Aus der Abteilung Gastroenterologie und Endokrinologie
(Komm. Leiter: Prof. Dr. med. T. Sauerbruch)
im Zentrum Innere Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Der Einfluss des Transkriptionsfaktors Runx2 auf osteogene und adipogene Differenzierungsmarker, insbesondere auf PPARγ

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät

der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Jana Daniela Deuschl, geb. Ebert

aus

Ludwigsburg

Göttingen 2013

Dekan:	Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer
1. Berichterstatterin:	Prof. Dr. med. H. Siggelkow
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. N. Miosge

Tag der mündlichen Prüfung: 11.12.2013

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1. Einleitung ... 1

1.1 Osteoporose ... 1

1.2 Bau und Funktion des Knochens ... 2

1.2.1 ‚Remodeling' ... 2

1.2.2 Knochenzellen ... 3

1.2.2.1 Osteoblasten ... 4

1.2.2.1.1 ‚Wnt-Signaling' in Osteoblasten ... 5

1.2.2.2 Osteozyten ... 5

1.2.2.3 Osteoklasten ... 6

1.2.2.3.1 Die Bedeutung des RANKL/OPG-Quotienten in der Osteoklastogenese ... 6

1.2.2.4 ‚Bone-Lining'-Zellen ... 7

1.3 Knochenassoziierte Proteine und Transkriptionsfaktoren ... 7

1.3.1 ‚Runt-related transcription factor 2' (Runx2) ... 8

1.3.2 ‚Peroxisome proliferator-activated receptor gamma' (PPARγ) ... 10

1.3.2.1 Interaktionen zwischen PPARγ und Runx2 ... 12

1.3.3 Osterix (OSX) ... 13

1.3.4 Osteokalzin (OC) ... 13

1.3.5 Knochenspezifische Alkalische Phosphatase (BAP) ... 14

1.3.6 Adipozytäres Protein 2 (aP2) ... 15

1.3.7 Lipoproteinlipase (LPL) ... 15

1.3.8 Osteoblastäres Differenzierungsmodell ... 16

1.4 Zielsetzung ... 17

2. Material und Methoden ... 18

2.1 Material ... 18

2.1.1 Zellkultur ... 18

2.1.1.1 Primäre humane Osteoblasten (pHOB) ... 18

2.1.1.2 ‚Single-cell-derived human mesenchymal stem cell line' (SCP1) ... 18

2.1.2 Stimulationsverfahren ... 20

2.1.2.1 Osteogene Stimulation ... 20

2.1.2.2 Adipogene Stimulation ... 21

2.1.3 Arbeiten mit Bakterien ... 21

2.1.4 Arbeiten mit Nukleinsäuren ... 22

2.1.4.1 Arbeiten mit RNA ... 22

2.1.4.1.1 Verwendete siRNAs ... 22

2.1.4.2 Arbeiten mit Desoxyribonukleinsäure (DNA) ... 22

2.1.4.2.1 Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) ... 22

2.1.4.2.2 ‚Real-Time'-PCR ... 22

2.1.4.2.3 Plasmidpräparation ... 23
2.1.4.2.4 Verwendete Plasmide bzw. Vektoren ... 23
2.1.4.2.4.1 PPARγ-Promotorgen ... 23
2.1.4.2.4.2 PPRE-Gen (PPRE-Luc) ... 24
2.1.4.2.4.3 Runx2-Plasmid ... 24
2.1.4.2.5 Restriktionsverdau ... 25
2.1.4.2.6 Agarosegelelektrophorese ... 25
2.1.4.2.7 Transfektion mit Lipofektamin ... 25
2.1.4.2.8 Luziferase-Reportergenassay ... 26
2.1.5 Arbeiten mit Proteinen ... 27
2.1.5.1 Proteinvorbereitung für den ‚Westernblot' ... 27
2.1.5.2 ‚Westernblot' ... 28
2.1.5.3 Image-J-Densitometrie ... 29
2.2 Methoden ... 29
2.2.1 Zellkultur ... 29
2.2.1.1 Primäre humane Osteoblasten (pHOB) ... 29
2.2.1.2 ‚Single-cell-derived human mesenchymal stem cell line' (SCP1) ... 29
2.2.1.3 Kultivierung der Zellen ... 29
2.2.1.4 Ablösung der Zellen durch Trypsin ... 30
2.2.1.5 Lebendzellzahlbestimmung ... 30
2.2.1.6 Einfrieren von Zellen ... 30
2.2.1.7 Auftauen von Zellen ... 30
2.2.2 Stimulationsverfahren ... 30
2.2.2.1 Osteogene Stimulation ... 30
2.2.2.2 Adipogene Stimulation ... 31
2.2.3 Arbeiten mit Bakterien ... 31
2.2.3.1 Transformation chemisch kompetenter DH5 α-E.-coli-Bakterien ... 31
2.2.4 Arbeiten mit Nukleinsäuren ... 32
2.2.4.1 Arbeiten mit RNA ... 32
2.2.4.1.1 RNA-/Protein-Isolierung anhand des AllPrep-RNA/Protein-Kits ... 32
2.2.4.1.2 RNA-Isolierung anhand des RNeasy-Micro-Kits ... 32
2.2.4.1.3 Photometrische mRNA-Konzentrationsmessung ... 32
2.2.4.2 Arbeiten mit DNA ... 33
2.2.4.2.1 Reverse-Transkriptase-PCR ... 33
2.2.4.2.2 ‚Real-Time'-PCR ... 33
2.2.4.2.3 Auswertung der ‚Real-Time'-PCR ... 34
2.2.4.2.4 Statistik ... 34
2.2.4.2.5 Präparation von Plasmid-DNA ... 35
2.2.4.2.6 Restriktionsverdau ... 35
2.2.4.2.7 Agarosegelelektrophorese ... 36
2.2.4.2.8 Lipofektamintransfektion ... 36
2.2.4.2.9 Luziferase-Reportergenassay ... 37
2.2.4.2.10 Quantitativer Nachweis der GFP-Reportergen-Aktivität ... 37
2.2.5 Arbeiten mit Proteinen ... 38

2.2.5.1 Protein-Isolierung adhärenter Zellen ... 38
2.2.5.2 Proteinmessung anhand der Bicinchoninsäure (BCA)- Reaktion ... 38
2.2.5.3 Probenvorbereitung ... 38
2.2.5.4 Invitrogen-Gelelektrophorese ... 39
2.2.5.5 Invitrogen-‚Westernblot' ... 39
2.2.5.6 Bio-Rad-‚Westernblot' ... 39
2.2.5.7 Immunreaktion durch ‚enhanced chemiluminescence' (ECL) ... 40
2.2.5.8 Detektion ... 40
2.2.5.9 Wiederverwendung der Nitrozellulosemembran ... 40
2.2.5.10 Image-J-Densitometrie ... 40

3. Ergebnisse ... 42

3.1 Runx2-‚Knockdown' ... 42
3.1.1 7-Tage-Runx2-‚Knockdown' ... 42
3.1.2 29-Tage-Runx2-‚Knockdown' ... 44
3.1.2.1 Einfluss der siRNA-Runx2 auf die Runx2-Expression in pHOB ... 45
3.1.2.2 Einfluss der siRNA-Runx2 auf die OC-Expression in pHOB ... 47
3.1.2.3 Einfluss der siRNA-Runx2 auf die OSX-Expression in pHOB ... 48
3.1.2.4 Einfluss der siRNA-Runx2 auf die AP-Expression in pHOB ... 49
3.1.2.5 Einfluss der siRNA-Runx2 auf die PPARγ2-Expression in pHOB ... 51
3.1.2.6 Einfluss der siRNA-Runx2 auf die aP2-Expression in pHOB ... 52
3.1.2.7 Einfluss der siRNA-Runx2 auf die LPL-Expression in pHOB ... 54
3.1.2.8 Einfluss der siRNA-Runx2 auf das Runx2-Protein in pHOB ... 55

3.2 Runx2-Überexpression ... 56
3.2.1 Runx2-Überexpression (mRNA) ... 56
3.2.2 Runx2-Überexpression (Protein) ... 58

3.3 Runx2-/PPARγ-Interaktionsversuche ... 60
3.3.1 Interaktionsversuch I ... 60
3.3.2 Interaktionsversuch II ... 62
3.3.3 Interaktionsversuch III ... 63
3.3.4 Interaktionsversuch IV ... 65
3.3.5 Interaktionsversuch V ... 66
3.3.6 Troglitazoneinfluss auf die PPARγ2-mRNA ... 68
3.3.7 Interaktionsversuch VI ... 70
3.3.8 Interaktionsversuch VII ... 72
3.3.9 Interaktionsversuch VIII ... 74
3.3.10 Interaktionsversuch IX ... 76

4. Diskussion ... 79

4.1 Runx2-‚Knockdown' ... 79
4.1.1 Vor- und Nachteile der Arbeit mit pHOB ... 79
4.1.2 Die siRNA-Runx2 führt in pHOB zur Runx2-Suppression ... 80
4.1.3 Die Runx2-Suppression führt in pHOB nach 48 Stunden zu einer signifikanten OC-und zu einer tendenziellen AP-Reduktion ... 83

4.1.4 Die Runx2-Suppression besitzt in pHOB keinen signifikanten Einfluss auf die OSX-mRNA 83
4.1.5 Die Runx2-Suppression führt in pHOB nach 7 Tagen zur Reduktion osteogener Marker und zur PPARγ-Induktion 84
4.1.6 Die siRNA-Runx2 führt in pHOB nach 29 Tagen zu einer Runx2-Suppression, beeinflusst die anderen osteogenen und adipogenen Differenzierungsmarker jedoch nicht 85
4.1.7 Die osteogene Stimulation bewirkte nach zweimaliger Transfektion der siRNA-Runx2 in pHOB keinen Runx2-‚Rescue' 85
4.1.8 Die siRNA-Runx2 führt nach 7 Tagen vermutlich auch zur Suppression des Runx2-Proteins 86

4.2 Interaktion zwischen Runx2 und PPARγ 87
4.2.1 Runx2-Einfluss auf PPARγ 87
4.2.1.1 Das Runx2-Plasmid führt in pHOB- und SCP1-Zellen zur Steigerung der Runx2-mRNA und zu einem konträren Effekt auf die PPARγ2-mRNA 88
4.2.1.2 Das Runx2-Plasmid führt in SCP1-Zellen vermutlich zu einer Induktion des Runx2-Proteins und zu einer Reduktion des PPARγ-Proteins 89
4.2.1.3 Lokalisation des Runx2-Einflusses auf PPARγ 90
4.2.1.3.1 Runx2 reduziert die PPARγ-Promotoraktivität 90
4.2.1.3.2 Runx2 verändert nicht die PPARγ2-mRNA 93
4.2.1.4 Die adipogene Stimulation bewirkte eine Steigerung der Aktivität des PPARγ-Proteins als Transkriptionsfaktor 93
4.2.2 Gegenseitiger Einfluss der beiden Faktoren Runx2 und PPARγ 94

5. Zusammenfassung 96

6. Literaturverzeichnis 97

7. Abbildungsverzeichnis 111

8. Tabellenverzeichnis 112

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
AK	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
aP2	Adipozytäres Protein 2
ATP	Adenosintriphosphat
BAP	Knochenspezifische Alkalische Phosphatase
BCA	Bicinchoninsäure
BMP	bone morphogenetic protein
BMP-2	bone morphogenetic protein-2
BMU	basic multicellular unit
Bp	Basenpaare
BRC	bone remodeling compartment
bzw.	Beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	Circa
Cbfα1	core binding factor alpha 1
Cbfβ	core binding factor beta
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
C/EBPα	CCAAT-enhancer binding protein alpha
CO_2	Kohlenstoffdioxid
CTP	Cytidintriphosphat
CT-Wert	cycle-threshold-Wert
D	densitometrisch erfasste Dichte
DAPI	4′,6-Diamidin-2-phenylindol
d.h.	das heißt
DICER	Endonuklease, von engl. to dice: in Würfel schneiden
Dlx5	distal-less homeobox 5
DMEM	Dulbecco's modified eagle‘s medium
DMP1	dentin matrix acidic phosphoprotein 1
DANN	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonukleasen
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
Dr.	Doktor
DTT	Dithiothreitol
ECL	enhanced chemiluminescence
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylene glycol tetraacetic acid
et al.	et alii
FABP	Fatty acid-binding protein
FCS	fötales Kälberserum
FGF23	fibroblast growth factor 23
G	Gramm
GCS-F	granulocyte colony stimulating-factor

GFP	green fluorescent protein
ggf.	gegebenenfalls
Grg	Groucho
GTP	Guanosintriphosphat
HAT	Histon-Acetyltransferase
HCl	Chlorwasserstoff
HDAC	Histon-Deacetylasen
HIND III	Enzym der Typ-II-Restriktionsendonukleasen aus Haemophilus influenzae
hTERT	Humane-Telomerase-Reverse-Transkriptase
IBMX	Isobutylmethylxanthin (3-Isobutyl-1-methylxanthin)
Ig	Immunglobulin
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
kDa	Kilodalton
Ko	Kontrolle
L	Liter
LB-Medium	Lysogeny-broth-Medium
LDL	low-density lipoprotein
LPL	Lipoproteinlipase
LRP	low-density lipoprotein-receptor-related protein
mA	Milliampere
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MCSF	Makrophagenkolonie stimulierender Faktor
MCSFR	Makrophagenkolonie-stimulierender-Faktor-Rezeptor
MEM	modified eagle‘s medium
µg	Mikrogramm
Min	Minute/n
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
mM	MilliMol
mm^3	Kubikmillimeter
M-MLV	moloney murine leukemia virus
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MSC	mesenchymale Stammzelle
Msx2	msh homeobox 2
N	Anzahl
Na	Natrium
Ng	Nanogramm
NL	Niederlande
NLS	nuclear localisation signal
Nm	Nanometer
NMTS	nuclear matrix targeting signal
Nr.	Nummer
OC	Osteokalzin
OP	Operation
OPG	Osteoprotegerin
ORF	open reading frame

OSE	Osteoblast-specific element
OSX	Osterix
P	Prolin
P(dt) 15	Primer (deoxynucleotid transferase) 15
Pat	Patient
PBS	Phospatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PD	Privatdozent
Pen./Strep.-Lösung	Penicillin/Streptomycin-Fertiglösung
pH	Pondus Hydrogenii, negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
pHOB	primäre humane Osteoblasten
PP2A Cα	serine/threonine protein phosphatase 2A
PPARγ	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
PPRE	Peroxisome proliferator-response element
prä-mRNA	Präkursor-messenger Ribonukleinsäure
Prof.	Professor
R	Arginin
RANK	Receptor for activation of nuclear factor kappa B
RANKL	Receptor for activation of nuclear factor kappa B-Ligand
RFU	relative Fluoreszenzeinheiten
RISC	RNA-induced silencing complex
RLU	relative Lichteinheiten
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rSmad	receptor-activated Smad
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
Runx1	Runt-related transcription factor 1
Runx2	Runt-related transcription factor 2
Runx3	Runt-related transcription factor 3
RXR	retinoid X receptor
s.u.	siehe unten
SCP1-Zellen	Single-cell-derived human mesenchymal stem cell line
Sec	Sekunden
siKo	Kontroll-small interfering Ribonukleinsäure
siRNA	small interfering Ribonukleinsäure
siRunx2	small interfering Ribonukleinsäure gegen Runx2
Smad	Kombination aus Drosophila-Protein "mothers against decapentaplegic" und dem Caenorhabditis-elegans-Protein SMA für „small body size“
Smurf1	Smad ubiquitin regulatory factor 1
Sox 9	Sry-type HMG box 9
T	Tag
TEP	Totalendoprothese
TGF-β	transforming growth factor-β
TLE	transducin-like enhancer of split
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

TTP	Thymidintriphosphat
Tween 20	Poly(Oxy-1,2-Ethandiyl)-Monododekansäure-Sorbitylester
TZD	Thiazolidindione
u.a.	unter anderem
UpM	Umdrehungen pro Minute
USA	United States of America
V	Volt
vgl.	vergleiche
VLDL	very low-density lipoprotein
W	Tryptophan
XBA 1	Xanthomonas badrii Gen1
Y	Tyrosin

1. Einleitung

1.1 Osteoporose

Die Osteoporose ist eine systemische Skeletterkrankung, die sich durch verminderte Knochenmasse und verschlechterte Knochenmikroarchitektur in Verbindung mit erhöhter Frakturanfälligkeit auszeichnet. Qualität und Quantität des Knochens werden sowohl genetisch als auch durch Umweltfaktoren wie Ernährung, körperlichen Trainingszustand und Hormonstatus beeinflusst. Knochenverlust kommt unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen wie Altern, Postmenopause, Immobilität, Diabetes mellitus und Knochenmetastasen bei Krebserkrankungen vor. Mit zunehmender Ausweitung der Lebensspanne und Veränderung der Lebensbedingungen wurde die Osteoporose mit daraus resultierenden Frakturen zu einer führenden Ursache der Morbidität und Mortalität in der modernen Gesellschaft (Johnell and Kanis, 2006). Insgesamt ein Drittel aller Frauen und ein Fünftel aller Männer über 50 Jahre erleiden osteoporotische Frakturen (Melton, III et al., 1998). Besonders gefürchtet ist die Schenkelhalsfraktur, da sie mit einer hohen Mortalitätsrate einhergeht. Sie wird bis zum Jahr 2050 bei Männern um 310% und bei Frauen um 240% im Vergleich zum Ausgangswert des Jahrs 1990 ansteigen (Gullberg et al., 1997). Dabei bedarf die Osteoporose eines enormen personellen und wirtschaftlichen Aufwands. Die Liegedauer der von osteoporotischen Frakturen betroffenen Patientinnen oberhalb des 45. Lebensjahres liegt zum Beispiel über der Liegedauer von an Brustkrebs oder Myokardinfarkt erkrankten Patientinnen über 45 Jahren (Kanis et al., 1997). Bedauerlicherweise ist bei über 80% der Hochrisikopatienten ihre Krankheit weder bekannt, noch wird sie behandelt (Nguyen et al., 2004). Es werden hingegen oft nur die akuten Folgen der Erkrankung, also die Frakturen, therapiert.

Aus diesem Grund ist es von enormer Bedeutung, die Biologie des Knochens besser zu verstehen und die Entwicklung auf eine effektive Diagnosestellung, Prävention und Behandlung der Osteoporose zu fokussieren.

Es folgt ein Überblick über Aufbau und Funktion des Knochens, sowie die wichtigsten Knochenzellen. Anschließend werden wichtige Faktoren und Regulationsmechanismen vorgestellt:

1.2 Bau und Funktion des Knochens

Der Knochen ist ein hochspezialisiertes, mineralisiertes Binde- und Stützgewebe und neben Zahnschmelz und Zahnbein das härteste Gewebe des menschlichen Körpers. Als passiver Teil des Bewegungsapparates dient er dem Ansatz von Bändern und Muskeln und ermöglicht somit die Bewegung. Das knöcherne Skelett besitzt eine Stützfunktion für den gesamten Körper und schützt die inneren Organe. Als größter Kalziumspeicher erfüllt der Knochen zudem wichtige metabolische Funktionen. Er ist unmittelbar eingebunden in die Regulierung des Blutkalziumspiegels, woraus sich wichtige pathophysiologische Konsequenzen ergeben. An dieses System knüpft die Regulierung des Phosphathaushaltes an.

Knochen besteht zu etwa 60% aus anorganischer Matrix, zu etwa 30% aus organischer Matrix, zu 5 bis 10% aus Wasser und zu weniger als 3% aus Lipiden (Mackiewicz et al., 2011). Knochenbildende Zellen gehören der organischen Matrix an. Sie stellen initial unmineralisiertes Gewebe her, das aus Kollagen Typ I, Proteoglykanen und Glykoproteinen besteht und als Osteoid bezeichnet wird. Dieses wird anschließend mineralisiert. Hauptbestandteil des mineralisierten Anteils ist Kalziumhydroxylapatit, das dem Knochen seine Stabilität verleiht. Zusätzlich besteht der mineralische Anteil aus kleinen Mengen Karbonat, Magnesium und Phosphorsäure.

Die Knochenbildung findet auf zwei unterschiedlichen Wegen statt: während bei der chondralen Ossifikation ein Knorpelmodell vorgeformt wird, das allmählich durch Knochengewebe ersetzt wird, erfolgt bei der desmalen Ossifikation die Knochenbildung direkt durch Kondensierung mesenchymaler Zellen (Soltanoff et al., 2009).

Der Aufbau jedes Knochens besteht aus einer außen gelegenen dünnen Schicht kompakter Knochensubstanz, der Substantia corticalis, und einem innen gelegenen Maschenwerk aus Knochenbälkchen, der Substantia spongiosa. Die Spongiosabälkchen werden in Bereichen großer Druck- und Zugspannung des Knochens vermehrt und an wenig belasteten Stellen vermindert aufgebaut, sodass mit einem Minimum an Material ein Maximum an Stabilität erreicht wird. Dies wird als trajektorielle Bauweise bezeichnet.

1.2.1 ‚Remodeling'

Knochen passt sich äußeren Spannungsverhältnissen permanent an und befindet sich somit zeitlebens im Umbau. Dieser Vorgang wird als ‚Remodeling' bezeichnet und erfordert ein gut reguliertes Nebeneinander von Knochensynthese und Knochenresorption. Dysregulationen dieses Systems können Probleme wie Osteoporose, Arthritis und ungesteuertes Knochenwachstum hervorrufen (Rachner et al., 2011; Sturge et al., 2011). Das ‚Remodeling'

findet in spezialisierten vaskulären Strukturen statt, sogenannten ‚bone remodeling compartments' (BRC), deren Anzahl mit dem Knochenumsatz korreliert (s. Abbildung 1). Diese sind vom Knochenmark separiert und beinhalten Osteoblasten, Osteoklasten und Osteozyten, die zusammen die sogenannte ‚basic multicellular unit' (BMU) bilden. ‚Bone-Lining'-Zellen grenzen das BRC dachartig gegen das Knochenmark ab (Hauge et al., 2001). Die Aktivität der Osteoblasten und Osteoklasten unterliegt einer strengen lokalen sowie systemischen Kontrolle.

Das ‚Remodeling' umfasst vom Beginn der Knochenresorption bis zum Abschluss der Knochensynthese in der Substantia spongiosa ca. 150 Tage (Eriksen et al., 1984a; Eriksen et al., 1984b), in der Substantia corticalis ca. 120 Tage (Agerbaek et al., 1991).

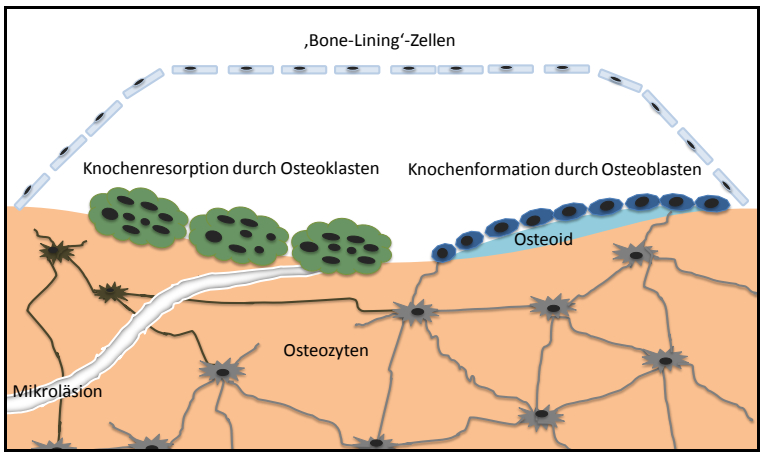

Abbildung 1: Schematische Darstellung eines ‚bone remodeling compartments' (BRC) mit den wichtigsten Knochenzellen und ihren Aufgaben, modifiziert nach McGee-Lawrence and Westendorf (2011, S.16). Der Knochenabbau erfolgt hier infolge einer Mikroläsion durch Osteoklasten. Osteoblasten hingegen sind für den Knochenaufbau zuständig. Sie produzieren das Osteoid und mineralisieren dieses anschließend. ‚Bone-Lining'-Zellen grenzen das BRC dachartig gegen das Knochenmark ab. Das osteozytäre Netzwerk wandelt die von außen einwirkenden Biegungs- und Dehnungskräfte in Veränderungen der osteoblastären und osteoklastären Aktivität um. Apoptotische Osteozyten werden braun, intakte Osteozyten grau dargestellt.

1.2.2 Knochenzellen

Zu den Knochenzellen zählt man im Wesentlichen folgende: Osteoblasten, Osteozyten, ‚Bone-Lining'-Zellen und Osteoklasten (s. Abbildung 1). Osteoklasten entstehen im Knochenmark aus hämatopoetischen Vorläuferzellen. Die übrigen der genannten Zelltypen entwickeln sich aus Osteoprogenitorzellen, die von mesenchymalen Vorläuferzellen abstammen. Im Folgenden werden die Knochenzellen vorgestellt:

1.2.2.1 Osteoblasten

Osteoblasten sind einkernige, an der Oberfläche der Knochenbälkchen epithelartig angeordnete Zellen (s. Abbildung 1). Ihre Ultrastruktur lässt auf hohe Stoffwechselaktivität schließen, da sie zahlreiche Mitochondrien und Lysosomen, einen gut ausgebauten Golgi-Apparat, raues endoplasmatisches Retikulum und eine hohe Anzahl an Ribosomen besitzen (Marks, Jr. and Popoff, 1988).

Osteoblasten entstammen multipotenten mesenchymalen Stammzellen (MSC) des lokalen Stromagewebes, die durch hohe Proliferationsraten gekennzeichnet sind. Aus ihnen gehen ebenfalls Chondrozyten, Myoblasten, Adipozyten und retikuläre Zellen hervor (Bernard and Harley, 2010; Chamberlain et al., 2007; Nuttall et al., 1998; Szalay et al., 1997). Für jede Entwicklungsrichtung gibt es einen führenden Transkriptionsregulator. Diese Rolle übernimmt ‚Runt-related transcription factor 2‘ (Runx2) für die Osteogenese (Komori et al., 1997; Otto et al., 1997) und ‚Peroxisome proliferator-activated receptor γ‘ (PPARγ) für die Adipogenese (Tontonoz and Spiegelman, 2008). Die Expression osteoblastärer Gene variiert je nach Entwicklungsstand der Zelle und gibt damit Aufschluss über ihren Differenzierungsstatus. Von Bedeutung sind hierbei die Expressionsmuster der knochenspezifischen Alkalischen Phosphatase (BAP), des Kollagens Typ I, des Osteokalzins (OC), des Runx2 und des Osterix (OSX). Runx2 und OSX sind dabei essentiell für die osteoblastäre Differenzierung. Hoch differenzierte Osteoblasten sind charakterisiert durch die Expression von OC (Owen et al., 1990; Siggelkow et al., 2004), produzieren das Osteoid und führen anschließend zu dessen Kalzifikation. Neben dem Knochenaufbau beeinflussen Osteoblasten auch die Knochenresorption durch Osteoklasten (s. 1.2.2.3.1) (Chambers and Fuller, 1985; Teitelbaum, 2000). Zudem sind sie für Wachstum, Wundregeneration und Umbauvorgänge des Knochens von zentraler Bedeutung.

Osteoblasten haben eine durchschnittliche Lebensdauer von etwa drei Monaten. Anschließend gehen sie entweder in die Apoptose über oder sie entwickeln sich zu Osteozyten oder ‚Bone-Lining’-Zellen (Eriksen, 2010; Uchihashi et al., 2012).

Auf ihrer Zelloberfläche exprimieren Osteoblasten verschiedene Rezeptoren, unter anderem für Vitamin D, Parathormon und Östrogen, über die sie endokrin reguliert werden. Zudem werden sie in ihrer Differenzierung und Funktion sowohl lokal als auch mechanisch beeinflusst (Drissi et al., 2002; Kang JS et al., 2005; Salingcarnboriboon et al., 2006). Einen wichtigen Regulationsmechanismus der osteoblastären Differenzierung stellt das ‚Wnt-Signaling‘ dar, das im Folgenden in seinen Grundzügen vorgestellt werden soll.

1.2.2.1.1 ‚Wnt-Signaling' in Osteoblasten

Das ‚Wnt-Signaling' stellt einen Signaltransduktionsweg dar, durch den eine Zelle auf spezielle, von außen einwirkende Signale reagieren kann. Diese Wnt-Moleküle sind Glykoproteine und nehmen eine bedeutende Rolle für die Entwicklung und Erneuerung des Knochens ein. Unterteilt wird das ‚Wnt-Signaling' in den ‚Canonical' und den ‚Noncanonical' Signalweg. Der ‚Canonical' Signalweg findet in allen Zellen der osteoblastären Linie statt. Hierbei binden Wnt-Moleküle an einen Rezeptorkomplex aus ‚low-densitiy lipoprotein (LDL)-receptor-related protein' (LRP) 5 oder LRP6 und eins von zehn ‚frizzled molecules' (Westendorf et al., 2004). Es kommt zur Stabilisierung des ‚β-catenin' und dadurch zur Transkription der Wnt-Zielgene (Hens et al., 2005; Westendorf et al., 2004) sowie zur Suppression des PPARγ (Kang S et al., 2007; Takada et al., 2009). Die osteoblastäre Differenzierung wird also auf Kosten der adipozytären Differenzierung gefördert und die Knochenfestigkeit erhöht (Bain et al., 2003). Die Suppression dieses Signalwegs hingegen führt zum Knochenverlust (Bodine and Komm, 2006). Viele Regulationsfaktoren greifen an dieser Stelle in den Knochenstoffwechsel ein. Runx2 beispielsweise führt zur Antagonisierung dieses Systems durch Sklerostin-Aktivierung (Mendoza-Villanueva et al., 2011). Im Gegensatz dazu übt der ‚Noncanonical' Signalweg abhängig vom jeweiligen Liganden einen unterschiedlichen Einfluss auf die Adipogenese in MSC aus. Die Bindung des Liganden Wnt5A beispielsweise bewirkt eine Hemmung der Adipogenese, wobei die Bindung des Liganden Wnt5B die Adipogenese unterstützt (Kanazawa et al., 2005; Zaidi et al., 2012).

1.2.2.2 Osteozyten

Osteozyten machen etwa 90% aller Knochenzellen aus und entstehen, wenn sich Osteoblasten in die sie umgebende mineralisierte Matrix einmauern (Mackiewicz et al., 2011). Sie liegen in Knochenhöhlen (Lacunae osseae) und ihre Fortsätze in Knochenkanälchen (Canaliculi ossei), mit denen sie über ‚gap junctions' synzytial mit Nachbarosteozyten, Osteoblasten und ‚Bone-Lining'-Zellen in Verbindung stehen (s. Abbildung 1). Eine wesentliche Aufgabe der Osteozyten stellt die Mechanorezeption dar. Auf den Knochen einwirkende Stresssignale wie Biegungs- oder Dehnungskräfte werden durch das osteozytäre Netzwerk in Veränderungen der osteoblastären und osteoklastären Aktivität im BRC umgewandelt (Marotti et al., 1992). Zu den Osteozyten-spezifischen Molekülen gehören ‚dentin matrix acidic phosphoprotein' (DMP) 1, ‚fibroblast growth factor' (FGF) 23 und Sklerostin, die neben ihrer Rolle in der Knochenbildung auch am Phosphatstoffwechsel beteiligt sind (Bonewald, 2006). Im höheren Lebensalter des Menschen sowie bei Untergang interzellulärer Verbindungen,

Östrogenmangel oder Glukokortikoidbehandlung gehen Osteozyten in die Apoptose über (Plotkin et al., 2005).

1.2.2.3 Osteoklasten

Osteoklasten sind vielkernige Riesenzellen, die mononukleären Phagozytenvorläuferzellen entstammen und mit Makrophagen und Monozyten verwandt sind. Ihre Hauptaufgabe besteht in der Resorption der Knochensubstanz (Marks, Jr. and Popoff, 1988), wobei die Resorptionsintensität mit der Sekretion der Wasserstoffionen und des Enzyms Kathepsin K korreliert. Die Demineralisierung des Knochens wird durch ein Absenken des lokalen pH-Wertes auf 4,5 mithilfe gezielter Salzsäuresekretion erreicht. Die Lyse des organischen Materials erfolgt überwiegend durch die Sekretion von Kathepsin K, wodurch ‚Howship'-Lakunen auf der Oberfläche des Trabekelwerks und Haverskanäle im kortikalen Knochen entstehen. Bei Osteoporose sind Osteoblasten unfähig, diese Resorptionshohlräume wieder zu verschließen, sodass aus jedem ‚Remodeling'-Vorgang ein Knochenverlust resultiert (Eriksen et al., 1990).

1.2.2.3.1 Die Bedeutung des RANKL/OPG-Quotienten in der Osteoklastogenese

Die beiden Zytokine ‚macrophage colony stimulating factor' (MCSF) und ‚receptor for activation of nuclear factor kappa B'-Ligand (RANKL) sind für die Entwicklung der osteoklastären Vorläuferzelle zum reifen Osteoklasten erforderlich. MCSF fördert durch die Bindung an seinen Rezeptor MCSFR die Proliferation und das Überleben der makrophagozytären bzw. osteoklastären Vorläuferzellen. RANKL bindet an seinen Rezeptor RANK, der auf der Membran der Osteoklastenvorläufer vorkommt, und aktiviert somit verschiedene Schlüsseltranskriptionsfaktoren sowie osteoklastäre Enzyme, die gemeinsam die Differenzierung, Reifung und Aktivierung der Osteoklasten fördern (Rachner et al., 2011; Wan, 2010).

Den natürlichen Gegenspieler dieses Systems bildet Osteoprotegerin (OPG). Dieses hemmt durch RANKL-Bindung die Osteoklastogenese und konsekutiv die Knochenresorption (Rachner et al., 2011). Ist weniger OPG vorhanden, führt dies zu einer vermehrten RANKL-Aktivität, die wiederum in einer Osteoporose resultieren kann. Da sowohl RANKL als auch OPG häufig von Osteoblasten produziert werden, sind diese in die Kontrolle der Osteoklastendifferenzierung wesentlich involviert. Werden Osteozyten beschädigt, sezernieren diese ebenfalls MCSF und RANKL und unterstützen somit die osteoklastäre Differenzierung und die Knochenresorption (Kurata et al., 2006). Erste medikamentöse Eingriffe in dieses System sind vorhanden: Der monoklonale RANKL-Antikörper

Denosumab führt zu einer ausgeprägten Reduktion der Osteoklastenanzahl (Reid et al., 2010) und zu einer exzellenten Reduktion des Frakturrisikos bei postmenopausaler Osteoporose (Cummings et al., 2009).
Der RANKL/OPG-Quotient gilt als kritischer Faktor in der Regulierung des Gleichgewichts zwischen Osteoblasten und Osteoklasten und somit zwischen Knochenformation und Knochenresorption.

1.2.2.4 ‚Bone-Lining'-Zellen

‚Bone-Lining'-Zellen sind länglich geformte, flache Zellen, die alle Oberflächen des Knochens auskleiden. Sie entstehen aus Osteoblasten und entstammen somit ebenfalls mesenchymalen Stammzellen. Unter Einfluss des Parathormons oder unter Einwirkung mechanischer Kräfte können diese Zellen zu Osteoblasten rückdifferenzieren (Robling et al., 2006). Über ‚gap junctions' sind ‚Bone-Lining'-Zellen sowohl untereinander als auch mit Osteozyten und Osteoblasten verbunden (Duncan and Turner, 1995; Robling et al., 2006). Sie regulieren die Ein- und Ausfuhr mineralischer Ionen in die extrazelluläre Matrix des Knochens und dienen als Blut-Knochengrenze. Eine wichtige Aufgabe besitzen ‚Bone-Lining'-Zellen während des ‚Remodelings'. Sie entfernen das von den Osteoklasten unverdaut zurückgelassene, demineralisierte Kollagen (Everts et al., 2002). Anschließend heben sie sich dachartig von der Knochenoberfläche ab (s. Abbildung 1) und schaffen somit eine spezialisierte Umgebung für gezieltes ‚Remodeling' (Hauge et al., 2001). Um die Integrität der Knochenoberfläche wiederherzustellen, bilden die sich während des ‚Remodelings' abflachenden Osteoblasten eine neue Reihe ‚Bone-Lining'-Zellen und schließen sich vermutlich mit der alten ‚Bone-Lining'-Zellschicht zu einer Schicht zusammen (Hauge et al., 2001). ‚Bone-Lining'-Zellen nehmen durch Expression von OPG und RANKL ebenfalls auf die Osteoklastogenese Einfluss (Eriksen et al., 2007).

1.3 Knochenassoziierte Proteine und Transkriptionsfaktoren

Osteoblasten und Adipozyten stammen von gemeinsamen Vorläuferzellen ab, den MSC (Chamberlain et al., 2007). Auf deren Differenzierungsrichtung Einfluss nehmende Vorgänge bilden ein hochsensibles System, in dem zahlreiche Faktoren mitwirken. Insbesondere die beiden Schlüsseltranskriptionsfaktoren Runx2 und PPARγ (Duque, 2008; Komori, 2006; Moerman et al., 2004) spielen eine große Rolle und sollen daher im Folgenden besonders gründlich vorgestellt werden.

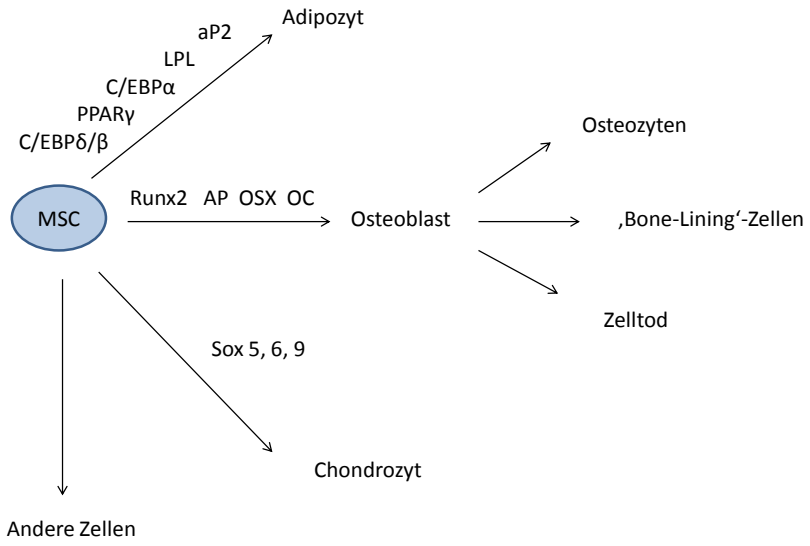

Abbildung 2: Differenzierung mesenchymaler Stammzellen (MSC). MSC können sich zu Adipozyten, Osteoblasten, Chondrozyten und anderen Zellen differenzieren. Hierbei ist die Entwicklungsrichtung abhängig von der Anwesenheit bestimmter Transkriptionsfaktoren, die anhand ihrer Abkürzungen eingezeichnet sind. Osteoblasten wiederum können sich zu Osteozyten oder ‚Bone-Lining'-Zellen weiterentwickeln oder sie gehen in die Apoptose über.

1.3.1 ‚Runt-related transcription factor 2' (Runx2)

‚Runt-related transcription factor 2', auch bekannt als ‚core-binding factor alpha 1' (Cbfα1), ist ein für die osteoblastäre Differenzierung und Funktion essentieller Transkriptionsfaktor der Runtdomäne-Genfamilie (Stein et al., 2004). Zu dieser Genfamilie gehören die drei Gene Runx1, Runx2 und Runx3, die in ihrer 128 Aminosäuren langen Runtdomäne eine Homologie zum Drosophila-Gen aufweisen (Aronson et al., 1997). Diese Runtdomäne ist ein hoch konserviertes Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Bindungs- und Protein-Protein-Interaktionsmotiv und für die Genfamilie namensgebend. Durch Bildung eines Heterodimers zwischen Runtdomäne und ‚core-binding factor beta' (Cbfβ) findet eine Strukturänderung der DNA-Interaktionsfläche im Bereich der Runtdomäne statt (Backstrom et al., 2002; Warren et al., 2000). Diese ermöglicht eine spezifische Bindung an die DNA-Sequenz 5'-PuACCPuCA-3' in der Promotorregion des Zielgenes und führt somit zu dessen Expression oder Repression (Kamachi et al., 1990).

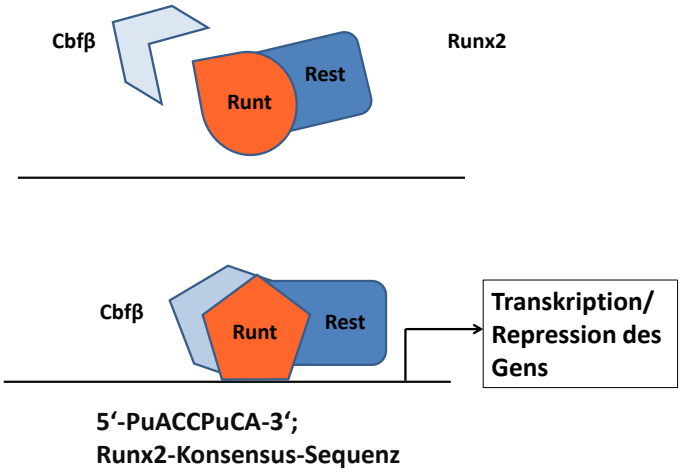

Abbildung 3: Schematische Darstellung der Runx2-Bindung an der 5'-PuACCPuCA-3'-Sequenz des Zielgens. Cbfβ bindet an die Runtdomäne des Runx2 und bewirkt damit deren Strukturänderung, wodurch eine Bindung an die DNA ermöglicht wird. Je nach Aktivierungsstatus der weiteren Domänen des Runx2-Proteins (in der Abbildung als Rest bezeichnet) vermittelt dieser Komplex anschließend die Transkription bzw. Repression des Zielgens.

Durch Nutzung zweier unterschiedlicher Promotoren können die beiden Hauptisoformen Runx2 I und Runx2 II mit eigenen voneinander abgrenzbaren Funktionen unterschieden werden (Banerjee et al., 2001).

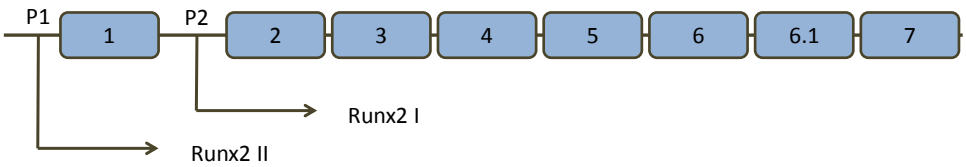

Abbildung 4: Das Runx2-Gen beinhaltet acht informationstragende Genabschnitte, sogenannte Exons, die hier mit den Zahlen 1 bis 7 markiert sind. Die Transkription des Gens wird durch zwei unterschiedliche Promotoren, P1 und P2, kontrolliert, wodurch die zwei Isoformen Runx2 I und Runx2 II entstehen (Abbildung modifiziert nach Ziros et al., 2008, S. 1660).

Runx2 I reicht für die frühe osteoblastäre Differenzierung und die desmale Knochenbildung aus, während Runx2 II für die komplette osteoblastäre Reifung und chondrale Ossifikation notwendig ist. Aus nur einem Runx2-Gen geht durch die Verwendung der beiden Promotoren und durch alternatives Spleißen eine Vielfalt von Proteinisoformen mit unterschiedlichen biologischen Funktionen hervor (Terry et al., 2004). Während des alternativen Spleißens werden posttranskriptionell aus der Präkursor-mRNA (prä-mRNA) neben nicht-codierenden Genabschnitten, den Introns, auch verschiedene informationstragende Genabschnitte,

sogenannte Exons, herausgeschnitten (Stamm et al., 2005). Zusätzlich zu seiner DNA-Bindungsdomäne beinhaltet das Protein multiple Domänen, die je nach Assoziation mit einem Koaktivator oder einem Korepressor entweder eine Transkription oder eine Repression des Gens nach sich ziehen (Jensen et al., 2007; Schroeder et al., 2005; Aronson et al., 1997). Die Transkriptionsaktivität des Runx2 untersteht einer komplexen und strengen Regulation in Knochenzellen.

Runx2 ist essentiell für die osteoblastäre Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen und stellt den frühesten osteoblastären Marker dar (Komori, 2006; Lian et al., 2003). Ein homozygoter Runx2-‚Knockdown' in Mäusen führt aufgrund des vollständigen Fehlens mineralisierten Knochens postnatal zur respiratorischen Insuffizienz und damit zum Tod der Tiere (Komori et al., 1997; Otto et al., 1997). Ein heterozygoter Runx2-‚Knockdown' führt im Mausmodell zu einem Phänotyp, der dem Phänotyp der Kleidokranialen Dysplasie des Menschen entspricht (Mundlos et al., 1997). Die Kleidokraniale Dysplasie ist eine autosomal-dominant vererbte Entwicklungsstörung des Knochens. Betroffene Patienten fallen durch hypoplastische Klavikel auf, die in Kombination mit unterschiedlichen Defekten der Zahnanlage, einer verzögerten Ossifikation der Schädelknochen und weiteren Fehlbildungen des Skeletts einhergehen (Han et al., 2010; Kim et al., 2006; Mundlos et al., 1997; Otto et al., 1997). Interessanterweise führt die Runx2-Überexpression hingegen zu einer gesteigerten Knochenresorption, vermutlich da die osteoklastäre Differenzierung RANKL-assoziiert vermehrt wird (Geoffroy et al., 2002). Des Weiteren wird bei Runx2-Überexpression die terminale osteoblastäre Differenzierung gehemmt (Liu W et al., 2001).

Runx2 beschleunigt zudem durch Expressionssteigerung der Zielgene die chondrozytäre Differenzierung (Yoshida et al., 2004) und reguliert die vaskuläre Invasion des sich entwickelnden Knochens (Komori, 2003).

Die Regulierung der Runx2-Funktion ist sehr komplex. Einen wesentlichen Einfluss besitzen Wachstumsfaktoren der Gruppen TGF-β und ‚bone morphogenic protein' (BMP) (Phimphilai et al., 2006). Über verschiedene Aktivierungspfade laufen ihre Einflüsse am Runx2-Gen zusammen, sodass sie über diesen Weg die Differenzierung mesenchymaler Vorläuferzellen kontrollieren können. Runx2 ist teilweise essentiell für die Ausführung und Vervollständigung dieser Signalwege.

1.3.2 ‚Peroxisome proliferator-activated receptor gamma' (PPARγ)

‚Peroxisome proliferator-activated receptor γ' ist ein Transkriptionsfaktor der nukleären Rezeptorfamilie, der sowohl im braunen als auch im weißen Fettgewebe reichlich vorkommt

(He et al., 2003; Imai et al., 2004). Er wird durch Anlagerung lipophiler Liganden aktiviert und wirkt in Verbindung mit seinem Partnerprotein ‚CCAAT-enhancer binding protein α' (C/EBPα). Nach obligater Heterodimerbildung mit dem ‚retinoid X receptor' (RXR) bindet PPARγ an das ‚Peroxisome Proliferator-response element' (PPRE) in der Promotorregion des Zielgenes und führt damit zu seiner Expression oder Repression (Tontonoz and Spiegelman, 2008; Wu et al., 1999).

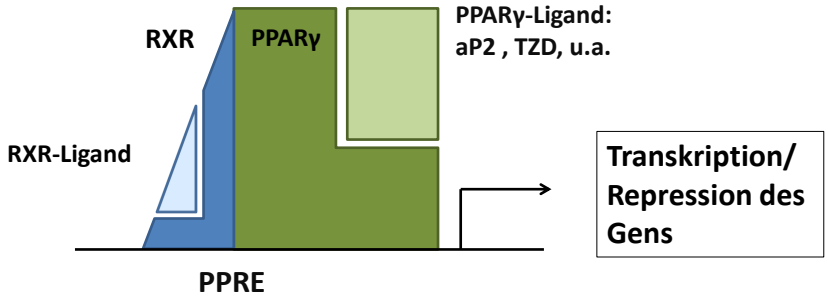

Abbildung 5: Schematische Darstellung der PPARγ-Bindung an die PPRE-Region des Zielgens. Durch Bildung eines Heterodimers mit RXR kann eine DNA-Bindung und somit eine Transkription bzw. Repression des Zielgens bewirkt werden. Die jeweiligen Liganden können dabei den Einfluss auf das Gen verstärken.

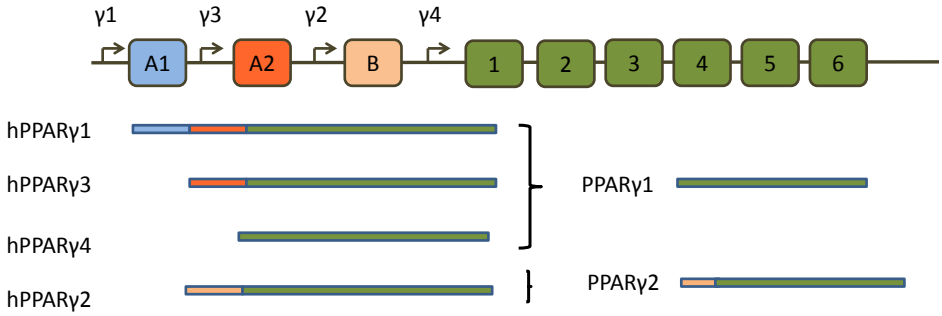

Abbildung 6: Schematische Darstellung des PPARγ-Gens (obere Reihe), der PPARγ-Transkripte hPPARγ1-4 und der beiden PPARγ-Isoformen PPARγ1 und PPARγ2. Die beiden Exons A1 und A2 werden im Gegensatz zu Exon B nicht translatiert. Während PPARγ2 nur aus hPPARγ2 hervorgeht, bilden die anderen drei Transkripte die Grundlage für PPARγ1. Dabei werden sie posttranskriptionellen Modifikationen wie alternativem Spleißen unterzogen (Fajas et al., 1997).

Es existieren zwei Isoformen, PPARγ1 und PPARγ2, die vom selben Gen abgelesen werden und durch unterschiedliche Promotoren und alternatives Spleißen entstehen. Während die PPARγ2-Expression weitestgehend auf Adipozyten beschränkt ist, wird PPARγ1 auch in Muskelzellen, Osteoblasten und Makrophagen gebildet (Sugii and Evans, 2011; Zhu et al., 1995). Deutliche Unterschiede bezüglich ihrer Funktion in der Adipogenese wurden nicht festgestellt (Fajas et al., 1997).

Die PPARγ-Aktivierung ist der Schlüsselschritt der adipozytären Differenzierung mesenchymaler Vorläuferzellen des Knochenmarks (Kawai and Rosen, 2010). Homozygot PPARγ-defiziente embryonale Stammzellen entwickeln sich nicht zu Adipozyten, sondern differenzieren spontan zu Osteoblasten. Bei heterozygot PPARγ-defizienten Mäusen findet man neben einer reduzierten Adipogenese eine erhöhte Knochenmasse mit gesteigerter Osteoblastogenese (Akune et al., 2004).

Erhöht man die PPARγ2-Expression in spezialisierten Zellen ohne angelegtes adipogenes Potential, kommt es zur Transdifferenzierung dieser Zellen zu Adipozyten (Kook et al., 2006). Des Weiteren führt die Steigerung der PPARγ-Aktivität über zwei Mechanismen zum Knochenverlust. Zum einen findet durch ‚β-catenin'-Suppression eine Hemmung der osteoblastären Differenzierung statt (Wei et al., 2010; Wei et al., 2011), zum anderen kommt es zur RANKL-assoziierten Aktivierung der osteoklastären Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen (Lecka-Czernik, 2009; Lecka-Czernik, 2010; Park et al., 2009). So verursacht der PPARγ-Funktionsverlust in hämatopoetischen Zelllinien der Maus Osteopetrose mit hoher Knochenmasse und extramedullärer Hämatopoese in der Milz (Wan et al., 2007).

PPARγ moduliert die Insulinsensitivität der Zellen und ist an der Regulierung des Glukose- und Fettsäurestoffwechsels beteiligt (Rosen and Spiegelman, 2001). Es bildet eine Schaltstelle zwischen systemischem Fettstoffwechsel und der Adipogenese (Tontonoz et al., 1994). Dysregulationen können zu Adipositas, Insulinresistenz und Diabetes mellitus Typ2 führen (Sharma and Staels, 2007).

Thiazolidindione (TZD) wie Rosiglitazon, Pioglitazon und Troglitazon gehören zur Medikamentengruppe der Antidiabetika und bewirken durch PPARγ2-Aktivierung in vitro und in vivo irreversibel die Förderung der Adipogenese und die Hemmung der Osteogenese (Okazaki et al., 1999; Schwartz, 2008). Es ist davon auszugehen, dass TZD den Knochenhaushalt durch Apoptoseinduktion der Osteozyten negativ beeinflussen (Mabilleau et al., 2010), sodass es zu reduzierter Knochenmasse und Knochenfestigkeit kommt.

1.3.2.1 Interaktionen zwischen PPARγ und Runx2

Entscheidend für die Entwicklungsrichtung einer MSC sind die beiden Schlüsseltranskriptionsfaktoren Runx2 und PPARγ (Duque, 2008; Komori, 2006; Moerman et al., 2004). Eine gesteigerte Adipogenese im Knochenmark ist assoziiert mit einer verminderten Osteogenese (Duque, 2008). Runx2 fördert die osteogene Differenzierung, wohingegen PPARγ die adipogene Differenzierung fördert. Runx2 und PPARγ agieren also als Gegenspieler in diesem System. Bei Infiltration des Knochenmarks können Adipozyten parakrin durch sekretorische Produkte und Adipozytokine auf Funktion und Differenzierung

der Osteoblasten einwirken (Shockley et al., 2009; Wolf, 2008). Kokulturen mit primären bzw. differenzierten Fettzellen und Osteoblasten führen so zu einer signifikanten Reduktion der Expression der Runx2-messenger-Ribonukleinsäure (mRNA) und des Runx2-Proteins in Osteoblasten und zu einer gesteigerten Expression der PPARγ-mRNA und des PPARγ-Proteins. Durch anschließenden PPARγ-‚Knockdown' wird die Runx2-Suppression verhindert. In der Kokultur findet keine vermehrte Apoptose in Osteoblasten statt (Liu LF et al., 2010).

Jeon et al. beschrieben 2003, dass durch PPARγ-Aktivierung eine Reduktion der Transkriptionsaktivität des Runx2-Promotors und somit eine Suppression der Runx2-mRNA erfolgt. Des Weiteren wird die Runx2-Transkriptionsaktivität gehemmt, sodass durch vermindertes Ablesen zum Beispiel des Osteokalzinpromotors eine Reduktion der Osteokalzin-mRNA stattfindet (Jeon et al., 2003; Liu LF et al., 2010). Eine direkte Hemmung der Runx2-Expression durch PPARγ ist demnach beschrieben. Über den Einfluss des Runx2 auf PPARγ und den Ort der Interaktion ist bislang nur wenig bekannt.

1.3.3 Osterix (OSX)

Osterix, auch bekannt als SP7, ist ein Zinkfinger-Transkriptionsfaktor, der von Osteoblasten exprimiert wird und für die Differenzierung von Präosteoblasten in reife Osteoblasten erforderlich ist (Nakashima et al., 2002). Osterix-‚Knockout'-Mäuse sterben bei der Geburt, weil ihnen größtenteils mineralisierter Knochen fehlt. Ihre mesenchymalen Stammzellen können sich aber zu Chondrozyten differenzieren, wodurch in Bereichen chondraler Ossifikation minimal mineralisierte Regionen entstehen können (Nakashima et al., 2002). Osterix aktiviert den Kollagen-IA1-Promotor (Koga et al., 2005) und inhibiert den ‚Canonical Wnt'-Signalpfad, sowie konsekutiv die osteoblastäre Proliferation (Zhang et al., 2008).

OSX und Runx2 beeinflussen einander positiv. Die Mechanismen dieser Induktionen sind bislang jedoch weitestgehend unbekannt (Celil et al., 2005; Nakashima et al., 2002; Tai et al., 2004). Ebenso sind Details über die Regulation und Funktion von Osterix nur unvollständig verstanden.

1.3.4 Osteokalzin (OC)

Osteokalzin ist ein γ-carboxyliertes Protein, das etwa 10 bis 20% aller nicht-kollagenen Proteine im Knochen ausmacht. Seine Expression ist weitestgehend auf Osteoblasten beschränkt (McKee et al., 1992). Die Regulation erfolgt systemisch durch Hormone wie z.B. 1,25-Dihydroxy-Vitamin D und gewebsspezifisch (Ducy et al., 1997). Die Funktion des Osteokalzins ist abhängig von seinem Karboxylierungszustand. Karboxyliert ist es biologisch

inaktiv, bindet an freies Kalzium und kalziumhaltige Oberflächen und hat eine hohe Affinität zum Knochen (Bugel, 2008; Hauschka et al., 1989). Unterkarboxyliert ist es biologisch aktiv und besitzt hormonale Charakteristika. Zu diesen zählen die Zellspezifität des Osteokalzin-Gens, die Sekretion in zirkadianer Rhythmik und die Synthese als Prä-Pro-Molekül (Hauschka et al., 1989). Osteokalzin spielt eine Hauptrolle in der Regulierung des Energiemetabolismus. Es führt zu einem Anstieg der Betazell-Proliferation, der Insulinsekretion und -Sensitivität und des Energieverbrauchs (Lee NK et al., 2007). Des Weiteren wird Osteokalzin durch Osteoblasten in der Phase der Matrixmineralisation und damit relativ spät in der osteoblastären Differenzierung synthetisiert (Viereck et al., 2002). Das Serum-Osteokalzin stellt einen spezifischen Marker der Knochenbildung (Brown et al., 1984) bzw. des Knochenumsatzes dar (Delmas et al., 1983). In seinem Promotor befinden sich zwei ‚osteoblast-specific elements' (OSE): OSE1 und OSE2, wobei Letzteres die Runx2-bindende Promotorsequenz des Osteokalzingens darstellt (Ducy et al., 1997) und heute als Runx2-Konsensus-Sequenz bezeichnet wird. Die Runx2-Bindung in diesem Bereich führt zur Promotorinduktion des OC-Gen.

1.3.5 Knochenspezifische Alkalische Phosphatase (BAP)

Die Alkalische Phosphatase ist ein ubiquitär vorkommendes, membranständiges Enzym, dessen Isoenzyme in verschiedenen Geweben nachgewiesen werden können. Bei der knochenspezifischen Isoform (BAP) handelt es sich um ein Glykoprotein, das auf der Zelloberfläche der Osteoblasten zu finden ist (Swaminathan, 2001). Die Aktivität der BAP lässt sich im Serum messen und ist unter physiologischen Bedingungen während der Mineralisation des Knochens maximal (Wennberg et al., 2000). Pathologisch erhöhte Serumkonzentrationen sind mit einem erhöhten Knochenumsatz assoziiert, beispielsweise bei postmenopausaler Osteoporose oder metastasierenden Tumoren. Bei homozygoten AP-‚Knockout'-Mäusen bleibt die Mineralisation des Knochens aus, obwohl sich die Osteoblasten normal differenzierten (Wennberg et al., 2000). Daraus lässt sich schließen, dass die BAP eine wichtige Rolle in der Kalzifikation der Knochenmatrix einnimmt (Golub et al., 1992). BAP wird als hochspezifischer Marker für die knochenbildende Aktivität der Osteoblasten betrachtet und gilt als früher osteoblastärer Marker (Dresner-Pollak et al., 1996; Okazaki et al., 1999; Siggelkow et al., 1999b). Ihre Expression folgt einem charakteristischen Verlauf während der osteoblastären Entwicklung und stellt somit einen Marker der Osteoblastendifferenzierung dar (Liu LF et al., 2010; Siggelkow et al., 2004).

1.3.6 Adipozytäres Protein 2 (aP2)

Das adipozytäre Protein 2 gehört zur Gruppe der ‚fatty acid-binding proteins' (FABP). Diese Gruppe umfasst etwa 14 bis 15 Kilodalton große Proteine, die Lipidantworten in Zellen koordinieren (Furuhashi and Hotamisligil, 2008). Sie binden mit hoher Affinität reversibel an hydrophobische Liganden wie gesättigte und ungesättigte Fettsäuren und ermöglichen somit ihren Transport in den Nukleus oder zu anderen spezifischen Kompartimenten der Zelle (Furuhashi and Hotamisligil, 2008). Dort erleichtern sie die Bindung der Liganden an ihren nukleären Rezeptor und steigern zudem dessen Transkriptionsaktivität an den Zielgenen. FABPs agieren auf diesem Wege als Übermittler der Transkriptionsregulierung durch Lipide.
FABP4, auch bekannt als aP2, wird von Adipozyten und Makrophagen exprimiert und gilt als später adipozytärer Marker (Gregoire et al., 1998; Nuttall et al., 1998). Es besitzt einen signifikanten Einfluss auf das metabolische Syndrom, bei dem die vier folgenden Aspekte häufig aufeinandertreffen: stammbetonte Adipositas, Dyslipoproteinämie, essentielle Hypertonie und Glukosetoleranzstörung. Insbesondere in Letztere und in deren Verknüpfung mit der Adipositas greift aP2 in wichtigem Grade ein. Zu dieser Erkenntnis gelangten Hotamisligil et al. (1996), da diese in einem aP2-defizienten Mausmodell weniger Hyperinsulinämie und weniger Insulinresistenz bei adipösen, nicht jedoch bei schlanken Mäusen feststellten (Hotamisligil et al., 1996). Des Weiteren fanden Furuhashi et al. (2007) in einem kleinmolekularen aP2-Inhibitor einen effektiven Wirkstoff gegen stark ausgeprägte Arteriosklerose und Diabetes mellitus Typ II in Mausmodellen. Es ist also anzunehmen, dass die aP2-Funktion einen wichtigen Ansatzpunkt in der Entwicklung neuer Therapien gegen Insulinresistenz, Diabetes mellitus und Arteriosklerose bilden wird (Furuhashi et al., 2007).

1.3.7 Lipoproteinlipase (LPL)

Die Lipoproteinlipase wird von Adipozyten, skelettalen wie kardialen Muskelzellen und Makrophagen sezerniert und spielt eine wichtige Rolle im Lipoproteinstoffwechsel. Sie unterstützt durch Hydrolysierung von Triglyzeriden und Konversion von Triglyzerid-reichem ‚very low-density lipoprotein' (VLDL) zu Cholesterol-reichem ‚low-density lipoprotein' (LDL) die Freisetzung von Fettsäuren (Russell, 1992). Diese werden anschließend in metabolisch aktiven Geweben wie Leber und Muskel verstoffwechselt oder in Adipozyten gespeichert. Defekte dieses Proteins verursachen die Familiäre Chylomikronämie. Betroffene Patienten leiden an sehr hohen Plasmatriglyzeridwerten, eruptiven Xanthomen, Lipaemia retinalis und Hepatosplenomegalie (Reina et al., 1992). Die LPL dient als Marker der adipogenen Differenzierung, gilt dabei allerdings im Gegensatz zu aP2 als Protein der frühen Differenzierung (Nuttall et al., 1998).

1.3.8 Osteoblastäres Differenzierungsmodell

Rattenosteoblasten durchlaufen nach einem Modell von Owen unter Einfluss von Vitamin-C-Phosphat und β-Glycerolphosphat nacheinander folgende Stadien: Proliferation, Matrixreifung und Mineralisation (Owen et al., 1990). Ein vergleichbares Modell konnte auch für primäre humane Osteoblasten (pHOB) erstellt werden (Owen et al., 1990; Siggelkow et al., 1999a; Siggelkow et al., 2004). Dabei können jedem Stadium charakteristische Genexpressionsmuster zugeteilt werden. Das Proliferationsstadium ist charakterisiert durch die aktive Proliferation der Zellen und die Expression der Gene, die mit der Bildung der extrazellulären Matrix assoziiert sind. Hierzu gehören Prokollagen I, ‚transforming growth factor-β' (TGF-β) und Fibronektin (Owen et al., 1990). Unter den von Owen gewählten Kulturbedingungen schließt sich nach circa 12 Tagen die Matrixreifung an, die durch die Zunahme der AP-Expression und -Enzymaktivität charakterisiert ist. In dieser Zeit erreicht die AP ihr Maximum, wohingegen OC noch nicht signifikant ansteigt. Am Ende der Matrixreifung kommt es zum maximalen Anstieg der OC-Expression, wodurch der Beginn der Mineralisation gekennzeichnet ist. Diese Phase beginnt nach Owen ungefähr an Tag 22 und ist charakterisiert durch hohe Expressionen von OC, ‚Bone Sialoprotein' und Osteopontin (Stein and Lian, 1993). Die Proliferation der pHOB nimmt unter Standardkulturbedingungen mit zunehmender Konfluenz ab, während der Grad der Differenzierung zunimmt (Siggelkow et al., 1999b).

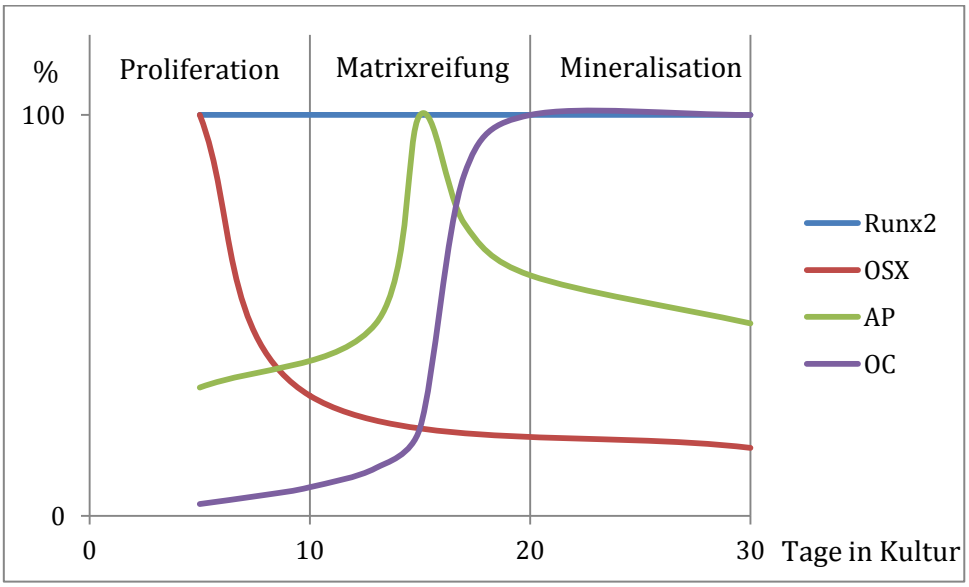

Abbildung 7: Das „osteoblastäre Differenzierungsmodell" modifiziert nach Owen et al. (1990, S. 422), Siggelkow et al. (2004, S.575) und Giesen (2007, S.86).

1.4 Zielsetzung

Die Zielsetzung dieser Arbeit gliederte sich in drei Teile.

Im ersten Abschnitt sollte in der Polymerase-Kettenreaktion die Auswirkung eines Runx2-‚Knockdowns' in pHOB auf die osteogenen Differenzierungsmarker OC, OSX und AP, sowie die adipogenen Differenzierungsmarker PPARγ, aP2 und LPL erfasst werden, um die Rolle des Runx2 im Gleichgewicht zwischen adipogener und osteogener Differenzierung besser zu verstehen.

Im zweiten Abschnitt sollte im ‚Westernblot' die Auswirkung der Runx2-mRNA supprimierenden ‚small-interfering'-Ribonukleinsäure- (siRNA-) Runx2 auf Proteinebene untersucht werden. Bislang erfolgte die Untersuchung der Runx2-Suppression auf Proteinebene durch die siRNA-Runx2 in pHOB-Zellen noch nicht. Dafür sollte der ‚Western-Naßblot' in unserem Labor etabliert werden.

Im dritten Abschnitt sollte in der Polymerase-Kettenreaktion und im Luziferase-Reportergenassay die Interaktion zwischen Runx2 und PPARγ untersucht werden. Insbesondere auf die Lokalisation des Runx2-Einflusses auf PPARγ wurde der Fokus gelegt. Der Luziferase-Reportergenassay sollte hierfür ebenfalls in unserem Labor etabliert werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zellkultur

2.1.1.1 Primäre humane Osteoblasten (pHOB)

Die primären humanen Osteoblasten entstammen dem Knochenmaterial verschiedener Patienten, die sich in der orthopädischen Abteilung des Universitätsklinikums Göttingen (PD Dr. med. Mike Baums) und des Krankenhauses Neu-Mariahilf (Dr. med. Georg J. Manthey) in Göttingen operativen Eingriffen unterzogen haben. Sämtliche Knochenproben bestanden aus spongiösem Material, das aus Femur oder Tibiaplateau entnommen wurde.

Die Patienten willigten schriftlich in die Verwendung des Materials zu Forschungszwecken ein. Der Ethikantrag lag bereits vor (Ethikantrag Nr. 9/5/01 mit dem Studientitel „Etablierung eines humanen Osteoblasten-Zellkulturmodells zur Untersuchung der Differenzierung während der Zeit in Kultur“).

Tabelle 1: Übersicht verwendeter pHOB-Zellen

Patient	Patientenalter	OP-Datum	Operation	Anmerkung
S.R.	62	01.12.2009	Knie-TEP	Gonarthrose
A.S.	76	15.03.2010	Hüft-TEP	
W.V.	72	01.03.2010	Knie-TEP	Gonarthrose
B.S.	60	27.10.2008	Knie-TEP	Gonarthrose

2.1.1.2 ‚Single-cell-derived human mesenchymal stem cell line’ (SCP1)

Die ‚single-cell-derived human mesenchymal stem cell line‘ wurde freundlicherweise durch Herrn Matthias Schieker aus der Abteilung Experimentelle Chirurgie und Regenerative Medizin der Ludwig-Maximilians-Universität München zur Verfügung gestellt (Boker et al., 2008). Es handelt sich hierbei um humane mesenchymale Stammzellen, die durch lentiviralen Gentransfer modifiziert wurden und ektopisch Humane-Telomerase-Reverse-Transkriptase (hTERT) exprimieren.

Nicht transfizierte mesenchymale Stammzellen verlieren bei Zellteilung die an den Chromosomenenden befindlichen Telomere. Nach circa 24 bis 40 Proliferationszyklen kommt es zum Wachstums- und Proliferationsstopp und zum Verlust mesenchymaler Funktionen. Diese beinhalten im Wesentlichen folgende Merkmale: unbegrenzte Proliferationskapazität sowie Differenzierungsmöglichkeiten zu unterschiedlichen Geweben; zu Knochen-, Knorpel-,

Fett- oder Muskelgewebe. Dem Telomer- und damit Funktionsverlust wirkt hTERT entgegen. Diese besteht aus dem ribonukleären Protein-Komplex Telomerase, dessen RNA als telomerische Matrize dient, und aus einer katalytischen Untereinheit mit Reverse-Transkriptase-Aktivität. Die Zellen behalten somit auch nach einigen Replikationszyklen ihren Stammzellcharakter.

Im Gegensatz zum Einsatz retroviraler Vektoren findet beim Einsatz lentiviraler Vektoren keine maligne Transformation der mesenchymalen Stammzellen in vitro statt.

Tabelle 2: Reagenzien zur Nährmediumherstellung

Reagenz	**Hersteller**
Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM)	PAA, Pasching
Modified eagle's medium (MEM) alpha	PAA, Pasching
FCS (Fötales Kälberserum)	PAA, Pasching
L-Glutamin-Lösung (200mM)	Gibco BRL, Cölbe
Penicillin/Streptomycin-Fertiglösung (Pen./Strep.-Lösung)	Gibco BRL, Cölbe

Tabelle 3: Nährmediumherstellung

pHOB-Nährmedium	500 ml DMEM + 50 ml FCS + 5 ml Pen./Strep.-Lösung (10.000 units/ml) + 5 ml L-Glutamin-Lösung (200 mM)
SCP1-Nährmedium	500 ml MEMalpha + 50 ml FCS + 5 ml Pen./Strep.-Lösung

Tabelle 4: Reagenzien für die Zellkultur

Reagenzien	**Hersteller**
OptiMEM (serumfreies Medium)	Gibco BRL, Cölbe
PBS (- CaCl2, - MgCl2)	PAA, Pasching
Trypsin-EDTA-Lösung	Gibco BRL, Cölbe
Trypanblau	Serva, Heidelberg
2-Mercaptoethanol	Sigma, Taufkirchen
75% Ethanol	J.T. Backer, Deventer, NL
Kryoröhrchen Nalgene	Nunc, Roskilde, Dänemark
Zellkulturflaschen	Nunc, Roskilde, Dänemark
Stickstofftank	Cryoson, Schöllkrippen

Tabelle 5: Geräte für die Zellkultur

Produkt	Hersteller
Einmalpipetten 10ml, 20 ml	Greiner, Nürtingen
Pipettenspitzen 10µl, 20µl, 100µl, 1.000µl	Biozym, Hessisch-Oldendorf
Neubauer-Zählkammer	Brand, Wertheim
Mikroplatte 6er Wells	Nunc, Roskilde, Dänemark
96-well- Platten	Nunc, Roskilde, Dänemark
Petrischale 9,4 x 1,6cm	Greiner, Nürtingen
Kulturflaschen	Nunc, Roskilde, Dänemark
Falconröhrchen	Becton-Dickinson, Mountain View, USA
Reaktionsgefäß 0,5ml, 1,5ml, 2 ml	Eppendorf, Hamburg
Pasteurpipetten	Brand, Wertheim
Sterilfilter Minisart	Sartorius, Göttingen
Absaugpumpe	Schütt, Göttingen
Mikroskop CK 2 mit Kamera SC 35	Olympus, Tokyo, Japan
Bio-Photometer	Eppendorf, Hamburg
Bunsenbrenner	Schuett, Göttingen
Pipettus	Hirschmann, Eberstadt
CO_2 Incubator MCO- 18 AIC	Sanyo, Loughborough, UK
Sterilbank	Schirp, Bork, Westfalen
Wasserbad	Gebr. Rettberg, Göttingen
Rotixa K	Hettich, Lauenau
Skalpel	Techno cut, Horsham, UK
Zellschaber	Sarstedt, Newton, USA
Fluoreszenzmikroskop	Carl Zeiss, Jena
Minirocker	PeqLab, Erlangen

2.1.2 Stimulationsverfahren

2.1.2.1 Osteogene Stimulation

Tabelle 6: Materialien für die osteogene Stimulation

Reagenz	Hersteller
β-Glycerolphosphat	Sigma, Taufkirchen
Ascorbinsäure-2-Phosphat	Sigma,Taufkirchen
Dexamethason	Sigma, Taufkirchen
1,25-Dihydrocholecalciferol	Hoffmann-La Roche, Grenzach

2.1.2.2 Adipogene Stimulation

Tabelle 7: Materialien für die adipogene Stimulation

Reagenz	Hersteller
Dexamethason	Sigma, Taufkirchen
IBMX (3-Isobutyl-1-methylxanthine)	Sigma, Taufkirchen
Insulin	Berlin-Chemie, Berlin
Troglitazon	Molekulare Onkologie, Göttingen

Tabelle 8: Stimulationsmedien

Osteogenes Stimulationsmedium	300 ml Nährmedium + 10 mM ß-Glycerolphosphat + 10 µM Ascorbinsäure-2-Phosphat + 10 nM Dexamethason + 48 µM 1,25-Dihydroxycholecalciferol
Adipogenes Stimulationsmedium	300 ml Nährmedium + 1µM Dexamethason + 0,5 mM IBMX + 0,2 µM Insulin

2.1.3 Arbeiten mit Bakterien

Zur Herstellung chemisch kompetenter Bakterien wurden Escherichia coli der Linie DH5α hausintern bezogen und genutzt. Diese Bakterien waren zuvor einer Kalziumbehandlung unterzogen worden.

Tabelle 9: Materialien für die Bakterienkultur

Reagenz	Hersteller
Tryptone	AppliChem, Darmstadt
Yeast extract (Hefe)	AppliChem, Darmstadt
NaCl	Merck, Darmstadt
Ampicillin	AppliChem, Darmstadt
50% Glycerol	Sigma, Taufkirchen
LB-Kulturplatten	hausintern bezogen

Tabelle 10: Herstellung des LB- Mediums

Reagenz	Menge
Tryptone	10 g
Yeast extract	5 g
NaCl	10 g
Ampicillin	200 mg
H_2O dest	ad 1.000 ml
pH	7,4

2.1.4 Arbeiten mit Nukleinsäuren

2.1.4.1 Arbeiten mit RNA

2.1.4.1.1 Verwendete siRNAs

Tabelle 11: Verwendete siRNAs

siRNA	Hersteller
siRNA, Runx2 Nr.4	Qiagen, Hilden
siRNA, control (non-silencing)	Qiagen, Hilden

2.1.4.2 Arbeiten mit Desoxyribonukleinsäure (DNA)

2.1.4.2.1 Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Tabelle 12: Materialien für die RT-PCR

Reagenz	Hersteller
5 x First Strand-Buffer	Invitrogen, Karlsruhe
dNTP (0,1µmol/µl);TTP,GTP,CTP,ATP	Roche, Mannheim
DTT (0,1mol/l)	Invitrogen, Karlsruhe
P(dT) 15 – Primer (11 µM)	Roche, Mannheim
RNase-Inhibitor (40U/µl)	Roche, Mannheim
M-MLV(200U/µl)	Invitrogen, Karlsruhe
Thermocycler Primus advanced 96	PeqLab, Erlangen
PCR-Reaktionsgefäße	Biozym, Hessisch-Oldendorf

2.1.4.2.2 ‚Real-Time'-PCR

Tabelle 13: Materialien für die ‚Real-Time'-PCR

Reagenz/Gerät	Hersteller
SYBR Green Master Mix	Applied Biosystems, Carlsbad, USA
Step One Plus Real Time PCR System	Applied Biosystems, Carlsbad, USA
Micro Amp Fast 96-well Reaction Plate	Applied Biosystems, Carlsbad, USA
Optical Adhesive Covers PCR compatible	Applied Biosystems, Carlsbad, USA

Tabelle 14: Verwendete ‚Real-Time'-PCR Primer

Gen	Sequenz	Hersteller
β-Aktin sense β-Aktin antisense	5'- CTG GAA CGG TGA AGG TGA CG -3' 5'- AGT CCT CGG CCA CAT TGT GA -3'	Invitrogen, Karlsruhe
Runx2 sense Runx2 antisense	5'- TTC CAG ACC AGC AGC ACT C -3' 5'- CAG CGT CAA CAC CAT CAT T -3'	Invitrogen, Karlsruhe
OSX sense OSX antisense	5´- GCA GCT AGA AGG GAG TGG TG - 3´ 5´- GCA GGC AGG TGA ACT TCT TC - 3´	Invitrogen, Karlsruhe
OC sense OC antisense	5´- ATG AGA GCC CTC ACA CTC CTC - 3´ 5´- GCC GTA GAA GCG CCG ATA GGC- 3´	Invitrogen, Karlsruhe
AP sense AP antisense	5'- CCA CGT CTT CAC ATT TGG TG- 3' 5'- AGA CTG CGC CTG GTA GTT GT- 3'	Invitrogen, Karlsruhe
PPARγ2 sense PPARγ2 antisense	5´- CTT TTG GTG ACT TTA TGG A- 3´ 5´- CTT GTA GCA GGT TGT CTT- 3´	Invitrogen, Karlsruhe
aP2 sense aP2 antisense	5´- TAC TGG GCC AGG AAT TTG AC- 3´ 5'- GTG GAA GTG ACG CCT TTC AT- 3'	Invitrogen, Karlsruhe
LPL sense LPL antisense	5'- AGT GGC CAA ATA GCA CAT CC -3' 5'- CCG AAA GAT CCA GAA TTC CA-3'	Invitrogen, Karlsruhe

2.1.4.2.3 Plasmidpräparation

Tabelle 15: Materialien für die Plasmidpräparation

Reagenz/Gerät	Hersteller
Ethanol	JT Baker, Deventin, NL
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Endofree Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
Ampicillin	Prothetik, Göttingen
Schüttler	IKA, Staufen

2.1.4.2.4 Verwendete Plasmide bzw. Vektoren

2.1.4.2.4.1 PPARγ-Promotorgen

Das PPARγ-Promotorgen wurde in einen pGL3-Basic Vector eingebaut. Dieser gehört zur Gruppe der pGL3-Luziferase-Reporter-Vektoren und ermöglicht eine quantitative Analyse genexpressionsregulierender Faktoren. Er umfasst in nicht modifiziertem Zustand 4818 Basenpaare (bp). Auf seinem Genom liegen verschiedene Restriktionsstellen, die man sich für die Insertion eines Gens zu Nutze machen kann. In diesem Fall waren zuvor Genabschnitte, die zwischen Kpn I und Xho I liegen, durch einen 587 bp umfassenden, für den PPARγ-Promotor kodierenden Genabschnitt ersetzt worden. Distal davon befindet sich eine für die ‚firefly' (Photinus pyralis)-Luziferase kodierende Region auf dem Vektor. Diese wird nach der Transkription des vorgeschalteten PPARγ-Promotors abgelesen und gibt somit Aufschluss über die Transkriptionsaktivität des PPARγ-Promotorgens an. Luziferase baut unter Chemilumineszenz Luziferin zu Oxyluziferin um, das mithilfe eines Luminometers gemessen

werden kann. Der Vektor enthält des Weiteren ein Ampicillinresistenzgen, das nach Einbau des Vektors in Escherichia coli- (E. coli-) Bakterien als Selektionsmerkmal dient. Transformierte E. coli-Bakterien werden hierbei in ein mit Ampicillin versehenes Medium gegeben. Nur die den Vektor enthaltenden und damit Ampicillin-resistenten Bakterien überleben und proliferieren, während nicht-transformierte Bakterien absterben. Für darauffolgende Versuche entnommene Bakterien enthalten neben der Ampicillinresistenz auch den Rest des Vektors inklusive Reportergen.

2.1.4.2.4.2 PPRE-Gen (PPRE-Luc)

In den pGL3-Basic Vector kann anstatt des PPARγ-Promotors (s. 2.1.4.2.4.1) auch das ‚Peroxisome proliferator-response element' (PPRE) eingebaut werden. Auch in diesem Fall ist das PPRE als Reportergen an das Luziferasegen gekoppelt. Interessant ist dieses Konstrukt, um die Transkriptionsaktivität des PPARγ-Proteins zu erfassen und damit seine Funktionalität zu prüfen.

2.1.4.2.4.3 Runx2-Plasmid

Der ‚Precision Lenti open reading frame' (ORF) Vector der Firma Thermo Scientific ist ein lentivirales Plasmid, das benutzerdefiniert modifiziert werden kann. Es besteht aber anders als bei oben genannten Vektoren keine Kopplung an das Luziferasegen. An seinen ORF-Bereich wurde das Runx2-Gen eingefügt. Dadurch führt die Transfektion des Plasmids in einer Zelle zur ektopischen, nicht adäquat durch endogene Regulationsmechanismen beeinflussbaren Runx2-Produktion und damit zur Runx2-Überexpression. Das Plasmid besitzt den antibiotischen Selektionsmarker Ampicillin und zusätzlich den Fluoreszenzmarker TurboGFP, der zur Bestimmung der Transfektionseffizienz benutzt werden kann. Runx2-Gen, Fluoreszenzmarker und Selektionsmarker werden durch nur einen gemeinsamen Promotor reguliert, sodass das Vorkommen einer der genannten Komponenten mit dem Vorkommen der beiden anderen Komponenten einhergeht. Das Plasmid wurde schon mit eingefügtem Runx2-Gen von ABgene, United Kingdom bezogen.

Tabelle 16: Verwendete Plasmide

Plasmid	Hersteller/zur Verfügung gestellt von
pGL3-Basic Vector PPARγ Promotor	Klinische Pharmakologie, UMG
pGL3-Basic Vector PPRE	Klinische Pharmakologie, UMG
Precision LentiORF mit Runx2-Gen	ABgene, United Kingdom

2.1.4.2.5 Restriktionsverdau

Tabelle 17: Materialien für den Restriktionsverdau

Produkt	Hersteller
Tango Puffer	Fermentas, St. Leon-Rot
HIND III	Fermentas, St. Leon-Rot
XBA 1	Fermentas, St. Leon-Rot

2.1.4.2.6 Agarosegelelektrophorese

Tabelle 18: Materialien für die Agarosegelelektrophorese

Reagenz/Gerät	Hersteller
Tris Base	Roth, Karlsruhe
Borsäure	Sigma, Taufkirchen
EDTA (0,5M)	Gibco BRL, Cölbe
Agarose	Biozym, Hessisch-Oldendorf
Ethidiumbromid	Sigma, Taufkirchen
DNA-Längenstandard	Invitrogen, Karlsruhe
Saccharose	Merck, Darmstadt
Harnstoff	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Sigma, Taufkirchen
Spannungsgerät	Bio RAD, München
Elektrophoresekammer	Bio RAD, München
Mikrowelle Micromat	AEG, Winnenden
GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder	Fermentas international

Tabelle 19: Herstellung des Agarosegels und des Auftragspuffers

20 x TBE- Puffer:	Auftragspuffer:
216 g Tris 110 g Borsäure 40 ml 0,5M EDTA ad 400 ml H_2Odest. pH 8 – 8,2 (HCl) ad 1.000 ml H_2Odest.	21 g Harnstoff 25 g Saccharose 100µl 0,5M EDTA 0,05g Bromphenolblau

2.1.4.2.7 Transfektion mit Lipofektamin

Tabelle 20: Materialien für die Lipofektamintransfektion

Reagenz	Hersteller
Lipofektamin 2000	Invitrogen, Karlsruhe
Plus Reagent	Invitrogen, Karlsruhe
Opti MEM	Gibco, Cölbe

2.1.4.2.8 Luziferase-Reportergenassay

Tabelle 21: Materialien für den Luziferase-Reportergenassay

Reagenz/Gerät	Hersteller
TRIS	Roth, Karlsruhe
HCl	Roth, Karlsruhe
NaCl	Merck, Darmstadt
EDTA	Sigma, Deisenhofen
Dikaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4)	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck, Darmstadt
PBS	PAA, Pasching
DTT	Sigma, Deisenhofen
Stickstoff, flüssig	hausintern bezogen
Glycylglycin	AppliChem, Darmstadt
Magnesiumsulfat ($MgSO_4$)	Merck, Darmstadt
EGTA	Sigma, Deisenhofen
D-Luziferin-Na-Salt	p.j.k., Kleinblittersdorf
ATP	p.j.k., Kleinblittersdorf
Luminometerröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
Luminometer Auto-Lumat LB 953	Berthold Technologies, Bad Wildbad
GFP	Pharmakologie Uni Göttingen
Fluorometer Fusion™	Canberra-Packard, Dreieich

Tabelle 22: Herstellung des Kratzpuffers

Kratzpuffer	
TRIS/HCl (pH 7,5)	40 mM
NaCl	150 mM
EDTA (pH 8,0)	1 mM

Tabelle 23: Herstellung des Kaliumphosphatpuffers

Kaliumphosphatpuffer (pH 7,8)	
K_2HPO_4	100mM
KH_2PO_4	100mM

Tabelle 24: Herstellung des Glycylglycin-Puffers

Glycylglycin- Puffer	
Glycylglycin (pH 7,8)	25 mM
$MgSO_4$	15 mM
EGTA (pH 8,0)	4 mM

Tabelle 25: Herstellung der Luziferin-Stammlösung

Luziferin- Stammlösung	
DTT	10 mM
Luziferin	1 mM
Glycylglycin-Puffer	in 180 ml

Tabelle 26: Herstellung des Luziferase-Assay-Mix

Luziferase-Assay-Mix	
Kaliumphosphatpuffer	16,5 mM
Glycylglycin-Puffer	82,4% (v/v)
DTT	1,1 mM
ATP	2,2 mM

Tabelle 27: Herstellung des Luziferin-Mix

Luziferin-Mix	
Luziferin	1 mM
DTT	10 mM
Glycylglycinpuffer	in 7 ml

Der Luziferin-Mix wird eisgekühlt und lichtgeschützt hergestellt und bis zur Verwendung aufbewahrt.

2.1.5 Arbeiten mit Proteinen

2.1.5.1 Proteinvorbereitung für den ‚Westernblot'

Tabelle 28: Materialien für die Proteinvorbereitung

Reagenz/Gerät	**Hersteller**
Bovines Serumalbumin	Invitrogen, Karlsruhe
Bio-Photometer	Eppendorf, Hamburg
Hepes	Sigma, Taufkirchen
NaCl	Merck, Darmstadt
$MgCl_2$	Merck, Darmstadt
EGTA	Sigma, Taufkirchen
Glycerin	Merck, Darmstadt
NP-40	Sigma, Taufkirchen
Proteaseinhibitor	Roche, Mannheim

Tabelle 29: Herstellung des Lysepuffers

Reagenz	**Konzentration**
Hepes pH 7,5	50 mM
NaCl	150 mM
$MgCl_2$	1,5 mM
EGTA	1 mM
Glycerin	10%
NP-40	0,50%
Proteaseinhibitor	1 Tablette
	ad 10 ml H_2O

2.1.5.2 ‚Westernblot'

Tabelle 30: Materialien für den ‚Westernblot'

Reagenz/Produkt	Hersteller
Ampuwa, H_2O dest.	Fresenius, Bad Homburg
NuPage LDS Sample Buffer	Invitrogen, Karlsruhe
DTT (0,1 mol/l)	Invitrogen, Karlsruhe
2-Mercaptoethanol	Sigma, Taufkirchen
NuPage Gel	Invitrogen, Karlsruhe
Laufpuffer	Invitrogen, Karlsruhe
ColorPlus Prestained Protein Ladder	New England BioLabs, Ipswich, MA
Gelelektrophoresekammer	Invitrogen, Karlsruhe
Schwämme	Invitrogen, Karlsruhe
Wardman-Papier	omnilab, Bremen
Nitrozellulosemembran	GE Healthcare, München
Blotkammer (1.Methode)	Invitrogen, Karlsruhe
Transferpuffer 1.Methode)	Invitrogen, Karlsruhe
Blotkammer (2.Methode)	Bio-Rad, München
Blotpuffer (2.Methode)	Bio-Rad, München
Magermilchpulver	Roth, Karlsruhe
Primärantikörper Runx2 M70, sc 10758	Santa Cruz, Heidelberg
Sekundärantikörper Runx2 anti-rabbit	Dako, Hamburg
Primärantikörper PPARγ E8, sc 7273	Santa Cruz, Heidelberg
Sekundärantikörper PPARγ anti-mouse	Dako, Hamburg
Primärantikörper β-Aktin, A5441	Sigma, Taufkirchen
Sekundärantikörper β-Aktin anti-mouse	Dako, Hamburg
Ponceau S	AppliChem, Darmstadt
Amersham ECL Plus Detection Solution	GE Healthcare, München
Röntgenkassette	Intas, Göttingen
Röntgenfilm	Konica Minolta, Langenhagen
Medical Film Processor SRX 101A	Konica Minolta, Langenhagen
Tween 20	Sigma, Taufkirchen
GFP	Hausintern bezogen
RLT-Puffer (aus RNeasy mini Kit)	Qiagen, Hilden
Re Blot Plus Strong Lösung	Millipore Californien

Tabelle 31: Verdünnung der ‚Westernblot'-Antikörper

Primärantikörper	Verdünnung	Sekundärantikörper	Verdünnung
Runx2 M70	1:100	Runx2 anti-rabbit	1:2.000
PPARγ E8	1:50	PPARγ anti-mouse	1:2.000
Anti-β-Aktin	1:5.000	β-Aktin anti-mouse	1:2.000

Tabelle 32: Herstellung des TBS-T

TBS-T Puffer	
TRIS HCl	24,2 g/l
NaCl	87,6 g/l
pH	auf 7,5 einstellen, anschließend
Tween	5 ml dazugeben

2.1.5.3 Image-J-Densitometrie

Tabelle 33: Materialien für die Image-J-Densitometrie

Produkt	**Hersteller**
Scanner DCP-7030	Brother, Bad Vilbel
Image-J-Densitometrie	http://lukemiller.org/index.php/2010/11/ analyzing-gels-and-western-blots-with-image-j/

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Primäre humane Osteoblasten (pHOB)

Primäre humane Osteoblasten wurden wie bei Siggelkow et al. beschrieben aus Knochenfragmenten gewonnen (Siggelkow et al., 1999a). Nach Entnahme aus dem Operationsgebiet wurden diese sofort steril in 0,9% NaCl-Lösung eingelegt und anschließend bei 4°C gekühlt. Innerhalb von 24 Stunden wurden sie aufgearbeitet und kultiviert.

Durch eine sterile Pinzette und ein steriles Skalpell wurde die Knochenprobe von kortikalem Gewebe und Fettgewebe befreit. Nach Zerkleinerung des übrig gebliebenen spongiösen Knochenmaterials in ca. 1 mm^3 Knochenstücke wurden diese mehrfach mit PBS gewaschen, um anhaftende Blutbestandteile zu entfernen. Zehn bis zwölf dieser Knochenfragmente wurden nun in Gewebekulturschalen gegeben und jeweils mit 3 ml pHOB-Nährmedium bedeckt.

2.2.1.2 ‚Single-cell-derived human mesenchymal stem cell line' (SCP1)

Die SCP1-Zellen wurden bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und mithilfe des Nährmediums ‚modified eagle's medium alpha' (MEMalpha) in Kultur genommen.

2.2.1.3 Kultivierung der Zellen

Die in dieser Promotionsarbeit verwendeten Zellen wurden bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO_2 im Brutschrank kultiviert. Zweimal wöchentlich wurden etwa zwei Drittel des verbrauchten Mediums abgesaugt und je nach Zelllinie durch frisches pHOB-Nährmedium bzw. MEMalpha ersetzt. Es wurde darauf geachtet, die Zellen beim Einfüllen des neuen

Mediums nicht aufzuwirbeln. Im Folgenden wird die Kultivierung von Zellen häufig als ‚basale Kulturbedingungen' bzw. ‚Standardkulturbedingungen' bezeichnet.

2.2.1.4 Ablösung der Zellen durch Trypsin

Nach Absaugen des Zellkulturmediums wurden die adhärenten Zellen mit ca. 8 ml PBS gewaschen. Es folgte die Inkubation im Brutschrank mit 2 ml Trypsin für 3 bis 5 Minuten (min) und anschließend die Überführung in ein 15 ml Falconröhrchen durch Zugabe von 8 ml Medium. Bei 1400 UpM wurden die Zellen 5 Min zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in 3 ml pHOB-Medium resuspendiert und nach Lebendzellzahlbestimmung mit einer versuchsabhängigen Zellzahl auf die Kultur-Platten ausgesät.

2.2.1.5 Lebendzellzahlbestimmung

Für die Bestimmung der Anzahl vitaler Zellen in einer Zellsuspension wurden 10 µl der Zellsuspension mit 10 µl 0,5% Trypanblau-Lösung gemischt. Hiervon wurden 10 µl in eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Zur Erfassung der vitalen Zellen wurden nur die ungefärbten Zellen gezählt, da sich vitale Zellen nicht durch Trypanblau anfärben lassen.

2.2.1.6 Einfrieren von Zellen

Nach Abtrypsinierung der Zellen erfolgte die Resuspension des Zellpellets in 1,8 ml Einfriermedium und deren Überführung in Kryoröhrchen. Diese Röhrchen wurden für 2 bis 3 Tage in ein mit Isopropanol gefülltes Einfriergefäß gestellt und bei -70°C gelagert. Anschließend wurden sie in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

2.2.1.7 Auftauen von Zellen

Die mit Zellen versehenen Kryoröhrchen wurden im Wasserbad bei 37°C erwärmt, in 8 ml Medium überführt und abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in Medium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt.

2.2.2 Stimulationsverfahren

2.2.2.1 Osteogene Stimulation

Die osteogene Stimulation erfolgte durch Ascorbinsäure-2-Phosphat (Vitamin C), 1,25-Dihydrocholecalciferol (Vitamin D_3), β-Glycerolphosphat und Dexamethason. Vitamin C erhöht extrazelluläre Matrixproteine wie Kollagen Typ1 und Osteokalzin (Urban et al., 2012). Vitamin D_3 erhöht die Runx2- und Osteokalzin-Genexpression in pHOB (Siggelkow et al., 1999b; Siggelkow et al., 2004; Viereck et al., 2002). β-Glycerolphosphat induziert in

knochenbildenden Zellen die Mineralisierung und wird vermutlich durch AP hydrolysiert (Chung et al., 1992; Tenenbaum et al., 1992). Glukokortikoide unterstützen die Knochenresorption und führen zur Suppression osteoblastenspezifischer Marker (Delany et al., 1994). Paradoxerweise aber besitzen sie ebenfalls einen stimulierenden Effekt auf die Osteogenese, da sich humane Knochenmarkszellen unter Dexamethasoneinfluss osteoblastär differenzieren. pHOB exprimieren nach 24-stündiger Dexamethasonstimulation mehr Runx2, aber weniger Osteokalzin (Viereck et al., 2002).

Unter Zugabe des im Materialteil aufgeführten osteogenen Stimulationsmediums erfolgte die Stimulation im Brutschrank bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO_2-Anteil (Siggelkow et al. 1999a). Zweimal wöchentlich wurde das Stimulationsmedium ausgetauscht. Für die anschließende Transfektion wurde das Stimulationsmedium durch das Transfektionsmedium OptiMEM ersetzt.

2.2.2.2 Adipogene Stimulation

Die adipogene Stimulation erfolgte durch Dexamethason, Insulin und Isobutylmethylxanthin (IBMX). Dexamethason besitzt als Glukokortikoid einen paradoxen Einfluss auf den Knochenhaushalt (s. 2.2.2.1). Insulin ist ein Peptidhormon, das in Zusammenhang mit dem Phosphodiesterasehemmer IBMX und Dexamethason über eine PPARγ2- und C/EBPα-Induktion die adipogene Differenzierung fördert (Ding et al., 2003; Nuttall et al., 1998; Prichett et al., 2000).

Unter Zugabe des im Materialteil aufgeführten adipogenen Stimulationsmediums (ggf. plus 10 µM Troglitazon) erfolgte die Stimulation im Brutschrank bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO_2-Anteil. Zweimal wöchentlich wurde das Stimulationsmedium ausgetauscht. Für die anschließende Transfektion wurde das Stimulationsmedium durch das Transfektionsmedium OptiMEM ersetzt.

2.2.3 Arbeiten mit Bakterien

2.2.3.1 Transformation chemisch kompetenter DH5 α-E.-coli-Bakterien

100 µl kalziumbehandelte DH5α-Bakterien wurden langsam aufgetaut. Nach Zugabe von 50 ng Plasmid-DNA erfolgte eine 30-minütige Inkubation auf Eis. Anschließend wurde der Ansatz bei 42°C 2 min einem Wärmeschock ausgesetzt und sofort für weitere 20 min auf Eis gelagert. Nach Zugabe von 300 µl LB-Medium wurde der Ansatz für 30 min bei 37°C in das Schüttelbad gestellt. 200 µl der Suspension wurden auf einer auf 37°C vorgewärmten LB/Ampicillin-Agarplatte ausgestrichen. Die Platten inkubierten bei 37°C über Nacht im

Brutschrank. Am nächsten Morgen wurde pro Agarplatte eine gewachsene Kolonie in 5 ml LB-Medium mit 1 µl Selektionsantibiotikum Ampicillin/ml Medium bei 37°C und etwa 300 UpM 8 bis 16 Stunden im Schüttelinkubator kultiviert. Aus diesen Vorkulturen wurden die Plasmide durch Maxi-Präparationen am folgenden Tag isoliert.

2.2.4 Arbeiten mit Nukleinsäuren

2.2.4.1 Arbeiten mit RNA

2.2.4.1.1 RNA-/Protein-Isolierung anhand des AllPrep-RNA/Protein-Kits

Die Isolierung von RNA und Protein aus kultivierten Zellen ist eine Standardmethode und wurde mithilfe des AllPrep-RNA/Protein-Kits von Qiagen durchgeführt. Die Methode umfasst folgende Schritte: Probenlyse, RNA- und Proteinisolierung. Die Probenlyse erfolgt mithilfe eines APL-Puffers, der Protein und RNA vor Ab- und Umbau schützt. Durch spezifische Bindung der RNA an eine in der AllPrep-Spin-Säule befindliche Silika-Gel-Membran kann diese von Proteinen und weiteren Zellbestandteilen getrennt werden. Die Aufreinigung der Proteine gelingt mittels einer Protein-Cleanup-Spin-Säule. Die Benutzung des Qiagenproduktes wurde exakt nach Anweisung des Herstellers durchgeführt. Protein und RNA wurden bei -80°C gelagert.

2.2.4.1.2 RNA-Isolierung anhand des RNeasy-Micro-Kits

Die reine RNA-Isolierung erfolgte anhand des RNeasy-Micro-Kit von Qiagen. Durch spezifische Bindung der RNA an eine in der mitgelieferten RNeasy-Spin-Säule befindlichen Silika-Gel-Membran konnte diese von Proteinen, genomischer DNA und sonstiger Verunreinigung gesäubert werden. Die Benutzung des Qiagenproduktes befolgte exakt das Handbuch des Herstellers. Im letzten Schritt erfolgte die Eluation der RNA in RNase-freiem Wasser. Darin wurde die RNA-Konzentration mittels Photometrie bestimmt. Die RNA wurde bei -80°C gelagert.

2.2.4.1.3 Photometrische mRNA-Konzentrationsmessung

Nach Verdünnung der RNA-Suspension mit Ampuwa im Verhältnis 1:50 erfolgte die RNA-Messung im Eppendorf Bio-Photometer bei 230, 260 und 280 nm Wellenlänge.

2.2.4.2 Arbeiten mit DNA

2.2.4.2.1 Reverse-Transkriptase-PCR

Während der Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion wird die Gesamt-RNA einer Zellpopulation mithilfe der M-MLV Reverse Transkriptase und oligo (dt) Primern in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Die Reverse-Transkriptase-PCR stellt ein Standardverfahren dar.

Für die reverse Transkription wurden 150 ng RNA entsprechend der jeweiligen Konzentration mit destilliertem Wasser auf 10 µl Gesamtvolumen gemischt und 10 min bei 60°C inkubiert. Der Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

8 µl 5x First Strand Buffer
8 µl dNTP
8 µl oligo (dt) 15 Primer
4 µl DTT
2 µl MMLV
0,5 µl RNase-Inhibitor

Dieser Ansatz wurde anschließend im Thermo-Cycler mithilfe des folgenden Programms amplifiziert:

Zeit (min)	Temperatur (°C)
60	38
10	72
∞	4

2.2.4.2.2 ‚Real-Time'-PCR

Die ‚Real-Time'-Polymerase-Kettenreaktion ist eine Standardmethode, um DNA-Abschnitte einer DNA-Sequenz selektiv zu amplifizieren. Ein PCR-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

4,5 µl sybr Mix
2,5 µl steriles Wasser
1,0 µl sense primer
1,0 µl antisense primer

9 µl dieses Ansatzes wurden mit 1 µl c-DNA in jedes Well gegeben.

Der Ansatz inkubierte nach folgendem Temperaturschema im PCR-Cycler:

Zeit (sec)	Temperatur (°C)	Zyklen
20	95	
3	95	40
30	60	

Es wurden jeweils 40 Amplifikationszyklen durchlaufen. Anschließend wurde eine Schmelzkurve für jeden Primer nach folgendem Schema erstellt:

Zeit (sec)	Temperatur (°C)
15	95
60	60
15	95

Diese Schmelzkurve dient der Überprüfung der korrekten Amplifikation. Optimalerweise entsteht ein Temperaturpeak, der sich je nach Primer ungefähr zwischen 75°C und 85°C befindet.
Als ‚Housekeeping'-Gen wurde β-Aktin verwendet.

2.2.4.2.3 Auswertung der ‚Real-Time'-PCR

Bei der relativen Quantifizierung der ‚Real-Time'-PCR wird der ‚cycle-threshold' (CT)-Wert eines zu untersuchenden Gens mit dem ‚Housekeeping'-Gen β-Aktin in Bezug gesetzt. Dabei wird die Differenz der CT-Werte von Zielgen und ‚Housekeeping'-Gen (ΔCT) gebildet und in folgende arithmetische Formel eingesetzt:

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

Die Ratio ist dann die Expression des Zielgens in Relation zum ‚Housekeeping'-Gen. Die Ratios der Proben wurden entsprechend der oben aufgeführten Formel berechnet. Bei Mehrfachansätzen innerhalb der Versuche wurden zunächst Mittelwert und Standardfehler der einzelnen Ergebnisse berechnet.

2.2.4.2.4 Statistik

Zur statistischen Auswertung wurde das Programm GraphPadPrism 4.0 verwendet. Die erhaltenen Daten wurden dem Man-Whitney-Test unterzogen. Dieser ist ein nichtparametrischer t-Test und vergleicht zwei ungepaarte Gruppen miteinander. Der resultierende p-Wert gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der eine zufällige Probe wieder in dem beobachteten Bereich liegt. Ist der p-Wert kleiner als 0,05, sind weniger als 5% der Ergebnisse zufallsbedingt und man spricht von einer statistischen Signifikanz. Bei einem

Wert kleiner als 0,01 spricht man von einer hohen statistischen Signifikanz. Ein p-Wert kleiner als 0,1 wird als Tendenz eingestuft.

2.2.4.2.5 Präparation von Plasmid-DNA

Die Plasmidpräparationen des PPRE- und PPARγ-Promotorgens erfolgten anhand des Endofree-Plasmid-Maxi-Kit von Qiagen und wurden genau nach Vorschrift des Herstellers Qiagen unter Verwendung der mitgelieferten Puffer P1, P2, P3, ER, QBT, QC, QN und TE durchgeführt, deren Zusammensetzung vom Hersteller nicht angegeben ist.

200 ml LB-Medium plus 200 µl Ampicillin wurden mit 40 µl der am Vortag angesetzten Bakterienkultur gemischt. Es folgte die Inkubation im Schüttler (300 rpm) bei 37°C für 12 bis 16 Stunden. Nach Resuspension in 10 ml Puffer P1, Zelllyse in 10 ml Puffer P2 und Neutralisation mit 10 ml Puffer P3 wurde die Lösung in eine QIAfilter-Maxi-Filtrationseinheit gefüllt, mit dem mitgelieferten Kolben durch den Filter in ein Auffanggefäß gedrückt und mit 2,5 ml ER-Puffer auf Eis inkubiert. Während der Inkubation wurde eine Qiagen-Tip 500-Säule mit 10 ml QBT Puffer äquilibriert. Das gefilterte Gemisch wurde auf diese Säule gegeben. Durch die Bindung der Plasmid-DNA an den Filter des Qiagen-Tips erfolgte die Trennung von Plasmid-DNA und Lösungsmittel. Nach zweimaligem Waschen mit 30 ml QC-Puffer wurde die DNA in 15 ml QN-Puffer gelöst, 10,5 ml Isopropanol dazugegeben und mit 5 ml 70% Ethanol gewaschen. Endgültig eluiert wurde die DNA in 100 µl TE-Puffer. Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte im Bio-Photometer der Firma Eppendorf. Die DNA wurde bei -20°C gelagert.

2.2.4.2.6 Restriktionsverdau

Der Restriktionsverdau dient der Kontrolle einer Plasmidamplifikation. Zwei Restriktionsendonukleasen können nur dann ein Plasmid in zwei Teile schneiden, wenn dieses die für sie spezifischen Schnittstellen enthält und somit korrekt amplifiziert wurde. In der anschließend durchgeführten Agarosegelelektrophorese werden die zwei in ihrer Basenpaarlänge bekannten Plasmidanteile entsprechend ihrer Größe aufgetrennt und können anhand einer DNA-¸Ladder‘ verifiziert werden.

Zur Optimierung der Reaktionsbedingungen für die Restriktionsenzyme wird Tango Puffer zum Reaktionsansatz gegeben. Die Schnittstelle der Restriktionsendonuklease HIND III befindet sich an der Basenpaarposition 53, der Restriktionsendonuklease XBA I an Position 1742. Beispielsweise gilt für den PPARγ-Promotor enthaltenden, 4916 bp großen pGL3-Vektor, dass durch die Restriktion eine 1689 bp große und eine 3229 bp große Untereinheit entstehen.

Es wurde wie folgt pipettiert:

	PPRE 1	PPRE 2	PPARγ 1	PPARγ 2
Tango Puffer	2 µl	-	2 µl	-
HIND III	1 µl	-	1 µl	-
XBA 1	1µl	-	1µl	-
DNA	1,2 µl	1,2 µl	1 µl	1 µl
H_2O	14,8 µl	18,8 µl	15 µl	19 µl

Weiterhin ermöglicht ein Ampicillinresistenzgen die Selektion der transformierten Bakterienkulturen.

2.2.4.2.7 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese stellt eine Methode zur Auftrennung von DNA-Molekülen unterschiedlicher Größe mithilfe eines elektrischen Feldes dar, die sich die negative Ladung der DNA zu Nutze macht.

Für die Herstellung des Agarosegels wurde eine 1%-ige Lösung aus Agarose und 1x TBE Puffer in der Mikrowelle aufgekocht. Zur Visualisierung der cDNA-Moleküle erfolgte im Anschluss die Zugabe von 3 µl Ethidiumbromid. Die Agaroselösung wurde in Gelform gegossen und in eine mit 1x TBE-Puffer gefüllte Gelelektrophoresekammer gelegt. Es wurden zu jeder Probe 5 µl eines Bromphenolblau enthaltenden Auftragspuffers hinzupipettiert. Bei einer Spannung von 100V wurde für 45 min ein elektrisches Feld erzeugt, sodass die DNA-Moleküle entsprechend ihrer negativen Ladung zum positiven Pol wanderten. Die Wanderungsgeschwindigkeit verhielt sich dabei antiproportional zur Größe der cDNA-Moleküle. Zum Größenvergleich der DNA-Banden wurde eine sogenannte DNA-‚Ladder' benutzt. Die Detektion der cDNA-Banden erfolgte unter UV-Licht durch das im Gel enthaltene Ethidiumbromid.

2.2.4.2.8 Lipofektamintransfektion

Pro 6-well-Platte wurden folgende Ansätze vorbereitet:

Ansatz A	125 µl OptiMEM 4 µl Plus Reagent 1 µl siRNA (soweit nicht anders im Versuch beschrieben)	15 min Inkubation bei RT
Ansatz B	125 µl OptiMEM 5/10 µl Lipofektamin (s. Versuch)	5 min Inkubation bei RT

Die beiden Ansätze wurden anschließend zusammengeführt und inkubierten 15 min bei RT. Nach Zellzahlbestimmung erfolgte die Aussaat der benötigten Zellen auf 6-well Platten. Nach 24 Stunden wurde das Medium entfernt, die Zellen zweimalig mit PBS gewaschen und pro well 1,5 ml OptiMEM dazugegeben. Der vorbereitete Lipofektaminansatz wurde tropfenweise hinzugefügt. Nach 6 Stunden Inkubation im CO_2-Inkubator wurde das Transfektionsmedium entfernt und Kulturmedium dazugeben.

2.2.4.2.9 Luziferase-Reportergenassay

Der Luziferase-Reportergenassay dient der quantitativen Messung der Transkriptionsaktivität eines Reportergens. Das Reportergen wird hierfür mit dem Luziferasegen gekoppelt, sodass bei vorhandener Transkriptionsaktivität an dem Reportergen, beispielweise bei Bindung eines Agonisten, das Enzym Luziferase hergestellt wird. Daraufhin wird dem Testsystem zugegebenes Luziferin unter Chemilumineszenz zu Oxyluziferin umgebaut. Es wird Licht der Wellenlänge 560 nm emittiert, das sich bei Substratüberschuss proportional zur Luziferasemenge verhält und im Luminometer gemessen werden kann. Bei Antagonisierung des Reportergens stellt sich ein Verblassen der Chemilumineszenz ein.

Die Zellernte für den Reportergenassay erfolgte 48 Stunden nach Transfektion. Nach Entfernung des Kulturmediums und anschließendem Waschen in PBS wurden die Zellen in je ca. 1,5 ml Kratzpuffer mithilfe eines Gummispatels aus der Kulturschale gelöst und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß auf Eis überführt. Es folgten Zentrifugation (5 min, 4°C, 5.000 UpM), Entfernung des Überstandes und Resuspension des Sediments in 150 µl kaltem Kaliumphosphatpuffer mit 1 mM DTT. Die Zellen wurden einem Gefrierschock in flüssigem Stickstoff ausgesetzt, anschließend im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und geschüttelt. Dieser Vorgang erfolgte insgesamt dreimal. Danach wurden die Zelltrümmer herunterzentrifugiert (5 min, 4°C, 14.000 UpM). Luziferase- und GFP-Messungen erfolgten im Überstand.

Für den Luziferase-Genassay wurden 368 µl Luziferase-Assay-Mix mit 50 µl Probe im Luminometerröhrchen gemischt. Die Messung der Proben erfolgte im Luminometer vor und 20 sec nach automatisierter Zugabe von 200 µl Luziferin-Lösung. Das Luminometer gab die Ergebnisse in Relativen Lichteinheiten (RLU) an.

2.2.4.2.10 Quantitativer Nachweis der GFP-Reportergen-Aktivität

Zur Bestimmung der Transfektionseffizienz bei Durchführung des Luziferase-Genassays wurden die Zellen mit dem für ‚green fluorescent protein‘ (GFP) kodierenden Plasmid CMV-pGFPtpz kotransfiziert. GFP ist ein Protein, das bei Anregung durch Licht einer bestimmten

Wellenlänge fluoresziert und somit detektiert werden kann. Die Fluoreszenz korreliert hierbei mit der Menge des GFP und schließlich mit dem Transfektionserfolg.
Es wurden je 50 µl Zellextrakt in eine 96-well Schale gegeben und im computergesteuerten Fluorometer gemessen. Die Proben wurden mit einer Wellenlänge von 485 nm angeregt und die Fluoreszenz wurde bei 530 nm für 1 sec bei einer Signalverstärkung von 110 Volt (V) gemessen. Die Quantität der Fluoreszenz wurde in Relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU) angegeben.

2.2.5 Arbeiten mit Proteinen

2.2.5.1 Protein-Isolierung adhärenter Zellen

Nach Entfernung von Medium und Knochenfragmenten wurden die Zellen in PBS gewaschen, anschließend in 400 µl 60°C heißem Lysepuffer durch einen Zellschaber aus der Petrischale gelöst und in ein E-Cup überführt. Es folgte eine Zentrifugation bei 4°C und 1.400 UpM über 5 min, die 15-minütige Inkubation auf Eis sowie eine erneute Zentrifugation (10 min, 14.000 UpM, 4°C). Die Proteinkonzentration erfolgte im Überstand und wurde anhand der BCA-Methode nach Erstellung einer Standardkurve am Eppendorf Bio-Photometer durchgeführt.

2.2.5.2 Proteinmessung anhand der Bicinchoninsäure (BCA)- Reaktion

Vor Beginn der Proteinbestimmung wurde mittels einer Standardlösung aus bovinem Serumalbumin der Firma Invitrogen eine Standardkurve erstellt. Die Ausgangskonzentration betrug 1 µg/µl. Hieraus wurde eine Verdünnungsreihe im Verhältnis 1:2 mit destilliertem Wasser angesetzt und daraus sechs Standardproben à 50 µl hergestellt.
Nach Isolierung der Proteine aus der Zellkultur wurden je 10 µl der gewonnenen Probe zu je 40 µl destilliertem Wasser gegeben. BCA-Protein-Assay-Reagent A und -Reagent B wurden im Verhältnis 50:1 gemischt, pro Probe 950 µl hiervon mit 50 µl Proteinlösung sorgfältig vermengt und bei 37°C 30 min inkubiert.
Am Eppendorf Bio-Photometer wurden die Standardlösungen und die Proben bei einer Wellenlänge von 562 nm gemessen.

2.2.5.3 Probenvorbereitung

Nach der Proteinisolierung wurde die Proteinlösung entsprechend der jeweiligen Konzentration auf eine Gesamtmenge von 10 µl Flüssigkeit aufgefüllt. Anschließend wurden jeder Probe 10 µl NuPage 4xLDS Sample Buffer und 1M DTT im Verhältnis 1:5 zugeführt. Bei 10-minütiger Inkubation erfolgte die Denaturierung bei 70°C.

2.2.5.4 Invitrogen-Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese ist ein Standardverfahren zur Auftrennung von Proteinen. Entsprechend der Arbeitsanleitung des Herstellers wurde das NuPage Gel für die Invitrogen-Gelelektrophorese vorbereitet. Pro Gel wurden 5 µl Protein-‚Ladder‘ zum Größenvergleich der Proteinbanden in eine separate Tasche hineinpipettiert. Die anderen Taschen wurden mit einer einheitlichen Proteinmenge zwischen 50 und 150 µg befüllt. Bei 100 V erfolgte der Durchlauf der Proben durch das Sammelgel in ca. einer Stunde, der Durchlauf durch das Trenngel erfolgte bei 120 V in ungefähr einer weiteren Stunde.

2.2.5.5 Invitrogen-‚Westernblot’

Der Gelelektrophorese folgt das Aufbringen der auf dem Gel befindlichen Polypeptidbanden auf einen festen Träger, die Nitrozellulosemembran. Das Gel wird direkt auf die Nitrozellulosemembran gelegt und senkrecht zur Laufrichtung des Gels wird eine elektrische Spannung angelegt. Die Proteinbanden gelangen somit aus dem Gel heraus auf die Membran, wo sie gebunden werden. Das Muster der getrennten Proteinbanden bleibt dabei bestehen. Die ‚geblotteten’ Banden können anschließend mithilfe spezifischer Antikörper identifiziert werden.

Entsprechend der Arbeitsanleitung der Firma Invitrogen wurde der ‚Westernblot’ aufgebaut und durchgeführt. Das Blotten erfolgte in einem Zeitraum von zwei Stunden bei 30 V. Zur Überprüfung des ‚Westernblots‘ wurde eine unspezifische Färbung aller Proteinbanden durch Ponceau S durchgeführt.

2.2.5.6 Bio-Rad-‚Westernblot’

Nach Auftrennung der Proteine durch Gelelektrophorese werden die auf dem Gel befindlichen Polypeptidbanden auf einen festen Träger, die Nitrozellulosemembran, gebracht. Durch das Anlegen einer elektrischen Spannung senkrecht zur Laufrichtung des Gels wandern die Proteinbanden aus dem Gel heraus auf die dem Gel anliegende Membran und werden dort gebunden. Das Muster der getrennten Proteinbanden bleibt dabei bestehen. Die ‚geblotteten’ Banden können mithilfe spezifischer Antikörper identifiziert werden. Unspezifisch gebundene Antikörper werden durch Waschen mit Detergenzien-enthaltenden Puffern wieder entfernt.

Gearbeitet wurde mit dem System der Firma Bio-Rad. Der Zusammenbau des sogenannten Gelsandwiches erfolgte strikt der von Bio-Rad beigefügten Anleitung. Hierbei war insbesondere darauf zu achten, dass das Gel auf der Kathodenseite der Membran zum Liegen kommt. Das Blotten erfolgte bei 350 mA über einen Zeitraum von 90 min. Zur Überprüfung

des ‚Westernblots' wurde eine unspezifische Färbung aller Proteinbanden durch Ponceau S durchgeführt.

2.2.5.7 Immunreaktion durch ‚enhanced chemiluminescence' (ECL)

In dieser Promotionsarbeit wurden zur Entfernung unspezifisch bindender Antikörper 5% Magermilchpulver in TBS-T als Detergenzien-enthaltende Pufferlösung eingesetzt. Der etwa einstündigen Inkubation in dieser Lösung bei RT folgte das Einlegen der Nitrozellulosemembran über Nacht bei 4°C im 1:100 durch 5%-Milch-TBS-T-Lösung verdünnten Primärantikörper.

Anschließend wurde die Membran zweimal kurz mit PBS und zweimal 10 min in 5%-Milch-TBS-T gewaschen. Die Verdünnung des Sekundärantikörpers erfolgte im Verhältnis 1:2.000 in 2,5%-Milch-TBS-T-Lösung. Hierin wurde die Membran eine Stunde bei RT auf dem Schwenktisch inkubiert. Nachfolgend wurde die Membran zweimal kurz mit PBS, dreimal 10 min in 5%-Milch-TBS-T und anschließend noch einmal kurz in PBS gewaschen.

2.2.5.8 Detektion

Die Antikörperbindung wurde mit dem ECL-Plus-Detection-System von Amersham nachgewiesen. Die Detektionslösungen A und B wurden im Verhältnis 40:1 gemischt und 5 min bei RT auf die Membran gegeben.

Nach Entfernung der Lösung erfolgte die Detektion durch Belichtung eines Röntgenfilms in einer Röntgenkassette in der Dunkelkammer. Je nach Signalstärke wurde der Film zwischen einer Minute und einer Stunde belichtet.

2.2.5.9 Wiederverwendung der Nitrozellulosemembran

Nach der Immundetektion ist es möglich, den gebundenen Antikörper wieder zu entfernen und die Membran für weitere Analysen mit anderen Antikörpern einzusetzen.

Hierfür wurde die Membran mit PBS gewaschen und im Anschluss 30 min in einer 1: 10 verdünnten Re Blot Plus Strong-Lösung inkubiert. Anschließend wurde die Membran nochmal mit PBS gewaschen und zur Kontrolle in einer Röntgenkassette detektiert. Die Membran konnte nun erneut der Prozedur Blockade, Primärantikörper, Sekundärantikörper, Detektion unterzogen werden.

2.2.5.10 Image-J-Densitometrie

Die Image-J-Densitometrie ist ein semiquantitatives Verfahren, mit dem man nach Durchführung eines ‚Westernblots' die Bandendichte auf einem Röntgenfilm erfassen kann.

Der Röntgenfilm wurde hierfür durch Einscannen digitalisiert. Anschließend erfolgte dessen Auswertung nach Anleitung der folgenden Homepage:
http://lukemiller.org/index.php/2010/11/analyzing-gels-and-western-blots-with-image-j/.
Die Banden wurden mit dem Cursor manuell umkreist und durch das Internetprogramm ausgewertet.

3. Ergebnisse

3.1 Runx2-‚Knockdown'

3.1.1 7-Tage-Runx2-‚Knockdown'

Versuch	Medium	Zellen	Messzeitpunkte (Tage)	Analysierte Genexpressionen
7-Tage-Runx2-‚Knockdown'	pHOB-Nährmedium; Transf: OptiMEM, 5µl Lipofektamin, 1 µg siRunx2/ 1 µg siKo	pHOB, 40.000/well	0, 2, 4, 7	Runx2 PPARγ2

In Vorversuchen von M. Giesen wurde gezeigt, dass die Qiagen siRNA-Runx2 Nr. 4 (siRunx2) die Runx2-mRNA in pHOB effektiv herunterreguliert (Giesen, 2007). Um den Effekt der Transfektion zu überprüfen und die Auswirkungen auf die PPARγ2-mRNA zu untersuchen, wurde der 7-Tage-Runx2-‚Knockdown'-Versuch durchgeführt.

Hierfür wurden 40.000 pHOB-Zellen des Patienten S.R. pro well auf einer 6-well-Platte ausgesät (n=6). Die Aussaat erfolgte 24 Stunden vor Transfektion (Tag -1) und die Zellen wurden zu vier verschiedenen Zeitpunkten abgeerntet: Am Tag der Transfektion (Tag 0) sowie nach 48 Stunden (Tag 2), 96 Stunden (Tag 4) und 168 Stunden (Tag 7).

Transfiziert wurden 1 µg siRunx2 bzw. 1 µg Kontroll-siRNA (siKo) mit 5 µl Lipofektamin. Nach 6-stündiger Transfektion wurde das Transfektionsmedium durch pHOB-Nährmedium ersetzt und die Zellen wurden wie gewohnt in Kultur genommen (s. 2.2.1.1).

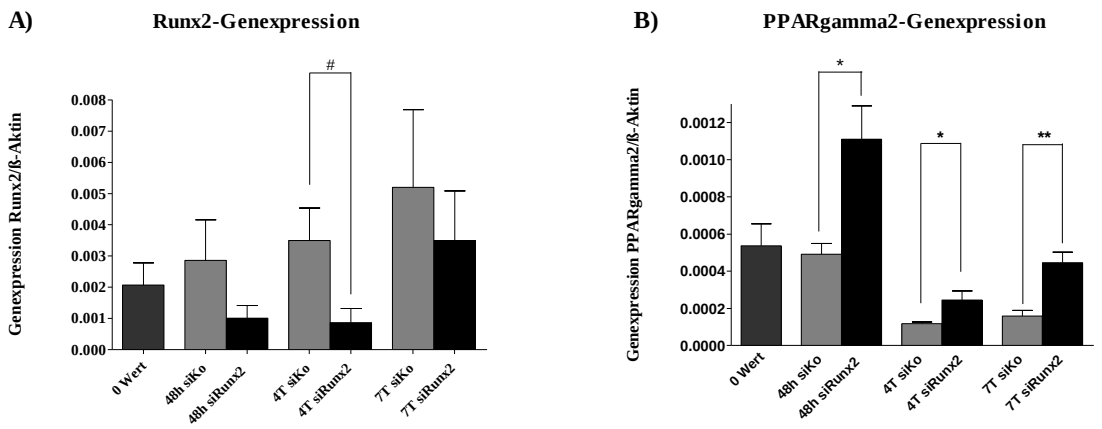

Abbildung 8: 7-Tage-Runx2-‚Knockdown' in pHOB. Darstellung der Genexpression von A) Runx2 bzw. B) PPARγ2 jeweils in Relation zum β-Aktin-Gen nach Transfektion von 1 µg siRunx2 bzw. 1 µg siKo an Tag 0. Die Analysen erfolgten an Tag 0, 2, 4 und 7 anhand der ‚Real-Time'-PCR. Die Darstellungen zeigen die Mittelwerte (n=6) und die entsprechenden Standardfehler (SEM). Die Sterne markieren die Signifikanzen zwischen siKo und siRunx2: *=p<0,05; **=p<0,01. Das Kreuz markiert eine Tendenz der Veränderungen zwischen siKo und siRunx2: #=p<0,1.

Abbildung 8A: Die Transfektion der siRunx2 bewirkte nach vier Tagen eine im Vergleich zur Kontroll-siRNA tendenzielle Runx2-Suppression auf 41% des 0-Wertes. Nach 48 Stunden (48% des 0-Wertes) und 7 Tagen (168% des 0-Wertes) fand keine signifikante Veränderung der Runx2-Genexpression statt. Die Transfektionseffizienz ließ im Verlauf nach.

Abbildung 8B: Nach Transfektion der Kontroll-siRNA kam es zu einer Abnahme der PPARγ2-Genexpression auf minimal 29% des 0-Wertes an Tag 4 und 47% an Tag 7. Die Transfektion der siRunx2 führte im Vergleich zur Kontroll-siRNA (siKo) zu einer signifikanten Steigerung der PPARγ2-mRNA auf 287% des 0-Wertes nach 48 Stunden, 49% des 0-Wertes nach vier Tagen und 113% des 0-Wertes an Tag 7. Der 7-Tage-Wert war dabei hochsignifikant.

Fazit:

Die Transfektion der siRunx2 führte nach vier Tagen zu einer tendenziellen Reduktion der Runx2-mRNA. Die Transfektion der siRunx2 führte nach 48 Stunden, 4 Tagen und 7 Tagen zu einer (hoch-) signifikanten Steigerung der PPARγ2-mRNA.

3.1.2 29-Tage-Runx2-‚Knockdown'

Versuch	Medium	Zellen	Messzeitpunkte (Tage)	Analysierte Genexpression	Anmerkung
29-Tage-Runx2-‚Knockdown'	pHOB-Nährmedium; Transf.: 5 µl Lipofektamin, 1 µg siRunx2/ 1 µg siKo	pHOB Pat1: 50.000/well Pat2: 70.000/well	0, 2, 7, 29	Runx2 PPARγ OC OSX AP aP2 LPL	osteogene Stimulation an Tag 26/27

Für den 29-Tage-Runx2-‚Knockdown'-Versuch wurden folgende pHOB-Zellen ausgesät (n=4): A.S. (Patient 1) und W.V. (Patient 2) (vgl. 2.1.1.1). Die Aussaat erfolgte 24 Stunden vor Transfektion (Tag -1) und die Zellen wurden zu vier verschiedenen Zeitpunkten abgeerntet: Am Tag der Transfektion (Tag 0), sowie nach 48 Stunden (Tag 2), 168 Stunden (Tag 7) und nach 696 Stunden (Tag 29).

Zeitplan	
Tag -1	Aussaat
Tag 0	1. Transfektion, Analyse
Tag 2	Analyse
Tag 4	2. Transfektion
Tag 7	Analyse
Tag 26/27	osteogene Stimulation
Tag 29	Analyse

Es erfolgten zwei Transfektionen (Tag 0; Tag 4) von 1 µg siRunx2 bzw. 1 µg siKo mit 5 µl Lipofektamin. Nach jeweils 6 Stunden wurde das Transfektionsmedium wieder durch das pHOB-Nährmedium (s. Tabelle 3) ersetzt und die Zellen wurden darin wie gewohnt in Kultur genommen (s. 2.2.1.1). Ein Teil der Zellen wurde über zwei Tage an Tag 26 und 27 osteogen stimuliert (vgl. 2.1.2.1, 2.2.2.1). Bei den nicht stimulierten Zellen erfolgte der letzte Wechsel des pHOB-Nährmediums 48 Stunden vor der Ernte. Die Analyse erfolgte durch ‚Real-Time'-PCR und ‚Westernblot'.

3.1.2.1 Einfluss der siRNA-Runx2 auf die Runx2-Expression in pHOB

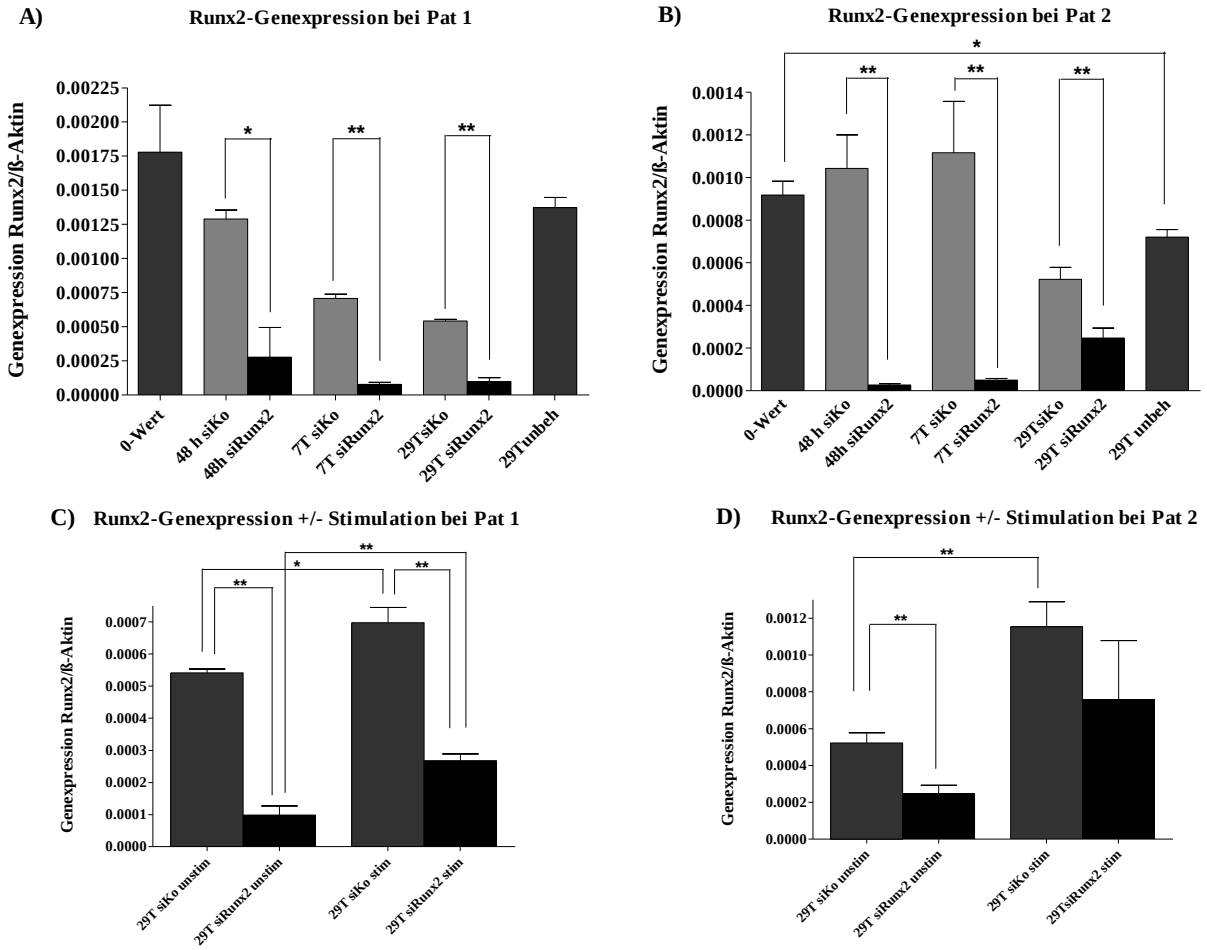

Abbildung 9: Darstellung der Runx2-Genexpression bei pHOB des A) Patienten 1 bzw. B) Patienten 2 ggf. mit osteogener Stimulation bei C) Patient 1 bzw. D) Patient 2, jeweils in Relation zum β-Aktin-Gen. Bei Transfektion von 1 µg siRunx2 bzw. 1 µg siKo an Tag 0 und Tag 4 erfolgten die Analysen an Tag 0, 2, 7 und 29 anhand der ‚Real-Time'-PCR. Die Darstellungen zeigen die Mittelwerte (n=4) und die entsprechenden Standardfehler (SEM). Die Sterne markieren die Signifikanzen zwischen zwei ausgewählten Vergleichsgruppen: *=p<0,05; **=p<0,01.

Abbildung 9A: Bei pHOB des ersten Patienten fiel die basale Runx2-Genexpression nicht signifikant auf 84% des 0-Wertes im Verlauf der 29 Versuchstage. Die siRunx2-Transfektion bewirkte im Vergleich zu Kontroll-siRNA-transfizierten Zellen zu allen erfassten Zeitpunkten eine signifikante Reduktion der Runx2-Genexpression auf 16%, 4% bzw. 6% des 0-Wertes an den jeweiligen Tagen. Nach 7 und nach 29 Tagen war die Reduktion im Vergleich zur Kontroll-siRNA hochsignifikant.

Abbildung 9B: Bei pHOB des zweiten Patienten fiel die basale Runx2-Genexpression während der 29 Tage signifikant auf 79% des 0-Wertes. Zu allen erfassten Zeitpunkten konnte eine hochsignifikante Reduktion der Runx2-Genexpression gezeigt werden. Diese betrug 3%, 5% bzw. 26% des 0-Wertes an den jeweiligen Tagen.

Abbildung 9C: Bei pHOB des ersten Patienten bestand sowohl mit als auch ohne osteogene Stimulation ein hoch signifikanter Unterschied zwischen Kontroll-siRNA- und siRunx2-

transfizierten Zellen. Während bei nicht stimulierten Zellen die Kontroll-siRNA-transfizierten Zellen bei 33% des 0-Wertes lagen, wurden unter siRunx2-Einfluss 6% des 0-Wertes erreicht. Bei stimulierten Zellen lagen die Kontroll-siRNA-transfizierten Zellen bei 38% des 0-Wertes, wohingegen die siRunx2-transfizierten Zellen 16% des 0-Wertes erreichten. Die Runx2-Expression wurde also bei stimulierten Zellen durch siRunx2-Einfluss signifikant weniger reduziert als bei unstimulierten Zellen. So wurde bei Kontroll-siRNA-transfizierten Zellen anstatt einer Reduktion auf 33% nur eine Reduktion auf 38% des 0-Wertes und bei siRunx2-transfizierten Zellen anstatt einer Reduktion auf 6% nur eine Reduktion auf 16% des 0-Wertes erreicht.

Abbildung 9D: Bei pHOB des zweiten Patienten bestand ein signifikanter Unterschied bezüglich der Runx2-Expression bei unstimulierten Zellen, jedoch nicht bei stimulierten Zellen. Während bei unstimulierten Zellen die Kontrolle (siKo) bei 57% des 0-Wertes lag, wurde unter siRunx2-Einfluss eine signifikante Reduktion auf 26% erreicht. Bei stimulierten Zellen lag die Kontrolle (siKo) bei 130% des 0-Wertes, wohingegen die siRunx2-transfizierten Zellen 83% des 0-Wertes erreichten (nicht signifikant). Bei stimulierten Zellen wurde die Runx2-Expression durch die siRunx2 nicht signifikant weniger gehemmt als bei nicht stimulierten Zellen (von 26% auf 83%). Bei den Kontroll-Zellen (siKo) konnte hingegen anstatt einer Reduktion auf 83% eine Steigerung auf 130% des 0-Wertes gezeigt werden. Dieser Unterschied war signifikant.

Berechnet man die Mittelwerte beider Patienten, ergibt sich folgende Tabelle:

0-Wert	1
siKo48h/0-Wert	0,975
siRunx2 48h/0-Wert	0,087
siKo7T/0-Wert	0,8665
siRunx2 7T/0-Wert	0,049
siKo 29Tunst/0-Wert	0,457
siRunx2 29Tunstim/0-Wert	0,167
siKo 29T stim/0-Wert	0,909
siRunx2 29T stim/0-Wert	0,499
29T unbeh/0-Wert	0,819

Fazit (betrifft die Mittelwerte der pHOB beider Patienten):

Im Langzeit-‚Knockdown'-Versuch gelang die Downregulation der Runx2-Suppression über 29 Tage durch zweimalige Transfektion der siRunx2 an Tag 0 und Tag 4. Die osteogene Stimulation führte zu einem Anstieg der Genexpression von Runx2 (siKo: von 45,7% auf 90,9% (Tendenz) bzw. siRunx2: von 16,7% auf 49,9%). Da die Mittelwerte nicht signifikant sind, zeigen die Ergebnisse aber keinen sogenannten ‚Rescue' der Runx2-mRNA durch die Stimulation, sondern allenfalls eine Abschwächung des siRunx2-Effekts.

3.1.2.2 Einfluss der siRNA-Runx2 auf die OC-Expression in pHOB

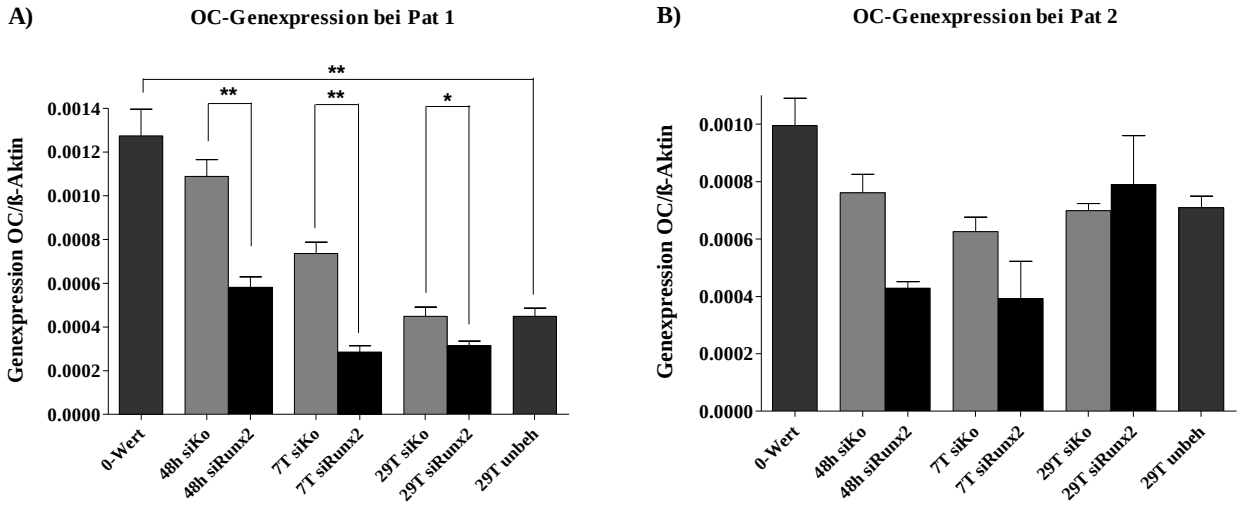

Abbildung 10: Darstellung der OC-Genexpression bei pHOB des A) Patienten 1 (n=4) bzw. B) Patienten 2 (n=2) im 29-Tage-Runx2-‚Knockdown', jeweils in Relation zum β-Aktin-Gen. Bei Transfektion von 1 µg siRunx2 bzw. 1 µg siKo an Tag 0 und Tag 4 erfolgten die Analysen an Tag 0, 2, 7 und 29 anhand der ‚Real-Time'-PCR. Die Darstellungen zeigen die Mittelwerte und die entsprechenden Standardfehler (SEM). Die Sterne markieren die Signifikanzen zwischen zwei ausgewählten Vergleichsgruppen: *=p<0,05; **=p<0,01.

Abbildung 10A: Bei pHOB des ersten Patienten (n=4) fiel die basale OC-Expression im Versuchsverlauf hochsignifikant auf 36% des 0-Wertes ab. Die Kontroll-siRNA-transfizierten Zellen zeigten eine abnehmende OC-Expression auf minimal 34% des Ausgangswertes an Tag 29. Durch den Runx2-‚Knockdown' fand im Vergleich zu Kontroll-siRNA-transfizierten Zellen zu allen untersuchten Zeitpunkten eine signifikante Reduktion der OC-Genexpression auf 43%, 21% bzw. 24% des 0-Wertes statt. Die Werte nach 48 Stunden und 7 Tagen waren hochsignifikant.

Abbildung 10B: Bei pHOB des zweiten Patienten betrug n=2, sodass diese Ergebnisse alleine statistisch nicht verwertet werden können. Die basale OC-Expression fiel im Versuchsverlauf (signifikant) auf 80% des 0-Wertes ab. Die siRunx2-Transfektion führte zu einer (hochsignifikanten) OC-Gensuppression nach 48 Stunden auf 48% des 0-Wertes. Die anderen Zeitpunkte (68%, 122%) blieben unverändert.

Berechnet man die Mittelwerte beider Patienten, ergibt sich folgende Tabelle:

0-Wert	1
siKo48h/0-Wert	0,855
siRunx2 48h/0-Wert	0,455
siKo7T/0-Wert	0,624
siRunx2 7T/0-Wert	0,405
siKo 29Tunst/0-Wert	0,516
siRunx2 29Tunstim/0-Wert	0,635
29T unbeh/0-Wert	0,511

Fazit (betrifft die Mittelwerte der pHOB beider Patienten):
Im Versuchsverlauf fand unter Basisbedingungen eine Reduktion der OC-Expression auf 51,1% des 0-Wertes statt. Die siRunx2 führte insgesamt zu einer Reduktion der osteogenen Differenzierung durch eine signifikante OC-Reduktion, die im Mittel nur nach 48 Stunden signifikant war (45,5%).

3.1.2.3 Einfluss der siRNA-Runx2 auf die OSX-Expression in pHOB

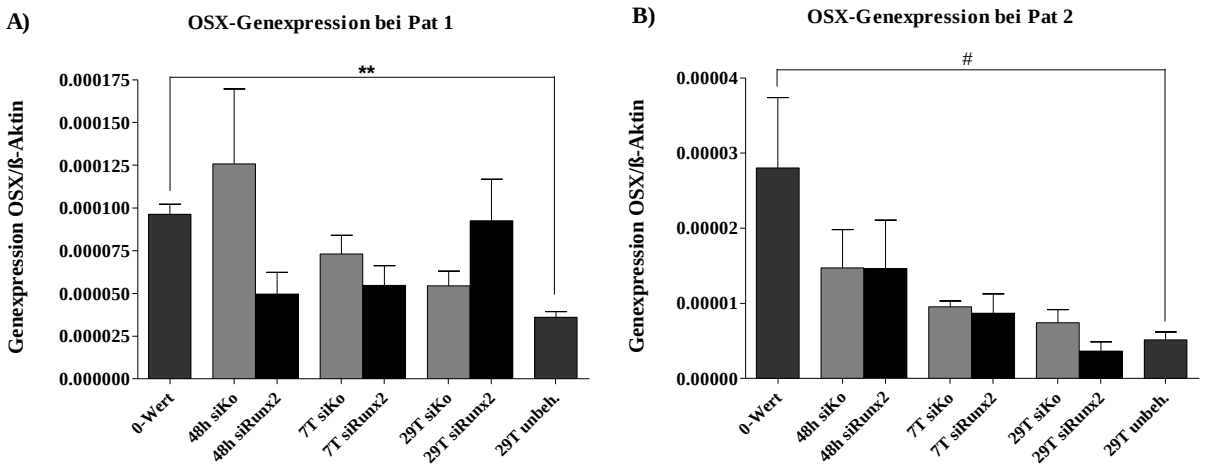

Abbildung 11: Darstellung der OSX-Genexpression bei pHOB des A) Patienten 1 bzw. B) Patienten 2, jeweils in Relation zum β-Aktin-Gen. Bei Transfektion von 1 µg siRunx2 bzw. 1 µg siKo an Tag 0 und Tag 4 erfolgten die Analysen an Tag 0, 2, 7 und 29 anhand der ‚Real-Time'-PCR. Die Darstellungen zeigen die Mittelwerte (n=4) und die entsprechenden Standardfehler (SEM). Die Sterne markieren die Signifikanzen zwischen zwei ausgewählten Vergleichsgruppen: **=p<0,01. Das Kreuz markiert eine tendenzielle Reduktion: #=p<0,1.

Abbildung 11A: Bei pHOB des ersten Patienten fiel die basale OSX-Expression im 29-Tageverlauf hochsignifikant auf 38% des 0-Wertes. Die Kontroll-siRNA-Transfektion bewirkte nach 48 Stunden eine nicht signifikante, auf 133% des Ausgangswerts erhöhte OSX-Expression, an Tag 7 und Tag 29 eine verminderte OSX-Expression mit einem Minimum von 44% des 0-Wertes an Tag 29. Durch den Runx2-‚Knockdown' fanden im Vergleich zu Kontroll-siRNA-transfizierten Zellen nicht signifikante Veränderungen der OSX-Genexpression auf 55%, 59% bzw. 77% des 0-Wertes statt.

Abbildung 11B: Bei pHOB des zweiten Patienten fiel die basale OSX-Expression im Verlauf des Versuches tendenziell auf 29% des 0-Wertes ab. Bei Kontroll-siRNA-Transfektion wurde die OSX-Expression auf minimal 30% des Ausgangswertes an Tag 29 reduziert. Die Transfektion der siRunx2 zog an Tag 7 eine Reduktion auf 48% und an Tag 29 eine Reduktion der OSX-Genexpression auf minimal 13% des 0-Wertes nach sich. Im Vergleich zu Kontroll-siRNA-transfizierten Zellen ergaben sich jedoch keine Signifikanzen.
Berechnet man die Mittelwerte beider Patienten, ergibt sich folgende Tabelle:

0-Wert	1
siKo48h/0-Wert	0,979
siRunx2 48h/0-Wert	0,83
siKo7T/0-Wert	0,617
siRunx2 7T/0-Wert	0,532
siKo 29Tunst/0-Wert	0,432
siRunx2 29Tunstim/0-Wert	0,52
29T unbeh/0-Wert	0,338

Fazit (betrifft die Mittelwerte der pHOB beider Patienten):
Unter basalen Kulturbedingungen kommt es zu einer Abnahme der OSX-Expression auf 33,8%. Der Runx2-‚Knockdown' führt nicht zu einer signifikanten Veränderung der OSX-Expression.

3.1.2.4 Einfluss der siRNA-Runx2 auf die AP-Expression in pHOB

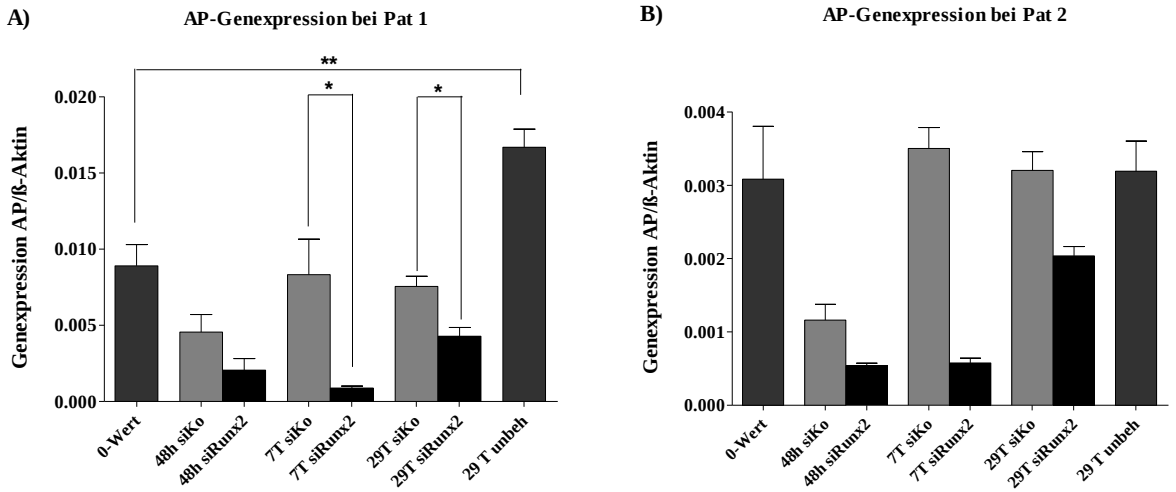

Abbildung 12: Darstellung der AP-Genexpression bei pHOB des A) Patienten 1 (n=4) bzw. B) Patienten 2 (n=2), jeweils in Relation zum β-Aktin-Gen. Bei Transfektion von 1 µg siRunx2 bzw. 1 µg siKo an Tag 0 und Tag 4 erfolgten die Analysen an Tag 0, 2, 7 und 29 anhand der ‚Real-Time'-PCR. Die Darstellungen zeigen die Mittelwerte und die entsprechenden Standardfehler (SEM). Die Sterne markieren die Signifikanzen zwischen zwei ausgewählten Vergleichsgruppen: *=p<0,05; **=p<0,01.

Abbildung 12A: In der Versuchsspanne von 29 Tagen beobachtete man bei pHOB des ersten Patienten eine hochsignifikante Steigerung der basalen AP-Genexpression auf 211% des 0-

Wertes. Nach Kontroll-siRNA-Transfektion fand eine Reduktion der AP-Genexpression auf minimal 53% nach 48 Stunden statt. Die Runx2-Suppression bewirkte eine im Vergleich zu Kontroll-siRNA-transfizierten Zellen nicht signifikante AP-Reduktion auf 22% des 0-Wertes nach 48 Stunden, sowie eine signifikant verminderte AP-Genexpression an Tag 7 auf 9% des 0-Wertes und an Tag 29 auf 44% des 0-Wertes.

Abbildung 12B: Bei pHOB des zweiten Patienten betrug n=2, sodass diese Ergebnisse alleine statistisch nicht ausgewertet werden können. Diese Zellen verzeichneten während der 29 Tage keine (signifikante) Änderung der basalen AP-Expression im Vergleich zum 0-Wert. Unter Einfluss der siKo lag der 48-Stunden-Wert bei 22% des Ausgangswertes. Zu den beiden anderen Zeitpunkten fand eine geringe Steigerung der Genexpression auf 135% (Tag 7) bzw. 127% (Tag 29) statt. Durch Einfluss der siRunx2 bestand zu allen erfassten Zeitpunkten eine (signifikante) Reduktion der AP-Genexpression auf 22% nach 48 Stunden, auf 29% nach 7 Tagen und 94% des 0-Wertes an Tag 29. (Nach 7 und nach 29 Tagen war diese hochsignifikant.)

Berechnet man die Mittelwerte beider Patienten, ergibt sich folgende Tabelle:

0-Wert	1
siKo48h/0-Wert	0,544
siRunx2 48h/0-Wert	0,226
siKo7T/0-Wert	1,094
siRunx2 7T/0-Wert	0,176
siKo 29Tunst/0-Wert	0,963
siRunx2 29Tunstim/0-Wert	0,645
29T unbeh/0-Wert	1,877

Fazit (betrifft die Mittelwerte der pHOB beider Patienten):

Unter Basisbedingungen fand eine tendenzielle Zunahme der AP-Expression im Verlauf auf 187,7% des 0-Wertes statt. Der Runx2-‚Knockdown' führt zu einer Reduktion der AP-Expression, die tendenziell nach 48 Stunden (22,6% des 0-Wertes) und hochsignifikant nach 7 Tagen vorliegt (17,6% des 0-Wertes). Anschließend ist sie im Mittel nicht mehr detektierbar.

3.1.2.5 Einfluss der siRNA-Runx2 auf die PPARγ2-Expression in pHOB

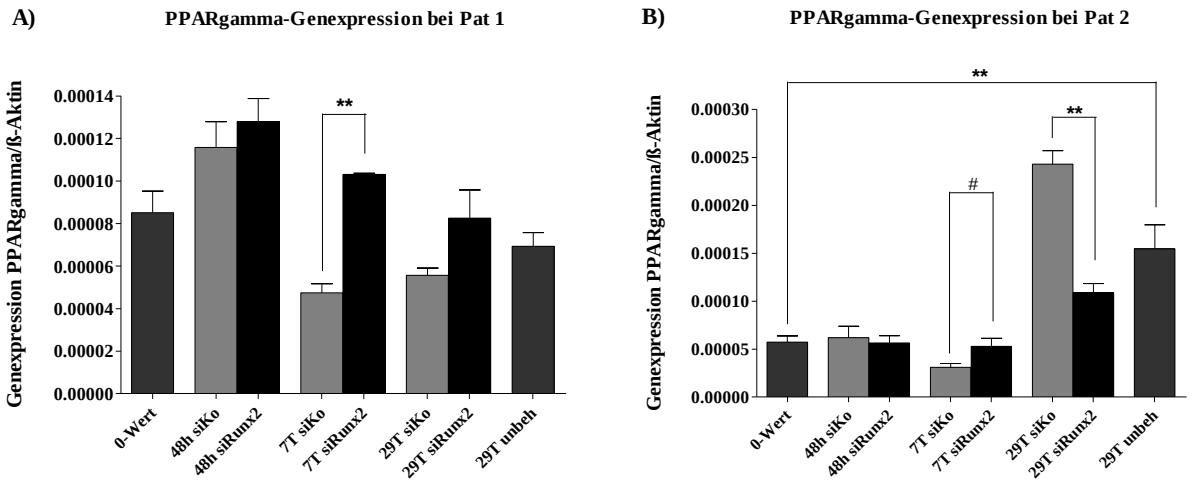

Abbildung 13: Darstellung der PPARγ2-Genexpression bei pHOB des A) Patienten 1 bzw. B) Patienten 2, jeweils in Relation zum β-Aktin-Gen. Bei Transfektion von 1 µg siRunx2 bzw. 1 µg siKo an Tag 0 und Tag 4 erfolgten die Analysen an Tag 0, 2, 7 und 29 anhand der ‚Real-Time'-PCR. Die Darstellungen zeigen die Mittelwerte (n=4) und die entsprechenden Standardfehler (SEM). Die Sterne markieren die Signifikanzen zwischen zwei ausgewählten Zellgruppen: *=p<0,05; **=p<0,01. Das Kreuz kennzeichnet eine tendenzielle Reduktion: #=p<0,1.

Abbildung 13A: Unter Standardkulturbedingungen sank die PPARγ2-Genexpression während der 29 Versuchstage bei pHOB des ersten Patienten ohne Signifikanz auf 84% des Ausgangswertes ab. Unter siKo-Einfluss stieg die PPARγ-Genexpression nach 48 Stunden auf 144% des 0-Wertes, nach 7 Tagen sank sie auf 58%. Die Runx2-Suppression bewirkte nach 7 Tagen im Vergleich zur Kontrolle (siKo) eine hochsignifikante Induktion des PPARγ2-Gens auf 120% des 0-Wertes. Die anderen Zeitpunkte zeigten keine Signifikanz und keine Tendenz einer Induktion an (48 Stunden: 152%; 29 Tage: 100% des 0-Wertes).

Abbildung 13B: Eine hochsignifikante Steigerung der PPARγ2-Genexpression hingegen fand bei pHOB des zweiten Patienten auf 297% des Ausgangswertes statt. Nach Kontroll-siRNA-Transfektion zeigte sich ein 7-Tage-Wert von 57% und ein 29 Tage-Wert von 446% des 0-Wertes. Unter Runx2-Suppression konnte nach 48 Stunden keine signifikante Veränderung gezeigt werden (100% des 0-Wertes). Nach 7 Tagen hingegen konnte im Vergleich zur Kontrolle (siKo) eine Tendenz der PPARγ2-Geninduktion auf 90% des 0-Wertes beobachtet werden. Nach 29 Tagen zeigte sich im Vergleich zur Kontrolle (siKo) eine hochsignifikante Repression des PPARγ2-Gens auf 202% des 0-Wertes.

Berechnet man die Mittelwerte beider Patienten, ergibt sich folgende Tabelle:

0-Wert	1
siKo48h/0-Wert	1,262
siRunx2 48h/0-Wert	1,225
siKo7T/0-Wert	0,582
siRunx2 7T/0-Wert	1,034
siKo 29Tunst/0-Wert	2,827
siRunx2 29Tunstim/0-Wert	1,589
29T unbeh/0-Wert	1,906

Fazit (betrifft die Mittelwerte der pHOB beider Patienten):

Unter Basisbedingungen nahm die PPARγ2-Genexpression in pHOB auf 190,6% des 0-Wertes zu. Durch den Runx2-‚Knockdown' kommt es nach sieben Tagen zu einer hochsignifikanten Steigerung der PPARγ2-Expression (auf 103,4% des 0-Wertes). Im Kurzzeit-Runx2-‚Knockdown' war sie nach 48 Stunden und 4 Tagen signifikant, nach 7 Tagen hochsignifikant (3.1.1).

3.1.2.6 Einfluss der siRNA-Runx2 auf die aP2-Expression in pHOB

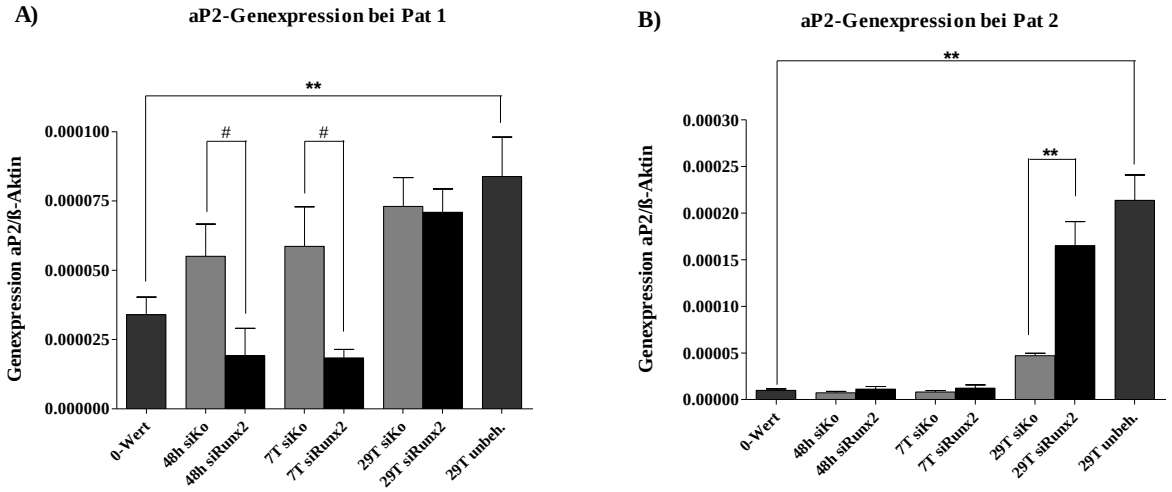

Abbildung 14: Darstellung der aP2-Genexpression bei pHOB des A) Patienten 1 bzw. B) Patienten 2, jeweils in Relation zum β-Aktin-Gen. Bei Transfektion von 1 µg siRunx2 bzw. 1 µg siKo an Tag 0 und Tag 4 erfolgten die Analysen an Tag 0, 2, 7 und 29 anhand der ‚Real-Time'-PCR. Die Darstellungen zeigen die Mittelwerte (n=4) und die entsprechenden Standardfehler (SEM). Die Sterne markieren die Signifikanzen zwischen zwei ausgewählten Vergleichsgruppen: *=p<0,05; **=p<0,01. Das Kreuz kennzeichnet eine tendenzielle Reduktion zwischen den Vergleichsgruppen: #=p<0,1.

Abbildung 14A: Unter Standardkulturbedingungen nahm die basale aP2-Genexpression bei pHOB des ersten Patienten während 29 Tagen hochsignifikant auf 299% des 0-Wertes zu. Unter Kontroll-siRNA-Einfluss wurde die aP2-Expression auf ein Maximum von 260% nach 29 Tagen linear gesteigert. Bei Runx2-Suppression zeigte sich im Vergleich zu Kontroll-siRNA-transfizierten Zellen nach 48 Stunden und 7 Tagen eine tendenzielle Reduktion der

aP2-Genexpression auf 52% bzw. 75% des 0-Wertes. Nach 29 Tagen entsprach die aP2-Genexpression 251% des 0-Wertes. Eine Signifikanz bestand zu keinem Zeitpunkt.

Abbildung 14B: Bei pHOB des zweiten Patienten führte die Kultivierung der Zellen unter Standardbedingungen zu einer hochsignifikanten Steigerung auf 2313% des 0-Wertes. Die Kontrolle (siKo) erreichte nach 48 Stunden mit 72% die geringste aP2-Genexpression und nach 29 Tagen mit 515% die stärkste Genexpression. Die Transfektion der siRunx2 hatte nach 48 Stunden (115% des 0-Wertes) und 7 Tagen (133% des 0-Wertes) keinen Einfluss auf die aP2-Genexpression. Nur nach 29 Tagen konnte man nach Transfektion der siRunx2 eine aP2-Expression (entspricht 2130% des 0-Wertes) beobachten, die beinahe so hoch war wie die unbehandelte Kontrolle (29T unbehandelt). Zu diesem Zeitpunkt bestand ein hochsignifikanter Unterschied zur Kontrolle (29T siKo).

Berechnet man die Mittelwerte beider Patienten, ergibt sich folgende Tabelle:

0-Wert	1
siKo48h/0-Wert	1,159
siRunx2 48h/0-Wert	0,889
siKo7T/0-Wert	1,593
siRunx2 7T/0-Wert	1,09
siKo 29T/0-Wert	4,06
siRunx2 29T/0-Wert	13,252
29T unbeh/0-Wert	13,062

Fazit (betrifft die Mittelwerte der pHOB beider Patienten):

Unter Basisbedingungen nimmt die aP2-Genexpression während der 29 Tage auf 1306,2% des 0-Wertes zu. Der Runx2-‚Knockdown' führt nach 29 Tagen zu einer tendenziellen Steigerung der aP2-Expression (1325,2% des 0-Wertes) im Vergleich zu Kontroll-siRNA-transfizierten Zellen und damit dazu, dass die aP2-Expression ungefähr so hoch ist wie die unbehandelte Kontrolle.

3.1.2.7 Einfluss der siRNA-Runx2 auf die LPL-Expression in pHOB

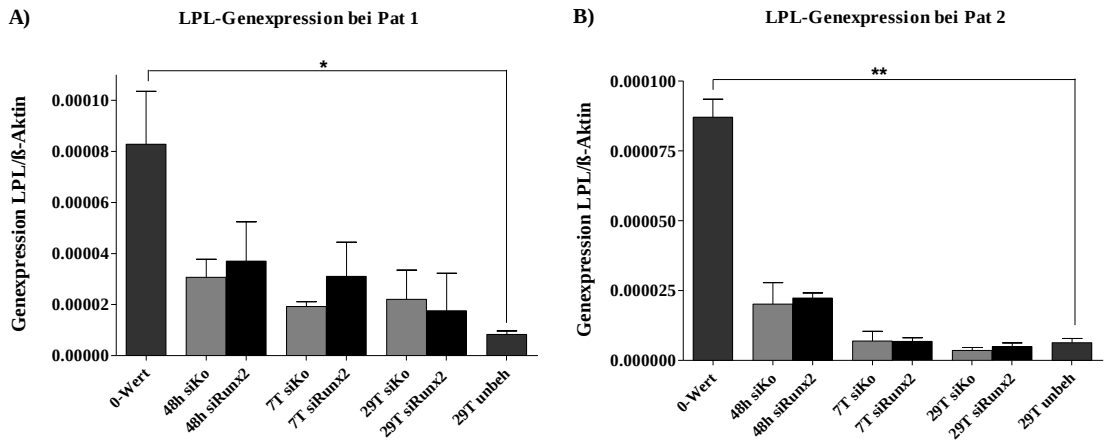

Abbildung 15: Darstellung der LPL-Genexpression bei pHOB des A) Patienten 1 bzw. B) Patienten 2, jeweils in Relation zum β-Aktin-Gen. Bei Transfektion von 1 µg siRunx2 bzw. 1 µg siKo an Tag 0 und Tag 4 erfolgten die Analysen an Tag 0, 2, 7 und 29 anhand der ‚Real-Time'-PCR. Die Darstellungen zeigen die Mittelwerte (n=4) und die entsprechenden Standardfehler (SEM). Die Sterne markieren die Signifikanzen zwischen zwei ausgewählten Vergleichsgruppen: *=p<0,05; **=p<0,01.

Abbildung 15A: Bei pHOB des ersten Patienten fiel die basale LPL-Expression im Versuchsverlauf signifikant auf 12% ab. Nach Kontroll-siRNA-Transfektion sank die LPL-Expression und erreichte minimal 28% des Ausgangswertes an Tag 7. Auch unter Runx2-Suppression zeigte sich eine Reduktion der LPL-Expression im Versuchsverlauf. Die im Vergleich zur Kontroll-siRNA an Tag 4 (37% des 0-Wertes) und Tag 7 (48% des 0-Wertes) erhöhte LPL-Genexpression wies ebenso wie die nach 29 Tagen beobachtete Genreduktion (32% des 0-Wertes) keine Tendenz und keine Signifikanz auf.

Abbildung 15B: pHOB des zweiten Patienten reduzierten ihre LPL-Expression während der 29 Tage unter Basalbedingungen hochsignifikant auf 11% des Ausgangswertes. Sowohl unter Kontroll-siRNA-, als auch siRunx2-Einfluss fand ein steter Rückgang der LPL-mRNA statt. Eine Signifikanz oder Tendenz zwischen beiden Ansätzen konnte hier nicht beobachtet werden. (48 Stunden: 35% des 0-Wertes, 7 Tage: 11% des 0-Wertes, 29 Tage: 8% des 0-Wertes).

Berechnet man die Mittelwerte beider Patienten, ergibt sich folgende Tabelle:

0-Wert	1
siKo48h/0-Wert	0,353
siRunx2 48h/0-Wert	0,364
siKo7T/0-Wert	0,201
siRunx2 7T/0-Wert	0,274
siKo 29Tunst/0-Wert	0,169
siRunx2 29Tunstim/0-Wert	0,183
29T unbeh/0-Wert	0,119

Fazit (betrifft die Mittelwerte der pHOB beider Patienten):
Die LPL-Genexpression nimmt während der 29 Tage unter Basisbedingungen ab (Pat 1: 12%, Pat 2: 11%). Die Transfektion der siRunx2 bewirkt keine signifikante Veränderung der LPL-Expression.

3.1.2.8 Einfluss der siRNA-Runx2 auf das Runx2-Protein in pHOB

Im 29-Tage-Runx2-‚Knockdown'-Versuch erfolgte neben der Auswertung der Runx2-mRNA auch die Betrachtung des Runx2-Proteins im ‚Westernblot'. Dafür wurden aus pHOB-Zellen des zweiten Patienten je 60 µg Protein eingesetzt. Der Primärantikörper Runx2 M70 wurde im Verhältnis 1:100 und der Sekundärantikörper anti-rabbit im Verhältnis 1:2.000 verdünnt. Auch mit pHOB des ersten Patienten wurde eine ‚Westernblot'-Analyse durchgeführt, die aber wegen fehlender Bandenbildung hier nicht dargestellt werden kann. Im Gegensatz zur mRNA-Ebene, wo nur die PPARγ2-Isoform erfasst wurde, erfolgte im ‚Westernblot' die Bestimmung des Gesamt-PPARγ, also beider Isoformen.

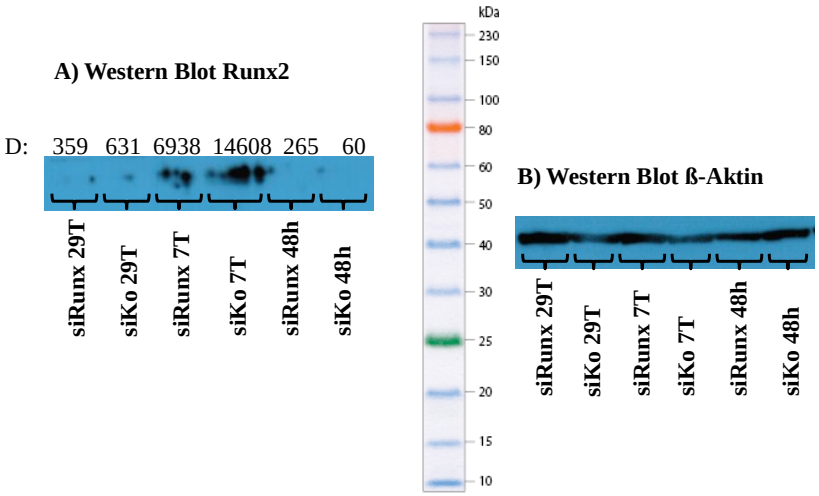

Abbildung 16: Darstellung des ‚Westernblots' nach der Bio-Rad-Methode mit Detektionsantikörpern für A) Runx2 und B) β-Aktin bei pHOB des Patienten 2. Bei Transfektion von 1 µg siRunx2 bzw. 1 µg siKo an Tag 0 und Tag 4 erfolgten die Analysen an Tag 2, 7 und 29. Zwischen den beiden Abbildungen befindet sich die Protein-‚Ladder'. Der Buchstabe D steht hierbei für die in der Densitometrie erfasste Dichte.

Da die β-Aktin-Genexpression von experimentellen Bedingungen unabhängig ist, diente β-Aktin neben der PCR auch im ‚Westernblot' als ‚Housekeeping'-Gen. Anhand der β-Aktin-Banden kann überprüft werden, ob die pro Tasche eingesetzte Proteinmenge ungefähr einheitlich ist und die am Ende des ‚Westernblots' detektierten Banden somit miteinander vergleichbar sind.

Nach 48 Stunden zeigten sich dezente punktförmige Banden des Runx2-Proteins etwa auf Höhe der 58 kDa-Bande (vgl. Protein-‚Ladder'). Zwischen der Transfektion der Kontroll-

siRNA und der siRunx2 konnte kein deutlicher Unterschied festgestellt werden. Nach 7 Tagen hingegen zeigte sich auf der gleichen Höhe die Kontrollbande deutlich stärker als die siRunx2-Bande, obwohl in der Kontrolle weniger Protein nachweisbar ist (s. β-Aktin). Wertete man diese in der Image-J-Densitometrie aus, war die Dichte auf 210% gesteigert. Nach 29 Tagen zeigten sich dezente punktförmige Banden des Runx2-Proteins zwischen der 50- und 60-kDa-Bande. Auch hier konnte man keinen signifikanten Unterschied zwischen der Transfektion der Kontroll-siRNA und der siRunx2 feststellen.

Fazit (n=1):
Es kam zum ‚Knockdown' des Runx2-Proteins an Tag 7. Die Dichte der siRunx2-Bande war im Vergleich zur Kontroll-Bande (siKo) auf ca. 50% reduziert.

3.2 Runx2-Überexpression

3.2.1 Runx2-Überexpression (mRNA)

Versuch	Medium	Zellen	Messzeitpunkt	Analysierte Genexpression	Anmerkung
Runx2-Über-expression (mRNA)	pHOB-Nährmedium/ MEMalpha; Transf.: 10 µl Lipofektamin, Runx2-Plasmid (0,6 µg; 2 µg; 5µg)	pHOB 60.000/well; SCP1-Zellen 100.000/well	48h	Runx2 PPARγ	0h: Aussaat 24h: Transfektion 30h: Nährmedium 72h: Aufarbeitung, Analyse

In diesem Versuch wurden pHOB- und SCP1-Zellen 24 Stunden nach Aussaat mit folgenden unterschiedlichen Mengen des Runx2-Plasmids im OptiMEM-Medium transfiziert: 0 µg/ 0,6 µg/ 2 µg/ 5 µg. Sechs Stunden später wurde das Transfektionsmedium durch das jeweilige Kulturmedium ausgetauscht. 72 Stunden nach Aussaat erfolgte die Aufarbeitung mittels RT-PCR und ‚Real-Time'-PCR.

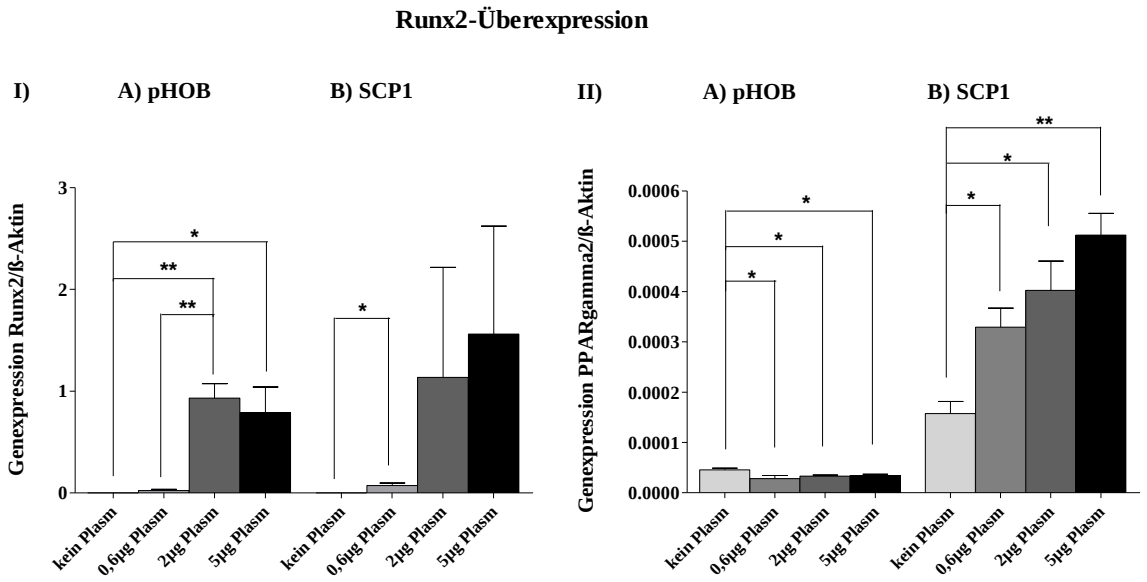

Abbildung 17: I) Darstellung der Runx2-Genexpression bei IA) pHOB und IB) SCP1-Zellen, jeweils in Relation zum β-Aktin-Gen in der ‚Real-Time'-PCR; nach Transfektion unterschiedlicher Mengen des Runx2-Plasmids.
II) Darstellung der PPARγ2-Genexpression bei IIA) pHOB und IIB) SCP1-Zellen, jeweils in Relation zum β-Aktin-Gen in der ‚Real-Time'-PCR; nach Transfektion unterschiedlicher Mengen des Runx2-Plasmids. Die Darstellungen zeigen die Mittelwerte (n=4) und die entsprechenden Standardfehler (SEM). Die Sterne markieren die Signifikanzen zwischen zwei ausgewählten Vergleichsgruppen: *=p<0,05; **=p<0,01.

Abbildung 17I): pHOB-Zellen und SCP1-Zellen wiesen mit steigender Plasmidmenge eine zunehmende Runx2-Genexpression auf. Die einzige Ausnahme hierbei bildete die Transfektion von 5 µg Runx2-Plasmid in pHOB-Zellen, da diese eine nicht signifikante, geringere Geninduktion aufwies als die Transfektion von 2 µg Plasmid. Diese hingegen erreichte eine hochsignifikante 40,78-fache Genexpression im Vergleich zum Ausgangswert (ohne Plasmid). Bei SCP1-Zellen konnte eine signifikante Steigerung der Runx2-Genexpression bei Transfektion von 0,6µg Plasmid auf 217% des Ausgangswertes gezeigt werden.

Abbildung 17II): Bezüglich der PPARγ2-Genexpression wurden in diesem Versuch große Differenzen zwischen beiden Zellarten festgestellt. Bei pHOB-Zellen fand eine signifikante Reduktion der PPARγ2-Genexpression bei Plasmidtransfektion statt, die nach Transfektion bei 0,6 µg Runx2-Plasmid mit 60% des Ausgangswertes ihre stärkste Ausprägung fand. SCP1-Zellen hingegen steigerten ihre PPARγ2-Genexpression um ca. 2- bis 3,48-fache. Der Maximalwert wurde nach Transfektion von 5 µg Plasmid erreicht.

Fazit:

Bei Transfektion des Runx2-Plasmids zeigte sich eine Steigerung der Runx2-mRNA in pHOB- und SCP1-Zellen.

Die PPARγ2-mRNA wurde nach Transfektion des Runx2-Plasmids in pHOB-Zellen reduziert, wohingegen in SCP1-Zellen zur Steigerung der PPARγ2-mRNA führte.

3.2.2 Runx2-Überexpression (Protein)

Versuch	Medium	Zellen	Messzeitpunkte	Analyse	Anmerkung
Runx2-Über-expression (Protein)	MEMalpha; Transf.: 10 µl Lipofektamin, Runx2-Plasmid (2 µg)	SCP1-Zellen 200.000/well	48h 120h	‚Westernblot': Runx2 PPARγ β-Aktin	-24h: Aussaat 0h: Transfektion 5h: Nährmedium 48/120h: Aufarbeitung, Analyse

SCP1-Zellen wurden unter Standardkulturbedingungen 24 Stunden vor Transfektion (2 µg Runx2-Plasmid) ausgesät. Fünf Stunden nach Transfektion wurde das Transfektionsmedium wieder gegen MEMalpha ausgetauscht. Aufarbeitung und Analyse erfolgten 48 bzw. 120 Stunden nach Transfektion durch den Invitrogen-‚Westernblot'. Hierbei wurden 150 µg Protein eingesetzt. Die unterschiedlichen Proteine wurden jeweils mit ihren spezifischen Antikörpern in eigenen Detektionsumläufen auf dem Röntgenfilm sichtbar gemacht. Zwischen diesen Umläufen wurde die Membran nach dem Protokoll (s. 2.2.5.9) wiederaufbereitet.

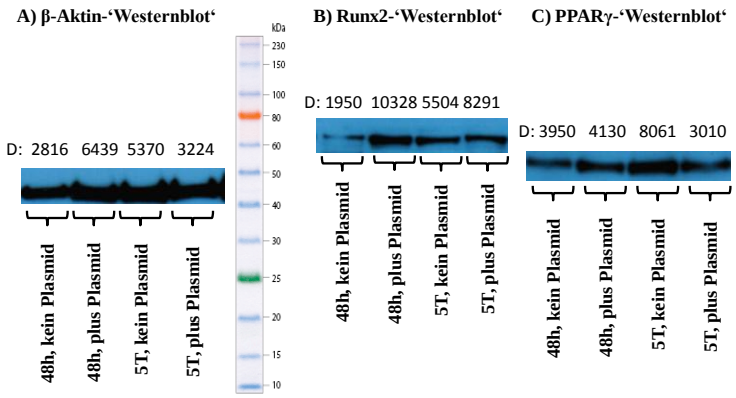

Abbildung 18: Darstellung der Proteinbanden im A) β-Aktin-‚Westernblot', B) Runx2-‚Westernblot', C) PPARγ-‚Westernblot' nach Transfektion von 2 µg Runx2-Plasmid. Zugabe von 150 µg Protein in SCP1-Zellen. Der Buchstabe D gibt die in der Densitometrie gemessenen Dichtewerte der einzelnen Banden an.

Abbildung 18A: β-Aktin wurde im ‚Westernblot' als ‚Housekeeping'-Gen eingesetzt. Die β-Aktin-Bande befand sich in etwa zwischen der 40 und der 45 kDa-Bande der Protein-

‚Ladder‘. Der 48-Stunden-Wert der transfizierten Zellen war in der Densitometrie etwa 2,27-fach höher als bei nicht-transfizierten Zellen, der 5-Tage-Wert entsprach etwa dem 0,6-fachen Wert der nicht-transfizierten Zellen.

Abbildung 18B/C: In SCP1-Zellen war nach 48 Stunden und 5 Tagen unter Basalbedingungen mehr PPARγ-Protein als Runx2-Protein nachweisbar. Die Expression beider Proteine wurde unter basalen Kulturbedingungen zwischen Tag 2 und Tag 5 erhöht. Im Runx2-‚Westernblot’ zeigte sich bei nicht-Plasmid-transfizierten Zellen nach 48 Stunden eine schmale Bande etwa auf Höhe der 55- bis 65-kDa-Bande der Protein-‚Ladder‘. Im Vergleich hierzu zeigten die Plasmid-transfizierten Zellen nach 48 Stunden eine wesentlich dichtere Bande, die in der Densitometrie einer 5,29-fache Steigerung entsprach. Im Bezug auf β-Aktin zeigte sich hier also eine deutliche, etwa 2,3-fachen Steigerung. Nach 5 Tagen ließ sich nur ein geringer Unterschied zwischen der Bandendichte beider Vergleichsgruppen feststellen. In der Densitometrie war bei Plasmid-transfizierten Zellen eine 1,5-fach dichtere Runx2-Bande zu beobachten als bei nicht-Plasmid-transfizierten Zellen. Im Vergleich zu β-Aktin zeigte sich nach 5 Tagen eine etwa 2,4-fache Steigerung der Bandendichte.

Die PPARγ-Banden waren ungefähr zwischen der 55- und 60-kDa-Bande zu beobachten. Im ‚Westernblot’ war die 48-Stunden-Bande der Plasmid-transfizierten Zellen dichter als bei nicht-Plasmid-transfizierten Zellen. Allerdings entsprach dieses Ergebnis in etwa der β-Aktin-Steigerung. Nach 5 Tagen war die Bande der Plasmid-transfizierten Zellen 0,37-mal so dicht wie die der nicht-Plasmid-transfizierten Zellen und somit deutlich schmaler. Im Verhältnis zu β-Aktin zeigte sich hier eine Reduktion auf das 0,61-fache der nicht-Plasmid-transfizierten Zellen. Es kam also 5 Tagen nach Induktion des Runx2-Proteins zu einer verminderten Produktion des PPARγ-Proteins.

Fazit (n=1):

Die einmalige Runx2-Überexpression durch das Runx2-Plasmid wurde nach 48 Stunden auf Proteinebene sichtbar und war nach 5 Tagen nur noch geringer detektierbar. Das PPARγ-Protein schien nach 2 Tagen induziert zu sein. Nach 5 Tagen kam es auf Proteinebene zu einer Abnahme des PPARγ-Proteins.

3.3 Runx2-/PPARγ-Interaktionsversuche

3.3.1 Interaktionsversuch I

Versuch	Medium	Zellen	Messzeitpunkt	Analyse	Zeitplan
Interaktion I	pHOB-/ MEMalpha-Nährmedium; Transf.: 10 µl Lipofektamin; unterschiedliche Konzentrationen des PPARγ-Promotors	pHOB: 100.000/well SCP1: 100.000/well	48h	RLU PPARγ-Promotor	0h: Aussaat 24h: Transfektion 30h: Nährmedium 72h: Aufarbeitung, Analyse

Für das bessere Verständnis der Interaktion zwischen Runx2 und PPARγ-Promotor wurden die Interaktionsversuche durchgeführt. Um für die Hauptversuche optimale Versuchsbedingungen zu erhalten, wurde vorher eine große Versuchsreihe durchgeführt (Interaktion I-VI). Die Anzahl aller Interaktionsversuche betraf n=2, wodurch Signifikanzen nicht errechnet werden konnten. Dies hatte zur Folge, dass in diesem Teil der Ergebnisse alle Veränderungen in Prozentzahlen angegeben wurden, dabei aber keine Aussage über die Signifikanz getroffen wurde.

Der Interaktionsversuch I diente der Suche nach der optimalen PPARγ-Promotormenge, mit der die PPARγ-Genaktivität in der Zelle messbar ist und war somit rein methodischer Natur. Es wurden hierbei pHOB-Zellen des Patienten B.S. und SCP1-Zellen 24 Stunden nach Aussaat mit folgenden unterschiedlichen Mengen des PPARγ-Promotors im OptiMEM-Medium transfiziert: 0 µg/ 0,6 µg/ 2 µg/ 5 µg Promotor. Sechs Stunden nach der Transfektion wurde das Transfektionsmedium durch das jeweilige Kulturmedium ausgetauscht. 72 Stunden nach Aussaat erfolgte die Aufarbeitung nach dem Luziferase-Reportergenassay-Protokoll.

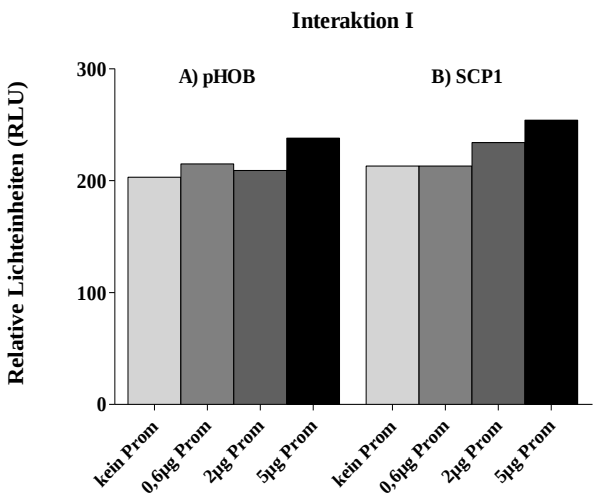

Abbildung 19: Darstellung der RLU-Werte im Luziferase-Reportergenassay nach Transfektion unterschiedlicher PPARγ-Promotormengen (0 µg/0,6 µg/2 µg/5 µg) A) in pHOB bzw. B) in SCP1-Zellen. Darstellung der Mittelwerte (n=2).

Abbildung 19A: Der Durchschnittswert der im Interaktion-I-Versuch ermittelten RLU-Werte der pHOB-Zellen ohne Promotortransfektion betrug 203. Wurden 0,6 µg PPARγ-Promotor transfiziert, stieg dieser dezent auf 105% und bei Transfektion von 2 µg Promotor auf 102%. Das Maximum von 117% wurde bei Transfektion von 5 µg Promotor erreicht.

Abbildung 19B: Betrachtete man RLU-Durchschnittswerte der SCP1-Zellen, lagen diese nach Transfektion von 0 µg bzw. 0,6 µg bei 213. Dies entspricht 104% des pHOB-Basalwertes. Wurden 2 µg PPARγ-Promotor transfiziert, stieg der durchschnittliche Wert dezent auf 109% und bei Transfektion von 5 µg auf 119%.

Es wurden also keine relevanten Unterschiede der RLU-Werte bei Änderung der PPARγ-Promotormenge festgestellt. Ursächlich hierfür war wahrscheinlich eine nicht ausreichend hoch gewählte Zellzahl, sodass der nächste Versuch mit 400.000 Zellen pro well durchgeführt wurde.

Fazit:

Es zeigte sich kein relevanter Unterschied durch Veränderung der Promotormenge. Wahrscheinlich war die Zellzahl nicht ausreichend.

3.3.2 Interaktionsversuch II

Versuch	Medium	Zellen	Messzeitpunkt	Analyse	Zeitplan
Interaktion II	MEMalpha Nährmedium; Transf.: 5 µl Lipofektamin; unterschiedliche Konzentrationen des Promotors	SCP1 400.000/well	48h	RLU PPARγ-Promotor	0h: Aussaat 1h/24h: Transfektion 7h/30h: Nährmedium 49h/72h: Aufarbeitung, Analyse

Um die richtige PPARγ-Promotormenge zu ermitteln, mit der die PPARγ-Genaktivität in der Zelle messbar ist und um zu prüfen, ob die frühe, bereits eine Stunde nach Aussaat durchgeführte Transfektion einen Vorteil für das Transfektionsergebnis bringt, wurde der Interaktion-II-Versuch durchgeführt.

Im Interaktion-II-Versuch wurden 400.000 SCP1-Zellen pro well eine Stunde bzw. 24 Stunden nach Aussaat mit unterschiedlichen Mengen des PPARγ-Promotors transfiziert: 0 µg/ 0,6 µg/ 2 µg/ 5 µg Promotor. Sechs Stunden nach der Transfektion wurde das Transfektionsmedium durch das MEMalpha Kulturmedium ausgetauscht. 48 Stunden nach Transfektion erfolgte die Aufarbeitung nach dem Luziferase-Reportergenassay-Protokoll.

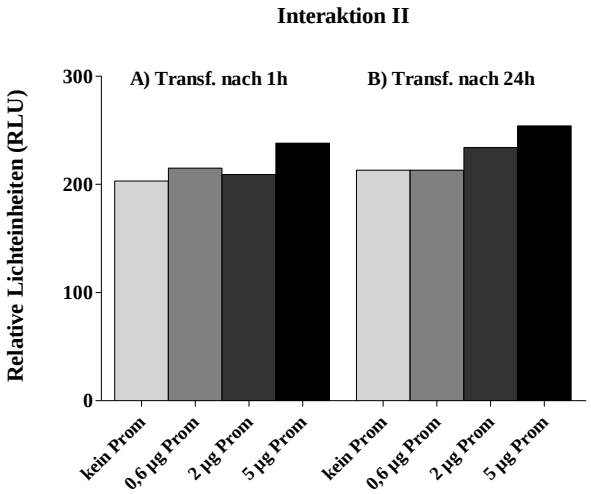

Abbildung 20: Darstellung der RLU-Werte im Luziferase-Genassay nach Transfektion unterschiedlicher PPARγ-Promotormengen (0 µg/0,6 µg/2 µg/5 µg) A) eine Stunde nach Aussaat bzw. B) 24 Stunden nach Aussaat in SCP1-Zellen**.** Darstellung der Mittelwerte (n=2).

Abbildung 20A: Wurde eine Stunde nach Aussaat der SCP1-Zellen bereits transfiziert, betrug der durchschnittliche RLU-Wert ohne Promotortransfektion 203. Wurden 0,6 µg PPARγ-Promotor transfiziert, stieg dieser dezent auf 105% und bei Transfektion von 2 µg Promotor auf 102%. Das Maximum von 117% wurde bei Transfektion von 5 µg Promotor erreicht.

Abbildung 20B: Wurde erst 24 Stunden nach Aussaat mit 0 µg bzw. 0,6 µg transfiziert, lagen RLU-Durchschnittswerte bei 213. Wurden 2 µg PPARγ-Promotor transfiziert, stieg der durchschnittliche Wert leicht auf 109% und bei Transfektion von 5 µg auf 119%.
Es wurden also keine relevanten Unterschiede der RLU-Werte bei Änderung des Zeitpunktes der Transfektion und mit Änderung der PPARγ-Promotormenge festgestellt.

Fazit:
Der Zeitpunkt der Transfektion nach Aussaat machte keinen Unterschied bezüglich des RLU-Wertes. Eine Stimulation ist erforderlich, da wahrscheinlich zu wenig PPARγ in den Zellen vorhanden ist.

3.3.3 Interaktionsversuch III

Versuch	Medium	Zellen	Messzeitpunkt	Analyse	Zeitplan
Interaktion III	MEMalpha Nährmedium; Transf.: 5 µl Lipofektamin; unterschiedliche Konzentrationen des Promotors; adipog. Stim.	SCP1 400.000/well	48 Stunden nach Transfektion	RLU PPARγ-Promotor	0h: Aussaat 24h: Transfektion 30h: Nährmedium, bzw. adipogene Stimulation 72h: Aufarbeitung, Analyse

Für den Interaktion-III-Versuch wurden SCP1-Zellen 24 Stunden nach Aussaat mit unterschiedlichen Mengen des PPARγ-Promotors im OptiMEM-Medium transfiziert: 0 µg/ 0,6 µg/ 2 µg/ 5 µg Promotor. Sechs Stunden nach der Transfektion wurde das Transfektionsmedium durch Nährmedium bzw. durch adipogenes Stimulationsmedium ersetzt. 72 Stunden nach Aussaat erfolgte die Aufarbeitung im Luziferase-Reportergenassay.

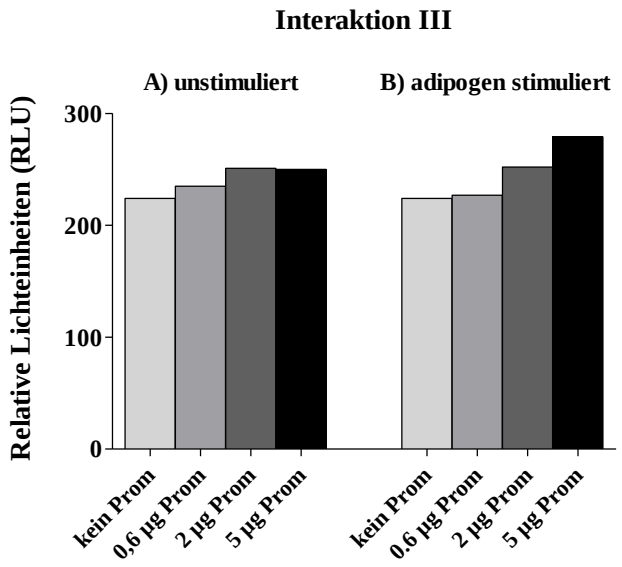

Abbildung 21: Darstellung der RLU-Werte im Luziferase-Reportergenassay nach Transfektion unterschiedlicher PPARγ-Promotormengen (0 µg/0,6 µg/2 µg/5 µg) in SCP1-Zellen A) ohne Stimulation, B) mit adipogener Stimulation. Darstellung der Mittelwerte (n=2)**.**

Abbildung 21A: Der RLU-Wert der Negativkontrolle lag im Interaktion-III-Versuch bei 224. Ohne adipogene Stimulation stiegen die Werte mit zunehmender Promotormenge dezent auf maximal 112% des Ausgangswertes.

Abbildung 21B: Wurde adipogen transfiziert, stiegen die RLU-Werte auf maximal 124% des Ausgangswertes an. Es ließen sich also insgesamt keine deutlichen Unterschiede ausmachen. Wahrscheinlich war die Stimulationsdauer nicht ausreichend, sodass diese im nächsten Interaktionsversuch auf 14 Tage verlängert und die Zellzahl wegen der damit erhöhten Proliferationsmöglichkeit reduziert wurde.

Fazit:

Nach 42-stündiger adipogener Stimulation zeigten sich keine deutlichen Unterschiede. Eine längere Stimulation ist erforderlich. Somit müssen weniger Zellen ausgesät werden.

3.3.4 Interaktionsversuch IV

Versuch	Medium	Zellen	Messzeitpunkt	Analyse	Zeitplan
Interaktion IV	MEMalpha Nährmedium/ adipog. Stim.; Transf.: 5 µl Lipofektamin; unterschiedliche Konzentrationen des Promotors	SCP1 40.000/well	Tag 23	RLU PPARγ-Promotor	0h: Aussaat T7: Konfluenz T7 bis T21: adipogene Stimulation T21: Transfektion nach 6h: Nährmedium T23: Aufarbeitung, Analyse

SCP1-Zellen wuchsen unter Standardkulturbedingungen etwa 7 Tage bis zu ihrer Konfluenz. Zellen der Gruppe A wurden für weitere 14 Tage unter Standardkulturbedingungen kultiviert und anschließend an Tag 21 für sechs Stunden mit reinem Transfektionsmedium ohne Transfektionssubstrat behandelt. Zellen der Gruppe B wurden ebenfalls weitere 14 Tage unter Standardkulturbedingungen kultiviert und im Anschluss mit unterschiedlichen PPARγ-Promotormengen transfiziert (0,6 µg; 2 µg; 5 µg). Zellen der Gruppe C wurden nach ihrer Konfluenz 14 Tage lang adipogen stimuliert. Anschließend erfolgte die Transfektion unterschiedlicher Mengen des PPARγ-Promotors (0,6 µg; 2 µg; 5 µg). 6 Stunden nach Transfektion wurde das Transfektionsmedium durch das Nährmedium MEMalpha ausgetauscht. Die Aufarbeitung und Analyse erfolgte 48 Stunden nach Transfektion.

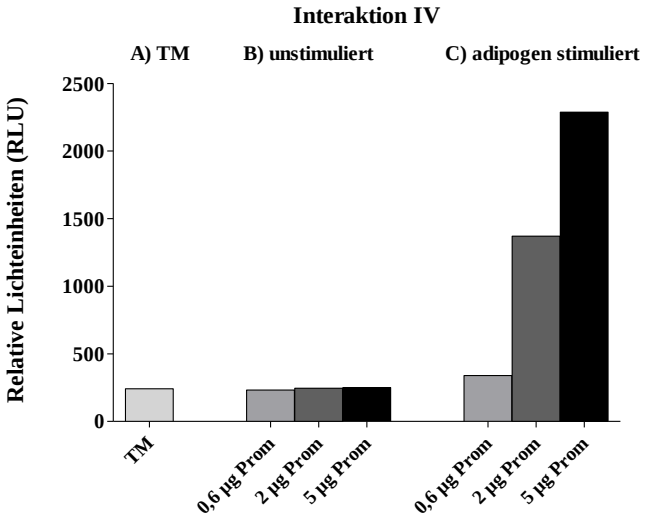

Abbildung 22: Darstellung der RLU-Werte im Luziferase-Reportgenassay A) unter Einfluss des Transfektionsmediums (TM), B) nach Transfektion unterschiedlicher PPARγ-Promotormengen (0,6 µg/2 µg/5 µg) ohne Stimulation und C) mit adipogener Stimulation nach Transfektion unterschiedlicher PPARγ-Promotormengen in SCP1-Zellen. Darstellung der Mittelwerte (n=2).

Abbildung 22A/B: Die Negativkontrolle des Interaktion-IV-Versuchs zeigte durchschnittliche RLU-Werte von 242. Ohne adipogene Stimulation stiegen diese nur sehr gering auf maximal 103% des Ausgangswertes an (5 µg PPARγ-Promotor).
Abbildung 22C: Die adipogene Stimulation bewirkte allerdings eine deutliche Steigerung der RLU-Werte. Bei Transfektion von 0,6 µg PPARγ-Promotor erhöhten sich diese auf 140%, bei 2 µg auf 566% und bei 5 µg auf 945%. Die adipogene Stimulation bewirkte also eine deutliche Erhöhung der PPARγ-Promotoraktivität und damit eine vermehrte Transkription des PPARγ-Gens.

Fazit:
Die adipogene Stimulation über 14 Tage führte zu einer steigenden PPARγ-Promotoraktivität.

3.3.5 Interaktionsversuch V

Versuch	Medium	Zellen	Messzeitpunkt	Analyse	Zeitplan
Interaktion V	MEMalpha Nährmedium/ adip. Stim. (+ Troglitazon); Transf.: 5 µl Lipofektamin; PPARγ-Promotor/ PPRE-Luc/ Runx2-Plasmid	SCP1 40.000/well	Tag 13	RLU PPARγ-Promotor	0h: Aussaat T7: Konfluenz T7 bis T11: adip. Stimulation (+ Troglitazon) T11: Transfektion nach 5h: adip. Stimulation (+ Troglitazon) T13: Aufarbeitung, Analyse

Die Antidiabetikagruppe Thiazolidindione bewirkt eine PPARγ-Aktivierung. Für den Interaktion-V-Versuch wurde aus dieser Gruppe das Medikament Troglitazon in Kombination mit der in den Vorversuchen angewandten adipogenen Stimulation eingesetzt. Außer dem PPARγ-Promotor wurden zwei weitere Transfektionssubstrate verwendet. Bei PPRE-Luc ist das ‚Peroxisome proliferator-response element' an das Luziferasegen gekoppelt. Es führt bei vermehrtem Aufkommen funktionsfähigen PPARγ-Proteins zu einer gesteigerten Luziferaseaktivität und dient somit als Reportergen dem PPARγ-Funktionsnachweis. Das Runx2-Plasmid bewirkt eine Steigerung der Runx2-mRNA und des Runx2-Proteins in der transfizierten Zelle (s. Runx2-Überexpressionsversuche).
SCP1-Zellen wuchsen 7 Tage unter Basisbedingungen bis zu ihrer Konfluenz. Zellen der Gruppe A wurden nach weiteren 4 Tagen unter Standardkulturbedingungen an Tag 11 für

sechs Stunden mit reinem Transfektionsmedium ohne Transfektionssubstrat behandelt. Anschließend inkubierten sie für weitere 42 Stunden unter Standardkulturbedingungen. Hier dienten sie als Negativkontrolle. Zellen der Gruppe B wurden nach insgesamt 11 Tagen in Kultur mit unterschiedlichen Substraten transfiziert (2 µg PPARγ-Promotor/ 0,5 µg PPRE-Luc/ 0,5 µg PPRE-Luc + 2 µg Runx2-Plasmid). Eine adipogene Stimulation erfolgte nicht. Bei Zellen der Gruppe C wurde nach Konfluenz eine 4-tägige adipogene Stimulation plus zusätzliche Troglitazongabe und die Transfektion unterschiedlicher Substrate (2 µg PPARγ-Promotor/ 0,5 µg PPRE-Luc/ 0,5 µg PPRE-Luc + 2 µg Runx2-Plasmid) durchgeführt. 5 Stunden nach Transfektion wurde das Transfektionsmedium wiederum gegen das Stimulationsmedium plus Troglitazon ausgetauscht. Die Aufarbeitung und Analyse erfolgte 48 Stunden nach Transfektion.

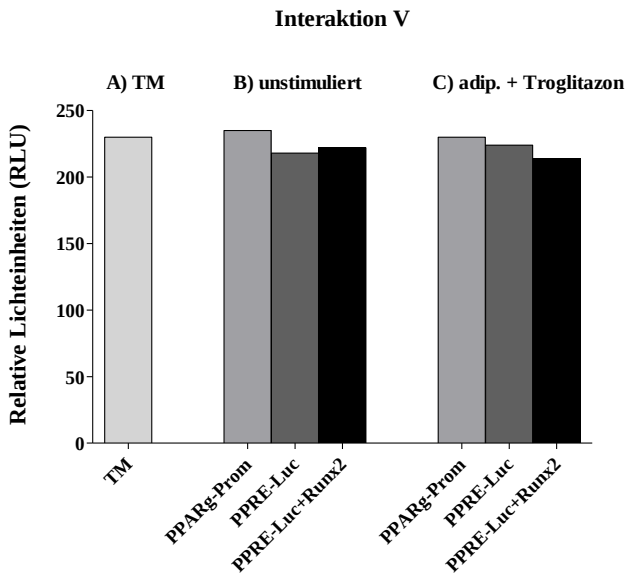

Abbildung 23: Darstellung der RLU-Werte im Luziferase-Genassay A) ohne Transfektion unter Einfluss des Transfektionsmediums (TM), B) nach Transfektion unterschiedlicher Substrate ohne Stimulation und C) nach Transfektion unterschiedlicher Substrate mit adipogener Stimulation plus Troglitazon in SCP1-Zellen. Darstellung der Mittelwerte (n=2).

Abbildung 23A/B: Im Interaktion-V-Versuch betrug der durchschnittliche RLU-Wert der Negativkontrolle 230. Ohne Stimulation und mit Transfektion des PPARγ-Promotors wurden RLU-Werte von durchschnittlich 102% gemessen, bei Transfektion von des PPRE-Luc 94% und bei Transfektion des PPRE-Luc plus Runx2-Plasmid 96%.

Abbildung 23C: Wurde zusätzlich adipogen und mit 10 µM Troglitazon stimuliert, betrug der durchschnittliche RLU-Wert bei Transfektion des PPARγ-Promotor 230, bei Transfektion des PPRE-Luc 97% und bei Transfektion des PPRE-Luc plus Runx2-Plasmid 93%.

Die zusätzliche, durch Troglitazon erfolgte Stimulation hat also auf Reportergenebene nicht ausreichend funktioniert, sodass im nächsten Versuch die Wirkung des Troglitazons auf SCP1-Zellen zuerst auf RNA-Ebene getestet wurde.

Fazit:
Die viertägige adipogene Stimulation plus Troglitazon führte nicht zu einer Induktion der PPARγ-Promotoraktivität oder der PPARγ-Transkriptionsaktivität.
Das Runx2-Plasmid führte nicht zu einer Repression der PPARγ-Transkriptionsaktivität.

3.3.6 Troglitazoneinfluss auf die PPARγ2-mRNA

Versuch	Medium	Zellen	Messzeitpunkte (Tage)	Analysierte Genexpression	Anmerkung
Troglitazon	MEMalpha-Nährmedium; adipogenes Stimulationsmedium; 10 µM Troglitazon	SCP1: 100.000/well	8T; 11T; 18T	PPARγ2-mRNA	adipogene Stimulation nach 4 Tagen; Troglitazon

Dieser Versuch wurde durchgeführt, um den Einfluss des adipogenen Stimulationsmediums in Kombination mit Troglitazon auf die PPARγ2-mRNA zu messen.
Alle SCP1-Zellen inkubierten vier Tage unter Standardkulturbedingungen bis zu ihrer Konfluenz. Zellen der Gruppe A wurden nicht adipogen stimuliert. Sie dienten als Negativkontrolle und wurden nach weiteren 4, 7 bzw. 14 Tagen abgeerntet. Zellen der Gruppe B wurden ab Tag 4 über einen Zeitraum von 4, 7 bzw. 14 Tage adipogen stimuliert. Gruppe C-Zellen wurden ab Tag 4 adipogen stimuliert und mit 10 µM Troglitazon kostimuliert. Auch hier wurde die Stimulation über 4, 7 bzw. 14 Tage durchgeführt Aufarbeitung und Analyse erfolgten durch RT-PCR und ‚Real-Time'-PCR.

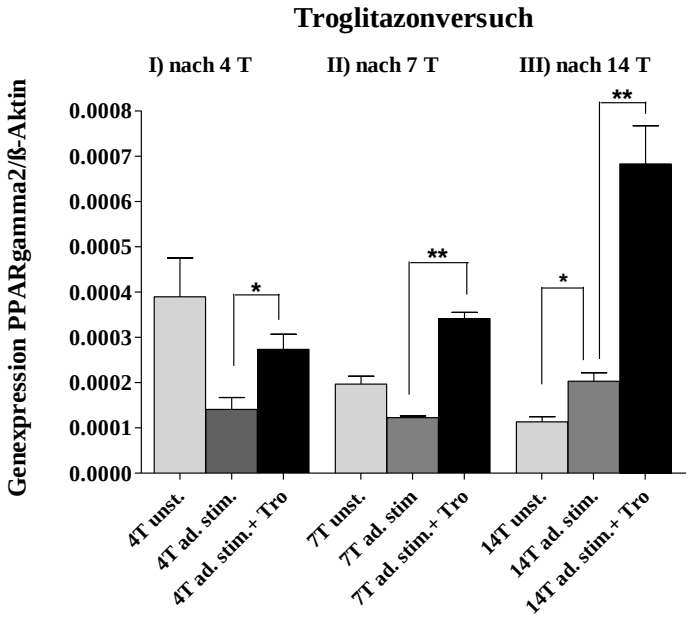

Abbildung 24: Darstellung der PPARγ2-Genexpression bei SCP1-Zellen ohne Stimulation/ mit adipogener Stimulation/ mit adipogener Stimulation und Troglitazon A) nach 4 Tagen, B) nach 7 Tagen und C) nach 14 Tagen, jeweils in Relation zur β-Aktin-Genexpression in der ‚Real-Time'-PCR; Darstellung der Mittelwerte (n=3).

Abbildung 24: Im Troglitazonversuch fiel der basale PPARγ2-mRNA-Spiegel in SCP1-Zellen von Tag 4 bis Tag 14 auf 30% ab. Nach adipogener Stimulation wurde die PPARγ2-mRNA an Tag 4 und Tag 7 auf 37% bzw. 34% des Ausgangswertes (4T unst.) reduziert. An Tag 14 induzierte die adipogene Stimulation die PPARγ2-mRNA-Produktion signifikant auf 182% der unstimulierten Zellen desselben Messzeitpunktes. Wurde parallel adipogen stimuliert und Troglitazon hinzugegeben, führte dies an jedem der drei gemessenen Zeitpunkte zu einer signifikant vermehrten PPARγ2-mRNA verglichen mit Ergebnissen der nur adipogen stimulierten Zellen. An Tag 4 betrug diese Steigerung 217% des Vergleichswertes, überstieg jedoch nicht die Kontrolle. An Tag 7 wurde die PPARγ2-Genexpression auf 278% und an Tag 14 auf 348% des Vergleichswertes induziert. An beiden Tagen wurde die Kontrolle übertroffen.

Fazit:

Der basale PPARγ2-mRNA-Spiegel fiel in SCP1-Zellen auf 30% in 14 Tagen ab.

Nach 4 und 7 Tagen fand eine Hemmung und nach 14 Tagen eine Induktion der PPARγ2-mRNA durch die adipogene Stimulation statt. Der zusätzliche Troglitazoneinfluss führte zur Hemmung der PPARγ2-mRNA nach 4 Tagen im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle, aber zur Induktion nach 7 und 14 Tagen, also zur früheren und stärkeren PPARγ2-mRNA Induktion.

3.3.7 Interaktionsversuch VI

Versuch	Medium	Zellen	Messzeitpunkt	Analyse	Zeitplan
Interaktion VI	MEMalpha Nährmedium/ adipog. Stim. (+ Troglitazon); Transf.: 5 µl Lipofektamin; PPARγ-Promotor (2 µg; 5 µg)	SCP1 40.000/well	Tag 23	PPARγ2-mRNA, RLU PPARγ-Promotor	0h: Aussaat T7: Konfluenz T7 bis T21: adipogene Stimulation (+ Troglitazon) T21: Transfektion nach 5h: adip. Stimulation (+ Troglitazon) T23: Aufarbeitung, Analyse

Um einen direkten Vergleich zwischen der Expression der PPARγ2-mRNA (‚Real-Time'-PCR) und der Funktionalität des PPARγ-Proteins (Luziferase-Reportergenassay) zu erhalten wurde der Interaktion-VI-Versuch durchgeführt.

SCP1-Zellen wuchsen hierbei 7 Tage unter Standardkulturbedingungen bis zu ihrer Konfluenz. Wurde nicht adipogen stimuliert, folgten bis zur Transfektion weitere 14 Tage unter diesen Bedingungen. Wurde adipogen stimuliert, fand dies nach Konfluenz ggf. mit Kostimulation durch Troglitazon über einen Zeitraum von 14 Tagen statt. Anschließend erfolgte die Transfektion von 2 µg bzw. 5 µg PPARγ-Promotor und die Weiterführung der entsprechenden Stimulation. Aufarbeitung und Analyse wurden 48 Stunden nach Transfektion an Tag 23 durch RT-PCR und ‚Real-Time'-PCR bzw. durch den Luziferase-Reportergenassay durchgeführt.

Zellen der Gruppe A wurden nicht stimuliert, Zellen der Gruppe B wurden adipogen stimuliert und Zellen der Gruppe C wurden mit adipogenem Stimulationsmedium und Troglitazon kostimuliert.

Interaktion VI

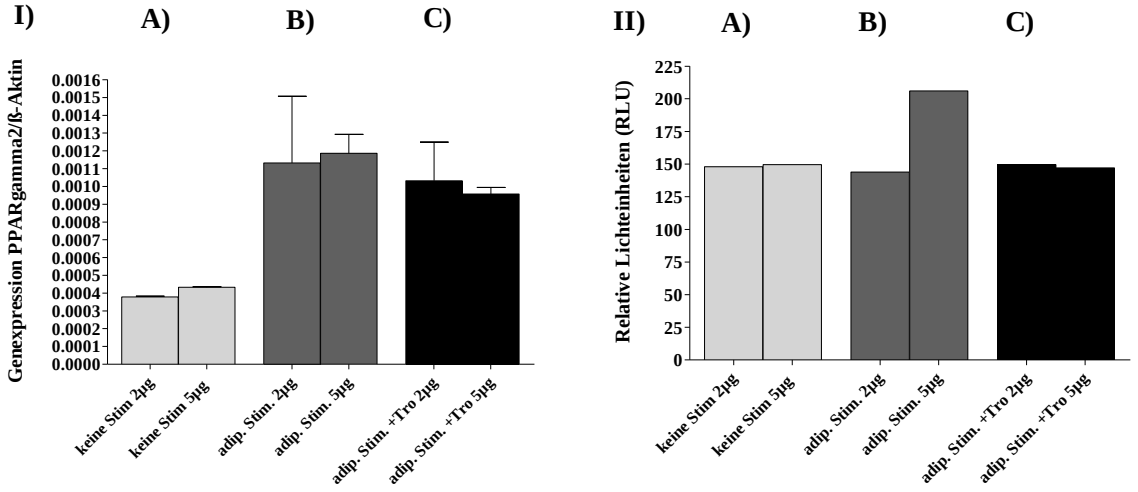

Abbildung 25: I) Darstellung der PPARγ2-Genexpression in der ‚Real-Time'-PCR nach Transfektion des PPARγ-Promotors IA) ohne Stimulation, IB) mit adipogener Stimulation, IC) mit adipogener Stimulation plus Troglitazon, jeweils in Relation zum β-Aktin-Gen. Darstellung der Mittelwerte (n=2) und der entsprechenden Standardfehler (SEM).
II) Darstellung der RLU-Werte im Luziferase-Reportergenassay nach Transfektion des PPARγ-Promotors IIA) ohne Stimulation, IIB) mit adipogener Stimulation, IIC) mit adipogener Stimulation und Troglitazon. Darstellung der Mittelwerte (n=2) bei SCP1-Zellen.

Abbildung 25: Bei nicht stimulierten Zellen ergab die Transfektion unterschiedlicher Promotormengen sowohl auf mRNA-Ebene als auch bezüglich der PPARγ-Promotoraktivität keinen deutlichen Unterschied. Wurde adipogen stimuliert, führte dies zu einem Anstieg der PPARγ2-Genexpression auf etwa 300% (2 µg Promotor) bzw. 273% (5 µg Promotor) des Ausgangswertes. Dieser Anstieg konnte auf der Promotorebene bei Transfektion von 2 µg Promotor nicht festgestellt werden. Wurden 5 µg Promotor transfiziert, fand eine Steigerung des durchschnittlichen RLU-Wertes auf 137% des Vergleichswertes an. Wurde eine Kostimulation durch adipogenes Stimulationsmedium plus Troglitazon durchgeführt, konnte dies keinen weiteren Anstieg der PPARγ2-Genexpression bewirken. Es kam sogar zu einer dezenten Reduktion der Genexpression auf 273% bzw. 220% des Ausgangswertes. Die Aktivität des PPARγ-Promotors konnte durch die Kostimulation ebenfalls nicht erhöht werden.

Fazit:

Die adipogene Stimulation über 14 Tage führte zu einem deutlichen Anstieg der PPARγ2-mRNA und der Promotoraktivität bei Transfektion von 5 µg PPARγ-Promotor. Die Kostimulation mit Troglitazon erzielte auf mRNA-Ebene keine Steigerung, auf Promotorebene eine Reduktion im Vergleich zur alleinigen adipogenen Stimulation.

3.3.8 Interaktionsversuch VII

Versuch	Medium	Zellen	Messzeitpunkt	Analyse	Zeitplan
Interaktion VII	MEMalpha Nährmedium/ adip. Stim.; Transf.: 5 µl Lipofektamin; PPARγ-Promotor (2 µg; 5 µg)/ PPRE-Luc (2 µg; 5 µg)/ Runx2-Plasmid (2 µg)	SCP1 40.000/well	T23	PPARγ2-mRNA, RLU PPARγ-Promotor	0h: Aussaat T7: Konfluenz T7 bis T21: adip. Stim. T21: Transfektion nach 5h: adip. Stimulations-medium T23: Aufarbeitung, Analyse

Im Interaktion-VII-Versuch kam erstmals das Runx2-Plasmid in der Luziferase-Versuchsreihe zum Einsatz, durch das die Produktion der Runx2-mRNA und des Proteins in SCP1-Zellen gesteigert wird (s. 3.2.1 und 3.2.2). Ziel dieses Einsatzes war die bessere Erfassung der Lokalisation der Interaktion zwischen Runx2-Plasmid und PPARγ. Findet diese bereits am PPARγ-Promotor statt, erwartet man nach Runx2-Plasmidtransfektion eine verminderte PPARγ-Promotoraktivität im Luziferase-Genassay und dadurch eine verminderte PPARγ-mRNA-Produktion in der PCR. Findet diese erst später statt, erwartet man keine verminderte PPARγ-Produktion in der PCR und keine verminderte PPARγ-Promotoraktivität. Allerdings wäre dann eine Reduktion der Funktionalität des Proteins anzunehmen. Diese lässt sich durch das PPRE erfassen. Um eine gut detektierbare basale PPARγ-Aktivität zu erhalten wurde adipogen stimuliert.

SCP1-Zellen wuchsen unter Standardkulturbedingungen 7 Tagen bis zu ihrer Konfluenz. Wurde nicht stimuliert, folgten weitere 14 Tage unter diesen Bedingungen. Wurde adipogen stimuliert, fand dies nach Konfluenz der Zellen bis zur Transfektion über einen Zeitraum von 14 Tagen statt. Im Anschluss wurde die adipogene Stimulation fortgesetzt. Aufarbeitung und Analyse erfolgten 48 Stunden nach Transfektion an Tag 23 durch RT-PCR und ‚Real-Time'-PCR bzw. durch Luziferase-Reportergenassay.

Zellen der Gruppe A wurden nicht stimuliert, allerdings mit 2 µg bzw. 5 µg PPARγ-Promotor transfiziert. Zellen der Gruppe B wurden stimuliert und mit 2 µg bzw. 5 µg PPARγ-Promotor transfiziert. Bei Zellen der Gruppe C erfolgte eine adipogene Stimulation und die Transfektion von 2 µg bzw. 5 µg PPARγ-Promotor plus 2 µg Runx2-Plasmid. Zellen der

Gruppe D wurden ebenfalls adipogen stimuliert und mit 2 µg bzw. 5 µg PPRE-Luc transfiziert.

Interaktion VII

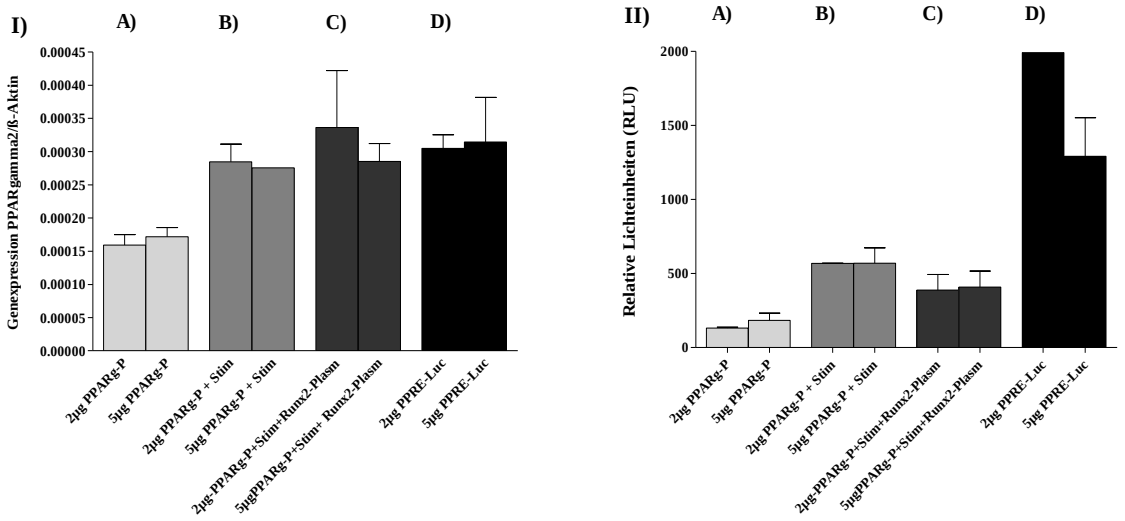

Abbildung 26: I) Darstellung der PPARγ2-Genexpression in der ‚Real-Time'-PCR IA) nach Transfektion des PPARγ-Promotors ohne Stimulation, IB) nach adipogener Stimulation und Transfektion des PPARγ-Promotors, IC) nach adipogener Stimulation und Kotransfektion des PPARγ-Promotors und des Runx2-Plasmids, ID) nach adipogener Stimulation und Transfektion des PPRE-Luc, jeweils in Relation zum β-Aktin-Gen. Darstellung der Mittelwerte (n=2) und der entsprechenden Standardfehler (SEM).
II) Darstellung der RLU-Werte im Luziferase-Reportergenassay IIA) nach Transfektion des PPARγ-Promotors ohne Stimulation, IIB) nach adipogener Stimulation und Transfektion des PPARγ-Promotors, IIC) nach adipogener Stimulation und Kotransfektion des PPARγ-Promotors und des Runx2-Plasmids, IID) nach adipogener Stimulation und Transfektion des PPRE-Luc, jeweils in Relation zum β-Aktin-Gen. Darstellung der Mittelwerte (n=2) bei SCP1-Zellen.

Abbildung 26: Bei nicht stimulierten SCP1-Zellen ergab sich kein wesentlicher Unterschied zwischen der Transfektion mit 2 µg und 5 µg PPARγ-Promotor sowohl auf RNA-Ebene als auch bezüglich der PPARγ-Promotoraktivität. Bei adipogener Stimulation erhöhte sich die PPARγ2-Genexpression auf 182% (2 µg Promotor) bzw. 174% (5 µg Promotor), der RLU-Wert stieg auf 435% bzw. 309% des Ausgangswertes (2µg Prom) an. Die zusätzliche Gabe von Runx2-Plasmid führte bei Transfektion von 2 µg Promotor zu einem weiteren Anstieg der PPARγ2-Genexpression auf 218% des Ausgangswertes, wohingegen bei 5 µg Promotortransfektion eine leichte Reduktion auf 168% zu erkennen war. Auch die PPARγ-Promotoraktivität wurde auf 297% bzw. 222% des Ausgangswertes reduziert.

Adipogen stimulierte Zellen, die zusätzlich mit PPRE-Luc transfiziert wurden, zeigten eine Steigerung der PPARγ2-Genexpression auf 191% (2 µg Promotor) bzw. 180% (5 µg Promotor) im Vergleich zu unstimulierten Zellen. Auch die PPARγ-Promotoraktivitätsmessung ergab mit 898% bzw. 701% deutlich höhere RLU-Werte.

Fazit:
PPARγ-Promotoraktivität und PPARγ2-mRNA stiegen unter adipogener Stimulation an. Die Zugabe des Runx2-Plasmids reduzierte die PPARγ-Promotoraktivität. Eine Veränderung der PPARγ2-mRNA durch das Runx2-Plasmid ist jedoch nicht zu beobachten. Die Induktion von PPRE-Luc nach adipogener Stimulation zeigt, dass das gebildete PPARγ-Protein auch funktionsfähig ist.

3.3.9 Interaktionsversuch VIII

Versuch	Medium	Zellen	Messzeitpunkt	Analyse	Zeitplan
Interaktion VIII	MEMalpha Nährmedium/ adip. Stim. Transf.: 5 µl Lipofektamin; PPARγ-Promotor (2 µg; 5 µg)/ PPRE-Luc (2 µg; 5 µg); Runx2 Plasmid (2 µg)	SCP1 40.000/well	Tag 23	PPARγ2-mRNA, RLU PPARγ-Promotor	0h: Aussaat T7: Konfluenz T7 bis T21: adip. Stim. T21: Transfektion nach 10h: adip. Stim. T23: Aufarbeitung, Analyse

Der Interaktion-VIII-Versuch wurde durchgeführt, um die Interaktion zwischen Runx2 und PPARγ besser zu lokalisieren und die Ergebnisse des Interaktion-VII-Versuchs zu verifizieren.
Hierbei wurde im Gegensatz zum letzten Versuch zusätzlich eine unstimulierte Kontrolle zur PPRE-gebundenen Luziferasemessung hinzugefügt.
SCP1-Zellen wuchsen 7 Tage unter Standardkulturbedingungen bis zur Konfluenz. Wurde nicht stimuliert, folgten bis zur Transfektion weitere 14 Tage unter diesen Konditionen. Wurde adipogen stimuliert, fand dies nach Konfluenz der Zellen über einen Zeitraum von 14 Tagen statt. Daran schlossen sich die Transfektion und eine weitere adipogene Stimulation an. Aufarbeitung und Analyse erfolgten 48 Stunden nach Transfektion an Tag 23 durch ‚Real-Time'-PCRs und Luziferase-Reportergenassays.
Zellen der Gruppe A wurden nicht adipogen stimuliert, allerdings mit PPARγ-Promotor transfiziert. Bei Zellen der Gruppe B erfolgte eine adipogene Stimulation und die Transfektion des PPARγ-Promotors. Zellen der Gruppe C wurden adipogen stimuliert und mit PPARγ-Promotor und Runx2-Plasmid kotransfiziert. Bei Zellen der Gruppe D wurde keine Stimulation durchgeführt. Sie wurden mit PPRE transfiziert. In der Gruppe E fanden eine adipogene Stimulation und die Transfektion von PPRE-Luc statt.

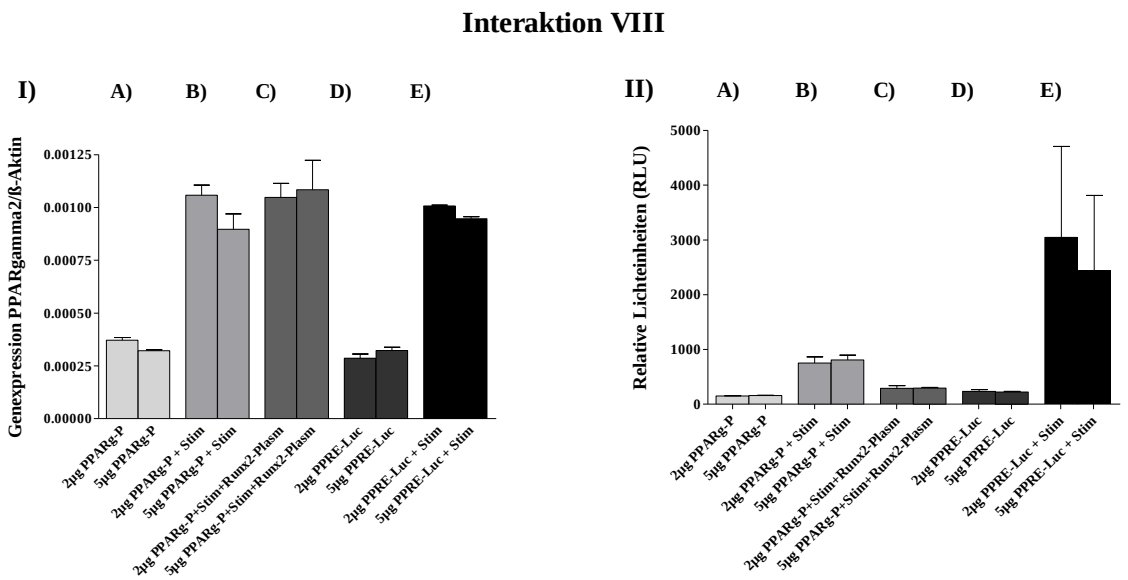

Abbildung 27: I) Darstellung der PPARγ2-Genexpression in der ‚Real-Time'-PCR IA) nach Transfektion des PPARγ-Promotors ohne Stimulation, IB) nach adipogener Stimulation und Transfektion des PPARγ-Promotors, IC) nach adipogener Stimulation und Kotransfektion des PPARγ-Promotors und des Runx2-Plasmids, ID) nach Transfektion des PPRE-Luc ohne Stimulation, IE) nach adipogener Stimulation und nach Transfektion des PPRE-Luc, jeweils in Relation zum β-Aktin-Gen. Darstellung der Mittelwerte (n=2) und der entsprechenden Standardfehler (SEM).
II) Darstellung der RLU-Werte im Luziferase-Reportergenassay IIA) nach Transfektion des PPARγ-Promotors ohne Stimulation, IIB) nach adipogener Stimulation und Transfektion des PPARγ-Promotors, IIC) nach adipogener Stimulation und Kotransfektion des PPARγ-Promotors und des Runx2-Plasmids, IID) nach Transfektion des PPRE-Luc ohne Stimulation, IIE) nach adipogener Stimulation und nach Transfektion des PPRE-Luc, jeweils in Relation zum β-Aktin-Gen. Darstellung der Mittelwerte (n=2) bei SCP1-Zellen.

Abbildung 27: Bei nicht stimulierten und PPARγ-transfizierten SCP1-Zellen ergab sich kein wesentlicher Unterschied zwischen der Transfektion mit 2 µg und 5 µg PPARγ-Promotor sowohl auf mRNA-Ebene als auch bezüglich der PPARγ-Promotoraktivität. Bei adipogener Stimulation erhöhte sich die PPARγ2-Genexpression auf 285% (2 µg Promotor) bzw. 278% (5 µg Promotor), der RLU-Wert stieg auf 495% bzw. 505% an. Die zusätzliche Gabe von Runx2-Plasmid führte zu einer geringen Veränderung der PPARγ2-Genexpression auf 282% (2µg Promotor) bzw. 363% des Ausgangswertes (5µg Promotor). Die PPARγ-Promotoraktivität wurde auf 192% bzw. 184% reduziert.

Nicht-stimulierte Zellen, die mit PPRE-Luc transfiziert wurden, zeigten eine Reduktion der PPARγ-Genexpression auf 76% (2 µg Promotor) bzw. eine etwa gleichbleibende (5 µg Promotor) PPARγ2-Genexpression im Vergleich zur Referenzgruppe. Die PPARγ-Promotoraktivitätsmessung ergab etwas höhere RLU-Werte mit 155% bzw. 139%. Wurden diese Zellen hingegen adipogen stimuliert, stieg die PPARγ2-Genexpression auf 271% bzw. 293% an. Der durchschnittliche RLU-Wert verzeichnete einen deutlichen Anstieg auf 2011% bzw. 1523% des Ausgangswertes.

Fazit:
PPARγ-Promotoraktivität und PPARγ-mRNA stiegen unter adipogener Stimulation an. Die Zugabe von Runx2 reduzierte die PPARγ-Promotoraktivität. Eine Veränderung der PPARγ2-mRNA durch das Runx2-Plasmid konnte jedoch nicht beobachtet werden. Die Induktion von PPRE-Luc zeigte, dass das durch adipogene Stimulation gebildete PPARγ-Protein funktionsfähig und vermehrt aktiv ist.

3.3.10 Interaktionsversuch IX

Versuch	Medium	Zellen	Messzeitpunkt	Analyse	Zeitplan
Interaktion IX	MEMalpha Nährmedium/ adipog. Stim. Transf.: 5 µl Lipofektamin; PPARγ-Promotor (2 µg; 5 µg)/ PPRE-Luc (2 µg; 5 µg)/ Runx2 Plasmid (2 µg)	SCP1 40.000/well	Tag 25	PPARγ2-mRNA, RLU PPARγ-Promotor	0h: Aussaat T14: Konfluenz T14 bis T23: adip. Stim. T23: Transfektion nach 10h: adipog. Stimulations-medium T25: Aufarbeitung, Analyse

SCP1-Zellen wuchsen 14 Tage unter Standardkulturbedingungen bis zu ihrer Konfluenz. Wurde nicht stimuliert, folgten weitere 9 Tage unter diesen Konditionen bis zur zehnstündigen Transfektion. Wurde adipogen stimuliert, fand dies nach Konfluenz der Zellen über einen Zeitraum von 9 Tagen statt. Daran schlossen sich die Transfektion und eine weitere adipogene Stimulation an. Aufarbeitung und Analyse erfolgten 48 Stunden nach Transfektion an Tag 25 durch RT-PCR und ‚Real-Time'-PCR bzw. durch Luziferase-Reportergenassay.

Zellen der Gruppe A wurden nicht adipogen stimuliert, allerdings mit 2 µg bzw. 5 µg PPARγ-Promotor transfiziert. Zellen der Gruppe B wurden adipogen stimuliert und mit 2 µg bzw. 5 µg PPARγ-Promotor transfiziert. Zellen der Gruppe C wurden adipogen stimuliert und mit PPARγ-Promotor (2 µg; 5 µg) und Runx2-Plasmid (2 µg) transfiziert. Bei Zellen der Gruppe D wurde keine adipogene Stimulation durchgeführt. Sie wurden mit 2 µg bzw. 5 µg PPRE transfiziert. In der Gruppe E fand eine adipogene Stimulation statt. Auch hier wurde PPRE-Luc (2 µg; 5 µg) transfiziert.

Interaktion IX

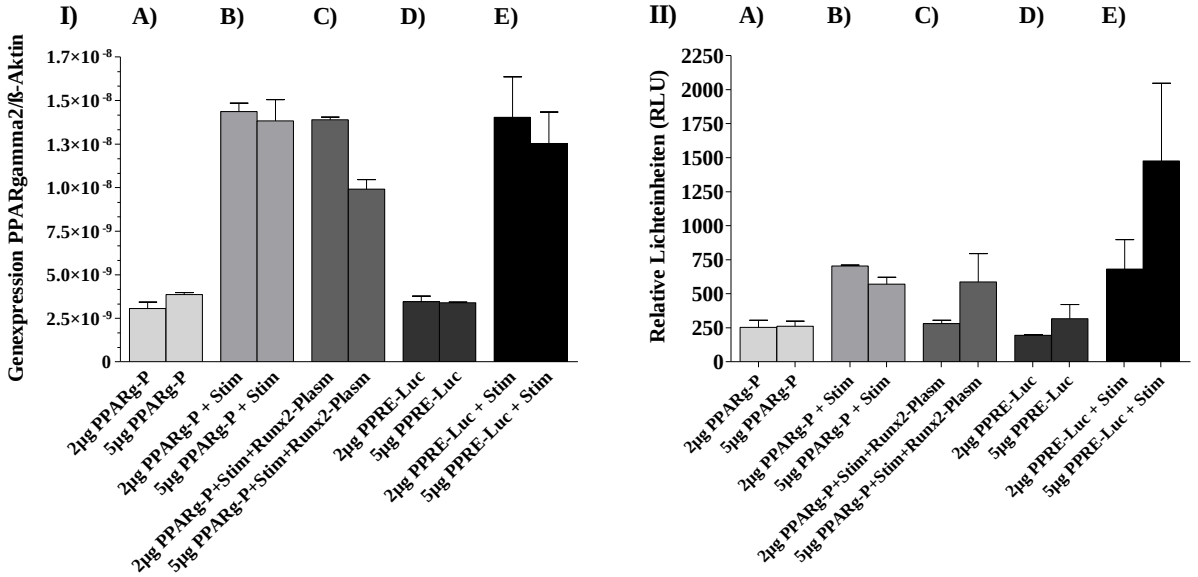

Abbildung 28: I) Darstellung der PPARγ2-Genexpression in der ‚Real-Time'-PCR IA) nach Transfektion des PPARγ-Promotors ohne Stimulation, IB) nach adipogener Stimulation und Transfektion des PPARγ-Promotors, IC) nach adipogener Stimulation und Kotransfektion des PPARγ-Promotors und des Runx2-Plasmids, ID) nach Transfektion des PPRE-Luc ohne Stimulation, IE) nach adipogener Stimulation und nach Transfektion des PPRE-Luc, jeweils in Relation zum β-Aktin-Gen. Darstellung der Mittelwerte (n=2) und der entsprechenden Standardfehler (SEM).
II) Darstellung der RLU-Werte im Luziferase-Reportergenassay IIA) nach Transfektion des PPARγ-Promotors ohne Stimulation, IIB) nach adipogener Stimulation und Transfektion des PPARγ-Promotors, IID) nach adipogener Stimulation und Kotransfektion des PPARγ-Promotors und des Runx2-Plasmids, IID) nach Transfektion des PPRE-Luc ohne Stimulation, IIE) nach adipogener Stimulation und nach Transfektion des PPRE-Luc, jeweils in Relation zum β-Aktin-Gen. Darstellung der Mittelwerte (n=2) bei SCP1-Zellen.

Abbildung 28: Als Ausgangswert wurde folgender Wert verwendet: 2µg PPARγ-Promotor. Die PPARγ2-mRNA und -Promotoraktivität zeigten in unstimulierten Zellen bei Transfektion unterschiedlicher Promotormengen nur einen geringen Unterschied. Wurde zusätzlich adipogen transfiziert, fand eine deutliche Steigerung der PPARγ-Genexpression auf 478,8% bzw. 359,3% des Ausgangswertes statt. Dieser Anstieg ließ sich mit 290,9% bzw. 224,5% des jeweiligen Ausgangswertes auch auf der Ebene der PPARγ-Promotoraktivität nachvollziehen. Das Runx2-Plasmid bewirkte bei Kotransfektion mit 2 µg PPARγ-Promotor eine leichte Reduktion der PPARγ2-mRNA auf 461,8%, bei Kotransfektion von 5 µg PPARγ-Promotor eine Reduktion der PPARγ2-mRNA auf 256,3%. Die PPARγ-Promotoraktivität wurde auf 114,2% bzw. 239,3% des Ausgangswertes verändert.

Unstimulierte, mit PPRE-Luc transfizierte Zellen verhielten sich bezüglich beider Parameter ähnlich wie unstimulierte, PPARγ-Promotor-transfizierte Zellen. Wurde adipogen stimuliert, führte dies zu einer deutliche Steigerung der mRNA auf 474,7% bzw. 325,9% des Ausgangswertes sowie der Promotoraktivität auf 263,8% bzw. 543,6% des jeweiligen Ausgangswertes.

Fazit:

PPARγ-Promotoraktivität und PPARγ2-mRNA stiegen unter adipogener Stimulation an. Die PPARγ-Promotoraktivität wurde durch das Runx2-Plasmid nur teilweise bei Transfektion von 2µg PPARγ-Promotor reduziert. Die Induktion von PPRE-Luc zeigt, dass das durch adipogene Stimulation vermehrt gebildete PPARγ-Protein funktionsfähig und vermehrt aktiv ist.

4. Diskussion

4.1 Runx2-‚Knockdown'

4.1.1 Vor- und Nachteile der Arbeit mit pHOB

Primäre humane Osteoblasten entstammen direkt den Knochenproben eines Operationsgebietes in Femur oder Tibia (s. 2.1.1.1). Die Zellen sind nicht osteoblastär differenziert und können sich zu Adipozyten, Chondrozyten und Myoblasten entwickeln. Sie werden in der Literatur häufig als MSC bezeichnet. Da es sich aber nicht um Stammzellen im eigentlichen Sinne handelt, ist diese Bezeichnung unpräzise. Der Begriff pHOB wird im Sinne der mesenchymalen Vorläuferzelle verwendet und dient der Beschreibung, dass die Zellen direkt aus Knochenfragmenten gewonnen wurden.

pHOB können in Abhängigkeit von Alter, Geschlecht, Hormonstatus, zugrundeliegender Erkrankung und anderer Faktoren der Patienten interindividuell unterschiedlich sein. Beispielsweise vermutet man, dass pHOB älterer Patienten mehr zur Ausprägung adipogener Markerproteine neigen als pHOB junger Menschen (Giesen, 2007). Zudem kann eine begrenzte Zellanzahl die Vielfalt der Versuchsansätze einschränken, sodass in pHOB-Studien eine größere Varianz der Ergebnisse möglich ist. Den wesentlichen Vorteil dieser Zellen stellt jedoch der große klinische Bezug dar. Sie gewähren einen realistischen Einblick in die Physiologie bzw. Pathophysiologie der osteogenen Differenzierung. Anhand dieser Zellen können experimentell hervorgerufene Veränderungen in vitro relativ authentisch ermittelt werden. Studien über die Differenzierung menschlichen Knochens werden also durch den Einsatz der pHOB vereinfacht.

Im Folgenden werden die Mittelwerte der pHOB beider Patienten aus den Runx2-‚Knockdown'-Versuchen diskutiert, da die Zellen gleichzeitig unter denselben Rahmenbedingungen kultiviert wurden und die Patienten vergleichbar alt waren (s. 2.1.1.1). Es gilt dabei zu beachten, dass Patient 1 weiblich ist und die Knochenfragmente aus dem proximalen Femur entnommen wurden, während es sich bei dem zweiten Patienten um einen Mann handelt, dessen Proben dem distalen Femur entstammen. Zudem war bei Patient 2 eine Arthrose des operierten Gelenks vorbeschrieben. Ein entsprechender Hinweis lag bei Patient 1 nicht vor. pHOB des ersten Patienten wurden vor Versuchsbeginn 13 Tage länger unter Basisbedingungen kultiviert als die des zweiten Patienten, womit ein Unterschied bezüglich des Differenzierungsstatus möglich ist.

4.1.2 Die siRNA-Runx2 führt in pHOB zur Runx2-Suppression

Runx2 ist essentiell für den Übergang mesenchymaler Vorläuferzellen in Osteoblasten. Um die Bedeutung dieses Faktors während der osteogenen Differenzierung besser zu verstehen, wurden Runx2-‚Knockdown'-Versuche mithilfe einer gegen Runx2 gerichteten siRNA in pHOB durchgeführt. siRNAs sind kleine, etwa 21 bis 25 Nukleotide umfassende RNA-Doppelstränge. Sie sind Teil der RNA-Interferenz, die in den letzen Jahren in den Fokus der Wissenschaft gerückt ist, und führen zu einer hochspezifischen mRNA-Spaltung. Die doppelsträngige RNA wird vorerst durch die Endonuklease DICER (von engl. to dice: in Würfel schneiden) prozessiert, bevor sie im ‚RNA-induced silencing complex' (RISC) auf einen Strang reduziert wird, spezifisch an die mRNA bindet und diese schließlich spaltet. Anschließend bleibt die siRNA funktionsfähig am RISC gebunden, wodurch eine einzelne siRNA zum Abbau mehrerer mRNAs führen kann (Gavrilov and Saltzman, 2012). Durch Verwendung der siRNAs erfolgt ein spezifischer und potenter ‚Knockdown'. Als Negativkontrolle wurde eine ‚non-silencing'-siRNA (Kontroll-siRNA; siKo) eingesetzt, die nicht zur Beeinflussung der Genexpression führt, da sie zu keinem Säugetiergen eine Homologie aufweist.

Die siRunx2 führte im Kurzzeit-‚Knockdown'-Versuch nicht zu einer ausreichenden Suppression der Runx2-Expression. Alle drei Zeitpunkte (48%, 41%, 168% des 0-Wertes) erfüllten formal nicht die Kriterien einer suffizienten Gensuppression, die eine mRNA-Reduktion auf 10% des Ausgangswertes bzw. einen signifikanten Unterschied im t-Test erforderlich machen (s. 3.1.1). Da zeitgleich eine Steigerung der PPARγ-Expression vorliegt und der ‚Knockdown' mittels RNA-Interferenz spezifisch ist, liegt ein methodisches Problem im Kurzzeit-Versuch für die fehlende Runx2-Suppression als Ursache nahe. Beispielweise können Fehler bei der Durchführung der PCR verantwortlich sein. Eventuell war aber auch die Anzahl der Versuche nicht ausreichend, woraus eine größere Varianz der Ergebnisse resultieren kann. Ein möglicher Effekt, in diesem Falle die Suppression, könnte sich somit nicht entsprechend in den Ergebnissen wiederfinden.

Da M. Giesen (2007) nach einmaliger Transfektion derselben siRunx2 in pHOB-Zellen eine für vier Tage suffiziente Runx2-Suppression beobachtete, die anschließend abschwächte, empfahl er eine erneute Transfektion zum Erhalt der Gensuppression. Gründe für die zeitlich begrenzte Wirkung liegen in der Halbwertszeit der siRNA, die in „bloßem" Zustand der siRNA im Serum mit wenigen Minuten bis zu einer Stunde sehr kurz ist (Behlke, 2006; Stein and Lian, 1993). Diese variiert in Abhängigkeit von der Lokalisation und der vorliegenden Form der siRNA. Doppelsträngige RNA ist deutlich stabiler als Einzelstrang-RNA und damit

abhängig von der DICER- und RISC-Aktivität (Hutvagner and Zamore, 2002). Dadurch arbeiten siRNAs in Säugetierzellen über durchschnittlich 66 Stunden (Chiu and Rana, 2002), bevor sie durch RNasen abgebaut oder über mehrere Zellteilungen hinweg heraus verdünnt werden.

Im Langzeit-‚Knockdown'-Versuch wurden also zwei siRunx2-Transfektionen durchgeführt (Tag 0; Tag4). Die bereits 48 Stunden nach einfacher siRunx2-Transfektion hochsignifikant supprimierten Runx2-mRNA-Werte bleiben nach einer zweiten siRunx2-Transfektion über 29 Tage erhalten (s. 3.1.2.1). Für diese Zeitspanne kann die unmittelbare Funktion der siRunx2 nicht mehr als Erklärung dienen, da die Wirkdauer der siRNA überschritten ist und Zellproliferationen stattgefunden haben.

Ein Vergleich mit den Mittelwerten der basal kultivierten pHOB ist hier sinnvoll (0-Wert; 29 Tage unbehandelt). Die basale Runx2-Expression wird auf 81,3% (s. 3.1.2.1) und die OC-Expression auf 51,1% des 0-Wertes reduziert (s. 3.1.2.2). Die OSX-mRNA wird auf 33,8% reduziert (s. 3.1.2.3), während die AP-Expression in dieser Zeit um 187,72% des 0-Wertes zunimmt (s. 3.1.2.4).

Zieht man zur Einschätzung des Differenzierungsstatus der basal kultivierten Zellen das modifizierte osteoblastäre Differenzierungsmodell nach Owen hinzu (s. 1.3.8; Abbildung 7), muss man beachten, dass die Zellen in allen zu dieser modifizierten Version des Modells beitragenden Veröffentlichungen durch β-Glycerolphosphat, aktiviertes Vitamin C und Dexamethason osteogen stimuliert wurden (Giesen, 2007; Owen et al., 1990; Siggelkow et al., 1999a; Siggelkow et al., 2004). Da die in dieser Arbeit vorliegenden pHOB unter basalen Kulturbedingungen ohne osteogene Stimulation wuchsen, ist ein Vergleich nur bedingt möglich. Veränderungen der OSX- und AP-Expression weisen darauf hin, dass sich pHOB unter basalen Kulturbedingungen osteogen differenzieren und sich nach 29 Tagen im frühen Matrixreifungsstadium befinden (vgl. Abbildung 7). Der fehlende OC-Anstieg lässt darauf schließen, dass die Mineralisationsphase nicht erreicht wurde. Außerdem wären in diesem Stadium eine Abnahme der AP-Expression und die Bildung von Mineralisationsknoten zu erwarten.

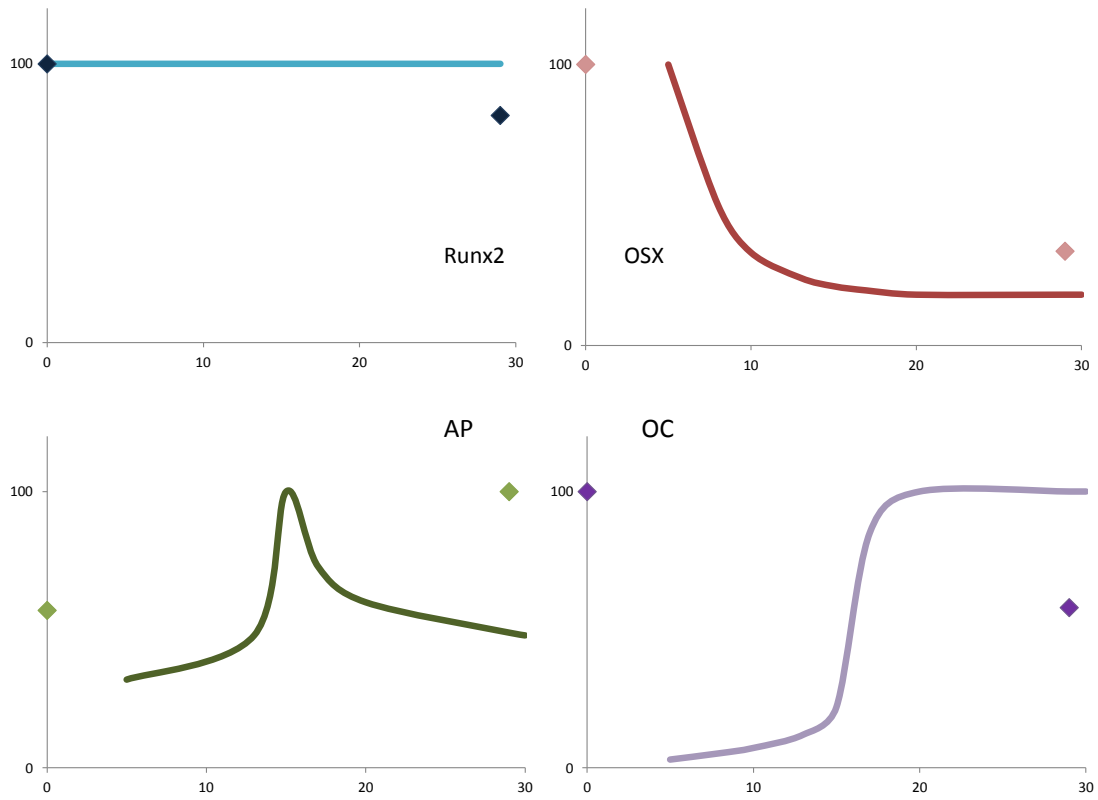

Abbildung 29: Vergleich der Expression verschiedener osteogener Differenzierungsmarker mit dem modifizierten osteoblastären Differenzierungsmodell nach Owen. Die Liniendiagramme markieren den unter osteogener Stimulation charakteristischen Verlauf der Differenzierungsmarker. Die Rauten markieren die Genexpressionen der basal kultivierten pHOB zu Beginn (Tag 0) und am Ende (Tag 29) des großen Runx2-‚Knockdown'-Versuchs.

Im Vergleich zu diesen basal kultivierten pHOB zeigten die Mittelwerte der siRunx2-transfizierten Zellen nach 29 Tagen eine hochsignifikante Reduktion der Runx2-Expression auf 16,68% des 0-Wertes. Möglicherweise fand unter Runx2-Suppression eine Umdifferenzierung in andere aus MSC hervorgehende Zellen statt. Eine adipogene Umdifferenzierung ist hierbei unwahrscheinlich, da kein signifikanter Unterschied bezüglich der PPARγ2-, aP2- und LPL-Expression zwischen transfizierten und basal kultivierten Zellen besteht. Um alternative Differenzierungsrichtungen zu erfassen, könnte beispielweise die Bestimmung des Sry-type HMG box 9 (Sox9) für die chondrogene Differenzierung (Bernard and Harley, 2010; Kamachi et al., 2000) bzw. von MyoD und Myogenin für die myogene Differenzierung (Szalay et al., 1997) hilfreich sein. Nakashima et al. (2002) vermuteten eine wichtige Rolle des Runx2 in der mesenchymalen Kondensation. Somit könnte unter Runx2-Suppression auch ein Differenzierungsstopp oder aber eine Rückdifferenzierung in frühere Differenzierungsstufen stattgefunden haben. Die pHOB waren vor Versuchsbeginn 60 bzw. 73 Tage in Kultur unter basalen, nicht osteogenen Kulturbedingungen. In dieser Zeit hat vermutlich ein osteogener Differenzierungsprozess stattgefunden (s. oben). Song und Tuan

beschrieben 2004 Rückdifferenzierungen von Osteoblasten in MSC-ähnliche Zellen, die dadurch ihre Pluripotenz wiedererlangten. Hierbei wurde ein Rückgang der Schlüsseltranskriptionsfaktoren Runx2, PPARγ und Sox9 beobachtet. Zur Erfassung dieses MSC-Stadiums könnten in einer Immunfluoreszenzuntersuchung die folgenden, dann gemeinsam auftretenden Marker bestimmt werden: Fibronektin, Kollagen Typ I, Kollagen Typ IV und CD44 (Schieker et al., 2004).

4.1.3 Die Runx2-Suppression führt in pHOB nach 48 Stunden zu einer signifikanten OC-und zu einer tendenziellen AP-Reduktion

Nach 48 Stunden zeigte sich neben der Suppression des Runx2-Gens auf durchschnittlich 8,7% eine Reduktion des OC-Gens auf 45,5% des 0-Wertes. Der Einfluss des Runx2 auf die OC-Genexpression könnte durch eine spezifische Bindungsstelle für Runx2 im OC-Promotor, die sogenannte Runx2-Konsensus-Sequenz, erklärbar sein (Ducy et al., 1997). Die Runx2-Bindung in diesem Bereich führt zur Promotorinduktion des OC-Gens und damit zu einer gesteigerten Genexpression. Fällt dieser Stimulus durch einen Runx2-‚Knockdown' weg, könnte es konsekutiv zur Reduktion der OC-Genexpression kommen.

Des Weiteren zog die Runx2-Suppression nach 48 Stunden eine tendenzielle Reduktion der AP auf 22,6% des 0-Wertes nach sich (s. 3.1.2.4). Auch M. Giesen konnte in seiner Dissertation einen Runx2-Einfluss auf die AP-Expression in pHOB nachweisen, die allerdings erst nach 96 Stunden eine Signifikanz aufzeigte (Giesen, 2007). Aber auch einige andere Faktoren nehmen Einfluss auf die AP-Regulation. Hierzu gehören beispielsweise die aktivierte Vitamin A-Säure (Retinsäure), aktiviertes Vitamin-D (1,25-Dihydrocholecalciferol) und ‚granulocyte colony stimulating-factor' (GCS-F) (Gianni et al., 1995; Kyeyune-Nyombi et al., 1991; Rambaldi et al., 1990).

In dieser Dissertation konnte also durch die Korrelation zwischen Runx2 und OC bzw. teilweise AP gezeigt werde, dass die Runx2-Suppression die osteogene Differenzierung hemmt.

4.1.4 Die Runx2-Suppression besitzt in pHOB keinen signifikanten Einfluss auf die OSX-mRNA

OSX wird durch den Runx2-‚Knockdown' nach 48 Stunden nicht signifikant beeinflusst (s. 3.1.2.3). Die Regulation dieses Faktors ist noch nicht abschließend geklärt. Ursprünglich ging man davon aus, dass OSX in der Osteoblastendifferenzierung als Transkriptionsfaktor Runx2 nachgeschaltet ist und damit vor allem durch Runx2 reguliert wird. Diese These entstand durch die Beobachtung, dass OSX-‚Knockout'-Mäuse Runx2 exprimieren (Nakashima et al.,

2002), wohingegen Runx2-‚Knockout'-Mäuse kein OSX exprimieren (Inada et al., 1999). Des Weiteren führte die Runx2-Überexpression zur OSX-Induktion (Matsubara et al., 2008). Anschließend entdeckten verschiedene Arbeitsgruppen, dass OSX auch Runx2-unabhängig reguliert werden kann. Matsubara et al. stellten fest, dass ‚bone morphogenetic protein-2' (BMP-2) bestimmte ‚Smad' (Kombination aus dem Drosophila-Protein ‚mothers against decapentaplegic' und dem Caenorhabditis-elegans-Protein SMA für ‚small body size')-Moleküle aktiviert, die ‚msh-homeobox-2'-(Msx2-) assoziiert OSX induzieren (Matsubara et al., 2008). Celil et al. beschrieben einen Runx2-unabhängigen OSX-Regulierungspfad über ‚Mitogen-activated protein kinase pathway' (MAPK) und ‚Insulin-like growth factor 1' (IGF-1) (Celil et al., 2005). Lee MH et al. entdeckten eine Steigerung der OSX-Expression durch BMP-2 gesteuerte Aktivierung von ‚distal-less homeobox 5' (Dlx5) (Lee MH et al., 2003). Da OSX in unseren pHOB-Versuchen nicht durch Runx2 reguliert zu sein scheint, wäre es interessant, diese alternativen Regulationswege in pHOB genauer zu untersuchen.

4.1.5 Die Runx2-Suppression führt in pHOB nach 7 Tagen zur Reduktion osteogener Marker und zur PPARγ-Induktion

7 Tage nach Transfektion der siRunx2 zeigte sich eine ausgeprägte, hochsignifikante Reduktion der osteogenen Marker Runx2 auf 4,9% und AP auf 17,6% des 0-Wertes. Zu diesem Zeitpunkt gilt dies allerdings nicht für OC (40,5% des 0-Wertes), und wiederum bleibt ein signifikanter Einfluss auf OSX aus (s. 3.1.2.1-3.1.2.4). Anders als zuvor zeigte sich zu diesem Zeitpunkt eine partielle Induktion adipogener Marker. PPARγ2, das als Schlüsseltranskriptionsfaktor der adipogenen Differenzierung gilt, ist im Vergleich zu siKo-transfizierten Zellen hochsignifikant auf 103,4% des 0-Wertes induziert. Zu diesem Zeitpunkt des Versuchs scheint die Runx2-Suppression also eine Umdifferenzierung der Zellen mit Steigerung des adipogenen Markers PPARγ2 nach sich zu ziehen. Dies konnte im kurzen ‚Knockdown'-Versuch zu allen drei untersuchten Zeitpunkten (48 Stunden, 4 Tage, 7 Tage) durch eine signifikante bis hochsignifikante PPARγ2-Induktion auf 287%, 49% bzw. 113% des 0-Wertes gezeigt werden (s. 3.1.1). Auch hier ist der Unterschied zu Kontroll-siRNA-transfizierten Zellen nach sieben Tagen am deutlichsten ausgeprägt. Diese Steigerung der PPARγ2-Genexpression wäre erwartungsgemäß auf die Runx2-Reduktion zurückzuführen, die hier jedoch nicht vorlag. Nur nach vier Tagen zeigte sich eine tendenzielle Runx2-Reduktion auf 41% des 0-Wertes. Kollaterale Regulationswege kommen als Ursache nicht infrage, da die Verwendung einer siRNA zu einem spezifischen ‚Knockdown' führt. Wahrscheinlich ist also die größtenteils fehlende Runx2-Reduktion im Kurzzeit-Runx2-‚Knockdown'-Versuch methodischer Natur (s. 4.1.2). Um das Zusammenspiel zwischen den

beiden zentralen Transkriptionsfaktoren Runx2 und PPARγ genauer zu untersuchen, wurden die Interaktionsversuche durchgeführt (s. 3.3.1 bis 3.3.10).

Die LPL als früher adipozytärer Marker wurde unter Runx2-Suppression zu keinem Zeitpunkt des Versuchs verändert und gab somit keinen Hinweis auf eine gesteigerte adipozytäre Differenzierung. Obwohl Bindungsstellen des PPARγ im LPL-Promotor beschrieben wurden (Schoonjans et al., 1996), lässt sich keine Korrelation zwischen der Expression beider Gene feststellen. Eine Vielzahl LPL-regulierender Proteine wie der Kofaktor Apolipoprotein CII sind bekannt (Catapano, 1982; Kinnunen et al., 1977). Die Regulation erfolgt auf transkriptioneller, posttranskriptioneller, translationaler und posttranslationaler Ebene (Wang H and Eckel, 2009). Des Weiteren existiert ein negativer Rückkopplungsmechanismus, über den die enzymatische Aktivität der LPL durch hohe Fettsäurekonzentrationen herunterreguliert wird. Dies soll verhindern, dass die Kapazität der Gewebe, welche die Fettsäuren aufnehmen, überschritten wird (Bengtsson and Olivecrona, 1980). Die LPL besitzt in Osteoblasten eine wichtige Aufgabe: Für die γ-Carboxylierung der Knochenmatrixproteine benötigen Osteoblasten das lipophile Vitamin K1. Die LPL unterstützt die endozytotische Aufnahme dieses Faktors über ‚LDL receptor-related protein 1‘ (LRP1) (Niemeier et al., 2005).

4.1.6 Die siRNA-Runx2 führt in pHOB nach 29 Tagen zu einer Runx2-Suppression, beeinflusst die anderen osteogenen und adipogenen Differenzierungsmarker jedoch nicht

Nach 29 Tagen konnte durch die siRunx2 eine hochsignifikante Runx2-Reduktion auf 16,7% des 0-Wertes beobachtet werden (s. 0). Die anderen osteoblastären Marker OC, AP und OSX wurden nicht signifikant auf 63,5%, 64,5% bzw. 52% des 0-Wertes verändert.

Die adipogenen Marker PPARγ2, aP2 und LPL wurden durch die Runx2-Suppression nach 29 Tagen im Mittel nicht beeinflusst. Die nach 7 Tagen beobachtete partielle adipogene Umdifferenzierung kann hier also nicht mehr detektiert werden. Mögliche Hintergründe wurden bereits in Absatz 4.1.2 diskutiert.

4.1.7 Die osteogene Stimulation bewirkte nach zweimaliger Transfektion der siRNA-Runx2 in pHOB keinen Runx2-‚Rescue’

Nach zweifacher Runx2-Suppression erfolgte eine 48-stündige osteogene Stimulation durch Vitamin C, Vitamin D_3, β-Glycerolphosphat und Dexamethason. Dadurch stieg die Runx2-Expression in siRunx2-transfizierten Zellen nicht signifikant von 16,7% auf 49,9% des 0-Wertes. Es gelang demnach im Mittel kein Runx2-mRNA-‚Rescue’, d.h. keine durch

osteogene Stimulation signifikant geringere Suppression des Runx2-Gens (s. 3.1.2.1). Dexamethason, Vitamin C und Vitamin D_3 können einzeln in pHOB zu einer Steigerung der Runx2-Genexpression führen, die allerdings erst später als 48 Stunden nach Stimulationsbeginn eintritt (Giesen, 2007; Siggelkow et al., 1999a; Siggelkow et al., 2004; Viereck et al., 2002). Eine Steigerung der Runx2-Genexpression durch β-Glycerolphosphat konnte kürzlich durch Cui et al (2012) in glatten Gefäßmuskelzellen gezeigt werden. In knochenbildenden Zellen fördert dieser Faktor die osteoblastären Differenzierung durch Induktion der Mineralisierung (Chung et al., 1992; Tenenbaum et al., 1992), eine Runx2-Steigerung ist hier jedoch bislang nicht beschreiben.

Durch Kombination der unterschiedlichen osteogenen Stimulanzien findet im vorliegenden Versuch kein Runx2-‚Rescue' statt. Vermutlich war die Stimulationsdauer von 48 Stunden hierfür nicht ausreichend lang.

4.1.8 Die siRNA-Runx2 führt nach 7 Tagen vermutlich auch zur Suppression des Runx2-Proteins

Neben Genuntersuchungen auf mRNA-Ebene wurde zur Untersuchung der Proteinebene auch ein Runx2-‚Westernblot' durchgeführt. Runx2 ist als Transkriptionsfaktor in nur geringem Maße in der Zelle enthalten, sodass der Proteinnachweis insbesondere in ‚Knockdown'-Versuchen schwierig ist (s. 3.1.2.8).

Anhand der β-Aktinbanden ist ersichtlich, dass die ‚Westernblot'-Methodik funktioniert hat und dass eine ausreichende Proteinmenge eingesetzt wurde. Nach 48 Stunden ist sowohl in Kontroll-siRNA- als auch siRunx2-transfizierten Zellen kein Runx2-Protein nachweisbar. Nach sieben Tagen ist hingegen ein Unterschied der Bandendichte beider Vergleichsgruppen sichtbar. Während die mRNA auf 4,9% des 0-Wertes supprimiert ist (vgl. 3.1.2.1), beträgt die Reduktion auf Proteinebene in der Densitometrie etwa 47,5%. Da die entsprechenden β-Aktinbanden visuell einen großen Dichteunterschied aufweisen, ist die Differenz beider Runx2-Banden vermutlich größer. Wahrscheinlich ist die Halbwertszeit des Proteins nach sieben Tagen überschritten, der Abbau des Proteins hat somit voraussichtlich bereits stattgefunden und durch die fehlende mRNA nach Runx2-‚Knockdown' wird keines nachproduziert. Nach 29 Tagen ist ebenfalls kein Runx2-Protein in Kontrolle (29TsiKo) und Probe (29TsiRunx2) detektierbar.

In den hier durchgeführten Versuchen wurde die Proteinsynthese ausschließlich mit Hilfe des ‚Westernblots' untersucht. Da bei pHOB des ersten Patienten keine Banden sichtbar waren, konnte hier nur der ‚Westernblot' des zweiten Patienten gezeigt werden. Eine sichere Aussage ist somit nicht möglich. Um den Effekt zu verifizieren, sollten die Ergebnisse an anderen

pHOB wiederholt werden. Empfehlenswert wäre hierbei eine der Runx2-Suppression vorgeschaltete Runx2-Überexpression.

4.2 Interaktion zwischen Runx2 und PPARγ

4.2.1 Runx2-Einfluss auf PPARγ

Sowohl Osteoblasten, als auch Adipozyten stammen von MSCs des Knochenmarks ab. Beobachtungen, dass zwischen diesen beiden Zelllinien häufig ein Differenzierungswechsel stattfindet und dass eine Abnahme des Knochenvolumens mit steigendem Knochenmarkfettgewebe einhergeht (Meunier et al., 1971), lassen auf eine ausgeprägte Wechselwirkung mit hoher Plastizität der Knochenmarkzellen schließen (Nuttall et al., 1998). Da diese Wechselwirkung im Hinblick auf die Entwicklung neuer Therapieoptionen bei Erkrankungen des Knochens von großer Bedeutung ist, besteht hier ein großes wissenschaftliches Interesse. Hierbei dient die altersbedingte Osteoporose als besonders passendes Beispiel. Persönliches Risiko und wirtschaftliche Bedeutung dieser häufigen Erkrankung wurden zu Beginn der Einleitung schon ausführlich geschildert (s. 1.1). Zugrunde liegt der Osteoporose im Wesentlichen neben einer verringerten Knochenmasse ein erhöhter Knochenfettanteil und damit eine deutliche Verlagerung des Gleichgewichts zwischen osteoblastärer und adipogener Differenzierung (Burkhardt et al., 1987). Eine entscheidende Rolle für die Entwicklungsrichtung der MSC spielen die beiden als Gegenspieler agierenden Schlüsseltranskriptionsfaktoren Runx2 und PPARγ.

In der Literatur liegen, anders als im umgekehrten Fall (s. 1.3.2.1), nicht viele Informationen über den Runx2-Einfluss auf PPARγ vor. Um diesen Einfluss genauer zu untersuchen, wurden Runx2-Überexpressionsversuche durchgeführt (s. 3.2.1; 3.2.2). Die Überexpression erfolgte hierbei durch Transfektion eines Runx2-Plasmids in pHOB- und SCP1-Zellen. Darauf folgten Messungen der Runx2- und PPARγ2-mRNA in PCRs. Um zu überprüfen, ob Veränderungen der Runx2- und PPARγ2-mRNA auch Veränderungen auf Proteinebene nach sich ziehen, wurde ein ‚Westernblot' durchgeführt, in dem sich der Antikörper gegen das Gesamt-PPARγ richtete.

Um das Zusammenspiel der beiden Faktoren genauer zu untersuchen, erfolgten die Runx2-PPARγ-Interaktionsversuche (s. 3.3.1 bis 3.3.10). Hierbei interessierten insbesondere die Auswirkungen des plasmidinduzierten Runx2-Proteins auf die PPARγ-Promotoraktivität im Luziferase-Reportergenassay und die PPARγ2-mRNA in der PCR.

Da in SCP1-Zellen eine geringe Spontanaktivität des PPARγ-Promotors und geringe PPARγ2-mRNA-Konzentrationen vorlagen, wurde adipogen stimuliert. Im Luziferase-

Reportergenassay wurde anhand des PPRE geprüft, ob das durch adipogene Stimulation gesteigerte PPARγ-Protein die Funktion als Transkriptionsfaktor aufnimmt und somit funktionsfähig ist.

4.2.1.1 Das Runx2-Plasmid führt in pHOB- und SCP1-Zellen zur Steigerung der Runx2-mRNA und zu einem konträren Effekt auf die PPARγ2-mRNA

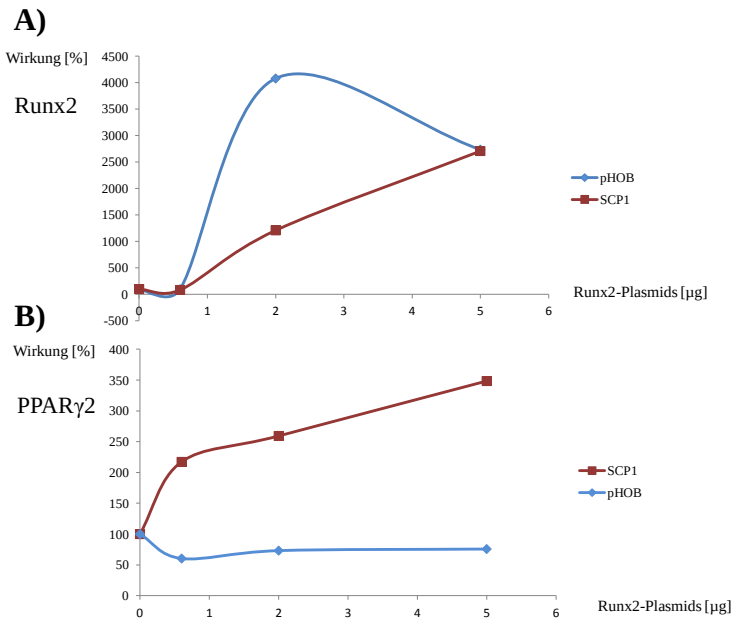

Abbildung 30: Dosis-Wirkungskurve des Runx2-Plasmids in Bezug auf die A) Runx2-Genexpression bzw. B) PPARγ2-Genexpression in pHOB (blaue Linie) und SCP1-Zellen (rote Linie). Der 0-Wert entspricht 100%, alle anderen Werte werden hier in Relation zum 0-Wert angegeben (y-Achse). Die x-Achse gibt die Menge des transfizierten Runx2-Plasmids an.

Durch das Runx2-Plasmid gelang sowohl in pHOB, als auch in SCP-1-Zellen nach 48 Stunden eine Runx2-Induktion (vgl. Abb. 30 bzw. 3.2.1). Es zeigte sich bei beiden Zellarten eine Korrelation zwischen der Menge des transfizierten Runx2-Plasmids und der Runx2-mRNA. Bezüglich der PPARγ2-Expression wurde allerdings ein deutlicher Unterschied beobachtet. Das Runx2-Plasmid führte in pHOB-Zellen nach 48 Stunden zu einer signifikanten Reduktion der PPARγ2-mRNA auf bis zu 60% des Ausgangswertes. In SCP1-Zellen fand hingegen ein signifikanter, mit der Menge des transfizierten Runx2-Plasmids zunehmender Anstieg der PPARγ2-mRNA auf maximal 348% des 0-Wertes statt (s. 3.2.1). Dieser Differenz könnten Unterschiede bezüglich der Homogenität beider Zellarten zugrunde liegen. Während SCP1-Zellen auf eine einzige, hTERT-transfizierte MSC zurückgehen und somit homogen sind, bestehen pHOB aus einer relativ inhomogenen Zellgruppe. Man geht von Zellen unterschiedlicher Differenzierungsstadien aus, unter denen wahrscheinlich auch (Vorläufer-) Zellen der adipozytären Differenzierung vorkommen. Diese Zellgruppe reagiert

auf die Runx2-Überexpression entsprechend der gegenläufigen Differenzierungshypothese zwischen Adipogenese und Osteogenese, d.h. bei gesteigerter Runx2-Expression findet eine Reduktion der PPARγ-Expression statt (Gori et al., 1999) und umgekehrt. Möglicherweise sind SCP1-Zellen zu einseitig vorgeprägt oder sie weisen Defizienzen auf, um gegenläufig reagieren zu können. Möglicherweise findet aber auch keine rein osteogene Differenzierung bei Runx2-Überexpression in SCP1-Zellen statt, sondern eine parallel ablaufende, adipogene Differenzierung mit PPARγ2-Induktion. Ponce et al (2008) vermuteten, dass osteogene und adipogene Differenzierungswege in mesenchymalen Vorläuferzellen wahrscheinlich nicht ausschließlich gegenläufig, sondern bis zu einem relativ späten Moment der osteogenen Differenzierung parallel verlaufen (Ponce et al., 2008). Ahdjoudj et al. (2001) beobachteten ebenfalls eine sehr späte Trennung von Osteoblasten und Adipozyten während der MSC-Differenzierung, die mit einer lang erhaltenen Plastizitätskapazität zwischen den Zelllinien einhergeht. So hielten sich adipogen differenzierende MSC die Expression osteoblastärer Marker aufrecht, während sie mit der Expression adipogener Marker begannen (Ahdjoudj et al., 2001; Ahdjoudj et al., 2004).

4.2.1.2 Das Runx2-Plasmid führt in SCP1-Zellen vermutlich zu einer Induktion des Runx2-Proteins und zu einer Reduktion des PPARγ-Proteins

Zur Untersuchung der Runx2-Proteinsynthese nach Runx2-Plasmidtransfektion wurde ein orientierender ‚Westernblot' in SCP1-Zellen durchgeführt (n=1) (s. 3.2.2). Die Densitometrie ergab nach 48 Stunden eine 2,27-fache Steigerung und nach 5 Tagen eine Reduktion auf 60% der Bandendichte des β-Aktins. Bei rein visueller Beurteilung erschienen die Unterschiede jedoch geringer.

Die Runx2-Banden zeigten, dass das Runx2-Protein im ‚Westernblot' mit dem verwendeten Antikörper nachweisbar und in den SCP1-Zellen vorhanden ist. 48 Stunden nach Runx2-Plasmid-Transfektion war eine deutliche Runx2-Proteininduktion sichtbar. Nach 5 Tagen bestand ein Unterschied zwischen visueller Auswertung und Densitometrie. Die Runx2-Bande transfizierter Zellen erschien in ähnlichem Maße wie β-Aktin etwas weniger dicht als die der untransfizierten Zellen. Die Densitometrie gibt allerdings eine deutliche, etwa dem 48 Stunden-Wert entsprechende Steigerung des Runx2-Proteins an.

Die PPARγ-Banden zeigen, dass auch das PPARγ-Protein im ‚Westernblot' mit dem gewählten Antikörper nachweisbar und in den SCP1-Zellen vorhanden ist. Im Gegensatz zur PCR-Auswertung werden hier beide PPARγ-Isoformen erfasst. Nach 48 Stunden ist der Dichteanstieg in etwa äquivalent zu β-Aktin. Im Gegensatz dazu ergibt die densitometrische

Berechnung eine Reduktion des PPARγ-Proteins durch die Runx2-Überexpression nach 48 Stunden an. Nach 5 Tagen findet eine Reduktion des PPARγ-Proteins statt.
Die Runx2-Überexpression führt also vermutlich zu einer Änderung der Runx2- und PPARγ-Proteinsynthese. Da Unterschiede zwischen der visuellen und densitometrischen Auswertung bestehen, sind die Aussagen nicht eindeutig. Weitere ‚Westernblot'-Analysen mit pHOB und SCP1-Zellen sollten folgen, um die Auswirkungen der Runx2-Überexpression besser zu erfassen bzw. zu verifizieren.

4.2.1.3 Lokalisation des Runx2-Einflusses auf PPARγ

Um den Runx2-Einfluss auf PPARγ besser zu verstehen, wurden zwei Genabschnitte an zwei unterschiedlichen Genen untersucht. Der PPARγ-Promotor gibt Auskunft über die Transkriptionsaktivität am PPARγ-Gen, also über den Beginn der PPARγ-mRNA-Synthese, wohingegen das PPRE die Funktionalität des PPARγ-Proteins in seiner Position als Transkriptionsfaktor an einem fremden Gen wiedergibt. Da in SCP1-Zellen spontan eine nicht ausreichende PPARγ-Promotoraktivität beobachtet wurde (s. 3.3.1 bis 3.3.3), musste mit Dexamethason, Insulin und Isobutylmethylxanthin adipogen stimuliert werden. Nach vier und sieben Tagen bewirkte dies eine Hemmung der PPARγ-mRNA. Ding et al. (2003) hingegen beschrieben schon am ersten Tag einer adipogenen Stimulation, die mit den gleichen Faktoren durchgeführt wurde, eine deutliche Steigerung der zwei Proteine PPARγ und C/EBPα in Knochenmarkzellen der Maus (Ding et al., 2003). Die Abweichung der Ergebnisse könnte speziesspezifisch bedingt sein (Mensch vs. Maus), aber auch durch Unterschiede des Zellmaterials (Primärmaterial vs. Zelllinie) oder des Versuchsaufbaus begründet sein. Erst nach 14 Tagen gelang eine Geninduktion, die durch zusätzliche Gabe des PPARγ-Agonisten Troglitazon früher hervorgerufen und in stärkerem Maße erreicht werden konnte (s. 3.3.6). Auch Okazaki et al. beschrieben durch Troglitazon eine PPARγ2-Erhöhung in Knochenmarkzellen der Maus (Okazaki et al., 1999).
Für die folgenden Versuche war die adipogene Stimulation ausreichend, bei der kein sicherer Unterschied bezüglich der PPARγ-Promotoraktivität zwischen der Transfektion von 2µg und 5 µg PPARγ-Promotor gezeigt werden konnte.

4.2.1.3.1 Runx2 reduziert die PPARγ-Promotoraktivität

Die Lokalisation des Runx2-Einflusses auf PPARγ wurde bislang in der Literatur nicht beschrieben. In dieser Dissertation konnte gezeigt werden, dass Runx2 bereits die Aktivität des PPARγ-Promotors hemmt. Die Berechnung der Mittelwerte aus Interaktionsversuch VII und VIII (s. 3.3.8 und 3.3.9) ergibt nach Transfektion von 2µg PPARγ-Promotor und 2µg

Runx2-Plasmid eine signifikante Reduktion der PPARγ-Promotoraktivität im Vergleich zu adipogen stimulierten, nur PPARγ-Promotor transfizierten Zellen von 465,5% auf 246,8% des Ausgangswertes. Nach Transfektion von 5µg PPARγ-Promotor und 2µg Runx2-Plasmid zeigte sich eine tendenzielle Reduktion der PPARγ-Promotoraktivität von 426,9% auf 219,3% des Ausgangswertes. Auch der letzte Interaktionsversuch, dessen Aufbau von den beiden genannten Versuchen abweicht (s. 3.3.10), bestätigte die deutliche Reduktion der PPARγ-Promotoraktivität bei Transfektion von 2µg PPARγ-Promotor plus Plasmid im Vergleich zu adipogen stimulierten, nur PPARγ-Promotor transfizierten Zellen. Die Transfektion von 5 µg PPARγ-Promotor plus Plasmid hingegen erzielte diese Wirkung nicht. Es erscheint dabei verständlich, dass der Effekt des Runx2-Plasmids mit steigender PPARγ-Promotormenge abnimmt. Da Liu LF et al. (2010) eine Hemmung des Runx2-Promotors durch PPARγ beobachteten, kann man davon ausgehen, dass die beiden Gegenspieler Runx2 und PPARγ durch Hemmung des Promotors miteinander interagieren.

Ein Blick auf die Struktur des Proteins hilft bei der Überlegung, wie Runx2 den PPARγ-Promotor hemmen könnte. Runx2 besitzt verschiedene Domänen, die nach ihrer Funktion im Wesentlichen in folgende Gruppen eingeteilt werden: DNA-Bindungs-, Aktivierungs- und Repressionsdomäne(n) (Schroeder et al., 2005). Für die richtige, intranukleäre Lokalisation sind das ‚nuclear localisation signal' (NLS) und das ‚nuclear matrix targeting signal' (NMTS) zuständig.

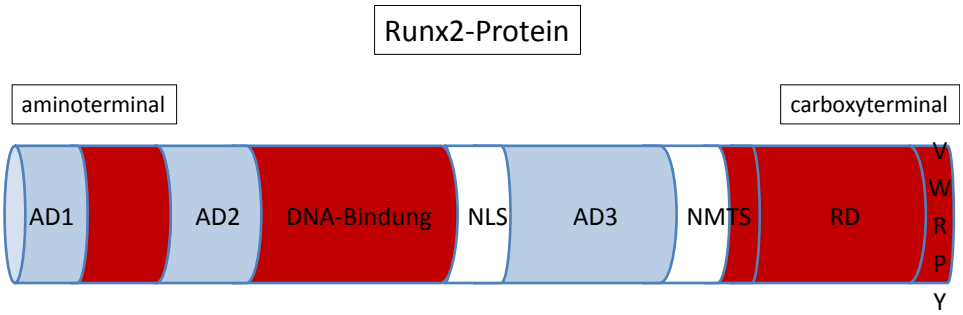

Abbildung 31: Schematischer Aufbau des Runx2-Proteins. Bereiche mit (potentieller) Repressionsfunktion werden hier rot dargestellt. Hierzu gehören aminoterminale Regionen des Proteins, die DNA-Bindungsdomäne (Runt-Domäne), Teile des ‚nuclear matrix targeting signal' (NMTS), die Repressionsdomäne (RD) und die carboxyterminalen Aminosäuren VWRPY. NLS= ‚nuclear localisation signal', AD=Aktivierungsdomäne.

Die Betrachtung der Repressionsdomänen ist für die vorliegende Runx2-Hemmung des PPARγ-Promotors von entscheidender Bedeutung. Die transkriptionelle Repression erfolgt hier wahrscheinlich durch Kondensierung der Chromatinstruktur. Dies geschieht über Histone, die in deacetyliertem Zustand positiv geladen sind und somit die stark negativ geladene DNA binden können. Für die Deacetylierung ist die Histon-Deacetylase (HDAC) verantwortlich, wodurch die Bindung der Runtdomäne an die DNA erschwert wird. Die

Histon-Acetyltransferase (HAT) hingegen führt zur Acetylierung mit nachfolgendem Verlust der positiven Ladung und der DNA-Bindefähigkeit. Eine Transkription ist somit möglich.

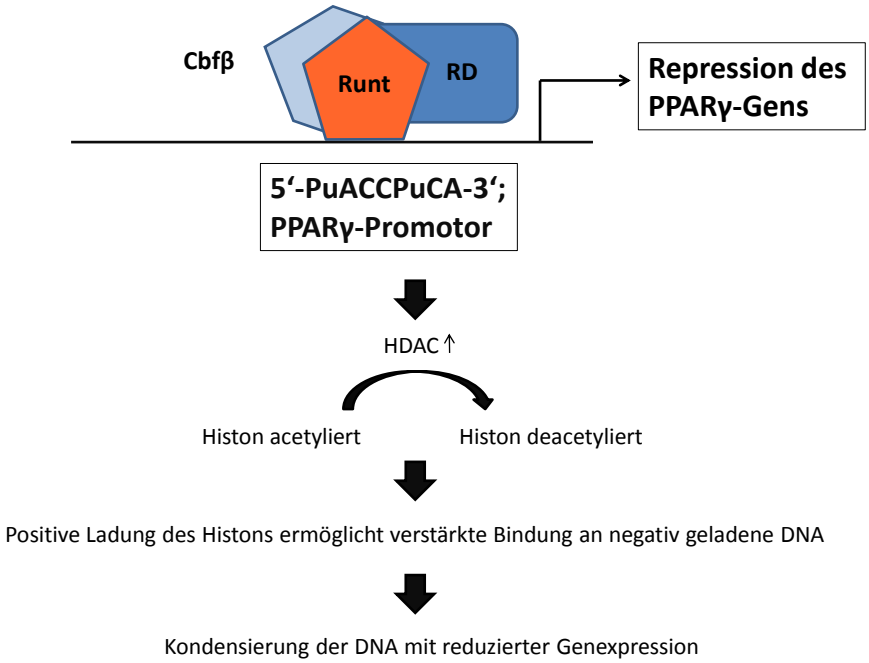

Abbildung 32: Möglicher Mechanismus der Hemmung der PPARγ-Promotoraktivität durch Runx2. Nach Heterodimerbildung mit Cbfβ bindet Runx2 an die spezifische Sequenz im PPARγ-Promotor. Durch HDAC-Aktivierung erfolgt die Histondeacetylierung und somit eine verstärkte Bindung des Histons an die DNA. Dadurch kondensiert diese mit konsekutiv reduzierter Genexpression.

Verschiedene Regionen des Proteins sind bekannt, die eine Repression bewirken oder zu einer solchen beitragen (s. Abbildung 31). Die letzten fünf Aminosäuren Valin (V), Tryptophan (W), Arginin (R), Prolin (P) und Tyrosin (Y) am carboxyterminalen Endes des Proteins interagieren mit Korepressoren, beispielsweise mit verschiedenen Mitgliedern der ‚transducin-like enhancer of split' (TLE)/ Groucho (Grg)-Proteinfamilie (Javed et al., 2000). Diese formen einen Komplex mit der HDAC Rpd3, über den sie ihre repressive Wirkung entfalten (Chen et al., 1999). Eine zweite carboxyterminale Repressionsregion liegt proximal davon, rekrutiert HDAC6 in den Nukleus und vermittelt über dieses Enzym die Repression. Diese HDAC6-Interaktionsdomäne liegt teilweise in der Region des NMTS (Westendorf et al., 2002). In und um die NMTS-Region gibt es weitere Repressionsregionen, die u.a. auch mit TLEs interagieren. Eine dritte Repressionsdomäne befindet sich am aminoterminalen Ende innerhalb der ersten 94 Aminosäuren des Proteins. Hier bindet HDAC3 und führt zu einer Repression des Runx2-vermittelten Aktivierung des OC-Promotors (Schroeder et al., 2004). Schließlich trägt die Runtdomäne zu Interaktionen mit Korepressoren bei, womit

vermutlich die DNA-Bindung durch Maskierung der DNA-Interaktionsfläche verhindert wird (Kahler and Westendorf, 2003).

4.2.1.3.2 Runx2 verändert nicht die PPARγ2-mRNA

Obwohl der verwendete PPARγ-Promotor, der beide PPARγ-Isoformen abdeckt, den Beginn der PPARγ-mRNA-Synthese darstellt, wird bei Reduktion der PPARγ-Promotoraktivität nicht die PPARγ2-mRNA reduziert. Dieser Beobachtung könnte eine zeitliche Differenz des Effektes zwischen Promotor- und mRNA-Ebene zugrunde liegen. Die Zellen könnten einen PPARγ-mRNA-Vorrat besitzen, durch den sich die Wirkung von PPARγ-Promotor- auf PPARγ-mRNA-Ebene verzögert. Eventuell ist die Erklärung aber auch im methodischen Bereich zu finden. Der Runx2-Effekt auf die PPARγ-Promotoraktivität erfolgt über eine Koexpression und wird somit nur in transfizierten Zellen gemessen. Die Messung der mRNA jedoch findet in der Gesamtheit der Zellen statt. Da aber nur ein Teil der Zellen transfiziert ist und somit Runx2 überexprimiert, könnte der Effekt in der Gesamt-mRNA-Messung untergehen. Auch die RNA-Interferenz kommt als Ursache infrage. Im Rahmen posttranskriptioneller Modifikationen nehmen siRNAs und miRNAs Einfluss auf die Produktion der mRNA (s. 4.1.2). Von der Promotoraktivität abweichende mRNA-Ergebnisse könnten auf eine reduzierte Hemmung der PPARγ2-mRNA durch diese Systeme zurückzuführen sein. Auch der Runx2-Überexpressionsversuch könnte eine Erklärung aufzeigen. Hier bewirkte die Runx2-Überexpression eine starke Induktion der PPARγ-mRNA in SCP1-Zellen (s. 3.2.1). Diese Steigerung blieb hingegen in den Interaktionsversuchen aus, sodass womöglich eine nicht sichtbare Reduktion vorliegt.

4.2.1.4 Die adipogene Stimulation bewirkte eine Steigerung der Aktivität des PPARγ-Proteins als Transkriptionsfaktor

Die adipogene Stimulation bewirkte parallel zur mRNA-Ebene eine Steigerung der Funktionalität des PPARγ-Proteins. Diese Aussage kann anhand des an die Luziferase gekoppelten PPRE-Gens getätigt werden. Es kommt zu einer Steigerung der PPRE-RLU-Werte, die sich durch eine unstimulierte Kontrolle verifizieren lässt. Diese Steigerung beträgt ungefähr das 14-fache bei Transfektion von 2µg PPRE-Luc bzw. das 11-fache der unstimulierten, PPRE-Luc transfizierten Zellen bei 5µg PPRE.

Diese Versuche könnten als Vorbereitung für weitere Untersuchungen der Interaktion zwischen Runx2 und PPARγ dienen. Die Hemmung der PPARγ-Funktion als Transkriptionsfaktor könnte beispielweise durch eine Kotransfektion von Runx2-Plasmid und PPRE-Luc überprüft werden. Zur Steigerung der PPARγ-Aktivität und –Konzentration wäre

eine vorausgehende adipogene Stimulation über ca. 10 bis 14 Tage empfehlenswert. Zu erwarten wäre eine abnehmende Luziferaseaktivität des PPRE-Luc unter Runx2-Plasmid-Einfluss.

4.2.2 Gegenseitiger Einfluss der beiden Faktoren Runx2 und PPARγ

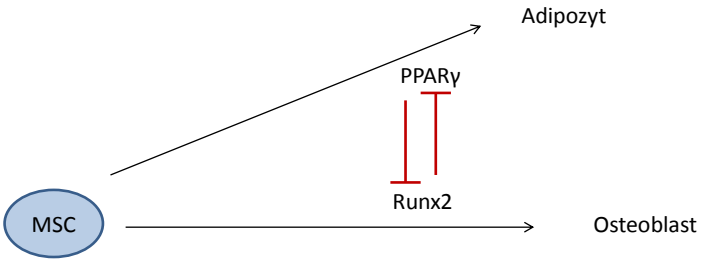

Abbildung 33: Einfluss der beiden Transkriptionsfaktoren PPARγ und Runx2 auf die Differenzierung mesenchymaler Stammzellen.

Sowohl Osteoblasten, als auch Adipozyten entstammen pluripotenten MSCs des Knochenmarks. Man geht davon aus, dass sich Adipogenese und Osteogenese in diesem Differenzierungsprozess gegenläufig verhalten (Akune et al., 2004; Jeon et al., 2003; Lecka-Czernik et al., 1999; Parhami et al., 1999). PPARγ hemmt Runx2 dabei auf Promotor-, mRNA- und Proteinebene und zudem seine Funktion als Transkriptionsfaktor (s. 1.3.2.1) (Jeon et al., 2003; Liu LF et al., 2010). Diese Erkenntnisse führten zu dem Versuch, durch PPARγ-‚Down'-Regulation dessen Einfluss auf Runx2 zu vermindern und somit die Knochenmasse zu erhöhen. Akune et al. (2004) supprimierten mithilfe einer siRNA die PPARγ-Genexpression, wodurch ein Anstieg der Osteogenese in vivo und in vitro zu verzeichnen war (Akune et al., 2004). Yu et al. hingegen supprimierten PPARγ kürzlich mit Hilfe zweier PPARγ-Antagonisten und mittels RNA-Interferenz und beobachteten zwar eine Hemmung der Adipogenese in MSC, jedoch keine Steigerung der Osteogenese (Yu et al., 2012). Ein wichtiger Aspekt in dieser Hinsicht ist die Frage danach, welche PPARγ-Isoform herunterreguliert wird. Es erscheint sinnvoll, das sehr viel seltenere PPARγ2 selektiv in seiner Genexpression zu reduzieren, da dieses (fast) ausschließlich in Adipozyten vorkommt und einen wesentlich wichtigeren Einfluss auf die Adipogenese hat (Yu et al., 2012). Ein isolierter therapeutischer Einfluss könnte also eine spezifische Regulierung ohne Beeinflussung anderer Systeme ermöglichen. Das in dieser Dissertation aufgrund der eingeschränkten Lokalisation unerwartete Vorkommen der PPARγ2-mRNA in pHOB- und SCP1-Zellen (s. 3.1.1, 0, 3.1.2.5, 3.3.6-3.3.9) könnte durch die Pluripotenz beider Zellarten mit möglicher konsekutiver adipozytärer Differenzierung erklärbar sein. Während Bruedigam et al. (2008) eine wichtige

Rolle des PPARγ2 in der Osteogenese vermuteten, konnten Yu et al. (2012) PPARγ2 während der Osteogenese nicht nachweisen, ganz im Gegensatz zu PPARγ1. Letztere Isoform ist nicht zellspezifisch und ist in die Regulierung des Glukose- und Lipidstoffwechsels involviert. Dysregulationen führen zu Problemen wie Adipositas, Insulinresistenz und Diabetes mellitus Typ 2 (Kadowaki, 2000; Kubota et al., 1999). Bei medikamentöser Therapie dieser Isoform muss also mit multiplen Nebenwirkungen gerechnet werden. Die PPARγ-Regulierung muss als komplexes System verstanden werden, in das weitere Forschungsprojekte noch mehr Klarheit bringen sollten.

Über den Einfluss des Runx2 auf PPARγ gestaltet sich die Literatursuche sehr schwierig. In der vorliegenden Dissertation konnte gezeigt werden, dass Runx2 den PPARγ-Promotor, also den Beginn der mRNA-Synthese hemmt. Allerdings konnte eine Hemmung der mRNA nicht festgestellt werden (s. 0). Im ‚Westernblot' erhält man den Hinweis, dass Runx2 auch zu einer Reduktion des PPARγ-Proteins führt. Die Fragestellung, ob Runx2 auch die PPARγ-Funktion als Transkriptionsfaktor hemmt, wurde nicht untersucht, aber in der vorliegenden Dissertation durch die PPRE-Luc- und Runx2-Plasmid-Versuche vorbereitet (4.2.1.4).

Bei kritischer Auseinandersetzung mit der Dissertation fällt auf, dass die Proteinuntersuchung im ‚Westernblot' nur orientierend stattgefunden hat. Eine sichere Aussage über das Verhalten des Runx2- und PPARγ-Proteins kann somit nicht getroffen werden. Zudem wurde die Runx2-Überexpression in pHOB und SCP1-Zellen auf mRNA-und Proteinebene nur über eine kurze Zeitspanne hinweg beobachtet. Untersuchungen über die Auswirkungen des Runx2-Plasmids im Verlauf, insbesondere auf die adipogenen Differenzierungsmarker, wären jedoch sehr interessant. Des Weiteren wären Untersuchungen über den Runx2-Einflusses auf PPRE-Luc spannend, die im Rahmen dieser Dissertation vorbereitet wurden (s. 4.2.1.4).

Abschließend kann festgestellt werden, dass die komplexe Interaktion zwischen Runx2 und PPARγ in den Ergebnissen nicht gänzlich erfasst werden konnte. Aufgrund der Ergebnislage kann jedoch von einer engen Interaktion zwischen den beiden Faktoren ausgegangen werden, die eine klinische Relevanz in der Osteoporoseforschung besitzen könnte.

.

5. Zusammenfassung

Mesenchymale Stammzellen können sich je nach führendem Transkriptionsfaktor zu Osteoblasten, Adipozyten, Chondrozyten oder Myoblasten differenzieren. Während sie sich unter Runx2-Einfluss entlang der osteoblastären Linie differenzieren, entwickeln sie sich bei vorliegendem PPARγ entlang des adipogenen Differenzierungswegs. Das Gleichgewicht zwischen beiden Faktoren und ihr Zusammenspiel besitzen eine wichtige klinische Bedeutung. In dieser Dissertation wurden durch Runx2-Suppression bzw. -Überexpression die Rolle dieses Faktors in pHOB und SCP1-Zellen erfasst und die Interaktion zwischen Runx2 und PPARγ untersucht.

Der Runx2-Knockdown' erfolgte mittels RNA-Interferenz, die Runx2-Überexpression durch ein Runx2 exprimierendes Plasmid. In RT-PCRs wurden mRNA-Messungen durchgeführt. Die Proteinbestimmung erfolgte im ‚Westernblot'. Promotoraktivität und Funktionalität der Proteine wurden in Luziferase-Reportergenassays überprüft.

Unter basalen Kulturbedingungen differenzierten sich pHOB osteogen ohne Erreichen der Mineralisationsphase. Durch zweimalige siRunx2-Transfektion gelang auf mRNA-Ebene eine suffiziente Runx2-Suppression über 29 Tage auf durchschnittlich 10,1%, die wahrscheinlich auch auf Proteinebene stattfindet. Neben einer Steigerung der PPARγ-mRNA nach sieben Tagen konnte darunter auch eine Suppression der osteogenen Differenzierungsmarker OC und AP beobachtet werden. Ein Rescue' der supprimierten Runx2-Genexpression konnte durch osteogene Stimulation nicht erreicht werden.

In den Runx2-/PPARγ-Interaktionsversuchen wurden SCP1-Zellen adipogen stimuliert, um die PPARγ2-mRNA und PPARγ-Promotoraktivität zu erhöhen. Darunter konnte ebenfalls eine gesteigerte Funktionalität des PPARγ-Proteins beobachtet werden. Die Kostimulation mit Troglitazon führte zu einer früheren und verstärkten PPARγ2-mRNA-Expression. Runx2 hemmt die PPARγ-Promotoraktivität in SCP1-Zellen, während die PPARγ2-mRNA unbeeinflusst bleibt.

Die zentrale Rolle des Runx2 in der osteogenen Differenzierung scheint durch den Einfluss auf die osteogenen Marker OC und AP in pHOB bestätigt zu werden. Auch der Einfluss auf die adipogene Differenzierung erfolgt voraussichtlich über Runx2, das den zentralen Transkriptionsfaktor PPARγ hemmt. Dies geschieht bereits am Promotor. Gründe für die fehlende PPARγ-mRNA-Suppression könnten zeitlicher oder methodischer Natur sein, aber auch auf zellmolekulare Mechanismen zurückführbar sein.

6. Literaturverzeichnis

Reference List

Agerbaek MO, Eriksen EF, Kragstrup J, Mosekilde L and Melsen F (1991): A reconstruction of the remodelling cycle in normal human cortical iliac bone. *Bone Miner.* 12, 101-112.

Ahdjoudj S, Lasmoles F, Oyajobi BO, Lomri A, Delannoy P and Marie PJ (2001): Reciprocal control of osteoblast/chondroblast and osteoblast/adipocyte differentiation of multipotential clonal human marrow stromal F/STRO-1(+) cells. *J. Cell Biochem.* 81, 23-38.

Ahdjoudj S, Fromigue O and Marie PJ (2004): Plasticity and regulation of human bone marrow stromal osteoprogenitor cells: potential implication in the treatment of age-related bone loss. *Histol. Histopathol.* 19, 151-157.

Akune T, Ohba S, Kamekura S, Yamaguchi M, Chung UI, Kubota N, Terauchi Y, Harada Y, Azuma Y, Nakamura K et al. (2004): PPARgamma insufficiency enhances osteogenesis through osteoblast formation from bone marrow progenitors. *J. Clin. Invest* 113, 846-855.

Ayers SD, Nedrow KL, Gillilan RE and Noy N (2007): Continuous nucleocytoplasmic shuttling underlies transcriptional activation of PPARgamma by FABP4. *Biochemistry* 46, 6744-6752.

Aronson BD, Fisher AL, Blechma, K, Caudy M and Gergen JP (1997): Groucho-dependent and -independent repression activities of Runt domain proteins. *Mol. Cell Biol.* 17, 5581-5587.

Backstrom S, Wolf-Watz M, Grundstrom C, Hard T, Grundstrom T and Sauer UH (2002): The RUNX1 Runt domain at 1.25A resolution: a structural switch and specifically bound chloride ions modulate DNA binding. *J. Mol. Biol.* 322, 259-272.

Bain G, Muller T, Wang X and Papkoff J (2003): Activated beta-catenin induces osteoblast differentiation of C3H10T1/2 cells and participates in BMP2 mediated signal transduction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 301, 84-91.

Banerjee C, Javed A, Choi JY, Green J, Rosen V, Van Wijnen AJ, Stein JL, Lian JB and Stein GS (2001): Differential regulation of the two principal Runx2/Cbfa1 n-terminal isoforms in response to bone morphogenetic protein-2 during development of the osteoblast phenotype. *Endocrinology* 142, 4026-4039.

Behlke MA (2006): Progress towards in vivo use of siRNAs. *Mol. Ther.* 13, 644-670.

Bengtsson G and Olivecrona T (1980): Lipoprotein lipase. Mechanism of product inhibition. *Eur. J. Biochem.* 106, 557-562.

Bernard P and Harley VR (2010): Acquisition of SOX transcription factor specificity through protein-protein interaction, modulation of Wnt signalling and post-translational modification. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 42, 400-410.

Bodine PV and Komm BS (2006): Wnt signaling and osteoblastogenesis. *Rev. Endocr. Metab Disord.* 7, 33-39.

Boker W, Yin Z, Drosse I, Haasters F, Rossmann O, Wierer M, Popov C, Locher M, Mutschler W, Docheva D et al. (2008): Introducing a single-cell-derived human mesenchymal stem cell line expressing hTERT after lentiviral gene transfer. *J. Cell Mol. Med.* 12, 1347-1359.

Bonewald L (2006): Osteocytes as multifunctional cells. *J. Musculoskelet. Neuronal. Interact.* 6, 331-333.

Brown JP, Delmas PD, Malaval L, Edouard C, Chapuy MC and Meunier PJ (1984): Serum bone Gla-protein: a specific marker for bone formation in postmenopausal osteoporosis. *Lancet* 1984, 1, 1091-1093.

Bruedigam C, Koedam M, Chiba H, Eijken M and van Leeuwen JP (2008): Evidence for multiple peroxisome proliferator-activated receptor gamma transcripts in bone: fine-tuning by hormonal regulation and mRNA stability. *FEBS Lett.* 582, 1618-1624.

Bugel S (2008): Vitamin K and bone health in adult humans. *Vitam. Horm.* 78, 393-416.

Burkhardt R, Kettner G, Bohm W, Schmidmeier M, Schlag R, Frisch B, Mallmann B, Eisenmenger W and Gilg T (1987): Changes in trabecular bone, hematopoiesis and bone marrow vessels in aplastic anemia, primary osteoporosis, and old age: a comparative histomorphometric study. *Bone* 8, 157-164.

Catapano AL (1982): Apolipoprotein C-II and lipoprotein lipase activity. *Ric. Clin. Lab.* 12, 35-40.

Celil AB, Hollinger JO and Campbell PG (2005): Osx transcriptional regulation is mediated by additional pathways to BMP2/Smad signaling. *J. Cell Biochem.* 95, 518-528.

Chamberlain G, Fox J, Ashton B and Middleton J (2007): Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells* 25, 2739-2749.

Chambers TJ and Fuller K (1985): Bone cells predispose bone surfaces to resorption by exposure of mineral to osteoclastic contact. *J. Cell Sci.* 76, 155-165.

Chen G, Fernandez J, Mische S and Courey AJ (1999): A functional interaction between the histone deacetylase Rpd3 and the corepressor groucho in Drosophila development. *Genes Dev.* 13, 2218-2230.

Chiu YL and Rana TM (2002): RNAi in human cells: basic structural and functional features of small interfering RNA. *Mol. Cell* 10, 549-561.

Choi JY, Pratap J, Javed A, Zaidi SK, Xing L, Balint E, Dalamangas S, Boyce B, Van Wijnen AJ, Lian JB et al. (2001): Subnuclear targeting of Runx/Cbfa/AML factors is

essential for tissue-specific differentiation during embryonic development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 8650-8655.

Chung CH, Golub EE, Forbes E, Tokuoka T and Shapiro IM (1992): Mechanism of action of beta-glycerophosphate on bone cell mineralization. *Calcif. Tissue Int.* 51, 305-311.

Cui RR, Li SJ, Liu LJ, Yi L, Liang QH, Zhu X, Liu GY, Liu Y, Wu SS, Liao XB et al. (2012): MicroRNA-204 regulates vascular smooth muscle cell calcification in vitro and in vivo. *Cardiovasc. Res.* 96, 320-329.

Chung CH, Golub EE, Forbes E, Tokuoka T and Shapiro IM (1992): Mechanism of action of beta-glycerophosphate on bone cell mineralization. *Calcif. Tissue Int.* 51, 305-311.

Cui RR, Li SJ, Liu LJ, Yi L, Liang QH, Zhu X, Liu GY, Liu Y, Wu SS, Liao XB et al. (2012): MicroRNA-204 regulates vascular smooth muscle cell calcification in vitro and in vivo. *Cardiovasc. Res.* 96, 320-329.

Cummings SR, San MJ, McClung MR, Siris ES, Eastell R, Reid IR, Delmas P, Zoog HB, Austin M, Wang A et al. (2009): Denosumab for prevention of fractures in postmenopausal women with osteoporosis. *N. Engl. J. Med.* 361, 756-765.

Delany AM, Dong Y and Canalis E (1994): Mechanisms of glucocorticoid action in bone cells. *J. Cell Biochem.* 56, 295-302.

Delmas PD, Stenner D, Wahner HW, Mann KG and Riggs BL (1983): Increase in serum bone gamma-carboxyglutamic acid protein with aging in women. Implications for the mechanism of age-related bone loss. *J. Clin. Invest.* 71, 1316-1321.

Ding J, Nagai K and Woo JT (2003): Insulin-dependent adipogenesis in stromal ST2 cells derived from murine bone marrow. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67, 314-321.

Dresner-Pollak R, Parker RA, Poku M, Thompson J, Seibel MJ and Greenspan SL (1996): Biochemical markers of bone turnover reflect femoral bone loss in elderly women. *Calcif. Tissue Int.* 59, 328-333.

Drissi H, Pouliot A, Koolloos C, Stein JL, Lian JB, Stein GS and Van Wijnen AJ (2002): 1,25-(OH)2-vitamin D3 suppresses the bone-related Runx2/Cbfa1 gene promoter. *Exp. Cell Res.* 274, 323-333.

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

Duncan RL and Turner CH (1995): Mechanotransduction and the functional response of bone to mechanical strain. *Calcif. Tissue Int.* 57, 344-358.

Duque G (2008): Bone and fat connection in aging bone. *Curr. Opin. Rheumatol.* 20, 429-434.

Eriksen EF (2010): Cellular mechanisms of bone remodeling. *Rev. Endocr. Metab Disord.* 11, 219-227.

Eriksen EF, Gundersen HJ, Melsen F and Mosekilde L (1984a): Reconstruction of the formative site in iliac trabecular bone in 20 normal individuals employing a kinetic model for matrix and mineral apposition. *Metab Bone Dis. Relat Res.* 5, 243-252.

Eriksen EF, Melsen F and Mosekilde L (1984b): Reconstruction of the resorptive site in iliac trabecular bone: a kinetic model for bone resorption in 20 normal individuals. *Metab Bone Dis. Relat Res.* 5, 235-242.

Eriksen EF, Hodgson SF, Eastell R, Cedel SL, O'Fallon WM and Riggs BL (1990): Cancellous bone remodeling in type I (postmenopausal) osteoporosis: quantitative assessment of rates of formation, resorption, and bone loss at tissue and cellular levels. *J. Bone Miner. Res.* 5, 311-319.

Eriksen EF, Eghbali-Fatourechi GZ and Khosla S (2007): Remodeling and vascular spaces in bone. *J. Bone Miner. Res.* 22, 1-6.

Everts V, Delaisse JM, Korper W, Jansen DC, Tigchelaar-Gutter W, Saftig P and Beertsen W (2002): The bone lining cell: its role in cleaning Howship's lacunae and initiating bone formation. *J. Bone Miner. Res.* 17, 77-90.

Fajas L, Auboeuf D, Raspe E, Schoonjans K, Lefebvre AM, Saladin R, Najib J, Laville M, Fruchart JC, Deeb S et al. (1997): The organization, promoter analysis, and expression of the human PPARgamma gene. *J. Biol. Chem.* 272, 18779-18789.

Furuhashi M and Hotamisligil GS (2008): Fatty acid-binding proteins: role in metabolic diseases and potential as drug targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* 7, 489-503.

Furuhashi M, Tuncman G, Gorgun CZ, Makowski L, Atsumi G, Vaillancourt E, Kono K, Babaev VR, Fazio S, Linton MF et al. (2007): Treatment of diabetes and atherosclerosis by inhibiting fatty-acid-binding protein aP2. *Nature* 447, 959-965.

Gavrilov K and Saltzman WM (2012): Therapeutic siRNA: principles, challenges, and strategies. *Yale J. Biol. Med.* 85, 187-200.

Geoffroy V, Kneissel M, Fournier B, Boyde A and Matthias P (2002): High bone resorption in adult aging transgenic mice overexpressing cbfa1/runx2 in cells of the osteoblastic lineage. *Mol. Cell Biol.* 22, 6222-6233.

Gianni M, Terao M, Norio P, Barbui T, Rambaldi A and Garattini E (1995): All-trans retinoic acid and cyclic adenosine monophosphate cooperate in the expression of leukocyte alkaline phosphatase in acute promyelocytic leukemia cells. *Blood* 85, 3619-3635.

Giesen M (2007): Die Rolle der Transkriptionsfaktoren "runt-related transcription factor-2" (RUNX2) und Osterix in humanen Osteoblasten. Med. Diss. Göttingen 2007.

Golub EE, Harrison G, Taylor AG, Camper S and Shapiro IM (1992): The role of alkaline phosphatase in cartilage mineralization. *Bone Miner.* 17, 273-278.

Gori F, Thomas T, Hicok KC, Spelsberg TC and Riggs BL (1999): Differentiation of human marrow stromal precursor cells: bone morphogenetic protein-2 increases OSF2/CBFA1, enhances osteoblast commitment, and inhibits late adipocyte maturation. *J. Bone Miner. Res.* 14, 1522-1535.

Gregoire FM, Smas CM and Sul HS (1998): Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev.* 78, 783-809.

Gullberg B, Johnell O and Kanis JA (1997): World-wide projections for hip fracture. *Osteoporos. Int.* 7, 407-413.

Han MS, Kim HJ, Wee HJ, Lim KE, Park NR, Bae SC, Van Wijnen AJ, Stein JL, Lian JB, Stein GS et al. (2010): The cleidocranial dysplasia-related R131G mutation in the Runt-related transcription factor RUNX2 disrupts binding to DNA but not CBF-beta. *J. Cell Biochem.* 110, 97-103.

Hauge EM, Qvesel D, Eriksen EF, Mosekilde L and Melsen F (2001): Cancellous bone remodeling occurs in specialized compartments lined by cells expressing osteoblastic markers. *J. Bone Miner. Res.* 16, 1575-1582.

Hauschka PV, Lian JB, Cole DE and Gundberg CM (1989): Osteocalcin and matrix Gla protein: vitamin K-dependent proteins in bone. *Physiol. Rev.* 69, 990-1047.

Hens JR, Wilson KM, Dann P, Chen X, Horowitz MC and Wysolmerski JJ (2005): TOPGAL mice show that the canonical Wnt signaling pathway is active during bone development and growth and is activated by mechanical loading in vitro. *J. Bone Miner. Res.* 20, 1103-1113.

Hotamisligil GS, Johnson RS, Distel RJ, Ellis R, Papaioannou VE and Spiegelman BM (1996): Uncoupling of obesity from insulin resistance through a targeted mutation in aP2, the adipocyte fatty acid binding protein. *Science* 274, 1377-1379.

Hutvagner G and Zamore PD (2002): A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science* 297, 2056-2060.

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

Javed A, Guo B, Hiebert S, Choi JY, Green J, Zhao SC, Osborne MA, Stifani S, Stein JL, Lian JB et al. (2000): Groucho/TLE/R-esp proteins associate with the nuclear matrix and repress RUNX (CBF(alpha)/AML/PEBP2(alpha)) dependent activation of tissue-specific gene transcription. *J. Cell Sci.* 113 (Pt 12), 2221-2231.

Jensen ED, Nair AK and Westendorf JJ (2007): Histone deacetylase co-repressor complex control of Runx2 and bone formation. *Crit Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 17, 187-196.

Jeon MJ, Kim JA, Kwon SH, Kim SW, Park KS, Park SW, Kim SY and Shin CS (2003): Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma inhibits the Runx2-mediated transcription of osteocalcin in osteoblasts. *J. Biol. Chem.* 278, 23270-23277.

Johnell O and Kanis JA (2006): An estimate of the worldwide prevalence and disability associated with osteoporotic fractures. *Osteoporos. Int.* 17, 1726-1733.

Kadowaki T (2000): Insights into insulin resistance and type 2 diabetes from knockout mouse models. *J. Clin. Invest.* 106, 459-465.

Kahler RA and Westendorf JJ (2003): Lymphoid enhancer factor-1 and beta-catenin inhibit Runx2-dependent transcriptional activation of the osteocalcin promoter. *J. Biol. Chem.* 278, 11937-11944.

Kamachi Y, Ogawa E, Asano M, Ishida S, Murakami Y, Satake M, Ito Y and Shigesada K (1990): Purification of a mouse nuclear factor that binds to both the A and B cores of the polyomavirus enhancer. *J. Virol.* 64, 4808-4819.

Kamachi Y, Uchikawa M and Kondoh H (2000): Pairing SOX off: with partners in the regulation of embryonic development. *Trends Genet.* 16, 182-187.

Kanazawa A, Tsukada S, Kamiyama M, Yanagimoto T, Nakajima M and Maeda S (2005): Wnt5b partially inhibits canonical Wnt/beta-catenin signaling pathway and promotes adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 330, 505-510.

Kang JS, Alliston T, Delston R and Derynck R (2005): Repression of Runx2 function by TGF-beta through recruitment of class II histone deacetylases by Smad3. *EMBO J.* 24, 2543-2555.

Kang S, Bennett CN, Gerin I, Rapp LA, Hankenson KD and Macdougald OA (2007): Wnt signaling stimulates osteoblastogenesis of mesenchymal precursors by suppressing CCAAT/enhancer-binding protein alpha and peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J. Biol. Chem.* 282, 14515-14524.

Kanis JA, Delmas P, Burckhardt P, Cooper C and Torgerson D (1997): Guidelines for diagnosis and management of osteoporosis. The European Foundation for Osteoporosis and Bone Disease. *Osteoporos. Int.* 7, 390-406.

Kanis JA, Johnell O, Oden A, Sembo I, Redlund-Johnell I, Dawson A, De LC and Jonsson B (2000): Long-term risk of osteoporotic fracture in Malmo. *Osteoporos. Int.* 11, 669-674.

Kawai M and Rosen CJ (2010): PPARgamma: a circadian transcription factor in adipogenesis and osteogenesis. *Nat. Rev. Endocrinol.* 6, 629-636.

Kim HJ, Nam SH, Kim HJ, Park HS, Ryoo HM, Kim SY, Cho TJ, Kim SG, Bae SC, Kim IS et al. (2006): Four novel RUNX2 mutations including a splice donor site result in the cleidocranial dysplasia phenotype. *J. Cell Physiol.* 207, 114-122.

Kinnunen PK, Jackson RL, Smith LC, Gotto AM Jr and Sparrow JT (1977): Activation of lipoprotein lipase by native and synthetic fragments of human plasma apolipoprotein C-II. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 74, 4848-4851.

Kliewer SA, Forman BM, Blumberg B, Ong ES, Borgmeyer U, Mangelsdorf DJ, Umesono K and Evans RM (1994): Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferator-activated receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91, 7355-7359.

Koga T, Matsui Y, Asagiri M, Kodama T, de Crombrugghe B, Nakashima K and Takayanagi H (2005): NFAT and Osterix cooperatively regulate bone formation. *Nat. Med.* 11, 880-885.

Komori T (2003): Requisite roles of Runx2 and Cbfb in skeletal development. *J. Bone Miner. Metab* 21, 193-197.

Komori T (2006): Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors. *J. Cell Biochem.* 99, 1233-1239.

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

Kook SH, Choi KC, Son YO, Lee KY, Hwang IH, Lee HJ, Chang JS, Choi IH and Lee JC (2006): Satellite cells isolated from adult Hanwoo muscle can proliferate and differentiate into myoblasts and adipose-like cells. *Mol. Cell* 22, 239-245.

Kubota N, Terauchi Y, Miki H, Tamemoto H, Yamauchi T, Komeda K, Satoh S, Nakano R, Ishii C, Sugiyama T et al. (1999): PPAR gamma mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. *Mol. Cell* 4, 597-609.

Kurata K, Heino TJ, Higaki H and Vaananen HK (2006): Bone marrow cell differentiation induced by mechanically damaged osteocytes in 3D gel-embedded culture. *J. Bone Miner. Res.* 21, 616-625.

Kyeyune-Nyombi E, Lau KH, Baylink DJ and Strong DD (1991): 1,25-Dihydroxyvitamin D3 stimulates both alkaline phosphatase gene transcription and mRNA stability in human bone cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 291, 316-325.

Lecka-Czernik B (2009): Bone as a target of type 2 diabetes treatment. *Curr. Opin. Investig. Drugs* 10, 1085-1090.

Lecka-Czernik B (2010): Bone loss in diabetes: use of antidiabetic thiazolidinediones and secondary osteoporosis. *Curr. Osteoporos. Rep.* 8, 178-184.

Lecka-Czernik B, Gubrij I, Moerman EJ, Kajkenova O, Lipschitz DA, Manolagas SC and Jilka RL (1999): Inhibition of Osf2/Cbfa1 expression and terminal osteoblast differentiation by PPARgamma2. *J. Cell Biochem.* 74, 357-371.

Lee MH, Kwon TG, Park HS, Wozney JM and Ryoo HM (2003): BMP-2-induced Osterix expression is mediated by Dlx5 but is independent of Runx2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 309, 689-694.

Lee NK, Sowa H, Hinoi E, Ferron M, Ahn JD, Confavreux C, Dacquin R, Mee PJ, McKee MD, Jung DY et al. (2007): Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell* 130, 456-469.

Levanon D and Groner Y (2004): Structure and regulated expression of mammalian RUNX genes. *Oncogene* 23, 4211-4219.

Lian JB, Javed A, Zaidi SK, Lengner C, Montecino M, Van Wijnen AJ, Stein JL and Stein GS (2004): Regulatory controls for osteoblast growth and differentiation: role of Runx/Cbfa/AML factors. *Crit Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 14, 1-41.

Liu LF, Shen WJ, Zhang ZH, Wang LJ and Kraemer FB (2010): Adipocytes decrease Runx2 expression in osteoblastic cells: roles of PPARgamma and adiponectin. *J. Cell Physiol.* 225, 837-845.

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

Mabilleau G, Mieczkowska A and Edmonds ME (2010): Thiazolidinediones induce osteocyte apoptosis and increase sclerostin expression. *Diabet. Med.* 27, 925-932.

Mackiewicz Z, Niklinska WE, Kowalewska J and Chyczewski L (2011): Bone as a source of organism vitality and regeneration. *Folia Histochem. Cytobiol.* 49, 558-569.

Makowski L, Brittingham KC, Reynolds JM, Suttles J and Hotamisligil GS (2005): The fatty acid-binding protein, aP2, coordinates macrophage cholesterol trafficking and inflammatory activity. Macrophage expression of aP2 impacts peroxisome proliferator-activated receptor gamma and IkappaB kinase activities. *J. Biol. Chem.* 280, 12888-12895.

Marks SC Jr. and Popoff SN (1988): Bone cell biology: the regulation of development, structure, and function in the skeleton. *Am. J. Anat.* 183, 1-44.

Marotti G, Ferretti M, Muglia MA, Palumbo C and Palazzini S (1992): A quantitative evaluation of osteoblast-osteocyte relationships on growing endosteal surface of rabbit tibiae. *Bone* 13, 363-368.

Matsubara T, Kida K, Yamaguchi A, Hata K, Ichida F, Meguro H, Aburatani H, Nishimura R and Yoneda T (2008): BMP2 regulates Osterix through Msx2 and Runx2 during osteoblast differentiation. *J. Biol. Chem.* 283, 29119-29125.

McGee-Lawrence ME and Westendorf JJ (2011): Histone deacetylases in skeletal development and bone mass maintenance. *Gene* 474, 1-11.

McKee MD, Glimcher MJ and Nanci A (1992): High-resolution immunolocalization of osteopontin and osteocalcin in bone and cartilage during endochondral ossification in the chicken tibia. *Anat. Rec.* 234, 479-492.

Melton LJ III, Chrischilles EA, Cooper C, Lane AW and Riggs BL (1992): Perspective. How many women have osteoporosis? *J. Bone Miner. Res.* 7, 1005-1010.

Melton LJ III, Atkinson EJ, O'Connor MK, O'Fallon WM and Riggs BL (1998): Bone density and fracture risk in men. *J. Bone Miner. Res.* 13, 1915-1923.

Mendoza-Villanueva D, Zeef L and Shore P (2011): Metastatic breast cancer cells inhibit osteoblast differentiation through the Runx2/CBFbeta-dependent expression of the Wnt antagonist, sclerostin. *Breast Cancer Res.* 13, R106.

Meunier P, Aaron J, Edouard C and Vignon G (1971): Osteoporosis and the replacement of cell populations of the marrow by adipose tissue. A quantitative study of 84 iliac bone biopsies. *Clin. Orthop. Relat Res.* 80, 147-154.

Meyers S, Downing JR and Hiebert SW (1993): Identification of AML-1 and the (8;21) translocation protein (AML-1/ETO) as sequence-specific DNA-binding proteins: the runt homology domain is required for DNA binding and protein-protein interactions. *Mol. Cell Biol.* 13, 6336-6345.

Miller SC and Jee WS (1987): The bone lining cell: a distinct phenotype? *Calcif. Tissue Int.* 41, 1-5.

Moerman EJ, Teng K, Lipschitz DA and Lecka-Czernik B (2004): Aging activates adipogenic and suppresses osteogenic programs in mesenchymal marrow stroma/stem cells: the role of PPAR-gamma2 transcription factor and TGF-beta/BMP signaling pathways. *Aging Cell* 3, 379-389.

Mundlos S, Otto F, Mundlos C, Mulliken JB, Aylsworth AS, Albright S, Lindhout D, Cole WG, Henn W, Knoll JH et al. (1997): Mutations involving the transcription factor CBFA1 cause cleidocranial dysplasia. *Cell* 89, 773-779.

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

Nguyen TV, Center JR and Eisman JA (2004): Osteoporosis: underrated, underdiagnosed and undertreated. *Med. J. Aust.* 180, S18-S22.

Niemeier A, Kassem M, Toedter K, Wendt D, Ruether W, Beisiegel U and Heeren J (2005): Expression of LRP1 by human osteoblasts: a mechanism for the delivery of lipoproteins and vitamin K1 to bone. *J. Bone Miner. Res.* 20, 283-293.

Nuttall ME, Patton AJ, Olivera DL, Nadeau DP and Gowen M (1998): Human trabecular bone cells are able to express both osteoblastic and adipocytic phenotype: implications for osteopenic disorders. *J. Bone Miner. Res.* 13, 371-382.

Okazaki R, Toriumi M, Fukumoto S, Miyamoto M, Fujita T, Tanaka K and Takeuchi Y (1999): Thiazolidinediones inhibit osteoclast-like cell formation and bone resorption in vitro. *Endocrinology* 140, 5060-5065.

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

Owen TA, Aronow M, Shalhoub V, Barone LM, Wilming L, Tassinari MS, Kennedy MB, Pockwinse S, Lian JB and Stein GS (1990): Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. *J. Cell Physiol.* 143, 420-430.

Parhami F, Jackson SM, Tintut Y, Le V, Balucan JP, Territo M and Demer LL (1999): Atherogenic diet and minimally oxidized low density lipoprotein inhibit osteogenic and promote adipogenic differentiation of marrow stromal cells. *J. Bone Miner. Res.* 14, 2067-2078.

Park JY, Bae MA, Cheon HG, Kim SS, Hong JM, Kim TH, Choi JY, Kim SH, Lim J, Choi CH et al. (2009): A novel PPARgamma agonist, KR62776, suppresses RANKL-induced osteoclast differentiation and activity by inhibiting MAP kinase pathways. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 378, 645-649.

Phimphilai M, Zhao Z, Boules H, Roca H and Franceschi RT (2006): BMP signaling is required for RUNX2-dependent induction of the osteoblast phenotype. *J. Bone Miner. Res.* 21, 637-646.

Plotkin LI, Aguirre JI, Kousteni S, Manolagas SC and Bellido T (2005): Bisphosphonates and estrogens inhibit osteocyte apoptosis via distinct molecular mechanisms downstream of extracellular signal-regulated kinase activation. *J. Biol. Chem.* 280, 7317-7325.

Ponce ML, Koelling S, Kluever A, Heinemann DE, Miosge N, Wulf G, Frosch KH, Schutze N, Hufner M and Siggelkow H (2008): Coexpression of osteogenic and adipogenic differentiation markers in selected subpopulations of primary human mesenchymal progenitor cells. *J. Cell Biochem.* 104, 1342-1355.

Pratap J, Wixted JJ, Gaur T, Zaidi SK, Dobson J, Gokul KD, Hussain S, Van Wijnen AJ, Stein JL, Stein GS et al. (2008): Runx2 transcriptional activation of Indian Hedgehog and a downstream bone metastatic pathway in breast cancer cells. *Cancer Res.* 68, 7795-7802.

Prichett WP, Patton AJ, Field JA, Brun KA, Emery JG, Tan KB, Rieman DJ, McClung HA, Nadeau DP, Mooney JL et al. (2000): Identification and cloning of a human urea transporter HUT11, which is downregulated during adipogenesis of explant cultures of human bone. *J. Cell Biochem.* 76, 639-650.

Rachner TD, Khosla S and Hofbauer LC (2011): Osteoporosis: now and the future. *Lancet* 377, 1276-1287.

Rambaldi A, Terao M, Bettoni S, Tini ML, Bassan R, Barbui T and Garattini E (1990): Expression of leukocyte alkaline phosphatase gene in normal and leukemic cells: regulation of the transcript by granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* 76, 2565-2571.

Reid IR, Miller PD, Brown JP, Kendler DL, Fahrleitner-Pammer A, Valter I, Maasalu K, Bolognese MA, Woodson G, Bone H et al. (2010): Effects of denosumab on bone histomorphometry: the FREEDOM and STAND studies. *J. Bone Miner. Res.* 25, 2256-2265.

Reina M, Brunzell JD and Deeb SS (1992): Molecular basis of familial chylomicronemia: mutations in the lipoprotein lipase and apolipoprotein C-II genes. *J. Lipid Res.* 33, 1823-1832.

Rini D and Calabi F (2001): Identification and comparative analysis of a second runx3 promoter. *Gene* 273, 13-22.

Robling AG, Castillo AB and Turner CH (2006): Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling. *Annu. Rev. Biomed. Eng* 8, 455-498.

Rosen ED and Spiegelman BM (2001): PPARgamma : a nuclear regulator of metabolism, differentiation, and cell growth. *J. Biol. Chem.* 276, 37731-37734.

Russell DW (1992): Cholesterol biosynthesis and metabolism. *Cardiovasc. Drugs Ther.* 6, 103-110.

Salingcarnboriboon R, Tsuji K, Komori T, Nakashima K, Ezura Y and Noda M (2006): Runx2 is a target of mechanical unloading to alter osteoblastic activity and bone formation in vivo. *Endocrinology* 147, 2296-2305.

Schieker M, Pautke C, Reitz K, Hemraj I, Neth P, Mutschler W and Milz S (2004): The use of four-colour immunofluorescence techniques to identify mesenchymal stem cells. *J. Anat.* 204, 133-139.

Schoonjans K, Peinado-Onsurbe J, Lefebvre AM, Heyman RA, Briggs M, Deeb S, Staels B and Auwerx J (1996): PPARalpha and PPARgamma activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene. *EMBO J.* 15, 5336-5348.

Schroeder TM, Kahler RA, Li X and Westendorf JJ (2004): Histone deacetylase 3 interacts with runx2 to repress the osteocalcin promoter and regulate osteoblast differentiation. *J. Biol. Chem.* 279, 41998-42007.

Schroeder TM, Jensen ED and Westendorf JJ (2005): Runx2: a master organizer of gene transcription in developing and maturing osteoblasts. *Birth Defects Res. C. Embryo. Today* 75, 213-225.

Schwartz AV (2008): TZDs and Bone: A Review of the Recent Clinical Evidence. *PPAR. Res.* 2008, 297893.

Sharma AM and Staels B (2007): Review: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and adipose tissue--understanding obesity-related changes in regulation of lipid and glucose metabolism. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 92, 386-395.

Shockley KR, Lazarenko OP, Czernik PJ, Rosen CJ, Churchill GA and Lecka-Czernik B (2009): PPARgamma2 nuclear receptor controls multiple regulatory pathways of osteoblast differentiation from marrow mesenchymal stem cells. *J. Cell Biochem.* 106, 232-246.

Siggelkow H, Rebenstorff K, Kurre W, Niedhart C, Engel I, Schulz H, Atkinson MJ and Hufner M (1999a): Development of the osteoblast phenotype in primary human osteoblasts in culture: comparison with rat calvarial cells in osteoblast differentiation. *J. Cell Biochem.* 75, 22-35.

Siggelkow H, Schulz H, Kaesler S, Benzler K, Atkinson MJ and Hufner M (1999b): 1,25 dihydroxyvitamin-D3 attenuates the confluence-dependent differences in the osteoblast characteristic proteins alkaline phosphatase, procollagen I peptide, and osteocalcin. *Calcif. Tissue Int.* 64, 414-421.

Siggelkow H, Schmidt E, Hennies B and Hufner M (2004): Evidence of downregulation of matrix extracellular phosphoglycoprotein during terminal differentiation in human osteoblasts. *Bone* 35, 570-576.

Soltanoff CS, Yang S, Chen W and Li YP (2009): Signaling networks that control the lineage commitment and differentiation of bone cells. *Crit Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 19, 1-46.

Song L and Tuan RS (2004): Transdifferentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow. *FASEB J.* 18, 980-982.

Stamm S, Ben-Ari S, Rafalska I, Tang Y, Zhang Z, Toiber D, Thanaraj TA and Soreq H (2005): Function of alternative splicing. *Gene* 344, 1-20.

Stein GS and Lian JB (1993): Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype. *Endocr. Rev.* 14, 424-442.

Stein GS, Lian JB, Van Wijnen AJ, Stein JL, Montecino M, Javed A, Zaidi SK, Young DW, Choi JY and Pockwinse SM (2004): Runx2 control of organization, assembly and activity of the regulatory machinery for skeletal gene expression. *Oncogene* 23, 4315-4329.

Stock M and Otto F (2005): Control of RUNX2 isoform expression: the role of promoters and enhancers. *J. Cell Biochem.* 95, 506-517.

Sturge J, Caley MP and Waxman J (2011): Bone metastasis in prostate cancer: emerging therapeutic strategies. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 8, 357-368.

Sugii S and Evans RM (2011): Epigenetic codes of PPARgamma in metabolic disease. *FEBS Lett.* 585, 2121-2128.

Swaminathan R (2001): Biochemical markers of bone turnover. *Clin. Chim. Acta* 313, 95-105.

Szalay K, Razga Z and Duda E (1997): TNF inhibits myogenesis and downregulates the expression of myogenic regulatory factors myoD and myogenin. *Eur. J. Cell Biol.* 74, 391-398.

Tai G, Polak JM, Bishop AE, Christodoulou I and Buttery LD (2004): Differentiation of osteoblasts from murine embryonic stem cells by overexpression of the transcriptional factor osterix. *Tissue Eng.* 10, 1456-1466.

Takada I, Kouzmenko AP and Kato S (2009): Wnt and PPARgamma signaling in osteoblastogenesis and adipogenesis. *Nat. Rev. Rheumatol.* 5, 442-447.

Tan NS, Shaw NS, Vinckenbosch N, Liu P, Yasmin R, Desvergne B, Wahli W and Noy N (2002): Selective cooperation between fatty acid binding proteins and peroxisome proliferator-activated receptors in regulating transcription. *Mol. Cell Biol.* 22, 5114-5127.

Tang QQ, Gronborg M, Huang H, Kim JW, Otto TC, Pandey A and Lane MD (2005): Sequential phosphorylation of CCAAT enhancer-binding protein beta by MAPK and glycogen synthase kinase 3beta is required for adipogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102, 9766-9771.

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

Tenenbaum HC, Limeback H, McCulloch CA, Mamujee H, Sukhu B and Torontali M (1992): Osteogenic phase-specific co-regulation of collagen synthesis and mineralization by beta-glycerophosphate in chick periosteal cultures. *Bone* 13, 129-138.

Terry A, Kilbey A, Vaillant F, Stewart M, Jenkins A, Cameron E and Neil JC (2004): Conservation and expression of an alternative 3' exon of Runx2 encoding a novel proline-rich C-terminal domain. *Gene* 336, 115-125.

Tontonoz P and Spiegelman BM (2008): Fat and beyond: the diverse biology of PPARgamma. *Annu. Rev. Biochem.* 77, 289-312.

Tontonoz P, Hu E, Graves RA, Budavari AI and Spiegelman BM (1994): mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes Dev.* 8, 1224-1234.

Tontonoz P, Hu E and Spiegelman BM (1995): Regulation of adipocyte gene expression and differentiation by peroxisome proliferator activated receptor gamma. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 5, 571-576.

Uchihashi K, Aoki S, Matsunobu A and Toda S (2012): Osteoblast migration into type I collagen gel and differentiation to osteocyte-like cells within a self-produced mineralized matrix: A novel system for analyzing differentiation from osteoblast to osteocyte. *Bone* 52, 102-110.

Urban K, Hohling HJ, Luttenberg B, Szuwart T and Plate U (2012): An in vitro study of osteoblast vitality influenced by the vitamins C and E. *Head Face. Med.* 8, 25.

Viereck V, Siggelkow H, Tauber S, Raddatz D, Schutze N and Hufner M (2002): Differential regulation of Cbfa1/Runx2 and osteocalcin gene expression by vitamin-D3, dexamethasone, and local growth factors in primary human osteoblasts. *J. Cell Biochem.* 86, 348-356.

Wan Y (2010): PPARgamma in bone homeostasis. *Trends Endocrinol. Metab* 21, 722-728.

Wan Y, Chong LW and Evans RM (2007): PPAR-gamma regulates osteoclastogenesis in mice. *Nat. Med.* 13, 1496-1503.

Wang H and Eckel RH (2009): Lipoprotein lipase: from gene to obesity. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* 297, E271-E288.

Wang S, Wang Q, Crute BE, Melnikova IN, Keller SR and Speck NA (1993): Cloning and characterization of subunits of the T-cell receptor and murine leukemia virus enhancer core-binding factor. *Mol. Cell Biol.* 13, 3324-3339.

Warren AJ, Bravo J, Williams RL and Rabbitts TH (2000): Structural basis for the heterodimeric interaction between the acute leukaemia-associated transcription factors AML1 and CBFbeta. *EMBO J.* 19, 3004-3015.

Wei W, Wang X, Yang M, Smith LC, Dechow PC, Sonoda J, Evans RM and Wan Y (2010): PGC1beta mediates PPARgamma activation of osteoclastogenesis and rosiglitazone-induced bone loss. *Cell Metab.* 11, 503-516.

Wei W, Zeve D, Suh JM, Wang X, Du Y, Zerwekh JE, Dechow PC, Graff JM and Wan Y (2011): Biphasic and dosage-dependent regulation of osteoclastogenesis by beta-catenin. *Mol. Cell Biol.* 31, 4706-4719.

Wennberg C, Hessle L, Lundberg P, Mauro S, Narisawa S, Lerner UH and Millan JL (2000): Functional characterization of osteoblasts and osteoclasts from alkaline phosphatase knockout mice. *J. Bone Miner. Res.* 15, 1879-1888.

Westendorf JJ, Zaidi SK, Cascino JE, Kahler R, Van Wijnen AJ, Lian JB, Yoshida M, Stein GS and Li X (2002): Runx2 (Cbfa1, AML-3) interacts with histone deacetylase 6 and represses the p21(CIP1/WAF1) promoter. *Mol. Cell Biol.* 22, 7982-7992.

Westendorf JJ, Kahler RA and Schroeder TM (2004): Wnt signaling in osteoblasts and bone diseases. *Gene* 341, 19-39.

Wolf G (2008): Energy regulation by the skeleton. *Nutr. Rev.* 66, 229-233.

Wu Z, Rosen ED, Brun R, Hauser S, Adelmant G, Troy AE, McKeon C, Darlington GJ and Spiegelman BM (1999): Cross-regulation of C/EBP alpha and PPAR gamma controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity. *Mol. Cell* 3, 151-158.

Xiong J and O'Brien CA (2012): Osteocyte RANKL: new insights into the control of bone remodeling. *J. Bone Miner. Res.* 27, 499-505.

Yoshida CA, Yamamoto H, Fujita T, Furuichi T, Ito K, Inoue K, Yamana K, Zanma A, Takada K, Ito Y et al. (2004): Runx2 and Runx3 are essential for chondrocyte maturation, and Runx2 regulates limb growth through induction of Indian hedgehog. *Genes Dev.* 18, 952-963.

Yu WH, Li FG, Chen XY, Li JT, Wu YH, Huang LH, Wang Z, Li P, Wang T, Lahn BT et al. (2012): PPARgamma suppression inhibits adipogenesis but does not promote osteogenesis of human mesenchymal stem cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 44, 377-384.

Zaidi M, Buettner C, Sun L and Iqbal J (2012): Minireview: The link between fat and bone: does mass beget mass? *Endocrinology* 153, 2070-2075.

Zhang C, Cho K, Huang Y, Lyons JP, Zhou X, Sinha K, McCrea PD and de Crombrugghe B. (2008): Inhibition of Wnt signaling by the osteoblast-specific transcription factor Osterix. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 105, 6936-6941.

Zhu Y, Qi C, Korenberg JR, Chen XN, Noya D, Rao MS and Reddy JK (1995): Structural organization of mouse peroxisome proliferator-activated receptor gamma (mPPAR gamma) gene: alternative promoter use and different splicing yield two mPPAR gamma isoforms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 7921-7925.

Ziros PG, Basdra EK and Papavassiliou AG (2008): Runx2: of bone and stretch. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40, 1659-1663.

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: 3
Abbildung 2: 8
Abbildung 3: 9
Abbildung 4: 9
Abbildung 5: 11
Abbildung 6: 11
Abbildung 7: 16
Abbildung 8: 43
Abbildung 9: 45
Abbildung 10: 47
Abbildung 11: 48
Abbildung 12: 49
Abbildung 13: 51
Abbildung 14: 52
Abbildung 15: 54
Abbildung 16: 55
Abbildung 17: 57
Abbildung 18: 58
Abbildung 19: 61
Abbildung 20: 62
Abbildung 21: 64
Abbildung 22: 65
Abbildung 23: 67
Abbildung 24: 69
Abbildung 25: 71
Abbildung 26: 73
Abbildung 27: 75
Abbildung 28: 77
Abbildung 29: 82
Abbildung 30: 88
Abbildung 31: 91
Abbildung 32: 92
Abbildung 33: 94

8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht verwendeter pHOB-Zellen 18
Tabelle 2: Reagenzien zur Nährmediumherstellung 19
Tabelle 3: Nährmediumherstellung 19
Tabelle 4: Reagenzien für die Zellkultur 19
Tabelle 5: Geräte für die Zellkultur 20
Tabelle 6: Materialien für die osteogene Stimulation 20
Tabelle 7: Materialien für die adipogene Stimulation 21
Tabelle 8: Stimulationsmedien 21
Tabelle 9: Materialien für die Bakterienkultur 21
Tabelle 10: Herstellung des LB- Mediums 21
Tabelle 11: Verwendete siRNAs 22
Tabelle 12: Materialien für die RT-PCR 22
Tabelle 13: Materialien für die ‚Real-Time'-PCR 22
Tabelle 14: Verwendete ‚Real-Time'-PCR Primer 23
Tabelle 15: Materialien für die Plasmidpräparation 23
Tabelle 16: Verwendete Plasmide 24
Tabelle 17: Materialien für den Restriktionsverdau 25
Tabelle 18: Materialien für die Agarosegelelektrophorese 25
Tabelle 19: Herstellung des Agarosegels und des Auftragspuffers 25
Tabelle 20: Materialien für die Lipofektamintransfektion 25
Tabelle 21: Materialien für den Luziferase-Reportergenassay 26
Tabelle 22: Herstellung des Kratzpuffers 26
Tabelle 23: Herstellung des Kaliumphosphatpuffers 26
Tabelle 24: Herstellung des Glycylglycin-Puffers 26
Tabelle 25: Herstellung der Luziferin-Stammlösung 26
Tabelle 26: Herstellung des Luziferase-Assay-Mix 27
Tabelle 27: Herstellung des Luziferin-Mix 27
Tabelle 28: Materialien für die Proteinvorbereitung 27
Tabelle 29: Herstellung des Lysepuffers 27
Tabelle 30: Materialien für den ‚Westernblot' 28
Tabelle 31: Verdünnung der ‚Westernblot'-Antikörper 28
Tabelle 32: Herstellung des TBS-T 29
Tabelle 33: Materialien für die Image-J-Densitometrie 29

Danksagung:

Frau Prof. Dr. Heide Siggelkow danke ich für die Vergabe des Themas, für ihre ständige Diskussionsbereitschaft, für das große persönliche Engagement bei der Betreuung meiner Arbeit und das anregende Arbeitsklima in ihrer Arbeitsgruppe.

Besonderer Dank geht an Frau Regine Köpp für die permanente Hilfsbereitschaft und für die vielen schönen und lustigen gemeinsamen Stunden im Labor.

Frau Prof. Dr. Elke Oetjen und Frau Marie Stahnke danke ich für die Mithilfe bei der Etablierung der Luziferaseversuche und die Hilfsbereitschaft rund herum.

Bei Herrn Prof. Dr. Nicolai Miosge und Frau Christa Bode möchte ich mich ganz herzlich für die Hilfe bei der Etablierung des ‚Westernblots' und der Plasmidamplifikation bedanken.

Frau Dr. Martina Blaschke danke ich für die freundliche Unterstützung rund um die Arbeit.

Regine, Julia, Fides und Cornelius und danke ich herzlichst für das Korrekturlesen dieser Arbeit.