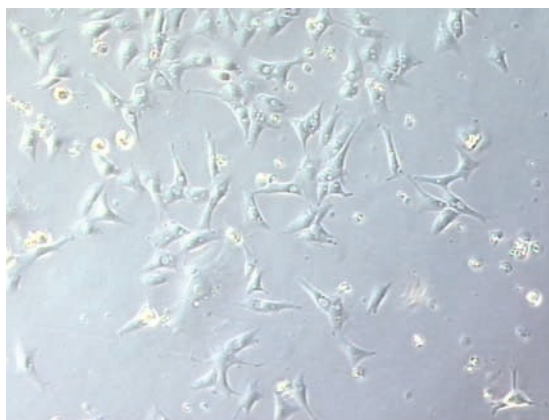


Expression des non-neuronalen cholinergen Systems in osteoblastären Zellen der Maus und des Menschen

Maryam En-Nosse



Inauguraldissertation zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei den Autoren dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2015

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1st Edition 2015

© 2015 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

**Expression des non-neuronalen cholinergen
Systems in osteoblastären Zellen der Maus
und des Menschen**

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Maryam En-Nosse
aus Gießen

Gießen 2015

Aus dem Labor für Experimentelle Unfallchirurgie

Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie

Direktor: Univ.-Prof. Dr. Christian Heiß

Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen

Gutachter: Prof. Dr. Katrin S. Lips

Gutachter: Prof. Dr. Ritva Tikkanen

Tag der Disputation: 30.11.2015

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Das cholinerge System.....	1
1.1.1	Bildung und Freisetzung von Acetylcholin.....	2
1.1.2	Acetylcholinrezeptoren	4
1.1.2.1	Nikotinische Acetylcholinrezeptoren	4
1.1.2.2	Muskarinische Acetylcholinrezeptoren	7
1.1.3	Acetylcholinabbau.....	10
1.2	Aufbau, Struktur und Funktion des Knochens.....	12
1.2.1	Zelltypen des Knochens	14
1.3	Einfluss des cholinergen Systems auf den Knochenstoffwechsel	17
1.4	Fragestellung.....	21
2	Material und Methoden.....	22
2.1	Zellkultur.....	22
2.1.1	Murine Zelllinien.....	22
2.1.2	Humane Zelllinien.....	24
2.1.3	Wachstumsbedingungen.....	26
2.1.4	Vermehrung der Zellen	26
2.1.5	Einfrieren der Zellen	27
2.1.6	Mycoplasmentest.....	28
2.1.7	Gewebe.....	29
2.2	Reverse-Transkriptase Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR)	29
2.2.1	Isolierung der Ribonucleinsäure (RNA)	29
2.2.2	cDNA-Synthese.....	30
2.2.3	Amplifizierung der DNA durch PCR.....	30
2.2.4	Primer	31
2.2.5	Gelelektrophorese.....	34
2.3	Immunfärbungsverfahren.....	34
3	Ergebnisse.....	36
3.1	Nachweis der Genexpression mittels qualitativer RT-PCR.....	36
3.1.1	Acetylcholin-Bildungsenzyme	36
3.1.2	Acetylcholin-Transporter	37
3.1.3	Muskarinische Acetylcholinrezeptoren.....	38
3.1.4	Nikotinische Acetylcholinrezeptoren.....	40

3.1.5	Acetylcholin-Abbauenzyme.....	42
3.1.6	Knochenmarker Osteopontin.....	43
3.2	Nachweis und Lokalisation von $\alpha 3$ und $\alpha 5$ mittels Immunfluoreszenz.....	45
4	Diskussion	46
4.1	Auswahl der Zelllinien.....	47
4.2	Synthese- und Freisetzungsapparat von Acetylcholin	50
4.3	Cholinerge Rezeptoren.....	54
4.4	Degradation.....	63
4.5	Synopsis der Ergebnisse	66
4.6	Schlussfolgerungen und Ausblick.....	69
5	Zusammenfassung	72
6	Summary.....	73
7	Abkürzungsverzeichnis	74
8	Abbildungsverzeichnis.....	78
9	Tabellenverzeichnis	80
10	Literaturverzeichnis	81
11	Publikationsverzeichnis.....	95
12	Ehrenwörtliche Erklärung.....	96
13	Danksagung	97
14	Tabellarischer Lebenslauf.....	98

1 Einleitung

1.1 Das cholinerge System

Der Begriff „cholinerges System“ umfasst das Signalmolekül Acetylcholin (ACh) und alle Komponenten, die für Bildung, Freisetzung und Abbau von ACh notwendig sind, sowie cholinerge Rezeptoren. Neben seiner großen Bedeutung als Neurotransmitter ist ACh ein wichtiger auto- und parakriner Signalstoff in non-neuronalen Geweben. ACh ist ein phylogenetisch sehr altes Molekül, das bereits mehr als zwei Milliarden Jahre vor der Entstehung von Nervenzellen existierte (Wessler et al. 1999). Es findet sich sowohl bei Säugetieren, als auch in ein- und mehrzelligen Organismen wie Bakterien, Algen, Protozoen, Pilzen, Schwämmen und Pflanzen (Wessler et al. 1999; Wessler et al. 2001; Wessler et al. 2008; Horiuchi et al. 2003). Nach seiner erstmaligen Identifizierung 1914 durch Henry Dale und der Entdeckung seiner Funktion als „Vagusstoff“ durch Otto Loewi 1924 (Siegel et al. 2006) wurde Acetylcholin für lange Zeit als reiner Neurotransmitter betrachtet. Erst allmählich vollzog sich ein Paradigmenwechsel, als entdeckt wurde, dass neben dem neuronalen cholinergen System ein non-neuronales cholinerges System existiert. Bereits 1964 beschrieben Whittaker et al. das Vorkommen von Acetylcholin in non-neuronalem Gewebe (Whittaker et al. 1964). Später wurde der Begriff „universeller Zytotransmitter“ von Grando et al. eingeführt, um die ausgedehnte Verteilung und die basalen zellulären Funktionen von ACh zu beschreiben (Grando et al. 1997). Ebenfalls zu dieser Zeit etablierten Wessler et al. die Bezeichnung „non-neuronales cholinerges System/Acetylcholin“, um zwischen ACh als „universelles Zytomolekül“ und ACh als Neurotransmitter unterscheiden zu können (Wessler et al. 1998; Wessler et al. 1999; Wessler et al. 2003). Bisher wurde ACh in zahlreichen Zelltypen und Geweben nachgewiesen, unter anderem (u.a.) in Epithel, Endothel, Mesothel, glatten Muskelzellen und immunkompetenten Zellen (Wessler et al. 2008). Unterschiedliche Organsysteme wurden hierbei untersucht: Atemwege, Verdauungstrakt, Haut, Urogenitaltrakt, Plazenta, Herz- und Skelettmuskel. In diesen non-neuronalen Geweben vermittelt ACh als auto- und parakrines Signalmolekül basale Zellfunktionen wie Proliferation, Differenzierung, Aufbau und Erhalt von Zell-Zellkontakten und die Kontrolle von Entzündungsprozessen (Wessler et al. 2008). Obwohl der Skelettmuskel als Teil des muskuloskelettalen Systems bereits hinsichtlich einiger Komponenten des cholinergen Systems untersucht wurde (Tucek 1982), fehlten bisher detaillierte Daten über

die Existenz eines non-neuronalen cholinergen Systems im Knochen. Hierfür gibt es jedoch viele Hinweise. Das cholinerge System scheint eine essentielle Funktion in der Regulation des Knochenstoffwechsels (Eimar et al. 2013) und in der Entstehung ossärer Krankheiten zu spielen.

In diesem Kapitel sollen zunächst die einzelnen Komponenten des cholinergen Systems erläutert werden, anschließend wird auf den Knochen und dessen Aufbau, Struktur und Funktion eingegangen. Schließlich werden die Hinweise auf die Beteiligung des cholinergen Systems im Knochenstoffwechsel dargestellt.

1.1.1 Bildung und Freisetzung von Acetylcholin

Das klassische Enzym für die Bildung von ACh ist die Cholinacetyltransferase (ChAT). Dieses im Zytosol vorkommende Enzym benötigt für die Synthese von ACh die Vorläufersubstanzen Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA) und Cholin. Acetyl-CoA wird im Glukose- und Fettstoffwechsel der Zelle durch Mitochondrien generiert. Cholin muss von der Zelle aus dem Extrazellulärraum aufgenommen werden und stammt zum großen Teil aus der Degradation von ACh (Kummer et al. 2008).

Die Cholin-Wiederaufnahme stellt hierbei den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der ACh-Synthese dar und wird durch den natriumabhängigen hochaffinen Cholintransporter (CHT1) vermittelt (Okuda et al. 2003). Dieses membranständige Protein mit 13 Transmembrandomänen (TMD) gehört zur Familie der Natrium (Na^+)/Glukose-Co-transporter (SLC5) (Okuda et al. 2011) und erfüllt in Neuronen mit dem Sitz an der prä-synaptischen Plasmamembran seine essentielle Funktion für die ACh-Synthese.

Neuronen speichern ACh in Vesikeln, wodurch einerseits ein großer Vorrat an ACh aufrechterhalten wird, andererseits ein hocheffektiver Mechanismus zur schnellen Freisetzung von ACh zu Verfügung steht. Der Transport von ACh in die synaptischen Vesikel wird durch den vesikulären ACh-Transporter (VACHT) bewerkstelligt. Er ist ein 12-TMD-Protein, das im Austausch mit Wasserstoff (H^+)- Ionen den Transport von ACh in die Vesikel katalysiert (Eiden 1998; Parsons 2000). Der Genlocus des VACHT befindet sich innerhalb des ersten Introns des ChAT-kodierenden Gens (Eiden 1998). Bei Säugtieren wurde in neuronalen Zellen eine Co-Expression von ChAT und VACHT beobachtet. Auf Grund der strukturellen Beziehung der Genloci wurde eine Coregulation der Genexpression beider Enzyme vermutet (Erickson et al. 1994).

In neuronalen Zellen erfolgt die ACh-Freisetzung durch Exozytose. Durch ein Aktionspotential kommt es zur Depolarisation der Zellmembran, wodurch spannungsabhängige Calcium (Ca^{2+})-Kanäle geöffnet werden. Der Ca^{2+} -Einstrom führt zur Fusion der Vesikel mit der präsynaptischen Membran. Somit wird ACh in den synaptischen Spalt entleert.

In vielen non-neuronalen Zellen wurde ein alternativer ACh-Synthesemechanismus durch die Carnitinacetyltransferase (CarAT) nachgewiesen, beispielsweise in Urothelzellen (Lips et al. 2007; Hanna-Mitchell et al. 2007) und in Epithelzellen des Ösophagus (Wolf-Johnston et al. 2012). Auch in Skelettmuskelzellen katalysiert die CarAT die Synthese von ACh (Tucek 1982), wenn auch grundsätzlich weniger effizient als die ChAT.

Zudem besitzen non-neuronale Zellen einen weiteren Mechanismus, durch den ACh direkt und kontinuierlich aus dem Zytoplasma sezerniert werden kann (Wessler et al. 2001). Plasmamembran-gebundene polyspezifische organische Kationentransporter, die zur SLC22-Familie gehören, vermitteln hier die direkte ACh-Freisetzung. Als treibende Kräfte gelten Substratkonzentration und Membranpotential, wobei der Transport von ACh auch bidirektional erfolgen kann (Koepsell et al. 2007; Koepsell et al. 2013). Die SLC22-Familie enthält drei Subtypen der organischen Kationentransporter (OCT), OCT1-3 (SLC22A1-3), den Kationen- und Carnitintransporter OCTN1 (SLC22A4), sowie OCTN2 (SLC22A5) und OCT6 (SLC22A16). Diese ubiquitär vorkommenden Transporter vermitteln im Körper den Transport von endogenen organischen Kationen, exogenen Pharmaka, Toxinen und Stoffwechselabfallprodukten (Koepsell et al. 2007) insbesondere in der Leber und Niere.

OCT1-3 und OCTN1 spielen in non-neuronalen Zellen eine wichtige Rolle in der Aufnahme von Cholin und Freisetzung von ACh. Pochini et al. (2012) untersuchten anhand eines experimentellen Membranmodells von Proteoliposomen die physiologische Funktion der OCTN1 im Transport von ACh. OCTN1 kann ACh bidirektional transportieren, jedoch erfolgt unter physiologischen Bedingungen hauptsächlich ein Efflux von ACh durch die inhibitorische Wirkung extrazellulärer Na^+ -Ionen (Pochini et al. 2012a; Pochini et al. 2012b). Die Transporter der SLC22-Familie sind weit verbreitet und die Expression ihrer Subtypen unterscheidet sich je nach Gewebe (Wolf-Johnston et al. 2012). Kummer et al. wiesen eine erhöhte ACh-Konzentration im Atemwegsepithel von OCT1/2 Doppel-Knockout-Mäusen nach, was die Rolle der OCT in der ACh-Freisetzung belegte (Kummer et al. 2006). Weitere Untersuchungen machten die Loka-

lisation der OCT sichtbar: so erfolgte beispielsweise in kinezilientragenden Epithelzellen der Trachea eine transmembrane ACh-Freisetzung via OCT1 und OCT2 in Richtung apikal und bei Basalzellen via OCT3 nach basal (Kummer et al. 2008). Neben diesem direkten und kontinuierlichen Sekretionsmechanismus besitzen sekretorische Zellen und Bürstenzellen der Atemwege eine vesikuläre ACh-Freisetzung (Kummer et al. 2008). Nicht nur in der Lunge sondern auch in Placentagewebe scheint OCT3 für den ACh-Transport verantwortlich zu sein (Koepsell 2013; Koepsell et al. 2007). Sata et al. (2005) konnten in humaner Placenta OCT3 an der basolateralen Trophoblastenmembran nachweisen.

1.1.2 Acetylcholinrezeptoren

Als Anfang des 20. Jahrhunderts die Forschung um den Transmitter ACh begann, wurde bereits die Existenz verschiedener Arten von ACh-Rezeptoren angenommen (Siegel 2006). Grundsätzlich existieren zwei Typen von cholinergen Rezeptoren: ionotrope nikotinische ACh-Rezeptoren (nAChR), und metabotrope muskarinische ACh-Rezeptoren (mAChR). Lange vor der Entdeckung der molekularen Rezeptorstrukturen wurde anhand der Wirkung von Rezeptoragonisten und -antagonisten die Funktion der AChR untersucht: namensgebend waren hierbei die cholinergen Rezeptoragonisten Muskarin und Nikotin (Siegel 2006). Mittels der Rezeptorantagonisten Atropin, D-Turbocurarin, Schlangen- α -Toxine (z. B. α -Bungarotoxin) und weiteren Substanzen wurden viele Erkenntnisse über Verteilung und Charakteristika der Rezeptorsubtypen gewonnen (Siegel 2006). Cholinerge Rezeptoren finden eine weite Verbreitung im zentralen und peripheren Nervensystem, in Effektororganen des autonomen Nervensystems, in den motorischen Endplatten der Skelettmuskeln und in Zellen, die nicht primär von Neuronen innerviert sind. Das Expressionsmuster der Rezeptoren in diesen non-neuronalen Zellen variiert je nach Zelltyp, Zellfunktion, Differenzierung, internen und externen Umweltbedingungen (Wessler et al. 2008).

1.1.2.1 Nikotinische Acetylcholinrezeptoren

Nikotinische Acetylcholinrezeptoren sind ligandengesteuerte schnelle Ionenkanäle, die aus fünf Untereinheiten (UE) zusammengesetzt sind. Bei Wirbeltieren wurden 17 verschiedene UE gefunden, wobei Säugetiere neun unterschiedliche α -UE exprimieren ($\alpha 1$ - $\alpha 7$, $\alpha 9$ - $\alpha 10$) und vier verschiedene β -UE ($\beta 1$ - $\beta 4$) (Millar et al. 2008). Die $\alpha 8$ -UE wur-

de nur bei Küken beschrieben (Schoepfer et al. 1990). Je nach Komposition der UE bilden sich Homo- oder Heteropentamere. Generell lassen sich die nAChR in einen muskulären Typ und einen neuronalen Typ einteilen. Der muskuläre Typ wird hauptsächlich an der motorischen Endplatte von Skelettmuskelzellen exprimiert und besteht aus den UE $\alpha 1$, $\beta 1$, δ , ϵ . Eine γ -UE kommt hierbei nur temporär in embryonalem Gewebe vor. Der neuronale Typ, der sich im zentralen und peripheren Nervensystem und in non-neuronalen Zellen wiederfindet, enthält die UE $\alpha 2$ - $\alpha 7$, $\alpha 9$ - $\alpha 10$ und $\beta 2$ - $\beta 4$. Bei einigen non-neuronalen Zellen wurden zudem Kombinationen der UE von neuronalem mit muskulärem Typ nachgewiesen, beispielsweise bei humanen Atemwegsepithelzellen (Carlisle et al. 2007), Melanozyten der Haut (Wessler und Kirkpatrick 2008) und Adipozyten der Ratte (Brüggmann et al. 2003).

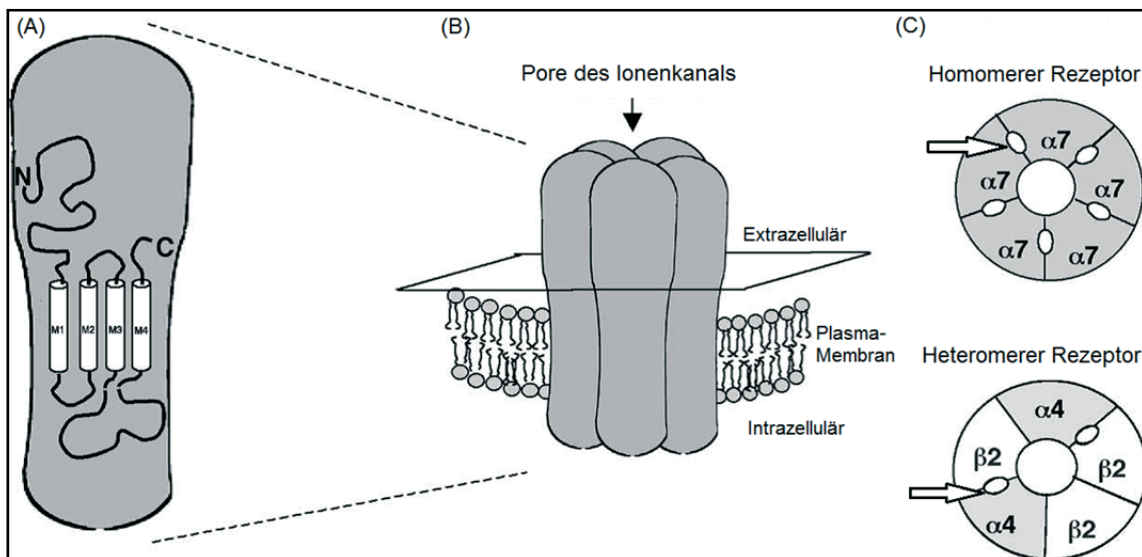


Abb. 1: (A-C) Organisation und Struktur der nAChR (Modifiziert nach Gotti et al. 2004).

- (A) Schematische Abbildung der membranspannenden Domänen einer nAChR-UE. Das Modell zeigt den extrazellulären N-terminalen Abschnitt, gefolgt von drei hydrophoben Transmembran-Domänen (TMD; M₁-M₃), eine große intrazelluläre Schleife und eine vierte TMD (M₄).
- (B) Pentamere Komposition der nAChR-UE zu einem Ionenkanal.
- (C) Zusammenstellung der UE im homomeren $\alpha 7$ - und heteromeren $\alpha 4\beta 2$ -Rezeptorsubtyp. Die weißen Pfeile weisen auf die ACh-Bindungsstellen an den α -UE.

Insgesamt entstehen durch die Menge an Kombinationsmöglichkeiten der UE verschiedene Rezeptorsubtypen. Diese unterscheiden sich in den Eigenschaften der Ligandenspezifität, Ligandenaffinität, Kationenpermeabilität und Kanalkinetik (Siegel 2006).

Abb. 2 veranschaulicht die Substratpermeabilität der verschiedenen nikotinischen Rezeptorsubtypen.

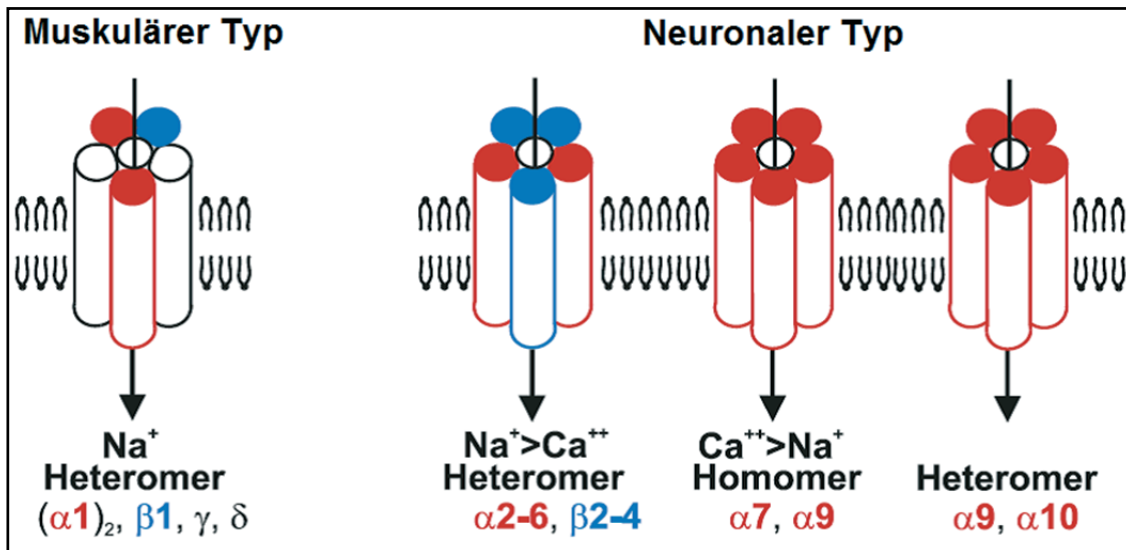


Abb. 2: Die Substratpermeabilität der nAChR (Modifiziert nach Kummer 2014, unpublizierte Darstellung).

Die Substratpermeabilität der nAChR differiert je nach Konstellation der Rezeptor-UE. Homopentamere aus $\alpha 7$ und $\alpha 9$ sind vorzugsweise für zweiwertige Kationen wie Ca^{2+} permeabel, die Heteropentamere hingegen eher für Na^+ -Ionen.

Es wurde eine weitere Klassifizierung der nAChR vom neuronalen Typ anhand der Reaktivität auf den Rezeptorantagonist α -Bungarotoxin beschrieben: so reagieren die nAChR mit den UE $\alpha 7$, $\alpha 9$, $\alpha 10$ sensibel auf α -Bungarotoxin (Gotti et al. 2004) und sind vor allem für zweiwertige Kationen wie Ca^{2+} permeabel (Dani 2001), siehe Abb. 2. Die übrigen nAChR mit den UE $\alpha 2-6$ und $\beta 2-4$ reagieren nicht auf α -Bungarotoxin (Dani 2001, Gotti et al. 2004).

Die Funktionsweise der nAChR zeigt das typische Prinzip für ligandengesteuerte Ionenkanäle: der inaktive Rezeptor wird durch Ligandenbindung (ACh) an der extrazellulären Domäne aktiviert, wodurch sich der Ionenkanal durch eine Konformationsänderung öffnet. Es werden zwei Moleküle ACh für die Öffnung des Ionenkanals benötigt, die ca. 1 ms anhält (Siegel 2006). Neben der direkten Wirkung des Ionentransports von Na^+ - und Ca^{2+} -Ionen können nAChR zahlreiche intrazelluläre Signaltransduktionswege beeinflussen: exemplarisch genannt seien hier die Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK), Phospholipase C (PLC) und Phosphokinase C (PKC) (Wessler et al. 2008).

Vorkommen und Effekte der nAChR präsentieren sich mindestens so vielfältig wie die Kombinationsmöglichkeiten ihrer UE. In non-neuronalen Zellen finden sich nAChR beispielsweise in Keratinozyten der Haut (Grando 1997), im Epithel der Atemwege (Carlisle et al. 2007; Zia et al. 1997) und des Verdauungstraktes (Richardson et al. 2003), im Urothel (Lips et al. 2007), in Endothelzellen von Aorta und Pulmonalgefäßen (Brüggmann et al. 2003), in Fibroblasten (Sekhon et al. 2002), Adipozyten und glatten Muskelzellen (Wessler et al. 2008). In non-neuronalen Zellen erfüllen nAChR verschiedenste Aufgaben. Eine besondere Funktion des $\alpha 7$ -Homopentamers in der Immunreaktion des Körpers entdeckten Tracey et al. (2002): der $\alpha 7$ -nAChR scheint essentiell in einem anti-entzündlichen Signalweg involviert zu sein, dem „cholinergen anti-inflammatorischen Signalweg“. Der $\alpha 7$ -nAChR wird von vielen Immunzellen exprimiert, zum Beispiel (z.B.) Monozyten, Makrophagen, T- und B-Lymphozyten, dendritische Zellen (Kawashima et al. 2007; de Jonge et al. 2007) und Fibroblasten-ähnlichen Synoviozyten (Waldburger et al. 2008). Durch Aktivierung des $\alpha 7$ -nAChR mittels ACh oder Nikotin werden verschiedene intrazelluläre Signalmechanismen getriggert, wie die *Janus Kinase and Signal Transducer and Activator of Transcription 3* (JaK-STAT3) und der Transkriptionsfaktor *Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells* (NF- κ B), die wahrscheinlich miteinander interagieren und so eine anti-inflammatorische Wirkung erzielen (de Jonge et al. 2007; Walker et al. 2005).

Humane Keratinozyten und humane Atemwegsepithelzellen stellen gute Beispiele für den regulatorischen Effekt von auto- und parakrinem ACh dar (Wessler et al. 2008). Grando et al. (2007) konnten deutliche morphologische Veränderungen durch nAChR- und mAChR-Antagonisten an Keratinozyten nachweisen: innerhalb von Minuten kam es zu Verlust der polygonalen Zellform, Verminderung des Zellvolumens, Retraktion der Intermediärfilamentbündel des Zellskeletts und Verlust der Zellkontakte. Diese Alterationen waren reversibel.

Funktionen wie Zelladhäsion und Integrität der Zellmorphologie sind gerade für den Erhalt von Knochengewebe von großer Bedeutung.

1.1.2.2 Muskarinische Acetylcholinrezeptoren

Die mAChR gehören zur Gruppe der Guanosin triphosphat-(GTP)-Protein (G-Protein)-gekoppelten Rezeptoren. Im neuronalen und non-neuronalen cholinergen System sind fünf Subtypen bekannt (M_1R - M_5R), wobei die einzelnen Typen unterschiedliche phar-

makologische Profile zeigen. Sie finden sich genau wie die nAChR im zentralen und peripheren Nervensystem, an den Erfolgsorganen des Parasympathikus und außerhalb des autonomen Nervensystems an vielen non-neuronalen Zellen.

Strukturell bestehen die mAChR aus sieben Transmembranhelices, an deren extrazellulärer Seite die Ligandenbindungsstelle zu finden ist und an deren intrazellulärer Domäne das G-Protein gekoppelt ist (Abb. 3). G-Proteine bestehen aus drei UE (α , β , γ), deren Aktivierung eine Dissoziation der UE bewirkt. Dies geschieht durch die freiwerdende Energie aus der Hydrolyse von GTP zu Guanosindiphosphat und Phosphat. Die dissoziierten UE können inhibitorische und stimulierende Signaltransduktionswege aktivieren, indem sie entsprechend die Bildung von *Second Messengern* steuern. Die Ligandenbindung bewirkt eine Konformationsänderung des Rezeptors, die zur Aktivierung des G-Proteins und somit zur Signalweiterleitung ins Zellinnere führt. Im Vergleich zu nAChR ist die muskarinische Rezeptorantwort mit einer Latenz von 100-250 Millisekunden (ms) relativ langsam (Siegel 2006).

Die mAChR steuern hauptsächlich folgende Signaltransduktionswege: M_2R und M_4R sind an inhibitorische G-Proteine ($G_{i/o}$) gekoppelt, deren α -UE eine Hemmung der Adenylatzyklase und somit eine Reduktion des *Second Messengers* zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) bewirkt (Caulfield et al. 1998). Durch den $\beta\gamma$ -Komplex der $G_{i/o}$ -Proteine können M_2R und M_4R die Aktivität von Kalium (K^+)- und Ca^{2+} -Kanälen regulieren.

M_1R , M_3R und M_5R aktivieren durch das gekoppelte $G_{q/11}$ -Protein die PLC, welche die Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP_2) in Inositol-1,4,5-Trisphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG) katalysiert (Caulfield et al. 1998). DAG erhöht die PKC und IP_3 erhöht die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration durch Freisetzung von Ca^{2+} aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER).

Die Steuerung anderer Signalwege durch mAChR, sowie die Kopplung mehrerer Signaltransduktionswege sind ebenfalls bekannt (Caulfield et al. 1998). Die mAChR sind generell nicht an stimulierende G-Proteine (G_s) gekoppelt.

Wie bei den nAChR ist hier der MAPK-Signaltransduktionsweg interessant. Beispielsweise stimuliert M_3R durch den intrazellulären Ca^{2+} -Anstieg die Aktivität der MAPK in Bronchialkarzinomzellen (Song et al. 2003; Song et al. 2007). Die Aktivierung der MAPK führt zu einer Zellproliferation, die durch M_3R -Antagonisten gehemmt werden kann (Song et al. 2003; Song et al. 2007).

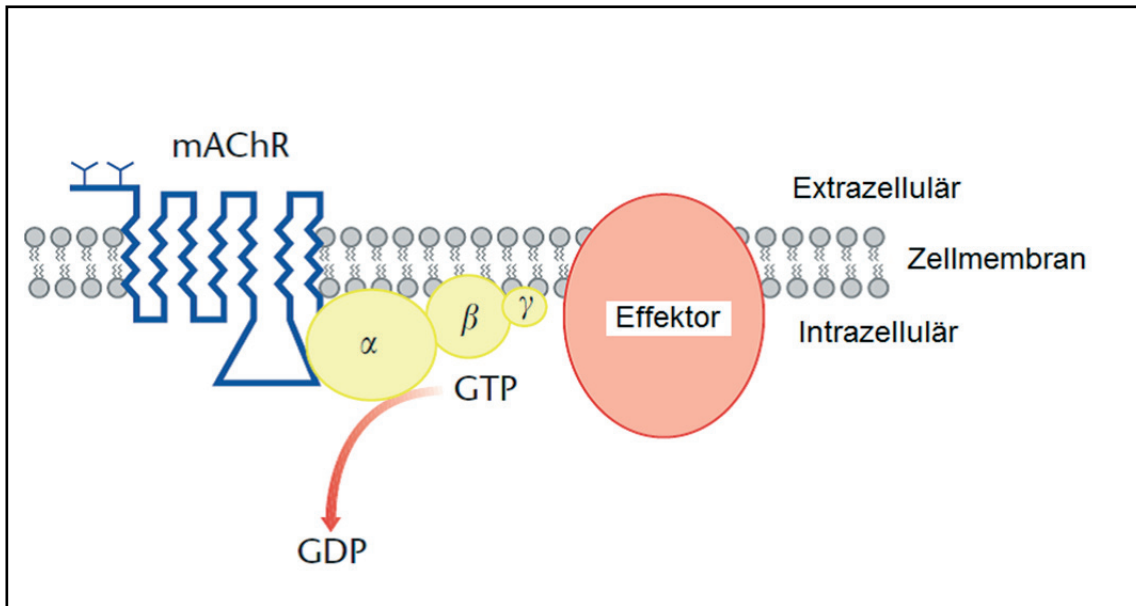


Abb. 3: Schema des mAChR mit Kopplung an ein G-Protein (Modifiziert nach Nathanson 2006).

Verteilung und Funktion von mAChR an non-neuronalen Zellen gestaltet sich vielfältig und variiert je nach Zellfunktion (Wessler et al. 2008). Beispielsweise finden sich in Oberflächenepithelzellen der Atemwege M_1R und M_3R , in Endothelzellen und in Lymphozyten M_1R – M_5R (Wessler et al. 2008). In Keratinozyten beobachteten Grando et al. 2006 eine von der Zelldifferenzierung abhängige Expression der Rezeptoren: unreife Keratinozyten exprimierten hauptsächlich M_2R und M_3R , Zellen in der Übergangsphase exprimierten mehr M_4R und M_5R , wohingegen reife Keratinozyten nachweislich M_1R produzierten (Grando et al. 2006). Fibroblasten der Lunge exprimieren M_2R , worüber Zellproliferation und Produktion der Extrazellulärmatrix (EZM) gesteuert wird (Matthiesen et al. 2006). M_2R und M_3R finden sich zudem in glatten Muskelzellen der Atemwege. Die Stimulation der mAChR an diesen non-neuronalen Zellen reguliert neben der Bildung der EZM die Sekretion von Zytokinen und Chemokinen, was zu Fibrosierung der Atemwege, Hypertrophie glatter Muskelzellen und Entzündung beitragen könnte (Meurs et al. 2013).

Auch scheinen Signale zur Regulation der Immunfunktion durch mAChR und nAChR gemeinsam vermittelt zu werden (Kawashima et al. 2012). Die Bildung proinflammatorischer Zytokine, wie z.B. Tumornekrosefaktor α , wird in Zellen der Milz via M_1R und M_5R aktiviert (Kawashima et al. 2012), wohingegen der bereits oben beschriebene $\alpha 7$ -nAChR die Bildung inflammatorischer Zytokine herunterreguliert (Kawashima et al. 2007).

1.1.3 Acetylcholinabbau

Die Wirkung von ACh an den Rezeptoren ist durch dessen hydrolytische Spaltung zeitlich stark limitiert (Massoulie 2002). Erst durch die Hydrolyse von ACh in Cholin und Acetat steht das für die ACh-Synthese essentielle Cholin zur Wiederaufnahme in die Zelle wieder bereit. Neuronale und non-neuronale Zellen exprimieren hierfür das Enzym Acetylcholinesterase (AChE), welches mit einer sehr hohen Umsatzrate eines der bislang schnellsten bekannten Enzyme ist. Die Genstruktur beim Menschen ist durch sechs Exone gekennzeichnet, wobei alternatives Splicing zu verschiedenen AChE-Splicevarianten führt (Abb. 4), die sich in ihren Eigenschaften wie z.B. Löslichkeit und Plasmamembranbindung unterscheiden (Massoulie 2002). So entstehen Proteine mit derselben katalytischen Domäne (Taylor et al. 1994) aber verschiedenen C-terminalen Peptiden (Massoulie 2002).

Die AChE-Variante vom Typ T (*tailed*) ist durch die C-terminalen Peptide charakterisiert. Sie kommt vor allem im Muskel und Gehirn vor. Diese Subtypen bilden unterschiedliche oligomere Formen aus (Abb. 4). Zudem können sie an Kollagen Q (ColQ) und Membrananker PRiMA (*protein-rich membrane anchor*) gekoppelt werden (Massoulie 2002).

Posttranslationale Modifizierungen der AChE, wie Glykosylierung, Proteolyse und Oligomerisierung, können die Enzymfunktion modulieren (Inkson et al. 2004b). Kerem et al. (1993) beschrieben die N-terminale Glykosylierung von oligomeren rekombinanten AChE-Molekülen in transfizierten humanen embryonalen Nierenzellen. In Versuchen mit den gleichen Zelllinien beschrieben Velan et al. (1993) eine geringere Enzymstabilität bei AChE-Molekülen mit mutierten N-Glykosylierungsstellen. Es zeigten sich jedoch keine wesentlichen Defizite in der Enzymaktivität nach Aufhebung der N-terminalen Glykosylierung (Velan et al. 1993).

Die Butyrylcholinesterase (BChE), auch unspezifische Cholinesterase genannt, übernimmt ebenfalls die Spaltung von AChE. Jedoch erfolgt dieser Vorgang langsamer (Tsim et al. 2012) und mit einer viel breiteren Substratspezifität als bei der AChE. BChE kommt ebenfalls in non-neuronalen Zellen vor und ist abundant im Blutplasma, in der Leber und Lunge nachweisbar (Massoulie 2002, Wessler et al. 1999).

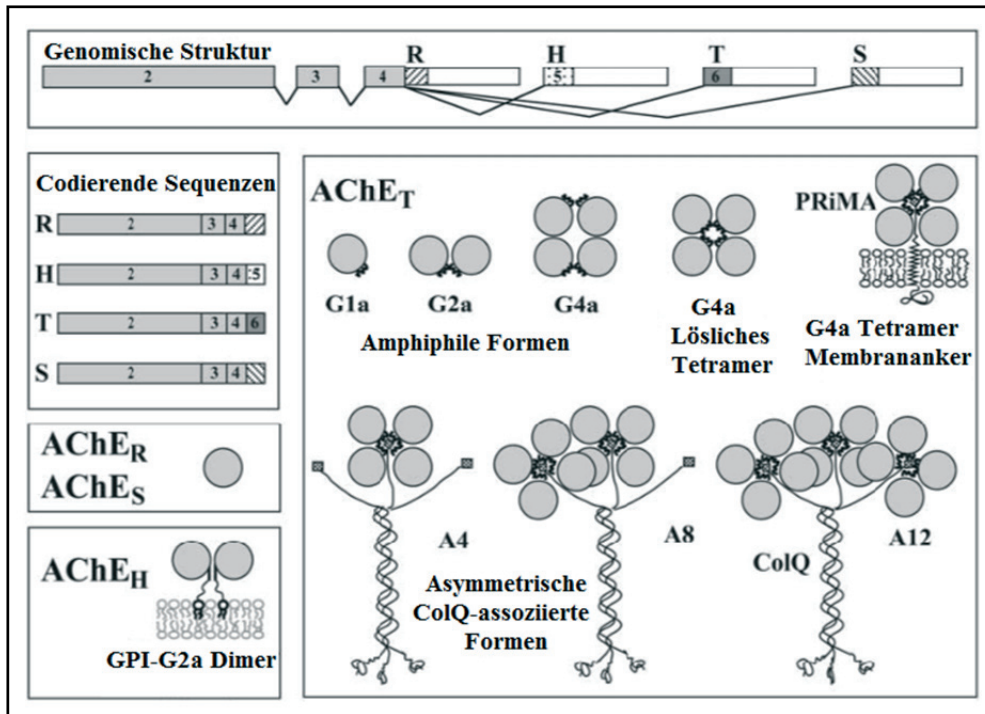


Abb. 4: AChE-Varianten (Modifiziert nach Massoulié 2002).

Die AChE-Varianten vom Typ T (*tailed*) kommen als Dimere und Tetramere vor und können mit ColQ oder PRiMA assoziiert sein. Sie existieren in allen Spezies und auch die BChE kommt in dieser Variante vor. Die AChE Variante vom Typ H (*hydrophob*) ist ein Glykophosphatidylinositol (GPI) -gekoppeltes Dimer und wird meistens von Blutzellen gebildet. Die AChE Variante vom Typ R (*readthrough*) ist ein lösliches Monomer und wird vor allem (v.a.) in der Entwicklung und unter Stress im Gehirn der Maus exprimiert. Die lösliche AChE-Variante vom Typ S (*soluble*) wurde nur in bestimmten Schlangenarten beschrieben.

Während der letzten 40 Jahre stieg das Bewusstsein über die Rolle der Cholinesterasen in der Regulation non-neuromuskulärer Zell-Zell-Interaktion, beispielsweise während der Interaktion von Gameten und in der embryonalen Entwicklung (Falugi et al. 2012). Darüber hinaus sind Cholinesterasen an der Regulation des Gleichgewichts zwischen Zellproliferation und Apoptose (Zhang et al. 2012) sowie an der Modulation von Zella-dhäsion und Zellmigration beteiligt (Falugi et al. 2012).

Bei Fibroblasten wurden non-enzymatische Effekte der AChE beobachtet: vor allem an den äußeren Zellfortsätzen von migrierenden Fibroblasten lokalisiert, scheint AChE an Zellmigration und Fortbewegung polarisierter Zellen beteiligt zu sein (Anderson et al. 2008). Es wird vermutet, dass diese Funktionen der AChE u.a. mit der Bindung an Extrazellulärmatrixproteinen zusammenhängen, z.B. Laminin-1, Kollagen Typ IV (Johnson et al. 2007) und Fibronectin (Bigbee et al. 2004). Bisher fehlen Nachweise dieser Funktionen der AChE im Knochen.

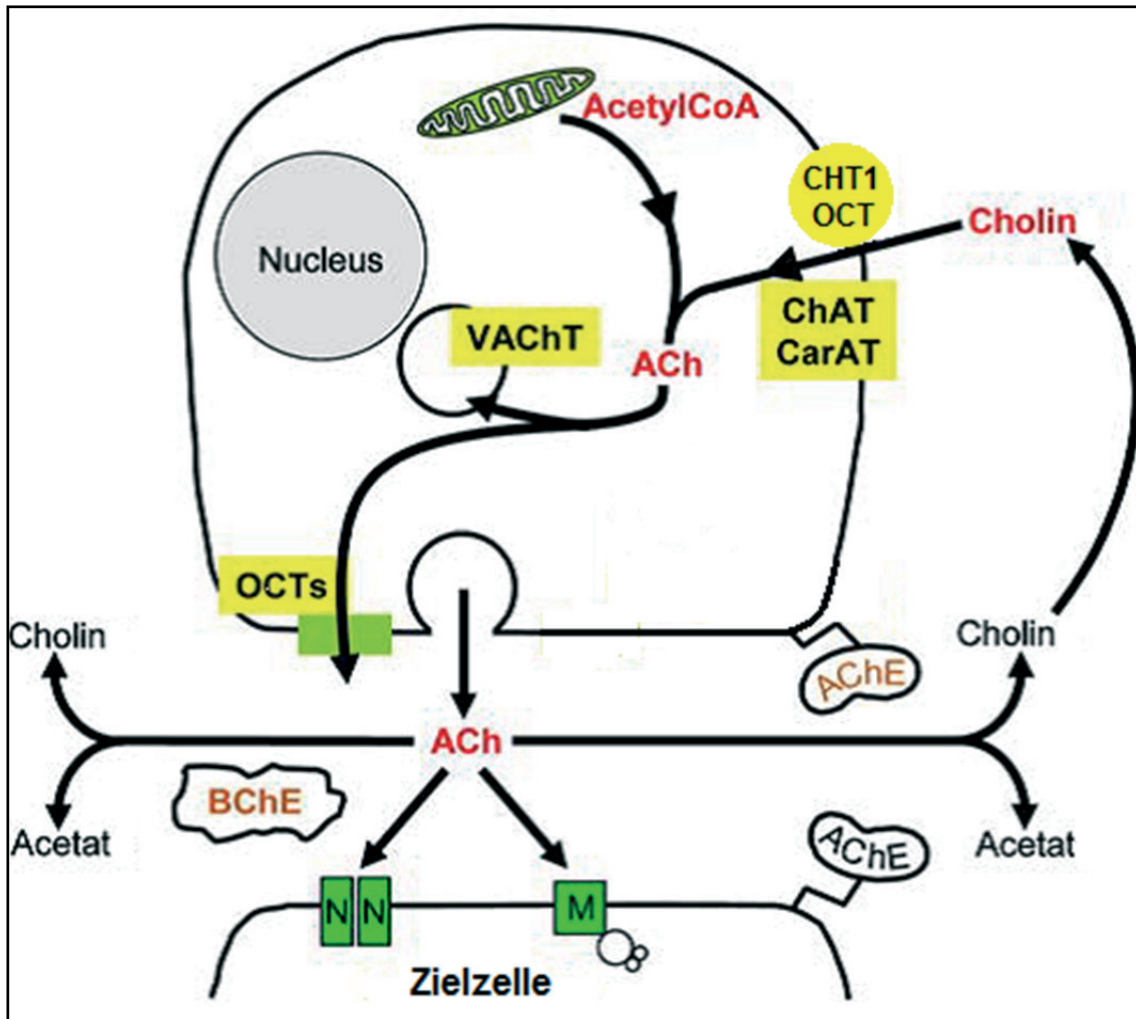


Abb. 5: Schematische Darstellung des cholinergen Systems in non-neuronalen Zellen (Modifiziert nach Kummer et al. 2008).

Aufnahme von extrazellulärem Cholin durch CHT1 oder OCT, Synthese von ACh durch ChAT und/oder CarAT. Der Transport von ACh in Vesikel durch VAcHT und Sekretion via Exozytose ist möglich, ebenso die direkte Freisetzung über OCTs. ACh agiert an der Zielzelle über nAChR (N) und mAChR (M) und wird im interzellulären Raum durch AChE und/oder BChE in Cholin und Acetat gespalten.

1.2 Aufbau, Struktur und Funktion des Knochens

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression der molekularen Komponenten des cholinergen Systems in murinen und humanen osteoblastären Zelllinien untersucht. Osteoblastäre Zelllinien bieten durch ihre Osteoblasten-ähnlichen Eigenschaften ein vorteilhaftes Modell für in vitro-Untersuchungen (Czekanska et al. 2012) und ermöglichen es, bedingt Rückschlüsse auf Osteoblasten in vivo zu ziehen. Osteoblasten spielen durch die Bildung von Knochensubstanz eine fundamentale Rolle in der Entstehung und im

Erhalt von Knochengewebe. Im Folgenden werden zunächst Aufbau und Struktur des Knochens beschrieben und anschließend die Zelltypen des Knochens, speziell Osteoblasten, erläutert.

Formal gehört Knochen zum Stützgewebe des Körpers und entsteht wie andere Bindegewebsformen aus dem Mesenchym. Knochengewebe besteht aus mehreren Zelltypen und aus einer mineralisierten Extrazellulärmatrix, die für die Hauptfunktion des Knochens sorgt: biomechanische Stabilität (Druck-, Zug- und Biegefestigkeit) und Schutz der inneren Organe. Die Hauptbestandteile der mineralisierten Knochenmatrix sind Kollagen I und Hydroxylapatit $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$. Das Skelett stellt somit ein riesiges Ca^{2+} -Phosphatreservat dar, bietet die Grundlage für die metabolische Funktion des Knochens und hält die Mineralhomöostase im Blutserum aufrecht (Hadjidakis et al. 2006).

Makroskopisch treten zwei Bauformen des Knochengewebes auf: Spongiosa und Kompakta. Die Kompakta ist dicht und kompakt gebautes Knochengewebe, das die Rindenschicht eines Knochens darstellt. In großen Röhrenknochen (z.B. Tibia) kann sie bis zu 10 mm dick werden (Lüllmann-Rauch 2003). Sie umfasst ca. 80 % der Skelettmasse und ist durch besondere mechanische Festigkeit und langsamen Knochenumbau gekennzeichnet (Hadjidakis et al. 2006). Die Spongiosa bildet durch ihre schwammähnlich gebauten Knochenbälkchen und -plättchen ein Gitterwerk im Inneren des Knochens und bietet mit den dadurch entstehenden Lücken Raum für das Knochenmark. Sie repräsentiert ca. 20 % der Knochenmasse, bildet aber durch ihren trabekulären Aufbau 80 % der Knochenoberfläche (Hadjidakis et al. 2006). Mit ihren Eigenschaften von höherer Elastizität und geringer Dichte trägt die Spongiosa auch zur mechanischen Unterstützung bei (Hadjidakis et al. 2006). So zeigt sich in großen Röhrenknochen eine typische trajektorielle Ausrichtung der Knochenbälkchen entlang der Druck- und Zugbelastung im Knochen (Drenckhahn 2003). Mikroskopisch lassen sich nach der räumlichen Struktur der Knochenmatrix zwei Bauprinzipien des Knochens unterscheiden. Der im adulten Skelett vorwiegend auftretende Lamellenknochen zeigt eine geordnete Ausrichtung der Kollagenfibrillen in lamellären Schichten. Sowohl Spongiosa als auch Kompakta sind aus Lamellenknochen aufgebaut. Hingegen ist Geflechtknochen die in der frühen Entwicklung vorherrschende Bauform, die durch netzartig verwobene Kollagenfibrillen charakterisiert ist. Sie kommt auch an Stellen neugebildeten Knochens vor (z.B. an Orten der Frakturheilung) und wird in Lamellenknochen umgebaut. Die mikroskopische Struktur des Lamellenknochens gewährleistet zusammen mit der makroskopischen Bau-

form (Kompakta und Spongiosa) die hohe biomechanische Stabilität des Knochens (Drenckhahn 2003).

Obwohl Knochen diese mechanische Festigkeit besitzt, ist er kein statisches Gewebe, sondern befindet sich zeitlebens in kontinuierlich dynamischen Umbauprozessen, um sich den aktuellen mechanischen und metabolischen Anforderungen anzupassen. Der Begriff *bone remodeling* beschreibt die Homöostase zwischen den ständigen Vorgängen der Resorption alten Knochengewebes und der Erneuerung durch Knochenbildung. Ein genaues Gleichgewicht zwischen diesen Prozessen ist entscheidend für den Erhalt der Knochenmasse und -festigkeit sowie der systemischen Mineralhomöostase (Zuo et al. 2012). Das *bone remodeling* gewährleistet somit eine Anpassung der Knochenmikroarchitektur an Veränderungen mechanischer Belastung, stellt die Reparatur von Mikrotraumata sicher und beugt eine Akkumulation alten Knochengewebes vor (Hadjidakis et al. 2006). An Regulation und Ablauf des Knochenumbaus sind die spezifischen Zellen des Knochens durch komplexe Systeme der Zellkommunikation beteiligt. Durch Dysregulation solcher Systeme können Knochenerkrankungen mit gestörter Mikroarchitektur resultieren.

1.2.1 Zelltypen des Knochens

Zu den spezifischen Zellen des Knochens gehören knochenbildende Osteoblasten, regulierende und mechanosensorische Osteozyten und knochenabbauende Osteoklasten. Alle Knochenzellen tragen mit ihrer Aktivität zum Gleichgewicht des Knochenstoffwechsels bei und stehen durch ein komplexes Regulationssystem miteinander in Beziehung. Schwerpunktmäßig wird hier auf Eigenschaften und Funktion der Osteoblasten eingegangen.

Osteoblasten bilden die organische Knochenmatrix (Osteoid) und regulieren die Mineralisierung dieser Grundsubstanz. Die einkernigen kubischen Zellen sind durchschnittlich 15-30 μm groß und basophil (reich an rauem ER und Golgi-Apparat), womit sie Merkmale für eine hohe Proteinsyntheseleistung aufweisen. An ihrer Plasmamembran und in Matrixvesikeln sitzt das Enzym alkalische Phosphatase (ALP) (Whyte 1994; Sarathchandra et al. 2005), die durch ihre hohe Aktivität für den Mineralisierungsprozess wichtig ist. ALP hydrolysiert Hexosemonophosphatester, wodurch Ca^{2+} -Phosphatpräzipitate entstehen (Sarathchandra et al. 2005).

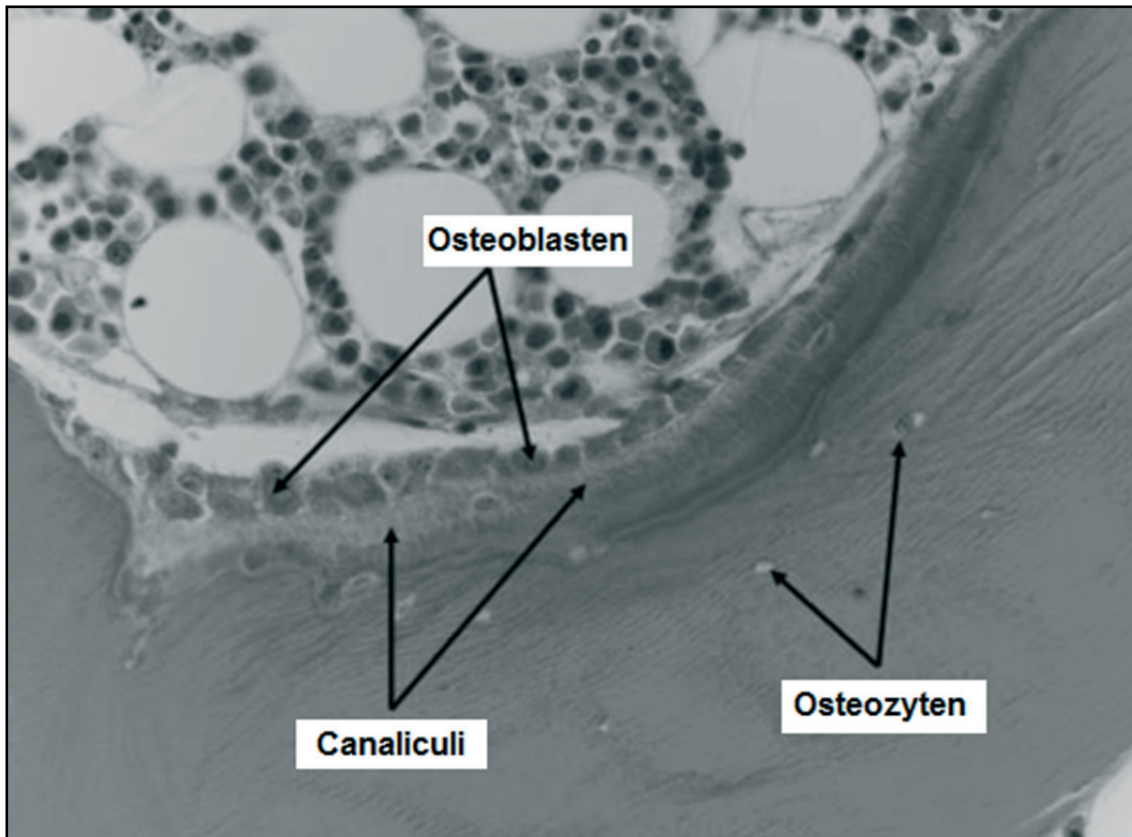


Abb. 6: Lichtmikroskopische Darstellung von Osteoblasten und Osteozyten (Modifiziert nach Clarke 2008).

Osteoblasten sitzen der Knochenmatrix aneinandergereiht auf und produzieren das proteinreiche Osteoid, welches anschließend von ihnen mineralisiert wird. Über ein enormes Netzwerk an Kommunikationskanälen (Canaliculi) stehen sie mit den Osteozyten in Verbindung, die eingemauert in der mineralisierten Knochenmatrix liegen.

Osteoblasten sitzen aneinandergereiht oder in kleinen Gruppen auf der mineralisierten Knochenmatrix (Abb. 6, (Clarke 2008)). Dort sezernieren sie zunächst eine Schicht Osteoid und regulieren anschließend die Mineralisierung der organischen Substanz, indem sie kleine mit Ca^{2+} - und Phosphationen beladene Matrixvesikel abgeben (Anderson 2003). Das Osteoid besteht zu 90 % aus Kollagen Typ I (Brodsky und Persikov 2005). Zu den übrigen non-kollagenen Matrixproteinen gehört das Glykoprotein Osteopontin (OPN). In der vorliegenden Arbeit diente OPN als osteoblastenspezifisches Markerprotein. OPN spielt im Knochenstoffwechsel eine wichtige Rolle: es hemmt die Mineralisierung des Osteoids (Clarke 2008) und aktiviert den Knochenabbau durch Stimulation von Osteoklasten. Es ist in den Knochenumbau nach mechanischer Belastung involviert und agiert zudem als Zytokin zur Vermittlung von Proliferations-, Apoptose- und Entzündungssignalen (Drenckhahn 2003). Bevor Osteoblasten zu aktiven matrix-

produzierenden Zellen werden, durchlaufen sie verschiedene Stadien der Reifung. Grundsätzlich gehen ihre Vorläuferzellen aus mesenchymalen Stammzellen (MSC) hervor. Das Knochenmark enthält Populationen dieser MSC, aus denen sich nicht nur Osteoblasten, sondern auch Chondroblasten, Adipozyten und Fibroblasten differenzieren können (Clarke 2008). Verschiedene Faktoren sind notwendig, um die Entwicklung der Progenitorzelle in einen proliferierenden Präosteoblasten und schließlich in einen reifen matrixproduzierenden Osteoblasten zu ermöglichen (Khosla et al. 2008). Zu diesen Faktoren gehören Hormone, Zytokine und Matrixproteine (Hadjidakis et al. 2006). Osteoblastäre Progenitorzellen finden sich nicht nur im Knochenmark, sondern auch im Stratum osteogenicum der Knochenhaut (Periost). Diese innere Schicht der Knochenhaut liegt zwischen der äußeren straffen Bindegewebsschicht (Stratum fibrosum) und dem Knochengewebe. Sie liefert neben Gefäß- und Nervenversorgung einen Pool an osteogenen Progenitorzellen, die sich bei Reparaturbedarf und auch während des Dickenwachstums des Knochens zu aktiven Osteoblasten differenzieren können (Clarke 2008). Ein weiteres Reservoir an osteogenen Zellen liefert das Endost. Dieser dünne Belag aus Kollagenfibrillen und flachen Zellen überzieht alle inneren Knochenoberflächen. Unter diesen Zellen finden sich MSC, Osteoprogenitorzellen, ruhende Osteoblasten und ruhende Osteoklasten (Lüllmann-Rauch 2003). Hier wird deutlich, dass sich differenzierte Osteoblasten aus ihrem aktiven matrixproduzierenden Stadium in andere Aktivitätszustände begeben können. Einerseits können sie zu ruhenden, reaktivierbaren Osteoblasten werden, den sogenannten Knochensaumzellen (*bone lining cells*). Andererseits vermögen sie sich zu Osteozyten zu entwickeln, indem sie in die mineralisierte Knochenmatrix eingemauert werden. Als Osteozyten übernehmen sie weiterhin wichtige Aufgaben in der Regulation des Knochenstoffwechsels. Osteozyten nehmen mechanischen Stress, Mikrorisse und Änderungen im hormonalen Milieu wahr, vermitteln diese Signale und beeinflussen die Aktivität der Osteoblasten und -klasten (Lanyon 1993). Die Signalvermittlung zwischen den verschiedenen Knochenzellen und den Osteoblasten verläuft unter anderem über Zellkontakte. Neben Adhäsions- und Verschlusskontakten spielen *gap junctions* eine wesentliche Rolle in der Zellkommunikation. Connexin 43 ist das am häufigsten vorkommende Transmembranprotein der *gap junctions* in Knochenzellen (Plotkin et al. 2013). Neben der Kommunikation zwischen Osteoblasten und den übrigen Knochenzellen vermittelt Connexin 43 über Hemikanäle Informationen aus dem Extrazellulärraum und kontrolliert somit Differenzierung, Aktivität und Überleben von Knochenzellen (Plotkin et al. 2013).

1.3 Einfluss des cholinergen Systems auf den Knochenstoffwechsel

Zellkommunikation nimmt eine zentrale Position in der Regulation des Knochenstoffwechsels ein. Prozesse wie Osteogenese, *bone remodeling* und Pathogenese von Knochenerkrankungen und beruhen auf (fehlerhaften) Kommunikationsmechanismen zwischen Osteoblasten und übrigen Knochenzellen. Das cholinerge System vermittelt in zahlreichen non-neuronalen Geweben Informationen zwischen Zellen, wodurch Proliferation, Differenzierung und Ausbildung von Zell-Zellkontakten reguliert werden (Wessler et al. 2008). Diese Vorgänge sind auch für Bildung und Erhalt von Knochengewebe fundamental und werden durch Zigarettenrauch, Nikotin und die Funktion der AChE beeinflusst.

Zigarettenrauch enthält mehr als 4700 chemische Bestandteile (Chen et al. 2011), darunter 150 verschiedene toxische Substanzen (Rothen et al. 2009), wovon Nikotin als ein Hauptbestandteil und exogener Ligand an nAChR bindet.

Langzeit-in-vivo-Studien haben Rauchen als Risikofaktor für verschiedene Knochenerkrankungen untersucht: Rauchen beeinträchtigt die Frakturheilung (Hernigou 2013), reduziert die Knochenmasse (Krall et al. 1999), erhöht die Rate von Pseudarthrosen (Hernigou et al. 2013) und erhöht das Risiko für postmenopausale Osteoporose (Walker et al. 2005). Die Knochenheilung dauert bei Rauchern länger als bei Nichtrauchern (Hernigou et al. 2013). Eine Metaanalyse ergab, dass die Knochendichte bei Rauchern signifikant niedriger war als bei Nichtrauchern (Ward et al. 2001). Auch beeinträchtigt Tabakkonsum das Einwachsverhalten von dentalen Implantaten in den Knochen: der Konsum von mehr als 20 Zigaretten pro Tag steigert das Risiko einer fehlerhaften Implantatintegration von 15,8 % auf 30,8 % (Sánchez-Pérez et al. 2007).

Mehrere Studien überprüften in Tierversuchen, ob Nikotin tatsächlich für die Effekte des Zigarettenrauches auf die Knochenheilung verantwortlich ist: in Kaninchen verursacht Nikotin eine höhere Inzidenz von Pseudarthrosen bei Tibiafrakturen (Raikin et al. 1998). Nach subkutaner Gabe von Nikotin konnte per radiologischer Kontrolle eine deutlich schlechtere Kallusbildung im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet werden. Auch in biomechanischen Tests (Dreipunkt-Biegetest) war unter Nikotin neugebildeter Knochen ca. 26 % instabiler als der der Referenzgruppe (Raikin et al. 1998).

Machado et. al (2010) konnten eine signifikant verzögerte Regeneration des Alveolarknochens in Ratten nach Zahnextraktion und subkutaner Nikotingabe feststellen.

In der Studie von Hapidin et al. (2011) wurde der Effekt von Nikotin auf histomorphometrische und biochemische Marker des Knochens von Ratten untersucht. Via intraperitonealer Injektion (7 mg/kg/Tag) erhielten Ratten für zwei oder vier Monate Nikotin. Ein Ungleichgewicht im Bone remodeling durch Nikotin konnte bereits nach zwei Monaten gezeigt werden und die Ergebnisse unterschieden sich nicht von der verlängerten Gabe für vier Monate. Die Nikotingabe führte zu gesteigerten Knochenresorptionsmarkern (vergrößerte Osteoklastenoberfläche und erhöhte Pyridinolinwerte im Serum) sowie zu verminderter Knochenbildung, was sich in Reduktion von Anzahl, Volumen und Dicke der Knochenbälkchen, sowie in Reduktion des Serum-Osteocalcin (OCN), einem Knochenmatrixprotein, äußerte (Hapidin et al. 2011).

Trotz zahlreicher in-vivo-Studien gab es entsprechend wenige in-vitro-Studien, die den Effekt von Nikotin auf den Knochen auf zellulärer Ebene untersuchten (Walker et al. 2001).

Walker et al. (2001) demonstrierten in humanen primären Osteoblasten, in humanem Knochengewebe und in der humanen Osteosarkomzelllinie MG63 die Wirkung von Nikotin auf die Zellproliferation von Osteoblasten: Nikotin wirkt sich biphasisch auf das Zellwachstum aus, mit toxischem antiproliferativem Effekt in hohen Dosen ($> 1 \text{ mmol/l}$) und stimulierendem Effekt in niedrigen Dosen ($0,01 - 10 \text{ } \mu\text{mol/l}$) nach 72 Stunden (Walker et al. 2001).

Rothem et al. (2009) untersuchten den Effekt von Nikotin auf die Genexpression der Zelllinie MG63. Sie bestätigten die Befunde von Walker et al. (2001), die dosis- und zeitabhängige biphasische Effekte von Nikotin auf Zellwachstum der Osteoblasten zeigten. Zudem wiesen sie eine Expressionssteigerung von Kollagen Typ I, dem non-kollagenen Matrixprotein OCN und der ALP unter Administration niedriger Nikotindosen ($0,01 - 10 \text{ } \mu\text{mol/l}$) nach und entsprechend eine Abnahme der Expression unter hohen Konzentrationen ($100 - 10000 \text{ } \mu\text{mol/l}$) (Rothem et al. 2009). Die Nikotinlevel in den Versuchen entsprachen den Blutserumwerten von Gewohnheitsrauchern und der Speichelkonzentration von Langzeit-Schnupftabakkonsumenten (Rothem et al. 2009). Kollagen Typ I, OCN und ALP spielen eine Schlüsselrolle im Knochenstoffwechsel und in der Osteogenese. Daraus lässt sich schließen, dass eine Nikotinadministration in Dosierungen entsprechend der Dosis von Gewohnheitsrauchern die Genexpression, Osteogenese und Zellproliferation hemmt. Hierdurch kann der biologische und klinische Einfluss von Rauchen auf die Knochenheilung erklärt werden (Rothem et al. 2009). Aufbauend auf ihren vorangehenden Versuchen konnten Rothem et al. zwei Jahre später

die genomischen Effekte von Nikotin in Osteoblasten zeigen. In MG63-Zellen identifizierten sie 842 Gene, deren Expression durch Nikotingabe verändert wurde. Genauer untersucht wurden neun Gene, die für die Knochenheilung besonders interessant waren, da sie mit Prozessen wie Zellvitalität, Proliferation, Differenzierung und Apoptose assoziiert waren (Rothem et al. 2011). Die Expression dieser Gene wurde durch Nikotinalgabe über 24 Stunden beeinträchtigt. Mittels nAChR-Antagonisten wurde der Effekt von Nikotin gehemmt, wodurch die Nikotinwirkung auf die Zellfunktion von Osteoblasten über die direkte Bindung an nAChR gezeigt werden konnte (Rothem et al. 2011).

Acetylcholinesterase

Über ihre klassische Aufgabe der Degradation von ACh hinaus, besitzt die AChE weitere Funktionen: sie scheint in der Entwicklung und Morphogenese von vielen Geweben involviert zu sein (Inkson et al. 2004; Falugi et al. 2012). Die Expression von AChE wurde in Osteoblasten und ihren Progenitorzellen durch mehrere Arbeitsgruppen bereits nachgewiesen (Grisaru et al. 1999; Genever et al. 1999; Inkson et al. 2004; Hoogduijn et al. 2006). Die AChE scheint Differenzierung und Proliferation von Osteoblasten zu regulieren, sowie an der Adhäsion von Osteoblasten an die Extrazellulärmatrix beteiligt zu sein (Grisaru et al. 1999; Inkson et al. 2004; Genever et al. 1999). Inkson et al. (2004) untersuchten humane Osteosarkomzelllinien und murine osteoblastäre MC3T3-E1-Zellen: Die Sekretion der AChE erfolgte abhängig vom Differenzierungsgrad der Osteoblasten. Vor allem an Stellen neu gebildeten Knochens fand sich eine starke AChE-Expression, was darauf hindeutet, dass AChE als Knochenmatrixprotein agiert (Inkson et al. 2004). AChE-Moleküle können di- oder oligomerisieren (Massoulié 2002). So könnte zellgebundene AChE mit matrixgebundener AChE interagieren und auf diese Weise einen Mechanismus für Zelladhäsion der Osteoblasten darstellen (Inkson et al. 2004). Auch Genever et al. (1999) beobachteten eine Abhängigkeit der Expression vom Differenzierungsgrad der Osteoblasten. So wurde AChE nur von differenzierten kuboiden Osteoblasten gebildet, aber nicht von Prä-Osteoblasten (Genever et al. 1999).

Die AChE-Expression in Osteoblasten wird offenbar ähnlich wie andere Knochenmatrixproteine durch osteogene Stimuli reguliert (Inkson et al. 2004). Es existieren Bindungsstellen für osteogene Faktoren wie Vitamin D₃ und 17 β -Östradiol im AChE-Promotor (Grisaru et al. 1999). Die Expression der E6-AChE Variante in Osteoblasten wurde durch Gabe von 17 β -Östradiol und Vitamin D₃ gesteigert, wodurch ein direkter

Zusammenhang zwischen osteogener Differenzierung und AChE-Expression gezeigt werden konnte (Grisaru et al. 1999).

In vivo konnte die funktionelle Bedeutung der AChE-Expression in der Osteogenese an differenzierenden Chondrozyten aus Feten mit thanatophorer Dysplasie demonstriert werden (Grisaru et al. 1999). Diese autosomal-dominant vererbte Skelettentwicklungsstörung ist eine schwerwiegende Form der Osteochondrodysplasie, die starke Wachstumsstörungen und abnorme Körperproportionen verursacht und meistens pränatal oder kurz nach der Geburt zum Tode führt (Grisaru et al. 1999). Fehlende AChE-Expression in diesen dysplastischen Knochen weist zum einen auf die Induktion der AChE-Expression während früher Stadien der Osteogenese hin, als auch auf die Abhängigkeit der AChE-Expression von osteogenen Faktoren, welche im dysplastischen Knochen fehlen (Grisaru et al. 1999).

1.4 Fragestellung

Das cholinerge System vermittelt in non-neuronalen Geweben Informationen zwischen Zellen und reguliert basale Zellfunktionen wie Proliferation, Differenzierung und Ausbildung von Zell-Zellkontakten (Wessler et al. 2008). Diese Funktionen sind essentiell für Bildung und Erhalt von Knochengewebe. Störungen dieser Prozesse führen zur Entstehung von Knochenerkrankungen, z.B. verzögerte Frakturheilung, reduzierte Knochenmasse und gestörte Knochenmikroarchitektur. In der Literatur lassen sich viele Hinweise auf die Existenz eines cholinergen Systems im Knochen finden. Bislang fehlte allerdings eine systematische Charakterisierung von Osteoblasten und Osteoblasten-ähnlichen Zellen hinsichtlich der Expression des non-neuronalen cholinergen Systems. Vor diesem Hintergrund stellen wir die Hypothese auf, dass ein endogenes cholinerges System im Knochen, speziell in Osteoblasten, exprimiert wird. Mittels folgender Fragen soll die Hypothese überprüft werden:

- Exprimieren Osteoblasten und Präosteoblasten Proteine für Synthese, Freisetzung und Recycling von ACh?
- Welche muskarinischen Rezeptoren und nikotinische Rezeptor-UE werden von Osteoblasten und Präosteoblasten exprimiert?
- Lassen sich bestimmte Rezeptoruntereinheiten der nAChR auf Osteoblasten und Präosteoblasten lokalisieren?
- Gibt es innerhalb einer Spezies (Maus) Unterschiede im Expressionsmuster der cholinergen Komponenten zwischen reifen Osteoblasten und undifferenzierten Präosteoblasten?
- Gibt es Spezies-spezifische Unterschiede im cholinergen Expressionsmuster von reifen Osteoblasten zwischen Maus und Mensch?

Durch die Beantwortung dieser Fragen sollen detaillierte Daten über die Expression des cholinergen Systems in osteoblastären Zellen geliefert werden. Da bislang noch viele Wissenslücken in der Regulation des Knochenstoffwechsels existieren (Zuo et al. 2012), könnten diese Daten zu einem besseren Verständnis der Pathophysiologie von Knochenerkrankungen beitragen und der Entwicklung pharmakologischer Therapieoptionen dienen.

2 Material und Methoden

2.1 Zellkultur

Für die Untersuchung des cholinergen Systems an Knochenzellen *in vitro* wurden murine und humane Osteoblasten-ähnliche Zelllinien ausgewählt. Als Vertreter typischer cholinergischer Zellen dienten neuronale Zelllinien für die Positivkontrollen.

2.1.1 Murine Zelllinien

Zu den untersuchten Zellen der Maus gehörte die osteogene Zelllinie MC3T3-E1, sowie die Neuroblastomzelllinie NS20Y als Positivkontrolle.

MC3T3-E1

Die osteogene Zelllinie MC3T3-E1 (Nr. ACC 210, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, DSMZ, Braunschweig, Deutschland) stammt aus der Schädelkalotte des Mausembryos C57BL/6 (Sudo et al. 1983). MC3T3-E1-Zellen zeigen ein Wachstum in Monolayern. Sie haben eine spindelartige Form, bilden Fortsätze aus und wachsen adhärent mit einer Verdopplungszeit von ca. zwei bis drei Tagen (Abb. 7). 1983 wurde erstmals die Differenzierung der MC3T3-E1-Zellen von Präosteoblasten zu reifen Osteoblasten mit der Bildung von kalzifiziertem Knochengewebe (Abb. 8, Abb. 9) *in vitro* beschrieben (Sudo et al. 1983). Dies macht die MC3T3-E1-Zelllinie zu einem attraktiven Objekt für *in vitro* Experimente über Knochenbildung und -umbau (Czekanska et al. 2012).



Abb. 7: Undifferenzierte MC3T3-E1-Zellen nach drei Tagen Kultivierung.
Spindelartige Morphologie und Ausbildung von Zellausläufern. Der Pfeil zeigt eine einzelne Zelle. Maßstab: 100 Mikrometer (μm).



Abb. 8: Osteogen differenzierte MC3T3-E1- Zellen nach 19 Tagen Kultivierung in osteogenem Medium.
Transformation in kuboide Zellen. Pfeil: Einzelne Zelle. Maßstab: 100 μm .

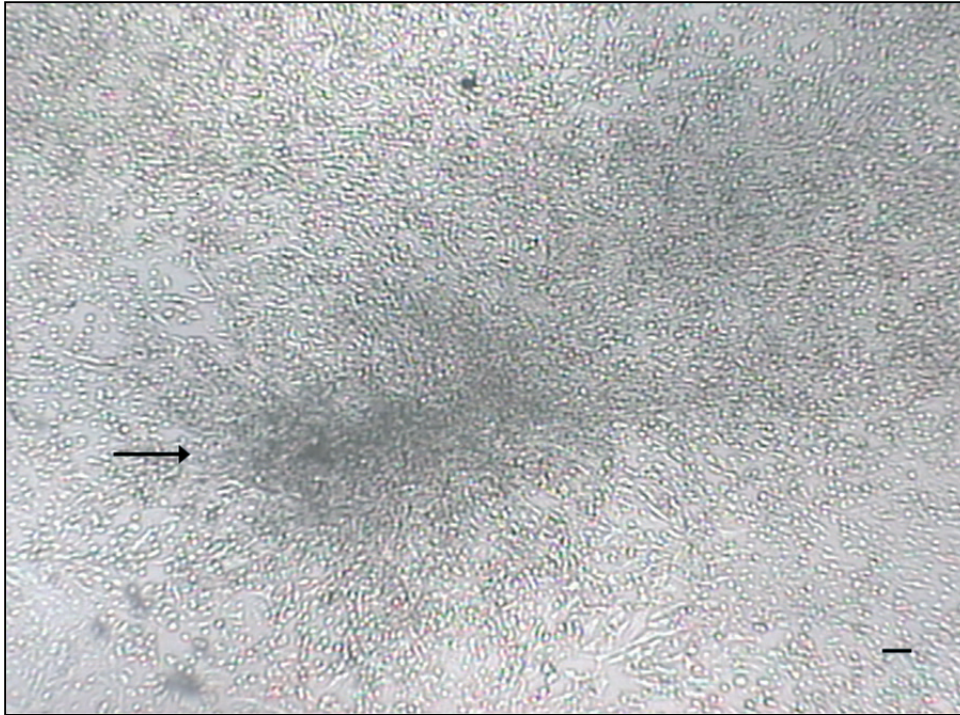


Abb. 9: Osteogen differenzierte MC3T3-E1- Zellen nach mehr als 19 Tagen Kultivierung in osteogenem Medium.

Die kubioden Zellen aggregieren zu Zellhaufen und bilden partiell kalzifizierte Knochenmatrix (Pfeil). Maßstab: 100 μm

NS20Y

Die Zelllinie NS20Y (Nr. ACC 94, DSMZ) wurde als cholinerg Klon der murinen Neuroblastom C1300-Zellen von Amano et al. etabliert. Amano et al. beschrieben diese Zellen als aneuploid mit hoher Aktivität der Cholinacetyltransferase und der Acetylcholinesterase (Amano et al. 1972). NS20Y-Zellen haben runde Zellkörper und bilden Axone und Dendriten aus. Sie wachsen in Monolayern oder kleinen Zellhaufen mit einer Verdopplungszeit von ca. 30 Stunden.

2.1.2 Humane Zelllinien

Zu den untersuchten Zellen des Menschen gehörten die Osteosarkomzelllinie SAOS-2, sowie die Neuroepitheliomzelllinie SH-SY5Y als Positivkontrolle.

SAOS-2

Die humane Zelllinie SAOS-2 (Nr. ACC 243, DSMZ) stammt aus Tumorzellen eines primären Osteosarkoms eines 11-jährigen kaukasischen Mädchens aus dem Jahr 1973 (Fogh et al. 1977). Zellen der SAOS-2-Zelllinie haben epithelartiges Aussehen, wachsen adhärent in Monolayern (Abb. 10) und verdoppeln sich etwa alle 43 Stunden. SAOS-2-Zellen wurden 1987 von Rodan et al. als humane Osteosarkomzelllinie mit Osteoblasten-artigen Eigenschaften charakterisiert.

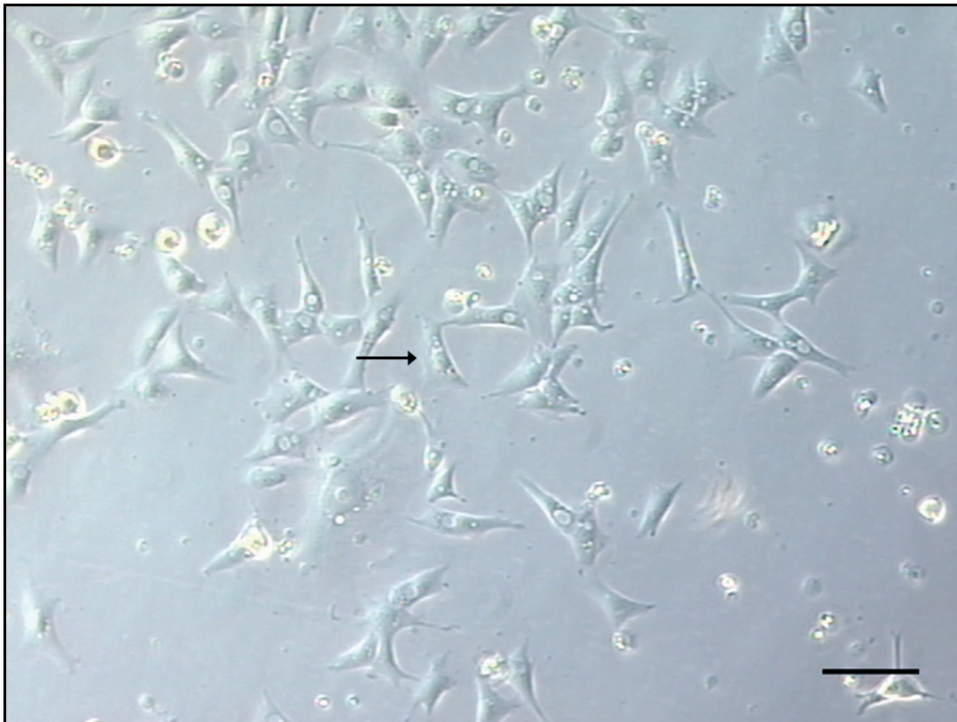


Abb. 10: SAOS-2-Zellen.

SAOS-2-Zellen mit spindelartiger Zellform und Ausbildung von Zellfortsätzen. Der Pfeil zeigt auf eine einzelne Zelle. Maßstab: 50 μm

SH-SY5Y

SH-SY5Y-Zellen (ACC 209, DSMZ, Deutschland) sind eine klonale Sublinie der Neuroepitheliomzelllinie SK-N-SH, die 1970 aus der Knochenmarksbiopsie eines vier Jahre alten kaukasischen Mädchens mit Neuroblastometastasen entnommen wurde (Biedler et al. 1978; Jalava et al. 1990). Die länglichen Zellen wachsen in Monolayern und aggregieren zu Zellhaufen, sie teilen sich etwa alle 55 Stunden. Sie erreichen beim Wachsen keine komplette Konfluenz. Bei dieser Neuronen-ähnliche Zelllinie wurde die Aktivität der Cholinacetyltransferase, Acetylcholinesterase, Dopamin- β -Hydroxylase und

Butyrylcholinesterase, sowie die Bildung von Acetylcholin, Dopamin und γ -Aminobuttersäure mit radioaktiv markierten Cholin, Tyrosin und Glutamat nachgewiesen (Biedler et al. 1978).

2.1.3 Wachstumsbedingungen

Alle Zelllinien wurden in Zellkulturflaschen (25 cm², Nunc, Wiesbaden, Deutschland) kultiviert. Der Flaschenboden wurde für eine bessere Zelladhäsion zunächst mit fetalem Kälberserum (FKS, Hyclone, Perbio, Bonn, Deutschland) für ca. 1 Stunde (h) beschichtet. Für die verschiedenen Zelllinien wurden unterschiedliche Medien benutzt. Diesen waren in verschiedenen Konzentrationen FKS und Penicillin/Streptomycin (P/S, PAA Laboratories, Pasching, Österreich) zugesetzt.

Für MC3T3-E1-Zellen wurde dem α -Minimum Essential Medium (α -MEM, Gibco-BRL, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) 15 % FKS und 1 % P/S hinzugefügt.

Zur Differenzierung der MC3T3-E1-Zellen in reife mineralisierende Osteoblasten wurden die Zellen in *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM, Low Glucose 1 g/l, PAA) kultiviert. Dieses Medium war ergänzt durch 10 % FKS, 1 % P/S, 0,1 μ M Dexamethason (Sigma-Aldrich, München, Deutschland), 0,05 mM Ascorbinsäure-2-Phosphat (Sigma-Aldrich) und 10 mM β -Glycerolphosphat (Sigma-Aldrich).

NS20Y-Zellen wurden in DMEM Medium (PAA) mit 10 % FKS und 1 % P/S kultiviert.

SAOS-2-Zellen wuchsen in *Iscove's modified Dulbecco's Medium* (IMDM, Gibco-BRL) mit 10 % FKS und 1 % P/S.

Das Nährmedium für SH-SY5Y-Zellen bestand aus RPMI 1640 (PAA), 10 % FKS und 2,5 % P/S. Alle Zellen wurden bei 37° C und 5 % Kohlenstoffdioxid (CO₂) in feuchter Atmosphäre im Brutschrank (Typ BB 16 Heraeus, Hanau, Deutschland) inkubiert. Jedes Medium wurde dreimal pro Woche gewechselt.

2.1.4 Vermehrung der Zellen

Nach drei bis fünf Tagen bildeten die MC3T3-E1-Zellen ein konfluentes Monolayer und konnten gesplittet werden, ebenso wie SAOS-2 und SH-SY5Y-Zellen. Die NS20Y-Zellen wurden nach ca. drei Tagen aus einem semi-konfluenten Monolayer passagiert. Die Passagierung wurde bei allen Zelllinien auf die gleiche Weise durchgeführt.

Nach Entnahme des alten Mediums wurden die Zellen durch Zugabe von 2 ml Trypsin (PAA) vom Boden der Kulturflasche gelöst. Dieser Vorgang wurde durch Zugabe von 5 ml FKS oder 10 ml Medium gestoppt. Es folgte die Trennung der Zellen von der Flüssigkeit mittels Zentrifuge (5 Minuten (min), 1500 Rotationen/min (rpm)). Das Zellpellet wurde nach Verwerfen des Überstandes mit Medium resuspendiert und zur vollständigen Entfernung des Trypsins nochmals mit Medium gewaschen (5 min, 1000 rpm). Nach wiederholter Resuspension mit Medium wurden die Zellen im Verhältnis 1:3 mit Medium auf neue Flaschen (zuvor mit FKS beschichtet) verteilt.

Die sich zu Osteoblasten differenzierenden MC3T3-E1-Zellen wurden nicht mehr gesplittet. Nach durchschnittlich drei Wochen Differenzierung war makroskopisch sichtbare Knochenmatrix synthetisiert worden, womit die Zellen reif zur Ernte waren.

Für die Untersuchungen der Zellen mittels PCR wurden jeweils 5 Passagen der SAOS-2 und der nativen und osteogen differenzierten MC3T3-E1 verwendet und je 2 Passagen der Positivkontrollen SH-SY5Y und NS20Y- Zellen.

2.1.5 Einfrieren der Zellen

Zur Kryokonservierung der Zellen wurden diese mit 2 ml Trypsin (PAA) vom Boden der Kulturflaschen abgelöst, mit 5 ml FKS suspendiert und zentrifugiert (5 min, 1500 rpm). Den mit 70 % Medium und 20 % FKS resuspendierten Zellen wurde 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO, Serva, Heidelberg, Deutschland) als Gefrierschutz hinzugefügt. In 1 ml Kryo-Röhrchen wurden die Zellen langsam 1° C pro Minute im Alkoholkühler (Isopropanol, Nalgene, Neerijse, Belgien) bis auf -80° C abgekühlt, wobei die Zellen einer Kulturflasche auf je zwei Röhrchen verteilt wurden. Für längere Konservierung für bis zu 2 Jahre wurden danach einige Kryo-Röhrchen jeder Passage in flüssigen Stickstoff überführt.

Tab. 1: Übersicht aller Zelllinien und Wachstumsbedingungen

Zelllinien	Wachstumsbedingungen	Medien	Zusatz	Splitting	Lagerung
Murine MC3T3-E1	37°C 5 % CO ² feuchte Atmosphäre	α-MEM (Gibco-BRL)	15 % FKS 1 % P/S	mittels Trypsin Verhältnis 1:3	10 % DMSO 20 % FKS 70 % Medium bei -80° C
differenzierte MC3T3-E1		DMEM (low glucose, PAA)	10 % FKS 1 % P/S 0,1 µM Dexamethason 0,05 mM Ascorbinsäure-2-Phosphat 10 mM β-Glycerol-Phosphat (Sigma-Aldrich)	kein weiteres Splitten	keine weitere Lagerung
NS20Y		DMEM Medium (PAA)	10 % FKS 1 % P/S	mittels Trypsin	10 % DMSO 20 % FKS
Humane SAOS-2		IMDM (Gibco-BRL)		Verhältnis 1:3	70 % Medium bei -80° C
SH-SY5Y		RPMI 1640 (PAA)			

2.1.6 Mycoplasmentest

Die Zellkulturen aller verwendeten Zelllinien wurden regelmäßig auf Kontamination mit Mycoplasmen mittels Immunfluoreszenz (Kernfärbung DAPI 4,6-Diamin-2-Phenylindol-Dihydrochlorid, 1 µg/ml, Boehringer, Mannheim) und PCR getestet. In keinen Zellen, die für die hier beschriebenen Versuche verwendet wurden, gab es einen Nachweis von Mycoplasmen.

2.1.7 Gewebe

Zur Ergänzung der Positivkontrollen der cholinergen Zelllinien NS20Y und SH-SY5Y wurde für bestimmte Komponenten des cholinergen Systems komplementäre DNA (cDNA) von verschiedenen murinen und humanen Gewebeproben verwendet. Hierfür diente cDNA von murinen Gewebeproben aus Haut, Leber, Rückenmark, Gehirn und Niere. Die cDNA der humanen Gewebeproben stammten aus Plazenta, Haut, Knochen und aus der Arteria cerebri media. Die cDNAs der Gewebeproben wurden von den Arbeitsgruppen von Prof. Dr. K. Lips (Labor für experimentelle Unfallchirurgie der Universität Gießen) und Prof. Dr. W. Kummer (Institut für Anatomie und Zellbiologie der Universität Gießen) zur Verfügung gestellt.

2.2 Reverse-Transkriptase Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR)

2.2.1 Isolierung der Ribonucleinsäure (RNA)

Die Gesamt-RNA wurde aus den Zellkulturen mittels RNeasy mini kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) entsprechend dem Herstellerprotokoll isoliert. Die Kulturen von SAOS-2 (n=5), SH-SY5Y (n=2), NS20Y (n=2) sowie native und osteogen differenzierte MC3T3-E1 (n=5) wurden mit Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (*phosphate-buffered saline*, PBS) drei Mal gewaschen und anschließend mit 600 Mikroliter (μl) RLT-Puffer (Qiagen) lysiert. Dem RLT-Puffer wurde 1 % β -Mercaptoethanol (14,3 M, Serva) zugesetzt. Das Lysat wurde in die Qiashreder spin Säule (Qiagen) pipettiert und 2 min bei maximaler Geschwindigkeit mittels Zentrifugation homogenisiert. Mit 600 μl 70 % Ethanol (Riedel-de-Haen, Seelze) wurde das aufgefangene homogenisierte Lysat vorsichtig gemischt. 700 μl dieser Probe wurde in die RNeasy mini Säule (Qiagen) gegeben, wodurch die RNA mittels Zentrifugation für 15 Sekunden (s) bei 10000 rpm an die Säule gebunden wurde. Dieser Vorgang wurde wiederholt bis das gesamte Lysat verbraucht war, der Durchfluss wurde jeweils verworfen. Zum Waschen der Säule wurde 700 μl RW1-Puffer (Qiagen) zugegeben und zentrifugiert (15 s, 10000 rpm). Die RNeasy mini Säule (Qiagen) wurde mit 500 μl RPE-Puffer gewaschen (15 s, 10000 rpm). Zum Trocknen der RNeasy Silica-Gel Membran wurde der Schritt mit 500 μl RPE-Puffer (Qiagen) wiederholt (2 min, maximale Geschwindigkeit). Die RNA wurde mit 30-50 μl Ribonuclease-freiem Wasser (Ampuwa, Fresenius, Bad Homburg,

Deutschland) eluiert (1 min, 10000 rpm). Der RNA-Gehalt der Probe wurde bei einer Wellenlänge von 290 Nanometern (nm) photometrisch bestimmt. Er lag bei den verschiedenen Zellarten bei 140-3100 µg/ml. Die RNA wurde bei -80° C maximal drei Monate gelagert.

2.2.2 cDNA-Synthese

Mittels des Enzyms reverse Transkriptase (RT) wurde aus RNA cDNA synthetisiert.. Eine Negativkontrolle ohne RT (Ø RT) wurde für jede Probe durchgeführt, um die Kontaminierung mit genomischer DNA auszuschließen, wobei die RT durch Wasser (Ampuwa, Fresenius) ersetzt wurde. Zuerst erfolgte der DNA-Verdau: 1 µl Desoxyribonucleinase I (Amplifikationsgrad, 1 Unit/µl (U/µl); Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) wurde bei 37° C für 25 min mit 8 µl RNA-Wasser-Gemisch (davon 1 µg RNA, mit Ampuwa, Fresenius) und 1 µl 10x DNase I Reaktionspuffer (Invitrogen) inkubiert. Nach Inaktivierung der DNase I durch Ethylendiamin-Tetraacetacid (EDTA, 25 mM, pH 8,0; Invitrogen) bei 65° C für 10 min wurden 1 µl Oligo (dT)₁₈ (0,5 µg/ml, MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland) und 1 µl dNTP-Mix (je 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP bei pH 7,5, Qiagen) zum Starten der Polymerisierung hinzugefügt und 5 min inkubiert (65° C). Es folgte die Zugabe der Puffer für die reverse Transkription: 4 µl 5x-First-Strand Puffer (250 mM Tris-HCl, pH 8,3 bei Raumtemperatur, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂; Invitrogen) und 2 µl Dithiothreitol (DTT, 0,1 M; Invitrogen) 2 min, 42°C. Hinzugefügt wurde 1 µl Superscript II Reverse Transkriptase (200 U/µl; Invitrogen). Bei 42°C synthetisierte die RT für 50 min cDNA. Nach der Polymerisierung wurde die RT durch Erwärmung inaktiviert (70° C, 15 min). Das Reaktionsprodukt wurde bei -20°C aufbewahrt.

2.2.3 Amplifizierung der DNA durch PCR

Die Amplifizierung der cDNA mittels PCR erfolgte im Thermocycler (Eppendorf Mastercycler Personal, Hamburg, Deutschland). Es wurde ein Mastermix mit einem Gesamtvolumen von 24 µl hergestellt, dem 1 µl cDNA hinzugefügt wurde. Der Mastermix beinhaltete 18,125 µl H₂O (Ampuwa, Fresenius), 2 µl MgCl₂-Puffer (25 mM, Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland), 2,5 ml 10x-PCR-Puffer II (Applied Biosystems), 0,625 µl dNTP (Qiagen) sowie 0,625 µl Primer (200 pmol/µl, MWG) und

0,125 ml AmpliTaq Gold Polymerase (5 U/ μ l; Applied Biosystems, Branchburg, New Jersey, USA). Es wurden genspezifische Primerpaare benutzt. Die Probe mit dem Endvolumen von 25 μ l wurde im Thermocycler für 12 min auf 95° C erhitzt, um die DNA zu denaturieren. Der folgende Zyklus wurde 39 Mal wiederholt: Bei 95° C wurden die DNA-Doppelstränge nochmals für 45 s denaturiert. Bei genspezifischen Annealingtemperaturen von 57-61° C für 45 s hybridisierten die Primer mit ihrer spezifischen Zielstruktur der DNA-Einzelstränge, bei 72° C für 45 s folgte die Polymerisierung an der DNA-Matrize mit Nukleotiden durch die AmpliTaq Polymerase. Daran schloss sich für 7 min und gleicher Temperatur die finale Elongation der DNA-Stränge an. Nach 40 Zyklen wurde das PCR-Produkt auf 4°C heruntergekühlt. Eine RT-Negativkontrolle mit 1 μ l H₂O (Ampuwa, Fresenius) anstelle von cDNA wurde für jede PCR durchgeführt.

2.2.4 Primer

Die verwendeten Primer (Tab. 2, Tab. 3) wurden im Institut für Anatomie und Zellbiologie und im Labor für experimentelle Unfallchirurgie (Justus-Liebig-Universität Gießen) etabliert und dort bereits vielfach angewandt. Für das Primerdesign wurde zunächst aus der öffentlichen pubmed Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) die entsprechende Sequenz für das Zielgen herausgesucht. Mittels des Suchprogramms „Primer 3“ (<http://frodo.wi.mit.edu/>) wurden die Primer entworfen und anschließend auf ihre Genspezifität überprüft (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Alle Primer wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) hergestellt. Bei folgenden humanen und murinen Primerpaaren handelt es sich um Intron-spannende Primer: OCT1-OCT3, CHT1, ChAT, BChE (human); α 2, α 6, OCT1, OCT2, AChE (murin). Mit Intron-spannenden Primerpaaren sollte im Falle einer Kontamination mit genomischer DNA eine Amplifizierung dieser genomischen DNA verhindert werden. Um den Erfolg der cDNA-Synthese und der RNA-Isolierung nachzuweisen wurden Primer für das Haushaltsgen Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) bei allen cDNA-Proben benutzt. Für den Nachweis der Osteoblasten-artigen Aktivität der Zelllinie SAOS-2 sowie der nativen und osteogen differenzierten MC3T3-E1-Zellen wurden Primer für Osteopontin (OPN) benutzt.

Tab. 2: Humane Primer

Primer	Sequenz (5'-3')	Produktlänge (bp)	Annealingtemperatur (°C)	Genbankzugangsnummer
M ₁ R for Rev	ACGCTCTACTGGCGCATCTA GCCTTCGTCCTCTTCCTCTT	233	59	NM_000738
M ₂ R for Rev	CTCCAGCCATTCTCTTCTGG GCAACAGGCTCCTTCTTGTC	210	59	AF498916
M ₃ R for Rev	CGCTCCAACAGGAGGAAGTA GGAGTTGAGGATGGTGCTGT	236	59	AF498917
M ₄ R for Rev	GCCCACTAATGAAGCAGAGC ACTGCCTGAGCTGGACTCAT	160	57	NM_000741
M ₅ R for Rev	CCTGGCTGATCTCCTTCATC GTCCTTGGTTCGCTTCTCTG	217	59	NM_012125
α ₂ for rev	GTGGAGGAGGAGGACAGA CTTCTGCATGTGGGGTGATA	155	59	XM_027441
α ₃ for rev	CAGAGTCCAAAGGCTGCAAG AGAGAGGACAGCACAGCAT	148	57	M37981
α ₄ for rev	CTCACCGTCCTTCTGTGTC CTGGCTTCTCAGCTTCCAG	110	59	L35901
α ₅ for rev	CTTCACACGCTTCCCAA CTTCAACAACCTCACGGACA	186	59	NM_000745
α ₆ for rev	TCCATCGTGGTGACTGTGT AGGCCACCTCATCAGCAG	125	59	XM_056108
α ₇ for rev	GTACGCTGGTTTCCCTTTGA CCTAGGTCCCATCTCC	138	59	U40583
α ₉ for rev	GAAAGCAGCCAGGAACAAAG GCACTTGCGGATGTA CTCAA	156	57	NM_01758
α ₁₀ for rev	GATGTACAGCCTCCCGTT CACTCCACGTTCTCCACGAAG	137	60	AF199235
β ₂ for rev	GGCATGTACGAGGTGTCCTT CACCTCACTCTCAGCACCA	200	59	BC075041
β ₃ for rev	AATCGCCGAAAATGAAGATG TTGAGCCACACATTTGGTTGT	173	54	BC069788
β ₄ for rev	TCCCTGGTCCTTTTCTTCTT TGCAGCTTGATGGAGATGAG	160	57	BC096080
OCT1 for Rev	GACGCCGAGAACCTTGGG GGGTAGGCAAGTATGAGG	198	55	NM_003057
OCT2 for Rev	CTACAGTCCTCATAAATGCTGCAGC GCTGAAGGGAGGCGGGTAGAG	414	59	NM_153191
OCT3 for Rev	GGAGTTTCGCTCTGTTTCAGG GGAATGTGGACTGCCAAGTT	216	55	NM_021977
VChT for Rev	TACCCTACGGAGAGCGAAGA CTGTAGAGGCGAACATGACG	157	59	U10554
CHT1 for Rev	ATCCCAGCCATACTCATT CAGAAACTGCACCAAGACCA	168	59	AB043997
ChAT for Rev	ATCGCTGGTACGACAAGTCC ATCAGCTTCCTGCTGCTCTG	151	57	NM_020549
CarAT for Rev	CTAACCTCCAACCACCGAAA CCACCACCATGTAGCATCTG	187	57	X85983
AChE for Rev	CCTCCTTGGACGTGTACGAT AAACAGCGTCACTGATGTCG	217	57	M55040
BChE for rev	AGAATGGATGGGAGTGATGC AGGCCAGCTTGTGCTATTGT	180	57	NM_000055
OPN for rev	TCCTAGCAAGAGCCAAGAGG GCCATATGCCACACTGTAC	252	59	NM_001040058
GAPDH for rev	CGTCTTACCACCATGGAGA CGGCCATCACGCCACAGCTT	299	59	AF106860

Tab. 3: Murine Primer

Primer	Sequenz (5'-3')	Produktlänge (bp)	Annealingtemperatur (°C)	Genbankzugangsnnummer
M ₁ R for rev	CAGTCCCAACATCACCGTCTT GAGAACGAAGGAAACCAACCAC	441	60	NM_007698
M ₂ R for rev	TGTCTCCAGTCTAGTGCAAGG CATTCTGACCTGACGATCCAAC	368	60	NM_203491
M ₃ R for rev	GTACAACCTCGCCTTTGTTTCC GACAAGGATGTTGCCGATGATG	244	60	NM_033269
M ₄ R for rev	GCCTTCATCCTCACCTGGAC AGTGGCATTGCAGAGTGCAT	136	60	NM007699
M ₅ R for rev	CCATGGACTGTGGGAAGTCA CAGCGTCCCATGAGGATGTA	215	60	NM_205783
α ₂ for rev	CTCCCATCCTGCTTTCCAG GTTTGAACAGGCGGTCCTC	115	59	NM_144803
α ₃ for rev	CGCCTGTTCCAGTACCTGTT CAGAGGGTTTCCATTTCAGC	195	59	AF472588
α ₄ for rev	CTCAGATGTGGTCCTTGTC GGTGGGTGACTGCAAAGTTG	238	59	AF225912
α ₅ for rev	CCAGCTAATGACCACCAACG GCTGCGTCCAAGTGACAGT	217	59	AF204689
α ₆ for rev	CCTGCACTCCGGTTTATGTC CAGCCACAGATTGGTCTCCA	231	59	NM_021369
α ₇ for rev	ACAATACTTCGCCAGCACCA AAACCATGCACACCAGTTCA	144	59	AF225980
α ₉ for rev	CAATGCTCTGCGTCCAGTAG ACACCAGATCGCTGGGAATC	208	59	XM_132045
α ₁₀ for rev	TCTGCTCCTGCTCTTTCTCC CCACAGGTACAAGGTCAGCA	207	59	XM_890671
β ₂ for rev	CGAAGTGAAGATGATGACCAGA GTCCCAAAGACACAGACAAAGA	107	58	NM_009602
β ₃ for rev	CGATGGAACGGAGAGTAAGG AGAGGAAGATGCGGTC AAGA	217	59	AY574268
β ₄ for rev	CAGCCCATCCAACCTCTATG CTGACGCCCTCTAATGCTTC	164	59	AY574269
OCT1 for rev	GTAAGCTCTGCCTCCTGGTG GCTGTCTCTCCTGTAGCC	186	61	NM_009202
OCT2 for rev	TACCGGAGTCTCCAAGATGG GACCAAGTCCAGGAACGAAG	169	59	NM_013667
OCT3 for rev	CAGATATGGCAGGCTCATCA TCACGATCACGAAGCAAGTC	160	57	NM_011395
VChT for rev	TTGATCGCATGAGCTACGAC AGGTCCTCGGGATACTTGT	188	60	NM_021712
CHT1 for rev	CATCCTCAGCCACCTATGCT TGGATACCCGTAGGCAGTCT	133	60	AF276872
ChAT for rev	CCTGCCAGTCAACTCTAGCC TCAGGGCAGCCTCTCTGTAT	183	60	NM_009891
CarAT for rev	CTAACCTCCAACCACCGAAA CCACCACCATGTAGCATCTG	187	57	X85983
AChE for rev	ATGACCCTCGAGACTCCAAA TCCGCTCGTCCAGAGTAT	180	57	NM_009599
BChE for rev	ACACAGACCCACTTCCTCCT GTGCATAGGGGATACCGAGA	165	59	NM_009738
OPN for rev	GGATTCTGTGGACTCGGATG GACTCACCGCTCTTCATGTG	245	59	AF515708
GAPDH for rev	CGTCTTCACCACCATGGAGA CGGCCATCACGCCACAGCTT	299	59	AF106860

2.2.5 Gelelektrophorese

Die PCR-Produkte wurden mittels Gelelektrophorese in einem 1,25 %igen Agarosegel nach ihrer Größe aufgetrennt. Das Gel wurde aus 1,25 g Agarosepulver (Inno-Train Diagnostik, Kronberg/Taunus, Deutschland) und 100 ml Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer, 1x; für 50x: 242 g Tris Base (Merck, Darmstadt, Deutschland), 57,1 ml Essigsäure und 100 ml EDTA (0,5 M, pH 8,0, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) durch kochen hergestellt. Vor dem Auspolymerisieren wurde 1 µl Ethidiumbromid (1 %ig, Carl Roth) in das noch flüssige Gel eingerührt, das in den DNA-Fragmenten interkaliert und sie später durch Fluoreszenz unter UV-Licht sichtbar macht. Durch einen Ladepuffer konnte das Durchlaufen der Proben durch das Agarosegel verfolgt werden. Hierzu wurden 5 µl farbiger Ladepuffer 1 % Orange G (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) in 50 % Glycerol-H₂O-Gemisch mit je 50 mM Tris-HCl und EDTA, pH 8,0) mit 25 µl PCR-Produkt vermischt, bevor 12 µl dieser Probe in die Taschen des Gels pipettiert wurden. Bei einer angelegten Spannung von 140 Volt trennten sich die DNA-Fragmente der PCR-Produkte mit Ladepuffer nach ihrer Größe auf. Ein standardisierter DNA-Marker (100 bp DNA-Ladder, Invitrogen) galt als Markierung für die Länge der Basenpaare bei der Analyse der Ergebnisse. Unter UV-Licht wurde durch Fluoreszenz der Vergleich der DNA-Banden mit dem Marker in ihrer Höhe vorgenommen und ein digitales Bild gemacht.

2.3 Immunfärbungsverfahren

Indirekte Immunfluoreszenz an den MC3T3-E1 und SAOS-2-Zellen

Es wurden Kulturen von nativen MC3T3-E1-Zellen und SAOS-2-Zellen auf Objektträgern immunhistochemisch untersucht. Die Kulturen wurden mit dem jeweiligen Fixativ Aceton (20 min bei -20° C) oder Paraformaldehyd (20 min, Raumtemperatur) fixiert. Zum Blocken unspezifischer Proteinbindungen wurden die Proben mit 50 % Schweineserum vorbehandelt (1 h) und danach für 12-16 h mit dem primären Antiserum (Tab. 4) inkubiert. Nach dem Waschen mit PBS wurden die Proben für 1 h mit dem Sekundärantikörper beschichtet, anschließend gewaschen, mit Carbonat-gepuffertertem Glycerol (pH 8,6) eingedeckelt und bei 4° C dunkel gelagert. Der Sekundärantikörper war Kaninchen-IgG (Dianova, Hamburg, Deutschland) vom Wirtstier Esel, mit Cy3 konjugiert und wurde in 1:2000-facher Verdünnung verwendet. Die Auswertung der Immun-

reaktion sowie Dokumentation inklusive digitaler Kamera erfolgte mittels Epifluoreszenzmikroskop (Axioplan 2 imaging, Zeiss, Jena, Deutschland). Um die Spezifität der Antikörperbindung zu überprüfen wurde eine Präabsorption mit den korrespondierenden Peptiden in einer Konzentration von 10-100 µg/ml (1 h, Raumtemperatur) durchgeführt. Die entsprechenden Peptide stammten von derselben Firma wie die Antiseren.

Tab. 4: Charakteristika der Primärantikörper

Antigen und Aminosäuresequenz (AS)	Wirt	Verdünnung	Herkunft
α 3-nAChR-UE (AS 496-503)	Kaninchen, polyklonal	1:800-1:1600	DPC Biermann, Bad Nauheim, Deutschland
α 5-nAChR-UE (AS 460-468)	Kaninchen, polyklonal	1:800-1:1600	DPC Biermann

3 Ergebnisse

Expression der molekularen Komponenten des cholinergen Systems in humanen und murinen osteoblastären Zellen

3.1 Nachweis der Genexpression mittels qualitativer RT-PCR

3.1.1 Acetylcholin-Bildungsenzyme

Das Synthesenzym ChAT wurde weder in humanen noch in murinen Zellen nachgewiesen. Als Positivkontrolle wurde in humaner Plazenta eine einzelne Bande nachgewiesen, sowie eine Bande in murinen NS20Y. CarAT-mRNA wurde bei beiden Zelllinien gefunden, die Positivkontrolle lieferte saubere Banden in SH-SY5Y und NS20Y-Zellen. Die Transkripte des Haushaltgens GAPDH wurde in SAOS-2-Zellen, nativen und differenzierten MC3T3-E1-Zellen detektiert (Abb. 11, Abb. 12).

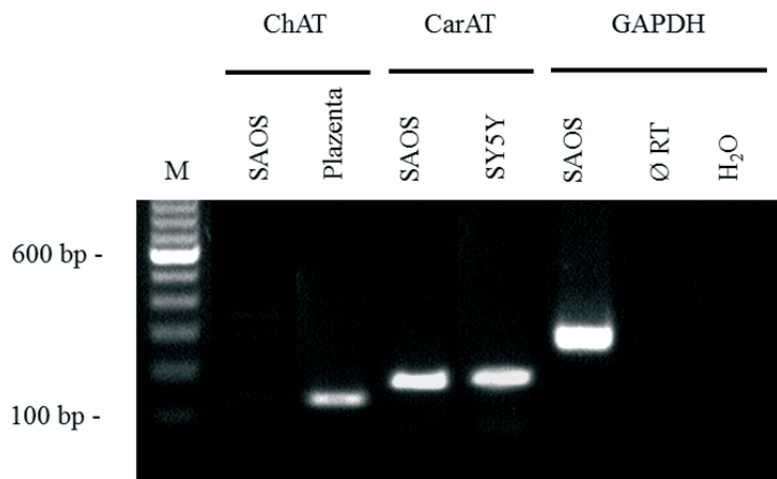


Abb. 11: Agarosegel der RT-PCR-Produkte zum Nachweis der ACh-Syntheseenzyme in humanen SAOS-2-Zellen.

CarAT-mRNA wurde in humanen SAOS-2 und SH-SY5Y detektiert, wobei ChAT nur in der Positivkontrolle nachgewiesen wurde. Das Haushaltgen GAPDH wurde in SAOS-2 detektiert. Positivkontrollen: humanes Plazentagewebe und neuronale SH-SY5Y-Zellen. Negativkontrollen: Ø RT = cDNA-Synthese ohne reverse Transkriptase, H₂O = Wasserkontrolle, RT-PCR ohne Template. M = DNA-Marker.

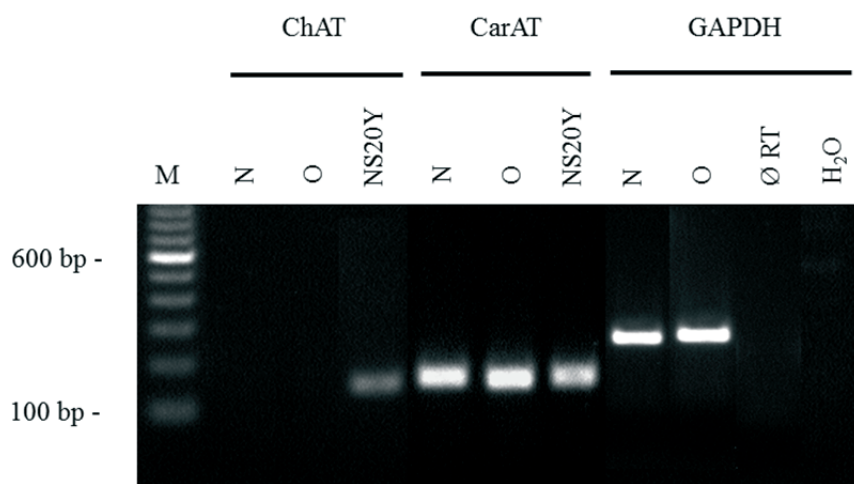


Abb. 12: Agarosegel der RT-PCR-Produkte zum Nachweis der ACh-Synthesenzyme in murinen nativen und differenzierten MC3T3-E1-Zellen.

In nativen und differenzierten MC3T3-E1-Zellen wurde keine ChAT-mRNA nachgewiesen, wobei sich eine einzelne Bande für CarAT-mRNA darstellte. Das Haushaltsgen GAPDH in murinen MC3T3-E1-Zellen war nachweisbar. N = Native MC3T3-E1, O = Osteogen differenzierte MC3T3-E1. Positivkontrollen: neuronale NS20Y-Zellen. Negativkontrollen: Ø RT = cDNA-Synthese ohne reverse Transkriptase, H₂O = Wasserkontrolle, RT-PCR ohne Template. M = DNA-Marker.

3.1.2 Acetylcholin-Transporter

Von der Gruppe der ACh-Transporter war in humanen und murinen Zellen keine mRNA von CHT1, VAcHT und OCT3 detektierbar. Als Positivkontrollen für die humanen Zellen wurden in SH-SY5Y PCR-Produkte für CHT1 und VAcHT nachgewiesen, sowie in Haut für OCT3. Für die murinen Zellen diente Rückenmark der Maus als Positivkontrolle für CHT1, NS20Y für VAcHT und ebenfalls Haut für OCT3.

In humanen SAOS-2 und murinen osteogen differenzierten MC3T3-E1 wurde OCT1-mRNA nachgewiesen. Banden der Positivkontrollen zeigten sich bei humaner und muriner Haut. OCT2-mRNA fand sich bei nativen und differenzierten MC3T3-E1, sowie bei der Positivkontrolle in murinem Nierengewebe und in humaner Plazenta (Abb. 13, Abb. 14).

Ergebnisse

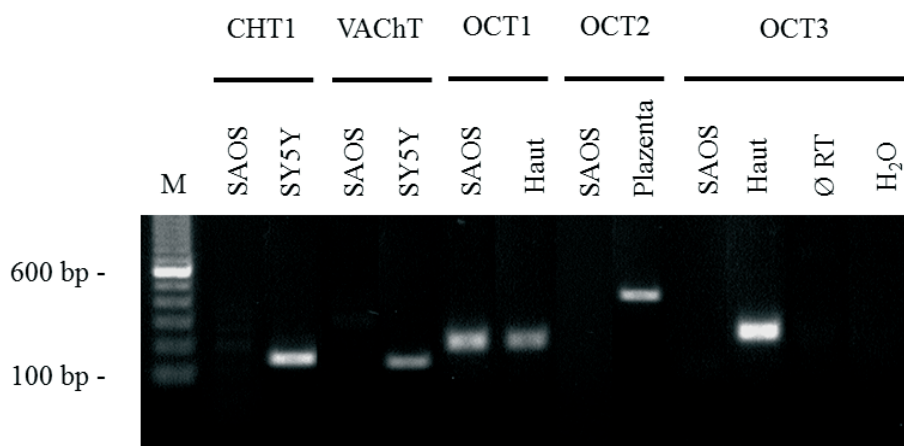


Abb. 13: Gel der RT-PCR zum Nachweis der ACh-Transporter in humanen SAOS-2-Zellen.

In SAOS-2-Zellen wurde nur OCT1-mRNA gefunden, während keine mRNA von CHT1, VACHT, OCT2 und OCT3 detektiert wurde. Positivkontrollen: neuronale SH-SY5Y-Zellen, humanes Haut- und Plazentagewebe. Negativkontrollen: Ø RT = cDNA-Synthese ohne reverse Transkriptase, H₂O = Wasserkontrolle, RT-PCR ohne Template. M = DNA-Marker.

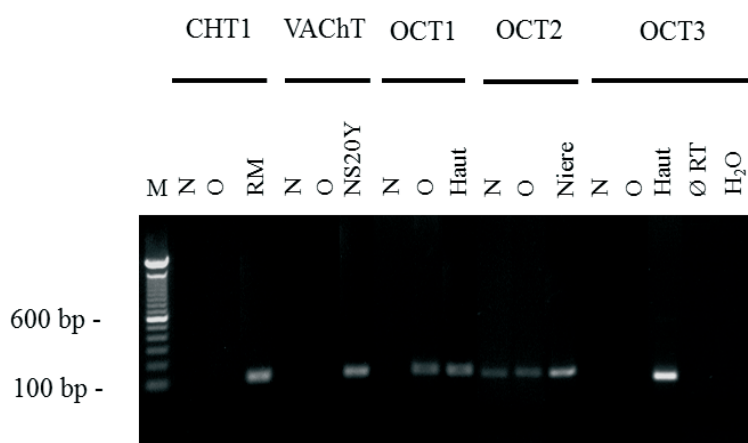


Abb. 14: Gel der RT-PCR zum Nachweis der ACh-Transporter in MC3T3-E1-Zellen.

OCT1-mRNA wurde in murinen differenzierten MC3T3-E1-Zellen detektiert, OCT2 wurde in nativen und differenzierten Zellen nachgewiesen. CHT1, VACHT und OCT3 war nur in den Positivkontrollen exprimiert. N = Native MC3T3-E1, O = Osteogen differenzierte MC3T3-E1. Positivkontrollen: neuronale NS20Y-Zellen, murines Gewebe von Rückenmark (RM), Haut und Niere. Negativkontrollen: Ø RT = cDNA-Synthese ohne reverse Transkriptase, H₂O = Wasserkontrolle, RT-PCR ohne Template. M = DNA-Marker.

3.1.3 Muskarinische Acetylcholinrezeptoren

Transkripte von M₁R und M₄R wurde nur in murinen Zellen gezeigt und M₃R nur in humanen Zellen. M₂R - und M₅R -mRNA wurde in beiden Zelllinien nachgewiesen. In beiden Zelllinien mit einer Dominanz von M₂R. In SAOS-2 Zellen war M₂R -mRNA

nicht in allen Passagen nachweisbar, genauso wie sich bei MC3T3-E1-Zellen nicht in allen Passagen M₅R -Transkripte fanden (Abb. 15, Abb. 16). Als Positivkontrollen zeigten sich Banden für alle mAChR in humanen SH-SY5Y, für M₁R-M₄R in murinen NS20Y und für M₅R in murinem Hirngewebe.

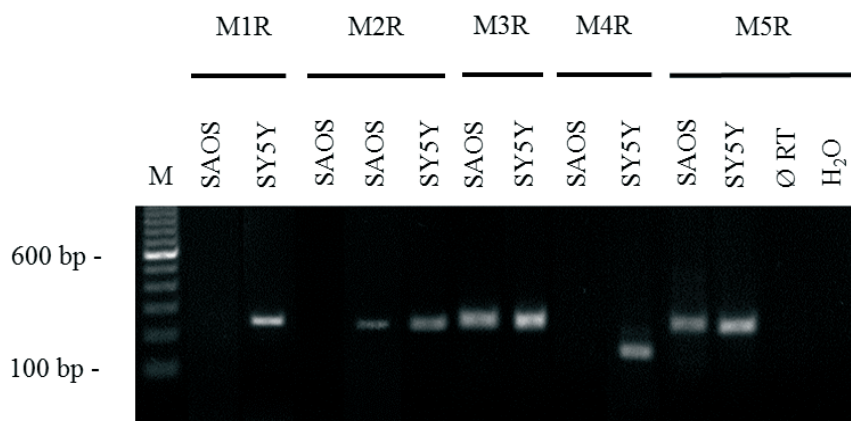


Abb. 15: Gel der RT-PCR zum Nachweis der mAChR in SAOS-2-Zellen.

M₁R und M₄R wurden in humanen SAOS-2-Zellen nicht exprimiert, hingegen fand sich mRNA für M₃R und M₅R. Nur in zwei von fünf Proben wurde eine Bande für M₂R beobachtet. Positivkontrollen: neuronale SH-SY5Y-Zellen. Negativkontrollen: Ø RT = cDNA-Synthese ohne reverse Transkriptase, H₂O = Wasserkontrolle, RT-PCR ohne Template. M = DNA-Marker.

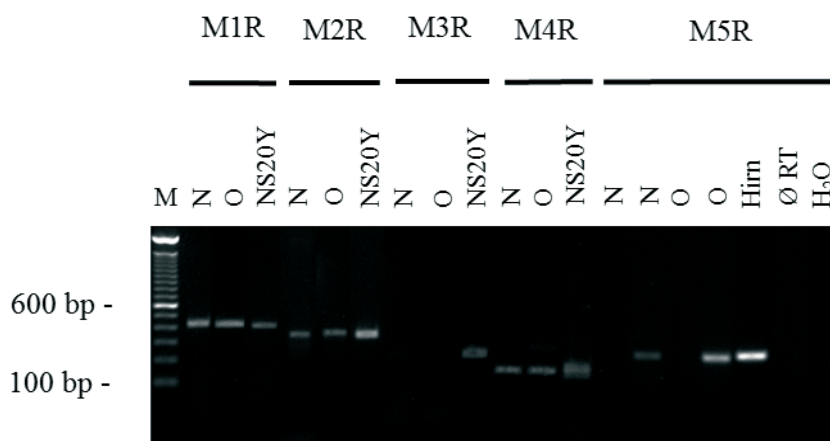


Abb. 16: Gel der RT-PCR zum Nachweis der mAChR in MC3T3-E1-Zellen.

Starke Banden fanden sich für M₁R, Banden von geringerer Intensität zeigten sich für M₂R und M₄R in nativen und differenzierten murinen MC3T3-E1-Zellen. M₃R wurde nicht nachgewiesen. M₅R-Transkripte wurden in drei von fünf nativen Zellproben und in zwei von fünf differenzierten Proben detektiert. N = Native MC3T3-E1, O = Osteogen differenzierte MC3T3-E1. Positivkontrollen: neuronale NS20Y-Zellen, murines Hirngewebe. Negativkontrollen: Ø RT = cDNA-Synthese ohne reverse Transkriptase, H₂O = Wasserkontrolle, RT-PCR ohne Template. M = DNA-Marker.

3.1.4 Nikotinische Acetylcholinrezeptoren

Die nAChR-UE $\alpha 5$, $\alpha 9$, $\alpha 10$ und $\beta 2$ wurden in allen analysierten Zelltypen exprimiert (Abb. 17 bis Abb. 21), wobei $\alpha 9$ und $\alpha 10$ nicht in allen Passagen der MC3T3 beobachtet werden konnten. Die $\alpha 2$ - und $\beta 4$ -UE kamen nur in MC3T3-E1-Zellen vor und $\alpha 7$ nur in SAOS-2. Die mRNA der $\alpha 3$ -UE fand sich in humanen und nativen murinen Zellen, $\beta 3$ in humanen und osteogen differenzierten murinen Zellen. In beiden untersuchten Zelllinien wurden weder Transkripte für $\alpha 4$ noch für $\alpha 6$ detektiert. Für die humanen Zellen dienten als Positivkontrollen: Gewebe der Arteria cerebri media (ACM) für $\alpha 2$, $\alpha 4$, $\alpha 6$ und $\beta 3$, SH-SY5Y für $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 7$, $\beta 2$, $\beta 4$ und Haut für $\alpha 9$ und $\alpha 10$. NS20Y lieferten als murine Positivkontrolle Banden für $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\beta 2$, $\beta 4$, Gehirn für $\alpha 6$, $\alpha 7$, $\beta 3$ und Haut für $\alpha 9$ und $\alpha 10$.

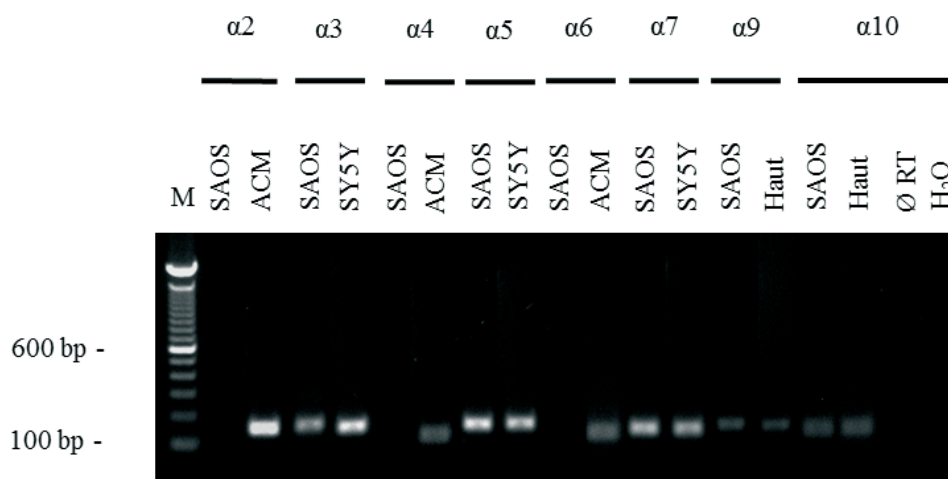


Abb. 17: Gel der RT-PCR zum Nachweis der nAChR-UE $\alpha 2$ bis $\alpha 10$ in SAOS-2-Zellen.

Humane SAOS-2-Zellen exprimierten die nAChR-UE $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 7$, $\alpha 9$ und $\alpha 10$. Positivkontrollen: neuronale SH-SY5Y-Zellen, Gewebe von ACM, Haut, Hirn. Negativkontrollen: \emptyset RT = cDNA-Synthese ohne reverse Transkriptase, H_2O = Wasserkontrolle, RT-PCR ohne Template. M = DNA-Marker.

Ergebnisse

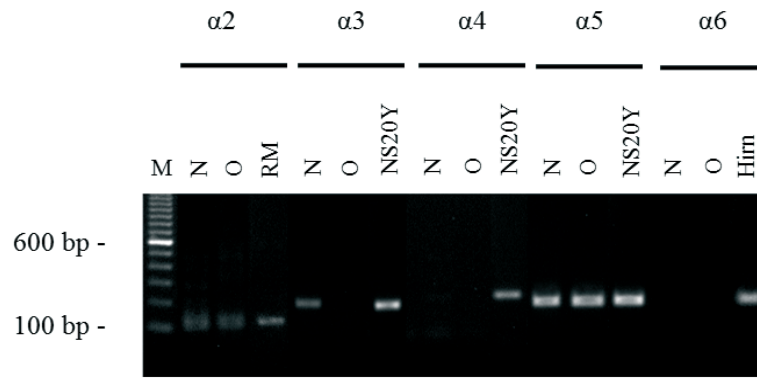


Abb. 18: Gel der RT-PCR zum Nachweis der nAChR-UE $\alpha 2$ bis $\alpha 6$ in MC3T3-E1-Zellen.

In nativen MC3T3-E1-Zellen wurden die nAChR-UE $\alpha 2$, $\alpha 3$ und $\alpha 5$ exprimiert. Osteogen differenzierte MC3T3-E1-Zellen zeigten nur Banden für $\alpha 2$ und $\alpha 5$. N = Native MC3T3-E1, O = Osteogen differenzierte MC3T3-E1. Positivkontrollen: neuronale NS20Y-Zellen, murines Gewebe von Rückenmark und Hirn. M = DNA-Marker.

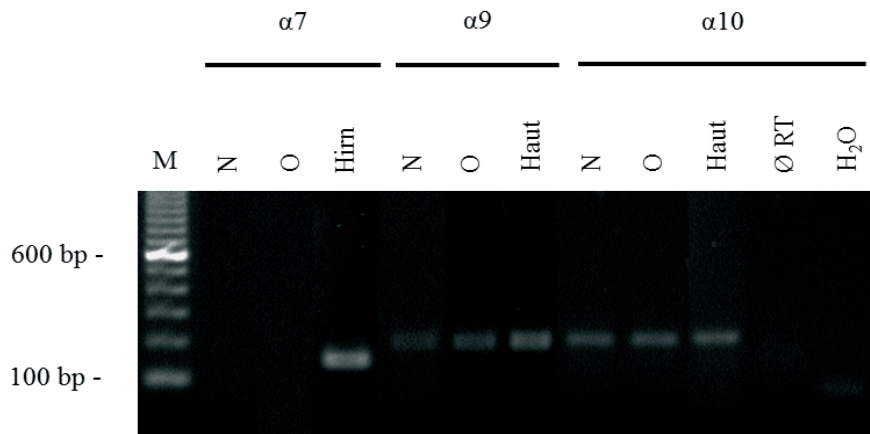


Abb. 19: Gel der RT-PCR zum Nachweis der nAChR-UE $\alpha 7$ - $\alpha 10$ in MC3T3-E1-Zellen.

In murinen MC3T3-E1-Zellen waren Banden schwacher Intensität für $\alpha 9$ und $\alpha 10$ nachweisbar. N = Native MC3T3-E1, O = Osteogen differenzierte MC3T3-E1. Positivkontrollen: neuronale NS20Y-Zellen, murines Gewebe von Hirn und Haut. Negativkontrollen: Ø RT = cDNA-Synthese ohne reverse Transkriptase, H₂O = Wasserkontrolle, RT-PCR ohne Template. M = DNA-Marker.

Ergebnisse

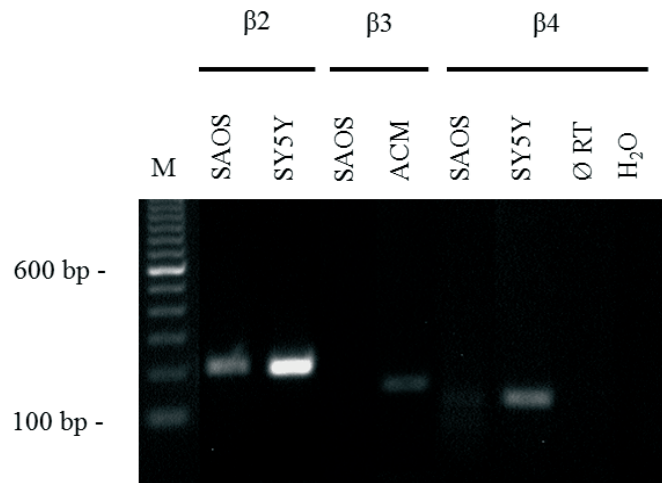


Abb. 20: Gel der RT-PCR zum Nachweis der nAChR-UE $\beta 2$ - $\beta 4$ in SAOS-2-Zellen.

In humanen SAOS-2-Zellen war nur $\beta 2$ -mRNA detektierbar. Positivkontrollen: neuronale SH-SY5Y-Zellen, Gewebe der ACM. Negativkontrollen: \emptyset RT = cDNA-Synthese ohne reverse Transkriptase, H₂O = Wasserkontrolle, RT-PCR ohne Template. M = DNA-Marker.

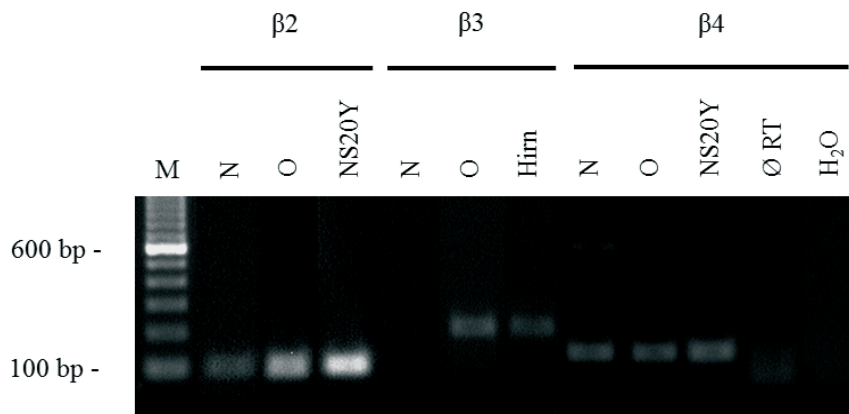


Abb. 21: Gel der RT-PCR zum Nachweis der nAChR-UE $\beta 2$ - $\beta 4$ in MC3T3-E1-Zellen.

Die nAChR-UE $\beta 2$ und $\beta 4$ wurde in nativen und differenzierten murinen MC3T3-E1-Zellen beobachtet, während $\beta 3$ nur von den osteogen differenzierten Zellen exprimiert wurde. N = Native MC3T3-E1, O = Osteogen differenzierte MC3T3-E1. Positivkontrollen: neuronale NS20Y-Zellen, murines Hirngewebe. Negativkontrollen: \emptyset RT = cDNA-Synthese ohne reverse Transkriptase, H₂O = Wasserkontrolle, RT-PCR ohne Template. M = DNA-Marker.

3.1.5 Acetylcholin-Abbauenzyme

Beide Degradationsenzyme, AChE und BChE, waren in nativen und osteogen differenzierten MC3T3-E1-Zellen nachweisbar, während in SAOS-2 nur BChE-mRNA exprimiert wurde (Abb. 22, Abb. 23). Als humane Positivkontrolle lieferten SH-SY5Y Banden für AChE und BChE. Murine NS20Y-Zellen dienten als Positivkontrolle für AChE und murine Leber für BChE.

3.1.6 Knochenmarker Osteopontin

Die mRNA des Knochenmarkers OPN wurde in SAOS-2-Zellen nachgewiesen, wobei humanes Knochengewebe als Positivkontrolle diente. Ebenso wurden Transkripte für OPN in nativen und osteogen differenzierten MC3T3-E1 detektiert (Abb. 22, Abb. 23).

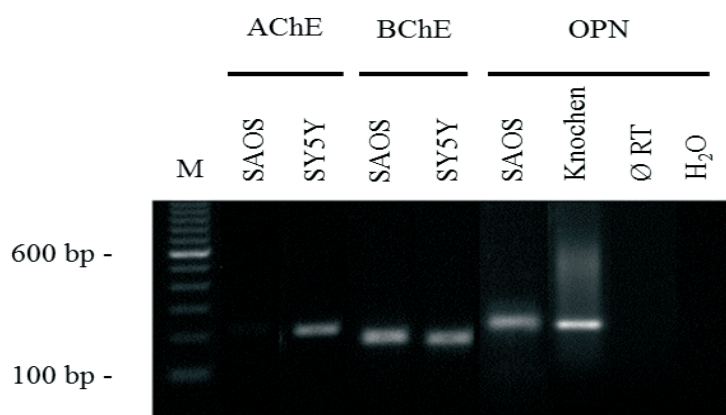


Abb. 22: Gel der RT-PCR zum Nachweis der ACh-Abbauenzyme in SAOS-2-Zellen.

In humanen SAOS-2-Zellen wurden nur Transkripte für BChE gefunden, sowie für den Knochenmarker OPN. Positivkontrollen: neuronale SH-SY5Y-Zellen, humanes Knochengewebe. Negativkontrollen: Ø RT = cDNA-Synthese ohne reverse Transkriptase, H₂O = Wasserkontrolle, RT-PCR ohne Template. M = DNA-Marker.

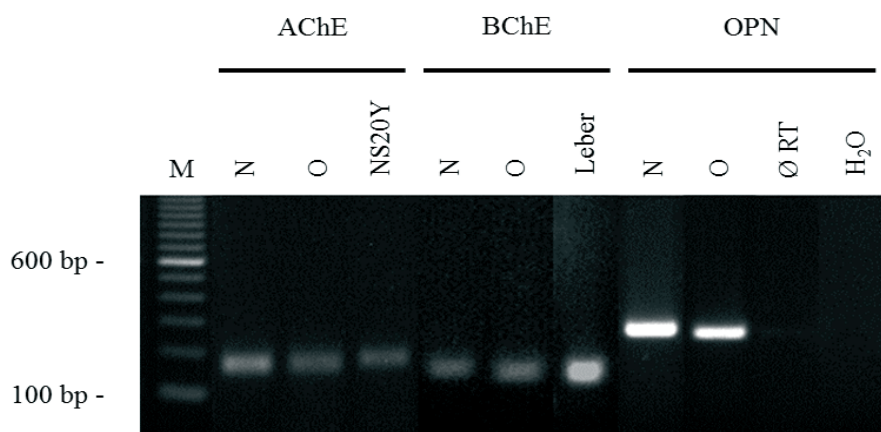


Abb. 23: Gel der RT-PCR zum Nachweis der ACh-Abbauenzyme in MC3T3-E1-Zellen.

Alle murinen MC3T3-E1-Zellen exprimierten die Abbauenzyme AChE und BChE, sowie den Knochenmarker OPN. N = Native MC3T3-E1, O = Osteogen differenzierte MC3T3-E1. Positivkontrollen: neuronale NS20Y-Zellen, murine Leber. Negativkontrollen: Ø RT = cDNA-Synthese ohne reverse Transkriptase, H₂O = Wasserkontrolle, RT-PCR ohne Template. M = DNA-Marker.

Ergebnisse

Tab. 5: Übersicht der PCR-Ergebnisse: ACh-Syntheseenzyme und Transporter.

Syntheseenzyme Transporter	SAOS-2	MC3T3-E1 nativ	MC3T3-E1 osteogen
ChAT	-	-	-
CarAT	+	+	+
CHT1	-	-	-
VAcHT	-	-	-
OCT1	+	-	+
OCT2	-	+	+
OCT3	-	-	-

Tab. 6: Übersicht der PCR-Ergebnisse: muskarinische Acetylcholinrezeptoren.

mAChR	SAOS-2	MC3T3-E1 nativ	MC3T3-E1 osteogen
M ₁ R	-	+	+
M ₂ R	(+)	+	+
M ₃ R	+	-	-
M ₄ R	-	+	+
M ₅ R	+	(+)	(+)

Tab. 7: Übersicht der PCR-Ergebnisse: nikotinische Acetylcholinrezeptoren

nAChR	SAOS-2	MC3T3-E1 nativ	MC3T3-E1 osteogen
α 2	-	+	+
α 3	+	+	-
α 4	-	-	-
α 5	+	+	+
α 6	-	-	-
α 7	+	-	-
α 9	+	+	+
α 10	+	+	+
β 2	+	+	+
β 3	-	-	+
β 4	-	+	+

Tab. 8: Übersicht der PCR-Ergebnisse: ACh-Abbauenzyme, Haushaltsgen und Knochenmarker.

Abbauenzyme Haushaltsgen Knochenmarker	SAOS-2	MC3T3-E1 nativ	MC3T3-E1 osteogen
AChE	-	+	+
BChE	+	+	+
GAPDH	+	+	+
OPN	+	+	+

3.2 Nachweis und Lokalisation von $\alpha 3$ und $\alpha 5$ mittels Immunfluoreszenz

In kultivierten SAOS-2 (n=2) und nativen MC3T3-E1 (n=2) wurde für die nAChR-UE $\alpha 3$ und $\alpha 5$ Immunreaktivität nachgewiesen. Starke Bindungsintensität wurde in der Region um den Zellkern beobachtet und in kleinen kugelförmigen Zellen. Durch Präabsorptionskontrollen mit den korrespondierenden Peptiden wurde die Spezifität der Bindung nachgewiesen (Abb. 24).

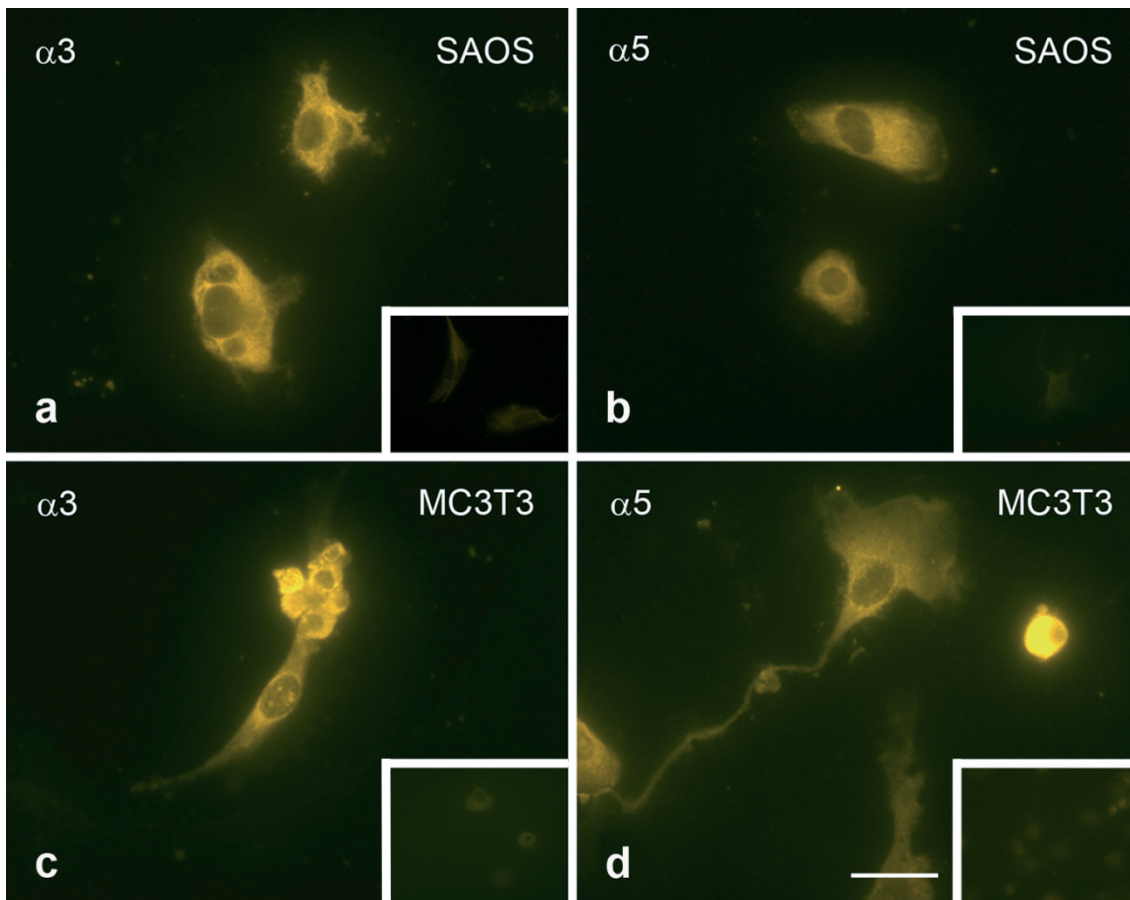


Abb. 24: Immunfluoreszenz für $\alpha 3$ und $\alpha 5$ -UE des nAChR in vitro in SAOS-2- und nativen MC3T3-E1-Zellen.

- a-d: Immunreaktivität war im Zytoplasma von kultivierten SAOS-2- und nativen MC3T3-E1-Zellen nachweisbar, jeweils mit Präabsorptionskontrollen.
- c, d: Starke Bindungsintensität zeigte sich perinukleär und in kleinen sphärischen Zellen
Maßstab: 20 μ m

4 Diskussion

Das non-neuronale cholinerge System in osteoblastären Zellen der Maus und des Menschen

Das Ziel dieser Arbeit ist der Nachweis und die Charakterisierung des non-neuronalen cholinergen Systems in osteoblastären Zellen der Maus und des Menschen. Gegenstand der Experimente waren die murine osteoblastäre Zelllinie MC3T3-E1 und die humane Osteosarkomzelllinie SAOS-2. Die murinen Zellen wurden in zwei Entwicklungsstadien untersucht, zuerst als undifferenzierte Präosteoblasten und nach Applikation eines osteogenen Mediums als differenzierte Osteoblasten. Anhand der qualitativen Methode der RT-PCR wurden alle Zellen auf die Expression der molekularen Komponenten des cholinergen Systems untersucht. Die Lokalisation ausgewählter α -UE der nAChR wurde speziesübergreifend an den Zellen sichtbar gemacht.

Bis zu dem Zeitpunkt der Publikation dieser Arbeit (En-Nosse et al. 2009) war eine systematische Charakterisierung des cholinergen Systems in Osteoblasten oder osteoblastären Zellen noch nicht erfolgt. Es existierten nur spärliche Daten über das Vorkommen einiger Komponenten des cholinergen Systems im Knochen. Hingegen lieferten experimentelle Studien an Zellen und Tiermodellen sowie klinische Studien Hinweise für die Existenz eines endogenen non-neuronalen Systems im Knochen: der cholinerge Rezeptoragonist Nikotin hat nachweislich einen Effekt auf den Knochenstoffwechsel. Auf zellulärer Ebene beeinträchtigen hohe Nikotin die Zellaktivität von Osteoblasten negativ (Rothen et al. 2009). Zigarettenrauch, der zu großem Teil Nikotin enthält (Walker et al. 2001), gilt als wesentlicher Risikofaktor für postmenopausale Osteoporose (Ní Chróinín et al. 2013). Erhöhte Raten von Pseudarthrosen wurden bei Rauchern festgestellt (Hernigou et al. 2013). Ergebnisse aus Studien über die Funktion des Abbauenzym AChE in Osteogenese und Zell-Matrix-Interaktion geben weitere Anhaltspunkte für die Existenz des cholinergen Systems im Knochen. AChE scheint sowohl die Osteoblastogenese zu regulieren, als auch an der Adhäsion von Osteoblasten an die Extrazellulärmatrix beteiligt zu sein (Genever et al. 1999; Grisaru et al. 1999; Inkson et al. 2004).

Vor diesem Hintergrund wurde in der vorliegenden Arbeit die Expression des gesamten non-neuronalen cholinergen Systems mit den molekularen Komponenten für Synthese, Freisetzung, Recycling und Signalrezeption von ACh in der murinen osteoblastären

Zelllinie MC3T3-E1 und in der humanen Osteosarkomzelllinie SAOS-2 mittels RT-PCR und Immunhistochemie untersucht.

4.1 Auswahl der Zelllinien

Die murine Zelllinie MC3T3-E1 wurde auf Grund ihrer osteoblastären Eigenschaften von Czekanska et al. als adäquates Modellobjekt für in vitro Untersuchungen zu *bone remodeling* charakterisiert (Czekanska et al. 2012). 1983 wurde erstmals die Differenzierung von MC3T3-E1-Zellen zu Osteoblasten und die Bildung von kalzifiziertem Knochengewebe in vitro beschrieben (Sudo et al. 1983). Unter der Wirkung von Ascorbinsäure mineralisieren MC3T3-E1-Subklone kollagene Extrazellulärmatrix in vitro und in vivo und exprimieren mRNA für Osteoblastenmarker wie *Bone Sialoprotein*, OCN und *Parathyroid Hormone-Related Protein* (PTHrP)-Rezeptor (Wang et al. 1999). Dexamethason bewirkt eine hohe Kalzifizierung bei Zugabe von β -Glycerolphosphat sowie eine gesteigerte Aktivität der ALP (Miyahara et al. 1991). Diese ist die Voraussetzung für die Expression des Osteoblastenmarkers OPN (Beck et al. 1998). In der vorliegenden Arbeit wurde OPN als Marker der osteoblastären Eigenschaften sowohl bei den murinen, als auch bei den humanen untersuchten Zellen bestimmt (Abb. 22, Abb. 23). Native und osteogen differenzierte MC3T3-E1-Zellen und SAOS-2-Zellen zeigten jeweils deutliche Banden für OPN.

Zur Induktion der osteogenen Differenzierung der MC3T3-E1-Zellen wurde das Protokoll von Wenisch et al. (2005) angewendet: DMEM-Medium mit 10 % FKS, 0,1 μ M Dexamethason, 10 mM β -Glycerolphosphat und 0,05 mM Ascorbinsäure-2-Phosphat. Ohne Zusatz von Ascorbinsäure-2-phosphat und β -Glycerolphosphat bleibt durch niedrige ALP-Aktivität eine Mineralisierung aus (Hong et al. 2010). Auch Yohay et al. (1994) beschrieben den positiven Effekt von FKS auf Proliferation und Differenzierung der MC3T3-E1-Zellen. Mit dem oben genannten Kulturprotokoll konnten Wenisch et al. (2005) eine osteogene Differenzierung von MSC aus humanem Knochenbohrmehl erzielen. Knochenbohrmehl entsteht bei chirurgischen Interventionen an Röhrenknochen, z.B. beim Fräsen vor einer Marknagelung. Kontroverse Ansichten über die Zusammensetzung und Effekte auf Frakturheilung existieren. Wenisch et al. (2005) zeigten, dass humanes Knochenbohrmehl eine Quelle multipotenter Stammzellen ist, die in vitro proliferieren und unter entsprechenden Stimuli osteogen oder sogar neuronal differenzieren können.

Die Differenzierung der MC3T3-E1-Zellen zu reifen Osteoblasten ist neben den oben genannten Faktoren zeitabhängig. So wurde von Quarles et al. (1992) nach den ersten neun Tagen Wachstum eine Änderung der Zellform von fusiform zu kuboid beschrieben, die mit Produktion von Extrazellulärmatrix und Aktivität alkalischer Phosphatase einherging. Die Mineralisierung wurde nach ca. 16 Tagen beobachtet (Quarles et al. 1992). Die verschiedenen Stadien der Replikation, Differenzierung und Mineralisierung werden von den MC3T3-E1-Zellen in analoger Weise zur in vivo Knochenbildung durchlaufen: anfangs proliferieren die Osteoblastenprogenitorzellen, danach folgt die Differenzierung der Osteoblastenvorläuferzellen zu postmitotisch matrixproduzierenden Osteoblasten, woran sich die finale Mineralisierung des Osteoids anschließt (Quarles et al. 1992).

Wir beobachteten in unseren Versuchen nach drei Tagen eine starke Proliferation der Zellen mit nahezu konfluentem Wachstum und spindelförmiger Morphologie (Abb. 7). Nach 19 Tagen sahen wir vorherrschend eine kuboide Zellform mit Vergrößerung der interzellulären Räume (Abb. 8). Partiiell bildeten sich „nestförmige“ Formationen der reifen Zellen, die mineralisierte Knochenmatrix bildeten (Abb. 9).

2010 bestätigten Hong et al. die Klassifizierung der Reifestadien der MC3T3-E1-Zellen von Quarles et al. und ergänzten die Charakterisierung um die Aktivität der ALP. Im ersten Stadium fand sich weder ALP-Aktivität, noch Mineralisierung (Hong et al. 2010). Im zweiten Stadium, die Transformationsphase der Osteoblastendifferenzierung, zeigte sich nur eine gesteigerte ALP-Aktivität. Im dritten Stadium stellten Hong et al. eine hohe ALP-Aktivität und Mineralisierung der Extrazellulärmatrix fest. In hohen Passagen (über 36) wurde eine abnehmende Proliferation beobachtet und bei sehr hohen Passagen zeigten MC3T3-E1-Zellen einen instabilen Zellzyklus (Hong et al. 2010). Dieses Phänomen ähnelt humanen Zellen und könnte auf Zellerterung hinweisen (Gri-goriadis et al. 1988) und macht die MC3T3-E1-Zellen daher zu einem attraktiven Modell für in vitro Studien (Czekanska et al. 2012).

Auch die humane Osteosarkomzelllinie SAOS-2 wurde angesichts ihrer osteoblastären Eigenschaften als besonders geeignetes Modell für Studien zu Osteoblasten bezeichnet (Rodan et al. 1987). Als Hauptmerkmal der Osteoblasten-artigen Eigenschaften gilt auch hier die Produktion einer mineralisierten Matrix, die Rodan et al. (1987) als Geflechtknochen identifizierten. SAOS-2-Zellen weisen eine hohe Aktivität der ALP auf. Verglichen mit primären Osteoblasten war die ALP-Aktivität initial gleich, steigerte

sich aber um das 120-fache nach 14 Tagen Kultivierung unter gleichen Bedingungen (Saldaña et al. 2011).

Das Expressionsprofil von Zytokinen, Wachstumsfaktoren, deren Rezeptoren und Knochenmatrixproteinen korreliert in hohem Maße mit dem Expressionsmuster von humanen primären Osteoblasten (Bilbe et al. 1996). SAOS-2 exprimieren PTH-Rezeptoren, Vitamin D₃-Rezeptoren und Osteonektin (Rao et al. 1996). Bei der Untersuchung der von SAOS-2-Zellen produzierten EZM zeigte sich eine Kollagenstruktur ähnlich dem humanen Knochengewebe (Fernandes et al. 2007): sie enthält Kollagen Typ I und Typ V, sowie etwas weniger Kollagen Typ XI. Die Kultivierung der SAOS-2-Zellen mit Dexamethason steigert die Expression der ALP und die Aktivität der PTH-stimulierten Adenylatzyklase (Rao et al. 1996). Der externe Phosphatdonor β -Glycerolphosphat fördert die Mineralisierung der EZM (Ahmad et al. 1999).

Bei dieser Grundlagenarbeit wurden die Untersuchungen auf Zelllinien begrenzt, die auf Grund ihrer osteoblastären Eigenschaften sorgfältig ausgewählt wurden. Selbstverständlich sind die Ergebnisse dieser Arbeit nur begrenzt repräsentativ, da es sich um Zelllinien handelt, die sich in ihrem Zellzyklus von Primärzellen und intaktem Gewebe unterscheiden. Primärzellen sind in ihrer klinischen Anwendbarkeit attraktiver, da sie das Zellverhalten in vivo besser widerspiegeln. Zelllinien sind hingegen unbegrenzt verfügbar, ohne zeitaufwendige Isolation und ohne notwendige ethische Zulassung (Czekanska et al. 2012).

Um eine Spezies-übergreifende Aussage treffen zu können und die Relevanz für den menschlichen Knochenstoffwechsel und seine Pathologien herzustellen, wurde eine humane Osteosarkomzelllinie ausgewählt. Maligne Zelllinien weisen ein unphysiologisches Zellwachstum auf, da die Mechanismen der Kontakthemmung und viele andere mit der Zellteilung verbundene Prozesse gestört sind. Dennoch ist der Gebrauch von diesen Zelllinien weit verbreitet (Czekanska et al 2012).

Insgesamt erwiesen sich die murine Zelllinie MC3T3-E1 und die humane Zelllinie SAOS-2 für unsere Versuche als passende in vitro Modelle für osteoblastäre Zellen.

Weitere Experimente an humanen Primärzellen und Gewebe sowie in vivo-Studien sollten folgen, um Unterschiede im cholinergen Expressionsprofil zwischen Osteosarkomzellen, primären mesenchymalen Zellen und Osteoblasten darzustellen.

4.2 Synthese- und Freisetzungsapparat von Acetylcholin

Viele non-neuronale Zellen exprimieren die Cholinacetyltransferase ChAT, das typische Bildungsenzym für Acetylcholin: Epithelzellen der Atemwege, des Magendarmtraktes, der Haut, der Plazenta, Urothel, Endothelzellen und Immunzellen (Wessler et al. 2008). Auch α -Zellen der Langerhansinseln des Pankreas zeigen eine starke Immunreaktivität für ChAT (Rodriguez-Diaz et al. 2011). ACh fungiert hier als parakrines Signal für β -Zellen und hat Einfluss auf den Insulinspiegel (Rodriguez-Diaz et al. 2011). In Kardiomyozyten der Ratte wurde ebenfalls eine ChAT-Expression nachgewiesen (Rana et al. 2010). Auch andere Zellen mesenchymalen Ursprungs zeigen eine positive anti-ChAT-Immunreaktivität oder messbare intrazelluläre ACh-Konzentration mittels *High Pressure Liquid Chromatography* (HPLC): Adipozyten, glatte Muskelzellen und Tendozyten (Wessler et al. 2008). Kürzlich konnte eine positive ChAT-Immunreaktivität in Tendozyten aus der Plantarsehne von Patienten mit Achillessehnentendinopathie gezeigt werden (Spang et al. 2013). Allerdings erfolgte bisher weder der direkte Nachweis von ACh in Osteoblasten mittels HPLC noch der indirekte Nachweis durch die Expression der ChAT.

In den hier untersuchten osteoblastären Zelllinien SAOS-2 und MC3T3-E1 war ChAT mittels RT-PCR nicht nachweisbar. Ob die untersuchten osteoblastären Zellen zur ACh-Bildung fähig sind, lässt sich anhand der nicht nachweisbaren Expression von ChAT noch nicht vollständig beantworten. Denn in einigen non-neuronalen Zellen wurde ein alternativer Synthesemechanismus durch die Carnitinacetyltransferase CarAT beschrieben (Lips et al. 2007). Lips et al. konnten im Urothel der Maus eine positive Immunreaktivität für CarAT zeigen, während im Urothel der Ratte sogar beide Bildungsenzyme ChAT und CarAT nachgewiesen wurden (Hanna-Mitchell et al. 2007). Auch im Skelettmuskel wurde CarAT detektiert (Tucek 1982) sowie im Epithel der Ösophagus-schleimhaut (Wolf-Johnston et al. 2012). In der vorliegenden Arbeit konnte CarAT-mRNA in allen untersuchten osteoblastären Zellen nachgewiesen werden (Abb. 11, Abb. 12). Eine Synthese von ACh in MC3T3-E1 und SAOS-2-Zellen wäre folglich möglich.

Für die vesikuläre Freisetzung benötigen ACh-bildende Zellen den vesikulären ACh-Transporter VAcHT. VAcHT vermittelt in neuronalen Zellen den Import von ACh in Vesikel (Parsons 2000), wodurch ACh in hohen Konzentrationen gespeichert und durch

Exozytose schnell und effektiv freigesetzt werden kann. Auch einige non-neuronale Zellen sind mit VAcHT für die vesikuläre Freisetzung von ACh ausgestattet: z.B. Bürstenzellen und neuroendokrine Zellen des Atemwegsepithels (Kummer et al. 2008), endokrine α -Zellen des Pankreas und Schleimhautepithel der Speiseröhre (Wolf-Johnston et al. 2012). Hier konnte VAcHT-mRNA weder in SAOS-2 noch in MC3T3-E1-Zellen beobachtet werden. Eine ACh-Freisetzung in diesen Zellen via Exozytose erscheint nach diesen Ergebnissen demnach unwahrscheinlich.

Sato et al. (2010) veröffentlichten ein Jahr nach der Publikation der vorliegenden Arbeit die Ergebnisse ihrer Studie über die funktionelle Rolle von ACh und die Expression cholinergischer Komponenten in Osteoblasten. Den Autoren gelang der Nachweis von ChAT- und VAcHT-mRNA in murinen primären Osteoblasten und in MC3T3-E1-Zellen mittels RT-PCR (Sato et al. 2010). Ähnlich wie in unseren Versuchen wurden MC3T3-E1-Zellen in osteogenem Medium kultiviert und nach 14 Tagen Differenzierung mit den Passagen der unreifen Zellen verglichen. Um die Änderungen der Genexpression zu bestätigen wendeten die Autoren zusätzlich die Methode der *real time* RT-PCR an. Die Expression von ChAT wurde in differenzierten MC3T3-E1-Zellen hochreguliert. Im Vergleich dazu wurde in primären Osteoblasten neben ChAT auch die VAcHT-Expression hochreguliert (Sato et al. 2010). Die Unterschiede zwischen unseren Ergebnissen und denen von Sato et al. könnten verschiedene Ursachen haben: z.B. unterschiedliche PCR-Bedingungen oder Differenzierungsbedingungen in der Zellkultur. Sato et al. benutzten zur Differenzierung der MC3T3-E1-Zellen α -MEM-Medium, anstatt DMEM. Sie verwendeten dieselben Konzentrationen an β -Glycerolphosphat und 0,05 mM Ascorbinsäure-2-Phosphat, jedoch ohne den Zusatz von Dexamethason. Für ChAT wurde ein Primer mit derselben Basensequenz verwendet, für VAcHT und CHT1 jedoch andere Primer.

Interessanterweise könnte auch die Existenz verschiedener Splicevarianten des ChAT-Enzyms ursächlich sein: das gewöhnliche Genprodukt der ChAT-codierenden Region wird *common type of ChAT* (cChAT) genannt. In einer Splicevariante, die vor allem in peripheren Neuronen (pChAT) vorkommt, fehlen die Exone sechs bis neun (Bellier et al. 2011). Insgesamt enthält der sogenannte „cholinerge Genlocus“, welcher ChAT codiert, 15 Exone, aber auch in einem Intron die codierende Region für VAcHT (Eiden 1998). Beim Menschen wurden allein sechs verschiedene Splicevarianten für cChAT beschrieben (Oda et al. 2004), bei der Maus sieben Varianten (Misawa et al. 1992).

Der hochaffine Cholintransporter CHT1 stellt mit der Aufnahme von essentiellm Cholin in die Zelle eine der wesentlichen Komponenten zur ACh-Synthese bereit (Okuda et al. 2003). Die Cholin-Wiederaufnahme in die Zelle ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in der Synthese von ACh (Okuda et al. 2003). CHT1 konnte hier in beiden Zelllinien nicht detektiert werden (Abb. 13, Abb. 14).

Sato et al. (2010) wiesen in murinen primären Osteoblasten CHT1 mittels RT-PCR nach, allerdings auch nicht in MC3T3-E1-Zellen. Zwar finden wir hier unsere Ergebnisse durch die Untersuchungen von Sato et al. bestätigt, es wird aber auch der Unterschied innerhalb einer Spezies zwischen immortalen Zelllinien und Primärzellen deutlich.

Wie Cholin schließlich in die osteoblastären Zellen gelangt ist somit noch nicht klar. Die Aufnahme von essentiellm Cholin kann jedoch nicht nur durch CHT1, sondern auch durch organische Kationentransporter, OCT, vermittelt werden (Kummer et al. 2008; Wessler et al. 2008). Insbesondere OCT1 und OCT2 können Cholin transportieren (Busch et al. 1996; Sweet et al. 2001). In OCT1/2 Doppel-Knockout-Mäusen war allerdings der ACh-Gehalt in Atemwegsepithelzellen erhöht (Kummer et al. 2006). Somit scheinen die OCT nicht entscheidend für den Cholintransport zu sein (Kummer et al. 2008), auch wenn sie dazu in der Lage sind. Ob es andere Transporter für den Cholin-Reuptake in Osteoblasten gibt oder ob tatsächlich OCTs diese Aufgabe übernehmen, sollte in weiteren Experimenten geklärt werden.

Eine weitere wichtige Aufgabe der OCTs besteht indes bei den meisten non-neuronalen Zellen in der kontinuierlichen Freisetzung von ACh (Lips et al. 2005; Wessler et al. 2008). Die Subtypen OCT1 und OCT3 wurden bereits als Transporter für die ACh-Freisetzung in humanen Plazentavilli identifiziert (Wessler et al. 2001), wobei andere Studien zeigten, dass OCT1 und OCT2 die Freisetzung von ACh im Epithel der Trachea vermitteln (Lips et al. 2005; Kummer et al. 2006; Kummer et al. 2008). Auch im Schleimhautepithel des Ösophagus der Katze wurden OCT1-3 als Transporter für die ACh-Freisetzung demonstriert (Wolf-Johnston et al. 2012). Ma et al. (2009) konnten das Vorkommen von OCT1 in Osteoblasten aus der Mandibula der Ratte mittels RT-PCR, Immunhistochemie und Western Blot nachweisen. Sie wiesen die Aufnahme von Metformin, ein antihyperglykämisch wirkendes Antidiabetikum, in Osteoblasten mittels HPLC nach. Der Transport war charakteristisch für die OCT, nämlich konzentrationsabhängig, Na⁺- und pH-abhängig, sowie durch Phenformin und Cimetidin (ein OCT-Antagonist) hemmbar (Ma et al. 2009). Metformin scheint bei Diabetes mellitus-Patienten einen positiven Einfluss auf die Knochenbildung zu haben. Demnach befür-

worteten Ma et al. (2009) eine topische Anwendung von Metformin beispielsweise an Patienten mit Zahnimplantaten, um die Knochenbildung und Osseointegration zu fördern. Ob und welche Rolle OCTs beim ACh-Transport in Osteoblasten spielen, wurde bislang noch nicht untersucht.

In der vorliegenden Arbeit wurde OCT1 in humanen SAOS-2-Zellen detektiert, wobei OCT1 bei den murinen Zellen nur in osteogen differenzierten MC3T3-E1-Zellen vorkam. Zusätzlich zu OCT1 war OCT2 in nativen und differenzierten MC3T3-E1 nachweisbar (Abb. 13, Abb. 14). Der Transport von ACh scheint in osteoblastären Zellen folglich spezies-spezifisch über verschiedene OCT-Typen zu erfolgen.

Für OCT2 wurde eine geschlechtsspezifische Expression in der Niere von Ratten beschrieben: bei männlichen Ratten lag eine höhere Expressionsrate vor als bei weiblichen (Urakami et al. 1999). Jedoch bestanden keine geschlechtsspezifischen Unterschiede für OCT1 und OCT3 (Urakami et al. 2000). Urakami et al. (2000) zeigten, dass die OCT2-Expression in Ratten durch Testosteron hochreguliert und durch Östradiol moderat herunterreguliert wurde. Dieser hormonabhängige Unterschied könnte interessante Hinweise auf die Knochenphysiologie und geschlechtsspezifischen Risiken für die Entstehung von Knochenerkrankungen geben. Es ist bekannt, dass postmenopausale Frauen in der Umstellungsphase mit absinkenden Blutöstradiolspiegeln ein höheres Risiko für Osteoporose haben (Maeda et al. 2014). Jedoch warnten Groves et al. (2006) davor, Spezies-übergreifende Rückschlüsse zu ziehen, denn sie fanden bei Kaninchen keine geschlechtsspezifischen Differenzen bei der Expression von OCT. Auch Schlatter et al. (2013) demonstrierten eine geschlechtstunabhängige Expression von OCT1-3 in der Niere von Mäusen und betonten ebenfalls, dass diese Ergebnisse nicht direkt auf andere Spezies übertragen werden können. Wir fanden OCT2 in murinen MC3T3-E1-Zellen, aber nicht in humanen SAOS-2-Zellen. Eine geschlechtsspezifische Expression von OCT2 beim Menschen ist bislang nicht bekannt. Vor dem Hintergrund, dass OCT2 in Osteoblasten die ACh-Freisetzung vermitteln könnte, wären weitere Untersuchungen notwendig, um zunächst die Expression von OCT2 im humanen Knochen nachzuweisen und darauffolgend mögliche Geschlechtsunterschiede in der OCT2-Expression darzulegen. Interessant wäre auch ein Vergleich der Expressionslevel bei prä- und postmenopausalen Frauen.

Insgesamt konnten wir nachweisen, dass die untersuchten Zelllinien SAOS-2 und MC3T3-E1 das alternative ACh-Bildungsenzym CarAT und die Transporter OCT1 und OCT2 exprimieren. ChAT, CHT1 und VAcHT ließen sich jedoch nicht detektieren.

Somit sind SAOS-2- und MC3T3-E1-Zellen mit den notwendigen Proteinen für Bildung und Freisetzung von ACh ausgestattet. Darüber hinaus stellten wir fest, dass es bei einem möglichen ACh-Transport via verschiedener OCT in osteoblastären Zellen Spezies-spezifische Unterschiede gibt. Innerhalb der Spezies Maus zeigte sich bei osteogen differenzierten MC3T3-E1-Zellen eine Hochregulation von OCT1. OCT1 scheint folglich eine Rolle in der Osteoblastogenese zu spielen. Weitere Studien hierzu sollten folgen.

4.3 Cholinerge Rezeptoren

Extrazelluläres ACh agiert indem es an nikotinische und muskarinische Acetylcholinrezeptoren bindet. Über verschiedene Rezeptortypen übt ACh Effekte auf die Zellfunktion non-neuronaler Zellen aus. Welche Rolle ACh via cholinergere Rezeptoren im Knochen spielt, war bis vor kurzem noch unklar. Bei den mit Osteoblasten ontogenetisch verwandten Fibroblasten wurden interessante Wirkungen von ACh beschrieben: in Fibroblasten der Lunge führt die Stimulation von mAChR zu Proliferation und Steigerung der Kollagensynthese via Aktivierung der MAPK-Kaskade (Matthiesen et al. 2006). Zellproliferation und Kollagensynthese sind essentielle Prozesse für Knochenwachstum und Frakturheilung, weshalb vorstellbar wäre, dass diese Signale über mAChR auch in Osteoblasten vermittelt werden könnten.

Die Expression der mAChR ist in hämatopoetischen Zellen und Stromazellen des Knochenmarks (Pereira et al. 2003), aber bis zu dem Zeitpunkt unserer Untersuchungen nicht für Knochen selbst bekannt. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die untersuchten osteoblastären Zelllinien mit deutlichen Unterschieden zwischen den Spezies Maus und Mensch mAChR exprimieren. In murinen osteoblastären Zellen wurde M₁R und M₄R in nativen und differenzierten Zellen mit einer moderaten Intensität der Banden exprimiert (Abb. 16). Das PCR-Produkt des M₂R zeigte eine nur schwach detektierbare Bande, was auf eine extrem niedrige mRNA-Konzentration hinweisen könnte.

Auch Sato et al. (2010) detektierten in nativen und differenzierten MC3T3-E1-Zellen M₁R, M₂R und M₄R, wodurch sich unsere Ergebnisse bestätigen.

Wir konnten zeigen, dass humane SAOS-2-Zellen M₃R und M₅R exprimierten. Wie bei den murinen Zellen war M₂R nur als schwache Bande in nicht allen Passagen nachweisbar (Abb. 15).

Verglichen mit den humanen Zellen war M₅R in den murinen Zellen nicht in allen Proben nachweisbar. Zu beobachten war eine Hochregulation von M₅R in einigen Passagen der osteogen differenzierten MC3T3-E1: dort zeigte sich eine starke Bande in vergleichbarer Intensität zur Positivkontrolle (Abb. 16). Eine besondere Bedeutung des M₅R in der Regulation des Knochenstoffwechsels kann an dieser Stelle nur vermutet werden. Beweise für die Regulation des zellulären Ca²⁺-Haushaltes durch M₅R (und M₃R) liegen jedoch vor: M₁R, M₃R und M₅R sind G_i-gekoppelte Rezeptoren und erhöhen die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration über die Wirkung von PLC und IP₃ (Caulfield et al. 1998). Aber auch die Rezeptorsubtypen M₂R und M₄R (beide an inhibitorische G-Proteine gekoppelt) könnten eine relevante Funktion im Knochenstoffwechsel spielen, da sie die Aktivität von Ca²⁺-Kanäle modulieren können (Allen et al. 1993). In humanen Retinoblastomzellen konnte eine Calciummobilisation aus den intrazellulären Speichern durch M₅R und M₃R nachgewiesen werden (Kim et al. 2007). Ob diese Mechanismen auch für Osteoblasten und somit für den Knochenstoffwechsel gelten, bedarf weiterer Untersuchungen.

In ihrer Arbeit beschrieben Ma et al. (2014) kürzlich das Expressionsmuster cholinergischer Rezeptoren in jungem Knochengewebe von drei und sechs Wochen alten Mäusen. Im Vergleich zum Tibiagewebe junger Mäuse zeigte sich bei den sechs Wochen alten Tieren eine starke Expression von M₁R, M₂R, M₄R, M₅R, α1-, α4-, α5-, β2-, β4- und γ-UE im Gegensatz zu niedriger bis keiner Expression bei den drei Wochen alten Mäusen (Ma et al. 2014). AChR scheinen demnach eine wichtige Rolle in der Entwicklung des jungen Knochens zu spielen.

Jüngste Ergebnisse der in-vivo-Studie von Kliemann et al. (2012) zeigten, dass M₃R eine Schlüsselrolle in der Pathogenese degenerativer Knochenerkrankungen zu spielen scheint. Obwohl wir M₃R in der murinen Zelllinie nicht nachweisen konnten, beschrieben Kliemann et al. das Vorkommen von M₃R in vivo in Mäusen. Sie untersuchten die Funktion von M₃R im Knochen anhand von M₃R-Knockout-Mäusen: M₃R übt positive Effekte auf die trabekuläre Mikrostruktur, Biegefestigkeit und Matrixsynthese, v.a. von Kollagen Typ I aus. Die Knochenmikrostruktur der M₃R-Knockout-Mäuse ähnelt hochgradig der des systemisch erkrankten Knochen, wie z.B. bei Osteoporose (Kliemann et al. 2012). Diese Ergebnisse stimmen mit den Befunden von Shi et al. (2010) überein. Es scheint folglich wahrscheinlich, dass M₃R in der Entstehung und Manifestation systemischer Knochenerkrankungen beteiligt ist. Allerdings wurden in der Studie von Kliemann et al. Mäuse verwendet, deren gesamter Organismus M₃R-defizient war. Shi et al.

(2010) hingegen fanden durch spezielle M_3R_{neuron} -Knockout-Mäuse heraus, dass die Regulation der Knochenbildung über Aktivierung zentralnervöser M_3R geschieht (Shi et al. 2010).

Liu et al. beschrieben 2010 die Expression und die funktionelle Aktivität von mAChR in humanen Osteosarkomzellen (HOS-Zellen), sowie in Knochengewebe von Mensch, Rind, Ratte und Maus. In HOS-Zellen konnte gezeigt werden, dass durch mAChR-Aktivierung mit dem spezifischen mAChR-Agonist Methacholin die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration ansteigt und die Zellproliferation verstärkt wird (Liu et al. 2011). Weiterführende Untersuchungen mit einem MAPK-Inhibitor entschlüsselten die intrazelluläre Signaltransduktionskaskade: mAChR sind offensichtlich an die MAPK-Kaskade gekoppelt und übertragen hierüber proliferative Signale (Liu et al. 2011).

Osteoblasten sezernieren die Proteine *Receptor Activator of NF- κ B-Ligand* (RANKL) und Osteoprotegerin (OPG), die das *bone remodeling* regulieren, indem sie die Aktivität von Osteoklasten stimulieren oder hemmen (Khosla et al. 2008). Da diese Sekretion bekannterweise einen intrazellulären Ca^{2+} -Anstieg voraussetzt und dieser auch durch mAChR vermittelt wird, könnte hier eine Verbindung bestehen (Liu et al. 2011). Bisher wurde angenommen, dass Osteoblasten die Hauptrolle in der RANKL/OPG-gesteuerten Interaktion zwischen Osteoblasten und Osteoklasten spielen (Sudo et al. 1983). Osteoblasten sezernieren RANKL, ein Protein aus der Familie der Tumornekrosefaktoren, welches an das Transmembranprotein *Receptor Activator of NF- κ B* (RANK) auf der Zelloberfläche von Osteoklasten bindet und so deren Proliferation und Aktivierung stimuliert. OPG, ebenfalls von Osteoblasten gebildet, unterbricht durch Rezeptorbindung an RANKL diese Wirkung. Dieses Wechselspiel stellt einen der Regulationsmechanismen des *bone remodelings* dar. Kürzlich fanden Nakashima et al. (2011) heraus, dass die eigentlichen Hauptakteure im RANK/RANKL-System Osteozyten sind, da sie in vitro weit höhere Expressionsraten von RANKL aufweisen und somit ein höheres Potential der Osteoklastenaktivierung haben (Nakashima et al. 2011). Auch in vivo scheinen Osteozyten die Hauptquelle von RANKL im *bone remodeling* zu sein (Nakashima et al. 2011). Interessanterweise scheint ACh die Expression von RANKL hoch zu regulieren und die von OPG zu senken (Ma et al. 2014). Somit zeigt sich ein weiterer Hinweis auf die Beteiligung des cholinergen Systems im Bone remodeling. Ob tatsächlich Osteozyten die führende Rolle in der Regulation des Bone remodelings in der Form cholinergere Signale tragen oder ob es sich nicht eher um ein komplexes Zusammenspiel

von Osteoblasten, Osteozyten und anderen Zellen stromalen Ursprungs handelt, könnte Gegenstand zukünftiger Studien sein.

Über die physiologischen Funktionen der mAChR im Knochenstoffwechsel hinaus ist auch eine Rolle in der Pathogenese von Tumoren denkbar. Pathophysiologisch spielen mAChR beim Wachstum von Karzinomen eine Rolle. Beispielsweise bildet das kleinzellige Bronchialkarzinom ACh, welches als autokriner Wachstumsfaktor via mAChR das Tumorwachstum stimuliert (Song et al. 2007; Spindel 2012). Ebenso vermitteln Kolonkarzinome zellproliferative Signale über mAChR (Frucht et al. 1999). Eine potentielle Rolle der mAChR in der Entstehung von Knochentumoren sollte bedacht werden und erfordert weitere Studien (Liu et al. 2011). In der vorliegenden Arbeit wurde die humane Osteosarkomzelllinie SAOS-2 untersucht und die Expression von M₂R, M₃R und M₅R in diesen Zellen gezeigt. Interessant wären Studien an Patienten mit Osteosarkomen, um zu überprüfen, ob in vivo dieselben Rezeptoren exprimiert werden und ob bzw. welche Rolle sie in der Karzinogenese spielen.

Einen weiteren Effekt von mAChR auf den Knochen zeigt sich indirekt über die Blutversorgung des Knochengewebes. So spielen mAChR an vasalen Endothelzellen eine feste Rolle bei der Regulation der Knochenperfusion. In normalem und ischämischem Knochen vermittelt die Bindung von ACh an mAChR eine signifikante Vasodilatation durch Stimulation der Bildung endothelialer Stickstoffoxide (McCarthy et al. 1997).

Die Regulation der Knochendurchblutung trägt entscheidend zur Knochenfunktion bei und wird neben endogenen Faktoren (vasoaktive Substanzen, Hormone, etc.) auch durch exogene Substanzen (Toxine, Pharmaka) beeinflusst.

Nikotin, der toxische Hauptbestandteil von Zigarettenrauch, verändert die physiologische Regulation des Blutflusses zum Knochen und hat somit einen nachteiligen Effekt auf die Knochenfunktion (Feitelson et al. 2003). Es wurde gezeigt, dass Nikotin die Vasokonstriktion der Knochenblutgefäße in der Rattentibia als Antwort auf exogenes Norepinephrin verstärkt. Folglich könnte Nikotin die Ansprechbarkeit der ossären Gefäße auf endogenes Norepinephrin erhöhen und somit möglicherweise über den adrenergen Signalweg zu Ischämie und Beeinträchtigung der Knochenheilung führen (Feitelson et al. 2003).

Nikotin wirkt bekanntermaßen aber auch durch die Bindung als Rezeptoragonist an nAChR, die in einer Vielzahl von Geweben exprimiert werden. Walker et al. (2001) beschrieben erstmals den zellulären Effekt von Nikotin auf Knochenzellen durch die Bindung an nAChR. Sie wiesen die Expression der nAChR-UE $\alpha 4$ in primären huma-

nen Osteoblasten, osteoblastären MG63-Zellen und im humanen Knochen nach. Sie beobachteten, wie durch die Expression von nAChR-UE $\alpha 4$ die Proliferation von Osteoblasten verstärkt und die Expression von c-fos nach Stimulation mit niedrigdosiertem Nikotin hochreguliert wurde (Walker et al. 2010). C-fos ist ein zelluläres Protoonkogen, das den Transkriptionsfaktor *activator protein* (AP)-1 der ALP kodiert, welche die Mineralisierung von Knochen fördert (Walker et al. 2010).

Die nikotininduzierte Steigerung der Zellproliferation im humanen trabekulären Knochen konnte dosisabhängig durch die Zugabe des nAChR-Antagonisten D-Turbocurarin gehemmt werden (Walker et al. 2010). Neben der Hochregulation des Transkriptionsfaktors c-fos/AP-1 wurde auch ein Anstieg des Knochenmatrixproteins OPN mittels Western Blot nachgewiesen (Walker et al. 2010). Da OPN als ein Indikator für Knochenumsatz und -abbau gilt (Roach 1994), könnte die erhöhte Expression dieses Proteins mit dem Effekt von Nikotin auf Knochenumsatz in Verbindung stehen. Langzeit-Administration von Nikotin würde wahrscheinlich in Verlust von Knochenmasse oder verminderter Frakturheilung resultieren (Walker et al. 2010).

In dieser Arbeit wurde OPN in allen osteoblastären Zelllinien detektiert, um die osteoblastären Eigenschaften nachzuweisen. Die von Walker et al. beschriebene im Knochen vorkommende nAChR-UE $\alpha 4$ konnte in dieser Arbeit weder in humanen noch in murinen Zellen nachgewiesen werden (Abb. 17, Abb. 18). Die Ursache dieser Diskrepanz könnte auf der Verwendung anderer Zelllinien beruhen, auf dem Austausch von $\alpha 4$ mit einer anderen UE bei der Bildung der pentameren nAChR oder auf intra-individuellen Unterschieden. Auch Sato et al. (2010) konnten in ihren Versuchen keine $\alpha 4$ -mRNA in MC3T3-E1 und primären murinen Osteoblasten nachweisen.

Die nAChR-UE $\alpha 4$ ist allein nicht in der Lage funktionelle nAChR zu bilden. Hierfür wird mindestens eine weitere β -UE benötigt. Wir untersuchten daher, ob osteoblastäre Zellen auch alle weiteren bei Säugetieren vorkommenden α - und β -UE der nAChR exprimieren.

Insgesamt wurden die UE $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 7$, $\alpha 9$, $\alpha 10$ und $\beta 2$ in humanen SAOS-2-Zellen nachgewiesen (Abb. 17, Abb. 20). In murinen MC3T3-E1-Zellen wurden die nAChR-UE $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 9$, $\alpha 10$, $\beta 2$, $\beta 3$ und $\beta 4$ detektiert (Abb. 18, Abb. 19, Abb. 21). Hierbei waren die nAChR-UE $\alpha 3$ nur in nativen Zellen und $\beta 3$ nur in osteogen differenzierten Zellen nachweisbar. Die UE $\alpha 9$ und $\alpha 10$ waren jeweils nur mit schwachen Banden in nativen und osteogen differenzierten Zellen detektierbar.

Somit konnte nach Kultivierung der MC3T3-E1-Zellen in osteogenem Medium eine Änderung des Expressionsmusters der nAChR-UE beobachtet werden. Differenzierte MC3T3-E1 zeigten eine Hochregulation der nAChR-UE β_3 , sowie eine Herunterregulation der nAChR-UE α_3 . Diese Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass bestimmte nAChR-UE in verschiedenen Stadien der Zelldifferenzierung von Osteoblasten gebildet werden und dass sie möglicherweise an der Regulation der Osteoblastogenese beteiligt sind.

Es wurde bereits eine Vielzahl von Kombinationsmöglichkeiten der nAChR-UE in der Literatur beschrieben. Von den bislang bekannten α -Bungarotoxin-sensiblen nAChR könnten folgende Rezeptoren in den hier untersuchten Zellen exprimiert werden (siehe Tab. 9).

Tab. 9: Mögliche Bildung von α -Bungarotoxin-sensiblen nAChR in SAOS-2- und MC3T3-E1-Zellen.

Bekannte Rezeptorsubtypen der α-Bungarotoxin-sensiblen Rezeptoren		Positive Expression der UE in den untersuchten Zelllinien
α_7 -Homopentamer	(Couturier et al. 1990)	SAOS-2
$\alpha_7\beta_2$ -Heteropentamer	(Khiroug et al. 2002, Moretti et al. 2014)	SAOS-2
α_9 -Homopentamer	(Elgyohen et al. 1994)	SAOS-2, native und differenzierte MC3T3-E1
$\alpha_9\alpha_{10}$ -Heteropentamer	(Elgoyhen et al. 2001)	SAOS-2, native und differenzierte MC3T3-E1

Von den übrigen α -Bungarotoxin-resistenten nAChR-UE wäre folgende Rezeptorbildung in murinen und humanen Zellen denkbar (Tab. 10):

Tab. 10: Mögliche Bildung von α -Bungarotoxin-resistenten nAChR in SAOS-2- und MC3T3-E1-Zellen.

Bekannte Rezeptorsubtypen der α-Bungarotoxin-resistenten Rezeptoren		Positive Expression der UE in den untersuchten Zelllinien
$\alpha_2\beta_2$ -Heteropentamer	(Papke 1993)	Native und differenzierte MC3T3-E1
$\alpha_2\beta_4$ -Heteropentamer	(Papke 1993)	Native und differenzierte MC3T3-E1
$\alpha_3\beta_2$ -Heteropentamer	(Wang et al. 1996)	SAOS-2, native MC3T3E1
$\alpha_3\beta_4$ -Heteropentamer	(Wang et al. 1996)	native MC3T3E1
$\alpha_3\alpha_5\beta_2$ -Heteropentamer	(Wang et al. 1996)	SAOS-2, native MC3T3-E1
$\alpha_3\alpha_5\beta_2\beta_4$ -Heteropentamer	(Conroy et al. 1995)	Native MC3T3-E1

Das Vorkommen der nAChR-UE α_7 wurde erstmals 1997 im Periost, in mesenchymalen Stammzellen und in Fibroblasten beschrieben (Romano et al. 1997). Das Periost enthält innerhalb des Stratum osteogenicum osteoblastäre Vorläuferzellen, die sich zu Osteoblasten differenzieren können.

Das Vorkommen des $\alpha 7$ -nAChR in Fibroblasten ist auch von anderen Organen bekannt, z.B. Haut und Lunge, in denen die Expression von Kollagen vermittelt (Arredondo et al. 2006; Sekhon et al. 2002). Die Hochregulation der Kollagenexpression würde biomechanische Eigenschaften des neugebildeten Knochens verbessern. Der $\alpha 7$ -nAChR könnte demnach eine essentielle Rolle in der Osteogenese und Frakturheilung spielen.

Für die vorliegende Arbeit wurde der Schwerpunkt auf RT-PCR Analyse gelegt, mit Ausnahme der zusätzlichen Immunhistochemie für die Untersuchung der $\alpha 3$ und $\alpha 5$ nAChR-UE. Während der letzten Jahre wurde vermehrt von der Problematik der unspezifischen Bindung von Antikörpern berichtet, die durch den Einsatz von Knockout-Mäusen bestimmt wurden. Jositsch et al. (2009) analysierten mAChR-Antikörper, auch nAChR-Antikörper wurden in mehreren Studien mit entsprechenden Knockout-Mäusen untersucht (Herber et al. 2004; Moser et al. 2007).

Die nAChR-UE $\alpha 5$ wurde aus zwei Gründen für die Immunhistochemie ausgewählt: erstens wurde bisher nicht gezeigt, dass $\alpha 5$ -Antikörper unspezifische Bindungen eingehen. Zweitens wurde hier durch RT-PCR nachgewiesen, dass die $\alpha 5$ -UE von beiden untersuchten Zelllinien exprimiert wird: von SAOS-2 und von nativen und osteogen differenzierten MC3T3-E1. Darüber hinaus bildet die $\alpha 5$ -UE in Kombination mit der $\alpha 3$ -UE und einer zusätzlichen β -UE funktionelle nikotinsche Rezeptoren (Wang et al. 1996, Conroy et al. 1995). Aus diesem Grund wurde die Immunfärbung auch für UE $\alpha 3$ durchgeführt. Da Moser et al. (2007) über unspezifische Bindungen von $\alpha 3$ -Antikörpern berichteten, wurden für die vorliegende Untersuchung andere Antikörper als die von Moser et al. beschriebenen ausgesucht. Die $\alpha 3$ -UE wird im Gegensatz zur $\alpha 5$ -UE nicht von den osteogen differenzierten Zellen exprimiert. Immunreaktivität beider UE wurde daher nur im Zytoplasma der nativen MC3T3-E1-Zellen (ohne Behandlung mit osteogenem Medium) beobachtet. Vor allem perinukleär und in Bereichen, wo typischerweise der Golgi-Apparat lokalisiert ist, zeigte sich eine starke Immunreaktivität (Abb. 24). Starke Bindungsintensität der $\alpha 3$ - und $\alpha 5$ -UE zeigte sich auch in kleinen runden Zellausläufern (Abb. 24c, d). Sogenannte Zellsprosse wurden von García-Contreras et al. (2011) in ihrer Studie zu den morphologischen Eigenschaften der MC3T3-E1-Zellkulturen auf UV-bestrahlten Titanplatten beschrieben. *Sprouting processes* wurden als Merkmale positiver Zellproliferation und Adhäsion auf Implantatmaterial gewertet (García-Contreras et al. 2011). Demnach scheinen die $\alpha 3$ - und $\alpha 5$ -UE besonders an Stellen des voranschreitenden Zellwachstums exprimiert zu werden. Vor allem $\alpha 3$ scheint

eine besondere Bedeutung in der Zellproliferation der MC3T3-E1 zu haben, da wir sie im Differenzierungsstadium nicht mehr nachweisen konnten.

Welche Effekte ACh als potentieller auto-/parakriner Signalstoff via nAChR im Knochen ausüben könnte, wurde erst nach Veröffentlichung der vorliegenden Arbeit untersucht. Indirekte Hinweise lieferten bis dahin Studien über die Wirkung des Rezeptoragonisten Nikotin auf Osteoblasten.

Nikotin induzierte die Expression von Matrixmetalloproteinasen und gewebespezifischem Plasminogenaktivator in humanen SAOS-2-Zellen (Katono et al. 2006). Dadurch kann angenommen werden, dass Nikotin den Knochenumsatz anregt und das Gleichgewicht zwischen Knochenmatrixbildung und -resorption in Richtung Resorption verschiebt (Katono et al. 2006).

Yuhara et al. demonstrierten nicht nur die Wirkung von Nikotin auf Osteoblasten sondern auch auf Osteoklasten. Es scheint, dass Nikotin die Differenzierung und Mineralisierung von osteoblastären Zellen reguliert und die Differenzierung und Aktivierung von Osteoklasten hemmt (Yuhara et al. 1999).

Ma et al. (2011) untersuchten den Effekt von Nikotin auf Proliferation und Genexpression osteogener und angiogener Mediatoren von primären Kaninchenosteoblasten. Sie fanden heraus, dass Nikotin das Wachstum der Osteoblasten hemmt und negativ die Expression von *transforming growth factor* (TGF)- β 1, *bone morphogenic protein* (BMP)-2, *platelet-derived growth factor* (PDGF)-AA und *vascular endothelial growth factor* (VEGF) beeinflusst (Ma et al. 2011). TGF- β 1 und BMP-2 sind Wachstumsfaktoren, die während Zellwachstum und -differenzierung in der Heilung und Regeneration von Knochen eine wichtige Rolle spielen (Ma et al. 2011). PDGF und VEGF stimulieren Zellmigration und -proliferation und fördern Angiogenese und Geweberegeneration (De la Riva et al. 2010; Beatriz et al. 2010). Neben angiogenen Effekten während der Knochenheilung haben VEGF und PDGF auch osteogene Eigenschaften: sie stimulieren die Zellreifung der Osteoprogenitorzellen, beeinflussen die Proliferation und Differenzierung von Osteoblasten positiv und induzieren die Kalzifizierung der Knochematrix (De la Riva et al. 2010; Beatriz et al. 2010).

Eine mögliche Erklärung für die beeinträchtigte Frakturheilung durch Rauchen lieferten Chen et al. (2011): Sie vermuten, dass Nikotin durch eine Aktivierung des cholinergen antiinflammatorischen Signalwegs die Sekretion des Tumornekrosefaktors α (TNF- α) hemmt. TNF- α ist ein wichtiger proinflammatorischer Faktor und Teil der körpereigenen Immunantwort auf eine Verletzung. Es ist dafür bekannt, die enchondrale Ossifika-

tion zu aktivieren, indem die Sekretion von Matrixmetalloproteinase verstärkt wird (Chen et al. 2011). TNF- α fördert die Osteoklastogenese und induziert die Apoptose von Chondrozyten (Polzer et al. 2007). Somit trägt das Zytokin entscheidend zur Frakturheilung bei (Chen et al. 2011).

Natürlich sind auch andere Inhaltsstoffe des Zigarettenrauchs mit schlechter Knochenheilung assoziiert: neben Nikotin gilt auch Kohlenstoffmonoxid als Ursache für Gewebehypoxie und somit beeinträchtigter Knochenheilung (Chen et al. 2011). Dennoch scheint Nikotin von großer Wichtigkeit zu sein und bietet durch die Aktivierung des cholinergen antiinflammatorischen Signalwegs potentielle Angriffspunkte diesen Prozess zu beeinflussen (Chen et al. 2011).

Nach En-Nosse et al. (2009) beschrieben Sato et al. ein Jahr später das Expressionsmuster des cholinergen Systems in Osteoblasten und untersuchten die Wirkung von ACh auf Zellwachstum und -differenzierung von murinen MC3T3-E1-Zellen und murinen primären Osteoblasten. ACh fördert in prä-Osteoblasten die Zellzyklusprogression durch Hochregulation von Cyclin D (Sato et al. 2010). Weiterhin reduziert ACh die Aktivität der ALP während der Osteoblastendifferenzierung. Sato et al. zeigten, dass reife Osteoblasten die Enzyme für Synthese und Abbau von ACh exprimieren. Darüber hinaus stellten sie eine Änderung der Rezeptoreigenschaften während der Osteoblastendifferenzierung fest: die β 4-UE des nAChR wurde stark in Präosteoblasten gebildet, wobei reife Zellen die nAChR-UE α 1, α 6, α 7, β 1, β 4, δ , ϵ sowie M_1R , M_2R und M_4R exprimierten. Die Diskrepanz zwischen dem hemmenden Effekt von ACh auf die ALP-Expression und die vermehrte Sekretion von ACh während der Zellreifung erklären Sato et al. (2010) folgendermaßen: die Wirkung von ACh auf Osteoblasten scheint sich während der Differenzierung zu ändern, da sich die Expression der Rezeptorsubtypen bzw. Untereinheiten verändert. Daraus lässt sich vermuten, dass ACh via β 4 die osteoblastäre Differenzierung hemmt und die exprimierten Rezeptoren der reifen Zellen wiederum die inhibierende Wirkung von ACh blockieren (Sato et al. 2010).

Kürzlich beschrieben Ma et al. (2014) die Wirkung von ACh auf das *bone remodeling* und die Zellfunktionen in Osteozyten der Maus via cholinergere Rezeptoren. Die Behandlung osteozytärer MLO-Y4-Zellen mit ACh führte zu einem signifikanten Anstieg der Zellproliferation und Lebensfähigkeit. Aufgrund der Blockierung mit nAChR-Antagonisten Mecamylamin und D-Turbocurarin scheinen hier vor allem nAChR involviert zu sein, insbesondere die UE α 4, α 5, β 2 und β 4 (Ma et al. 2014).

In osteozytären MLO-Y4-Zellen der Maus wiesen Ma et al. die mRNA Expression von M1, M2, M5, β 2-, β 4- und γ -UE nach. Die weite Spanne der detektierten AChR, ähnlich wie in unseren Versuchen, deutet auf die verschiedenen intrazellulären Signalwege hin, die durch AChR initiiert werden können (Ma et al. 2014). Hier sind weitere Studien nötig, um den Zusammenhang zwischen cholinergem Signalweg und Osteozyten zu untersuchen (Ma et al. 2014). Auch im Hinblick auf mögliche Therapiestrategien von Knochenerkrankungen wäre dies interessant.

4.4 Degradation

Die Expression von AChE in humanen SAOS-2-Zellen wurde von mehreren Autoren bereits beschrieben (Genever et al. 1999; Grisar et al. 1999).

Im Gegensatz dazu konnte in dieser Arbeit keine mRNA für AChE in SAOS-2 nachgewiesen werden (Abb. 22). Dies könnte durch unterschiedliche Zellkulturbedingungen erklärt werden. Ein anderer Grund für den beobachteten Unterschied der AChE-Expression könnte das Vorhandensein verschiedener Splicing-Varianten der AChE sein (Massoulié 2002). Genever et al. (1999) zeigten eine ausschließliche Expression der AChE-T-Untereinheiten durch Osteoblasten. Diese Splicing-Variante kommt als membranständige und lösliche Form vor, sowie als Homo- oder Heterooligomere, die einen Kollagenschwanz oder Membrananker enthalten können (Abb. 4). Nötig wären weitere Informationen über das Expressionsmuster verschiedener Splicing-Varianten der AChE in Osteoblasten unterschiedlicher Spezies.

Die Genexpression der AChE unterliegt noch weiteren erst seit kurzem bekannten Steuerungsmechanismen: Shaked et al. (2009) fanden heraus, dass die AChE-mRNA durch die microRNA-132 supprimiert wird.

MicroRNAs sind kleine einsträngige nicht kodierende RNA-Moleküle, die aus ca. 21-25 Nukleotiden bestehen (Wienholds et al. 2005; Sriram et al. 2014). Sie spielen in der post-transkriptionalen Phase der Genregulation eine besondere Rolle. So können sie entweder durch partielle oder komplette Basenpaarung am 3'-Ende der untranslatierten mRNA eine Hemmung der Translation oder komplette Degradation des mRNA-Moleküls eines Zielgens bewirken und steuern somit das Gensilencing (Wienholds et al. 2005). Erst vor kurzem rückte die Bedeutung der nichtkodierenden microRNAs in den Fokus der Wissenschaft (Soreq 2014). So wurden bislang 244 passende microRNAs in silico für AChE- und BChE- Transkripte identifiziert (Hanin et al. 2011). Da microR-

NAs nicht nur eine sondern viele Zielstrukturen haben, verursachen sie auch multiple Effekte. Sie scheinen zentrale biologische Prozesse der Cholinesterasen zu steuern (Hannin et al. 2011).

Ob microRNAs unterschiedliche Expressionslevel der AChE in Osteoblasten und z.B. in SAOS-2-Zellen steuern ist noch nicht geklärt, bedarf aber weiterer Untersuchungen.

Ein Einfluss der microRNA auf den Knochenstoffwechsel, insbesondere auf Proliferation und Differenzierung von Osteoblasten, wurde erst jüngst beschrieben (Sriram et al. 2014). Bestimmte microRNAs werden im Zusammenhang mit Knochenerkrankungen wie Osteoporose, rheumatoide Arthritis oder Osteoarthritis jeweils hoch- oder herunterreguliert (Sriram et al. 2014). Hogan et al. (2014) wiesen auf eine mögliche Regulation der nAChR durch microRNAs hin. Hier öffnet sich ein spannendes neues Forschungsfeld über die Regulation des non-neuronalen cholinergen Systems durch microRNAs im Knochen, das interessante Ansätze für künftige Studien bietet.

Ältere Untersuchungen zeigten eine Differenzierungs-abhängige AChE-Sekretion von Osteoblasten, die mit der Aktivität der ALP korrelierte (Walker et al. 2010; Inkson et al. 2004). Des Weiteren zeigten Inkson et al. (2004), dass die Gabe von spezifischen AChE-Inhibitoren eine konzentrationsabhängige Abnahme der Zelladhäsion von Osteoblasten verursacht. Dies lässt vermuten, dass AChE in der Regulation der Zell-Matrix-Interaktion im Knochen eine Rolle spielt (Inkson et al. 2004).

Darüber hinaus ist die AChE in den Vorgang des programmierten Zelltodes, der Apoptose, involviert (Wang et al. 2009). Rauchen gilt als eine Ursache für die Entstehung von Parodontose, welche sich mit den klinischen Symptomen Knochenverlust, Kontaktverlust und evtl. Zahnverlust manifestiert (Bergström 2004). Die ossären Wechselwirkungen stehen in der Pathogenese also im Vordergrund. Wang et al. (2009) stellten die Hypothese auf, dass Nikotin das cholinerge System in periodontalem Gewebe aktiviert und eine konsekutive Stimulation der AChE entscheidend die Apoptose und somit Pathogenese fördert. Denkbar wäre in dieser Situation eine Therapie mit AChE-Inhibitoren.

Zusätzlich zur AChE ist BChE in der Lage ACh zu spalten (Shenhar-Tsarfaty et al. 2014). In den hier untersuchten SAOS-2-Zellen wurde BChE detektiert, die für den Abbau von AChE verantwortlich sein könnte. Spezielle Untersuchungen zur Bedeutung der Hydrolyse von ACh im Knochen könnte Gegenstand künftiger Arbeiten sein. Ob auch BChE eine Funktion in Zelladhäsion, Regulation von Apoptose und Zell-Matrix-

Interaktion im Knochen hat, wurde noch nicht erforscht. Da auch BChE in verschiedenen Isoformen vorkommt (Massoulié 2002), wären solche Funktionen denkbar.

In nativen und osteogen differenzierten MC3T3-E1 konnten wir beide Abbauenzyme nachweisen (Abb. 23). Im Gegensatz zu Genever et al. (1999) konnten wir keinen Unterschied der Expressionslevel von Präosteoblasten zu Osteoblasten mittels qualitativer RT-PCR nachweisen. Genever et al. (1999) beobachteten eine AChE-Expression nur von differenzierten kuboiden Osteoblasten, aber nicht von Prä-Osteoblasten. In weiterführenden Versuchen könnten mittels quantitativer PCR die tatsächlichen Expressionslevel von AChE und BChE in nativen und differenzierten MC3T3-E1-Zellen untersucht werden.

Einen interessanten Zusammenhang zwischen AChE und Knochenfunktion beleuchtet die Studie von Tamimi et al (2012): die neurodegenerative Erkrankung Morbus Alzheimer ist durch einen Mangel cholinergischer Neurone charakterisiert und wird daher mit AChE-Inhibitoren therapiert. Bei Alzheimerpatienten reduziert die Therapie mit den AChE-Inhibitoren Donepezil und Rivastigmin das Risiko von Hüftfrakturen (Tamimi et al. 2012). Vor allem ältere Alzheimerpatienten, die ein erhöhtes Osteoporoserisiko haben, könnten von dieser Therapie profitieren (Tamimi et al. 2012). Ob prinzipiell Pharmaka mit cholinergischer Wirkung (wie AChE-Inhibitoren) einen positiven Effekt auf die Knochenphysiologie, insbesondere bei Osteoporosepatienten haben, könnte in Tierversuchen und Versuchen mit Zelllinien und primären Zellen genauer untersucht werden.

4.5 Synopsis der Ergebnisse

Die nachfolgende Abb. 25 zeigt nochmals zusammenfassend wichtige im vorherigen Text aufgeführte Studienergebnisse, die den Einfluss von ACh auf den Knochen und Knochenzellen belegen. Einige dieser Studien waren Grundlagen für die Entstehung der vorliegenden Arbeit. Für die Abbildung wurden jedoch auch aktuelle Forschungsergebnisse mitberücksichtigt.

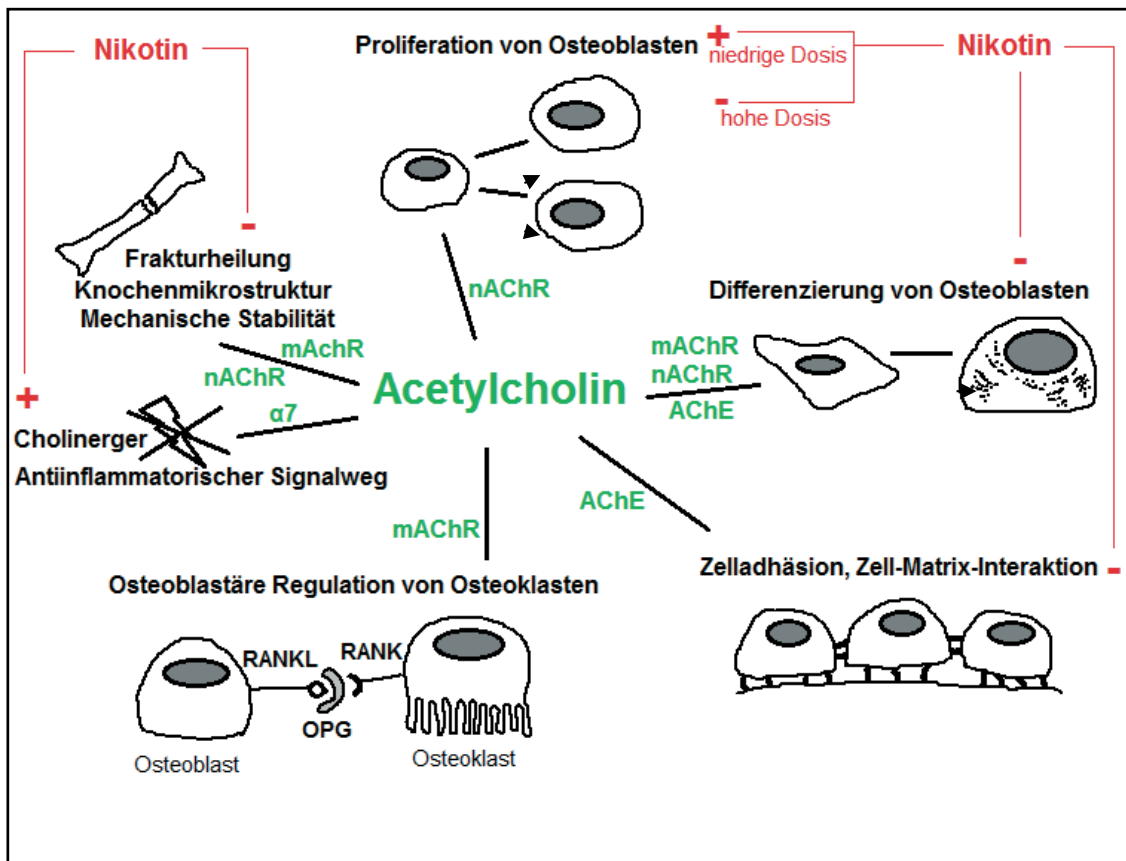


Abb. 25: Darstellung der Effekte von ACh auf Osteoblasten.

Zusammenfassend zeigt diese schematische Darstellung die Effekte von ACh auf Osteoblasten auf Basis der Forschungsergebnisse von Rothem et al. (2009), Sato et al. (2010), Walker et al. (2010), Chen et al. (2011), Liu et al. (2011), Rothem et al. (2011), Kliemann et al. (2012) und Ma et al. (2014).

Folgende Schemata veranschaulichen wie die Mechanismen des non-neuronalen Systems entsprechend unserer erhobenen Daten in MC3T3-E1- und SAOS-2-Zellen konkret ablaufen könnten. Zudem werden die Unterschiede der Expressionsmuster der undifferenzierten und differenzierten MC3T3-E1-Zellen sowie zwischen den beiden Spezies Maus und Mensch deutlich.

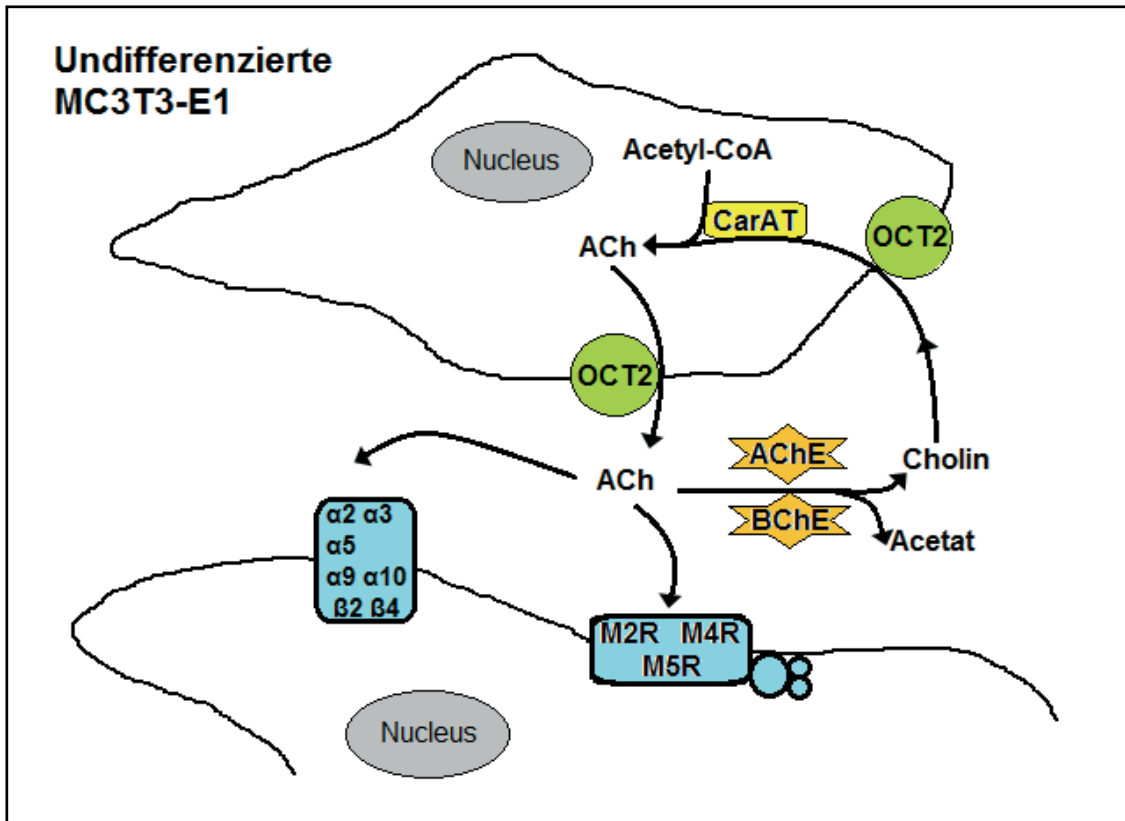


Abb. 26: Non-neurales cholinerges System der murinen undifferenzierten MC3T3-E1-Zellen.

Die Bildung von ACh kann durch CarAT (gelb) bewerkstelligt werden. Acetyl-CoA steht in jeder Zelle zur Verfügung. Cholin muss von außen transferiert werden. OCT2 (grün) könnte diesen Transport in nativen MC3T3-E1-Zellen übernehmen. Andere mögliche Transportmechanismen für Cholin müssen noch belegt werden. Freisetzung von ACh erfolgt wie bei vielen anderen non-neuronalen Zellen nicht durch vesikuläre Exozytose, sondern könnte ebenfalls durch OCT2 erfolgen. Extrazelluläres ACh kann durch beide gebildete Abbauenzyme BChE und AChE (orange) hydrolysiert werden. Undifferenzierte MC3T3-E1-Zellen exprimieren M₁R, M₂R und M₄R sowie die nikotinischen Rezeptor-UE α₂, α₃, α₅, α₉, α₁₀, β₂, und β₄ (Rezeptoren in blau). Bei dieser Darstellung wurde die mögliche Kombination der nAChR-UE zu Rezeptorsubtypen nicht berücksichtigt, siehe hierzu Tab. 9 und Tab. 10.

Nach Kultivierung der MC3T3-E1-Zellen im osteogenen Medium konnte eine Änderung des Expressionsmusters der Komponenten des cholinergen Systems beobachtet werden: differenzierte MC3T3-E1 zeigten eine Hochregulation von OCT1, M₅R und nAChR-UE β₃, sowie eine Herunterregulation der nAChR-UE α₃. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass bestimmte Komponenten des cholinergen Systems zu verschiedenen Stadien der Zelldifferenzierung von Osteoblasten gebildet werden und dass sie möglicherweise an der Regulation der Osteoblastogenese beteiligt sind. In reifen osteoblastären MC3T3-E1-Zellen könnte das cholinerge System wie folgt aussehen:

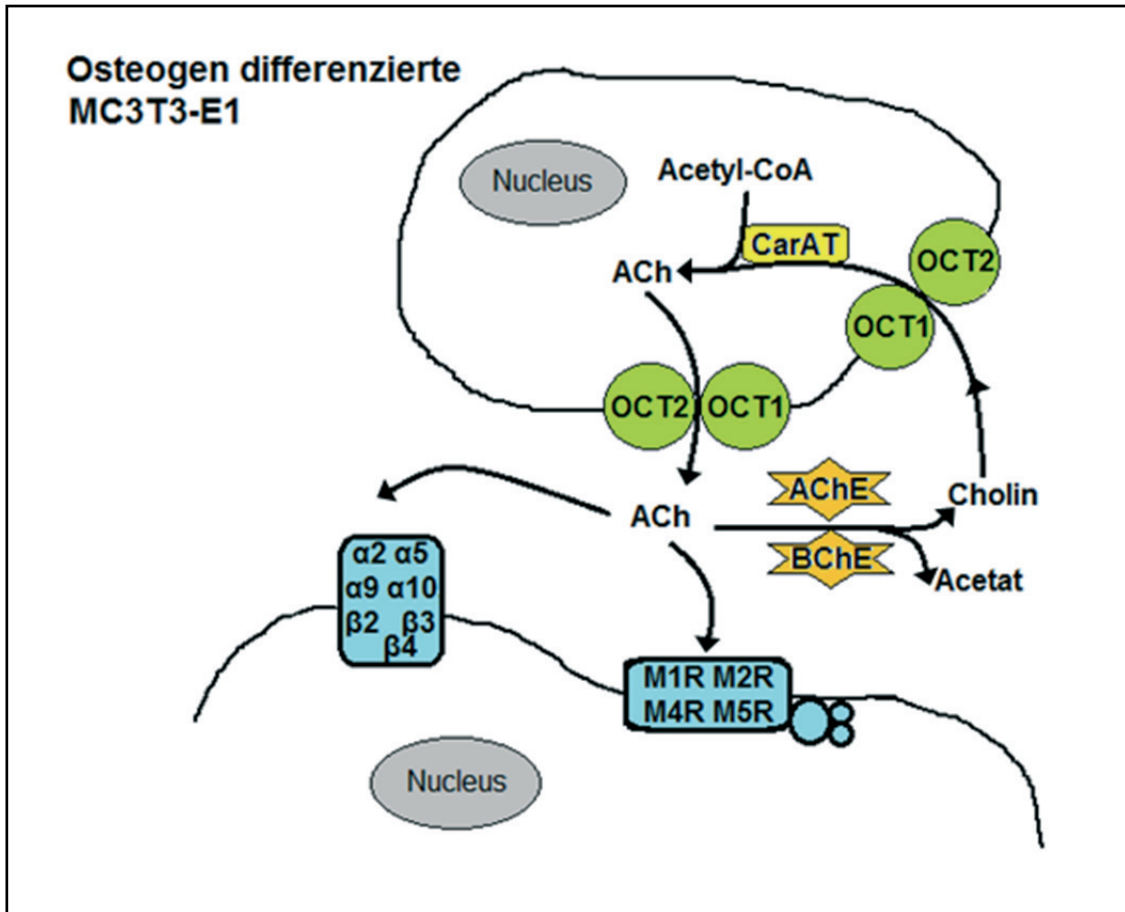


Abb. 27: Non-neurales cholinerges System der murinen differenzierten MC3T3-E1-Zellen.

Die Zellen ändern ihre Zellform von fusiform zu kuboid. Synthese von ACh: via CarAT. Wiederaufnahme von Cholin könnte über OCT1 und OCT2 (grün) reguliert sein, welche ebenfalls die Freisetzung von ACh vermitteln können. Degradation: durch AChE und BChE (orange). Reife osteoblastäre MC3T3-E1-Zellen bilden M₁R, M₂R, M₄R und M₅R sowie die nikotinischen Rezeptor-UE α₂, α₅, α₉, α₁₀, β₂, β₃ und β₄ (Rezeptoren in blau). Bei dieser Darstellung wurde die mögliche Kombination der nAChR-UE zu Rezeptorsubtypen nicht berücksichtigt, siehe hierzu Tab. 9 und Tab. 10.

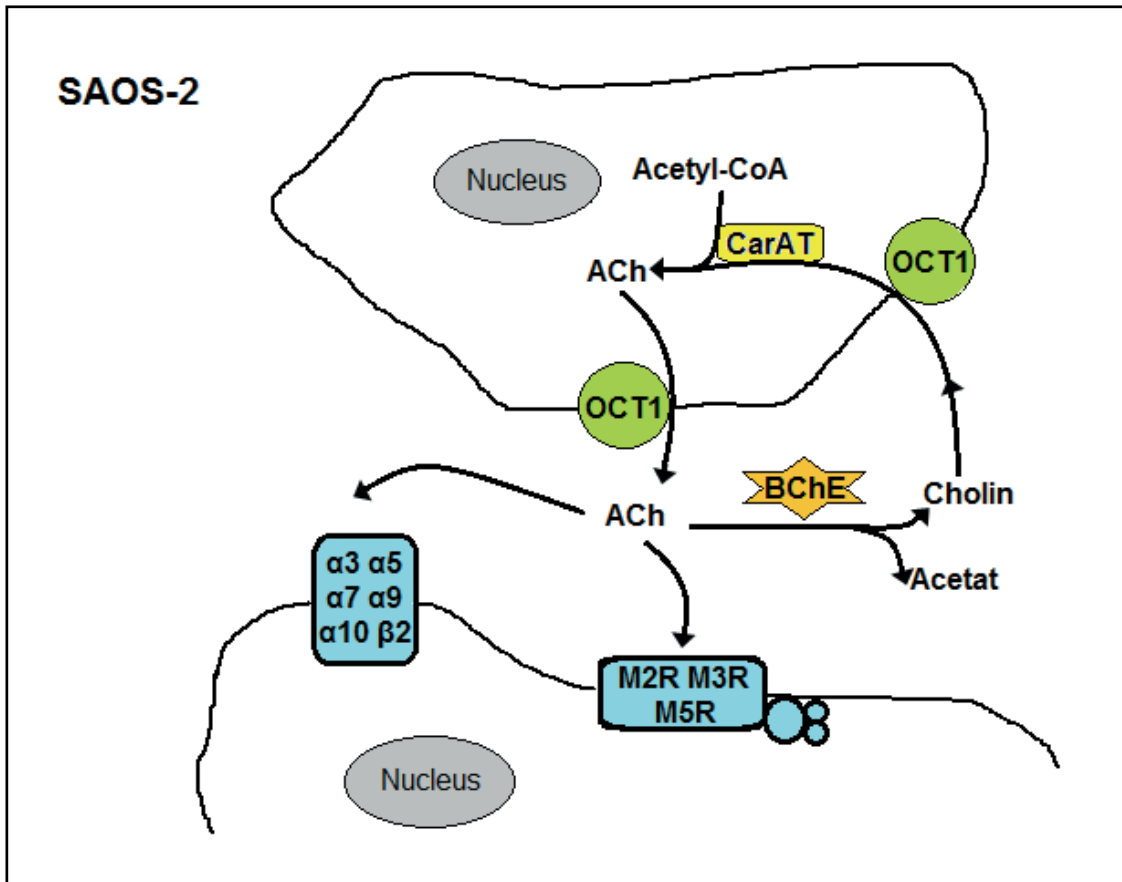


Abb. 28: Non-neuronalen cholinerges System der humanen SAOS-2-Zellen.

Im Vergleich der Spezies Maus und Mensch könnte in den humanen Osteosarkomzellen die Bildung von ACh ebenfalls über die CarAT laufen. Die humanen Zellen exprimieren OCT1, welches hier die Aufnahme von Cholin in die Zelle sowie die Freisetzung von ACh aus der Zelle vermitteln könnte. Im Unterschied zu murinen Zellen exprimieren die SAOS-2-Zellen nur BChE zum Abbau des ACh. Sie exprimieren M₂R, M₃R und M₅R, sowie die nikotinischen Rezeptor-UE α₃, α₅, α₇, α₉, α₁₀ und β₂. Bei dieser Darstellung wurde die mögliche Kombination der nAChR-UE zu Rezeptorsubtypen nicht berücksichtigt, siehe hierzu Tab. 9 und Tab. 10.

4.6 Schlussfolgerungen und Ausblick

Zusammenfassend demonstriert diese Arbeit die Existenz aller notwendigen molekularen Komponenten für Synthese, Freisetzung, Degradation und Wiederaufnahme von ACh in humanen und murinen osteoblastären Zellen, wie sie bereits für non-neuronale cholinerge Systeme anderer Zelltypen und Gewebe beschrieben wurde. Eine Vielzahl cholinergischer Rezeptoren wurde von den hier untersuchten Zellen exprimiert. Unterschiede zwischen humanen und murinen Zellen lassen auf Spezies-spezifische Eigenschaften des non-neuronalen cholinergen Systems osteoblastärer Zellen schließen. Die Expression bestimmter Komponenten wurde in der Differenzierungsphase von Prä-Osteoblasten

zu reifen matrixproduzierenden Osteoblasten hoch- bzw. herunterreguliert. Folglich scheinen sie eine Rolle während der Osteoblastogenese zu spielen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit füllen eine Wissenslücke im Verständnis des endogenen ossären cholinergen Systems und somit der Physiologie des Knochenstoffwechsels. Diese Erkenntnisse liefern Grundsteine für weiterführende Studien. Denn für die Entwicklung neuer Therapiestrategien zur Behandlung von Knochenerkrankungen werden grundlegende Informationen über die Expression des cholinergen Systems benötigt. Es wäre daran anknüpfend interessant, die Expression und die Änderung des Expressionsmusters bestimmter cholinergischer Rezeptoren in ossären Zellen unter pathologischen Bedingungen zu untersuchen. Experimente mit Knockout-Mäusen könnten spezifische Informationen über die Funktionen einzelner Komponenten des cholinergen Systems in ossären Zellen liefern, beispielsweise über die Rolle bestimmter cholinergischer Rezeptoren oder Bildungs- und Abbauenzyme von ACh.

Durch das gewonnene Wissen über das cholinerge System im Knochen eröffnen sich neue Therapiestrategien. Grundsätzlich könnte man mit dem Wissen des proliferativen Effektes von ACh in einer cholinerg-gerichteten Therapie zwei Ansätze verfolgen: wachstumsfördernd bei degenerativen Erkrankungen und wachstumshemmend bei proliferativen und malignen Erkrankungen.

Eine anti-proliferative Therapie im Sinne einer ACh-Blockade durch spezielle Rezeptorantagonisten käme beispielsweise in der Tumorthherapie zur Anwendung. Die Expression von M₃R im kleinzelligen Bronchialkarzinom, Mamma- und Kolonkarzinom und seine wachstumsfördernde Funktion konnte bereits nachgewiesen werden (Song et al. 2003, Song et al. 2007). Für den Knochen kommen maligne Tumore wie Osteosarkome für eine solche Therapie mit Rezeptorantagonisten in Betracht. Am Beispiel der hier untersuchten humanen Osteosarkomzelllinie SAOS-2 wären weitere Studien angebracht, um herauszufinden, welche cholinergen Rezeptoren genau in die Regulation der Zellproliferation involviert sind.

Im Gegensatz dazu ist der proliferative Effekt in der Behandlung degenerativer Erkrankungen erwünscht: hier könnten AChE-Inhibitoren oder spezifische Rezeptoragonisten die wachstumsfördernde Wirkung von ACh verstärken, z.B. für die Therapie der Osteoporose.

Osteoporose ist eine der häufigsten osteodegenerativen Erkrankungen. Sie entsteht durch ein Ungleichgewicht zwischen Knochenresorption und -formation, wobei die Resorption überwiegt. Zurzeit wird Osteoporose vornehmlich mit anti-resorptiven Sub-

stanzen therapiert. Bisphosphonate, der RANKL-Inhibitor Denosumab und Östrogen hemmen die Knochenresorption. Allerdings existieren kaum Pharmaka, die aktiv die Knochenbildung stimulieren, aktuell darf nur Parathormon als anabole Substanz intermittierend angewendet werden (Khosla et al. 2008; Zuo et al. 2012). Für Therapie und Prävention von Knochenmasseverlust besteht also großer Bedarf für die Entwicklung weiterer Pharmaka, die die Knochenbildung stimulieren (Zuo et al. 2012). Hierfür ist Grundlagenforschung über die Mechanismen und Steuerung der Osteoblastogenese notwendig, um neue Zielstrukturen für die Pharmatherapie ausfindig zu machen. Das cholinerge System würde sich mit vielen potentiellen Zielstrukturen und als auto-/parakrines Regulationssystem des *bone remodelings* dafür geradezu anbieten.

Zukünftig sollte im Hinblick auf den Knochenstoffwechsel auch die Bedeutung der microRNAs beachtet werden. Inwiefern microRNAs die Expression spezifischer Komponenten des cholinergen Systems beeinflussen und dies die Funktion von Knochenzellen und somit physiologische und pathologische Prozesse steuert, wären interessante zukünftige Fragestellungen.

5 Zusammenfassung

Acetylcholin kommt in vielen non-neuronalen Zellen und Geweben vor und ist längst nicht mehr als reiner Neurotransmitter zu bezeichnen. In non-neuronalen Zellen beeinflusst ACh basale Zellfunktionen wie Differenzierung, Proliferation und Ausbildung von Zellkontakten. Die Bildung von ACh aus Cholin und Acetyl-CoA erfolgt durch die Enzyme ChAT und CarAT. In non-neuronalen Zellen wird die Freisetzung von ACh via OCT vermittelt, aber auch durch Exozytose mittels VAcT. ACh bindet extrazellulär an muskarinische und nikotinische ACh-Rezeptoren und wird durch die Enzyme AChE oder BChE gespalten. Nikotin bindet ebenfalls an nAChR und viele Studien belegten einen negativen Effekt von Nikotin auf den Knochenstoffwechsel, Frakturheilung und Knochenmikroarchitektur, sowie Zellproliferation und -differenzierung von Osteoblasten. Rauchen - also Nikotinkonsum - gilt als Risikofaktor für die Entstehung von Knochenkrankungen, z.B. Osteoporose. Bislang gab es noch keine systematische Darstellung eines ossären cholinergen Systems. Vor diesem Hintergrund postulierten wir die Existenz eines endogenen cholinergen Systems im Knochen. Mittels RT-PCR und Immunhistochemie wurde das cholinerge Expressionsmuster in der murinen osteoblastären Zelllinie MC3T3-E1 vor und nach osteoblastärer Differenzierung sowie in der humanen Osteosarkomzelllinie SAOS-2 bestimmt. In undifferenzierten murinen MC3T3-E1-Zellen wurde die Expression von CarAT, OCT2, BChE, AChE, M₁R, M₂R, M₄R, α 2, α 3, α 5, α 10, β 2, und β 4 nachgewiesen. Nach Kultivierung in osteogenem Medium exprimierten die MC3T3-E1-Zellen zusätzlich OCT1, M₅R und β 3, aber nicht mehr α 3. In humanen SAOS-2-Zellen konnten Transkripte für CarAT, OCT1, BChE, M₂R, M₃R, M₅R, α 3, α 5, α 7, α 9, α 10 und β 2 detektiert werden. Mittels Immunhistochemie wurde die Expression von α 3 und α 5 auf nativen MC3T3-E1- und SAOS-2-Zellen dargestellt. Diese Studie zeigt, dass osteoblastäre Zellen alle nötigen Komponenten für Bildung, Freisetzung, Rezeptorbindung und Abbau von ACh besitzen. Während der Osteoblastendifferenzierung scheinen vor allem OCT1, M₅R, α 9, β 3 und α 3 bei den murinen Zellen eine besondere Rolle zu spielen. Darüber hinaus stellten wir Spezies-spezifische Unterschiede im Expressionsmuster fest. Insgesamt scheint ACh ein weiterer wichtiger Regulator des Knochenstoffwechsels zu sein. Es bedarf weiterer Studien um die Bedeutung des ossären cholinergen Systems in vivo zu erforschen und um schließlich Therapieoptionen für ossäre Erkrankungen entwickeln zu können.

6 Summary

Acetylcholine occurs in many non-neuronal cells and tissues and is no longer considered a pure neurotransmitter. In non-neuronal cells, ACh controls basic cell functions such as cell differentiation, proliferation and maintenance of cell-contacts.

Synthesis of ACh out of choline and acetyl-CoA can be performed either by ChAT or CarAT. In non-neuronal cells release of ACh is mediated by OCT but also VACHT mediates the transport into vesicles and thus the release via exocytosis. ACh binds to its muscarinic or nicotinic receptors on the cell surface. The degradation enzymes AChE and BChE both hydrolyse extracellular ACh. Also, nicotine is known to bind to nAChR and many studies have shown a negative effect of nicotine on bone metabolism, fracture healing and bone microarchitecture, as well as cell proliferation and differentiation of osteoblasts. Smoking and consuming nicotine has been shown to be a risk factor for bone diseases like osteoporosis. Until we had published our data, there had been no systematic description of an osseous cholinergic system. Using this background we assumed the existence of an endogenous cholinergic system in bone.

RT-PCR and immunofluorescence were used to characterize the cholinergic expression in murine osteoblast-like MC3T3-E1 cells before and after osteoblastic differentiation and also in human osteosarcoma SAOS-2 cells. mRNA for CarAT, OCT2, BChE, AChE, M₁R, M₂R, M₄R, α 2, α 3, α 5, α 10, β 2, and β 4 were detected in undifferentiated murine MC3T3-E1 cells. After growing these cells in an osteogenic medium, OCT1, M₅R and β 3, were additionally found but a down-regulation of α 3 was observed. In human SAOS-2 cells, transcripts of CarAT, OCT1, BChE, M₂R, M₃R, M₅R, α 3, α 5, α 7, α 9, α 10 and β 2 were detected. By means of immunofluorescence α 3 and α 5 on native MC3T3-E1 cells and SAOS-2 cells were localised. Thus, murine osteoblast-like cells and human osteoblastic cells express all necessary components for synthesis, release, receptor binding and degradation of ACh. Certain components seem to play a particular role during osteoblastic differentiation in murine cells, especially OCT1, M₅R, α 9, β 3 and α 3. Furthermore, interspecies differences in the cholinergic expression pattern were observed. In conclusion, ACh is obviously an important regulator of bone metabolism. Further studies are needed to better understand its role and effect in vivo and to finally develop future pharmacological therapies for bone diseases. For this, the present study fills knowledge gaps in the understanding of the osseous cholinergic system.

7 Abkürzungsverzeichnis

α	Alpha
α -MEM	Alpha-Minimum Essential Medium
Abb.	Abbildung
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
ACh	Acetylcholin
AChE	Acetylcholinesterase
ACM	Arteria cerebri media
ALP	Alkalische Phosphatase
AP-1	activator protein-1
AS	Aminosäuresequenz
β	Beta
BChE	Butyrylcholinesterase
BMP	Bone Morphogenic Protein
Ca ²⁺	Calcium
cAMP	cyklisches Adenosinmonophosphat
CarAT	Carnitinacetyltransferase
cChAT	common type of ChAT
cDNA	copyDNA, komplementäre DNA
ChAT	Cholinacetyltransferase
CHT1	Cholintransporter
ColQ	Kollagen Q
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DAG	Diacylglycerol
DAPI	4,6-Diamin-2-Phenylindol-Dihydrochlorid
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
DTT	Dithiothreitol

Abkürzungsverzeichnis

EDTA	Ethylendiamin-Tetraacetacid
ER	endoplasmatisches Retikulum
EZM	Extrazellulärmatrix
FKS	fetales Kälberserum
γ	Gamma
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GPI	Glykophosphatidylinositol
G-Protein	Gunaosintriphosphat-Protein
$G_{i/o}$	inhibitorisches G-Protein
$G_{q/11}$	Phospholipase C-aktivierendes G-Protein
GTP	Gunaosintriphosphat
h	Stunde
H^+	Wasserstoff
H_2O	Wasser
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
IgG	Immunglobulin G
IP_3	Inositol-1,4,5-Trisphosphat
IMDM	Iscove's modified Dulbecco's Medium
Jak-STAT 3	Janus Kinase and Signal Transducer and Activator of Transcription 3
K^+	Kalium
M	Mol
mAChR	muskarinischer Acetylcholinrezeptor
MAPK	Mitogen-Aktivierte Proteinkinase
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer
min	Minute
M_1R - M_5R	muskarinischer Acetylcholinrezeptor Typ 1-5
mRNA	messenger Ribonucleinsäure
ms	Millisekunde
MSC	mesenchymale Stammzellen
Na^+	Natrium
nAChR	nikotinischer Acetylcholinrezeptor
NF- κ B	Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
nm	Nanometer

Abkürzungsverzeichnis

OCN	Osteocalcin
OCT	organische/r Kationentransporter
OCTN	Kationen- und Carnitintransporter
OPG	Osteoprotegerin
OPN	Osteopontin
P	Phosphat
PBS	Phosphate-buffered Saline
PDGF	Platelet-derived growth Factor
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat
PKC	Phosphokinase C
PLC	Phospholipase C
PRiMA	Protein-rich Membrane Anchor
P/S	Penicillin/Streptomycin
PTH-Rezeptor	Parathyroid Hormone- Rezeptor
PTH _r P	Parathyroid Hormone Related Protein
RANK/L	Receptor Activator of NF- κ B/-Ligand
RM	Rückenmark
RNA	Ribonucleinsäure
rpm	Rotationen pro Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	reverse Transkriptase
RT-PCR	Reverse-Transkriptase Polymerase-Ketten-Reaktion
s	Sekunde
SLC	Plasmamembran-gebundene polyspezifische organische Kationen-transporter
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TGF- β	Transforming Growth Factor- β
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TMD	Transmembrandomänen
U	Unit
u.a.	unter anderem
UE	Untereinheit
UV	Ultraviolett
v.a.	vor allem

Abkürzungsverzeichnis

VAcHt	vesikulärer ACh-Transporter
VEGF	vascular endothelial growth factor
z.B	zum Beispiel
Ø	ohne

8 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	(A-C) Organisation und Struktur der nAChR (Modifiziert nach Gotti et al. 2004).	5
Abb. 2:	Die Substratpermeabilität der nAChR (Modifiziert nach Kummer 2014, unpublizierte Darstellung).	6
Abb. 3:	Schema des mAChR mit Kopplung an ein G-Protein (Modifiziert nach Nathanson 2006).	9
Abb. 4:	AChE-Varianten (Modifiziert nach Massoulié 2002).	11
Abb. 5:	Schematische Darstellung des cholinergen Systems in non-neuronalen Zellen (Modifiziert nach Kummer et al. 2008).	12
Abb. 6:	Lichtmikroskopische Darstellung von Osteoblasten und Osteozyten (Modifiziert nach Clarke 2008).	15
Abb. 7:	Undifferenzierte MC3T3-E1-Zellen nach drei Tagen Kultivierung.	23
Abb. 8:	Osteogen differenzierte MC3T3-E1- Zellen nach 19 Tagen Kultivierung in osteogenem Medium.	23
Abb. 9:	Osteogen differenzierte MC3T3-E1- Zellen nach mehr als 19 Tagen Kultivierung in osteogenem Medium.	24
Abb. 10:	SAOS-2-Zellen.	25
Abb. 11:	Agarosegel der RT-PCR-Produkte zum Nachweis der ACh-Syntheseenzyme in humanen SAOS-2-Zellen.	36
Abb. 12:	Agarosegel der RT-PCR-Produkte zum Nachweis der ACh-Syntheseenzyme in murinen nativen und differenzierten MC3T3-E1-Zellen.	37
Abb. 13:	Gel der RT-PCR zum Nachweis der ACh-Transporter in humanen SAOS-2-Zellen.	38
Abb. 14:	Gel der RT-PCR zum Nachweis der ACh-Transporter in MC3T3-E1-Zellen.	38
Abb. 15:	Gel der RT-PCR zum Nachweis der mAChR in SAOS-2-Zellen.	39
Abb. 16:	Gel der RT-PCR zum Nachweis der mAChR in MC3T3-E1-Zellen.	39
Abb. 17:	Gel der RT-PCR zum Nachweis der nAChR-UE $\alpha 2$ bis $\alpha 10$ in SAOS-2-Zellen.	40
Abb. 18:	Gel der RT-PCR zum Nachweis der nAChR-UE $\alpha 2$ bis $\alpha 6$ in MC3T3-E1-Zellen.	41

Abb. 19: Gel der RT-PCR zum Nachweis der nAChR-UE $\alpha 7$ - $\alpha 10$ in MC3T3-E1-Zellen.....41

Abb. 20: Gel der RT-PCR zum Nachweis der nAChR-UE $\beta 2$ - $\beta 4$ in SAOS-2-Zellen. ..42

Abb. 21: Gel der RT-PCR zum Nachweis der nAChR-UE $\beta 2$ - $\beta 4$ in MC3T3-E1-Zellen... ..42

Abb. 22: Gel der RT-PCR zum Nachweis der ACh-Abbauenzyme in SAOS-2-Zellen.....43

Abb. 23: Gel der RT-PCR zum Nachweis der ACh-Abbauenzyme in MC3T3-E1-Zellen.....43

Abb. 24: Immunfluoreszenz für $\alpha 3$ und $\alpha 5$ -UE des nAChR in vitro in SAOS-2- und nativen MC3T3-E1-Zellen.....45

Abb. 25: Darstellung der Effekte von ACh auf Osteoblasten.66

Abb. 26: Non-neuronales cholinerges System der murinen undifferenzierten MC3T3-E1-Zellen.67

Abb. 27: Non-neuronales cholinerges System der murinen differenzierten MC3T3-E1-Zellen.68

Abb. 28: Non-neuronales cholinerges System der humanen SAOS-2-Zellen.....69

9 Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Übersicht aller Zelllinien und Wachstumsbedingungen	28
Tab. 2:	Humane Primer	32
Tab. 3:	Murine Primer	33
Tab. 4:	Charakteristika der Primärantikörper	35
Tab. 5:	Übersicht der PCR-Ergebnisse: ACh-Synthaseenzyme und Transporter	44
Tab. 6:	Übersicht der PCR-Ergebnisse: muskarinische Acetylcholinrezeptoren	44
Tab. 7:	Übersicht der PCR-Ergebnisse: nikotinische Acetylcholinrezeptoren	44
Tab. 8:	Übersicht der PCR-Ergebnisse: ACh-Abbauenzyme, Haushaltsgen und Knochenmarker	44
Tab. 9:	Mögliche Bildung von α -Bungarotoxin-sensiblen nAChR in SAOS-2- und MC3T3-E1-Zellen	59
Tab. 10:	Mögliche Bildung von α -Bungarotoxin-resistenten nAChR in SAOS-2- und MC3T3-E1-Zellen	59

10 Literaturverzeichnis

Allen, T. G.; Brown, D. A. (1993): M2 muscarinic receptor-mediated inhibition of the Ca²⁺ current in rat magnocellular cholinergic basal forebrain neurones. In: *The Journal of physiology* 466, S. 173–189.

Amano, T. (1972): Neurotransmitter Synthesis by neuroblastoma clones. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 69 (1), S. 258–263

Anderson, A. A.; Ushakov, D. S.; Ferenczi, M. A.; Mori, R.; Martin, P.; Saffell, J. L. (2008): Morphoregulation by acetylcholinesterase in fibroblasts and astrocytes. In: *Journal of Cellular Physiology* 215 (1), S. 82–100.

Anderson, H. C. (2003): Matrix vesicles and calcification. In: *Current rheumatology reports* 5 (3), S. 222–226.

Arredondo, J.; Chernyavsky, A. I.; Jolkovsky, D. L.; Webber, R. J.; Grando, S. A. (2006): SLURP-2: A novel cholinergic signaling peptide in human mucocutaneous epithelium. In: *Journal of Cellular Physiology* 208 (1), S. 238–245.

Beck, G. R.; Sullivan, E. C.; Moran, E.; Zerler, B. (1998): Relationship between alkaline phosphatase levels, osteopontin expression, and mineralization in differentiating MC3T3-E1 osteoblasts. In: *Journal of Cellular Biochemistry* 68 (2), S. 269–280.

Bellier, J.-P.; Kimura, H. (2011): Peripheral type of choline acetyltransferase: biological and evolutionary implications for novel mechanisms in cholinergic system. In: *Journal of Chemical Neuroanatomy* 42 (4), S. 225–235.

Bergström, J. (2004): Tobacco smoking and chronic destructive periodontal disease. In: *Odontology / the Society of the Nippon Dental University* 92 (1), S. 1–8.

Biedler, J. L.; Roffler-Tarlov, S.; Schachner, M., Freedman, L.S. (1978): Multiple Neurotransmitter Synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones. In: *Cancer Research* 38, S. 3751–3757.

Bigbee, J. W.; Sharma, K. V. (2004): The adhesive role of acetylcholinesterase (AChE): detection of AChE binding proteins in developing rat spinal cord. In: *Neurochemical Research* 29 (11), S. 2043–2050.

Bilbe, G.; Roberts, E.; Birch, M.; Evans, D. B. (1996): PCR phenotyping of cytokines, growth factors and their receptors and bone matrix proteins in human osteoblast-like cell lines. In: *Bone* 19 (5), S. 437–445.

Brodsky, B.; Persikov, A. V. (2005): Molecular structure of the collagen triple helix. In: *Advances in Protein Chemistry* 70, S. 301–339.

- Brüggmann, D.; Lips, K. S.; Pfeil, U.; Haberberger, R. V.; Kummer, W. (2003): Rat arteries contain multiple nicotinic acetylcholine receptor alpha-subunits. In: *Life Sciences* 72 (18-19), S. 2095–2099.
- Busch, A. E.; Quester, S.; Ulzheimer, J. C.; Waldegger, S.; Gorboulev, V.; Arndt, P. et al. (1996): Electrogenic properties and substrate specificity of the polyspecific rat cation transporter rOCT1. In: *The Journal of Biological Chemistry* 271 (51), S. 32599–32604.
- Carlisle, D. L.; Liu, X.; Hopkins, T. M.; Swick, M. C.; Dhir, R.; Siegfried, J. M. (2007): Nicotine activates cell-signaling pathways through muscle-type and neuronal nicotinic acetylcholine receptors in non-small cell lung cancer cells. In: *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* 20 (6), S. 629–641.
- Caulfield, M.P., Birdsall, N.J. (1998): Classification of muscarinic ACh Receptors. In: *Pharmacological Reviews* 50 (2), S. 279-290.
- Chen, Y.; Guo, Q.; Pan, X.; Qin, L.; Zhang, P. (2011): Smoking and impaired bone healing: will activation of cholinergic anti-inflammatory pathway be the bridge? In: *International orthopaedics* 35 (9), S. 1267–1270.
- Clarke, B. (2008): Normal bone anatomy and physiology. In: *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* (3), S. 131-139.
- Conroy, W.G.; Berg, D.K. (1995) Neurons can maintain multiple classes of nicotinic acetylcholine receptors distinguished by different subunit compositions. In: *The Journal of Biological Chemistry* 270, S.4424-4431.
- Couturier, S.; Bertrand, D.; Matter, J.M.; Hernandez, M.C.; Bertrand, S. et al. (1990): A neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit (alpha 7) is developmentally regulated and forms a homo-oligomeric channel blocked by alpha-BTX. In: *Neuron* 5 S. 847-856.
- Czekanska, E. M.; Stoddart, M.J.; Richards, R.G., Hayes, J.S. (2012): In search of an osteoblast cell model for in vitro research. In: *European Cells and Materials* 24, S. 1-17.
- Dani, J.A. (2001): Overview of nicotinic receptors and their role in the central nervous system. In: *Biological Psychiatry* 49, S. 166-174.
- de Jonge, W J; Ulloa, L. (2007): The alpha7 nicotinic acetylcholine receptor as a pharmacological target for inflammation. In: *British Journal of Pharmacology* 151 (7), S. 915–929.
- De la Riva, B.; Sánchez, E.; Hernández, A.; Reyes, R.; Tamimi, F.; López-Cabarcos, E. et al. (2010): Local controlled release of VEGF and PDGF from a combined brushite-chitosan system enhances bone regeneration. In: *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society* 143 (1), S. 45–52.

Drenckhahn, D. (2003): Anatomie Band 1: Zellen- und Gewebelehre, Entwicklungslehre, Skelett- und Muskelsystem, Atemsystem, Verdauungssystem, Harn- und Genitalsystem. *Urban & Fischer Verlag München*. 16. Auflage. S.133-149.

Eiden, L. E. (1998): The Cholinergic Gene Locus. In: *Journal of Neurochemistry* (70), S. 2227-2240

Eimar, H.; Tamimi, I.; Murshed, M.; Tamimi, F. (2013): Cholinergic regulation of bone. In: *Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions* 13 (2), S. 124–132.

Elgoyhen, A.B.; Johnson, D.S.; Boulter, J.; Vetter, D.E.; Heinemann, S. (1994) Alpha 9: an acetylcholinereceptor with novel pharmacological properties expressed in rat cochlea hair cells. In: *Cell* 79, S. 705-715

Elgoyhen, A.B.; Vetter, D.E.; Katz, E.; Rothlin, C.V.; Heinemann, S.F. et al. (2001) Alpha10: a determinant of nicotinic cholinergic receptor function in mammalian vestibular and cochlear mechanosensory hair cells. In: *Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA* 98, S. 3501-3506.

En-Nosse, M.; Hartmann, S.; Trinkaus, K.; Alt, V.; Stigler, B.; Heiss, C. et al. (2009): Expression of non-neuronal cholinergic system in osteoblast-like cells and its involvement in osteogenesis. In: *Cell and Tissue Research* 338 (2), S. 203–215.

Erickson, J. D. (1994): Functional identification of VACht and its expression from cholinergic gene locus. *Journal of Biological Chemistry* 269 (35), S. 21929-21932.

Falugi, C.; Aluigi, M. G. (2012): Early appearance and possible functions of non-neuromuscular cholinesterase activities. In: *Frontiers in Molecular Neuroscience* 5, Article 54, S. 1-12.

Feitelson, J B A; Rowell, P. P.; Roberts, C. S.; Fleming, J. T. (2003): Two week nicotine treatment selectively increases bone vascular constriction in response to norepinephrine. In: *Journal of Orthopaedic Research: official publication of the Orthopaedic Research Society* 21 (3), S. 497–502.

Fernandes (2007): The Post-translational phenotype of collagen synthesized by SAOS-2 osteosarcoma cells. In: *Bone* 40 (5); S.1343-1351.

Fogh, J.; Fogh, J. M.; Orfeo, T. (1977): One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. In: *Journal of the National Cancer Institute* 59 (1), S. 221–226.

Frucht, H.; Jensen, R. T.; Dexter, D.; Yang, W. L.; Xiao, Y. (1999): Human colon cancer cell proliferation mediated by the M3 muscarinic cholinergic receptor. In: *Clinical Cancer Research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 5 (9), S. 2532–2539.

- García-Contreras, R.; Kanagawa, S.; Beppu, Y.; Nagao, T.; Sakagami, H.; Nakajima, H. et al. (2011): Morphological features of osteoblasts cultured on ultraviolet-irradiated titanium plates. In: *In vivo* 25 (4), S. 649–655.
- Genever, P. G.; Birch, M. A.; Brown, E.; Skerry, T. M. (1999): Osteoblast-derived acetylcholinesterase: a novel mediator of cell-matrix interactions in bone? In: *Bone* 24 (4), S. 297–303.
- Gotti, C.; Clementi, F. (2004): Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology. In: *Progress in Neurobiology* 74 (6), S. 363–396.
- Grando, S. A. (1997): Biological functions of keratinocyte cholinergic receptors. In: *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings* 2 (1), S. 41–48.
- Grando, S. A.; Pittelkow, M. R.; Schallreuter, K. U. (2006): Adrenergic and cholinergic control in the biology of epidermis: physiological and clinical significance. In: *The Journal of Investigative Dermatology* 126 (9), S. 1948–1965.
- Grigoriadis, A. E.; Heersche, J. N.; Aubin, J. E. (1988): Differentiation of muscle, fat, cartilage, and bone from progenitor cells present in a bone-derived clonal cell population: effect of dexamethasone. In: *The Journal of Cell Biology* 106 (6), S. 2139–2151.
- Grisaru, D.; Lev-Lehman, E.; Shapira, M.; Chaikin, E.; Lessing, J. B.; Eldor, A. et al. (1999): Human osteogenesis involves differentiation-dependent increases in the morphogenetically active 3' alternative splicing variant of acetylcholinesterase. In: *Molecular and Cellular Biology* 19 (1), S. 788–795.
- Groves, C. E.; Suhre, W. B.; Cherrington, N. J.; Wright, S. H. (2006): Sex differences in the mRNA, protein, and functional expression of organic anion transporter (Oat) 1, Oat3, and organic cation transporter (Oct) 2 in rabbit renal proximal tubules. In: *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 316 (2), S. 743–752.
- Hadjidakis, D. J.; Androulakis, I. I. (2006): Bone Remodeling. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 1092 (1), S. 385–396.
- Hanin, G.; Soreq, H. (2011): Cholinesterase-Targeting microRNAs Identified in silico Affect Specific Biological Processes. In: *Frontiers in Molecular Neuroscience* 4, S. 28.
- Hanna-Mitchell, A. T.; Beckel, J. M.; Barbadora, S.; Kanai, A. J.; de Groat, William C.; Birder, L. A. (2007): Non-neuronal acetylcholine and urinary bladder urothelium. In: *Life Sciences* 80 (24-25), S. 2298–2302.
- Hapidin, H.; Othman, F.; Soelaiman, I. N.; Shuid, A. N.; Mohamed, N. (2011): Effects of nicotine administration and nicotine cessation on bone histomorphometry and bone biomarkers in Sprague-Dawley male rats. In: *Calcified tissue international* 88 (1), S. 41–47.

- Herber, D. L.; Severance, E. G.; Cuevas, J.; Morgan, D.; Gordon, M. N. (2004): Biochemical and histochemical evidence of nonspecific binding of alpha7nAChR antibodies to mouse brain tissue. In: *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society* 52 (10), S. 1367–1376.
- Hernigou, J.; Schuind, F. (2013): Smoking as a predictor of negative outcome in diaphyseal fracture healing. In: *International Orthopaedics* 37 (5), S. 883–887.
- Hogan, E. M.; Casserly, A. P.; Scofield, M. D.; Mou, Z.; Zhao-Shea, R.; Johnson, C. W. et al. (2014): miRNAome analysis of the mammalian neuronal nicotinic acetylcholine receptor gene family. In: *RNA (New York, N.Y.)* 20 (12), S. 1890–1899.
- Hong, D.; Chen, H.-X.; Yu, H.-Q.; Liang, Y.; Wang, C.; Lian, Q.-Q. et al. (2010): Morphological and proteomic analysis of early stage of osteoblast differentiation in osteoblastic progenitor cells. In: *Experimental Cell Research* 316 (14), S. 2291–2300.
- Hoogduijn, M. J.; Rakonczay, Z.; Genever, P. G. (2006): The effects of anticholinergic insecticides on human mesenchymal stem cells. In: *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology* 94 (2), S. 342–350.
- Horiuchi, Y.; Kimura, R.; Kato, N.; Fujii, T.; Seki, M.; Endo, T. et al. (2003): Evolutional study on acetylcholine expression. In: *Life Sciences* 72 (15), S. 1745–1756.
- Inkson, C. A.; Brabbs, A. C.; Grewal, T. S.; Skerry, T. M.; Genever, P. G. (2004): Characterization of acetylcholinesterase expression and secretion during osteoblast differentiation. In: *Bone* 35 (4), S. 819–827.
- Jalava, A. M.; Heikkilä, J.; Akerlind, G.; Pettit, G.R.; Akerman, K.E. (1990): Effects of bryostatins 1 and 2 on morphological and functional differentiation of SH-SY5Y human neuroblastoma cells. In: *Cancer Research* 50, S. 3422-3428.
- Johnson, G.; Moore, S. W. (2007): Acetylcholinesterase readthrough peptide shares sequence similarity to the 28-53 peptide sequence of the acetylcholinesterase adhesion-mediated site and competes for ligand binding in vitro. In: *Journal of molecular neuroscience* 31 (2), S. 113–126.
- Jositsch, G.; Papadakis, T.; Haberberger, R. V.; Wolff, M.; Wess, J.; Kummer, W. (2009): Suitability of muscarinic acetylcholine receptor antibodies for immunohistochemistry evaluated on tissue sections of receptor gene-deficient mice. In: *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 379 (4), S. 389–395.
- Katono, T.; Kawato, T.; Tanabe, N.; Suzuki, N.; Yamanaka, K.; Oka, H. et al. (2006): Nicotine treatment induces expression of matrix metalloproteinases in human osteoblastic Saos-2 cells. In: *Acta biochimica et biophysica Sinica* 38 (12), S. 874–882.
- Kawashima, K.; Fujii, T.; Moriwaki, Y.; Misawa, H. (2012): Critical roles of acetylcholine and the muscarinic and nicotinic acetylcholine receptors in the regulation of immune function. In: *Life Sciences* 91 (21-22), S. 1027–1032.

- Kawashima, K.; Yoshikawa, K.; Fujii, Y. X.; Moriwaki, Y.; Misawa, H. (2007): Expression and function of genes encoding cholinergic components in murine immune cells. In: *Life Sciences* 80 (24-25), S. 2314–2319.
- Kerem, A.; Kronman, C.; Bar-Nun, S.; Shafferman, A.; Velan, B. (1993): Interrelations between assembly and secretion of recombinant human acetylcholinesterase. In: *The Journal of Biological Chemistry* 268 (1), S. 180–184.
- Khiroug, S.S.; Harkness, P.C.; Lamb, P.W.; Sudweeks, S.N.; Khiroug, L. et al. (2002): Rat nicotinic ACh receptor alpha7 and beta2 subunits co-assemble to form functional heteromeric nicotinic receptor channels. In: *The Journal of Physiology* 540, S.425-434.
- Khosla, S.; Westendorf, J. J.; Oursler, M. J. (2008): Building bone to reverse osteoporosis and repair fractures. In: *Journal of Clinical Investigation* 118 (2), S. 421–428.
- Kim, D.-R.; Rah, S. H.; Sohn, J. H.; Yeh, B.-I.; Ko, C. M.; Park, J. S. et al. (2007): Calcium mobilization by activation of M(3)/M(5) muscarinic receptors in the human retinoblastoma. In: *Journal of pharmacological sciences* 105 (2), S. 184–192.
- Kliemann, K.; Kneffel, M.; Bergen, I.; Kampschulte, M.; Langheinrich, A. C.; Dürsel, L. et al. (2012): Quantitative analyses of bone composition in acetylcholine receptor M₃R and alpha7 knockout mice. In: *Life Sciences* 91 (21-22), S. 997–1002.
- Koepsell, H. (2013): The SLC22 family with transporters of organic cations, anions and zwitterions. In: *Molecular aspects of medicine* 34 (2-3), S. 413–435.
- Koepsell, H.; Lips, K.; Volk, C. (2007): Polyspecific Organic Cation Transporters: Structure, Function, Physiological Roles, and Biopharmaceutical Implications. In: *Pharmaceutical Research* 24 (7), S. 1227–1251.
- Krall, E. A.; Dawson-Hughes, B. (1999): Smoking increases bone loss and decreases intestinal calcium absorption. In: *Journal of Bone and Mineral Research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 14 (2), S. 215–220.
- Kummer, W.; Lips, K. S.; Pfeil, U. (2008): The epithelial cholinergic system of the airways. In: *Histochemistry and Cell Biology* 130 (2), S. 219–234.
- Kummer, W.; Wiegand, S.; Akinci, S.; Wessler, I.; Schinkel, A. H.; Wess, J. et al. (2006): Role of acetylcholine and polyspecific cation transporters in serotonin-induced bronchoconstriction in the mouse. In: *Respiratory Research* 7, S. 65.
- Lanyon, L. E. (1993): Osteocytes, strain detection, bone modeling and remodeling. In: *Calcified Tissue International* 53, S102-107;
- Lips, K. S.; Volk, C.; Schmitt, B. M.; Pfeil, U.; Arndt, P.; Miska, D. et al. (2005): Polyspecific cation transporters mediate luminal release of acetylcholine from bronchial epithelium. In: *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 33 (1), S. 79–88.

Lips, K. S.; Wunsch, J.; Zarghooni, S.; Bschiepfer, T.; Schukowski, K.; Weidner, W. et al. (2007): Acetylcholine and Molecular Components of its Synthesis and Release Machinery in the Urothelium. In: *European Urology* 51 (4), S. 1042–1053.

Liu, P.-S.; Chen, Y.-Y.; Feng, C.-K.; Lin, Y.-H.; Yu, T.-C. (2011): Muscarinic acetylcholine receptors present in human osteoblast and bone tissue. In: *European Journal of Pharmacology* 650 (1), S. 34–40.

Lüllmann-Rauch, R. (2003): Histologie. *Thieme, Stuttgart*. 1. Auflage. S.122-134.

Ma, L.; Wu, X.; Ling-Ling, E.; Wang, D.-S.; Liu, H.-C. (2009): The transmembrane transport of metformin by osteoblasts from rat mandible. In: *Archives of Oral Biology* 54 (10), S. 951–962.

Ma, L.; Zwahlen, R. A.; Zheng, L. W.; Sham, M. H. (2011): Influence of nicotine on the biological activity of rabbit osteoblasts. In: *Clinical oral Implants Research* 22 (3), S. 338–342.

Ma, Y.; Li, X.; Fu, J.; Li, Y.; Gao, L.; Yang, L. et al. (2014): Acetylcholine affects osteocytic MLO-Y4 cells via acetylcholine receptors. In: *Molecular and Cellular Endocrinology* 384 (1-2), S. 155–164.

Machado, Giscard José Ribeiro; Dias, Sheila Mônica Damásio; Bosco, A. F.; Okamoto, T.; Bedran de Castro, João César; Dornelles, Rita Cássia Menegati (2010): Action of nicotine and ovariectomy on bone regeneration after tooth extraction in rats. In: *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 68 (11), S. 2675–2681.

Maeda, S. S.; Lazaretti-Castro, M. (2014): An overview on the treatment of postmenopausal osteoporosis. In: *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia* 58 (2), S. 162–171.

Massoulie, J. (2002): Origin of molecular Diversity and functional anchoring of Cholinesterases. In: *Neurosignals* 11, S. 130-143.

Matthiesen, S.; Bahulayan, A.; Kempkens, S.; Haag, S.; Fuhrmann, M.; Stichnote, C. et al. (2006): Muscarinic receptors mediate stimulation of human lung fibroblast proliferation. In: *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 35 (6), S. 621–627.

McCarthy, I. D.; Andhoga, M.; Batten, J. J.; Mathie, R. T. (1997): Endothelium-dependent vasodilatation produced by the L-arginine/nitric oxide pathway in normal and ischemic bone. In: *Acta orthopaedica Scandinavica* 68 (4), S. 361–368.

Meurs, H.; Dekkers, Bart G J; Maarsingh, H.; Halayko, A. J.; Zaagsma, J.; Gosens, R. (2013): Muscarinic receptors on airway mesenchymal cells: novel findings for an ancient target. In: *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* 26 (1), S. 145–155.

- Millar, N. S.; Harkness, P. C. (2008): Assembly and trafficking of nicotinic acetylcholine receptors (Review). In: *Molecular Membrane Biology* 25 (4), S. 279–292.
- Misawa, H.; Ishii, K.; Deguchi, T. (1992): Gene expression of mouse choline acetyltransferase. Alternative splicing and identification of a highly active promoter region. In: *The Journal of Biological Chemistry* 267 (28), S. 20392–20399.
- Miyahara, T.; Nemoto, M.; Tukamoto, S.; Yamada, H.; Kozuka, H.; Kuze, S. et al. (1991): Induction of metallothionein and stimulation of calcification by dexamethasone in cultured clonal osteogenic cells, MC3T3-E1. In: *Toxicology Letters* 57 (3), S. 257–267.
- Moretti, M.; Zoli, M.; George, A.A.; Lukas, R.J.; Pistillo, F. et al. (2014) The Novel $\alpha_7\beta_2$ -Nicotinic Acetylcholine Receptor Subtype Is Expressed in Mouse and Human Basal Forebrain: Biochemical and Pharmacological Characterization. In: *Molecular Pharmacology* 86, S. 306-317
- Moser, N.; Mechawar, N.; Jones, I.; Gochberg-Sarver, A.; Orr-Urtreger, A.; Plomann, M. et al. (2007): Evaluating the suitability of nicotinic acetylcholine receptor antibodies for standard immunodetection procedures. In: *Journal of Neurochemistry* 102 (2), S. 479–492.
- Nakashima, T.; Hayashi, M.; Fukunaga, T.; Kurata, K.; Oh-Hora, M.; Feng, J. Q. et al. (2011): Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. In: *Nature medicine* 17 (10), S. 1231–1234.
- Nathanson, N. M. (2006): Muscarinic Acetylcholine Receptors. In: *Encyclopedia of Life Sciences*, S. 1-7.
- Ní Chróinín, D.; Glavin, P.; Power, D. (2013): Awareness of osteoporosis, risk and protective factors and own diagnostic status: a cross-sectional study. In: *Archives of osteoporosis* 8 (1-2), S. 117.
- Oda, Y.; Muroishi, Y.; Misawa, H.; Suzuki, S. (2004): Comparative study of gene expression of cholinergic system-related molecules in the human spinal cord and term placenta. In: *Neuroscience* 128 (1), S. 39–49.
- Okuda, T.; Haga, T. (2003): High-Affinity Choline Transporter. In: *Neurochemical Research* 28 (3/4), S. 483–488
- Okuda, T.; Konishi, A.; Misawa, H.; Haga, T. (2011): Substrate-Induced Internalization of the High-Affinity Choline Transporter. In: *Journal of Neuroscience* 31 (42), S. 14989–14997.

- Taylor, P.; Radic, Z. (1994): The Cholinesterases: From Genes to Proteins. In: *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 34, S. 281-320.
- Papke, R.L. (1993) The kinetic properties of neuronal nicotinic receptors: genetic basis of functional diversity. In: *Progress in Neurobiology* 41, S. 509-531
- Parsons, S. M. (2000): Transport mechanisms in acetylcholine and monoamine storage. In: *Faseb Journal* 14 (15), S. 2423–2434.
- Pereira, A.; McLaren, A.; Bell, W. R.; Copolov, D.; Dean, B. (2003): Potential clozapine target sites on peripheral hematopoietic cells and stromal cells of the bone marrow. In: *The Pharmacogenomics Journal* 3 (4), S. 227–234.
- Plotkin, L. I.; Bellido, T. (2013): Beyond gap junctions: Connexin43 and bone cell signaling. In: *Bone* 52 (1), S. 157–166.
- Pochini, L.; Scalise, M.; Galluccio, M.; Indiveri, C. (2012a): Regulation by physiological cations of acetylcholine transport mediated by human OCTN1 (SLC22A4). Implications in the non-neuronal cholinergic system. In: *Life Sciences* 91 (21-22), S. 1013–1016.
- Pochini, L.; Scalise, M.; Galluccio, M.; Pani, G.; Siminovitch, K. A.; Indiveri, C. (2012b): The human OCTN1 (SLC22A4) reconstituted in liposomes catalyzes acetylcholine transport which is defective in the mutant L503F associated to the Crohn's disease. In: *Biochimica et biophysica acta* 1818 (3), S. 559–565.
- Polzer, K.; Schett, G.; Zwerina, J. (2007): The lonely death: chondrocyte apoptosis in TNF-induced arthritis. In: *Autoimmunity* 40 (4), S. 333–336.
- Quarles, L. D.; Yohay, D.H.; Lever, L.; Caton, R.; Wenstrup, R.J. (1992): Distinct proliferative and differentiated stages of murine MC3T3-E1 cells in culture: An in vitro model of osteoblast development. In: *Journal of Bone and Mineral Research* 7 (6), S. 683-692.
- Raikin, S. M.; Landsman, J. C.; Alexander, V. A.; Froimson, M. I.; Plaxton, N. A. (1998): Effect of nicotine on the rate and strength of long bone fracture healing. In: *Clinical Orthopaedics and Related Research* (353), S. 231–237.
- Rana, O. R.; Schauerte, P.; Kluttig, R.; Schröder, J. W.; Koenen, R. R.; Weber, C. et al. (2010): Acetylcholine as an age-dependent non-neuronal source in the heart. In: *Autonomic Neuroscience : basic & clinical* 156 (1-2), S. 82–89.
- Rao, L. G.; Sutherland, M. K.; Reddy, G. S.; Siu-Caldera, M. L.; Uskokovic, M. R.; Murray, T. M. (1996): Effects of 1 α ,25-dihydroxy-16ene, 23yne-vitamin D3 on osteoblastic function in human osteosarcoma SaOS-2 cells: differentiation-stage dependence and modulation by 17-beta estradiol. In: *Bone* 19 (6), S. 621–627.

- Richardson, C. E.; Morgan, J. M.; Jasani, B.; Green, J. T.; Rhodes, J.; Williams, G. T. et al. (2003): Effect of smoking and transdermal nicotine on colonic nicotinic acetylcholine receptors in ulcerative colitis. In: *QJM : monthly journal of the Association of Physicians* 96 (1), S. 57–65.
- Roach, H. I. (1994): Why does bone matrix contain non-collagenous proteins? The possible roles of osteocalcin, osteonectin, osteopontin and bone sialoprotein in bone mineralisation and resorption. In: *Cell biology international* 18 (6), S. 617–628.
- Rodan, S. B.; Imai, Y.; Thiede, M.A.; Wesolowski, G.; Thompson, D. et al. (1987): Characterization of SAOS-2. In: *Cancer Research* 47, S. 4961-4966.
- Rodriguez-Diaz, R.; Dando, R.; Jacques-Silva, M. C.; Fachado, A.; Molina, J.; Abdulreda, M. H. et al. (2011): Alpha cells secrete acetylcholine as a non-neuronal paracrine signal priming beta cell function in humans. In: *Nature medicine* 17 (7), S. 888–892.
- Romano, S. J.; Corriveau, R. A.; Schwarz, R. I.; Berg, D. K. (1997): Expression of the nicotinic receptor alpha 7 gene in tendon and periosteum during early development. In: *Journal of Neurochemistry* 68 (2), S. 640–648.
- Rothem, D. E.; Rothem, L.; Dahan, A.; Eliakim, R.; Soudry, M. (2011): Nicotinic modulation of gene expression in osteoblast cells, MG-63. In: *Bone* 48 (4), S. 903–909.
- Rothem, D. E.; Rothem, L.; Soudry, M.; Dahan, A.; Eliakim, R. (2009): Nicotine modulates bone metabolism-associated gene expression in osteoblast cells. In: *Journal of Bone and Mineral Metabolism* 27 (5), S. 555–561.
- Saldaña, L.; Bensiamar, F.; Boré, A.; Vilaboa, N. (2011): In search of representative models of human bone-forming cells for cytocompatibility studies. In: *Acta Biomaterialia* 7 (12), S. 4210–4221.
- Sánchez-Pérez, A.; Moya-Villaescusa, M. J.; Caffesse, R. G. (2007): Tobacco as a risk factor for survival of dental implants. In: *Journal of Periodontology* 78 (2), S. 351–359.
- Sarathchandra, P.; Cassella, J. P.; Ali, S. Y. (2005): Enzyme histochemical localisation of alkaline phosphatase activity in osteogenesis imperfecta bone and growth plate: a preliminary study. In: *Micron* 36 (7-8), S. 715–720.
- Sata, R.; Ohtani, H.; Tsujimoto, M.; Murakami, H.; Koyabu, N.; Nakamura, T. et al. (2005): Functional analysis of organic cation transporter 3 expressed in human placenta. In: *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 315 (2), S. 888–895.
- Sato, T.; Abe, T.; Chida, D.; Nakamoto, N.; Hori, N.; Kokabu, S. et al. (2010): Functional role of acetylcholine and the expression of cholinergic receptors and components in osteoblasts. In: *FEBS Letters* 584 (4), S. 817–824.

Schlatter, E.; Klassen, P.; Massmann, V.; Holle, S. K.; Guckel, D.; Edemir, B. et al. (2013): Mouse organic cation transporter 1 determines properties and regulation of basolateral organic cation transport in renal proximal tubules. In: *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology* 466 (8), S. 1581-1589

Schoepfer, R.; Conroy, W. G.; Whiting, P.; Gore, M.; Lindstrom, J. (1990): Brain alpha-bungarotoxin binding protein cDNAs and MAbs reveal subtypes of this branch of the ligand-gated ion channel gene superfamily. In: *Neuron* 5 (1), S. 35-48.

Sekhon, H. S.; Keller, J. A.; Proskocil, B. J.; Martin, E. L.; Spindel, E. R. (2002): Maternal nicotine exposure upregulates collagen gene expression in fetal monkey lung. Association with alpha7 nicotinic acetylcholine receptors. In: *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 26 (1), S. 31-41.

Shaked, I.; Meerson, A.; Wolf, Y.; Avni, R.; Greenberg, D.; Gilboa-Geffen, A.; Soreq, H. (2009): MicroRNA-132 potentiates cholinergic anti-inflammatory signaling by targeting acetylcholinesterase. In: *Immunity* 31 (6), S. 965-973.

Shenhar-Tsarfaty, S.; Berliner, S.; Bornstein, N. M.; Soreq, H. (2014): Cholinesterases as biomarkers for parasympathetic dysfunction and inflammation-related disease. In: *Journal of Molecular Neuroscience : MN* 53 (3), S. 298-305.

Shi, Y.; Oury, F.; Yadav, V. K.; Wess, J.; Liu, X. S.; Guo, X. E. et al. (2010): Signaling through the M3 Muscarinic Receptor Favors Bone Mass Accrual by Decreasing Sympathetic Activity. In: *Cell Metabolism* 11 (3), S. 231-238.

Siegel, G.J. (2006): Basic neurochemistry. Molecular, cellular, and medical aspects. American Society for Neurochemistry. *Elsevier Academic*. 7. Edition, S. 185-209.

Song, P.; Sekhon, H. S.; Jia, Y.; Keller, J. A.; Blusztajn, J. K.; Mark, G. P.; Spindel, E. R. (2003): Acetylcholine is synthesized by and acts as an autocrine growth factor for small cell lung carcinoma. In: *Cancer Research* 63 (1), S. 214-221.

Song, P.; Sekhon, H. S.; Lu, A.; Arredondo, J.; Sauer, D.; Gravett, C. et al. (2007): M3 muscarinic receptor antagonists inhibit small cell lung carcinoma growth and mitogen-activated protein kinase phosphorylation induced by acetylcholine secretion. In: *Cancer Research* 67 (8), S. 3936-3944.

Soreq, H. (2014): Novel roles of non-coding brain RNAs in health and disease. In: *Frontiers in Molecular Neuroscience* 7, S. 55.

Spang, C.; Alfredson, H.; Ferguson, M.; Roos, B.; Bagge, J.; Forsgren, S. (2013): The plantaris tendon in association with mid-portion Achilles tendinosis: tendinosis-like morphological features and presence of a non-neuronal cholinergic system. In: *Histology and Histopathology* 28 (5), S. 623-632.

Spindel, E. R. (2012): Muscarinic receptor agonists and antagonists: effects on cancer. In: *Handbook of Experimental Pharmacology* (208), S. 451-468.

- Sriram, M.; Sainitya, R.; Kalyanaraman, V.; Dhivya, S.; Selvamurugan, N. (2014): Biomaterials mediated microRNA delivery for bone tissue engineering. In: *International Journal of Biological Macromolecules* 74C, S. 404–412.
- Sudo, H.; Kodama H.I.; Amagai, Y.; Shigehisa, Y.; Kasai, S. (1983): In vitro differentiation and calcification in a new clonal osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria. In: *The Journal of Cell Biology* 96, S. 191-198
- Sweet, D. H.; Miller, D. S.; Pritchard, J. B. (2001): Ventricular choline transport: a role for organic cation transporter 2 expressed in choroid plexus. In: *The Journal of Biological Chemistry* 276 (45), S. 41611–41619.
- Tamimi, I.; Ojea, T.; Sanchez-Siles, J. M.; Rojas, F.; Martin, I.; Gormaz, I. et al. (2012): Acetylcholinesterase inhibitors and the risk of hip fracture in Alzheimer's disease patients: a case-control study. In: *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 27 (7), S. 1518–1527.
- Tracey, K. J. (2002): The inflammatory reflex. In: *Nature* 420 (6917), S. 853–859.
- Tsim, K.; Soreq, H. (2012): Acetylcholinesterase: old questions and new developments. In: *Frontiers in Molecular Neuroscience* 5, S. 101.
- Tucek, S. (1982): The Synthesis of ACh in skeletal muscles of the rat. In: *Journal of Physiology* 322, S. 53-69.
- Urakami, Y.; Nakamura, N.; Takahashi, K.; Okuda, M.; Saito, H.; Hashimoto, Y.; Inui, K. (1999): Gender differences in expression of organic cation transporter OCT2 in rat kidney. In: *FEBS Letters* 461 (3), S. 339–342.
- Urakami, Y.; Okuda, M.; Saito, H.; Inui, K. (2000): Hormonal regulation of organic cation transporter OCT2 expression in rat kidney. In: *FEBS Letters* 473 (2), S. 173–176.
- Velan, B.; Kronman, C.; Ordentlich, A.; Flashner, Y.; Leitner, M.; Cohen, S.; Shafferman, A. (1993): N-glycosylation of human acetylcholinesterase: effects on activity, stability and biosynthesis. In: *The Biochemical Journal* 296 (3), S. 649–656.
- Waldburger, J.-M.; Boyle, D. L.; Pavlov, V. A.; Tracey, K. J.; Firestein, G. S. (2008): Acetylcholine regulation of synoviocyte cytokine expression by the alpha7 nicotinic receptor. In: *Arthritis and rheumatism* 58 (11), S. 3439–3449.
- Walker, J. G.; Smith, M. D. (2005): The Jak-STAT pathway in rheumatoid arthritis. In: *The Journal of rheumatology* 32 (9), S. 1650–1653.
- Walker, L. M.; Preston, M.R.; Magnay, J.L.; Thomas, P.B.M.; El Haj, A.J. (2001): Nicotinic regulation of c-fos and osteopontin expression in human-derived osteoblast-like cells und human trabecular bone organ culture. In: *Bone* 28 (6), S. 603-608.

Wang, D.; Christensen, K.; Chawla, K.; Xiao, G.; Krebsbach, P.H. et al. (1999): Isolation and Characterization of MC3T3-E1 Preosteoblast Subclones with Distinct In Vitro and In Vivo Differentiation/Mineralization Potential. In: *Journal of Bone and Mineral Research* 14 (6), S. 893-903.

Wang F., Gerzanich V., Wells G.B., Anand R., Peng X. et al.(1996) Assembly of human neuronal nicotinic receptor alpha5 subunits with alpha3, beta2, and beta4 subunits. In: *The Journal of Biological Chemistry* 271, S.17656-17665.

Wang, Y.; Ge, X.; Xu, X. F.; Wang, X. J. (2009): Acetylcholinesterase inhibitor is a potentially useful therapeutic agent for nicotine-induced periodontal disease. In: *Medical hypotheses* 73 (4), S. 604–605.

Ward, K. D.; Klesges, R. C. (2001): A meta-analysis of the effects of cigarette smoking on bone mineral density. In: *Calcified Tissue International* 68 (5), S. 259–270.

Wenisch, S.; Trinkaus, K.; Hild, A.; Hose, D.; Herde, K.; Heiss, C. et al. (2005): Human remaining debris: a source of multipotent stem cells. In: *Bone* 36 (1), S. 74–83.

Wessler, I.; Kirkpatrick, C.J.; Racké, K. (1999): Acetylcholine, a universal cell molecule in biological systems including human. In: *Journal of Bone and Mineral Research* 14 (6), S. 198-205.

Wessler, I.; Roth, E.; Deutsch, C.; Brockerhoff, P.; Bittinger, F. et al. (2001): Release of non-neuronal acetylcholine from the isolated human placenta is mediated by organic cation transporters. In: *British Journal of Pharmacology* 134, 951-956

Wessler, I.; Kilbinger, H.; Bittinger, F.; Unger, R.; Kirkpatrick, C. J. (2003): The non-neuronal cholinergic system in humans: Expression, function and pathophysiology. In: *Life Sciences* 72 (18-19), S. 2055–2061.

Wessler, I.; Kirkpatrick, C. J. (2008): Acetylcholine beyond neurons: the non-neuronal cholinergic system in humans. In: *British Journal of Pharmacology* 154 (8), S. 1558–1571.

Wessler, I.; Kirkpatrick, C. J.; Racké, K. (1998): Non-neuronal acetylcholine, a locally acting molecule, widely distributed in biological systems: expression and function in humans. In: *Pharmacology & Therapeutics* 77 (1), S. 59–79.

Whittaker, V.P.; Dowe, G. H. (1964): The identification of acetylcholine-like substance in synatosomes derived from guinea-pig brain as acetylcholine itself. In: *International journal of neuropharmacology* 3, S. 593–597.

Whyte, M. P. (1994): Hypophosphatasia and the role of alkaline phosphatase in skeletal mineralization. In: *Endocrine Reviews* 15 (4), S. 439–461.

Wienholds, E.; Plasterk, Ronald H A (2005): MicroRNA function in animal development. In: *FEBS Letters* 579 (26), S. 5911–5922.

Wolf-Johnston, A. S.; Hanna-Mitchell, A. T.; Buffington, C. A.; Shinde, S.; Roppolo, J. R.; Mayer, E.; Birder, L. A. (2012): Alterations in the non-neuronal acetylcholine synthesis and release machinery in esophageal epithelium. In: *Life Sciences* 91 (21-22), S. 1065–1069.

Yohay, D. A.; Zhang, J.; Thrailkill, K. M.; Arthur, J. M.; Quarles, L. D. (1994): Role of serum in the developmental expression of alkaline phosphatase in MC3T3-E1 osteoblasts. In: *Journal of Cellular Physiology* 158 (3), S. 467–475.

Yuhara, S.; Kasagi, S.; Inoue, A.; Otsuka, E.; Hirose, S.; Hagiwara, H. (1999): Effects of nicotine on cultured cells suggest that it can influence the formation and resorption of bone. In: *European Journal of Pharmacology* 383 (3), S. 387–393.

Zhang, X.-J.; Greenberg, D. S. (2012): Acetylcholinesterase involvement in apoptosis. In: *Frontiers in Molecular Neuroscience* 5, S. 40.

Zia, S.; Ndoye, A.; Nguyen, V. T.; Grando, S. A. (1997): Nicotine enhances expression of the alpha 3, alpha 4, alpha 5, and alpha 7 nicotinic receptors modulating calcium metabolism and regulating adhesion and motility of respiratory epithelial cells. In: *Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology* 97 (3), S. 243–262.

Zuo, C.; Huang, Y.; Bajis, R.; Sahih, M.; Li, Y.-P.; Dai, K.; Zhang, X. (2012): Osteoblastogenesis regulation signals in bone remodeling. In: *Osteoporosis International* 23 (6), S. 1653–1663.

Onlinequellen

Abb. 2, Kummer 2014:

<http://www.uni-giessen.de/cms/fbz/fb11/institute/anatomie/assoz/loewe/cholinergic%20seminars>
zuletzt aufgerufen am 09.03.2015

Links zum Primerdesign:

Gendatenbank: **<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>**
zuletzt aufgerufen am 09.03.2015

Suchprogramm „Primer 3“:

<http://frodo.wi.mit.edu/>
zuletzt aufgerufen am 09.03.2015

Website zur Überprüfung auf Genspezifität:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>
zuletzt aufgerufen am 09.03.2015

11 Publikationsverzeichnis

En-Nosse, M.; Hartmann, S.; Trinkaus, K.; Alt, V.; Stigler, B.; Heiss, C.; Kilian, O.; Schnettler, R; Lips, KS (2009): Expression of non-neuronal cholinergic system in osteoblast-like cells and its involvement in osteogenesis. In: *Cell and tissue research* 338 (2), S. 203–215.

12 Ehrenwörtliche Erklärung

Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

13 Danksagung

Hier möchte ich allen Menschen danken, die an der Entstehung dieser Arbeit beteiligt waren:

zu allererst geht mein herzlicher Dank an Frau Prof. Dr. Katrin Lips, nicht nur für die Überlassung des interessanten Themas, sondern auch für die außerordentlich gute Betreuung als Doktormutter. Sie stand mir bei allen Fragen zu Seite und ohne ihre stets hilfsbereite und kompetente Betreuung und ihre scheinbar unendliche Geduld wäre diese Arbeit nie zustande gekommen.

Herrn Prof. Dr. W. Kummer möchte ich für die Bereitstellung von Labormaterial, räumlichen und zeitlichen Ressourcen im Institut für Anatomie und Zellbiologie danken. Zusammenhängend all denen, die mich während der Durchführung dieser Arbeit tatkräftig unterstützt haben, mich in die Laborarbeit eingewiesen haben und bei vielen kleinen und größeren Problemen geholfen haben: Martin Bodenbenner, Anna Goldenberg, Petra Faulhammer, Silke Wiegand, Tamara Papadakis, Dr. R. Paddenberg.

Vielen Dank an Herrn Prof. Dr. C. Heiß sowie an Herrn Prof. Prof. h.c. Dr. Dr. Dr. h.c. R. Schnettler und den Mitarbeitern aus dem Labor für experimentelle Unfallchirurgie für die Unterstützung dieses Projekts. Bedanken möchte ich mich auch für die Bereitstellung der Zelllinien NS20Y und SH-SY5Y aus den Instituten für Neurologie und Pathologie der Universität Gießen.

Den (ehemaligen) Doktoranden Dr. Constanze Schmidmeier, Dr. Katharina Münch, Dr. Julia Wunsch, Dr. Miriam Wolf, Dr. Amir Rafiq und Dr. Rajender Nandigama möchte ich für die gemeinsame Zeit danken, und auch für die vielen Hilfestellungen, die ihr mir gegeben habt. Und besonders dir, Dr. Torben Lohmann.

Nicht vergessen werden sollen Dr. Christina Neugebauer und Inessa Markus, die während der Schreibphase dieser Arbeit eine wichtige Rolle gespielt haben, ich danke euch für die vielen motivierenden gemeinsamen Stunden am Schreibtisch.

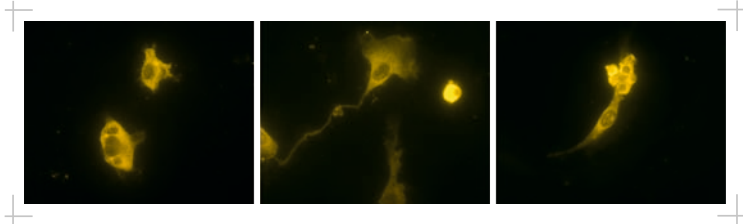
Nadine Nink hat mich in der letzten Korrekturphase des Manuskripts tatkräftig unterstützt – ganz herzlichen Dank für dein aufmerksames Adlerauge.

Ohne meine Familie, meinen Freund und meine Freunde, die mich immer auf allen Linien unterstützt haben, wäre ich heute nicht da, wo ich jetzt stehe.

Ich danke euch!

14 Tabellarischer Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus Datenschutzgründen entfernt.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6389-4



9 17 8 3 8 3 5 19 6 3 8 9 4 1