

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

**Veränderungen verschiedener Targets im Wnt- und  
BMP-Signalweg durch Zigarettenrauch während der  
Differenzierung von SCP-1 zu Osteoblasten**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Zahnheilkunde

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von  
Strobel, Julius

2019

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. A. Nüssler  
2. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. Dr. S. Kluba

Tag der Disputation: 28.11.2018

*„Ich bin immer noch verwirrt, aber auf einem höheren Niveau.“*

Enrico Fermi

## I Inhaltsverzeichnis

I Inhaltsverzeichnis .....	4
II Abbildungs- und Tabellenverzeichnis .....	6
III Abkürzungsverzeichnis .....	9
1 Einleitung .....	13
1.1 Rauchen .....	13
1.1.1 Rauchen in der Gesellschaft .....	13
1.1.2 Inhalts- bzw. Zusatzstoffe .....	14
1.1.3 Auswirkungen von Zigarettenrauch .....	14
1.2 Der Knochen .....	18
1.2.1 Arten der Ossifikation (Lüllmann-Rauch 2009) .....	18
1.2.2 Knochenumbau und Knochenaufbau .....	18
1.2.3 Osteogene Stammzellendifferenzierung .....	19
1.3 Signalwege .....	20
1.3.1 Der Wnt-/ $\beta$ -Catenin-Signalweg .....	21
1.3.2 Der BMP-Signalweg .....	22
1.3.3 Andere wichtige Signalmoleküle .....	24
1.4 Knochenerkrankungen und Veränderungen der Signalwege .....	25
1.5 Auswirkung von Rauchen auf Osteoblasten .....	26
1.6 Ziel dieser Arbeit .....	27
2 Material und Methoden .....	29
2.1 Reagenzien und Verbrauchsmaterialien .....	29
2.2 Geräte und Programme .....	30
2.3 Zelllinien .....	31
2.3.1 Kultivierung und osteogene Differenzierung von SCP-1 Zellen (Bocker et al. 2008, Novara et al. 2010) .....	31
2.4 Humane Osteoblasten .....	32
2.4.1 Isolierung und Kultivierung von menschlichen Präosteoblasten (Ehnert et al. 2010) .....	32
2.4.2 Differenzierung von humanen Präosteoblasten (Ehnert et al. 2010) 33	
2.5 Lösungen .....	34
2.5.1 Herstellen von CSE (Sreekumar et al. 2017) .....	34
2.6 RNA-Isolierung (Peqlab a VWR company 2017) .....	34
2.7 RNA-Quantifizierung (BMG LABTECH The Microplate Reader Company 2017) .....	35

2.8	Überprüfung der RNA-Integrität mittels Gelelektrophorese (Sambrook und Russell 2001).....	36
2.9	cDNA-Synthese.....	37
2.10	Primerdatenbank.....	38
2.11	Die Polymerase-Kettenreaktion .....	39
2.12	Herstellen der PCR Ausgangsprodukte .....	41
2.13	Die Agarose-Gelelektrophorese.....	41
2.14	Optische Auswertung mit ImageJ .....	42
2.15	Datenverarbeitung – die Genexpression der targets in Bezug zum housekeeping gene .....	43
2.16	Statistische Auswertung.....	46
3	Ergebnisse .....	47
3.1	Zelllinien.....	47
3.1.1	Targets des BMP Signalwegs (Tag 7, 14 und 21) .....	47
3.1.2	Targets des Wnt-Signalwegs (Tag 14 und 21) .....	62
3.2	humane Osteoblasten .....	68
3.2.1	Targets des BMP Signalwegs (Tag 14) .....	68
3.2.2	Targets des Wnt-Signalwegs (Tag 14) .....	77
4	Diskussion.....	82
4.1	Rauchen – die gefährliche Droge.....	82
4.2	Das Rauchen und seine Folgen in Bezug auf das Remodelling und die Abhängigkeit der Inkubationszeit auf Signalwege.....	83
4.3	Der Vergleich von Zelllinien zu humanen Osteoblasten – Die Übertragbarkeit auf <i>in-vivo</i> Studien.....	87
4.4	Die Übertragbarkeit auf den klinischen Alltag.....	87
4.5	Ausblick.....	89
5	Zusammenfassung.....	90
6	Literaturverzeichnis .....	91
7	Erklärung zum Eigenanteil .....	100
IV	Danksagung.....	101

## II Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Die Inhalts- und Zusatzstoffe einer Zigarette (Pötschke-Langer et al. 2015b). .....	14
Abbildung 2: Die Erkrankungen und Beeinträchtigungen infolge des Rauchens (Pötschke-Langer et al. 2015a). .....	15
Abbildung 3: Die Risikorate bei Patienten für eine beliebige Fraktur (Any fracture), beziehungsweise einer Hüft-Fraktur (Hip fracture). .....	17
Abbildung 4: Die osteogene Zelldifferenzierung .....	20
Abbildung 5: Wichtige Signalmoleküle im komplexen Prozess des Knochenstoffwechsels im Hinblick auf die regulatorische Funktion.....	21
Abbildung 6: Versuchsaufbau zur Herstellung von CSE, SWI 2017.....	34
Abbildung 7: Die Gelelektrophorese zur Kontrolle der Integrität der RNA. ....	36
Abbildung 8: Schematische Darstellung der Gelelektrophorese (Manske 2003). .....	42
Abbildung 9: Das Bild einer Gelelektrophorese Exemplarisch für die Auswertung der Genexpression mittels der Gelelektrophorese. ....	43
Abbildung 10: Statistische Auswertung der Genexpression von BMP2 und BMP7. ....	48
Abbildung 11: Statistische Auswertung der Genexpression der Typ-I-Rezeptoren Alk1, Alk2 und Alk6. ....	50
Abbildung 12: Statistische Auswertung der Genexpression der Rezeptor-Smads, Smad1 und Smad2.....	52
Abbildung 13: Statistische Auswertung der Genexpression der Rezeptor-Smads, Smad3 und Smad5.....	53
Abbildung 14: Statistische Auswertung der Genexpression des co-Smad Smad4. ....	54
Abbildung 15: Statistische Auswertung der Genexpression der Inhibitor-Smads, Smad6 und Smad7.....	55
Abbildung 16: Statistische Auswertung der Genexpression von OPG und Rankl .....	56

Abbildung 17: Statistische Auswertung der Genexpression des Schlüssel-Transkriptionsfaktors Runx2.....	57
Abbildung 18: Statistische Auswertung der Genexpression des TGF-beta.....	58
Abbildung 19: Statistische Auswertung der Genexpression des Endoglin. ....	59
Abbildung 20: Statistische Auswertung der Genexpression des Smad-Komplex Inhibitors Smurf2. ....	60
Abbildung 21: Statistische Auswertung der Genexpression der Typ-II-Rezeptoren ActR2A und ActR2B. ....	61
Abbildung 22: Statistische Auswertung der Genexpression des Wnt2. ....	62
Abbildung 23: Statistische Auswertung der Genexpression der Antagonisten des Wnt-Signalwegs DKK1 und DKK2.....	63
Abbildung 24: Statistische Auswertung der Genexpression des Sost. ....	64
Abbildung 25: Statistische Auswertung der Genexpression der Transkriptionsfaktoren Gli2 und Foxo.....	65
Abbildung 26: Statistische Auswertung der Genexpression des AP und OC. ..	66
Abbildung 27: Statistische Auswertung der Genexpression des alpha-TAT1 und Pc2. ....	67
Abbildung 28: Statistische Auswertung der Genexpression von BMP2 und BMP7. ....	68
Abbildung 29: Statistische Auswertung der Genexpression der Typ-I-Rezeptoren Alk1, Alk2 und Alk6. ....	69
Abbildung 30: Statistische Auswertung der Genexpression des Smad1 und 2.	70
Abbildung 31: Statistische Auswertung der Genexpression von Smad3 und 5.	71
Abbildung 32: Statistische Auswertung der Genexpression von Smad4. ....	71
Abbildung 33: Statistische Auswertung der Genexpression von Smad6 und 7.	72
Abbildung 34: Statistische Auswertung der Genexpression von OPG und Rankl. ....	73
Abbildung 35: Statistische Auswertung der Genexpression von Runx2. ....	74
Abbildung 36: Statistische Auswertung der Genexpression von TGF-beta.....	74
Abbildung 37: Statistische Auswertung der Genexpression von Endoglin. ....	75
Abbildung 38: Statistische Auswertung der Genexpression von Smurf2. ....	75

Abbildung 39: Statistische Auswertung der Genexpression von ActR2A und ActR2B. ....	76
Abbildung 40: Statistische Auswertung der Genexpression von Wnt2. ....	77
Abbildung 41: Statistische Auswertung der Genexpression von DKK1 und DKK2. ....	78
Abbildung 42: Statistische Auswertung der Genexpression von Sost. ....	78
Abbildung 43: Statistische Auswertung der Genexpression von Gli2 und Foxo. ....	79
Abbildung 44: Statistische Auswertung der Genexpression von AP und OC. ...	80
Abbildung 45: Statistische Auswertung der Genexpression von alpha-TAT1 und Pc2. ....	81

Tabelle 1: Der Anteil der Raucherinnen und Raucher in den verschiedenen Altersgruppen (statistisches Bundesamt 2014). ....	13
Tabelle 2: Die in dieser Arbeit verwendeten Primer. ....	39
Tabelle 3: Die ausgewerteten Werte der Expression der GAP-DH mit Hilfe von ImageJ. ....	44
Tabelle 4: Die ausgewerteten Werte der Expression des BMP2 mit Hilfe von ImageJ. ....	44
Tabelle 5: Die Genexpression des zu untersuchenden Genes ins Verhältnis zur GAP-DH. ....	45
Tabelle 6: Die Genexpression bei unterschiedlichen Konzentrationen von Zigarettenrauch im Verhältnis zu 0% Zigarettenrauch. ....	45
Tabelle 7: Abhängigkeit der verschiedenen Inkubationszeiten auf die Signalwege bzw. auf die Primer. ....	84



#### III Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celcius
Activin-A	Activin Untereinheit A
ActR2A/B	Actin Related Protein 2A/2B
Alk2	Activin Receptor-Like Kinase 2
Alk3 (BMPRIA)	Activin Receptor-Like Kinase 3 (Bone Morphogenetic Protein Receptor Type IA)
Alk6 (BMPRIB)	Activin Receptor-Like Kinase 6 (Bone Morphogenetic Protein Receptor Type IB)
ALP/AP	Alkalische Phosphatase
Alpha-Tat1	Alpha-Tubulin N-Acetyltransferase 1
BMPs/2/4/6/7/9	Bone Morphogenetic Proteins/2/4/6/7/9
BMPR2/I/II	Bone Morphogenetic Protein Receptor Type 2/I/II
bzw.	beziehungsweise
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cm <sup>2</sup>	Quadratcentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CSE	Zigarettenrauch-Extrakt
DEPC-Wasser	Diethyldicarbonat-Wasser
DKK1/2	Dickkopf 1/2
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure

### III Abkürzungsverzeichnis

---

DNase	Desoxyribonukleasen
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DPBS	Dulbecco`s Phosphate-Buffered Saline
ECM	Extracelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FBS	Fötales Rinderserum
FKS	Fötales Kälberserum
Foxo	Forkhead-Box-Protein
GAP-DH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
Gli2	Zinc finger protein
GS	Glycin- und Serinreste
HEPES	Hydroxyethylpiperazin-N`-2-ethansulfonsäure
l	Liter
LRP5	Low-density Lipoprotein Receptor-Related Protein 5
LVis Platte	Mikroplatte mit integriertem Küvetten-Schacht für die Messung kleinster Volumina
MEM	Minimal Essential Medium
µg	Mikrogramm
mg	Milligramm
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
µl	Mikroliter
ml	Milliliter

mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MSC	Mesenchymale Stammzelle
n	Anzahl der Versuchsreihen
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	Nanogramm
OC	Osteokalzin
OPG	Osteoprotegerin
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Pc2	Polycystein 2
pH	Pondus Hydrogenii, negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
RANK	Receptor for Activation of Nuclear Factor $\kappa$ B
RANKL	Receptor for Activation of Nuclear Factor $\kappa$ B-Ligand
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rRNA 40S/60S	ribosomale Ribonukleinsäure 40S/60S Untereinheit
rSmad	receptor-activated Smad
Runx1	Runt-related Transcription Factor 1
SCP-1 Zellen	Single-cell-derived human mesenchymal stem cell line
Sost	Sklerostin

Smad1/2/3/4/5/6/7	Kombination aus Drosophila-Protein "mothers against decapentaplegic" und dem Caenorhabditis-elegans-Protein SMA für „small body size“ 1/2/3/4/5/6/7
Smurf2	Smad ubiquitin regulatory factor 2
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
Temp.	Temperatur
TGF-beta/beta3	Transforming Growth Factor-beta/beta3
Tris	Trishydroxymethyl-aminomethan
vgl.	Vergleich
Wnt (Wg+Int1)	1982 entdeckten Roel Nusse und Harold Varmus (Amerika) das erste Gen des Wnt-Signalweges: Int1. Zur gleichen Zeit zeigte die spätere Nobelpreisträgerin Christiane Nüsslein-Volhard (Tübingen), dass die Fruchtfliege <i>Drosophila melanogaster</i> ohne das Gen <i>Wingless</i> (Wg) keine Flügel entwickelt. Wie sich herausstellte, handelt es sich bei Wg um das gleiche Gen, das Nusse bei den Mäusen entdeckt hatte. Nusse schlug daraufhin vor, die Namen Wg und Int1 zu „ <i>Wnt</i> “ zu verschmelzen.

## 1 Einleitung

### 1.1 Rauchen

#### 1.1.1 Rauchen in der Gesellschaft

Mitte des 20. Jahrhunderts stieg der Raucheranteil bei Frauen stark an, während das Rauchen bei Männern schon immer weit verbreitet war. Obwohl in der Gesellschaft oft davon gesprochen wird, dass der Eine oder Andere das Rauchen aufgehört hat, raucht heute etwa jeder vierte Erwachsene. Junge Erwachsene rauchen eher gelegentlich (Pötschke-Langer et al. 2015c). Tabelle 1 zeigt den Anteil der rauchenden Bevölkerung in den verschiedenen Altersgruppen im Jahr 2014 (statistisches Bundesamt 2014).

Alter	Männer %	Frauen %
18-19 Jahre	15,9	11,2
20-29 Jahre	38	28,8
30-39 Jahre	40,7	27,8
40-49 Jahre	36,5	28,4
50-59 Jahre	34	27,3
60-69 Jahre	22,7	16
Ab 70 Jahre	9,8	5,2

Tabelle 1: Der Anteil der Raucherinnen und Raucher in den verschiedenen Altersgruppen (statistisches Bundesamt 2014). Die Angaben werden in Prozent (%) angegeben. Im Alter zwischen 30 und 39 Jahren rauchen die meisten Männer. Frauen zwischen 20 und 59 Jahren rauchen ähnlich viel.

Das Rauchen ist die häufigste Todesursache, die vermieden werden kann (Deutsche Krebsgesellschaft 2015). Mit steigendem Sozialstatus sinkt der Raucheranteil (Pötschke-Langer et al. 2015c). 57% der Bevölkerung haben noch nie geraucht, doch auch durch das Passivrauchen werden viele unfreiwillig dem Tabakrauch ausgesetzt (Deutsche Krebsgesellschaft 2015).

### 1.1.2 Inhalts- bzw. Zusatzstoffe

Außer dem Rohtabak enthalten Zigaretten bis zu 600 Zusatzstoffe, welche über 10% des Gesamtgewichts einer Zigarette entsprechen können. Außerdem benötigt eine Zigarette einen Filter und eine Papierhülle. Die meisten Zusatzstoffe sind in der Lebensmittelindustrie genehmigt und unbedenklich. Darunter fallen eine Vielzahl von Aromen, Einzelsubstanzen und chemisch nur vage oder nicht definierte Gemische (vgl. Abbildung 1). Die am häufigsten verwendeten Zusatzstoffe sind Menthol, Kakao, Lakritze und Zucker. Obwohl die Zusatzstoffe in Lebensmitteln oft unbedenklich sind, können sie sich in Tabakprodukten in gesundheitsgefährdende Substanzen umwandeln (Pötschke-Langer et al. 2015b). Ein Grund ist, dass sie in sehr hohen Temperaturen verdampfen bzw. verbrennen (bis zu 900°C). Dadurch entsteht eine Vielzahl von kanzerogenen Produkten wie Kohlendioxid, Schwefeldioxid und Stickstoffoxide. Die Produkte und Inhaltsstoffe werden über die Lunge inhaled und so sehr schnell in den Körper aufgenommen.



Abbildung 1: Die Inhalts- und Zusatzstoffe einer Zigarette (Pötschke-Langer et al. 2015b).

### 1.1.3 Auswirkungen von Zigarettenrauch

Tabakrauch ist ein Gemisch aus über 3500 Substanzen. Dazu gehören sowohl kanzerogene als auch toxische Stoffe, die gasförmig, flüchtig oder als kleinste Partikel vorliegen können. Die verschiedenen Substanzen können miteinander in Wechselwirkungen treten und sich sogar gegenseitig verstärken. Wie bereits erläutert, werden diese Substanzen über die Lunge sehr schnell in den Körper

---

Die Wirkung von Zigarettenrauch auf die Differenzierung von SCP-1 abgeleitete Osteoblasten und die Modifikation im Wnt- und BMP- Signalweg

aufgenommen. Ein Schwellenwert, unter dem keine Gefährdung für die Gesundheit anzunehmen ist, gibt es nicht! Abbildung 2 zeigt im Allgemeinen die Erkrankungen und Beeinträchtigungen infolge des Rauchens (Pötschke-Langer et al. 2015d).

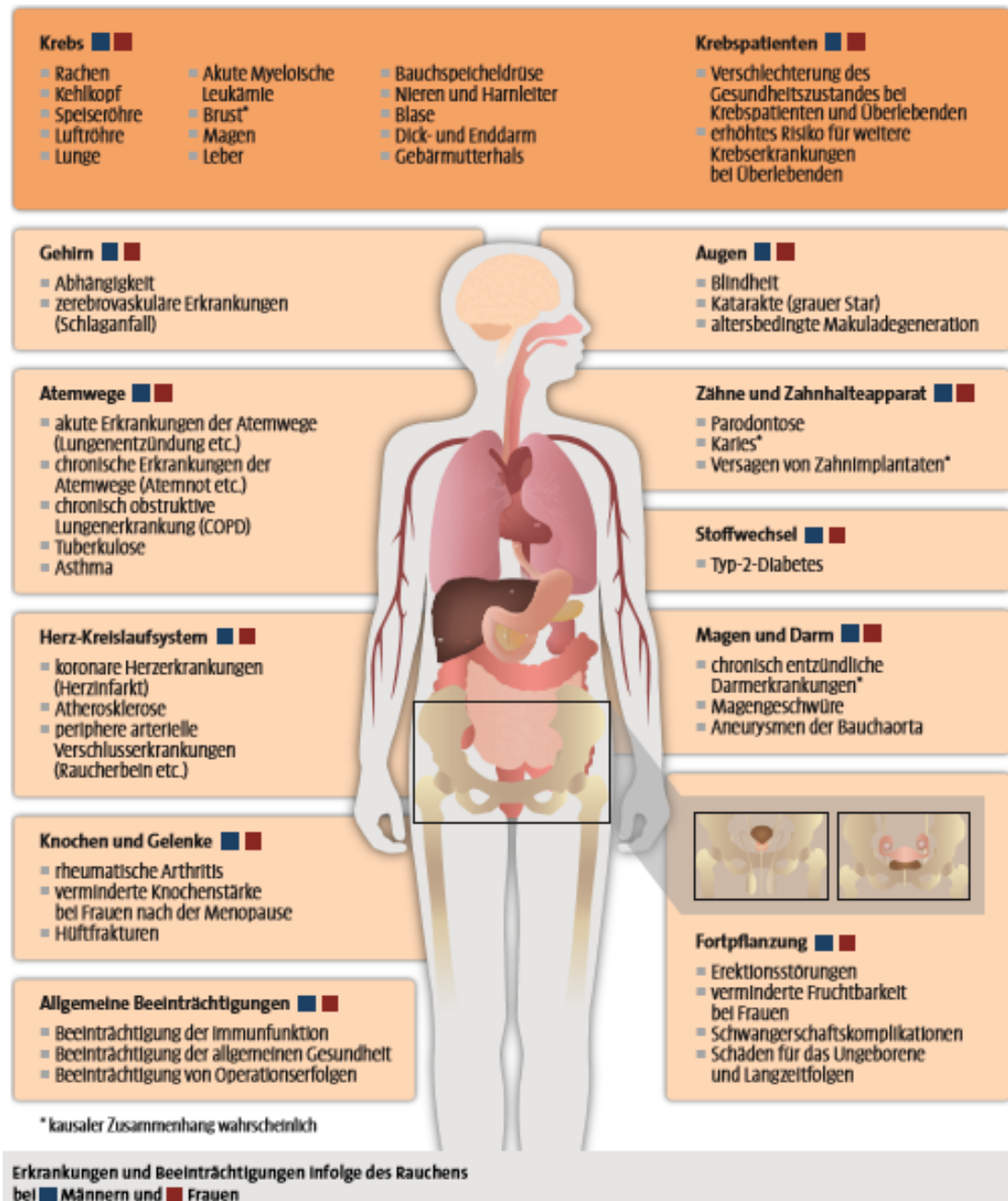


Abbildung 2: Die Erkrankungen und Beeinträchtigungen infolge des Rauchens (Pötschke-Langer et al. 2015a).

In der Vergangenheit hat beispielsweise eine Studie von Abate et al. 2013 die schädlichen Wirkungen des Zigarettenrauches auf das muskuloskelettale System bezeugt (Abate et al. 2013). Die zahlreichen Toxine und freien Radikale, die im Zigarettenrauch enthalten sind, induzieren eine Kette von Schäden im gesamten Skelettsystem, indem sie Knochenzellen zerstören, die Knochenneubildung beeinträchtigen und den Knochenverlust beschleunigen (Abate et al. 2013, Barreiro et al. 2010). Folglich können diese Faktoren die Knochenheilung nach einer Operation oder einem Trauma bei Rauchern verzögern oder hemmen, wie dies durch mehrere klinische Studien bereits nachgewiesen wurde (Patel et al. 2013, Shibli et al. 2010, Wong et al. 2007). Eine Studie aus dem Jahr 1999 von Schmitz et al. untersuchte Patienten nach einer Tibia-Fraktur. In dieser Studie wurde festgestellt, dass der Klinikaufenthalt bei Rauchern mit 269 Tagen im Vergleich zu Nichtrauchern mit 136 Tagen signifikant länger war (Schmitz et al. 1999). Abbildung 3 zeigt die Risikorate einer beliebigen bzw. einer Hüft-Fraktur zwischen Rauchern und Nichtrauchern (Vestergaard und Mosekilde 2003a). Bei Rauchern ist, wie auch aus anderen Quellen belegt, ein erhöhtes Frakturrisiko zu erkennen (Vestergaard und Mosekilde 2003a, Vestergaard und Mosekilde 2003b, Kanis et al. 2005).



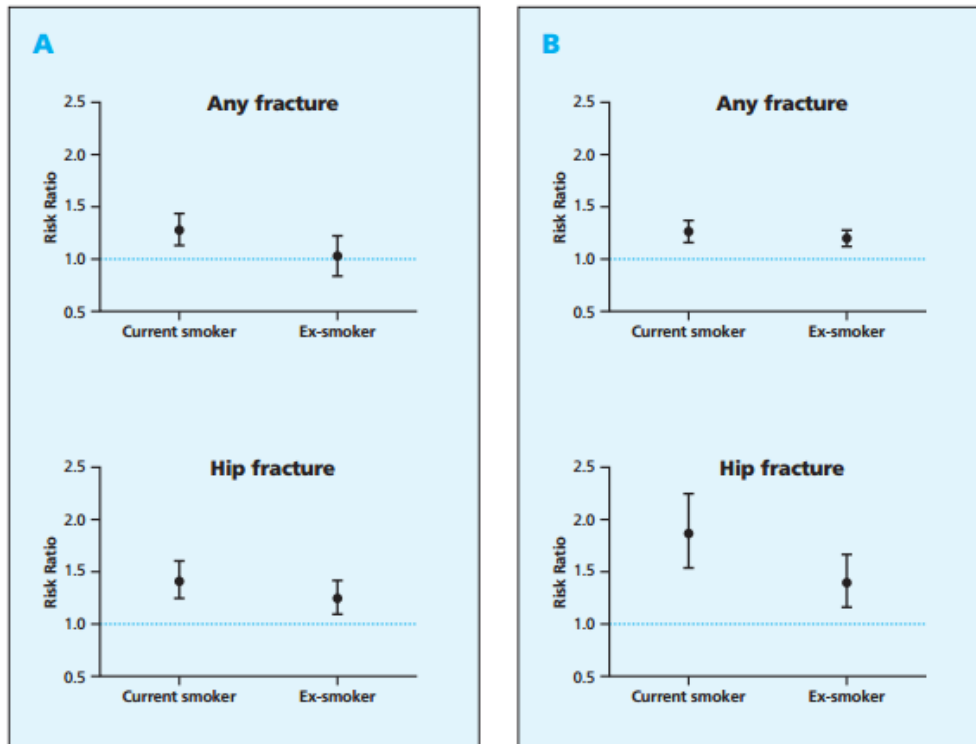


Abbildung 3: Die Risikorate bei Patienten für eine beliebige Fraktur (Any fracture), beziehungsweise einer Hüft-Fraktur (Hip fracture). Beide Abbildungen (A und B) sind zeitlich unabhängig voneinander. Unterschieden wird zwischen Rauchern (Current smoker) und Nicht-Rauchern (Ex-smoker). Bei Rauchern ist ein erhöhtes Frakturrisiko zu erkennen (Vestergaard und Mosekilde 2003a).

Als komplexer Prozess wird die Knochenheilung durch zahlreiche biologische, mechanische und systemische Faktoren beeinflusst. Darüber hinaus handelt es sich um gut organisierte Abläufe, bei denen die Infiltration und Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen (MSCs) eine entscheidende Rolle spielen (Einhorn und Gerstenfeld 2015, Marsell und Einhorn 2011, Marsh und Li 1999). Mehrere nachteilige Effekte von Zigarettenrauch wurden bereits berichtet, wie eine geringere Immunreaktivität, Zytotoxizität, eine Schädigung von zellulären Organellen wie Mitochondrien und Schädigung von Nukleinsäuren, Lipiden und Proteinen. Ihre Wirkung ist jedoch auf die zellulären Sensoren nicht umfassend untersucht worden (Sung et al. 2015, Wahl et al. 2016).

## 1.2 Der Knochen

### 1.2.1 Arten der Ossifikation (Lüllmann-Rauch 2009)

Unter Ossifikation versteht man die Bildung von Knochengewebe. Dieser physiologische Prozess braucht der menschliche Organismus für das Wachstum und die Regeneration zum Beispiel nach einer Knochenfraktur. Es wird zwischen der desmalen und chondralen Ossifikation unterschieden.

Bei der desmalen Ossifikation wird Knochen direkt aus Bindegewebe gebildet, wobei sich multipotente Mesenchymzellen zu Osteoblasten differenzieren. Die Osteoblasten bilden zunächst einen unregelmäßigen Geflechtknochen, der später zu Lamellenknochen umgebaut wird.

Bei der chondralen Ossifikation wird Knochen indirekt über hyalinen Knorpel als Zwischenstufe gebildet. Aus mesenchymalen Zellen differenzieren sich Chondroblasten, die das knorpelige Primordialskelett bilden. Der Knorpel kann dann enchondral oder perichondral verknöchern. Bei der enchondralen Ossifikation durchziehen Blutgefäße den Knorpel, Chondroblasten resorbieren den Knorpel und Osteoblasten ersetzen ihn durch Knochenmatrix. Bei der perichondralen Ossifikation wird von Osteoblasten eine Knochenspanne um den Knorpel gebildet. Die Osteoblasten differenzieren sich nach Kapillareinsprossung aus Zellen des bindegewebigen Perichondriums.

Bei pathologischer Knochenneubildung im Bindegewebe handelt es sich um heterotoper Ossifikation (Linß und Fanghänel 1998, Lüllmann-Rauch 2009, Yang 2009).

### 1.2.2 Knochenumbau und Knochenaufbau

Der Knochenumbau ist ein Prozess, der zeitlebens stattfindet und stellt die Bilanz von Knochenabbau und -anbau dar. Für den Knochenabbau sind zellulär die knochenresorbierenden Osteoklasten verantwortlich, für den Anbau die knochenbildenden Osteoblasten.

Osteoblasten bilden zunächst unverkalktes Osteoid. Durch die Expression alkalischer Phosphatase und Synthese von Kollagen Typ 1 von den Osteoblasten entsteht dann durch Apatitablagerungen reifer Knochen (Garant 2003, Sodek und McKee 2000). Osteozyten, vom Knochen eingeschlossene Osteoblasten, stehen über zytoplasmatische Fortsätze miteinander in Verbindung und spielen ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Regulation des Knochenstoffwechsels.

Die Osteoklasten haben eine hohe Mitochondriendichte und eine hohe plasmatische Konzentration an hydrolytischen Enzymen, vor allem saure Phosphatase. Sie resorbieren den mineralischen Anteil des Knochens durch Salzsäureproduktion. Der organische Anteil wird durch die Expression von Kollagenasen, Kathepsinen und Matrixmetalloproteasen resorbiert (Garant 2003, Vaananen und Laitala-Leinonen 2008).

Knochensaumzellen bedecken die Knochenoberfläche, ihre Funktion ist noch nicht ausreichend erforscht. Es ist unklar, ob sie den Knochen vor Osteoklasten schützen, sie Osteoklasten für den Knochenumbau anziehen oder sie eine ganz andere Funktion haben (Radlanski 2011, Linß und Fanghänel 1998, Garant 2003).

### **1.2.3 Osteogene Stammzellendifferenzierung**

Mesenchymale Stammzellen sind Stammzellen des Bindegewebes und haben ein hohes Proliferations- und Differenzierungspotenzial. Sie lassen sich kultivieren und sich *in vitro* in unterschiedliche Zellen, wie unter anderem in Osteoblasten ausdifferenzieren. Je nach dem Mikroenvironment differenzieren sie sich in Osteoblasten, Chondrozyten, Myozyten und Adipozyten. Durch den Einfluss von Wachstumsfaktoren kann die Entwicklung von Stammzellen induziert werden (Raisz 1999).

Bei der osteogenen Stammzellendifferenzierung können sowohl mesenchymale als auch humane embryonale Stammzellen eingesetzt werden. Bei der Differenzierung wird zwischen Proliferation, Entwicklung der extrazellulären Matrix (ECM), Reifung und Mineralisierung unterschieden. Unter Zugabe von  $\beta$ -

Glycerolphosphat, Dexamethason und Ascorbinsäure in das Zellkulturmedium wird die Knochenzellendifferenzierung induziert (Jaiswal et al. 1997). Wie Abbildung 4 zeigt, können Wachstumsfaktoren, wie das *BMP2* die Osteogenese zusätzlich beeinflussen (Govender et al. 2002, Raisz 1999, Jaiswal et al. 1997).

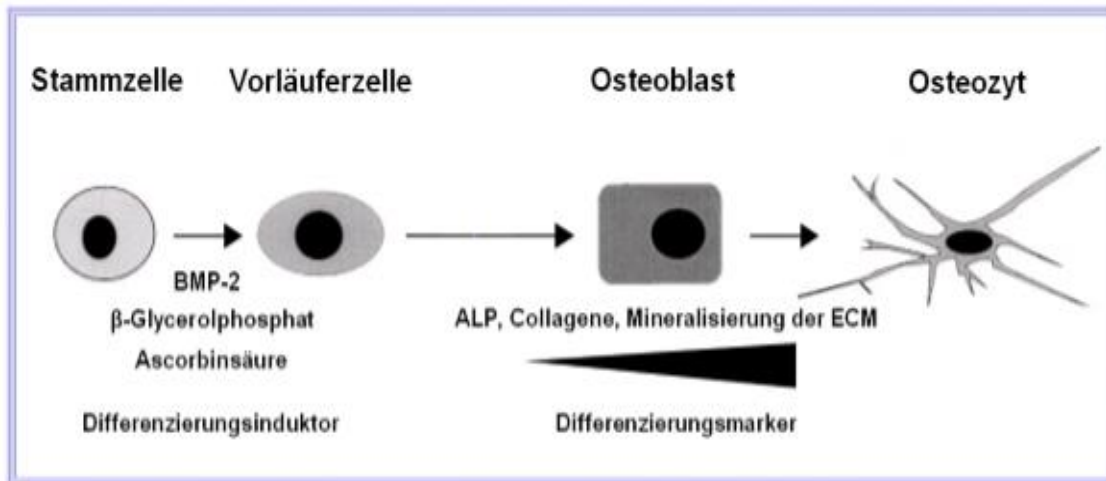


Abbildung 4: Die osteogene Zelldifferenzierung mit den Differenzierungsinduktoren  $\beta$ -Glycerolphosphat, Dexamethason und Ascorbinsäure. Mit Hilfe der alkalischen Phosphatase (*ALP*), Collagene und Mineralisierung der extrazellulären Matrix (*ECM*) kann die Differenzierung verfolgt werden (Schema modifiziert nach (Raisz 1999)).

### 1.3 Signalwege

Es gibt sehr viele wichtige Signalmoleküle im komplexen Prozess des Knochenstoffwechsels im Hinblick auf die regulatorische Funktion der Knochenzelle, wie Abbildung 5 zeigt.

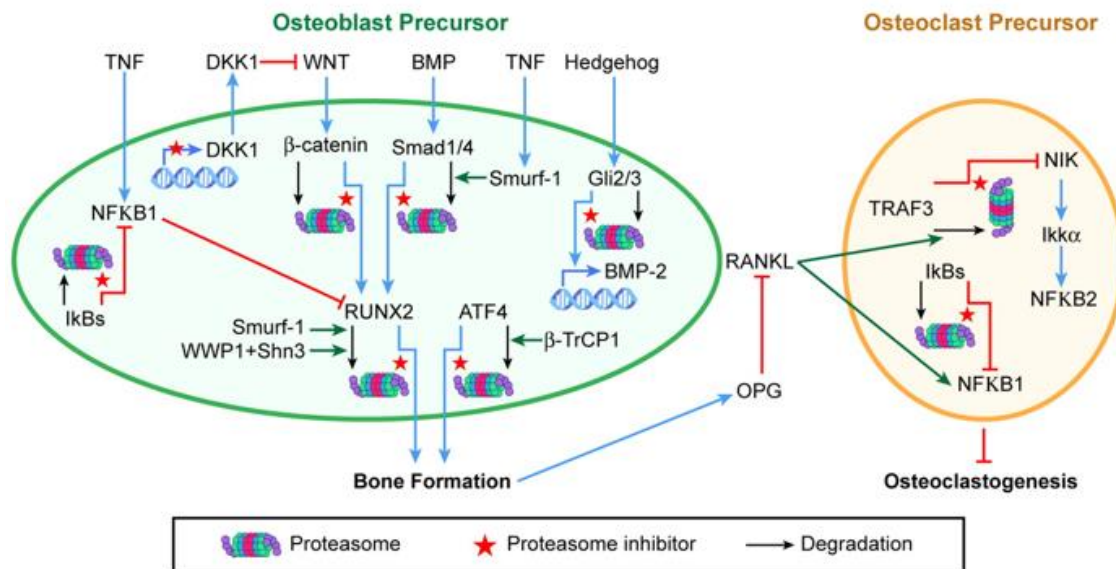


Abbildung 5: Wichtige Signalmoleküle im komplexen Prozess des Knochenstoffwechsels im Hinblick auf die regulatorische Funktion. Die Ziele in osteogenen Zellen und Osteoklastenvorläufern, die durch Proteasominhibition induziert werden. Die Osteoblastogenese wird durch mehrere Mechanismen stimuliert. Die BMP-Signalisierung wird durch die Verbesserung der Hedgehog-Signaling-induzierten *BMP-2*-Expression und durch die Verhinderung des Abbaus der relevanten Smad-Rezeptoren induziert. Die Stabilisierung des Wnt-Mediators  $\beta$ -Catenins wird unabhängig von *Wnt* und möglicherweise auch durch reduzierte Werte des Wnt-Inhibitors *DKK1* induziert. Die Osteoklastenzahlen werden auch indirekt aufgrund einer erhöhten Anzahl von reifen Osteoblasten reduziert, die ein höheres Maß an *OPG* erzeugen. Die gleichzeitige Induktion der Osteoblastogenese und die Unterdrückung der Osteoklastogenese führen zu einer erhöhten Knochenmasse (Yaccoby 2010).

### 1.3.1 Der Wnt-/ $\beta$ -Catenin-Signalweg

Das "W" stammt aus "Wg" (engl. Wingless = flügellos) dem Liganden des Signalwegs. Es handelt sich um den Wachstumsfaktor der Wnt-Familie, der als erster entdeckt wurde. Das "nt" kommt vom "Int1"-Gen. Er ist für viele Vorgänge in der Embryogenese wichtig und spielt bei der Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Zellpolarität eine wichtige Rolle. So ist der Wnt-Signalweg auch für den Knochenumbau und dessen Regulation von Bedeutung, indem er die Differenzierung von Chondrozyten und Osteoblasten reguliert. Chondrozyten und Osteoblasten haben eine gemeinsame Vorläuferzelle, die Osteochondrovorläuferzellen. Wird der Signalweg durch den Verlust von  $\beta$ -Catenin gehemmt, entstehen vermehrt Chondrozyten und die terminale Differenzierung zu den Osteoblasten ist blockiert (Day et al. 2005, Hartmann 2006).

Die Wirkung von Zigarettenrauch auf die Differenzierung von SCP-1 abgeleitete Osteoblasten und die Modifikation im Wnt- und BMP- Signalweg

Neben vielen anderen Signalwegen reguliert der Wnt-Signalweg den Knochenumbau, indem eine nicht zelleigene Regulation der Knochenresorption stattfindet. Der Signalweg steuert die *OPG*-Expression, welches ebenfalls ein Gen in der Knochenreifung ist, und Knochenresorption durch die Osteoklasten steuert (Glass et al. 2005). Durch die Bindung des *OPG* an *Rankl* auf dem Osteoblasten wird die Interaktion zwischen Rankl und seinem Liganden auf den Osteoklast-Vorläufern. Somit wird die Differenzierung zu Osteoklasten gehemmt (Keck und Pecherstorfer 2003). Ursache zahlreicher Knochenerkrankungen sind auf Veränderungen dieses  $\beta$ -Catenin-abhängigen Signalwegs zurückzuführen. Zum einen zeigt sich die Wichtigkeit des Signalwegs für den Knochen durch vererbte genetische Veränderungen. Antagonisten, wie *DKK2* und *Sost* (Sklerostin) können den Wnt-Signalweg blockieren, indem sie an den *LRP5*-Rezeptor binden (Niehrs 2006, Semenov et al. 2005). Zum anderen kann das *DKK1*-Gen, als Antagonist des Wnt-Signalwegs (Pinzone et al. 2009), wie zuvor schon erläutert, pathologische Veränderungen hervorrufen: z.B. osteolytische Tumorzellen (z.B. beim Mammakarzinom) können vermehrt *DKK1* sezernieren, was eine Verringerung der Knochendichte und Osteolysen zur Folge hat (Forget et al. 2007). *Gli2* ist ein Transkriptionsfaktor und reguliert dadurch die Transkription des *BMP2* (Zhao et al. 2006).

### 1.3.2 Der BMP-Signalweg

Wachstumsfaktoren haben Einfluss auf die Differenzierung und Aktivierung der Knochenzellen und damit auch auf die Remodellierungsvorgänge (Urist 1965). Darunter zählen zum Beispiel die BMPs (Bone morphogenetic proteins), die zur Superfamilie der TGF-beta (Transforming Growth Factors-beta) gehören. BMP's spielen eine Schlüsselrolle in der osteogenen Differenzierung (Ehnert et al. 2012). Es werden verschiedene BMPs unterschieden (Chen und Ito 2001, Hoffmann und Gross 2001). Eines der wichtigsten BMPs ist das *BMP2*, welches klinisch eingesetzt wird, in der Wachstumsfuge gebildet wird und bei der Modellierung der Knorpelstruktur und bei der Formgebung der Extremitäten beteiligt ist (Wozney 1992, Lyons et al. 1990). *BMP2* hat eine lokale osteogene

und osteoinduzierende Aktivität und induziert die osteogene und chondrogene Differenzierung von ausgewählten Stammzellen (Govender et al. 2002). Ferner werden auch *BMP4*, *BMP6*, *BMP7* und *BMP9* osteoinduktive Wirkungen berichtet (Derynck und Zhang 2003, Hahn et al. 1992). Die BMPs fördern ebenfalls über den Rank/Rankl/OPG-Signalweg auch die Osteoklastogenese und können damit knochenresorptive Prozesse einleiten (Garant 2003).

Smad-Proteine sind eine Familie, die von *TGF-beta* aktiviert werden und somit Signale der TGF-beta-Familie weiterleiten, um dann die Transkription bestimmter Gene zu aktivieren. Man unterscheidet Rezeptor-Smads (*Smad1, 2, 3, 5*) vom common-mediator *Smad4* und inhibitorische Smads (*Smad6 und 7*). Nach Aktivierung des TGF-beta-Rezeptors kann er die Rezeptor-Smads binden und phosphorylieren, welche sich danach mit dem common-mediator *Smad4* zusammenlagern. In den Zellkern eingewandert, können sie dann DNA binden und die Genexpression verstärken oder vermindern. Inhibitorische Smads können die Zusammenlagerung hemmen und damit die TGF-beta-Signalkaskade deaktivieren (Nakao et al. 1997, Takase et al. 1998, Jayaraman und Massague 2000). *Smurf2* ist eine Ubiquitin-Protein-Ligase, die Smad-Proteine mit dem Protein Ubiquitin versieht. Dadurch werden diese gehemmt, was bedeutet, dass *Smurf2* als Inhibitor des BMP-Signalwegs gesehen werden kann (David et al. 2013).

Die Wirkung der BMPs kann mit Hilfe der zwei Rezeptoren, Transmembran-Serin- und Threonin-Kinase-Rezeptoren, die als Typ I (*BMPRI*) und Typ II Rezeptoren (*BMPRII*) bekannt sind, entfaltet werden (Rosenzweig et al. 1995). Es gibt drei Typ-II-Rezeptoren, die die BMPs binden. Es gibt den BMP-Typ-II-Rezeptor (*BMPRII*), den Aktivin-A-Rezeptor Typ II (*ActR2A*) und den Aktivin-A-Rezeptor Typ IIB (*ActR2B*). Es gibt auch drei Typ-I-Rezeptoren, die bevorzugt an BMPs binden. Die Aktivin-Rezeptor-ähnliche Kinase *Alk2*, *Alk3* (*BMPRIA*) und *Alk6* (*BMPRIIB*) (Nohe et al. 2004). Bestimmte BMPs haben gezeigt, dass sie eine höhere Affinität für bestimmte Typ-I-Rezeptoren aufweisen. Beispielsweise bindet *BMP4* bevorzugt an *Alk3* und *Alk6*, während *BMP6* und *BMP7* bevorzugt an *Alk2* binden, aber auch mit *Alk3* binden können (Aoki et al. 2001). Einmal

gebunden, rekrutiert dieser Ligand/Rezeptor-Komplex den aktiven Typ-II-Rezeptor, der den Typ-I-Rezeptor auf seinem zytoplasmatischen Bereich phosphoryliert, der reich an Glycin- und Serinresten ist (GS-Domäne) (Miyazono et al. 2010). Welche Signalkaskade letztlich durch ein BMP-Molekül aktiviert wird, ist abhängig, woran es bindet. Der Smad-Signalweg wird beispielsweise durch die Bindung an den bereits vorhandenen Typ-I-II-Rezeptorkomplex aktiviert (Jayaraman und Massague 2000). *Endoglin* ist ein Hilfsrezeptor des TGF-beta-Rezeptorkomplexes und wirkt so hilfstellend auf die Bindung *BMP2*, *BMP7*, *TGF-beta1*, *TGF-beta3* und *Activin-A* (Guerrero-Esteo et al. 2002).

### 1.3.3 Andere wichtige Signalmoleküle

Über den Rank/Rankl/OPG-Signalweg wird durch die Osteoblasten die Osteoklastendifferenzierung beeinflusst. *Rankl* (Receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand) bindet an den Rezeptor *Rank* und fördert die Aktivität und Proliferation der Osteoklasten. *OPG*, Osteoprotegerin, wirkt als Antagonist von *Rankl* hemmend auf die Osteoklastendifferenzierung (Garant 2003, Vaananen und Laitala-Leinonen 2008).

*Runx2* ist als Transkriptionsfaktor an der Regulation der Differenzierung von Mesenchymzellen zu Osteoblasten beteiligt (Lian et al. 2004).

Bei der alkalischen Phosphatase, kurz *AP* bzw. *ALP*, handelt es sich um ein Enzym, das Phosphorsäuremonoester spalten kann. Es ist auf der Zelloberfläche von Osteoblasten zu finden und so ein spezifischer Marker für den Knochenaufbau. Die Osteoblastenaktivität kann damit bestimmt werden (Swaminathan 2001).

Ähnlich wie *AP* ist auch *OC* ein spezifischer Osteoblastenmarker (Schedlich et al. 1994). *OC* wird von aktiven Osteoblasten sezerniert und kann somit als Parameter für die Knochenneubildung dienen (Bharadwaj et al. 2009).



*Alpha-Tat1* reguliert die Acetylierung von Mikrotubuli und ist damit ein entscheidender Faktor für das Aussehen und die Funktion der Zilien (Berbari et al. 2013).

*Foxo* reguliert die Gentranskription von *Runx2* und beeinflusst somit die osteogene Differenzierung (Teixeira et al. 2010).

Bei der *GAP-DH* handelt es sich um das Housekeeping gene und ist somit ein guter Marker für die Stoffwechselaktivität in den Zellen. Als solchen Marker benutzten wir die *GAP-DH* in den Versuchsreihen (Horn et al. 2003).

### **1.4 Knochenerkrankungen und Veränderungen der Signalwege**

Ist das *Sost*-Gen inaktivierend mutiert, kommt es zum van Buchem-Syndrom, bei dem es zu einer Osteosklerose kommt (Balemans et al. 2001). Das *Sost*-Gen ist dabei meistens nahe dem Amino-Ende der zu kodierenden Region verändert. Gleichzeitig ist diese Mutation verantwortlich für das Krankheitsbild der Sklerosteose. Hierbei handelt es sich um eine autosomal-rezessiv vererbte Krankheit (Canalis 2010). Bei einer inaktivierenden Mutation des humanen *LRP5*-Gens kommt es zur Osteoporose (Osteoporosis Pseudoglioma Syndromes). Sie ist verbunden mit einer geringeren Knochendichte (Gong et al. 2001). Interessanterweise führt beispielsweise das Glukokortikoid Dexamethason, das entzündungshemmend wirkt, zu einer Steigerung der Gen-Expression von *DKK1*, welches wiederum als Antagonist des Wnt-Signalwegs wirkt. Dadurch kommt es zu einer Unterdrückung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs in den Osteoblasten, was zu einer Glucocorticoid-induzierten Osteoporose führt (Krishnan et al. 2006).

## 1.5 Auswirkung von Rauchen auf Osteoblasten

Zigarettenrauch wirkt sich auf die Differenzierung, die Mechanotransduktion von Osteoblasten und auf Vorgänge auf genetischer Ebene aus und kann so die Genexpression verschiedener Gene der Osteogenese verändern. Dadurch wird der Knochenumbau beeinträchtigt.

Die Arbeitsgruppe um Professor Dr. Nüssler begann vor mehr als 10 Jahren mit Untersuchungen, wie sich das Rauchen auf Osteoblasten auswirkt. Es wurde gezeigt, dass Osteoblasten, welche Zigarettenrauch ausgesetzt wurden, je nach Konzentration und Zeit vermehrt reaktive Sauerstoffspezies bilden, oder vereinfacht Sauerstoffradikale. Es wurde untersucht, ob Quercetin, welches beispielsweise in Tee vorhanden ist einen positiven Effekt auf die Bildung von Sauerstoffradikalen hat. Hier konnte gezeigt werden, dass die Bildung radikaler Sauerstoffspezies aufgrund des Antioxidants Quercetin verringert wurde (Braun et al. 2011).

Auch konnte gezeigt werden, dass durch eine Stimulierung von primären humanen Osteoblasten mit niedrigen Dosen von Grüntee-Extrakt eine verbesserte Mineralisierung stattfand. Zusätzlich führte das Grüntee-Extrakt in Kombination mit  $H_2O_2$  zu einer erhöhten Genexpression von Osteocalcin und Kollagen  $1\alpha_1$ , welche beide wichtig für die Knochenqualität sind. Die Inkubation mit hohen Grüntee-Extrakt-Dosen schützte die Zellen vor akutem oxidativem Stress (Vester et al. 2014).

Desweiteren wurden primäre Zilien von Osteoblasten untersucht. Die primären Zilien sind als Mechanosensoren vieler Zellen bekannt. Hierbei handelt es sich um Organellen, welche auf Mikrotubuli basieren. Um die Integrität und die Verteilung von Zilien der SCP-1 Zellen zu untersuchen, wurden Zellen gefärbt. Die primären Zilien wurden mit acetyliertem  $\alpha$ -Tubulin, die Nucleoli mit Hoechst 33342 und das Zytoskelett mit Phalloidin gefärbt. Hierbei wurde festgestellt, dass es bei der Verwendung von Zigarettenrauch zu einer signifikanten Reduktion der Länge der primären Zilien kommt. Die Zahl der Zellen mit Zilien nahm im Vergleich der Kontrollgruppe nicht signifikant ab (Sreekumar et al. 2017).

## 1.6 Ziel dieser Arbeit

Die vorliegende Arbeit basiert insbesondere auf Erhebungen der Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik Tübingen. Diese Studien zeigten eindeutig, dass es bei Rauchern zu einer signifikant höheren Komplikationsrate kommt, als bei Nichtrauchern und dass Raucher signifikant länger im Krankenhaus verweilen als Nichtraucher.

Da es bis jetzt noch unklar ist, wie sich das Rauchen auf verschiedene Signalkaskaden in der Osteoblastogenese auswirkt, wurde dies in dieser Arbeit anhand verschiedener Targets des BMP- und Wnt-Signalwegs analysiert. Bei diesen Signalwegen ist bekannt, dass sie in der Ossifikation eine elementare Rolle spielen. Bei Aktivierung der beiden Signalwege kommt es einerseits zur Bildung von Osteoblasten aus mesenchymalen Stammzellen, welche für die Knochenbildung verantwortlich sind. Andererseits wird am Ende der Signalkette das Gen *OPG* exprimiert, welches *Rankl* hemmen kann. *Rankl* hingegen würde die Osteoklastogenese fördern, was zum Knochenabbau führt. Die veränderte Genexpression der untersuchten Targets wurde anhand der PCR analysiert.

Diese Versuche wurden zum einen an mesenchymalen Stammzellen durchgeführt (SCP-1 Zellen), und zum anderen an menschlichen Osteoblasten. An den Stammzellen sollten die Differenzierung und die molekularen Veränderungen nach Exposition von Rauch gegenüber keinem Rauch verglichen werden. An den bereits ausdifferenzierten menschlichen Osteoblasten sollte gezeigt werden, wie sich diese Osteoblasten unter Einwirkung von Zigarettenrauch molekular verändern. Hierzu erhielten wir Proben von Patienten der Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik Tübingen von jeweils drei Rauchern und drei Nichtrauchern. Das experimentelle Setup war bei beiden Versuchsreihen dasselbe.

Die SCP-1 Zellen wurden in drei Versuchsreihen gestartet. Bei der ersten Versuchsreihe wurde eine RNA-Isolierung nach 7 Tagen durchgeführt, bei der Zweiten nach 14 Tagen und bei der Dritten nach 21 Tagen. Ziel dieser unterschiedlichen Dauer der Inkubation von Zellen mit und ohne Rauchextrakt war es zu zeigen, ob sich die Länge der Inkubation auch verstärkt auf die Zellen

auswirkt. Darüber hinaus wurden verschiedene Konzentrationen von Zigarettenrauchextrakt verwendet, um zu zeigen, ob vermehrtes Rauchen auch zu einer stärkeren Veränderung in beiden Signalwegen führt.

Da bei der Analyse des BMP-Signalweges nach 7 Tagen keine eindeutige Veränderung der Genexpression der untersuchten Gene zu sehen war, wurde die Versuchsreihe für 7 Tage gestoppt. Die Osteoblasten für die Untersuchung der Gene des Wnt-Signalweges wurden deshalb erst nach 14 Tagen Inkubationszeit untersucht.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

- 6-well-Platte, Greiner Bio-One GmbH, #657160
- Antibiotikum/Antimykotikum, PAA Laboratories GmbH, #P11-002
- $\beta$ -Glycerol-Phosphat, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, #G6376-100G
- Agarose, Carl Roth GmbH+Co. KG, #2267.1
- Borsäure, Carl Roth GmbH+Co. KG, #6943.1
- Calciumchlorid, Carl Roth GmbH+Co. KG, #CN93.1
- cDNA Synthese Kit, Fermentas GmbH, #K1621
- Chloroform, Carl Roth GmbH+Co. KG, #Y015.1
- DEPC, Carl Roth GmbH+Co. KG, #K020.3
- Dexamethason, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, #D4902-100MG
- Dimethylsulfoxid, Carl Roth GmbH+Co. KG, #4720.2
- DPBS, PAA Laboratories GmbH, #H15- 002
- Eppendorf-Röhrchen, Eppendorf AG
- Ethidiumbromidlösung, Carl Roth GmbH+Co. KG, #2218.1
- Ethanol, VWR International GmbH, #20821310
- FBS South American, PAA Laboratories GmbH, # A15- 151
- Glycerol, Carl Roth GmbH+Co. KG, #7530.1
- Ham's F12, PAA Laboratories GmbH, #E15- 016
- HEPES, Carl Roth GmbH+Co. KG, #HN78.2
- Kollagenase II, PAA Laboratories GmbH, #K21-240
- L-Ascorbinsäure-2-phosphat, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, #A8960-5G
- MEM Alpha, PAA Laboratories GmbH, #E15-832
- MEM Earle's, PAA Laboratories GmbH, #E15- 024
- Penicillin/Streptomycin, PAA Laboratories GmbH, #P11- 010
- peqGOLD Trifast, peqlab GmbH, #30-2020
- Pipettenspitzen (1  $\mu$ l, 20  $\mu$ l, 100  $\mu$ l, 1000  $\mu$ l), Greiner Bio-One GmbH
- pUC19-Marker ready-to-use DNA marker, Carl Roth GmbH+Co. KG, #X901.1

- Propan-2-ol, VWR Internation GmbH, #20842.330
- RedMastermix, Genaxxon Bio-Science GmbH, #M3029
- TRIS, Carl Roth GmbH+Co. KG, #AE15.2
- Trypanblau, Carl Roth GmbH+Co. KG, #CN76.1
- Trypsin EDTA, Sigma-Aldrich Chemie GmbH. #T3924

### 2.2 Geräte und Programme

- Elektrophorese, EV 231 P, Peqlab Biosysteme GmbH
- Elektrophorese, EV 222 P, Peqlab Biosysteme GmbH
- Eismaschine AF 80, Scotsman Ice Systems SRL
- FLUOstar Plattenleser, BMG Labtech GmbH
- Geldokumentationssystem, Intas Science Imaging Instruments GmbH
- GraphPadPrism 7, GraphPad Software Inc.
- ImageJ Software ([imagej.nih.gov](http://imagej.nih.gov), letzter Besuch 15.10.2017, Version 1.49)
- Inkubator, Heratherm OMS 60, Thermo Fisher Scientific GmbH
- LVis Platte, BMG Labtech GmbH
- Microsoft Excel 2016, Microsoft Corporation
- Mikroskop, Primo Vert 415510-1101-000, Carl Zeiss Microskopy GmbH
- Mikrowellenofen, Severin Elektrogeräte GmbH
- pH-Meter, Five Easy FE 20, Mettler-Toledo GmbH
- Schüttler, LSE Vortex Mixer, Corning Incorporated
- Thermoreaktor für PCR, Step One Plus, Applied Biosystems GmbH
- Thermoreaktor für PCR, Veriti96-WellThermalCycler, Applied Biosystems GmbH
- Waage, Labor, PCB 250-3, Kern & Sohn GmbH
- Waage, Labor, ABJ 120-4, Kern & Sohn GmbH
- Zentrifuge, Megafuge 40 R, Thermo Fisher Scientific GmbH

## 2.3 Zelllinien

### 2.3.1 Kultivierung und osteogene Differenzierung von SCP-1 Zellen (Bocker et al. 2008, Novara et al. 2010)

Menschlich immortalisierte mesenchymale Stammzellen (SCP-1 Zellen) wurden in MEM alpha medium, welchem pro 500 ml 50 ml FBS (fetal bovine serum), 5 ml Penicillin/Streptomycin hinzugefügt wurde, in einer wassergesättigten Atmosphäre mit 5% CO<sub>2</sub> bei 37°C kultiviert. Hierzu wurden 6-well-Platten verwendet und in jede Mulde der Platte 100 000 SCP-1 Zellen auf 2 ml Medium appliziert. Die Zellen wurden mit Hilfe einer Neubauer-Kammer unter einem Mikroskop ausgezählt um zu wissen, wieviel Mikroliter der Zelllösung benötigt wird, um jeweils 100 000 SCP-1 Zellen pro Platte zu erhalten. Hierzu werden zu 50 µl der Zellsuspension 50 µl Trypanblau in ein steriles Eppendorf-Cap pipettiert. Nun wird die Probe zwischen Neubauer-Kammer und dem Deckglas pipettiert. Gezählt werden alle vier Eckfelder im Uhrzeigersinn. Die Werte der vier Eckfelder werden daraufhin gemittelt. Zur Berechnung wird folgende Formel angewandt:

Zellzahl/ml=Mittelwert der Eckfelder x Verdünnungsfaktor x 10<sup>4</sup> Zellen/ml.

Die osteogene Differenzierung wurde durch ein Differenzierungsmedium induziert. Dieses bestand aus dem MEM alpha medium mit 5 ml FBS, 5 ml Penicillin/Streptomycin. Zusätzlich wurden noch 29 mg L-ascorbat-2-phosphat, 1,08 g β-Glycerol-Phosphat, 2,98 g HEPES, 83 mg CaCl<sub>2</sub> und 10 µl der Dexamethason-Lösung hinzugefügt. Diese Lösung enthielt 2 mg Dexamethason und 1 ml Dimethylsulfoxid, welche in 10 ml PBS aufgelöst wurde. Für das Experiment wurde die Differenzierungslösung mit der 100% Zigarettenrauchlösung verdünnt, um Konzentrationen von 0,1%, 0,5%, 1%, 5% und 10% Zigarettenrauch zu erhalten. Um mehr DNA zu erhalten wurden für jede Lösung immer zwei Mulden ausplantiert. Ein Mediumwechsel erfolgte alle 3 Tage während der osteogenen Differenzierung. Hierbei wurde das alte Medium mittels einer Pumpe entfernt, jede Mulde mit PBS gewaschen und im Nachhinein wieder 2 ml des Differenzierungsmediums hinzugefügt.

## 2.4 Humane Osteoblasten

### 2.4.1 Isolierung und Kultivierung von menschlichen Präosteoblasten (Ehnert et al. 2010)

Die menschlichen Präosteoblasten wurden aus Knochenproben der BG Unfallklinik Tübingen gewonnen. Hierzu wurden die Knochenfragmente mittels einer Luer-Knochenzange zerkleinert und in ein Falcon gegeben. Die Knochenfragmente wurden danach gewaschen und gereinigt, indem der Falcon mit DPBS gefüllt und vorsichtig geschüttelt wurde. Dieser Vorgang wurde so lange wiederholt, bis keine Kollagenreste bzw. keine Blutspuren mehr zu sehen waren. Nach dem Waschen des Knochens wurde nun die Kollagenase-II-Lösung zu den Fragmenten hinzugegeben. Hierzu wurde abgeschätzt, wieviel Knochenmasse im Falcon ist und dann 1:1 mit der Kollagenase-II-Lösung verdünnt, sprich 1 ml Knochenmaterial zu 1 ml Kollagenase-II-Lösung. Die Kollagenase-II-Lösung wurde eigenständig hergestellt, indem zu 10 ml PBS 1 ml DPBS und 0,7 mg Kollagenase II hinzugegeben wurde. Danach wurden die Knochenfragmente in der Kollagenase-II-Lösung für circa 1,5 h bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Nun wurde der Überstand in ein 50 ml Falcon pipettiert. Die Knochenfragmente wurden nochmals zweimal mit DPBS gewaschen und das verwendete DPBS wurde danach zum Überstand der Kollagenase-II-Lösung hinzugefügt. Der Überstand wurde dann bei 600 g für 10 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde danach entfernt und das Pellet wurde bis zur Auflösung in 25 ml Osteoblast Culture Medium resuspendiert. Das Osteoblast Culture Medium wurde ebenfalls eigenständig hergestellt, indem 500 ml einer 1:1 Mischung aus MEM Earle's und Ham's F12 Medium mit 50 ml FBS (fötales Rinderserum) gemischt wurden. Des Weiteren wurden 5 ml Penicillin/Streptomycin, 0,5 ml L-ascorbat-2-phosphat-Lösung, sowie 0,5 ml  $\beta$ -Glycerol-Phosphat-Lösung hinzugegeben. Zum Herstellen der L-ascorbat-2-phosphat-Lösung wurden 128 mg L-ascorbat-2-phosphat in 10 ml PBS gelöst. Für die Herstellung der  $\beta$ -Glycerol-Phosphat-Lösung wurden 108 mg  $\beta$ -Glycerol-Phosphat in 10 ml PBS gegeben. Diese Zelllösung wurde nun in eine 175 cm<sup>2</sup> Flasche gefüllt. Dazu wurde noch 125  $\mu$ l der antibiotischen/antimykotischen Lösung hinzugefügt. Die Zellen wurden nun in



einer wassergesättigten Atmosphäre mit 5% CO<sub>2</sub> bei 37°C kultiviert. Die menschlichen Präosteoblasten wurden im Vergleich zu den SCP-1-Zellen lediglich 14 Tage mit Zigarettenrauch inkubiert, da bei den SCP-1-Zellen nach 14 Tagen die größten Signifikanzen festzustellen waren. Unsere Experimente wurden mit menschlichen Osteoblasten in der zweiten Passage durchgeführt, da bei Osteoblasten in der ersten Passage noch Zellen, wie beispielsweise Monozyten vorhanden sind, welche in der ersten Passage entfernt werden.

### **2.4.2 Differenzierung von humanen Präosteoblasten (Ehnert et al. 2010)**

Um die menschlichen Präosteoblasten zu Osteoblasten zu differenzieren, wurde zuerst das Osteoblast Culture Medium entfernt und die Zellen mit PBS gespült. Um die Differenzierung zu menschlichen Osteoblasten zu induzieren, wurde ein Differenzierungsmedium hergestellt. Hierzu wurden 500 ml einer 1:1 Lösung aus MEM Earl's und Ham's F12 Medium hergestellt, zu welcher 5 ml FBS, 5 ml Penicillin/Streptomycin hinzugefügt wurde. Des Weiteren wurden noch 29 mg L-ascorbat-2-phosphat, 1,08 g  $\beta$ -Glycerol-Phosphat, 2,98 g HEPES, 83 mg CaCl<sub>2</sub> und 10  $\mu$ l der Dexamethason-Lösung hinzugegeben. Die Dexamethason-Lösung wurde hergestellt, indem 2 mg Dexamethason und 1 ml DMSO in 10 ml PBS gelöst wurden. Die Zellen wurden in einer 6-well-Platte gezüchtet und in jede Mulde der Platte etwa 100 000 Zellen appliziert. Die Zellen wurden danach unter einem Mikroskop ausgezählt und es wurde berechnet, wieviel Mikroliter der Zelllösung benötigt wird. Es wurden 2 ml des Differenzierungsmediums hinzugefügt. Genauso wie bei den SCP-1 Zellen, wurde das Differenzierungsmedium mit der 100% Zigarettenrauchlösung verdünnt, um Konzentrationen von 0,1%, 0,5%, 1%, 5% und 10% Zigarettenrauch zu erhalten.

## 2.5 Lösungen

### 2.5.1 Herstellen von CSE (Sreekumar et al. 2017)

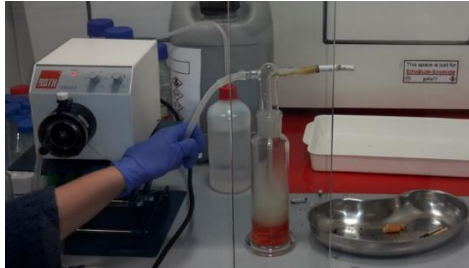


Abbildung 6: Versuchsaufbau zur Herstellung von CSE, SWI 2017.

Wie Abbildung 6 zeigt, wurden im freien Handel erhältliche Zigaretten der Marke Marlboro (Philip Morris International, New York City, USA), von welcher jede Zigarette 0,8 mg Nikotin und 10 mg Teer enthält, unter Zuhilfenahme einer Pumpe (Cyclo II, Carl Roth, Deutschland) ‚geraucht‘. Der Zigarettenrauch wurde in eine Gaswaschflasche mit 50 ml vorgewärmtem SCP-1 Differenzierungsmedium ohne FBS, unter einer Geschwindigkeit von 90 Blasen pro Minute gelöst. Die Absorption wurde standardisiert bei einer Wellenlänge von 320 nm gemessen (optische Dichte = 0,7). Die Lösung mit einer optischen Dichte von 0,7 wurde als die 100% Lösung mit Zigarettenrauch angesehen. Sie wurde durch einen Filter mit einer Porenbreite von 0,22 µm filtriert. Die 100% Lösung wurde nun mit SCP-1 Differenzierungsmedium weiter verdünnt, um physiologische Konzentrationen von 3,2 ng/ml bis zu 320 ng/ml Zigarettenrauch zu erhalten (0,1%, 1%, 5% und 10%). Um mehr DNA zu erhalten, wurden für jede Lösung immer zwei Mulden ausplantiert.

## 2.6 RNA-Isolierung (Peqlab a VWR company 2017)

Die RNA-Isolierung der verschiedenen Versuchsreihen fand nach 7 Tagen für die erste Reihe, nach 14 Tagen für die zweite Reihe und nach 21 Tagen für die dritte Reihe statt. Bei der RNA-Isolierung wurde zuerst das komplette Differenzierungsmedium. Pro Mulde in der Platte wurden nun 250 µl TriFast appliziert. Die Zellen wurden vom Boden der Platten mithilfe eines steril verpackten Schabers gelöst und die gewonnene Lösung in sterile Eppendorf-

Röhrchen pipettiert und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden zu jeweils 500 µl der Zelllösung 100 µl Chloroform hinzugegeben und diese Suspension nur vorsichtig vermischt. Danach wurde die Lösung für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und im Nachhinein bei 14.000 g für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Während dem Zentrifugieren wurden 250 µl Isopropanol pro 500 µl TriFast in ein frisches Eppendorf-Röhrchen pipettiert. Nach der Zentrifugation wurde die wässrige obere Phase in das neue, mit Isopropanol bestückte Eppendorf-Röhrchen pipettiert und vorsichtig vermischt. Diese Lösung wurde dann für 10 Minuten auf Eis inkubiert und wieder bei 14.000 g für 10 Minuten und bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde nun vorsichtig abpipettiert, um das RNA-Pellet nicht zu beschädigen. Das RNA-Pellet wurde danach mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen und wieder mit den vorherigen Einstellungen zentrifugiert. Weiterhin wurde das Ethanol entfernt und wieder frisches Ethanol zum Waschen und Zentrifugieren hinzugefügt. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt. Nach der letzten Zentrifugation wurde das Eppendorf-Röhrchen offen auf dem Eis stehen gelassen, sodass das restliche Ethanol verdampfen konnte. Nach einigen Minuten wurde 30 µl DEPC-Wasser in jedes Eppendorf-Röhrchen hinzugegeben und das RNA-Pellet vorsichtig resuspendiert. Das DEPC-Wasser war ein Wasser frei von Ribonukleasen. Um RN-ase-freies Wasser herzustellen wird 0,1%iges Diethyldicarbonat in Wasser autoklaviert. Das unverbrauchte Diethyldicarbonat hydrolysiert bei den Temperaturen des Vorgangs zu Ethanol und Kohlenstoffdioxid

## 2.7 RNA-Quantifizierung

### **(BMG LABTECH The Microplate Reader Company 2017)**

Die RNA-Quantifizierung wurde mittels eines optischen Mikroplatten-Readers der Firma BMG Labtech durchgeführt. Hierzu wurden die „LVis Platte“ verwendet. Die Einstellung am Mikroplatten-Reader wurden wie folgt vorgenommen. Es wurden die Programme „LVis Dust Check“ und „LVis DNA“ verwendet. Die Wellenlänge betrug 230 nm. Die „LVis Platte“ wurde vor der Messung von Staub entfernt. Danach wurden auf jede Messstelle 2 µl DEPC-Wasser appliziert und

die Platte in den Platten-Reader eingeführt. Nun folgte eine erste Messung mit dem Programm „LVis Dust Check“. Danach wurden das Programm „LVis DNA“ eingestellt und die Messung gestartet. Der erste Teil der Messung mit DEPC-Wasser dient dem Gerät als Leerprobe um nachher die RNA-Konzentration zu messen. Nach dem ersten Teil der Messung wurden die Messstellen vom DEPC-Wasser gereinigt und jeweils 2 µl der RNA-Lösung appliziert. Nun folgte der zweite Teil der Messung um den tatsächlichen RNA-Gehalt unserer Proben zu erhalten.

### **2.8 Überprüfung der RNA-Integrität mittels Gelelektrophorese (Sambrook und Russell 2001)**

Um die Integrität der gewonnenen RNA zu überprüfen, wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt (vgl. Abbildung 7). Die gewonnene RNA sollte frei von Salzen und Proteinen sein. Zuerst wurde ein 1,5% Agarosegel hergestellt. Das Gel wurde mit 1,5 g Agarose-Pulver, 100 ml 1xTBE und 5 µl Ethidiumbromid hergestellt. Das 1xTBE wurde aus 100 ml 10xTBE und 900 ml destilliertem Wasser hergestellt. Das 10xTBE bestand aus 540 g Tris, 275 g Borsäure und 37,3 g EDTA, welches mit 5 l mit destilliertem Wasser aufgefüllt wurde und auf einen pH-Wert von 8,3 eingestellt wurde. Nun wurden jeweils 8 µl jeder RNA-Lösung zu 2 µl PCR-Puffer pipettiert. Der PCR-Puffer wurde hergestellt, indem 25 mg Bromphenol blau zu 5 ml 10xTBE hinzugefügt wurden. Nach Aushärten des Gels wurde die Kammer mit den 10 µl RNA-Lösungen gefüllt und 3 µl eines Markers in eine Gelkammer appliziert. Die Spannung wurde auf 90 Volt eingestellt und die Gelelektrophorese für 40 Minuten gestartet. Die Fotos der fertigen Gelelektrophorese wurden unter Zuhilfenahme des Gel-Docs erstellt.

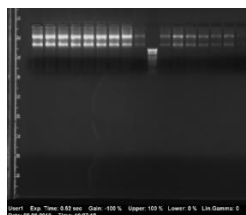


Abbildung 7: Die Gelelektrophorese zur Kontrolle der Integrität der RNA. Die obere Bande stellt die 60S Untereinheit der rRNA dar, die untere Bande die der 40S Untereinheit.

## 2.9 cDNA-Synthese

Bei cDNA handelt es sich um eine komplementäre DNA, die mithilfe des Enzyms reverse Transkriptase aus mRNA synthetisiert wird. Erster Schritt der cDNA-Synthese war es, einen gleichen RNA-Gehalt aller Proben zu erhalten. Ziel war es immer, 1000 ng cDNA zu synthetisieren. Dafür wurde ein gemeinsamer Nenner der verschiedenen RNA-Proben ermittelt. Dadurch erhielt man jeweils eine unterschiedliche Menge an RNA in Mikroliter für die cDNA-Synthese. Die cDNA-Synthese erfolgte in einem Thermocycler mit dem Programm „cDNA-Synthese“. Die cDNA-Synthese wurde mithilfe eines Kits der Firma „Thermo Fisher Scientific“ durchgeführt. Dieses Kit beinhaltet eine reverse Transkriptase, einen RiboLock RNase Inhibitor, einen Oligo und Random Primer, einen 5x reaction buffer, einen dNTP Mix, sowie nukleasefreies Wasser. Die reverse Transkriptase ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, sprich ein Enzym, welches die Umschreibung von RNA in DNA katalysiert (Temin und Mizutani 1970). Der RiboLock RNase Inhibitor inhibiert RNasen. Der Oligo Primer besteht aus circa 15 Thymidin-Nukleotiden. Diese können an das polyadenylierte 3'-Ende der mRNA binden. Der Oligo Primer dient somit als Primer für die reverse Transkriptase. Der Random Primer besteht aus sechs zufällig ausgewählten Nukleotiden. Der dNTP Mix besteht aus den vier verschiedenen Desoxyribonukleosidtriphosphate, welche die Bausteine der neu synthetisierten cDNA darstellen (Grabowski 2006). Als erstes wurden in 50 µl Eppendorf-Röhrchen jeweils 1 µl Oligo Primer, 1 µl Random Primer, sowie eine bestimmte Menge X an RNA und eine bestimmte Menge X an nukleasefreiem Wasser zugegeben. Die Menge an RNA ermittelte sich aus der Auswertung der Integrität. Anhand dieser Menge der RNA errechnete sich auch die Menge an nukleasefreiem Wasser. Insgesamt wurde für den ersten Schritt der Reaktion eine Gesamtmenge von 11 µl benötigt. Im Anschluss wurde die cDNA-Synthese im Thermocycler gestartet. Der erste Schritt des Programmes „cDNA-synthesis“ lief bei einer Temperatur von 95°C und einer Dauer von 5 Minuten ab. Dieser Schritt diente der verbesserten Anlagerung der Primer. Während des ersten Schrittes im Thermocycler wurde in separaten Eppendorf-Röhrchen eine Mischung aus 4 µl 5x reaction buffer, 1 µl RiboLock RNase, 2 µl dNTP Mix, sowie

2 µl reverse Transkriptase für jede cDNA-Synthese hergestellt. Nach dem ersten Schritt wurde der Thermocycler angehalten und die hergestellte Mischung zu jedem Eppendorf-Röhrchen im Thermocycler hinzugegeben. Nun waren in jeder Probe insgesamt 20 µl der fertigen Mischung für die cDNA-Synthese. Der Thermocycler wurde wieder geschlossen und das Programm fortgesetzt. Am Ende der cDNA-Synthese wurde ein Wert von 1000 ng/20 µl cDNA erreicht. Gewünscht war jedoch ein cDNA-Gehalt von 10 ng/µl. Die cDNA wurde mit DEPC-Wasser auf den gewünschten Wert verdünnt.

## 2.10 Primerdatenbank

Die Primer wurden mit der Software PrimerBlast generiert (NationalCenterforBiotechnologyInformation 2017). Nachstehend eine Tabelle der Primer, welche für die Versuche in dieser Arbeit verwendet wurden (vgl. Tabelle 2). Aufgelistet ist jeweils der Name des Primers, die Reihenfolge der Nukleotide für forward und reverse Primer, die Basenpaarlänge, die Annealing-Temperatur sowie die Nummer in der Gen-Datenbank des NCBI.

Name	Vorwärts Rückwärts	Länge	Temp.	Gen-Datenbank NM_
<i>BMP2</i>	CCCCCTACATGCTAGACCTGT CACTCGTTTCTGGTAGTTCTTCC	150	60°C	1200.3
<i>BMP7</i>	CTACGCCGCCTACTACTGTG GAAAGTTGGGTAGTGGCAGC	247	60°C	001719.2
<i>Alk1</i>	GCTCAGACACGACAACATCC ATTGCCGGCTCTTGAAGTCG	260	58°C	001077401.1
<i>Alk2</i>	CTTGCAATTGCTGACTTTGG CCAATTTCTCCTCAAATGG	309	60°C	001347667.1
<i>Alk6</i>	CTTTTGCGAAGTGCAGGAAAAT TGTTGACTGAGTCTTCTGGACAA	246	60°C	001256793.1
<i>Smad1</i>	CGACCAGATCAATCCAGGCT AAGTAACCCAGTCAGCACCG	209	60°C	005900.2
<i>Smad2</i>	CAATCGCCCATTCCCCTCTT AGTCTCTTCACAACCTGGCGG	213	60°C	005901.5
<i>Smad3</i>	GAGTTGAGGCGAAGTTTGGG CTGGGGATGGTGATGCACTT	330	60°C	005902.3
<i>Smad4</i>	CCATCCAGCATCCACCAAGT TGTCGATGACACTGACGCAA	796	60°C	005359.5
<i>Smad5</i>	CTGCCTCTGACTTGACCCAAT CCTGCAGGCGTCCATCTAAA	409	60°C	005903.6
<i>Smad6</i>	CCACCGGGAGGCACTTTT	502	60°C	005585.4

	CCTTCAAAGTTGTGCGGCT			
<i>Smad7</i>	GGAGGTCATGTTGCTCCTT CCGAGGAATGCCTGAGATCC	576	60°C	005904.3
<i>ActR2A</i>	ACAAGATGGCCTACCCTCCT TCAACACTGGTGCCTCGTTT	473	60°C	001278579.1
<i>ActR2B</i>	CTCCTCTGGGGATCGCTGT CTCCCAGTTGGCGTTGTAGT	84	60°C	001106.3
<i>Runx2</i>	TCCTATGACCAGTCTTACCCCT GGCTCTTCTTACTGAGAGTGGAA	190	62°C	1024630.3
<i>Sost</i>	TGAGACCAAAGACGTGTCCG CTTGAGCTCCGACTGGTTGT	331	60°C	025237.2
<i>OPG</i>	CCGGAAACAGTGAATCAACTC AGGTTAGCATGTCCAATGTG	313	60°C	002546.3
<i>OC</i>	TCCTTTGGGGTTTGGCCTAC CTTGGACACAAAGGCTGCAC	319	60°C	199173.5
<i>Foxo</i>	CAGCCGCCACATTCAACAGG GCTCTTGACCATCCACTCGT	963	61°C	002015.3
<i>TGF-beta</i>	GGGCTACCATGCCAATTCT GACACAGAGATCCGCAGTCC	384	60°C	000660.6
<i>alpha-Tat1</i>	AAGGATGCAGAGTAACCGCC TCTTGGTTGCCTGTATTGGGG	855	60°C	001031722.3
<i>Endoglin</i>	TACCACAGCCTTCATCTGCG CAGGCTGGAATTGTAGGCCA	674	60°C	001114753.2
<i>DKK1</i>	TGGAACCTCCCTGTGATTGC AATAGGCAGTGCAGCACCTT	115	60°C	012242.2
<i>DKK2</i>	GGTGGAGAGCTCACAGATCG CCCTGATGGAGCACTGGTTT	567	60°C	014421.2
<i>AP</i>	TTTATAAGGCGGCGGGGGTG AGCCAGAGATGCAATCGAC	198	61°C	000478.5
<i>Smurf2</i>	CATGTCTAACCCCGGAGGC TGCCAGATCCATCAACCAC	138	60°C	022739.3
<i>Wnt2</i>	TAACAAGGTGGGGACGTGTG TTATTGTAAGGCCGCCCCAG	429	60°C	003391.2
<i>Gli2</i>	GATTTCCCTTGCCAGTCCA TTCTTGGCAAAGGCGGGATA	328	59°C	005270.4
<i>Pc2</i>	CGCCGGGAAGAAAGGAACAT ATTGGAGCTCATCATGCCGT	821	60°C	000297.3
<i>Rankl</i>	GGAGTTGGCCGCAGACAAGA CGGATCCAGTAAGGAGGGGT	976	61°C	003701.3
<i>GAP-DH</i>	CTCTGCTCCTCCTGTTTCGAC GCGCCCAATACGACCAAATC	121	60°C	002046.5

Tabelle 2: Die in dieser Arbeit verwendeten Primer.

## 2.11 Die Polymerase-Kettenreaktion

Entwickelt wurde die Methode der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durch Kary B. Mullis im Jahr 1983 (Mullis et al. 1986), wofür er 1993 den Nobelpreis für Chemie erhielt. Ziel der PCR ist es, die Nukleotidsequenz der DNA millionenfach

zu vervielfältigen. Diese Methode macht es möglich, bereits sehr geringe Mengen an DNA nachzuweisen (Saiki et al. 1988). Es wurden zwei Oligonukleotide (Primer) eingesetzt, die zu den beiden Enden der Zielsequenz identisch waren. Die PCR lief in einem Thermocycler ab. Erster Schritt der PCR war die Denaturierung, das Trennen der doppelsträngigen DNA. Dies wurde erreicht, indem die DNA für 10 Minuten auf 95°C erhitzt wurde, was dazu führte, dass die Wasserstoffbrückenbindungen, welche die beiden DNA-Einzelstränge zusammenhalten, aufgebrochen wurden. Während der Annealingphase lagerten sich die komplementären Primer an die einzelsträngige DNA an. Je nach Primertemperatur wurde eine Temperatur zwischen 50-68°C gewählt. Während der Elongation synthetisierte die Taq-Polymerase, bei welcher es sich um ein hitzestabiles Enzym handelte, ausgehend vom 3`-Ende der Primer einen neuen DNA-Doppelstrang. Für die Elongationsphase hatte der Hersteller unseres Readymixes, die Firma Genaxxon, eine Temperatur von 72°C vorgeschrieben. Die DNA-Sequenz konnte gezielt vervielfältigt werden, indem man ein gegenläufig orientiertes Oligonukleotid-Primerpaar wählte. Die DNA konnte nun zwischen den beiden Primern vervielfältigt werden. Diese Schritte wurden nun zyklisch wiederholt – Denaturierung, Annealing und Elongation – und die Matrizen-DNA somit exponentiell vervielfältigt. In dieser Arbeit wurde für diese Phase der PCR 35 Zyklen gewählt. Die finale Extensionsphase fand bei 72°C für 10 Minuten statt.

Das verwendete PCR-Programm lautete wie folgt:

95°C für 10 Minuten

[95°C für 30 Sekunden

35 Zyklen T<sub>anneal</sub> für 30 Sekunden

72°C für 1 Minute]

72°C für 10 Minuten



## 2.12 Herstellen der PCR Ausgangsprodukte

Zu der synthetisierten cDNA mussten noch Primer, destilliertes Wasser und ein PCR-Readymix hinzugegeben werden. Hierzu wurden 6 µl der cDNA, jeweils 1 µl forward, beziehungsweise reverse Primer, 2 µl DEPC-Wasser und 10 µl des PCR-Readymixes in 0,2 ml Eppendorf-Röhrchen pipettiert. Der PCR RedMastermix der Firma Genaxxon enthielt Taq DNA Polymerase, dNTPs, MgCl<sub>2</sub>, roter Farbstoff und Reaktionspuffer. Jede PCR-Reihe hatte zusätzlich noch eine Negativ-Kontrolle ohne cDNA. Diese dient der eventuellen Anzeige von Kontaminationen der Primer, beziehungsweise des DEPC-Wassers.

## 2.13 Die Agarose-Gelelektrophorese

Ausgewertet wurden die PCR-Produkte unter Zuhilfenahme einer Agarose-Gelelektrophorese. Bei der Gelelektrophorese handelt es sich um die einfachste und effektivste Methode um DNA-Fragmente zu identifizieren und zu trennen (Aaij und Borst 1972). Hierzu wurde ein Elektrophoresepuffer, ein TBE-Puffer, bestehend aus 540 g Tris, 275 g Borsäure und 37,3 g EDTA, auf 5 l mit destilliertem Wasser aufgefüllt und auf einen pH-Wert von 8,3 eingestellt. Mit dem Elektrophoresepuffer wurde ein zweiprozentiges Agarosegel hergestellt. Die Agarose löste sich beim Erhitzen in einer Mikrowelle. Es wurden noch 7 µl Ethidiumbromid hinzugegeben, welches sich zwischen die Basenpaare der DNA lagerte. Dadurch wurde das Anregungsspektrum des Ethidiumbromids verändert und somit die Fluoreszenz bei Verwendung von ultraviolettem Licht stark erhöht. Das nun noch flüssige Gel wurde in eine Kammer, in welcher sich ein Kamm befand, gegeben. Beim Gelieren des Gels bildeten sich durch die Kammzinken Taschen, in welche im ausgelierten Zustand die DNA-Lösung pipettiert wurde. Die Gelkammer wurde vollständig mit TBE-Puffer übergossen. Im Anschluss wurde eine Spannung angelegt. Da die DNA negativ geladen war, wanderte sie im angelegten elektrischen Feld vom Minus-Pol zum Plus-Pol. Beim Wandern trennte sich die DNA der Größe nach auf, da die Moleküle von der Gelmatrix unterschiedlich gebremst wurden. Große Moleküle wurden durch das quervernetzte Agarosegel bereits sehr früh gebremst, kleine Moleküle wanderten

hingegen sehr weit durch das Gel. Dadurch bildeten sich verschiedene Banden, welche später unter UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert wurden. Mithilfe einer Pipette wurden die Taschen mit den DNA-Proben geladen. In jede Tasche wurden 10  $\mu\text{l}$  der Probe vorsichtig appliziert. Jeweils in der Mitte einer Reihe wurden 6  $\mu\text{l}$  eines DNA-Größenmarkers appliziert und mitlaufen gelassen. Zum Abschluss wurden noch Fotos mithilfe des Gel-Docs angefertigt und diese mit der Software ImageJ ausgewertet. Abbildung 8 zeigt im Folgenden eine kleine schematische Darstellung der Gelelektrophorese (Manske 2003).

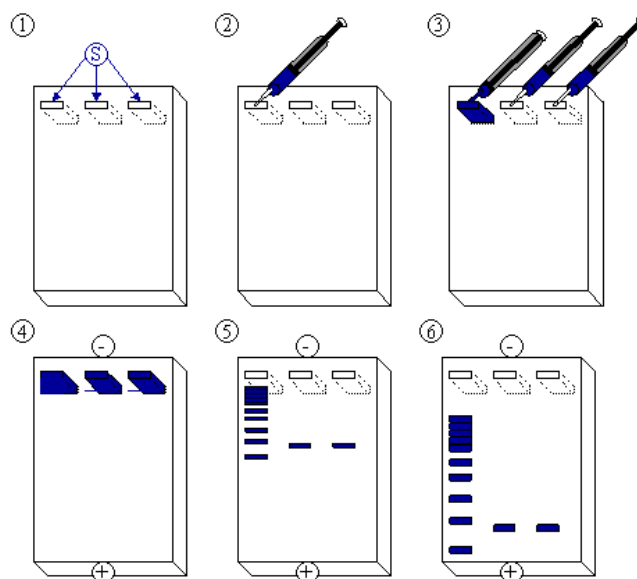


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Gelelektrophorese (Manske 2003).

### 2.14 Optische Auswertung mit ImageJ

Die Auswertung der Gelelektrophorese wurde mithilfe der Software ImageJ durchgeführt. Das auszuwertende Foto der Gelelektrophorese wurde im Programm aufgerufen. Danach wurde unter dem Punkt „Plugins“ der Punkt „macros“ geöffnet und der Button „record“ betätigt. Nun wurde die Helligkeit, im übertragenen Sinne die Genexpression, jeder einzelnen Bande eingerahmt und unter dem Punkt „Analyze->measure“ gemessen. Zum Schluss wurde eine Aufnahme des Hintergrundes der Gelelektrophorese ausgewertet. Dies diente dazu, die reine Genexpression ohne den schwarzen Hintergrund zu analysieren. Daher wurde der Hintergrund jeweils vom gemessenen Mittelwert subtrahiert.

## 2.15 Datenverarbeitung – die Genexpression der targets in Bezug zum housekeeping gene

Die komplette Auswertung beruhte auf dem Vergleich der Genexpression eines bestimmten Gens mit der Genexpression der *GAP-DH*. Die *GAP-DH* ist das Schlüsselenzym der Glycolyse und zeigt somit deutlich, wie aktiv die zu untersuchenden Zellen waren. Daher wurde zuerst die Genexpression der *GAP-DH* mit ImageJ gemessen. Im Anschluss wurde jede der folgenden Genexpressionen mit der der *GAP-DH* verglichen. Abbildung 9 zeigt ein Beispiel der Auswertung.

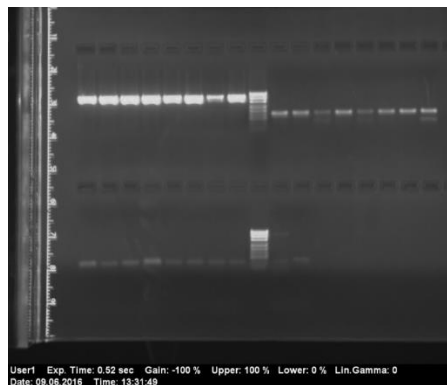


Abbildung 9: Das Bild einer Gelelektrophorese Exemplarisch für die Auswertung der Genexpression mittels der Gelelektrophorese. Im linken oberen Bild ist die Genexpression der *GAP-DH* zu sehen, im rechten oberen Rand die des *BMP2* und im linken unteren Bild die Expression des *BMP7*.

Abbildung 9 zeigt auf der linken oberen Seite des Bildes der Gelelektrophorese die Genexpression der *GAP-DH*. Von links nach rechts wurden 0%, 0,1%, 0,5%, 1%, 5%, 10%, 20% CSE und eine Positivkontrolle aufgelistet. Im oberen rechten Teil des Bildes sieht man die Genexpression des *BMP2*. Tabelle 3 zeigt die durch ImageJ ausgewerteten Werte für die Expression der *GAP-DH*.

Konzentration Zigarettenrauch	<i>GAP-DH</i>	Hintergrund	<i>GAP-DH-Hintergrund</i>
0%	37.417.721	12.040.433	25.377.288
0,1%	41.706.105	12.040.433	29.665.672
0,5%	42.252.204	12.040.433	30.211.771
1%	42.600.737	12.040.433	30.560.304
5%	40.062.130	12.040.433	28.021.697
10%	40.139.307	12.040.433	28.098.874

Tabelle 3: Die ausgewerteten Werte der Expression der *GAP-DH* mit Hilfe von ImageJ.

Des Weiteren ergaben sich für die Expression des *BMP2* folgende Ergebnisse (vgl. Tabelle 4).

Konzentration Zigarettenrauch	<i>BMP2</i>	Hintergrund	<i>BMP2-Hintergrund</i>
0%	22.675.350	12.040.433	10.634.917
0,1%	22.026.043	12.040.433	9.985.610
0,5%	19.553.282	12.040.433	7.512.849
1%	21.705.591	12.040.433	9.665.158
5%	19.734.347	12.040.433	7.693.914
10%	21.400.211	12.040.433	9.359.778

Tabelle 4: Die ausgewerteten Werte der Expression des *BMP2* mit Hilfe von ImageJ.

Die Genexpression des zu untersuchenden Genes wurde nun ins Verhältnis zur *GAP-DH* gesetzt, wie Tabelle 5 zeigt.

Konzentration Zigarettenrauch	<i>GAP-DH</i>	<i>BMP2</i>	<i>BMP2/GAP-DH</i>
0%	25.377.288	10.634.917	0,41907224
0,1%	29.665.672	9.985.610	0,33660488
0,5%	30.211.771	7.512.849	0,24867291
1%	30.560.304	9.665.158	0,31626511
5%	28.021.697	7.693.914	0,27456988
10%	28.098.874	9.359.778	0,33310153

Tabelle 5: Die Genexpression des zu untersuchenden Genes ins Verhältnis zur *GAP-DH*.

Als letzter Schritt wurde jeder Wert in Bezug zu der 0% Zigarettenrauchlösung gesetzt. Somit war der Wert für 0% Zigarettenrauch jeweils 1 und an diesem orientierten sich die restlichen Werte der verschiedenen Konzentration von Zigarettenrauch. Als Beispiel nun wieder mit den oben aufgeführten Werten (vgl. Tabelle 6).

Konzentration Zigarettenrauch	<i>BMP2/BMP2</i> control
0%	1
0,1%	0,80321445
0,5%	0,59338912
1%	0,75467922
5%	0,65518508
10%	0,79485468

Tabelle 6: Die Genexpression bei unterschiedlichen Konzentrationen von Zigarettenrauch im Verhältnis zu 0% Zigarettenrauch

Die nun erhaltenen Werte wurden mithilfe der Software GraphPadPrism 6 (El Camino Real, CA, USA) analysiert.

## 2.16 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung und grafische Darstellung der erhobenen Daten erfolgte mit dem Programm GraphPadPrism 6 (El Camino Real, CA, USA). Die Daten wurden zuerst durch einen Kruskal-Wallis H-Test analysiert und im Anschluss noch mittels eines Dunn Test, um mehrere Gruppen untereinander zu vergleichen. Signifikanzen ab  $p < 0,5$  wurden als \*, Signifikanzen ab  $p < 0,01$  wurden als \*\* und Signifikanzen ab  $p < 0,001$  wurden als \*\*\* angegeben. Unter den Abbildungen der jeweiligen Versuche wird in jedem Einzelfall gekennzeichnet, welche Parameter zur Berechnung der Signifikanzen herangezogen wurden. Dieselbe Versuchsreihe wurde jeweils mindestens zweifach durchgeführt ( $N \geq 2$ ).

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Zelllinien

##### 3.1.1 Targets des BMP Signalwegs (Tag 7, 14 und 21)

Bei der ersten Vorversuche wurde die RNA-Isolierung der SCP-1 Zellen nach 7 Tagen durchgeführt, da untersucht werden sollte, wie sich das Rauchen auf die Osteoblasten zu Beginn einer Frakturheilung auswirkt. Da bei der Genexpression keine signifikanten Veränderungen festzustellen waren, wurde diese Versuchsreihe nur zweimal N=2 durchgeführt und nicht bei allen Genen.

Die differenzierten SCP-1 Zellen durchliefen in der zweiten Versuchsreihe 14 Tage unter den unterschiedlichen Zigarettenrauchkonzentrationen. Die RNA-Isolierung erfolgte nach 14 Tagen.

Als letzte Versuchsreihe wurden die SCP-1 Zellen 21 Tage lang den verschiedenen Zigarettenrauchkonzentrationen ausgesetzt.

Die Versuchsreihe mit 14 und 21 Tagen wurde für jedes Gen  $N \geq 3$  durchgeführt.

Bei zwei der Schlüsselspieler in der osteogenen Differenzierung, *BMP2* und *BMP7*, welche die Fähigkeit besitzen Knochenwachstum zu induzieren, wurden nach 7 Tagen keine statistisch signifikanten Veränderungen in der Genexpression festgestellt. Wie Abbildung 10 zeigt, war auch keine Tendenz festzustellen, ob eine vermehrte bzw. eine verminderte Genexpression bei zunehmender Konzentration des Zigarettenrauchs vorlag.

Nach 14 und 21 Tagen wurden sowohl *BMP2*, als auch *BMP7* herunterreguliert. Jedoch wurde die Genexpression von *BMP7* nach 14 Tagen nicht signifikant verändert. Im Gegensatz dazu wurde die Genexpression des *BMP2* mit steigender Konzentration des Zigarettenrauchs im Vergleich zu 0% Zigarettenrauchkonzentration signifikant verringert (*BMP2*: 0,1%  $p < 0,001$ ; 0,5%  $p < 0,001$ ; 1%  $p < 0,001$ ; 5%  $p < 0,001$ ; 10%  $p < 0,001$ ; im Vergleich zu 0% Zigarettenrauchkonzentration). *BMP7* wurde nach 21 Tagen statistisch signifikant herunterreguliert (10%  $p < 0,5$  im Vergleich zu 0% CSE).

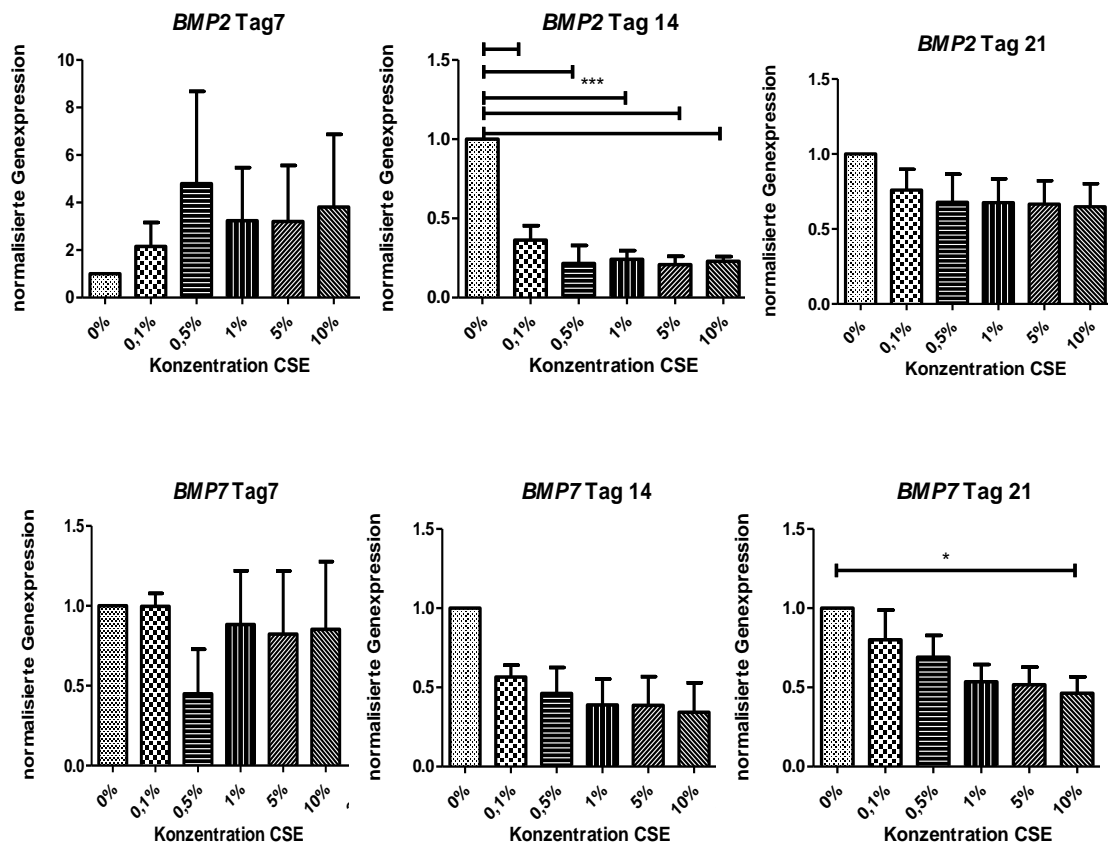


Abbildung 10: Statistische Auswertung der Genexpression von *BMP2* und *BMP7*. Auf der x-Achse wurde die Konzentration von Zigarettenrauch aufgetragen, zunächst wurde Tag 7, dann Tag 14 und schließlich Tag 21 aufgeführt. Auf der y-Achse wurde die Genexpression des zu untersuchenden Gens im Vergleich zur *GAP-DH* und zu 0% Zigarettenrauch aufgetragen. Alle Versuche (Tag 7: N=2; Tag 14 und 21: N≥3) wurden zuerst durch einen Kruskal-Wallis H-Test analysiert und im Anschluss noch mittels eines Dunn Tests ausgewertet. Die erhöhte Zigarettenrauchkonzentration wirkte sich an Tag 7 weder positiv, noch negativ auf die Genexpression aus. Es war keine statistisch signifikanten Veränderungen in der Genexpression festzustellen. Die Genexpression des *BMP2* wurde an Tag 14 mit steigender Konzentration des Zigarettenrauchs im Vergleich zu 0% Zigarettenrauchkonzentration signifikant verringert (*BMP2*: 0,1%  $p < 0,001$ ; 0,5%  $p < 0,001$ ; 1%  $p < 0,001$ ; 5%  $p < 0,001$ ; 10%  $p < 0,001$ ; im Vergleich zu 0% CSE). *BMP7* wurde an Tag 21 statistisch signifikant herunterreguliert (10%  $p < 0,5$  im Vergleich zu 0% CSE).



Als nächstes wurden die drei Typ-I-Rezeptoren der BMPs, *Alk1*, *Alk2* und *Alk6* nach CSE Inkubation analysiert (vgl. Abbildung 11). Auch hier wurde keine statistische Signifikanz an Tag 7 in der Genexpression festgestellt. Es ließ sich eine leichte Tendenz zu einer Hochregulierung des *Alk1* vermuten. Außerdem ließ sich eine Herunterregulierung des *Alk2* feststellen. Bei *Alk6* fand keine Veränderung nach CSE Inkubation statt.

Im Gegensatz zu der Auswertung nach 7 Tagen, lässt sich nach 14 Tagen eine deutliche Veränderung der Genexpressionen nach CSE inkubation feststellen. Lediglich bei *Alk1* war nichts zu erkennen. Hier war auch keine Tendenz einer Herunter- bzw. Hochregulierung zu konstatieren. Bei *Alk2* wurden in der Genexpression signifikante Veränderungen ermittelt. Die Genexpression wurde massiv herunterreguliert (*Alk2*: 10%  $p < 0,001$  im Vergleich zu 0%; 0,5%  $p < 0,01$ ; 1%  $p < 0,01$ ; 5%  $p < 0,01$ ; 10%  $p < 0,01$ ; im Vergleich zu 0,1% Zigarettenrauchkonzentration). Beim letzten Typ-I-Rezeptor, dem *Alk6*, fand eine deutliche Herunterregulierung der Genexpression statt, jedoch ohne statistische Signifikanzen.

Nach 21 Tagen wurden alle drei Rezeptoren durch CSE herunterreguliert, jedoch lediglich *Alk2* statistisch signifikant (0,1%  $p < 0,5$ ; 0,5%  $p < 0,01$ ; 1%  $p < 0,01$ ; 5%  $p < 0,01$ ; 10%  $p < 0,01$ ; im Vergleich zu 0% CSE).

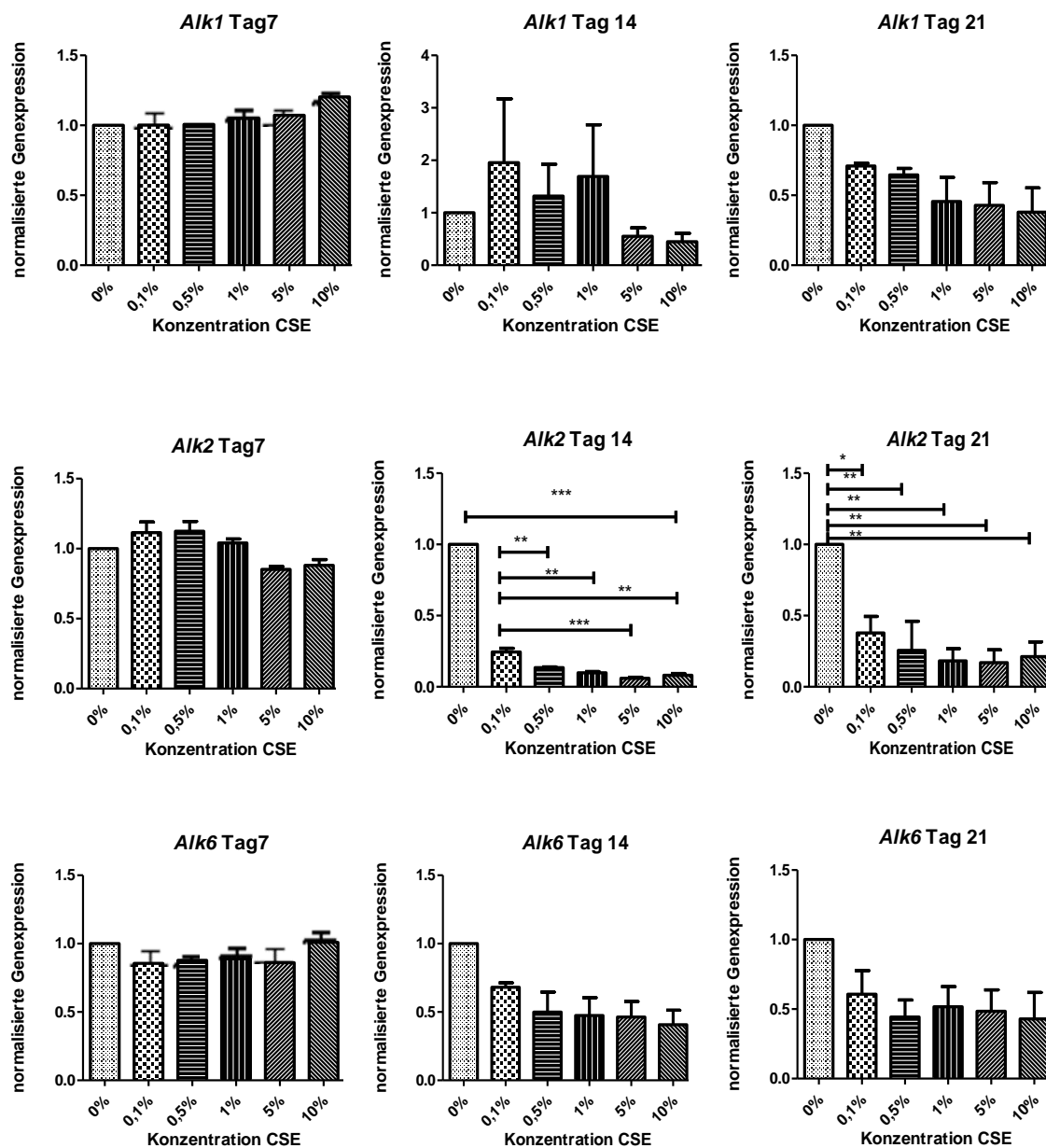


Abbildung 11: Statistische Auswertung der Genexpression der Typ-I-Rezeptoren *Alk1*, *Alk2* und *Alk6*. Auf der x-Achse wurde die Konzentration von Zigarettenrauch aufgetragen, zunächst wurde Tag 7, dann Tag 14 und schließlich Tag 21 aufgeführt. Auf der y-Achse wurde die Genexpression des zu untersuchenden Gens im Vergleich zur *GAP-DH* und zu 0% Zigarettenrauch aufgetragen. Alle Versuche (Tag 7: N=2; Tag 14 und 21: N≥3) wurden zuerst durch einen Kruskal-Wallis H-Test analysiert und im Anschluss noch mittels eines Dunn Tests ausgewertet. *Alk1* wurde nach 7 Tagen leicht hochreguliert. *Alk2* ließ sich eine Herunterregulierung vermuten. Bei *Alk6* fand keine Veränderung statt. Statistisch signifikanten Veränderungen in der Genexpression waren nicht zu sehen. Nach 14 Tagen zeigte *Alk1* weder eine Tendenz zur Herunter- bzw. Hochregulierung, noch eine statistische Signifikanz. Bei der Genexpression von *Alk2* war eine signifikante Herunterregulierung festzumachen (10% p<0,001 im Vergleich zu 0% CSE; 0,5% p<0,01; 1% p<0,01; 5% p<0,01; 10% p<0,01; im Vergleich zu 0,1% CSE). Bei *Alk6* war eine deutliche Herunterregulierung zu eruieren, jedoch ohne statistische Signifikanz. Nach 21 Tagen zeigte lediglich *Alk2* eine statistisch signifikante Herunterregulierung (0,1% p<0,5; 0,5% p<0,01; 1% p<0,01; 5% p<0,01; 10% p<0,01; im Vergleich zu 0% CSE).

Abbildung 12 bis Abbildung 15 wurden nun die Smad-Proteine untersucht. Diese Proteine leiten die Signale weiter und aktivieren im Zellkern die Transkription bestimmter Gene. Als Erstes wurden die Rezeptor-Smads, *Smad1*, 2, 3 und 5, untersucht. Nach 7 Tagen ließ sich eine leichte Tendenz zur Hochregulierung des *Smad1* vermuten. Bei *Smad2* und *Smad3* waren keine Tendenzen festzustellen. *Smad5* hatte eine klare Tendenz zur Herunterregulierung. Auch hier wurden keine statistisch signifikanten Veränderungen festgestellt.

Nach 14 Tagen wurde bei *Smad1* eine statistisch signifikante Herunterregulierung ausgemacht (0,1%  $p < 0,01$ ; 0,5%  $p < 0,01$ ; 1%  $p < 0,01$ ; 5%  $p < 0,01$ ; 10%  $p < 0,01$ ; im Vergleich zu 0% CSE). Ebenso wurden statistisch signifikante Werte für die Herunterregulierung der Genexpression für *Smad2* erhalten (0,1%  $p < 0,01$ ; 0,5%  $p < 0,001$ ; 1%  $p < 0,001$ ; 5%  $p < 0,001$ ; 10%  $p < 0,001$ ; im Vergleich zu 0% CSE; 10%  $p < 0,5$  im Vergleich zu 0,1% CSE). Bei *Smad3* wurde eine statistisch signifikante Herunterregulierung ermittelt (0,5%  $p < 0,5$ ; 1%  $p < 0,01$ ; 5%  $p < 0,5$ ; 10%  $p < 0,01$ ; im Vergleich zu 0% CSE). Bei *Smad5* wurde eine deutliche sichtbare Herunterregulierung analysiert, jedoch ohne statistisch signifikante Werte.

Nach 21 Tagen ist bei allen Smads, *Smad1*, 2, 3 und 5, eine Herunterregulierung zu erkennen. *Smad3* wird statistisch signifikant herunterreguliert (5%  $p < 0,5$ ; 10%  $p < 0,01$ ; im Vergleich zu 0% CSE).

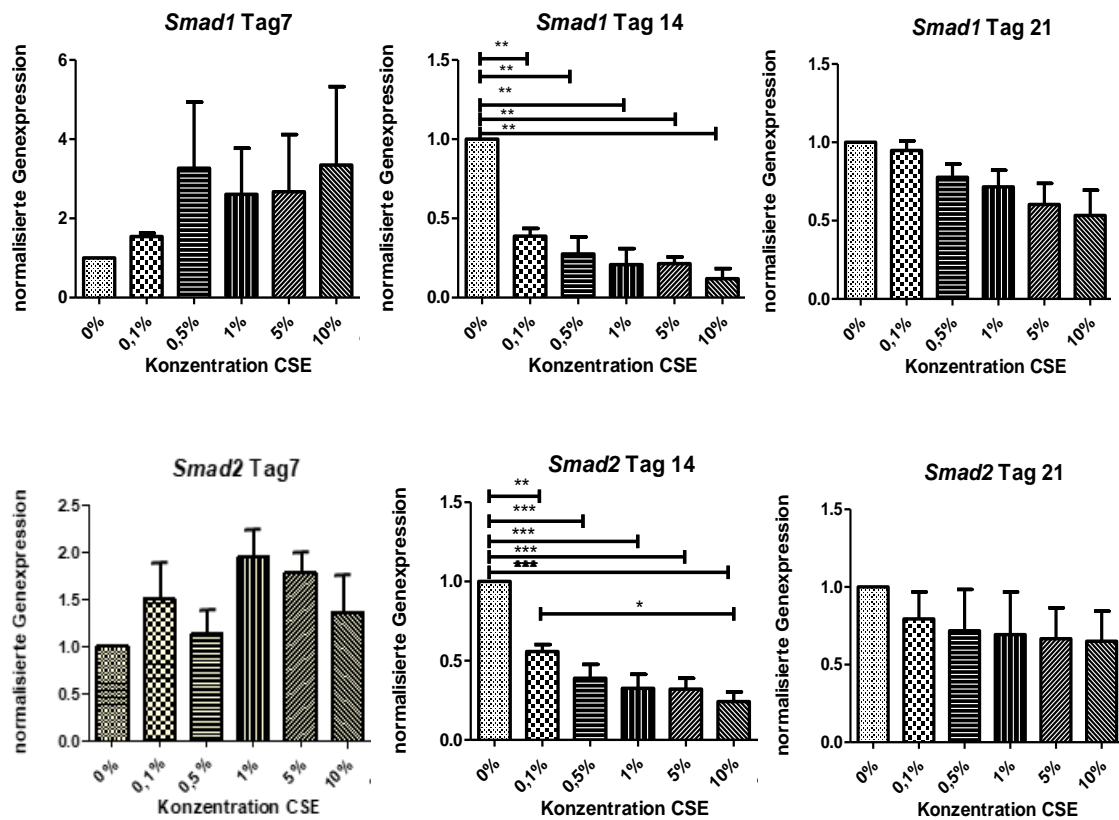


Abbildung 12: Statistische Auswertung der Genexpression der Rezeptor-Smads, *Smad1* und *Smad2*. Auf der x-Achse wurde die Konzentration von Zigarettenrauch aufgetragen, zunächst wurde Tag 7, dann Tag 14 und schließlich Tag 21 aufgeführt. Auf der y-Achse wurde die Genexpression des zu untersuchenden Gens im Vergleich zur *GAP-DH* und zu 0% Zigarettenrauch aufgetragen. Alle Versuche (Tag 7: N=2; Tag 14 und 21: N≥3) wurden zuerst durch einen Kruskal-Wallis H-Test analysiert und im Anschluss noch mittels eines Dunn Tests ausgewertet. Nach 7 Tagen wurde *Smad1* leicht hochreguliert. Es waren jedoch keine statistische Signifikanz zu sehen. *Smad2* zeigte keine Tendenz. Nach 14 Tagen wurden signifikante statistische Veränderungen der Genexpression von *Smad1* festgestellt (0,1% p<0,01; 0,5% p<0,01; 1% p<0,01; 5% p<0,01; 10% p<0,01; im Vergleich zu 0% CSE). Ebenso waren statistisch signifikante Veränderungen bei *Smad2* zu erfassen (0,1% p<0,01; 0,5% p<0,001; 1% p<0,001; 5% p<0,001; 10% p<0,001; im Vergleich zu 0% CSE; 10% p<0,5 im Vergleich zu 0,1% CSE). Nach 21 Tagen war eine leichte Herunterregulierung bei *Smad1* und *Smad2* zu erkennen.

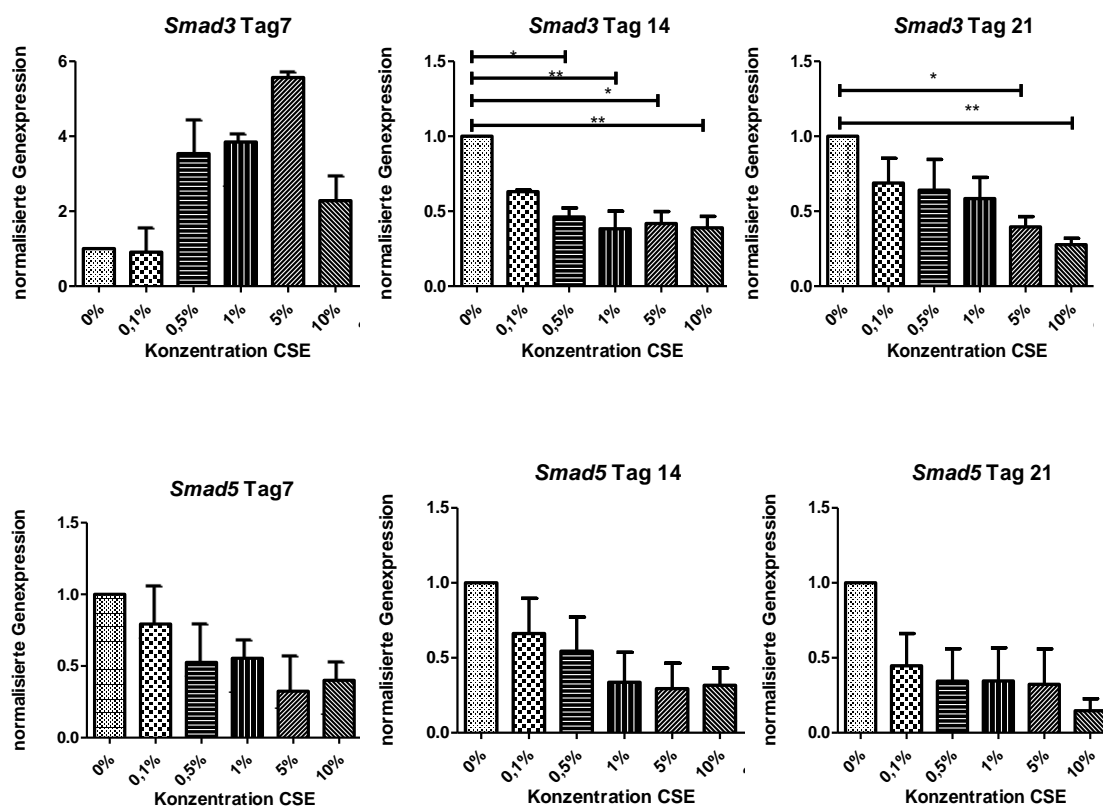


Abbildung 13: Statistische Auswertung der Genexpression der Rezeptor-Smads, *Smad3* und *Smad5*. Auf der x-Achse wurde die Konzentration von Zigarettenrauch aufgetragen, zunächst wurde Tag 7, dann Tag 14 und schließlich Tag 21 aufgeführt. Auf der y-Achse wurde die Genexpression des zu untersuchenden Gens im Vergleich zur *GAP-DH* und zu 0% Zigarettenrauch aufgetragen. Alle Versuche (Tag 7: N=2; Tag 14 und 21: N≥3) wurden zuerst durch einen Kruskal-Wallis H-Test analysiert und im Anschluss noch mittels eines Dunn Tests ausgewertet. Nach 7 Tagen zeigte *Smad3* keine Tendenz. *Smad5* hatte eine deutliche Tendenz zur Herunterregulierung. Eine statistische Signifikanz in der Veränderung der Genexpression wurde nicht festgestellt. Nach 14 Tagen waren statistisch signifikante Werte nur bei *Smad3* zu erkennen (0,5%  $p < 0,5$ ; 1%  $p < 0,01$ ; 5%  $p < 0,5$ ; 10%  $p < 0,01$ ; im Vergleich zu 0% CSE). Bei *Smad5* war lediglich eine Herunterregulierung zu sehen, jedoch ohne statistische Signifikanz. Nach 21 Tagen wurden sowohl *Smad3*, als auch *Smad5* herunterreguliert, jedoch nur *Smad3* statistisch signifikant (5%  $p < 0,5$ ; 10%  $p < 0,01$ ; im Vergleich zu 0% CSE).

Auch bei *Smad4* war nach 7 Tagen keine statistisch signifikante Veränderung nach CSE Inkubation zu sehen, wie Abbildung 14 zeigt. *Smad4* ist das co-Smad, welches mit den Rezeptor-Smads interagiert und somit die Transkription der Gene im Zellkern fördert (Nakao et al. 1997, Takase et al. 1998, Jayaraman und Massague 2000).

Nach 14 Tagen wurde eine statistisch signifikante Herunterregulierung ausgemacht (0,1%  $p < 0,001$ ; 0,5%  $p < 0,001$ ; 1%  $p < 0,001$ ; 5%  $p < 0,001$ ; 10%  $p < 0,001$ ; im Vergleich zu 0% CSE).

Auch nach 21 Tagen ist eine Herunterregulierung zu erkennen, jedoch ohne statistische Signifikanz.

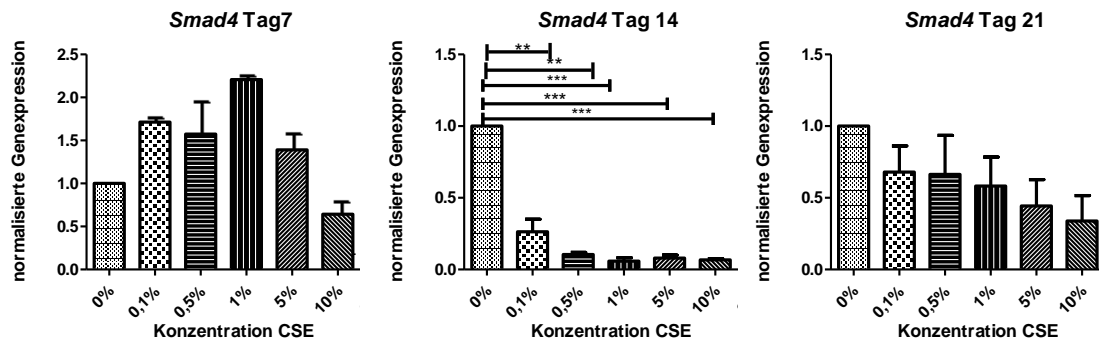


Abbildung 14: Statistische Auswertung der Genexpression des co-Smad *Smad4*. Auf der x-Achse wurde die Konzentration von Zigarettenrauch aufgetragen, zunächst wurde Tag 7, dann Tag 14 und schließlich Tag 21 aufgeführt. Auf der y-Achse wurde die Genexpression des zu untersuchenden Gens im Vergleich zur *GAP-DH* und zu 0% Zigarettenrauch aufgetragen. Alle Versuche (Tag 7: N=2; Tag 14 und 21: N≥3) wurden zuerst durch einen Kruskal-Wallis H-Test analysiert und im Anschluss noch mittels eines Dunn Tests ausgewertet. Statistische Signifikanzen wurden nach 7 Tagen bei *Smad4* nicht ermittelt. Nach 14 Tagen wurden statistische Signifikanzen bei *Smad4* für alle Zigarettenrauchkonzentrationen im Vergleich zu 0% Zigarettenrauch ausgemacht (0,1% p<0,001; 0,5% p<0,001; 1% p<0,001; 5% p<0,001; 10% p<0,001). Nach 21 Tagen wurde *Smad4* ebenfalls herunterreguliert.

Als letzte der Smad-Familie wurden die zwei Inhibitoren der Rezeptor-Smads und des co-Smads *Smad6* und *7* untersucht. Auch hier wurde nach 7 Tagen in Gegenwart von CSE weder eine statistische Signifikanz, noch eine Tendenz zur Hoch- bzw. Herunterregulierung festgestellt.

Nach 14 Tagen wurde bei *Smad6* in Gegenwart von CSE zwar eine Herunterregulierung der Genexpression festgestellt, diese hatte jedoch im Vergleich zu der Herunterregulierung von *Smad7* keine statistisch signifikanten Werte. Bei *Smad7* wurde eine statistisch signifikante Herunterregulierung ermittelt (1% p<0,01; 5% p<0,01; 10% p<0,01; im Vergleich zu 0% Zigarettenrauch).

Nach 21 Tagen wurden sowohl *Smad6* (1% p<0,5; 10% p<0,01; im Vergleich zu 0% CSE), als auch *Smad7* (1% p<0,5; 5% p<0,5; 10% p<0,5; im Vergleich zu 0% CSE) nach Inkubation mit CSE signifikant herunterreguliert.

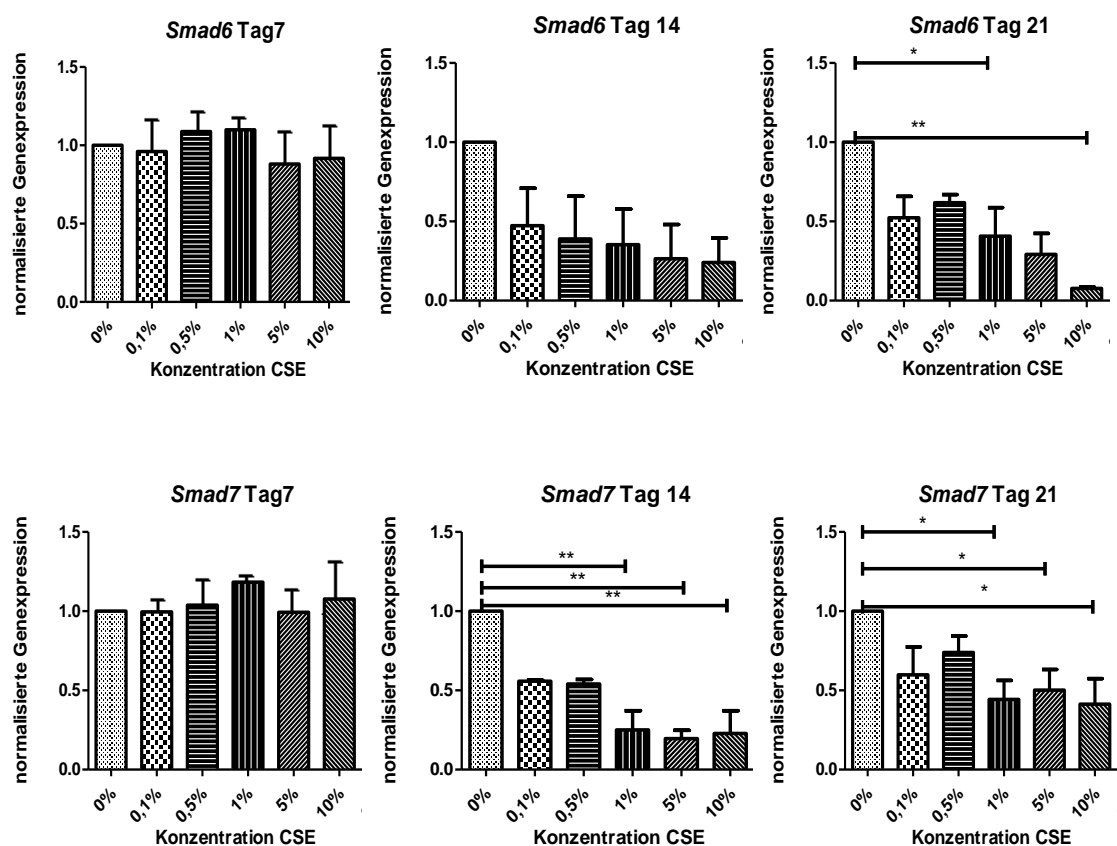


Abbildung 15: Statistische Auswertung der Genexpression der Inhibitor-Smads, *Smad6* und *Smad7*. Auf der x-Achse wurde die Konzentration von Zigarettenrauch aufgetragen, zunächst wurde Tag 7, dann Tag 14 und schließlich Tag 21 aufgeführt. Auf der y-Achse wurde die Genexpression des zu untersuchenden Gens im Vergleich zur *GAP-DH* und zu 0% Zigarettenrauch aufgetragen. Alle Versuche (Tag 7: N=2; Tag 14 und 21: N≥3) wurden zuerst durch einen Kruskal-Wallis H-Test analysiert und im Anschluss noch mittels eines Dunn Tests ausgewertet. Signifikanzen wurden bei *Smad6* und 7 nach 7 Tagen nicht gesehen. Nach 14 Tagen wurde bei *Smad6* eine deutliche Herunterregulierung ausgemacht, jedoch ohne statistische Signifikanzen. Dahingegen wurde die Genexpression des *Smad7* statistisch signifikant herunterreguliert (1%  $p < 0,01$ ; 5%  $p < 0,01$ ; 10%  $p < 0,01$  im Vergleich zu 0% CSE). *Smad6* wird nach 21 Tagen statistisch signifikant herunterreguliert (1%  $p < 0,5$ ; 10%  $p < 0,01$ ; im Vergleich zu 0% CSE), genauso wie *Smad7* (1%  $p < 0,5$ ; 5%  $p < 0,5$ ; 10%  $p < 0,5$ ; im Vergleich zu 0% CSE).

Als nächstes wurde die Genexpression von *OPG* und *Rankl* untersucht, um zu sehen, wie sich das Zigarettenrauchen indirekt über *OPG* und *Rankl* auf die Osteoklastendifferenzierung auswirkt. Wie Abbildung 16 zeigt, war auch hier nach 7 Tagen keine statistisch signifikante Veränderung mit CSE zu sehen. Bei *Rankl* ließ sich eine leichte Herunterregulierung nach CSE Inkubation erkennen. Bei *OPG* hingegen waren kaum Veränderungen in der Genexpression nach CSE Zugabe zu erkennen.

Nach 14 Tagen und nach 21 Tagen wurden beide Gene nach CSE Zugabe herunterreguliert, jedoch lediglich *OPG* nach 21 Tagen war statistisch signifikant (0,1%  $p < 0,01$ ; 0,5%  $p < 0,01$ ; 1%  $p < 0,01$ ; 5%  $p < 0,001$ ; 10%  $p < 0,001$ ; im Vergleich zu 0% CSE).

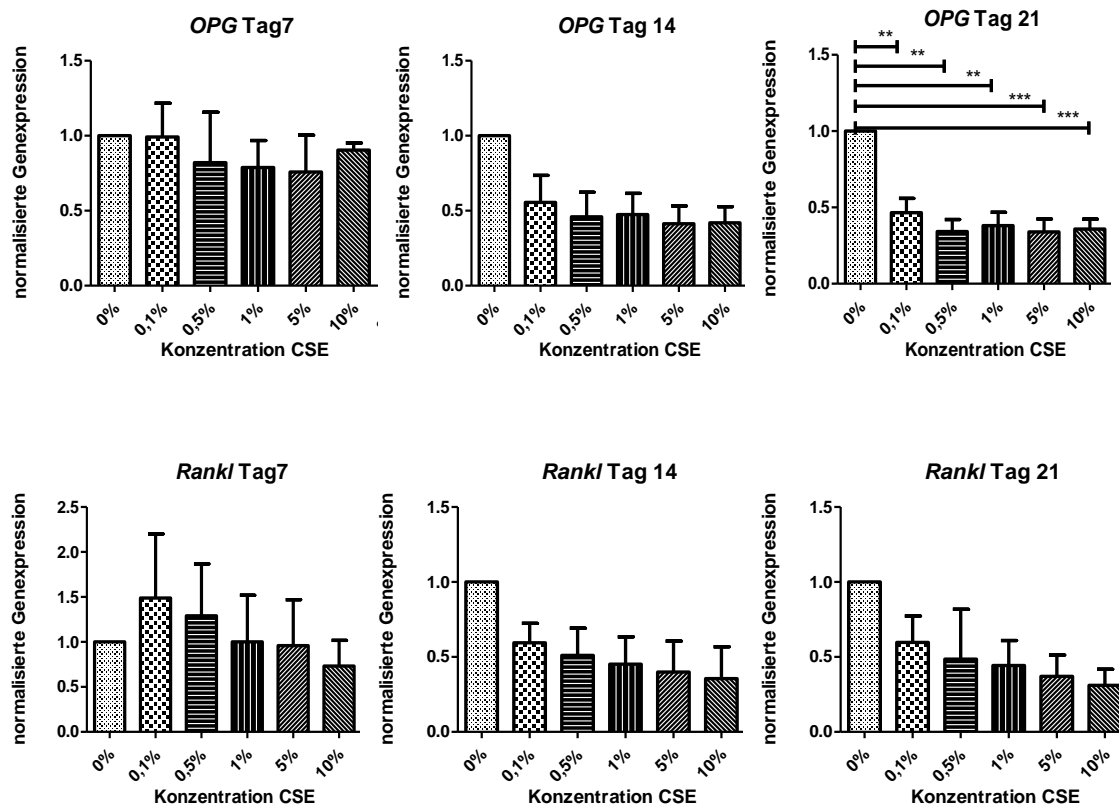


Abbildung 16: Statistische Auswertung der Genexpression von *OPG* und *Rankl* Auf der x-Achse wurde die Konzentration von Zigarettenrauch aufgetragen, zunächst wurde Tag 7, dann Tag 14 und schließlich Tag 21 aufgeführt. Auf der y-Achse wurde die Genexpression des zu untersuchenden Gens im Vergleich zur *GAP-DH* und zu 0% Zigarettenrauch aufgetragen. Alle Versuche (Tag 7: N=2; Tag 14 und 21: N≥3) wurden zuerst durch einen Kruskal-Wallis H-Test analysiert und im Anschluss noch mittels eines Dunn Tests ausgewertet. Bei *Rankl* war nach 7 Tagen eine Herunterregulierung zu erkennen, jedoch eine statistisch signifikante Veränderung war weder bei *OPG* noch bei *Rankl* zu sehen. Nach 14 und 21 Tagen zeigten beide Gene eine Herunterregulierung, jedoch nur *OPG* nach 21 Tagen mit statistischen Signifikanzen (0,1%  $p < 0,01$ ; 0,5%  $p < 0,01$ ; 1%  $p < 0,01$ ; 5%  $p < 0,001$ ; 10%  $p < 0,001$ ; im Vergleich zu 0% CSE).

Als letztes wurde die Genexpression von *Runx2* untersucht. *Runx2* ist einer der Schlüssel-Transkriptionsfaktoren in der Osteoblastendifferenzierung (Lian et al. 2004). Hier war nach 7 Tagen eine klare Hochregulierung zu erkennen, jedoch wieder ohne statistische Signifikanz, wie Abbildung 17 deutlich macht.



Nach 14 Tagen zeigte dieses Gen eine statistisch signifikante Herunterregulierung (0,1%  $p < 0,01$ ; 10%  $p < 0,001$ ; im Vergleich zur 0% CSE; 0,5%  $p < 0,5$ ; 1%  $p < 0,01$ ; 5%  $p < 0,001$ ; 10%  $p < 0,01$ ; im Vergleich zur 0,1% CSE).

Auch nach 21 Tagen zeigte sich eine deutliche Herunterregulierung, jedoch ohne statistische Signifikanz.

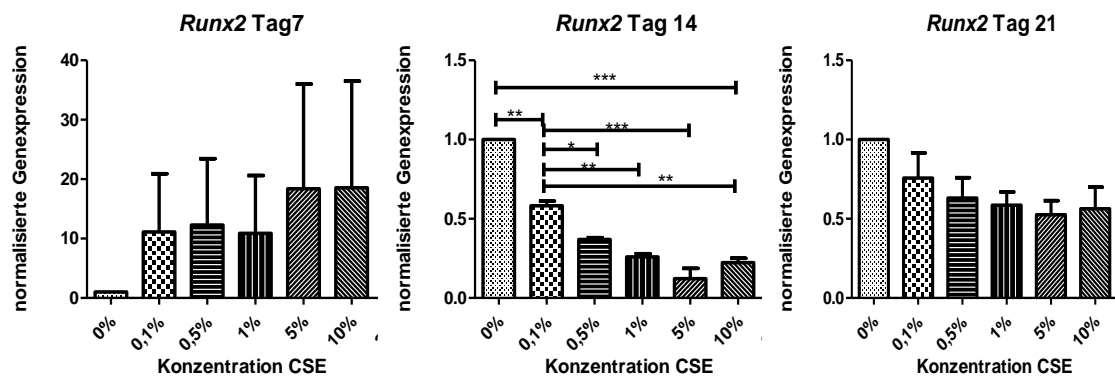


Abbildung 17: Statistische Auswertung der Genexpression des Schlüssel-Transkriptionsfaktors *Runx2*. Auf der x-Achse wurde die Konzentration von Zigarettenrauch aufgetragen, zunächst wurde Tag 7, dann Tag 14 und schließlich Tag 21 aufgeführt. Auf der y-Achse wurde die Genexpression des zu untersuchenden Gens im Vergleich zur *GAP-DH* und zu 0% Zigarettenrauch aufgetragen. Alle Versuche (Tag 7: N=2; Tag 14 und 21: N≥3) wurden zuerst durch einen Kruskal-Wallis H-Test analysiert und im Anschluss noch mittels eines Dunn Tests ausgewertet. Nach 7 Tagen war eine deutliche Hochregulierung zu erkennen, jedoch auch bei dieser statistischen Auswertung von *Runx2* wieder ohne Signifikanz. Nach 14 Tagen zeigte *Runx2* eine statistisch signifikante Herunterregulierung der Genexpression (0,1%  $p < 0,01$ ; 10%  $p < 0,001$ ; im Vergleich zur 0% CSE; 0,5%  $p < 0,5$ ; 1%  $p < 0,01$ ; 5%  $p < 0,001$ ; 10%  $p < 0,01$ ; im Vergleich zur 0,1% CSE). Nach 21 Tagen zeigte *Runx2* eine deutliche Herunterregulierung, jedoch ohne statistische Signifikanz.

Da nach 7 Tagen keine statistisch signifikanten Veränderungen der Genexpression einiger targets des BMP-Signalwegs nach CSE Inkubation festzustellen war, wurde die Versuchsreihe gestoppt und sich im Weiteren auf die Veränderungen nach 14 und 21 Tagen konzentriert. Die Versuchsreihe mit 14 und 21 Tagen wurde für jedes Gen  $N \geq 3$  durchgeführt.

Nun wurde *TGF-beta* analysiert. Das *TGF-beta* bindet an Serin- /Threonin-Rezeptorkinasen, welche daraufhin die R-Smads phosphorylieren (Rosenzweig et al. 1995). Hierbei ergab sich nach 14 Tagen einer CSE Inkubation eine statistisch signifikante Herunterregulierung der Genexpression, wie Abbildung 18 zeigt (0,1%  $p < 0,5$ ; 0,5%  $p < 0,5$ ; 1%  $p < 0,01$ ; 5%  $p < 0,01$ ; im Vergleich zu 0% CSE). Auch nach 21 Tagen war eine Herunterregulierung zu erkennen.

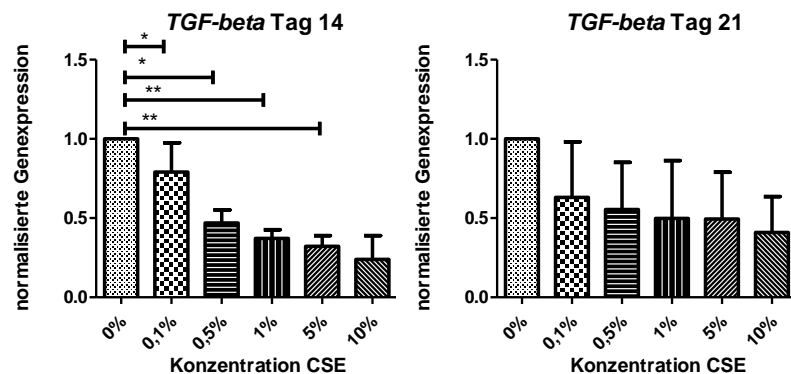


Abbildung 18: Statistische Auswertung der Genexpression des *TGF-beta*. Auf der x-Achse wurde die Konzentration von Zigarettenrauch aufgetragen, zunächst wurde Tag 14, dann Tag 21 aufgeführt. Auf der y-Achse wurde die Genexpression des zu untersuchenden Gens im Vergleich zur *GAP-DH* und zu 0% Zigarettenrauch aufgetragen. Alle Versuche ( $N \geq 3$ ) wurden zuerst durch einen Kruskal-Wallis H-Test analysiert und im Anschluss noch mittels eines Dunn Tests ausgewertet. Bei *TGF-beta* war nach 14 Tagen eine statistisch signifikante Herunterregulierung zu erkennen (0,1%  $p < 0,5$ ; 0,5%  $p < 0,5$ ; 1%  $p < 0,01$ ; 5%  $p < 0,01$ ; im Vergleich zu 0% CSE). Auch nach 21 Tagen war eine Herunterregulierung zu erkennen.

Nun wurde die Genexpression von *Endoglin*, dem Hilfsrezeptor des TGF-beta-Rezeptorkomplexes untersucht (Rodriguez-Pena et al. 2001). Wie Abbildung 19 verdeutlicht, wurde nach 14 Tagen zwar eine Tendenz zur Herunterregulierung des *Endoglin* nach CSE Zugabe festgestellt, jedoch ohne statistische Signifikanz. Nach 21 Tagen konnte dagegen eine statistisch signifikante Herunterregulierung nach CSE Inkubation festgestellt werden (0,1%  $p < 0,01$ ; 0,5%  $p < 0,01$ ; 1%  $p < 0,01$ ; 5%  $p < 0,01$ ; 10%  $p < 0,001$ ; im Vergleich zu 0% CSE).

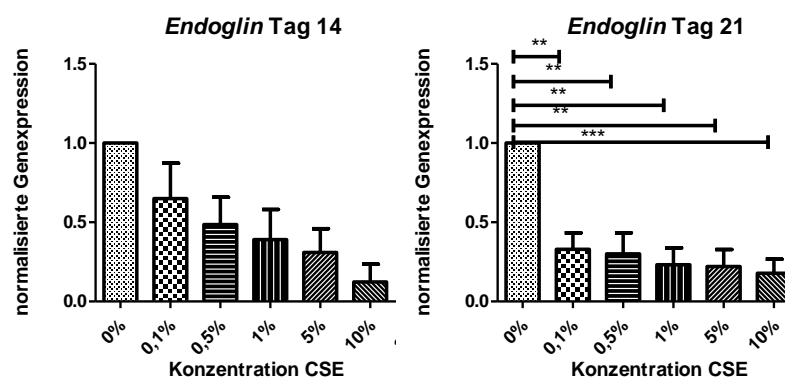


Abbildung 19: Statistische Auswertung der Genexpression des Endoglin. Auf der x-Achse wurde die Konzentration von Zigarettenrauch aufgetragen, zunächst wurde Tag 14, dann Tag 21 aufgeführt. Auf der y-Achse wurde die Genexpression des zu untersuchenden Gens im Vergleich zur GAP-DH und zu 0% Zigarettenrauch aufgetragen. Alle Versuche ( $N \geq 3$ ) wurden zuerst durch einen Kruskal-Wallis H-Test analysiert und im Anschluss noch mittels eines Dunn Tests ausgewertet. Nach 14 Tagen war eine deutliche Tendenz zur Herunterregulierung auszumachen, jedoch ohne statistische Signifikanz. Nach 21 Tagen konnte eine statistisch signifikante Herunterregulierung festgestellt werden (0,1%  $p < 0,01$ ; 0,5%  $p < 0,01$ ; 1%  $p < 0,01$ ; 5%  $p < 0,01$ ; 10%  $p < 0,001$ ; im Vergleich zu 0% CSE).

Als nächstes wurde *Smurf2* untersucht, was seinerseits die Smad-Komplexbildung zwischen Rezeptor-Smad und co-Smad behindert. *Smurf2* dient somit als Inhibitor des BMP-Signalwegs ist (David et al. 2013). Wie man in Abbildung 20 sieht, wurde der Inhibitor *Smurf2* sowohl nach 14 als auch nach 21 Tagen statistisch signifikant herunterreguliert in Gegenwart von CSE (Tag 14: 0,5%  $p < 0,5$ ; 1%  $p < 0,5$ ; 5%  $p < 0,01$ ; 10%  $p < 0,5$ ; Tag 21: 1%  $p < 0,01$ ; 5%  $p < 0,5$ ; 10%  $p < 0,01$ ; im Vergleich zur 0% Zigarettenrauchkonzentration).

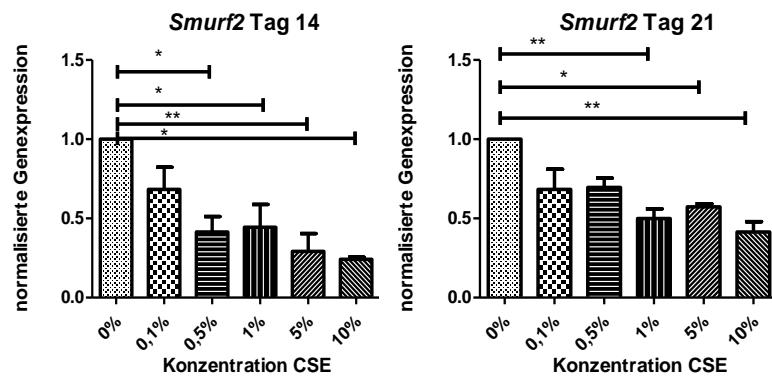


Abbildung 20: Statistische Auswertung der Genexpression des Smad-Komplex Inhibitors *Smurf2*. Auf der x-Achse wurde die Konzentration von Zigarettenrauch aufgetragen, zunächst wurde Tag 14, dann Tag 21 aufgeführt. Auf der y-Achse wurde die Genexpression des zu untersuchenden Gens im Vergleich zur *GAP-DH* und zu 0% Zigarettenrauch aufgetragen. Alle Versuche ( $N \geq 3$ ) wurden zuerst durch einen Kruskal-Wallis H-Test analysiert und im Anschluss noch mittels eines Dunn Tests ausgewertet. Sowohl nach 14 als auch nach 21 Tagen wurde *Smurf2* statistisch signifikant herunterreguliert (Tag 14: 0,5%  $p < 0,5$ ; 1%  $p < 0,5$ ; 5%  $p < 0,01$ ; 10%  $p < 0,5$ ; Tag 21: 1%  $p < 0,01$ ; 5%  $p < 0,5$ ; 10%  $p < 0,01$ ; im Vergleich zur 0% CSE).

Nach den Typ-I-Rezeptoren *Alk1*, *Alk2* und *Alk6* wurden nun die zwei Typ-II-Rezeptoren *ActR2A* und *ActR2B* analysiert. Wie Abbildung 21 zeigt, ließ sich nach 14 Tagen für die Genexpression des *ActR2A* keine Tendenz einer Herauf- bzw. Herabregulierung nach CSE Zugabe ausmachen. Bei der Genexpression des *ActR2B* wurde eine statistisch signifikante Tendenz zur Herunterregulierung mit CSE festgestellt (10%  $p < 0,5$  im Vergleich zu 0% Zigarettenrauchkonzentration). Nach 21 Tagen sind bei *ActR2A* kleine Schwankungen zu erkennen, jedoch keine Tendenz zur Herauf- bzw. Herabregulierung. *ActR2B* wird leicht nach CSE Zugabe herabreguliert.

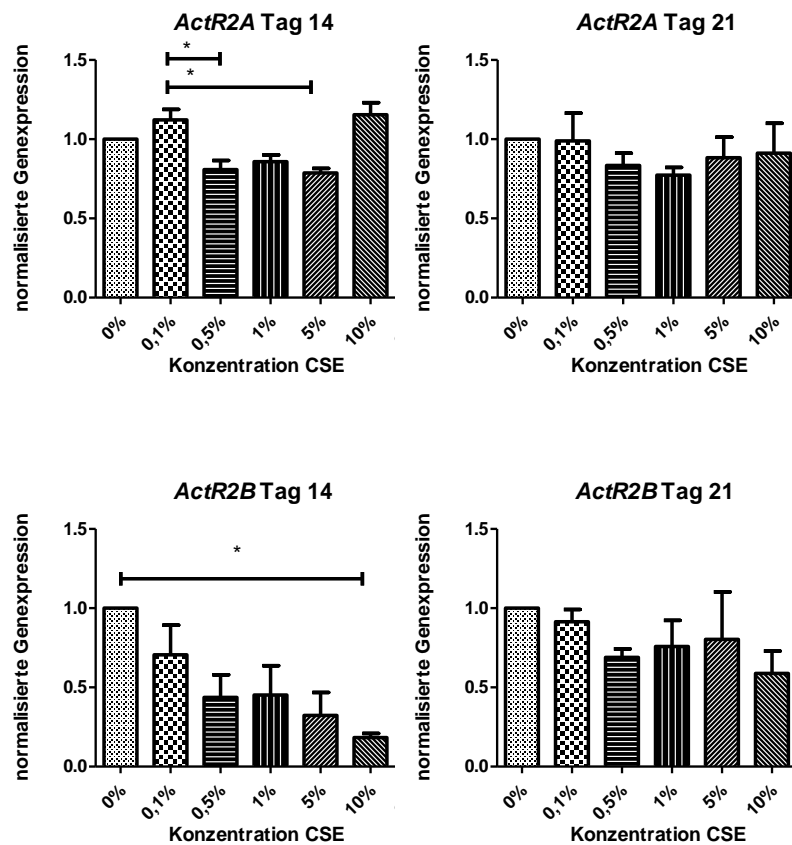


Abbildung 21: Statistische Auswertung der Genexpression der Typ-II-Rezeptoren *ActR2A* und *ActR2B*. Auf der x-Achse wurde die Konzentration von Zigarettenrauch aufgetragen, zunächst wurde Tag 14, dann Tag 21 aufgeführt. Auf der y-Achse wurde die Genexpression des zu untersuchenden Gens im Vergleich zur *GAP-DH* und zu 0% Zigarettenrauch aufgetragen. Alle Versuche ( $N \geq 3$ ) wurden zuerst durch einen Kruskal-Wallis H-Test analysiert und im Anschluss noch mittels eines Dunn Tests ausgewertet. *ActR2A* zeigte nach 14 Tagen keine sichtbare Tendenz. *ActR2B* hingegen zeigte eine Herunterregulierung mit einer statistischen Signifikanz (10%  $p < 0,5$  im Vergleich zu 0% CSE). Nach 21 Tagen waren bei *ActR2A* leichte Schwankungen zu erkennen, bei *ActR2B* eine leichte Herabregulierung.

### 3.1.2 Targets des Wnt-Signalwegs (Tag 14 und 21)

Der zweite Signalweg, welcher untersucht wurde, war der Wnt-Signalweg. Hierzu wurde zuallererst das *Wnt2*-Gen analysiert. Wie Abbildung 22 zeigt, wurde hier nach 14 Tagen jedoch keine signifikante Veränderung der Genexpression nach CSE analysiert. Es war auch hier keine Tendenz zu erkennen, ob sich die Genexpression vermehrt oder verringert hat. Auch nach 21 Tagen wurde bei *Wnt2* jedoch keine Veränderung in Gegenwart nach CSE Inkubation festgestellt. Es waren lediglich leichte Schwankungen zu erkennen.

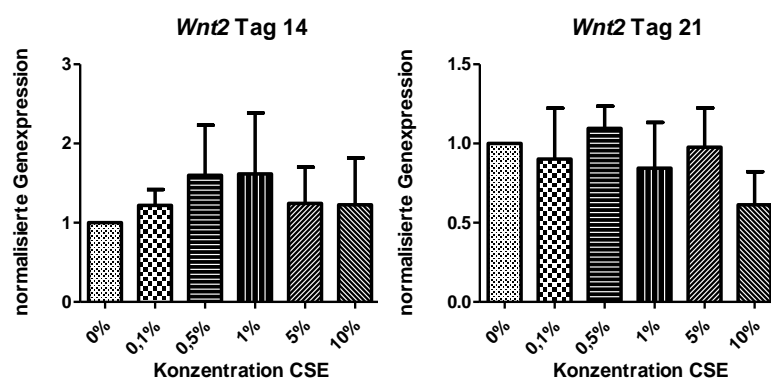


Abbildung 22: Statistische Auswertung der Genexpression des *Wnt2*. Auf der x-Achse wurde die Konzentration von Zigarettenrauch aufgetragen, zunächst wurde Tag 14, dann Tag 21 aufgeführt. Auf der y-Achse wurde die Genexpression des zu untersuchenden Gens im Vergleich zur *GAP-DH* und zu 0% Zigarettenrauch aufgetragen. Alle Versuche ( $N \geq 3$ ) wurden zuerst durch einen Kruskal-Wallis H-Test analysiert und im Anschluss noch mittels eines Dunn Tests ausgewertet. *Wnt2* zeigte nach 14 Tagen keine sichtbare Tendenz. Nach 21 Tagen waren bei *Wnt2* lediglich leichte Schwankungen zu erkennen.

Als nächstes wurden zwei der Antagonisten des Wnt-Signalwegs untersucht. Hierbei handelte es sich um *DKK1* und *DKK2*, welche beide zu der Familie der Dickkopf-Proteine gehören. Wie in Abbildung 23 zu sehen ist, wurden nach 14 Tagen beide Antagonisten signifikant herunterreguliert. *DKK1* noch sehr viel deutlicher, als *DKK2*. Bei *DKK1* konnten folgende Signifikanzen ermittelt werden, 0,1%  $p < 0,5$ ; 0,5%  $p < 0,5$ ; 1%  $p < 0,01$ ; 5%  $p < 0,01$ ; im Vergleich zu 0% Zigarettenrauchkonzentration. *DKK2* hingegen wies weniger signifikante Veränderungen nach CSE auf, lediglich bei 1%  $p < 0,5$  und bei 5%  $p < 0,5$  im Vergleich mit der Konzentration von 0% Zigarettenrauch. Nach 21 Tagen werden sie ebenfalls herabreguliert, jedoch nicht statistisch signifikant.

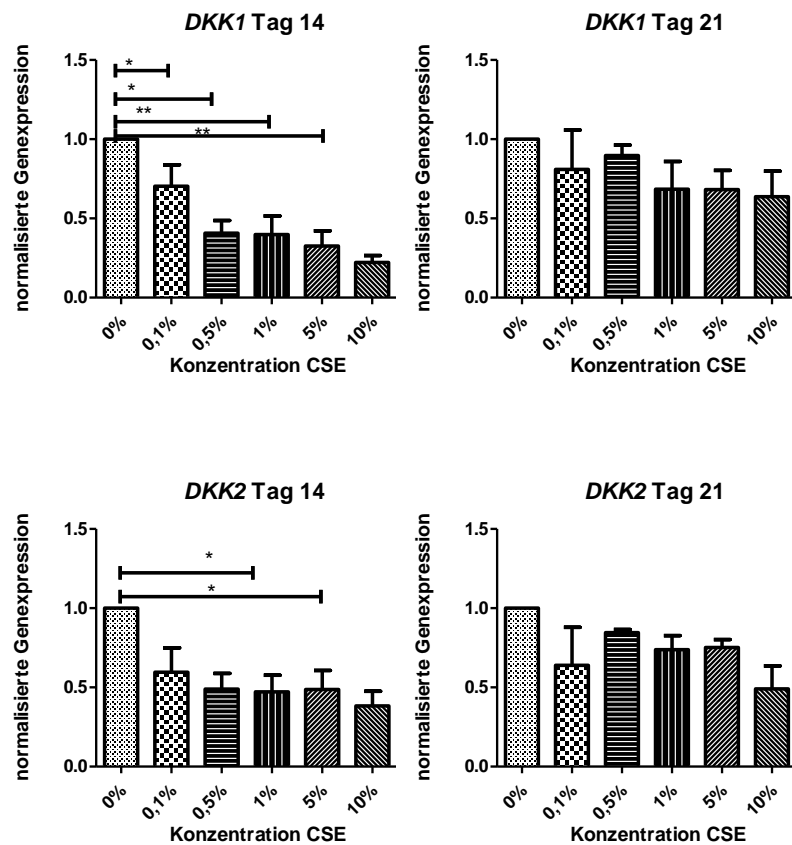


Abbildung 23: Statistische Auswertung der Genexpression der Antagonisten des Wnt-Signalwegs *DKK1* und *DKK2*. Auf der x-Achse wurde die Konzentration von Zigarettenrauch aufgetragen, zunächst wurde Tag 14, dann Tag 21 aufgeführt. Auf der y-Achse wurde die Genexpression des zu untersuchenden Gens im Vergleich zur *GAP-DH* und zu 0% Zigarettenrauch aufgetragen. Alle Versuche (N≥3) wurden zuerst durch einen Kruskal-Wallis H-Test analysiert und im Anschluss noch mittels eines Dunn Tests ausgewertet. Nach 14 Tagen zeigte *DKK1* im Gegensatz zu *DKK2* eine statistisch deutlichere Herabregulierung der Genexpression (0,1% p<0,5; 0,5% p<0,5; 1% p<0,01; 5% p<0,01; im Vergleich zu 0% CSE). *DKK2* zeigte hingegen nur bei 1% p<0,5 und 5% p<0,5 im Vergleich zu 0% CSE. Auch nach 21 Tagen wurden es leicht herabreguliert.

Als nächstes wurde ein weiterer Inhibitor des Wnt-Signalwegs untersucht. Das *Sost*, oder auch Sclerostin, bindet den *LRP5*-Rezeptor und inhibiert dadurch den Signalweg (Niehrs 2006, Semenov et al. 2005). Bei diesem Inhibitor war sowohl nach 14 als auch nach 21 Tagen eine deutliche Tendenz der Heraufregulierung nach CSE Zugabe festzustellen, wie Abbildung 24 zeigt. Jedoch wurde keine statistische Signifikanz ausgemacht.

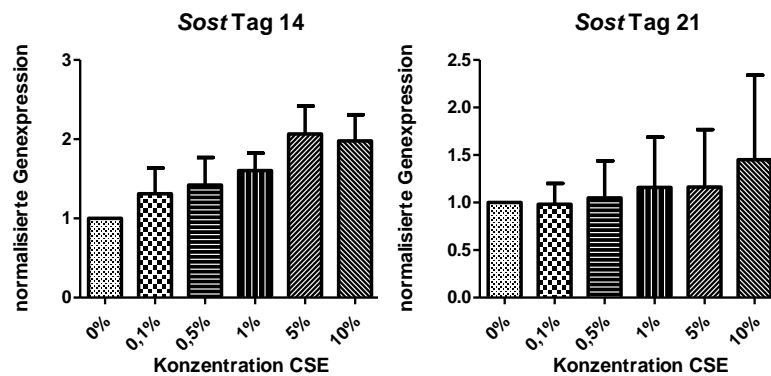


Abbildung 24: Statistische Auswertung der Genexpression des Sost. Auf der x-Achse wurde die Konzentration von Zigarettenrauch aufgetragen, zunächst wurde Tag 14, dann Tag 21 aufgeführt. Auf der y-Achse wurde die Genexpression des zu untersuchenden Genes im Vergleich zur *GAP-DH* und zu 0% Zigarettenrauch aufgetragen. Alle Versuche ( $N \geq 3$ ) wurden zuerst durch einen Kruskal-Wallis H-Test analysiert und im Anschluss noch mittels eines Dunn Tests ausgewertet. Sost zeigte sowohl nach 14 als auch nach 21 Tagen eine sichtbare Tendenz der Heraufregulierung, jedoch ohne statistisch signifikante Werte.

Nun wurde die Genexpression zweier Transkriptionsfaktoren analysiert, *Gli2* und *Foxo*. Bei beiden Genen war sowohl nach 14 als auch nach 21 Tagen eine Herunterregulierung nach CSE Inkubation zu erkennen (vgl. Abbildung 25). Nach 14 Tagen war bei *Gli2* sowohl die Herunterregulierung der Gene im Vergleich zu 0% statistisch signifikant, als auch die Herunterregulierung im Vergleich zu 0,1% Zigarettenrauch (0,1%  $p < 0,001$ ; 0,5%  $p < 0,001$ ; 1%  $p < 0,001$ ; 5%  $p < 0,001$ ; im Vergleich zu 0% CSE; 0,5%  $p < 0,5$ ; 1%  $p < 0,5$ ; 5%  $p < 0,001$ ; 10%  $p < 0,001$ ; im Vergleich zu 0,1% CSE). Auch bei *Foxo* wurden statistisch signifikante Werte im Vergleich zu 0%, bzw. 0,1% Zigarettenrauch festgestellt (10%  $p < 0,001$  im Vergleich zu 0% CSE; 0,5%  $p < 0,5$ ; 1%  $p < 0,01$ ; 5%  $p < 0,01$ ; 10%  $p < 0,01$ ; im Vergleich zu 0,1% CSE). Nach 21 Tagen wurde bei *Gli2* eine statistisch signifikante Herabregulierung ermittelt (5%  $p < 0,5$ ; 10%  $p < 0,5$ ; im Vergleich zu 0% CSE). Bei *Foxo* hingegen wurde nur eine leichte Herabregulierung festgestellt.



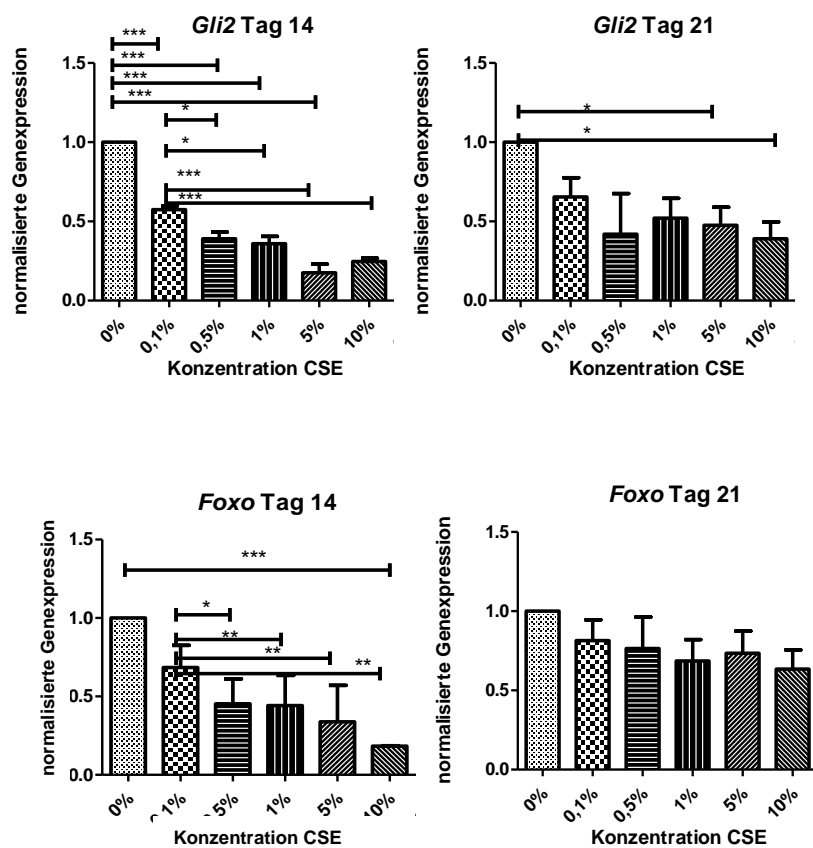


Abbildung 25: Statistische Auswertung der Genexpression der Transkriptionsfaktoren *Gli2* und *Foxo*. Auf der x-Achse wurde die Konzentration von Zigarettenrauch aufgetragen, zunächst wurde Tag 14, dann Tag 21 aufgeführt. Auf der y-Achse wurde die Genexpression des zu untersuchenden Gens im Vergleich zur *GAP-DH* und zu 0% Zigarettenrauch aufgetragen. Alle Versuche (N≥3) wurden zuerst durch einen Kruskal-Wallis H-Test analysiert und im Anschluss noch mittels eines Dunn Tests ausgewertet. Beide Genexpressionen wurden nach 14 Tagen statistisch signifikant herunterreguliert. Für *Gli2* wurden sowohl statistisch signifikante Werte für die Vergleiche mit 0%, beziehungsweise 0,1% Zigarettenrauchkonzentration ermittelt (0,1% p<0,001; 0,5% p<0,001; 1% p<0,001; 5% p<0,001; im Vergleich zu 0% CSE; 0,5% p<0,5; 1% p<0,5; 5% p<0,001; 10% p<0,001; im Vergleich zu 0,1% CSE). Ähnliches ergab sich für die Analyse des *Foxo* (10% p<0,001 im Vergleich zu 0% CSE; 0,5% p<0,5; 1% p<0,01; 5% p<0,01; 10% p<0,01; im Vergleich zu 0,1% CSE). Nach 21 Tagen wurde *Foxo* leicht herabreguliert und *Gli2* statistisch signifikant (5% p<0,5; 10% p<0,5; im Vergleich zu 0% CSE).

Um die allgemeine Aktivität der Osteoblasten zu untersuchen, wurde sowohl die Genexpression des *AP*, als auch des *OC* eruiert. Wie Abbildung 26 zeigt, war nach 14 Tagen im Gesamten eine Herunterregulierung nach CSE Zugabe zu erkennen, jedoch mit keiner statistische Signifikanz. Nach 21 Tagen zeigte lediglich *OC* eine Herunterregulierung, *AP* hingegen zeigte kaum eine Veränderung.

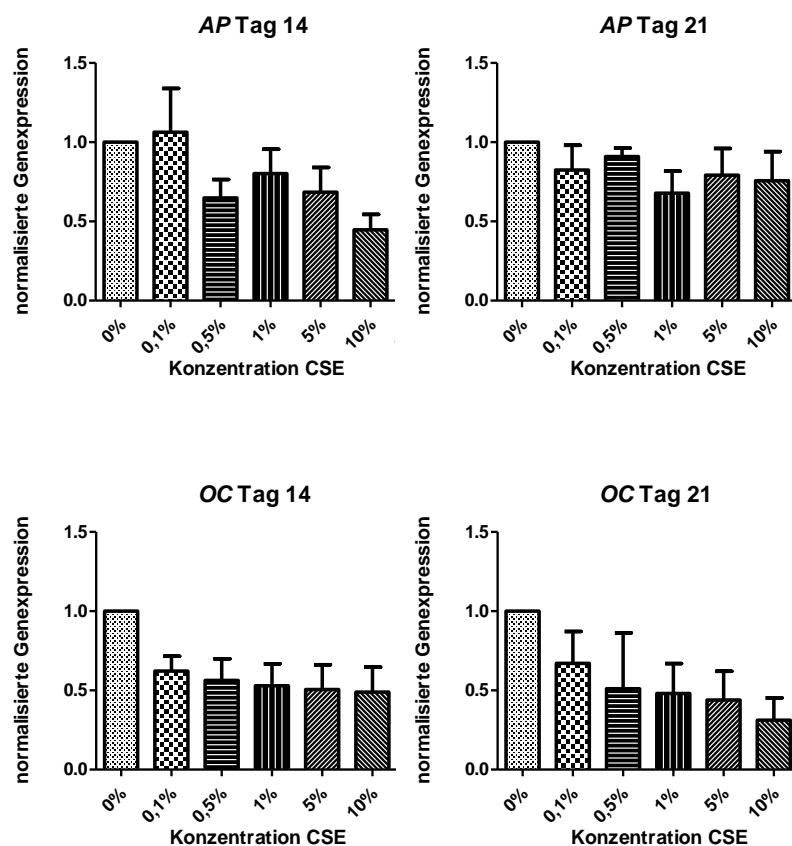


Abbildung 26: Statistische Auswertung der Genexpression des *AP* und *OC*. Auf der x-Achse wurde die Konzentration von Zigarettenrauch aufgetragen, zunächst wurde Tag 14, dann Tag 21 aufgeführt. Auf der y-Achse wurde die Genexpression des zu untersuchenden Gens im Vergleich zur *GAP-DH* und zu 0% Zigarettenrauch aufgetragen. Alle Versuche ( $N \geq 3$ ) wurden zuerst durch einen Kruskal-Wallis H-Test analysiert und im Anschluss noch mittels eines Dunn Tests ausgewertet. *AP* und *OC* zeigten nach 14 Tagen eine deutliche Herunterregulierung, jedoch keine statistische Signifikanz. *AP* zeigte nach 21 Tagen keine großen Veränderungen, *OC* hingegen wurde deutlich herunterreguliert.

Nun wurde das Gen *alpha-TAT1* untersucht, welches intrazellulär Stoffe transportiert. Auch hier wurde nach 14 Tagen eine statistisch signifikante Herunterregulierung analysiert (0,1%  $p < 0,5$ ; 0,5%  $p < 0,001$ ; 1%  $p < 0,001$ ; 5%  $p < 0,001$ ; 10%  $p < 0,001$ ; im Vergleich zu 0% CSE). Des Weiteren wurde noch *Pc2* analysiert, welches als Marker für die primären Zilien dient. Wie in Abbildung 27 zu sehen ist, zeigte dieses Gen eine statistisch signifikante Herunterregulierung (1%  $p < 0,5$ ; 5%  $p < 0,5$  und 10%  $p < 0,5$  im Vergleich zu 0% CSE) nach CSE Inkubation.

Nach 21 Tagen konnte bei *alpha-TAT1* eine statistisch signifikante Herabregulierung ermittelt werden (0,5%  $p < 0,5$ ; 1%  $p < 0,5$ ; 5%  $p < 0,5$ ; 10%  $p < 0,5$ ; im Vergleich zu 0% CSE). Auch *Pc2* zeigte eine statistisch signifikante Herunterregulierung (0,5%  $p < 0,5$ ; 1%  $p < 0,5$ ; 5%  $p < 0,5$  und 10%  $p < 0,5$  im Vergleich zu 0% CSE).

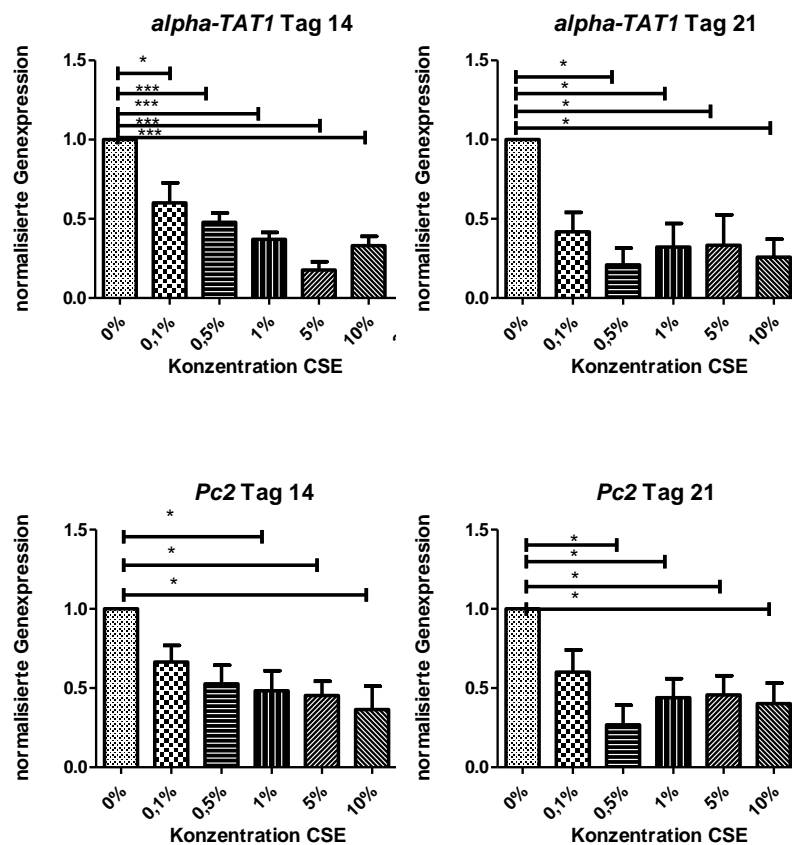


Abbildung 27: Statistische Auswertung der Genexpression des *alpha-TAT1* und *Pc2*. Auf der x-Achse wurde die Konzentration von Zigarettenrauch aufgetragen, zunächst wurde Tag 14, dann Tag 21 aufgeführt. Auf der y-Achse wurde die Genexpression des zu untersuchenden Gens im Vergleich zur *GAP-DH* und zu 0% Zigarettenrauch aufgetragen. Alle Versuche ( $N \geq 3$ ) wurden zuerst durch einen Kruskal-Wallis H-Test analysiert und im Anschluss noch mittels eines Dunn Tests ausgewertet. Bei *alpha-TAT1* wurde nach 14 Tagen eine statistisch signifikante Herunterregulierung ermittelt (0,1%  $p < 0,5$ ; 0,5%  $p < 0,001$ ; 1%  $p < 0,001$ ; 5%  $p < 0,001$ ; 10%  $p < 0,001$ ; im Vergleich zu 0% CSE). Ebenso wie *alpha-TAT1* zeigte auch *Pc2* eine statistisch signifikante Herunterregulierung (1%  $p < 0,5$ ; 5%  $p < 0,5$  und 10%  $p < 0,5$  im Vergleich zu 0% CSE). *Alpha-TAT1* zeigte nach 21 Tagen eine statistisch signifikante Herabregulierung (0,5%  $p < 0,5$ ; 1%  $p < 0,5$ ; 5%  $p < 0,5$ ; 10%  $p < 0,5$ ; im Vergleich zu 0% CSE). Ebenso zeigte *Pc2* eine statistisch signifikante Herunterregulierung (0,5%  $p < 0,5$ ; 1%  $p < 0,5$ ; 5%  $p < 0,5$  und 10%  $p < 0,5$  im Vergleich zu 0% CSE).

## 3.2 humane Osteoblasten

### 3.2.1 Targets des BMP Signalwegs (Tag 14)

Als letzte Versuchsreihe wurden die Versuche an menschlichen Osteoblasten durchgeführt. Die Reihenfolge der zu untersuchenden Gene war wie bei den SCP-1 Zellen. Es wurde lediglich die Genexpression nach 14 Tagen nach CSE Zugabe untersucht. Die Versuchsreihe wurde für jedes Gen  $N \geq 3$  durchgeführt.

Zuerst wurden *BMP2* und *BMP7* untersucht. Sowohl *BMP2*, als auch *BMP7* zeigten eine Herunterregulierung der Genexpression nach CSE Zugabe. *BMP7* jedoch deutlicher als *BMP2*, wie Abbildung 28 zeigt. Beide Herunterregulierungen zeigten jedoch keine statistische Signifikanz.

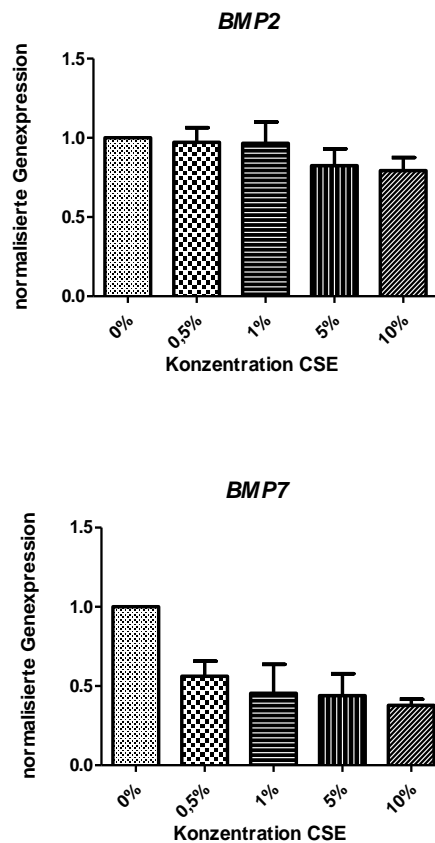


Abbildung 28: Statistische Auswertung der Genexpression von *BMP2* und *BMP7*. Auf der x-Achse wurde die Konzentration von Zigarettenrauch aufgetragen. Auf der y-Achse wurde die Genexpression des zu untersuchenden Gens im Vergleich zur *GAP-DH* und zu 0% Zigarettenrauch aufgetragen. Alle Versuche ( $N \geq 3$ ) wurden zuerst durch einen Kruskal-Wallis H-Test analysiert und im Anschluss noch mittels eines Dunn Tests ausgewertet. Sowohl *BMP2*, als auch *BMP7* zeigten eine Herunterregulierung, jedoch ohne statistische Signifikanz.

Nun wurden die drei Typ-I-Rezeptoren *Alk1*, *Alk2* und *Alk6* mit CSE untersucht. Bei keinem der drei Rezeptoren war eine deutliche Tendenz zu erkennen. *Alk1* zeigte eine leichte Herunterregulierung. Sowohl *Alk2*, als auch *Alk6* wurden bis 5% herunterreguliert, zeigten jedoch bei einer Konzentration von 10% Zigarettenrauch eine Heraufregulierung, wie Abbildung 29 zeigt. Des Weiteren zeigten *Alk2* und *Alk6* eine statistische Signifikanz (*Alk2*: 5%  $p < 0,01$  im Vergleich zu 0% CSE; *Alk6*: 5%  $p < 0,5$  im Vergleich zu 0% CSE).

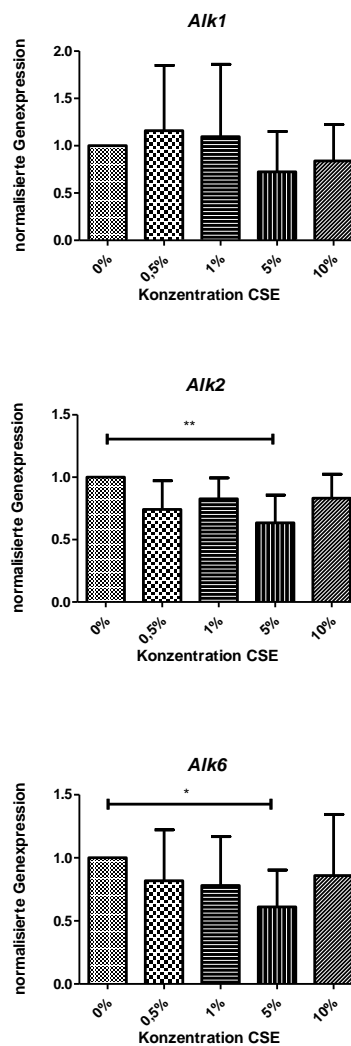


Abbildung 29: Statistische Auswertung der Genexpression der Typ-I-Rezeptoren *Alk1*, *Alk2* und *Alk6*. Auf der x-Achse wurde die Konzentration von Zigarettenrauch aufgetragen. Auf der y-Achse wurde die Genexpression des zu untersuchenden Gens im Vergleich zur *GAP-DH* und zu 0% Zigarettenrauch aufgetragen. Alle Versuche ( $N \geq 3$ ) wurden zuerst durch einen Kruskal-Wallis H-Test analysiert und im Anschluss noch mittels eines Dunn Tests ausgewertet. *Alk1* zeigte eine leichte Herunterregulierung. *Alk2* und *Alk6* zeigten bis zu einer Konzentration von 5% Zigarettenrauch eine Herunterregulierung, bei einer Konzentration von 10% Zigarettenrauch jedoch wieder eine Heraufregulierung. Sowohl *Alk2*, als auch *Alk6* zeigten statistische Signifikanzen (*Alk2*: 5%  $p < 0,01$  im Vergleich zu 0% CSE; *Alk6*: 5%  $p < 0,5$  im Vergleich zu 0% CSE).

Im Folgenden wurden die Rezeptor-Smads *Smad1*, *Smad2*, *Smad3* und *Smad5* analysiert. *Smad1* und *Smad2* zeigten eine Herunterregulierung mit steigender Konzentration an Zigarettenrauch. Lediglich *Smad2* zeigte jedoch eine statistische Signifikanz, wie Abbildung 30 zeigt (10%  $p < 0,5$  im Vergleich zu 0% CSE). *Smad5* zeigte eine Hochregulierung bei einer Konzentration von 0,5%, jedoch nachfolgend eine statistisch signifikante Herunterregulierung im Vergleich zu einer Konzentration von 0,5% (vgl. Abbildung 31; 10%  $p < 0,5$  im Vergleich zu 0,5% CSE). Bei *Smad3* war keine Tendenz zu erkennen, jedoch eine statistische Signifikanz bei 5%  $p < 0,5$  im Vergleich zu 1% CSE.

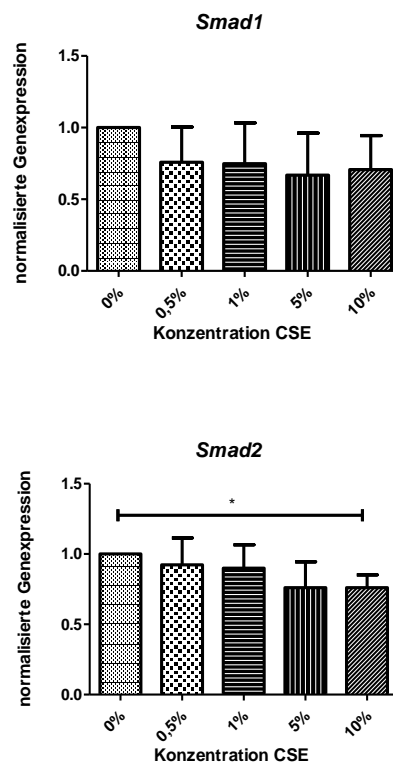


Abbildung 30: Statistische Auswertung der Genexpression des *Smad1* und 2. Auf der x-Achse wurde die Konzentration von Zigarettenrauch aufgetragen. Auf der y-Achse wurde die Genexpression des zu untersuchenden Gens im Vergleich zur *GAP-DH* und zu 0% Zigarettenrauch aufgetragen. Alle Versuche ( $N \geq 3$ ) wurden zuerst durch einen Kruskal-Wallis H-Test analysiert und im Anschluss noch mittels eines Dunn Tests ausgewertet. Sowohl *Smad1*, als auch *Smad2* wurden herunterreguliert, jedoch nur *Smad2* statistisch signifikant (10%  $p < 0,5$  im Vergleich zu 0% CSE).

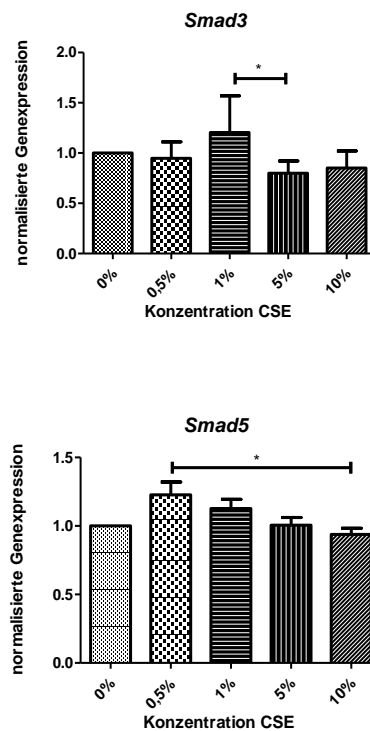


Abbildung 31: Statistische Auswertung der Genexpression von *Smad3* und *5*. Auf der x-Achse wurde die Konzentration von Zigarettenrauch aufgetragen. Auf der y-Achse wurde die Genexpression des zu untersuchenden Gens im Vergleich zur *GAP-DH* und zu 0% Zigarettenrauch aufgetragen. Alle Versuche ( $N \geq 3$ ) wurden zuerst durch einen Kruskal-Wallis H-Test analysiert und im Anschluss noch mittels eines Dunn Tests ausgewertet. *Smad5* zeigt zuerst eine Hochregulierung bei 0,5%. Danach eine statistisch signifikante Herunterregulierung (10%  $p < 0,5$  im Vergleich zu 0% CSE). *Smad3* zeigte keine Tendenz, jedoch eine Signifikanz zwischen 5% und 1% (5%  $p < 0,5$  im Vergleich zu 1% CSE).

Daraufhin wurde das co-Smad *Smad4* analysiert. Wie Abbildung 32 zeigt, wies *Smad4* in Gegenwart von CSE eine statistisch signifikante Herunterregulierung auf (10%  $p < 0,5$  im Vergleich zu 0% CSE).

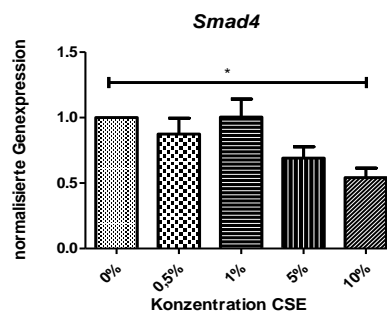


Abbildung 32: Statistische Auswertung der Genexpression von *Smad4*. Auf der x-Achse wurde die Konzentration von Zigarettenrauch aufgetragen. Auf der y-Achse wurde die Genexpression des zu untersuchenden Gens im Vergleich zur *GAP-DH* und zu 0% Zigarettenrauch aufgetragen. Alle Versuche ( $N \geq 3$ ) wurden zuerst durch einen Kruskal-Wallis H-Test analysiert und im Anschluss noch mittels eines Dunn Tests ausgewertet. *Smad4* wurde statistisch signifikant herunterreguliert (10%  $p < 0,5$  im Vergleich zu 0% CSE).

Als letzte Gene der Familie der Smads wurden die zwei Inhibitoren *Smad6* und *Smad7* nach Zugabe von CSE analysiert. Ebenso wie *Smad6* wurde auch *Smad7* herunterreguliert. Wie in Abbildung 33 zu sehen ist, zeigte *Smad7* statistische Signifikanzen bei 10%  $p < 0,5$  im Vergleich zu 0% CSE und 5%  $p < 0,5$  im Vergleich zu 0% CSE.

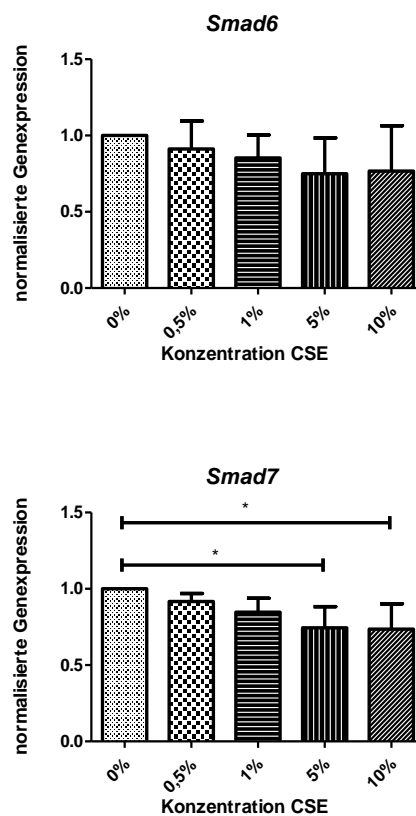


Abbildung 33: Statistische Auswertung der Genexpression von *Smad6* und 7. Auf der x-Achse wurde die Konzentration von Zigarettenrauch aufgetragen. Auf der y-Achse wurde die Genexpression des zu untersuchenden Genes im Vergleich zur *GAP-DH* und zu 0% Zigarettenrauch aufgetragen. Alle Versuche ( $N \geq 3$ ) wurden zuerst durch einen Kruskal-Wallis H-Test analysiert und im Anschluss noch mittels eines Dunn Tests ausgewertet. Wie auch *Smad6* wurde auch *Smad7* herunterreguliert. *Smad7* zeigte zusätzlich noch statistisch signifikante Veränderungen in der Genexpression (5%  $p < 0,5$  im Vergleich zu 0% CSE; 10%  $p < 0,5$  im Vergleich zu 0% CSE).



Auch bei der Genexpression von *OPG* und *Rankl* in Gegenwart von CSE war eine Herunterregulierung analysiert worden. Wie Abbildung 34 zeigt, wies *OPG* eine statistisch signifikante Herabregulierung auf (5%  $p < 0,5$  im Vergleich zu 0% CSE).

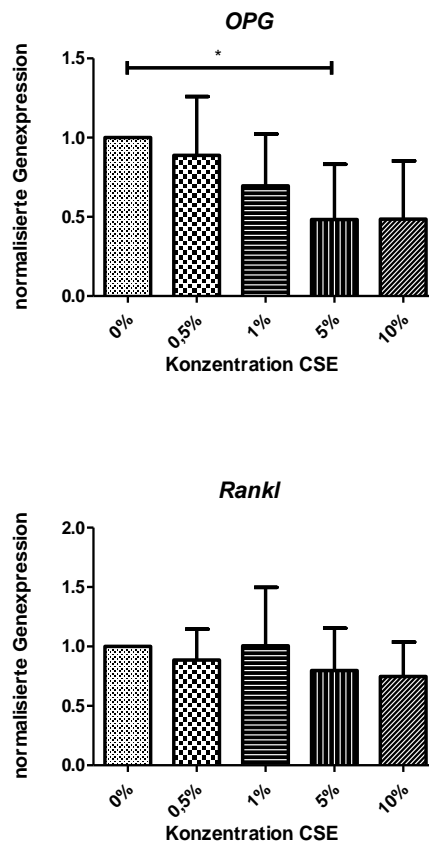


Abbildung 34: Statistische Auswertung der Genexpression von *OPG* und *Rankl*. Auf der x-Achse wurde die Konzentration von Zigarettenrauch aufgetragen. Auf der y-Achse wurde die Genexpression des zu untersuchenden Gens im Vergleich zur *GAP-DH* und zu 0% Zigarettenrauch aufgetragen. Alle Versuche ( $N \geq 3$ ) wurden zuerst durch einen Kruskal-Wallis H-Test analysiert und im Anschluss noch mittels eines Dunn Tests ausgewertet. Sowohl *Rankl*, als auch *OPG* wurden herunterreguliert, *OPG* auch mit einer statistischen Signifikanz (5%  $p < 0,5$  im Vergleich zu 0% CSE).

Dann wurde der Haupttranskriptionsfaktor der Osteoblastendifferenzierung, das *Runx2* mit CSE untersucht. Wie in Abbildung 35 zu sehen ist, wurde *Runx2* im Gegensatz zu den Versuchen mit den SCP-1 Zellen hochreguliert.

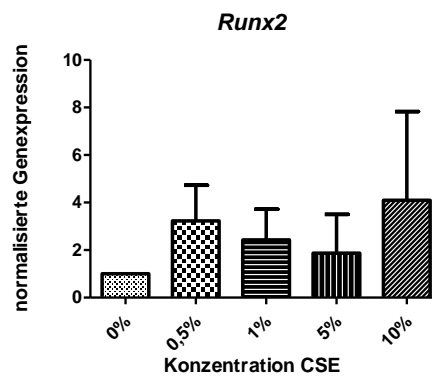


Abbildung 35: Statistische Auswertung der Genexpression von *Runx2*. Auf der x-Achse wurde die Konzentration von Zigarettenrauch aufgetragen. Auf der y-Achse wurde die Genexpression des zu untersuchenden Genes im Vergleich zur *GAP-DH* und zu 0% Zigarettenrauch aufgetragen. Alle Versuche (N≥3) wurden zuerst durch einen Kruskal-Wallis H-Test analysiert und im Anschluss noch mittels eines Dunn Tests ausgewertet. *Runx2* wies eine Hochregulierung ohne statistische Signifikanz auf.

Als nächstes wurde die Genexpression des *TGF-beta* mit CSE analysiert. Wie Abbildung 36 zeigt, wurde *TGF-beta* anfangs leicht hochreguliert, mit steigender Konzentration des Zigarettenrauchs jedoch insgesamt herunterreguliert. Dies geschah jedoch ohne statistische Signifikanz.

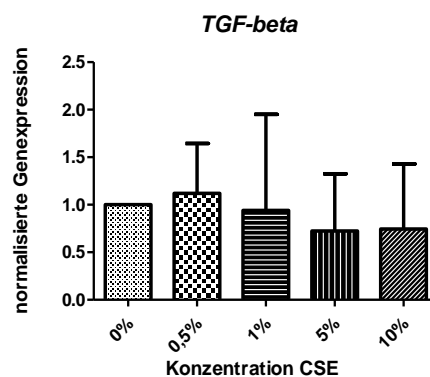


Abbildung 36: Statistische Auswertung der Genexpression von *TGF-beta*. Auf der x-Achse wurde die Konzentration von Zigarettenrauch aufgetragen. Auf der y-Achse wurde die Genexpression des zu untersuchenden Genes im Vergleich zur *GAP-DH* und zu 0% Zigarettenrauch aufgetragen. Alle Versuche (N≥3) wurden zuerst durch einen Kruskal-Wallis H-Test analysiert und im Anschluss noch mittels eines Dunn Tests ausgewertet. *TGF-beta* zeigte eine leichte Herunterregulierung, jedoch ohne statistische Signifikanz.

Nun wurde *Endoglin* mit CSE untersucht, der Hilfsrezeptor des TGF-beta Signalwegs. *Endoglin* wurde statistisch signifikant herunterreguliert (vgl. Abbildung 37: 1%  $p < 0,5$  im Vergleich zu 0% CSE; 5%  $p < 0,001$  im Vergleich zu 0% CSE; 10%  $p < 0,01$  im Vergleich zu 0% CSE).

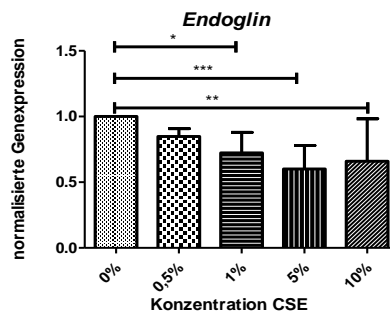


Abbildung 37: Statistische Auswertung der Genexpression von *Endoglin*. Auf der x-Achse wurde die Konzentration von Zigarettenrauch aufgetragen. Auf der y-Achse wurde die Genexpression des zu untersuchenden Gens im Vergleich zur *GAP-DH* und zu 0% Zigarettenrauch aufgetragen. Alle Versuche ( $N \geq 3$ ) wurden zuerst durch einen Kruskal-Wallis H-Test analysiert und im Anschluss noch mittels eines Dunn Tests ausgewertet. Die Genexpression von *Endoglin* zeigte eine statistisch signifikante Herunterregulierung (1%  $p < 0,5$  im Vergleich zu 0% CSE; 5%  $p < 0,001$  im Vergleich zu 0% CSE; 10%  $p < 0,01$  im Vergleich zu 0% CSE).

Als nächstes wurde im Zusammenhang der Smads das *Smurf2* mit CSE analysiert. *Smurf2* behindert die Komplexbildung zwischen Rezeptor-Smads und co-Smad und dient somit als Inhibitor. Wie Abbildung 38, wurde *Smurf2*, wie auch der Inhibitor *Smad7* statistisch signifikant herunterreguliert (5%  $p < 0,5$  im Vergleich zu 0% CSE; 10%  $p < 0,5$  im Vergleich zu 0% CSE).

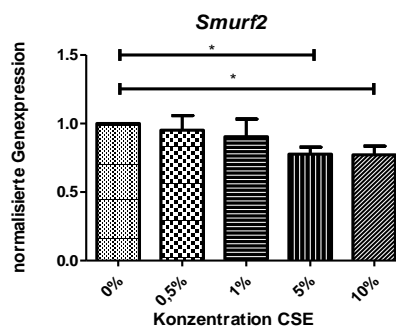


Abbildung 38: Statistische Auswertung der Genexpression von *Smurf2*. Auf der x-Achse wurde die Konzentration von Zigarettenrauch aufgetragen. Auf der y-Achse wurde die Genexpression des zu untersuchenden Gens im Vergleich zur *GAP-DH* und zu 0% Zigarettenrauch aufgetragen. Alle Versuche ( $N \geq 3$ ) wurden zuerst durch einen Kruskal-Wallis H-Test analysiert und im Anschluss noch mittels eines Dunn Tests ausgewertet. *Smurf2* zeigte eine statistisch signifikante Herunterregulierung (5%  $p < 0,5$  im Vergleich zu 0% CSE und 10%  $p < 0,5$  im Vergleich zu 0% CSE).

Als nächstes wurde die Genexpression der Typ-II-Rezeptoren *ActR2A* und *ActR2B* mit CSE untersucht. Beide Rezeptoren zeigten eine Tendenz zur Herunterregulierung, jedoch ohne Signifikanz, wie Abbildung 39 zeigt.

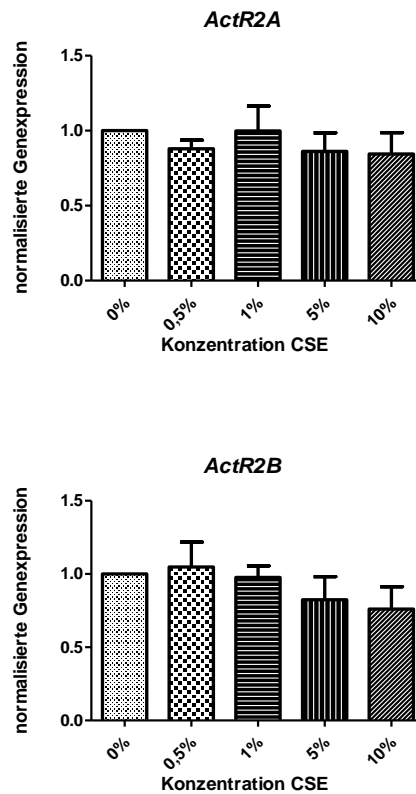


Abbildung 39: Statistische Auswertung der Genexpression von *ActR2A* und *ActR2B*. Auf der x-Achse wurde die Konzentration von Zigarettenrauch aufgetragen. Auf der y-Achse wurde die Genexpression des zu untersuchenden Gens im Vergleich zur *GAP-DH* und zu 0% Zigarettenrauch aufgetragen. Alle Versuche ( $N \geq 3$ ) wurden zuerst durch einen Kruskal-Wallis H-Test analysiert und im Anschluss noch mittels eines Dunn Tests ausgewertet. Statistische Signifikanzen waren nicht vorhanden, jedoch sah man bei beiden Rezeptoren eine Herunterregulierung.

### 3.2.2 Targets des Wnt-Signalwegs (Tag 14)

Nach dem BMP-Signalweg wurde der Wnt-Signalweg in Gegenwart von CSE untersucht. *Wnt2* zeigte eine leichte Hochregulierung bei 1% Zigarettenrauchkonzentration, jedoch bei 5% und 10% eine leichte Herunterregulierung im Vergleich zu den Zellen, welche ohne Zigarettenrauch behandelt wurden (vgl. Abbildung 40).

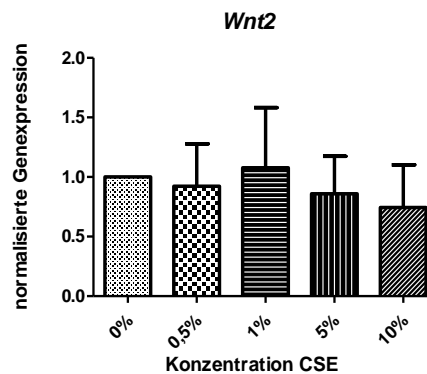


Abbildung 40: Statistische Auswertung der Genexpression von *Wnt2*. Auf der x-Achse wurde die Konzentration von Zigarettenrauch aufgetragen. Auf der y-Achse wurde die Genexpression des zu untersuchenden Gens im Vergleich zur *GAP-DH* und zu 0% Zigarettenrauch aufgetragen. Alle Versuche ( $N \geq 3$ ) wurden zuerst durch einen Kruskal-Wallis H-Test analysiert und im Anschluss noch mittels eines Dunn Tests ausgewertet. *Wnt2* zeigte insgesamt eine leichte Herunterregulierung mit einer Hochregulierung bei 1%, jedoch ohne statistische Signifikanz.

Als nächstes wurden die zwei Inhibitoren des Wnt-Signalwegs *DKK1* und *DKK2* nach Inkubation mit CSE analysiert. Die zwei Inhibitoren zeigten starke Gegensätze. Während *DKK2* ohne statistische Signifikanzen hochreguliert wurde, war bei *DKK1* eine statistisch signifikante Herunterregulierung auszumachen, wie Abbildung 41 zeigt (5%  $p < 0,01$  im Vergleich zu 0% CSE; 10%  $p < 0,001$  im Vergleich zu 0% CSE; 10%  $p < 0,5$  im Vergleich zu 0,5% CSE und 10%  $p < 0,5$  im Vergleich zu 1% CSE).

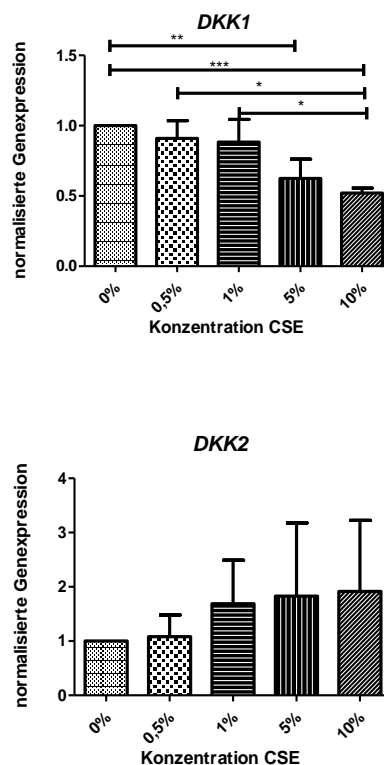


Abbildung 41: Statistische Auswertung der Genexpression von *DKK1* und *DKK2*. Auf der x-Achse wurde die Konzentration von Zigarettenrauch aufgetragen. Auf der y-Achse wurde die Genexpression des zu untersuchenden Genes im Vergleich zur *GAP-DH* und zu 0% Zigarettenrauch aufgetragen. Alle Versuche ( $N \geq 3$ ) wurden zuerst durch einen Kruskal-Wallis H-Test analysiert und im Anschluss noch mittels eines Dunn Tests ausgewertet. *DKK2* zeigte eine Hochregulierung, wohingegen *DKK1* eine statistisch signifikante Herunterregulierung aufwies (5%  $p < 0,01$  im Vergleich zu 0% CSE; 10%  $p < 0,001$  im Vergleich zu 0% CSE; 10%  $p < 0,5$  im Vergleich zu 0,5% CSE und 10%  $p < 0,5$  im Vergleich zu 1% CSE).

Als dritter und letzter Inhibitor des Wnt-Signalwegs wurde *Sost* in Gegenwart von CSE untersucht. Hier war keine Veränderung festzustellen (Abbildung 42).

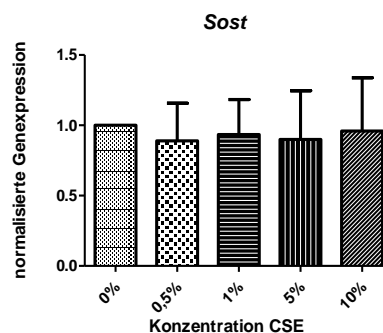


Abbildung 42: Statistische Auswertung der Genexpression von *Sost*. Auf der x-Achse wurde die Konzentration von Zigarettenrauch aufgetragen. Auf der y-Achse wurde die Genexpression des zu untersuchenden Genes im Vergleich zur *GAP-DH* und zu 0% Zigarettenrauch aufgetragen. Alle Versuche ( $N \geq 3$ ) wurden zuerst durch einen Kruskal-Wallis H-Test analysiert und im Anschluss noch mittels eines Dunn Tests ausgewertet. Hier wurde keine Veränderung festgestellt.

Nun folgte die Untersuchung der zwei Transkriptionsfaktoren *Gli2* und *Foxo* mit CSE untersucht. *Gli2* zeigte eine statistisch signifikante Herunterregulierung, *Foxo* hingegen zeigte bis zu einer Konzentration von 1% eine Hochregulierung, danach wurde es bis zu einer Konzentration von 10% Zigarettenrauch herabreguliert (vgl. Abbildung 43 *Gli2*: 5%  $p < 0,5$  im Vergleich zu 0% CSE und 10%  $p < 0,5$  im Vergleich zu 0% CSE).

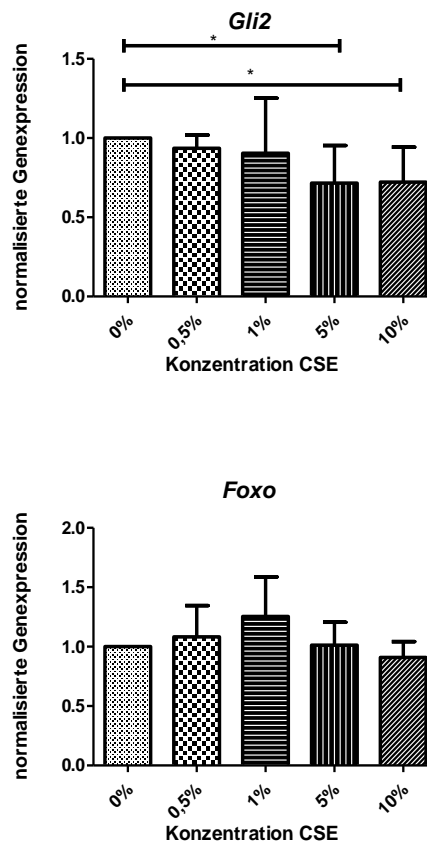


Abbildung 43: Statistische Auswertung der Genexpression von *Gli2* und *Foxo*. Auf der x-Achse wurde die Konzentration von Zigarettenrauch aufgetragen. Auf der y-Achse wurde die Genexpression des zu untersuchenden Genes im Vergleich zur *GAP-DH* und zu 0% Zigarettenrauch aufgetragen. Alle Versuche ( $N \geq 3$ ) wurden zuerst durch einen Kruskal-Wallis H-Test analysiert und im Anschluss noch mittels eines Dunn Tests ausgewertet. *Gli2* zeigte eine Herunterregulierung mit statistischen Signifikanzen (5%  $p < 0,5$  im Vergleich zu 0% CSE und 10%  $p < 0,5$  im Vergleich zu 0% CSE). *Foxo* hingegen zeigte bis zu einer Zigarettenrauchkonzentration von 1% eine Hochregulierung und im weiteren Verlauf bis zu einer Konzentration von 10% eine Herabregulierung.

Im Folgenden wurden *AP* und *OC* mit CSE untersucht, um die Osteoblastenaktivität zu eruieren. Im Gesamten war eine Herunterregulierung auszumachen, wie Abbildung 44 zeigt, jedoch lediglich bei *AP* statistisch signifikant (5%  $p < 0,01$  im Vergleich zu 0% CSE und 10%  $p < 0,5$  im Vergleich zu 0% CSE).

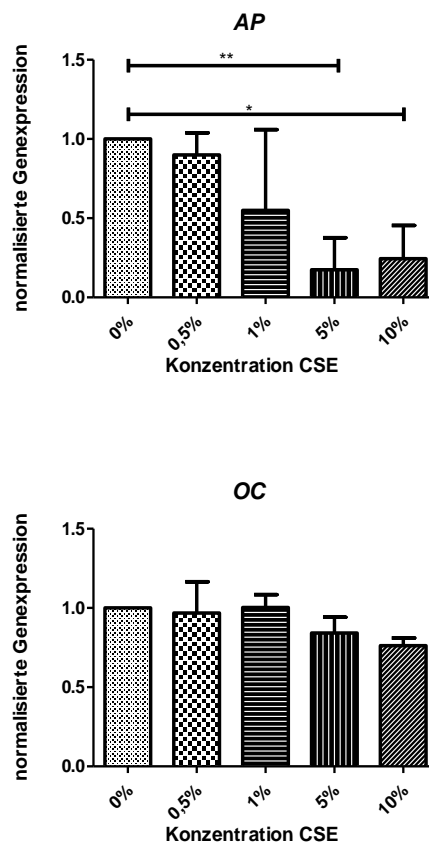


Abbildung 44: Statistische Auswertung der Genexpression von *AP* und *OC*. Auf der x-Achse wurde die Konzentration von Zigarettenrauch aufgetragen. Auf der y-Achse wurde die Genexpression des zu untersuchenden Gens im Vergleich zur *GAP-DH* und zu 0% Zigarettenrauch aufgetragen. Alle Versuche ( $N \geq 3$ ) wurden zuerst durch einen Kruskal-Wallis H-Test analysiert und im Anschluss noch mittels eines Dunn Tests ausgewertet. Beide Gene zeigten eine Herunterregulierung, *AP* auch mit statistischen Signifikanzen (5%  $p < 0,01$  und 10%  $p < 0,5$  im Vergleich zu 0% CSE).



Mit dem *alpha-TAT1* wurde nun ein Gen analysiert, welches für den intrazellulären Transport von Botenstoffen zuständig ist. Auch bei diesem Gen konnte eine Herunterregulierung nach CSE Inkubation ausgemacht werden, wie Abbildung 45 zeigt. Ebenso zeigt diese Abbildung die Genexpression des *Pc2*. Hier konnte keine Tendenz festgestellt werden, weder zur Herauf- noch zur Herabregulierung.

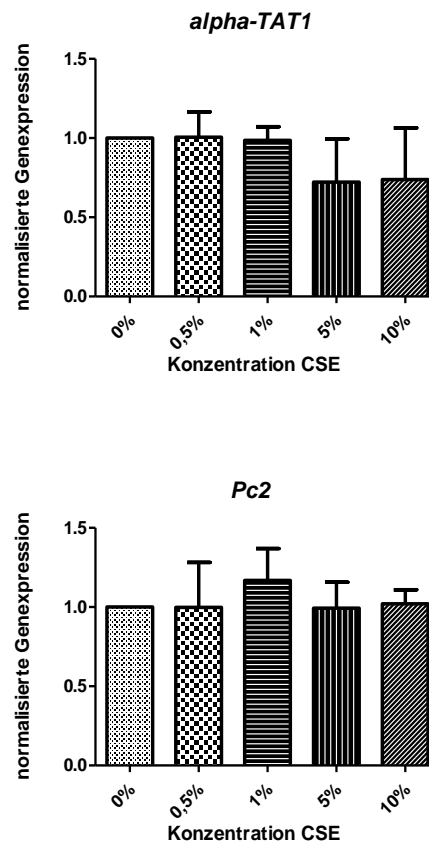


Abbildung 45: Statistische Auswertung der Genexpression von *alpha-TAT1* und *Pc2*. Auf der x-Achse wurde die Konzentration von Zigarettenrauch aufgetragen. Auf der y-Achse wurde die Genexpression des zu untersuchenden Gens im Vergleich zur *GAP-DH* und zu 0% Zigarettenrauch aufgetragen. Alle Versuche (N $\geq$ 3) wurden zuerst durch einen Kruskal-Wallis H-Test analysiert und im Anschluss noch mittels eines Dunn Tests ausgewertet. Auch *alpha-TAT1* zeigte eine Herunterregulierung. Bei *Pc2* konnte keine Tendenz festgestellt werden.

## 4 Diskussion

### 4.1 Rauchen – die gefährliche Droge

Wie Anfangs bereits erläutert, beinhaltet Zigarettenrauch fast 150 toxische Bestandteile (Pötschke-Langer et al. 2015b). Darunter fallen unter anderem Nikotin, toxische Gase, Kanzerogene, Amine und noch viele weitere. Rauchen ist eine Droge, wie auch Alkohol. Der primäre Faktor, der für die Sucht verantwortlich ist, ist das Nikotin. Nikotin wird vom Körper leicht absorbiert. Die Konzentration von Nikotin im arteriellen Blut erhöht sich schon kurz nach dem Rauchen auf 100 ng/ml. Dies verteilt sich dann im gesamten Körper einschließlich auf das Skelettsystem (Benowitz et al. 2009).

In mehreren Studien der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. A. Nüssler wurde bereits gezeigt, dass die Toxine, die in Zigaretten enthalten sind, oxidativen Stress hervorrufen können (Braun et al. 2011, Holzer et al. 2012). So kann es zu einer bedeutenden Beeinträchtigung der Knochenregeneration kommen (Barreiro et al. 2010, Patel et al. 2013).

Da die osteogene Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen während der Frakturheilung eine wichtige Komponente darstellt, wurde in dieser Arbeit versucht, die Wirkung von Zigarettenrauch auf die Differenzierung von SCP-1 abgeleitete Osteoblasten und die Modifikation im Wnt- bzw. BMP-Signalweg zu untersuchen, da der Wnt-Signalweg und der BMP-Signalweg eine Schlüsselrolle in der Osteoblastendifferenzierung einnehmen (Kenkre und Bassett 2018, Aquino-Martinez et al. 2017). Desweiteren spielt der Wnt-Signalweg durch die letztendliche Expression von *OPG* eine wichtige Rolle im Remodelling des Knochens, da *OPG* an *Rankl* bindet, welches nicht mehr seinen Liganden binden kann und die Differenzierung von Vorläufer-Osteoklasten zu Osteoklasten somit behindert wird (Keck und Pecherstorfer 2003). Das Ziel unseres Versuches war es zu zeigen, inwiefern sich verschiedene Gene des BMP- und Wnt-Signalwegs aus SCP-1-Zellen abgeleiteten Osteoblasten unter Einwirkung verschiedener Konzentrationen von Zigarettenrauch und verschiedener Wachstumszeit verändern.

## **4.2 Das Rauchen und seine Folgen in Bezug auf das Remodelling und die Abhängigkeit der Inkubationszeit auf Signalwege**

In einer Studie wurde bereits berichtet, dass Zigarettenrauch eine direkte toxische Wirkung auf die primären Osteoblasten hat (Braun et al. 2011, Holzer et al. 2012).

Des Weiteren wurde in einer anderen Studie gezeigt, dass die primären Zilien in der Skelettentwicklung eine überaus wichtige Rolle spielen. Mit dem Verlust der primären Zilien kann es zu Skelettdeformitäten kommen (Temiyasathit und Jacobs 2010). Darüber hinaus weiß man außerdem, dass primäre Zilien für die Differenzierung von Stammzellen entscheidend sind (Tummala et al. 2010).

Ein anderer Versuch um die Arbeitsgruppe um Prof. Dr. A. Nüssler zeigte auch, dass das Rauchen sich direkt negativ auf die primären Zilien während der osteogenen Differenzierung von SCP-1-Zellen zu Osteoblasten auswirkt (Sreekumar et al. 2017).

Die Arbeitsgruppe um Prof. Dr. A. Nüssler beobachtete bereits, dass bei der osteogenen Differenzierung mit Zigarettenrauch eine signifikante Reduktion der primären Zilien bei den SCP-1-Zellen stattfindet. Außerdem untersuchten sie, ob es durch den Zigarettenrauch induzierten Verlust der Zilien auch zu einer beeinträchtigten Differenzierung kommen kann. Sie haben festgestellt, dass eine erhöhte radikalische Produktion während des Rauchens einer der verantwortlichen Faktoren ist, der für den beobachteten Verlust der Zilien und damit für eine verzögerte Frakturheilung verantwortlich ist. Auch wurde die genetische Veränderung verschiedener Targets des Hedgehog-Signalwegs untersucht. Der Hedgehog-Signalweg ist seinerseits ein anderer elementarer Signalweg in der Osteoblastogenese. Hier konnte gezeigt werden, dass die Targets signifikant herunterreguliert wurden. Desweiteren konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass mit der Behandlung von Resevatrol, welches als Radikalfänger für radikale Sauerstoffspezies, welche beim Rauchen entstehen, die negativen Auswirkungen des Rauchens geringer sind (Sreekumar et al. 2017).

In der vorliegenden Arbeit um Prof. Dr. A. Nüssler wurde sich auf die Wirkung von Zigarettenrauch auf die Differenzierung von SCP-1 abgeleitete Osteoblasten und die Modifikation im Wnt- und BMP-Signalweg konzentriert. Es wurde sich auf die molekularen Veränderungen, die die osteogene Differenzierung von SCP-1 Zellen durch Zigarettenrauch beeinflussen kann, konzentriert. Tabelle 7 zeigt in tabellarischer Form ein Überblick über die von uns erzielten Ergebnisse.

Primer/Tag	Tag 7	Tag 14	Tag 21
<b>BMP2</b>	-	↓ ***	↓ Tendenz
<b>BMP7</b>	-	↓ Tendenz	↓ *
<b>TGF-beta</b>		↓ * / **	↓ Tendenz
<b>Endoglin</b>		↓ Tendenz	↓ ** / ***
<b>Alk1</b>	↑ Tendenz	-	↓ Tendenz
<b>Alk2</b>	↓ Tendenz	↓ ** / ***	↓ * / **
<b>Alk6</b>	-	↓ Tendenz	↓ Tendenz
<b>Smad1</b>	↑ Tendenz	↓ **	↓ Tendenz
<b>Smad2</b>	-	↓ * / ** / ***	↓ Tendenz
<b>Smad3</b>	-	↓ * / **	↓ * / **
<b>Smad5</b>	↓ Tendenz	↓ Tendenz	↓ Tendenz
<b>Smad4</b>	-	↓ ***	↓ Tendenz
<b>Smad6</b>	-	↓ Tendenz	↓ * / **
<b>Smad7</b>	-	↓ **	↓ *
<b>Smurf2</b>		↓ * / **	↓ * / **
<b>ActR2A</b>		(↓ *)	-
<b>ActR2B</b>		↓ *	↓ Tendenz
<b>Wnt2</b>		-	-
<b>DKK1</b>		↓ * / **	↓ Tendenz
<b>DKK2</b>		↓ *	↓ Tendenz
<b>Sost</b>		↑ Tendenz	↑ Tendenz
<b>Gli2</b>		↓ * / ***	↓ *
<b>Foxo</b>		↓ * / ** / ***	↓ Tendenz
<b>AP</b>		↓ Tendenz	↓ Tendenz
<b>OC</b>		↓ Tendenz	↓ Tendenz
<b>alpha-TAT1</b>		↓ * / ***	↓ *
<b>Pc2</b>		↓ *	↓ *
<b>OPG</b>	↓ Tendenz	↓ Tendenz	↓ ** / ***
<b>Rankl</b>	-	↓ Tendenz	↓ Tendenz
<b>Runx2</b>	↑ Tendenz	↓ * / ** / ***	↓ Tendenz

Tabelle 7: Abhängigkeit der verschiedenen Inkubationszeiten auf die Signalwege bzw. auf die Primer. Links sind die verschiedenen Primer aufgelistet. Nach rechts wird die Inkubationszeit nach 7, 14 und 21 Tagen aufgelistet. Wenn keine Veränderung der Regulierung der Primer stattgefunden hat, wird dies mit – gekennzeichnet. Findet eine Tendenz der Herunter- bzw. Hochregulierung statt, wird dies mit ↓ Tendenz bzw. ↑ Tendenz gekennzeichnet. Wird die Herunter- bzw. Hochregulierung signifikant, wird dies durch ↓\*/\*\*/\*\* bzw. ↑\*/\*\*/\*\* deutlich. \* p<0,5, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001.

*BMP2* hat eine lokale osteogene und osteoinduzierende Aktivität und induziert die osteogene und chondrogene Differenzierung von ausgewählten Stammzellen (Govender et al. 2002). Auch das *BMP7* hat eine osteoinduktive Wirkung und phosphoryliert *Smad1* und *Smad5* (Garant 2003). Desweiteren können die *BMP*'s jedoch auch eine knochenresorbierende Wirkung haben über den Rank/Rankl/OPG Weg (Garant 2003).

Die Genexpressionsstudie in unserer Arbeit zeigt eine signifikante Herunterregulierung des *BMP2* und des *BMP7*. Interessanterweise führt die Exposition von Zigarettenrauch ebenfalls zu einer signifikanten Reduktion der Expression von *Runx2* und *Gli2* in unseren Zellen. So führt der Zigarettenrauch möglicherweise zur Herunterregulierung des BMP-Signalwegs und der osteogenen Differenzierung von SCP-1-Zellen und der damit verbundenen Gene *BMP2* und *Runx2*. Auch TGF-beta und die Smad-Proteine *Smad1, 2, 3, 4, 5, 6* und *7*, die durch *TGF-beta* aktiviert werden (Nakao et al. 1997, Takase et al. 1998, Jayaraman und Massague 2000), werden signifikant herunterreguliert. Des Weiteren wird auch *Smurf2*, das als Inhibitor des BMP-Signalwegs wirkt (David et al. 2013), signifikant herunterreguliert. Auch *Endoglin*, ein Hilfsrezeptor des TGF-beta-Rezeptorkomplexes (Guerrero-Esteo et al. 2002), die Rezeptoren *Alk1, 2, 6* und *ActR2A* und *B* und das *Pc2* werden herunterreguliert. Durch all diese Umstände kann daraus gefolgert werden, dass es zu einer Fehlfunktion in der Osteoblastendifferenzierung durch Zigarettenrauch kommt.

Auch der Wnt-Signalweg ist, wie bereits erläutert, für den Knochenumbau und dessen Regulation von Bedeutung, indem er die Differenzierung von Chondrozyten und Osteoblasten reguliert. Chondrozyten und Osteoblasten haben eine gemeinsame Vorläuferzelle, die Osteochondrovorläuferzellen. Wird der Signalweg durch den Verlust von  $\beta$ -Catenin gehemmt, entstehen vermehrt Chondrozyten (Day et al. 2005, Hartmann 2006). In dieser Genexpressionsstudie wurde das Wnt-Gen durch Zigarettenrauch weder herunter- noch hochreguliert.

Weiterhin ist bekannt, dass sowohl *OPG* als auch *Rankl* entscheidend für die Knochenrekonstruktion ist. Die Knochenbildung wird unter anderem durch die Kontrolle der *Rankl*-Expression reguliert (Garant 2003, Vaananen und Laitala-

Leinonen 2008). *OPG*, welches die Knochenresorption durch die Osteoklasten steuert (Glass et al. 2005), und *Rankl* vermitteln so den Osteoblasten und den Osteoklasten die Knochenbildung und Resorption (Mak et al. 2008). Da die Behandlung mit Zigarettenrauch sowohl die *Rankl*- als auch die *OPG*-Expression in unseren Zellen signifikant reduziert hat, kann gezeigt werden, dass die gesamte Knochenhomöostase beeinträchtigt wird.

Antagonisten, wie *DKK2* und *Sost* können den Wnt-Signalweg blockieren, indem sie an den *LRP5*-Rezeptor binden (Niehrs 2006, Semenov et al. 2005). Des Weiteren kann das *DKK1*-Gen, als Antagonist des Wnt-Signalwegs (Pinzone et al. 2009), pathologische Veränderungen hervorrufen. In dieser Expressionsstudie wird *DKK1* und *DKK2* signifikant herunterreguliert, wohingegen *Sost* signifikant hochreguliert wird. Durch *Sost* kann davon ausgegangen werden, dass durch den Zigarettenrauch der Wnt-Signalweg signifikant gehemmt wird (Niehrs 2006, Semenov et al. 2005), was zur Folge hätte, dass die osteogene Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen zu Osteoblasten teilweise gehemmt wird.

Auch *AP* und *OC* wurden, als spezifische Osteoblastenmarker (Schedlich et al. 1994, Swaminathan 2001), herunterreguliert. Die Osteoblasteaktivität wurde durch Zigarettenrauch damit herunterreguliert. Weiterhin wurde auch das *alpha-TAT1*-Gen und das *Foxo*-Gen signifikant herunterreguliert.

Es lässt sich daraus schließen, dass egal welche Inkubationszeit betrachtet wird, Zigarettenrauch vermutlich zu einer verzögerten Frakturheilung beiträgt, die nicht nur für die frühzeitige osteogene Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen zutrifft, sondern auch für das Gleichgewicht von reifen Osteoblasten und Osteoklasten. Dadurch wird die Knochenrekonstruktion in gebrochenen Knochen wesentlich von Zigarettenrauch beeinträchtigt. Nach 14 Tagen ist die deutlichste Veränderung zu sehen. Man kann davon ausgehen, dass mit längerer Inkubationszeit die Zellen adaptieren.

### **4.3 Der Vergleich von Zelllinien zu humanen Osteoblasten – Die Übertragbarkeit auf *in-vivo* Studien**

Die verwendeten primären humanen Osteoblasten stammen ausschließlich von freiwilligen Spendern. Leider war über die Spender nicht bekannt, ob Sie nun selbst Raucher waren. Oder ob Sie eventuell an Osteoporose oder Diabetes mellitus leiden. Beide Krankheiten würden für eine geringere Knochendichte sprechen, da Diabetes ebenfalls zu Osteoporose führt (Aktion gesunde Knochen-keine Chance für Osteoporose 2018) Dies bedeutet weitergehend, dass die Osteoblasten der betroffenen Patienten bereits vorgeschädigt sind, was zu einem verfälschten Ergebnis führt.

In anderen Arbeiten mit unterschiedlichen Fragestellungen wurde bereits das *in vitro* Verhalten von Zelllinien und primären humanen Osteoblasten verglichen. Ergebnisse, die mit Hilfe von Zelllinien gewonnen wurden, sollte man nicht zu 100% auf primäre humane Osteoblasten übertragen, da Zelllinien immer reproduzierbar sind und sich in verschiedenen Versuchsreihen immer gleich verhalten. Zelllinien dienen nicht als genereller Ersatz für Untersuchungen mit Primärzellen (Czekanska et al. 2014).

### **4.4 Die Übertragbarkeit auf den klinischen Alltag**

Die Behandlung von Frakturen durchläuft derzeit zwei wichtige Phasen. Die erste Phase ist die Immobilisierung oder auch reparative Phase. Hier wird die Fraktur fixiert. Bei der zweiten Phase handelt es sich um die Remodelling-Phase. Sie beinhaltet die mechanische Belastung bzw. die Physiotherapie. Diese zwei Schlüsselphasen sind bei der Frakturbehandlung von großer Bedeutung (Sfeir et al. 2015).

Vorherige Daten um die Arbeitsgruppe um Prof. Dr. A. Nüssler zeigen, dass eine Wiederherstellung der primären Zilien eine bessere Differenzierung und Reifung von mesenchymalen Stammzellen zu Osteoblasten in der ersten Phase, der anfänglichen Immobilisierungsphase der Frakturbehandlung, gewährleisten könnte. Durch Physiotherapie, elektrischer Stimulation und hochintensiver

gepulster Ultraschall könnte außerdem der Erfolg der Frakturheilung verbessert werden (Sreekumar et al. 2017).

Andere Studien untersuchten bereits die Frakturheilung mit Resveratrol. Resveratrol hat eine starke antioxidative Knochenschutzfunktion und zeigt unter normaler Konzentrationseinnahme im menschlichen Organismus in vivo keine Toxizität (Zunino und Storms 2015). Daten um die Arbeitsgruppe um Prof. Dr. A. Nüssler zeigen, dass mit einer Resveratrol-Behandlung primären Zilien schneller wiederhergestellt werden können. Die Produktion von freier Radikale wird reduziert. Außerdem hilft Resveratrol, dass die SCP-1-Zellen besser und für längere Zeiträume überleben. Eine Inkubation mit Resveratrol verbessert die AP-Aktivität und die Differenzierung, was bei einer besseren Matrixmineralisierung eine Aufwärtsregulierung der *OPG*- und *Runx2*-Genexpression zeigt. Bei der Resveratrol-Behandlung kommt es außerdem zu einer verbesserten *Runx2* und *BMP2* Expression, die zusammen zu einer verbesserten osteogenen Differenzierung führen (Sreekumar et al. 2017).

Es konnte auch gezeigt werden, dass die Gabe von *BMP2* zu einer verbesserten Knochenheilung führen kann. Auch dies ist ein möglicher Therapieansatz für eine verbesserte Knochenheilung bei Rauchern (Schmidmaier et al. 2007).

Um die Frakturheilung allgemein bei Rauchern zu verbessern, sei die beste und einfachste Lösung zwar das Rauchen zu beenden, doch eine Lösung ist das im klinischen Alltag nicht. Da Rauchen wie Alkohol ein Suchtmittel ist, können Raucher das Rauchen für Tage und Wochen nicht einfach einstellen. Der Ansatz mit Hilfe von Resveratrol bei der Behandlung von Frakturen, gefolgt von zusätzlichen Rehabilitationsmaßnahmen, kann zur Beschleunigung der Frakturheilung bei Rauchern führen und könnte ein neuer und entscheidender Therapieansatz sein (Zhou et al. 2017).



#### 4.5 Ausblick

Für den Versuch mit Zelllinien würde ich weiterhin den gleichen Versuchsaufbau empfehlen. Jedoch gibt es vielleicht eine Möglichkeit, nicht nur mesenchymale Stammzellen zu Osteoblasten zu differenzieren, sondern im gleichen Versuch noch Osteoklasten zu differenzieren. Osteoklasten müssten dann aus Zelllinien des mononukleären-phagozytären Systems gewonnen werden. Da in dem jetzigen Versuch lediglich herausgefunden wurde, wie sich verschiedene Gene der Signalwege während der Differenzierung zu Osteoblasten verändern, wäre es nun spannend herauszufinden, ob diese veränderte Genexpression, vor allem von *Rankl* und *OPG*, einen direkten Einfluss auf die Differenzierung von Osteoklasten hat. In unserem Versuchsaufbau konnten wir leider nur mutmaßen, ob dies der Fall ist. Auch eine Art 3D-CoCulture System, in dem beide Zellen parallel unter dem Einfluss von Zigarettenrauch differenzieren wäre eine Möglichkeit.

Des Weiteren könnte man erforschen, warum die Veränderung der Genexpression sich nach 21 Tagen wieder zu regenerieren scheint. Ein anderer Grund für diese scheinbare Verbesserung könnte sein, dass die Zellen nach 21 Tagen größtenteils durch den Zigarettenrauch abgetötet worden sind. Dadurch sind eventuell nur noch Osteoblasten vorhanden, welche nicht so stark beeinträchtigt wurden vom Zigarettenrauch und dadurch das Ergebnis beschönigen. Dahingehend ist der Versuchsaufbau limitierend

Auch die Versuche mit primären humanen Osteoblasten, welche wir zu Osteoblasten differenziert haben, sollten noch vertieft werden. Hier würde ich eine höhere N-Nummer vorschlagen.

## 5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, wie sich aus mesenchymalen Stammzellvorläufern Osteoblasten differenzieren, welche unter dem Einfluss von Zigarettenrauch ernährt wurden. Es wurden hierzu zwei Signalwege untersucht, der BMP-Signalweg und der Wnt-Signalweg, wessen Genexpressionen mithilfe von PCRs analysiert wurden. Zweiter Teil des Versuches war es, den gleichen Versuchsaufbau auf menschliche Zellen zu übertragen. Die Inkubationszeit für die SCP-1 Zellen betrug entweder 7, 14 oder 21 Tage. Die menschlichen Osteoblasten wurden lediglich 14 Tage inkubiert. Die verschiedenen Konzentrationen an Zigarettenrauch waren von 0% über 0,1%, 0,5%, 1%, 5% bis zu 10%. An den Zelllinien, den SCP-1 Zellen konnte eine signifikante Veränderung in den beiden Signalwegen festgestellt werden. Beide Signalwege wurden unter dem Einfluss von Zigarettenrauch signifikant herunterreguliert. Es konnte auch festgestellt werden, dass die molekulare Veränderung mit einer erhöhten Zigarettenrauchkonzentration zusammenhängt. Je höher die Konzentration an Zigarettenrauch, desto geringer war die Genexpression der zu untersuchenden Gene. Die größte Veränderung wurde des Weiteren nach einer Inkubationszeit von 14 Tagen erreicht. Hieraus lässt sich schließen, dass eine Inkubationszeit von 7 Tagen zu kurz ist, eine Inkubationszeit von 21 Tagen jedoch eventuell zu lange. Nach 21 Tagen lässt sich eine Adaption der Zellen an den Zigarettenrauch vermuten. Die humanen Osteoblasten wurden lediglich 14 Tage inkubiert, da dort bei den Zelllinien die besten Ergebnisse erzielt wurden. Dies wurde auf die Osteoblasten übertragen. Bei dieser Versuchsreihe konnte keine eindeutige Veränderung der Genexpression festgestellt werden.

## 6 Literaturverzeichnis

- Aaij, C. und Borst, P. (1972): The gel electrophoresis of DNA. *Biochim Biophys Acta.* 269(2): S. 192-200.
- Abate, M., Vanni, D., Pantalone, A. und Salini, V. (2013): Cigarette smoking and musculoskeletal disorders. *Muscles Ligaments Tendons J.* 3(2): S. 63-9.
- Aktion\_gesunde\_Knochen-keine\_Chance\_für\_Osteoporose (2018): Osteoporose und Diabetes, [online]. - URL: <http://www.aktiongesundeknochen.at/osteoporose/osteoporose-und-andere-krankheiten/osteoporose-und-diabetes.html> [Zugriff: 10.03.2018].
- Aoki, H., Fujii, M., Imamura, T., Yagi, K., Takehara, K., Kato, M. und Miyazono, K. (2001): Synergistic effects of different bone morphogenetic protein type I receptors on alkaline phosphatase induction. *J Cell Sci.* 114(Pt 8): S. 1483-9.
- Aquino-Martinez, R., Artigas, N., Gamez, B., Rosa, J. L. und Ventura, F. (2017): Extracellular calcium promotes bone formation from bone marrow mesenchymal stem cells by amplifying the effects of BMP-2 on SMAD signalling. *PLoS One.* 12(5): S. e0178158.
- Balemans, W., Ebeling, M., Patel, N., Van Hul, E., Olson, P., Dioszegi, M., Lacza, C., Wuyts, W., Van Den Ende, J., Willems, P., Paes-Alves, A. F., Hill, S., Bueno, M., Ramos, F. J., Tacconi, P., Dikkers, F. G., Stratakis, C., Lindpaintner, K., Vickery, B., Foerzler, D. und Van Hul, W. (2001): Increased bone density in sclerosteosis is due to the deficiency of a novel secreted protein (SOST). *Hum Mol Genet.* 10(5): S. 537-43.
- Barreiro, E., Peinado, V. I., Galdiz, J. B., Ferrer, E., Marin-Corral, J., Sanchez, F., Gea, J., Barbera, J. A. und Project, Enigma in COPD (2010): Cigarette smoke-induced oxidative stress: A role in chronic obstructive pulmonary disease skeletal muscle dysfunction. *Am J Respir Crit Care Med.* 182(4): S. 477-88.
- Benowitz, N. L., Hukkanen, J. und Jacob, P., 3rd (2009): Nicotine chemistry, metabolism, kinetics and biomarkers. *Handb Exp Pharmacol.* (192): S. 29-60.
- Berbari, N. F., Sharma, N., Malarkey, E. B., Pieczynski, J. N., Boddu, R., Gaertig, J., Guay-Woodford, L. und Yoder, B. K. (2013): Microtubule modifications and stability are altered by cilia perturbation and in cystic kidney disease. *Cytoskeleton (Hoboken).* 70(1): S. 24-31.
- Bharadwaj, S., Naidu, A. G., Betageri, G. V., Prasadarao, N. V. und Naidu, A. S. (2009): Milk ribonuclease-enriched lactoferrin induces positive effects on bone turnover markers in postmenopausal women. *Osteoporos Int.* 20(9): S. 1603-11.
- BMG\_LABTECH\_The\_Microplate\_Reader\_Company (2017): Omega Series - Single- und multi-mode Microplate Reader mit individueller Ausstattung, [online]. - URL: <https://www.bmglabtech.com/de/omega-serie/> [Zugriff: 19.08.2017].
- Bocker, W., Yin, Z., Drosse, I., Haasters, F., Rossmann, O., Wierer, M., Popov, C., Locher, M., Mutschler, W., Docheva, D. und Schieker, M. (2008): Introducing a single-cell-derived human mesenchymal stem cell line

- expressing hTERT after lentiviral gene transfer. *J Cell Mol Med.* 12(4): S. 1347-59.
- Braun, K. F., Ehnert, S., Freude, T., Egana, J. T., Schenck, T. L., Buchholz, A., Schmitt, A., Siebenlist, S., Schyschka, L., Neumaier, M., Stockle, U. und Nussler, A. K. (2011): Quercetin protects primary human osteoblasts exposed to cigarette smoke through activation of the antioxidative enzymes HO-1 and SOD-1. *ScientificWorldJournal.* 11: S. 2348-57.
- Canalis, E. (2010): Update in new anabolic therapies for osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 95(4): S. 1496-504.
- Chen, G. und Ito, Y. (2001): Gradient micropattern immobilization of EGF to investigate the effect of artificial juxtacrine stimulation. *Biomaterials.* 22(18): S. 2453-7.
- Czekanska, E. M., Stoddart, M. J., Ralphs, J. R., Richards, R. G. und Hayes, J. S. (2014): A phenotypic comparison of osteoblast cell lines versus human primary osteoblasts for biomaterials testing. *J Biomed Mater Res A.* 102(8): S. 2636-43.
- David, D., Nair, S. A. und Pillai, M. R. (2013): Smurf E3 ubiquitin ligases at the cross roads of oncogenesis and tumor suppression. *Biochim Biophys Acta.* 1835(1): S. 119-28.
- Day, T. F., Guo, X., Garrett-Beal, L. und Yang, Y. (2005): Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis. *Dev Cell.* 8(5): S. 739-50.
- Derynck, R. und Zhang, Y. E. (2003): Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature.* 425(6958): S. 577-84.
- DeutscheKrebsgesellschaft (2015): Rauchen - Zahlen und Fakten, [online]. - URL: <https://www.krebsgesellschaft.de/onko-internetportal/basis-informationen-krebs/bewusst-leben/rauchen-zahlen-und-fakten.html> [Zugriff: 11.08.2017].
- Ehnert, S., Baur, J., Schmitt, A., Neumaier, M., Lucke, M., Dooley, S., Vester, H., Wildemann, B., Stockle, U. und Nussler, A. K. (2010): TGF-beta1 as possible link between loss of bone mineral density and chronic inflammation. *PLoS One.* 5(11): S. e14073.
- Ehnert, S., Zhao, J., Pscherer, S., Freude, T., Dooley, S., Kolk, A., Stockle, U., Nussler, A. K. und Hube, R. (2012): Transforming growth factor beta1 inhibits bone morphogenic protein (BMP)-2 and BMP-7 signaling via upregulation of Ski-related novel protein N (SnoN): possible mechanism for the failure of BMP therapy? *BMC Med.* 10: S. 101.
- Einhorn, T. A. und Gerstenfeld, L. C. (2015): Fracture healing: mechanisms and interventions. *Nat Rev Rheumatol.* 11(1): S. 45-54.
- Forget, M. A., Turcotte, S., Beauseigle, D., Godin-Ethier, J., Pelletier, S., Martin, J., Tanguay, S. und Lapointe, R. (2007): The Wnt pathway regulator DKK1 is preferentially expressed in hormone-resistant breast tumours and in some common cancer types. *Br J Cancer.* 96(4): S. 646-53.
- Garant, P.R. (2003): Oral cells and tissues. Chicago: Quintessence Pub. Co. S. Glass, D. A., 2nd, Bialek, P., Ahn, J. D., Starbuck, M., Patel, M. S., Clevers, H., Taketo, M. M., Long, F., McMahon, A. P., Lang, R. A. und Karsenty, G.

- (2005): Canonical Wnt signaling in differentiated osteoblasts controls osteoclast differentiation. *Dev Cell.* 8(5): S. 751-64.
- Gong, Y., Slee, R. B., Fukai, N., Rawadi, G., Roman-Roman, S., Reginato, A. M., Wang, H., Cundy, T., Glorieux, F. H., Lev, D., Zacharin, M., Oexle, K., Marcelino, J., Suwairi, W., Heeger, S., Sabatakos, G., Apte, S., Adkins, W. N., Allgrove, J., Arslan-Kirchner, M., Batch, J. A., Beighton, P., Black, G. C., Boles, R. G., Boon, L. M., Borrone, C., Brunner, H. G., Carle, G. F., Dallapiccola, B., De Paepe, A., Floege, B., Halfhide, M. L., Hall, B., Hennekam, R. C., Hirose, T., Jans, A., Juppner, H., Kim, C. A., Keppler-Noreuil, K., Kohlschuetter, A., LaCombe, D., Lambert, M., Lemyre, E., Letteboer, T., Peltonen, L., Ramesar, R. S., Romanengo, M., Somer, H., Steichen-Gersdorf, E., Steinmann, B., Sullivan, B., Superti-Furga, A., Swoboda, W., van den Boogaard, M. J., Van Hul, W., Vikkula, M., Votruba, M., Zabel, B., Garcia, T., Baron, R., Olsen, B. R., Warman, M. L. und Osteoporosis-Pseudoglioma Syndrome Collaborative, Group (2001): LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development. *Cell.* 107(4): S. 513-23.
- Govender, S., Csimma, C., Genant, H. K., Valentin-Opran, A., Amit, Y., Arbel, R., Aro, H., Atar, D., Bishay, M., Borner, M. G., Chiron, P., Choong, P., Cinats, J., Courtenay, B., Feibel, R., Geulette, B., Gravel, C., Haas, N., Raschke, M., Hammacher, E., van der Velde, D., Hardy, P., Holt, M., Josten, C., Ketterl, R. L., Lindeque, B., Lob, G., Mathevon, H., McCoy, G., Marsh, D., Miller, R., Munting, E., Oevre, S., Nordsletten, L., Patel, A., Pohl, A., Rennie, W., Reynders, P., Rommens, P. M., Rondia, J., Rossouw, W. C., Daneel, P. J., Ruff, S., Ruter, A., Santavirta, S., Schildhauer, T. A., Gekle, C., Schnettler, R., Segal, D., Seiler, H., Snowdowne, R. B., Stapert, J., Taglang, G., Verdonk, R., Vogels, L., Weckbach, A., Wentzensen, A., Wisniewski, T. und Group, B. M. P. Evaluation in Surgery for Tibial Trauma Study (2002): Recombinant human bone morphogenetic protein-2 for treatment of open tibial fractures: a prospective, controlled, randomized study of four hundred and fifty patients. *J Bone Joint Surg Am.* 84-A(12): S. 2123-34.
- Grabowski, g. (2006): Polymerase als Lückenfüller, Zielgerichtete Mutagenese Teil 2, [online]. - URL: <http://www.laborjournal.de/rubric/methoden/methoden/v68.lasso> [Zugriff: 09.08.2017].
- Guerrero-Esteo, M, Sanchez-Elsner, T, Letamendia, A und Bernabeu, C (2002): Extrazelluläre und zytoplasmatische Domänen von Endoglin interagieren mit den transformierenden Wachstumsfaktor-Beta-Rezeptoren I und II. *The Journal of Biological Chemistry.* 277(32): S. 29197-209.
- Hahn, G. V., Cohen, R. B., Wozney, J. M., Levitz, C. L., Shore, E. M., Zasloff, M. A. und Kaplan, F. S. (1992): A bone morphogenetic protein subfamily: chromosomal localization of human genes for BMP5, BMP6, and BMP7. *Genomics.* 14(3): S. 759-62.
- Hartmann, C. (2006): A Wnt canon orchestrating osteoblastogenesis. *Trends Cell Biol.* 16(3): S. 151-8.
- Hoffmann, A. und Gross, G. (2001): BMP signaling pathways in cartilage and bone formation. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 11(1-3): S. 23-45.

- Holzer, N., Braun, K. F., Ehnert, S., Egana, J. T., Schenck, T. L., Buchholz, A., Schyschka, L., Neumaier, M., Benzing, S., Stockle, U., Freude, T. und Nussler, A. K. (2012): Green tea protects human osteoblasts from cigarette smoke-induced injury: possible clinical implication. *Langenbecks Arch Surg.* 397(3): S. 467-74.
- Horn, F., Moc, I., Schneider, N., Grillhösl, C., Berghold, S. und Lindenmeier, G. (2003): Die Phase der Energieerzeugung - von Glycerol-3-Phosphat zu Pyruvat, In: F. Horn, I. Moc, N. Schneider, C. Grillhösl, S. Berghold und G. Lindenmeier (Hrsg.): *Biochemie des Menschens - das Lehrbuch für das Medizinstudium*, 3., Georg Thieme Verlag - Stuttgart, New York, S. S. 80.
- Jaiswal, N., Haynesworth, S. E., Caplan, A. I. und Bruder, S. P. (1997): Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem.* 64(2): S. 295-312.
- Jayaraman, L. und Massague, J. (2000): Distinct oligomeric states of SMAD proteins in the transforming growth factor-beta pathway. *J Biol Chem.* 275(52): S. 40710-7.
- Kanis, J. A., Johnell, O., Oden, A., Borgstrom, F., Johansson, H., De Laet, C. und Jonsson, B. (2005): Intervention thresholds for osteoporosis in men and women: a study based on data from Sweden. *Osteoporos Int.* 16(1): S. 6-14.
- Keck, A-V. und Pecherstorfer, M. (2003): Knochenstoffwechsel bei malignen Erkrankungen. *Journal für Mineralstoffwechsel und Mukoskeletale Erkrankungen.* 10(2): S. 6-11.
- Kenkre, J. S. und Bassett, J. (2018): The bone remodelling cycle. *Ann Clin Biochem.* S. 4563218759371.
- Krishnan, V., Bryant, H. U. und Macdougald, O. A. (2006): Regulation of bone mass by Wnt signaling. *J Clin Invest.* 116(5): S. 1202-9.
- Lian, J. B., Javed, A., Zaidi, S. K., Lengner, C., Montecino, M., van Wijnen, A. J., Stein, J. L. und Stein, G. S. (2004): Regulatory controls for osteoblast growth and differentiation: role of Runx/Cbfa/AML factors. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 14(1-2): S. 1-41.
- Linß, W. und Fanghänel, J. (1998): Zytologie, allgemeine Histologie, mikroskopische Anatomie, In: W. Linß und J. Fanghänel (Hrsg.): *Histologie*, 1., Walter de Gruyter, S. S.65-68.
- Lüllmann-Rauch, R. (2009): Ossifikation, In: R. Lüllmann-Rauch (Hrsg.): *Taschenlehrbuch Histologie*, 3., Georg Thieme Verlag KG Stuttgart, S. S.162-165.
- Lyons, K. M., Pelton, R. W. und Hogan, B. L. (1990): Organogenesis and pattern formation in the mouse: RNA distribution patterns suggest a role for bone morphogenetic protein-2A (BMP-2A). *Development.* 109(4): S. 833-44.
- Mak, K. K., Bi, Y., Wan, C., Chuang, P. T., Clemens, T., Young, M. und Yang, Y. (2008): Hedgehog signaling in mature osteoblasts regulates bone formation and resorption by controlling PTHrP and RANKL expression. *Dev Cell.* 14(5): S. 674-88.
- Manske, M. (2003): Agarose-Gelelektrophorese, [online]. - URL: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Agarose-Gelelektrophorese.png> [Zugriff: 18.08.2017].

- Marsell, R. und Einhorn, T. A. (2011): The biology of fracture healing. *Injury*. 42(6): S. 551-5.
- Marsh, D. R. und Li, G. (1999): The biology of fracture healing: optimising outcome. *Br Med Bull*. 55(4): S. 856-69.
- Miyazono, K., Kamiya, Y. und Morikawa, M. (2010): Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction. *J Biochem*. 147(1): S. 35-51.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. und Erlich, H. (1986): Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 51 Pt 1: S. 263-73.
- Nakao, A., Afrakhte, M., Moren, A., Nakayama, T., Christian, J. L., Heuchel, R., Itoh, S., Kawabata, M., Heldin, N. E., Heldin, C. H. und ten Dijke, P. (1997): Identification of Smad7, a TGFbeta-inducible antagonist of TGF-beta signalling. *Nature*. 389(6651): S. 631-5.
- NationalCenterforBiotechnologyInformation (2017): Primer-BLAST: Finding primers specific to your PCR template (using Primer3 and BLAST). , [online]. - URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> [Zugriff: 12.08.2017].
- Niehrs, C. (2006): Function and biological roles of the Dickkopf family of Wnt modulators. *Oncogene*. 25(57): S. 7469-81.
- Nohe, A., Keating, E., Knaus, P. und Petersen, N. O. (2004): Signal transduction of bone morphogenetic protein receptors. *Cell Signal*. 16(3): S. 291-9.
- Novara, G., Svatek, R. S., Karakiewicz, P. I., Skinner, E., Ficarra, V., Fradet, Y., Lotan, Y., Isbarn, H., Capitanio, U., Bastian, P. J., Kassouf, W., Fritsche, H. M., Izawa, J. I., Tilki, D., Dinney, C. P., Lerner, S. P., Schoenberg, M., Volkmer, B. G., Sagalowsky, A. I. und Shariat, S. F. (2010): Soft tissue surgical margin status is a powerful predictor of outcomes after radical cystectomy: a multicenter study of more than 4,400 patients. *J Urol*. 183(6): S. 2165-70.
- Patel, R. A., Wilson, R. F., Patel, P. A. und Palmer, R. M. (2013): The effect of smoking on bone healing: A systematic review. *Bone Joint Res*. 2(6): S. 102-11.
- Peqlab\_a\_VWR\_company (2017): peqGold TriFast™ Optimierte Guanidinisothiocyanat/Phenol-Methode für die gleichzeitige Extraktion von RNA, DNA und Proteinen, [online]. - URL: [https://ru.vwr.com/assetsvc/asset/ru\\_RU/id/17035117/contents](https://ru.vwr.com/assetsvc/asset/ru_RU/id/17035117/contents) [Zugriff: 18.08.2017].
- Pinzone, J. J., Hall, B. M., Thudi, N. K., Vonau, M., Qiang, Y. W., Rosol, T. J. und Shaughnessy, J. D., Jr. (2009): The role of Dickkopf-1 in bone development, homeostasis, and disease. *Blood*. 113(3): S. 517-25.
- Pötschke-Langer, Dr. Martina, Kahnert, Dipl.-Biol. Sarah, Schaller, Dr. Katrin, Viarisio, Dr. Verena, Heidt, Dipl.-Biol. Christopher, Schunk, Susanne, Mons, Dr. Ute, Fode, Kristin, Schoppa, Dr. Andreas, Lampert, PD Dr. Thomas, Kuntz, Dr. Benjamin, Kienle, Dr. Udo, Kraus, Prof. Dr. Ludwig und Piontek, Dr. Daniela (2015a): Gesundheitliche Folgen des Rauchens, In: Dr. Martina Pötschke-Langer, Dipl.-Biol. Sarah Kahnert, Dr. Katrin Schaller, Dr. Verena Viarisio, Dipl.-Biol. Christopher Heidt, Susanne Schunk, Dr. Ute Mons, Kristin Fode, Dr. Andreas Schoppa, PD Dr. Thomas Lampert, Dr. Benjamin Kuntz, Dr. Udo Kienle, Prof. Dr. Ludwig

- Kraus und Dr. Daniela Piontek (Hrsg.): Tabakatlas Deutsche 2015, 1., Deutsches Krebsforschungszentrum, Pabst Science Publishers, Heidelberg, S. S.27.
- Pötschke-Langer, Dr. Martina, Kahnert, Dipl.-Biol. Sarah, Schaller, Dr. Katrin, Viariso, Dr. Verena, Heidt, Dipl.-Biol. Christopher, Schunk, Susanne, Mons, Dr. Ute, Fode, Kristin, Schoppa, Dr. Andreas, Lampert, PD Dr. Thomas, Kuntz, Dr. Benjamin, Kienle, Dr. Udo, Kraus, Prof. Dr. Ludwig und Piontek, Dr. Daniela (2015b): In Tabakprodukten verwendete Zusatzstoffe, In: Dr. Martina Pötschke-Langer, Dipl.-Biol. Sarah Kahnert, Dr. Katrin Schaller, Dr. Verena Viariso, Dipl.-Biol. Christopher Heidt, Susanne Schunk, Dr. Ute Mons, Kristin Fode, Dr. Andreas Schoppa, PD Dr. Thomas Lampert, Dr. Benjamin Kuntz, Dr. Udo Kienle, Prof. Dr. Ludwig Kraus und Dr. Daniela Piontek (Hrsg.): Tabakatlas Deutsche 2015, 1., Deutsches Krebsforschungszentrum, Pabst Science Publishers, Heidelberg, S. S.8.
- Pötschke-Langer, Dr. Martina, Kahnert, Dipl.-Biol. Sarah, Schaller, Dr. Katrin, Viariso, Dr. Verena, Heidt, Dipl.-Biol. Christopher, Schunk, Susanne, Mons, Dr. Ute, Fode, Kristin, Schoppa, Dr. Andreas, Lampert, PD Dr. Thomas, Kuntz, Dr. Benjamin, Kienle, Dr. Udo, Kraus, Prof. Dr. Ludwig und Piontek, Dr. Daniela (2015c): Tabakkonsum und gesundheitliche Folgen, Passivrauchen und gesundheitliche Folgen, In: Dr. Martina Pötschke-Langer, Dipl.-Biol. Sarah Kahnert, Dr. Katrin Schaller, Dr. Verena Viariso, Dipl.-Biol. Christopher Heidt, Susanne Schunk, Dr. Ute Mons, Kristin Fode, Dr. Andreas Schoppa, PD Dr. Thomas Lampert, Dr. Benjamin Kuntz, Dr. Udo Kienle, Prof. Dr. Ludwig Kraus und Dr. Daniela Piontek (Hrsg.): Tabakatlas Deutsche 2015, 1., Deutsches Krebsforschungszentrum, Pabst Science Publishers, Heidelberg, S. S.36-61.
- Pötschke-Langer, Dr. Martina, Kahnert, Dipl.-Biol. Sarah, Schaller, Dr. Katrin, Viariso, Dr. Verena, Heidt, Dipl.-Biol. Christopher, Schunk, Susanne, Mons, Dr. Ute, Fode, Kristin, Schoppa, Dr. Andreas, Lampert, PD Dr. Thomas, Kuntz, Dr. Benjamin, Kienle, Dr. Udo, Kraus, Prof. Dr. Ludwig und Piontek, Dr. Daniela (2015d): Tabakprodukte, E-Inhalationsprodukte, Tabakkonsum und gesundheitliche Folgen, In: Dr. Martina Pötschke-Langer, Dipl.-Biol. Sarah Kahnert, Dr. Katrin Schaller, Dr. Verena Viariso, Dipl.-Biol. Christopher Heidt, Susanne Schunk, Dr. Ute Mons, Kristin Fode, Dr. Andreas Schoppa, PD Dr. Thomas Lampert, Dr. Benjamin Kuntz, Dr. Udo Kienle, Prof. Dr. Ludwig Kraus und Dr. Daniela Piontek (Hrsg.): Tabakatlas Deutsche 2015, 1., Deutsches Krebsforschungszentrum, Pabst Science Publishers, Heidelberg, S. S.10-31.
- Radlanski, R.J. (2011): Orale Struktur- und Entwicklungsbiologie. 1.Auflage Berlin: Quintessenz Verlags-GmbH. S.
- Raisz, L. G. (1999): Physiology and pathophysiology of bone remodeling. Clin Chem. 45(8 Pt 2): S. 1353-8.
- Rodriguez-Pena, A., Prieto, M., Duwel, A., Rivas, J. V., Eleno, N., Perez-Barriocanal, F., Arevalo, M., Smith, J. D., Vary, C. P., Bernabeu, C. und Lopez-Novoa, J. M. (2001): Up-regulation of endoglin, a TGF-beta-binding



- protein, in rats with experimental renal fibrosis induced by renal mass reduction. *Nephrol Dial Transplant.* 16 Suppl 1: S. 34-9.
- Rosenzweig, B. L., Imamura, T., Okadome, T., Cox, G. N., Yamashita, H., ten Dijke, P., Heldin, C. H. und Miyazono, K. (1995): Cloning and characterization of a human type II receptor for bone morphogenetic proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92(17): S. 7632-6.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. und Erlich, H. A. (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 239(4839): S. 487-91.
- Sambrook, J.F. und Russell, D.W. (2001): 9: Purification of Plasmid DNA by Chromatography, In: J.F. Sambrook und D.W. Russell (Hrsg.): *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, S. 1.62.
- Schedlich, L. J., Flanagan, J. L., Crofts, L. A., Gillies, S. A., Goldberg, D., Morrison, N. A. und Eisman, J. A. (1994): Transcriptional activation of the human osteocalcin gene by basic fibroblast growth factor. *J Bone Miner Res.* 9(2): S. 143-52.
- Schmidmaier, G., Schwabe, P., Wildemann, B. und Haas, N. P. (2007): Use of bone morphogenetic proteins for treatment of non-unions and future perspectives. *Injury.* 38 Suppl 4: S. S35-41.
- Schmitz, M. A., Finnegan, M., Natarajan, R. und Champine, J. (1999): Effect of smoking on tibial shaft fracture healing. *Clin Orthop Relat Res.* (365): S. 184-200.
- Semenov, M., Tamai, K. und He, X. (2005): SOST is a ligand for LRP5/LRP6 and a Wnt signaling inhibitor. *J Biol Chem.* 280(29): S. 26770-5.
- Sfeir, C., Ho, M. K., Doll, B. A., Azari, K. und Hollinger, J. O. (2015): Fracture Repair, In: J. R. Lieberman und G. E. Friedlaender (Hrsg.): *Bone Regeneration and Repair*, Humana Press, Totowa, New Jersey, S. 21-44.
- Shibli, J. A., Piattelli, A., Iezzi, G., Cardoso, L. A., Onuma, T., de Carvalho, P. S., Susana, d, Ferrari, D. S., Mangano, C. und Zenobio, E. G. (2010): Effect of smoking on early bone healing around oxidized surfaces: a prospective, controlled study in human jaws. *J Periodontol.* 81(4): S. 575-83.
- Sodek, J. und McKee, M. D. (2000): Molecular and cellular biology of alveolar bone. *Periodontol* 2000. 24: S. 99-126.
- Sreekumar, V., Aspera-Werz, R., Ehnert, S., Strobel, J., Tendulkar, G., Heid, D., Schreiner, A., Arnscheidt, C. und Nussler, A. K. (2017): Resveratrol protects primary cilia integrity of human mesenchymal stem cells from cigarette smoke to improve osteogenic differentiation in vitro. *Arch Toxicol.* S.
- statistisches Bundesamt (2014): Gesundheitswesen - Fragen zur Gesundheit - Rauchgewohnheiten der Bevölkerung - Mikrozensus 2013. Wiesbaden, [online]. - URL: <http://www.dhs.de/datenfakten/tabak.html> [Zugriff: 18.08.2017].
- Sung, I. Y., Park, B. C., Hah, Y. S., Cho, H. Y., Yun, J. W., Park, B. W., Kang, Y. H., Kim, H. C., Hwang, S. C., Rho, G. J., Kim, U. K., Woo, D. K., Oh, S. H. und Byun, J. H. (2015): FOXO1 Is Involved in the Effects of Cigarette

- Smoke Extract on Osteoblastic Differentiation of Cultured Human Periosteum-derived Cells. *Int J Med Sci.* 12(11): S. 881-90.
- Swaminathan, R. (2001): Biochemical markers of bone turnover. *Clin Chim Acta.* 313(1-2): S. 95-105.
- Takase, M., Imamura, T., Sampath, T. K., Takeda, K., Ichijo, H., Miyazono, K. und Kawabata, M. (1998): Induction of Smad6 mRNA by bone morphogenetic proteins. *Biochem Biophys Res Commun.* 244(1): S. 26-9.
- Teixeira, C. C., Liu, Y., Thant, L. M., Pang, J., Palmer, G. und Alikhani, M. (2010): Foxo1, a novel regulator of osteoblast differentiation and skeletogenesis. *J Biol Chem.* 285(40): S. 31055-65.
- Temin, H. M. und Mizutani, S. (1970): RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature.* 226(5252): S. 1211-3.
- Temiyasathit, S. und Jacobs, C. R. (2010): Osteocyte primary cilium and its role in bone mechanotransduction. *Ann N Y Acad Sci.* 1192: S. 422-8.
- Tummala, P., Arnsdorf, E. J. und Jacobs, C. R. (2010): The Role of Primary Cilia in Mesenchymal Stem Cell Differentiation: A Pivotal Switch in Guiding Lineage Commitment. *Cell Mol Bioeng.* 3(3): S. 207-212.
- Urist, M. R. (1965): Bone: formation by autoinduction. *Science.* 150(3698): S. 893-9.
- Vaananen, H. K. und Laitala-Leinonen, T. (2008): Osteoclast lineage and function. *Arch Biochem Biophys.* 473(2): S. 132-8.
- Vester, H., Holzer, N., Neumaier, M., Lilianna, S., Nussler, A. K. und Seeliger, C. (2014): Green Tea Extract (GTE) improves differentiation in human osteoblasts during oxidative stress. *J Inflamm (Lond).* 11: S. 15.
- Vestergaard, P. und Mosekilde, L. (2003a): Fracture risk associated with smoking: a meta-analysis. *J Intern Med.* 254(6): S. 572-83.
- Vestergaard, P. und Mosekilde, L. (2003b): Hyperthyroidism, bone mineral, and fracture risk--a meta-analysis. *Thyroid.* 13(6): S. 585-93.
- Wahl, E. A., Schenck, T. L., Machens, H. G. und Egana, J. T. (2016): Acute stimulation of mesenchymal stem cells with cigarette smoke extract affects their migration, differentiation, and paracrine potential. *Sci Rep.* 6: S. 22957.
- Wong, P. K., Christie, J. J. und Wark, J. D. (2007): The effects of smoking on bone health. *Clin Sci (Lond).* 113(5): S. 233-41.
- Wozney, J. M. (1992): The bone morphogenetic protein family and osteogenesis. *Mol Reprod Dev.* 32(2): S. 160-7.
- Yaccoby, S. (2010): The role of the proteasome in bone formation and osteoclastogenesis. *IBMS BoneKEy.* 7: S. 147-155.
- Yang, Y. (2009): Skeletal morphogenesis during embryonic development. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 19(3): S. 197-218.
- Zhao, M., Qiao, M., Harris, S. E., Chen, D., Oyajobi, B. O. und Mundy, G. R. (2006): The zinc finger transcription factor Gli2 mediates bone morphogenetic protein 2 expression in osteoblasts in response to hedgehog signaling. *Mol Cell Biol.* 26(16): S. 6197-208.
- Zhou, Y., Jiang, R., An, L., Wang, H., Cheng, S., Qiong, S. und Weng, Y. (2017): Benzo[a]pyrene impedes self-renewal and differentiation of mesenchymal stem cells and influences fracture healing. *Sci Total Environ.* 587-588: S. 305-315.

Zunino, S. J. und Storms, D. H. (2015): Physiological levels of resveratrol metabolites are ineffective as anti-leukemia agents against Jurkat leukemia cells. *Nutr Cancer*. 67(2): S. 266-74.

## 7 Erklärung zum Eigenanteil

Ich, Julius Strobel, erkläre hiermit, die vorgelegte Dissertation mit dem Titel „Die Wirkung von Zigarettenrauch auf die Differenzierung von SCP-1 abgeleitete Osteoblasten und die Modifikation im Wnt- und BMP-Signalweg“ verfasst zu haben und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen als solche gekennzeichnet zu haben.

Die Ergebnisse folgender Versuche habe ich von den genannten Mitarbeitern des Siegfried-Weller-Instituts für Unfallchirurgische Forschung der BG-Unfallklinik Tübingen zur Verfügung gestellt bekommen:

Prof. Dr. A. Nüssler und Dr. V. Sreekumar überließen mir das Thema, halfen bei der Konzeption und betreuten die Arbeit.

Ich erkläre hiermit, dass ich alle Daten, Ergebnisse und Bilder eigenständig erarbeitet und angefertigt habe. Ich versichere an Eides statt, dass diese Angaben wahr sind und dass ich nichts verschwiegen habe. Die Arbeit habe ich selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe angefertigt. Die verwendeten Quellen und Hilfsmittel sind im Literaturverzeichnis vollständig aufgeführt. Ich versichere alles kenntlich gemacht zu haben, was aus Arbeiten anderer unverändert oder mit Abänderungen übernommen wurde.

Tübingen, den 23.04.2018

.....  
(Unterschrift)

### **IV Danksagung**

Hiermit möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die zum Gelingen meiner Doktorarbeit beigetragen haben. Besonders bedanken möchte ich mich bei:

Prof. Dr. Andreas K. Nüssler für die Bereitstellung der Mittel, für die Ermöglichung dieser Doktorarbeit, die hervorragenden Arbeitsbedingungen und die Hilfsbereitschaft, die ich während der ganzen Zeit erfahren durfte.

Frau Dr. Vrinda Srekumar und Frau Romina Aspera-Werz für ihre erstklassige Betreuung, ihr Engagement und ihre Hilfsbereitschaft. Sie haben mich in das wissenschaftliche Denken eingeführt, mir methodisch und technisch viel beigebracht und sich sehr für meine Arbeit engagiert.

Desweiteren möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Siegfried-Weller-Instituts bedanken, vor allem bei Herrn Marc Ruoß, Frau Gauri Tendulkar und Frau Hanna Scheffler, die mir bei Fragen jederzeit geholfen haben.

Meinen Eltern, die mir meine wundervolle Kindheit, mein Studium und meine Promotion ermöglichten und mir viel Kraft und Liebe gaben.

Ein besonderer Dank gilt meiner Schwester Jule, die mich immer wieder neu motiviert hat.

Zum Schluss möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Frau Aileen für den Rückhalt in schwierigen Situationen und für ihre Unterstützung bedanken.