

**Aus dem Institut Hämatologie/Onkologie
des Zentrums für Kinderheilkunde
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf
Direktor Prof. Dr. Schneppenheim**

**Analyse und Bewertung
potenziell spezifischer Promotoren auf ihre Eignung
zur Anwendung in einem gentherapeutischen Ansatz
bei der Behandlung des Osteosarkoms**

Promotion

**zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin,
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von**

**Annika Eva Charlotte Bronsema, geb. Pollmann
aus Münster
Hamburg 2006**

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. H. Kabisch
Prüfungsausschuss, 2. Gutachter: Prof. Dr. W. Fiedler
Prüfungsausschuss, 3. Gutachter: Prof. Dr. A.R. Zander

Diese Arbeit ist Dr. Olaf José-Carlos Hellwinkel gewidmet.

**Wissenschaft braucht die Zusammenarbeit,
indem die Entdeckung des Einen
das Wissen des Anderen bereichert.**

José Ortega y Gasset

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	8
1.1 Das Osteosarkom und seine potenzielle Behandlung.....	8
durch Gentherapie	8
1.2 Fragestellung	14
2. Material und Methoden	15
2.1 Material	15
2.1.1 Geräte.....	15
2.1.2 Kommerzielle Gebrauchslösungen und Chemikalien.....	16
2.1.3 Molekularbiologische Reagenzien.....	17
2.1.4 Puffer	18
2.1.5 Medien.....	19
2.1.5.1 Füttermedien.....	19
2.1.5.2 Einfriermedien.....	20
2.1.6 Kits	21
2.1.7 Bakterien.....	21
2.1.8 Antikörper, Enzyme, Proteine.....	22
2.1.9 Primer	22
2.1.10 Promotoren.....	23
2.1.11 Zellkulturen	27
2.2 Methoden.....	28
2.2.1 Konstruktherstellung und Klonierungsarbeiten	28
2.2.1.1 PCR.....	29
2.2.1.2 RT-PCR.....	29
2.2.1.3 Quantifizierung von DNA.....	30
2.2.1.4 Restriktionsverdau und Kontrollverdau.....	30
2.2.1.5 Agarosegelelektrophorese.....	31
2.2.1.6 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen	31

2.2.1.7 Topo XL PCR Cloning.....	32
2.2.1.8 Dephosphorilierung (Zippen).....	32
2.2.1.9 Ligation.....	33
2.2.1.10 Transformation.....	34
2.2.1.11 Plasmid-Minipräparation.....	34
2.2.1.12 DNA-Sequenzierung.....	34
2.2.1.13 Plasmid-Maxipräparation	35
2.2.2 Zellkultur	37
2.2.2.1 Bebrütung und Fütterung	37
2.2.2.2 Trypsinierung (Passagierung).....	37
2.2.2.3 Einfrieren und Lagerung von Zellen.....	38
2.2.2.4 Auftauen von Kulturen	38
2.2.2.5 Zellzahlbestimmung	38
2.2.3 β -Galaktosidase-assay	38
2.2.4 Transfektion	39
2.2.4.1 Chemische Transfektion	39
2.2.4.2 Elektroporation	40
2.2.5 Dual-Luciferase-Reporter-assay	40
3. Ergebnisse	42
3.1 Herstellung der Promotorkonstrukte	42
3.2 Etablierung der Zelltransfektion.....	49
3.3 Evaluation der höchsten Aktivität der Promotoren.....	51
3.3.1 Kinetik des Col1-A-1-CMV-min.-prom.	52
3.3.2 Kinetik des hOC-prom.-compl.....	53
3.3.3 Kinetik des Bsp 2472-prom.	54
3.3.4 Voruntersuchung an den verkürzten hOC-Promotoren.....	55
3.4 Hauptversuche.....	56
3.4.1 Aktivität der zelleigenen Gene	56

3.4.2 Hauptversuch: Col1-A-1-CMV-min.-prom. Aktivität in.....	
OS-Zellen und Kontrollen	57
3.4.3 Hauptversuch: hOC-AV-prom. Aktivität in OS-Zellen.....	
und Kontrollen.....	59
3.4.4 Hauptversuch: hOC-prom.-compl. Aktivität in OS-Zellen.....	
und Kontrollen.....	61
3.4.5 Hauptversuch: Bsp 2472-prom. Aktivität in OS-Zellen.....	
und Kontrollen.....	63
3.4.6 Hauptversuch: β -cat.-prom. Aktivität in OS-Zellen und LL-86...	65
3.4.7 Hauptversuch: pAd.3r-luc.-Konstrukt Aktivität in OS-Zellen.....	
und LL-86.....	66
4. Diskussion.....	68
5. Zusammenfassung	77
6. Literatur	78
7. Danksagung.....	83
8. Lebenslauf	84
9. Erklärung	86
10. Abkürzungen	87

1. Einleitung

1.1 Das Osteosarkom und seine potenzielle Behandlung durch Gentherapie

Tumore sind entartete Zellgruppen mit hohen Zellteilungsraten (Proliferation), deren natürliche Funktion im Gewebeverband gestört ist. Maligne Tumorzellen proliferieren ungehemmt und besitzen die Fähigkeit, sich in tumorfernen Bereichen des Körpers auszusäen und somit weiter auszubreiten (Dissimination). Als Ursachen sind Mutationen und Alterationen in DNA-Abschnitten zu betrachten, die für eine Reihe wichtiger in der Regulation von Dissimination und Proliferation beteiligter Gene kodieren. In welcher Häufigkeit oder Reihenfolge diese Veränderungen erfolgen und welche Wechselwirkungen mit anderen Faktoren eine Rolle spielen ist von großer Bedeutung für das Verständnis der Entstehungsmechanismen von Tumoren und folglich notwendig, um neue Therapien zu entwickeln. Eine Schlüsselrolle spielen Alterationen in Tumorsuppressorgenen, besonders Retinoblastoma (Rb) und p53. Tumorsuppressoren kontrollieren die Zellteilung normaler Zellen bzw. leiten das zelleigene Selbstmordprogramm (Apoptose) beschädigter Zellen ein. Sind diese Gene oder wichtige Enzyme, welche ihre Aktivität ermöglichen, defekt, besteht die Möglichkeit der ungehinderten Proliferation der betroffenen Zellen (Scholz, Kabisch et al. 1990; Scholz, Kabisch et al. 1992; Hoffmann, Catron et al. 1994; Hanahan and Weinberg 2000). Es wird vermutet, dass im Kindesalter die hohe Teilungsrate der Zellen den Auslöser erhöhter Mutationsraten darstellt, während im Erwachsenenalter Mutationen z.T. erst nach jahrzehntelanger Schadstoffexposition (z.B. Rauchen) zur Entartung der Zellen führen.

Das Osteosarkom (OS) ist mit einer Inzidenz von 2-3/Mio/Jahr (Bielack, Flege et al. 2000) der häufigste Knochentumor bei Kindern und Jugendlichen. Es zeigt sich, dass der Tumor in den Metaphysen der langen Röhrenknochen, am häufigsten im distalen Femur und der proximalen Tibia (Gibbs, Weber et al. 2002), lokalisiert ist. Das männliche Geschlecht ist häufiger betroffen als das weibliche (60:40) (Bielack, Flege et al. 2000). Das Prädelektionsalter liegt im 2. Lebensjahrzehnt.

Seit Ende der 1970er Jahre wird das Osteosarkom durch die Kombination aus Operation und aggressiver prä- und postoperativer Polychemotherapie behandelt. Es konnte in den folgenden Jahren gezeigt werden, dass die Heilungsraten deutlich zunahmen (Rosen, Nirenberg et al. 1981). Die Operation ist die einzige Wahl der Lokaltherapie und stellt einen wichtigen Faktor der Prognose dar. Ist es möglich, den Tumor radikal mit ausreichender tumorfreier Randzone

zu entfernen und spricht zusätzlich der Tumor gut an, sinkt das Risiko eines Lokalrezidivs um ein Vielfaches (Bielack, Flege et al. 2000; Gibbs, Weber et al. 2002). Es muss allerdings davon ausgegangen werden, dass zum Zeitpunkt der Diagnosestellung nicht darstellbare Mikrometastasen existieren. Aus diesem Grund sollte ein Therapieansatz nicht auf den Primärtumor beschränkt bleiben.

Ein weiteres prognostisches Kriterium stellt somit das Ansprechen des Tumors auf die neoadjuvante Therapie dar; reagiert der Tumor ($< 10\%$ vitaler Resttumor), ist die Überlebenswahrscheinlichkeit um 20-30 % erhöht (Bielack, Kempf-Bielack et al. 1999).

Entsprechend hat sich gezeigt, dass die Therapie des Osteosarkoms in einem multifokalen Ansatz besteht, der auf der lokalen Sanierung durch die Chirurgie (seltener der Bestrahlung inoperabler Tumore) und einer intensiven prä- und postoperativen Polychemotherapie, die sich heute aus Kombinationen von Methotrexat, Ifosfamid, Cisplatin und Adriamycin zusammensetzt, basiert (Bielack, Flege et al. 2000).

Bis heute konnte die 5-Jahres-Überlebensrate für Patienten mit lokalisierten Extremitätentumoren auf 60 % gesteigert werden (Coss 1977-1992). Gegenwärtig können diese ermutigenden Ergebnisse jedoch nicht auf Patienten mit Lokalisation des Primärtumors am Rumpf (12 % aller OS-Lokalisationen) oder mit bei Diagnosestellung darstellbaren Metastasen (20 % aller Patienten) übertragen werden. Das gilt auch für die Fälle, bei denen eine spätere Metastasierung (40 % aller Patienten) in die Lunge oder das Skelett vorliegt, bzw. bei denen sich in den folgenden Monaten ein Rückfall entwickelt. Die davon betroffenen Patienten haben eine erheblich schlechtere Prognose (Bielack, Flege et al. 2000).

Um für diese Patientengruppe die Prognose zu verbessern, wurden in den letzten 25 Jahren mehrere Therapieansätze erprobt: Dosissteigerung Osteosarkom-wirksamer Chemotherapeutika (Methotrexat, Ifosfamid, Cisplatin und Adriamycin), Einführung neuer Medikamente wie Carboplatin und VP 16, Blutstammzell-Autotransplantation, Bestrahlung und lokale, auf den Tumor gerichtete Infusion hoch radioaktiver Stoffe. Diese Versuche brachten jedoch nicht den gewünschten Erfolg oder beinhalteten nicht tolerable Nebenwirkungen wie Herz-, Nieren- und Gehörschäden. Aus diesem Grund müssen weitere Therapien geschaffen werden, welche die Metastasen direkt angreifen und die Therapie für den Patienten erträglicher machen. Eine Möglichkeit stellt die Genterapie dar.

Genterapie bedeutet grundsätzlich die Übertragung fremder Gene (Transgene) in lebende Zellen, in welchen Transgenprodukte (Expressionsprodukte = Proteine) exprimiert werden und eine therapeutische Wirkung entfalten wie Tumorzellen töten oder ihr Wachstum zum Stillstand bringen (Zhang, Kimijima et al. 1999). Für den effektiven genetischen Transfer

wurden verschiedene Methoden entwickelt: die Übertragung durch künstliche Polymere (hierbei wird die DNA kondensiert oder in Liposomen eingekapselt; diese verschmelzen mit den Membranen der Zielzelle und geben die DNA ins Zytoplasma ab (Cotten and Wagner 1993; Chang, Xuan et al. 1999), die Vermittlung der nackten DNA in Form ringförmiger Plasmide (Cotten and Wagner 1993) und mittels gentechnisch veränderter Viren als Genfähren (= Vektoren) (Wilson 2002).

Die Grundidee zur letztgenannten Methode basiert auf der Nutzung der Fähigkeit von Viren, Zellen effizient zu infizieren und die virale DNA direkt in den Zellkern zu bringen. Die infizierten Zellen schließen die fremde DNA in ihre Proteinbiosynthese mit ein und produzieren die auf den Transgenen kodierten Proteine.

Es bieten sich verschiedene Arten therapeutischer Transgene zur Verwendung an. Zunächst kann ein so genanntes „Selbstmord“-Gen (z.B. Herpes simplex Thymidinkinase) transfiziert werden, dessen Produkt, ein Enzym, ein dem Patienten verabreichtes Medikament (Gancyclovir) intrazellulär in seine zytotoxische Form überführt (Ram, Culver et al. 1997) und dieses somit lokal therapeutisch wirksam macht. Ebenso ist es möglich, immunaktive Gene zu übertragen (Interleukin 2-12), deren Produkte nach ihrer Sezernierung durch die infizierten Zellen Komponenten des Immunsystems rekrutieren und somit eine Zerstörung und eventuell Immunisierung gegen die entartete Zelle ermöglichen (Worth, Jia et al. 2000). Schließlich kann man Tumorsuppressoren einsetzen, die zur Einstellung des ungehemmten Wachstums führen können, indem sie die Funktion des in Tumoren häufig fehlerhaften zelleigenen Tumorsuppressorgens (z.B. p53, pRb) ersetzen (Wilson, Richman et al. 1995). Das p53 hemmt den Zellzyklus am G1/S und/oder G2/M-Checkpoint des Zellzyklus oder leitet bei irreparablen Schäden an der DNA der Zelle die Apoptose ein, während das Rb-Gen den Zellzyklus in der G1-Phase blockiert. Zusätzlich kann durch den Einsatz hyperaktiver Varianten die Aktivität dieser Gene gesteigert werden (Xu, Sun et al. 1996). Bei Fehlübertragung des Transgens in normale Zellen kann jedoch grundsätzlich ein schädlicher Effekt nicht ausgeschlossen werden, da ein unspezifisches Transgen nicht nur auf entartete Zellen wirkt, sondern auch einige normale Zellenarten beeinträchtigen kann (Willis and Chen 2002). Es kann somit zur Schädigung gesunder Zellen, die für die Wahrung der Gesundheit und Sicherung der Lebensqualität des Patienten von entscheidender Bedeutung sind, kommen. Aus der Überlegung, einen möglichen zytotoxischen Effekt an gesundem Gewebe zu vermeiden, resultiert der Ansatz gewebsspezifischer Gentherapie. Die Zielsetzung eines gentherapeutischen Ansatzes sollte eine weitgehend ausschließliche Aktivität der therapeutischen Gene in den Zielzellen sein.

Spezifität gentherapeutischer Agenzien kann erstens durch lokale Anwendung, also über Applikation ausschließlich in das Tumorgebiet, zweitens durch Wahl eines spezifischen Vektors, der erhöhte Transduktionseffizienzen in die Zielzellen erzielt, und drittens durch spezifische Transgenexpression, über Regulation und Kontrolle der Transgentranskription mittels eines geeigneten, in den Zielzellen spezifisch hoch aktiven Promotors erreicht werden.

Promotoren kontrollieren die Transkription und somit die Aktivität von Genen. Es sind Bereiche in der Erbsubstanz (DNA), die sich in räumlicher Nähe, meist unmittelbar vor den eigentlichen Genen befinden. Promotoren enthalten verschiedene Sequenzelemente, an die sich Transkriptionsfaktoren (Proteine) ankoppeln können. Diese Proteine ermöglichen im Verbund mit der RNA-Polymerase II eine Abschrift des Gens oder blockieren diese. Die Abschrift (messenger RNA) wird nach weiterer Bearbeitung in das Zellplasma transportiert und dient dort als Anleitung für den Aufbau des im Gen kodierten Proteins. Einige der Sequenzelemente sind grundsätzlich für die Transkription von Bedeutung und daher in den Promotoren der meisten Gene zu finden. Die Unterschiede in Aufbau und Funktion der Körperzellen implizieren jedoch, dass eine Vielzahl von Genen nur zu genau festgelegten Zeitpunkten oder in bestimmten Zellen aktiv werden darf. Dies wird durch gewebe- oder zelltypspezifische Elemente in den Promotoren ermöglicht. Endogen wird also die Transkription über gewebe- bzw. zellspezifische Transkriptionsfaktoren reguliert, die in homo- oder heteromeren Form die entsprechenden Elemente innerhalb der Promotoren binden und letztere dadurch in ihrer Aktivität reprimieren oder induzieren können. Exogen können weitere Co-Faktoren (wie zum Beispiel Hormone, Vitamin D₃ oder Vitamin C) direkt oder indirekt zur Zunahme oder Reduktion des Aktivitätsstatus (Morrison, Shine et al. 1989) führen. Zum Beispiel können Glukokortikoide oder bestimmte Vitamine (Vitamin D₃) direkt an Rezeptoren binden, welche als Transkriptionsfaktoren in der Regulation der Aktivität verschiedener Gene von Bedeutung sind.

Der vorliegenden Doktorarbeit wurde ein Therapiemodell zu Grunde gelegt, welches vorsieht, ein hyperaktives Tumorsuppressorgen über adenovirale Vektoren in die OS-Metastasen der Lunge zu applizieren und die Transkription des Transgens mit Hilfe OS-spezifischer Promotoren auf die OS-Zellen zu beschränken. Durch die Verwendung spezifischer Promotoren soll es nicht nur möglich gemacht werden, die Expression des Transgens auf Tumorzellen zu limitieren, sondern idealerweise auch über exogene Regulation mittels Substituten die Aktivitätsrate des Gens zu steuern. Die Aufgabe der vorliegenden

Doktorarbeit ist es, einzelne Promotorkonstrukte auf ihre potenzielle Eignung für dieses System zu analysieren.

Für den oben genannten Therapieansatz wurden acht verschiedene Promotorkonstrukte aus fünf verschiedenen Promotoren untersucht, deren Auswahl auf Forschungsergebnissen der letzten Jahre basiert: der humane Osteocalcinpromotor (hOC-prom.-compl.), der Collagen1-A-1-Promotor (Col1-A-1-prom.), der Bone-Sialoprotein-Promotor (Bsp-prom.), der β -catenin-Promotor (β -cat.-prom.) und ein externregulierbares Promotorkonstrukt, das in der Klinik für Innere Medizin, Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf (Labor Dr. Block) konstruiert wurde (pAd.3r-luc) (siehe Abb. 1, Seite 26). Mit Ausnahme des letzteren wurden für alle diese Promotoren unterschiedliche Elemente (siehe Kapitel 2.1.10, Seite 23) beschrieben, die eine spezifische Aktivität in OS, Osteoblasten oder Tumorzellen aufweisen.

Der in der Literatur wiederholt als osteosarkomspezifisch beschriebene hOC-prom.-compl. beinhaltet zwei Sequenzelemente (OSE1+2), die für die Einschätzung des Promotors als osteosarkomspezifisch von großer Bedeutung sind (Ducy and Karsenty 1995; Ko, Cheon et al. 1996). Zusätzlich enthält der hOC-prom.-compl. ein Vitamin D₃-responsives Element (AV-Element) (Morrison, Shine et al. 1989; Hsieh, Yang et al. 2002) und ist somit potenziell über Vitamin D₃ induzier- und von außen regulierbar.

Der Col1-A-1-prom. weist osteoblastenspezifische Elemente auf (Rossert, Chen et al. 1996), die nicht identisch mit denen des hOC-prom.-compl. sind. Für den Bsp-prom. wurden drei Elemente A, B und C beschrieben, die die Expression des Bone-Sialoproteins in Osteoblasten regulieren (Benson, Bargeon et al. 2000). Diese Elemente und Eigenschaften machen die Promotoren zur Anwendung in einem gentherapeutischen Ansatz für die Behandlung des OS geeignet.

Anders als diese Promotoren sind der β -cat.-prom. und das pAd.3r-luc-Promotorkonstrukt nicht osteosarkom- oder osteoblastenspezifisch. Der β -cat.-prom. wird als allgemein tumorspezifisch beschrieben, er weist in verschiedenen Tumoren (Kolonkarzinomen) eine erhöhte Expression auf (Lipinski, Djeha et al. 2001).

Das pAd.3r-luc-Konstrukt hingegen stellt ein hoch aktives bidirektionales Promotorkonstrukt dar, das im Gegensatz zu den anderen Promotoren unspezifisch, aber in seiner Aktivität extern herunterregulierbar ist (Block, Puls et al. 2003). Das im Konstrukt kodierte Transkriptionsprodukt eines Tetracycline supprimierbaren Transaktivators (tTa-fusionsprotein) interagiert in Abwesenheit von Tetracycline mit einem vorgeschalteten Operator, sodass die den Operator flankierenden Promotoren aktiviert werden. Auf der einen Seite des Operators schließt sich ein Tyrosinkinase-minimal-Promotor, der den tTA reguliert, und auf

der anderen Seite ein CMV-minimal-Promotor, der das zu untersuchende Transgen kontrolliert, an. Dieses bewirkt sowohl eine verstärkte Transkription des therapeutischen Transgens (in diesem Fall Luciferase) als auch des Transaktivators (positive Rückkopplung). So kann das tTA-fusions-protein auf der einen Seite die Amplifikationsrate des therapeutischen Transgens der anderen Seite in Abwesenheit von Tetracycline steigern. In Anwesenheit von Tetracycline fällt dieser Autoregulationsmechanismus aus und führt zu einer Herunterregulierung des tTA und somit auch des Transgens (siehe Abb. 1, Seite 26). Eine Transgenaktivität in fehlinduzierten Normalgewebe könnte sofort beendet werden.

1.2 Fragestellung

Das Ziel dieser Arbeit ist es, verschiedene Promotorkonstrukte in Zellkultur auf ihre Spezifität in Osteosarkom-Zelllinien zu prüfen und eine potenzielle Gefährdung gesunder, den Zielzellen benachbarter normaler Zellen zu evaluieren. Fernziel ist der Einsatz in einem gentherapeutischen Ansatz.

Um die in-vivo-Situation simulieren zu können, soll ein in-vitro-Modell etabliert werden, das sieben unterschiedliche Zelllinien beinhaltet: 1. Die genetische Diversität von Osteosarkomen wird durch fünf verschiedene Osteosarkom-Zelllinien (MG63, U2OS, SAOS-2, KHOS und SJS-1) repräsentiert. 2. Um zu einer Einschätzung der prospektiven Aktivität der Promotoren in normalem Lungengewebe zu gelangen, soll ihre Funktion in einer primären Lungenfibroblasten-Zelllinie (LL-86) untersucht werden. 3. Zusätzlich wird eine Prostatakarzinom-Zelllinie (LNCaP) als nicht osteogene Tumorzelllinie in die Untersuchungen einbezogen. Dies ermöglicht die Vergleichbarkeit der Untersuchungen mit publizierten Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen und stellt eine zusätzliche Kontrolle in der vorliegende Arbeit dar.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

ABI-Prism	Applied Biosystems
Steril mol. Bench, Sicherheitsklasse III	Holten Laminair, Allerød, Dänemark
Brutschrank	Sanyo, Bensenville, IL, USA
DNA-Sequenzierer	Applied Biosystems # ABI 310, #ABI 3700, Foster City, CA, USA
Elektroporator, Gene Pulser X-cell	BioRad, München, Deutschland
Luminometer	Turner Design (20/20), Sunnyvale, CA, USA LB 960 Centro, Bertold Technologies, Pforzheim, Deutschland
Mikroskop	Olympus CKX41, Hamburg, Deutschland
Photometer	Bio Photometer, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
PCR-Trio-Block	Biometra, Göttingen, Deutschland
UV-Imager	Appligene, Illkirch Graffenstaden, Frankreich
Zentrifuge	Hettich Rotanta/TRC, Werneck, Zeuzleben, Deutschland Eppendorf #5417C, Hamburg, Deutschland

2.1.2 Kommerzielle Gebrauchslösungen und Chemikalien

Antibiotika /Pen-Strep 100x	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Ampicillin-Pulver	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Canamycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Bromphenolblau	Serva, Hildesheim, Deutschland
BSA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
DCC-FCS (steroidfreies Kälberserum)	BD Biosciences, Palo Alto, CA, USA
DMSO	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
EDTA (Na ₂)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Ethidium-Bromid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
FCS (fetales Kälberserum)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
HEPES-Lösung	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Hefeextrakt	Merck, Eurolab GmbH, Hamburg, Deutschland
L-Glutamin Lösung (200mM)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Natriumpyruvat MEM flüssig	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Nicht essentielle Aminosäuren MEM	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Peptone/Hytone	Merck, Eurolab GmbH, Hamburg, Deutschland

SOC Medium	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Sodium Chlorid	Merck, Eurolab GmbH, Hamburg, Deutschland
Tet-free FCS	BD Biosciences, Clontech, Palo Alto, CA, USA
Tris-Base	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Trypsin-EDTA (1x)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Vitamin D ₃ (1, 25-(OH) ₂ -D ₃)	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
Vitamin C	Sigma- Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

2.1.3 Molekularbiologische Reagenzien

big-Dye	Perkin-Elmer, Rodgau Jügesheim, Deutschland
dNTPs für PCRs	Roche, Mannheim, Deutschland
DMRIE-C	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Dotap	Roche, Mannheim, Deutschland
Duo-Fect	Q-bioGene, Heidelberg, Deutschland
Effectene Transfektions-Reag.	Quiagen, Hilden, Deutschland
Half-Term	Perkin-Elmer, Rodgau Jügesheim, Deutschland
Lipofectamin 2000	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

SuperFect	Quiagen, Hilden, Deutschland
Plus Reagenz	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
pGL-basic Vektor	Promega, Mannheim, Deutschland
pRL-TK Vektor	Promega, Mannheim, Deutschland
SAP (shrimp Alkalische Phosphatase)	Roche, Mannheim, Deutschland
Topo XL-cloning-Kit	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

2.1.4 Puffer

PBS-Puffer

8g NaCl; 0,2g KCl; 0,24g KH₂PO₄; 1,44g NA₂HPO₄ x 7 H₂O
in 1l H₂O bidest. gelöst, pH 7,4; sterilisiert

10 x PCR-Puffer

500mM KCl; 200mM Tris (pH 8,7 bzw 9,0); 500µg/ml BSA (bovides
Seumalbumin); 7,5mM bzw. 10mM MgC₁₂ in 1ml H₂O bidest.

Agarose-Gel-Ladepuffer

10 x TBE-Puffer

4,35g Tris(Base); 223g Borsäure (pH 8,3); 37,2g Na₂-EDTA in 4l H₂O bidest.

DNA-Ladepuffer

6 x Puffer

0,25 % Bromphenolblau, 0,25 % xylene/Xyanol, 15 % Ficoll in H₂O (Typ 400 von
Pharmacia)

2.1.5 Medien

MC-Coy's 5a (Sigma) Medium	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
EMEM+Earl's BSS-Medium	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
F12-K Medium	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
LB-Medium	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
OptiMEM I (1x) –Medium	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
RMPI 1640-Medium	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

2.1.5.1 Füttermedien

Unter sterilen Bedingungen wurden die Medien je nach Versuchsansatz mit normalem FCS (fetales Kälber-Serum), DCC-FCS (Dextran Charcol stripped) oder tetracyclinfreiem FCS durchgeführt; nach Bedarf der Zellen wurde zusätzlich mit Glutamin, nicht-essentiellen Aminosäuren, Penicillin-Streptomycin und Natrium-Pyruvat substituiert.

Füttermedium für SAOS-2 Zellen:

Zu 500ml Mc Coy's 5A Medium wurden 88ml FCS, 5ml 100-fache Penicillin-Streptomycin-Lösung und 3,75ml 200mmolare L-Glutamin-Lösung hinzugefügt.

Füttermedium für KHOS, MG 63 und U2OS Zellen:

Zu 500ml EMEM+Earl'sBSS Medium wurden 55ml FCS, 5ml 100-fache Penicillin-Streptomycin-Lösung, 5ml 200mmolare L-Glutamin-Lösung, 5ml 100-fache nicht-essentielle Aminosäuren und 5ml 100mmolare Natrium-Pyruvat-Lösung beigemischt.

Füttermedium für SJSA1 Zellen:

500ml RPMI 1640 Medium wurden mit 55ml FCS, 5ml 100-fache Penicillin-Streptomycin-Lösung, 5ml 100mmolare Natriumpyruvat-Lösung und 5ml 1 M Hepes-Lösung versetzt.

Füttermedium für LL-86 Zellen:

500ml F12-K Medium wurden 88ml FCS und 5ml 100-fache Penicillin-Streptomycin-Lösung beigemischt.

Füttermedium für LNCaP Zellen:

500ml RPMI-Medium wurden 55ml FCS und 5ml 100-fache Penicillin-Streptomycin-Lösung hinzugefügt.

LB-Medium

In 1 Liter destilliertes Wasser wurden 10g Natrium Chlorid, 10g Peptone/Hytone und 5g Hefeextrakt gemischt.

LB Agar (Lennox Agar)

Gibco, Paisley, Schottland

Agaroseplattenherstellung

32g LB Agar wurden in 1 Liter destilliertem Wasser aufgelöst und für 15 min. autoklaviert. Nach Kühlung der Lösung auf 50 °C wurde 1ml Antibiotikum (Ampicillin oder Clindamycin) in die Lösung gegeben (Endkonzentration:100 µg/ml). Je 25ml Agarose wurden unter sterilen Bedingungen in eine Platte gegossen und ruhen gelassen.

2.1.5.2 EinfriermedienEinfriermedium für SaOs-2 Zellen (bei 4 °C mindestens 3 Monate haltbar):

Zu 47,5ml McCoy's 5a Füttermedium für SaOs-2 Zellen wurden 2,5ml DMSO zugegeben.

Einfriermedium für MG-63, KHOS, U2-OS Zellen (bei 4 °C mindestens 3 Monate haltbar):

Zu 47,5ml EMEM+Earle's BSS Füttermedium für MG-63, KHOS, U2-OS Zellen wurden 2,5ml DMSO zugefügt.

Einfríermedium für LL-86 Fibroblasten-Zellen (bei 4 °C mindestens 3 Monate haltbar):

Zu 47,5ml F12K Füttermedium für LL-86 Zellen wurden 2,5ml DMSO beigegeben.

Einfríermedium für SJSA-1 (bei 4 °C mindestens 3 Monate haltbar):

Zu 47,5ml RPMI 1640 Füttermedium für SJSA-1 Zellen wurden 2,5ml DMSO hinzugefügt.

Einfríermedium für LNCaP Zellen (bei 4 °C mindestens 3 Monate haltbar):

Zu 47,5ml RPMI 1640 Füttermedium für LNCaP-Zellen wurden 2,5ml DMSO zugegeben.

2.1.6 Kits

Dual-Luciferase-Reporter-assay	Promega, Mannheim, Deutschland
DyeEx Spin Kit (50)	Quiagen, Hilden, Deutschland
GFX Micro Plasmid Prep Kit	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland
β -Gal Staining Kit	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
QiaQuick PCR-Purification Kit	Quiagen, Hilden, Deutschland
Quiagen Plasmid Maxi Purification Kit	Quiagen, Hilden, Deutschland

2.1.7 Bakterien

JM109 E.coli	Promega, Mannheim, Deutschland
--------------	--------------------------------

XL-1 Blue E.coli

Stratagene, La Jolla, CA, USA

2.1.8 Antikörper, Enzyme, Proteine

Alk. Phosphatase

Promega, Mannheim, Deutschland

BamHI-Restriktionsenzym

NEB, Frankfurt a.M., Deutschland

DNA-Ligase (T4)

MBI, St. Leon-Rot, Deutschland

EcoRI-Restriktionsenzym

Promega, Mannheim, Deutschland

Hind III-Restriktionsenzym

NEB, Frankfurt a.M., Deutschland

Kpn I-Restriktionsenzym

Promega, Mannheim, Deutschland

Taq-DNA-Polymerase

Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Xho I-Restriktionsenzym

Promega, Mannheim, Deutschland

Xba I-Restriktionsenzym

NEB, Frankfurt a. M., Deutschland

2.1.9 Primer

hOC-Prs

5' TCA CCC TCC ATC ACT CCC AG 3'

MetaBion, München, Deutschland

hOC-Pr (-829-809)s

5' GGG TCA GGA GGA GAA TCG TG 3'

MetaBion, München, Deutschland

hOC-Pra	5' TGC TGC TCA GG A CTC AGC TG 3' MetaBion, München, Deutschland
RV 3	5' CTA GCA AAA TAG GCT GTC CC 3' MetaBion, München, Deutschland
GL 2	5'CTT TAT GTT TTT GGC GTC TTC C 3' MetaBion, München, Deutschland
M13 reverse	5'CAG GAA ACA GCT ATG AC 3' Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
M13 Forward (-20)	5' GTA AAA CGA CGG CCA G 3' Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
hOCpr-seq	5'CAA CCG GCT GAC CTC ATC TC 3' MetaBion, München, Deutschland

2.1.10 Promotoren

Um Spezifität und Aktivität zu optimieren, wurden einige Promotoren im Vorfeld verkürzt und auf ihre spezifischen Elemente reduziert oder anders alteriert.

Die *hOC-prom.-Konstrukte* beinhalten hOC-Promotorsequenzen unterschiedlicher Länge. Allen gemeinsam sind die osteoblasten-spezifischen Elemente OSE 1+ OSE 2 und die TATA-box, die den Start der Transkriptionseinheit des Transgens markiert. Wie in Abb. 1 (Seite 25) dargestellt, beinhaltet der hOC-prom.-compl. die Nukleotide von -829>+21 des hOC-prom. und das AV-Element, während der hOC(-215>+21)-prom. lediglich die beiden OSE-Elemente (die Nukleotide -215>+21 beinhalten diese Elemente) enthält; der upstream liegende Teil des Promotors ist deletiert. Beim hOC(-215>+21)-AV-prom. (hOC-AV-prom.) wurde am 5' Ende des hOC(-215>+21)-prom. direkt das Vitamin D₃-responsive AV-Element hinzugefügt.

Das Coll-A-1-CMV-min.-prom.-Konstrukt verbindet die Nukleotide von -1791>-1667 des Collagen1-A-1-Promotors, die ein osteoblasten-spezifisches Element beinhalten, mit einem minimalen CMV-Promotor einschließlich TATA-box.

Die Bsp-Promotorkonstrukte umfassen die Nukleotide -2472>+41 des murinen Bsp-Promotors (Bsp 2472-prom.) und in der verkürzten Form die Nukleotide -705>+41 (Bsp 705-prom.) und beinhalten die osteoblastenspezifischen Elemente A,B und C (die Nukleotide der Elemente beginnen bei Nukleotid 2183 und reichen bis 2289 der Promotorsequenz, siehe Abb. 10, Seite 48). Dieser Promotor wurde uns freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Prof. Franceschi (Department of Periodontics; University of Michigan, USA) aus den USA zur Verfügung gestellt.

Das β -catenin-Promotorkonstrukt ist eine Gabe von Dr. Lipinski (MLS laboratories, New Hampshire,England), patent-geschützt und beinhaltet die tumorspezifischen Elemente des β -catenin-Promotors in repetitiver Form (Sequenz patentiert und vertraulich).

Das pAd.3r-luc.-Konstrukt wurde von Herrn Dr. Block (Labor für adenovirale Gentherapie, Zentrum für Innere Medizin, UKE, Hamburg) entwickelt und uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

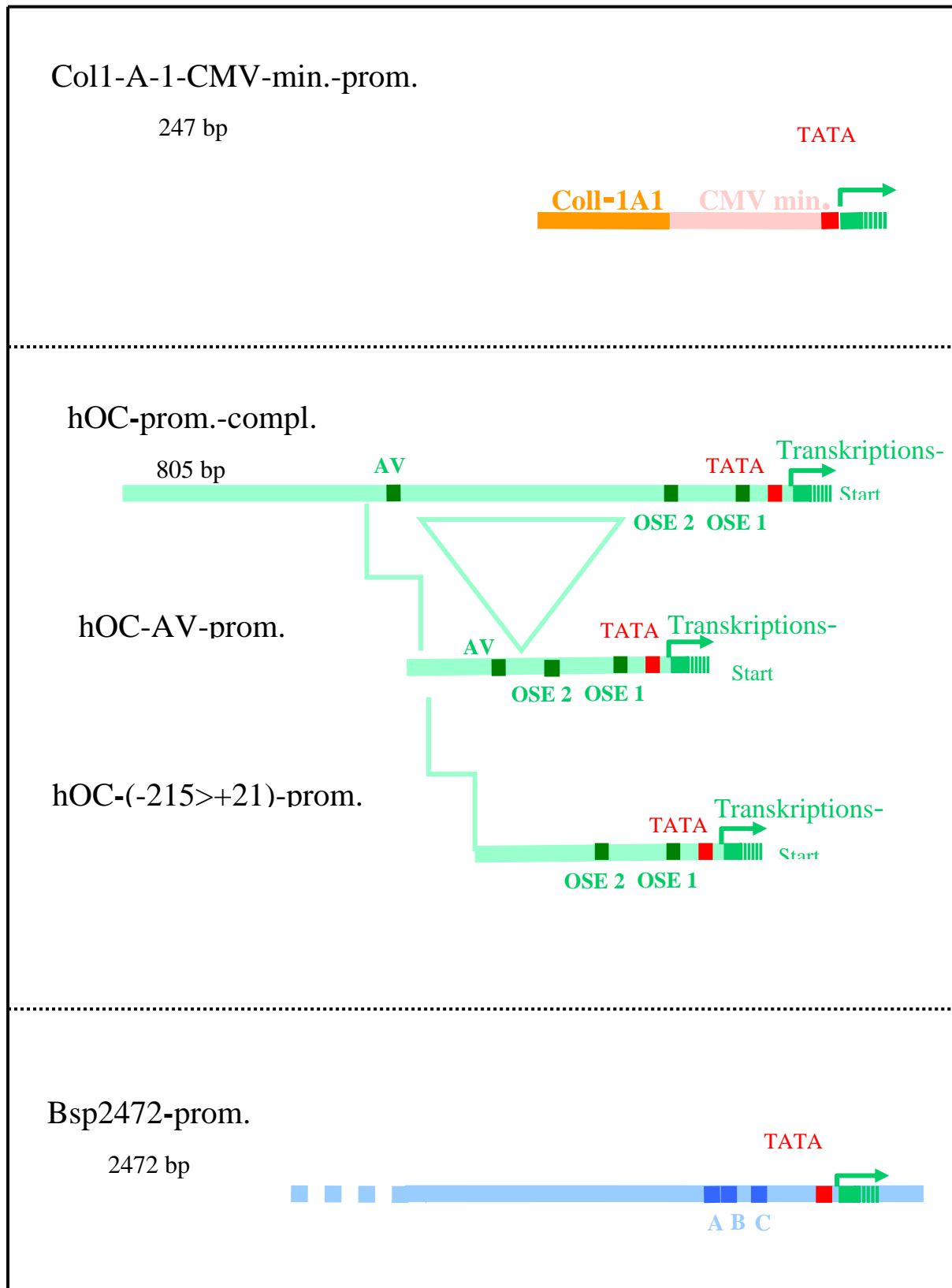


Abb.1: Schematische Darstellung der verwendeten Promotorkonstrukte.

β -cat.-prom.



pAd.3r-luc.-Konstrukt

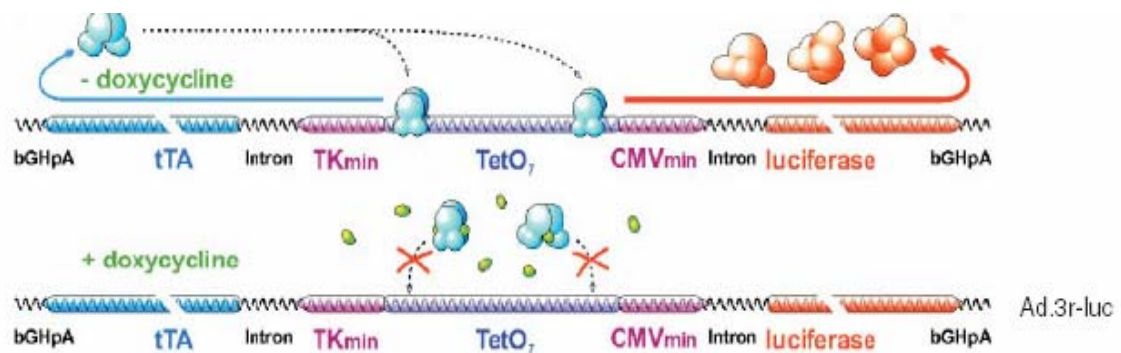


Abb. 1: Schematische Darstellung der verwendeten Promotorkonstrukte. Abb. des pAd.3r-luc aus: Block et al., The Journal of Gene Medicine, 2003, 5

2.1.11 Zellkulturen

KHOS (OS-Zelllinie)	ATCC, Manssas, USA
LL-86 (prim. Lungenfibroblasten-Zelllinie)	ATCC, Manssas, USA
LNCaP (Prostatakarzinom-Zelllinie)	zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Olaf Hjort, MU-Lübeck
MG 63 (OS-Zelllinie)	ATCC, Manssas, USA
SAOS-2 (OS-Zelllinie)	ATCC, Manssas, USA
SJSA-1 (OS-Zelllinie)	ATCC, Manssas, USA
U2OS (OS-Zelllinie)	ATCC, Manssas, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Konstruktherstellung und Klonierungsarbeiten

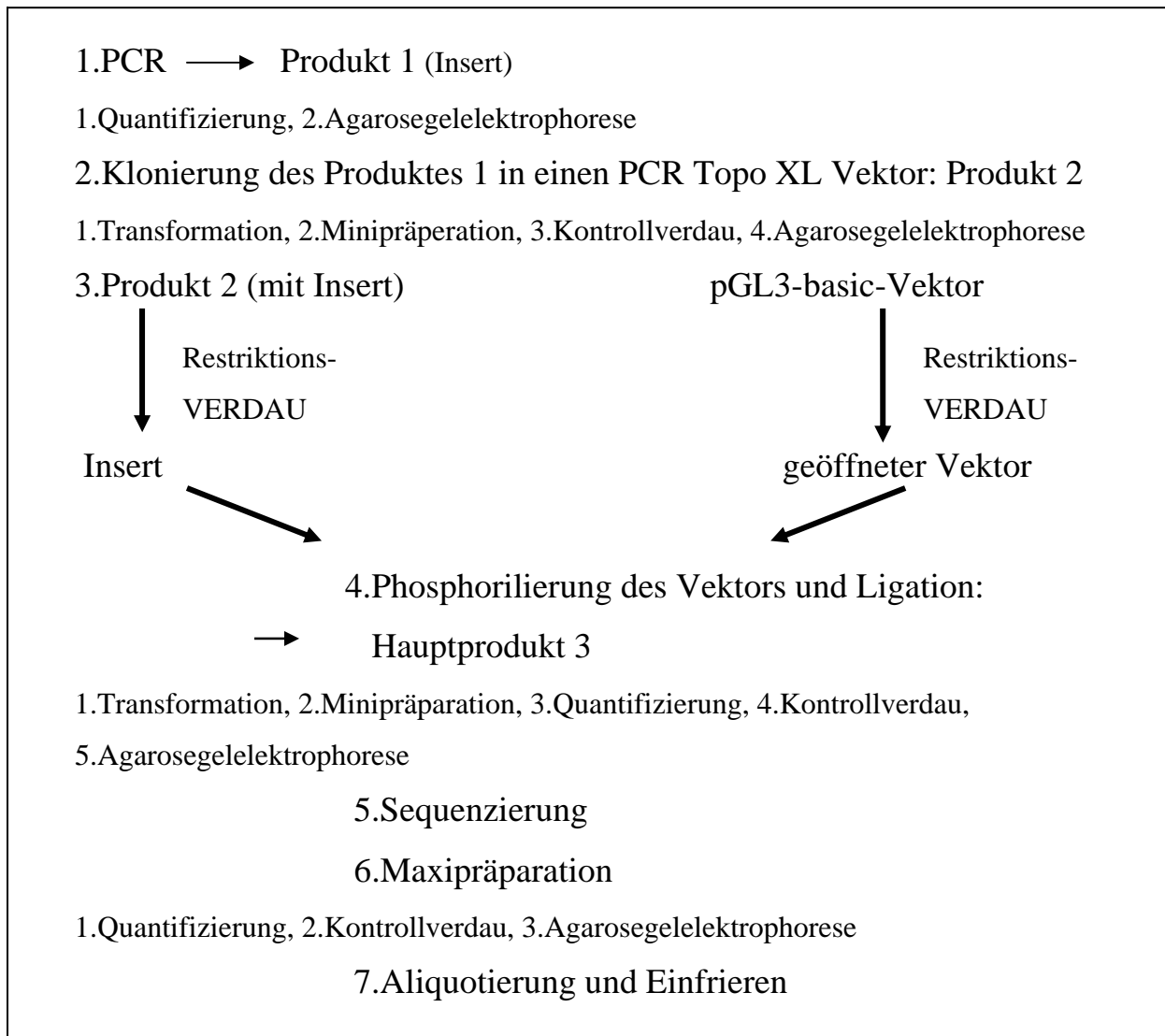


Abb. 2: Schematische Darstellung des Arbeitsablaufes zur Erstellung der Konstrukte. Der Eintritt in den Herstellungsablauf wurde für jedes Konstrukt individuell festgelegt (Die Schritte sind im Kapitel 3.1, Seite 42: “Herstellung der Promotorkonstrukte“ für jedes Promotorkonstrukt einzeln aufgeführt).

2.2.1.1 PCR

In der so genannten PCR (Polymerase-Chain-Reaction) können spezifische DNA-Fragmente mit Hilfe der thermostabilen Taq-Polymerase, deren Funktionsoptimum bei 72 °C liegt, amplifiziert werden. Zwei spezifische Oligonukleotide („sense und antisense primer“), die zu ca. 20bp an den 5´ und 3`-Enden des zu vermehrenden Amplifikationsfragments komplementär sind, bilden die Voraussetzung für die Amplifikation. Normale doppelsträngige DNA, welche die zu vervielfältigende DNA-Sequenz (Amplicon), enthält, dient als Matrize (Template). Die PCR besteht aus drei Schritten:

1. Denaturierung der doppelsträngigen DNA
2. Hybridisierung der Primer
3. Polymerisation (= Primerextension) zur Generierung des Gegenstranges
4. Neuer Cyclus ab 1.

Alle PCRs wurden nach einem Grundmuster angesetzt, die optimalen Reaktionsbedingungen wurden individuell ermittelt. Die Variablen des Ansatzes wurden durch die Annealingtemperatur, die Anzahl der Zyklen und die Primer charakterisiert. In jeweils 50µl-Ansätzen wurden 100ng DNA, 5µl 10 x Puffer, 1,5µl 50mM MgCl₂, 1µl dNTP's (je Nukleotid 10mM), 1µl sense primer (20pMol/µl)/antisense primer (20pMol/µl) und 0,2µl Taq-polymerase (5U/µl) in Aqua Bidest gegeben. Das PCR-Programm wurde unter Verwendung eines Thermocyclers entsprechend folgendem Schema ausgeführt: die Proben wurden zur Denaturierung der doppelsträngigen DNA 30 sek. lang auf 95 °C gebracht, um dann für 30 sek. auf eine individuelle Annealingtemperatur herunterzukühlen. Die nun folgende Primerextension wurde für 30 sek. bei 72 °C durchgeführt. Dieser Zyklus wurde 35-mal wiederholt und wurde dann, bevor der Ansatz auf 4 °C heruntergekühlt wurde, nochmals für 7 min. auf 72 °C gebracht. Nach der Reaktion wurde das Ergebnis über eine Agarosegelelektrophorese kontrolliert.

2.2.1.2 RT-PCR

RT-PCRs für zelluläre hOC, Bsp, β-cat, und Col1-A-1 m-RNAs wurden nach Standardprotokollen durchgeführt. Die gesamte zelluläre RNA der OS-Zellen wurde mittels RNeasy-Säulen (Quiagen) isoliert; jeweils 1µg der gesamten RNA wurde mit reverser

Transkriptase (Superscript RT, Invitrogen) unter Verwendung von poly-dT Primern in 20µl Proben nach Angaben des Herstellers revers transkribiert (cDNA-Generierung). Die Effizienz und Qualität der reversen Transkription wurde durch eigene Amplifikationen des intrazellulär ubiquitär vorhandenen Transkripts des ribosomalen L7 Proteins überprüft. Alle PCRs an den cDNA-Korrelaten der Transkripte von hOC, Bsp, β-cat, und Col1-A-1 (und L7) wurden an jeweils 1µl cDNA mit den Primern und unter den vorher beschriebenen Konditionen durchgeführt.

2.2.1.3 Quantifizierung von DNA

Die Bestimmung der Konzentration einer DNA-Lösung erfolgte fotometrisch durch Messen der optischen Dichte (OD) bei 260 nm nach der Formel: $OD \times 50 = \mu\text{g/ml DNA}$. Die Relation der OD bei 260 nm zu 280 nm ($OD_{260/280}$) sollte im Bereich zwischen 1.7 und 2.0 liegen; dieser Wert ist ein Richtwert, der den Reinheitsgrad der DNA wiedergibt.

2.2.1.4 Restriktionsverdau und Kontrollverdau

Restriktionsendonukleasen erkennen bestimmte Sequenzen an der DNA und zerschneiden die DNA an dieser Stelle. Diese Eigenschaft wird in der Molekularbiologie genutzt, um Plasmide gezielt zu zerlegen. In der vorliegenden Arbeit wurden die Konstrukte (PCR-Produkt oder Plasmide) an spezifischen Erkennungssequenzen von Restriktionsenzymen geschnitten, um sie später mit weiteren Fragmenten zu legieren. Die entstandenen DNA-Fragmente wurden über Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und identifiziert. Nach Angaben des Herstellers wurden DNA (300-700ng), 10 x Puffer, 10 x BSA und das spezifische Restriktionsenzym mit Aqua Bidest auf ein Gesamtvolumen von 20µl gebracht, eine Stunde bei 37 °C inkubiert und dann für 15 min. bei 65 °C deaktiviert.

2.2.1.5 Agarosegelelektrophorese

Zur Analyse von PCRs oder zur Kontrolle von Klonierungsexperimenten wurde die horizontale Gelelektrophorese genutzt. Die Agarose (je nach Größe des aufzutrennenden Fragments) wurde mit 1 x TAE oder TBE-Puffer (auf 100ml) auf eine Konzentration von 1-1,4 % gebracht. Der Mix wurde erhitzt, mit 12µl Ethidiumbromid versetzt und dann zum Erkalten in den Schlitten mit Kamm (zur Bildung der Taschen) gegeben. Nun wurden die 10µl Aliquots mit 2µl Ladepuffer (zum Erhöhen des spezifischen Gewichts) versetzt und in die Taschen des Gels pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 80-120 V. Nach dem Lauf wurde das Gel bei UV-Licht evaluiert und fotografiert.

2.2.1.6 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

Das QIAquick PCR Purification Kit (Quiagen) dient u.a. der Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen. Nach dem Elektrophoreselauf wurden die DNA-haltigen Bereiche im Gel, die in Form von Banden zur Darstellung kommen, bei UV-Licht aus dem Gel zügig ausgeschnitten. Die Gelstücke wurden zunächst in Puffer (QG-Puffer von Quiagen) über 10 min. bei 50 °C aufgelöst, dann wurde die DNA nach Herstellerprotokoll über Qia-Quick-Säulchen aus dem Gel extrahiert und aufgereinigt.

2.2.1.7 Topo XL PCR Cloning

Die Angabe des Herstellers (Protokoll der Firma Invitrogen: „TOPO Cloning“) sieht ein Einschritt-Klonierverfahren vor. Die Taq-Polymerase, die bei der PCR benutzt wurde, addiert bei der Amplifikation an dem 3' Ende des PCR- Produktes ein einzelnes Desoxyadenosin (A). Das PCR-XL-Topo-Plasmid besitzt an jedem 3' Ende ein überhängendes Desoxythymidin (T) und dort anhängend eine Topoisomerase 1. Diese legiert beidseitig PCR-Produkt und Vektor miteinander. Dieses Verfahren wurde genutzt, um über den Vektor spezifische Restriktionsschnittstellen im hergestellten Produkt einzufügen. Diese Schnittstellen wurden in den weiteren Klonierungsschritten genutzt.

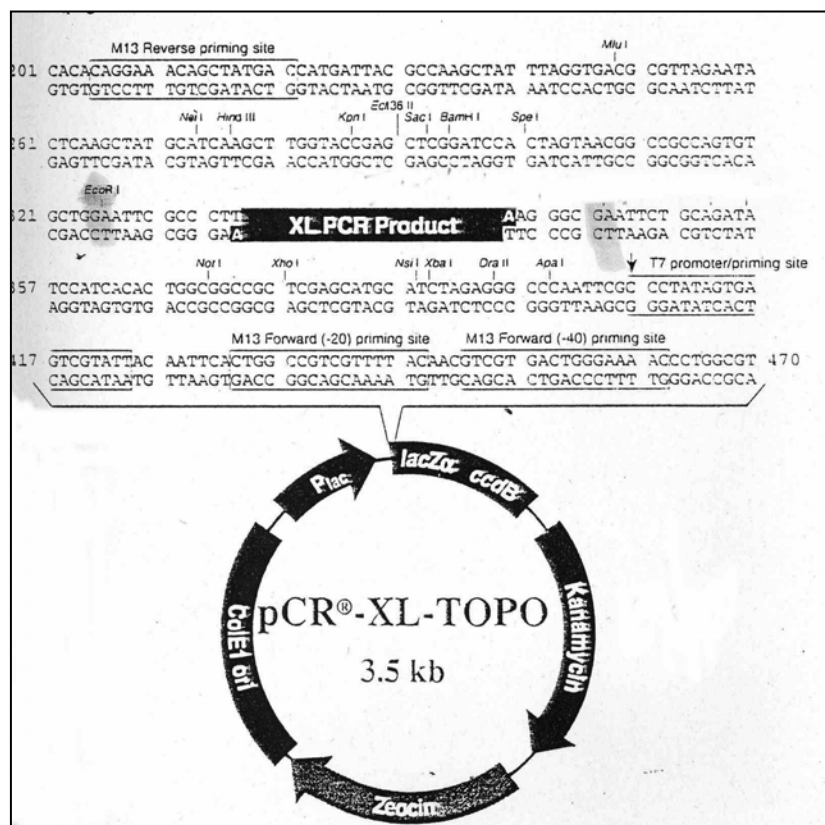


Abb. 3: Schematische Darstellung des Vektors und seiner Restriktionsschnittstellen aus der Produktbeschreibung der Firma Invitrogen: TOPO XL PCR Cloning Kit Version D 190502 25-0199

2.2.1.8 Dephosphorilierung (Zippen)

Die Shrimp Alkalische Phosphatase (SAP) erkennt sowohl DNA als auch RNA als Substrat und katalysiert die Dephosphorilierung des 5' Phosphates von DNA oder RNA, sodass eine

unerwünschte Rezirkulierung eines geschnittenen Plasmids vermieden werden kann. Der Vorgang, der nach Herstellerangaben durchgeführt wurde, sieht einen Mix aus DNA, 1 x Reaktionspuffer und SAP vor, der mit Aqua Bidest auf 20µl Gesamtvolumen gebracht und dann einmal 15 min. auf 37 °C und 15 min. auf 65 °C erhitzt wurde.

2.2.1.9 Ligation

Zur Einfügung von DNA-Fragmenten an definierten Stellen von Plasmiden, die vorher durch Verdauung mit spezifischen Restriktionsenzymen (20-30 Units) linearisiert worden waren, wurden Ligationen durchgeführt. Die Ligase, das Enzym, das diesen Schritt katalysiert, bindet die 5' und 3' Enden von DNA-Fragmenten kovalent miteinander. Der Versuchsansatz aus linearisiertem Vektor, prospektivem Insert, Ligase und 1 x Reaktionspuffer in 20µl, wurde bei 22 °C für eine Stunde inkubiert. Die ligierten Plasmide wurden dann in kompetente Bakterien transformiert (siehe unten).

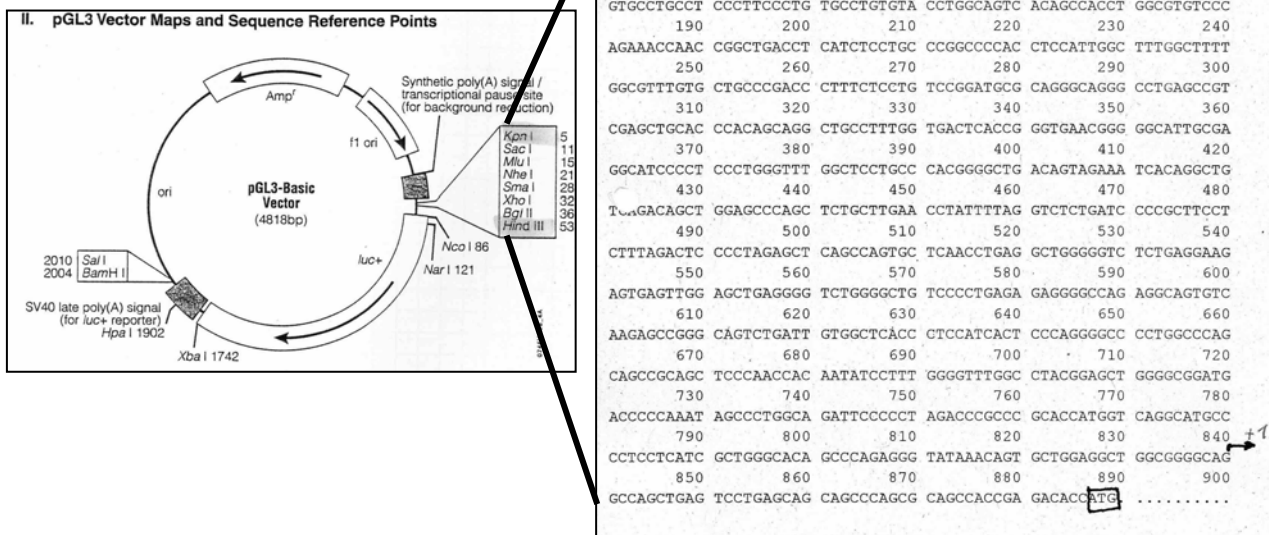


Abb. 4: Schematische Darstellung der Ligation eines zuvor erstellten Inserts mit dem pGL3 Basis-Vektors mit Aufweisung möglicher Restriktionsschnittstellen. Die Plasmidkarte des pGL3-Basis-Vektors ist dem „technical manual“ der Firma Promega: „Instructions for use of products E1741, E1751, E1761 and E1771“ entnommen. Die DNA-Sequenz stellt einen Teil des hOC-Promotors dar.

2.2.1.10 Transformation

Bei der Transformation wird das hergestellte Plasmid in kompetente - für die Aufnahme von DNA vorbereitete - Bakterien eingebracht. Die transformierten Bakterien replizieren die Plasmide im Verlauf der eigenen Vermehrung.

Transformationsprotokoll

Die bei -80 °C gelagerten kompetenten Bakterien der Stämme XL-1 Blue/JM 109 wurden auf Eis aufgetaut und jeweils $100\mu\text{l}$ in eisgekühlte Kulturröhrchen übertragen. $1\text{-}50\text{ng}$ DNA wurde den Bakterien hinzugefügt und die Ansätze 30 min. (XL-1-Blue) bzw. 10 min. (JM 109) auf Eis ruhen gelassen. Die Transformationsansätze wurden 45 sek. in ein 42 °C warmes Wasserbad gegeben und dann schnell auf Eis gestellt. Nach der Zugabe von $900\mu\text{l}$ SOC-Medium wurden die Ansätze für 1 Stunde bei 220 U/min. Rotation bei 37 °C inkubiert, bevor $100\mu\text{g}$ mit Triangelspatel auf LB-Ampicillin-Agarplatten ausgestrichen wurden.

2.2.1.11 Plasmid-Minipräparation

Nach vierundzwanzig Stunden Wachstum auf Agarplatten wurden bis zu acht isoliert wachsende Bakterienklone mit Hilfe steriler Pipettenspitzen in mit 2ml LB-Medium und Antibiotikum gefülltes Kulturröhrchen gegeben und über Nacht bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Alkalische Plasmid-Minipräparation wurden angewandt, um Plasmid-DNA aus den gewachsenen Bakterien zu gewinnen. Die Minipräparation wurde gemäß den Anweisungen des Herstellers über Silicagel-Säulchen (GFX Micro Plasmid Prep Kit, Amersham Pharmacia Biotech) lysiert, aufgereinigt, die DNA in $100\mu\text{l}$ TRIS-Puffer gelöst und quantifiziert. Das isolierte Plasmid wurde per Restriktionsverdau und Gelelektrophorese überprüft und konnte dann weiter verwendet werden.

2.2.1.12 DNA-Sequenzierung

Durch Sequenzierung kann die Reihenfolge von Nukleotiden in einem DNA-Abschnitt bestimmt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die Kettenabbruchmethode, die Sanger et

al. 1974 entwickelten, verwendet. Diese Methode sieht den enzymatischen Aufbau eines DNA-Stranges vor, der komplementär zu der zu untersuchenden einzelsträngigen DNA-Matrize ist. Durch die Anheftung eines spezifischen Primers an die DNA wird der Start der Synthese markiert. Die Zugabe der 4 Desoxynukleotidtriphosphate ATP, GTP, CTG, TTP (dNTP's) ermöglicht die Synthesereaktion des Stranges. Abgewandelte Nukleotide, Nukleotid-spezifisch markierte Dideoxy-Versionen der dNTP's, stoppen die Synthese des Stranges, sobald sie eingebaut werden, und schaffen so verschieden lange DNA-Fragmente. Die unterschiedlich markierten, neu synthetisierten Stränge werden in folgenden Gelelektrophoresen entsprechend ihrer Markierung und Länge aufgetrennt und sichtbar gemacht. Anhand der Längenreihenfolge kann die Sequenz abgelesen werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode (Cycle-Sequenzierung-PCR) unter Verwendung von unterschiedlich fluoreszenzmarkierten, kommerziell hergestellten Terminatoren („Half-Term“ und „big-Dye“) nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Für die Sequenzierung wurden DNA, Primer, „Half-Term“ und „big-Dye“ mit Aqua Bidest auf ein Volumen von 20µl gebracht. Es wurden 3 Schritte 35-mal durchlaufen: Im ersten Schritt wurde die DNA für 30 sek. bei 94 °C denaturiert, es konnte somit in einem weiteren Schritt zu einer Anheftung des Primers (Annealing) an den Einzelstrang über eine Zeit von 30 sek. bei 60 °C kommen. Dann wurde im folgenden Schritt in einem Zeitraum von 3 min. der Sequenzierungsstrang bei 60 °C vom Primer ab aufgebaut (Elongation).

Danach wurde das Gemisch mit dem DyeEx.Kit nach Angaben des Herstellers aufgereinigt, um nicht eingebaute Terminatoren zu entfernen und zur Analyse mittels Kapilargelelektrophorese in das ABI-Prism (ein Gerät der Firma Applied Biosystems) gegeben.

2.2.1.13 Plasmid-Maxipräparation

Die Gewinnung großer Mengen des konstruierten Plasmids erfolgt mittels Maxipräparation 100µl Minipräparation-Bakterienkultur wurden in 100ml LB-Medium mit Antibiotikum über Nacht bei ca. 220 U/min. geschwenkt und bei 37 °C inkubiert. Die Isolierung dieser Plasmide erfolgte unter Verwendung des Quiagen Plasmid Maxi Purifikation Kit und basiert auf der alkalischen Lyse der Bakterien und der Bindung des Plasmids an einem Anionen-Austauscher-Harz zur nachfolgenden Aufreinigung. Das Risiko der Verunreinigung mit RNA wird durch die Zugabe von RNase reduziert. Die Isolierung wurde nach Herstellerprotokoll

durchgeführt. Plasmid-DNA-Konzentrationen wurden quantifiziert, mit TRIS-Puffer auf eine Konzentration von $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ gebracht und dann eingefroren.

2.2.2 Zellkultur

Alle Arbeiten an lebenden Zellen wurden unter sterilen Bedingungen vorgenommen.

2.2.2.1 Bebrütung und Fütterung

Die Zellen wurden je nach Wachstumsverhalten 2-3-mal pro Woche gefüttert. Hierzu wurden in die Zellkulturflaschen mit einer Wachstumsfläche von 80cm² bzw. 175cm² je 10ml bzw. 20-25ml Füttermedium den Zellen zugegeben. Die Zellen wurden in Brutschränken bei einer Temperatur von 37 °C in 21 % O₂- und 4 % CO₂-haltiger Atmosphäre inkubiert.

2.2.2.2 Trypsinierung (Passagierung)

Den Vorgang der Umverteilung adhärent wachsender Zellen auf neue Flaschen nennt man Trypsinierung. Diese wird vorgenommen, wenn die Bodenfläche der liegenden Flaschen zu 80-100 % bewachsen ist. Zunächst wurde hierzu das alte Füttermedium aspiriert und verworfen, dann wurden die Zellen zweimal mit 5 bis 10ml angewärmtem (37 °C) PBS gewaschen. Nun wurden 1,5 bis 3,0ml Trypsin auf die Zellen gegeben, die Flasche verschlossen und unter dem Mikroskop begutachtet. Trypsin bewirkt eine Ablösung der adhärent wachsenden Zellen, dies wurde durch leichtes Klopfen an den Flaschenboden unterstützt. Sobald sich alle Zellen abgelöst hatten, wurden 10 bis 17ml Füttermedium in die Flasche gegeben, um den Prozess der Ablösung zu stoppen (im Füttermedium enthaltenes FCS hemmt die Trypsinfunktion).

Das Füttermedium mit den abgelösten Zellen wurde in 10ml-Röhrchen bei 800 U/min über 7 min. abzentrifugiert. Der Überstand wurde aspiriert und das Zellpellet in neuem Füttermedium resuspendiert. Die Zellen wurden in einem Verteilungsverhältnis von 1:4 neu in Zellkulturflaschen ausgesät oder für den Beginn eines Versuches ausgezählt.

2.2.2.3 Einfrieren und Lagerung von Zellen

Die Zellen wurden zunächst trypsiniert und nach der Zentrifugation in eisgekühltem Einfriermedium resuspendiert. Die Zellen wurden in je 1,5ml Einfriermedium in einem Kryoröhrchen 24 h bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ vorgefroren. Am nächsten Tag wurden die Röhrchen in $-200\text{ }^{\circ}\text{C}$ kalten flüssigen Stickstoff überführt.

2.2.2.4 Auftauen von Kulturen

Die eingefrorenen Zellen wurden kurz nach dem Auftauen mit 8,5ml Füttermedium versetzt in ein 10ml-Röhrchen gegeben und bei 800 U/min. 7 min. abzentrifugiert. Der Überstand wurde aspiriert, verworfen und die Zellen im Verhältnis 1:4 in Füttermedium auf Kulturflaschen aufgeteilt.

2.2.2.5 Zellzahlbestimmung

Die Zellen wurden trypsiniert und dann in 1ml Medium resuspendiert. Hieraus wurden $50\mu\text{l}$ entnommen, mit $50\mu\text{l}$ Etylenphenolblau vermischt und in eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Die Anzahl der nicht verfärbten lebenden Zellen im 4×16 Felder-Rasterschema wurde bestimmt, durch vier dividiert und mit 10.000 multipliziert. Das Ergebnis gibt die Anzahl der Zellen an, die in einem ml Medium erhalten sind.

2.2.3 β -Galaktosidase-assay

Der β -Galaktosidase-assay dient der Optimierung oder Etablierung der erforderlichen Bedingungen für die Transfektion unterschiedlicher Zelllinien. Das Plasmid (pmv-sport- β -galaktosidase), das hier zum Einsatz kommt, exprimiert bei erfolgreicher Transfektion in der Zelle β -Galaktosidase, welche dann ein zugegebenes β -Galaktose-Derivat in einen blauen Farbstoff umwandelt und so eine Quantifizierung der Transfektion durch Auszählen der

gefärbten Zellen unter dem Mikroskop ermöglicht. Durch das Variieren der Relation zwischen der Menge an Transfektionsreagenz, DNA und Zelldichte wurde die optimale Transfektionseffizienz ermittelt (Transfektionsprotokolle siehe unten).

2.2.4 Transfektion

2.2.4.1 Chemische Transfektion

Die optimalen Transfektionsbedingungen wurden für jede Zelllinie einzeln etabliert. Für die Zelllinien MG-63 und SAOS-2 und LL-86 lag bereits ein Transfektionsprotokoll vor (siehe unten), das lediglich für LL-86 modifiziert wurde. Für die Zellen MG-63, U2OS, SAOS-2, SJS-A1 wurde Effectene (Qiagen) eingesetzt, während LL-86 und KHOS mit Lipofectamine 2000 (Invitrogen) transfiziert wurden. Die Transfektion der LNCaP-Zelllinie wurde mit DuoFect (Q.bioGene) oder über Elektroporation durchgeführt. Bei den Transfektionen wurde nach Protokoll der Hersteller vorgegangen, wobei Zellzahl, Reagenz- und DNA-Mengen je nach Zelllinie für eine optimale Transfektionseffizienz variierten. Die Aktivität wurde mit dem Dual-Luciferase-Reporter-assay (Kapitel 2.2.5, Seite 40) gemessen. Jedes der pGL3 Promotor Plasmide, Positiv- und Negativ-Kontrollen wurde gemeinsam mit dem ubiquitär aktiven Renilla-luciferase Expressions Plasmid pRL-TK in einem molaren Verhältnis von 10:1 kotransfiziert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen lysiert und bei -20 °C eingefroren.

Transfektionsprotokoll für SAOS-2 und MG-63

Die Transfektion wurde bei beiden Zelllinien mit Effectene nach Qiagenprotokoll bei gleicher Zusammensetzung der erforderlichen Reagenzien durchgeführt. Einen Tag vor der Transfektion wurden die Zellen in 6- oder 12-Well-Platten derart ausgesät, dass sie am Tag der Transfektion zu 60 % konfluent waren. Am Tage der Transfektion wurde pro Well ein Vormix aus 0,6µg DNA, 75µl Puffer EC, und 4,8µl Enhancer fertiggestellt, gemischt und dann für 2-3 min. ruhen gelassen, bevor 4,8µl Effectene hinzugefügt wurden. Der Hauptmix wurde noch einmal für 5-10 min. ruhen gelassen. In dieser Zeit wurde das Restmedium von den Kulturen abgesaugt, die Zellen wurden mit PBS gewaschen und dann je Well 800µl bzw. 350µl (12/6-Well-Platte) Füttermedium zugegeben. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 400µl Füttermedium pro Well zum Transfektionsmix zugegeben und dann 485µl je Well

tropfenweise in die Wells pipettiert. Die Platte wurde vorsichtig geschwenkt und in den Brutschrank verlegt, um dann wie bereits oben beschrieben entsprechend der unterschiedlichen Versuchsreihen fortzufahren.

Die Etablierung der Transfektion der anderen Zelllinien wird in Kapitel 3.2, Seite 49 beschrieben.

2.2.4.2 Elektroporation

Die Zellen wurden trypsiniert und nach der Ablösung gezählt; die Anzahl der Zellen pro Elektroporationsansatz wurde auf $1 \cdot 10^6$ festgelegt. Das Zellpellet wurde in 800 μ l PBS resuspendiert. Nach Zugabe von 10-20 μ g DNA wurden die Zellen in 4mm Elektroporationsküvetten gegeben und mit elektrischem Puls (exponentieller Abfall) bei 220 V und einer Feldstärke (Capacitance) von 950 μ F elektroporiert. Nach dem Vorgang wurden die Zellen in Füttermedium, das je nach Versuchsansatz verschiedene Substitute enthielt, ausgesät und bei 37 °C inkubiert.

2.2.5 Dual-Luciferase-Reporter-assay

Um die Aktivität der Promotoren in den verschiedenen Zellen messen zu können, wurden Dual-Luciferase-Reporter-assays (Promega) durchgeführt. Die zu untersuchenden Promotoren sind in das Firefly-Luciferase-Expressionsplasmid pGL3 (Promega) eingefügt. Nach deren Transfektion wird Firefly-Luciferase entsprechend der jeweiligen Aktivität des Promotorkonstruktes exprimiert. Um die unterschiedlichen Transfektionsraten der einzelnen Zelllinien in Zusammenhang zu setzen, muss bei jedem Ansatz ein zweiter Vektor, der konstant Renilla-Luciferase exprimiert (pRL-TK), co-transfiziert werden; dessen Aktivität stellt ein Maß für die Transfektionseffizienz der jeweiligen Zelllinie und somit eine interne Kontrolle dar. Durch die Normalisierung der Aktivität jedes Promotorkonstruktes (Firefly-Luciferase) gegen die konstante Aktivität der Renilla-Luciferase wird es möglich, die Aktivität der unterschiedlichen Promotorkonstrukte miteinander zu vergleichen. Die Aktivität der Konstrukte wird durch Biolumineszenz widerspiegelt und durch ein Luminometer gemessen.

Der pGL-SV40 (Expressionsplasmid mit dem simian virus 40 large T-Antigen Promotor) und der pGL-CMV (cytomegalie early Promotor) sind zwei Promotoren, die als Positiv-Kontrollen verwendet wurden, da hier hohe Aktivitäten zu erwarten sind. Im Gegensatz dazu wurde ein promotorloser Vektor als Negativ-Kontrolle genutzt.

Vier Stunden nach Transfektion wurde das Medium gewechselt und neues Füttermedium mit den je nach Versuchsaufbau erforderlichen Substituten Vitamin D₃ (50ng/ml) und/oder Vitamin C (50µl/ml) bzw. Doxycyclin (2µg/ml) zu den Zellen gegeben. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und bei -20 °C für mindestens 2 Stunden eingefroren.

Nach Auftauen der Lysate erfolgte die Messung im Luminometer. Im Verhältnis 1:5

(Lysat/Substrat) wird das Lumineszenz-Substrat LAR II durch den Luminometer automatisch dem Lysat hinzugegeben. LAR II wird durch die Firefly-Luciferase metabolisiert; die entstehende Lumineszenz, die qualitativ mit der Aktivität des Promotors korreliert, wird vom Luminometer gemessen. Die anschließende Gabe des Substrats Stop & Glow stoppt zunächst die erste Reaktion ab; dann metabolisiert das Enzym Renilla-Luciferase das neue Substrat und luminesziert seinerseits. Durch den Quotienten der Aktivitäten von Firefly-Luciferase und Renilla-Luciferase ist es möglich, die auf die Transfektionseffizienz normalisierte (relative) Aktivität der Promotorkonstrukte in den unterschiedlichen Zellen zu messen.

3. Ergebnisse

3.1 Herstellung der Promotorkonstrukte

Der hOC-AV- prom. und der hOC-(-215 >+21)-prom. (einkloniert in den pGL3-basis-Vektor) lagen im Hause bereits vor. Der Col1-A-1-CMV-min.-prom. wurde von der Firma GeneArt nach Vorgaben des Hauses konstruiert (Hellwinkel; pers. Mitteilung) und dann im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit in den pGL3-basis-Vektor einkloniert. Desweiteren wurde der hOC-prom.-compl. aus DNA mittels PCR amplifiziert, um ihn ebenso in den pGL3-basis-Vektor (Abb. 2, Seite 28) einzubringen. Die Umklonierung des Promotorkonstruktes in den pGL3-basis-Vektor ist die Voraussetzung für die Transfektion und Messung über Dual-Luciferase-Reporter-assays. Alle Promotorkonstrukte, die in dieser Arbeit verwendet wurden, wurden mittels Agarosegelelektrophorese und Sequenzierung verifiziert.

Col1-A-1-CMV-min.-prom.

Während der pGL3-basis-Vektor mit Kpn I und Hind III entsprechend den ab Kapitel 2.2.1.4, Seite 30 beschriebenen Arbeitsschritten verdaut, an den 5'Enden dephosphoryliert und aufgereinigt wurde, wurde der Col1-A-1-CMV-min.-prom. mit den gleichen Enzymen aus seinem ursprünglichen Vektor (ein Vektor der Firma GeneArt 02-429 pCR-Script) herausgeschnitten. Es folgte die Einlegung des Col1-A-1-CMV-min.-prom.-Insert in den pGL3-basis-Vektor. Das daraus resultierende Konstrukt wurde in (JM 109) E-coli-Bakterien transformiert. Mittels Minipräparation wurden 8 isolierte Plasmide aus transformierten Klonen hergestellt, einem Kontrollverdau mit Xba I unterzogen, gelelektrophoretisch aufgetrennt und evaluiert (siehe Banden 1-8). Beim Restriktionsverdau waren bei Einbau und korrekter Orientierung des Col1-A-1-CMV-min.-prom.-Inserts im pGL-3-basis-Vektor zwei Fragmente der Größe 1936 bp und 2445 bp zu erwarten. Die Klone 1-6, die in Abb. 5 dargestellt sind, stellen die erwarteten Fragmente dar und wurden über Sequenzierung als korrekte Konstrukte bestätigt. Probe Nr. 1 und 2 wurden dann in Maxipräparation zur Gewinnung großer Plasmidmengen gegeben.

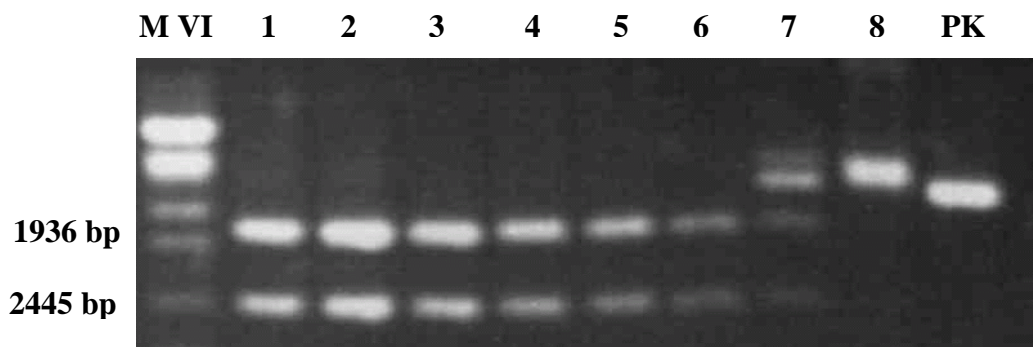


Abb. 5: Die Abb. zeigt gelelektrophoretisch aufgetrennte acht Klone des pGL3-basis-vektor-Col1-A-1-CMV-min.-prom., nach Verdau mit Xba1. Die erste Bahn zeigt den Peqlab-marker Nummer 6, die letzte eine Positiv-Kontrolle des pGL3-basis-Vektors ohne Insert.

hOC-prom.-compl.

Der hOC-prom.-compl.(-829 >+24) wurde aus Placenta-DNA mit Hilfe von PCRs mit den Primern Prs und Pra vervielfältigt, in den pCR-TOPO-Vektor legiert und in E-coli (XL-1 blue) transformiert. Klone wurden isoliert und die entsprechenden Plasmide über Minipräparation aufgereinigt. Die Plasmide wurden über EcoRI-Verdaue und Agarosegelelektrophorese auf korrekte Inserts überprüft (nicht dargestellt). Das hOC-prom.-compl.-Insert wurde vom PCR-Topo-XL-hOC-compl.-prom. in den pGL3-basis-Vektor in Kpn I und XHO I –Schnittstellen umkloniert und in E-coli (JM 109) transformiert. Beim Kontrollverdau der aus den Minipräparationen resultierenden Plasmide (siehe Banden 1-8) mit BamH 1 und Hind III sind bei korrekter Orientierung des Inserts im pGL3-basis-Vektor-hOC-prom.-compl. drei unterschiedliche Fragmente der Größe 907 bp, 1951 bp und 2827 bp zu erwarten (siehe Abb. 7). Die Probe Nr. 7 enthielt diese Fragmente, wurde über Sequenzierung verifiziert (Abb. 8, Seite 46) und daraufhin zur Gewinnung ausreichender Mengen in eine Maxipräparation gegeben. Auch am hier gewonnenen Plasmid wurde ein Kontrollverdau durchgeführt. In der Agarosegelelektrophorese konnten die erwarteten Fragmente dargestellt werden (Abb. nicht dargestellt).

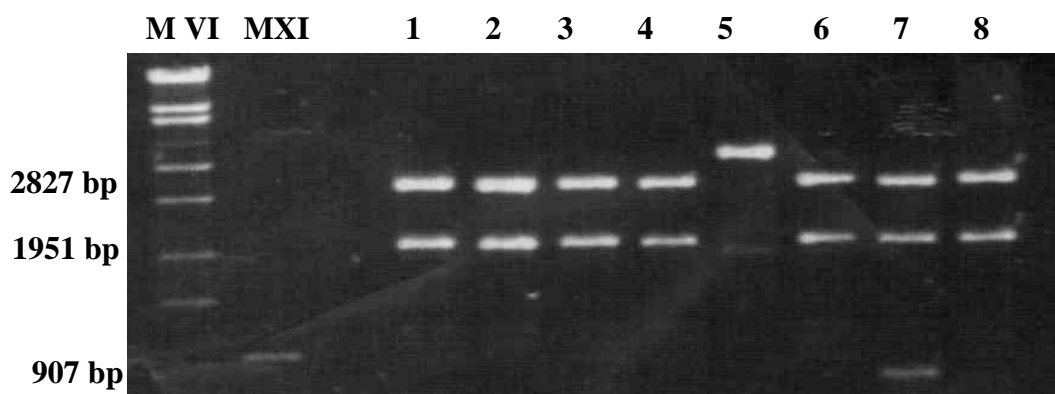


Abb. 7: Agarosegelelektrophoretische Auftrennung von 8 BamH1/Hind III-verdauten pGL3-Plasmiden nach der Einklonierung von hOC-prom.-compl. Der Klon Nr. 7 enthält die theoretisch erwarteten Fragmente bei vollständigem und korrekt orientiertem Insert. (M: Marker VI und XI)

Beginn des hOC-prom.	10	20	30	40	50	60
	CTGCAGGGTC	AGGAGGAGAA	TCGTGGGGCC	AGGAGGGCAG	AGGCACACTC	CATCTTCGTG
	70	80	90	100	110	120
	CTCCTCACAG	GCCCTGCCTC	CCTGCCTGCT	AAGGACACAG	GGAAGGGGGT	CCCCACCTCA
	130	140	150	160	170	180
	GTGCCTGCCT	CCCTTCCCTG	TGCCTGTGTA	CCTGGCAGTC	ACAGCCACCT	GGCGTGTCCC
	190	200	210	220	230	240
	AGAAACCAAC	CGGCTGACCT	CATCTCCTGC	CCGGCCCCAC	CTCCATTGGC	TTTGGCTTTT
	250	260	270	280	290	300
	GGCGTTTGTG	CTGCCCGACC	CTTCTCCTG	TCCGGATGCG	CAGGGCAGGG	CCTGAGCCGT
	310	320	330	AV- Element	350	360
	CGAGCTGCAC	CCACAGCAGG	CTGCCTTTGG	TGACTCACCG	GGTGAACGGG	GGCATTGCGA
	370	380	390	400	410	420
	GGCATCCCCT	CCCTGGGTTT	GGCTCCTGCC	CACGGGGCTG	ACAGTAGAAA	TCACAGGCTG
	430	440	450	460	470	480
	TCAAGACAGCT	GGAGCCCAGC	TCTGCTTGAA	CCTATTTTAG	GTCTCTGATC	CCCGCTTCCT
	490	500	510	520	530	540
	CTTTAGACTC	CCCTAGAGCT	CAGCCAGTGC	TCAACCTGAG	GCTGGGGGTC	TCTGAGGAAG
	550	560	570	580	590	600
	AGTGAGTTGG	AGCTGAGGGG	TCTGGGGCTG	TCCCCTGAGA	GAGGGGCCAG	AGGCAGTGTC
	610	620	630	640	650	660
	AAGAGCCGGG	CAGTCTGATT	GTGGCTCACC	CTCCATCACT	CCCAGGGGCC	CCTGGCCCAG
	670	OSE 2680	690	700	710	720
	CAGCCGCAGC	TCCCAACCAC	AATATCCTTT	GGGGTTTGGC	CTACGGAGCT	GGGGCCGGATG
	730	740	750	760	770	780
	ACCCCCAAAT	AGCCCTGGCA	GATTCCCCTT	AGACCCGCCC	GCACCATGGT	CAGGCATGCC
	790	800	810	Tata-box	830	840
OSE 1	CCTCCTCATC	GCTGGGCACA	GCCCAGAGGG	TATAAACAGT	GCTGGAGGCT	GGCGGGGCAG
	850	860	870	880	890	Transkriptionsstart
	GCCAGCTGAG	TCCTGAGCAG	CAGCCAGCG	CAGCCACCGA	GACACCATG
				Start-Codon		

Abb. 8: Dargestellt ist der hOC-prom. ab Base – 834. Der sequenzierte Bereich des Plasmids der Probe Nr. 7 ist identisch.

Bsp 2472-prom. und Bsp 705-prom.

Der Bsp-Promotor stellt auf Grund seiner osteoblastenspezifischen Elemente einen weiteren Kandidaten für die Verwendung zur induzierten spezifischen Transgenstranskription in OS-Zellen dar. Er wurde freundlicherweise von Prof. Franceschi von der Universität Michigan (Department of Biological Chemistry, School of Medicine, Ann Arbor, Michigan, USA) zur Verfügung gestellt.

Nach Transformation in E-coli (JM 109), Maxipräparation und Plasmidisolierung wurden Kontrollverdau (siehe Abb. 9) und Sequenzierung vorgenommen. Die Plasmide wurden mittels Xba 1 geschnitten, zu erwarten waren für den verkürzten Promotor Bsp705-prom. in 5570 bp großes Fragment und für den Bsp 2472-prom. ein 7290 bp großes Fragment. Die Proben 1-4 zeigen das zu erwartende Fragment des Bsp 705-prom.; die Proben 6-9 das Fragment des Bsp 2472-prom..

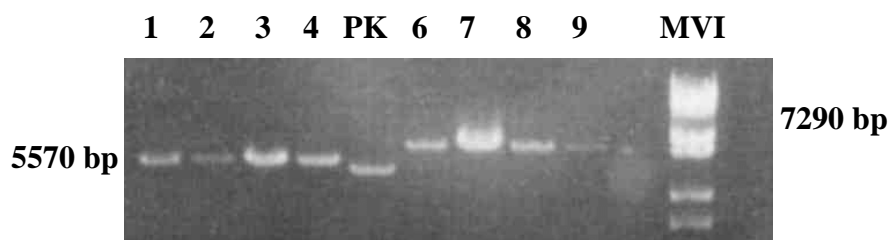


Abb. 9: Die Proben 1-4 stellen den Verdau des Bsp 705-prom. dar, Slot 5 stellt eine PK (den pGL3-basis-Vektor ohne Insert) dar und die Proben 6-9 beinhalten den Bsp 2472-prom.. In Slot 10 wurde der Marker VI pipettiert.

Durch die Sequenzierung (nicht dargestellt) der Promotoren verifiziert, dass die drei Elemente A, B und C im pGL3-basis-Vektor enthalten waren (siehe Abb. 10, Seite 48).

```

1 tctagaaagc actgttcctt taaaatcatt caccacctct ggctcctaca atcttcctgt
61 cctcccttcc acacagatcc ctgagccttg aggagagggc tgtgataaat catccccttt
121 ggagtgagca gtctgaagtc tctcattctc catgcaactgt ttattccgt cccgcgggat
181 tcagttatcc gtgggtgcga gggggaccac gaacctggaa ggaaatggga ggaaaagaaa
241 gagagcggac gaccaagtag attgaacata tcaaggtctc gtttattagg ctgaggtgcc
301 ttctttttaa agcatacacc acggggaata tgggaggggt cgagggagaa ttatacaaa
361 aacaaagaag tgggcatctg ctgacatggg ggccgaagtc aggcgccagg cagcgggcac
421 tctggatfff atctctggaa cattgatcct ccttgacagc cttgggggtc aggctgggct
481 caggcgtaac tcatgtcctt ggatggcacg ggaactcagg aagagatagg gaagagggga
541 ctataattca gcttttacag cctcaggtgc caagaaagga atagggagga aggggggtga
601 taaccagctc ttagtacaag gccatctggc ctgttaggga gattgtgaag ggctcacttt
661 ctcacgggat ggtctctgac actgtctggc tgtgtgtctc cccatctact gcaagactgg
721 gcttttctga tgaagtgtaa gcctagttag ggtgccctgt tcattagaag tcatfctgca
781 gtcactcagc agaatattag tagtgggttt ctttccccct gagagctcac aacctgtcta
841 gtctcgggtt cttagcaccg tgaataattc tattttcaga agttaacatc cttcccctca
901 gacacctttg aagcttgtgg gtgtttgggt ttctgtgccc tctacctgca cgtctctcca
961 tacccaactg tgagcatttg aaagcgtgtg ctagagtttc ttgttttagct ccccatgtcc
1021 tataaaacac tttggtttgg tagagaactg agcagttcaa actttgctca actgagctta
1081 tgggggtgaa ttgaatacaa gcaaataaaa ggagcttatt caacttctct tttgtggttc
1141 tctatfctat ttttaaatgc tgaataactt ttcttttagct aatcatctg aagaatctaa
1201 cagagtcact actctggcaa caatactgga caacaatggc atttattgat ttctgtaaa
1261 tagaagtcaa cagagaagaa tatggggata aagaatatag ggataaagaa gacaaccaac
1321 cagagctccc agggctctaa ccaccaacca gggagtacac atggagggac ccatggctcc
1381 atctgtatat gtagcagagg atggcctagt ccatcatcaa tgggatgaga ggcccttggf
1441 cccatgaagg cctgatatcc cagtgtcggg gaatttgagg gcagggagga gagagtggat
1501 gggtaggtgg gggaaacacc tcatagaagc aggagggggg tgggatagg gggttttggg
1561 gtgtgggaat tgggaaaggg gataaacctt gaaacgtaa taaataaaat atccaataaa
1621 aaaatcttct ggaaaagaaa agatatacaa aatacaaagg cagtttcctt tgcaaaacta
1681 ggaaatgttc agtttgccaa tgcatgcagt aagtttattt tccagtaatt attcaataac
1741 catgaactgc tctctggcag tgctagtaat tattctctac tcataggaaa aaaattacat
1801 aagaagacga ctagaaataa gattatacga tgtgcagtgg cctcatttac acagcaaagg
1861 gccacatagg ggataatccc aaggacttgt tctatgaaag ttacatcag ctcccttggtc
1921 tcaacctcga acgctgtaac gttcacagtc agcattgtgc tttagcaaag cttaggtaat
1981 ctgactgggt taataatata agttttgact tacaagcctc tgaaatatgt ttcagggaga
2041 aatataaagg aatcaatatt aaactatctc ttggcatcaa ctcatfctct aattcagtac
2101 ttttagacct atgcagtgtc gtgtgaaagc cagctttcct ttctttcaac acagtgaaaa
A 2161 cctgtatcat tgtgaaagct taaatgctta agtcttttgc tatttatfctt atttgaaatg
B 2221 cagtatatta ttatatatat tcagaactct aactaccatc ttctcctcac ccttcaatta
C 2281 aatcccacaa tgcaagcctc ttggcagaag gccacacttt catgtttatt caactgaggc
2341 tgaatcttga aaatgtgttg aagtttggga ttctctgggtg agaaccaca gctgacgtt
2401 gtgctggcca cagctgtgat tggctgttga gaggcggaga agggtttata gtcagcaaga
2461 gcaagtgaat gagtgagtga cagccgggag aacaatccgt gccactcact cgactcgagc
2521 caaggacctg gccgaaagga aggttaaggt aatgggcaag gacctcacag ccaggtaatg
2581 ggcaaggacc tcacagccag gcacctcagt cttccctgtg tggctttggc ttggagtttg
2641 tagctgcagc atggatctta ctgcacagtg cacagtggct ctagttgaac ttttgcttgc

```

Abb. 10: Original-Sequenz des Bsp-Promotors mit den Elementen A, B und C aus dem NCBI Sequence Viewer, Version : AF 071079.1 GI: 3288847 von Benson, M.D. et al.

3.2 Etablierung der Zelltransfektion

Die Transfektionsprotokolle für die Zelllinien SAOS-2 und MG-63 lagen im Hause vor (siehe Kapitel 2.2.4.1, Seite 39). Mit Hilfe des β -Galaktosidase-Kits wurden die Transfektionsbedingungen für die Zelllinie LL-86 weiter optimiert und für die Zelllinien U2OS, SJS-A-1, KHOS und LNCaP neu etabliert. Hierzu wurde das Plasmid pCMV sport- β -Gal in die Zellen transduziert. Nach 48 Stunden wurde die Galaktosidaseexpression mittels β -Galaktosidase-assays in den zuvor fixierten Zellen festgestellt. Um die Bedingungen für optimale Transfektionseffizienzen zu ermitteln, wurde die Dichte der Zellen/Well, die Transfektionsreagenz (Effectene, Lipofectamine 2000, Duofect) sowie die Relation von DNA zu Reagenz- und Puffer- Menge variiert. Die jeweils optimalen Bedingungen zur Transfektion der o.g. Zelllinien sind in Tabelle 1 (Seite 50) dargestellt.

Um eine verbesserte Adhärenz der LNCaP-Zellen zu ermöglichen, wurden diese 48 Stunden vor der Transfektion in Collagen-beschichtete 6-Well-Platten ausgesät. Die LNCaP-Zellen wurden sowohl mit Duofect als auch durch Elektroporation transfiziert. Für die chemische Transfektion mit Duofect wurde 24 Stunden vorher das Medium durch Serum (10 %)- und defferioxamine (50 μ M)-haltiges Medium ausgetauscht.

Die LL-86 wurden bis zu 3 Tage, die anderen Zelllinien 24 Stunden vor der Transfektion ausgesät.

Zellen Reagenz	LNCaP Duofect	U2OS Effectene	SJSA-1 Effectene	KHOS Lipofectamine	LL-86 Lipofectamine
Konfluenz am Tag der Transfektion	60%	60-80%	60%	60%	60% und gut verteilt
Arbeitsschritte Pro Well	MIX 1: Duofect und Puffer zusammen mischen	Vormix: Nach Fertigstellung vortexen und dann 2-3 min. ruhen lassen	Vormix: Nach Fertigstellung vortexen und dann 2-3 min. ruhen lassen	MIX 1 Zuerst zubereiten	MIX 1: Zuerst zubereiten
DNA (µg)	4	0,2	0,6	1,7	1,7
Duofect (µl)	2,6	-	-	-	-
HBS-Puffer (µl)	97,4	-	-	-	-
Enhancer (µl)	-	1,6	4,8	-	-
Puffer EC (µl)	-	75	75	-	-
EMEM+Earles´BS S (µl)	-	-	-	91,25	91,25
Arbeitsschritte	MIX 2: DNA und Puffer	Zum Vormix Effectene geben	Zum Vormix Effectene geben	MIX 2: Vortexen und 3 min. ruhen lassen	MIX 2: Vortexen und 3 min. ruhen lassen
Plus Reagenz (µl) optional	-	-	-	10,4	10,4
Effectene (µl)	-	1,5	12	-	-
HBS-Puffer (µl)	d.h. 4 µg DNA in 100 µl	-	-	-	-
Lipofectamine 2000 (µl)	-	-	-	4	5
EMEM+Earles´BS S (µl)	-	-	-	91,7	90,68
Arbeitsschritte	Die beiden Mixe durch auf- und abpipettieren gut mischen und 20 min. stehen lassen	Vortexen und 10 min. ruhen lassen	Vortexen und 10 min. ruhen lassen	Die beiden Mixe gut mischen und 20 min. ruhen lassen	Die beiden Mixe gut mischen und 20 min. ruhen lassen

Tabelle 1: Die Tabelle zeigt die effizientesten Transfektionsprotokolle jeder Zelllinie nach der Etablierung durch das β -gal-assay. Die Hersteller der Kits sind dem Materialteil zu entnehmen.

3.3 Evaluation der höchsten Aktivität der Promotoren

Bei einem Einsatz in gentherapeutischen Szenarios ist eine höchstmögliche Aktivität der Promotoren in den Zielzellen von Bedeutung. Die Ermittlung des Aktivitätsoptimums der untersuchten Promotoren ist Gegenstand der im vorliegenden Kapitel beschriebenen Arbeitsabschnitte. Zunächst sollte der Zeitpunkt der höchsten Aktivität ermittelt werden.

Es wurde beschrieben, dass der Bsp-prom. nach 7 Tagen bei Vitamin-C-Substituierung (Benson, Bargeon et al. 2000) am aktivsten sei. In einer anderen Arbeit wird die Induzierung des hOC-prom. durch Vitamin D₃ beschrieben (Morrison, Shine et al. 1989; Hsieh, Yang et al. 2002). Aus diesem Grund wurden die Aktivitäten von hOC-prom.-compl., Col1-A-1-CMV-min.-prom. und von Bsp2472-prom. nach 48 h, 96 h und 168 h post Transfektion gemessen. Es wurde zu dem der Einfluss von Vitamin C und D₃ untersucht. An den verkürzten Promotoren hOC-AV-prom., hOC(-215>+21)-prom. und Bsp705-prom. wurde der Einfluss von Vitamin C und D₃ nach je 48 h (Standardprotokoll, Kapitel 2.2.4.1, Seite 39), gemessen. Für alle Vorversuche wurde jeweils eine Zelllinie transfiziert.

3.3.1 Kinetik des Col1-A-1-CMV-min.-prom.

Die Untersuchungen am Col1-A-1-CMV-min.-prom. an MG-63-Zellen zeigten, dass die Aktivität des Promotors nach 48 h ohne Vitaminsupplemente am höchsten war. Die Aktivität des Promotors konnte weder durch die Gabe von Vitaminen noch durch die Wachstumsdauer post Transfektionem gesteigert werden (siehe Abb. 11). Es wurde für die Durchführung der Hauptversuche (die Testung der Aktivität des Promotors an allen Zelllinien) beschlossen, die Aktivität des Promotors 48 h nach Transfektion ohne Zugabe von Vitaminen zu messen.

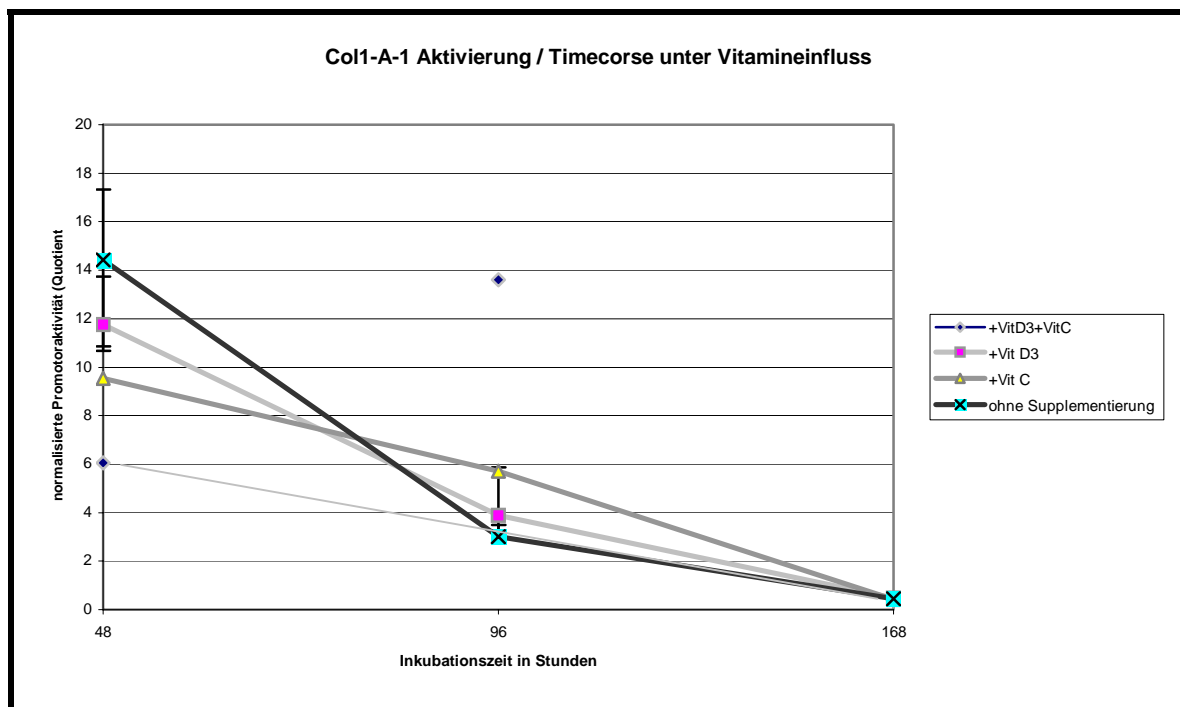


Abb. 11: Die Grafik zeigt den Kinetikversuch (über 7 Tage) des Col-1-A-1-CMV-min.-prom. in 4 unterschiedlichen Medien und zu 3 unterschiedlichen Zeitpunkten. Die Medien wurden alle 48 Stunden gewechselt. Die Werte geben den Mittelwert aus 3 individuellen Versuchsansätzen wieder. (Allein der Wert nach 96 h mit Vit. D₃ und C wurde nur als Punkt dargestellt, da hier nur ein Ansatz auswertbar war.)

3.3.2 Kinetik des hOC-prom.-compl.

Für den hOC-prom.-compl., der an MG-63-Zellen untersucht wurde, konnte festgestellt werden, dass die Promotoraktivität nach 48 h unabhängig von der Supplementierung der Medien mit verschiedenen Vitaminen über 96 h und 168 h abfiel; die Aktivität des Promotors war nach 48 h bei Zugabe von Vitamin C und D₃ am höchsten. Für den weiteren Versuchsaufbau der Hauptversuche des hOC-prom.-compl. wurde festgelegt, Vit. D₃ zu substituieren.

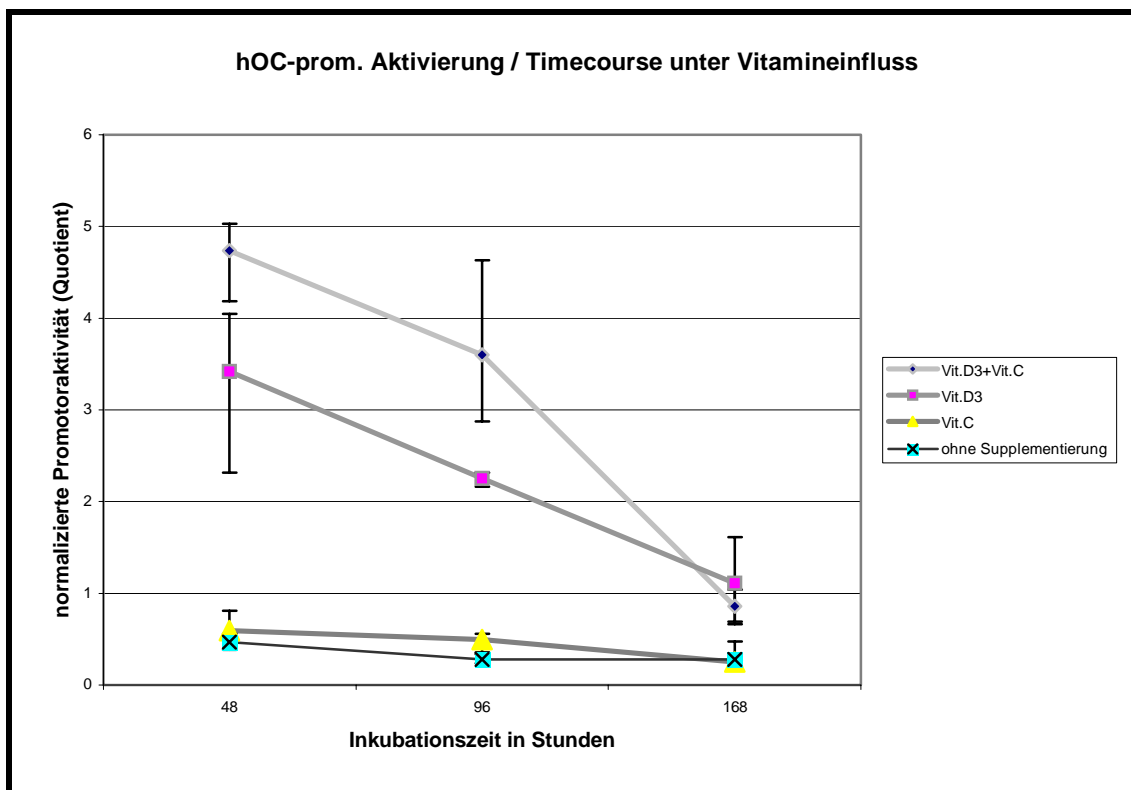


Abb. 12: Die Grafik zeigt einen Kinetikversuch des hOC-compl.-prom. Die Versuchsbedingungen sind identisch zu denen des Vorversuchs am Col1-A-1-cmv-min.-prom. in Abb. 11, Seite 52.

3.3.3 Kinetik des Bsp 2472-prom.

Der Bsp2472-prom. wies die langanhaltendste Aktivität auf. Der Versuch wurde an U2OS-Zellen durchgeführt. Diese Beobachtung war vergleichbar mit der Beobachtung der Gruppe um Prof. Franceschi (Benson, Bargeon et al. 2000). Die anhaltende Aktivität wurde in allen Medien gemessen, wobei die höchste Aktivität bei fehlender Vitaminzugabe festgestellt wurde.

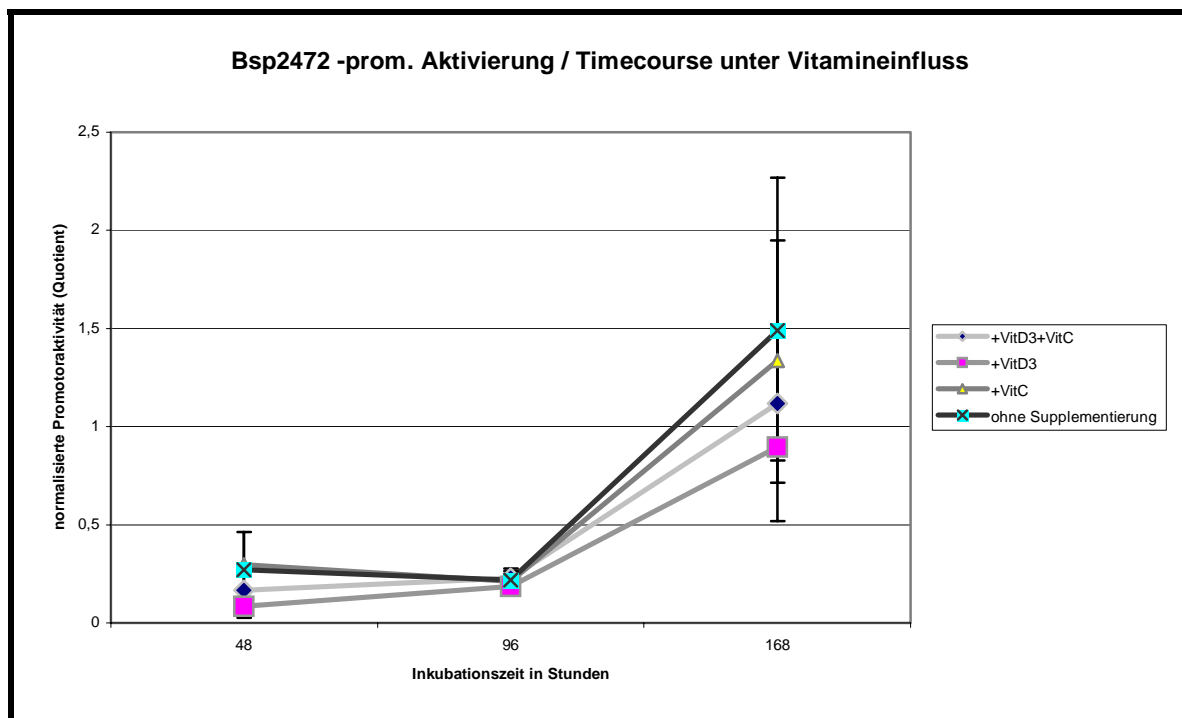


Abb. 13: Die Grafik zeigt den Kinetikversuch des Bsp2472-prom. zu den gleichen Konditionen wie die vorhergegangenen Versuche.

3.3.4 Voruntersuchung an den verkürzten hOC-Promotoren

Die Voruntersuchung an den verkürzten hOC-Promotoren wurde an U2OS-Zellen durchgeführt und zeigte drei signifikante Unterschiede zwischen den Konstrukten (siehe Abb. 13, Seite 54). Erstens wurden für den hOC-AV-prom. höhere Aktivitäten als für den verkürzten Promotor ohne AV-Element (hOC(-215>+21)-prom.) gemessen. Zweitens wurde eine höhere Aktivität des hOC-AV-prom. unter Vit. D₃ Supplementierung festgestellt, wobei der zusätzliche Effekt der Supplementierung mit Vitamin C nur gering ist. Drittens zeigt der hOC(-215>+21)-prom. keine signifikante Veränderung seiner Aktivität durch Vitamin-Supplementierung.

Es wurde festgelegt, die Hauptversuche an dem hOC-AV-prom. mit Vitamin D₃ und zusätzlich Vitamin-C-Supplementierung durchzuführen.

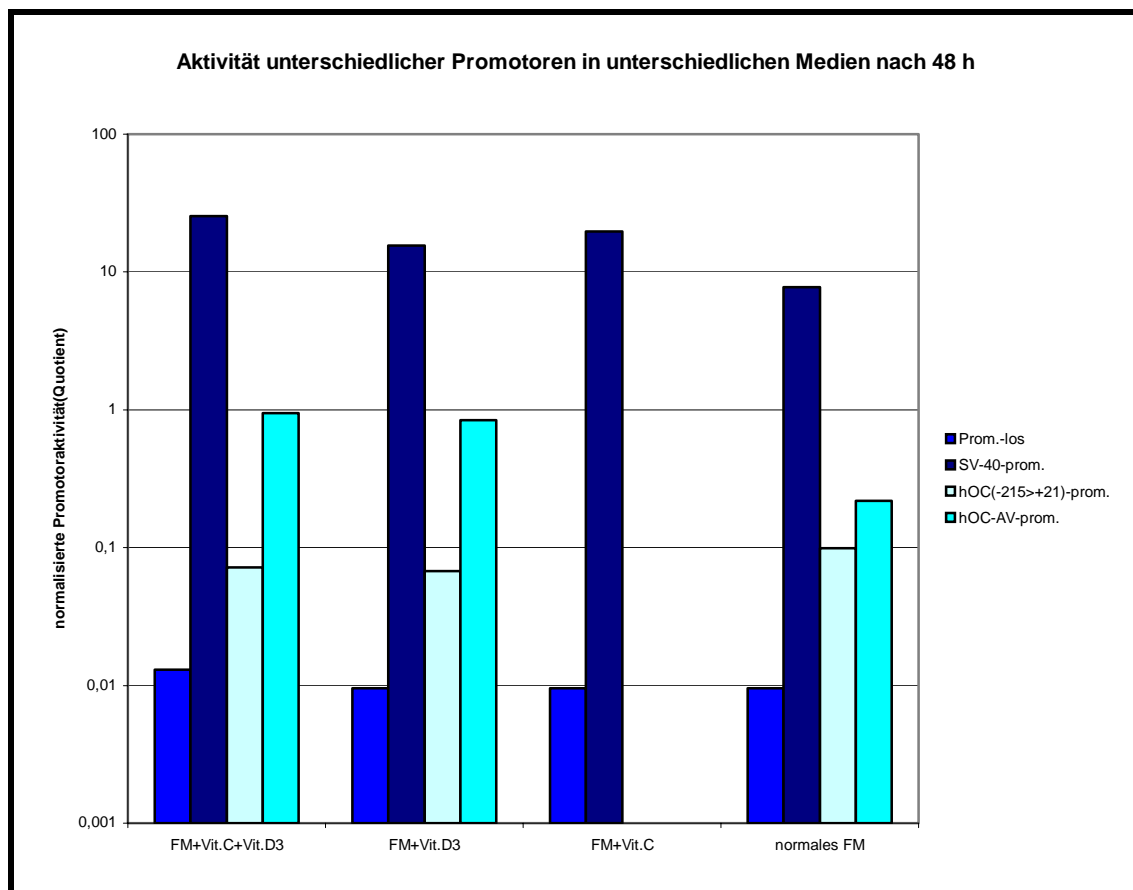


Abb. 14: Die verkürzten hOC-Promotoren wurden unter den gleichen Bedingungen wie die vorhergegangenen Versuche transfiziert und nach 48 h gemessen.

3.4 Hauptversuche

3.4.1 Aktivität der zelleigenen Gene

Um zu untersuchen, ob in den einzelnen Zelllinien eine Transkription der jeweiligen Gene erfolgt, wurden an allen Osteosarkom-Zelllinien RT-PCRs am Col1-A-1, hOC, Bsp und β -cat.- Transkripten durchgeführt.

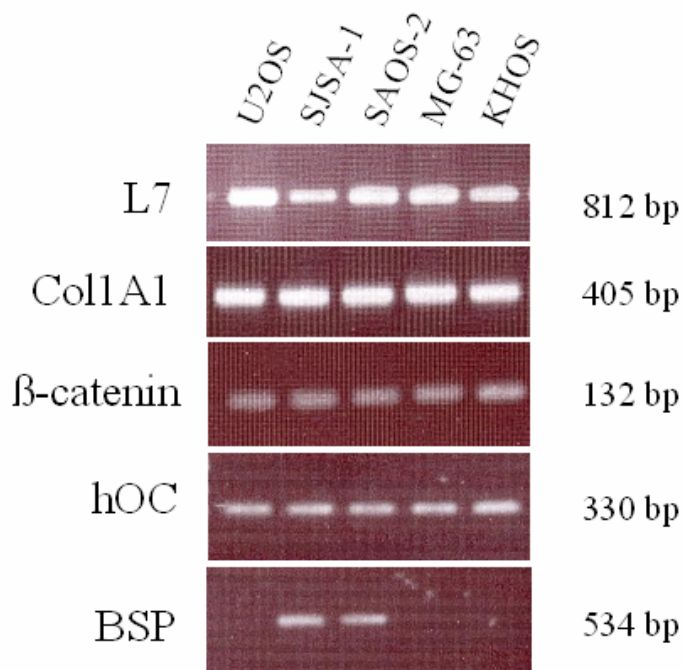


Abb. 15: Intrinsische Aktivität der Col1-A-1-, β -cat.-, hOC- und Bsp-Gene in den genannten Zelllinien über RT-PCRs und Darstellung der Amplifikationsprodukte nach agarosegelelektrophoretischer Auftrennung.

Es konnte gezeigt werden (Abb. 15), dass das Col1-A-1-, β -cat.- und hOC-Gen in allen OS-Zelllinien transkribiert wird, die entsprechenden Promotoren sind somit aktiv. Allein das Bsp-Gen wurde lediglich in SJSA-1- und SAOS-2-Zellen in messbaren Mengen transkribiert. L7, ein ubiquitär und gleichmäßig aktives Gen (ribosomales housekeeping gene), stellt eine interne Kontrolle für die RT-PCR und RNA-Qualität dar.

3.4.2 Hauptversuch: Col1-A-1-CMV-min.-prom. Aktivität in OS-Zellen und Kontrollen

Der Col1-A-1-CMV-min.-prom. wies in allen OS-Zelllinien eine hohe Aktivität auf, welche mit der Positiv-Kontrolle (SV-40) vergleichbar war (siehe Abb. 16). In den Zelllinien MG-63, KHOS, LNCaP und LL-86 konnten sogar höhere Aktivitäten gemessen werden. In LNCaP wurde mit einem Wert von 1,22 die geringste Aktivität gemessen. Bei KHOS, SJSA-1, SAOS-2 und U2OS wurden Aktivitäten zwischen 1,29 (SJSA-1) und 3,32 (U2OS) festgestellt. Mit 11,3 zeigte sich in der MG-63 Zelllinie die höchste Promotoraktivität aller OS-Zelllinien. Bemerkenswert ist, dass der höchste Wert von 24,78 in primären Fibroblasten (LL-86) gemessen wurde.

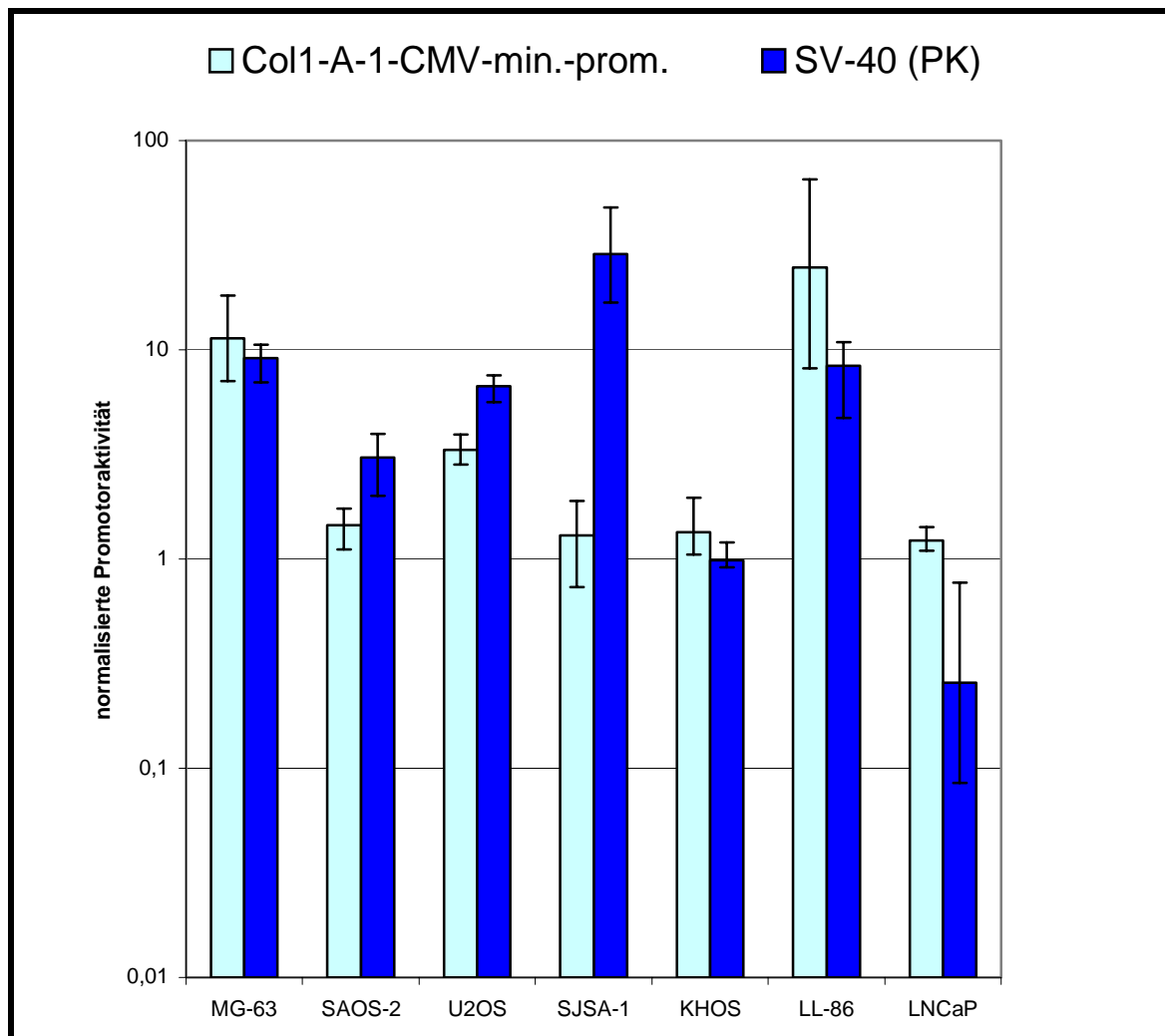


Abb. 16: Aktivitäten des Col1-A-1-CMV-min.-prom. und der Positiv-Kontrolle SV-40 in 5 OS-Zelllinien, einer Lungenfibroblastenzelllinie (LL-86) und einer Prostatazelllinie (LNCaP). Die Säulen repräsentieren den Mittelwert der normalisierten Promotoraktivität aus individuellen Messungen von jeweils 9 unabhängigen Transfektionen. Die Fehlerbalken indizieren die minimale und maximale Abweichung vom Mittelwert.

Um diese Ergebnisse mit jenen aus anderen Untersuchungen vergleichbar zu machen, wurden die Werte an den Werten der LNCaP-Zelllinie, die als nicht-osteogene Kontrolle verwendet wurde, normalisiert. Es zeigte sich, dass LL-86 im Vergleich mit MG-63 eine zweifach verstärkte Promotoraktivität aufwies.

	MG-63	SAOS-2	U2OS	SJSA-1	KHOS	LL-86
x-fache Aktivität im Vergleich mit LNCaP (= 1)	9,29	1,18	2,7	1,05	1,09	20,31

Tabelle 2: Darstellung der x-fachen Promotoraktivität des Col1-A-1-CMV-min.-prom. bezogen auf die nicht-osteogene LNCaP-Zelllinie.

3.4.3 Hauptversuch: hOC-AV-prom. Aktivität in OS-Zellen und Kontrollen

Der hOC-AV-prom. erwies sich insgesamt als geringfügig aktiv (siehe Abb. 17). Die Aktivitäten des Promotors in Zellen bei Vitamin-C-Supplementierung erreichten die höchsten Werte mit 0,7 (MG-63) und den niedrigsten mit 0,01 (SJSA-1). LL-86 lag mit 0,56 bei dieser Versuchsreihe unter dem Wert von MG-63. Insgesamt zeigte sich keine signifikante Steigerung der Aktivität des Promotors durch zusätzliche Vitamin-D₃-Substitution des Mediums. Die höchste Aktivität mit Vitamin C und D₃-Substituierung konnte in LL-86 mit dem Wert von 0,47 gemessen werden.

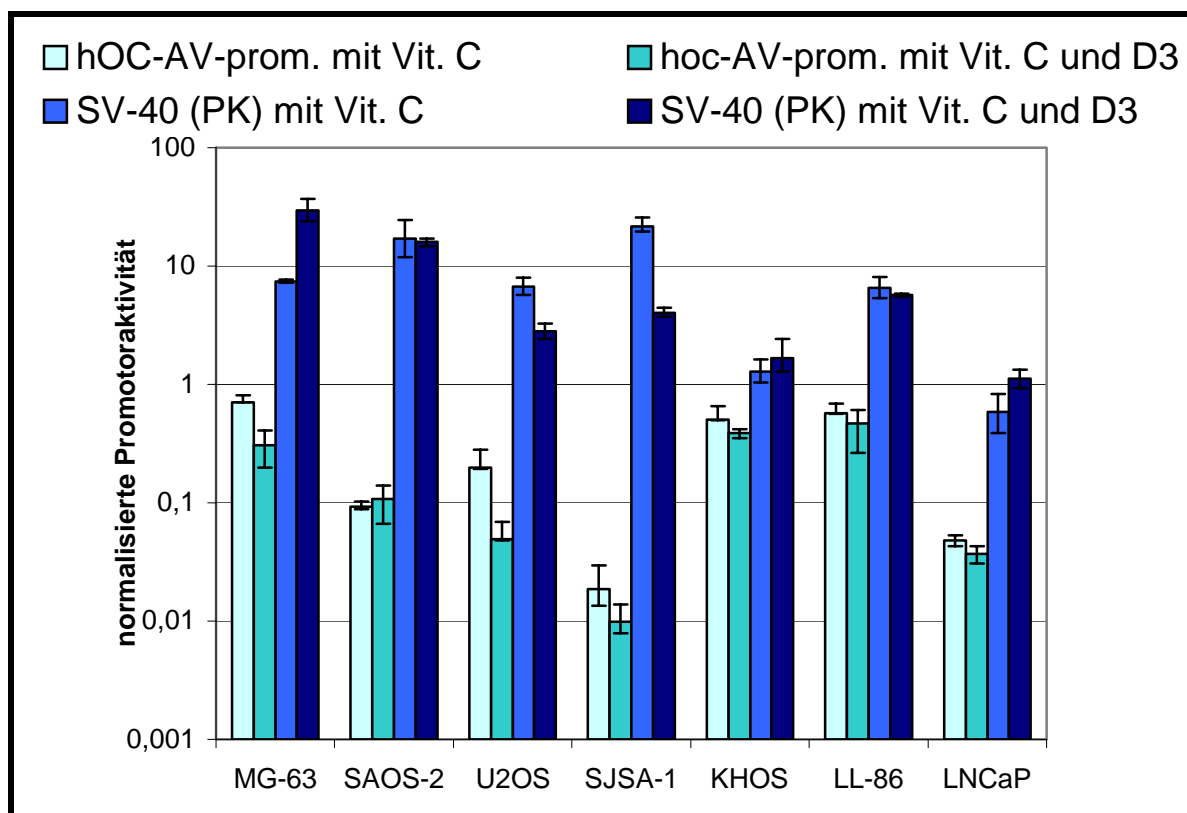


Abb. 17: Aktivität des hOC-AV-prom. und der Positiv-Kontrolle SV-40 in 5 OS-Zelllinien und den Kontrollzelllinien LL-86 und LNCaP. Messungen an 6 individuellen Transfektionen. Die Fehlerbalken stellen die minimalen und maximalen Abweichungen der Einzelmessungen vom Mittelwert dar. Während des Versuchs wuchsen die Zellen in DCC-Medium (steroidfreiem Medium), dieses wurde 4 Stunden nach Transfektion mit Vitamin C oder Vitamin C und D₃ substituiertem frischem Medium ersetzt.

	MG-63	SAOS-2	U2OS	SJSA-1	KHOS	LL-86
x-fache Induktion mit Vit. D3	0,43	1,11	0,21	0,5	0,77	0,82

Tabelle 3: Darstellung der x-fachen Promotoraktivität des hOC-AV-prom. bezogen auf die nicht-osteogene LNCaP-Zelllinie.

Wie in Tabelle 3 dargestellt, erfolgte keine nennenswerte Induktion des hOC-AV-prom. durch Vitamin-D₃-Supplementierung.

3.4.4 Hauptversuch: hOC-prom.-compl. Aktivität in OS-Zellen und Kontrollen

Anders als der verkürzte Promotor weist der hOC-compl.-prom. eine starke Induktion durch Vitamin D₃ auf. Der Effekt ist bei der MG-63 Zelllinie am größten (siehe Abb. 18 und Tabelle 4, Seite 62). Die höchsten Aktivität mit 11,54 wies MG-63 unter Vitamin-C- und D₃-Substitution auf. In den anderen Zelllinien erreichte die Promotoraktivität Werte zwischen 2,56 (LL-86) und 0,004 (SJSA-1). Bei alleiniger Vitamin C Gabe lagen die Werte zwischen 0,56 (LL-86) und 0,002 (SJSA-1).

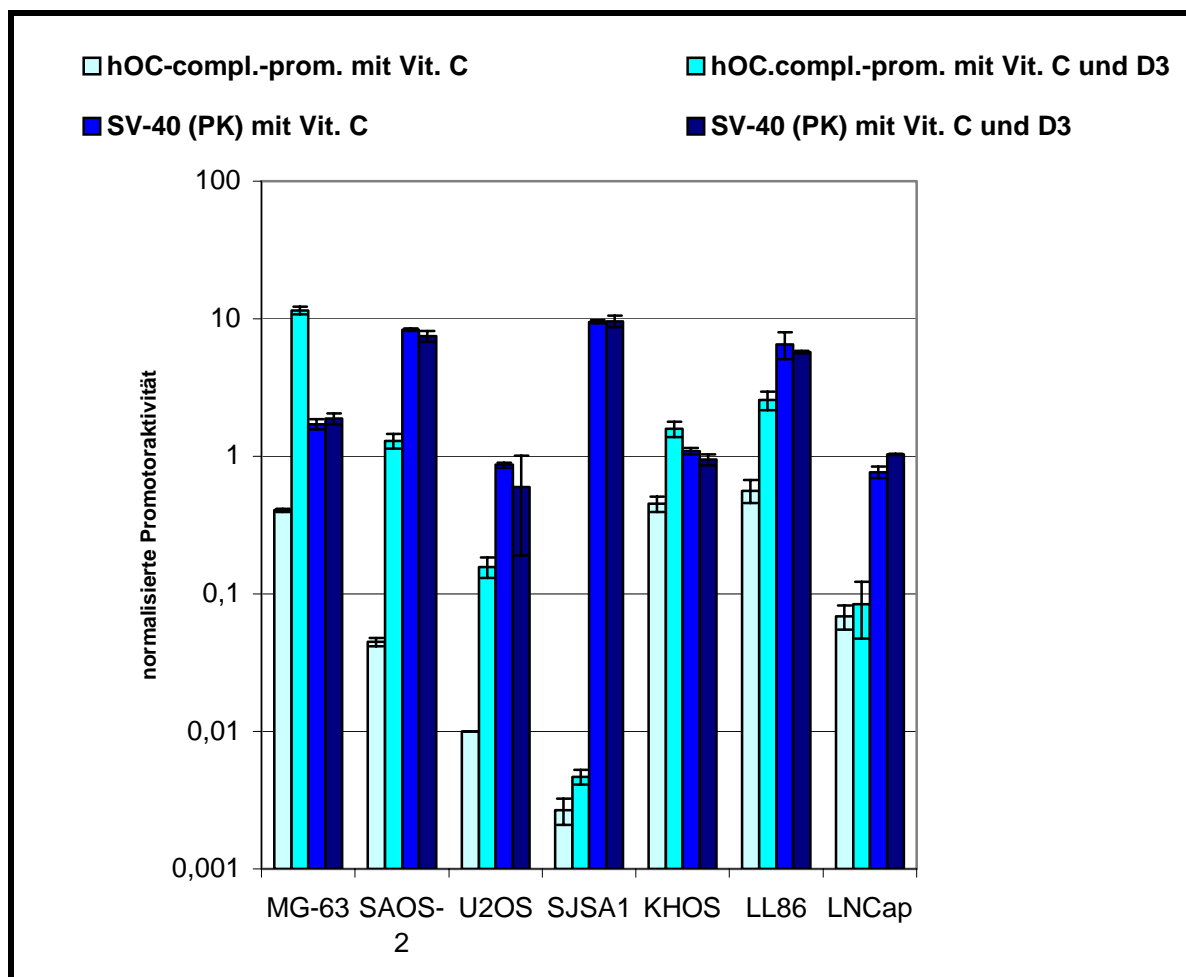


Abb. 18: Aktivität des hOC-prom.-compl. und der Positiv-Kontrolle SV-40 in 5 OS-Zelllinien und den Kontrollzelllinien LL-86 und LNCaP. Messungen an 6 individuellen Transfektionen. Die Fehlerbalken stellen die minimalen und maximalen Abweichungen der Einzelmessungen vom Mittelwert dar. Während des Versuchs wuchsen die Zellen in DCC-Medium (steroidfreiem Medium), dieses wurde 4 Stunden nach Transfektion mit Vitamin C oder Vitamin C und D₃ substituiertem frischem Medium ersetzt.

Im Vergleich mit LNCaP ist die Aktivität des hOC-prom.-compl. bei Vitamin C- und D₃-Induktion in MG-63 um ein 144,25-faches höher als bei alleiniger Gabe von Vitamin C. Sie liegt deutlich über der Aktivität von SV-40 (mit 1,88; siehe Abb. 18, Seite 61). Vitamin D₃ und C induzieren den Promotor auf eine 28,85-fach höhere Aktivität (siehe Tabelle 4).

	MG-63	SAOS-2	U2OS	SJSA-1	KHOS
x-fache Aktivität im Vergleich mit LNCaP (= 1)	144,25	16,125	1,87	0,05	19,75
x-fache Induktion durch Vit. D ₃	28,85	32,25	15,7	2	3,5

Tabelle 4: Darstellung der x-fachen Promotoraktivität des hOC-prom.-compl. bezogen auf die nicht-osteogene LNCaP-Zelllinie (oben) und Darstellung der x-fachen Induktion durch Vitamin C und D₃ im Gegensatz zur alleinigen Gabe von Vitamin C (unten).

3.4.5 Hauptversuch: Bsp 2472-prom. Aktivität in OS-Zellen und Kontrollen

Der Bsp 2472-prom. wies in allen OS-Zellen eine geringe Aktivität auf. Bei Vitamin-C-Zusatz konnte in OS-Zellen der niedrigste Wert von 0,007 für SAOS-2 und der höchste von 0,21 für KHOS gemessen werden. Die höchsten Werte zeigte diese Untersuchung für die LL-86 Zellen mit 1,18 bei Vitamin-C-Supplementierung (siehe Abb. 19). Die hier untersuchten Versuchansätze zeigten bei den meisten Zelllinien keine Zunahme an Aktivität bei Vitamin-C-Substitution. Allein SAOS-2 und SJSA-1 wiesen einen Aktivitätsanstieg um das 11,2- und 1,46-fache (siehe Tabelle 5, Seite 64) auf.

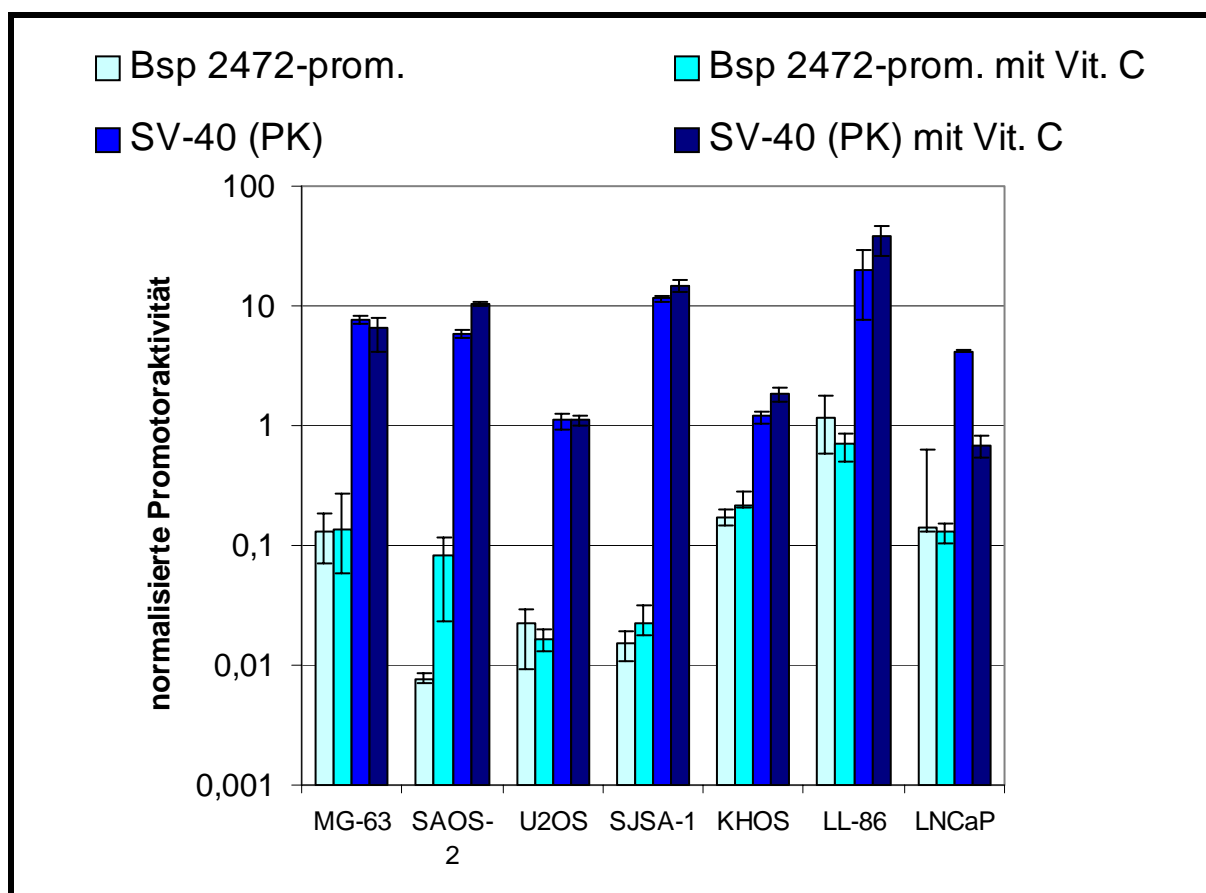


Abb. 19: Aktivität des Bsp 2472-prom. und der Positiv-Kontrolle SV-40 in 5 OS-Zelllinien und den Kontrollzelllinien LL-86 und LNCaP. Messungen an 6 individuellen Transfektionen. Die Fehlerbalken stellen die minimalen und maximalen Abweichungen der Einzelmessungen vom Mittelwert dar. 4 Stunden nach Transfektion wurde das Medium mit Vitamin C substituiertem frischem Medium ersetzt.

	MG-63	SAOS-2	U2OS	SJSA-1	KHOS	LL-86
x-fache Aktivität im Vergleich mit LNCaP (= 1)	1,007	0,62	0,12	0,15	1,64	5,26
x-fache Induktion mit Vit. C	1,04	11,42	0,8	1,46	1,26	0,59

Tabelle 5: Darstellung der x-fachen Promotoraktivität des Bsp 2472-prom. bezogen auf die nicht-osteogene LNCaP-Zelllinie (oben) und Darstellung der x-fachen Induktion durch Vitamin C (unten).

Eine 5,26-fach höhere Aktivität des Bsp 2472-prom. im Vergleich mit LNCaP wurde in den LL-86 Zellen gemessen. Während die Zelllinien U2OS, SJSA-1 und SAOS-2 einen kaum nennenswerten Unterschied der Aktivität im Vergleich zu LNCaP zeigen, war die Aktivität vom Bsp 2472-prom. in der KHOS-Zelllinie gegenüber der LNCaP Zelllinie um das 1,64-fache gesteigert.

3.4.6 Hauptversuch: β -cat.-prom. Aktivität in OS-Zellen und LL-86

Der β -cat.-prom. zeigte eine sehr geringe Aktivität in allen Zelllinien, in diesem Fall auch für LL-86 mit einem Wert von 0,009 ohne und von 0,015 mit Vitamin-C-Substitution. Ohne Vitamin-Induktion wies der Promotor in allen OS-Zelllinien außer KHOS im Vergleich zu LL-86 eine höhere Aktivität auf. Die geringste messbare Aktivität dieser Versuchsreihe zeigte sich für SAOS-2 bei 0,004 mit Vitamin-C-Substitution (siehe Abb. 20).

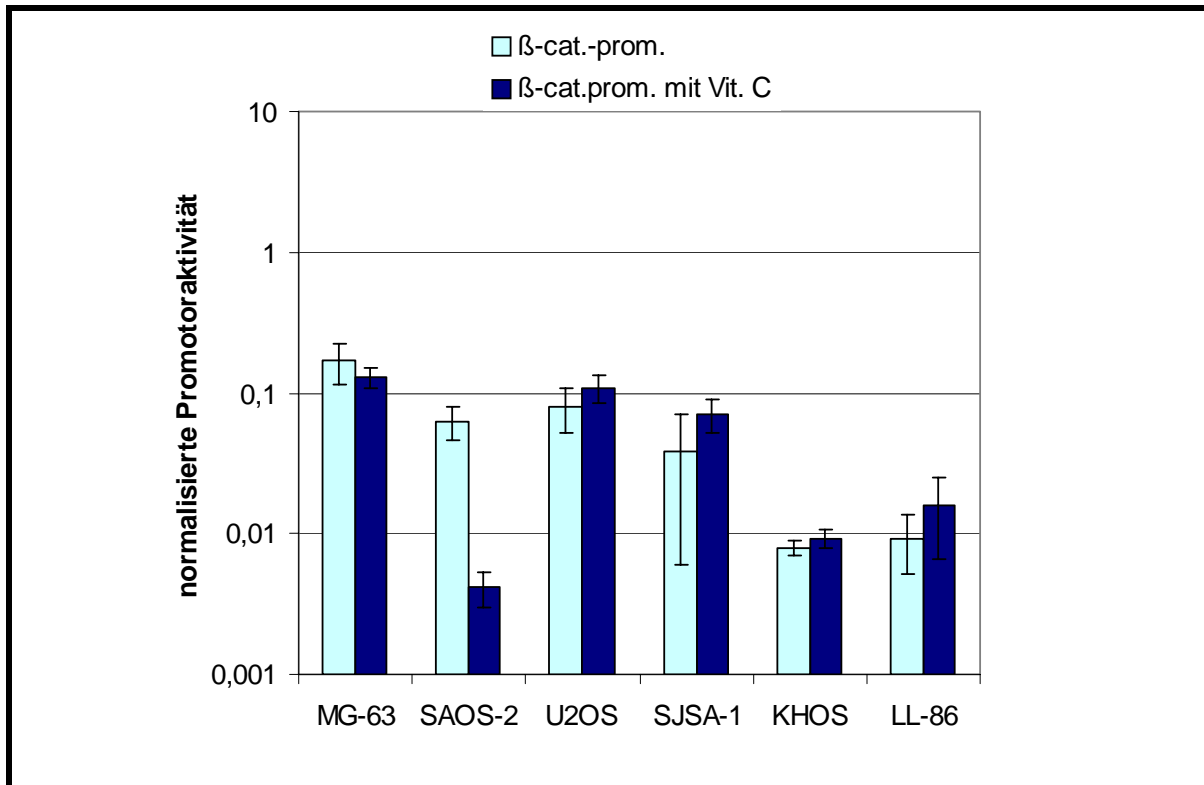


Abb. 20: Aktivität des β -cat-prom. in 5 OS-Zelllinien und der Kontrollzelllinie LL-86. Messungen an 6 individuellen Transfektionen. Die Fehlerbalken stellen die minimalen und maximalen Abweichungen der Einzelmessungen vom Mittelwert dar. 4 Stunden nach Transfektion wurde das Medium mit Vitamin C substituiertem frischem Medium ersetzt.

3.4.7 Hauptversuch: pAd.3r-luc.-Konstrukt Aktivität in OS-Zellen und LL-86

Das Promotorkonstrukt pAd.3r-luc. zeigte ohne Doxycyclinegabe im Vergleich mit den anderen untersuchten Promotoren die stärkste Aktivität in OS-Zelllinien. Diese lag zwischen den Werten 4,36 (SJSA-1) und 26,12 (MG-63). Den höchsten Wert dieser gesamten Versuchsreihe wies LL-86 mit 90,24 auf; auch die Positiv-Kontrolle (SV-40) mit einem Wert von 23,84 liegt noch deutlich unter dem von pAd.3r-luc. (für LL 86, siehe Abb. 21).

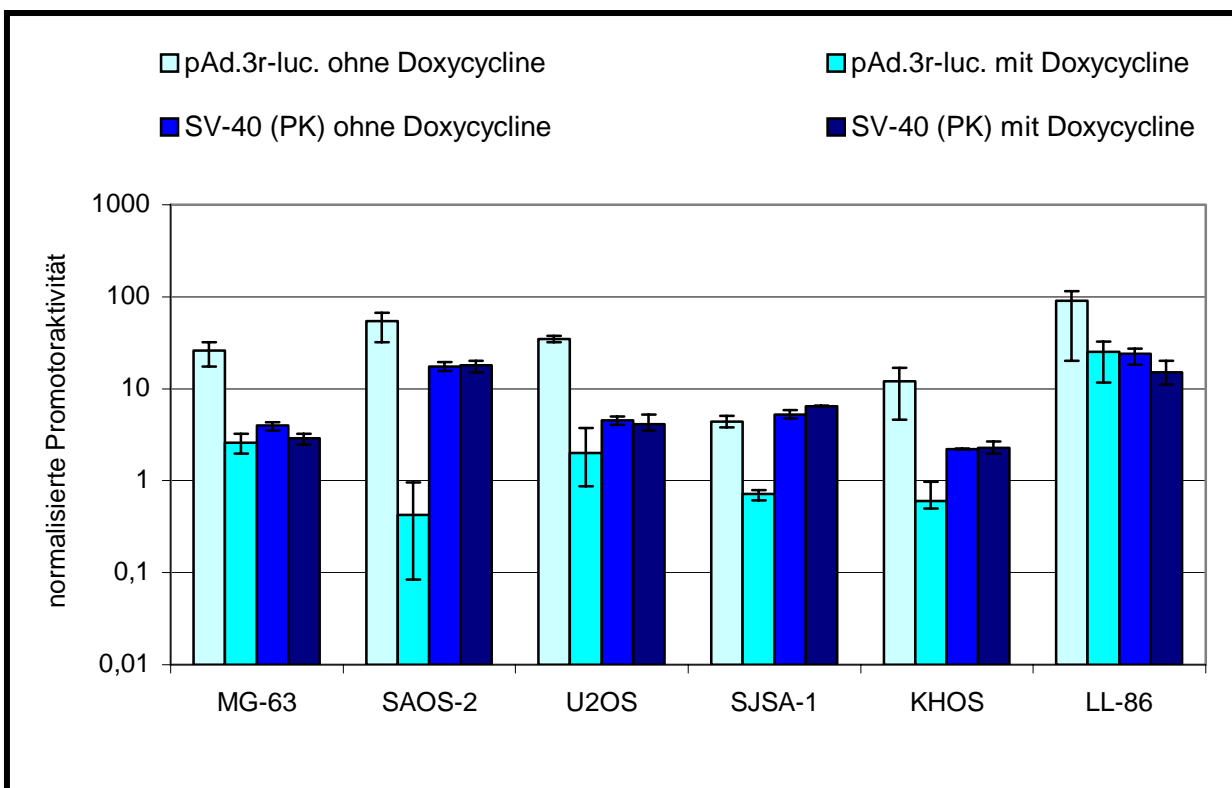


Abb. 21: Aktivität des pAd.3r-luc.-Konstruktes mit und ohne Doxycycline-Substitution. Der Mittelwert ergibt sich aus 6 individuellen Messungen. Die Zellen für diesen Versuch wuchsen in Tetracycline-freiem Medium auf. Die Fehlerbalken zeigen die minimale und maximale Abweichung vom Mittelwert.

Die Aktivitätssenkung, die über die externe Gabe von Doxycycline erfolgte, ist in der folgenden Tabelle dargestellt:

	MG-63	SAOS-2	U2OS	SJSA-1	KHOS
x-fache Aktivitätssenkung bei Doxycyclinegabe	10,48	128,57	17,42	6,02	19,9

Durch die Reduzierung der Promotoraktivität bei Gabe von Doxycycline zeigten sich Aktivitätswerte zwischen 0,42 (SAOS-2) und 2,59 (MG-63). Die LL-86-Zelllinie erreichte durch eine Aktivitätssenkung um den Faktor 3,6 einen Wert von 24,97; im Vergleich mit den Werten in OS-Zellen zeigt sich jedoch, dass die reprimierte Promotoraktivität in LL-86 vergleichbar ist mit der Promotoraktivität in der unreprimierten MG-63-Zelllinie.

In zahlreichen Studien über Promotoraktivitäten in diversen Zelltypen wurde als Positiv-Kontrolle der CMV als unspezifischer, hoch aktiver Promotor genutzt. Um die Möglichkeit eines Vergleichs mit jenen Arbeiten zu erhalten, wurden an allen OS-Zelllinien der CMV-prom. transfiziert und der Aktivität des pAd.3r-luc. gegenübergestellt (Tabelle 6). Es zeigt sich, dass der CMV-prom. eine zwischen 2,04- (SAOS-2) und 14,9- (SJSA-1) fach höhere Aktivität als der unreprimierte pAd.3r-luc. aufweist.

	Mittlere Aktivität des CMV-prom.	Mittlere Aktivität des pAd.3r-luc. unreprimiert	x-fache CMV-prom. Aktivität im Vergleich zu der Aktivität von pAd.3r-luc. (= 1)
MG-63	119,19	30,3	3,93
SAOS-2	114,43	56,075	2,04
U2OS	320,86	52,88	6,06
SJSA-1	186	12,48	14,9
KHOS	29,89	14,29	2,09
LL-86	513,4	95,15	5,39

Tabelle 6: Aktivität des CMV-Promotors, dargestellt als ein x-faches der pAd.3r-luc.-Konstrukt-Aktivität in der jeweiligen Zelllinie.

4. Diskussion

Die Gentherapie - die Transduktion therapeutischer Gene - bietet eine Möglichkeit der direkten Behandlung pathologisch veränderter, darunter auch entarteter Zellen bzw. Gewebe. Das größte Risiko, das eine Anwendung viraler Vektoren, welche potenziell toxische Transgene übertragen, birgt, ist die Fehltransduktion der Transgene in gesunde Zellen und somit deren potenzielle Schädigung bei Transgenexpression. Gelingt es, die Transkription von Transgenen zu kontrollieren, so können u.a. bei Fehltransduktion toxische Nebeneffekte in gesunden Geweben verhindert werden. Eine Möglichkeit der Kontrolle der Transkription ist die Nutzung geeigneter spezifischer Promotoren. Die Spezifität eines Promotors wird u.a. über seine Aktivität in unterschiedlichen Gewebetypen definiert. Die Aktivität kann über unterschiedliche Faktoren wie Vitamine, Hormone, gewebespezifische Transkriptionsfaktoren oder das intrazelluläre Milieu und den Status der Zelldifferenzierung beeinflusst werden.

Es gibt zahlreiche Untersuchungen, in denen tumorspezifische Promotoren beschrieben werden (Harrington, Linardakis et al. 2000). In den Untersuchungen, die dieser Arbeit zugrunde liegen, wurden Promotoren, die in früheren Veröffentlichungen als potenziell osteosarkom-, osteoblasten- und tumorspezifisch (Ducy and Karsenty 1995; Rossert, Chen et al. 1996; Ducy, Zhang et al. 1997; Benson, Bargeon et al. 2000; Lipinski, Djeha et al. 2001; Yeung, Law et al. 2002) beschrieben wurden, sowie einige Varianten dieser Promotoren auf eine mögliche Anwendung in einem gentherapeutischen Ansatz zur Therapie des Osteosarkoms hin geprüft. Gewählt wurden ein Collagen1-A-1-Promotor (Coll1-A-1.-prom.)-Konstrukt, drei Varianten des humanen Osteocalcin-Promotors (hOC-prom.), zwei Varianten des Bone-Sialoprotein-Promotors (Bsp-prom.) und ein β -catenin-Promotor (β -cat.-prom.)-Konstrukt. Zum Vergleich wurde ein unspezifisches, aber durch Doxycyclin reprimierbares duales Promotorsystem (pAd.3r-luc.-Konstrukt) untersucht (Block, Puls et al. 2003).

Mit der Wahl einer Anzahl unterschiedlicher Zelllinien wurde die Grundlage einer möglichst objektiven Evaluation der Promotor-Spezifitäten *in Vitro* geschaffen: Anhand von fünf Osteosarkomzelllinien, die Patienten unterschiedlichen Alters entstammen, wurde die interindividuelle genetische Variabilität, die für Osteosarkome beschrieben ist, repräsentiert (Al-Romaih, Bayani et al. 2003; Overholtzer, Rao et al. 2003). In den meisten Arbeiten basiert die Klassifizierung der Spezifität eines Promotors auf dem Vergleich seiner Aktivität in den Zielzellen einerseits mit seiner Aktivität in Tumorzelllinien aus anderen Gewebeentitäten andererseits (Yeung, Law et al. 2002). Mit der Wahl einer primären Zellkultur aus Lungenfibroblasten als Repräsentant des normalen Lungengewebes sollte die

klinische Anwendung eines gentherapeutischen Agens an Osteosarkom-Metastasen in der Lunge widergespiegelt werden. Um jedoch die erzielten Ergebnisse mit denen anderer Arbeiten vergleichen zu können, wurde die Prostatazelllinie (LNCaP) als zusätzliche Kontrolle genutzt. Schließlich kommt der Messung der Stärke der Aktivität der ausgewählten Promotoren im Vergleich zu viralen, hoch aktiven Promotoren besondere Bedeutung zu, um abzuschätzen, inwiefern die Promotorkonstrukte eine ausreichend hohe Aktivität für die Verwendung in gentherapeutischen Expressionseinheiten aufweisen.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Frage der Aktivität und der Fähigkeit zur spezifischen Genexpression der genannten Promotorkonstrukte in OS-Zellen und somit ihrer Eignung zur Anwendung in einem therapeutischen Ansatz nachgegangen. Um zu zeigen, dass die von den Promotoren kontrollierten zelleigenen Gene in den OS-Zelllinien transkribiert wurden, wurden RT-PCRs an hOC-, Collagen-, Bsp- und β -catenin- Transkripten durchgeführt. Wie in der Abb. 15, Seite 56 dargestellt, wurden hOC, Collagen und β -catenin in allen Zelllinien transkribiert, allein für das Bsp-Gen konnte lediglich in SAOS-2- und SJSA-1-Zellen eine Transkription nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis steht im Kontrast zu der Untersuchung von Valabrega et al., in der auch in MG-63 und U2OS-Zellen eine Expression des Bsp-Genes festgestellt wurde (Valabrega, Fagioli et al. 2003). In den Versuchangaben zu jener Studie wurde ein DNase-Verdau vor der reversen Transkription und Intron-überspannende Primerpaare jedoch nicht zufriedenstellend belegt, sodass eine mögliche Kontamination mit genomischer DNA nicht ausgeschlossen werden konnte, daher erscheinen die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung zuverlässiger.

Für den Coll1-A-1-CMV-min.-prom., in dem das von Rossert et al. als osteoblastenspezifisch beschriebene (Rossert, Chen et al. 1996) Element inkloniert und mit dem Minimal-Promotor des Cytomegalie-Virus (CMV) kombiniert (siehe Kapitel 3.1, Seite 42) wurde, konnte in der vorliegenden Arbeit eine Promotoraktivität vergleichbar zum SV-40-prom. beobachtet werden (siehe Abb. 16, Seite 57). Die höchste Aktivität wurde jedoch in den LL-86-Zellen gemessen, somit lässt das Ergebnis des Versuches bezogen auf die primären Fibroblasten LL-86 eine Beschreibung dieses Promotorkonstruktes als spezifisch nicht zu. In den Arbeiten von Rossert et al. (Rossert, Eberspaecher et al. 1995; Rossert, Chen et al. 1996) wurde die Funktion des Collagen-Promotors an embryonischen Zelllinien (bzw. die Konsequenz seiner Inaktivität in Mäuseembryos) untersucht. Im Zusammenhang mit den vorliegenden Untersuchungen lässt dies die Folgerung zu, dass der Promotor in embryonischen Zelllinien und Embryos andere intrazelluläre Abläufe kontrolliert und somit eine andere Funktion, möglicherweise durch die Präsenz anderer Regulationsfaktoren, übernimmt als in primären Zelllinien aus adulten

Individuen. Es sei hinzugefügt, dass weitere Untersuchungen des Collagen1-A-1-prom. gezeigt haben, dass das entsprechende Gen eine frühe Rolle in der Osteoblastendifferenzierung erfüllt (Rossert, Eberspaecher et al. 1995; Rossert, Chen et al. 1996). Diese Punkte führen zur Vermutung, dass die in Kultur genommenen OS-Zellen bereits so weit dedifferenziert waren, dass im Vergleich zu Lungenfibroblasten keine erhöhte Aktivität des Col1-A-1-CMV-min.-prom. mehr zu erwarten war. Würde weiter angenommen, dass das osteoblastenspezifische Element allein keine Aktivität aufweist, sondern die gemessene Aktivität ausschließlich von dem eingebauten CMV-min.-prom. induziert würde, müsste die Aktivität des vollständigen CMV-prom. vergleichbare Variationen unter den Zelllinien hervorrufen wie der Col1-A-1-CMV-min.-prom. Dieses wurde in den folgenden Experimenten nicht beobachtet, wie in der Abb. 16, Seite 57 und Tabelle 6, Seite 67 zu sehen ist. Zum experimentellen Ausschluss der These, die hohe Promotoraktivität in LL-86 käme durch die starke Aktivität des CMV-min.-prom. zustande, könnte in zukünftigen Studien untersucht werden, inwieweit das separate CMV-min.-Element in den hier untersuchten Zellen Aktivität aufweist. Ein weiteres Ergebnis des Vorversuches zeigte, dass der Col1-A-1-CMV-min.-prom. nicht durch Vitamin C oder D₃ (Abb. 11, Seite 52) induziert wurde.

Zur Verwendung bei einem gentherapeutischen Behandlungsansatz des Osteosarkoms scheint der Promotor des Osteocalcin-(OC)-Gens besonders geeignet zu sein. Es wurden bereits Versuche beschrieben, in denen ein Transgen unter der Kontrolle des OC-Promotors gesetzt und in einem adenoviralen Vektor verpackt, an OS getestet wurde (Ko, Cheon et al. 1996). Die Ergebnisse zu den Untersuchungen am hOC-prom.-compl. in dieser Arbeit führten zu drei Aussagen: Erstens ist der Promotor durch Vitamin D₃ induzierbar, zweitens weist er bezogen auf die Lungenfibroblasten keine OS-Spezifität auf und drittens ist seine Aktivität in den Zelllinien U2OS, SJSA-1 und SAOS-2 im Vergleich zu der Positiv-Kontrolle (SV-40) relativ niedrig (siehe Abb. 18, Seite 61).

Der hOC-prom.-compl. enthält ein AV-Element (Abb. 8, Seite 46), das als VDRE-Element beschrieben wurde und mit der Vitamin-D₃-Induktion assoziiert ist (Morrison, Shine et al. 1989; Goldberg, Gardiner et al. 1995; Hsieh, Yang et al. 2002). Goldberg et al. konnten zeigen, dass die Aktivitätssteigerung des Promotors als Antwort auf Vitamin-D₃-Substitution im Zusammenhang mit dem VDRE-Element zu sehen ist (Goldberg, Gardiner et al. 1995). Morrison et al. konnten beobachten, dass der Spiegel an Serum Osteocalcin durch die Gabe von Glukokortikoiden reduziert wurde (Morrison, Shine et al. 1989; Ko, Cheon et al. 1996). Um auszuschließen, dass Glukokortikoide oder internes Vitamin D₃ in unbehandelten FCS (als Supplement im Füttermedium) Einfluss auf die hOC-prom. gesteuerte Fluc-Expression

nehmen, wurde in dieser Versuchsreihe in allen Versuchen mit steroidfreiem FCS (DCC-FCS) gearbeitet. Tatsächlich wurde in der vorliegenden Arbeit eindeutig eine Aktivitätssteigerung durch Vitamin D₃ festgestellt (Abb. 18, Seite 61).

Auch die Spezifität des hOC-prom.-compl. im Bezug zur Prostatazelllinie (LNCaP), welche auch von Hsieh et al. und Yeung et al. genutzt wurde, konnte bestätigt werden. Die Aktivität des Promotors war in dieser Zelllinie am geringsten, sodass die Behauptung, der Promotor sei im Vergleich zu LNCaP-Zellen spezifisch für OS-Zellen, aufgestellt werden darf. Es ist hier jedoch anzumerken, dass bezüglich ihrer Verwendung in gentherapeutischen Agenzien gegen Tumore die Spezifität eines Promotors nicht über den Vergleich mit anderen, für die Expression des jeweiligen Gens negativen Zelllinien definiert werden sollte, sondern im Vergleich mit primären Zellen, die eine natürliche Funktion in den Zellverbänden einnehmen, in welche fernmetastasierende Anteile des Tumors üblicherweise einwandern (in dieser Arbeit die den OS-Metastasen in der Lunge benachbarten Lungenfibroblasten). Da der Promotor in der Lungenfibroblasten-Zelllinie LL-86 aktiv war (Abb.18, Seite 61), konnte hier für den hOC-prom.-compl. keine Spezifität festgestellt werden. Dieser Umstand könnte mehrere Ursachen haben. Durch Ducy et al. wurde dargestellt, dass der Transkriptionsfaktor *Osf 2*, welcher den hOC-Promotor transaktiviert, für die Regulation der Osteoblastendifferenzierung und Erhaltung der Osteoblastenfunktion von großer Bedeutung ist (Ducy, Zhang et al. 1997; Frendo, Xiao et al. 1998). Es sollte also geklärt werden, ob dieser Faktor in LL-86 Zellen vermehrt exprimiert wird. Die Beobachtung von Yeung sowie Schedlich et al. (Yeung, Law et al. 2002; Schedlich, Flanagan et al. 1994), dass der hOC-prom. einerseits in Anwesenheit von FGF (Fibroblast Growth Factor) induziert wird und dass andererseits der Transkriptionsfaktor *Runx-2* eine entscheidende Rolle in der Regulation des hOC-Promotors in PC3-Zellen einnimmt, steht im direkten Zusammenhang mit der Beobachtung von Willis et al., dass die *Runx-2*-Transkription wiederum durch FGF-Rezeptoren hochreguliert wird (Willis, Loewy et al. 2002). Die erhöhte Aktivität des hOC-prom.-compl. in Lungenfibroblasten könnte also durch FGF im FCS verursacht sein.

In jedem Falle sollte durch Kürzung des hOC-Promotors (bei Erhaltung der osteoblastenspezifischen Elemente OSE-1 und OSE-2) einerseits versucht werden, die Spezifität des Promotors durch Eliminierung möglicher unspezifischer Bereiche des Promotors zu erhöhen. Zum anderen sollte der Promotor ohne Verlust von Spezifität oder Aktivität so kurz wie möglich gestaltet werden; durch den Verbrauch geringeren Raumes in der Genkassette gentherapeutischer Vektoren durch den Promotor können somit prinzipiell auch längere oder bicistronische Transgene darin verpackt werden. Zu diesem Zweck

wurden zwei weitere hOC-Promotorkonstrukte in unserem Labor hergestellt, der hOC-(-215>+21)-prom. ohne bzw. bei Erhalt des AV-Elements (hOC-AV-prom., siehe Abb. 1, Seite 25). Die Ergebnisse des Vorversuches (Abb.15, Seite 56) zeigten, dass der hOC-(-215>+21)-prom. in U2OS-Zellen eine geringere Aktivität als der hOC-AV-prom. aufwies und sich wie erwartet nicht mit Vitamin D₃ induzieren ließ, während für den hOC-AV-prom. eine erhöhte Aktivität bei Vitamin-D₃-Substitution festgestellt wurde (Abb. 15, Seite 56). Auf Grund dieser Vorergebnisse wurde der hOC-AV-prom. in einem Hauptversuch an den verschiedenen Zelllinien und LL-86 getestet. Hier wurde jedoch keine durchgehende Induktion durch Vitamin D₃ beobachtet und im Vergleich zu hOC-prom.-compl. zudem eine verringerte Aktivität registriert (Abb. 17, Seite 59). Wie dargestellt, enthält der hOC-prom.-compl. zwei osteoblastenspezifische Elemente, OSE-1 und OSE-2. Es wird zurzeit vermutet, dass OSE-1 am Anfang der Osteoblastendifferenzierung von Bedeutung und OSE-2 für den Erhalt des Phänotyps (Ducy and Karsenty 1995; Frenzo, Xiao et al. 1998; Ducy, Zhang et al. 1997) verantwortlich ist. Dennoch ist es durch die Verkürzung auf diese wichtigen Elemente zu einem Verlust an Aktivität gekommen. Im deletierten Bereich von hOC-(-215>+21)-prom. und hOC-AV-prom. müssen sich bislang unbekannte, für die Promotorfunktion wichtige Bereiche befinden.

Eine Ursache der unterschiedlich hohen Aktivitäten von hOC-prom.-compl. in den verschiedenen OS-Zellen könnte in der Rolle des hOC-Promotor bindenden Transkriptionsfaktors Cbfa-1 (= PEPB2aA) zu suchen sein. Cbfa-1/osf-2 scheint den Weg der Differenzierung in Osteoblasten zu kontrollieren (Ducy, Zhang et al. 1997). Die Gruppe um Xiao et al. konnte mehrere Isoformen des Cbfa-1-Gens beschreiben und stellte die Hypothese auf, dass möglicherweise verschiedene Isoformen des Gens unterschiedliche Ereignisse im Verlauf der Osteoblastendifferenzierung regulieren (Xiao, Thomas et al. 1998). Dies wirft die Frage auf, in welchem individuellem Stadium der De-Differenzierung sich die einzelnen OS-Zelllinien befinden und ob dieses im Zusammenhang mit den variablen Promotoraktivitäten stehen könnte. In diesem Kontext steht auch die Beobachtung von Ogawa et al., dass das Cbfa-1-Gen in NIH 3T3, einer ras-transformierten Fibroblastenzelllinie exprimiert wurde (Ogawa, Maruyama et al. 1993). Eine Funktion der Cbfa-1-Produkte in Lungenfibroblasten erscheint somit nicht unwahrscheinlich, entsprechend könnte das Cbfa-1-Gen auch eine Rolle bei der Induktion des hOC-prom.-compl. in LL-86 spielen. Die Hypothese (Ducy and Karsenty 1995), das OSE1-Element sei für die frühe Osteoblastendifferenzierung (noch vor Mineralisierung der Matrix) zuständig, könnte auch die allgemein nicht sehr hohe

Promotoraktivität in OS-Zellen erklären, da Tumorzellen stark dedifferenziert sind und somit viele für Osteoblasten spezifische Eigenschaften nicht mehr aufweisen.

Der Bsp-prom. reguliert andere biochemische Funktionen des Knochens als der hOC-prom. und ist mit der terminalen Osteoblastendifferenzierung assoziiert (Benson, Bargeon et al. 2000). In diesem Zusammenhang konnten die osteoblastenspezifischen Elemente A, B und C beschrieben werden, die sich von denen des hOC-prom. unterscheiden. Aus diesem Grund wurde der Bsp-prom. in der vorliegenden Arbeit analysiert und auf seine Eignung für eine spezifische Gentherapie überprüft. Zusätzlich zum vollständigen Bsp 2472-prom. wurde ein auf die spezifischen Elemente verkürzter Bsp 705-prom. zur Verfügung gestellt. In der Arbeit von Franceschi et al. wurde konstatiert, dass der Bsp 2472-prom. mit Vitamin-C-Substitution nach 6 Tagen die höchste Aktivität in der präosteoblastischen Zelllinie MC3T3-E1 aufwies (Benson, Bargeon et al. 2000). Diese Beobachtung wurde durch einen Vorversuch für den Bsp 2472-prom. überprüft; in der Zelllinie U2OS konnte tatsächlich eine lang anhaltende Aktivität gemessen werden (Abb.13, Seite 54). In einem weiteren Versuchsansatz mit U2OS wurde der Bsp 705-prom. in einer Zelllinie getestet. Hier wurden sehr geringe Transfektionseffizienzen gemessen, sodass die Ergebnisse nicht ausgewertet werden konnten (nicht dargestellt). In einem folgenden Experiment wurden die Aktivitäten des Bsp 2472-prom. und des Bsp 705-prom. erneut nach je 6 Tagen gemessen, die Transfektionseffizienz für die einzelnen Zelllinien war derart gering, dass auch dieser Versuch nicht ausgewertet werden konnte. Eine mögliche Ursache der geringen Transfektionseffizienz könnte im veränderten Ablauf des Transfektionsprotokolls liegen, welches die Aussaat der Zellen in einer verringerten Dichte vorsah, um ungehindertes Wachstum über 6 Tage zu ermöglichen. Auch könnten die Zellen nach sechs Tagen die transient transfizierten Expressionsvektoren verloren bzw. mittlerweile gebildete Expressionsprodukte (wie Flu-luc oder auch R-luc) in das Medium abgegeben haben. Für den Hauptversuch wurde die Aktivität des Bsp 2472-prom. daher nach 48 Stunden (gemäß Standardprotokoll, Seite 39) in allen Zelllinien gemessen. Der Promotor zeigte in allen Zelllinien eine geringe Aktivität und eine Induktion über Vitamin C nur in zwei Fällen (SAOS-2 und SJSA-1, siehe Abb. 19, Seite 63). Dieses Ergebnis geht mit dem Ergebnis der RT-PCR (Abb. 15, Seite 56) einher, welche die Expression des Bsp-Gens nur für die Zelllinien SAOS-2 und SJSA-1 belegt. (Allerdings konnte im Vorversuch bei Vitamin-C-Induktion nach 6 Tagen auch in U2OS-Zellen eine Aktivitätssteigerung beobachtet werden; Abb.13, Seite 54). Die Aussage in der Arbeit von Valabrega et al., eine mögliche Markerfunktion des Bsp-Proteins wegen der geringen Aktivität des Promotors in OS-Zellen sei ungeeignet (Valabrega, Fagioli et al. 2003), wird

somit von den Ergebnissen des vorliegenden Versuches unterstützt. Diese Beobachtungen könnten sich daraus erklären, dass das Bsp-Protein erst in der terminalen Osteoblastendifferenzierung eine Rolle spielt und in stark dedifferenzierten OS-Zellen nicht aktiv ist.

Im Gegensatz zu den bereits beschriebenen Promotoren ist der β -cat.-prom. nicht als OS- sondern allgemein als tumorspezifisch (Polakis 2000; Lipinski, Djeha et al. 2001; Haydon, Deyrup et al. 2002) definiert. In einer Übersichtsarbeit von Paul Polakis wurde der Transkription des β -catenin-Gens eine entscheidende Rolle in der Tumorentstehung zugewiesen. Von Cowin et al. wurde ein möglicher Zusammenhang von β -catenin und den Mechanismen der Zellproliferation beschrieben (Cowin and Burke 1996). Bei der Untersuchung des β -cat.-prom. war der Vergleich mit der primären Lungenfibroblasten-Zelllinie von besonderer Bedeutung, da der Promotor nicht auf seine Gewebsspezifität bezüglich des OS, sondern generell gegenüber Tumoren geprüft wurde. Die Ergebnisse weisen auf eine geringe Aktivität in OS-Zellen hin, eine noch schwächere Aktivität wurde jedoch in LL-86 (Abb. 20, Seite 65) gemessen. Die Deregulation von β -catenin in OS wurde von Haydon et al. als ein häufig auftretendes Ereignis beschrieben, dennoch wurde von der Nutzung des β -catenin-Proteins als prognostischer Marker Abstand genommen. Es wurde angenommen, dass eine Beteiligung des β -catenin-Signalwegs zur Entstehung von Osteosarkomen zu einem frühen Zeitpunkt der Kanzerogenese beitrage. Diese Beobachtung könnte ein Grund für die geringe Aktivität des Promotors in bereits dedifferenzierten OS-Zelllinien darstellen. Da der β -cat.-prom. ein patentgeschütztes Konstrukt darstellt, dessen Sequenz nicht freigegeben ist, können die Aktivität des Promotors betreffend keine näheren Diskussionen angestellt werden.

Zusammenfassend konnte -bezogen auf die Lungenfibroblasten- weder der hOC-, noch der Bsp- oder der Col1-A-1-CMV-min.-prom. (siehe Abb. 17-19, Seite 59-63) als OS-spezifisch charakterisiert werden, da in den jeweiligen Versuchsansätzen überraschenderweise eine hohe Aktivität in den LL-86-Zellen gemessen wurde; ganz im Gegensatz zur Prostatazelllinie (LNCaP), in der niedrige Aktivitäten der Promotorkonstrukte beobachtet wurden. Der β -cat.-prom. zeigte als einziger der potenziell spezifischen Promotoren eine im Vergleich geringere Aktivität in LL-86-Zellen, wobei jedoch auch in den OS-Zelllinien eine sehr niedrige Aktivität gemessen wurde (siehe Abb. 19, Seite 63).

Im Gegensatz zu den bereits erwähnten Promotoren ist das Konstrukt pAd.3r-luc. nicht OS- oder tumorspezifisch. In den Versuchen der vorliegenden Arbeit wurde dessen Aktivität in den OS-Zellen und die Regulierbarkeit über die Gabe von Doxycycline evaluiert. Das

Konstrukt zeigte eine hohe Aktivität in OS-Zellen, welche diejenige des SV-40-prom. übertraf, jedoch niedriger als die des CMV-prom. war (Abb. 21, Seite 66 und Tabelle 6, Seite 67). Das Konstrukt konnte mit Hilfe von Doxycycline bis um den Faktor 128 (SAOS-2) seiner Aktivität reduziert werden; nach Reprimierung durch Doxycycline wurde die höchste Aktivität jedoch in den LL-86 Zellen gemessen; die Aktivität des Konstruktes wurde in LL-86-Zellen nur um einen Faktor von 3,6 reduziert. Angesichts der Tatsache, dass die Aktivität des Promotors in den gesunden Zellen der Lunge auf ein Minimum reduziert werden sollte, um möglichen Schaden bei Fehltransduktion eines Gentherapeutikums abzuwenden, sollte das Konstrukt für eine Anwendung in der Osteosarkomtherapie weiter optimiert werden. pAd.3r-luc. zeigte in der vorliegenden Arbeit eine wünschenswert hohe Aktivität. In früheren Studien wurden an HT-29-Zellen sogar die CMV-prom. Aktivitäten durch pAd.3r-luc. übertroffen (Block, Puls et al. 2003). Somit erreicht das pAd.3r-luc.-Konstrukt eine Aktivität, die in ihrer durchgehenden Stärke mit der viraler Promotoren, die üblicherweise in gentherapeutischen Studien verwendet werden, vergleichbar ist.

Wenn die Spezifität eines Promotors auf Grund des Vergleiches seiner Aktivität in einem Gewebe gegenüber seiner Nicht-Aktivität in einem anderen Gewebe festgelegt wird, kann zusammenfassend die Hypothese aufgestellt werden, er sei für das eine der beiden Gewebe spezifisch. Wurde also von Yeung et al. die Beobachtung aufgestellt, der hOC-prom. sei OS-spezifisch, so ist das im Vergleich mit der LNCaP-Linie, die in dieser Studie als Kontrolle gewählt wurde, richtig. Wurden im Collagen1-A-1- und Bsp-prom. jeweils Elemente entdeckt, deren Entfernung zu einem Verlust von Aktivität in Osteoblasten führten, so kann man sie als osteoblastenspezifische Elemente beschreiben. Wurde eine Akkumulation des β -catenins in Tumorzellen und seine Rolle bei der Tumorentstehung aufgezeigt, so liegt es nahe, dieses Protein als tumorspezifisch darzustellen.

Das der vorliegenden Arbeit zugrunde liegende gentherapeutische Modell sieht vor, Osteosarkometastasen in der Lunge zu behandeln. Deswegen war es von großer Bedeutung, die potenziell spezifischen Promotoren nicht nur an verschiedenen OS-Zellen, sondern auch an Zellen (primäre Lungenfibroblasten) zu testen, die normales Lungengewebe in Vitro repräsentieren und die Beschreibung der Spezifität der Promotoren somit nicht über den Vergleich mit LNCaP-Zellen definieren.

Die in Bezug auf die Eignung der vorgestellten Promotoren für Anwendungen in der Gentherapie skeptischen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass Promotoren nicht erst in viralen Vektoren untersucht werden sollten, deren Konstruktion zeit-, arbeits- und

kostenintensiv ist, sondern einen Schritt eher, also auf Ebene transienter Transfektionen mit Plasmiden.

Auf eine mögliche Lösung der hier diskutierten Probleme weisen die Ergebnisse der beiden zuletzt untersuchten Promotorkonstrukte hin: eine Kombination des β -cat.-prom. mit dem pAd.3r-luc, bei der ein durch den schwächeren, aber gewebespezifischen Promotor (β -cat.-prom.) kontrolliertes Transgen-Produkt einen zweiten, hoch reaktiven Promotor (pAd.3r-luc), der das eigentliche therapeutische Transgen kontrolliert, zu einer hohen Expressionsrate anregt (siehe Abb. 22). Durch die Konstruktion eines solchen Expressionssystems, das seine Aktivität durch positive Rückkopplung steigert, könnte so ein relativ spezifischer und hoch aktiver Promotor resultieren, der durch Doxycycline regulierbar ist und im Falle unerwartet hoher Nebenwirkungen herunterreguliert werden könnte. Das bidirektionale Konstrukt ermöglicht es, Promotoren mit niedriger, aber zumindest in Bezug auf Lungenfibroblasten spezifischer Aktivität für eine OS-Gentherapie nutzbar zu machen. Denn durch die positive Rückkopplung würde das erwünschte Ergebnis, eine hohe Expressionsrate in OS-Zellen und eine geringere in Lungenfibroblasten, erreicht.

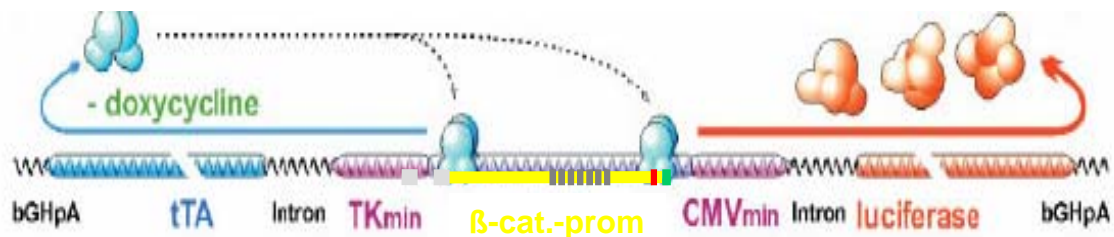


Abb. 22 Schematische Darstellung aus der Kombination des bidirektionalen Konstrukt mit einem schwachem, aber gewebsspezifischen Promotor, wie des β -cat.-prom., verändert nach Block et al., The Journal of Gene Medicine, 2003, 5

Abgesehen von dem eigentlichen wissenschaftlich/medizinischen Erkenntnisgewinn zeigt der o.g. Ausblick, dass auch und gerade die kritische Beurteilung bisheriger Ansätze zu der Entwicklung neuer Ideen führen kann, welche die Medizin auf dem Weg zu neuen, innovativen und erfolgversprechenden Behandlungsformen schwerer Erkrankungen weiter voranbringen können.

5. Zusammenfassung

In den letzten 25 Jahren hat sich die Prognose der Osteosarkompatienten mit Lungenmetastasen trotz neuer Therapieverfahren nicht entschieden verbessert. Ein neuer Ansatz könnte weniger durch die Modifizierung der Therapeutika, als durch den gezielten Angriff auf die Metastasen selbst durch Gentherapie geschaffen werden. Der Einsatz hyperaktiver Tumorsuppressorgene, die durch Viren in das Metastasengebiet eingebracht werden, birgt die Möglichkeit der lokalen Therapie; also die Expression therapeutischer Gene in Metastasen. Eine Fehlübertragung therapeutischer Gene in normale Gewebe könnte jedoch zu schweren lokalen und systemischen Nebenwirkungen führen. Daher sollte ein in viralen Vektoren eingebauter Promotor zwei Eigenschaften erfüllen: Zum einen Spezifität gegenüber Osteosarkomzellen, also Transkription des Transgens in den Metastasen und nicht im normalem Lungengewebe; und zum anderen Aktivität in OS-Zellen, also eine hohe Expressionsrate des Transgens. In der vorliegenden Arbeit wurden Promotoren, die in der Literatur als OS-, Tumor- oder Osteoblastenspezifisch beschrieben wurden und ein unspezifisches durch Doxycycline reprimierbares Konstrukt (pAd.3r-luc.) auf ihre Eignung zur Anwendung in einem gentherapeutischen Ansatz bei der Behandlung des Osteosarkoms untersucht. Ihre Aktivität wurde in 5 OS-Zelllinien, einer Prostatakarzinomzelllinie und einer Lungenfibroblastenzelllinie mittels Dual-Luciferase-Reporter-assays gemessen. In allen Zelllinien konnte eine Aktivität der Promotorkonstrukte von unterschiedlicher Stärke gemessen werden. Der komplette OC-Promotor und der Bsp-Promotor konnten in OS-Zellen teilweise durch Vitamin D₃ oder C induziert werden. Die Aktivität des hOC-Promotors war in der Prostatakarzinomzelllinie relativ gering und konnte nicht durch Vitamin D₃ induziert werden. Das pAd.3r-luc.-Konstrukt konnte durch Doxycycline effektiv herunterreguliert werden. Mit Ausnahme des β -cat.-Promotors waren jedoch alle Promotoren in der Lungenfibroblastenzelllinie hochaktiv. Die in Bezug auf die Eignung der vorgestellten Promotorkonstrukte skeptischen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass Promotoren nicht erst in viralen Vektoren untersucht werden sollten, deren Konstruktion zeit-, arbeits- und kostenintensiv ist, sondern einen Schritt eher, also auf Ebene transienter Transfektionen mit Plasmiden. Wichtiges Ergebnis dieser Arbeit ist die Erkenntnis der möglichen Kombination zweier Promotorkonstrukte, bei denen ein durch den schwächeren, aber gewebespezifischen Promotor kontrolliertes Transgen-Produkt einen zweiten, hoch reaktiven Promotor, der das eigentliche therapeutische Transgen kontrolliert, zu einer hohen Expressionsrate anregt. Dies wäre durch die Kombination des pAd.3r-luc.-Konstruktes mit dem β -cat.-prom., der zwar schwach, aber nicht in Lungefibroblasten aktiv ist, denkbar.

6. Literatur

Al-Romaih, K., J. Bayani, et al. (2003). "Chromosomal instability in osteosarcoma and its association with centrosome abnormalities." Cancer Genet Cytogenet **144**(2): 91-9.

Benson, M. D., J. L. Bargeon, et al. (2000). "Identification of a homeodomain binding element in the bone sialoprotein gene promoter that is required for its osteoblast-selective expression." J Biol Chem **275**(18): 13907-17.

Bielack, S., S. Flege, et al. (2000). Behandlungskonzept des Osteosarkoms.

Bielack, S., B. Kempf-Bielack, et al. (1999). "[Neoadjuvant therapy for localized osteosarcoma of extremities. Results from the Cooperative osteosarcoma study group COSS of 925 patients]." Klin Padiatr **211**(4): 260-70.

Block, A., F. Puls, et al. (2003). "Highly suppressible expression of single-chain interleukin-12 by doxycycline adenoviral infection with a single-vector Tet-regulatory system." J Gene Med **5**: 190-200.

Chang, B. D., Y. Xuan, et al. (1999). "Role of p53 and p21waf1/cip1 in senescence-like terminal proliferation arrest induced in human tumor cells by chemotherapeutic drugs." Oncogene **18**(34): 4808-18.

Cotten, M. and E. Wagner (1993). "Non-viral approaches to gene therapy." Curr Opin Biotechnol **4**(6): 705-710.

Cowin, P. and B. Burke (1996). "Cytoskeleton-membrane interactions." Curr Opin Cell Biol **8**(1): 56-65.

Ducy, P. and G. Karsenty (1995). "Two distinct osteoblast-specific cis-acting elements control expression of a mouse osteocalcin gene." Mol Cell Biol **15**(4): 1858-1869.

Ducy, P., R. Zhang, et al. (1997). "Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation." Cell **89**(5): 747-54.

Frendo, J. L., G. Xiao, et al. (1998). "Functional hierarchy between two OSE2 elements in the control of osteocalcin gene expression in vivo." J Biol Chem **273**(46): 30509-16.

Gibbs, C. P., Jr., K. Weber, et al. (2002). "Malignant bone tumors." Instr Course Lect **51**: 413-28.

Goldberg, D., E. Gardiner, et al. (1995). "The osteocalcin and collagen type I (alpha 1) promoters share common basal regulatory units." DNA Cell Biol **14**(6): 519-28.

Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." Cell **100**: 57-70.

Harrington, K. J., E. Linardakis, et al. (2000). "Transcriptional control: an essential component of cancer gene therapy strategies?" Adv Drug Deliv Rev **44**(2-3): 167-184.

Haydon, R. C., A. Deyrup, et al. (2002). "Cytoplasmic and/or nuclear accumulation of the beta-catenin protein is a frequent event in human osteosarcoma." Int J Cancer **102**(4): 338-42.

Hoffmann, H. M., K. M. Catron, et al. (1994). "Transcriptional control of the tissue-specific, developmentally regulated osteocalcin gene requires a binding motif for the Msx family of homeodomain proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(26): 12887-91.

Hsieh, C. L., L. Yang, et al. (2002). "A novel targeting modality to enhance adenoviral replication by vitamin D(3) in androgen-independent human prostate cancer cells and tumors." Cancer Res **62**(11): 3084-92.

Ko, S. C., J. Cheon, et al. (1996). "Osteocalcin promoter-based toxic gene therapy for the treatment of osteosarcoma in experimental models." Cancer Research **56**: 4614-4619.

Lipinski, K. S., A. H. Djeha, et al. (2001). "High-level, beta-catenin/TCF-dependent transgene expression in secondary colorectal cancer tissue." Mol Ther **4**(4): 365-71.

Morrison, N. A., J. Shine, et al. (1989). "1,25-dihydroxyvitamin D-responsive element and glucocorticoid repression in the osteocalcin gene." Science **246**(4934): 1158-61.

Ogawa, E., M. Maruyama, et al. (1993). "PEBP2/PEA2 represents a family of transcription factors homologous to the products of the *Drosophila* runt gene and the human AML1 gene." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(14): 6859-63.

Overholtzer, M., P. H. Rao, et al. (2003). "The presence of p53 mutations in human osteosarcomas correlates with high levels of genomic instability." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(20): 11547-52.

Polakis, P. (2000). "Wnt signaling and cancer." Genes Dev **14**(15): 1837-51.

Ram, Z., K. W. Culver, et al. (1997). "Therapy of malignant brain tumors by intratumoral implantation of retroviral vector-producing cells." Nat Medicine **3**(12): 1354-1361.

Rosen, G., A. Nirenberg, et al. (1981). "Osteogenic sarcoma: eight-percent, three-year, disease-free survival with combination chemotherapy (T-7)." Natl Cancer Inst Monogr(56): 213-20.

Rossert, J., H. Eberspaecher, et al. (1995). "Separate cis-acting DNA elements of the mouse pro-alpha 1(I) collagen promoter direct expression of reporter genes to different type I collagen-producing cells in transgenic mice." J Cell Biol **129**(5): 1421-32.

Rossert, J. A., S. S. Chen, et al. (1996). "Identification of a minimal sequence of the mouse pro-alpha 1(I) collagen promoter that confers high-level osteoblast expression in transgenic mice and that binds a protein selectively present in osteoblasts." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(3): 1027-31.

Schedlich, L. J., J. L. Flanagan, et al. (1994). "Transcriptional activation of the human osteocalcin gene by basic fibroblast growth factor." J Bone Miner Res **9**(2): 143-52.

Scholz, R. B., H. Kabisch, et al. (1990). "Homozygous deletion within the retinoblastoma gene in a native osteosarcoma specimen of a patient cured of a retinoblastoma of both eyes." Pediatr Hematol Oncol **7**(3): 265-73.

Scholz, R. B., H. Kabisch, et al. (1992). "Studies of the RB1 gene and the p53 gene in human osteosarcomas." Pediatr Hematol Oncol **9**(2): 125-37.

Valabrega, G., F. Fagioli, et al. (2003). "ErbB2 and bone sialoprotein as markers for metastatic osteosarcoma cells." Br J Cancer **88**(3): 396-400.

Willis, A. C. and X. Chen (2002). "The promise and obstacle of p53 as a cancer therapeutic agent." Curr Mol Med **2**(4): 329-45.

Willis, D. M., A. P. Loewy, et al. (2002). "Regulation of osteocalcin gene expression by a novel Ku antigen transcription factor complex." J Biol Chem **277**(40): 37280-91.

Wilson, D. R. (2002). "Viral-mediated gene transfer for cancer treatment." Curr Pharm Biotechnol **3**(2): 151-64.

Wilson, G. D., P. I. Richman, et al. (1995). "p53 status of head and neck cancer: relation to biological characteristics and outcome of radiotherapy." Br J Cancer **71**(6): 1248-52.

Worth, L. L., S. F. Jia, et al. (2000). "Intranasal therapy with an adenoviral vector containing the murine interleukin-12 gene eradicates osteosarcoma lung metastases." Clin Cancer Res **6**(9): 3713-8.

Xiao, Z. S., R. Thomas, et al. (1998). "Genomic structure and isoform expression of the mouse, rat and human Cbfa1/Osf2 transcription factor." Gene **214**(1-2): 187-97.

Xu, G. W., Z. T. Sun, et al. (1996). "Tissue-specific growth suppression and chemosensitivity promotion in human hepatocellular carcinoma cells by retroviral-mediated transfer of the wild-type p53 gene." Hepatology **24**(5): 1264-8.

Yeung, F., W. K. Law, et al. (2002). "Regulation of human osteocalcin promoter in hormone independent human prostate cancer cells." J Biol Chem **277**(4): 2468-2476.

Zhang, G. J., I. Kimijima, et al. (1999). "Tamoxifen-induced apoptosis in breast cancer cells relates to down-regulation of bcl-2, but not bax and bcl-X(L), without alteration of p53 protein levels." Clin Cancer Res **5**(10): 2971-7.

7. Danksagung

Ich danke der Hamburger Krebsgesellschaft e.V. und der Fördergemeinschaft Kinder-Krebs-Zentrum Hamburg e.V., die es mir durch ihre finanzielle Hilfe ermöglichte, mich ausschließlich dieser Arbeit zu widmen. Ich danke Herrn Prof. Franceschi, Herrn Dr. Kai Lipinski und Herrn Dr. Block, dass sie mir ihre Promotorkonstrukte zur Verfügung gestellt haben.

Ich danke dem Forschungslabor der Hämatologie und Onkologie für die Unterstützung bei dieser Doktorarbeit, insbesondere Tobias Obser und Guido Looft für die Gabe von OS-Zellen. Mein besonderer Dank gilt den Arbeitsgruppen um Herrn Professor Kabisch, vor allem der OS-Gruppe: Susanne Heinsohn für ihren Beistand auf „griechischem Boden“, Roswitha Scholz für ihre konstruktiven Vorschläge für meinen Vortrag, Jürgen Müller für seine stete Hilfe bei der Verbesserung aller Arbeitstechniken, Prof. Kabisch für seine Unterstützung für diesen und meine weiteren Wege, es ehrt mich sehr.

Diese Arbeit ist meinem Betreuer Olaf Hellwinkel gewidmet, der meinen Enthusiasmus und Idealismus erhalten hat und der mir seine Unterstützung und seinen Rat nie schuldig geblieben ist.

Man kann als Medizinstudent seine Doktorarbeit sehr unterschiedlich gestalten und zum Abschluss bringen. Es ist dieser Gruppe Menschen und besonders Olaf Hellwinkel, Jürgen Müller und Herrn Kabisch zu verdanken, dass ich sie mit so viel Freude durchgeführt habe.

8. Lebenslauf

- Oktober 4, 1977** Geburt in Münster, Deutschland, als drittes Kind von Karl Pollmann und Elsbeth Schult-Pollmann
- August 1994**
bis Februar 1995 Aufenthalt in Nampa, USA, Besuch der Vallievue Highschool
- Juni 1997** Abitur am Pascal-Gymnasium in Münster
- April 1998** Beginn des Medizinstudiums an der Wilhelm Universität in Münster
- August 2000** Physikum
- September 2000** Umzug nach Hamburg, Weiterführung des Studiums an der Universität in Hamburg
- August 2001**
bis Februar 2002 Studium an der Universität in Lund, Schweden
- März 2002** Staatsexamen I
- September 2002**
bis September 2003 Durchführung der experimentelle Doktorarbeit:
Analyse und Bewertung potentiell spezifischer Promotoren auf ihre Eignung zur Anwendung in einem gentherapeutischen Ansatz bei der Behandlung des Osteosarkoms
- Juni 2003** Vortrag der Ergebnisse beim XVI. Treffen der Kind-Phillipp-Stiftung für Leukämieforschung in Wilsede, Deutschland
- November 2003** Posterpräsentation beim *Annual meeting of the International Society of Gene Therapy* in Edinburgh, Schottland
- April 2004** Einreichung des Manuskriptes: "*Limited specificity of promoter constructs for gene therapy in Osteosarcoma*" zur Publikation im *International Journal of Molecular Medicine*

-
- Juni 2004** Annahme zur Publikation im *International Journal of Molecular Medicine*
- August 2004** Staatsexamen II
- April bis Juni 2005** Durchführung eines acht wöchigen chirurgischen Teils des PJs an der St. George Universität in London, England
- August 2005** Eheschließung mit Martin Bronsema
- August bis Oktober 2005** Durchführung eines acht wöchigen Pädiatrischen Teils des PJs an dem Great Ormond Street Hospital for Children in London, England
- 30. November 2005** Staatsexamen III
- Dezember 20, 2005** Geburt des ersten Sohnes Ruben Karl Bronsema

9. Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die 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.

Unterschrift:

10. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AV-Element	Vitamin D ₃ -responsives Av-Element
Bsp-prom.	Bone Sialoprotein-Promotor
β-cat.prom.	β-catenin-Promotor
Bp	Basenpaare
CbfA1	Transkriptionsfaktor
CMV	Cytomegalie-Virus
Col1-A-1-prom.	Collagen 1-A-1-Promotor
dNTP	desoxy-Nukleotid-Tri-Phosphat
FCS	fetales Kälberserum
FGF	Fibroblast Growth Factor
Flu-luc	Firefly-Luciferase
hOC-AV-prom.	humaner Osteocalcinpromotor mit Vit. D responsivem Element
hOC (-215>+21)-prom.	humaner Osteocalcinpromotor (-215>+21)
hOC-prom.-compl.	humaner Osteocalcinpromotor (-829>+21)
KHOS	Osteosarkom-Zelllinie
LAR II	Luciferase assay Reagent II
LL-86	Lungenfibroblasten (Zelllinie)
LNCaP	Prostatacarzinom-Zelllinie
MG-63	Osteosarkom-Zelllinie
OC	Osteocalcin
OS	Osteosarkom
OSE 1+2	Osteoblasten spezifisches Element
Osf 2	Transfektionsfaktor
PCR	Poly-chain-reaction
PGL3	Luciferase Vektor
pRL	Renilla-Luciferase Vektor
Rb	Retinoblastom
R-luc	Renilla-Luciferase
Runx-2	Transfektionsfaktor
SAOS-2	Osteosarkom-Zelllinie
SJSA-1	Osteosarkom-Zelllinie

TATA	Transkriptionsstart
tTA	Tetracycline supprimierbarer Transaktivator
U2OS	Osteosarkom-Zelllinie