

Etablierung eines Luciferase-Reportergen-Assays unter
Verwendung stabil transfizierter ROS 17/2.8-Zellen als
molekularbiologisches Screeningsystem für neue
osteoblastische Faktoren

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Hannover

zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation
von

Diplom-Biologe Jens van de Flierdt
geboren am 11.02.1973 in Kleve

2006

Referent: Prof. Dr. W. Müller

Koreferent: PD Dr. E. Maronde

Tag der Promotion: 17.02.2006

Zusammenfassung: Die Osteoporose ist die weltweit verbreitetste Knochenerkrankung. Sie ist durch eine Abnahme der Knochenmasse, eine Veränderung in der Mikroarchitektur des Knochens und eine daraus resultierende Erhöhung des Frakturrisikos gekennzeichnet. Obwohl es bereits effektive Medikamente zur Behandlung der Osteoporose gibt, besteht nach wie vor der Bedarf für neue osteoanabole Verbindungen. Inhalt dieser Arbeit ist die Etablierung eines Screeningsystems zur Detektion osteoanaboler Faktoren auf molekularbiologischer Grundlage. Zu diesem Zweck wurden die Promotorregionen der Osteoblastenspezifischen Gene, core binding factor alpha 1 (Cbfa1) und Osteocalcin, kloniert und in Luciferase-Reportergenkonstrukte integriert. Anschließend erfolgte die stabile Transfektion der Konstrukte in osteoblastäre ROS 17/2.8-Zellen. Anhand zweier Einzelklone konnte die Wirkung verschiedener pharmakologisch wirksamer Substanzen auf die beiden Reportergenkonstrukte gezeigt werden. Ferner wurden durch Einsatz des Reportergen-Assays auf Basis des Osteocalcin-Promotors im Screening sowohl in einer Peptidbank aus humanem Hämofiltrat als auch in einer Schweinemagen-Peptidbank mehrere aktive Fraktionen nachgewiesen. Die chromatographische Auftrennung zweier ausgewählter Peptidbankfraktionen resultierte in einer partiellen Aufreinigung der biologisch aktiven Komponenten. Dabei konnte durch Verfolgung der Aktivitäten mit Hilfe des Reportergen-Assays über mehrere Reinigungsstufen die Funktionalität des etablierten Screeningsystems bestätigt werden.

Schlagerworte: Luciferase-Reportergen-Assay, ROS 17/2.8, Osteocalcin

Abstract: Osteoporosis is the most common bone disease worldwide. Osteoporotic patients have a reduced bone mineral density and an increased fracture risk due to changes in the microarchitecture of the bone tissue. Several pharmacological substances are already available for the effective treatment of osteoporosis. Nevertheless there is still need for new agents to be developed for improved management of osteoporosis in the future. In this work a luciferase based reporter gene assay for detection of new osteoanabolic substances is described and established as a valuable screening tool. Promotor fragments of two osteoblast-specific genes - osteocalcin and core binding factor alpha 1 (cbfa1) - have been cloned and ligated into luciferase reporter gene constructs. The latter have been stably transfected into the rat osteosarcoma cell line ROS 17/2.8. Subsequently single clones have been isolated. Using two stable transfectants the effects of different pharmacological substances on the reporter gene constructs have been shown. Furthermore the screening of both, a human hemofiltrate peptide library and one derived from porcine stomach, revealed several fractions capable to increase the activity of the osteocalcin-based reporter gene construct. The biologically active compounds of two selected fractions were partially purified using high performance liquid chromatography (HPLC). Activities have been detected with the reporter gene assay, validating its functionality.

Keywords: luciferase reporter gene assay, ROS 17/2.8, osteocalcin

Inhaltsverzeichnis:

1. Einleitung.....	1
1.1. Funktion, Aufbau und Entwicklung von Knochen.....	1
1.1.1. Osteoblasten	4
1.1.2. Osteozyten	4
1.1.3. Bone lining cells	4
1.1.4. Osteoklasten.....	5
1.2. Knochenstoffwechsel.....	5
1.2.1. Kalziumhomöostase.....	9
1.2.2. Erkrankungen des Knochenstoffwechsels	11
1.2.3. Behandlungsmöglichkeiten der Osteoporose.....	12
1.3. Funktion von Cbfa1 und Osteocalcin im Knochenstoffwechsel.....	15
1.4. Hämofiltrat und Schweinemagen als Quellen für neue osteoanabole Faktoren	18
1.5. Aufgabenstellung.....	20
2. Material und Methoden	21
2.1. Materialien, Organismen und Anzuchtbedingungen	21
2.1.1. Herstellung und Sterilisation von Lösungen	21
2.1.2. Verwendete Organismen und Plasmide	21
2.1.3. Allgemeine Kulturbedingungen	22
2.1.4. Herstellung von LB (Luria-Bertani)-Agarplatten und flüssigem LB-Medium	22
2.1.5. Kits und Enzyme	23
2.1.6. Restriktionsendonukleasen, DNA-modifizierende Enzyme	23
2.1.7. Verwendete Oligonukleotide (Primer)	24
2.1.8. Geräte und Apparaturen	25
2.1.9. Computer und Programme	26
2.2. Herstellung der Reportergenkonstrukte	27
2.2.1. PCR - Polymerasekettenreaktion.....	27
2.2.1.1. Standard-PCR.....	27
2.2.1.2. RT-PCR.....	28
2.2.1.3. Kolonie-PCR.....	29
2.2.2. Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA	30
2.2.3. Isolierung von DNA aus Agarosegelen.....	31
2.2.4. Klonierung in den pCR [®] 2.1-Vektor	31
2.2.4.1. Ligation	32
2.2.4.2. Transformation von Plasmid-DNA in kompetente <i>E. coli</i> -Zellen.....	32
2.2.4.3. Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien.....	33
2.2.4.4. Restriktionsverdau von Plasmid-DNA	34
2.2.5. Sequenzierung von DNA	34
2.2.6. Klonierung in den pGL2-basic-Vektor	36
2.2.6.1. Herstellung endotoxinfreier Plasmid-DNA.....	36
2.2.6.2. Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration.....	37
2.2.6.3. Verdau des pGL2-basic-Vektors	37

2.2.6.4. Verdau von pCR2.1-osteo und pCR2.1-cbfa.....	38
2.2.6.5. Aufreinigung von geschnittener DNA	38
2.2.6.6. Dephosphorylierung von geschnittener DNA	39
2.2.6.7. Auffüllen von überhängenden DNA-Enden	39
2.2.6.8. Ligation in den pGL2-basic-Vektor	40
2.2.6.9. Transformation von Plasmid-DNA in kompetente <i>E.coli</i> -XL10-Gold-Zellen.....	41
2.2.7. Herstellung transformationskompetenter Zellen	41
2.2.8. Isolierung von RNA aus eukaryotischen Zellen	42
2.2.9. DNase-Verdau von RNA-Lösungen	42
2.2.10. Herstellung von cDNA (Erststrangsynthese)	43
2.3. Kultivierung eukaryotischer Zellen.....	44
2.3.1. Allgemeine Zellkulturbedingungen	44
2.3.1.1. Subkultivierung	46
2.3.1.2. Auftauen kryokonservierter Zellen	46
2.3.1.3. Kryokonservierung von Zellen.....	47
2.3.2. Beschichtung von Kulturgefäßen mit Kollagen.....	47
2.3.3. Transfektion von Zellen	48
2.3.3.1. Transiente Transfektion von Zellen	48
2.3.3.2. Stabile Transfektion von ROS 17/2.8-Zellen	49
2.3.4. Isolierung von Einzelklonen.....	50
2.3.5. Stimulation transfizierter Zellen	51
2.3.6. Luciferase-Reportergen-Assay	52
2.3.7. Bestimmung der Zellvitalität (WST-1).....	53
2.3.8. Alkalische Phosphatase Test.....	53
2.4. Aufreinigung osteoanaboler Substanzen	54
2.4.1. Präparation einer Hämofiltrat-Peptidbank	54
2.4.2. Präparation einer Schweinemagen-Peptidbank.....	54
2.4.2.1. Vorbereitung des Materials, Peptidextraktion und Filtration	54
2.4.2.2. Ultra- und Diafiltration	55
2.4.2.3. Chromatographische Auftrennung	55
2.4.3. Gefriertrocknung von Peptiden	57
2.4.4. Chromatographische Methoden	57
2.4.4.1. Umkehrphasenchromatographie (RPC)	57
2.4.4.2. Kationenaustauschchromatographie (CEC).....	57
2.4.4.3. Entsalzung von Fraktionen der Kationenaustauschchromatographie	58
2.4.4.4. Größenausschlußchromatographie (SEC)	58
2.4.4.5. Aufreinigung osteoanaboler Aktivitäten aus Hämofiltrat und Schweinemagen.....	58
2.5. Analytische Methoden	60
2.5.1. Massenspektrometrie.....	60
2.5.2. Kapillarzonenelektrophorese.....	60
2.5.3. Hydrolyse von Peptiden mit der Protease Subtilisin.....	61
3. Ergebnisse	62
3.1. Etablierung des Bioassays	62
3.1.1. Herstellung der Reportergenkonstrukte	64
3.1.1.1. Klonierung in den pCR [®] 2.1-Vektor.....	64

3.1.1.2. Umklonierung in den pGL2-basic-Vektor	66
3.1.2. Transfektion eukaryotischer Zellen.....	68
3.1.2.1. Optimierung der Transfektionsparameter.....	68
3.1.2.2. Verifizierung der Promotoraktivität und Auswahl der Positivkontrolle	71
3.1.3. Stabile Transfektion von ROS 17/2.8-Zellen und Isolierung von Einzelklonen.....	74
3.1.4. Charakterisierung der beiden ausgewählten Einzelklone.....	76
3.1.4.1. Funktionelle Untersuchung durch Stimulation mit Vitamin D ₃	76
3.1.4.2. Nachweis der Aktivierung des endogenen Osteocalcin-Promotors mittels semiquantitativer RT-PCR.....	78
3.1.4.3. Einfluß des Zellalters auf die Promotoraktivität	79
3.1.4.4. Verifizierung des Phänotyps anhand des Alkalische Phosphatase Tests als interne Bioassay-Kontrolle	81
3.2. Stimulation der beiden ausgewählten Einzelklone mit pharmakologischen Substanzen.....	82
3.3. Aufreinigung osteoanaboler Substanzen	84
3.3.1. Herstellung der Schweinemagen-Peptidbank.....	84
3.3.2. Initiales Screening der Schweinemagen-Peptidbank	87
3.3.3. Initiales Screening der Hämofiltrat-Peptidbank.....	89
3.3.4. Bestätigung der Peptidstruktur der biologisch aktiven Komponenten in ausgewählten Peptidbankfraktionen.....	90
3.3.5. Konzentrationsabhängigkeit der osteoanabolen Wirkung ausgewählter Peptidbankfraktionen.....	91
3.3.6. Partielle Aufreinigung osteoanaboler Substanzen aus Schweinemagen	92
4. Diskussion	101
4.1. Reportergenkonstrukte als Grundlage des Screeningsystems.....	101
4.2. Transfektion osteoblastärer Zelllinien.....	104
4.3. Etablierung des Luciferase-Reportergen-Assays.....	106
4.4. Nachweis und partielle Aufreinigung osteoanaboler Faktoren in humanem Hämofiltrat und Schweinemagen	121
5. Zusammenfassung.....	123
6. Literaturverzeichnis.....	124
7. Anhang.....	137
7.1. Abkürzungsverzeichnis.....	137
7.2. DNA-Sequenz des klonierten Promotorfragments "cbfa-prom"	139
7.3. DNA-Sequenz des klonierten Promotorfragments "osteo-prom"	141

1. Einleitung

1.1. Funktion, Aufbau und Entwicklung von Knochen

Der Knochen ist eine hoch spezialisierte Form von Bindegewebe und zählt zu den härtesten Geweben des menschlichen Körpers. Er erfüllt drei Hauptaufgaben. Zum Einen sind Knochen die bedeutendsten Bestandteile des internen Stützsystems, dem Skelett. Sie bilden die Grundlage der Brust- und Beckenhöhle und dienen als Ansatzstellen der Skelettmuskeln (Liebich, 1993). Des Weiteren kommt ihnen eine Schutzfunktion zu, da sie das Knochenmark in den Hohlräumen der Spongiosa (s. u.) und den Knochenhöhlen der Diaphysen von Röhrenknochen (s. u.) umgeben (Schiebler *et al.*, 1986). Schließlich stellen Knochen ein Depot von Kalzium und Phosphor dar und sind im Kalziummetabolismus von großer Bedeutung (Marks, Jr. and Odgren, 2002).

Sowohl morphologisch als auch funktionell kann jeder Knochen in zwei Bereiche unterteilt werden. Als *Substantia compacta* wird die oberflächliche, kompakte Schicht eines Knochens bezeichnet. Ihr werden in erster Linie Stützfunktionen zugeschrieben. Die im Knocheninneren befindlichen Knochenbälkchen, die *Substantia spongiosa*, sind schwammartig aufgebaut und erfüllen primär metabolische Funktionen (Marks, Jr. and Odgren, 2002). Vergleicht man lange, kurze und flache Knochen miteinander, so können große Unterschiede in der Ausprägung der *Substantia compacta* und *Substantia spongiosa* festgestellt werden.

Lange Knochen (Röhrenknochen) sind aus einem Knochenschaft (Diaphyse) und den als Epiphysen bezeichneten Knochenenden aufgebaut. Die Epiphyse ist als Bestandteil eines Gelenks oft überknorpelt. Der Bereich zwischen Epiphyse und Diaphyse bildet die Metaphyse, welche als Epiphysenplatte dem Knochenwachstum bei der Knochenentwicklung dient. Im Bereich der Diaphyse besitzt der Knochen eine dicke *Substantia compacta* mit einer schwach ausgeprägten, sich anschließenden *Substantia spongiosa*, die das Innere des Knochens nicht ausfüllt. Der resultierende Hohlraum stellt die Knochenhöhle dar. Epiphysen haben eine relative dünne *Substantia compacta* und sind mit dem Bälkchenwerk der *Substantia spongiosa* ausgefüllt. Zu den Röhrenknochen gehören beispielsweise der Oberarm- und Oberschenkelknochen sowie das Schienbein.

Wirbelkörper zählen zu den kurzen Knochen. Sie weisen ebenfalls eine dünne *Substantia compacta* auf, und ihr Inneres ist mit *Substantia spongiosa* ausgefüllt.

Flache Knochen, z. B. das Schulterblatt oder das Schädeldach, sind aus schmalen Schichten von *Substantia compacta* und einer von ihnen eingeschlossenen, ebenfalls schmalen *Substantia spongiosa* aufgebaut.

Mit Ausnahme der von Knorpel bedeckten Stellen und vieler Muskelansätze sind Knochen mit einer Bindegewebsschicht bedeckt. Sie dient der Versorgung des Knochengewebes und wird als Periost bezeichnet. Das Endost stellt eine Bindegewebsschicht auf der Innenseite der *Substantia compacta* dar (Schiebler *et al.*, 1986; Liebich, 1993).

Histologisch können zwei Arten von Knochengewebe, Geflecht- und Lamellenknochen, unterschieden werden.

Geflechtknochen entwickelt sich bei jeglicher Neubildung von Knochen und bei der Heilung von Knochenbrüchen. Die Kollagenfasern in ihrer Matrix können als grobe und feine Bündel vorliegen und weisen keine besondere Laufrichtung auf, so daß es zu keiner Lamellenbildung kommt. Im Vergleich zum Lamellenknochen ist der Geflechtknochen weniger stark mineralisiert, besitzt jedoch eine größere Zahl an Osteozyten (s. u.). Im Laufe der Entwicklung wird der Geflechtknochen meist durch den Lamellenknochen ersetzt. Beispiele für die wenigen Geflechtknochen des erwachsenen Menschen sind die Pars petrosa des Felsenbeins, Ansatzstellen von Sehnen und die Umgebung der Schädelnähte (Schiebler *et al.*, 1986).

Lamellenknochen bildet bei langen Röhrenknochen die *Substantia compacta* und ist aus einer Vielzahl von unterschiedlich angeordneten Lamellen aufgebaut (Abbildung 1). Er geht nach mehreren Umbauvorgängen aus dem zuvor gebildeten Geflechtknochen hervor. Besondere Strukturen stellen dabei die Osteone (Havers'schen Systeme) dar. Sie bestehen aus einem Zentralkanal (Havers'scher Kanal), der Blutgefäße, Nerven und lockeres Bindegewebe enthält, und konzentrisch um diesen Kanal angeordnete Lamellen. Zwischen diesen sogenannten Speziallamellen liegen Osteozyten, die über den Zentralkanal versorgt werden. Zwischen den Osteonen finden sich Schalllamellen, die Speziallamellen oder Überreste von ab- oder umgebauten Osteonen darstellen. Umgeben wird das gesamte System von den inneren und äußeren Generallamellen. Senkrecht zu den Havers'scher Kanälen verlaufen die sogenannten Volkmann'schen Kanäle, durch die aus dem Endost und Periost Blutgefäße in den Knochen einwachsen. Insgesamt ergibt sich ein den Knochen durchziehendes Kanalsystem, in dem Nerven sowie Blutgefäße für die Versorgung der Zellen verlaufen.

Prinzipiell gilt dieser Aufbau ebenfalls für die *Substantia compacta* anderer Knochen und für das Bälkchenwerk der *Substantia spongiosa*. Die oben beschriebene Anordnung ist jedoch weniger systematisch und regulär aufgebaute Osteone fehlen (Schiebler *et al.*, 1986).

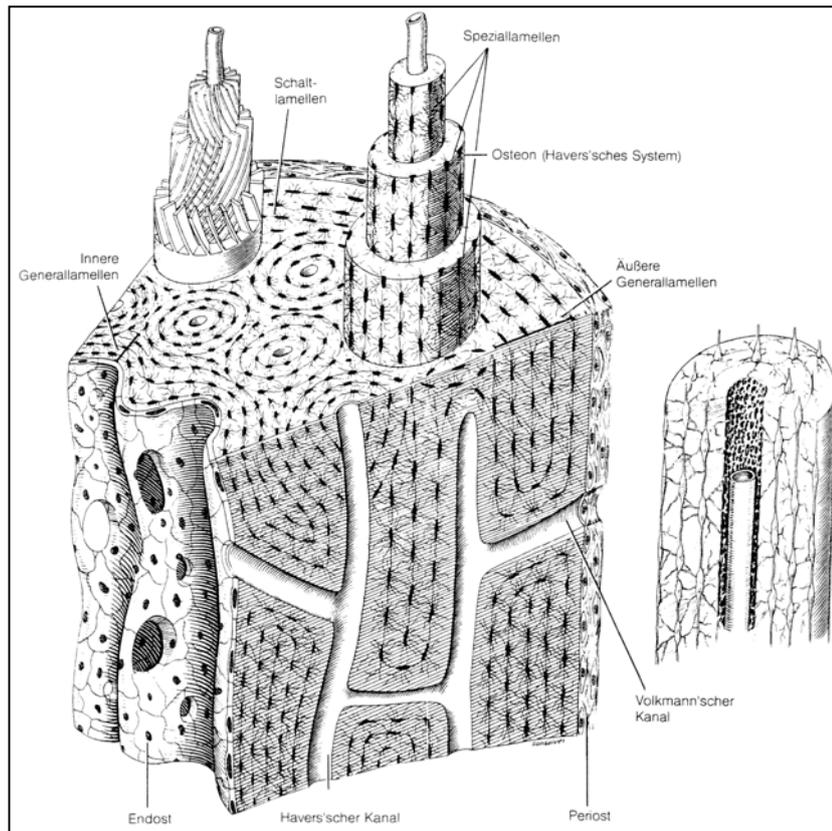


Abbildung 1: Schematische Zeichnung eines Ausschnitts der *Substantia compacta* der Diaphyse eines Röhrenknochens. Dargestellt sind 4 unterschiedliche Lamellensysteme. Osteone (Havers'sche Systeme) mit Speziallamellen und Schaltlamellen werden von inneren und äußeren Generallamellen umschlossen. Rechts ist ein Längsschnitt durch ein Osteon herausgezeichnet. Zu erkennen sind ein Zentralkanal mit einem in ihm verlaufenden Blutgefäß, Speziallamellen sowie Osteozyten mit Fortsätzen (Nach: Schiebler *et al.*, 1986).

Das Knochengewebe besteht aus vier verschiedenen Zelltypen. Man unterscheidet zwischen Osteoblasten (OB), Osteozyten (OZ), Osteoklasten (OK) und "Bone lining cells" (BLC) (Abbildung 2). Im Folgenden soll eine kurze Zusammenfassung der Charakteristika und Funktionen der einzelnen Zelltypen gegeben werden.

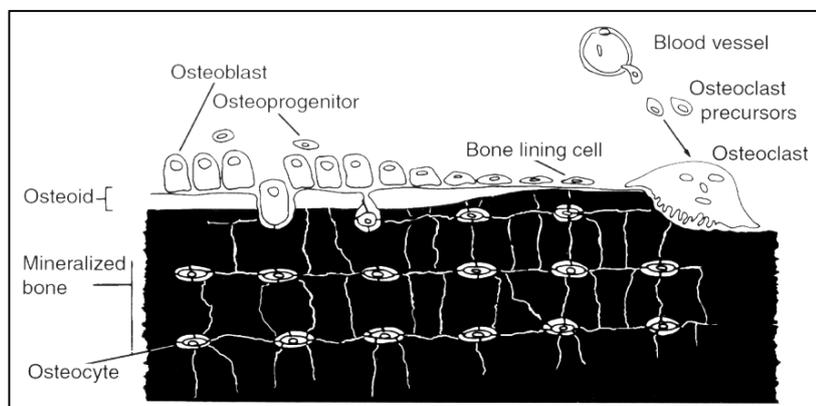


Abbildung 2: Ursprung und Lokalisation von Knochenzellen (Nach: Marks, Jr. and Popoff, 1988).

1.1.1. Osteoblasten

Aus multipotenten mesenchymalen Stammzellen entwickeln sich Osteoblastenvorläuferzellen, Präosteoblasten und schließlich Osteoblasten (OB). OB sind voll differenzierte, kubische Zellen, deren Aufgabe die Synthese der organischen Knochenmatrix (Osteoid) ist. OB mit hoher Syntheseaktivität weisen ein ausgeprägtes rauhes endoplasmatisches Retikulum und einen deutlichen Golgi-Apparat auf. Von ihnen werden Kollagen Typ I und nichtkollagene Proteine des Osteoids, sowie die als Osteoblastenmarker verwendete alkalische Phosphatase, sezerniert. Verringert sich die Syntheseaktivität von OB, werden sie flach. OB liegen wie ein einschichtiges Epithel auf Knochenoberflächen, wobei sich zwischen ihnen und dem Knochen stets eine Schicht aus Osteoid befindet. Benachbarte OB sind durch zytoplasmatische Fortsätze miteinander verbunden. Die Sezernierung ihrer Syntheseprodukte erfolgt überwiegend polarisiert in Richtung der Knochenmatrix. Werden OB dennoch von Osteoid eingeschlossen, können sie sich zu Osteozyten entwickeln (Marotti, 1996) oder unterliegen dem apoptotischen Zelltod (Jilka *et al.*, 1999).

1.1.2. Osteozyten

Osteozyten (OZ) gehen aus OB hervor und sind vollständig von Knochenmatrix eingeschlossen. Die Funktion der OZ besteht in der Erhaltung des Knochens (Buckwalter *et al.*, 1996) und der biomechanischen Steuerung von Knochenmasse und -struktur (Cowin *et al.*, 1991; Mullender and Huiskes, 1997; Huiskes *et al.*, 2000). Im Gegensatz zu OB sind sie flach und mandelförmig und weisen eine vergleichsweise geringe Syntheseaktivität auf. Dies spiegelt sich in einem kleinen Golgi-Apparat und wenig rauhem, endoplasmatischem Retikulum wider. Reife OZ liegen in Lakunen innerhalb der mineralisierten Knochenmatrix und besitzen filopodienartige Fortsätze. Die Lakunen sind durch feine Knochenkanälchen verbunden, in die die Fortsätze der OZ hineinragen. Über gap junctions stehen die Fortsätze benachbarter OZ miteinander in Verbindung und ermöglichen den interzellulären Transport von Ionen und kleinen Molekülen (Liebich, 1993; Marks, Jr. and Odgren, 2002), sowie die Kommunikation zwischen OZ und dem Knochenmark (Kamioka *et al.*, 2001).

1.1.3. Bone lining cells

Bei den BLCs handelt es sich um flache, gestreckte Zellen mit wenigen zytoplasmatischen Organellen. Sie sind inaktiv und bedecken Knochenoberflächen, die keinem Aufbau- oder

Abbauprozessen unterliegen. Obwohl ihre Rolle als Vorläuferzellen von Osteoblasten spekuliert wird, ist ihre Funktion noch weitestgehend unklar (Marks, Jr. and Odgren, 2002).

1.1.4. Osteoklasten

Osteoklasten (OK) sind große, multinukleäre Riesenzellen, die durch Fusion von mononukleären Zellen des hämatopoetischen Systems entstehen. Ihre Aufgabe innerhalb des Knochengewebes ist die Resorption von Knochenmatrix. Die in direktem Kontakt zur Knochenoberfläche stehende Plasmamembran von OK kann in zwei Bereiche eingeteilt werden. Zahlreiche Auffaltungen und eine demzufolge stark vergrößerte Zelloberfläche sind charakteristisch für die zentralen Abschnitte der Plasmamembran ("ruffled border"), an denen Knochenmatrix abgebaut wird. Umgeben wird dieser Bereich von einer Art Dichtungszone ("sealing zone"), die der Anheftung des OK an die Knochensubstanz und der Kontrolle über die Diffusion von Substanzen aus der Resorptionslakune dient (Stenbeck and Horton, 2000).

OK weisen einen ausgeprägten Golgi-Apparat, zahlreiche Mitochondrien und viele Lysosomen auf (Schiebler *et al.*, 1986; Marks, Jr. and Odgren, 2002).

1.2. Knochenstoffwechsel

Die Knochenmatrix eines erwachsenen Menschen setzt sich in etwa zu 50% aus Mineralien und jeweils zu 25% aus Wasser und organischen Verbindungen zusammen (Abbildung 3). Unter den Mineralien überwiegen anorganisches Phosphat und Kalzium. Sie liegen vorwiegend in Form von Hydroxylapatitkristallen vor und machen zusammen einen Anteil von circa 85% aus. Das in der Knochenmatrix gebundene Kalzium stellt 99% des gesamten Kalziums im Körper eines Erwachsenen dar und ist damit der wichtigste Kalziumspeicher im menschlichen Körper (Schiebler *et al.*, 1986).

Betrachtet man die organischen Komponenten der Knochenmatrix, so überwiegt Kollagen mit 90-95%. Den verbleibenden Anteil bilden Glycoproteine und Proteoglycane. Zu den Proteoglycanen zählt u. a. die als Differenzierungsmarker von Osteoblasten verwendete alkalische Phosphatase (AP).

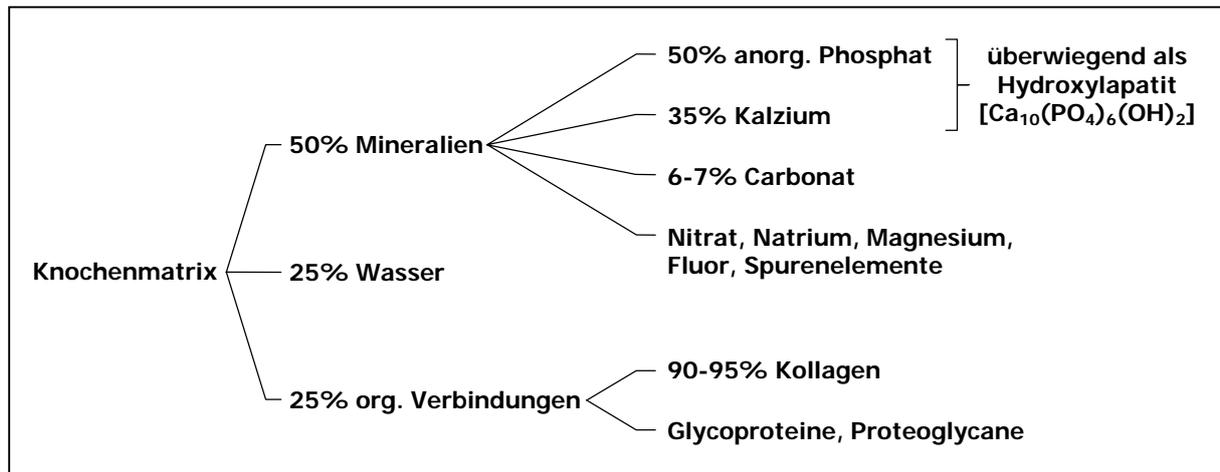


Abbildung 3: Zusammensetzung der Knochenmatrix eines erwachsenen Menschen (Quelle: eigene Darstellung).

Die Entwicklung der Knochenmasse des Menschen kann grob in drei Phasen eingeteilt werden. Bis zu einem Alter von etwa 20 Jahren wird das Skelett aufgebaut, die Knochenmasse nimmt kontinuierlich zu. In dieser Phase überwiegt die Knochenbildung gegenüber der Knochenresorption. Zwischen dem 20. und 30. Lebensjahr erreicht die Knochenmasse schließlich ihr Maximum. Es folgt eine Phase, in der ein Gleichgewicht von Knochenauf- und -abbau besteht, d. h. die Knochenmasse wird erhalten. Gegen Ende des dritten Lebensjahrzehnts beginnt die Knochenresorption im Vergleich zur Knochenbildung zu überwiegen und es kommt zu einer Reduktion der Knochenmasse (Rodan *et al.*, 2002). Hinsichtlich des Krankheitsbildes der Osteoporose ist es von großer Bedeutung, daß Frauen in den ersten 5 bis 10 Jahren nach der Menopause eine beschleunigte Reduktion der Knochensubstanz erfahren (Melton, III, 1995). Die daran anschließende Phase ist durch einen langsameren Abbau der Knochenmasse gekennzeichnet und kann sowohl bei Frauen als auch bei Männern nach dem 40. Lebensjahr beobachtet werden.

Knochenauf- und -abbau sind demnach nicht auf die Phase der Knochenentwicklung begrenzt. Vielmehr unterliegt das Knochengewebe während des gesamten Lebens einer Dynamik, dem sog. "bone remodeling" oder Knochen-Turnover. Neben der Bedeutung für das Knochenwachstum bildet ein solcher Knochenumbau das Fundament für die Anpassung des Knochens an Veränderungen von Zug-, Druck- und Scherkräften, denen er standhalten muß. Beispielsweise kann im Verlauf einer Knochenbruchheilung der zunächst an der Frakturstelle neugebildete Geflechtknochen sukzessiv durch Lamellenknochen ersetzt werden. Im Idealfall besitzt dieser umgestaltete Knochen schließlich den gleichen inneren Aufbau wie der Knochen vor der Fraktur und ist entsprechend an die funktionellen Anforderungen angepaßt.

Allgemeiner formuliert dient der Knochen-Turnover der Prävention eines alterungsbedingten Funktionsverlusts des Knochengewebes.

Das komplette Skelett eines gesunden, erwachsenen Menschen wird im Zuge des stetigen Knochenumbaus schätzungsweise alle 2-4 Jahre ersetzt (Roodman and Windle, 2005). Der erste Schritt des Knochenumbaus besteht in der Resorption von Knochenmatrix durch Osteoklasten, gefolgt von der Neubildung der Knochensubstanz durch Osteoblasten. Dabei erfolgen Knochenab- und -aufbau in separaten anatomischen Strukturen, den sogenannten "basic multicellular units" (BMU). Eine solche Umbaueinheit besteht im voll entwickelten Stadium aus einer Gruppe resorbierender OK, einem Verband knochenbildender OB, einer entsprechenden Blutversorgung, sowie einem zugehörigen Bindegewebe. BMUs bewegen sich dreidimensional durch das Knochengewebe und erneuern auf diese Weise einen tunnelförmigen Abschnitt des Knochens (Parfitt, 2002). Die Prozesse von Knochenresorption und -neubildung sind dabei eng miteinander verknüpft und werden, vereinfacht gesagt, durch die gegenseitige Wirkung von OB und OK aufeinander repräsentiert (Marks, Jr. and Popoff, 1988; Mundy, 1994). OB produzieren Faktoren, die Einfluß auf Differenzierung und Funktion von OK haben (Martin and Ng, 1994; Lacey *et al.*, 1998). Im Gegenzug werden durch Knochenresorption Faktoren freigesetzt, die zur Rekrutierung und Aktivierung von OB führen (Drivdahl *et al.*, 1981; Farley *et al.*, 1982).

Zur vollständigen Entwicklung der unterschiedlichen Knochenzellen und zur Ausbildung ihrer speziellen Eigenschaften ist eine genaue Stimulationsabfolge mehrerer Faktoren in bestimmten Konzentrationen erforderlich. Dabei ist die Koordination der Knochenzellen lokal begrenzt, d. h. lokale Faktoren rekrutieren die benötigten Zellen und regulieren ihre Aktivität (Marks, Jr. and Odgren, 2002). Ferner wird der Knochen-Turnover von systemischen Hormonen beeinflusst, jedoch wirken diese Signale nicht spezifisch auf bestimmte Stellen des Knochengewebes und dienen keiner lokalen Anpassung der mechanischen Eigenschaften des Knochens. Folglich ist ihre Regulation nicht an die Bedürfnisse des Knochenumbaus gekoppelt (Parfitt, 2002). Wird Kalzium durch Knochenresorption mobilisiert (siehe auch 1.2.1), so erfahren jedoch Knochenstrukturen mit der höchsten mechanischen Belastung den geringsten Substanzverlust (Harada and Rodan, 2003).

Osteoklasten gehen aus dem hämatopoetischen System hervor. Aus hämatopoetischen Stammzellen entstehen CFU-Monozyten (CFU = colony forming unit), die zu mononukleären Vorläuferzellen (Präosteoklasten) differenzieren. Mehrere Präosteoklasten bilden durch Fusion multinukleäre, inaktive OK, die schließlich aktiviert werden können. Für diesen Differenzierungsprozess sind u. a. der Transkriptionsfaktor PU.1, der "macrophage colony-stimulating

factor" (m-CSF) und der "receptor activator of nuclear factor κ B ligand" (RANKL) notwendig (Goltzman, 2002). Beide Faktoren können von OB produziert werden (Takahashi *et al.*, 2002). Verbindungen wie $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D_3 , das Parathormon (PTH) und die Interleukine 1 und 11 (IL-1 bzw. IL-11) fördern ebenfalls die Bildung von OK, wohingegen das überwiegend von OB exprimierte Osteoprotegerin (OPG) einen Inhibitor der Osteoklastenentwicklung darstellt (Takahashi *et al.*, 2002; Roodman and Windle, 2005). Eine schematische Übersicht der Osteoklastenentwicklung und der Interaktion zwischen OK und OB ist in Abbildung 4 dargestellt.

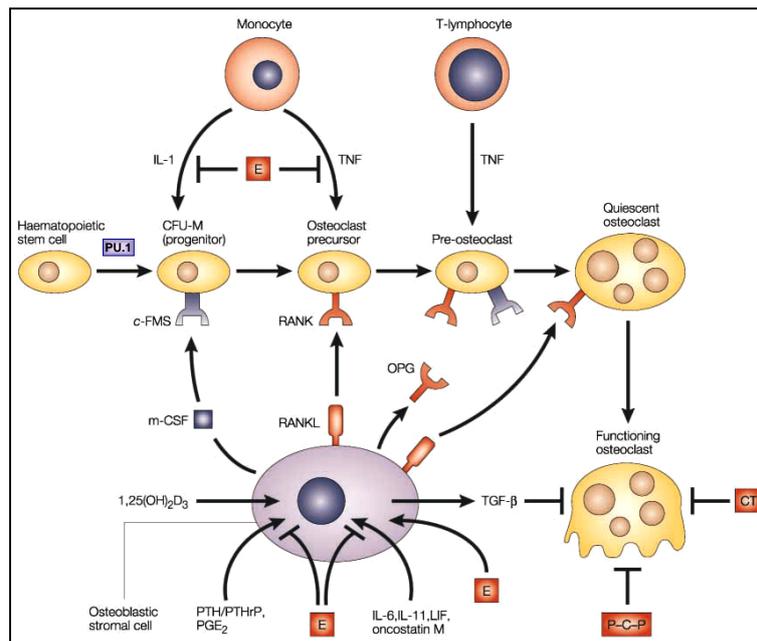


Abbildung 4: Differenzierung von Osteoklasten und Interaktionen von Osteoklasten und Osteoblasten. Erstmals verwendete Abkürzungen: 1,25-Dihydroxyvitamin D_3 [$1,25(OH)_2D_3$], Rezeptor des m-CSF (c-FMS), Calcitonin (CT), Östrogene (E), lymphocyte-inhibiting factor (LIF), Bisphosphonate (P-C-P), Prostaglandine der E-Reihe (PGEs), PTH-related peptide (PTHrP), RANKL-Rezeptor (RANK), transforming growth factor beta (TGF- β), tumor necrosis factor (TNF) (Modifiziert nach: Goltzman, 2002).

Osteoblasten entwickeln sich aus mesenchymalen Stammzellen, die zu Präosteoblasten und schließlich zu Osteoblasten differenzieren (Abbildung 5). Schlüsselfunktionen für diesen Differenzierungsprozeß übernehmen der Transkriptionsfaktor CBFA-1 (core binding factor alpha 1), auch als RUNX-2 bezeichnet (Karsenty, 2000), und das Zinkfingerprotein Osterix (Osx) (Nakashima *et al.*, 2002). In Abwesenheit einer der beiden Faktoren unterbleibt die Bildung von Osteoblasten (Krane, 2005). Entscheidende Bedeutung hat auch der Transkriptionsfaktor ATF4. Verdeutlicht wird dies durch die Beobachtung, dass eine ATF4-Defizienz zu einer verspäteten Knochenbildung in der embryonalen Entwicklung führt und die Knochenmasse während des gesamten Lebens gering bleibt (Yang *et al.*, 2004). Wichtige Signale für

die Differenzierung von Präosteoblasten zu reifen Osteoblasten werden durch die Gruppe der "bone morphogenetic proteins" (BMPs) und durch β -Catenin vermittelt (Krane, 2005). Weitere Regulatoren der Osteoblastendifferenzierung sind der "transforming growth factor beta" (TGF- β) und das Parathormon (PTH). TGF- β beeinflusst sowohl die Proliferation als auch die Differenzierung von Osteoblasten, wobei die Hauptfunktionen von TGF- β in der Stimulation des Differenzierungsprozesses und der Bildung von Knochenmatrix liegen (Bonewald, 2002). Die Funktion von PTH im Knochenstoffwechsel wird in den Abschnitten 1.2.1 und 1.2.3 näher erläutert.

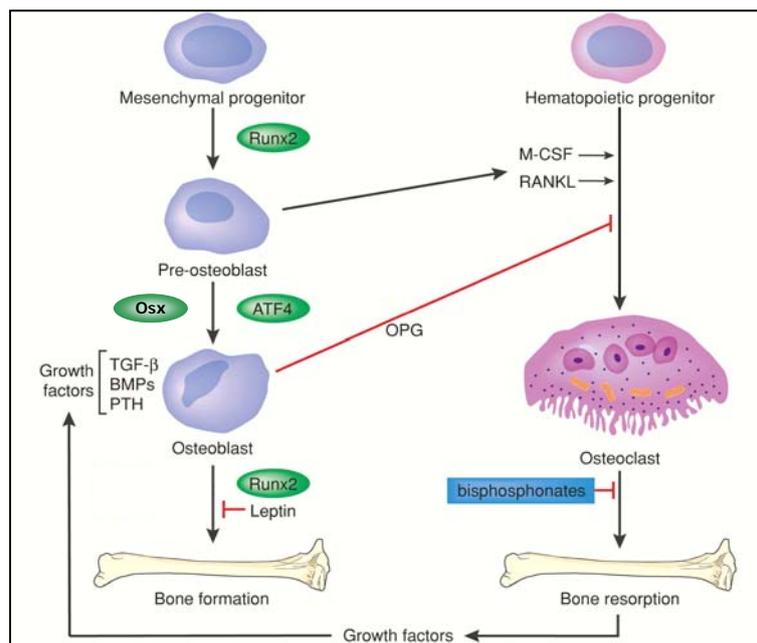


Abbildung 5: Differenzierung von Osteoblasten und Interaktionen von Osteoblasten und Osteoklasten (Modifiziert nach: Krane, 2005).

Da viele Regulatoren des Knochen-Turnovers nicht nur von OB, OK und OZ produziert werden, ist eine normale Entwicklung des Skeletts nur durch ein Zusammenspiel von Zellen mit unterschiedlicher Abstammung möglich (Marks, Jr. and Popoff, 1988; Yamazaki and Eyden, 1995; Yoder and Williams, 1995).

1.2.1. Kalziumhomöostase

Wie bereits erwähnt ist das Skelett der wichtigste Kalziumspeicher des menschlichen Körpers und beinhaltet 99% des gesamten Kalziums. Zwischen Blut und Knochen existiert ein kontinuierlicher Austausch von Kalziumionen. Es wird angenommen, daß etwa 25% der Kalziumionen des Blutes pro Minute im Knochengewebe eingelagert und durch entsprechende Kalziumionen des Knochens ersetzt werden. Trotz dieser hohen Transferrate bleibt der Kalzium-

spiegel im Blut relativ konstant und liegt zwischen 2,3 und 2,7 mmol/l Blutplasma (Schiebler *et al.*, 1986). Voraussetzung dafür ist ein empfindliches Steuerungssystem, an dem Calcitonin, Parathormon und Vitamin D₃ (Calcitriol) beteiligt sind (Abbildung 6).

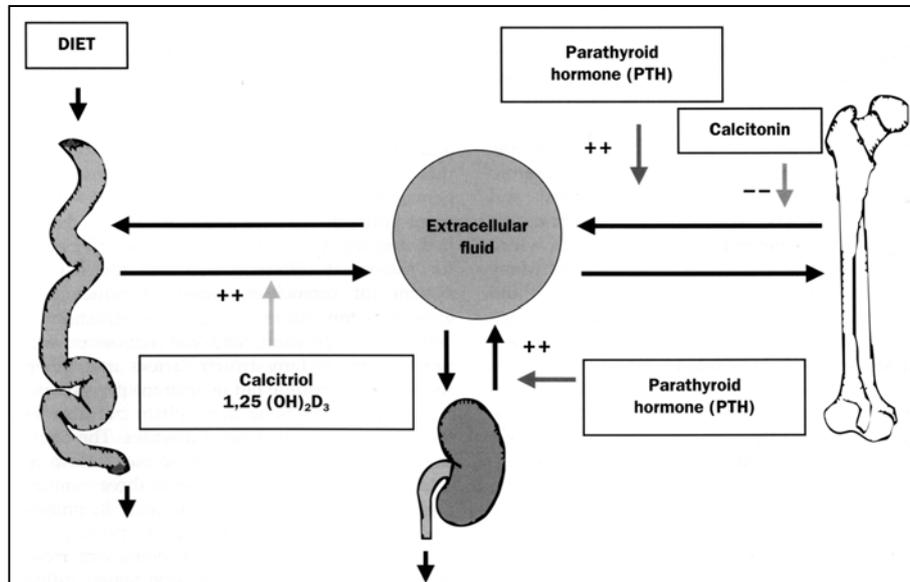


Abbildung 6: Hauptfaktoren der physiologischen Regulation des Kalziummetabolismus (Nach: Russell, 2001).

Wird Kalzium mit der Nahrung aufgenommen, erfolgt eine schnelle Ablagerung in den Knochen oder die Ausscheidung über Darm und Niere. Muß Kalzium aus dem Knochen mobilisiert werden, so kann dies einerseits infolge von Diffusionsprozessen vor allem an jungen Lamellen des Knochengewebes geschehen. Jüngere, weniger verkalkte Lamellen geben Kalzium leichter ab und nehmen es auch leichter auf als ältere, stärker mineralisierte Lamellen. Durch diesen schnellen Mechanismus kommt es zur Einstellung eines Gleichgewichts zwischen der Kalziumkonzentration im Blut und im Knochen. Darüber hinaus kann Kalzium durch einen langsamen Mechanismus, dem Einfluß von Hormonen, aus dem Knochen freigesetzt werden. Das primär in der Nebenschilddrüse und alternativ im Thymus gebildete Parathormon (PTH) (Gunther *et al.*, 2000) sowie das als Antagonist fungierende Calcitonin spielen dabei eine entscheidende Rolle. PTH führt über die Aktivierung der OK zur Steigerung der Knochenresorption und schließlich zur Erhöhung des Blutkalziumspiegels. Weiterhin wird die Kalziumaufnahme im Darm erhöht und die Kalziumausscheidung über die Niere vermindert. Calcitonin wird in den C-Zellen der Schilddrüse gebildet und verursacht eine Reduktion der OK-Aktivität. Ferner steigert es die Synthese von Knochenmatrix und die Kalziumablagerung im Knochengewebe und bewirkt, daß vermehrt Kalzium durch die Niere ausgeschieden wird (Schiebler *et al.*, 1986; Liebich, 1993).

1.2.2. Erkrankungen des Knochenstoffwechsels

Das Knochengewebe stellt ein komplexes System dar, dessen stationärer Zustand aufgrund des stetigen Knochen-Turnovers als Fließgleichgewicht bezeichnet werden kann. Verschiedene Signale und Rückkopplungsschleifen verknüpfen Knochenauf- und -abbau miteinander und dienen der Erhaltung der Knochenhomöostase. Neben den Signalen, die aus der Erhaltung des Blutkalziumspiegels und der mechanischen Stabilität des Skeletts resultieren, haben auch Sexualhormone wie Östrogen und Testosteron bedeutenden Einfluß auf dieses System (Harada and Rodan, 2003). Darüber hinaus scheint das "bone remodeling" einer zirkadianen Regulation zu unterliegen (Fu *et al.*, 2005). Kommt es zu einem Ungleichgewicht zwischen Resorption und Neubildung des Knochens, können sich infolgedessen verschiedene Krankheitsbilder entwickeln.

Die am weitesten verbreitete Knochenkrankheit ist die Osteoporose (Jap *et al.*, 2001; Roodman and Windle, 2005). Sie ist gekennzeichnet durch eine Abnahme der Knochenmasse und eine Veränderung in der Mikroarchitektur des Knochens, die zur Erhöhung des Frakturrisikos führt. Osteoporosebedingte Frakturen treten hauptsächlich am Unterarm, an der Hüfte und an den Wirbeln auf (Marcus *et al.*, 1996). Gemäß der Richtlinien der World Health Organization (WHO) wird die Osteoporose als eine Verminderung der Knochendichte (bone mineral density, BMD) um 2,5 Standardabweichungen relativ zum Durchschnittswert für junge Erwachsene definiert. Eine Abnahme um 1,5 bis 2,5 Standardabweichungen bezeichnet man als Osteopenie (Jap *et al.*, 2001; Akesson, 2003). Mit einem Anteil von 80% erkranken vor allem Frauen an Osteoporose (Jap *et al.*, 2001). Wie bereits erwähnt, erfahren Frauen in den ersten 5 bis 10 Jahren nach der Menopause einen beschleunigten Knochenmasseverlust. Bis zu 20 Jahren nach der Menopause kann sich daraus eine Typ-I-Osteoporose (postmenopausale Osteoporose) entwickeln (Jap *et al.*, 2001; Riggs *et al.*, 2003). Die Hauptursache hierfür ist der Östrogenmangel bei postmenopausalen Frauen. Es müssen jedoch auch andere Faktoren eine Rolle spielen, da nicht alle Frauen nach der Menopause unter einer Osteoporose leiden (Harada and Rodan, 2003).

Die zweithäufigste Knochenerkrankung ist der Morbus Paget. Charakterisiert wird die Krankheit durch fokale Bereiche, in denen extrem hohe Knochenumbauraten und Abnormalitäten in allen Phasen des Knochenauf- und -abbaus zu beobachten sind. Zu Beginn des Morbus Paget kommt es in den betroffenen Knochenregionen zu exzessiver Resorption der Knochen substanz, gefolgt von ebenfalls deutlich verstärkter Knochenneubildung. Übermäßig viele hyperaktive Osteoblasten führen zu einem schnellen Aufbau von schlecht strukturiertem Knochengewebe. Infolge der mangelhaften Qualität des neugebildeten Knochens sinkt seine mechanische Belastbarkeit, das Frakturrisiko nimmt zu und es können Deformationen entstehen. Im fortgeschrittenen Stadium des Morbus Paget überwiegt der Knochenaufbau und

resultiert in Verhärtungen des betroffenen Gewebes. Es kann zu Verdickungen des Knochens und zur Verdrängung des Knochenmarks durch fibröses und vaskuläres Gewebe kommen (Singer and Roodman, 2002; Roodman and Windle, 2005).

Auf die wichtigsten Medikamente zur Behandlung von Knochenkrankheiten, von denen hier nur die zwei am häufigsten vorkommenden genannt wurden, soll im folgenden Kapitel eingegangen werden.

1.2.3. Behandlungsmöglichkeiten der Osteoporose

Erst im Verlauf der letzten zwei Jahrzehnte wurde der Stellenwert der Osteoporose als bedeutendes gesellschaftliches Gesundheits- und gesundheitspolitisches Problem erkannt (Akesson, 2003). Die direkt durch Osteoporose bedingten jährlichen Kosten für das Gesundheitssystem wurden vom Statistischen Bundesamt in Deutschland im Jahr 2004 auf etwa 1,4 Milliarden Euro geschätzt (www.bmgs.bund.de).

Mittlerweile sind auf dem Arzneimittelmarkt eine ganze Reihe von Medikamenten zur Behandlung der Osteoporose erhältlich. Im Folgenden werden einige der wichtigsten Therapeutika beschrieben. Eine schematische Darstellung physiologischer und pharmakologischer Faktoren und ihre relative Bedeutung für die Erhaltung der Knochenmasse - soweit diese bekannt ist - findet sich in Abbildung 7.

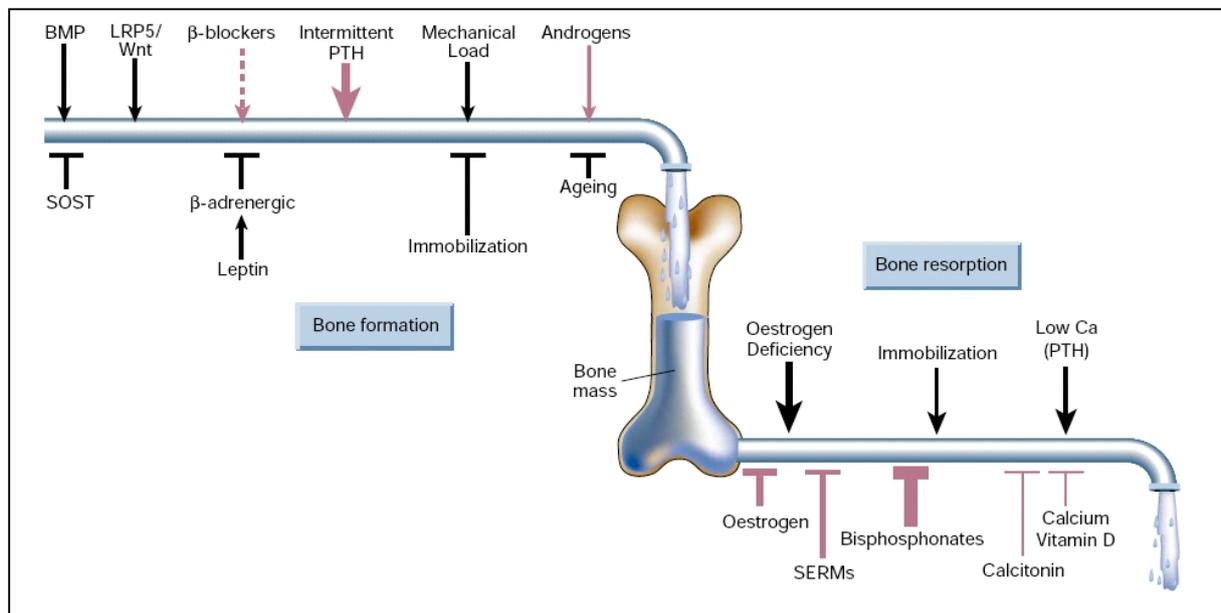


Abbildung 7: Faktoren, die Einfluß auf die Erhaltung der Knochenmasse und des Skeletts haben. In der schematischen Abbildung sind physiologische Regulatoren blau und pharmakologische Substanzen rot dargestellt. Die Dicke der Pfeile repräsentiert die relative Bedeutung, soweit diese bekannt ist. Durchgezogene Linien stehen für angewendete und gestrichelte Linien für putative Therapeutika. Erstmals verwendete Abkürzungen: Sclerostin (SOST), low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5), selective estrogen-receptor modulator (SERM) (Nach: Harada and Rodan, 2003).

Kalzium und Vitamin D₃

Eine ausreichende Versorgung mit Kalzium und Vitamin D₃ bildet das Fundament für die Behandlung der Osteoporose. Allein die präventive Verabreichung der beiden Substanzen führt nachweislich zur Senkung des Frakturrisikos. Darüber hinaus könnte die Therapie mit Vitamin D₃ vor allem für sehr alte Patienten von zusätzlichem Vorteil sein, da Vitamin D₃ die Stärke der Muskeln erhöht und möglicherweise Stürzen und damit verbundenen Frakturen vorbeugt (Dawson-Hughes, 1996; Reid, 1996; Goltzman, 2002; Akesson, 2003).

Östrogene

Der Einsatz von Östrogenen im Rahmen einer Hormonersatztherapie basiert auf der Annahme, daß durch den Ersatz eines fehlenden oder unzureichend vorhandenen Faktors innerhalb eines Gleichgewichtssystems ein Mangelzustand ausgeglichen werden kann (Harada and Rodan, 2003; Riggs *et al.*, 2003). Anfänglich wurden Östrogene bei Frauen mit Osteoporose eingesetzt, um das Risiko von Frakturen zu verringern (Gallagher, 1996). Mittlerweile ist jedoch bekannt, daß eine solche Behandlung Langzeitnebenwirkungen wie die Entstehung von Brustkrebs und Thrombosen haben kann. Auf Grund dessen erfolgt eine Hormonersatztherapie mit Östrogenen nunmehr zur Minderung von Symptomen des Klimakteriums, wobei die Behandlungsdauer nicht über 5 Jahren liegen sollte und der Einfluß auf die Knochenmasse als positiver Nebeneffekt gesehen werden kann (Akesson, 2003). Zur Prävention von Gebärmutterkrebs als Folge einer Hormonersatztherapie kann diese durch Verabreichung von Progestin ergänzt werden (Goltzman, 2002).

Bisphosphonate

Bisphosphonate gehören zu den antiresorptiven Substanzen und lagern sich aufgrund ihrer hohen Affinität für Hydroxylapatit im Knochen ab. Sie kommen bei der Knochenresorption mit Osteoklasten in Kontakt und reduzieren den Knochensubstanzverlust durch Inhibition der Osteoklastenaktivierung und -aktivität (Papapoulos, 1996; Goltzman, 2002). Dabei zeigen sie nur geringe Effekte auf andere Organsysteme. Nachteilig ist ihre geringe Bioverfügbarkeit bei oraler Verabreichung, da sie schlecht vom Magen-Darm-Trakt aufgenommen werden. Insbesondere müssen Patienten vor und unmittelbar nach der Einnahme der Bisphosphonate Alendronat und Risendronat nüchtern sein. Ferner konnten Nebenwirkungen wie beispielsweise schwere Schädigungen der Speiseröhre und des Magens festgestellt werden (Papapoulos, 1996; Akesson, 2003).

Neben ihrer Bedeutung bei der Therapie von Osteoporose werden Bisphosphonate heutzutage auch als Medikament der Wahl zur Behandlung des Morbus Paget eingesetzt (1.2.2). Sie haben das ursprünglich verwendete Calcitonin abgelöst (Roodman and Windle, 2005).

Calcitonin

Die Wirkung von Calcitonin beruht auf der Hemmung der Osteoklastenneubildung. Anwendung finden Präparate, deren Zusammensetzung auf dem Calcitonin des Lachses basieren, da letzteres eine etwa 10-fach stärkere Wirkung als das humane Calcitonin besitzt. Positive Effekte auf die Knochendichte von postmenopausalen Frauen konnten bereits nachgewiesen werden, wohingegen es nur begrenzt Belege über den Einfluß auf das Frakturrisiko gibt. Als positiver Nebeneffekt kann Calcitonin die in Verbindung mit Wirbelfrakturen stehenden Schmerzen lindern (Akesson, 2003). Ferner wurde Calcitonin früher zur Behandlung des Mobus Paget (1.2.2) verwendet, jedoch bildeten viele Patienten nach einer gewissen Zeit Antikörper gegen Calcitonin des Lachses, und infolgedessen kam es bei 10-20% der Patienten zur Ausbildung einer Resistenz (Civitelli, 1996; Roodman and Windle, 2005).

Selektive Östrogenrezeptor-Modulatoren

Raloxifen gehört zu den selektiven Östrogenrezeptor-Modulatoren, deren Wirkung auf spezifische Konformationsänderungen der Östrogenrezeptoren zurückgeführt wird. Dadurch kommt es zur gewebespezifischen Rekrutierung verschiedener Koregulatoren (Goltzman, 2002). Es konnte zwar gezeigt werden, daß die Behandlung mit Raloxifen zur Reduktion der Wirbelfrakturen führt, jedoch fehlen entsprechende Hinweise in Bezug auf Frakturen anderer Knochen. Raloxifen vermindert zusätzlich die Wahrscheinlichkeit von kardiovaskulären Ereignissen (z. B. Herzinfarkt) bei Frauen, die diesbezüglich einem erhöhten Risiko ausgesetzt sind (Akesson, 2003).

Parathormon

Das Parathormon (PTH) stellt das einzige zur Zeit auf dem Arzneimittelmarkt verfügbare Präparat dar, durch das eine pharmakologisch stimulierte Knochenbildung erzielt werden kann (Harada and Rodan, 2003). Es besteht aus einer einzelnen, 84 Aminosäuren langen Peptidkette. Die physiologische Funktion von PTH besteht in der Regulation des Blutkalziumspiegels (1.2.1). In mehreren Studien konnte belegt werden, daß PTH sowohl Einfluß auf Osteoblasten als auch auf Osteoklasten hat. Eine kontinuierliche Verabreichung von PTH resultiert in einem katabolen, eine intermittierende Gabe in einem anabolen Effekt auf das Knochengewebe (Mosekilde and Reeve, 1996; Orwoll *et al.*, 2003). Offensichtlich findet die Knochenneubildung nach intermittierender PTH-Applikation primär im Bereich der *Substantia spongiosa* statt und zeigt demzufolge eine ausgeprägte Zunahme der Knochendichte im Bereich der Wirbelsäule. In geringerem Umfang konnte dieser Effekt aber auch in den Bereichen der *Substantia compacta* beobachtet werden, die dem Endost anliegen. Im Verlauf

einer Therapie mit PTH müssen Patienten intensiver kontrolliert werden, da für sie ein erhöhtes Risiko einer Hyperkalzämie besteht. Dies verursacht relativ hohe Therapiekosten und birgt einen entscheidenden Nachteil dieser Behandlungsstrategie (Mosekilde and Reeve, 1996; Akesson, 2003).

Obwohl es bereits effektive pharmakologische Substanzen zur Behandlung der Osteoporose gibt, besteht nach wie vor der Bedarf für die Isolierung und Charakterisierung neuer osteoanaboler Verbindungen. Mit Ausnahme der Kombinationstherapie mit Kalzium und Vitamin D₃ sind die Behandlungsstrategien sehr kostenintensiv, insbesondere unter Verwendung von PTH, des einzigen zur Zeit zugelassenen Medikaments, das nicht nur die Knochenresorption hemmt, sondern nachweislich die Knochenneubildung stimuliert. Obwohl die herkömmliche Therapie mit PTH eine tägliche Applikation des Wirkstoffs umfaßt, gibt es bereits Studien, denen zufolge bereits eine einmal wöchentlich verabreichte Dosis an PTH (1-34) eine Erhöhung der Knochendichte bewirken kann (Fujita *et al.*, 1999; Gittens *et al.*, 2004; Miki *et al.*, 2004). Daraus ergeben sich sowohl Perspektiven zur Verringerung der Nebenwirkungen als auch zur Senkung der Therapiekosten.

Da es sich bei der Osteoporose um ein weltweites Gesundheitsproblem handelt und die durchschnittliche Lebenserwartung höher ist als jemals zuvor, kann mit einer weiterhin steigenden Nachfrage nach entsprechenden Therapeutika gerechnet werden. Zukünftige Untersuchungen sollten durch Optimierung von Wirksamkeit und Dosierbarkeit auf Grundlage bekannter Wirkstoffe und durch Isolierung und Weiterentwicklung neuer potentieller Medikamente eine verbesserte Versorgung behandlungsbedürftiger Patienten ermöglichen (Akesson, 2003).

1.3. Funktion von Cbfa1 und Osteocalcin im Knochenstoffwechsel

Der "core binding factor alpha 1" (Cbfa1) ist eines von drei in Säugetieren vorkommenden Homologen des Transkriptionsfaktors Runt in *Drosophila*. Runt ist für die Segmentierung im Laufe der embryonalen Entwicklung und für die Neurogenese notwendig. Die enorme Bedeutung von Cbfa1 als Transkriptionsfaktor bei der Differenzierung von Osteoblasten konnte erst vor 8 Jahren nachgewiesen werden (Ducy *et al.*, 1997; Otto *et al.*, 1997; Komori *et al.*, 1997). Mäuse, die eine homozygote Mutation des Cbfa1-Gens aufwiesen, starben unmittelbar nach ihrer Geburt und besaßen lediglich unreife Osteoblasten, die keinerlei Osteopontin und Osteocalcin exprimierten. Ihr Skelett zeigte keinerlei Verknöcherung (Ossifikation). Bei heterozygoten Tieren waren die Schlüsselbeine unterentwickelt und es konnte ein verzögerter

Fontanellenschluss beobachtet werden (Komori *et al.*, 1997; Otto *et al.*, 1997). Ähnliche Symptome zeigen auch Patienten, die unter der sogenannten Cleidocranialen Dysplasie (CCD) leiden, unter anderem charakterisiert durch Fehlentwicklungen von Schlüsselbein und Gesichtsknochen. Es konnte nachgewiesen werden, dass bei diesen Patienten das Cbfa1-kodierende Gen mutiert oder zerstört war (Mundlos, 1999; Karsenty, 2000).

Cbfa1 wird ausschließlich in Osteoblasten und ihren Vorläuferzellen gebildet und ist damit ein hoch spezifischer Marker für ihre Entwicklung, der sehr früh im Zuge der Osteoblastendifferenzierung exprimiert wird. Ferner stehen Gene, die erst in voll differenzierten Osteoblasten exprimiert werden (z. B. Osteocalcin), unter der Kontrolle von Cbfa1. Dies zeigt, dass Cbfa1 nicht nur eine entscheidende Rolle bei der Differenzierung von Osteoblasten spielt, sondern auch regulatorischen Einfluss auf ihre Funktion hat (Karsenty, 2000; Schinke and Karsenty, 2002). Neben der Promotorregion von Osteocalcin enthalten auch Gene wie $\alpha 1(I)$ Kollagen, Osteopontin, Bone sialoprotein, RANKL und Kollagenase 3 sogenannte OSE2-Sequenzen (OSE2=osteoblast-specific cis-acting element), die Bindungsstellen für Cbfa1 darstellen. Vier der genannten Proteine sind Bestandteile der extrazellulären Knochenmatrix, was darauf schließen lässt, dass Cbfa1 ein Regulator der Matrixbildung ist (Ducy *et al.*, 1997; Ducy *et al.*, 1999; Schinke and Karsenty, 2002).

Die Steuerung der Cbfa1-Expression erfolgt zum Teil durch Autoregulation, also durch Cbfa1 selbst. Wurde die Expression in Osteoblastenvorläuferzellen einmal initiiert, wird diese durch eine positive Rückkopplungsschleife verstärkt und sowohl während als auch nach der Differenzierung der Zellen fortgesetzt. Möglicherweise dient dieser Mechanismus der Aufrechterhaltung des begonnenen Differenzierungsprozesses (Ducy *et al.*, 1999; Karsenty, 2000; Schinke and Karsenty, 2002). Erzwingt man hingegen eine hohe Cbfa1-Expression, wird diese durch einen negativen Rückkopplungsmechanismus gehemmt und wirkt einer zu hohen Expressionsrate entgegen (Drissi *et al.*, 2000).

Weitere Regulatoren der Cbfa1-Expression sind Msx2, Bapx1, Hoxa-2 und Indian Hedgehog, jedoch sind die Wirkmechanismen dieser Faktoren noch weitestgehend unklar (Schinke and Karsenty, 2002).

Osteocalcin (OC) ist ein kleines ($M_w \approx 6$ kDa), aus 49 Aminosäuren bestehendes Protein, das von reifen Osteoblasten, Odontoblasten und hypertrophen Chondrozyten gebildet wird. Die alternativ für OC verwendete Bezeichnung "bone Gla-protein" leitet sich von den drei für OC charakteristischen Seitenketten der γ -Carboxyglutaminsäure (Gla) ab. Sie sind für die Interaktion des Proteins mit dem Hydroxylapatit der Knochenmatrix verantwortlich (Gundberg, 2001; Seibel *et al.*, 2002).

OC wird erst in einem fortgeschrittenen Differenzierungsstadium der Osteoblasten exprimiert und mit zunehmender Mineralisierung des Knochengewebes verstärkt gebildet. Demzufolge ist OC ein sehr später Marker der Osteoblastendifferenzierung (Aubin and Triffitt, 2002). Der überwiegende Teil des synthetisierten Osteocalcins wird in der Knochenmatrix abgelagert, eine geringe Menge gelangt jedoch in den Blutkreislauf. Dabei setzt sich das im Blut nachweisbare OC schätzungsweise aus etwa einem Drittel des intakten Moleküls und jeweils einem Drittel eines großen N-terminalen Fragments und einer Mischung kleinerer Fragmente zusammen. Das im Serum vorhandene OC gilt als spezifischer Marker des Knochenaufbaus und sein Nachweis dient der Abschätzung des relativen Ausmaßes des Knochen-Turnovers. Auf diese Weise können Rückschlüsse auf mögliche Knochenerkrankungen gezogen werden. Dabei ist zu beachten, dass der OC-Spiegel im Blut einem zirkadianen Rhythmus folgt (Gundberg, 2001; Seibel *et al.*, 2002).

Welche Funktion OC im Knochen hat, ist noch weitgehend unklar. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass OC einer der Faktoren für die Regulation des Knochenumbaus (bone remodeling) ist. *In vitro* hemmt es die Bildung von Kristallisationskeimen von Hydroxylapatit (siehe 1.2) und inhibiert dadurch möglicherweise die Mineralisierung der Knochenmatrix *in vivo* (Gopalakrishnan *et al.*, 2001; Gundberg, 2001).

An der Regulation der OC-Expression sind Faktoren wie Cbfa1 (s. o.), TGF- β , Glucocorticoide und Vitamin D₃ beteiligt (Lian and Stein, 1996; Stein *et al.*, 1998; Yamaguchi *et al.*, 2000; Stein *et al.*, 2002).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass der Transkriptionsfaktor Cbfa1 eine Schlüsselfunktion bei der Differenzierung von Osteoblasten einnimmt und darüber hinaus im Zusammenspiel mit weiteren Faktoren die Funktion der reifen Osteoblasten reguliert. Cbfa1 wird in einem sehr frühen Stadium der Osteoblastendifferenzierung exprimiert, wobei seine Bildung auf Osteoblasten und ihre Vorläuferzellen beschränkt ist. Damit repräsentiert Cbfa1 einen hoch spezifischen Marker für ihre Entwicklung.

Osteocalcin ist ein Protein der Knochenmatrix und kann darüber hinaus im Serum nachgewiesen werden, um das Ausmaß des Knochen-Turnovers abzuschätzen. Im Gegensatz zu Cbfa1 erfolgt seine Expression erst in reifen Osteoblasten. Folglich stellt Osteocalcin einen späten, spezifischen Marker des Differenzierungsprozesses von Osteoblasten dar.

Die Promotorregionen des humanen Cbfa1- und Osteocalcin-Gens dienen aufgrund ihrer Bedeutung für den Knochenmetabolismus als Grundlage für die Herstellung der in dieser Arbeit verwendeten Reporter-genkonstrukte.

1.4. Hämofiltrat und Schweinemagen als Quellen für neue osteoanabole Faktoren

Peptide regulieren in Form von Hormonen, Wachstumsfaktoren, Neuropeptiden oder Immunmodulatoren zahlreiche Prozesse des menschlichen Körpers. Daher kommt ihrer Identifizierung und Charakterisierung bei der Therapie und Diagnostik von Krankheiten eine große Bedeutung zu. Prominente Beispiele für den therapeutischen Einsatz von Peptiden sind die Behandlung von Diabetes mellitus mit rekombinantem Insulin, die Applikation von Wachstumshormon bei Kleinwuchs und die osteoanabole Therapie mit Parathormon.

Für die Isolierung von peptidischen Wirkstoffen stellt Blut als zentrale Körperflüssigkeit eine umfassende Quelle dar (Forssmann *et al.*, 1993). Die im Blutkreislauf zirkulierenden Peptide werden entweder als endokrine Faktoren direkt in den Blutstrom sezerniert oder diffundieren vom Interstitium in den vaskulären Raum. Für den Nachweis unbekannter, regulatorischer Peptide ist es dabei von Vorteil, dass sie im Blut bereits in ihrer posttranslational modifizierten und damit bioaktiven Form vorliegen (Forssmann, 1996). Nachteilig ist die beschränkte Verfügbarkeit entsprechender Blutmengen für die Detektion und Isolierung biologisch aktiver Substanzen, v. a. wenn sie in sehr geringen Konzentrationen im Blutkreislauf zirkulieren. Vergleiche von Hämofiltrat mit Blutplasma konnten jedoch zeigen, daß ihre Protein-, Peptid- und Aminosäurezusammensetzung bis zu einem Molekulargewicht von etwa 10 kDa in etwa vergleichbar ist (Schepky *et al.*, 1994). Hämofiltrat ist ein Abfallprodukt, das in nephrologischen Zentren bei der Dialyse von Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz entsteht. Verwendet man die dabei anfallenden, großen Mengen an Hämofiltrat als Ausgangsmaterial, so können selbst Peptide, die im pico- bis femtomolaren Konzentrationsbereich im Blut zirkulieren, daraus isoliert und ihre Primärstruktur aufgeklärt werden (Schulz-Knappe *et al.*, 1996).

Bei der IPF PharmaCeuticals GmbH werden biologisch aktive Peptide aus sogenannten Peptidbanken isoliert und ihre Wirkmechanismen untersucht, um nachfolgend eine Abwägung ihrer potentiellen klinischen Bedeutung vornehmen zu können. Potentielle Verwendung finden die identifizierten Substanzen entweder in der isolierten Form oder sie dienen als Leitstruktur für die Entwicklung eines Medikamentes.

Für die systematische und reproduzierbare Isolierung von Peptiden aus Hämofiltrat-Peptidbanken erfolgte die Optimierung und Standardisierung einer Extraktionsmethode zur Herstellung solcher Peptidbanken im Großmaßstab. Aus 10.000 Litern Hämofiltrat werden auf diese Weise Peptidbanken generiert, die aus 300 bis 500 Fraktionen bestehen (Schulz-Knappe *et al.*, 1997). Ferner wurden Peptidbanken aus Gewebehomogenisaten wie Gehirn, Thymus, Sperma und Plazenta hergestellt, die neben der Isolierung zirkulierender Substanzen aus Hämofiltrat (Kuhn *et al.*, 1993; Hess *et al.*, 1995; Schulz-Knappe *et al.*, 1996;

Meder *et al.*, 2003; Fricke *et al.*, 2005) die Identifizierung gewebespezifischer Verbindungen mit biologischer Aktivität ermöglichten (Seiler *et al.*, 1999; Lammerich *et al.*, 2003).

Im Rahmen dieser Promotion wurde eine Peptidbank aus humanem Hämofiltrat sowie eine Schweinemagen-Peptidbank als Basis für den Nachweis und die partielle Aufreinigung osteoanaboler Substanzen verwendet. Die Hämofiltrat-Peptidbank wurde als Quelle für im Blutkreislauf zirkulierende, osteoanabole Peptide ausgewählt. Welche Bedeutung der Magen für den Knochenstoffwechsel hat und aus welchem Grund eine Peptidbank aus Schweinemagen im Screening Verwendung fand, soll nachfolgend verdeutlicht werden.

Gastrin ist ein zirkulierendes Hormon, das von den G-Zellen der Antrumschleimhaut im Ausgangsbereich des Magens gebildet wird. Es stimuliert über den Blutweg die Säuresekretion der Belegzellen des Magens (Schiebler *et al.*, 1986). Ferner bewirkt Gastrin eine Senkung des Blutkalziumspiegels und eine erhöhte Kalziumablagerung im Knochen. Offensichtlich werden diese Effekte jedoch nicht durch das Hormon Calcitonin (vgl. 1.2.1) vermittelt (Krishnamra and Limlomwongse, 1981; Persson *et al.*, 1989; Hakanson *et al.*, 1990; Persson *et al.*, 1991). Wird der gesamte Magen oder nur der säurebildende Teil entfernt (Gastrektomie bzw. Fundektomie), so kann weder exo- noch endogenes Gastrin eine Hypokalzämie auslösen (Krishnamra and Limlomwongse, 1981; Persson *et al.*, 1991). Es wird daher angenommen, dass das hypothetische Peptidhormon "Gastrocalcin" als Bindeglied der Gastrin-induzierten Senkung des Blutkalziumspiegels fungiert (Persson *et al.*, 1989). Produziert wird dieses Hormon möglicherweise von den sogenannten ECL-Zellen (enterochromaffin-like, ECL) in der Schleimhaut des Magengrundes (Fundus) (Larsson *et al.*, 2001).

In diversen Studien konnte demonstriert werden, dass eine Gastrektomie Störungen des Knochenstoffwechsels verursacht und bis hin zur Osteopenie oder Osteoporose führen kann. Die Frage, über welchen Mechanismus der Magen Einfluß auf den Knochenmetabolismus nimmt, bleibt dabei noch größtenteils unbeantwortet (Tovey *et al.*, 1991; Resch *et al.*, 1992; Persson *et al.*, 1993; Rumenapf *et al.*, 1997; Zittel *et al.*, 1997; Lehto-Axtelius *et al.*, 1998).

Da das hypothetisch vom Magen gebildete Gastrocalcin bis dato nicht identifiziert werden konnte, besteht nach wie vor Interesse daran, osteoanabole Faktoren des Magens nachzuweisen und zu isolieren.

1.5. Aufgabenstellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung eines molekularbiologischen Screening-systems zur Detektion osteoanaboler Faktoren und dessen Anwendung auf verschiedene Peptidbanken.

Zunächst sollten die Promotorregionen der Osteoblasten-spezifischen Gene, Cbfa1 und Osteocalcin, kloniert und nachfolgend jeweils in Luciferase-Reporterergenkonstrukte eingebracht werden. Nach Transformation der Konstrukte in Bakterien sollte eine Überprüfung der Promotorregionen auf eventuelle Mutationen durch vollständige Sequenzierung erfolgen. Parallel dazu sollte unter Verwendung des Luciferase-Reporter-Vektors "pGL2-Control" eine geeignete Transfektionsmethode für die osteoblastäre Zelllinie ROS 17/2.8 ermittelt und optimiert werden. Anhand des optimierten Transfektionsprotokolls sollten die Reporterergenkonstrukte zunächst transient in ROS 17/2.8-Zellen transfiziert und die Induzierbarkeit des jeweiligen Promotors mit Hilfe einer entsprechenden Positivkontrolle überprüft werden. Nachfolgend sollten beide Konstrukte stabil in ROS 17/2.8-Zellen transfiziert und Einzelklone selektioniert werden.

Der Klon mit der höchsten induzierbaren Promotoraktivität sollte im Rahmen eines Primär-screenings auf zwei unterschiedliche Peptidbanken angewandt werden. Durch den Nachweis osteoanaboler Aktivitäten in einer Peptidbank aus humanem Hämofiltrat bzw. Schweinema-gen sollte die Funktionalität des Luciferase-Reporter-Gen-Assays validiert werden.

Abschließend sollte eine Auswahl der aktiven Fraktionen durch chromatographische Trennverfahren aufgereinigt werden.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien, Organismen und Anzuchtbedingungen

2.1.1. Herstellung und Sterilisation von Lösungen

Alle Lösungen, Puffer, Nährmedien und Nähragar wurden mit deionisiertem Wasser aus einer Reinstwasseranlage (Milli-Q^{UF}plus, Millipore) angesetzt.

Alle Chemikalien und Materialien wurden in Analysenqualität verwendet und stammen, soweit nicht anders angegeben, ausschließlich von den Firmen BioWhittaker, Costar/Corning, Fluka, Greiner, Invitrogen, Merck, Roth, Sarstedt und Sigma.

Die Sterilisation von thermostabilen Lösungen und Einwegkunststoffmaterialien (z. B. Pipettenspitzen) erfolgte für 20 min bei 120°C und 2 bar in einem Dampfdruckautoklaven (Bioclav 3021001, Schütt Labortechnik, Göttingen).

Lösungen, die thermolabile Bestandteile enthielten, wurden mittels eines Membranfilters sterilfiltriert (Filtropur, Sarstedt, $\varnothing = 0,22 \mu\text{m}$ oder $0,45 \mu\text{m}$). Glas-, Keramik- und Metallwaren wurden für 4 h bei 180°C trockener Hitze entkeimt.

2.1.2. Verwendete Organismen und Plasmide

Im Rahmen dieser Arbeit wurden für die molekularbiologischen Experimente die in Tabelle 1 aufgeführten Bakterienstämme und Ausgangsplasmide verwendet.

Bakterienstamm	Genotyp / relevante Eigenschaften	Firma
Escherichia coli INV α F'	F' <i>endA1 recA1 hsdR17</i> (r_k^- , m_k^+) <i>supE44 thi-1 gyrA96 relA1</i> $\phi 80$ <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169 λ^-	Invitrogen
Epicurian Coli® XL10-Gold® Ultracompetent Cells	<i>recA1 relA1 gyrA96 thi-1 Tet^r</i> Δ (<i>mcrA</i>)183 Δ (<i>mcrCB-hsdSMR-mr'</i>)173 <i>endA1 supE44 lac Hte</i> [<i>F' proAB lacI^q lacZ</i> Δ M15 <i>Tn10</i> (Tet ^r) <i>Amy Cam^r</i>]	Stratagene
Plasmide	relevante Eigenschaften	Firma
pCR®2.1-Vektor	Vektor für T/A-Klonierung, Ampicillinresistenz	Invitrogen
pGL2-basic-Vektor	Luciferase-Reportergen-Vektor, kein Promotor oder Enhancer	Promega
pGL2-control-Vektor	Luciferase-Reportergen-Vektor, SV-40-Promotor	Promega
pcDNA™3.1(-)-Vektor	Klonierungs-Vektor, Geneticin-Resistenz zur Selektion stabil transfizierter Zellen	Invitrogen

Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Bakterienstämme und Plasmide

2.1.3. Allgemeine Kulturbedingungen

Die Kultivierung aller verwendeten Bakterien wurde, soweit nicht anders angegeben, folgendermaßen durchgeführt: Die Kultivierung der Zellen erfolgte in flüssigem LB-Medium (s. u.) in Erlenmeyerkolben, bei ampicillinresistenten Klonen unter Zusatz von 100 µg/ml Ampicillin. Die Kulturen wurden bei 37°C und 220 UPM im Umluftkulturschüttler inkubiert.

Die Aufbewahrung und Vereinzeln der Bakterien erfolgte durch Ausstreichen der Klone auf entsprechenden LB-Agarplatten (\pm Ampicillin). Die bewachsenen Platten wurden anschließend für maximal 2 - 3 Monate bei 4°C gelagert.

Von bestimmten Bakterienkulturen und positiven Klonen wurden für die Konservierung über längere Zeiträume Glycerinkulturen hergestellt. Zu diesem Zweck wurden je 650 µl einer üN-Kultur mit 150 µl sterilem 80%igen Glycerin versetzt, gemischt und bei -80°C gelagert.

2.1.4. Herstellung von LB (Luria-Bertani)-Agarplatten und flüssigem LB-Medium

Der zum Gießen der Platten benötigte Agar enthielt folgende Komponenten:

LB-Agar:	1,5% Agar
	1% Caseinhydrolysat
	0,5% Hefeextrakt
	0,5% Natriumchlorid

Nach Einstellen des pH-Wertes mit 1 M Natriumhydroxidlösung auf 7,4 wurde das Medium für 20 min bei 120°C autoklaviert, anschließend im Wasserbad auf 50-60°C abgekühlt und gegebenenfalls benötigtes Ampicillin (100 µg/ml) zugesetzt. Der Agar wurde auf ca. 50 Petrischalen ($\varnothing = 10$ cm) verteilt und diese nach Abkühlen dunkel bei 4°C bis zur Benutzung gelagert. Die Zugabe des Ampicillins und das Gießen der Platten erfolgte unter sterilen Bedingungen.

Flüssiges LB-Medium wurde in gleicher Weise zubereitet, enthielt jedoch keinen Agar. Ampicillinhaltiges LB-Medium wird nachfolgend als "LB/Amp-Medium" bezeichnet, ampicillinhaltige LB-Agarplatten entsprechend als "LB/Amp-Agarplatten".

2.1.5. Kits und Enzyme

Wenn nicht explizit erwähnt, kamen für die entsprechenden Anwendungen die in Tabelle 2 aufgelisteten kommerziell erhältlichen Kits zum Einsatz.

Anwendung	Bezeichnung	Firma
Klonierung von PCR-DNA-Fragmenten	Original TA Cloning [®] Kit	Invitrogen
DNA-Extraktion aus Agarosegelen	NucleoSpin Extract	Macherey-Nagel
Reinigung von DNA-Fragmenten	NucleoSpin Extract	Macherey-Nagel
Plasmidisolierung	EndoFree [®] Plasmid Maxi Kit	Qiagen
	NucleoSpin Plasmid	Macherey-Nagel
DNA-Sequenzierung	ABI PRISM [™] Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	Applied Biosystems
RNA-Isolierung	RNeasy mini Kit	Qiagen

Tabelle 2: Verwendete kommerziell erhältliche Kits

2.1.6. Restriktionsendonukleasen, DNA-modifizierende Enzyme

Für gentechnische Arbeiten wurden die unten aufgeführten Enzyme und die entsprechenden Puffer von den angegebenen Firmen bezogen. Die spezifische Hydrolyse von DNA erfolgte mit den jeweiligen Restriktionsendonukleasen der Firmen Invitrogen, TaKaRa Bio Inc. und MBI Fermentas.

Enzym	Bezeichnung	Firma
DNA-Ligase	T4 DNA Ligase	Invitrogen
	T4 DNA Ligase	Promega
DNA-Nuklease	DNase I	Invitrogen
DNA-Polymerasen	CombiPol DNA Polymerase	InViTek
	Klenow Enzyme, DNA-Polymerase I, large fragment	Roche Molecular Biochemicals
	Expand High Fidelity PCR-System	Roche Molecular Biochemicals
	<i>Taq</i> DNA Polymerase	Qiagen
	TaKaRa Z-Taq [™]	TaKaRa Bio Inc.
Phosphatase	Alkalische Phosphatase	Boehringer Mannheim GmbH
Reverse Transkriptase	SuperScript [™] II RNase H ⁻ Reverse Transcriptase	Invitrogen

Tabelle 3: Für gentechnische Arbeiten verwendete Enzyme

2.1.7. Verwendete Oligonukleotide (Primer)

Alle zur PCR und DNA-Sequenzierung eingesetzten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech AG hergestellt und sind in Tabelle 4 aufgelistet. Im Folgenden wird die zu amplifizierende Region des Osteocalcin-Promotors mit "osteo-prom" und die zu amplifizierende Region des Cbfa1-Promotors mit "cbfa-prom" bezeichnet (2.2.1).

Bezeichnung	Oligonukleotidsequenz 5'→3'	Bemerkungen
β-Tub1 ¹⁾	TTCCCTGGCCAGCTSAANGCNGACCTNCGCAAG	degenerierter Primer für β-Tubulin (sense; Überprüfung der cDNA)
β-Tub2 ¹⁾	CATGCCCTCGCCNGTGTACCAGTGNANGAAGGC	degenerierter Primer für β-Tubulin (antisense; Überprüfung der cDNA)
cbfa-1F	GATTCTGCTATTATAGGTACACATGA	Primer für cbfa-prom (sense)
cbfa-1R	GAAGAGGCTGTTTGATGCCATAGT	Primer für cbfa-prom (antisense)
cbfa-2F	GAGATACAGATAATATGGATACGACTT	Primer für cbfa-prom (sense)
cbfa-2R	TTCAGATAGAACTTGTACCCTCTGTT	Primer für cbfa-prom (antisense)
cbfaSeq1F	GCACTAGGAAGAACACAGGGATATT	Sequenzierprimer für cbfa-prom
cbfaSeq2F	CCAACTGATGAAAACAGGAAGCT	Sequenzierprimer für cbfa-prom
cbfaSeq3F	CAGAATTAGCAAATCGAGACGACT	Sequenzierprimer für cbfa-prom
cbfaSeq4F	TTCAAAGTAGGCATGAGATAATGGTA	Sequenzierprimer für cbfa-prom
cbfaSeq5F	ACCCAGAATGTGATACAGTCCA	Sequenzierprimer für cbfa-prom
cbfaSeq6F	AGCCACAGTGGTAGGCAGTCCA	Sequenzierprimer für cbfa-prom
cbfaSeq7F	GAGTCAGTGAGTGCTCTTAACCACA	Sequenzierprimer für cbfa-prom
osteo-1F	TGGCTCCAGTCAAGGCTTCAGT	Primer für osteo-prom (sense)
osteo-1R	GAGTGTGAGGGCTCTCATGGT	Primer für osteo-prom (antisense)
osteo-2F	GGTTCCTGTGGATAGGATGA	Primer für osteo-prom (sense)
osteo-2R	GTGAGGGCTCTCATGGTGTCT	Primer für osteo-prom (antisense)
osteo3F	AGAGGGTATAAACAGTGTGGAG	Sequenzierprimer für osteo-prom
osteo-3R	CTCCAGCACTGTTTATACCCTCT	Sequenzierprimer für osteo-prom
osteoSeq1F	TGGGCAACAAGAGTGAAGCTCCAT	Sequenzierprimer für osteo-prom
osteoSeq2F	CTGGGGACACAGGCAAGCATCA	Sequenzierprimer für osteo-prom
osteoSeq3F	TGCAGGGTCAGGAGGAGAATCGT	Sequenzierprimer für osteo-prom
osteoSeq4F	ACGGGGCTGACAGTAGAAATCACA	Sequenzierprimer für osteo-prom
pGL2-basic-forw.	ACTCATCAATGTATCTTATGGTACTG	Sequenzierprimer für den pGL2-basic-Vektor (sense)
pGL2-basic-rev.	GTTCCATCCTCTAGAGGATAGAATG	Sequenzierprimer für den pGL2-basic-Vektor (antisense)
ROCAL-1S	ACTGCATTCTGCCTCTCTGACCTGGC	Primer für Osteocalcin (sense)
ROCAL-4AS	GTAGGCGTCCTGGAAGCCAATGTG	Primer für Osteocalcin (antisense)

¹⁾ Redundanzen: S = G + C; N = A + T + G + C

Tabelle 4: Übersicht der eingesetzten Oligonukleotide

2.1.8. Geräte und Apparaturen

Wenn nicht explizit erwähnt, kamen für alle Arbeiten Einwegkunststoffmaterialien (z. B. Reaktionsgefäße, Pipettenspitzen) und Glasmaterialien (z. B. Meßzylinder, Duran-Flaschen) zum Einsatz. Zusätzlich zu den laborüblichen Standardgerätschaften wie Pipetten, Magnetrührer, Thermomixer etc. wurden folgende Geräte verwendet:

- Chromatographiesystem 1: - 2 Doppelkolbenpumpen Typ 420 der Firma Kontron, Henningen
- Detektor Typ 432 der Firma Kontron, Henningen
- Steuercomputer Data-System Typ 450 der Firma Kontron, Henningen
- Fraktionssammler 2128 der Firma BioRad, München
- Chromatographiesystem 2: - HPLC-Anlage "BioCad 60" der Firma PerSeptive Biosystems, Freiburg
- Fraktionssammler "Advantec SF-2120" der Firma Advantec Toyo Kaisha, Tokyo
- Chromatographiesystem 3: - Pumpensystem "ABI 140D" der Firma Perkin Elmer
- Ofen/Einspritzventil "112A" der Firma Applied Biosystems, Weiterstadt
- Detektor "785A" der Firma Applied Biosystems, Weiterstadt
- Fraktionssammler "Marathon" der Firma Spark Holland B.V., Emmen, NL
- Chromatographiesystem 4: - Autopilot-Anlage der Firma PerSeptive Biosystems, Freiburg
- Chromatographiesäule "Amicon Vantage VA250" der Firma Millipore GmbH, Schwalbach
- 4 l Säulenfüllung "Toyopearl SP 650M" der Firma Tosoh Bioscience GmbH, Stuttgart
- Chromatographiesystem 5: - HPLC-Anlage "BioCad 250" der Firma PerSeptive Biosystems, Freiburg
- Säule "FineLINE" ($\varnothing = 10$ cm) der Firma Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden
- 1,185 l Säulenfüllung "Source™ 15RPC" der Firma Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden
- Chromatographiesystem 6: - HPLC-Anlage "NovaPrep ST-Series" der Firma Merck/SepTech™
- Detektor "L-4000A" der Firma Merck/Hitachi
- Säule "FineLINE" ($\varnothing = 20$ cm) der Firma Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden
- 4,7 l Säulenfüllung "Source™ 15RPC" der Firma Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden
- DNA-Gelelektrophorese: - "Geltray U.V.-Transparent" der Firma Renner, Dannstadt
- DNA-Sequenzierer: - Kapillarelektrophorese-Sequenzier "ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer" der Firma Applied Biosystems, Weiterstadt
- Elektroporation: - "Gene Pulser Xcell™ System" der Firma Bio-Rad Laboratories GmbH, München
- Filtrationsanlage: - Filtrationsstand mit Büchnertrichter, $\varnothing = 320$ mm
- Saugflasche, 20 l
- Vakuumpumpe
- Gefriertrockner: - Vakuumentrifuge "Univapo 150H" der Firma UniEquip, Martinsried
- Vakuumentrifuge "RC 10-10" der Firma Jouan, Saint-Nazaire, Frankreich
- Typ "Epsilon 1-45" der Firma Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz
- Typ "Alpha 1-4" der Firma Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz
- Geldokumentation: - UV-Tisch "TFP-20M" (312 nm) der Firma Renner, Dannstadt
- Dokumentationssystem "EDAS 290" und Software "Kodak 1D v. 3.5.0" der Firma Kodak
- Inkubationsschränke: - "B 5061 EC-CO2" der Firma Heraeus, Hanau
- "B 6120" der Firma Heraeus, Hanau
- Inkubationsschüttler: - "Innova™ 4230" der Firma New Brunswick Scientific, Nürtingen

Kapillarelektrophorese:	- "P/ACE MDQ" mit "P/ACE Diode Array Detector", Software "Beckman P/ACE System MDQ 2.2" und "fused silica" Kapillare (eCAP™ Capillary Tubing, unbeschichtet, 57 cm Länge, Best.Nr. 338454) der Firma Beckman Coulter, München
Küvettschleuder:	- "KS 8 CE" der Firma Innovative-Technische-Systeme Th. Betzel, Hattersheim
Lumineszenz-Reader	- "LUMIstar" (Firmware v. 2.02-0 und Software v. 3.01-0) der Firma BMG Labtech, Offenburg
Mikroplatten-Reader	- "MRX® II" mit Steuerungssoftware "Revelation" Version 4.22 der Firma DYNEX Technologies, West Sussex, UK
Massenspektrometrie:	- "Voyager-DE™ PRO BioSpectrometry™ Workstation" der Firma Perseptive Biosystems/Vestec, Houston
pH-Meter:	- "CG 840" der Firma Schott, Mainz
Reinstwasseranlage:	- "Milli-Q ^{UF} plus" der Firma Millipore GmbH, Schwalbach
Spektralphotometer:	- "DU® 640" der Firma Beckman, inklusive wassertemperierbarem 6-fach Küvettenhalter und Softwarepaket
Sterilisator:	- "Bioclav 3.021 001" der Firma Schütt Labortechnik, Göttingen
Thermocycler:	- "GeneAmp PCR System 2400" der Firma Perkin Elmer
Waagen:	- Laborwaage "LC 2200 S" der Firma Sartorius, Göttingen - Analysenwaage "AC 120 S" der Firma Sartorius, Göttingen
Ultrafiltrationsanlage:	- "FlexStand™ Benchtop System" der Firma Schleicher & Schuell, Dassel - "Polysulfon Hohlfasermodule UFP-50-E-9A", Trenngrenze: 50 kDa, Fläche: 0,84 m ² , Firma Schleicher & Schuell, Dassel - Rotierende Verdrängerpumpe Nemo®, Typ NM031BH01L06H der Firma Netzsch Mohnpumpen, Waldkraiburg
Ultraschallgerät	- "Vibra cell" der Firma Sonics & Materials, Newtown, CT, USA
Zentrifugen:	- Kühlzentrifuge "Centrifuge T-124" der Firma Kontron, Henningen - Kühlzentrifuge "Biofuge 28 RS" der Firma Heraeus, Hanau - Kühlzentrifuge "SIGMA 2K15" der Firma Sigma, Osterode am Harz - Kühlzentrifuge "SIGMA 6K10" der Firma Sigma, Osterode am Harz - Tischzentrifuge "Hettich Mikroliter" der Firma Hettich, Tuttlingen

2.1.9. Computer und Programme

Die Dissertation wurde mit Hilfe eines Personal Computers und Microsoft® Word 97 erstellt. Zum Durchsuchen von öffentlichen Datenbanken über das Internet fand der NCBI-Server und der BLAST-Algorithmus (Basic Local Alignment Search Tool; Altschul *et al.*, 1997) Anwendung. DNA-Vergleiche wurden unter Verwendung der Programme Sequencher™ Version 3.1 und BioEdit Version 7.0.1 durchgeführt. Zur Auswertung und graphischen Darstellung der Daten dienten die Programme Microsoft® Excel 97 und GraphPad Prism Version 3.03 (GraphPad Prism Software Inc., San Diego, CA, USA).

Soweit Signifikanzen in den Abbildungen angegeben wurden, erfolgte zuvor eine One-Way ANOVA mit anschließendem Bonferroni-Test. Abweichungen in den statistischen Auswertungen mit $P < 0,05$ wurden als signifikant gewertet und in den entsprechenden Darstellungen mit einem Sternchen (*) gekennzeichnet.

2.2. Herstellung der Reportergenkonstrukte

2.2.1. PCR - Polymerasekettenreaktion

Zur selektiven Amplifikation von DNA-Fragmenten wurde die Polymerasekettenreaktion ("Polymerase chain reaction" [PCR]; Saiki *et al.*, 1985) verwendet. Die Reaktionen wurden, dem zu amplifizierenden Fragment entsprechend, mit verschiedenen Oligonukleotiden (Tabelle 4) durchgeführt. Für die jeweiligen Anforderungen fanden speziell modifizierte PCR-Methoden Verwendung.

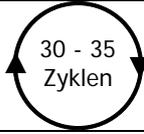
2.2.1.1. Standard-PCR

Diese Methode wurde hauptsächlich eingesetzt, um ausreichende Mengen an DNA für Klonierungen zu gewinnen.

Allgemeiner PCR-Reaktionsansatz:

- 1× PCR-Reaktionspuffer
- 1,5 mM MgCl₂
- 200 nM dNTP-Mix (je 200 nM dATP, dCTP, dGTP, dTTP; Promega)
- 200 nM je Primer
- 10 ng DNA-Matrize (genomische DNA, lysierte Zellen bei Kolonie-PCR oder cDNA bei RT-PCR)
- 0,4 - 1,0 U DNA-Polymerase
- ad 25 µl bidest. H₂O (Sigma)

Allgemeiner PCR-Reaktionsablauf:

1. Erst-Denaturierung der DNA	94°C	3 min	1×
2. Denaturierung	94°C	3 sec	 30 - 35 Zyklen
3. Primeranlagerung	56 - 60°C	30 sec	
4. Verlängerung	72°C	2 - 2.5 min	
5. Endverlängerung	72°C	8 min	1×
6. Kühlen	4°C	∞ min	

Die PCR wurde im "GeneAmp PCR System 2400" der Firma Perkin Elmer durchgeführt. Die Temperatur zur Primeranlagerung wurde für das jeweilige Primerpaar möglichst hoch gewählt, um spezifische Amplifikate zu erhalten. Die Dauer der Verlängerungsphase bei 72°C richtete sich nach der Größe des zu amplifizierenden DNA-Fragments und entsprach einem Richtwert von ca. 1 min pro 1000 Basenpaaren (Bp). Es wurden im Standardfall 30 bzw. 35 Reaktionszyklen (2. - 4. Schritt) durchgeführt.

Für die Amplifikation der Promotorfragmente wurden verschiedene Primerpaare eingesetzt. Eine Übersicht der verwendeten Primerkombinationen, die Länge der resultierenden Fragmente und ihre relative Position zum Translationsstart ist in Tabelle 5 dargestellt.

Sense-Primer	Antisense-Primer	Fragmentlänge [Bp]	Position relativ zum Translationsstart
cbfa-1F	cbfa-1R	2445	-2421 bis +24
	cbfa-2R	2405	-2421 bis -17
cbfa-2F	cbfa-1R	2350	-2326 bis +24
	cbfa-2R	2310	-2326 bis -17
osteo-1F	osteo-1R	2140	-2122 bis +18
	osteo-2R	2136	-2122 bis +14
osteo-2F	osteo-1R	2012	-1994 bis +18
	osteo-2R	2008	-1994 bis +14

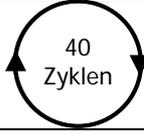
Tabelle 5: Übersicht der verwendeten Primerpaare und die resultierenden Fragmentgrößen und -positionen

2.2.1.2. RT-PCR

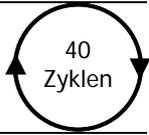
Als RT-PCR ("Reverse transcription - polymerase chain reaction") bezeichnet man eine PCR, bei der als Matrize RNA eingesetzt wird, die zuvor durch Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben wurde (2.2.10).

Die Amplifikation des 237 Bp großen mRNA-Fragments von Osteocalcin erfolgte unter Verwendung der Primer ROCAL-1S/ROCAL-4AS. Zur Überprüfung der synthetisierten cDNA wurde zusätzlich eine RT-PCR mit einem Primerpaar für β -Tubulin (β -Tub1/ β -Tub2) durchgeführt. Die Reaktion erfolgte unter Anpassung des Reaktionsablaufs analog zur Standard-PCR (2.2.1.1).

PCR-Reaktionsablauf für β -Tubulin:

1. Erst-Denaturierung der DNA	94°C	3 min	1x
2. Denaturierung	98°C	1 sec	 40 Zyklen
3. Primeranlagerung	48°C	30 sec	
4. Verlängerung	72°C	1 min	
5. Endverlängerung	72°C	5 min	
6. Kühlen	4°C	∞ min	

PCR-Reaktionsablauf für Osteocalcin:

1. Erst-Denaturierung der DNA	94°C	3 min	1×
2. Denaturierung	98°C	1 sec	
3. Primeranlagerung	58°C	30 sec	
4. Verlängerung	72°C	1 min	
5. Endverlängerung	72°C	5 min	
6. Kühlen	4°C	∞ min	

Anschließend wurden die PCR-Produkte elektrophoretisch in einem 1,2%igen Agarosegel aufgetrennt (2.2.2). Bei erfolgreicher Erststrangsynthese sollte für β -Tubulin ein Amplifikat mit einer Größe von 461 Bp nachweisbar sein.

2.2.1.3. Kolonie-PCR

Mit Hilfe der Kolonie-PCR wurden nach der Transformation die in den Bakterienkolonien etablierten Plasmide auf Vektoren mit integriertem osteo-prom- bzw. cbfa-prom-Fragment hin untersucht. Zu diesem Zweck fanden für den pGL2-basic-Vektor die Sequenzierprimer "pGL2-basic-forw." und "pGL2-basic-rev." Verwendung. Sie schließen die Multiple Cloning Site (MCS) des Plasmids ein. Das PCR-Produkt eines rekombinanten Plasmids (Vektor mit integriertem DNA-Fragment) unterscheidet sich von dem PCR-Produkt des Ausgangsvektors (Plasmid ohne DNA-Fragment) um die Größe der zu klonierenden DNA.

In einem PCR-Reaktionsgefäß wurden 20 μ l Kolonie-PCR-Mix I (siehe unten) vorgelegt und mit einer sterilen kleinen Pipettenspitze etwas Zellmaterial von der zu untersuchenden Bakterienkolonie abgenommen und in den vorgelegten Puffer überführt. Anschließend wurde mit derselben Pipettenspitze ein Impfstrich auf eine ampicillinhaltige LB-Agarplatte (2.1.4) gezogen und diese Replikplatte üN bei 37°C inkubiert. Nach einem initialen Denaturierungsschritt des PCR-Ansatzes von 10 min bei 96°C im Thermocycler folgte eine Abkühlung der Proben auf 55°C für weitere 10 min. Während dieser Phase wurden je 10 μ l des Kolonie-PCR-Mix II (siehe unten) zu den Reaktionsansätzen zugefügt. Anschließend wurde eine Standard-PCR mit den unten angegebenen Bedingungen durchgeführt.

In einer nachfolgenden Gelelektrophorese wurden rekombinante Plasmide anhand der Größe der Kolonie-PCR Produkte identifiziert. Die rekombinante Plasmid-DNA konnte dann durch die Anzucht des entsprechenden *E.coli*-Klons von der Replikplatte mit anschließender Plasmidpräparation hergestellt und als Ausgangsmaterial für weitere Untersuchungen verwendet werden.

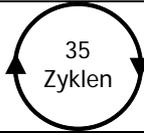
Kolonie-PCR-Mix I für einen Ansatz:

- 1× OptiPerform Puffer III (InViTek)
- 3 mM MgCl₂
- ad 20 µl bidest. H₂O (Sigma)

Kolonie-PCR-Mix II für einen Ansatz:

- 1× OptiPerform Puffer III (InViTek)
- 3 mM MgCl₂
- 100 nM dNTP-Mix (je 100 nM dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Promega)
- 100 nM Primer (pGL2-basic-forw.; sense)
- 100 nM Primer (pGL2-basic-rev.; antisense)
- 0,4 U CombiPol Polymerase (InViTek)
- ad 10 µl bidest. H₂O (Sigma)

Reaktionsablauf der Kolonie-PCR:

1. Erst-Denaturierung der DNA mit Kolonie-PCR-Mix I	96°C	10 min	1×
2. Zugabe des Kolonie-PCR-Mix II	55°C	10 min	1×
3. Denaturierung	95°C	10 sec	
4. Primeranlagerung	60°C	20 sec	
5. Verlängerung	72°C	3 min	
6. Endverlängerung	72°C	3 min	1×
7. Kühlen	4°C	∞ min	

2.2.2. Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

Die analytische bzw. präparative Auftrennung von DNA erfolgte dem Trennungsziel entsprechend in 0,8 - 2,0%igen Agarosegelen. Nach Aufkochen der Agarose in 1× TAE-Puffer (s. u.) wurde diese auf ca. 50°C abgekühlt und es wurden 0,1 µg/ml Ethidiumbromid zur späteren Visualisierung der DNA-Banden unter UV-Licht zugesetzt. Die Proben wurden vor dem Einfüllen in die Geltaschen im Verhältnis 4 Teile Probe : 1 Teil Marker mit 5-fach konzentriertem Blaumarker versetzt, wodurch ein Einsinken der Proben in die Geltaschen und eine Sichtbarmachung der Lauffront erreicht wurde. Die Auftrennung der DNA wurde in Abhängigkeit von der Gelgröße bei 80 V bzw. 120 V in 1× TAE-Puffer in einer horizontalen Elektrophoresekammer durchgeführt. Die Größen der DNA-Fragmente konnten anhand eines im Gel aufgetrennten DNA-Größenstandards (1 kbp DNA-Leiter bzw. 100 Bp DNA-Leiter, Invitrogen) abgeschätzt werden.

Ethidiumbromid-Lösung: 1 µg/µl Ethidiumbromid in bidest. H₂O

50x TAE-Puffer:
2 M Tris
0,1 M EDTA
1 M Essigsäure

Der Puffer wurde vor der Verwendung im Verhältnis 1 : 50 mit bidest. H₂O verdünnt.

5x Blaumarker:
70% Glycerin
10 mM Tris-HCl, pH 8,0
10 mM EDTA
0,05% (w/v) Bromphenolblau

2.2.3. Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Die Gewinnung von DNA nach Auftrennung in Agarosegelen erfolgte mit Hilfe des "NucleoSpin Extract Kit" (Macherey-Nagel).

Die entsprechend elektrophoretisch isolierte DNA-Bande wurde mit einem sterilen Skalpell aus dem Agarosegel herausgeschnitten, in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und gewogen. Pro 100 mg Gel wurden 300 µl Puffer NT1 zugesetzt und bei 50°C inkubiert, bis das Gelstück vollständig geschmolzen war. Zur Beschleunigung des Lösevorgangs wurde die Probe alle 2-3 min vorsichtig gevortext. Die Lösung wurde anschließend in eine NucleoSpin Säule überführt und bei 6.000 × g für 1 min zentrifugiert. Die Säule wurde je zweimal mit 700 µl Puffer NT3 gewaschen und für 1 min bei 6.000 × g zentrifugiert. Durch die nachfolgende Zentrifugation für 5 min wurde die Säule getrocknet. Die Elution der DNA erfolgte mit 50 µl bidest. H₂O in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß.

Ein Aliquot der gereinigten DNA wurde zwecks Überprüfung der Isolierung auf ein Agarosegel aufgetragen.

2.2.4. Klonierung in den pCR[®]2.1-Vektor

Die aufgereinigten Promotorfragmente (2.2.3) wurden zunächst zum Zwecke der Vervielfältigung und Sequenzierung über T/A-Klonierung (Marchuk *et al.*, 1991) unter Verwendung des "Original TA Cloning[®] Kit" (Invitrogen) in den pCR[®]2.1-Vektor kloniert.

Dieser Vektor enthält das *lacZ*α-Fragment, welches die ersten 146 Aminosäuren einer aktiven β-Galaktosidase kodiert. Dieses Enzym hydrolysiert das farblose Substrat X-Gal und das auf diese Weise abgespaltene Indoxyl wird an der Luft zu einem blauen Indigo-Farbstoff oxidiert. Innerhalb des *lacZ*α-Fragments befindet sich die Multiple Cloning Site (MCS) des

pCR[®]2.1-Vektors. Das Plasmid ist in diesem Bereich linearisiert und besitzt an beiden 3'-Enden Thymidin (T)-Überhänge, welche durch die T4 DNA Ligase mit den Adenosin-Überhängen im PCR-Produkt verknüpft werden.

Enthält der Vektor keine Fremd-DNA, so bleibt das *lacZ* α -Fragment intakt und das β -Galaktosidase-Teilprotein kann synthetisiert werden. Zellen, die diesen Vektor enthalten, färben sich nach Zugabe von X-Gal zum Kulturmedium blau. Wird jedoch ein DNA-Fragment in die MCS eingefügt, zerstört dieses die Funktionalität des β -Galaktosidase-Teilproteins, so dass keine aktive β -Galaktosidase gebildet werden kann. Folglich wird X-Gal nicht hydrolysiert und die Kulturen bleiben weiß. Dieses Prinzip ist die Grundlage eines einfachen Screenings von transformierten Bakterien und wird als Blau/Weiß-Selektion bezeichnet.

Im Folgenden werden die pCR[®]2.1-Vektoren, die den Osteocalcin- oder den Cbfa1-Promotor enthalten, mit "pCR2.1-osteo" bzw. "pCR2.1-cbfa" bezeichnet.

2.2.4.1. Ligation

Zur Ligation der DNA in den pCR[®]2.1-Vektor wurden folgende Ansätze pipettiert:

<u>Ligationsansatz:</u>	1 μ l	10 \times Ligationspuffer
	1 μ l	pCR [®] 2.1-Vektor (25 ng/ μ l), linearisiert
	1 μ l	T4 DNA Ligase (4,0 Weiss units/ μ l)
	1,5 - 3 μ l	aufgereinigte DNA
	ad 10 μ l	bidest. H ₂ O (Sigma)

Die Ligation erfolgte über Nacht (>8 h) bei 14°C. Als Negativkontrolle wurde anstelle von aufgereinigter DNA Wasser (Sigma) verwendet.

Die rekombinante DNA wurde anschließend in kompetente *Escherichia coli* INV α F'-Zellen (Invitrogen) transformiert.

2.2.4.2. Transformation von Plasmid-DNA in kompetente *E.coli*-Zellen

Nach Ligation der Promotorfragmente in den pCR[®]2.1-Vektor wurde die Plasmid-DNA in kompetente Zellen ("One Shot[®] Competent Cells", Stamm: INV α F', Invitrogen) transformiert. Die kompetenten Zellen wurden hierzu 5 min in Eiswasser aufgetaut, der Ligationsansatz zugegeben und die Probe durch vorsichtiges Umrühren mit der Pipettenspitze vermischt.

Ein Transformationsansatz enthielt:

50 μ l	kompetente <i>E.coli</i> INV α F'
3 μ l	Ligationsansatz

Die Probe wurde 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock für 30 sec bei 42°C im Wasserbad. Der Ansatz wurde wieder auf Eis gestellt, 250 µl SOC Medium (Raumtemperatur) zugefügt und die Zellen für 1 h bei 37°C mit 225 UPM geschüttelt. Das Ausplattieren des gesamten Transformationsansatzes erfolgte auf LB/Amp-Agarplatten (2.1.4), die zuvor mit 40 µl einer 2%igen X-Gal-Lösung (in Dimethylformamid) bestrichen worden waren. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

Anschließend wurden positive (weiße) Kolonien mittels Plasmidisolierung (2.2.4.3) und nachfolgendem Restriktionsverdau (2.2.4.4) überprüft. Klone, die Plasmid-DNA der erwarteten Größe enthielten, wurden zwecks genauer Sequenzanalyse einer DNA-Sequenzierung (2.2.5) unterzogen.

<u>Zusammensetzung des SOC-Mediums:</u>	2% Trypton
	0,5% Hefeextrakt
	10 mM NaCl
	2,5 mM KCl
	10 mM MgCl ₂
	10 mM MgSO ₄
	20 mM Glukose

2.2.4.3. Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Zur Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien wurde das "NucleoSpin[®] Plasmid Kit" (Macherey-Nagel) verwendet. Die Zentrifugationen erfolgten jeweils bei 13.000 × g.

Die Bakterien wurden über Nacht in 3 ml flüssigem LB/Amp-Medium bei 37°C und 225 UPM auf einem horizontalen Inkubationsschüttler kultiviert. Nach etwa 18 h wurden 2 ml der Kultur 5 min zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet in 250 µl Puffer A1 vollständig resuspendiert. Die anschließende Lyse der Zellen erfolgte durch Zugabe von 250 µl Puffer A2 und nachfolgender Inkubation für 5 min bei RT. Danach wurden 300 µl Puffer A3 zugegeben und die ausgefällten Bestandteile 10 min bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine NucleoSpin Plasmid Säule gegeben und 1 min bei RT zentrifugiert. Durch Zugabe von 2× aufeinanderfolgende 600 µl Puffer A4 mit nachfolgender Zentrifugation für 1 min bei RT wurde die Säule gewaschen. Pufferreste wurden durch eine weitere Zentrifugation für 2 min von der Säule entfernt. Die Elution der Plasmid-DNA erfolgte nach Zugabe von 50 µl Puffer AE durch Zentrifugation für 1 min.

2.2.4.4. Restriktionsverdau von Plasmid-DNA

Um den erfolgreichen Einbau der Promotor-DNA in den pCR[®]2.1-Vektor zu überprüfen, wurde ein Verdau der isolierten Plasmid-DNA durchgeführt. Die aus den verschiedenen Klonen gewonnene Plasmid-DNA wurde durch spezifische Restriktionsendonukleasen geschnitten, mittels Gelelektrophorese aufgetrennt (2.2.2) und die entstandenen Bandenmuster wurden mit den erwarteten Fragmentgrößen verglichen. Die Plasmid-DNA der Klone, die dem Restriktionsverdau zufolge den pCR2.1-osteo bzw. pCR2.1-cbfa Vektor enthielten, wurde zur genaueren Analyse sequenziert (2.2.5).

Folgende Komponenten wurden pro Restriktionsansatz pipettiert:

Für pCR2.1-osteo:

- 3 µl Plasmid-DNA
- 2 µl 10× *Bam*H I-Puffer (Invitrogen)
- 0,3 µl *Bam*H I (Invitrogen)
- 14,7 µl bidest. H₂O

Für pCR2.1-cbfa:

- 2 µl Plasmid-DNA
- 2 µl 10× Puffer Gelb(Invitrogen)
- 0,3 µl *Pst* I (Invitrogen)
- 15,7 µl bidest. H₂O

Der Verdau erfolgte 60 min bis 90 min lang bei 37°C.

2.2.5. Sequenzierung von DNA

Zur Bestimmung der Nukleotidsequenz von DNA wurde eine modifizierte Form des von SANGER *et al.* (1977) beschriebenen enzymatischen Kettenabbruchverfahrens verwendet. Bei dieser als "Cycle-Sequencing" bezeichneten Methode wird die zu sequenzierende DNA-Sequenz in einer PCR mit nur einem Primer linear amplifiziert. Der Reaktionsablauf wird einer PCR entsprechend bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt und ist in die Schritte Denaturierung der DNA, Anlagerung des Primers und Verlängerung unterteilt.

Dem Reaktionsansatz werden neben den für die DNA-Synthese benötigten Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs) zusätzlich Didesoxynukleosidtriphosphate (ddNTPs) in einem bestimmten Verhältnis zugesetzt. Werden diese ddNTPs während der Verlängerungsphase in einen neu entstehenden DNA-Strang eingebaut, kommt es wegen der fehlenden 3'-OH-Gruppe zum Abbruch der Kettenreaktion. Durch diesen Prozeß reichern sich im Verlauf der Reaktionszyklen spezifische Abbruchprodukte im Reaktionsansatz an. Zur Markierung der Abbruchprodukte sind die ddNTPs direkt mit Farbstoffen unterschiedlicher Fluores-

zesspektren verbunden. Dadurch wird die parallele automatisierte Detektion der spezifischen PCR-Produkte während der anschließend durchgeführten Kapillarelektrophorese ermöglicht. Die DNA-Fragmente werden dabei in Abhängigkeit von ihrer Größe separiert.

Die Sequenzierreaktionen erfolgten unter Verwendung des "ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit" der Fa. Applied Biosystems und wurden den Angaben des Herstellers entsprechend durchgeführt.

Einfacher PCR-Reaktionsansatz für die Sequenzierreaktion:

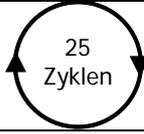
3 µl Dye Terminator Ready Reaction Mix
 1 µl Oligonukleotid (10 pmol/µl)
 x µl DNA-Matrize
 ad 20 µl bidest. H₂O

Das Volumen der Plasmid-DNA-Lösung wurde so gewählt, dass eine Gesamtmasse [m_{DNA}] von

$$m_{\text{DNA}} [\text{ng}] = \frac{\text{Plasmidgröße [Bp]}}{10}$$

pro Reaktionsansatz enthalten war.

Temperaturprogramm der PCR:

Denaturierung	96°C	10 sec	
Anlagerung	55-60°C	5 sec	
<u>Verlängerung</u>	60°C	4 min	
Kühlen	4°C		

Die PCR-Produkte wurden nach Beendigung des Temperaturprogramms durch DNA-Fällung gereinigt. Hierzu wurden die Ansätze jeweils in 1,5 ml Eppendorfgläser überführt und das Gesamtvolumen mit bidest. H₂O auf 100 µl eingestellt. Durch Zugabe von 260 µl eines Gemisches aus 250 µl Ethanol und 10 µl 3 M Natriumacetatlösung (pH 4,6) wurde die DNA bei RT gefällt und für 15 min bei 15.000 × g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die gefällte DNA einmal mit 400 µl 70%igem Ethanol gewaschen und 5 min bei 15.000 × g zentrifugiert. Das Sediment wurde nach Entfernen des Überstandes für 5 - 10 min bei 37°C im Thermomixer getrocknet und anschließend in 25 µl bidest. H₂O gelöst.

Die Analyse der DNA erfolgte auf einem Kapillarelektrophorese-Sequenzier (ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer) mit nachstehenden Parametern:

Injektionszeit = 8 sec
Spannung = 15 kV
Temperatur = 50°C
Laufzeit = 36 min

Die Aufzeichnung und Auswertung der Daten erfolgte durch die "Data Collection Software" bzw. "Data Analysis Software" der Firma Applied Biosystems auf einem Macintosh-Computer.

2.2.6. Klonierung in den pGL2-basic-Vektor

Nachdem die Promotorfragmente in den pCR[®]2.1-Vektor kloniert wurden (2.2.4) , erfolgte die Umklonierung in den pGL2-basic-Vektor.

Im Folgenden werden die pGL2-basic-Vektoren, die den Osteocalcin- oder den Cbfa1-Promotor enthalten, mit "pGL2-osteo-x" bzw. "pGL2-cbfa-x" bezeichnet. Der Anhang "x" gibt an, in welcher Richtung das Promotorfragment in den pGL2-basic-Vektor eingefügt wurde. Die Abkürzung "s" steht dabei für "sense" und "as" für "antisense".

2.2.6.1. Herstellung endotoxinfreier Plasmid-DNA

Zur Gewinnung größerer Mengen von endotoxinfreier Plasmid-DNA aus Bakterien wurde das "EndoFree™ Plasmid Maxi Kit" (Qiagen) verwendet.

Der jeweilige Bakterienstamm wurde in 3 ml LB/Amp-Medium (2.1.4) angeimpft und für ca. 6 h bei 37°C und 225 UPM geschüttelt. Es wurden 1 - 3 ml dieser Vorkultur in 100 ml LB/Amp-Medium überführt und über Nacht bei 37°C und 225 UPM inkubiert. Die Bakterien wurden für 20 min mit 2.800 × g bei 4°C abzentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Die Resuspendierung des Bakterienpellets erfolgte durch Zugabe von 10 ml Puffer P1 und anschließendem Vortexen. Durch vorsichtiges Mischen der Suspension mit 10 ml Puffer P2 und Inkubation für 5 min bei RT lysierten die Zellen. Nach Fällung der chromosomalen Bakterien-DNA und bakterieller Proteine durch Zugabe von 10 ml eiskaltem Puffer P3 und vorsichtigem Durchmischen wurde die Probe in die Filterspritze ("QIAfilter cartridge") gefüllt und weitere 10 min bei RT inkubiert. Die ausgefällten Zellbestandteile wurden anschließend durch Filtration entfernt, das resultierende Lysat wurde mit 2,5 ml Puffer ER versetzt und nachfolgend für 30 min auf Eis gekühlt, wodurch eine Zersetzung der in der Suspension enthaltenen Endotoxine erzielt wurde. Nach Äquilibrierung der "QIAGEN-Tip500" Säule mit

10 ml Puffer QBT wurde das Lysat über diese Säule gegeben und zweimal mit je 30 ml Puffer QC gewaschen. Die gebundene Plasmid-DNA wurde mit 15 ml Puffer QN in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen (Herolab) eluiert, durch Zugabe von 10,5 ml [= 0,7 Vol.(v/v)] Isopropanol gefällt und 30 min bei $15.000 \times g$ und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 1 ml 70%igem Ethanol gewaschen und weitere 10 min bei $15.000 \times g$ und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, das Pellet vollständig bei 37°C im Thermomixer getrocknet und die DNA anschließend in 150 μl endotoxinfreiem H_2O (Sigma) gelöst.

2.2.6.2. Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Die Ermittlung der DNA- bzw. RNA-Konzentration erfolgte mittels UV-Spektrometrie. Dazu wurden jeweils 5 μl der Proben mit 295 μl bidest. H_2O verdünnt und in eine Quarzküvette mit 1 cm Schichtdicke überführt. Die optische Dichte bei 260 nm wurde gegen bidest. H_2O als Referenz gemessen und die Nukleinsäurekonzentration nach folgender Formel berechnet:

$$c [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = \text{OD}_{260} \times \varepsilon \times \text{VF}$$

c = DNA- bzw. RNA-Konzentration

OD_{260} = optische Dichte bei 260 nm

ε = Extinktionskoeffizient ($\varepsilon = 0,05$ für dsDNA bzw. $0,04$ für ssRNA)

VF = Verdünnungsfaktor (hier: VF = 60)

Zur Ermittlung der Reinheit der jeweiligen DNA oder RNA wurde zusätzlich der Quotient von $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ bestimmt. Bei einem Wert $> 1,6$ wurde mit der Aufarbeitung fortgefahren (der Idealwert für wässrige Nukleinsäurelösungen liegt bei ca. 1,8-2,0).

Die DNA-Konzentration der Plasmid-DNA-Präparationen wurde zum Zwecke der Umklonierung und zur Transfektion eukaryotischer Zellen mit endotoxinfreiem H_2O (Sigma) auf $c = 1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ eingestellt.

2.2.6.3. Verdau des pGL2-basic-Vektors

Zur Umklonierung der Promotorfragmente in den pGL2-basic-Vektor mußte die zirkuläre Plasmid-DNA mittels einer Restriktionsendonuklease geöffnet werden. Dieser mit *Sma* I geschnittene Vektor wird als "pGL2-basic↓*Sma*I" bezeichnet. Nach dem Verdau durch die Nuklease *Sma* I besitzt der linearisierte Vektor zwei glatte Enden ("blunt ends").

Restriktionsansatz für pGL2-basic: 1 µg Plasmid-DNA
4 µl 10× Puffer React 4 (Invitrogen)
14 U *Sma* I (Invitrogen)
ad 40 µl bidest. H₂O

Die Restriktion erfolgte für 2 h bei 30°C. Anschließend wurde die geschnittene DNA aufgereinigt (2.2.6.5) und wie unter 2.2.6.6 beschrieben dephosphoryliert.

2.2.6.4. Verdau von pCR2.1-osteo und pCR2.1-cbfa

Die in den pCR[®]2.1-Vektor klonierte Promotor-DNA wurde aufgrund der im Plasmid enthaltenen Restriktionsschnittstellen unter Verwendung von entsprechenden Restriktionsendonukleasen aus dem Plasmid herausgeschnitten. Die erhaltenen Promotorfragmente werden mit "osteo↓*Eco*RI" bzw. "cbfa↓*Eco*RI" benannt und besitzen nach dem Verdau durch die Nuklease "*Eco*R I" zwei überhängende Enden ("sticky ends").

Restriktionsansatz für pCR2.1-osteo: 1 µg Plasmid-DNA
4 µl 10× Puffer H (TaKaRa)
21 U *Eco*R I (TaKaRa)
ad 40 µl bidest. H₂O

Restriktionsansatz für pCR2.1-cbfa: 2 µg Plasmid-DNA
4 µl 10× Puffer H (TaKaRa)
22,5 U *Eco*R I (TaKaRa)
ad 40 µl bidest. H₂O

Die Restriktionen wurden jeweils für 2 h bei 37°C durchgeführt. Die Reinigung der geschnittenen DNA erfolgte anschließend wie unter 2.2.6.5 beschrieben.

2.2.6.5. Aufreinigung von geschnittener DNA

Die Aufreinigung von DNA nach Behandlung mit Restriktionsendonukleasen wurde mit dem "NucleoSpin Extract Kit" (Macherey-Nagel) durchgeführt.

Der entsprechende Restriktionsansatz (2.2.6.4) wurde mit dem vierfachen Volumen an Puffer NT2 versetzt, in eine NucleoSpin Säule überführt und bei 11.000 × g für 1 min zentrifugiert. Die Säule wurde einmal mit 600 µl Puffer NT3 gewaschen und für 1 min bei 11.000 × g zentrifugiert. Anschließend erfolgte nochmaliges Waschen mit 200 µl Puffer NT3 und Zentrifugation für 2 min bei 11.000 × g. Um Reste von Ethanol zu entfernen, wurde die Säule im Thermomixer für 2 - 5 min auf 70°C erhitzt. Durch Zugabe von 50 µl endotoxinfreiem H₂O (Sigma), 1-minütiger Inkubation bei RT und nachfolgender Zentrifugation für 1 min bei 11.000 × g wurde die gebundene DNA von der Säule eluiert.

2.2.6.6. Dephosphorylierung von geschnittener DNA

Die pGL2-basic \downarrow *Sma*I-DNA (2.2.6.3) wurde vor der Ligation mit den Promotorfragmenten dephosphoryliert. Die hierzu verwendete Alkalische Phosphatase (AP) ist eine Phosphomonoesterase, die 3'- und 5'-Phosphate von DNA hydrolysiert. Da die zur Ligation eingesetzte T4-DNA-Ligase nur 5'-Phosphat-Enden mit 3'-OH-Enden verknüpfen kann, verhindert man durch die Behandlung der gespaltenen pGL2-basic \downarrow *Sma*I-DNA mit alkalischer Phosphatase eine Religation des Vektors. Die geschnittenen und aufgereinigten Promotorfragmente besitzen die für die Ligation benötigten 5'-Phosphat-Enden und können demnach mit der Vektor-DNA verbunden werden. Insgesamt erhöht sich somit der Anteil rekombinanter Plasmide (pGL2-basic-Vektor mit eingefügtem Promotor) im Ligationsansatz.

Die Dephosphorylierung wurde wie folgt durchgeführt:

Dephosphorylierungsansatz:

49,5 μ l	pGL2-basic \downarrow <i>Sma</i> I
5,5 μ l	10 \times AP-Puffer
1 μ l	Alkalische Phosphatase

Die Probe wurde gemischt und für 15 min bei 37°C inkubiert, dann wurde dem Ansatz erneut

1 μ l Alkalische Phosphatase

zugefügt. Nach Durchmischen erfolgte eine weitere Inkubation für 15 min bei 37°C. Durch Erhitzen der Probe auf 65°C für 20 min wurde die Alkalische Phosphatase inaktiviert.

Der linearisierte und dephosphorylierte pGL2-basic \downarrow *Sma*I-Vektor wurde anschließend elektrophoretisch in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt (2.2.2) und aufgereinigt (2.2.3).

2.2.6.7. Auffüllen von überhängenden DNA-Enden

Bei der Herstellung der beiden Promotorfragmente "osteo \downarrow *Eco*RI" und "cbfa \downarrow *Eco*RI" mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen (2.2.6.4) entstehen an den Enden des DNA-Doppelstranges sogenannte "überhängende" Enden. Dabei handelt es sich um überstehende Basen eines der beiden Einzelstränge. Das verwendete Restriktionsenzym "*Eco*R I" erzeugt folgende Schnittstellen (5'-Überhang):

5'-G	AATTC-3'
3'-CTTAA	G-5'

Das Klenow-Enzym ("Großes Fragment" der DNA-Polymerase I) katalysiert die Anlagerung von Mononukleotiden aus Desoxynucleosid-5'-triphosphaten (dNTPs) an das freie 3'-OH-Ende des kürzeren Einzelstranges. Diese Verlängerung erfolgt komplementär zum 5'-Überhang und erzeugt Doppelstrang-DNA ohne Überhang, die man als DNA mit "stumpfen" Enden bezeichnet (Abbildung 8).

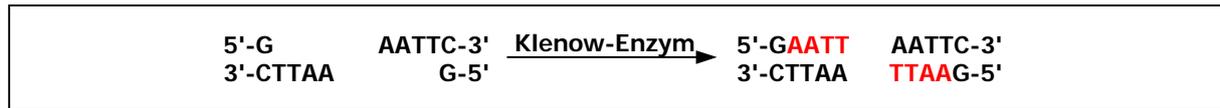


Abbildung 8: Auffüllen der "überhängenden" Enden der DNA durch das Klenow-Enzym. Die neu angelagerten Basen sind rot dargestellt.

Die Erzeugung von stumpfen Enden bildete die Voraussetzung einer Ligation mit dem pGL2-basic \downarrow *Sma*I-Vektor, der durch den Verdau mit *Sma*I ebenfalls stumpfe Enden aufwies. Ein Reaktionsansatz enthielt folgende Bestandteile:

<u>Klenow-Reaktionsansatz:</u>	45-47 μ l	osteo \downarrow <i>Eco</i> RI bzw. cbfa \downarrow <i>Eco</i> RI
	6 μ l	10 \times Klenow-Puffer
	3 μ l	Klenow-Enzym (2 Einheiten/ μ l)
	1,2 μ l	dNTP-Mix (mit je 200 nM dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Promega)
	ad 60 μ l	bidest. H ₂ O

Nach Inkubation für 15 min bei 37°C erfolgte die Hitzeinaktivierung des Klenow-Enzyms durch Inkubation für 10 min bei 65°C. Die beiden mit Klenow-Enzym behandelten Promotorfragmente wurden elektrophoretisch in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt (2.2.2) und aufgereinigt (2.2.3).

2.2.6.8. Ligation in den pGL2-basic-Vektor

Die Ligation der Promotorfragmente in den pGL2-basic-Vektor wurde wie folgt durchgeführt:

<u>Ligationsansatz für osteo\downarrow<i>Eco</i>RI:</u>	1 μ l	10 \times Ligationspuffer (Promega)
	10 μ l	osteo \downarrow <i>Eco</i> RI *
	1 μ l	pGL2-basic \downarrow <i>Sma</i> I
	1 μ l	T4 DNA Ligase (Promega)

*) Die benötigte Menge der DNA-Präparation "osteo \downarrow *Eco*RI" wurde zuvor lyophilisiert und in 7 μ l endotoxinfreiem H₂O (Sigma) gelöst.

<u>Ligationsansatz für cbfa\downarrow<i>Eco</i>RI:</u>	1 μ l	10 \times Ligationspuffer (Promega)
	3 μ l	cbfa \downarrow <i>Eco</i> RI
	1 μ l	pGL2-basic \downarrow <i>Sma</i> I
	1 μ l	T4 DNA Ligase (Promega)
	4 μ l	bidest. H ₂ O

Die Ligation der Fragmente mit dem pGL2-Vektor zu den jeweiligen Reporter-genkonstrukten erfolgte über Nacht (>8 h) bei 16°C im Wasserbad.

2.2.6.9. Transformation von Plasmid-DNA in kompetente *E.coli*-XL10-Gold-Zellen

Die Reportergergenkonstrukte "pGL2-osteo" und "pGL2-cbfa" wurden in kompetente *E.coli*-XL10-Gold-Zellen (2.2.7) transformiert.

Die Bakterien wurden 5 min auf Eis aufgetaut, der Ligationsansatz vorsichtig mit den Zellen vermischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Pro Transformationsansatz wurden verwendet:

100 µl kompetente *E.coli*-XL10-Gold-Zellen
5 µl Ligationsansatz

Die Transformation erfolgte durch Hitzeschock für 45 sec bei 42°C im Wasserbad. Der Ansatz wurde auf Eis überführt und nach 1 - 2 min mit 900 µl SOC Medium (RT) vermischt. Die Zellen wurden für 1 h bei 37°C und 200 UPM inkubiert und anschließend für 10 min bei 1.000 x g abzentrifugiert. Es wurden 700 µl des Überstandes verworfen, die Zellen im restlichen Medium resuspendiert und auf LB/Amp-Agarplatten (2.1.4) ausgestrichen. Die Inkubation der Bakterien erfolgte über Nacht bei 37°C.

Nachfolgend wurden die Klone mittels Kolonie-PCR (2.2.1.3) auf rekombinante Plasmide hin überprüft. Aus den Klonen, die Plasmid-DNA der erwarteten Größe enthielten, wurde Plasmid-DNA isoliert (2.2.4.3) und diese zur genauen Analyse sequenziert (2.2.5).

2.2.7. Herstellung transformationskompetenter Zellen

Die Herstellung transformationskompetenter *E.coli*-Zellen des Stammes "Epicurian Coli XL10-Gold" erfolgte in Anlehnung an die Methode von Nishimura *et al.* (1990).

Hierzu wurden 5 ml LB-Medium mit Zellen des o. g. Stammes angeimpft und üN bei 37°C und 200 UPM kultiviert. Von dieser Vorkultur wurde 1 ml entnommen und in 100 ml Medium A überführt. Die Zellen wurden bis zu einer $OD_{578\text{ nm}} = 0,55$ bei 37°C und 200 UPM inkubiert, für 10 min auf Eis abgekühlt und 10 min bei 1.500 x g und 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml eiskaltem Medium A resuspendiert und anschließend erfolgte unter leichtem Schwenken die tropfenweise Zugabe von 5 ml Medium B. Es wurden Aliquots von je 100 µl in vorgekühlte (-80°C) Eppendorfgefäße gefüllt und bei -80°C eingefroren und gelagert.

Medium A: 10 mM MgSO₄
0,2% Glukose
gelöst in LB-Medium (2.1.4)

Medium B: 12 mM MgSO₄
36% Glukose
12% Polyethylenglykol (PEG) 8000
gelöst in LB-Medium (2.1.4)

Beide Medien wurden mit Hilfe eines Spritzenfilters steril filtriert.

2.2.8. Isolierung von RNA aus eukaryotischen Zellen

Zur Isolierung von RNA aus ROS-IPF-o-15-Zellen wurde das "RNeasy Mini Kit" der Firma Qiagen verwendet. Alle Arbeits- und Zentrifugationsschritte erfolgten bei Raumtemperatur. Die in 6-Well-Platten kultivierten Zellen wurden nach Entfernen des Überstandes einmal mit 1 ml D-PBS gewaschen und durch Zugabe von 500 µl Puffer RLT (inkl. 1% β-Mercaptoethanol) lysiert. Das Lysat wurde in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

Nach Auftauen der tiefgefrorenen Lysate erfolgte die Zugabe von 500 µl 70%igem Ethanol. Die Proben wurden durch Auf- und Abpipettieren gemischt, auf die RNeasy-Säule gegeben und für 15 sec bei 8.000 × g zentrifugiert. Das Waschen der Säule erfolgte zunächst durch Zugabe von 700 µl Puffer RW1 und Zentrifugation für 15 sec bei 8.000 × g, anschließend durch zweimaligen Zusatz von je 500 µl ethanolhaltigem Puffer RPE mit jeweils nachfolgender Zentrifugation für 2 min bei 8.000 × g. Der Durchlauf wurde entfernt und die Säule eine weitere Minute bei 13.000 × g bis zur Trocknung zentrifugiert. Die Elution der RNA erfolgte durch Zugabe von 50 µl RNase-freiem Wasser und Zentrifugation für 1 min bei 8.000 × g. Um eine höhere Gesamt-RNA-Konzentration zu erzielen, wurde das Eluat erneut auf die Säule gegeben und ein zweites Mal für 1 min bei 8.000 × g zentrifugiert.

Zur photometrischen Bestimmung der Konzentration und Qualität der isolierten RNA (2.2.6.2) wurden je 5 µl der Proben entnommen und die verbleibende RNA-Lösung bei -80°C gelagert.

2.2.9. DNase-Verdau von RNA-Lösungen

Die RNA-Lösungen wurden vor der Verwendung als Matrize in der cDNA-Synthese (2.2.10) einem DNase-Verdau unterzogen, um verunreinigende genomische DNA zu hydrolysieren. Das Volumen der eingesetzten RNA-Lösung entsprach einer RNA-Menge von 2 µg. Folgende Komponenten wurden pro Reaktionsansatz pipettiert:

Ansatz für DNase-Verdau:

- 2 µg RNA
- 1 µl RNasin (Promega)
- 1 µl 10× DNase I Reaktionspuffer (Invitrogen)
- 1 µl DNase I (Invitrogen)
- ad 9 µl RNase-freies H₂O

Der Verdau erfolgte für 15 min bei RT. Die DNase wurde durch Zugabe von

1 µl 25 mM EDTA (Gibco BRL)

und Inkubation für 10 min bei 65°C inaktiviert. Nach Abkühlen der Proben auf Eis erfolgte die cDNA-Synthese.

2.2.10. Herstellung von cDNA (Erststrangsynthese)

Zum Nachweis bestimmter RNA-Fragmente mittels RT-PCR (2.2.1.2) mußte die RNA mit Hilfe des viralen Enzyms "Reverse Transkriptase" in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden.

Für die Reaktion wurde ein DNase-Reaktionsansatz (2.2.9) mit 2 µl cDNA-Synthese-Mix I vermischt, 10 min bei 70°C denaturiert und anschließend direkt auf Eis abgekühlt.

cDNA-Synthese-Mix I für einen Ansatz:

- 1 µl RNase-freies H₂O
- 1 µl 0,5 µg/µl Random Primer (Hexamere, Invitrogen)

Nach einer Zentrifugation für 1 min in einer Tischzentrifuge erfolgte die Zugabe von 7 µl cDNA-Synthese-Mix II und Mischen der Probe mit der Pipettenspitze.

cDNA-Synthese-Mix II für einen Ansatz:

- 4 µl 5× Erststrang-Puffer (Invitrogen)
- 2 µl 0,1 M Dithiothreitol (DTT) (Invitrogen)
- 1 µl dNTP-Mix (je 2,5 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Promega)

Der Ansatz wurde für 2 min bei 42°C inkubiert, und nach Zusatz von

- 1 µl SuperScript II RNase H⁻ (Invitrogen)

erfolgte die Synthese der cDNA bei 42°C für 50 min. Abschließend wurde das Enzym für 15 min bei 70°C inaktiviert die erhaltene cDNA bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Für die vergleichende Quantifizierung mittels semiquantitativer RT-PCR (2.2.1.2) wurde angenommen, dass die eingesetzte RNA (2 µg) vollständig in cDNA umgeschrieben wurde. Bei einem Endvolumen von 20 µl betrug die Endkonzentration demnach $c_{\text{cDNA}} = 100 \text{ ng}/\mu\text{l}$.

2.3. Kultivierung eukaryotischer Zellen

2.3.1. Allgemeine Zellkulturbedingungen

Für die Arbeiten mit Zellkulturen wurden die allgemeinen Empfehlungen für den Umgang mit eukaryotischen Zellen befolgt (Lindl *et al.*, 2000). Die Kultivierung der verwendeten Zelllinien (Tabelle 6) erfolgte ausschließlich unter Verwendung der in Tabelle 7 aufgeführten Zellkulturmedien und -materialien.

Zelllinie	Herkunft / Morphologie / relevante Eigenschaften	Referenz
hFOB 1.19 (hFOB) ATCC-Nr. CRL-11372	<i>Homo sapiens</i> (Mensch) osteoblastäre Zelllinie, etabliert aus immortalisierten (mit dem großen SV40 T Antigen transfiziert) fötalen Gliedmaßenzellen. Adhärenente Zellen, die als einschichtiger Zellrasen ("Monolayer") wachsen.	Harris <i>et al.</i> , 1995a
MG-63 ATCC-Nr. CRL-1427	<i>Homo sapiens</i> (Mensch), fibroblastische Zelllinie, etabliert aus einem Osteosarkom. Adhärenente Zellen, die als einschichtiger Zellrasen ("Monolayer") wachsen.	Billiau <i>et al.</i> , 1977
ROS 17/2.8 Dauerkulturen (IPF)	<i>Rattus norvegicus</i> (Ratte), osteoblastäre Zelllinie, etabliert aus einem Osteosarkom. Adhärenente Zellen, die als einschichtiger Zellrasen ("Monolayer") wachsen.	Majeska <i>et al.</i> , 1980
UMR-106 ATCC-Nr. CRL-1661	<i>Rattus norvegicus</i> (Ratte), epitheliale Zelllinie, etabliert aus einem durch Injektion von Radiophosphor (³² P) induzierten Osteosarkom. Adhärenente Zellen, die als einschichtiger Zellrasen ("Monolayer") wachsen.	Martin <i>et al.</i> , 1976

Tabelle 6: Verwendete Zelllinien

Kulturmedien, Zusätze	Anbieter, Bestellnummer
Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium (D-MEM), High Glucose	GIBCO™, 41966-029
Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium : F-12 Nutrient Mixture [D-MEM/F-12 (1:1)]	GIBCO™, 11039-021
Dulbecco's Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (D-PBS)	GIBCO™, 14190-094
Fötale Kälberserum (Fetal Calf Serum = FCS)	Biochrom AG, S0215
Geneticin®, Selektives Antibiotikum (G418)	GIBCO™, 10131-027
L-Glutamin 200 mM (100×)	GIBCO™, 25030-024
MEM Nichtessentielle Aminosäure Lösung (100×)	GIBCO™, 11140-035
Minimum Essential Medium (MEM)	GIBCO™, 21090-022
Minimum Essential Medium α Medium (MEM-α)	GIBCO™, 41061-029
Natriumpyruvat MEM 100 mM	GIBCO™, 11360-039
Penicillin-Streptomycin-Lösung, 10000 Einheiten/ml Penicillin und 10000 µg/ml Streptomycin	GIBCO™, 15140-122
RPMI 1640 Medium	GIBCO™, 31870-025
Trypsin-EDTA (0,25% Trypsin, 1 mM EDTA*4Na) (1×)	GIBCO™, 25200-072

Tabelle 7: Kulturmedien und Verbrauchsmaterialien für die Zellkultur (Teil 1)

Sonstige Substanzen und Lösungen	Anbieter, Bestellnummer
1 α ,25-Dihydroxyvitamin D ₃ (Calcitriol)	Sigma-Aldrich, 17936
Carbonate-Bicarbonate Buffer Capsules	Sigma-Aldrich, D3041
Cell Proliferation Reagent WST-1	Roche Diagnostics GmbH, 1644807
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, D2650
Effectene [®] Transfection Reagent	Qiagen, 301427
Kollagen Typ I, aus Rattenschwanz	Sigma-Aldrich, C7661
Lipofectamine [™] Transfection Reagent	Invitrogen [™] , 18324-111
ProFection [®] Mammalian Transfection System - DEAE-Dextran	Promega, E1210
Steady-Glo [®] Luciferase Assay System	Promega, E2520
SuperFect [®] Transfection Reagent	Qiagen, 301305
4-Nitrophenyl phosphate disodium salt hexahydrate (pNPP)	Fluka, 71768
TransFectin [™] Lipid Reagent	Bio-Rad Laboratories, 170-3350
Wasser, A.C.S.-Reagenz	Sigma-Aldrich, 320072
Zellkulturgefäße	Anbieter, Bestellnummer
Cryoröhrchen mit Außengewinde, 1,2 ml	Carl Roth GmbH+Co. KG, E290.1
Gewebekulturflasche, 25 cm ² Kulturoberfläche, belüftet	Sarstedt, 83.1810.002
Gewebekulturflasche, 75 cm ² Kulturoberfläche, belüftet	Sarstedt, 83.1813.002
Nunclon [™] Δ Zellkulturschale, $\varnothing = 92$ mm, 56,7 cm ² Kulturoberfläche	Nunc GmbH & Co. KG, 172958
6-Well-Platte, klar, 9,5 cm ² Kulturoberfläche pro Vertiefung	Costar, 3516
12-Well-Platte, klar, 3,8 cm ² Kulturoberfläche pro Vertiefung	Costar, 3513
24-Well-Platte, klar, 1,9 cm ² Kulturoberfläche pro Vertiefung	Costar, 3526
48-Well-Platte, klar, 0,95 cm ² Kulturoberfläche pro Vertiefung	Costar, 3548
96-Well-Platte, klar, 0,32 cm ² Kulturoberfläche pro Vertiefung	Costar, 3599
96-Well-Platte, weiß, 0,32 cm ² Kulturoberfläche pro Vertiefung	Costar, 3610

Tabelle 7: Kulturmedien und Verbrauchsmaterialien für die Zellkultur (Teil 2)

Zelllinie	Kulturmedium	Einfriermedium
hFOB 1.19	- D-MEM/F-12 (1:1) - 300 µg/ml Geneticin® - 10% FCS (v/v)	- Kulturmedium +20% FCS +8% DMSO
MG-63	- MEM - 1× MEM Nichtessentielle Aminosäure Lösung - 1 mM Natriumpyruvat MEM - 2 mM L-Glutamin - 100 Einheiten/ml Penicillin / 100 µg/ml Streptomycin - 10% FCS (v/v)	- Kulturmedium +5% DMSO
ROS 17/2.8	- RPMI 1640 Medium - 2 mM L-Glutamin - 100 Einheiten/ml Penicillin / 100 µg/ml Streptomycin - 10% FCS (v/v)	- Kulturmedium +20% FCS +8% DMSO
ROS-IPF (stabil transfizierte ROS 17/2.8-Zellen)	- RPMI 1640 Medium - 2 mM L-Glutamin - 100 Einheiten/ml Penicillin / 100 µg/ml Streptomycin - 300 µg/ml Geneticin® - 10% FCS (v/v)	- Kulturmedium +20% FCS +10% DMSO
UMR-106	- D-MEM, High Glucose - 100 Einheiten/ml Penicillin / 100 µg/ml Streptomycin - 10% FCS (v/v)	- Kulturmedium +5% DMSO

Tabelle 8: Zusammensetzung der verwendeten Kultur- und Einfriermedien

2.3.1.1. Subkultivierung

Mit Ausnahme der Zelllinie "hFOB 1.19" wurden die adhärent wachsenden Zellen in den entsprechenden Zellkulturmedien (Tabelle 8) unter sterilen Bedingungen bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Zum Aufteilen der neu entwickelten Zellen ("Passagieren") wurden die Zellen einmal mit D-PBS gewaschen und anschließend durch Inkubation mit 1× Trypsin-EDTA für ca. 2-5 min bei 37°C vom Kulturflaschenboden abgelöst ("Trypsinierung"). Das Abstoppen der Trypsinierung erfolgte durch Zugabe von FCS-haltigem Kulturmedium. In Abhängigkeit von Zelllinie und gewünschter Zelldichte wurden die Zellen im Verhältnis 1:3 bis 1:20 in neue Kulturflaschen mit entsprechendem Kulturmedium überführt.

Die Kultivierung der hFOB-Zellen erfolgte sowohl bei 34°C als auch bei 37°C. Die Zellen wurden stabil mit dem temperatursensitiven Expressionsvektor "pUCSVtsA58" transfiziert und weisen dadurch ein unterschiedliches Wachstumsverhalten bei verschiedenen Temperaturen auf (Harris *et al.* 1995). Die Subkultivierung wurde wie oben beschrieben durchgeführt.

2.3.1.2. Auftauen kryokonservierter Zellen

Tiefgefrorene Zellen aus einem Vorrat in flüssigem Stickstoff (-196°C), in einer Ultratiefkühltruhe (-152°C) oder auf Trockeneis (bei Anlieferung) wurden zur Rekultivierung bei 37°C im Wasserbad aufgetaut. Die Zellen wurden schnellstmöglich mit 20 ml des entsprechenden Kulturmediums in eine 75 cm²-Kulturflasche überführt und bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

Nach etwa 24 h erfolgte ein einmaliges Waschen der Zellen mit D-PBS und Zugabe von 20 ml frischem Kulturmedium.

2.3.1.3. Kryokonservierung von Zellen

Zum Anlegen einer tiefgefrorenen Dauerkultur wurden die Zellen, wie unter 2.3.1.1 beschrieben, bis zu einer Zelldichte von 60-80% kultiviert und trypsinisiert. Das Ablösen der Zellen wurde durch Zusatz von Kulturmedium gestoppt und die Zellsuspension für 5 min bei $125 \times g$ zentrifugiert. Nach Resuspendierung des Zellpellets einer Kulturflasche in 2 ml Einfriermedium (Tabelle 8) wurde 2×1 ml in Einfriergefäße (Cryoröhrchen) pipettiert. Die Röhrchen wurden in mehrere Lagen Zellstoff gewickelt und in einer Styroporschachtel verpackt in einen Tiefkühlschrank (-80°C) überführt, so dass durch die Isolierung eine langsame Absenkung der Temperatur erfolgte. In Kombination mit dem im Einfriermedium enthaltenen DMSO wird die Kristallbildung während des Einfrierprozesses verhindert und die Zellen werden vor einer Zerstörung der Zellmembran geschützt. Nach 2-7 Tagen konnten die Dauerkulturen schließlich in flüssigem Stickstoff (-196°C) oder in einer Ultratiefkühltruhe (-152°C) eingelagert werden.

2.3.2. Beschichtung von Kulturgefäßen mit Kollagen

Bei der Kultivierung von hFOB-Zellen in Kulturplatten konnte beobachtet werden, dass sich die Zellen nach Erreichen von 100% Konfluenz innerhalb von 1-2 Tagen vom Plattenboden ablösten. Infolgedessen wurden die Kulturplatten für die entsprechenden Experimente zuvor mit Kollagen Typ I beschichtet. Unter Verwendung dieser vorbehandelten Platten kam es auch nach 7 Tagen zu keiner Ablösung des konfluenten Zellrasens.

Es wurden 0,5 mg/ml Kollagen Typ I (Sigma) in 10 mM Essigsäure gelöst (Stammlösung), aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Für die Beschichtung der Kulturplatten wurde durch eine 100-fache Verdünnung der Stammlösung mit 10 mM Essigsäure eine Arbeitslösung hergestellt, von der je 300 μl in jedes Well einer 24-Well-Platte pipettiert wurden. Dies entspricht einer Menge von 7,9 μg Kollagen pro cm^2 der Kulturoberfläche. Bei Verwendung anderer Plattenformate wurde das zugesetzte Volumen der Arbeitslösung entsprechend angepaßt.

Nach Anlagerung des Kollagens an die Gefäßwände für 15-18 h bei $4-8^{\circ}\text{C}$ wurde die Flüssigkeit entfernt, die Platten wurden bei RT in einer sterilen Sicherheitswerkbank getrocknet und über Nacht durch Bestrahlung mit UV-Licht sterilisiert. Die Lagerung der Platten erfolgte bis zur Benutzung bei Raumtemperatur.

2.3.3. Transfektion von Zellen

2.3.3.1. Transiente Transfektion von Zellen

Zur Transfektion von ROS 17/2.8-Zellen wurde das "Effectene Transfection Reagent[®]" (Effectene) der Firma Qiagen verwendet. Die zu transfizierende Plasmid-DNA wird bei dieser Methode mit einem kondensierenden Reagenz ("Enhancer", Qiagen) in einem dafür geeigneten Puffersystem ("Buffer EC", Qiagen) in eine kompakte Form überführt. Durch Zugabe von Lipiden ("Effectene", Qiagen) kommt es zur Bildung von kondensierten Effectene-DNA-Komplexen in Form von Micellen. Die Fusion dieser Micellen mit der Zellmembran führt schließlich dazu, dass die Fremd-DNA ins Innere der Zellen gelangen kann.

Transfektionsprotokoll für das Effectene Transfection Reagent[®]

Die zu transfizierenden Zellen wurden 18-24 h vor der Transfektion in dem entsprechenden Kulturmedium ausplattiert. Vor Beginn der Transfektion wurde das alte Kulturmedium gründlich entfernt und neues Kulturmedium vorgelegt. Nach Vermischen von DNA und Buffer EC wurde der Enhancer zugefügt, der Ansatz 1 sec gevortext und 2-5 min bei RT inkubiert. Es folgte die Zugabe von Effectene und Vortexen für 10 sec. Der Transfektionsansatz wurde weitere 10 min bei RT inkubiert und nach Zusatz von Kulturmedium vollständig auf die Zellen pipettiert. Die Zellen wurden für 24 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert, bevor sie weiterverwendet wurden.

Für die Etablierung stabil transfizierter ROS 17/2.8-Zellen (2.3.3.2) mittels Effectene wurde zunächst eine Optimierung der Transfektionsparameter, ausgehend vom Transfektionsprotokoll des Herstellers, durchgeführt. Die Bestimmung der Transfektionseffizienz unter verschiedenen Bedingungen erfolgte unter Verwendung des Reporterplasmids "pGL2-control" (Tabelle 1). Durch die anhaltend hohe Expression des Reportergens Luciferase ist die Transfektionseffizienz dabei direkt proportional zur abgegebenen Lichtmenge.

Zusätzlich zu den ROS 17/2.8-Zellen wurde versucht, drei weitere Zelllinien (Tabelle 6) mit dem pGL2-control-Vektor zu transfizieren, um eine potentiell besser geeignete Kombination aus Zelllinie und Transfektionsmethode zu finden. Hierbei wurden für die Versuche mit hFOB-Zellen neben dem "Effectene Transfection Reagent[®]" weitere Transfektionsreagenzien und -verfahren (Tabelle 9) mit verschiedenen Transfektionsparametern angewandt.

Reagenz bzw. Verfahren, Anbieter	Verwendete Zelllinien
Effectene® Transfection Reagent, Qiagen	hFOB 1.19 MG-63 ROS 17/2.8 UMR-106
Elektroporation, Gene Pulser Xcell™ System, Bio-Rad Laboratories	hFOB 1.19
Lipofectamine™ Transfection Reagent, Invitrogen™	hFOB 1.19
ProFectin® Mammalian Transfection System - DEAE-Dextran, Promega	hFOB 1.19
SuperFect® Transfection Reagent, Qiagen	hFOB 1.19
TransFectin™ Lipid Reagent, Bio-Rad Laboratories	hFOB 1.19

Tabelle 9: Verwendete Transfektionsreagenzien und -verfahren

2.3.3.2. Stabile Transfektion von ROS 17/2.8-Zellen

Zur Etablierung stabil transfizierter ROS 17/2.8-Zellen unter Verwendung von Effectene wurde die Transfektion mit den in Tabelle 10 zusammengefaßten Parametern durchgeführt. Da die Optimierung der Transfektionsbedingungen in 96-Well-Platten erfolgte, mußten die benötigten Substanzmengen für die stabile Transfektion in Zellkulturschalen (\varnothing 92 mm) entsprechend angepaßt werden. Das Transfektionsprotokoll entsprach ansonsten dem der transienten Transfektion (2.3.3.1).

Komponente	Benötigte Menge	
	pro Well einer 96-Well-Platte	pro Zellkulturschale (\varnothing 92 mm)
Zellen	12.000	2.000.000
DNA*	0,12 μ g	20,6 μ g
Buffer EC	29,9 μ l	1,2 ml
Enhancer	0,96 μ l	164,8 μ l
Effectene	0,4 μ l	68,8 μ l
Kulturmedium im Transfektionsansatz	20 μ l	500 μ l

*) Die Angaben beziehen sich auf die eingesetzte Gesamtmenge an DNA. Für die stabile Transfektion in Zellkulturschalen wurden 2,0 μ g pcDNA™3.1(-) und 18,6 μ g des entsprechenden Reporterengenkonstrukts verwendet.

Tabelle 10: Optimierte Transfektionsparameter

Neben dem jeweiligen Reporterengenkonstrukt (pGL2-osteo-s bzw. pGL2-cbfa-s) wurde als Selektionsmarker der pcDNA™3.1(-)-Vektor in die Zellen kotransfiziert. Dieses Plasmid kodiert für das Resistenzgen Neomycin und führt unter Zugabe von Geneticin (G418) zur Selektion von pcDNA™3.1(-)-positiven Zellen. Die Transfektion von Reporterengenkonstrukt und

Selektionsmarker erfolgte in einem Verhältnis von etwa 9:1, um die Zahl der falsch positiven Klone möglichst gering zu halten. Als "falsch positiv" wurden die Klone bezeichnet, bei denen keine Integration eines Reportergenkonstrukts erfolgte, die jedoch aufgrund des eingebrachten pcDNA™3.1(-)-Vektors eine Resistenz gegen G418 aufwiesen. Als Kontrolle wurden Transfektionen durchgeführt, bei denen nur das jeweilige Reportergenkonstrukt, nicht aber der Selektionsmarker transfiziert wurde.

24 h nach Transfektion der Zellen wurde das Medium entfernt, einmal mit D-PBS gewaschen und 10 ml Selektionsmedium (geneticinhaltiges Medium für ROS-IPF-Zellen; Tabelle 8) zugegeben. Bis zur Selektion der Einzelklone erfolgte die Inkubation der Zellen bei 37°C und 5% CO₂, wobei die Kulturplatten weiterhin alle 48 h zur Entfernung toter Zellen einmal mit D-PBS gewaschen und 10 ml frisches Selektionsmedium zugesetzt wurden.

2.3.4. Isolierung von Einzelklonen

Mit der Isolierung der Einzelklone wurde erst begonnen, nachdem alle Zellen auf den Kontrollplatten abgestorben waren (nach etwa 1 Woche). Die transfizierten ROS 17/2.8-Zellen wurden nach Entfernen des Selektionsmediums einmal mit D-PBS gewaschen und mit Trypsin-EDTA von der Kulturoberfläche abgelöst. Durch Zugabe von Selektionsmedium wurde die Trypsinierung gestoppt, die Zellkonzentration bestimmt und durch Zugabe von Selektionsmedium auf 10.000 Zellen/ml eingestellt.

Es wurden 100 µl Selektionsmedium in alle Wells einer 96-Well-Platte, mit Ausnahme von Well A1, vorgelegt und 200 µl der Zellsuspension in das Well A1 gegeben. Nachfolgend wurden 100 µl der Suspension von Well A1 in das Well B1 überführt, mit den vorgelegten 100 µl Medium vermischt und wiederum 100 µl mit derselben Pipettenspitze in das Well C1 übertragen. Dieser Vorgang wurde bis zum Well H1 wiederholt, wobei die zu entnehmenden 100 µl Zellsuspension aus Well H1 verworfen wurden, so dass alle Vertiefungen von A1 bis H1 je 100 µl Suspension enthielten (Abbildung 9a).

Mit einer 8-Kanal-Pipette wurden in jedes Well der Spalte 1 je 100 µl Selektionsmedium zugegeben, die Zellsuspensionen durchmischt und anschließend 100 µl aus jedem Well in das jeweils rechts daneben liegende Well der Spalte 2 überführt. Analog dazu wurden 100 µl aus jedem Well der Spalte 2 in die Wells der Spalte 3 übertragen und diese Verdünnungsschritte entsprechend bis zur Spalte 12 fortgeführt. Die aus den Wells der Spalte 12 zu entnehmenden 100 µl wurden verworfen (Abbildung 9b). Abschließend erfolgte die Zugabe von je 100 µl Selektionsmedium in jedes Well, so dass ein Gesamtvolumen von 200 µl eingestellt wurde.

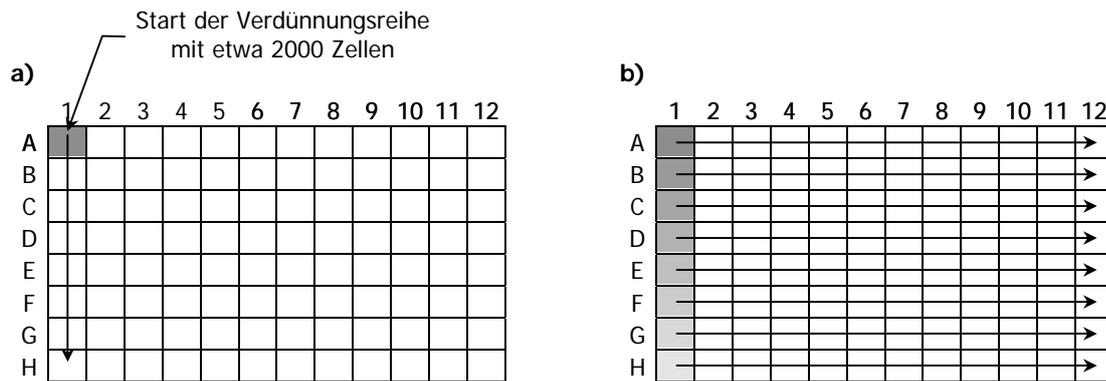


Abbildung 9: Erzeugung von Verdünnungsreihen zur Isolierung von Einzelklonen

Nach Inkubation der transfizierten Zellen für 9 Tage bei 37°C und 5% CO₂ erfolgte die Markierung der Wells, die nur eine Zellkolonie enthielten. Die Zellen in den markierten Wells wurden 24 h später einmal mit je 200 µl D-PBS gewaschen, und nach Zugabe von je 200 µl Selektionsmedium pro Well folgte eine weitere Inkubationsphase von 6 Tagen unter den oben genannten Bedingungen.

Zur Überführung der Einzelklone in 24-Well-Platten wurde in jedes Well einer Platte 1 ml Selektionsmedium vorgelegt und das Medium von den Zellkolonien entfernt. Nach Ablösen der Klone durch Inkubation mit je 100 µl Trypsin-EDTA wurden 100 µl Selektionsmedium pro Well zugefügt und die gesamte Zellsuspension eines Wells in ein Well einer 24-Well-Platte pipettiert. Im Folgenden werden die ROS 17/2.8-Zellen, die mit dem Reporter-genkonstrukt "pGL2-osteo-s" oder "pGL2-cbfa-s" stabil transfiziert wurden, mit "ROS-IPF-o-x" bzw. "ROS-IPF-c-x" bezeichnet. Der Anhang "x" steht dabei für eine fortlaufende Numerierung zur Unterscheidung der Klone, die das gleiche Reporter-genkonstrukt aufgenommen hatten.

Die einzelnen Klone wurden bis zum Erreichen einer Zelldichte von mehr als 60% kultiviert und dann sukzessiv in 25 cm²-Zellkulturflaschen und schließlich in 75 cm²-Zellkulturflaschen überführt.

Vor der Verwendung der stabil kotransfiziert Zellen für Stimulationsexperimente wurde die Reporter-genaktivität der verschiedenen Klone mittels Luciferase-Reporter-gen-Assay (2.3.6) bestimmt, um falsch positive Klone mit nur geringer oder gar keiner Luciferaseaktivität auszuschließen. Dazu wurden die Klone wie unter 2.3.5 beschrieben stimuliert und die Luciferaseaktivität nach 48 h mit der von nicht stimulierten Zellen verglichen.

2.3.5. Stimulation transfizierter Zellen

Für die Induktion der Reporter-genaktivität wurden transient oder stabil transfizierte Zellen mindestens 18 h vor Beginn der Stimulation in 96-Well-Platten mit durchsichtigem Boden und weißen Seitenwänden ausplattiert (Costar, Kat. Nr. 3610). Die verwendeten Substanzen

oder Peptidbankfraktionen (lyophilisiert) wurden zur Vernachlässigung eines potentiellen Lösemiteleinflusses in einer Verdünnung von mindestens 1:10 der Stammlösung, für in 2-Propanol gelöste Substanzen mindestens 1:100, eingesetzt. Das Kulturmedium in den einzelnen Wells wurde abgenommen und durch jeweils 100 µl der entsprechend gelösten Substanz oder Fraktion ersetzt. Nach einer Inkubationszeit von 5 - 72 h bei 37°C und 5% CO₂ erfolgte die Bestimmung der Luciferaseaktivität (2.3.6).

Die für die Stimulation verwendeten Substanzen und Lösemittel sind in Tabelle 11 aufgelistet. Alle Substanzen wurden in Wasser (A.C.S.-Reagenz, Sigma), DMSO (Sigma), D-PBS (Gibco) oder 2-Propanol (Merck) gelöst, aliquotiert und bei -20°C gelagert. Zur eindeutigen Identifizierung der in unterschiedlichen Aktivitätseinheiten und Reinheitsgraden angebotenen Substanzen wurden die jeweiligen Bestellnummern ebenfalls aufgeführt.

Substanz	Konzentration der Stammlösung	Lösemittel	Anbieter, Bestellnummer
rhBMP-2	0,1 ng/µl	H ₂ O	PeptoTech EC Ltd, 120-02
Dexamethason	1 µM	H ₂ O	Sigma-Aldrich, D-2915
1α,25-Dihydroxyvitamin D ₃ (Calcitriol)	1 mM	2-Propanol	Sigma-Aldrich, 17936
hPTH 1-34	100 µM	H ₂ O	IPF PharmaCeuticals GmbH
hPTH 1-37	100 µM	H ₂ O	IPF PharmaCeuticals GmbH
hrTGF-β1	1 ng/µl	D-PBS	Roche Diagnostics GmbH, 1412272
Peptidbankfraktionen	unterschiedlich	H ₂ O oder DMSO	IPF PharmaCeuticals GmbH

Tabelle 11: Verwendete Substanzen zur Stimulation transfizierter Zellen

2.3.6. Luciferase-Reporterergen-Assay

Die Bestimmung der Reporterergenaktivität erfolgte unter Verwendung des "Steady-Glo® Luciferase Assay System" (SteadyGlo®) der Firma Promega. Hierbei findet die Umsetzung des Substrats Luciferin nicht in einer schnellen, sogenannten "Flash Reaktion" mit geringer Halbwertszeit statt ($t_{1/2} \approx 10$ min), sondern wird durch besondere Pufferbedingungen verlangsamt, so dass die Halbwertszeit der Reaktion bei RT etwa 2 h beträgt. Die Zugabe der SteadyGlo®-Lösung führt aufgrund weiterer Inhaltsstoffe gleichzeitig zur Lyse der Zellen, so dass die gebildete Luciferase aus dem Zellinneren freigesetzt wird.

Nach Stimulation der Zellen (2.3.5) wurden nach Entfernen des Mediums pro Well 50 µl eines Gemisches (RT) aus SteadyGlo®-Lösung und MEM-α im Verhältnis 1:1 zugegeben und die gesamte Platte für 15-20 min bei 200 Upm bei RT geschüttelt. Die Messung des abgestrahlten Lichts erfolgte in einem automatischen Lumineszenz-Reader (LumiStar, BMG), wobei jedes Well 10 sec gemessen wurde. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe einer speziellen LumiStar-Maske für Microsoft Excel (BMG).

2.3.7. Bestimmung der Zellvitalität (WST-1)

Das "Cell Proliferation Reagent WST-1" der Firma Roche Diagnostics GmbH ist ein Test zur Bestimmung der Zellproliferation und -entwicklungsfähigkeit. Bei diesem Test wird ein Tetrazoliumsalz von Dehydrogenasen in den Mitochondrien entwicklungsfähiger Zellen zu Formazan umgewandelt. Der durch die Spaltung verursachte Farbumschlag ist mit einem Mikroplatten-Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm (Referenz: 630 nm) meßbar.

Für die Durchführung des Tests wurde das WST-1 Reagenz mit dem jeweiligen serumfreien Kulturmedium im Verhältnis 1:10 verdünnt. Auf den Zellrasen (96-Well-Format) wurden nach Entfernen des alten Mediums 100 µl der verdünnten WST-1 Lösung pro Well pipettiert. Die Platten wurden geschwenkt und 30 min bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Dann erfolgte die Messung der Absorption bei 450 nm (Referenz: 630 nm) im Mikroplatten-Reader.

Im Anschluss wurde, je nach Versuchsaufbau, die Aktivität der alkalischen Phosphatase (2.3.8) oder die Luciferaseaktivität (2.3.6) bestimmt.

2.3.8. Alkalische Phosphatase Test

Das Enzym alkalische Phosphatase ist ein Osteoblastenmarker, der von Osteoblasten gebildet wird, wenn sie sich im Differenzierungsstadium befinden (Aubin *et al.*, 1995).

Die membrangebundene alkalische Phosphatase katalysiert die Umsetzung des Substrats 4-Nitrophenyl-phosphat Dinatriumsalz Hexahydrat (pNPP) zu einem gelben Farbstoff, dessen Absorption bei 405 nm gemessen werden kann. Die Durchführung des Tests erfolgte in Anlehnung an YEH *et al.* (1999) unter Verwendung der unten aufgelisteten Lösungen.

Carbonat-Bicarbonat Puffer: 1 Kapsel Carbonat-Bicarbonat Puffer (Sigma-Aldrich, D3041)
100 ml bidest. H₂O

pNPP-Lösung: 50 mg pNPP
100 mg MgCl₂
1 Kapsel Carbonat-Bicarbonat Puffer (Sigma-Aldrich, D3041)
ad. 100 ml bidest. H₂O

Die Lagerung der pNPP-Lösung erfolgte lichtgeschützt bei 4°C.

Nach Entfernen des Mediums wurden die Zellen für 5 min mit 50 µl 95%igem Ethanol bei RT fixiert, der Alkohol abgesaugt und pro Well 50 µl Carbonat-Bicarbonat Puffer zugegeben. Im Anschluss an eine Inkubation für 5 min bei RT wurde der Puffer gegen 100 µl der pNPP-Lösung ausgetauscht und die Platten 60 min bei 37°C inkubiert. Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte durch Messung der Absorption bei 405 nm im Mikroplatten-Reader.

2.4. Aufreinigung osteoanaboler Substanzen

2.4.1. Präparation einer Hämofiltrat-Peptidbank

Zur Aufreinigung osteoanaboler Substanzen wurde die humane Hämofiltrat-Peptidbank verwendet, die am Niedersächsischen Institut für Peptidforschung (IPF; heute: IPF PharmaCeuticals GmbH) entwickelt und etabliert wurde (Schulz-Knappe *et al.*, 1997). Die Herstellung der Peptidbank erfolgte unter Verwendung von humanem Hämofiltrat, das als Nebenprodukt bei der Behandlung von niereninsuffizienten Patienten anfällt. Es wurde aus dem "Nephrologischen Zentrum Niedersachsen (NZN)" in Hannoversch-Münden bezogen.

2.4.2. Präparation einer Schweinemagen-Peptidbank

2.4.2.1. Vorbereitung des Materials, Peptidextraktion und Filtration

Es wurden 120 entleerte, gewaschene und zentrifugierte Schweinemägen (=76 kg Gewebe) über die Firma Enders (Kuttelei des Schlachthofes Gleidingen, Hannover) bezogen und für die weitere Verarbeitung auf Brucheis gekühlt zur IPF PharmaCeuticals GmbH transportiert. Dort wurden die Mägen in 5-10 cm große Stücke zerteilt und die resultierende Gewebemasse portionsweise für 15 min in 30 l 95-100°C heißer 1 M Essigsäure gekocht. Die Gewebestücke wurden nach jedem Kochprozess mit einem Sieb entfernt und durch Zugabe von Brucheis abgekühlt. Nach Beendigung der Kochvorgänge wurde die Essigsäure bei RT abgekühlt, die vereinigte Zellmasse wieder zugefügt und der gesamte Ansatz mit 1 M Essigsäure +150 mM NaCl auf ein Volumen von 240 l verdünnt. Zur Peptidextraktion wurde die Masse über Nacht bei 4°C schwach gerührt.

Dem Extraktionsansatz wurde 1% Filterhilfsmittel zugesetzt (FH-1500, SeitzSchenk Filtersystems), anschließend wurde der Ansatz filtriert, da dieser trübe war und einen hohen Fettanteil aufwies. Die erste Filtration erfolgte mittels einer Filtrationsanlage (2.1.8) über eine 3-4 mm dicke Schicht Precoat (FH-1500, SeitzSchenk Filtersystems) als Filterhilfsmittel, eine Lage Papierfilter 520A (Schleicher & Schuell, Dassel) und zwei Lagen Papierfilter 1574 (Schleicher & Schuell, Dassel). Das Retentat wurde mit 10 l 1 M Essigsäure gewaschen und wie oben beschrieben filtriert, jedoch ohne Zusatz des Filterhilfsmittels. Das vereinigte Volumen beider Filtrate betrug hiernach 204 Liter und wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert.

2.4.2.2. Ultra- und Diafiltration

Zunächst wurde eine Filtration mit einem Tiefenfilter (Seitz-Bio 40, SeitzSchenk Filtersystems, Bad Kreuznach) durchgeführt, da der Schweinemagenextrakt nach dem Auftauen eine leichte Trübung aufwies. Anschließend wurde das Filtrat in zwei aufeinanderfolgenden Prozeduren ultra- und diafiltriert. Durch die beiden Filtrationen wurde eine weitestgehende Abtrennung von Verbindungen mit einem Molekulargewicht von mehr als 50 kDa von den niedermolekularen Substanzen erzielt. Die höhermolekularen Komponenten des Extraktes verblieben dabei im Retentat, die niedermolekularen Verbindungen passierten die Membran und gelangten ins Permeat.

Im ersten Schritt wurde das gesamte Volumen des Schweinemagenextraktes (204 l) über eine Ultrafiltrationsanlage mit einer Trenngrenze von 50 kDa und einer Flußrate von 1200 l/h filtriert. Das nach 10 h verbliebene Retentat (ca. 20 l) wurde dann einer sogenannten Diafiltration unterzogen. Dem Extrakt wurden 60 l 0,5 M Essigsäure zugefügt, es wurde eine weitere Ultrafiltration durchgeführt (wie oben beschrieben) und das Permeat mit dem der ersten Ultrafiltration vereinigt. Durch diesen Vorgang wurde ein Teil der niedermolekularen Verbindungen, die nach dem ersten Schritt im Retentat verblieben waren, ebenfalls ins Permeat überführt. Somit wurde eine höhere Gesamtausbeute erreicht. Das Volumen der beiden Permeate betrug insgesamt 253 l.

2.4.2.3. Chromatographische Auftrennung

Die Auftrennung der im Schweinemagenextrakt enthaltenen Substanzen erfolgte mit Hilfe von Kationenaustausch- (Cation Exchange Chromatography, CEC) und Umkehrphasenchromatographie (Reversed Phase Chromatography, RPC) an HPLC-Anlagen.

Vor der chromatographischen Auftrennung wurde das nach Ultrafiltration erhaltene Permeat mit voll entsalztem Wasser (VE-Wasser) auf ein Volumen von 450 l verdünnt und der pH-Wert mit ca. 900 ml 25%iger Salzsäure auf 2,5 eingestellt. Für den anschließenden präparativen CEC-Lauf (pH-Stufenelution) mit einem starken Kationenaustauscher diente das Chromatographiesystem 4 (2.1.8) unter Verwendung der in Tabelle 12 aufgeführten Puffer.

Der Probenauftrag erfolgte mit einer Flußrate von 0,37 l/min, wobei der Durchlauf bis zur weiteren Verarbeitung in einem Kunststoffbehälter (500 l) aufgefangen und bei 4°C gelagert wurde. Nach Waschen der Säule mit 30 l Puffer A wurden die gebundenen Peptide mit variierenden Volumina der verschiedenen Puffer eluiert (Tabelle 12) und die Eluate jeweils manuell in Kunststoffkanistern (30 l) gesammelt. Die pH-Werte der Eluate 2-6 wurden zur Vermeidung von Proteolyseaktivität mit 25%iger HCl auf 2,5 bis 3,5 korrigiert und die Lösungen anschließend bei 4°C aufbewahrt. Die chromatographische Trennung wurde durch Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm verfolgt.

Bezeichnung Puffer	Zusammensetzung Puffer	pH-Wert ¹ Puffer	Bezeichnung Eluat	Volumen Eluat [l]
(Auftrag) ²	(450 l Permeat nach Ultrafiltration) ²	(2,5) ²	pH-Pool 0	450
Puffer A	VE-Wasser, pH-Wert mit HCl eingestellt	2,5	nicht gesammelt	ca. 30
Puffer B	0,1 M Citronensäure-1-hydrat	3,6	pH-Pool 1	15,0
Puffer C	0,1 M Essigsäure + 0,1 M Natriumacetat	4,5	pH-Pool 2	14,5
Puffer D	0,1 M Äpfelsäure	5,0	pH-Pool 3	15,0
Puffer H	0,5 M Ammoniumacetat	7,0	pH-Pool 4	16,0
VE-H ₂ O	VE-Wasser, pH-Wert nicht eingestellt	n. b.	vereinigt zu pH-Pool 5	10,8
Puffer I	0,1 M Natriumhydroxid	ca. 13,0		17,0

¹) Der pH-Wert wurde mit HCl bzw. NaOH eingestellt.

²) Die Angaben zur aufgetragenen Probe sind in Klammern dargestellt, da es sich hierbei nicht um einen Puffer handelt.

Tabelle 12: Verwendete Puffer und die entsprechenden Eluate des präparativen CEC-Laufs

Zur Herstellung der Peptidbank wurde als nächster Trennschritt ein präparativer RPC-Lauf an den Chromatographiesystemen 5 (pH-Pool 1-5) und 6 (pH-Pool 0) durchgeführt. Dabei fanden die folgenden Eluenten Verwendung:

Eluent A: 10 mM HCl
in bidest. H₂O

Eluent B: 10 mM HCl
80% Acetonitril (v/v)
in bidest. H₂O

Die Bedingungen für die Auftrennungen der einzelnen pH-Pools sind in Tabelle 13 zusammengefaßt.

	Chromatographiesystem 5	Chromatographiesystem 6
Säulenmaterial	1,185 l Säulenfüllung "Source™ 15RPC"	4,7 l Säulenfüllung "Source™ 15RPC"
Probe	jeweils 1/3 der pH-Pools 1-5	gesamter pH-Pool 0
Flußrate	150 ml/min	300 ml/min
Gradient	0% Eluent B über 400 ml 0-60% Eluent B über 8000 ml 60-95% Eluent B über 600 ml 95% Eluent B über 400 ml 95-0% Eluent B über 400 ml 0% Eluent B über 1000 ml	0% Eluent B über 400 ml 0-60% Eluent B über 21600 ml 60-95% Eluent B über 1600 ml 95% Eluent B über 1000 ml 95-0% Eluent B über 1000 ml 0% Eluent B über 6000 ml
Detektion	bei 214 nm und 280 nm	bei 280 nm
Fraktionierung	Beginn 400 ml nach Start des Gradienten, dann 46 Fraktionen mit 200 ml/Fraktion	Beginn 400 ml nach Start des Gradienten, dann 46 Fraktionen mit 600 ml/Fraktion

Tabelle 13: Parameter für die Durchführung der präparativen RPC-Läufe

Das Sammeln der Fraktionen erfolgte manuell. Anschließend wurden die 46 Fraktionen jeden pH-Pools lyophilisiert (2.4.3) und bei -20°C gelagert.

2.4.3. Gefriertrocknung von Peptiden

Zur Lyophilisation wurden die Peptidlösungen zunächst bei -80°C eingefroren. Die Fraktionen wurden in Abhängigkeit vom Probenvolumen unter Vakuum in einer Vakuumzentrifuge oder in einem Gefriertrockner lyophilisiert. Dabei blieben die Probelösungen ständig gefroren.

2.4.4. Chromatographische Methoden

2.4.4.1. Umkehrphasenchromatographie (RPC)

Soweit nicht anders angegeben wurden gefriergetrocknete Fraktionen in dem jeweiligen Eluenten aufgenommen, der zur Äquilibrierung der Säule Verwendung fand. Der Auftrag von Proben, die aus einem vorangegangenen CEC-Lauf resultierten, erfolgte nach Verdünnung mit mindestens dem vierfachen Probenvolumen des Eluenten. Enthielt die Probe unlösliche Bestandteile, so wurden diese durch Filtration (Minisart[®] 17597, $0,2\ \mu\text{m}$, Sartorius, Göttingen) abgetrennt.

Die Trennung des Peptidgemisches erfolgte durch einen linearen Anstieg von Eluent B im Elutionsmittel. Eine detaillierte Auflistung der jeweiligen Chromatographiebedingungen, sowie Angaben zum verwendeten Chromatographiesystem und Säulenmaterial findet sich in Tabelle 14. Zur Herstellung der Eluenten wurden die verwendeten Fließmittel mit Wasser aus einer Reinstwasseranlage (Milli-Q^{UF}plus) angesetzt und mit einem Heliumstrom 10 min lang entgast. Die analytischen Säulen wurden vor ihrem Einsatz mit Hilfe eines Standards hinsichtlich ihres Trennverhaltens überprüft. Nach der Verwendung wurden die Säulen gespült und in 20%igem Methanol gelagert.

2.4.4.2. Kationenaustauschchromatographie (CEC)

Für den Auftrag auf eine CEC-Säule wurde die Probe entweder gefriergetrocknet und in dem jeweiligen Eluenten A aufgenommen oder nach Verdünnung mit mindestens dem doppelten Probenvolumen des Eluenten A auf die Säule geladen. Eine detaillierte Zusammenstellung der jeweiligen Chromatographiebedingungen, sowie Angaben zum verwendeten Chromatographiesystem und Säulenmaterial enthält Tabelle 14. Alle Lösungen wurden mit Wasser aus einer Reinstwasseranlage (Milli-Q^{UF}plus) angesetzt und vor Verwendung 10 min mit

einem Heliumstrom entgast. Vor ihrem Einsatz wurden die Säulen mit Hilfe eines Standards hinsichtlich ihres Trennverhaltens überprüft. Nach der Verwendung wurden die Säulen gründlich mit bidest. H₂O gespült und anschließend in 20%igem Methanol gelagert.

2.4.4.3. Entsalzung von Fraktionen der Kationenaustauschchromatographie

Die Entsalzung der Proben erfolgte nach dem Prinzip der RP-Chromatographie. Die Löcher der 96-Well-Extraktionsplatte (3M Empore™ 96 Well Extraction Disks, 3M Filtration Products, St. Paul, MN, USA) enthielten zwischen zwei Fritten eine Lage aus RP C18-Material. Zum Entsalzen der Probe wurde ein Aliquot der einzelnen Fraktionen in eines der Wells pipettiert. Die Peptide banden dabei an das RP-Material, wohingegen das in den Proben gelöste Salz durch Spülen des RP-Materials mit 600 µl Eluent A (0,1% TFA) abgetrennt wurde. Die Peptide wurden anschließend mit 600 µl Eluent B (0,1% TFA/80% ACN) eluiert. Die entsalzten Proben wurden lyophilisiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Zur Regeneration wurde die Extraktionsplatte mit 100% ACN gewaschen und in 30% Methanol bei 4°C aufbewahrt.

2.4.4.4. Größenausschlußchromatographie (SEC)

Bei der Reinigung von Substanzen mittels Größenausschlußchromatographie (**Size Exclusion Chromatography**; SEC) erfolgt die Auftrennung der Verbindungen nach ihrer Größe. Salze und kleine Moleküle eluieren dabei langsam, große Moleküle eluieren zuerst von der Säule.

Die verwendeten Proben wurden lyophilisiert und anschließend in einem kleinen Volumen des Eluenten gelöst. Nach Auftrag der Probe auf die SEC-Säule erfolgte die Trennung bei gleichbleibender Zusammensetzung des Eluenten (isokratische Trennung).

Als Referenz diente die entsprechende Auftrennung eines Standards, der vier Peptide unterschiedlicher Molekülgröße enthielt. Dadurch konnten die Molekülgrößen der in der Probe enthaltenen Substanzen grob abgeschätzt werden.

2.4.4.5. Aufreinigung osteoanaboler Aktivitäten aus Hämofiltrat und Schweinemagen

Zur partiellen Aufreinigung von osteoanabolen Aktivitäten aus Hämofiltrat und Schweinemagen wurden verschiedene chromatographische Schritte durchgeführt. Die detaillierten Chromatographiebedingungen der einzelnen Schritte für die Reinigung der Aktivitäten aus Schweinemagen sind in Tabelle 14 zu finden.

Da mittels chromatographischer Reinigung keine aktiven Substanzen isoliert werden konnten, wurde die Aufreinigung aktiver Verbindungen aus Peptidbankfraktionen exemplarisch anhand einer Aktivität aus Schweinemagen beschrieben. Eine detaillierte Beschreibung der entsprechenden Chromatographieschritte für die partielle Reinigung der Aktivitäten aus Hämofiltrat erfolgte daher nicht.

Lauf Nr.	Säule	Anlage	Fließmittel	Gradient	Flußrate	Fraktionierung
SM 1	Parcosil PepKat 4 x 50 mm 300 Å, 5 µm	Chromatographie- system 1	A: 50 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 3,0 B: 50 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 3,0 1,5 M NaCl	0-100% B 100 ml 100% B 1 ml 100-0% B 0,5 ml 0% B 12 ml	1 ml/min	2 ml Start nach 0 min
SM 2	Biotek RP Silica C18 4 x 250 mm 300 Å, 5 µm	Chromatographie- system 1	A: 0,1% TFA B: 0,1% TFA 80% ACN	0% B 1 min 0-60% B 60 min 60-90% B 4 min 90% B 2 min 90-0% B 1 min 0% B 3 min	0,75 ml/min	0,75 ml Start nach 7 min
SM 3	PolySULFOETHYL Asp. Bulk Material 4 x 125 mm 300 Å, 5 µm	Chromatographie- system 1	A: 20 mM KH ₂ PO ₄ , pH 3,0 B: 20 mM KH ₂ PO ₄ , pH 3,0 1,5 M KCl	0-100% B 100 ml 100% B 1 ml 100-0% B 0,5 ml 0% B 12 ml	1 ml/min	1,5 ml Start nach 1 min
SM 4	Phenomenex Jupiter C5 10 x 250 mm 300 Å, 5 µm	Chromatographie- system 1	A: 0,1% TFA B: 0,1% TFA 80% ACN	0-30% B 1 min 30-60% B 50 min 60-100% B 2 min 100% B 2 min 100-0% B 1 min 0% B 18 min	1,5 ml/min	1,5 ml Start nach 1 min
SM 5	ReproSil-Pur C18-AQ 1 x 250 mm 3 µm	Chromatographie- system 3 Säulenofen: 30°C	A: 0,06% TFA B: 0,05% TFA 80% ACN	0-10% B 1 min 10-70% B 120 min 70-95% B 5 min 95% B 5 min 95-0% B 5 min	20 µl/min	22,3 µl Start nach 50 min
SM 6	ReproSil-Pur C18-AQ 1 x 250 mm 3 µm	Chromatographie- system 3 Säulenofen: 30°C	A: 0,06% TFA B: 0,05% TFA 80% ACN	0-10% B 1 min 10-70% B 120 min 70-95% B 5 min 95% B 5 min 95-0% B 5 min	20 µl/min	22,3 µl Start nach 60 min
SM 7	ReproSil-Pur C18-AQ 1 x 250 mm 3 µm	Chromatographie- system 3 Säulenofen: 30°C	A: 0,06% TFA B: 0,05% TFA 80% ACN	0-10% B 1 min 10-70% B 120 min 70-95% B 5 min 95% B 5 min 95-0% B 5 min	20 µl/min	22,3 µl Start nach 45 min
SM 8	Phenomenex Jupiter C5 10 x 250 mm 300 Å, 5 µm	Chromatographie- system 1	A: 0,1% TFA B: 0,1% TFA 80% ACN	0-30% B 1 min 30-60% B 50 min 60-100% B 2 min 100% B 2 min 100-0% B 1 min 0% B 18 min	1,5 ml/min	1,5 ml Start nach 1 min

Tabelle 14: Detaillierte Darstellung der durchgeführten Chromatographieschritte zur Aufreinigung osteoanaboler Aktivitäten aus Schweinemagen.

2.5. Analytische Methoden

2.5.1. Massenspektrometrie

Massenspektrometrische Bestimmungen erfolgten mit einem **Matrix Assisted Laser Desorption / Ionisation - Time Of Flight (MALDI-TOF)** Massenspektrometer ("Voyager-DE™ PRO BioSpectrometry™ Workstation, PerSeptive Biosystems/Vestec, Houston).

Die Messung des Molekulargewichts wurde im linearen Modus mit einem Stickstofflaser (337 nm) durchgeführt. Jeweils 1 µl Matrix und 1 µl salzfreie Probe wurden auf den Proben-träger pipettiert, gemischt und an der Luft getrocknet. Als Matrix diente eine gesättigte Lösung α -Cyano-4-hydroxymizinsäure (CHC; Sigma). Die Steuerung des Spektrometers und die Auswertung der Spektren erfolgte mit der "Voyager BioSpectrometry™ Workstation Software Version 5.1" (PerSeptive Biosystems, Vestec, Houston).

Bei der Massenbestimmung mittels MALDI-TOF treten überwiegend einfach geladene Ionen auf. Dies macht es möglich, komplexe Peptidgemische hinsichtlich ihrer Massenzusammensetzung zu analysieren.

2.5.2. Kapillaronenelektrophorese

Die Kapillaronenelektrophorese (Capillary Zone Electrophoresis; CZE) dient als eine hochauflösende Analysemethode zur Reinheitsüberprüfung von Peptiden. Dabei erfolgt die Trennung der Analytionen aufgrund von Unterschieden in ihrer Mobilität, die durch Größen- und Ladungsunterschiede entstehen.

Als Elektrophoresesystem wurde ein "P/ACE MDQ" mit einem "P/ACE Diode Array Detector" der Firma Beckman Coulter verwendet, wobei die Detektionswellenlänge 214 nm betrug. Die Auswertung der Elektropherogramme erfolgte mit der Software "P/ACE System MDQ 2.2" (Beckman Coulter). Zur Trennung der Peptide wurde eine 57 cm lange, unbeschichtete "fused silica" Kapillare (Beckman Coulter) verwendet.

Durch Anlegen eines geringen Überdrucks für 10 - 20 sec wurde die Probe in die Kapillare injiziert. Die Messung erfolgte bei einer gleichbleibenden Hochspannung von 18 bzw. 20 kV und einer durch Flüssigkühlung konstant gehaltenen Kapillartemperatur von 25°C. Als Puffer wurde 0,1 M H₃PO₄ mit 0,02% Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) verwendet. Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 2,5 eingestellt.

2.5.3. Hydrolyse von Peptiden mit der Protease Subtilisin

Zur Überprüfung des peptidischen Charakters aktiver Substanzen erfolgte eine Inkubation der Proben mit der Protease Subtilisin. Peptidbindungen werden von dieser Protease unspezifisch gespalten und es kommt infolgedessen zu einem Verlust der biologischen Aktivität (Zucht *et al.*, 1995).

Es wurden Aliquots von aktiven Fraktionen der Hämofiltrat- und Schweinemagen-Peptidbank entnommen, lyophilisiert und in Verdaupuffer (50 mM Tris-HCl + 20 mM CaCl₂, pH 7,8) resuspendiert. Subtilisin (Boehringer Mannheim), eine Protease aus *Bacillus subtilis*, wurde der Lösung im Verhältnis von 1:10 (Enzym/Peptid) zugesetzt. Die Proben wurden für 2 h bei 37°C inkubiert. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch Erhitzen auf 70°C für 10 min.

Für jede Fraktion wurden zusätzlich 3 Kontrollansätze erstellt, so dass insgesamt die folgenden 4 Ansätze pipettiert wurden:

Bezeichnung	Komponenten	Behandlung
Ansatz 1	- lyophilisierte Probe - 100 µl Verdaupuffer - 10 µg Subtilisin	- 2 h Inkubation bei 37°C - Hitzeinaktivierung für 10 min bei 70°C
Ansatz 2	- lyophilisierte Probe - 100 µl Verdaupuffer	- 2 h Inkubation bei 37°C - Hitzeinaktivierung für 10 min bei 70°C
Ansatz 3	- 100 µl Verdaupuffer - 10 µg Subtilisin	- 2 h Inkubation bei 37°C - Hitzeinaktivierung für 10 min bei 70°C
Ansatz 4	- lyophilisierte Probe - 100 µl H ₂ O	- 2 h Inkubation bei RT

Tabelle 15: Ansätze für die enzymatische Hydrolyse durch Subtilisin

Alle Ansätze wurden nach der Behandlung entsalzt (2.4.4.3), für 30 min bei -80°C eingefroren und anschließend in einer Vakuumzentrifuge gefriergetrocknet. Die Lagerung der Lyophilisate erfolgte bis zur Verwendung in Stimulationsexperimenten bei -20°C.

3. Ergebnisse

3.1. Etablierung des Bioassays

Die wichtigsten Eckpunkte für die Etablierung eines robusten Bioassays waren die Auswahl und Klonierung von Promotorregionen osteoblastenspezifischer Gene und ihre Integration in Reporter-genkonstrukte, sowie die Optimierung einer Transfektionsmethode, die eine stabile Transfektion einer geeigneten Zelllinie mit ausreichender Effizienz ermöglichte. Eine schematische Darstellung der Strategie für die Etablierung des Bioassays findet sich in Abbildung 10.

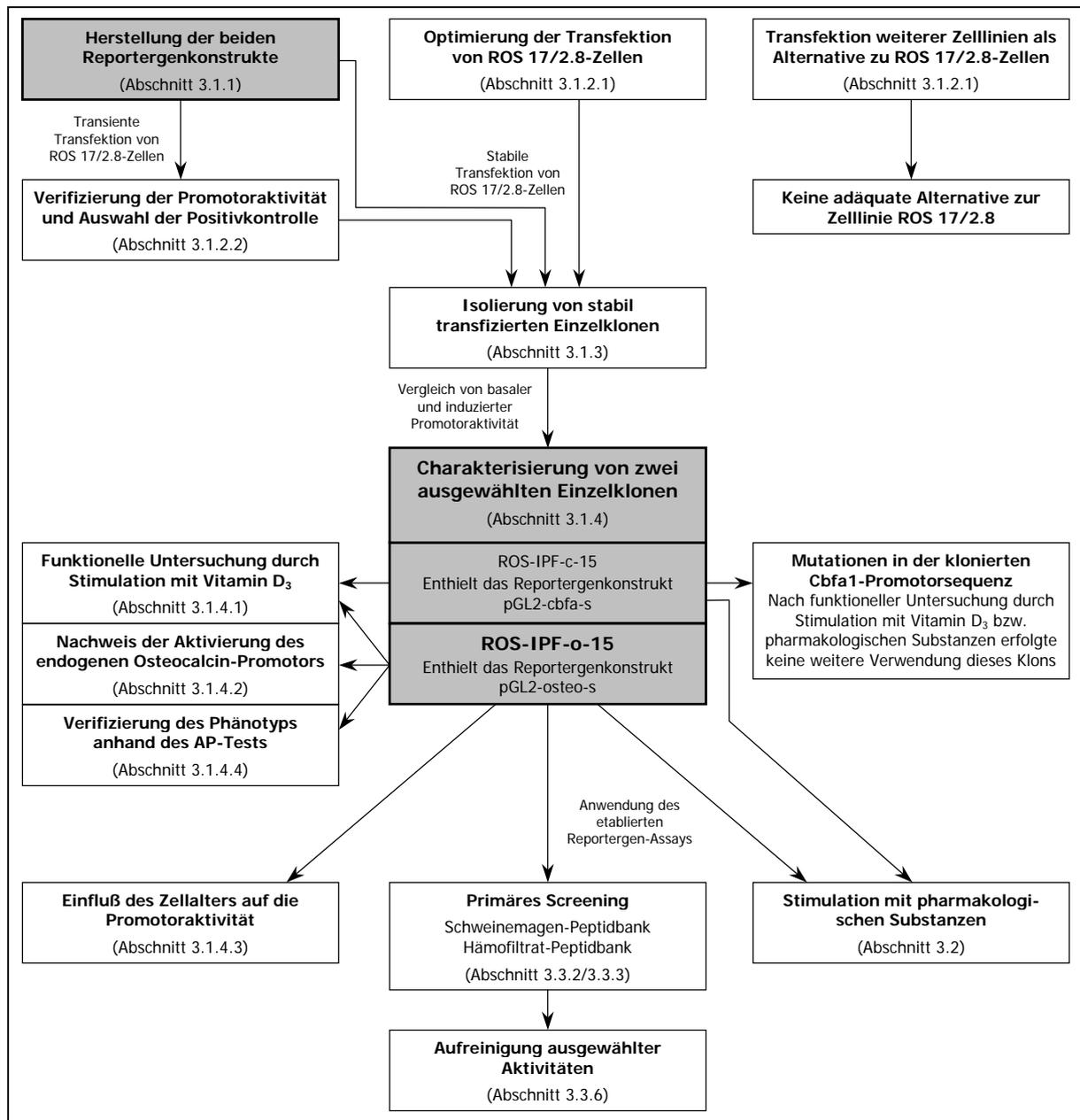


Abbildung 10: Strategie für die Etablierung des Reporter-gen-Assays.

Aufgrund ihrer großen Bedeutung für den Knochenstoffwechsel wurde jeweils ein Promotorfragment des humanen Cbfa1- bzw. Osteocalcin-Gens (vgl. 1.3) als regulatorische Sequenz in den Reporter-genvektor pGL2-basic eingebracht, wobei sich die mutationsfreie Klonierung des Cbfa1-Promotors als schwierig erwies. Das Plasmid pGL2-basic enthielt als Reporter-gen die kodierende Region der Glühwürmchenluciferase und wurde für die Herstellung der Reporter-genkonstrukte ausgewählt, weil es eine schnelle, empfindliche und quantitative Analyse von Promotoraktivitäten ermöglichte (<http://www.promega.com/tbs/tm003/tm003.html>). In Kombination mit dem Steady-Glo™ Luciferase Assay System konnte so eine große Anzahl von Proben im Hochdurchsatzscreening (96-Well-Format) verarbeitet werden. Unter Verwendung von Steady-Glo™ hatten Lumineszenzsignale eine Halbwertszeit von mehr als 5 h. Dies erlaubte eine simultane Verarbeitung mehrerer 96-Well-Platten mit nur geringen Veränderungen der Signalstärke (<http://www.promega.com/tbs/tm051/tm051.pdf>).

Als Zellsystem für die stabile Transfektion wurde die aus einem Ratten-Osteosarkom hervorgegangene Zelllinie ROS 17/2.8 ausgewählt (Majeska *et al.*, 1980). ROS 17/2.8-Zellen exprimieren eine Reihe von Genen, die charakteristisch für Osteoblasten sind, wie z. B. Osteopontin, Alkalische Phosphatase, Kollagen Typ I, Parathormon-Rezeptor und Osteocalcin. Ihr Phänotyp kann daher am ehesten mit dem von reifen Osteoblasten verglichen werden (Majeska *et al.*, 1985; Onyia *et al.*, 1999). Insgesamt stellen ROS 17/2.8-Zellen ein durch zahlreiche Studien gut charakterisiertes Zellsystem dar, dessen Transfizierbarkeit unter Verwendung verschiedener Agenzien nachgewiesen werden konnte (Kerner *et al.*, 1989; Williams *et al.*, 1994; Drissi *et al.*, 2002).

Weiterhin wurde untersucht, inwieweit sich andere osteoblastäre Zelllinien für die Transfektion mit den hergestellten Reporter-genkonstrukten eignen. Als potentielle Alternativen zu ROS 17/2.8-Zellen wurden die Zelllinien MG-63, UMR-106 und hFOB 1.19 in Betracht gezogen. Die Zelllinie MG-63 wurde aus humanen Osteosarkomzellen etabliert (Billiau *et al.*, 1977) und bietet möglicherweise eine höhere Kompatibilität zu den humanen Promotoren der verwendeten Reporter-genkonstrukte als ROS 17/2.8-Zellen. Bei den UMR-106-Zellen handelt es sich um Ratten-Osteosarkomzellen (Martin *et al.*, 1976), die sich u. a. hinsichtlich ihres Phänotyps von ROS 17/2.8-Zellen unterscheiden. Ihr Phänotyp entspricht eher dem eines Präosteoblasten, wodurch sich UMR-106-Zellen im Vergleich zu ROS 17/2.8-Zellen für Untersuchungen eines früheren Entwicklungsstadiums von Osteoblasten eignen.

Die interessanteste Alternative war die Zelllinie hFOB 1.19, die aus immortalisierten fötalen Gliedmaßenzellen hervorgegangen ist. Hierbei handelt es sich um humane Zellen, die unter entsprechenden Bedingungen zu Osteoblasten differenzieren und mineralisierte Knochenmatrix bilden können (Harris *et al.*, 1995a). Ein solches Zellsystem würde nach stabiler Transfek-

tion mit einem entsprechenden Reporter-genkonstrukt eine Analyse der basalen und induzierbaren Promotoraktivität (beispielsweise die des Cbfa1-Promotors) in verschiedenen Phasen der osteoblastären Differenzierung ermöglichen.

3.1.1. Herstellung der Reporter-genkonstrukte

Für die Etablierung eines Luciferase-Reporter-gen-Assays wurden zunächst verschiedene Luciferase-Reporter-genkonstrukte hergestellt, die später bei der Transfektion von eukaryotischen Zellen eingesetzt wurden. Die Promotorfragmente von Cbfa1 und Osteocalcin wurden mittels PCR und humaner genomischer DNA amplifiziert, in den pCR[®]2.1-Vektor kloniert und nachfolgend in das Reporter-genplasmid pGL2-basic umkloniert.

3.1.1.1. Klonierung in den pCR[®]2.1-Vektor

Mittels PCR und unter Verwendung humaner, genomischer DNA (Invitrogen) konnten die in Abbildung 11 dargestellten Promotorfragmente "cbfa-prom" und "osteo-prom" mit einer Größe von 2310 Bp bzw. 2136 Bp (vgl. Tabelle 5) amplifiziert werden. Neben der für die Wirkung von Vitamin D₃ benötigten Nukleotidsequenz (VDRE) (Ozono *et al.*, 1990), enthielt das Fragment des Osteocalcin-Promotors weitere regulatorische Elemente (Abbildung 12A). Die Nukleotidsequenz des von Drissi *et al.* (2002) nachgewiesenen VDREs im Cbfa1-Promotor der Ratte (Abbildung 12B) war ebenfalls im amplifizierten Promotorfragment "cbfa-prom" enthalten und stellte somit ein putatives VDRE des humanen Cbfa1-Promotors dar. Die genauen Positionen einiger regulatorischer Elemente innerhalb der beiden Promotorregionen sind in Anhang 7.2 und 7.3 angegeben.

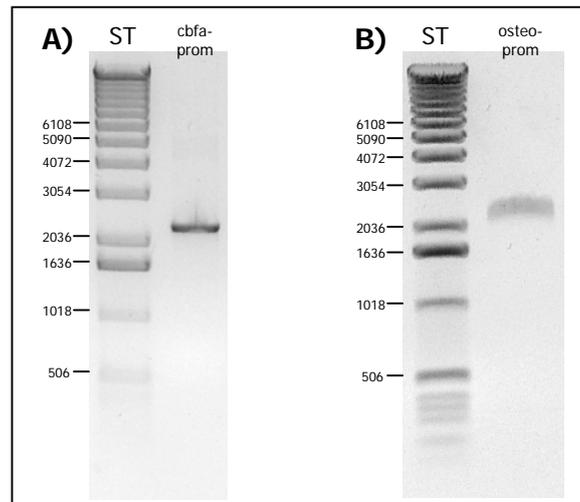


Abbildung 11: Durch PCR generierte Promotorfragmente. Abbildung 11A zeigt das Promotorfragment cbfa-prom, welches mit dem Primerpaar cbfa-2F/cbfa-2R amplifiziert wurde, Abbildung 11B das mit dem Primerpaar osteo-1F/oste-2R erzeugte Fragment osteo-prom. Die Größen der Banden wurden anhand der 1 kbp-DNA-Leiter (Gelspur ST; Angaben in Bp) abgeschätzt.

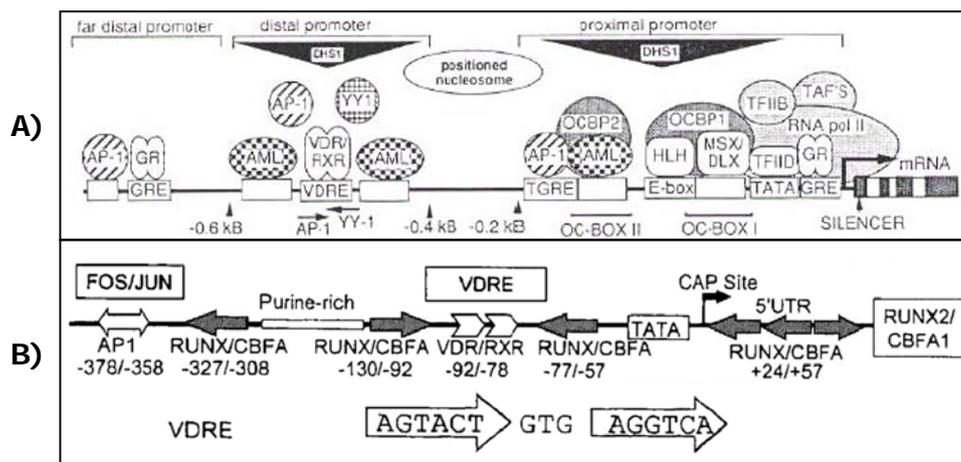


Abbildung 12: A) Regulatorische Elemente und Transkriptionsfaktoren des Osteocalcin-Promotors. Die amplifizierte Sequenz enthält u. a. TGF- β (TGRE), Glucocorticoid (GRE) und Vitamin D₃ responsive Elemente (VDRE) (nach: Stein *et al.*, 1998). B) Regulatorische Elemente des Ratte-Cbfa1-Promotors. Gekennzeichnet sind u. a. Cbfa1 (RUNX/CBFA) und Vitamin D₃ responsive Elemente (VDRE) (nach: Drissi *et al.*, 2002).

Die Fragmente wurden isoliert, aufgereinigt und nach Ligation in den pCR[®]2.1-Vektor in *E.coli*-Bakterien transformiert. Von den resultierenden Bakterienkolonien (Blau/Weiß-Selektion) wurde Plasmid-DNA isoliert. Nach einem Restriktionsverdau der DNA mit anschließender gelelektrophoretischer Auftrennung konnten die erhaltenen Bandenmuster zur Identifizierung der Klone verwendet werden, die den pCR2.1-Vektor mit dem entsprechenden Promotorfragment enthielten (Abbildung 13).

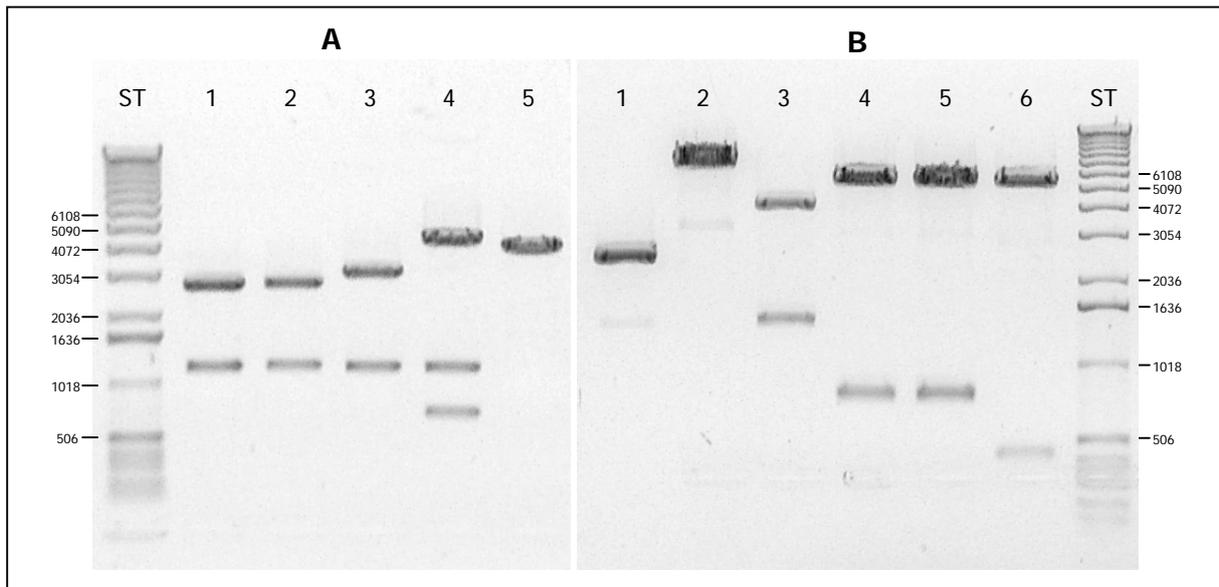


Abbildung 13: Restriktionsverdau einiger isolierter Plasmid-DNAs. Die DNA-Präparationen wurden zur Identifizierung von pCR2.1-cbfa mit *Pst*I verdaut. Die drei resultierenden Banden hatten eine Größe von 4335 Bp, 1167 Bp und 714 Bp (Abbildung 13A-4). Die entsprechenden Fragmentgrößen für das Plasmid pCR2.1-osteo liegen nach einem Restriktionsverdau mit *Bam*HI bei 5264 Bp und 779 Bp (Abbildung 13B-4/5). Die Größen der Banden wurden von der 1 kb-DNA-Leiter (Gelspur ST; Angaben in Bp) abgeleitet.

Zur genauen Überprüfung der Nukleotidsequenz der klonierten DNA-Fragmente wurde die Plasmid-DNA derjenigen Klone sequenziert, die nach dem Restriktionsverdau das errechnete Bandenmuster aufwiesen. Die erhaltenen Sequenzen der Klone "cbfa8-s2F2R" (Abbildung 13A, Gelspur 4) und "Osteo3-s1F2R" (Abbildung 13B, Gelspur 5) sind im Anhang 7.2 bzw. 7.3 dargestellt.

Alle weiteren Klonierungsschritte wurden mit der Plasmid-DNA der genannten Klone durchgeführt, wobei das Promotorfragment cbfa-prom einige von der erwarteten Sequenz abweichende Nukleotide enthielt. Das Promotorfragment osteo-prom wies keine Mutationen auf.

3.1.1.2. Umklonierung in den pGL2-basic-Vektor

Die im pCR[®]2.1-Vektor integrierte DNA wurde nachfolgend mit einer Restriktionsendonuklease herausgeschnitten und die überhängenden Enden der doppelsträngigen DNA aufgefüllt (Klenow-Enzym). Mit einem Restriktionsenzym erfolgte die Linearisierung endotoxinfreier Plasmid-DNA des Vektors "pGL2-basic". Anschließend erfolgte die Dephosphorylierung, die gelelektrophoretische Auftrennung und die Isolierung des geöffneten Vektors.

Zur Überprüfung der DNA-Präparationen wurde je ein Aliquot des Vektors sowie beider Promotorfragmente elektrophoretisch in einem Agarosegel aufgetrennt (Abbildung 14).

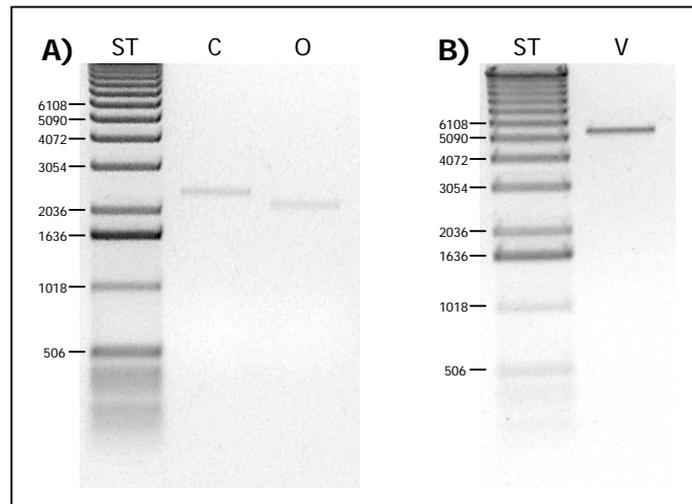


Abbildung 14: Überprüfung der DNA-Präparationen. Es wurden jeweils 10% der DNA-Präparationen in einem 0,8%igen Agarosegel aufgetrennt. Abbildung 14A zeigt das Fragment *cbfa*↓*EcoRI* mit einer Größe von ca. 2400 Bp (Gelspur C) und das etwa 2100 Bp große Fragment *osteo*↓*EcoRI* (Gelspur O). Die errechnete Größe des linearisierten Vektors *pGL2-basic*↓*SmaI* lag bei 5576 Bp (Abbildung 14B, Gelspur V). Die Abschätzung der Fragmentgrößen erfolgte anhand der 1 kBp-DNA-Leiter (Gelspur ST; Angaben in Bp).

Für die Ligation wurden pro Ansatz 1 µl der dephosphorylierten Vektor-DNA und 3 µl der *cbfa*↓*EcoRI*- bzw. 10 µl der *osteo*↓*EcoRI*-Präparation verwendet. Die Hälfte der beiden Ligationsansätze wurden jeweils in kompetente *E. coli* XL10-Gold-Zellen transformiert und die resultierenden Klone mittels Kolonie-PCR hinsichtlich einer Insertion überprüft. Durch Isolierung von Plasmid-DNA und nachfolgender DNA-Sequenzierung konnten folgende Klone identifiziert werden:

Bezeichnung	enthaltene Plasmid	Bemerkung
Cbfa-6-s	pGL2-cbfa-s	Promotorfragment in sense-Orientierung
Cbfa-5-as	pGL2-cbfa-as	Promotorfragment in antisense-Orientierung
Osteo-10-s	pGL2-osteo-s	Promotorfragment in sense-Orientierung
Osteo-29-as	pGL2-osteo-as	Promotorfragment in antisense-Orientierung

Tabelle 16: Klone mit aufgenommenem Reportergenkonstrukt

Die Plasmide enthielten keine von der erwarteten Sequenz abweichenden Nukleotide, mit Ausnahme derjenigen, die im Promotorfragment *cbfa*-prom bereits nach der Klonierung in den pCR2.1-Vektor detektiert wurden. Beide Plasmide, die eines der Promotorfragmente in sense-Orientierung enthielten, repräsentierten die für die nachfolgende Transfektion von ROS 17/2.8-Zellen benötigten Reportergenkonstrukte.

3.1.2. Transfektion eukaryotischer Zellen

Bei der Transfektion von Zellen können Faktoren wie die Zellzahl, die DNA-Menge, die Menge des Reagenz, sowie die Dauer die Transfektionseffizienz beeinflussen. Daher wurden die genannten Parameter vor Beginn der Transfektionsversuche mit den generierten Reporter-genkonstrukten (3.1.1) unter Verwendung eines Kontrollplasmids für die Transfektion von ROS 17/2.8-Zellen optimiert.

Zur Ermittlung einer möglichen Alternative zu ROS 17/2.8-Zellen wurden darüber hinaus weitere Zelllinien hinsichtlich ihrer Transfizierbarkeit getestet.

Nach Bestimmung der optimalen Bedingungen für die Transfektion von ROS 17/2.8-Zellen wurde eine Reihe transienter Transfektionen durchgeführt. In erster Linie wurde überprüft, ob die hergestellten Reporter-genkonstrukte mit einer entsprechenden Positivkontrolle induziert werden konnten.

Abschließend erfolgte die stabile Transfektion der Plasmide pGL2-cbfa-s und pGL2-osteo-s in ROS 17/2.8-Zellen und die Selektion von Einzelklonen, die für das Screening nach osteoanabolen Faktoren geeignet waren.

3.1.2.1. Optimierung der Transfektionsparameter

Für die Transfektion der Reporter-genkonstrukte in ROS 17/2.8-Zellen wurden zunächst transiente Transfektionen in 24-Well-Platten durchgeführt. In Abbildung 15 ist ein Beispiel eines Optimierungsschrittes dargestellt. Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Zelldichten ausplattiert und 24 h später mit einer steigenden Menge an DNA transfiziert. Hierzu fand der pGL2-control-Vektor Verwendung. In diesem Plasmid ist die kodierende Nukleotidsequenz der Luciferase an den Promotor des Cytomegalievirus (CMV) gekoppelt, was in einer maximalen Transkription des Luciferasegens resultiert.

Die Messung der Luciferaseaktivität erfolgte 24 h bzw. 48 h nach der Transfektion.

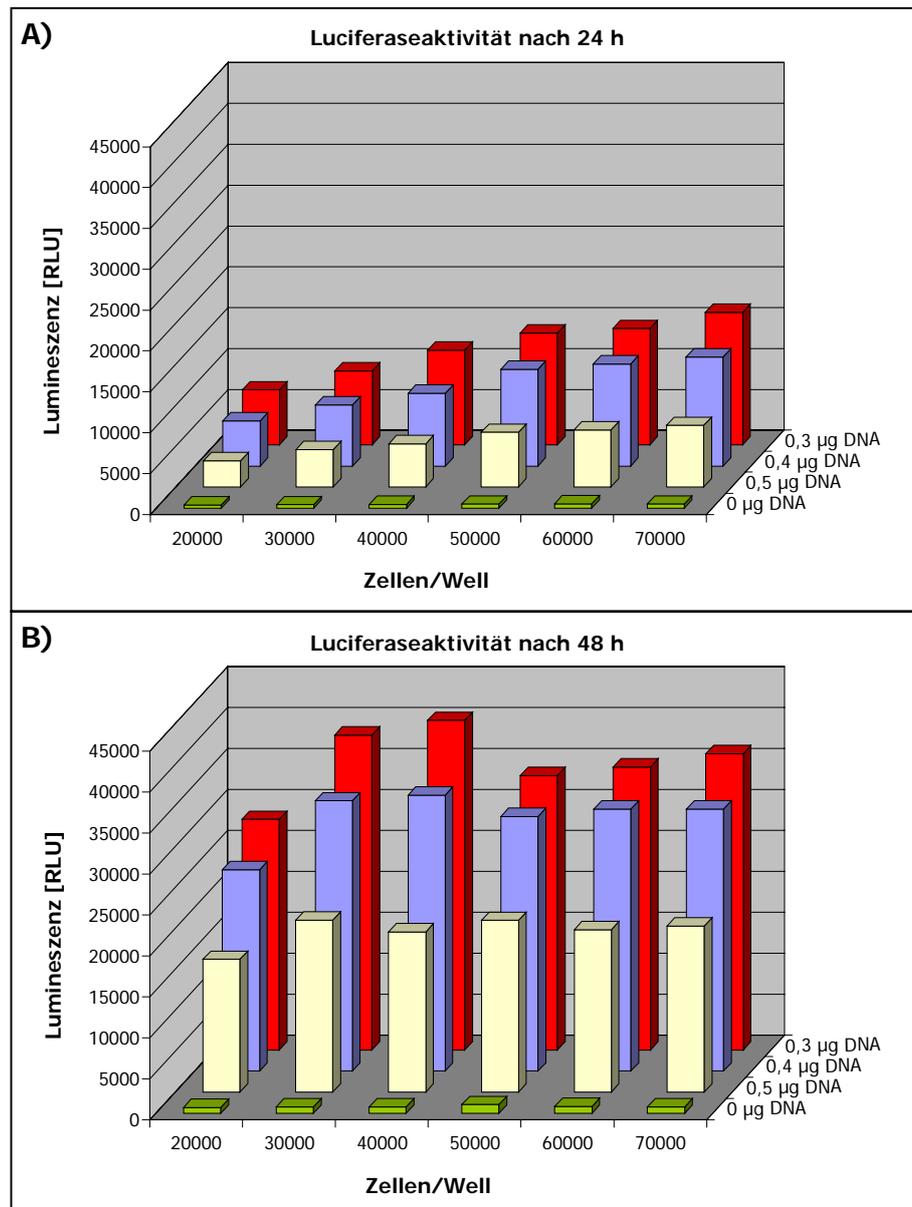


Abbildung 15: Optimierung der Transfektionseffizienz. ROS 17/2.8-Zellen wurden mit unterschiedlichen Mengen an Plasmid-DNA (pGL2-control-Vektor) transfiziert. Die Bestimmung der Luciferaseaktivität erfolgte nach einer Inkubationszeit von 24 h (Abbildung 15A) bzw. 48 h (Abbildung 15B). Für eine übersichtlichere Darstellung wurden die Daten mit Ausnahme der ohne Plasmid-DNA durchgeführten Versuche (0 µg DNA) in umgekehrter Reihenfolge abgebildet.

Nachdem eine ausreichende Transfektionseffizienz im 24-Well-Format erzielt werden konnte, erfolgte die weitere Optimierung der Parameter im 96-Well-Format. Abbildung 16 zeigt den abschließenden Optimierungsschritt.

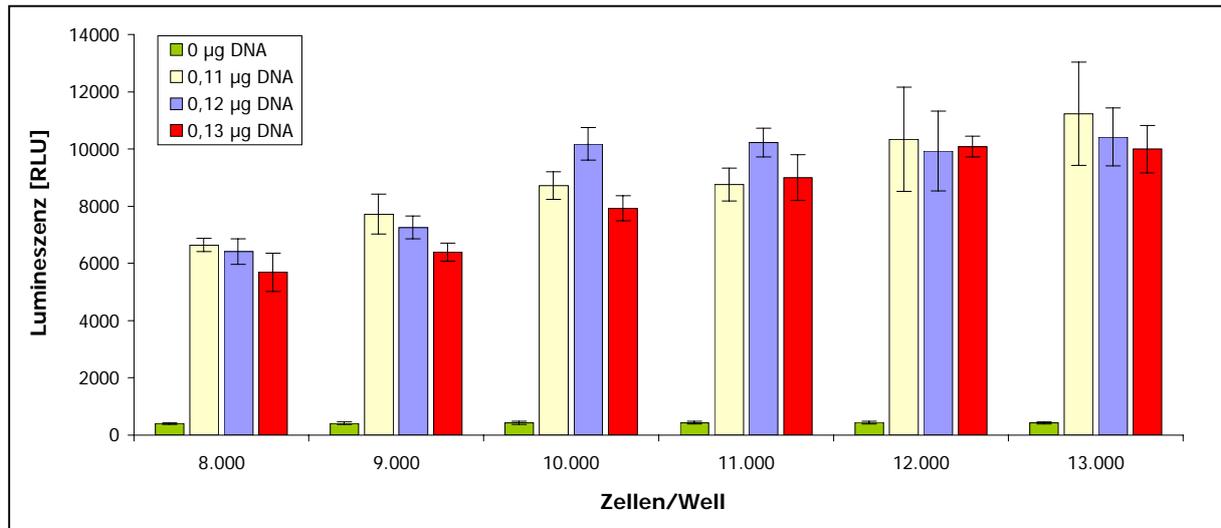


Abbildung 16: Optimierte Parameter zur Transfektion von ROS 17/2.8-Zellen unter Verwendung von Effectene. Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Mengen an pGL2-control-Vektor-DNA transfiziert. Die Bestimmung der Luciferaseaktivität erfolgte nach 48 h. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte von $n=4$ Transfektionen \pm SD.

Die höchste Transfektionseffizienz wurde mit einer Zelldichte von 12.000 Zellen/Well und unter Einsatz von 0,12 µg DNA und 0,4 µl Effectene pro Well erreicht. Eine Zusammenfassung der optimierten Parameter findet sich in Tabelle 17 (3.1.3).

Die Transfektionen der anderen Zelllinien (vgl. Tabelle 6; 2.3.1) resultierten durchweg in geringeren Luciferaseaktivitäten und stellten folglich keine Alternative zur Transfektion von ROS 17/2.8-Zellen dar. Zum exemplarischen Vergleich der unterschiedlichen Transfektionseffizienzen wurden in Abbildung 17 die Luciferaseaktivitäten von drei unter gleichen Bedingungen transfizierten Zelllinien dargestellt. Die höchste nicht in ROS 17/2.8-Zellen gemessene Luciferaseaktivität konnte nach Transfektion von 9.000 UMR-106-Zellen mit 0,45 µl Effectene und 0,12 µg DNA (pGL2-control) beobachtet werden. Mit den gleichen, für ROS 17/2.8-Zellen nicht optimalen Parametern, konnte mit ROS 17/2.8-Zellen dennoch eine fast doppelt so hohe Luciferaseaktivität erzielt werden. Die Ergebnisse aller weiteren Transfektionen wurden daher nicht abgebildet.

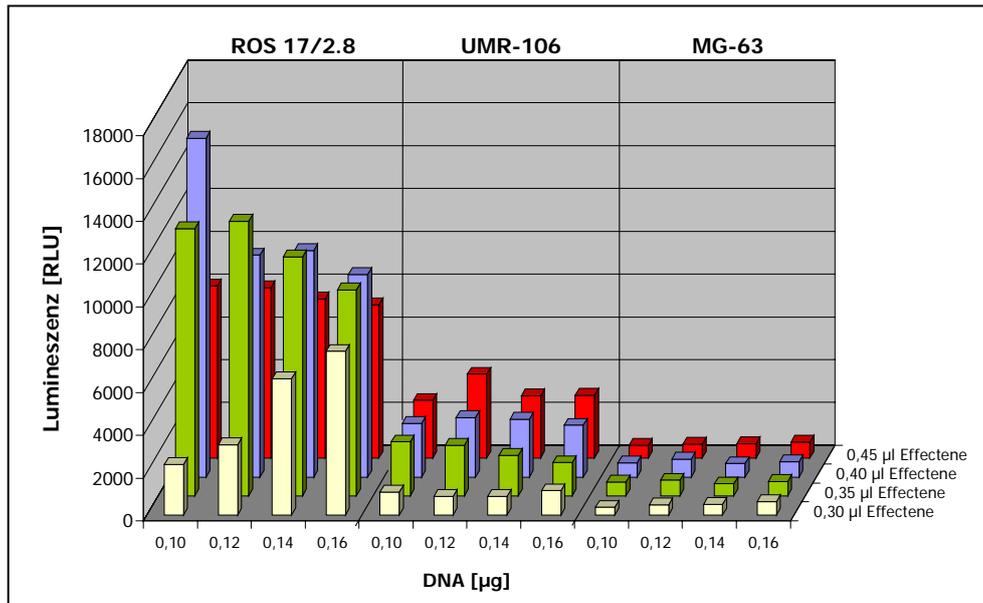


Abbildung 17: Transfektion dreier Zelllinien unter Verwendung von Effectene. Es wurden 9000 Zellen/Well mit unterschiedlichen Mengen an Effectene und pGL2-control-Vektor-DNA transfiziert. Die Bestimmung der Luciferaseaktivität erfolgte nach 48 h. Dargestellt sind die Mittelwerte von n=4 Transfektionen.

3.1.2.2. Verifizierung der Promotoraktivität und Auswahl der Positivkontrolle

Anhand transient transfizierter ROS 17/2.8-Zellen wurde überprüft, ob das in den pGL2-basic-Vektor klonierte Promotorfragment "osteo-prom" die Expression des Luciferasegens induzieren bzw. hemmen konnte. Dazu wurden zunächst zwei Stimulanzen gewählt, deren induzierender Effekt auf einen weiteren Osteoblastenmarker - die Alkalische Phosphatase (AP) - in ROS 17/2.8-Zellen bereits nachgewiesen werden konnte. Unter Verwendung des AP-Tests wurde aus dem als "Fraktion 32" (Fr.32) bezeichneten Substanzgemisch das Glucocorticoid Hydrocortison als aktive Komponente isoliert (Stephan, 2004). Dexamethason diente dabei als Positivkontrolle. Die hier eingesetzte Äquivalentmenge (Äq) der Fraktion 32 entsprach 40 ml des zur Herstellung der Peptidbank verwendeten Hämofiltrats (HF) pro Milliliter Medium (=40 ml HF Äq/ml).

Am Vortag der Transfektion wurden 8.000 Zellen/Well in einer 96-Well-Platte ausplattiert. Die Transfektion erfolgte mit 0,12 µg der jeweiligen Plasmid-DNA und 0,36 µl Effectene pro Well. Nach 24 h Inkubation wurden die Stimulanzen zugefügt und die Luciferaseaktivität wurde weitere 24 h später gemessen. Abbildung 18 zeigt die Luciferaseaktivitäten nach Stimulation verschiedener transfizierter Plasmide mit Dexamethason oder Fraktion 32.

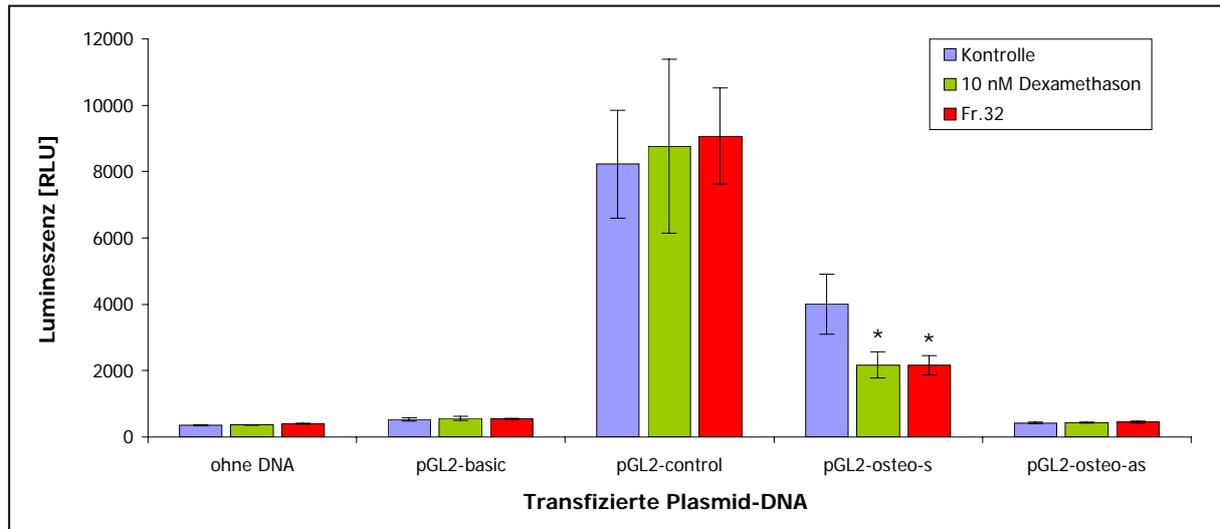


Abbildung 18: Luciferaseaktivität in stimulierten ROS 17/2.8-Zellen nach Transfektion mit unterschiedlichen Plasmiden. Die Zellen wurden mit den beiden Vektoren transfiziert, die das Fragment osteoprom in sense (s)- bzw. antisense (as)-Orientierung enthielten. Als Kontrolle dienten der leere pGL2-basic-Vektor, sowie Zellen, die der Transfektionsprozedur ohne Zusatz von DNA unterzogen wurden. Gezeigt sind die Mittelwerte von n=4 Transfektionen \pm SD. Die Signifikanzen (*) beziehen sich jeweils auf die Kontrolle.

Lediglich der pGL2-osteo-s-Vektor zeigte eine Reduktion der Luciferaseaktivität um 40-50% nach Stimulation mit Dexamethason oder Fraktion 32. Wurde das Plasmid, welches das gleiche Promotorfragment in umgekehrter Orientierung enthielt (pGL2-osteo-as), mit diesen Substanzen stimuliert, so konnten keine Veränderungen der Luciferaseaktivität festgestellt werden. Die Aktivitäten waren dabei mit denen des pGL2-basic-Vektors vergleichbar. Folglich wurden die Effekte durch das in sense-Orientierung vorliegende Fragment des Osteocalcin-Promotors und nicht durch Sequenzen innerhalb des pGL2-basic-Vektors hervorgerufen.

Zur Verifizierung von $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D_3 (Calcitriol; Vitamin D_3 ; Vit. D_3) als potentielle Positivkontrolle für den Luciferase-Reporter-Gen-Assay erfolgte die transiente Transfektion von ROS 17/2.8-Zellen gemäß des optimierten Protokolls. Die Zellen wurden mit 100 nM Vitamin D_3 stimuliert und die Luciferaseaktivität nach 20 h Inkubation bestimmt (Abbildung 19). Als zusätzliche Kontrolle wurden Zellen mit Dexamethason und Fraktion 32 stimuliert, da ihr inhibierender Effekt bereits unter suboptimalen Transfektionsbedingungen beobachtet werden konnte (Abbildung 18).

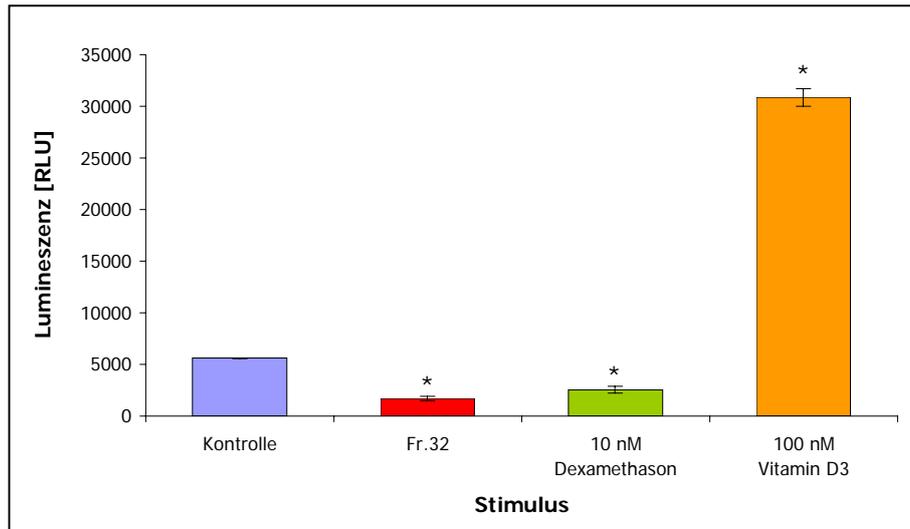


Abbildung 19: Luciferaseaktivität in stimulierten ROS 17/2.8-Zellen nach transients Transfektion mit pGL2-osteo-s. Dargestellt sind die Mittelwerte von $n=2$ Transfektionen \pm SD. Die Signifikanzen (*) beziehen sich auf die Kontrolle.

Die Zugabe von 40 ml HF Äq/ml der Fraktion 32 oder 10 nM Dexamethason führte zu einer Reduktion der Luciferaseaktivität um 70% bzw. 55%. Vitamin D₃ hingegen steigerte die Aktivität um mehr als das 5-fache und wurde nachfolgend in einer Konzentration von 100 nM als Positivkontrolle im Luciferase-Reportergen-Assay eingesetzt.

Um abschätzen zu können, nach welcher Inkubationszeit die Stimulation mit 100 nM Vitamin D₃ bereits zu einer signifikanten Erhöhung der Luciferaseaktivität in transfizierten ROS 17/2.8-Zellen führt, wurden Zellen nach dem optimierten Protokoll transfiziert. Nach 24 h erfolgte die Stimulation mit 100 nM Vitamin D₃ und die Luciferaseaktivität wurde nach 5 h, 20 h und 42 h gemessen. Zuvor wurde jeweils die Zellvitalität (WST-1) bestimmt. Die Inkubationszeit für die nachfolgenden Versuche sollte einen Zeitraum von zwei Tagen nicht überschreiten, um die Gesamtdauer des Tests vom Ausplattieren der Zellen bis zur Bestimmung der Luciferaseaktivität möglichst gering zu halten.

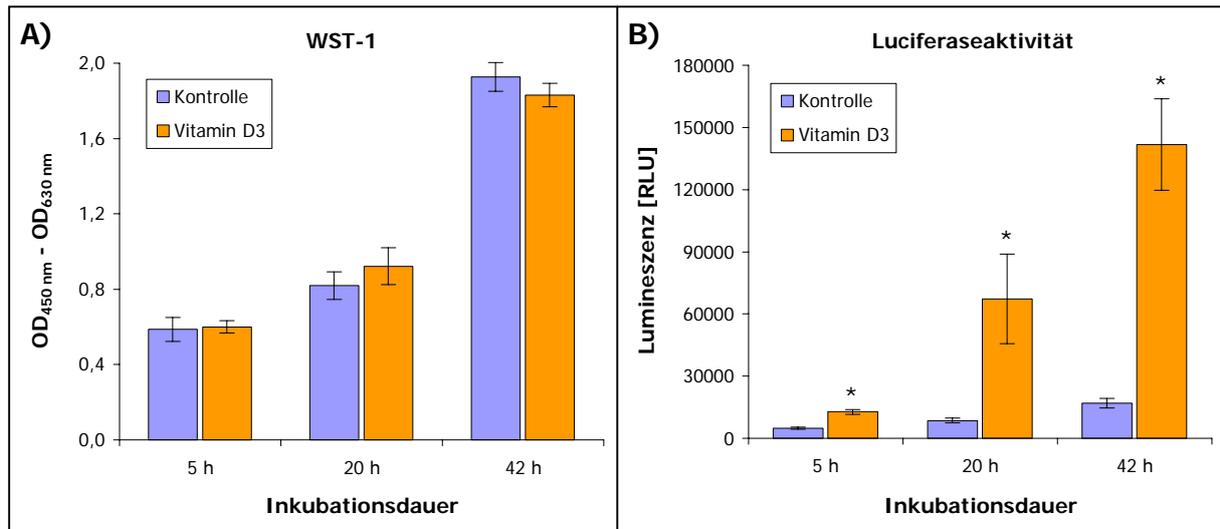


Abbildung 20: Vergleich von Zellvitalität (WST-1) und Luciferaseaktivität in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer mit 100 nM Vitamin D₃. Dargestellt sind die Mittelwerte von n=4 Transfektionen ± SD. Die Signifikanzen (*) beziehen sich jeweils auf die Kontrolle.

Die WST-1-Messungen zeigten nach 42 h eine Verdreifachung der Zellvitalität, verglichen mit den Werten nach einer Inkubation von 5 h. Signifikante Unterschiede zwischen unstimulierten und stimulierten Zellen waren nicht erkennbar (Abbildung 20A). Die Luciferaseaktivität der Kontrollzellen nahm in diesem Zeitraum ebenfalls um einen Faktor von etwa 3 zu und korrelierte mit der Zunahme der Zellvitalität. Dies bedeutete, dass die Erhöhung der Luciferaseaktivität offensichtlich auf die steigende Zelldichte zurückzuführen war.

Stimulierte man die Zellen mit 100 nM Vitamin D₃, so erhöhte sich die Promotoraktivität nach 20 h auf das 5-fache, nach 42 h auf das 11-fache im Vergleich zu den Messungen nach 5 h (Abbildung 20B).

Für die folgenden Versuche mit stabil transfizierten Zellen erfolgte die Bestimmung der Luciferaseaktivität, soweit nicht anders angegeben, 48 h nach Zugabe der jeweiligen Stimulanzien.

3.1.3. Stabile Transfektion von ROS 17/2.8-Zellen und Isolierung von Einzelklonen

Die Verwendung stabil transfizierter Zellen wurde für die Etablierung des Bioassays gewählt, da dies einige bedeutende Vorteile gegenüber der transienten Transfektion bot. Zum einen bestand nach der Selektion geeigneter Einzelklone keine Notwendigkeit, für jede Messreihe eine erneute Transfektionsprozedur durchzuführen. Der Arbeitsaufwand war entsprechend geringer und die Gesamtdauer des für ein Hochdurchsatzscreening konzipierten Bioassays verkürzte sich um eine Inkubationszeit von 48 h. Zum anderen fielen pro Assay weniger Kosten an, da beispielsweise das Transfektionsagenz nur einmal benötigt wurde.

Ein entscheidender Vorteil war die höhere Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, da die Beeinflussung der Promotoraktivitäten durch Schwankungen der Transfektionseffizienz vermieden werden konnte. Außerdem wurden die Zellen nicht unmittelbar vor Durchführung der Stimulationsexperimente dem Stress der Transfektionsprozedur ausgesetzt. Infolgedessen konnte ein potentieller Effekt der Transfektion auf die Induzierbarkeit der Promotoraktivität minimiert werden.

Nachdem die optimalen Bedingungen für die Transfektion von ROS 17/2.8-Zellen ermittelt wurden, erfolgte die stabile Transfektion. Eine Zusammenfassung der optimierten Parameter für die transiente Transfektion in 96-Well-Platten und die entsprechend angepaßten Mengen für die stabile Transfektion in Zellkulturschalen findet sich in Tabelle 17. Ebenfalls aufgeführt ist die Positivkontrolle für die nachfolgende Stimulation der Einzelklone.

Komponente	Mengen-/Zeitangabe	
	pro Well einer 96-Well-Platte	pro Zellkulturschale (Ø 92 mm)
Zellen	12.000	2.000.000
DNA	0,12 µg	20,6 µg
Effectene	0,4 µl	68,8 µl
Inkubationszeit	48 h	48 h
Positivkontrolle	100 nM Vitamin D ₃	
Inkubationszeit	48 h	

Tabelle 17: Optimierte Bedingungen für die stabile Transfektion von ROS 17/2.8-Zellen und Positivkontrolle zur Überprüfung der Einzelklone

Anstelle der für die Optimierungsexperimente verwendeten pGL2-control-Vektor-DNA wurde pGL2-osteo-s- bzw. pGL2-cbfa-s-DNA in einem Verhältnis von 9:1 mit dem pcDNATM3.1-Vektor kotransfiziert. Die Zellen wurden mit geneticinhaltigem Medium selektioniert und eine Woche nach der Transfektion in 96-Well-Schalen umgesetzt (= Zellpassage 1). Die in Verdünnungsreihen ausplattierten Zellen wurden sukzessiv in 75 cm²-Zellkulturflaschen überführt, soweit nur eine Zellkolonie in dem jeweiligen Well beobachtet werden konnte. Alle Klone wurden in 96-Well-Platten mit 100 nM Vitamin D₃ stimuliert und die Luciferaseaktivität nach 48 h mit der von unstimulierten Zellen des entsprechenden Klons verglichen (Abbildung 21). Zellen, deren Wachstum bereits vor Überführung in 75 cm²-Zellkulturflaschen stagnierte, wurden verworfen und nicht getestet. Da diese Klone jedoch in die fortlaufende Numerierung einbezogen wurden, fehlen die dazugehörigen Meßdaten in Abbildung 21.

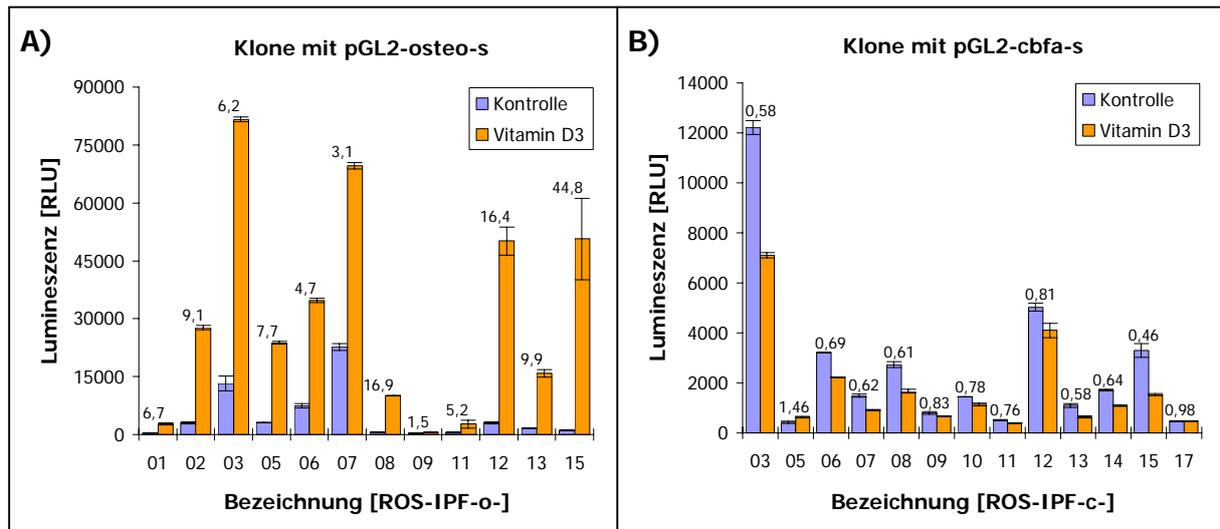


Abbildung 21: Überprüfung der stabilen Klone. Dargestellt sind die Luciferaseaktivitäten in Klonen, die stabil mit dem Reporter-genkonstrukt "pGL2-osteo-s" (A) bzw. "pGL2-cbfa-s" (B) transfiziert wurden. Die Zahlen über den Säulen geben den Faktor an, um den sich die Luciferaseaktivität nach Stimulation des jeweiligen Klons mit 100 nM Vitamin D₃ gegenüber der unstimulierten Kontrolle verändert. Gezeigt sind die Mittelwerte von n=2 Stimulationsexperimenten ± SD.

Bei Klonen, die mit dem Reporter-genkonstrukt "pGL2-osteo-s" transfiziert wurden, konnte eine basale Luciferaseaktivität zwischen 300 und 23.000 RLU gemessen werden. Durch Stimulation der Zellen mit Vitamin D₃ stieg die Aktivität um einen Faktor von 1,5 bis 45 ("ROS-IPF-o-09"/"ROS-IPF-o-15").

ROS 17/2.8-Zellen mit integriertem pGL2-cbfa-s-Plasmid wiesen in unstimuliertem Zustand Luciferaseaktivitäten zwischen 400 und 12.500 RLU auf. Die Inkubation mit Vitamin D₃ bewirkte eine Abnahme der Aktivität um bis zu 54% ("ROS-IPF-c-15"). Eine Zunahme der Aktivität konnte lediglich bei einem der Klone ("ROS-IPF-c-05") beobachtet werden, wobei die Luciferaseaktivität der stimulierten Zellen 46% über den Werten der Kontrolle lag.

3.1.4. Charakterisierung der beiden ausgewählten Einzelklone

3.1.4.1. Funktionelle Untersuchung durch Stimulation mit Vitamin D₃

Zunächst erfolgte die Stimulation der Zellen durch Inkubation mit vier verschiedenen Konzentrationen an Vitamin D₃ in einem Bereich von 0,1 nM bis 100 nM (Abbildung 22), um die in Abbildung 21 dokumentierten Luciferaseaktivitäten und die daraus errechneten Stimulationsfaktoren für die Klone ROS-IPF-o-15 und ROS-IPF-c-15 zu validieren.

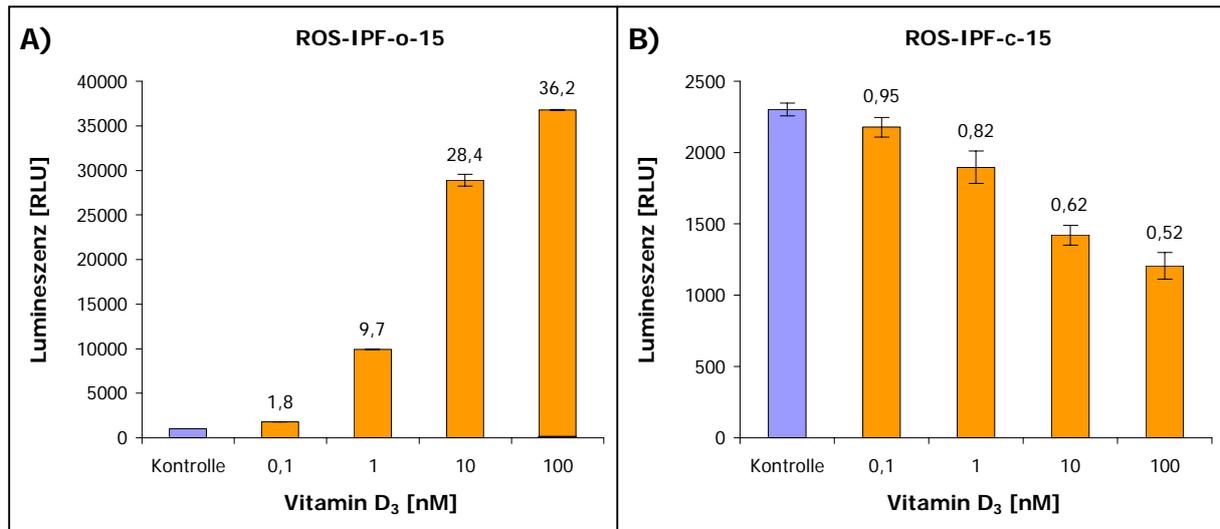


Abbildung 22: Validierung der Promotoraktivität der stabilen Klone ROS-IPF-o-15 und ROS-IPF-c-15. Die Zahlen über den Säulen geben den Faktor an, um den sich die Luciferaseaktivität nach Stimulation des jeweiligen Klons mit unterschiedlichen Vitamin D₃-Konzentrationen gegenüber der unstimulierten Kontrolle verändert. Gezeigt sind die Mittelwerte von n=2 Stimulationsexperimenten ± SD.

Die Stimulation des Klons "ROS-IPF-o-15" mit 100 nM Vitamin D₃ bewirkte eine 36-fache Steigerung der Promotoraktivität. Der Faktor lag damit etwas niedriger als der im ersten Stimulationsexperiment ermittelte Wert (vgl. Abbildung 21). Unter gleichen Bedingungen nahm die Promotoraktivität des Klons "ROS-IPF-c-15" um 48% ab. Die in Abbildung 21 zusammengefaßten Ergebnisse zeigten eine Reduktion der Aktivität um 54%.

Wurde die Stimulation mit geringeren Vitamin D₃-Konzentrationen durchgeführt, so verringerte sich auch der entsprechende Effekt auf die Promotoraktivität beider Klone.

Wie bereits beschrieben, wurden in der Nukleotidsequenz des Reportergenkonstrukts "pGL2-cbfa-s" Mutationen festgestellt (siehe 3.1.1.1 und Anhang 7.2). Da keine Aussagen über die Auswirkungen der Mutationen innerhalb des klonierten Cbfa1-Promotorfragments auf die Promotoraktivität gemacht werden konnten, wurde der Klon "ROS-IPF-c-15" mit Ausnahme der in Abschnitt 3.2 dargestellten Ergebnisse nicht weiter verwendet.

Der Klon "ROS-IPF-o-15" repräsentierte das in dieser Arbeit etablierte Testsystem zur Detektion osteoanaboler Substanzen im Hochdurchsatzscreening. Nachfolgend wurden die ROS-IPF-o-15-Zellen näher charakterisiert und im Screening nach osteoanabolen Faktoren eingesetzt.

3.1.4.2. Nachweis der Aktivierung des endogenen Osteocalcin-Promotors mittels semiquantitativer RT-PCR

Das bei der Transfektion von ROS 17/2.8-Zellen verwendete Reporter-genkonstrukt "pGL2-osteo-s" enthielt ein Fragment des humanen Osteocalcin-Promotors. Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine Stimulation der stabil transfizierten ROS-IPF-o-15-Zellen mit Vitamin D₃ zu einer Induktion dieses Promotors führte (3.1.4.1).

Für den Nachweis der endogenen Aktivierung des Ratten-Osteocalcin-Promotors wurde ein semiquantitativer Nachweis der Osteocalcin-mRNA durchgeführt (2.2.1.2). Dabei diente die Gensequenz für das "Housekeeping-Gen" von β -Tubulin als Kontrolle. Bei den sogenannten "Housekeeping-Genen" geht man davon aus, dass sie in etwa gleichem Maße in allen Zellen exprimiert werden.

Die mit spezifischen Primern für β -Tubulin durchgeführte Kontroll-PCR zeigte, dass die eingesetzte cDNA intakt und in den verschiedenen cDNA-Präparationen in annähernd gleicher Konzentration vorhanden war. Dies wird durch die Banden mit einer Größe von 461 Bp deutlich. Die Amplifikate von stimulierten und unstimulierten Zellen waren von vergleichbarer Intensität (Abbildung 23A).

Unter gleichen Bedingungen wurde eine RT-PCR mit Osteocalcin-spezifischen Primern durchgeführt und die resultierende Bande mit einer Größe von 237 Bp konnte in allen Proben amplifiziert werden (Abbildung 23B). Die visuelle Abschätzung der Bandenintensität ließ darauf schließen, dass die Transkriptmenge in den stimulierten Zellen deutlich über der basalen Transkriptionsrate von unstimulierten Zellen lag.

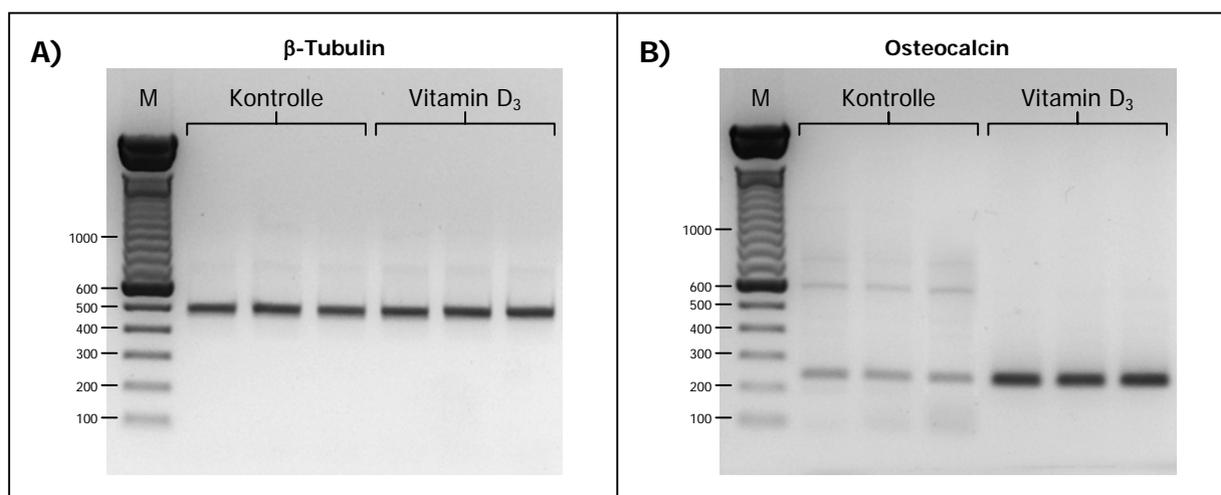


Abbildung 23: Darstellung der Amplifikationsprodukte mit cDNA aus stimulierten und unstimulierten ROS-IPF-o-15-Zellen als PCR-Matrize (Erläuterungen siehe Text).

Von allen Ansätzen wurden vor Gewinnung der mRNA jeweils 3,3% der Zellen abgenommen, um die Promotoraktivität des Reportergenkonstrukts "pGL2-osteo-s" zu messen. Durch Zugabe von 100 nM Vitamin D₃ stieg die Promotoraktivität von 1.174 ± 52 RLU (Kontrolle) um den Faktor 36 auf 42.933 ± 4.130 RLU (Abbildung 24).

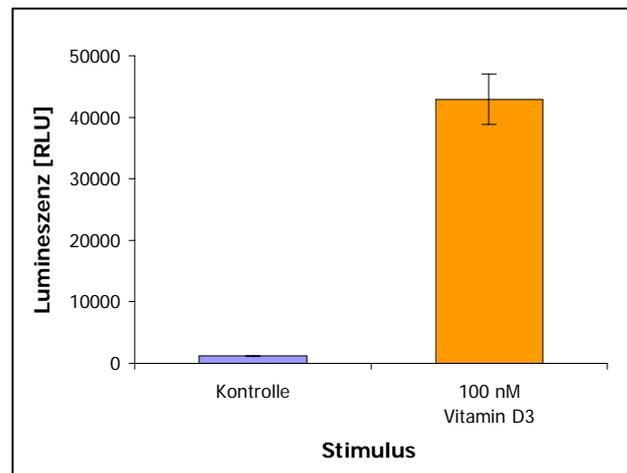


Abbildung 24: Promotoraktivität von ROS-IPF-o-15-Zellen vor der Gewinnung von mRNA. Dargestellt sind die Mittelwerte von n=3 Stimulationsexperimenten \pm SD.

Es konnte nachgewiesen werden, dass Vitamin D₃ neben der Promotoraktivität des transfizierten Reportergenkonstrukts auch die Aktivität des endogenen Ratten-Osteocalcin-Promotors induzierte und zu einer höheren Menge an Transkript des Ratten-Osteocalcin-Gens führte.

3.1.4.3. Einfluß des Zellalters auf die Promotoraktivität

Um festzustellen, inwieweit sich die basale und die maximale Promotoraktivität mit steigender Zahl der Zellpassagen veränderte, wurden Zellen der Passagen 9, 28, 64 und 87 miteinander verglichen. Die Promotoraktivitäten wurden jeweils für stimulierte (+100 nM Vitamin D₃) und unstimulierte Zellen bestimmt (Abbildung 25).

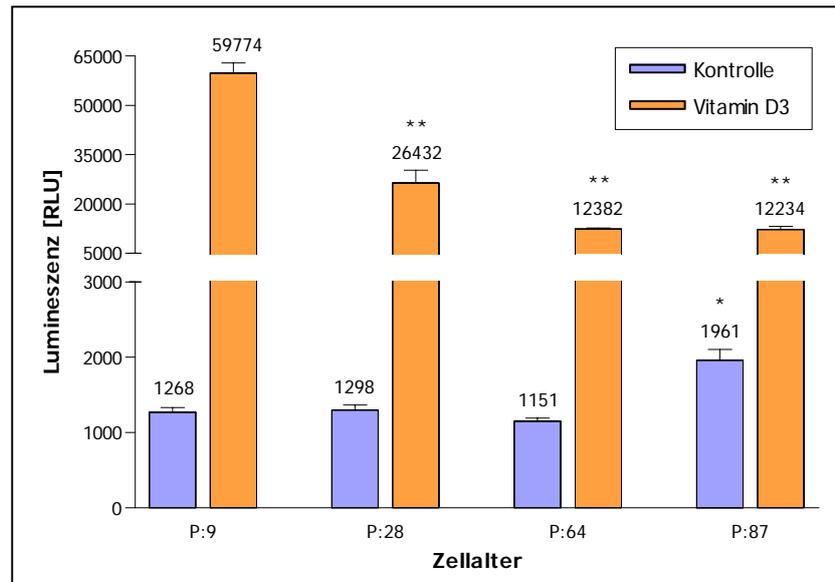


Abbildung 25: Einfluß des Zellalters auf die Promotoraktivität. Unterschiedlich alte ROS-IPF-o-15-Zellen wurden mit und ohne 100 nM Vitamin D₃ inkubiert und die Promotoraktivitäten gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte von n=6 Stimulationsexperimenten ± SD. Die Signifikanzen beziehen sich auf die Kontrollen der Passage 9, 28 und 64 (*) bzw. auf die stimulierten Zellen der Passage 9 (**).

Vergleicht man Aktivitäten der mit 100 nM Vitamin D₃ stimulierten Zellen miteinander, so konnte eine signifikante Reduktion der maximalen Promotoraktivität bei Zellen der höheren Zellpassagen beobachtet werden. Die Werte sanken dabei von 59.774 ± 3.134 RLU (P:9) auf 26.432 ± 3.901 RLU (P:28), 12.382 ± 305 RLU (P:64) bzw. 12.234 ± 999 RLU (P:87). Eine fortschreitende Alterung der Zellen von Passage 64 zu Passage 87 führte zu keiner weiteren Reduktion der maximalen Promotoraktivität.

Im Gegensatz dazu gab es keine signifikante Veränderung der basalen Promotoraktivität, betrachtet man die Zellpassagen 9, 28 und 64. Im Laufe der weiteren Kulturdauer bis hin zur Passage 87 erfolgte dann eine signifikante Erhöhung der konstitutiven Promotoraktivität von 1.268 ± 65 RLU (P:9), 1.298 ± 68 RLU (P:28) und 1.151 ± 42 RLU (P:64) auf 1.961 ± 144 RLU (P:87). Zellen, die mehr als 90-mal passagiert wurden, erreichten basale Promotoraktivitäten von mehr als 2.500 RLU (Ergebnisse nicht dargestellt).

Folglich war vor allem für die Detektion schwacher Stimuli das Alter der Zellen von Bedeutung, da bei einer höheren basalen Promotoraktivität die Möglichkeit bestand, dass eine dementsprechend geringe Stimulation nicht mehr zu einer signifikanten Aktivitätssteigerung führte.

3.1.4.4. Verifizierung des Phänotyps anhand des Alkalische Phosphatase Tests als interne Bioassay-Kontrolle

ROS 17/2.8-Zellen können im Alkalische Phosphatase Test eingesetzt werden, um osteoanabole Substanzen nachzuweisen (Stephan, 2004). ROS-IPF-o-15-Zellen wurden mit Dexamethason oder Vitamin D₃ stimuliert, um zu überprüfen, ob auch nach Transfektion von ROS 17/2.8-Zellen mit dem Reporter-genkonstrukt pGL2-osteos eine Induktion der Alkalischen Phosphatase Aktivität bewirkt werden konnte. Beide Substanzen führten zu einer Zunahme der Alkalischen Phosphatase Aktivität (Abbildung 26B), hatten aber keinen Einfluß auf die Zellvitalität (Abbildung 26A).

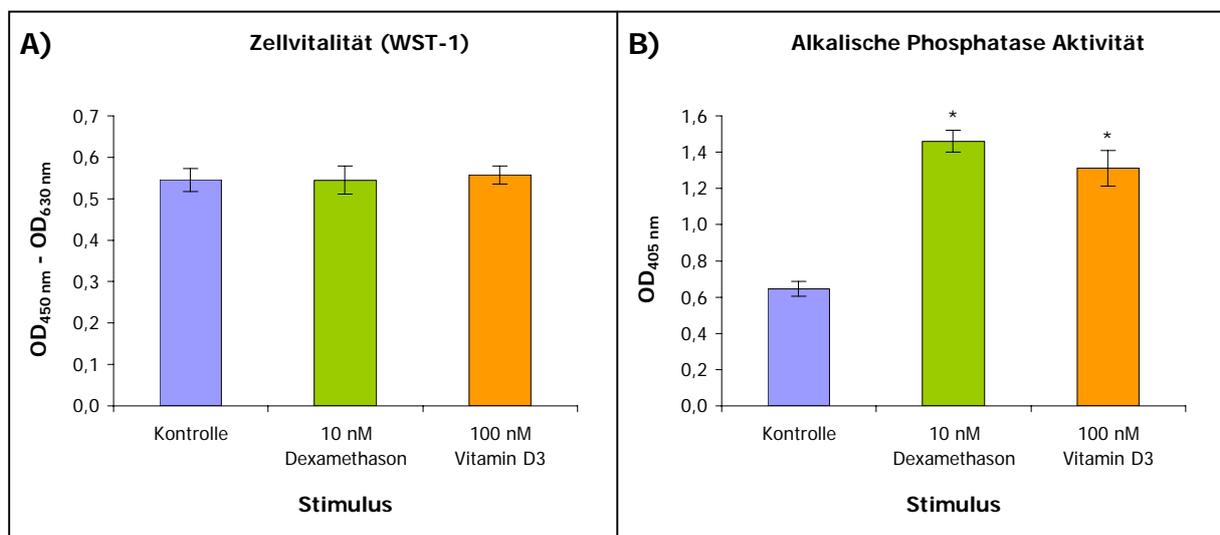


Abbildung 26: Zellvitalität und Alkalische Phosphatase Aktivität von ROS-IPF-o-15-Zellen. Gezeigt sind die Mittelwerte von n=6 Stimulationsexperimenten ± SD. Die Signifikanzen (*) beziehen sich jeweils auf die Kontrolle.

Dies zeigte, dass sich der Phänotyp der ROS 17/2.8-Zellen in Bezug auf die Alkalische Phosphatase Aktivität durch die stabile Transfektion mit dem Reporter-genkonstrukt "pGL2-osteos" nicht gravierend verändert hatte. Der AP-Test konnte demzufolge ebenfalls auf ROS-IPF-o-15-Zellen angewendet werden, um osteoanabole Faktoren nachzuweisen.

Faßt man die bisher beschriebenen Ergebnisse zusammen, so ergab sich für die Durchführung des etablierten Luciferase-Reporter-gen-Assays folgendes Schema:

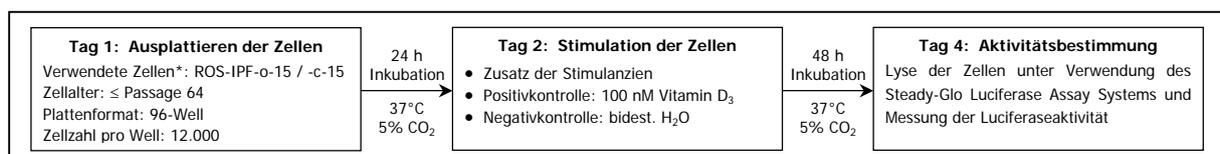


Abbildung 27: Schematische Darstellung des Reporter-gen-Assays. *) Für die Durchführung des Screenings (3.3) wurden ausschließlich ROS-IPF-o-15-Zellen verwendet.

3.2. Stimulation der beiden ausgewählten Einzelklone mit pharmakologischen Substanzen

Neben der Wirkung von Vitamin D₃ auf die Promotoraktivität der beiden transfizierten Reporter-genkonstrukte wurde der Effekt von weiteren Substanzen untersucht. Dazu erfolgte die Stimulation der Zellen mit Verbindungen, von denen bereits bekannt war, dass sie eine regulatorische Funktion im Knochenstoffwechsel besitzen (Abbildung 28).

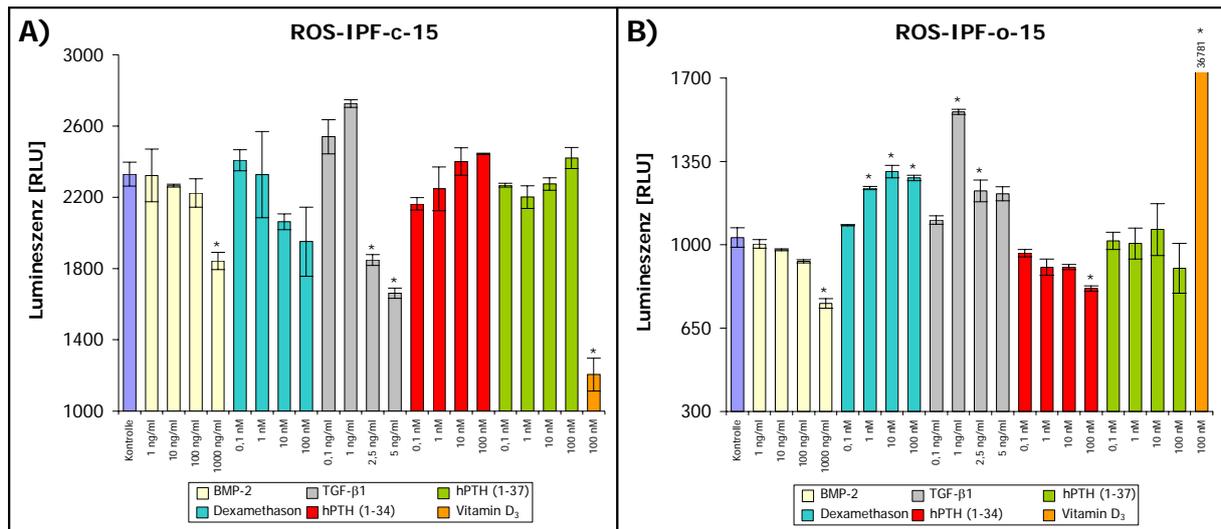


Abbildung 28: Effekte einiger Regulatoren des Knochenstoffwechsels auf die Aktivität der beiden Promotorfragmente. Gezeigt sind die Mittelwerte von n=2 Stimulationsexperimenten ± SD. Die Signifikanzen (*) beziehen sich jeweils auf die Kontrolle.

Die Stimulation von ROS-IPF-c-15-Zellen mit BMP-2 führte bei einer Konzentration von 1 µg/ml zu einer Reduktion der Cbfa1-Promotoraktivität um 21% (Abbildung 28A). Bei einer Konzentration von 2,5 ng/ml verminderte TGF-β die Promotoraktivität ebenfalls um 21%, bei 5 ng/ml sank der Wert um 29%. Mit Ausnahme von Vitamin D₃ (Positivkontrolle) bewirkten die übrigen Substanzen, sowie BMP-2 und TGF-β in niedrigeren Konzentrationen, keine signifikante Veränderung der Promotoraktivität.

Nach Inkubation von ROS-IPF-o-15-Zellen mit 1 µg/ml BMP-2 konnte eine 27%ige Abnahme der Promotoraktivität gemessen werden, wohingegen geringere Konzentrationen keine signifikante Effekte erkennen ließen (Abbildung 28B). Wurden die Zellen mit Dexamethason stimuliert, so konnte ab einer Konzentration von 1 nM eine Aktivitätszunahme beobachtet werden. Durch eine Erhöhung der Dexamethasonkonzentration von 10 nM auf 100 nM resultierte keine weitere Steigerung der Promotoraktivität. Die Zunahme der Aktivität betrug 27% (bei 10 nM Dexa) bzw. 24% (bei 100 nM Dexa). TGF-β bewirkte bei einer Konzentration von 1 ng/ml eine Aktivitätssteigerung von 51%, unter Verwendung von 2,5 ng/ml lag die Promotoraktivität nur noch 19% über dem Kontrollwert. Eine signifikante Beeinflussung der Aktivität nach Zusatz eines der beiden PTH-Fragmente konnte lediglich durch hPTH (1-34) in einer

Konzentration von 100 nM hervorgerufen werden. Dabei wurde eine Inhibition von 21% erzielt.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass neben Vitamin D₃ auch andere Regulatoren des Knochenstoffwechsels die Promotoraktivitäten beeinflussen. Die prozentual höchsten Veränderungen der Aktivitäten beider Reportergenkonstrukte wurden jedoch durch Vitamin D₃ bewirkt.

In Anlehnung an die Arbeiten von Yu und Chandrasekhar (1997) sollte ferner untersucht werden, ob die hPTH-Fragmente (1-34) und (1-37) bei einer Inkubationszeit von weniger als 48 h eine Induktion des Osteocalcin-Promotors hervorrufen. Zu diesem Zweck erfolgte die Stimulation von ROS-IPF- α -15-Zellen mit 10 bzw. 100 nM hPTH (1-34) oder (1-37) und Inkubation für 1 h bis 24 h. Die resultierenden Promotoraktivitäten sind in Abbildung 29 dargestellt.

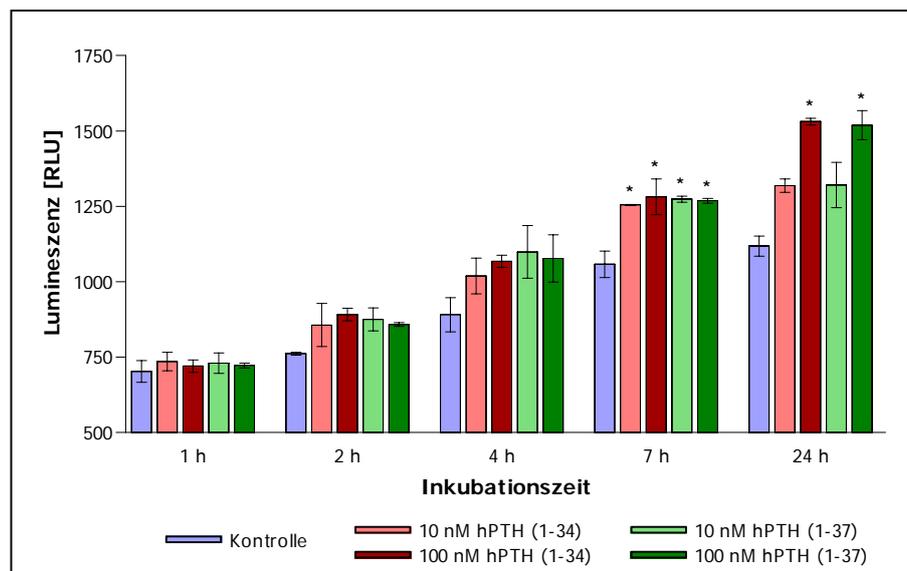


Abbildung 29: Zeitabhängigkeit der PTH-abhängigen Promotoraktivierung. Es wurden jeweils zwei Konzentrationen der beiden PTH-Fragmente zur Stimulation eingesetzt. Gezeigt sind die Mittelwerte von $n=2$ Stimulationsexperimenten \pm SD. Die Signifikanzen (*) beziehen sich jeweils auf die entsprechende Kontrolle.

Es konnte gezeigt werden, dass die hPTH-Fragmente nach 7 h in beiden Konzentrationen zu einer signifikanten Erhöhung der Promotoraktivität um etwa 19 - 21% führten. Wurden die Zellen 24 h mit 100 nM hPTH (1-34) oder (1-37) inkubiert, so ergab sich eine Aktivitätssteigerung von 37% bzw. 36%. Die Messwerte der entsprechenden Stimulationen mit 10 nM der hPTH-Fragmente unterschieden sich hingegen nicht signifikant von denen der unstimulierten Kontrollzellen.

3.3. Aufreinigung osteoanaboler Substanzen

Nachdem der Luciferase-Reporter-Gen-Assay etabliert und seine Funktionalität gezeigt werden konnte, erfolgte die Anwendung des Bioassays im Screening nach neuen osteoanabolen Faktoren. Hierzu wurden die Effekte von Fraktionen einer Schweinemagen- und einer Hämofiltrat-Peptidbank auf die Aktivität des Osteocalcin-Promotors in ROS-IPF-o-15-Zellen untersucht. Im Folgenden wurden die Ergebnisse des initialen Screenings beider Peptidbanken dargestellt. Ferner erfolgte eine Bestätigung der Peptidstruktur der biologisch aktiven Komponenten in ausgewählten Peptidbankfraktionen und der Nachweis ihrer konzentrationsabhängigen Wirkung auf ROS-IPF-o-15-Zellen. Mittels chromatographischer Reinigung der osteoanabolen Aktivitäten aus Schweinemagen und Hämofiltrat konnte keine Isolierung der aktiven Substanzen erzielt werden. Daher wurde die Aufreinigung aktiver Verbindungen aus Peptidbankfraktionen exemplarisch anhand der Isolierungsstrategie für eine Aktivität aus Schweinemagen beschrieben. Die entsprechenden Ergebnisse für die partielle Reinigung der Aktivitäten aus Hämofiltrat wurden nicht dargestellt.

3.3.1. Herstellung der Schweinemagen-Peptidbank

Als Quelle für die Entdeckung neuer osteoanaboler Substanzen diente eine aus Schweinemagen erstellte Peptidbank. Die erste Auftrennung des aus 76 kg Gewebe gewonnenen Extraktes (= 120 Schweinemagen; siehe 2.4.2.1) erfolgte durch eine Kationenaustauschchromatographie. Die Verwendung eines starken Kationenaustauschers und die Stufenelution der gebundenen Substanzen durch Puffer mit steigenden pH-Werten von 2,5 bis 13 ermöglichte die Separation von sauren und basischen Verbindungen. Das Chromatogramm ist in Abbildung 30 dargestellt. Anionische Peptide und andere Bestandteile, die nicht an den Kationenaustauscher binden, wurden im Durchlauf gesammelt und als pH-Pool 0 bezeichnet.

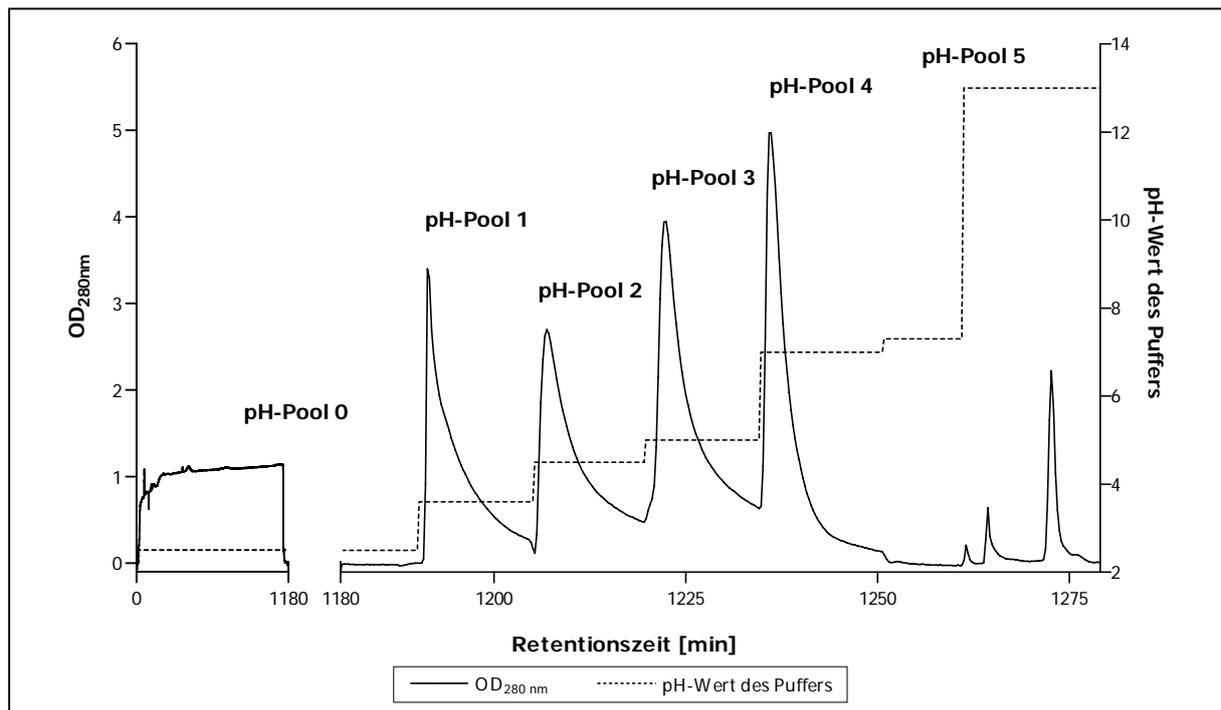


Abbildung 30: Kationenaustauschchromatographie des Schweinemagenextrakts. In den jeweiligen pH-Pools sind die aus 120 Schweinemägen (76 kg Gewebe) extrahierten Substanzen nach Elution von einem starken Kationenaustauscher enthalten. Die Elution erfolgte batchweise durch Lösungen mit ansteigendem pH-Wert (2.4.2.3, Tabelle 12).

Zur weiteren Separation der Peptide wurden die einzelnen pH-Pools in einem zweiten Schritt durch Umkehrphasenchromatographie aufgetrennt (Abbildung 31). So konnten Salze und andere nicht am RP-Material bindende Komponenten abgetrennt werden.

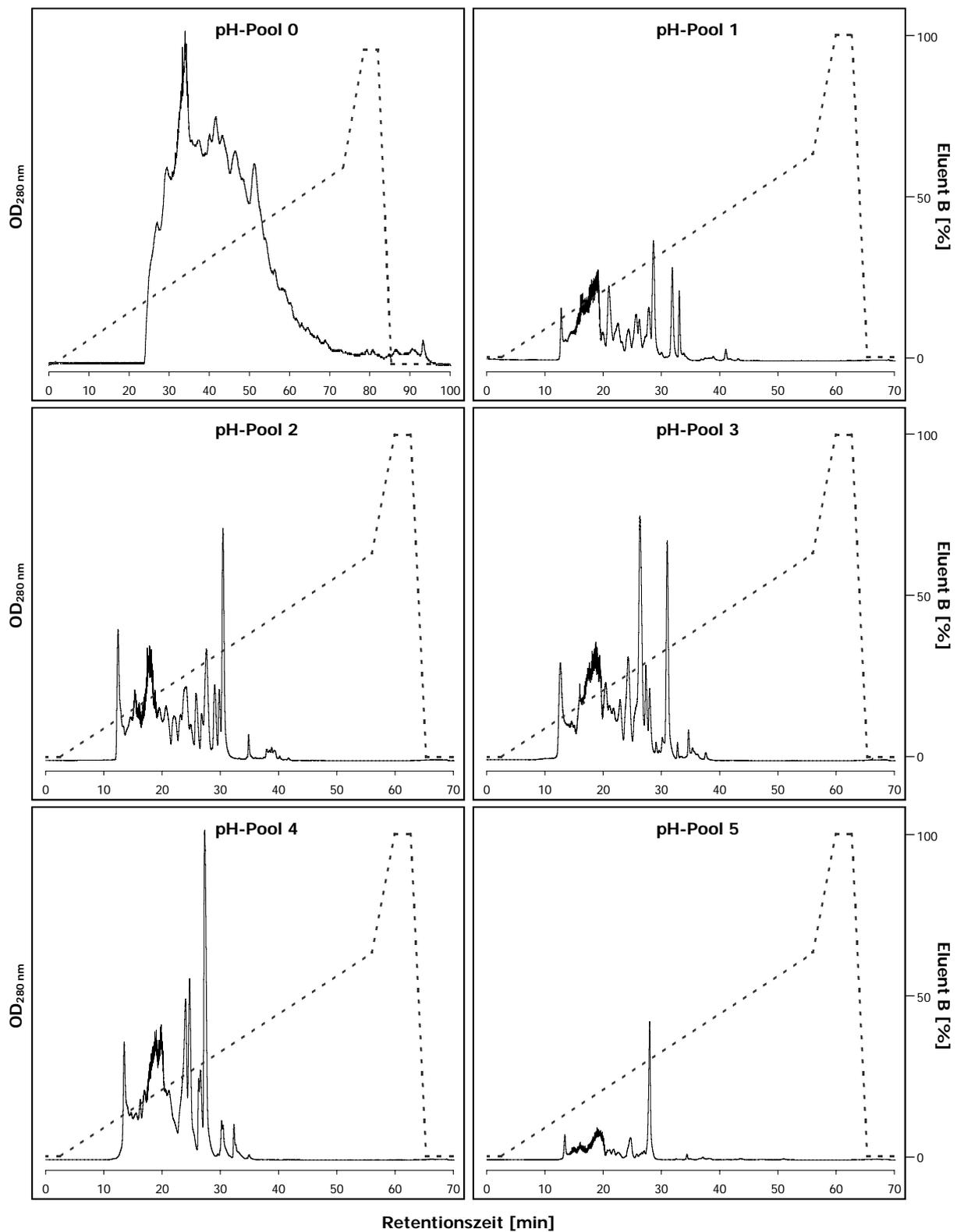


Abbildung 31: RP-Chromatographie der verschiedenen pH-Pools. Dargestellt sind die Chromatogramme der pH-Pools 0 bis 5 inklusive der verwendeten Gradienten (gestrichelte Linie). Die Elutionsprofile wurden bei einer Wellenlänge von 280 nm aufgezeichnet (durchgezogene Linie).

Jede Chromatographie ergab 46 salzfreie Fraktionen mit einer Größe von je 200 ml (pH-Pool 1-5) bzw. 600 ml (pH-Pool 0). Für die Durchführung des initialen Screenings nach osteoanabolen Substanzen wurden allen Fraktionen Aliquots entnommen und diese lyophilisiert.

Die insgesamt 276 Fraktionen repräsentierten eine Schweinemagen-Peptidbank, die die extrahierten Peptide aus 120 Schweinemägen enthielten.

3.3.2. Initiales Screening der Schweinemagen-Peptidbank

Im Folgenden wurden die Fraktionen der Schweinemagen-Peptidbank hinsichtlich ihrer osteoanabolen Aktivität überprüft. Dazu erfolgte die Stimulation von ROS-IPF-o-15-Zellen mit je 0,01 Schweinemagenäquivalent (SMäq) pro Fraktion mit anschließender Bestimmung der Luciferaseaktivität. In Abbildung 32 sind die Ergebnisse des initialen Screenings dargestellt.

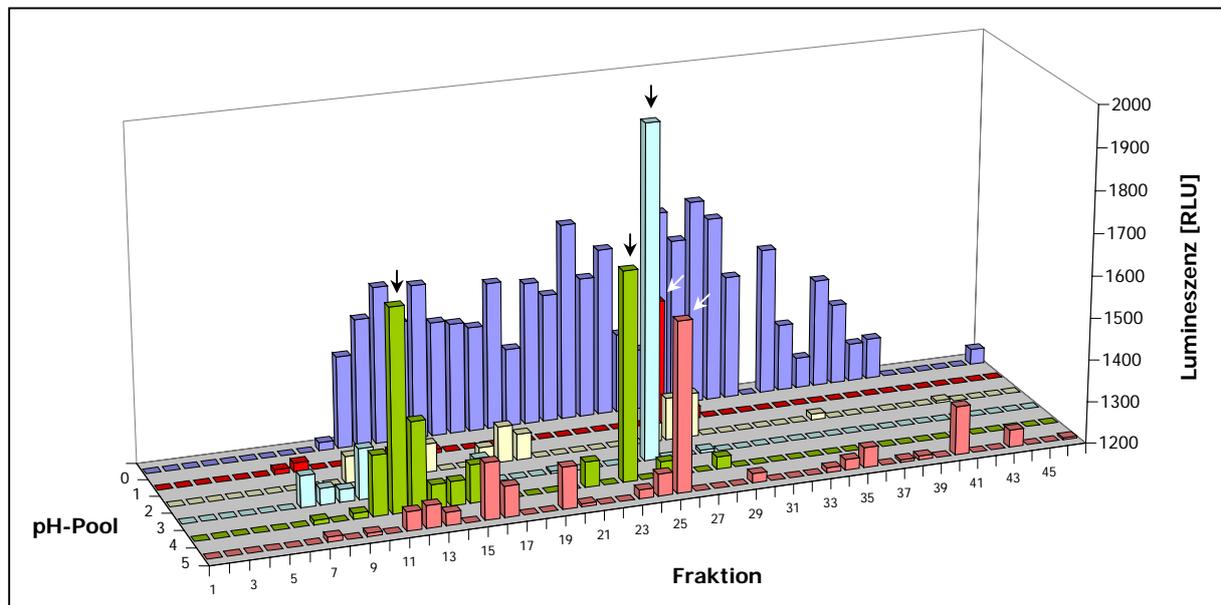


Abbildung 32: Initiales Screening der Schweinemagen-Peptidbank nach osteoanabolen Substanzen. ROS-IPF-o-15-Zellen wurden mit je 0,01 SMäq stimuliert. Die Skalierung der Größenachse (Lumineszenz) wurde so gewählt, dass der Kleinstwert etwa der Promotoraktivität der unstimulierten Kontrolle entspricht (1.169 RLU). Der Meßwert für die Positivkontrolle (23.204 RLU) wurde zur Verbesserung der Übersicht nicht abgebildet.

Bei den Ergebnissen für pH-Pool 0 schien es sich um keine spezifische Induktion des Osteocalcin-Promotors zu handeln, da sich die Aktivität auf fast alle Fraktionen von 11 bis 41 verteilte. In den pH-Pools 1 bis 5 konnten osteoanabole Aktivitäten nachgewiesen werden, wobei pH-Pool 2 nur sehr geringe Aktivitäten aufwies. Zur Überprüfung der Aktivitäten wurden die in Abbildung 32 markierten Fraktionen und die jeweils benachbarten Fraktionen erneut im Luciferase-Reporter-Gen-Assay getestet.

Es konnten erneut die osteoanabolen Aktivitäten der im initialen Screening identifizierten Fraktionen nachgewiesen werden. Die höchste Steigerung der Promotoraktivität wurde durch Fraktion 25 des pH-Pools 3 hervorgerufen (Abbildung 33).

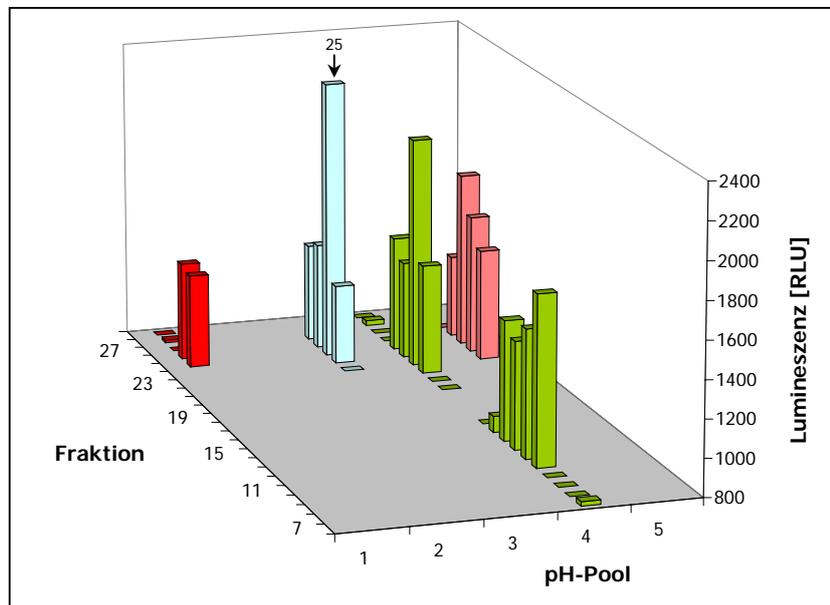


Abbildung 33: Validierung der osteoanabolen Aktivität ausgewählter Fraktionen der Schweinemagen-Peptidbank. ROS-IPF-o-15-Zellen wurden mit je 0,01 SMäq stimuliert. Die Skalierung der Größenachse (Lumineszenz) wurde so gewählt, dass der Kleinstwert etwa der Promotoraktivität der unstimulierten Kontrolle entspricht (774 RLU). Der Meßwert für Positivkontrolle (9.454 RLU) wurde zur Verbesserung der Übersicht nicht abgebildet.

Für die partielle Aufreinigung einer osteoanabolen Aktivität aus Schweinemagen diene die Fraktion 25 des pH-Pools 3.

3.3.3. Initiales Screening der Hämofiltrat-Peptidbank

Um einen Überblick über die vorhandenen osteoanabolen Aktivitäten in der Hämofiltrat-Peptidbank zu erhalten, wurde zunächst ein Screening mit vereinigten Aliquots von je 5 Peptidbankfraktionen durchgeführt. Die im Luciferase-Reportergen-Assay eingesetzten Äquivalentmengen entsprachen jeweils 83,3 ml Hämofiltrat (HFäq). In Abbildung 34 ist zu erkennen, dass es mehrere Fraktionen in der Hämofiltrat-Peptidbank gab, die eine Aktivierung des Osteocalcin-Promotors bewirkten.

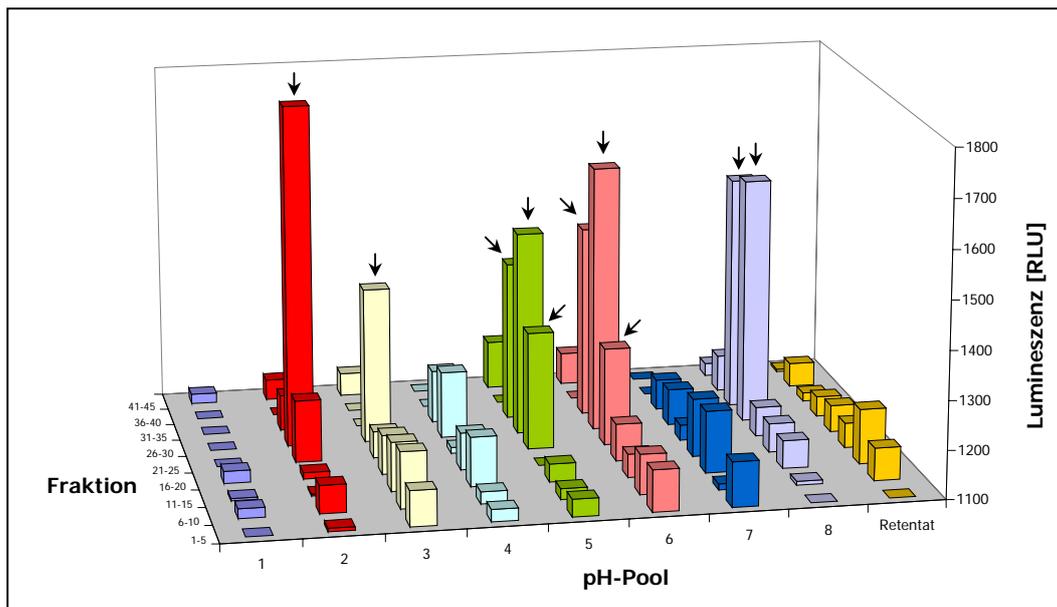


Abbildung 34: Initiales Screening der Hämofiltrat-Peptidbank nach osteoanabolen Substanzen. ROS-IPF-o-15-Zellen wurden mit je 83,3 ml HFäq stimuliert. Die Skalierung der Größenachse (Lumineszenz) wurde so gewählt, dass der Kleinstwert etwa der Promotoraktivität der unstimulierten Kontrolle entspricht (1.167 RLU). Der Meßwert für die Positivkontrolle (25.529 RLU) wurde zur Verbesserung der Übersicht nicht abgebildet.

Zur Identifizierung der aktiven Fraktionen wurden die Einzelfractionen der in Abbildung 34 markierten Aliquotpools im Luciferase-Reportergen-Assay untersucht. Damit konnten die Aktivitäten des initialen Screenings bestätigt werden (Abbildung 35). Die vergleichsweise ähnlichen Aktivitätsprofile der pH-Pools 5 und 6 lassen vermuten, dass es sich in beiden pH-Pools um die gleichen aktiven Substanzen handelt und diese bei der pH-Stufenelution zur Erstellung der Peptidbank in zwei aufeinanderfolgenden pH-Pools eluierten.

Für die nachfolgenden Versuche wurde die Fraktion 28 des pH-Pools 2 und die Fraktion 30 des pH-Pools 6 verwendet.

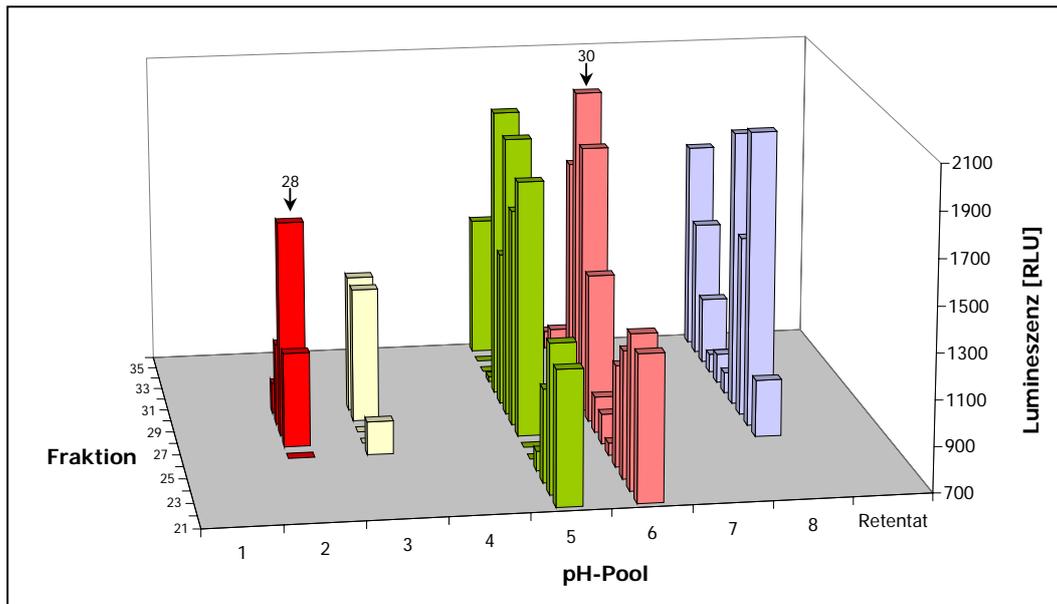


Abbildung 35: Validierung der osteoanabolen Aktivität ausgewählter Fraktionen der Hämofiltrat-Peptidbank. ROS-IPF-o-15-Zellen wurden mit je 417 ml HFäq stimuliert. Die Skalierung der Größenachse (Lumineszenz) wurde so gewählt, dass der Kleinstwert etwa der Promotoraktivität der unstimulierten Kontrolle entspricht (774 RLU). Der Meßwert für die Positivkontrolle (9.454 RLU) wurde zur Verbesserung der Übersicht nicht abgebildet.

3.3.4. Bestätigung der Peptidstruktur der biologisch aktiven Komponenten in ausgewählten Peptidbankfraktionen

Vor der weiteren Aufreinigung der osteoanabolen Substanzen aus Schweinemagen und Hämofiltrat erfolgte zunächst die Überprüfung des peptidischen Charakters der aktiven Komponenten. Es wurden drei Peptidbankfraktionen, die im initialen Screening eine hohe Aktivität aufwiesen, ausgewählt und Äquivalentmengen von 400 ml Hämofiltrat bzw. 0,008 Schweinemagen mit Subtilisin hydrolysiert. Die Endoprotease Subtilisin katalysiert die unspezifische Spaltung von Peptidbindungen und erzeugt auf diese Weise kurze Fragmente von Peptiden und Proteinen. Sollte es sich bei den osteoanabolen Komponenten der aktiven Peptidbankfraktionen um peptidische Verbindungen handeln, so müßte ihr enzymatischer Abbau zum Verlust der Aktivität führen (Zucht *et al.*, 1995).

Als Referenz für die mit Subtilisin behandelten Fraktionen wurde ein entsprechender Teil jeder Fraktion dem Versuchsablauf unterzogen, jedoch ohne Zusatz der Protease. Ein weiterer Ansatz enthielt jeweils die gleiche Äquivalentmenge Hämofiltrat bzw. Schweinemagen und wurde lediglich mit Wasser inkubiert. Damit sollte ausgeschlossen werden, dass eine Reduktion der Aktivität durch den Hydrolysepuffer allein und nicht durch den Zusatz von Subtilisin hervorgerufen wird.

Bei der nachfolgenden Bestimmung der osteoanabolen Aktivität konnte bei allen mit Subtilisin behandelten Fraktionen ein vollständiger Verlust der Aktivität beobachtet werden (Abbildung 36). Peptidbankfraktionen, die nur mit Hydrolysepuffer oder Wasser inkubiert wurden, bewirkten eine deutliche Steigerung der Promotoraktivität. Eine Lösung aus Subtilisin und Hydrolysepuffer zeigte keinen osteoanabolen Effekt.

Aufgrund des vollständigen Aktivitätsverlustes nach Behandlung mit Subtilisin konnte auf den peptidischen Charakter der aktiven Verbindungen geschlußfolgert werden.

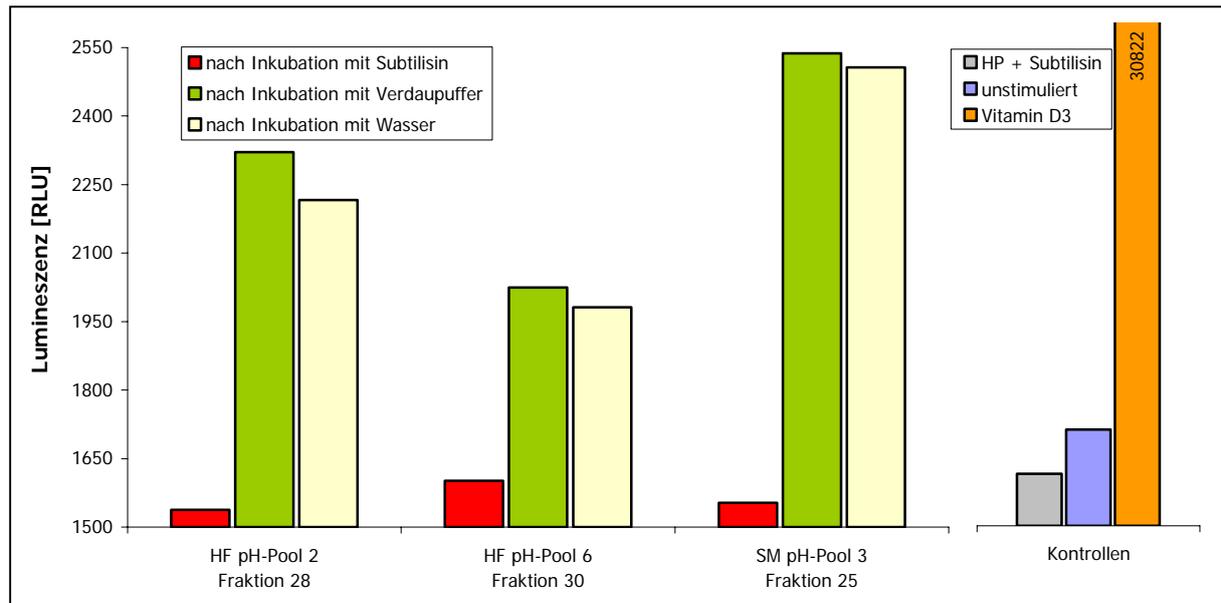


Abbildung 36: Osteoanabole Aktivität ausgewählter Peptidbankfraktionen nach Hydrolyse durch die Protease Subtilisin. Die zur Stimulation von ROS-IPF-o-15-Zellen verwendeten Proben wurden mit Subtilisin, mit Verdaupuffer oder Wasser inkubiert. Als Kontrollen dienten unstimulierte Zellen, sowie Zellen, die mit Vitamin D₃ bzw. Subtilisin und Hydrolysepuffer (HP) stimuliert wurden.

3.3.5. Konzentrationsabhängigkeit der osteoanabolen Wirkung ausgewählter Peptidbankfraktionen

Im Folgenden wurde die Konzentrationsabhängigkeit der osteoanabolen Aktivität überprüft. Von den jeweiligen Peptidbankfraktionen wurden Äquivalentmengen von 0,0001 bis 0,02 Schweinemagen (pH-Pool 3, Fr. 25) bzw. 5 bis 800 ml Hämofiltrat (pH-Pool 6, Fr. 30 und pH-Pool 2, Fr. 28) zur Stimulation von ROS-IPF-o-15-Zellen verwendet (Abbildung 37).

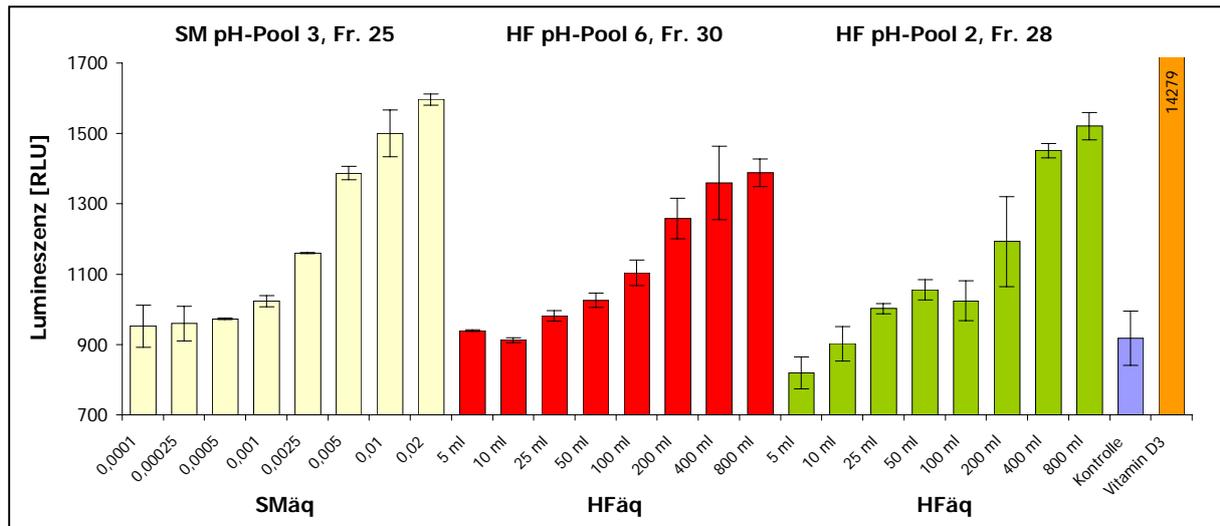


Abbildung 37: Konzentrationsabhängigkeit der osteoanabolen Aktivität ausgewählter Peptidbankfraktionen. Zur Stimulation wurden Äquivalentmengen von 0,0001 bis 0,02 Schweinemagen (SMäq) bzw. 5 bis 800 ml Hämofiltrat (HFäq) eingesetzt. Als Kontrollen dienten unstimulierte und mit Vitamin D₃ stimulierte Zellen.

Für jede der getesteten Fraktionen konnte eine konzentrationsabhängige Aktivitätszunahme im Luciferase-Reporter-Gen-Assay nachgewiesen werden.

Nachstehend sind die Schritte zur partiellen Aufreinigung einer der untersuchten Fraktionen dargestellt. Hierfür wurde die Fraktion 25 des pH-Pools 3 der Schweinemagen-Peptidbank (3.3.6) ausgewählt. Des Weiteren fanden die im initialen Screening aktiven, benachbarten Fraktionen ebenfalls Verwendung.

3.3.6. Partielle Aufreinigung osteoanaboler Substanzen aus Schweinemagen

Zum Zwecke der Aufreinigung und -konzentrierung osteoanaboler Peptide aus Schweinemagen fand eine Kombination aus CE- und RP-Chromatographie Verwendung. Für die Durchführung der Reporter-Gen-Assays wurden den fraktionierten Eluaten der einzelnen Reinigungsschritte Aliquots entnommen und lyophilisiert. Damit war es möglich, ein Elutionsprofil der aktiven Substanzen zu erstellen. Bei der Darstellung des jeweils zur Chromatographie verwendeten Gradienten wurde das Totvolumen zwischen Säuleneingang und Detektor nicht berücksichtigt.

Eine schematische Zusammenfassung der zur partiellen Aufreinigung osteoanaboler Substanzen aus Schweinemagen durchgeführten Arbeitsschritte findet sich in Abbildung 38.

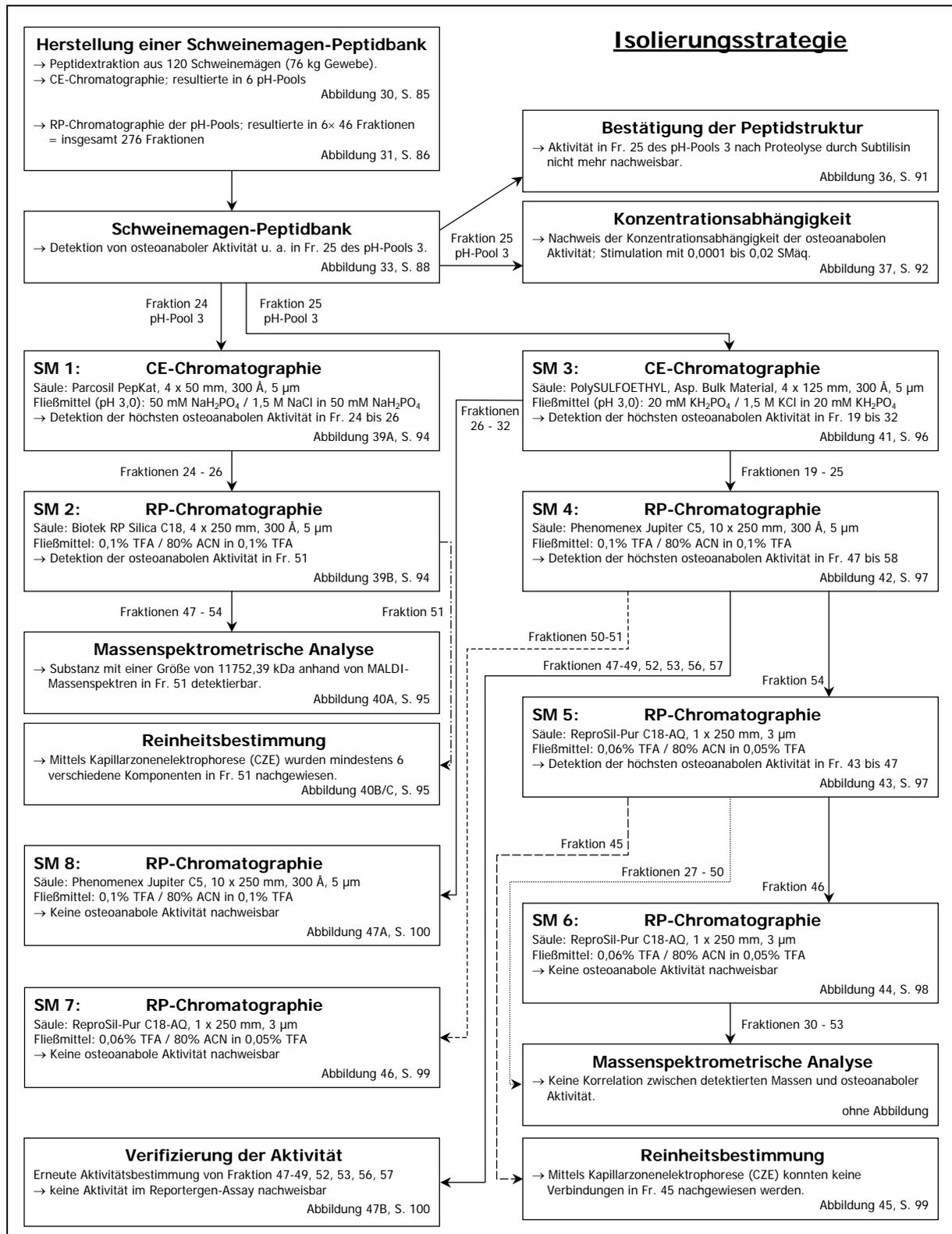


Abbildung 38: Schematische Darstellung der Arbeitsschritte zur partiellen Aufreinigung osteoanaboler Substanzen aus Schweinemagen.

Zunächst erfolgte die partielle Aufreinigung der ebenfalls aktiven Fraktion 24 des pH-Pools 3 der Schweinemagen-Peptidbank. Dadurch konnte ohne Verlust von Lyophilisat der Fraktion 25 geprüft werden, ob ein Nachweis der aktiven Substanzen nach Durchführung einer CEC

bzw. RPC möglich war. Hierzu wurde die lyophilisierte Probe in 10 ml Eluent A gelöst, auf die Säule aufgetragen und durch einen linearen NaCl-Gradienten getrennt (Abbildung 39A). Eine Zusammenfassung der Chromatographiebedingungen findet sich in Abschnitt 2.4.4.5 (Tabelle 14, Lauf SM 1) zusammengefaßt.

Die höchste osteoanabole Aktivität konnte im Bereich von Fraktion 24 bis 26 detektiert werden. Für den anschließenden Reinigungsschritt wurden diese drei Fraktionen vereinigt und nach Verdünnung mit Eluent A auf eine RPC-Säule geladen. Gebundene Substanzen wurden mit einem steigenden Anteil von ACN im Fließmittel eluiert (Abbildung 39B). Die Chromatographiebedingungen sind in Abschnitt 2.4.4.5 (Tabelle 14, Lauf SM 2) angegeben.

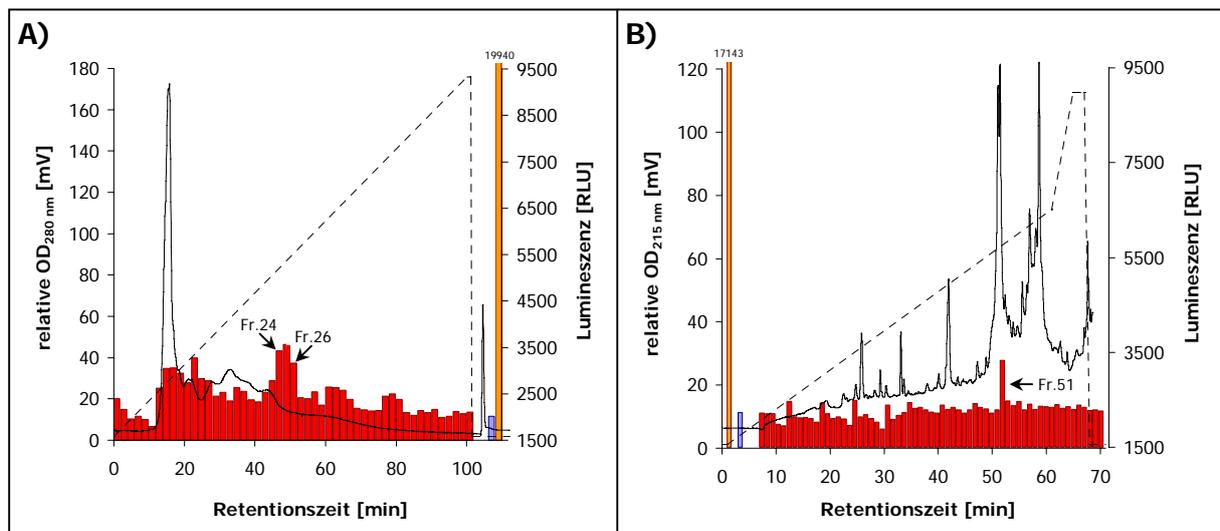


Abbildung 39: Partielle Aufreinigung von Fraktion 24 des pH-Pools 3. A) Lauf SM 1: CEC der Fraktion 24. Es wurden 2 SMäq pro Fraktion im Reporter-Gen-Assay eingesetzt. B) Lauf SM 2: RPC von 70% der vereinigten Fraktionen 24-26 des Laufes SM 1. Zur Aktivitätsbestimmung wurden 2 SMäq pro Fraktion eingesetzt. (—) Absorption bei 280 nm (A) bzw. 215 nm (B), (---) Verlauf des Gradienten, (■) Aktivität der Fraktionen im Reporter-Gen-Assay, (□) unstimulierte Kontrolle, (■) 100 nM Vitamin D₃

Eine deutliche Aktivität zeigte lediglich Fraktion 51. Da die Menge des aktiven Probenmaterials für einen weiteren Reinigungsschritt nicht mehr ausreichend war, wurde eine massenspektrometrische Analyse (MALDI-TOF) der Fraktionen 47 bis 54 durchgeführt (Abbildung 40A). Darüber hinaus erfolgte eine Reinheitsbestimmung der Fraktion 51 mittels Kapillarzonenoelektrophorese (Abbildung 40B/C).

Das MALDI-Massenspektrum der Fraktion 51 zeigt das Vorhandensein einer Verbindung mit einer Größe von ungefähr 11.752 kDa sowie das zweifach positiv geladene Ion der Substanz (5.873,71 kDa). Da dieses Signal in keiner der übrigen untersuchten Fraktionen nachgewiesen werden konnte (Fr. 50 und 52 sind repräsentativ abgebildet), wurde vermutet, dass die detektierte Masse von 11.752,39 kDa der osteoanabolen Verbindung in Fraktion 51 entsprach.

Gemäß des Elektropherogramms der CZE beinhaltete die Fraktion 51 noch mindestens 6 unterschiedliche Komponenten. Aufgrund des unzureichenden Reinheitsgrades konnte folglich keine Peptidsequenzierung auf der Basis des Edman-Abbaus durchgeführt werden.

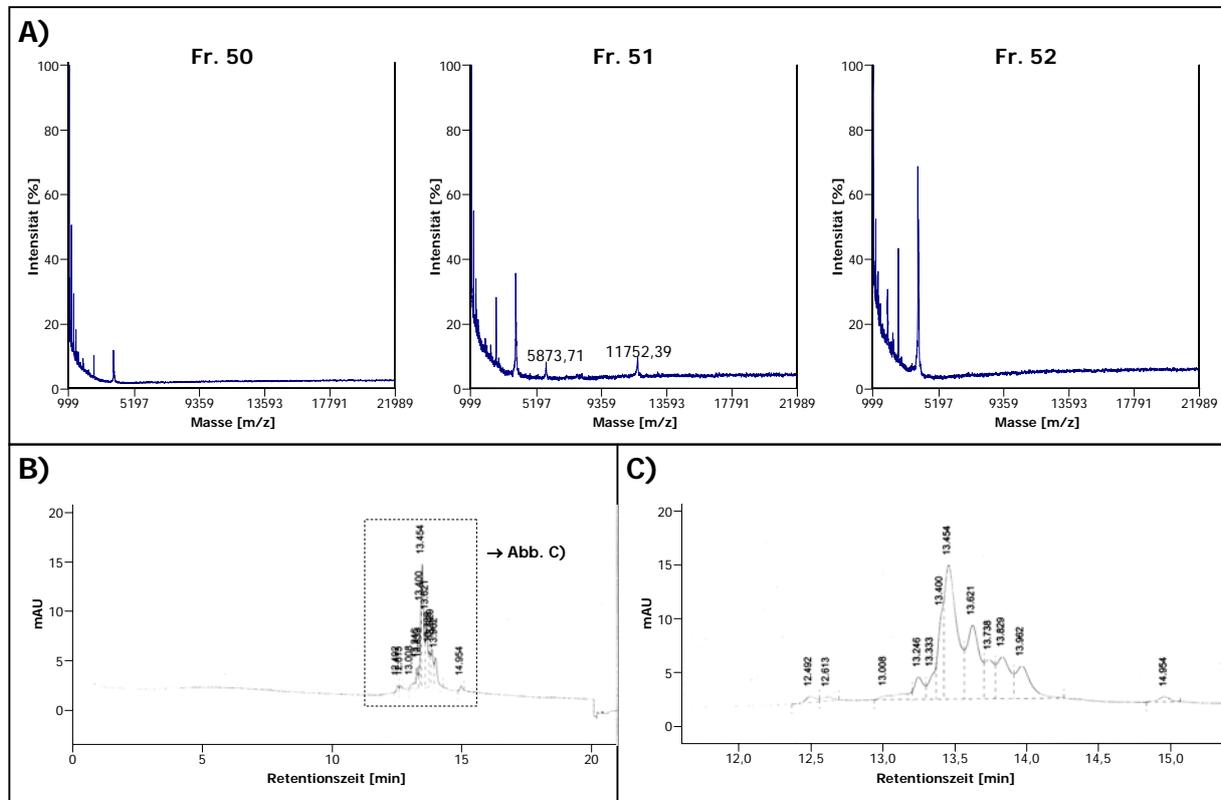


Abbildung 40: Analyse der aktiven Fraktion 51 des HPLC-Laufes SM 2 A) MALDI-Massenspektrum der Fraktionen 50-52; Detektion einer Substanz mit der Größe von etwa 11.752 kDa und des zweifach positiv geladenen Ions (5.873,71 kDa) in der aktiven Fraktion 51. B) Untersuchung des Reinheitsgrades der osteoanabolen Fraktion durch Kapillarzonenelektrophorese (CZE). C) Vergrößerter Ausschnitt des Elektropherogramms in Abb. B; die Probe besteht aus mindestens 6 verschiedene Komponenten.

Für die weitere Aufreinigung der Aktivitäten aus Schweinemagen wurde Fraktion 25 des pH-Pools 3 der Schweinemagen-Peptidbank ebenfalls durch eine CEC mit anschließender RPC getrennt.

Im ersten Reinigungsschritt wurde das lyophilisierte Material der Fraktion 25 in 35 ml Eluent A aufgenommen und auf einen starken Kationenaustauscher geladen. Durch lineare Erhöhung der KCl-Konzentration erfolgte anschließend die Elution (Abbildung 41). Aliquots, die einer Äquivalentmenge von 0,4 Schweinemagen pro Fraktion entsprachen, wurden entsalzt und ihre Aktivität im Reportergen-Assay bestimmt. Die Chromatographiebedingungen sind in Abschnitt 2.4.4.5 (Tabelle 14, Lauf SM 3) zusammengefasst.

Die höchsten osteoanabolen Aktivitäten konnten im Bereich von Fraktion 19 bis 32 nachgewiesen werden, wobei es sich dem Elutionsprofil zufolge um mindestens zwei aktive Sub-

stanzen handelte. Ein erstes Aktivitätsmaximum wurde in Fraktion 25 erreicht, ein zweites in Fraktion 29. Aus diesem Grund erfolgte die nächste chromatographische Trennung unter Verwendung der vereinigten Fraktionen 19 bis 25.

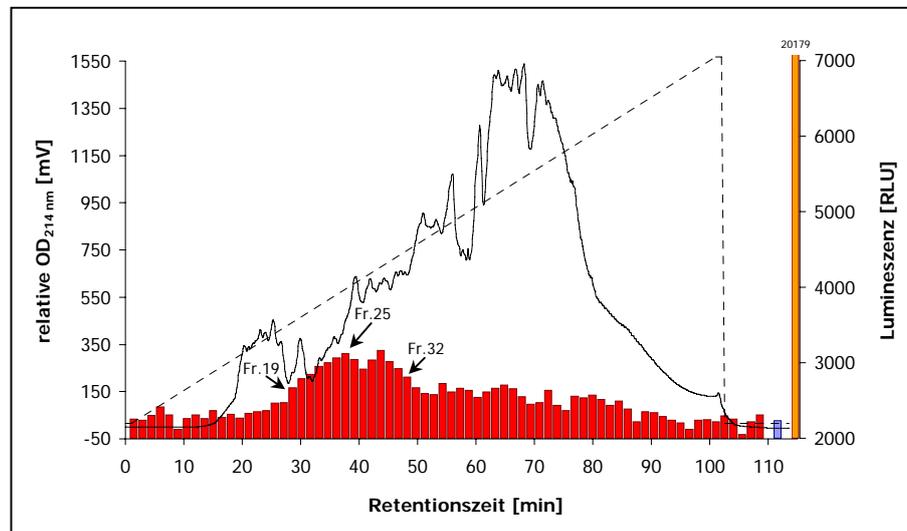


Abbildung 41: CE-Chromatographie der Fraktion 25 des pH-Pools 3 (Lauf SM 3). Die Trennung erfolgte durch einen KCl-Gradienten. Zur Aktivitätsbestimmung wurden 0,4 SMäq pro Fraktion eingesetzt. (—) Absorption bei 214 nm, (---) Verlauf des Gradienten, (■) Aktivität der Fraktionen im Reporter-Gen-Assay, (■) unstimulierte Kontrolle, (■) 100 nM Vitamin D₃

Ein Pool der Fraktionen 19 bis 25 wurde nach Verdünnung mit dem vierfachen Volumen an Eluent A zur weiteren Auftrennung auf eine RPC-Säule geladen. Nach Elution der gebundenen Substanzen mittels eines linearen ACN-Gradienten erfolgte die Bestimmung der osteoanabolen Aktivität von jeweils 0,25 SMäq und die Erstellung eines Aktivitätsprofils (Abbildung 42). Tabelle 14 in Abschnitt 2.4.4.5 enthält die detaillierten Chromatographiebedingungen (Lauf SM 4).

Durch RP-Chromatographie konnte eine weitere Abtrennung von inaktiven Komponenten erzielt werden. Die Fraktionen 47 bis 58 zeigten deutlich einen induzierenden Effekt auf die Promotoraktivität in ROS-IPF-o-15-Zellen.

Im dritten Reinigungsschritt wurde erneut eine RPC durchgeführt. Fraktion 54 des Laufes SM 4 wurde lyophilisiert und in 45 µl Wasser gelöst. Nach Beladen der RPC-Säule mit 2 × 20 µl der Probe erfolgte die Elution durch lineare Erhöhung des ACN-Anteils im Fließmittel. Für die Messung der osteoanabolen Aktivität wurden alle Fraktionen mit 25 µl bidest. H₂O verdünnt und jeweils 1 µl pro Fraktion im Reporter-Gen-Assay eingesetzt. Das resultierende Elutionsprofil sowie das Chromatogramm der RPC SM 5 sind in Abbildung 43 dargestellt.

Genauere Angaben zu den Chromatographiebedingungen des Laufes SM 5 sind in Tabelle 14 (Abschnitt 2.4.4.5) enthalten.

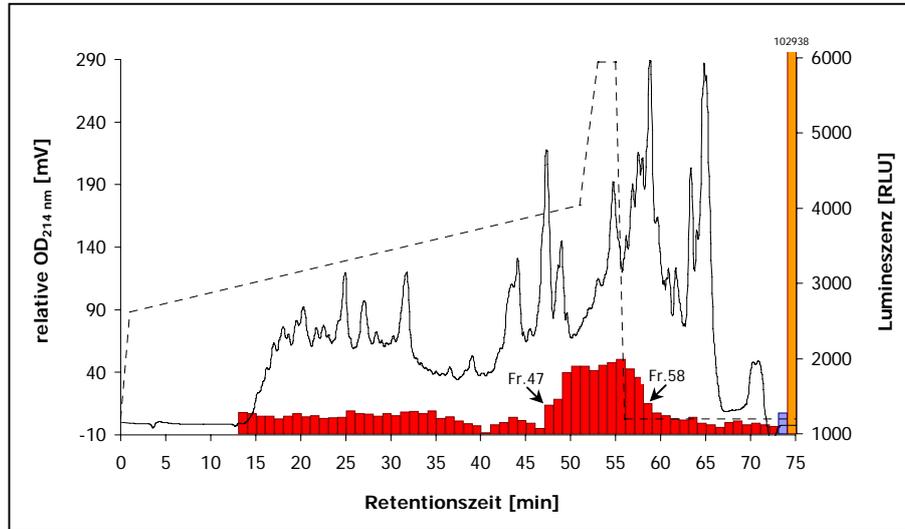


Abbildung 42: Lauf SM 4: Aufreinigung der vereinigten Fraktionen 19-25 des Laufes SM 3 mittels RPC. Die Trennung erfolgte durch einen ACN-Gradienten. Zur Aktivitätsbestimmung wurden 0,25 SMäq pro Fraktion eingesetzt. (—) Absorption bei 214 nm, (---) Verlauf des Gradienten, (■) Aktivität der Fraktionen im Reporter-Gen-Assay, (■) unstimulierte Kontrolle, (■) 100 nM Vitamin D₃

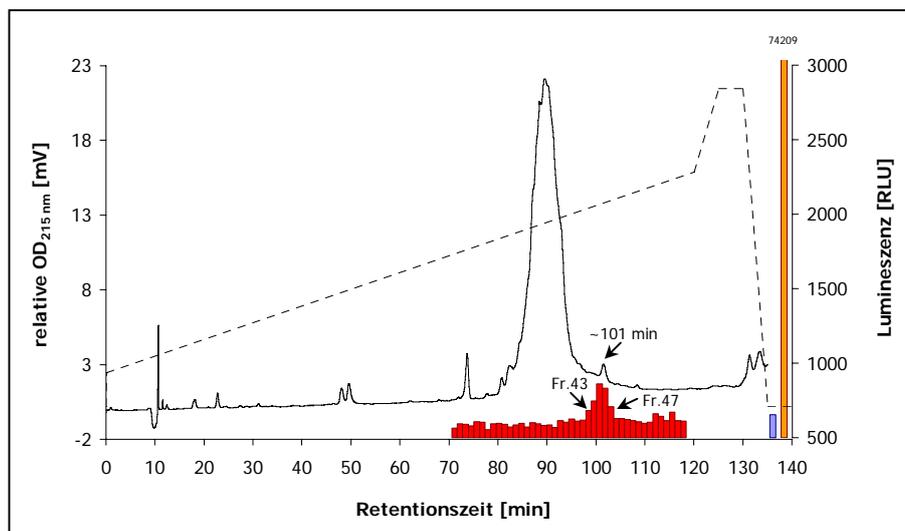


Abbildung 43: Lauf SM 5: RPC der Fraktion 54 des Laufes SM 4. Die Elution erfolgte durch einen ACN-Gradienten. Zur Aktivitätsbestimmung wurden 0,0042 SMäq pro Fraktion eingesetzt. (—) Absorption bei 215 nm, (---) Verlauf des Gradienten, (■) Aktivität der Fraktionen im Reporter-Gen-Assay, (■) unstimulierte Kontrolle, (■) 100 nM Vitamin D₃

Die Aufreinigung der Fraktion 54 mittels RPC resultierte in einer sehr guten Separation der inaktiven Inhaltsstoffe. Aktive Substanzen konnten in den Fraktionen 43 bis 47 nachgewiesen werden und entsprachen offensichtlich einem kleinen Peak mit einer Retentionszeit von etwa 101 Minuten.

Eine hinreichende Separation der aktiven Substanz zum Zwecke der Reinheitsbestimmung (CZE) und Peptidsequenzanalyse sollte durch erneute Chromatographie der Fraktion 46 des Reinigungsschrittes SM 5 erzielt werden. Der bereits mit bidest. H₂O verdünnten Probe (s.o.) wurden 5 µl Eluent A zugefügt und anschließend erfolgte die Auftrennung analog zu HPLC-Lauf SM 5 (Abbildung 44). In Tabelle 14 (Abschnitt 2.4.4.5) sind die Chromatographiebedingungen des Laufes SM 6 aufgelistet.

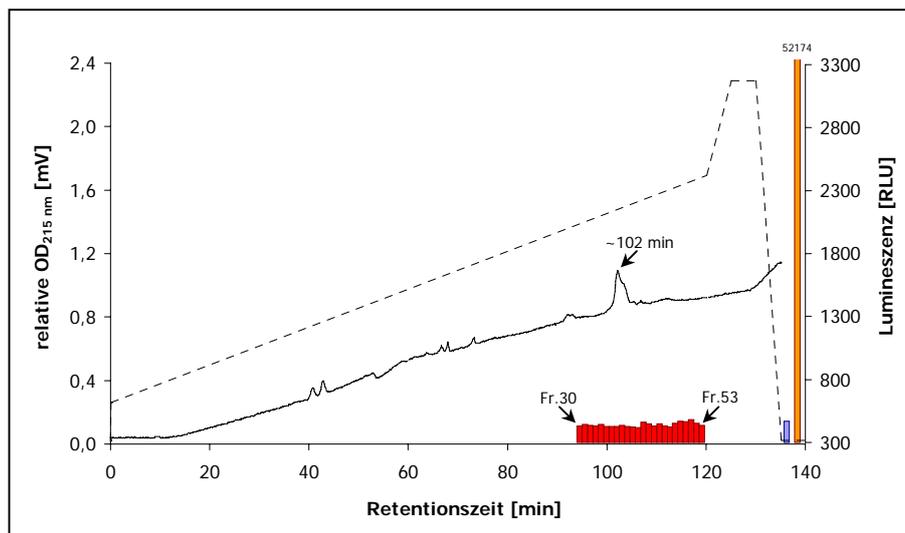


Abbildung 44: Lauf SM 6: RPC der Fraktion 46 des Laufes SM 5. Die Elution erfolgte durch einen ACN-Gradienten. Zur Aktivitätsbestimmung wurden 0,00312 SMäq pro Fraktion eingesetzt. (—) Absorption bei 215 nm, (---) Verlauf des Gradienten, (■) Aktivität der Fraktionen im Reporter-Gen-Assay, (□) unstimulierte Kontrolle, (■) 100 nM Vitamin D₃

Gemäß des vorangegangenen Reinigungsschrittes (SM 5) eluierte die aktive Substanz mit einer Retentionszeit von etwa 101 Minuten. Das Chromatogramm des HPLC-Laufes SM 6 zeigt einen entsprechenden Peak mit einem Absorptionsmaximum bei 102 Minuten, jedoch konnte eine Aktivität in den Fraktionen 30 bis 53 nicht nachgewiesen werden. Auch die Stimulation von ROS-IPF-o-15-Zellen mit der 5,8-fachen Äquivalentmenge pro Fraktion (0,0181 SMäq) erbrachte keine Änderung des Aktivitätsprofils (ohne Abb.).

Offensichtlich enthielt Fraktion 46 des Laufes SM 5 eine sehr geringe Menge der aktiven Substanz, so dass nachfolgend der Reinheitsgrad der Fraktion 45 desselben Reinigungsschrittes mittels CZE untersucht wurde. Darüber hinaus erfolgte die Aufnahme von Massenspektren der Fraktionen 27 bis 50 des Laufes SM 5 bzw. der Fraktionen 30 bis 53 des Laufes SM 6 durch MALDI-Messungen.

Im resultierenden Elektropherogramm (Abbildung 45) konnten keine Verbindungen nachgewiesen werden, was vermutlich auf zu geringe Substanzkonzentrationen zurückzuführen war. Eine Korrelation zwischen detektierten Massen und osteoanaboler Aktivität wurde nach massenspektrometrischer Analyse nicht festgestellt (ohne Abb.).

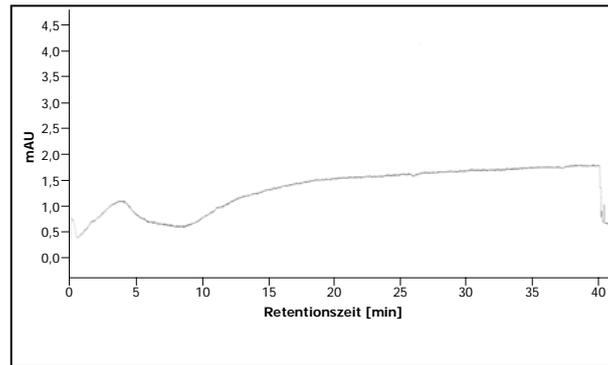


Abbildung 45: Untersuchung des Reinheitsgrades der osteoanabolen Fraktion 46 des HPLC-Laufes SM 5 durch Kapillarzonenelektrophorese (CZE).

Zur Abtrennung einer größeren Menge der aktiven Verbindung wurden die vereinigten Fraktionen 50 und 51 des zweiten Reinigungsschrittes (Lauf SM 4, Abbildung 42) lyophilisiert und in 110 μl Wasser gelöst. Die Auftrennung erfolgte analog zum dritten Reinigungsschritt (Lauf SM 5), jedoch wurden zum Beladen der RPC-Säule $5 \times 20 \mu\text{l}$ der Probe injiziert. Die Bedingungen, unter denen die Chromatographie durchgeführt wurde, finden sich in Abschnitt 2.4.4.5 (Tabelle 14, Lauf SM 7).

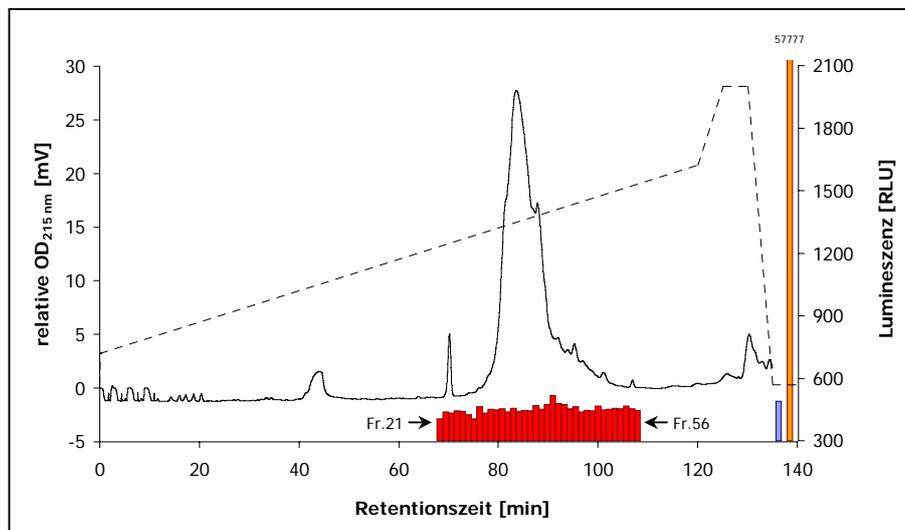


Abbildung 46: Lauf SM 7: RPC der vereinigten Fraktionen 50-51 des Laufes SM 4. Die Elution erfolgte durch einen ACN-Gradienten. Zur Aktivitätsbestimmung wurden 0,168 SMäq pro Fraktion eingesetzt. (—) Absorption bei 215 nm, (---) Verlauf des Gradienten, (■) Aktivität der Fraktionen im Reporter-Gen-Assay, (■) unstimulierte Kontrolle, (■) 100 nM Vitamin D₃

Das Elutionsprofil in Abbildung 46 verdeutlicht, dass im Reporter-Gen-Assay keine osteoanabolen Aktivitäten in den Fraktionen 21 bis 56 erkannt wurden.

In einem letzten Reinigungsschritt wurden die aktiven Fraktionen 26 bis 32 der CEC SM 3 vereinigt und analog zur Aufreinigung der Fraktionen 19 bis 25 (Lauf SM 4) mittels RP-Chromatographie aufgetrennt. Das resultierende Chromatogramm und das entsprechende Elutionsprofil der Aktivität im Reportergen-Assay ist in Abbildung 47A dargestellt. Genaue Angaben zu den Chromatographiebedingungen der RPC (Lauf SM 5) sind in Tabelle 14 (Abschnitt 2.4.4.5) enthalten.

Ferner wurde die Aktivität der verbleibenden Fraktionen des Reinigungsschrittes SM 4 im Bereich von Fr. 47 - 58 überprüft. Es sollte festgestellt werden, ob der mißlungene Nachweis osteoanaboler Aktivität in den Fraktionen der RPC SM 7 auf eine geringe oder fehlende Aktivität im Ausgangsmaterial (Fr.50/51) zurückzuführen war (Abbildung 47B).

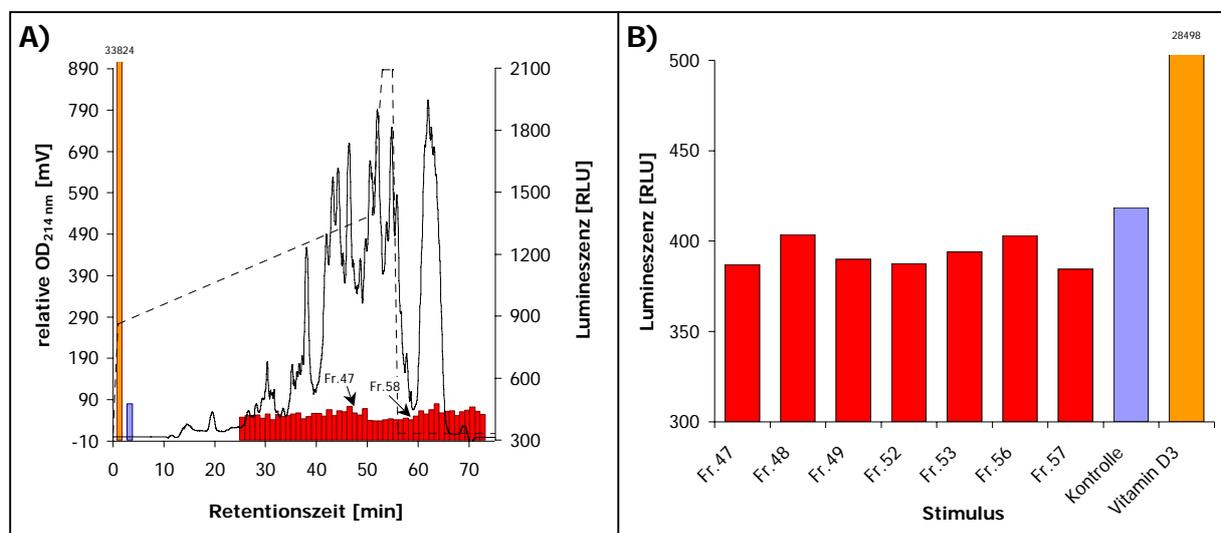


Abbildung 47: A) Lauf SM 8: RPC der vereinigten Fraktionen 26-32 des Laufes SM 3. Die Elution erfolgte durch einen ACN-Gradienten. Zur Aktivitätsbestimmung wurden 0,3 SMäq pro Fraktion eingesetzt. B) Verifizierung der Aktivität ausgewählter Fraktionen des HPLC-Laufes SM 4. (—) Absorption bei 214 nm, (---) Verlauf des Gradienten, (■) Aktivität der Fraktionen im Reportergen-Assay, (■) unstimulierte Kontrolle, (■) 100 nM Vitamin D₃

Nach RP-Chromatographie der Fraktionen 26 bis 32 zeigte das fraktionierte Eluat keinerlei Aktivität im Reportergen-Assay. Im analog durchgeführten Reinigungsschritt der Fraktionen 19 bis 25 konnte zunächst im Bereich von Fraktion 47 bis 58 eine induzierende Wirkung auf den Osteocalcin-Promotor nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 42). Sowohl die Fraktionen im entsprechenden Bereich der RPC SM 8, als auch die verbleibenden Fraktionen der RPC SM 4 bewirkten eine geringfügige Verminderung der Promotoraktivität (Abbildung 47B). Dies läßt vermuten, dass die aktiven Verbindungen in den Fraktionen der Schweinemagen-Peptidbank degradiert wurden und ihre Abbauprodukte zu einer leichten Reduktion der Osteocalcin-Expression führten.

4. Diskussion

Ziel dieser Doktorarbeit war die Etablierung eines molekularbiologischen Screeningsystems zur Detektion osteoanaboler Faktoren und dessen Anwendung auf verschiedene Peptidbanken. Im Rahmen der Promotion konnten zwei verschiedene Reportergenkonstrukte hergestellt und stabil in ROS 17/2.8-Zellen transfiziert werden. Die unterschiedliche Wirkung der pharmakologischen Substanzen $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D_3 , Dexamethason, hPTH (1-34) und (1-37), BMP-2, sowie TGF- β 1 auf die Promotoraktivität wurde gezeigt. Durch den Einsatz einer der isolierten Einzelklone im Screening von humanem Hämofiltrat und Schweinemagen wurden osteoanabole Faktoren nachgewiesen und partiell aufgereinigt.

4.1. Reportergenkonstrukte als Grundlage des Screeningsystems

Die Verwendung einer Glühwürmchen-Luciferase als Reportergen bietet im Vergleich zu anderen Reportergenen wie beispielsweise der Chloramphenicol Transacetylase (CAT), Neomycin Phosphotransferase (neo) oder der β -Glucuronidase (GUS) einige wesentliche Vorteile. Luciferase-Reportergen-Assays können schnell und sehr einfach durchgeführt werden. Im Vergleich zur Aktivitätsbestimmung der Alkalischen Phosphatase im Screening nach neuen osteoanabolen Faktoren (Stephan, 2004) erforderte der Luciferase-Reportergen-Assay als einzigen Pipettiervorgang die Zugabe der Substratlösung (Steady-Glo™ Luciferase Assay System). Anschließend konnte die Lumineszenz als relatives Maß für die osteoanabole Wirkung der verwendeten Stimulanzien in einem Detektor gemessen werden. Aufgrund der hohen Empfindlichkeit des Luciferase-Testsystems ist es möglich, selbst geringe Aktivitäten von regulatorischen Sequenzen nachzuweisen. Darüber hinaus werden für Luciferase-Reportergen-Assays keine Radioisotope benötigt, wie es häufig für CAT- oder neo-Assays der Fall ist. Eine Verminderung der Gesundheitsgefährdung und die Vermeidung hoher Entsorgungskosten kann dadurch erreicht werden (Williams *et al.*, 1989; Luehrsen and Walbot, 1993). Insgesamt stellt die Integration eines Promotorfragments in ein Luciferase-Reportergenkonstrukt eine gute Basis zur Etablierung eines Bioassays für den Einsatz im Hochdurchsatzscreening dar.

Dabei ist jedoch zu beachten, dass neben dem Promotor auch stromabwärts oder weiter stromaufwärts lokalisierte Sequenzabschnitte eine Rolle bei der Regulation der Genexpression spielen können (Abbildung 48). Solche Elemente können in einer Entfernung von mehreren tausend Basenpaaren oder in einem Intron oder Exon des von ihnen regulierten Gens liegen (Stryer, 1994; Tjian, 1995). Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Sequenzen

im ersten Intron, sowie im ersten Exon des Osteocalcin-Gens an seiner transkriptionellen Repression beteiligt sind (Li *et al.*, 1995; Stein *et al.*, 1998; Kearns *et al.*, 1999).

Faktoren, die über diese Regionen eines Gens die Genexpression beeinflussen, können mit einem promotorbasierten Reporter-genkonstrukt folglich nicht nachgewiesen werden.

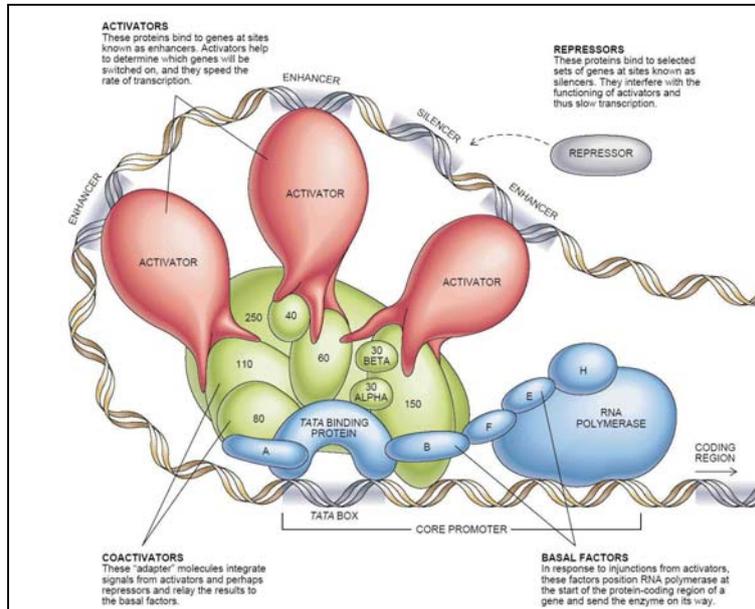


Abbildung 48: Regulation der Genexpression durch verschiedene Sequenzelemente und Faktoren. Die schematische Darstellung veranschaulicht, wie spezifische Elemente innerhalb der DNA-Sequenz (z. B. Enhancer oder Silencer) die Genexpression beeinflussen können, obwohl sie sich in großer Entfernung zum Promotor befinden (Nach: Tjian, 1995).

Der Prozeß der Osteoblastenentwicklung kann in die Phasen Proliferation, Differenzierung und Mineralisierung (Reifung) eingeteilt werden. Durchläuft ein Osteoblast diese Stadien, so geht der Vorgang mit der temporären Expression bestimmter Gene einher. Die Intensität ihrer Expression erfolgt dabei nach einem für die Differenzierung notwendigen Schema (Owen *et al.*, 1990; Onyia *et al.*, 1999; Aubin and Triffitt, 2002).

Einige dieser Gene bzw. ihre Produkte stellen Marker für die Bildung oder den Turnover von Knochen dar und finden Verwendung in der medizinischen Diagnostik. In diesem Kontext ist zu beachten, dass Ihre Expression oft nicht auf Osteoblasten und damit auf das Knochengewebe beschränkt ist. Diese Marker werden also möglicherweise auch in anderen Geweben gebildet und können von Vorgängen beeinflusst werden, die nicht Teil des Knochenstoffwechsels sind (Russell, 2001; Seibel *et al.*, 2002).

Als Grundlage für die Etablierung des Screeningsystems wurden die Promotorregionen zweier dieser Osteoblasten-spezifischen Gene, Cbfa1 und Osteocalcin, kloniert und in Luciferase-Reporter-gen-Konstrukte eingebracht. Sowohl Cbfa1 als auch Osteocalcin sind hoch spezifi-

sche Marker für die Entwicklung von Osteoblasten und werden größtenteils von Osteoblasten und ihren Vorläuferzellen gebildet.

Untersuchungen der regulatorischen Region des *Cbfa1*-Gens haben gezeigt, dass den ersten 976 Bp des Promotors eine besondere Bedeutung zukommt, da ein solches Promotorfragment nur in osteoblastären Zellen aktiv ist. Über ein *Cbfa1*-Element (CE1) in diesem Bereich des *Cbfa1*-Gens wird die zellspezifische Aktivierung von *Cbfa1* in osteoblastären Zellen bzw. die Repression in nicht-osteoblastären Zellen vermittelt (Zambotti *et al.*, 2002). In weiteren Studien wurden für die Untersuchung der Promotoraktivität Reportergenkonstrukte verwendet, die *Cbfa1*-Promotorfragmente mit einer Größe zwischen 0,6 und 3,0 kBp enthielten (Tou *et al.*, 2001; Gilbert *et al.*, 2002; Yeung *et al.*, 2002).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein 2,3 kBp großes Fragment des humanen *Cbfa1*-Promotors in das Luciferase-Reporter-Gen-Plasmid pGL2-Basic ligiert. Es umfaßte unter anderem 6 Bindestellen für *Cbfa1* (OSE2), die offensichtlich der Autoregulation von *Cbfa1* dienen, Bindestellen für das "activator protein 1" (AP1), sowie ein putatives Vitamin D responsives Element (VDRE) (Tou *et al.*, 2001; Drissi *et al.*, 2002). In einem 3 kBp großen Promotorfragment konnten drei weitere regulatorische Elemente nachgewiesen werden, die in dem verwendeten 2,3 kBp großen Fragment nicht vorhanden waren (Tou *et al.*, 2001).

In der klonierten Sequenz waren folglich nicht alle Elemente enthalten, die potentiell bei der Regulation der *Cbfa1*-Expression eine Rolle spielen. Ferner konnten die in der klonierten Promotorregion detektierten Mutationen (vgl. 7.2) zu Abweichungen in der Promotoraktivität im Vergleich zur Aktivität des mutationsfreien Promotors führen. Daher diente das auf dem *Cbfa1*-Promotor basierende Reportergenkonstrukt (pGL2-cbfa-s) als Alternative zum entsprechenden Reportergenkonstrukt mit integriertem Osteocalcin-Promotor (pGL2-osteo-s). Ferner wurden mit pGL2-cbfa-s transfizierte Zellen nur für einen Teil der Experimente verwendet, die mit pGL2-osteo-s transfizierten Zellen durchgeführt wurden.

In Studien zur Funktionsanalyse des Osteocalcin-Promotors wurden Promotorfragmente mit einer Größe von 0,5 bis 1,3 kBp eingesetzt (Yoon *et al.*, 1988; Aslam *et al.*, 1995; Sneddon *et al.*, 1997; Subramaniam *et al.*, 2001). Das in das Reporterplasmid pGL2-Basic eingebrachte Fragment des Osteocalcin-Promotors war mit einer Länge von etwa 2,1 kBp deutlich größer und enthielt somit neben VDRE-, OSE1-, OSE2- und AP1-Sequenzen (Ozono *et al.*, 1990; Yeung *et al.*, 2002) möglicherweise weitere regulatorische Elemente, die für den Nachweis unbekannter osteoanaboler Faktoren von Bedeutung sein können.

4.2. Transfektion osteoblastärer Zelllinien

Die Transfektion der beiden Reportergerkonstrukte erfolgte in ROS 17/2.8-Zellen. Diese Zelllinie wurde aus einem transplantierbaren Osteosarkom gewonnen (Majeska *et al.*, 1980) und stellt ein gut charakterisiertes Zellsystem dar, dessen Zellen den Phänotyp des reifen Osteoblasten exprimieren (Majeska *et al.*, 1985; Onyia *et al.*, 1999).

Die Transfizierbarkeit von ROS 17/2.8-Zellen wurde bereits unter Verwendung verschiedener Agenzien in früheren Arbeiten gezeigt (Kerner *et al.*, 1989; Williams *et al.*, 1994; Drissi *et al.*, 2002). Im Rahmen dieser Arbeit erwies sich die Transfektion mit dem Effectene Transfection Reagent (Effectene) als die geeignetste Transfektionsmethode für diese Zellen. Mit Hilfe des Luciferase-Reportervektors "pGL2-Control" erfolgte die Optimierung des Transfektionsprotokolls, da der Vektor eine hohe konstitutive Expression der Luciferase und eine dementsprechend hohe, meßbare Luciferaseaktivität bewirkte. Eine hohe Transfektionseffizienz ist für eine stabile Transfektion von Zellen wichtig, da nur ein Teil der zunächst transient eingebrachten Fremd-DNA in das Genom einer Wirtszelle integriert wird oder als Episom in transfizierten Zellen erhalten bleibt. Ist die Anzahl der Kopien, in der ein eingebrachtes Reportergerkonstrukt in den Wirtszellen vorliegt, zu gering, so ist die meßbare Aktivität des Reportergens im Rahmen eines Bioassays möglicherweise unzureichend.

Aus den bereits erwähnten Vorteilen wurden für die Etablierung des Reporterger-Assays primär ROS 17/2.8-Zellen ausgewählt. Ihre Herkunft barg jedoch auch potentielle Nachteile, weshalb die Verwendung von drei weiteren Zelllinien für die stabile Transfektionen in Betracht gezogen wurde. ROS 17/2.8-Zellen wurden aus dem Osteosarkom einer Ratte etabliert, wohingegen die klonierten Promotorregionen humanen Ursprungs waren. Anhand der Beispiele Insulin und Wachstumshormon (growth hormone, GH) soll die Bedeutung der Speziespezifität veranschaulicht werden.

Zur Behandlung des Diabetes kann sowohl rekombinantes, humanes Insulin als auch tierisches (meist Schweineinsulin) eingesetzt werden. Obwohl es Variationen in der Aminosäuresequenz von Rinder-, Schweine- und menschlichem Insulin gibt, konnten in zahlreichen Studien keine Unterschiede hinsichtlich ihrer klinischen Wirksamkeit und ihrer Nebenwirkungen festgestellt werden (Mohan, 2002).

Transgene Mäuse, die sowohl humanes als auch murines Wachstumshormon exprimieren, scheinen bei der Geburt Mäusen des Wildtyps zu gleichen. Ausgewachsene transgene Mäuse wiegen jedoch 50 bis 100% mehr als nicht transgene Mäuse. Ferner altern die transgenen Tiere schneller und haben eine geringere Lebenserwartung. Weibliche Mäuse, die beide Formen des Wachstumshormons exprimieren, sind darüber hinaus steril, die entsprechenden

männlichen Tiere jedoch nicht. Die Strukturunterschiede zwischen humanem und murinem Wachstumshormon führen demnach zu deutlichen Veränderungen der physiologischen Wirkung (Loeb, 2000).

Hinsichtlich der Spezies Ratte und Mensch konnten demnach im Luciferase-Reporter-Gen-Assay Strukturunterschiede in Verbindungen, die an der Regulation der Promotoraktivität beteiligt waren, Auswirkungen auf das "chimärische" Testsystem aus Rattenzellen und humanem Promotor haben (Harris *et al.*, 1995a).

Aus diesem Grund wurde überprüft, inwieweit sich die aus einem humanen Osteosarkom hervorgegangene Zelllinie MG-63 (Billiau *et al.*, 1977) für eine stabile Transfektion mit den Reporter-Genkonstrukten eignete. In einem solchen Testsystem wären sowohl der verwendete Promotor als auch die Wirtszellen humanen Ursprungs.

Eine weitere potentielle Alternative zu ROS 17/2.8-Zellen stellte die Zelllinie UMR-106 dar. Sie wurde ebenfalls, wie auch ROS 17/2.8-Zellen, aus Ratten-Osteosarkomzellen etabliert (Martin *et al.*, 1976), exprimiert jedoch einen anderen Phänotyp (Williams *et al.*, 1994; Preston *et al.*, 1997). Diese vielmehr präosteoblastären Zellen hätten nach Transfektion mit dem Cbfa1-Promotor-basierten Reporter-Genkonstrukt für Untersuchungen eines früheren Entwicklungsstadiums von Osteoblasten eingesetzt werden können.

Das favorisierte, alternative Zellsystem neben ROS 17/2.8-Zellen repräsentierte die Zelllinie hFOB 1.19, deren Ursprung immortalisierte, fötale Gliedmaßenzellen bildeten. Diese humanen Zellen können unter entsprechenden Bedingungen zu Osteoblasten differenzieren und sind in der Lage, mineralisierte Knochenmatrix zu bilden (Harris *et al.*, 1995a). Im Gegensatz zu den Zelllinien ROS 17/2.8, MG-63 und UMR-106 handelt es sich bei hFOB 1.19-Zellen nicht um Osteosarkomzellen. Sie wurden durch Transfektion mit einem temperatursensitiven SV40 T-Antigen immortalisiert und weisen eine hohe Proliferationsrate auf.

Osteosarkomzelllinien haben den Nachteil, dass sowohl ihre phänotypischen Ähnlichkeiten als auch ihre genotypischen Abnormalitäten in Relation zu nicht entarteten Zellen meist nicht exakt definierbar sind (Harris *et al.*, 1995a). Führt man beispielsweise eine vergleichende Karyotypanalyse von MG-63- und hFOB 1.19-Zellen durch, so zeigen MG-63-Zellen mehrfache, oft komplexe numerische und strukturelle Abnormalitäten des Chromosomensatzes. hFOB-Zellen weisen zwar ebenfalls Anomalien auf, jedoch sind davon lediglich 1 bis 2 Chromosomen betroffen (Subramaniam *et al.*, 2002).

Die Zelllinie hFOB 1.19 würde als Zellsystem im Rahmen eines Reporter-Gen-Assays die Untersuchung verschiedener Phasen der osteoblastären Differenzierung ermöglichen, da der Differenzierungsprozeß der Zellen gezielt induziert werden kann. Sowohl Zellen als auch Promotor wären humanen Ursprungs, wodurch unerwünschte, speziesspezifische Effekte

(s. o.) vermieden werden könnten. Ferner wären die karyotypischen Anomalien, verglichen mit Osteosarkomzellen wie z. B. MG-63-Zellen, relativ gering.

Die erfolgreiche Anwendung verschiedener Transfektionsmethoden auf hFOB 1.19-Zellen wurde bereits von mehreren Arbeitsgruppen beschrieben (Harris *et al.*, 1995a; Harris *et al.*, 1995b; Billiard *et al.*, 2001; Ismail *et al.*, 2004). Dennoch resultierten alle 6 verwendeten Transfektionsmethoden in relativ geringen Transfektionsraten. Die anhand des pGL2-Control-Vektors abgeschätzte Transfektionseffizienz lag für ROS 17/2.8-Zellen um einen Faktor von mindestens 120 über der für hFOB-Zellen. Transfektionen der Zelllinie MG-63 ergaben mit hFOB-Zellen vergleichbare Ergebnisse, wohingegen die Transfektionseffizienz für ROS 17/2.8-Zellen in Relation zu UMR-106-Zellen etwa 7-mal höher war. Bezüglich ihrer Transfizierbarkeit erwies sich also keine der untersuchten Zelllinien als adäquate Alternative zu ROS 17/2.8-Zellen.

4.3. Etablierung des Luciferase-Reportergen-Assays

Die Etablierung des Luciferase-Reportergen-Assays wurde in mehrere Unterpunkte eingeteilt. In den nachstehenden Abschnitten soll auf die folgenden Fragen eingegangen werden:

- 1) Welchen Einfluß hatte die Orientierung des OC-Promotors innerhalb des Reportergenkonstrukts pGL2-osteo auf die Promotoraktivität?
- 2) Nach welchen Kriterien wurden die verwendeten Einzelklone ausgewählt?
- 3) Inwiefern eignete sich $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D_3 als Positivkontrolle?
- 4) Änderten sich die basale und die durch Vitamin D_3 induzierbare Promotoraktivität im Laufe der Zellkultivierung?
- 5) Hatten neben Vitamin D_3 auch andere pharmakologische Substanzen Einfluß auf die Promotoraktivität?
- 6) Welche Methoden zum Screening nach osteoanabolen Faktoren ermöglichten ROS-IPF-o-15-Zellen?

Die Orientierung des Osteocalcin-Promotors innerhalb des Reportergenkonstrukts pGL2-osteo war entscheidend für seine Induzierbarkeit

Vor der stabilen Transfektion wurde zunächst durch transiente Transfektion mit anschließender Stimulation von ROS 17/2.8-Zellen nachgewiesen, dass die Luciferaseexpression des Reportergenkonstrukts pGL2-osteo-s durch den integrierten Osteocalcin-Promotor reguliert wurde. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die entweder mit dem analogen antisense-Konstrukt pGL2-osteo-as (enthielt den Osteocalcin-Promotor in umgekehrter Orientierung) oder dem leeren pGL2-Basic-Vektor ohne Promotorfragment transfiziert wurden.

Die mit den unterschiedlichen Konstrukten transfizierten Zellen wurden mit Dexamethason bzw. Hydrocortison stimuliert, da der Effekt der beiden Glucocorticoide auf die Alkalische

Phosphatase in ROS 17/2.8-Zellen bereits bekannt war. Bei der Alkalischen Phosphatase handelt es sich um einen Marker für die Differenzierung von Osteoblasten, dessen Aktivität in ROS 17/2.8-Zellen durch Dexamethason zunimmt (Majeska *et al.*, 1985). Ferner konnte unter Verwendung der Zelllinie ROS 17/2.8 in Kombination mit dem Alkalische Phosphatase Test als Screeningsystem und Dexamethason als Positivkontrolle Hydrocortison als biologisch aktive Komponente aus einer Hämofiltrat-Peptidbank isoliert werden (Stephan, 2004).

In früheren Studien konnte die repressive Wirkung von Glucocorticoiden auf die OC-Promotoraktivität in transient transfizierten ROS 17/2.8-Zellen demonstriert werden (Morrison *et al.*, 1989; Schepmoes *et al.*, 1991; Heinrichs *et al.*, 1993; Aslam *et al.*, 1995). Die Aktivität des OC-Promotors im Reporter-genkonstrukt pGL2-osteos wurde durch Inkubation mit Dexamethason oder einer hydrocortisonhaltigen Peptidbankfraktion für 24 h um etwa 50% gehemmt. Weder das leere Reporter-genplasmid noch das antisense-Konstrukt zeigten eine Veränderung der Luciferaseaktivität. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass die beobachtete Repression der Luciferaseaktivität auf unspezifische Sequenzabschnitte des Reporter-genplasmids zurückzuführen war. Ferner wurde gezeigt, dass eine sense-Orientierung des Osteocalcin-Promotors zum Luciferasegen essentiell für eine Beeinflussung der Promotoraktivität durch die beiden Glucocorticoide war.

1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ eignete sich als Positivkontrolle für beide Reporter-genkonstrukte

Als einheitliche Positivkontrolle für die beiden unterschiedlichen Reporter-gen-Assays (basierend auf pGL2-osteos bzw. pGL2-cbfa-s) wurde 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃, (Vit. D₃), die biologisch aktive Form von Vitamin D₃ (Christakos, 2002), ausgewählt, da sowohl die Expression von Osteocalcin als auch die von Cbfa1 durch Vit. D₃ reguliert wird. Transfektionsversuche mit ROS 17/2.8-Zellen haben gezeigt, dass die Aktivität des OC-Promotors durch Vit. D₃ induziert (Kerner *et al.*, 1989; Ozono *et al.*, 1990), die des Cbfa1-Promotors hingegen gehemmt wird (Drissi *et al.*, 2002).

Van den Bemd *et al.* (1995) stellten nach Inkubation von ROS 17/2.8-Zellen mit Vit. D₃ eine Stimulation des Zellwachstums fest. Die erhöhte Luciferaseaktivität nach Stimulation mit Vit. D₃ ging in Zellen, die mit dem Konstrukt pGL2-osteos transfiziert wurden, jedoch nicht auf eine entsprechende Erhöhung der Zellzahl zurück. Vergleiche zwischen Zellvitalität (WST-1) und Luciferaseaktivität ließen erkennen, dass Vit. D₃ nach einer Inkubationszeit von 5 h, 20 h und 42 h eine zunehmende Aktivierung des OC-Promotors bewirkte. Hingegen konnte nach Stimulation mit Vit. D₃ kein signifikanter Unterschied der Zellvitalität in Relation zu unstimulierten Zellen beobachtet werden. Vit. D₃ stellte also eine geeignete Positivkontrolle für beide Reporter-genkonstrukte dar.

Die Auswahl der verwendeten Einzelklone erfolgte anhand der Basalaktivität des Promotors und der Induzierbarkeit der Promotoraktivität

Unter Anwendung der optimierten Transfektionsmethode konnten ROS 17/2.8-Zellen stabil mit dem Reporter-genkonstrukt pGL2-osteo-s bzw. pGL2-cbfa-s transfiziert werden. Die anschließende Selektion von Einzelklonen resultierte in 12 Klonen mit integriertem pGL2-osteo-s-Plasmid und 13 Klonen mit integriertem pGL2-cbfa-s-Plasmid. Bemerkenswert war dabei die hohe Varianz der basalen und Vit. D₃-induzierten Promotoraktivität innerhalb der beiden Einzelklongruppen. Für die pGL2-osteo-s-Transfektanten konnten basale Luciferaseaktivitäten in einem Bereich von 300 bis 23.000 RLU gemessen werden, was einem Faktor von etwa 75 zwischen niedrigstem und höchstem Meßwert entspricht. Nach Stimulation der Zellen führte die Induktion des Osteocalcin-Promotors je nach Einzelklon zu einer 1,5- bis 45-fachen Steigerung der Aktivität. Die analogen Werte für die Basalaktivität der pGL2-cbfa-s-Transfektanten lagen zwischen 400 und 12.500 RLU, wobei die Inkubation mit Vit. D₃ in einer Reduktion der Cbfa1-Promotoraktivität um bis zu 54% resultierte.

Bei der Auswahl eines pGL2-osteo-s- bzw. pGL2-cbfa-s-Transfektanten für weiterführende Untersuchungen und das initiale Screening von Peptidbanken waren zwei Kriterien von Bedeutung. Diese sollen anhand ausgewählter Einzelklone erläutert werden (Abbildung 49).

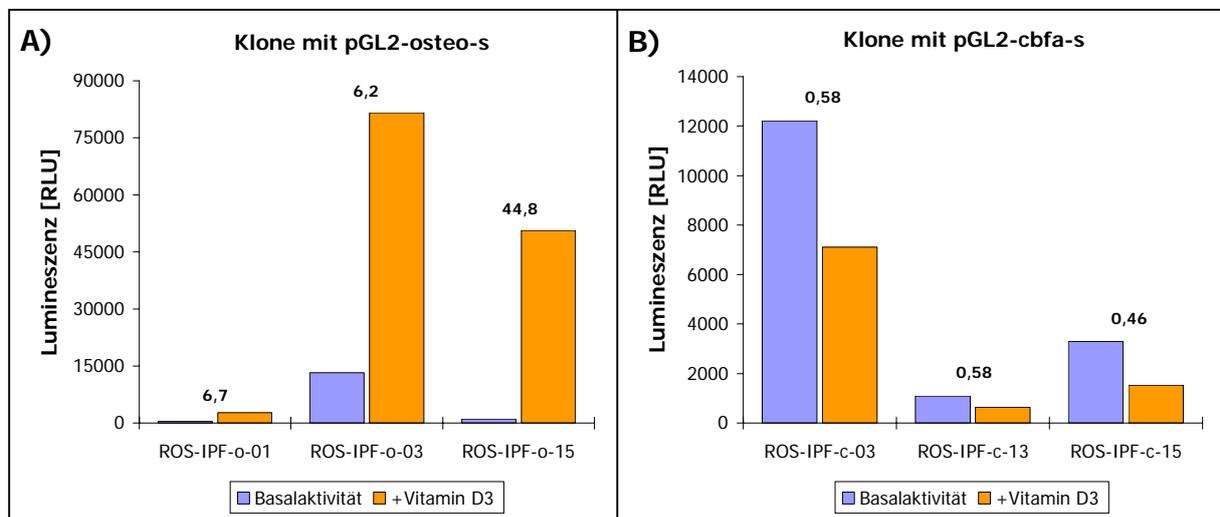


Abbildung 49: Basale und durch Vitamin D₃ stimulierte Luciferaseaktivität ausgewählter Einzelklone. Dargestellt sind die Luciferaseaktivitäten von jeweils drei Klonen, die stabil mit dem Reporter-genkonstrukt "pGL2-osteo-s" (A) bzw. "pGL2-cbfa-s" (B) transfiziert wurden. Die basale Aktivität und das Verhältnis der Aktivität von unstimulierten und stimulierten Zellen verdeutlichen die Unterschiede zwischen den Einzelklonen der jeweiligen Gruppe. Über den Säulen ist der Quotient aus der Luciferaseaktivität von stimulierten und unstimulierten Zellen angegeben.

Zum einen sollte die basale Promotoraktivität gering sein, weil eine potentiell osteoanabole Komponente einer untersuchten Peptidbankfraktion gemäß des zugrundeliegenden Testprin-

zips eine Steigerung der Promotoraktivität bewirken sollte. Eine hohe Basalaktivität hätte dazu führen können, dass ein solcher Stimulus nicht ausreicht, um den ohnehin schon aktiven Promotor meßbar zu beeinflussen. Eine geringe basale Promotoraktivität wiesen die Klone ROS-IPF-o-01 und ROS-IPF-o-15 bzw. ROS-IPF-c-13 und ROS-IPF-c-15 auf.

Zum anderen sollte die Induzierbarkeit der Promotoraktivität möglichst hoch sein. Für pGL2-osteo-s-Transfektanten spiegelte sich dies in einem hohen Quotienten aus der Luciferaseaktivität von stimulierten und unstimulierten Zellen wider, da Vit. D₃ zu einer Aktivitätssteigerung führte. Im Gegensatz dazu sollte der entsprechende Quotient für die pGL2-cbfa-s-Transfektanten aufgrund des inhibierenden Effekts von Vit. D₃ auf die Cbfa1-Promotoraktivität möglichst klein sein (<1). Ein relativ geringer Unterschied zwischen basaler und induzierter Promotoraktivität hätte bewirken können, dass eine Erhöhung der Promotoraktivität durch schwache Stimulanzen sich nicht ausreichend von den Basalwerten abgehoben hätte. Je nach Höhe der Standardabweichung wären die Differenz zwischen induzierter und nicht induzierter Promotoraktivität nicht signifikant gewesen. Wurden die Klone ROS-IPF-o-01 und ROS-IPF-o-03 bzw. ROS-IPF-c-03 und ROS-IPF-c-13 diesbezüglich miteinander verglichen, so konnte eine jeweils annähernd gleiche Induzierbarkeit festgestellt werden. Dahingegen unterschieden sich die basalen Promotoraktivitäten der beiden pGL2-osteo-s- bzw. pGL2-cbfa-s-Transfektanten um ein Vielfaches.

Aufgrund der genannten Kriterien wurden die Einzelklone ROS-IPF-o-15 und -c-15 für die nachfolgenden Versuche und das Screening von Peptidbanken ausgewählt. Beide Klone zeichneten sich durch eine relativ geringe basale Promotoraktivität aus, wenngleich die Klone ROS-IPF-o-01 und -c-13 geringere Werte aufwiesen. Ihre Induzierbarkeit war jedoch im Vergleich zu den anderen Klonen der jeweiligen Gruppe am höchsten.

Die im Rahmen dieser Arbeit selektionierten, jedoch nicht weiter verwendeten Einzelklone könnten auf dem Hintergrund einer abweichenden Fragestellung von Nutzen sein. Für eine Untersuchung von Inhibitoren des Knochenstoffwechsels wären Klone mit einer hohen basalen Promotoraktivität möglicherweise besser geeignet als die ausgewählten Klone ROS-IPF-o-15 und -c-15.

Desweiteren kann der Effekt einer regulatorischen Substanz, deren Wirkung von der basalen Expression eines Gens abhängig ist, mit Hilfe von Subklonen einer Zelllinie analysiert werden. Schepmoes *et al.* (1991) konnten beispielsweise anhand zweier Subklone der Zelllinie ROS 17/2.8 zeigen, dass der inhibierende Effekt von Dexamethason auf die Vit. D₃-induzierte OC-Expression in Abhängigkeit von der basalen OC-Expression unterschiedlich stark ist. Möglicherweise eignen sich anstelle von Subklonen auch pGL2-osteo-s- bzw. pGL2-cbfa-s-Transfektanten mit unterschiedlichen basalen Promotoraktivitäten für die Untersuchung eines

solchen Ansatzes. Zunächst müßte jedoch gezeigt werden, dass die Variationen der basalen Promotoraktivitäten auch Unterschiede der intrinsischen OC-Expression auf mRNA- bzw. Proteinebene widerspiegeln. Könnte eine Korrelation von endogener und transgener OC-Promotoraktivität nachgewiesen werden, wäre eine entsprechende Anwendung des Luciferase-Reporter-Gen-Assays auf dem oben beschriebenen Hintergrund denkbar.

Die basale und Vitamin D₃-induzierte Promotoraktivität in ROS-IPF-o-15-Zellen verändert sich mit zunehmender Anzahl der Zellpassagen

Für die Durchführung des Screenings nach neuen osteoanabolen Faktoren unter Verwendung des beschriebenen Luciferase-Reporter-Gen-Assays wurde der Einzelklon ROS-IPF-o-15 ausgewählt. Um festzustellen, ob sich die verwendeten Zellen im Laufe der Kulturdauer hinsichtlich der beiden o. g. Parameter - geringe Basalaktivität und hohe Induzierbarkeit - veränderten, wurden in Anlehnung an Pagliaro und Praestegaard (2001) diesbezüglich vier unterschiedliche Zellpassagen untersucht. Dabei konnte eine kontinuierliche Verringerung der durch Vit. D₃ induzierten Promotoraktivierung bis hin zur 30. Zellpassage beobachtet werden. Obwohl dadurch auch ein geringeres Lumineszenzsignal nach Inkubation der Zellen mit unbekanntem, potentiell osteoanabolen Substanzen resultieren konnte, ermöglichte die Verwendung von ROS-IPF-o-15-Zellen bis zur Passage 70 im Screening noch eine deutliche Identifikation aktiver Peptidbankfraktionen.

Eine mögliche Ursache für die sinkende Induzierbarkeit des Reporter-Genkonstrukts könnte ein veränderter Methylierungsgrad des OC-Promotors sein. Die Methylierung von DNA stellt die Hauptmodifikation des eukaryotischen Genoms dar und kann gravierenden Einfluß auf die Genexpression haben. Methylierte DNA-Regionen in Promotoren oder stromaufwärts oder stromabwärts gelegene Sequenzen eines Gens können dabei inhibierende Effekte bis hin zur vollständigen Repression der Genexpression ("Gene Silencing") haben (Bird, 2002; Curradi *et al.*, 2002).

Da sich die basale Promotoraktivität der ROS-IPF-o-15-Zellen bis zur Passage 64 nicht signifikant änderte, schien die Kopienzahl der exprimierten Luciferasegene im Laufe der Kulturdauer in etwa konstant geblieben zu sein. Die vollständige Inaktivierung einiger Reporter-Genkonstrukte, deren Folge eine entsprechende Verminderung der Vit. D₃-induzierten Promotoraktivierung gewesen wäre, hätte ebenfalls zu einer Abnahme der Basalaktivität geführt. Da dies jedoch nicht beobachtet werden konnte, handelte es sich möglicherweise um einen Mechanismus, durch den nicht die Funktion des gesamten Promotors, sondern nur eine Teilfunktion beeinflußt wurde. Eine derartige Veränderung könnte auf die Methylierung der DNA innerhalb des Promotors zurückzuführen sein. Werden Basen einer bestimmten Erken-

nungssequenz methyliert, kann dies Einfluß auf die Bindung eines entsprechenden Proteins an diese Erkennungssequenz haben (Bird, 2002). In diesem Fall hieße das, dass Methylierungen im Bereich des VDRE zu einer verminderten Bindung des VDR und damit zu einer geringeren Aktivierung des OC-Promotors führten, ohne die basale Promotoraktivität zu reduzieren. Alternativ könnte der beobachtete Effekt auch durch eine verminderte Expression des VDR infolge einer entsprechenden DNA-Methylierung des VDR-Promotors oder einer anderweitigen Herabregulierung der VDR-Expression hervorgerufen worden sein.

Die Ursache für die sinkende Induzierbarkeit des OC-Promotors durch Vit. D₃ könnte auch in einer Modifikation des Vit. D₃-Metabolismus liegen. Wie in Abbildung 50 schematisch dargestellt, katalysiert CYP24, ein Cytochrom P450-Enzym, im Zuge des Vit. D₃-Abbaus die Hydroxylierung von 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ [1,25-(OH)₂D₃] und 25-Hydroxyvitamin D₃ (25-OH-D₃). CYP24 wird dabei von 1,25-(OH)₂D₃ induziert und reguliert offensichtlich die Konzentration der biologisch aktiven Form von Vit. D₃ in der Zelle.

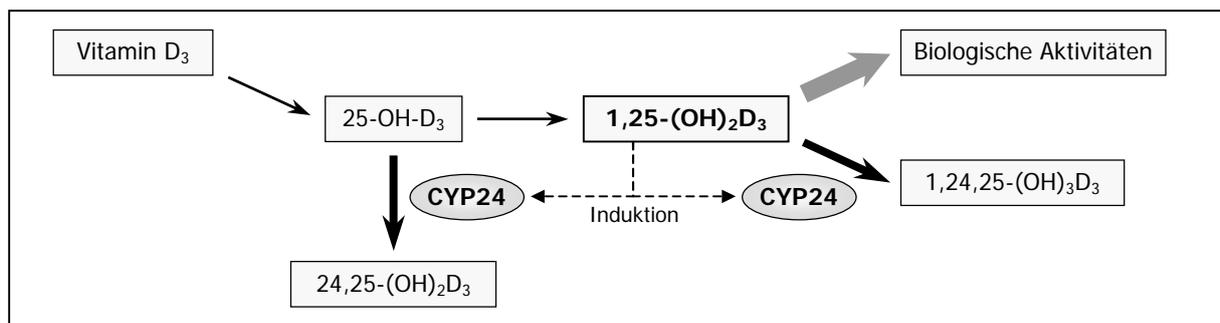


Abbildung 50: Metabolisierung von Vitamin D₃ (Quelle: eigene Darstellung).

Im Gegensatz zu anderen Zellen erfolgte nach Stimulation von ROS 17/2.8-Zellen mit 1,25-(OH)₂D₃ keine Induktion der CYP24-Expression (Ohyama *et al.*, 2002). Es konnte dabei festgestellt werden, dass Teile des CYP24-Gens in hohem Maße methyliert vorlagen. Ohyama *et al.* (2002) vermuten darin den Grund für die fehlende Induzierbarkeit von CYP24.

Von dieser Hypothese ausgehend wäre also die Wirkung von 1,25-(OH)₂D₃ auf die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten ROS 17/2.8-Zellen zunächst unabhängig von CYP24 gewesen. Möglicherweise resultierte die stabile Transfektion dieser Zellen mit dem Reportergenkonstrukt pGL2-osteos bei den selektierten ROS-IPF-o-15-Zellen in einer langsamen Veränderung des Methylierungsgrades des CYP24-Gens. Zuvor methylierte DNA-Regionen würden im Laufe der Zellpassagen demethyliert, die Repression von CYP24 würde teilweise aufgehoben und die CYP24-Expression wäre zunehmend durch Vit. D₃ induzierbar. Gleichzeitig würde die intrazelluläre Vit. D₃-Konzentration bei der Durchführung eines Luciferase-Reportergen-Assays durch CYP24 erniedrigt und die Induktion des OC-Promotors entsprechend abgeschwächt. Folglich würden ROS-IPF-o-15-Zellen mit steigender Passagenzahl eine höhere CYP24-Expression und eine geringere Aktivierung des OC-Promotors durch Vit. D₃ aufweisen.

Neben dem beschriebenen Effekt auf die Induzierbarkeit der Promotoraktivität hatte die Kulturdauer auch Auswirkungen auf die basale Promotoraktivität. ROS-IPF-o-15-Zellen, die über die Passage 70 hinaus im Luciferase-Reporter-gen-Assay getestet wurden, zeigten zwar keine weitere Abnahme der Vit. D₃-induzierten Promotoraktivität, jedoch stieg die konstitutive Promotoraktivität allmählich an. Die Veränderung der Zellen könnte auf eine Entwicklung des Zellphänotyps zum weiter differenzierten Osteoblasten hindeuten. Weiterhin wäre es denkbar, dass innerhalb dieser transfizierten Osteosarkomzellen Subpopulationen durch Veränderungen des Karyotyps entstanden waren. Zeichnet sich ein hypothetischer Subklon beispielsweise durch eine relativ hohe Proliferationsrate und eine gleichzeitig hohe basale OC-Expression aus, so würde dies im Laufe der Zellkultivierung zu einer Selektion zugunsten dieser Zellen führen. Demzufolge würden die Zellen mit steigender Passagenzahl eine zunehmende Basalaktivität des OC-Promotors aufweisen.

Um zu verhindern, dass Peptidbankfraktionen mit schwacher induktiver Aktivität infolgedessen nicht mehr erkannt wurden, erfolgte die ausschließliche Nutzung von ROS-IPF-o-15-Zellen, die nicht öfter als 70-mal passagiert worden waren.

Die Wirkung von 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ auf die Reporter-genkonstrukte ist konzentrationsabhängig

Anhand der ausgewählten Klone ROS-IPF-o-15 und -c-15 erfolgte der Nachweis, dass der durch Vit. D₃ hervorgerufene, stimulierende Effekt auf den OC-Promotor und der inhibierende Effekt auf den Cbfa1-Promotor konzentrationsabhängig war.

Steigende Konzentrationen von 0,1 nM bis 100 nM Vit. D₃ bewirkten eine zunehmende Erhöhung der OC-Promotoraktivität um das 2- bis 36-fache der Basalaktivität. Darüber hinaus konnte mittels RT-PCR nachgewiesen werden, dass nicht nur der humane OC-Promotor des Reporter-genkonstrukts, sondern auch der endogene Ratten-OC-Promotor induziert wurde. Mit Vit. D₃ stimulierte ROS-IPF-o-15-Zellen zeigten gegenüber den unstimulierten Zellen eine deutliche Erhöhung des OC-mRNA-Levels. Die Expression des als interne Kontrolle verwendeten "Housekeeping-Gens" β -Tubulin wurde durch Vit. D₃ nicht beeinflusst.

Die Ergebnisse bestätigten damit die vielfach beschriebene, induzierende Wirkung von Vit. D₃ auf die Expression von Osteocalcin (Kerner *et al.*, 1989; Ozono *et al.*, 1990; Viereck *et al.*, 2002; Paredes *et al.*, 2004). Vermittelt wird dieser Effekt durch einen spezifischen Abschnitt innerhalb der OC-Promotorsequenz, dem VDRE (vitamin D-responsive element) (Kerner *et al.*, 1989; Ozono *et al.*, 1990). Vitamin D₃ bindet an den Vitamin D₃ Rezeptor (VDR) und begünstigt die Dimerisierung des Komplexes mit dem Retinoid X Rezeptor (RXR). Dieses Heterodimer interagiert mit dem VDRE und führt zur Aktivierung bzw. Inhibierung der Ge-

nexpression (Sone *et al.*, 1991; Norman, 2002; Paredes *et al.*, 2002). Obwohl der VDR auch als Homodimer an VDREs binden kann, scheint die spezifische Regulation der Expression von Zielgenen überwiegend durch VDR/RXR-Heterodimere zu erfolgen (Thompson *et al.*, 1998; Norman, 2002; Nezbedova and Brtko, 2004). Weitere Studien konnten zeigen, dass im Falle des Ratten-OC-Promotors darüber hinaus eine direkte Interaktion des Transkriptionsfaktors Cbfa1 mit dem VDR entscheidend für die Vit. D₃-vermittelte Promotoraktivierung ist (Javed *et al.*, 1999; Paredes *et al.*, 2004).

Bezugnehmend auf die in Abschnitt 4.2 diskutierte Bedeutung der Speziespezifität für die Auswahl des Zellsystems sei an dieser Stelle erwähnt, dass die Expression von OC in der murinen Zelllinie MC3T3-E1 durch Vit. D₃ nicht stimuliert, sondern inhibiert wird. Offensichtlich bestehen diesbezüglich gravierende Unterschiede zwischen der Regulation der OC-Expression in Mauszellen verglichen mit der in Ratten- oder humanen Zellen (Clemens *et al.*, 1997; Lian *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1997).

Im Gegensatz zu den zahlreichen Studien, in denen die stimulierende Wirkung von Vit. D₃ auf die OC-Promotoraktivität demonstriert wird, gibt es relativ wenige Informationen über den Effekt von Vit. D₃ auf die Expression des Transkriptionsfaktors Cbfa1. Ducy *et al.* (1997) konnten zeigen, dass nach Inkubation von primären murinen Osteoblasten mit 10 nM Vit. D₃ für 12 h keine Expression von Cbfa1 durch Northern Blot Analyse mehr nachweisbar war. Ferner hemmt Vit. D₃ auch die Aktivität des murinen und Ratten-Cbfa1-Promotors in osteoblastären MC3T3 bzw. ROS 17/2.8-Zellen (Drissi *et al.*, 2002). In primären humanen Osteoblasten hingegen erfolgte nach Stimulation der Zellen mit Vit. D₃ sowohl eine Erhöhung des Cbfa1-mRNA-Levels als auch des OC-mRNA-Levels (Viereck *et al.*, 2002).

Die Aktivität des Cbfa1-Promotors wurde im Kontext des Reportergenkonstrukts pGL2-cbfa-s konzentrationsabhängig von Vit. D₃ inhibiert. Während bei einer Konzentration von 0,1 nM Vit. D₃ eine geringe Hemmung um etwa 5% im Vergleich zur basalen Promotoraktivität gemessen werden konnte, führte eine Inkubation mit 100 nM Vit. D₃ zu einer Reduktion um 50%. Damit korrelierten die Ergebnisse mit den Beobachtungen von Ducy *et al.* (1997) und Drissi *et al.* (2002), nach denen Vit. D₃ eine Repression des Cbfa1-Promotors bewirkt.

Faßt man die Ergebnisse bezüglich der Vit. D₃-vermittelten Effekte auf die beiden Promotoren zusammen, so wurde die Aktivierung des OC-Promotors durch Vit. D₃ offenbar nicht über eine Aktivierung des Cbfa1-Promotors und eine demzufolge vermehrte Expression des Transkriptionsfaktors Cbfa1 vermittelt. Obwohl eine gewisse Cbfa1-Expression eine Voraussetzung für die Induktion des OC-Promotors durch Vit. D₃ darstellt (Javed *et al.*, 1999;

Paredes *et al.*, 2004), scheinen beide Faktoren die OC-Expression unabhängig voneinander regulieren zu können. Möglicherweise handelt es sich bei der Repression von Cbfa1 durch Vit. D₃ um einen Mechanismus, der eine Abschwächung der Vit. D₃-vermittelten Hochregulation der OC-Expression erlaubt (Drissi *et al.*, 2002).

ROS-IPF-o-15-Zellen ermöglichen die Durchführung von drei unterschiedlichen Methoden zum Screening nach osteoanabolen Faktoren

Osteocalcin und die Alkalische Phosphatase (AP) gelten als Marker der osteoblastären Differenzierung (Russell, 2001; Aubin and Triffitt, 2002). Beide Proteine werden erst relativ spät im Zuge dieses Prozesses exprimiert, zunächst die AP und nachfolgend Osteocalcin. Letzteres gilt dabei als sehr später Marker und wird erst von postproliferativen Zellen zu Beginn der Mineralisierung synthetisiert (Aronow *et al.*, 1990; Owen *et al.*, 1990; Aubin and Triffitt, 2002).

ROS 17/2.8-Zellen werden hinsichtlich ihres Phänotyps dem Differenzierungsstadium des reifen Osteoblasten zugeordnet, da sie eine Reihe von osteoblastentypischen Genen exprimieren. Zu diesen Genen gehören u. a. die Alkalische Phosphatase (AP) und Osteocalcin (Majeska *et al.*, 1985; Onyia *et al.*, 1999). Im Gegensatz zu normalen diploiden Osteoblasten erfolgt die Bildung von Osteocalcin auch in proliferierenden Osteosarkomzellen der Zelllinie ROS 17/2.8 (Bortell *et al.*, 1993). Die Aktivität der AP kann in diesen Zellen sowohl durch Vit. D₃ als auch durch Glucocorticoide wie beispielsweise Dexamethason induziert werden (Manolagas *et al.*, 1981; Majeska and Rodan, 1982; Majeska *et al.*, 1985).

Ein auf der Aktivitätsbestimmung der AP in ROS 17/2.8-Zellen basierendes Testsystem wurde von Stephan (2004) für das Screening nach osteoanabolen Faktoren verwendet. Dexamethason diente dabei als Positivkontrolle.

Die Stimulation des Einzelklons ROS-IPF-o-15 mit Dexamethason bzw. Vit. D₃ führte ebenfalls zu einer deutlichen Aktivitätssteigerung der AP. Folglich wurde die Expression und Induzierbarkeit der AP durch den Prozeß der stabilen Transfektion nicht grundlegend beeinflusst. Weiterhin war es möglich die Vitalität bzw. Proliferation der Zellen mittels Wst-1 zu bestimmen. In Kombination mit dem AP-Test oder dem etablierten Luciferase-Reportergen-Assay erlaubte dies die Betrachtung von Zellvitalität und -differenzierung in direkter Relation zueinander, da beide Tests nacheinander mit der Zellpopulation einer Zellkulturplatte durchgeführt werden konnten.

Die Durchführung der drei genannten Tests erfolgte im 96-Well-Format. Insgesamt repräsentierten die stabil transfizierten ROS-IPF-o-15-Zellen damit ein Zellsystem, mit dem die Wirkung von (unbekannten) osteoanabolen Substanzen auf zwei Marker der Osteoblastendiffe-

renzung, die AP und Osteocalcin, und auf die Zellproliferation mit hohem Probendurchsatz untersucht werden konnte. Berücksichtigt man die Tatsache, dass auch die alleinige Verwendung eines Proliferationsassays bereits zur Identifizierung von TIMP-2 (Tissue inhibitor of metalloproteinase 2) als osteoanaboler Faktor eingesetzt werden konnte [IPF PharmaCeuticals GmbH: WO 01/74380 A3 (2001)], so ermöglichen ROS-IPF-o-15-Zellen drei verschiedene Methoden zum Screening nach osteoanabolen Faktoren mit demselben Zellsystem.

Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit lag auf der Etablierung des Luciferase-Reporter-Gen-Assays. Daher wurden die Optionen, die sich aus einer Kombination der unterschiedlichen Tests ergeben könnten, zunächst nicht weiter untersucht. Aus der Verfolgung dieses Ansatzes könnten sich jedoch neue Möglichkeiten für zukünftige Screeningexperimente ergeben.

Stimulation der ausgewählten Einzelklone mit pharmakologischen Substanzen

Nachdem die Wirkung von Vit. D₃ auf die Aktivitäten der beiden untersuchten Promotoren gezeigt werden konnte, wurde untersucht, ob auch andere pharmakologische Substanzen die Promotoraktivitäten beeinflussen. Anhand der Einzelklone ROS-IPF-o-15 und -c-15 wurden die Effekte von unterschiedlichen Konzentrationen an BMP-2, Dexamethason, TGF-β₁, hPTH (1-34) und hPTH (1-37) auf die Aktivität der Reporter-Genkonstrukte gemessen.

BMP-2

Die Gruppe der "bone morphogenetic proteins" (BMPs) gehört zur "transforming growth factor β" (TGF-β) Superfamilie (Centrella *et al.*, 1994). Mitglieder dieser Familie weisen untereinander einen variierenden Prozentsatz an Sequenzhomologien auf und übernehmen trotz dieser Ähnlichkeiten eine Vielzahl biologischer Funktionen. Unter ihnen zählen BMP-2, die BMPs-4 bis 7, sowie BMP-9 zu den Verbindungen mit osteoanaboler Wirkung (Celeste *et al.*, 1990; Gitelman *et al.*, 1994; Rosen and Wozney, 2002).

Untersuchungen der Cbfa1- und Osteocalcin-Expression konnten belegen, dass BMPs an der transkriptionellen Regulation der beiden Gene beteiligt sind (Yamaguchi *et al.*, 2000). In verschiedenen Zellsystemen resultierte die Inkubation der Zellen mit BMP-2 in einer erhöhten Transkription von Cbfa1 (Chen *et al.*, 1998; Gori *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2003) bzw. Osteocalcin (Yamaguchi *et al.*, 1991; Guicheux *et al.*, 2003; Sowa *et al.*, 2004).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen erkennen, dass Konzentrationen von 1 ng/ml bis 100 ng/ml BMP-2 keinen signifikanten Einfluß auf den Cbfa1- oder den OC-Promotor hatten. Lediglich die höchste verwendete Konzentration von 1 µg/ml BMP-2 resultierte in

einer Reduktion der Promotoraktivität beider Reportergenkonstrukte. Diese Beobachtungen unterschieden sich damit größtenteils von den Ergebnissen der o. g. Arbeitsgruppen.

Lee *et al.* (1999) konnten jedoch die Existenz eines negativen BMP-2-responsiven Elements im Bereich von -365 bis -108 des Osteocalcin-Promotors nachweisen. Transfektionsexperimente mit OC-Promotorkonstrukten ergaben eine signifikante Repression der Promotoraktivität in transfizierten, mit BMP-2 stimulierten C2C12-Myoblasten. Hingegen wurden keine vergleichbaren Effekte bei entsprechend transfizierten ROS 17/2.8-Zellen beobachtet. Lee *et al.* vermuteten, dass die inhibierende Wirkung von BMP-2 auf die OC-Expression in reifen osteoblastären Zellen durch Faktoren überlagert wurde, die an der Regulation der basalen Expression von Osteocalcin beteiligt sind. Inwieweit der Transkriptionsfaktor Cbfa1 eine Rolle bei einer derartigen Maskierung spielte, konnte in diesem Zusammenhang jedoch nicht geklärt werden.

Die BMP-2-induzierte Repression der OC-Promotoraktivität in ROS-IPF-o-15-Zellen könnte folglich auf die Wirkung des negativen BMP-2-responsiven Elements zurückzuführen sein. Aufgrund der ebenfalls inhibierenden Wirkung von BMP-2 auf die Cbfa1-Promotoraktivität in ROS-IPF-c-15-Zellen könnte man vermuten, dass eine verminderte Expression des Transkriptionsfaktors Cbfa1 die Verringerung der OC-Expression bedingte. Da BMP-2 aber auch in Abwesenheit von Cbfa1 eine Induktion von OC in murinen Calvariazellen bewirken kann, wird der Effekt von BMP-2 auf die OC-Expression offensichtlich nicht (ausschließlich) über Cbfa1 vermittelt (Komori *et al.*, 1997). Vielmehr bietet die verminderte Cbfa1-Transkriptionsrate in ROS-IPF-c-15-Zellen einen Erklärungsansatz, warum Lee *et al.* (1999) nach Inkubation mit BMP-2 keine Inhibierung der OC-Expression in ROS 17/2.8-Zellen beobachten konnte, die OC-Promotoraktivität in ROS-IPF-o-15-Zellen hingegen gehemmt wurde. In diesem Kontext könnte die reduzierte Cbfa1-Expression der transfizierten ROS 17/2.8-Zellen einer Maskierung des inhibitorischen Effekts von BMP-2 auf die OC-Expression durch Cbfa1 selbst oder andere Faktoren entgegenwirken.

Dass die Transkription von Cbfa1 im Widerspruch zu zahlreichen Studien durch BMP-2 gehemmt wurde, könnte möglicherweise auf die Autoregulation von Cbfa1 (Ducy *et al.*, 1999; Drissi *et al.*, 2000) zurückzuführen sein. Es ist denkbar, dass bei einem hohen endogenen Expressionsniveau von Cbfa1 in den Zellen die zusätzliche Stimulation des Cbfa1-Promotors mit BMP-2 in einer autokrinen Herabregulation der Cbfa1-Expression resultierte (Lee *et al.*, 1999).

TGF- β 1

Die Entstehung der TGF- β Superfamilie geht auf den "transforming growth factor- β 1" (TGF- β 1) zurück. Zu den Hauptfunktionen der vier TGF- β -Isoformen (TGF- β 1 bis 3 und TGF- β 5) zählen die Regulation des Zellwachstums, die Stimulation der Matrixsynthese und die Inhibierung des Immunsystems (Centrella *et al.*, 1994; Bonewald, 2002). In Abhängigkeit vom Gewebe und der Rezeptorexpression können dabei die Effekte der unterschiedlichen Isoformen stark variieren. Die Verteilung der Isoformen in den verschiedenen Geweben ist ebenfalls nicht einheitlich. So findet man im Knochengewebe mit einem Anteil von 80-90% überwiegend TGF- β 1. Die jeweiligen Isoformen liegen überwiegend als Homodimere vor, bei denen die beiden Untereinheiten über Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind (Centrella *et al.*, 1994).

TGF- β hat großen Einfluß auf alle Phasen des Knochenumbaus (bone remodeling), von der Rekrutierung der osteoblastären Vorläuferzellen über die Proliferation bis hin zur Differenzierung von Osteoblasten. Die Stimulation des Differenzierungsprozesses und der Bildung von unmineralisierter Knochenmatrix (Osteoid) sind dabei die primären Effekte auf Osteoblasten. Im Gegensatz dazu wird der Prozeß der Mineralisierung und in diesem Zusammenhang auch die Bildung von Osteocalcin als Marker der mineralisierten Matrix von TGF- β gehemmt (Centrella *et al.*, 1994; Spinella-Jaegle *et al.*, 2001). Die Inhibierung der OC-Expression konnte u. a. anhand der Zelllinie ROS 17/2.8 festgestellt werden (Noda, 1989; Alliston *et al.*, 2001; Bonewald, 2002). Hingegen beobachteten Subramaniam *et al.* (2001) in transient transfizierten COS-1 Fibroblasten eine Aktivierung des heterogenen humanen OC-Promotors durch TGF- β . Aus humanem Knochenmark isolierte Knochenvorläuferzellen reagieren auf eine Stimulation mit TGF- β ebenfalls mit einer erhöhten Expression von Osteocalcin (Long *et al.*, 1995).

Alliston *et al.* (2001) zeigten, dass neben der Expression von Osteocalcin auch die von Cbfa1 durch TGF- β gehemmt wird. Die Effekte auf die Transkription der beiden Gene wurden dabei direkt durch TGF- β vermittelt, konnten aber nur in Gegenwart von Cbfa1 beobachtet werden. Diese Beobachtungen unterstützen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit. Bei einer Konzentration von 1 ng/ml erfolgte zunächst eine Erhöhung der OC-Promotoraktivität in ROS-IPF-o-15-Zellen. Eine Verfünffachung der TGF- β -Konzentration konnte diesen Effekt jedoch aufheben, so dass die Promotoraktivität auf das basale Niveau reduziert wurde.

Die Aktivität des Cbfa1-Promotors reduzierte sich durch Stimulation mit 2,5 ng/ml und 5 ng/ml TGF- β um 20% bzw. 30%. Geringere Konzentrationen hatten keine signifikanten Auswirkungen.

Weitere Studien dokumentierten hingegen eine Induktion der Cbfa1-Expression in C2C12-Myoblasten durch TGF- β (Lee *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2000). Zusammenfassend kann man sagen, dass die Effekte von TGF- β auf die Proliferation und Differenzierung von osteoblastären Zellen sehr stark davon abhängen, welche Zellen verwendet werden, in welchem Stadium des Differenzierungsprozesses sich diese befinden, in welchen Konzentrationen TGF- β eingesetzt wird und wie die genauen experimentellen Bedingungen gewählt wurden (Centrella *et al.*, 1994; Spinella-Jaegle *et al.*, 2001; Bonewald, 2002). Das Wirkungsspektrum von TGF- β auf einen bestimmten biochemischen Prozeß kann dabei unter Umständen inhibierende, stimulierende oder keine Effekte umfassen, selbst wenn Zellen des gleichen Gewebes betrachtet werden (Centrella *et al.*, 1998). Daher muß eine TGF- β -induzierte Inhibierung der Cbfa1-Transkription in ROS 17/2.8-Zellen nicht zwingend im Widerspruch zu einer entsprechenden Steigerung in C2C12-Zellen stehen.

Glucocorticoide

Das in der Nebenniere gebildete Glucocorticoid Kortisol ist in physiologischen Konzentrationen für die Differenzierung und Funktion sowohl von Osteoblasten als auch Osteoklasten von essentieller Bedeutung. Sehr hohe Konzentrationen an Kortisol oder anderen Glucocorticoiden wie z. B. Prednison, Prednisolon, Betamethason oder Dexamethason hemmen indessen *in vivo* den Knochenaufbau und führen zum Verlust von Knochenmasse bis hin zur Ausbildung einer Osteoporose. Glucocorticoide bewirken dabei die Apoptose von Osteoblasten und Osteozyten, inhibieren die Funktionen der Osteoblasten und steigern gleichzeitig die Rate des Knochenbaus. Infolgedessen wird mehr Knochensubstanz resorbiert als aufgrund der reduzierten Osteoblastenaktivität wieder neu gebildet wird (Kream and Lukert, 2002).

In zahlreichen Studien konnten *in vitro* osteoanabole und -katabole Effekte von Glucocorticoiden auf die Knochenbildung und -differenzierung beobachtet werden (Tenenbaum and Heersche, 1985; Bellows *et al.*, 1987; Kream and Lukert, 2002). Ähnlich wie bereits für die Wirkung von TGF- β auf den Knochenstoffwechsel beschrieben, wird die Interpretation der in der Literatur dokumentierten Ergebnisse durch eine Vielzahl von Variablen innerhalb der verwendeten Testsysteme erschwert (Kream and Lukert, 2002).

Wie bereits zuvor erläutert, führte die Stimulation von ROS 17/2.8-Zellen mit Dexamethason im Anschluß an die transiente Transfektion mit dem Reportergenkonstrukt pGL2-osteos zu einer Reduktion der OC-Promotoraktivität. Diese Beobachtung ging konform mit den Ergebnissen anderer Studien, denen zufolge Glucocorticoide eine repressive Wirkung auf die OC-

Promotoraktivität in transient transfizierten ROS 17/2.8-Zellen ausübten (Morrison *et al.*, 1989; Schepmoes *et al.*, 1991; Heinrichs *et al.*, 1993; Aslam *et al.*, 1995).

Im Kontrast dazu zeigen andere Arbeiten eine Steigerung oder keine signifikante Änderung der OC-Expression durch den Einfluß von Glucocorticoiden. Beispielsweise inhibierten 100 nM Dexamethason zwar die Vit. D₃ -induzierte Aktivierung des OC-Promotors in transfizierten ROS 17/2.8-Zellen, jedoch hatte Dexamethason allein keine Wirkung auf die Promotoraktivität (Bortell *et al.*, 1993). Dexamethason hatte in gleicher Konzentration keinen Einfluß auf die OC-Expression der klonalen humanen Zelllinie C1 (aus Knochenmarkzellen hervorgegangen), wohingegen 100 nM Vit. D₃ zu einer deutlichen Zunahme der OC-mRNA führte (Ogston *et al.*, 2002). Bei fötalen Ratten-Calvariazellen, die ihre proliferative Phase beendet hatten, resultierte Dexamethason in einer Zunahme des mRNA-Levels von Osteocalcin (Pockwinse *et al.*, 1995).

Bemerkenswert war die Tatsache, dass stabil transfizierte ROS-IPF-o-15-Zellen - im Gegensatz zu transient transfizierten ROS 17/2.8-Zellen - eine geringe, signifikante Steigerung der OC-Promotoraktivität nach Inkubation mit 1 bis 100 nM Dexamethason erkennen ließen.

Hodge und Kream (1988) konnten anhand von ROS 17/2.8-Zellen und zweier Subklone dieser Zelllinie, C12 und G2 (Spiess *et al.*, 1986), nachweisen, dass Dexamethason in Konzentrationen von 10⁻⁹ bis 10⁻⁶ M die Kollagensynthese sowohl hemmen als auch stimulieren konnte. Außerdem zeichneten sich C12- und G2-Zellen trotz ähnlicher morphologischer Eigenschaften durch unterschiedliche basale Expressionslevel der Alkalischen Phosphatase und von Osteocalcin aus (Spiess *et al.*, 1986).

Die Stimulation mit 10⁻⁹ bis 10⁻⁶ M Dexamethason bewirkte bei einem weiteren Subklon der Zelllinie ROS 17/2.8 mit der Bezeichnung ROS 17/2.8C keine Änderung des OC-mRNA-Levels. Eine entsprechende Stimulation des Subklons ROS 17/2.8K, charakterisiert durch einen deutlich geringeren basalen OC-mRNA-Level, resultierte in einer zwei- bis dreifachen Erhöhung des OC-mRNA-Levels (Schepmoes *et al.*, 1991). Die Beobachtungen von Hodge und Kream (1988) bzw. Schepmoes *et al.* (1991) belegen das Vorhandensein verschiedener Subpopulationen an Zellen innerhalb einer Kultur von ROS 17/2.8-Zellen. Der Phänotyp dieser Zellen kann dabei unterschiedlich stark von dem der ROS 17/2.8-Zellen abweichen.

Durch die Selektion von Einzelklonen im Anschluß an die stabile Transfektion von ROS 17/2.8-Zellen wurde mit dem Einzelklon ROS-IPF-o-15 offensichtlich ein Subklon gewonnen, der sich ebenfalls von den Ausgangszellen unterscheidet. Aufgrund einer niedrigen basalen OC-Promotoraktivität erfolgte die Auswahl des Einzelklons ROS-IPF-o-15 für die Durchführung der dargestellten Experimente. Sollte die geringe basale OC-Promotoraktivität eine niedrige endogene OC-Expression in den Zellen widerspiegeln, so wäre dies ein Charak-

teristikum, das sich ROS-IPF-o-15-, G2- und ROS 17/2.8K-Zellen teilen. Hodge und Kream (1988) stellten die Hypothese auf, dass die Subklone G2 und C12 verschiedene Differenzierungsstadien repräsentierten, wobei C12-Zellen im Hinblick auf ihre geringere OC-Expression weniger differenzierte Zellen darstellten. Möglicherweise handelte es sich bei ROS-IPF-o-15-Zellen ebenfalls um einen Subklon, der im Vergleich zur Zelllinie ROS 17/2.8 einem abweichenden Stadium der Differenzierung zugeordnet werden könnte und infolgedessen anders auf die Stimulation mit Dexamethason reagierte als transient transfizierte ROS 17/2.8-Zellen. Im Vergleich zu den zahlreichen Arbeiten, in denen die Wirkung von Glucocorticoiden auf die Expression von Osteocalcin beschrieben wurde, gibt es relativ wenige Studien über Effekte von Glucocorticoiden auf die Expression von Cbfa1. Primäre humane Osteoblasten zeigten nach Inkubation mit Dexamethason eine Steigerung (Viereck *et al.*, 2002), primäre Osteoblastenkulturen aus Parietalknochen von Ratten hingegen eine Verringerung der Cbfa1-Expression (Chang *et al.*, 1998). Murine ST-2-Bindegewebszellen, die potentiell zu Osteoblasten oder Adipozyten differenzieren können, wiesen nach Stimulation mit Kortisol eine reduzierte Cbfa1-Transkriptionsrate auf (Pereira *et al.*, 2002). Luppen *et al.* (2003) konnten nach Behandlung von MC3T3-E1-Zellen mit 1 μ M Dexamethason keine signifikante Beeinflussung des Cbfa1-Expressionslevels feststellen. (Luppen *et al.*, 2003)

Der transgene Cbfa1-Promotor in ROS-IPF-c-15-Zellen zeigte nach Stimulation mit 0,1 bis 100 nM Dexamethason keine signifikante Änderung seiner Aktivität.

PTH

Das Parathormon (PTH) ist ein Regulator der Kalziumhomöostase (siehe Abschnitt 1.2.1) und spielt eine entscheidende Rolle bei der Erhaltung des Gleichgewichts von Knochenresorption und -neubildung im Zuge des Knochenumbaus (siehe Abschnitt 1.2.3). Seine Wirkungen auf die Proliferation und Differenzierung von Knochenzellen und die damit in Verbindung stehende Regulation verschiedener Gene werden in der Literatur teilweise kontrovers diskutiert (Hock *et al.*, 2002).

Um festzustellen, inwiefern PTH die Aktivitäten des Cbfa1- bzw. OC-Promotors beeinflusst, wurden die beiden Einzelklone ROS-IPF-c-15 und -o-15 zunächst gemäß des Standardprotokolls jeweils für 48 h mit 0,1 bis 100 nM hPTH (1-34) oder hPTH (1-37) stimuliert. Dabei konnte lediglich bei ROS-IPF-o-15-Zellen, die mit 100 nM hPTH (1-34) inkubiert worden waren, eine signifikante Änderung der OC-Promotoraktivität beobachtet werden.

In Anlehnung an die Arbeiten von Yu *et al.* (1997) und Boguslawski *et al.* (2000) wurde nachfolgend untersucht, ob es sich bei dem Effekt von PTH auf die Aktivität des OC-Promotors um eine transiente Inhibierung handelte. Da eine kontinuierliche Verabreichung

von PTH zu katabolen, eine intermittierende Gabe hingegen zu anabolen Effekten auf das Knochengewebe führt (Mosekilde and Reeve, 1996; Orwoll *et al.*, 2003), konnte ferner nicht ausgeschlossen werden, dass der negativen Wirkung von PTH nach 48 h möglicherweise eine Induktion des Promotors vorausgegangen war.

PTH (1-34) induzierte die Aktivität des Ratten-OC-Promotors in transfizierten humanen SaOS-2-Zellen. Bei einer Konzentration von 10 nM PTH konnte nach 4 bis 8 h die maximale Promotoraktivierung beobachtet werden, wohingegen nach 24 und 48 h nur noch eine sehr geringe Steigerung der Aktivität zu messen war (Yu and Chandrasekhar, 1997). Die Stimulation des Ratten-OC-Promotors mit 50 nM PTH (1-38) resultierte in transfizierten ROS 17/2.8-Zellen in einer Induktion der Promotoraktivität, wobei das Maximum der Wirkung nach etwa 8 h gemessen wurde (Boguslawski *et al.*, 2000).

ROS-IPF-o-15-Zellen zeigten nach 7 h eine signifikante Erhöhung der OC-Promotoraktivität, die in vergleichbarem Ausmaß sowohl durch 10 nM als auch 100 nM hervorgerufen wurde und unabhängig vom verwendeten PTH-Fragment war. Eine Inkubationsdauer von 24 h führte nur bei der höheren Konzentration an PTH zu einer signifikanten Aktivitätssteigerung. Die Stimulation mit hPTH (1-34) und hPTH (1-37) zeigte auch hier keinen unterschiedlichen Effekt. Beide PTH-Fragmente bewirkten also zunächst eine transiente Induktion des OC-Promotors, die sich jedoch bei einer Konzentration von 10 nM PTH nach 24 h bereits nicht mehr signifikant von den Kontrollwerten unterschied. Durch eine verlängerte Inkubationszeit wurde der induzierende Effekt von PTH aufgehoben, bzw. führte zu einer leichten Abnahme der Promotoraktivität.

Eine Änderung der Cbfa1-Promotoraktivität in ROS-IPF-c-15-Zellen durch hPTH (1-34) oder hPTH (1-37) konnte indessen nicht beobachtet werden. Die Ergebnisse wurden unterstützt durch die Arbeiten von Selvamurugan *et al.* (2000) und Fujita *et al.* (2001), in denen nachgewiesen wurde, dass PTH keine Veränderung der Cbfa1-Expression bewirkte. Vielmehr induziert PTH eine Phosphokinase A-abhängige Transaktivierung von Cbfa1 und vermittelt auf diese Weise seine osteoanabole Wirkung.

4.4. Nachweis und partielle Aufreinigung osteoanaboler Faktoren in humanem Hämofiltrat und Schweinemagen

Die praktische Anwendung des Reporter-gen-Assays erfolgte durch Einsatz des Einzelklons ROS-IPF-o-15 im Screening zweier Peptidbanken nach unbekanntem osteoanabolen Faktoren. Dabei wurden sowohl in der Peptidbank aus humanem Hämofiltrat als auch in der generierten Schweinemagen-Peptidbank mehrere Fraktionen nachgewiesen, die eine Zunahme der

OC-Promotoraktivität bewirkten. Anhand dreier exemplarisch ausgewählter Fraktionen konnte gezeigt werden, dass die induzierenden Effekte der aktiven Komponenten in den Peptidbankfraktionen von der eingesetzten Äquivalentmenge an Hämofiltrat bzw. Schweinemagen abhängig waren. Da die aktivierende Wirkung der unbekanntenen Verbindungen unter dem Einfluß der Endoprotease Subtilisin zerstört wurden, handelte es sich dabei offensichtlich um Peptide oder Substanzen mit peptidischen Eigenschaften.

Nachfolgend ergab die chromatographische Trennung je einer Hämofiltrat- und Schweinemagen-Peptidbankfraktion eine partielle Aufreinigung der osteoanabolen Aktivitäten. Unter Verwendung des Reporteragen-Assays konnten die aktiven Fraktionen nach Durchführung von Umkehrphasen- und Kationenaustauschchromatographien identifiziert und entsprechend weiter gereinigt werden. Warum die Aktivitäten schließlich nicht mehr nachgewiesen werden konnten, blieb unklar. Aufgrund der Beobachtung, dass im Laufe der Zellkultivierung Änderungen der basalen und induzierten Promotoraktivität bei ROS-IPF-o-15-Zellen festgestellt wurden, erfolgte die Untersuchung der scheinbar inaktiven Fraktionen zusätzlich mit kryokonservierten Zellen einer niedrigen Passagenzahl. Da auch mit diesen Zellen keine aktiven Fraktionen detektiert werden konnten, die Positivkontrolle Vit. D₃ jedoch bei Zellen beider Passagen einen hohen induzierenden Effekt auf die Promotoraktivität ausübte, wurde vermutet, dass es zu einer Zerstörung der Aktivität gekommen war. Ehemals aktive Fraktionen aus jeweils vorangegangenen Reinigungsstufen wurden gleichermaßen getestet und zeigten im Reporteragen-Assay ebenfalls keine Aktivität mehr. Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, dass die aktiven Verbindungen in den Peptidbankfraktionen unter den gewählten Lagerungsbedingungen instabil waren oder dass ihre Aktivität durch wiederholte Gefrier- und Auftauprozesse verlorengegangen war.

5. Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Dissertation war es, ein Testsystem zu etablieren, das auf molekularbiologischer Basis ein Hochdurchsatzscreening nach neuen osteoanabolen Substanzen ermöglicht. Zu diesem Zweck wurde je ein Promotorfragment der beiden osteoblastenspezifischen Gene Osteocalcin und Cbfa1 kloniert und nachfolgend in ein Luciferase-Reportergenkonstrukt integriert.

Transfektionen der Osteosarkomzelllinie ROS 17/2.8 mit dem "Effectene[®] Transfection Reagent" erbrachten sehr gute Transfektionseffizienzen. Nach Optimierung der Transfektionsparameter wurde diese Methode für die stabile Transfektion von ROS 17/2.8-Zellen mit den Reportergenkonstrukten mit nachfolgender Isolierung von Einzelklonen verwendet. Bezüglich ihrer Transfizierbarkeit erwiesen sich die als potentielle Alternativen untersuchten osteoblastären Zelllinien MG-63, UMR-106 und hFOB 1.19 im Vergleich zu ROS 17/2.8-Zellen als ungeeignet.

Anhand zweier ausgewählter Einzelklone konnte die Funktionalität des Reportergen-Assays gezeigt werden. Neben dem als Positivkontrolle für den Reportergen-Assay verwendeten $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D_3 hatten auch weitere pharmakologische Substanzen Einfluß auf die Promotoraktivität.

Dexamethason und PTH (1-37) bewirkten eine Hoch-, BMP-2 ein Herabregulation der Aktivität. PTH (1-34) und TGF- β 1 zeigten sowohl inhibierende als auch aktivierende Effekte auf die Promotoraktivität. Weiterhin wurde festgestellt, dass sich stabil transfizierte ROS 17/2.8-Zellen für mindestens drei verschiedene Screeningverfahren - dem Reportergen-Assay, dem Alkalische Phosphatase Test und einem Proliferations-Assay - eignen, die dem Nachweis osteoanaboler Faktoren dienen.

Praktische Anwendung fand der Reportergen-Assay auf Basis des Osteocalcin-Promotors im Screening zweier Peptidbanken nach unbekanntem osteoanabolen Faktoren. Das initiale Screening zeigte sowohl in der Peptidbank aus humanem Hämofiltrat als auch in der Schweinemagen-Peptidbank mehrere aktive Fraktionen. Exemplarisch wurde für drei der aktiven Fraktionen die Konzentrationsabhängigkeit ihrer Wirkung im Reportergen-Assay gezeigt. Darüber hinaus konnte der peptidische Charakter der biologisch aktiven Verbindungen nachgewiesen werden. Durch Anwendung chromatographischer Trennverfahren wurde eine partielle Aufreinigung der Aktivitäten aus je einer Fraktion der Hämofiltrat- bzw. Schweinemagen-Peptidbank erzielt. Die Aktivitäten konnten dabei über mehrere Reinigungsstufen mit Hilfe des Reportergen-Assays verfolgt werden. Eine Auftrennung der Fraktionen bis hin zur Isolierung der aktiven Komponenten wurde durch die Zerstörung der biologischen Aktivität verhindert. Vermutlich war dies auf eine unzureichende Stabilität der Verbindungen unter den gewählten Lagerungsbedingungen zurückzuführen.

6. Literaturverzeichnis

- Akesson K. (2003). New approaches to pharmacological treatment of osteoporosis. *Bull. World Health Organ* **81**: 657-664.
- Alliston T., Choy L., Ducey P., Karsenty G., Derynck R. (2001). TGF-beta-induced repression of CBFA1 by Smad3 decreases cbfa1 and osteocalcin expression and inhibits osteoblast differentiation. *EMBO J.* **20**: 2254-2272.
- Altschul S.F., Madden T.L., Schaffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**: 3389-3402.
- Aronow M.A., Gerstenfeld L.C., Owen T.A., Tassinari M.S., Stein G.S., Lian J.B. (1990). Factors that promote progressive development of the osteoblast phenotype in cultured fetal rat calvaria cells. *J. Cell Physiol* **143**: 213-221.
- Aslam F., Shalhoub V., van Wijnen A.J., Banerjee C., Bortell R., Shakoory A.R., Litwack G., Stein J.L., Stein G.S., Lian J.B. (1995). Contributions of distal and proximal promoter elements to glucocorticoid regulation of osteocalcin gene transcription. *Mol. Endocrinol.* **9**: 679-690.
- Aubin J.E., Liu F., Malaval L., Gupta A.K. (1995). Osteoblast and chondroblast differentiation. *Bone* **17**: 775-835.
- Aubin J.E. and Triffitt J.T. (2002). Mesenchymal Stem Cells and Osteoblast Differentiation. In: *Principles of Bone Biology* (Bilezikian J.P., Raisz L.G., Rodan G.A., eds) S. 59-81, Academic Press, San Diego.
- Bellows C.G., Aubin J.E., Heersche J.N. (1987). Physiological concentrations of glucocorticoids stimulate formation of bone nodules from isolated rat calvaria cells in vitro. *Endocrinology* **121**: 1985-1992.
- Billiard J., Umayahara Y., Wiren K., Centrella M., McCarthy T.L., Rotwein P. (2001). Regulated nuclear-cytoplasmic localization of CCAAT/enhancer-binding protein delta in osteoblasts. *J. Biol. Chem.* **276**: 15354-15361.
- Billiau A., Edy V.G., Heremans H., Van Damme J., Desmyter J., Georgiades J.A., De Somer P. (1977). Human interferon: mass production in a newly established cell line, MG-63. *Antimicrob. Agents Chemother.* **12**: 11-15.
- Bird A. (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* **16**: 6-21.
- Boguslawski G., Hale L.V., Yu X.P., Miles R.R., Onyia J.E., Santerre R.F., Chandrasekhar S. (2000). Activation of osteocalcin transcription involves interaction of protein kinase A- and protein kinase C-dependent pathways. *J. Biol. Chem.* **275**: 999-1006.
- Bonewald L.F. (2002). Transforming Growth Factor- β . In: *Principles of Bone Biology* (Bilezikian J.P., Raisz L.G., Rodan G.A., eds) S. 903-918, Academic Press, San Diego.
- Bortell R., Owen T.A., Shalhoub V., Heinrichs A., Aronow M.A., Rochette-Egly C., Lutz Y., Stein J.L., Lian J.B., Stein G.S. (1993). Constitutive transcription of the osteocalcin gene in osteosarcoma cells is reflected by altered protein-DNA interactions at promoter regulatory elements. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **90**: 2300-2304.

- Buckwalter J.A., Glimcher M.J., Cooper R.R., Recker R. (1996). Bone biology. I: Structure, blood supply, cells, matrix, and mineralization. *Instr. Course Lect.* **45**: 371-386.
- Celeste A.J., Iannazzi J.A., Taylor R.C., Hewick R.M., Rosen V., Wang E.A., Wozney J.M. (1990). Identification of transforming growth factor beta family members present in bone-inductive protein purified from bovine bone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **87**: 9843-9847.
- Centrella M., Horowitz M.C., Wozney J.M., McCarthy T.L. (1994). Transforming growth factor-beta gene family members and bone. *Endocr. Rev.* **15**: 27-39.
- Centrella M., Ji C., McCarthy T.L. (1998). Control of TGF-beta receptor expression in bone. *Front Biosci.* **3**: d113-d124.
- Chang D.J., Ji C., Kim K.K., Casinghino S., McCarthy T.L., Centrella M. (1998). Reduction in transforming growth factor beta receptor I expression and transcription factor Cbfa1 on bone cells by glucocorticoid. *J. Biol. Chem.* **273**: 4892-4896.
- Chen D., Ji X., Harris M.A., Feng J.Q., Karsenty G., Celeste A.J., Rosen V., Mundy G.R., Harris S.E. (1998). Differential roles for bone morphogenetic protein (BMP) receptor type IB and IA in differentiation and specification of mesenchymal precursor cells to osteoblast and adipocyte lineages. *J. Cell Biol.* **142**: 295-305.
- Christakos S. (2002). Vitamin D Gene Regulation. In: *Principles of Bone Biology* (Bilezikian J.P., Raisz L.G., Rodan G.A., eds) S. 573-586, Academic Press, San Diego.
- Civitelli R. (1996). Calcitonin. In: *Osteoporosis* (Marcus R., Feldman D., Kelsey J., eds) S. 1235-1258, Academic Press, San Diego.
- Clemens T.L., Tang H., Maeda S., Kesterson R.A., Demayo F., Pike J.W., Gundberg C.M. (1997). Analysis of osteocalcin expression in transgenic mice reveals a species difference in vitamin D regulation of mouse and human osteocalcin genes. *J. Bone Miner. Res.* **12**: 1570-1576.
- Cowin S.C., Moss-Salentijn L., Moss M.L. (1991). Candidates for the mechanosensory system in bone. *J. Biomech. Eng* **113**: 191-197.
- Curradi M., Izzo A., Badaracco G., Landsberger N. (2002). Molecular mechanisms of gene silencing mediated by DNA methylation. *Mol. Cell Biol.* **22**: 3157-3173.
- Dawson-Hughes B. (1996). The Role of Calcium in the Treatment of Osteoporosis. In: *Osteoporosis* (Marcus R., Feldman D., Kelsey J., eds) S. 1159-1168, Academic Press, San Diego.
- Drissi H., Luc Q., Shakoory R., Chuva De Sousa L.S., Choi J.Y., Terry A., Hu M., Jones S., Neil J.C., Lian J.B., Stein J.L., van Wijnen A.J., Stein G.S. (2000). Transcriptional autoregulation of the bone related CBFA1/RUNX2 gene. *J. Cell Physiol* **184**: 341-350.
- Drissi H., Pouliot A., Koolloos C., Stein J.L., Lian J.B., Stein G.S., van Wijnen A.J. (2002). 1,25-(OH)₂-vitamin D₃ suppresses the bone-related Runx2/Cbfa1 gene promoter. *Exp. Cell Res.* **274**: 323-333.
- Drivdahl R.H., Puzas J.E., Howard G.A., Baylink D.J. (1981). Regulation of DNA synthesis in chick calvaria cells by factors from bone organ culture. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **168**: 143-150.

- Ducy P., Starbuck M., Priemel M., Shen J., Pinero G., Geoffroy V., Amling M., Karsenty G. (1999). A Cbfa1-dependent genetic pathway controls bone formation beyond embryonic development. *Genes Dev.* **13**: 1025-1036.
- Ducy P., Zhang R., Geoffroy V., Ridall A.L., Karsenty G. (1997). Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* **89**: 747-754.
- Farley J.R., Masuda T., Wergedal J.E., Baylink D.J. (1982). Human skeletal growth factor: characterization of the mitogenic effect on bone cells in vitro. *Biochemistry* **21**: 3508-3513.
- Forssmann W.G. (1996). Prinzipien der Informationsausbreitung und Signalübertragung im endokrinen System durch peptiderge Regulatorsubstanzen. *Nova Acta Leopoldina* **294**: 103-122.
- Forssmann W.G., Schulz-Knappe P., Meyer M., Adermann K., Forssmann K., Hock D., Aoki A. (1993). Characterization of natural posttranslationally processed peptides from human blood: A new tool in the systematic investigation of native peptides. In: *Peptide Chemistry* (Yanaihara N., ed) S. 553-557, Escom, Leiden.
- Fricke K., Schulz A., John H., Forssmann W.G., Maronde E. (2005). Isolation and characterization of a novel proopiomelanocortin-derived peptide from hemofiltrate of chronic renal failure patients. *Endocrinology* **146**: 2060-2068.
- Fu L., Patel M.S., Bradley A., Wagner E.F., Karsenty G. (2005). The molecular clock mediates leptin-regulated bone formation. *Cell* **122**: 803-815.
- Fujita T., Fukuyama R., Izumo N., Hirai T., Meguro T., Nakamuta H., Koida M. (2001). Transactivation of core binding factor alpha1 as a basic mechanism to trigger parathyroid hormone-induced osteogenesis. *Jpn. J. Pharmacol.* **86**: 405-416.
- Fujita T., Inoue T., Morii H., Morita R., Norimatsu H., Orimo H., Takahashi H.E., Yamamoto K., Fukunaga M. (1999). Effect of an intermittent weekly dose of human parathyroid hormone (1-34) on osteoporosis: a randomized double-masked prospective study using three dose levels. *Osteoporos. Int.* **9**: 296-306.
- Gallagher J.C. (1996). Estrogen: Prevention and Treatment of Osteoporosis. In: *Osteoporosis* (Marcus R., Feldman D., Kelsey J., eds) S. 1191-1208, Academic Press, San Diego.
- Gilbert L., He X., Farmer P., Rubin J., Drissi H., van Wijnen A.J., Lian J.B., Stein G.S., Nanes M.S. (2002). Expression of the osteoblast differentiation factor RUNX2 (Cbfa1/AML3/Pebp2alpha A) is inhibited by tumor necrosis factor-alpha. *J. Biol. Chem.* **277**: 2695-2701.
- Gitelman S.E., Kobrin M.S., Ye J.Q., Lopez A.R., Lee A., Derynck R. (1994). Recombinant Vgr-1/BMP-6-expressing tumors induce fibrosis and endochondral bone formation in vivo. *J. Cell Biol.* **126**: 1595-1609.
- Gittens S.A., Wohl G.R., Zernicke R.F., Matyas J.R., Morley P., Uludag H. (2004). Systemic bone formation with weekly PTH administration in ovariectomized rats. *J. Pharm. Pharm. Sci.* **7**: 27-37.
- Goltzman D. (2002). Discoveries, drugs and skeletal disorders. *Nat. Rev. Drug Discov.* **1**: 784-796.

- Gopalakrishnan R., Ouyang H., Somerman M.J., McCauley L.K., Franceschi R.T. (2001). Matrix gamma-carboxyglutamic acid protein is a key regulator of PTH-mediated inhibition of mineralization in MC3T3-E1 osteoblast-like cells. *Endocrinology* **142**: 4379-4388.
- Gori F., Thomas T., Hicok K.C., Spelsberg T.C., Riggs B.L. (1999). Differentiation of human marrow stromal precursor cells: bone morphogenetic protein-2 increases OSF2/CBFA1, enhances osteoblast commitment, and inhibits late adipocyte maturation. *J. Bone Miner. Res.* **14**: 1522-1535.
- Guicheux J., Lemonnier J., Ghayor C., Suzuki A., Palmer G., Caverzasio J. (2003). Activation of p38 mitogen-activated protein kinase and c-Jun-NH2-terminal kinase by BMP-2 and their implication in the stimulation of osteoblastic cell differentiation. *J. Bone Miner. Res.* **18**: 2060-2068.
- Gundberg C.M. (2001). Osteocalcin. In: *Bone Markers: Biochemical and Clinical Perspectives* (Eastell R., Baumann M., Hoyle N.R., Wiczorek L., eds) S. 65-72, Martin Dunitz Ltd, London.
- Gunther T., Chen Z.F., Kim J., Priemel M., Rueger J.M., Amling M., Moseley J.M., Martin T.J., Anderson D.J., Karsenty G. (2000). Genetic ablation of parathyroid glands reveals another source of parathyroid hormone. *Nature* **406**: 199-203.
- Hakanson R., Persson P., Axelson J., Johnell O., Sundler F. (1990). Evidence that gastrin enhances ⁴⁵Ca uptake into bone through release of a gastric hormone. *Regul. Pept.* **28**: 107-118.
- Harada S. and Rodan G.A. (2003). Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature* **423**: 349-355.
- Harris S.A., Enger R.J., Riggs B.L., Spelsberg T.C. (1995a). Development and characterization of a conditionally immortalized human fetal osteoblastic cell line. *J. Bone Miner. Res.* **10**: 178-186.
- Harris S.A., Tau K.R., Enger R.J., Toft D.O., Riggs B.L., Spelsberg T.C. (1995b). Estrogen response in the hFOB 1.19 human fetal osteoblastic cell line stably transfected with the human estrogen receptor gene. *J. Cell Biochem.* **59**: 193-201.
- Heinrichs A.A., Bortell R., Rahman S., Stein J.L., Alnemri E.S., Litwack G., Lian J.B., Stein G.S. (1993). Identification of multiple glucocorticoid receptor binding sites in the rat osteocalcin gene promoter. *Biochemistry* **32**: 11436-11444.
- Hess R., Kuhn M., Schulz-Knappe P., Raida M., Fuchs M., Klodt J., Adermann K., Kaefer V., Cetin Y., Forssmann W.G. (1995). GCAP-II: isolation and characterization of the circulating form of human uroguanylin. *FEBS Lett.* **374**: 34-38.
- Hock J.M., Fitzpatrick L.A., Bilezikian J.P. (2002). Actions of Parathyroid Hormone. In: *Principles of Bone Biology* (Bilezikian J.P., Raisz L.G., Rodan G.A., eds) S. 463-481, Academic Press, San Diego.
- Hodge B.O. and Kream B.E. (1988). Variable effects of dexamethasone on protein synthesis in clonal rat osteosarcoma cells. *Endocrinology* **122**: 2127-2133.
- Huiskes R., Ruimerman R., van Lenthe G.H., Janssen J.D. (2000). Effects of mechanical forces on maintenance and adaptation of form in trabecular bone. *Nature* **405**: 704-706.

IPF PharmaCeuticals GmbH: WO 01/74380 A3 (2001). Medicament Containing A Tissue Inhibitor Of Metalloproteinases-2 (TIMP-2) As An Osteoanabolically Active Substance.

Ismail A., Nguyen C.V., Ahene A., Fleet J.C., Uskokovic M.R., Peleg S. (2004). Effect of cellular environment on the selective activation of the vitamin D receptor by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ and its analog 1 α -fluoro-16-ene-20-epi-23-ene-26,27-bishomo-25-hydroxyvitamin D₃ (Ro-26-9228). *Mol. Endocrinol.* **18**: 874-887.

Jap D., Oppelt P.G., Fasching P., Niederacher D., Beckmann M.W. (2001). Genetik der Osteoporose. *J. Menopause Sonderheft* **1**: 10-16.

Javed A., Gutierrez S., Montecino M., van Wijnen A.J., Stein J.L., Stein G.S., Lian J.B. (1999). Multiple Cbfa/AML sites in the rat osteocalcin promoter are required for basal and vitamin D-responsive transcription and contribute to chromatin organization. *Mol. Cell Biol.* **19**: 7491-7500.

Jilka R.L., Weinstein R.S., Bellido T., Roberson P., Parfitt A.M., Manolagas S.C. (1999). Increased bone formation by prevention of osteoblast apoptosis with parathyroid hormone. *J. Clin. Invest* **104**: 439-446.

Kamioka H., Honjo T., Takano-Yamamoto T. (2001). A three-dimensional distribution of osteocyte processes revealed by the combination of confocal laser scanning microscopy and differential interference contrast microscopy. *Bone* **28**: 145-149.

Karsenty G. (2000). Role of Cbfa1 in osteoblast differentiation and function. *Semin. Cell Dev. Biol.* **11**: 343-346.

Kearns A.E., Goto K., Gianakakos G., Lippmann W., Demay M.B. (1999). Transcriptional repression of the rat osteocalcin gene: role of two intronic CCTCCT motifs. *Endocrinology* **140**: 4120-4126.

Kerner S.A., Scott R.A., Pike J.W. (1989). Sequence elements in the human osteocalcin gene confer basal activation and inducible response to hormonal vitamin D₃. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **86**: 4455-4459.

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

Krane S.M. (2005). Identifying genes that regulate bone remodeling as potential therapeutic targets. *J. Exp. Med.* **201**: 841-843.

Kream B.E. and Lukert B.P. (2002). Clinical and Basic Aspects of Glucocorticoid Action in Bone. In: *Principles of Bone Biology* (Bilezikian J.P., Raisz L.G., Rodan G.A., eds) S. 723-740, Academic Press, San Diego.

Krishnamra N. and Limlomwongse L. (1981). Possible role and mode of action of gastrin on calcium homeostasis in the rat. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **168**: 65-71.

Kuhn M., Raida M., Adermann K., Schulz-Knappe P., Gerzer R., Heim J.M., Forssmann W.G. (1993). The circulating bioactive form of human guanylin is a high molecular weight peptide (10.3 kDa). *FEBS Lett.* **318**: 205-209.

- Lacey D.L., Timms E., Tan H.L., Kelley M.J., Dunstan C.R., Burgess T., Elliott R., Colombero A., Elliott G., Scully S., Hsu H., Sullivan J., Hawkins N., Davy E., Capparelli C., Eli A., Qian Y.X., Kaufman S., Sarosi I., Shalhoub V., Senaldi G., Guo J., Delaney J., Boyle W.J. (1998). Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* **93**: 165-176.
- Lammerich H.P., Busmann A., Kutzleb C., Wendland M., Seiler P., Berger C., Eickelmann P., Meyer M., Forssmann W.G., Maronde E. (2003). Identification and functional characterization of hemorphins VV-H-7 and LVV-H-7 as low-affinity agonists for the orphan bombesin receptor subtype 3. *Br. J. Pharmacol.* **138**: 1431-1440.
- Larsson B., Gritli-Linde A., Norlen P., Lindstrom E., Hakanson R., Linde A. (2001). Extracts of ECL-cell granules/vesicles and of isolated ECL cells from rat oxyntic mucosa evoke a Ca²⁺ second messenger response in osteoblastic cells. *Regul. Pept.* **97**: 153-161.
- Lee K.S., Kim H.J., Li Q.L., Chi X.Z., Ueta C., Komori T., Wozney J.M., Kim E.G., Choi J.Y., Ryoo H.M., Bae S.C. (2000). Runx2 is a common target of transforming growth factor beta1 and bone morphogenetic protein 2, and cooperation between Runx2 and Smad5 induces osteoblast-specific gene expression in the pluripotent mesenchymal precursor cell line C2C12. *Mol. Cell Biol.* **20**: 8783-8792.
- Lee M.H., Javed A., Kim H.J., Shin H.I., Gutierrez S., Choi J.Y., Rosen V., Stein J.L., van Wijnen A.J., Stein G.S., Lian J.B., Ryoo H.M. (1999). Transient upregulation of CBFA1 in response to bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor beta1 in C2C12 myogenic cells coincides with suppression of the myogenic phenotype but is not sufficient for osteoblast differentiation. *J. Cell Biochem.* **73**: 114-125.
- Lee M.H., Kim Y.J., Kim H.J., Park H.D., Kang A.R., Kyung H.M., Sung J.H., Wozney J.M., Kim H.J., Ryoo H.M. (2003). BMP-2-induced Runx2 expression is mediated by Dlx5, and TGF-beta 1 opposes the BMP-2-induced osteoblast differentiation by suppression of Dlx5 expression. *J. Biol. Chem.* **278**: 34387-34394.
- Lehto-Axtelius D., Stenstrom M., Johnell O. (1998). Osteopenia after gastrectomy, fundectomy or antrectomy: an experimental study in the rat. *Regul. Pept.* **78**: 41-50.
- Li Y.P., Chen W., Stashenko P. (1995). Characterization of a silencer element in the first exon of the human osteocalcin gene. *Nucleic Acids Res.* **23**: 5064-5072.
- Lian J.B., Shalhoub V., Aslam F., Frenkel B., Green J., Hamrah M., Stein G.S., Stein J.L. (1997). Species-specific glucocorticoid and 1,25-dihydroxyvitamin D responsiveness in mouse MC3T3-E1 osteoblasts: dexamethasone inhibits osteoblast differentiation and vitamin D down-regulates osteocalcin gene expression. *Endocrinology* **138**: 2117-2127.
- Lian J.B. and Stein G.S. (1996). Osteoblast Biology. In: *Osteoporosis* (Marcus R., Feldman D., Kelsey J., eds) S. 23-60, Academic Press, San Diego.
- Liebich H.-G. (1993). *Funktionelle Histologie*. 2. Auflage, S. 64-71, Verlag Schattauer, Stuttgart-New York.
- Loeb W.F. (2000). A mouse is not a man is not a dog 2000 or species specificity in clinical chemistry. *Revue Méd. Vét.* **151**: 619-622.

- Long M.W., Robinson J.A., Ashcraft E.A., Mann K.G. (1995). Regulation of human bone marrow-derived osteoprogenitor cells by osteogenic growth factors. *J. Clin. Invest* **95**: 881-887.
- Luehrsen K.R. and Walbot V. (1993). Firefly Luciferase as a Reporter for Plant Gene Expression Studies. *Promega Notes Magazine* **44**: 24-32.
- Luppen C.A., Leclerc N., Noh T., Barski A., Khokhar A., Boskey A.L., Smith E., Frenkel B. (2003). Brief bone morphogenetic protein 2 treatment of glucocorticoid-inhibited MC3T3-E1 osteoblasts rescues commitment-associated cell cycle and mineralization without alteration of Runx2. *J. Biol. Chem.* **278**: 44995-45003.
- Majeska R.J., Nair B.C., Rodan G.A. (1985). Glucocorticoid regulation of alkaline phosphatase in the osteoblastic osteosarcoma cell line ROS 17/2.8. *Endocrinology* **116**: 170-179.
- Majeska R.J. and Rodan G.A. (1982). The effect of 1,25(OH)₂D₃ on alkaline phosphatase in osteoblastic osteosarcoma cells. *J. Biol. Chem.* **257**: 3362-3365.
- Majeska R.J., Rodan S.B., Rodan G.A. (1980). Parathyroid hormone-responsive clonal cell lines from rat osteosarcoma. *Endocrinology* **107**: 1494-1503.
- Manolagas S.C., Burton D.W., Deftos L.J. (1981). 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ stimulates the alkaline phosphatase activity of osteoblast-like cells. *J. Biol. Chem.* **256**: 7115-7117.
- Marcus R., Feldman D., Kelsey J. (1996). *Osteoporosis*, Academic Press, San Diego.
- Marks S.C., Jr. and Odgren P.R. (2002). Structure and Development of the Skeleton. In: *Principles of Bone Biology* (Bilezikian J.P., Raisz L.G., Rodan G.A., eds) S. 3-15, Academic Press, San Diego.
- Marks S.C., Jr. and Popoff S.N. (1988). Bone cell biology: the regulation of development, structure, and function in the skeleton. *Am. J. Anat.* **183**: 1-44.
- Marotti G. (1996). The structure of bone tissues and the cellular control of their deposition. *Ital. J. Anat. Embryol.* **101**: 25-79.
- Martin T.J., Ingleton P.M., Underwood J.C., Michelangeli V.P., Hunt N.H., Melick R.A. (1976). Parathyroid hormone-responsive adenylate cyclase in induced transplantable osteogenic rat sarcoma. *Nature* **260**: 436-438.
- Martin T.J. and Ng K.W. (1994). Mechanisms by which cells of the osteoblast lineage control osteoclast formation and activity. *J. Cell Biochem.* **56**: 357-366.
- Meder W., Wendland M., Busmann A., Kutzleb C., Spodsberg N., John H., Richter R., Schleuder D., Meyer M., Forssmann W.G. (2003). Characterization of human circulating TIG2 as a ligand for the orphan receptor ChemR23. *FEBS Lett.* **555**: 495-499.
- Melton L.J., III (1995). How many women have osteoporosis now? *J. Bone Miner. Res.* **10**: 175-177.

- Miki T., Nakatsuka K., Naka H., Masaki H., Imanishi Y., Ito M., Inaba M., Morii H., Nishizawa Y. (2004). Effect and safety of intermittent weekly administration of human parathyroid hormone 1-34 in patients with primary osteoporosis evaluated by histomorphometry and microstructural analysis of iliac trabecular bone before and after 1 year of treatment. *J. Bone Miner. Metab* **22**: 569-576.
- Mohan V. (2002). Which insulin to use? Human or animal? *Current Science* **83**: 1544-1547.
- Morrison N.A., Shine J., Fragonas J.C., Verkest V., McMenemy M.L., Eisman J.A. (1989). 1,25-dihydroxyvitamin D-responsive element and glucocorticoid repression in the osteocalcin gene. *Science* **246**: 1158-1161.
- Mosekilde L. and Reeve J. (1996). Treatment with PTH Peptides. In: *Osteoporosis* (Marcus R., Feldman D., Kelsey J., eds) S. 1293-1312, Academic Press, San Diego.
- Mullender M.G. and Huiskes R. (1997). Osteocytes and bone lining cells: which are the best candidates for mechano-sensors in cancellous bone? *Bone* **20**: 527-532.
- Mundlos S. (1999). Cleidocranial dysplasia: clinical and molecular genetics. *J. Med. Genet.* **36**: 177-182.
- Mundy G.R. (1994). Peptides and growth regulatory factors in bone. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* **20**: 577-588.
- Nakashima K., Zhou X., Kunkel G., Zhang Z., Deng J.M., Behringer R.R., de Crombrugge B. (2002). The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* **108**: 17-29.
- Nezbedova P. and Brtko J. (2004). 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ inducible transcription factor and its role in the vitamin D action. *Endocr. Regul.* **38**: 29-38.
- Noda M. (1989). Transcriptional regulation of osteocalcin production by transforming growth factor-beta in rat osteoblast-like cells. *Endocrinology* **124**: 612-617.
- Norman A.W. (2002). 1 α ,25(OH)₂ Vitamin D₃. In: *Principles of Bone Biology* (Bilezikian J.P., Raisz L.G., Rodan G.A., eds) S. 545-571, Academic Press, San Diego.
- Ogston N., Harrison A.J., Cheung H.F., Ashton B.A., Hampson G. (2002). Dexamethasone and retinoic acid differentially regulate growth and differentiation in an immortalised human clonal bone marrow stromal cell line with osteoblastic characteristics. *Steroids* **67**: 895-906.
- Ohyama Y., Kusada T., Yamasaki T., Ide H. (2002). Extensive methylation of CpG island of CYP24 gene in osteoblastic ROS17/2.8 cells. *Nucleic Acids Res. Suppl* 249-250.
- Onyia J.E., Hale L.V., Miles R.R., Cain R.L., Tu Y., Hulman J.F., Hock J.M., Santerre R.F. (1999). Molecular characterization of gene expression changes in ROS 17/2.8 cells cultured in diffusion chambers in vivo. *Calcif. Tissue Int.* **65**: 133-138.
- Orwoll E.S., Scheele W.H., Paul S., Adami S., Syversen U., Diez-Perez A., Kaufman J.M., Clancy A.D., Gaich G.A. (2003). The effect of teriparatide [human parathyroid hormone (1-34)] therapy on bone density in men with osteoporosis. *J. Bone Miner. Res.* **18**: 9-17.

- Otto F., Thornell A.P., Crompton T., Denzel A., Gilmour K.C., Rosewell I.R., Stamp G.W., Beddington R.S., Mundlos S., Olsen B.R., Selby P.B., Owen M.J. (1997). *Cbfa1*, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell* **89**: 765-771.
- Owen T.A., Aronow M., Shalhoub V., Barone L.M., Wilming L., Tassinari M.S., Kennedy M.B., Pockwinse S., Lian J.B., Stein G.S. (1990). Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. *J. Cell Physiol* **143**: 420-430.
- Ozono K., Liao J., Kerner S.A., Scott R.A., Pike J.W. (1990). The vitamin D-responsive element in the human osteocalcin gene. Association with a nuclear proto-oncogene enhancer. *J. Biol. Chem.* **265**: 21881-21888.
- Pagliaro L. and Praestegaard M. (2001). Transfected cell lines as tools for high throughput screening: a call for standards. *J. Biomol. Screen.* **6**: 133-136.
- Papapoulos S.E. (1996). Bisphosphonates: Pharmacology and Use in the Treatment of Osteoporosis. In: *Osteoporosis* (Marcus R., Feldman D., Kelsey J., eds) S. 1209-1234, Academic Press, San Diego.
- Paredes R., Arriagada G., Cruzat F., Villagra A., Olate J., Zaidi K., van Wijnen A., Lian J.B., Stein G.S., Stein J.L., Montecino M. (2004). Bone-specific transcription factor Runx2 interacts with the 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 receptor to up-regulate rat osteocalcin gene expression in osteoblastic cells. *Mol. Cell Biol.* **24**: 8847-8861.
- Paredes R., Gutierrez J., Gutierrez S., Allison L., Puchi M., Imschenetzky M., van Wijnen A., Lian J., Stein G., Stein J., Montecino M. (2002). Interaction of the 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 receptor at the distal promoter region of the bone-specific osteocalcin gene requires nucleosomal remodelling. *Biochem. J.* **363**: 667-676.
- Parfitt A.M. (2002). Targeted and nontargeted bone remodeling: relationship to basic multicellular unit origination and progression. *Bone* **30**: 5-7.
- Pereira R.C., Delany A.M., Canalis E. (2002). Effects of cortisol and bone morphogenetic protein-2 on stromal cell differentiation: correlation with CCAAT-enhancer binding protein expression. *Bone* **30**: 685-691.
- Persson P., Gagnemo-Persson R., Chen D., Axelson J., Nylander A.G., Johnell O., Hakanson R. (1993). Gastrectomy causes bone loss in the rat: is lack of gastric acid responsible? *Scand. J. Gastroenterol.* **28**: 301-306.
- Persson P., Gagnemo-Persson R., Orberg J., Chen D., Hakanson R. (1991). Effects of gastrin on calcium homeostasis in chickens. *Endocrinology* **129**: 1162-1166.
- Persson P., Hakanson R., Axelson J., Sundler F. (1989). Gastrin releases a blood calcium-lowering peptide from the acid-producing part of the rat stomach. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **86**: 2834-2838.
- Pockwinse S.M., Stein J.L., Lian J.B., Stein G.S. (1995). Developmental stage-specific cellular responses to vitamin D and glucocorticoids during differentiation of the osteoblast phenotype: interrelationship of morphology and gene expression by in situ hybridization. *Exp. Cell Res.* **216**: 244-260.

- Preston S.J., Clifton-Bligh P., Laurent M.R., Jackson C., Mason R.S. (1997). Effect of methotrexate and sulphasalazine on UMR 106 rat osteosarcoma cells. *Br. J. Rheumatol.* **36**: 178-184.
- Reid I.R. (1996). Vitamin D and Its Metabolites in the Management of Osteoporosis. In: *Osteoporosis* (Marcus R., Feldman D., Kelsey J., eds) S. 1169-1190, Academic Press, San Diego.
- Resch H., Pietschmann P., Pernecker B., Krexner E., Willvonseder R. (1992). The influence of partial gastrectomy on biochemical parameters of bone metabolism and bone density. *Clin. Investig.* **70**: 426-429.
- Riggs B.L., Khosla S., Atkinson E.J., Dunstan C.R., Melton L.J., III (2003). Evidence that type I osteoporosis results from enhanced responsiveness of bone to estrogen deficiency. *Osteoporos. Int.* **14**: 728-733.
- Rodan G.A., Raisz L.G., Bilezikian J.P. (2002). Pathophysiology of Osteoporosis. In: *Principles of Bone Biology* (Bilezikian J.P., Raisz L.G., Rodan G.A., eds) S. 1275-1289, Academic Press, San Diego.
- Roodman G.D. and Windle J.J. (2005). Paget disease of bone. *J. Clin. Invest* **115**: 200-208.
- Rosen V. and Wozney J.M. (2002). Bone Morphogenetic Proteins. In: *Principles of Bone Biology* (Bilezikian J.P., Raisz L.G., Rodan G.A., eds) S. 919-928, Academic Press, San Diego.
- Rumenapf G., Schwille P.O., Erben R.G., Schreiber M., Fries W., Schmiedl A., Hohenberger W. (1997). Osteopenia following total gastrectomy in the rat--state of mineral metabolism and bone histomorphometry. *Eur. Surg. Res.* **29**: 209-221.
- Russell G. (2001). Introduction: bone metabolism and its regulation. In: *Bone Markers: Biochemical and Clinical Perspectives* (Eastell R., Baumann M., Hoyle N.R., Wiczorek L., eds) S. 1-25, Martin Dunitz Ltd, London.
- Saiki R.K., Scharf S., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H.A., Arnheim N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**: 1350-1354.
- Schepky A.G., Bensch K.W., Schulz-Knappe P., Forssmann W.G. (1994). Human hemofiltrate as a source of circulating bioactive peptides: determination of amino acids, peptides and proteins. *Biomed. Chromatogr.* **8**: 90-94.
- Schepmoes G., Breen E., Owen T.A., Aronow M.A., Stein G.S., Lian J.B. (1991). Influence of dexamethasone on the vitamin D-mediated regulation of osteocalcin gene expression. *J. Cell Biochem.* **47**: 184-196.
- Schiebler T.H., Peiper U., Schneider Fr. (1986). *Histologie*. 2. Auflage, S. 169-195, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo.
- Schinke T. and Karsenty G. (2002). Transcriptional Control of Osteoblast Differentiation and Function. In: *Principles of Bone Biology* (Bilezikian J.P., Raisz L.G., Rodan G.A., eds) S. 83-91, Academic Press, San Diego.

Schulz-Knappe P., Raida M., Meyer M., Quellhorst E.A., Forssmann W.G. (1996). Systematic isolation of circulating human peptides: the concept of peptide trapping. *Eur. J. Med. Res.* **1**: 223-236.

Schulz-Knappe P., Schrader M., Standker L., Richter R., Hess R., Jurgens M., Forssmann W.G. (1997). Peptide bank generated by large-scale preparation of circulating human peptides. *J. Chromatogr. A* **776**: 125-132.

Seibel M.J., Eastell R., Gundberg C.M., Hannon R., Pols H.A.P. (2002). Biochemical Markers of Bone Metabolism. In: *Principles of Bone Biology* (Bilezikian J.P., Raisz L.G., Rodan G.A., eds) S. 1543-1571, Academic Press, San Diego.

Seiler P., Standker L., Mark S., Hahn W., Forssmann W.G., Meyer M. (1999). Application of a peptide bank from porcine brain in isolation of regulatory peptides. *J. Chromatogr. A* **852**: 273-283.

Selvamurugan N., Pulumati M.R., Tyson D.R., Partridge N.C. (2000). Parathyroid hormone regulation of the rat collagenase-3 promoter by protein kinase A-dependent transactivation of core binding factor alpha1. *J. Biol. Chem.* **275**: 5037-5042.

Singer F.R. and Roodman G.D. (2002). Paget's Disease of Bone. In: *Principles of Bone Biology* (Bilezikian J.P., Raisz L.G., Rodan G.A., eds) S. 1249-1258, Academic Press, San Diego.

Sneddon W.B., Bogado C.E., Kiernan M.S., Demay M.B. (1997). DNA sequences downstream from the vitamin D response element of the rat osteocalcin gene are required for ligand-dependent transactivation. *Mol. Endocrinol.* **11**: 210-217.

Sone T., Kerner S., Pike J.W. (1991). Vitamin D receptor interaction with specific DNA. Association as a 1,25-dihydroxyvitamin D₃-modulated heterodimer. *J. Biol. Chem.* **266**: 23296-23305.

Sowa H., Kaji H., Hendy G.N., Canaff L., Komori T., Sugimoto T., Chihara K. (2004). Menin is required for bone morphogenetic protein 2- and transforming growth factor beta-regulated osteoblastic differentiation through interaction with Smads and Runx2. *J. Biol. Chem.* **279**: 40267-40275.

Spieß Y.H., Price P.A., Deftos J.L., Manolagas S.C. (1986). Phenotype-associated changes in the effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on alkaline phosphatase and bone GLA-protein of rat osteoblastic cells. *Endocrinology* **118**: 1340-1346.

Spinella-Jaegle S., Roman-Roman S., Faucheu C., Dunn F.W., Kawai S., Gallea S., Stiot V., Blanchet A.M., Courtois B., Baron R., Rawadi G. (2001). Opposite effects of bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor-beta1 on osteoblast differentiation. *Bone* **29**: 323-330.

Stein G.S., Lian J.B., Montecino M., van Wijnen A.J., Stein J.L., Javed A., Zaidi K. (2002). Involvement of Nuclear Architecture in Regulating Gene Expression in Bone Cells. In: *Principles of Bone Biology* (Bilezikian J.P., Raisz L.G., Rodan G.A., eds) S. 169-188, Academic Press, San Diego.

Stein G.S., van Wijnen A.J., Stein J.L., Lian J.B. (1998). Nuclear structure--skeletal gene expression interrelationships. *Front Biosci.* **3**: d849-d864.

- Stenbeck G. and Horton M.A. (2000). A new specialized cell-matrix interaction in actively resorbing osteoclasts. *J. Cell Sci.* **113 (Pt 9)**: 1577-1587.
- Stephan, S. (2004). Charakterisierung von antiosteoporotischen Aktivitäten und Faktoren im Tiermodell der ovariectomierten beziehungsweise gastrektomierten Ratte als Osteoporose-Modell. Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover.
- Stryer L. (1994). *Biochemie*. 2. korr. Nachdruck 1994 der völlig Neubearb. Aufl. 1990, S. 735-784, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford.
- Subramaniam M., Jalal S.M., Rickard D.J., Harris S.A., Bolander M.E., Spelsberg T.C. (2002). Further characterization of human fetal osteoblastic hFOB 1.19 and hFOB/ER alpha cells: bone formation in vivo and karyotype analysis using multicolor fluorescent in situ hybridization. *J. Cell Biochem.* **87**: 9-15.
- Subramaniam N., Leong G.M., Cock T.A., Flanagan J.L., Fong C., Eisman J.A., Kouzmenko A.P. (2001). Cross-talk between 1,25-dihydroxyvitamin D3 and transforming growth factor-beta signaling requires binding of VDR and Smad3 proteins to their cognate DNA recognition elements. *J. Biol. Chem.* **276**: 15741-15746.
- Takahashi N., Udagawa N., Takami M., Suda T. (2002). Cells of Bone. In: *Principles of Bone Biology* (Bilezikian J.P., Raisz L.G., Rodan G.A., eds) S. 109-126, Academic Press, San Diego.
- Tenenbaum H.C. and Heersche J.N. (1985). Dexamethasone stimulates osteogenesis in chick periosteum in vitro. *Endocrinology* **117**: 2211-2217.
- Thompson P.D., Jurutka P.W., Haussler C.A., Whitfield G.K., Haussler M.R. (1998). Heterodimeric DNA binding by the vitamin D receptor and retinoid X receptors is enhanced by 1,25-dihydroxyvitamin D3 and inhibited by 9-cis-retinoic acid. Evidence for allosteric receptor interactions. *J. Biol. Chem.* **273**: 8483-8491.
- Tjian R. (1995). Molecular machines that control genes. *Sci. Am.* **272**: 54-61.
- Tou L., Quibria N., Alexander J.M. (2001). Regulation of human cbfa1 gene transcription in osteoblasts by selective estrogen receptor modulators (SERMs). *Mol. Cell Endocrinol.* **183**: 71-79.
- Tovey F.I., Hall M.L., Ell P.J., Hobsley M. (1991). Postgastrectomy osteoporosis. *Br. J. Surg.* **78**: 1335-1337.
- van den Bemd G.J., Pols H.A., Birkenhager J.C., Kleinkoort W.M., van Leeuwen J.P. (1995). Differential effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3-analogs on osteoblast-like cells and on in vitro bone resorption. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **55**: 337-346.
- Viereck V., Siggelkow H., Tauber S., Raddatz D., Schutze N., Hufner M. (2002). Differential regulation of Cbfa1/Runx2 and osteocalcin gene expression by vitamin-D3, dexamethasone, and local growth factors in primary human osteoblasts. *J. Cell Biochem.* **86**: 348-356.
- Williams G.R., Bland R., Sheppard M.C. (1994). Characterization of thyroid hormone (T3) receptors in three osteosarcoma cell lines of distinct osteoblast phenotype: interactions among T3, vitamin D3, and retinoid signaling. *Endocrinology* **135**: 2375-2385.

- Williams T.M., Burlein J.E., Ogden S., Kricka L.J., Kant J.A. (1989). Advantages of firefly luciferase as a reporter gene: application to the interleukin-2 gene promoter. *Anal. Biochem.* **176**: 28-32.
- Yamaguchi A., Katagiri T., Ikeda T., Wozney J.M., Rosen V., Wang E.A., Kahn A.J., Suda T., Yoshiki S. (1991). Recombinant human bone morphogenetic protein-2 stimulates osteoblastic maturation and inhibits myogenic differentiation in vitro. *J. Cell Biol.* **113**: 681-687.
- Yamaguchi A., Komori T., Suda T. (2000). Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs, and Cbfa1. *Endocr. Rev.* **21**: 393-411.
- Yamazaki K. and Eyden B.P. (1995). A study of intercellular relationships between trabecular bone and marrow stromal cells in the murine femoral metaphysis. *Anat. Embryol. (Berl)* **192**: 9-20.
- Yang X., Matsuda K., Bialek P., Jacquot S., Masuoka H.C., Schinke T., Li L., Brancorsini S., Sassone-Corsi P., Townes T.M., Hanauer A., Karsenty G. (2004). ATF4 is a substrate of RSK2 and an essential regulator of osteoblast biology; implication for Coffin-Lowry Syndrome. *Cell* **117**: 387-398.
- Yeh J.K., Evans J.F., Chen M.M., Aloia J.F. (1999). Effect of hypophysectomy on the proliferation and differentiation of rat bone marrow stromal cells. *Am. J. Physiol* **276**: E34-E42.
- Yeung F., Law W.K., Yeh C.H., Westendorf J.J., Zhang Y., Wang R., Kao C., Chung L.W. (2002). Regulation of human osteocalcin promoter in hormone-independent human prostate cancer cells. *J. Biol. Chem.* **277**: 2468-2476.
- Yoder M.C. and Williams D.A. (1995). Matrix molecule interactions with hematopoietic stem cells. *Exp. Hematol.* **23**: 961-967.
- Yoon K.G., Rutledge S.J., Buenaga R.F., Rodan G.A. (1988). Characterization of the rat osteocalcin gene: stimulation of promoter activity by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Biochemistry* **27**: 8521-8526.
- Yu X.P. and Chandrasekhar S. (1997). Parathyroid hormone (PTH 1-34) regulation of rat osteocalcin gene transcription. *Endocrinology* **138**: 3085-3092.
- Zambotti A., Makhlef H., Shen J., Ducy P. (2002). Characterization of an osteoblast-specific enhancer element in the CBFA1 gene. *J. Biol. Chem.* **277**: 41497-41506.
- Zhang R., Ducy P., Karsenty G. (1997). 1,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits Osteocalcin expression in mouse through an indirect mechanism. *J. Biol. Chem.* **272**: 110-116.
- Zittel T.T., Zeeb B., Maier G.W., Kaiser G.W., Zwirner M., Liebich H., Starlinger M., Becker H.D. (1997). High prevalence of bone disorders after gastrectomy. *Am. J. Surg.* **174**: 431-438.
- Zucht H.D., Raida M., Adermann K., Magert H.J., Forssmann W.G. (1995). Casocidin-I: a casein-alpha s2 derived peptide exhibits antibacterial activity. *FEBS Lett.* **372**: 185-188.

7. Anhang

7.1. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
A	Absorption
Å	Angström
Abb.	Abbildung
ACN	Acetonitril
anorg.	anorganisch
AP	Alkalische Phosphatase
AS	Aminosäure/n
ATCC	American Type Culture Collection
bidest.	bidestilliert
Bis-Tris	Bis(2-hydroxyethyl)imino-tris(hydroxymethyl)-methan
BLC	"bone lining cell"
BMP	"bone morphogenetic protein"
BMU	"basic multicellular unit", Umbaueinheit beim "bone remodeling"
Bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
cDNA	"complementary DNA", komplementäre DNA, die bei der reversen Transkription von RNA entsteht
CEC	"cation exchange chromatography", Kationenaustauschchromatographie
CHC	"α-cyano-4-hydroxy cinnamic acid ", α-Cyano-4-hydroxizimtsäure
CMV	Cytomegalievirus
CZE	"capillary zone electrophoresis", Kapillarzonenelektrophorese
Da	Dalton
Dexa	Dexamethason
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	"deoxyribonucleic acid", Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
dsDNA	"double-stranded DNA", doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
EC ₅₀	halbmaximale effektive Konzentration
EDTA	"ethylenediaminetetraacetic acid", Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	et altera
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FCS	fetal calf serum, fötales Kälberserum
Fr.	Fraktion
g	Gramm
Gla	"γ-carboxyglutamic acid"; γ-Carboxyglutaminsäure
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
h	Stunde/n
H ₃ PO ₄	Phosphorsäure
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
HCl	Salzsäure
HF	Hämofiltrat
HFäq	Hämofiltratäquivalent
HPLC	"high performance liquid chromatography", Hochleistungsflüssigchromatographie
HPMC	Hydroxypropylmethylcellulose
IPF	Institut für Peptid-Forschung
K	Kontrolle
kBp	Kilobasenpaare

kDa	Kilodalton (siehe auch Da)
kg	Kilogramm
l	Liter
LB	Luria-Bertani
M	Molar
m/z	Masse pro Ladung
MALDI-TOF	"Matrix-assisted laser desorption/ionisation-time of flight"
MCS	Multiple Cloning Site
MeOH	Methanol
min	Minute/n
ml	Milliliter
mM	Millimolar
Mw	"molecular weight", Molekulargewicht
n. b.	nicht bestimmt
NCBI	National Center for Biotechnology Information
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
OB	Osteoblast/en
OC	Osteocalcin
OD	Optische Dichte
OK	Osteoklast/en
org.	organisch
OZ	Osteozyt/en
PBS	"phosphate buffered saline", phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	"polymerase chain reaction", Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
pH	pH-Wert
rh	"recombinant human", rekombinant human
RNA	"ribonucleic acid", Ribonukleinsäure
RP	"reversed phase", Umkehrphase
RPC	"reversed phase chromatography ", Umkehrphasenchromatographie
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SDS	"sodiumdodecylsulfate", Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunden
SEC	"Size Exclusion Chromatography", Größenausschlußchromatographie
SM	Schweinemagen
SMäq	Schweinemagenäquivalent
ssRNA	"single-stranded RNA", einzelsträngige RNA
ST	Molekulargewichtsstandard
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TFA	"trifluoroacetic acid", Trifluoressigsäure
TGF-β	"transforming growth factor beta"
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Units (definierte Einheiten)
u. a.	unter anderem
üN	über Nacht
UPM	Umdrehungen pro Minute
VDR	Vitamin D Rezeptor
VDRE	"vitamin D responsive element"
VE-Wasser	voll entsalztes Wasser
vgl.	vergleiche
Vit. D ₃	1α,25-Dihydroxyvitamin D ₃
× g	Erdbeschleunigung
z. B.	zum Beispiel

Zur Abkürzung von Nukleotiden wurde die Einbuchstaben-Nomenklatur verwendet.

7.2. DNA-Sequenz des klonierten Promotorfragments "cbfa-prom"

```

      10      20      30      40      50      60      70
Cbfa1 2F-2R  GAGATACAGA TAATATGGAT ACGACTTATT TATAAAAGAG AAAAAATAAT TTTTCTCTCC TTCACATGAA
Klon cbfa8-s2F2R  .....

      80      90      100     110     120     130     140
Cbfa1 2F-2R  TAACTGCATG TTAAATGAAC GCTTTTACCT TTCAATGTAA AATCTGTTTA CACATACAAT AAGGCATGAT
Klon cbfa8-s2F2R  .....

      150     160     170     180     190     200     210
Cbfa1 2F-2R  AAATCCATAG TTAAATAAAA ACACCAAAAT GTATTCTGGG TTTTTTATCA CTAAAAGTTT ATTCTGAAAA
Klon cbfa8-s2F2R  .....

      220     230     240     250     260     270     280
Cbfa1 2F-2R  GGTTCGGAC  ATTTGAAAAA TAAAGGACTA GAATCATTC  CATAACCTAC CAGTGTATTT TGGGAAAAATC
Klon cbfa8-s2F2R  .....

      290     300     310     320     330     340     350
Cbfa1 2F-2R  AAATTTCTG  TAAAGAAACT TATGAACATA TTTGTACAGT TATTGTGATC TAATATGAAC CAAAAGCAGA
Klon cbfa8-s2F2R  .....

      360     370     380     390     400     410     420
Cbfa1 2F-2R  TAATGAATAG CACTAGGAAG AACACAGGGA TATTTAGTT  CTAACACCTC CCTGTCTCCC TAGCCCTTAC
Klon cbfa8-s2F2R  .....

      430     440     450     460     470     480     490
Cbfa1 2F-2R  CTCCTGCAC  ATTCCAAATA ATCTTTTGTA ATTCACTGTC TCCGCCACCC CCATTTACTT TATGCCACTC
Klon cbfa8-s2F2R  .....

      500     510     520     530     540     550     560
Cbfa1 2F-2R  CTAGTTACTG TCACACTAGG AAGAAGTCTA ACATGCAGAT TTAGAGTGGC ATGGATAAAT GGCAAAAAAA
Klon cbfa8-s2F2R  .....

      570     580     590     600     610     620     630
Cbfa1 2F-2R  TGCCTAGAAA ATTGGTCTGT TCGCCTTTAT AATTTGGTT  GAAAAATACT CCATCGCTCC CAACTGATGA
Klon cbfa8-s2F2R  .....

      640     650     660     670     680     690     700
Cbfa1 2F-2R  AAACAGGAAG CTCTATTCAT AAATATAAAA TTCACTGCCT ATGATATATA ATCATCTCAA TAAGAAAAATG
Klon cbfa8-s2F2R  .....

      710     720     730     740     750     760     770
Cbfa1 2F-2R  AGTTCTATAC ATACTTGTCC AAAGGGGCAA AAAAGGAGAT AGTTTCCCAA AGATGTTTCC AATTTTCTTC
Klon cbfa8-s2F2R  .....

      780     790     800     810     820     830     840
Cbfa1 2F-2R  TGAATCAGAA TTAGCAAATC GAGACGACTA ACATACTCTG TCTGTGGGCA TTATTCCTTA CTACACACAG
Klon cbfa8-s2F2R  .....

      850     860     870     880     890     900     910
Cbfa1 2F-2R  CATTTTGTA  TTTATTTCAA AGCTTCCATT AGAAACAAAA AAATACATAG CTCTGTGTTA CCCACTCTAT
Klon cbfa8-s2F2R  .....

      920     930     940     950     960     970     980
Cbfa1 2F-2R  TCTAAGCTCA TAGAATCAAA TACTGAACAA TCTACATTAT AACATAAGCA TTTTACTTTA TAGAAGATCT
Klon cbfa8-s2F2R  .....

      990    1000    1010    1020    1030    1040    1050
Cbfa1 2F-2R  GCTATCAGAA ACTCTATTA  TGTCTAACT  ACTTAAAGAA CTATATAAAC TGAATACACT TCAATGAAAG
Klon cbfa8-s2F2R  .....

      1060   1070   1080   1090   1100   1110   1120
Cbfa1 2F-2R  ACAAAAAAAT ATTACAATCA TAAAGAAAA  TAAGATTGAT CCAATAAACT ATATTACAAT CCCTGTCACT
Klon cbfa8-s2F2R  .....T.

      1130   1140   1150   1160   1170   1180   1190
Cbfa1 2F-2R  CATTTTTTTA AGATCTTCAA ACTAGGCATG AGATAATGGT ATACATGGAA CATTACACTT AATCTTTATT
Klon cbfa8-s2F2R  .....A.....T.....

```

Cbfa1 2F-2R	GTAAAGGCCG	CCATCTAATA	GATTGATAAT	AAACTAGACA	GACGTGATT	AAAATTTGTA	AAAGAATGCC
Klon cbfa8-s2F2R
Cbfa1 2F-2R	CAGACTAACA	CTTTCATGAC	AGCCAATTAT	AGTCAAGCCT	AGCAAGCAGT	TTGCAACCAG	ACCTTAAGGT
Klon cbfa8-s2F2R
Cbfa1 2F-2R	AAACTTTTTT	TTTTT-ACA	ATGAGTTACA	GATTCACAAG	TTAAGAAGA	CAAGAAAAAG	GAAAACAGAA
Klon cbfa8-s2F2R	TT.....
Cbfa1 2F-2R	GGAATCCAGC	CACCCAGCAA	ATATGAAGCA	GACCCAGAA	TGTGATACAG	TCCAAAGATG	TGAATTATTG
Klon cbfa8-s2F2R
Cbfa1 2F-2R	TATATCATCA	CTGTTGTTCA	GAATTTTACA	CAGACTCTTG	AGCCAATTTT	GTTTCAATTTT	CCACAGACAC
Klon cbfa8-s2F2R
Cbfa1 2F-2R	AATAATGAAC	TAAAAAGAGG	AGGCAAAAAG	GCAGAGGTTG	AGCGGGGAGT	AGAAAAGGAA	GCCCTTAAGT
Klon cbfa8-s2F2R
Cbfa1 2F-2R	GCAGAGCTCT	GCTCTACAAA	TGCTTAACCT	TACAGGAGTT	TGGGCTCCTT	CAGCGTTTGT	ATTCTATCCA
Klon cbfa8-s2F2R	A.....
Cbfa1 2F-2R	AATCCTCATG	AGTCGCAAAA	ATTAAAATGC	TATATCCTTC	TGGATGCCAG	GAAAGGCCTT	ACCACAAGCC
Klon cbfa8-s2F2R	A.....	A.....
Cbfa1 2F-2R	TTTTGTGAGA	GAAAGAGAGA	GAGAGAAAAG	GCAAGGGGGA	AAAGCCACAG	TGGTAGGCAG	TCCCACITTA
Klon cbfa8-s2F2R
Cbfa1 2F-2R	CTTAAGAGTA	CTGTGAGGTC	ACAAACCACA	TGATTCTGCC	TCTCCAGTAA	TAGTGCTTGC	AAAAAAAAAGG
Klon cbfa8-s2F2R
Cbfa1 2F-2R	AGTTTTAAAG	CTTTTGCTTT	TTTGGATTGT	GTGAATGCTT	CATTGCGCTC	ACAAACAACC	ACAGAACCAC
Klon cbfa8-s2F2R
Cbfa1 2F-2R	AAGTGCGGTG	CAAACCTTCT	CCAGGAGGAC	AGCAAGAAGT	CTCTGGTTTT	TAAATGGTTA	ATCTCCGCAG
Klon cbfa8-s2F2R
Cbfa1 2F-2R	GTCACTACCA	GCCACCGAGA	CCAACAGAGT	CAGTGAGTGC	TCTCTAACCA	CAGTCTATGC	AGTAATAGTA
Klon cbfa8-s2F2R
Cbfa1 2F-2R	GGTCCTTCAA	ATATTTGCTC	ATTCTCTTTT	TGTTTGTGTT	CTTTGCTTTT	CACATGTTAC	CAGCTACATA
Klon cbfa8-s2F2R
Cbfa1 2F-2R	ATTTCTTGAC	AGAAAAAAAT	AAATATAAAG	TCTATGTACT	CCAGGCATAC	TGTAAAACTA	AAACAAGGTT
Klon cbfa8-s2F2R
Cbfa1 2F-2R	TGGGTATGGT	TTGTATTTTC	AGTTTAAGGC	TGCAAGCAGT	ATTTACAACA	GAGGGTACAA	GTTCTATCTG
Klon cbfa8-s2F2R
Cbfa1 2F-2R	AA						
Klon cbfa8-s2F2R	..						

Anhang 7.2: Dargestellt ist die unter Verwendung der Primer cbfa-2F und cbfa-2R erwartete DNA-Sequenz des Promotorfragments "cbfa-prom" (Cbfa1 2F-2R) und die Nukleotidfolge, die durch Sequenzierung der Plasmid-DNA des Klons "cbfa8-s2F-2R" erhalten wurde. Nukleotide, die in beiden Sequenzen identisch waren, wurden in der unteren Sequenz durch Punkte dargestellt. Die Position des putativen VDRE, der OSE2- und der AP1-Bindestellen sind gekennzeichnet (Tou *et al.*, 2001; Drissi *et al.*, 2002).

7.3. DNA-Sequenz des klonierten Promotorfragments "osteo-prom"

```

.....10.....20.....30.....40.....50.....60.....70.....80
TGGCTCCAGT CAAGGCTTCA GTCGTGGTCC TCTGGGAGCA TCCAGGCTGG GGTGGTTTGG CAAGGGGCTT ACTAGACCAT

.....90.....100.....110.....120.....130.....140.....150.....160
CATGTGCAGA GAGCAGCAGA GCCCCTTGT CAAAAACCAG GACCCCTGGG TTCCCTGTGG ATAGGATGAG CTGCCAAGGA

.....170.....180.....190.....200.....210.....220.....230.....240
GATGTCACCT TTGGCACCTT CCAAGAATCA TTACGGCCGG GTGCAGTGGC TCATGCTTGA AATCCAGCA CTTTGGGAGG

.....250.....260.....270.....280.....290.....300.....310.....320
CCGAGGCGGG TGAATCACCT GAGGTCAGGA GTTCGAGACC AGCCTGGCCA ACATGGTGAA ATCCTGTCTC TACTAAAAAT

.....330.....340.....350.....360.....370.....380.....390.....400
ACAAAATTAG CCAGGCATGG TGGCATGTGC CTGTAATCCC AGCTACTCGG GAGGCTGAGG CAGGAGAATC ACTTGAACCC

.....410.....420.....430.....440.....450.....460.....470.....480
GGGAGGCGGA GGTTGCAGTC AGCCAAGATT GCGCCACTGT ACTCCAGCCT GGGCAACAAG AGTGAAACTC CATCTCAAAA

.....490.....500.....510.....520.....530.....540.....550.....560
AAAAATACAG AATTAGCCAG GCATGGTGGC GTGTGCCTGT AGTCCCAGCT ACTCAAGAGG CTGAGGCAGG AGAATCACTT

.....570.....580.....590.....600.....610.....620.....630.....640
GAACCTGGGA GGCAGAGGTT GCAGTGAGCC GAGATCGCAC CATTGCACTC CTGCCTGGC GACAGAGCGA GACTCCGTCT

.....650.....660.....670.....680.....690.....700.....710.....720
CAAAAAAAAA GAACCGCGAG CACTTTGTTT CTCTTGCTTC TTCCACTTCA CTCTTCTTCA GCCAGGGCAG CCAAAGGCAG

.....730.....740.....750.....760.....770.....780.....790.....800
GATGGGTGCT TCCCGGATCC ACCAGAGGGG GAAAGGGGTT GGGCGTGTAT GGGGGCAGAA CTTTTCCCTA GTGAGAGCCT

.....810.....820.....830.....840.....850.....860.....870.....880
TGGTGAGGTC TGCTGGAGGC ACACTGGGGA CACAGGCAAG CATCAGGTGG TCCCAACTTC CCACCCCCCT CCCATAAACG

.....890.....900.....910.....920.....930.....940.....950.....960
GCCTTGGCT CAGTCTCCCT CTGCCACCT TGTCAACATG GAGCTGTGGC ATTCAAGCAT CCAAATGCC TGTCTCTGTC

.....970.....980.....990.....1000.....1010.....1020.....1030.....1040
AGGCTTGCC CGTCGGGTGC TTTGTTTACT TGTCAAGTTG GGCAGATGGT CTCAAGCCCT GGTTGGTGGG TGGGTGAGTG

.....1050.....1060.....1070.....1080.....1090.....1100.....1110.....1120
AGGAGACAGG TTAGACAGGG GAAGGTCCA GGACATGTCT TCCCTCTCTG GGCTGACCTG AGGCAGTGA GGCTCTCAGG

.....1130.....1140.....1150.....1160.....1170.....1180.....1190.....1200
TGTGGGATGG GGTTTTCAGG CTGGGATGTT CTGTACCGTA GAGGATAGGC CTTCTTATTA CTTATCGGAG CACTACGGGA

.....1210.....1220.....1230.....1240.....1250.....1260.....1270.....1280
GGGAGGTCC CTCCCAGGG TGTTTAACAC TGGAGGCTGC AGGGTCAGGA GGAGAATCGT GGGGCCAGGA GGGCAGAGGC

.....1290.....1300.....1310.....1320.....1330.....1340.....1350.....1360
ACACTCCATC TTCGTGCTCC TCACAGGCC TGCCTCCCTG CCTGCTAAGG ACACAGGAA GGGGTCCCC ACCTCAGTGC

.....1370.....1380.....1390.....1400.....1410.....1420.....1430.....1440
CTGCCTCCCT TCCCTGTGCC TGTGTACCTG GCAGTCACAG CCACCTGGCG TGTCCAGAA ACCAACGGCG TGACCTCATC

.....1450.....1460.....1470.....1480.....1490.....1500.....1510.....1520
TCCTGCCCGG CCCACCTCC ATTGGCTTTG GCTTTTGGCG TTTGTGCTGC CCGACCCTTT CTCCTGTCCG GATGCGCAGG

.....1530.....1540.....1550.....1560.....1570.....1580.....1590.....1600
GCAGGGCCTG AGCCGTGAG CTGCACCCAC AGCAGGCTGC CTTTGTGAC TCACCGGTTG AACGGGGCA TTGCGAGGCA

.....1610.....1620.....1630.....1640.....1650.....1660.....1670.....1680
TCCCTCCCTT GGGTTTGGCT CCTGCCACG GGGCTGACAG TAGAAATCAC AGGCTGTGAG ACAGCTGGAG CCCAGCTCTG

.....1690.....1700.....1710.....1720.....1730.....1740.....1750.....1760
CTTGAACCTA TTTTAGGTCT CTGATCCCCG CTTCTCTTT AGACTCCCCT AGAGCTCAGC CAGTGCTCAA CCTGAGGCTG

```

AP1

VDRE

```
.....1770.....1780.....1790.....1800.....1810.....1820.....1830.....1840
GGGGTCTCTG AGGAAGAGTG AGTTGGAGCT GAGGGGTCTG GGGCTGTCCC CTGAGAGAGG GGCCAGAGGC AGTGTCAAGA
.....1850.....1860.....1870.....1880.....1890.....1900.....1910.....1920
GCCGGGCAGT CTGATTGTGG CTCACCCTCC ATCACTCCCA GGGGCCCTG GCCCAGCAGC CGCAGCTCCC AACCACAATA
.....1930.....1940.....1950.....1960.....1970.....1980.....1990.....2000
TCCTTTGGGG TTTGGCCTAC GGAGCTGGGG CGGATGACCC CCAAATAGCC CTGGCAGATT CCCCTAGAC CCGCCCGCAC
.....2010.....2020.....2030.....2040.....2050.....2060.....2070.....2080
CATGGTCAGG CATGCCCTC CTCATCGCTG GGCACAGCCC AGAGGGTATA AACAGTGCTG GAGGCTGGCG GGCAGGCCA
.....2090.....2100.....2110.....2120.....2130.....
GCTGAGTCCT GAGCAGCAGC CCAGCGCAGC CACCGAGACA CCATGAGAGC CCTCACA
                OSE1
                OSE2
```

Anhang 7.3: Die erwartete DNA-Sequenz des Promotorfragments "osteo-prom" und die durch Sequenzierung der Plasmid-DNA des Klons "Osteo3-s1F2R " nachgewiesene Nukleotidfolge stimmten überein. Die Positionen des VDRE und der regulatorischen Elemente OSE1 und OSE2 sind gekennzeichnet (Ozono *et al.*, 1990; Yeung *et al.*, 2002).

Danksagung

Die Durchführung der vorliegenden Arbeit erfolgte bei der IPF PharmaCeuticals GmbH in Hannover. Ich danke dem wissenschaftlichen Direktor des Institutes, Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. Wolf-Georg Forssmann herzlich für die Überlassung des Themas und für die sehr guten Arbeitsbedingungen.

Ganz besonders möchte ich Herrn PD Dr. Erik Maronde für die kompetente und freundschaftliche Betreuung dieser Arbeit, sowie für die Übernahme des Korreferates danken.

Herrn Prof. Dr. Walter Müller vom Zentrum Biochemie der Medizinischen Hochschule Hannover möchte ich für die Übernahme des Referates danken.

Desweiteren danke ich Herrn Dr. Dirk Motzkus für die zahlreichen Diskussionen und Hilfestellungen zu Beginn der Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Annette Busmann für die konstruktiven Gespräche, die Ideen und die Motivation.

Herrn Rainer Schreeb möchte ich für die freundliche Unterstützung bei der Durchführung der molekularbiologischen Arbeiten danken.

Bei den Mitarbeitern der Abteilung Analytische Peptidchemie möchte ich mich für die Unterstützung bei den analytischen Untersuchungen bedanken.

Allen Mitarbeitern der IPF PharmaCeuticals GmbH, besonders Herrn Abbas Mahouachi, Herrn Dr. Harald John, Frau Stefanie Schulz, Frau Dr. Susann Baxmann, Herrn Rolf Kopittke, sowie den Mitarbeitern der Abteilungen 4 und 5 danke ich für die stete Diskussionsbereitschaft, die gute Zusammenarbeit und das stets sehr gute Arbeitsklima.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei meiner Frau, meinen Eltern, Frau Barbara Kock und meinen Freunden, die mir während der Erstellung der Arbeit in vielfältiger Weise zur Seite standen.

Publikationsliste

—/—

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides Statt, dass die vorliegende Dissertation von mir selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt wurde. Zu Hilfsleistungen herangezogene Institutionen habe ich vollständig angegeben. Ich versichere ferner, dass die Dissertation nicht schon als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet worden ist.

Jens van de Flierdt

Hannover, im Februar 2006

Lebenslauf

Name: Jens van de Flierdt
Geburtsdatum: 11.02.1973
Geburtsort: Kleve
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: verheiratet, zwei Kinder

Schulbildung und Zivildienst

08/1979 – 07/1983 St. Markus Grundschule, Bedburg-Hau
08/1983 – 06/1992 Freiherr-vom-Stein-Gymnasium, Kleve
Abschluß: Allgemeine Hochschulreife
09/1992 – 11/1993 Zivildienst Rheinische Landeslinik, Bedburg-Hau

Berufserfahrungen

12/1999 – 06/2001 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Botanischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität in München, Arbeitsgruppe Biochemie und Phytopathologie
08/2001 – 09/2004 Wissenschaftlicher Mitarbeiter bei der IPF PharmaCeuticals GmbH in Hannover, Abteilung Funktionsanalyse von Peptiden

Akademische Laufbahn

11/1993 – 07/1999 Studium der Biologie an der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf, Studienschwerpunkte Botanik und Biochemie
Abschluß: Diplom
12/1999 – 06/2001 Promotionsstudium am Botanischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität, München
08/2001 – 09/2005 Promotionsstudium bei der IPF PharmaCeuticals GmbH, Hannover
Abschluß: Promotion