

Aus der Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik
Klinik für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie
an der Universität Tübingen

**In primären humanen Osteoblasten hemmt TGF- β_1 die
Genexpression von HDAC9 – eine mögliche Rolle bei
der Osteogenese?**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Heuberger, Elisabeth Anna

2018

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. A. Nüssler

2. Berichterstatter: Professor Dr. D. Alexander-Friedrich

Tag der Disputation: 15.03.2018

MEINER FAMILIE

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Knochengewebe	2
1.2 Frakturheilung.....	3
1.3 Die Transforming Growth Factor β (TGF- β) Familie	5
1.3.1 Zelluläre Signaltransduktion.....	5
1.3.2 Transforming Growth Factor β_1	6
1.4 Histondeacetylasen	8
1.4.1 Einteilung.....	9
1.4.2 Funktionen und Aufgaben im Knochen.....	10
1.4.3 Interaktion mit Runx2.....	11
1.5 Histondeacetylasen-Inhibitoren.....	12
2 Zielsetzung der Arbeit	15
3 Material und Methoden.....	16
3.1 Material.....	16
3.1.1 Chemikalienliste.....	16
3.1.2 Verbrauchs – und Gebrauchsmaterialien	17
3.1.3 Geräteliste	18
3.1.4 Hergestellte Medien und Lösungen	19
3.1.5 Oligonukleotide	20
3.1.6 Software.....	20

3.2	Methoden.....	22
3.2.1	Isolation und Kultivierung von primären humanen Osteoblasten ..	22
3.2.1.1	Herstellung der Medien	22
3.2.1.2	Isolieren von primären humanen Osteoblasten.....	23
3.2.1.3	Kultivieren von primären humanen Osteoblasten.....	23
3.2.2	Stimulation der Zellkulturen	25
3.2.3	Reverse Transkription und Polymerasekettenreaktion (RT-PCR). 25	
3.2.3.1	Isolieren von zellulärer RNA.....	26
3.2.3.2	Bestimmung der RNA-Konzentration und –Reinheit	26
3.2.3.3	Kontrolle der RNA-Integrität	27
3.2.3.4	DNase-Verdau	27
3.2.3.5	cDNA-Synthese.....	28
3.2.3.6	Entwicklung und Optimierung der Primer	28
3.2.3.7	PCR	29
3.2.4	Zytotoxizitätstest - Laktatdehydrogenase (LDH) Bestimmung	30
3.2.5	Bestimmung des Resazurinumsatzes.....	31
3.2.6	Bestimmung der AP-Aktivität	32
3.2.7	Nachweis mineralisierter Matrix	32
3.2.7.1	Alizarin Rot Färbung	33
3.2.7.2	Von Kossa Färbung	33
3.2.8	Statistische Auswertung	34
4	Ergebnisse	35
4.1	Entwicklung und Optimierung der Primer.....	35
4.2	Ergebnisse der RT-PCR-Analysen	37
4.2.1	Genexpression der HDAC Klasse I.....	38
4.2.1.1	HDAC1: signifikante leichte Expressionsabnahme an Tag 2 und 4	38
4.2.1.2	HDAC2: signifikante leichte Expressionsabnahme an Tag 4 .	39
4.2.1.3	HDAC3: signifikante leichte Expressionsabnahme an Tag 4 .	40
4.2.1.4	HDAC8: signifikante leichte Expressionsabnahme an Tag 2 und 4	41

4.2.2	Genexpression der HDAC Klasse IIa.....	42
4.2.2.1	HDAC4: signifikante Expressionsabnahme an allen Tagen ...	42
4.2.2.2	HDAC5: signifikante Expressionsabnahme an Tag 4 und 7... 43	
4.2.2.3	HDAC7: signifikante Expressionsabnahme an Tag 4 und 7... 44	
4.2.2.4	HDAC9: starke signifikante Expressionsabnahme an allen Tagen.....	45
4.2.3	Genexpression der HDAC Klasse IIb.....	46
4.2.3.1	HDAC6: signifikante Expressionszunahme an allen Tagen ...	46
4.2.3.2	HDAC10: signifikante Expressionsabnahme an Tag 4 und 7 .	47
4.2.4	Genexpression der HDAC Klasse IV	48
4.2.4.1	HDAC11: signifikante Expressionsabnahme an allen Tagen .	48
4.2.5	Zusammenfassung der PCR-Ergebnisse.....	49
4.3	Zytotoxizität von TMP269	50
4.4	Auswirkung der Inhibierung von HDAC9 auf den Umsatz von Resazurin in primären humanen Osteoblasten.....	52
4.5	Auswirkung der Inhibierung von HDAC9 auf die AP-Aktivität in primären humanen Osteoblasten.....	53
4.6	Auswirkung der Inhibierung von HDAC9 auf die Bildung von mineralisierter Matrix	54
5	Diskussion.....	57
6	Ausblick.....	67
7	Zusammenfassung	69
8	Literaturverzeichnis.....	i
9	Eigenständigkeitserklärung.....	ix
10	Veröffentlichungen	x
11	Danksagung	xi

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
Alk	Activin like Rezeptor Kinase
AP	Alkalische Phosphatase
BMP	Bone Morphogenetic Protein
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
Ca	Kalzium
ca.	circa
Cbfa1	Core-binding factor alpha 1
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cm ²	Quadratcentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CSF-1	Colony stimulating factor 1
ddH ₂ O	Double distilled water
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
ds DNA	doppelsträngige DNA
dT	Desoxythymidin
EDTA	Ethylenediaminetetraacetat
FCS	Fetales Kälberserum
g	Gramm/Zentrifugalkraft
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
H ₂ O	Wasser
Ham's F-12	Aminosäurereiches Kulturmedium
HAT	Histonacetyltransferase
HEK	human embronic kidney cells
Hepes	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HDAC	Histondeacetylase

Abkürzungsverzeichnis

HDACi	Histondeacetylase-Inhibitor
IC	inhibitorische Konzentration
l	Liter
K	Kontrolle
LDH	Laktatdehydrogenase
Mef2	Myocyte enhancer-binding factor 2
MEM	Minimal Essential Medium
Mg	Magnesium
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mmol	Millimol
M-MuLV	Moloney Murine Leukämievirus
NAD	Nikotinamidadenindinukleotid
NF- κ B	Nuclear Factor „kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-cells
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nmol/nM	Nanomol
ns	nicht signifikant
OD	optische Dichte
OSÜ	Osteoblastenüberstand
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PP	Polypropylen
pRb	Retinoblastoma Protein
RANKL	Receptor Activator of NF- κ B Ligand
rh	recombinant human
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse Transkriptase PCR
Runx2	Runt-related transcription factor 2
S	Svedberg-Einheit

Abkürzungsverzeichnis

sec	Sekunden
SIRT	Sirtuin
SnoN	Ski-related novel protein N
SOP	Standard Operating Procedure
ssDNA	Einzelstrang DNA
s.u.	siehe unten
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
Temp	Temperatur
TGF- β	Transforming Growth Factor beta
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
u.a.	unter anderem
UV	ultraviolet
V	Volt
VEGF	Vascular endothelial growth factor

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Effekt der Histondeacetylasen (HDACs) auf die Struktur der Histone	9
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Strukturen von Histondeacetylasen, ihrer Klassifikation und ihrer Expression im menschlichen Knochen.....	10
Abbildung 3: Genexpression von <i>HDAC1</i> unter TGF- β_1 -Stimulation (5 ng/ml)	38
Abbildung 4: Genexpression von <i>HDAC2</i> unter TGF- β_1 -Stimulation (5 ng/ml)	39
Abbildung 5: Genexpression von <i>HDAC3</i> unter TGF- β_1 -Stimulation (5 ng/ml)	40
Abbildung 6: Genexpression von <i>HDAC8</i> unter TGF- β_1 -Stimulation (5 ng/ml)	41
Abbildung 7: Genexpression von <i>HDAC4</i> unter TGF- β_1 -Stimulation (5 ng/ml)	42
Abbildung 8: Genexpression von <i>HDAC5</i> unter TGF- β_1 -Stimulation (5 ng/ml)	43
Abbildung 9: Genexpression von <i>HDAC7</i> unter TGF- β_1 -Stimulation (5 ng/ml)	44
Abbildung 10: Genexpression von <i>HDAC9</i> unter TGF- β_1 -Stimulation (5 ng/ml)	45
Abbildung 11: Genexpression von <i>HDAC6</i> unter TGF- β_1 -Stimulation (5 ng/ml)	46
Abbildung 12: Genexpression von <i>HDAC10</i> unter TGF- β_1 -Stimulation (5 ng/ml).	47
Abbildung 13: Genexpression von <i>HDAC11</i> unter TGF- β_1 -Stimulation (5 ng/ml).	48
Abbildung 14: Zytotoxizität von TMP269	50
Abbildung 15: LDH-Aktivität Stimulation mit 160 nM TMP269	51
Abbildung 16: Effekt von TGF- β_1 und TMP269 auf den Resazurinumsatz	52
Abbildung 17: Effekt von TGF- β_1 und TMP269 auf die AP-Aktivität	53
Abbildung 18: Effekt von TGF- β_1 /TMP269 auf die Zellzahl nach 21 Tagen.....	54
Abbildung 19: Von Kossa Färbung nach Stimulation über 21 Tage	55
Abbildung 20: Effekt von TGF- β_1 /TMP269 auf die Bildung von extrazellulärer Matrix (Alizarin Rot Färbung) nach 21 Tagen	56

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Beispiele der jeweiligen Signaltransduktion von TGF- β 1/2/3 bzw. BMPs [35]	6
Tabelle 2:	Interaktion von einigen Histondeacetylasen (HDACs) mit dem Runt domain transcription factor 2 (Runx2)	12
Tabelle 3:	Histondeacetylasen-Inhibitoren [49, 73]	13
Tabelle 4:	Chemikalienliste	16
Tabelle 5:	Verbrauchs- und Gebrauchsmaterialien	17
Tabelle 6:	Geräteliste	18
Tabelle 7:	Hergestellte Medien und Lösungen	19
Tabelle 8:	Software	20
Tabelle 9:	Ansatz zur Durchführung der PCR	30
Tabelle 10:	PCR-Programm zur DNA-Amplifikation	30
Tabelle 11:	verwendete Oligonukleotide	36
Tabelle 12:	PCR-Bedingungen der Exons.....	37
Tabelle 13:	Zusammenfassung der PCR Ergebnisse.....	49

1 Einleitung

Pro Jahr wird durchschnittlich 10% des menschlichen Skeletts umgebaut [1]. Voraussetzung dafür ist das intakte Zusammenspiel zwischen Aufbau, Umbau und Abbau von Knochen. Wichtig sind diese Vorgänge um die immer wieder neue Anpassung des Knochengewebes an die auf den Knochen wirkenden Kräfte zu gewährleisten, um beschädigten Knochen zu reparieren und altes Gewebe zu ersetzen [2]. Sind die dafür verantwortlichen Mechanismen und Signalwege gestört, kann es zu einem Verlust der Knochenmasse, sowie zu einer gestörten Frakturheilung kommen. Mögliche weitere Folgen sind Osteoporose und weitere metabolische Knochenerkrankungen [3]. Die Auswirkungen für den Patienten sind dann vor allem Einschränkungen in der Mobilität und ein Verlust an Lebensqualität.

Um diesen Folgen und den dadurch verursachten immer weiter steigenden finanziellen Belastungen unsers Gesundheitssystems [4] entgegenzuwirken, ist es essentiell die Mechanismen auf molekularer Ebene des Knochenstoffwechsels zu verstehen. Trotz ihrer Bedeutung sind diese aber bisher weitgehend noch unverstanden. Aktuell wird vermutet, dass für Knochenumbau und Frakturheilung das Zusammenspiel zwischen den Wachstumsfaktoren Transforming Growth Factor beta 1-3 ($TGF-\beta_{1-3}$) und ausgewählten Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) eine entscheidende Rolle spielt [5]. $TGF-\beta_1$ blockiert die Signalweiterleitung von BMP2 und -7 in Osteoblasten, welche aber durch chemische Inhibierung von Histondeacetylasen (HDACs) wieder hergestellt werden kann. Weiter ist bekannt, dass durch $TGF-\beta_1$ die Aktivität von HDACs gesteigert wird [3]. Aufbauend auf diesen Erkenntnissen wird in dieser Arbeit der Einfluss von $TGF-\beta_1$ in primären humanen Osteoblasten bezüglich der Expression von HDACs untersucht und bildet so einen Beitrag auf dem Weg, den Knochenmetabolismus zu verstehen.

1.1 Knochengewebe

Der menschliche Knochen besteht aus verschiedenen Zelltypen, organischer (z.B. Kollagen) und anorganischer (mineralisierter) Matrix. Er ist keine statische Masse, sondern befindet sich in ständigem Aufbau, Umbau und Abbau. Dieser ständige Erneuerungsprozess wird als Remodelling bezeichnet und ist mitverantwortlich für die Funktionen des Knochengewebes [1].

Die wichtigsten Aufgaben des Knochens sind die Stützfunktion des Körpers, der Schutz der Organe vor äußeren Verletzungen, die Regulation des Kalzium-, Phosphat- und Säure-Basen-Haushaltes, sowie die Speicherung wichtiger Elektrolyte wie Magnesium- oder Kaliumionen [6, 7]. Vor allem die Festigkeit und Robustheit von Knochen sind auf die Zusammensetzung der extrazellulären Knochenmatrix zurückzuführen. Osteoblasten bauen hierfür eine unmineralisierte Matrix auf und sezernieren Proteine wie die Alkalische Phosphatase (AP), durch welche es dann zur Bildung der mineralisierten Knochenmatrix kommt [1]. Diese besteht zu 30% aus organischem Material (v.a. Kollagenfasern), zu 45% aus anorganischem Material (v.a. Hydroxylapatit-Kristallen) und zu 25% aus Wasser [6]. Zur Knochenbildung stehen dem Körper zwei Wege zur Verfügung. Die desmale (direkte) Ossifikation wandelt mesenchymale Stammzellen direkt in knochenbildende Osteoblasten um [8]. Die enchondrale (indirekte) Ossifikation baut Knochengewebe aus einer davor gebildeten Knorpelmatrize auf [9].

Die den Knochen aufbauenden Osteoblasten und die für den Knochenabbau zuständigen Osteoklasten zählen zu den wichtigsten Zellen im Knochengewebe. Im erwachsenen Skelett befindet sich die Mehrzahl der Osteoblasten im Ruhezustand, die Zellen werden dann als Lining Cells bezeichnet. Zu den knochenspezifischen Zellen zählen weiter die Osteozyten, welche als endständig differenzierte, von Knochenmatrix umbaute Osteoblasten angesehen werden [6].

Osteoklasten sind große vielkernige Zellen, die das Knochengewebe ab- und umbauen. Sie entwickeln sich aus hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks [10]. Wichtige Signale der Osteoklastogenese werden durch die Interaktion mit Osteoblasten oder Stromazellen sowie über die Faktoren

Receptor Activator of NF- κ B Ligand (RANKL) oder Colony stimulating factor 1 (CSF-1) vermittelt [11].

In der vorliegenden Arbeit wurden molekulare Vorgänge in Osteoblasten untersucht. Diese Zellen sind epithelartig angeordnete aktiv sezernierende Zellen, welche über kurze Fortsätze miteinander in Verbindung stehen. Sie entwickeln sich unter dem Einfluss von Wachstumsfaktoren aus mesenchymalen Stammzellen [6]. Gesteuert wird die Differenzierung der Osteoblasten durch Mitglieder der TGF- β Familie, über die Aktivierung osteogener Transkriptionsfaktoren, wie Runx-related transcription factor 2 (Runx2) und den osteoblasten spezifischen Transkriptionsfaktor Osterix [12, 13]. Weiter wird der Prozess über die Wnt-Signalkaskade und Fibroblasten-Wachstumsfaktoren beeinflusst [8]. Osteoblasten produzieren u.a. Kollagen I als Grundsubstanz der extrazellulären Matrix, Osteocalcin, Osteopontin, RANKL und Wachstumsfaktoren wie BMPs und TGF- β . An der Zellmembran von Osteoblasten befinden sich neben Rezeptoren für Hormone, Zytokine, Vitamine und Glukokortikoide vor allem eine große Anzahl an hoch affinen TGF- β Rezeptoren. Dies zeigt, dass der in dieser Arbeit verwendete Wachstumsfaktor TGF- β_1 in Osteoblasten einen wichtigen Regulator darstellt [5].

1.2 Frakturheilung

Ein intakter Knochenmetabolismus ist entscheidend für die Stabilität und Regenerationsfähigkeit unserer Knochen. Im Falle einer Fraktur kommt es im Rahmen der primären Frakturheilung bei guter Adaptation der Bruchränder (meist mittels operativer Osteosynthese) zu einer direkten Kontaktheilung der beteiligten Knochenfragmente. Im Rahmen der sekundären Frakturheilung bildet sich zuerst als Überbrückung des Defekts das sogenannte Kallusgewebe aus Binde- und Knorpelgewebe, welches später wieder in Knochen umgebaut wird [14]. Meist heilt Knochen durch eine Kombination dieser beiden Möglichkeiten. Reguliert werden die Vorgänge durch entzündungsfördernde Zytokine, Mitglieder der TGF- β Familie und Faktoren der Angiogenese [15]. So

entstehen aufgrund der hohen ossären Regenerationsfähigkeit keine Narben und somit kein Funktionsverlust [9].

Im klinischen Alltag kommt es allerdings bei den herkömmlichen Verfahren der Therapie von ossären Frakturen (Reposition mit Ruhigstellung oder Osteosynthesen) häufig zu einer verzögerten oder gar zu einer ausbleibenden Frakturheilung. In den USA liegt dies bei jährlich 5-10% aller Frakturen vor [4]. Besonders die Heilung von Knochen multimorbider Patienten stellt trotz stetiger Therapieverbesserungen immer noch eine große Herausforderung in der Unfallchirurgie und Orthopädie dar. Ziel ist es nun die Vorgänge des Heilungsprozesses auf zellulärer und molekularer Ebene möglichst genau zu verstehen, um bessere Therapien bei Risikopatientengruppen etablieren zu können. Risikopatienten für verzögerte Frakturheilung könnten durch den Nachweis niedrigerer TGF- β_1 Serumkonzentrationen (prädiktiver Marker) bereits vier Wochen nach Frakturereignis ermittelt werden [16, 17]. Aktuell bildet die autologe Knochentransplantation den Goldstandard der Knochenregeneration und Frakturheilung. Weitere Konzepte sind autologe Spongiosaübertragung, die Allotransplantation und der klinische Einsatz von Osteoprogenitorzellen [18]. Erste positive Ergebnisse, eine ausbleibende Konsolidierung nach Fraktur mittels Substitution von Wachstumsfaktoren zu verhindern, zeigte auch der klinische Einsatz der Wachstumsfaktoren BMP2 und BMP7 [17-19]. Aufgrund hoher Kosten, Sicherheitsrisiken und mäßiger Erfolgsraten ist aber aktuell das hierfür verwendete rhBMP7 (Eptotermin alfa) nicht mehr auf dem Markt erhältlich, rhBMP2 (Dibotermin alfa) darf aktuell auch nur noch sehr restriktiv eingesetzt werden [20-24]. Es wird vermutet, dass erhöhte TGF- β_1 Serumspiegel durch Eingreifen in den BMP Signalweg für die geringe Ansprechrate dieser Therapie mit verantwortlich sind [3]. Diskutiert wird aktuell als Alternative eine mögliche Verwendung von rhBMP9 [25]. BMPs gehören zu der TGF- β -Familie (siehe 1.3), welche auch das Zytokin TGF- β_1 beinhaltet. Der Nachweis, dass TGF- β_1 den Signalweg der BMPs blockiert, andererseits aber die Aktivität von HDACs (siehe 1.4) fördert [3], lässt hier neben der Verwendung von rhBMPs eine weitere interessante Interaktion im

Rahmen der Knochenhomöostase vermuten. Es könnte sich damit eine neue therapeutische Möglichkeit bieten in die Frakturheilung einzugreifen.

1.3 Die Transforming Growth Factor β (TGF- β) Familie

Die TGF- β -Familie beinhaltet eine heterogene Gruppe von strukturell verwandten ubiquitär vorkommenden Wachstumsfaktoren, die bei der Regulation vieler zellulärer Prozesse beteiligt sind. Dieser Gruppe an Wachstumsfaktoren zugehörig sind TGF- β (unterteilt in TGF- β_1 , - β_2 , und - β_3), BMPs (Gruppe 1: BMP2 und -4, Gruppe 2: BMP5, -6, -7, -8a und -8b, Gruppe 3: BMP-9 und -10, Gruppe 4: BMP-3, -3b, -11, -12, -13 -14, -15 und -16), Aktivin, Inhibin und das Anti-Müller-Hormon [10, 26]. Sie haben u.a. wichtige regulatorische Funktionen in der Embryogenese, der Wundheilung, der Angiogenese und bei Entzündungsreaktionen [27].

Im Knochen haben Repräsentanten der TGF β -Familie wichtige Funktionen im Verlauf der skelettalen Entwicklung, der Frakturheilung und der Knochenregeneration inne [28]. Es wird davon ausgegangen, dass vor allem das Zusammenspiel von TGF- β_1 und BMPs auf zellulärer Ebene eine zentrale Rolle im Knochenmetabolismus und der Frakturheilung einnimmt. TGF- β_1 ist hier wichtig bei der Proliferation und frühen Differenzierungsphase von Osteoblasten, die BMPs – vor allem BMP2 und BMP7 – zur weiteren Zelldifferenzierung [3, 29]. Ist die Regulation der BMPs gestört, kann es zu ossären Deformationen, Karzinomen und kardiovaskulären oder autoimmunen Erkrankungen kommen [30].

1.3.1 Zelluläre Signaltransduktion

Auf zellulärer Ebene erfolgt die Signaltransduktion von TGF- β und den BMPs über zwei Serin/Threonin-Kinase Rezeptoren, den Typ-I- und Typ-II-Rezeptor. Derzeit sind sieben Typ-I-Rezeptoren, die auch Activin like Rezeptor Kinase Alk1-7 genannt werden, sowie fünf Typ-II-Rezeptoren bekannt [5, 31]. Die Rezeptoraffinität ist vom jeweiligen BMP/TGF- β abhängig, so dass TGF- β und BMPs jeweils an verschiedene Typ-I-Rezeptoren binden. Nach

Ligandenbindung wird der Typ-I-Rezeptor durch den zugehörigen Typ-II-Rezeptor phosphoryliert. Darauf aktiviert (phosphoryliert) nun der Typ-I-Rezeptor Transkriptionsfaktoren im Zytoplasma. Diese Transkriptionsfaktoren werden als Smads bezeichnet. Sie haben verschiedene Funktionen inne. Die aktivierten rezeptor-regulierten Smads (Smad1, -2, -3, -5 und -8) können u.a. an Co-Smad/Smad4 gebunden in den Zellkern wandern und dort in die Regulation der Genexpression eingreifen [32-34]. Hemmend auf den TGF- β bzw. BMP Signalweg wirken die inhibierenden Smads Smad6 und Smad7 [27]. In Tabelle 1 sind Beispiele der aktuell bekannten dem jeweiligen Liganden (TGF- β bzw. BMP) zugehörigen Rezeptoren und Transkriptionsfaktoren in Osteoblasten aufgelistet [35].

Tabelle 1: Beispiele der jeweiligen Signaltransduktion von TGF- $\beta_{1/2/3}$ bzw. BMPs [35]

Ligand	Typ-I-Rezeptor	Typ-II-Rezeptor	Smads
TGF- $\beta_{1/2/3}$	T β R-I Alk1	T β R-II	Smad2/3 Smad1/5/8
BMP2/4	BMPRIa BMPRIb	BMPRII ActRIIA ActRIIB	Smad1/5/8
BMP5/6/7/8	Alk2 BMPRIa BMPRIb	ActRIIA ActRIIB BMPRII	Smad1/5/8
BMP9/10	Alk1	BMPRII ActRIIB ActRIIA	Smad1/5/8

Weitere Möglichkeiten der TGF- β Signaltransduktion sind mittels Smad-unabhängig aktivierten Proteinkinasen oder auch aus einer Kombination beider Wege möglich [10].

1.3.2 Transforming Growth Factor β_1

TGF- β_1 ist ein ubiquitär vorkommender Wachstumsfaktor, welcher eine wichtige Rolle in Proliferation, Differenzierung und Überleben vieler Zelltypen spielt [10].

Er ist mit einer Konzentration von 200 mg/kg vor allem im Knochen zu finden, wo er einer der wichtigsten Faktoren zu Aufrechterhaltung des Gleichgewichts zwischen Knochenresorption und Knochenbildung ist [10, 36].

TGF- β_1 wird von Osteoblasten sowie von Osteoklasten sezerniert und liegt als inaktive Form in der Knochenmatrix vor. Einer der verschiedenen Aktivierungswege ist die Aktivierung in saurem Milieu, wie es in Knochenresorptionszonen vorkommt [5, 33, 36].

1998 zeigten Geiser et al. [37] in TGF- β_1 Knockout-Mäusen Verluste der Tibiallänge, der elastischen Eigenschaften und im Mineralgehalt des Knochens. Allerdings zeigen andere Tierversuche auch eine negative Auswirkung durch TGF- β_1 auf den Knochen [38, 39]. *In vitro* ließen sich jedoch wieder positive Effekte von TGF- β_1 auf den Knochen nachweisen: TGF- β_1 rekrutiert Osteoblastenvorläuferzellen und stimuliert auch deren Proliferation in der frühen Phase [33]. Ebenfalls wird die Expression von typischen osteoblastären Markern wie Kollagen Typ I, Osteopontin und Matrixmetalloproteinase von TGF- β_1 gefördert [40]. So ist es nicht verwunderlich, dass die systemische oder topische Applikation von TGF- β_1 zu einer Verbesserung der Knochenheilung *in vivo* führt [41, 42]. Hierbei spielt allerdings die Konzentration an TGF- β_1 eine wichtige Rolle. Lind et al. [43] zeigten hierzu 1998 in einem Hundemodell, dass nur bei niedrigen TGF- β_1 Konzentrationen eine Verbesserung der Knochenbildung um ein Implantat eintritt. Dass die Konzentration an TGF- β_1 auch beim Menschen für die Knochenheilung ein ausschlaggebender Faktor ist, zeigten Moghaddam et al. [14] und Zimmermann et al. [37]. In der Frühphase der physiologischen Frakturheilung in Patienten waren erhöhte TGF- β_1 Serumlevel nachzuweisen, war aber die Frakturheilung verzögert, zeigten sich signifikant niedrigere Werte. Weiter ist bei Erkrankungen, welche mit chronisch erhöhten TGF- β_1 -Serumspiegeln einhergehen wie sie bei Patienten mit Leberfibrose, -zirrhose oder chronischem Nierenversagen vorkommen [44, 45], eine Assoziation mit einem Verlust der Knochenmasse wie bei der hepatischen oder renalen Osteodystrophie zu diskutieren [5, 46, 47].

Auf zellulärer Ebene zeigten Janssens et al. [10], dass durch TGF- β_1 spätere Proliferationsphasen der Osteoblasten und die Mineralisierung der

Knochenmatrix blockiert werden. Ehnert et al. zeigten 2010 [5], dass TGF- β_1 *in vitro* sowohl dosis- als auch zeitabhängig die Proliferation primärer humaner Osteoblasten fördert, aber gleichzeitig die AP-Aktivität und die Produktion von mineralisierter Matrix zurückgehen. Nach einer 8-tägigen Stimulation von Osteoblasten mit TGF- β_1 verschiebt sich die Expression von Genen der Osteoblastenreifung zugunsten der Expression von Genen der Osteoklastenrekrutierung. Weiter konnte die Gruppe 2012 zeigen [3], dass schon eine kleine Menge an TGF- β_1 die Signaltransduktion von BMP2 und BMP7 in Osteoblasten blockiert und so deren weitere Differenzierung inhibiert. Als möglicher Mechanismus wird angenommen, dass das durch TGF- β_1 induzierte Ski-related novel protein N (ein negatives Regulatorprotein des TGF- β Signalweges [48]) die Aktivität der HDACs fördert. Dadurch könnte durch Histonveränderungen die Expression der Faktoren des BMP-Signalwegs reduziert werden, der so zum Erliegen kommt. Unterstützt wird diese Theorie durch das Wiederherstellen des BMP Signalwegs mittels dem Einsatz des Histondeacetylase-Inhibitors (HDACi) Valproinsäure in mit TGF- β_1 stimulierten Zellen [3]. So also muss die HDAC Aktivität eine bedeutende Rolle in dem komplexen Prozess der Osteoblastendifferenzierung innehaben.

Dies hat uns zu der Fragestellung geführt, ob TGF- β_1 Veränderungen in der Genexpression von HDACs in primären humanen Osteoblasten hervorruft und welche der HDAC Isoformen daran beteiligt sind. Die vorliegende Arbeit versucht dieser Fragestellung gerecht zu werden.

1.4 Histondeacetylasen

HDACs sind intrazelluläre Enzyme, welche an einer Vielzahl von zellulären und mitochondrialen Prozessen einschließlich Transkription, DNA Reparatur und Veränderung der Histonstrukturen sowie epigenetischen Veränderungen beteiligt sind [8, 49]. Sie katalysieren das reversible Entfernen von Acetylgruppen aus den Lysinresten von Histonen. Dies führt zu einer Kondensation des Chromatins. Als Folge davon können sequenzspezifische Aktivatoren nicht an ihre Gensequenzen binden und es resultiert eine Hemmung der Transkription und Verminderung der Genexpression [50, 51]

(siehe Abbildung 1). Im Gegensatz dazu führt eine Acetylierung von Histonen zu einer Auflockerung ihrer Struktur und so zu einem einfacheren Zugang der Transkriptionsfaktoren an ihre DNA Zielsequenzen. Dieser Vorgang ist meist mit Histonacetyltransferasen (HATs) verknüpft [52].

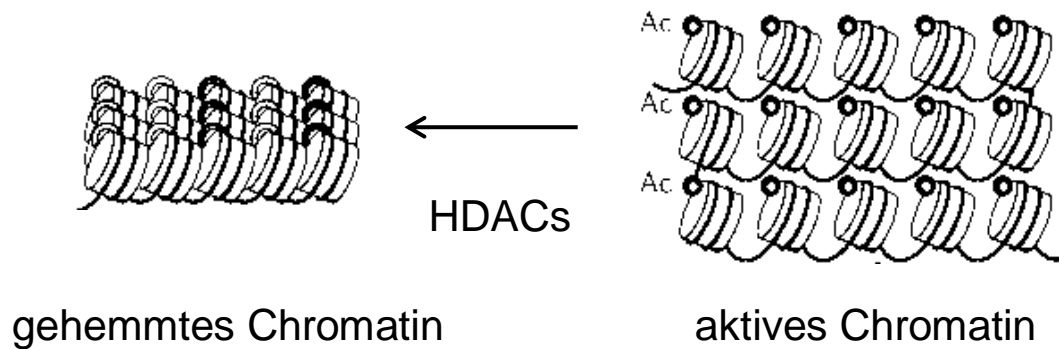


Abbildung 1: Effekt der Histondeacetylasen (HDACs) auf die Struktur der Histone
Modifiziert aus: Bolden, J.E., M.J. Peart, and R.W. Johnstone, Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov*, 2006. 5(9): p. 769-84 ([49]).

1.4.1 Einteilung

Beim Menschen sind aktuell 18 HDAC Isoformen bekannt und sind entsprechend ihrer Homologie zu Hefemolekülen, ihrer Lokalisation und enzymatischen Aktivität in vier Gruppen eingeteilt [53] (siehe Abbildung 2).

Die Klasse I beinhaltet HDAC1, 2, 3 und 8. Sie ist homolog zu dem Hefeprotein Rpd3, befindet sich bevorzugt im Nukleus und wird ubiquitär exprimiert [54]. Die Klasse II wird in Klasse IIa (HDAC4, 5, 7 und 9) und IIb (HDAC6 und 10) unterteilt, gleicht in Teilen dem Hefeprotein Hda1 und kann zwischen Nukleus und Zytoplasma wandern [54]. HDAC6 und 10 besitzen zwei Deacetylierungsdomänen und befinden sich im Zytoplasma [49]. HDAC6 besitzt zusätzlich eine α -Tubulin Deacetylasedomäne [55]. HDAC11 ist der einzige Repräsentant der Klasse IV und ähnelt den katalytischen Regionen von Klasse I und II [56].

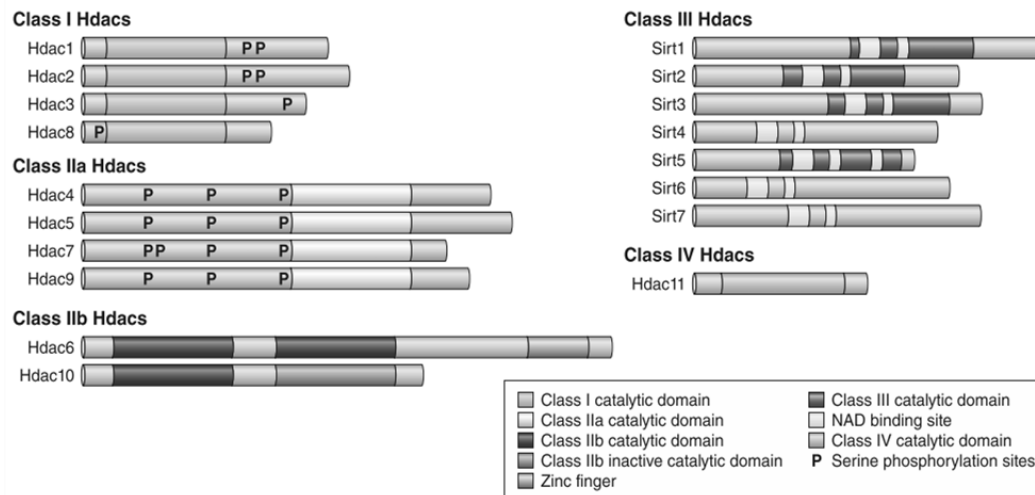


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Strukturen von Histondeacetylasen, ihrer Klassifikation und ihrer Expression im menschlichen Knochen

Modifiziert aus: Bradley, E.W., et al., Histone Deacetylases in Bone Development and Skeletal Disorders. *Physiological Reviews*, 2015. 95(4): p. 1359-1381 ([8]).

Die HDAC Klasse III besteht aus den sogenannten atypischen HDACs, den Sirtuinen SIRT1 bis -7 und ist homolog zu dem Hefeprotein Sir2. Diese Klasse unterscheidet sich von den zuerst genannten, Zink-abhängigen Molekülen durch die Verwendung von NAD^+ anstatt Zn^{2+} als Katalysator der Deacetylaseaktivität [49]. Somit nimmt sie eine Sonderrolle ein und wurde in dieser Arbeit nicht mit betrachtet.

1.4.2 Funktionen und Aufgaben im Knochen

Im Knochen beeinflussen HDACs die Osteoblastenproliferation, die Regulierung der Osteoblastenreifung und auch die Funktion von Osteoklasten. So beeinflussen sie die skelettale Entwicklung, den Erhalt der Knochenmasse sowie die Knochenresorption [8]. HDACs binden an viele entscheidende Transkriptionsfaktoren der Osteoblasten wie Runx2, Osterix und Twist [53].

Die Expression der HDACs im erwachsenen Knochen ist sehr unterschiedlich. Bradley et al. [8] beschrieben, dass in Osteoblasten HDAC1, -3, -5, -6 und -7 am meisten exprimiert werden, die Expression von HDAC2, -10 und -11 im Mittelfeld liegt und HDAC4, -8 und -9 nur sehr gering exprimiert werden. Ehnert

et al. [57] zeigten 2017 eine unterschiedliche Expression der HDAC Isoformen in Osteoblasten. Hier konnte eine hohe bis mittlere Expression von HDAC1, -2, -3, -5, und -7, eine geringe Expression von HDAC4, -6, -8 und -9 und eine kaum nachweisbare Expression von HDAC10 und -11 gezeigt werden. Man geht davon aus, dass die verschiedenen HDACs im Prozess der Differenzierung der Osteoblasten jeweils ihre eigene Rolle spielen [53], auch werden sie im Verlauf der Osteoblastenreifung verschieden stark exprimiert. Westendorf et al. [53] zeigten, dass einige HDACs (HDAC3, HDAC7) in allen osteoblastären Differenzierungsstufen, andere vor allem in Progenitorzellen (HDAC1) oder reifen Osteoblasten (HDAC4, HDAC6) exprimiert werden. Ehnert et al. [57] zeigten weiter, dass im Verlauf der osteogenen Differenzierung HDAC5, -7 und -6 fast doppelt so stark exprimiert werden als anfangs nachweisbar.

1.4.3 Interaktion mit Runx2

Runx2 wird in Osteoblasten stark exprimiert und ist ein essentieller Transkriptionsfaktor für die Entwicklung und Differenzierung von Osteoblasten [58]. In Runx2 defizienten Mäusen liegt eine totale Blockierung der Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen zu Osteoblasten vor [59]. Runx2 ist Mitglied der RUNX-Genfamilie welche die Gene *RUNX1-3* beinhaltet [60]. Runx2 bindet an spezifische DNA-Sequenzen und wirkt über Co-Faktorenkomplexe fördernd oder hemmend auf die Transkription gewebespezifischer Gene [58, 61]. Osteoblastentypische Zielgene von Runx2 sind u.a. Osteocalcin, Bone Sialoprotein (BSP), Osteopontin und Kollagen-Ia [58, 59, 61, 62]. Es ist bekannt, dass HDACs und auch HDACi mit Runx2 interagieren und Runx2 acetylieren bzw. deacetylieren können [60, 63]. Eine Acetylierung von Runx2 fördert seine Stabilität und transkriptionelle Wirkung [60, 63]. Während der Osteogenese wirken die meisten HDACs als Co-Repressoren hemmend auf die Aktivität von Runx2 [64-66] (siehe Tabelle 2). HDACs vermitteln u.a. eine Deacetylierung von Lysinresten des Runx2 Proteins. So kommt es zu einer Proteolyse und konsekutiv zu einer Abnahme von Runx2 [60, 63]. Ausnahmen bilden HDAC9, -10 und -11. Sie wirken nicht

hemmend auf Runx2 [67]. Unter Einbeziehung von HDAC4 oder -5 via Smad3 hemmt TGF- β_1 ebenfalls die Runx2 Funktion [68].

Tabelle 2: Interaktion von einigen Histondeacetylasen (HDACs) mit dem Runt domain transcription factor 2 (Runx2)

HDAC	Mechanismus	Effekt	Referenz
HDAC1	Interagiert mit Runx2	Hemmt Runx2 Aktivität	[13]
HDAC3	Bindet an amino-terminalen Bereich von Runx2	Hemmt Runx2 transaktivierende Wirkung am Osteocalcin Promoter	[64]
HDAC4	Bindet an Runt Domäne von Runx2	Blockiert DNA-Bindungsaktivität in Chondrozyten	[65]
HDAC5	Interagiert mit Runx2 Deacetyliert Runx2	Hemmen Runx2 Aktivität	[63], [69]
HDAC6	Bindet an carboxy-terminalen Bereich	Hemmt Runx2 Aktivität	[66]
HDAC7	Bindet an carboxy-terminalen Bereich	Hemmt Runx2 Aktivität deacetylierungsunabhängig	[67]
HDAC8	Interagiert mit Runx2	Hemmt Runx2 Aktivität	[70]

Durch ihre Schlüsselrolle bei epigenetischen Veränderungen ist das Interesse an HDACs in der Forschung sehr groß. Neben dem in dieser Arbeit beleuchteten Aspekt wird aktuell vor allem an dem Verständnis über ihre Rolle in der Tumorentstehung gearbeitet [71].

1.5 Histondeacetylasen-Inhibitoren

HDACi sind bei einem immer weiter zunehmenden Verständnis der Zusammenhänge von epigenetischen Veränderungen und intrazellulären Vorgängen in physiologischen als auch in pathologischen Vorgängen immer weiter in den Fokus aktueller Forschung getreten. Sie hemmen die Aktivität der HDAC Klassen I, IIa, IIb und IV, indem sie deren katalytische Domänen blockieren [53]. Es existiert eine große Zahl von strukturell verschiedenen HDACi, die natürlichen oder synthetischen Ursprungs sind [49]. HDACi können

u.a. in Tumorzellen die Apoptose induzieren, den Zellzyklus in der G1/S- oder der G2/M-Phase stoppen, die Angiogenese hemmen und immunmodulatorisch wirken [49]. Es wird angenommen, dass in Tumorzellen durch HDACi aufgrund vermehrter Acetylierung von Histonen und Proteinen Tumorsuppressorgene induziert werden, die DNA-Reparatur gehemmt wird und die Zellen durch die Auflockerung der Chromatinstruktur anfälliger für Strahlen- und Chemotherapie sind [8]. Man vermutet, dass diese Effekte zelltyp-abhängig sind und strukturell verschiedene HDACi verschiedene Effekte in einem Zelltyp auslösen können [49]. In Osteoblasten haben geringe Konzentrationen an HDACi keinen nachteiligen Effekt auf die Synthese oder Proliferation. Hohe Konzentrationen der HDACi Trichostatin A und MS-275 führen aber zu einem Zellzyklusarrest in der G1 Phase und Zelltod [72].

Es gibt Inhibitoren die gleichzeitig mehrere HDAC Klassen hemmen, aber auch HDAC spezifische Inhibitoren. Valproinsäure hemmt beispielsweise die komplette HDAC Klasse I und Klasse IIa, dagegen hemmt TMP269 spezifisch HDAC9 [49, 73].

Tabelle 3 zeigt eine Übersicht über einige HDACi und die HDACs, welche durch diese inhibiert werden.

Tabelle 3: Histondeacetylase-Inhibitoren [49, 73]

Histondeacetylase-Inhibitor	inhibiert
Depsipeptide	HDAC1, HDAC2
MS-275 (Entinostat)	HDAC1, HDAC2, HDAC3
SB-379872-A	HDAC8
TMP269	HDAC9
Valproinsäure, Butyrat, Trapoxin	HDAC Klasse I, HDAC Klasse IIa
Tubacin	HDAC6
SAHA (Vorinostat), Trichostatin A	HDAC Klasse I, IIa, IIb, IV

Seit langer Zeit ist Valproinsäure als antikonvulsive Therapie bei Epilepsie und als Therapie bei bipolaren Störungen zugelassen. Vorinostat (SAHA) wird als Therapeutikum bei kutanen T-Zelllymphomen und in Kombination mit weiteren

Chemotherapeutika bei hämatopoetischen und soliden Tumoren eingesetzt. Weiter werden HDACi als potentielle Therapeutika in der Behandlung von Arthritis, HI-Virus Infektion, Diabetes mellitus, neurodegenerativen Erkrankungen und vielen altersabhängigen Funktionsstörungen diskutiert [8, 53, 71]. Aktuell wird nach weiteren Anwendungsmöglichkeiten gesucht. Allerdings zeigen erste präklinische Studien, dass die Auswirkungen von HDACi aufgrund der ubiquitären Verteilung ihrer Zielstrukturen (HDACs) breiter und komplizierter sein können als ursprünglich angenommen wurde [49]. Für eine gezielte Therapie ist es deshalb wichtig, die genauen Mechanismen der Beteiligung von HDACs in dem jeweiligen Zelltyp zu verstehen. Wünschenswert wäre es, durch die Identifikation der an der Histonveränderung beteiligten HDAC Isoformen die Spezifität des Inhibitors zu erhöhen, um so Nebenwirkungen zu reduzieren und Ansprechraten zu erhöhen.

2 Zielsetzung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit ist Teil des Fortüne Junior Projekts von Dr. Sabrina Ehnert am Siegfried Weller Institut der Universität Tübingen. Gesamtziel dieses Projekts ist das Erlangen grundlegender Erkenntnisse über die epigenetische Regulation des Knochenstoffwechsels, um neue Ansätze für die Entwicklung neuer, kausaler Therapiestrategien bei Knochenerkrankungen zu etablieren. Der aktuelle Stand der Forschung ist, dass TGF- β_1 den BMP-Signalweg in Osteoblasten blockiert, dieser aber durch chemische Inhibierung von HDACs wiederhergestellt werden kann. Weiter ist bekannt, dass durch TGF- β_1 die Aktivität von HDACs gesteigert wird [3], welche wiederum, z.B. über Interaktion mit Runx2, regulierend auf den Knochenstoffwechsel wirken (siehe 1.4.3).

In dieser Arbeit sollen deshalb Veränderungen der Genexpression von HDAC Isoformen in primären humanen Osteoblasten unter TGF- β_1 Einfluss gezeigt werden. Es wird angenommen, dass Expressionsveränderungen auslösend für Histonveränderungen sind. Das weitere Ziel besteht in der Charakterisierung der Funktionsweise der in ihrer Expression veränderten HDACs in humanen Osteoblasten, um so eventuell mittels HDACi einen neuen Ansatz der Therapie von Knochenerkrankungen zu erhalten.

Überblick über die Teilschritte in dieser Arbeit:

Es wurden primäre humane Osteoblasten mit rekombinanten humanem TGF- β_1 (in der folgenden Arbeit nur als TGF- β_1 bezeichnet) stimuliert. Nach der RNA-Isolation wurde mittels semiquantitativer reverser Transkriptase (RT)-PCR eine eventuelle Veränderung in der Genexpression der HDACs identifiziert. Bei Expressionsänderung kann dann das jeweilige HDAC gezielt aktiviert oder inhibiert werden, um zu prüfen, ob ein gleicher oder ähnlicher Effekt erreicht werden kann, wie ihn die Stimulation mit TGF- β_1 zeigt. Die Erfassung der osteogenen Differenzierung wurde anhand der AP-Aktivität gemessen, die Mineralisierung durch Färbung der Matrix nach von Kossa und Alizarin Rot.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalienliste

In Tabelle 4 sind die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien aufgelistet.

Tabelle 4: Chemikalienliste

Name	Hersteller
4-Nitrophenol solution 10 mM	Sigma-Aldrich
4-Nitrophenyl phosphate disodium salt hexahydrate	Carl Roth
10X Reaction Buffer mit MgCl ₂	Thermo Scientific
Agarose Standard	Carl Roth
Alizarin Red S	Carl Roth
Antibiotikum/Antimycotikum (100 X)	PAA Laboratories
β-Glycerol-Phosphate	Sigma-Aldrich
Boric acid	Carl Roth
Calciumchlorid	Carl Roth
cDNA Synthese Kit	Thermo Scientific
Cetylpyridiumchlorid monohydrate	Carl Roth
Chloroform	Carl Roth
Collagenase II	PAA Laboratories
ddH ₂ O	Apotheke UKT
DEPC	Carl Roth
Dexamethason	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth
DNAse I, RNAse-free	Thermo Scientific
Dulbecco´s PBS without Ca & Mg (DPBS)	PAA Laboratories
EDTA	PAA Laboratories
Ethanol 99 %	Apotheke UKT
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich
Fetales Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories
First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Scientific
Glycerol (10%)	Carl Roth
Glycin	Carl Roth
Ham's F12	PAA Laboratories
Hepes Buffer Solution	Carl Roth

3 Material und Methoden

Name	Hersteller
Hoechst 33342	Thermo Scientific
Isopropanol	VWR Chemicals
Kapa Fast Ready Mix	Peqlab
L-Ascorbat-2-Phosphat	Sigma-Aldrich
MEM Earle's	PAA Laboratories
MgCl ₂	Carl Roth
NaOH	Carl Roth
Penicillin(1000E/ml)/Streptomycin(10mg/ml)	PAA Laboratories
peqGOLD TriFast	Peqlab
pUC19-Marker	Carl Roth
Resazurin sodium salt	Sigma-Aldrich
rhTGF- β_1	PeptoTech
Testkit Fluitest LDH-L	Analyticon Biotechnologies
TMP269	Cellagen Technology
Tris-Base	Carl Roth
Trypanblau 0,5%	Carl Roth
Trypsin/EDTA	PAA Laboratories

3.1.2 Verbrauchs – und Gebrauchsmaterialien

In Tabelle 5 sind die in dieser Arbeit verwendeten Verbrauchs- und Gebrauchsmaterialien aufgelistet.

Tabelle 5: Verbrauchs- und Gebrauchsmaterialien

Name	Hersteller
Einfrierröhrchen für Zellen	PAA Laboratories
Glasflasche (500 ml, 1000 ml)	Schott Duran
Handschuhe	Paul Hartmann AG
Hohlmeißelzange, steril	BG Unfallklinik
LVis Platte	BMG Labtech
Neubauer-Zählkammer, Improved	Superior Marienfeld
Pipette Controller RF3000™	Heathrow Scientific
Pipette Research plus 2,5; 10; 100; 1000 μ l	Eppendorf
Pipettenspitzen 10 μ l	Biozym Scientific
Pipettenspitzen 200 μ l	SARSTEDT
Pipettenspitzen 200 – 1000 μ l	Ratiolab
PP-Röhrchen 15 ml, 50 ml steril	Greiner Bio-One

3 Material und Methoden

Name	Hersteller
Pipettierwanne	Camlass Trifill
Reaktionsgefäße 15 ml, 50 ml	SARSTEDT
Safe-lock Tubes 0,2 ml, 1,5 ml	Carl Roth
Safe-lock Tubes 0,5 ml	SARSTEDT
Sterilfilter Unit 0,22 µm	Millex®GP
Stripette (5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml)	Corning Incorporated
Well-Platte (48-Well)	Corning Incorporated
Well-Platte (96-Well)	Greiner Bio-One
Zellkulturflasche Cell star T125, T175	Greiner Bio-One
Zellkulturschale 10 cm ² , 25 cm ²	Greiner Bio-One
Zellschaber, steril	Corning Incorporated

3.1.3 Geräteliste

In Tabelle 4 sind die in dieser Arbeit verwendeten Geräte aufgelistet.

Tabelle 6: Geräteliste

Name	Hersteller
Abzug Secuflow 1200	Thermo Scientific, Langenselbold, Deutschland
CO ₂ -Inkubator (37 °C, 5 % CO ₂)	BINDER, Tuttlingen, Deutschland
Eismaschine	Scotsman Ice Systems, Vernon Hills, USA
Elektrophoresekammer	Bio-Rad, Hercules, USA
Gefrierschrank -20 °C	Liebherr, Kirchberg an der Iller, Deutschland
Gefrierschrank -80 °C	Thermo Scientific, Langenselbold, Deutschland
Gelstick Imager (GelDoc)	Intas science imaging, Göttingen, Deutschland
Heraeus Fresco 17 Centrifuge	Thermo Scientific, Langenselbold, Deutschland
Kühlschrank +4 °C	Liebherr, Kirchberg an der Iller, Deutschland
Megafuge 40 R	Thermo Scientific, Langenselbold, Deutschland
Mikroskop Primo Vert	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Mikrowelle 700 Watt	SEVERIN Elektrogeräte, Sundern, Deutschland
Netzgerät Power Pac 200	Bio-Rad, Hercules, USA
Netzgerät Power Pac HC	Bio-Rad Hercules, USA

Name	Hersteller
Sicherheitswerkbank Maxisafe S2020 1.8	Thermo Scientific, Langenselbold, Deutschland
Spektralphotometer FluoStar Omega	BMG Labtech, Ortenberg, Deutschland
Thermal Cycler Arktik	Thermo Scientific, Langenselbold, Deutschland
Thermal Cycler Veriti 96-Well	Applied Biosystems, Carlsbad, USA
Vortex Mixer	Corning LSE, Corning, USA
Waage Kern PCB 250-3	Kern & Sohn GmbH, Balingen, Deutschland
Wasserbad Aqualine AL 25	LAUDA, Lauda-Königshofen, Deutschland

3.1.4 Hergestellte Medien und Lösungen

Die aufgeführten Medien und Lösungen wurden gemäß den Standard Operating Procedures (SOPs) des Siegfried Weller Institutes für Unfallmedizinische Forschung hergestellt und sind in Tabelle 7 aufgelistet.

Tabelle 7: Hergestellte Medien und Lösungen

Medien und Lösungen

Alizarin Rot Färbelösung 0,5%

Zu 200 mg Alizarin Red S werden 40 ml ddH₂O gegeben und auf einen pH-Wert von 4,0 eingestellt

AP-Aktivitätspuffer

3,75 g Glycin (50 mM), 12,11 g Tris-Base (100 mM) und 203 mg MgCl₂ (1 mM) werden in 900 ml ddH₂O gelöst, mit NaOH auf einen pH-Wert von 10,5 eingestellt und mit ddH₂O auf 1 l aufgefüllt

AP-Substratlösung

1,3 mg 4-Nitrophenylphosphat (3,5 mM) werden in 1 ml AP-Aktivitätspuffer (0,1 M) gelöst

β-Glycerol-Phosphat-Stammlösung

108 mg β-Glycerol-Phosphat (50 mM) werden in 10 ml DPBS gelöst, steril filtriert, aliquotiert und bis zur Verwendung bei -20 °C eingefroren

Dexamethason-Stammlösung

2 mg Dexamethason (5mM) werden in 1 ml DMSO gelöst, steril filtriert, aliquotiert und bis zur Verwendung bei -20 °C eingefroren

DEPC H₂O 0,1%

1 ml DEPC werden zu 1 l ddH₂O gegeben, vermischt und bei 37 °C für eine Stunde inkubiert, danach autoklaviert

Medien und Lösungen

Ethanol 70 %

35 ml Ethanol 99 % werden zu 15 ml H₂O gegeben und vermischt

L-Ascorbat-2-Phosphat-Stammlösung

128 mg L-Ascorbat-2-Phosphat (50 mM) werden in 10 ml PBS gelöst, steril filtriert, aliquotiert und bei – 20 °C eingefroren bis zur Verwendung

Natriumcarbonat-Formaldehydlösung

50 g Natriumcarbonat werden in 250 ml 37-40% Formaldehyd gelöst und mit ddH₂O zu 1 l aufgefüllt, Lagerung unter dem Abzug

Natriumthiosulfatlösung 5%

Zu 50 g Natriumthiosulfat werden 1 l ddH₂O gegeben

PCR Ladepuffer (5X)

25 mg Bromphenolblau in 5 ml 10X TBE und 5 ml Glycerol (10%) lösen

Resazurin-Stammlösung

5 mg Resazurin werden in 20 ml DPBS gelöst, aliquotiert und bis zur Verwendung bei – 20 °C eingefroren

Silbernitratlösung 3 %

Zu 30 g Silbernitrat wird 1 l ddH₂O gegeben und lichtgeschützt gelagert

TBE (TRIS-Borat-EDTA-Puffer) 1X

10 ml 10X TBE mit 90 ml ddH₂O auffüllen

TBE 10X

540 g TRIS (0,89 M), 275 g Borsäure (0,89 M) und 37,3 g EDTA (20 mM) mit ddH₂O auf 5 l auffüllen

Trypanblaulösung

Zu 0,75 ml Trypanblau 0,5 % werden 2,25ml Dulbecco's PBS gegeben

3.1.5 Oligonukleotide

Primer (siehe Tabelle 11) bestellt bei Eurofins Genomics, Ebersberg, Deutschland.

3.1.6 Software

In Tabelle 8 sind die in dieser Arbeit verwendeten Software Programme aufgelistet.

Tabelle 8: Software

Name	Hersteller
EndNote X7	Japone/Team LnDL, Thomas Reuters, San

3 Material und Methoden

Name	Hersteller
	Francisco, USA
GraphPad Prism 5	GraphPad Software Inc., San Diego, USA
Image J: Image Processing and Analysis in Java	National Institute of Health, USA
Intas Image Software	Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland
NCBI Primer-BLAST	National Center for Biotechnology Information, USA
OMEGA Software FLUOstar, V1.10	BMG Labtech, Ortenberg, Deutschland
Gene-regulation.com	BIOBASE Biological Databases, USA

3.2 Methoden

Die verwendeten Methoden wurden gemäß der am Siegfried Weller Institut der Universität Tübingen bewährten SOPs ausgeführt.

Die Zellkulturarbeiten fanden allesamt unter aseptischen Bedingungen in der sterilen Werkbank statt. Die Materialien waren steril verpackte Einmalartikel oder wurden vor der Benutzung sterilisiert.

3.2.1 Isolation und Kultivierung von primären humanen Osteoblasten

Die Isolierung und Kultivierung der primären humanen Osteoblasten erfolgte nach Ehnert et al. 2010 [5] und Braun et al. 2011 [74].

3.2.1.1 Herstellung der Medien

Die Versuche dieser Arbeit wurden an primären humanen Osteoblasten durchgeführt. Für die Zellkulturen und die später gewünschte Differenzierung der Zellen wurden jeweils eigene Medien benötigt.

Osteoblastenkulturmedium

Jeweils 250 ml MEM Earle's und Ham's F12 wurden gemischt. Dem so entstandenen Medium wurden 50 ml FCS, 5 ml Penicillin/Streptomycin Lösung, 0,5 ml L-Ascorbate-2-Phosphate-Stammlösung und 0,5 ml β -Glycerol-Phosphate-Stammlösung zugegeben und alles durch Schwenken vermischt. Das Osteoblastenkulturmedium kann bei 4 °C bis zu drei Wochen aufbewahrt werden.

Osteoblastendifferenzierungsmedium

Jeweils 250 ml MEM Earle's und Ham's F12 wurden gemischt. In je 10ml davon wurden 29 mg L-Ascorbat-2-Phosphat (200 μ M), 1,08 mg β -Glycerol-Phosphat (10 mM), 2,98 g Hepes (25mM), 83 mg Kalziumchlorid (1,5 mM) und 10 μ l Dexamethason-Stammlösung gelöst und steril filtriert zurück in das MEM/Ham's-F12-Gemisch gegeben. Daraufhin wurden 5 ml FCS und 5 ml Penicillin/Streptomycin Lösung zugegeben und alles durch Schwenken

vermischt. Das Osteoblastendifferenzierungsmedium kann bei 4 °C bis zu drei Wochen aufbewahrt werden.

3.2.1.2 Isolieren von primären humanen Osteoblasten

Die primären humanen Osteoblasten wurden für die vorliegende Arbeit aus Knochenfragmenten, welche im Rahmen elektiver Operationen von Knie- oder Hüftgelenktotalendoprothesen in der BG Unfallklinik Tübingen gewonnen wurden, isoliert. Der Altersdurchschnitt der Patienten lag bei 65,4 Jahren. Ein positives Votum der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät Tübingen, sowie die Einwilligung der Patienten zu der Spende lagen vor den Operationen vor (364/2012B02 und 316/2012B02).

Mit einer Hohlmeißelzange wurden aus Knochenfragmenten steril kleine Spongiosastücke herausgebrochen und mehrmals mit DPBS gewaschen. 7 mg Collagenase II wurden in 10 ml DPBS gelöst und davon 1 ml zu je 1 ml Knochenfragment für den Spongiosa-Verdau in ein PP-Röhrchen gegeben und ca. eine Stunde bei 37 °C im Wasserbad mit mehrmaligem Durchmischen inkubiert. Danach wurde der Überstand zusammen mit der durch erneutes Waschen der Knochenfragmente mit DPBS entstandenen Flüssigkeit in ein neues 50 ml PP-Röhrchen gegeben. Nach Zentrifugation (600 g, 10 min, Raumtemperatur (RT)) wurde der entstandene Überstand aspiriert und das entstandene Pellet in 25 ml Osteoblastenkulturmedium (siehe 3.2.1.1) resuspendiert. Die Lösung wurde in eine T175 Gewebekulturflasche gegeben, 125 µl Antibiotikum/Antimycotikum hinzugefügt und bis zur Zelladhäsion im Brutschrank inkubiert (37 °C, 5 % CO₂).

3.2.1.3 Kultivieren von primären humanen Osteoblasten

Am Tag nach der Isolation der Zellen aus dem Spendermaterial wurde das Osteoblastenkulturmedium gewechselt und erneut mit 125 µl Antibiotikum/Antimycotikum versetzt. Während der Kultivierung im Brutschrank wurde alle drei bis vier Tage das Kulturmedium erneuert. Die Zellen wurden bis zum Erreichen von ca. 90% Konfluenz (im Lichtmikroskop wird mehr als 90%

der Fläche der Gewebekulturflasche mit Osteoblasten bedeckt) kultiviert, um sie dann zu passagieren.

Passagieren der Zellen

Frisch isolierte Zellen wurden als Passage Null definiert. In den Zellkulturflaschen von Osteoblasten dieser Passage befinden sich bedingt durch den Isolationsprozess Überreste der Spongiosa und Fetttropfen. Zur Gewinnung einer möglichst reinen Osteoblastenkultur und Vermehrung der Osteoblasten wurden die Zellen mehrfach passagiert.

Zur Vorbereitung des Passagierens wurden Trypsin/EDTA, das Osteoblastenkulturmedium und DPBS im Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Daraufhin wurde Kulturmedium unter der sterilen Werkbank aus den Kulturflaschen abgesaugt und die Zellen für 5 min mit 10 ml DPBS inkubiert, um eine vollständige Entfernung des Kulturmediums zu gewährleisten. DPBS wurde abgesaugt und je Kulturflasche 2 ml Trypsin/EDTA hinzugefügt und 5 min bei 5% CO₂ und 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden durch leichtes Klopfen gegen die Kulturflasche und nachfolgendem Auf- und Abpipettieren vollständig abgelöst. Das vollständige Ablösen der Zellen wurde mit Hilfe eines Lichtmikroskops kontrolliert. Durch Hinzufügen von Kulturmedium und wiederholtes Durchmischen der Suspension wurde das Trypsin durch das im Kulturmedium enthaltene FCS inaktiviert und so die Reaktion gestoppt. Die Zellsuspension wurde in ein 50 ml PP-Röhrchen überführt und 10 min zentrifugiert (600 g, RT). Der Überstand wurde abgesaugt und das zurückbleibende Pellet in 10 ml Kulturmedium resuspendiert. Mittels Neubauerzählkammer erfolgte die Zellzahlbestimmung. Danach wurden die Zellen in zwei bis drei neuen T175 Kulturflaschen ausgesät, je 25 ml Osteoblastenkulturmedium hinzugegeben und erneut im Brutschrank inkubiert (37 °C, 5% CO₂). Ein Mediumwechsel fand alle drei bis vier Tage statt.

3.2.2 Stimulation der Zellkulturen

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden Zellen der Passagen zwei und drei verwendet und pro Spender sowohl stimulierte Proben als auch immer eine nicht stimulierte Kontrolle angelegt.

Für die Bestimmung der Genexpression von HDACs mittels RT-PCR (siehe 3.2.3) wurden Osteoblasten in 25 cm² Zellkulturschalen ausplattiert und nach Adhäsion der Zellen und Erreichen von ca. 80% Konfluenz mit 5 ng/ml TGF- β_1 in Kulturmedium stimuliert. Für die Versuchsdurchführung wurden die Zellen über zwei, vier und sieben Tagen inkubiert (37 °C, 5% CO₂).

Für die weiteren Tests wurde durch Wechseln des Kulturmediums zu Osteoblastendifferenzierungsmedium (siehe 3.2.1.1) die benötigte osteogene Differenzierung der Zellen erzielt.

Für den Zytotoxizitätstest (siehe 3.2.4) wurden Osteoblasten auf 96-Well Platten übertragen, 24 Stunden zur Adhärenz mit Kulturmedium inkubiert (37 °C, 5% CO₂) und anschließend mit verschiedenen Konzentrationen von TMP269 in Differenzierungsmedium stimuliert. TMP269 wurde in DMSO gelöst, deshalb wurde zusätzlich zur Kontrolle mit 0,1% DMSO stimuliert. Nach 72 Stunden fand die Messung des Resazurin-Umsatzes und der AP-Aktivität statt (siehe 3.2.5 und 3.2.6). Für die Bestimmung der AP-Aktivität und Matrixmineralisierung (siehe 3.2.7) wurden Osteoblasten auf 48-Well Platten übertragen. Nach Adhäsion der Zellen wurden die Zellen mit 5 ng/ml TGF- β_1 bzw. 40 nmol/l TMP269 in Osteoblastendifferenzierungsmedium stimuliert. Die Versuchsdurchführung sah eine Inkubation der Zellen (37 °C, 5% CO₂) für drei, sieben und 21 Tage vor.

3.2.3 Reverse Transkription und Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Für die Untersuchung der Genexpression der HDACs in mit TGF- β_1 stimulierten Osteoblasten wurde die in der Zelle enthaltene Ribonukleinsäure (RNA) isoliert, in komplementäre Desoxyribonukleinsäure (cDNA) umgeschrieben und mit Hilfe der RT-PCR quantifiziert. Die Durchführung der Arbeitsschritte in diesem Abschnitt erfolgte angelehnt an Green und Sambrook 2012 [75].

3.2.3.1 *Isolieren von zellulärer RNA*

Zur Isolation der RNA wurde PeqGOLD TriFast verwendet [76]. Diese Lösung trennt eine Zellsuspension unter Zentrifugieren in drei Phasen. In der oberen wässrigen Phase befindet sich die RNA, in der mittleren die DNA, Proteine und das TriFast reichern sich in der unteren Phase an.

Die Zellen wurden mit 500 µl PeqGOLD TriFast je Zellkulturschale lysiert und die Suspension in ein Reaktionsgefäß überführt, 100 µl Chloroform hinzugegeben, 15 sec gevortext und nach 5 min Inkubationszeit bei RT 10 min zentrifugiert (14.000 g, 4 °C). Die RNA enthaltende oberste Phase wurde in ein mit 250 µl Isopropanol gefülltes Reaktionsgefäß überführt und 10 min auf Eis inkubiert. Der durch erneute Zentrifugation bei 14.000 g für 10 min bei 4 °C entstandene Isopropanolüberstand und die darin ausgefällte RNA wurde vorsichtig abpipettiert. Das RNA Pellet wurde zwei Mal wie folgt mit Ethanol gewaschen: auf das Pellet wurde 70% Ethanol gegeben, wie zuvor zentrifugiert, der Ethanolüberstand vorsichtig abgenommen und danach das Reaktionsgefäß zum Verdunsten des restlichen Ethanols einige Minuten offen gelassen. Zuletzt wurden die RNA-Pellets in 30 µl DEPC H₂O resuspendiert. Das DEPC inaktiviert Ribonukleasen (RNAsen) und verhindert somit einen Abbau der isolierten RNA. Die Lagerung der so gewonnene RNA erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C.

3.2.3.2 *Bestimmung der RNA-Konzentration und –Reinheit*

Die Bestimmung von Konzentration und Reinheit der RNA erfolgte anhand der optischen Dichte (OD) mittels UV-Spektralphotometer. Nukleinsäuren besitzen ihr Absorptionsmaximum bei 260 nm. Ein gemessener Wert von 1 bedeutet, dass circa 40 µg/ml an RNA in der Lösung enthalten sind. Proteine besitzen ihr Adsorptionsmaximum bei 280 nm. Mittels dem Quotient der gemessenen Werte bei 260 nm und 280 nm lässt sich die Verunreinigung der isolierten RNA ermitteln, er sollte zwischen 1,5 und 2,0 liegen.

Die Messung erfolgte in zwei Teilschritten. Zuerst wurden 2 µl DEPC H₂O je Vertiefung auf die Messplatte aufgetragen und die Extinktion bei 260 nm und 280 nm gemessen. Diese Blindwerte wurden später mit den Werten der Proben

verrechnet. Dann wurden 2 µl von den unverdünnten RNA-Proben auf jede Vertiefung gegeben und die Extinktion wie oben gemessen. Die RNA-Konzentration der Suspension wird vom Spektralphotometer direkt in µg/µl ausgegeben.

3.2.3.3 Kontrolle der RNA-Integrität

Die Kontrolle der RNA-Integrität wurde mittels elektrophoretischer Trennung im Agarosegel überprüft. Bei intakter RNA sind unter UV-Licht die zwei gut abgrenzbaren 18S und 28S ribosomale RNA-Banden zu erkennen.

Zur Herstellung des Agarosegels wurden 1,5 g Agarose in 100 ml 1x TBE aufgekocht, 7 µl Ethidiumbromid hinzugegeben und in einen Gelschlitten mit Kämmen, deren Zähne die späteren Geltaschen bilden, gegossen. Nach Erstarren erfolgte die Entfernung der Kämmen. Das Gel wurde in eine mit 1x TBE gefüllte Gelkammer gegeben, Volumina von je 400 ng RNA mit DEPC H₂O auf 10 µl verdünnt, 2,5 µl PCR-Ladepuffer 5x dazugegeben und 12 µl davon wurden in eine Tasche des Agarosegels gegeben. In die erste Tasche des Gels wurden 1,5 µl des pUC19-Markers pipettiert. Die elektrophoretische Auftrennung der Moleküle erfolgte bei 90 V Gleichstrom für 50 min. Die Darstellung der Banden erfolgte mittels Ethidiumbromid-Fluoreszenz unter UV-Licht (GelDoc).

3.2.3.4 DNase-Verdau

Um Sicherzustellen, dass die entstandenen RNA-Lösungen DNA frei sind, wurde ein DNase-Verdau durchgeführt.

Zu je 5 µg RNA wurde je 1 µl DNase I, RNase-free und 10X Reaktion Buffer mit MgCl₂ gegeben und mit DEPC auf 10 µl aufgefüllt.

Nach 50 min bei für die DNase-Aktivität optimalen 37°C wurde zu deren Inaktivierung je 1 µl 50 mM EDTA hinzugegeben und nochmals 10 min bei 65°C inkubiert.

3.2.3.5 cDNA-Synthese

In der PCR wird cDNA vervielfältigt. Mittels Reverser Transkriptase wird RNA in cDNA umgeschrieben [77]. Verwendet wurde hierfür das cDNA Synthese Kit von Thermo Scientific.

3000 ng RNA wurden mit DEPC H₂O 0,1% auf ein Probenvolumen von 9 µl verdünnt. Je Probe wurde 1 µl Random Hexamer Primer und 1 µl Oligo (dT)₁₈ Primer hinzugegeben. Die Proben wurden im Thermocycler 5 min auf 65 °C erhitzt. Während einer Abkühlung auf 4 °C wurden je Probe 4 µl Reaktionspuffer, 2 µl dNTP, 2 µl MuLV und 1 µl des RNase Inhibitors RiboLock hinzu pipettiert. Im Anschluss erfolgte die cDNA-Synthese bei 37 °C. Nach 60 min wurde zur Beendigung der Synthese über 5 min auf 70 °C erhitzt. Jede Probe wurde mit 280 µl DEPC H₂O auf die zur PCR benötigte Konzentration der cDNA von 10 ng/µl verdünnt und bei - 80 °C gelagert.

3.2.3.6 Entwicklung und Optimierung der Primer

Zur Amplifizierung der gewünschten DNA-Bereiche während der PCR, werden als Begrenzung dieser Abschnitte zwei Oligonukleotide, die Primer, benötigt. Während der Entwicklung von Primern sollte folgendes beachtet werden [78]:

- Primergröße von 18-25 Nukleotiden
- Guanin-Cytosin-Gehalt zwischen 40% und 60%
- vermeiden von komplementäre Sequenzen (Dimerisierungen, Haarnadelstrukturen)
- Differenz der Schmelztemperaturen eines Primerpaares ≤ 5 °C
- Primerpaar überspannt ein Intron oder einer der Primer liegt an einer Exon-Exon Bindungsstelle

Die benötigten Primer (siehe Tabelle 11) wurden mit NCBI Primer-BLAST generiert (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Die Spezifität wurde anhand eines genomweiten Blast verifiziert.

3.2.3.7 PCR

Die PCR ist ein *in vitro* Verfahren, bei dem ein beliebiger Abschnitt des DNA-Moleküls selektiv und exponentiell vervielfältigt werden kann. Die Methode wurde 1985 von Kary Mullis entwickelt [79]. Die Durchführung erfolgte auf Grundlage des Technical Manuals der Firma Thermo Scientific [80].

Ein DNA-Synthese-Zyklus besteht aus den folgenden drei Schritten:

1. Denaturierung: die Doppelstrang DNA (dsDNA) wird auf 95 °C erhitzt, um die Stränge durch Aufbrechen der Wasserstoffbrückenbindungen in zwei komplementäre Einzelstränge (ssDNA) zu trennen, so wird die Bindung der Primer ermöglicht
2. Primerannealing: für den Prozess der Primerhybridisierung mit der DNA wird die Temperatur jeweils spezifisch gesenkt
3. Elongation: bei 72 °C lagert eine thermostabile DNA-Polymerase sukzessive dNTPs entlang des DNA-Stranges an, so entstehen zwei neue Doppelstränge

Dieser Zyklus wurde 25 bis 35-fach in einem Thermocycler wiederholt. Durch die stetige Verdopplung der DNA nimmt die Vervielfachung einen exponentiellen Verlauf. Abgeschlossen wird durch die finale Polymerisation, bei der die noch nicht komplett neu synthetisierten DNA-Stränge vervollständigt werden. Für jede PCR wurde ein eigener PCR-Ansatz (siehe Tabelle 9) vorbereitet. Für jedes Primerpaar wurden zuvor die optimalen Bedingungen ermittelt und so spezifisch die cDNA-Probenmenge und das PCR-Programm (siehe Tabelle 10 und Tabelle 12) angepasst. Pro durchgeführte PCR wurden je eine Positiv- und eine Negativkontrolle mitpipettiert. Die Positivkontrollen stammten von bereits im Labor getesteten cDNAs, für Negativkontrollen wurde DEPC H₂O verwendet.

Tabelle 9: Ansatz zur Durchführung der PCR

Materialien	Menge [μl]
Kapa Fast Ready Mix	10
Probe (cDNA) 10 ng/ μ l	X
Primer forward	1
Primer reverse	1
DEPC H ₂ O	8-X
Gesamt	20

Tabelle 10: PCR-Programm zur DNA-Amplifikation

Modus	Temperatur [$^{\circ}$C]	Zeit
HOLD	95	3 min
CYCLE (X Zyklen)	95	15 sec
	X	15 sec
	72	10 sec
HOLD	72	5 min
HOLD	4	∞

In jede Geltasche des zuvor (wie in Kapitel 3.2.3.3 beschrieben) hergestellten Agarosegels, wurden 8,8 μ l eines jeden PCR-Produkts pipettiert. In die erste Geltasche wurde zur Längenkontrolle der Fragmente 1,5 μ l pUC19-Marker aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgte für 40 min bei einer Gleichspannung von 90 V. Dabei interkaliert das Ethidiumbromid in die Nucleinsäuren der DNA bzw. RNA, wodurch unter UV-Licht (GelDoc) der Wellenlänge 254 nm die Fragmente fluoreszieren und so sichtbar werden.

Die densitometrische Analyse der PCR Gele wurde mit der Software ImageJ durchgeführt und die Ergebnisse jeder cDNA-Probe auf die des Housekeeping-Gens *hGAPDH* bezogen.

3.2.4 Zytotoxizitätstest - Laktatdehydrogenase (LDH) Bestimmung

Eine erhöhte LDH-Aktivität im Zellkulturüberstand lässt auf eine Beschädigung der Zellmembran schließen. Im Zytoplasma wird durch LDH die Umwandlung von L-Laktat zu Pyruvat katalysiert, wobei dazu direkt proportional NAD⁺ zu

NADH⁺ reduziert wird. Das gebildete NADH⁺ kann photometrisch bei 340 nm gemessen werden [81].

Auf einer 96-Well Platte wurden Osteoblasten in 100 µl/Well Osteoblastenkulturmedium für 24 Stunden inkubiert (37 °C, 5% CO₂), das Kulturmedium entfernt, durch Differenzierungsmedium ersetzt, die Zellen mit TMP269-Konzentrationen von 160 nM, 80 nM, 40 nM, 20 nM, 10 nM, 5 nM und 2,5 nM stimuliert und erneut inkubiert. TMP269 wurde dabei in DMSO gelöst. Anhaltspunkt für die verwendeten Test-Konzentrationen war die in der Literatur bezogen auf die HDAC9 Aktivität beschriebene IC₅₀ von 19 nM [73]. Als Kontrollen fungierten in 0,1% DMSO und allein in Differenzierungsmedium inkubierte Zellen. Nach 72 Stunden wurde der Zellkulturüberstand entnommen und zu 75 µl davon 50 µl der beiden Reaktionslösungen R1 und R2 des LDH-L Testkit Fluitest im Verhältnis 5:1 gegeben und die Extinktion bei 340 nm im Spektralphotometer über einen Zeitraum von 10 min gemessen. Die Ergebnisse wurden auf die Werte der Zellkontrolle normiert und ebenfalls nach 72 Stunden der Resazurinumsatz bzw. die AP-Aktivität der stimulierten Osteoblasten bestimmt (siehe 3.2.5 und 3.2.6).

3.2.5 Bestimmung des Resazurinumsatzes

Der Resazurinumsatz kann zur Messung der Proliferation und Vitalität der Osteoblasten genutzt werden. Lebende Zellen können in ihren Mitochondrien Resazurin zu Resorufin reduzieren. Die Menge an produziertem Resorufin kann fluoreszenz- oder absorptionsbasiert gemessen werden. Die Bestimmung erfolgte nach McMillian et al. 2002 [82].

Auf einer 96-Well Platte wurden Osteoblasten in 100 µl/Well Osteoblastenkulturmedium für sieben Tage mit 5 ng/ml TGF-β₁ bzw. 40 nM TMP269 inkubiert (37 °C, 5% CO₂). Als Kontrolle dienten Osteoblasten welche über diesen Zeitraum nur in Osteoblastenkulturmedium inkubiert wurden. Pro Well wurden 10 µl Resazurin-Stammlösung gegeben und nach 30 min im Spektralphotometer die Fluoreszenz bei 544 nm (Anregungswellenlänge) und 590-10 nm (Emissionswellenlänge) gemessen. Nach Abzug des

durchschnittlichen Hintergrundwertes leerer Wells normierten wir die erhaltenen Werte mittels der Ergebnisse der Kontrollgruppe.

3.2.6 Bestimmung der AP-Aktivität

Die Alkalische Phosphatase ist ein Enzym, das u.a. im wachsenden Knochen in hoher Konzentration vorkommt und so als früher Marker zur Bestimmung der Differenzierung und Funktion von Osteoblasten benutzt werden kann [83]. Zur Bestimmung der AP-Aktivität wird das aus p-Nitrophenylphosphat mittels Alkalischer Phosphatase erzeugte p-Nitrophenol photometrisch bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen. Die Messung wurde nach Ehnert et al. 2010 [5] und Wildemann et al. 2004 [84] durchgeführt.

Auf einer 96-Well Platte wurden je 5000 Osteoblasten in 100 µl Osteoblastenkulturmedium pro Well für sieben Tage mit 5 ng/ml TGF-β₁ bzw. 40 nM TMP269 inkubiert (37 °C, 5 % CO₂). Nach einmaligem Waschen mit DPBS gaben wir je Well 100 µl AP-Substratlösung zu und inkubierten bei 37 °C. Die Absorption wurde nach 20 min bzw. 40 min bei 405 nm gemessen.

Die gemessenen Werte wurden anhand der Standardkurve der verwendeten Lösung in die entsprechenden Substratkonzentrationen von p-Nitrophenol umgerechnet und mit der Inkubationszeit normalisiert. Die Standardkurve entstand aus den gemessenen Extinktionen einer seriellen Verdünnung von p-Nitrophenol. Zusätzlich wurden die Werte auf die relative Zellzahl mittels des Resazurin-Umsatzes der Zellen normalisiert.

3.2.7 Nachweis mineralisierter Matrix

Die Bestimmung der mineralisierten Matrix durch Färbung mittels Alizarin Rot und von Kossa Färbung erfolgte jeweils nach einer Kultur der Osteoblasten von 21 Tagen. Die Färbeergebnisse wurden zur densitometrischen Auswertung gescannt und mittels Mikroskopbilder festgehalten. Im Falle der Alizarin Rot Färbung wurde der gebundene Farbstoff wieder gelöst und photometrisch quantifiziert.

3.2.7.1 *Alizarin Rot Färbung*

Alizarin Rot bindet anhand einer Chelatbindungsreaktion an die Kalziumionen der von den Osteoblasten gebildeten Matrix. Diese Bindung wird rötlich sichtbar. Die Durchführung erfolgte anhand des Protokolls von Sheehan et al. [85].

Nach dem Absaugen des Mediums von den Zellen fixierten wir sie mit 99% Ethanol bei -20 °C für 60 min. Nach dem anschließenden dreimaligen Waschen mit Leitungswasser wurden die Zellen mit 0,5% Alizarin Rot Färbelösung für 30 min bei RT inkubiert. Daraufhin wurde die Platte erneut dreimal mit Leitungswasser gewaschen, getrocknet und die Färbeergebnisse mittels Mikroskopbilder festgehalten. Zur weiteren Messung wurde in jedes Well Cetylpyridiumchlorid Lösung gegeben um den Farbstoff zu lösen. Nach 15-60 min auf dem Shaker erfolgte die Messung der Absorption mit dem Spektralphotometer FluoStar Omega. Zur Bestimmung der Alizarin Rot Konzentration wurde eine Standardkurve pipettiert und mittels dem Omega Plate Reader die Extinktion bei 560 nm gemessen. Über die Steigung der linearen Trendlinie der Standardkurve konnte jedem Extinktionswert seine Konzentration von Alizarin Rot zugeordnet werden.

Wir normierten die gemessenen Werte auf die vor der Färbung bestimmten Zellzahlen. Ermittelt wurde die Zellzahl durch die Fluoreszenzbestimmung von Hoechst 33342, welches in die Zellkerne aufgenommen wird [86]. Dafür wurden 2ng/µl Hoechst 33342 in das Zellkulturmedium gegeben, 5 min unter Lichtausschluss bei RT inkubiert und anschließend der überschüssige Fluoreszenzfarbstoff mittels Zellkulturmedium abgewaschen und im Spektralphotometer die Emission bei einer Wellenlänge von 485 nm gemessen.

3.2.7.2 *Von Kossa Färbung*

Bei der Färbemethode nach von Kossa [85] wird eine Silbernitratlösung zu den Zellen gegeben. Die Silberionen reagieren mit dem dort vorhandenen Phosphat oder Carbonat und werden zu Silber reduziert, dabei entsteht eine Schwarzfärbung. So lässt sich mit dieser Methode eine osteogene Differenzierung der Zellen nachweisen.

Die Zellen wurden mit Leitungswasser gewaschen und mit 99% Ethanol für 60 min bei -20 °C fixiert. Das Ethanol wurde abgenommen und nach dreimaligem Waschen mit Leitungswasser für 30 min bei RT eine 3%-ige Silbernitratlösung auf die Zellen gegeben. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit Leitungswasser erfolgte die Zugabe von Natriumcarbonat-Formaldehydlösung. Nach 2 min wurden die Zellen nochmals dreimal mit Leitungswasser gewaschen und 5 min mit 5% Natriumthiosulfatlösung inkubiert. Zum Entfernen der Lösung wurde ein letztes Mal dreimal mit Leitungswasser gewaschen und die Platte getrocknet. Unter dem Lichtmikroskop erscheint die mineralisierte extrazelluläre Matrix dunkelbraun bis schwarz gefärbt.

3.2.8 Statistische Auswertung

Die statistischen Analysen erfolgten mit der Software GraphPad Prism 5. Eine Normalverteilung der Daten wurde aufgrund der Gruppengröße nicht angenommen. Die statistische Analyse zweier Gruppen berechneten wir mittels Mann-Whitney Test. Zur Analyse von drei oder mehr Gruppen erfolgte die statistische Auswertung mittels One-Way ANOVA (Kruskal Wallis) gefolgt von Dunn's multiplem Vergleichstest ($\alpha = 0,05$). Die Patientenzahl (N) und die Anzahl Versuchsdurchführungen pro Patient (n) wurden in den Graphiken entsprechend angegeben.

Signifikanzen wurden wie folgt definiert: * entspricht $p < 0,05$, ** entspricht $p < 0,01$, *** entspricht $p < 0,001$.

4 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob durch TGF- β_1 die Genexpression von HDACs in primären humanen Osteoblasten verändert wird. Basierend auf den im Folgenden dargestellten Ergebnissen der Genexpressionsveränderungen ergab sich im Verlauf des Projektes die zweite Fragestellung, ob das unter der Stimulation mit TGF- β_1 in der Genexpression stark herabgesetzte HDAC9 eine wichtige funktionelle Rolle in Osteoblasten spielt.

4.1 Entwicklung und Optimierung der Primer

Für die gewählte Methode der RT-PCR zur Bestimmung der HDAC-Genexpressionen werden zur Amplifizierung der gewünschten DNA-Bereiche HDAC-spezifische Primer benötigt. Die benötigten Primer wurden mit NCBI Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) generiert und ihre Spezifität anhand eines genomweiten Blast verifiziert. Die verwendeten Primersequenzen sind in Tabelle 11 aufgeführt.

Vor Verwendung der Primer in der PCR wurde das benötigte Volumen, das Temperaturoptimum sowie die Zyklenzahl ermittelt. Dazu testeten wir je Primer PCRs mit den eingesetzten cDNA Mengen von 20 – 60 ng, Temperaturen von 56 °C bis 64 °C und 30, 35 oder 40 Zyklen. Die Bedingungen, bei welchen sich die stärksten und am besten abgrenzbaren spezifischen Banden zum optimalen Vergleich einer Expressionsänderung der Gene ergaben und die eingesetzten cDNA quantifiziert werden konnte, verwendeten wir für die PCR-Analysen und sind in Tabelle 12 aufgeführt.

Tabelle 11: verwendete Oligonukleotide

Exon	NM-Nummer	Länge [bp]	5' Primer (forward)	3' Primer (reverse)
hGAPDH	NM_001289746.1	420	GTCAGTGGTGGACCTGACCT	AGGGGTCTACATGGCAACTG
hHDAC1	NM_004964.2	221	CGTTGCCCGGTGCTGGACAT	TTTGACCCCCAGGTGCGTGTC
hHDAC2	NM_001527.3	316	CTTCCCCGGGGACTATCGC	TCGGCAGTGGCTTTATGGGGC
hHDAC3	NM_003883.3	258	AAGCCCCATCGCCTGGCATT	TGCGCCTGTGTAACGGGAGC
hHDAC4	NM_006037.3	229	GGCTCGGCGCTTGAACGTCT	ATGTGGTTCACGCGGGCAGG
hHDAC5	NM_005474.4	175	CATTAGAGGCACGGCGGCC	CCCGACCTGACATCCCATCCGA
hHDAC6	NM_006044.2	495	CTGGTGCTTCCCATTGCCTA	TGATGCCGAGGTGACTTTCC
hHDAC7	NM_015401.3	133	TAGCAGCACGCCCGCATCAG	CAAGGGGAACGGGGCCACAG
hHDAC8	NM_001166420.1	259	TGGAGGAGCCGGGGAACCG	TCGCCCTCTTGGCTGACCCTT
hHDAC9	NM_058176.2	599	TGGCCATCACGCTGAAGAAT	GTGGCTCCAGCTCATTTCCT
hHDAC10	NM_032019.5	329	AAGCAGAAACACGGGCTACA	GCTGAGTCAAATCCTGCCGA
hHDAC11	NM_024827.3	323	GGATGCTACACACAACCCAGC	CTGCACAAGGAAGTTGGGGA

Tabelle 12: PCR-Bedingungen der Exons

Exon	Temp [°C]	[Zyklen]	Menge [μ l] der Probe (10 ng/ μ l)	Positiv Kontrolle
hGAPDH	56	25	2	OSÜ 65
hHDAC1	60	35	3	OSÜ 65
hHDAC2	62	35	3	HEK 293T
hHDAC3	58	35	3	OSÜ 65
hHDAC4	60	35	3	OSÜ 65
hHDAC5	64	35	4	OSÜ 65
hHDAC6	58	35	3	HEK 293T
hHDAC7	62	35	3	OSÜ 65
hHDAC8	58	35	3	OSÜ 65
hHDAC9	60	35	4	HEK 293T
hHDAC10	62	35	3	HEK 293T
hHDAC11	58	35	3	OSÜ 65

4.2 Ergebnisse der RT-PCR-Analysen

Primäre humane Osteoblasten von 10 Spendern wurden in Kulturschalen ausplattiert und in Osteoblastenkulturmedium mit 5 ng/ml TGF- β_1 stimuliert. Ein Mediumwechsel fand alle vier Tage statt. Als Kontrolle dienten Zellen, die in Osteoblastenkulturmedium ohne Zusatz von TGF- β_1 inkubiert wurden. Zur Identifizierung von Expressionsänderungen der HDACs wurde nach zwei, vier und sieben Tagen die mRNA aus den Zellen isoliert und daraus mittels reverser Transkriptase cDNA synthetisiert. Daraufhin erfolgte die RT-PCR, die entstandene DNA wurde in Duplikaten im Agarosegel aufgetrennt und die unter UV-Licht entstandenen Fotografien densitometrisch analysiert. Die GAPDH Produkte wurden als Referenzwerte bei allen Auswertungen der Experimente verwendet und alle Ergebnisse als Prozentsatz des Wertes der Kontrolle zum Referenzwert angegeben. Die Ergebnisse werden in Abbildung 3 bis Abbildung 13 dargestellt.

4.2.1 Genexpression der HDAC Klasse I

4.2.1.1 HDAC1: signifikante leichte Expressionsabnahme an Tag 2 und 4

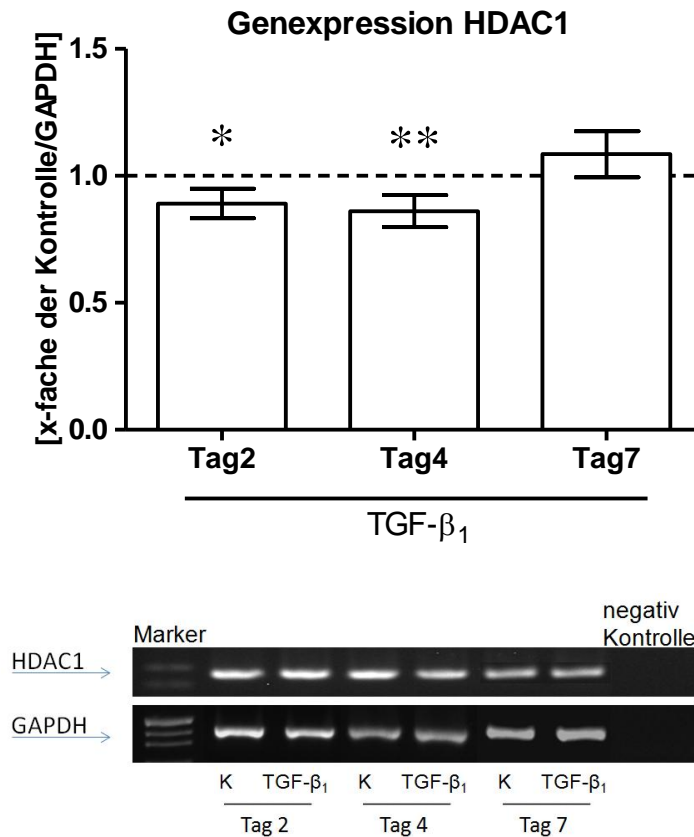


Abbildung 3: Genexpression von HDAC1 unter TGF- β_1 -Stimulation (5 ng/ml)

N = 10, n = 2. Gestrichelte Linie = Wert der Kontrolle/Genexpression GAPDH entspricht 100%; * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$; GAPDH = Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, HDAC = Histondeacetylase, K = Kontrolle, TGF- β_1 = Transforming Growth Factor beta 1.

Es zeigt sich eine leichte signifikante Abnahme von 11% ($p < 0,05$) bzw. 14% ($p < 0,01$) der Genexpression von HDAC1 nach zwei bzw. vier Tagen der Stimulation mit TGF- β_1 . Nach sieben Tagen Stimulation zeigt sich ein Trend zur Zunahme der Expression von 8,5% (siehe Abbildung 3).

4.2.1.2 HDAC2: signifikante leichte Expressionsabnahme an Tag 4

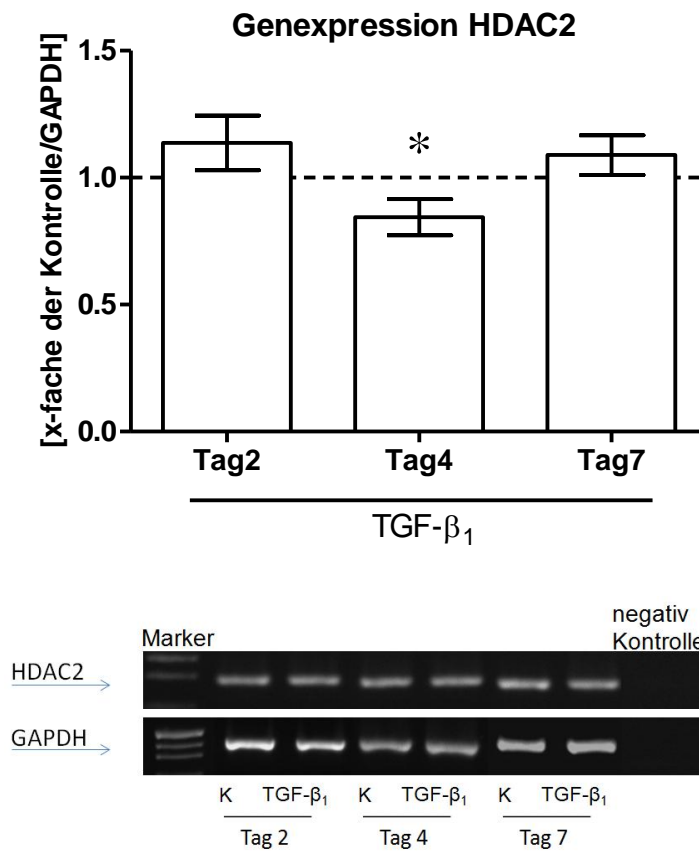


Abbildung 4: Genexpression von HDAC2 unter TGF-β₁-Stimulation (5 ng/ml)

N = 10, n = 2. Gestrichelte Linie = Wert der Kontrolle/Genexpression GAPDH entspricht 100%, * = p < 0,05; GAPDH = Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, HDAC = Histon-deacetylase, K = Kontrolle, TGF-β₁ = Transforming Growth Factor beta 1.

Es zeigt sich nach zwei bzw. sieben Tagen Stimulation mit TGF-β₁ eine leichte Zunahme der Genexpression von HDAC2 um 14% bzw. 9%. An Tag vier zeigt sich eine signifikante (p<0.05) geringe Abnahme der Expression von 16% (siehe Abbildung 4).

4.2.1.3 HDAC3: signifikante leichte Expressionsabnahme an Tag 4

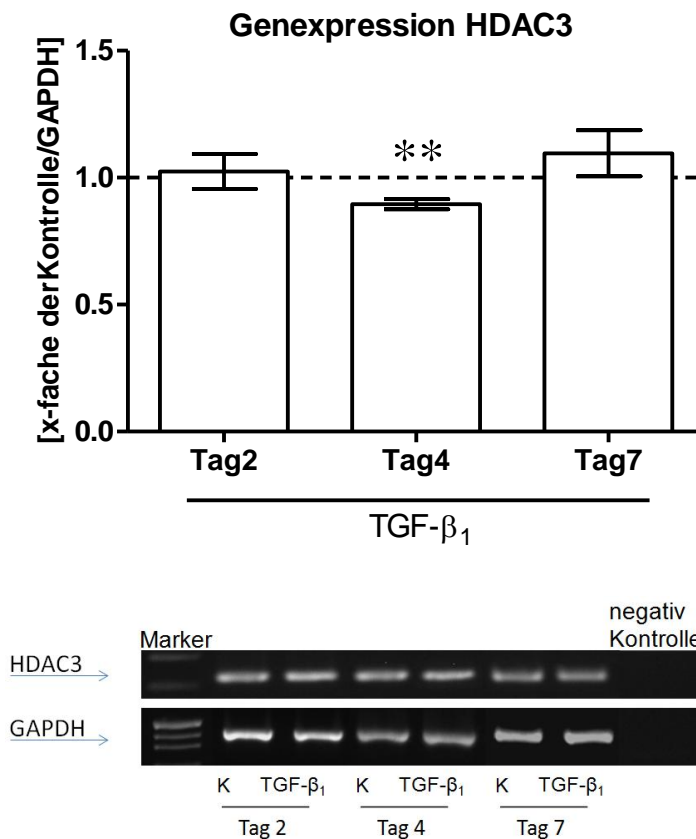


Abbildung 5: Genexpression von HDAC3 unter TGF-β₁-Stimulation (5 ng/ml)

N = 10, n = 2. Gestrichelte Linie = Wert der Kontrolle/Genexpression GAPDH entspricht 100%, ** = p < 0,01; GAPDH = Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, HDAC = Histon-deacetylase, K = Kontrolle, TGF-β₁ = Transforming Growth Factor beta 1.

Es zeigt sich eine signifikante Abnahme von 10% (p<0,01) der Genexpression von HDAC3 nach vier Tagen der Stimulation mit TGF-β₁. Nach sieben Tagen Stimulation zeigt sich eine leichte Zunahme der Expression von 10% (siehe Abbildung 5).

4.2.1.4 HDAC8: signifikante leichte Expressionsabnahme an Tag 2 und 4

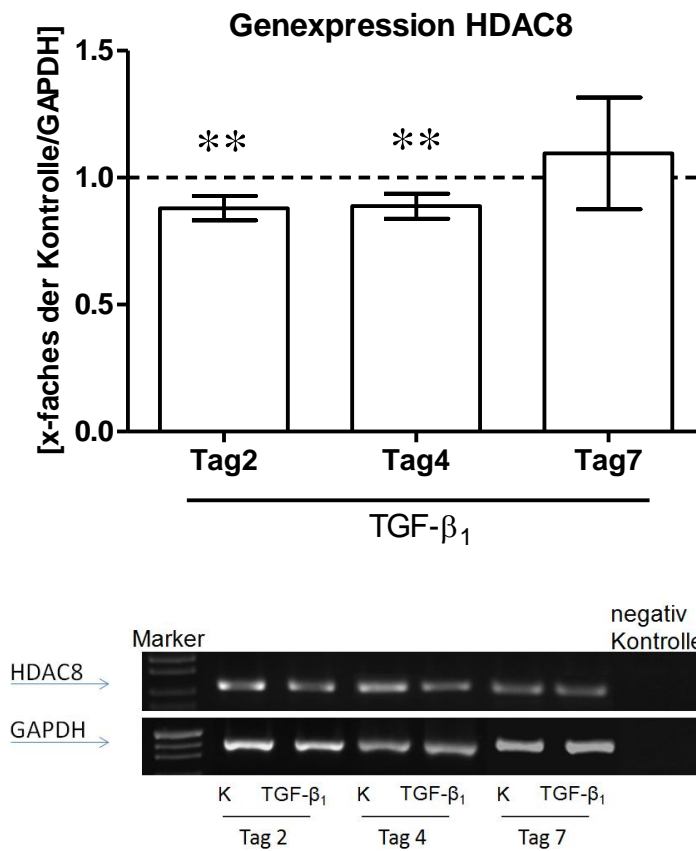


Abbildung 6: Genexpression von HDAC8 unter TGF-β₁-Stimulation (5 ng/ml)

N = 10, n = 2. Gestrichelte Linie = Wert der Kontrolle/Genexpression GAPDH entspricht 100%, ** = p < 0,01; GAPDH = Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, HDAC = Histon-deacetylase, K = Kontrolle, TGF-β₁ = Transforming Growth Factor beta 1.

Es zeigt sich eine signifikante Abnahme von 12% bzw. 11% (je p<0,01) der Genexpression von HDAC8 nach zwei bzw. vier Tagen der Stimulation mit TGF-β₁. Nach sieben Tagen Stimulation zeigt sich eine leichte Zunahme der Expression von 10% (siehe Abbildung 6).

4.2.2 Genexpression der HDAC Klasse IIa

4.2.2.1 HDAC4: signifikante Expressionsabnahme an allen Tagen

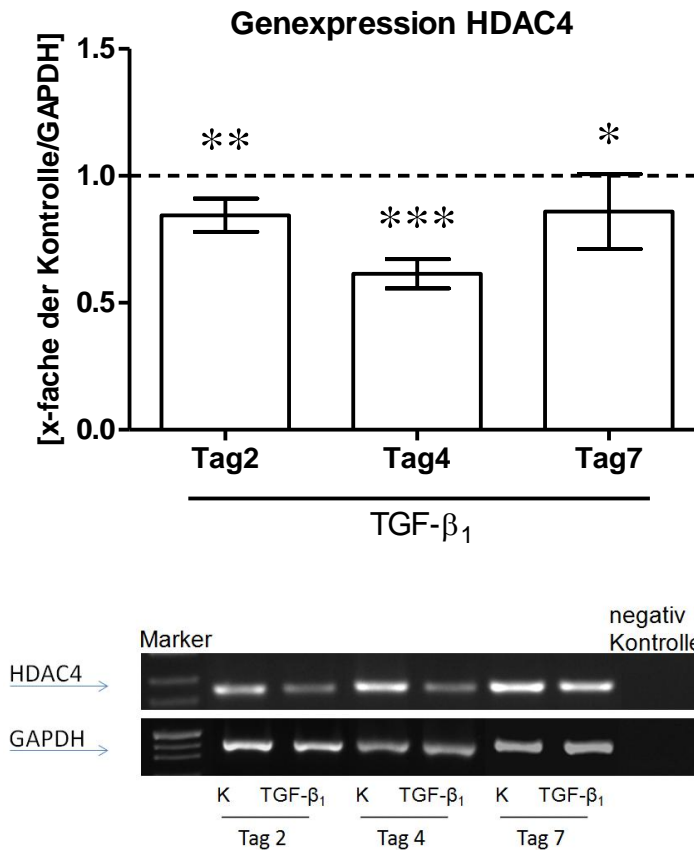


Abbildung 7: Genexpression von HDAC4 unter TGF- β_1 -Stimulation (5 ng/ml)

N = 10, n = 2. Gestrichelte Linie = Wert der Kontrolle/Genexpression GAPDH entspricht 100%, * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$, GAPDH = Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, HDAC = Histondeacetylase, K = Kontrolle, TGF- β_1 = Transforming Growth Factor beta 1.

Es zeigt sich eine signifikante Abnahme von 15% ($p < 0,01$), 39% ($p < 0,001$) und 14% ($p < 0,05$) der Genexpression von HDAC4 nach zwei, vier und sieben Tagen der Stimulation mit TGF- β_1 (siehe Abbildung 7).

4.2.2.2 HDAC5: signifikante Expressionsabnahme an Tag 4 und 7

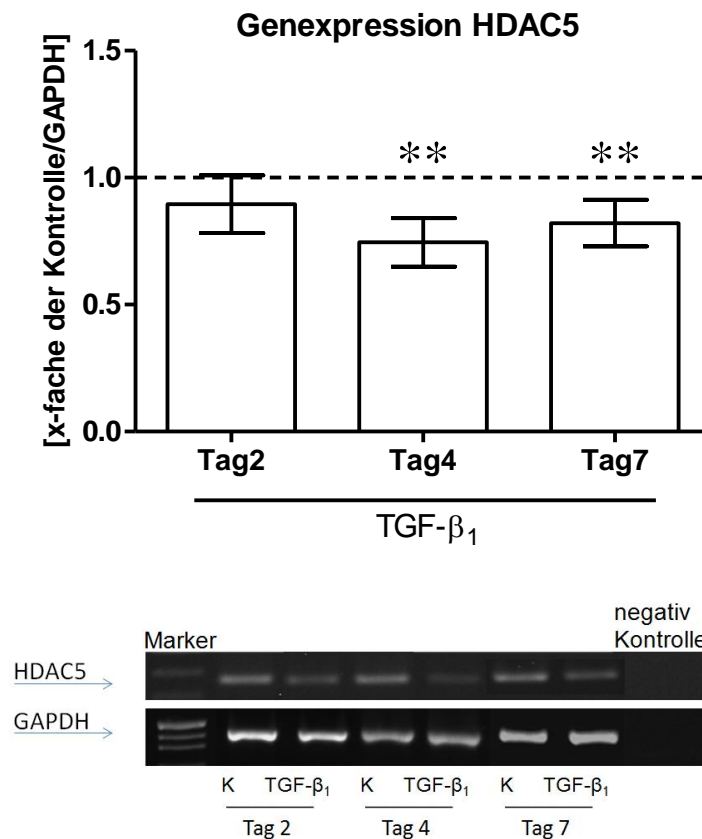


Abbildung 8: Genexpression von HDAC5 unter TGF-β₁-Stimulation (5 ng/ml)

N = 10, n = 2. Gestrichelte Linie = Wert der Kontrolle/Genexpression GAPDH entspricht 100%, ** = p < 0,01; GAPDH = Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, HDAC = Histon-deacetylase, K = Kontrolle, TGF-β₁ = Transforming Growth Factor beta 1.

Es zeigt sich eine signifikante Abnahme von 25% bzw. 18% (je p<0,01) der Genexpression von HDAC5 nach vier bzw. sieben Tagen der Stimulation mit TGF-β₁. Nach zwei Tagen Stimulation zeigt sich ebenfalls schon eine leichte Abnahme der Expression von 10% (siehe Abbildung 8).

4.2.2.3 HDAC7: signifikante Expressionsabnahme an Tag 4 und 7

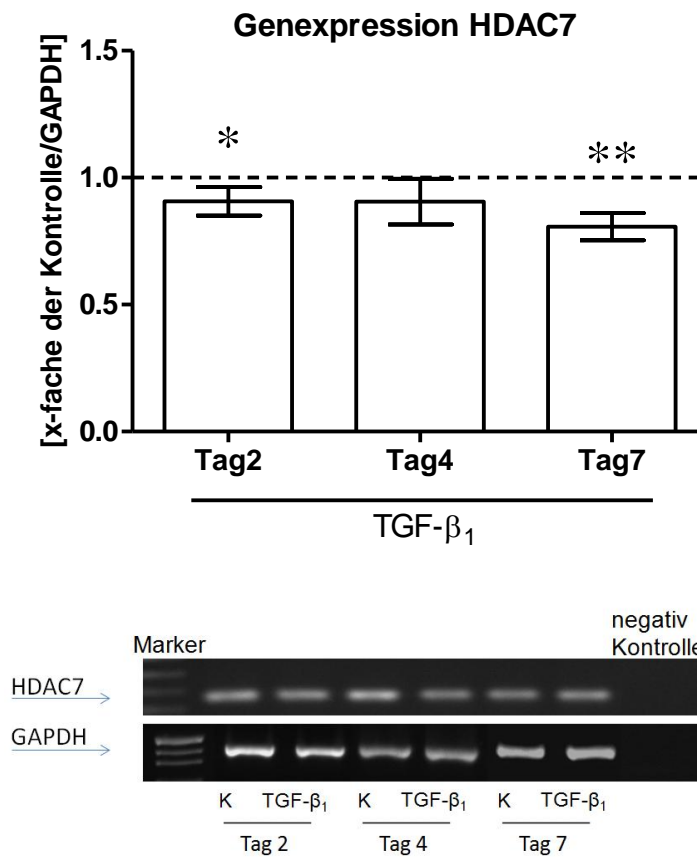


Abbildung 9: Genexpression von HDAC7 unter TGF- β_1 -Stimulation (5 ng/ml)

N = 10, n = 2. Gestrichelte Linie = Wert der Kontrolle/Genexpression GAPDH entspricht 100%, * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$; GAPDH = Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, HDAC = Histondeacetylase, K = Kontrolle, TGF- β_1 = Transforming Growth Factor beta 1.

Es zeigt sich eine signifikante Abnahme von 9% ($p < 0,05$) und 19% ($p < 0,01$) der Genexpression von HDAC7 nach zwei und sieben Tagen der Stimulation mit TGF- β_1 . Nach vier Tagen der Stimulation zeigt sich ebenfalls eine leichte Abnahme der Expression von 9% (siehe Abbildung 9).

4.2.2.4 HDAC9: starke signifikante Expressionsabnahme an allen Tagen

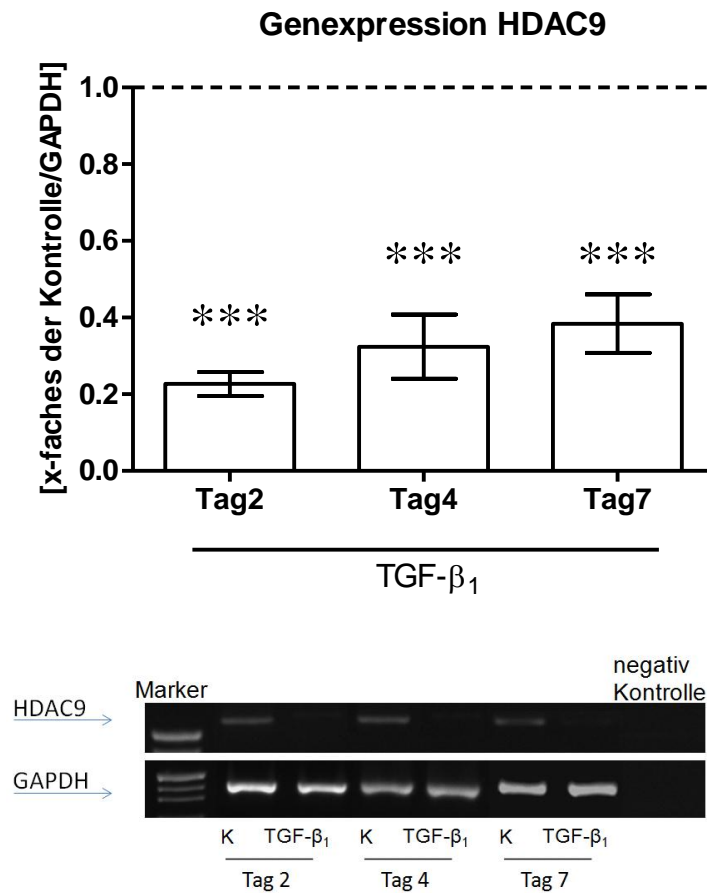


Abbildung 10: Genexpression von HDAC9 unter TGF- β_1 -Stimulation (5 ng/ml)

N = 10, n = 2. Gestrichelte Linie = Wert der Kontrolle/Genexpression GAPDH entspricht 100%, *** = $p < 0,001$; GAPDH = Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, HDAC = Histon-deacetylase, K = Kontrolle, TGF- β_1 = Transforming Growth Factor beta 1.

Es zeigt sich eine signifikante Abnahme von 78%, 68% bzw. 62% (je $p < 0,001$) der Genexpression von HDAC9 nach zwei, vier bzw. sieben Tagen der Stimulation mit TGF- β_1 . Optisch war auf den PCR Gelen kaum noch eine Bande detektierbar (siehe Abbildung 10).

4.2.3 Genexpression der HDAC Klasse IIb

4.2.3.1 HDAC6: signifikante Expressionszunahme an allen Tagen

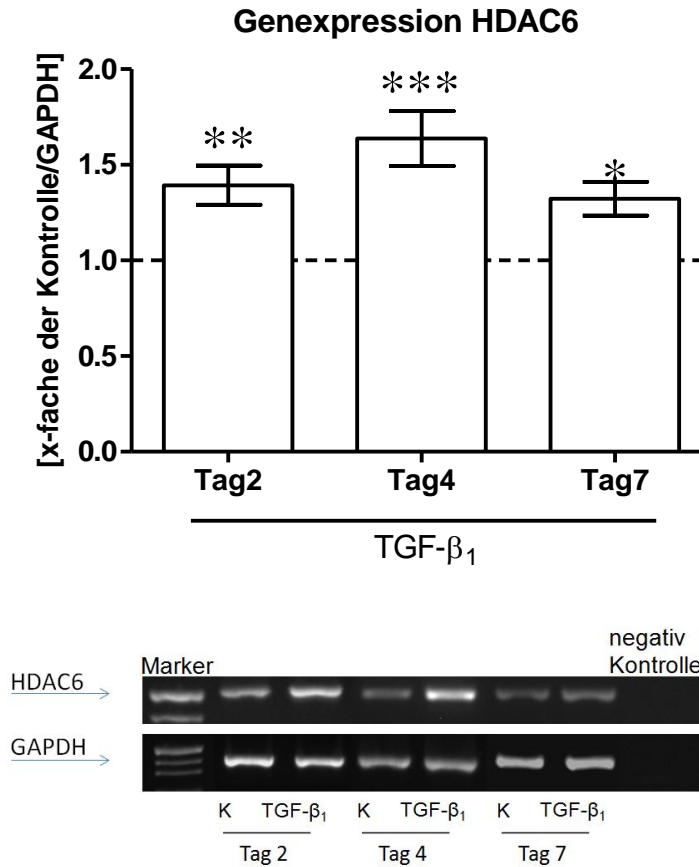


Abbildung 11: Genexpression von HDAC6 unter TGF- β_1 -Stimulation (5 ng/ml)

$N = 8, n = 2$. Gestrichelte Linie = Wert der Kontrolle/Genexpression GAPDH entspricht 100%; * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$; GAPDH = Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, HDAC = Histondeacetylase, K = Kontrolle, TGF- β_1 = Transforming Growth Factor beta 1. Datenwerte der Graphik aus [57].

Es zeigt sich eine signifikante Zunahmen der HDAC6 Genexpression von ca. 71% ($p < 0,01$), 105% ($p < 0,001$) und 51% ($p < 0,05$) an den Tagen zwei, vier und sieben unter der Stimulation mit TGF- β_1 (siehe Abbildung 11) [57].

4.2.3.2 *HDAC10*: signifikante Expressionsabnahme an Tag 4 und 7

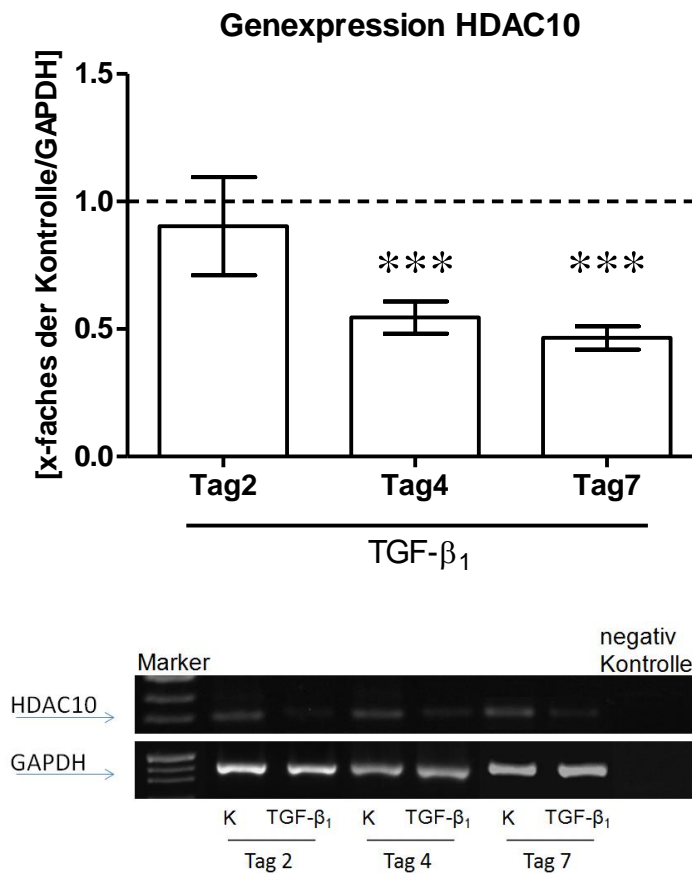


Abbildung 12: Genexpression von *HDAC10* unter $TGF-\beta_1$ -Stimulation (5 ng/ml)

N = 10, n = 2. Gestrichelte Linie = Wert der Kontrolle/Genexpression GAPDH entspricht 100%, *** = $p < 0,001$; GAPDH = Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, HDAC = Histon-deacetylase, K = Kontrolle, $TGF-\beta_1$ = Transforming Growth Factor beta 1.

Es zeigt sich eine signifikante Abnahme von 45% bzw. 53% (je $p < 0,001$) der Genexpression von *HDAC10* nach vier bzw. sieben Tagen der Stimulation mit $TGF-\beta_1$. Nach zwei Tagen der Stimulation zeigt sich ebenfalls schon eine leichte Abnahme der Expression um 10% (siehe Abbildung 12).

4.2.4 Genexpression der HDAC Klasse IV

4.2.4.1 HDAC11: signifikante Expressionsabnahme an allen Tagen

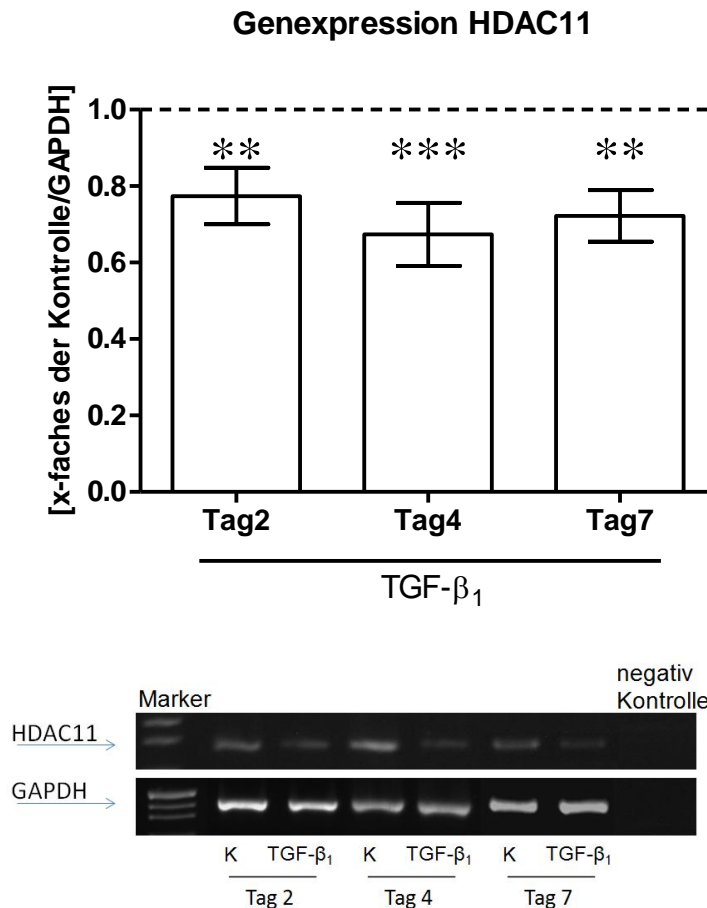


Abbildung 13: Genexpression von HDAC11 unter TGF- β_1 -Stimulation (5 ng/ml)

N = 10, n = 2. Gestrichelte Linie = Wert der Kontrolle/Genexpression GAPDH entspricht 100%, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$; GAPDH = Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, HDAC = Histondeacetylase, K = Kontrolle, TGF- β_1 = Transforming Growth Factor beta 1.

Es zeigt sich eine signifikante Abnahme von 23% ($p < 0,01$) und 33% ($p < 0,001$) bzw. 28% (je $p < 0,01$) der Genexpression von HDAC11 nach zwei, vier bzw. sieben Tagen der Stimulation mit TGF- β_1 (siehe Abbildung 13).

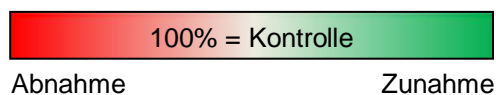
4.2.5 Zusammenfassung der PCR-Ergebnisse

Insgesamt lässt sich zusammenfassend sagen, dass die Genexpression der HDACs durch TGF- β_1 verändert wird. In der HDAC-Klasse I zeigt sich die Genexpression kaum beeinflusst. Eine signifikante Herabregulation wird vor allem in den Klassen II und IV beobachtet. Eine Ausnahme bildet die signifikante Genexpressionssteigerung von HDAC6. Ebenfalls sehr auffallend ist die konstant signifikante Hemmung der Genexpression von HDAC9. Als Überblick sind die Ergebnisse der PCR-Analyse in Tabelle 13 zusammengefasst.

Tabelle 13: Zusammenfassung der PCR Ergebnisse

In grün dargestellt ist eine durch TGF- β_1 bedingte Zunahme der Genexpression der jeweiligen HDAC im Vergleich zur Kontrolle, in rot eine Abnahme. HDAC = Histondeacetylase, PCR = Polymerasekettenreaktion, TGF- β_1 = Transforming Growth Factor beta 1. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$. Datenwerte von HDAC6 aus [57].

HDAC		Tag 2	Tag 4	Tag 7
Klasse I	1	*	**	
	2		*	
	3		**	
	8	**	**	
IIa	4	**	***	*
	5		**	**
	7	*		**
	9	***	***	***
IIb	6	**	***	*
	10		***	***
IV	11	**	***	**



4.3 Zytotoxizität von TMP269

Zur Abklärung einer eventuellen Zytotoxizität von TMP269 wurden primäre humane Osteoblasten von drei verschiedenen Spendern in 96 Well-Platten mit den Konzentrationen 2,5, 5, 10, 20, 40, 80 und 160 nM TMP269 für drei Tage stimuliert. TMP269 wurde dabei in DMSO gelöst. Die Kontrollen bildeten dabei in Differenzierungsmedium mit 0,1% DMSO inkubierte Zellen. Anschließend wurde zur Bestimmung der Zellviabilität der Resazurinumsatz (siehe Abbildung 14 a)) und zur Bestimmung der Zelldifferenzierung nach 40 min Inkubationszeit die AP-Aktivität gemessen (siehe Abbildung 14 b)). Die Werte der AP-Aktivität wurden mittels der zuvor erstellten Standardkurve des verwendeten AP-Aktivitätspuffers normalisiert und an die mittels des Resazurin-Umsatzes gemessene Proliferation der Zellen angeglichen.

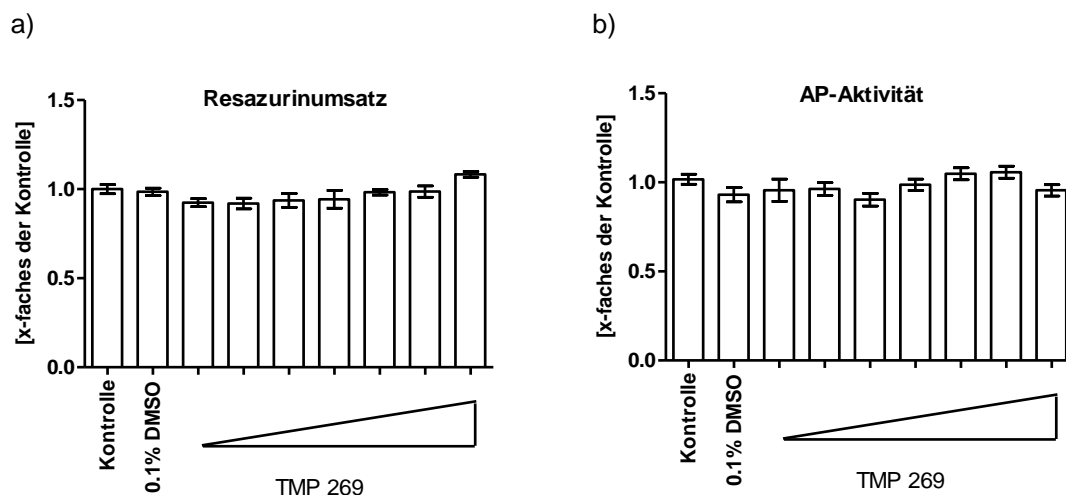


Abbildung 14: Zytotoxizität von TMP269

Die Zytotoxizität wurde mittels a) des Resazurinumsatzes und b) der AP-Aktivität nach drei tägiger Stimulation in aufsteigenden Konzentrationen (2,5, 5, 10, 20, 40, 80 und 160 nM) von TMP269 bestimmt. 0,1% DMSO fungierte im Sinne einer Positivkontrolle. N = 3, n = 5. AP = Alkalische Phosphatase, DMSO = Dimethylsulfoxid.

Im Vergleich zur Kontrolle führt die Stimulation mit TMP269 bei den Konzentrationen 2,5 nM bis 80 nM und 0,1% DMSO zu einem nur sehr leichten Abfall des Resazurinumsatzes. Durch Stimulation mit 160 nM TMP269 ist ein nur leichter Anstieg des Resazurinumsatzes zu beobachten. Ähnlich dazu

zeigen die Werte der AP-Aktivität lediglich leichte Schwankungen. Alle Werte, bis auf die Konzentrationen 40 nM und 80 nM, die einen leichten Anstieg zeigen, sind leicht vermindert (siehe Abbildung 14).

Es lässt sich somit keine zytotoxische Wirkung, sowie keine Einschränkung der Funktion von primären humanen Osteoblasten durch TMP269 beobachten.

Zur weiteren Abklärung der Zytotoxizität von TMP269 wurde zuvor der Zellkulturüberstand der höchsten Konzentration von TMP269 (160 nM), sowie der der Kontrolle entnommen und darin die LDH-Aktivität gemessen.

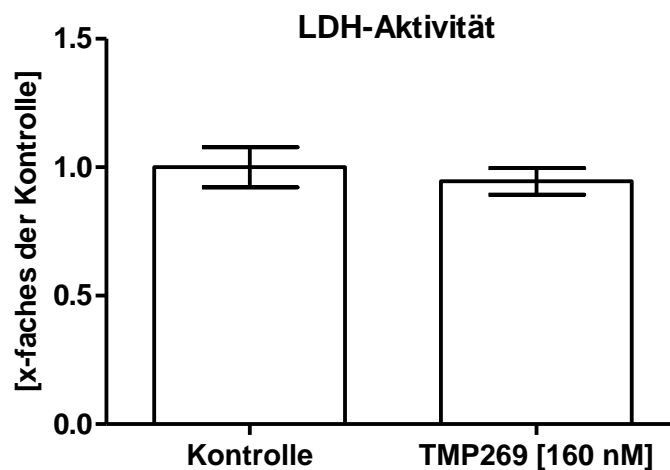


Abbildung 15: LDH-Aktivität Stimulation mit 160 nM TMP269

Die LDH-Aktivität im Kulturüberstand wurde nach drei tägiger Stimulation mit 160 nM TMP269 gemessen. N = 3, n = 5. LDH = Laktatdehydrogenase, nM = Nanomol

Es ist kein Anstieg der LDH-Aktivität im Zellkulturüberstand der mit TMP269 stimulierten Zellen im Vergleich zur Kontrolle feststellbar. Die hohe Konzentration von 160 nM TMP269 bewirkt somit keine zytotoxische Wirkung auf humane Osteoblasten (siehe Abbildung 15).

Für die folgenden Experimente wählten wir so eine Konzentration von 40 nM TMP269, welche der zweifachen inhibitorischen Konzentration von HDAC9 (IC₅₀) entspricht.

4.4 Auswirkung der Inhibierung von HDAC9 auf den Umsatz von Resazurin in primären humanen Osteoblasten

Zur Beurteilung der funktionellen Rolle von HDAC9 in der Osteogenese wurden Zellen in Osteoblastendifferenzierungsmedium mit 5 ng/ml TGF- β_1 bzw. mit 40 nM des spezifischen HDAC9 Inhibitors TMP269 stimuliert. Zur Untersuchung der Proliferation und Viabilität der Osteoblasten wurde nach sieben Tagen der Resazurinumsatz bestimmt. Untersucht wurden Osteoblasten von 17 Patienten in Pentaplikaten. Die Ergebnisse sind in Abbildung 16 abgebildet.

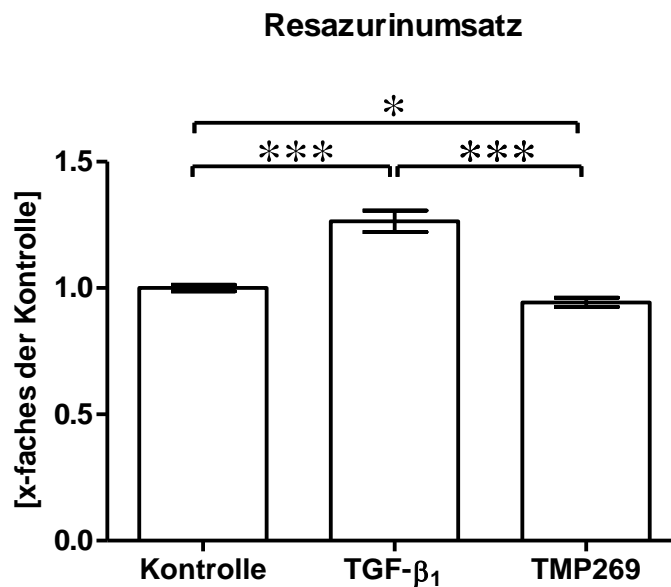


Abbildung 16: Effekt von TGF- β_1 und TMP269 auf den Resazurinumsatz

Bestimmung des Resazurinumsatzes nach 7-tägiger Stimulation mit 5ng/ml TGF- β_1 bzw. 40 nM TMP269. N = 17, n = 5. * = p < 0,05, *** = p < 0,001, TGF- β_1 = Transforming Growth Factor beta 1.

Die Ergebnisse zeigen, dass TGF- β_1 den Resazurinumsatz von primären humanen Osteoblasten signifikant um 26% (p<0,001) im Vergleich zur Kontrolle steigert. Die chemische Inhibierung von HDAC9 durch TMP269 beeinflusst mit einer Abnahme von nur 6% (p<0,05) im Vergleich zur Kontrolle den Resazurinumsatz kaum (siehe Abbildung 16).

4.5 Auswirkung der Inhibierung von HDAC9 auf die AP-Aktivität in primären humanen Osteoblasten

Zur weiteren Beurteilung der funktionellen Rolle von HDAC9 in der Osteogenese wurden Osteoblasten in Differenzierungsmedium mit 5 ng/ml TGF- β_1 bzw. mit 40 nM des spezifischen HDAC9 Inhibitors TMP269 stimuliert. Zur Untersuchung der Differenzierung der Osteoblasten wurde nach sieben Tagen die AP-Aktivität (20 min Inkubationszeit) bestimmt. Untersucht wurden Osteoblasten von 17 Patienten in Pentaplikaten. Abbildung 17 zeigt die mittels der zuvor erstellten Standardkurve des verwendeten AP-Aktivitätspuffers normalisierten und an die mittels des Resazurinumsatzes bestimmten Proliferation der Zellen angeglichenen Ergebnisse.

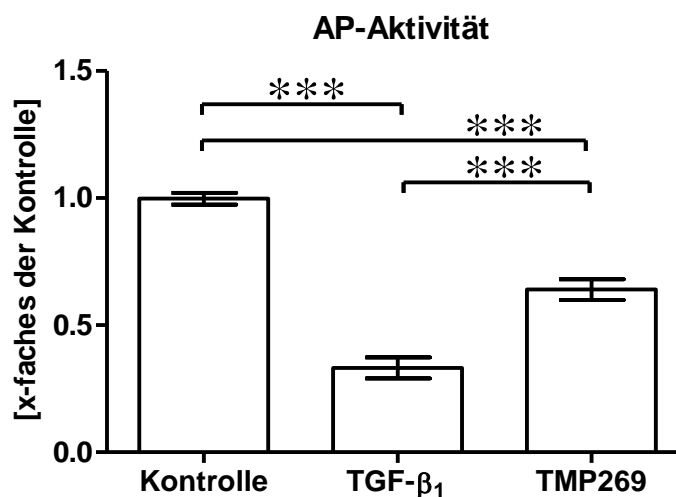


Abbildung 17: Effekt von TGF- β_1 und TMP269 auf die AP-Aktivität

Bestimmung der AP-Aktivität nach 7-tägiger Stimulation mit 5ng/ml TGF- β_1 bzw. 40 nM TMP269. N = 14, n = 1-5. *** = p < 0,001, TGF- β_1 = Transforming Growth Factor beta 1.

Im Vergleich zur Kontrolle senkt TGF- β_1 die AP-Aktivität von primären humanen Osteoblasten signifikant um 67% (p<0,001). Die chemische Inhibierung von HDAC9 durch TMP269 senkt im Vergleich zur Kontrolle die AP-Aktivität signifikant um 36% (p<0,001). Die Differenz der Abnahme der AP-Aktivität zwischen der Stimulation mit TGF- β_1 bzw. TMP269 von 31% zeigt ebenfalls eine Signifikanz (p<0,001) auf (siehe Abbildung 17).

4.6 Auswirkung der Inhibierung von HDAC9 auf die Bildung von mineralisierter Matrix

Abschließend wurde die funktionelle Rolle von HDAC9 in Bezug auf die Bildung von mineralisierter Matrix untersucht. Osteoblasten wurden in Differenzierungsmedium mit 5 ng/ml TGF- β_1 bzw. mit 40 nM des spezifischen HDAC9 Inhibitors TMP269 stimuliert und nach 21 Tagen eine von Kossa sowie eine Alizarin Rot Färbung durchgeführt. Untersucht wurden Osteoblasten von fünf Patienten in Triplikaten. Vor den Anfärbungen erfolgte mittels Zugabe von 2 ng/ μ l Hoechst 33342 die Bestimmung der Zellzahl mittels Fluoreszenzintensität. Die Färbeergebnisse wurden auf die erhaltenen Zellzahlen normiert.

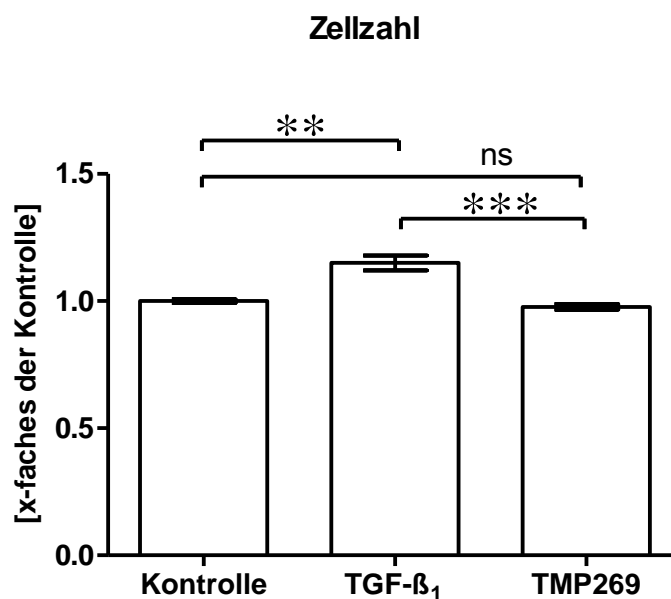


Abbildung 18: Effekt von TGF- β_1 /TMP269 auf die Zellzahl nach 21 Tagen

Stimulation mit 5ng/ml TGF- β_1 bzw. 40 nM TMP269. Zellzahlbestimmung mittels Hoechst. N = 5, n = 3. ** = p < 0,01, *** = p < 0,001, ns = nicht signifikant, TGF- β_1 = Transforming Growth Factor beta 1.

TGF- β_1 steigert nach 21 Tagen die Zellzahl von primären humanen Osteoblasten signifikant um 15% (p<0,01) im Vergleich zur Kontrolle. Die

4 Ergebnisse

chemische Inhibierung von HDAC9 durch TMP269 für 21 Tage beeinflusst im Vergleich zur Kontrolle die Zellzahl kaum (siehe Abbildung 18).

Die erhaltenen Ergebnisse der von Kossa Färbung sind in Abbildung 19 dargestellt. Auch nach wiederholtem Durchführen des Experiments zeigten sie sich nur sehr schwach.

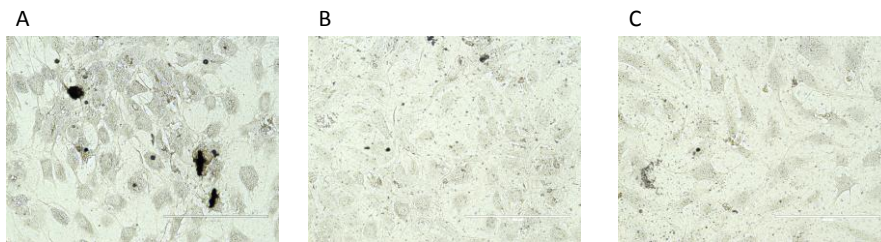


Abbildung 19: Von Kossa Färbung nach Stimulation über 21 Tage

A Kontrolle, B 5ng/ml TGF- β_1 , C 40 nM TMP269.

Die erhaltenen Ergebnisse der Alizarin Rot Färbung auf die Zellzahl gemittelt in Abbildung 20 zeigen signifikante Unterschiede der Kontrollgruppe und der mit TGF- β_1 bzw. TMP269 stimulierten Osteoblasten in der Bildung von extrazellulärer Matrix.

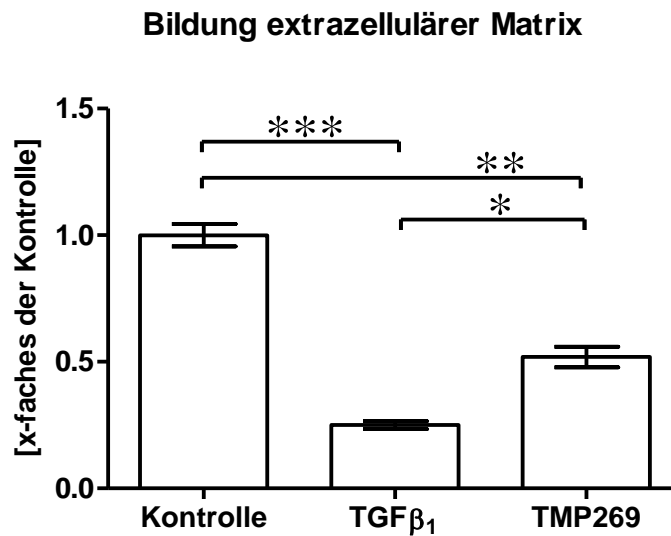


Abbildung 20: Effekt von TGF- β_1 /TMP269 auf die Bildung von extrazellulärer Matrix (Alizarin Rot Färbung) nach 21 Tagen

Stimulation mit 5ng/ml TGF- β_1 bzw. 40 nM TMP269. N = 5, n = 3. * = p < 0,05, ** = p < 0,01, *** = p < 0,001, TGF- β_1 = Transforming Growth Factor beta 1.

TGF- β_1 senkt die Bildung extrazellulärer Matrix in primären humanen Osteoblasten im Vergleich zur Kontrolle signifikant um 75% (p<0,001). Die chemische Inhibierung von HDAC9 durch TMP269 senkt die Bildung extrazellulärer Matrix im Vergleich zur Kontrolle signifikant um 48% (p<0,01). Die Differenz der Abnahme der Bildung von extrazellulärer Matrix zwischen der Stimulation mit TGF- β_1 bzw. TMP269 von 27% zeigt ebenfalls eine Signifikanz (p<0,05) auf (siehe Abbildung 20).

5 Diskussion

Die Aussage TGF- β_1 stimuliert die Knochenbildung, aber inhibiert die Knochenmineralisierung [36] erscheint zuerst widersprüchlich. Auf den zweiten Blick wird aber deutlich, dass es sich bei den Prozessen Mineralisierung und Knochenbildung um zwei verschiedene und sehr komplexe Vorgänge im menschlichen Knochen handelt. Wir wissen, dass TGF- β_1 dabei eine sehr wichtige Rolle einnimmt. Der Einfluss von TGF- β_1 auf Osteoblasten ist abhängig von dem Differenzierungsstadium der Zellen: TGF- β_1 fördert die Proliferation von Präosteoblasten, während die terminale Differenzierung von TGF- β_1 gehemmt wird [36]. Es besteht die Vermutung, dass epigenetische Veränderungen an Histonen durch HDACs zu einer verminderten Genexpression von Faktoren, die zur Knochenbildung und Knochenregeneration benötigt werden, führen. Hintergrund hierfür bildet die Beobachtung, dass schon eine geringe Menge TGF- β_1 in primären humanen Osteoblasten zu einer Inhibierung des für die Knochenhomöostase wichtigen BMP-Signalwegs führt, welche aber durch chemische Hemmung von HDACs durch den HDACi Valproinsäure wieder aufgehoben werden kann [5]. Dies führte nun zu der Frage ob TGF- β_1 in primären humanen Osteoblasten zu einer Veränderung der HDAC Genexpression führt und ob dabei spezielle HDACs besonders betroffen sind. Aufgrund des Nachweises, dass durch TGF- β_1 die Aktivität von HDACs gesteigert wird [3], sowie dem Wissen, dass die meisten HDACs hemmend auf das für den Knochenaufbau essentielle Runx2 wirken [63, 68, 87], erwarteten wir am ehesten eine vermehrte Genexpression der HDACs in Osteoblasten unter der Stimulation mittels TGF- β_1 .

Ziel dieser Arbeit war, die Rolle von TGF- β_1 als auch von HDACs im Osteoblasten besser verstehen zu können und gegebenenfalls anhand dieser Ergebnisse neue Therapieansätze für Knochenerkrankungen entwickeln zu können.

Unsere Ergebnisse zeigten erwartungsgemäß Veränderungen der Genexpression der HDACs in mit TGF- β_1 stimulierten primären humanen Osteoblasten. Große Veränderungen der Genexpression konnten bei HDACs

der Klassen II und IV nachgewiesen werden. Die Genexpression der Klasse I HDACs zeigte sich im Vergleich generell wenig verändert. Signifikant starke Abnahmen fanden sich bei HDAC9, -10 und -11. Die einzige signifikant starke Zunahme der Genexpression konnte bei HDAC 6 gezeigt werden [57]. Nimmt man alle HDAC Klassen zusammen, zeigten unsere Ergebnisse insgesamt eine Abnahme der Genexpression. Ehnert et al. [57] zeigten nach einer 48-stündigen Stimulation mit 5 ng/ml TGF- β_1 in primären humanen Osteoblasten ebenfalls eine insgesamt reduzierte HDAC Genexpression. Ursprünglich erwarteten wir jedoch aufgrund der zu Beginn erläuterten Erkenntnisse aus der Literatur eine generelle Zunahme der HDAC Genexpression in primären humanen Osteoblasten unter der Stimulation von TGF- β_1 . Erklärend hierfür könnte die Überlegung sein, dass Genexpression und enzymatische Aktivität von HDACs nicht gleichgesetzt werden dürfen. Weiter ist zu bedenken, dass nicht nur die katalytischen Domänen der HDACs die Vorgänge der Osteoblastogenese beeinflussen. Möglich wäre, dass weitere Regionen jeder HDAC Isoform mit Proteinen interagieren oder in zelluläre Prozesse eingreifen können [88-91]. Auch zu diskutieren ist, dass hauptsächlich die Genexpression der Klassen II und IV abnimmt, die katalytische Aktivität dieser aber nur sehr gering ist [8, 88] und die HDAC Klasse II nicht nur im Nukleus sondern auch im Zytoplasma zu finden ist [54].

Es wird davon ausgegangen, dass jedem HDAC eine eigene Rolle im Differenzierungsprozess der Osteoblasten zugeordnet werden kann [53]. Da unsere Ergebnisse verschiedene Tendenzen der Expressionsveränderung einzelner HDACs zeigen, muss jede Isoform individuell betrachtet und diskutiert werden. Aufgrund der doch ähnlichen Expressionsveränderungen innerhalb einer jeden HDAC Klasse verwenden wir diese Klasseneinteilung der HDACs als Grundlage der im Nachfolgenden aufgeführten Reihenfolge.

Die Klasse I der HDACs wird von HDAC1, -2, -3 und -8 repräsentiert. HDACs der Klasse I besitzen gegenüber Histonsubstraten eine hohe enzymatische Aktivität, und sind entscheidend für DNA-Replikation, DNA-Reparatur, Splicing, Zellproliferation und Zellüberleben [8]. Die aktuell bekannten Knock-out

Tiermodelle von Repräsentanten der HDAC Klasse I geben einen Einblick auf den Einfluss dieser Enzyme auf die generelle und skelettale Entwicklung. Bei HDAC1 bzw. HDAC3 Knock-out Mäusen zeigt sich eine embryonale Letalität [92, 93]. Ein Fehlen von HDAC2 zeigt eine reduzierte Größe von Wirbelsäule und Becken [94]. Konditionale HDAC3 Knock-out Mäuse zeigen einen mit dem Alter zunehmenden Verlust an trabekulärer und kortikaler Knochenmasse, eine defekte Matrixmineralisierung sowie insgesamt eine geringere Anzahl an Osteoblasten [95]. Im HDAC8 Knock-out Mausmodell zeigen sich kraniofaziale Deformitäten [96]. Klasse I HDACs zeigen sich so im Tiermodell als ausschlaggebender Faktor der Skelettentwicklung und bei dem Erhalt von Knochenmasse in erwachsenen Tieren. In humanen Osteoblasten werden HDAC1, -2 und -3 im Vergleich zu HDAC8 stärker exprimiert [8, 57]. Weiter ist bekannt, dass HDAC3 in allen osteoblastären Differenzierungsstufen, HDAC1 hingegen vor allem in Progenitorzellen exprimiert wird [53]. Lee et al. [13] zeigten 2006, dass eine Suppression von HDAC1 die Osteoblastenreifung beschleunigt und die Produktion von AP sowie Osteopontin fördert. Daraus lässt sich eine wichtige Rolle von HDAC1 für die Osteoblastenproliferation aber nicht für die osteoblastäre Differenzierung schließen. Unterstützt wird diese Vermutung dadurch, dass die HDAC1 Expression im Verlauf der Osteoblastendifferenzierung abnimmt [13, 53]. Bezüglich einer Suppression von HDAC3 zeigten 2004 Schroeder et al. [64], dass die Expression von Osteocalcin und die Matrixmineralisierung beschleunigt wird, was eine ähnliche Rolle von HDAC3 wie die von HDAC1 im Osteoblasten vermuten lässt. TGF- β_1 zeigt ebenfalls einen positiven Effekt auf die frühe Osteoblastenproliferation, erhöhte TGF- β_1 Serumspiegel inhibieren aber die terminale Osteoblastendifferenzierung [3, 36]. So liegt es nahe, dass TGF- β_1 via Interaktion mit HDAC1 und HDAC3 diese Abläufe beeinflussen könnte. Deshalb erwarteten wir am ehesten eine Erhöhung der Genexpression von HDAC1 und -3 unter der Stimulation von TGF- β_1 im Osteoblasten. Unsere Ergebnisse zeigten im Großteil keine starken Genexpressionsveränderungen für die HDAC der Klasse I. Die größten Expressionsunterschiede stellten eine Zunahme der Expression von HDAC2 an Tag 2 und eine signifikante Abnahme der Expression von

HDAC3 bzw. -8 an Tag 4 bzw. 2 dar. Insgesamt zeigte sich aber keine größere Veränderung als 16%. Dies lässt vermuten, dass die durch TGF- β_1 hervorgerufenen Genexpressionsveränderungen der HDACs der Klasse I nicht als entscheidender intrazellulärer Prozess, welcher die durch TGF- β_1 hervorgerufenen osteoblastären Veränderungen steuert, gewertet werden darf.

Die HDAC Klasse II wird in Klasse IIa (HDAC4, -5, -7 und -9) und Klasse IIb (HDAC6 und -10) unterteilt. HDACs der Klasse II besitzen in ihrer katalytischen Domäne anstelle der Tyrosinketten wie in Klasse I HDACs Histidinketten und besitzen so im Vergleich eine geringere Deacetylaseaktivität [8, 88]. Der Großteil ihrer enzymatischen Aktivität entsteht durch Bildung von funktionellen Komplexen mit Klasse I HDACs [8]. Die HDAC Klasse IIa besitzt neben der katalytischen Domäne spezielle große NH₂-terminale Fortsätze zur Interaktion mit gewebespezifischen Transkriptionsfaktoren und Rekrutierung von Zielgenen. Zum Beispiel befinden sich hier Bindungsstellen für Mef2 [88] [97], Runx2 [89-91] und dem Protein 14-3-3 [8]. Mef2 ist eine ursprünglich als unterstützend in der Muskeldifferenzierung wirkende bekannte Familie an Transkriptionsfaktoren [98], deren Aktivität u.a. von HDACs der Klasse IIa beeinflusst wird [97, 99]. Runx2 ist ein essentieller Transkriptionsfaktor der osteoblastären Entwicklung und Differenzierung [58]. An den NH₂-terminalen Fortsätzen befinden sich auch Serinreste welche signalabhängig phosphoryliert werden können [88]. Eine Phosphorylierung fördert die Bindung von 14-3-3 Proteinen an die HDACs und führt so zu einer Translokation der HDACs vom Nukleus ins Zytoplasma. So kommt es konsequenterweise zu einer Aufhebung der Hemmung ihrer jeweiligen Zielgene [8, 100]. Diese Fähigkeit der HDACs der Klasse II, sich zwischen Nukleus und Zytoplasma zu bewegen, könnte auch transkriptionsunabhängige Funktionen und Vorgänge in Osteoblasten beeinflussen [8]. Man geht davon aus, dass HDACs der Klasse II gewebespezifische Rollen einnehmen und so insgesamt mehr spezialisierte Funktionen als Klasse I HDACs besitzen [101].

Knock-out Mäuse der HDAC Klasse II zeigen bezüglich HDAC4 Defekte in der Differenzierung von Chondrozyten [65], bezüglich HDAC5 eine reduzierte

Knochendichte sowie eine verringerte Knochenbildung durch Osteoblasten [102]. Ein Fehlen von HDAC7 führt zu einer Zunahme der Matrixmetalloproteinase 10 [103] und Knock-out von HDAC6 zu hyperacetyliertem Tubulin sowie zu einer leichten Zunahme an Knochendichte der Spongiosa [104]. Auffällig ist, dass es im Vergleich zu Klasse I HDAC Knock-out Mäusen in keinem dieser Tiermodelle zu einer embryonalen Letalität kommt. Erklärend könnte die insgesamt geringe enzymatische Aktivität der Klasse II HDACs sein [8]. Die Klasse II HDACs werden in den verschiedenen osteoblastären Differenzierungsstadien unterschiedlich exprimiert. HDAC4 und HDAC6 vor allem in reifen Osteoblasten, HDAC7 wird in allen ossären Zellen gleichbleibend exprimiert [53]. Im Verlauf der osteogenen Differenzierung werden HDAC5, -6 und -7 fast doppelt so stark exprimiert als zu Beginn [57]. Die Expression von HDAC4, -9 und -10 in Osteoblasten ist eher gering [8, 57]. Dies muss aber nicht unbedingt die Wichtigkeit der Enzyme im Knochenmetabolismus reflektieren. HDAC4 gilt beispielsweise ein wichtiger Regulator der enchondralen Knochenbildung [65].

Unsere Ergebnisse zeigen die Genexpression der Klasse II HDACs meist signifikant herabgesetzt, vor allem HDAC9, -10 und -11, wobei HDAC9 mit einer durchschnittlichen Minderung von 69% am stärksten hervorsteht und deshalb etwas später ausführlich diskutiert wird. Die große Ausnahme bildet HDAC6. HDAC6 wird an allen Messtagen im Durchschnitt ca. 76% signifikant vermehrt exprimiert. Auffällig ist die große Diskrepanz der Expressionsänderungen der zwei Repräsentanten der HDAC Klasse IIb (HDAC6 und HDAC10).

HDAC 4, -5, -6 und -7 sind HDACs der Klasse IIa, interagieren mit Runx2 und hemmen die Aktivität des Transkriptionsfaktors [63-65, 69]. Der Transkriptionsfaktor Runx2 bindet an die OSE2 Bindungssequenz (Runx2-Bindungsstelle) der Promotoren vieler osteoblastenspezifischer Gene (u.a. Osteocalcin, Bone Sialoprotein, Osteopontin und Kollagen- α 1) [58, 59, 61, 62]. Er interagiert mit transkriptionellen Koaktivatoren und Korepressoren, um entweder die Transkription bestimmter gewebespezifischer Gene zu aktivieren oder zu hemmen [66]. Runx2 ist so essentiell für die Osteogenese. Ohne Runx2 findet keine osteoblastäre Differenzierung statt [105]. Sehr interessant ist, dass

auch durch TGF- β_1 via Smad3, einem Effektor im TGF- β_1 Signalweg, die Expression von Runx2 und dessen Aktivität gehemmt wird [106]. Kang et al. [68] zeigten dass dies durch direktes Involvieren von HDAC4 oder -5 (Komplexbildung aus HDAC4/-5, Smad3 und Runx2, welcher an die Runx2-DNA Bindungsstelle bindet) geschieht. Diese TGF- β_1 vermittelte Hemmung der Runx2 Funktion und konsekutive Inhibierung der Runx2 Zielgene könnte zur Hemmung der terminalen Osteoblastendifferenzierung durch TGF- β_1 beitragen [68, 106]. TGF- β_1 und die HDACs der Klasse IIa, ausgenommen HDAC9 (s.u.), führen also zu einer Hemmung der transkriptionalen Aktivität von Runx2. Unsere Ergebnisse zeigen eine Minderung der HDAC-Genexpression der Klasse IIa unter TGF- β_1 Stimulation in Osteoblasten, was schlussfolgern lässt, dass es so durch fehlende Hemmung zu einer vermehrten Runx2 Aktivität kommt. Liu et al. [107] zeigten auf der Basis von Untersuchungen in Mäusen, dass eine Runx2-Überexpression in Osteoblasten zu Knochenfrakturen und Osteopenie durch Anhäufung von unreifen Osteoblasten im Gewebe führt. Die Arbeitsgruppe nahm so an, dass die späten Stadien der Osteoblastendifferenzierung durch eine Überexpression von Runx2 inhibiert werden [107]. Dies passt mit unseren Ergebnissen zusammen.

Die Klasse IIb der HDACs beinhaltet zwei HDAC Isoformen. HDAC6 nimmt mit seinen zwei Deacetylase Domänen und einer ubiquitin-bindenden Region eine Sonderrolle ein [100]. Hubbert et al. [55] zeigten 2002, dass HDAC6 im Zytoplasma Nicht-Histon-Proteine wie α -Tubulin deacetyliert. Aus acetyliertem α -Tubulin sind Mikrotubuli aufgebaut, welche u.a. das Grundgerüst von primären Zilien bilden [108]. Eine Deacetylierung von α -Tubulin führt zu einer Instabilität der Mikrotubuli [109]. Es wird vermutet, dass primäre Zilien im Knochen als Mechanosensor von extrazellulären Stimuli in der Knochenhomöostase von Bedeutung sind [109-114], da ein Fehlen der Zilien zu einem Verlust der Knochenmasse führt [115]. Unsere Arbeitsgruppe [57] zeigte in diesem Jahr, dass in mit TGF- β_1 stimulierten primären humanen Osteoblasten nicht nur die HDAC6 Genexpression, sondern auch HDAC6 auf Proteinebene signifikant gefördert wird, was zu einer Veränderung und geringeren Menge an primären Zilien der Osteoblasten führt. Auch unter

mechanischer Reizung der Zellen (Flüssigkeitsstrom) zeigte sich eine geringere osteogene Differenzierung [57]. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass TGF- β_1 via Expressionsförderung von HDAC6 negativ auf die osteoblastäre Differenzierung wirkt.

Über die Funktion von HDAC10 im Osteoblasten ist kaum etwas bekannt. Gemeinsam mit HDAC11 ist die basale Expression von HDAC10 in primären humanen Osteoblasten im Vergleich mit allen restlichen HDAC Isoformen sehr gering [57]. In unserem Versuchsaufbau geht die Expression von HDAC10 als auch von HDAC11, dem einzigen Repräsentanten der Klasse IV, zu allen Messzeitpunkten (mit Ausnahme der Expression von HDAC10 an Tag 2) sogar noch weiter signifikant um bis zu 53% zurück. HDAC11 zeigt strukturelle Ähnlichkeit zu den Klassen I und II und besitzt eine Deacetylase Domäne mit COOH- und NH₂-terminalen Endigungen [8]. Obwohl HDAC11 in vielen Geweben zu finden ist, ist aktuell nur wenig über seine Funktion bekannt. Jensen et al. [67] zeigten, dass HDAC10, wie auch HDAC9 und HDAC11 nicht hemmend auf Runx2 wirken. Auffallend ist, dass in unseren Ergebnissen gerade diese drei HDAC Isoformen insgesamt am meisten in ihrer Expression gehemmt wurden. Dies lässt vermuten, dass trotz ihrer geringen Expression in Osteoblasten [8, 57] diese drei HDAC Isoformen nicht unwichtig im Prozess der osteoblastären Differenzierung sind.

Nun zu HDAC9, dem letzten hier noch nicht erwähnten Mitglied der HDAC Klasse II. HDAC9 sticht in dieser Arbeit mit einer signifikanten Abnahme der Genexpression in Osteoblasten unter der Stimulation mit TGF- β_1 von 78%, 68% und 62% gemessen an den Tagen zwei, vier und sieben eindeutig heraus. Im Vergleich zu manch anderer HDAC Isoform sind die Erkenntnisse über Funktionen und Aufgaben von HDAC9 im Menschen noch sehr gering. Bereits bekannt ist, dass HDAC9 im Nervensystem dendritisches Wachstum fördert [116], eine hemizygote Deletion von HDAC9 in Patienten mit Schizophrenie zu finden ist [117] oder dass HDAC9 in regulären T-Zellen exprimiert wird und deren Funktion kontrolliert [118]. Zhou et al. [119] zeigten, dass im Vergleich zu HDAC4 HDAC9 in 293T Zellen nur eine 1/10 so große enzymatische Aktivität

besitzt. Die Gruppe zeigte weiter, dass durch alternatives Splicing mindestens sechs verschiedene HDAC9 Proteinisoformen entstehen können. Auch bei anderen HDACs sind Isoformen bekannt, aber nicht in der gleichen Anzahl wie bei HDAC9. Dies lässt vermuten, dass HDAC9 neben der enzymatischen Aktivität noch weitere, eventuell sogar dieser übergeordnete, Funktionen inne haben muss. Bezüglich der skelettalen Entwicklung kommt es in HDAC9 Knock-out Mäusen zu einer reduzierten Knochenmasse, einer vermehrten Knochenresorption und einer geringeren Knochenbildung [120]. Dies ist ein erster Hinweis, dass der Einfluss von HDAC9 auf die Knochenhomöostase nicht vernachlässigt werden sollte. Weiter ist bereits bekannt, dass HDAC9 ein negativer Regulator der Adipogenese ist, da HDAC9 vor Beginn der Differenzierung der Adipozyten herabreguliert wird [121, 122]. Adipozyten und Osteoblasten sind beide mesenchymalen Ursprungs, so dass die Menge der entstehenden differenzierten Zellen negativ miteinander korrelieren muss. Wenn HDAC9 also die Adipogenese negativ beeinflusst, müsste das Enzym die Osteoblastogenese positiv beeinflussen. Diese Überlegung wird von unseren Ergebnissen der Herabregulation der HDAC9 Expression durch TGF- β_1 gestützt. Zuletzt wurde HDAC9 in der Literatur oft gemeinsam mit Mef2 und NF- κ B genannt. Die Upstream Promoter Sequenz des HDAC9 Genes zeigt Transkriptionsfaktorbindungsstellen von Mef2 und NF- κ B stark repräsentiert [123]. Zhou et al zeigten 2001 [119], dass in 293T Zellen HDAC9 spezifisch mit Mef2 interagiert und die Mef2-vermittelte Transkription dosisabhängig hemmt. Haberland et al. zeigten 2007 bezogen auf die Muskeldifferenzierung, dass HDAC9 einerseits von Mef2 beeinflusst wird, andererseits HDAC9 die Aktivität von Mef2 hemmt. So ist eine Selbstregulation der Expression von HDAC9 im Sinne eines negativen Feedbacks möglich [99]. Weiter zeigte die Gruppe, dass Mef2 in Neuronen die HDAC9 Expression positiv beeinflusst. Ob im Nervengewebe oder aber auch in weiteren Gewebearten ähnliche Mef2-HDAC9 Regulationsmechanismen bestehen, ist aktuell noch nicht bekannt. Spannend ist, dass seit 2011 bekannt ist, dass Mef2c auch in der Osteoblastendifferenzierung ein wichtiger Transkriptionsfaktor ist [124]. Stephens et al. [124] postulierten, dass Mef2c die Expression von Runx2 und

Osterix positiv reguliert. Dies wurde von Kawane et al. [87] 2014 bestätigt, als gezeigt werden konnte, dass Mef2c direkt an eine Runx2-Enhancerregion binden kann und Teil eines Enhanceosomes bildet. Interessant wäre nun zu wissen ob in Osteoblasten ähnlich zu Myoblasten ein Regulationsmechanismus zwischen HDAC9 und Mef2 besteht und natürlich, ob HDAC9 so über Mef2 Einfluss auf Runx2 ausübt.

Bezüglich des osteoblastären Einflusses von NF- κ B ist bekannt, dass im Tiermodell eine Beseitigung von Sirt1 (HDAC Gruppe III) die Aktivität von NF- κ B fördert, was zu einer Suppression der Osteoblastendifferenzierung und einer Abnahme der trabekulären Knochenmasse führt [125, 126]. Bezüglich einer Interaktion zwischen HDAC9 und NF- κ B ist ein Zusammenspiel mit reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) denkba: Morgan et al. [127] zeigten, dass NF- κ B regulierte Gene eine wichtige Rolle der Regulation der Menge an reaktive Sauerstoffspezies (ROS) spielen und ROS wiederum verschiedene inhibitorische oder stimulierende Einflüsse auf den NF- κ B Signalweg haben. Koli et al. [128] zeigten, dass ROS TGF- β_1 aktivieren können, aber auch durch TGF- β_1 induziert werden. Wir konnten in dieser Arbeit einen negativen Effekt von TGF- β_1 auf die HDAC9 Expression zeigen. Alle drei Faktoren scheinen sich also gegenseitig zu beeinflussen. Wie genau ist allerdings noch nicht bekannt.

Aufgrund der auffallend starken Hemmung der HDAC9 Genexpression in mit TGF- β_1 stimulierten Osteoblasten untersuchten wir die funktionelle Rolle von HDAC9 bezogen auf die Osteogenese. Hierfür stimulierten wir Osteoblasten neben TGF- β_1 mit dem spezifischen HDAC9-Inhibitor TMP269. So ließ sich, ohne dass auch weitere HDACs beeinflusst wurden, isoliert der Effekt der chemischen Hemmung von HDAC9 auf Osteoblasten untersuchen.

Der Nachweis von mineralisierter Matrix anhand der von Kossa Methode gelang auch bei Wiederholung der Färbung nur sehr schwach. Aus Vorarbeiten unseres Labors ist bekannt, dass die Qualität und somit das Auftreten von schwachen Färbeergebnissen spenderabhängig ist. Alternativ hätte die osteogene Differenzierung mittels dem aber weniger sensitiven Nachweis der

Kalziumabnahme im Medium oder auch dem Nachweis von Osteocalcin oder Bone Sialoprotein erhoben werden können [129].

Die Ergebnisse zeigen, dass im Gegensatz zu TGF- β_1 die chemische Inhibierung von HDAC9 die Proliferation (indirekte Messung mittels des Resazurinumsatzes) von primären humanen Osteoblasten nicht verändert. Allerdings wird ähnlich zur TGF- β_1 Stimulation durch die Blockierung von HDAC9 die Funktion der primären humanen Osteoblasten im Sinne eines negativen Effekts auf die Differenzierung beeinflusst: Es zeigt sich eine signifikante Reduktion der AP-Aktivität durch Stimulation mit TGF- β_1 von 67% und durch Stimulation mit TMP269 von 36%. Auch die Bildung von extrazellulärer Matrix zeigte sich in der Alizarin Rot Färbung durch TGF- β_1 um 75% und durch TMP269 um 48% signifikant reduziert. Die Ergebnisse zeigen, dass die Herabregulation von HDAC9 eine entscheidende Rolle bei dem beobachteten Funktionsverlust der primären humanen Osteoblasten zu spielen scheint. Aber sie scheint nicht allein dafür ausschlaggebend zu sein.

Zusammenfassend zeigen mit TGF- β_1 stimulierte Osteoblasten Veränderungen in der Expression von HDACs, wobei es insgesamt zu einer Expressionsabnahme kommt. Eine Ausnahme zeigt die Expressionszunahme von HDAC6. HDAC9 sticht mit seiner sehr starken Expressionsabnahme ebenfalls heraus. Wir gehen davon aus, dass die Steigerung der HDAC6- und die Herabregulation der HDAC9-Genexpression bedeutsam für den Funktionsverlust der primären humanen Osteoblasten durch TGF- β_1 ist. Die Regulation von HDAC6 bzw. HDAC9 könnte somit einen neuen therapeutischen Ansatz für die Knochenregeneration und Frakturheilung darstellen.

6 Ausblick

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit einem Teilaspekt der intrazellulären Regulationsmechanismen von Osteoblasten. Die genaue Kenntnis der Mechanismen, welche die Knochenhomöostase aufrechterhalten ist essentiell um neue Ansätze für kausale Therapien bei Störungen des Knochenmetabolismus zu ermitteln. In der vorliegenden Arbeit wurde versucht bezüglich der Rolle von TGF- β_1 im Osteoblasten einen kleinen Beitrag für das bessere Verständnis dieses überaus komplexen Knochenmetabolismus zu leisten.

Bezüglich der hier gezeigten Inhibierung der Genexpression von HDAC9, aber auch HDAC10 und -11 durch TGF- β_1 in primären humanen Osteoblasten, wäre sicherlich der nächste Schritt auch auf Proteinebene eine Verminderung dieser HDAC Isoformen festzustellen (z.B. mittels Western Blot). Hinsichtlich des spezifischen HDAC9 Inhibitors TMP269 sollten weiter auch eventuelle Veränderungen in der Expression osteoblastentypischer Gene (u.a. Osteocalcin, BMP2, BSP2 oder Osteoprotegerin) durch TMP269 bestimmt werden, sowie Veränderungen osteoblastärer Marker wie Osteopontin, Osteocalcin und Osteoprotegerin. Interessant ist, dass HDAC9 während der Osteoklastendifferenzierung ebenfalls herunterreguliert wird [120], sowie dass eine Hemmung von HDAC7 die Osteoklastogenese unterstützt und sogar die Osteoklastengröße steigert [130, 131]. Dies zeigt, dass die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse nicht nur in Bezug auf den Osteoblasten gesehen werden dürfen, sondern auch im Zusammenspiel mit den weiteren an der Knochenhomöostase beteiligten Zellen. Bezüglich HDAC6 zeigten Ehnert et al. [57], dass es neben der Förderung der Genexpression von HDAC6 durch TGF- β_1 es auch zu einer Zunahme auf Proteinebene kommt. Aufgrund der negativen Auswirkung von vermehrter HDAC6 Expression auf die Osteoblastendifferenzierung wäre hier der Einsatz des spezifischen HDACi Tubacin als neuer Therapieansatz bei Störungen im Knochenmetabolismus denkbar.

Die Sirtuine Sirt 1-7 bilden die HDAC Gruppe III, welche aufgrund der Verwendung von NAD⁺ anstatt Zn²⁺ als Katalysator der Deacetylaseaktivität als

atypische HDACs bezeichnet werden und in dieser Arbeit nicht mit untersucht wurden. Allerdings ist bekannt, dass Sirt1 und Sirt6 die enchondrale Ossifikation positiv beeinflussen [8] und dass ein Fehlen von Sirt1 über eine Zunahme der NF- κ B Aktivität zu einer verminderten osteoblastären Differenzierung in Mäusen kommt [125, 126]. So sollte der Einfluss von TGF- β_1 auf die Genexpression von Sirtuinen ebenfalls ergänzend untersucht werden.

Ein neuer Ansatz in die Osteoblastendifferenzierung positiv einzugreifen, ist der Einsatz von microRNAs. MicroRNAs sind epigenetische Regulatoren der Proteinexpression und spielen eine Schlüsselrolle während der Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen hin zu Osteoblasten [132]. MicroRNAs schützen beispielsweise Runx2 vor dem hemmenden Einfluss von HDACs und wirken so fördernd auf die osteoblastäre Differenzierung [133].

So bestehen aktuell bereits einige Möglichkeiten in die bisher bekannten Mechanismen der Osteogenese einzugreifen. Wichtig ist die Zusammenhänge des Knochenmetabolismus weiter verstehen zu lernen und so möglichst bald neue klinische Anwendungen etablieren zu können.

7 Zusammenfassung

Die Signalübertragung der für die Reifung von Osteoblasten wichtigen BMPs wird durch kleine Mengen TGF- β_1 blockiert und lässt sich durch chemische Inhibierung von HDACs wiederherstellen. So war es Ziel dieser Arbeit, in mit TGF- β_1 stimulierten primären humanen Osteoblasten (OB), die daran beteiligten HDACs zu identifizieren und deren Funktionsweise zu charakterisieren.

Aus Spongiosa gewonnene OB (10 Spender) wurden für 2, 4 oder 7 Tage mit 5 ng/ml TGF- β_1 stimuliert. Die HDAC Genexpressionsänderungen wurden mittels semiquantitativer RT-PCR bestimmt, die Ergebnisse mittels Mann-Whitney Test verglichen. Um die funktionelle Rolle von HDAC9 in der Osteogenese zu beurteilen, stimulierten wir Zellen mit 40 nM des HDAC9-Inhibitors TMP269. Die Proliferation und die AP-Aktivität wurde nach 3 bzw. 7 Tagen, die Matrixbildung (von Kossa und Alizarin Rot Färbung) nach 21 Tagen bestimmt.

Die Genexpression von HDAC1, 2, 3, und 8 zeigte sich unwesentlich verändert, von HDAC4, 5, 7, 9 und 10 vermindert. An allen Tagen wird HDAC6 signifikant gesteigert und HDAC9 stark gehemmt (jeweils $p < 0,001$). Im Gegensatz zu TGF- β_1 beeinflusst die chemische Inhibierung von HDAC9 die Proliferation von primären humanen Osteoblasten nicht. Allerdings wird ähnlich zur TGF- β_1 Stimulation durch die Blockierung von HDAC9 die OB-Funktion beeinflusst. Dies zeigt sich durch eine signifikante Reduzierung der AP-Aktivität und eine verminderte Bildung von extrazellulärer Matrix.

Zusammenfassend zeigen mit TGF- β_1 stimulierte OB Veränderungen in der Expression von HDACs, wobei vor allem signifikant die Expression von HDAC6 gesteigert und die von HDAC9 herabgesetzt wird. Die chemische Inhibierung von HDAC9 hat keinen Effekt auf die Proliferation, aber einen negativen auf die Differenzierung. So scheint die durch TGF- β_1 bedingte HDAC9 Herabregulation eine entscheidende Rolle bei dem beobachteten Funktionsverlust der OB zu spielen. Im Weiteren sollte auch die funktionelle Rolle von HDAC6 untersucht werden. Die Regulation von HDAC9 oder HDAC6 könnte somit einen neuen therapeutischen Ansatz für die Knochenregeneration und Frakturheilung darstellen.

8 Literaturverzeichnis

1. Lüllmann-Rauch, R.A., E., *Taschenlehrbuch Histologie*, ed. 5.Auflage. 2015: Georg Thieme Verlag KG.
2. Rose, F.R. and R.O. Oreffo, *Bone tissue engineering: hope vs hype*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **292**.
3. Ehnert, S., et al., *Transforming growth factor beta1 inhibits bone morphogenic protein (BMP)-2 and BMP-7 signaling via upregulation of Ski-related novel protein N (SnoN): possible mechanism for the failure of BMP therapy?* BMC Med, 2012. **10**: p. 101.
4. Marsell, R. and T.A. Einhorn, *Emerging bone healing therapies*. J Orthop Trauma, 2010. **24 Suppl 1**: p. S4-8.
5. Ehnert, S., et al., *TGF-beta1 as possible link between loss of bone mineral density and chronic inflammation*. PLoS One, 2010. **5**(11): p. e14073.
6. Welsch, U.K., W.; Deller, T., *Lehrbuch Histologie*. Vol. 4. Auflage. 2014: Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH.
7. Katagiri, T. and N. Takahashi, *Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation*. Oral Dis, 2002. **8**(3): p. 147-59.
8. Bradley, E.W., et al., *Histone Deacetylases in Bone Development and Skeletal Disorders*. Physiological Reviews, 2015. **95**(4): p. 1359-1381.
9. Marsell, R. and T.A. Einhorn, *The biology of fracture healing*. Injury, 2011. **42**(6): p. 551-5.
10. Janssens, K., et al., *Transforming growth factor-beta1 to the bone*. Endocr Rev, 2005. **26**(6): p. 743-74.
11. Suda, T., et al., *Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families*. Endocr Rev, 1999. **20**(3): p. 345-57.
12. Karsenty, G. and E.F. Wagner, *Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development*. Dev Cell, 2002. **2**(4): p. 389-406.
13. Lee, H.W., et al., *Histone deacetylase 1-mediated histone modification regulates osteoblast differentiation*. Mol Endocrinol, 2006. **20**(10): p. 2432-43.
14. Einhorn, T.A., *The cell and molecular biology of fracture healing*. Clin Orthop Relat Res, 1998. **355**.
15. Ai-Aql, Z.S., et al., *Molecular mechanisms controlling bone formation during fracture healing and distraction osteogenesis*. J Dent Res, 2008. **87**(2): p. 107-18.
16. Zimmermann, G., et al., *[TGF-beta1 as a pathophysiological factor in fracture healing]*. Unfallchirurg, 2007. **110**(2): p. 130-6.
17. Moghaddam, A., et al., *Cigarette smoking decreases TGF-b1 serum concentrations after long bone fracture*. Injury, 2010. **41**(10): p. 1020-5.
18. Dimitriou, R., et al., *Bone regeneration: current concepts and future directions*. BMC Medicine, 2011. **9**(1): p. 1-10.
19. Carreira, A.C., et al., *Bone morphogenetic proteins: facts, challenges, and future perspectives*. J Dent Res, 2014. **93**(4): p. 335-45.

20. Biberthaler, P. and M. van Griensven, *Knochendefekte und Pseudarthrosen*. 2017: Springer Berlin Heidelberg.
21. Hausmann, M., et al., [Use of Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) for the Treatment of Pseudarthroses - Efficiency and Therapy Failure]. *Z Orthop Unfall*, 2014. **152**(2): p. 144-51.
22. *Eptotermin alfa, Osigraft® (Stryker) Pharmazeutische Zeitung online, Govi-Verlag <http://www.pharmazeutische-zeitung.de/index.php?id=3408> Stand 09.03.2017.*
23. *Dibotermin alfa (InductOs®, Wyeth) Pharmazeutische Zeitung online, Govi Verlag <http://www.pharmazeutische-zeitung.de/index.php?id=157> Stand 09.03.2017.* .
24. Garrison, K.R., et al., *Bone morphogenetic protein (BMP) for fracture healing in adults*. *Cochrane Database Syst Rev*, 2010(6): p. Cd006950.
25. Sreekumar, V., et al., *BMP9 a possible alternative drug for the recently withdrawn BMP7? New perspectives for (re-)implementation by personalized medicine*. *Arch Toxicol*, 2017. **91**(3): p. 1353-1366.
26. Lissenberg-Thunnissen, S.N., et al., *Use and efficacy of bone morphogenetic proteins in fracture healing*. *Int Orthop*, 2011. **35**(9): p. 1271-80.
27. Blobel, G.C., W.P. Schiemann, and H.F. Lodish, *Role of transforming growth factor beta in human disease*. *N Engl J Med*, 2000. **342**(18): p. 1350-8.
28. Rosier, R.N., R.J. O'Keefe, and D.G. Hicks, *The potential role of transforming growth factor beta in fracture healing*. *Clin Orthop Relat Res*, 1998(355 Suppl): p. S294-300.
29. Beederman, M., et al., *BMP signaling in mesenchymal stem cell differentiation and bone formation*. *J Biomed Sci Eng*, 2013. **6**(8a): p. 32-52.
30. Rahman, M.S., et al., *TGF-beta/BMP signaling and other molecular events: regulation of osteoblastogenesis and bone formation*. *Bone Res*, 2015. **3**: p. 15005.
31. Massague, J., *TGF-beta signal transduction*. *Annu Rev Biochem*, 1998. **67**: p. 753-91.
32. Miyazawa, K., et al., *Two major Smad pathways in TGF-beta superfamily signalling*. *Genes Cells*, 2002. **7**(12): p. 1191-204.
33. Shi, Y. and J. Massague, *Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus*. *Cell*, 2003. **113**(6): p. 685-700.
34. Ehnert, S., et al., *Distinct Gene Expression Patterns Defining Human Osteoblasts' Response to BMP2 Treatment: Is the Therapeutic Success All a Matter of Timing?* *Eur Surg Res*, 2016. **57**(3-4): p. 197-210.
35. Yadin, D., P. Knaus, and T.D. Mueller, *Structural insights into BMP receptors: Specificity, activation and inhibition*. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2016. **27**: p. 13-34.
36. Bonewald, L.F. and S.L. Dallas, *Role of active and latent transforming growth factor beta in bone formation*. *J Cell Biochem*, 1994. **55**(3): p. 350-7.

37. Geiser, A.G., et al., *Decreased bone mass and bone elasticity in mice lacking the transforming growth factor-beta1 gene*. Bone, 1998. **23**(2): p. 87-93.
38. Erlebacher, A. and R. Derynck, *Increased expression of TGF-beta 2 in osteoblasts results in an osteoporosis-like phenotype*. J Cell Biol, 1996. **132**(1-2): p. 195-210.
39. Filvaroff, E., et al., *Inhibition of TGF-beta receptor signaling in osteoblasts leads to decreased bone remodeling and increased trabecular bone mass*. Development, 1999. **126**(19): p. 4267-79.
40. Harris, S.E., et al., *Effects of transforming growth factor beta on bone nodule formation and expression of bone morphogenetic protein 2, osteocalcin, osteopontin, alkaline phosphatase, and type I collagen mRNA in long-term cultures of fetal rat calvarial osteoblasts*. J Bone Miner Res, 1994. **9**(6): p. 855-63.
41. Lind, M., et al., *Transforming growth factor-beta enhances fracture healing in rabbit tibiae*. Acta Orthop Scand, 1993. **64**(5): p. 553-6.
42. Beck, L.S., et al., *TGF-beta 1 induces bone closure of skull defects: temporal dynamics of bone formation in defects exposed to rhTGF-beta 1*. J Bone Miner Res, 1993. **8**(6): p. 753-61.
43. Lind, M., *Growth factor stimulation of bone healing. Effects on osteoblasts, osteomies, and implants fixation*. Acta Orthop Scand Suppl, 1998. **283**: p. 2-37.
44. Fedulov, A.V., et al., *Serum TGF-beta 1 and TNF-alpha levels and cardiac fibrosis in experimental chronic renal failure*. Immunol Invest, 2005. **34**(2): p. 143-52.
45. Hochrath, K., et al., *Modeling hepatic osteodystrophy in Abcb4 deficient mice*. Bone, 2013. **55**(2): p. 501-11.
46. Pscherer, S., et al., *Anti-diabetic treatment regulates pro-fibrotic TGF-beta serum levels in type 2 diabetics*. Diabetol Metab Syndr, 2013. **5**(1): p. 48.
47. Ehnert, S., et al., *Factors circulating in the blood of type 2 diabetes mellitus patients affect osteoblast maturation - description of a novel in vitro model*. Exp Cell Res, 2015. **332**(2): p. 247-58.
48. Deheuninck, J. and K. Luo, *Ski and SnoN, potent negative regulators of TGF-beta signaling*. Cell Res, 2009. **19**(1): p. 47-57.
49. Bolden, J.E., M.J. Peart, and R.W. Johnstone, *Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors*. Nat Rev Drug Discov, 2006. **5**(9): p. 769-84.
50. Roth, S.Y., J.M. Denu, and C.D. Allis, *Histone acetyltransferases*. Annu Rev Biochem, 2001. **70**: p. 81-120.
51. Thiagalingam, S., et al., *Histone deacetylases: unique players in shaping the epigenetic histone code*. Ann N Y Acad Sci, 2003. **983**: p. 84-100.
52. Hassig, C.A. and S.L. Schreiber, *Nuclear histone acetylases and deacetylases and transcriptional regulation: HATs off to HDACs*. Curr Opin Chem Biol, 1997. **1**(3): p. 300-8.
53. Westendorf, J.J., *Histone deacetylases in control of skeletogenesis*. J Cell Biochem, 2007. **102**(2): p. 332-40.

54. de Ruijter, A.J., et al., *Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family*. Biochem J, 2003. **370**(Pt 3): p. 737-49.
55. Hubbert, C., et al., *HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase*. Nature, 2002. **417**(6887): p. 455-8.
56. Gao, L., et al., *Cloning and functional characterization of HDAC11, a novel member of the human histone deacetylase family*. J Biol Chem, 2002. **277**(28): p. 25748-55.
57. Ehnert, S., et al., *TGF-beta1 impairs mechanosensation of human osteoblasts via HDAC6-mediated shortening and distortion of primary cilia*. J Mol Med (Berl), 2017.
58. Ducy, P., et al., *Osf2/Cbfa1: A Transcriptional Activator of Osteoblast Differentiation*. Cell, 1997. **89**(5): p. 747-754.
59. Otto, F., et al., *Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development*. Cell, 1997. **89**(5): p. 765-71.
60. Bruderer, M., et al., *Role and regulation of RUNX2 in osteogenesis*. Eur Cell Mater, 2014. **28**: p. 269-86.
61. Komori, T., et al., *Targeted Disruption of Cbfa1 Results in a Complete Lack of Bone Formation owing to Maturation Arrest of Osteoblasts*. Cell, 1997. **89**(5): p. 755-764.
62. Banerjee, C., et al., *Runt homology domain proteins in osteoblast differentiation: AML3/CBFA1 is a major component of a bone-specific complex*. J Cell Biochem, 1997. **66**(1): p. 1-8.
63. Jeon, E.J., et al., *Bone morphogenetic protein-2 stimulates Runx2 acetylation*. J Biol Chem, 2006. **281**(24): p. 16502-11.
64. Schroeder, T.M., et al., *Histone deacetylase 3 interacts with runx2 to repress the osteocalcin promoter and regulate osteoblast differentiation*. J Biol Chem, 2004. **279**(40): p. 41998-2007.
65. Vega, R.B., et al., *Histone Deacetylase 4 Controls Chondrocyte Hypertrophy during Skeletogenesis*. Cell, 2004. **119**(4): p. 555-566.
66. Westendorf, J.J., et al., *Runx2 (Cbfa1, AML-3) interacts with histone deacetylase 6 and represses the p21(CIP1/WAF1) promoter*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(22): p. 7982-92.
67. Jensen, E.D., et al., *Histone deacetylase 7 associates with Runx2 and represses its activity during osteoblast maturation in a deacetylation-independent manner*. J Bone Miner Res, 2008. **23**(3): p. 361-72.
68. Kang, J.S., et al., *Repression of Runx2 function by TGF-beta through recruitment of class II histone deacetylases by Smad3*. Embo j, 2005. **24**(14): p. 2543-55.
69. Jonason, J.H., et al., *Post-translational Regulation of Runx2 in Bone and Cartilage*. J Dent Res, 2009. **88**(8): p. 693-703.
70. Fu, Y., et al., *Histone deacetylase 8 suppresses osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells by inhibiting histone H3K9 acetylation and RUNX2 activity*. Int J Biochem Cell Biol, 2014. **54**: p. 68-77.
71. Rodriguez-Paredes, M. and M. Esteller, *Cancer epigenetics reaches mainstream oncology*. Nat Med, 2011. **17**(3): p. 330-9.

72. Schroeder, T.M. and J.J. Westendorf, *Histone deacetylase inhibitors promote osteoblast maturation*. J Bone Miner Res, 2005. **20**(12): p. 2254-63.
73. Cellagen Technology, *Product Specification Sheet TMP269* http://www.cellagentech.com/content/product_files/TMP269_Product_specification.pdf Stand 04.10.2015.
74. Braun, K.F., et al., *Quercetin protects primary human osteoblasts exposed to cigarette smoke through activation of the antioxidative enzymes HO-1 and SOD-1*. ScientificWorldJournal, 2011. **11**: p. 2348-57.
75. Green, M.R.a.J.S., *Molecular cloning : a laboratory manual*, ed. N.Y.C.S.H.L.P. Cold Spring Harbor. 2012.
76. peqlab peqGOLD TriFast Datenblatt https://de.vwr.com/assetsvc/asset/de_DE/id/17035117/contents Stand 28.09.2015.
77. Thermo Scientific Product Information RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0012717_RevertAid_H_Minus_FirstStrand_cDNA_Syn_UG.pdf Stand 04.10.2015.
78. Ye, J., et al., *Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction*. BMC Bioinformatics, 2012. **13**: p. 134.
79. Lorenz, T.C., *Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies*. J Vis Exp, 2012(63): p. e3998.
80. Scientific, T., *Thermo Scientific DyNAmo Flash SYBR Green qPCR Kit. Technical Manual*. 2011.
81. analyticon, Fluitest LDH-L L-LACTATE DEHYDROGENASE Arbeitsanleitung https://www.analyticon-diagnostics.com/downloads/pbl_db/PLDH-L_GB-D_21_001.pdf Stand 04.10.2015.
82. McMillian, M.K., et al., *An improved resazurin-based cytotoxicity assay for hepatic cells*. Cell Biol Toxicol, 2002. **18**(3): p. 157-73.
83. Garnero, P. and P.D. Delmas, *Bone markers*. Baillieres Clin Rheumatol, 1997. **11**(3): p. 517-37.
84. Wildemann, B., et al., *IGF-I and TGF-beta 1 incorporated in a poly(D,L-lactide) implant coating maintain their activity over long-term storage-cell culture studies on primary human osteoblast-like cells*. Biomaterials, 2004. **25**(17): p. 3639-44.
85. Sheehan, D.C. and B.B. Hrapchak, *Theory and practice of histotechnology*. 1980: Mosby, Incorporated.
86. Instructions Hoechst 33342 Thermo Scientific https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0011717_Hoechst_33342_UG.pdf Stand: 09.03.2017.
87. Kawane, T., et al., *Dlx5 and mef2 regulate a novel runx2 enhancer for osteoblast-specific expression*. J Bone Miner Res, 2014. **29**(9): p. 1960-9.
88. Parra, M., *Class IIa HDACs - new insights into their functions in physiology and pathology*. Febs j, 2015. **282**(9): p. 1736-44.

89. Parra, M. and E. Verdin, *Regulatory signal transduction pathways for class IIa histone deacetylases*. *Curr Opin Pharmacol*, 2010. **10**(4): p. 454-60.
90. Martin, M., R. Kettmann, and F. Dequiedt, *Class IIa histone deacetylases: conducting development and differentiation*. *Int J Dev Biol*, 2009. **53**(2-3): p. 291-301.
91. Haberland, M., et al., *Epigenetic control of skull morphogenesis by histone deacetylase 8*. *Genes Dev*, 2009. **23**(14): p. 1625-30.
92. Lagger, G., et al., *Essential function of histone deacetylase 1 in proliferation control and CDK inhibitor repression*. *Embo j*, 2002. **21**(11): p. 2672-81.
93. Bhaskara, S., et al., *Deletion of histone deacetylase 3 reveals critical roles in S phase progression and DNA damage control*. *Mol Cell*, 2008. **30**(1): p. 61-72.
94. Zimmermann, S., et al., *Reduced body size and decreased intestinal tumor rates in HDAC2-mutant mice*. *Cancer Res*, 2007. **67**(19): p. 9047-54.
95. McGee-Lawrence, M.E., et al., *Histone deacetylase 3 is required for maintenance of bone mass during aging*. *Bone*, 2013. **52**(1): p. 296-307.
96. Harakalova, M., et al., *X-exome sequencing identifies a HDAC8 variant in a large pedigree with X-linked intellectual disability, truncal obesity, gynaecomastia, hypogonadism and unusual face*. *J Med Genet*, 2012. **49**(8): p. 539-43.
97. Lu, J., et al., *Signal-dependent activation of the MEF2 transcription factor by dissociation from histone deacetylases*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(8): p. 4070-5.
98. Potthoff, M.J. and E.N. Olson, *MEF2: a central regulator of diverse developmental programs*. *Development*, 2007. **134**(23): p. 4131-40.
99. Haberland, M., et al., *Regulation of HDAC9 gene expression by MEF2 establishes a negative-feedback loop in the transcriptional circuitry of muscle differentiation*. *Mol Cell Biol*, 2007. **27**(2): p. 518-25.
100. Bertos, N.R., A.H. Wang, and X.J. Yang, *Class II histone deacetylases: structure, function, and regulation*. *Biochem Cell Biol*, 2001. **79**(3): p. 243-52.
101. Haberland, M., R.L. Montgomery, and E.N. Olson, *The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy*. *Nat Rev Genet*, 2009. **10**(1): p. 32-42.
102. Wein, M.N., et al., *HDAC5 controls MEF2C-driven sclerostin expression in osteocytes*. *J Bone Miner Res*, 2015. **30**(3): p. 400-11.
103. Parra, M., T. Mahmoudi, and E. Verdin, *Myosin phosphatase dephosphorylates HDAC7, controls its nucleocytoplasmic shuttling, and inhibits apoptosis in thymocytes*. *Genes Dev*, 2007. **21**(6): p. 638-43.
104. Zhang, Y., et al., *Mice lacking histone deacetylase 6 have hyperacetylated tubulin but are viable and develop normally*. *Mol Cell Biol*, 2008. **28**(5): p. 1688-701.
105. Harada, S. and G.A. Rodan, *Control of osteoblast function and regulation of bone mass*. *Nature*, 2003. **423**(6937): p. 349-55.

106. Alliston, T., et al., *TGF-beta-induced repression of CBFA1 by Smad3 decreases cbfa1 and osteocalcin expression and inhibits osteoblast differentiation*. *Embo j*, 2001. **20**(9): p. 2254-72.
107. Liu, W., et al., *Overexpression of Cbfa1 in osteoblasts inhibits osteoblast maturation and causes osteopenia with multiple fractures*. *J Cell Biol*, 2001. **155**(1): p. 157-66.
108. Lüllmann-Rauch, R.P., F., *Taschenlehrbuch Histologie*, ed. 4.Auflage. 2012: Georg Thieme Verlag KG.
109. Veland, I.R., et al., *Primary cilia and signaling pathways in mammalian development, health and disease*. *Nephron Physiol*, 2009. **111**(3): p. p39-53.
110. DeRouen, M.C. and A.E. Oro, *The primary cilium: a small yet mighty organelle*. *J Invest Dermatol*, 2009. **129**(2): p. 264-5.
111. Gardner, K., S.P. Arnoczky, and M. Lavagnino, *Effect of in vitro stress-deprivation and cyclic loading on the length of tendon cell cilia in situ*. *J Orthop Res*, 2011. **29**(4): p. 582-7.
112. McGlashan, S.R., et al., *Mechanical loading modulates chondrocyte primary cilia incidence and length*. *Cell Biol Int*, 2010. **34**(5): p. 441-6.
113. Delaine-Smith, R.M., A. Sittichokechaiwut, and G.C. Reilly, *Primary cilia respond to fluid shear stress and mediate flow-induced calcium deposition in osteoblasts*. *Faseb j*, 2014. **28**(1): p. 430-9.
114. Malone, A.M., et al., *Primary cilia mediate mechanosensing in bone cells by a calcium-independent mechanism*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(33): p. 13325-30.
115. Xiao, Z. and L.D. Quarles, *Physiological mechanisms and therapeutic potential of bone mechanosensing*. *Rev Endocr Metab Disord*, 2015. **16**(2): p. 115-29.
116. Sugo, N., et al., *Nucleocytoplasmic translocation of HDAC9 regulates gene expression and dendritic growth in developing cortical neurons*. *Eur J Neurosci*, 2010. **31**(9): p. 1521-32.
117. Lang, B., et al., *HDAC9 is implicated in schizophrenia and expressed specifically in post-mitotic neurons but not in adult neural stem cells*. *Am J Stem Cells*, 2012. **1**(1): p. 31-41.
118. Tao, R., et al., *Deacetylase inhibition promotes the generation and function of regulatory T cells*. *Nat Med*, 2007. **13**(11): p. 1299-307.
119. Zhou, X., et al., *Cloning and characterization of a histone deacetylase, HDAC9*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(19): p. 10572-7.
120. Jin, Z., et al., *HDAC9 Inhibits Osteoclastogenesis via Mutual Suppression of PPARgamma/RANKL Signaling*. *Mol Endocrinol*, 2015. **29**(5): p. 730-8.
121. Chatterjee, T.K., et al., *Histone deacetylase 9 is a negative regulator of adipogenic differentiation*. *J Biol Chem*, 2011. **286**(31): p. 27836-47.
122. Chatterjee, T.K., et al., *HDAC9 knockout mice are protected from adipose tissue dysfunction and systemic metabolic disease during high-fat feeding*. *Diabetes*, 2014. **63**(1): p. 176-87.
123. 2015; Available from: http://www.gene-regulation.com/cgi-bin/pub/programs/match/bin/files.cgi?REM_USR=SWIUMF&STATUS=PRINT&version=.

- .%2Fdata%2FmatrixTFP60.lib+&filename=default&fileno=1&SUBMIT=graphic.
124. Stephens, A.S., et al., *Myocyte enhancer factor 2c, an osteoblast transcription factor identified by dimethyl sulfoxide (DMSO)-enhanced mineralization*. J Biol Chem, 2011. **286**(34): p. 30071-86.
 125. Edwards, J.R., et al., *Silent information regulator (Sir)T1 inhibits NF-kappaB signaling to maintain normal skeletal remodeling*. J Bone Miner Res, 2013. **28**(4): p. 960-9.
 126. Shakibaei, M., C. Buhrmann, and A. Mobasheri, *Resveratrol-mediated SIRT-1 interactions with p300 modulate receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL) activation of NF-kappaB signaling and inhibit osteoclastogenesis in bone-derived cells*. J Biol Chem, 2011. **286**(13): p. 11492-505.
 127. Morgan, M.J. and Z.G. Liu, *Crosstalk of reactive oxygen species and NF-kappaB signaling*. Cell Res, 2011. **21**(1): p. 103-15.
 128. Koli, K., et al., *Transforming growth factor-beta activation in the lung: focus on fibrosis and reactive oxygen species*. Antioxid Redox Signal, 2008. **10**(2): p. 333-42.
 129. Aubin, J.E., et al., *Osteoblast and chondroblast differentiation*. Bone, 1995. **17**(2 Suppl): p. 77s-83s.
 130. Pham, L., et al., *HDAC3 and HDAC7 have opposite effects on osteoclast differentiation*. J Biol Chem, 2011. **286**(14): p. 12056-65.
 131. Stemig, M., et al., *Deletion of histone deacetylase 7 in osteoclasts decreases bone mass in mice by interactions with MITF*. PLoS One, 2015. **10**(4): p. e0123843.
 132. Sera, S.R. and N.I. Zur Nieden, *microRNA Regulation of Skeletal Development*. Curr Osteoporos Rep, 2017.
 133. Vishal, M., et al., *Regulation of Runx2 by Histone Deacetylases in Bone*. Curr Protein Pept Sci, 2016. **17**(4): p. 343-51.

9 Eigenständigkeitserklärung

Die Arbeit wurde im Siegfried Weller Institut der Universität Tübingen unter der Betreuung von Prof. Dr. Andreas K. Nüssler durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Dr. Sabrina Ehnert.

Die Versuche bezüglich der Genexpressionsänderung (Osteoblastenkultivierung und -differenzierung, Stimulation der Zellen, Entwicklung und Optimierung der Primer, RT-PCR-Analysen) wurden von mir eigenständig durchgeführt (Einarbeitung durch Mario Hausmann). Die Daten der Genexpressionsänderung von HDAC6 wurden von Mitarbeitern des Siegfried Weller Instituts für Unfallmedizinische Forschung erhoben.

Die Versuche bezüglich der funktionellen Rolle von HDAC9 (Zytotoxizität, Resazurin-Umsatz, AP-Aktivität, von Kossa und Alizarin Rot Färbung) wurden von mir in Zusammenarbeit mit Jessica Bold durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

München, den 30.07.2017

10 Veröffentlichungen

Postervorstellung beim Deutschen Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie 2015 in Berlin.



Modulation von HDAC9 als potentieller Therapieansatz bei Knochenbrüchen?

E. Heuberger, J. Bold, G. Ochs, T. Freude, A. K. Nussler, S. Ehnert

Hintergrund

Bei Proliferation und Differenzierung von primären humanen Osteoblasten spielen Bone morphogenetic proteins eine entscheidende Rolle [1]. Geringe Mengen des aktiven Wachstumsfaktors TGF- β_1 blockieren ihre Signalübertragung [2]. Vermutlich sind epigenetische Veränderungen der Histone verantwortlich, da die Signalübertragung mittels chemischer Inhibierung von Histondeacetylasen (HDACs) wieder hergestellt werden kann [2].

Fragestellung

- 1) Verändert TGF- β_1 die Genexpression von HDAC1 bis HDAC11 in primären humanen Osteoblasten?
- 2) basierend auf den gewonnenen Erkenntnissen von 1): Spielt HDAC9 eine wichtige funktionelle Rolle in primären humanen Osteoblasten?

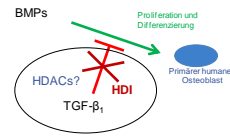


Abbildung 1 Vereinfachte Darstellung der intrazellulären Mechanismen HDI: Histondeacetylase-Inhibitor

Material und Methoden

Primäre humane Osteoblasten von 10 Spendern wurden mittels Kollagenase-Verdau aus Knochen isoliert und expandiert. Die Zellen wurden zwei, vier und sieben Tage mit 5 ng/ml rhTGF- β_1 stimuliert. Die Genexpression von HDAC1 bis 11 wurde mittels semiquantitativer RT-PCR bestimmt und ausgewertet. Zur Beurteilung der funktionellen Rolle von HDAC9 wurden die Zellen sieben und 21 Tage mit 5 ng/ml rhTGF- β_1 bzw. 40 nM TMP269 (spezifischer HDAC9-Inhibitor [3]) stimuliert und osteogen differenziert. Untersucht wurden Resazurinumsatz, AP-Aktivität und mineralisierte Matrix mittels Alizarin Rot Färbung.

Ergebnisse

TGF- β_1 -Stimulation zeigt in primären humanen Osteoblasten die Genexpression von HDACs der

- Klasse I (HDAC1, -2, -3 und -9) an den Tagen 2 und 4 teilweise signifikant leicht vermindert, an Tag 7 tendenziell leicht gesteigert
- Klasse II (HDAC4, -5, -6, -7, -9 und -10) überwiegend vermindert, v.a. HDAC9 (77 % an Tag 2, 68 % an Tag 4, 62 % an Tag 7, jeweils $p < 0.0001$)
- Klasse IV (HDAC11) an allen Tagen signifikant vermindert

- Beurteilung der funktionellen Rolle von HDAC9 zeigt
- Resazurin-Umsatz: signifikanter Anstieg durch TGF- β_1 , kein Anstieg durch TMP269
 - AP-Aktivität/Alizarin Rot: signifikanter Abfall um 71 %/73 % durch TGF- β_1 , um 30 %/45 % durch TMP269

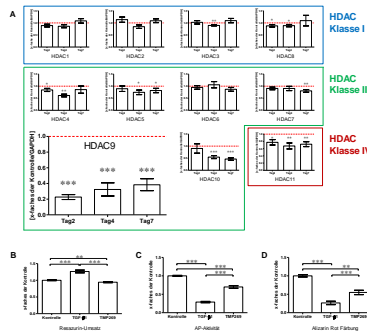


Abbildung 2 entspricht $p < 0.05$, ** entspricht $p < 0.01$, *** entspricht $p < 0.001$. Primäre humane Osteoblasten wurden mit 5 ng/ml TGF- β_1 bzw. mit 40 nM TMP269 stimuliert. A) Genexpression von HDACs Abgebildet ist die Genexpression nach Stimulation mit TGF- β_1 für 2, 4 oder 7 Tage. Rot gestrichelte Linie = Wert der Kontrolle/Genexpression von GAP-DH B) Effekte auf die Proliferation Abgebildet ist der Resazurin-Umsatz, Stimulation für 7 Tage. C) Effekte auf die Funktion Abgebildet ist die AP-Aktivität, Stimulation für 7 Tage. D) Effekte auf die Bildung von extrazellulärer Matrix Abgebildet ist die Photometrisch bestimmte Menge von an Calciumionen gebundene Alizarin Rot, Stimulation für 21 Tage

Diskussion

- chemische Inhibierung von HDAC9 beeinflusst im Gegensatz zu TGF- β_1 die Proliferation von Osteoblasten kaum
- chemische Inhibierung von HDAC9 und TGF- β_1 vermindern die Differenzierung von Osteoblasten signifikant
- Auswirkungen auf die Differenzierung von Osteoblasten durch TGF- β_1 und Inhibierung von HDAC9 unterscheidet sich

Schlussfolgerung

Die TGF- β_1 bedingte Herabregulation von HDAC9 scheint eine entscheidende Rolle für den Funktionsverlust der primären humanen Osteoblasten zu spielen.

Die Regulation von HDAC9 könnte einen neuen therapeutischen Ansatz für die Knochenregeneration und Frakturheilung darstellen.

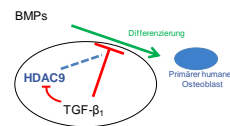


Abbildung 3 Vereinfachte Darstellung der intrazellulären Mechanismen

Literatur:

- [1] Sánchez-Duffhus, G., et al., Bone morphogenetic protein signaling in bone homeostasis. Bone.
- [2] Ehnert, S., et al., Transforming growth factor beta1 inhibits bone morphogenetic protein (BMP)-2 and BMP-7 signaling via upregulation of Smad-related novel protein N (SnoN): possible mechanism for the failure of BMP therapy? BMC Med. 2012, 10, p. 101.
- [3] Lobers, M., et al., Selective class I/II histone deacetylase inhibition via a nonchelating zinc-binding group. Nat Chem Biol. 2013, 9(5), p. 319-25.

Die Ergebnisse entstanden im Rahmen des Fortune Junior Projekts, Fördernummer: 2174-0-0

Anspruchpartnerinnen: Elisabeth Heuberger elisabeth.heuberger@student.uni.tuebingen.de
Dr. Sabrina Ehnert sehnert@bgu-tuebingen.de

11 Danksagung

An dieser Stelle nutze ich die Möglichkeit mich bei den vielen Personen zu bedanken, die mich bei dem Prozess der Entstehung dieser Dissertation unterstützt haben.

Mein erster Dank geht an Prof. Dr. Andreas Nüssler, der mir die Möglichkeit zu dieser Arbeit gab. Ich bedanke mich für die gute Betreuung und Begutachtung meine Arbeit.

Bei Dr. Sabrina Ehnert möchte ich mich sehr herzlich bedanken. Sabrina, danke für deine Ratschläge, deine Unterstützung und die unkomplizierte Kommunikation während der gesamten Zeit.

Ein weiterer großer Dank geht an alle derzeitigen und ehemaligen Mitarbeiter des Siegfried Weller Institutes, die mir immer mit ihrem Fachwissen zu Seite standen. Danke Mario Hausmann für die ausführliche Einarbeitung in die Experimente.

Mein besonderer Dank geht an meine großartige Familie, ohne die ich diese Arbeit und das Studium nicht geschafft hätte.