>O eluiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

#### **2.2.4.8 cDNA-Synthese**

Für die reverse Transkription von RNA zu cDNA wurde das *Verso cDNA Kit* mit integriertem DNase-Verdau verwendet (Thermo Fisher Scientific). Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers, wobei jeweils 1 µg der isolierten RNA zur cDNA-Synthese eingesetzt wurde. Die cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

#### **2.2.4.9 qRT-PCR**

Die Genexpression auf mRNA-Ebene wurde mittels quantitativer Real Time PCR (qRT-PCR) analysiert. Hierfür kam sowohl die SYBR® Green-Technologie also auch das TaqMan®-System zur Anwendung. Beiden Technologien liegt eine herkömmliche PCR zu Grunde, deren Verlauf jedoch anhand einer fluoreszenzbasierten Messung dokumentiert werden kann. Demnach ist die gemessene Fluoreszenz proportional zu der entstandenen Menge an PCR-Produkt. Unter Berücksichtigung der Reaktionszyklen können daraus Rückschlüsse auf die Ausgangsmenge der untersuchten Transkripte gezogen werden. Die Expressionsanalysen wurden mit dem *StepOnePlus™* Real-Time-PCR-System (Applied Biosystem) durchgeführt. Reaktionsansatz und -bedingungen des SYBR® Green und

TaqMan®-Systems sind in Tab. 7 und Tab. 8 dargestellt. Die verwendeten Primersequenzen sowie die TaqMan®-Sonden sind im Anhang aufgeführt (Kapitel 8.1.7.2 und 8.1.8). Als Referenz-Transkript diente bei beiden Systemen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (*Gapdh*). Für die relative Quantifizierung wurde die Genexpression des Zielgens mit der Expression des Referenzgens normalisiert.

**Tab. 7: qRT-PCR Reaktionsansatz und –bedingungen mit SYBR® Green.**

Reaktionsansatz			
SYBR® Green Mastermix (2x)	10 µl		
Primer for [2 pM]	1 µl		
Primer rev [2 pM]	1 µl		
cDNA (1:5 verdünnt)	1 µl		
H <sub>2</sub> O	ad 20 µl		
Reaktionsbedingungen			
PCR-Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (min:s)	Zyklen
Schritt 1	50	2:00	1
Schritt 2	95	10:00	1
Schritt 3	95	00:15	40
	60	1:00	
Schritt 4	95	00:15	1
	60	00:15	
	95	00:15	

**Tab. 8: qRT-PCR Reaktionsansatz und –bedingungen mit TaqMan®-Sonden.**

Reaktionsansatz			
TaqMan® Gene Expression Master-Mix (2x)	10 µl		
TaqMan® Sonde	1 µl		
cDNA (1:5 verdünnt)	2 µl		
H <sub>2</sub> O	ad 20 µl		
Reaktionsbedingungen			
PCR-Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (min:s)	Zyklen
Schritt 1	50	2:00	1
Schritt 2	95	10:00	1
Schritt 3	95	00:15	40
	60	1:00	

#### 2.2.4.10 Microarray-Genchip-Analyse

Die Microarray-Genchip-Analyse ermöglicht eine differentielle genomweite Expressionsanalyse zwischen zwei oder mehreren Proben. In dieser Arbeit wurde der *GeneChip® Mouse Genome 430 2.0 Array* (Affymetrix) eingesetzt, um die Transkriptome von Osteosarkomen aus *c-fos*-transgenen Mäusen und *c-fos*-transgenen, *Rsk2*-defizienten Tieren zu vergleichen. Dieser Chip repräsentiert ca.

39000 Mausgene bzw. Transkripte, deren Sequenzen aus den Datenbanken *dbEST*, *GenBank*<sup>®</sup> und *RefSeq* ausgewählt wurden. Die Probenaufbereitung sowie Hybridisierung, Scannen und Auswertung der Genchips wurden am deutschen Rheuma-Forschungszentrum (DRFZ) in Berlin durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit Unterstützung von Dr. Joachim Grün der Arbeitsgruppe Bioinformatik. Hierzu wurden die von der Affymetrix-Software (*GeneChip Operating Software*, GCOS) ausgelesenen Expressionsdaten und Vergleichsanalysen in die *BioRetis*-Datenbank importiert. Die Analyse der Daten erfolgte mithilfe der HPCDA (*High Performance Chip Data Analysis*)-Methode der *BioRetis*-Datenbank (<http://bioretis-analysis.de/db/comparison>). Für Cluster-Analysen wurde im weiteren Verlauf das Programm *Genes@Work* verwendet. Zudem wurde das *Functional Annotation Tool* von *DAVID Bioinformatics Resources* (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) genutzt, um die in den Osteosarkomen differentiell regulierten Gene in ihre biologischen Prozesse einzuordnen.

## **2.2.5 Zellbiologische Methoden**

### **2.2.5.1 Generierung primärer Osteoblastenkulturen**

Zur Gewinnung primärer muriner Osteoblasten wurden Schädeldächer von 3-5 Tage alten Mäusen verwendet. Da in diesem Altersstadium die Mineralisation der Schädeldecke noch nicht vollständig abgeschlossen ist, können die enthaltenen Knochenzellen durch einen enzymatischen Verdau aus der Matrix gewonnen werden. Hierzu wurden die Schädeldächer der Tiere präpariert und das Chondrocranium sowie andere Gewebsbestandteile entfernt. Die Schädeldächer wurden in sterilem PBS gewaschen und anschließend mit Verdauung (0,1 % Collagenase und 0,2 % Dispase in Minimalmedium) für 10 min bei 37°C unter Schütteln vorverdaut. Der Überstand wurde verworfen und die Schädeldächer erneut mit Verdauung für 30-45 min bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Im Anschluss wurde dieser Ansatz durch ein 70 µm Zellsieb filtriert, für 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert und das erhaltene Zell-Pellet in Osteoblastenmedium (Kapitel 8.1.12) resuspendiert. Nach Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer wurden die Zellen mit einer Dichte von 50000 Zellen/ml auf 12-Well-Zellkulturschalen ausplattiert (1 ml/Well). Die Kultivierung der Zellen erfolgte standardmäßig bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und 100 % rH in Osteoblasten-Medium. Bei einer Konfluenz von ca. 80-90 % wurde durch Zugabe von 50 µg/ml Ascorbat und 10 mM β-Glycerophosphat (Osteoblasten-Differenzierungsmedium) die osteogene Differenzierung induziert. Das Osteoblasten-Differenzierungsmedium wurde bis zum Zeitpunkt der Analyse jeden zweiten Tag gewechselt.

### **2.2.5.2 Generierung primärer Osteoklastenkulturen**

Osteoklasten wurden aus dem Knochenmark 12 Wochen alter Mäuse gewonnen. Hierzu wurden die Tiere zunächst durch CO<sub>2</sub>-Intoxikation getötet und die Femora sowie Tibiae präpariert. Unter sterilen Bedingungen wurde der Markraum proximal des Femurs bzw. distal der Tibia eröffnet und das Knochenmark mittels Zentrifugalkraft aus den Knochen gespült. Hierfür wurden die eröffneten Knochen in ein PCR-Reaktionsgefäß überführt, in welches zuvor ein Loch gestochen wurde. Dieses wurde in ein 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß platziert, in dem durch einen Zentrifugationsschritt (16 s bei 8000 rpm) das Knochenmark aufgefangen werden konnte. Die Knochenmarkszellen wurden zügig in Osteoklastenmedium (Kapitel 8.1.12) resuspendiert und durch ein 100 µm Zellsieb gefiltert. Nach Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer wurden die Zellen mit einer Dichte von  $5 \cdot 10^6$ /ml auf 12-Well-Zellkulturschalen ausplattiert (1 ml/Well) und unter Standardbedingungen im Brutschrank kultiviert. Zwei Tage nach Präparation erfolgte ein Mediumwechsel mit Osteoklasten-Differenzierungsmedium, welches zusätzlich 10 nM Vitamin D, 40 ng/ml sRANKL und 20 ng/ml MCSF enthielt. Das Medium wurde bis zum Zeitpunkt der Analyse jeden zweiten Tag gewechselt.

### **2.2.5.3 Generierung muriner Osteosarkom-Zelllinien**

Für die Isolierung primärer Tumorzellen aus Osteosarkomen wurden die Mausskelette unmittelbar nach Tötung der Tiere (CO<sub>2</sub>-Intoxikation) mittels Kontaktradiographie auf die Existenz und Lokalisation von Knochentumoren untersucht. Die so identifizierten skelettalen Tumoren wurden anschließend herauspräpariert, in PBS gewaschen und unter sterilen Bedingungen mithilfe einer Schere zerkleinert. Nach einem weiteren Waschschrift in PBS wurden die Tumorstücke in Osteoblastenmedium aufgenommen und in Zellkulturflaschen (T-25) transferiert. Die Kultivierung erfolgte unter Standardbedingungen. Sobald die aus dem Tumorgewebe auswachsenden Zellen eine Konfluenz von 80-90 % erreicht hatten, wurden diese mithilfe von Trypsin vom Boden der Kulturflasche abgelöst und auf eine neue Zellkulturflasche ausplattiert. Für die Etablierung von Osteosarkom-Zelllinien wurden die Tumorzellen mindestens 12-mal passagiert.

### **2.2.5.4 Stimulation/Behandlung von Zellen**

Mit Hilfe von Proliferations- (Kapitel 2.2.5.6 und 2.2.5.7), Immunfluoreszenz- (Kapitel 2.2.6.1), und Zellzyklusanalysen (Kapitel 2.2.5.8) wurden die Effekte des Rptp $\zeta$ -Antagonisten Midkine (Mdk) sowie des Rsk-Inhibitors BI-D1870 auf die unterschiedlichen Osteosarkom-Zelllinien untersucht. Je nach Versuchsaufbau wurden die Zellen zunächst bis zur gewünschten Dichte unter Standardbedingungen kultiviert, bevor die entsprechende Substanz zugesetzt wurden. Rekombinantes murines Mdk wurde

hierbei in einem Konzentrationsbereich von 25-200 ng/ml und das Dihydropterinon-Derivat BI-D1870 in einem Bereich von 0,1-10  $\mu$ M verwendet. Die jeweiligen Konzentrationen und Inkubationsbedingungen sind in Tab. 9 dargestellt. Da BI-1870 in DMSO gelöst war, wurde bei jedem Versuch eine DMSO-Vehikelkontrolle mitgeführt. Bei den Mdk-Stimulationsversuchen dienten jeweils PBS-behandelte Zellen als Kontrolle.

**Tab. 9: Stimulation/Behandlung von Zellen mit Mdk und BI-D1870.**

Methode		BrdU-Inkorporationsanalyse	Wachstumskurve	Immunfluoreszenz	Zellzyklusanalyse
Mdk	Konzentration	25-200 ng/ml	100 ng/ml		
	Inkubationsbedingungen	12 h in serumfreiem Kulturmedium (gleichzeitige Zugabe von BrdU)	6 d in serumhaltigem Kulturmedium		
BI-D1870	Konzentration		0,1-10 $\mu$ M	10 $\mu$ M	10 $\mu$ M
	Inkubationsbedingungen		6 d in serumhaltigem Kulturmedium	24 bzw. 48 h in serumhaltigem Kulturmedium	24 bzw. 48 h in serumhaltigem Kulturmedium

### 2.2.5.5 Mineralisationsanalyse

Die Mineralisierungsfähigkeit von Zellen *ex vivo* wurde mittels Alizarinrot-Färbung untersucht. Der Farbstoff bildet hierbei einen Chelatkomplex mit dem Calcium der extrazellulären Matrix und lässt damit die Mineralisationskerne rot erscheinen. Zur Färbung wurden die Zellen zunächst mit eiskaltem 90 %igem Ethanol für 30 min bei Raumtemperatur (RT) fixiert. Nach zwei Waschschritten mit destilliertem H<sub>2</sub>O erfolgte die Inkubation mit Alizarinrot-Färbelösung für 10 min bei RT unter leichtem Schütteln. Die überschüssige Färbelösung wurde durch fünffaches Waschen mit H<sub>2</sub>O entfernt, bevor die Zellen mit PBS überschichtet wurden. Das Ergebnis konnte nun fotografisch dokumentiert werden.

### 2.2.5.6 BrdU-Inkorporationsanalyse

Der BrdU Inkorporationsanalyse beruht auf dem kompetitiven Einbau des Pyrimidinanalogons 5-Brom-2'-desoxyuridin (BrdU) in die DNA proliferierender Zellen, welches über einen Peroxidasegekoppelten anti-BrdU-Antikörper detektiert werden kann. Durch Zugabe von Tetramethylbenzidin kommt es zu einer spezifischen Substratreaktion, deren Produkt spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm bestimmt werden kann. Die Höhe der Extinktion ist dabei proportional zur

Menge neu synthetisierter DNA und damit zur Proliferation der Zellen. In dieser Arbeit wurde das *Cell Proliferation Biotrack Elisa System* (GE Healthcare) verwendet. Hierzu wurden je nach Zelllinie 1000-5000 Zellen pro Well einer 96-Well-Zellkulturschale ausplattiert (n=8 pro Bedingung). Bei einer Konfluenz von ca. 70 % wurden die Zellen für 12 h mit BrdU unter Standardbedingungen im entsprechenden Vollmedium inkubiert. Zur Ermittlung des Effekts von Mdk erfolgte die Inkubation von BrdU und Mdk simultan in serumfreiem Medium (Kapitel 2.2.5.4). Der Nachweis des in die DNA eingebauten BrdUs wurde nach Protokoll des Herstellers durchgeführt. Bei Transfektionsversuchen (Kapitel 2.2.5.9) wurden die gemessenen OD<sub>450</sub> Werte auf den Proteingehalt (Bradford bei OD<sub>595</sub>) bezogen.

### **2.2.5.7 Wachstumskurven**

Zur Bestimmung der zellulären Proliferationsrate von Osteosarkomzellen wurden diese in Triplikaten mit einer initialen Dichte von 20000 Zellen pro Well einer 6-Well-Zellkulturschale ausplattiert. Über einen Zeitraum von 7 Tagen wurden die Zellen täglich mit Hilfe von Trypsin abgelöst und mittels Neubauer-Zählkammer die Zellzahl bestimmt. Zur Untersuchung des Effekts von Mdk oder BI-D1870 auf die Zellproliferation wurde die jeweilige Substanz 24 h nach Aussaat der Zellen dem Kulturmedium zugesetzt (Kapitel 2.2.5.4). Ein Mediumwechsel erfolgte jeden zweiten Tag.

### **2.2.5.8 Zellzyklusanalyse mittels Propidiumiodid**

Propidiumiodid (PI) ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der in doppelsträngige DNA interkaliert. Dies macht man sich zu Nutze, um den DNA-Gehalt von Zellen mittels Durchflusszytometrie zu bestimmen. Anhand des DNA-Gehalts kann sowohl der Zellzyklus-Status einer Zellpopulation als auch eine Polyploidie (Vervielfachung des Chromosomensatzes) von Zellen ermittelt werden. Die zu analysierenden Osteosarkom-Zelllinien wurden auf T-175-Zellkulturflaschen (50000 Zellen/ml) ausplattiert und gemäß Kapitel 2.2.5.4 mit BI-1870 bzw. DMSO behamikrndelt. Für die Färbung wurden jeweils  $1,5 \cdot 10^6$  Zellen eingesetzt. Diese wurden zunächst in FACS-Röhrchen mit 70 % EtOH für 15 min auf Eis fixiert, da PI die intakte Membran von lebenden Zellen nicht permeieren kann. Nach 5 min Zentrifugation bei 1500 rpm und 4°C wurde das entstandene Zell-Pellet in 500 µl PI-Lösung resuspendiert und für 40 min bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Die in der Färbelösung enthaltene RNase verhinderte die Bindung von PI an RNA. Nach einem Waschschrift wurden die gefärbten Zellen in 500 µl PBS aufgenommen und in einem *FACS Calibur* Durchflusszytometer (Becton, Dickinson and Co.) vermessen. Die Datenerfassung erfolgte mit Hilfe der *CellQuest™* Software. Anhand der erstellten Histogramme konnten der DNA-Gehalt sowie die Zellzyklusphasenverteilung analysiert werden. In einem Versuch erfolgte die Zellzyklusanalyse mittels

DAPI-Färbung. Diese Analysen wurden durchgeführt von Dr. Stefan Teufel (Department für Medizinische Klinik 3, Rheumatologie und Immunologie, Universität Erlangen-Nürnberg)

### **2.2.5.9 Transfektion**

Die Transfektion von Plasmid-DNA in humane Zelllinien erfolgte mittels *Lipofectamine™ 2000 reagent* (Invitrogen) nach Herstellerprotokoll. Hierfür wurden je nach Zelllinie 1000-3000 Zellen pro Well einer 96-Well-Zellkulturschale ausplattiert und bis zu einer Konfluenz von 50-70 % kultiviert. Für die Transfektion wurde jeweils 0,5 µg Plasmid-DNA pro Well eingesetzt. Als Kontrollplasmid diente pCMV-GFP. Nach 24 h wurden die Zellen 2-mal mit PBS gewaschen und für weitere 24 h im entsprechenden Zellkulturmedium unter Standardbedingungen kultiviert. Anhand der GFP (*Green Fluorescent Protein*)-Expression der Kontroll-Zellen konnte mittels Fluoreszenz-mikroskopie (Zeiss Axiolab) die Transfektionseffizienz bestimmt werden. Die transfizierten Zellen wurden schließlich mittels BrdU-Inkorporationsassay (Kapitel 2.2.5.6) analysiert.

## **2.2.6 Proteinanalytische Methoden**

### **2.2.6.1 Immunfluoreszenz**

Für die Immunfluoreszenz wurden die zu analysierenden Zellen zunächst auf Coverslips (20000 Zellen/20x20 mm Coverslip) ausplattiert und bis zur gewünschten Konfluenz kultiviert. Zur Ermittlung des Effekts von BI-D1870, wurden die Zellen wie in Kapitel 2.2.5.4 beschrieben mit dem Inhibitor inkubiert. Die Coverslips wurden sodann mit PBS gespült und zur Fixierung der Zellen für 30 min in 3,5 %iger Formafix-Lösung bei RT gelagert. Nach 3 Waschschritten in kaltem PBS wurden die Zellen mit Triton X-Lösung (0,1 % in PBS) für 5 min bei RT permeabilisiert und mit FKS (10 % in PBS) für 30 min bei RT geblockt. Danach erfolgte die Immunfärbung mit Fluorophor-konjugiertem Antikörper bzw. Fluorophor-konjugiertem Phalloidin (Kapitel 8.1.6). Hierfür wurden die Coverslips mit der zellbewachsenen Seite in 50 µl Antikörper/Phalloidin-Lösung (verdünnt in Blockpuffer) gelegt und für 30-60 min bei RT inkubiert. Nach 3 Waschvorgängen in PBS konnten die Coverslips auf Objektträgern eingedeckt werden, wobei das im Eindeckmedium enthaltene DAPI eine zusätzliche Abfärbung der Zellkerne ermöglichte. Die Analyse der gefärbten Zellen erfolgte mittels konfokaler Lasermikroskopie (Leica TCS SP5 der UKE Microscopy Imaging Facility). Für die quantitative Analyse mehrkerniger Zellen wurden jeweils 7 Aufnahmen von unterschiedlichen Arealen eines Coverslips angefertigt. Pro Bedingung wurden die Bilder von jeweils 3 Coverslips ausgezählt.

### 2.2.6.2 Isolierung von Proteinen

Zur Isolation von Gesamtprotein aus kultivierten Zellen wurden diese zunächst 2-mal mit kaltem PBS gewaschen und mit RIPA-Puffer in entsprechendem Volumen (inklusive Protease- und Phosphataseinhibitoren) überschichtet. Mithilfe eines Zellschabers wurden die Zellen aus den Kulturschalen abgekratzt und in 1,5 ml Mikroreaktionsgefäße überführt. Nach einer 15-minütigen Inkubation auf Eis wurde das Lysat für 5 min bei 13000 rpm und bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

### 2.2.6.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Proteinkonzentration der Zelllysate wurde kolorimetrisch mittels Bradford-Assay ermittelt. Hierzu wurden jeweils 5 µl des Zelllysats mit 795 µl H<sub>2</sub>O und 200 µl Bradford-Reagenz vermischt und in Küvetten überführt. Nach 3-minütiger Inkubation bei RT konnte die Absorption bei 595 nm in einem Spektralphotometer (Biochrom) gemessen werden. Die Proteinkonzentration wurde anhand einer BSA-Eichkurve (0-20 µg/ml) bestimmt.

### 2.2.6.4 SH2-Profilung mittels Far-Western Blot Analyse

Das SH2-Profilung ist eine Methode zur Analyse des zellulären Tyrosinphosphorylierungsstatus, welche auf der spezifischen Bindung von SH2 (*Src-Homology 2*)-Domänen an phosphorylierte Tyrosinreste basiert. Diese Versuche wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Nollau des Forschungsinstituts Kinderkrebs-Zentrum Hamburg konzipiert und durchgeführt. Hierfür wurden Osteosarkom-Zelllinien bis zu einer Konfluenz von 80 % kultiviert, für 5 h serumfrei gesetzt und anschließend für 5 min mit 10 % FKS restimuliert. Zur Präparation von Gesamtzellextrakten wurden die Zellen mit kaltem PBS gewaschen, sofort in KLB-Puffer lysiert und 30 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation für 5 min bei 13000 rpm und bei 4°C wurde die Proteinkonzentration der gewonnenen Zelllysate bestimmt. Je 15 µg Proteinextrakt wurden für den Far-Western Blot eingesetzt. Hierfür wurden die Proteine zunächst mittels SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) anhand ihres Molekulargewichts aufgetrennt und im Tank-Blot-Verfahren auf PVDF-Membranen transferiert. Die Membranen wurden anschließend in 10 % Milchpulver in TBST-Puffer geblockt und mit je 1 µg/ml biotinylierten SH2-Domänen inkubiert, welche zuvor mit Streptavidin-Meerrettichperoxidase konjugiert worden waren. Nach 60 min Inkubation bei RT wurden die Membranen 3-mal in TBST-Puffer gewaschen und die Signale schließlich per Chemilumineszenz mit Hilfe des *ECL Western Blotting Detection Reagents* (GE Healthcare) detektiert.

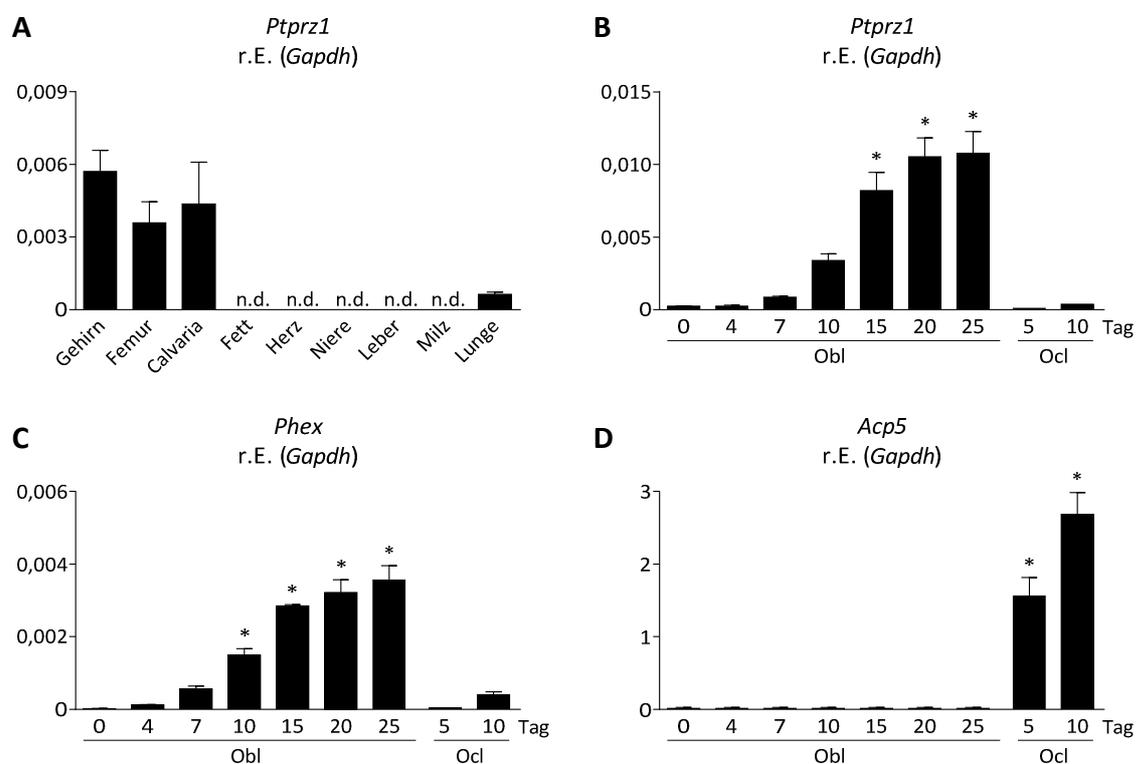
### **2.2.7 Statistische Verfahren**

Die statistische Analyse der Daten erfolgte mit dem Programm *Graphpad Prism 5.0* (Graphpad Software San Diego, CA, USA). Die Ergebnisse wurden als arithmetischer Mittelwert±Standardabweichung (SD) dargestellt, wobei die Anzahl der Einzelversuche mit „n“ angegeben wurde. Für den Vergleich der Mittelwerte wurde je nach Art der zugrunde liegenden Daten der Student t-Test für unverbundene Stichproben oder die einfaktorielle bzw. zweifaktorielle Varianzanalyse (One-Way ANOVA bzw. Two-Way ANOVA) mit anschließendem Post-Hoc-Test nach Dunnett oder Bonferroni verwendet. Zur Kontingenzanalyse wurde der exakte Test nach *Fisher* angewandt. Ein p-Wert von <0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen und als solcher gekennzeichnet.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Bestimmung des *Ptprz1*-Expressionsprofils

Zur Bestimmung des *Ptprz1*-Expressionsprofils wurden qRT-PCR-Analysen mit verschiedenen Geweben aus Wildtyp-Mäusen durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass *Ptprz1* spezifisch im Gehirn, Femur und Schädeldach exprimiert wurde (Abb. 6A). In geringerem Ausmaß konnte *Ptprz1* auch im Lungengewebe detektiert werden, nicht jedoch im Fett-, Herz-, Nieren-, Leber- und Milzgewebe. Um den *Ptprz1*-produzierenden Zelltyp im Knochen zu identifizieren, wurde die Expression in primären Osteoblasten und Osteoklasten zu unterschiedlichen Zeitpunkten der *ex vivo* Differenzierung untersucht. So nahm die *Ptprz1*-Expression im Verlauf der Osteoblastendifferenzierung kontinuierlich zu, wohingegen die Osteoklastenkulturen nur sehr geringe Expressionswerte aufzeigten (Abb. 6B). Als Kontrollen dienten hierbei die Expressionsprofile bekannter Differenzierungsmarker für Osteoblasten (*Phex*, Abb. 6C) und für Osteoklasten (*Acp5*-kodierend für TRAP, Abb. 6D). Die Expressionsanalysen ergaben demnach, dass *Ptprz1* ein Marker der terminalen Osteoblastendifferenzierung ist, der gewebespezifisch exprimiert wird.



**Abb. 6: *Ptprz1*-Expressionsprofil.** (A) qRT-PCR Expressionsanalyse von *Ptprz1* in ausgewählten Organen 12 Wochen alter Wildtyp Mäuse. Mittelwert $\pm$ SD (n=3). qRT-PCR Expressionsanalyse von *Ptprz1* (B), *Phex* (C) und *Acp5* (D) in primären Osteoblasten (Obl) und Osteoklasten (Ocl) zu unterschiedlichen Zeitpunkten der *ex vivo* Differenzierung. Mittelwert $\pm$ SD (n=3 Kulturen aus Wildtyp Mäusen). Dargestellt ist jeweils die relative Expression zu *Gapdh*. (\*) Signifikante Unterschiede zur Expression von Obl an Tag 0 der Differenzierung ( $p < 0,05$ , One-Way ANOVA, Dunnett's Posttest).

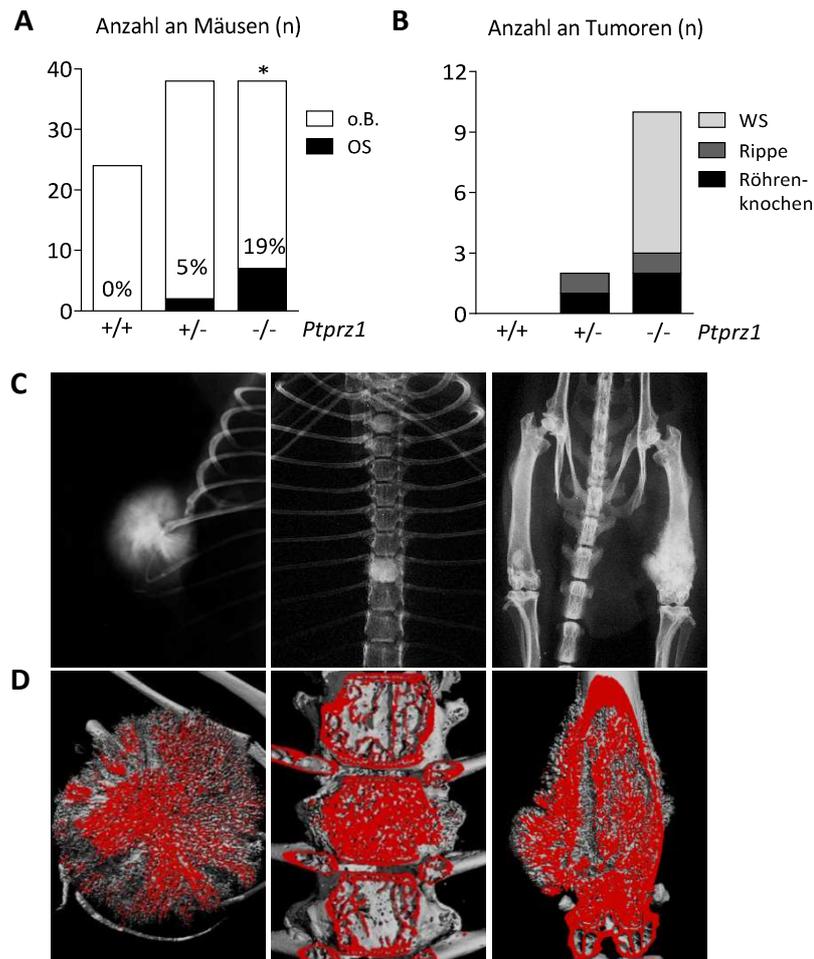
### 3.2 Untersuchung des Einflusses von Rptpζ auf die Osteosarkom-Entstehung in *Trp53*-heterozygoten Mäusen

Um die putative Rolle von Rptpζ als Tumorsuppressor im Osteosarkom zu analysieren, wurden *Trp53*-heterozygote Mäuse mit einer zusätzlichen heterozygoten bzw. homozygoten *Ptprz1*-Defizienz (*Trp53<sup>+/-</sup>/Ptprz1<sup>+/-</sup>* bzw. *Trp53<sup>+/-</sup>/Ptprz1<sup>-/-</sup>*) generiert. Mittels Kontaktradiographie wurden die Tiere im Alter von 52 Wochen auf die Existenz von Knochentumoren untersucht. Während keine der 24 analysierten *Trp53<sup>+/-</sup>/Ptprz1<sup>+/-</sup>* Kontrolltiere Anzeichen von Osteosarkomen zeigten, konnten in 2 von 38 *Trp53<sup>+/-</sup>/Ptprz1<sup>+/-</sup>* und in 7 von 38 *Trp53<sup>+/-</sup>/Ptprz1<sup>-/-</sup>* Mäusen die Bildung von Knochentumoren nachgewiesen werden (Abb. 7A). Wie in Abb. 7C zu erkennen ist, stellten sich die Tumoren im Röntgenbild als unscharf begrenzte Knochenzubildungen dar. Diese konnten sowohl am Rippenbogen als auch an der Wirbelsäule und im Röhrenknochen lokalisiert werden (Abb. 7B,C). Die entsprechenden  $\mu$ CT-Analysen erbrachten zudem, dass die Tumormatrix aus mineralisiertem Gewebe bestand (Abb. 7D). Eine detaillierte Übersicht über die identifizierten Osteosarkome in den einzelnen Mäusen ist in Tab. 10 aufgeführt. Bei 2 von 9 Tieren konnten bereits in jüngerem Alter Knochentumore detektiert werden. Diese Mäuse zeigten motorische Einschränkungen sowie Verhaltensauffälligkeiten und wurden daher schon vor dem geplanten Analysezeitpunkt von 52 Wochen aufgearbeitet.

Zusammenfassend unterstreichen die vorliegenden Befunde die potentielle Rolle von *Ptprz1* als Tumorsuppressor im Osteosarkom, da sich die Tumor-Inzidenz in *Trp53*-heterozygoten Mäusen durch den zusätzlichen Verlust beider *Ptprz1*-Allele signifikant um 19 % erhöht hat.

Tab. 10: Überblick über die in *Trp53*-heterozygoten Mäusen detektierten OS mit angegebenem *Ptprz1*-Genotyp.

<i>Ptprz1</i> -Genotyp	Geschlecht	Alter bei OS-Analyse	OS-Lokalisation
+/-	♀	52 Wochen	Rippe
	♀	29 Wochen	Röhrenknochen (Tibia)
-/-	♂	52 Wochen	Röhrenknochen (Femur)
	♂	16 Wochen	Rippe
	♀	52 Wochen	WS (2x)
	♀	52 Wochen	WS (3x)
	♀	52 Wochen	Röhrenknochen (Femur)
	♀	52 Wochen	WS (2x)
	♀	52 Wochen	WS

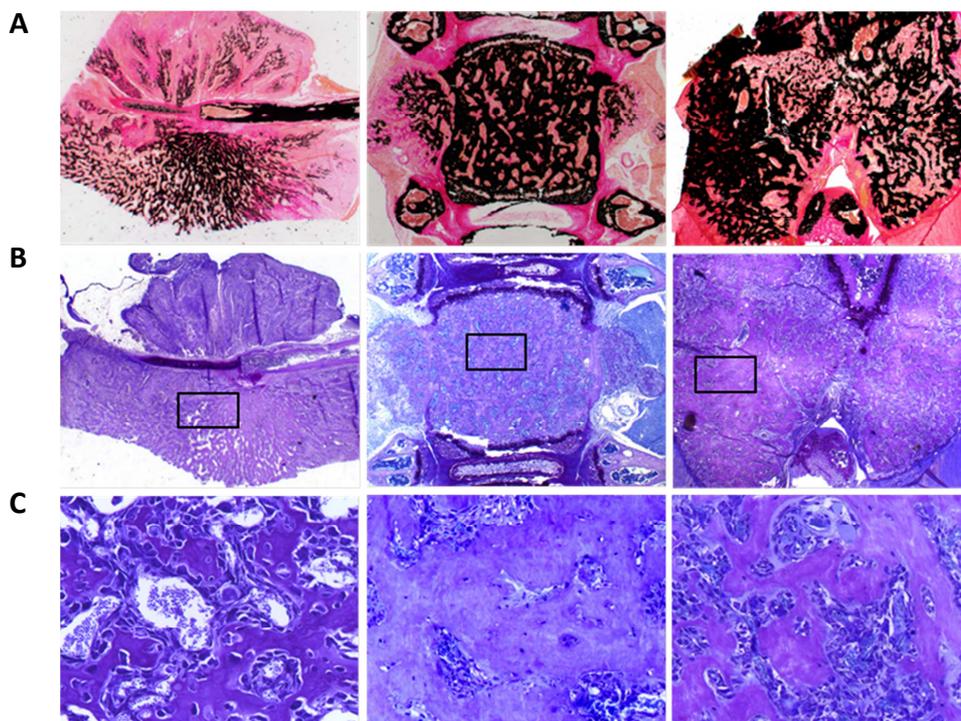


**Abb. 7: Nachweis von Knochentumoren in  $Trp53$ -heterozygoten Mäusen mit hetero- bzw. homozygoter  $Ptpz1$ -Deletion.** Mittels Kontaktradiographie wurden 52 Wochen alte  $Trp53$ -heterozygote Mäuse mit den angegebenen  $Ptpz1$ -Genotypen auf die Existenz und Lokalisation von OS untersucht. **(A)** OS-Indizienz. Dargestellt ist die Anzahl der analysierten Tiere mit dem Anteil an Mäusen mit OS (schwarzer Balken) und dem Anteil an Mäusen ohne morphologische Auffälligkeiten (weißer Balken; o.B. = ohne Befund). (\*) Statistische Signifikanz vs.  $Trp53^{+/-}/Ptpz1^{+/+}$  ( $p < 0,05$ , Exakter Test nach Fisher). **(B)** Anzahl und Lokalisation der detektierten OS. **(C)** Repräsentative Röntgenaufnahmen von  $Trp53^{+/-}/Ptpz1^{-/-}$  Mäusen mit OS an Rippe, Wirbelsäule (WS) und Röhrenknochen. **(D)**  $\mu$ CT-Aufnahmen der entsprechenden Tumoren.

### 3.3 Histologische Analyse der Osteosarkome

Zur weiteren Charakterisierung und Differenzierung der in  $Trp53^{+/-}/Ptpz1^{+/-}$  und  $Trp53^{+/-}/Ptpz1^{-/-}$  Mäusen detektierten Osteosarkome, wurden die Tumoren histologisch begutachtet. Dies beinhaltet die Präparation und Anfertigung nicht-dekalifizierter Schnittpräparate. Definitionsgemäß handelt es sich bei einem Osteosarkom um einen Tumor, dessen Zellen Osteoid bzw. mineralisierten Knochen bilden. Das histologische Bild von Osteosarkomen kann allerdings sehr vielfältig sein. Beim Menschen unterscheidet man in Abhängigkeit von der im Tumor überwiegend gebildeten Matrix im Wesentlichen 3 Subtypen: Osteoblastische (knochenbildende), chondroblastische (knorpelbildende) und fibroblastische (bindegewebebildende) Osteosarkome. In der von Kossa-/van Gieson-Färbung  $Trp53$ -heterozygoter  $Ptpz1$ -defizienter Osteosarkom-Schnitte konnten die Ergebnisse der  $\mu$ CT-

Analyse bestätigt werden. So war die Matrix der entsprechenden Tumorareale deutlich von schwarz angefärbtem Mineral geprägt (Abb. 8A). Weiterhin zeigte die Toluidinblau-Färbung, dass das Tumorgewebe vorwiegend aus Knochenmatrix bestand (Abb. 8B,C). In der vergrößerten Darstellung ließen sich zudem Osteozyten erkennen, die in die mineralisierte Matrix eingemauert waren (Abb. 8C). Fibroblastische Anteile oder knorpelige Strukturen konnten hingegen nur in geringem Ausmaß bzw. gar nicht im Tumorgewebe nachgewiesen werden. Damit konnten die in den *Trp53<sup>+/-</sup>/Ptpz1<sup>-/-</sup>* und *Trp53<sup>+/-</sup>/Ptpz1<sup>-/-</sup>* Mäusen detektierten skelettalen Tumoren eindeutig als Osteosarkome identifiziert werden, die vor allem durch knochenbildende Matrix geprägt waren.



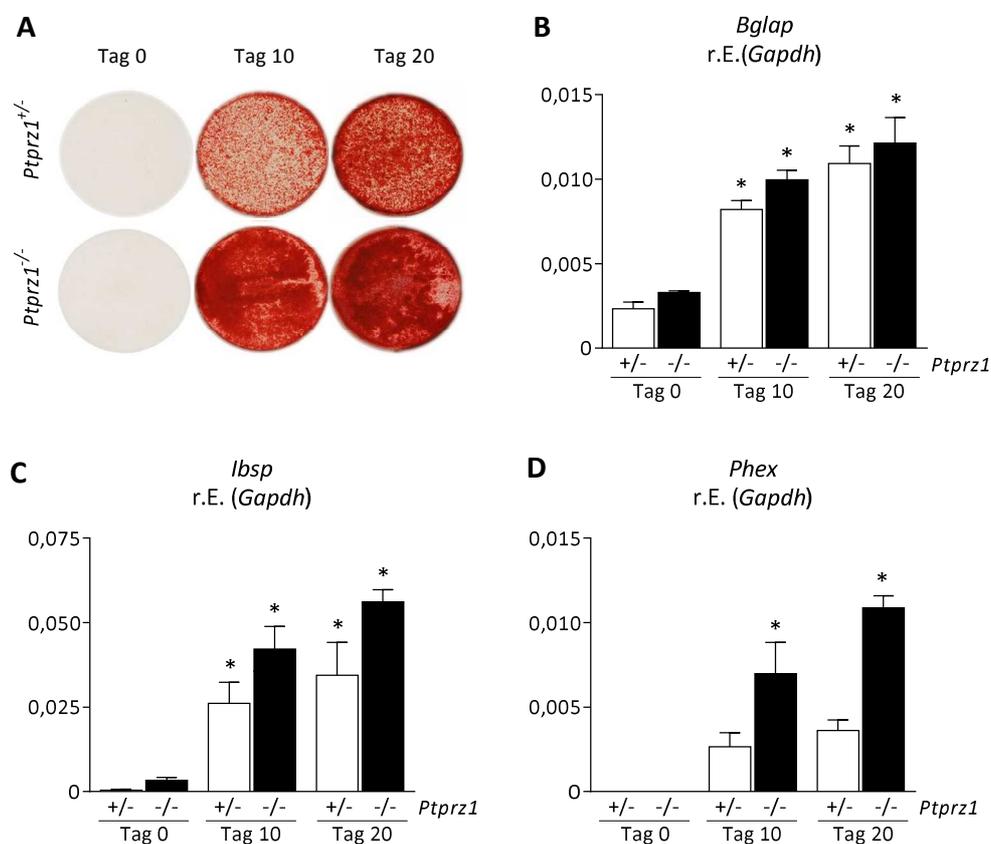
**Abb. 8: Histologische Analyse *Trp53*-heterozygoter *Ptpz1*-defizienter Knochentumoren.** Dargestellt sind repräsentative unentkalkte histologische Tumorschnitte 52 Wochen alter *Trp53<sup>+/-</sup>/Ptpz1<sup>-/-</sup>* Mäuse. OS-Lokalisationen: Rippe (links), Wirbelkörper (mitte), Röhrenknochen (rechts). **(A)** Von Kossa/van Gieson-Färbung; Darstellung mineralisierter Gewebeanteile in schwarz und nicht mineralisierter Bereiche in rot (12,5-fache Vergrößerung). **(B)** Toluidinblau-Färbung; Darstellung von Gewebe und zellulären Bestandteilen in unterschiedlichen Blauschattierungen (12,5-fache Vergrößerung). **(C)** Vergrößerte Ausschnitte der angegebenen Tumorareale (200-fache Vergrößerung).

### 3.4 Charakterisierung *Trp53*-heterozygoter OS-Zelllinien mit hetero- bzw. homozygoter *Ptpz1*-Deletion

Um das Verhalten der Osteosarkomzellen *ex vivo* zu analysieren, wurden Zelllinien aus zwei verschiedenen Osteosarkomen (*Trp53<sup>+/-</sup>/Ptpz1<sup>+/-</sup>* und *Trp53<sup>+/-</sup>/Ptpz1<sup>-/-</sup>*) etabliert. Diese wurden im weiteren Verlauf auf Differenzierungs- bzw. Mineralisationsfähigkeit, Proliferationsverhalten, Tyrosinphosphorylierungsstatus sowie das Ansprechen auf den Rptpζ-Antagonisten Midkine (Mdk) untersucht.

### 3.4.1 Osteogene Differenzierung der OS-Zelllinien

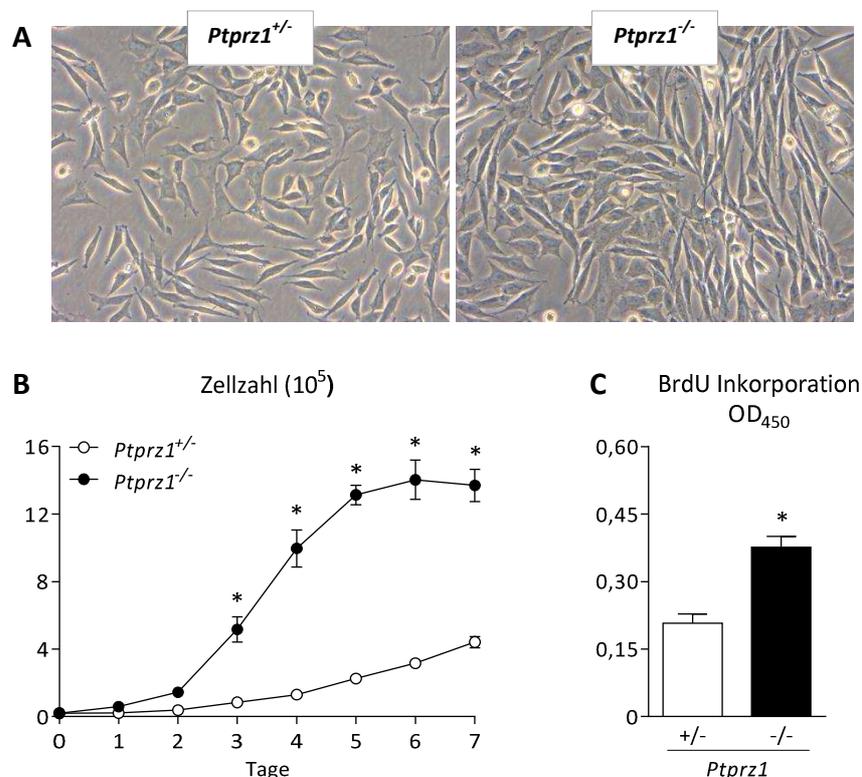
Zur Analyse des osteogenen Differenzierungspotentials der *Trp53<sup>+/-</sup>/Ptprz1<sup>+/-</sup>* und *Trp53<sup>+/-</sup>/Ptprz1<sup>-/-</sup>* Zelllinien wurden diese für 10 bzw. 20 Tage in Anwesenheit von Ascorbat und  $\beta$ -Glycerophosphat kultiviert. Mittels Alizarinrot-Färbung konnte in den Kulturen beider Zelllinien die Bildung einer mineralisierten Matrix nachgewiesen werden (Abb. 9A). Analog dazu zeigten Genexpressionsanalysen eine Induktion der Osteoblastenmarker Osteocalcin (*Bglap*), Bone Sialoprotein (*Ibsp*) und *Phex* im Verlauf der Differenzierung beider Zelllinien (Abb. 9B-D). Das *ex vivo* Differenzierungspotential der isolierten Tumorzellen bestätigte somit analog zu den histologischen Analysen die Diagnose von osteoblastischen Osteosarkomen in *Trp53<sup>+/-</sup>/Ptprz1<sup>+/-</sup>* und *Trp53<sup>+/-</sup>/Ptprz1<sup>-/-</sup>* Mäusen.



**Abb. 9: Osteogene Differenzierung von OS-Zelllinien.** (A) Alizarinrot-Färbungen von OS-Zelllinien, isoliert aus den Tumoren *Trp53*-heterozygoter Mäusen mit hetero bzw. homozygoter *Ptprz1*-Deletion an Tag 0, 10 und 20 der *ex vivo* Differenzierung. qRT-PCR Expressionsanalyse von *Bglap* (B), *Ibsp* (C) und *Phex* (D) zu den jeweiligen Differenzierungszeitpunkten. Mittelwert $\pm$ SD (n=3 Kulturen der entsprechenden OS-Zelllinie). Dargestellt ist jeweils die relative Expression zu *Gapdh*. (\*) Signifikante Unterschiede zur Expression an Tag 0 der jeweiligen Zelllinie. (p<0,05, One-Way ANOVA, Dunnett's Posttest).

### 3.4.2 Proliferationsverhalten und Tyrosinphosphorylierungsstatus der OS-Zelllinien

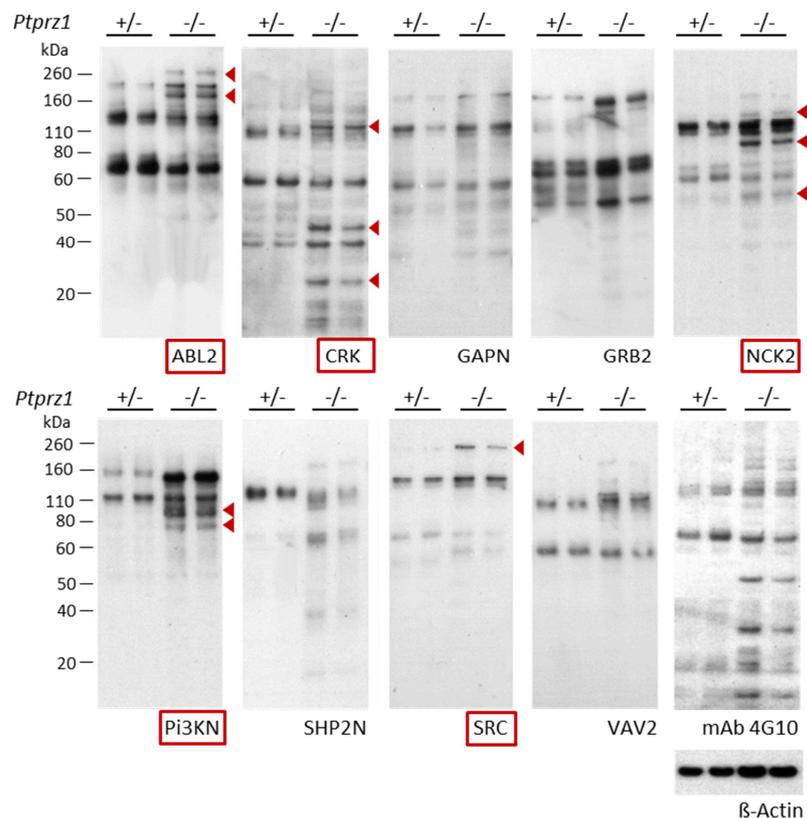
Nachdem in vorangehenden Arbeiten gezeigt wurde, dass *Ptprz1* eine inhibitorische Funktion auf die Proliferation primärer Osteoblasten hat (Schinke et al. 2008), war das proliferative Verhalten der *Ptprz1*-defizienten Osteosarkom-Zelllinie im Vergleich zu den Zellen, bei denen nur ein *Ptprz1*-Allel deletiert war, von besonderem Interesse. Bereits nach 24 h Kultivierung zeichnete sich ein unterschiedliches Proliferationspotential beider Zelllinien ab (Abb. 10A). In der Tat konnte durch Erstellung von Wachstumskurven und BrdU-Inkorporationsanalysen in der *Trp53<sup>+/-</sup>/Ptprz1<sup>-/-</sup>* Zelllinie eine signifikant höhere zelluläre Proliferationsrate als in den *Trp53<sup>+/-</sup>/Ptprz1<sup>+/-</sup>* Zellen nachgewiesen werden (Abb. 10B,C).



**Abb. 10: Proliferation von OS-Zelllinien.** (A) Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen *Trp53*-heterozygoter Zelllinien mit hetero- bzw. homozygoter *Ptprz1*-Deletion in Kultur (20-fache Vergrößerung). (B) Wachstumskurven und (C) BrdU-Inkorporationsanalysen der beiden OS-Zelllinien. Mittelwert $\pm$ SD ( $n \geq 3$  Kulturen der jeweiligen Zelllinie). (\*) Signifikante Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien ( $p < 0,05$ , Two-Way ANOVA, Bonferroni's Posttest (B), Student t-Test (C)).

Weiterhin stellte sich die Frage, ob es bei den Zelllinien in Abhängigkeit des *Ptprz1*-Genotyps Unterschiede im zellulären Tyrosinphosphorylierungsstatus gab. So wurden für beide Zelllinien SH2-Profile erstellt, welche auf der spezifischen Bindung von SH2-Domänen an tyrosinphosphorylierte intrazelluläre Proteine beruhen (Machida et al. 2012). Die Profile ergaben, dass einige Proteine ausschließlich in der *Ptprz1*-defizienten Zelllinie detektiert werden konnten, wobei die deutlichsten Unterschiede in den Profilen der SH2-Domänen von ABL2, CRK, NCK2, Pi3KN und SRC sichtbar waren

(Abb. 11; in rot hervorgehoben). Der Verlust der Tyrosinphosphatase Rptp $\zeta$  in der *Trp53<sup>+/-</sup>/Ptprz1<sup>-/-</sup>* Zelllinie hatte demnach eine verstärkte Tyrosinphosphorylierung spezifischer Substrate zur Folge. Diese molekularen Veränderungen könnten möglicherweise für das gesteigerte Proliferationspotential der Zellen im Vergleich zu der *Ptprz1*-heterozygoten Zelllinie verantwortlich sein.

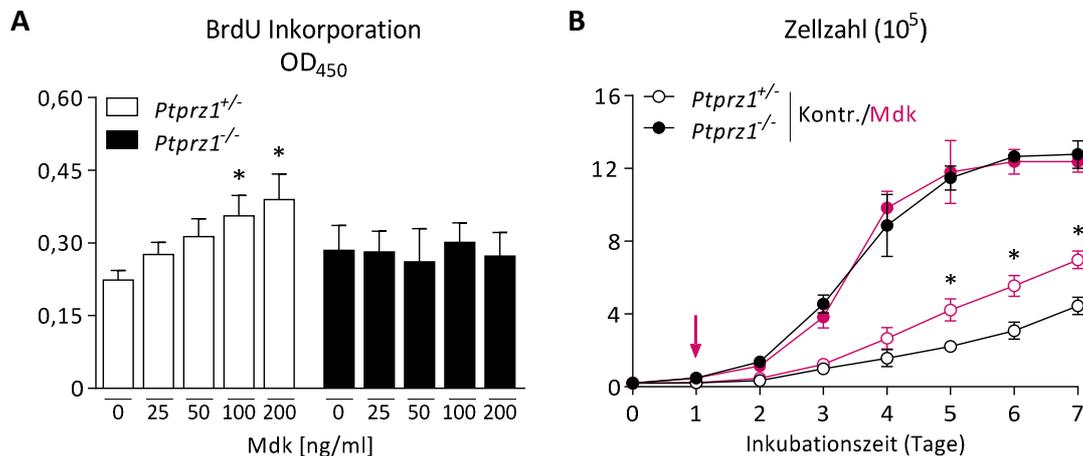


**Abb. 11: SH2-Profil der OS-Zelllinien.** Für die Far-Western Blot Analyse der *Trp53*-heterozygoten Zelllinien mit hetero- bzw. homozygoter *Ptprz1*-Deletion wurden insgesamt 9 SH2-Domänen verwendet. Die Unterschiede in der Tyrosinphosphorylierung spezifischer Proteine sind durch rote Pfeile gekennzeichnet. Die Tyrosinphosphorylierung wurde zusätzlich mit dem Phosphotyrosin-spezifischen Antikörper 4G10 überprüft. Als Beladungskontrolle diente  $\beta$ -Actin. Die Analysen wurden jeweils in Duplikaten durchgeführt, wobei die Zellextrakte aus Kulturen mit unterschiedlichen Zelldichten isoliert wurden (25000 bzw. 50000 Zellen/ml).

### 3.4.3 Effekt von Midkine auf die Proliferation der OS-Zelllinien

Zur weiteren Analyse der potentiellen Rolle von *Ptprz1* bei der Tumorgenese des Osteosarkoms sollte der Einfluss von Mdk auf die Proliferation der *Trp53<sup>+/-</sup>/Ptprz1<sup>+/-</sup>* und *Trp53<sup>+/-</sup>/Ptprz1<sup>-/-</sup>* Zelllinien untersucht werden. Mdk ist ein Heparin-bindender Wachstumsfaktor, der als Antagonist von Rptp $\zeta$  beschrieben wird und im humanen Osteosarkom überexprimiert ist (Kadomatsu et al. 2013; Maehara et al. 2007; Sueyoshi et al. 2012). BrdU-Inkorporationsanalysen der beiden OS-Zelllinien ergaben, dass die Proliferation der *Ptprz1*-heterozygoten Zelllinie mit steigender Mdk-Konzentration [25-200 ng/ml] signifikant zunahm (Abb. 12A). Das proliferative Verhalten der *Ptprz1*-defizienten Zelllinie blieb hingegen unbeeinflusst in Anwesenheit von Mdk. Gleiches Resultat zeigten die

Wachstumskurven, bei denen die Zelllinien über einen Zeitraum von 6 Tagen mit einer definierten Mdk-Konzentration [100 ng/ml] inkubiert wurden (Abb. 12B). Auch hier konnte lediglich die Proliferation der *Ptprz1*-heterozygoten Zelllinie durch die Anwesenheit des Rptpζ-Antagonisten gesteigert werden. Diese Daten implizierten, dass der proliferationsfördernde Effekt von Mdk auf die OS-Zelllinien von der Interaktion mit Rptpζ abhängt.



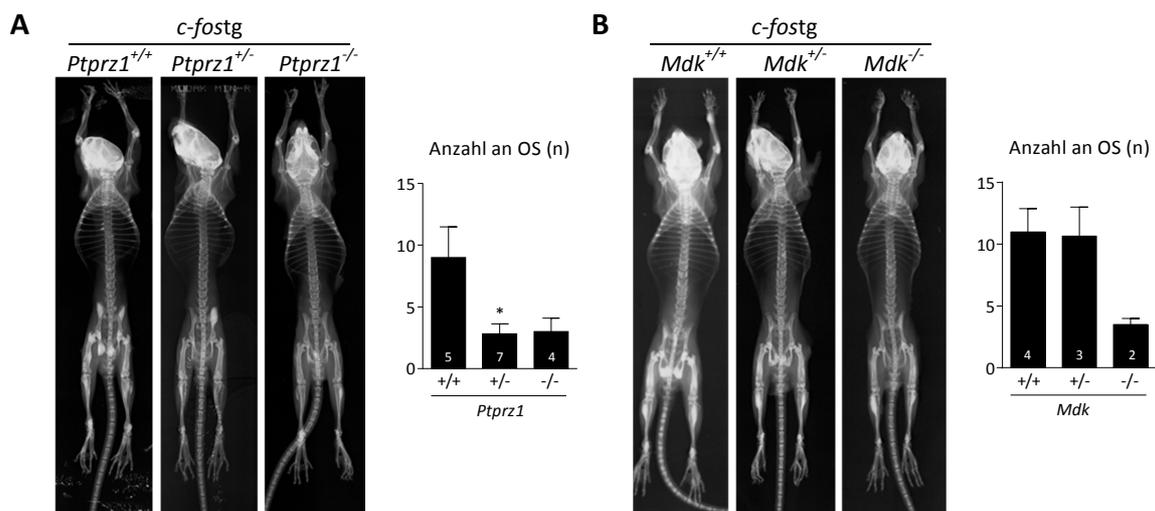
**Abb. 12: Effekt von Mdk auf die Proliferation der OS-Zelllinien. (A)** BrdU-Inkorporationsanalysen *Trp53*-heterozygoter Zelllinien mit hetero- bzw. homozygoter *Ptprz1*-Deletion in Anwesenheit steigender Mdk-Konzentrationen. Die Inkubation erfolgte für 12 h in serumfreiem Kulturmedium. Mittelwert±SD (n=8 Kulturen der jeweiligen Zelllinie). (\*) Signifikante Unterschiede zu den jeweiligen PBS-Kontrollen ohne Mdk (p<0,05, One-Way ANOVA, Dunnett's Posttest). **(B)** Wachstumskurven der OS-Zelllinien in Anwesenheit von 100 ng/ml Mdk. Der Pfeil gibt den Zeitpunkt der Mdk-Zugabe an. Ein Mediumwechsel erfolgte an jedem zweiten Tag. Die Kontrollzellen (Kontr.) wurden mit dem entsprechenden Volumen an PBS kultiviert. Mittelwert±SD (n=3 Kulturen pro Zelllinie und Bedingung). (\*) Signifikante Unterschiede zu den *Trp53*<sup>+/-</sup>/*Ptprz1*<sup>+/-</sup> Kontrollzellen. (p<0,05, Two-Way ANOVA, Bonferroni's Posttest).

### 3.5 Untersuchung der Rolle von Rptpζ im c-Fos-induzierten Osteosarkom

Parallel zur Untersuchung der Funktion von Rptpζ in *Trp53*-heterozygoten Mäusen, wurde die potentiell tumorunterdrückende Funktion der Phosphatase ebenfalls im *c-fos*-transgenen Mausmodell analysiert. Mäuse, die den Transkriptionsfaktor c-Fos überexprimieren, entwickeln bereits wenige Wochen nach Geburt Osteosarkome, und zwar mit einer Penetranz von 100 % (Rüther et al. 1989). Durch gezielte Verpaarungen wurden *c-fos*-transgene Mäuse mit hetero- bzw. homozygoter *Ptprz1*-Deletion generiert und mittels Kontaktradiographie im Alter von 6 Wochen untersucht. Überraschenderweise nahm die durchschnittliche Anzahl an Osteosarkomen durch die hetero- bzw. homozygote Deletion von *Ptprz1* im Vergleich zu den *c-fos*-transgenen Kontrolltieren nicht zu, sondern ab (Abb. 13A). Die in *Trp53*-heterozygoten Mäusen identifizierte tumorunterdrückende Funktion von Rptpζ konnte demnach nicht im c-Fos-induzierten Osteosarkom bestätigt werden.

Um zu ermitteln, ob die Phosphatase möglicherweise indirekt als putativer Mdk Rezeptor an der Pathogenese des c-Fos-induzierten Osteosarkoms beteiligt sein könnte, wurden im weiteren

Verlauf *c-fos*-transgene Mäuse generiert, die heterozygot bzw. defizient für das *Mdk*-Gen waren. *Mdk*-defiziente Mäuse haben eine erhöhte Knochendichte, die auf eine gesteigerte Knochenformationsrate zurückzuführen ist (Neunaber et al. 2010). Die kontaktradiographischen Untersuchungen im Alter von 6 Wochen zeigten, dass die durchschnittliche Anzahl an Osteosarkomen *c-fos*-transgener Mäuse durch die Defizienz von *Mdk* deutlich gesenkt werden konnte (Abb. 13B). Diese Beobachtungen bestätigten die für *Mdk* beschriebene Relevanz im Osteosarkom und ließen eine indirekte Beteiligung von Rptpζ an der Tumorgenese vermuten.



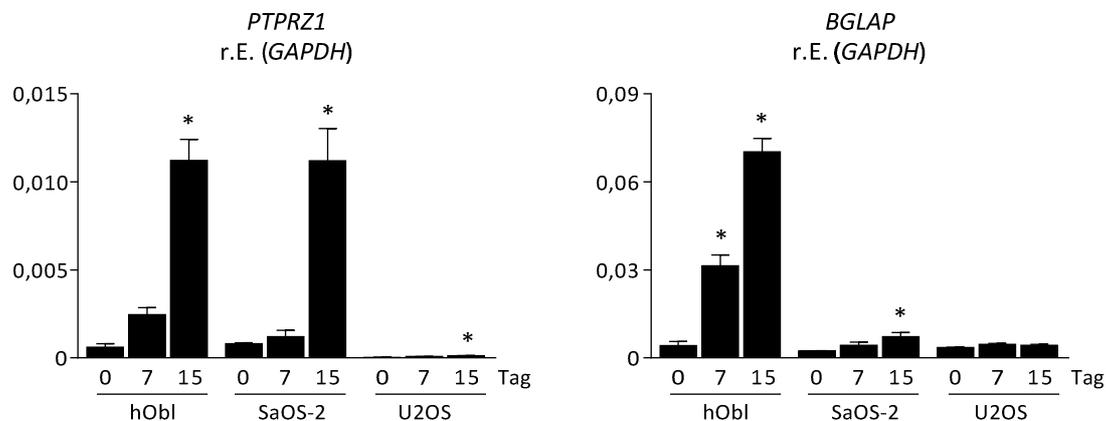
**Abb. 13: Kontaktradiografische Untersuchungen *c-fos*-transgener Mäuse mit zusätzlicher *Ptpz1*- (A) bzw. *Mdk*-Defizienz (B).** Dargestellt sind jeweils repräsentative Röntgenaufnahmen 6 Wochen alter *c-fos*-transgener Mäuse mit angegebenen *Ptpz1* bzw. *Mdk*-Genotypen. Die Graphen zeigen die durchschnittliche Anzahl an detektierten OS in den entsprechenden Mäusen. Mittelwert±SD (n = 2-7 Tiere, angegeben im Diagramm). (\*) Signifikante Unterschiede vs. *c-fos*/*Ptpz1*<sup>+/+</sup> (p<0,05, One-Way ANOVA, Dunnett's Posttest).

### 3.6 Untersuchung der Rolle von Rptpζ im humanen Osteosarkom

#### 3.6.1 *PTPRZ1*-Expression in primären human Osteoblasten und human OS-Zelllinien

Die bisher dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die Abwesenheit der Tyrosinphosphatase Rptpζ in *Trp53*-heterozygoten Mäusen die Entstehung von Osteosarkomen begünstigt. Folglich stellte sich die Frage, ob die Phosphatase auch im humanen Osteosarkom als Tumorsuppressor fungieren könnte. Um dieser Hypothese nachzugehen, wurde zunächst die Expression von *PTPRZ1* in primären humanen Osteoblasten (hObl) sowie in den humanen OS-Zelllinien SaOS-2 und U2OS zu unterschiedlichen Zeitpunkten der osteogenen *ex vivo* Differenzierung untersucht. Die qRT-PCR Analysen zeigten, dass *PTPRZ1* in Analogie zu dem terminalen Osteoblastenmarker Osteocalcin (*BGLAP*) in allen 3 Zelltypen im Verlauf der Differenzierung induziert wurde (Abb. 14). Die Rolle von Rptpζ als Marker der terminalen Osteoblastendifferenzierung konnte demnach auch in humanen

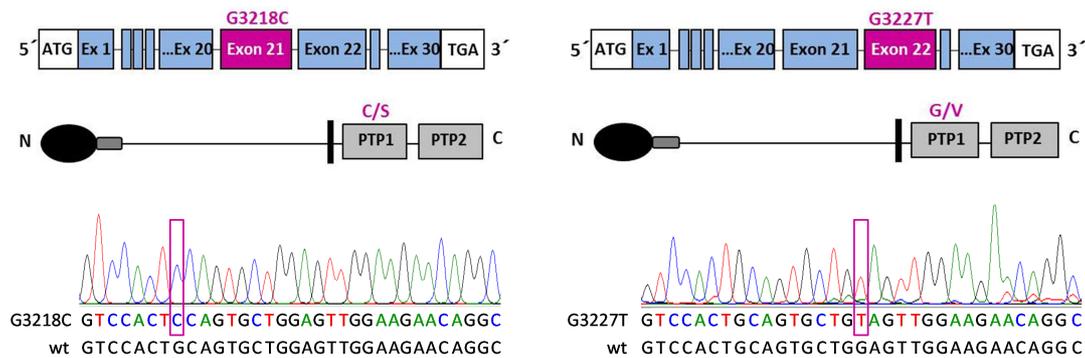
Zellen bestätigt werden, was eine Bedeutung von Rptpζ im Knochenstoffwechsel des Menschen vermuten ließ.



**Abb. 14: PTPRZ1-Expression in primären humanen Osteoblasten (hObl) und humanen OS-Zelllinien (SaOS-2 und U2OS).** qRT-PCR Expressionsanalyse von *PTPRZ1* und *BGLAP* an Tag 0, 7 und 15 der osteogenen Differenzierung. Die Differenzierung der hObl wurde durch kommerziell erhältliches Mineralisierungsmedium induziert. In den Kulturen der OS-Zelllinien erfolgte die Differenzierung durch Zugabe von Ascorbat,  $\beta$ -Glycerophosphat und Dexamethason. Mittelwert $\pm$ SD (n=3 Kulturen pro Zelltyp und Zeitpunkt). Dargestellt ist jeweils die relative Expression zu *Gapdh*. (\*) Signifikante Unterschiede zur Expression an Tag 0 des jeweiligen Zelltyps (p<0,05, One-Way ANOVA, Dunnett's Posttest).

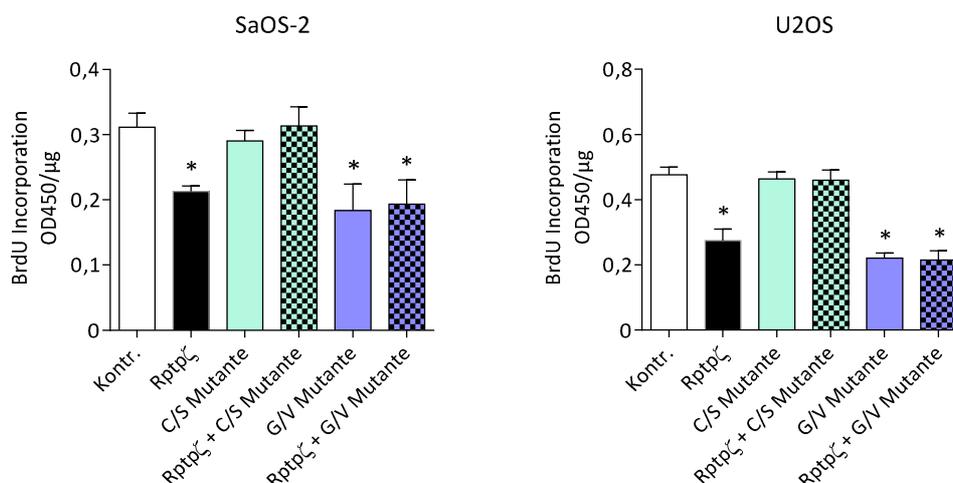
### 3.6.2 Analyse von *PTPRZ1*-Mutationen in humanen Osteosarkomen

In einer Kooperation mit dem Knochentumor-Referenzzentrum des Universitätsspitals Basel (PD Dr. Daniel Baumhoer) wurden im weiteren Verlauf SNP-Datensätze (SNP= *single nucleotide polymorphism*; CytoScan Array) von insgesamt 160 humanen Osteosarkomen auf mögliche chromosomale Veränderungen des *PTPRZ1*-Locus (7q31.3) untersucht. Besondere Auffälligkeiten, die auf eine Kopienzahlveränderung von *PTPRZ1* im humanen Osteosarkom hindeuten, ließen sich jedoch nicht nachweisen (Daten nicht gezeigt). Des Weiteren wurden die Datensätze von 17 Exomsequenzierten humanen Osteosarkomen auf etwaige *PTPRZ1*-Mutationen analysiert. In der Tat konnte dabei eine heterozygote Keimbahnmutation in Exon 22 des humanen *PTPRZ1*-Gens identifiziert werden (G3227T). Da die Mutation auf Proteinebene einen Aminosäureaustausch (G1076V) in der katalytischen Phosphatasedomäne bedingt, ergab sich die Vermutung, dass die Substitution Auswirkungen auf die katalytische Aktivität von Rptpζ haben könnte. Um dem nachzugehen, wurde die Mutation mittels gerichteter Mutagenese in ein Rptpζ Expressionsplasmid eingefügt (G/V Mutante). Zur Kontrolle wurde außerdem eine weitere Mutante generiert, bei der das katalytische Cystein im aktiven Zentrum durch ein Serin substituiert wurde (Exon21:c.G3218T:p.C1073S). Diese C/S Mutante sollte demnach keine dephosphorylierenden Eigenschaften mehr besitzen. Die eingefügten Mutationen wurden jeweils mittels DNA-Sequenzierung verifiziert (Abb. 15)



**Abb. 15: Generierung von Rptpζ Mutanten.** Schematische Darstellung des *PTPRZ1*-Gens sowie des Rptpζ Proteins zur Veranschaulichung der Lokalisation der beiden Mutationen, die in ein Rptpζ Expressionsplasmid eingefügt wurden. Zum Nachweis der korrekt eingefügten Mutationen wurde der entsprechende DNA-Abschnitt sequenziert und mit der Wildtyp-Sequenz verglichen.

Zur funktionellen Analyse der Rptpζ Mutanten wurden die entsprechend mutierten Expressionsplasmide und/oder das intakte Rptpζ Plasmid in die humanen OS-Zelllinien SaOS-2 und U2OS transfiziert und die Proliferation mittels BrdU-Inkorporationsassays analysiert. In beiden Zelllinien hatte die Transfektion des intakten Rptpζ Plasmids eine signifikante Verminderung der Proliferation im Vergleich zu den mit pCMV-GFP Plasmid transfizierten Kontrollzellen zur Folge (Abb. 16). Damit konnte die Rolle von Rptpζ als negativer Regulator der Osteoblastenproliferation auch in humanen Zellen bestätigt werden. Wie erwartet, wurde dieser antiproliferative Effekt durch die enzymatisch inaktive C/S Mutante aufgehoben. Die simultane Transfektion des intakten und mutierten Plasmids ergab weiterhin, dass die C/S Mutation sogar dominant-negativ wirkte. Dahingegen konnte bei der patientenspezifischen G/V Mutation keine funktionelle Beeinträchtigung der Phosphataseaktivität festgestellt werden. So hatte die Transfektion des mutierten Rptpζ Expressionsplasmids keinen Einfluss auf den antiproliferativen Effekt von Rptpζ. Folglich schien die im Patienten identifizierte *PTPRZ1*-Mutation nicht maßgeblich an der OS-Entstehung beteiligt zu sein.



**Abb. 16: Funktionelle Analyse von Rptpζ Mutanten in human OS-Zelllinien.** Dargestellt sind BrdU-Inkorporationsanalysen von SaOS-2 und U2OS nach Transfektion mit Wildtyp Rptpζ Expressionsplasmid und/oder mutiertem Rptpζ Expressionsplasmid (C/S Mutante bzw. G/V Mutante). Die gemessenen OD<sub>450</sub> Werte wurden jeweils auf den Proteingehalt der Zellen bezogen. Als Kontrollplasmid (Kontr.) diente pCMV-GFP. Mittelwert±SD (n=6 Kulturen pro Zelllinie und Bedingung). (\*) Signifikante Unterschiede zu Zellen nach Transfektion mit Kontr. (p<0,05, One-Way ANOVA, Dunnett's Posttest).

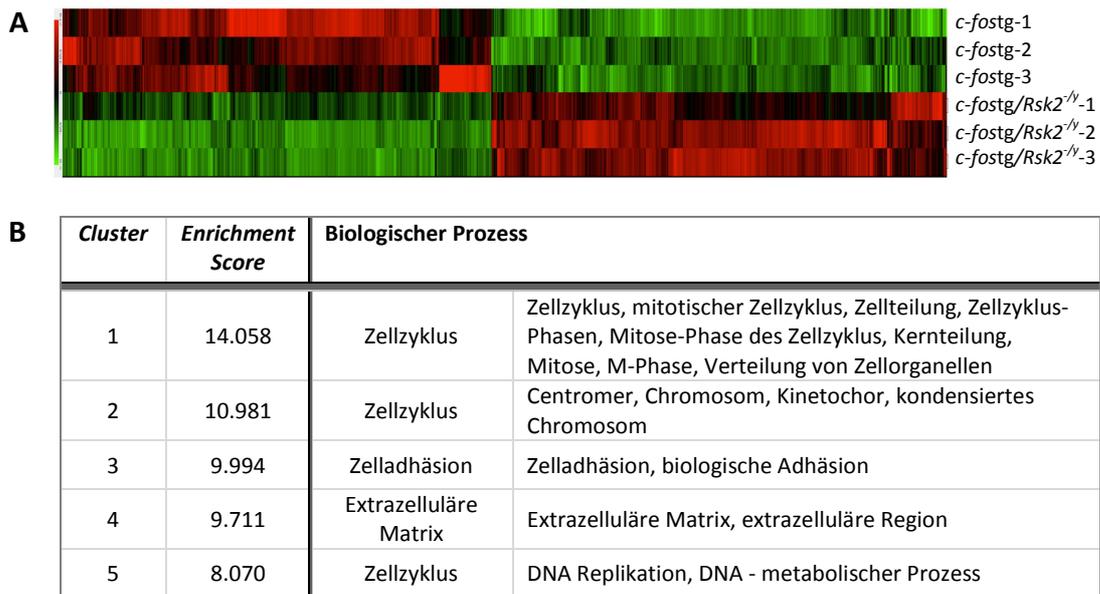
### 3.7 Untersuchung der Rolle von Rsk2 im c-Fos-induzierten Osteosarkom

Zum besseren Verständnis der molekularen Ursachen der Osteosarkom-Entstehung wurde in dieser Arbeit ein weiteres Mausmodell analysiert. Dies beinhaltete die Untersuchung der pro-onkogenen Rolle der Serin/Threonin Kinase Rsk2 im c-Fos-induzierten Osteosarkom. In vorangehenden Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die c-Fos-abhängige Osteosarkom-Progression in Abwesenheit von Rsk2 deutlich gestört ist (David et al. 2005). So war die Anzahl und Größe der skelettalen Tumoren drastisch reduziert und die transformierten Zellen im Tumorgewebe zeigten eine verminderte Proliferations- sowie eine erhöhte Apoptoserate.

#### 3.7.1 Genexpressionsanalysen c-fos-transgener Osteosarkome mit bzw. ohne Rsk2-Defizienz

Zur Untersuchung des molekularen Mechanismus von Rsk2 bei der Entstehung c-Fos-induzierter Osteosarkome wurden zunächst Microarray-Genchipsanalysen ausgewertet. Hierbei wurden die Transkriptome von jeweils 3 unabhängig voneinander isolierten Osteosarkomen aus c-fos-transgenen Mäusen (*c-fostg*) und c-fos-transgenen Tieren mit zusätzlicher Rsk2-Defizienz (*c-fostg/Rsk2<sup>-/-</sup>*) miteinander verglichen. Insgesamt konnten 5742 differentiell exprimierte Gene detektiert werden. Die hierarchische Cluster-Analyse zeigte eine deutliche Diskriminierung zwischen den beiden Genotypen (Abb. 17A).

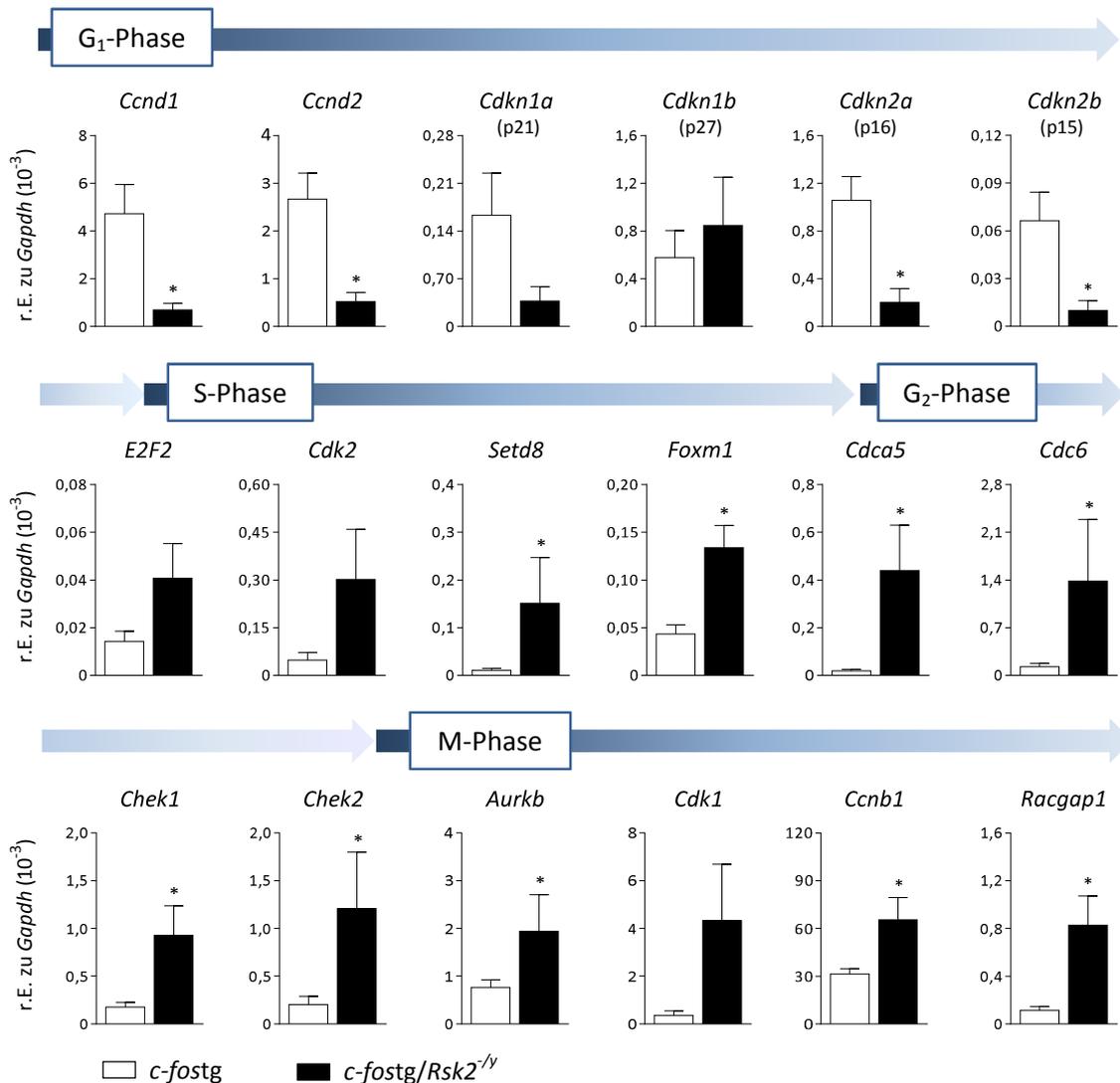
Zur funktionellen Interpretation der Daten wurde das *Functional Annotation Tool* von DAVID (*Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*) genutzt. Hierbei wurden die unterschiedlich regulierten Gene gemäß ihrer biologischen Funktion in Annotationsgruppen bzw. „Cluster“ eingeteilt. Eine Gewichtung der Annotationsgruppen erfolgte über den sog. „*Enrichment Score*“, der die biologische Signifikanz des jeweiligen Clusters angibt (Huang et al. 2007). Die Analyse ergab, dass die Defizienz von Rsk2 in den c-fos-transgenen Osteosarkomen vor allem in einer veränderten Expression von Zellzyklus-Genen resultierte. So konnten 3 der 5 am stärksten angereicherten Cluster dem Zellzyklus und insbesondere der Mitose-Phase (M-Phase) zugeordnet werden (Abb. 17B).



**Abb. 17: Microarray-Genchip-Analysen *c-fos*-transgener Osteosarkome mit bzw. ohne *Rsk2*-Defizienz. (A)** Hierarchische Cluster-Analysen der 5742 unterschiedlich exprimierten Gene in jeweils 3 unabhängig voneinander isolierten *c-fostg* und *c-fostg/Rsk2<sup>-/-</sup>* Osteosarkomen. Hochregulierte Gene werden rot und herunterregulierte Gene grün dargestellt. **(B)** Funktionelle Cluster-Analyse der differentiell regulierten Gene.

Zur Verifizierung dieser Ergebnisse wurde die Expression ausgewählter regulierter Zellzyklus-Marker in 6 bzw. 11 unabhängig voneinander isolierten Osteosarkomen aus *c-fostg* und *c-fostg/Rsk2<sup>-/-</sup>* Mäusen mittels qRT-PCR analysiert. Die gewonnenen Daten bestätigten die verminderte Expression von G<sub>1</sub>-Phase-Markern (*Ccnd1*, *Ccnd2*, *Cdkn1a*, *Cdkn1b*, *Cdkn2a*, *Cdkn2b*) in *Rsk2*-defizienten Osteosarkomen (Abb. 18). Weiterhin konnten in diesen Tumoren die erhöhte Expression von S-Phase, G<sub>2</sub>-Phase und M-Phase-Genen (*E2F2*, *Cdk2*, *Setd8*, *Foxm1*, *Cdca5*, *Cdc6*, *Chek1*, *Chek2*, *Aurkb*, *Ckd1*, *Ccnb1*, *Racgap1*) validiert werden.

Die Ergebnisse der Expressionsanalysen waren insofern überraschend, als dass die *Rsk2*-defizienten Osteosarkome mit einer verminderten Proliferation (signifikant verminderter Anteil Ki67-positiver Zellen im Tumorgewebe) sowie einer erhöhten Apoptoserate (signifikant erhöhter Anteil TUNEL-positiver Zellen im Tumorgewebe) assoziiert waren (vgl. Kapitel 1.5.3 Abb. 3; David et al. 2005). Wieso also zeigten diese Osteosarkome eine gesteigerte Expression von Genen, die die Zellproliferation eigentlich fördern? Als Hypothese ergab sich, dass es in Abwesenheit von *Rsk2* zu einer Blockade der Mitose-Phase kommt und die transformierten Zellen in diesem Abschnitt des Zellzyklus akkumulieren ohne eine Zellteilung zu vollziehen. Diese Annahme sollte im weiteren Verlauf auf zellulärer und molekularer Ebene evaluiert werden.

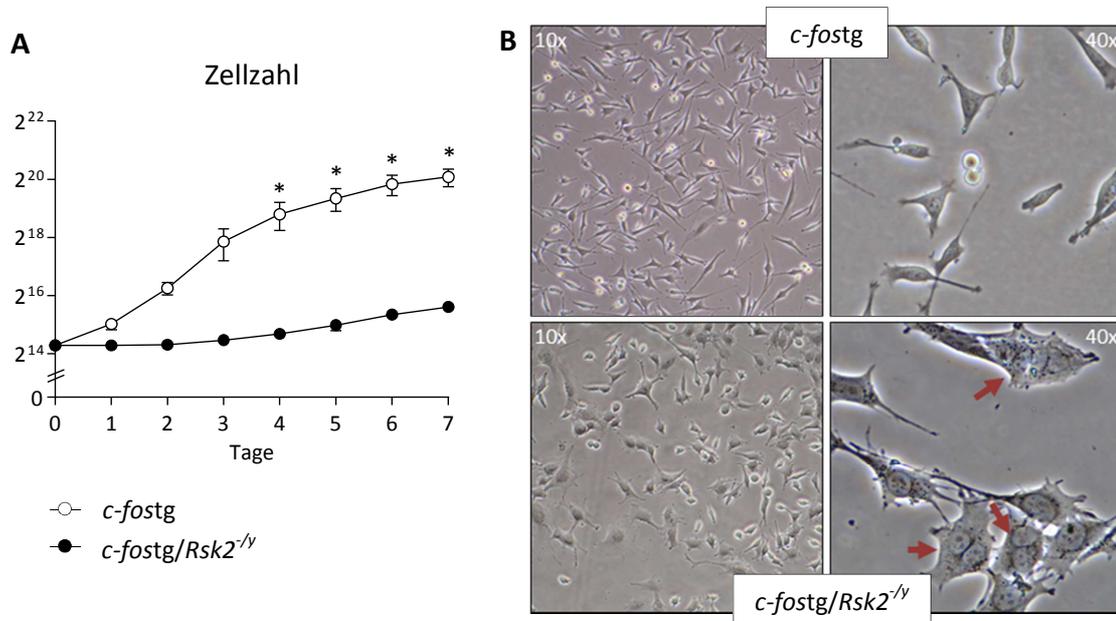


**Abb. 18:** qRT-PCR-Analysen ausgewählter Zellzyklus-Marker in *c-fos*-transgenen Osteosarkomen mit bzw. ohne *Rsk2*-Defizienz. Die Expressionsanalysen wurden mit unabhängig von voneinander isolierten Tumoren 16 Wochen alter *c-fostg* und *c-fostg/Rsk2<sup>-/-</sup>* durchgeführt. Mittelwert $\pm$ SD (n=11 *c-fostg*, n=6 *c-fostg/Rsk2<sup>-/-</sup>*). Dargestellt ist jeweils die relative Expression zu *Gapdh*. (\*) Signifikante Unterschiede zwischen den beiden Genotypen. (p<0,05, Student t-Test). Zellzyklusphasen: G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> („gap“), S (Synthese), M (Mitose).

### 3.7.2 Proliferationsanalysen *c-fos*-transgener OS-Zelllinien mit bzw. ohne *Rsk2*-Defizienz

Um der o.g. Hypothese eines *Rsk2*-abhängigen Mitose-Blocks in *c-fos*-überexprimierenden Osteosarkomen nachzugehen, sollte zunächst das proliferative Verhalten der Osteosarkomzellen *ex vivo* untersucht werden. Hierfür wurden aus jeweils 3 *c-fostg* und *c-fostg/Rsk2<sup>-/-</sup>* Mäusen Osteosarkome isoliert und durch mehrmaliges Passagieren Zelllinien etabliert. Die erstellten Wachstumskurven bestätigten eine signifikant niedrigere Proliferationsrate der *Rsk2*-defizienten Zelllinie (Abb. 19A). Je nach Wachstumsphase stellten sich die *c-fostg* Zellen morphologisch

weitgehend als spindelförmig dar, wohingegen die *c-fostg/Rsk2<sup>-/-</sup>* Zellen vergrößert waren und meist eine polygonale Form aufwiesen (Abb. 19B, 10-fache Vergrößerung). Interessanterweise fielen bei lichtmikroskopischer Betrachtung in 40-facher Vergrößerung Zellen mit 2 oder auch mehr als 2 Zellkernen auf (Abb. 19B). Solche mehrkernigen Zellen konnten fast ausschließlich in den langsam proliferierenden *c-fostg/Rsk2<sup>-/-</sup>* Zelllinien detektiert werden.



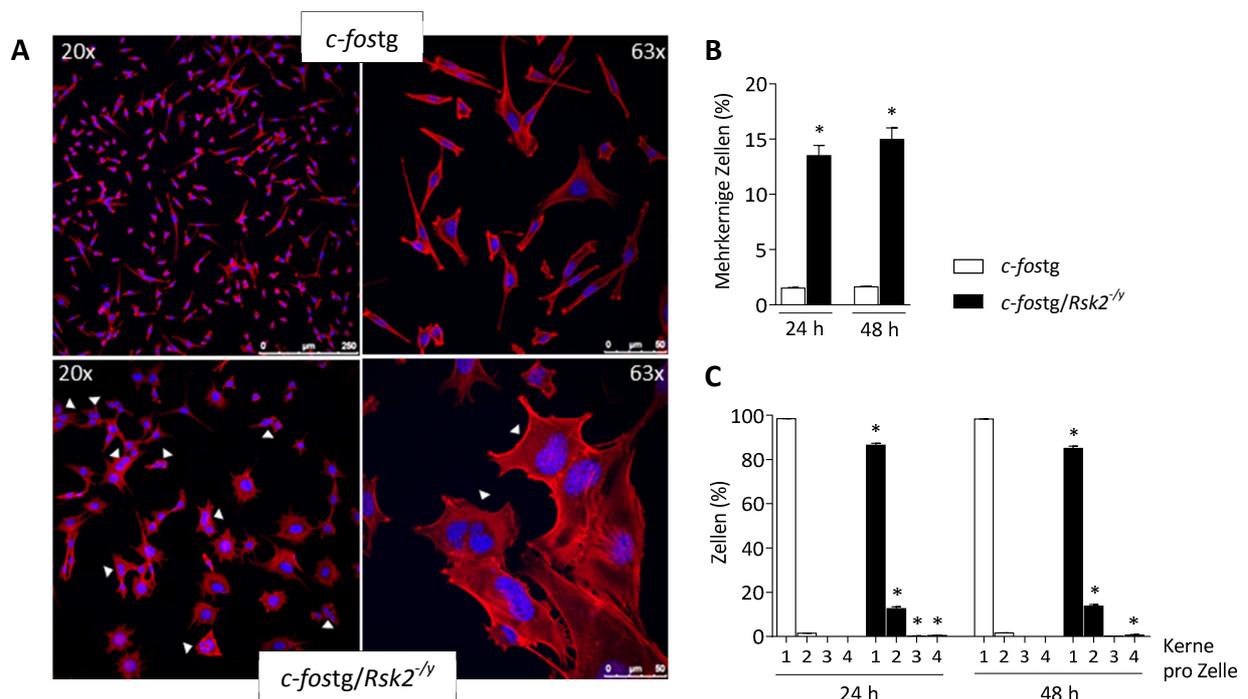
**Abb. 19: Proliferationsanalyse *c-fos*-transgener OS-Zelllinien mit bzw. ohne *Rsk2*-Defizienz. (A)** Wachstumskurven von jeweils 3 unabhängig voneinander isolierten Zelllinien 16 Wochen alter *c-fostg* und *c-fostg/Rsk2<sup>-/-</sup>* Mäuse. Mittelwert $\pm$ SD (n=9 Kulturen pro Zelllinie, Genotyp und Zeitpunkt). (\*) Signifikante Unterschiede zwischen den beiden Genotypen. (p<0,05, Two-Way ANOVA, Bonferroni's Posttest). **(B)** Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahme einer *c-fostg* und *c-fostg/Rsk2<sup>-/-</sup>* Zelllinie an Tag 2 der Kultivierung (10-fache und 40-fache Vergrößerung). Mehrkernige Zellen in der *c-fostg/Rsk2<sup>-/-</sup>* Zelllinie sind exemplarisch durch rote Pfeile gekennzeichnet.

### 3.7.3 Untersuchung eines Mitose-Defekts in *c-fos*-transgenen *Rsk2*-defizienten Zelllinien

#### 3.7.3.1 Quantitative Analyse polynukleärer Zellen

Die Ergebnisse der Proliferationsanalyse deuteten darauf hin, dass der Proliferationsdefekt der *Rsk2*-defizienten Zelllinien mit dem vermehrten Auftreten polynukleäre Zellen zusammenhing. Multinukleäre Zellen entstehen z.B. durch fehlerhafte Chromosomenverteilung aufgrund der Bildung multipolarer Mitose-Spindeln oder aber durch eine gestörte Zytokinese (Davoli und de Lange 2011). Sie sind also die Konsequenz fehlerhafter Mitosen. Um die mehrkernigen Zellen zu quantifizieren, erfolgte zunächst eine Fluoreszenzfärbung der *c-fostg* und *c-fostg/Rsk2<sup>-/-</sup>* Zelllinien. Dabei wurden die DNA sowie die Aktin-Filamente des Zytoskeletts mithilfe spezifischer Fluoreszenzfarbstoffe markiert und mittels konfokaler Lasermikroskopie visualisiert. Dies ermöglichte zum einen eine gute

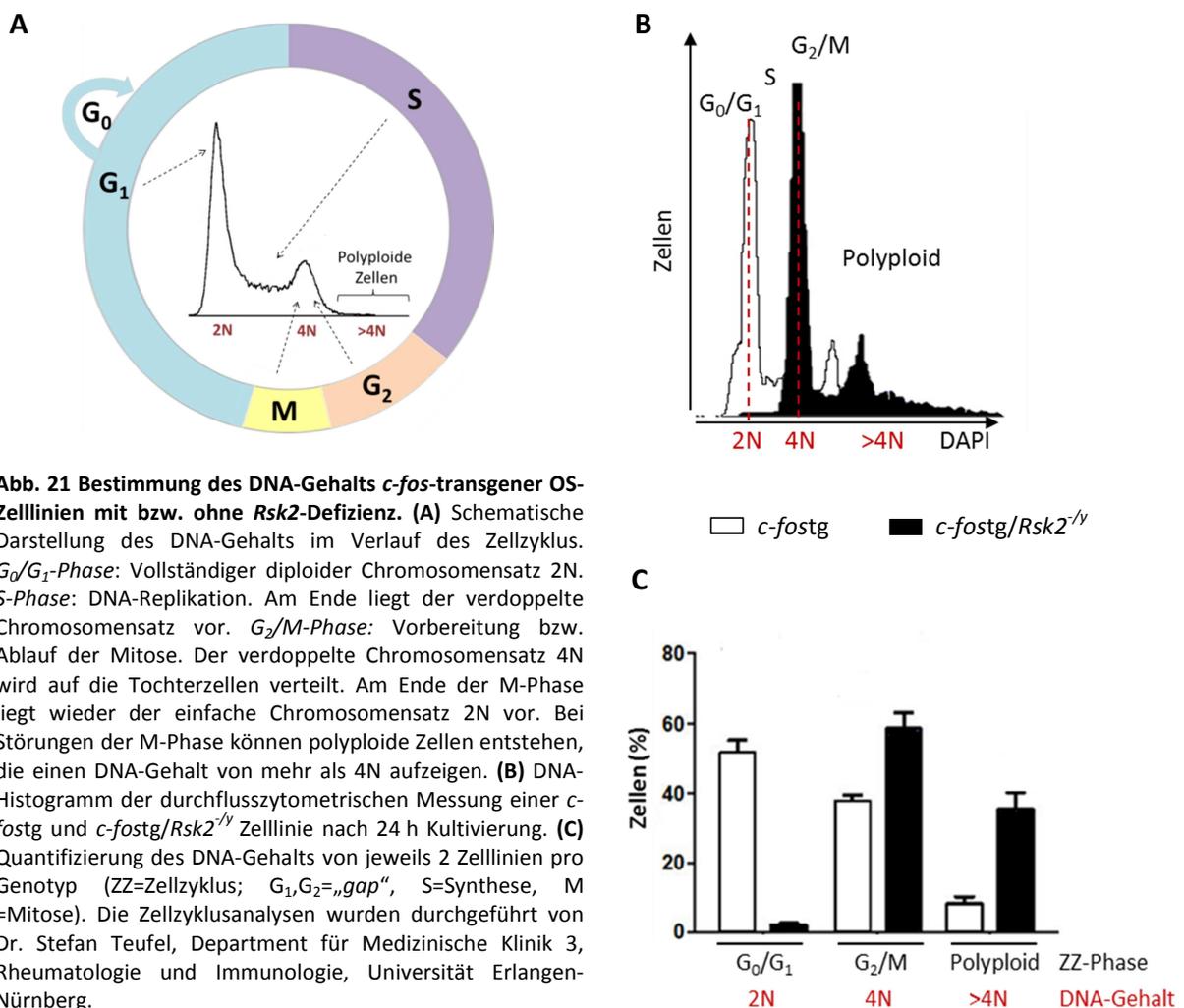
Veranschaulichung der morphologischen Unterschiede zwischen den Zelllinien (Abb. 20A). Zum anderen konnte die Anzahl an Kernen pro Zelle sehr gut identifiziert und daher auch quantifiziert werden. Die quantitative Analyse ergab, dass in den *c-fostg/Rsk2<sup>-/-</sup>* Zelllinien nach 24 bzw. 48 h Kultivierung signifikant mehr polynukleäre Zellen vorlagen als in den *c-fostg* Zelllinien (Abb. 20B). So waren in den *Rsk2*-defizienten Linien mindestens 13 % der Zellen 2-, 3- oder 4-kernig während in den *c-fos*-transgenen Linien zu 98 % Zellen mit nur einem Kern zu finden waren (Abb. 20C). Die dargestellten Ergebnisse bestätigten demnach die Hypothese eines Mitose-Defekts in den *Rsk2*-defizienten Zelllinien.



**Abb. 20: Visualisierung und Quantifizierung mehrkerniger Zellen in *c-fos*-transgenen OS-Zelllinien mit bzw. ohne *Rsk2*-Defizienz. (A)** Repräsentative konfokale Aufnahmen einer für 24 h kultivierten *c-fostg* und *c-fostg/Rsk2<sup>-/-</sup>* Zelllinie nach Färbung von Aktin mittels Fluorophor-konjugiertem Phalloidin (rot) und Kernfärbung mittels DAPI (blau) in 20- und 63-facher Vergrößerung (Maßstab: 250 µm bei 20x, 50 µm bei 63x). Mehrkernige Zellen sind exemplarisch durch weiße Pfeile gekennzeichnet. Quantitative Auswertung des Anteils mehrkerniger Zellen **(B)** sowie der Anzahl an Kernen pro Zelle **(C)** nach 24 bzw. 48 h Kultivierung von jeweils 3 *c-fostg* und *c-fostg/Rsk2<sup>-/-</sup>* Zelllinien. Pro Genotyp und Zeitpunkt wurden 3 zellbewachsene Coverslips angefärbt. Von jedem Coverslip wurden 7 Aufnahmen von unterschiedlichen Arealen angefertigt und quantitativ ausgewertet. Mittelwert±SD (n=9 Kulturen pro Zelllinie, Genotyp und Zeitpunkt). (\*) Signifikante Unterschiede zwischen den beiden Genotypen zum jeweiligen Zeitpunkt (p<0,05, Student t-Test).

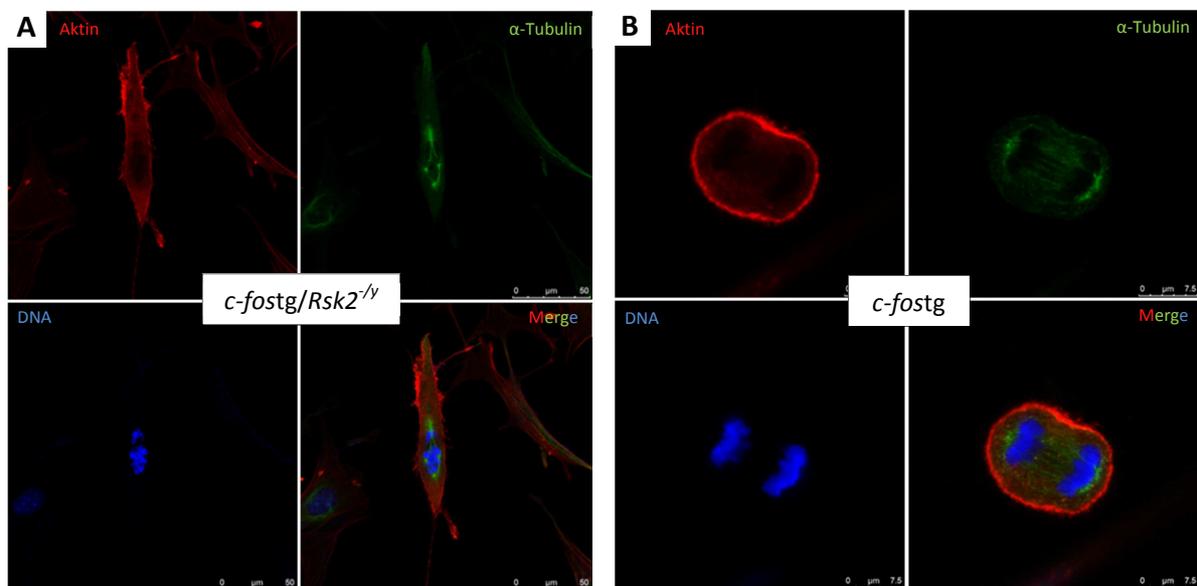
### 3.7.3.2 Bestimmung des DNA-Gehalts

Im weiteren Verlauf wurde mittels DAPI-Färbung und anschließender Messung per Durchflusszytometrie der DNA-Gehalt der *c-fostg* und *c-fostg/Rsk2<sup>-/-</sup>* Zelllinien ermittelt. Dies ermöglichte zum einen die Untersuchung der Ploidie (Zahl der vorhandenen Chromosomensätze) und zum anderen die Bestimmung der Zellzyklusphasenverteilung der OS-Zellen. Ein DNA-Histogramm mit den entsprechenden Phasen des Zellzyklus ist exemplarisch in Abb. 21A dargestellt. Die durchflusszytometrischen Analysen ergaben deutliche Unterschiede zwischen den beiden Genotypen (Abb. 21B,C). Während in den *c-fos*-transgenen Zelllinien eine weitgehend normale Zellzyklusphasenverteilung vorlag, konnten in den *Rsk2*-defizienten Zelllinien kaum Zellen in der  $G_1$ -Phase mit 1-fachem DNA-Gehalt identifiziert werden. Hingegen wiesen circa 60 % der Zellen einen 4-fachen ( $4N$ =tetraploid) und 35 % einen 8-bzw. 16-fachen Chromosomensatz ( $>4N$ = polyploid) auf. Diese Ergebnisse implizierten, dass es in *Rsk2*-defizienten Zellen zu einem fehlerhaften Ablauf der Kern- oder Zellteilung kommt, was die Entstehung von mehrkernigen Zellen mit einem DNA-Gehalt von  $\geq 4N$  zur Folge hatte.



### 3.7.3.3 Visualisierung der Mitose-Phase mittels Immunfluoreszenz

Zur weiteren Analyse des Mitose-Defekts in *c-fos*-transgenen *Rsk2*-defizienten Zellen sollte jene Phase des Zellzyklus per Immunfluoreszenz visualisiert und begutachtet werden. Hierfür wurden die Aktinfilamente, die DNA, sowie  $\alpha$ -Tubulin zur Darstellung der Mitose-Spindel in den OS-Zelllinien mithilfe spezifischer Fluoreszenzfarbstoffe markiert. Wie erwartet, konnten mittels konfokaler Lasermikroskopie in den *Rsk2*-defizienten Zellen vermehrt atypische Mitosefiguren identifiziert werden. So lagen unter anderem Zellen mit einem multipolaren Spindelapparat vor. Abb. 22A zeigt die unter dem Einfluss einer multipolaren Mitose-Spindel stattfindende Mitose. Im Gegensatz zu einer symmetrisch ausgebildeten bipolaren mitotischen Spindel (Abb. 22B), ist hier eine korrekte Verteilung der Chromosomen nicht gewährleistet. Als Konsequenz könnten Tochterzellen entstehen, die vom normalen DNA-Gehalt abweichen.



**Abb. 22: Immunfluoreszenz-Färbung *c-fos*-transgener OS-Zellen mit bzw. ohne *Rsk2*-Defizienz.** Dargestellt sind die konfokalen Aufnahmen der Mitose-Phase einer *c-fostg/Rsk2*<sup>-/-</sup> (A) und einer *c-fostg* (B) Zelle nach Immunfluoreszenz-Färbung von  $\alpha$ -Tubulin (grün), Phalloidin-Färbung von Aktin (rot) und Kernfärbung mittels DAPI (blau) in 63-facher Vergrößerung (Maßstab: 7  $\mu\text{m}$  (A) bzw. 50  $\mu\text{m}$  (B)). Die Bilder zeigen jeweils die einzelnen Fluoreszenzsignale sowie die Überlagerung aller Kanäle (Merge).

Die bisher dargestellten Daten deuteten darauf hin, dass die transformierten Zellen *c-fos*-transgener Osteosarkome in Abwesenheit von *Rsk2* fehlerhafte Mitosen durchlaufen, die zur Bildung mehrkerniger Zellen mit einem von der Norm abweichendem DNA-Gehalt führten. In Folge dieser Defekte zeigten die Tumorzellen eine verminderte Proliferationsrate. Dieses Phänomen beschreibt den Mechanismus der „mitotischen Katastrophe“. Hierbei handelt es sich um einen zelleigenen onkosuppressiven Schutzmechanismus, bei dem die Zelle ihre Teilungsfähigkeit verliert und es infolge von Mitoseaberrationen zum Zelltod kommt (Vitale et al. 2011; Galluzzi et al. 2012). Die Induktion der mitotischen Katastrophe stellt somit eine vielversprechende Strategie in der Tumorthherapie dar.

---

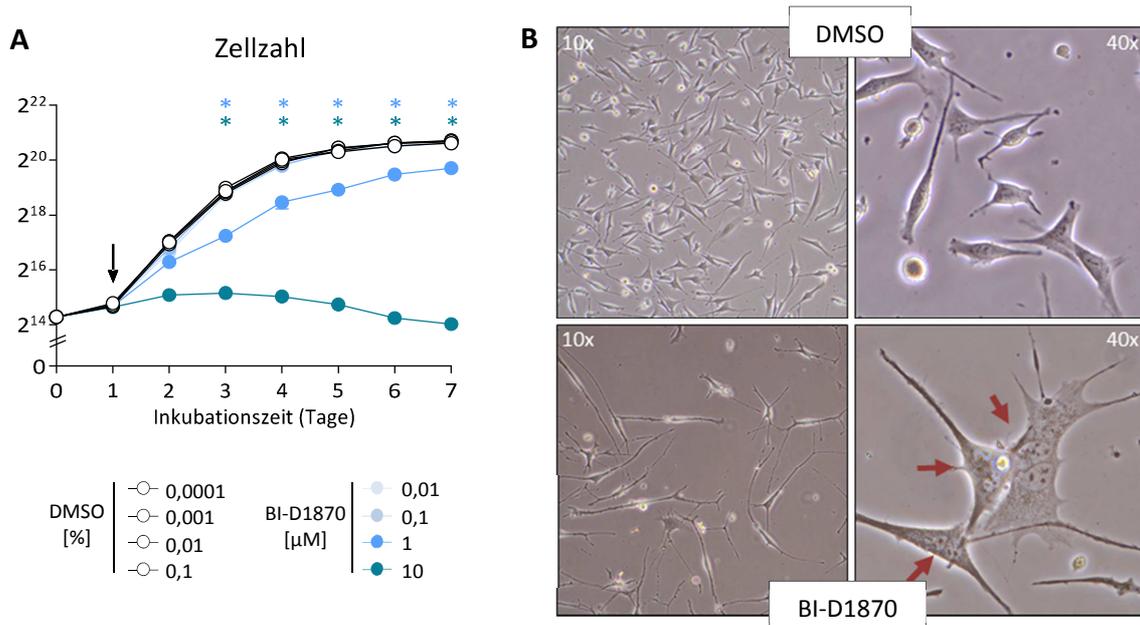
Ob sich in diesem Kontext die Serin/Threonin Kinase Rsk2 als therapeutisches Zielprotein für die Osteosarkom-Therapie eignen könnte, sollte im weiteren Verlauf dieser Arbeit untersucht werden.

### **3.7.4 Analyse des Effekts von BI-D1870 auf *c-fos*-transgene Zelllinien**

Da bisher gezeigt werden konnte, dass die genetische Inaktivierung von Rsk2 einen protektiven Effekt auf die Progression c-Fos-induzierter Osteosarkome hat, war es von besonderem Interesse, ob jener Effekt durch eine pharmakologische Inhibition von Rsk2 reproduziert werden konnte. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden *in vitro* Versuche mit BI-D1870 durchgeführt, einem niedermolekularen Dihydropteridinon-Derivat, das die Aktivität der Rsk-Isoformen 1, 2, 3 und 4 inhibiert (Sapkota et al. 2007).

#### **3.7.4.1 Proliferationsanalysen *c-fos*-transgener OS-Zellen in Anwesenheit von BI-D1870**

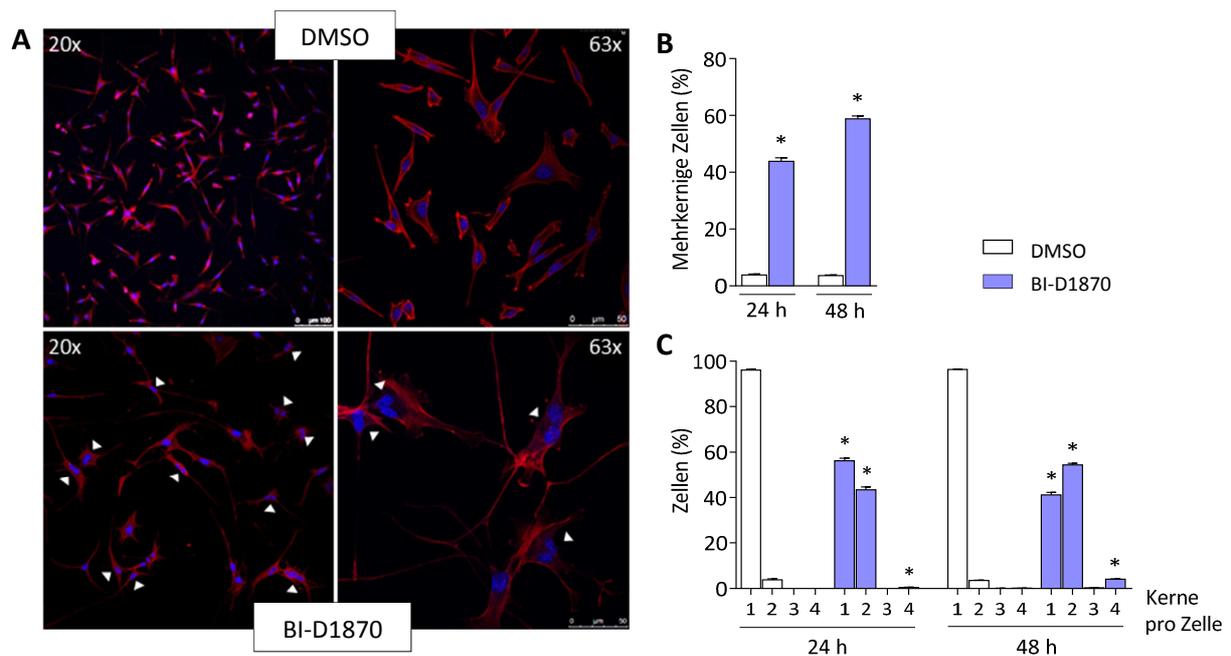
Zunächst sollte der Effekt von BI-D1870 auf die Proliferation *c-fos*-transgener Zellen ermittelt werden. Hierfür wurden 3 unabhängig voneinander isolierte Zelllinien über einen Zeitraum von 6 Tagen in Anwesenheit steigender BI-D1870 Konzentrationen [0,01-10  $\mu$ M] inkubiert. Die erstellten Wachstumskurven erbrachten eine konzentrationsabhängige Verminderung der Zellproliferation in Gegenwart des Rsk-Inhibitors (Abb. 23A). Während im nanomolaren Konzentrationsbereich kein Unterschied zu den Kontrollen (DMSO) zu beobachten war, zeigten die Zellen durch die BI-D1870-Zugabe im mikromolaren Bereich eine signifikant niedrigere Proliferationsrate. In Analogie zu den *c-fostg/Rsk2<sup>-/-</sup>* Zellen konnten auch hier mehrkernige Zellen detektiert werden (Abb. 23B). Da das Proliferationsprofil der Zellen in Anwesenheit von 10  $\mu$ M BI-D1870 der genetischen *Rsk2*-Inaktivierung gleichkam, wurde diese Konzentration für alle weiteren *in vitro* Experimente verwendet.



**Abb. 23: Effekt von BI-D1870 auf die Proliferation *c-fos*-transgener OS-Zelllinien. (A)** Wachstumskurven von jeweils 3 unabhängig voneinander isolierten Zelllinien 16 Wochen alter *c-fostg* Mäuse in Anwesenheit steigender BI-D1870- bzw. DMSO-Konzentrationen. Der Pfeil gibt den Zeitpunkt der Zugabe an. Ein Mediumwechsel erfolgte an jedem zweiten Tag. Mittelwert $\pm$ SD (n=9 Kulturen pro Zelllinie, Bedingung und Zeitpunkt). (\*) Signifikante Unterschiede zwischen den beiden Bedingungen zu einem bestimmten Zeitpunkt ( $p < 0,05$ , Two-Way ANOVA, Bonferroni's Posttest). **(B)** Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahme einer *c-fostg* Zelllinie in Anwesenheit von 10  $\mu$ M BI-D1870 bzw. 0,1 % DMSO nach 48 h Inkubation (10-fache und 40-fache Vergrößerung). Mehrkernige Zellen sind exemplarisch durch rote Pfeile gekennzeichnet.

### 3.7.4.2 Untersuchung des Auftretens mehrkerniger polyploider Zellen in *c-fos*-transgenen Zelllinien in Anwesenheit von BI-D1870

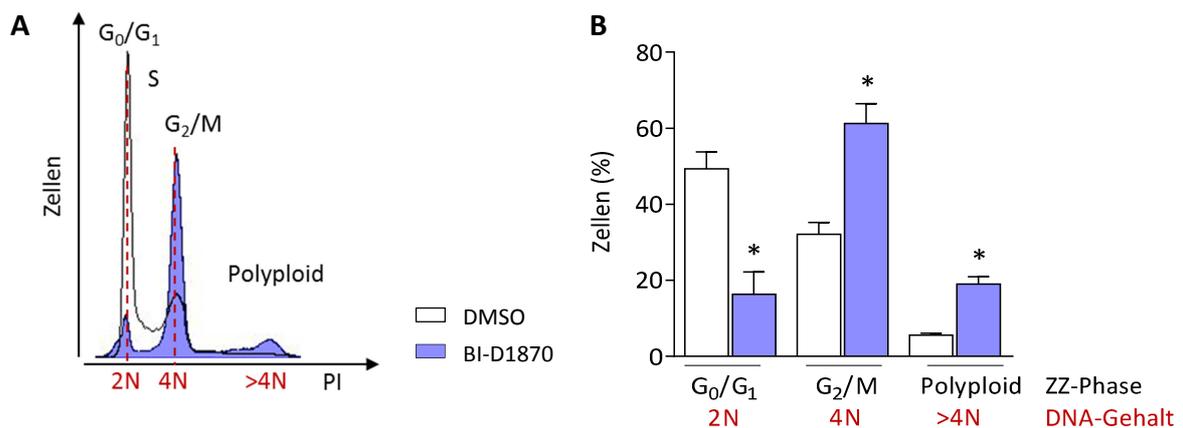
Mittels Fluoreszenzfärbungen und zytometrischen Analysen wurde die Anzahl an Kernen pro Zelle sowie der Plodie-Grad der *c-fos*-transgenen Zelllinien nach Zugabe von BI-D1870 ermittelt. Die quantitative Analyse der Zellkerne nach Visualisierung des Aktin-Zytoskeletts und der DNA erbrachte einen signifikant erhöhten Anteil multinukleärer Zellen in Anwesenheit des Rsk-Inhibitors (Abb. 24A,B). So lagen nach 24 h Inkubation ca. 43 % der Zellen als 2- oder 4-kernig vor, wohingegen bei den DMSO-Kontrollen vorwiegend Zellen mit nur einem Nukleus quantifiziert werden konnten (ca. 96 %, Abb. 24C). Nach einer Inkubationszeit von 48 h überwog sogar der prozentuale Anteil an 2- und 4-kernigen Zellen den Anteil an 1-Kernigen.



**Abb. 24: Visualisierung und Quantifizierung mehrkerniger Zellen in *c-fos*-transgenen OS-Zelllinien nach Inkubation mit BI-D1870. (A)** Repräsentative konfokale Aufnahmen einer für 48 h in Gegenwart von BI-D1870 [10  $\mu$ M] bzw. DMSO [0,1 %] kultivierten *c-fostg* Zelllinie nach Färbung von Aktin mittels Phalloidin (rot) und Kernfärbung mittels DAPI (blau) in 20- und 63-facher Vergrößerung (Maßstab: 100  $\mu$ m bei 20x, 50  $\mu$ m bei 63x). Mehrkernige Zellen sind exemplarisch durch weiße Pfeile gekennzeichnet. Quantitative Auswertung des Anteils mehrkerniger Zellen **(B)** sowie der Anzahl an Kernen pro Zelle **(C)** nach 24 bzw. 48 h Kultivierung von 3 *c-fostg* Zelllinien in Anwesenheit von BI-D1870 und DMSO. Pro Zelllinie, Bedingung und Zeitpunkt wurden 3 zellbewachsene Coverslips angefärbt. Von jedem Coverslip wurden 7 Aufnahmen von unterschiedlichen Arealen angefertigt und quantitativ ausgewertet. Mittelwert $\pm$ SD (n=9 Kulturen pro Zelllinie, Bedingung und Zeitpunkt). (\*) Signifikante Unterschiede zwischen BI-D1870 und DMSO zum jeweiligen Zeitpunkt ( $p < 0,05$ , Student t-Test).

Des Weiteren wurde untersucht, welchen Einfluss BI-D1870 auf den DNA-Gehalt der *c-fostg* Zellen hat. Die 3 Zelllinien wurden nach 24 h Inkubation mit dem Rsk-Inhibitor bzw. DMSO einer Propidiumiodid (PI)-Färbung unterzogen. Die anschließenden Messungen per Durchflusszytometrie erbrachten, dass in Anwesenheit von BI-D1870 signifikant weniger Zellen mit einem 1-fachen DNA-Gehalt vorlagen (Abb. 25A,B). Die meisten BI-D1870-behandelten Zellen wiesen einen DNA-Gehalt von 4N auf, der signifikant höher als in den Kontrollzellen war. Dieser Anteil an tetraploiden Zellen spiegelte sowohl die Zellen wider, die als 2-kernig vorlagen, als auch jene Zellen, die sich zum Zeitpunkt der Analyse in der  $G_2$  bzw. M-Phase des Zellzyklus befanden und sich auf eine bevorstehende Kern- bzw. Zellteilung vorbereiteten. In Analogie zu den *Rsk2*-defizienten Zellen, konnte auch in Anwesenheit des Rsk-Inhibitors ein signifikant erhöhter Anteil an Zellen mit polyploidem DNA-Gehalt nachgewiesen werden.

Zusammenfassend konnte durch die Intervention mit dem Rsk-Inhibitor BI-D1870 der Mitose-Defekt *c-fos*-transgener *Rsk2*-defizienter Zellen reproduziert werden. Als nächstes stellte sich die Frage, ob BI-1870 das Verhalten der humanen OS-Zelllinie U2OS, in der das *Rsk2*-Zielgen *c-fos* nicht überexprimiert wird (Isfort et al. 1995), in ähnlicher Art und Weise beeinflusst.

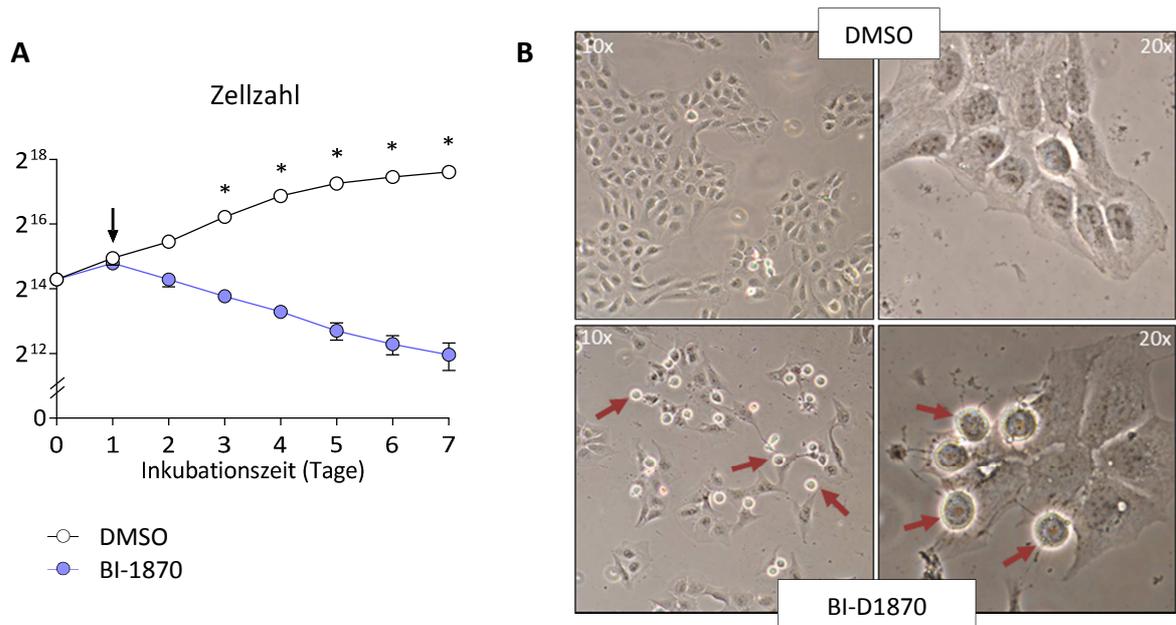


**Abb. 25: Bestimmung des DNA-Gehalts *c-fos*-transgener OS-Zelllinien in Anwesenheit von BI-D1870. (A)** Repräsentatives DNA-Histogramm der durchflusszytometrischen Messung einer *c-fostg* Zelllinie nach 24 h Inkubation mit BI-1870 [10  $\mu$ M] bzw. DMSO [0,1 %]. Dargestellt ist die Anzahl der Zellen gegen die Propidiumiodid (PI)-Intensität. **(B)** Quantifizierung des DNA-Gehalts von jeweils 3 *c-fostg* Zelllinien pro Bedingung (ZZ=Zellzyklus; G<sub>1</sub>,G<sub>2</sub>=„gap“, S=Synthese, M =Mitose). Mittelwert $\pm$ SD (n=3 Zelllinien pro Bedingung). (\*) Signifikante Unterschiede zwischen BI-D1870 und DMSO (p<0,05, Student t-Test).

### 3.7.5 Analyse des Effekts von BI-D1870 auf die humane OS-Zelllinie U2OS

#### 3.7.5.1 Proliferationsanalysen von U2OS Zellen in Anwesenheit von BI-D1870

Zur Untersuchung der Relevanz von Rsk2 als potentielles therapeutisches Zielprotein für die Osteosarkom-Therapie war es von Bedeutung, die Auswirkungen von BI-D1870 auf das proliferative Verhalten humaner Osteosarkomzellen zu untersuchen. Hierfür wurden Wachstumskurven für U2OS Zellen in Gegenwart von BI-D1870 erstellt. Wie bei den *c-fos*-transgenen Zelllinien war die Proliferation der Zellen durch Zugabe des Inhibitors im Vergleich zu den Kontrollen signifikant vermindert (Abb. 26A). Während des Inkubationszeitraums von 6 Tagen kam es sogar zu einer Abnahme der Zellzahl, was auf eine erhöhte Apoptoserate schließen ließ. Interessanterweise konnten in den BI-D1870-behandelten Kulturen neben mehrkernigen Zellen auch ein beachtlicher Anteil an großen abgerundeten Zellen beobachtet werden (Abb. 26B). Diese Morphologie weisen Zellen auf, die sich gerade in der Mitose befinden.

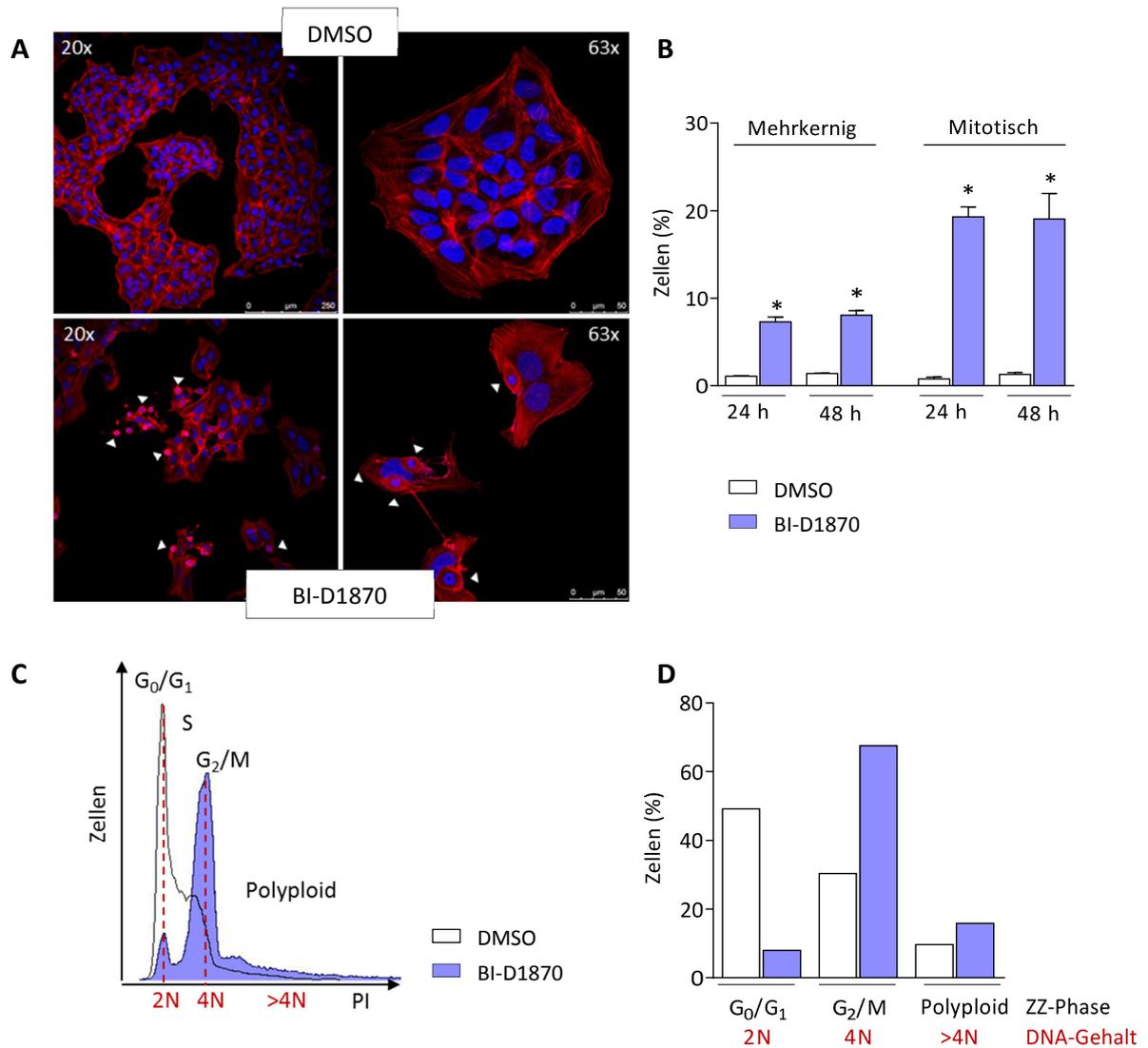


**Abb. 26: Effekt von BI-D1870 auf die Proliferation der humanen OS-Zelllinie U2OS. (A)** Wachstumskurven von U2OS Zellen in Gegenwart von BI-D1870 [10  $\mu$ M] bzw. DMSO [0,1 %]. Der Pfeil gibt den Zeitpunkt der Zugabe an. Ein Mediumwechsel erfolgte an jedem zweiten Tag. Mittelwert $\pm$ SD (n=3 Kulturen pro Bedingung). (\*) Signifikante Unterschiede zwischen den beiden Bedingungen zu einem bestimmten Zeitpunkt ( $p < 0,05$ , Two-Way ANOVA, Bonferroni's Posttest). **(B)** Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahme der U2OS Zellen in Kultur (10-fache und 40-fache Vergrößerung). Große abgerundete Zellen in den Kulturen mit BI-D1870 Intervention sind exemplarisch durch rote Pfeile gekennzeichnet.

### 3.7.5.2 Untersuchung des Auftretens mehrkerniger sowie mitotischer polyploider U2OS Zellen in Anwesenheit von BI-D1870

In Analogie zu den *c-fos*-transgenen Zelllinien wurden zur weiteren Analyse Fluoreszenzfärbungen der U2OS Zellen nach Zugabe von BI-D1870 durchgeführt. Die Markierung der DNA sowie des Aktin-Zytoskeletts ermöglichte die Visualisierung und Quantifizierung mehrkerniger Zellen. Da die BI-D1870-behandelten U2OS Kulturen vorwiegend durch das Auftreten mitotischer Zellen mit kondensiertem Heterochromatin geprägt waren (Abb. 27A), wurde der Anteil jener Zellen ebenso quantitativ ausgewertet. Wie erwartet konnten in den Kulturen, die für 24 bzw. 48 h in Anwesenheit von BI-D1870 gewachsen waren, ein signifikant höherer Anteil an mehrkernigen sowie mitotischen Zellen im Bezug zu den DMSO-Kontrollen nachgewiesen werden (Abb. 27B). Diese Beobachtungen spiegelten sich auch in den Analysen des DNA-Gehalts wider. So konnten nach 24 h in der BI-D1870 Kultur vorwiegend tetraploide (~70 %) und polyploide (~15 %) U2OS Zellen detektiert werden (Abb. 27C,D).

Schlussfolgernd schienen auch die U2OS Zellen durch die Inkubation mit dem Rsk-Inhibitor BI-D1870 zur Mitose gezwungen zu werden und durch abberante Kern- bzw. Zellteilungen als mehrkernige Zellen mit einem von der Norm abweichenden DNA-Gehalt zu akkumulieren.

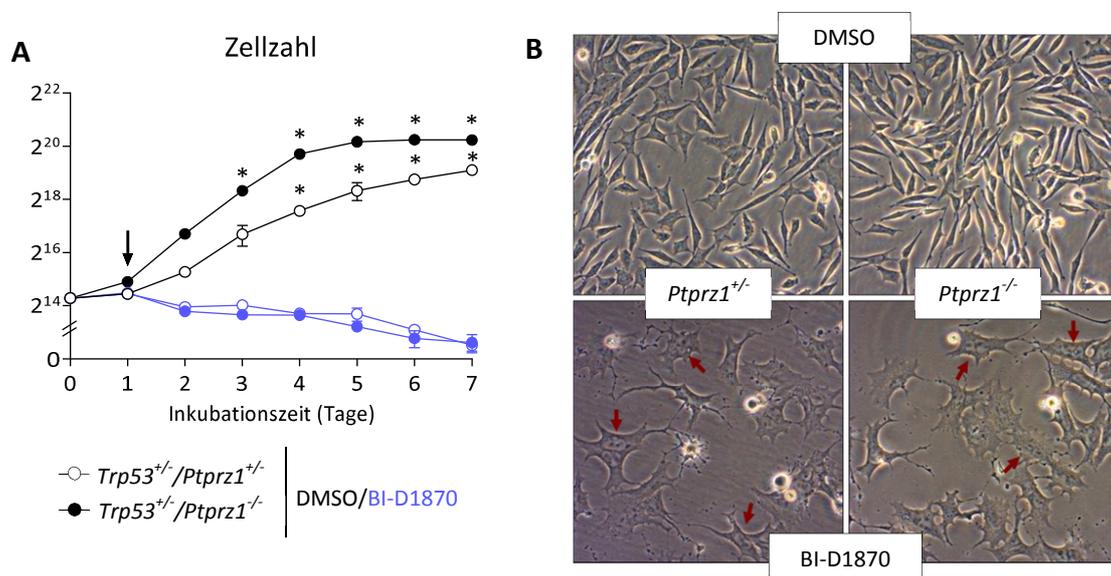


**Abb. 27: Nachweis mehrkerniger und mitotischer polyploider U2OS Zellen nach Inkubation mit BI-D1870.** (A) Repräsentative konfokale Aufnahmen der für 24 h in Gegenwart von BI-D1870 [10  $\mu$ M] bzw. DMSO [0,1 %] kultivierten Zelllinie U2OS nach Färbung von Aktin mittels Phalloidin (rot) und Kernfärbung mittels DAPI (blau) in 20- und 63-facher Vergrößerung (Maßstab: 250  $\mu$ m bei 20x, 50  $\mu$ m bei 63x). Mitotische Zellen sind exemplarisch durch weiße Pfeile gekennzeichnet. (B) Quantitative Auswertung des Anteils mehrkerniger sowie mitotischer Zellen nach 24 bzw. 48 h Kultivierung in Anwesenheit von BI-D1870 und DMSO. Pro Bedingung und Zeitpunkt wurden 3 zellbewachsene Coverslips angefärbt. Von jedem Coverslip wurden 7 Aufnahmen von unterschiedlichen Arealen angefertigt und quantitativ ausgewertet. Mittelwert $\pm$ SD (n=3 Kulturen pro Bedingung und Zeitpunkt). (\*) Signifikante Unterschiede zwischen BI-D1870 und DMSO zum jeweiligen Zeitpunkt ( $p < 0,05$ , Student t-Test). (C) Repräsentatives DNA-Histogramm der durchflusszytometrischen Messung von U2OS Zellen nach 24 h Inkubation mit BI-1870 [10  $\mu$ M] bzw. DMSO [0,1 %]. Dargestellt ist die Anzahl der Zellen gegen die Propidiumiodid (PI)-Intensität. (D) Quantitative Analyse des DNA- Gehalts (ZZ=Zellzyklus; G<sub>1</sub>,G<sub>2</sub>=„gap“, S=Synthese, M=Mitose).

### 3.8 Analyse des Effekts von BI-D1870 auf das Proliferationsverhalten *Trp53*-heterozygoter OS-Zelllinien mit hetero-bzw. homozygoter *Ptprz1*-Deletion

Da die U2OS Zellen hinsichtlich der *Trp53*-Expression Wildtyp-Status haben (Isfort et al. 1995), sollte abschließend geklärt werden, ob BI-D1870 auch die Proliferation von Zellen mit einem deletierten *Trp53*-Allel beeinflusst. Hierzu wurden Wachstumskurven für die in Abschnitt 3.4 beschriebenen *Trp53*-heterozygoten OS-Zelllinien *Trp53<sup>+/-</sup>/Ptprz1<sup>+/-</sup>* und *Trp53<sup>+/-</sup>/Ptprz1<sup>-/-</sup>* in Gegenwart von BI-D1870 erstellt. In Analogie zu den anderen BI-D1870-Proliferationsanalysen hatte die Zugabe des Inhibitors ein signifikant vermindertes Zellwachstum zur Folge und war zudem mit dem Auftreten mehrkerniger Zellen assoziiert (Abb. 28A,B). Diese Proliferationsdefekte konnten in beiden *Trp53*-heterozygoten Zelllinien in gleichem Ausmaß beobachtet werden und waren folglich unabhängig von der Anwesenheit der Phosphatase Rptpζ.

Demnach konnten in 2 unterschiedlichen murinen Osteosarkom-Modellen nachgewiesen werden, dass eine Inhibition von Rsk die Proliferationsrate transformierter Zellen negativ beeinflusst. Auf molekularer Ebene ist dieser Effekt möglicherweise die Konsequenz der durch Rsk2-Hemmung induzierten mitotischen Katastrophe.



**Abb. 28: Effekt von BI-D1870 auf die Proliferation *Trp53*-heterozygoter Zelllinien mit hetero- bzw. homozygoter *Ptprz1*-Deletion. (A) Wachstumskurven der OS- Zellen in Gegenwart von BI-D1870 [10  $\mu$ M] bzw. DMSO [0,1 %]. Der Pfeil gibt den Zeitpunkt der Zugabe an. Ein Mediumwechsel erfolgte an jedem zweiten Tag. Mittelwert $\pm$ SD (n=3 Kulturen pro Zelllinie und Bedingung). (\*) Signifikante Unterschiede zwischen BI-D1870 und den entsprechenden Kontrollen zu einem bestimmten Zeitpunkt (p<0,05, Two-Way ANOVA, Bonferroni's Posttest). (B) Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahme der Zelllinien in Kultur (20-fache Vergrößerung). Mehrkernige Zellen in den Kulturen mit BI-D1870 Intervention sind exemplarisch durch rote Pfeile gekennzeichnet.**

## 4 Diskussion und Ausblick

### 4.1 Die Rolle von Rptpζ als Osteoblasten-spezifischer Tumorsuppressor im Osteosarkom

#### 4.1.1 Einfluss von Rptpζ auf die Osteosarkom-Entstehung im *Trp53*-Mausmodell

Die Protein-Tyrosinphosphatase Rptpζ (*Ptprz1*) wurde erstmals in Zellen des zentralen Nervensystems entdeckt, wo sie auch ihre bisher wichtigsten nachgewiesenen Funktionen erfüllt (Krueger und Saito 1992; Levy et al. 1993). So wird Rptpζ vorwiegend von Astrozyten, Oligodendrozyten und Neuronen exprimiert und spielt im Nervensystem u.a. eine Rolle bei der Myelinisierung, dem Neuritenwachstum sowie der axonalen Wegfindung (Harroch et al. 2002; Hayashi et al. 2005, Shintani und Noda 2008). Daneben zeigten Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe, dass die Phosphatase auch im Knochen exprimiert wird und beim Prozess der Knochenformation von Bedeutung ist (Schinke et al. 2008).

Grundsätzlich gehört Rptpζ zur Superfamilie der PTPs, die in einem koordinierten Zusammenspiel mit den PTKs den zellulären Tyrosinphosphorylierungsstatus kontrollieren und somit bei der Regulation fundamentaler Prozesse wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose eine zentrale Funktion einnehmen (Stoker 2005). Ein Ungleichgewicht in der Aktivität beider Enzymklassen kann zur Entstehung von Tumorerkrankungen beitragen. So findet man in vielen Krebsarten eine onkogene Aktivierung von PTKs. Zudem gelten PTK-Inhibitoren in der Tumorthherapie bereits als etablierte Therapeutika (Hojjat-Farsangi 2014). Aufgrund ihrer dephosphorylierenden Eigenschaften werden die PTPs - als Gegenspieler der PTKs - meist als Tumorsuppressoren beschrieben und eine Inaktivierung von PTPs konnte bereits in verschiedenen Tumoren nachgewiesen werden (Julien et al. 2011). Auch für Rptpζ wurde von Diamantopoulou et al. (2010) eine mögliche Tumorsuppressorfunktion im Prostatakarzinom postuliert. So führte der shRNA-vermittelte *Ptprz1*-Knockdown in Prostatakarzinom-Zelllinien nicht nur *in vitro* zu einem erhöhten Migrationsverhalten dieser Zellen, sondern förderte auch *in vivo* deren metastatisches Potential nach Injektion in Nacktmäuse. Die putative Tumorsuppressorfunktion von Rptpζ bei anderen Tumorerkrankungen wurde bisher noch nicht beschrieben.

Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe deuteten darauf hin, dass Rptpζ bei der Pathogenese des Osteosarkoms als Tumorsuppressor fungieren könnte. So konnte Rptpζ als ein Marker terminal differenzierter Osteoblasten identifiziert werden, der *in vitro* einen hemmenden Einfluss auf die Proliferation dieser Zellen hat (Schinke et al. 2008). Diese Beobachtungen legten nahe, dass Rptpζ einen negativen Regulator der Osteoblastendifferenzierung darstellt, der im Verlauf der Reifung die

Proliferation inhibiert und letztlich einen postmitotischen Status in terminal differenzierten Osteoblasten induziert. Es stellte sich demnach die Frage, ob eine Defizienz von Rptpζ die Bildung von Osteosarkomen begünstigen könnte. Da bereits andere murine Defizienz-Modelle gezeigt haben, dass der alleinige Verlust einer Phosphatase in der Regel nicht ausreicht, um eine Tumorbildung zu initiieren (Hendriks et al. 2008), war es nicht verwunderlich, dass in *Ptprz1*-defizienten Mäusen bis zum Alter von 50 Wochen keine skelettalen Tumoren detektiert werden konnten (Schinke et al. 2008). Um die potentielle tumorsupprimierende Eigenschaft von *Ptprz1* weiter zu untersuchen, wurde aufgrund der häufigen Beteiligung an der Tumorgenese der Tumorsuppressor *Trp53* als Defizienzpartner gewählt (Wunder et al. 2005). So generierte unsere Arbeitsgruppe zunächst *Trp53/Ptprz1*-defiziente Mäuse. Da eine homozygote *Trp53*-Deletion in Mäusen allerdings mit einer frühen Letalität assoziiert ist (v.a. bedingt durch die Entstehung von Lymphomen, Jacks et al. 1994), wurden die Tiere bereits im Alter von 12 Wochen analysiert. Weder in den *Trp53/Ptprz1*-defizienten noch in den *Trp53*-defizienten Kontrolltieren konnten mittels Kontaktradiographie und histologischen Analysen der Wirbelsäule und der Tibia die Entwicklung von Knochentumoren detektiert werden (Baldauf et al. 2015).

Jedoch zeigten schon andere Osteosarkom-Studien an Mausmodellen, dass sich jene Knochentumoren in der Regel erst zu einem späteren Lebenszeitpunkt manifestieren (Walkley et al. 2008; Rauch et al. 2010). Daher wurden in der vorliegenden Arbeit Mäuse mit einer heterozygoten *Trp53*-Deletion (*Trp53*<sup>+/-</sup>) herangezogen, die aufgrund einer geringeren Prädisposition für Lymphome eine deutlich längere Lebensspanne aufweisen (Harvey et al. 1993, Jacks et al. 1994). Dieser Genotyp wurde ebenfalls mit einer *Ptprz1*-Defizienz (*Ptprz1*<sup>+/-</sup> und *Ptprz1*<sup>-/-</sup>) kombiniert und im Alter von 52 Wochen mittels Kontaktradiographie auf die Existenz von Osteosarkomen untersucht.

Folgende Hauptergebnisse wurden erzielt und sollen in den nächsten Abschnitten diskutiert werden.

- 1) *Ptprz1* ist ein Marker der terminalen Osteoblastendifferenzierung, der gewebespezifisch exprimiert wird.
- 2) Die Defizienz beider *Ptprz1*-Allele in *Trp53*-heterozygoten Mäusen erhöhte die Osteosarkom-Inzidenz signifikant von 0 % auf 19 %.
- 3)  $\mu$ CT- und histologische Analysen bestätigten das Vorliegen von Osteosarkomen und ermöglichten deren histologische Klassifizierung als „osteoblastisch“.
- 4) *In vitro* Analysen von Zelllinien, die aus *Ptprz1*<sup>+/-</sup> und *Ptprz1*<sup>-/-</sup> Osteosarkomen etabliert wurden, bestätigten die putative Tumorsuppressorfunktion von *Ptprz1* in *Trp53*-heterozygoten Mäusen.
- 5) Die Tumorsuppressorfunktion von *Ptprz1* in einem anderen murinen Osteosarkom-Modell, dem *c-fos*-transgenen Modell, konnte nicht bestätigt werden.

- 6) Midkine (Mdk) ist ein bekannter Rptpζ-Antagonist, der im humanen Osteosarkom häufig überexprimiert ist. Erste Analysen *Mdk*-defizienter *c-fos*-transgener Mäuse bestärkten die für Mdk beschriebene Relevanz im Osteosarkom und ließen eine indirekte Beteiligung von Rptpζ an der Tumorgenese des c-Fos-induzierten Osteosarkoms vermuten.

Zunächst wurde das *Ptprz1*-Expressionsprofil mittels qRT-PCR-Analysen in 9 verschiedenen Geweben aus Wildtyp-Mäusen bestimmt. Die Analysen zeigten eine spezifische Expression der Phosphatase im Gehirn, im Knochen sowie in der Lunge und bestätigten damit das bereits von unserer Arbeitsgruppe publizierte Expressionsmuster von *Ptprz1*, welches zu seiner Zeit semi-quantitativ mittels RT-PCR ermittelt worden war (Schinke et al. 2008). Zudem spiegelte das Expressionsprofil jene Gewebe wider, für die bereits eine physiologische bzw. pathophysiologische Rolle von Rptpζ beschrieben wurde. Denn neben der schon dargestellten Bedeutung der Phosphatase im Gehirn und im Knochen, wurde Rptpζ auch im Zusammenhang mit der Pathogenese des kleinzelligen Lungenkarzinoms erwähnt (Makinoshima et al. 2012). Eine pathophysiologische Rolle von Rptpζ ist zwar ebenso für das humane Nierenzellkarzinom beschrieben (Shang et al 2013), allerdings war *Ptprz1* bei unseren Untersuchungen im Nierengewebe nicht detektierbar. Ergänzend sei erwähnt, dass Prostatagewebe – jenes Organ, in dem bereits eine Tumorsuppressorfunktion von Rptpζ nachgewiesen wurde (Diamantopoulou et al. 2010) – in dem Kollektiv der insgesamt 9 analysierten Gewebe nicht enthalten war.

Weiterhin wurde die *Ptprz1*-Expression in primären murinen Osteoblastenkulturen zu verschiedenen Zeitpunkten der *ex vivo* Differenzierung untersucht. Die Ergebnisse verifizierten die Daten der 2008 von uns publizierten Affimetrix-Genchip-Analyse (Schinke et al. 2008). So nahm auch hier die *Ptprz1*-Expression im Laufe der osteoblastären Reifung kontinuierlich zu. Zudem konnten in dieser Arbeit erstmals die Osteoblasten als der *Ptprz1*-produzierende Knochenzelltyp identifiziert werden, da die Expression in Osteoklastenkulturen kaum nachweisbar war. In der Gesamtheit bestätigten die durchgeführten qRT-PCR-Analysen, dass es sich bei *Ptprz1* um einen Osteoblastendifferenzierungsmarker handelt, dessen Expression auf nur wenige Gewebe beschränkt ist. Die Erkenntnis, dass Rptpζ als Transmembranprotein gewebespezifisch exprimiert wird, war gerade im Hinblick auf eine potentielle Bedeutung von Rptpζ als therapeutisches Zielmolekül beim Osteosarkom von besonderem Wert.

Die zentrale Frage dieses Projekts war jedoch, ob die genetische Inaktivierung von *Ptprz1* in 52 Wochen alten *Trp53*-heterozygoten Mäusen die Bildung von Osteosarkomen zur Folge hat. In der Tat konnten mittels Kontaktradiographie in 5 % der *Trp53<sup>+/-</sup>/Ptprz1<sup>+/-</sup>* und in 19 % der *Trp53<sup>+/-</sup>/Ptprz1<sup>-/-</sup>* Mäuse Knochentumoren nachgewiesen werden, wohingegen die *Trp53<sup>+/-</sup>* Kontrolltiere keine

skelettalen Auffälligkeiten zeigten. Diese Beobachtungen bestärkten somit eindeutig die Hypothese einer Tumorsuppressorfunktion von Rptpζ im *Trp53*-heterozygoten Mausmodell. Die Tatsache, dass in keinen der insgesamt 24 analysierten *Trp53*-heterozygoten Kontrolltieren Knochentumore detektiert werden konnten, mag auf den ersten Blick etwas überraschend sein, da eine heterozygote *Trp53*-Keimbahnmutation sowohl beim Menschen (Li-Fraumeni-Syndrom; Srivastava et al. 1990) als auch bei Mäusen mit der Entstehung von Osteosarkomen assoziiert ist (Jacks et al. 1994). Allerdings zeigten unabhängige Untersuchungen *Trp53*-heterozygoter Mäuse, dass zu dem in dieser Arbeit angesetzten Analysezeitpunkt von 52 Wochen nur ca. 8 % der Tiere Osteosarkome entwickeln (Harvey et al. 1993; Jacks et al. 1994). Der Inzidenz Gipfel liegt bei 78 Wochen (Venkatachalam et al. 2001). Da zu jenem Lebenszeitpunkt allerdings auch etwa 50 % der Tiere infolge der Bildung von Lymphomen versterben, waren in unserem Versuchsaufbau keine Analysen zu einem höheren Lebensalter vorgesehen. Allerdings könnte auch eine eingeschränkte Sensitivität der eingesetzten kontaktradiographischen Screeningmethode dazu beigetragen haben, dass eine beginnende Osteosarkom-Entwicklung in *Trp53*-heterozygoten wie auch in den Tieren mit zusätzlicher *Ptprz1*-Defizienz nicht erfasst wurde. So ist dieses bildgebende Verfahren im Vergleich zur Mikro-Computertomographie nicht sensitiv genug, um kleinere fokale Läsionen sowie kortikale Veränderungen detailliert darzustellen. Da die Kontaktradiographie jedoch eine schnelle und einfache Analyse des gesamten Mausskeletts ermöglicht, eignete sich dieses Verfahren ideal für das Screening einer großen Anzahl von insgesamt 100 Tieren und daher auch zur Erstdiagnostik von größeren skelettalen Tumoren in *Trp53<sup>+/-</sup>/Ptprz1<sup>+/-</sup>* und *Trp53<sup>+/-</sup>/Ptprz1<sup>-/-</sup>* Mäusen.

An dieser Stelle sei erwähnt, dass die Tiere nicht gezielt auf die Entstehung von Lymphomen oder anderen Weichteilsarkomen sowie auf die Bildung von Lungenmetastasen untersucht wurden. Bei der Präparation der Mäuse erfolgte stets eine sorgfältige makroskopische Begutachtung aller entnommenen Organe. Da allerdings keine auffälligen Veränderungen des lymphatischen oder pulmonalen Gewebes festgestellt werden konnten – wie es in anderen Studien der Fall war (Walkley et al. 2008; Hashizume et al. 2012; Moriarity et al. 2015) – wurden keine weiteren histologischen Analysen einzelner Organe vorgenommen.

Was die Lokalisation der identifizierten Osteosarkome betrifft, war die Wirbelsäule am häufigsten beteiligt (58 %), gefolgt vom Röhrenknochen (Femur/Tibia, 25 %) sowie dem Rippenbogen (17 %). Beim Menschen entstehen Osteosarkome hingegen primär im Röhrenknochen und nur sehr selten an der Wirbelsäule oder in den Rippen (Nathrath et al. 2011). Diese Diskrepanz wurde auch schon von anderen Arbeitsgruppen beobachtet (Mohseny et al. 2010; Kansara et al. 2013; Zhao et al. 2015). Somit bestätigten unsere Ergebnisse, dass sich die Lokalisation von Osteosarkomen beim Menschen und der Maus unterscheidet.

Zusätzlich reihten sich auch die histologischen Analysen der Tumoren in andere Osteosarkom-Studien ein. So entsprachen diese den Kriterien eines osteoblastischen Osteosarkoms: Das Tumorgewebe war geprägt durch die Bildung von Osteoid bzw. mineralisierter Matrix und die Bildung von Knochensubstanz erfolgte unmittelbar – ohne knorpelige Zwischenstufen. Äquivalente histologische Klassifizierungen konnten auch in Mäusen mit einer Osteoblasten-spezifischen Inaktivierung von *Trp53* vorgenommen werden (Walkley et al. 2008; Zhao et al. 2015). Darüber hinaus entsprach dieser Phänotyp im Wesentlichen auch den Charakteristika eines humanen osteoblastischen Osteosarkoms, wobei sich jene im Allgemeinen durch eine größere intra- und intertumorale histologische Heterogenität und Komplexität auszeichnen (Unni 2005).

Besonders hervorzuheben ist, dass die *in vivo* diagnostizierte tumorunterdrückende Eigenschaft von Rptp $\zeta$  in *Trp53*-heterozygoten Mäusen durch *ex vivo* Untersuchungen untermauert wurde. Kurz- und Langzeit-Proliferationsanalysen (24 h bzw. 7 d) von Zelllinien, die aus je einem *Trp53<sup>+/-</sup>/Ptpz1<sup>+/-</sup>* und *Trp53<sup>+/-</sup>/Ptpz1<sup>-/-</sup>* Osteosarkom generiert wurden, zeigten, dass die *Ptpz1*-defizienten Kulturen signifikant schneller proliferierten als die Heterozygoten. Eine mögliche Ursache für dieses unterschiedliche Proliferationspotential mag der abweichende zelluläre Tyrosinphosphorylierungsstatus sein, der mittels SH2-Profilings festgestellt wurde. So korrelierte die gesteigerte Proliferation *Ptpz1*-defizienter Zellen mit einer verstärkten Tyrosinphosphorylierung intrazellulärer Substrate. Erste Versuche eines spezifischen Nachweises bekannter Rptp $\zeta$ -Substrate in *Ptpz1*-defizienten Zelllysaten blieben bislang erfolglos (Daten nicht gezeigt). Beispielsweise konnte das G-protein gekoppelte Rezeptor Kinase Interaktionsprotein Git1 (Kawachi et al. 2001), welches u.a. die Proliferation von Osteoblasten fördert (Wu et al. 2014), weder mittels Western-Blot-Analysen noch mittels Immunpräzipitation in den OS-Zelllysaten nachgewiesen werden. Weitere Rptp $\zeta$ -Substrate, die man in der Fachliteratur findet, sind  $\beta$ -Catenin (Meng et al. 2000),  $\beta$ -Adducin (Pariser et al. 2005), Fyn (Pariser et al. 2005), MAGI-3 (Adamsky et al. 2003) und p190RhoGAP (Tamura et al. 2006). Der genaue Mechanismus der Rptp $\zeta$ -vermittelten zellulären Signalübertragung ist jedoch noch nicht bekannt. Interessanterweise zeigten Diamantopoulou et al. (2010), dass das metastatische Potential von Rptp $\zeta$  in Prostatakarzinom-Zelllinien durch die Herunterregulierung der Kinasen Src und FAK vermittelt wurde und auch Erk1/2 sowie PTEN beim Rptp $\zeta$ -Signaling eine Rolle spielten. Da auch jene Signaltransduktionsprozesse von Rptp $\zeta$  mittels Western-Blot-Analysen nicht verifiziert werden konnten (Daten nicht gezeigt), wurde in der vorliegenden Arbeit ein anderer Ansatz zur Identifizierung von Rptp $\zeta$ -Substraten verfolgt – das sog. *Substrate trapping*. Diese Methode beruht auf der Generierung von PTP-Mutanten, die ihre tyrosinphosphorylierten Substrate binden können, jedoch keinerlei katalytische Aktivität mehr aufweisen (Blanchetot et al. 2005). Bei einer Inkubation

mit geeigneten Zellysaten bleiben diese Mutanten somit stabil mit ihren Substraten assoziiert, während die entsprechenden Wildtyp-Phosphatasen ihre Substrate nach der Dephosphorylierung wieder freisetzen. In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Dr. Peter Nollau (Forschungsinstitut Kinderkrebs-Zentrum Hamburg) wurde bereits eine für das *Substrate trapping* taugliche Rptpζ-Mutante generiert (C/S Mutante, Kapitel 3.6.2) sowie deren katalytische Aktivität verifiziert (Daten nicht gezeigt). Auch wenn die entsprechenden *Pulldown*-Experimente sowie die Analyse der potentiellen Substrate mittels Massenspektrometrie noch ausstehen, lässt sich an dieser Stelle festhalten, dass es sich bei der Methode um einen vielversprechenden Ansatz zur Entschlüsselung der intrazellulären Rptpζ-Mediatoren handelt.

Weiterhin waren unter den *in vitro* Versuchen insbesondere die Proliferationsanalysen der OS-Zelllinien in Anwesenheit von Mdk von Bedeutung. Mdk ist neben Pleiotrophin eines der beiden Heparin-bindenden Wachstumsfaktoren, die als Liganden von Rptpζ identifiziert wurden (Maeda et al. 1996; 1999). Genauer gesagt, handelt es sich bei diesen Zytokinen um Antagonisten, die mit den Glykosaminoglykan-Seitenketten benachbarter Rptpζ Rezeptoren interagieren und durch die induzierte Oligomerisierung deren Phosphatase-Aktivität inhibieren (Meng et al. 2000; Fukada et al. 2006). Beide Faktoren spielen eine Rolle im Knochenstoffwechsel. Hinsichtlich der Entstehung von Osteosarkomen ist allerdings die Mdk/Rptpζ Interaktion von besonderem Interesse, da *MDK* im humanen OS häufig überexprimiert ist (Maehara et al. 2007; Sueyoshi et al. 2012). Sueyoshi et al. (2012) zeigten zudem, dass rekombinantes Mdk einen pro-proliferativen Effekt auf die humane Osteosarkom-Zelllinie 143B hat. Jene Beobachtungen ließen sich auch in unserem System reproduzieren. Interessanterweise erbrachten die Proliferationsanalysen der murinen OS-Zelllinien, dass das zugesetzte rekombinante Mdk lediglich die Proliferation der *Ptprz1*-heterozygoten Kulturen förderte – das Wachstum der *Ptprz1*-defizienten Linie blieb hingegen unbeeinflusst. Dies deutete daraufhin, dass der durch Mdk vermittelte Effekt tatsächlich von der Interaktion mit Rptpζ abhängt. Auch wenn der Zusammenhang zwischen Mdk und Rptpζ in der Pathogenese des Osteosarkoms noch weiteren Untersuchungen bedarf, deuten diese Ergebnisse auf einen interessanten potentiellen Ansatzpunkt zur Osteosarkom-Therapie hin.

Die für Mdk beschriebene Relevanz im Osteosarkom wurde in dieser Arbeit auch am *c-fos*-transgenen Mausmodell aufgezeigt. So erbrachten erste kontaktradiographische Analysen *c-fostg/Mdk<sup>-/-</sup>* Mäuse, dass die durchschnittliche Anzahl an Osteosarkomen in *c-fos*-transgenen Mäusen durch die Defizienz von *Mdk* deutlich abnahm. Um eine definitive Aussage zu machen, bedarf es jedoch höherer Fallzahlen sowie weiterer molekularbiologischen Untersuchungen.

Die putative Tumorsuppressorfunktion von Rptp $\zeta$  konnte im *c-fos*-transgenen Mausmodell allerdings nicht bestätigt werden – die OS-Inzidenz *c-fos*-transgener Mäuse nahm durch die zusätzliche Defizienz von *Ptprz1* sogar ab. Nichtsdestotrotz ist eine Beteiligung von Rptp $\zeta$  an der Tumorgenese im *c-fos*-transgenen Modell nicht ausgeschlossen, da Rptp $\zeta$  auch indirekt durch Wechselwirkungen mit Mdk Einfluss auf die Osteosarkom-Entstehung nehmen könnte.

#### 4.1.2 Die Rolle von Rptp $\zeta$ im humanen Osteosarkom

Nach Etablierung der tumorunterdrückenden Funktion von Rptp $\zeta$  im *Trp53*-Mausmodell stellte sich die Frage, ob die Phosphatase auch im humanen Osteosarkom als Tumorsuppressor fungiert. Hierfür wurde zunächst in der vom Sanger Institut bereitgestellten COSMIC-Datenbank, die detaillierte Informationen zu somatischen Mutationen diverser humaner Krebserkrankungen speichert (Forbes et al. 2015), nach bereits identifizierten *PTPRZ1*-Mutationen im Osteosarkom gesucht. Jedoch waren hierzu keine Einträge hinterlegt. Interessanterweise fanden wir eine Mutation in dem Gen einer anderen Rezeptor-Proteintyrosinphosphatase, und zwar Rptpp, kodiert von *PTPRT* (Daten nicht gezeigt). Um auszuschließen, dass die Funktionen von Rptp $\zeta$  in humanen Zellen von einem anderen Mitglied der PTP Familie ausgeübt wird – äquivalent zum Beispiel der Dephosphorylierung des Insulin Rezeptors, die in murinen Osteoblasten von OST-PTP und in humanen Osteoblasten von PTP $\beta$  vermittelt wird (Ferron et al, 2010), untersuchten wir die Expression von *PTPRZ1* und *PTPRT* im Verlauf der osteogenen *ex vivo* Differenzierung humaner Osteoblasten und humaner OS-Zelllinien (SaOS-2 und U2OS). Während *PTPRT* in keiner der Kulturen detektierbar war (Daten nicht gezeigt), zeigte die *PTPRZ1* Expression in allein 3 Zelltypen dieselbe Kinetik wie in primären murinen Osteoblasten. Darüber hinaus führte die Transfektion eines Rptp $\zeta$ -Expressionsplasmids in humanen OS-Zelllinien zu einer signifikanten Verminderung der Proliferation, wodurch ebenso die Rolle von Rptp $\zeta$  als negativer Regulator der Osteoblastenproliferation in humanen Zellen bestätigt wurde. Demnach schien Rptp $\zeta$  in murinen und humanen Osteoblasten ähnliche Funktionen auszuüben – zumindest *in vitro*.

In Zusammenarbeit mit dem Knochentumor-Referenzzentrum des Universitätsspitals Basel (PD Dr. Daniel Baumhoer) wurden weiterhin SNP-Datensätze von 160 humanen Osteosarkomen und Exom-Daten von 17 sequenzierten OS-Geweben auf Kopienzahlveränderungen sowie etwaige Mutationen im *PTPRZ1*-Gen untersucht. Wie bei der COSMIC-Datenbank-Analyse konnten auch hier keine besonderen Veränderungen, die auf eine Beteiligung von *PTPRZ1* bei der Pathogenese des Osteosarkoms beim Menschen hindeuten, identifiziert werden. Bei der Analyse der Exomsequenzierten Osteosarkome wurde zwar eine heterozygote Keimbahnmutation im *PTPRZ1*-Gen detektiert, allerdings zeigten anschließende Transfektionsversuche eines Rptp $\zeta$ -Expressionsplasmids

in humanen OS-Zelllinien, dass jene Mutation keine funktionelle Beeinträchtigung der antiproliferativen Aktivität des Rptp $\zeta$ -Proteins zur Folge hatte.

Zusammenfassend gibt es derzeit keine Hinweise auf eine Rolle von Rptp $\zeta$  als Tumorsuppressor beim Osteosarkom des Menschen. Da jedoch bekannt ist, dass Mdk – als Ligand von Rptp $\zeta$  – in humanen Osteosarkom-Geweben verstärkt exprimiert wird und die Anwendung eines Mdk-spezifischen Antikörpers im Mausmodell sowohl *in vitro* als auch *in vivo* das Osteosarkom-Wachstum minimierte (Sueyoshi et al. 2012), kann eine indirekte Beteiligung von Rptp $\zeta$  im nicht mutierten Status bei der Pathogenese des humanen Osteosarkoms nicht ausgeschlossen werden. So bleibt festzuhalten, dass Rptp $\zeta$  ein Membranprotein ist, das gewebespezifisch exprimiert wird. Eine gezielte Antagonisierung der Mdk/Rptp $\zeta$  Interaktion stellt demnach einen potentiellen Ansatz in der Osteosarkom-Therapie dar.

An dieser Stelle sei allerdings nochmals darauf hingewiesen, dass die Osteosarkom-Forschung aufgrund der Seltenheit dieser Erkrankung, der genomischen Komplexität sowie der inter- und intratumoralen Heterogenität sehr schwierig ist (Stephens et al. 2011; Martin et al. 2012; Kansara et al. 2014). Die überwiegende Mehrzahl der humanen Osteosarkome weisen zwar Mutationen im *P53*-Gen auf, jedoch ist es trotz intensiver Forschung auf diesem Gebiet bisher nicht möglich eine definierte Abfolge genetischer Veränderungen zu identifizieren. Zudem zeigen neuere Untersuchungen, dass Osteosarkome weniger mit somatischen Mutationen, sondern vielmehr mit numerischen sowie strukturellen Veränderungen einzelner bzw. mehrerer Chromosomen assoziiert sind (Martin et al. 2012). So wurde erst kürzlich ein neuer Mechanismus beschrieben, bei dem es durch ein einmaliges Ereignis zu einer Vielzahl von Umlagerungen von Chromosomenabschnitten kommt (Stephens et al. 2011). Bei diesem als „Chromothripsis“ bezeichneten Mechanismus geht man davon aus, dass einzelne oder mehrere Chromosomen in Stücke zerreißen und es beim Zusammenbauen neben rearrangierten Chromosomen auch zum Verlust chromosomaler Abschnitte sowie zu extrachromosomal amplifizierten Regionen kommt (Holland und Cleveland 2012). Entdeckt wurde dieses Phänomen bei einem Patienten mit chronisch lymphatischer Leukämie und man geht davon aus, dass es bei der Pathogenese von etwa 2-3 % aller Krebsarten eine Rolle spielt (Stephens et al. 2011). Interessanterweise wurden Chromothripsis-Muster in 33 % primärer Osteosarkome nachgewiesen (Kansara et al. 2014). Welche zellulären bzw. molekularen Mechanismen Chromothripsis bewirken und welche Konsequenzen dieses Ereignis für die Therapie des Osteosarkoms haben könnte, ist allerdings noch nicht verstanden und daher aktuell Gegenstand vieler Untersuchungen.

## 4.2 Die Rolle von Rsk2 bei der c-Fos-induzierten Osteosarkom-Entstehung

Die Ser/Thr Kinase Rsk2 gehört zur Familie der Ribosomalen S6 Kinasen, die in einer Vielzahl von Geweben exprimiert werden und eine Rolle bei der Regulierung des Zellzyklus, der Proliferation sowie der Differenzierung spielen (Anjum und Blenis 2008). Sowohl beim Menschen als auch bei der Maus umfasst diese Familie 4 Mitglieder, welche charakteristischerweise 2 – durch eine linker Region verbundene – Kinase Domänen besitzen (Frödin und Gammeltoft 1999, Hauge und Frödin 2006). Die Aktivierung von Rsk2 erfolgt durch sequentielle Phosphorylierung von der MAP-Kinase ERK und der Pi3-Kinase-abhängigen Kinase PDK1 als Antwort auf Wachstumsfaktoren, Chemokine oder andere extrazelluläre Stimuli. Unter den Rsk2-spezifischen Substraten befinden sich Proteine, die u.a. mit der Entwicklung von Tumoren assoziiert sind. Zu nennen sind beispielsweise p53 (Cho et al. 2005), Bad (Bonni et al. 1999), Histon H3 (Sassone-Corsi et al. 1999), CREB (Xing et al. 1996) oder c-Fos, welches mit der Entstehung von Osteosarkomen assoziiert ist (De Cesare et al. 1998; David et al. 2005). In der Tat wurde eine verstärkte Aktivierung von Rsk2 im Zusammenhang mit der Entwicklung und Progression diverser Tumorarten wie Kopf-Hals-Tumoren (Kang et al. 2010), der Myeloischen Leukämie (Elf et al. 2011), dem Mammakarzinom (Stratford et al. 2012) und eben dem Osteosarkom (David et al. 2005) beschrieben.

Die Arbeitsgruppe um Dr. Jean-Pierre David (UKE, Hamburg) beschäftigt sich seit geraumer Zeit mit der Untersuchung der Rolle von Rsk2 im Skelettsystem. Dass Rsk2 im Knochen von Bedeutung ist, ergab sich aus dem bereits 1966 beschriebenen Coffin-Lowry-Syndrom – eine X-Chromosomal vererbte Form geistiger Behinderung, welche durch inaktivierende Mutationen im humanen *Rsk2*-Gen verursacht wird (Coffin et al. 1966, Lowry et al. 1971, Pereira et al. 2010). Interessanterweise sind neben der mentalen Retardierung v.a. skelettale Auffälligkeiten – wie ein gestörtes Knochenwachstum, ein fortschreitender Verlust der Knochenmasse und kraniofaziale Dystrophien – die vorherrschenden Symptome. Untersuchungen am *Rsk2*-defizienten Mausmodell erbrachten, dass Rsk2 essentiell für die Differenzierung sowie die Funktion von Osteoblasten ist (Yang et al. 2004) und unter inflammatorischen Bedingungen eine protektive Wirkung auf den Knochen hat (Böhm et al. 2012). Basierend auf *in vitro* Untersuchungen, die zeigten, dass die Rsk2-abhängige Phosphorylierung des Proto-Onkogens c-Fos die Stabilität und damit die transformierende Aktivität dieses Proteins moduliert (Chen et al. 1996), untersuchten David und Kollegen die Rolle von Rsk2 im c-Fos-induzierten Osteosarkom. In der Tat konnten sie 2005 zeigen, dass die c-Fos-abhängige Osteosarkom-Progression in Mäusen mit einer zusätzlichen *Rsk2*-Defizienz (*c-fostg/Rsk2<sup>-/-</sup>*) deutlich gestört ist (David et al. 2005). Der Mechanismus, über den der protektive Effekt der *Rsk2*-Inaktivierung vermittelt wird, ist jedoch noch nicht vollständig verstanden und war Gegenstand der

Untersuchung in der vorliegenden Arbeit. Darüber hinaus sollte die Bedeutung von Rsk2 als potentielles Zielprotein für die Osteosarkom-Therapie evaluiert werden.

Folgende Ergebnisse wurden erzielt, die in den nächsten Abschnitten diskutiert werden.

- 1) *Rsk2*-defiziente Osteosarkome *c-fos*-transgener Mäuse zeigten eine erhöhte Expression von Mitose-Genen.
- 2) Vergleichende Analysen *c-fos*-transgener und *c-fos*-transgener *Rsk2*-defizienter Zelllinien, die aus Osteosarkomen der Mäuse generiert wurden, erbrachten, dass die Inaktivierung von *Rsk2* mit einem Proliferationsdefekt sowie mit dem vermehrten Auftreten mehrkerniger polyploider Zellen assoziiert war.
- 3) Dieser Phänotyp konnte durch die pharmakologische Rsk-Inhibition mittels BI-D1870 sowohl in *c-fos*-transgenen als auch in den oben beschriebenen *Trp53*-heterozygoten sowie in humanen U2OS Zellen reproduziert werden.

#### **4.2.1 Expressionsanalysen deuten auf einen Mitose-Block in *c-fos*-transgenen *Rsk2*-defizienten Osteosarkomen hin**

Die Auswertung einer genomweiten Expressionsanalyse *c-fos*-transgener Osteosarkome erbrachte, dass die Defizienz von *Rsk2* eine divergierende Expression von Zellzyklus-assoziierten-Genen zur Folge hatte. Zur Verifikation der Microarray-Daten wurden einige dieser differentiell regulierten Gene mittels qRT-PCR analysiert. Hierbei bestätigte sich eine verminderte Expression von G<sub>1</sub>-Phase-Genen sowie eine erhöhte Expression von S-, G<sub>2</sub>- und v.a. M-Phase-Genen in Abwesenheit von *Rsk2*. Diese Ergebnisse waren verwunderlich, da unsere Arbeitsgruppe in vorherigen Untersuchungen gezeigt hatte, dass die intratumorale Proliferation transformierter Zellen in jenen Osteosarkomen signifikant vermindert und die Apoptoserate signifikant erhöht war (David et al. 2005).

Als Hypothese – weshalb proliferationsinhibierte Osteosarkome verstärkt Wachstumsfördernde Gene exprimieren – ergab sich das Vorliegen eines Mitose-Blocks in den *Rsk2*-defizienten Tumoren. Das bedeutet, dass die Zellen in Abwesenheit von *Rsk2* zum Großteil in der M-Phase des Zellzyklus arretieren, ihre Teilungsfähigkeit verlieren und es infolge fehlerhafter Mitosen zu einer verminderten Proliferation bzw. zum programmierten Tod jener Zellen kommt. Diesen Mechanismus bezeichnet man im Allgemeinen als „Mitotische Katastrophe“ (Castedo et al. 2004; Vitale et al. 2011; Galluzzi et al. 2011). Es handelt sich hierbei um einen zelleigenen onkosuppressiven Schutzmechanismus, der im gesunden Organismus beispielsweise bei DNA- oder Mitosespindelschäden eintritt und dem Erhalt der genetischen Integrität dient (Okada und Mak 2004; Vakifahmetoglu et al. 2008). Ob der protektive Effekt der *Rsk2*-Inaktivierung auf die Osteosarkom-Entstehung *c-fos*-transgener Mäuse tatsächlich über den Mechanismus der mitotischen

Katastrophe vermittelt wird, wurde im weiteren Verlauf an Zelllinien, die aus Osteosarkomen von je 3 unabhängig voneinander präparierten Tieren generiert worden waren, untersucht.

#### 4.2.2 Proliferations- und Mitose-Defekt in *c-fos*-transgenen *Rsk2*-defizienten OS-Zelllinien

Wie bereits im Osteosarkom-Gewebe gezeigt (David et al. 2005), konnte die verminderte Proliferationsrate in Abwesenheit von *Rsk2* auch in den entsprechenden OS-Zelllinien nachgewiesen werden (vgl. Wachstumskurven von *c-fostg* und *c-fostg/Rsk2<sup>-/-</sup>*). Der Proliferationsdefekt in *Rsk2*-defizienten Kulturen war zudem assoziiert mit dem vermehrten Auftreten multinukleärer polyploider Zellen, die z.T. multipolare Mitosespindeln aufwiesen. Dieser Phänotyp beschreibt exakt die charakteristischen morphologischen Merkmale der mitotischen Katastrophe, wie sie beispielsweise auch in humanen Jurkat-T-Zellen, chronisch myeloischen Leukämiezellen oder malignen Gliomzellen nach Inkubation mit DNA-schädigenden Substanzen bzw. nach gezielter Inaktivierung Mitose-relevanter Gene (z.B. Survivin) beschrieben wurden (Caruso et al. 2011; Hendruschk et al. 2011; Maskey et al. 2013; Mc Gee 2015).

Die genauen molekularen Mechanismen, denen die mitotische Katastrophe unterliegt, sind aktuell jedoch noch nicht verstanden (Mc Gee 2015). Besonders im Fokus steht hierbei der Übergang von der G<sub>2</sub>-Phase in die M-Phase des Zellzyklus, der durch den Cyclin B1/Cdk1 Komplex gesteuert wird. Bei DNA-Schäden verhindert normalerweise der sog. G<sub>2</sub>/M-Kontrollpunkt die Aktivierung der Cyclin-abhängigen Kinase Cdk1 und somit den Eintritt in die Mitose. Ein aktiver G<sub>2</sub>/M-Kontrollpunkt induziert demnach einen G<sub>2</sub>-Phase Arrest, welcher der Zelle Zeit zur Reparatur von DNA-Schäden verschafft (Kastan und Bartek 2004). Daher ist es nicht überraschend, dass Defekte dieses Kontrollpunktes durch Inaktivierung beteiligter Gene mit der mitotischen Katastrophe assoziiert sind. Dies wurde beispielsweise für die Effektorinasen Chek1 und Chek2 beschrieben (Chen et al. 2003; Castedo et al. 2004). Interessanterweise erbrachten die qRT-PCR-Expressionsdaten *c-fos*-transgener Osteosarkome hingegen eine erhöhte Expression beider Kinasen in *Rsk2*-defizienten Tumoren. Allerdings schien in diesem Falle kein erfolgreicher G<sub>2</sub>-Arrest induziert worden zu sein, denn die *Rsk2*-defizienten Osteosarkome zeigten zudem gesteigerte Expressionswerte für Cyclin B1(*Ccnd1*) und Cdk1, welche den Übertritt sowie die Progression durch die Mitose-Phase regulieren. Dies zeigt deutlich, dass die beteiligten Effektoren, die für den oben beschriebenen Phänotyp der mitotischen Katastrophe verantwortlich ist, sowohl auf mRNA- als auch Proteinebene noch eingehender untersucht werden müssen.

Ebenso betrifft dies das Schicksal jener mehrkernigen polyploiden Zellen. So wurde die mitotische Katastrophe sowohl mit den Prozessen der Apoptose als auch mit der Nekrose sowie der

der Zellseneszenz assoziiert (Vakifahmetoglu et al. 2008; Al-Ejeh et al. 2010; Vitale et al. 2011; Galluzzi et al. 2012). Für die Apoptose innerhalb der mitotischen Katastrophe sind zwei Wege beschrieben. Einer ist p53-unabhängig und löst einen Zelltod direkt in der Mitose-Phase aus. Der zweite Weg wird in der G<sub>1</sub>-Phase nach abberanten Mitosen induziert. Hier sterben die polyploiden Zellen p53-abhängig ab (Castedo et al. 2004, Mc Gee et al. 2015). Welches Schicksal die *Rsk2*-defizienten *c-fos*-transgenen Zellen betrifft, wurde in der vorliegenden Arbeit noch nicht hinreichend analysiert. Auch wenn im *Rsk2*-defizienten Osteosarkom-Gewebe bereits eine erhöhte Apoptoserate (erhöhter Anteil TUNEL-positiver Zellen; David et al. 2005) nachgewiesen wurde, muss der Vorgang der Apoptose noch detaillierter auf zellulärer und molekularer Ebene analysiert werden. Für eine umfassende Charakterisierung des protektiven Effekts der *Rsk2*-Inaktivierung auf die Osteosarkom-Entstehung ist es im weiteren Verlauf dieses Projekts von besonderer Bedeutung, die pro-onkogene Rolle von *Rsk2* während der Replikation der OS-Zellen genauer zu beschreiben. Dies umfasst vor allem die Identifizierung von *Rsk2*-Substrate sowie die Untersuchung des Einflusses jener Substrate auf die Proliferation der Tumorzellen. Zusammenfassend belegten die *in vitro* Untersuchungen der OS-Zelllinien eindeutig einen Mitose-Defekt *c-fos*-transgener Osteosarkomzellen in Abwesenheit von *Rsk2*. Auch wenn die genauen molekularen Regulationsmechanismen noch genauer untersucht werden müssen, erfüllen die dargestellten Beobachtungen in *Rsk2*-defizienten OS-Zellen die wesentlichen morphologischen Charakteristika der mitotischen Katastrophe.

#### **4.2.3 *Rsk2* als potentielles Zielmolekül zur Eliminierung von Osteosarkomzellen durch Induktion der mitotischen Katastrophe**

Die medikamentöse Tumorthherapie stellt neben der Chirurgie und der Bestrahlung eine der wichtigsten Säulen in der Behandlung von Krebserkrankungen dar. Hierbei unterscheidet man die tumorspezifisch wirksame zielgerichtete Therapie (*targeted therapy*) von der konventionellen Chemotherapie, die unspezifisch auf alle stark-proliferierenden Gewebe wirkt (Freissmuth 2012). Erstere richtet sich gegen bestimmte Komponenten von Signalwegen – wie Liganden, Rezeptoren oder Signalmoleküle – die verstärkt im Tumorgewebe exprimiert bzw. aktiviert werden. Während jene Therapeutika vor allem zytostatische (wachstumshemmende) Eigenschaften haben, wirken die Medikamente der Chemotherapie vorwiegend zytotoxisch (zellschädigend). Chemotherapeutika erzielen ihre Wirkung u.a. durch Interaktion mit der DNA bzw. mit DNA-Bausteinen sowie deren Synthese. Bei der Therapie des Osteosarkoms kommen aktuell eine Kombination aus Folsäure-Antagonisten in Form von Methotrexat; Anthracyclin-Antibiotika in Form von Doxorubicin sowie DNA-Replikationshemmern in Form von Cisplatin zum Einsatz (Kansara et al. 2014).

Ein weiterer therapeutischer Ansatzpunkt, der bei vielen Krebsformen erfolgreich adressiert wird, ist die Hemmung der Mitose-Phase. Jene zytotoxischen Spindelgifte inhibieren entweder die Polymerisation oder die Depolymerisation der Mikrotubuli, die den Spindelapparat bilden (Freissmuth 2012). Mitosehemmstoffe zeichnen sich einerseits durch eine extrem hohe Wirksamkeit auf schnell-proliferierende Zellen aus, andererseits bedingen sie aus eben diesem Grund auch ein häufiges Auftreten starker Nebenwirkungen (u.a. Neurotoxizität). Daher liegt die Überlegung nahe, ob eine gezielte (*targeted*) aber gleichzeitig auch zytotoxische Therapie entarteter Zellen möglich ist. Als Angriffspunkt eignet sich hier wiederum besonders die Mitose, da sie die vulnerabelste Phase des Zellzyklus darstellt (Chan et al. 2012). Interessanterweise sind Tumorzellen aufgrund ihrer erhöhten genomischen Instabilität wesentlich anfälliger für die Induktion des Zelltodes durch mitotische Katastrophe als nicht transformierte Zellen (Janssen et al. 2009). So zielen neuere Untersuchungen der medikamentösen Tumorthherapie auf die Identifizierung von Signalwegen bzw. Signalmolekülen ab, über die ein solcher spezifischer onkosuppressiver Mechanismus initiiert werden kann. Unter den bisher identifizierten potentiellen Targets befindet sich beispielsweise die Mikrotubuli-assoziierte Aurora Kinase A, die vor allem an der Regulation des Eintritts in die Mitose beteiligt ist (Marumoto et al. 2002) und in vielen Krebsarten überexprimiert vorliegt. Alisertib, ein potenter und selektiver Inhibitor dieser Kinase, ist bereits in Phase III Studien bei der Therapie des peripheren T-Zell-Lymphoms in der klinischen Erprobung (Malumbres und de Castro 2014, Kobayashi et al. 2015).

## 5 Zusammenfassung

Das Osteosarkom (OS) – ein äußerst aggressiver primärer Knochentumor – zählt zu den häufigsten malignen soliden Tumoren im Kindes- und Jugendalter. Da sich die Prognose dieser Erkrankung in den letzten 30 Jahren kaum verbessert hat und nach wie vor trotz Therapie mehr als 30 % der Patienten versterben, ist die Identifizierung krankheitsspezifischer Zielmoleküle zur Entwicklung neuer Therapieansätze von zentraler Bedeutung. In der vorliegenden Arbeit sollte die Rolle der Rezeptor-Proteintyrosinphosphatase Rptp $\zeta$  sowie der Ribosomalen S6 Kinase Rsk2 bei der Pathogenese des Osteosarkoms untersucht werden.

Wie durch Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe bereits gezeigt wurde, handelt es sich bei Rptp $\zeta$  (kodiert von *Ptprz1*) um einen Marker terminal differenzierter Osteoblasten, der *in vitro* einen hemmenden Einfluss auf die Proliferation dieser Zellen hat. Es stellte sich demnach die Frage, ob Rptp $\zeta$  auch *in vivo* als negativer Regulator der Osteoblastenproliferation fungiert und somit als Tumorsuppressor die Entstehung von Osteosarkomen verhindert. Daher wurden *Ptprz1*-defiziente Mäuse mit Tieren, die aufgrund einer heterozygoten *Trp53*-Deletion zur Tumorbildung neigen, verpaart und mittels Kontaktradiographie im Alter von 52 Wochen analysiert. Tatsächlich ließ sich in Abhängigkeit des *Ptprz1*-Genotyps die Bildung von Osteosarkomen nachweisen. Während keine der *Trp53*<sup>+/-</sup> Kontrolltiere skelettale Auffälligkeiten zeigten, konnten in 5 % der *Trp53*<sup>+/-</sup>/*Ptprz1*<sup>+/-</sup> sowie in 19 % der *Trp53*<sup>+/-</sup>/*Ptprz1*<sup>-/-</sup> Mäuse Knochentumoren identifiziert werden. Diese traten sowohl am Rippenbogen als auch an der Wirbelsäule und im Röhrenknochen auf.  $\mu$ CT- und histologische Analysen der Tumoren bestätigten das Vorliegen von Osteosarkomen und ermöglichten deren histologische Klassifizierung als „osteoblastisch“. Zudem erbrachte die Analyse von Zelllinien, die aus verschiedenen Osteosarkomen (*Trp53*<sup>+/-</sup>/*Ptprz1*<sup>+/-</sup> und *Trp53*<sup>+/-</sup>/*Ptprz1*<sup>-/-</sup>) etabliert worden waren, dass das osteogene Differenzierungspotential dieser Zellen auch *ex vivo* vorhanden war. Die putative Tumorsuppressorfunktion von *Ptprz1* wurde weiterhin durch vergleichende Analysen beider OS-Zelllinien aufgezeigt. So konnte in den *Ptprz1*-defizienten Zellen eine signifikant höhere zelluläre Proliferationsrate sowie eine verstärkte Tyrosinphosphorylierung spezifischer intrazellulärer Substrate nachgewiesen werden. Weiterhin belegten Proliferationsanalysen in Anwesenheit des Rptp $\zeta$ -Antagonisten Midkine (Mdk), dass durch dessen Zugabe ausschließlich die Proliferation der *Ptprz1*-heterozygoten Zelllinie gesteigert wurde. Dies implizierte, dass der proliferationsfördernde Effekt von Mdk auf die OS-Zelllinien von der Interaktion mit Rptp $\zeta$  abhängt, was insofern relevant ist, als dass *MDK* im humanen Osteosarkom häufig überexprimiert wird. Bei Untersuchungen zur Rolle von Rptp $\zeta$  im Osteosarkom des Menschen blieben Datensatzanalysen zur Identifizierung von Kopienzahlveränderungen oder etwaigen Mutationen im humanen *PTPRZ1*-Gen bislang erfolglos. Mittels Datenanalyse 17 Exom-sequenzierter humaner OS-Gewebe konnte zwar eine heterozygote Keimbahnmutation im *PTPRZ1*-Gen identifiziert werden, jedoch zeigten darauffolgende *in vitro*

Untersuchungen, dass jene Mutation keine funktionelle Beeinträchtigung der antiproliferativen Aktivität des Rptp $\zeta$ -Proteins zur Folge hatte. Nichtsdestotrotz handelt es sich bei Rptp $\zeta$  um ein Membranprotein, das gewebespezifisch exprimiert wird. So könnte es als Zielmolekül für die Entwicklung von OS-Therapieansätzen dennoch von Bedeutung sein, z.B. durch eine gezielte Antagonisierung seiner Interaktion mit Mdk.

Für die Untersuchung der Rolle von Rsk2 bei der Tumorgenese des Osteosarkoms wurde ein anderes Mausmodell herangezogen – das *c-fos*-transgene Modell. Die Überexpression dieses Transkriptionsfaktors führt in den Tieren zur Entwicklung von Osteosarkomen. Vorarbeiten zeigten, dass das Osteosarkom-Wachstum bei gleichzeitiger genetischer Inaktivierung von Rsk2 - einer Kinase, die *in vitro* die Stabilität von c-Fos moduliert - deutlich gestört ist. Es stellte sich daher die Frage, über welchen molekularen Mechanismus dieser protektive Effekt der *Rsk2*-Deletion vermittelt wird. Der von unserer Arbeitsgruppe postulierte Mechanismus ist die „Mitotische Katastrophe“. Erste Hinweise hierfür ergaben sich aus Genexpressionsanalysen, die eine erhöhte Expression von mitotischen Genen in *Rsk2*-defizienten *c-fos*-transgenen Osteosarkomen zeigten. Proliferations-, Immunfluoreszenz- und Zellzyklusanalysen von Zelllinien, die aus Tumoren *c-fos*-transgener Mäuse mit bzw. ohne *Rsk2*-Defizienz etabliert worden waren, erbrachten, dass die Abwesenheit der Kinase mit einem drastischen Proliferationsdefekt sowie mit dem vermehrten Auftreten multinukleärer polyploider Zellen assoziiert war. Zudem ließen sich in jenen Zellen atypische multipolare Mitosefiguren beobachten. Als wichtiger Aspekt dieser Arbeit sollte weiterhin ermittelt werden, ob jener Phänotyp ebenso durch eine pharmakologische *Rsk2*-Inhibition reproduziert werden kann. In der Tat bestätigten äquivalente *in vitro* Versuche mit *c-fos*-transgenen Zellen in Anwesenheit des *Rsk*-Inhibitors BI-D1870 die Ergebnisse der genetischen *Rsk2*-Inaktivierung. Der wachstumshemmende Effekt von BI-D1870 konnte weiterhin in der humanen OS-Zelllinie U2OS sowie in den o.g. *Trp53*-heterozygoten Zelllinien nachgewiesen werden. Zusammenfassend implizierten diese Daten, dass transformierte OS-Zellen in Folge einer *Rsk2*-Inaktivierung fehlerhafte Mitosen durchlaufen, die zur Bildung mehrkerniger Zellen mit einem von der Norm abweichenden DNA-Gehalt führen. Letztlich resultieren diese Defekte in einer verminderten Zellproliferation bzw. in der Apoptose. Die Induktion dieses als „mitotische Katastrophe“ bezeichneten onkosuppressiven Schutzmechanismus durch die gezielte Inhibition der *Rsk2* Kinase stellt demnach einen vielversprechend Ansatz zur Eliminierung von OS-Tumorzellen dar.

## 6 Summary

Osteosarcoma (OS) – a highly aggressive primary bone tumor – belongs to the most common malignant solid tumors in childhood and adolescence. As the prognosis has not improved significantly over the last 30 years and more than 30 % of the treated patients still die of this disease, the identification of specific molecular targets for novel therapies is highly relevant. This thesis focused on the implication of the receptor protein tyrosine phosphatase Rptpζ and the ribosomal S6 Kinase Rsk2 in the pathogenesis of osteosarcoma.

Our group previously identified Rptpζ (encoded by *Ptprz1*) as a marker of terminally differentiated osteoblasts which negatively regulates their proliferation *in vitro*. The question which has been addressed in this thesis is, whether Rptpζ can function as a tumor suppressor protein inhibiting OS development *in vivo*. We therefore crossed *Ptprz1*-deficient mice with tumor-prone *Trp53*-heterozygous mice and analyzed the skeletal phenotype by contact radiography at the age of 52 weeks. By screening a large number of mice we did detect OS development depending on the genotype of *Ptprz1*. While none of the *Trp53*<sup>+/-</sup> littermates displayed skeletal abnormalities, OS development was detected in 5 % of *Trp53*<sup>+/-</sup>/*Ptprz1*<sup>+/-</sup> and in 19 % of the *Trp53*<sup>+/-</sup>/*Ptprz1*<sup>-/-</sup> mice. The skeletal tumors were located in ribs, spine and long bones. μCT- and histological analyses confirmed the presence of osteosarcoma and allowed their histological subclassification as "osteoblastic OS". Additionally, cell lines derived from different tumors (*Trp53*<sup>+/-</sup>/*Ptprz1*<sup>+/-</sup> and *Trp53*<sup>+/-</sup>/*Ptprz1*<sup>-/-</sup>) were able to undergo osteogenic differentiation *ex vivo*. The putative tumor suppressor function of *Ptprz1* was further demonstrated by a comparison of the two OS cell lines. Importantly, *Ptprz1*-deficient cells displayed a significant increase in proliferation together with a higher abundance of tyrosine-phosphorylated substrates. Further analyses revealed that Midkine (Mdk), an antagonist of Rptpζ, exclusively enhanced the proliferation of the *Ptprz1* heterozygous cell line. This implied that the pro-proliferative influence of Mdk on the OS cell lines depends on Rptpζ interaction, which is potentially relevant, as *MDK* is over-expressed in human OS. To address the question, if Rptpζ would also act as a tumor suppressor in human OS we performed datasets analyses to identify copy number variations or mutations in the *PTPRZ1* gene, yet we did not detect any specific chromosomal or mutational changes. Although the data analysis of 17 human OS samples revealed one heterozygous germline mutation in the *PTPRZ1* gene, subsequent *in vitro* studies showed that it did not interfere with the anti-proliferative activity of the Rptpζ protein. However, Rptpζ is a transmembrane protein with restricted expression pattern. Since it is principally targetable for treatment, it may be important for OS therapy, for example by antagonizing its interaction with Mdk.

The role of Rsk2 in OS pathogenesis was studied in the *c-fos* transgenic mouse model. Mice over-expressing the transcription factor c-Fos develop osteosarcomas. However, it was recently shown that c-Fos-induced OS development is impaired in mice additionally lacking Rsk2, a kinase modulating c-Fos stability *in vitro*. This suggested a protective role of *Rsk2* inactivation against c-Fos-induced osteosarcoma. Based on the results "mitotic catastrophe" was proposed to be the underlying molecular mechanism. First indications were obtained by gene expression analyses showing an up-regulation of mitotic genes in *c-fos*-transgenic tumors lacking *Rsk2*. Proliferation, immunofluorescence and cell cycle analyses of cell lines established from tumors of *c-fos*-transgenic mice with or without *Rsk2*-deficiency, revealed a dramatic growth defect and an increased frequency of multinuclear polyploid cells in the absence of Rsk2. In addition, disorganized multipolar mitotic figures were observed in *Rsk2*-deficient cells. An important aspect of this project was to analyze whether the genetic inactivation of *Rsk2* can be phenocopied by pharmacological inhibition. In fact, respective *in vitro* experiments performed with *c-fos* transgenic cells in the presence of the Rsk inhibitor BI-D1870 proved the occurrence of the described phenotype. The growth inhibiting effect of BI-D1870 was also observed in the human OS cell line U2OS as well as in the above-mentioned *Trp53*-heterozygous cell lines. In summary, these data implied that transformed OS cells undergo incomplete mitosis in the absence of Rsk2, leading to the formation of polynuclear cells with deviant DNA contents. Consequently, these defects result in decreased proliferation and apoptotic cell death. The induction of the so called "mitotic catastrophe" as an onco-suppressive protection mechanism via targeted inhibition of Rsk2 kinase represents a promising approach for the elimination of OS-tumor cells.

## 7 Literaturverzeichnis

- Adamsky K, Arnold K, Sabanay H, Peles E (2003) Junctional protein MAGI-3 interacts with receptor tyrosine phosphatase beta (RPTP beta) and tyrosine-phosphorylated proteins. *J Cell Sci* 116(7): 1279–1289
- Al-Ejeh F, Kumar R, Wiegman A, Lakhani SR, Brown MP, Khanna KK (2010) Harnessing the complexity of DNA-damage response pathways to improve cancer treatment outcomes. *Oncogene* 29(46): 6085–6098.
- Allison DC, Carney SC, Ahlmann ER, Hendifar A, Chawla S, Fedenko A, Angeles C, Menendez LR (2012) A meta-analysis of osteosarcoma outcomes in the modern medical era. *Sarcoma* 2012: 704872
- Anjum R, Blenis J (2008) The RSK family of kinases: emerging roles in cellular signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9(10): 747–758
- Anninga JK, Gelderblom H, Fiocco M, Kroep JR, Taminiau AH, Hogendoorn PC, Egeler RM (2011) Chemotherapeutic adjuvant treatment for osteosarcoma: Where do we stand? *Eur J Cancer* 47(16): 2431–2445
- Ariyama T, Hasegawa K, Inazawa J, Mizuno K, Ogimoto M, Katagiri T, Yakura H (1995) Assignment of the human protein tyrosine phosphatase, receptor-type, zeta (PTPRZ) gene to chromosome band 7q31.3. *Cytogenet Cell Genet* 70(1-2): 52–54
- Baldauf C, Jeschke A, Kanbach V, Catala-Lehnen P, Baumhoer D, Gerull H, Buhs S, Amling M, Nollau P, Harroch S, Schinke T (2015) The Protein Tyrosine Phosphatase Rptp $\zeta$  Suppresses Osteosarcoma Development in Trp53-Heterozygous Mice. *PLoS One* 10(9): e0137745
- Barnea G, Grumet M, Sap J, Margolis RU, Schlessinger J (1994) Close similarity between receptor-linked tyrosine phosphatase and rat brain proteoglycan. *Cell* 76(2): 205
- Bellido T (2014) Osteocyte-driven bone remodeling. *Calcif Tissue Int* 94(1): 25–34
- Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG (2001) Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells* 19(3): 180–192
- Bielack SS, Kempf-Bielack B, Delling G, Exner GU, Flege S, Helmke K, Kotz R, Salzer-Kuntschik M, Werner M, Winkelmann W, Zoubek A, Jürgens H, Winkler K (2002) Prognostic Factors in High-Grade Osteosarcoma of the Extremities or Trunk: an Analysis of 1,702 Patients Treated on Neoadjuvant Cooperative Osteosarcoma Study Group Protocols. *J Clin Oncol* 20(3): 776–790
- Black BL, Croom J, Eisen EJ, Petro AE, Edwards CL, Surwit RS (1998) Differential effects of fat and sucrose on body composition in A/J and C57BL/6 mice. *Metabolism* 47(11): 1354–1359
- Blanchetot C, Chagnon M, Dube N, Halle M, Tremblay ML (2005). Substrate-trapping techniques in the identification of cellular PTP targets. *Methods* 35: 44–53
- Blume-Jensen P, Hunter T (2001) Oncogenic kinase signalling. *Nature* 411: 355–365
- Böhm C, Derer A, Axmann R, Hillienhoff U, Zaiss MM, Luther J, Zech C, Stock M, Scholtysek C, Engelke K, Hess A, Tuckermann JP, Schett G, David JP (2012) RSK2 protects mice against TNF-induced bone loss. *J Cell Sci* 125(Pt 9): 2160–2171
- Bonewald LF (2011) The amazing osteocyte. *J Bone Miner Res* 26(2): 229–38
- Bonni A, Brunet A, West AE, Datta SR, Takasu MA, Greenberg ME (1999) Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms. *Science* 286(5443): 1358–1362
- Botter SM, Neri D, Fuchs B (2014) Recent advances in osteosarcoma. *Curr Opin Pharmacol* 16(1): 15–23
- Caruso R, Fedele F, Lucianò R, Branca G, Parisi C, Paparo D, Parisi A (2011) Mitotic catastrophe in malignant epithelial tumors: the pathologist's viewpoint. *Ultrastruct Pathol* 35(2): 66–71

- Castedo M, Perfettini JL, Roumier T, Andreau K, Medema R, Kroemer G (2004) Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene* 23(16): 2825–2837
- Chan KS, Koh CG, Li HY (2012) Mitosis-targeted anti-cancer therapies: where they stand. *Cell Death Dis* 3: e41
- Chen RH, Juo PC, Curran T, Blenis J (1996) Phosphorylation of c-Fos at the C-terminus enhances its transforming activity. *Oncogene* 12(7): 1493–1502
- Chen Z, Xiao Z, Chen J, Ng SC, Sowin T, Sham H, Rosenberg S, Fesik S, Zhang H (2003) Human Chk1 expression is dispensable for somatic cell death and critical for sustaining G2 DNA damage checkpoint. *Mol Cancer Ther* 2(6): 543–548
- Chen X, Bahrami A, Pappo A, Easton J, Dalton J, Hedlund E, Ellison D, Shurtleff S, Wu G, Wei L, Parker M, Rusch M, Nagahawatte P, Wu J, Mao S, Boggs K, Mulder H, Yergeau D, Lu C, Ding L, Edmonson M, Qu C, Wang J, Li Y, Navid F, Daw NC, Mardis ER, Wilson RK, Downing JR, Zhang J, Dyer MA, St. Jude Children’s Research Hospital–Washington University Pediatric Cancer Genome Project (2014) Recurrent somatic structural variations contribute to tumorigenesis in pediatric osteosarcoma. *Cell Rep* 7(1): 104–112
- Cho YY, He Z, Zhang Y, Choi HS, Zhu F, Choi BY, Kang BS, Ma WY, Bode AM, Dong Z (2005) The p53 protein is a novel substrate of ribosomal S6 kinase 2 and a critical intermediary for ribosomal S6 kinase 2 and histone H3 interaction. *Cancer* 65(9): 3596–3603
- Cho YY, Yao K, Kim HG, Kang BS, Zheng D, Bode AM, Dong Z (2007). Ribosomal S6 kinase 2 is a key regulator in tumor promoter induced cell transformation. *Cancer Res* 67(17): 8104–8112
- Clark DE, Errington TM, Smith JA, Frierson HF Jr, Weber MJ, Lannigan DA (2005) The serine/threonine protein kinase, p90 ribosomal S6 kinase, is an important regulator of prostate cancer cell proliferation. *Cancer Res* 65(8): 3108–3116
- Coffin GS, Siris E, Wegenkia LC (1966) Mental retardation with osteocartilaginous anomalies. *Am J Dis Child* 112: 205–213
- Cohen MS, Zhang C, Shokat KM, Taunton J (2005) Structural Bioinformatics-Based Design of Selective, Irreversible Kinase Inhibitors *Science* 308(5726): 1318–1321
- Cohen MM Jr (2006) The new bone biology: pathologic, molecular, and clinical correlates. *Am J Med Genet A* 140(23): 2646–2706
- Colombo EA, Fontana L, Roversi G, Negri G, Castiglia D, Paradisi M, Zambruno G, Larizza L (2014) Novel physiological RECQL4 alternative transcript disclosed by molecular characterisation of Rothmund-Thomson Syndrome sibs with mild phenotype. *Eur J Hum Genet* 22(11): 1298–1304
- Crockett JC, Rogers MJ, Coxon FP, Hocking LJ, Helfrich MH (2011) Bone remodelling at a glance. *J Cell Sci* 124(7): 991–998
- Dahlin DC, Unni KK (1977) Osteosarcoma of bone and its important recognizable varieties. *Am J Surg Pathol* 1(1): 61–72
- David J, Mehic D, Bakiri L, Schilling AF, Mandic V, Priemel M, Idarraga MH, Reschke MO, Hoffmann O, Amling M, Wagner EF (2005) Essential role of RSK2 in c-Fos – dependent osteosarcoma development. *J Clin Invest* 115(3): 664–672
- Davoli T, de Lange T (2011) The Causes and Consequences of Polyploidy in Normal Development and Cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol* 27(1): 585–610
- De Cesare D, Jacquot S, Hanauer A, Sassone-Corsi P (1998) Rsk-2 activity is necessary for epidermal growth factor-induced phosphorylation of CREB protein and transcription of c-fos gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(21): 12202–12207
- De Vernejoul MC (2008) Sclerosing bone disorders. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 22(1): 71–83
- Diamantopoulou Z, Bermek O, Polykratis A, Hamma-Kourbali Y, Delbé J, Courty J, Katsoris P (2010) A Pleiotrophin C-terminus peptide induces anti-cancer effects through RPTPβ/ζ. *Mol Cancer* 9: 224

- Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G (1997) *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 89(5): 747–754
- Dumont J, Umbhauer M, Rassinier P, Hanauer A, Verlhac MH (2005) p90Rsk is not involved in cytoskeletal factor arrest in mouse oocytes. *J Cell Biol* 169(2): 227–231
- Elf S, Blevins D, Jin L, Chung TW, Williams IR, Lee BH, Lin JX, Leonard WJ, Taunton J, Khoury HJ, Kang S (2011) p90RSK2 is essential for FLT3-ITD- but dispensable for BCR-ABL-induced myeloid leukemia. *Blood* 117(25): 6885–6894
- Entz-Werlé N, Stoetzel C, Berard-Marec P, Kalifa C, Brugiere L, Pacquement H, Schmitt C, Tabone MD, Gentet JC, Quillet R, Oudet P, Lutz P, Babin-Boilletot A, Gaub MP, Perrin-Schmitt F (2005) Frequent genomic abnormalities at TWIST in human pediatric osteosarcomas. *Int J Cancer* 117(3): 349–355
- Faissner A, Heck N, Dobbertin A, Garwood J (2006) DSD-1-Proteoglycan/Phosphacan and receptor protein tyrosine phosphatase-beta isoforms during development and regeneration of neural tissues. *Adv Exp Med Biol* 557: 25–53
- Ferron M, Wei J, Yoshizawa T, Del Fattore A, DePinho RA, Teti A, Ducy P, Karsenty G (2010) Insulin signaling in osteoblasts integrates bone remodeling and energy metabolism. *Cell* 142(2): 296–308
- Fletcher CDM, Unni KK, Mertens F (2002): Pathology and genetics of tumors of soft tissue and bone. Lyon: IARC Press
- Forbes SA, Beare D, Gunasekaran P, Leung K, Bindal N, Boutselakis H, Ding M, Bamford S, Cole C, Ward S, Kok CY, Jia M, De T, Teague JW, Stratton MR, McDermott U, Campbell PJ. COSMIC: exploring the world's knowledge of somatic mutations in human cancer. *Nucleic Acids Res (Database issue)*: D805–811
- Franchi A, Calzolari A, Zampi G (1998) Immunohistochemical detection of c-fos and c-jun expression in osseous and cartilaginous tumours of the skeleton. *Virchows Arch* 432(6): 515–519
- Freeman SS, Allen SW, Ganti R, Wu J, Ma J, Su X, Neale G, Dome JS, Daw NC, Khoury JD (2008) Copy number gains in EGFR and copy number losses in PTEN are common events in osteosarcoma tumors. *Cancer* 113(6): 1453–1461
- Freissmuth (2012) Chemotherapie von Tumorerkrankungen. In: Freissmuth M, Offermanns S, Böhm S (Hrsg): Pharmakologie und Toxikologie. 1. Aufl., Springer Medizin Verlag, Heidelberg, S. 247–250
- Frödin M, Gammeltoft S (1999) Role and regulation of 90 kDa ribosomal S6 kinase (RSK) in signal transduction. *Mol Cell Endocrinol* 151(1-2): 65–77
- Fukada M, Fujikawa A, Chow JP, Ikematsu S, Sakuma S, Noda M (2006) Protein tyrosine phosphatase receptor type Z is inactivated by ligand-induced oligomerization. *FEBS Lett* 580(17): 4051–4056
- Fukumoto S, Martin TJ (2009) Bone as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab* 20(5): 230–236
- Galluzzi L, Vitale I, Vacchelli E, Kroemer G (2011) Cell death signaling and anticancer therapy. *Front Oncol* doi: 10.3389/fonc.2011.00005
- Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, Dawson TM, Dawson VL, El-Deiry WS, Fulda S, Gottlieb E, Green DR, Hengartner MO, Kepp O, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Lu X, Madeo F, Malorni W, Mehlen P, Nuñez G, Peter ME, Piacentini M, Rubinsztein DC, Shi Y, Simon HU, Vandenabeele P, White E, Yuan J, Zhivotovsky B, Melino G, Kroemer G (2012) Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ* 19(1): 107–120
- Gamberi G, Benassi MS, Bohling T, Ragazzini P, Molendini L, Sollazzo MR, Pompetti F, Merli M, Magagnoli G, Balladelli A, Picci P (1998) C-myc and c-fos in human osteosarcoma: prognostic value of mRNA and protein expression. *Oncology* 55(6): 556–563

- Garwood J, Heck N, Reichardt F, Faissner A (2003) Phosphacan short isoform, a novel non-proteoglycan variant of phosphacan/receptor protein tyrosine phosphatase-beta, interacts with neuronal receptors and promotes neurite outgrowth. *J Biol Chem* 278(26): 24164–24173
- Gowen M, Lazner F, Dodds R, Kapadia R, Feild J, Tavaría M, Bertocello I, Drake F, Zavarselk S, Tellis I, Hertzog P, Debouck C, Kola I (1999) Cathepsin K knockout mice develop osteopetrosis due to a deficit in matrix degradation but not demineralization. *J Bone Miner Res* 14(10): 1654–1663
- Green J (1994) The physicochemical structure of bone: cellular and noncellular elements. *Miner Electrolyte Metab* 20(1-2): 7–15
- Grigoriadis AE, Schellander K, Wang ZQ, Wagner EF (1993) Osteoblasts are target cells for transformation in c-fos transgenic mice. *J Cell Biol* 122(3): 685–701
- Hansen MF, Koufos A, Gallie BL, Phillips RA, Fodstad O, Brøgger A, Gedde-Dahl T, Cavenee WK. (1985) Osteosarcoma and retinoblastoma: a shared chromosomal mechanism revealing recessive predisposition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82(18): 6216–6220
- Harroch S, Palmeri M, Rosenbluth J, Custer A, Okigaki M, Shrager P, Blum M, Buxbaum JD, Schlessinger J (2000) No Obvious Abnormality in Mice Deficient in Receptor Protein Tyrosine Phosphatase  $\beta$ . *Mol Cell Biol* 20(20): 7706–7715
- Harroch S, Furtado GC, Brueck W, Rosenbluth J, Lafaille J, Chao M, Buxbaum JD, Schlessinger J (2002) A critical role for the protein tyrosine phosphatase receptor type Z in functional recovery from demyelinating lesions. *Nat Genet* 32(3): 411–414
- Harvey M, McArthur MJ, Montgomery CA Jr, Butel JS, Bradley A, Donehower LA (1993) Spontaneous and carcinogen-induced tumorigenesis in p53- deficient mice. *Nat Genet* 5(3): 225–229
- Hashizume O, Shimizu A, Yokota M, Sugiyama A, Nakada K, Miyoshi H, Itami M, Ohira M, Nagase H, Takenaga K, Hayashi J (2012) Specific mitochondrial DNA mutation in mice regulates diabetes and lymphoma development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(26): 10528–10533
- Hauge C, Frödin M (2006) RSK and MSK in MAP kinase signalling. *J Cell Sci* 119(Pt 15): 3021–2023
- Hayashi N, Mizusaki MJ, Kamei K, Harada S, Miyata S (2005) Chondroitin sulfate proteoglycan phosphacan associates with parallel fibers and modulates axonal extension and fasciculation of cerebellar granule cells. *Mol Cell Neurosci* 30(3): 364–377
- Hendriks WJ, Elson A, Harroch S, Stoker AW (2008) Protein tyrosine phosphatases: functional inferences from mouse models and human diseases. *FEBS J* 275(5): 816–830
- Hendruschk S, Wiedemuth R, Aigner A, Töpfer K, Cartellieri M, Martin D, Kirsch M, Ikonomidou C, Schackert G, Temme A (2011) RNA interference targeting survivin exerts antitumoral effects in vitro and in established glioma xenografts in vivo. *Neuro Oncol* 13(10): 1074–1089
- Hojjat-Farsangi M (2014) Small-molecule inhibitors of the receptor tyrosine kinases: promising tools for targeted cancer therapies. *Int J Mol Sci* 15(8): 13768–13801
- Holland AJ, Cleveland DW (2012) Chromoanagenesis and cancer: mechanisms and consequences of localized, complex chromosomal rearrangements. *Nat Med* 18(11): 1630–1638
- Hou P, Ji M, Yang B, Chen Z, Qiu J, Shi X, Lu Z (2006) Quantitative analysis of promoter hypermethylation in multiple genes in osteosarcoma. *Cancer* 106(7): 1602–1609
- Huang DW, Sherman BT, Tan Q, Collins JR, Alvord WG, Roayaei J, Stephens R, Baseler MW, Lane HC, Lempicki RA (2007) The DAVID Gene Functional Classification Tool: a novel biological module-centric algorithm to functionally analyze large gene lists. *Genome Biol* 8(9): R183
- Huvos AG (1986) Osteogenic sarcoma of bones and soft tissues in older persons. A clinicopathologic analysis of 117 patients older than 60 years. *Cancer* 57(7): 1442–1449

- Isfort RJ, Cody DB, Lovell G, Doersen CJ (1995) Analysis of oncogenes, tumor suppressor genes, autocrine growth-factor production, and differentiation state of human osteosarcoma cell lines. *Mol Carcinog* 14(3): 170–178
- Jacks T, Remington L, Williams BO, Schmitt EM, Halachmi S, Bronson RT, Weinberg RA (1994) Tumor spectrum analysis in p53-mutant mice. *Curr Biol* 4(1): 1–7
- Jaenisch R, Mintz B (1974) Simian virus 40 DNA sequences in DNA of healthy adult mice derived from preimplantation blastocysts injected with viral DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71(4): 1250–1254
- Janssen A, Kops GJ, Medema RH (2009) Elevating the frequency of chromosome missegregation as a strategy to kill tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(45): 19108–19113
- Jilka RL, Weinstein RS, Bellido T, Roberson P, Parfitt AM, Manolagas SC (1999) Increased bone formation by prevention of osteoblast apoptosis with parathyroid hormone. *J Clin Invest* 104(4): 439–446
- Jochum W, Passequé E, Wagner EF (2001) AP-1 in mouse development and tumorigenesis. *Oncogene* 20(19): 2401–2412
- Julien SG, Dubé N, Hardy S, Tremblay ML (2011) Inside the human cancer tyrosine phosphatome. *Nat Rev Cancer* 11(1): 35–49
- Junqueira LC, Carneiro J (2004) Gratzl M (Hrsg): Histologie. 6. Aufl. Springer Medizin Verlag Heidelberg, S. 98–101
- Kadomatsu K, Kishida S, Tsubota S (2013) The heparin-binding growth factor midkine: the biological activities and candidate receptors. *J Biochem* 153(6): 511–521
- Kager L, Zoubek A, Pötschger U, Kastner U, Flege S, Kempf-Bielack B, Branscheid D, Kotz R, Salzer-Kuntschik M, Winkelmann W, Jundt G, Kabisch H, Reichardt P, Jürgens H, Gadner H, Bielack SS; Cooperative German-Austrian-Swiss Osteosarcoma Study Group (2003) Primary metastatic osteosarcoma: Presentation and outcome of patients treated on neoadjuvant Cooperative Osteosarcoma Study Group protocols. *J Clin Oncol* 21(10): 2011–2018
- Kang S, Elf S, Dong S, Hitosugi T, Lythgoe K, Guo A, Ruan H, Lonial S, Khoury HJ, Williams IR, Lee BH, Roesel JL, Karsenty G, Hanauer A, Taunton J, Boggon TJ, Gu TL, Chen J (2009) Fibroblast growth factor receptor 3 associates with and tyrosine phosphorylates p90 RSK2, leading to RSK2 activation that mediates hematopoietic transformation. *Mol Cell Biol* 29(8):2105–2117
- Kang S, Elf S, Lythgoe K, Hitosugi T, Taunton J, Zhou W, Xiong L, Wang D, Muller S, Fan S, Sun SY, Marcus AI, Gu TL, Polakiewicz RD, Chen ZG (2010) p90 ribosomal S6 kinase 2 promotes invasion and metastasis of human head and neck squamous cell carcinoma cells. *J Clin Invest* 120(4): 1165–1177
- Kansara M, Leong HS, Lin DM, Popkiss S, Pang P, Garsed DW, Walkley CR, Cullinane C, Ellul J, Haynes NM, Hicks R, Kuijjer ML, Cleton-Jansen AM, Hinds PW, Smyth MJ, Thomas DM (2013) Immune response to RB1-regulated senescence limits radiation-induced osteosarcoma formation. *J Clin Invest* 123(12): 5351–5360
- Kansara M, Teng MW, Smyth MJ, Thomas DM (2014) Translational biology of osteosarcoma. *Nat Rev Cancer* 14(11): 722–735
- Karsenty G (2003) The complexities of skeletal biology. *Nature* 423(6937): 316–318
- Karsenty G, Kronenberg HM, Settembre C (2009) Genetic control of bone formation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 25: 629–648
- Kastan MB, Bartek J. (2004) Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* 432(7015): 316–323
- Kaste SC, Pratt CB, Cain AM, Jones-Wallace DJ, Rao BN (1999) Metastases detected at the time of diagnosis of primary pediatric extremity osteosarcoma at diagnosis: imaging features. *Cancer* 86(8): 1602–1608
- Kawachi H, Fujikawa A, Maeda N, Noda M (2001) Identification of GIT1/Cat-1 as a substrate molecule of protein tyrosine phosphatase zeta /beta by the yeast substrate-trapping system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(12): 6593–6588

- Keller J, Catala-Lehnen P, Huebner AK, Jeschke A, Heckt T, Lueth A, Krause M, Koehne T, Albers J, Schulze J, Schilling S, Haberland M, Denninger H, Neven M, Hermans-Borgmeyer I, Streichert T, Breer S, Barvencik F, Levkau B, Rathkolb B, Wolf E, Calzada-Wack J, Neff F, Gailus-Durner V, Fuchs H, de Angelis MH, Klutmann S, Tsourdi E, Hofbauer LC, Kleuser B, Chun J, Schinke T, Amling M (2014) Calcitonin controls bone formation by inhibiting the release of sphingosine 1-phosphate from osteoclasts. *Nat Commun* 5:5215
- Khosla S (2001) Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology* 142(12): 5050–5055
- Klein MJ, Siegal GP (2006) Osteosarcoma: anatomic and histologic variants. *Am J Clin Pathol* 125(4): 555–581
- Knothe Tate ML, Adamson JR, Tami AE, Bauer TW (2004) The osteocyte. *Int J Biochem Cell Biol* 36(1): 1–8
- Kobayashi A, Hashizume C, Dowaki T, Wong RW (2015) Therapeutic potential of mitotic interaction between the nucleoporin Tpr and aurora kinase A. *Cell Cycle* 14(9): 1447–1158
- Krueger NX, Saito H (1992) A human transmembrane protein-tyrosine-phosphatase, PTP $\zeta$ , is expressed in brain and has an N-terminal receptor domain homologous to carbonic anhydrases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(16): 7417–7421
- Lamprianou S, Chatzopoulou E, Thomas JL, Bouyain S, Harroch S (2011) A complex between contactin-1 and the protein tyrosine phosphatase PTPRZ controls the development of oligodendrocyte precursor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(42): 17498–174503
- Lee NK, Sowa H, Hinoi E, Ferron M, Ahn JD, Confavreux C, Dacquin R, Mee PJ, McKee MD, Jung DY, Zhang Z, Kim JK, Mauvais-Jarvis F, Ducy P, Karsenty G. (2007) Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell* 130: 456–469
- Levine AJ, Oren M (2009) The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nat Rev Cancer* 9(10): 749–758
- Levy JB, Canoll PD, Silvennoinen O, Barnea G, Morse B, Honegger AM, Huang JT, Cannizzaro LA, Park SH, Druck T, Huebner K, Sap J, Ehrlich M, Musacchio JM, Schlessinger J (1993) The cloning of a receptor-type protein tyrosine phosphatase expressed in the central nervous system. *J Biol Chem* 268(14): 10573–10581
- Liedert A, Schinke T, Ignatius A, Amling M (2014) The role of midkine in skeletal remodelling. *Br J Pharmacol* 171(4): 870–878
- Link MP, Gebhardt MC, Meyers PA (2002) Osteosarcoma. In: Pizzo PA, Poplack DG (Hrsg): Principles and practice of pediatric oncology. 4. Aufl., Lippincott, Williams and Wilkins, Baltimore, S. 1051–1089
- Lonardo F, Ueda T, Huvos AG, Healey J, Ladanyi M (1997) p53 and MDM2 alterations in osteosarcomas: correlation with clinicopathologic features and proliferative rate. *Cancer* 79 (8): 1541–1547
- Lowry B, Miller JR, Fraser FC. 1971. A new dominant gene mental retardation syndrome. *Am J Child Dis* 121: 496–500
- Machida K, Khenkhar M, Nollau P (2012) Deciphering Phosphotyrosine-Dependent Signaling Networks in Cancer by SH2 Profiling. *Genes Cancer* 3(5-6): 353–361
- Maeda N, Nishiwaki T, Shintani T, Hamanaka H, Noda M (1996) 6B4 proteoglycan/phosphacan, an extracellular variant of receptor-like protein-tyrosine phosphatase zeta/RPTPbeta, binds pleiotrophin/heparin-binding growth-associated molecule (HB-GAM). *J Biol Chem* 271(35): 21446–21452
- Maeda N, Ichihara-Tanaka K, Kimura T, Kadomatsu K, Muramatsu T, Noda M (1999) A receptor-like protein-tyrosine phosphatase PTPzeta/RPTPbeta binds a heparin-binding growth factor midkine. Involvement of arginine 78 of midkine in the high affinity binding to PTPzeta. *J Biol Chem* 274(18): 12474–12479
- Maehara H, Kaname T, Yanagi K, Hanzawa H, Owan I, Kinjou T, Kadomatsu K, Ikematsu S, Iwamasa T, Kanaya F, Naritomi K (2007) Midkine as a novel target for antibody therapy in osteosarcoma. *Biochem Biophys Res Commun* 358(3): 757–762

- Makinoshima H, Ishii G, Kojima M, Fujii S, Higuchi Y, Kuwata T, Ochiai A (2012) PTPRZ1 regulates calmodulin phosphorylation and tumor progression in small-cell lung carcinoma. *BMC Cancer* 12: 537
- Malakhova M, Tereshko V, Lee SY, Yao K, Cho YY, Bode A, Dong Z (2008) Structural basis for activation of the autoinhibitory C-terminal kinase domain of p90 RSK2. *Nat Struct Mol Biol* 15(1): 112–113
- Malumbres M, de Castro P (2014) Aurora kinase A inhibitors: promising agents in antitumoral therapy. *Expert Opin Ther Targets* 18(12): 1377–1393
- Mann M, Ong SE, Grønborg M, Steen H, Jensen ON, Pandey A (2002) Analysis of protein phosphorylation using mass spectrometry: deciphering the phosphoproteome. *Trends Biotechnol* 20(6): 261–268
- Martin TJ, Seeman E (2008) Bone remodelling: its local regulation and the emergence of bone fragility. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 22(5): 701–722
- Martin JW, Squire JA, Zielenska M (2012) The genetics of osteosarcoma. *Sarcoma* 2012: 627254
- Marumoto T, Hirota T, Morisaki T, Kunitoku N, Zhang D, Ichikawa Y, Sasayama T, Kuninaka S, Mimori T, Tamaki N, Kimura M, Okano Y, Saya H (2002) Roles of aurora-A kinase in mitotic entry and G2 checkpoint in mammalian cells. *Genes Cells* 7(11): 1173–1182
- Maskey D, Yousefi S, Schmid I, Zlobec I, Perren A, Friis R, Simon HU (2013) ATG5 is induced by DNA-damaging agents and promotes mitotic catastrophe independent autophagy. *Nat Commun*: 2130. doi: 10.1038/ncomms3130
- Mc Gee MM (2015) Targeting the Mitotic Catastrophe Signaling Pathway in Cancer. *Mediators Inflamm*: 146282. doi: 10.1155/2015/146282
- Meng K, Rodriguez-Peña A, Dimitrov T, Chen W, Yamin M, Noda M, Deuel TF (2000) Pleiotrophin signals increased tyrosine phosphorylation of beta beta-catenin through inactivation of the intrinsic catalytic activity of the receptor-type protein tyrosine phosphatase beta/zeta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(6): 2603–2608
- Mirabello L, Troisi RJ, Savage SA (2009) Osteosarcoma incidence and survival rates from 1973 to 2004: data from the Surveillance, Epidemiology, and End Results Program. *Cancer* 115(7): 1531–1543
- Mohseny AB, Hogendoorn PC, Cleton-Jansen AM (2012) Osteosarcoma models: from cell lines to zebrafish. *Sarcoma* 2012: 417271
- Moriarity BS, Otto GM, Rahrman EP, Rathe SK, Wolf NK, Weg MT, Manlove LA, LaRue RS, Temiz NA, Molyneux SD, Choi K, Holly KJ, Sarver AL, Scott MC, Forster CL, Modiano JF, Khanna C, Hewitt SM, Khokha R, Yang Y, Gorlick R, Dyer MA, Largaespada DA (2015) A Sleeping Beauty forward genetic screen identifies new genes and pathways driving osteosarcoma development and metastasis. *Nat Genet* 47(6): 615–624
- Muller PA, Vousden KH (2013) p53 mutations in cancer. *Nat Cell Biol* 15(1): 2–8
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51: 263–273
- Mutsaers AJ, Walkley CR (2014) Cells of origin in osteosarcoma: mesenchymal stem cells or osteoblast committed cells? *Bone* 62: 56–63
- Nakamura E, Kadomatsu K, Yuasa S, Muramatsu H, Mamiya T, Nabeshima T, Fan QW, Ishiguro K, Igakura T, Matsubara S, Kaname T, Horiba M, Saito H, Muramatsu T (1998) Disruption of the midkine gene (Mdk) resulted in altered expression of a calcium binding protein in the hippocampus of infant mice and their abnormal behaviour. *Genes Cells* 3(12): 811–822
- Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, de Crombrugge B (2002) The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* 108(1): 17–29
- Nesbitt SA, Horton MA (1997) Trafficking of matrix collagens through bone-resorbing osteoclasts. *Science* 276(5310): 266–269

- Nathrath M, Schlemmer M, Teichert-von Lüttichau (2011) Osteosarkom. In: Tumorzentrum München, Issels R (Hrsg): Knochentumoren und Weichteilsarkome - Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge. 5. Aufl., W. Zuckschwerdt Verlag, München, S.117
- Netter FH (2001) Netters Orthopädie. Georg Thieme Verlag KG Stuttgart, S. 16
- Neunaber C, Catala-Lehnen P, Beil FT, Marshall RP, Kanbach V, Baranowsky A, Lehmann W, Streichert T, Ignatius A, Muramatsu T, Schinke T, Amling M (2010) Increased trabecular bone formation in mice lacking the growth factor midkine. *J Bone Miner Res* 25(8): 1724–1735
- Nguyen TL (2008) Targeting RSK: an overview of small molecule inhibitors. *Anticancer Agents Med Chem* 8(7): 710–716
- Nishiwaki T, Maeda N, Noda M (1998) Characterization and developmental regulation of proteoglycan-type protein tyrosine phosphatase zeta/RPTPbeta isoforms. *J Biochem* 123(3): 458–467
- Okada H, Mak TW (2004) Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nat Rev Cancer* 4(8): 592–603
- Ostman A, Hellberg C, Böhmer FD (2006) Protein-tyrosine phosphatases and cancer. *Nat Rev Cancer* 6(4): 307-20
- Ottaviani G, Jaffe N (2009) The etiology of osteosarcoma. *Cancer Treat Res* 152: 15-32
- Ottaviano L, Schaefer KL, Gajewski M, Huckenbeck W, Baldus S, Rogel U, Mackintosh C, de Alava E, Myklebost O, Kresse SH, Meza-Zepeda LA, Serra M, Cleton-Jansen AM, Hogendoorn PC, Buerger H, Aigner T, Gabbert HE, Poremba C (2010) Molecular characterization of commonly used cell lines for bone tumor research: a trans-European EuroBoNet effort. *Genes Chromosomes Cancer* 49(1): 40–51
- Papachristou DJ, Batistatou A, Sykiotis GP, Varakis I, Papavassiliou AG (2003) Activation of the JNK-AP-1 signal transduction pathway is associated with pathogenesis and progression of human osteosarcomas. *Bone* 32(4): 364–371
- Pariser H, Ezquerra L, Herradon G, Perez-Pinera P, Deuel TF (2005) Fyn is a downstream target of the pleiotrophin/receptor protein tyrosine phosphatase beta/zeta-signaling pathway: regulation of tyrosine phosphorylation of Fyn by pleiotrophin. *Biochem Biophys Res Commun* 332(3): 664–669
- Pariser H, Herradon G, Ezquerra L, Perez-Pinera P, Deuel TF (2005) Pleiotrophin regulates serine phosphorylation and the cellular distribution of beta-adducin through activation of protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(35): 12407–12412
- Pederson L, Ruan M, Westendorf JJ, Khosla S, Oursler MJ (2008) Regulation of bone formation by osteoclasts involves Wnt/BMP signaling and the chemokine sphingosine-1-phosphate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 30;105(52): 20764–20769
- Pereira PM, Schneider A, Pannetier S, Heron D, Hanauer A (2010) Coffin-Lowry syndrome. *Eur J Hum Genet* 18(6): 627–633
- Poole KE, van Bezooijen RL, Loveridge N, Hamersma H, Papapoulos SE, Löwik CW, Reeve J (2005) Sclerostin is a delayed secreted product of osteocytes that inhibits bone formation. *FASEB J* 19(13): 1842–1844
- Rauch DA, Hurchla MA, Harding JC, Deng H, Shea LK, Eagleton MC, Niewiesk S, Lairmore MD, Piwnica-Worms D, Rosol TJ, Weber JD, Ratner L, Weilbaecher KN (2010) The ARF tumor suppressor regulates bone remodeling and osteosarcoma development in mice. *PLoS One* 5(12): e15755
- Robey PG, Boskey AL (2008) The composition of bone. In: Rosen CJ (Hrsg): Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism. Am. Soc. Bone Miner. Res; Washington, DC, S. 32–38
- Roodman GD (2004) Mechanisms of bone metastasis. *N Engl J Med* 350(16): 1655–1664
- Rosen G, Nirenberg A (1982) Chemotherapy for osteogenic sarcoma: an investigative method, not a recipe. *Cancer Treat Rep* 66(9): 1687–1697

- Rosenberg AE, Cleton-Jansen A-M, de Pinieux G, Deyrup AT, Hauben E, Squire J (2013) Conventional osteosarcoma. In: Fletcher CDM, Bridge JA, Hogendoorn PCW, Mertens F (Hrsg): WHO Classification of Tumours of Soft Tissue and Bone. IARC Press, Lyon, France, S. 282–288
- Rüther U, Komitowski D, Schubert FR, Wagner EF (1989) c-fos expression induces bone tumors in transgenic mice. *Oncogene* 4(7): 861–865
- Sapkota GP, Cummings L, Newell FS, Armstrong C, Bain J, Frodin M, Grauert M, Hoffmann M, Schnapp G, Steegmaier M, Cohen P, Alessi DR (2007) BI-D1870 is a specific inhibitor of the p90 RSK (ribosomal S6 kinase) isoforms in vitro and in vivo. *Biochem J* 401(1): 29–38
- Sassone-Corsi P, Mizzen CA, Cheung P, Crosio C, Monaco L, Jacquot S, Hanauer A, Allis CD (1999) Requirement of Rsk-2 for epidermal growth factor-activated phosphorylation of histone H3. *Science* 285(5429): 886–891
- Schiebler TH (2004) Anatomie. 9. Aufl. Springer Medizin Verlag Heidelberg, S. 168
- Schinke T, Gebauer M, Schilling AF, Lamprianou S, Priemel M, Mueldner C, Neunaber C, Streichert T, Ignatius A, Harroch S, Amling M (2008) The protein tyrosine phosphatase Rptpzeta is expressed in differentiated osteoblasts and affects bone formation in mice. *Bone* 42(3): 524–534
- Shang D, Xu X, Wang D, Li Y, Liu Y (2013) Protein tyrosine phosphatase  $\zeta$  enhances proliferation by increasing  $\beta$ -catenin nuclear expression in VHL-inactive human renal cell carcinoma cells. *World J Urol* 31(6):1547–1554
- Shaulian E, Karin M (2001) AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene* 20(19): 2390–2400
- Shintani T, Noda M (2008) Protein tyrosine phosphatase receptor type Z dephosphorylates TrkA receptors and attenuates NGF-dependent neurite outgrowth of PC12 cells. *J Biochem* 144(2): 259–266
- Sims NA, Martin TJ (2015) Coupling Signals between the Osteoclast and Osteoblast: How are Messages Transmitted between These Temporary Visitors to the Bone Surface? *Front Endocrinol (Lausanne) eCollection* 2015. doi: 10.3389/fendo.2015.00041
- Smith JA, Poteet-Smith CE, Xu Y, Errington TM, Hecht SM, Lannigan DA (2005) Identification of the first specific inhibitor of p90 ribosomal S6 kinase (RSK) reveals an unexpected role for RSK in cancer cell proliferation. *Cancer Res* 65(3): 1027–1034
- Srivastava S, Zou ZQ, Pirollo K, Blattner W, Chang EH (1990) Germ-line transmission of a mutated p53 gene in a cancer-prone family with Li-Fraumeni syndrome. *Nature* 348(6303): 747–749
- Stark Z, Savarirayan R (2009) Osteopetrosis. *Orphanet J Rare Dis* 4: 5
- Stephens PJ, Greenman CD, Fu B, Yang F, Bignell GR, Mudie LJ, Pleasance ED, Lau KW, Beare D, Stebbings LA, McLaren S, Lin ML, McBride DJ, Varela I, Nik-Zainal S, Leroy C, Jia M, Menzies A, Butler AP, Teague JW, Quail MA, Burton J, Swerdlow H, Carter NP, Morsberger LA, Iacobuzio-Donahue C, Follows GA, Green AR, Flanagan AM, Stratton MR, Futreal PA, Campbell PJ (2011) Massive genomic rearrangement acquired in a single catastrophic event during cancer development. *Cell* 144(1): 27–40
- Stoker AW (2005) Protein tyrosine phosphatases and signalling. *J Endocrinol* 185(1): 19–33
- Stratford AL, Reipas K, Hu K, Fotovati A, Brough R, Frankum J, Takhar M, Watson P, Ashworth A, Lord CJ, Lasham A, Print CG, Dunn SE. Targeting p90 ribosomal S6 kinase eliminates tumor-initiating cells by inactivating Y-box binding protein-1 in triple-negative breast cancers. *Stem Cells* 30(7): 1338–1348
- Sueyoshi T, Jono H, Shinriki S, Ota K, Ota T, Tasaki M, Atsuyama E, Yakushiji T, Ueda M, Obayashi K, Mizuta H, Ando Y (2012) Therapeutic approaches targeting midkine suppress tumor growth and lung metastasis in osteosarcoma. *Cancer Lett* 316(1): 23–30
- Tamura H, Fukada M, Fujikawa A, Noda M (2006) Protein tyrosine phosphatase receptor type Z is involved in hippocampus-dependent memory formation through dephosphorylation at Y1105 on p190 RhoGAP. *Neurosci Lett* 399(1-2): 33–38

- Tan A, Ralston SH (2014) Paget's disease of bone. *QJM* 107(11): 865–869
- Teitelbaum SL (2000) Bone resorption by osteoclasts. *Science* 289(5484): 1504–1508
- Toguchida J, Ishizaki K, Sasaki MS, Nakamura Y, Ikenaga M, Kato M, Sugimot M, Kotoura Y, Yamamuro T (1989) Preferential mutation of paternally derived RB gene as the initial event in sporadic osteosarcoma. *Nature* 338(6211): 156–158
- Tonks NK (2006) Protein tyrosine phosphatase: from genes, to function, to disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7(11): 833–846
- Tsuchiya T, Sekine K, Hinohara S, Namiki T, Nobori T, Kaneko Y (2000) Analysis of the p16INK4, 14ARF, p15, TP53, and MDM2 genes and their prognostic implications in osteosarcoma and Ewing sarcoma. *Cancer Genet Cytogenet* 120(2): 91–98
- Turner CH, Forwood MR, Otter MW (1994) Mechanotransduction in bone: do bone cells act as sensors of fluid flow? *FASEB J* 8(11): 875–878
- Unni KK, Inwards CY, Bridge JA, Kindblom LG, Wold LE (2005) Tumors of the bones and joints. American Registry of Pathology, Washington, D.C.
- Utepbegenov D, Derewenda U, Olekhnovich N, Szukalska G, Banerjee B, Hilinski MK, Lannigan DA, Stukenberg PT, Derewenda ZS (2012) Insights into the inhibition of the p90 ribosomal S6 kinase (RSK) by the flavonol glycoside SL0101 from the 1.5 Å crystal structure of the N-terminal domain of RSK2 with bound inhibitor. *Biochemistry* 51(33):6499–6510
- Väänänen HK, Zhao H, Mulari M, Halleen JM (2000) The cell biology of osteoclast function. *J Cell Sci* 113(3): 377–381
- Vakifahmetoglu H, Olsson M, Zhivotovsky B (2008) Death through a tragedy: mitotic catastrophe. *Cell Death Differ* 15(7): 1153–1162
- Venkatachalam S, Tyner SD, Pickering CR, Boley S, Recio L, French JE, Donehower LA (2001) Is p53 haploinsufficient for tumor suppression? Implications for the p53<sup>+/-</sup> mouse model in carcinogenicity testing. *Toxicol Pathol* 29 Suppl: 147–154
- Vetter SW, Zhang ZY (2002) Probing the Phosphopeptide Specificities of Protein Tyrosine Phosphatases, SH2 and PTB Domains with Combinatorial Library Methods. *Curr Protein Pept Sci* 3(4): 365–397
- Vitale I, Galluzzi L, Castedo M, Kroemer G (2011) Mitotic catastrophe: a mechanism for avoiding genomic instability. *Nature reviews. Nat Rev Mol Cell Biol* 12(6): 385–392
- Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL (1988) Genetic alterations during colorectal tumor development. *N Engl J Med* 319(9): 525–532
- Vogelstein B, Kinzler KW (1993) The multistep nature of cancer. *Trends Genet* 9(4): 138–141
- Wagner (2002) Functions of AP1 (Fos/Jun) in bone development. *Ann Rheum Dis* 61 Suppl 2:ii40–2
- Walker EC, McGregor NE, Poulton IJ, Pompolo S, Allan EH, Quinn JM, Gillespie MT, Martin TJ, Sims NA (2008) Cardiotrophin-1 is an osteoclast-derived stimulus of bone formation required for normal bone remodeling. *J Bone Miner Res* 23(12): 2025–2036
- Walkley CR, Qudsi R, Sankaran VG, Perry JA, Gostissa M, Roth SI, Rodda SJ, Snay E, Dunning P, Fahey FH, Alt FW, McMahon AP, Orkin SH (2008) Conditional mouse osteosarcoma, dependent on p53 loss and potentiated by loss of Rb, mimics the human disease. *Genes Dev* 22(12) :1662–1676
- Wang LL, Gannavarapu A, Kozinetz CA, Levy ML, Lewis RA, Chintagumpala MM, Ruiz-Maldonado R, Contreras-Ruiz J, Cunniff C, Erickson RP, Lev D, Rogers M, Zackai EH, Plon SE (2003) Association between osteosarcoma and deleterious mutations in the RECQL4 gene in Rothmund-Thomson syndrome. *J Natl Cancer Inst* 95(9): 669–674

- Wei G, Lonardo F, Ueda T, Kim T, Huvos AG, Healey JH, Ladanyi M (1999) CDK4 gene amplification in osteosarcoma: reciprocal relationship with INK4A gene alterations and mapping of 12q13 amplicons. *Int J Cancer* 80(2): 199–204
- World Health Organization (1994) Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. Report of a WHO Study Group. *World Health Organ Tech Rep Ser* 843: 1–129
- Widhe B, Widhe T (2000) Initial symptoms and clinical features in osteosarcoma and Ewing sarcoma. *J Bone Joint Surg Am* 82(5): 667–674
- Wolff AE, Jones AN, Hansen KE (2008) Vitamin D and musculoskeletal health. *Nat Clin Pract Rheumatol* 4(11): 580–588
- Wu JX, Carpenter PM, Gresens C, Keh R, Niman H, Morris JW, Mercola D (1990) The proto-oncogene c-fos is over-expressed in the majority of human osteosarcomas. *Oncogene* 5(7): 989–1000
- Wu Y, Zhang Y, Yin Q, Xia H, Wang J (2014) Platelet-derived growth factor promotes osteoblast proliferation by activating G-protein-coupled receptor kinase interactor-1. *Mol Med Rep* 10(3): 1349–1354
- Wunder JS, Gokgoz N, Parkes R, Bull SB, Eskandarian S, Davis AM, Beauchamp CP, Conrad EU, Grimer RJ, Healey JH, Malkin D, Mangham DC, Rock MJ, Bell RS, Andrulis IL (2005) TP53 mutations and outcome in osteosarcoma: a prospective, multicenter study. *J Clin Oncol* 23(7): 1483–1490
- Xing J, Ginty DD, Greenberg ME (1996) Coupling of the RAS-MAPK pathway to gene activation by RSK2, a growth factor-regulated CREB kinase. *Science* 273(5277): 959–963
- Yang X, Matsuda K, Bialek P, Jacquot S, Masuoka HC, Schinke T, Li L, Brancorsini S, Sassone-Corsi P, Townes TM, Hanauer A, Karsenty G (2004) ATF4 is a substrate of RSK2 and an essential regulator of osteoblast biology; implication for Coffin-Lowry Syndrome. *Cell* 117(3): 387–398
- Yotov WV, Hamel H, Rivard GE, Champagne MA, Russo PA, Leclerc JM, Bernstein ML, Levy E (1999) Amplifications of DNA primase 1 (PRIM1) in human osteosarcoma. *Genes Chromosomes Cancer* 26(1): 62–69
- Zaidi M (2007) Skeletal remodeling in health and disease. *Nat Med* 13(7): 791–801
- Zhao S, Kurenbekova L, Gao Y, Roos A, Creighton CJ, Rao P, Hicks J, Man TK, Lau C, Brown AM, Jones SN, Lazar A, Ingram D, Lev D, Donehower LA, Yustein JT (2015) NKD2, a negative regulator of Wnt signaling, suppresses tumor growth and metastasis in osteosarcoma. *Oncogene* 34(39): 5069–5079

## Abbildung

- Bley CL, Centgraf M, Cieslik A, Hack J, Hohloch L, Holzheimer C, Horn H, Kircher C, Kleiner P, Schneider A, Schulte A (2015) *I care Anatomie, Physiologie*. Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, S. 345. Lizenznummer 3710091084245

## 8 Anhang

### 8.1 Material

#### 8.1.1 Geräte

Produkt	Hersteller
Analysenwaage (CPA224S)	Sartorius
Autotechnikon (2050)	Bavimed Laborgeräte
CO <sub>2</sub> /O <sub>2</sub> Brutschrank (B 6200)	Heraeus
Durchflusszytometer (FACS Calibur)	Becton, Dickinson and Co.
Elektrophorese-Spannungsgerät	Bio-Rad Laboratories
Filmentwickler (Optimax 1170-1-0000)	Protec
Filmscanner (Scanjet G4050)	Hewlett-Packard Company
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss AxioLab
Gel-Dokumentationsanlage (Universal Hood 75S)	Bio-Rad Laboratories
Gelelektrophoresekammer (Sub-Cell, SDS/PAGE Mini Protean)	Bio-Rad Laboratories
Homogenisierer (Ultra-Turrax T25)	IKA®-Werke
Inkubationsschüttler (Innova 4000)	New Brunswick Scientific
Konfokales Laser-Scanning Mikroskop (TCS SP5)	Leica Microsystems
Kontakt-Röntgenapparat (Faxitron Xray Sterile)	Faxitron Xray
Leica TCS SP5 II Konfokal-Mikroskop	Leica Camera
Lichtmikroskop (Axioskop)	Carl Zeiss
Lichtmikroskop (IX50)	Olympus
Mikropipetten (Research Plus)	Eppendorf
Mikroskopkamera (Axiocam)	Carl Zeiss
Mikroskopkamera (DP72)	Olympus
Mikrotiterplatten-Lesegerät (Versamax)	Molecular Devices,
Neubauer Zählkammer	Glaswarenfabrik Karl Hecht
PCR-System (Mastercycler pro S)	Eppendorf
pH Meter	WTW
Pipettierhilfe (Pipetboy acu)	INTEGRA Biosciences
Präzisionswaage (Talent TE2101)	Sartorius
Real-Time PCR System (StepOnePlus)	Applied Biosystems
Röntgen-Mikrocomputertomograf (µCT 40)	Scanco Medical
Rotationsmikrotom (Reichert-Jung Mod.1140/Autocut)	Cambridge Instruments
Schleifgerät (Pheonix Alpha)	Buehler
Sicherheitswerkbank (HS12)	Heraeus
Spektralphotometer (Nanodrop ND1000)	Thermo Fisher Scientific
Spektralphotometer (Ultraspec 2100 pro)	Biochrom
Spiegelreflexkamera (EOS 10D)	Canon
Thermoblock (Thermomixer Comfort)	Eppendorf
Tischzentrifuge (5415D, 5430R)	Eppendorf
Vortexer (Certomat MV)	B. Braun Biotechnologie International
Wasserbad	GFL Gesellschaft für Labortechnik
Wiegeschüttler (Duomax 1030)	Heidolph Instruments
Zentrifuge (GS-6)	Beckman Coulter

#### 8.1.2 Verbrauchsmaterial

Produkt	Hersteller
Deckgläser	Carl Roth
Durchflusszytometrierohrchen	Becton, Dickinson and Co.
Einweg-Untersuchungshandschuhe	Supermax Healthcare
Filterspitzen	Sarstedt
Flaschenaufsatzfilter	Thermo Fisher Scientific

Gewebekulturschale (6-Well, 12-Well, 24-Well, 96-Well)	Becton, Dickinson and Co.
Kanülen (0, 60 x 25 mm; 0, 40 x 20 mm)	B. Braun Melsungen
Küvetten (10 x 4 x 45 mm)	Brand
Mikroreaktionsgefäße (1,5 ml; 2 ml)	Eppendorf
Objektträger	Glaswarenfabrik Karl Hecht
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging
PCR Reaktionsgefäße	Biozym Scientific
Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Eppendorf
Präzisionswischtücher	Kimberly-Clark
qRT-PCR Dichtfolie	Thermo Fisher Scientific
qRT-PCR Reaktionsplatte	Thermo Fisher Scientific
Reaktionsgefäße (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One International
Röntgenfilme	Agfa-Gevaert
Rundbodenröhrchen	Greiner Bio-One International
Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Becton, Dickinson and Co.
Skalpellsklingen	C. Bruno Bayha
Spritzen	B. Braun Melsungen
Sterilfilter	Becton, Dickinson and Co.
Zellkulturflaschen (T-25, T-75, T-175)	Sarstedt
Zellschaber	Sarstedt
Zellsieb (70 µm, 100 µm)	Becton, Dickinson and Co.

### 8.1.3 Chemikalien und Substanzen

Produkt	Abkürzung	Hersteller	CAS-Nummer
			H- und P-Sätze
Adefofix		Adefo-Chemie	
Agarose (SeaKem® LE)		Lonza Group	
Albumin Standard (2 mg/ml)	BSA	Thermo Fisher Scientific	
Ammoniumhydroxid		Sigma-Aldrich	1336-21-6 H: 272-302-315-319-335-334-317 P: 273-280-305+351+338-309+310
Ampicillin	Amp	Sigma-Aldrich	69-53-4 H: 315-317-319-334-335 P: 261-280-305+351+338-342+311
Benzoylperoxid	BPO	Merck	94-36-0 H: 242-319-317 P: 210-220-280-305+351+338-302+352
BI-D1870	BI	Calbiochem	
Bradford-Reagenz		Bio-Rad Laboratories	
Chrom(III)-kaliumsulfat	Chromalaun	Merck	7788-99-0 H: 315-319 P: 302+352-305+351+338
Diethylpyrocarbonat	DEPC	Sigma-Aldrich	1609-47-8 H: 302-315-319-335 P: 261-305+351+338
Dimethylsulfoxid	DMSO	Carl Roth	
Di-Natriumhydrogenphosphat		Sigma-Aldrich	
Dithiothreitol	DTT	Sigma-Aldrich	7634-42-6 H: 302-315-319 P: 302+352-305+351+338
DNA-Ladder, GeneRuler™ 1 kb		Thermo Fisher Scientific	
dNTP Mix, 10mM Each		Thermo Fisher Scientific	
DPX Eindeckmittel		Sigma-Aldrich	
Ethanol		Merck	64-17-5 H: 225 P: 210

Ethylendiamintetraacetat	EDTA	Merck	60-00-4 H: 319 P: 305+351+338
FACSClean		Becton, Dickinson and Co	
FACSFlow		Becton, Dickinson and Co	
FACSRinse		Becton, Dickinson and Co	
FKS für Obl (Hyclone, RYL35914)		Thermo Fisher Scientific	
FKS für Ocl (Gibco, 41G8512K)		Thermo Fisher Scientific	
Fluoroshild™ DAPI Eindeckmedium		Sigma-Aldrich	
Formafix 3,5 %		Grimm med. Logistik	
Formaldehyd (37 % Lösung)		Sigma-Aldrich	50-00-0 H: 351-331-311-301-314-317 P: 301+310-303+361+353-305+351+338 320-361-405-501
GIBCO® Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline)	PBS	Thermo Fisher Scientific	
Isopropanol		Carl Roth	67-63-0 H: 225-319-336 P: 210-233-305+351+338
Kaliumchlorid	KCl	Merck	
Kaliumhydrogenphosphat		Merck	
Kohlendioxid		TMG	124-38-9 H: 280 P: 410+403
L-Ascorbinsäure	Asc	Sigma-Aldrich	
LB-Agar		Invitrogen	
LB-Pulver		Invitrogen	
McCoy's 5A Medium		Thermo Fisher Scientific	
Methanol	MeOH	Carl Roth	67-56-1 H: 225-331-311-301-370 P: 210-233-280-302+352
Methylmethacrylat	MMA	Merck	80-62-6 H: 225-335-315-317 P: 210-262-280-301+310-315
Minimum Essential Medium Eagle Alpha Modification		Sigma-Aldrich	
Monoglycol-Butylether		Sigma-Aldrich	111-76-2 H: 311-331-302-315-319 P: 261-270-280-301+312-302+352-305 +351+338
N,N Dimethyl-p-Toluidin	DMT	Merck	99-97-8 H: 301+311+331-373-412 P: 261-273-280-301+310-311
Natrium-3,4-dihydroxy-9,10-dioxo-2-anthracenesulfonat	Alizarin Rot S	Chroma	130-22-3 H: 315-319-335 P: 261-305+351+338
Natriumcarbonat		Carl Roth	497-19-8 H: 319 P: 260-305+351+338
Natriumchlorid	NaCl	Sigma-Aldrich	
Natriumdihydrogenphosphat		Sigma-Aldrich	
Natriumfluorid	NaF	Sigma-Aldrich	7681-49-4 H: 301-319-315 P: 305+351+338-302+352-309-310
Natriumhydrogencarbonat		Merck	
Natriumhydroxid		Avantor Performance Materials	1310-73-2 H: 314-290 P: 280-301+330+331-309+310-305+351 +338

Natriumorthovanadat		Sigma-Aldrich	
Natriumpervanadat		Merck	
Natriumpyrophosphat		Sigma-Aldrich	
Nonylphenyl- polyethyleneglykol-acetat	NPG	Sigma-Aldrich	
Penicillin	Pen	Thermo Fisher Scientific	118-53-6 H: 315-317-320-334-335-361 P: 264-304+340-305+351+338-312-337 +313-332+313
Phenol		Carl Roth	108-95-2 H: 341-331-311-301-373-314 P: 280-302+352-301+330+331-309-310 -305+351+338
Phenylmethylsulfonylfluorid	PMSF	Sigma-Aldrich	329-98-6 H: 301-314 P: 280-305+351+338-310
Phosphatase-Inhibitor, PhosSTOP		Roche Applied Science	
Pikrinsäure		Sigma-Aldrich	88-89-1 H: 201-331-311-301 P: 210-280-301+310-312
Polyoxyethylen(20)-sorbitan- monolaurat	Polysorbat 20	Carl Roth	
Propan-1,2,3-triol	Glycerin	Merck	
Propidiumiodid	PI	Sigma-Aldrich	25535-16-4 H: 315-319-335 P: 261-305+351+338
Protease Inhibitor, complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets		Roche Applied Science	
Roti®-P/C/I (Phenol/Chlororom DNA Aufreinigungslösung)		Carl Roth	
Rotiphorese® Gel 30 (30 % Acrylamidlösung)		Carl Roth	
Salpetersäure (65 % Lösung)		Sigma-Aldrich	
Salzsäure		Sigma-Aldrich	7647-01-0 H: 290-314-335 P: 234-260-304+340-303+361+353 -305+351+338-309+311-501
Säurefuchsin		Merck	3244-88-0 H: 315-319-335 P: 261-305+351+338
Silbernitrat		Merck	7761-88-8 H: 272-314-410 P: 273-280-301+330+331-305+351+338 -309+310
Stickstoff		TMG	7727-37-9 H: 280 P: 403
Streptomycin	Strep	Thermo Fisher Scientific	
SYBR® Green PCR Master Mix		Applied Biosystems	
Tetramethylbenzidin	TMB	GE Healthcare	54827-17-7 H: 315-319-335 P: 261-305+351+338
Toluidinblau O		Sigma-Aldrich	92-31-9 H: 302-315-351-373 P: 302+352-314
Trichlormethan	Chloroform	Sigma-Aldrich	67-66-3 H: 302-315-351-373 P: 302+352-314

Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Tris Base	Sigma-Aldrich	77-86-1 H: 315-319-335 P: 261-305+351+338
Tris(hydroxymethyl)aminomethan Hydrochloride	Tris/HCl	Sigma-Aldrich	1185-53-1 H: 315-319-335 P: 261-305+351+338
Triton X-100		Sigma-Aldrich	
TRIzol® Reagent		Invitrogen	
Trypsin/EDTA		Gibco/Invitrogen	
Wasserstoffperoxid		Merck	7722-84-1 H: 271-332-302-314 P: 220-261-280-305+351+338-310
β-Glycerolphosphat	β-Gly	Sigma-Aldrich	
β-Mercaptoethanol		Sigma-Aldrich	60-24-2 H: 301-310-330-315-318-410 P: 280-273-302+352-304+340-305+351+338-309-310
1,4-Dimethylbenzol	p-Xylol	Merck	
10x DreamTaq Green Buffer		Thermo Fisher Scientific	
1α,25-Dihydroxyvitamin-D <sub>3</sub>	Vitamin-D <sub>3</sub>	Sigma-Aldrich	32222-06-3 H: 300-310-330-361 P: 260-264-280-284-301+310-302+350
2-Isopropyl-5-methylphenol	Thymol	Sigma-Aldrich	89-83-8 H: 302-314-411 P: 273-301+330+331-305+351+338-309
2-Methoxyethylacetat		Merck	110-49-6 H: 302-312-332-360FD P: 201-280-308+313
3-Aminophthalhydrazid	Luminol	Sigma-Aldrich	521-31-3 H: 315-319-335 P: 261-305+351+338
5-Brom-2'-desoxyuridin	BrdU		59-14-3 H: 340-360D P: 201-281-308+313-405
6x DNA Loading Dye		Thermo Fisher Scientific	

### 8.1.4 Kits

Bezeichnung	Hersteller
Cell Proliferation Biotrak™ Version 2 ELISA	GE Healthcare
ECL Western Blotting Detection Reagents	GE Healthcare
EndoFree® Plasmid Maxi Kit	Qiagen
Lipofectamine™ 2000 reagent	Invitrogen
Nucleospin® Gel & PCR Cleanup	Macherey-Nagel
Nucleospin® RNA II	Macherey-Nagel
Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase Kit	Thermo Fisher Scientific
QIAprep Spin® Miniprep Kit	Qiagen
QuikChange Lightning Multi Site-Directed Mutagenesis	Agilent Technologies
Verso cDNA Kit	Thermo Fisher Scientific

### 8.1.5 Enzyme und Proteine

Name	Hersteller
Aprotinin	Sigma-Aldrich
Collagenase Ia from <i>C.histolyticum</i>	Sigma-Aldrich
Dispase II	Roche Applied Science
DNA-DreamTaq-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>	Thermo Fisher Scientific
LA Taq® DNA Polymerase	Takara Bio
msRANKL	Peprotech
Rekombinantes M-CSF	Peprotech
Rekombinantes murines Midkine	Peprotech
RNaseA	Roche Applied Science

### 8.1.6 Antikörper und andere Farbstoffe

Ziel	Antikörper	Isotyp	Verdünnung	Hersteller
$\alpha$ -Tubulin	$\alpha$ -Tubulin Alexa Fluor®488 Konjugat (monoklonal)	Maus IgG1	1:500	Cell Signaling
F-Aktin	Phalloidin Alexa Fluor®546 Konjugat	Toxin von <i>Amanita phalloides</i>	1:40	Molecular Probes
Phosphotyrosin	Phosphotyrosin Klon 4G10®, HRP Konjugat (monoklonal)	Maus IgG2b	1:25000	Merck Millipore
$\beta$ -Actin	$\beta$ -Actin (13E5) (monoklonal)	Kaninchen IgG	1:1000	Cell Signaling
Sekundärantikörper	Ziege-anti-Kaninchen IgG – HRP		1:5000	Santa Cruz

### 8.1.7 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotid-Primer wurden mit dem Programm *NCBI Primer-BLAST* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) bzw. dem *QuikChange Primer Design Tool* (<http://www.genomics.agilent.com/primerDesignProgram.jsp>) entworfen und von der Firma Eurofins Genomics GmbH synthetisiert.

#### 8.1.7.1 Primer für die Genotypisierung

Gen	Primersequenz (5'→3')	Fragmentgröße (bp)
<i>c-fos</i>	For: AGTCTGGCCTGCGGGTCTC Rev: GTCGGCTGGGAATGGTAGTAGG	600
<i>Mdk</i>	For: TAACCCAGGTTTTACCCCTA Rev: GTTGCAGGGCACCTTGCAATGGAC	360 (WT)
	For: TAACCCAGGTTTTACCCC Rev: GAGAACCTGCGTGCAATCCAT	400 (KO)
<i>Ptprz1</i>	For: AGATCCATTTCGTCTTGACGCTCC Rev: CACCTGCCTGGAAACTTGTACTG	400 (WT)
	For: GAAAAGCGCCTCCCCTACCCGGTAGAATTGAC Rev: CCAGACATGACACCCCAATGCCTGAACATCTC	650 (KO)
<i>Rsk2</i>	For: TTGTTGGTTTACTTTCTTCGGTCTG Rev: AAGATGATTGCTTTGCTTAGTTTA	230 (WT) 320 (KO)
	For: ACAGCGTGGTGGTACCTTAT Rev 1: TATACTCAGAGCCGGCCT Rev 2: CTATCAGGACATAGCGTTGG	450 (WT) 650 (KO)

### 8.1.7.2 Primer für qRT-PCR

Gen	Primersequenz (5'→3')	Fragmentgröße (bp)
<i>c-fos</i>	For: CGGGTTTCAACGCCGACTAC Rev: CAGGTCTGGGCTGGTGGAGA	206
<i>Gapdh</i>	For: GACATCAAGAAGGTGGTGAAGCAG Rev: CCAGACCCCATATAAACAGGAG	196
<i>Ptprz1</i>	For: TGGTGGTTATGATTCCAGATGGTC Rev: AAGTTCCTGCTGTACTCCCCCG	200

### 8.1.7.3 Mutagenese-Primer

Name	Primersequenz (5'→3')	Anwendung
G3218C	CTGTTGTCGTCCTCCACTC <u>C</u> CAGTGCTGGAGTTGG	Einfügen des Nukleotidaustausches G→C an Position 3218 des humanen <i>Ptprz1</i> -Gens (NM_001206838.1) (Rptpζ Mutation: C1073S)
G3227T	GTCCACTGCAGTGCTG <u>T</u> AGTTGGAAGAAGCAGGC	Einfügen des Nukleotidaustausches G→T an Position 3227 des humanen <i>Ptprz1</i> -Gens (NM_001206838.1) (Rptpζ Mutation: G1076V)

### 8.1.7.4 Primer für die Sequenzierung

Name	Primersequenz (5'→3')	Anwendung
Seq Mut	For: CAGGGATCCCAAAGCATGTTGCAGAT Rev: GTTGGTGCATAAGGGTTGTCAG	Verifizierung der ausgetauschten Nukleotide G3218C und G3227T

### 8.1.8 TaqMan® Gene Expression Assays

Alle verwendeten Reagenzien wurden von der der Firma Applied Biosystems bezogen und nach Angaben des Herstellers verwendet.

TaqMan® Gene Expression Master Mix #4369016

Gen	TaqMan®-Sonde
<i>Acp5</i>	Mm00475698_m1
<i>Aurkb</i>	Mm01718146_g1
<i>Bglap</i> (human)	Hs00609452_m1
<i>Bglap</i> (murin)	Mm03413826_mH
<i>Ccnb1</i>	Mm00838401_g1
<i>Ccnd1</i>	Mm00432359_m1
<i>Ccnd2</i>	Mm00438070_m1
<i>Cdc6</i>	Mm03048221_m1
<i>Cdca5</i>	Mm01233533_m1
<i>Cdk1</i>	Mm00772472_m1
<i>Cdk2</i>	Mm00443947_m1
<i>Cdkn1a</i>	Mm00432448_m1
<i>Cdkn1b</i>	Mm00438168_m1

Gen	TaqMan®-Sonde
<i>Cdkn2a</i>	Mm00494449_m1
<i>Cdkn2b</i>	Mm00483241_m1
<i>Chek1</i>	Mm01176757_m1
<i>Chek2</i>	Mm00443844_m1
<i>E2F2</i>	Mm00624964_m1
<i>Foxm1</i>	Mm00514924_m1
<i>Gapdh</i> (human)	433764
<i>Gapdh</i> (murin)	4308313
<i>Ibsp</i>	Mm00492555_m1
<i>Phex</i>	Mm00475698_m1
<i>Ptprz1</i> (human)	Hs00960146_m1
<i>Racgap1</i>	Mm00488847_m1
<i>Setd8</i>	Mm01201497_m1

### 8.1.9 Plasmide

Name	Beschreibung	Quelle
pRK5-Rptpζ	pRK5 Expressionsvektor für die Expression der kurzen humanen Rptpζ Variante (NM_001206838.1); Amp-R	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Frau Dr. Sheila Harroch (Institut Pasteur, Paris, FRA)
pCMV-GFP	pCMV Expressionsvektor für die Expression von GFP; Amp-R	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Frau Dr. Doreen Stimpel (Institut für experimentelle Pharmakologie, UKE,DE)

### 8.1.10 Bakterien

<i>E. coli</i> Stämme	Beschreibung	Quelle
TOP10	F-, mcrA, Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC), φ80lacZΔM15, ΔlacX74, deoR, recA1, araD139, Δ(ara-leu)7697, galU, galK, rpsL(StrR), endA1, nupG	Thermo Fisher Scientific
XL1 blue	recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac [F'proAB lacIqΔM15 Tn10 (TetR)]	Stratagene

### 8.1.11 Puffer und Lösungen

<u>Acrylat Gießlösung</u>	0,33 % Benzoylperoxid 11 % Nonylphenyl-polyethyleneglykol-acetat ad Methylmethacrylat (entstabilisiert)
<u>Acrylat Infiltrationslösung I</u>	0,33 % Benzoylperoxid ad Methylmethacrylat (entstabilisiert)
<u>Acrylat Infiltrationslösung II</u>	0,33 % Benzoylperoxid 11 % Nonylphenyl-polyethyleneglykol-acetat ad Methylmethacrylat (entstabilisiert)
<u>Alizarinrot Färbelösung</u>	40 mM Alizarinrot S ad H <sub>2</sub> O pH 4,2
<u>Ascorbat-Stammlösung</u>	10 mg/ml L-Ascorbinsäure ad H <sub>2</sub> O
<u>Biopsie-Lysis-Puffer</u>	100 mM EDTA 50 mM Tris Base 100 mM NaCl 1 % SDS ad H <sub>2</sub> O pH 8,0
<u>BI-Stammlösung</u>	10 mM BI-D1780 ad DMSO
<u>Chromalaun-Gelatine</u>	10 % Gelatine 4 % Chromalaun Lösung 60 Stk/l kleine Thymol Kristalle ad H <sub>2</sub> O
<u>Chromalaun-Lösung</u>	4 % Chromalaun ad H <sub>2</sub> O
<u>DEPC-H<sub>2</sub>O</u>	0,2 % DEPC ad H <sub>2</sub> O

<u>Immunfluoreszenz-Blockpuffer</u>	10 % FKS ad PBS
<u>Immunfluoreszenz-Permeabilisationspuffer</u>	0,1 % Triton X-100 ad PBS
<u>KLB-Puffer</u>	150 mM NaCl 25 mM Tris/HCl 5 mM EDTA 1 % Triton X-100 10 % Glycerol 1 mM PMSF 0,2 mg/ml Aprotinin 10 mM NAF 0,1 mM Natriumpervanadat 1 mM DTT ad H <sub>2</sub> O pH 7,4
<u>PI-Lösung</u>	25 µg/ml PI 0,1 mg/ml Rnase A 0,05 % Triton X-100 ad PBS
<u>PI-Stammlösung</u>	2,5 mg/ml PI ad PBS
<u>Proteinase-K-Stammlösung</u>	10 mg/ml Proteinase-K ad H <sub>2</sub> O
<u>RANKL-Stammlösung</u>	10 µg/ml msRANKL ad H <sub>2</sub> O
<u>RIPA-Puffer</u>	1 % NP-40 1 % Natriumdesoxycholat 0,1 % SDS 150 mM NaCl 2 mM EDTA 10 mM Natriumphosphat ad H <sub>2</sub> O pH 7,4
<u>Natriumthiosulfatlösung</u>	5 % Natriumthiosulfat ad H <sub>2</sub> O
<u>PBS-Puffer (1x)</u>	10 mM Di-Natriumhydrogenphosphat 137 mM NaCl 2,7 mM KCl 2 mM Kaliumhydrogenphosphat ad H <sub>2</sub> O pH 7,4
<u>M-CSF Stammlösung</u>	10 µg/ml M-CSF ad H <sub>2</sub> O
<u>Rnase A Stammlösung</u>	5 mg/ml Rnase A ad H <sub>2</sub> O
<u>Schneidelösung</u>	0,1 % Polysorbat 20 ad H <sub>2</sub> O
<u>Sodaformollösung</u>	473 mM Natriumcarbonat 24,8 % 37 % Formaldehydlösung ad H <sub>2</sub> O

<u>Strecklösung</u>	80 % Isopropanol 1 Tropfen/l Monoglykol-Butylether ad H <sub>2</sub> O
<u>TAE-Puffer (50x)</u>	2 M Tris/HCl 50 mM EDTA ad H <sub>2</sub> O pH 7,8
<u>TE-Puffer</u>	10 mM Tris Base 1 mM EDTA ad H <sub>2</sub> O pH 8,0
<u>Toluidin-Färbelösung</u>	32,7 mM Toluidinblau O ad H <sub>2</sub> O pH 4,5
<u>Van Gieson-Färbelösung</u>	4,27 mM Säurefuchsin 10 % Glycerin 0,5 % 65 % Salpetersäure ad gesättigte Pikrinsäure
<u>Vitamin-D<sub>3</sub> Stammlösung</u>	10 µM Vitamin-D <sub>3</sub> ad EtOH
<u>Von Kossa-Färbelösung</u>	194 mM Silbernitrat ad H <sub>2</sub> O
<u>β-Glycerophosphat-Stammlösung</u>	2 M β-Glycerophosphat ad H <sub>2</sub> O

### 8.1.12 Bakterien- und Zellkulturmedien

Medium	Zusammensetzung	Zusätze	Kultivierte Zellen
<b>Minimalmedium</b>	32,5 g/l α-MEM Pulver 2,2 g/l NaHCO <sub>3</sub> ad H <sub>2</sub> O pH 7,4		
<b>Osteoblasten-medium</b>	Minimalmedium	10 % FKS (Obl) 100 U/ml Penicillin/Streptomycin	Primäre murine Osteoblasten Murine Osteosarkom-Zelllinien
<b>Osteoblasten-Differenzierungs-medium</b>	Osteoblastenmedium	50 µg/ml Ascorbinsäure 10 mM β-Glycerophosphat	Primäre murine Osteoblasten
<b>Osteoklasten-medium</b>	Minimalmedium	10 % FKS (Ocl) 100 U/ml Penicillin/Streptomycin	Primäre Osteoklasten
<b>Osteoklasten-Differenzierungs-medium</b>	Osteoklastenmedium	10 nM Vitamin-D <sub>3</sub> 20 ng/ml M-CSF 40 ng/ml msRANKL	Primäre Osteoklasten

<b>Vollmedium für humane OS-Zelllinien</b>	Mc Coy's 5A Medium	10 % FKS (Obl) 100 U/ml Penicillin/Streptomycin	U2OS Zellen
		20 % FKS (Obl) 100 U/ml Penicillin/Streptomycin	SaOS-2-Zellen
<b>Fertigmedium für humane Osteoblastenkulturen</b> Osteoblasten-Wachstumsmedium (PromoCell, C-27001) Osteoblasten-Mineralisierungssmedium (PromoCell, C-27020)			Primäre humane Osteoblasten
<b>LB-Medium</b>	32 g/l LB-Pulver ad H <sub>2</sub> O		
<b>LB/Amp-Medium</b>	LB-Medium	286 µM Ampicilin	<i>E.coli</i> (TOP10) <i>E.coli</i> (XL1 blue)
<b>SOC Medium</b>			<i>E.coli</i> -Transformation

## 8.2 Sicherheit und Entsorgung

Alle Versuche wurden in Laboren der Sicherheitsstufe 1 durchgeführt. Der Umgang mit Chemikalien erfolgte unter Beachtung der jeweiligen Sicherheitsdatenblätter. Alle Chemikalien, Lösungen und Puffer sowie Komponenten der Versuchstiere wurden entsprechend der Entsorgungsrichtlinien des UKE entsorgt. Die Sicherheitsinformationen zu den verwendeten Chemikalien und Substanzen sind in Kapitel 8.1.3 aufgeführt.

### Bedeutung der H- und P-Sätze

H-Satz	Gefährdung	P-Satz	Sicherheitshinweis
201	Explosiv, Gefahr der Massenexplosion	201	Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen
225	Flüssigkeit und Dampf leicht entzündbar	210	Von Hitze / Funken / offener Flamme / heißen Oberflächen fernhalten. Nicht rauchen
226	Flüssigkeit und Dampf entzündbar	220	Von Kleidung / brennbaren Materialien fernhalten / entfernt aufbewahren
242	Erwärmung kann Brand verursachen	233	Behälter dicht verschlossen halten
271	Kann Brand oder Explosion verursachen; starkes Oxidationsmittel	234	Nur im Originalbehälter aufbewahren
272	Kann Brand verstärken; Oxidationsmittel	260	Staub / Rauch / Gas / Nebel / Dampf / Aerosol nicht einatmen
280	Enthält Gas unter Druck; kann bei Erwärmung explodieren	261	Einatmen von Staub / Rauch / Gas / Nebel / Dampf / Aerosol vermeiden
290	Kann gegenüber Metallen korrosiv sein	262	Nicht in die Augen, auf die Haut oder auf die Kleidung gelangen lassen
300	Lebensgefahr bei Verschlucken	264	Nach Gebrauch gründlich waschen
301	Giftig bei Verschlucken	270	Bei Gebrauch nicht essen, trinken oder rauchen
302	Gesundheitsschädlich bei Verschlucken	273	Freisetzung in die Umwelt vermeiden
310	Lebensgefahr bei Hautkontakt	280	Schutzhandschuhe / Schutzkleidung / Augenschutz / Gesichtsschutz tragen
311	Giftig bei Hautkontakt	284	Atemschutz tragen
312	Gesundheitsschädlich bei Hautkontakt	301	Bei Verschlucken:
314	Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden	302	Bei Berührung mit der Haut:
315	Verursacht Hautreizungen	303	Bei Berührung mit der Haut (oder dem Haar):
317	Kann allergische Hautreaktionen verursachen	304	Bei Einatmen:
318	Verursacht schwere Augenschäden	305	Bei Kontakt mit den Augen:
319	Verursacht schwere Augenreizung	307	Bei Exposition
320	Verursacht Augenreizung	308	Bei Exposition oder falls betroffen:
330	Lebensgefahr bei Einatmen	309	Bei Exposition oder Unwohlsein:
331	Giftig bei Einatmen	310	Sofort Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen
332	Gesundheitsschädlich bei Einatmen	311	Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen
334	Kann bei Einatmen Allergie, asthmaartige Symptome oder Atembeschwerden verursachen	312	Bei Unwohlsein Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen
335	Kann die Atemwege reizen	313	Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen
336	Kann Schläfrigkeit und Benommenheit verursachen	314	Bei Unwohlsein ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen
340	Kann genetische Defekte verursachen	315	Sofort ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen
341	Kann vermutlich genetische Defekte verursachen	320	Besondere Behandlung dringend erforderlich
350	Kann Krebs erzeugen	330	Mund ausspülen
351	Kann vermutlich Krebs erzeugen	331	Kein Erbrechen herbeiführen
360D	Kann das Kind im Mutterleib schädigen	332	Bei Hautreizung:
360F	Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen	337	Bei anhaltender Augenreizung:
361	Kann vermutlich die Fruchtbarkeit beeinträchtigen oder das Kind im Mutterleib schädigen	338	Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter ausspülen.
361f	Kann vermutlich die Fruchtbarkeit beeinträchtigen	340	Die betroffene Person an die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert

370	Schädigt die Organe	342	Bei Symptomen der Atemwege:
372	Schädigt die Organe bei längerer oder wiederholter Exposition	350	Behutsam mit viel Wasser und Seife waschen
373	Kann die Organe schädigen bei längerer oder wiederholter Exposition	351	Einige Minuten lang behutsam mit Wasser ausspülen
410	Sehr giftig für Wasserorganismen mit langfristiger Wirkung	352	Mit viel Wasser und Seife waschen
411	Giftig für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung	353	Haut mit Wasser abwaschen / duschen
412	Schädlich für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung	361	Alle kontaminierten Kleidungsstücke sofort ausziehen
		403	An einem gut belüfteten Ort aufbewahren
		405	Unter Verschluss aufbewahren
		410	Vor Sonnenbestrahlung schützen
		501	Inhalt / Behälter der entsprechenden Entsorgung zuführen

### 8.3 Abkürzungsverzeichnis

In diesem Verzeichnis nicht aufgeführt sind:

- im DUDEN zu findende Abkürzungen
- SI-Einheiten, deren Symbole sowie Zeichen und Kürzel aus chemischen Formeln
- Kurzbezeichnungen der verwendeten Chemikalien und Substanzen. Diese werden in Kapitel 8.1.3 erläutert.

μCT	Mikro Computertomographie
Acp5	<i>Acid phosphatase 5</i> = kodierendes Gen für TRAP
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i> , Varianzanalyse
ASBMR	<i>American Society for Bone and Mineral Research</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
Aurkb	<i>Aurora kinase B</i>
Bglap	<i>Bone gamma carboxyglutamate protein</i> , kodierendes Gen für Osteocalcin
bp	Base pairs, Basenpaare
C/S Mutante	Aminosäureaustausch C1073S (Austausch von Cystein nach Serin an Position 1073)
Ccnb1	<i>Cyclin b1</i>
Ccnd1	<i>Cyclin d1</i>
Ccnd2	<i>Cyclin d2</i>
Cdc6	<i>Cell division cycle 6</i>
Cdca5	<i>Cell division cycle associated 5</i>
Cdk1,2	<i>Cyclin-dependent kinase</i>
Cdkn1a (p21)	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor p21</i>
Cdkn1b (p27)	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor p27</i>
Cdkn2a (p16)	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor p16</i>
Cdkn2b (p15)	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor p15</i>
cDNA	<i>Complementary DNA</i> , komplementäre DNA
c-Fos	<i>FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog</i>
Chek1,2	<i>checkpoint kinase 1,2</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
E2F2	<i>E2F transcription factor 2</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i> , Durchflusszytometrie
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
FKS	Fötales Kälberserum
For	5'-3'Primer ( <i>Forward</i> )
Foxm1	<i>Forkhead box M1</i>
G/V Mutante	Aminosäureaustausch G1076V (Austausch von Glycin nach Valin an Position 1076)
G <sub>1</sub> , G <sub>2</sub> -Phase	<i>Gap</i> -Phasen des Zellzyklus
Gapdh	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
gDNA	genomische DNA
GFP	<i>Green fluorescence protein</i> , Grün fluoreszierendes Protein
hObl	humane Osteoblasten
HRP	<i>Horse raddish peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase

---

lbsp	<i>Integrin binding sialoprotein</i>
LOH	<i>Loss of heterozygosity</i>
M-CSF	<i>Macrophage colony-stimulating factor</i>
Mdk	Midkine
M-Phase	Mitose-Phase des Zellzyklus
n	Anzahl der untersuchten Proben, biologische Replikate
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
n.d.	Nicht detektierbar
o.B.	Ohne Befund
Obl	Osteoblast
Ocl	Osteoklast
OS	Osteosarkom
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> , Polymerase Kettenreaktion
Phex	<i>Phosphate regulating endopeptidase homolog, X-linked</i>
PTH	Parathormon
PTK	Protein-Tyrosinkinasen
PTP	Protein-Tyrosinphosphatasen
Ptprz1	Protein Tyrosin Phosphatase, Rezeptor-Typ zeta, Polypeptid 1, kodierendes Gen für Rptp $\zeta$
qRT-PCR	Quantitative Real Time PCR
r.E.	Relative Expression
Racgap1	<i>Rac GTPase activating protein 1</i>
RANKL	<i>Receptor activator of NF-<math>\kappa</math>B ligand</i>
RB1	<i>Retinoblastoma 1</i>
Rev	3'-5'Primer (Reverse)
rH	<i>Relative Humidity</i> , Relative Luftfeuchtigkeit
rpm	<i>Rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
Rptp $\zeta$	Rezeptor-Proteintyrosinphosphatase $\zeta$
Rsk2	<i>Ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 2</i>
RT	Raumtemperatur
Runx2	<i>Runt-related transcription factor 2</i>
SD	<i>Standard deviation</i> , Standardabweichung
Setd8	<i>SET domain containing (lysine methyltransferase) 8</i>
SH2	<i>Src-Homology 2</i>
S-Phase	Synthese-Phase des Zellzyklus
TP53	<i>Tumor protein 53</i> ; kodierendes Gen für humanes p53
TRAP	<i>Tartrate-resistant acid phosphatase</i>
Trp53	<i>Transformation related protein 53</i> ; kodierendes Gen für murines p53
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
VTH	Zentrale Versuchstierhaltung
WHO	<i>World Health Organization</i> , Weltgesundheitsorganisation
WS	Wirbelsäule
WT	Wildtyp

## 9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich bei der Entstehung dieser Arbeit unterstützt haben.

Mein erster Dank geht an Herrn Prof. Dr. rer. nat. Thorsten Schinke und Prof. Dr.med. Michael Amling für die Vergabe der Promotionsarbeit und die Bereitstellung ausgezeichneter Arbeitsbedingungen. Herrn Thorsten Schinke danke ich besonders für die stetige Unterstützung, das Engagement, die anregenden Diskussionen, das uneingeschränkte Verständnis sowie für die äußerst nette Zusammenarbeit. Ebenso danke ich Herrn Dr. Jean-Pierre David für die Betreuung des Rsk2-Projekts.

Frau Dr. med. Elke Oetjen bin ich sehr dankbar für die Übernahme des zweiten Gutachtens sowie für die Betreuung meiner Promotionsarbeit für das Department Chemie.

Ein weiterer Dank geht an Herrn Dr. Peter Nollau, Frau Dr. Sophia Buhs und Frau Dr. Anna-Katharina Kurze des Forschungsinstituts Kinderkrebs-Zentrum Hamburg für die Erstellung der SH2-Profile, die unkomplizierte Zusammenarbeit und die fachlichen Anregungen.

Ebenso möchte ich mich bei den Tierpflegern der VTH für die zuverlässige Betreuung und Pflege der Mauskolonien bedanken.

Ganz herzlich danke ich allen Mitarbeitern des IOBMs für die kollegiale Zusammenarbeit, die ständige Hilfsbereitschaft und das äußerst nette Arbeitsklima. Vor allem danke ich Anke Jeschke, die mir bei der Planung und Durchführung meiner Versuche stets mit großem Engagement zur Seite stand. Des Weiteren bedanke ich mich bei Mona Neven, Claudia Reymers und Stephanie Peters für die Unterstützung jeglicher Art, die Aufmerksamkeit und ihr stets offenes Ohr.

Ein großes Dankeschön an Dorothee.

Mein ganz besonderer Dank geht an Doreen. Natürlich auch an Steffi, Anna, Ionida, Caro und Maria. Es ist ein unbeschreibliches Glück, euch in meinem Leben zu haben.

Arne, dir danke ich für so vieles.

Mein größter Dank geht an meine Familie, die immer an mich glaubt und mich in jeder Lebenssituation uneingeschränkt unterstützt.

## 10 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die vorliegende Dissertation selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt zu haben.

.....  
Ort, Datum

.....  
Unterschrift