
Aus der Klinik und Poliklinik für
Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Direktor: Prof. Dr. med. J. M. Rueger

**Untersuchung der Genexpression im Verlauf der
terminalen Differenzierung von Osteoblasten**

D i s s e r t a t i o n
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg
vorgelegt von

Djahesh Noor
aus Kabul

Hamburg 2005

Angenommen vom Fachbereich
Medizin der Universität Hamburg am:

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereiches
Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der / die Vorsitzende/r:

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter/in:

A Inhaltsverzeichnis

A Inhaltsverzeichnis.....	I
1 Einleitung.....	1
1.1 Knochenaufbau und Osteoporose	1
1.2 Knochenzellen.....	2
1.2.1 Osteoklasten.....	2
1.2.2 Osteoblasten.....	4
1.2.3 Osteozyten.....	5
1.3 Untersuchung physiologischer Prozesse mit Hilfe der Mausgenetik.....	7
1.4 Aufgabenstellung und Zielsetzung.....	7
2 Material und Methoden.....	9
2.1 Isolierung primärer Osteoblasten	9
2.2 Differenzierung primärer Osteoblastenkulturen	9
2.3 Färbung der mineralisierten Matrix	10
2.4 RNA-Isolation.....	10
2.5 cDNA-Synthese	11
2.6 PCR-Expressionsanalyse	11
2.7 DNA-Agarose-Gelelektrophorese.....	13
2.8 RNA-Agarose-Gelelektrophorese.....	14
2.9 Membrantransfer der aufgetrennten RNA (Northern Blot)	15
2.10 Restriktion und DNA-Isolation aus Agarosegelen.....	16
2.11 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten	16
2.12 Hybridisierung der aufgetrennten RNA mit der radioaktiven Sonde.....	17
2.13 mRNA-Isolation.....	18
2.14 Affymetrix Gen-Chip-Hybridisierung	18
2.15 Isolierung des OF45-Gens aus einer BAC-Bibliothek.....	19
3 Ergebnisse	21
3.1 Differenzierung von Osteoblasten-Primärkulturen.....	21
3.2 mRNA-Isolierung aus nicht-mineralisierten und mineralisierten Kulturen.....	23
3.3 Affymetrix-Expressionsanalyse	25
3.4 Untersuchung der gewebespezifischen Expression von Genen, deren Expression durch Mineralisation maximal induziert wurde	26

3.5 Isolierung des OF45-Gens	32
4 Diskussion	35
4.1 Identifizierung Mineralisierungs-induzierter Gene.....	35
4.2 Untersuchung der gewebespezifischen Expression einiger Gene.....	36
4.3 Nachweis einer physiologischen Funktion von <i>Ptprz</i> und <i>ApoE</i> im Knochenstoffwechsel	37
4.4 Nachweis der knochenspezifischen Expression einiger Gene	39
4.5 Untersuchung der Osteozyten-Funktion <i>in vivo</i>	40
5 Zusammenfassung.....	43
B Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	III
C Literaturverzeichnis.....	IV
D Abkürzungsverzeichnis	IX
E Danksagung.....	IX
F Lebenslauf	IX
G Erklärung	IX

1 Einleitung

1.1 Knochenaufbau und Osteoporose

Knochen ist das wichtigste Stützgewebe der Wirbeltiere und hat außerdem eine Schutzfunktion für lebenswichtige Organe wie z.B. das Gehirn oder das hämatopoetische System, das im adulten Organismus im Knochenmark lokalisiert ist. Das Skelettsystem trägt weiterhin entscheidend zum Mineralhaushalt des Körpers bei, da die mineralisierte Knochenmatrix ein großes Reservoir an Calcium und Phosphat darstellt. Aus diesem Grund unterliegt die Knochensubstanz im adulten Organismus einem permanenten modellierenden Prozess, der dazu führt, dass mineralisiertes Knochengewebe ständig erneuert wird. Dementsprechend befindet sich Knochen in einem empfindlichen Gleichgewicht zwischen Resorption und Synthese. Ist diese Balance gestört, wie z.B. bei der Osteoporose oder der Osteopetrose, kann dies zu statischen Veränderungen führen und sich klinisch manifestieren (Raisz, 1999).

Osteoporose bezeichnen wir als eine systemische Skeletterkrankung, bei der es über eine kritische Verminderung der Knochenmasse und Störung der knöchernen Mikroarchitektur zu einer verminderten Bruchfestigkeit des Knochens kommt. Klinisch tritt uns die Osteoporose in den beiden Manifestationsformen der Wirbelkörperfraktur und der meist durch einen Sturz ausgelösten peripheren Fraktur entgegen (Lin & Lane, 2004). Die Osteoporose ist ein gesellschaftliches und ökonomisch wichtiges Gesundheitsproblem. Eine von drei Frauen und einer von sechs Männern über 50 Jahre tragen das Risiko, im Laufe des weiteren Lebens einen durch Osteoporose bedingten Bruch zu erleiden. In Deutschland leiden bereits 5-7 Millionen Menschen an Osteoporose (www.osteoporose.org). Osteoporotische Frakturen führen nicht nur zu irreversiblen Einbußen an Lebensqualität und Behinderungen, sondern sie verursachen nach konservativen Schätzungen in Deutschland derzeit jährlich auch etwa 2,5-3 Mrd € an direkten und indirekten Kosten. Hochrechnungen zufolge wird das Problem der Fragilitätsfrakturen in den kommenden Jahrzehnten aufgrund der demographischen Entwicklung an Brisanz um ein Vielfaches zunehmen. Das ist einer der Gründe, warum die WHO die Osteoporose auf die Liste der 10 wichtigsten Erkrankungen gesetzt hat.

1.2 Knochenzellen

Der adulte Knochen ist aus drei Zelltypen zusammengesetzt, den knochenresorbierenden Osteoklasten, den knochenbildenden Osteoblasten und den Osteozyten. Im folgenden sollen die wichtigsten Eigenschaften dieser drei Zellen beschrieben sowie der derzeitige Kenntnisstand über deren Regulation dargestellt werden.

1.2.1 Osteoklasten

Die Osteoklasten entstehen aus hämatopoetischen Vorläuferzellen der Monozyten/Makrophagen-Linie (Teitelbaum und Ross, 2003). Morphologisch sind sie als multinukleäre Zellen charakterisiert. Die Osteoklastendifferenzierung wurde in den vergangenen Jahren sehr ausführlich an Mausmodellen untersucht. Man fand heraus, dass eine Kaskade von Signalmolekülen in verschiedenen Differenzierungsstufen der Osteoklastogenese wirken. Auf Cytokinebene wirkt M-CSF sehr früh in der Differenzierung, während die terminale Differenzierung hauptsächlich durch RANKL und dessen Antagonisten OPG reguliert wird (Khosla, 2001). RANKL wird von Osteoblasten und Lymphozyten exprimiert und bindet an seinen Rezeptor RANK. Dieser Rezeptor ist in der Plasmamembran von Osteoklasten lokalisiert und aktiviert intrazellulär einen TRAF6-abhängigen Signaltransduktionsweg. Die Bindung von RANKL an RANK wird durch OPG kompetitiv gehemmt. Das Verhältnis von RANKL und OPG ist somit entscheidend für die Regulation der Knochenresorption. Dies zeigt sich am deutlichsten dadurch, dass RANKL-defiziente Mäuse eine Osteopetrose aufweisen, während OPG-defiziente Mäuse osteoporotisch sind (Bucay et al., 1998; Kong et al., 1999; Lacey et al. 1998; Simonet et al. 1997).

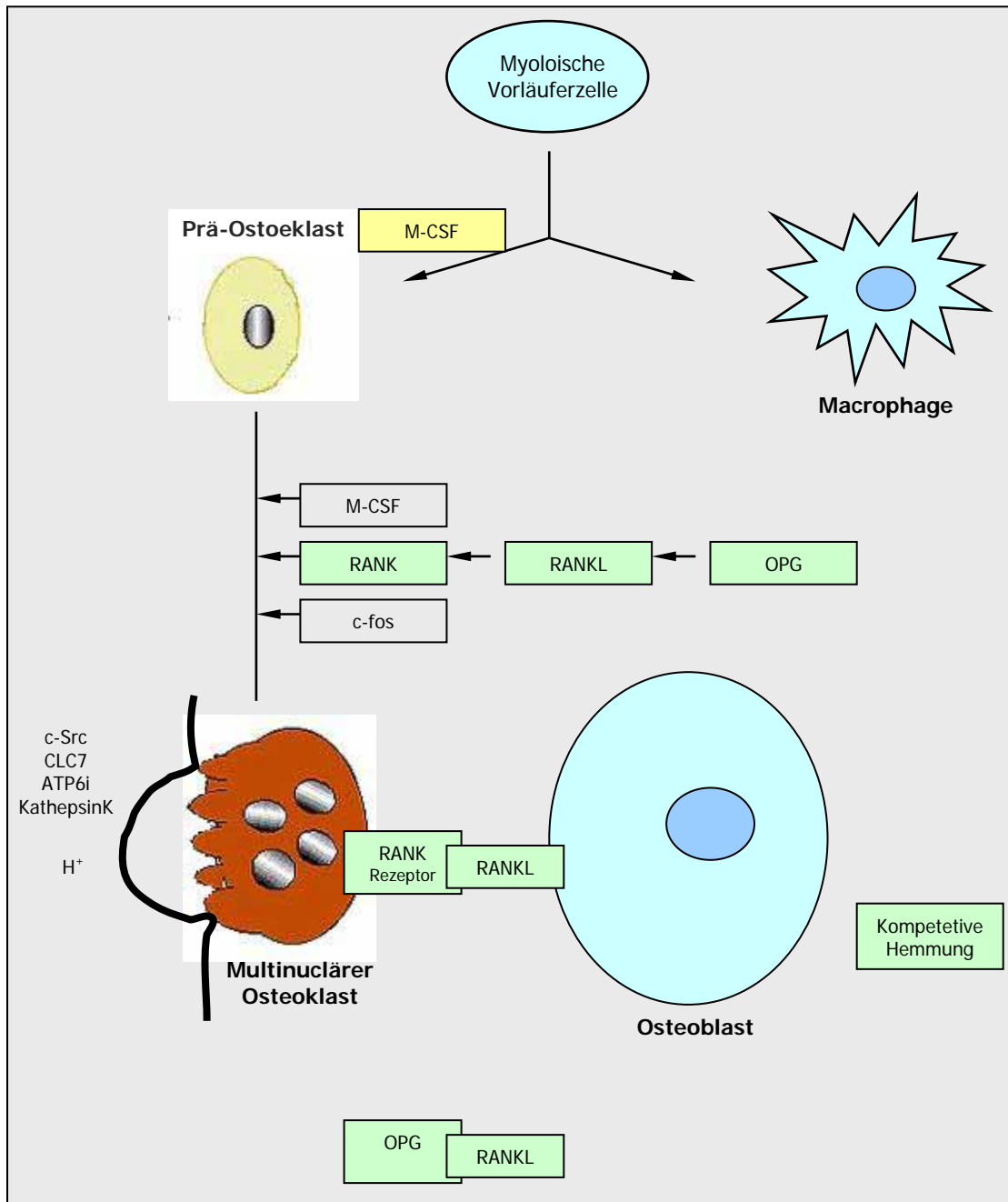


Abbildung 1: Osteoklasten-Differenzierung: Osteoklasten entstehen durch Fusion myeloischer Vorläuferzellen durch die Wirkung von M-CSF und RANKL. OPG führt durch kompetitive Hemmung der RANKL-Bindung an seinen Rezeptor RANK zu einer Inhibition der Osteoklasten-Differenzierung. c-Src, CLC7, ATP6i und Kathepsin K sind im ausdifferenzierten, multinukleären Osteoklasten entscheidend für die Auflösung der Knochenmatrix.

Nachdem die Osteoklasten differenziert sind, können sie die mineralisierte Knochenmatrix unter azidem Milieu (H⁺-Sekretion) abbauen. Dabei versiegelt der Osteoklast die zu resorbierende Zone. Für diese Knochenresorption sind verschiedene Moleküle wichtig. Dies betrifft die Tyrosinkinase c-src, den Chloridkanal CLC7, die

Protonenpumpe ATP6i sowie die Protease Kathepsin K (Kornak et al. 2001; Li et al. 1999; Saftig et al. 1998; Soriano et al. 1991). In allen Fällen führte die Deletion der betreffenden Gene in Mäusen zu einer Osteopetrose, obwohl die Anzahl der differenzierten Osteoklasten unverändert war. Desweiteren führten inaktivierende Mutationen der betreffenden Gene auch im Menschen zur Osteopetrose (Kornak et al. 2001; Motyckova und Fisher, 2002; Taranta et al. 2003).

1.2.2 Osteoblasten

Die Osteoblasten gehen aus mesenchymalen Vorläuferzellen hervor. Voll ausdifferenziert produzieren sie eine kollagenreiche extrazelluläre Matrix (die Kollagenfasern machen 90% der organischen Knochenmatrix aus), die anschliessend mineralisiert (Harada und Rodan, 2003). Weitere wichtige Proteine der Knochenmatrix sind Osteocalcin, Osteopontin und Bone Sialoprotein (BSP), deren Rolle im Mineralisierungsprozess jedoch noch unklar ist. Bisläng sind zwei Transkriptionsfaktoren bekannt, Runx2/Cbfa1 und Osterix (Osx), die für die Differenzierung von Osteoblasten essentiell sind (Ducy et al. 1997; Komori et al. 1997; Mundlos et al. 1997; Nakashima et al. 2002; Otto et al. 1997). Sowohl Runx2/Cbfa1 als auch Osx-defiziente Mäuse sind unfähig, Knochen zu bilden. Während Runx2/Cbfa1 im Verlauf der Osteoblasten-Differenzierung früher als Osx exprimiert wird und zusätzlich eine Funktion bei der Differenzierung hypertropher Chondrozyten ausübt, ist Osx strikt osteoblastenspezifisch exprimiert (Nakashima et al. 2002; Takeda et al. 2001).

Erst vor kurzem wurde ein weiterer wichtiger Regulator der Knochenformation gefunden, Low-density lipoprotein (LDL)-receptor-related Protein (LRP5). Im Falle einer Genmutation manifestiert sich die beim Menschen bekannte Krankheit Osteoporosis-Pseudoglioma (OPPG), während eine aktivierende Mutation zu einer erhöhten Knochendichte führt (Boyden et al. 2002; Gong et al, 2001). LRP5 ist ein Co-Rezeptor von Wnt-Signalmolekülen. Die hierdurch aktivierte Signaltransduktion führt letztendlich zur Förderung der Knochenformation. Diese Ergebnisse zeigten erstmals die Bedeutung der Wnt-Signaltransduktion bei der Osteoblasten-Differenzierung auf (Kato et al. 2002).

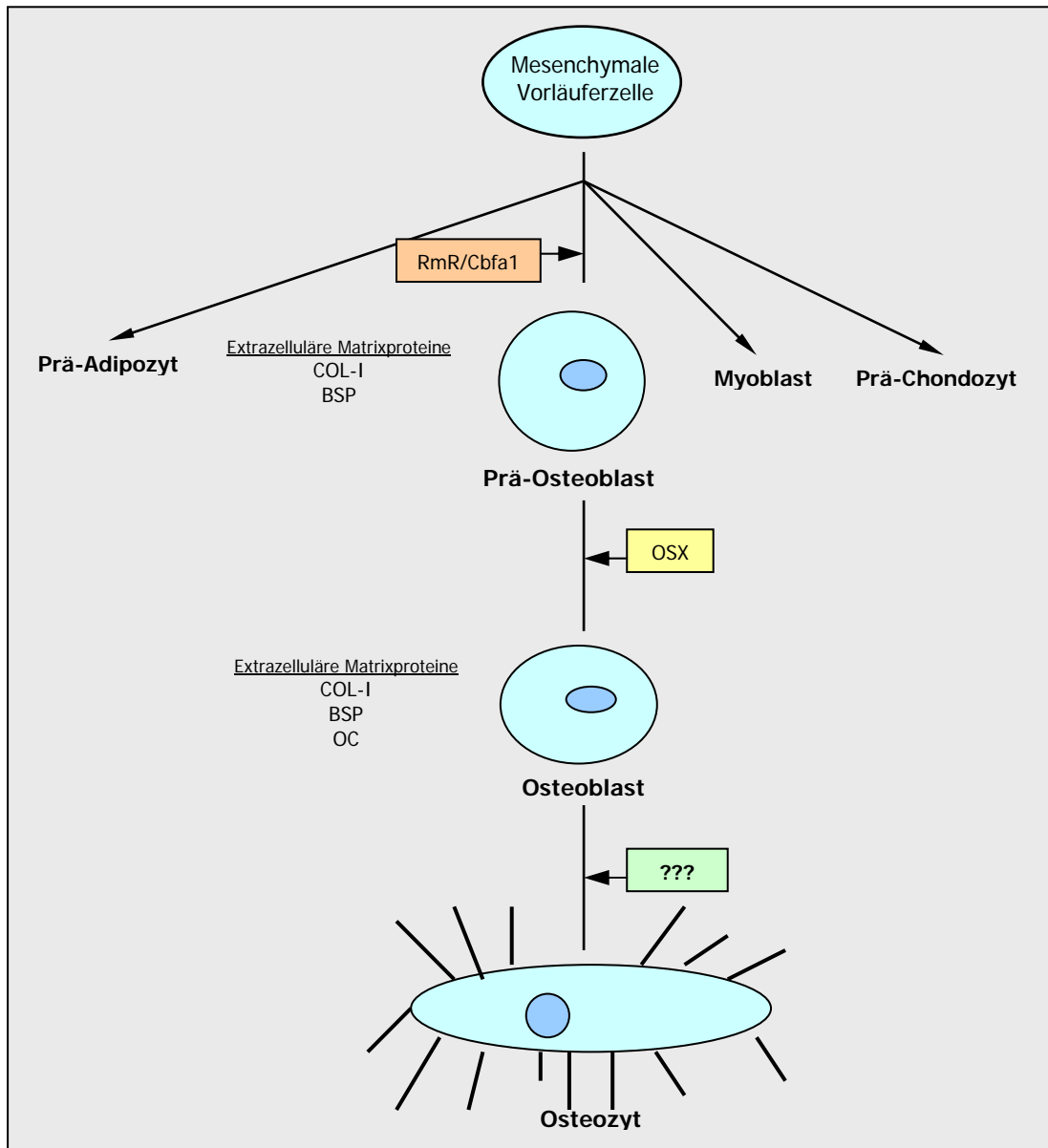


Abbildung 2: Osteoblasten-Differenzierung: Aus mesenchymalen Vorläuferzellen entstehen durch die Wirkung der Transkriptionsfaktoren Runx2/Cbfa1 und Osx, sowie dem Wnt-Rezeptor LRP5 knochenbildende Osteoblasten. Differenzierte Osteoblasten bilden eine extrazelluläre Matrix, bestehend aus Typ-I-Collagen (Col-I), Osteocalcin (OC), Osteopontin (Opn) und Bone sialoprotein (BSP), die anschliessend mineralisiert. Durch einen wenig verstandenen Mechanismus verbleiben einige dieser Zellen in der mineralisierten Matrix und werden zu Osteozyten.

1.2.3 Osteozyten

Der Osteozyt ist der häufigste Zelltyp im adulten Knochen, über seine Funktion ist jedoch wenig bekannt (Knothe-Tate et al. 2004). Osteozyten entsprechen terminal differenzierten Osteoblasten, die komplett von mineralisierter Matrix umgeben sind. Sie

sind morphologisch von ihren Vorläufern, den Osteoblasten, deutlich zu unterscheiden, da sie zahlreiche Fortsätze bilden. Diese verbinden die Osteozyten über gap junctions zu einem Netzwerk. Man vermutet, dass dieses osteozytäre Netzwerk eine entscheidende Rolle bei der Integration des Knochenstoffwechsels spielt. Allerdings konnte eine solche Funktion bislang experimentell nicht bestätigt werden. Dies liegt hauptsächlich daran, dass Osteozyten *in vitro* nur schwer zu untersuchen sind.

In den letzten Jahren ist es einigen Forschungsgruppen gelungen, mit unterschiedlichen Methoden Osteozyten zu isolieren und *in vitro* zu kultivieren (Mikuni-Takagaki et al. 1995; Van der Plas und Nijweide, 1992). Die isolierten Osteozyten verlieren hierbei zunächst ihre Morphologie, erlangen sie jedoch während der Kultivierung auf bestimmten Oberflächen wieder. Unter gewissen Kulturbedingungen bilden sich auch die sogenannten gap junctions zwischen einzelnen Zellen aus, d.h. auch *in vitro* können Osteozyten ein Synzytium bilden. Auch wenn diese Primärkulturen wichtige morphologische Eigenschaften von Osteozyten aufweisen, sollte jedoch immer in Betracht gezogen werden, dass sich diese Zellen *in vitro* in einer völlig anderen Umgebung befinden als *in vivo*. Dies schränkt die Aussagekraft von Zellkultur-experimenten mit Osteozyten stark ein. Gleiches gilt für die bislang einzig etablierte osteozytische Zelllinie MLO-Y4 (Bonewald, 1999). Diese Zelllinie weist zwar einige wichtige Eigenschaften von Osteozyten auf (Zellausläufer und Verbindung über gap junctions, keine Expression von alkalischer Phosphatase bei hoher Expression von Osteocalcin), allerdings sollten Primärkulturen immer dieser Zelllinie vorgezogen werden, weil Osteozyten *in vivo* postmitotisch sind.

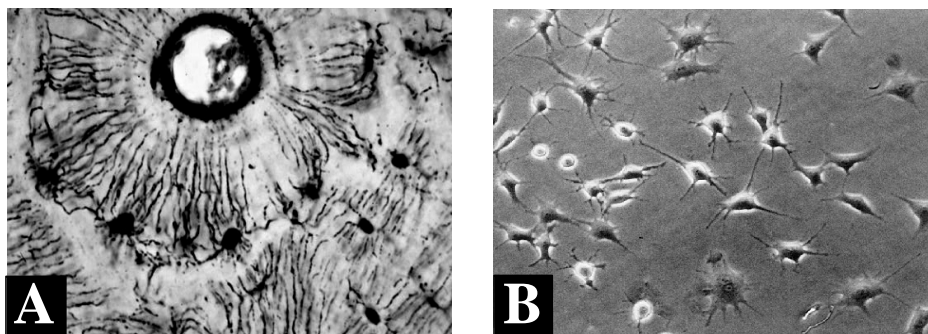


Abbildung 3: Morphologie von Osteozyten: (A) Dargestellt sind Osteozyten *in vivo*, ummauert von Knochenmatrix. Die Zellen sind um einen Haverschen Kanal kreisförmig angeordnet und stehen über Zellausläufer in Kontakt miteinander. (B) Dargestellt ist die osteozytenähnliche Zelllinie MLO-Y4, die *in vitro* Zellausläufer bildet, die miteinander in Verbindung stehen.

1.3 Untersuchung physiologischer Prozesse mit Hilfe der Mausgenetik

Eine Möglichkeit, die Funktion von Osteozyten *in vivo* zu untersuchen, bietet die Mausgenetik. In den letzten Jahren haben genetisch veränderte Mausmodelle entscheidend dazu beigetragen, wichtige entwicklungsbiologische und physiologische Prozesse aufzuklären. Ebenfalls wurden Funktionen von Genen gefunden, die durch Zellkulturexperimente nur schwer zu untersuchen sind. Auch die Knochenforschung hat entscheidend von der Mausgenetik profitiert (Karsenty, 1999). So wurde beispielsweise durch die Überexpression des Moleküls Osteoprotegerin (OPG), ähnlich dem TNF-Rezeptor, ein wichtiger Regulator der Knochenresorption gefunden (Simonet et al. 1997). Durch eine gezielte Gendelektion wurde die entscheidende Rolle des Transkriptionsfaktors Runx2/Cbfa1 für die Knochenbildung dargestellt (Komori et al., 1997; Otto et al. 1997), und durch die Analyse Leptin-defizienter ob/ob-Mäuse das Konzept etabliert, dass die Knochenmasse einer zentralen Regulation durch den Hypothalamus unterliegt (Ducy et al. 2000).

Die Vorteile der Mausgenetik liegen einerseits darin, dass man jedes beliebige Gen gezielt aus dem Genom entfernen kann, andererseits aber auch in Zellen überexprimieren oder ektopisch exprimieren kann. Hierzu benötigt man zelltypspezifische Promotoren, unter deren Kontrolle man das zu untersuchende Gen stellt. Zelltypspezifische Promotoren können allerdings auch eingesetzt werden, um unter Zuhilfenahme des sogenannten Cre-lox-Systems definierte Gene in bestimmten Zellen zu deletieren, aber in anderen Geweben intakt zu lassen (Sauer, 1998). Hierzu werden zunächst Mäuse generiert, in denen das betreffende Gen von loxP-sites flankiert ist, die als Erkennungsstellen für das Rekombinationsenzym Cre dienen. Diese Mäuse werden anschliessend mit transgenen Mauslinien verpaart, bei denen die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle eines zelltypspezifischen Promotors steht. Die Tatsache, dass bislang noch keine osteozytenspezifischen Gene etabliert sind, hat sicherlich entscheidend dazu beigetragen, dass über den häufigsten Zelltyp des Knochens wesentlich weniger bekannt ist, als über Osteoblasten und Osteoklasten.

1.4 Aufgabenstellung und Zielsetzung

Das primäre Ziel der vorliegenden Dissertation war die Identifizierung osteozytenspezifischer Gene. Zum einen gibt es in der Literatur zahlreiche Beispiele dafür, dass

Gene, die spezifisch in einem Zelltyp exprimiert werden, oftmals, wenn auch nicht zwangsläufig, eine wichtige Rolle bei der Differenzierung und/oder Funktion des betreffenden Zelltyps spielen. Zum anderen könnten die regulatorischen Elemente dieser Gene langfristig dazu genutzt werden, in transgenen Mäusen bestimmte Gene spezifisch in Osteozyten zu exprimieren. Dies gilt auch für die Cre-Rekombinase, wodurch es in zukünftigen Studien möglich sein sollte, definierte Gene spezifisch in Osteozyten zu deletieren, um somit deren physiologische Funktion im Knochen-Remodeling zu untersuchen.

Aus diesem Grund sollte in der vorliegenden Arbeit zunächst eine Affymetrix-Expressionsanalyse durchgeführt werden, um Gene zu identifizieren, die selektiv in der terminalen Differenzierungsphase primärer Osteoblastenkulturen in ihrer Expression induziert werden. Das gewebespezifische Expressionsmuster dieser Gene sollte anschliessend durch eine RT-PCR-Expressionsanalyse ermittelt werden. Desweiteren sollten die Grundlagen zur Herstellung einer Mauslinie geschaffen werden, in der die Cre-Rekombinase spezifisch in Osteozyten exprimiert wird. Langfristig sollen die hierdurch erzielten Ergebnisse dazu dienen, ein besseres Verständnis der Funktion von Osteozyten *in vivo* zu gewinnen.

2 Material und Methoden

2.1 Isolierung primärer Osteoblasten

Primäre Osteoblasten wurden aus Schädeldächern neugeborener Mäuse isoliert. Hierzu wurden jeweils aus 50 drei Tage alten C57Bl/6-Mäusen die Schädeldächer präpariert und nach Entfernung des Chondrokraniums zunächst in PBS (phosphate-buffered saline, Gibco, 14190-094) gesammelt. Die präparierten Schädeldächer wurden anschliessend 5 mal für 10 Minuten mit Lösung 1 bei 37°C in einem Schüttler verdaut. Die Überstände der ersten beiden Verdaus wurden verworfen. Die Überstände der drei letzten Verdaus wurden kombiniert und durch einen Filter (Falcon Cell Strainer, 352340) pipettiert, wodurch unverdaute Reste von den isolierten Zellen getrennt werden konnten. Anschliessend wurden die Zellen bei 1000 rpm abzentrifugiert und in 50 ml Kulturmedium aufgenommen. Je 10 ml dieser Suspension wurden auf 94 mm-Zellkulturschalen (Cellstar 664160) ausplattiert und bei 37 °C und 5%-iger CO₂-Sättigung inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium abgesaugt und durch frisches Kulturmedium ersetzt. Nach zwei weiteren Tagen wurde die Differenzierung eingeleitet (siehe 3.2).

Lösung 1: Minimal essential medium (alpha modification) - Gibco, M0644
 0,1 %-ige Kollagenase Typ Ia (Sigma C-9891)
 0,2 %-ige Dispase Grade II (Roche, 165859)

Kulturmedium: Minimal essential medium (alpha modification) - Gibco, M0644
 10 %-iges fötales Kälberserum (Perbio, 30160)

2.2 Differenzierung primärer Osteoblastenkulturen

Drei Tage nach Isolierung der Osteoblasten waren die Kulturen zu ca. 80 % konfluent und wurden zur Differenzierung induziert. Hierzu wurde das Kulturmedium mit Ascorbat (als Kofaktor der Kollagensynthese) und β -Glycerophosphat (als Phosphatquelle) versetzt (Bellows et al. 1986). Aufgrund der limitierten Stabilität beider Reagenzien wurde das Differenzierungsmedium alle 2 Tage gewechselt. Die Differenzierung verlief über insgesamt 25 Tage, wobei zu mehreren Zeitpunkten eine

von Kossa-Färbung durchgeführt wurde (siehe 3.3), bzw. RNA isoliert wurde (siehe 3.4).

Differenzierungsmedium: Kulturmedium (siehe 3.1)
+ 50 µg/ml Ascorbat (Sigma, 205-126-1)
+ 10 mM β-Glycerophosphat (Sigma, 212-464-3)

2.3 Färbung der mineralisierten Matrix

An Tag 0, 5, 10, 15, 20 und 25 der Differenzierung wurde die Mineralisierung der in den Kulturen gebildeten Matrix durch Silbernitratfärbung nach von Kossa überprüft (Ducy et al. 2000). Hierzu wurden die Zellen in der Kulturschale zunächst 3 mal mit kaltem PBS gewaschen und anschliessend mit 5 ml kaltem Methanol fixiert. Nach 3 Waschschrritten mit destilliertem Wasser wurden pro Schale 5 ml einer 5 %-igen Silbernitrat-Lösung zugegeben. Innerhalb von 30 Minuten führte dies unter direkter Beleuchtung zu einer Schwarzfärbung des abgelagerten Minerals. Danach wurde erneut 3 mal mit destilliertem Wasser gewaschen und überschüssiges Silbernitrat durch 5-minütige Behandlung mit einer 10 %-igen Natriumthiosulfat-Lösung entfernt. Die Mineralisierung wurde direkt im Anschluss fotografisch dokumentiert.

2.4 RNA-Isolation

An Tag 0, 5, 10, 15, 20 und 25 der Differenzierung wurde desweiteren die Gen-Expression in den kultivierten Osteoblasten verfolgt, weshalb zunächst RNA isoliert werden musste. Hierzu wurden die Zellen auf der Schale 3 mal mit kaltem PBS gewaschen. Anschliessend wurde pro Schale 1 ml TrizolTM-Reagenz (Invitrogen, 15596-018) zugesetzt, wodurch die Zellen lysiert wurden. Nach dem kompletten Abkratzen der lysierten Zellen mit einem Zellschaber (Falcon, 353085) wurde das Zelllysate in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäss (Eppendorf, 0030073.746) überführt und für 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschliessend wurden 200 µl Chloroform zugegeben und nach Vermischung für weitere 2 Minuten inkubiert. Nach einer 15-minütigen Zentrifugation bei 13000 rpm und 4°C wurden 600 µl der oberen Phase in ein neues Reaktionsgefäss überführt und zur Ausfällung der RNA 500 µl Isopropanol zugesetzt. Nach einer 15-minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde die RNA wie oben beschrieben abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit 1 ml 70 %-igem

Ethanol (in DEPC-behandeltem H₂O) gewaschen und in 25 µl DEPC-behandeltem H₂O (Fluka, 95284) gelöst. Zur Konzentrationsbestimmung wurden 4 µl dieser Lösung in 1 ml H₂O verdünnt, die Absorption wurde bei 260 nm gemessen.

Die Isolation von RNA aus verschiedenen Geweben 2 Wochen alter Mäuse erfolgte in der gleichen Art. Nach Entnahme der Gewebe wurden diese jedoch zusätzlich in 1 ml TrizolTM-Reagenz mit einem Ultraturrax-Gerät (Ika, T25-basic) für 10 Sekunden homogenisiert.

2.5 cDNA-Synthese

Der nächste Schritt zur Analyse der Gen-Expression im Verlauf der Osteoblasten-Differenzierung war die Umwandlung der RNA in doppelsträngige cDNA (copy DNA) durch reverse Transkription. Hierzu wurde der „Cloned AMV First-Strand cDNA synthesis Kit“ der Firma Invitrogen (12328-032) benutzt. Je 1 µg der isolierten RNA (siehe 3.4) wurden mit 1 µl Oligo(dT)₂₀-Primer (50 µM) und 2 µl dNTP-Mix (je 10 mM) versetzt und mit DEPC-behandeltem H₂O auf ein Volumen von 12 µl aufgefüllt. Die RNA wurde in diesem Mix für 5 Minuten bei 65°C denaturiert und anschliessend auf Eis gestellt. Pro Reaktionsansatz wurden anschliessend 4 µl des 5-fach Synthesepuffers, 1 µl Dithiothreitol (0.1 M), 1 µl RNase OUTTM (40 U/µl), 1 µl DEPC-behandeltes H₂O und 1 µl Cloned AMV RT (15 U/µl) zugesetzt. Die reverse Transkription erfolgte anschliessend für 60 Minuten bei 50°C. Die Reaktion wurde danach durch eine 5-minütige Inkubation bei 85°C terminiert.

2.6 PCR-Expressionsanalyse

Die somit gewonnene cDNA wurde schliesslich als Matrize in einer PCR-Reaktion eingesetzt, um durch genspezifische Primer die Expression der betreffenden Gene im Verlauf der Osteoblasten-Differenzierung nachzuweisen. Hierzu wurden je 2 µl der synthetisierten cDNA (siehe 3.5) mit 1 µl dNTPs (5 mM), 2 µl 10-fach Reaktionspuffer (Roche, 1435094) und je 3 µl der genspezifischen Primer (2 µM) versetzt (Tabelle 1). Die Ansätze wurden mit H₂O auf 19 µl aufgefüllt und nach Zugabe von je 1 µl Taq-Polymerase (Roche, 1435094) in einem Thermocycler (BioRad, iCycler) folgendermassen inkubiert:

Inkubation: 4 Minuten bei 94°C
 36 Zyklen: 1 Minute bei 94°C (Denaturierung)
 1 Minute bei 55°C (Anlagerung der Primer)
 1 Minute bei 72°C (Polymerisation)
 10 Minuten bei 72°C

Die Überprüfung der genspezifischen Amplifikation erfolgte im Anschluss durch DNA-Agarose-Gelelektrophorese (siehe 3.7).

Tabelle 1: Verwendete Oligonukleotid-Primer für die Expressionsanalyse. Alle PCR-Primer wurden unter Zuhilfenahme des MacVector™ 7.2-Programms (Accelrys) ausgewählt und von der Firma MWG bezogen. Bgp, Bone GLA protein (Osteocalcin); Gapdh, Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase; Ptpz, Protein-Tyrosin-Phosphatase-Rezeptor Typ Z (Harroch et al. 2002); Dkk-1, Dickkopf-1; ApoE, Apolipoprotein E; Fzd-related, Frizzled-related; Osap, Ovary-specific acidic protein (Hennebold et al. 2000); EST, expressed sequence tag; PHEX, phosphate-regulating gene with homologies to endopeptidases located on the X-chromosome (Dixon et al. 1998); OF45, osteoblast/osteocyte factor 45 (Petersen et al. 2000)

Gen	Sequenz der Primer	Fragmentgröße
Bgp	5'-TCCAAGCAGGAGGGCAATAAG-3' 5'-GCGTTTGTAGGCGGTCTTCAAG-3'	162 bp
Gapdh	5'-GACATCAAGAAGGTGGTGAAGCAG-3' 5'-CTCCTGTTATTATGGGGGTCTGG-3'	361 bp
Ptpz	5'-TGGTGGTTATGATTCCAGATGGTC-3' 5'-AAAGTTCCTGCTGTTACTCCCCCG-3'	349 bp
Adipsin	5'-GCTATCCCAGAATGCCTCGTTG-3' 5'-CGTGTCTCTTGTTTCCCTGAGC-3'	463 bp
Dkk-1	5'-CCACACCTGCCAGAGACACTAAAC-3' 5'-GGGGAGTTCATCAAGAAACAAAG-3'	197 bp
ApoE	5'-TTTTGGTGACCGCATCCGAG-3' 5'-CAGGACAGGAGAAGGATACTCATTG-3'	299 bp

Fzd-related	5'-TGTATTTTGGGGGGTGGGTAG-3' 5'-GTTGTTGTTGTCGTCTCTGCTGAC-3'	171 bp
Osap	5'-GCCTGAGTCACAAGAAGAAGAAACC-3' 5'-CACAGCCTGATTTTAGAGGGTGG-3'	226 bp
EST #1	5'-CGAATAAAGCCACAAGGAAGAG-3' 5'-CAGAACCCCATACCTACCC-3'	212 bp
EST #2	5'-GTGACACTTTCTATGCTATGCTGGTT-3' 5'-GCCTCTCAAATCGTGGTTAGGG-3'	141 bp
PHEX	5'-TGATGGAAGCAGAAACAGGGAG-3' 5'-GGGGACACATACAAACGGATGAAC-3'	631 bp
OF45	5'- GCTTTCCTGAAGGTGAATGAC -3' 5'- GTCTTCATTCGGCATTGG -3'	109 bp

2.7 DNA-Agarose-Gelelektrophorese

Um die Amplifikationsprodukte der PCR-Reaktionen nach Grösse aufzutrennen, wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Hierzu wurde 1 g Agarose (Seakem, Biozym, 840.004) mit 100 ml TAE-Puffer versetzt und durch 2-minütiges Kochen in der Mikrowelle gelöst. Nach einer kurzen Abkühlungsphase wurden 50 µl einer Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) zur Visualisierung der DNA zugesetzt. Anschliessend wurde dieses Gemisch in eine Gelform mit einem Kamm gegossen, wodurch nach ca. 30 Minuten ein gehärtetes Gel mit 20 Probenaschen entstand. Dieses Gel wurde in eine mit TAE-Puffer gefüllte Laufkammer (BioRad) gelegt. Zu den PCR-Ansätzen (je 20 µl) wurden je 2 µl Probenpuffer gegeben, um dieses Gemisch anschliessend in die Probenaschen zu laden. Zur Verifizierung der Fragmentgrössen wurde in eine Spur ein DNA-Längenmarker (Invitrogen, 10488-072) gegeben. Die Auftrennung erfolgte schliesslich im elektrischen Feld bei 80 V für 60 Minuten. Die DNA wurde anschliessend im UV-Licht visualisiert und fotografisch dokumentiert.

50-fach TAE-Puffer: 242 g Tris
 57 ml Essigsäure

8.6 g EDTA

H₂O ad 1 l

Diese Lösung wurde vor Benutzung 50-fach mit destilliertem H₂O verdünnt.

Probenpuffer: 20 %-iges Ficoll 400

1 %-iges SDS

0.25 %-ige Bromphenolblaulösung

0.25 %-iges Xylencyanol

2.8 RNA-Agarose-Gelelektrophorese

Um die Expression des Differenzierungsmarkers Osteocalcin (Bone GLA Protein, Bgp) am Tag 5 und 25 der Differenzierung zu vergleichen, wurde desweiteren eine Northern Blot-Analyse durchgeführt. Hierzu wurde zunächst die gewonnene RNA in einem Agarosegel nach Grösse aufgetrennt. Je 5 µg RNA wurden mit 20 µl RNA-Probenpuffer versetzt, für 5 Minuten bei 65°C denaturiert und anschliessend auf Eis gestellt. Zwischenzeitlich wurde ein 1 %-iges Agarosegel vorbereitet. Hierzu wurde 1 g Agarose in 90 ml MOPS-Puffer durch Erhitzen in der Mikrowelle gelöst. Nach einer kurzen Abkühlungsphase wurden 12 ml einer 37 %-igen Formaldehydlösung zugesetzt und das Gel in eine zuvor gesäuberte Gelkammer mit Kamm für 15 Probenaschen gegossen. Nach dem Aushärten des Gels wurde das Gel in eine Kammer mit MOPS-Puffer gelegt, und die RNA-Proben wurden in die Probenaschen geladen. Die Auftrennung der RNA erfolgte anschliessend im elektrischen Feld bei 60 V. Nach ca. 60 Minuten wurde das Gel in einer Schale mit Ethidumbromid-Lösung (5 µg/ml) für 5 Minuten gefärbt. Die Entfärbung und gleichzeitige Entfernung des Formaldehyds erfolgte anschliessend für 3 Stunden in destilliertem H₂O, das mindestens 10 mal gewechselt wurde. Die aufgetrennte RNA wurde schliesslich im UV-Licht visualisiert und fotografisch dokumentiert.

RNA-Probenpuffer:	720 µl Formamid 160 µl 10-fach MOPS-Puffer 260 µl 37 %-iges Formaldehyd 180 µl DEPC-behandeltes H ₂ O 100 µl 80 %-iges Glycerol (in DEPC-behandeltem H ₂ O) 20 % gesättigtes Bromphenolblau (in DEPC-behandeltem H ₂ O)
10-fach MOPS-Puffer:	0.4 M MOPS, pH 7 0.5 M Natriumacetat 10 mM EDTA Diese Lösung wurde vor Benutzung 10-fach mit destilliertem H ₂ O verdünnt.

2.9 Membrantransfer der aufgetrennten RNA (Northern Blot)

Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der isolierten RNA wurde diese auf eine Nylon-Membran (Hybond N+, Amersham, #RPN303B) transferiert. Hierzu wurde zunächst das Gel für 15 Minuten in 10-fach SSC-Puffer äquilibriert. Das Gel wurde anschliessend auf drei Lagen eines speziellen Filterpapiers gelegt (Gel Blotting Paper, Schleicher & Schuell, # 10426892), wobei die unterste Lage Verbindung zu einer mit 10-fach SSC gefüllten Schale hatte. Auf das Gel wurde die ebenfalls mit 10-fach SSC befeuchtete Membran gelegt. Nach vollständiger Entfernung der Luftblasen wurden zwei weitere Lagen Filterpapier auf die Membran gelegt. Darauf wurde ein Stapel trockenes saugfähiges Papier gelegt, wodurch der Puffer und die RNA durch Kapillarkräfte nach oben gezogen wurde, die RNA somit auf die Membran transferiert werden konnte. Am nächsten Tag wurde die RNA durch UV-Behandlung (UVP Hybrilinker HL-2000) mit der Membran quervernetzt und in einem geeigneten Puffer (siehe 3.11) für die Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten Sonde (siehe 3.10) bei 60 °C äquilibriert.

10-fach SSC: 1.5 M NaCl
0.15 M Natriumcitrat
pH 7 (mit HCl eingestellt)

2.10 Restriktion und DNA-Isolation aus Agarosegelen

Als Sonden für die Northern-Blot-Expressionanalyse wurden die cDNAs von Osteocalcin und Gapdh eingesetzt, die im Labor der Experimentellen Unfallchirurgie in Plasmiden eingefügt, vorhanden waren. Als erster Schritt wurden 2 µg der betreffenden Plasmide mit 16 µl H₂O, 2 µl eines 10-fach konzentrierten Reaktionspuffers und 1 µl des Restriktionsenzym EcoRI (Roche) versetzt. Während einer 2-stündigen Inkubation bei 37°C führte dies zum Herausschneiden der betreffenden cDNAs aus dem Restplasmid. Durch die anschliessende DNA-Agarose-Gelelektrophorese (siehe 3.7) wurden die cDNAs aufgrund ihrer geringeren Grösse vom Restplasmid getrennt. Die cDNA-Fragmenthaltigen Gelstücke wurden schliesslich mit einem Skalpell aus dem Agarosegel herausgeschnitten und in ein 1.5 ml-Reaktionsgefäss überführt.

Zum Herauslösen der DNA aus den Gelstücken wurde der „Quiaex II Gel extraction kit“ (Quiagen, # 20051) eingesetzt. Hierzu wurden 500 µl des Puffers QX1 sowie 10 µl der DNA-bindenden Quiaex-Beads zu den Gelstücken hinzugefügt und für 10 Minuten bei 50°C inkubiert. Nach vollständiger Auflösung der Agarose wurden die Beads mit der gebundenen DNA für 1 Minute bei 13000 rpm abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Beads wurden anschliessend 1 mal mit 500 µl Puffer QX1 und 2 mal mit 500 µl Puffer PE gewaschen und danach getrocknet. Die Elution der DNA erfolgte schliesslich durch Resuspension der Beads in 20 µl H₂O. Nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten wurde erneut für 2 Minuten zentrifugiert. Der DNA-haltige Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäss überführt. Danach wurde durch eine Agarose-Gelelektrophorese der Erfolg der Reinigung überprüft, und 4 µl der isolierten cDNA-Fragmente wurden für die radioaktive Markierung (siehe 3.10) eingesetzt.

2.11 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten

Die aus den Gelstücken isolierten cDNA-Fragmente wurden anschliessend durch den Einbau von 5'-(α-³²P)-dCTP (Amersham, AA0075) radioaktiv markiert. Hierzu wurde der „Random-Primed DNA-Labeling Kit“ (Roche, # 1004760) verwendet. Zunächst wurden 4 µl DNA mit 6 µl H₂O versetzt, im Wasserbad für 5 Minuten gekocht und danach auf Eis gestellt. Zu der somit denaturierten DNA wurden 2 µl des primerhaltigen Reaktionspuffers sowie 3 µl eines Nukleotidmixes aus ATP, TTP und GTP gegeben. Anschliessend wurden 4 µl 5'-(α-³²P)-dCTP und 1 µl Klenow-Enzym

zugesetzt, was durch eine 30-minütige Polymerisation bei 37°C zum Einbau der Nukleotide führte. Nach Abschluss dieser Reaktion wurden 80 µl STE-Puffer zugesetzt und der Reaktionsmix auf eine mit STE-Puffer äquibrierte Sephadex-G50-Säule (Roche, # 1273973) gegeben. Durch anschliessende Zentrifugation bei 4000 rpm für 2 Minuten wurden die nicht eingebauten Nukleotide von der radioaktiv markierten DNA getrennt. 1 µl von 100 µl der im Durchfluss befindlichen DNA-Sonde wurden mit 4 ml Szintillationsflüssigkeit (Rotiszint, Roth, # 0016.2) versetzt, um die eingebaute Radioaktivität zu messen (Beckman Coulter, Multi-purpose Scintillation Counter, # LS 6500). Die restlichen 99 µl wurden im Wasserbad gekocht und anschliessend auf Eis gestellt, um die DNA zu denaturieren. Diese radioaktiv markierte DNA-Sonde wurde schliesslich in den Hybridisierungspuffer zu der darin inkubierten Nylon-Membran gegeben (siehe 3.9).

STE-Puffer: 10 mM Tris, pH 7.4
10 mM NaCl
1 mM EDTA

2.12 Hybridisierung der aufgetrennten RNA mit der radioaktiven Sonde

Die Nylon-Membran mit der aufgetrennten RNA (siehe 3.9) wurde für 2 Stunden bei 60°C im Hybridisierungspuffer äquilibriert. Anschliessend wurde die radioaktiv markierte DNA-Sonde (siehe 3.11) zugesetzt und über Nacht bei 60°C inkubiert. Am nächsten Tag erfolgten zunächst 2 Waschschrte für 5 Minuten mit Waschpuffer 1 bei 60°C. Danach erfolgten zwei weitere Waschschrte mit Waschpuffer 2 für je 30 Minuten bei der gleichen Temperatur. Die Membran wurde anschliessend zwischen 2 Frischhaltefolien gelegt, um darauf in geeigneten Kassetten (Dr. Goos-Suprema GmbH) einen Autoradiographiefilm (Kodak X-omat-AR, # 8532665) aufzulegen. Nach ca. 3 Tagen Inkubationszeit wurde dieser Film entwickelt (Protec Optimax), wodurch die Hybridisierungssignale auf dem Röntgenfilm sichtbar gemacht werden konnten.

Hybridisierungspuffer: 330 mM Natriumphosphat pH 7
6.6 %-iges SDS
Waschpuffer 1: 2-fach SSC (siehe 3.9)
0.1 %-iges SDS
Waschpuffer 2: 0.5-fach SSC (siehe 3.9)
0.1 %-iges SDS

2.13 mRNA-Isolation

Zur Durchführung der Affymetrix-Expressionanalyse musste aus der an Tag 5 und Tag 25 der Osteoblastendifferenzierung gewonnenen Gesamt-RNA selektiv der mRNA-Anteil isoliert werden, wofür der „Nucleo-Trap-Kit“ der Firma Clontech (# 636023) eingesetzt wurde. Hierzu wurden je 100 µg Gesamt-RNA ausgefällt und in RM0-Puffer resuspendiert. Anschließend wurden 15 µl Oligo(dT)-beads zugesetzt, für 5 Minuten bei 68°C erhitzt, und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer 5-minütigen Zentrifugation bei 13000 rpm wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 600 µl RM2-Puffer resuspendiert. Diese Suspension wurde anschließend in einen Nucleo-Spin-Mikrofilter überführt. Nach einer erneuten Zentrifugation wurde der Durchlauf verworfen. Die Oligo(dT)-beads, welche die Poren des Mikrofilters nicht passieren, wurden in 500 µl RM3-Puffer resuspendiert. Diese Suspension wurde für 2 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Die letzten zwei Schritte wurden wiederholt. Anschließend wurde der Waschpuffer verworfen. Die somit isolierte mRNA wurde in 20 µl DEPC-behandeltem H₂O resuspendiert.

2.14 Affymetrix Gen-Chip-Hybridisierung

Dieser Teil der Arbeit wurde von Dr. Matthias Gebauer (Experimentelle Unfallchirurgie) und Dr. Thomas Streichert aus der Abteilung für Klinische Chemie durchgeführt, weshalb hier nur kurz das Prinzip des Versuchs dargestellt werden soll. Aus der zuvor isolierten mRNA aus Osteoblastenkulturen an Tag 5 und Tag 25 der Differenzierung wurden biotinylierte Sonden hergestellt, mit denen jeweils 3 verschiedene Gen-Chips der Firma Affymetrix (U74v2) hybridisiert wurden. Die auf diesen Gen-Chips durch den Prozess der Photolithographie aufgebrachtten Oligonukleotide entsprechen Teilsequenzen von 36000 Genen des Maus-Genoms. Die Hybridisierung erfolgte in einer spezialisierten Apparatur (Affymetrix Fluidics Station) für 16 Stunden bei 45°C. Die Auswertung der Hybridisierungssignale erfolgte durch einen Hewlett-Packard-Agilent Gene-Chip scanner. Durch diese Methode war es somit möglich, das Expressionsmuster von 36000 Genen an Tag 5 und Tag 25 der Osteoblastendifferenzierung quantitativ zu erfassen. Da durch diese Expressionsanalyse eine sehr grosse Datenmenge generiert wurde, sollten im weiteren Verlauf dieser Dissertationsarbeit zunächst ausschliesslich Gene untersucht werden, deren Expression

durch die Mineralisierung der Osteoblasten, d.h. von Tag 5 auf Tag 25, maximal induziert wurde.

Da das Hauptziel dieser Arbeit in der Identifizierung osteozytenspezifischer Gene lag, sollte dementsprechend im nachfolgenden Schritt zunächst das gewebespezifische Expressionsmuster einiger dieser Gene analysiert werden. Als Methode der Wahl wurde hierzu die zuvor beschriebene RT-PCR-Expressionsanalyse (3.4 – 3.6) eingesetzt, wobei cDNA aus Osteoblastenkulturen, aber auch aus verschiedenen Geweben zwei Wochen alter Mäuse als Matrize eingesetzt wurde.

2.15 Isolierung des OF45-Gens aus einer BAC-Bibliothek

Da sich durch die RT-PCR-Expressionsanalyse ein osteozytenspezifisches Expressionsmuster für das Gen OF45 ergeben hatte, sollte in einem ersten Schritt zur Generierung eines osteozytenspezifischen Cre-Rekombinase-exprimierenden Mausmodells dieses Gen isoliert werden. Hierzu wurde die von der Firma Research Genetics vertriebene BAC-DNA-Bibliothek (# 6343 SI) als Ausgangsmaterial verwendet. In dieser Bibliothek sind Fragmente des kompletten Maus-Genoms in Plasmide eingebracht worden, die als BACs (bacterial artificial chromosomes) bezeichnet werden. Diese Plasmide wurden hierarchisch in 576 sogenannten Subpools und 72 sogenannten Superpools zusammengefügt.

In der ersten Runde der spezifischen BAC-Isolierung wurden die 72 Superpools durch eine MEPE/OF45-spezifische PCR analysiert. Hierzu wurde je 1 µl der Superpool-DNA mit 1 µl dNTPs (5 mM), 2 µl 10-fach Reaktionspuffer (Roche, 1435094) und je 3 µl der genspezifischen Primer (2 µM) versetzt. Die Ansätze wurden mit H₂O auf 19 µl aufgefüllt und nach Zugabe von je 1 µl Taq-Polymerase (Roche, 1435094) in einem Thermocycler (BioRad, iCycler) wie folgt inkubiert:

Inkubation: 4 Minuten bei 94°C
36 Zyklen: 1 Minute bei 94°C (Denaturierung)
1 Minute bei 60°C (Anlagerung der Primer)
1 Minute bei 72°C (Polymerisation)
10 Minuten bei 72°C

Eingesetzte Primer: 5'- GAGAGAAAAGGTAAAGGGGGGC -3'
5'- AGAGCAGGGGACTGGTTCAATC -3'

Erwartete Fragmentgrösse: 417 bp

Die Überprüfung der genspezifischen Amplifikation erfolgte im Anschluss durch DNA-Agarose-Gelelektrophorese (siehe 3.7). Pro positivem Superpool wurden anschliessend 8 Suppools in der gleichen Weise auf das Vorhandensein des OF45-Gens getestet. Diese Suppools waren aus je 348 Einzelklonen zusammengesetzt, weshalb in der dritten Runde der OF45-spezifischen BAC-Isolierung eine Membran von der Firma Research Genetics bezogen wurde, auf der die DNA der 348 Einzelklone des positiven Suppools nebeneinander in 24 Spalten und 16 Zeilen aufgetragen war.

Zur Hybridisierung dieser Membran wurde zunächst das oben beschriebene PCR-Fragment aus dem Agarosegel isoliert (siehe 3.10) und radioaktiv markiert (siehe 3.11). Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 65°C im Hybridisierungspuffer. Am nächsten Tag folgten zwei 5-minütige Waschschriffe mit Waschpuffer 1 und zwei 30-minütige Waschschriffe mit Waschpuffer 2. Daraufhin wurde wie in 3.12 beschrieben ein Film aufgelegt und nach 3 Tagen entwickelt, wodurch der BAC-Klon mit einem OF45-haltigen genomischen Fragment eindeutig identifiziert werden konnte.

Hybridisierungspuffer: 330 mM Natriumphosphat pH 7
6.6 %-iges SDS
100 µg/ml Heringssperma-DNA (Roche, 1467140)

Waschpuffer 1: 2-fach SSC (siehe 3.9)
0.1 %-iges SDS

Waschpuffer 2: 0.2-fach SSC (siehe 3.9)
0.1 %-iges SDS

3 Ergebnisse

3.1 Differenzierung von Osteoblasten-Primärkulturen

Ziel dieser Dissertation war die Identifizierung osteozytenspezifischer Gene. Da sich Osteozyten gegenüber Osteoblasten dadurch unterscheiden, dass sie komplett von einer mineralisierten Matrix umgeben sind, stellten wir die Hypothese auf, dass durch die Mineralisierung kultivierter Osteoblasten unter anderem die Expression Osteozyten-spezifischer Gene induziert wird. Aus diesem Grund war ein primäres Ziel dieser Arbeit, Gene zu identifizieren, die in mineralisierten Osteoblastenkulturen differentiell exprimiert werden. Der erste Schritt hierzu war die Kultivierung und Differenzierung primärer Osteoblasten.

Diese wurden aus Schädeldächern neugeborener Mäuse des Stamms C57Bl/6 isoliert. Hierzu wurden die Schädeldächer sequentiell mit Collagenase und Dispase verdaut, wodurch die Zellen freigesetzt wurden. Diese Zellen wurden anschliessend auf einer Zellkulturschale ausplattiert und bei einer Konfluenz von 80-90% (etwa 3 Tage danach) durch die Zugabe von Ascorbat und β -Glycerophosphat zur osteoblastären Differenzierung induziert. Um die Mineralisation dieser Kulturen zu überprüfen, wurde zunächst eine Silbernitratfärbung nach von Kossa zu verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt. Hierbei zeigte sich eine Schwarzfärbung mineralisierter Areale, beginnend an Tag 15 der Differenzierung und mit vollständiger Ausprägung an Tag 25 nach Zugabe von Ascorbat und β -Glycerophosphat (Abbildung 4).



Abbildung 4: Mineralisation primärer Maus-Osteoblasten. An Tag 0, 5, 10, 15, 20 und 25 nach Zugabe von Ascorbat und β -Glycerophosphat wurde eine Silbernitratfärbung nach von Kossa durchgeführt. Mineralisierte Areale wurden hierdurch schwarz angefärbt und sind ab Tag 15 der Differenzierung deutlich sichtbar.

Die osteoblastäre Differenzierung dieser Primärkulturen sollte desweiteren durch das Verfolgen der *Osteocalcin*-Expression überprüft werden. Osteocalcin, das genetisch als *Bgp* (Bone GLA Protein) bezeichnet wird, ist der beste molekulare Marker der Osteoblastendifferenzierung, da *Bgp* spezifisch in differenzierten Osteoblasten, nicht aber in Prä-Osteoblasten und anderen Zelltypen exprimiert wird.

Um die *Bgp*-Expression zu untersuchen, wurde zunächst RNA aus den kultivierten Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung isoliert. Diese wurde durch reverse Transkription in doppelsträngige DNA (cDNA) umgeschrieben. Diese cDNA wurde als Matrize in einer PCR-Reaktion mit *Bgp*-spezifischen Primern eingesetzt. Zur Kontrolle der cDNA-Qualität für alle Zeitpunkte der Differenzierung wurde parallel eine PCR mit spezifischen Primern für das Gen *Gapdh* durchgeführt. Dieses Gen kodiert für das Glykolyseenzym Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase, dessen Expression in verschiedenen Zelltypen, bzw. zu verschiedenen Differenzierungsstadien vergleichbar sein sollte.

Durch die anschließende Auftrennung der PCR-Produkte in einem Ethidiumbromid-haltigen Agarosegel konnte nachgewiesen werden, dass die *Bgp*-Expression im Verlauf der Osteoblasten-Differenzierung zunimmt, während die *Gapdh*-Expression unverändert ist (Abb. 5). Zusammen mit der in Abb. 4 beschriebenen Silbernitratfärbung zeigen diese Ergebnisse auf, dass die angelegten Primärkulturen erfolgreich zu knochenbildenden Osteoblasten differenziert werden konnten.

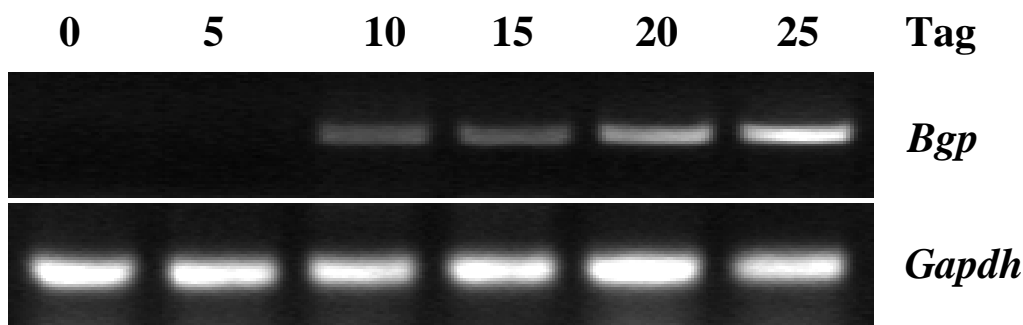


Abbildung 5: Differenzierung primärer Maus-Osteoblasten. An Tag 0, 5, 10, 15, 20 und 25 nach Zugabe von Ascorbat und β -Glycerophosphat wurde RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben, und eine PCR-Expressionsanalyse durchgeführt. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der PCR-Ansätze zeigte sich unter UV-Bestrahlung des Ethidiumbromid-haltigen Gels, dass die Expression von *Bgp* (*Osteocalcin*) durch die Zugabe von Ascorbat und β -Glycerophosphat induziert wurde, während die *Gapdh*-Expression zu allen Zeitpunkten nachweisbar war.

3.2 mRNA-Isolierung aus nicht-mineralisierten und mineralisierten Kulturen

Aufgrund dieser Vorergebnisse wurde das Ziel definiert, durch eine Affymetrix-Expressionsanalyse das Expressionsmuster von 36000 Genen in nicht-mineralisierten Kulturen an Tag 5 der Differenzierung mit dem von mineralisierten Kulturen an Tag 25 der Differenzierung zu vergleichen. Aus diesem Grund wurden zunächst grosse Mengen an Gesamt-RNA aus primären Osteoblastenkulturen zu beiden Zeitpunkten isoliert. Um auch bei diesen Proben die Induktion des Differenzierungsmarkers Osteocalcin (*Bgp*) zu überprüfen, wurde die RNA gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und mit einer radioaktiv markierten *Bgp*-cDNA-Sonde hybridisiert. Parallel hierzu wurde eine identisch vorbereitete Membran mit einer radioaktiv markierten *Gapdh*-cDNA-Sonde hybridisiert. Nach Autoradiographie konnte durch diese Northern Blot-Expressionsanalyse zweifelsfrei nachgewiesen werden, dass *Bgp* ausschliesslich in mineralisierten Osteoblastenkulturen exprimiert wird, während die *Gapdh*-Expression auch in nicht-mineralisierten Kulturen nachweisbar ist (Abb. 6).

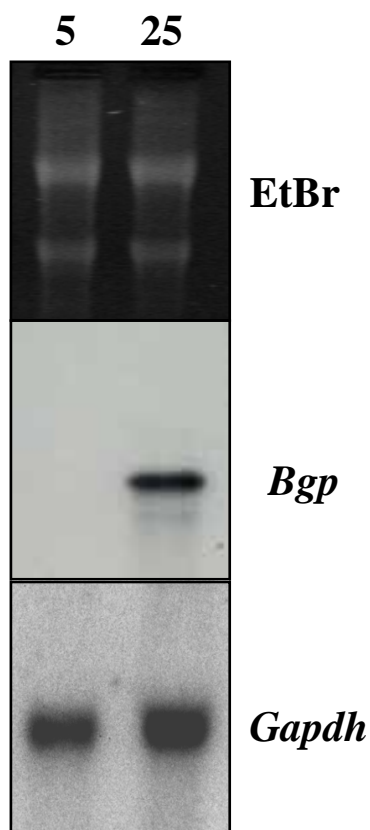


Abbildung 6: RNA-Isolation an Tag 5 und Tag 25 der osteoblastären Differenzierung. In der Ethidiumbromidfärbung (EtBr) des Agarosegels sind die Banden der 28S- und 18S-rRNA prominent, was für eine gute Qualität der isolierten RNA spricht. Die Hybridisierung der Membran mit einer radioaktiven *Bgp*-cDNA-Sonde zeigt, dass *Bgp* ausschliesslich in mineralisierten Kulturen exprimiert wird. Im Gegensatz dazu ist die Expression von *Gapdh* unabhängig vom Differenzierungsgrad der Zellen.

Nach der Überprüfung der isolierten Gesamt-RNA mittels Northern Blot sollte im nächsten Schritt spezifisch der mRNA-Anteil durch Bindung an Oligo-dT-Cellulose isoliert werden, da diese mRNA als Ausgangsmaterial für die Affymetrix-Expressionanalyse dienen sollte. Hierzu wurde die Gesamt-RNA mit Oligo-dT-Cellulose inkubiert, um die poly(A)-haltige mRNA von der rRNA, bzw. tRNA abzutrennen. Letztere RNA-Anteile binden nicht an Oligo-dT-Cellulose und finden sich nach einer Zentrifugation im Überstand. Die gebundene mRNA wurde anschliessend von der Oligo-dT-Cellulose freigesetzt. Der Erfolg dieser Aufreinigungsmethode wurde exemplarisch für die RNA-Fraktion an Tag 5 der Differenzierung überprüft.

In der Ethidiumbromid-Färbung zeigte sich, dass die prominenten 28S- und 18S-rRNA-Banden nur in der Gesamt-RNA, bzw. in der nicht an Oligo-dT-Cellulose gebundenen Fraktion nachweisbar waren. Im Gegensatz dazu zeigte sich die diffus im Agarosegel erscheinende mRNA-Fraktion im Eluat angereichert. Zur weiteren Überprüfung dieses Ergebnisses wurden die aufgetrennten RNA-Fractionen auf eine Membran transferiert, die anschliessend mit einer *Gapdh*-cDNA-Sonde hybridisiert wurde. Nach Autoradiographie zeigte sich das *Gapdh*-mRNA-Signal ausschliesslich in der Gesamt-RNA, bzw. der Eluat-Fraktion. Nicht jedoch in der Fraktion, die nicht an Oligo-dT-Cellulose gebunden hatte. Dadurch konnte der Erfolg der mRNA-Isolation eindeutig dokumentiert werden (Abb. 7).

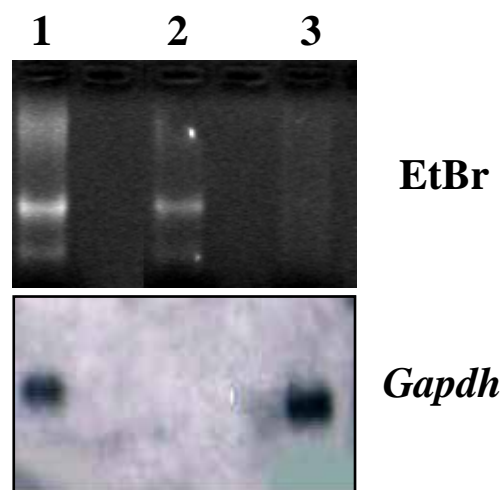


Abbildung 7: Überprüfung der mRNA-Isolierung. In der Ethidiumbromidfärbung (EtBr) des Agarosegels sind die Banden der 28S- und 18S-rRNA in der Gesamt-RNA (1) und in der nicht an Oligo-dT-Cellulose gebundenen Fraktion (2) nachweisbar, während nach Elution der gebundenen Anteile (3) nur die diffus erscheinende mRNA nachweisbar ist. Die Hybridisierung der Membran mit einer radioaktiven *Gapdh*-cDNA-Sonde zeigt, dass sich die für *Gapdh* kodierende mRNA selektiv in der Oligo-dT-Cellulose-gebundenen Fraktion (3) angereichert hat.

3.3 Affymetrix-Expressionsanalyse

Im nächsten Schritt wurden die mRNA-Fraktionen von Tag 5 und Tag 25 der osteoblastären Differenzierung in einer Affymetrix-Expressionsanalyse untersucht. Dieser Teil der Arbeit wurde von Dr. Matthias Gebauer und Dr. Thomas Streichert in der Abteilung für Klinische Chemie durchgeführt, da dort die erforderlichen Apparaturen, sowie die notwendige Expertise zur Auswertung der Daten vorhanden waren. Dementsprechend sollen im Folgenden ausschliesslich die für diese Dissertation relevanten Ergebnisse besprochen werden, die als Grundlage für die weiterführende Charakterisierung einiger Gene dienen, deren Expression im Verlauf der Mineralisation stark induziert wurde.

Die Affymetrix-Analyse ermöglichte die quantitative Erfassung der Expression von 36000 Genen an Tag 5 und Tag 25 der Differenzierung. Bei einem Vergleich der Affymetrix-Signal-Intensitäten zu beiden Zeitpunkten für eine gezielte Auswahl von Genen zeigte sich, dass das durchgeführte Experiment zu verlässlichen Ergebnissen geführt haben sollte (Abb. 8). Zunächst wurden Gene, die für bekannte Marker der Osteoblasten-Differenzierung kodieren, z.B. *Osteopontin (Opn)*, *Bone Sialoprotein (Bsp)* und *Osteocalcin (Bgp)* an Tag 25 der Differenzierung in ihrer Expression deutlich induziert, was sich in erhöhten Affymetrix-Signalintensitäten widerspiegelte. Im Gegensatz dazu zeigte sich, dass *Gapdh* in nicht-mineralisierten und in mineralisierten Kulturen in unverändert hoher Rate exprimiert wurde. Ebenfalls wichtig ist, dass zu keinem Zeitpunkt der Differenzierung eine Expression von *Typ II-Kollagen (Col2a1)* und *Typ X-Collagen (Col10a1)* nachweisbar war, weshalb davon auszugehen ist, dass es sich bei den Primärkulturen um reine Osteoblasten handelte, da keine Chondrozytenmarker exprimiert wurden.

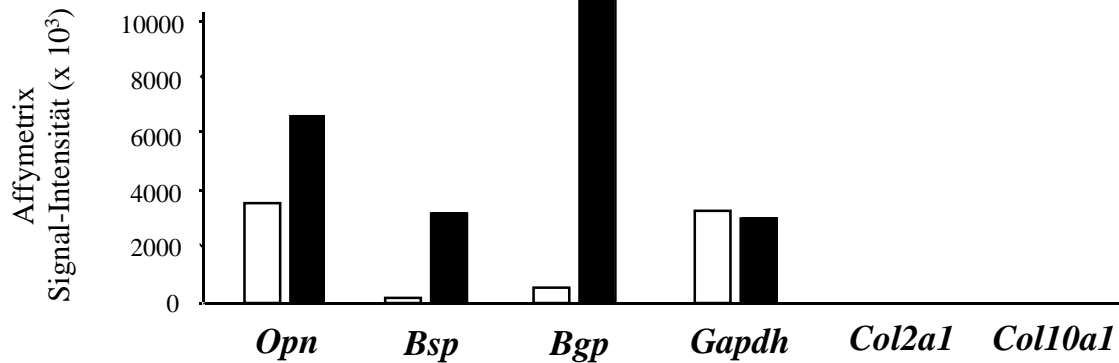


Abbildung 8: Expression von Differenzierungsmarkern. Der Vergleich der Affymetrix-Signalintensitäten an Tag 5 (weisse Balken) und Tag 25 (schwarze Balken) der osteoblastären Differenzierung zeigt die spezifische Induktion der Osteoblasten-Differenzierungsmarker *Osteopontin* (*Opn*), *Bone Sialoprotein* (*Bsp*) und *Osteocalcin* (*Bgp*), während *Gapdh* in seiner Expression nicht reguliert wird. Im Gegensatz dazu werden die Chondrozyten-Differenzierungsmarker *Typ II-Kollagen* (*Col2a1*) und *Typ X-Kollagen* (*Col10a1*) zu keinem Zeitpunkt exprimiert.

3.4 Untersuchung der gewebespezifischen Expression von Genen, deren Expression durch Mineralisation maximal induziert wurde

Da durch die Affymetrix-Expressionsanalyse eine grosse Menge an Daten generiert wurde, sollte im Folgenden das Hauptaugenmerk auf die Gene gelegt werden, deren Expression durch die Mineralisation der Kulturen maximal induziert wurde. Für einige dieser Gene sollte zunächst das gewebespezifische Expressionsmuster durch eine RT-PCR-Expressionsanalyse untersucht werden, um möglicherweise osteozytenspezifisch exprimierte Gene identifizieren zu können.

Abb. 9 zeigt die Rangliste der 10 am stärksten induzierten Gene auf einem der drei Chips. Auf diesem sogenannten A-Chip sind hauptsächlich Oligonukleotid-Sequenzen von Genen aufgebracht, die bereits gut charakterisiert sind. Hierbei zeigte sich zunächst, dass sich mit *Osteocalcin* (*Bgp*) und *Bone sialoprotein* (*Bsp*) zwei bekannte Osteoblasten-Differenzierungsmarker unter den 10 am stärksten induzierten Genen befanden, wodurch die Aussagekraft dieses experimentellen Ansatzes unterstrichen wird. Das am stärksten induzierte Gen, *Ptprz*, wurde jedoch bislang noch nicht im Hinblick auf die Osteoblasten-Differenzierung beschrieben. *Ptprz* kodiert für eine membranständige Proteintyrosin-Phosphatase (Harroch et al. 2002) mit bislang wenig charakterisierter Funktion, weshalb dieses Gen weiterführend analysiert werden sollte. Gleiches galt für die Gene *Adipsin*, *Dkk-1* und *ApoE*, deren gewebespezifisches

Expressionsmuster ebenfalls im nächsten Schritt überprüft werden sollte. Da die physiologischen Funktionen des Fc-Rezeptors, des Proteoglykan-Core Proteins, der hepatischen Lipase und CD83 in anderen Geweben hingegen bereits sehr gut charakterisiert sind, wurde in diesen Fällen auf die RT-PCR-Expressionanalyse verzichtet.

Tabelle 2: Rangliste der am stärksten induzierten Gene auf dem A-Chip. Die Affymetrix-Signalintensitäten an Tag 5 und Tag 25 der Differenzierung für die 10 am stärksten induzierten Gene sind angegeben. Mit *Osteocalcin (Bgp)* und *Bone Sialoprotein* finden sich zwei bekannte Marker der terminalen Osteoblasten-Differenzierung unter den am stärksten induzierten Genen.

	Name des Gens	Tag 5	Tag 25
1	<i>Ptprz</i>	2.6	262.1
2	<i>FcRII</i>	3.3	262.4
3	<i>PG core protein</i>	3.2	81.7
4	<i>Adipsin</i>	6.7	280
5	<i>Bgp</i>	409.6	11568
6	<i>Dkk-1</i>	3.4	89.3
7	<i>ApoE</i>	349.5	7704.4
8	<i>Hepatic lipase</i>	3.6	86.2
9	<i>CD83</i>	3.3	262.1
10	<i>Bone sialoprotein</i>	107.2	3127

Um die gewebespezifische Expression der genannten Gene zu untersuchen, wurde zunächst RNA aus Gehirn, Femur, Schädeldach, Fettgewebe, Herz, Niere, Leber, Lunge und Milz 2 Wochen alter C57Bl/6-Mäuse isoliert. Zusammen mit der RNA der Osteoblastenkulturen an Tag 5 und Tag 25 der Differenzierung wurden diese RNA-Proben durch reverse Transkription in doppelsträngige cDNA umgeschrieben und anschliessend eine PCR-Reaktion mit Gen-spezifischen Primern für *Ptprz*, *Adipsin*, *Bgp*, *Dkk-1*, *ApoE*, bzw. *Gapdh* durchgeführt. Wie erwartet zeigte sich in diesem Experiment die osteoblastenspezifische Expression von *Bgp*, sowie die ubiquitäre Expression von *Gapdh*. Während *Adipsin* und *ApoE* ebenfalls in allen Geweben exprimiert werden, zeigte sich für die Gene *Ptprz* und *Dkk-1* ein selektives Expressionsmuster (Abb. 10). Die *Ptprz*-Expression war deutlich in mineralisierten Osteoblasten, sowie in Gehirn, Femur, Schädeldach und Lunge nachweisbar, nicht jedoch in nicht-mineralisierten Osteoblasten und in anderen Geweben. Die Expression von *Dkk-1* scheint in adulten Mäusen sogar knochenspezifisch zu sein, da ein PCR-Amplifikationsprodukt mit *Dkk-1*-spezifischen Primern nur mit cDNA aus Osteoblasten, Femur und Schädeldach nachweisbar war. Aus diesem Grund sollten in weiterführenden Analysen hauptsächlich *Ptprz* und *Dkk-1* untersucht werden, da ein gewebespezifisches Expressionsmuster in der Regel eine physiologische Funktion des betreffenden Gens in diesem Gewebe widerspiegelt.

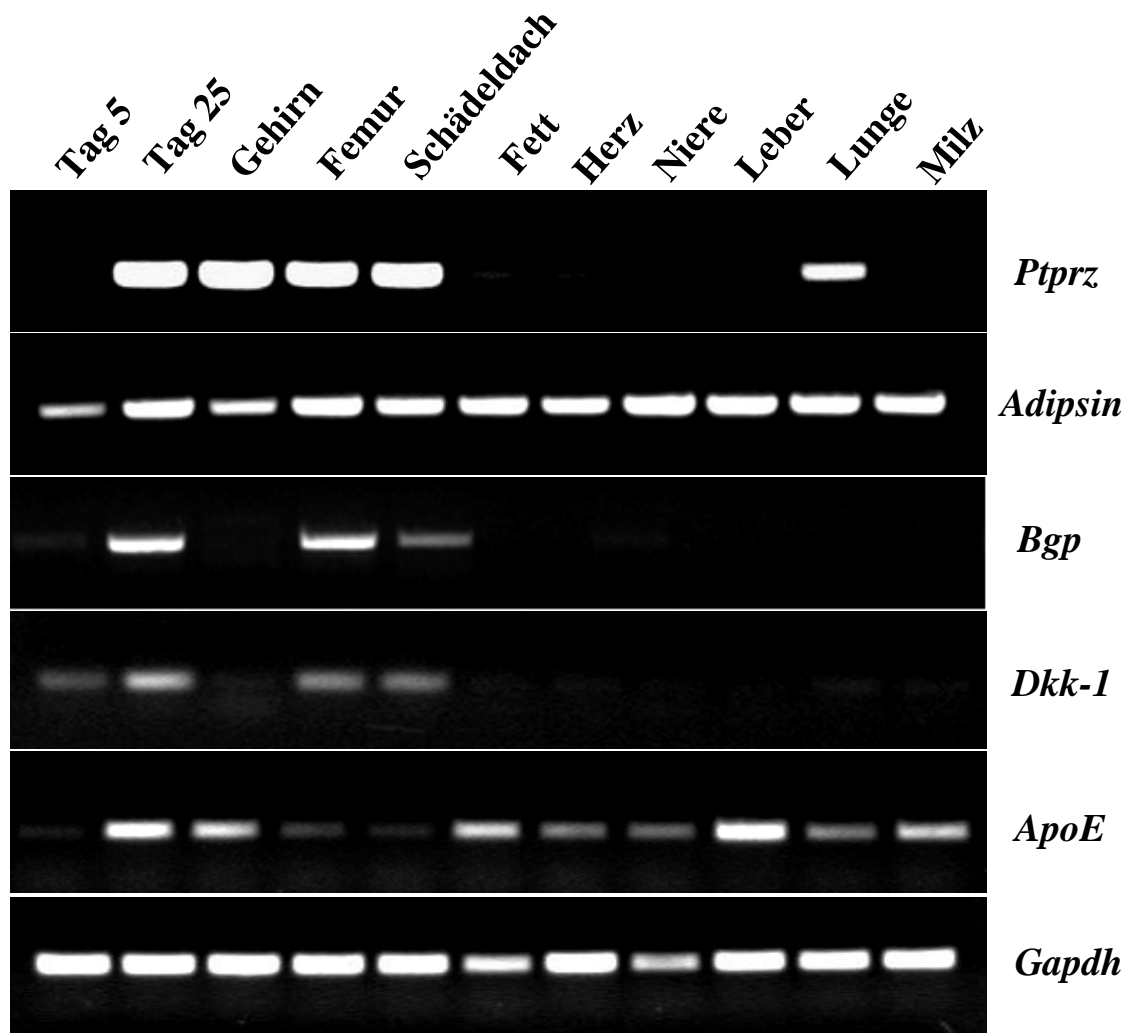


Abbildung 9: RT-PCR-Expressionsanalyse für einige der induzierten Gene des A-Chips. cDNA aus nicht-mineralisierten Osteoblasten (Tag 5), mineralisierten Osteoblasten (Tag 25), Gehirn, Femur, Schädeldach, Fettgewebe, Herz, Niere, Leber, Lunge oder Milz wurde als Matrize in einer PCR-Reaktion mit genspezifischen Primern eingesetzt. Hierbei zeigte sich in knochenspezifisches Expressionsmuster für *Osteocalcin* (*Bgp*) und *Dkk-1* und ein selektives Expressionsmuster für *Ptprz* in Knochen, Gehirn und Lunge. Im Gegensatz dazu werden *Adipsin*, *ApoE* und *Gapdh* in allen Geweben exprimiert.

Im nächsten Schritt wurden die im Verlauf der Mineralisation am stärksten induzierten Gene analysiert, deren Sequenzen als Oligonukleotide auf dem sogenannten B- und C-Chip aufgebracht waren (Abb. 11). Im Gegensatz zum A-Chip handelt es sich hierbei fast ausschliesslich um Gene, die zum Zeitpunkt der Chip-Herstellung noch weitestgehend uncharakterisiert waren. In der Rangliste der am stärksten induzierten Gene fand sich zum einen *Ptprz*, das auch schon bei der A-Chip-Analyse als maximal induziertes Gen aufgefallen war. Zum anderen war mit dem Gen *PHEX* ein weiterer, allerdings erst seit kurzem bekannter Marker der Osteoblasten-Differenzierung unter den 10 am stärksten induzierten Gene. *PHEX* kodiert für eine membranständige

Endopeptidase, die eine entscheidende Rolle bei der Knochenmineralisation spielt, da inaktivierende Mutationen dieses Gens beim Menschen zu X-gekoppelter Hypophosphatämie führen (The Hyp Consortium, 1995).

Desweiteren waren die kodierenden Gene für Comp (Cartilage oligomeric matrix protein) und Transglutaminase unter den am stärksten induzierten Gene, deren Funktionen in anderen Geweben allerdings schon gut charakterisiert sind, weshalb diese Gene nicht in die weiterführende Analyse einbezogen wurden. Interessant erschienen ein Gen mit Homologien zu Frizzled-Rezeptoren (Fzd-related), ein Gen, das kurz zuvor als Ovary-specific acidic protein (OSAP) beschrieben worden war (Hennebold et al. 2000), sowie 4 komplett uncharakterisierte Gene, die in der Datenbank nur als sogenannte Expressed Sequence Tags (ESTs) abgelegt waren. Von letzteren wurden allerdings nur 2 in die Expressionsanalyse einbezogen, da die Affymetrix-Signalintensitäten für EST #1 und EST #4 unterhalb des als signifikant angesehenen Wertes von 50 lagen.

Tabelle 3: Rangliste der am stärksten induzierten Gene auf dem B- und C-Chip. Die Affymetrix-Signalintensitäten an Tag 5 und Tag 25 der Differenzierung für die 10 am stärksten induzierten Gene sind angegeben. Mit *PHEX* befand sich erneut ein bekannter Marker der terminalen Osteoblasten-Differenzierung unter den am stärksten induzierten Genen.

	Name des Gens	Tag 5	Tag 25
1	<i>Fzd-related</i>	14.8	434.4
2	<i>Osap</i>	4.6	144.1
3	<i>Ptprz</i>	24.1	473.6
4	<i>EST #1</i>	1.8	45.6
5	<i>EST #2</i>	9	142.9
6	<i>Comp</i>	543	8548.9
7	<i>EST #3</i>	5.8	98.2
8	<i>EST #4</i>	1.3	28.4
9	<i>PHEX</i>	48.9	876.7
10	<i>Transglutaminase</i>	94.2	1193

Wie bereits für die interessant erscheinenden Gene des A-Chips wurde auch für einige maximal induzierte Gene des B- und C-Chips eine RT-PCR-Expressionsanalyse durchgeführt, um das gewebespezifische Expressionsmuster zu untersuchen (Abb. 12). Hierbei zeigte sich eine nahezu ubiquitäre Expression für das Fzd-ähnliche Gen sowie für die beiden EST-Sequenzen. Im Gegensatz dazu zeigte sich eine spezifische Expression in mineralisierten Osteoblastenkulturen und Knochen für die Gene *PHEX* und *OSAP*. Während dieses Ergebnis für *PHEX*, das zudem in der Lunge exprimiert wird, aufgrund der publizierten Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen erwartet werden konnte, so ist dieses Ergebnis für *OSAP*, das geringfügig auch in der Milz exprimiert wird, von grosser Bedeutung, da dieses noch wenig charakterisierte Gen noch nie im Zusammenhang mit Knochenbildung untersucht wurde. Dementsprechend könnte die weiterführende Charakterisierung dieses Gens ein vielversprechender Ansatz für die Zukunft zu sein.

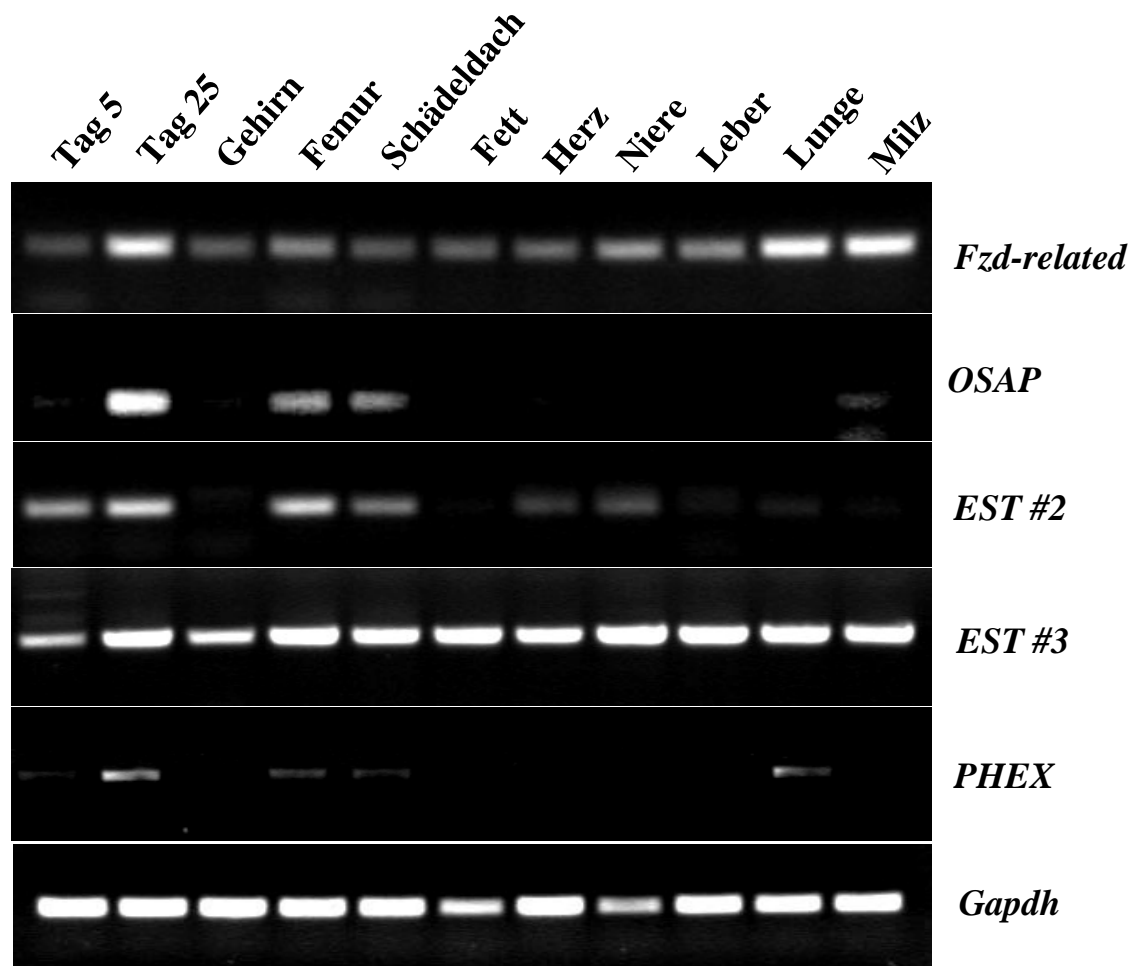


Abbildung 10: RT-PCR-Expressionsanalyse für einige der induzierten Gene des B- und C-Chips. cDNA aus nicht-mineralisierten Osteoblasten (Tag 5), mineralisierten Osteoblasten (Tag 25), Gehirn, Femur, Schädeldach, Fettgewebe, Herz, Niere, Leber, Lunge oder Milz wurde als Matrize in einer PCR-Reaktion mit Gen-spezifischen Primern eingesetzt. Hierbei zeigte sich ein knochenspezifisches Expressionsmuster für *PHEX* und *OSAP*, nicht jedoch für die anderen Gene.

3.5 Isolierung des OF45-Gens

Trotz der vielversprechenden Daten, die durch die hier beschriebene Affymetrix-Expressions-Analyse hervorgebracht werden konnten, muss jedoch angemerkt werden, dass auch diese Methode ihre Limitationen hat. Dies liegt hauptsächlich daran, dass nicht alle Gene des Maus-Genoms als Oligonukleotide auf den drei Gen-Chips repräsentiert waren. Im Zusammenhang mit dem Ziel, osteozytenspezifische Gene zu identifizieren, war am auffälligsten, dass das kodierende Gen für OF45 (osteoblast/osteocyte factor 45) nicht auf den Chips annotiert war. Dieses Gen wurde vor wenigen Jahren erstmals beschrieben und gilt als bislang spätester Marker der Osteoblasten-Differenzierung mit vermeintlicher osteozytenspezifischer Expression (Petersen et al. 2000). Aus diesem Grund wurde ohne Kenntnis von Affymetrix-Expressionswerten eine RT-PCR-Expressionsanalyse für dieses Gen durchgeführt, um gegebenenfalls osteozytenspezifische Expression nachzuweisen. Hierbei zeigte sich, dass *OF45*, im Gegensatz zu *Bgp* und *PHEX*, in nicht-mineralisierten Osteoblastenkulturen auch bei höherer PCR-Zyklenzahl nicht nachweisbar ist und in keinem anderen Gewebe exprimiert wird (Abb. 13).

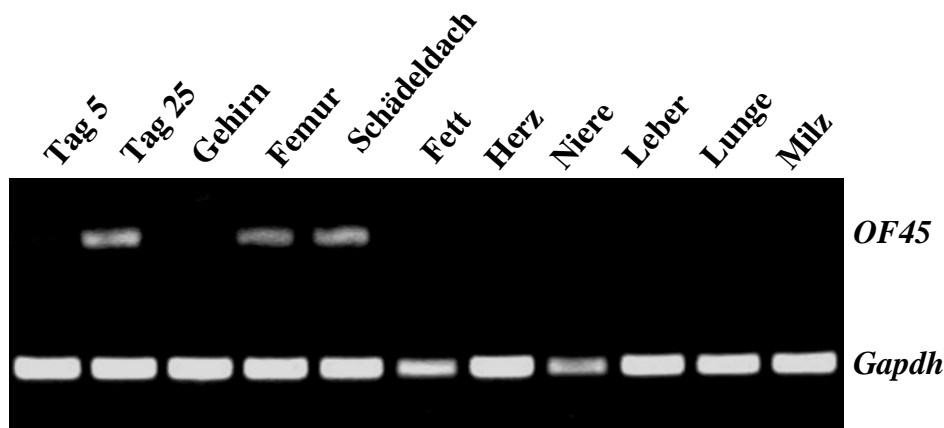


Abbildung 11: RT-PCR-Expressionsanalyse für das Gen OF-45. cDNA aus nicht-mineralisierten Osteoblasten (Tag 5), mineralisierten Osteoblasten (Tag 25), Gehirn, Femur, Schädeldach, Fettgewebe, Herz, Niere, Leber, Lunge oder Milz wurde als Matrize in einer PCR-Reaktion mit Gen-spezifischen Primern eingesetzt. Hierbei zeigte sich ein strikt Knochen-spezifisches Expressionsmuster für *OF45*, da ein Amplifikationsprodukt ausschliesslich mit cDNA aus mineralisierten Osteoblasten, Femora und Schädeldächern entstanden war.

Dementsprechend hat dieses Gen, im Hinblick auf die Etablierung eines osteozytenspezifischen Promotors, von allen getesteten Genen das selektivste Expressionsmuster, weshalb in einem weiteren Ziel dieser Arbeit dieses Gen isoliert werden sollte. Um ein

möglichst grosses genomisches Fragment mit dem OF45-Gen zu erhalten, wurde eine BAC-Bibliothek der Firma Research Genetics als Ausgangsmaterial eingesetzt. Bei diesen BACs (Bacterial artificial chromosomes) handelt es sich um bakterielle Plasmide, die ein ca. 100 kb grosses Fragment des Maus-Genoms beinhalten. Die ca. 2×10^5 verschiedenen BAC-Klone, die alle ein anderes Fragment des Maus-Genoms beinhalten, wurden von der Firma Research Genetics hierarchisch zusammengefügt, sodass man durch 2 Runden einer PCR-Analyse und 1 Runde einer DNA-Hybridisierung innerhalb dieser sogenannten Pools den OF45-haltigen Einzelklon identifizieren kann.

In der ersten Runde dieser Gen-Isolierung wurde die DNA aus den 72 sogenannten Superpools durch eine PCR mit OF45-genspezifischen Primern analysiert. Hierbei zeigte sich ein deutliches Signal im Superpool 3C, der dementsprechend, neben vielen anderen Genomfragmenten, auch ein Fragment mit dem OF45-Gen beinhaltete (Abb. 14). Dieser Superpool 3 C setzt sich wiederum aus den sogenannten Subpools A-H zusammen, die anschliessend in einer identisch durchgeführten PCR-Reaktion analysiert wurden. Hierbei zeigte sich eine OF-45-spezifische Bande im Subpool 3C-F, der dementsprechend, neben 347 anderen Genfragmenten, auch das OF45-Gen beinhaltete.

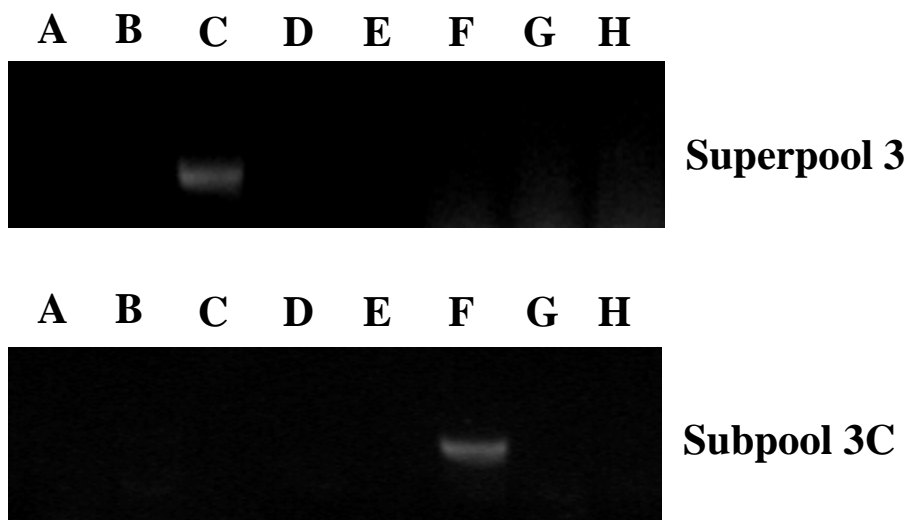


Abbildung 12: PCR-Identifizierung OF-45-haltiger BAC-Pools. Eine mit OF45-spezifischen Primern durchgeführte PCR-Reaktion zeigte in der ersten Runde ein Signal im Superpool 3C. Dieser setzt sich aus den Subpools A-H zusammen, die in der zweiten Runde durch eine identisch durchgeführte PCR-Reaktion analysiert wurden. Hierbei zeigte sich, dass ein OF-45-haltiges Genom-Fragment im Subpool 3C-F enthalten ist.

Der Subpool 3C-F setzt sich aus 348 Einzelklonen zusammen, die auf Anfrage bei der Firma Research Genetics in 24 Spalten und 16 Zeilen auf eine Membran aufgetragen wurden. Diese Membran wurde anschliessend mit einer radioaktiv markierten OF45-DNA-Sonde hybridisiert, wodurch nach Autoradiographie der BAC-Klon mit dem OF45-Gen eindeutig identifiziert werden konnte (Abb. 14). Dieser Einzelklon wurde schliesslich von der Firma Research Genetics bezogen und steht nun für weiterführende Analysen zur Verfügung.

Filter #147

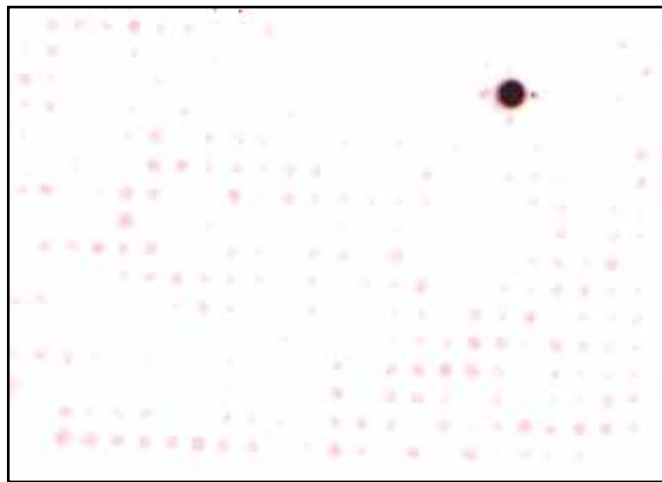


Abbildung 13: Identifizierung des OF-45-haltigen BAC-Klons. Die 348 Einzelklone des Subpools 3C-F wurden in 24 Spalten und 16 Zeilen auf eine Membran aufgebracht, die anschliessend mit einer radioaktiv markierten OF-45-DNA-Sonde hybridisiert wurde. Nach Autoradiographie war auf dem Film ein deutlicher schwarzer Punkt sichtbar, der auf die Hybridisierung mit dem in diesem BAC-Klon beinhalteten OF-45-Gen zurückzuführen ist.

4 Diskussion

4.1 Identifizierung Mineralisierungs-induzierter Gene

Das finale Ziel dieser Dissertation war die Identifizierung osteozytenspezifischer Gene. Als Methode der Wahl wurde die Affymetrix-Expressionsanalyse eingesetzt, da bei dieser Methode durch den Vergleich zweier verschiedener Zellpopulationen differentiell exprimierte Gene erfasst werden können (Wan und Nordeen, 2003). Es wurde davon abgesehen, Osteozytenkulturen mit Osteoblastenkulturen zu vergleichen, da durch die Verwendung der osteozytenähnlichen Zelllinie MLO-Y4 (Bonewald, 1999) oder durch osteozytenähnliche Primärkulturen (Mikuni-Takagaki et al. 1995), die auf einer spezialisierten Matrix (Matrigel) kultiviert werden, die Vergleichbarkeit zu den primären Osteoblasten sicherlich durch mehrere andere Aspekte überlagert worden wäre. Um ausschliesslich solche Gene zu identifizieren, deren Expression spezifisch durch den Prozess der Mineralisierung induziert wird, haben wir uns dazu entschlossen, gleichartig isolierte und kultivierte primäre Osteoblasten zu zwei verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung zu analysieren. Hierzu wurde zunächst die Mineralisation und Genexpression dieser Kulturen überprüft, um die besten Zeitpunkte für die Affymetrix-Analyse festzulegen. Da an Tag 5 nach Zugabe von Ascorbat und β -Glycerophosphat weder Mineralisation noch *Osteocalcin*-Expression nachweisbar waren, an Tag 25 der Differenzierung dies jedoch der Fall war, sollten diese beiden Zeitpunkte miteinander verglichen werden. Hierdurch sollte ermöglicht werden, weitere Gene zu identifizieren, die wie Osteocalcin in der terminalen Differenzierung von Osteoblasten in ihrer Expression induziert werden und eine wichtige Rolle bei der Regulation der Knochenformation spielen (Ducy et al. 1996).

Die initiale Auswertung der Affymetrix-Expressionsdaten im Hinblick auf bereits bekannte Marker der terminalen Osteoblasten-Differenzierung zeigte auf, dass der gewählte Ansatz erfolgreich war, da sowohl *Osteopontin*, *Osteocalcin*, *Bone Sialoprotein* und *PHEX* unter den am stärksten durch die Mineralisation induzierten Genen waren. Die unveränderte Expression von *Gapdh* zu beiden Zeitpunkten, sowie die fehlende Expression von Markern der Chondrozyten-Differenzierung unterstrich weiterhin die Aussagekraft der Methode und zeigte zudem die Reinheit der Osteoblastenkulturen auf. Desweiteren ist es wichtig zu erwähnen, dass die Gen-Induktion in allen Fällen unabhängig durch die RT-PCR-Expressionsanalyse bestätigt

werden konnte, in der sich immer eine stärkere Bande an Tag 25 der Differenzierung zeigte. Aus diesen Gründen kann davon ausgegangen werden, dass alle durch die Affymetrix-Analyse identifizierten Gene, deren Expression in der Mineralisationsphase stark induziert wird, eine potentielle Funktion in der Knochenformation spielen könnten, was in weiterführenden Experimenten untersucht werden sollte.

4.2 Untersuchung der gewebespezifischen Expression einiger Gene

Da eine solche Studie sicherlich über den Rahmen einer medizinischen Dissertation hinausgeht, sollte in der vorliegenden Arbeit zunächst ein weiterer Schritt für alle interessant erscheinenden Gene durchgeführt werden, nämlich die Bestimmung ihres gewebespezifischen Expressionsmusters, wozu eine RT-PCR-Expressionsanalyse mit cDNA aus verschiedenen Geweben 2 Wochen alter Mäuse durchgeführt wurde. Hierbei zeigte sich die spezifischste Expression für das nicht auf den Gen-Chips repräsentierte Gen *OF-45*, das selektiv in mineralisierten Osteoblasten, sowie in Femora und Schädeldächern exprimiert wird, nicht aber in allen anderen Geweben. Eine knochen-spezifische Expression zeigte sich ebenfalls für *Osteocalcin*, wenngleich in diesem Fall auch eine geringfügige Expression in nicht-mineralisierten Osteoblastenkulturen nachweisbar war. Ebenfalls ein sehr restriktives Expressionsmuster konnte für *PHEX* nachgewiesen werden, das bekanntermaßen aber auch in der Lunge exprimiert wird (Zoidis et al. 2002).

Neben diesen bereits aus der Knochenliteratur bekannten Genen war vor allen Dingen interessant, dass mit *Dkk-1* und *OSAP* zwei Gene identifiziert werden konnten, die durch die Mineralisation der Osteoblasten sehr stark in ihrer Expression induziert werden, und die in adulten Mäusen ein nahezu Knochen-spezifisches Expressionsmuster aufweisen. Da eine solche spezifische Expression auf eine physiologische Funktion beider Genprodukte bei der Regulation der Knochenformation hindeutet, sollte diese Möglichkeit durch weiterführende Experimente überprüft werden. Ein relativ selektives Expressionsmuster konnte auch für das Gen *Ptprz* nachgewiesen werden, das neben mineralisierten Osteoblasten, Femora und Schädeldächern auch im Gehirn und in der Lunge exprimiert wird, nicht jedoch in anderen Geweben. Auch dieses Gen könnte dementsprechend eine entscheidende Rolle bei der Integration des Knochenstoffwechsels spielen, was derzeit in der Arbeitsgruppe untersucht wird (siehe 5.2). Andere getestete Gene wurden hingegen in vielen Geweben

exprimiert, was nicht zwangsläufig ausschliesst, dass sie eine wichtige Rolle in der Regulation der Knochenformation spielen. Ein ubiquitäres Expressionsmuster wurde beispielsweise auch für *LRP5* beschrieben, ein Gen, das für einen Wnt-Rezeptor kodiert und dessen Inaktivierung im Menschen zu Osteoporose führt (Gong et al. 2001).

4.3 Nachweis einer physiologischen Funktion von *Ptprz* und *ApoE* im Knochenstoffwechsel

Der Erfolg des gewählten experimentellen Ansatzes wird zusätzlich durch weiterführende Untersuchungen unterstützt, die in der Arbeitsgruppe aufgrund der hier beschriebenen Ergebnisse durchgeführt wurden. So konnte in einer Kollaboration mit Dr. Sheila Harroch in Paris nachgewiesen werden, dass *Ptprz*-defiziente Mäuse im Alter von 12 Monaten eine Osteopenie aufweisen (Abb. 15). Durch die histomorphometrische Auswertung undekalzifizierter Schnitte von Wirbelkörper und Tibia *Ptprz*-defizienter Mäuse zeigte sich ein signifikant erniedrigtes trabekuläres Knochenvolumen im Vergleich zu Wildtyp-Kontrollmäusen. Auch wenn die zellulären Grundlagen dieser Osteopenie noch weiterführend untersucht werden müssen, zeigt dieses Ergebnis, dass einige der hier beschriebenen Mineralisations-induzierten Gene in der Tat eine physiologische Funktion im Knochenstoffwechsel übernehmen.

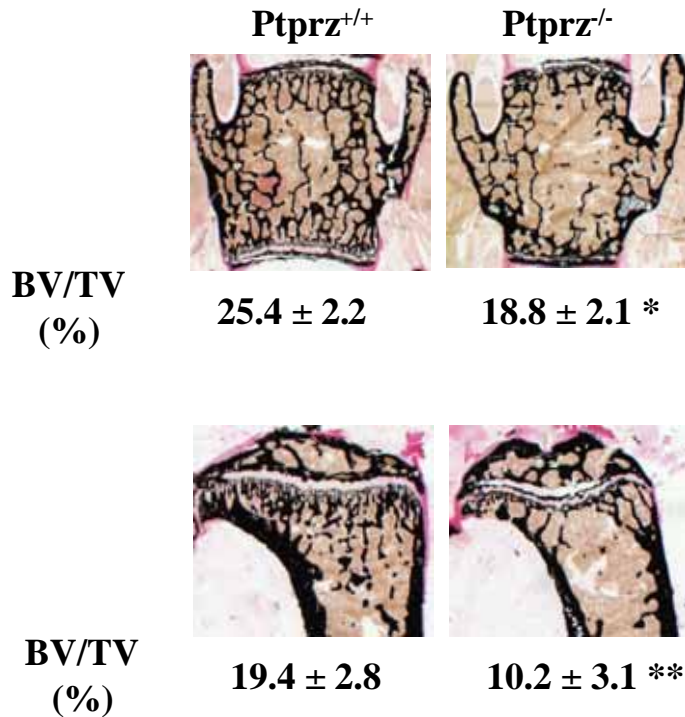


Abbildung 14: Osteopenie in *Ptprz*-defizienten Mäusen. Dargestellt sind von Kossa-Färbungen unentkalkter Schnitte von Wirbelkörper und Tibia 12 Monate alter Wildtyp- (*Ptprz*^{+/+}) und *Ptprz*-defizienter (*Ptprz*^{-/-}) Mäuse. Die mineralisierte Knochenmatrix ist schwarz angefärbt. Die histomorphometrische Auswertung ergab ein signifikant erniedrigtes Knochenvolumen (BV/TV, bone volume/total volume) in den *Ptprz*-defizienten Mäusen. Der genetische Hintergrund der Mäuse ist 129, ein Maus-Stamm der ein höheres trabekuläres Knochenvolumen aufweist als der Stamm C57Bl/6.

Ein weiteres durch die Affymetrix-Expressionsanalyse identifiziertes Gen, das eine physiologische Rolle im Knochenstoffwechsel spielt ist *ApoE*. Es ist zwar bekannt, dass *ApoE*-defiziente Mäuse eine Atherosklerose aufweisen, allerdings wurde der Knochenphänotyp dieser Mäuse noch nicht analysiert (Plump et al. 1992; Zhang et al. 1992). Dies wurde jedoch mittlerweile in der Experimentellen Unfallchirurgie getan, wobei sich eine erhöhte Knochendichte in *ApoE*-defizienten Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Kontrollmäusen zeigte (Abb. 16). In weiterführenden Untersuchungen konnte dies auf eine erhöhte Knochenformationsrate zurückgeführt werden, die ihrerseits über eine verminderte Vitamin K-Aufnahme in Osteoblasten erklärt werden könnte (unpublizierte Ergebnisse). Diese beiden Beispiele unterstreichen somit eindrucksvoll, dass der hier beschriebene experimentelle Ansatz zur Identifizierung neuer Gene führen konnte, die bei der Regulation der Knochendichte von Bedeutung sind.

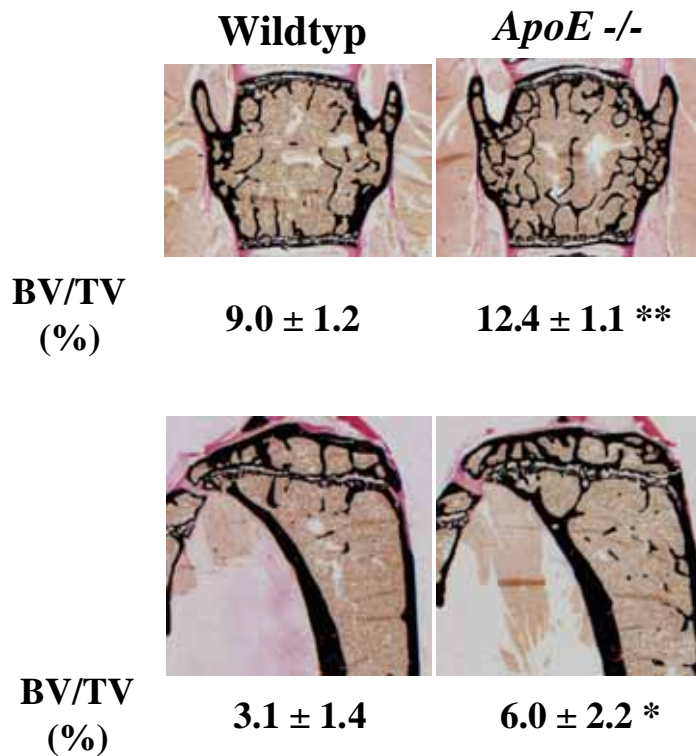


Abbildung 15: Erhöhte Knochendichte *ApoE*-defizienter Mäuse. Dargestellt sind von Kossa-Färbungen unentkalkter Schnitte von Wirbelkörper und Tibia 9 Monate alter Wildtyp- und *ApoE*-defizienter Mäuse. Die mineralisierte Knochenmatrix ist schwarz angefärbt. Die histomorphometrische Auswertung ergab ein signifikant erhöhtes Knochenvolumen (BV/TV, bone volume/total volume) in den *ApoE*-defizienten Mäusen. Der genetische Hintergrund der Mäuse ist C57Bl/6.

4.4 Nachweis der knochenspezifischen Expression einiger Gene

Zahlreiche Beispiele haben gezeigt, dass die gewebespezifische Expression bestimmter Gene oftmals mit einer physiologischen Funktion dieser Gene in dem betreffenden Gewebe korreliert. Im Knochenstoffwechsel gibt es hierfür mehrere gute Beispiele. So haben die osteoblastenspezifisch exprimierten Transkriptionsfaktoren *Runx2/Cbfa1* und *Osx* eine entscheidende Rolle bei der Einleitung der Knochenformation, da in beiden Fällen die gezielte Gendeletion in Mäusen zu einer kompletten Abwesenheit von Knochenmatrix führte (Komori et al. 1997; Nakashima et al. 2002; Otto et al. 1997). Desweiteren konnten auch für die osteoblastenspezifisch exprimierten Gene *Osteocalcin*, *PHEX* und *OF45* wichtige Funktionen bei der Regulation der Knochenformation und Biomineralisation durch die Analyse entsprechender defizienter Mausmodelle nachgewiesen werden (Ducy et al. 1996; Strom et al. 1997; Gowen et al. 2003). Vor diesem Hintergrund ist der Befund, dass auch die Gene *Dkk-1* und *OSAP* ein

nahezu knochenspezifisches Expressionsmuster in der RT-PCR-Expressionsanalyse aufweisen, ein vielversprechendes Ergebnis, das die weiterführende Charakterisierung dieser Gene zu sinnvollen Projekten für die Zukunft macht.

Dkk-1 ist in diesem Zusammenhang besonders interessant. Es gehört zur Familie der Dickkopf-Proteine, die als extrazelluläre Antagonisten der Wnt-Signaltransduktion beschrieben wurden (Krupnik et al. 1999). Aufgrund der kürzlich beschriebenen Funktion des Wnt-Rezeptors LRP5 in der Regulation der Knochenformation (Boyden et al. 2002; Gong et al, 2001), erscheint es sinnvoll, dass im Verlauf der terminalen Differenzierung von Osteoblasten ein Inhibitor der Wnt-Signaltransduktion im Sinne eines negativen Rückkopplungskreises exprimiert wird. Die Tatsache, dass *Dkk-1* in adulten Mäusen eine knochenspezifische Expression aufweist, ist ein Hinweis auf eine physiologische Funktion von Dkk-1 als Regulator der Knochenformation und könnte langfristig auch in therapeutischer Hinsicht, d.h. zur Behandlung von Knochenmasseverlust-Syndromen von Bedeutung sein. Über die vermeintliche Funktion von *OSAP* lässt sich hingegen weniger spekulieren, da dieses Gen noch nicht weitergehend charakterisiert wurde. Dies sollte jedoch Ziel weiterführender Arbeiten sein, durch die die Rolle von *OSAP* im Rahmen der Osteoblastendifferenzierung untersucht werden könnte, z.B. durch Transfektionsexperimente *in vitro*, oder durch die Etablierung transgener Mausmodelle *in vivo*.

4.5 Untersuchung der Osteozyten-Funktion *in vivo*

Neben der Identifizierung neuer Gene, die im Rahmen des Knochenstoffwechsels eine physiologische Rolle spielen könnten, war ein Ziel dieser Dissertation ein osteozyten-spezifisches Gen zu finden, dessen regulatorischen Elemente zur Etablierung eines Mausmodells genutzt werden könnten, in der z.B. die Cre-Rekombinase spezifisch in Osteozyten exprimiert wird. Langfristig könnte ein solches Mausmodell dazu genutzt werden, um durch Verpaarungen mit anderen Mausmodellen osteozytenspezifische Gendeletionen *in vivo* zu erzeugen, oder um die Osteozyten-Population *in vivo* gezielt zu deletieren.

Dies könnte zum Beispiel durch Verpaarung einer osteozytenspezifisch Cre-exprimierenden Maus mit einem Mausmodell erreicht werden, das von Brockschnieder et al. am ZMNH in Hamburg etabliert wurde (Brockschnieder et al. 2004). Die betreffenden Mäuse enthalten ein Transgen, das durch Cre-vermittelte Exzision zur Expression des Diphtherie-Toxin A-Gens führt. Würde diese Exzision nur in Osteozyten erfolgen (wie im Falle einer osteozytenspezifisch Cre-exprimierenden Maus), so würde diese Zellpopulation selektiv vernichtet, wodurch es erstmals möglich wäre, eine Funktion der Osteozyten *in vivo* zu definieren.

Der erste Schritt bei der Herstellung eines solchen Mausmodells war die Wahl eines osteozytenspezifischen Gens für dieses Vorhabens. Aufgrund der durchgeführten RT-Expressionanalysen wurde im Zusammenhang mit den Literaturdaten (Petersen et al. 2000) das *OF45*-Gen gewählt, das im Verlauf dieser Dissertation bereits als BAC-Fragment isoliert wurde. Es gibt nun zwei Möglichkeiten, um in der Zukunft osteozytenspezifische Cre-exprimierende Mäuse zu erhalten. Die erste Möglichkeit wäre eine aufwendige Charakterisierung des *OF45*-Promotors, um die regulatorischen Elemente zu definieren, die *in vivo* die osteozytenspezifische Expression gewährleisten. Die zweite Möglichkeit ist die sogenannte ET-Rekombination (Zhang et al. 1998), die in der Durchführung zunächst einfacher erscheint, da keine spezifischen Kenntnisse über die osteozytenspezifische Regulation des *OF45*-Gens generiert werden müssten.

Bei der ET-Rekombination handelt es sich um einen durch die bakteriellen Enzyme *recE* und *recT* vermittelten homologen Rekombinationsprozess. Dieser könnte dazu genutzt werden, in dem das *OF45*-Gen enthaltenden BAC die für die Cre-Rekombinase kodierende Sequenz unter Beibehaltung des Leserasters mit dem *OF45*-Start-Kodon zu fusionieren (Abb. 17). Durch die Generierung transgener Mäuse mit diesem modifizierten BAC-Fragment sollte dementsprechend die Cre-Rekombinase in der gleichen Weise exprimiert werden wie das *OF45*-Gen, d.h. spezifisch in Osteozyten.

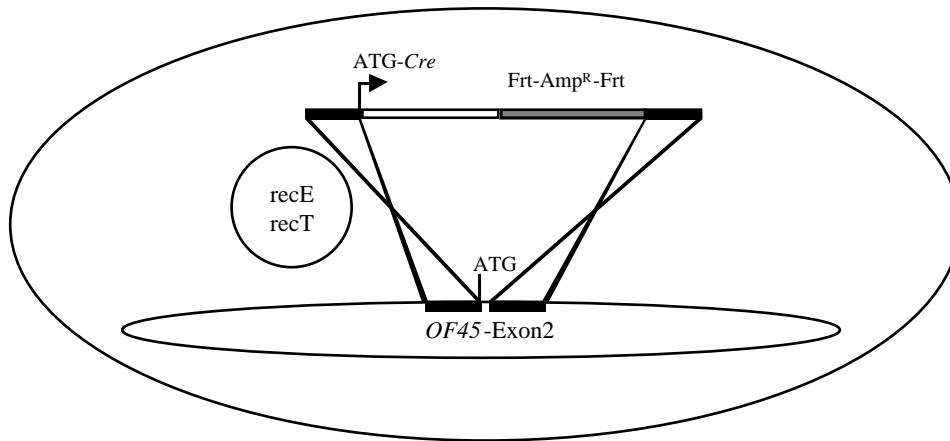


Abbildung 16: „Knock-In“ der Cre-Rekombinase in das *OF45*-Gen durch ET-Rekombination. In *E.coli*-Bakterien soll vermittelt durch die Enzyme *recE* und *recT* eine homologe Rekombination erzielt werden, durch die die für die Cre-Rekombinase kodierende Sequenz unter Beibehaltung des Leserasters mit dem *OF45*-Start-Kodon fusioniert wird. Hierzu werden Bakterien, die sowohl den *OF45*-haltigen BAC als auch das *recE/recT*-Expressionsplasmid enthalten, mit einem Targeting-Konstrukt transformiert, das 5'- und 3'-flankierende Sequenzen des *OF45*-Start-Kodons beinhaltet. Das Ampicillin-Resistenzgen dient der Selektion rekombinierter Klone und kann anschließend durch die Aktivität der FLP-Rekombinase (nach Transformation eines betreffenden Expressionsplasmids) entfernt werden.

5 Zusammenfassung

Der adulte Knochen ist zusammengesetzt aus Knochen-resorbierenden Osteoklasten, Knochen-bildenden Osteoblasten und Osteozyten, d.h. terminal differenzierten Osteoblasten mit unbekannter physiologischer Funktion. Wie bedeutend das Gleichgewicht dieser zellulären Aktivitäten ist, zeigt die gesundheitspolitische Bedeutung der Osteoporose, einer Erkrankung, die im Alter zu Knochenmasseverlust und erhöhter Frakturneigung führt. Da Osteoporose bislang nur unzureichend behandelt werden kann, ist es wichtig, neue therapeutische Ansatzpunkte zu finden, was zum Beispiel durch die Identifizierung von Genen erreicht werden kann, die bei der Regulation der Knochenformation eine Rolle spielen.

Vor diesem Hintergrund sollte in der vorliegenden Dissertation die terminale Differenzierung von Osteoblasten molekulargenetisch untersucht werden. Der erste Schritt hierzu war die Kultivierung und Differenzierung primärer Osteoblasten, die aus Schädeldächern neugeborener Mäuse gewonnen wurden. An Tag 5 und Tag 25 der durch Ascorbat und β -Glycerophosphat eingeleiteten Differenzierung wurde anschließend mRNA isoliert, die in Zusammenarbeit mit Dr. Streichert in der Abteilung für Klinische Chemie für eine Affymetrix Gen-Chip-Hybridisierung eingesetzt wurde. Durch diese Methode konnte simultan das Expressionsprofil von über 30000 Genen quantitativ erfasst werden, um somit Gene zu identifizieren, die in mineralisierten (Tag 25) im Gegensatz zu nicht-mineralisierten (Tag 5) Kulturen in ihrer Expression induziert wurden. Im nächsten Schritt sollte für einige dieser Gene das Gewebespezifische Expressionsmuster mittels RT-PCR analysiert werden.

Die Kombination beider Methoden führte zur Etablierung einiger Kandidatengene (z.B. Dkk1, Ptpz oder OF45), deren Expression einerseits in der terminalen Osteoblasten-Differenzierung stark induziert wird und andererseits relativ spezifisch für Knochengewebe ist. Die funktionelle Analyse einiger dieser Gene ist Ziel weiterführender Experimente. Zudem sollte es allerdings auch möglich sein, durch Generierung einer transgenen Mauslinie mit Osteozyten-spezifischer Expression der Cre-Rekombinase Gene in vivo selektiv in Osteozyten zu deletieren. Um dieses Ziel langfristig zu erreichen, wurde im letzten Teil der vorliegenden Dissertation ein genomisches Fragment des OF45-Gens isoliert, das nun zur genetischen Manipulation (d.h. Integration der Cre-Rekombinase) zur Verfügung steht.

B Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Osteoklasten-Differenzierung	3
Abbildung 2: Osteoblasten-Differenzierung	5
Abbildung 3: Morphologie von Osteozyten	6
Abbildung 4: Mineralisation primärer Maus-Osteoblasten	21
Abbildung 5: Differenzierung primärer Maus-Osteoblasten	22
Abbildung 6: RNA-Isolation an Tag 5 und Tag 25 der osteoblastären Differenzierung	23
Abbildung 7: Überprüfung der mRNA-Isolierung	24
Abbildung 8: Expression von Differenzierungsmarkern	26
Abbildung 9: RT-PCR-Expressionsanalyse für einige der induzierten Gene des A-Chips	28
Abbildung 10: RT-PCR-Expressionsanalyse für einige der induzierten Gene des B- und C-Chips	31
Abbildung 11: RT-PCR-Expressionsanalyse für das Gen OF-45	32
Abbildung 12: PCR-Identifizierung OF-45-haltiger BAC-Pools	33
Abbildung 13: Identifizierung des OF-45-haltigen BAC-Klons	34
Abbildung 14: Osteopenie in P ^{trprz} -defizienten Mäusen	38
Abbildung 15: Erhöhte Knochendichte ApoE-defizienter Mäuse	39
Abbildung 16: „Knock-In“ der Cre-Rekombinase in das OF45-Gen durch ET-Rekombination ..	41
Tabelle 1: Verwendete Oligonukleotid-Primer für die Expressionsanalyse	13
Tabelle 2: Rangliste der am stärksten induzierten Gene auf dem A-Chip	27
Tabelle 3: Rangliste der am stärksten induzierten Gene auf dem B- und C-Chip	30

C Literaturverzeichnis

Bellows CG, Aubin JE, Heersche JN, Antosz ME. 1986 Mineralized bone nodules formed in vitro from enzymatically released rat calvaria cell populations. *Calcif. Tissue Int.* **38**:143-54

Bonewald LF. 1999 Establishment and characterization of an osteocyte-like cell line, MLO-Y4. *J. Bone Miner. Metab.* **17**:61-65

Boyden LM, Mao J, Belsky J, Mitzner L, Farhi A, Mitnick MA, Wu D, Insogna K, Lifton RP. 2002 High bone density due to a mutation in LDL-receptor-related protein 5. *N. Engl. J. Med.* **346**:1513-1521

Brockschnieder D, Lappe-Siefke C, Goebbels S, Boesl MR, Nave KA, Riethmacher D. 2004 Cell depletion due to diphtheria toxin fragment A after Cre-mediated recombination. *Mol. Cell. Biol.* **24**:7636-7642

Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C, Scully S, Tan HL, Xu W, Lacey DL, Boyle WJ, Simonet WS. 1998 osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev.* **12**:1260-1268

Dixon PH, Christie PT, Wooding C, Trump D, Grieff M, Holm I, Gertner JM, Schmidtke J, Shah B, Shaw N, Smith C, Tau C, Schlessinger D, Whyte MP, Thakker RV. 1998 Mutational analysis of PHEX gene in X-linked hypophosphatemia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **83**:3615-3623

Ducy P, Desbois C, Boyce B, Pinero G, Story B, Dunstan C, Smith E, Bonadio J, Goldstein S, Gundberg C, Bradley A, Karsenty G. 1996 Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature* **382**:448-452

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

Ducy P, Amling M, Takeda S, Priemel M, Schilling AF, Beil FT, Shen J, Vinson C, Rueger JM, Karsenty G. 2000 Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass. *Cell*. **100**:197-207

Gong Y, Slee RB, Fukai N, Rawadi G, Roman-Roman S, Reginato AM, Wang H, Cundy T, Glorieux FH, Lev D, Zacharin M, Oexle K, Marcelino J, Suwairi W, Heeger S, Sabatakos G, Apte S, Adkins WN, Allgrove J, Arslan-Kirchner M, Batch JA, Beighton P, Black GC, Boles RG, Boon LM, Borrone C, Brunner HG, Carle GF, Dallapiccola B, De Paepe A, Floege B, Halfhide ML, Hall B, Hennekam RC, Hirose T, Jans A, Juppner H, Kim CA, Keppeler-Noreuil K, Kohlschuetter A, LaCombe D, Lambert M, Lemyre E, Letteboer T, Peltonen L, Ramesar RS, Romanengo M, Somer H, Steichen-Gersdorf E, Steinmann B, Sullivan B, Superti-Furga A, Swoboda W, van den Boogaard MJ, Van Hul W, Vikkula M, Votruba M, Zabel B, Garcia T, Baron R, Olsen BR, Warman ML; Osteoporosis-Pseudoglioma Syndrome Collaborative Group. 2001 LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development. *Cell*. **107**:513-523

Gowen LC, Petersen DN, Mansolf AL, Qi H, Stock JL, Tkalcevic GT, Simmons HA, Crawford DT, Chidsey-Frink KL, Ke HZ, McNeish JD, Brown TA. 2003 Targeted disruption of the osteoblast/osteocyte factor 45 gene (OF45) results in increased bone formation and bone mass. *J. Biol. Chem.* **278**:1998-2007

Harada S, Rodan GA. 2003 Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature*. **423**:349-355

Harroch S, Furtado GC, Brueck W, Rosenbluth J, Lafaille J, Chao M, Buxbaum JD, Schlessinger J. 2002 A critical role for the protein tyrosine phosphatase receptor type Z in functional recovery from demyelinating lesions. *Nat. Genet.* **32**:411-414

Karsenty G. 1999 The genetic transformation of bone biology. *Genes Dev.* **13**:3037-3051

Kato M, Patel MS, Levasseur R, Lobov I, Chang BH, Glass DA 2nd, Hartmann C, Li L, Hwang TH, Brayton CF, Lang RA, Karsenty G, Chan L. 2002 Cbfa1-independent decrease in osteoblast proliferation, osteopenia, and persistent embryonic eye vascularization in mice deficient in Lrp5, a Wnt coreceptor. *J. Cell Biol.* **157**:303-314

Knothe Tate ML, Adamson JR, Tami AE, Bauer TW. 2004 The osteocyte. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **36**:1-8

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

Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, Tan HL, Timms E, Capparelli C, Morony S, Oliveira-dos-Santos AJ, Van G, Itie A, Khoo W, Wakeham A, Dunstan CR, Lacey DL, Mak TW, Boyle WJ, Penninger JM. 1999 OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* **397**:315-323

Khosla S. 2001 Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology* **142**:5050-5055

Kornak U, Kasper D, Bosl MR, Kaiser E, Schweizer M, Schulz A, Friedrich W, Delling G, Jentsch TJ. 2001 Loss of the ClC-7 chloride channel leads to osteopetrosis in mice and man. *Cell.* **104**:205-215

Hennebold JD, Tanaka M, Saito J, Hanson BR, Adashi EY. 2000 Ovary-selective genes I: the generation and characterization of an ovary-selective complementary deoxyribonucleic acid library. *Endocrinology*. **141**:2725-2734

Krupnik VE, Sharp JD, Jiang C, Robison K, Chickering TW, Amaravadi L, Brown DE, Guyot D, Mays G, Leiby K, Chang B, Duong T, Goodearl AD, Gearing DP, Sokol SY, McCarthy SA. 1999 Functional and structural diversity of the human Dickkopf gene family. *Gene*. **238**:301-313

Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S, Hsu H, Sullivan J, Hawkins N, Davy E, Capparelli C, Eli A, Qian YX, Kaufman S, Sarosi I, Shalhoub V, Senaldi G, Guo J, Delaney J, Boyle WJ. 1998 Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*. **93**:165-176

Li YP, Chen W, Liang Y, Li E, Stashenko P. 1999 Atp6i-deficient mice exhibit severe osteopetrosis due to loss of osteoclast-mediated extracellular acidification. *Nat. Genet*. **23**:447-451

Lin JT, Lane JM. 2004 Osteoporosis: a review. *Clin. Orthop*. **425**:126-134

Mikuni-Takagaki Y, Kakai Y, Satoyoshi M, Kawano E, Suzuki Y, Kawase T, Saito S. 1995 Matrix mineralization and the differentiation of osteocyte-like cells in culture. *J. Bone Miner. Res*. **10**:231-242

Motyckova G, Fisher DE. 2002 Pycnodysostosis: role and regulation of cathepsin K in osteoclast function and human disease. *Curr. Mol. Med*. **2**:407-421

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

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

Otto F, Thornell AP, Crompton T, Denzel A, Gilmour KC, Rosewell IR, Stamp GW, Beddington RS, Mundlos S, Olsen BR, Selby PB, Owen MJ. 1997 Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell*. **89**:765-771

Petersen DN, Tkalcevic GT, Mansolf AL, Rivera-Gonzalez R, Brown TA. 2000 Identification of osteoblast/osteocyte factor 45 (OF45), a bone-specific cDNA encoding an RGD-containing protein that is highly expressed in osteoblasts and osteocytes. *J. Biol. Chem*. **275**:36172-36180

Plump AS, Smith JD, Hayek T, Aalto-Setälä K, Walsh A, Verstuyft JG, Rubin EM, Breslow JL. 1992 Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell*. **71**:343-353

Raisz LG. 1999 Physiology and pathophysiology of bone remodeling. *Clin. Chem*. **45**:1353-1358.

Saftig P, Hunziker E, Wehmeyer O, Jones S, Boyde A, Rommerskirch W, Moritz JD, Schu P, von Figura K. 1998 Impaired osteoclastic bone resorption leads to osteopetrosis in cathepsin-K-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. **95**:13453-13458

Sauer B. 1998 Inducible gene targeting in mice using the Cre/lox system. *Methods*. **14**:381-392

Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan

J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Boyle WJ. 1997 Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*. **89**:309-319

Soriano P, Montgomery C, Geske R, Bradley A. 1991 Targeted disruption of the c-src proto-oncogene leads to osteopetrosis in mice. *Cell*. **64**:693-702

Strom TM, Francis F, Lorenz B, Boddlich A, Econs MJ, Lehrach H, Meitinger T. 1997 Pex gene deletions in Gy and Hyp mice provide mouse models for X-linked hypophosphatemia. *Hum. Mol. Genet.* **6**: 165-171

Takeda S, Bonnamy JP, Owen MJ, Ducy P, Karsenty G. 2001 Continuous expression of Cbfa1 in nonhypertrophic chondrocytes uncovers its ability to induce hypertrophic chondrocyte differentiation and partially rescues Cbfa1-deficient mice. *Genes Dev.* **15**:467-481

Taranta A, Migliaccio S, Recchia I, Caniglia M, Luciani M, De Rossi G, Dionisi-Vici C, Pinto RM, Francalanci P, Boldrini R, Lanino E, Dini G, Morreale G, Ralston SH, Villa A, Vezzoni P, Del Principe D, Cassiani F, Palumbo G, Teti A. 2003 Genotype-phenotype relationship in human ATP6i-dependent autosomal recessive osteopetrosis. *Am. J. Pathol.* **162**:57-68

Teitelbaum SL, Ross FP. 2003 Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat. Rev. Genet.* **4**:638-649

The HYP Consortium. 1995 A gene (PEX) with homologies to endopeptidases is mutated in patients with X-linked hypophosphatemic rickets. *Nat. Genet.* **11**:130-136

Van der Plas A, Nijweide PJ. 1992 Isolation and purification of osteocytes. *J. Bone Miner. Res.* **7**:389-396

Wan Y, Nordeen SK. 2003 Overlapping but distinct profiles of gene expression elicited by glucocorticoids and progestins. *Recent Prog. Horm. Res.* **58**:199-226

Zhang SH, Reddick RL, Piedrahita JA, Maeda N. 1992 Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science.* **258**:468-471

Zhang Y, Buchholz F, Muirers JP, Stewart AF. 1998 A new logic for DNA engineering using recombination in *Escherichia coli*. *Nat Genet.* **20**:123-128

Zoidis E, Gosteli-Peter M, Ghirlanda-Keller C, Meinel L, Zapf J, Schmid C 2002 IGF-I and GH stimulate Phex mRNA expression in lungs and bones and 1,25-dihydroxyvitamin D(3) production in hypophysectomized rats. *Eur. J. Endocrinol.* **146**: 97-105

D Abkürzungsverzeichnis

ApoE	Apolipoprotein E
BAC	bacterial artificial chromosomes
Bgp	osteocalcin
BSP	bone sialoprotein
Cbfa1/Runx2	osteoblast-specific transcript factor
CLC7	chloride channel 7
Col2a1	TypII-Collagen
Col10a1	TypX-Collagen
Comp	cartilage oligomeric matrix protein
CSF	colony-stimulating factor
Dkk-1	Dickkopf-1
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid
EST	expressed sequence tag
Fzd-related	frizzled-related
Gapdh	glyceraldehydphosphat-dehydrogenase
LRP5	(LDL)-receptor-related protein5
MLO-Y4	osteocyte-like cell line
MOPS	Morpholinpropansulfonsäure
Mepe/OF45	osteoblast/osteocyte factor of 45 kDa
OPG	osteoprotegerin
Opn	Osteopontin
OPPG	osteoporosis-pseudoglioma syndrom
Osap	ovary specific acidic protein
Osx	osterix
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PHEX	phosphate-regulating gene with homologies to endopeptidases located on X-chromosome
Ptprz	protein-tyrosin-phosphatase-receptor typ Z
RANK	receptor activator of NF-kB
RANKL	RANK ligand
RT-PCR	<i>reverse transcriptase-polymerase chain reaction</i>

SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium <i>dodecyl</i> sulfate)
TAE	Tris-Acetate-EDTA
TRAF6	tumor necrosis factor receptor-associated factor 6
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan

E Danksagung

Herrn Prof. Dr. M. Amling danke ich für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung der Arbeitsmittel, sowie für das entgegengebrachte Interesse für die vorliegende Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt meinem Mentor Dr. Thorsten Schinke für die Betreuung, die Einarbeitung in wichtige Methoden der Molekularbiologie und den intellektuellen Beitrag zur vorliegenden Arbeit.

Dr. Matthias Gebauer und Dr. Thomas Streichert danke ich für eine fruchtbare Zusammenarbeit im Bereich der Affymetrix Gen-Chip-Hybridisierung, sowie der Auswertung der daraus gewonnenen Daten.

Für hilfreiche Anregungen möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Experimentellen Unfallchirurgie bedanken.

F Lebenslauf

Angaben zur Person

Name	Djahesh Noor
Geburtsdatum/-ort	27.06.1974 in Kabul, Afghanistan
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulbildung

1979 - 1983	Grundschule und Gymnasium Kabul
1985 - 1995	Gesamtschule Mümmelmansberg Hamburg, Abschluss: Abitur

Ersatzdienst

1995 - 1996	Ausbildung zum Rettungssanitäter bei Johanniter-Unfall-Hilfe e.V.
1996 - 1997	Erste-Hilfe-Ausbilder bei der Johanniter-Unfall-Hilfe e.V.

Studium

1997-2005	Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg
1999	Vorärztliche Prüfung
2001	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2003	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2004	Ärztliche Prüfung und Approbation

Praktisches Jahr

2003 - 2004	Innere Medizin, Prof. Dr. von Schrenck, Bethesda AK Bergedorf Allgemeine und Gefäßchirurgie, Prof. Dr. Eggert, Krankenhaus Reinbek St. Adolfstift Molekularbiologie, Prof. Dr. Laufs, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
-------------	---

Publikation

2004	“Evaluation of a new cefepime – clavulanate ESBL Etest to detect extended-spectrum β -lactamases in an Enterobacteriaceae strain collection“ erschieden im Mai 2004 in Journal of Antimicrobial Chemotherapy
------	---

Beruf

seit 2005	Assistenzarzt für Orthopädie im Klinikum Neustadt in Holstein
-----------	---

G Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich diese Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Hamburg, den 28. Februar 2005

Djahesh Noor