

**Laser- Mikrodissektion und molekulare Analyse
von endostalen „Lining Cells“ aus mineralisiertem
humanem Knochen**

CHRISTIAN DIERKES

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



edition scientifique
VVB LAUFFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

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

1. Auflage 2008

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 Author or the Publishers.

1st Edition 2008

© 2008 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

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

www.doktorverlag.de

**Laser- Mikrodissektion und molekulare Analyse
von endostalen „Lining Cells“ aus
mineralisiertem humanem Knochen**

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

vorgelegt von

Christian Dierkes

aus Bocholt

Gießen 2007

Aus dem Institut für Pathologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Leiter: Prof. Dr. med. A. Schulz

Gutachter: Prof. Dr. med. A. Schulz
PD Dr. med. O. Kilian

Tag der Disputation: 04. Juni 2008

Meiner Familie gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.	07
1.1. Osteologischer Hintergrund.	07
1.2. Der menschliche Knochen, Struktur und Funktion.	08
1.2.1 Struktur.	08
1.2.2 Funktion.	10
1.3 Knochenumbau.	11
1.4. „Lining Cells“.	13
1.5 Osteoporose.	15
1.5.1 Maximale Knochenmasse.	15
1.5.2 Östrogen.	15
1.5.3 Parathormon.	16
1.5.4 Idiopathische Osteoporose.	17
1.5.5 Morphologie des alternden Knochens.	17
1.6 Matrix-Metallo-Proteinase.	18
1.6.1 <i>MMP13/TIMP-1</i> – Bedeutung für den Knochenstoffwechsel.	18
1.7 Laser- unterstützte Mikrodisektion.	19
2. Fragestellung.	21
3. Material und Methoden.	23
3.1 Probengewinnung.	23
3.2 Aufarbeitung des Untersuchungsmaterials.	23
3.2.1 Verarbeitung von nativem Knochengewebe.	23
3.2.2 Erstellung von Gefrierschnitten am Kryostaten.	23
3.2.3 Färbung der Schnittpräparate.	24
3.3. Laser- unterstützte Mikrodisektion von „Lining Cells“.	24
3.4. Polymerase-Kettenreaktion (PCR).	26
3.4.1 Prinzip.	26
3.4.2 Qualitative PCR.	27
3.4.3 Reverse Transkription.	28

3.5.	Gelelektrophoretische Größenfraktionierung der amplifizierten DNA.	30
3.6.	Isolierung und Aufreinigung von RNA zur Primertestung.	30
4.	Ergebnisse.	32
4.1.	Gefrierschnitte von nativem, humanem Knochen.	32
4.2.	Laser- unterstützte Mikrodisektion von nativem Knochen.	33
4.3.	Amplifikation von <i>Cbfa1</i> in isolierten „Lining Cells“.	37
4.4.	Testung der „Primer“ für <i>MMP13</i> und <i>TIMP-1</i> .	38
4.5.	Expression von <i>MMP13</i> und <i>TIMP-1</i> in humanen „Lining Cells“.	39
5.	Diskussion.	40
5.1.	Gefrierschnitte von nativem humanem Knochen.	40
5.2.	Laser- unterstützte Mikrodisektion.	41
5.3.	Charakterisierung der isolierten Zellen.	42
5.4.	<i>MMP13</i> und <i>TIMP-1</i> .	43
5.4.1	Expression von <i>MMP13</i> und <i>TIMP-1</i> in „Lining Cells“.	43
5.4.2	Bedeutung für den Knochenumbau im alternden Menschen.	45
5.5.	Schlussfolgerungen und Ausblick.	48
6.	Zusammenfassung.	50
7.	Summary.	52
8.	Literaturverzeichnis.	53
9.	Materialliste.	66
10.	Datentabelle.	70
11.	Erklärung.	71

12.	Danksagung.	72
13.	Lebenslauf.	73
14.	Eigene Veröffentlichungen.	74

1. Einleitung

1.1 Osteologischer Hintergrund

In der überalternden Gesellschaft, in Deutschland wie in den meisten anderen Staaten Westeuropas, in der das Durchschnittsalter der Bevölkerung weiter zunimmt steigt die Zahl Osteoporose- assoziierter Frakturen. Die Osteoporose ist nach den aktuellen Kriterien der WHO definiert als „systemische Skeletterkrankung, die durch eine geringe Knochendichte und erhebliche Störungen der Mikroarchitektur des Knochens gekennzeichnet ist“. Dies führt zu einer erhöhten Fragilität des Knochens und zu einem erhöhten Risiko von Frakturen (1993, Konsensus-Konferenz). Die Osteoporose ist die Hauptursache der durch Frakturen bedingten Morbidität und Mortalität. Die häufigsten Lokalisationen Osteoporose- assoziierter Frakturen sind die Wirbelsäule, die Hüfte (der proximale Femur), der Humerus und der distale Unterarm (Melton, 1988). In einer aktuellen Studie wird die Inzidenz der Osteoporose im Jahr 2003 mit 7,8 Millionen Einwohnern Deutschlands berechnet und die, durch die Osteoporose verursachten Kosten mit 5,4 Milliarden € veranschlagt (Häussler et al., 2007). Die Länge, der durch Osteoporose verursachten Krankenhausaufenthalte übertrifft in Europa bei weitem die durch Diabetes, Myokardinfarkte oder Brustkrebs (Kanis et al., 1997, Lippuner et al., 1997). Insgesamt ist die Osteoporose unterdiagnostiziert. Obwohl eine von drei Frauen in der Postmenopause und einer von fünf Männern im Alter von über 50 Jahren eine Osteoporose- assoziierte Fraktur erleiden wird, erhalten in Deutschland nur ein Fünftel (21,7%) der Betroffenen eine adäquate Behandlung (Melton et al., 1997, Häussler et al., 2007). Vor diesem Hintergrund, sind Erkenntnisse zu zellulären Veränderungen des Knochenbaus wichtig, um mögliche Ziele für Therapieansätze zu entwickeln. Das menschliche Skelett ist ein komplexes System, das einem ständigen Wandel unterliegt. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit zellulären Grundlagen der Osteoporose im menschlichen Knochen.

1.2 Der menschliche Knochen, Struktur und Funktion

Der Knochen ist ein dynamisches System funktionell spezialisierter mesenchymaler Zellpopulationen des menschlichen Organismus. Die Interaktion zwischen den spezifischen Zellpopulationen ist wesentlich für die strukturelle, biochemische und mechanische Integrität des Knochens und für die zentrale Rolle des Knochens als Mineraldepot. Der Knochen behält während des gesamten Lebens die Fähigkeit, auf mechanische Reize und metabolische Stimuli zu reagieren. Als Folge kommt es zu einem Erneuerungsprozess des Knochens („remodelling“), einer kontinuierlichen Abfolge von Knochenresorption und Knochenaufbau.

1.2.1 Struktur

Anatomisch werden zwei Knochenarten unterschieden: Deckknochen und Röhrenknochen. Deckknochen bilden Teile der Schädelkalotte, des Gesichtsschädels, das Os ileum und die Klavikula. Sie entstehen im Embryo oder heranwachsenden Kind direkt aus dem Mesenchym (desmale Ossifikation) durch Zellverdichtung und anschließende Mineralisation. Röhrenknochen, z. B. der Femur und die Tibia entstehen indirekt über Knorpelvorstufen (enchondrale Ossifikation). Dabei werden anatomische Untereinheiten dieser Röhrenknochen ausgebildet. An beiden Enden des Knochens finden sich die Epiphysen, dazwischen der mehr oder weniger zylindrische Schaft, die Diaphyse. Zwischen den Epiphysen und der Diaphyse befindet sich die Wachstumszone des Knochens, die Metaphyse. Meta- und Epiphyse entstehen ontogenetisch aus zwei getrennten Ossifikationszentren. Im heranwachsenden Knochen sind die Meta- und die Diaphyse durch eine schmale Knorpelzellschicht, die Epiphysenfuge, voneinander getrennt. Diese Schicht aus proliferierenden Zellen und sich ausdehnender Knorpelmatrix ist verantwortlich für das

Längenwachstum des Knochens. Am Ende der Wachstumsperiode des Organismus wird die Epiphysenfuge mineralisiert und vollständig durch Knochen ersetzt (Olsen, 2006, Dempster, 2006).

Die äußere Hülle des Knochens bildet eine dicke und kompakte Schicht mineralisierten Gewebes, der Kortex. Der Kortex umschließt in der Diaphyse den Markraum mit dem hämatopoetischen Knochenmark. Zur Metaphyse und Epiphyse dünnt der Kortex aus und der umschlossene Raum wird durch ein feines, verzweigtes Netzwerk von dünnen mineralisierten Trabekeln ausgefüllt. Die Zwischenräume dieser Spongiosa oder des trabekulären Knochen sind mit hämatopoetischem Mark und mit Fettmark ausgefüllt. Die Verteilung zwischen blutbildendem und ausschließlich fetthaltigem Mark verschiebt sich mit dem Alterungsprozeß des menschlichen Körpers. Die Epiphysen des Knochens werden von hyalinem Gelenkknorpel überzogen, der nicht mineralisiert (Olsen, 2006, Dempster 2006).

Aufgrund der Knochengrundstruktur kann zwischen zwei Knochenoberflächen, die in Kontakt zu umgebendem Bindegewebe stehen, unterschieden werden: Die äußere, periostale Oberfläche und die innere, endostale Oberfläche. Beide Oberflächen werden von knochenaufbauenden Zellschichten überzogen, dem Periosteum und dem Endosteum. Das Verhältnis von kortikalem zu trabekulärem Knochen im menschlichen Körper beträgt ungefähr 80% kortikaler zu 20% trabekulärem Knochen. Dabei variiert die Verteilung dieser beiden Knochentypen stark zwischen unterschiedlichen Abschnitten des menschlichen Skeletts. Das Verhältnis von trabekulärem zu kortikalem Knochen beträgt z. B. in den Wirbelkörpern 75:25, im Femurkopf 50:50 und in der Diaphyse des Radius 5:95. Morphologisch werden kortikaler und trabekulärer Knochen von identischen Zelltypen und gleichartigen Matrixkomponenten gebildet. Beide bestehen aus einer Basiseinheit, dem Osteon. Im kortikalen Knochen werden diese Osteone auch als Haver'sches System, nach dem englischen Anatom Clopton Havers (17. Jh), bezeichnet. Die Haver'schen Systeme sind zylinderförmig und durchziehen den kortikalen Knochen wie ein feines Netzwerk (Stout et al., 1999). Die Wand der Osteone wird durch konzentrisch angeordnete Knochenlamellen gebildet. Die Osteone des trabekulären

Knochens imponieren muldenförmig und sind ebenfalls von Knochenlamellen umgeben. Der Knochenaufbau wird durch folgende Zellen aufrechterhalten:

Osteoprogenitorzellen, die zu einer gleichmäßig hohen Osteoblastenpopulation im Knochen beitragen;

Osteoblasten, die die Knochenmatrix synthetisieren und die Knochenoberfläche formen;

Osteozyten; die innerhalb der mineralisierten Knochenmatrix liegen;

Sogenannte „*Lining Cells*“ an den endostealen Oberflächen;

Osteoklasten, spezialisierte und überwiegend mehrkernige makrophagozytäre Zellen, die knöchernen Matrix resorbieren.

Die *Knochenmatrix* besteht überwiegend aus Kollagenfasern, hauptsächlich Kollagen Typ I (90% der gesamten Proteinmenge) und Nicht- Kollagenen Knochenproteinen (10% der Matrixproteine). Hydroxyapatit $[3Ca_3(PO_4)_2(OH)_2]$ findet sich an und zwischen den Kollagenfasern eingelagert und steht in molekularer Verbindung zu den Nicht- Kollagenen Knochenproteinen (Robey und Boskey, 2006).

1.2.2 Funktion

Der menschliche Knochen erfüllt unterschiedliche, komplexe Funktionen. Die langen Röhrenknochen dienen als Angriffspunkte für Muskeln und Sehnen und gewährleisten so die Lokomotion und andere Bewegungen. Die flachen Knochen des Schädels, der Rippen oder des Beckens dienen als Schutz für lebenswichtige Organe. Dem menschlichen Skelett kommt zudem eine Schlüsselrolle für die Regulation der Kalziumkonzentration im Serum zu, da es die Kalziumreserve des menschlichen Körpers darstellt. Eine ähnliche Funktion

erfüllt der Knochen für den Säure- Basen- Haushalt (Arnett, 2003). Weiterhin werden aus dem Knochen Wachstumsfaktoren und Zytokine freigesetzt oder gebildet. Ein Beispiel hierfür sind von Osteoblasten gebildete Faktoren, die essentiell für die Differenzierung und das Überleben von hämatopoetischen Stammzellen sind (Taichman, 2005).

Grundsätzlich wird der trabekuläre Knochen als der metabolisch „aktiver“ Teil des menschlichen Skeletts gesehen. Aktuelle Studien zeigen allerdings, daß dieses Konzept möglicherweise nicht haltbar ist, da es offensichtlich deutliche, situationsabhängige und auch Spezies- spezifische Unterschiede gibt. Es konnte gezeigt werden das der medulläre Knochen bei Vögeln, der eine trabekuläre Struktur besitzt, nur eine unsichere Kalziumquelle darstellt, die nur bei der Kalzifikation der Eierschale mobilisiert wird (Whitehead, 2004). Hingegen ist beim Dammhirsch der kortikale Knochen das wichtigste Depot für Kalzium beim Wachstum des Geweihs (Banks et al., 1968). Bei Menschen wird während der Schwangerschaft und der Laktation vorwiegend Kalzium aus nicht-tragenden Knochen freigesetzt (Bowman und Miller, 2001). Im Gegensatz dazu, tritt beim primären Hyperparathyreoidismus der Knochenverlust vorwiegend am kortikalen Knochen auf (Bilezikian et al., 2005).

1.3. Knochenumbau

Im Gegensatz zum Knochenaufbau („modelling“) im Kindes- und Heranwachsendenalter, bei dem Osteoblasten und Osteoklasten unabhängig voneinander agieren, um Knochen zu formen, findet beim erwachsenen und alternden Menschen vorwiegend ein kontinuierlicher Knochenumbau („remodelling“) statt. Bei bestimmten pathologischen Stoffwechsellagen kann allerdings auch beim erwachsenen Menschen ein verstärkter Knochenaufbau beobachtet werden, z. B. beim Hypoparathyreoidismus und bei der renalen Osteopathie (Ubara et al., 2003, 2005); bei letzterer in Form des sogenannten „mini-modelling“. Anabole Stimulanzen, die in der Therapie der Osteoporose eingesetzt werden wie PTH(1-34) können ebenso einen Knochenaufbau im erwachsenen Menschen bewirken.

Der Knochenumbau im Säugetierskelett stellt einen kontinuierlichen Selbsterneuerungsprozeß dar. In diesem Prozeß wirken bestimmten Zellen des Knochens zusammen und in einer festgelegten Reihenfolge auf die Knochenmatrix ein. Dieses Zusammenspiel wird auch als Knochenumbaueinheit oder englisch „Bone Remodelling Unit“ (BRU) bezeichnet. Der Prozeß läßt sich in vier Schritte untergliedern:

- 1.) Aktivierung
- 2.) Resorption
- 3.) Umkehrung
- 4.) Aufbau

Die Aktivierung erfolgt über die Rekrutierung osteoklastärer Vorläuferzellen aus dem Blutkreislauf (Roodman, 1999) und die Penetration der endostealen Zellschicht. An der Knochenoberfläche fusionieren die monozytoid-makrophagozytären Zellen zu den multinukleären Osteoklasten und beginnen mit der Resorption. Obwohl die Aktivierung und Steuerung der osteoklastären Resorption Gegenstand intensiver Untersuchungen war und ist, ist es bis jetzt immer noch nicht geklärt, warum der Resorptionsprozeß an bestimmten Orten der Knochenoberflächen gestartet wird. Zum Teil wird die Aktivierung auf minimale Schäden der Knochensubstanz zurückgeführt. Zum überwiegenden Teil scheint der Resorptionsvorgang aber zufällig an bestimmten Punkten der Knochenoberflächen zu beginnen (Burr, 2002, Parfitt, 2002). Eine Vielzahl von Zytokinen wie RANKL, Interleukin-1 und -6, und anderer Faktoren wie dem Kolonie- stimulierenden Faktor (CSF) sowie verschiedene Hormone, Parathormon, Calcitonin und Vitamin D₃ sind für Lenkung und Aktivierung der Osteoklastenvorläufer und der Osteoklasten verantwortlich (Roodman, 2004, Simonet et al., 2003, Troen, 2003, Blair et al., 2004). Die Resorption durch die Osteoklasten geschieht bei einem sehr niedrigen pH-Wert (Silver et al., 1988), in einem, vom Knochenmark getrennten Areal, dem sogenannten „Bone remodeling compartment“ (BRC). Dieses Kompartiment wird begrenzt durch „Lining Cells“ (Hauge et al., 2001). Histomorphometrische Studien konnten zeigen, daß die flachen „Lining Cells“, die die Grenze zwischen endostaler Oberfläche und Knochenmark bilden, Eigenschaften osteoblastärer Zellen

besitzen (Hauge et al., 2001). Man nimmt an, daß sich zu Beginn des Knochenumbaus, „Lining Cells“ von der Knochenoberfläche lösen, die Knochenoberfläche dadurch für Osteoklasten zugänglich wird und nach dem anschließenden Knochenaufbau Osteoblasten, zum einen als Osteozyten in die neue Knochenmatrix eingebaut werden und zum anderen als neue „Lining Cells“ fungieren. Dabei kann durch Verbindung der das Knochenmark begrenzenden alten Generation von „Lining Cells“ mit der neuen Generation wieder eine gemeinsame Zellschicht an der Knochenoberfläche entstehen (Hauge et al., 2001). Die Interaktion zwischen Osteoklasten und Osteoblasten im Prozeß des Knochenumbaus ist Gegenstand intensiver Untersuchungen. Die genaue Funktion der „Lining Cells“ ist bis jetzt noch nicht umfassend untersucht worden.

1.4. „Lining Cells“

„Lining Cells“, teilweise auch als, flache Osteoblasten, Hemiosteozyten oder flache mesenchymale Zellen bezeichnet, bedecken ungefähr 75-80% der endostalen Oberflächen (Miller et al., 1992). „Lining Cells“ sind Zellen mit osteoblastärem Phänotyp und exprimieren z. B. den Core-binding factor α -1 (*Cbfa1*), ein osteoblastäres Differenzierungsmerkmal (Ducy et al., 1997, Komori et al., 1997). „Lining Cells“ werden als eine von zwei möglichen Erscheinungsformen von Osteoblasten angesehen, die nach dem Knochenaufbau auf der Knochenoberfläche persistieren, während ein anderer Teil als Osteozyten in die Knochenmatrix eingebaut wird (Aubin et al., 2006). Diese Oberflächen werden im Allgemeinen als ruhende, d. h. metabolisch inaktive Oberflächen bezeichnet (Parfitt, 1994). „Lining Cells“ liegen nicht direkt der Lamina limitans, dem Beginn der mineralisierten Knochenmatrix, sondern einem schmalen Band nicht mineralisierter Filamente und Kollagenfasern auf, das nicht mit dem von Osteoblasten produzierten Osteoid, der noch nicht kalzifizierten Knochenmatrix, gleichzusetzen ist (Bowman et al., 1986). Durch elektronenmikroskopische Untersuchungen konnten morphologische Eigenschaften der „Lining Cells“ charakterisiert werden (Cooper et al., 1966,

Vander Wiel et al., 1978, Miller et al., 1980, Deldar et al., 1985, Menton et al., 1984). „Lining Cells“ besitzen ein extrem dünnes, flaches Profil, sowohl des Zytoplasmas als auch des Nukleus. Das Zytoplasma ist lang über die Knochenoberfläche ausgebreitet und teilweise nur 0,1µm dick. „Lining Cells“ besitzen einzelne zytoplasmatische Organellen, z.B. Mitochondrien, Mikrofilamente, freie Ribosomen und vereinzelt auch raues endoplasmatisches Retikulum (Schulz, 1980). „Lining cells“ und Osteoblasten, aber auch „Lining cells“ und Osteozyten sowie „Lining Cells“ untereinander, bilden gap-junctions (Bennett et al., 1978, Miller et al., 1980). Weiterhin wird ein enger Zell- Zell-Kontakt durch Cadherine, Kalzium- abhängige transmembranöse Proteine gewährleistet (Aubin et al., 2006). In verschiedenen Studien konnte bisher gezeigt werden, daß „Lining cells“ eine Membran auf der Knochenoberfläche bilden, die eine Trennung der intraossären Flüssigkeiten, die sog. „bone fluid“, von der Flüssigkeit im Interstitium des Knochenmarks bewirken (Canas et al., 1969). Diese Membran erfüllt eine wichtige Funktion der Mineralhomöostase, insbesondere da sie den größten Teil der endostalen Oberflächen im menschlichen Körper bedeckt (Talmage, 1970). Zusammengefasst bilden „Lining Cells“ und Osteozyten sowie zum Teil auch Osteoblasten ein funktionelles Synzytium innerhalb des Knochens (Doty, 1981).

Als Teil des BRC werden den „Lining Cells“ zusätzlich zu der schon beschriebenen Barrierefunktion weitere wichtige Funktionen zugeordnet. Durch die Degradation der nicht mineralisierten Matrix über der Lamina limitans, ermöglichen sie die Resorption der mineralisierten Matrix durch Osteoklasten (Hauge et al., 2001). In histomorphometrischen Untersuchungen an Schädel- und Fußknochen (Metatarsale) von Mäusen konnte gezeigt werden, dass „Lining Cells“ auch nach der Resorption eine wichtige Rolle spielen. Durch die Degradation von Kollagenfasern, die von den Osteoklasten nicht phagozytiert wurden, „säubern“ und glätten die „Lining cells“ die Knochenoberfläche und ermöglichen so die Neusynthese von Knochen durch die Osteoblasten (Everts et al., 2002). In dieser Studie konnte auch gezeigt werden, daß Matrix- Metallo-Proteinase (MMP) eine Schlüsselrolle für diesen Vorgang einnehmen (Everts et al., 2002). Durch die Inkubation von Semi- Dünnschnitten der Knochen mit dem MMP- Inhibitor CI- 1, zeigten sich deutlich vermehrt Howship- Lakunen mit

nicht resorbierten Kollagenfasern auf dem Boden der Lakune (Everts et al., 2002).

1.5 Osteoporose

Der Verlust von Knochenmasse beim alternden Menschen wird von einer Vielzahl von Faktoren beeinflusst.

1.5.1 Maximale Knochenmasse

Ein Faktor ist die maximale Knochenmasse, die beim erwachsenen Menschen zwischen dem 20. und 30. Lebensjahr erreicht wird (Eastell, 2003). Studien bei Zwillingspaaren oder vergleichende Untersuchungen an Müttern und Töchtern konnten zeigen, daß die maximale Knochenmasse beim Menschen in der Hauptsache durch genetische Faktoren determiniert ist (Ralston, 2002, Kanis, 2004, Michaelsson, 2005). Die genetischen Anlagen bestimmt 50- 85% der Varianz der Knochenmasse, abhängig von der Lokalisation im menschlichen Skelett. Andere Gründe für eine verminderte maximale Knochenmasse sind eine geringe Kalziumzufuhr im Kindesalter, ein geringes Körpergewicht zum Zeitpunkt der Geschlechtsreife, ein bewegungsarmer Lebensstil und eine verzögerte Pubertät (Eastell, 2003).

1.5.2 Östrogen

Der schleichende Verlust von Knochensubstanz im Alter ist geschlechtsunabhängig und wird durch ein Ungleichgewicht zwischen Knochenauf- und -abbau verursacht (Ryan et al., 1992, Seeman et al., 1993). Gleichwohl gibt es geschlechtsspezifische Faktoren, die den Knochenverlust im Alter beschleunigen. Die Menopause und Postmenopause führt bei Frauen zu

einem Östrogendefizit. Dies führt zu einer beschleunigten Abnahme der Knochenmasse, die in zwei Phasen unterteilt werden kann (Riggs et al., 2002). Die erste Phase zeigt durch das rasche Nachlassen der Östrogenwirkung einen schnellen Verlust von Knochenmasse über einen Zeitraum von 5 Jahren (~3%/pro Jahr in der Wirbelsäule). Daran schließt sich die Phase des langsamen Knochenverlusts an (~0,5%/pro Jahr im gesamten Skelett). Die zweite Phase des langsamen Knochenverlusts wird auch beim alternden Mann beobachtet.

Der Wirkmechanismus des Östrogendefizits auf den Knochenstoffwechsel bzw. das Ungleichgewicht zwischen Knochenauf- und -abbau ist trotz intensiver Untersuchungen zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht mit letzter Sicherheit geklärt. Man nimmt an, daß Östrogen zu einem Teil über die Osteoblasten (erhöhte Synthese von IGF-1, Osteoprotegerin, TGF- β und eine herabgesetzte Synthese von RANKL) und zu einem anderen Teil durch Monozyten im umgebenden Knochenmark (herabgesetzte Produktion von IL-1, IL-6 und TNF- α) auf den Knochenumbau einwirkt (Rogers und Eastell, 2005). Ein erniedrigter Östrogenspiegel scheint auch beim alternden Mann zumindest teilweise für den schleichenden Knochenverlust eine Rolle zu spielen (Carlsen et al., 2000).

1.5.3 Parathormon

Der langsame Verlust von Knochenmasse wird zusätzlich zu Faktoren des Lebensstils wie verminderte körperliche Aktivität, Rauchen, verminderte Kalziumaufnahme und ein Mangel an Vitamin D, durch einen Anstieg des Parathormonspiegels begünstigt (Eastell, 2006). Dieser Anstieg wird mit zunehmendem Alter bei Frauen und Männern beobachtet (Fatayerji et al., 2000). Die Zunahme des Serum- Parathormonspiegels wird verursacht durch eine Abnahme der renalen Kalzium- Reabsorption und eine verminderte Kalziumaufnahme im Gastrointestinaltrakt (Eastell, 2006). Letzteres kann, z.B. bei immobilen älteren Menschen durch einen Mangel an Vitamin D verstärkt werden.

1.5.4 Idiopathische Osteoporose

Der hormonelle Einfluss auf den Knochenstoffwechsel verstärkt aber in den meisten Fällen nur den mit zunehmendem Alter autonom auftretenden Knochenverlust. Es gibt Hinweise, daß die hormonelle Steuerung allein nicht ausreicht um das Ungleichgewicht zwischen Knochenaufbau und Knochenabbau zu erklären. Eine Studie zeigte, daß in den Röhrenknochen, der Verlust an Knochenmasse auf der inneren kortikalen Knochenoberfläche zu einer gleichzeitigen Zunahme der Knochenmasse an der äußeren periostalen Knochenoberfläche führte (Villanueva et al, 1966). Der Hormon- und Mineralspiegel an beiden Lokalisationen unterscheidet sich jedoch nicht (Villanueva et al, 1966). Im trabekulären Knochen wird bei dem zuerst auftretenden Verlust von Knochensubstanz der transversalen Knochentrabekel zumindest ein Erhalt, z. T. aber auch eine Zunahme der Substanz der axialen Knochentrabekel beobachtet (Arnold et al., 1966, Atkinson, 1967, Merz et al., 1970, Parfitt et al., 1983, Vesterby et al., 1989). Dieser ungleichmäßige Knochenverlust wird in allen Knochen beobachtet (Merz und Schenk, 1970).

1.5.5 Morphologie des alternden Knochens

Die Entkopplung der Osteoklasten- von der Osteoblastenaktivität, das sog. „uncoupling“ wird als Hauptursache des zunehmenden Knochenverlusts im Alter angenommen. Die Aktivität der Osteoblasten reicht, z. T. auch durch eine fehlende Bildung von Wachstumsfaktoren (IGF-I, TGF- β), nicht aus um den durch die Osteoklasten verursachten Knochenabbau auszugleichen (Ensrud et al., 1995, Ross et al., 1998). Das morphologische Korrelat des „uncoupling“ entspricht histomorphologisch dem Nachweis einer erhöhten Anzahl von Resorptionslakunen an den endostealen Oberflächen bei gleichzeitigem Ausbleiben von osteoblastärem Knochenaufbau, der sich durch eine Ablagerung von noch nicht mineralisierter Knochengrundsubstanz (Osteoid) unter den Osteoblasten darstellt. Zahlreiche Studien an Beckenkammbiopsien von älteren Menschen in unterschiedlichen Kollektiven zeigen jedoch eine

Abnahme des trabekulären Knochenvolumens, ohne eine signifikante Zunahme der Knochenresorption an den endostalen Knochenoberflächen (Melsen et al., 1978, Hoikka et al., 1981, Vedi et al., 1982, Palle et al., 1982, Ballani et al., 1990). In einzelnen dieser Studien konnte zum Teil eine erniedrigte Osteoklastenaktivität nachgewiesen werden (Melsen et al., 1978, Palle et al., 1982). In diesen Studien wird der überwiegende Anteil der endostalen Oberflächen als ruhend beschrieben. Die vorherrschende Zellpopulation an den endostalen Oberflächen sind die „Lining Cells“. Eine katabole Funktion wird ihnen bisher nicht zugeschrieben.

1.6. Matrix Metallo Proteinasen

Matrix-Metallo-Proteinasen sind, neben anderen Enzymgruppen, wichtiger Bestandteil der stetigen Umbauvorgänge („remodelling“) im menschlichen Skelett. MMPs sind ein Gruppe von mehr als 20 Endoproteinase (Nagase et al., 2000), die bei neutralem PH-Wert, in Proteinen gebundene Peptide hydrolisieren. Für die katalytische Aktivität benötigen sie Metallionen. Bei den drei am besten charakterisierten MMPs (Kollagenasen, Proteinase 24.11 und Meprin) sind dies Zinkionen. Teilweise kann diese Funktion aber auch von Cobaltionen übernommen werden (Bonds et al., 1985, Lennarz et al., 1991).

1.6.1 *MMP13/TIMP1* – Bedeutung für den Knochenstoffwechsel

MMP13 oder Collagenase 3 wurde in humanem Gewebe erstmals von einer humanen Brustkrebs- cDNA- Datenbank kloniert (Freije et al., 1994). *MMP13* wird aufgrund der Fähigkeit zur Matrixdegradation eine wichtige Funktion bei der Tumorinvasion aber auch eine entscheidende Rolle bei destruierenden Erkrankungen wie der Osteoarthritis zugeschrieben (Freije et al., 1994, Mitchell et al., 1996). *MMP13* besitzt eine hohe Affinität zu Kollagen II, kann aber auch Kollagen I und III hydrolisieren (Mitchell et al., 1996, Knäuper et al., 1996). Ein wichtiger, endogener Inhibitor für *MMP13* ist Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 1 (*TIMP-1*) (Knäuper et al., 1996).

Neben anderen MMPs wie *MMP2*, - 9 und *MMP14* konnte mittels in situ-Hybridisierung, vornehmlich in Zellkulturen und Mausmodellen, bzw. Ratten, gezeigt werden, daß *MMP13* sowohl von osteoblastären Zellformen als auch von Chondrozyten, hingegen nicht von Osteoklasten exprimiert wird (Fuller et al., 1995, Gack et al., 1995). Gleichwohl konnte durch Untersuchungen in tierexperimentellen Studien an Ratten gezeigt werden, daß *MMP13*, produziert von „Lining Cells“ unter den Osteoklasten im Bereich der Resorptionszone nachzuweisen ist. Möglicherweise agiert *MMP13* hier zusammen mit *MMP9* und Kathepsin K im Rahmen der osteoklastären Knochenresorption (Nakamura et al., 2003). Das Wechselspiel von MMPs und TIMPs erfüllt eine wichtige Funktion bei der Regulierung des Knochenumbaus. Bis jetzt fehlen noch transgene Maus- Modelle zur Überexpression von *MMP13*. In Maus- Modellen, in denen eine Expression von *MMP13* in Osteoblasten und osteoblastären Zellformen unterdrückt wurde, zeigte sich allerdings eine Zunahme des Trabekelvolumens (Stickens et al., 2004). Ein ähnliches Ergebnis zeigte eine Studie an Mäusen, die eine Überexpression von *TIMP-1* aufwiesen (Geoffroy et al., 2004).

1.7. Laser- unterstützte Mikrodissektion

Die überwiegende Anzahl der Studien zum Knochenumbau und zum Zusammenspiel der verschiedenen Zellen und der Bedeutung verschiedener Enzymgruppen, Rezeptoren und Hormone, stützen sich auf Erkenntnisse aus Tiermodellen, sog. „knock-out“ Mausmodelle oder transgene Rattenmodelle, auf Zellkulturstudien von Osteoblasten- oder Osteoklastenzelllinien und auf die histomorphometrische Auswertung tierischer und humaner Knochenproben (Übersicht bei Priemel et al., 2002, Schaller et al., 2005). Studien an Zellkulturen von humanem Knochen beschränken sich zumeist auf Osteoblasten und Osteoklasten. Die Laser- unterstützte Mikrodissektion ist eine gut etablierte Methode zur Isolation einzelner Zellen oder auch von Zellgruppen aus komplexen Geweben (Fink et al, 1998, 1999, 2000, 2005). Die Laser- unterstützte Mikrodissektion ermöglicht die Untersuchung der Proteinexpression

oder auf Transkriptionsebene der mRNA- Expression in einzelnen Zellen. Für den Erhaltungszustand der mRNA ist die Verarbeitung von nativem Gewebe essentiell, um den Einfluss von Fixativen oder, besonders im Hinblick auf den Knochen von Demineralisierungsprozeduren, möglichst gering zu halten (Goldsworthy et al., 1999, Saal et al., 2003). Bisher wurde die Laserunterstützte Mikrodissektion in nur sehr geringem Umfang in nativem humanem Knochen zur Zellisolierung eingesetzt (Eisenberger et al., 2004). In Tiermodellen wurde diese Methode bisher vorwiegend zur Untersuchung der Wachstumsfuge, z. B. der Ratte, benutzt (Shao et al, 2006, Zhang et al, 2007).

2. Fragestellung

Wie in der Einleitung dargestellt, sind Osteoporose- induzierte Veränderungen des Knochens ein wesentlicher Kostenfaktor für das Gesundheitssystem der alternden Gesellschaften der westlichen Hemisphäre. Den Veränderungen im Knochenstoffwechsel und hier besonders dem komplizierten Prozeß des „bone remodelling“ kommt bei der Entwicklung des alters- assoziierten Knochenschwunds eine Schlüsselrolle zu. Bisherige Studien in Tiermodellen oder histomorphometrische Untersuchungen an humanen Knochenproben fokussieren besonders auf eine Dissoziation der Osteoklastenaktivität vom Knochenaufbau durch die Osteoblasten. Die Bedeutung der dritten und eigentlich der Anzahl nach größten Gruppe von Zellen an den endostalen Oberflächen des Knochens, der „Lining Cells“ ist bis jetzt noch nicht eingehend untersucht worden. Obwohl verschiedene Untersuchungen zeigen konnten, daß die „Lining Cells“ im besonderen Maße Matrix- degradierende Proteinasen exprimieren wird eine katabole Funktion dieser Zellen nicht diskutiert. Da Tiermodelle und besonders sog. „knock- out“ Mausmodelle den Nachteil besitzen, daß der Fokus der Untersuchung schon bei der Embryogenese eine Veränderung des Knochenstoffwechsels, bzw. der Knochenentwicklung bewirkt ist eine Vergleichbarkeit zu den Veränderungen im Skelett des alternden Menschen nur bedingt gegeben. Um die genaue Funktion der „Lining Cells“ in dieser komplexen Mikroarchitektur des menschlichen Knochens zu untersuchen, ist ihre Isolation direkt aus dem Knochen nötig. Um molekulare Untersuchungen durchführen zu können, muß das Gewebe zudem möglich schonend verarbeitet werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten daher folgende Fragestellungen beantwortet werden.

1. Läßt sich durch eine Kombination von einer einfachen und schnellen Färbemethode mit der Gefrierschnitttechnik eine zufrieden stellende histomorphologische Identifikation von

„Lining Cells“ im mineralisierten, nativen humanen Knochen erreichen?

2. Ist die Laser- unterstützte Mikrodissektion eine geeignete Methode um „Lining Cells“ aus der komplexen Mikroarchitektur des humanen Knochens zu isolieren?
3. Können genügend Zellen isoliert werden um die Expression bestimmter Gene mittels RT-PCR durchzuführen?
4. Gibt die Expression, insbesondere von Matrixmetalloproteinasen und ihren endogenen Inhibitoren einen Hinweis auf mögliche katabole Eigenschaften der „Lining Cells“?

3. Material und Methoden

3.1. Probengewinnung

Es wurde ausschließlich humane Spongiosa aus Femurkopfresektaten verwendet, die die Orthopädische Klinik der Justus-Liebig-Universität uns im Rahmen von Hüft-Totalendoprothesen-Operationen zur Verfügung stellte. Die Patienten wurden informiert und waren mit der wissenschaftlichen Bearbeitung ihres durch die Operations-Indikation entfernten Femurkopfes einverstanden („informed consent“). Bei allen Patienten lag eine traumatische Schenkelhalsfraktur der Indikationsstellung zu Grunde. Die Probengewinnung erfolgte an 15 Femurkopfresektaten (Alter im Durchschnitt 73 Jahre, Spannweite 54 - 86 Jahre, weiblich n=8, männlich n=7) (Tabelle im Anhang).

3.2. Aufarbeitung des Untersuchungsmaterials.

3.2.1 Verarbeitung von nativem Knochengewebe.

Der Knochen wurde steril transportiert und sofort mit einer Diamantsäge aufgearbeitet. Es wurden Quader mit einer Kantenlänge von ca. 4 cm x 0.5 cm x 0.5 cm gesägt und diese in Würfel mit 0.5 cm Kantenlänge zerteilt. Diese Proben wurden in Kryoröhrchen überführt und sofort in flüssigem Stickstoff gefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

3.2.2. Erstellung von Gefrierschnitten am Kryostaten.

Die Knochenfragmente wurden in einem Kryotom bei -30°C bearbeitet. Es wurde eine wieder verwendbare, wolfram-gehärtete Kryotomklinge mit einem D-Profil benutzt. Die Gefrierschnitte wurden mit möglichst geringer Dicke angefertigt (4-6 µm) und mit Glass-Deckgläsern aufgenommen. Nach dem Schneiden erfolgte eine sofortige Fixierung der Schnittpräparate in 70% Ethanol

für 30 sek. und anschließend wurden die Schnitte in Diethyl-pyrocyanat-behandeltem Wasser gewaschen.

3.2.3 Färbung der Schnittpräparate

Die Gefrierschnittpräparate wurden für eine 1 min mit Kernechtrot-Aluminiumsulfat gefärbt und anschließend für 30 sek. in Diethyl-pyrocyanat-behandeltem Wasser gewaschen. Darauf erfolgte eine Entwässerung der Proben durch kurzes Waschen in einer aufsteigenden Ethanolreihe von 70% bis 96% für jeweils 1 min. Anschließend wurden die gefärbten Schnitte in Glasküvetten, gefüllt mit 100% Ethanol bis zur Weiterbearbeitung aufbewahrt. Um die Lagerzeit zu reduzieren, wurden nie mehr als 10 Gefrierschnitte bearbeitet.

3.3. Laser- unterstützte Mikrodissektion

Die Laser- unterstützte Mikrodissektion (LMD) der Gefrierschnittpräparate erfolgte nach etablierten Methoden (Fink et al., 1998, 1999, 2002). Die Schnittpräparate wurden auf dem Objektträgertisch eines inversen Mikroskops plaziert. Dieser ist motorisiert und Computer- gesteuert, ebenso der Mikromanipulator. Der gepulste Laserstrahl ist an das inverse Mikroskop gekoppelt. Die Schnittführung wird mit der Computer-Maus über einen angeschlossenen Monitor gesteuert. Die verwendete Apparatur zeigt die **Abb. 1**.

Zellverbände oder einzelne Zellen wurden identifiziert und unter visueller Kontrolle mikrodisseziert. Bei der Isolierung von „Lining-Cells“ wurde stets ein schmaler Streifen benachbarter, zellfreier Knochenmatrix mitgeschnitten, um die Integrität der „Lining cells“ nicht zu zerstören. Benachbarte Strukturen des Knochenmarks wurde vor der Isolierung der „Lining-Cells“ mit dem Laserstrahl „gesäubert“. Nach der Mikrodissektion konnten die einzelnen Zellen oder Zellverbände mit einer sterilen Nadel, die auf den Mikromanipulator aufgesteckt wurde, vom Objektträger abgenommen werden. Die Zellen wurden anschließend in Reaktionsröhrchen mit 4.5 µl first-strand-buffer (FSB) überführt.

Jedes Röhrchen enthielt ungefähr 10-15 Zellen. Die Röhrchen wurden sofort in flüssigem Stickstoff gefroren und dort bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.



Abb. 1: Die Abbildung zeigt links im Bild das inverse Mikroskop mit der Kamera am vorderen Strahlengang und der Laser- Einheit sowie dem Mikromanipulator am hinteren Strahlengang. Auf dem Computermonitor ist ein Knochentrabekel zu erkennen. Im Vordergrund am unteren Bildrand die Küvette mit den Schnittpräparaten.

Während der Mikrodissektion wurden die Schnittpräparate wiederholt mit einem Tropfen 100% Ethanol gewässert. Dies verhinderte das Austrocknen des Präpates, sorgte für eine bessere Adhäsion des dissezierten Materials an den Manipulator und führte zu einer verbesserten visuellen Kontrolle durch eine Steigerung der optischen Dichte (Deckglaseffekt).

3.4. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

3.4.1 Prinzip

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine *in vitro*-Technik zur Amplifikation und Nachweis eines bestimmten DNA-Abschnittes (Saiki et al. 1998, Mullis 1990). Um die Amplifikation zu starten, müssen zwei einzelsträngige Oligonukleotide (Primer) die zueinander komplementär sind, vorliegen. Der zwischen den Bindungsstellen der beiden Primern liegende DNA-Abschnitt wird von einer hitzestabilen DNA-Polymerase in Gegenwart von Desoxy-ribonukleotid-Triphosphaten in 5' → 3'-Richtung synthetisiert (Löffler, 1989). In mehreren Reaktionszyklen unterschiedlicher Temperatur wird die doppelsträngige DNA denaturiert, durch Abkühlung die Primer an die Nukleinsäure hybridisiert und durch die thermostabile Taq-Polymerase elongiert (Saiki et al., 1988). In jedem Zyklus wird die Anzahl der DNA-Kopien jeweils verdoppelt. Nach den ersten beiden Amplifikationszyklen ist die Länge der amplifizierten DNA-Stränge noch nicht definiert. Erst ab dem dritten Zyklus liegen Amplikons mit beidseitig durch die beiden Primer definierten Enden vor, deren Anzahl in den folgenden Amplifikationszyklen exponentiell steigt. Die Anzahl der Kopien läßt sich nach der Formel $(2^n - 2n) \cdot x$ berechnen, wobei n = Anzahl der Zyklen; $2n$ = Produkt der ersten beiden Zyklen; x = Anzahl der ursprünglichen DNA-Matrizenstränge ist.

Die Produktakkumulation ist durch den Verbrauch der Reaktionskomponenten limitiert, die Verminderung der Polymeraseaktivität und die Rehybridisierung der PCR-Produkte. Die Reaktion geht dann in eine „Plateau-Phase“ über (Morrison und Gannon, 1994), in der keine weitere Produktakkumulation erfolgt. Man erreicht normalerweise in 20-40 Zyklen eine zur Auswertung ausreichende Menge an gewünschter DNA-Sequenz (Mullis et al., 1994, Bej et al., 1991).

Aufgrund der geringen Anzahl der isolierten Zellen wurde, gemäß eines bereits etablierten Protokolls für Einzelzell- PCR, die Anzahl der Zyklen bei den durchgeführten Auswertungen erhöht (Fink und Bohle, 2005).

3.4.2 Qualitative PCR.

Zur Durchführung der PCR wurde die cDNA zunächst auf Eis aufgetaut und jeweils 5µl cDNA in ein 0,5ml Eppendorf- Hütchen pipettiert, dazu 45µl Mastermix (**Tabelle 1**) pipettiert, homogenisiert und die Proben im Thermocycler nach dem Programm aus **Tabelle 3** geschrieben.

Tab. 1 PCR Mastermix zum Schreiben der DNA

Reagenzien (Stock-Konzentrationen)	Volumen für 50µl
10x Genamp-Gold-Buffer ohne MgCl ₂	5,0µl
MgCl ₂ (25mM)	4,0µl
dNTP's (10mM)	1,0µl
3'-Primer (10µM)	1,0µl
5'-Primer (10µM)	1,0µl
Amplitaq-Gold Polymerase (5U/µl)	0,5µl
RNase-freies H ₂ O	32,5µl

Es wurden jeweils ein Ansatz mit *Cbfa1* und ein Ansatz mit der Zielsequenz *MMP13* oder *TIMP1* aus einer Probe mit den unten aufgeführten Primersequenzen (**Tabelle 2**) angesetzt.

Tab. 2 Die Sequenzen der eingesetzten Primer

<i>Cbfa1</i>	Forward	5' CGATCTGAGATTTGTGGGCC 3'
	Reverse	5' GGGAGGATTTGTGAAGACGG 3'
<i>MMP13</i>	Forward	5'GACGATGTACAAGGGATCCAGTC3
	Reverse	5'GGGTCACATTTGTCTGGCGT3'
<i>TIMP1</i>	Forward	5'GGCCTTCTGCAATTCCGAC3'
	Reverse	5'CGCTGGTATAAGGTGGTCTGG3'

Tab. 3 Temperaturprogramm des Thermocyclers zum Schreiben der DNA

<u>Vorgang</u>	<u>Temperatur</u>	<u>Zeitdauer</u>	<u>Anzahl der Zyklen</u>
Denaturierung	95°C	6min	1
Denaturierung	95°C	5sek.	55
Annealing	59°C	5sek.	
Elongation	73°C	10sek.	
Elongation	73°C	7min	1

Im Anschluß wurden die Proben auf ein Agarosegel aufgetragen.

3.4.3 Reverse Transkription

Aus den mikrodisssezierten Zellen wurde mit Hilfe der Reversen Transkriptase die entsprechende cDNA umgeschrieben. Es wurde das gesamte Probenmaterial, aufgelöst in 4,5µl FSB, in einem 0,5ml Eppendorf Hütchen bei 70°C im Thermoblock für 10min denaturiert (**Tabelle 4**)

Tab. 4 Denaturierung der RNA

Stufe 1	18°C	1min
Stufe 2	70°C	10min
Stufe 3	04°C	Hold

Danach wurde der Probe der Mastermix (**Tabelle 5**) zugegeben.

Tab. 5 Mastermix zum Schreiben der DNA

Reagenzien (Stock-Konzentration)	Volumen für 11µl
10x PCR Puffer II ohne MgCl ₂	1µl
MgCl ₂ (25mM)	2µl
dNTP's (10µM)	1µl
Random Hexamer Primer (50µM)	1µl
RNase-Inhibitor (10U)	0,5µl
Reverse Transkriptase (50U)	1µl

Die cDNA wurde mit dem Temperaturprogramm aus **Tabelle 6** im Thermoblock synthetisiert. Die Proben wurden nach dem Hold sofort weiterverarbeitet oder bei -80°C eingefroren.

Tab. 6 Das Temperaturprogramm zum Schreiben der cDNA

Initiale Denaturierung	20°C	10min
Amplifikation	43°C	1h 15min
	99°C	5min
Hold	04°C	

3.5. Gelelektrophoretische Größenfraktionierung der amplifizierten DNA

Mit Hilfe der Methode der Gelelektrophorese ist es möglich, unterschiedlich große DNA-Moleküle in einem elektrischen Feld durch eine Gelmatrix ihrer Größe nach zu trennen. Dabei wandert die negativ geladene DNA zur Anode. Während dieses Vorgangs entscheiden die Größe der DNA-Moleküle, die angelegte Spannung und die Porengröße des Gels über die Fraktionierung der Fragmente. Kleinere Moleküle wandern schneller als große. Durch das gleichzeitige Aufbringen eines Markers Φ X174 DNA/ *HINF I*, der ein Spektrum von 20 DNA-Fragmenten in der Größe von 24 – 726bp abdeckt, lässt sich die Größe der Fragmente abschätzen.

Für die Durchführung wurde ein 2,5%iges Agarosegel hergestellt. Dazu wurde für unsere Gelkammer (Bächle) 1,25g Agarose in 50ml 0,5 x TBE-Puffer durch Kochen in der Mikrowelle gelöst, nach Abkühlen auf ca. 50°C das Gemisch mit 1,5µl Ethidiumbromid vermischt und in die Gelkammer gegossen. Je nach Probenumfang wurde ein Kamm mit 21 oder 35 Zähnen gesteckt. Nach Aushärten wurden das Gel und die Elektroden mit 0,5 x TBE-Puffer beschichtet. Das PCR-Produkt wurde mit 7µl Ladepuffer homogenisiert und ca. 8µl DNA-Ladepuffer-Gemisch in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese wurde bei 120 V und 300 mA getrennt bis ca. 2/3 des Gels durchlaufen wurde. Das Bandenmuster lässt sich durch Auflage auf eine UV-Quelle (312nm) darstellen. Das Ethidiumbromid wird in die DNA interkaliert und durch das UV-Licht zur Fluoreszenz angeregt. Das Gel wurde mit einer Polaroid Kamera fotografiert (Film Polaplan; Blende 11; Belichtungszeit 2*1/8 sek.).

3.6. Isolierung und Aufreinigung von RNA zur Primertestung

Zur Testung der Spezifität der eingesetzten Primersequenzen für humane *MMP13* und *TIMP-1* wurden aus Synovialis, die im Rahmen routinemäßig durchgeführter diagnostischer Autopsien gewonnen wurde, RNA isoliert.

Die Isolation aus der Synovialis erfolgte durch die Homogenisierung von Gefrierschnitten, Zugabe von 1ml TriFast und anschließendem „vortexen“ für 5min bei Raumtemperatur. Die Lyse des Zellmaterials wurde durch Zugabe

von 200µl Chloroform/ml TriFast erreicht. Die weitere Aufreinigung erfolgte mit dem Rneasy Mini Kit[®] der Firma Quiagen. Dabei wurden die Proben mit 350µl 70% Ethanol homogenisiert, in ein Spin- Colum überführt und die Probe für 15sek. bei 8000g zentrifugiert. Das Spin- Colum wurde nun zweimal mit 350µl RW1-Puffer für 15sek. bei 8000g zentrifugiert. Zwischen diesen Waschvorgängen wurde ein DNase-Verdau mit DNase I Stock Solution durchgeführt, im Anschluß daran wurde zweimal mit 500µl RPE-Puffer gewaschen, einmal für 15sek. bei 8000g und das zweite Mal für 2 min. bei maximaler Umdrehungszahl zentrifugiert, um das im Spin Colum befindliche Gel mit der RNA zu trocknen. Danach wurde das Gel mit 34µl Rnase free water 5min. bei Raumtemperatur inkubiert und 1min. bei 8000g zentrifugiert. Die gewonnene RNA wurde entweder anschließend sofort weiterverarbeitet oder bei -80°C eingefroren.

4. Ergebnisse

4.1. Gefrierschnitte von nativem, humanem Knochen

Die Gefrierschnitte, die gemäß dem hier vorgestellten Protokoll hergestellt und gefärbt wurden, zeigten eine reguläre Morphologie (**Abbildung 2**). Die Färbung mit Kernechtrot ermöglichte eine klare Unterscheidung von „Lining cells“, Osteoblasten, Osteozyten, Knochenmatrix und Zellen des Knochenmarks.

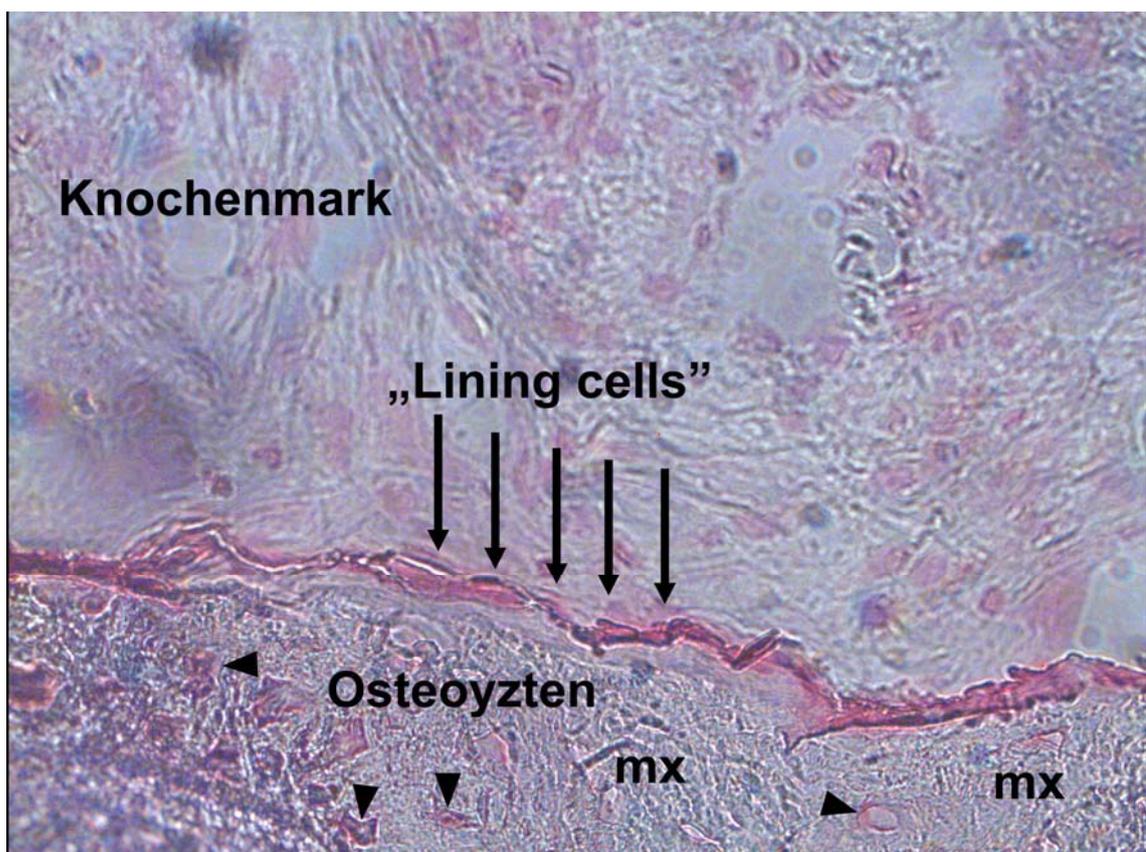


Abb. 2: Typische Morphologie eines Gefrierschnittes; „Lining Cells“ (Pfeile), Knochenmatrix (mx) und Osteozyten (Pfeilspitzen). Kernechtrot- Färbung; Vergrößerung 200fach.

4.2. Laser- unterstützte Mikrodissektion von nativem Knochen

Zunächst wurde im Gefrierschnitt ein Areal mit „Lining Cells“ ausgewählt (Abbildung 3).

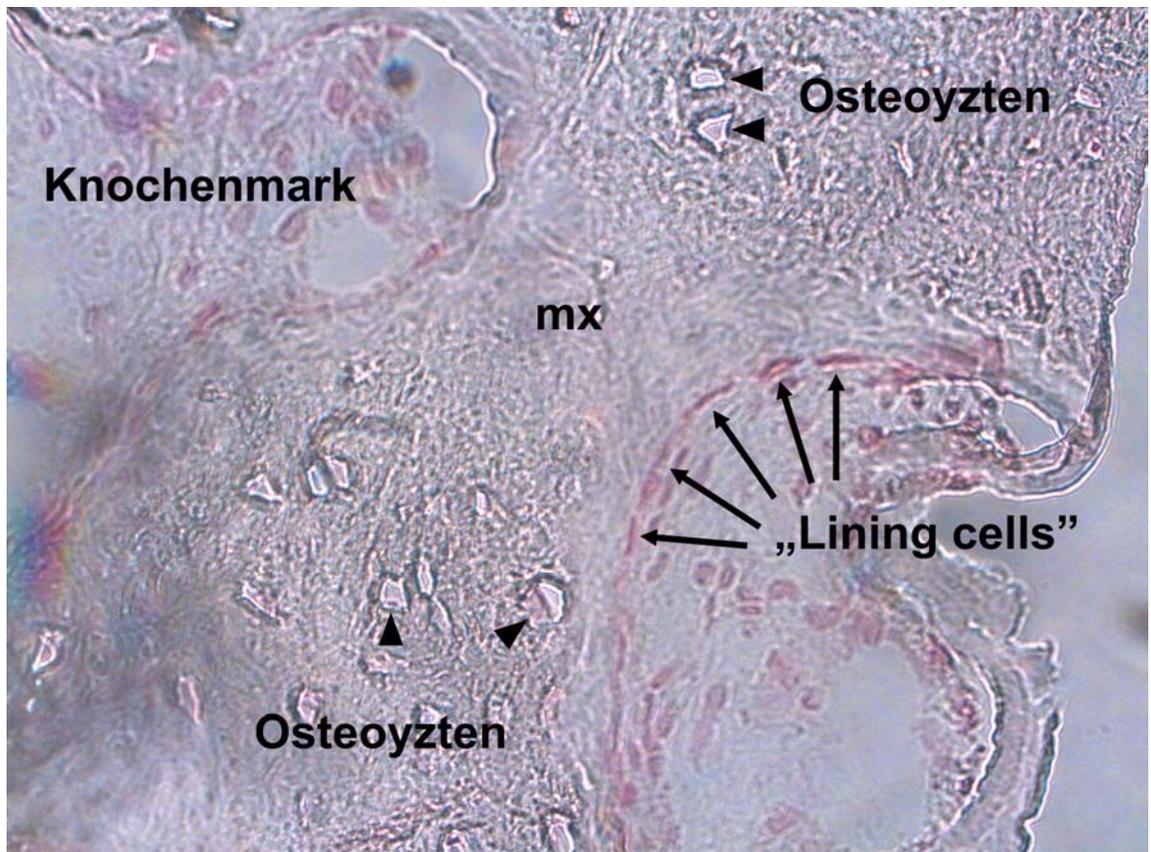


Abb. 3: Ein Areal mit „Lining Cells“ an der endostalen Knochenoberfläche. Weiterhin erkennt man Osteozyten (Pfeilspitzen), Knochenmark und Knochenmatrix (mx). Kernechtrot- Färbung; Vergrößerung 200fach.

Das Areal mit „Lining Cells“ an der endostealen Oberfläche der Knochentrabekel wurde mit dem Laserstrahl umfahren (**Abbildung 4**).



Abb. 4: Die gestrichelte Linie rahmt die Spur des Laserstrahls ein. Die Knochenmatrix ist entlang dieser Linie unterbrochen. Kernechtrot- Färbung; Vergrößerung 200fach.

Die Probe wurde anschließend mit Hilfe des Mikromanipulators (**Abbildungen 5 und 6**) aufgenommen. Mit diesem Verfahren wurden auch Osteozyten, Knochenmatrix und Zellen des Knochenmarks isoliert

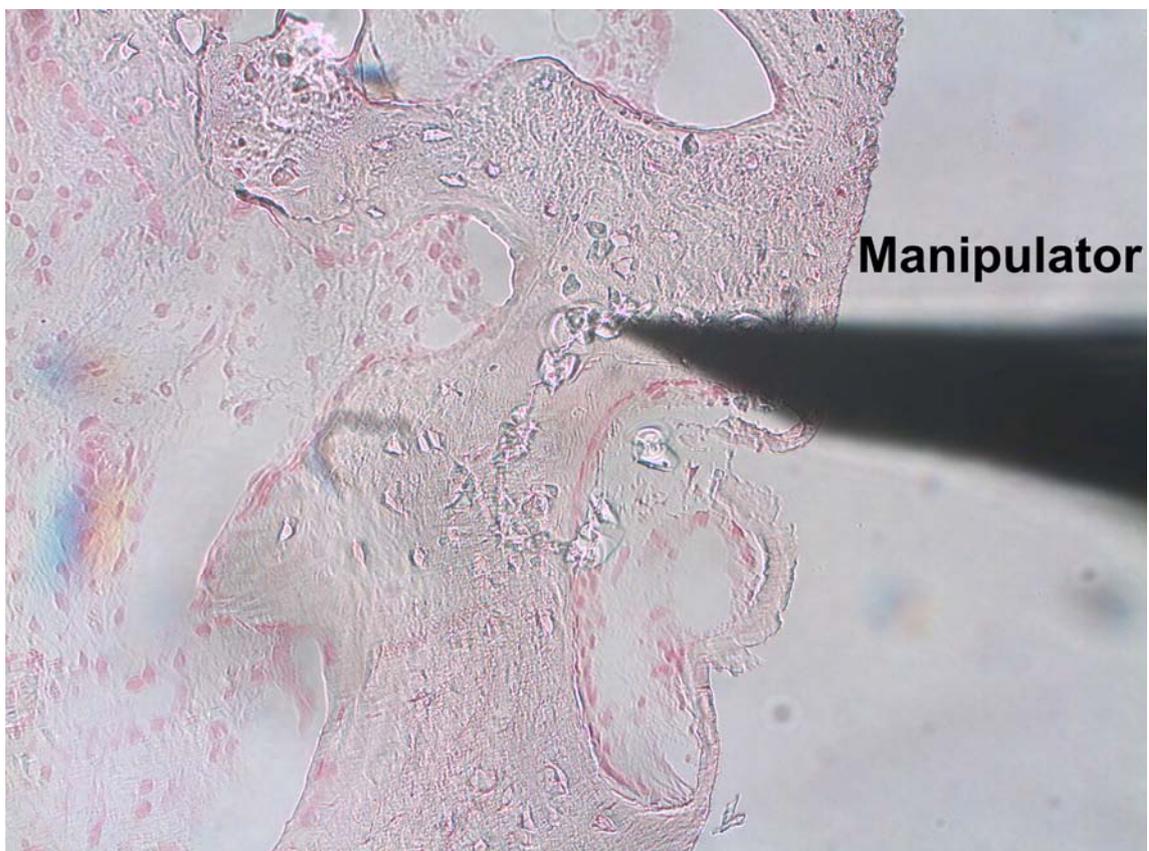


Abb. 5: Zunächst wird der Mikromanipulator mit der aufgesteckten Kanüle über den Computermonitor zum dissezierten Areal navigiert. Kernechtrot- Färbung; Vergrößerung 200fach.

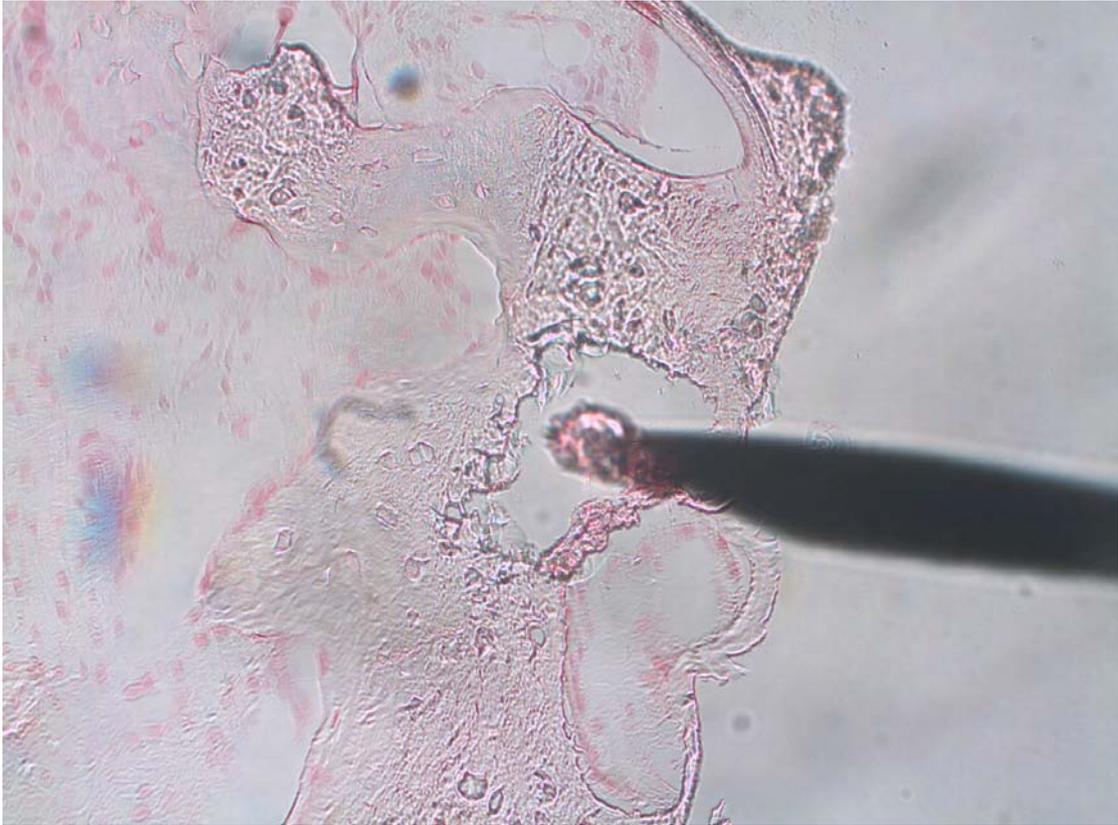


Abb. 6: Der Mikromanipulator wird mit der Probe, die an der Kanülenspitze haftet, aus der Schnittebene entfernt. Anschließend wird die Probe in ein Eppendorfhütchen mit 4,5µl First- strand- Puffer überführt und sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Kernechtrot- Färbung; Vergrößerung 200fach.

4.3. Amplifikation von *Cbfa1* in isolierten „Lining cells“

Die Expression von mRNA für *Cbfa1* wurde mit Hilfe der qualitativen RT-PCR gemessen, um die Spezifität der Isolierung von „Lining cells“ mittels Laser-unterstützter Mikrodisektion nachzuweisen. **Abbildung 7** zeigt ein typisches Ergebnis einer Gelelektrophorese nach der PCR. In 14 von 16 Proben der „Lining cells“ konnte *Cbfa1* amplifiziert werden. In der extrazellulären Knochenmatrix und den Osteozyten konnte *Cbfa1* nicht amplifiziert werden. In den Isolierten Zellen des Knochenmarks zeigte lediglich ein von 10 Proben die Expression von *Cbfa1* mRNA.

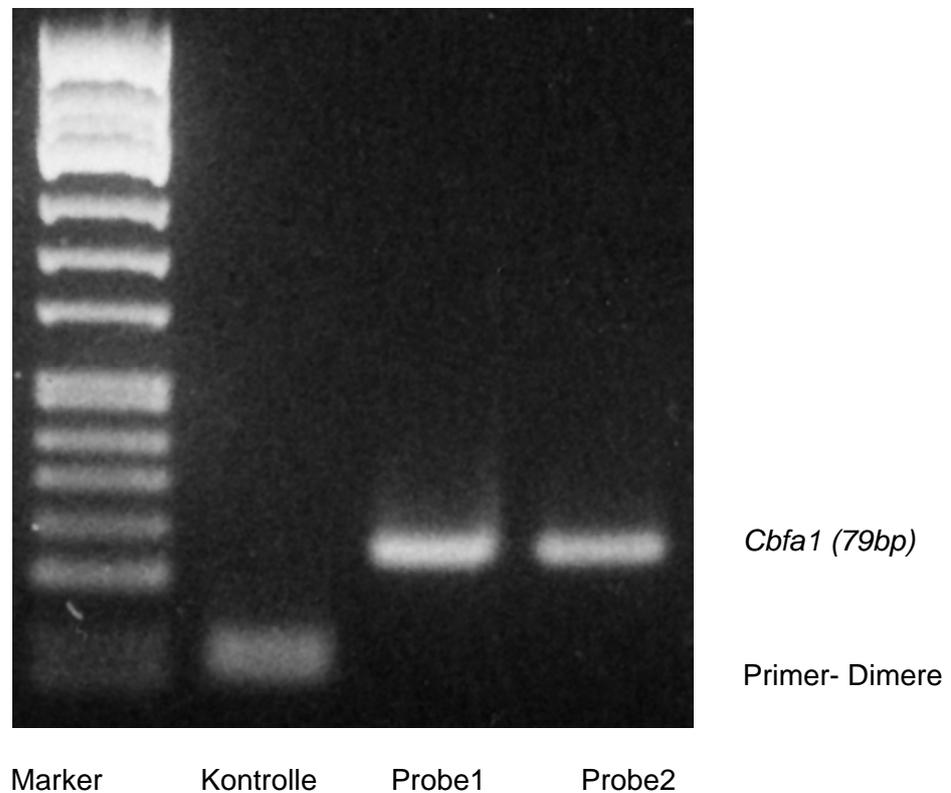


Abb. 7: Amplifikation von *Cbfa1* in mikrodisezierten „Lining Cells“.

4.5. Expression von *MMP13* und *TIMP-1* in humanen „Lining cells“

Im nativen, mineralisierten humanem Knochen wird sowohl *MMP13* als auch *TIMP-1* von „Lining cells“ an den endostealen Oberflächen von Knochentrabekeln der der Spongiosa exprimiert (**Abbildung 9**). Osteozyten, die extrazelluläre Knochenmatrix und Zellen des Knochenmarks zeigen keine Expression dieser Enzyme.

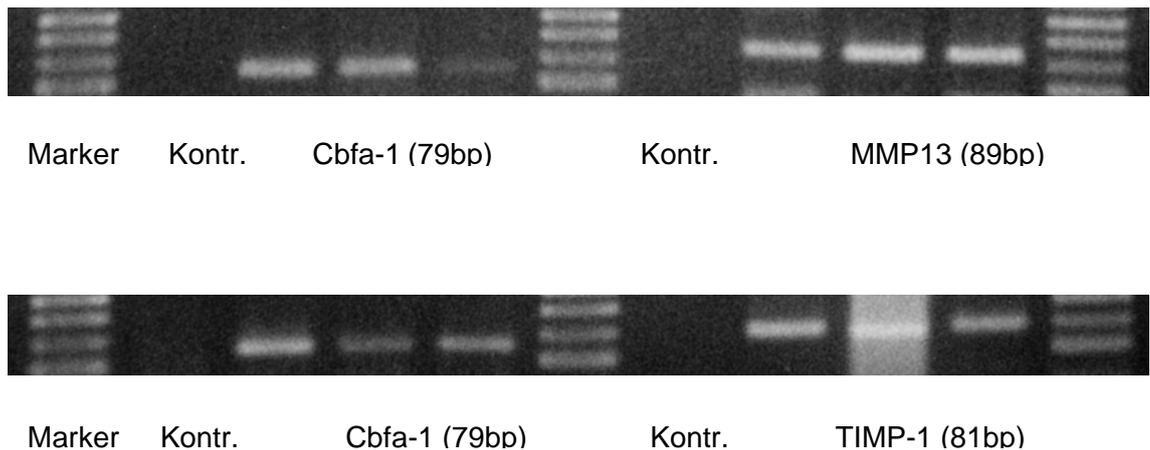


Abb. 9: Expression von *MMP13* und *TIMP-1* in humanen „Lining Cells“. Die oberen Banden zeigen die Expression von *MMP13* und die unteren Banden zeigen die Expression von *TIMP-1* in humanen „Lining Cells“. Die Proben wurden geteilt, so daß gleichzeitig die Expression von *Cbfa1* als Differenzierungsmerkmal osteoblastärer Zellen amplifiziert werden konnte.

5. Diskussion

5.1. Gefrierschnitte von nativem humanem Knochen

Der menschliche Knochen besteht aus kompaktem, mineralisiertem Gewebe, das sich für allgemein gebräuchliche Analysemethoden, wie sie in weichen Geweben angewandt werden, als nicht oder nur sehr schwer zugänglich erweist. Die in der Diagnostik angewandten Methoden zur Fixierung und Dekalzifizierung des Knochens erleichtern das Herstellen von Schnittpräparaten zur mikroskopischen Analyse (Goldsworthy et al., 1999, Srinivasan et al., 2002). Im Gegenzug bewirken diese Verfahren allerdings einen deutlichen Verlust der zellspezifischen mRNA Expression. Gefrierschnitte von nativem Gewebe werden deshalb als beste Methode angesehen, um intakte RNA zu isolieren (Goldsworthy et al., 1999). In dieser Arbeit wurde nach einer schnellen und zuverlässig reproduzierbaren Methode gesucht, die es einerseits ermöglicht Knochen im gefrorenen Zustand in, für eine adäquate histomorphologische Beurteilung unerlässliche, sehr dünne (4-6µm) Schnitte zu schneiden und andererseits diese mit einem kurzen Färbeprotokoll möglichst schonend zu behandeln, um eine Manipulation des Gehaltes an intakter RNA weitestgehend zu auszuschließen. Beides konnte mit der hier entwickelten Methodik erreicht werden. Die Morphologie des Knochens war nach der Anfertigung der histologischen Schnittpräparate gut erhalten, und die kurze Färbung mit Kernechtrot ermöglichte es, Knochenmark, Knochentrabekel, die endostalen Oberflächen mit den „Lining Cells“, Osteoblasten und Osteozyten zuverlässig zu unterscheiden. Insbesondere blieb bei diesem Verfahren die Beziehung zwischen weichem Knochenmark und den mineralisierten Knochentrabekeln erhalten. Die Schnittdicke ist auch entscheidend für die anschließende, Laserunterstützte Mikrodissektion. Die Isolierung einzelner Zellen mit dem Laserstrahl wird durch möglichst dünne Schnitte erleichtert.

5.2. Laser- unterstützte Mikrodissektion

Die Laser- unterstützte Mikrodissektion ist eine, in vielen anderen Geweben bereits gut etablierte, Methode zur Isolierung von Einzelzellen oder Zellclustern aus komplexen Gewebsstrukturen für Zell- spezifische Gen- Expressionsanalysen (Fink et al., 1998, 1999, 2000). Die Anwendung dieser Methode in mineralisiertem Knochen beschränkte sich bis jetzt zumeist auf Untersuchungen in tierischem Gewebe (Schao et al., 2006, Zhang et al., 2007). An nativem humanem Knochen, wurde die Laser- unterstützte Mikrodissektion bisher einmal beschrieben (Eisenberger et al., 2004). Allerdings konzentrierten sich die Autoren dieser Arbeit auf die Isolierung von Osteozyten. In dieser Arbeit wurden keine Zellen aus der mineralisierten Matrix herausgeschnitten sondern die Oberfläche der Knochentrabekel und die Umgebung mit dem Laserstrahl „gesäubert“ und anschließend der gesamte Knochentrabekel mit den darin enthaltenen Osteozyten aufgenommen. Eine Isolierung einzelner Zellen aus dem Knochen fand im eigentlichen Sinne nicht statt. Möglicherweise ist diese Vorgehensweise auch durch die Schnittdicke der histologischen Arbeit in dieser Studie zu erklären. Die Autoren geben an, daß die durchschnittliche Dicke der Schnittpräparate betrug $12\mu\text{m}$ (Eisenberger et al., 2004). Eine zu große Schnittdicke kann bewirken, daß der Laser den Knochen nicht mehr durchdringt, was bei der Anfertigung der vorliegenden Arbeit auch beobachtet werden konnte. Die hier präsentierte Untersuchung ist, nach umfangreichen Recherchen der aktuellen Literatur, die einzige, in der die die Isolierung einzelner „Lining Cells“ von der endostealen Oberfläche aus nativem humanem Knochen mittels Laser- unterstützter Mikrodissektion gezeigt werden konnte. Zum Ausschluß einer Kontamination der isolierten „Lining Cells“ durch benachbarte Zellen aus dem Knochenmark, wurden unmittelbar benachbarte Zellgruppen mit dem Laserstrahl evaporiert und die Umgebung gleichsam „gesäubert“. Die hier vorgestellte Methode erlaubt auch eine gezielte Isolierung von Osteozyten, da die dünnen Schnitte es ermöglichen, auch Osteozyten aus der Matrix herauszuschneiden. Dies wurde aber von uns nicht weiter verfolgt.

Eine komplette Isolierung ganzer Knochen trabekel wie in der oben zitierten Arbeit gezeigt, ist daher nicht nötig.

5.3. Charakterisierung der isolierten Zellen

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß mit Hilfe der Laser-unterstützten Mikrodisektion und der anschließenden RT-PCR die mRNA-Expression in unterschiedlichen Zelltypen, isoliert aus nativem humanem Knochen möglich ist. Um die osteoblastäre Differenzierung der isolierten „Lining cells“ zu verifizieren, wurde die mRNA- Expression für *Cbfa1* qualitativ gemessen. *Cbfa1* gehört zur Familie der Core-Binding-Faktoren, die heterodimere Transkriptionsfaktoren sind. Core-Binding-Faktoren besitzen eine *Runt*-Domäne (Kagoshima et al, 1993), die aufgrund ihrer Homologie zum Drosophila Pair-Rule-Gen *runt* (Yoshida et al., 2002) gehören. *Cbfa1* wird in osteoblastären und chondroblastären Zellen exprimiert und ist ein entscheidender Transkriptionsfaktor für die Knochenentstehung (Ducy et al., 1997, Komori et al., 1997). „knock- out“ Mäuse mit fehlender Expression von *Cbfa1* sind zur Osteogenese nicht im Stande (Komori et al, 1997, Otto et al., 1997) und Mutationen im Genlokus für *Cbfa1* stehen in Zusammenhang mit multiplen Fehlbildungen des Skeletts, wie bei Patienten mit cleidocranialer Dysplasie (Mundlos et al., 1997, Lee et al, 1997). In einer aktuellen Studie konnte gezeigt werden, daß die *Cbfa1*- Expression in Stromazellen aus dem Fettgewebe der Ratte, die *in vitro* eine osteogene Transdifferenzierung durchlaufen, deutlich erhöht ist (Zeng et al., 2007). Osteocalcin, ein häufig eingesetzter Marker zur Identifizierung osteoblastärer Zellen, wird in „Lining Cells“ nicht exprimiert (Everts et al., 2002). Ein Einfluss der mit den „Lining Cells“ zusammen mikrodissezierten Knochenmatrix auf die Expression von *Cbfa1* konnte ausgeschlossen werden. Weiterhin zeigten auch Osteozyten keine Expression von *Cbfa1*. Diese Ergebnisse stimmen überein mit Studien, die zeigen konnten, daß *Cbfa1* bei der Entwicklung des Gesichtsschädels sowohl bei Nagetieren als auch in fetalem humanem Gewebe noch in

ontogenetisch jungen Osteozyten, nicht jedoch in älteren Osteozyten nachweisbar ist (Bronckers et al., 2003). In einer Probe aus dem Knochenmark wurde die Expression von *Cbfa1* mRNA nachgewiesen. Durch die ausschließlich nukleäre Färbung der Zellen konnte nicht ausgeschlossen werden, daß möglicherweise bei den Proben, die in Form von Zellgruppen aus dem Knochenmark isoliert wurden, vereinzelte Osteoprogenitorzellen oder Präosteoblasten isoliert wurden. In zahlreichen Studien an Zellkulturen humaner osteoblastärer Zelllinien konnte gezeigt werden, daß *Cbfa1* während der Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark zu Osteoblasten kontinuierlich exprimiert wird (Shui et al., 2003). Durch den Nachweis der *Cbfa1*- Expression in den isolierten Zellen wurde vor allem nachgewiesen, daß Osteoklasten die Messergebnisse für die nachfolgenden Untersuchungen der Expression von Matrixmetalloproteinasen nicht verfälschten. In den nachfolgenden Untersuchungen wurden die Proben geteilt und die Expression von *Cbfa1* als Referenz- Gen zur Kontrolle genutzt.

5.4. *MMP13* und *TIMP-1*

5.4.1 Expression von *MMP13* und *TIMP-1* in „Lining Cells“

In der hier vorliegenden Arbeit konnte eindeutig gezeigt werden, daß *MMP13* und der endogene Inhibitor dieser Metalloproteinase *TIMP-1* auf der Ebene der mRNA in den „Lining cells“ der endostalen Oberflächen des spongiösen humanen Knochens exprimiert werden. Diese Ergebnisse bestätigen vorausgegangene Untersuchungen in Tiermodellen und Zellkulturen. In einer Studie an Knochen, bzw. Knochenanlagen verschiedener Lokalisationen in Rattenembryos (Femur, Tibia und Wirbelsäule) wurde gezeigt, daß „Lining cells“ an der Oberfläche der Knochen trabekel des spongiösen Knochens eine starke Expression von mRNA für *MMP13* aufweisen (Fuller et al., 1995). Ähnliche Ergebnisse wurden für Mäuseembryos beschrieben. In diesen Embryos konnte mittels *in situ*- Hybridisierung interessanterweise auch gezeigt

werden, daß „Lining cells“ an den endostalen Oberflächen des trabekulären Knochens der langen Röhrenknochen eine starke Expression von *MMP13* bei gleichzeitig fehlender Expression von Osteocalcin aufwiesen (Tuckermann et al, 2000). Die hier vorgelegten Ergebnisse werden auch gestützt durch Untersuchungen in Ratten, in denen eine Expression von *MMP13* in „Lining cells“ im trabekulären Knochen der Tibia, auch mit Hilfe der Elektronenmikroskopie nachgewiesen wurde. In den „Lining cells“ ließ sich ein Signal (Kolloidale Goldmarkierung) für *MMP13* im Golgiapparat der „Lining cells“ nachweisen (Nakamura et al, 2004). In der letztgenannten Studie konnte auch in einzelnen Osteozyten, benachbart zu Resorptionslakunen und in der Knochenmatrix entlang von Zementlinien immunhistochemisch und immunelektronenmikroskopisch *MMP13* nachgewiesen werden. Eine Expression von *MMP13* mRNA in Osteozyten, wie sie durch immunhistochemische Untersuchungen und durch in-situ Hybridisierung in Osteozyten der Maus belegt wurde (Fuller et al., 1995, Nakamura et al, 2004), konnte in der vorliegenden Arbeit nicht nachgewiesen werden. Dies ist möglicherweise durch eine zu niedrige Kopienzahl in den Osteozyten bedingt oder durch eine zu geringe Zahl der isolierten Osteozyten, die für die RT-PCR verwendet wurden. Die Expression von *MMP13* wurde allerdings in beiden oben zitierten Arbeiten nicht als homogen in allen Osteozyten beschrieben. So kann möglicherweise auch ein „sampling error“ zu einem falsch negativen Ergebnis geführt haben.

Die Ergebnisse zur Expression von *TIMP-1*- mRNA in endostalen „Lining Cells“ werden durch vorausgegangene immunhistochemische Untersuchungen an humanem Knochen bestätigt. In einer vergleichenden Studie an fetalem Rippenknochen, Osteophyten und heterotopem Knochen wurde die *TIMP-1* Expression in unterschiedlichen Ausprägungen nachgewiesen. Im fetalen Knochen, der dem regulären adulten Knochen allerdings nicht ganz gleichzusetzen ist, wurde eine deutliche Expression von *TIMP-1* in den „Lining cells“ der endostalen Oberflächen festgestellt (Bord et al., 1999). Diese Ergebnisse unterstützten vorausgegangene Untersuchungen in Schädelknochen von Kaninchen (Everts et al., 1993). Im Vergleich zu den hier vorgestellten Ergebnissen, wurde auch von diesen Autoren ein schwaches

Signal für *TIMP-1* in Osteozyten nachgewiesen. Allerdings beschreiben die Autoren eine Expression von *TIMP-1* nur in weniger als 20% der Osteozyten der untersuchten Knochenproben (Bord et al., 1999). Möglicherweise ist auch in diesem Fall, die Anzahl der isolierten Osteozyten pro RT-PCR zu gering gewesen, um einen Nachweis der mRNA zu erbringen. Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, daß sich die Expressionsprofile von *TIMP-1* in neonatalen und adulten Osteozyten unterscheiden. Die hier zum Vergleich hinzugezogene Arbeit beschreibt auch eine Expression von *TIMP-1* in Osteoklasten (Bord et al, 1999). Eine Vermischung von Osteoklasten mit isolierten „Lining Cells“ in unseren Proben läßt sich aber ausschließen, da bei der vergleichend durchgeführten internen Kontrolle in den geteilten Proben, die Expression von *Cbfa-1* als Marker der Osteoblasten- Linie nachgewiesen werden konnte.

5.4.2 Bedeutung für den Knochenumbau im alternden Menschen

Welche Implikationen für den Knochenstoffwechsel lassen sich aus der Expression von *MMP13* und *TIMP-1* bezüglich der Funktionen der „Lining cells“ im Knochenstoffwechsel des alternden Menschen herleiten? Die gleichzeitige Expression einer Matrix-Metallo-Proteinase und ihres endogenen Inhibitors weist auf einen regulatorischen Mechanismus hin, der zur exakten Steuerung der Aktivität von *MMP13* dienen könnte. MMPs müssen einer genauen Kontrolle ihrer Aktivität unterliegen, um im richtigen Moment am richtigen Ort ihre Wirkung zu entfalten (Übersicht bei Sternlicht et al, 2001). Eine unkontrollierte Aktivität könnte zu einer erheblichen Destruktion des Osteoidsaums auf der Knochenoberfläche führen und eine übermäßige osteoklastäre Knochendestruktion, durch die freiliegende mineralisierte Matrix nach sich ziehen.

Die beiden Enzyme haben aber auch voneinander unabhängige Funktionen. *MMP13* ist ein wichtiges Zielenzym der Ca^{2+} - Homöostase, die durch Parathormon reguliert wird. In Mäusen bewirkt eine Injektion von Parathormon

eine deutliche Steigerung der *MMP13*- Expression in osteoblastären Zellen (Porte et al., 1999, Hess et al, 2001). Diese Steigerung der Expression wird als wichtiger Faktor im „coupling“- Mechanismus zwischen osteoblastärer und osteoklastärer Aktivität und einer damit einhergehenden Steigerung des Knochenumbaus angesehen (Chambers et al, 1985, Holliday et al, 1997, Delaisse et al., 2000). Die Steigerung des Knochenumbaus durch Parathormon führt zu einer positiven Bilanz, d. h. eine Zunahme der Knochensubstanz, so daß Parathormon, zumindest in der Therapie der postmenopausalen Osteoporose eingesetzt wird (Seeman et al, 2001, Whitfield et al, 2002). Allerdings konnten in Studien an Primaten gezeigt werden, daß die Parathormongabe bei gesteigertem Knochenumbau mit einer erhöhten Porosität des Knochens einhergeht (Sato et al., 2004). Wie in der Einleitung bereits erwähnt, wird die Erhöhung des Parathormonspiegels auch als ein wichtiger Faktor bei der Entstehung der Osteoporose betrachtet. Zum Teil werden die sowohl anabolen, als auch katabolen Wirkungen von Parathormon auf Unterschiede bezüglich der Dosis, der Applikationsart (kontinuierlich oder intermittierend) und auf unterschiedliche Wirkungen in den verschiedenen Knochenarten zurückgeführt (Dempster et al., 1993, Dobnig et al., 1997, Gowen et al., 2000, Shen et al., 2000, Stewart et al., 2000, Uzawa et al., 1995). Diese unterschiedlichen Effekte sind möglicherweise auf die Wirkung von *MMP13* zurückzuführen (Chiusaroli et al., 2003). Transgene Mäuse, die eine Überexpression des Makrophagen Migrations- Inhibitor Faktor besitzen, entwickeln eine „high-turnover“ Osteoporose, ähnlich der postmenopausalen Osteoporose. Bei diesem vermehrten Knochenabbau wird keine Zunahme der osteoklastären Aktivität beobachtet (Onodera et al., 2006). Die Autoren führen dies u. a. auf die Wirkung von *MMP13* zurück. Ähnliche Beobachtungen wurden auch in ovariectomierten Ratten beschrieben, einem allgemein verbreitetem Modell für die postmenopausale Osteoporose. Die Untersuchungen in diesem Modell zeigten eine erhöhte Expression von *MMP13* besonders in den „Lining cells“, die von den Autoren auch mit einer erhöhten Matrixdegeneration in Zusammenhang gesehen wurde (Li et al., 2004).

TIMP-1 besitzt zusätzlich zu der inhibitorischen Wirkung auf MMPs noch weitere wichtige Funktionen für die Zellbiologie. Die bisher bekannten vier Isoformen *TIMP-1*, -2, -3 und -4 sind Regulatoren der Apoptose. Dabei besitzen

die verschiedenen Isoformen z. T. gegensätzliche Funktionen. *TIMP-1* besitzt eine anti- apoptotische Wirkung, *TIMP-3* eine pro- apoptotische und *TIMP-2* und *-4* besitzen sowohl pro- als auch anti- apoptotische Eigenschaften (Alexander et al., 1996, Baker et al., 1998, Guedez et al., 1998). Die anti- apoptotische Wirkung von *TIMP-1* ist von großer Bedeutung für die Differenzierung von, z.B. Osteoblasten. *TIMP-1* unterstützt die Differenzierung von Stammzellen aus dem Knochenmark zu Osteoblasten durch seine anti- apoptotische Wirkung, besitzt aber keinen Einfluss auf die osteoblastäre Differenzierung. Dies konnte in Zellkulturstudien von Stammzellen aus dem Knochenmark von Mäusen belegt werden (Guo et al., 2006). Unabhängig von der Wirkung von *MMP13* auf das „coupling“ zwischen Osteoblasten und Osteoklasten, kann *TIMP-1* auch direkt die Knochenresorption durch Osteoklasten ,zumindest im Zellkulturmodell, induzieren (Sobue et al., 2001). Möglicherweise wird die anti- apoptotische Wirkung von *TIMP-1* auch zum Erhalt der „Lining Cell“- Population an den endostalen Oberflächen benötigt.

Betrachtet man die oben angeführten Funktionen von *MMP13* und *TIMP-1* im Zusammenhang mit dem schleichenden Verlust von Knochenmasse des alternden Menschen und unter Berücksichtigung der tierexperimentell gewonnenen Erkenntnisse, könnte den „Lining Cells“ eine aktive, katabole Funktion in Verbindung mit der Osteoklastären Resorption zugeschrieben werden. Dabei muss nicht unbedingt eine direkte Demineralisation der Knochenmatrix im Vordergrund stehen. Möglicherweise kommt es unter dem Einfluss von steigenden Parathormonspiegeln im Alter zu einer geringen Aktivitätszunahme der *MMP13* an den endostealen Oberflächen des trabekulären Knochens und zu einer kontinuierlichen Degradation von Osteoid. Dies stellt einen dauernden Resorptionsreiz für die Osteoklasten dar. Bei einer gleich bleibenden Zahl von Osteoklasten könnte bei einem stetigen katabolen Reiz, möglicherweise die osteoklastäre Resorption den osteoblastären Knochenaufbau überwiegen. Als auslösende Faktoren kommen außer Parathormon noch eine Vielzahl anderer Knochenresorption- stimulierender Faktoren in Frage. Hier wäre in erster Linie zu nennen 1,25-dihydroxy- Vitamin D₃, Prostaglandin E₂, IL-1, TNF- α , Katabolin, Retinolsäure oder Endotoxin (Thomson et al., 1987, Delaisse et al., 1988). Für eine oder mehrer zusätzliche

Komponenten, die zur Entstehung des schleichenden Verlusts an Knochenmasse im Alter beitragen, spricht auch, daß zum Beispiel im Mausmodell der Überexpression von Makrophagen Migrations- Inhibierendem-Faktor der dramatische Rückgang des trabekulären Knochenvolumens mit der Alterung der Mäuse abnahm und schließlich fast normale Werte erreichte (Onodera et al., 2006).

5.5. Schlußfolgerungen und Ausblick

Die bisherige Forschung zu den zellulären Grundlagen der Osteoporose hat sich vor allem auf die Funktion der Osteoblasten und Osteoklasten, bzw. ihrer Interaktion im Rahmen des Knochenumbaus, dem sog. „bone remodelling“ konzentriert. Bei den Untersuchungen des sog. „Bone remodelling compartments“ ist außer den Osteozyten immer wieder die Zellpopulation der „Lining Cells“, zumindest in einigen Studien in den Fokus gerückt, allerdings aufgrund mangelnder Möglichkeit der Isolation selten eingehend untersucht worden.

Für eine umfassende Aufklärung der komplizierten Zell- Zell- Interaktion im menschlichen Skelett gerade im Hinblick auf den Knochenumbau und besonders vor dem Hintergrund möglicher therapeutischer Ansätze zum Stillstand, bzw. sogar zur Umkehr des fortschreitenden Knochenabbaus im Alter, stellt sich die Frage, ob man eine Zellpopulation, die ungefähr 75% der endostealen Knochenoberflächen bedeckt, als Faktor bei der Pathogenese der Osteoporose wirklich vernachlässigen kann.

Die immer wieder diskutierte Frage, ob es sich bei den „Lining Cells“ um einen eigenen Phänotyp handelt, wurde bisher auch eher durch Indizien verneint, bzw. nicht eingehend untersucht. Auch eine dezidierte Untersuchung der möglicherweise vorhanden katabolen Eigenschaften dieser Zellen an den immer wieder als „ruhend“ bezeichneten Knochenoberflächen ist bisher nicht erfolgt.

Mit der hier vorgestellten Methode der Laser- unterstützten Mikrodisektion konnte erstmals eine exakte Isolierung einzelner „Lining Cells“ von den endostealen Oberflächen aus nativem humanem Knochen gezeigt werden.

Dabei wurde ein einfaches Verfahren zur Gefrierschnitterstellung und Anfärbung der erhaltenen Schnittpräparate angewandt, welches sich auch gut auf andere Labore übertragen läßt. Mit dieser Technik ist es möglich genügend Zellmaterial zu isolieren um die Proteinexpression auf der Ebene der mRNA zu bestimmen.

Erste Hinweise auf mögliche katabole Eigenschaften der „Lining Cells“ ergeben sich aus der Expression wichtiger Enzyme für den Knochenstoffwechsel, *MMP13* und *TIMP-1*, denen im Tiermodell und bei Untersuchungen im humanen Gewebe schon Bedeutung für die Pathogenese der Osteoporose zugesprochen wurde.

Mit der hier vorgestellten Technik sollte es in Zukunft möglich sein die Eigenschaften der „Lining Cells“, aber auch anderer Zellgruppen des Knochens, wie vor allem der Osteozyten auf molekularer Ebene genauer zu charakterisieren, um damit vor allem Aussagen über ihre aktuelle Funktion in ihrem Mikromilieu zu treffen.

6. Zusammenfassung

Die Osteoporose generell und vor allem der geschlechtsunabhängige Verlust der Knochenmasse im Alter stellen bedeutende Morbiditäts- und Mortalitätsfaktoren für die alternden Gesellschaften der westlichen Hemisphäre dar. Um neue Therapiestrategien zu entwickeln und bekannte Mechanismen aus Tiermodellen verschiedener Spezies auf die komplizierten Umbauvorgänge im menschlichen Knochen zu übertragen sind Untersuchungen der Zell- Zell-Interaktion, vor allem zwischen Osteoblasten- und Osteoklasten im Rahmen des Knochenumbaus notwendig. Dieser Umbau findet in einem spezialisierten Kompartiment, dem sog. „Bone remodelling compartment“ statt und schließt eine weitere Zellgruppe, die „Lining Cells“, die 75% der endostealen Oberflächen des trabekulären Knochens im menschlichen Skelett bedecken, mit ein. Obwohl in hoher Zahl vorhanden, sind die „Lining Cells“ bisher nicht im Fokus der Untersuchungen zum Knochenstoffwechsel gewesen. Eine Schwierigkeit besteht in der genauen Abgrenzung von Osteoblasten und in der Isolation dieser Zellen von der Knochenoberfläche.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß mit Hilfe der Laser-unterstützten Mikrodissektion eine exakte Isolation der „Lining Cells“ von den endostealen Oberflächen aus nativem humanen Knochen möglich ist. Dazu wurde ein einfaches Protokoll zur Gefrierschnittaufarbeitung von nativem, mineralisiertem humanem Knochen mit konsekutiver Kernfärbung etabliert, welches eine schnelle Bearbeitung der Proben erlaubt und somit eine Beeinträchtigung von molekularbiologischen Untersuchungen durch Proteinverlust minimiert.

Bei der Untersuchung der „Lining Cells“ mittels qualitativer RT-PCR konnte als Referenzgen *Cbfa1* und zum Studium kataboler Eigenschaften die Expression von mRNA für *MMP13* und *TIMP-1* nachgewiesen werden. Beide Enzyme spielen eine wichtige Rolle, nicht nur für die Matrixdegeneration (*MMP13*), sondern auch für andere Zellfunktionen, wie den Schutz vor Apoptose (*TIMP-1*). Besonders die Expression von *MMP13* ist ein Indiz für eine mögliche katabole Funktion der „Lining Cells“ im Knochenstoffwechsel und besonders im Knochen

des alternden Menschen. Möglicherweise kommt es hier zu einem synergistischen Knochenabbau, zusammen mit der osteoklastären Resorption mineralisierter Matrix. Die Arbeit bietet durch Adaptation der Laser- unterstützten Mikrodissektion einen neuen methodischen Zugang zur Untersuchung verschiedener Knochenzelltypen auf molekularer Ebene in ihrem eigenen Mikromilieu.

7. Summary

Osteoporosis and in particular the slow and gender independent bone loss with increasing age is a major cause for morbidity and mortality leading to an increased risk of fractures in the western civilisations. To further investigate cell-cell interaction, especially between osteoclasts and osteoblasts in the human bones in order to evaluate new targets for anti-resorptive therapies, a method has to be established, which opens the access to different cells of human bone directly in their complex microenvironment. This is necessary to check whether results of different animal models at the molecular level apply to human bone tissue as well. Bone remodelling takes place in a specialized compartment called the "bone remodelling compartment" which encloses as one of the types of cells, the bone lining cells. So far, the properties of endosteal bone lining cells have not been studied carefully although they cover almost 75% of endosteal bone surfaces in human cancellous bone. This might be due to a lack of knowledge concerning their exact phenotype and because of difficulties in isolating bone lining cells from their complex microenvironment.

The present study demonstrates that laser-assisted microdissection is a highly suitable tool for the isolation of bone lining cells from native, mineralized human bone. For this purpose, a quick and simple protocol of cryosectioning in combination with a staining method utilising Nuclear Fast Red was established in order to minimize protein loss of the dissected cells.

Examining the dissected bone lining cells by qualitative RT-PCR demonstrated *Cbfa1* as reference gene of the osteoblastic lineage and for catabolic properties the expression profile of mRNA for *MMP13* and *TIMP-1*. Both enzymes play a pivotal role for matrix degradation (*MMP13*) and for unknown reasons by their anti-apoptotic effect (*TIMP-1*). Thus the expression of *MMP13* indicates a possible catabolic function of bone lining cells, especially for the slow bone loss in aging man. Bone lining cells may act synergistically with osteoclastic bone resorption through this process. The adaptation of laser-assisted microdissection to bone tissue presents a new promising approach to study different bone cells in their specific complex microenvironment.

8. Literaturverzeichnis.

1. (1993) Consensus Development Conference on Osteoporosis. Hong Kong, April 1-2, 1993. Am J Med 95:1S-78S
2. Arnett T (2003) Regulation of Bone Cell Function by acid-balance. Proc Nutr Soc 62:511-520
3. Arnold JS, Bartley MH, Tont SA, Jenkins DP (1966) Skeletal changes in aging and disease. Clin Orthop Relat Res 49:17-38
4. Atkinson PJ (1967) Variation in trabecular structure of vertebrae with age. Calcif Tissue Res 1:24-32
5. Aubin J, Lian, JB, Stein, GS (2006) Bone Formation: Maturation and Functional Activities of Osteoblast Lineage Cells. American Society for Bone and Mineral Research, Washington, DC
6. Ballanti P, Bonucci E, Della Rocca C, Milani S, Lo Cascio V, Lo Imbimbo B (1990) Bone histomorphometric reference values in 88 normal Italian subjects. Bone Miner 11:187-197
7. Banks WJ, Jr., Epling GP, Kainer RA, Davis RW (1968) Antler growth and osteoporosis. I. Morphological and morphometric changes in the costal compacta during the antler growth cycle. Anat Rec 162:387-398
8. Bennett M, Goodenough DA (1978) Gap junctions, electric coupling and intercellular communications. Neurosci Res Program Bull 16:373-486
9. Bilezikian JP, Brandi ML, Rubin M, Silverberg SJ (2005) Primary hyperparathyroidism: new concepts in clinical, densitometric and biochemical features. J Intern Med 257:6-17

10. Blair H, Athanasou, NA (2004) Recent advances in osteoclast biology and pathological bone resorption. *Histol Histopathol* 19:189-199
11. Bord S, Horner A, Beeton CA, Hembry RM, Compston JE (1999) Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 (TIMP-1) distribution in normal and pathological human bone. *Bone* 24:229-235
12. Bowman BM, Miller SC (2001) Skeletal adaptations during mammalian reproduction. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 1:347-355
13. Bowman BM, Miller SC (1986) The proliferation and differentiation of the bone-lining cell in estrogen-induced osteogenesis. *Bone* 7:351-357
14. Bronckers AL, Sasaguri K, Engelse MA (2003) Transcription and immunolocalization of Runx2/Cbfa1/Pebp2alphaA in developing rodent and human craniofacial tissues: further evidence suggesting osteoclasts phagocytose osteocytes. *Microsc Res Tech* 61:540-548
15. Burr DB (2002) Targeted and nontargeted remodeling. *Bone* 30:2-4
16. Canas F, Terepka AR, Neuman WF (1969) Potassium and milieu interieur of bone. *Am J Physiol* 217:117-120
17. Carlsen CG, Soerensen TH, Eriksen EF (2000) Prevalence of low serum estradiol levels in male osteoporosis. *Osteoporos Int* 11:697-701
18. Chambers TJ, Darby JA, Fuller K (1985) Mammalian collagenase predisposes bone surfaces to osteoclastic resorption. *Cell Tissue Res* 241:671-675
19. Chiusaroli R, Maier A, Knight MC, Byrne M, Calvi LM, Baron R, Krane SM, Schipani E (2003) Collagenase cleavage of type I collagen is essential for both basal and parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor-induced osteoclast activation and has differential effects on discrete bone compartments. *Endocrinology* 144:4106-4116

20. Cooper RR, Milgram JW, Robinson RA (1966) Morphology of the osteon. An electron microscopic study. *J Bone Joint Surg Am* 48:1239-1271
21. Delaisse JM, Eeckhout Y, Vaes G (1988) Bone-resorbing agents affect the production and distribution of procollagenase as well as the activity of collagenase in bone tissue. *Endocrinology* 123:264-276
22. Delaisse JM, Engsig MT, Everts V, del Carmen Ovejero M, Ferreras M, Lund L, Vu TH, Werb Z, Winding B, Lochter A, Karsdal MA, Troen T, Kirkegaard T, Lenhard T, Heegaard AM, Neff L, Baron R, Foged NT (2000) Proteinases in bone resorption: obvious and less obvious roles. *Clin Chim Acta* 291:223-234
23. Deldar A, Lewis H, Weiss L (1985) Bone lining cells and hematopoiesis: an electron microscopic study of canine bone marrow. *Anat Rec* 213:187-201
24. Dempster D (2006) *Anatomy and Functions of the Adult Skeleton*. American Society for Bone and Mineral Research, Washington, DC
25. Dempster DW, Cosman F, Parisien M, Shen V, Lindsay R (1993) Anabolic actions of parathyroid hormone on bone. *Endocr Rev* 14:690-709
26. Dobnig H, Turner RT (1997) The effects of programmed administration of human parathyroid hormone fragment (1-34) on bone histomorphometry and serum chemistry in rats. *Endocrinology* 138:4607-4612
27. Doty SB (1981) Morphological evidence of gap junctions between bone cells. *Calcif Tissue Int* 33:509-512
28. Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G (1997) *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 89:747-754
29. Eisenberger S, Hoppe G, Pyerin W, Ackermann K (2004) High-quality RNA preparation for transcript profiling of osteocytes from native human bone microdissections. *Anal Biochem* 335:260-266

30. Ensrud KE, Palermo L, Black DM, Cauley J, Jergas M, Orwoll ES, Nevitt MC, Fox KM, Cummings SR (1995) Hip and calcaneal bone loss increase with advancing age: longitudinal results from the study of osteoporotic fractures. *J Bone Miner Res* 10:1778-1787
31. Everts V, Delaisse JM, Korper W, Jansen DC, Tigchelaar-Gutter W, Saftig P, Beertsen W (2002) The bone lining cell: its role in cleaning Howship's lacunae and initiating bone formation. *J Bone Miner Res* 17:77-90
32. Everts V, Hoeben K, Beertsen W (1993) The release of tissue inhibitor of metalloproteinases by calvarial bone explants and its immunolocalization. *Bone Miner* 22:43-55
33. Fatayerji D, Mawer EB, Eastell R (2000) The role of insulin-like growth factor I in age-related changes in calcium homeostasis in men. *J Clin Endocrinol Metab* 85:4657-4662
34. Fink L, Stahl, U, Ermert, L, Kummer, W, Seeger, W, Bohle, RM. (1999) Rat porphobilinogen deaminase gene: a pseudogene-free internal standard for laser-assisted cell picking. *Biotechniques* 26:510-516
35. Fink L, Bohle RM (2005) Laser microdissection and RNA analysis. *Methods Mol Biol* 293:167-185
36. Fink L, Kinf T, Stein MM, Ermert L, Haenze J, Kummer W, Seeger W, Bohle RM (2000) Immunostaining and laser-assisted cell picking for mRNA analysis. *Lab Invest* 80:327-333
37. Fink L, Seeger W, Ermert L, Haenze J, Stahl U, Grimminger F, Kummer W, Bohle RM (1998) Real-time quantitative RT-PCR after laser-assisted cell picking. *Nat Med* 4:1329-1333
38. Freije JM, Diez-Itza I, Balbin M, Sanchez LM, Blasco R, Tolivia J, Lopez-Otin C (1994) Molecular cloning and expression of collagenase-3, a novel

human matrix metalloproteinase produced by breast carcinomas. *J Biol Chem* 269:16766-16773

39. Fuller K, Chambers TJ (1995) Localisation of mRNA for collagenase in osteocytic, bone surface and chondrocytic cells but not osteoclasts. *J Cell Sci* 108 (Pt 6):2221-2230

40. Geoffroy V, Marty-Morieux C, Le Goupil N, Clement-Lacroix P, Terraz C, Frain M, Roux S, Rossert J, de Vernejoul MC (2004) In vivo inhibition of osteoblastic metalloproteinases leads to increased trabecular bone mass. *J Bone Miner Res* 19:811-822

41. Goldsworthy SM, Stockton PS, Trempus CS, Foley JF, Maronpot RR (1999) Effects of fixation on RNA extraction and amplification from laser capture microdissected tissue. *Mol Carcinog* 25:86-91

42. Gowen M, Stroup GB, Dodds RA, James IE, Votta BJ, Smith BR, Bhatnagar PK, Lago AM, Callahan JF, DeMar EG, Miller MA, Nemeth EF, Fox J (2000) Antagonizing the parathyroid calcium receptor stimulates parathyroid hormone secretion and bone formation in osteopenic rats. *J Clin Invest* 105:1595-1604

43. Guo LJ, Luo XH, Xie H, Zhou HD, Yuan LQ, Wang M, Liao EY (2006) Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase-1 Suppresses Apoptosis of Mouse Bone Marrow Stromal Cell Line MBA-1. *Calcif Tissue Int*

44. Hauge EM, Qvesel D, Eriksen EF, Mosekilde L, Melsen F (2001) Cancellous bone remodeling occurs in specialized compartments lined by cells expressing osteoblastic markers. *J Bone Miner Res* 16:1575-1582

45. Häussler B, Gothe H, Gol D, Glaeske G, Pientka L, Felsenberg D (2007) Epidemiology, treatment and costs of osteoporosis in Germany--the BoneEVA Study. *Osteoporos Int* 18:77-84

46. Hess J, Porte D, Munz C, Angel P (2001) AP-1 and Cbfa/runt physically interact and regulate parathyroid hormone-dependent MMP13 expression in osteoblasts through a new osteoblast-specific element 2/AP-1 composite element. *J Biol Chem* 276:20029-20038
47. Hoikka V, Arnala I (1981) Histomorphometric normal values of the iliac crest cancellous bone in a Finnish autopsy series. *Ann Clin Res* 13:383-386
48. Holliday LS, Welgus HG, Fliszar CJ, Veith GM, Jeffrey JJ, Gluck SL (1997) Initiation of osteoclast bone resorption by interstitial collagenase. *J Biol Chem* 272:22053-22058
49. Holliday LS, Welgus HG, Fliszar CJ, Veith GM, Jeffrey JJ, Gluck SL (1997) Initiation of osteoclast bone resorption by interstitial collagenase. *J Biol Chem* 272:22053-22058
50. Kagoshima H, Shigesada K, Satake M, Ito Y, Miyoshi H, Ohki M, Pepling M, Gergen P (1993) The Runt domain identifies a new family of heteromeric transcriptional regulators. *Trends Genet* 9:338-341
51. Kanis JA, Delmas P, Burckhardt P, Cooper C, Torgerson D (1997) Guidelines for diagnosis and management of osteoporosis. The European Foundation for Osteoporosis and Bone Disease. *Osteoporos Int* 7:390-406
52. Kanis JA, Johansson H, Oden A, Johnell O, De Laet C, Eisman JA, McCloskey EV, Mellstrom D, Melton LJ, 3rd, Pols HA, Reeve J, Silman AJ, Tenenhouse A (2004) A family history of fracture and fracture risk: a meta-analysis. *Bone* 35:1029-1037
53. Knäuper V, Lopez-Otin C, Smith B, Knight G, Murphy G (1996) Biochemical characterization of human collagenase-3. *J Biol Chem* 271:1544-1550
54. Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, Shimizu Y, Bronson RT, Gao YH, Inada M, Sato M, Okamoto R, Kitamura Y,

Yoshiki S, Kishimoto T (1997) Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* 89:755-764

55. Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, Shimizu Y, Bronson RT, Gao YH, Inada M, Sato M, Okamoto R, Kitamura Y, Yoshiki S, Kishimoto T (1997) Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* 89:755-764

56. Lee B, Thirunavukkarasu K, Zhou L, Pastore L, Baldini A, Hecht J, Geoffroy V, Ducy P, Karsenty G (1997) Missense mutations abolishing DNA binding of the osteoblast-specific transcription factor OSF2/CBFA1 in cleidocranial dysplasia. *Nat Genet* 16:307-310

57. Li J, Liao EY, Dai RC, Wei QY, Luo XH (2004) Effects of 17 beta-estradiol on the expression of interstitial collagenases-8 and -13 (MMP-8 and MMP-13) and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) in ovariectomized rat osteoblastic cells. *J Mol Histol* 35:723-731

58. Lippuner K, von Overbeck J, Perrelet R, Bosshard H, Jaeger P (1997) Incidence and direct medical costs of hospitalizations due to osteoporotic fractures in Switzerland. *Osteoporos Int* 7:414-425

59. Melsen F, Melsen B, Mosekilde L, Bergmann S (1978) Histomorphometric analysis of normal bone from the iliac crest. *Acta Pathol Microbiol Scand [A]* 86:70-81

60. Melton L (1988) Osteoporosis: etiology, diagnosis and management. In: Riggs B, Melton, LJ (ed) *Epidemiology of fractures*. Raven Press, New York, p 133-154

61. Melton LJ, 3rd, Thamer M, Ray NF, Chan JK, Chesnut CH, 3rd, Einhorn TA, Johnston CC, Raisz LG, Silverman SL, Siris ES (1997) *Fractures*

attributable to osteoporosis: report from the National Osteoporosis Foundation.
J Bone Miner Res 12:16-23

62. Menton DN, Simmons DJ, Chang SL, Orr BY (1984) From bone lining cell to osteocyte--an SEM study. Anat Rec 209:29-39

63. Merz WA, Schenk RK (1970) Quantitative structural analysis of human cancellous bone. Acta Anat (Basel) 75:54-66

64. Michaelsson K, Melhus H, Ferm H, Ahlbom A, Pedersen NL (2005) Genetic liability to fractures in the elderly. Arch Intern Med 165:1825-1830

65. Miller SC, Bowman BM, Smith JM, Jee WS (1980) Characterization of endosteal bone-lining cells from fatty marrow bone sites in adult beagles. Anat Rec 198:163-173

66. Miller VJ (1992) The effect of age on condylar asymmetry in patients with craniomandibular disorders of arthrogenous origin. J Prosthet Dent 67:845-846

67. Mitchell PG, Magna HA, Reeves LM, Lopresti-Morrow LL, Yocum SA, Rosner PJ, Geoghegan KF, Hambor JE (1996) Cloning, expression, and type II collagenolytic activity of matrix metalloproteinase-13 from human osteoarthritic cartilage. J Clin Invest 97:761-768

68. Mundlos S, Otto F, Mundlos C, Mulliken JB, Aylsworth AS, Albright S, Lindhout D, Cole WG, Henn W, Knoll JH, Owen MJ, Mertelsmann R, Zabel BU, Olsen BR (1997) Mutations involving the transcription factor CBFA1 cause cleidocranial dysplasia. Cell 89:773-779

69. Nakamura H, Sato G, Hirata A, Yamamoto T (2004) Immunolocalization of matrix metalloproteinase-13 on bone surface under osteoclasts in rat tibia. Bone 34:48-56

70. Olsen B (2006) Bone Embryology. American Society for Bone and Mineral Research, Washington, DC

71. Onodera S, Sasaki S, Ohshima S, Amizuka N, Li M, Udagawa N, Irie K, Nishihira J, Koyama Y, Shiraishi A, Tohyama H, Yasuda K (2006) Transgenic mice overexpressing macrophage migration inhibitory factor (MIF) exhibit high-turnover osteoporosis. *J Bone Miner Res* 21:876-885
72. Otto F, Thornell AP, Crompton T, Denzel A, Gilmour KC, Rosewell IR, Stamp GW, Beddington RS, Mundlos S, Olsen BR, Selby PB, Owen MJ (1997) *Cbfa1*, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell* 89:765-771
73. Palle S, Chappard D, Vico L, Riffat G, Alexandre C (1989) Evaluation of the osteoclastic population in iliac crest biopsies from 36 normal subjects: a histoenzymologic and histomorphometric study. *J Bone Miner Res* 4:501-506
74. Parfitt AM (2002) Targeted and nontargeted bone remodeling: relationship to basic multicellular unit origination and progression. *Bone* 30:5-7
75. Parfitt AM (1994) Osteonal and hemi-osteonal remodeling: the spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone. *J Cell Biochem* 55:273-286
76. Porte D, Tuckermann J, Becker M, Baumann B, Teurich S, Higgins T, Owen MJ, Schorpp-Kistner M, Angel P (1999) Both AP-1 and *Cbfa1*-like factors are required for the induction of interstitial collagenase by parathyroid hormone. *Oncogene* 18:667-678
77. Priemel M, Schilling AF, Haberland M, Pogoda P, Rueger JM, Amling M (2002) Osteopenic mice: animal models of the aging skeleton. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2:212-218
78. Riggs BL, Khosla S, Melton LJ, 3rd (2002) Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton. *Endocr Rev* 23:279-302
79. Robey, AL (2006) *Extracellular Matrix and Biomineralization of Bone*. American Society for Bone and Mineral Research, Washington, DC

80. Rogers A, Eastell R (2005) Circulating osteoprotegerin and receptor activator for nuclear factor kappaB ligand: clinical utility in metabolic bone disease assessment. *J Clin Endocrinol Metab* 90:6323-6331
81. Roodman GD (1999) Cell biology of the osteoclast. *Exp Hematol* 27:1229-1241
82. Roodman GD (2004) Mechanisms of bone metastasis. *N Engl J Med* 350:1655-1664
83. Ross PD, Knowlton W (1998) Rapid bone loss is associated with increased levels of biochemical markers. *J Bone Miner Res* 13:297-302
84. Saal I, Gustin A, Rombaut K, Pelaez P, Rorive S, Rimmelink M, Salmon I (2003) Laser-assisted microdissection applied to frozen surgical pathologic specimens - methodological aspects on RT-PCR. *J Exp Ther Oncol* 3:325-335
85. Sato M, Westmore M, Ma YL, Schmidt A, Zeng QQ, Glass EV, Vahle J, Brommage R, Jerome CP, Turner CH (2004) Teriparatide [PTH(1-34)] strengthens the proximal femur of ovariectomized nonhuman primates despite increasing porosity. *J Bone Miner Res* 19:623-629
86. Schulz A (1980) *Ultrastrukturpathologie der Knochentumoren zelluläre Subklassifikation und Zytopathogenese ; 21 Tab In: Veröffentlichungen aus der Pathologie ; 115 Fischer Stuttgart ; New York p276 S.*
87. Seeman E (1993) Osteoporosis in men: epidemiology, pathophysiology, and treatment possibilities. *Am J Med* 95:22S-28S
88. Seeman E, Delmas PD (2001) Reconstructing the skeleton with intermittent parathyroid hormone. *Trends Endocrinol Metab* 12:281-283
89. Shao YY, Wang L, Hicks DG, Ballock RT (2006) Analysis of gene expression in mineralized skeletal tissues by laser capture microdissection and RT-PCR. *Lab Invest* 86:1089-1095

90. Shen V, Birchman R, Wu DD, Lindsay R (2000) Skeletal effects of parathyroid hormone infusion in ovariectomized rats with or without estrogen repletion. *J Bone Miner Res* 15:740-746
91. Shui C, Spelsberg TC, Riggs BL, Khosla S (2003) Changes in Runx2/Cbfa1 expression and activity during osteoblastic differentiation of human bone marrow stromal cells. *J Bone Miner Res* 18:213-221
92. Silver IA M, RJ, Etherington, DJ (1988) Microelectrode studies on the acid microenvironment beneath adherent macrophages and osteoclasts. *Exp Cell Res* 175:266-276
93. Simonet W, Lacey, DL (2003) Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 423:337-342
94. Sobue T, Hakeda Y, Kobayashi Y, Hayakawa H, Yamashita K, Aoki T, Kumegawa M, Noguchi T, Hayakawa T (2001) Tissue inhibitor of metalloproteinases 1 and 2 directly stimulate the bone-resorbing activity of isolated mature osteoclasts. *J Bone Miner Res* 16:2205-2214
95. Sternlicht MD, Werb Z (2001) How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17:463-516
96. Stewart AF, Cain RL, Burr DB, Jacob D, Turner CH, Hock JM (2000) Six-month daily administration of parathyroid hormone and parathyroid hormone-related protein peptides to adult ovariectomized rats markedly enhances bone mass and biomechanical properties: a comparison of human parathyroid hormone 1-34, parathyroid hormone-related protein 1-36, and SDZ-parathyroid hormone 893. *J Bone Miner Res* 15:1517-1525
97. Stickens D, Behonick DJ, Ortega N, Heyer B, Hartenstein B, Yu Y, Fosang AJ, Schorpp-Kistner M, Angel P, Werb Z (2004) Altered endochondral bone development in matrix metalloproteinase 13-deficient mice. *Development* 131:5883-5895

98. Stout SD, Brunsten BS, Hildebolt CF, Commean PK, Smith KE, Tappen NC (1999) Computer-assisted 3D reconstruction of serial sections of cortical bone to determine the 3D structure of osteons. *Calcif Tissue Int* 65:280-284
99. Taichman RS (2005) Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche. *Blood* 105:2631-2639
100. Talmage RV (1970) Morphological and physiological considerations in a new concept of calcium transport in bone. *Am J Anat* 129:467-476
101. Thomson BM, Atkinson SJ, Reynolds JJ, Meikle MC (1987) Degradation of type I collagen films by mouse osteoblasts is stimulated by 1,25 dihydroxyvitamin D3 and inhibited by human recombinant TIMP (tissue inhibitor of metalloproteinases). *Biochem Biophys Res Commun* 148:596-602
102. Troen B (2003) Molecular mechanisms underlying osteoclast formation and activation. *Exp Gerontol* 38:605-614
103. Tuckermann JP, Pittois K, Partridge NC, Merregaert J, Angel P (2000) Collagenase-3 (MMP-13) and integral membrane protein 2a (Itm2a) are marker genes of chondrogenic/osteoblastic cells in bone formation: sequential temporal, and spatial expression of Itm2a, alkaline phosphatase, MMP-13, and osteocalcin in the mouse. *J Bone Miner Res* 15:1257-1265
104. Ubara Y, Fushimi T, Tagami T, Sawa N, Hoshino J, Yokota M, Katori H, Takemoto F, Hara S (2003) Histomorphometric features of bone in patients with primary and secondary hypoparathyroidism. *Kidney Int* 63:1809-1816
105. Ubara Y, Tagami T, Nakanishi S, Sawa N, Hoshino J, Suwabe T, Katori H, Takemoto F, Hara S, Takaichi K (2005) Significance of minimodeling in dialysis patients with adynamic bone disease. *Kidney Int* 68:833-839
106. Uzawa T, Hori M, Ejiri S, Ozawa H (1995) Comparison of the effects of intermittent and continuous administration of human parathyroid hormone(1-34) on rat bone. *Bone* 16:477-484

107. Vander Wiel C, Grubb SA, Talmage, RV. (1978) The presence of lining cells on surfaces of human trabecular bone. *Clin Orthop* 134:350-355
108. Vedi S, Compston JE, Webb A, Tighe JR (1982) Histomorphometric analysis of bone biopsies from the iliac crest of normal British subjects. *Metab Bone Dis Relat Res* 4:231-236
109. Villanueva AR, Ilnicki L, Duncan H, Frost HM (1966) Bone and cell dynamics in the osteoporoses: a review of measurements by tetracycline bone labeling. *Clin Orthop Relat Res* 49:135-150
110. Whitehead C (2004) Overview of bone biology in the egg-laying hen. *Poult Sci* 83:193-199
111. Whitfield JF, Morley P, Willick GE (2002) Parathyroid hormone, its fragments and their analogs for the treatment of osteoporosis. *Treat Endocrinol* 1:175-190
112. Yoshida CA, Furuichi T, Fujita T, Fukuyama R, Kanatani N, Kobayashi S, Satake M, Takada K, Komori T (2002) Core-binding factor beta interacts with Runx2 and is required for skeletal development. *Nat Genet* 32:633-638
113. Zeng Q, Li X, Beck G, Balian G, Shen FH (2007) Growth and differentiation factor-5 (GDF-5) stimulates osteogenic differentiation and increases vascular endothelial growth factor (VEGF) levels in fat-derived stromal cells in vitro. *Bone* 40:374-381
114. Zhang M, Wang Y, Middleton FA, Horton JA, Farnum CE, Damron TA (2007) Growth plate zonal microarray analysis shows upregulation of extracellular matrix genes and downregulation of metalloproteinases and cathepsins following irradiation. *Calcif Tissue Int* 81:26-38

9. Materialliste

Chemikalien und apparative Hilfsmittel

Verbrauchsmaterialien

Deckgläser (26x76x0.13-0.17mm)

Fotoplatte (20x25cm)

Kryoröhrchen

Reaktionsgefäße (0.2-2 ml)

Reaktionsgefäße (0.2 ml) / Verschlußkappe
Langen)

Pipetten (1-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl)

Pipettenspitzen (steril, 10-1000µl)

Sterican® 30 G x ½"

Langenbrick (Emmendingen)

Fuji (Düsseldorf)

XXX

Eppendorf (Hamburg)

Applied Biosystems (

Eppendorf (Hamburg)

Greiner bio-one

(Kremsmünster, Österreich)

B. Braun (Melsungen)

Routine-Färbung

Kernechtrot-Aluminiumsulfat

RNase-freies H₂O (DEPC-behandelt)

Waldeck, Division Chroma
(Münster)

Geräte

Diamantsäge

Gelelektrophoreskammern und Gelkämme

Inverses Mikroskop Axiovert 135

Kryotom CM3050s

Kryotommesser

Exakta

Bächler (Hölstein)

Carl Zeiss (Jena)

Leica (Bensheim)

Leica (Bensheim)

PCR Sprint

Trio Thermocycler

Schüttler Typ REAX 2000 („Vortexer“)

Sofortbildkamera

Spannungsgerät (LKB Bromma, 2303 Multidrive XL)

UV-Laser Microbeam System

Zentrifugen: - Biofuge pico

- Centrifuge 541D

Hybaid-AGS (Heidelberg)

Biometra (Göttingen)

Heidolph (Schwabach)

Bachofer (Reutlingen)

Pharmacia (New Jersey, U.S.A.)

P.A.L.M (Bernried)

Heräus Instruments (Hanau)

Eppendorf (Hamburg)

Reagenzien

Aceton (100 %)

Agarose (QunatexGold™ Agarose)

Ampuwa®-Wasser

Aqua ad inectabilia

Blaupuffer (Ladepuffer)-Ansatz:

- 900 µl 5 x TBE (s.u.)
- 100 µl Glycerin (98 %)
- 1 Spatelspitze Bromphenolblau

Choloroform (100 %)

Desoxiribose- Nukleotriphosphate [dNTPs]:

- 10 mM dATP
- 10 mM dTTP
- 10 mM dCTP
- 10 mM dGTP

DNA-Längenstandard Hinf I (50 µl-Ansatz):

- *Hinf* I DNA Marker
- 10 µl 5 x TBE (s.u.)
- 10 µl Blaupuffer (s.o.)
- 20 µl Ampuwa – H₂O

EDTA

Ethanol (100%, puriss. p.a.)

First-Strand-Buffer (FSB, pH 8.3):

Roth (Karlsruhe)

Hybaid (Heidelberg)

Fresenius (Bad Homburg v.d.H.)

Baxter (Unterschleißheim)

Roth (Karlsruhe)

Merck (Darmstadt)

Merck (Darmstadt)

Eurobio (Raunheim)

Promega (Madison WI, U.S.A.)

Sigma (Taufkirchen)

Sigma Aldrich (Seelze)

- 52 mM Tris
- 78 mM KCL
- 3.1 mM Mg₂Cl₂

Glykogen (20 mg/ml)

Boehringer (Mannheim)

Hämalaun

Merck (Darmstadt)

Kaliumchlorid

Merck (Darmstadt)

Sodiumdodecylsulfat (SDS)

Sigma (Taufkirchen)

5 x TBE:

- 54 g Tris
- 27.5 g Borsäure
- 20 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0)
- Aqua dest. ad 1000 ml
- Gebrauchsverdünnung des Laufpuffers: 0.5 x TBE

Sigma (Taufkirchen)

Sigma (Taufkirchen)

Merck (Darmstadt)

TE:

- 10 mM Tris (ph 7.6)
- 1 mM EDTA

s.o.

s.o.

Tris

Merck (Darmstadt)

Tris-HCl

USBTM (Cleveland OH, U.S.A.)

cDNA-Synthese

GeneAmp[®] RNA PCR Kit, Lagerung bei -20°C

Applied Biosystems(Langen)

GeneAmp[®] 10X PCR Buffer II.

25 mM Mg₂Cl₂.

50 µM Random hexamers.

20 U/µl RNase-inhibitor.

50 U/µl MMLV-reverse-transcriptase.

Qualitative PCR

GeneAmp[®] 10X PCR Gold Buffer II

Applied Biosystems (Langen)

25 mM Mg₂Cl₂

Applied Biosystems (Langen)

Primer
AmpliTaq[®] Gold 5U/ml

MWG-Biotech (Ebersberg)
Applied Biosystems

10. Datentabelle

Auflistung der verwendeten Proben zur Mikrodissektion

Probe	Geschlecht	Alter	Lokalisation
1	W	86	Femurkopf
2	M	64	Femurkopf
3	M	73	Femurkopf
4	M	54	Femurkopf
5	W	75	Femurkopf
6	W	81	Femurkopf
7	M	69	Femurkopf
8	W	72	Femurkopf
9	W	79	Femurkopf
10	W	84	Femurkopf
11	W	71	Femurkopf
12	M	81	Femurkopf
13	M	66	Femurkopf
14	W	69	Femurkopf
15	M	74	Femurkopf

11. Erklärung

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten 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“.

Gießend, den

Christian Dierkes

12. Danksagung

Mein Dank gilt Prof. Dr. med. A. Schulz für die Überlassung des Themas, die Möglichkeit zum experimentellen Arbeiten am Institut für Pathologie und die Bereitstellung der finanziellen Mittel.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. L. Fink für die ausführliche Einweisung in die Technik der Laser- unterstützten Mikrodissektion und die immer bereitwillige und kritisch konstruktive Unterstützung bei allen Problemen und Fragen. Aus der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Fink möchte ich vor allem Frau M. M. Stein und Frau E. Kuhlman-Farat für die technische Unterstützung in allen Fragen der PCR danken. Ebenso möchte ich Herrn Dr. med. J.- C. Wolff für die Hilfe beim Design der Primer danken.

Aus der osteologischen Arbeitsgruppe gilt mein herzlicher Dank Herrn F. Dönges für die technische Unterstützung bei der Aufarbeitung der Knochenproben und für die Anleitung zur Erstellung der Gefrierschnitte.

Frau Birgit Kube möchte ich für Ihr Verständnis und Ihre Unterstützung danken. Besonders der von Ihr vermittelte Kontakt zu Herrn Prof. Dr. H. Stürz und zu Herrn Prof. Dr. J. Steinmeyer, Klinik für Orthopädie der Justus-Liebig-Universität Gießen, denen ich hiermit herzlich danken möchte, hat wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

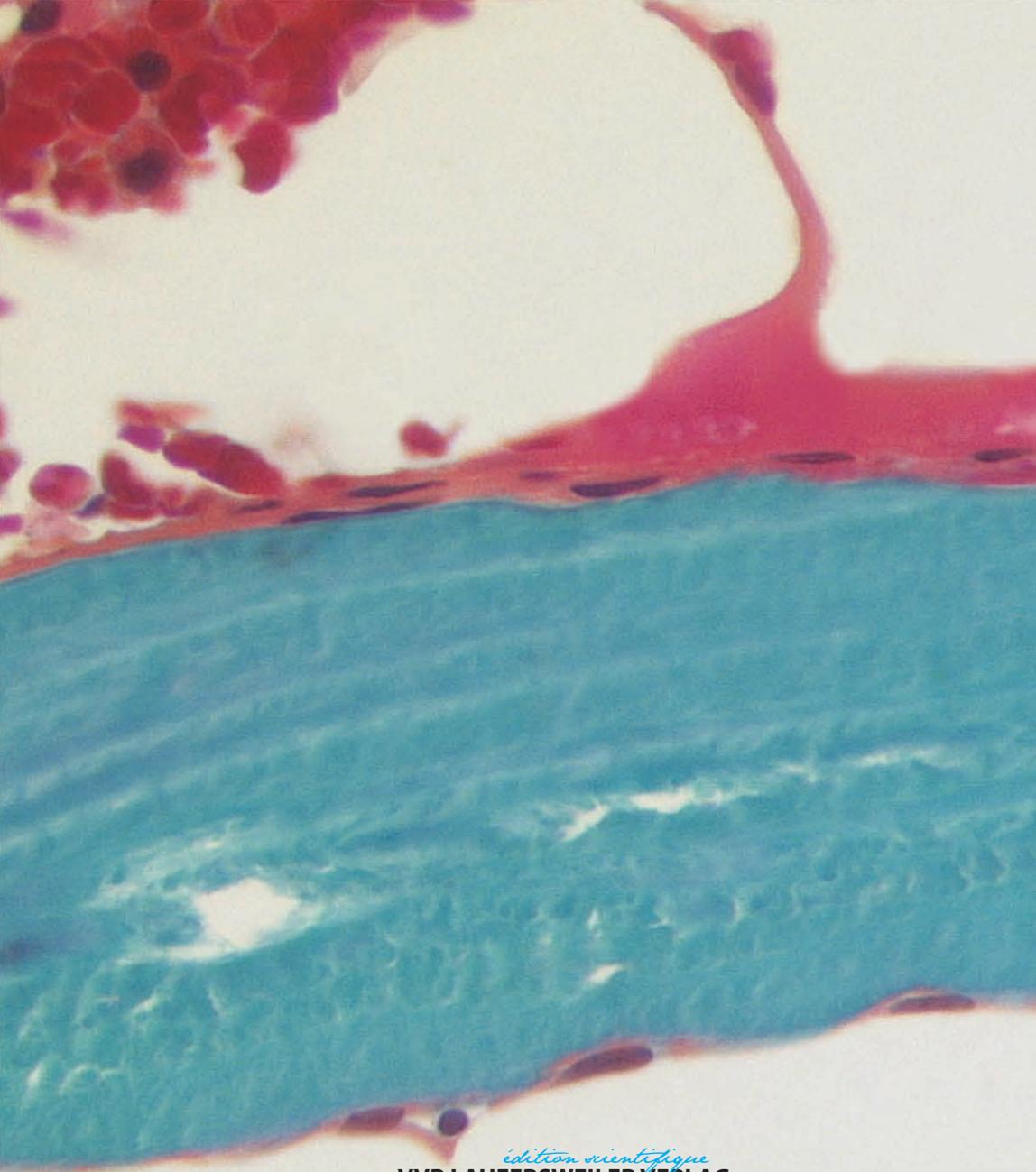
13. Lebenslauf

Christian Dierkes	geboren am 26.03.1971 in Bocholt, Westfalen Staatsangehörigkeit: deutsch
1977 – 1981	Clemens- Dülmer Schule, Grundschule, Bocholt
1981 – 1990	St. Georg-Gymnasium, Bocholt
1990 – 1992	Zivildienst als Krankenpflegehelfer am St. Agnes-Hospital, Bocholt
April 1992 - November 1999	Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität Gießen
Dezember 1999 – Oktober 2000	Arzt im Praktikum am Institut für Pathologie der St. Vincentius-Kliniken, Karlsruhe
Oktober 2000 - Mai 2001	Arzt im Praktikum in der Abteilung Pneumologie der Medizinischen Klinik der St. Vincentius-Kliniken, Karlsruhe
Juni 2001	Approbation als Arzt
August 2001 - Januar 2002	Assistenzarzt am Zentrum für Innere Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen, Medizinische Klinik und Poliklinik II / Pneumologie
Februar 2002 - Oktober 2003	Wiss. Mitarbeiter im Teilprojekt B1 des SFB 547 „Kardiopulmonales Gefäßsystem“ bei Herrn PD Dr. L. Ermert, Justus-Liebig-Universität Gießen
Seit Oktober 2003	Wiss. Mitarbeiter am Institut für Pathologie, Justus- Liebig-Universität Gießen, Leiter Prof. Dr. A. Schulz

14. Eigene Veröffentlichungen

Vorträge

1. Dierkes C, Wolff JC, Schulz A, Fink L. Laser-assisted microdissection of endosteal lining cells from mineralized human bone for m-RNA analysis. 17th Scientific Meeting International Bone and Mineral Society, Montréal 24.-29. Juni 2007, Bone, Bd. 40, Supl. 2:S109.



édition scientifique

VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFBENGRING 15
D-35396 GIESSEN

ISBN 3-8359-5320-6

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



9 783835 11953208