

Einleitung

Als eigenständiger wissenschaftlicher Zweig ist **Tissue Engineering (TE)** durch Erkenntnisse verschiedener Einzeldisziplinen entstanden. Immer häufiger entstehen solche neuen Fachgebiete, einerseits nehmen Spezialisierung und Fächerauftrennung immer mehr zu - andererseits können durch Verknüpfung der gewonnenen Erkenntnisse, neue und eigenständige Gebiete entspringen; ein Beispiel hierfür ist die molekulare Biologie.

Bei der folgenden Darstellung von TE liegt der Schwerpunkt in der Biologie, wobei natürlich auch andere Betrachtungsweisen möglich sind; aus der Sicht der Werkstoffkunde, Biophysik, Bioelektronik, Kybernetik und Bioinformatik - somit gewährt diese Arbeit Einblicke in ein TE-Teilgebiet.

Knochen wurde als ein mögliches Modell für „Hard Tissue Engineering“ gewählt. Da in den letzten fünf Jahren in der Knochenbiologie und -entwicklung kolossale Erkenntnisse erzielt wurden, werden diese angeführt; außerdem ist die genaue Kenntnis von physiologischen Abläufen der betreffenden Organe, oder Gewebe, eine Voraussetzung für TE. Dem Leser soll anhand des Knochenmodells vorgeführt werden, wie komplex und wichtig für ein erfolgreiches Konzept das Verständnis von Grundlagenwissen und die Verknüpfung von Fachgebieten ist; knochenspezifisches TE wird nicht abgehandelt.

Diese Arbeit beginnt mit einer allgemeinen Erklärung bezüglich der Geschichte und Entwicklung von TE, die einzelnen Fächer werden erläutert (immer unter biologischem Blickschwerpunkt); es folgt die Beschreibung einiger Techniken aus den einzelnen Fachgebieten, eine Vollständige Aufzählung dieser ist nicht beabsichtigt. Der biologische Einstieg beginnt mit einem allgemeinen Überblick der molekularen Biologie; die Entwicklungen und Teilgebiete dieses Faches werden kurz erläutert, um ein besseres Verständnis über Naturwissenschaften zu liefern. Knochenspezifisch wird es ab der histologischen Beschreibung des Knochens, die folgenden Schwerpunkte der Arbeit sind die Knochenentwicklung und knochenwichtige Zytokine. Bioethische Überlegungen bezüglich TE bilden den Abschluss.

Interessierte Leser werden erkennen, dass nur eine sinnvolle Verknüpfung von Ressourcen gute Ergebnisse liefern kann. Folglich ist TE nicht die Domäne eines einzelnen Wissenschaftlers. Um diesen enormen Datenberg zu verarbeiten, ist es notwendig, dass Wissenschaftler aus verschiedenen Bereichen wie Genetik, Embryologie, Zellbiologie, Biochemie, Medizin, Informatik, Mathematik, Kybernetik und Physik kooperieren.

1. Allgemeines über Tissue Engineering (TE)

1.1. Begriffserklärung

1.2. Grundlagen über die Zell-Extrazelluläre Matrix (ECM) Interaktionen

1.3. Überlegungen zu TE in vivo

1.4. TE Materialien

1.5. TE in vitro

1.6. Allgemeines zur Interaktion von Zellen mit Biomaterialien

1.7. Aspekte zur Transplantation/Lagerung von "Skulpturen"

1.8. Fetales TE und Stammzellen

1.9. Generelles zur Gentherapie

1.1. Begriffserklärung

Tissue Engineering ist die Herstellung (Fabrikation) menschengemachter Gewebe oder Organe, sogenannter Neo-Organe, zur Schaffung von Körperteilen. Beim TE wird in der Regel heute ein künstliches, abbaubares Biopolymergerüst in einer gewünschten Form konstruiert, das dann mit den entsprechenden Zellen besät, in eine mit Nähr- und Wachstumsstoffen angereicherte Lösung eingesetzt wird, die Körperbedingungen zu emulieren versucht (37°C, 5% CO₂). Das System, das diese Lebensbedingungen in vitro herstellt, bezeichnet man als Bioreaktor. Ein Gewebe ist eine Ansammlung von Zellen eines Einzelorganismus, die auf die Ausführung einer bestimmten Aufgabe spezialisiert sind. Werden diese Zellen mit anderen, nicht unbedingt vom selben Organismus stammenden Geweben, und künstlich konstruierten Trägergerüsten kombiniert, lassen sich aufgabenspezifische oder allgemein einsetzbare Werkzeuge, "Skulpturen", züchten. Solche Skulpturen sind Objekte, die zum Teil künstlich konstruiert, zum Teil gezüchtet werden, sie bestehen sowohl aus synthetischen Materialien als auch aus lebender Biomasse komplexer Organismen. TE ermöglicht die Herstellung von halblebendigen Objekten, auch ermöglicht es die Veränderung unseres eigenen Konstruktionsplans als auch die Schaffung einer neuen Kategorie von "Dingen". Momentan versucht die Wissenschaft die Natur nachzuahmen; dieses Feld der Forschung birgt natürlich die Gefahr des Glaubens, "Mann" könne die Natur verbessern. Deshalb sollte diese junge wissenschaftliche Disziplin nicht nur im Labor nach neuen Erkenntnissen suchen, sondern sich ernsthaft der Konfrontation mit Philosophie und Ethik stellen.

1987 wurde der Begriff "Tissue Engineering" von Professor Y.C. Fung erstmals bei der "National Science Foundation" Konferenz verwendet. Die erste ernsthafte Auseinandersetzung mit dem biologischen Ersatz von Körperteilen aber begann schon früher, im zweiten Weltkrieg. Es kamen massiv thermoplastische Polymere wie Nylon, Dacron, Polypropylene und Polyurethane zum Einsatz, mit dem Ziel, verwundetes Gewebe zu rekonstruieren. Dies führte aber meistens nur zu einer reparativen Heilung, von Ersatz konnte keine Rede sein. Viele dieser Materialien sind heute in der Chirurgie nach wie vor in Verwendung - was früher die Domäne der rekonstruktiven Chirurgie war, wird heute durch Tissue Engineering erweitert. Mit der Akzeptanz der Biotechnologie in der Gesellschaft begann sich dieses Feld der Forschung auszudehnen. Die Bausteine von TE kann man in drei Überschriften zusammenfassen. (1)

Zunächst das **Gerüst**, welches den Zellen einen Lebensraum bietet und in dem integriert, sie ihrer Funktion nachkommen können. In Verwendung finden sich verschiedene Gels, Schäume, Membranen und Fasern. (1)

Zweitens **Zellen**, welche allogener, autologer, auch xenogener Herkunft sind; man beschäftigt sich mit totipotenten-, pluripotenten-, oder multipotenten Zellen. (1)

Der dritte Bereich, mit dem sich TE beschäftigt sind **Signale** und **Signalwege**, welche die Morphogenese steuern und das Zellschicksal letztendlich entscheiden. (1)

Es existieren zur Zeit generell fünf Möglichkeiten defektes Gewebe oder schadhafte Organe zu ersetzen - das wären die **Transplantation**, **Transposition (Autografting)**, **Implantation**, **In vitro-** und die **In vivo Synthese**. Die beiden letztgenannten sind noch relativ junge Disziplinen. {2} Dem heute routinemäßig praktizierten Ersatz von Körperteilen und Geweben, durch Transplantation und Transposition liegt eine lange Entwicklungsgeschichte zugrunde; der Vorgang ist jedoch nach wie vor mit technischen und ethischen Themen konfrontiert. So können sich zum Beispiel bei der autologen Transposition von Urogenitalgewebe, welches in den Gastrointestinaltrakt verpflanzt wird, nach 20 bis 30 Jahren fatale Tumore entwickeln; Oesophagusimitationen aus Haut können Jahre später zu Hauttumoren führen. Transplantationen bergen ebenfalls Probleme in sich. Zum einen die Verfügbarkeit, meistens sind viel zuwenige Organe vorhanden, um den Bedarf zu decken; gerade hier sind häufig fragliche ethische Auswahlverfahren in Gebrauch. Zum anderen besteht die Gefahr der Infektion mit bekannten Krankheitserregern; von den noch unbekanntem ganz abgesehen. Auch ist die akute- und chronische Immunantwort des Empfängers nach wie vor ein ungelöstes Problem. {1}

In all den Jahren sammelte man mit den zahlreichen Geweben und Techniken verschiedene Erfahrungen, die heute bei TE einfließen. Es wird an verschiedenen Fronten geforscht, mit unterschiedlichen Zielsetzungen; Zellen und deren Vorläufer (Progenitorzellen) stehen zurzeit besonders im Vordergrund. Progenitorzellen lassen sich für verschiedene Gewebe ubiquitär im Organismus finden. Diese Zellen werden wie schon erwähnt in Brutmaschinen gezüchtet, vermehrt und auf Vorlagen übertragen. Es wird versucht, die Interaktion Zelle - Vorlage zu optimieren, um den klinischen Gebrauch anzutreiben. Auch arbeitet man an der Entwicklung von Vorläuferzellen, welche weniger sensibel gegen metabolischen-, mechanischen Stress und Hypoxie sind. Zudem müssen all diese Phänomene auch in der vierten Dimension verstanden werden, der Zeit. Wie verhält sich das Wachstum der Skulpturen, die Alterung und somit die Funktion in einem biologisch dynamischen Organismus? {1}

Viele Fragen auf die es zur Zeit noch wenige Antworten gibt.

1.2. Grundlagen über die Zell - Extrazelluläre Matrix Interaktionen

Die *Extrazelluläre Matrix* ist ein molekularer Komplex bestehend aus **Kollagen (Coll)**, **Glykoproteinen (GP)**, Hyaluronsäure, Proteoglykanen, **Glykosaminoglykanen (Gag)**, Elastin, Aggrecan, Wachstumsfaktoren, Enzymen, Zytokinen und vielen anderen Molekülen. Die Bedeutung der ECM für Zellen ist in vielen Experimenten gezeigt worden, selbst im Labor benötigen Zellen verschiedene Medien und Kulturböden, um optimal zu wachsen oder den gewünschten Phänotyp auszubilden. In vivo beginnen Zellen schon im frühen Morulastadium, weniger als 150 Zellen, mit der Sekretion von Komponenten der ECM. Coll ist eine der frühesten Komponenten, welche sekretiert wird; bei Blockierung dieses Vorganges kommt es zu einem Stopp in der Entwicklung (3). {2}

Die Diversität der Matrix liegt nicht nur dem genetischen Code zugrunde, sie findet auch auf der Transkriptions- und Translationsebene sowie in posttranslationalen Modifikationen statt. Durch Veränderung der Matrixzusammensetzung können diverse Zellschritte eingeleitet werden. Einerseits beeinflusst die Zelle selbst durch aktive Sekretion die Matrix, andererseits werden in der Matrix viele systemische Komponenten gespeichert und bei Bedarf wieder freigesetzt. Früher sprach man von intrazellulären Signalpathways, welche sich im Zytoplasma der Zelle abspielen; heute begreift man, dass es sich um komplexe Netzwerke handelt, die in vielen Bereichen miteinander vernetzt sind und so eine Homöostase gewährleisten und keine isolierten Signalwege. Diese Einsicht veränderte auch das Bild der extrazellulären Abläufe; die Matrix ist weit mehr als nur eine "Einbettmasse" für Zellen.

Durch Erkenntnisse über diese ECM Komponente und das zytoplasmatische-nucleoplasmatische Skelett ist das Verständnis für die Mechanotransduktion und die damit verbundenen Auswirkungen auf die Zelle gestiegen. Mittels verschiedener Adhäsionsmoleküle sind diese Kompartimente miteinander verbunden. Vier große Klassen von Adhäsionsmolekülen ermöglichen den Zellen eine Interaktion untereinander und der ECM. (4)

Cadherine sind an homophilen Zell-Zellkontakten maßgeblich beteiligt, sie spielen eine wichtige Rolle in der frühen Embryogenese. Ihre Funktion ist Ca^{2+} abhängig, sie finden sich in vielschichtigen Ankerkomplexen wie zum Beispiel den Desmosomen. (4)

Selectine sind hauptsächlich für heterophile Kontakte zwischen Blut und Endothelzellen verantwortlich, auch ihre Funktion ist an Ca^{2+} Ionen gekoppelt. Sie sind in der Lage, verzweigte Oligosaccharide wie Lewis X - und Lewis A Strukturen zu erkennen. Eine wichtige Rolle spielen sie bei Entzündungen. (4)

Die **Immunoglobulin-Superfamilie**, auch Cell Adhesion Molecules genannt, umfasst die größte Gruppe; sie binden Ca^{2+} unabhängig, heterophile und homophile Zell-Zellkontakte sind möglich. (4)

Die **Integrinfamilie** beteiligt sich an Zell-Matrix und Zell-Zellbindungen. Sie bestehen aus zwei transmembranen heterogenen Peptidketten; einer α und β Kette. Es existiert eine Vielzahl an Subtypen mit verschiedenen Eigenschaften. Integrine sind an großen Ankerkomplexen wie zum Beispiel den Hemidesmosomen oder Adhäsions-Plaques beteiligt. (4) Veränderungen der Umweltbedingungen werden über die ECM an die Zellmembran und somit an das Zytoskelett weitergeleitet. Im Zytoskelett erfolgt eine Filterung und Modulation, da die einzelnen Komponenten des Skeletts (Micro-, Intermediär- und Macrofilamente), die Reize unterschiedlich leiten, streuen und auch verstärken. Zudem sind diese Strukturen keine starren Gebilde, sie unterliegen einem dauernden Um-/Abbau und Anpassungsvorgang. Bei dieser Modulation und somit Funktion der Zelleigenschaften spielen Multi-Domän-Proteine, sogenannte Zytolinker, welche verschiedene Komponente miteinander verbinden, eine wichtige Rolle. (4)

Das **Nukleoskeletton** organisiert dreidimensional die DNA im Kern (5-11) und leitet auch mechanische Reize vom Zytoskelett an die DNA weiter. Obwohl jede Zelle eine Kopie des gesamten Genoms enthält, wird nur ein gewebs- und zellspezifischer Teil exprimiert; dazu trägt die topologische Organisation der DNA bei (12-15). Somit beeinflussen auch physikalische Faktoren wie die Promotorgeometrie das Maß der DNA-Windungen, -

Biegungen und -Loops die Aktivität der Zelle (16-21). Zudem befinden sich aktive Gene meistens im Inneren des Zellkerns, seltener am äußeren Rand (22). {23}

Viele Zellen reagieren mit einer Formänderung auf äußere Einflüsse. Diese Beeinflussungen müssen nicht nur mechanischer Art sein, sie können auch Temperatur, Konzentration von gelösten Molekülen oder Zellkommunikation betreffen (24-28). {23}

Die Zelle ist unter bestimmten Umständen in der Lage, sich in einen anderen Zelltyp zu transformieren. Epitheliale-Mesenchymale Transformationen (EMT) und vice versa - Mesenchymale-Epitheliale Transformationen (MET), spielen in der Embryogenese, Wundheilung und Tumorgenese eine wichtige Rolle. Durch ein Zusammenspiel der verschiedenen Faktoren, den löslichen Liganden (systemisch oder lokal gebildet) und deren Interaktion mit der Zelle sowie der Matrix werden diverse Differenzierungsschritte eingeleitet. Dabei spielt auch die Art der Sekretion der Liganden (parakrin, autokrin, endokrin), eine wichtige Rolle; so kann zum Beispiel ein und derselbe Ligand anders sekretiert verschiedene Funktionen erfüllen. (1). Somit kontrolliert die Zelle in einem evolutionsbedingten genetischen Programm die Komposition der ECM einerseits, andererseits kontrolliert die ECM wiederum die Genexpression der Zelle und passt sie den gegebenen Erfordernissen an. Viele der involvierten Proteine sind labile Moleküle, die schnell wieder abgebaut werden können; dadurch kann die Zelle auf gewisse Reize schnell und adäquat reagieren.

Diese Interaktionen spielen im Knochen eine wichtige Rolle. Besonders physikalische Größen wie Druck, Zug und Scherbelastungen (29-33) bewirken, dass unser Endoskelett, welches gezielte Bewegungen mit Hilfe der Muskelarbeit erst ermöglicht und dem Körper Form verleiht, ständig remodeliert wird und sich den ändernden Bedürfnissen anpasst. Man sollte nicht vergessen, dass sich diese Veränderungen auf molekularer Ebene abspielen, im Microenvironment. Im Großen gesehen bietet die ECM der Zelle Schutz und eine sehr homophile Umgebung - gemessen an Prokaryonten, welche meistens ständigen Änderungen ihres Macroenvironment ausgesetzt sind. Eukaryotische Zellen reagieren damit verglichen relativ träge und sind sehr sensibel auf Wechsel, da sie sich zu Zellverbänden mit einer bestimmten Funktion versammelt und spezialisiert haben. Besonders deutlich werden diese Unterschiede zwischen Pro- und Eukaryonten bezüglich ihrer Anpassungsfähigkeit in der unterschiedlichen Genregulation.

Verschiedene Komponenten der Knochenmatrix spielen eine signifikante Rolle in der Genexpression (29-33) des **Osteoblasten (OB)**. Auch enthalten viele Promotoren im OB Konsensussequenzen für Transkriptionsfaktoren, welche die Fähigkeit haben, die DNA-

Geometrie zu verändern (34-36). Knochenwichtige chemische Botenstoffe wie **Vitamin D₃** (**D₃**) und **Parathyroidales Hormon (PTH)** können die Zellform des OB beeinflussen (37-40). {23}

Aufgrund von Variablen wie Druck, Zug und systemischen Faktoren, spielen vor allem beim Knochenhaushalt nicht genetisch determinierte Faktoren eine wichtige Rolle; es ist fraglich, ob man einen genauen Plan des Knochenmetabolismus, für die zum Teil schon heute angestrebten pharmakologischen Forderungen, erhalten wird können.

1.3. Überlegungen zu TE in vivo

Normalerweise füllt sich jedes Wundbett mit einem Exsudat, welches unter optimalen Bedingungen in ein physiologisches Gewebe konvertiert wird. Diesen Vorgang bezeichnet man als **Regeneration**. Findet diese Konversion nicht statt, so kommt es zur Umwandlung des Exsudates in Narbengewebe, die sogenannte **reparative Heilung**. Da der selbständigen Regeneration im erwachsenen Organismus meist Grenzen gesetzt sind erfolgt häufig eine reperate Heilung, die mit Funktionseinschränkungen assoziiert ist. So können Knochendefekte bis zu einem Durchmesser von einem Zentimeter (42) und getrennte Nerven bis zu fünf Millimeter (43), in Kombination mit einer entsprechenden Vorlage, physiologisch regeneriert werden. Demgegenüber erscheint Haut nicht zu regenerativer Heilung fähig zu sein (44). {41}

Das **Exsudat**, welches das Wundbett füllt, enthält sowohl alle zellulären Bestandteile, als auch den entsprechenden metabolischen Cocktail; Matrixkomponente welche für die Regeneration erforderlich wären, sind aber nicht vorhanden. {41}

In vivo TE beschäftigt sich mit der Bereitstellung geeigneter Matrices, die direkt appliziert, es dem Körper selbst ermöglichen verlorengegangene Strukturen zu ersetzen. Der Vorteil dieser Verfahren liegt darin, dass die Bedingungen einer optimalen Heilung vom Körper selbst reguliert werden; der Körper stellt somit den Bioreaktor, dabei sind Temperatur, Feuchtigkeit und pH-Wert meist konstant. Die Zusammensetzung der einzelnen eingeschwemmten Moleküle und Zellen variiert, unter optimalen Bedingungen, den Bedürfnissen entsprechend. {41}

Somit ist die Auswahl der Matrix entscheidend für den Erfolg. Sie muss nach verschiedenen Kriterien gefällt werden, wobei reproduzierbare Bedingungen gegeben sein müssen (45). Dabei ist zu berücksichtigen, dass Wunden meist sehr heterogen in ihrer Beschaffenheit sind, gekennzeichnet durch die Verletzung verschiedener histologischer Strukturen. Das Problem

der Wund-Wund-Variabilität kann durch Schaffung eines einheitlichen Wundbettes umgangen werden, zum Beispiel durch Exzision einer Hautwunde bis zu einer bestimmten histologischen Struktur wie dem Muskel (46,47). {41}

Die physiologischen Eigenschaften des jeweiligen Organs müssen bei der Auswahl der Matrix berücksichtigt werden; die Oberflächenbeschaffenheit und Porengröße sind entscheidende Parameter bei der Konstruktion solcher Matrices. Die Dimension und Oberfläche der Vorlage sollte nach folgenden Überlegungen getroffen werden:

Bei der **Kolonisation** der Matrix durch Zellen sind diese von Nährstoffen abhängig. Angiogenese spielt in der frühen Phase noch keine Rolle, die Diffusionskapazität ist somit entscheidend. Die entsprechenden Nährstoffe werden von Zellen gebildet und in einer bestimmten Rate R mol/cm³/sec abgegeben. Sekretiert an der Wund-Matrix-Grenze erreichen die Nährstoffe eine anfängliche Konzentration C_0 , wobei sie dann über eine Distanz L diffundieren, charakterisiert durch die Diffusionskonstante D cm²/sec. Daraus errechnet sich die Zell-Versorgungskonstante S :

$$S = R L^2 / D C_0,$$

welche die relative Größe an notwendigen Nährstoffen der Zelle und den Verbrauch dieser, charakterisiert. Wenn der Verbrauch größer ist als die Bereitstellung, $S > 1$, wird die Zelle früh sterben. In einem Steady State, $S = 1$, wo Bedarf und Nachfrage ausgewogen sind, gibt L die maximale Zell-Migrationsstrecke, L_c , an. Für die meisten Stoffe mit niedrigem Molekulargewicht liegt L_c in einem Bereich von 100µm, was auf eine möglichst große Nahebeziehung zwischen Zelle und Wundbettcocktail hinweist (48). {41}

Strukturen, welche es der Zelle ermöglichen, längere Strecken zurückzulegen, würden die Wundheilung beschleunigen und somit die Hospitalisation mit all den Gefahren und Kosten verkürzen.

Bei der **Struktur (Porosität)** der Oberfläche sollte bedacht werden, dass Zellen mit der Matrix Verbindungen eingehen müssen. Die Oberfläche der gebundenen Zellen, Φ_c , ist gleich der Anzahl der gebundenen Zellen N_c pro Matrixoberfläche A (cm²). Φ_c entspricht auch dem Bindungsvolumen der Zellen, ρ_c , pro Volumsoberfläche der Matrix, σ (mm³). $\Phi_c = N_c / A = \rho_c / \sigma$

Wenn mehr über die Interaktion Zelle-Matrix bekannt wird, kann dieses Modell um den Faktor χ , der die Rezeptorzahl pro Zelle ausdrückt, erweitert werden. Wenn jeder Zellrezeptor an eine Bindungsseite der Matrix bindet, dann ist $\chi N_c / A = \chi \rho_c / \sigma$ und der Bedarf an Bindungsstellen der Matrix und somit ihrer Oberflächenbindungsseiten, Φ_{bs} , entspricht dann

$\Phi_{bs} = \chi\Phi_c = \chi N_c/A = \chi\rho_c / \sigma = \rho_{bs}/ \sigma$. Damit muss eine gewisse Oberfläche zur Verfügung stehen, welche natürlich durch Vermehrung der Porezahl erhöht werden kann; andererseits ist der Vermehrung der Porezahl bei gegebenen Gesamtvolumen der Matrix eine Grenze gesetzt, da der einzelne Porendurchmesser dadurch abnimmt. Zu bedenken ist dies deshalb, da die Zellen bei der Migration nicht behindert werden dürfen. {41 }

Die **Vorlage** sollte weiters nach dem Abschluss der Regeneration vollständig abgebaut werden können. Jedoch darf dieser Abbau nicht zu früh erfolgen, denn sonst besteht die Gefahr der Narbenbildung. Da es sich bei der Matrix um ein Netzwerk handelt, ist ein abdiffundieren nicht möglich; vielmehr muss durch lokale Enzyme ein kataboler Prozess, das heißt aus einer hochmolekularen Vorlage werden niedermolekulare Verbindungen gelöst, eingeleitet werden. Diese Überlegungen prägte den Begriff: Isomorphiegewebsetsatzung: $t_b/t_h=0$.

t_b steht für eine charakteristische Zeit der Degradation, t_h dagegen für die benötigte Zeit bei der Gewebsneubildung. Ist die Gleichung viel kleiner als Eins - resultiert Vernarbung aufgrund einer zu schnell degradierenden Matrix; ist sie viel größer als Eins - handelt es sich um ein Implantat, welches völlige Regeneration und somit physiologisches "Wirken" verhindert. Verschiedene chemische Komponenten und die Vernetzung dieser beeinflussen die Degradation; so wird durch Inkooperation von Gag aufgrund einer Erhöhung der Quervernetzungen die Degradation verlangsamt. Somit üben die Bestandteile wie Coll 1 und Gag nicht nur eine biologische Aktivität aus, sondern ihr Verhältnis ist auch für die Geschwindigkeit der Degradation verantwortlich. {41 }

Wie wichtig die biologische Aktivität der Bestandteile ist, zeigt sich daran, dass bei geeigneter Auswahl die Adhäsion bestimmter Zellen wie kontraktiver **Fibroblasten (FB)** gehemmt wird. Es konnte gezeigt werden, dass dieser Zelltyp maßgeblich für die Wundkontraktion bei Hautwunden, bevor noch reparative Stimuli einsetzen, verantwortlich ist. Es existiert eine Relation zwischen dem Ausmaß an Kontraktion und dem Grad der Regeneration. Solche Phänomene finden sich auch bei anderen Geweben; durch gezielte Förderung oder Hemmung eines Zelltyps mit der geeigneten Matrix kann das Ergebnis also manipuliert werden. {41 }

1.4. TE Materialien

Viele der hier vorgestellten Werkstoffe werden schon lange in der Medizin verwendet. Durch neue Produktionstechniken und Erkenntnisse in der Biologie dehnt sich ihr Einsatzgebiet

kontinuierlich aus. Die Werkstoffe lassen sich allgemein in *biologisch-* und *synthetisch biodegradierbare Materialien* einteilen.

Biologisch biodegradierbare Materialien können nach verschiedenen Gesichtspunkten unterteilt werden.

Beim **Kollagen-Gel-Modell** wird eine Suspension von FB mit 30% bis 100% Coll hergestellt und auf einer Petri-Schale ausplattiert. Die diversen Kollagenmoleküle polymerisieren spontan in vitro zu starken Fasern, welche weiter verarbeitet werden können (49). Bei Inkubation mit 37° in 5% CO₂ kommt es zur Polymerisation und Ausformung eines feinen, 10-20nm großen Fibrillennetzwerks, welche Flüssigkeit binden. Die Zellen bündeln diese Fibrillen zu größeren Bündel, Feuchtigkeit geht dabei verloren und es kommt zur Schrumpfung des Gels, gleichzeitig wird es verfestigt. Dieses kann nun zum Beispiel mit Epithelzellen, Endothelzellen oder Mesenchymzellen beschichtet und weiter inkubiert werden (50). {55}

Beim **Kollagen-Schaum-Gerüst** wird Kollagenschaum in eine gewünschte Gussform gebracht und gefriergetrocknet. Je nach Dichte und Vernetzung sind diese Schäume (Schwämme) unterschiedlich belastungsfähig und degradationsresistent (51). Zum Einsatz kommen auch noch Kollagen-Faser-Gerüste und Kollagenmembranen, je nach Erfordernissen mit oder ohne Zellen. Der Vorteil gegenüber Gelen liegt in der vermehrten Zellproliferation, da die Zellen das Gerüst besiedeln, ohne von einem Gel umschlossen zu sein. Coll eignet sich besonders für in vivo Anwendungen, aufgrund der phylogenetisch konservierten Primärsequenz weist es kaum immunologische Reaktionen auf (52). Zudem kann es durch verschiedene physikalische und chemische Methoden einfach modifiziert werden, wodurch die Biodegradation, die Festigkeit, die Löslichkeit und die Wasseraufnahme beeinflusst werden (53). Angewendet wird Coll für den Hautersatz, bekannt als Alpligraf, wobei ein Fibroblasten-Kollagen-Gel mit Keratinozyten besät wird (54). {55}

Gag bestehen aus wiederholenden Disaccharideinheiten, meist Glucuronsäure und einer Hexosekomponente wie N-acetyl-*d*-Glukosamin. Der größte Teil ist kovalent an Proteine gebunden, die daraus resultierenden Moleküle werden als Proteoglykane bezeichnet; die häufigsten Proteoglykane sind Chondroitin Sulfat, Dermatan Sulfat, Keratan Sulfat und Heparan Sulfat (244). Im groben unterscheidet man membrangebundene- und Matrix Proteoglykane. Hyaluronsäure ist ein riesiger Gag-Komplex, der nicht an ein Protein bindet, sondern frei in der ECM liegt. In der Embryogenese spielt dieses Molekül eine wichtige Rolle, aufgrund der enormen Wasserbindungsfähigkeit weisen stark hyaluron-säurehaltige Gewebe eine Gelform auf. Die Zellmigration wird dadurch erleichtert (4). Mittels verschiedener

Techniken kann dieses Molekül modifiziert werden; eingesetzt wird es in der Augenheilkunde und der allgemeinen Chirurgie (56-58). {55}

Chitosan ist ein biosynthetisches Polysaccharid, ein deazetyliertes Derivat von Chitin. Wie Hyaluronsäure ruft es keine Immunantwort aus und wird gut toleriert (59). Getestet wurde dieses Material in verschiedenen Applikationen wie Membranbarrieren, Kontaktlinsenmaterial, Inhibitor der Koagulation und als Trägerkapsel für Medikamente (60). {55}

Polyhydroxyalkanoate (PHA)-Polyester sind thermoplastische Materialien, welche von verschiedenen Mikroorganismen als Kohlen- und Energiespeicher synthetisiert werden (61). PHA-Polyester werden in vivo sehr langsam abgebaut; eingesetzt werden sie als Nahtmaterialien und Medikamententräger (62,63). {55}

Synthetisch biodegradierbare Materialien: **Poly(α -hydroxy acids)** sind Ester aus natürlich vorkommenden Hydroxysäuren wie der Glykol-, Laktat- und ϵ -Kapron Säure. Die Esterbindungen werden durch Hydrolyse gespalten und das Molekulargewicht nimmt bis zu einer bestimmten Grenze hin ab; die daraus resultierenden kleineren Ketten werden erst dann biologisch abgebaut. Dieser Abbau involviert inflammatorische Zellen, aber da es sich um einen relativ späten Entzündungsreiz handelt, ist die Heilung kaum beeinträchtigt (64,65). Eingesetzt werden sie als Nahtmaterialien und bei der Erforschung von verschiedenen Matrix-Herstellungsverfahren. **Poly(glycolic acid) (PGA)** und **Poly(lactic acid) (PLA)**, **Poly(L-lactic acid) (PLLA)** sind die am meisten verwendeten linearen aliphatischen Polyester in der Medizin. Sie gehören zusammen mit den **Poly(lactic-co-glycolic acid) copolymers (PLGA)** zu der Familie der Poly(α -hydroxy acids). PGA ist kristallin, hydrophil, hat einen hohen Schmelzpunkt und ist schlecht in organischen Lösungsmitteln löslich. Nahtmaterial aus diesem Stoff hat die Eigenschaft schnell abgebaut zu werden. Alternative Nahtmaterialien, bestehend aus PGA und PLA Copolymeren, werden schon lange in der Chirurgie eingesetzt, etwa "Vicryl" und "Polyglactin 910". Der kristalline Charakter geht bei Copolymeren verloren, was zu einer schnelleren Degradation als bei Isopolymeren führt. Durch Verwendung von *L*- oder *D*-Formen können die Eigenschaften des Materials weiter beeinflusst werden. **Initiales Gewicht und die Copolymer-Ratio sind entscheidende Parameter für die Geschwindigkeit der Degradation.** **Poly(ϵ -caprolactone) (PCL)** zeichnen sich durch besondere Merkmale aus. Es handelt sich ebenso um aliphatische Polyester wie PGA und PLA, die Degradation aber erfolgt weitaus langsamer; somit eignet sich dieses Material für Langzeitimplantate (66). Weiters haben sie eine niedrige Schmelz- und eine hohe

Zerfallstemperatur. Die Konsistenz von PCL ist bei Zimmertemperatur gummiartig. Sie können mit anderen Polymeren kombiniert werden, was ihren Einsatz stark erweitert. Sie sind die am wenigsten toxischen Polymere, welche im Einsatz sind. Ursprünglich wurden sie als Medikamententräger eingesetzt. {55}

Bei Monofilnähten finden **Polydioxanone** (PDS) Verwendung. Sie zeichnen sich durch geringe Toxizität ihrer Abbauprodukte aus. Auch werden sie bei der Herstellung von Nahtclips und Knochenpins eingesetzt. {55}

Poly(ortho esters) weisen eine Oberflächenerosion auf, wodurch sie kontinuierlich dünner werden, nicht aber in Einzelteile zerfallen. Diese Eigenschaft macht sich bei kontrolliert freisetzenden und abbaubaren Medikamententrägern bezahlt (67). {55}

Polyanhydride sind hydrolytisch instabil, was als der limitierende Faktor bei ihrem Einsatz gilt. Sie zeichnen sich aber durch eine exzellente Biokompatibilität aus (68). Als Medikamententräger wurden sie schon für viele Pharmaka eingesetzt (Insulin, bovine growth factor, diverse Anästhetika, ...) (69). {55}

Mit Hilfe dieser Stoffe können verschiedene Formen hergestellt werden, jede mit bestimmten Funktionen. Membranen und Tubes dienen zur Separation von Zellen und Geweben, um zum Beispiel Gewebsregeneration zu steuern. Gels hingegen isolieren Zellen und bieten ihnen damit eine bestimmbare Umgebung; so können sie als Immunmodulatoren eingesetzt werden. Matrices bieten die Möglichkeit, dreidimensionale Regeneration mit bestimmbar Parametern zu ermöglichen.

1.5. TE in vitro

Bei den meisten biologischen Fragestellungen werden Zellen zweidimensional im Labor auf Kulturschalen gezüchtet. Organspezifische Eigenschaften gehen dabei verloren, meist beschränkt man sich auf zelltypische Merkmale. Außerdem finden hauptsächlich Zelllinien Verwendung, um die Arbeit zu erleichtern. Eines der Hauptprobleme bei der dreidimensionalen Züchtung von Zellen ist die gezielte Beförderung von Nährstoffen und der Abtransport von Stoffwechselprodukten. Zwar wachsen Zellen in vitro in einigen Lagen übereinander, beginnen dann jedoch abzusterben, bevor sich noch ein klinisch nutzbarer mehrlagiger Zellrasen bildet.

TE beschäftigt sich vor allem mit Organkulturen, das heißt dreidimensionale Kulturen und mit verschiedenen Zellstämmen, die miteinander die Organfunktion zumindest zu einem Teil nachahmen. Das Problem dieser Verfahren ist die kurze Lebensdauer, der genannte zentral

nekrotische Zelluntergang, die auftretenden vaskulären Okklusionen und die Variabilität der Modelle. Verschiedene Zellträger, Matrizes, wurden für diese Erfordernisse etabliert, wobei man häufig Zellen, wie oben beschrieben, als **Gerüstkonstrukteure** einsetzt. Bei dreidimensionalen Matrizes haben sich verschiedene Polymergerüste bewährt, welche mittels diverser Techniken hergestellt werden können. Jedes dieser Herstellungsverfahren beinhaltet Vor- und Nachteile, die bei der Auswahl der gewünschten Matrix genau abgewogen werden müssen. Um einen kleinen Einblick in die Problematik, welche mit der Herstellung und Anwendung dieser Matrizes verbunden sind, zu erhalten, werden einige Verfahren näher erläutert. Die Polymergerüste müssen eine Reihe von Anforderungen erfüllen; sie sollten eine hohe Porosität und Oberfläche aufweisen, strukturelle Stabilität besitzen und bestimmbare dreidimensionale Formen einnehmen können. Der Grundbaustoff sind die oben erwähnten biodegradierbaren Polymere wie Coll, PLA, PLLA, PLGA und PGA. Je poröser die Struktur, umso leichter können Zellen migrieren. Die Porengröße spielt auch eine Rolle bei der Einheilung und dem erwähnten Oberflächenangebot für die Zelladhäsion. Stabilität wird besonders in Hartgeweben wie Knochen und Knorpel gefordert und mittels hoher Quervernetzung erreicht. Weiters sollten bioaktive Moleküle in die Matrizes inkorporiert werden können. (70)

Es stehen verschieden Techniken für die *Gerüsterstellung* zur Verfügung. Beim **"Fiber Bonding"** wird PLLA in Methylenchlorid aufgelöst und mit PGA versetzt, wobei dieses vom verwendeten Lösungsmittel nicht gelöst wird. Die daraus resultierende Polymerlösung aus flüssigem PLLA und festem PGA wird über ein planes PGA-Fasernetz ausgebreitet. Methylenchlorid verdampft, Reste werden durch Gefriertrocknung entfernt; nun liegen PGA-Fasern verzweigt und, außer an den Kreuzungspunkten von einer PLLA Matrix umgeben, übereinander. Die Masse wird über den Schmelzpunkt von PGA für eine bestimmte Zeit erhitzt, dabei verschweißen sich die PGA Kreuzpunkte; ohne dass die Fasern, aufgrund der Unmischbarkeit der beiden Polymere PGA und PLLA, ganz verklumpen. PLLA verhindert somit die Verschmelzung der Fasern; das Resultat ist eine Matrix mit großer Oberfläche und Porosität, wobei sich aber die Porengröße nur schwer steuern lässt. Nach dem Lösen wird PLLA mittels Methylenchlorid wieder entfernt und das PGA Fasernetzwerk gefriergetrocknet. (70)

"Solvent casting and particulate leaching" stellt eine Möglichkeit dar, Matrizes mit einer gewünschten Porengröße zu erzeugen. Diese Methode kann für alle Polymere angewandt werden, welche in Chloroform oder Methylenchlorid lösbar sind. Gesiebte Salzkristalle

werden mit einer PLLA/Chloroform-Lösung gemischt und in eine Form gebracht. Die Kristalle/Partikel dürfen nicht in Chloroform lösbar sein. Wieder verdampft das Lösungsmittel dieser Dispersion, Reste werden mit Gefriertrocknung entfernt und ein PLLA/Salzgemisch ist das Resultat. Durch Erhitzung wird gewährleistet, dass sich die Polymere eng um die Kristalle anlagern; diesen Zwischenschritt kann man auch auslassen. Das Salz wird nun mit Wasser ausgewaschen, und man gewinnt eine Matrix mit bestimmbaren Parametern. Die Porosität kann mit der Partikelmenge, die Porengröße mit dem Partikelvolumen bestimmt werden. Durch Mischen mit Poly(ethylene glycol) kann die Elastizität gesteigert werden; dadurch können die fertigen Matrices gerollt und geformt werden. Durch Waschen in einem hydrophilen Polymer wie Poly(vinyl alcohol) wird die hydrophobe Eigenschaft dieses Materials reduziert und die Zellbesiedelung dadurch erleichtert. (70)

"**Membrane Lamination**" ist ein Verfahren, welches eine einfache Produktion von anatomisch gewünschten dreidimensionalen Strukturen ermöglicht. Die oben beschriebenen Membranen werden Lage für Lage zusammengeklebt, wobei sich Membran und Bindungsstellen aufgrund einer speziellen Technik nicht unterscheiden. Somit kann jede neue Lage durch Ausschneiden an die räumlichen Bedürfnisse angepasst werden. (70)

Beim "**Melt Molding**" wird ein feines PLGA Puder mit gesiebten Gelatinpartikeln vermischt und in eine Teflonform gebracht. Erhitzung über die Transitionstemperatur des Polymers bewirkt eine Verschmelzung des Puders, und sofortiges Abkühlen in destilliertem deionisiertem Wasser löst die Gelatinpartikel aus. Es bleibt ein PLGA Gerüst zurück, welches der geometrischen Form der Teflongussform entspricht. Die Porosität und Porengröße wird wie beim Salz mittels Partikelgröße und Anzahl der Gelatinpartikel gesteuert. Im Gegensatz zur Verwendung von PLLA oder PGA, wo höhere Temperaturen verwendet werden müssen, ist der Vorteil dieses Verfahrens, dass bioaktive Moleküle eingebracht werden können, da die verwendeten Temperaturen relativ gering sind und zudem keine organischen Lösungsmittel verwendet werden. (70)

Mittels der "**Extrusion Technique**" ist es möglich, PLGA oder PLLA Polymerplatten auf die gewünschte Masse zu dehnen. Der Hauptparameter bei diesem Vorgang ist die Extrusionstemperatur; je höher, desto niedriger ist die erforderliche Extrusionskraft. (70)

"**Three-dimensional Printing**" ist eine sehr elegante Methode um komplexe dreidimensionale Gerüste zu erhalten. Mittels Computer Assisted Design (CAD) wird ein Druckerkopf, welcher einen liquiden Binder versprüht, bewegt. Als Unterlage dient ein

Kolben mit einem Polymerpulver, der durch den Binder verfestigt wird. Diese Technik gehört zu den "Solid Free Form"-Methoden, zu welchen auch die "Stereolithographie" und das "Laser Sintering" zählt. (70)

"Gas Foaming" hat gegenüber den genannten Methoden den großen Vorteil, dass auch hier, wie beim "Melt Molding", keine organischen Lösungsmittel verwendet werden, welche entzündliche Prozesse *in vivo* auslösen könnten oder *in vitro* toxisch sind. Nicht immer kann durch Gefriertrocknung die Entfernung aller organischen Lösungsmittel garantiert werden. Bei diesem Verfahren werden PLGA Teile zu festen Scheiben komprimiert und hohem CO₂ Druck ausgesetzt. Durch Kombination der "Particulate Leaching" Technik erhält man offene Porensysteme, welche die Voraussetzung für die *in vivo* Anwendung sind.

Der Vollständigkeit halber seien noch "Freeze Drying", "Phase Separation", "Polymer/Ceramic Composite Foams" und "In situ Polymerization" genannt. (70)

Besonderes Interesse besteht bei der Schaffung *genau definierter Oberflächen* dieser Matrizes, Muster und chemische Zusammensetzung betreffend. Es gilt in der Makromatrix eine Mikromatrix zu etablieren. Nischen, Kanäle und Lakunen müssen in der Größenordnung von Zellen gebildet werden, um zellspezifische Verhältnisse zu schaffen. Auch sollen Moleküle nicht irgendwie in der Matrix zu liegen kommen; domänenspezifische Anordnungen im Raum sind erwünscht, um Protein- und Molekül-Interaktionen genau kontrollieren zu können. All dies führte zur Entwicklung einer Reihe an Verfahren. Heute stehen verschiedene Techniken, jede mit bestimmten Eigenschaften und Nachteilen für die Generierung von Mustern zur Verfügung.

Mittels "Self Assembled Monolayers" (SAM) lassen sich chemisch genau definierte Oberflächen aufbauen, die in Reaktion mit anderen Strukturen treten. Es handelt sich um organische einschichtige Filme, auf einer Goldpartikelunterlage adhärirt, bestehend aus Thioalkan-derivaten, welche durch andere Moleküle chemisch moduliert werden können. Somit weisen diese Filme eine Polarität auf; durch Modulation der organischen Komponente lässt sich die chemische Interaktion an der wässrigen Oberfläche bestimmen und variieren. (2)

Die "Soft Lithography" (SL) ermöglicht die Musterbildung, welche im Bereich von 0,5 µm liegt. Es werden elastomere (soft) Stempel, Gussformen, Kanäle oder Membranen für die Musterbildung verwendet. Die gebräuchlichsten Elastomere sind **Poly(dimethylsiloxane)** (PDMS). Gegenüber der häufig angewandten Photolithographie weist SL mehrere Vorteile auf. Sie ist billiger, einfacher in der Handhabung, für Musterbildung auf verschiedenen

Biomaterialien verwendbar und sowohl auf planaren als auch gekrümmten Oberflächen einsetzbar; zudem ist PDMS biokompatibel. (2)

Das "**Microcontact Printing**" erweitert die SL. Es ermöglicht, Muster im Größenbereich unter $0,5\mu\text{m}$ zu erzeugen. Es werden PDMS-Stempel mit Molekülen beschichtet und getrocknet, welche bei Kontakt mit SAM gewünschte Verbindungen eingehen. Aufgrund der bekannten Polarität und der chemischen Bindungen können so gezielt Moleküle und Proteine adhärirt und Muster gebildet werden. Dieses Verfahren ist eine recht einfache Möglichkeit, um genau definierte Oberflächen zu erhalten, wobei die Moleküle nicht gegen Feuchtigkeitsentzug und gewissen Druck empfindlich sein dürfen (71). (2)

Beim "**Microfluid Patterning**" (μFP) werden kleinste Kanäle genützt, um Moleküle und auch Zellen genau auf den Trägern zu deponieren. Dieses Verfahren eignet sich besonders, um delikate Objekte wie Zellen und hochmolekulare Proteine zu adhärieren. (2)

"**Laminar Flow**" ist eine weitere, dem μFP ähnliche Möglichkeit um Muster zu generieren, wobei hier die Moleküle in einem Kanal fließen, aber in verschiedenen Lösungen und aufgrund der resultierenden laminaren Strömungen nicht miteinander vermischt werden. (2)

Die Schaffung chemisch und strukturell genau definierter Oberflächen ermöglicht auch die bessere Erforschung von Zell-Matrix Interaktionen. Diese Modelle können durch verschiedene Faktoren erweitert und betrachtet werden (Magnetfelder, Gravitation, Licht-Laser, Gase und Zeit).

1.6. Allgemeines zur Interaktion von Zellen mit Biomaterialien

Von besonderem Interesse in der Biomaterialforschung ist die Besiedelung der Matrices durch Zellen, die zelluläre **Adhäsions-** und **Migrationsfähigkeit** steht hier im Mittelpunkt.

Die **Adhäsion** an eine feste Unterlage ist für die meisten Zellen lebenswichtig. Die einfachste Methode, um das Ausmaß der Stärke von Zellbindungen mit synthetischen Stoffen zu messen, besteht aus drei Schritten: Aussäen von Zellen auf die zu untersuchende Oberfläche, Zellen über eine bestimmte Periode adhärieren lassen und Zellen wieder abwaschen. Das Verhältnis ausgesäte/adhärerte oder ausgesäte/abgewaschene Zellen gibt eine Auskunft über die Qualität der Adhäsion. Mittels fluoreszierender Farbstoffe oder durch Radio Labeling kann das Zählen vereinfacht und mittels Computer erfasst werden. Ein Problem bei dieser Methode ist der Vergleich der eingesetzten Abwaschkräfte, jedoch kann dies mit Zentrifugen oder durch automatisierte Waschkammern umgangen werden. (72)

Die **Migration** von Zellen kann direkt mittels visueller Assays gemessen werden. Nachteilig hierbei sind die hohen Kosten. Kostengünstiger ist die indirekt Erfassung der Wanderung von Zellen, mittels spezieller Filterassays. Diese Filter haben eine bestimmte Porengröße, zu beiden Seiten befinden sich zwei Kammern. In die obere Kammer füllt man eine Zellsuspension, lässt die Zellen adhären und dann hungern. Nach einem gewissen Zeitintervall füllt man in die untere Kammer serumhaltiges Medium, kombiniert mit einem zellspezifischen Lockstoff. Je nach Migrationsfähigkeit passieren die Zellen unterschiedlich schnell den Filter und wandern in die untere Kammer, wo sie dann erfasst werden können. Nachteil dieser Methode ist, dass die Zellen häufig eine Matrix wie zum Beispiel Gelatine benötigen, welche dann aber wiederum die Poren der Filter verlegt und somit das Ergebnis verändert wird.

Durch Analysen der Zellaggregation können Rückschlüsse auf Zell-Zell Interaktionen, Zelldifferenzierung und Viabilität gemacht werden. Durch Vernetzen von synthetischen Polymeren mit Multiadhäsivproteindomänen wie Laminin, Nidogen und **Fibronectin (FN)** kann die Bildung von Zellaggregaten beschleunigt werden. (72)

1.7. Aspekte zur Lagerung/Transplantation von "Skulpturen"

Ein wesentliches Gebiet aus dem Sektor TE stellt die *Konservierung* und damit verbundene Lagerung von Geweben dar. Alle Erkenntnisse und Techniken in Bezug auf die Gewebsherstellung wären nichts wert, wenn man diese nicht reproduzierbar, lagerungsfähig und somit transportfähig machte; die Gründe, wieso Zellen in einem unveränderten Zustand konserviert werden müssen, sind also nicht nur mit der einfacheren Verfügbarkeit verbunden. Zellen müssen häufig lange erforscht werden und durchlaufen oft mehrere Testphasen, bevor sie zur Testung am lebenden Organismus freigegeben werden. Hierbei werden viele Zellen verbraucht; zudem ist es sinnvoll, bei jedem Schritt Zellen aufzuheben, um die Ergebnisse nachvollziehbar zu gestalten und eine eventuelle Fehlersuche zu erleichtern. Hat man einmal eine Prozedur erfolgreich etabliert, so benötigt man Zellbanken, in denen Zellen mit der gewünschten Eigenschaft lange verharren können, ohne sich genotypisch/phänotypisch zu verändern. Der Transport stellt ein weiteres Problem dar, welches durch Zellkonservierung gelöst wird. All diese Faktoren müssen wirtschaftlich und mit geringem zeitlichem Aufwand verbunden sein, denn oft ist das Leben von Patienten davon abhängig.

Eines der häufigsten und größten Gebiete bezüglich der Lagerung von Zellen stellt die **Kryokonservierung** dar. Zellen, welche mittels Kühlung haltbar gemacht werden,

durchlaufen eine Reihe von Veränderungen, welche die Zelle auch schädigen können. Einmal bilden sich in der Zelle bei schneller Abkühlung massiv Kristalle, welche durch mechanische Kräfte Zellstrukturen verletzen können. Zudem verändert sich der osmotische Gradient; aufgrund der Eiskristallbildung wird Wasser entzogen, der Anteil an gelösten Teilchen im ungefrorenem Wasser erhöht sich. Dies kann zu chemischen Störungen der Zellhomöostase während des Einfriervorgangs und letztendlich zum Zelltod führen. Bei zu langsamer Abkühlung kommt es zu einem zellulären Wasserentzug, was Dehydration, Zellschrumpfung und wiederum den Zelltod auslösen kann. Somit ergibt sich eine optimale Kühlungsrate, bei welcher Kristallbildung und Wasserentzug ausbalanciert sind. Neben der Zeitmodifikation können durch Zugabe von chemischen Substanzen die Vorgänge des Abkühlens/Auftauens optimiert werden. Im Überblick werden **permeable** von **nicht permeablen Kryoprotektoren** unterschieden. Dimethyl Sulfoxid, eines der häufigsten angewandten Mittel, gehört zur Gruppe der Permeablen. Die Wirkung der einzelnen Stoffe ist nicht genau bekannt, zudem sind sie häufig bei längerer Inkubation zytotoxisch und müssen somit effizient wieder entfernt werden. Alleine die Auswaschung ist mit Problemen assoziiert; die meisten permeablen Kryoprotektoren diffundieren langsamer als Wasser durch die Zellmembran, was zu Veränderungen im Zellvolumen beim Einfrieren oder Auftauen führt. All diese Phänomene müssen noch differenzierter betrachtet werden, wenn es sich um mehrlagige Zellsysteme wie Gewebe handelt. Tiere, die ihre Körpertemperatur zwecks der Überwinterung an die Außentemperatur anpassen ohne Schäden zu erleiden, sind nützliche Modelle beim Studieren dieser Vorgänge (73).

Die *Übertragung (Transplantation)* von körperfremden Zellen ist mit einer Reihe von Problemen verbunden, vor allem der Abstoßungsreaktion. Eine Möglichkeit, dieses Problem zu umgehen, ist die **Immunmodulation**. Durch "Modellieren" der Spender- Zelloberfläche soll der Wirt an der Abstoßung gehindert werden. Vorteile sind, wenn dieses System einmal erfolgreich etabliert ist, die geringeren Komplikationen und Nebenwirkungen *in vivo*. Natürlich setzt dies genaue Kenntnisse des Immunsystems, der antigenen Determinanten des Spendergewebes und deren Interaktionen voraus. Erst dann wird man in der Lage sein, Komplikationen und Nebeneffekte des Spenderorgans *in vitro* auszuschalten. Prinzipiell gibt es mehrere Möglichkeiten der Modulation der Zelloberfläche. Dies kann auf Proteinebene oder Genebene erfolgen; daraus ergeben sich das "Antibody masking", die "Gen Ablation", die "Gen Addition" und die "RNA Ablation". All diese Verfahren können durch

unterschiedliche Techniken erreicht werden, was die Diversität der Verfahren bei ihrem Einsatz erhöht (74).

Eine weitere Möglichkeit ist die **Immunisolation**. Die Idee hierbei ist, dass das Spendergewebe von schädigenden Einflüssen des Empfängers mittels einer Membran isoliert wird. Dieses Verfahren ist trotz klinischer Teilerfolge mit verschiedenen Problemen konfrontiert (75-77). Einerseits müssen Nährstoffe, Abbauprodukte und die gewünschten Moleküle frei passieren können, andererseits müssen teilweise sehr kleine Stoffe an der Passage gehindert werden, um das Transplantat nicht zu gefährden. (78)

Die verwendeten Zellen können allogener oder xenogener Herkunft sein, wobei bei der Auswahl des Zelltyps verschiedene Aspekte berücksichtigt werden. Bei der Verwendung von Zelllinien wird lieber auf xenogene Zellen zurückgegriffen, da bei einer etwaigen Membranverletzung xenogene Zellen besser vom Immunsystem abgefangen werden und so die Bildung von Tumoren vermieden wird. Der Nachteil ist, dass die verwendeten Membranen fester und dichter sein müssen als bei allogenen Zellen, da bei xenogenen Systemen nicht nur immunkompetente Zellen, sondern auch Mikromoleküle wie Komplement, Lymphokine und andere Zytokine abgehalten werden müssen. Wird nämlich erst einmal eine unspezifische Entzündungsreaktion gestartet und setzen diverse Zellen ihr Repertoire an Stoffen frei, dann ist eine Membran nutzlos geworden. Gegen freie Radikale, Sauerstoff und Nitrogen hilft selbst die kleinste Porengröße nichts; somit gilt es, den Ausbruch der unspezifischen Immunabwehr zu verhindern. Weiters haben Zelllinien im Allgemeinen gegenüber primären Zellen den Vorteil der leichteren Handhabung im Labor, zudem wäre die Lebensdauer solcher Implantate unter optimalen Bedingungen „unendlich“. Mittels genetischer Manipulation könnten Zellen optimal modifiziert werden und eine kontrollierte Produktion und Freisetzung eines Moleküls wäre möglich. Hierzu ist dieses Verfahren abhängig von Erkenntnissen in der Gentherapie. Bei Primärzellen macht es nur Sinn, xenogenes Material zu verwenden, da man ansonst nicht genügend Gewebe für industrielle Produktion zur Verfügung hätte. (78)

Leider existiert zusätzlich eine Reihe von Problemen, sodass man noch sehr weit von der routinemäßigen klinischen Anwendung entfernt ist. Einmal besteht wie bei jeder Einbringung von fremdem Gewebe in einen Organismus die Gefahr der Ansteckung mit Viren. Meistens sind diese Partikel zu klein, um effizient von einer Membran abgehalten zu werden. Ein weiteres Problem ist die Sauerstoffversorgung. Optimal wäre, das Kapsulat in einem atriovenösen Shunt mit einem Sauerstoffpartialdruck von 100_{mm}Hg zu platzieren. Hierdurch

wäre eine gute Versorgung der Zellen garantiert, meistens ist dies aber nicht möglich. Im Gewebe, wie zum Beispiel subkutan, subperitoneal oder intramuskulär, herrschen weitaus geringere pO_2 Werte (ungefähr 40mmHg), die eine ausreichende Versorgung kaum ermöglichen. Hinzu kommen noch andere modulierende Faktoren, die das Resultat beeinflussen: Viskosität des Blutes; Sättigung; 2,3 Diphosphoglyzerat; Membranpermeabilität; Sauerstoffbedarf der verwendeten Zellen; Gewebsdichtheit und räumliche Verteilung des Gewebes im Kapsulat. Implantationen in das Peritoneum haben noch andere Nachteile als die mangelhafte Sauerstoffversorgung; so muss man mit einer verminderten Absorptionsrate der supplementierten Moleküle rechnen, kämpft mit einer erhöhten Anzahl von Makrophagen und somit der Gefahr von fibrotischen Reaktionen. Zuletzt ist der hohe mechanische Stress zu nennen, der sich ebenfalls nicht vorteilhaft auf das Kapsulat auswirkt (79). (78)

Zu bedenken ist auch, dass jeder entzündliche Prozess das Kapsulat durch Bildung von Granulationsgewebe gefährdet; dadurch wird wiederum die Sauerstoffversorgung beeinträchtigt. Wären alle diese Probleme gelöst, so bliebe noch immer die Initiale Hypoxie, nach der Implantation. In den ersten paar Wochen ist das Kapsulat besonders Sauerstoff unterversorgt, da die Angiogenese eben ihre Zeit benötigt. Darum sterben die meisten Zellen, immer unter der Vorraussetzung, dass alle anderen Faktoren optimal laufen, in den ersten paar Wochen. Mit diesem Problem kämpft man auch bei nicht immunisolierten Geweben. (78)

Eine Möglichkeit diese Initiale Hypoxie zu umgehen sind Sauerstoff-Generatoren. Mittels der Elektrolyse von Wasser in einer mehrlagigen „Batterie“ kann Sauerstoff in einem gewissen Rahmen zur Verfügung gestellt werden (80).

1.8. Fetales TE und Stammzellen (SZ)

Fetal-TE ist eine sehr junge Disziplin, eine der jüngsten auf diesem Gebiet überhaupt. Die Vorzüge von fetalen Geweben wären enorme Wundheilungskapazität, exzellentes Regenerationsvermögen und geringe Antigenität. Diese Vorteile sind schon lange bekannt; Probleme der Immunabstoßung, der Wachstumslimitation, der Differenzierungsrestriktion, der verschiedenen Immunbarrieren und der Bereitstellung von Geweben oder Zellen könnten mit fetalen TE gelöst werden. (81)

Fetale Zellen teilen sich *in vitro* schneller, sprechen besser auf beeinflussende Faktoren an, können länger in sauerstoffarmer Umgebung überleben und überstehen besser

Einfrierungs/Auftauungsprozeduren. Dies macht sie auch für Arbeiten in vitro interessant. (81)

In vivo hängt ihr Immunpotential vom Alter und Differenzierungsstadium ab, auch bei Verwendung von xenogene Modellen sind fetale Zellen erfolgreicher. Beim fetalen TE können bei Transplantationen aufgrund des unreifen Immunsystems, je nach Gewebe und Alter, Immunreaktionen vermieden werden. Auch erfolgt aufgrund noch nicht genau bekannter Faktoren meistens eine regenerative Heilung. (81)

Eines der Modelle bei TE baut darauf auf, dass man bei bekannten angeborenen Stoffwechselstörungen, haematopoetischen- und anderen Erkrankungen sowie Fehlbildungssyndromen, Gewebe des Embryos entnimmt, im Labor aufgrund der oben genannten Vorteile auf geeigneten Matrizes züchtet; dadurch ist es einfacher genetisch manipulierbar - es vermehrt und dann nach der Geburt replantiert (82-84). (81)

Stammzellen haben in der Biologie besonders in den letzten paar Jahren an Bedeutung gewonnen. Der routinemäßige klinische Einsatz wird noch einige Zeit auf sich warten lassen; zu sehr ist dieses Feld noch in Bewegung, eine Erkenntnis wird im nächsten Moment von einer anderen eingeholt. Allgemein können **embryonale SZ** von **adulten SZ** unterschieden werden. **Embryonale SZ** sind totipotent (bezüglich ihrer Transdifferenzierungsfähigkeit) und erfüllen das Kriterium, welches SZ allgemein ausmacht, die Selbsterneuerung. Bei dem Begriff totipotent ist zu berücksichtigen, dass sich in der Blastozyste zwei Arten von Zellhaufen formen, ein Innerer und ein Äußerer. Die Zellen des Inneren Zellhaufens differenzieren während der Gastrulation und formen die drei Keimblätter. So sind Zellen des Inneren Kompartiments totipotent, allerdings nur in Bezug auf den Embryo. Sie können nicht zu äußeren Trophoblastenzellen, welche die Plazenta bilden, differenzieren. Mittels exprimierter Marker kann das jeweilige Stadium überprüft werden; zum Beispiel sprechen Oct3, Oct4, Stat3 und Rex1 für Totipotenz. Gehen diese Marker verloren, ist dies ein Zeichen das die embryonalen SZ differenzieren; die Fertigkeit im Umgang mit SZ besteht darin, sie lange im totipotenten Zustand zu halten, es passiert häufig, dass die Zellen ungewollt differenzieren. Zudem wachsen embryonale SZ nicht auf einfachen Kulturmedien, meistens werden sie auf mitoseinaktivierten FB gezüchtet. All dies erschwert ihre Verwendung bei TE, wobei dieses Feld erst im Aufbruch ist. (85)

Adulte SZ finden sich in verschiedenen Geweben (hämatopoetische SZ, neuronale SZ, mesenchymale SZ, ...). Je nach ihrer Fähigkeit und Potenz der Differenzierung in verschiedene Gewebsarten unterscheidet man unipotente, multipotente und pluripotente adulte

SZ; dies spiegelt ein Kontinuum der Differenzierungsvielfalt wieder. Auf die ersten euphorischen Meldungen, dass adulte SZ beliebig transdifferenzieren können, folgt kühle Ernüchterung; sowie es scheint enthält jede Zelle eine "Zellgeschichte" im Laufe des Daseins, wodurch die Totipotenz verloren geht, eher ist eine gewebespezifische Differenzierung zu beobachten.

1.9. Generelles zur Gentherapie

Viele angeborene und erworbene Krankheiten lassen sich auf Veränderungen im Genom zurückführen. Das Konzept der Gen-Therapie klingt recht einfach, defekte Gene durch gesunde zu ersetzen oder aber zusätzlich funktionelle Gene einführen. Bei der Umsetzung allerdings kollidieren verschiedene Aspekte. Ein wichtiger Punkt ist das *Beförderungssystem*, da nackte DNA nicht einfach von Zellen aufgenommen wird; weiters die *kontrollierte Expression* und schließlich die *Sicherheitsaspekte*. (86)

Unter *Beförderungssystem* versteht man alle Hilfsmittel, welche es ermöglichen, DNA- Konstrukte beim Lebenden in die gewünschten Zellen einzuschleusen. In vitro existieren verschiedene Methoden, etwa das Elektroporieren, chemische Agenzien wie Lipofectamin und Phagen, um das gewünschte Konstrukt in den verwendeten Zelltyp einzubringen. Größere Konstrukte müssen mit Vektoren übertragen werden, wobei man Plasmid- von viralen Vektoren unterscheidet. In vivo ist man gezwungen, auf die letztgenannte Methode zurückzugreifen, wo mit mehreren sehr unterschiedlichen Barrieren zu kämpfen ist. Es kommen modifizierte Vektoren zur Verwendung. So wird versucht, die Antigenität zu minimieren, indem man den Vektor nur auf essentielle Bausteine für die Transfektion reduziert; ausserdem dürfen die Vektoren nicht mehr replikationsfähig sein. Grob gesehen kann man drei Knotenpunkte bei der Transfizierung mit Vektoren ausmachen, deren Lösung mit dem Erfolg oder Misserfolg der Therapie zusammenhängt. Zu nennen wäre hierbei **extrazelluläres Trafficking**, die **Aufnahme** und **intrazelluläres Trafficking**. (86)

Beim **extrazellulären Trafficking** sind verschiedene Überlegungen zu treffen, so kann die Form der Verabreichung (i.v.-, i.m.-, s.c Gaben und andere Verabreichungsformen) die anhaltende Expression, die Effizienz und das Risiko von Nebenwirkungen beeinflussen. Aufgrund der unterschiedlichen Applikationen ergeben sich wiederum verschiedene Interaktionen mit dem Immunsystem, die das Ergebnis weiter modulieren. Bei der Auswahl ob das Pharmakon lokal oder systemisch verabreicht wird, werden Überlegungen bezüglich des Zielgewebes und die Möglichkeit dieses zu erreichen, eine wichtige Rolle spielen. Bei der

Verwendung von viralen Vektoren ist bei systemischer Gabe mit Wirkungseinbußen aufgrund des Komplements zu rechnen, hingegen wirkt sich die Opsonisierung auf Plasmide nicht aus (87,88). Die Entwicklung kontrollierbarer, nicht replizierbarer Vektoren ist immer verbunden mit dem Zielgewebe, da dieses Zielrezeptoren aufweisen muss. (86)

Die **Aufnahme** hängt von verschiedenen Faktoren ab; so spielt bei manchen viralen Vektoren das Zellstadium aufgrund der unterschiedlichen Expression von Rezeptoren eine Rolle, andererseits sind Viren nicht dem Ionenmilieu und der damit verbundenen Beeinflussung der Endozytose ausgesetzt. (86)

Beim **intrazellulären Trafficking** müssen diverse degradierende Enzyme, das gelförmige Zytoplasma mit Zytoskelett, endosomale Vesikel mit nachfolgenden Pathways und schließlich die Zellkernmembran überwunden werden. Plasmide können nur während der Mitose den Kernkomplex durchdringen (89); man versucht, mittels Inkorporation von "nuclear localization signals" (NLSs) diesen Nachteil zu beheben - virale Systeme tangiert dies wiederum kaum. Auch sind bei der Diffusion durch das Zytoplasma großen Plasmidvesikeln Grenzen gesetzt; andererseits können Plasmide mehr Material aufnehmen, was für die Synthese und Regulation von komplexen Molekülen essentiell ist. (86)

Ein weiteres Problem, in Bezug auf *kontrollierte Expression*, ist es möglichst viele Zellen des gewünschten Typs zu erreichen; häufig beeinflussen Erkrankungen aber mehrere zum Teil sehr verschiedene Systeme, und man ist mit verschiedenen Barrieren konfrontiert. Andererseits ist nicht geklärt, ob nur der Gensatz eine chronisch lang vorhandene Erkrankung wirklich heilt (Regeneration versus Reparatur). Unklar ist auch, wie sich die über Jahre entwickelnden Kompensationsmechanismen und Symptome verhalten. Ein weiterer Punkt ist, dass im gewünschten Gewebe nur eine bestimmte Menge an Molekülen exprimiert werden soll. Mittels programmierbarem Zelltod und wiederholter Verabreichung wäre dies möglich, doch läuft man wiederum Gefahr der Sensibilisierung. (86)

Sicherheitsaspekte und etablierte Protokolle in Bezug auf Therapiepläne und Notfälle sind ebenfalls wichtige Punkte, die berücksichtigt werden müssen bei der Anwendung. Der peinlichst genaue Einhaltung der unkontrollierten Ausbreitung von genetisch manipuliertem Material im Labor, im jeweiligen Organismus, aber besonders von Individuum zu Individuum, ist zu berücksichtigen. Es darf kein "infektiöses" Material ausgeschieden und die Keimzellen nicht tangiert werden. Zudem muss garantiert sein, dass keine spontanen Mutationen auftreten, die all die gelösten Probleme mit einem Schlag zu Nichte machen könnten. (86)

2. Kurzer histologischer Überblick des Knochens

2.1 Allgemeines

2.2 Periost und Endost

2.3 Knochenzellen

2.4 Interzellulärsubstanz

2.5 Knochenarten

2.6 Ernährung des Knochens

2.1 Allgemein

Der Alveolarknochen ist Teil des Alveolarfortsatzes. Die Alveolarfortsätze der Maxilla und der Mandibula bestehen aus einer äußeren, unterschiedlich dicken, vom Periost bedeckten Knochenplatte, der vestibulären und der lingualen/palatalen Kortikalis; einer inneren und stark durchlöcherten Knochenplatte, dem Alveolarknochen oder der Lamina cribriformis, und der zwischen beiden Knochenplatten und auch interdental oder interradikulär zwischen zwei Laminae cribriformes befindlichen Spongiosa.

Die äußeren, kompakten Kortikalisschichten gehen am Eingang der Alveole in die Lamina cribriformis über. Dieser Teil des Alveolarfortsatzes wird als alveolärer Knochenkamm bezeichnet. Die Struktur der Kortikalis und der Knochenbälkchen der Spongiosa entspricht generell derjenigen anderer Knochen, das heißt, sie besteht aus Haversschen Systemen (Osteonen) und interstitiellen Lamellen (90). Die Kortikalis ist im Unterkiefer generell stärker ausgeprägt und dicker als im Oberkiefer. Innerhalb beider Kiefer ist die Dicke der Kortikalis je nach Stellung der Zähne außerordentlich variabel, oral aber generell größer als vestibulär (91). Die Spongiosa besteht aus zarten, dreidimensional-netzförmig angeordneten Knochenbälkchen, zwischen denen sich Knochenmarksräume befinden, die meist Fettmark enthalten. Die Alveolarfortsätze der Maxilla weisen mehr, die der Mandibula weniger Spongiosa auf. Horizontal, vertikal und leiterförmige Anordnung beziehungsweise eine unterschiedliche Dicke der trabekulären Knochenbälkchen führen zu einer großmaschigen oder engmaschigen Spongiosa (92),(91). Die Spongiosabälkchen sind entlang sogenannter Trajektorien angeordnet, die Ebenen oder Drucklinien darstellen, entlang derer die auf den Kieferkörper einwirkenden Kräfte aufgefangen und abgeleitet werden (93). {94}

2.2 Periost und Endost

Der Knochen wird an seiner äußeren und inneren Oberfläche von Bindegewebe bedeckt, dem Periost beziehungsweise Endost. Periost besteht aus zwei Bindegewebschichten. Das Stratum fibrosum, eine äußere, dem Knochen angewandte Schicht, ist sehr faserreich mit FB und sogenannten Sharpey-Fasern, die in die Knochenmatrix eintreten und das Periost am Knochen befestigen. Das Stratum osteogenicum, das dem Knochen unmittelbar anliegt, ist sehr zell-, nerven- und gefäßreich mit FB und Knochenvorläuferzellen. Das Periost trägt wesentlich zur Ernährung und Erhaltung des Knochens bei. Endost besteht aus abgeflachten Bindegewebszellen, die den Knochen an der inneren Oberfläche einschließlich der Spongiosabälkchen bedecken und auch die Knochenkanälchen (canales perforantes und centrales) auskleiden. Kollagenfasern fehlen dem Endost in der Regel. Gemeinsam mit dem Periost hat das Endost die Fähigkeit Knochen neu zu bilden. (95)

2.3 Knochenzellen

2.3.1. Vorläuferzellen

Vorläuferzellen sind während des ganzen Lebens im Knochen vorhanden. Sie sind mesenchymaler Herkunft und besonders proliferationsfreudig. Sie liegen in der Nähe der äußeren und inneren Knochenoberfläche sowie in den Havers-Kanälen und sind unter anderem während des Knochenwachstums aktiv.

2.3.2. Osteoblasten (OB)

OB sind für die Synthese der organischen Bestandteile der Knochengrundsubstanz verantwortlich, nämlich von Coll, Proteoglykanen und GP. Ausserdem wirken sie bei der Hartschichtbildung mit. Anzutreffen sind OB an der Oberfläche von Knochenbälkchen, wo sie nach Art eines einschichtigen Epithels dicht nebeneinander liegen, sogenannte bone lining cells. (96). Gesteuert wird die Aktivität der OB vor allem durch Hormone. OB produzieren Typ-I-Coll. Ausserdem sezernieren sie alkalische Phosphatase, deren Aktivität im Serum zur Abschätzung der Osteoblastenaktivität dienen kann. OB sind polarisierte Zellen. Die Abgabe der Syntheseprodukte erfolgt jeweils dort, wo die Zellen mit der Knochengrundsubstanz in Berührung stehen. Diese neugebildete, noch nicht verkalkte Grundsubstanz wird als Osteoid oder Vorknochen bezeichnet.

2.3.3. Osteozyten (OZY)

Osteozyten sind aus OB hervorgegangen. Sie dienen der Erhaltung des Knochens. Gehen Osteozyten zugrunde, wird die benachbarte Matrix abgebaut. Als Osteozyt wird eine Knochenzelle dann bezeichnet, wenn sie ringsum von Knochengrundsubstanz umgeben ist.

Reife Osteozyten liegen in verkalkter Grundsubstanz und sind in Schichten angeordnet. Charakteristisch für sie sind feine filopodienartige Fortsätze, die sich in feinen Knochenkanälchen (Kanalikuli) befinden, die radiär von den Knochenhöhlen (Lakunen) ausgehen, in denen die Knochenzellen liegen (95).

2.3.4. Osteoklasten (OC)

Osteoklasten sind große, stark verzweigte, mehrkernige (2-6 Kerne), bewegliche Zellen (Riesenzellen). Sie sind in der Lage, Knochengrundsubstanz abzubauen. Im allgemeinen wölben sich Osteoklasten über die Oberfläche der Knochenbälkchen und überdecken manchmal Oben und andere Osteoklasten. Dort, wo Knochen abgebaut wird, liegen häufig Teile der Osteoklasten in Einbuchtungen der Grundsubstanz, den Howship-Lakunen (95).

2.4 Interzellulärsubstanz

Sie besteht etwa zu 50% aus Mineralien - 25% aus organischen Verbindungen und etwa zu 25% aus Hydratationswasser. Unter den organischen Bestandteilen der Grundsubstanz herrschen anorganisches Phosphat (ca. 50%) und Kalzium (ca.35%) vor. Der Rest verteilt sich auf Zitrat, Karbonat, Nitrat, Natrium, Magnesium, Fluor und Spurenelemente. Diese Mineralien liegen in Form von Apatitkristallen vor. Es überwiegt Hydroxylapatit. Die Kristalle liegen längs der Kollagenfibrillen oder in ihnen. Über 90% des organischen Materials ist Coll (97), (98). Es liegt in Form von Kollagenfasern vor. Der Kollagentyp, der im Knochen hauptsächlich vorkommt, ist das Typ-I-Coll, welches aus zwei α 1-Peptidketten und einer α 2- Peptidkette besteht. Bei den restlichen 10% handelt es sich um verschiedene Proteine, z.B. Osteonektin, **Osteocalcin (Oc)**, sowie um kleinere Proteoglykane bzw. Glykosaminoglykane. An ihrer Oberfläche sind die Hydroxylapatitkristalle von einem Hydratmantel umgeben, welcher die Voraussetzung für einen Ionenaustausch zwischen den Kristallen und der Umgebung liefert. (95)

2.5 Knochenarten

Histologisch lassen sich 2 Arten von Knochengewebe unterscheiden:

Geflechtknochen, der vor allem während der Knochenentwicklung auftritt, und Lamellenknochen. Beide Arten bestehen aus Knochenzellen und Matrix, die jedoch

unterschiedlich angeordnet sind: Im Geflechtknochen sind Knochenzellen und Kollagenfasern unregelmässig verteilt (95), im Lamellenknochen verlaufen die Kollagenfasern parallel in Lagen, wobei die Ausrichtung der Fasern ständig wechselt (99).

Geflechtknochen; Bei jeder Neubildung von Knochen wird das Stadium des Geflechtknochens durchlaufen. Charakteristisch ist, dass die Kollagenfasern in der Grundsubstanz, die teils grobe, teils feine Bündel bilden, keine besondere Verlaufsrichtung haben. Dadurch fehlt eine Lamellenbildung. Vorhanden sind aber Knochenkanälchen für Blutgefässe und Nerven. Der Bestandteil an Mineralien ist im Geflechtknochen geringer als im Lamellenknochen, der an Osteozyten höher ist. Der Geflechtknochen ist besonders fest gegen Zug und Biegung.

Lamellenknochen ist gekennzeichnet durch Lamellen und Knochenkanälchen. Lamellen sind deutlich voneinander abgesetzte Knochenschichten, charakterisiert durch Kollagenfasern und Osteozyten. Kollagenfasern haben in jeder Lamelle einen typischen, in der Regel schraubenförmigen Verlauf. Verlaufsrichtung und Steigungswinkel wechseln von Lamelle zu Lamelle. Innerhalb einer Lamelle entsteht bereits ein Fasergitter, das durch einzelne ausscherende Fasern in benachbarte Lamellen sich zu einem Lamellenverbund organisiert. Kollagenfibrillen im Knochen verlaufen immer gestreckt, jene im Bindegewebe gewellt. In den Lamellen oder an deren Grenzen liegen die Osteozyten. Sie befinden sich in abgeflachten Knochenhöhlen, von denen radiär Knochenkanälchen für Osteozytenfortsätze ausgehen. Die Knochenkanälchen benachbarter Knochenhöhlen stehen untereinander in Verbindung und bekommen schliesslich Anschluss an den Zentralkanal (Havers-Kanal).

Anordnung der Lamellen

1. Äussere und innere Generallamellen: Hierbei handelt es sich um Lamellen, die den Knochen unter der äusseren und inneren Oberfläche als Ganzes umfassen.
2. Speziallamellen: Es handelt sich um Lamellen, die jeweils zu einem Lamellensystem (Havers-Systeme, Osteone) gehören. Osteone bestehen aus einem Zentralkanal (Havers-Kanal), um den zentrisch eine unterschiedliche Anzahl von Speziallamellen (3-20) mit ihren Osteozyten angeordnet sind.
3. Schaltlamellen: Hierbei handelt es sich um Lamellen oder Lamellenbruchstücke, die zwischen den Osteonen liegen. Sie gehören zu ehemaligen, dann aber ab- bzw. umgebauten Osteonen.

Knochenkanälchen

Zu unterscheiden sind Canales centrales (Havers-Kanäle) von Canales perforantes. Ersteres sind Teile eines die Knochensubstanz durchziehenden Kanalsystems, das vor allem die den Knochen ernährenden Blutgefäße sowie Nerven leitet; ausserdem enthalten sie lockeres Bindegewebe mit Vorläuferzellen und die die Knochenoberfläche bekleidenden Zellen. Canales perforantes stehen mit ersteren in Verbindung. Ihnen fehlen konzentrisch angeordnete Lamellen, da sie senkrecht von der Oberfläche in den Knochen eintreten. In den canales perforantes treten Gefäße aus dem Periost beziehungsweise Endost ein.

Lamellenknochen ist Hauptbestandteil der Spongiosa und Kompakta beim Erwachsenen und besitzt die besten physikalischen Eigenschaften. Sein Mineralgehalt ist höher als der von Geflechtknochen. (99).

2.6 Ernährung des Knochens

Knochen sind sehr stoffwechselaktiv und unterliegen insbesondere einem dauernden Stoffaustausch. Dies erklärt die vielen Blutgefäße in der Hartschicht des Knochens, die für das Überleben der Osteozyten und die Erhaltung der Interzellularsubstanz erforderlichen Nährstoffe an- und Stoffwechselprodukte abtransportieren. Der Stofftransport erfolgt durch die Fortsätze der Knochenzellen, deren innerste Lage an die Knochenkapillaren herantritt. Außerdem werden für den Stofftransport in größerem Umfang feine Spalträume zwischen der Oberfläche der Knochenzellen und der umgebenden Hartschicht benötigt. (95)

3. Molekulare Biologie

Die molekulare Biologie, ist wie schon oben erwähnt durch die zunehmende Spezialisierung von Einzelgebieten aus der Biologie entstanden. Durch die Verschmelzung von verschiedenen Techniken der Genetik, Biochemie, Zellbiologie und Mikrobiologie wurde diese neue Disziplin geschaffen; dieser Entwicklung hat man mit einem neuen Studium Rechnung getragen.

Die **Zellbiologie** beschäftigt sich vor allem mit zellmorphologischen Aspekten, zum Beispiel mit dem Migrations-, oder dem Teilungsverhalten. Die Techniken sind sehr vielfältig und häufig an einen bestimmten Zelltyp angepasst. Damit ist die Erforschung von verschiedenen Züchtungsmöglichkeiten von Zellstämmen und Schaffung von Zelllinien, die einen Phänotypen ausbilden, welcher bei der biologischen Fragestellung dienlich ist, von zentraler

Bedeutung. Das Sichtbar machen von Zellabläufen, ist ein weiterer wichtiger Punkt in der Zellbiologie; die mikroskopische Auswertung steht hierbei im Vordergrund, wobei auch hier verschiedene Techniken zur Verfügung stehen. Die bekanntesten wären die Fluoreszenzmikroskopie und Elektronenmikroskopie; durch verschiedene Techniken wird das mikroskopieren erweitert, so zum Beispiel mittels Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET).

Die **Biochemie** setzt sich vor allem mit Stoffwechselwegen auseinander, eigentlich könnte man sagen - setzte, große Erkenntnisse werden heute hauptsächlich noch in der oxidativen Phosphorylierung erwartet. Die Erforschung dieser Prozesse ist aber mit großem finanziellem Aufwand verbunden und somit Budget starken Investoren vorbehalten. Viele „Biochemiker“ sind heute eigentlich molekular biologisch tätig.

Die **Genetik** kann in mehrere Wissensgebiete aufgetrennt werden; Mäusegenetiker entwickelten mit dem Gen-Knockout, ein dem Menschen ähnliches Model; zur Erforschung von genetisch bedingten Erkrankungen und deren Mechanismen. „Konditionelle Knockouts“, „Transgene Mäuse“ und „Knock In“ wären nur einige der folgenden Weiterentwicklungen in der Mäusegenetik. Die Hefegenetik liefert hauptsächlich Einblicke in die Zellzyklusregulation, Meiose und Mitose; wobei man auch, in den Zellzyklus-nicht-involvierte Proteine untersucht und dadurch bei Homologen in Vertebraten neue Erkenntnisse gewinnt. Auch hier werden Gene selektiv ausgeschaltet (Gendisruption). Die Entwicklungsgenetik beschäftigt sich hauptsächlich mit Organismen wie Drosophila, Xenopus, und Caenorhabditis. Hier wurden große Fortschritte bei der Organisation von Multizellulären Organismen, zum Beispiel der Musterbildung und Segmentierung betreffend gemacht.

Die **Mikrobiologie** zerfällt in die Mykologie, Virologie und Bakteriologie, wobei letzteres maßgeblich zur molekularen Biologie beigetragen hat. Die Bakteriengenetik (DNA-Repair, Transposons (replikative-nichtreplikative, Phagengenetik,...)) trug maßgeblich zum Verständnis der Genetik einerseits und Entwicklung von neuen Techniken andererseits, bei.

Die **molekulare Biologie** vereint aus allen diesen Gebieten - Techniken und Teilwissen - zu einem neuem Gebiet, wobei man sich mit der Materie auf drei Ebenen (tabelarisch vereinfacht gesehen) auseinandersetzt. Einmal dem DNA Level (Southern Blot, Modifikation von DNA Molekülen für Klonieren, Yeast two hybride,...), dem RNA Level (Nuclease Protection Assay, Northern Blot, rPCR, RTPCR, cDNA,...) und dem Protein Level (Western Blot, Immunopräzipitation (IP), Co-IP,...). Da es sich bei der Arbeit in der molekularen Biologie

um nicht sichtbare Elemente handelt, steht wiederum das "Sichtbar machen" im Vordergrund. Natürlich sind keine starren Grenzen aufgestellt und die Gebiete ergänzen und überlappen sich teilweise; vergleichbares in der Medizin wäre die Innere, wo Hepatologen, Nephrologen, Kardiologen und Gastroenterologen, alle ein internistisches Grundwissen haben.

4. Biologische Betrachtungsweisen des Knochens...

4.1. ...in Bezug auf Zellen, Embryogenese und ECM

4.1.1. Zellbiologische Beschreibung des OB

4.1.2. Embryonalen Skelettogenese

4.1.2.1. Gelenkformation

4.1.2.2. CDZ Proliferation

4.1.2.3. CDZ Differenzierung

4.1.2.4. Hypertrophe CDZ Differenzierung

4.1.2.5. Vaskularisation des hypertrophen Knorpels

4.1.2.6. OB Differenzierung

4.1.2.7. Osteoklasten

4.2. ...in Bezug auf bedeutende Zytokine im Knochenmetabolismus

4.2.1. TGF- β

4.2.2. BMP

4.2.3. PTH

4.2.4. IGF

4.2.5. TNF Familie

4.2.6. D₃

4.2.7. Leptin

4.1 ... in Bezug auf Zellen, Embryogenese und ECM

Biologisch kann man Zellen nach verschiedenen Gesichtspunkten betrachten, so natürlich auch Knochenzellen. Einmal nach morphologischen Gesichtspunkten, weiters nach der Lokalisation und Funktion in vivo, nach dem Expressionsmuster verschiedener Oberflächenproteine und nach genetischen Standpunkten, mit inbegriffen die Transkriptionskontrolle.

Die Betrachtungsweise der Zellen spiegelt die Entwicklung der Biologie wieder. Zuerst waren es hauptsächlich histologisch - morphologische Beschreibungen, wie eingangs beschrieben, später klassische zellbiologische Arbeiten. Die molekulare Genetik hat in den letzten paar Jahren schließlich weiter zum Verständnis der biologischen Abläufe beigetragen. Diese Entwicklung wird auch im Aufbau dieser Zusammenfassung berücksichtigt. Zuerst folgt eine kurze zellbiologische Beschreibung, anschließend eine Ausführung aus der Sicht der molekularen Biologie und der embryonalen Skelettogenese.

4.1.1. Zellbiologische Beschreibung des OB

Osteoprogenitorzellen entwickeln sich aus multipotenten **mesenchymale Stammzellen (MS)**, welche sich zu Chondroblasten, Adipozyten, Myoblasten und OB entwickeln können. Zu berücksichtigen ist, dass Stromazellen häufig als MS klassifiziert werden, weil sie zu verschiedenen Zellen differenzieren können, ohne aber den Beweis erbracht zu haben Kriterien von Stammzellen zu erfüllen. In vitro konnten zwei Populationen von OB-Progenitorzellen unterschieden werden; eine die konstitutiv zum OB differenziert, sowie eine andere, weniger differenzierte Population, die erst durch induktive Stimuli ihren Phänotypen ausbildet (100). Ob sie zu einer Gruppe, welche strikt in OB differenzieren, oder zu zwei verschiedenen Linien gehören, bleibt abzuklären.

Unter der Berücksichtigung der Histochemie können anhand der Inkorporation von BrdU oder H-Thymidin vier Zelltypen unterschieden werden: **Preosteoblasten (pOB)**, die "bone lining" Zellen, OZY und OB.

Der *pOB* ist der Vorläufer des OB; unterscheiden kann man ihn hauptsächlich aufgrund seiner Topographie, denn er liegt ein bis zwei Zellenlagen vom OB bei der Knochenbildung entfernt. Die Fähigkeit der Teilung gegenüber dem OB scheint vermindert zu sein. {101}

Der reife Knochen ist von einer dünnen, elongierten Zellschicht umgeben, den "*lining*" Zellen, welche in Bezug auf ihre Matrix-Produktion als ruhende OB angesehen werden. Durch gewisse Stimuli sind diese Zellen in der Lage, zu voll funktionsfähigen OB zu reifen (102). OZY und "lining" Zellen stellen nur einen geringen Prozentsatz der ursprünglichen Zellzahl dar; ob OB nach ihrer Matrix-Synthese in vivo gezielt einer Apoptose entgegen steuern, wird untersucht.) {101}

OZY sind ein kleiner Teil der ursprünglichen OB, welche "eingemauert" in der Knochenmatrix sind (103). Sie sind die am weitesten differenzierten Zellen - postproliferativ,

kleiner als die OB und haben auch einen Großteil ihrer zytoplasmatischen Organellen eingebüßt. Sie zeichnen sich durch einen geringeren Metabolismus und niedrigere **alkalische Phosphatase (AP)** Aktivität aus, einige phänotypische Marker bleiben jedoch erhalten. Manche Autoren unterscheiden noch den osteozytischen OB; mittels AK konnte solch ein transitorisches Zwischenstadium nachgewiesen werden (104). {101}

Die phänotypische Einteilung des *OB* kann man nach verschiedenen Gesichtspunkten fällen, denn der reife OB zeichnet sich durch die Synthese vieler verschiedener Moleküle aus; wobei viele auch in anderen Geweben gefunden werden. Auf alle Fälle sind OB in der Lage, eine mineralisierte Matrix zu bilden, den Knochen. Zum größten Teil knochenspezifisch und hier angeführt sind membrangebundene AP und ECM Komponenten wie Coll 1, Oc, **Osteopontin (Op)** und **Bone Sialo Protein (BSP)**. Es ist zu betonen, dass der OB nicht das ganze mögliche Repertoire exprimiert; vielmehr hängt sein Expressionsmuster von Alter, Lage, Matrix und „metabolischem“ Cocktail ab. {101}

Die AP gehört zu einer Gruppe von Zelloberflächenproteinen, welche kovalent an Phosphoinositol-Phospholipid-Komplexe binden und somit wahrscheinlich in transmembrane Signalwege eingebunden sind (100,105). Hohe Expressionswerte dieses Proteins findet man bereits im pOB. Es wird eine Rolle bei der OB-Osteoprogenitorzellen Adhäsion, Migration und Differenzierung vermutet (106). {101}

Coll-1 macht 90% der reifen Knochenmatrix aus und ist die quantitativ größte Sekretionskomponente des OB. Auch der pOB bildet Coll-1, die Erhöhung der Expression erfolgt noch vor allen anderen Matrixbestandteilen, auch vor der AP (107). {101}

Op, ein nicht kollagenes Phosphoglykoprotein, wird ebenfalls von OB gebildet; es ist wie Coll-1 nicht knochenspezifisch, da es auch von transformierten Zellen gebildet wird (108). Es wird schon sehr früh in Vorläuferzellen gebildet, vermehrt jedoch in Preosteoblasten und besonders stark im OB (109,110). Es zeigt strukturelle Ähnlichkeiten zu BSP. {101}

BSP weist eine sehr spezifische räumliche Verteilung auf und wird nur von „skelettalen“ assoziierten Zellen gebildet, den **hypertrophen Chondrozyten (hCDZ)**, OB, und OZY (111,112). Die einzigen nicht skelettalen Zellen, welche BSP bilden, sind Trophoblasten in der Placenta (113). BSP wird stark vom OB exprimiert, aber auch vom pOB (110,111) und kurzzeitig in Vorläuferzellen (109). {101}

Oc, auch Bone Gla Protein bezeichnet, ist ein später Marker des OB; es wird auch im geringeren Ausmaß von Thrombozyten und Megakaryozyten exprimiert (114). Osteocalcin ist der zurzeit spezifischste Marker des reifen OB. {101}

In vitro belegte man die Bedeutung von **Fibronectin**, ein weiteres vom OB sekretiertes Protein, welches zu den nicht kollagenen Bestandteilen der ECM zählt. Man vermutet, dass dieses weit verbreitete, multiadhäsive Protein für die Osteogenese essentiell ist. **Anti-FN-Antikörper (AK-FN)** führen beim unreifen OB zu einer Suppression der mRNA Werte von AP und Oc, auch kommt es zu einer Reduktion der Knochenformation. Welche FN Domäne für die Interaktion FN-OB ausschlaggebend ist, bleibt abzuklären, bedeutend scheint die Integrin- bindende RGD Sequenz (FNIII10) zu sein, wobei auch noch andere Domänen eine Rolle spielen dürften. Die beobachteten Effekte sind reversibel. Die Expression von FN sowie die Affinität OB-FN kann durch verschiedene, zum Teil systemische Hormone wie D₃, PTH und **Transforming growth factor β (TGF- β)** beeinflusst werden (115).

Auch bei anderen Zellen konnte die Bedeutung von FN gezeigt werden; so induziert FN bei Monozyten die Apoptose durch die Beteiligung von $\alpha\beta_1$ Integrinen. Dagegen bewahrt FN in vitro reife OB, welche Oc exprimieren, vor dem Zelltod. Durch Gabe von FN-AK wurde bei reifen OB der Zelltod eingeleitet, gleichzeitige Gabe von TGF- β schützt die Zellen vor diesem Effekt. FN leitet somit zuerst Differenzierungsschritte ein, später ist es anscheinend für das Überleben des OB notwendig (116).

Der OB exprimiert eine Reihe anderer, nicht zur Matrix zählender Moleküle und Rezeptoren. Auch "exotische" Moleküle wie zum Beispiel Opioidrezeptoren finden sich auf seiner Oberfläche (117). Einige Funktionen dieser Moleküle sind bekannt, wobei der größte Teil jedoch noch unbekannt ist und intensiv erforscht wird.

Opioidrezeptoren werden in vielen Geweben wie Herz, Gastro-Intestinal- Trakt, Nebennieren, Reproduktions-, Immunsystem und natürlich im ZNS exprimiert (118-120). Andere Neurotransmitter wie Vaso intestinal polypeptide, Calcitonin gene related peptide, Substanz P, Neuropeptide Y und Norepinephrin konnten in Nervenfasern im Knochen nachgewiesen werden (121,122). Der Umstand, dass die Knochenwachstumsplatte reich an Nervenfasern ist, ist ein weiterer Hinweis auf eine mögliche Verknüpfung der Opiode mit der Skelettogenese. Das Nervensystem ist außer bei der Knochenentwicklung auch bei der Frakturheilung und dem Knochenumbau involviert (123). {117}

Endogene Opiode stammen aus drei voneinander unabhängigen Genen, **Proopiomelanocortin (POMC)**, **Proenkephalin (PENK)**, **Prodynorphin (PDYN)**, welche für inaktive Polypeptide kodieren und erst durch gewebsspezifisches Prozessieren in aktive Moleküle verwandelt werden. Mehr als 20 Peptide mit opiatähnlichen Eigenschaften sind bekannt (124-126). Drei Typen von Rezeptoren konnten identifiziert werden, der μ -

Opioidrezeptor mit hoher Affinität zu Morphin, β -Endorphin und auch zu einigen Met-Enkephalin Formen, der δ -Opioidrezeptor mit hoher Affinität zu Enkephalinen und der κ -Opioidrezeptor, welcher Dynorphine bindet. Es handelt sich um metabotrope Rezeptoren mit sieben transmembranen Domänen, welche klassisch für G-Protein-gekoppelte Rezeptoren sind (127-131). {117}

PENK-mRNA wird während der Embryonalzeit im mesenchymalen Knochen-, Knorpel-, Haut, Muskel- und Nierengewebe stark exprimiert. POMC- und PDYN-mRNAs sind in diesen Geweben nicht messbar (132). OB, **Chondrozyten (CDZ)** können PENK- abgeleitete Peptide synthetisieren und freisetzen. Das Sekretionsmuster wird in vitro durch exogene Faktoren wie zum Beispiel D_3 und PTH beeinflusst. {117}

κ -Opioidrezeptor-mRNA konnte wie auch der zur Familie von G-Protein gekoppelten Rezeptoren gehörende Somatostatinrezeptor, ebenfalls in vielen OB-Linien nachgewiesen werden (133). Auch lassen klinische Fälle neben den Erkenntnissen im Labor auf eine Verstrickung von Opioiden mit dem Knochenmetabolismus schließen. Kinder von Müttern, welche Methadon erhalten, haben nämlich signifikant kleinere Knochen (134). {117}

Geläufiger und in vielen anderen Zellsystemen exprimiert, ist die **Stickstoffmonoxidsynthase (NOS)**. Stickstoffmonoxid (NO) ist in viele physiologische Prozesse wie Gefäßdilatation, Neurotransmission, Thrombozytenaggregation und Immunsystemregulation involviert (135,136). Auch im Knochen scheint dieses Molekül wichtige Aufgaben zu übernehmen. {137}

Drei Isoformen von NOS sind bekannt, neuronal NOS (nNOS oder NOS1), eine endotheliale Form (eNOS oder NOS3) und eine induzierbare NOS Form (iNOS oder NOS2) (138-140). eNOS und nNOS werden in den jeweiligen Geweben konstitutiv exprimiert, beeinflusst werden sie hauptsächlich durch die freie Ca^{2+} Konzentration (141). Jedoch können auch diese "konstitutiv" arbeitenden Synthesen durch verschiedene Zytokine beeinflusst werden, wie gezeigt werden konnte (142). Zudem konnte man auf dem eNOS Promotor Östrogen- und shear stress „responding elements“ (143) nachweisen, ein weiteres Indiz für die Induzierbarkeit dieser Isoformen. In der Tat werden erhöhte mRNA-Werte von eNOS in endothelialen Zellen und OB, welche Östrogen ausgesetzt sind, gemessen (144a,b;145); endotheliale Zellen reagieren zudem auch bei Scherbelastungen (146). Weiters sind die anabolen Effekte von Östrogen in eNOS null Mäusen vermindert (147); eNOS scheint somit eine wichtige Rolle bei der östrogen-vermittelten anabolen Reaktion zu spielen. Ob diese Effekte auch für den Knochen von Bedeutung sind, bleibt abzuklären. {137}

Bei mechanischem Stress reagieren OZY und OB mit NO-Freisetzung, der OZY stärker als der OB - ein Hinweis, der die OZY als eigentliche Sensor-Zellen in der Diskussion bei der Mechanotransduktion des Knochens, ausweist (145,148). Aufgrund der rapiden Induktion der NO-Freisetzung scheinen die konstitutiven Formen eine bedeutendere Rolle zu spielen (149,150). Im Knochen wird von verschiedenen Zellen wie OB, OZY, OC und Stromazellen, die konstitutiv arbeitende eNOS exprimiert (151-153). {137}

iNOS scheint normalerweise nicht im adultem Knochen konstitutiv exprimiert zu werden (152,154), durch proinflammatorische Zytokine können Zellen aber zur Synthese in vitro stimuliert werden (155-158). iNOS wird durch Zytokine wie **Interleukin (IL)** -1, Interferon γ , **tumor necrosis factor α (TNF α)**, hauptsächlich auf Transkriptionsebene positiv reguliert, wogegen IL-4, IL-10, TGF- β eher inhibitorisch wirken (136). Da sich der murine iNOS Promotor vom humanem unterscheidet, ist die Wirkung von den oben genannten Zytokinen und die damit verbundene NOS-Aktivität nicht eins zu eins auf den Menschen umlegbar (159). {137}

iNOS und eNOS scheinen für die OC-induzierte Knochenresorption unter physiologischen Bedingungen nicht essentiell zu sein. Vielmehr scheint der iNOS-Pathway beim pathogenen zytokininduzierten Knochenverlust eine Rolle zu spielen (160,161). IL-1 bewirkt im OB NO-Produktion durch Aktivierung des iNOS-Pathways; dies wiederum bewirkt eine nukleäre Translokation von **Nuklearen Faktors κ B (NF- κ B)** in OC-Progenitorzellen (160,161). Zwar zeigen Zellen von iNOS-defizienten Tieren das gleiche Reaktionsmuster, jedoch hält die Antwort nur kurzfristig an, was darauf hinweisen könnte, dass NO oder der Signalweg für die Aufrechterhaltung der Kaskade benötigt wird (161). {137}

Andererseits hemmen hohe NO-Konzentrationen die OC-Formation und -Aktivität (151,156,157,162). Der mögliche Mechanismus der OC-Inhibition könnte in einer chemischen Modifikation von Cathepsin K liegen, ein Enzym, welches Coll degradiert und vom OC synthetisiert wird (163). {137}

Auch am OB weist NO biphasische Effekte auf. Geringe NO-Mengen, welche konstitutiv vom OB produziert werden, wirken parakrin stimulatorisch auf das OB-Wachstum und die Zytokinproduktion (164). So beobachtet man bei eNOS null Mäusen Defekte in der Knochenformation und eine Herabsetzung der OB-Aktivität in vivo und in vitro (147,165,166). Andererseits können hohe NO-Konzentrationen die OB in Wachstum und Differenzierung inhibieren (155,167,168); dies könnte am pro-Apoptose-Effekt liegen (169,170). {137}

Bei Patienten mit **rheumathoider Arthritis (RA)** ist iNOS in der Synovialflüssigkeit zu finden, wogegen dies beim Gesunden fehlt (171-173). Es kommt zur vermehrter Apoptose von CDZ und Synovialzellen (172,174,175); in vitro konnten diese Effekte des NO auf CDZ beobachtet werden (177). Der Mechanismus könnte in der Aufregulation von p53 liegen (176). Weiters stimuliert Zytokin-induziertes NO die Produktion von verschiedenen Metallo-Proteinasen, die die ECM degradieren können; der protektive Effekt von IL-4 scheint in einer Hemmung dieses Mechanismus zu bestehen (178). In vitro konnte gezeigt werden, dass humane Zellen wie OB und Hepatozyten eine Kombination von zwei oder mehreren Zytokinen benötigen, um die NO-Synthese in Gang zu setzen (155,179), CDZ aber reagieren wiederum alleine auf IL-1 oder TNF mit einer erhöhten NO Produktion (180,181). Jedoch ist die Kombination mehrerer Zytokine immer für eine potentere NO-Ausschüttung verantwortlich als nur ein Zytokin alleine (155,180,182). Zusammengefasst scheint also bei der entzündlich mediierten Knochenresorption vor allem die iNOS Isoform eine wichtige Rolle zu spielen (183). {137}

Eine in dieser Diplomarbeit erstmals publizierte Funktion von NO im OB könnte die Stabilisierung des Zytoskelettes sein. Es wird vermutet, dass die C-terminale Domäne des zytoskelettalen Linkerproteins Plectin über Disulfidbrücken stabilisiert wird. Der C-terminale Teil des Moleküls weist homologe Wiederholungsdomänen auf; ähnliches findet man auch bei anderen Zytolinkern (184). Disulfidbindungen finden sich normalerweise extrazellulär; es handelt sich um kovalente Bindungen zwischen zwei Zysteinresten auf der gleichen oder auf verschiedenen Polypeptidketten nach der Oxidation der SH-Gruppe, unter Bildung eines Moleküls Zystin; zum Beispiel bei Insulin (185).

Da OB und OZY bei mechanischen Belastungen mit einer Erhöhung von NO reagieren, könnte dieses nicht nur oben genannte Funktionen erfüllen, sondern würde auch zur intrazellulären Stabilisierung des Zytoskelettes beitragen.

Anhand verschiedener, teilweise bereits erwähnter Marker wurde die OB-Differenzierung unter zellbiologischen Gesichtspunkten von Aubin J.E. 1998 in sieben transiente Schritte unterteilt (109,186). Primitive Progenitorzellen exprimieren niedrige Werte von **Fibroblast Growth Factor Receptor 1 (FGFR-1)**, **Parathyroidales Hormon related Peptide (PTHrP)** und Platelet derived growth factor receptor α , nicht aber AP und COLL-1. BSP-mRNA wird transient in einem sehr frühen Differenzierungsschritt exprimiert (187). Es wird weiters eine interzellulare Heterogenität in jedem dieser Differenzierungsschritte beobachtet; kleine morphologische als auch genetische Subpopulationen, die sich durch diverse Marker

unterscheiden, abhängig von Knochenart, Lokalisation der Zelle im Knochen und Mikroenvironment. {101}

Die Entwicklung des OB durchläuft somit folgende bekannte Stadien: Mesenchymale Stammzelle →→ unbekanntes Zwischenstadium →→ früher Osteoprogenitor → später Osteoprogenitor (beide Zelltypen können sich selbst erneuern) Preosteoblast (limitierte Proliferation) → reifer OB (postmitotisch) → Osteozyt und lining-Zellen. {101}

4.1.2. Embryonalen Skelettogenese mit molekularbiologischen Schwerpunkten

Um Knochen im Labor zu generieren, ist die Auseinandersetzung mit der Knochenentwicklung besonders wichtig. Knochen ist ein „Organ“, welcher nicht wie andere Organe homotop, sondern heterotop verstreut im Körper in unterschiedlicher Form anzutreffen ist. Dabei sind die Musterbildungsgene nicht in die OB-Differenzierung involviert; es sind dies zwei getrennte Pathways, wobei hier das Hauptaugenmerk auf die Differenzierung und Proliferation gelegt wird. Mesenchymzellen bilden Aggregate, die die Form der zukünftigen Knochen annehmen. Meistens differenzieren aus diesen mesenchymalen Kondensaten Chondrozyten, welche die Grundlage für die enchondrale Ossifikation darstellen; nur wenige Zellen umgehen diesen Schritt und differenzieren direkt zu OB - der Schlüsselschritt bei der membranösen Ossifikation (188). Somit wird die Chondrogenese als wichtiger und unentbehrlicher Schritt der Osteogenese näher erläutert. {189}

Im Zentrum der Kondensate differenzieren CDZ aus mesenchymalen Zellen, molekularer Marker dieses Zelltyps sind Aggrecan und Coll $\alpha 1(\text{II})$. Sie unterscheiden sich somit von den sie umgebenden Mesenchymzellen, die eine Struktur bilden, welche als Perichondrium bezeichnet wird (190). Zu den unspezifischen CDZ zählt man nicht hypertrophe und proliferierende CDZ. Wenn die knorpelige Vorlage des künftigen Knochens einmal gebildet ist, differenzieren im Inneren CDZ zu hCDZ; wobei man nochmals zwei Zelltypen unterscheiden kann, den **prehypertrophen CDZ (phCDZ)**, dessen molekularer Marker ebenfalls Coll $\alpha 1(\text{II})$ ist (jedoch geringer exprimiert als bei den unspezifischen CDZ) und den hCDZ der kein Coll $\alpha 1(\text{II})$, jedoch Coll $\alpha 1(\text{X})$ exprimiert. Coll $\alpha 1(\text{X})$ ist somit zur Zeit der einzige spezifische molekulare Marker für den hCDZ (191). CDZ spielen eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der CDZ-Hypertrophie. Ab dem Zeitpunkt, an dem die CDZ hypertrophieren, beim Mäuseembryo ab dem **13. Tag (E13)**, beginnen perichondrale Zellen zu OB zu differenzieren, deren molekularer Marker **Core Binding Factor 1 (Cbfa1)** ist, auch

als Runx2, Pebp2 α A, AML3 und OSF2 bezeichnet. Sie bilden eine knöchernen Matrix um die knorpelige Vorlage, die als Knochenmanschette bezeichnet wird (192). Ist der hCDZ voll ausdifferenziert, wird er schließlich von einer kalzifizierenden Matrix umgeben und stirbt durch Apoptose. Diese mineralisierte ECM begünstigt die Invasion von Gefäßen mittels eines **vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF)**-abhängigen Signalweges. Die Angiogenese der knorpeligen Vorlage erfüllt demnach zwei Aufgaben. Erstens dient sie der Einbringung von **Chondroklasten (CC)**, welche die knorpelige ECM der CDZ degradieren, zweitens der Einschwemmung von OB-Progenitorzellen aus der Knochenmanschette. Die ECM, reich an Coll X, wird in eine Knochenmatrix, reich an Coll I, umgebaut. Der Knorpel erfüllt somit eine "Vorlagefunktion", die Ossifikation schreitet dabei zentrifugal voran. Noch bevor die Ossifikation die Enden der zukünftigen Knochen erreicht, beginnen CDZ distal der Ossifikationsfront zu proliferieren, bevor sie hypertrophieren. Dieser sequentielle Prozess, CDZ-Proliferation, -Hypertrophie und -Ersetzung durch OB findet in der Wachstumszone, einer avaskulären Zone, weiterhin bis zur Pubertät statt. Es zeigen sich verschiedene CDZ-Stadien nebeneinander, eine "Fotoaufnahme" der CDZ-Reifung und -Differenzierung, ruhender CDZ, proliferierender CDZ, prehypertropher CDZ und hypertropher CDZ, alle in Säulen angeordnet. Hier findet das Längenwachstum des Knochens statt (188). Somit bildet der CDZ erstens eine Vorlage für den späteren Knochen, zweitens ist er auch für das Längenwachstum des Knochens verantwortlich, und drittens bewirkt er die Bildung und Aufrechterhaltung des Gelenkknorpels. Der Begriff CDZ würde einen einzigen Zelltypen implizieren, der für all diese Prozesse verantwortlich ist; die Realität zeigt aber, dass es sich um mehrere Subtypen handelt, jeder Typ mit speziellen molekularen Markern und Aufgaben. Ein weiterer CDZ-Typ findet sich im bleibenden Knorpel wie zum Beispiel Ohr- und Nasenknorpel. Dieser Typ wird hier nicht weiter erwähnt; er scheint starke Ähnlichkeiten zu haben mit dem nicht hypertrophem CDZ. Die wichtige Aufgabe der CDZ im Rahmen der Gelenkformation wird im Folgenden kurz erläutert. {189}

4.1.2.1. Gelenkformation

Drei Moleküle kennt man zurzeit, Wnt, TGF- β und GDF5, die eine wichtige Rolle bei der Gelenkformation spielen.

Wnt Signalmoleküle binden an den Rezeptor Frizzled und aktivieren unter anderem β -Catenin-Signaling. Wnt14 gilt als früher molekularer Marker der Gelenkbildung. Bei der Gelenkbildung kann man verschiedene Zonen unterscheiden, eine Zone mit hoher CDZ

Zelldichte, die Interzonen, wo die CDZ ihre phänotypischen Marker verlieren und stattdessen Coll α 1(III) exprimieren. Diese Interzone lässt sich wiederum in drei Subzonen unterteilen, ein zentrales Intermediat, wo die Zellen später durch Apoptose sterben und somit der Gelenkspalt gebildet wird, daneben zwei Laminae mit höherer Zelldichte, die den Gelenkknorpel bilden werden (193). Jede dieser Zonen weist einen speziellen molekularen Marker auf. {189}

Growth/differentiation Factor 5 (GDF5), auch als **cartilage derived morphogenetic protein 1 (CDMP-1)** bekannt, beeinflusst die Gelenkformation beim Mensch und der Maus. Dieser Wachstumsfaktor gehört zur **TGF/Bone morphogenetic Proteins (BMPs)** Superfamilie. Mutationen von *Gdf5*-bei der Maus führen zu einem brachypoden Phänotyp, welcher durch kurze Extremitäten, abnorme Gelenke und einer verminderten Knochenanzahl der Finger, hervorgerufen durch Knochenfusionen, gekennzeichnet ist (194). Der humane Phänotyp ist der Maus sehr ähnlich und zeigt verschiedene Typen der Chondrodysplasie (195). *Gdf5* wird während der Mausentwicklung an jenen Stellen vermehrt exprimiert, wo später die Gelenkbildung einsetzt, im Schulter- und Ellbogenbereich am 11 Tag, am 12 Tag auch im Bereich der Hände und übrigen Gelenken (196). Überexpression führt interessanter Weise auch zu einer Gelenkfusion - eventuell wird dies durch überschüssiges Knorpelwachstum hervorgerufen (197). Die Effekte von GDF5-Überexpression können in vivo durch den BMP-Antagonisten Noggin gehemmt werden; in vitro konnte eine Bindung von Noggin an GDF5 nachgewiesen werden (197). Zudem haben Noggin defiziente Mäuse keine Gelenke und eine Pseudo-Knochenelongation, hervorgerufen durch überschüssiges Knorpelwachstum (198); *Gdf5* wird auch nicht in den Gelenkzonen exprimiert. Daraus lässt sich schließen, dass *Gdf5* downstream von *Noggin* bei der Gelenkbildung agiert. Es konnte gezeigt werden, dass *Wnt14* die *Gdf5*-Expression induziert, was wiederum vermuten lässt, dass *Gdf5* downstream von *Wnt14* figuriert (199). Da aktiviertes FGFR-Signaling in Chondrozyten ebenfalls zu Gelenkfusionen führt (200), liegt der Schluss nahe, dass bei der Gelenkformation zwischen Wnt, FGF und BMP-Signaling, wie bei anderen Entwicklungsschritten auch (201) Verbindungen existieren. {189}

Der dritte Signalpathway, welcher in die Gelenkbildung und/oder artikuläre CDZ-Aufrechterhaltung involviert ist, ist der **TGF- β** Pathway (189). Smad 3, einer der im TGF-Signalweg induzierten Transkriptionsfaktoren, scheint bei der Entwicklung der **Osteoarthritis (OA)** eine Rolle zu spielen. Mutante Mäuse mit einer Smad3-Störung entwickeln über die Zeit eine Erkrankung des Bewegungsapparates, ähnlich der OA beim Menschen. Diese Mäuse

zeigen eine ektope Coll $\alpha 1(X)$ -Expression in artikulären CDZ und vermehrte hypertrophe CDZ-Differenzierung in der Wachstumsplatte. TGF- β könnte als ein Inhibitor der artikulären CDZ-Differenzierung fungieren (202). Ob dieser Pathway während oder erst nach der Gelenkbildung aktiv ist, ist unbekannt. Eventuell besteht sogar eine Interaktion mit dem Wnt14/Gdf5-Signalweg während der Gelenkbildung. {189}

4.1.2.2. CDZ Proliferation

Verschiedene Wachstumsfaktoren, welche die CDZ-Proliferation in vivo kontrollieren, konnten einerseits durch Erforschung der molekularen Ursachen verschiedener humaner Erkrankungen, andererseits aber durch in vitro-Studien ausfindig gemacht werden. Zwei unabhängige, endokrine Faktoren beeinflussen die CDZ-Proliferation und somit das Längenwachstum des Knochens. Es scheint, dass Insulin like growth factor 1 (IGF1) und Growth Hormone (GH) die zwei wichtigsten Regulatoren des Säugerwachstums darstellen (203). Parakrin und autokrin wirksam, scheinen mehrere verschiedene Wachstumshormone zu existieren, wie *Fgfr3*, *Ihh*, *Dhh*, *Shh* und *CNP*. {189}

Aktivierungsmutationen von *Fgfr 3* sind verantwortlich für Achondroplasie (ACH), eine humane Erkrankung, gekennzeichnet durch das Fehlen von nicht-hCDZ, und eine ähnliche Erkrankung, die Thanatophoriedysplasie (TD) (204-207). Eines der vier Tyrosin-Kinase-Transmembranen Proteine des FGFR3 dient als Rezeptor für FGF und wird in proliferierenden CDZ exprimiert. In vitro zeigte sich bei der ACH und einer der TD-Mutationen des FGFR3, dass es zu einer ligandenunabhängigen Rezeptor-Tyrosinase-Phosphorylierung kommt; dies führt zu konstitutiver Aktivierung des FGF-Signalweges es resultiert verminderte Zellproliferation mit Zwergwachstum. Wenn *Fgfr3* in Mäusen deaktiviert wird, weisen diese verlängerte Knochen auf, gekennzeichnet durch eine vergrößerte proliferierende CDZ-Zone innerhalb der Wachstumsplatte (208). Diese Daten zeigen, dass FGFR3 die CDZ-Proliferation negativ beeinflusst. Normalerweise aber induzieren FGFRs klassische mitogen aktivierende Signale. Die negative Regulation könnte ein besonderes Merkmal der FGFR3 darstellen oder aber eine spezielle Eigenschaft der FGFR-Transduktionskaskade bei proliferierenden CDZ sein. Da eine Aktivierungsmutation von FGFR1 in CDZ, welche normale *Fgfr3* Level exprimieren, ebenfalls zu einem ACH ähnlichen Phänotyp führen, könnte die FGFR induzierte Inhibition der Proliferation ein charakteristisches Merkmal der CDZ sein (200a). {189}

In vitro Verabreichung von FGF2 zu Gewebekulturen, ahmt den Phänotyp des aktiven FGFR3-Signalings nach; die Rate der CDZ-Proliferation und das Ausmaß der *Ihh* und *CollX* exprimierenden hCDZ nimmt ab. Die Distanz zwischen Gelenk und *Ihh*-Expression wird durch FGF-Signale reduziert. FGF-Signale beschleunigen nicht nur die hypertrophe Differenzierung von CDZ an sich, sie beschleunigen auch den Zeitpunkt der Differenzierung. Zusammengefaßt führen die verminderte Proliferation und die beschleunigte Differenzierung von CDZ zu einer Verkleinerung der hCDZ Zone, wie man es bei *Fgf3ach* Mäusen beobachtet. Diese Interaktion verändert die bisherige pathophysiologische Betrachtungsweise des Zwergwuchses, zusätzlich wird das Signaling durch *Ihh* und BMPs moduliert. (200b)

Es stellt sich nun die Frage, welcher Ligand für den Rezeptor spezifisch ist; es sind zurzeit 22 verschiedene FGF bekannt (209). Ein Knockout-Modell zu etablieren ist schwierig, da die meisten Phänotypen letal sind, bevor noch die Chondrogenese einsetzt. Unter den wenigen Modellen, die etabliert werden konnten, weisen FGF18-defiziente Mäuse eine vergrößerte Zone von proliferierenden CDZ auf, ähnlich den FGFR3-defizienten Mäusen (210,211). Diese Beobachtung legt den Schluss nahe, dass FGF18 ein Ligand von FGFR3 ist. Welche Transkriptionsfaktoren downstream von FGFR liegen, ist ebenfalls noch nicht genau bekannt. STAT-1 scheint ein Mediator von FGFR3 bei der CDZ-Proliferation zu sein. Aktivierungsmutationen des FGFR3 induzieren die Phosphorylierung, Aktivierung und nukleäre Translokation von STAT-1, welches wiederum zu einer erhöhten Expression des Zellzyklus-Inhibitor p21 führt. Zudem stoppt FGF1-Gabe die CDZ-Proliferation in vitro bei Wildtypzellen, nicht aber bei STAT-1-defizienten Kulturen (212,213). {189}

Indian Hedgehog (*Ihh*), ein Säugerhomolog von dem *Drosophila* Segment Polaritätsgen Hedgehog (*Hh*), reguliert verschiedene Bereiche der Skelettogenese, unter anderem auch die nicht-hCDZ-Proliferation. *Ihh* null Mäuse weisen eine verminderte CDZ-Proliferation auf (214). *Hh*-Signale werden durch *Smoothed* (*Smo*), ein G-Protein-gekoppeltes transmembranöses Protein, übertragen. Bei *Ihh*-Abwesenheit wird *Smo* durch **patched-1** (**Ptc1**), ein anderer *Ihh*- bindender Zellrezeptor, reprimiert. Wenn *Ihh* an *Ptc1* bindet, wird die Repression von *Smo* aufgehoben, und die *Ihh*-Signaltransduktion findet statt (215). CDZ-spezifische Deletionen von *Smo* weisen eine verminderte CDZ-Proliferation auf, wie es bei *Ihh*-defizienten Mäusen beobachtet wird. Die Cyclin-D1-Expression ist bei diesen Mäusen stark vermindert, was vermuten lässt, dass *Ihh* auf diesen Zellzyklus-Regulator zurückgreift. Humane Mutationen, *PTC-1* betreffend, sind mit dem Basalzellnävus-Syndrom assoziiert (216). Ein interessanter Link zwischen dem *Ihh*- und dem FGF-Pathway liegt darin, dass

sowohl FGF18- als auch FGFR3-Signaling die *Ihh*-Expression inhibieren können (211,217). {189}.

Zu der Hedgehog-Gen-Familie zählen bei höheren Vertebraten noch **Desert hedgehog (Dhh, Shh)**. Auch *Shh* scheint in die Skelettogenese involviert zu sein; so weisen *Shh* null Mäuse Defekte im Bereich von Hirn, Rückenmark, Augen und Skelett auf und es fehlt ihnen die Wirbelsäule (218). Mutationen im humanen *SHH* und Genen, welche downstream agieren, sind mit verschiedenen hereditären Syndromen assoziiert, etwa das Greig-Syndrom und das Pallister-Hall Syndrom (219). Die Effektorproteine von Hh, **decapentaplegic (dpp)** bei *Drosophila*, entscheiden über das weitere Schicksal der Zellen (220); BMPs sind die Homologen bei Vertebraten. {221}

Das C-Typ natriuretische Peptid (CNP), ein weiterer Wachstumsfaktor, beeinflusst ebenfalls die CDZ-Proliferation. Dieses Peptid zählt zu einer kleinen Familie von Proteinen, der auch das brain- und atriale natriuretische Peptid (BNP, ANP) angehören. Diese Familie bindet an Rezeptoren mit Guanylat-Cyclase-Aktivität. CNP wird von einer Reihe von Zellen exprimiert, so auch von CDZ. CNP null Mäuse sind zwergwüchsig mit Störungen der enchondralen Ossifikation. Deletionen des natriuretischen Peptid-Clearance-Rezeptors *Npr3* oder Überexpression von BNP resultiert in Gigantismus; es kommt zur Erhöhung der Zellzahl von hCDZ und der nicht-hCDZ (222). In vitro steigert CNP die Chondrozytenproliferation und das Längenwachstum von fetalem Knochen. Wie oder ob dieser Pathway mit *Ihh* und FGF assoziiert ist, ist nicht geklärt. {189}

4.1.2.3. CDZ-Differenzierung

Die CDZ-Differenzierung wird von einer Menge Transkriptionsfaktoren beeinflusst, so zum Beispiel ATF-2 (223), CREB (224), Ets-2, NFAT-1 und c-Fos (225,226). DNA Bindungsproteine, welche zu der Familie "High mobility group (HMG)" gehören, spielen eine wichtige Rolle bei Differenzierung der nicht-hCDZ (227); so zum Beispiel **Sox9**. {189}

Sox9 null embryonale SZ können in verschiedene Zellstämme, nicht aber zu CDZ ausdifferenzieren (228); die Zellen bleiben an der Peripherie der mesenchymalen Kondensate-somit ist *Sox9* zur Zeit der früheste CDZ-Marker (228). *Sox5* und *Sox6*, beide ebenfalls in CDZ exprimiert, scheinen die Transaktivierungsfunktion von *Sox9* zu unterstützen (229) und tragen somit positiv zur CDZ Differenzierung bei. *Sox5* und *Sox6* doppelt defiziente Mäuse sterben nach dem 16. Tag, es kommt zu Störungen bei der Differenzierung der CDZ-Progenitorzellen in hCDZ. Somit zeigen jene Mäuse keine chondrozytäre Säulenbildung in

der Wachstumsplatte (230). Diese Studien zeigen, dass HMG-DNA Bindungsproteine die frühe Chondrogenese kontrollieren, namentlich die Differenzierung der Mesenchymalzellen zu CDZ-Progenitorzellen und CDZ-Progenitorzellen zu proliferierenden CDZ. In vitro konnte weiters eine Verbindung zweier wichtiger Signalwege gezeigt werden, FGF-Signaling erhöht die *Sox9*-Expression (231a). {189}. Sox 9 scheint zudem über Unwege in die Entwicklung einer klazifizierenden Matrix eingebunden zu sein; das Molekül wird nicht nur für die Bildung der mesenchymalen Kondensate benötigt, in diesem Stadium scheint es auch eine Wirkung auf die antiapoptotischen Moleküle wie Noggin und Chordin zu haben, welche Signale inhibieren, die für die Entwicklung der Finger notwendig sind. Später wird Sox9 für die normale Differenzierung von CDZ und deren unidirektionale Proliferation benötigt; auch scheint es die Transition von CDZ in hCDZ zu bremesen und kontrolliert somit die enchondrale Verkalkung. Die beiden Sox verwandten Gene *Sox5* und *-6* scheinen von Sox9 abhängig zu sein. Auch ist Sox9 in einem frühen Entwicklungsstadium der Akren für die *Runx2* Expression erforderlich, später aber nicht mehr. Hinweise, dass *Sox5*, *-6* und *Runx2* direkt von Sox9 angesteuert werden existieren nicht. (231b)

Hypoxia inducible factor 1 α (HIF1 α) scheint essentiell für das Überleben der CDZ zu sein. Mäuse, denen dieser Faktor in CDZ ausgeschaltet wurde, weisen durch fehlenden Proliferationsstopp erhöhte CDZ-Proliferation sowie erhöhten CDZ-Untergang auf. Die Wirkung von HIF1 α ist teilweise gekoppelt an die Regulation von *Vegf*-Genen (232). Diese Gene sind für die vaskuläre Invasion der Wachstumsplatte notwendig. {189}

4.1.2.4. Hypertrophe CDZ-Differenzierung

Die *hypertrophe CDZ-Differenzierung* ist für die Osteogenese unentbehrlich. Die hCDZ bestehen aus zwei Subpopulationen von Zelltypen, den phCDZ und den voll ausdifferenzierten hCDZ. phCDZ sind größer als proliferative CDZ, sie exprimieren *Ihh*, *FGFR1* und *Cbfa1*, hingegen nimmt die *Coll α 1(II)*-Expression ab. Der voll ausdifferenzierte CDZ hat an Größe zugenommen, exprimiert kein *Coll α 1(II)*, stattdessen aber *Coll α 1(X)*. Bei

Abwesenheit der hCDZ ist Knochenformation nicht möglich; eine besondere Rolle spielt die mineralisierte ECM, welche für die vaskuläre Invasion benötigt wird. {189}

PTHrP beeinflusst ebenfalls die Chondrogenese. PTHrP ist ein Inhibitor der CDZ-Hypertrophie. Das *PTHrP*-Gen wird von Zellen im Knorpel und im Perichondrium exprimiert. **PTH/PTHrP-Rezeptor (PPR)**, ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor, findet sich im phCDZ, verminderte Werte auch im proliferierenden CDZ. PTHrP null Mäuse weisen Zwergwuchs auf, hervorgerufen durch frühzeitige Differenzierung der nicht-hCDZ in hCDZ (233). Es weisen noch weitere Studien auf die Notwendigkeit des PTHrP und des Rezeptors, bei der CDZ-Hypertrophiehemmung hin. Die *PTHrP*-Expression ist unter *Ihh*-Kontrolle, welches von phCDZ exprimiert wird. *Ihh* erhöht in den perichondralen Zellen die Synthese von PTHrP und bewirkt somit eine Verlangsamung der Chondrozytenhypertrophie (214,234). *Ihh* kontrolliert ebenfalls die Differenzierung von mesenchymalen Zellen zu OB-Vorläuferzellen in der Knochenmanschette. Die Distanz zwischen *Ihh*-exprimierenden Zellen und PPR-exprimierenden Zellen legt den Grenzbereich für die Chondrozytenhypertrophie und die Knochenmanschette fest (235). {189}

Wnt Signaling spielt ebenfalls eine wichtige Rolle in der hCDZ-Biologie. *Wnt4* wird in periartikulären Chondroblasten exprimiert; der interzelluläre Mediator β -Catenin wird in Perichondrium und hCDZ gebildet (199,236). Fehlexpression von *Wnt4* oder konstitutiv aktives β -Catenin-Signaling beschleunigt die Umwandlung von nicht-hCDZ zu hCDZ, was zu einer leicht beschleunigten Ossifikation führt. Fehlexpression von dominant negativ aktiven Frizzled-1 und -7 Rezeptoren führt zu gegenläufigen Effekten. Fehlexpression von *Wnt5a*, normalerweise im Perichondrium exprimiert, verzögert die Transition vom phCDZ in hCDZ. All dies führt zu verkürzten Knochen, wobei *PTHrP*- und *Ihh*-Expressionslevel nicht beeinflusst werden, was wiederum vermuten lässt, dass das Wnt-Signaling als unabhängiger Loop, oder downstream von PTHrP/*Ihh*, agiert. Abschließend zu sagen wäre, dass auch eine Fehlexpression von *Delta1*, ein Notch-Ligand, welcher nur in hCDZ exprimiert wird, zu einer Inhibition der Umwandlung von nicht-hCDZ in hCDZ führt. {189}

Bei der *transkriptionellen Kontrolle der CDZ-Hypertrophie* konnten ebenfalls wichtige Teilschritte entschlüsselt werden. *Cbfa1/Runx2*, ein zur Runt-Familie gehörender Transkriptionsfaktor, spielt neben seiner Bedeutung bei der Osteogenese eine wichtige Teilrolle bei der hCDZ-Differenzierung. *Cbfa1* null Mäuse weisen keine hCDZ in den meisten skelettalen Abschnitten auf; Ausnahmen scheinen für alternative Pathways zu sprechen (237,238). *Cbfa1* wird in phCDZ und konstitutiv im nicht-hCDZ exprimiert, es induziert die

hCDZ-Differenzierung, die *Ihh*-Expression und eventuell die enchondrale Knochenformation (239,240). Ob *Cbfa1* direkt oder indirekt *Ihh* reguliert, ist fraglich. Andererseits reguliert *Ihh* *Cbfa1* in Mesenchymzellen der Knochenmanschette. *Ihh*-defiziente Mäuse weisen keine *Cbfa1*-Expression in der Knochenmanschette der langen Röhrenknochen auf, somit findet auch keine OB Differenzierung statt (214). Die enge Koppelung der Chondro- und Osteogenese wird auch hier wieder deutlich. {189}

4.1.2.5. Vaskularisation des hypertrophen Knorpels

Der vielleicht wichtigste Schritt der Osteogenese ist die Vaskularisation des hypertrophen Knorpels. Der Wechsel von Knorpel in Knochen erfolgt nicht durch Transdifferenzierung von CDZ zu OB (240), sondern erfordert einen angiogenetischen Zwischenschritt und den Umbau der ECM mit anschließender Zellinvasion. Die Invasion der Gefäße findet nur in jenen Bereichen der ECM statt, die den hCDZ umgeben; die Gefäße aus der Knochenmanschette befördern OB und Osteoklasten-Vorläuferzellen in die Knorpelmatrix. Die Homöostase zwischen matrixdegradierenden Enzymen und zellstimulierenden Wachstumshormonen ist für die Entwicklung eines funktionierenden Knochens entscheidend. Zwei Moleküle welche hierzu entscheidend beitragen wurden genauer untersucht - einerseits Wachstumsfaktoren wie VEGF, andererseits Proteasen wie die **Metalloproteinase 9 (MMP9)** und Gelatinase B. {189}

MMP9 wird von OC während der Embryogenese und nach der Geburt exprimiert, zudem auch von Chondroklasten. *MMP9* null Mäuse zeigen leicht verkürzte Röhrenknochen (241). Diese Protease begünstigt die Knorpeldegradation und somit die Angiogenese durch die Freisetzung diverser matrixgebundener Moleküle. OC und CC unterscheiden sich hauptsächlich durch ihre unterschiedliche Lokalisation und das Ausmaß der *MMP9*-Exprimierung (241,242). Diverse Essays sind etabliert, welche die Rolle von *MMP9* untersuchen. Es stellte sich heraus, dass hCDZ von *MMP9* null Mäusen verspätet die Migration und Proliferation von Endothelzellen induzieren, gemessen an den Wildtypzellen, was auf eine verlangsamte und/oder herabgesetzte Sekretion von angiogenetischen Faktoren zurückzuführen wäre; einer dieser Faktoren könnte VEGF sein. Das gängige Modell ist, dass VEGF von der ECM durch Bindung inaktiviert wird. Die Degradation der ECM durch *MMP9* setzt den Faktor aktiviert frei, dieser kann nun an Rezeptoren diverser Zellen wie CC, OB und Endothelzellen binden und so die Knochensynthese vorantreiben. Somit spielt die kontrollierte Degradation der ECM eine wichtige Rolle (4). {189}

Cbfa1 wird anscheinend auch für die Angiogenese benötigt; es findet keine vaskuläre Invasion in skelettale Elemente von null *Cbfa1*-Mäusen statt, auch nicht in jene, welche hCDZ enthalten (243). In diesen mutanten Mäusen findet man keine Aufregulation von *Vegf* in hCDZ, sowie sie normalerweise beobachtet wird, und der VEGF-Rezeptor wird nicht im Perichondrium exprimiert. In vitro bindet *Cbfa1* an den *Vegf*-Promotor und erhöht seine Aktivität. Diese Daten lassen vermuten, dass *Vegf* im hypertrophen Knorpel downstream von *Cbfa1* liegt (243). {189}

Da OB und CDZ aus den gleichen Vorläuferzellen stammen, ist es nicht verwunderlich, dass sie beide ähnliche, teilweise sogar gleiche Regulationswege nutzen (*Ihh*, *Cbfa1*,...). Der Ursprung des OB wird nach wie vor diskutiert, wahrscheinlich liegt er in der Knochenmanschette und erreicht über die einsprießenden Gefäße das Knocheninnere. OC hingegen differenzieren erst innerhalb des Knochenmarks und sind monozytären Ursprungs. {189}

4.1.2.6. OB-Differenzierung

Bei der OB-Differenzierung sind, aus genetischer Sicht, *Ihh* und FGF18 bedeutende Faktoren. In *Ihh*-defizienten Mäusen zeigen sich keine *Cbfa1*-positiven Zellen und es findet keine OB-Differenzierung in den enchondralen Ossifikationszonen statt. Bei jenen Knochen, welche membranös ossifizieren, existieren somit auch noch *Ihh*-unabhängige alternative Pathways {189}. Auch andere Proteine konnten als wichtige Faktoren bei der OB-Differenzierung ausgemacht werden, wobei bei einigen die vermutete Bedeutung revidiert werden musste, so bei BMP.

BMP induzieren die anfänglichen Schlüsselschritte der frühen Knochenformation; sie sind eher als skelettal-mesodermale Induktoren zu sehen denn als reine Knocheninduktoren (244). BMPs spielen eine wichtige Rolle bei der mesenchymalen Musterbildung und beschleunigen die CDZ-Differenzierung (245). Es konnte durch Gen-Ausschaltung noch nicht nachgewiesen werden, dass BMPs die OB-Differenzierung direkt beeinflussen, unabhängig von ihrer Funktion als mesodermale Induktoren. {189}

BMP5-mRNA wird in den mesenchymalen Kondensaten, noch bevor die Knorpelentwicklung einsetzt, exprimiert (246), dagegen findet sich BMP2, 4, 7 im Mesenchym, welches die Knorpelanlage später umgibt (247). Es existieren zwar Berichte über ihr Potential die OB-Differenzierung direkt zu steuern (248,249), {221}, jedoch bezieht sich dies auf Zelllinien. Andere Publikationen weisen auch auf die Fähigkeit von BMPs hin, Knochen ektop zu bilden.

Bei sub kutaner und intramuskulärer Applikation von BMP kommt es zur Knochenformation (250,251), {221}. Einerseits zeigt dies, dass Progenitorzellen, welche Knochen bilden können, auch extraskelettal vorhanden sind, was für die pharmakologische Manipulation von Knochenerkrankungen interessant sein könnte (252), andererseits unterstreichen diese Beobachtungen die Wirkung der BMPs als skelettal-mesodermale Induktoren (253,254).

Knockout-Modelle für BMPs sind schwer zu etablieren, da sie essentielle Moleküle schon kurz nach der Befruchtung sind. BMP3 null Mäuse sind das einzige knochenrelevante Modell - diese zeigen mehr Knochenmasse. Ob BMP3 die OB-Differenzierung oder -Proliferation beeinflusst, ist nicht geklärt (255). Einen indirekten Hinweis, dass BMPs die OB-Proliferation (nicht OB-Differenzierung) direkt beeinflussen, liefern Tob-defiziente Mäuse. Mäuse, bei denen dieses Protein, ein zur antiproliferativen Proteinfamilie gehörendes Molekül, ausgeknockt wurde, zeigen erhöhte OB-Proliferation und vermehrte Knochenmasse. Tob interagiert mit Smads1, -5, -8, welche im Rahmen des BMP-Signalings engagiert werden (256). Eventuell hemmt Tob BMP-Signaling, ohne andere Pathways zu stören, was für eine direkte Involvierung von BMPs bei der OB-Proliferation sprechen würde. {189}

TGF-β, welches in höherem Ausmaß als BMP in der Knochenmatrix zu finden ist, spielt ebenfalls eine gewichtige Rolle in der OB-Differenzierung. Bei OB-spezifischer Überexpression von *TGF-β2* in Mäusen, resultiert ein low-bone-mass Phänotyp mit vermehrten Osteozyten (257). Bei Deletionen von **TGF-β-binding-protein 3 (TBP3)**, ein Protein, welches die Bioverfügbarkeit von *TGF-β* hemmt, resultiert interessanterweise ein Phänotyp mit erhöhter Knochenmasse und Osteoarthritis (258). {189}

Der früheste und spezifischste molekulare Marker zur Zeit der OB-Differenzierung ist *Cbfa1*. Verschiedene *Cbfa1*-Isoformen konnten identifiziert werden. Diese Isoformen werden unterschiedlich stark exprimiert. Typ II findet man in allen Spezies, Typ III findet sich zwar in Maus und Ratte, nicht aber beim Menschen (259). Man nimmt an, dass Typ II die wichtigste Rolle bei der Skelettogenese spielt; obwohl alle Isoformen die Expression von Oc-, Op- und Coll I-mRNA in stabilen Transformanten induzieren oder aufregulieren, beobachtet man beim Typ II aber die höchsten Level (259). {221}

Im 10,5. Tage alten Mäuseembryo (E10,5) wird *Cbfa1* in der lateralen Mesodermalplatte und in allen Zellen der mesenchymalen Kondensate exprimiert. Zwischen E10,5 und E12,5 exprimieren *Cbfa1*-positive Zellen auch Coll α 1(II) (der Marker für undifferenzierte CDZ) und Coll α 1(I) (der molekulare Marker für undifferenzierte Mesenchymzellen und OB-Progenitorzellen (Osteochondroprogenitorzellen)) (260). Nach E12,5 steigt die *Cbfa1*-

Expression in OB kontinuierlich an, während sie im phCDZ abnimmt, bei der Geburt schließlich ist Cbfa1 im phCDZ nicht mehr nachweisbar (237,238,240). Cbfa1 ist im Gegensatz zu Ihh für die OB-Differenzierung notwendig, denn Cbfa1 null Mäuse haben keine OB und somit wird keine enchondrale noch membranöse Ossifikation beobachtet (261,262). Im Gegensatz weisen Cbfa1 +/- Mäuse Störungen nur in den membranösen Ossifikationszonen auf (262). Beim Menschen beobachtet man einen ähnlichen Phänotyp, welcher als cleidocraniale Dysplasie (CCD) bekannt ist. Die meisten Patienten mit CCD haben Mutationen Cbfa1 betreffend (263,264). Cbfa1 ist in vitro fähig, die OB-Differenzierung in Haut-FB zu induzieren (260), aber auch in vivo kommt es bei Überexpression zur Ossifikation (239,240). Wie es scheint, ist Cbfa1 auch für die OB-Funktion notwendig (265,266). Die Funktionen von Cbfa1 bei der hCDZ-Differenzierung, vaskulären Invasion, OB-Differenzierung und -Funktion machen dieses Molekül zu einem bedeutenden Faktor bei der Skelettogenese. Wie aber wird Cbfa1 reguliert ? {189}

Zur Beantwortung dieser Frage ist es notwendig das **Osteoclaingen** des OB zu betrachten. Oc wird außer vom Megakaryozyten nur vom OB exprimiert (267); drei Oc-Gene konnten in Mäusen identifiziert werden (268,269). Zwei von diesen, **Osteocalcingen 1 (OG)1** und OG2, auch als mOCA und mOC-B bezeichnet, werden nur im Knochen exprimiert (268,269). Das **Osteocalcin verwandte Gen (ORG)**, auch mOC-X bezeichnet, wird nur in der Niere gebildet (269). Im Oc-Promotor konnten verschiedene funktionelle Domänen nachgewiesen werden; so finden sich in der **Osteocalcin Box I (OCBoxI)** Homöodomän-Protein-Bindungsmotive. MSX1 und MSX2 binden an diese (270,271,272). An die *E-Box* binden Transkriptionsfaktoren der Helix-Loop-Helix (HLH)-Protein Familie; welche, ist noch unbekannt (270,273). Die *OCBoxII* enthält Runt-Bindungsmotive, die von den zu dieser Familie gehörenden Transkriptionsfaktoren erkannt werden. Drei Runt-Erkennungsseiten wurden gefunden; eine in der OC Box II, zwei andere bei der Ratte im distalen Oc Gen Promotor (270,274,275).

Zwei weitere OB-spezifische cis-aktive Elemente, **OB specific element (OSE) 1** und OSE2 wurden im OG2 bei der Maus gefunden (276,277). OSE2 weist ebenfalls Konsensussequenzen mit der Runt-Domän-Protein-Familie auf. Cbfa1 bindet an eine dieser Sequenzen (277), welche man auch in anderen Matrixkomponenten findet, wie Op und Coll $\alpha 1(I)$. Cbfas sind die Vertebratenhomologe zu Drosophila runt und lozenge Protein (270) {221}; alle Runt-Säugerhomologe werde als Cbfa bezeichnet. Drei Cbfa-Gene sind beim Säuger bekannt, Cbfa1 bis 3. Sie alle haben eine DNA-Bindungs-Domäne, welche 60%

homolog zu Runt ist. Cbfa1 weist keine Transaktivierungsfunktion auf, was spezifisch für die Runt Proteinfamilie ist. Cbfa1 ist OB-spezifisch, die anderen zwei Cbfas sind nicht im OB vorhanden. Die Expression von Cbfa1 wird durch verschiedenen Hormone beeinflusst, wie zum Beispiel den BMPs (Bone Morphogenetic Proteins). Cbfa1-Bindungsseiten lassen sich in verschiedenen Gen-Promotoren des OB nachweisen; so exprimieren Cbfa1-transfizierte FB Osteocalcin und Bone Sialoprotein. Cbfa1-defiziente Mäuse haben im enchondralen Knochen keine OB, das Skelett besteht aus einer rein knorpeligen Matrix. Die Funktion eines Cbfa1-related Protein, welches durch alternatives Splicen (3'Ende der Runt-Domäne) entsteht, ist unklar. Cbfa1 spielt nicht nur eine Rolle während der OB Entwicklung, es steuert auch später die Osteogenese. Während der Zahnentwicklung steuert Cbfa1 die mesenchymal-epitheliale Interaktion. {278}

Cbfb (PEBP2B) bildet einen Dimer mit RUNX1 (runt related transkription factor 1). Beide Proteine sind für Hämatopoese essentiell, -/- Cbfb Mäuse sterben normalerweise bei der Geburt. Bei Aufrechterhaltung der Hämatopoese mittels einer genetischen Modifikation des Knockouts zeigten sich schwere Knochenentwicklungsstörungen. Trotz der Differenzierung von mesenchymalen Zellen in unreife OB, bildet sich membranöser Knochen nur spärlich. Die Reifung von CDZ in hCDZ war deutlich verspätet und es bildete sich kein enchondraler Knochen. Es zeigte sich das Cbfb für die DNA Bindung von Runx2 und somit für die Skeletogenese notwendig ist. (278a)

Drei Transkriptionsfaktoren, die die Cbfa1-Expression regulieren, sind bekannt. Erstens *Msx2*, ein Mausehomolog zu Drosophilas muscle segment homeobox Gen *Msh*, kodiert für einen Homeobox enthaltenden Transkriptionsfaktor und wird in OB während der Entwicklung exprimiert. Bei einem humanen Syndrom, welches durch erhöhte Knochenformation um die Schädelsturen gekennzeichnet ist und als "Kraniosynostosis Boston-Typ" bezeichnet wird, fand man eine Aktivierungsmutation in *MSX2* (279). Auch weisen *Msx2* null Mäuse eine verspätete Ossifikation des Schädelknochens und eine generell verminderte Knochendichte auf und Cbfa1 ist herab reguliert, was darauf hinweist, dass *Msx2* direkt oder indirekt die Cbfa1-Expression reguliert (280). {189}

Bapx1, der zweite Faktor ist ein Säugerhomolog von Drosophilas bagpipe homeobox Gen, und ein ebenfalls zur Homeoboxfamilie gehörender Transkriptionsfaktor der für die axiale

Skelettogenese erforderlich ist; null Mäuse weisen eine Verminderung von *Cbfa1* im Achsenskelett auf (281). {189}

Der dritte Transkriptionsfaktor, **Hoxa2**, ebenfalls zur Homeoboxfamilie gehörend, könnte ein Inhibitor von *Cbfa1* sein. Null Mäuse leiden an ektopter *Cbfa1* Expression und damit verbundener ektopter Knochenformation (282). {189}

Eine weitere Frage betrifft das *Cbfa1*-Expressionsmuster, denn im Tiermodell kann man am 10,5 Embryonaltag *Cbfa1* detektieren, OB lassen sich aber erst am 14,5 Tag nachweisen. Hierfür gibt es mehrere mögliche Erklärungen. Es könnte sein, dass *Cbfa1* weitere OB-spezifische Transkriptionsfaktoren kontrolliert. Ein solcher könnte **Osterix (Osx)** sein, ein Transkriptionsfaktor zur "zinc finger" Proteinfamilie gehörend. Ein Fehlen dieses Faktors entspricht dem Phänotyp der *Cbfa1* null Mäuse, wenn auch nicht ganz so stark ausgeprägt. Es scheint, dass *Osx* downstream von *Cbfa1* liegt (283). Auch könnte die *Cbfa1*-Transaktivierungsfunktion von einem anderen Co-Faktor abhängig sein, welcher erst später exprimiert wird oder aber, drittens ein Inhibitor hemmt die Transaktivierungsfunktion von *Cbfa1* in der frühen Entwicklung. Zu diesem letzten Modell passend fand man *AJ18*, ein zinc-finger-Protein, welches *Cbfa1* in vitro durch kompetitive Bindung an die gleiche Konsensussequenz hemmt (284). Damit wären die anderen Mechanismen nicht ausgeschlossen, es könnte also durchaus sein, dass alle drei an diesem Phänomen beteiligt sind. {189}

Weiters bleibt abzuklären, ob *Cbfa1*-unabhängige Pathways, welche die OB-Differenzierung und -Proliferation beeinflussen, existieren. **Dlx5** könnte solch einen Signalweg darstellen. Dieses Homeobox enthaltende-Protein wird in mesenchymalen Kondensaten, welche membranös ossifizieren, exprimiert. *Dlx5* null Mäuse weisen bei normaler *Cbfa1* Expression, verspätete Schädelknochenreifung auf (285). Entweder agiert *Dlx5* *Cbfa1*-unabhängig, oder aber downstream. Auch zeigten sich bei der Überexpression von **Fos related antigen 1 (Fra1)**, ein c-Fos-verwandtes Protein, welches keine Transaktivierungsdomäne aufweist und Δ FosB, eine alternative splice-Form vom FosB-Transkript, erhöhte OB-Zahl und Knochenmasse nach der Geburt, bei normaler *Cbfa1*-Expression (286,287). Einen direkten Hinweis für die Existenz solcher *Cbfa1*-unabhängigen Pathways bei der OB-Proliferation/Differenzierung erbrachte man mit *LRP5*. Dieses Gen codiert für einen Rezeptor, genannt LDL-Rezeptor-verwandtes Protein 5, welcher ubiquitär exprimiert wird. Bei Deletionen oder Inaktivierungs-Mutationen dieses Gens resultiert das Osteoporose-Pseudogliom Syndrom, bei Überaktivierungs-Mutationen kommt es zur erhöhten

Knochenmasse (288,289). *Lrp5* null Mäuse weisen verminderte OB-Proliferation und verminderte Knochenmasse auf, *Cbfa1* wird aber nicht beeinflusst (290). *Lrp5* ist ein Säugerhomolog von Drosophila Protein Arrow, ein Korezeptor für Wntless (291). In vitro fungiert *Lrp5* als Korezeptor für Wnt-Proteine (292); weiters kann es in vitro Wnt-Proteine direkt binden (290). Diese Interaktion machen das ubiquitär exprimierte Protein *Lrp5* für die Skelettogenese interessant. Wnt-Proteine benützen die Lef/Tcf-Transkriptionsfaktorenfamilie, um ihre Funktionen auszuüben; eventuell binden *Lrp5*-Proteine an den Frizzled-Wnt-Rezeptorkomplex und regulieren so die OB-Proliferation und Genexpression *Cbfa1*-unabhängig, aber Lef/Tcf-abhängig. So scheint *Cbfa1* zwar essentiell für die OB-Differenzierung, nicht aber für die OB-Proliferation zu sein. {189}

Eine Knochenmarkszelle, welche nicht nur in mesenchymale Zelltypen, wie dem OB, Chondroblast, Adipozyt, differenziert, sondern auch in Zellen welche vom viszeralen mesodermalen Ursprung sind, wurde entdeckt. Bei dieser Zelle, Mesodermale Progenitor Zelle (MPC), findet man Zink-Finger assoziierte Transkriptionsfaktoren (TF), welche eine mögliche Rolle bei der Osteogenese spielen. Zudem sah man auch das eine Reihe von TF welche in der Hämatopoese aktiv sind ebenfalls in der frühen Knochenentwicklung aufreguliert werden. MPC könnten demnach nicht nur in OB und CDZ differenzieren sondern auch in Myoblasten, Endothelzell-, Neuroectodermalzell-, Endodermalzelllinien. (292a)

4.1.2.7. Osteoklasten

Das Skelett eines Erwachsenen wird an circa ein bis zwei Millionen mikroskopischen Seiten resorbiert. Der Abbau nimmt ungefähr drei Wochen in Anspruch, der Aufbau dauert drei bis vier Monate. Im jungen Menschen halten sich Ab- und Aufbau die Waage. Moduliert werden diese Vorgänge durch mechanische Belastungen, zentrale Faktoren und einen lokalen metabolischen Cocktail. Nach dem 40. Lebensjahr beginnt im Knochen der Abbau zu überwiegen; die Ursache hierfür ist nicht genau geklärt. Je 10% Verlust an Knochenmasse verdoppelt das Frakturrisiko (293). Für die Knochenhomöostase sind somit nicht nur CDZ und OB essentiell, sondern auch Zellen, welche die Matrix wieder degradieren können und so erst Remodelation ermöglichen. Jene Zellen, welche dies im Knochen bewerkstelligen, sind

Osteoklasten (OC). Es handelt sich um multinukleäre Zellen, welche die Fähigkeit haben, mineralisiertes Gewebe zu degradieren. Dieser Zelltyp erscheint als letzter bei der Knochenentwicklung, er stammt von der Monozyten/Makrophagenlinie ab (294). Während der Embryogenese versammeln sich mononukleäre Vorläuferzellen im Mesenchymgewebe, welches die Knochenvorlage umgibt. Dort teilen sie sich und differenzieren zu „tartrate resistant acid phosphatase“ (TRAP)-positiven Zellen, welche zusammen mit Endothelzellen durch die Knochenmanschette wandern. Sie treffen auf das mineralisierte Knorpelgewebe und versammeln sich im Diaphysenkern. Hier fusionieren sie zu reifen OC und bewirken in Folge die Entwicklung eines Markhohlraums. OC weisen ähnliche Oberflächenmoleküle wie Macrophagen auf, zusätzlich findet man jedoch Calcitonin-Rezeptoren und vermehrte Expression von TRAP und Vitronectin.

Die *Knochenresorption* beginnt mit der Adhäsion des OC an die Knochenmatrix. Es bildet sich eine Adhäsionszone, "sealing zone" genannt; die Adhäsionszone, ist reich an f-Actin und Matrix quervernetzenden Proteinen. Diese Zone begrenzt einen Teil des OC, der dem Knochen zugewandt ist und aufgrund der ausgefrachten OC-Membranoberfläche, als "ruffled border" bezeichnet wird. Durch die "Membranzotten" wird die Oberfläche des OC zum Knochen hin stark vergrößert; entlang diesem Membranabschnitt werden diverse ECM abbauenden Enzyme sekretiert, dadurch entsteht die Resorptionslakune - vergleichbar mit einem gigantischen Lysosom. Dieser Vorgang, Migration, Adhäsion und Resorption, wird wiederholt; wie der Resorptionsvorgang beendet wird ist nicht genau geklärt, es gibt Anzeichen dafür, dass zum Beispiel Östrogene und Biphosphonate die OC-Apoptose stimulieren können (295). Erfolgreiche Knochenresorption erfordert also eine Menge Umbauprozesse auf molekularer Ebene (zytoskelettaler Umbau, was zur Polarisation und Migration der Zelle führt; zusätzlich auch koordinierten intrazellulären vesikulären Transport), all dies involviert eine Vielzahl von Genen (296).

Die *Osteoklastogenese* wird durch Signale gesteuert, welche von verschiedenen Zellen wie OB, OZY und bone lining Zellen stammen (297,298). Diese sind wichtige Zielzellen von osteoclastogenen Wirkstoffen wie PTH und Vitamin D₃, welche den größten Teil ihrer Effekte über eine Erhöhung von **Rank Ligand (RANKL)** auslösen. Auch Zytokine wie IL-1 und TNF stimulieren die Expression von Makrophagen Kolonie Stimulierender Faktor (M-CSF) in Stromazellen, was durch Östrogen inhibiert wird (295). Zwei Moleküle sind somit für den Knochenabbau unentbehrlich, einmal M-CSF und der Aktivator von NF-κB, **RANKL**, auch bekannt als OPG-Ligand (OPGL), OC-Differenzierungsfaktor (ODF) und TRANCE. (189)

M-CSF ist für die Differenzierung und das Überleben von Makrophagen essentiell; dieser bindet an den Rezeptor c-Fms, welchen man auch auf OC-Vorläuferzellen findet. Somit ist dieser Faktor auch für Überleben und Proliferation der Vorläuferzellen verantwortlich. Belegt wurde dies mit Mäusen, die eine Inaktivierungsmutation von *M-CSF* tragen und an Osteopetrose leiden (256). Diese Mäuse haben keine reifen Makrophagen und auch keine OC; ihre Krankheit kann nicht mittels Knochenmarktransfusion geheilt werden, wogegen systemische Gabe von M-CSF eine Heilung bewirkt.

Der zweite Faktor RANKL wurde nach Identifikation seines Inhibitors **Osteoprotegerin (OPG)**, auch OCIF genannt, entdeckt. OPG ist ein „Lock“-Rezeptor und Inhibitor der OC Entwicklung; es handelt sich um ein lösliches TNF-Rezeptor-ähnliches Molekül, welches mit RANK um RANKL konkurriert. Transgene Mäuse mit erhöhten Werten an zirkulierendem OPG leiden an schwerer Osteopetrose. Hingegen ist Inaktivierung von OPG aufgrund einer erhöhten OC Zahl mit Osteoporose assoziiert (299). Bei einigen Mäusen konnten auch Gefäßverkalkungen beobachtet werden - eventuell ist OPG auch in den Calcium-Phosphat-Haushalt involviert. OPG wird in vielen Geweben exprimiert, seine Rolle ist also nicht nur skelettspezifisch; über seine anderen Funktionen ist aber noch wenig bekannt.

Auf der Suche nach dem Liganden der OPG-Expression fand man mit **RANKL** jenen Faktor, durch den OB/Stromazellen die OC-Formation und Knochenresorption steuern (300). Dieses Molekül war ident mit dem TNF-verwandten Protein TRANCE und nahe verwandt mit dem Apoptose induzierenden TRAIL/Apo2L Protein (301). RANKL wird in Präosteoblasten, OB, welche die Knorpelanlage umgeben, und den OC selbst, produziert (302-304). RANKL-Verabreichung führt zur vermehrten Knochenresorption bei Mäusen (305), wogegen RANKL-defiziente Mäuse Osteopetrose und keine OC aufweisen; ihnen fehlen auch Lymphknoten, und sie weisen Defekte in der Thymusdifferenzierung auf (306). Somit ist RANKL in vivo für die T-Zellendifferenzierung und die OC-Entwicklung essentiell. RANKL existiert nicht nur als lösliches Molekül im Knochenmicroenvironment, sondern es wird auch von T-Zellen und anderen Immunzellen synthetisiert (302). Dies könnte eine Erklärung sein, wieso eine T-Zellaktivierung mit Knochenabbau und OC-Erhöhung einhergeht. Auch findet man bei den meisten Autoimmunerkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis erhöhte RANKL-Werte (306). Zusammen mit M-CSF induziert RANKL, ohne jede weitere Zellinteraktion, die OC-Differenzierung aus Vorläuferzellen der Milz und des Knochenmarks. In vitro kann RANKL durch $TNF\alpha$ ersetzt werden; ob dies auch für in vivo gilt, ist fraglich. {189}. RANKL bindet an RANK, ein weitläufig exprimierter Rezeptor, den man auf Dendritischen Zellen, CDZ, OC

und deren Vorläuferzellen findet (307). RANK wird durch M-CSF aufreguliert (308). Wie OPG hemmt auch die rekombinante lösliche Form von RANK die OC-Entwicklung, Antikörper gegen RANK fördern die OC-Formation (307). RANK null Mäuse leiden an Osteopetrose, haben dysplastische Knorpel, Defekte in der Wachstumsplatte und besitzen keine Lymphknoten. T-Zellen und Dentritische Zellen sind aber in normaler Anzahl vorhanden (309). Außerdem weisen transgene Mäuse mit einer Erhöhung der OPG-Expression oder einem Verlust von RANK/RANKL eine extrem verdünnte Kortikalis auf, ein Hinweis auf die Bedeutung dieser Moleküle bei der kortikalen Knochenformation (306,309). {189}

Downstream von RANK/RANKL könnten an der Signaltransduktion einige TNF-Rezeptor-assoziierte Faktoren (TRAFs) beteiligt sein, da diese an die zytoplasmatische Domäne von RANK binden können (310). In OC-Vorläuferzellen aktiviert TRAF6 nach der Bindung an RANK den NF- κ B und JNK/AP-1-Pathway, zwei wichtige Transkriptionsfaktoren-Komplexe, die in die OC-Genese involviert sind. {189}

So sind bei der Zellproliferation und -differenzierung Mitglieder der AP-1-Transkriptionsfaktorenfamilie involviert; dieser Transkriptionsfaktor gehört zu einem der ersten, welche beim Säuger entdeckt wurde. Der AP-1 Transkriptionsfaktorkomplex ist aus verschiedenen Proteinen, wie der Fos- (c-Fos, FosB, Δ FosB, Fra1, und Fra2), der ATF- (ATF2, LRF1/ATF3, B-ATF, JDP1, JDP2), der MAF- (c-MAF, MafB, MafA MafG/F/K, Nrl) und der Jun-Proteinfamilie (cJun, JunB und JunD) zusammengesetzt und enthält TPA- und CRE erkennende Elemente. Nicht alle Fos Mitglieder enthalten eine Trans-Aktivierungsdomäne; Proteine der Fos-Familie können nur mit Jun-Partnern Heterodimere bilden, Jun verwandte Proteinen können sowohl Homodimere, als auch Heterodimere Proteinkomplexe formen. (310b)

ATF 4 könnte an der Entstehung des Coffin-Lowry Syndrome beteiligt sein. RSK2, eine Wachstumsfaktor abhängige ribosomale Serine/Threonin Kinase, phosphoryliert ATF4 unter Mithilfe von Runx2. Diese Vorgang scheint noch durch andere Pathways moduliert zu werden, denn -/- RSK2 Mäuse haben nicht so schwere Defekte wie -/- ATF4 Mäuse. RSK2 ist in der Lage andere Leucin Zipper Proteine, wie CREB, cFos und OSE1 zu phosphorylieren. Es vermehren sich die Hinweise, dass ATF4 OSE1 ist. Es scheint, als wären zwei große Pathways für die OB Entwicklung und Funktion notwendig. Einmal in der früher Differenzierungsphase (Runx, Osterix, ...) aus Osteoprogenitorzellen, danach für die Funktion der OB (ATF4, LRP, ...). (310c)

AP-1 kontrolliert wichtige Schritte der Zelle wie Differenzierung, Proliferation, Apoptose (wichtig bei Organogenese, beim Immunsystem und der onkogenen Transformation), Wundregeneration und Onkogene Transformation. Aufreguliert wird dieser Faktor durch verschiedene Stimuli (GH, Zytokine, Neurotransmitter, Polypeptide, Zell-Matrix Interaktionen, Bakterien, Viren, physikalischen- und chemischen Streß), Überträger dieser Signale sind verschiedene konservierte Signal-Kaskaden - MAPK (ERK, JNKs, p38). Die Regulation dieses wichtigen Transkriptionsfaktors erfolgt aber nicht nur auf der Ebene der Transkription, sondern auch bei dem postrationalen Processing, dem Protein Turnover und der Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren. Ap-1 ist nicht als starres Makromolekül zu sehen, je nach Anforderungen ändert sich die Zusammensetzung und somit auch die Konzentration der einzelnen Bausteine, erst so ist es diesem Transkriptionsfaktor möglich so vielfältige Funktionen zu besetzen. AP-1 fungiert hauptsächlich als Aktivator, wobei er auch repressorische Funktion ausüben kann, wahrscheinlich mittels Interaktionen mit Repressoren. Es mehren sich die Hinweise, dass c-Jun und JunB als Gegenspieler fungieren, wobei dies vom Zelltyp und auch von der Anwesenheit des Gegenpartners abhängt. c-Jun scheint eine wichtige Rolle bei der Proliferation zu haben, ähnlich wie JunD, nur stärker ausgeprägt. Die Liste der Funktion der einzelnen Bausteine wird mit jeder Woche länger und ist bei weitem noch nicht vollständig. (310b)

Interessanterweise besitzen verschiedene Gene, welche in der OB-Genese und Adipogenese eine Rolle spielen, AP-1-Bindungsdomänen. Einige Komponenten des AP-1 Komplexes scheinen nicht essentiell für seine Funktion zu sein, c-Jun, JunB und Fra-1 sind aber unabhömmlich. c-Fos zum Beispiel, scheint notwendig für die enchondrale Ossifizierung, nicht aber für die OB Differenzierung zu sein. Viele systemische Hormone wie PTH, D₃ und TGF β stimulieren die AP-1 Expression im OB, alles potente Regulatoren der Differenzierung und Proliferation dieses Zelltyps. (310a)

In den Knochenzellen übt dieser Komplex verschiedene Funktion aus, einerseits am OB als auch am OC, wobei sich seine Zusammensetzung ändert. (310a)

Während der OB Reifung werden Fos und Jun vermehrt expremiert, später während der Funktionsphase sind sie hinab reguliert, Fra-2 und JunD werden in dieser Phase vermehrt expremiert. Fra-1 Überexpression im OB und anderen Zellen resultiert in einem osteosklerotischem Phänotypen mit vermehrter Knochenmasse. C-Fos Überexpression in embryonalen Stammzellen führt zur Ausbildung von chondrogenen Tumoren, ein Hinweis auf eine Bedeutung in der Chondrogenese. Δ FosB ist eine natürliche, durch alternatives Splicen

des FosB-Transkripts auftretende, verkürzte Form. Bei Überexpression von Δ FosB kommt es durch die Bildung von $\Delta_2\Delta$ FosB-Heterodimeren, vorwiegend mit JunD, zur vermehrter Knochenapposition und schließlich zur Osteosklerose; zudem wird die Adipogenese, in vivo als auch in vitro, gehemmt. Frühe Marker der Adipogenese sind herab reguliert; es könnte sein, dass Δ FosB auf Transkriptionsebene die Osteoblastogenese in einem sehr frühen Stadium auf Kosten der Adipogenese reguliert. Die Knochenresorption wurde bei transgenen Mäusen, welche Δ FosB überexprimieren, nicht beeinflusst. $\Delta_2\Delta$ FosB besitzt keine bekannten Transaktivierungs- oder Repressionsdomänen, wohl aber die Fos homologe Domäne FHD. Eventuell reguliert $\Delta_2\Delta$ FosB über den Jun-Partner oder hemmt andere AP-1 Komplexe durch kompetitive Bindung an Co-Aktivatoren. {311}

RANK-Mutanten, denen die TRAF6-Bindungsdomäne entfernt wurde, konnten weiterhin JNK/AP-1, nicht aber NF- κ B aktivieren; dominant negative TRAFs-Formen bewirken eine Inhibition der RANK-vermittelten NF- κ B Aktivität (302). Es scheint, als wären TRAFs für die NF- κ B-Aktivierung in RANKL-vermittelter OC-Differenzierung notwendig. Den Nachweis erbrachte man mit TRAF6 null Mäusen; sie zeigen Osteopetrose und funktionsunfähige OC (312,313). Weiters konnte gezeigt werden, dass RANK die Anti-Apoptose Akt/PKB-Kinase durch einen c-Src- und TRAF6-involvierenden Signalkomplex aktiviert (300). Fehlen von c-Src führt zu einer Hemmung der RANKL abhängigen Akt Aktivierung, was zu funktionsunfähigen OC und letztendlich zur Osteopetrose führt. Diese Quervernetzungen zwischen TRAF6 und c-Src sind weiterer Bausteine in der RANK-abhängigen Regulation der OC-Aktivität. Inwieweit noch andere Moleküle interagieren bleibt abzuklären. Der OPG-RANKL-RANK-Pathway ist somit essentiell in der OC-Differenzierung und der Skelettogenese. Eine Hemmung dieses Pathways durch von T-Zellen produziertes INF- γ , welches zu einer TRAF6-Degradation führt, konnte gezeigt werden. Es resultiert eine starke Hemmung der JNK- und NF- κ B-Aktivierung. Somit besteht eine negative Feedbackschleife zwischen der T-Zell-Aktivierung und der Knochenresorption (314). Auch der INF- β -Signalweg antagonisiert die RANK-abhängige Signalkaskade. {189}

PU.1 ist einer der wenigen bekannten Transkriptionsfaktoren, die sehr früh in der Monozyten/Makrophagenlinie regulierend wirken. PU.1 null Mäuse haben keine OC, keine Makrophagen und leiden an Osteopetrose. PU.1 ist essentiell in der Lymphoid/Myeloid-Differenzierung (315); man nimmt an, dass er die Transkription vom M-CSF-Rezeptor c-Fms

reguliert - eine Downregulation dieses Faktors könnte den osteopetrotischen Phänotyp erklären. {189}

AP-1 und NF- κ B, zwei wichtige Transkriptionsfaktorkomplexe, welche in eine Menge von Entwicklungsschritten der Zelle involviert sind, werden wie erwähnt durch M-CSF und RANKL aktiviert. Interessanterweise beeinflussen viele Nebenprodukte dieser Pathways die OC sehr spezifisch. Mäuse ohne AP-1 Komponente c-Fos haben keine OC und leiden an Osteopetrose, besitzen jedoch eine erhöhte Makrophagenzahl im Knochenmark. Mittels Knochenmarkstransplantation oder Expression des c-Fos-Transgens kann dieser Phänotyp geheilt werden (316), zu erwähnen wäre, dass die Wirkung von Fos Protein durch andere Komponente wie Fra-1 ersetzt werden kann. Dies legt den Schluss nahe, dass c-Fos eine wichtige Rolle in Form einer Weichenstellung der Makrophagen/OC-Differenzierung zukommt. Nicht genau bekannt ist, ob dieser Faktor für die Aufrechterhaltung des Differenzierungsstatus der OC benötigt wird, wie es den Anschein hat (317). Genetisch gesehen agiert c-Fos bei der OC-Differenzierung downstream von PU.1, jedoch aktiviert c-Fos auch andere Pathways wie Interferon β , welches wiederum negativ die OC-Genese kontrolliert (314). Die RANKL induzierte c-Fos-Expression bewirkt somit die eigene Hemmung, ein Autoregulationsmechanismus, der die Knochenhomöostase gewährleistet. {189}

Zur Zeit sind einige Gene in der OC-Linie bekannt, welche downstream von c-Fos aktiv sind, so *fra-1* (318); es scheint aber nicht für die OC-Genese notwendig zu sein; Fra-2, ein weiteres Fos-verwandtes Protein, welches in der OC-Linie exprimiert wird, scheint demgegenüber bei der OC-Differenzierung eine Rolle zu spielen. {189}

Zwei weitere Komponenten des NF- κ B-Transkriptionsfaktorkomplexes, p50 und p52, scheinen ebenso in die OC-Differenzierung involviert zu sein. Deletionen dieser Faktoren führen zu einem osteopetroseähnlichen Phänotyp, dem von c-Fos sehr ähnlich. Auch dieses Krankheitsbild ist durch Knochenmarkstransplantation heilbar (319). {189}

Der letzte Transkriptionsfaktor, welcher zurzeit in der OC-Biologie bedeutungsvoll erscheint, ist das *microphthalmia*-Genprodukt **Mitf** (320). Mäusemutanten weisen verschiedene Pigmentierungsstörungen, Mastzelldefekte und Osteopetrose auf. Die OC sind mononukleär, somit unreif und funktionslos. Mitf und TFE3, zwei verwandte helix-loop-helix Proteine, werden in OC exprimiert und sind durch MAPK/ERK-medierte Phosphorylierung und Rekrutierung von p300/CBP mit dem M-CSF-Pathway gekoppelt (321). Diese Faktoren

agieren downstream der vorher genannten; inwieweit sie noch mit anderen Faktoren kooperieren, bleibt abzuklären. {189}

Eine Reihe anderer Moleküle sind für die *OC-Funktion*, nicht aber für die Differenzierung notwendig, so z.B. c-Src, Cathepsin K, Karbonanhydratase II, TRAP, β 3 Integrin und verschiedene Ionen-Kanal-Proteine, welche, wenn sie in der Maus ausgeschaltet oder im Menschen verändert werden, zu Osteopetrose führen. {189}

Es wurde lange Zeit angenommen, dass *Knochenanbau* und *Resorption* sich gegenseitig regulieren und so die Knochenhomöostase aufrechterhalten wird. Als Hardware-Link wurden mechanische und chemische Signale angenommen. Durch verschiedene in vivo- und vitro-Beobachtungen muss diese Anschauung allerdings revidiert werden. Da oben genannte Moleküle nicht OB-spezifisch sind, ist die Regulation komplexer als nur eine einfache Zell-Zell-Interaktion im Knochen. Es scheint zwischen Anbau und Abbau keinen direkten Link zu geben; ob Progenitorzellen diese Funktion übernehmen, ist nicht geklärt. Wie es scheint, bestehen Links auf Ebene der Differenzierung, nicht aber auf der Funktionsebene. Wie der Knochen es aber schafft, seine Masse aufrecht zu erhalten, ist fraglich; ob über systemische oder lokale Faktoren, bleibt abzuklären. Eventuell funktioniert der Steuerungsmechanismus ähnlich wie bei Appetitregulation und Fettdeposition. (322)

All diese Erkenntnisse fließen in die *Pharmathherapie* der Osteoporose und anderen Knochenerkrankungen ein. Sekundäre Osteoporose kann durch verschiedene Faktoren zustande kommen, etwa durch Kortisongabe, welches die OB-Aktivität hemmt. Bei der Paget-Erkrankung fand man in OC virale Bestandteile der Paramyxofamilie, zu der man Vertreter wie die human pathogenen Masern- und Respiratorische Syncytial-Viren zählt. Eventuell kommt es aufgrund einer genetischen Prädisposition nach Infektion mit diesen Viren als Manifestationsfaktor zu erhöhtem Knochenum- und -abbau. Durch verschiedene Aktivierungsmutationen konnte erhöhte OC-Funktion nachgewiesen werden. Tumorzellen haben verschiedene Mechanismen entwickelt, um im Knochen Metastasen zu setzen. So produzieren Mamakarzinome verschiedene Zytokine wie PTHrP, IL-6, IL-11 und COX-2-generierte PGE, welche teilweise über OB und/oder Stromazellen wiederum RANKL generieren und so die OC-Genese starten. Es konnten auch IL entdeckt werden, welche die OC-Genese hemmen. Die Therapie der Knochenerkrankungen kann unter diesen Betrachtungen von verschiedenen Punkten aus gestartet werden. (293)

Zurzeit werden bei gesteigertem Knochenabbau **Östrogen** und selektive **Östrogen-Rezeptor-Modulatoren (SERM)** verabreicht, hauptsächlich synthetisches humanes 17β

Östradiol, welches mittels Pflaster transkutan appliziert wird. Zusammen mit Progesteron gegeben, wird das Risiko eines Unterleibskarzinoms verringert, ebenso das für Brustkarzinome. Östrogene vermindern den Knochenabbau, sind aber nicht in der Lage, Knochen wieder aufzubauen. Bei der Östrogentherapie treten gehäuft thromboembolische Komplikationen auf; demgegenüber sind sie kardiovaskulär protektiv, außerdem wirken sie sich positiv auf die Haut und den Genitalbereich aus. Nutzen und Risiko müssen bei der Therapie abgeschätzt werden. Zwei **Östrogenrezeptoren (ER)** konnten nachgewiesen werden, ER α und ER β , wobei der Alpharezeptor für die meisten Effekte verantwortlich sein dürfte. Der erste SERM war Tamoxifen, ein Medikament, welches Knochenabbau verhindern kann. Tamoxifen bindet mit hoher Affinität an den ER. Raloxifene wirkt als ER-Agonist im Knochen, aber als Antagonist in Uterus und Brust. Diese unterschiedliche Wirkung kommt durch Regulatorproteine zustande, welche sich in den jeweiligen Organen befinden und den ER/SER-Komplex modulieren. Klinische Studien zeigen, dass Raloxifen bei postmenopausalen Frauen das vertebrale Frakturrisiko um bis zu 40% senkt, obwohl die Knochenmasse nur um 3-4% steigt (323); auch die Brustkrebsrate konnte gesenkt werden. Andere nukleäre Rezeptormodulatoren könnten die Probleme von Androgenen lösen. (293)

Biphosphonate (BP) sind zurzeit die effektivsten Hemmer der Knochenresorption; ihre Wirkung ist unabhängig von der Ätiologie des Knochenabbaus. BP werden von OC aufgenommen und hemmen ein Enzym im Mevalonat-Pathway bei der Cholesterolsynthese. In weiterer Folge werden OC deaktiviert und vermutlich deren Apoptose eingeleitet. Sie dienen der Prävention knochenabbauender Prozesse, da ein "Aufforsten" verlorengegangenen Knochens ebenfalls nicht möglich ist. (293)

Calcitonin stoppt Knochenabbau durch Hemmung der OC-Aktivität. Seine physiologische Rolle könnte darin liegen, dass es zu Zeiten hohen Ca-Turnovers (Schwangerschaft, Mahlzeiten, Wachstum, Laktation) regulativ eingreift. Da es bei Verabreichung zu einer Downregulation von Calcitoninrezeptoren kommt, ist der therapeutische Nutzen sehr eingeschränkt. (293)

Zur Calcitoninfamilie (Polypeptidhormone) gehören CGRP, Adrenomedullin, Intermedin, CALCR stimulierende Hormone und Amylin (Kahn 90). Amylin scheint die Knochenresorption zu hemmen. Die Funktion von OC wird nicht beeinflusst, vielmehr hemmt Amylin die Differenzierung von Trap + mononuclearen Zellen zu Trap + polynuclearen Zellen. Bei Amylin -/- Mäusen ist die Resorption der Compacta, sowie der Spongiosa betroffen, ein Punkt, der für die Osteoporose Forschung interessant sein könnte. Dies könnte

auch eine Erklärung sein, wieso Patienten mit DM I erniedrigte Knochenmasse haben (Amylin ist vermindert). Amylin scheint nicht Nahrungsaufnahme, Körpergewicht und Glucosestoffwechsel zu regulieren. Der Calcitonin Rezeptor (Calcr) ist nicht in diese Funktion involviert, Calcr +/- Mäuse haben vermehrte Knochenmasse. Somit übt Amylin diese Funktion über einen unbekanntem Rezeptor aus. (292b)

Neue Ziele in der Pharmatherapie beruhen auf den Erkenntnissen der molekularen Abläufe im Knochenmetabolismus. Im Tiermodell senken OPG-Injektionen das Ausmaß tumorinduzierter Hyperkalzämie und hemmen den Knochenabbau bei oophorektomierten Ratten (324). Ebenfalls gehemmt wird die periartikuläre Knochendestruktion bei Mäusen, die an Coll-induzierter Arthritis leiden (325). Auch Schmerz wird positiv beeinflusst (326). (293)

Ein spezifisches Merkmal der OC ist der $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Rezeptor. Verabreichung von Disintegrinen wie Echistatin und Kistrin an Ratten, welche mit hoher Affinität an diesen Rezeptor binden, verhindern den Knochenabbau, der durch PTH oder Östrogenmangel ausgelöst wurde (327). Kleinere Moleküle, welche das RGD-Motiv enthalten, zeigten dieselben Effekte. (293)

Bafilomycin, ein Hemmer der H-ATPase, verhindert OC-Knochenresorption in vivo und in vitro (328). Die H-ATPase zeigt im OC eine einzigartige 116kDa-Subunit, welche ein spezifisches Ziel der sonst ubiquitär vorkommenden konservierten ATPase darstellen könnte (323,325). (293)

Auch PTH kann bei kurzfristiger Gabe Knochenanbau positiv beeinflussen (329). Hierbei besteht nur ein kurzer Peak, es ist also die intermittierende Verabreichung erforderlich - dann werden OB schneller als OC aktiviert (304). Eine konstante Erhöhung von PTH führt schließlich auch zur OC-Formation. (293)

Derzeit steht eine Reihe anderer Medikamente in Erprobung; das pharmakologische Spektrum wird durch immer bessere Einsichten im Knochenmetabolismus zunehmend erweitert.

4.2 ... in Bezug auf bedeutende Zytokine im Knochenmetabolismus

Das Zusammenspiel der verschiedenen Liganden mit Zelle und ECM ist äußerst komplex. Ein großer Teil der Interaktionen wurde bereits beschrieben, hier sollen einerseits neue Erkenntnisse nochmals verdeutlicht werden; andererseits werden jene Zytokine, welche den Knochenmetabolismus entscheidend beeinflussen, kurz zusammengefasst.

4.2.1. TGF- β

Eine Reihe von Molekülen, welche wichtige Funktionen während der Entwicklung von Invertebraten und Vertebraten steuern, gehören zu der **TGF- β Superfamilie (T β S)**; sie spielen auch bei der Aufrechterhaltung verschiedener homöostatischer Prozesse eine wichtige Rolle. 28 Gene der T β S sind zurzeit bekannt (330), inklusive der TGF- β -Isoformen, Activine und BMPs. Diese Moleküle weisen proliferative als auch antiproliferative Effekte auf; das Spektrum reicht noch weiter, zahlreiche Wachstumshormone werden von T β S moduliert, weiters steuern sie die Expression zahlreicher Zelladhäsionsmoleküle und ECM-Komponenten. T β S-Moleküle weisen einen konservierten Bauplan auf.

Das Precursor-molekül (Präsequenz) besteht aus einem N-terminalen Signalpeptid, welches das Molekül in den sekretorischen Pathway entriert (331), einer Prodomäne, die eine Rolle bei der Faltung, Aktivität und Dimerisation spielt (331) und der eigentlichen Proteindomäne. Die Proteindomäne weist eine charakteristische Struktur auf: vier antiparallele β -Schleifen und drei Disulfidverbindungen, welche Zystein-Knots bilden. Die Zystein-Knot-Domäne ist besonders resistent gegenüber denaturierenden Einflüssen und dürfte somit extrazellulär verschiedene wichtige Funktionen erfüllen. Eine weitere Disulfidverbindung verbindet zwei Monomere zu einem TGF- β Dimermolekül, wobei auch die Bildung von Heteromeren möglich ist, was wiederum die funktionelle Diversität erhöht. {332}

TGFs- β sind dimere Zytokine, proteolytisch entstanden aus einem intrazellulären großen Protein (333). Einmal gespalten, verbleibt das TGF- β -Propeptid, auch latency associated peptide (LAP) genannt, nicht kovalent an reifes TGF- β gebunden (334). Dieser Komplex wird als kleiner latenter Komplex bezeichnet und ist inaktiv- die Dissoziation von TGF- β ist für die Funktion des Proteins entscheidend; LAP ist in der Lage, TGF- β zu hemmen (335). Die Freisetzung und Aktivierung wird durch Abtrennen von LAP, zum Beispiel durch Cathepsin oder Plasmin, erreicht (336,337); auch reicht hierfür bereits eine Konformationsänderung von LAP aus, zum Beispiel hervorgerufen durch Thrombospondin {338}. Nach der Sekretion des Moleküls kommt es extrazellulär zur Bindung an **latent-TGF- β -binding-proteins (LTBP)**, und der sogenannte große latente Komplex wird gebildet (339). LTBP 1-4 sind Matrixmoleküle bestehend aus multiplen **Epidermal growth Factor (EGF)**-ähnlichen Domänen und vier Domänen mit acht Zystinen, welche charakteristisch für LTBPs sind (334); sie binden kovalent an TGF- β (334). Alle drei TGF- β -Isoformen binden an LTBP 1,3,4. LTBP erfüllen zwei Funktionen - einmal als Bestandteile der ECM, andererseits sind sie Regulatoren der TGF- β -Aktivität (334). {258}

Man unterscheidet drei *TGF-β-Rezeptoren* (*TβI*, *TβII*, *TβIII*). Zwei davon, *TβI* und *TβII*, sind transmembrane Serin/Threonin-Kinasen, der dritte Rezeptor, auch als β-Glykan bekannt, ist ein Zelloberflächen-Proteoglykan und moduliert die Aktivität von freiem TGF-β. Durch alternatives Splicen wird die Heterogenität der Rezeptoren erhöht. Sowohl bei *Drosophila* als auch bei Säugern entscheiden diese Proteine das Schicksal von Zellen bei der dorsoventralen Musterbildung. {332}

Domänen des Typ I Rezeptormoleküls dürften für spezifische downstream-Signale verantwortlich sein. Liganden, Rezeptoren und intrazelluläre Effektoren finden sich bei vielen Eukaryonten (340,341). {342}

Bei der *Regulation der TGF-β-Signaltransduktion* spielen Smads eine wichtige Rolle. Smads sind die zur Zeit einzigen Substrate des Typ I Rezeptors, erstmal bei *Drosophila* (*Mad*) und *Caenorhabditis elegans* (*Sma*) entdeckt (340,341) {342}. Smads weisen drei unterschiedliche Domänen auf. Zwei konservierte, die **N-terminale Mad Homologe Domäne 1 (MH1)**, die C-terminale Mad Homologe Domäne 2 (MH2), sowie die prolinreiche Linkerdomäne, welche bei den einzelnen Familien nicht konserviert ist {338}. Smads werden während der Entwicklung und im erwachsenen Organismus ubiquitär exprimiert (343,344). Viele von ihnen entstehen durch alternatives Splicen; funktionell gliedern sich Smads in drei Klassen, R-: [1, 2, 3, 5, 8], welche wie oben erwähnt vom Typ I-Rezeptor phosphoryliert werden; Co-: [4], welche mit R-Smads Oligomere bilden, sowie I-Smads: [6, 7]. Die MH1-Domäne der I-Smads zeigt wenig Homologien zu R- und Co-Smads, sie reguliert den nukleären Import, die DNA-Bindung und die Interaktion mit anderen nukleären Proteinen. MH2 ist in allen Smads konserviert, sie reguliert die Smad-Oligomerisation und Erkennung des Typ I-Rezeptors und interagiert mit diversen zytoplasmatischen Adaptoren sowie mit Transkriptionsfaktoren {342}. Es zeigte sich, dass Rezeptoren und Smads mit vielen anderen Proteinen assoziiert sind. So bindet zum Beispiel **SARA** (Smad anchor for Rezeptor aktivation), ein zytoplasmatisches Protein, an nicht aktives Smad 2 und den Rezeptor. Diese Brücke begünstigt die Aktivierung von Smad 2 und verhindert die nukleäre Translokation des inaktiven Moleküls. (345,346). SARA ist ein Beispiel dafür wie ein Pathway mittels Hardwarekomponenten an die Plasmamembran gebunden und gesteuert wird. Auch Mikrotubuli können Smads binden und tragen somit zur Modulation dieser Signale bei (347); ein anderes Beispiel wäre Caveolin 1, welches mit dem Typ I-Rezeptor interagiert und den Rezeptorkomplex in Caveolen organisiert (348). {342}

TGF- β und die Activin-Rezeptoren phosphorylieren Smad 2 und 3, der BMP-Rezeptor phosphoryliert Smad 1, 5, und 8 (349), es kommt zur Oligomerisation mit Smad 4. Auch andere Kinasen sind in der Lage, Smads zu phosphorylieren, so zum Beispiel Erk, MAP, CamKII-Kinasen, was die Biopotenz dieser Signalmoleküle erhöht (350-352). Ob Co-Smads ebenfalls in Säugern phosphoryliert werden, ist unklar, bei anderen Spezies konnte dies nachgewiesen werden (353). I-Smads werden von zurzeit noch unbekanntem Kinasen phosphoryliert und in ihrer Aktivität moduliert (354,355). Erst durch die Phosphorylierung interagieren Smads miteinander; zuerst bilden R-Smads Homooligomere, dann erst folgt die Heterooligomerisierung mit Co-Smads (356,357). Somit induziert die Phosphorylierung die darauffolgende Multimerbildung und ein komplexes Signalnetzwerk. Wahrscheinlich können unphosphorylierte Smads aufgrund der MH1- und MH2-Domäne nicht miteinander Komplexe bilden (358,359). Alle Smads zeigen transkriptionelle Aktivität (360,361), wobei R-Co-Smadkomplexe die bedeutendsten sind; manche binden an Smad binding Elements (SBEs) (362). {342}

Ein anderer Pathway im TGF- β -Signaling ist der **TGF- β -activated kinase 1 (TAK1)**-Signalweg, welcher unabhängig von Smads agiert. Auch werden andere Transkriptionsfaktoren beeinflusst (363,364). Vieles ist noch unbekannt; so wurde ein neuartiges DNA-Bindungsmotiv in der MH1-Domäne von Smad3 entdeckt, das β -hairpin, welches sich sonst nur noch im bovinen Immundefizienzvirus, dem Protein Tat, findet (365). {338}

Eine Vielzahl von hereditären und spontanen *humanen Erkrankungen* ist mit Störungen der TBS in Verbindung gebracht worden; so treten zum Beispiel bei Mutationen im Rezeptor hämorrhagische Telangiectasie (Osler-Weber-Rendu-Syndrom), primäre pulmonale Hypertonie, persistierender Müller'scher Gang und das Lynch-Syndrom auf. (342). Mutationen in TGF- β -Signaling finden sich bei einer Reihe von Tumoren wie dem Pankreaskarzinom, der familiären juvenilen Polyposis, bei Brusttumoren, bei Lungen- und Kolonkarzinomen. Meist sind Punktmutationen, welche zu frameshift-Verschiebungen und Deletionen führen, verantwortlich (366-371). {338}

Die Wirkung von Zytokinen, so auch die von TGF- β , ist nicht immer von in vitro auf in vivo umlegbar. Die isolierte Betrachtungsweise im Labor lässt das komplexe Netzwerk, in dem sich Zellen im lebenden Organismus befinden, zum Teil außer acht. Autokrine, parakrine und endokrine Wirkung von Zytokinen können bei in vitro-Modellen nur schwer nachgeahmt werden, wobei aber erst häufig der richtige „Cocktail“ aus diversen Molekülen und Zellen,

Effekte induziert. Die Mäusegenetik half, diesen Nachteil auszugleichen, wobei die Etablierung eines aussagekräftigen Phänotyps ebenfalls mit zahlreichen Problemen assoziiert ist. Eine Studie, bei der man entdeckte, dass die Wirkung von TGF- β auf Chondrozyten von einem Faktor abhängig ist, der von perichondralen Zellen gebildet wird, zeigt, wie man in vitro immer mehr auf komplexere Zellsysteme setzt, um in vivo ablaufende Prozesse bestmöglich zu imitieren.

Ob es sich hier um einen linearen Effekt, (TGF- β übt seine Wirkung über einen unbekanntem Faktor) oder einen parallelen Effekt (erst mit dem unbekanntem Faktor zusammen wird die biologische Wirkung erzielt) handelt, ist noch nicht bekannt. Inwieweit hier Zell-Zell- und/oder Zell-Matrix-Kontakte eine Rolle spielen, ist ebenfalls noch nicht geklärt. {372}

Es konnte gezeigt werden, dass TGF- β 1, in Anwesenheit von perichondralen Zellen, das longitudinale Knochenwachstum vermindert. Auch nahm die hypertrophe CDZ-Zone ab, weiters zeigte sich, dass die Wirkung dosisabhängig ist. In Abwesenheit der perichondralen Zellen zeigte sich dieses Verhalten nicht, strukturell morphologische Veränderungen konnten aber trotzdem beobachtet werden. Die Gewebsisotropie nahm ab, Grenzen zwischen den einzelnen Zellzonen im Knorpel verschwammen (hypertrophe Zone, Proliferationszone, ...). TGF- β ist ein Faktor, der in vivo die CDZ-Hypertrophiedifferenzierung hemmt; außerdem konnte gezeigt werden, dass dieser Faktor upstream von PTHrP agiert. Letztgenanntes Protein ist für die Wirkung von TGF- β 1 in der terminalen CDZ-Differenzierung essentiell. Da PTHrP im Perichondrium exprimiert wird, unterstützt dies die Hypothese der Notwendigkeit von der Interaktion dieser Gewebe (373). Das Markermolekül, Coll X, wurde in perichondriumfreien Kulturen durch TGF- β 1-Gabe nicht beeinflusst, wohl aber in Normalkulturen. Das Perichondrium reguliert somit negativ die CDZ-Differenzierung und -proliferation mit Hilfe von TGF- β 1 und eines unbekanntem Liganden, wobei die Wirkung auf die Differenzierung zusätzlich vom PTHR abhängig zu sein scheint; die CDZ-Proliferation beeinflusst dies aber nicht. Da PTHrP durch Ihh reguliert wird, könnte dieser Pathway in der Differenzierung miteingeschaltet sein (234). Auch BMP-7 benötigt das Perichondrium, um seine Effekte am CDZ auszuüben (374), wobei es PTHrP unabhängig agiert, was auf verschiedene Regulationsvorgänge schließen lässt. {372}

Wie wichtig die assoziierten Moleküle im TGF- β -Signalweg sind, zeigt ein Knockout-Modell. Bei LTBP-3 null Mäusen beobachtet man Knochenanomalien, welche durch prämatüre Ossifikationen, vermehrter Akkumulation von trabekulärem Knochen in Wirbeln und langen Röhrenknochen sowie altersabhängige Degeneration der Gelenkknorpel gekennzeichnet sind.

Weiters zeigt sich bei der histomorphometrischen Untersuchung des Knochens, dass die Wachstumssäulen bei den Ltbp-3 null Mäusen ungeordnet sind, die hCDZ-Zone ist weiter. Coll X, ein Marker der hCDZ, ist nicht wie bei Wildtypmäusen auf die Enden der Synchronrose beschränkt, sondern ist über die ganze Synchronrose verstreut. Coll II, ein Marker der nicht-hCDZ, zeigt sich normalerweise in der Mitte der Synchronrose; bei den Mutanten fehlte dieser Marker vollständig, und die Distanz der kortikalen Fronten war vermindert. Ähnliches beobachtet man bei PTH/PTHrP-Rezeptor ausgeknockten Tieren (375). Es wird angenommen, dass die CDZ-Differenzierung durch ein negatives Feedback reguliert wird. Ihh, welches durch phCDZ und hCDZ sekretiert wird, stimuliert die Produktion von PTHrP durch periartikuläre und perichondrale Zellen, PTHrP wiederum hemmt die hCDZ-Differenzierung durch Interaktion des Liganden am phCDZ-Rezeptor (234,235). In den mutanten Mäusen wird Ihh nicht nur in phCDZ und im frühen hCDZ exprimiert; das Expressionsmuster ist weiter ausgedehnt, sodass CDZ in der zentralen Region der Synchronrose zur Hypertrophie befähigt zu sein scheinen. Dies könnte zu der schnelleren Differenzierung und somit gesteigerten Ossifikation beitragen. Da in vitro nachgewiesen wurde, dass TGF- β PTHrP-Expression fördert (373), könnte in LTBP- 3 null Mäusen das verminderte Angebot von TGF- β für den Ausfall der Hemmung und somit verstärkten CDZ-Hypertrophie verantwortlich sein. Die Verminderung des PTHrP, die mit der erweiterten Ihh-Expression zusammenfällt, lassen vermuten, dass TGF- β vor der PTHrP-Induktion und nach Ihh Expression agiert. Interessanterweise führen Mutationen in LAP zu Sklerose und Hyperostose, als Camurati-Engelmann-Syndrom bekannt (375). Hingegen zeigen transgene Mäuse, welche TGF- β 2 in OB überexpressieren, Osteoporose (257). {258}

Die Wirkung von TGF- β in vivo zeigt häufig gegenläufige Effekte. Während der OB-Entwicklung könnten Wechsel in Typ I- und Typ II-Rezeptor für den unterschiedlichen Respons verantwortlich sein (377). TGF- β inhibiert die frühe OC-Differenzierung von Knochenmarksmonozyten, stimuliert aber die Knochenresorption von reifen OC (378). In vivo-Administration von TGF- β induziert den Verschluss der Schädelplatten und erhöht die Knochenformation (379). Diese Daten zeigen, dass TGF- β sowohl OC als auch OB beeinflusst. Transgene Mäuse, welche ein dominant negatives TGF- β -Signaling aufweisen, zeigen eine altersabhängige Zunahme der trabekulären Knochenmasse. Interessanterweise zeigen diese Mäuse keine Zunahme in der OB-Aktivität, was auf eine Beeinflussung der OC-Tätigkeit schließen lässt. Trabekulärer Knochen nahe der Wachstumsplatte ähnelte interessanterweise den Wildtypmäusen, initial gebildeter Knochen scheint demnach nicht so

stark beeinflusst zu werden. Nach Entfernung der Ovarien bei transgenen Mäusen zeigt sich wie bei dem Wildtyp Knochenresorption, jedoch geringer ausgeprägt. {380}

4.2.2. BMP

Die *Geschichte* der BMPs begann schon 1917; Neuhof demonstrierte heterotopie Osteogenese (381), 1938 postulierte Levander " ...Knochenregeneration findet aufgrund spezieller Substanzen, welche nicht spezifisches mesenchymales Gewebe induzieren..." (382). Urist nahm diese These auf und er schuf 1965 das Konzept der Autoinduktion (250), 1971 prägte er den Begriff "Osteoinduktion". Er war der Pionier, der den Grundstein für diesen Begriff legte (250,383,384), seine Versuche durchliefen alle Phasen der frühen embryologischen Skelettformation (385-387). 17 Jahre später klonierte Wozney erstmals BMP-Gene (388). Anfänglich dachte man, es handelt sich um spezielle Knocheninduktoren, da es bei Implantationsversuchen von dekalzifizierter Knochenmatrix in Muskelgewebe zu ektopter Knochenformation kam; erst später erkannte man, dass es sich bei diesen Molekülen vielmehr um mesenchymale Induktoren handelt. Schließlich fand man heraus, dass es sich bei der BMP-Familie um wichtige morphogenetische Proteine handelt, die mit Ausnahme von BMP-1, der TBS angehören. (331)

Diese Proteine sind an der Steuerung der Zellproliferation und - differenzierung, Apoptose, Morphogenese und der Musterbildung von zahlreichen Organen beteiligt (389-391); einige beeinflussen den Knochen gar nicht (392-396). {397}

BMPs machen fast ein Drittel der TBS aus, mehr als 30 Mitglieder sind bis heute beschrieben. Sie werden als Osteogene Proteins (OPs), CDMPs und als GDFs bezeichnet. Aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeiten werden sie in Subgruppen unterteilt. Mit zunehmender Kenntnis wurde klar, dass es sich bei diesen Molekülen um GDFs handelt und der Begriff BMPs ein historisches Relikt darstellt. Das Knochenskelett ist also weder der einzige noch jener Platz mit der stärksten Expression dieser Proteine. {397}

Aufgrund der Bedeutung von BMPs in vivo sind Knockout-Mäuse häufig sehr früh letal. BMP-2 und 4 null Mäuse sterben während der Gastrulation aufgrund von Fehlern in der mesodermalen Entwicklung (398-400). BMP-7 null Mäuse sterben kurz nach der Geburt aufgrund von Nierenversagen; weiters weisen sie Augendefekte und milde skelettale Abnormalitäten auf (401). {221}

Die rezessive "short ear" (se/se)-Maus wurde intensiv erforscht und hat verschiedene skelettale und extraskelettale Defekte (402-407); der Gendeffekt, der diesem Maustyp zugrunde liegt, ist im *Bmp-5* lokalisiert und wurde erst später entdeckt (408). {397}

Die Brachipode Maus (409) weist ebenfalls Defekte im Skelett auf (409,410); aufgrund einer Frameshiftmutation kommt es zur frühzeitigen Termination im *Gdf5* (411). *Gdf5* gehört zur Familie der BMPs, weist aber keine Knochenformationsaktivität auf. Bei der klassischen subkutanen Implantation kommt es zur Formation von Bändern und Sehnen (392). Eine Mutation im humanen *GDF5*, auch *CDMP1* genannt, führt zu zwei rezessiven Erkrankungen, der Hunter-Thompson-Chondrodysplasie und der Chondrodysplasie Grebe-Typ (412-414). Auch eine autosomal dominante Erkrankung, die Brachidaktylie-Typ C, wird mit Mutationen im *CDMP1* in Verbindung gebracht (415). Interessanterweise rufen Mutationen, *Bmp-5* und *Gdf5* betreffend, rezessive Phänotypen bei Mäusen, dagegen dominante beim Menschen hervor (416,417). Wie vielfältig die Wirkung dieser Moleküle ist, zeigen die weitgestreuten Funktionen. So spielen *Bmp-2*, *-4*, *-7*, *Gdf1* und *11* eine Rolle in der Hirnentwicklung (418-421). All diese Daten zeigen, dass die Rolle im Skelettsystem eher eine untergeordnete, gemessen an den extraskelettalen Funktionen, ist. {397}

Um einen kleinen *Überblick* über die BMPs zu bekommen, werden kurz ihre Funktionen tabellarisch aufgelistet.

BMP-1 gehört zur Familie der Metalloproteinasen, entfernt Karboxylpropeptide von Prokollagen I, II, III, aktiviert andere BMPs und ist nicht osteoinduktiv. (331)

BMP-2 ist osteoinduktiv, spielt eine wichtige Rolle während der Musterbildung in der Embryogenese, ist wichtig bei der Differenzierung von OB, Adipozyten, CDZ, beeinflusst OC Aktivität und die neuronale Differenzierung. Findet sich im Knochen, Milz, Leber, Niere, Herz und Plazenta, inhibiert eventuell die Knochenheilung. (331)

BMP-3 ist osteoinduktiv, wichtig bei CDZ Differenzierung und findet sich in Lunge, Niere, Hirn und Leber. (331)

BMP-4 ist osteoinduktiv, bei der Maus wichtig während der Gastrulation und Mesodermformation. Findet sich in Zellen der Aorta, Hirnhäute, Lunge, Leber und Niere, im Mesoderm welches das Myocard, Verdauungstrakt, Auge und Hirn umgibt (502), spielt eine Rolle bei der Knochenheilung, Überexpression führt zur ektooper Ossifikation. (331)

BMP-5 ist osteoinduktiv und in Lunge, Niere, Leber (331), Ureter, Herzbeutel, Meningen und Telencephalon zu finden (418,419,422). {397}

BMP-6 weist keine osteoinduktive Funktion auf, spielt eine Rolle bei der neuronalen Maturation, reguliert die CDZ-Differenzierung und ist in Lunge, Hirn, Niere, Uterus, Muskel und der Haut zu finden. (331)

BMP-7 ist osteoinduktiv, spielt eine Rolle bei der Knochenheilung, in der Embryogenese, bei der Differenzierung von OB, Chondroblasten und Adipozyten. Findet sich in Nebenniere, Hirn, Auge, Herz, Harnleiter, Niere, Lunge, Plazenta, Milz und der Skelettmuskulatur. (331)

BMP-8 ist osteoinduktiv, spielt eine Rolle in der Embryogenese und der Spermatogenese bei der Maus. (331)

BMP-8b initiiert und hält die Spermatogenese bei der Maus aufrecht. (331)

BMP-9 ist osteoinduktiv, stimuliert die Hepatozytenproliferation und beteiligt sich bei deren Funktion und Wachstum. (331)

BMP-12 und **-13** inhibieren die terminale Differenzierung von Myoblasten, Homologe bei der Maus sind GDFs. (331)

BMPs sind im Gegensatz zu TGF- β glykolisiert, was ihr Funktionsspektrum erweitert; zusätzlich können auch hier Homo- oder Heterodimere gebildet werden. Es wird angenommen, dass das Vorläuferprotein nach der Dimerisierung intrazellulär gespalten wird, bevor es noch sekretiert wird (423,424). Obwohl diese Moleküle schon sehr früh eine wichtige Rolle in der Entwicklung spielen, sind die genauen Herkunftszellen im Embryo nicht bekannt. Diese Proteine sind nicht nur in Entwicklungsschritte eingebunden, sie spielen auch eine Rolle in der Musterbildung und verknüpfen so zwei unabhängige Entwicklungswege. Verbindungen von wichtigen Pathways wie Hox/Bmp/Shh/Fgf/Wnt werden vermutet; teilweise sind sie auch schon bestätigt worden. (331) Wie verstrickt diese Signalwege mit sehr konservierten Proteinen sind, wird kurz angeführt.

Moduliert werden BMPs, wie auch andere zur TGF- β Superfamilie zählende Liganden, durch extrazelluläre Faktoren (425), was die Eigenschaften und Funktionen dieser Moleküle erweitert. **Chordin (Chd)**, der Antagonist von BMP-4 bei Amphibien, ist bei der dorsoventralen Musterbildung beteiligt. Bei Vertebraten ist BMP-4 für ventrale Segmente und das Chd Homolog für dorsale Segmentierung verantwortlich, bei Amphibien funktionieren die Moleküle entgegengesetzt. Auch bei Drosophila beobachtet man diese zusammenhängenden Mechanismen, nur wiederum spiegelbildlich; das BMP Homolog dpp und **screw (scw)** ist für das dorsale Los verantwortlich, das Chd-Ortholog **short gastrulation (sog)** antagonisiert die beiden und wird ventral exprimiert. Sowohl in Vertebraten als auch in Invertebraten wird die Wirkung von Chd-Orthologen durch eine Familie von Metalloproteasen, bei Drosophila

Tolloid (Tld), bei *Xenopus* **Xolloid (Xol)** und beim Menschen BMP-1 antagonisiert. Sog/Chd wird durch Tld/Xol/BMP1 geschnitten und inaktiviert, was zu einer Verstärkung der BMP-Signale beisteuert. (426-428). Das *Drosophila*-Gen ***Twisted Gastrulation (tsg)*** und die Homologe bei Vertebraten tragen zu einer komplexeren extrazellulären Vernetzung dieser Moleküle bei. Ursprünglich dachte man, dass tsg, ein dpp-Agonist, bei der dorsalen Musterbildung für die am dorsalsten Elemente verantwortlich sei. (429). Kürzlich zeigte sich, dass Tsg-Orthologe in Verbindung mit Chd/Sog die BMP-Wirkung antagonisieren können. (430-432). Tsg scheint nicht für die Entwicklung einer Asymmetrie essentiell zu sein, vielmehr moduliert es andere Komponente in diesem Pathway. In der frühen Embryogenese scheint Tsg bei *Drosophila* und Zierbräufisch BMP-Signale zu antagonisieren. (430,431). Folglich führt Tsg-Verlust bei Vertebraten zu Ventralisation, bei Überexpression zu Dorsalisation, wobei diese Effekte bei *Drosophila* nicht beobachtet werden. Vertebraten zeigen eine Sensitivität bezüglich Tsg, die bei *Drosophila* in diesem Ausmaß nicht beobachtet wird. Tsg und Chordin könnten *in vivo* synergetisch wirken. Interessanterweise zeigen biochemische Studien, dass eine der möglichen Tsg-Wirkungen im Tsg/Chd/BMP-Komplex in einer Verstärkung der Chd-Spaltung durch Tld liegen könnte. Tld inaktiviert Chd und setzt damit aktives BMP frei (426,427). Diese Wirkung ist, verglichen mit der *in vivo*-Wirkung, paradox. Erklärung für dieses Phänomen gibt es in einigen Studien; Tsg scheint multifunktionell zu wirken, als BMP-Agonist und -Antagonist. {433}

Ähnlich wie TGF- β binden BMPs an zwei Typen von Serin-Threonin-Rezeptoren, BMPR-I und BMPR-II (434-438). Die Kinaseaktivität bei Typ II ist konstitutiv, wogegen Typ I erst durch Bindung des Liganden aktiviert wird. Optimale Bindung wird erreicht, wenn beide Typen vorhanden sind, obwohl BMPs an beide einzeln schwach binden können und nachfolgend die andere Untereinheit rekrutieren. Typ II transphosphoryliert den Typ I-Rezeptor (439,440), im Gegensatz dazu bindet TGF- β Rezeptor I nicht in Abwesenheit von TGF- β -Rezeptor II (441-443). Danach kommt es zur Smad-Aktivierung (444-446). In Säugern können zwei Klasse I-Rezeptoren unterschieden werden: IA und IB (447-449). IA wird während der Embryogenese weitläufiger exprimiert (450-451). IB exprimieren BMP-Rezeptoren während der Knochenbildung und Knochenheilung (246,247,450-459). {221}

4.2.3. PTH

PTH wird hauptsächlich von den Nebenschilddrüsen sezerniert, wahrscheinlich auch aus Gehirn und dem Thymus (460). Targetzellen finden sich in Knochen und Niere. Beide zeigen anabole

Effekte am Knochen; eine einmalige Verabreichung von rekombinanten PTH 1-34 Aminosäuren pro Tag über 21 Monate hindurch steigert die Knochendichte und vermindert das Frakturrisiko (461). Die genauen molekularen Interaktionen und die Struktur des Rezeptors sind wichtig für die Entwicklung neuer Medikamente, welche gezielt nur eine gewünschte Funktion aktivieren und so Nebenwirkungen minimieren sollen. Das Augenmerk richtet sich vor allem auf die unterschiedlichen Domänen des PTH/PTHrP und deren Interaktionen mit den Rezeptor-Isoformen. {462}

Zusammengesetzt ist PTH aus 84 **Aminosäuren (aa)**. Der N-terminale Teil des Liganden ist für die Signaltransduktion essentiell; es konnte gezeigt werden, dass 1-9aa eine wichtige Domäne bildet, die für die Rezeptoraktivierung von großer Bedeutung ist. Man nimmt an, dass die Interaktion der N-terminalen Domäne des Liganden mit dem juxtamembranösen Teil des PTH-1-Rezeptor für dessen Aktivierung notwendig ist (463); es könnte sogar sein, dass dies die einzige Interaktion der beiden Moleküle ist (464). Auch 15-34aa bilden eine amphile Bindungsdomäne mit hoher Affinität (465,466). PTH-Moleküle, welche am N-terminalen Ende modifiziert werden, können antagonistische oder agonistische Wirkung zeigen (467-471). Das kürzeste PTH-Molekül, welches noch wie ein kompletter Agonist agiert, besteht aus 1-31aa, wobei für 1-14aa auch noch eine leichte Wirkung nachweisbar ist. Kompliziert werden diese Interaktionen dadurch, dass der PTH-1-Rezeptor wahrscheinlich verschiedene Domänen des Liganden erkennen kann, abhängig vom intrazellulären Milieu; dadurch werden verschiedene Signalwege induziert (472). {462}

Die Kenntnis der Interaktionen des Liganden mit dem Rezeptor stellt eine Voraussetzung für eine pharmakologische Therapie mit synthetisch hergestellten, modifizierten Molekülen dar. Da bereits sehr kleine Peptide den Rezeptor modulieren können, gelingt es eventuell nicht Peptid-Liganden zu synthetisieren, wodurch man zum Teil die Gefahr einer möglichen Immunreaktion verringern könnte. Antagonistische Wirkung bei tumorinduzierter Hyperkalzämie, potentere Agonisten ohne Nebeneffekte bei Osteoporose und anderen Krankheiten wären therapeutische Ziele. {462}

Der *PTH/PTHrP-Rezeptor* spielt eine entscheidende Rolle in der enchondralen Knochenformation. Es handelt sich um einen Klasse II-G-Protein-gekoppelten Rezeptor, welcher stark an den Adenylat-Cyclase-PKA-Pathway, weniger an den PLC-PKC-Ca²⁺ Weg gekoppelt ist. PTH-1-Rezeptor weist Homologien mit anderen **Typ-II-G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR)** auf, welche ebenfalls Peptidliganden wie Calcitonin, Sekretin und Glucagon binden, auf (473). Ein besonderes Merkmal dieser Rezeptoren ist die

glykosilierte extrazelluläre N-terminale Domäne und die sechs konservierten Zystein-Reste, welche eventuell ein intermolekulares Netzwerk von Disulfidbrücken bilden (474). Diese Domäne scheint für die Interaktion mit dem Liganden 3-14aa notwendig zu sein. Bei einer humanen Erkrankung, welche schon im Embryoalter letal endet, die Blomstrand-Chondrodysplasie, konnten Mutationen in dieser Domäne ausfindig gemacht werden (475,476). {462}

Ein weiterer Rezeptor wurde entdeckt, der zur PTH/PTHrP-Rezeptor-Genfamilie gehört (477). Dieser findet sich in Gehirn, Pankreas und anderen Geweben (478). Er kann nur durch PTH, nicht aber durch PTHrP aktiviert werden. Die Entdeckung des TypII-Rezeptors führte zur Auffindung eines neuen Liganden; das **bovine tubero-infundibuläre peptide** von 39aa (**TIP39**) aktiviert sowohl den humanen als auch den Ratten-PTH-2Rezeptor, nicht aber den PTH-1-Rezeptor, wobei es aber mit moderater Affinität an ihn bindet. Dieses Peptid weist geringe Homologien zu PTH/PTHrP auf (479), interessanterweise können geschnittene Formen von TIP39 an PTH-1R als Antagonisten wirken (480,481). Die Funktionen des Rezeptors und des Liganden sind nicht genau bekannt; aufgrund der Konzentration im ZNS wird eine neuroendokrine Funktion angenommen (482), welche sehr konserviert sein muss. Ursprünglich isolierte man PTH-2R nämlich im Zebrafisch (483), kürzlich fand man auch einen PTH-3-Rezeptor (330). {462}

Ein Zwei-Seiten-Modell wird bei der *Interaktion Ligand mit Rezeptor* angenommen, wobei der C-terminale Teil des PTH mit der extrazellulären N-Domäne des Rezeptors hauptsächlich die Bindungsaffinität beeinflusst und der N-terminale Teil des Liganden mit der juxtamembranösen Domäne des Rezeptors das Signaling induziert. Dieses entspricht auch den anderen Klasse II-Rezeptoren (463,484-486). {462}

So wie bei allen GPCR kommt es nach Bindung des Liganden zur Konformationsänderung und zur Bewegung der transmembranösen Anteile, was wiederum die zytoplasmatischen Domänen den G-Proteinen präsentiert und so die Signaltransduktion einleitet (487). Verschiedene Aktivierungs-Mutationen dieser Rezeptoren sind für eine seltene Erkrankung, der "Jansen Chondrodysplasie", verantwortlich (488). Normalerweise kommt es nach einer Ligand-Exposition sehr schnell zu einem Abfall der Rezeptorantwort. Diese Desensibilisierung wird durch eine rasche Degradation des Ligand/Rezeptorkomplexes durch Internalisation erreicht (489-491). Der Hauptteil wird mittels Clathrin-coated-vesikels endozytisch aufgenommen (492). Die genaue Kenntnis dieser Interaktionen sind ebenfalls Voraussetzung einer möglichen pharmakologischen Therapie. {462}

Die anabolen Effekte von PTH sind an das Vorhandensein von Cbfa1 gekoppelt. Cbfa1 - mRNA und die -Protein Konzentrationen steigen in Ratten Osteosacroma Zellen (UMR106) und metatarsalen Knochen Kulturen bei intermittierenden Gaben. Dieser Prozess involviert den Protein Kinase A (PKA) Pathway und ist Zeit versetzt (24h). Die anabolen als auch katabolen Effekte am Knochen sind somit PTH dosisabhängig, niedrige Dosen stimulieren, höhere Dosen vermindern Cbfa1 -mRNA und -Proteinkonzentration. In vivo werden gleiche Effekte beobachtet. (492a)

PTHrP wurde im Zuge der Erforschung der Hyperkalzämie bei malignen Tumoren entdeckt (493,494). Eine kurze Sequenz am N-terminalen Ende weist Homologien zum PTH auf (495,496); diese ermöglicht beiden Molekülen, den PTH1-Rezeptor zu aktivieren (497). PTHrP wird in vielen embryonalen, aber auch in erwachsenen Geweben exprimiert. Der Rezeptor findet sich meist auf Zellen, welche das Hormon selbst produzieren, oder unmittelbar in deren Nähe. Aufgrund der autokrinen und parakrinen Wirkung findet sich PTHrP unter physiologischen Voraussetzungen kaum im Serum (498). Verschiedene Zellen produzieren zum Teil auch nur Fragmente des PTHrP, trotzdem sind diese fähig, den intrazellulären Ca^{2+} Spiegel zu erhöhen und den transplazentaren Ca^{2+} Austausch zu fördern (499). C-terminale Fragmente sind in der Lage, OC-Knochenresorption zu hemmen (500). Da diese Fragmente nicht den N-terminus besitzen und somit nicht den klassischen PTH1-Rezeptor aktivieren können, weisen diese Daten auf einen weiteren Rezeptortypen hin, der aber noch nicht identifiziert wurde {501}. Die am besten dokumentierten Funktionen von PTHrP betreffen seine Wirkung als Entwicklungs- und Differenzierungsfaktor. PTHrP null Mäuse weisen wie schon erwähnt akzelerierte CDZ-Differenzierung und eine prämatüre Ossifikation jener Knochen auf, die enchondral ossifizieren. Die enge Koppelung mit der Regulation von Entwicklungsschritten zeigt sich auch dadurch, dass PTHrP/PTH1 Rezeptor-Signale, *Ihh* und andere morphogenetischen Moleküle involvieren (502,503). PTHrP null Mäuse sterben in der Perinatalperiode, wahrscheinlich aufgrund Asphyxie, welche durch verfrühte Ossifikation des Brustbereichs verursacht wird. Genetische Ablationen des PTH1-Rezeptoren weisen einen ähnlichen (Chondrodysplasie, Wachstumsplatteabnormalitäten, exzessive Mineralisation, verspätete Angiogenese und verkürzte Akren), aber schwerwiegenderen Phänotypen auf (502). PTHrP null Mäuse konnten durch Gentechnik vor dem Tod bewahrt werden. Mittels eines Segmentes des Coll II-Promotors wurde die PTHrP-Expression in den phCDZ induziert (504). Diese Mäuse weisen einen den PTHrP null Mäusen komplementären Phänotypen auf: akzelerierte Proliferation der CDZ in der Wachstumsplatte

und somit schnellerer Reifung chondraler Knochen, was auch zu deren Verkürzung führt. Diese skelettalen Abnormitäten sind sehr ähnlich der oben erwähnten **Jansens-Chondrodysplasie (JMC)**; jene Patienten weisen eine Aktivierungsmutation im PTH1-Rezeptor auf und zeigen mit Hyperkalzämie, Hypophosphatämie und verkürzten Knochen, Ähnlichkeiten zum Mausmodell (505). Wieso PTHrP null Mäuse lebend geboren werden und PTH1-Rezeptor null Mäuse sterben, könnte zwei Ursachen haben - einerseits durch maternale transplazentare PTHrP-Substitution, andererseits auch ein weiterer Ligand. {501}

4.2.4. IGF

Die im Knochen am stärksten vertretenden Wachstumsfaktoren sind *IGF1* und *IGF2*; beide erhöhen in vitro die OB Proliferation (506), in vivo wird bei Überexpression von IGF-1 in OB eine moderate und transiente Zunahme der Knochenmasse beobachtet (507). (189)

IGF-1 ist der Mediator der anabolen und mitogenen Aktivität von GH. IGFs gehören zu einer Familie, welche mit Insulin verwandt sind; man findet sie auch in niederen Vertebraten (508). Wie Proinsulin besteht IGF-1 aus einer A- und B-Kette, verbunden über Disulfidbrücken und eine C-Kette (509). Die strukturelle Ähnlichkeit zu Insulin erklärt die Fähigkeit, an den Insulinrezeptor mit niedriger Affinität zu binden. 99% von IGF sind im Plasma an IGFBP-Proteine gebunden, davon 80% an den IGFBP-3 - Komplex, bestehend aus IGFBP-3, IGF-1 und einem 88kD-Peptid, genannt "acid labile subunit" (510). IGF-1 wird hauptsächlich von der Leber sezerniert und übt via Plasmaverteilung seine Wirkung als endokrines Hormon aus (511); es wird aber auch noch von anderen Zellen wie CDZ gebildet und fungiert parakrin (512). Zudem wird angenommen, dass es auch wie ein Onkogen autokrin wirken kann (513). IGF-1 scheint eines der wichtigsten anabolen Hormone für die Synthese von Coll und Proteoglykanen im Knorpel und Knochen zu sein (514,515). Im Knochen steigern IGFs die Matrixsynthese, Differenzierung von OB, verhindern die Matrixdegradation und schwächen die Wirkung anderer Wachstumshormone wie PDGF ab (516-523). Im Knorpel wird angenommen, dass IGF die Matrixsynthese steigert und/oder als Wachstumspromoter für CDZ, abhängig von deren Reifungsgrad, dient (514,515,524,525). Die meisten stimulatorischen Effekte in vitro finden auch bei Anwesenheit von DNA-Synthese-Inhibitoren statt; dies wäre ein Hinweis auf zellreplikationsunabhängige Mechanismen. Wenn die Knochenhomöostase gestört ist, ist IGF-1 in der Lage, CDZ-Phänotypen über längere Zeiträume zu stabilisieren (526-528). IGF-1 kann am N-Terminus von Proteasen geschnitten werden, ohne die Bindungsaktivität am Rezeptor einzubüßen;

allerdings wird es dann nicht mehr von IGFBP gebunden. Mit zunehmendem Alter kommt es zum Abfall von IGF-1 in Serum und Knochen; dies könnte der Auslöser des altersbedingten Knochenabbaus sein. IGF-2 gilt in allen Wachstumsstadien als Glukoseregulator der Zelle und verhält sich wie ein Wachstumsstimulator im nicht differenzierten Stadium (529,530). Die Precursor-mRNA der beiden Hormone wird in eine 1A- oder 1B-Form geschnitten, wobei diese wahrscheinlich keine Prohormone darstellen. Vielmehr könnte es sich um spezielle Subtypen handeln, welche gewebspezifische Funktionen erfüllen; so weisen sie unterschiedliche Bindungsaffinitäten zu IGFBP auf (531) und sind entweder para- oder autokrin wirksam. All das ergibt ein komplexes Regulationsnetzwerk, welches maßgeblich an der Knochenhomöostase beteiligt ist. {532}

Wie wichtig Insulin im Knochenmetabolismus ist zeigen Patienten mit verminderten Insulin Spiegel. Diabetiker (Diabetes Melitus Typ I) weisen verminderte OB Aktivität und verzögerte Knochenheilung auf. Die Mechanismen sind nicht nur auf die assoziierten Faktoren (IGF1, bFGF, ...) zurückzuführen, in Mäusen welche mit Strptozotocin (immunologisch vermittelte Destruktion der β -Zellen) behandelt wurden, kommt es zur Erniedrigung von TF (Cbfa1/Runx2, Dlx5) welche die OB Differenzierung regulieren. Zudem sind auch Gene für Matrixbestandteile downreguliert. Die Tiere produzieren zwar gleiche Mengen an unreifen mesenchymal Zellen, die Differenzierung findet zwar zum gleichen Zeitpunkt, aber in einem geringeren Ausmaß statt. Bei Insulin Gabe sind diese Effekte reversibel. (532a)

IGFBPs modifizieren die Wirkung von IGFs; sechs IGFbps sind zurzeit bekannt, ein siebentes wurde kürzlich in humanen Sekreten entdeckt und aus Medien von Brustkarzinomzellen gewonnen. IGFBP-7 zeigt geringere Affinität zu IGF-1 und IGF-2 auf, gemessen an den anderen IGFbps (533,534) - andere IGFbps werden noch vermutet (535). Jedes Molekül stellt ein eigenes Genprodukt dar. IGFBP-Produktion wird von IGF, Insulin und GH reguliert, wobei IGFBP-1 von Insulin und IGF-1 und IGFBP-3 hauptsächlich durch GH (510,536) stimuliert werden. Zusätzlich werden die Plasmawerte ontogenetisch durch verschiedene endokrine Faktoren entwicklungsabhängig und durch diverse proteolytische Modifizierungen bestimmt (537). Neben einer hohen AS-Homologie weisen sie unterschiedliche Strukturen und biochemische Eigenschaften auf, außerdem existieren

gewebsabhängige Spliceformen. Disulfidbrücken dürften eine wichtige Rolle in der Interaktion mit dem Liganden spielen. Die Affinität ihrer Bindung an den Liganden dürfte vom Ausmaß der Phosphorylierung abhängen; je stärker phosphoryliert sie sind, umso höher ist die Affinität (537). Zusammengenommen beeinflusst dies die biologische Aktivität dieser Proteine und macht sie unentbehrlich in diesem Regulationsnetzwerk. Die ersten zwei IGFBP weisen eine RGD-Sequenz am C-terminalen Ende auf; ob sie mit Integrinen interagieren ist fraglich. IGFBP-2 bis -5 findet man im humanen Knorpel (538-541), IGFBP-1 bis -4 findet man in der Synovialflüssigkeit (542). IGFBP-3 und -4 werden in einem hohen Maß von CDZ in Kultur produziert. Außerdem finden sich erhöhte Werte bei entzündlichen Erkrankungen der Gelenke (538,539,543); diese Werte übersteigen die Plasmalevel, ein Hinweis auf deren lokale Bedeutung. IGFBP-3 und -4 dürften demnach eine wichtige Rolle im Gelenk spielen. IGFBP-3 ist unabhängig von IGF in der Lage, via eines speziellen Membranrezeptors Zellen zu beeinflussen (571,597,598). Bei Brust Karzinomzellen (544,545) und in Hühnerfibroblasten (546,547) hemmt es die DNA-Synthese. Auch scheint das Sekretionsmuster eine Rolle zu spielen - so hemmt IGFBP-3 die Wirkung von IGF-1, wenn es gleichzeitig inkubiert wird, potenziert aber seine Wirkung, wenn Mäusefibroblasten preinkubiert werden (548). IGFBP-4 hemmt in fast allen Versuchen die Wirkung von IGF-1 und bindet an die ECM (546,549). Viele Zellen, die Proteasen freisetzen und somit die Aktivität von IGFBP-4 regulieren, sind wiederum IGF-1 abhängig (550). Die Proteasen gehören scheinbar zur Serin- und/oder Metalloproteasenfamilie. CDZ sekretieren konstitutiv eine IGFBP-4-spezifische Protease, deren Aktivität durch PGE₂ gehemmt werden kann (551). Die Balance der aktiven Peptide scheint also einerseits von den Konzentrationen der IGFBPs und der freisetzenden Proteasen abzuhängen, andererseits auch von den IGF-Werten selbst (550,552). Verschiedene Sequenzen und Bindungselemente auf dem IGFBP-3 Gen wie NLS (553), AP-2 (551) und p53 (554) zeigen, dass dieses Molekül noch weitere Funktionen in sich birgt. {532}

OB können die ersten sechs IGFBPs syntethisieren, wobei die Expression von der Zelllinie abhängt; drei aber scheinen für den OB eine besonders wichtige Rolle zu spielen. IGFBP-5 stimuliert Knochenformation, -4 hemmt diese Aktivität, -3 scheint in einer lokalen Aktivierungsschleife involviert zu sein, in der systemische Hormone wie PTH und D₃ die Verfügbarkeit von IGF an Knochenzellen steuern (555). GH scheint die Expression von IGFBP-3 in Knochenzellen stärker zu kontrollieren als die von IGF-1 (555). Gleiches gilt für PTH, welches auch IGFBP-2 und 4 vermehrt freisetzt. Letztere verhindern die Degradation

von IGF-1, was auch für die Akkumulation von IGF bei mit PTH inkubierten Zellen sprechen dürfte. Die Verteilung von IGF und IGFBP im Knochen ist unterschiedlich (556), was mit unterschiedlicher Knochendichte verknüpft sein dürfte. Proteolytische Aktivität gegen IGFBP findet man in Knochen und im Knorpel; die Enzyme gehören wie oben erwähnt wahrscheinlich zur Gruppe der Serin- und/oder Metalloproteinase-Familie. Solche Enzyme, die in der Lage sind, Proteoglykane und Coll zu degradieren, scheinen in der OA-Pathogenese eine entscheidende Rolle zu spielen (557-559). {532}

Die Bedeutung der genannten Moleküle konnte nicht nur im Labor gezeigt werden; auch viele klinische Fälle, gekennzeichnet durch Zwergwuchs, Entzündungen und innere Fehlbildungen, untermauern deren Bedeutung. Neben den oben erwähnten Interaktionen auf molekularem Level werden in Folge kurz zwei klinische Fälle, welche mit Störungen im IGF/Rezeptor/IGFBP-Stoffwechsel assoziiert sind, angeführt.

Osteoarthritis ist eine Erkrankung, welche subchondrale Knochen, Gelenkknorpel und Synovialmembran betrifft. Der Knorpel wird degradiert und abgebaut, im Knochen kommt es zu hypertrophen Umbauvorgängen, begleitet von einer entzündlichen Reaktion der Synovialmembran. Patienten weisen zudem neben einer allgemeinen Erhöhung diverser Zytokine auch erhöhte Expressionswerte von IGF-1 auf (542,560,561); diese stammen von CDZ, welche vermehrt IGF-1 produzieren (538,562,563). Die Serumwerte von IGF-1 aber korrelieren nicht mit der Erkrankung, obwohl in Studien häufig ein Zusammenhang angeführt wurde. Diese gewebspezifische Erhöhung weist auf eine lokale Regulation hin. Damit gewinnt ein primär systemisch sekretiertes Hormon erst durch lokale Modulation an Bedeutung an der Physiologie und der Pathophysiologie im Knochen. CDZ von OA-Patienten sind hyposensitiv gegenüber Stimulation mit IGF-1 (539); dies könnte einen Regulationsloop andeuten, oder aber auf erhöhte IGFBP-Spiegel zurückzuführen sein, denn IGFbps sind wie oben erwähnt wichtige Biomodulatoren von IGF. Dadurch würden auch andere Zytokine wie IL-1 und TNF- α zu dem hyporesponsiven Verhalten der pathologischen CDZ beitragen (564-568) - denn einerseits stimulieren sie die Ausschüttung von IGF-1 durch diese Zellen, andererseits aber auch die Bildung von IGFBP. IL stimuliert zudem auch noch verschiedene Proteasen, was ebenfalls zur Hyposensitivität der CDZ gegenüber IGF-1 beitragen könnte. Damit sind diese Zytokine wichtige Faktoren in der Pathogenese der OA (557,569). IGF-2 findet sich ebenfalls im Gelenk; zwar sind die Werte von IGF-2 in der Synovialflüssigkeit weitaus höher als IGF-1, zwischen Gesunden und OA-Patienten besteht aber bei diesem

Molekül kein Unterschied (542). Auch GH reguliert die Matrixsynthese mittels IGF-1, allerdings durch Bindung an einen eigenen GH-Rezeptor (GH-R) (570-573). {532}

In der frühen Phase der OA kommt es zu Knorpelverdichtungen und -verdickung durch vermehrte Proteoglykanablagerungen durch die CDZ (574-576), später folgt ein Verlust der Knorpelmasse. Die ursprünglich neu abgelagerten Moleküle weisen Abweichungen in ihrer Form auf (575). Dieser Abbau und Reparationsprozess hält sich über viele Jahre die Waage. Erst wenn der anabole Prozess durch die Degradation überholt wird, kommt es vermehrt zu klinischen Phänomenen, wobei dann häufig entzündliche Prozesse an der Synovialmembran dominieren. Auch Synovialflüssigkeit von Patienten mit **rheumatoider Arthritis (RA)** weist wie jene von OA-Patienten gegenüber gesunden Probanden erhöhte Werte von IGFBP-3 und -4 auf (542,577,578). Die Werte von IGFBP-4 sind im entzündeten Gewebe weitaus höher als im Serum (578), was auf eine lokale physiologische Rolle hindeutet. OA-Patienten haben erhöhte Knochendichte; auch korrelieren die IGF-Werte positiv mit der Knochendichte (515), zudem produzieren primäre OB von OA-Patienten im Vergleich zu normalen OB vermehrt IGF-1 (579). Die Verdickung des subchondralen Knochens könnte an der Progression der OA beteiligt sein (580,581). Osteoporose, gekennzeichnet durch kortikalen und spongiösen Knochenverlust, ist mit einer Verminderung von zirkulierenden IGF Werten und IGFBP-3 assoziiert (582). Vielleicht finden sich deswegen Osteoporose und OA nicht nebeneinander. Der Zusammenhang von ECM-Liganden-Zellen wird hier deutlich, wo die Zellen nicht nur von systemischen Faktoren moduliert werden, sondern auch von ihrem unmittelbaren Milieu. {532}

Beide Hormone, GH und IGFs, stimulieren lineares Wachstum, wobei lange Zeit nicht klar war, welcher der beiden Wachstumsfaktoren, den entscheidenden Einfluss ausübt. Anhand von klinischen Fällen und diversen Knockout-Mäusemodellen kam man der Antwort näher. {583}

Patienten mit **Laron Syndrom (LS)** sind nicht in der Lage, IGF-1 zu produzieren (584). Der Defekt am GH-Rezeptor besteht aufgrund Deletionen und/oder Mutationen im entsprechenden Gen (585,586), was zum Ausfall der Synthese von IGF und anderer Peptide führt. GH ist aufgrund der Rezeptorresistenz im Serum erhöht. Der Typ I-IGF-Rezeptor wird von fast allen Zellen während der Embryogenese exprimiert (587). Der Rezeptor ist ein Heterotetramer, wobei zwei α -Ketten extrazellulär liegen und diese keine transmembranösen Domänen aufweisen. Die zytoplasmatische β -Dimere durchspannen die Zellmembran und binden an die α -Subunits. Durch ligandinduzierte Aktivierung kommt es zur

Autophosphorylierung (588) - der aktivierte Rezeptor ist nun zur weiteren Phosphorylierung durch andere tyrosinhaltige Substrate wie IRS-1, PI3, Raf, MAP, ... fähig (589). Der Rezeptor bindet sowohl IGF-1, IGF-2 als auch Insulin. Im Gegensatz dazu weist der Typ II-IGFR höhere Affinität zu IGF-2 auf; er besteht aus nur einer Peptidkette mit einer großen extrazellulären-Domäne. Es wird angenommen, dass dieser Rezeptor hauptsächlich die Bioverfügbarkeit von IGF-2 reguliert (590). Neugeborene mit LS sind kleiner als gesunde Babys, was auf eine intrauterine Wirkung des IGF-1 hindeutet (591). Das postnatale Wachstum von Patienten mit LS ist langsamer, sie weisen Acromicria, Organomicria inkludiert Genital, Hirn, Herz, Gonaden (592-595), verminderte Muskelmasse und brüchige Haare (596,597) auf. Beim Mäusemodell zeigt sich, dass IGF-1 oder IGF-1 Rezeptor Knockout-Mäuse um bis 45% kleiner sind als der Wildtyp. IGF-1R null Mäuse sterben schon während der Geburt an Lungeninsuffizienz, welche auf vermindertem Wachstum des Zwerchfells und der interkostalen Muskeln beruht (598). IGF-1 ist somit ein wichtiges Wachstumshormon, welches die Signale von GH übermittelt. Obwohl bei beiden Modellen erhöhte GH-Werte zu finden sind, resultieren trotzdem diese Schäden; IGFs weisen somit GH-unabhängige Wirkung auf, diese wird aber bei bestimmten Zellen wie CDZ durch Anwesenheit von GH optimiert. {583}

Die Interaktionen in diesem Regulationsnetzwerk, welche letztendlich das Wachstum beeinflussen, werden auch noch durch andere Peptide moduliert. Dies beginnt schon zentral, denn die GH-Sekretion wird nicht nur von GHRH und Somatostatin reguliert; auch andere hypothalamische Peptide, GH-Sekretagogene genannt (599), arbeiten synergetisch mit GHRH und hemmen Somatostatin. Eines dieser Sekretogene ist Ghrelin (600). {583}

4.2.5. TNF-Familie

Die TNF-Proteinfamilie spielt in der Knochenbiologie eine wichtige Rolle, viele Subtypen dieser Moleküle lenken wichtige Schlüsselschritte. Bei der Aktivierung der OC wurden einige Punkte bereits kurz angesprochen, hier werden sie detaillierter dargelegt.

OB erkennen durch einen noch nicht genau bekannten Mechanismus Stellen der Knochenresorption und migrieren an diese Stellen, wo sie dann beginnen, Osteoid aufzubauen. Es wird angenommen, dass direkter Zell-Zellkontakt für die Aktivierung der OC-Precursorzellen durch OB notwendig ist. Dies wurde durch verschiedene Versuche gezeigt, die auch zur Entdeckung von neuen interagierenden Zytokinen führten, welche zu der TNF-Familie zählen und für die OC-Genese essentiell sind. {601}

OB/Stroma-Zellen exprimieren den Liganden RANKL, der erkennende Rezeptor RANK wird auf OC-Precursoren exprimiert. Osteoprotegerin (OPG) ist ein Mitglied der TNF-R-Familie (602-604); dieser Faktor ist auch unter den Namen FDCR-1 und OCIF (605-606) bekannt. Das N-terminale Ende des Proteins weist signifikante Homologien zu der TNF-R-Familie, speziell zu TNF-R2 und CD40, auf (602), wobei diesem Rezeptor im Gegensatz zu anderen Mitgliedern der TNF-R-Familie die hydrophoben transmembranen Regionen fehlen - ein Zeichen dafür, dass dieses Molekül sekretiert wird und demnach einen "löslichen" Rezeptor darstellt (602,603,605,606). OPG wird als Monomer synthetisiert und extrazellulär zu einem Disulfid- gebundenen Dimer konvertiert. Während der Knochenentwicklung durchläuft die OPG-mRNA bei der Maus zwei Peaks an den Tagen 7 und 15. Tag 15 ist der Zeitpunkt, wo die Bildung der mesenchymalen Kondensationen abgeschlossen ist. Die OPG-Expression ist wie oben erwähnt, auch in Gefäßen zu finden. Die Produktion kann durch Gabe von BMP, IL-1, TNF, TGF- β und Östrogen gesteigert werden (607-610). Gehemmt wird sie durch PGE2, Glucocorticoide, D₃ und PTH (611-615). Manche dieser Effekte sind aber zelllinienabhängig und werden eventuell in vivo nicht beobachtet. Überexpression von OPG führt zu Osteopetrose, deren Ausmaß mit dem OPG-Plasmaspiegel korreliert. Die bei Mäusen beobachtete Splenomegalie dürfte mit der extramedullären Blutbildung zusammenhängen. Die OPG-inhibitorische Aktivität dürfte erst spät, so scheint es, während der OC-Differenzierung erfolgen. Ovariectomierte Mäuse sind ein gutes Modell für den postmenopausal assoziierten Knochenabbau, hervorgerufen durch erhöhte OC-Anzahl. OPG-Injektionen bei diesen Mäusen reduziert den Knochenverlust, was auch bei postmenopausalen Frauen beobachtet wurde, denen man OPG verabreichte (616). Auch konnte es in vivo erfolgreich bei Mäusen bei tumorinduzierter Osteolyse eingesetzt werden (617); dabei scheint es sich auch positiv auf Schmerzen auszuwirken. OPG könnte bei einer Vielzahl von Knochenerkrankungen, bei denen die Ursache erhöhte OC-Aktivität ist, therapeutisch eingesetzt werden. OPG null Mäuse weisen Knochenverluste sowohl kortikaler als auch trabekulärer Natur auf, assoziiert mit einer erhöhten Frakturgefahr (618). Die Anzahl der OC ist erhöht; ebenfalls findet man vermehrt OB, die aber mit dem gesteigerten Abbau nicht mithalten können. Interessanterweise zeigen die Mäuse zwei Wochen nach der Geburt auch atherosklerotische Läsionen (618). OPG scheint auch in die Gefäßhomöostase involviert zu sein und dürfte kalzifizierende Gefäßzellen, auch Perizyten genannt, beeinflussen. Diese Zellen sind eine kleine Subpopulation an der Gefäßmembran und weisen bestimmte Charakteristika von OB auf (619,620). Diese Daten belegen die Bedeutung von niedrig konstitutiv sekretierten OPG-Level

in vivo; in der Knochenhomöostase selbst ist die Anwesenheit von OPG absolut notwendig. Um Knochenmasse aufrechtzuerhalten, bindet es RANKL ähnlich wie Östrogen und hemmt somit den RANKL-RANK-Pathway (621). {601}

TRAIL ist ein TNF-verwandter Ligand, welcher Apoptose bei Zellen mit „death“-Domänenrezeptoren induziert (622,623). OPG bindet TRAIL und verhindert die TRAIL-induzierte Apoptose (624). Andererseits wiederum hemmt TRAIL die Fähigkeit von OPG, OC zu hemmen, ist aber selbst nicht in die OC-Genese involviert (624). {601}

RANKL ist ein Typ II-Transmembranprotein, welches auf aktivierten T-Zellen, früher als TNF-related activation-induced cytokine (TRANCE) bezeichnet, exprimiert wird (625). RANKL zeigt starke Homologien mit anderen TNF-Liganden wie TRAIL, CD40 und FAS. Humanes RANKL besteht aus einer extrazellulären transmembranösen und einer N-terminalen zytoplasmatischen Domäne (626-628). RANKL existiert als membrangebundene als auch als kurze lösliche Form (627). Die lösliche Form wird von der Zelloberfläche durch eine spezielle Metalloprotease, "Disintegrin TNF α convertase" (TACE) genannt, geschnitten (629). Der Mäuse-RANKL-Promotor beinhaltet Kortikoid, Vitamin D und Cbfa-1-respondierende Elemente (630-632); Cbfa1 null Mäuse weisen kein RANKL auf (630), ein weiterer Hinweis auf die Koppelung der OB-bedingten Knochenformation und OC-Resorption. In sich entwickelnden Knochen wird RANKL in frühen mesenchymalen Zellen exprimiert, welche sich in unmittelbarer Nähe zur Knorpelanlage befinden, zudem auch in hCDZ (627). RANKL-mRNA wird beim Erwachsenen in Periost und in der Wachstumszone hoch exprimiert (627). Steady State Level von RANKL werden durch Zugabe von PTH, D₃, Dexamethason, IL1, IL11, Oncostatin M und PGE₂ erhöht (612,614,628,633-635), TGF- β hemmt die Expression (636). RANKL null Mäuse weisen Osteopetrose und fehlenden Zahndurchbruch auf; nur jene Knochen, die membranös ossifizieren, sind nicht betroffen. Einen ähnlichen Phänotyp beobachtet man bei OPG-Überexpression, der Zahndurchbruch ist dabei aber nicht betroffen. RANKL wird auch im lymphatischen Gewebe exprimiert und spielt eine Rolle bei der Thymusentwicklung. T-Zellen von mutanten Mäusen zeigen eine verminderte Zytokinproduktion, IL-2, -4, -5, -6 und IFN γ betreffend; auch B-Zellen sind reduziert. Unerwarteterweise können RANKL null Mäuse keine Lymphknoten entwickeln, die Peyersche Plaques sind verkleinert, die Milz ist aber normal groß. Das war ein erster Hinweis darauf, dass ein einzelnes Protein für die Organogenese erforderlich ist (637). Sowohl die lösliche als auch die membrangebundene Form von RANKL, welche von aktivierten T-Zellen produziert wird, ist in der Lage, OC zu aktivieren (638). Dieses kann durch Zugabe von OPG

gehemmt werden und räumt aktivierten T-Zellen eine Bedeutung in der Knochenformation ein. T-Zellen von ovariectomierten Mäusen produzieren mehr TNF α , was wiederum M-CSF erhöht und RANKL-induzierten OC-Knochenabbau fördert (639). T-Zell-defiziente Mäuse sind nicht in der Lage, OC-Zahl und somit Knochenresorption zu erhöhen; somit werden T-Zellen für den östrogenabhängigen Knochenverlust benötigt. Pharmakologisch-therapeutisch gesehen könnten RANKL-Antikörper entwickelt werden, ohne das Immunsystem zu beeinflussen, um so Knochenverlusten vorzubeugen. Dies wäre natürlich auch beim TE zur Erstellung einer Matrix ein ersehntes Ziel. {601}

RANK (Rezeptor Aktivator von NF- κ B) gehört zu einer Subfamilie von TNF-Rezeptoren wie TNFR1, CD40, CD95, CD27, Humanes RANK-Protein besteht aus einer extrazellulären, einer transmembranösen und einer zytoplasmatischen Domäne. Rank-mRNA wird in OC, B-, T-Zellen und Dendritischen Zellen produziert. Auch wird es in Lunge, Herz, Hirn, Skelett Muskel, Leber, Niere und Haut detektiert (626,640,641). Aufreguliert wird die Expression durch IL-4, TGF- β auf T-Zellen (626). Auf den Knochenzellen wird RANK-unabhängig von den klassischen Hormonen wie PTH, D₃ und TGF- β exprimiert (642). Durch Bindung von RANKL kommt es via TRAF (TNFR-assoziiertes factor) zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B und der Proteinkinase JNK (629,640,643,644). Lösliches RANK hemmt interessanterweise die OC-Formation (641). Transgene Mäuse mit einer Überexpression von RANK weisen einen osteopetrotischen Phänotyp mit Verminderung des Markraums und der OC auf (640). Die Tatsache, dass lösliches RANK die OC-Formation wie OPG hemmt, könnte klinisch von Nutzen sein. Mäuse, welche aufgrund einer Titanpartikel-induzierten Inflammation Knochenverluste erleiden, können durch Injektion von RANK gestoppt werden. Hohe Werte von RANKL werden in den osteolytischen Herden registriert (645). {601}

Bei der *familiären Expansilen Osteolyse (FEO)*, welche eine seltene autosomal dominante Erbkrankheit mit Ähnlichkeiten zum Morbus Padgett (646) darstellt, zeigen sich Insertionsmutationen im RANK-Gen; diese Mutationen resultieren in einem erhöhten NF- κ B-medierten Signaling (646). Demnach dürften Abweichungen im RANK-Signalweg für FEO, zum Teil auch für die Padgett-Krankheit verantwortlich sein. Sechs Mitglieder von TRAFs, zur zytoplasmatischen Zinc finger Adapter Protein-Familie zählend, sind bekannt. TRAFs regulieren via NF- κ B und JNK die Zellproliferation und die Apoptose (647). Die zytoplasmatische Bindungsseite von RANK beinhaltet drei TRAF-Bindungsstellen (Traf 2,5,6) (643). TRAF6 null Mäuse weisen leichte Osteopetrose auf, ähnlich der bei RANKL-

defizienten Mäusen (648). Sie haben eine normale Anzahl von OC, diese aber können keine Resorptionszone aufbauen (649); die Traf-6-Domäne ist zudem bei der Aktivierung von NF- κ B durch den RANK-Signalweg essentiell (650). Bisher wurde beschrieben, dass T-Zellen die OC-Genese fördern und so den Knochenabbau begünstigen; sie sind aber auch in der Lage, die OC-Formation zu hemmen, denn IFN γ degradiert TRAF-6 und führt somit zur verminderten Aktivierung von NF- κ B und JNK (651). {601}

4.2.6. D₃

Die klassischen Targetzellen von 1 α 25(OH)₂ Cholecalciferol sind Enterozyten, OB, renale Tubuluszellen und parathyroidale Zellen. Calcitriol beschleunigt die Absorption von Ca²⁺ und Phosphat aus dem Darm, aus dem Glomerulumfiltrat in der Niere und, wenn nötig, wird Ca²⁺ aus dem Knochen mobilisiert. Hohe Ca²⁺-Werte und Calcitriol hemmen die Sekretion von PTH. Calcitriol dient als Differenzierungsfaktor für viele verschiedene Zellen, unter anderem auch bei klassischen Zielzellen. So ist Calcitriol in der Lage, das Wachstum gewisser Tumoren durch Beeinflussung der Differenzierung zu verlangsamen (Melanom, Colonkarzinom, Brustkarzinom). Die therapeutische Breite ist aber sehr gering, was den klinischen Einsatz limitiert. D₃-Aktivität wird durch spezielle Rezeptoren ermöglicht (VDR), welche den nukleären Transkriptionsfaktoren der Steroid-Thyroid-Familie angehören. VDRs finden sich in vielen Zellen, sie bilden Homodimere oder Heterodimere mit T₃-Rezeptoren oder "retinoid acid"-Rezeptoren (RA-R); daraufhin kommt es zur Regulation von Targetgenen. Viele Effekte der Zelle werden unabhängig der Proteinsynthese induziert, laufen daher schnell ab, da sie nicht genomisch sondern zum Beispiel durch die Aktivierung von Ionenkanälen gesteuert werden. Das Zusammenspiel von TGF- β und Calcitriol wurde beim Wachstum von malignen und normalen Zellen wie auch bei der Beeinflussung von Knochenzellen gezeigt. Beide können das Zellwachstum hemmen und verwenden dabei gleiche zelluläre Ziele wie c-myc, p27kip1, In manchen Zelllinien wird aufgrund der Wirkung von Calcitriol TGF- β als Mediator vermutet, wobei die beiden Hormone auch bei alleiniger Wirkung einen Wachstumsarrest aufweisen. Auch sind verschieden Loops beschrieben. So setzen OC TGF- β von der ECM frei, welches wiederum OB zur Knochenformation anregt. Dies geschieht über verschiedene Faktoren, unter anderem auch mittels D₃, was wiederum OC anregt. Viele OB-spezifische Proteine werden von Calcitriol auf dem Transkriptionslevel reguliert. Die Wirkung von Calcitriol auf Knochenzellen ist von ihrem Reifungsstadium abhängig, was zu unterschiedlichen Angaben in der Literatur geführt

hat. OC weisen zwar keine VDRs auf, trotzdem beeinflusst Calcitriol indirekt ihre Differenzierung, indem es wie erwähnt OB zur Sekretion von ECM-Komponenten anregt, welche dann OC-Differenzierung und -Formation ermöglicht. Die in vitro-Effekte von TGF- β auf OB-Linien sind unterschiedlich. Synergetische Effekte bei AP-Expression, Coll I-Synthese und -mRNA sowie Fibronectin bei humanen OB-Linien (MG-63) und primären OB konnten gezeigt werden. In CDZ senkt Calcitriol TGF- β via posttranslationalem Mechanismus. Beide Hormone weisen viele gemeinsame Charakteristika auf und scheinen gemeinsame Effektoren in Zielzellen zu verwenden. {652}

4.2.7. Leptin

Die Biologie des Knochens wird wie es scheint, durch einen zentralen Faktor reguliert; Leptin wäre ein möglicher Kandidat dafür. Lange Zeit standen die parakrinen Eigenschaften von Leptin im Vordergrund, welche hauptsächlich auf klinische Beobachtungen zurückzuführen waren. Der Umstand, dass Fettleibigkeit vor Knochenmassenverlust schützt, ist lange bekannt (653); auch existieren zahlreiche mögliche Erklärungen, wie erhöhter mechanischer Stress, vermehrte Aromatisierung von Androgene in Östrogene durch Fettgewebe und die erhöhten Insulinspiegel.

Die positive Wirkung von Leptin auf Knochenzellen wurde in weiterer Folge durch verschiedene in vitro Versuch belegt; es stimuliert die OB Differenzierung auf Kosten der Adipogenese, zudem produzieren Adipozyten große Mengen an Leptin (653a), ein Link für seine parakrine Bedeutung. Auch wirkt Leptin als Wachstumsfaktor an CDZ in den Wachstumsfugen (653b). Zu guter letzt scheint es die Osteoclastogenese zu hemmen; der Schluss ist einfach, mehr Fett – mehr Leptin – mehr Knochen.

In letzter Zeit wurde aber die zentrale Bedeutung der Knochenregulation aufgezeigt und Leptin rückte in einen anderen Blickpunkt. Große Entwicklungen auf dem Gebiet der Nahrungsaufnahme-Regulation brachten Einblicke in die Bedeutung dieser zentral gesteuerten Regulationsmechanismen, so auch bei der Knochenhomöostase. Auch existiert schon eine mögliche Theorie für die widersprüchlichen Funktionen von Leptin (zentral hemmend – peripher stimulierend, den Knochenmetabolismus betreffend), diese wird weiter unten angeführt.

Viele Jahre dachte man, dass die Nahrungsaufnahme hauptsächlich durch zwei opponierende Zellpopulationen reguliert wird; die laterale Hypothalamusregion ist für Nahrungsaufnahme zuständig, der ventromediale Nucleus antagonisiert dieses Signal und vermittelt somit

Sättigung. Dieses anfangs durchaus nützliche Dogma wurde mit der Entdeckung von Leptin durchbrochen; dieses systemisch, in weißen Fettzellen produzierte Hormon vermittelt Sättigungsgefühl. Auf diese Entdeckung folgten zahlreiche Publikationen und es wurde klar, dass man nur einzelne Puzzle Bausteine bezüglich der Nahrungsregulation entdeckt hatte. (655c)

Viele neue Moleküle konnten identifiziert werden, Leptin scheint für die Gewichtshomöostase verantwortlich zu sein, Ghrelin, ein peripheres Signal reguliert den Antrieb zu essen, moduliert wird dieser Antrieb durch homöostatisch zentrale Nervenbahnen, reich an Orexin und Melanin-Concentrating-Hormone. Gastrointestinal produzierte Moleküle wie Cholezystokinin, Glukagon-like Peptide 1 und Peptide YY vermitteln das Gefühl der Sättigung. Diese homöostatischen Mechanismen alleine würden nicht dazu führen, dass Menschen massiv an Übergewicht leiden. (655c)

Ein hedonistisches Regulationsnetzwerk moduliert die oben genannten Mechanismen. Die Belohnung, welche durch Nahrungsaufnahme erfahren wird, ist ein enormer Motor und maßgeblich an der Regulation beteiligt; einige Studien weisen auf parallele Mechanismen mit dem Suchtverhalten hin. Diese beiden Regulationsnetzwerke sind also keine starren Gebilde, sondern beeinflussen sich gegenseitig. Die Hardware (Nervenbahnen) bedient sich einer Software (Signalmoleküle) welche die Hardware justieren und neu programmieren imstande ist. (655c)

Die Vermutung eines zentralen Regulationsnetzwerkes, welches **Körpergewicht (BW)**, **Knochenmasse (BM)** und Reproduktion steuert, erhielt man schließlich durch Leptin defiziente Lebewesen. Nager und Menschen, welche im Leptin-Signaling Defekte aufweisen, sind massiv übergewichtig, zusätzlich beobachtet man eine Unterfunktion der Gonaden. Normalerweise würde man erwarten, dass diese Faktoren zu einer Verminderung der Knochenmasse führen; in der Menopause, oder bei Patienten mit gonadalen Defekten beobachtet man häufig Knochenverlust und OP, zusätzlich fehlt ihnen auch noch Leptin. Jedoch weisen dieses übergewichtigen Menschen (Leptin defizient) kaum Knochenabbau auf, sie erkranken auch nicht an OP; Leptin defiziente Mäuse (*ob/ob*), Leptin Rezeptor defiziente Mäuse (*db/db*) und Lipodystrophe Mäuse, weisen zusätzlich zu den oben genannten Faktoren auch noch erhöhte Kortison-Spiegel auf, wiederum ein kataboler Knochenfaktor, die BM ist aber um das zwei- bis dreifache erhöht, das BW verhält sich unterschiedlich. (655b)

Eine Leptin-Infusion in den dritten Ventrikel (IVC) von *ob/ob* und *wt* Mäusen führte zu einer Verminderung der Knochenmasse und der entsprechenden Knochenparameter. OB von Leptin

null Mäusen weisen eine erhöhte Aktivität gegenüber denen von Wildtypmäusen auf, die Anzahl ist nicht erhöht (655a). Die bei der Wildtypmaus beobachteten Effekte (Leptinverabreichung in den IVC führt zu einer Verminderung der Knochenmasse), wurde auch bei Ratten beobachtet - es handelt sich also nicht um ein isoliertes Mausphänomen (655a).

Der Hypothalamus produziert eine Reihe von Molekülen, welche anorexische und orexische Funktionen ausüben, reguliert werden einige mittels anorexischem Leptin. Im ventromedialen hypothalamischem (VMH) und arcuatem - (ARC) Nucleus exprimieren viele Zellen Moleküle, welche für Leptin Signale charakteristisch sind. Bei Infusion von Monosodium-Glutamat (MSG) werden hauptsächlich Areale des ARC zerstört. *ob/ob* Mäuse reagieren nach dieser Zerstörung und IVC von Leptin mit einer Erniedrigung der BM; BW wird aber nicht beeinflusst. (655b)

In Mäusen, welche Gold-Thioglucose (GTG) behandelt werden, zerstört man Strukturen die dem VMH entsprechen. Diese Mäusen weisen nach 12 Wochen einen ähnlichen Phänotyp wie *ob/ob* Mäuse auf; sie haben erhöhte BM, welche auf eine erhöhte Knochenformation zurückzuführen ist (ein Kollagenebauprodukt – desoxypyridinoline wird renal ausgeschieden und ist ein Indikator der OC – Aktivität, diese war unverändert – folglich ist die OC Aktivität nicht vermindert). Bei nachfolgender IVC Infusion von Leptin kommt es zu einer Verminderung des BW, BM wird aber nicht beeinflusst. (655b)

So wie es scheint sind GTG (VMH) sensitive Neurone für die Aufrechterhaltung der antiosteogenen Funktion von Leptin notwendig; MSG sensitive Neurone (ARC) nicht unbedingt. Weiters zeigt sich auch, dass BM und BW in unterschiedlichen Strukturen ungleich reguliert werden - weitere Versuche untermauern diese Hypothese. (655b)

Alpha Melanozyten stimulierendes Hormon (α MSH) wird durch ARC produziert und bindet an Neuronen welche MC4-R und MC3-R besitzen. Dieser Vorgang scheint für den anorexischen Effekt von Leptin notwendig zu sein, wie Mäuseversuche belegen - A^y/a Mäuse haben Defekte im Melanocortin-Signaling, was zu einer „late onset“ Fettleibigkeit führt. Diese Mäuse leiden an einer zentralen Leptin anorexischen Resistenz, der Phänotyp gleicht dem der $-/-$ MC4-R Mäuse. Letztgenannte haben interessanterweise trotz erhöhten Insulins keine erhöhte BM (ein Hinweis der zentralen Regulation). A^y/a Mäuse haben also normale BM, das heißt, das der Leptin antiosteogene Effekt unabhängig agiert. ICV Infusion von Leptin bei A^y/a Mäuse führt zu einer Verminderung der BM; es sei aber erwähnt, dass bei $-/-$

MC4-R Mäusen hingegen die BM normal bleibt. Weiters beeinflusst ICV Infusion von MTHI (ein MC4-R und MC3-R Agonist) in *ob/ob* Mäuse nicht die BM, senkt aber das BW. (655b)

Das „cocain related transkript“ (CART) wird durch Leptin reguliert und gehört zu den anorexischen Peptiden. CART *-/-* Mäuse weisen keine erhöhte BM auf. (655b)

Zusammengefasst kann man sagen, dass CART- und Melanocortin Pathways für die anorexische Wirkung von Leptin erforderlich, nicht aber für seine antiosteogene Wirkung notwendig sind. (655b)

Es scheint nach den oben angeführten Fakten, dass die Leptin Wirkung neural und nicht humeral gesteuert wird. Untermauert wird dies durch verschiedene weitere Beobachtungen und Versuche.

Bei Leptin Defizienz kommt es zu einer Verminderung der Sympathikus Aktivität. (655b)

Dopamin α Hydroxylase (DBH) ist wichtig für die Norepinephrin und Epinephrin Synthese.

DBH *-/-* Mäuse weisen erhöhte BM auf, aber weniger ausgeprägt als bei *ob/ob* Mäusen.

Interessanterweise zeigen DBH *-/-* Mäuse erhöhte Kortison und Dopamin Spiegel, eigentlich zwei antiosteogene Hormone, trotzdem ist die OB Aktivität erhöht; die Nebenniere scheint also dem zentralen Mechanismus untergeordnet zu sein. ICV Infusionen von Leptin in DBH *-/-* Mäuse führt zu keiner Veränderung der BM, aber zu vermehrten Fettabbau; somit ist Leptin auch ohne Catecholamine (NOR, EPI) in der Lage BW zu beeinflussen, nicht aber BM. (655b)

ICV Infusion von Leptin und Verabreichung von β -Blocker in wt Mäusen führt zu einem Verlust von Fett, BM wird aber nicht beeinflusst. (655b)

Bei Verabreichung eines Sympathikomimetikum der *ob/ob* Mäuse kommt es zur einer Verminderung der BM, trotz Hyperinsulinismus (wiederum ein Hinweis für zentral über humeral), die Knochenabsorption wird nicht beeinflusst; BW wird dosisabhängig beeinflusst - bei wt Mäusen führt gleicher Vorgang nur zu einer Veränderung in der BM. (655b)

Es gibt Hinweise dafür, dass Sympathikomimetika die OB Proliferation hemmen, *Cbfa1* ist vermindert, durch β -Antagonisten werden diese Effekte aufgehoben. Daraus schließt man das der Sympathikus für die BM-Regulation notwendig ist. In der Tat finden sich β_2 Rezeptoren auf dem OB, auch lassen sich de- und myelinisierte Nerven im Knochen nachweisen. (655b)

Zusammengefasst lassen sich diese Daten folgendermaßen interpretieren: das ZNS reguliert mittels β_2 Rezeptoren und dem Sympathikus die BM, unabhängig von BW; ZNS hemmt die OB-Proliferation; Leptin benötigt also für seine antiosteogene Aktivität die Sympathikus Funktion. (655b)

Verbindungen zum Menschen belegen diese Beobachtungen. Patienten mit Lipodystrophie leiden häufig an Osteosklerose und vermehrtem Knochenwachstum (656). Die zentrale Kontrolle der Knochenhomöostase wird durch weitere humane Defekte von Rezeptoren im ZNS, zum Beispiel einer Inaktivierungsmutation im Melanocortinrezeptor 4 untermauert. Es handelt sich um einen hypothalamischen Rezeptor für Melanocortin; Patienten mit dieser Störung sind ebenfalls übergewichtig und haben eine erhöhte Knochenmasse (657). {270}

Wie aber lässt sich diese unterschiedliche Wirkung von Leptin erklären (peripher – zentral) ?

Wenn Nahrungsmangel besteht führt der rasche Abfall von Leptin (659) zur Aktivierung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren Achse, mit resultierendem Hyperkortisolismus und gleichzeitiger Hemmung der Schilddrüsen- und Gonadenfunktion. In Menschen kommt es auch noch zu einem Anstieg von GH und Abfall der IGF-1 Spiegel (660,661). Diese Änderungen bei Nahrungsmangel erscheinen durchaus sinnvoll, die Reproduktion, der Grundumsatz werden gedrosselt und durch Abfall von IGF-1 werden anabole Effekte (Muskelaufbau) bei Kalorienmangel zusätzlich gestoppt. Dies alles würde aber auch zu vermehrten Knochenabbau führen, ein Umstand der fatale Auswirkungen hätte. Die Natur hat dies durch einen zentralen modulierenden Prozess gelöst, welcher bei Leptin Abfall den Knochenabbau stoppt, sogar positiv auf den Knochen sich auswirkt. Dieser letzte zentrale Schutzmechanismus bricht aber ebenfalls zusammen, wenn man z.B. pathologisches Hungern hernimmt (Anorexia nervosa). Wenn der Organismus nun wieder reichlich Nahrung zur Verfügung hat wird nun gespeichert für harte Zeiten (662). Leptin steigt an, zentral entwickelt sich eine Leptinresistenz, welche sich bemerkbar macht durch verminderten Leptin Transport vom Blut in die zerebro-spinale Flüssigkeit (663). Der Appetit wird dadurch langsamer reduziert, auch wird die Hemmung der Knochenformation verlangsamt; gleichzeitig kommen nun die positiven peripheren Knocheneffekte von Leptin ins Spiel. (658)

Dieser Mechanismus scheint in Vertebraten konserviert zu sein, zudem wird der Leptin Spiegel, der wahrscheinlich ausschlaggebend für dessen Funktion ist (zentral keine Leptinproduktion nachweisbar) durch lösliche Rezeptoren moduliert. (658b)

Es wird deutlich, dass es sich um komplexe Regulationsmechanismen handelt, deren Verständnis für ein TE-Konzept unumgänglich ist.

4.2.8. Kortison

Bei Glucocorticoide (GC) Überschuß zeigt sich histologisch verminderte Knochenneubildung, verminderte Trabekeldichte und eine reduzierte OB Zahl. Die Ursachen sind mannigfaltig, diverse GC regulierenden Faktoren welche Apoptose des OB hervorrufen, Transdifferenzierung in Adipozyten, GC induzierte Störung der pOB auf mitogen wirkende Wachstumsfaktoren, (657a)

GC regulieren auf verschiedenen Ebenen, transkriptionell, über GC response elements (GRE) (GC verbinden sich mit GC-Rezeptoren (GR) und translozieren in den Kern wo sie GRE beeinflussen), Membranrezeptoren und auch Ionenkanäle. (657a)

Die Repression der Transkription im OB ist eher auf dem Proteinniveau zu suchen als über GRE, GR verbindet sich mit anderen TF (NFκB, activator protein 1, ...) und beeinflussen so die Synthesen der mRNA. (657a)

Die Inhibition der Proliferation kann bei diesem weitem Spektrum an Angriffspunkten über viele Mechanismen ablaufen, wie der Induktion des Zelltods; downregulation von Zyklusproteinen oder deren Rezeptoren; aufregulierung von Wachstumsinhibitoren und schließlich der damit assoziierten zellulären Signalwege. (657a)

Im OB sind viele dieser Signalwege bekannt, (RPTK, G Protein, Integrin gekoppelte Signalwege, BMP-2 gekoppelte Signalwege, ...), die meisten involvieren ERK. ERK selbst ist meist ein negativ Regulator. Es wurde gezeigt das GC Gabe die Protein Tyrosin Phosphatase Aktivität erhöht, z.B. von Mitogen activated protein kinase phosphatase 1 (MKP-1) durch einen transkriptionellen Mechanismus. Dies führt zur Dephosphorylierung von ERK und damit verbunden zur negativen Regulation der unreifen OB Reifung. (657a)

5. Abschluss

TE ist eine Disziplin, die *koordinierte Zusammenarbeit* von vielen einzelnen Gruppen erfordern würde. Viele Bereiche, welche bereits etabliert sind, könnten durch quervernetzten

der Ressourcen besser ausgebaut werden. Leider ist in Österreich die Etablierung solcher "Teams" sehr schwierig. Ich möchte zuerst einen Teil der Diskussion verwenden, wieso es meiner Meinung nach zu dieser Entwicklung, gekommen ist.

Einmal sind Wissenschaftler, welche es schaffen immer wieder in Top Journalen zu publizieren in Österreich sehr dünn gesät. Die Ursachen hierfür liegen hauptsächlich in der Unattraktivität dieses Landes als Forschungszentrum; dies hängt wiederum mit der Geldvergabe zusammen. Forscher sind meistens kaum interessiert mit Medizinern zusammenzuarbeiten, die Ursachen sind sehr vielfältig.

Wir begehen häufig den Fehler auf eigene Faust wissenschaftliche Grundlagenprojekte zu starten und vergessen dabei häufig unser eigentliches Potential in Kooperationen einzubringen, nämlich die klinische Erfahrung und Wissen. Zudem werden junge Ärzte getrieben wissenschaftlich zu arbeiten, obwohl sie keine Wissenschaftler sind; natürlich ist es wichtig ein Verständnis für das wissenschaftliche Denken zu entwickeln, jedoch sollte dies auf freiwilliger Basis erfolgen, genauso sollten Naturwissenschaftler einen Einblick in den medizinischen Alltag bekommen; nur so kann eine Kooperation erfolgreich gestartet werden. Sobald die Wissenschaft mit materiellen Anreizen kombiniert ist, läuft sie immer Gefahr in eine Scheinwissenschaft abzugleiten; dessen ungeachtet muss man natürlich von etwas leben, ein Ausweg aus diesem Dilemma könnte die absolute Gleichstellung des klinischen Betätigungsfeldes mit dem wissenschaftlichen Arbeiten sein. Man könnte sich dann frei entscheiden, vor allem würde das klinische Wissen wieder mehr an Bedeutung gewinnen. Gleichzeitig würde man der Entwicklung Einhalt gebieten, dass man Ärzte ausbildet, die schlechte Wissenschaftler und zudem auch noch schlechte Kliniker sind.

TE ist meiner Meinung nach ein sehr *potenter therapeutischer Bereich*, der jedoch auch Fragen aufwirft, auf die ich im Folgenden eingehen möchte. Ich glaube die Medizin läuft mit diesem Gebiet weiter Gefahr in einen rein therapeutischen Dienstleistungssektor abzurutschen. Prophylaxe, Aufklärung und Krankheitsvermeidung ist in den westlichen Ländern, trotz guter Möglichkeiten, sehr klein geschrieben. Dritte Welt Länder sind aus der Diskussion bewusst ausgenommen, denn auch wenn sie die Kenntnisse hätten/haben, mangelt es an der möglichen Umsetzung, aufgrund des Mangels an einfachsten Mittel; auch diese Entwicklung sollte überdacht werden - ist es nicht sinnvoller in Bezug auf zukünftige Konfliktvermeidung, zuerst einen bestehenden Niveauunterschied auszugleichen und erst dann weiter an der Entwicklung des Medizinsektors forscht ?.

Die Zunahme, einer mit enormen Kosten verbundenen High-Tech Medizin, wie TE es erfordert, birgt Gefahren. Einmal die Ausbildung einer Zwei-Klassen-Gesellschaft, jene die sich die "bessere" Medizin leisten können und andere die auf der Strecke bleiben. Das "auf der Strecke bleiben" kann verschiedene Entwicklungen annehmen, eine der grauenhaftesten Vorstellungen wären kaufbare Ersatzteillager, wo Betroffene durch den Verkauf eigener Biomasse größeres Unheil von sich abwenden, indem vorher Unleistbares durch den Verkauf kurzfristig leistbar wird. Die zweite darauf folgende mögliche Entwicklung, die mir problematisch erscheint ist, dass wir dann Gefahr laufen nachlässiger mit unserem Körper umzugehen. Jetzt schon ist der Umgang bei vielen Menschen mit dem eigenen Körper sehr sorglos, trotz Aufklärungen und Sanktionen. Was für eine Entwicklung wäre zu erwarten, wenn jeder wüsste: "Ist es kaputt, kann ich es mir wieder ersetzen lassen". Dies hätte nicht nur Folgen in Bezug auf den Umgang mit leiblicher Materie, ich glaube es käme auch zu einem Wandel im Denken; damit verbunden auch eine Wandlung im soziokulturellen Leben. Die folgenden politischen und gesellschaftlichen Veränderungen sind schwer vorauszusagen, der Umgang mit der Natur und anderen Lebewesen würden sich aber meiner Meinung nach negativ auswirken. Wir leben jetzt in einer Wegwerfgesellschaft - dann auch in Bezug auf biologische Materie.

Nicht zu vergessen ist auch, dass sozioökonomische Probleme der "alternden Gesellschaft". Schon jetzt werden die Menschen immer älter, durch diverse Maßnahmen kann das Leben Einzelner noch weiter zum Teil erheblich verlängert werden; auch dies wirkt sich natürlich auf unsere Gesellschaft aus. Es Bedarf also noch vieler Überlegungen und Diskussionen bei der Etablierung und Ausübung dieser Disziplin.

Die Entwicklung bei TE zeigt auch positive Aspekte auf, man geht z.B. immer mehr von synthetischen Lösungen ab, und wendet sich vermehrt der Biomimetic zu. Man erkennt, dass man die Evolution, eine mathematisch funktionierenden Auslese, die Jahrmillionen andauerte, nicht mit dem menschlichen Verstand überholen kann. Meiner Meinung nach steht das Verständnis der ablaufenden Prozesse, die bereits erfolgreich durch das Sein der Natur etabliert wurden im Vordergrund. Diese Prozesse zu imitieren, eventuell gewisse Schritte zu beschleunigen, sind meiner Meinung nach der einzige wirklich erfolgversprechende Schritt im Kampf gegen Erkrankungen. Das Aufdecken der grundlegenden Verläufe hat zudem einen weiteren Vorteil, statt der Suche nach neuen Wegen; es ermöglicht eine Vermeidungshaltung gegenüber Faktoren, welche das System gefährden - man wäre somit automatisch wieder

vermehrt in der Prophylaxe, die auch eine zunehmende Auseinandersetzung mit dem Sein mit sich bringt und eine Gegenbewegung zu der "Potato-Couch-Gesellschaft" darstellt.

6. Verwendete Abkürzungen

| | |
|----------------|--|
| aa | Aminosäuren |
| AP | Alkalische Phosphatase |
| BMP | Bone Morphogenetic Protein |
| BP | Biphosphonate |
| BSP | Bone Sialo Protein |
| Cbfa | Core binding factor |
| CC | Chondroblast |
| CDMPs | cartilage derived morphogenetic proteins |
| CDZ | Chondrozyt(en) |
| Chd | Chordin |
| CNP | C-Typ natriuretische Peptid |
| Coll | Kollagen |
| D ₃ | Vitamin D ₃ |
| Dhh | Desert Hedgehog |
| dpp | decapentaplegic |
| ECM | Extrazelluläre Matrix |
| EGF | Epidermal growth Factor |
| ER | Östrogenrezeptor(en) |
| ES | embryonale Stammzellen |
| FB | Fibroblast |
| FEO | familiären Expansile Osteolyse |
| FGF | Fibroblast Growth Factor |
| FGFR | Fibroblast Growth Factor Rezeptor |
| FN | Fibronectin |
| fra-1 | Fos related antigen |
| Gag | Glykosaminoglykane |
| GC | Glukokortikoid |
| GDF | Growth Differentiation Factor |
| GH | Growth Hormone |
| GP | Glykoproteine |
| GPCR | G-Protein gekoppelten Rezeptoren |
| GR | Glukokortikoidrezeptor |
| GRE | Glukokortikoid response elements |
| hCDZ | hypertrophen Chondrozyten |
| IGF | Insulin like Growth Factor |
| Ihh | Indian Hedgehog |
| IL | Interleukin |
| LS | Laron Syndrom |
| LTBP | latent TGF- β binding proteins |
| M-CSF | Macrophag Colonie Stimulating Factor |
| MH | N-terminale Mad Homologe Domäne |
| MKP-1 | Mitogen activated protein kinase phosphatase 1 |
| MMP9 | Metallo Proteinase 9 |
| MPC | Mesodermale Progenitor Zelle |
| MS | mesenchymale Stammzellen |
| NF κ B | nuclear Factor kappa B |
| NOS | Stickstoffmonoxidsynthase |
| OA | Osteoarthritis |
| OB | Osteoblast(en) |

| | |
|--------------|--|
| Oc | Osteocalcin |
| OC | Osteoklast(en) |
| OCBoxI | Osteocalcin Box I |
| OG | Osteocalcingen |
| Op | Osteopontin |
| ORG | Osteocalcin verwandte Gen |
| OSE | Osteoblast spezifisches Element |
| Osx | Osterix |
| OZY | Osteozyt(en) |
| PCL | Poly(ϵ -caprolactone) |
| PDMS | Poly(dimethylsiloxane) |
| PDS | Polydioxanone |
| PDYN | Prodynorphin |
| PENK | Proenkephalin |
| PGA | Poly(glycolic acid) |
| phCDZ | prehypertropher Chondrozyt |
| PLA | Poly(lactic acid) |
| PLGA | Poly(lactic-co-glycolic acid) copolymers |
| PLLA | Poly(L-lactic acid) |
| pOB | prä Osteoblast(en) |
| POMC | Proopiomelanocortin |
| PPR | PTH/PTHrP-Rezeptor |
| Ptc1 | Patched-1 |
| PTH | Parathyroidales Hormon |
| PTHrP | Parathyroidales Hormon verwandtes Protein |
| RA | rheumatoide Arthritis |
| RANKL | Rank Ligand |
| SAM | Self Assembled Monolayers |
| scw | screw |
| SERM | Östrogen Rezeptor Modulatoren |
| Shh | Sonic Hedgehog |
| sog | short gastrulation |
| SZ | Stammzellen |
| TBP | TGF- β -binding-protein |
| TE | Tissue Engineering |
| TF | Transkriptionsfaktoren |
| TGF- β | Transforming growth factor β |
| TIP39 | bovine tubero-infundibuläre peptide von 39aa |
| Tld | Tolloid |
| TNF | Tumor necrosis factor |
| tsg | Twisted Gastrulation |
| T β | TGF- β Rezeptoren |
| T β S | TGF- β Superfamilie |
| VEGF | vaskulären endothialen Wachstumsfaktors |
| Xol | Xolloid |
| μ FP | Microfluid Patterning |

6. Literaturverzeichnis:

- 1)
Vacanti J.P., Vacanti C.A., Nerem R.M. (2000) Introduction to Tissue Engineering *In* Principles of Tissue Engineering. eds. Lanza R.P., Langer R., Vacanti J. pp. 1-19. Academic Press
- 2)
Yannas I.V., Bell E., Grodzinsky A.J., Kamm R.D., Lauffenburger D.A., Takayama S., Chapman R.G., Kane R.S., Whitesides G.M. (2000) Part III,IV,V *In* Principles of Tissue Engineering. eds. Lanza R.P., Langer R., Vacanti J. pp. 167-218 Academic Press
- 3)
Wessel G.M. and McClay D.R. (1987) Gastrulation in the sea urchin embryo requires the deposition of crosslinked collagen within the ECM. *Dev. Biol.* 121(1): 149-165
- 4)
Lodish H., Berk A., Zipursky S.L., Matsudaira P., Baltimore D., Darnell J.E. (2000) Integrating cells into tissues *In* Molecular Cell Biology pp. 969-1048 W.H Freeman and Company
- 5)
Nickerson J.A., Blencowe B.J., Penman S. (1995) The architectural organization of nuclear metabolism. *Int. Rev. Cytol.*, 162A:67-123.
- 6)
Mirkovitch J., Mirault M.E., Laemmli U.K. (1984) Organization of the higher-order chromatin loop: specific DNA attachment sites on nuclear scaffold. *Cell*, 39(1):223-32.
- 7)
Hutchison C.J., Bridger J.M., Cox L.S., Kill I.R. (1994) Weaving a pattern from disparate threads: lamin function in nuclear assembly and DNA replication. *J. Cell Sci.*, 107 (Pt12):3259-69.
- 8)
Dijkwel P.A., Hamlin J.L. (1995) Origins of replication and the nuclear matrix: the DHFR domain as a paradigm. *Int. Rev. Cytol.*, 162A:455-484
- 9)
Xing Y., Johnson C.V., Dobner P.R., Lawrence J.B. (1993) Higher level organization of individual gene transkription and RNA splicing. *Science* 259:1326-1330.
- 10)

Davie J.R. (1995) The nuclear matrix and the regulation of chromatin organization and function. *Int. Rev. Cytol.*, 162A:191-250.

11)

He D., Zeng C., Brinkley B.R. (1995) Nuclear matrix proteins as structural and functional components of the mitotic apparatus. *Int. Rev. Cytol.*, 162B:1-74.

12)

Pienta K.J., Getzenberg R.H., Coffey D.S. (1991) Cell structure and DNA organization. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.*, 1(4):355-85.

13)

Manuelidis L. (1990) A view of interphase chromosomes. *Science* 250(4987):1533-40.

14)

Cook P.R. (1995) A chromomeric model for nuclear and chromosome structure. *J. Cell Sci.*, 108 (Pt 9):2927-35.

15)

Saitoh Y., Laemmli U.K. (1994) Metaphase chromosome structure: bands arise from a differential folding path of the highly AT-rich scaffold. *Cell* 76(4):609-22.

16)

Wolffe A.P. (1994) Architectural transcription factors *Science* 264(5162):1100-1.

17)

Grosschedl R., Giese K., Pagel J. (1994) HMG domain proteins: architectural elements in the assembly of nucleoprotein structures. *Trends Genet.* 10(3):94-100.

18)

Van der Vliet P.C., Verrijzer C.P. (1993) Bending of DNA by transcription factors. *Bioessays*, 15(1):25-32.

19)

Natesan S., Gilman M.Z. (1993) DNA bending and orientation-dependent function of YY1 in the c-fos promoter. *Genes Dev.* 7(12B):2497-509.

20)

Nakagomi K., Kohwi Y., Dickinson L.A., Kohwi-Shigematsu T. (1994) A novel DNA-binding motif in the nuclear matrix attachment DNA-binding protein SATB1. *Mol. Cell Biol.*, 14(3):1852-60

21)

Dickinson L.A., Kohwi-Shigematsu T. (1995) Nucleolin is a matrix attachment region DNA-binding protein that specifically recognizes a region with high base-unpairing potential. *Mol Cell Biol.* 15(1):456-65.

22)

Lawrence J.B., Carter K.C., Xing X. (1993) Probing functional organization within the nucleus: Is genome structure integrated with RNA metabolism ? *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 58:807-818

23)

Bidwell J.P., Alvarez M., Feister H., Onyia J., Hock J. (1998). Nuclear Matrix Proteins and Osteoblast Gene Expression. *J. of bone and mineral research*, 13(2):155-166

24)

Chen C.S., Mrksich M., Huang S., Whitesides G.M., Ingber D.E. (1997) Geometric control of cell life and death. *Science* 276: 1425-1428.

25)

Ingber D.E., Prusty D., Sun Z., Betensky H., Wang N. (1995) Cell shape, cytoskeletal mechanics, and cell cycle control in angiogenesis. *J. Biomech.*, 28:1471-1484

26)

Malek A.M., Izumo S. (1996) Mechanism of endothelial cell shape change and cytoskeletal remodeling in response to fluid shear stress. *J. Cell Science* 109:713-726

27)

Thoumine O., Ziegler T., Girard P.R., Nerem R.M. (1995) Elongation of confluent endothelial cells in culture: the importance of fields of force in the associated alterations of their cytoskeletal structure. *Exp. Cell Res.* 219:427-441

28)

Lelievre S., Weaver V.M., Bissell M.J. (1996) Extracellular matrix signaling from the cellular membran skeleton to the nuclear skeleton: A model of gene regulation. *Recent Prog. Horm. Res.* 51:417-432

29)

Diegelmann R.F., Peterkofsky B. (1972) Inhibition of collagen secretion from bone and cultured fibroblasts by microtubular disruptive drugs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 69(4):892-6.

30)

Scherft JP, Heersche JN. (1975) Accumulation of collagen-containing vacuoles in osteoblasts after administration of colchicine. *Cell Tissue Res.* 157(3):353-65.

31)

Takeuchi Y., Nakayama K., Matsumoto T. (1996) Differentiation and cell surface expression of transforming growth factor-beta receptors are regulated by interaction with matrix collagen in murine osteoblastic cells. *J. Biol. Chem.* 271(7):3938-44

32)

Engleman V.W., Nickols G.A., Ross F.P., Horton M.A., Griggs D.W., Settle S.L., Ruminski P.G., Teitelbaum S.L. (1997) A peptidomimetic antagonist of the alpha(v)beta3 integrin

inhibits bone resorption in vitro and prevents osteoporosis in vivo. *J. Clin. Invest.* 99(9):2284-92.

33)

Ajubi N.E., Klein-Nulend J., Nijweide P.J., Vrijheid-Lammers T., Alblas M.J., Burger E.H. (1996) Pulsating fluid flow increases prostaglandin production by cultured chicken osteocytes--a cytoskeleton-dependent process. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 225(1):62-8.

34)

Banerjee C., Hiebert S.W., Stein J.L., Lian J.B., Stein G.S. (1996) An AML-1 consensus sequence binds an osteoblast-specific complex and transcriptionally activates the osteocalcin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 93(10):4968-73.

35)

Geoffroy V., Ducy P., Karsenty G. (1995) A PEBP2 alpha/AML-1-related factor increases osteocalcin promoter activity through its binding to an osteoblast-specific cis-acting element. *J. Biol. Chem.* 270(52):30973-9.

36)

Alvarez M., Long H., Onyia J., Hock J., Xu W., Bidwell J. (1997) Rat osteoblast and osteosarcoma nuclear matrix proteins bind with sequence specificity to the rat type I collagen promoter. *Endocrinology* 138(1):482-9.

37)

Lloyd Q.P., Kuhn M.A., Gay C.V. (1995) Characterization of calcium translocation across the plasma membrane of primary osteoblasts using a lipophilic calcium-sensitive fluorescent dye, calcium green C18. *J. Biol. Chem.* 270(38):22445-51.

38)

Egan J.J., Gronowicz G., Rodan G.A. (1991) Parathyroid hormone promotes the disassembly of cytoskeletal actin and myosin in cultured osteoblastic cells: mediation by cyclic AMP. *J. Cell Biochem.* 45(1):101-11.

39)

Ali N.N., Melhuish P.B., Boyde A., Bennett A., Jones S.J. (1990) Parathyroid hormone, but not prostaglandin E₂, changes the shape of osteoblasts maintained on bone in vitro. *J. Bone Miner. Res.*, 5(2):115-21.

40)

Pockwinse S.M., Stein J.L., Lian J.B., Stein G.S. (1995) Developmental stage-specific cellular responses to vitamin D and glucocorticoids during differentiation of the osteoblast phenotype: interrelationship of morphology and gene expression by in situ hybridization. *Exp. Cell Res.*, 216(1):244-60.

41)

Yannas I.V. (2000) In Vivo Synthesis of Tissues and Organs *In Principles of Tissue Engineering.* eds. Lanza R.P., Langer R., Vacanti J. pp. 167-177 Academic Press

42)

Shapiro F. (1988) Cortical bone repair. The relationship of the lacunar-canalicular system and intercellular gap junctions to the repair process. *J. Bone Joint Surg. Am.*70(7):1067-81.

43)

Dahlin L.B., Zhao Q., and Bjusten L.M. (1995) Nerve regeneration in silicone tubes: Distribution of macrophages and interleukin 1 β in the formed fibrin matrix. *Restorative Neurol. Neurosci.* 8:199-203

44)

Boykin J.V. and Molnar J.A. (1992) Burn scars and skin equivalents. *In Wound healing.* eds. I.K. Cohen, R.F. Diegelmann and W.J. Lindblad pp. 500-509. Saunders, Philadelphia.

45)

Yannas I.V. (1997) Models of organ regeneration processes induced by templates. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 831: 280-293

46)

Billingham R.E., Medawar P.B. (1955) Contracture and intussusceptive growth in the healing of extensivewounds in mammalian skin. *J. Anat.* 89: 114-123

47)

Billingham R.E., Medawar P.B. (1951) The technique of free skin grafting in mammals. *J. Exp. Biol.* 28: 385-402

48)

Yannas I.V. and Burke J.F. (1980) Design of an artificial skin. I. Basic design principles. *J. Biomed. Mater. Res.* 14: 65-81

49)

Piez K. (1984) Molecular and aggregate structures of the collagens. *In ECM Biochemistry.* eds. K.A. Piez, A.H. Reddi. Chapter 1, Elsevier, New York

50)

Bell E., Ivarsson B., Merrill C. (1979) Production of a tissue like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:1274

51)

Chvapil M. (1977) Collagen sponge: Theory and practice of medical applications. *J. Biomed. Mater. Res.* 11: 721-741

52)

Anselme K., Bacques C., Charriere G., Hartmann D.J., Herbage D., Garrone R. (1990) Tissue reaction to subcutaneous implantation of a collagen sponge. *J. Biomed. Mater. Res.* 24:689-703

53)

Pachence J.M., Berg R.A., Silver F.H. (1987) Collagen: Its place in the medical device industry. *MD&DI*, pp.49-55

54)

Bell E., Parenteau R., Gay R., Rosenberg M., Kemp P., Green G.D., Muthukumaran N., Nolte C. (1991) The living skin equivalent: Its manufacture, its organotypic properties and its responses to irritants. *Toxicol. In Vitro* 5:591-596

55)

Pachence J.M., Kohn J. (2000) Biodegradable Polymers *In Principles of Tissue Engineering*. eds. Lanza R.P., Langer R., Vacanti J. pp. 263-274 Academic Press

56)

Medina M., Paddock H.N., Connolly R.J. (1995) Schwaitzberg SD. Novel antiadhesion barrier does not prevent anastomotic healing in a rabbit model. *J. Invest. Surg.* 8(3):179-86.

57)

Holzman S., Connolly R.J., Schwaitzberg S.D. (1994) Effect of hyaluronic acid solution on healing of bowel anastomoses. *J. Invest. Surg.* 7(5):431-7.

58)

Urmann B., Gomel V., Jetha N. (1991) Effect of hyaluronic acid on postoperative intraperitoneal adhesion prevention in the rat model. *Fertil.Steril.* 56:563-567

59)

Malette W., Quigley M., Adicks E. (1986) Chitosan effect in vascular surgery, tissue culture and tissue regeneration. *In Chitin in Nature and Technology*. eds. R. Muzzarelli, C. Jeuniaux, G. Gooday. pp. 435-442. Plenum, New York.

60)

East G.C., McIntyre J.E., Quin Y. (1989) Medical use of chitosan. *In Chitin and Chitosan*. eds. G. Skjak-Braek, T. Anthonsen, P. Sandford. pp. 757-764. Elsevier London.

61)

Miller N.D., Williams D.F. (1987) On the biodegradation of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) homopolymer and poly- β -hydroxybutyrate-hydroxyvalerate copolymers. *Biomaterials* 8:129-137

62)

Yasin M., Holland S.J., Jolly A.M., Tighe B.J. (1989) Polymers for biodegradable medical devices. VI. Hydroxybutyrate-hydroxyvalerate copolymers: Accelerated Degradation of blends with polysaccharides. *Biomaterials* 10: 400-412

63)

Doi Y., Kanesawa Y., Kunioka M., Saito T. (1990) Biodegradation of microbial copolyesters: Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and poly (3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxyvalerate). *Macromolecules* 23: 26-31

64)

Freed L.E., Grande D.A., Lingbin Z., Emmanuel J., Marquis J.C., Langer R. (1994) Joint resurfacing using allograft chondrocytes and synthetic biodegradable polymer scaffolds. *J. Biomed. Mater. Res.* 28(8):891-9.

65)

Freed L.E., Vunjak-Novakovic G., Biron R.J., Eagles D.B., Lesnoy D.C., Barlow S.K., Langer R. (1994) Biodegradable polymer scaffolds for tissue engineering. *Biotechnology (NY)* 12(7):689-93.

66)

Pitt C.G. (1990) Poly- ϵ -caprolactone and its copolymers. *In Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems.* eds. M. Chasin, R. Langer. pp. 71-119. Dekker, New York

67)

Heller J, Daniels A.U. (1994) Poly(ortho esters). *In Biomedical Polymers.* eds. S. Shalaby. pp. 35-67. Hanser Publishers, Munich and New York.

68)

Laurencin C., Domb A., Morris C., Brown V., Chasin M., McConnell R., Lange N., Langer R. (1990) Poly(anhydride) administration in high doses in vivo: studies of biocompatibility and toxicology. *J. Biomed. Mater. Res.* 24(11):1463-81.

69)

Chasin M., Domb A., Ron E., Mathiowitz E., Langer R., Leone K., Laurencin C., Brem H., Grossman (1990) Polyanhydrides as drug delivery systems. *In Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems.* eds. C.G. Pitt. pp. 43-69. Dekker, New York

70)

Thomson R.C., Shung A.K., Yaszemski M.J., Mikos A.G. (2000) Polymer Scaffold Processing *In Principles of Tissue Engineering.* eds. Lanza R.P., Langer R., Vacanti J. pp. 251-261 Academic Press

71)

Xia Y., Whitesides G.M. (1998) Soft Lithography. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 37:550-575

72)

Saltzman W.M. (2000) Cell Interactions with Polymers *In Principles of Tissue Engineering.* eds. Lanza R.P., Langer R., Vacanti J. pp. 221-234 Academic Press

73)

Karlsson J.O.M., Toner M. (2000) Cryopreservation *In Principles of Tissue Engineering.* eds. Lanza R.P., Langer R., Vacanti J. pp. 293-308 Academic Press

74)

Faustman D. (2000) Immunomodulation *In Principles of Tissue Engineering. eds. Lanza R.P., Langer R., Vacanti J. pp. 309-319 Academic Press*

75)

Aebischer P., Schuep M., Deglon N. et al. (1996) Intrathecal delivery of CNTF using encapsulated genetically modified xenogeneic cells in amyotrophic lateral sclerosis patients. *Nat. Med.* 2:1041

76)

Maki T., Lodge J.P.A., Carrot M. et al. (1993) Treatment of severe diabetes mellitus for more than one year using a vascularized hybrid artificial pancreas. *Transplantation* 55: 713-718

77)

Soon-Shiong P., Heintz R.E., Merideth N. (1994) Insulin independence in a type I diabetic patient after encapsulated islet transplantation. *Lancet* 343: 950-951

78)

Zielinski B.A., Lysaght M.J., Avgoustiniatos E.S., Wu H., Colton C.K. (2000) Part VI *In Principles of Tissue Engineering. eds. Lanza R.P., Langer R., Vacanti J. pp. 281-350 Academic Press*

79)

Leblond F.A., Simard G., Henley N., Rocheleau B., Huet P. -M., Hallé J. -P. (1999) Studies on smaller (315µm) microcapsules: IV. Feasibility and safety of intrahepatic implantations of small alginate poly-L-lysine microcapsules. *Cell Transplant.* 8: 327-337

80)

Wu H., Avgoustiniatos E.S., Swette L., Bonner-Weir S., Weir G.C., Colton C.K. (1999) In situ electrochemical oxygen generation with an immunoisolation device. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 875:105-125

81)

Fauza D.O. (2000) Fetal Tissue Engineering *In Principles of Tissue Engineering. eds. Lanza R.P., Langer R., Vacanti J. pp. 353-364 Academic Press*

82)

Fauza D.O., Marler J., Koka R., et al. (2000) Fetal tissue engineering: Diaphragmatic replacement. *J. Pediatr. Surg.*

83)

Fauza D.O., Fishman S., Mehegan K., et al. (1998) Videofetoscopically assisted fetal tissue engineering: Bladder augmentation. *J. Pediatr. Surg.* 33: 7-12

84)

Fauza D.O., Fishman S., Mehegan K., et al. (1998) Videofetoscopically assisted fetal tissue engineering: Skin replacement. *J. Pediatr. Surg.* 33: 357-361

85)

Shamblott M.J., Edwards B.E., Gearhart J.D. (2000) Pluripotent Stem Cells *In Principles of Tissue Engineering*. eds. Lanza R.P., Langer R., Vacanti J. pp. 369-378 Academic Press

86)

Fradkin L.G., Ropp J.D., Warner J.F. (2000) Gene-based Therapeutics *In Principles of Tissue Engineering*. eds. Lanza R.P., Langer R., Vacanti J. pp. 385-405 Academic Press

87)

Agrawal R.S., Karhu K., Laukkanen J., Kirkinen P., Yla-Herttuala S., Agrawal Y.P. (1999) Complement and anti- α -galactosyl natural antibody mediated inactivation of murine retrovirus occurs in adult serum but not in umbilical cord serum. *Gene Ther.* 6: 146-148

88)

Barron L.G., Meyer K.B., Szoka F.C.Jr. (1998) Effects of complement depletion on the pharmacokinetics and gene delivery mediated by cationic lipid DNA complexes. *Hum. Gene Ther.* 9: 315-323

89)

Greber U.F., Kasamatsu H. (1996) Nuclear targeting of SV40 and adenovirus. *Trends Cell Biol.* 6: 189-195

90)

Mac Milan H.W. (1924) The structure and function of the alveolar process. *J. nat. dent. Ass.* 11:1059

91)

Schröder H.E. (1986) The periodontium. *Handbook of microscopic anatomy*, vol.V/5. Springer, Berlin

92)

Parfitt G.J. (1962) An investigation of the normal variations in alveolar bone trabeculation. *Oral Surg.* 15:1453

93)

Seipel C.M. (1948) Trajectories of the jaws. *Acta odont. scand.*8: 81

94)

Schröder H.E. (1992) *Orale Strukturbiologie*. Thieme-Verlag

95)

Junqueira, Carneiro. (1996) *Histologie*. Springer-Verlag

96)

Buser D., Dula K., Hirt H.P., Berthold H. (1996) Localized ridge augmentation using guided bone regeneration. *In Guided Bone Regeneration in Implant Dentistry*. eds. Buser D., Dahlin C., Schenk R.K. Chicago: Quintessence Publishing Co.:189-233

97)

Cole A.S., Eastoe J.E. (1977) *Biochemistry and oral Biology*. Wright, Bristol (pp. 333ff.)

98)

Melcher A.H., Eastoe J.E. (1969) The connective tissue of the periodontium. *Academic Press, London* (pp.167ff.)

99)

Schwarzacher H.G., Schnedl W. (1988) *Histologie*. Facultas-Verlag

100)

Turksen K., Aubin J.E. (1991) Positive and negative immunoselection for enrichment of two classes of osteoprogenitor cells. *J.Cell Biol.*, 114: 373-384

101)

Aubin J.E. (1998). Advances in the osteoblast lineage. *Biochem. Cell Biol.*, 76:899-910

102)

Dobnig H., Turner R.T. (1995) Evidence that intermittent treatment with parathyroid hormone increases bone formation in adult rats by activation of bone lining cells. *Endocrinology*, 136: 3628-3632

103)

Nijweide P.J. Burger E.E., Nulend J.K., Van der Plas A. (1996) The osteocyte. *In Principles of bone Biologie*. eds. J.P. Bilezikian, L.G. Raisz, G.A. Rodan. Academic Press, San Diego. pp. 115-126

104)

Bruder S.P., Caplan A.I (1990) Terminal differentiation of osteogenic cells in the embryonic chick tibia is revealed by a monoclonal antibody against osteocyte. *Bone*, 11: 189-198

105)

Noda M., Yoon K., Rodan G.A., Koppel D.E. (1987) High lateral mobility of endogenous and transfected alkaline phosphatase: A phosphatidylinositol-anchored membrane protein. *J. Cell Biol.*, 105: 1671-1677

106)

Hui M., Hu M., Tenebaum H.C. (1993) Changes in cell adhesion and cell proliferation are associated with expression of tissue non-specific alkaline phosphatase. *Cell Tissue Res.*, 274: 429-437.

107)

Malaval L., Liu F., Roche P., Aubin J.E. (1999) Kinetics of osteoprogenitor proliferation and osteoblast differentiation in vitro. *J. Cell Biochem.*; 74(4):616-27.

108)

Rodan G.A. (1995) Osteopontin overview. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 760:1-5.

110)

Candelieri G.A., Liu F., Aubin J.E. (1997) Heterogeneity of marker expression by osteoblast in different zones of bone in 21 day fetal rat calvaria. *J. Bone Miner. Res.*, 12:187

111)

Bianco P., Riminucci E., Termine J.D., Robey P.G. (1993) Bone sialoprotein (BSP) secretion and osteoblast differentiation: relationship to bromodeoxyuridine incorporation, alkaline phosphatase, and matrix deposition. *J. Histochem. Cytochem.*, 41(2):183-91.

112)

Chen J., Shapiro H.S., Sodek J. (1992) Development expression of bone sialoprotein mRNA in rat mineralized connective tissues. *J. Bone Miner. Res.*, 7(8):987-97.

113)

Bianco P., Fisher L.W., Young M.F., Termine J.D., Robey P.G. (1991) Expression of bone sialoprotein (BSP) in developing human tissues. *Calcif. Tissue Int.*, 49(6):421-6.

114)

Thiede M.A., Smock S.L., Petersen D.N., Grasser W.A., Thompson D.D., Nishimoto S.K. (1994) Presence of messenger ribonucleic acid encoding osteocalcin, a marker of bone turnover, in bone marrow megakaryocytes and peripheral blood platelets. *Endocrinology*, 135(3):929-37

115)

Moursi A.M., Damsky C.H., Lull J., Zimmerman D., Doty S.B. (1996). Fibronectin regulates calvarial osteoblast differentiation. *J. of Cell Science*, 109:1369-1380

116)

Globus R.K., Doty S.B., Lull J.C., Holmuhamedov E., Humphries M.J., Damsky C.H. (1998). *J. of Cell Science*, 111:1385-1393

117)

Rosen H., Krichevsky A., Bar-Shavit Z. (1998). The enkephalinergic Osteoblast. *J. of bone and miner. research*, 13 (10):1515-1520.

118)

Stefano G.B., Scharrer B., Smith E.M., Hughes T.K. Jr., Magazine H.I., Bilfinger T.V., Hartman A.R. et al. (1996) Opioid and opiate immunoregulatory processes. *Crit. Rev. Immunol.*, 16:109-144

119)

Holt V. (1991) Opioid peptides genes: Structure and regulation. *In Neurobiology of Opioids. eds. Almeida O.F.X., Shippenberg T.S. Springer-Verlag Berlin Germany, pp. 11-51*

120)

Schafer M.K-H., Day R., Watson S.J., Akil H. (1991) Distribution of opioids in brain and in peripheral tissues. *In Neurobiology of Opioids. eds. Almeida O.F.X., Shippenberg T.S. Springer-Verlag Berlin Germany, pp. 53-71*

121)

Bjurholm A., Kreicbergs A., Schultzberg M., Lerner U.H. (1992) Neuroendocrine regulation of cAMP formation in osteoblastic cell lines (UMR-106-01, ROS 17/2.8, MC3T§-E1 and Saos-2) and primary bone cells. *J. Bone Miner. Res.*, 7:1011-1019

122)

Hill E.L., Elde R. (1991) Distribution of CGRP-, VIP-, D beta H-, SP-, and NPY-immunoreactive nerves in the periosteum of the rat. *Cell Tissue Res.*, 264:469-480

123)

Kontinen Y., Imai S., Suda A. (1996) Neuropeptides and the puzzle of bone remodeling. State of the art. *Acta Orthop. Scand.*, 667: 632-639

124)

Akil H., Watson S.J., Young E., Lewis M.E., Khachaturian H., Walker J.M. (1984) Endogenous opioids biology and function. *Annu. Rev. Neurosci.*, 7: 223-255

125)

Imura H., Kato Y., Nakao K., Tanaka I., et al (1985) Endogenous opioids and related peptides: from molecular biology to clinical medicine. The Sir Henry Dale lecture for 1985. *J. Endocrinol.*, 107(2):147-57

126)

Douglass J., Civelli O., Herbert E. (1984) Polyprotein gene expression: generation of diversity of neuroendocrine peptides. *Annu. Rev. Biochem.*, 53:665-715. Review.

127)

Evans C.J., Keith D.E. Jr., Morrison H., Magendzo K., Edwards R.H. (1992) Cloning of a delta opioid receptor by functional expression. *Science*, 258(5090):1952-5

128)

Chen Y., Mestek A., Liu J., Hurley J.A., Yu L. (1993) Molecular cloning and functional expression of a mu-opioid receptor from rat brain. *Mol. Pharmacol.*, 44(1):8-12.

129)

Meng F., Xie G.X., Thompson R.C., Mansour A., Goldstein A., Watson S.J., Akil H. (1993) Cloning and pharmacological characterization of a rat kappa opioid receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 90(21):9954-8

130)

Kieffer B.L., Befort K., Gaveriaux-Ruff C., Hirth C.G. (1992) The delta-opioid receptor: isolation of a cDNA by expression cloning and pharmacological characterization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 89(24):12048-52.

131)

Standifer K.M., Pasternak G.W. (1997) G proteins and opioid receptor-mediated signalling. *Cell Signal.*, 9(3-4):237-48.

132)

Keshet E., Polakiewicz R.D., Itin A., Ornoy A., Rosen H. (1989) Proenkephalin A is expressed in mesodermal lineages during organogenesis. *EMBO J.*, 8(10):2917-23

133)

Mackie E.J., Trechsel U., Bruns C. (1990) Somatostatin receptors are restricted to a subpopulation of osteoblast-like cells during endochondral bone formation. *Development*, 110(4):1233-9

134)

Chasnoff I.J., Hatcher R., Burns W.J. (1982) Polydrug- and methadone-addicted newborns: a continuum of impairment? *Pediatrics.*, 70(2):210-3

135)

Palmer R.M., Ferrige A.G., Moncada S. (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, 327(6122):524-6

136)

Moncada S., Higgs A. (1983) The L-arginine-nitric oxide pathway. *N. Engl. J. Med.*, 329(27):2002-12.

137)

Van 't Hof R.J., Ralston S.H. (2001). Nitric oxide and bone. *Immunology*, 103:255-261

138)

Bredt D.S., Hwang P.M., Glatt C.E., Lowenstein C., Reed R.R., Snyder S.H. (1991) Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature*, 351(6329):714-8.

139)

Robinson L.J., Weremowicz S., Morton C.C., Michel T. (1994) Isolation and chromosomal localization of the human endothelial nitric oxide synthase (NOS3) gene. *Genomics*, 19(2):350-7.

140)

Lowenstein C.J., Glatt C.S., Bredt D.S., Snyder S.H. (1992) Cloned and expressed macrophage nitric oxide synthase contrasts with the brain enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89(15):6711-5.

141)

Feelish M., Stamler J.S. (1996) *Methods in Nitric Oxide Research*. Chichester: J. Wiley Sons.

142)

Michell B.J., Griffiths J.E., Mitchelhill K.I., Rodriguez-Crespo I., Tiganis T., Bozinovski S., de Montellano P.R., Kemp B.E., Pearson R.B. (1999) The Akt kinase signals directly to endothelial nitric oxide synthase. *Curr. Biol.*, 9(15):845-8.

143)

Venema R.C., Nishida K., Alexander R.W., Harrison D.G., Murphy T.J. (1993) Organisation of the bovine gene encoding the endothelial nitric oxide synthase. *Bioch. Biophys. Acta*, 1218: 413-20.

144a)

Armour K.E., Ralston S.H. (1998) Estrogen upregulates endothelial constitutive nitric oxide synthase expression in human osteoblast-like cells. *Endocrinology*, 139(2):799-802.

144b)

Hayashi T., Yamada K., Esaki T., Kuzuya M., Satake S., Ishikawa T., Hidaka H., Iguchi A. (1995) Estrogen increases endothelial nitric oxide by a receptor-mediated system. *Biochem Biophys. Res. Commun.*, 214(3):847-55.

145)

Johnson D.L., McAllister T.N., Frangos J.A. (1996) Fluid flow stimulates rapid and continuous release of nitric oxide in osteoblasts. *Am. J. Physiol.*, 271(1 Pt 1):E205-8.

146)

Uematsu M., Ohara Y., Navas J.P., Nishida K., Murphy T.J., Alexander R.W., Nerem R.M., Harrison D.G. (1995) Regulation of endothelial cell nitric oxide synthase mRNA expression by shear stress. *Am. J. Physiol.*, 269(6 Pt 1):C1371-8.

147)

Armour K.E., Armour K.J., Gallagher M.E., Godecke A., Helfrich M.H., Reid D.M., Ralston S.H. (2001) Defective bone formation and anabolic response to exogenous estrogen in mice with targeted disruption of endothelial nitric oxide synthase. *Endocrinology*, 142(2):760-6.

148)

Klein-Nulend J., van der Plas A., Semeins C.M., Ajubi N.E., Frangos J.A., Nijweide P.J., Burger E.H. (1995) Sensitivity of osteocytes to biomechanical stress in vitro. *FASEB J.*, 9(5):441-5.

149)

Klein-Nulend J., Helfrich M.H., Sterck J.G., MacPherson H., Joldersma M., Ralston S.H., Semeins C.M., Burger E.H. (1998) Nitric oxide response to shear stress by human bone cell cultures is endothelial nitric oxide synthase dependent. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 250(1):108-14.

150)

Zaman G., Pitsillides A.A., Rawlinson S.C., Suswillo R.F., Mosley J.R., Cheng M.Z., Platts L.A., Hukkanen M., Polak J.M., Lanyon L.E. (1999) Mechanical strain stimulates nitric oxide production by rapid activation of endothelial nitric oxide synthase in osteocytes. *J Bone Miner. Res.*, 14(7):1123-31.

151)

Brandi M.L., Hukkanen M., Umeda T., Moradi-Bidhendi N., Bianchi S., Gross S.S., Polak J.M., MacIntyre I. (1995) Bidirectional regulation of osteoclast function by nitric oxide synthase isoforms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 92(7):2954-8.

152)

Helfrich M.H., Evans D.E., Grabowski P.S., Pollock J.S., Ohshima H., Ralston S.H. (1997) Expression of nitric oxide synthase isoforms in bone and bone cell cultures. *J Bone Miner Res.*, 12(7):1108-15.

153)

MacPherson H., Noble B.S., Ralston S.H. (1999) Expression and functional role of nitric oxide synthase isoforms in human osteoblast-like cells. *Bone*, 24(3):179-85.

154)

Fox S.W., Chow J.W. (1998) Nitric oxide synthase expression in bone cells. *Bone*, 23(1):1-6.

155)

Ralston S.H., Todd D., Helfrich M., Benjamin N., Grabowski P.S. (1994) Human osteoblast-like cells produce nitric oxide and express inducible nitric oxide synthase. *Endocrinology*, 135(1):330-6

156)

Lowik C.W., Nibbering P.H., van de Ruit M., Papapoulos S.E. (1994) Inducible production of nitric oxide in osteoblast-like cells and in fetal mouse bone explants is associated with suppression of osteoclastic bone resorption. *J. Clin. Invest.*, 93(4):1465-72.

157)

Ralston S.H., Ho L.P., Helfrich M.H., Grabowski P.S., Johnston P.W., Benjamin N. (1995) Nitric oxide: a cytokine-induced regulator of bone resorption. *J. Bone Miner. Res.*, 10(7):1040-9.

158)

Van't Hof R.J., Ralston S.H. (1997) Cytokine-induced nitric oxide inhibits bone resorption by inducing apoptosis of osteoclast progenitors and suppressing osteoclast activity. *J. Bone Miner. Res.*, 12(11):1797-804.

159)

De Vera M.E., Shapiro R.A., Nussler A.K., Mudgett J.S., Simmons R.L., Morris S.M. Jr, Billiar T.R., Geller D.A. (1996) Transcriptional regulation of human inducible nitric oxide synthase (NOS2) gene by cytokines: initial analysis of the human NOS2 promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 93(3):1054-9.

160)

Armour K.E., Van't Hof R.J., Grabowski P.S., Reid D.M., Ralston S.H. (1999) Evidence for a pathogenic role of nitric oxide in inflammation-induced osteoporosis. *J. Bone Miner. Res.*, 14(12):2137-42.

161)

Van't Hof R.J., Armour K.J., Smith L.M., Armour K.E., Wei X.Q., Liew F.Y., Ralston S.H. (2000) Requirement of the inducible nitric oxide synthase pathway for IL-1-induced osteoclastic bone resorption. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 97(14):7993-8.

162)

MacIntyre I., Zaidi M., Alam A.S., Datta H.K., Moonga B.S., Lidbury P.S., Hecker M., Vane J.R. (1991) Osteoclastic inhibition: an action of nitric oxide not mediated by cyclic GMP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 88(7):2936-40.

163)

Percival M.D., Ouellet M., Campagnolo C., Claveau D., Li C. (1999) Inhibition of cathepsin K by nitric oxide donors: evidence for the formation of mixed disulfides and a sulfenic acid. *Biochemistry*, 38(41):13574-83.

164)

Riancho J.A., Salas E., Zarrabeitia M.T., Olmos J.M., Amado J.A., Fernandez-Luna J.L., Gonzalez-Macias J. (1995) Expression and functional role of nitric oxide synthase in osteoblast-like cells. *J. Bone Miner. Res.*, 10(3):439-46.

165)

Buttery L.D., Aguirre I.J., Hukkanen M.V., Mancini L., Moradi-Bidhendi N., Huang P.L., MacIntyre I., Polak J.M. (1999) NO stimulates Osteoblast replication and development. *J. Bone Miner. Res.*, 14(Suppl.):1154

166)

Aguirre J., Buttery L., O'Shaughnessy M., Afzal F., Fernandez de Marticorena I., Hukkanen M., Huang P., MacIntyre I., Polak J. (2001) Endothelial nitric oxide synthase gene-deficient mice demonstrate marked retardation in postnatal bone formation, reduced bone volume, and defects in osteoblast maturation and activity. *Am. J. Pathol.*, 158(1):247-57.

167)

Mancini L., Moradi-Bidhendi N., Becherini L., Martinetti V., MacIntyre I. (2000) The biphasic effects of nitric oxide in primary rat osteoblasts are cGMP dependent. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 274(2):477-81.

168)

Damoulis P.D., Hauschka P.V. (1994) Cytokines induce nitric oxide production in mouse osteoblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 201(2):924-31.

169)

Damoulis P.D., Hauschka P.V. (1997) Nitric oxide acts in conjunction with proinflammatory cytokines to promote cell death in osteoblasts. *J. Bone Miner. Res.*, 12(3):412-22.

170)

Mogi M., Kinpara K., Kondo A., Togari A. (1999) Involvement of nitric oxide and biopterin in proinflammatory cytokine-induced apoptotic cell death in mouse osteoblastic cell line MC3T3-E1. *Biochem. Pharmacol.*, 58(4):649-54.

171)

McInnes I.B., Leung B.P., Field M., Wei X.Q., Huang F.P., Sturrock R.D., Kinninmonth A., Weidner J., Mumford R., Liew F.Y. (1996) Production of nitric oxide in the synovial membrane of rheumatoid and osteoarthritis patients. *J. Exp. Med.*, 184(4):1519-24.

172)

Grabowski P.S., Wright P.K., Van 't Hof R.J., Helfrich M.H., Ohshima H., Ralston S.H. (1997) Immunolocalization of inducible nitric oxide synthase in synovium and cartilage in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Br. J. Rheumatol.*, 36(6):651-5.

173)

Sakurai H., Kohsaka H., Liu M.F., Higashiyama H., Hirata Y., Kanno K., Saito I., Miyasaka N. (1995) Nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase expression in inflammatory arthritides. *J. Clin. Invest.*, 96(5):2357-63.

174)

Firestein G.S., Yeo M., Zvaifler N.J. (1995) Apoptosis in rheumatoid arthritis synovium. *J. Clin. Invest.*, 96(3):1631-8.

175)

van't Hof R.J., Hocking L., Wright P.K., Ralston S.H. (2000) Nitric oxide is a mediator of apoptosis in the rheumatoid joint. *Rheumatology (Oxford)*, 39(9):1004-8.

176)

Firestein G.S., Nguyen K., Aupperle K.R., Yeo M., Boyle D.L., Zvaifler N.J. (1996) Apoptosis in rheumatoid arthritis: p53 overexpression in rheumatoid arthritis synovium. *Am. J. Pathol.*, 149(6):2143-51.

177)

Blanco F.J., Ochs R.L., Schwarz H., Lotz M. (1995) Chondrocyte apoptosis induced by nitric oxide. *Am. J. Pathol.*, 146(1):75-85.

178)

Lubberts E., Joosten L.A., van de Loo F.A., van den Gersselaar L.A., van den Berg W.B. (2000) Reduction of interleukin-17-induced inhibition of chondrocyte proteoglycan synthesis in intact murine articular cartilage by interleukin-4. *Arthritis Rheum.*, 43(6):1300-6.

179)

Nussler A.K., Di Silvio M., Billiar T.R., Hoffman R.A., Geller D.A., Selby R., Madariaga J., Simmons R.L. (1992) Stimulation of the nitric oxide synthase pathway in human hepatocytes by cytokines and endotoxin. *J. Exp. Med.*, 176(1):261-4

180)

Grabowski P.S., Macpherson H., Ralston S.H. (1996) Nitric oxide production in cells derived from the human joint. *Br. J. Rheumatol.*, 35(3):207-12.

181)

Hickery M.S., Palmer R.M.J., Charles I.G., Moncada S., Bayliss M.T. (1994) The role of NO in IL-1 induced inhibition of proteoglycan synthesis in human articular cartilage. *Br. J. Rheumatol.*, 33(Suppl.1):92

182)

Ralston S.H., Grabowski P.S. (1996) Mechanisms of cytokine induced bone resorption: role of nitric oxide, cyclic guanosine monophosphate, and prostaglandins. *Bone*, 19(1):29-33

183)

Armour K.J., van Armour K.E., van't Hof R.J., Reid D.M., Wei X-Q, Liew F.Y., Ralston S.H. (2000) The effects of growth and ovariectomy on bone mineral density in inducible NOS deficient mice. *J. Bone Miner. Res.*, 15:S521

184)

Janda L., Damborsky J., Rezniczek G.A., Wiche G. (2001) Plectin repeats and modules: strategic cysteines and their presumed impact on cytolinker functions. *Bioessays*, 23(11):1064-9.

185)

Lodish H., Berk A., Zipursky S.L., Matsudaira P., Baltimore D., Darnell J.E. (2000) Glossary *In Molecular Cell Biology* pp. G5 W.H Freeman and Company

186)

Heersche J.N.M., Aubin J.E. (1990) Regulation of cellular activity of bone forming cells. *In The osteoblast and osteocyte. eds. B.K. Hal. pp. 327-349* Tilford Press, Cadwell, N.J.

187)

Malaval L, Liu F, Roche P, Aubin JE. (1999). Kinetics of osteoprogenitor proliferation and osteoblast differentiation in vitro. *J. Cell Biochem.*, 74(4):616-627

188)

Bloom W., Fawcett D.W. (1994) *In A Textbook Of Histology. 12th Edition. pp.194-233* Chapman&Hall book

189)

Karsenty G., Wagner E.F. (2002). Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. *Dev. Cell.*, 2(4):389-406.

190)

Horton W.A. Cartilage Morphology (1993) P.M. Royce and Steinman, eds. (New York) (73-84)

191)

Linsenmayer T.F., Chen Q.A., Gibney E., Gordon M.K., Marchant J.K., Mayne R. and Schmid T.M. (1991) Collagen types IX and X in the developing chick tibiotarsus: analyses of mRNAs and proteins. *Development*, 111:191-196.

192)

Caplan A.I. and Pechak D.G. (1987) The cellular and molecular embryology of bone formation. In: Peck W.A. (Ed.) *Bone and Mineral Research/5*. New York: Elsevier

193)

Mitrovic D.R. (1977) Development of the metatarsophalangeal joint of the chick embryo: morphological, ultrastructural and histochemical studies. *Am. J. Anat.*, 150:333-347.

194)

Gruneberg H. and Lee A.J. (1973) The anatomy and development of brachypodism in the mouse. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 30:119-141.

195)

Polinkovsky A., Robin N.H., Thomas J.T., Irons M., Lynn A., Goodman F.R., Reardon W., Kant S.G., Brunner H.G. and van der Burgt I. *et al.* (1997) Mutations in CDMP1 cause autosomal dominant brachydactyly type C. *Nat. Genet.*, 17:18-19.

196)

Storm E.E., Huynh T.V., Copeland N.G., Jenkins N.A., Kingsley D.M. and Lee S.J. (1994) Limb alterations in brachypodism mice due to mutations in a new member of the TGF beta-superfamily. *Nature*, 368:639-643.

197)

Merino R., Macias D., Ganan Y., Economides A.N., Wang X., Wu Q., Stahl N., Sampath K.T., Varona P. and Hurle J.M. (1999) Expression and function of Gdf-5 during digit skeletogenesis in the embryonic chick leg bud. *Dev. Biol.*, 206:33-45.

198)

Brunet L.J., McMahon J.A., McMahon A.P. and Harland R.M. (1998) Noggin, cartilage morphogenesis, and joint formation in the mammalian skeleton. *Science*, 280:1455-1457.

199)

Hartmann C. and Tabin C.J. (2001) Wnt-14 plays a pivotal role in inducing synovial joint formation in the developing appendicular skeleton. *Cell*, 104:341-351.

200a)

Wang Q., Green R.P., Zhao G. and Ornitz D.M. (2001) Differential regulation of endochondral bone growth and joint development by FGFR1 and FGFR3 tyrosine kinase domains. *Development*, 128:3867-3876.

200b)

E. Minina, C. Kreschel, M.C. Naski, A. Vortkamp (2002) Interaction of FGF, Ihh/Pth1H and BMP Signaling Integrates Chondrocyte Proliferation and Hypertrophic Differentiation. *Dev. Cell*, 3: 439-449

201)

Wilson S.I., Rydstrom A., Trimborn T., Willert K., Nusse R., Jessell T.M. and Edlund T. (2001) The status of Wnt signalling regulates neural and epidermal fates in the chick embryo. *Nature*, 411:325-330.

202)

Yang X., Chen L., Xu X., Li C., Huang C. and Deng C.X. (2001) TGF-beta/Smad3 signals repress chondrocyte hypertrophic differentiation and are required for maintaining articular cartilage. *J. Cell Biol.*, 153:35-46.

203)

Lupu F., Terwilliger J.D., Lee K., Segre G.V. and Efstratiadis A. (2001) Roles of growth hormone and insulin-like growth factor 1 in mouse postnatal growth. *Dev. Biol.*, 229:141-162.

204)

Naski M.C., Wang Q., Xu J. and Ornitz D.M. (1996) Graded activation of fibroblast growth factor receptor 3 by mutations causing achondroplasia and thanatophoric dysplasia. *Nat. Genet.*, 13:233-237.

205)

Rousseau F., Bonaventure J., Legeai-Mallet L., Pelet A., Rozet J.M., Maroteaux P., Le Merrer M. and Munnich A. (1994) Mutations in the gene encoding fibroblast growth factor receptor-3 in achondroplasia. *Nature*, 371:252-254.

206)

Shiang R., Thompson L.M., Zhu Y.Z., Church D.M., Fielder T.J., Bocian M., Winokur S.T. and Wasmuth J.J. (1994) Mutations in the transmembrane domain of FGFR3 cause the most common genetic form of dwarfism, achondroplasia. *Cell*, 78:335-342.

207)

Tavormina P.L., Shiang R., Thompson L.M., Zhu Y.Z., Wilkin D.J., Lachman R.S., Wilcox W.R., Rimoin D.L., Cohn D.H. and Wasmuth J.J. (1995) Thanatophoric dysplasia (types I and II) caused by distinct mutations in fibroblast growth factor receptor 3. *Nat. Genet.*, 9:321-328.

208)

Deng C., Wynshaw-Boris A., Zhou F., Kuo A. and Leder P. (1996) Fibroblast growth factor receptor 3 is a negative regulator of bone growth. *Cell*, 84:911-921.

209)

Ornitz, D.M., and Itoh, N. (2001). Fibroblast growth factors. *Genome Biol.* 2, REVIEW S3005.

210)

Ohbayashi N., Shibayama M., Kurotaki Y., Imanishi M., Fujimori T., Itoh N. and Takada S. (2002) Fgf18 is required for osteogenesis and chondrogenesis in mice. *Genes Dev.* 16(7):870-9.

211)

Liu Z., Xu J., Colvin J.S. and Ornitz D.M. (2002) Coordination of chondrogenesis and osteogenesis by fibroblast growth factor 18. *Genes Dev.* 16(7):859-69.

212)

Su W.C., Kitagawa M., Xue N., Xie B., Garofalo S., Cho J., Deng C., Horton W.A. and Fu X.Y. (1997) Activation of Stat1 by mutant fibroblast growth-factor receptor in thanatophoric dysplasia type II dwarfism. *Nature*, 386:288-292.

213)

Sahni M., Ambrosetti D.-C., Mansukhani A., Gertner R., Levy D. and Basilico C. (1999) FGF signaling inhibits chondrocyte proliferation and regulates bone development through the STAT-1 pathway. *Genes Dev.*, 13:1361-1366.

214)

St-Jacques B., Hammerschmidt M. and McMahon A.P. (1999) Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes Dev.*, 13:2072-2086.

215)

Ingham P.W. and McMahon A.P. (2001) Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev.*, 15:3059-3087.

216)

Hahn H., Wicking C., Zaphiropoulos P.G., Gailani M.R., Shanley S., Chidambaram A., Vorechovsky I., Holmberg E., Uden A.B., Gillies S., Negus K., Smyth I., Pressman C., Leffell D.J., Gerrard B., Goldstein A.M., Dean M., Toftgard R., Chenevix-Trench G., Wainwright B., Bale A.E. (1996) Mutations of the human homolog of *Drosophila* patched in the nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Cell* 85:841–851

217)

Naski M.C., Colvin J.S., Coffin J.D. and Ornitz D.M. (1998) Repression of hedgehog signaling and BMP4 expression in growth plate cartilage by fibroblast growth factor receptor 3. *Development*, 125:4977-4988.

218)

Chiang C., Litingtung Y., Lee E., Young K.E., Corden J.L., Westphal H., Beachy P.A. (1996) Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature* 383:407–413

219)

Ming J.E., Roessler E., Muenke M. (1998) Human developmental disorders and the sonic hedgehog pathway. *Mol. Med. Today* 4: 343–349

220)

Hammerschmidt M., Brook A., McMahon A.J. (1997) The world according to hedgehog. *Trends Genet.* 13:14–21

221)

Yamaguchi A., Komori T., Suda T. (2000). Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs, and Cbfa1. *Endocr Rev.*, 21(4):393-411.

222)

Chusho H., Tamura N., Ogawa Y., Yasoda A., Suda M., Miyazawa T., Nakamura K., Nakao K., Kurihara T. and Komatsu Y. *et al.* (2001) Dwarfism and early death in mice lacking C-type natriuretic peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98:4016-4021.

223)

Reimold A.M., Grusby M.J., Kosaras B., Fries J.W., Mori R., Maniwa S., Clauss I.M., Collins T., Sidman R.L. and Glimcher M.J. *et al.* (1996) Chondrodysplasia and neurological abnormalities in ATF-2-deficient mice. *Nature*, 379:262-265.

224)

Long F., Schipani E., Asahara H., Kronenberg H. and Montminy M. (2001) The CREB family of activators is required for endochondral bone development. *Development*, 128:541-550.

225)

Wang Z.Q., Grigoriadis A.E., Mohle-Steinlein U. and Wagner E.F. (1991) A novel target cell for c-fos-induced oncogenesis: development of chondrogenic tumours in embryonic stem cell chimeras. *EMBO J.*, 10:2437-2450.

226)

Thomas D.P., Sunter A., Gentry A. and Grigoriadis A.E. (2000) Inhibition of chondrocyte differentiation in vitro by constitutive and inducible overexpression of the c-fos proto-oncogene. *J. Cell Sci.*, 113:439-450.

227)

Bell D.M., Leung K.K., Wheatley S.C., Ng L.J., Zhou S., Ling K.W., Sham M.H., Koopman P., Tam P.P. and Cheah K.S. (1997) SOX9 directly regulates the type-II collagen gene. *Nat. Genet.*, 16:174-178.

228)

Bi W., Deng J.M., Zhang Z., Behringer R.R. and de Crombrughe B. (1999) Sox9 is required for cartilage formation. *Nat. Genet.*, 22:85-89.

229)

Lefebvre V., Ping L. and de Crombrughe B. (1998) A new long form of Sox5 (L-Sox5), Sox6 and Sox9 are coexpressed in chondrogenesis and cooperatively activate the type II collagen gene. *EMBO J.*, 17:5718-5733.

230)

Smits P., Li P., Mandel J., Zhang Z., Deng J.M., Behringer R., de Crombrughe B. and Lefebvre V. (2001) The transcription factors L-Sox5 and Sox6 are essential for cartilage formation. *Dev. Cell*, 1:277-290.

231a)

Murakami S., Kan M., McKeehan W.L. and de Crombrughe B. (2000) Up-regulation of the chondrogenic Sox9 gene by fibroblast growth factors is mediated by the mitogen-activated protein kinase pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97:1113-1118.

231b)

Akiyama H., Chaboissier M., Martin J.F., Schedl A., Crombrughe B. (2002) The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the CDZ differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. *Genes & Dev.* 16: 2813-2828

232)

Schipani E., Ryan H.E., Didrickson S., Kobayashi T., Knight M. and Johnson R.S. (2001) Hypoxia in cartilage: HIF-1alpha is essential for chondrocyte growth arrest and survival. *Genes Dev.*, 15:2865-2876.

233)

Karaplis A.C., Luz A., Glowacki J., Bronson R.T., Tybulewicz V.L., Kronenberg H.M. and Mulligan R.C. (1994) Lethal skeletal dysplasia from targeted disruption of the parathyroid hormone-related peptide gene. *Genes Dev.*, 8:277-289.

234)

Vortkamp A., Lee K., Lanske B., Segre G.V., Kronenberg H.M. and Tabin C.J. (1996) Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein. *Science*, 273:613-622.

235)

Chung U.I., Schipani E., McMahon A.P. and Kronenberg H.M. (2001) Indian hedgehog couples chondrogenesis to osteogenesis in endochondral bone development. *J. Clin. Invest.*, 107:295-304.

236)

Kawakami Y., Wada N., Nishimatsu S.I., Ishikawa T., Noji S. and Nohno T. (1999) Involvement of Wnt-5a in chondrogenic pattern formation in the chick limb bud. *Dev. Growth Differ.*, 41:29-40.

237)

Kim I.S., Otto F., Zabel B. and Mundlos S. (1999) Regulation of chondrocyte differentiation by Cbfa1. *Mech. Dev.*, 80:159-170.

238)

Inada M., Yasui T., Nomura S., Miyake S., Deguchi K., Himeno M., Sato M., Yamagiwa H., Kumura T. and Yasui N. (1999) Maturation disturbance of chondrocytes in Cbfa1-deficient mice. *Dev. Dyn.*, 214:279-290.

239)

Ueta C., Iwamoto M., Kanatani N., Yoshida C., Liu Y., Enomoto-Iwamoto M., Ohmori T., Enomoto H., Nakata K. and Takada K. *et al.* (2001) Skeletal malformations caused by overexpression of Cbfa1 or its dominant negative form in chondrocytes. *J. Cell Biol.*, 153:87-100.

240)

Takeda S., Bonnamy J.P., Owen M.J., Ducy P. and Karsenty G. (2001) Continuous expression of Cbfa1 in non-hypertrophic chondrocytes uncovers its ability to induce hypertrophic

chondrocytes differentiation and partially rescues Cbfa1-deficient mice. *Genes Dev.*, 15:467-481.

241)

Vu T.H., Shipley J.M., Bergers G., Berger J.E., Helms J.A., Hanahan D., Shapiro S.D., Senior R.M. and Werb Z. (1998) MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes. *Cell*, 93:411-422.

242)

Engsig M.T., Chen Q.J., Vu T.H., Pedersen A.C., Therkidsen B., Lund L.R., Henriksen K., Lenhard T., Foged N.T. and Werb Z. *et al.* (2000) Matrix metalloproteinase 9 and vascular endothelial growth factor are essential for osteoclast recruitment into developing long bones. *J. Cell Biol.*, 151:879-890.

243)

Zelzer E., Glotzer D.J., Hartmann C., Thomas D., Fukai N., Soker S. and Olsen B.R. (2001) Tissue specific regulation of VEGF expression during bone development requires Cbfa1/Runx2. *Mech. Dev.*, 106:97-106.

244)

Capdevila J. and Izpisua Belmonte J.C. (2001) Patterning mechanisms controlling vertebrate limb development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 17:87-132.

245)

Zou H., Wieser R., Massague J. and Niswander L. (1997) Distinct roles of type I bone morphogenetic protein receptors in the formation and differentiation of cartilage. *Genes Dev.*, 11:2191-2203.

246)

King J.A., Marker P.C., Seung K.J., Kingsley D.M. (1994) BMP5 and the molecular, skeletal, and soft-tissue alterations in short ear mice. *Dev. Biol.* 166:112–122

247)

Lyons K.M., Hogan B.L., Robertson E.J. (1995) Colocalization of BMP 7 and BMP-2 RNAs suggests that these factors cooperatively mediate tissue interactions during murine development. *Mech. Dev.* 50:71–83

248)

Katagiri T., Yamaguchi A., Ikeda T., Yoshiki S., Wozney J.M., Rosen V., Wang E.A., Tanaka H., Omura S., Suda T. (1990) The non-osteogenic mouse pluripotent cell line, C3H10T1/2, is induced to differentiate into osteoblastic cells by recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 172:295–299

249)

Katagiri T., Yamaguchi A., Komaki M., Abe E., Takahashi N., Ikeda T., Rosen V., Wozney J.M., Fujisawa-Sehara A., Suda T. (1994) Bone morphogenetic protein-2 converts the

differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage. *J. Cell Biol.* 127:1755–1766

250)

Urist M.R. (1965) Bone: formation by autoinduction. *Science* 150: 893–899

251)

Wozney J.M., Rosen V., Celeste A.J., Mitsock L.M., Whitters M.J., Kriz R.W., Hewick R.M., Wang E.A. (1988) Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* 242:1528–1534

252)

Oreffo R.O.C., Triffitt J.T. (1999) Future potentials for using osteogenic stem cells and biomaterials in orthopedics. *Bone* 25:5S–9S

253)

Yamaguchi A., Katagiri T., Ikeda T., Wozney J.M., Rosen V., Wang E.A., Kahn A.J., Suda T., Yoshiki S. (1991) Recombinant human bone morphogenetic protein-2 stimulates osteoblastic maturation and inhibits myogenic differentiation in vitro. *J. Cell Biol.* 113:681–687

254)

Gitelman S.E., Kirk M., Ye J-Q., Filvaroff E.H., Kahn A.J., Derynck R. (1995) Vgr-1/BMP-6 induces osteoblastic differentiation of pluripotential mesenchymal cells. *Cell Growth Differ.* 6:827–836

255)

Daluiski A., Engstrand T., Bahamonde M.E., Gamer L.W., Agius E., Stevenson S.L., Cox K., Rosen V. and Lyons K.M. (2001) Bone morphogenetic protein-3 is a negative regulator of bone density. *Nat. Genet.*, 27:84-88.

256)

Yoshida Y., Tanaka S., Umemori H., Minowa O., Usui M., Ikematsu N., Hosoda E., Imamura T., Kuno J. and Yamashita T. *et al.* (2000) Negative regulation of BMP/Smad signaling by Tob in osteoblasts. *Cell*, 103:1085-1097.

257)

Erlebacher A. and Derynck R. (1996) Increased expression of TGF-beta 2 in osteoblasts results in an osteoporosis-like phenotype. *J. Cell Biol.*, 132:195-210.

258)

Dabovic B., Chen Y., Colarossi C., Obata H., Zambuto L., Perle M.A. and Rifkin D.B. (2002) Bone abnormalities in latent TGF-beta binding protein (Ltbp)-3-null mice indicate a role for Ltbp-3 in modulating TGF-beta bioavailability. *J. Cell Biol.*, 156:1-7.

259)

Xiao Z.S., Hinson T.K., Quarles L.D. (1999) Cbfa1 isoform overexpression upregulates osteocalcin gene expression in non-osteoblastic and pre-osteoblastic cells. *J. Cell Biochem.* 74:596–605

260)

Ducy P., Zhang R., Geoffroy V., Ridall A.L. and Karsenty G. (1997) Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell*, 89:747-754.

261)

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

262)

Otto F., Thornell A.P., Crompton T., Denzel A., Gilmour K.C., Rosewell I.R., Stamp G.W., Beddington R.S., Mundlos S. and Olsen B.R. *et al.* (1997) Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell*, 89:765-771.

263)

Lee S., Solow-Cordero D.E., Kessler E., Takahara K. and Greenspan D.S. (1997) Transforming growth factor-beta regulation of bone morphogenetic protein-1/procollagen C-Proteinase and related proteins in fibrogenic cells and keratinocytes. *J. Biol. Chem.*, 272:19056-19066.

264)

Mundlos S., Otto F., Mundlos C., Mulliken J.B., Aylsworth A.S., Albright S., Lindhout D., Cole W.G., Henn W. and Knoll J.H. *et al.* (1997) Mutations involving the transcription factor CBFA1 cause cleidocranial dysplasia. *Cell*, 89:773-779.

265)

Liu W., Toyosawa S., Furuichi T., Kanatani N., Yoshida C., Liu Y., Himeno M., Narai S., Yamaguchi A. and Komori T. (2001) Overexpression of Cbfa1 in osteoblasts inhibits osteoblast maturation and causes osteopenia with multiple fractures. *J. Cell Biol.*, 155:157-166.

266)

Ducy P., Starbuck M., Priemel M., Shen J., Pinero G., Geoffroy V., Amling M. and Karsenty G. (1999) A Cbfa1-dependent genetic pathway controls bone formation beyond embryonic development. *Genes Dev.*, 13:1025-1036.

267)

Thiede M.A., Smock S.L., Petersen D.N., Gasser W.A., Thompson D.D., Nishimoto S.K. (1994) Presence of messenger ribonucleic acid encoding osteocalcin, a marker of bone turnover, in bone marrow megakaryocytes and peripheral blood platelets. *Endocrinology* 135:929–937

268)

Rahman S., Oberdorf A., Montecino M., Tanhauser S.M., Lian L.B., Stein G.S., Laipis P.J., Stein J.L. (1993) Multiple copies of the bone-specific osteocalcin gene in mouse and rat. *Endocrinology* 133:3050–3053

269)

Desbois C., Hogue D., Karsenty G. (1994) The mouse osteocalcin gene cluster contains three genes with two separate spatial and temporal patterns of expression. *J. Biol. Chem.* 269:1183–1190

270)

Ducy P., Schinke T., Karsenty G. (2000). The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science*,289(5484):1501-1504.

271)

Towler D.A., Rutledge S.J., Rodan G.A. (1994) Msx-2/Hox 8.1: a transcriptional regulator of the rat osteocalcin promoter. *Mol. Endocrinol.* 8:1484–1493

272)

Hoffmann H.M., Catron K.M., van Wijnen A.J., McCabe L.R., Lian J.B., Stein G.S., Stein J.L. (1994) Transcriptional control of the tissue-specific, developmentally regulated osteocalcin gene requires a binding motif for the Msx family of homeodomain proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:12887–12891

273)

Tamura M., Noda M. (1994) Identification of a DNA sequence involved in osteoblast-specific gene expression via interaction with helix-loop-helix (HLH)-type transcription factors. *J. Cell. Biol.* 126:773–782

274)

Bidwell J.P., van Wijnen A.J., Fey E.G., Dworetzky S., Penman S., Stein J.L., Lian J.B., Stein G.S. (1993) Osteocalcin gene promoter-binding factors are tissue-specific nuclear matrix components. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:3162–3166

275)

Merriman H.L., van Wijnen A.J., Hiebert S.W., Bidwell J.P., Fey E., Lian J.B., Stein J., Stein G.S. (1995) The tissue-specific nuclear matrix protein, NMP-2, is a member of the AML/CBF/PEBP2/Runt domain transcriptional factor family: interaction with the osteocalcin gene promoter. *Biochemistry* 34:13125–13132

276)

Geoffroy V., Ducy P., Karsenty G. (1995) A PEBP2/AML-1-related factor increases osteocalcin promoter activity through its binding to an osteoblast-specific cis-acting element. *J. Biol. Chem.* 270:30973–30979

277)

Ducy P., Karsenty G. (1995) Two distinct osteoblast-specific cis-acting elements control expression of a mouse osteocalcin gene. *Mol. Cell. Biol.* 15:1858–1869

278)

Karsenty G. (2000) Role of Cbfa1 in osteoblast differentiation and function. *Cell&Developmental Biology*, 11:343-346

(278a)

Yoshida C.A. et al. (2002) Core binding factor β interacts with Runx2 and is required for skeletal development. *Nature genetics* 32: 633

279)

Ma L., Golden S., Wu L. and Maxson R. (1996) The molecular basis of Boston-type craniosynostosis: the Pro148: His mutation in the N-terminal arm of the MSX2 homeodomain stabilizes DNA binding without altering nucleotide sequence preferences. *Hum. Mol. Genet.*, 5:1915-1920.

280)

Satokata I., Ma L., Ohshima H., Bei M., Woo I., Nishizawa K., Maeda T., Takano Y., Uchiyama M. and Heaney S. et al. (2000) Msx2 deficiency in mice causes pleiotropic defects in bone growth and ectodermal organ formation. *Nat. Genet.*, 24:391-395.

281)

Tribioli C. and Lufkin T. (1999) The murine Bapx1 homeobox gene plays a critical role in embryonic development of the axial skeleton and spleen. *Development*, 126:5699-5711.

282)

Kanzler B., Kuschert S.J., Liu Y.H. and Mallo M. (1998) Hoxa-2 restricts the chondrogenic domain and inhibits bone formation during development of the branchial area. *Development*, 125:2587-2597.

283)

Nakashima K., Zhou X., Kunkel G., Zhang Z., Deng J.M., Behringer R.R. and de Crombrughe B. (2002) The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell*, 108:17-29.

284)

Jheon A.H., Ganss B., Cheifetz S. and Sodek J. (2001) Characterization of a novel KRAB/C2H2 zinc finger transcription factor involved in bone development. *J. Biol. Chem.*, 276:18282-18289.

285)

Acampora D., Merlo G.R., Palarì L., Zerega B., Postiglione M.P., Mantero S., Bober E., Barbieri O., Simeone A. and Levi G. (1999) Craniofacial, vestibular and bone defects in mice lacking the Distal-less-related gene Dlx5. *Development*, 126:3795-3809.

286)

Jochum W., David J.P., Elliott C., Wutz A., Plenck H.J., Matsuo K. and Wagner E.F. (2000) Increased bone formation and osteosclerosis in mice overexpressing the transcription factor Fra-1. *Nat. Med.*, 6:985-990.

287)

Sabatakos G., Sims N.A., Chen J., Aoki K., Kelz M.B., Amling M., Bouali Y., Mukhopadhyay K., Ford K. and Nestler E.J. *et al.* (2000) Overexpression of delta FosB transcription factor(s) increases bone formation and inhibits adipogenesis. *Nat. Med.*, 6:985-990.

288)

Gong Y., Slee R.B., Fukai N., Rawadi G., Roman-Roman S., Reginato A.M., Wang H., Cundy T., Glorieux F.H. and Lev D. *et al.* (2001) LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development. *Cell*, 107:513-523.

289)

Little R.D., Carulli J.P., Del Mastro R.G., Dupuis J., Osborne M., Folz C., Manning S.P., Swain P.M., Zhao S.C. and Eustace B. *et al.* (2002) A mutation in the LDL receptor-related protein 5 gene results in the autosomal dominant high-bone-mass trait. *Am. J. Hum. Genet.*, 70:11-19.

290)

Kato, M., Patel, M.S., Levasseur, R., Lobov, I., Chang, B., Glass, D.A., II, Hartmann, C., Li, L., Huang, T.-H., Brayton, C.F., *et al.* (2002). Cbfa1/Runx2-independent decrease in osteoblast proliferation, osteopenia and persistent embryonic eye vascularization in mice deficient in Lrp5, a Wnt coreceptor. *J. Cell. Biol.* 157(2):303-14.

291)

Wehrli M., Dougan S.T., Caldwell K., O'Keefe L., Schwartz S. and Vaizel-Ohayon D. (2000) Arrow encodes an LDL-receptor-related protein essential for Wingless signalling. *Nature*, 407:527-530.

292)

Mao J., Wang J.Y., Bo L., Pan W., Farr G.H. III, Flynn C., Yuan H., Takada S., Kimelman D. and Lin L. *et al.* (2001) Low-density lipoprotein receptor-related protein-5 binds to axin and regulates the canonical Wnt Signaling Pathway. *Mol. Cell*, 7:801-809.

292a)

Qi H., Aguiar D.J., Williams S.M., Pean A., Pan W., Verfaillie C.M. (2003) Identification of genes responsible for OB differentiation from human mesodermal progenitor cells. *PNAS* 100/6

292b)

Romain Dacquin, Rachel A. Davey, Catherine Laplace, Régis Levasseur, Howard A. Morris, Steven R. Goldring, Samuel Gebre-Medhin, Deborah L. Galson, Jeffrey D. Zajac, Gérard Karsenty (2004) Amylin inhibits bone resorption while the calcitonin receptor controls bone formation in vivo. *The Journal of Cell Biology* 164, Number 4

293)

Rodan G.A., Martin T.J. (2000). Therapeutic Approaches to Bone Diseases. *Science*, 289: 1508-1514.

294)

Chambers T.J. (2000) Regulation of the differentiation and function of osteoclasts. *J. Pathol.*, 192:4-13.

295)

Teitelbaum S.L., (2000). Bone resorption by osteoclasts. *Science*, 289:1504-1508

296)

Duong L.T. and Rodan G.A. (2001) Regulation of osteoclast formation and function. *Rev. Endocr. Metab. Disord.*, 2:95-104.

297)

Suda T., Takahashi N., Udagawa N., Jimi E., Gillespie M.T. and Martin T.J. (1999) Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr. Rev.*, 20:345-357.

298)

Udagawa N., Takahashi N., Yasuda H., Mizuno A., Itoh K., Ueno Y., Shinki T., Gillespie M.T., Martin T.J. and Higashio K. *et al.* (2000) Osteoprotegerin produced by osteoblasts is an important regulator in osteoclast development and function. *Endocrinology*, 141:3478-3484.

299)

Bucay N., Sarosi I., Dunstan C.R., Morony S., Tarpley J., Capparelli C., Scully S., Tan H.L., Xu W. and Lacey D.L. *et al.* (1998) Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev.*, 12:1260-1268.

300)

Wong B.R., Josien R. and Choi Y. (1999) TRANCE is a TNF family member that regulates dendritic cell and osteoclast function. *J. Leukoc. Biol.*, 65:715-724.

301)

Emery J.G., McDonnell P., Burke M.B., Deen K.C., Lyn S., Silverman C., Dul E., Appelbaum E.R., Eichman C. and DiPrinzio R. *et al.* (1998) Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *J. Biol. Chem.*, 273:14363-14367.

302)

Wong B.R., Rho J., Arron J., Robinson E., Orlinick J., Chao M., Kalachikov S., Cayani E., Bartlett F.S. 3rd and Frankel W.N. *et al.* (1997) TRANCE is a novel ligand of the tumor necrosis factor receptor family that activates c-Jun N-terminal kinase in T cells. *J. Biol. Chem.*, 272:25190-25194.

303)

Kartsogiannis V., Zhou H., Horwood N.J., Thomas R.J., Hards D.K., Quinn J.M., Niforas P., Ng K.W., Martin T.J. and Gillespie M.T. (1999) Localization of RANKL (receptor activator

of NF kappa B ligand) mRNA and protein in skeletal and extraskeletal tissues. *Bone*, 25:525-534.

304)

Lacey D.L., Timms E., Tan H.L., Kelley M.J., Dunstan C.R., Burgess T., Elliott R., Colombero A., Elliott G. and Scully S. *et al.* (1998) Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 93:165-176.

305)

Burgess T.L., Qian Y., Kaufman S., Ring B.D., Van G., Capparelli C., Kelley M., Hsu H., Boyle W.J. and Dunstan C.R. *et al.* (1999) The ligand for osteoprotegerin (OPGL) directly activates mature osteoclasts. *J. Cell Biol.*, 145:527-538.

306)

Kong Y.Y., Boyle W.J. and Penninger J.M. (1999) Osteoprotegerin ligand: a common link between osteoclastogenesis, lymph node formation and lymphocyte development. *Immunol. Cell Biol.*, 77:188-193.

307)

Hsu H., Lacey D.L., Dunstan C.R., Solovyev I., Colombero A., Timms E., Tan H.L., Elliott G., Kelley M.J. and Sarosi I. *et al.* (1999) Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96:3540-3545.

308)

Arai F., Miyamoto T., Ohneda O., Inada T., Sudo T., Brasel K., Miyata T., Anderson D.M. and Suda T. (1999) Commitment and differentiation of osteoclast precursor cells by the sequential expression of c-Fms and receptor activator of nuclear factor kappaB (RANK) receptors. *J. Exp. Med.*, 190:1741-1754.

309)

Dougall W.C., Glaccum M., Charrier K., Rohrbach K., Brasel K., De Smedt T., Daro E., Smith J., Tometsko M.E. and Maliszewski C.R. (1999) RANK is essential for osteoclast and lymph node development. *Genes Dev.* 13:2412-2424.

310)

Darnay B.J., Ni J., Moore P.A. and Aggarwal B.B. (1999) Activation of NF-B by RANK requires tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 6 and NF-B inducing kinase. *Identification of a novel TRAF, 6:interaction motif. J. Biol. Chem.* 274:7724-7731.

310a)

Wagner E.F. (2002) Functions of AP1 (Fos/Jun) in bone development. *Ann. Rheum. Dis.* 61

310b)

Shaulian E., Karin M. (2002) AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nature Cell Biol.* 4: E131

310c)

Xiangli Yang, Koichi Matsuda, Peter Bialek, Sylvie Jacquot, Howard C. Masuoka, Thorsten Schinke, Lingzhen Li, Stefano Brancorsini, Paolo Sassone-Corsi, Tim M. Townes, Andre Hanauer, Gerard Karsenty (2004) ATF4 Is a Substrate of RSK2 and an Essential Regulator of Osteoblast Biology: Implication for Coffin-Lowry Syndrome. *Cell*, Vol. 117, 387–398

311)

Sabatakos G., Sims N.A., Chen J., Aoki K., Kelz M.B., Amling M., Bouali Y., Mukhopadhyay K., Ford K., Nestler E.J., Baron R. (2000). Overexpression of Δ FosB transcription factor(s) increases bone formation and inhibits adipogenesis. *Nature Medicine*, 6(9):985-990

312)

Naito A., Azuma S., Tanaka S., Miyazaki T., Takaki S., Takatsu K., Nakao K., Nakamura K., Katsuki M. and Yamamoto T. *et al.* (1999) Severe osteopetrosis, defective interleukin-1 signalling and lymph node organogenesis in TRAF6-deficient mice. *Genes Cells* 4:353-362.

313)

Lomaga M.A., Yeh W.C., Sarosi I., Duncan G.S., Furlonger C., Ho A., Morony S., Caparelli C., Van G. and Kaufman S. (1999) TRAF6 deficiency results in osteopetrosis and defective interleukin-1, CD40, and LPS signaling. *Genes Dev.*, 13:1015-1024.

314)

Takayanagi H., Ogasawara K., Hida S., Chiba T., Murata S., Sato K., Takaoka A., Yokochi T., Oda H. and Tanaka K. *et al.* (2000) T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signalling cross-talk between RANKL and IFN-gamma. *Nature*, 408:600-605.

315)

Tondravi M.M., McKercher S.R., Anderson K., Erdmann J.M., Quiroz M., Maki R. and Teitelbaum S.L. (1997) Osteopetrosis in mice lacking hematopoietic transcription factor PU.1. *Nature*, 386:81-84.

316)

Grigoriadis A.E., Wang Z.Q., Cecchini M.G., Hofstetter W., Felix R., Fleisch H.A. and Wagner E.F. (1994) c-Fos: a key regulator of osteoclast-macrophage lineage determination and bone remodeling. *Science*, 266:443-448.

317)

Beedles K.E., Sharpe P.T., Wagner E.F. and Grigoriadis A.E. (1999) A putative role for c-Fos in the pathophysiology of Paget's disease. *J. Bone Miner. Res.*, 14:Suppl. 2:21-28.

318)

Matsuo K., Owens J.M., Tonko M., Elliott C., Chambers T.J. and Wagner E.F. (2000) Fos11 is a transcriptional target of c-Fos during osteoclast differentiation. *Nat. Genet.*, 24:184-187.

319)

Franzoso G., Carlson L., Xing L., Poljak L., Shores E.W., Brown K.D., Leonardi A., Tran T., Boyce B.F. and Siebenlist U. (1997) Requirement for NF-kappaB in osteoclast and B-cell development. *Genes Dev.*, 11:3482-3496.

320)

Hodgkinson C.A., Moore K.J., Nakayama A., Steingrimsson E., Copeland N.G., Jenkins N.A. and Arnheiter H. (1993) Mutations at the mouse microphthalmia locus are associated with defects in a gene encoding a novel basic helix-loop-helix zipper protein. *Cell* 74:395-404

321)

Weilbaecher K.N., Motyckova G., Huber W.E., Takemoto C.M., Hemesath T.J., Xu Y., Hershey C.L., Dowland N.R., Wells A.G. and Fisher D.E. (2001) Linkage of M-CSF signaling to Mitf, TFE3, and the osteoclast defect in Mitf(mi/mi) mice. *Mol. Cell*, 8:749-758

322)

Corral D.A., Amling M., Priemel M., Loyer E., Fuchs S., Ducy P., Baron R., Karsenty G. (1998). Dissociation between bone resorption and bone formation in osteopenic transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95(23):13835-13840

323)

Ettinger B., Black D.M., Mitlak B.H., Knickerbocker R.K., Nickelsen T., Genant H.K., Christiansen C., Delmas P.D., Zanchetta J.R., Stakkestad J., Gluer C.C., Krueger K., Cohen F.J., Eckert S., Ensrud K.E., Avioli L.V., Lips P., Cummings S.R. (1999) Reduction of vertebral fracture risk in postmenopausal women with osteoporosis treated with raloxifene: results from a 3-year randomized clinical trial. Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation (MORE) Investigators. *JAMA* 282(7):637-45.

324)

Lacey D.L., Timms E., Tan H.L., Kelley M.J., Dunstan C.R., Burgess T., Elliott R., Colombero A., Elliott G., Scully S., Hsu H., Sullivan J., Hawkins N., Davy E., Capparelli C., Eli A., Qian Y.X., Kaufman S., Sarosi I., Shalhoub V., Senaldi G., Guo J., Delaney J., Boyle W.J. (1998) Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 93(2):165-76.

325)

Kong Y.Y., Feige U., Sarosi I., Bolon B., Tafuri A., Morony S., Capparelli C., Li J., Elliott R., McCabe S., Wong T., Campagnuolo G., Moran E., Bogoch E.R., Van G., Nguyen L.T., Ohashi P.S., Lacey D.L., Fish E., Boyle W.J., Penninger J.M. (1999) Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature* 402(6759):304-9.

326)

Honore P., Luger N.M., Sabino M.A., Schwei M.J., Rogers S.D., Mach D.B., O'keefe P.F., Ramnaraine M.L., Clohisy D.R., Mantyh P.W. (2000) Osteoprotegerin blocks bone cancer-induced skeletal destruction, skeletal pain and pain-related neurochemical reorganization of the spinal cord. *Nat Med.* 6(5):521-8.

327)

King K.L., D'Anza J.J., Bodary S., Pitti R., Siegel M., Lazarus R.A., Dennis M.S., Hammonds R.G. Jr, Kukreja S.C. (1994) Effects of kistrin on bone resorption in vitro and serum calcium in vivo. *J. Bone Miner. Res.* 9(3):381-7.

328)

Farina C., Gagliardi S. (1999) Selective inhibitors of the osteoclast vacuolar proton ATPase as novel bone antiresorptive agents. *Drug Discov. Today*. 4(4):163-172.

329)

Lindsay R., Nieves J., Formica C., Henneman E., Woelfert L., Shen V., Dempster D., Cosman F. (1997) Randomised controlled study of effect of parathyroid hormone on vertebral-bone mass and fracture incidence among postmenopausal women on oestrogen with osteoporosis. *Lancet*. 350(9077):550-5.

330)

Venter J. C., Adams M. D., Myers E. W., Li P. W., Mural R. J., Sutton G. G., Smith H. O., Yandell M., Evans C. A., Holt R. A. et al. (2001). The sequence of the human genome. *Science* 291: 1304-1351.

331)

Hollinger J.O., Buck D.C., Bruder S.P. (1999) Biology of Bone Healing: Its Impact on Clinical Therapy. *In Tissue Engineering: Applications in Maxillofacial Surgery and Periodontics*. eds. Lynch S.E., Genco R.J., Marx R.E. pp.17-53. Quintessence Books

332)

Lodish H., Berk A., Zipursky S.L., Matsudaira P., Baltimore D., Darnell J.E. (2000) Cell Interactions in Development *In Molecular Cell Biology* pp. 1003-1053 W.H Freeman and Company

333)

Massague J. (1998) TGF-beta signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.*, 67:753-91. Review.

334)

Koli K., Saharinen J., Hyytiainen M., Penttinen C., Keski-Oja J. (2001) Latency, activation, and binding proteins of TGF-beta. *Microsc. Res. Tech.*, 52(4):354-62. Review.

335)

Saharinen J., Keski-Oja J. (2000) Specific sequence motif of 8-Cys repeats of TGF-beta binding proteins, LTBP, creates a hydrophobic interaction surface for binding of small latent TGF-beta. *Mol. Biol. Cell* 11: 2691-2704.

336)

Fortunel N.O. et al. (2000) Transforming growth factor-beta: pleiotropic role in the regulation of hematopoiesis. *Blood* 96: 2022-2036.

337)

Piek E. et al. (1999) Specificity, diversity, and regulation in TGF- superfamily signalling. *FASEB J.* 13: 2105-2124.

338)

Kloos D.U., Wingender E. (2002) The TGF-beta--Smad network: introducing bioinformatic tools. *Trends Genet.*, 18(2):96-103. Review.

339)

Gleizes P.E., Beavis R.C., Mazziere R., Shen B., Rifkin D.B. (1996) Identification and characterization of an eight-cysteine repeat of the latent transforming growth factor-beta binding protein-1 that mediates bonding to the latent transforming growth factor-beta1. *J. Biol.Chem.*, 271(47):29891-6.

340)

Patterson G. I. and Padgett R. W. (2000) TGF β -related pathways: roles in *Caenorhabditis elegans* development. *Trends Genet.* 16: 27-33.

341)

Whitman M. (1998). Smads and early developmental signaling by the TGF- β superfamily. *Genes Dev.* 12: 2445-2462.

342)

Moustakas A., Souchelnytskyi S., Heldin C.H. (2001) Smad regulation in TGF-beta signal transduction. *J. Cell Sci.*, 114(Pt 24):4359-69. Review.

343)

Flanders K. C., Kim E. S., Roberts, A. B. (2001) Immunohistochemical expression of Smads 1-6 in the 15-day gestation mouse embryo: signaling by BMPs and TGF- β s. *Dev. Dyn.* 220: 141-154

344)

Luukko K., Ylikorkala A., Mäkelä, T. P. (2001). Developmentally regulated expression of Smad3, Smad4, Smad6, and Smad7 involved in TGF- β signaling. *Mech. Dev.* 101: 209-212

345)

Tsukazaki T., Chiang T. A., Davison A. F., Attisano L., Wrana, J. L. (1998) SARA, a FYVE domain protein that recruits Smad2 to the TGF- β receptor. *Cell* 95: 779-791

346)

Xu J., Attisano L. (2000) Mutations in the tumor suppressors Smad2 and Smad4 inactivate transforming growth factor β signaling by targeting Smads to the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 4820-4825

347)

Dong C., Li Z., Alvarez Jr. R., Feng X.-H., Goldschmidt-Clermont P. J. (2000) Microtubule binding to Smads may regulate TGF- β activity. *Mol. Cell* 5: 27-34

348)

Razani B., Zhang X. L., Bitzer M., von Gersdorff G., Böttinger E. P., Lisanti M. P. (2001) Caveolin-1 regulates transforming growth factor (TGF)- β /SMAD signaling through an interaction with the TGF- β type I receptor. *J. Biol. Chem.* 276: 6727-6738

349)

Chen Y. G., Hata A., Lo R. S., Wotton D., Shi Y., Pavletich N., Massagué J. (1998) Determinants of specificity in TGF- β signal transduction. *Genes Dev.* 12: 2144-2152

350)

Kretzschmar M., Doody J., Massagué J. (1997) Opposing BMP and EGF signalling pathways converge on the TGF- β family mediator Smad1. *Nature* 389: 618-622

351)

Wicks S. J., Lui S., Abdel-Wahab N., Mason R. M., Chantry, A. (2000) Inactivation of Smad-transforming growth factor β signaling by Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinase II. *Mol. Cell. Biol.* 20: 8103-8111

352)

Yakymovych I., ten Dijke P., Heldin C.-H., Souchelnytskyi S. (2001) Regulation of Smad signaling by protein kinase C. *FASEB J.* 15: 553-555

353)

Howell M., Itoh F., Pierreux C. E., Valgeirsdóttir S., Itoh S., ten Dijke P., Hill C. S. (1999) *Xenopus* Smad4 β is the co-Smad component of developmentally regulated transcription factor complexes responsible for induction of early mesodermal genes. *Dev. Biol.* 214: 354-369

354)

Imamura T., Takase M., Nishihara A., Oeda E., Hanai J., Kawabata M., Miyazono K. (1997) Smad6 inhibits signalling by the TGF- β superfamily. *Nature* 389: 622-626

355)

Pulaski L., Landström M., Heldin C.-H., Souchelnytskyi S. (2001) Phosphorylation of Smad7 at Ser-249 does not interfere with its inhibitory role in transforming growth factor- β -dependent signaling but affects Smad7-dependent transcriptional activation. *J. Biol. Chem.* 276: 14344-14349

356)

Correia J. J., Chacko B. M., Lam S. S., Lin K. (2001) Sedimentation studies reveal a direct role of phosphorylation in Smad3:Smad4 homo- and hetero-trimerization. *Biochem.* 40: 1473-1482

357)

Kawabata M., Inoue H., Hanyu A., Imamura T., Miyazono K. (1998) Smad proteins exist as monomers in vivo and undergo homo- and hetero-oligomerization upon activation by serine/threonine kinase receptors. *EMBO J.* 17: 4056-4065

358)

Hata A., Lo R. S., Wotton D., Lagna G., Massagué J. (1997) Mutations increasing autoinhibition inactivate tumour suppressors Smad2 and Smad4. *Nature* 388: 82-87

359)

Tada K., Inoue H., Ebisawa T., Makuuchi M., Kawabata M., Imamura T., Miyazono K. (1999) Region between -helices 3 and 4 of the mad homology 2 domain of Smad4: functional roles in oligomer formation and transcriptional activation. *Genes Cells* 4: 731-741

360)

Itoh S., Itoh F., Goumans M. J., ten Dijke P. (2000) Signaling of transforming growth factor- β family members through Smad proteins. *Eur. J. Biochem.* 267: 6954-6967

361)

Massagué J., Wotton D. (2000) Transcriptional control by the TGF- β /Smad signaling system. *EMBO J.* 19: 1745-1754

362)

Kusanagi K., Kawabata M., Mishima H. K., Miyazono K. (2001) Helix 2 in the amino-terminal mad homology 1 domain is responsible for specific DNA binding of Smad3. *J. Biol. Chem.* 276: 28155-28163

363)

Yamaguchi K. *et al.* (1999) XIAP, a cellular member of the inhibitor of apoptosis protein family, links the receptors to TAB1-TAK1 in the BMP signaling pathway. *EMBO J.* 18: 179-187

364)

Sano Y. *et al.* (2000) ATF-2 is a common nuclear target of Smad and TAK1 pathways in transforming growth factor-beta signalling. *J. Biol. Chem.* 275: 41430-41438.

365)

Shi Y. *et al.* (1998) Crystal structure of a Smad MH1 domain bound to DNA: insights on DNA binding in TGF-beta signalling. *Cell* 94: 585-594

366)

Hahn S.A. *et al.* (1996) DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. *Science* 271: 350-353.

367)

Takagi Y. *et al.* (1996) Somatic alterations of the *DPC4* gene in human colorectal cancers *in vivo*. *Gastroenterology* 111: 1369-1372.

368)

Schutte M. *et al.* (1996) DPC4 gene in various tumor types. *Cancer Res.* 56: 2527-2530

369)

Eppert K. *et al.* (1996) MADR2 maps to 18q21 and encodes a TGF-regulated protein that is functionally mutated in colorectal carcinoma. *Cell* 86: 543-552.

370)

Uchida K. *et al.* (1996) Somatic in vivo alterations of the JV18-1 gene at 18q1 in human lung cancers. *Cancer Res.* 56: 5583-5585

371)

Riggins G.J. *et al.* (1996) Mad-related genes in the human. *Nat. Genet.* 13: 347-349.

372)

Alvarez J., Horton J., Sohn P., Serra R. (2001) The perichondrium plays an important role in mediating the effects of TGF-beta1 on endochondral bone formation. *Dev. Dyn.*, 221(3):311-21.

373)

Serra R., Johnson M., Filvaroff E.H., LaBorde J., Sheehan D.M., Derynck R., Moses H.L. (1997) Expression of a truncated, kinase-defective TGF-beta type II receptor in mouse skeletal tissue promotes terminal chondrocyte differentiation and osteoarthritis. *J. Cell Biol.*, 139(2):541-52.

374)

Haaijman A., Karperien M., Lanske B., Hendriks J., Lowik C.W., Bronckers A.L., Burger E.H. (1999) Inhibition of terminal chondrocyte differentiation by bone morphogenetic protein 7 (OP-1) in vitro depends on the periarticular region but is independent of parathyroid hormone-related peptide. *Bone*, 25(4):397-404.

375)

Karsenty G. (2001) Chondrogenesis just ain't what it used to be. *J.Clin. Invest.*, 107(4):405-7.

376)

Janssens K., Gershoni-Baruch R., Guanabens N., Migone N., Ralston S., Bonduelle M., Lissens W., Van Maldergem L., Vanhoenacker F., Verbruggen L., Van Hul W. (2000) Mutations in the gene encoding the latency-associated peptide of TGF-beta 1 cause Camurati-Engelmann disease. *Nat. Genet.*, 26(3):273-5.

377)

Gazit D., Ebner R., Kahn A. J., Derynck R. (1993) Modulation of expression and cell surface binding of members of the transforming growth factor-superfamily during retinoic acid-induced osteoblastic differentiation of multipotential mesenchymal cells. *Mol. Endocrinol* 7: 189-198.

378)

Hattersley G., Chambers T. J (1991). Effects of transforming growth factor1 on the regulation of osteoclastic development and function. *J. Bone Miner. Res* 6: 165-172

379)

Mackie E. J., Trechsel U., (1990) Stimulation of bone formation in vivo by transforming growth factor- β : remodeling of woven bone and lack of inhibition by indomethacin. *Bone* 11: 295-300

380)

Filvaroff E., Erlebacher A., Ye J., Gitelman S.E., Lotz J., Heillman M., Derynck R. (1999) Inhibition of TGF- β receptor signaling in osteoblasts leads to decreased bone remodeling and increased trabecular bone mass. *Development*, 126(19):4267-79.

381)

Neuhof H. (1917) Fascia transplantation into visceral defects. *Surg. Gynecol. Obstet.* 27: 349

382)

Levander G. (1938) A study of bone regeneration. *Surg. Gynecol. Obstet.* 67: 705

383)

Urist M.R., Iwata H., Ceccotti P.L., Dorfman R.L., Boyd S.D., McDowell R.M., Chien C. (1973) Bone morphogenesis in implants of insoluble bone gelatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70:3511 3515

384)

Urist M.R., Mikulski A., Lietze A. (1979) Solubilized and insolubilized bone morphogenetic protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:1828 1832

385)

Reddi A.H., (1992) Regulation of cartilage and bone differentiation by bone morphogenetic proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 4:850 855

386)

HORTON W.A. (1992) Morphology of connective tissue: Cartilage, *In* Connective Tissue and Its Heritable Disorders. pp. 73-84 New York, Wiley-Liss, Inc.

387)

Reddi A.H. (1994) Bone and cartilage differentiation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 4:737 744

388)

Wang E.A., Rosen V., Cordes P., Hewick R.M., Kriz M.J., Luxenberg D.P., Sibley B.S., Wozney J.M. (1988) Purification and characterization of other distinct bone-inducing factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:9484-9488

389)

Graff J.M. (1997) Embryonic patterning: To BMP or not to BMP, that is the question. *Cell* 89:171 174

390)

Ebendal T., Bengtsson H., Soderstrom S. (1998) Bone morphogenetic proteins and their receptors: Potential functions in the brain. *J. Neurosci. Res.* 51:139 146

391)

Wozney J.M. (1998) The bone morphogenetic protein family: Multifunctional cellular regulators in the embryo and adult. *Eur. J. Oral Sci.* 106:160 166

392)

Wolfman N.M., Hattesley G., Cox K., Celeste A.J., Nelson R., Yamaji N., Dube J.L., Diblasio-Smith E., Nove J., Song J.J., Wozney J.M., Rosen V. (1997) Ectopic induction of tendon and ligament in rats by growth and differentiation factors 5, 6, and 7, members of the TGF-beta gene family. *J. Clin. Invest.* 100:321 330

393)

Luxenberg D.P., McQuaid D., Moustatos I.K., Nove J., Wozney J.M. (1990) Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:2220 2224

394)

Sampath T.K., Maliakal J.C., Hauschka P.V., Jones W.K., Sasak H., Tucker R.F., White K.H., Coughlin J.E., Tucker M.M., Pang R.H. (1992) Recombinant human osteogenic protein-1 (hOP-1) induces new bone formation in vivo with a specific activity comparable with natural bovine osteogenic protein and stimulates osteoblast proliferation and differentiation in vitro. *J. Biol. Chem.* 267:20352 20362

395)

Hammonds R.G. Jr., Schwall R., Dudley A., Berkemeier L., Lai C., Lee J., Cunningham N., Reddi A.H., Wood W.I., Mason A.J. (1991) Bone-inducing activity of mature BMP-2b produced from a hybrid BMP-2a/2b precursor. *Mol. Endocrinol.* 5:149 155

396)

Rutherford R.B., Sampath T.K., Rueger D.C., Taylor T.D. (1992) Use of bovine osteogenic protein to promote rapid osseointegration of endosseous dental implants. *Int. J. Oral. Maxillofac. Implants.* 7:297 301

397)

Ducy P., Karsenty G. (2000) The family of BMPs. *Kidney Int.* 57: 2207-2214

398)

Lawson K.A., Dunn N.R., Roelen B.A., Zeinstra L.M., Davis A.M., Wright C.W., Korving J.P., Hogan B.L. (1999) Bmp4 is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. *Genes* 13:424-436

399)

Zhang H., Bradley A. (1996) Mice deficient for BMP2 are nonviable and have defects in amnion/chorion and cardiac development. *Development* 122:2977-2986

400)

Winnier G., Blessing M., Labosky P.A., Hogan B.L.M. (1995) Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse. *Genes Dev.* 9:2105-2116

401)

Luo G., Hofmann C., Bronckers A.L., Sohocki M., Bradley A., Karsenty G. (1995) Bmp-7 is an inducer of nephrogenesis, and is also required for eye development and skeletal patterning. *Genes Dev.* 9:2808–2820

402)

Lynch C.J. (1921) Short ears, an autosomal mutation in the house mouse. *Am. Nat.* 55:421 426

403)

Green E.L., Green M.C. (1942) The development of three manifestations of the short ear gene in the mouse. *J. Morphol.* 70:1 19

404)

Green E.L. & Green M.C. (1946) Effect of the short ear gene on number of ribs and presacral vertebrae in the house mouse. *Am. Nat.* 80:619 625

405)

Green M.C. (1951) Further morphological effects of the short ear gene in the house mouse. *J. Morphol.* 88:1 22

406)

Green M.C. (1958) Effects of the short ear gene in the mouse on cartilage formation in healing bone fractures. *J. Exp. Zool.* 137:75 88

407)

Green M.C. (1968) Mechanism of the pleiotropic effects of the short ear mutant gene in the mouse. *J. Exp. Zool.* 167:129 150

408)

Kingsley D.M., Bland A.E., Grubber J.M., Marker P.C., Russell L.B., Copeland N.G., Jenkins N.A. (1992) The mouse short ear skeletal morphogenesis locus is associated with defects in a bone morphogenetic member of the TGF beta superfamily. *Cell* 71:399-410

409)

Landauer W. (1952) Brachypodism, a recessive mutation of house mice. *J. Hered* 43:293-298 embryogenesis. *Mech. Dev.* 80:185 189

410)

Gruneberg H., Lee A.J. (1973) The anatomy and development of brachypodism in the mouse. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 30:119 141

411)

Storm E.E., Huynh T.V., Copeland N.G., Jenkins N.A., Kingsley D.M., Lee S-J. (1994) Limb alterations in brachypodism mice due to mutations in a new member of the TGF- β superfamily. *Nature* 368:639-643

412)

Thomas J.T., Kilpatrick M.W., Lin K., Erlacher L., Lembessis P., Costa T., Tsipouras P., Luyten F.P. (1997) Disruption of human limb morphogenesis by a dominant negative mutation in DCMP1. *Nat. Genet* 17:58 64

413)

Thomas J.T., Lin K., Nandedkar M., Camargo M., Cervenka J., Luyten F.P. (1996) A human chondrodysplasia due to a mutation in a TGF-beta superfamily member. *Nat. Genet* 12:315 317

414)

Langer L.O. Jr., Cervenka J., Camargo M. (1989) A severe autosomal recessive acromesomelic dysplasia, the Hunter-Thompson type, and comparison with the Grebe type. *Hum. Genet* 81:323 328

415)

Polinkovsky A., Robin N.H., Thomas J.T., Irons M., Lynn A., Goodman F.R., Reardon W., Kant S.G., Brunner H.G., van der Burgt I., Chitayat D., McGaughran J., Donnai D., Luyten F.P., Warman M.L. (1997) Mutations in CDMP1 cause autosomal dominant brachydactyly type C. *Nat. Genet.* 17:18 19

416)

Brunet L.J., McMahon J.A., McMahon A.P., Harland R.M. (1998) Noggin, cartilage morphogenesis, and joint formation in the mammalian skeleton. *Science* 280:1455 1457

417)

Gong Y., Krakow D., Marcelino J., Wilkin D., Chitayat D., Babul-Hirji R., Hudgins L., Cremers C.W., Cremers F.P., Brunner H.G., Reinker K., Rimoin D.L., Cohn D.H., Goodman F.R., Reardon W., Patton M., Francomano C.A., Warman M.L. (1999) Heterozygous mutations in the gene encoding noggin affect human joint morphogenesis. *Nat. Genet.* 21:302 304,

418)

Dudley A.T., Robertson E.J. (1997) Overlapping expression domains of bone morphogenetic protein family members potentially account for limited tissue defects in BMP7 deficient embryos. *Dev. Dyn.* 208:349 362

419)

Furuta Y., Piston D.W., Hogan B.L. (1997) Bone morphogenetic proteins (BMPs) as regulators of dorsal forebrain development. *Development* 124:2203 2212

420)

Lee S.J. (1991) Expression of growth/differentiation factor 1 in the nervous system: Conservation of a bicistronic structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:4250 4254

421)

Nakashima M., Toyono T., Akamine A., Joyner A. (1999) Expression of growth/differentiation factor 11, a new member of the BMP/TGF- β superfamily during mouse

422)

Solloway M.J., Robertson E.J. (1999) Early embryonic lethality in Bmp5; Bmp7 double mutant mice suggests functional redundancy within the 60A subgroup. *Development* 126:1753-1768

423)

Cui Y., Jean F., Thomas G., Christian J.L. (1998) BMP-4 is proteolytically activated by furin and/or PC6 during vertebrate embryonic development. *EMBO J.* 17:4735-4743

424)

Constam D.B., Robertson E.J. (1999) Regulation of bone morphogenetic protein activity by pro domains and proprotein convertases. *J. Cell Biol.* 144:139-149

425)

DeRobertis E.M., Sasai Y. A common plan for dorsoventral patterning in Bilateria. *Nature* 380(6569):37-40.

426)

Marques G., Musacchio M., Shimell M.J., Wunnenberg-Stapleton K., Cho K.W., O'Connor M.B. (1997) Production of a DPP activity gradient in the early Drosophila embryo through the opposing actions of the SOG and TLD proteins. *Cell* 91(3):417-26.

427)

Piccolo S., Agius E., Lu B., Goodman S., Dale L., De Robertis E.M. (1997) Cleavage of Chordin by Xolloid metalloprotease suggests a role for proteolytic processing in the regulation of Spemann organizer activity. *Cell* 91(3):407-16.

428)

Scott I.C., Blitz I.L., Pappano W.N., Imamura Y., Clark T.G., Steiglitiz B.M., Thomas C.L., Maas S.A., Takahara K., Cho K.W., Greenspan D.S. (1999) Mammalian BMP-1/Tolloid-related metalloproteinases, including novel family member mammalian Tolloid-like 2, have differential enzymatic activities and distributions of expression relevant to patterning and skeletogenesis. *Dev. Biol.* 213(2):283-300.

429)

Mason E.D., Konrad K.D., Webb C.D., Marsh J.L. (1994) Dorsal midline fate in Drosophila embryos requires twisted gastrulation, a gene encoding a secreted protein related to human connective tissue growth factor. *Genes Dev.* 8(13):1489-501.

430)

Chang C., Holtzman D.A., Chau S., Chickering T., Woolf E.A., Holmgren L.M., Bodorova J., Gearing D.P., Holmes W.E., Brivanlou A.H. (2001) Twisted gastrulation can function as a BMP antagonist. *Nature* 410(6827):483-7.

431)

Ross J.J., Shimmi O., Vilmos P., Petryk A., Kim H., Gaudenz K., Hermanson S., Ekker S.C., O'Connor M.B., Marsh J.L. (2001) Twisted gastrulation is a conserved extracellular BMP antagonist. *Nature* 410(6827):479-83.

432)

Scott I.C., Blitz I.L., Pappano W.N., Maas S.A., Cho K.W., Greenspan D.S. (2001) Homologues of Twisted gastrulation are extracellular cofactors in antagonism of BMP signalling. *Nature* 410(6827):475-8.

433)

Ray R. P., Wharton K. A. (2001) Twisted Perspective: New insights into Extracellular Signaling during Development. *Cell*, 104:801-804

434)

Hogan B.L.M. (1996) Bone morphogenetic proteins: Multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes Dev.* 10:1580-1594

435)

Kingsley D.M. (1994) The TGF- β superfamily: New members, new receptors, and genetic tests of function in different organisms. *Genes Dev.* 8:133-146

436)

Massague J., Weis-Garcia F. (1996) Serine/threonine kinase receptors: Mediators of transforming growth factor beta family signals. *Cancer Surv.* 27:41-64

437)

Heldin C.H., Miyazono K., ten Dike P. (1997) TGF- β signaling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 390:465-471

438)

Kawabata M., Imamura T., Miyazono K. (1998) Signal transduction by bone morphogenetic proteins. *Cytokine Growth Factor Rev.* 9:49-61

439)

Liu F., Ventura F., Doody J., Massague J. (1995) Human type II receptor for bone morphogenetic proteins (BMPs): Extension of the two-kinase receptor model to the BMPs. *Mol. Cell Biol.* 15:3479-3486

440)

Ruberte E., Marty T., Nellen D., Affolter M., Basler K. (1995) An absolute requirement for both the type II and type I receptors, punt and thick veins, for dpp signaling in vivo. *Cell* 80:889-897

441)

Rosenzweig B.L., Imamura T., Okadome T., Cox G.N., Yamashita H., ten Dike P., Heldin C.H., Miyazono K. (1995) Cloning and characterization of a human type II receptor for bone morphogenetic proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:7632-7636

442)

Nohno T., Ishikawa T., Saito T., Hosokawa K., Noji S., Wolsing D.W., Rosenbaum J.S. (1995) Identification of a human type II receptor for bone morphogenetic protein-4 that forms differential heteromeric complexes with bone morphogenetic protein type I receptors. *J. Biol. Chem.* 270:5625–5630

443)

Liu F., Ventura F., Doody J., Massague J. (1995) Human type II receptor for bone morphogenetic proteins (BMPs): extension of the two-kinase receptor model to the BMPs. *Mol. Cell. Biol.* 15:3479–3486

444)

Heldin C.H., Miyazono K., ten Dijke P. (1997) TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 390: 465 471

445)

Massague J. (1998) TGF-beta signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* 67:753 791

446)

Lyons K.M., Pelton R.W., Hogan B.L. (1989) Patterns of expression of murine Vgr-1 and BMP-2a RNA suggest that transforming growth factor-beta-like genes coordinately regulate aspects of embryonic development. *Genes Dev.* 3:1657 1668

447)

ten Dike P., Yamashita H., Sampath T.K., Reddi A.H., Estevez M., Riddle D.L., Ichijo H., Heldin C.H., Miyazono K. (1994) Identification of type I receptors for osteogenic protein-1 and bone morphogenetic protein-4. *J. Biol. Chem.* 269:16985–16988

448)

Koenig B.B., Cook J.S., Wolsing D.H., Ting J., Tiesman J.P., Correa P.E., Olson C.C., Pequet A.L., Ventura F., Grant R.A., Chen G.X., Wrana J.L., Massague J., Rosenbaum J.S. (1994) Characterization and cloning of a receptor for BMP-2 and BMP-4 from NIH3T3 cells. *Mol. Cell. Biol.* 14:5961–5974

449)

Suzuki A., Thies R.S., Yamaji N., Song J.J., Wozney J.M., Muramaki K., Ueno N. (1994) A truncated bone morphogenetic protein receptor affects dorsal-ventral patterning in the early *Xenopus* embryo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:10255–10259

450)

Dewulf N., Verschueren K., Lonnoy O., Moren A., Grimsby S., Spiegle K.V., Miyazono K., Huylebroeck D., ten Dike P. (1995) Distinct spatial and temporal expression pattern of two type I receptors for bone morphogenetic proteins during mouse embryogenesis. *Endocrinology* 136:2652–2663

451)

Ikeda T., Takahashi H., Suzuki A., Ueno N., Yokose S., Yamaguchi A., Yoshiki S. (1996) Cloning of rat type I receptor cDNA for bone morphogenetic proteins and bone

morphogenetic-4, and the localization compared with that of the ligands. *Dev. Dyn.* 206:318–329

452)

Rosen V., Cox K., Hattersley G. (1996) Bone morphogenetic protein. *In Principles of Bone Biology.* eds. Bilezikian J.P., Raisz L.G., Rodan G.A. pp. 661–671 Academic Press, San Diego, CA,

453)

Storm E.E., Kingsley D.M. (1999) GDF5 coordinates bone and joint formation during digit development. *Dev. Biol.* 209:11–27

454)

Vukicevic S., Latin V., Chen P., Batorsky R., Reddi A.H., Sampath T.H. (1994) Localization of osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) during human embryonic development: high affinity binding to basement membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 198:693–700

455)

Helder M.N., Ozkaynak E., Sampath K.T., Luyten F.P., Latin V., Oppermann H., Vukicevic S. (1975) Expression pattern of osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) in human and mouse development. *J. Histochem Cytochem.* 43:1035–1044

456)

Chang S.C., Hoang B., Thomas J.T., Vukicevic S., Luyten F.P., Ryba N.J., Kozak C.A., Reddi A.H., Moos M. (1994) Cartilage derived morphogenetic proteins: new members of the transforming growth factor- β superfamily predominantly expressed in long bones during human embryonic development. *J. Biol. Chem.* 269:28227–28234

457)

Sakou T. (1998) Bone morphogenetic proteins: from basic studies to clinical approaches. *Bone* 22:591–603

458)

Natsume T., Tomita S., Iemura S., Kinto N., Yamaguchi A., Ueno N. (1997) Interaction between soluble type I receptor for bone morphogenetic protein and bone morphogenetic protein-4. *J. Biol. Chem.* 272:11535–11540

459)

Lyons K.M., Pelton R.W., Hogan B.J.M. (1989) Patterns of expression of murine Vgr-1 and BMP-2a RNA suggest that transforming growth factor- β -like genes coordinately regulate aspects of embryonic development. *Genes Dev.* 3:1657–1668

460)

Gunther T., Chen Z.F., Kim J., Priemel M., Rueger J.M., Amling M., Moseley J.M., Martin T.J., Anderson D.J., Karsenty G. (2000) Genetic ablation of parathyroid glands reveals another source of parathyroid hormone. *Nature* 406(6792):199-203.

461)

Neer R.M., Arnaud C.D., Zanchetta J.R., Prince R., Gaich G.A., Reginster J.Y., Hodsmann A.B., Eriksen E.F., Ish-Shalom S., Genant H.K., Wang O., Mitlak B.H. (2001) Effect of parathyroid hormone (1-34) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. *N. Engl. J. Med.* 344(19):1434-41.

462)

Gardella T.J., Juppner H. (2001) Molecular properties of the PTH/PTHrP receptor. *Trends Endocrinol Metab.*, 12(5):210-7.

463)

Bergwitz C., Gardella T.J., Flannery M.R., Potts J.T. Jr., Kronenberg H.M., Goldring S.R., Juppner H. (1996) Full activation of chimeric receptors by hybrids between parathyroid hormone and calcitonin. Evidence for a common pattern of ligand-receptor interaction. *J. Biol. Chem.* 271(43):26469-72.

464)

Shimizu M., Potts J.T. Jr., Gardella T.J. (2000) Minimization of parathyroid hormone. Novel amino-terminal parathyroid hormone fragments with enhanced potency in activating the type-1 parathyroid hormone receptor. *J. Biol. Chem.* 275(29):21836-43.

465)

Abou-Samra A.B., Uneno S., Jueppner H., Keutmann H., Potts J.T. Jr., Segre G.V., Nussbaum S.R. (1989) Non-homologous sequences of parathyroid hormone and the parathyroid hormone related peptide bind to a common receptor on ROS 17/2.8 cells. *Endocrinology* 125(4):2215-7.

466)

Caulfield M.P., McKee R.L., Goldman M.E., Duong L.T., Fisher J.E., Gay C.T., DeHaven P.A., Levy J.J., Roubini E., Nutt R.F., et al. (1990) The bovine renal parathyroid hormone (PTH) receptor has equal affinity for two different amino acid sequences: the receptor binding domains of PTH and PTH-related protein are located within the 14-34 region. *Endocrinology* 127(1):83-7.

467)

Nutt R.F., Caulfield M.P., Levy J.J., Gibbons S.W., Rosenblatt M., McKee R.L. (1990) Removal of partial agonism from parathyroid hormone (PTH)-related protein-(7-34)NH₂ by substitution of PTH amino acids at positions 10 and 11. *Endocrinology* 127(1):491-3.

468)

Carter P.H., Juppner H., Gardella T.J. (1999) Studies of the N-terminal region of a parathyroid hormone-related peptide (1-36) analog: receptor subtype-selective agonists, antagonists, and photochemical cross-linking agents. *Endocrinology* 140(11):4972-81.

469)

Cohen F.E., Strewler G.J., Bradley M.S., Carlquist M., Nilsson M., Ericsson M., Ciardelli T.L., Nissenson R.A. (1991) Analogues of parathyroid hormone modified at positions 3 and 6. Effects on receptor binding and activation of adenylyl cyclase in kidney and bone. *J. Biol. Chem.* 266(3):1997-2004.

470)

Behar V., Bisello A., Bitan G., Rosenblatt M., Chorev M. (2000) Photoaffinity cross-linking identifies differences in the interactions of an agonist and an antagonist with the parathyroid hormone/parathyroid hormone-related protein receptor. *J. Biol. Chem.* 275(1):9-17.

471)

Gardella T.J., Axelrod D., Rubin D., Keutmann H.T., Potts J.T. Jr., Kronenberg H.M., Nussbaum S.R. (1991) Mutational analysis of the receptor-activating region of human parathyroid hormone. *J. Biol. Chem.* 266(20):13141-6.

472)

Whitfield J.F., Isaacs R.J., Chakravarthy B., Maclean S., Morley P., Willick G., Divieti P., Bringhurst F.R. (2001) Stimulation of protein kinase C activity in cells expressing human parathyroid hormone receptors by C- and N-terminally truncated fragments of parathyroid hormone 1-34. *J. Bone Miner. Res.* 16(3):441-7.

473)

Kolakowski L.F. Jr. (1994) GCRDb: a G-protein-coupled receptor database. *Receptors Channels* 2(1):1-7.

474)

Grauschopf U., Lilie H., Honold K., Wozny M., Reusch D., Esswein A., Schafer W., Rucknagel K.P., Rudolph R. (2000) The N-terminal fragment of human parathyroid hormone receptor 1 constitutes a hormone binding domain and reveals a distinct disulfide pattern. *Biochemistry* 39(30):8878-87.

475)

Zhang P., Jobert A.S., Couvineau A., Silve C. (1998) A homozygous inactivating mutation in the parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor causing Blomstrand chondrodysplasia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83(9):3365-8.

476)

Karaplis A.C., He B., Nguyen M.T., Young I.D., Semeraro D., Ozawa H., Amizuka N. (1998) Inactivating mutation in the human parathyroid hormone receptor type 1 gene in Blomstrand chondrodysplasia. *Endocrinology* 139(12):5255-8.

477)

Usdin T.B., Gruber C., Bonner T.I. (1995) Identification and functional expression of a receptor selectively recognizing parathyroid hormone, the PTH2 receptor. *J. Biol. Chem.* 270(26):15455-8.

478)

Usdin T.B., Bonner T.I., Harta G., Mezey E. (1996) Distribution of parathyroid hormone-2 receptor messenger ribonucleic acid in rat. *Endocrinology* 137(10):4285-97.

479)

Piserchio A., Usdin T., Mierke D.F. (2000) Structure of tuberoinfundibular peptide of 39 residues. *J. Biol. Chem.* 275(35):27284-90.

480)

Hoare S.R., Usdin T.B. (2000) Tuberoinfundibular peptide (7-39) [TIP(7-39)], a novel, selective, high-affinity antagonist for the parathyroid hormone-1 receptor with no detectable agonist activity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 295(2):761-70.

481)

Jonsson K.B., John M.R., Gensure R.C., Gardella T.J., Juppner H. (2001) Tuberoinfundibular peptide 39 binds to the parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor, but functions as an antagonist. *Endocrinology* 142(2):704-9.

482)

Usdin T.B. (2000) The PTH2 receptor and TIP39: a new peptide-receptor system. *Trends Pharmacol. Sci.* 21(4):128-30.

483)

Rubin D.A., Hellman P., Zon L.I., Lobb C.J., Bergwitz C., Juppner H. (1999) A G protein-coupled receptor from zebrafish is activated by human parathyroid hormone and not by human or teleost parathyroid hormone-related peptide. Implications for the evolutionary conservation of calcium-regulating peptide hormones. *J. Biol. Chem.* 274(33):23035-42.

484)

Turner P.R., Mefford S., Bambino T., Nissenson R.A. (1998) Transmembrane residues together with the amino terminus limit the response of the parathyroid hormone (PTH) 2 receptor to PTH-related peptide. *J. Biol. Chem.* 273(7):3830-7.

485)

Nielsen S.M., Nielsen L.Z., Hjorth S.A., Perrin M.H., Vale W.W. (2000) Constitutive activation of tethered-peptide/corticotropin-releasing factor receptor chimeras. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 97(18):10277-81.

486)

Stroop S.D., Kuestner R.E., Serwold T.F., Chen L., Moore E.E. (1995) Chimeric human calcitonin and glucagon receptors reveal two dissociable calcitonin interaction sites. *Biochemistry* 34(3):1050-7.

487)

Gether U. (2000) Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Endocr. Rev.* 21(1):90-113.

488)

Calvi L.M., Schipani E. (2000) The PTH/PTHrP receptor in Jansen's metaphyseal chondrodysplasia. *J. Endocrinol. Invest.* 23(8):545-54.

489)

Malecz N., Bambino T., Bencsik M., Nissenson R.A. (1998) Identification of phosphorylation sites in the G protein-coupled receptor for parathyroid hormone. Receptor phosphorylation is not required for agonist-induced internalization. *Mol. Endocrinol.* 12(12):1846-56.

490)

Huang Z., Bambino T., Chen Y., Lamah J., Nissenson R.A. (1999) Role of signal transduction in internalization of the G protein-coupled receptor for parathyroid hormone (PTH) and PTH-related protein. *Endocrinology* 140(3):1294-300.

491)

Lefkowitz R.J. (1998) G protein-coupled receptors. III. New roles for receptor kinases and beta-arrestins in receptor signaling and desensitization. *J. Biol. Chem.* 273(30):18677-80.

492)

Huang Z., Chen Y., Nissenson R.A. (1995) The cytoplasmic tail of the G-protein-coupled receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related protein contains positive and negative signals for endocytosis. *J. Biol. Chem.* 270(1):151-6.

492a)

Krishnan V. et al. (2003) PTH bone anabolic action requires Cbfa1/Runx2 dependent signaling. *Molecular Endocr.* 17(3):423

493)

Philbrick W.M., Wysolmerski J.J., Galbraith S., Holt E., Orloff J.J., Yang K.H., Vasavada R.C., Weir E.C., Broadus A.E., Stewart A.F. (1996) Defining the roles of parathyroid hormone-related protein in normal physiology. *J. Physiol. Rev.* 76(1):127-73.

494)

Wysolmerski J.J., Stewart A.F. (1998) The physiology of parathyroid hormone-related protein: an emerging role as a developmental factor. *Annu. Rev. Physiol.* 60:431-60. Review.

495)

Burtis W.J., Wu T., Bunch C., Wysolmerski J.J., Insogna K.L., Weir E.C., Broadus A.E., Stewart A.F. (1987) Identification of a novel 17,000-dalton parathyroid hormone-like adenylate cyclase-stimulating protein from a tumor associated with humoral hypercalcemia of malignancy. *J. Biol. Chem.* 262(15):7151-6.

496)

Strewler G.J., Stern P.H., Jacobs J.W., Eveloff J., Klein R.F., Leung S.C., Rosenblatt M., Nissenson R.A. (1987) Parathyroid hormonelike protein from human renal carcinoma cells. Structural and functional homology with parathyroid hormone. *J. Clin. Invest.* 80(6):1803-7.

497)

Juppner H., Abou-Samra A.B., Uneno S., Gu W.X., Potts J.T. Jr., Segre G.V. (1988) The parathyroid hormone-like peptide associated with humoral hypercalcemia of malignancy and parathyroid hormone bind to the same receptor on the plasma membrane of ROS 17/2.8 cells. *J. Biol. Chem.* 263(18):8557-60.

498)

Burtis W.J., Brady T.G., Orloff J.J., Ersbak J.B., Warrell R.P. Jr., Olson B.R., Wu T.L., Mitnick M.E., Broadus A.E., Stewart A.F. (1990) Immunochemical characterization of circulating parathyroid hormone-related protein in patients with humoral hypercalcemia of cancer. *N. Engl. J. Med.* 322(16):1106-12.

599)

Kovacs C.S., Kronenberg H.M. (1997) Maternal-fetal calcium and bone metabolism during pregnancy, puerperium, and lactation. *Endocr. Rev.* 18(6):832-72.

500)

Orloff J.J., Reddy D., de Papp A.E., Yang K.H., Soifer N.E., Stewart A.F. (1994) Parathyroid hormone-related protein as a prohormone: posttranslational processing and receptor interactions. *Endocr. Rev.* 15(1):40-60.

501)

Clemens T.L., Jin Qian, Colbert M.C. (2001) Prenatal lethality in PTH type I receptor null mice-interrogating the usual suspects. *Endocrinology* 142(12): 5056-5058

502)

Lanske B., Karaplis A.C., Lee K., Luz A., Vortkamp A., Pirro A., Karperien M., Defize L.H., Ho C., Mulligan R.C., Abou-Samra A.B., Juppner H., Segre G.V., Kronenberg H.M. (1996) PTH/PTHrP receptor in early development and Indian hedgehog-regulated bone growth. *Science* 273(5275):663-6.

503)

Kronenberg H.M., Lee K., Lanske B., Segre G.V. (1997) Parathyroid hormone-related protein and Indian hedgehog control the pace of cartilage differentiation. *J. Endocrinol.* 154 Suppl:S39-45

504)

Weir E.C., Philbrick W.M., Amling M., Neff L.A., Baron R., Broadus A.E. (1996) Targeted overexpression of parathyroid hormone-related peptide in chondrocytes causes chondrodysplasia and delayed endochondral bone formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 93(19):10240-5.

505)

Bukoski R.D., Ishibashi K., Bian K. (1995) Vascular actions of the calcium-regulating hormones. *Semin. Nephrol.* 15(6):536-49.

506)

Canalis E. (1993) Insulin like growth factors and the local regulation of bone formation. *Bone*, 14:273-276.

507)

Zhao G., Monier-Faugée M.C., Langub M.C., Geng Z., Nakayama T., Pike J.W., Chernausk S.D., Rosen C.J., Donahue L.R. and Malluche H. *et al.* (2000) Targeted overexpression of insulin-like growth factor I to osteoblasts of transgenic mice: increased trabecular bone volume without increased osteoblast proliferation. *Endocrinology*, 141:2674-2682.

508)

Blundell T.L., Humbel R.E. (1980) Hormone families: pancreatic hormones and homologous growth factors. *Nature* 287:781-7

509)

Rinderknecht E., Humbel R.E. (1978) The amino acid sequence of human insulin like growth factor I and its structural homology, with proinsulin. *J. Biol. Chem.* 253:2769-76

510)

Lewitt M.S., Saunders H., Phuyal J.L., (1994) *et al.* Complex formation by human insulin-like growth factor-binding protein-3 and human acid-labile subunit in growth hormone-deficient rats. *Endocrinology* 134:2402-9.

511)

Merimee T., Laron Z., eds. *Growth hormone, IGF-I and growth: new views of old concepts. Modern endocrinology and diabetes*, Vol. 4. London-Tel Aviv: Freund Publishing House Ltd, 1996.

512)

D'Ercole A.J., Applewhite G.T., Underwood L.E. (1980) Evidence that somatomedin is synthesized by multiple tissues in the fetus. *Dev. Biol.* 75:315-28

513)

Baserga R. (1999) The IGF-I receptor in cancer research. *Exp. Cell. Res.* 253:1-6

514)

Guenther H.L., Guenther H.E., Froesch E.R., Fleisch H. (1982) Effect of insulin-like growth factor on collagen and glycosaminoglycan synthesis by rabbit articular chondrocytes in culture. *Experientia*. 38(8):979-81

515)

McQuillan D.J., Handley C.J., Campbell M.A., Bolis S., Milway V.E., Herington A.C. (1986) Stimulation of proteoglycan biosynthesis by serum and insulin-like growth factor-I in cultured bovine articular cartilage. *Biochem. J.* 240(2):423-30.

516)

Canalis E., McCarthy T.L., Centrella M. (1989) Effects of platelet-derived growth factor on bone formation in vitro. *J. Cell Physiol.* 140(3):530-7.

517)

Schmid C. Ernst M. (1992) IGFs *In Cytokines and bone metabolism eds.* Gowen M. Boca Raton. pp. 229-265 CRC Press

518)

Canalis E., McCarthy T.L., Centrella M. (1989) The role of growth factors in skeletal remodeling. *Endocrinol. Metab. Clin. North. Am.* 18(4):903-18.

519)

Mohan S., Baylink D.J. (1991) Bone growth factors. *Clin. Orthop.* (263):30-48.

520)

Mohan S., Baylink D.J. (1991) Modern Concept of IGFs. pp.169-84 New York: Elsevier

521)

Mohan S., Jennings J.C., Linkhart T.A., Baylink D.J. (1988) Primary structure of human skeletal growth factor: homology with human insulin-like growth factor-II. *Biochim. Biophys. Acta.* 966(1):44-55.

522)

Hock J.M., Centrella M., Canalis E. (1988) Insulin-like growth factor I has independent effects on bone matrix formation and cell replication. *Endocrinology* 122(1):254-60.

523)

Ernst M., Froesch E.R. (1987) Osteoblastlike cells in a serum-free methylcellulose medium form colonies: effects of insulin and insulinlike growth factor I. *Calcif. Tissue Int.* 40(1):27-34.

524)

Schoenle E., Zapf J., Humbel R.E., Froesch E.R. (1982) Insulin-like growth factor I stimulates growth in hypophysectomized rats. *Nature* 296(5854):252-3.

525)

Trippel S.B., Corvol M.T., Dumontier M.F., Rappaport R., Hung H.H., Mankin H.J. (1989) Effect of somatomedin-C/insulin-like growth factor I and growth hormone on cultured growth plate and articular chondrocytes. *Pediatr. Res.* 25(1):76-82.

526)

Franchimont P., Bassleer C. (1991) Effects of hormones and local growth factors on articular chondrocyte metabolism. *J. Rheumatol. Suppl.* 27:68-70.

527)

Sandell L.J., Dudek E.J. (1988) Insulin-like growth factor I stimulates type II collagen gene expression in cultured chondrocytes. *Trans. Orthop. Res. Soc.* 35:300

528)

Tesch G.H., Handley C.J., Cornell H.J., Herington A.C. (1992) Effects of free and bound insulin-like growth factors on proteoglycan metabolism in articular cartilage explants. *J. Orthop. Res.* 10(1):14-22.

529)

Bhaumick B. (1993) Insulin-like growth factor (IGF) binding proteins and insulin-like growth factor secretion by cultured chondrocyte cells: identification, characterization and ontogeny during cell differentiation. *Regul. Pept.* 48(1-2):113-22.

530)

Bhaumick B., Bala R.M. (1991) Differential effects of insulin-like growth factors I and II on growth, differentiation and glucoregulation in differentiating chondrocyte cells in culture. *Acta. Endocrinol. (Copenh)*. 125(2):201-11.

531)

Sara V.R., Hall K. (1990) Insulin-like growth factors and their binding proteins. *Physiol. Rev.* 70(3):591-614.

532)

Martel-Pelletier J., Di Battista J.A., Lajeunesse D., Pelletier J.P. (1998) IGF/IGFBP axis in cartilage and bone in osteoarthritis pathogenesis. *Inflamm. Res.*, 47(3):90-100. Review.

532a)

Lu H., Kraut D., Gerstenfeld L.C., Graves D.T (2003) Diabetes interferes with the bone formation by affecting the expression of transcription factors that regulate OB differentiation. *Endocrinology* 144(1): 346-352

533)

Oh Y., Nagalla S.R., Yamanaka Y., Kim H.S., Wilson E., Rosenfeld R.G. (1996) Synthesis and characterization of insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP)-7. Recombinant human mac25 protein specifically binds IGF-I and -II. *J. Biol. Chem.* 271(48):30322-5.

534)

Wilson E.M., Oh Y., Rosenfeld R.G. (1997) Generation and characterization of an IGFBP-7 antibody: identification of 31kD IGFBP-7 in human biological fluids and Hs578T human breast cancer conditioned media. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82(4):1301-3.

535)

Rechler M.M. (1997) Growth inhibition by insulin-like growth factor (IGF) binding protein-3--what's IGF got to do with it? *Endocrinology* 138(7):2645-7.

536)

Kanety H., Karasik A., Klinger B., *et al.* (1993) Long-term treatment of Laron type dwarfs with insulin-like growth factor I increases serum insulin-like growth factor-binding protein 3 in the absence of growth hormone activity. *Acta. Endocrinol.* 128:144-9

537)

Rosenfeld R.G., Pham H., Cohen P., Fielder P., Gargosky S.E., Muller H., Nonoshita L., Oh Y. (1994) Insulin-like growth factor binding proteins and their regulation. *Acta Paediatr. Suppl.* 399:154-8.

538)

Olney R.C., Tsuchiya K., Wilson D.M., Mohtai M., Maloney W.J., Schurman D.J, Smith R.L. (1996) Chondrocytes from osteoarthritic cartilage have increased expression of insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF-binding protein-3 (IGFBP-3) and -5, but not IGF-II or IGFBP-4. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81(3):1096-103.

539)

Dore S., Pelletier J.P., DiBattista J.A., Tardif G., Brazeau P., Martel-Pelletier J. (1994) Human osteoarthritic chondrocytes possess an increased number of insulin-like growth factor 1 binding sites but are unresponsive to its stimulation. Possible role of IGF-1-binding proteins. *Arthritis Rheum.* 37(2):253-63.

540)

Tardif G., Reboul P., Pelletier J.P., Geng C., Cloutier J.M., Martel-Pelletier J. (1996) Normal expression of type 1 insulin-like growth factor receptor by human osteoarthritic chondrocytes with increased expression and synthesis of insulin-like growth factor binding proteins. *Arthritis Rheum.* 39(6):968-78.

541)

Olney R.C., Smith R.L., Kee Y., Wilson D.M. (1993) Production and hormonal regulation of insulin-like growth factor binding proteins in bovine chondrocytes. *Endocrinology.* 133(2):563-70.

542)

Tavera C., Abribat T., Reboul P., Dore S., Brazeau P., Pelletier J.P., Martel-Pelletier J. (1996) IGF and IGF-binding protein system in the synovial fluid of osteoarthritic and rheumatoid arthritic patients. *Osteoarthritis Cartilage* 4(4):263-74.

543)

Di Battista J.A., Dore S., Martel-Pelletier J., Pelletier J.P. (1996) Prostaglandin E2 stimulates incorporation of proline into collagenase digestible proteins in human articular chondrocytes: identification of an effector autocrine loop involving insulin-like growth factor I. *Mol. Cell Endocrinol.* 123(1):27-35.

544)

Oh Y., Muller H.L., Lamson G., Rosenfeld R.G. (1993) Insulin-like growth factor (IGF)-independent action of IGF-binding protein-3 in Hs578T human breast cancer cells. Cell surface binding and growth inhibition. *J. Biol. Chem.* 268(20):14964-71.

545)

Oh Y., Muller H.L., Pham H., Rosenfeld R.G. (1993) Demonstration of receptors for insulin-like growth factor binding protein-3 on Hs578T human breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* 268(35):26045-8.

546)

Jones J.I., Clemmons D.R. (1995) Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr. Rev.* 16(1):3-34.

547)

Liu L., Delbe J., Blat C., Zapf J., Harel L. (1992) Insulin-like growth factor binding protein (IGFBP-3), an inhibitor of serum growth factors other than IGF-I and -II. *J. Cell Physiol.* 153(1):15-21.

548)

De Mellow J.S., Baxter R.C.(1988) Growth hormone-dependent insulin-like growth factor (IGF) binding protein both inhibits and potentiates IGF-I-stimulated DNA synthesis in human skin fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 156(1):199-204.

549)

Rechler M.M. (1995) *Molecular Endocrinology: Basic concepts and clinical correlations.* New York: Raven Press Ltd., 155-80

550)

Fowlkes J.L., Serra D.M., Rosenberg C.K., Thrailkill K.M. (1995) IGFBP-3 functions as an IGF reversible inhibitor of IGFBP-4 proteolysis. *J.Biol.Chem.* 270: 27481-8

551)

Di Battista J.A., Dore S., Morin N., He Y., Pelletier J.P., Martel-Pelletier J. (1997) Prostaglandin E2 stimulates insulin-like growth factor binding protein-4 expression and synthesis in cultured human articular chondrocytes: possible mediation by Ca(++)-calmodulin regulated processes. *J. Cell Biochem.* 65(3):408-19.

552)

Donnelly M.J., Holly J.M. (1996) The role of IGFBP-3 in the regulation of IGFBP-4 proteolysis. *J. Endocrinol.* 149(3):R1-7.

553)

Radulescu R.T. (1994) Nuclear localization signal in insulin-like growth factor-binding protein type 3. *Trends Biochem. Sci.* 19(7):278.

554)

Buckbinder L., Talbott R., Velasco-Miguel S., Takenaka I., Faha B., Seizinger B.R. et al. (1995) Induction of the growth Inhibitor IGFBP 3 by p53. *Nature* 377: 646-9

555)

Canalis E. (1997) Insulin-like growth factors and osteoporosis. *Bone* 21(3):215-6.

556)

Benedict M.R., Ayers D.C., Calore J.D., Richman R.A. (1994) Differential distribution of insulin-like growth factors and their binding proteins within bone: relationship to bone mineral density. *J. Bone Miner. Res.* 9(11):1803-11.

557)

Pelletier J.P., Martel- Pelletier J., Howell D.S. (1997) Etiopathogenesis of osteoarthritis. *In* Arthritis and allied Conditions. Atextbook of Rheumatology 13th eds. Koopman W.J. pp. 1969-1984 Baltimore: Williams&Wilkins

558)

Pelletier J.P., Roughley P.J., DiBattista J.A., McCollum R., Martel-Pelletier J. (1991) Are cytokines involved in osteoarthritic pathophysiology? *Semin. Arthritis Rheum.* 20(6 Suppl 2):12-25.

559)

Dean D.D. (1991) Proteinase-mediated cartilage degradation in osteoarthritis. *Semin. Arthritis Rheum.* 20(6 Suppl 2):2-11.

560)

Schneiderman R., Rosenberg N., Hiss J., Lee P., Liu F., Hintz R.L., Maroudas A. (1995) Concentration and size distribution of insulin-like growth factor-I in human normal and osteoarthritic synovial fluid and cartilage. *Arch. Biochem. Biophys.* 324(1):173-88.

561)

Fernihough J.K., Billingham M.E., Cwyfan-Hughes S., Holly J.M. (1996) Local disruption of the insulin-like growth factor system in the arthritic joint. *Arthritis Rheum.* 39(9):1556-65.

562)

Dore S., Abribat T., Rousseau N., Brazeau P., Tardif G., DiBattista J.A., Cloutier J.M., Pelletier J.P., Martel-Pelletier J. (1995) Increased insulin-like growth factor 1 production by human osteoarthritic chondrocytes is not dependent on growth hormone action. *Arthritis Rheum.* 38(3):413-9.

563)

Middleton J.F., Tyler J.A. (1992) Upregulation of insulin-like growth factor I gene expression in the lesions of osteoarthritic human articular cartilage. *Ann. Rheum. Dis.* 51(4):440-7.

564)

Matsumoto T., Tsukazaki T., Enomoto H., Iwasaki K., Yamashita S. (1994) Effects of interleukin-1 beta on insulin-like growth factor-I autocrine/paracrine axis in cultured rat articular chondrocytes. *Ann. Rheum. Dis.* 53(2):128-33.

565)

Linkhart T.A., MacCharles D.C. (1992) Interleukin-1 stimulates release of insulin-like growth factor-I from neonatal mouse calvaria by a prostaglandin synthesis-dependent mechanism. *Endocrinology* 131(5):2297-305.

566)

Olney R.C., Wilson D.M., Mohtai M., Fielder P.J., Smith R.L. (1995) Interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha increase insulin-like growth factor-binding protein-3 (IGFBP-3) production and IGFBP-3 protease activity in human articular chondrocytes. *J. Endocrinol.* 146(2):279-86.

567)

Yateman M.E., Claffey D.C., Cwyfan Hughes S.C., Frost V.J., Wass J.A., Holly J.M. (1993) Cytokines modulate the sensitivity of human fibroblasts to stimulation with insulin-like growth factor-I (IGF-I) by altering endogenous IGF-binding protein production. *J. Endocrinol.* 137(1):151-9.

568)

Scharla S.H., Strong D.D., Mohan S., Chevalley T., Linkhart T.A. (1994) Effect of tumor necrosis factor alpha on the expression of IGF 1 and IGFBP 4 in mouse osteoblast. *Eur. J. Endocrinol.* 131: 293-301

569)

Pelletier J.P., Martel-Pelletier J. (1989) Evidence for the involvement of IL1 in human osteoarthritic cartilage Degradation: Protective effect of NSAID. *J. Rheumatol.* 16: 19-27

570)

Isaksson O.P.G., Nilson A., Isgaard J., Lindahl A. (1990) Cartilage as a target tissue for growth hormone and IGF I. *Acta Paediatr. Suppl.* 367:137-41

571)

Isgaard J. (1992) Expression and regulation of IGF I in cartilage and skeletal muscle. *Growth Regul.* 2(1):16-22. Review.

572)

Barnard R., Haynes K.M., Werther G.A., Waters M.J. (1988) The ontogeny of growth hormone receptors in the rabbit tibia. *Endocrinology* 122:2562-9

573)

Isaksson O.P.G., Lindahl A., Nilson A., Isgaard J. (1987) Mechanism of the stimulatory effect of GH on longitudinal bone growth. *Endocr. Rev.* 8:426-38

574)

Mitchell N., Shepard N. (1981) Pericellular proteoglycan concentrations in early degenerative arthritis. *Arthritis Rheum.* 24(7):958-64.

575)

Mankin H.J., Lippiello L. (1971) The glycosaminoglycans of normal and arthritic cartilage. *J. Clin. Invest.* 50(8):1712-9.

576)

Vignon E., Arlot M., Hartmann D., Moyon B., Ville G. (1983) Hypertrophic repair of articular cartilage in experimental osteoarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 42(1):82-8.

577)

Matsumoto T., Gargosky S.E., Iwasaki K., Rosenfeld R.G. (1996) Identification and characterization of insulin-like growth factors (IGFs), IGF-binding proteins (IGFBPs), and IGFBP proteases in human synovial fluid. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81(1):150-5.

578)

Kanety H., Shimon I., Ehrenfeld M., Israeli A., Pariente C., Karasik A. (1996) Insulin-like growth factor I and its binding proteins 3 and 4 are increased in Human inflammatory synovial fluid. *J. Rheumatol.* 23(5):815-8.

579)

Hilal G., Martel-Pelletier J., Pelletier J.P., Ranger P., Lajeunesse D. (1998) Osteoblast-like cells from human subchondral osteoarthritic bone demonstrate an altered phenotype in vitro: possible role in subchondral bone sclerosis. *Arthritis Rheum.* 41(5):891-9.

580)

Radin E.L., Paul I.L., Tolkoﬀ M.J. (1970) Subchondral bone changes in patients with early degenerative joint disease. *Arthritis Rheum.* 13(4):400-5.

581)

Radin E.L., Rose R.M. (1986) Role of subchondral bone in the initiation and progression of cartilage damage. *Clin. Orthop.* (213):34-40.

582)

Wuster C., Blum W.F., Schlemilch S., Ranke M.B., Ziegler R. (1993) Decreased serum levels of insulin-like growth factors and IGF binding protein 3 in osteoporosis. *J. Intern. Med.* 234(3):249-55.

583)

Laron Z. (2001) Insulin-like growth factor 1 (IGF-1): a growth hormone. *Mol Pathol.*, 54(5):311-6. Review.

584)

Laron Z., Pertzalan A., Karp M., *et al.* (1971) Administration of growth hormone to patients with familial dwarfism with high plasma immunoreactive growth hormone. Measurement of sulfation factor, metabolic and linear growth responses. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 33:332–42

585)

Godowski P.J., Leung D.W., Meacham L.R., *et al.* (1989) Characterization of the human growth hormone receptor gene and demonstration of a partial gene deletion in 2 patients with Laron type dwarfism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 86:8083–7

586)

Amselem S., Duquesnoy P., Attree O., *et al.* (1989) Laron dwarfism and mutations of the growth hormone-receptor gene. *N. Engl. J. Med.* 321:989–95

587)

Bondy C.A., Werner H., Roberts C.T., Jr, *et al.* (1990) Cellular pattern of insulin-like growth factor I (IGF-I) and type I IGF receptor gene expression in early organogenesis: comparison with IGF-II gene expression. *Mol. Endocrinol.* 4:1386–98

588)

Kato H., Faria T.N., Stannard B., *et al.* (1994) Essential role of tyrosine residues 1131, 1135, and 1136 of the insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor in IGF-I action. *Mol. Endocrinol.* 8:40–50

589)

LeRoith D., Werner H., Beitner-Johnson D., *et al.* (1995) Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. *Endocr. Rev.* 16:143–63.

590)

Kiess W., Blickenstaff G.D., Sklar M.M., Thomas C.L., Nissley S.P., Sahagian G.G. (1988) Biochemical evidence that the type II Insulinlike GFR is identical to the cation dependent mannose 6-phosphat receptor. *J. Biol. Chem.* 263: 9339-44

591)

Laron Z. (1999) Laron syndrome—primary growth hormone resistance. *In* Hormone resistance syndromes. Contemporary endocrinology. eds. Jameson J.L. pp.17–37 Vol. 2. Totowa, NJ: Humana Press

592)

Laron Z. (1984) Laron type dwarfism (hereditary somatomedin deficiency): a review. *In* Advances in internal medicine and pediatrics. eds. Frick P., Von Harnack G.A., Kochsiek G.A., et al. pp.117–150 Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag

593)

Feinberg M.S., Scheinowitz M., Laron Z. (2000) Echocardiographic dimensions and function in adults with primary growth hormone resistance (Laron syndrome). *Am. J. Cardiol.* 85:209–13

594)

Laron Z., Pertzalan A., Mannheimer S. (1966) Genetic pituitary dwarfism with high serum concentration of growth hormone. A new inborn error of metabolism? *Isr. J. Med. Sci.* 2:153–5.

595)

Laron Z., Pertzalan A., Karp M. (1968) Pituitary dwarfism with high serum levels of growth hormone. *Isr. J. Med. Sci.* 4:883–94

596)

Brat O., Ziv I., Klinger B., et al. (1997) Muscle force and endurance in untreated and human growth hormone or insulin-like growth factor-I-treated patients with growth hormone deficiency or Laron syndrome. *Horm. Res.* 47:45–8

597)

Lurie R., Ben-Amitai D., Laron Z. (2001) Impaired hair growth and structural defects in patients with Laron syndrome (primary IGF-I deficiency) [abstract]. *Horm. Res.*

598)

Accili D., Nakae J., Kim J.J., et al. (1999) Targeted gene mutations define the roles of insulin and IGF-I receptors in mouse embryonic development. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* 12:475–85

599)

Laron Z. (1995) Growth hormone secretagogues: clinical experience and therapeutic potential. *Drugs* 50:595–601

600)

Kojima M., Hosada H., Date Y., *et al.* (1999I) Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 402:656–60

601)

Horowitz M.C., Xi Y., Wilson K., Kacena M.A. (2001) Control of osteoclastogenesis and bone resorption by members of the TNF family of receptors and ligands. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 12(1):9-18.

602)

Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang M-S, Lüthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan H-L, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Sander S, Van G, Tarpley J, Derby P, Lee R, Amgen EST Program, Boyle WJ. (1997) Osteoprotegerin: A novel secreted protein involved in the regulation of bone density, *Cell* 89:309-319.

603)

H. Yasuda, N. Shima, N. Nakagawa, S.-I. Mochizuki, K. Yano, N. Fujise, Y. Sato, M. Goto, K. Yamaguchi, M. Kuriyama, T. Kanno, A. Murakami, E. Tsuda, T. Morinaga and K. Higashio (1998) Identity of osteoclastogenesis inhibitor factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): A mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro. *Endocrinology* 39, 1329-1337.

604)

E. Tsuda, M. Goto, S.-I. Mochizuki, K. Yano, F. Kobayashi, T. Morinaga and K. Higashio (1997) Isolation of a novel cytokine from human fibroblasts that specifically inhibits osteoclastogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 234, 137-142.

605)

K.B. Tan, J. Harrop, M. Reddy, P. Young, J. Terrett, J. Emery, G. Moore and A. Truneh (1997) Characterization of a novel TNF-like ligand and recently described TNF ligand and TNF receptor superfamily genes and their constitutive and inducible expression in hematopoietic and non-hematopoietic cells. *Gene* 204, 35-46.

606)

B.S. Kwon, S. Wang, N. Udagawa, V. Haridas, Z.H. Lee, K.K. Kim, K.-O. Oh, J. Greene, Y. Li, J. Su, R. Gentz, B.B. Aggarwal, J. Ni. (1998) TR1, a new member of the tumor necrosis factor receptor family, induces fibroblast proliferation and inhibits osteoclastogenesis and bone resorption. *FASEB J.* 12 845-854.

607)

L.C. Hofbauer, C.R. Dunstan, T.C. Spelsberg, B.L. Riggs and S. Khosla (1998) Osteoprotegerin production by human osteoblast lineage cells is stimulated by vitamin D, bone morphogenetic protein-2, and cytokines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 250, 776-781.

608)

O.N.A. Vidal, K. Sjögren, B.I. Eriksson, Ö. Ljunggren and C. Ohlsson (1998) Osteoprotegerin mRNA is increased by interleukin- in the human osteosarcoma cell line MG-63 and in human osteoblast-like cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 248, 696-700.

609)

H. Brändström, K.B. Jonsson, N.O.A. Vidal, S. Ljunghall, C. Ohlsson and Ö. Ljunggren (1998) Tumor necrosis factor- and - upregulate the levels of osteoprotegerin mRNA in human osteosarcoma MG-63 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 248 454-457.

610)

L.C. Hofbauer, S. Khosla, C.R. Dunstan, D.L. Lacey, T.C. Spelsberg and B.L. Riggs (1999) Estrogen stimulates gene expression and protein production of osteoprotegerin in human osteoblastic cells. *Endocrinology* 140, 4367-4370.

611)

N.O.A. Vidal, H. Brändström, K.B. Jonsson and C. Ohlsson (1998) Osteoprotegerin mRNA is expressed in primary human osteoblast-like cells: Down-regulation by glucocorticoids. *J. Endocrinol.* 159, 191-195.

612)

L.C. Hofbauer, D.L. Lacey, C.R. Dunstan, T.C. Spelsberg, B.L. Riggs and S. Khosla (1999) Interleukin-1 and tumor necrosis factor-, but not interleukin-6 stimulate osteoprotegerin ligand gene expression in human osteoblastic cells. *Bone* 25, 255-259.

613)

H. Brändström, K.B. Jonsson, C. Ohlsson, O. Vidal, S. Ljunghall and Ö. Ljunggren (1998) Regulation of osteoprotegerin mRNA levels by prostaglandin E₂ in human bone marrow stroma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 247, 338-341.

614)

S.K. Lee and J.A. Lorenzo (1999) Parathyroid hormone stimulates TRANCE and inhibits osteoprotegerin messenger ribonucleic acid expression in murine bone marrow cultures: Correlation with osteoclast-like cell formation. *Endocrinology* 140, 3552-3561.

615)

T. Murakami, M. Yamamoto, K. Ono, M. Nishikawa, N. Nagata, K. Motoyoshi and T. Akatsu (1998) Transforming growth factor-1 increases mRNA levels of osteoclastogenesis inhibitory factor in osteoblastic/stromal cells and inhibits the survival of murine osteoclast-like cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 252, 747-752.

616)

P.J. Bekker, D. Holloway, A. Nakanishi, H.M. Arrighi and C.R. Dunstan,(1999) Osteoprotegerin (OPG) has potent and sustained anti-resorptive activity in postmenopausal women. *J. Bone Miner. Res.* 14, S180 (abstract).

617)

P. Honore, N.M. Luger, M.A.C. Sabino, M.J. Schwei, S.D. Rogers, D.B. Mach, P.F. O'Keefe, M.L. Ramnaraine, D.R. Clohisy and P.W. Mantyh (2000) Osteoprotegerin blocks bone cancer-induced skeletal destruction, skeletal pain and pain-related neurochemical reorganization of the spinal cord. *Nat. Med.* 6, 521-528.

618)

N. Bucay, I. Sarosi, C.R. Dunstan, S. Morony, J. Tarpley, C. Capparelli, S. Scully, H.L. Tan, W. Xu, D.L. Dacey, W.J. Boyle and W.S. Simonet (1998) Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev.* 12, 1260-1268.

619)

Y. Tintut, F. Parhami, K. Boström, S.M. Jackson and L.L. Demer (1998) cAMP stimulates osteoblast-like differentiation of calcifying vascular cells. Potential signaling pathway for vascular calcification. *J. Biol. Chem.* 273, 7547-7553.

620)

F. Parhami, A.D. Morrow, J. Balucan, N. Leitinger, A.D. Watson, Y. Tintut, J.A. Berliner and L.L. Demer (1997) Lipid oxidation products have opposite effects on calcifying vascular cell and bone cell differentiation: A possible explanation for the paradox of arterial calcification in osteoporotic patients. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17, 680-687.

621)

M. Horowitz (1993) Cytokines and estrogen in bone: Anti-osteoporotic effects. *Science* 260, 626-627.

622)

G. Pan, K. O'Rourke, A.M. Chinnaiyan, R. Gentz, R. Ebner, J. Ni and V.M. Dixit (1997) The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science* 276, 111-113.

623)

G. Pan, J. Ni, Y.-F. Wei, G. Yu, R. Gentz and V.M. Dixit (1997) An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. *Science* 277, 815-818.

624)

J.G. Emery, P. McDonnell, M.B. Brigham Burke, K.C. Deen, S. Lyn, C. Silverman, E. Dul, E.R. Appelbaum, C. Eichman, R. DiPrinzio, R.A. Dodds, I.E. James, M. Rosenberg, J.C. Lee and P.R. Young (1998) Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *J. Biol. Chem.* 273, 14363-14367.

625)

B.R. Wong, J. Rho, J. Arron, E. Robinson, J. Orlinick, M. Chao, S. Kalachikov, E. Cayani, F.S. Barlett, W.N. Frankel, S. Young Lee and Y. Choi (1997) TRANCE is a novel ligand of the tumor necrosis factor receptor family that activates c-jun N-terminal kinase in T cells. *J. Biol. Chem.* 272, 25190-25194.

626)

M.A. Anderson, E. Maraskovsky, W.L. Billingsley, W.C. Dougall, M.E. Tometsko, E.R. Roux, M.C. Teepe, R.F. DuBose, D. Cosman and L. Galibert (1997) A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature* 390, 175-179.

627)

D.L. Lacey, E. Timms, H.-L. Tan, M.J. Kelley, C.R. Dunstan, T. Burgess, R. Elliott, A. Colombero, G. Elliott, S. Scully, H. Hsu, J. Sullivan, N. Hawkins, E. Davy, C. Capparelli, A. Eli, Y.-X. Qian, S. Kaufman, I. Sarosi, V. Shalhoub, G. Senaldi, J. Guo, J. Delaney and W.J. Boyle (1998) Osteoprotegerin (OPG) ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 93, 165-176.

628)

H. Yasuda, N. Shima, N. Nakagawa, K. Yamaguichi, M. Kinosaki, S.-I. Mochizuki, A. Tomoyasu, K. Yano, M. Goto, A. Murakami, E. Tsuda, T. Morinaga, K. Higashio, N. Udagawa, N. Takahashi and T. Suda (1998) Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 3597-3602.

629)

L. Lum, B.R. Wong, R. Josien, J.D. Becherer, H. Erdjument-Bromage, J. Schlöndorff, P. Tempst, Y. Choi and C.P. Blobel (1999) Evidence for a role of a tumor necrosis factor-(TNF)-converting enzyme-like protease in shedding of TRANCE, a TNF family member involved in osteoclastogenesis and dendritic cell survival. *J. Biol. Chem.* 274, 13613-13618.

630)

Y.-H. Gao, T. Shinki, T. Yuasa, H. Kataoka-Enomoto, T. Komori, T. Suda and A. Yamaguchi (1998) Potential role of cbfa1, an essential transcriptional factor for osteoblast differentiation, in osteoclastogenesis: regulation of mRNA expression of osteoclast differentiation factor (ODF). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 252, 697-702.

631)

R. Kitazawa, S. Kitazawa and S. Maeda (1999) Promoter structure of mouse RANKL/TRANCE/OPGL/ODF gene. *Biochim. Biophys. Acta* 1445, 134-141.

632)

C.A. O'Brien, N.C. Farrar and S.C. Manolagas (1998) Identification of an OSF-2 binding site in the murine RANKL/OPGL gene promoter: a potential link between osteoblastogenesis and osteoclastogenesis. *Bone* 23 Suppl 1, 1003.

633)

L.C. Hofbauer, F. Gori, B.L. Riggs, D.L. Lacey, C.R. Dunstan, T.C. Spelsberg and S. Khosla (1999) Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: Potential paracrine mechanism of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Endocrinology* 140, 4382-4389.

634)

E.M. Greenfield (1999) ODF/OPGL expression is regulated by IL-1 and IL-6. *J. Bone Miner. Res.* 14 Suppl 1, A211.

635)

N.J. Horwood, J. Elliott, T.J. Martin and M.T. Gillespie (1998) Osteotropic agents regulate the expression of osteoclast differentiation factor and osteoprotegerin in osteoblastic stromal cells. *Endocrinology* 139, 4743-4746.

636)

H. Takai, M. Kanematsu, K. Yano, E. Tsuda, K. Higashio, K. Ikeda, K. Watanabe and Y. Yamada (1998) Transforming growth factor- stimulates the production of osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor by bone marrow stromal cells. *J. Biol. Chem.* 273, 27091-27096.

637)

D. Kim, R.E. Mebius, J.D. MacMicking, S. Jung, T. Cupedo, Y. Castellanos, J. Rho, B.R. Wong, R. Josien, N. Kim, P.D. Rennert and Y. Choi (2000) Regulation of peripheral lymph node genesis by the tumor necrosis factor family member TRANCE. *J. Exp. Med.* 192, 1467-1478.

638)

Y.-Y. Kong, U. Feige, I. Sarosi, B. Bolon, A. Tafuri, S. Morony, C. Capparelli, J. Li, R. Elliott, S. McCabe, T. Wong, G. Campagnuolo, E. Moran, E.R. Bogoch, G. Van, L.T. Nguyen, P.S. Ohashi, D.L. Lacey, E. Fish, W.J. Boyle and J.M. Penninger (1999) Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature* 402, 304-308.

639)

S. Cenci, M.N. Weitzmann, C. Roggia, N. Namba, D. Novack, J. Woodring and R. Pacifici (2000) Estrogen deficiency induces bone loss by enhancing T-cell production of TNA-. *J. Clin. Invest.* 106, 1229-1237.

640)

H. Hsu, D.L. Lacey, C.R. Dunstan, I. Solovyev, A. Colombero, E. Timms, H.-L. Tan, G. Elliott, M.J. Kelley, I. Sarosi, L. Wang, X.-Z. Xia, R. Elliott, L. Chiu, T. Black, S. Scully, C. Capparelli, S. Morony, G. Shimamoto, M.B. Bass and W.J. Boyle (1999) Tumor necrosis factor receptor family RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 3540-3545.

641)

N. Nakagawa, M. Kinoshita, K. Yamaguchi, N. Shima, H. Yasuda, K. Yano, T. Morinaga and K. Higashio (1998) RANK is the essential signaling receptor for osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 253, 395-400.

642)

M. Nishii, P. Niforas, T.J. Martin and M.T. Gillespie (1999) Structure and expression of the murine rank gene. *J. Bone Miner. Res.* 14, 483S (abstract).

643)

B.G. Darnay, V. Haridas, J. Ni, P.A. Moore and B.B. Aggarwal, Characterization of the intracellular domain of receptor activator of NF-B (RANK). *J. Biol. Chem.* 273, 20551-20555.

644)

B.R. Wong, R. Josien, S. Young Lee, M. Vologodskaja, R.M. Steinman and Y. Choi (1998) The TRAF family of signal transducers mediates NF-B activation by the TRANCE receptor. *J. Biol. Chem.* 273, 28355-28359

645)

L. Childs, E. Paschalis, Y. Shigeyama, L. Xing, W. Dougal, D. Anderson, T. Pap, A. Boskey, S. Gay, B. Boyce, E. Puzas, R. Rosier, R. O'Keefe and E. Schwarz (2000) Long term protection from wear debris-induced bone resorption and amelioration of established osteolysis by RANK;Fc. *J. Bone Miner. Res.* 15, S192 (abstract).

646)

A.E. Hughes, S.H. Ralston, J. Marken, C. Bell, H. MacPherson, R.G.H. Wallace, W. van Hul, M.P. Whyte, K. Nakatsuka, L. Hovy and D.M. Anderson (2000) Mutations in TNFRSF11A, affecting the signal peptide of RANK, cause familial expansile osteolysis. *Nat. Genet.* 24, 45-48.

647)

R.H. Arch, R.W. Gedrich and C.B. Thompson (1998) Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs) -- A family of adapter proteins that regulates life and death. *Genes Dev.* 12, 2821-2830.

648)

M.A. Lomaga, W.-C. Yeh, I. Sarosi, G.S. Duncan, C. Furlonger, A. Ho, S. Morony, C. Capparelli, G. Van, S. Kaufman, A. van der Heiden, A. Itie, A. Wakeham, W. Khoo, T. Sasaki, Z. Cao, J.M. Penninger, C.J. Paige, D.L. Lacey, C.R. Dunstan, W.J. Boyle, D.V. Goeddel and T.W. Mak (1999) TRAF6 deficiency results in osteopetrosis and defective interleukin-1, CD40, and LPS signaling. *Genes Dev.* 13, 1015-1024.

649)

A. Naito, S. Azuma, S. Tanaka, T. Miyazaki, S. Takaki, K. Takatsu, K. Nakao, K. Nakamura, M. Katsuki, T. Yamamoto and J. Inoue (1999) Severe osteopetrosis, defective interleukin-1 signalling and lymph node organogenesis in TRAF6-deficient mice. *Genes Cells* 4, 353-362.

650)

B.G. Darnay, J. Ni, P.A. Moore and B.B. Aggarwal (1999) Activation of NF-B by RANK requires tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF6) and NF-B-inducing kinase. Identification of a novel TRAF6 interaction motif. *J. Biol. Chem.* 274, 7724-7731.

651)

H. Takayanagi, K. Ogasawara, S. Hida, T. Chiba, S. Murata, K. Sato, A. Takaoka, T. Yokochi, H. Oda, K. Tanaka, K. Nakamura and T. Taniguchi (2000) T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signalling cross-talk between RANKL and IFN. *Nature* 408, 600-605.

652)

Heberden C., Denis I., Pointillart A., Mercier T. (1998) TGF- β and Calcitriol. *Gen. Pharmac.* 30(2): 145-151

653)

Tremollieres F.A., Pouilles J.M., Ribot C. (1993) Vertebral postmenopausal bone loss is reduced in overweight women: a longitudinal study in 155 early postmenopausal women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 77(3):683-6.

653a)

Laharrague P. et al. (1998) High expression of leptin by human bone marrow adipocytes. *FASEB* 12:747

653b)

Maor G., Rochwerger M., Segev Y., Phillip M. (2002) Leptin acts as a growth factor on the CDZ of skeletal growth centers. *J. bone min. res.* 17: 1034

654)

Elmqvist J.K., Maratos-Flier E., Saper C.B., Flier J.S. (1998) Unraveling the central nervous system pathways underlying responses to leptin. *Nat. Neurosci.* 1(6):445-50. Review.

655a)

Ducy P., Amling M., Takeda S., Priemel M., Schilling A.F., Beil F.T., Shen J., Vinson C., Rueger J.M., Karsenty G. (2000) Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass. *Cell* 100(2):197-207.

655b)

Takeda S., Eleftheriou F., Lévasséur R., Liu X., Zhao L., Parker K.L., Armstrong D., Ducy P., Karsenty G. (2002) Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system. *Cell* 111: 305-317

655c)

Saper C.B., Chou T.C., Elmqvist J.K. (2002) The need to feed: homeostatic and hedonic control of eating. *Neuron* 36: 199-211

656)

Westvik J. (1996) Radiological features in generalized lipodystrophy. *Acta Paediatr. Suppl.* 413:44-51.

657)

Farooqi I.S., Yeo G.S., Keogh J.M., Aminian S., Jebb S.A., Butler G., Cheetham T., O'Rahilly S. (2000) Dominant and recessive inheritance of morbid obesity associated with melanocortin 4 receptor deficiency. *J. Clin. Invest.* 106(2):271-9.

657a)

Engelbrecht Y., Wet H., Horsch K., et al. (2003) Glucocorticoids induce rapid up-regulation of mitogen activated protein kinase phosphatase 1 and dephosphorylation of extracellular

signal regulated kinase and impair proliferation in human and mouse osteoblast cell lines. *Endocrinology* 144(2):412-422

658)

Khosla S. (2002) Editorial: Leptin-Central or peripheral to the regulation of bone metabolism? *Endocrinology* 143:4161

658b)

F. Elefteriou, S. Takeda, K. Ebihara, J. Magre, N. Patano, C. Ae Kim, Y. Ogawa, X. Liu, S. M. Ware, W. J. Craigen, J. J. Robert, C. Vinson, K. Nakao, J. Capeau, G. Karsenty (2004) Serum leptin level is a regulator of bone mass. *PNAS* vol. 101 no. 9 3263

659)

Frederich R.C, Lollmann B., Hamann A, Napolitano-Rosen A., Kahn B.B., Lowell B.B., Flier J.S. (1995) Expression of ob mRNA and its encoded protein in rodents. Impact of nutrition and obesity. *J Clin Invest.* 96(3):1658-63.

660)

Carro E., Senaris R., Considine R.V., Casanueva F.F., Dieguez C. (1997) Regulation of in vivo growth hormone secretion by leptin. *Endocrinology* 138(5):2203-6.

661)

Snyder D.K., Clemmons D.R., Underwood L.E. (1989) Dietary carbohydrate content determines responsiveness to growth hormone in energy-restricted humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 69(4):745-52.

662)

Flier J.S. (1998) Clinical review 94: What's in a name? In search of leptin's physiologic role. *J Clin Endocrinol Metab.* 83(5):1407-13. Review.

663)

Caro J.F., Kolaczynski J.W., Nyce M.R., Ohannesian J.P., Opentanova I., Goldman W.H., Lynn R.B., Zhang P.L., Sinha M.K., Considine R.V. (1996) Decreased cerebrospinal-fluid/serum leptin ratio in obesity: a possible mechanism for leptin resistance. *Lancet.* 348(9021):159-61.

664)

Developmental Cell, Vol. 6, 423–435, March, 2004, Copyright ©2004 by Cell Press

A Twist Code Determines the
Onset of Osteoblast Differentiation

Peter Bialek,1,6 Britt Kern,1,2,6 Xiangli Yang,1

Marijke Schrock,1 Drazen Sobic,3

Nancy Hong,4 Hua Wu,4 Kai Yu,5

David M. Ornitz,5 Eric N. Olson, Monica J. Justice,1 and Gerard Karsenty1,*

