

Aus der Orthopädischen Klinik und Poliklinik

(König-Ludwig-Haus, Würzburg)

Lehrstuhl für Orthopädie der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. Jochen Eulert

**Funktionelle Analyse des Polymorphismus
im Promotor des 24-Hydroxylase-Gens**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Olaf Pöppelmeier

aus Oldenburg (Oldb.)

Würzburg, im Dezember 2006

Referent: Priv.-Doz. Dr. rer. Nat. Norbert Schütze

Koreferent: Prof. Dr. med. Franz Jakob

Dekan: Prof. Dr. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 18.07.2007

Der Promovend ist Arzt

Meinen Eltern,
Friederike
und allen die mich unterstützt haben.

Inhaltverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Vitamin D	1
1.2	Der Vitamin D-Rezeptor	1
1.3	Der Vitamin D-Metabolismus	3
1.4	Das Enzym 24-Hydroxylase	3
1.5	24,25(OH) ₂ D ₃	4
1.5.1	Einfluss von 24,25(OH) ₂ D ₃ auf die Differenzierung von Knorpelzellen	5
1.5.2	Einfluss von 24,25(OH) ₂ D ₃ auf Matrixvesikel	6
1.5.3	Intrazelluläre Reaktionen auf 24,25(OH) ₂ D ₃	7
1.6	Osteoporose	8
1.6.1	Genetik der Osteoporose	9
1.7	Zielsetzung der Arbeit	10
2	Material und Methoden	12
2.1	PCR	12
2.2	Agarosegelelektrophorese	12
2.3	Gelextraktion der PCR-Produkte	12
2.4	Restriktion von DNA	13
2.5	Klonierung der PCR-Produkte	13
2.5.1	Dephosphorylierung des restringierten pGL3-Basic Vektors	13
2.5.2	Ligation	13
2.5.2.1	TOPO Blueprint pCr 2.1 Vektor	13
2.5.2.2	pGL3-Basic Vektor	13
2.5.3	Transformation	14
2.5.4	Selektion	14
2.5.4.1	TOPO Blueprint pCr 2.1 Vektor	14
2.5.4.2	pGL3-Basic Vektor	14
2.6	Fragmentanalyse	14
2.7	DNA-Sequenzierung	15
2.8	Plasmid-Präparation	16
2.9	Zellkultur	16
2.9.1	hFOB 1.19	16
2.9.2	T/C 28a2	16
2.10	Luziferase Assay	17

2.10.1	Transfektion	17
2.10.2	Lyse der Zellen	18
2.10.3	Proteinbestimmung nach Bradford	18
2.10.4	Bestimmung der Luziferaseaktivität	18
2.11	Statistische Testverfahren	18
3	Ergebnisse	19
3.1	Amplifikation der zu untersuchenden Allele des Polymorphismus im Promotor des CYP24-Gens	19
3.1.1	Der CYP24-Promotor und die Wahl der Primer	19
3.1.2	Wahl der humanen genomischen DNA-Proben und die Durchführung der PCR	20
3.2	Klonierung des CYP24-Promotorkonstrukts in den pGL3-Basic Vektor	22
3.2.1	Ligation der PCR-Produkte in den TOPO Vektor	23
3.2.2	Fragmentanalyse der TOPO-klonierten Promotorkonstrukte	24
3.2.3	Ligation der Promotorkonstrukte mit dem pGL3-Basic Vektor	24
3.2.4	Sequenzierung	25
3.3	Messung der Promotoraktivität im Luziferase Assay	26
3.3.1	Herstellung der zu transfizierenden Vektor-Promotorkonstrukte	26
3.3.2	Versuchsaufbau und Datenverarbeitung	26
3.4	Luziferaseaktivität der pGL3-Basic Vektor-Promotorkonstrukte	30
3.4.1	Nach Transfektion in hFOB-Zellen	30
3.4.2	Nach Transfektion in T/C28-Zellen	32
3.5	Luziferaseaktivität der pGL3-Basic Vektor-Promotorkonstrukte unter Stimulation mit 1,25(OH) ₂ D ₃	34
3.5.1	Nach Transfektion in hFOB-Zellen unter Stimulation mit 1,25(OH) ₂ D ₃	34
3.5.2	Nach Transfektion in T/C 28-Zellen unter Stimulation mit 1,25(OH) ₂ D ₃	37
4	Diskussion	41
4.1	Einführung	41
4.2	Kritische Bewertung der Methoden	41
4.2.1	Zellkultursysteme	41
4.2.1.1	Die hFOB 1.19 Zelllinie	42
4.2.1.2	Die T/C28a2 Zelllinie	42
4.2.2	Transfektion durch Elektroporation	42
4.2.3	Bestimmung der Promotoraktivität mittels Luziferase Assays	43
4.3	Bewertung der Ergebnisse	44

4.3.1	Die Luziferaseaktivität im Wildtyp-Konstrukt	44
4.3.2	Die Luziferaseaktivität der Kontroll-Konstrukte	44
4.3.3	Die Auswirkung des Polymorphismus auf die Promotoraktivität	44
4.3.3.1	In Abwesenheit von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$	45
4.3.3.2	Unter Stimulation durch $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$	45
4.4	Weiterführende Forschung und praktische Relevanz	46
5	Zusammenfassung	49
6	Literaturverzeichnis	51

1 Einleitung

1.1 Vitamin D

1650 wurde die Knochenstoffwechselkrankheit Rachitis durch Glisson, DeBoot und Whistler¹ erstmals als eigenständige Krankheit beschrieben. In den nächsten 250 Jahren nahm die Inzidenz deutlich zu, welches nicht zuletzt auf die Veränderung der Lebensumstände durch die fortschreitende Industrialisierungen in Europa und den Vereinigten Staaten zurückzuführen war. Am Anfang des 20. Jahrhunderts zeigten bis zu 80% der Kinder in europäischen Städten Symptome von Rachitis². Mit der immer stärkeren Verbreitung der Erkrankung wuchs auch die Notwendigkeit über eine breit anwendbare Therapie oder Prophylaxe zu verfügen. Als 1920 die ersten Therapieerfolge mit UV-Bestrahlung^{3 4} und Lebertran⁵ erzielt wurden, ebnete dieses nicht nur den Weg für die Entschlüsselung der Pathogenese, sondern ermöglichte auch erstmals eine allgemeine und effektive Prophylaxe gegen Rachitis⁶. 1936 konnte dann das antirachitisch wirkende Bestrahlungsprodukt aus 7-Dehydrocholesterin⁷ dargestellt, und ein antirachitischer Faktor aus Thunfischleberöl⁸ isoliert werden. McCollum et al. nannten diesen Faktor Vitamin D⁹. Vitamin D ist, wie man heute weiß, kein Vitamin im klassischen Sinne, sondern eine Hormonvorstufe. Neben der Aufnahme über die Nahrung, kann es auch unter Einfluss von UVB-Strahlung in der Haut aus 7-Dehydrocholesterin hergestellt werden. Das wirksame Steroidhormon 1,25-Dihydroxy-VitaminD₃ (1,25(OH)₂D₃) entsteht dann durch die Hydroxylierung der Kohlenstoffatome an Position 25 in der Leber, und Position 1 in der Niere. Diese aktive Form hält vor allem über Wirkungen an Knochen, Niere, Darm und Nebenschilddrüse die Ca²⁺ und HPO₄²⁻ Plasmaspiegel im physiologischen Bereich. Aufgrund dieser Wirkungen ist 1,25(OH)₂D₃ für die Entwicklung, Mineralisierung und Erhaltung des Skelettsystems ein essentieller Faktor¹⁰.

1.2 Der Vitamin D-Rezeptor

Durch Arbeiten mit radioaktiv markiertem 1,25(OH)₂D₃ wurde nach 1970 von mehreren Arbeitsgruppen versucht einen Rezeptor für das Steroidhormon zu lokalisieren. Spezifische Anreicherungen in den Zellkernen¹¹ ließen auf einen nukleären Rezeptor schließen. Ähnlich dem für andere Steroidhormone, würde dieser Einfluss auf die Genregulation haben. Etwa 10 Jahre später wurde der

Rezeptor isoliert^{12 13} und durch die Entschlüsselung der Protein- und cDNA Sequenz¹⁴ die Zugehörigkeit zur Steroidhormon-Rezeptor-Superfamilie¹⁵ belegt. Entsprechend handelt es sich um ein 427 Aminosäuren großes Molekül, welches neben der Hormon- und DNA-bindenden Domäne, Transaktivierungs-, Phosphorylierungs- und Dimerisationsdomänen besitzt¹⁶. In seiner Funktion ist es ein Liganden abhängiger Transkriptionsfaktor, welcher in bestimmten Konstellationen auch hemmende Wirkung haben kann¹⁷.

Da die Expression des nukleären 1,25(OH)₂D₃-Rezeptors (VDR_{nuc}) in unerwartet vielen Geweben nachgewiesen werden konnte¹⁸, wurden für das Hormon 1,25(OH)₂D₃ Funktionen vermutet, die weit über die Regulation der Kalzium- und Phosphat-Plasmaspiegel hinausgehen. In der Tat sind mittlerweile das Immunsystem, das zentrale Nervensystem, zahlreiche Epithelien, das endokrine System, Muskeln und Fettzellen als neoklassische Ziele des Hormons beschrieben worden. Auf zellulärer Ebene konnten Auswirkungen auf die Genexpression, Proliferation und Differenzierung beobachtet werden¹⁶.

Neben den zu erwartenden, über die Genexpression regulierten Wirkungen, gibt es unter Stimulation mit 1,25(OH)₂D₃ auch schnell einsetzende Effekte. Da die Zeitspanne in der sie auftreten für die Transkription und Translation eines Gens nicht ausreicht, nimmt man an, dass sie über einen nicht nukleären Rezeptor vermittelt werden. Zu beobachteten waren unter anderem Effekte wie ein Anstieg der intrazellulären Ca⁺ Ionen Konzentration^{19 20 21 22} und der Protein-Kinase C Aktivität²³. Beide Vorgänge sind als Teile intrazellulärer Signaltransduktionskaskaden bekannt, die charakteristischer Weise bei der Aktivierung membranständiger Rezeptoren vorkommen. Bei weiteren Untersuchungen konnten die schon bekannten schnellen Effekte auch an einem Mausmodell mit funktionell inaktiviertem VDR_{nuc}-Gen, also an Mäusen ohne den nukleären Rezeptor für 1,25(OH)₂D₃, nachgewiesen werden²⁴. Bindungsanalysen und die Isolierung eines membranständigen Proteins mit Rezeptoreigenschaften²⁵ belegen die Existenz eines membranständigen Rezeptors für 1,25(OH)₂D₃ weiter, obgleich die genaue Gensequenz und Struktur noch nicht dargestellt werden konnten.

1.3 Der Vitamin D-Metabolismus

Das über die Nahrung zugeführte oder in der Haut gebildete Prävitamin D zirkuliert gebunden an ein spezielles Protein der α -Globulin Fraktion im Blut. Der erste Schritt auf dem Weg zum aktiven Hormon ist die Hydroxylierung an der Position 25, welche in der Leber durch die 25-Hydroxylase katalysiert wird¹⁰. Die Aktivierung zum hochpotenten $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ findet klassischerweise in der Niere statt und wird durch die 1-Hydroxylase katalysiert. Dieser Schritt ist geschwindigkeitsbestimmend. Über die Expression der 1-Hydroxylase wird der Umsatz dieser Katalyse und damit auch die Konzentration von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ kontrolliert. Durch Parathormon wird die 1-Hydroxylase Aktivität gesteigert²⁶ und durch $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, das Produkt der Katalyse, im Sinne einer negativen Rückkopplung reduziert^{27 28}. Neben der Niere als klassischer Ort der $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Synthese, wird 1-Hydroxylase in allen Zielgeweben von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ exprimiert, welches dort zu lokal erhöhten $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Spiegeln führt und damit auch auto-para- und intrakrine Wirkungen des Hormons ermöglicht¹⁶.

Weiteren Einfluss auf $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Spiegel nimmt das Enzym 24-Hydroxylase, dessen Produktion durch $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ angeregt wird. Die 24-Hydroxylase katalysiert zwei Reaktionen die sich negativ auf die $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Spiegel auswirken. Aus $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ wird durch die Hydroxylierung der Position 24 $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ produziert, welches dann in folgenden Reaktionen abgebaut wird. Des weiteren wird durch die Produktion von 24,25-Dihydroxy-VitaminD₃ ($24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) aus dem Prähormon $25(\text{OH})\text{D}_3$, der 1-Hydroxylase das Substrat zur Herstellung des aktiven $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ entzogen^{29 16}. Die Bedeutung der 24-Hydroxylase im Vitamin D Stoffwechsel konnte im Mausmodell mit funktioneller Inaktivierung des 24-Hydroxylasegens weiter belegt werden. Hier konnte eine verschlechterte Clearance für im Bolus verabreichtes $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ gezeigt werden³⁰.

1.4 Das Enzym 24-Hydroxylase

Die 24-Hydroxylase (CYP24) ist schon lange als Faktor im Stoffwechsel von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ bekannt. Die Frage ob das Enzym nur der Kontrolle der $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Spiegel dient oder Funktionen hat, die weit darüber hinausgehen, wurde aber seither diskutiert. Heute werden dem Enzym neben den katabolischen Fähigkeiten auch

biosynthetische zugeschrieben, da sein Hauptprodukt das $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ im Knochenstoffwechsel als Botenstoff zu fungieren scheint³⁰ (siehe 1.5).

Die CYP24 gehört zur Familie der NADPH abhängigen Cytochrom-P450-Hydroxylasen³⁰, die an der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert sind. Ähnlich wie die 1-Hydroxylase ist das Enzym nicht, wie ursprünglich angenommen, nur in den Zellen des distalen Nephrons der Niere sondern auch in allen anderen Zielgeweben von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ nachzuweisen^{31 32 33 34 35 36}. Dieses ermöglicht lokale Konzentrationen des Hormons $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, die von den Plasmaspiegeln abweichen, und lässt, wie zum Beispiel in der Epiphysenfuge von Knochen, (siehe 1.5) auf auto- intra- und parakrine Wirkungen schließen.

Die relative Affinität von CYP24 für $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ist um ein 10-faches höher als die für $25(\text{OH})\text{D}_3$ ³⁰. Da $25(\text{OH})\text{D}_3$ aber in weitaus höheren Konzentrationen als $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ vorliegt, reicht der Umsatz aus, um $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Konzentrationen zu erzeugen, die bei einem 1000-fachen derjenigen von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ liegen. Des weiteren scheint die Umsatzrate des Substrats $25(\text{OH})\text{D}_3$ höher als die von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ zu sein³⁷.

Die Produktion von CYP24 wird hauptsächlich durch die $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Spiegel reguliert. Bei steigenden $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Konzentrationen wird über den VDR_{nuc} (siehe 1.2) die Transkription des CYP24-Gens induziert²⁶. Interessanterweise besitzt der Promotor des CYP24-Gens zwei Vitamin D-responsive Elemente, mit denen der Hormon-Rezeptorkomplex interagieren kann¹⁶. Da er der potenteste $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -regulierte Promotor ist, wurden CYP24-Spiegel in Studien als Indikator für das Ausmaß der Aktivierung des VDR_{nuc} herangezogen³⁸. Des weiteren wird die Expression von CYP24 über Parathormon reguliert, wobei diese scheinbar über Änderungen der mRNA-Halbwertszeit beeinflusst wird³⁹. Die Auswirkungen scheinen sich aber in Abhängigkeit vom jeweiligen Gewebe zu unterscheiden³¹.

1.5 $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$

1972 wurde von Holick et al. $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ erstmals in Nierengewebe nachgewiesen⁴⁰. Es herrschte nun einige Jahre die Meinung vor, es sei ein biologisch inaktiver Metabolit, der bei der Kontrolle der $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Spiegel anfällt. 6 Jahre später aber konnte H. L. Henry zeigen, dass die Entwicklung und das Schlüpfen von Hühnerküken in Abwesenheit von $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ beeinträchtigt

ist⁴¹. In den nächsten Jahrzehnten folgten Arbeiten die auf eine Rolle von $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ bei der enchondralen Ossifikation hinwiesen^{42 43}, und seine biologische Aktivität damit weiter untermauerten. Bei Experimenten am Mausmodell mit funktionell inaktiviertem 24-Hydroxylasegen, blieb die Entwicklung des Unterkiefers, der durch enchondrale Ossifikation aus dem Meckel-Knorpel entsteht, aus und an den langen Röhrenknochen waren Mineralisierungsstörungen mit Anhäufungen von unverkalktem Osteoid zu beobachten. Zusätzlich waren Anzeichen einer Vitamin D_3 -Intoxikation, wie Verkalkungen der Nieren zu beobachten^{44 45}. Seo zeigte bei erneuten Untersuchungen mit Küken 3 bis 7 Tage nach einer Tibiafraktur einen dreifachen Anstieg der renalen CYP24-Aktivität und einen mehr als dreieinhalbfachen Anstieg des $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Plasmaspiegels^{46 47}. Bei einer Studie mit ovariectomierten Ratten konnte unter Behandlung mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ein Zuwachs des Mineralgehalts des Knochens gezeigt werden, ohne dass die mechanische Belastbarkeit wesentlich zunahm. Die Behandlung mit $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ aber zeigte eine Zunahme der mechanischen Belastbarkeit bei nur geringem Anstieg des Mineralgehalts des Knochens⁴⁸. In aktuelleren Veröffentlichungen wurde insbesondere bei der Behandlung mit einer Kombination von $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ eine Verbesserung der mechanischen Eigenschaften der Knochen beschrieben⁴⁹.

1.5.1 Einfluss von $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ auf die Differenzierung von Knorpelzellen

Die Epiphysenfuge der Röhrenknochen ermöglicht bei Säugetieren postfetales Längenwachstum des Skelettsystems. Die Epiphysenfuge besteht aus charakteristisch geschichteten Chondrozyten. Durch die mechanische Belastung der Epiphysenfugen ordnen sich die Knorpelzellen säulenförmig an. Es können Ruhezone (RZ) und Wachstumszone (WZ) lichtmikroskopisch unterschieden werden. Der phänotypische Wandel der Zellen findet linear entlang dieser Zellsäulen statt. Aufgrund dieser Tatsache lassen sich die Zellen auf dem Weg entlang dieses enchondralen Differenzierungspfades in ihren Eigenschaften vorzüglich untersuchen.

In der RZ sind phänotypisch reine Chondrozyten vorzufinden. Unter Einfluss von diversen Faktoren (u.a. IGF 1 und 2 sowie BMP 2,4 und 7) beginnen die Chondrozyten zu proliferieren⁵⁰, und bald darauf zu hypertrophieren. Phänotypisch wandeln sie sich zu Chondrozyten der WZ um. Die WZ ist charakterisiert durch ein

Zunehmen der Zahl von Matrixvesikeln⁵¹, die einerseits knorpeltypische Proteoglykane auflösen⁵² und andererseits erste Calcium-Phosphat-Ablagerungen bilden⁵³.

Um die Faktoren, die die Differenzierung der Chondrozyten in der Epiphysenfuge auslösen und steuern weiter zu verstehen, untersuchten Boyan et al. die Wirkung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ auf Knorpelzelllinien aus der WZ⁵⁴ von Rattenrippenknorpel. Eine Chondrozytenzelllinie aus der RZ von Rattenrippenknorpel und $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sollten lediglich als Negativkontrolle dienen. Die WZ-Zellen reagierten auf die Stimulation mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, wie erwartet mit einem Anstieg der alkalischen Phosphatase und Hydroxylapatit-Ablagerungen. Überraschenderweise zeigte sich aber in der Kontrollkultur mit RZ-Zellen eine eindeutige Reaktion auf $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Bei 24-stündiger Inkubation der RZ-Zellen mit $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ nahm die Proliferationsrate ab, die Zellen produzierten mehr nicht-kollagenes Protein in der extrazellulären Matrix, die Alkalische Phosphataseaktivität in den Matrixvesikeln nahm zu, und die Phospholipase-A2-Aktivität war reduziert. Bei Inkubationszeiten von >36 Stunden war ein mit Hypertrophie verbundener phänotypischer Wandel hin zur WZ-Zelle zu beobachten. Die vorher durch die RZ-Zelle aufrechterhaltene Knorpelmatrix, wurde dann durch die entstehenden WZ-Zellen und ihre Matrixvesikel umgebaut und zunehmend kalzifiziert. Der beschriebene Wechsel ging mit einer Sensibilisierung der Zellen für $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ einher, während die Fähigkeit auf Stimulation mit $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ zu reagieren abnahm⁵⁵. Diese spezifischen Reaktionen auf die beiden Vitamin D-Metabolite konnten am Rattenmodell auch *in vivo* nachvollzogen werden⁵⁶. Weitere Untersuchungen mit Knorpelzellen der WZ von Mäuserippen konnten diese Ergebnisse bestätigen²⁴.

Zusammenfassend hat somit der jeweilige Vitamin D-Metabolit seine eigene Zielzelle, an der eine jeweils eigenständige Reaktion ausgelöst wird. $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ scheint einen entscheidenden Einfluss auf die Differenzierung von Knorpelzellen in der Epiphysenfuge zu haben und damit für den Umbau von Knorpel zu Knochen von großer Bedeutung zu sein.

1.5.2 Einfluss von $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ auf Matrixvesikel

Sowohl RZ- als auch WZ-Zellen produzieren Matrixvesikel (MV). Hierbei handelt es sich um extrazelluläre Organellen, über welche die Zellen Einfluss auf die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix nehmen. Die MV der jeweiligen

Zellen unterscheiden sich in ihren Funktionen und der dafür notwendigen Enzymausstattung. RZ-MV produzieren und unterhalten die Knorpelmatrix, während die WZ-MV zur Mineralisierung ihres Umfelds beitragen^{49 50 57}.

Die registrierten Schwankungen der Alkalischen Phosphatase-Aktivität in den Zellkulturen, schienen hauptsächlich von den MV auszugehen. Daher stellte sich die Frage, ob die MV unabhängig von der Zelle auf Stimulation mit $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ reagieren können. In der Tat zeigten Kulturen mit isolierten MV, bezüglich der Alkalischen Phosphatase-Aktivität die selben Reaktionen auf $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ wie Kulturen mit Zellen und ihren MV⁵². Da MV ohne DNA oder RNA keinerlei Möglichkeiten zur selbstständigen Enzymproduktion haben, muss der Reaktionsmechanismus ein transkriptionsunabhängiger sein, für den die enzymatischen Voraussetzungen der MV von der jeweiligen Ausgangszelle stammen. Die Fähigkeit auf externe Stimuli, wie $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, zu reagieren ist daher wahrscheinlich mit einem membranständigen, Kern-unabhängigem Rezeptor für das Hormon assoziiert. $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ scheint somit auch die Funktion von MV in der RZ zu regulieren.

1.5.3 Intrazelluläre Reaktionen auf $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$

Immer mehr Untersuchungsergebnisse deuten auf die Existenz eines membranständigen Rezeptors für $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ($\text{VDR}_{\text{mem}24,25}$) hin, dessen Stimulation charakteristische Zielzell-spezifische Reaktionen hervorruft. Die Verteilung des $\text{VDR}_{\text{mem}24,25}$ scheint sich auf weniger Gewebe zu beschränken als die Verteilung der Rezeptoren für $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Knorpelzellen, Knochenzellen und möglicherweise auch Parathormon sezernierende Zellen scheinen diesen Rezeptor zu exprimieren. Isoliert und sequenziert konnte der Rezeptor trotz wiederholter Versuche noch nicht werden⁵⁸.

Bei der Stimulation von RZ-Zellen mit $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ zeigte sich ein Dosis und Zeit abhängiger Anstieg der Protein-Kinase C (PKC)^{52 59}, der bei WZ-Zellen nicht zu beobachten war. Selbst in isolierten Plasmamembranen von RZ-Zellen konnte ein Anstieg der PKC nachgewiesen werden. Darüber hinaus waren diese Reaktionen durch das Stereoisomer $24(\text{S})25(\text{OH})_2\text{D}_3$ nicht auszulösen,⁶⁰ welches für derartige Rezeptoren typisch ist. In weiteren Versuchen konnte unter Einfluss von $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ neben einer Veränderung der Membranfluidität, eine Reduktion der Arachidonsäurefreisetzung durch Hemmung der Phospholipase A_2 gezeigt werden. In Folge sanken die Spiegel der aus Arachidonsäure produzierten Prostaglandine,

welches eine Enthemmung der PKC zur Folge hatte⁶¹. Zusätzlich wurde die PKC durch Phospholipase D-abhängige Diacylglycerol-Produktion angeregt. Diese Signaltransduktionspfade via PKC liefen bei der MAP-Kinase zusammen. Die MAP-Kinase induzierte dann durch Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren die Genexpression⁶². Dieses Muster der Aktivierung konnte bei WZ-Zellen nicht nachgewiesen werden, welches die Eigenständigkeit und Spezifität der Reaktionen von RZ-Zellen auf $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ unterstreicht.

Der Einstrom von Kalziumionen in die RZ-Zellen wurde durch $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ebenfalls Zeit- und Dosis-abhängig reguliert⁶³. Initial nahm der Einstrom zu, wobei nach 15 min eine Reduktion zu beobachten war. Diese Reaktion konnte bei WZ-Zellen weder durch $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, noch durch $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ausgelöst werden⁵².

1.6 Osteoporose

Osteoporose ist eine systemische Skeletterkrankung, die durch eine reduzierte Knochenmasse und eine Veränderung der knöchernen Mikroarchitektur gekennzeichnet ist und konsekutiv zu einer Schwächung und damit einer verminderten Bruchfestigkeit des Knochens führt. Betroffen sind überwiegend postmenopausale Frauen und ältere Menschen. Die Folge dieser Erkrankung und leider auch oft das erstes wahrgenommene Symptom ist die Fragilitätsfraktur, sprich eine Fraktur ohne adäquates Trauma. Heute ist Osteoporose die volkswirtschaftlich relevanteste Knochenstoffwechselkrankheit in den industrialisierten Staaten der westlichen Welt. Die Kosten für Therapie von Osteoporose werden in der Bundesrepublik Deutschland auf jährlich über 5 Milliarden Euro geschätzt. Ein Großteil hiervon soll auf die Versorgung osteoporotisch bedingten Frakturen entfallen. Angesichts der sich immer weiter wandelnden Altersstruktur der Bevölkerung wird die Bedeutung einer wirksamen Therapie oder Prophylaxe zunehmend größer. Goldstandard in der Diagnostik der Osteoporose ist heute die duale Röntgen Absorbtiometrie (DXA), die meist im Bereich der Lendenwirbelsäule oder des proximalen Femurs durchgeführt wird. Anhand dieser Methode kann der Kalzium-Hydroxylapatit-Gehalt des Knochens Quantifiziert werden. Die Messwerte werden mit der durchschnittlichen Knochendichte einer 30-jährigen Frau (T-Wert) oder eines altersgleichen Kollektivs (Z-Wert) verglichen. Ab einem T-Wert von -1 liegt laut WHO Definition eine Osteopenie und ab -2,5 eine Osteoporose vor. Wird bei Messungen der

Knochendichte eine Abnahme der Knochensubstanz festgestellt, wird in der Regel versucht den Verlust an Knochensubstanz aufzuhalten oder umzukehren. Dies wird einerseits über Änderungen in der Ernährung und den Bewegungsgewohnheiten und andererseits über eine Pharmakotherapie versucht. Als Basistherapie wird die Gabe von Kalzium und Vitamin D bezeichnet, ergänzt wird sie durch die sogenannte spezifische Pharmakotherapie, meist antiresorptiv-wirkende Substanzen (Bisphosphonate) oder selektive Östrogen Rezeptor Modulatoren. Eine Prophylaxe im eigentlichen Sinn ist zu diesem Zeitpunkt nicht mehr möglich, da der Abbau der Knochensubstanz zum Zeitpunkt der Diagnose schon fortgeschritten ist. Eine Frakturprophylaxe ist aber möglich und sollte durchgeführt werden. Im Idealfall sollte es also möglich sein, die Veranlagung zur Osteoporose festzustellen, bevor die Erkrankung mit den heute gängigen Mitteln diagnostiziert werden kann. So wäre es vielleicht möglich, durch frühzeitiges Eingreifen das Fortschreiten und Symptomatisch werden der Krankheit zu verzögern oder sogar zu verhindern.

1.6.1 Genetik der Osteoporose

Ziel der aktuellen Forschung ist die Ursachen der Erkrankung auf genetischer Ebene aufzudecken. Die Forschungsergebnisse der Vergangenheit zeigen, dass die Pathogenese von Osteoporose sehr komplex, und das Auftreten von osteoporotischen Frakturen multifaktoriell bedingt ist. Ein einziges Osteoporose auslösendes Gen gibt es leider nicht. Die Interaktion und Addition von zahlreichen genetischen, hormonellen, physikalischen und nutritiv-alimentären Faktoren scheinen die Ausprägung und den Verlauf der Krankheit zu bestimmen. In Abhängigkeit verschiedener Konstellation dieser Faktoren variiert auch das Risiko für den Verlust an Knochensubstanz und damit das einer pathologischen Fraktur. Daher beschäftigt sich ein Großteil der aktuellen Osteoporoseforschung damit, diese sogenannten Kandidatengene, die Einfluss auf die Erkrankung haben, zu identifizieren und ihre Rolle im Komplex der Pathogenese zu verstehen. Wären diese Gene, ihre Wirkungen und Interaktionen bekannt, bestünde die Möglichkeit über die Identifizierung von Single-Nucleotid-Polymorphisms die mit den betroffenen Genen assoziiert sind individuelle Risikoprofile zu erarbeiten, welche leicht zugänglich gemacht werden könnten. Dies würde neben der Früherkennung auch eine effektivere pharmakotherapeutische Behandlung ermöglichen^{64 65}.

Da das Enzym CYP24 neben der Produktion des im Knochenstoffwechsel agierenden Botenstoffs 24,25(OH)₂D₃ auch in die Regulation der Vitamin D₃ und

damit der Ca^{2+} und HPO_4^- Plasmaspiegel eingebunden ist, könnte es bei nachweisbaren polymorphismusabhängigen Veränderungen seiner Aktivität als Kandidatengen in der Pathogenese von Osteoporose in Frage kommen.

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Eine Abweichung in der Gensequenz, die bei mehr als einem Prozent der Bevölkerung nachweisbar ist, wird als Polymorphismus bezeichnet. Unterschieden wird zwischen anonymen und funktionellen Polymorphismen. Funktionelle Polymorphismen haben in Abhängigkeit von ihrer Lage unterschiedliche Auswirkungen. Liegt die Abweichung der Sequenz in dem für das Protein kodierenden Abschnitt des Gens, ist das Proteinprodukt in seiner Form oder Funktion verändert. Liegt der polymorphe Bereich im Promotor des Gens, der die Transkriptionsrate kontrolliert, kann dies zu einer Über- oder Unterexpression des Produkts führen.

Da im Promotor des 24-Hydroxylasegens, 488 bp upstream des Transkriptionsstarts, eine potentiell instabile Region auffiel, untersuchte unsere Arbeitsgruppe diesen Abschnitt anhand von Fragmentanalysen hinsichtlich möglicher Polymorphismen. Im Rahmen der Versuche zeigten sich mit unterschiedlicher Wahrscheinlichkeit mehrere verschiedene Muster (unveröffentlichte Daten). In den darauf hin durchgeführten Sequenzreaktionen ließen sich tatsächlich Abweichungen der Sequenz in der verdächtigen Region des Promotors des CYP24-Gens nachweisen.

In dieser Arbeit sollte nun überprüft werden, ob es sich bei dem beschriebenen Polymorphismus im Promotor des CYP24-Gens, um einen funktionellen Polymorphismus handelt, das heißt ob er eine Auswirkung auf die Transkriptionsrate und damit möglicherweise auf die Expression des Enzyms CYP24 hat. Zu diesem Zweck wurden die verschiedenen Allele des Promotorpolymorphismus in den pGL3-Basic Luziferase-Vektor kloniert. Dies ist ein etabliertes System, mit dem im Luminometer durch Bestimmung der Luziferaseaktivität, die Aktivität eines Promotors quantifiziert werden kann. Neben der basalen Aktivität der verschiedenen Allele, wurde auch die Funktion unter Stimulation mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ überprüft.

Falls der Polymorphismus im Promotor des CYP24-Gens tatsächlich Einfluss auf die Transkriptionsrate und damit möglicherweise auch auf Expression des Enzyms

CYP24 hat, soll im Anschluss diskutiert werden, ob angesichts der zunehmenden Hinweise auf eine Relevanz des Enzyms in der Knochenentwicklung und in der Regulation des Knochenstoffwechsels, dieser Polymorphismus eine Rolle in der Pathogenese von Knochenstoffwechselkrankheiten spielen könnte.

2 Material und Methoden

2.1 PCR

2x 5pM Primer (in je 1µl)

1µl dNTP-Mix

0,5µl Amersham Taq DNA-Polymerase

3µl PCR-Puffer (mit Amersham Taq geliefert)

Der PCR Ansatz wurde mit 22.5µl HPLC Wasser auf 29µl aufgefüllt.

Nach Herstellung eines Mastermix mit den oben genannten Reagenzien wurden jedem Ansatz 100ng genomische DNA (in 1µl) als Template hinzugefügt.

40 PCR Zyklen wurden unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Initial 94°C für 4 min,

94°C für 30 sec

53-60°C für 1 min 15 sec (je nach Primer)

72°C für 1 min 30 sec

Zur Durchführung diente ein PTC-200 Multi Cyclor von Biozym

2.2 Agarosegelelektrophorese

Die PCR-Produkte wurden auf ein 1,5% Agarose Gel mit 0,5µg Ethidiumbromid pro 100 ml in 1xTBE-Puffer (10,8g/l Tris-Puffer, 5,5g/l Borsäure, 20mM EDTA) aufgetragen und bei 100V und 30 min Laufzeit elektrophoretisch getrennt.

Die Proben wurden mit DNA-Probenpuffer (1xTBE, 60% Glycerol, 0,4%Bromphenylblau, 0,4%Xylen-Cyanol) im Verhältnis 5:1 gemischt.

Zum Größenvergleich diente ein DNA-Standard bis 1kbp in 100bp Schritten.

2.3 Gelextraktion der PCR-Produkte

Die DNA-Banden der gesuchten Größe wurden ausgeschnitten und mit dem Invitrogen BRL Rapid Gel Extraction Set, nach Anleitung des Herstellers, aus dem Gel isoliert.

Das Eluat wurde in 100µl TE-Puffer gelöst und eine Ethanol-fällung durchgeführt. Dazu wurde die 2,5-fache Menge 100% Ethanol zugegeben und 10 min auf Eis inkubiert. Daraufhin wurde die Lösung 10 min bei 12 000 U/min zentrifugiert. Der

Überstand wurde abgenommen, und das Pellet in einer Speed-Vac Zentrifuge getrocknet. Anschließend wurde das Pellet in 20µl Aqua bidest resuspendiert.

2.4 Restriktion von DNA

1µl Restriktionsenzym

1,5µl des mitgelieferten Puffers

2,5µl Aqua bidest

Nach Herstellung eines Mastermix wurden 10µl des zu untersuchenden PCR-Produkts je Restriktionsansatz hinzugefügt.

Anschließend Kontrolle durch Agarosegelelektrophorese (siehe 2.2).

2.5 Klonierung der PCR-Produkte

2.5.1 Dephosphorylierung des restringierten pGL3-Basic Vektors

20µl restringierter Vektor, pGL3-Basic (Promega)

2µl Alkalische Phosphatase (Boehringer Ingelheim)

10µl Alkalische Phosphatase Puffer

68µl Aqua bidest

Dieser Ansatz wurde 15 min bei 37°C, 15 min bei 56°C und 20 min bei 65°C inkubiert. Nach Zugabe weiterer 2µl Alkalischen Phosphatase wurde der Inkubationszyklus erneut durchgeführt.

2.5.2 Ligation

2.5.2.1 TOPO Blueprint pCr 2.1 Vektor

1µl TOPO pCr 2.1

5µl des zu klonierenden PCR-Produkts

nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur 2µl Stop-Solution

2.5.2.2 pGL3-Basic Vektor

100ng pGL3-Basic Vektor, Hind III restringiert und dephosphoryliert

50ng Promotor DNA, Hind III restringiert und dephosphoryliert

1µl T4-DNA Ligase (1U/µl, Boehringer Ingelheim)

1µl des mitgelieferten 10xPuffers

8µl Aqua bidest

Der Ansatz wurde bei 4°C über Nacht inkubiert.

2.5.3 Transformation

Die kompetenten TOPO E-Coli Bakterien (One Shot, Invitrogen) wurden auf Eis aufgetaut.

5µl Ligationsansatz wurde zu den E-Coli Bakterien pipettiert.

30 min Inkubation auf Eis

30 sec Hitzeschock bei 42°C

Zugabe von 250µl SOC-Medium (Raumtemperatur)

Anschließend wurde der Ansatz bei 37°C für 60 min bei leichtem Schütteln inkubiert.

2.5.4 Selektion

2.5.4.1 TOPO Blueprint pCr 2.1 Vektor

LB-Amp Agarplatten (5g/l Bacto-Hefe-Extrakt, 10g/l NaCl, 10g/l Bactotryptone, 15g/l Bacto-Agar, pH 7, 50µg/ml Ampicillin) wurden mit 40µl X-Gal (40ng/ml in Dimethylformamid) präpariert.

200µl des Transformationsansatzes wurden ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert.

Aufgrund der X-Gal Farbreaktion des TOPO Blueprint Klonierungssystems sind die Bakterienkolonien in Abhängigkeit von der Anwesenheit des Inserts entweder blau oder weiß. Durch die Anwesenheit des Inserts im Vektor wird in den Zellen ein Enzym exprimiert welches den blauen Farbstoff spaltet. Eine weiße Kolonie geht also entsprechend von einem Bakterium aus, welches das Promotor-Vektorkonstrukt trägt. 3-10 der weißen Kolonien wurden zur weiteren Kultivierung ausgewählt.

2.5.4.2 pGL3-Basic Vektor

200µl des Transformationsansatzes wurden auf den oben beschriebenen LB-Amp Agarplatten ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert. 3-10 gut gewachsene einzeln liegende Kolonien wurden zur weiteren Kultivierung ausgewählt.

2.6 Fragmentanalyse

PCR:

2,5µl Template

2x 5pM Primer, einer Fluoreszenz-markiert

1µl dNTP-Mix

0,5µl Amersham Taq DNA-Polymerase

3µl PCR-Puffer (mit Amersham Taq geliefert)

Der PCR Ansatz wurde mit 21µl HPLC Wasser auf 30µl aufgefüllt.

20-30 PCR Zyklen wurden unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Initial 94°C für 3 min,

94°C für 30 sec

61°C für 30 sec

72°C für 30 sec

Der Erfolg der PCR wurde durch eine Gelelektrophorese überprüft.

Das PCR-Produkt wurde 1:10 verdünnt. Zur Analyse im Abi Prism 310 Kapillarsequenzier wurde 1µl des verdünnten PCR-Produkts mit 12µl TSR und 0,3µl TAMRA 500 Standard gemischt. Die Auswertung erfolgte durch die "Genescan Software".

2.7 DNA-Sequenzierung

Um DNA-Stränge zu sequenzieren wird nur ein Primer und ein dNTP-Mix, der zusätzlich Fluoreszenz-markierte Didesoxynukleotide enthält eingesetzt.

Die PCR wurde wie folgt angesetzt:

250ng Plasmid DNA

1µl Primer

8µl Big Dye Terminator Enzym-Mix (Applied Biosystems)

10µl Aqua bidest

25- 40 PCR Zyklen wurden unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

94°C für 4 min, Initial

94°C für 30 sec

54°C für 1 min

72°C für 20 sec

Die Produkte der PCR wurden mit Auto-Seq G 50-Säulen gereinigt und anschließend mit 60 µl Aqua bidest, 8,1µl NaAcetat (pH 4,3) und 220µl 100% Ethanol 10 min auf Eis inkubiert. Dann wurden die Lösung 10 min bei 12 000 U/min zentrifugiert, der Überstand verworfen, und das entstandene Pellet mit 70% Ethanol gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren und Dekantieren wurde das Pellet in der Speed-Vac Zentrifuge getrocknet.

Das Pellet wurde in 25µl TSR aufgenommen und nach der Big Dye Terminator-Methode im Kapillarsequenzier analysiert. Das Ergebnis wurde mittels der "Sequence Analysis Software" ausgewertet.

2.8 Plasmid-Präparation

Die ausgewählten Klone wurden in 3ml LB-Amp Medium über Nacht inkubiert und mit dem Ultra Clean mini Plasmid Kit von Mo-Bio Systems nach Angaben des Herstellers präpariert.

Um große DNA Mengen herzustellen wurde 1ml einer 3ml Übernachtskultur in 300ml LB-Medium im Schüttler bei 37°C über Nacht kultiviert. Die Präparation erfolgte mittels einem Quiagen Midi Plasmid Präparation Kit nach Angaben des Herstellers.

Zur weiteren Reinigung der DNA wurde eine Ethanol-fällung durchgeführt. Die 2,5fache Menge an absolutem Ethanol wurde dazugegeben. Nach 10 min auf Eis wurde die Lösung bei 12000U/min 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, das Pellet in 70% Ethanol gewaschen und erneut unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Nach dem Dekantieren folgte das Trocknen des Pellets in der Speed-Vac Zentrifuge. Das Pellet wurde in 100µl TE-Puffer (10nM TrisCl, pH 8,0) 1mM EDTA (pH 8,0) aufgenommen, und die DNA Konzentration biophotometrisch bestimmt. Anschließend wurde die Konzentration der DNA-Proben auf 250µg/ml normiert.

2.9 Zellkultur

2.9.1 hFOB 1.19

Diese immortalisierte humane, fetale Osteoblastenzelllinie wurde von Dr. T. C. Spelsberg (Mayo Clinic Rochester, Mn, USA) zur Verfügung gestellt.

Kultiviert wurde bei 34°C und 5% CO₂.

Als Medium diente DMEM/F12 (Invitrogen) mit 10% fetalem Kälberserum (FCS, Invitrogen), 10000U/I Penicillin und 10mg Streptomycin. Ein Mediumwechsel wurde jeden dritten Tag durchgeführt.

2.9.2 T/C 28a2

Diese humane Chondrozytenzelllinie wurde von Dr. V.M. Goldring (Harvard Institute of Medicine, Boston, MA, USA) zur Verfügung gestellt.

Kultiviert wurde bei 37°C und 5% CO₂.

Das oben beschriebene Medium wurde im gleichen Intervall gewechselt.

2.10 Luziferase Assay

Das Verfahren des Luziferase Assays beruht auf der Luminometrie. Vom im pGL3-Basic Reporter-Vektor enthaltenen Luziferase-Gen ausgehend, wird in Abhängigkeit von der Aktivität des eingefügten Promotors, das lumineszierende Leuchtkäferenzym Luziferase exprimiert. Über die Intensität der Lumineszenz lässt sich die Aktivität des zu untersuchenden Promotors bewerten.

2.10.1 Transfektion

Zur Transfektion der DNA-Konstrukte in die beiden Zelltypen, hFOB und T/C28, diente die Elektroporation. Bei dieser Methode wird die Zellmembran der zu transfizierenden Zelle durch eine pulsierende, elektrische Spannung kurz durchlässig gemacht, woraufhin die Plasmide durch Diffusion in die Zelle gelangen können. Die transfizierten Zellen wurden anschließend inkubiert, wie unter Zellkultur (siehe 2.9) beschrieben.

Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen mit kaltem PBS-Puffer gespült und durch Inkubation mit 3ml Trypsin für 5 min bei 37°C von der Kulturflasche abgelöst. Anschließend wurden 10 ml serumhaltiges Medium zugegeben, und die Zellsuspension bei 1200U/min und Raumtemperatur für 5 min zentrifugiert (Laborfuge 400R, Heraeus). Der Überstand wurde abpipettiert, und die Zellen in 11ml serumfreiem Medium resuspendiert. Mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer wurde die Zellzahl pro ml Zellsuspension bestimmt und dann auf $1 \times 10^6 / 400 \mu\text{l}$ normiert.

In Polystyrolröhrchen wurden 10µg des zu transfizierenden DNA Plasmids mit 1×10^6 Zellen in 400µl serumfreiem Medium vermischt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Elektroporation der Zellen fand in sterilen Küvetten mit integrierten Elektroden (Spaltbreite 2mm, Bio Rad) bei 0,12kV und 0,975µF statt (Gene Pulser II, Bio Rad).

Der Ansatz wurde auf drei Wells einer sterilen 12 Well Platte verteilt und mit 1ml serumhaltigem Pen/Strep-Medium über Nacht kultiviert. Nach 24 Stunden folgte ein Mediumwechsel, wobei je nach Versuchsanordnung teilweise mit 10nM Vitamin D3 stimuliert wurde.

2.10.2 Lyse der Zellen

Nach insgesamt 48 Stunden Inkubationszeit wurden die Zellen 2 x mit kaltem PBS gespült, mit 200µl RLP-Lösung (Reaction Lysis Buffer, Promega) lysiert und anschließend mit einem Zellschaber vom Wellboden gelöst. Die Suspension wurde in einem Eppendorf Cap bei 4 °C mit 12000U/min für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und für die folgenden Messungen verwendet.

2.10.3 Proteinbestimmung nach Bradford

10µl Zelllysats wurden mit 400µl Bradford-Reagenz (Bio Rad) gemischt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Messung erfolgte im Photometer (Eppendorff) nach Angaben des Herstellers.

2.10.4 Bestimmung der Luziferaseaktivität

20µl des jeweiligen Zelllysats wurden auf eine Lochplatte pipettiert und im Luminometer (Micro Lumat LB 96P, EG&G Berthold), unter automatischem Einsatz von Luziferasereagenz, (Luciferin, Mg^{+2} , ATP) untersucht. Anhand der Lichtemission wird die Luziferaseaktivität, ausgedrückt in Fluorescence-Units (FU), bestimmt. Durch die vorhergegangene Bestimmung der Proteinkonzentration ist es möglich die Luziferaseaktivität in FU/µg Protein auszudrücken.

2.11 Statistische Testverfahren

Die Auswertung der Daten erfolgte mit den Programmen Excel und SPSS 13 für Windows. Um die statistische Signifikanz der gemessenen Unterschiede in Luziferaseaktivität in Abhängigkeit von den verschiedenen Plasmiden zu beweisen, wurde der Kruskal-Wallis Test durchgeführt.

Zur Verwerfung der Nullhypothese wurde das allgemein übliche Signifikanzniveau von $p=0.05$ gewählt.

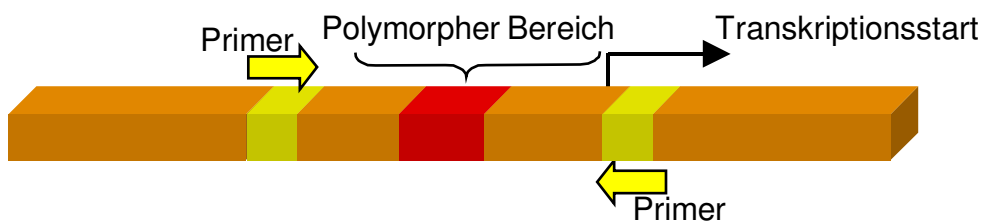
3 Ergebnisse

3.1 Amplifikation der zu untersuchenden Allele des Polymorphismus im Promotor des CYP24-Gens

3.1.1 Der CYP24-Promotor und die Wahl der Primer

In der von Chen und DeLuca 1996 veröffentlichten Sequenz (siehe Abb. 1) des Gens und Promotors der humanen 1α -25-Dihydroxyvitamin D₃ 24-Hydroxylase (CYP24) fällt im Promotor ein Bereich mit poly-A-Strecken auf. Da ein derartiger Sequenzbereich innerhalb einer Population häufig variabel ist, wurde dieser Abschnitt des Promotors in unserer Arbeitsgruppe auf potentielle Sequenzpolymorphismen hin untersucht. Tatsächlich zeigten sich in der durchgeführten Fragmentanalyse Hinweise auf einen Polymorphismus, der später in Sequenzreaktionen bestätigt werden konnte. Da es Ziel dieser Untersuchung ist, festzustellen ob die verschiedenen Allele des beschriebenen Polymorphismus im Promotor funktionelle Bedeutung haben, wurde zur Amplifikation in der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ein Abschnitt des Promotors gewählt, in dem sich neben der TATA-Box, dem Transkriptionsstart und den zwei beschriebenen Vitamin D-responsiven Elementen, der zu untersuchende polymorphe Bereich befindet (siehe Abb. 1 und 2).

Abb. 1: Schematische Darstellung des CYP24-Genpromotors mit Primern



Zur PCR wurden 3 verschiedene Primer-Kombinationen eingesetzt (siehe Abb. 2). Kombination 1 (24OHsense1 + 24OHrev1) amplifizierte das Promotorkonstrukt welches in den Versuchen eingesetzt wurde um die Promotoraktivität zu messen und zu vergleichen. Kombination 2 (24OHsense4 + 24OHrev1) amplifizierte einen minimal Promotor ohne den polymorphen Bereich, der im Luziferase-Assay als Kontrolle diente. Kombination 3 (24OHsense5+24OHrev3), die schon in vorangegangenen Arbeiten eingesetzt wurde, diente als Kontrolle in der PCR.

Abb. 2: Publierte Sequenz des Promotors des CYP24-Gens

```

-912      ggtgtagaag aacagaggcg ggcagtggac ataggggagg tggcccagcc
-862      tgaattcaag catcgttggt gcaagccacg ctctcaaggc gcatttccta
-812      acttcctaaa gaagtaacaa cagcaactaa cttttattga ctgttgacta
-762      tagacaaggc ttcgttgttg ccgctttacg tgcattaatt catttaatct
                Primer 240Hsense5
-712      gcaaaaacaac caaacatgaa acagcaggaa ggaaattcta caaactctcc
-662      ttcttgctca agttaagaaa gtctcctctt ctgggtgcatt tcagtaagac
                Primer 240Hsense1
-612      tcaaatcctc cccaccctgg gaggcgcaga aagccaaact tcctccaaaa
-562      aaaaaaaggc aaaaaaaaaa aaaatcactt cagtccaggc tgggggatc
                polymorpher Bereich Primer 240Hsense4
-512      tggctccccg ggaggcgcgc gggctccccg ggcctggca gacgcggcag
                Primer 240Hrev3
-462      cttttctggg cccgcactcg gggacctcgc ccgccggca tcgcgattgt
-412      gcaagcgccg gcggcaacca cggccggctg cggctcctgc gccgggggag
-362      ggcggggagg cgcgttcgaa gcacaccccg tgaactccgg cgttcgcag
                VDREd
-312      ccttctggg ggttatctcc ggggtggagt gctgcccgcc ccaccccacc
-212      tcccgcgcc agcgaacata gcccgggtca cccaggccc ggacgccctc
-162      gctcacctcg ctgactccat cctccttcca cccccctcc cctgggtccg
                VDREp
-112      cgtccctcgg agtctggcca gccgggggcc actccgccct cctctgctg
-62      ctcattggcc acccagggca tgctctgtct cataaatgc atggtccttg
                TATA-Box
-12      ggcataggaa catggagagg gacaggagga aacgcagcgc cagcagcatc
                # Primer 240Hrev1
38      tcatctaccc tccttgacac ctccccgtgc tccagccaga ccctagaggt

```

Legende: Die Sequenz des Promotors des CYP24-Gens bis kurz nach Transkriptionsstart (#). Der polymorphe Bereich, die verwendeten Primer sowie die TATA-Box und Vitamin D-responsiven Elemente (VDRE) sind hervorgehoben.

3.1.2 Wahl der humanen genomischen DNA-Proben und die Durchführung der PCR

Zur Untersuchung im Luziferase Assay wurden die drei häufigsten in der Analyse dargestellten Abweichungen von der publizierten Promotorsequenz ausgewählt. Die publizierte Sequenz des polymorphen Bereichs im Promotors wurde als Wildtyp (WT) bezeichnet:

WT: CCAAAAAAAAAAAGGCAAAAAAAAAAAAAAAAATC

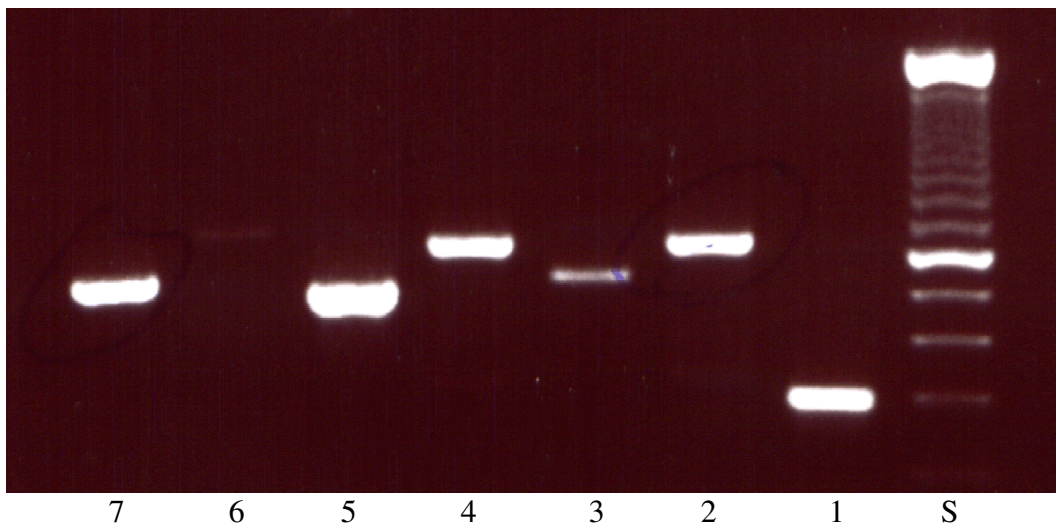
Die Verschiedenen Allele des Polymorphismus wurden nach der in der Sequenz unterstrichenen Abweichung vom WT benannt:

+A: CCAAAAAAAAAAAGGCAAAAAAAAAAAAAAAAATC

+2A: CCAAAAAAAAAAAGGCAAAAAAAAAAAAAAAAATC

+C5AC: CCAAAAAAAAAAAGGCAAAAAAAAAACAAAACAAAAATC

Abb. 3: Die Agarosegelelektrophorese der PCR-Produkte verschiedener Primer-Kombinationen im Versuch ausgehend von einer genomischen DNA-Probe.

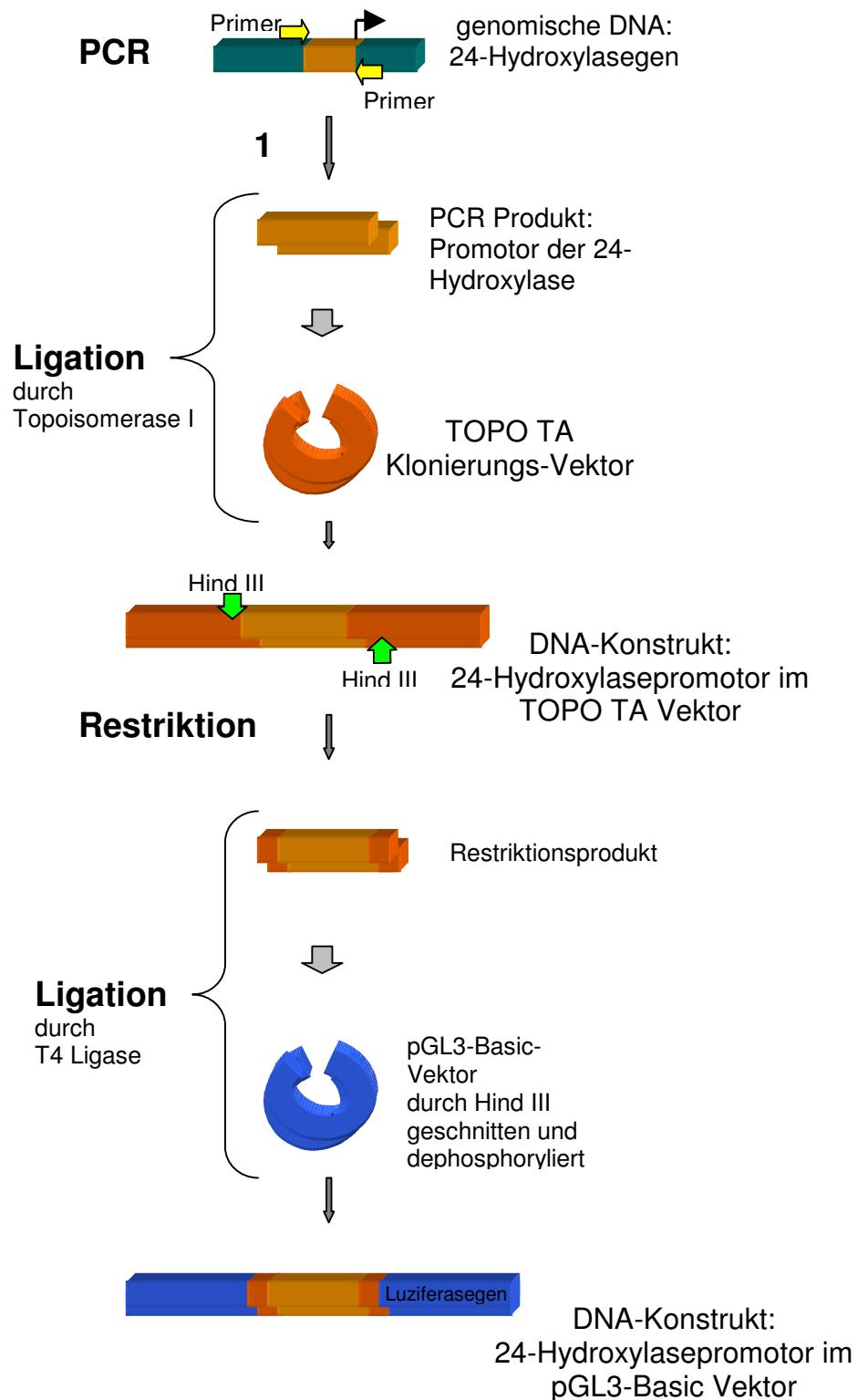


Legende: 1: 24OHsense5+24OHrev3 (Kontrolle der PCR), 2: 24OHsense1+24OHrev1 (zu untersuchendes Fragment), 7: 25OHsense4+24OHrev1 (minimal Promotor), S: Größenstandard, 3-6: Primer-Kombinationen die nicht zur Klonierung eingesetzt wurden. Die Banden der Bahnen 2 und 7 wurden aus dem Gel extrahiert und weiterverarbeitet.

Jede auf ihre CYP24-Promotoraktivität zu untersuchende DNA-Probe wurde mit allen drei Primer-Kombinationen zur PCR eingesetzt. Die zu untersuchenden PCR-Produkte wurden zur Weiterverarbeitung aus dem Gel extrahiert.

3.2 Klonierung des CYP24-Promotorkonstrukts in den pGL3-Basic Vektor

Abb. 4: Schematische Darstellung der Klonierung des 24-Hydroxylasepromotors in den Expressionsvektor pGL3-Basic

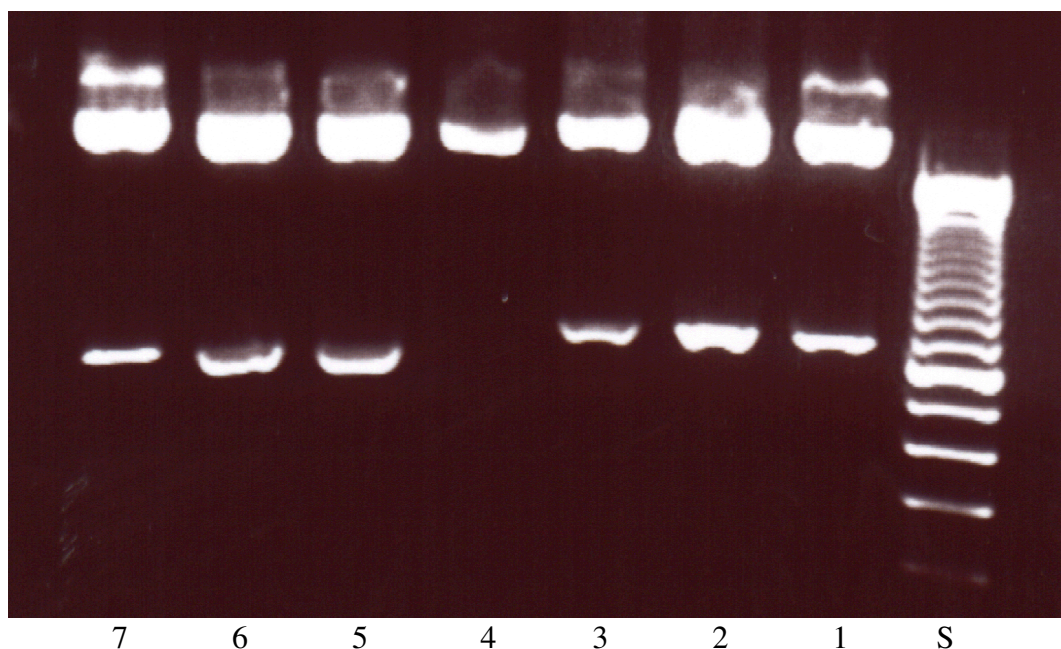


Da das direkte Klonieren des CYP24-Promotorkonstrukts in den pGL3-Basic Vektor sehr ineffizient war, wurde der Umweg über den TOPO Blueprint Vektor gewählt. Die freien Enden des TOPO Vektors sind aufgrund ihres Thymidin-Overhangs komplementär zu den Enden von nicht restringierten PCR-Produkten, die ihrerseits einen Adenin-Overhang vorweisen. Dies gewährleistet eine einfache und effiziente Ligation ohne Restriktion der PCR-Produkte.

3.2.1 Ligation der PCR-Produkte in den TOPO Vektor

Nach der Ligation des CYP24-Promotorsabschnitts in den TOPO Vektor und der Transformation in kompetente E-Coli-Zellen wurden die positiven Klone kultiviert. Im Anschluss wurden die Plasmide mittels Mini-Präp isoliert, und mit dem Restriktionsenzym EcoR1 (Schnittstellen an beiden Seiten des Inserts im Vektor vorhanden) geschnitten. Anhand einer Agarosegelelektrophorese wurde das Vorhandensein und die Größe der Inserts überprüft (Abb. 5).

Abb. 5: Exemplarische Agarosegelelektrophorese von mit EcoR1 geschnittener mini-Präp DNA aus der TOPO-Klonierung.

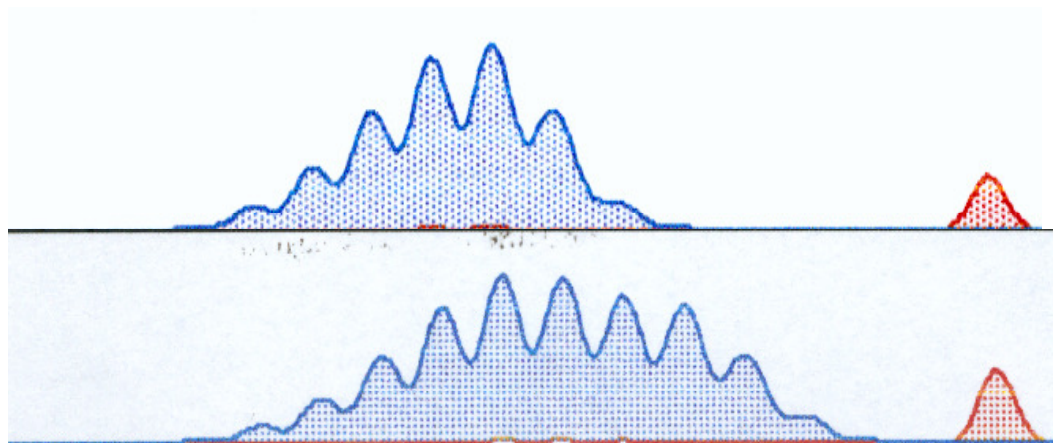


Bei der in jeder Bahn sichtbaren großen Bande handelt es sich um den TOPO Vektor, bei der kleineren um das Promotor-Insert. Bahn 1-3: sense1+rev1, Bahn 4: Vektor ohne Insert, Bahn 5-7: sense4+rev1. Analoges Vorgehen für die weiteren Konstrukte.

3.2.2 Fragmentanalyse der TOPO-klonierten Promotorkonstrukte

Die mit dem Restriktions-Enzym EcoR1 aus den TOPO-Plasmiden herausgeschnittenen DNA-Inserts wurden in einer Fragmentanalyse auf Übereinstimmung mit den zu untersuchenden Allelen des Promotorpolymorphismus untersucht.

Abb.6: Exemplarische Darstellung der Ergebnisse von zwei Fragmentanalysen

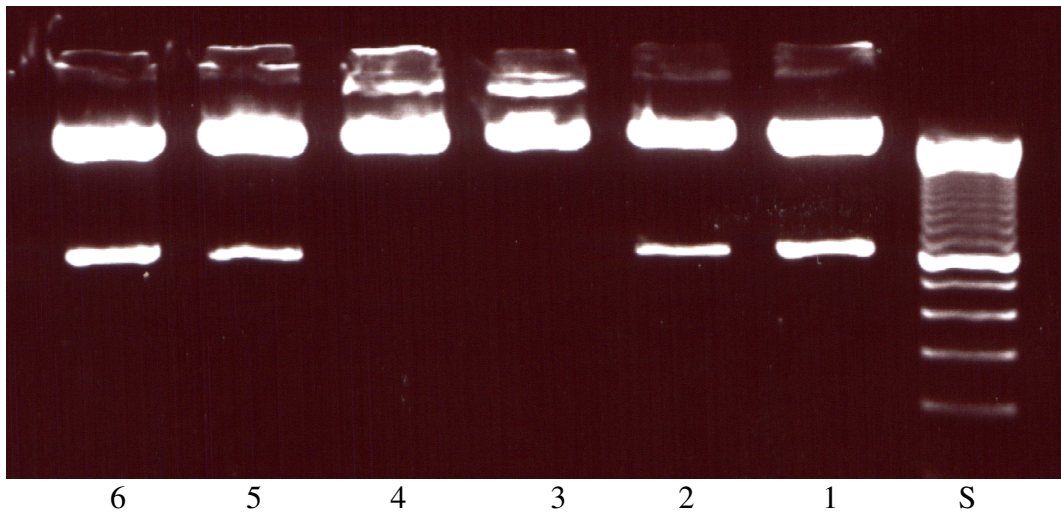


Der einzelne Peak stellt einen Größenstandard dar. Die höchste Peak zeigt die Länge des untersuchten Fragments. Die übrigen Peaks sind Stotterbanden die durch Ungenauigkeit der Taq-Polymerase in Repeat-Sequenzen entsteht. Oben: Das Wildtyp-Allel. Unten: Das Allel +2A

3.2.3 Ligation der Promotorkonstrukte mit dem pGL3-Basic Vektor

Die zu untersuchenden CYP24-Promotorabschnitte wurden anschließend mit dem Restriktions-Enzym HindIII geschnitten, mit dem ebenfalls HindIII geschnittenen pGL3-Basic Vektor ligiert, und zur Vermehrung in kompetente E-Coli-Zellen eingebracht. Zur Kontrolle der Klonierung wurden Mini-Päps angefertigt und nach Restriktion der Plasmide mit HindIII, eine Gelelektrophorese durchgeführt.

Abb. 7: Agarosegelelektrophorese mit HindIII geschnittene Mini-Präp DNA aus der pGL3-Basic Klonierung.



Bei der in jeder Bahn sichtbaren großen Bande handelt es sich um den Vektor. Bahn 1-2: +2A, Bahn 5-6: +A. Bei allen sichtbaren Inserts handelt es sich um Produkte der sense1+rev1 Primer-Kombination. Bahn 3-4: Vektor ohne Insert. Analoges Vorgehen für die weiteren Konstrukte.

3.2.4 Sequenzierung

Um die genaue Sequenz und die Orientierung des Inserts im Vektor zu überprüfen, wurde unter Zuhilfenahme eines Primers, der mit dem pGL3-Basic Vektor geliefert wird (pGL3 forward, Promega), eine Sequenzreaktion durchgeführt.

Abb. 8: Exemplarischer Auszug einer Sequenzreaktion

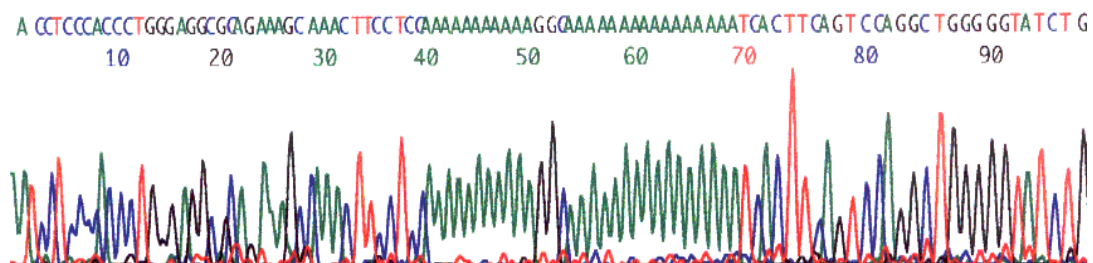


Abbildung des Ergebnisses einer Sequenzreaktion des +2A Polymorphismus im pGL3-Basic Vektor mit dem pGL3 forward Primer. Der polymorphe Bereich liegt in dieser Darstellung zwischen den Nukleotiden 40 und 70.

3.3 Messung der Promotoraktivität im Luziferase Assay

3.3.1 Herstellung der zu transfizierenden Vektor-Promotorkonstrukte

Neben den Promotorkonstrukten mit den zu untersuchenden Allelen wurden weitere Konstrukte als Kontrolle herangezogen (siehe Abb.9).

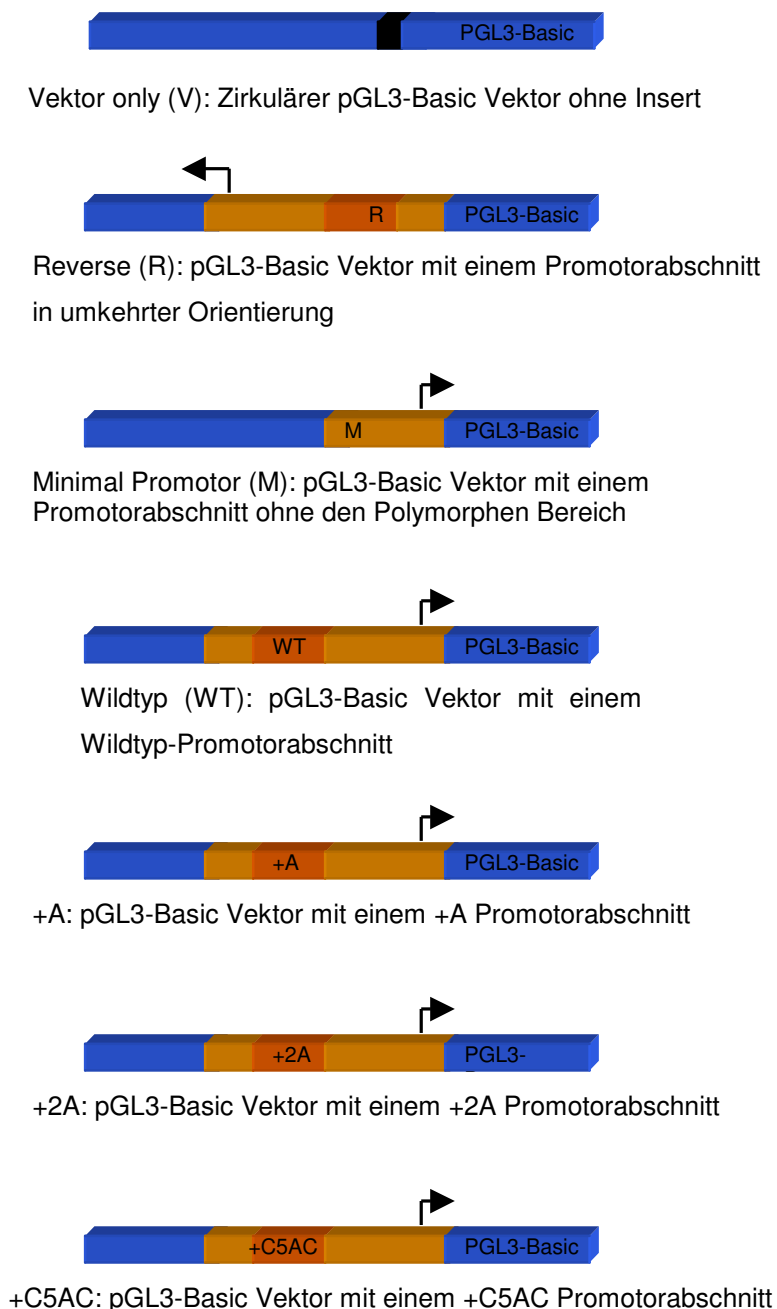
Um die für die Versuche notwendigen Mengen der Vektor-Promotorkonstrukte herzustellen, wurden die Klone mit den zu untersuchenden Konstrukten, in 300ml Medium kultiviert. Anschließend wurden dann die DNA-Konstrukte mittels einer Plasmid-Präparation isoliert und die Konzentration auf 250µg/ml normiert.

3.3.2 Versuchsaufbau und Datenverarbeitung

In jedem Versuch wurden mittels Elektroporation die in Abb. 9 dargestellten pGL3-Basic-Konstrukte in Zellen der hFOB- oder T/C28-Linie transfiziert.

Nach der Elektroporation wurde jeder Transfektionsansatz auf drei Wells verteilt und kultiviert (siehe Abb. 10 sowie Tabelle 1). Nach 48 Stunden wurden die Zellen geerntet. Die Proteinkonzentration des Zell-Lysats wurde jeweils doppelt bestimmt (ausgedrückt in µg/ml), und der Mittelwert gebildet. Der Luziferase Assay wurde pro Well einfach durchgeführt (ausgedrückt in Fluorescence Units (FU)/µl). Durch die Bestimmung der Proteinkonzentration des Zell-Lysats ergibt sich eine Bezugsgröße für die Bewertung der gemessenen Luziferaseaktivität. Diese ermöglicht es, die Promotoraktivität unabhängig von Schwankungen des Gesamtproteingehalts der Zellen oder der Zellzahl aufgrund von schwankenden Proliferationsraten zu bewerten. Diese relative Luziferaseaktivität wird demnach als **FU/µg Protein** ausgedrückt. Anschließend wurde aus den relativen Luziferaseaktivitäts-Werten von den drei Wells die aus einem Transfektionsansatz stammen der Mittelwert gebildet.

Abb.9: Schematische Übersicht der transfizierten Konstrukte



Schematisch werden die in jedem Versuch transfizierten Plasmide dargestellt. Vom pGL3-Basic Vektor der in zirkulärer Form vorliegt ist immer nur der Abschnitt der das Insert aufnimmt gezeigt. Vom Vektor farblich abgehoben ist der jeweilige CYP24-Promotorabschnitt, in diesem wiederum der polymorphe Bereich. Der Pfeil bezeichnet Transkriptions-Start und -Richtung.

Abb. 10: Standardisierter Versuchsablauf und Datenauswertung nach Transfektion eines Vektor-Promotorkonstrukts

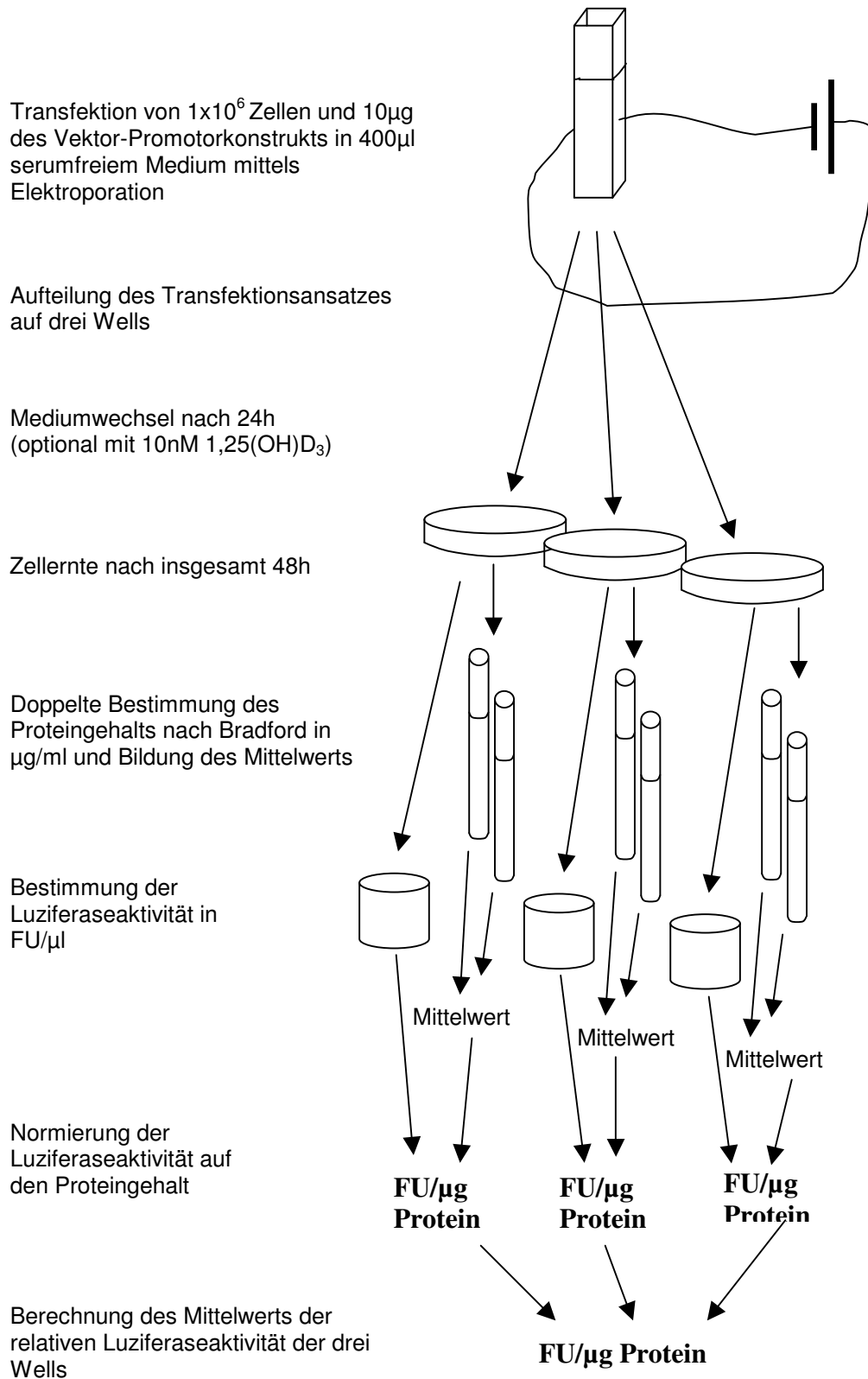


Tabelle 1: Exemplarische Datenverarbeitung, aufgezeigt an einem Versuch mit T/C28 Zellen in Abwesenheit von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$

Vektor-Promotor-konstrukt	Proteingehalt				Luziferaseaktivität			
	Well	Messung1 $\mu\text{g/ml}$	Messung2 $\mu\text{g/ml}$	Mittelwert $\mu\text{g/ml}$ (a)	FU/ μl (b)	Relative Luziferaseaktivität FU/μgProtein		Normiert auf den Wildtyp In %
						b/a*1000	Mittelwert \pm SEM	
V (Vektor only)	1	478	468	473	7,7	16,27	17,9	28,3%
	2	417	430	423,5	8	18,89	\pm 0,5	
	3	408	382	395	7,3	18,48		
R (Reverse)	1	716	691	703	13,9	19,75	20,8	32,9%
	2	706	598	652	13,8	21,16	\pm 0,3	
	3	581	679	630	13,5	21,42		
M (Minimal Promotor)	1	527	498	512,5	70,05	136,68	140,9	222,8%
	2	438	441	439,5	62,8	142,88	\pm 1,2	
	3	462	468	465	66,5	143,01		
WT (Wildtyp)	1	633	717	675	43,1	63,85	63,2	100%
	2	623	670	646,5	37,8	58,46	\pm 1,5	
	3	657	696	676,5	45,55	67,33		
+A	1	712	628	670	70,3	104,92	109,8	173,7%
	2	701	564	632,5	63,75	100,79	\pm 4,1	
	3	527	548	537,5	66,45	123,63		
+2A	1	673	577	625	90,4	144,64	140,7	222,6%
	2	639	636	637,5	93,7	146,98	\pm 3,0	
	3	640	608	624	81,5	130,61		
+C5AC	1	781	744	762,5	25,2	33,05	39,7	62,8%
	2	679	661	670	29,55	44,1	\pm 2,0	
	3	664	665	664,5	27,85	41,91		

Dargestellt sind die Rohdaten der Proteinkonzentrationen und der Luziferaseaktivitäten sowie die Berechnung der relativen Luziferaseaktivität pro Well. Der Mittelwert der relativen Luziferaseaktivität wird für jedes Triplet errechnet und auf die Aktivität des Wildtyp-Konstrukts normiert.

Um die Ergebnisse von Versuch zu Versuch vergleichbar zu machen, aber auch innerhalb einer Versuchs deutlicher darzustellen, wurde die Luziferaseaktivität der Konstrukte innerhalb einer Serie auf die Luziferaseaktivität des Wildtyp-Konstrukts normiert (Aktivität des jeweiligen Konstrukts / Aktivität des Wildtypskonstrukts*100). Die Aktivität des jeweiligen Promotorkonstrukts kann so auch in Prozent der Aktivität des Wildtyp-Konstrukts dargestellt werden. Bei der Zusammenfassung der Ergebnisse der Experimente einer Versuchsreihe wurden die Mittelwerte der relativen Luziferaseaktivitäten sowie die Mittelwerte der Prozenträge der einzelnen Konstrukte errechnet. Die Standardfehler der jeweiligen

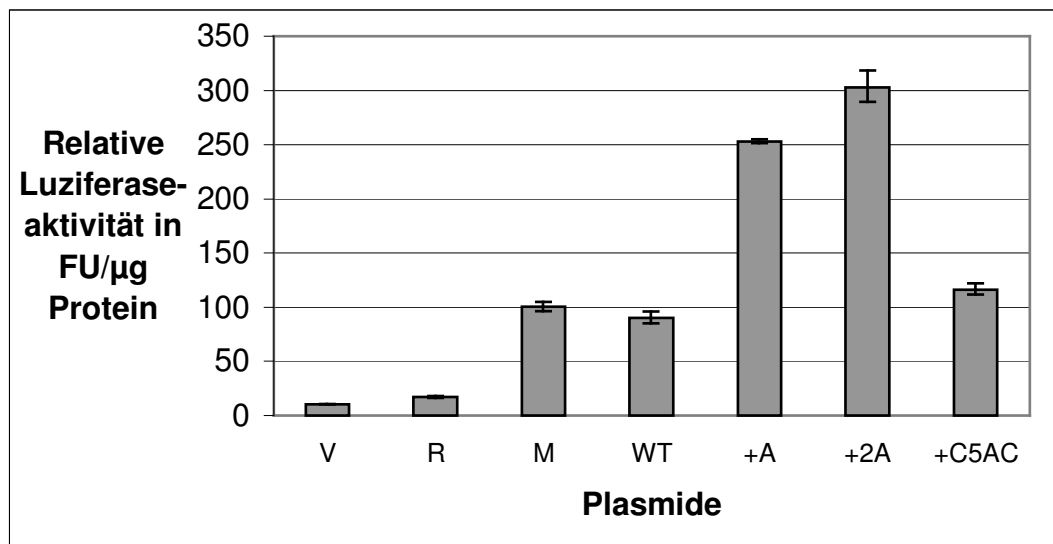
Mittelwerte wurden ermittelt und die statistische Signifikanz der Aktivitätsunterschiede mittels Kruskal-Wallis Test überprüft.

3.4 Luziferaseaktivität der pGL3-Basic Vektor-Promotorkonstrukte

3.4.1 Nach Transfektion in hFOB-Zellen

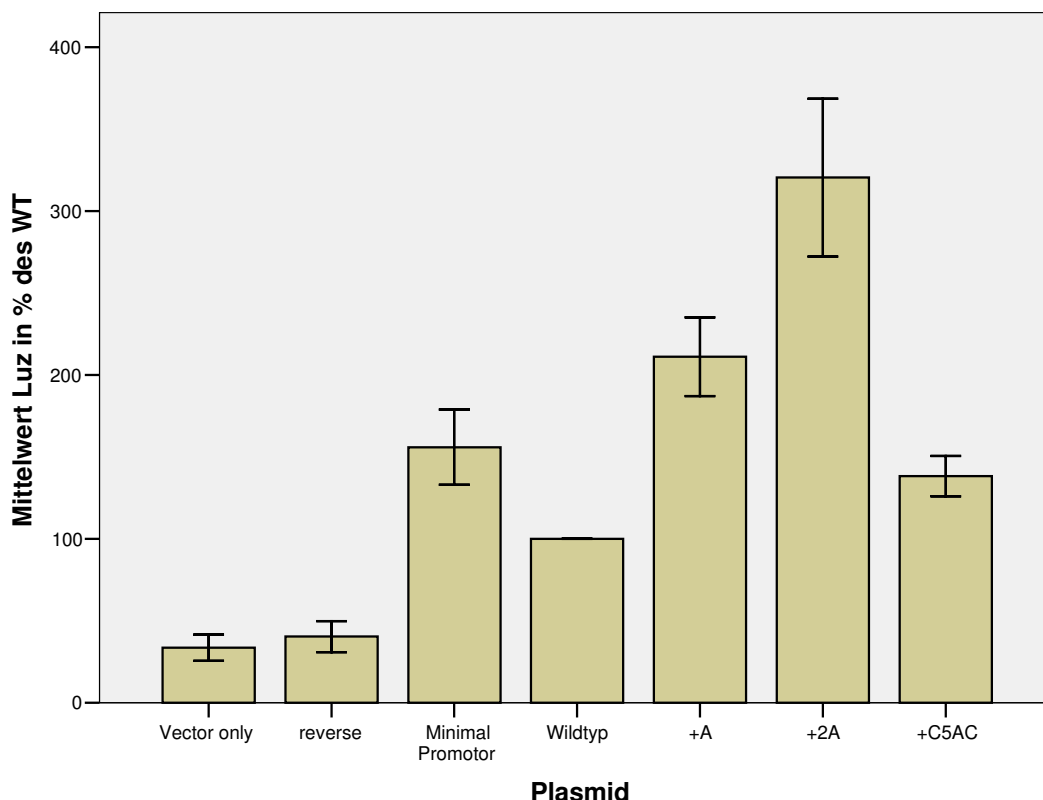
Die Versuchsreihe mit hFOB-Zellen in Abwesenheit von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ wurde wie oben und in Material und Methoden beschrieben durchgeführt. Abb. 11 zeigt das Ergebnis eines repräsentativen Versuchs. Die Daten aus fünf Versuchen ($n=5$) wurden in Abbildung 12 und Tabelle 2 zusammengefasst. Die Verarbeitung der Daten erfolgte wie oben beschrieben.

Abb. 11: Ergebnisse eines repräsentativen Versuchs mit hFOB Zellen ohne Stimulation.



Jeder Balken stellt den Mittelwert der relativen Luziferaseaktivitäten von den drei Wells die aus einem Transfektionsansatz stammen dar. Der Fehlerbalken gibt den Standardfehler des Mittelwerts an.

Abb. 12: Ergebnisse der Versuchsreihe (n=5) mit hFOB Zellen ohne Stimulation.



Dargestellt wird der Mittelwert der Luziferaseaktivität in Prozent der Wildtyp-Aktivität für jedes Promotorkonstrukt. Der Fehlerbalken zeigt den Standardfehler des Mittelwerts. Die statistische Signifikanz der Unterschiede der Mittelwerte wurde mit dem Kruskal-Wallis Test belegt ($p < 0,001$).

Tabelle 2: Ergebnisse der Versuchsreihe (n=5) mit hFOB Zellen ohne Stimulation.

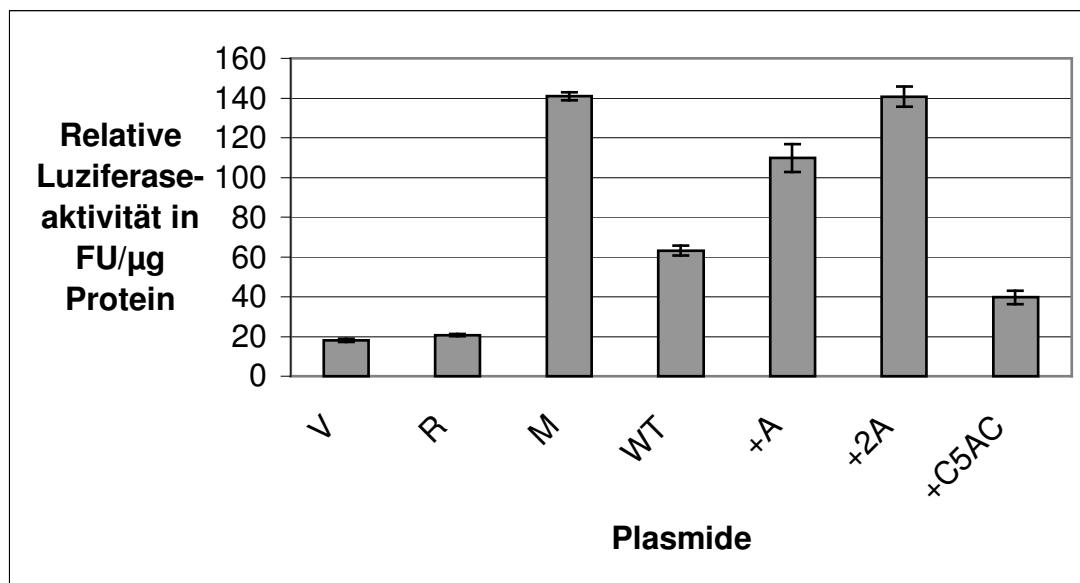
Vektor-Promotorkonstrukte	Mittelwert der relativen Luziferaseaktivitäten ±SEM p=0,001	Mittelwert der Luziferaseaktivität in % des Wildtyps ±SEM p<0,001
Vektor only (V)	21,9 ±6,9	33,7 ±8,0
Reverse (R)	27,2 ±9,0	40,4 ±9,5
Minimal Promotor (M)	113,9 ±24,4	155,9 ±23,0
Wildtyp (WT)	72,8 ±10,2	100 ±0
+A	160,8 ±35,5	211 ±24,1
+2A	241,7 ±56,0	320,4 ±48,1
+C5AC	102,5 ±17,8	138,4 ±12,3

Dargestellt werden die Mittelwerte der relativen Luziferaseaktivitäten sowie die Mittelwerte der Luziferaseaktivitäten in Prozent der Wildtyp-Aktivität für jedes Promotorkonstrukt. Für beide Mittelwerte wurde der Standardfehler berechnet. p gibt die im Kruskal-Wallis Test ermittelte statistische Signifikanz der Unterschiede der Mittelwerte an.

3.4.2 Nach Transfektion in T/C28-Zellen

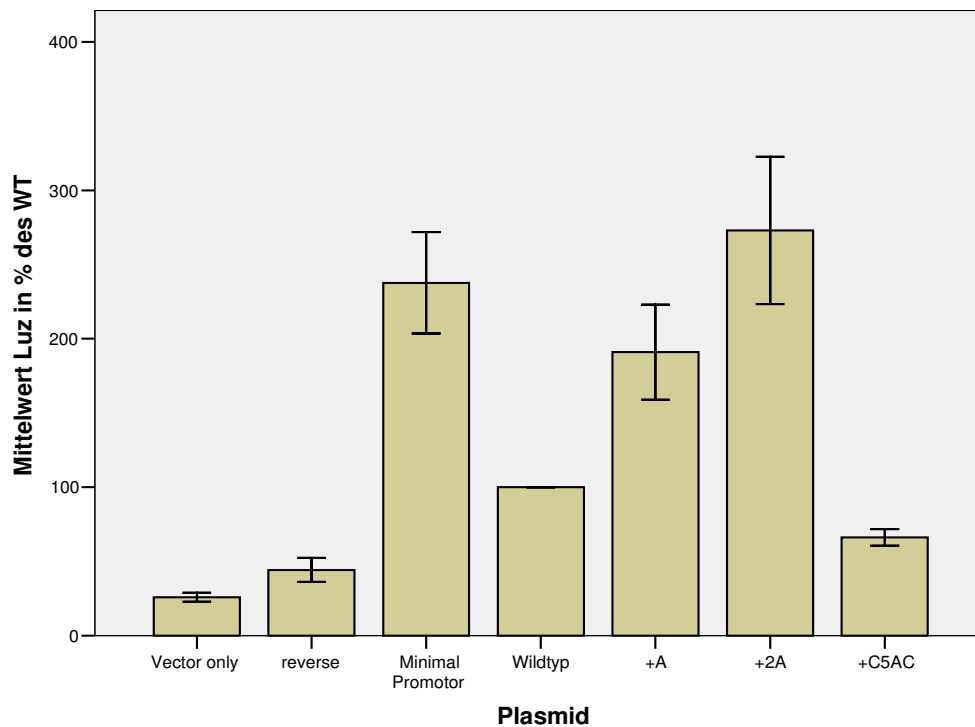
Die Versuchsreihe mit T/C28-Zellen in Abwesenheit von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ wurde wie oben und in Material und Methoden beschrieben durchgeführt. Abbildung 13 zeigt das Ergebnis eines repräsentativen Versuchs. Die Daten aus vier Versuchen ($n=4$) wurden in Abbildung 14 und Tabelle 3 zusammengefasst. Die Verarbeitung der Daten erfolgte wie oben beschrieben.

Abb. 13: Ergebnisse eines repräsentativen Versuchs mit T/C28 Zellen ohne Stimulation



Jeder Balken stellt den Mittelwert der relativen Luziferaseaktivitäten von den drei Wells die aus einem Transfektionsansatz stammen dar. Der Fehlerbalken gibt den Standardfehler des Mittelwerts an.

Abb. 14: Ergebnisse der Versuchsreihe (n=4) mit T/C 28 Zellen ohne Stimulation.



Dargestellt wird der Mittelwert der Luziferaseaktivität in Prozent der Wildtyp-Aktivität für jedes Promotorkonstrukt. Der Fehlerbalken zeigt den Standardfehler des Mittelwerts. Die statistische Signifikanz der Unterschiede der Mittelwerte wurde mit dem Kruskal-Wallis Test belegt ($p < 0,001$).

Tabelle 3: Ergebnisse der Versuchsreihe (n=4) mit T/C 28 Zellen ohne Stimulation.

Vektor-Promotorkonstrukte	Mittelwert der relativen Luziferaseaktivitäten \pm SEM $p=0,001$	Mittelwert der Luziferaseaktivität in % des Wildtyps \pm SEM $p < 0,001$
Vektor only (V)	17,4 \pm 1,4	25,9 \pm 3,0%
Reverse (R)	29,3 \pm 3,0	44,2 \pm 8,1%
Minimal Promotor (M)	178,6 \pm 46,9	237,7 \pm 34,2
Wildtyp (WT)	71,6 \pm 12,8	100% \pm 0
+A	145,5 \pm 41,8	190,9 \pm 32,1
+2A	213,9 \pm 74,4	273 \pm 49,6
+C5AC	49,35 \pm 13,3	66,1 \pm 5,6

Dargestellt wird der Mittelwert der relativen Luziferaseaktivitäten sowie der Mittelwert der Luziferaseaktivität in Prozent der Wildtyp-Aktivität für jedes Promotorkonstrukt. Für beide Mittelwerte wurde der Standardfehler berechnet. p gibt die im Kruskal-Wallis Test ermittelte statistische Signifikanz der Unterschiede der Mittelwerte an.

3.5 Luziferaseaktivität der pGL3-Basic Vektor-Promotorkonstrukte unter Stimulation mit 1,25(OH)₂D₃

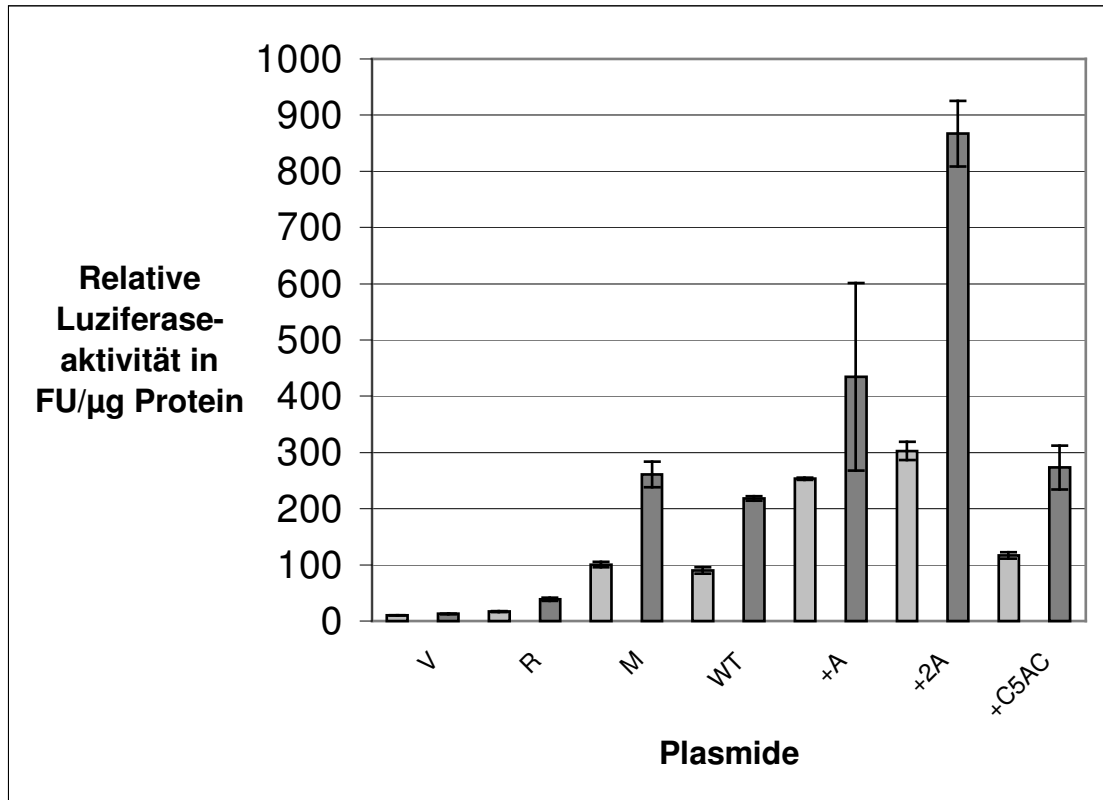
Da die Expression von CYP24 *in Vivo* durch 1,25(OH)₂D₃ stimuliert wird und im Promotor des CYP24-Gens zwei Vitamin D-responsive Elemente bekannt sind, wurden Versuchsreihen durchgeführt, in denen man den Einfluss der Allele des Polymorphismus auf die Promotoraktivität in Anwesenheit von 1,25(OH)₂D₃ untersuchte. Die Versuche in diesen Reihen wurden doppelt, also mit sechs Wells pro Plasmid angelegt. Bei dem in allen Experimenten nach 24 Stunden durchgeführten Mediumwechsel wurde für drei Wells Medium mit 10nM 1,25(OH)₂D₃ verwendet. Dem Medium der anderen drei Wells wurde das entsprechende Volumen des Vehikels (Ethanol) beigemischt.

Bei der Auswertung der Daten wurde die Luziferaseaktivität der Konstrukte mit derjenigen des Wildtyp-Konstrukts verglichen. Außerdem erfolgte die Berechnung der n-fachen Stimulierbarkeit der Konstrukte durch 1,25(OH)₂D₃.

3.5.1 Nach Transfektion in hFOB-Zellen unter Stimulation mit 1,25(OH)₂D₃

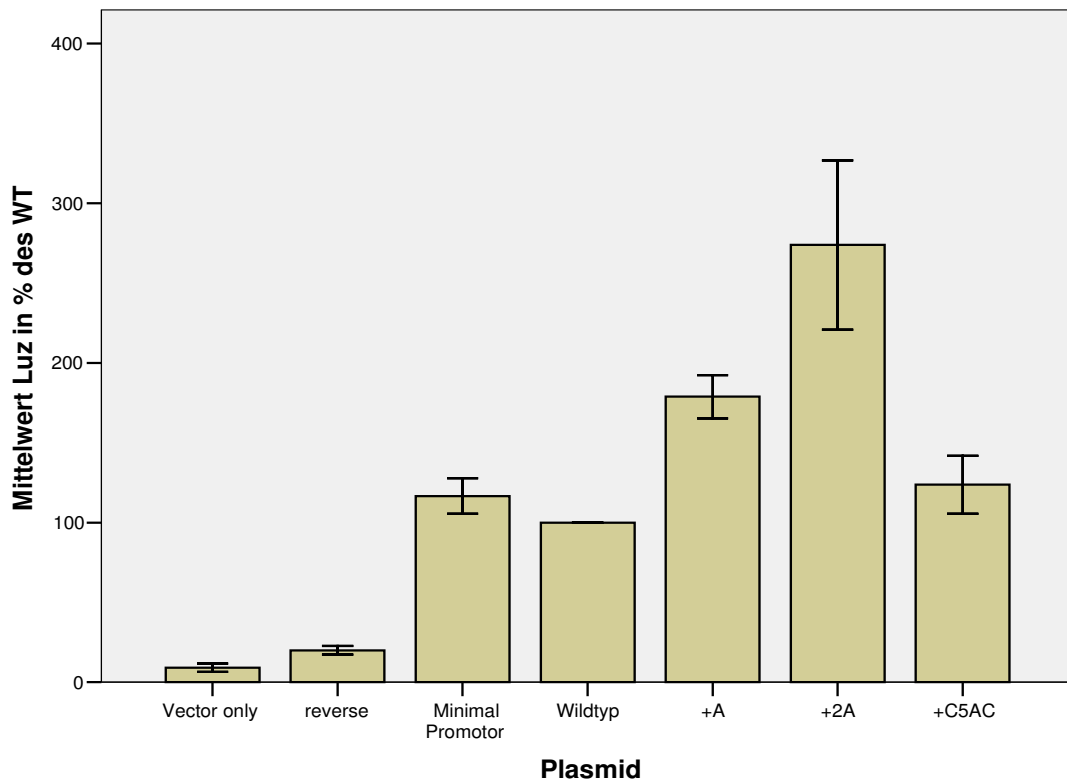
Die Versuchsreihe mit hFOB-Zellen in Anwesenheit von 1,25(OH)₂D₃ wurde wie oben und in Material und Methoden beschrieben durchgeführt. Abbildung 15 zeigt das Ergebnis eines repräsentativen Versuchs. Die Daten aus vier Versuchen (n=4) wurden in Abbildung 16 und Tabelle 4 zusammengefasst. Die Verarbeitung der Daten erfolgte wie oben beschrieben.

Abb. 15: Ergebnisse eines repräsentativen Versuchs mit hFOB-Zellen unter Stimulation mit 10nM 1,25(OH)D₃.



Jeder Balken stellt den Mittelwert der relativen Luciferaseaktivitäten von den drei Wells die aus einem Transfektionsansatz stammen dar. Pro Plasmid wurden zwei Transfektionsansätze angelegt von denen einer mit 10nM 1,25(OH)₂D₃ stimuliert wurde. Der dunkelgraue Balken zeigt den Versuchsarm mit Stimulation durch 1,25(OH)₂D₃ der hellgraue den ohne. Der Fehlerbalken gibt den Standardfehler des Mittelwerts an.

Abb. 16: Ergebnisse der Versuchsreihe (n=4) mit hFOB-Zellen unter Stimulation mit 10nM 1,25(OH)₂D₃



Dargestellt wird der Mittelwert der Luziferaseaktivität in Prozent der Wildtyp-Aktivität für jedes Promotorkonstrukt. Der Fehlerbalken zeigt den Standardfehler des Mittelwerts. Die statistische Signifikanz der Unterschiede der Mittelwerte wurde mit dem Kruskal-Wallis Test belegt ($p=0,001$).

Tabelle 4: Ergebnisse der Versuchsreihe (n=4) mit hFOB-Zellen unter Stimulation mit 10nM 1,25(OH)₂D₃

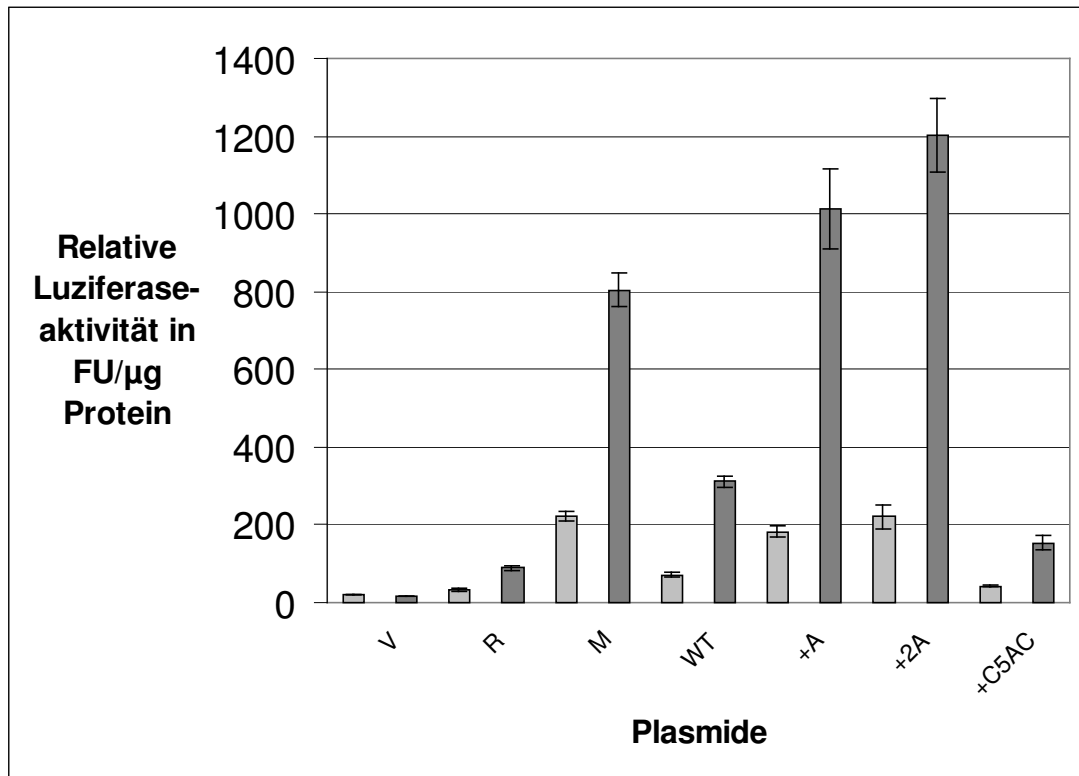
Vektor-Promotor-konstrukt	Mittelwert der relativen Luziferaseaktivität in FU/μg Protein ±SEM p=0,009	Mittelwert der Luziferase-aktivität in % des Wildtyps ±SEM p=0,001	Mittelwert der n-fachen Stimulation durch 1,25(OH) ₂ D ₃ ±SEM
Vektor only (V)	15,6 ±1,0	9,1% ±2,6	1,02 ±0,1
Reverse (R)	29,6 ±5,1	20% ±2,7	1,63 ±0,3
Minimal Promotor (M)	287,1 ±120,6	116,6% ±11,1	2,73 ±0,7
Wildtyp (WT)	231,7 ±83,1	100%	3,1 ±0,7
+A	417 ±148,2	178,8% ±13,5	2,77 ±0,5
+2A	708,7 ±311,4	273,9% ±53,0	3,12 ±0,9
+C5AC	263,3 ±72,2	123,7% ±18,2	2,81 ±0,3

Innerhalb des stimulierten Versuchsarms wurden die relativen Luziferaseaktivitäten der Vektor-Promotorkonstrukte in Prozent der Aktivität des Wildtypkonstrukts dargestellt. Um die Stimulierbarkeit der Vektor-Promotorkonstrukte aufzuzeigen, wurde die n-fache Stimulierbarkeit der einzelnen Konstrukte errechnet und der Mittelwert gebildet. p gibt die im Kruskal-Wallis Test ermittelte statistische Signifikanz der Unterschiede der Mittelwerte an.

3.5.2 Nach Transfektion in T/C 28-Zellen unter Stimulation mit 1,25(OH)₂D₃

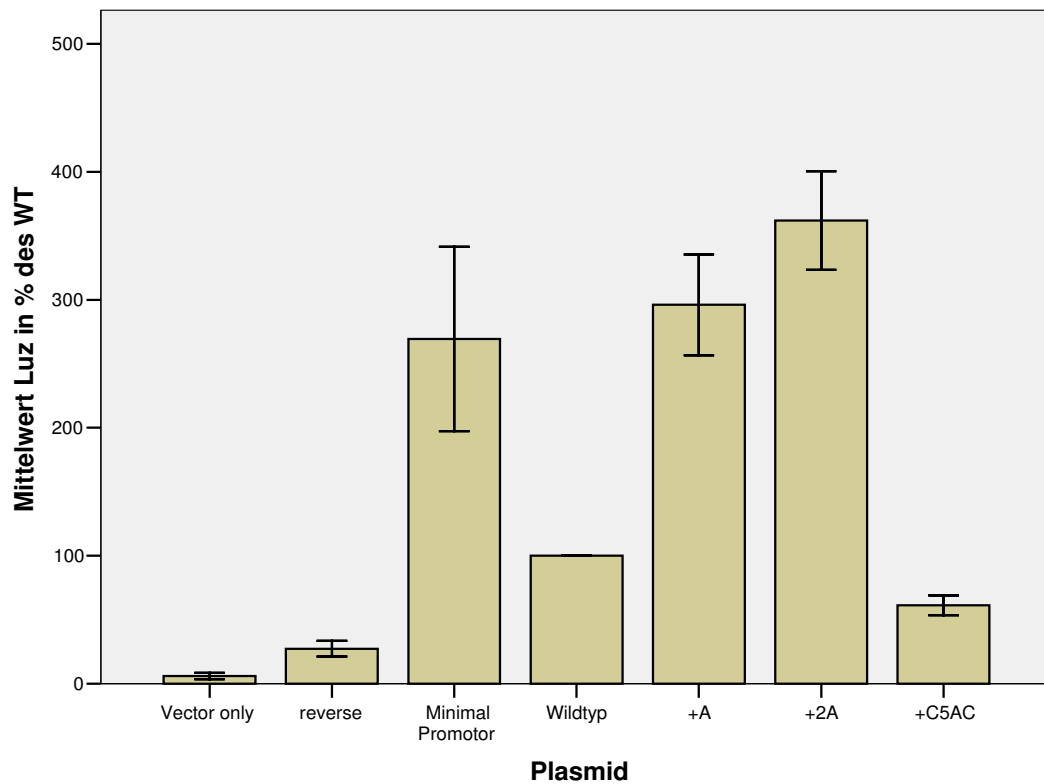
Die Versuchsreihe mit T/C28-Zellen in Anwesenheit von 1,25(OH)₂D₃ wurde wie oben und in Material und Methoden beschrieben durchgeführt. Abb. 17 zeigt das Ergebnis eines repräsentativen Experiments. Die Daten aus vier Experimenten (n=4) wurden in Abbildung 18 Tabelle 5 zusammengefasst. Die Verarbeitung der Daten erfolgte wie oben beschrieben.

Abb. 17: Ergebnisse eines repräsentativen Versuchs mit T/C28-Zellen unter Stimulation mit 10nM 1,25(OH)₂D₃.



Jeder Balken stellt den Mittelwert der relativen Luciferaseaktivitäten von den drei Wells die aus einem Transfektionsansatz stammen dar. Pro Plasmid wurden zwei Transfektionsansätze angelegt von denen einer mit 10nM 1,25(OH)₂D₃ stimuliert wurde. Der dunkelgraue Balken zeigt den Versuchsarm mit Stimulation durch 1,25(OH)₂D₃ der hellgraue den ohne. Der Fehlerbalken gibt den Standardfehler des Mittelwerts an.

Abb. 18: Ergebnisse der Versuchsreihe (n=3) mit T/C28-Zellen unter Stimulation mit 10nM 1,25(OH)₂D₃



Dargestellt wird der Mittelwert der Luziferaseaktivität in Prozent der Wildtyp-Aktivität für jedes Promotorkonstrukt. Der Fehlerbalken zeigt den Standardfehler des Mittelwerts. Die statistische Signifikanz der Unterschiede der Mittelwerte wurde mit dem Kruskal-Wallis Test belegt (p=0,005).

Tabelle 5: Ergebnisse einer Versuchsreihe (n=3) mit T/C 28-Zellen unter Stimulation mit 10nM 1,25(OH)D₃

Vektor-Promotor-konstrukt	Mittelwert der relativen Luziferaseaktivität in FU/µg Protein ±SEM p=0,009	Mittelwert der Luziferase-aktivität in % des Wildtyps ±SEM P=0,005	Mittelwert der n-fachen Stimulation durch 1,25(OH)₂D₃ ±SEM
Vektor only (V)	19 ±1,3	6,1 ±2,5	1,0 ±0,1
Reverse (R)	102,6 ±20,8	27,4 ±6,2	3,5 ±0,4
Minimal Promotor (M)	981,8 ±175,8	269,3 ±72	4,7 ±0,6
Wildtyp (WT)	466,4 ±211,9	100	5,3 ±1,6
+A	1214,1 ±370,1	296,1 ±39,4	6,63 ±0,7
+2A	1524,6 ±516,2	361,9 ±38,6	5,8 ±0,2
+C5AC	275,1 ±121,3	61,3 ±7,7	4,5 ±0,7

Innerhalb des stimulierten Versuchsarms wurden die relativen Luziferaseaktivitäten der Vektor-Promotorkonstrukte in Prozent der Aktivität des Wildtypkonstrukts dargestellt. Um die Stimulierbarkeit der Vektor-Promotorkonstrukte aufzuzeigen, wurde die n-fache Stimulierbarkeit der einzelnen Konstrukte errechnet und der Mittelwert gebildet. p gibt die im Kruskal-Wallis Test ermittelte statistische Signifikanz der Unterschiede der Mittelwerte an.

4 Diskussion

4.1 Einführung

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob es sich bei den Polymorphismen im Promotor des 24-Hydroxylasegens, um funktionelle Polymorphismen handelt, das heißt ob sie eine Auswirkung auf die Transkriptionsrate und damit möglicherweise auf die Expression des Enzyms 24-Hydroxylase haben. Zu diesem Zweck wurde in einem Luziferaseassay die Promotoraktivität der Polymorphismen bestimmt. Neben der Grundaktivität der Promotorkonstrukte, wurde auch die Aktivität unter Stimulation mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ überprüft.

4.2 Kritische Bewertung der Methoden

4.2.1 Zellkultursysteme

In Zellkulturen werden ausgewählte Zellen isoliert und unter kontrollierten Bedingungen kultiviert und untersucht. Dadurch können die Faktoren, die eine Zelle in ihrer Proliferation und Produktion beeinflussen, genau gemessen und kontrolliert werden. Der Nachteil ist, dass eben diese äußeren Faktoren nie in der Konstellation auf die Zelle wirken werden, wie es durch die vielfältig interagierenden Regulationsmechanismen im Körper der Fall ist. So werden auch Zellen einer Primärkultur immer Unterschiede zu den unter physiologischen Bedingungen wachsenden Zellen aufweisen. Dennoch ist die Zellkultur ein wichtiges Werkzeug in der Forschung, da sie Vergleiche und Einblicke ermöglicht, die *in vivo* nicht durchführbar wären. Um die Physiologie von Osteoblasten, Chondrozyten und mineralisiertem Gewebe zu untersuchen, wurden neben Tierzelllinien, humanen Primärkulturen und Tumorzelllinien auch immortalisierte Zellsysteme entwickelt. Jedes dieser Zellmodelle hat aber seine spezifischen Einschränkungen. Tierzellen können sich in Spezies-spezifischen phänotypischen Charakteristika von den humanen Equivalenten unterscheiden, wodurch die Ergebnisse nicht grundsätzlich übertragbar sind. Auch bei Tumorzellen können nicht alle Unterschiede zur untransformierten Zelle gesichert sein. Diese Probleme können mit Primärkulturen von humanen Zellen zwar umgangen werden, aber diese Systeme haben durch ihre geringe Proliferationsrate, hohe Variabilität und eingeschränkte Zahl von Passagen auch deutliche Grenzen.

In immortalisierten Zellsystemen werden die Zellen der Primärkultur zum Beispiel durch die Transfektion mit einer temperatursensitiven Mutante (tsA8) des großen T-Antigens des SV40-Virus immortalisiert, und dadurch die Proliferationsrate deutlich gesteigert. Das Protein p53, welches Einfluss auf die Proliferation von Zellen hat, wird unter anderem durch Komplexbildung mit dem T-Antigen stabilisiert. Durch diese stabilere Form des Proteins wird, ähnlich wie in manchen Tumorzellen, der Zellzyklus verändert. Durch den Einsatz der Temperatur sensitiven Variante des T-Antigens, erreicht die Proliferationsrate zwischen 32 und 34°C ihr Maximum, während ab 39,5°C keine Teilungsaktivität beobachtet werden kann. Diese Zellmodelle haben gute Proliferationseigenschaften ohne zu sehr vom Phänotyp der Primärzelle abzuweichen⁶⁶.

4.2.1.1 Die hFOB 1.19 Zelllinie

Von Harris et al. wurde eine Primärkultur von fetalen, humanen Osteoblasten, mit dem Gen der oben beschriebenen temperatursensitiven Mutante (tsA8) des großen T-Antigens des SV40-Virus transfiziert. Das Ergebnis war eine immortalisierte Osteoblasten Zelllinie deren Verdopplungszeit bei 33,5 C° ca. 36 Stunden beträgt. Phänotypisch bildet sich nach Erreichen der Konfluenz ein osteoblastärer Phänotyp aus. Nach acht Tagen sind mineralisierte Matrixnoduli zu beobachten. Osteopontin, Osteonectin, Knochensialoprotein, Typ I Kollagen, Osteocalcin und Alkalische Phosphatase sind nachweisbar. Die Zellen sind für PTH sensibel und zeigen unter Stimulation mit 1,25(OH)₂D₃ einen dosisabhängigen Anstieg der Alkalischen Phosphatase und Osteocalcinaktivität. Die Zelllinie ist daher ein gutes Osteoblastenmodell, das sich phänotypisch vor allem mit dem sich entwickelnden fetalen Osteoblasten *in vivo* vergleichen lässt⁶⁷.

4.2.1.2 Die T/C28a2 Zelllinie

Mit der oben beschriebenen Methode haben Goldring et al. aus Rippenknorpelzellen eine immortalisierte Chondrozytenzelllinie gewonnen. Bei diesen Zellen konnte die Nähe zu den Ursprungszellen durch Nachweis von Typ II Kollagen, Aggrecan, Biglycan und Decorin belegt werden. Darüber hinaus konnte eine Abnahme von Kollagen Typ II und Aggrecan mRNA unter Einfluss von IL1-β gezeigt werden, die bei humanen Chondrozyten auch *in vivo* nachweisbar ist⁶⁸.

4.2.2 Transfektion durch Elektroporation

Bei der von uns zur Transfektion eingesetzten Elektroporation, werden die Zellen durch die relativ hohe Spannung von 120V massivem Stress ausgesetzt. Es sind

vergleichsweise große DNA Mengen erforderlich. Nicht alle Zellen überleben dieses Verfahren und bei den intakten Zellen sind Auswirkungen auf den Stoffwechsel nicht auszuschließen. Da innerhalb der Versuche ausschließlich diese Methode verwendet wurde sind die Ergebnisse untereinander vergleichbar. Darüber hinaus unterliegt auch die Bestimmung der Zellzahl in der Mühlbauer Zählkammer einer gewissen Ungenauigkeit. Die daraus resultierenden Schwankungen in der Zahl der ausgesäten Zellen oder Proteinsyntheserate sollen aber durch die Normierung der gemessenen Luziferaseaktivitäten auf den Proteingehalt pro Volumen eliminiert werden.

Alternativ zur Elektroporation, wurde in unserer Arbeitsgruppe die Transfektion mittels Liposomen hinsichtlich ihrer Effizienz untersucht. In den Versuchen mit "Green Fluorescent Protein" erwies sich aber die Elektroporation bei den von uns eingesetzten Zelllinien als die effektivere Methode.

4.2.3 Bestimmung der Promotoraktivität mittels Luziferase Assays

Zur Bestimmung der Promotoraktivität wurde mit dem Luziferaseassay im pGL3-Basic Vektor ein etabliertes Instrument eingesetzt. Trotz gewisser Einschränkungen eignet sich das Verfahren sehr gut dazu, Polymorphismen eines Promotors innerhalb einer Versuchsreihe direkt miteinander zu vergleichen, da für alle Experimente einer Reihe die selben Bedingungen gelten.

Durch die hohe Plasmid Konzentration im Zytosol, kann sich ein Missverhältnis zwischen dem Promotor und den mit ihm interagierenden Transkriptionsfaktoren ergeben. Proteine die sonst durch Interaktion mit der DNA Einfluss auf die Transkriptionsrate nehmen, könnten möglicherweise nicht mehr wirksam werden.

Komplexere Regulationskreise sind in der Regel schlechter darstellbar. Wenn beispielsweise mit dem Promotor gleichzeitig ein Rezeptor transfiziert wird, könnten interagierende Faktoren limitiert sein und die Ergebnisse verfälschen.

Bei uns handelte es sich um ein einfaches System, welches sich mit dem Luziferase Assay gut untersuchen ließ. Die starken Reaktionen auf die Stimulation mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, können als Hinweis für eine ausreichende Interaktion von Promotor und Transkriptionsfaktoren (hier z.B. das Hormon Response Element für $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) in dem Modell gewertet werden.

Um Hintergrundaktivität und Artefakte im Luziferaseassay zu quantifizieren und heraus zu filtern zu können, wurden in jedem Versuch neben den Konstrukten deren Aktivität bestimmt werden sollte, auch Kontrollkonstrukte transfiziert. Zu diesem

Zweck wurden ein in zirkulärer Form vorliegender pGL3-Basic Vektor ohne Insert transfiziert und ein pGL3-Basic Vektor mit dem CYP24-Promotor in umgekehrter Orientierung eingesetzt.

4.3 Bewertung der Ergebnisse

4.3.1 Die Luziferaseaktivität im Wildtyp-Konstrukt

Bei dem Konstrukt WT (pGL3 Vektor mit Wildtyp-Promotor) konnte in beiden Zelllinien eine Luziferaseaktivität gemessen werden, die sich konstant deutlich vom Hintergrund abhob. Diese Aktivität führen wir auf die Anwesenheit des CYP24-Promotor im Vektor zurück. Die Luziferaseaktivität des Konstrukts WT diene als Vergleichswert für die Luziferaseaktivität der Konstrukte mit Allelen des Polymorphismus.

4.3.2 Die Luziferaseaktivität der Kontroll-Konstrukte

Das Konstrukt V, (pGL3 Vektor ohne Promotor) zeigte eine sehr geringe Luziferase Grundaktivität. Da sich die Luziferaseaktivitäten aller anderen Konstrukte aber deutlich von dieser abhoben, werteten wir dies als einen klaren Hinweis auf die Funktion der zu untersuchenden Promotorkonstrukte.

Die Luziferaseaktivität des Konstrukts R (pGL3 Vektor mit CYP24-Promotor in umgekehrter Orientierung) lag über der von Konstrukt V aber noch deutlich unter der von Konstrukt WT. Diese Aktivität ist möglicherweise auf im Promotor oft anwesende palindromische Elemente zurückzuführen, die eine teilweise Funktionsfähigkeit ermöglichen könnten. Der Vergleich mit dem Konstrukt WT zeigte jedoch deutliche geringere Aktivitäten.

Bei dem Konstrukt M (pGL3 Vektor mit CYP24-Promotor ohne den polymorphen Bereich) wurden Aktivitäten über dem Niveau des Konstrukts WT gemessen. Dieses oft zu beobachtende Phänomen ist möglicherweise mit dem Fehlen von Interaktionsstellen für transkriptionshemmende Faktoren in diesem Minimal-Promotor zu begründen.

4.3.3 Die Auswirkung des Polymorphismus auf die Promotoraktivität

In der von uns durchgeführten Untersuchung hatten die beschriebenen Polymorphismen einen zum Teil erheblichen Einfluss auf die gemessene Luziferaseaktivität.

4.3.3.1 In Abwesenheit von 1,25(OH)₂D₃

Die bei dem Konstrukt +A gemessenen Luziferaseaktivitäten waren signifikant ($p=0,05$) höher als die des Wildtyp Konstrukts (~Faktor 2 der Wildtypaktivität). Die bei dem Konstrukt +2A gemessenen Aktivitäten lagen wiederum deutlich über denen von dem Konstrukt +A (~Faktor 3 der Wildtypaktivität). Dieser Effekt war konstant in beiden Zelllinien nachweisbar. *In vitro* wird die Aktivität des CYP24-Promotors durch die o.g. Allele des Polymorphismus also signifikant gesteigert.

Bei der Messung der Luziferaseaktivität des +C5AC Konstrukts zeigten die beiden Zelllinien unterschiedliche Tendenzen. In den hFOB-Zellen, war im Mittel eine Zunahme der Luziferaseaktivität um den Faktor 1,4 zu beobachten während sich in den T/C 28-Zellen eine Abnahme um den Faktor 0,66 zeigte. *In vivo* ist daher wohl kein Effekt zu erwarten.

4.3.3.2 Unter Stimulation durch 1,25(OH)₂D₃

In Anwesenheit von 1,25(OH)₂D₃, welches auch *in vivo* die Transkription des CYP24-Gens steigert, zeigte sich in beiden Zelllinien, bei allen Konstrukten mit einem Promotor in korrekter Orientierung, eine beachtliche Zunahme der relativen Luziferaseaktivität. Bei Etwa 3-5x höheren Promotoraktivitäten, blieben die Allelspezifischen Veränderungen die selben wie die in Abwesenheit von 1,25(OH)₂D₃.

Beide Zelllinien sind offenbar 1,25(OH)₂D₃-responsive Systeme und die Allele des Polymorphismus beeinflussen die Promotoraktivität sowohl in Abwesenheit als auch in Anwesenheit von 1,25(OH)₂D₃. Indirekt kann so auch das Vorhandensein und die Funktion der Vitamin D-responsiven Elemente in den Konstrukten gezeigt werden.

Wenn die n-fache Stimulierbarkeit durch 1,25(OH)₂D₃ bei allen Konstrukten mit einem Promotor in korrekter Orientierung errechnet wurde, zeigte sich ein signifikanter ($p=0,05$) Unterschied zwischen den Zelllinien. Der Mittelwert dieser n-fachen Stimulierbarkeit durch 1,25(OH)₂D₃ war in hFOB-Zellen 3 und in den T/C28-Zellen 5,5. Dieses Phänomen ist möglicherweise auf phänotypische Unterschiede der Zelllinien wie zum Beispiel in der Ausstattung mit Transkriptionsfaktoren zurückzuführen.

Die n-fache Stimulierbarkeit zeigte innerhalb der Zelllinien keine signifikanten Unterschiede. Ein Effekt des Polymorphismus auf die Vitamin D Responsivität war also nicht Nachweisbar. Da die Vitamin D responsiven-Elemente vom Polymorphismus räumlich getrennt sind, war dies aber auch nicht zu erwarten.

Diese Ergebnisse führen nun zu der Annahme, dass die Transkriptionsraten durch die Polymorphismen *in vivo* ebenfalls erhöht sein könnten. Da die Regulation der CYP24-Aktivität über die Transkriptionsrate erfolgt kann man von einer höheren Aktivität des Enzyms CYP24OH *in vivo* ausgehen. Zwar ist über die Funktion und Relevanz des Enzyms CYP24OH noch lange nicht alles bekannt, aber immer mehr aktuelle Forschungsergebnisse weisen auf eine wichtige Rolle von 24,25(OH)₂D₃, dem Hauptprodukt des Enzyms, in der Entwicklung und Heilung von Knochen hin.

4.4 Weiterführende Forschung und praktische Relevanz

Nachdem zwei der untersuchten Polymorphismen im Promotor des CYP24-Gens *in vitro* deutlichen steigernden Einfluss auf die Transkriptionsrate zeigten, stellt sich nun die Frage ob in es *in vivo* dadurch tatsächlich zu Veränderungen der Aktivität des Enzyms CYP24 kommt. Über zwei Hauptmechanismen könnte die mögliche Mehrproduktion von CYP24 im Menschen symptomatisch werden: Zum einem über die Steigerung des 1,25(OH)₂D₃-Abbaus zum anderen über eine erhöhte Produktion von 24,25(OH)₂D₃. Hiermit könnte es lokal oder systemisch zu Konzentrationsveränderungen der beiden Botenstoffe kommen. Es ist dabei natürlich unklar, in welchem Ausmaß die Transkription *in vivo* durch andere Faktoren beeinflusst wird, und ob es systemische Kompensationsmechanismen für mögliche Plasmaspiegelveränderungen der beiden Botenstoffe gibt.

Ein Ziel von weiterführenden Untersuchungen könnte es also sein, zu überprüfen ob und in welchem Ausmaß diese Veränderungen Einfluß auf den Stoffwechsel und damit auf die Konzentration von Vitamin D Metaboliten haben.

Die direkte Messung der CYP24 Aktivität *in vivo* ist aufwändig, und gibt noch keinerlei Aufschluss über die Art und das Ausmaß des Einflusses auf den Gesamtorganismus. Daher wäre es vielleicht praktikabler zu versuchen, bei Trägern des Polymorphismus mögliche Auswirkungen von gesteigerter Enzymaktivität, wie zum Beispiel Normabweichungen von 1,25(OH)₂D₃ und 24,25(OH)₂D₃ Plasmaspiegeln nachzuweisen. Da aber gerade bei 24,25(OH)₂D₃ parakrine Wirkungen mit lokal erhöhten Hormonkonzentrationen eine Rolle zu spielen scheinen, könnten Untersuchungen der Plasmaspiegel ohne relevante Ergebnisse bleiben. Zusätzlich erschwerend wären auch die durch die Lichtabhängigkeit und

Ernährung entstehenden Schwankungen der $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Plasmaspiegel innerhalb der Population.

Sollte der Polymorphismus tatsächlich Einfluss auf $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ Serumspiegel haben, könnte sich dies auch in der Therapie von Osteoporose mit Vitamin D-Präparaten niederschlagen. Durch das Identifizieren des Polymorphismus könnte man die Therapie dem veränderten Vitamin D Stoffwechsel anpassen und damit effektiver gestalten.

Die Arbeitsgruppe von Norman Bell zeigte bereits eine Populationsabhängigkeit der CYP24-Aktivitäten⁶⁹. In Fibroblastenkulturen von Europäern waren zwei mal geringere CYP24-Aktivitäten verglichen mit denen von Indern nachweisbar. Gegenwärtig werden in Zusammenarbeit mit unserer Arbeitsgruppe Polymorphismus-Untersuchungen anhand von DNA Kollektiven mit 40 Proben je Population durchgeführt. Dabei zeigt sich eine dreifach höhere Prävalenz der +A und +2A Genotypen bei Indern. Beabsichtigt ist nun von einzelnen dieser Patienten (homozygote Träger für die verschiedenen Allele) Fibroblasten zu kultivieren und Enzymaktivitäten zu messen. Würde tatsächlich die Höhe der Enzymaktivität mit dem Genotyp korrelieren wäre dies als ein Hinweis für den Einfluss des Polymorphismus auf Enzymspiegel zu werten sein.

Eine andere Herangehensweise wäre es, ein Kollektiv, welches an einer potentiell $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ oder $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ assoziierten Krankheit leidet, auf den Polymorphismus hin zu untersuchen. Hierfür kämen zum Beispiel das Prostata Karzinom und Osteoporose in Betracht.

Aus Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Norman Bell ist bekannt, dass es ein in Georgia (USA) ein Kollektiv von Afro-Amerikanern mit einer hohen Inzidenz von Prostata Karzinomen gibt, welches auf Vitamin D-Metabolismus assoziierte Polymorphismen hin untersucht werden könnte.

In der multifaktoriellen und multigenetischen Pathogenese der Osteoporose, könnte das CYP24-Gen auf Grund der präsentierten Ergebnisse eine Rolle spielen, und sich somit als ein sogenanntes „Kandidatengen“ in der Pathogenese qualifizieren.

Osteoporosestudien erfordern sehr große Kollektive um Beziehungen zwischen Genotypen und der Erkrankung herzustellen. Die Arbeitsgruppe Uitterlinden et al. verfügt über eines der größten und best charakterisierten Kollektive von Osteoporotikern weltweit⁷⁰. Einschränkend ist jedoch, dass der CYP24 Promotor schwierig zu untersuchen ist, da die poly-A-Strecke bei der Sequenzanalyse des

PCR-Produkts zu Stotterbanden führen kann. Zwar kann die Kombination aus Fragmentanalyse und Sequenzierung eine Zuordnung homo- und heterozygoter Zustände liefern, aber die Untersuchung von großen Kollektiven wäre extrem kosten- und zeitaufwändig. Es wäre daher sinnvoll im Gen-Bereich des CYP24-Promotors nach Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) zu suchen die mit den Längenvarianten der poly-A-Strecke kosegregieren, um so eine „high throughput“ Analyse zur Relevanz der Polymorphismen im Promotor des CYP24-Gens zu ermöglichen.

Bei nachweislichem Einfluss auf die Pathogenese von Osteoporose könnte man den Polymorphismus in eine genetische Risikoanalyse mit einschließen. Sollten mit dem Polymorphismus assoziierte SNPs nachweisbar sein, könnte ein einfach durchzuführender Assay entwickelt werden und dann in einem möglichen „Osteoporose SNP Chip“ zur genetischen Risikoanalyse integriert werden. Neben der Risikoanalyse könnte mit einem solchen „Osteoporose SNP Chip“ durch das Erkennen von metabolisch relevanten Polymorphismen auch die Therapie gezielter und effektiver gestaltet werden.

5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, in der Arbeitsgruppe eindeutig nachgewiesene Polymorphismen im Promotor des 24Hydroxylasegens, auf eine funktionelle Relevanz zu untersuchen.

Die Substrate des Enzyms CYP24 sind $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $25(\text{OH})\text{D}_3$. Die entsprechenden Produkte der Katalyse sind $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ und $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Über das erste Produkt wird das hochpotente $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ im Sinne einer negativen Rückkopplung abgebaut. Dem zweiten Produkt $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, konnte die Funktion als Botenstoff in der Knochenheilung und -entstehung nachgewiesen werden. Detailliertere Ergebnisse gibt es insbesondere für Chondrozyten in der Ruhezone der Epiphysefuge.

Der Promotor des CYP24-Gens ist mit zwei Vitamin D-responsiven Elementen (VDREs) ausgestattet, welche die Transkriptionsrate des Gens in Anwesenheit von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ schnell und deutlich steigern. In einer poly-A-Strecke, die 488bp upstream des Transkriptionsstarts auffiel, konnte ein Polymorphismus nachgewiesen werden, die häufigsten Allele wurden als +A, +2A, und +C5AC bezeichnet.

Mittels PCR wurden aus humaner, genomischer DNA, 672-680bp lange Promotorfragmente mit TATA-box, den beiden bekannten VDREs und dem polymorphen Bereich hergestellt. Diese Promotorfragmente wurden in den pGL3 Basic Vektor (ein für Luziferase kodierendes Plasmid ohne Promotor) kloniert und die Sequenz dieser Vektor-Promotorkonstrukte durch Fragmentanalyse und Sequenzierung kontrolliert. Die Vektor-Promotorkonstrukte wurden dann mittels Elektroporation in hFOB und T/C28 Zellen transfiziert. Es wurden Versuchsreihen unter basalen Bedingungen und unter Stimulation mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ durchgeführt.

Anhand von Kontrollkonstrukten konnte die Spezifität der Promotoraktivität gezeigt werden. Für die Promotoren, die das Allel +A enthielten, konnte eine Verdoppelung und für die mit dem Allel +2A eine Verdreifachung der Luziferaseaktivität gezeigt werden. Das Allel +C5AC wies ähnliche Promotoraktivitäten wie der Wildtyp auf. Unter Stimulation mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ war in allen Konstrukten mit einem Promotor in korrekter Orientierung eine mindestens dreifache Steigerung der Luziferaseaktivität zu messen.

Sowohl Abwesenheit als auch in Anwesenheit von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ wird die Aktivität des Promotors des CYP24-Gens durch die Allele +A und +2A signifikant ($p < 0,001$) gesteigert. Demzufolge könnte der Polymorphismus auch unter physiologischen Bedingungen Einfluss auf die Transkriptionsrate des CYP24-Gens haben.

Da die CYP24-Aktivität vor allem über die Transkription reguliert wird, müsste durch den beschriebenen Polymorphismus die Aktivität des Enzyms *in vivo* gesteigert werden. In Folge könnte es lokal oder systemisch zu niedrigeren $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ - oder erhöhten $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Spiegeln kommen.

Potentielle Bedeutung hat dieser Befund in der Pathogenese von Osteoporose, dem Prostatakarzinom oder anderen Erkrankungen die mit veränderten $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ Aktivitäten einhergehen.

Gegenwärtig wird bereits nach SNPs gefahndet die mit dem beschriebenen Polymorphismus assoziiert sind, um Untersuchungen von größeren Kollektiven auf diesen Polymorphismus hin zu erleichtern. Bell et al. konnten Veränderungen von CYP24-aktivitäten in Fibroblastenkulturen in Abhängigkeit von ethnischer Herkunft zeigen.

Möglicherweise könnte das CYP24-Gen eines von zahlreichen Kandidatengenen sein, die bei der Entstehung von Osteoporose von Relevanz sind, und in ein System zur Risikoanalyse mit einfließen. Es könnten zum Beispiel über den Einsatz von zu entwickelnden „Single Nucleotid Polymorphisms Gen-Chips“ solche Risikoprofile relativ einfach erstellt werden. In Folge könnten sowohl in der Prophylaxe als auch in der Therapie von Osteoporose neue Möglichkeiten geschaffen und neue Perspektiven eröffnet werden.

6 Literaturverzeichnis

1. M. F. McCollum Award Lecture 1994: Vitamin D- new horizons for the 21st century. *AmJ Clin Nutr* 1994;60:619-30
2. Schmorl G. Die pathologische Anatomie der rachitischen Knochenerkrankung mit besonderer Berücksichtigung ihrer Histologie und Pathogenese. *Erge Inn Med Kinderheilk* 1909:403
3. Huldschinsky K. Heilung von Rachitis durch künstliche Höhensonne. *Deutsche Med Wochenschr* 1919;45:712-13
4. Hess AF, Unger LF Cure of infantile rickets by sunlight. *J Am Med assoc* 1921;77:39
5. Mellanby T. The part played by an „accessory factor“ in the production of experimental rickets. *J Physiol* 1918;52:11-4
6. Steenbock H. the induction of growth-prompting and calcifying properties in a ration exposed to light. *Science* 1924;60:224-5
7. Windaus A., Schenk Fr., v. Werder F. Über das antirachitisch wirksame Bestrahlungsprodukt aus 7-Dehydro-cholesterin. *Hoppr Seylers Z Physiol Chem* 1936;241:100-3
8. Brockmann H. Die Isolierung des antirachitischen Vitamins aus Thunfischleberöl. *Hoppe Seylers Z physiol Chem* 1936;241:104-13
9. McCollum EF, Simmonds N, Becker JE, Shipley PG. Studies on experimental rickets an experimental demonstration of the existence of a vitamin which promotes calcium deposition. *J Biol Chem* 1922;53:293-312
10. DeLuca H. F. The Vitamin D story: a collaborative effort of basic science and clinical medicine. *FASEB J* 1988;2:224-36
11. Brumbaugh P.F., Haussler M. R. Specific binding of 1alpha,25dihydroxycholecalciferol to nuclear components of chick intestine. *J Biol Chem* 1975;250(4):1588-94
12. Pike J. W., Haussler M.R. Purification of chicken intestinal receptor for 1,25-dihydroxyvitamin D. *Proc Natl.Acad Sci USA* 1979;76:5485-9
13. Simpson R. U., DeLuca H. F. Purification of chicken intestinal receptor for 1,25-dihydroxyvitamin D to apparent homogeneity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982;79:16-20
14. McDonnell D. P., Mangelsdorf D. J., Pike J. W., Haussler M. R., O'Malley B.W. Molecular Cloning of complementary DNA encoding the avian receptor for vitamin D. *Science* 1987;235:1214-7
15. Evans M. R. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 1988;240:889-95
16. Haussler M. R., Whitfield G. K., Haussler C. A., Hsieh J. C., Thompson P. D., Selznick S. H., Dominguez C. E., Jurutka P. W. The nuclear Vitamin D receptor: biological and molecular regulatory properties revealed. *J Bone Miner Res* 1998;13:325
17. Mackey SL, Heymont JL, Kronenberg LM, Demay MB Vitamin D receptor binding to the negative human parathyroid hormone vitamin D response element does not require the retinoid X receptor. *Mol Endocrinol* 1996;10:298-305
18. Stumpf W. E., Sar M., Reid F. A., Tanaka Y., DeLuca H. F. Target cells for 1,25-dihydroxyvitamin D in intestinal tract, stomach, kidney, skin, pituitary, and parathyroid. *Science* 1979;206:1188-90

19. Langston GG, Swain LD, Schwartz Z, Del Toro F, Gomez R, Boyan BD Effect of 1,25(OH)₂D₃ and 24,25(OH)₂D₃ on calcium ion fluxes in costochondral chondrocyte cultures. *Calcif Tissue Int* 1990;47:230-236
20. Schwartz Z, Langston GG, Swain LD, Boyan BD, Inhibition of 1,25(OH)₂D₃ and 24,25(OH)₂D₃ dependent stimulation of alkaline phosphatase activity by A23187 suggests a role for calcium in the mechanism of vitamin D regulation of chondrocyte cultures. *J Bone and Miner Res* 1991;6:709-718
21. Farach-Carson MC, Sergeev IN, Norman AW Nongenomic actions of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in rat osteosarcoma cells: Structure-function studies using ligand analogs. *Endocrinology* 1991;129:1876-1884
22. Lieberherr M, Grosse B, Duchambon P, Drueke T, A functional cell surface type receptor is required for the early action of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on the phosphoinositide metabolism in rat enterocytes. *J Biol Chem* 199;264:20403-20406
23. Sylvia VL, Schwartz Z, Curry DB, Chang Z, Dean DD, Boyan BD. 1,25(OH)₂D₃ regulates protein kinase C activity through two phospholipid-independent pathways involving phospholipase A₂ and phospholipase C in growth zone chondrocytes *J Bone Miner* 1998;13:559-569
24. Boyan BD, Sylvia VL, McKinney N, Schwartz Z. Membrane actions of Vitamin D metabolites 1 α ,25(OH)₂D₃ and 25R,25(OH)₂D₃ are retained in growth plate cartilage cells from Vitamin D receptor knockout mice. *J Cell Biochem* 2003;90:1207-1223
25. Nemere I, Schwartz Z, Pedrozo H, Sylvia VL, Dean DD, Boyan BD Identification of a membrane receptor for 1,25-dihydroxyvitamin D₃ mediates rapid activation of protein kinase C. *J Bone Miner Res* 1998;13:1353-13
26. Hughes MR, Brumbaugh PF, Haussler MR, Wergedal JE, Baylink DJ Regulation of serum 1,25-dihydroxyvitamin D₃ by calcium and phosphate in the rat. *Science* 1975;109:578-580
27. Henry HL Vitamin D hydroxylases. *J Cellular Biochem* 1992;49:4-9
28. Tanaka Y, DeLuca HF Rat renal 25-hydroxyvitamin D₃ 1- and 24-hydroxylases: their in vivo regulation. *Am J Physiol* 1984;246:E168-E173
29. Henry HL The 25(OH)D₃/1,25(OH)₂D₃-24R-hydroxylase: a catabolic or biosynthetic enzyme? *Steroids* 2001;66:391-398
30. Jones G, Byford V, Arabian A, St-Arnaud R. Altered pharmacokinetics of 1 α ,25-(OH)D₃ in blood and tissues of the CYP24-null mouse. *J Bone Miner. Res.* 2000;15:199
31. van Leeuwen JP, van den Bemd GJ, van Driel M, Burman CJ, Pols HA. 24,25-dihydroxyvitamin D₃ and bone metabolism. *Steroids* 2001;66:375-380
32. Henry HL. Regulation of the 25-hydroxyvitamin D₃ in vivo and in primary cultures of chick kidney cells. *J Biol Chem* 1979;254:2722-2729
33. Goff JP, Reinardt TA, Engstrom GW, Horst RL. effects of dietary calcium or phosphorous restriction and 1,25-dihydroxyvitamin D administration on rat intestinal 24-hydroxylase. *Endocrinology* 1992;131:100-104
34. Nishimura A, Shiniki A, Jin CH, et al. Regulation of messenger ribonucleic acid expression of 1,25-dihydroxyvitamin D₃-24-hydroxylase in rat osteoblast. *Endocrinology* 1994;134:1794-9
35. Pols HA, Birkenhager JC, Schittle JP, Visser TJ. Evidence that the self-induced metabolism of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ limits the homologous up-regulation of its receptor in rat osteosarcoma cells. *Biochim Biophys Acta* 1988;970:122-9

36. Reichel H, Koeffler HP, Norman AW. Regulation of 25-hydroxyvitamin D₃ metabolism in a human promyelocytic leukemia cell line (HL-60): 1,25-dihydroxyvitamin D₃ stimulates the synthesis of 24,25-dihydroxyvitamin D₃. *Arch Biochem Biophys* 1986;251:222-31
37. Ohyama Y, Okuda K. Isolation and characterisation of a cytochrome P-450 from a rat kidney mitochondria that catalyses the 24-hydroxylation of 25-hydroxyvitamin D₃. *J Biol Chem* 1991;266:8690-5
38. Menea C, Barsony J, Reddy SV, Cornish J, Cundy T, Roodman GD. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ hypersensitivity of osteoclast precursors from patients with Paget's disease. *J Bone Miner Res* 2000;15:228-235
39. Zierold C, Mings JA, DeLuca HF. Regulation of 25-Hydroxyvitamin D₃-24-Hydroxylase mRNA by 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ and Parathyroid Hormone. *J Cell Biochem* 2003; 88:234-237
40. Holick MF, Schnoes HK, DeLuca HF, Gray RW, Boyle IT, Suda T. Isolation and identification of 24,25dihydrocholecalciferol, a metabolite of vitamin D made by the kidney. *Biochemistry* 1972;11:4251-5
41. Henry HL Norman AW. Vitamin D: two dihydroxylated metabolites are required for normal chicken egg hatchability. *Science* 1978;201:835-7
42. Wientroub S, Price PA, Reddi AH. the dichotomy in the effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and 24,25-dihydroxyvitamin D₃ on bone gamma-carboxyglutamic acid-containing protein in serum and bone in vitamin D-deficient rats. *Calcif Tissue Int* 1987;40:166-72
43. Lidor C, Atkin I, Onroy A, Dekel S, Edelstein S. Healing of rachitic lesions in chicks by 24R,25-dihydroxycholecalciferol administered locally into bone. *J Bone Miner Res* 1987;2:91-8
44. St-Arnaud R. Targeted inactivation of vitamin D hydroxylases in mice. *Bone* 1999;25:127-9
45. ST-Arnaud R, Arabian A, Glorieux FH. Abnormal bone development in mice deficient for the vitamin D 24-hydroxylase gene. *J Bone Miner Res* 1996;11:S126
46. Seo EG, Einhorn TA, Norman AW. 24R,25-dihydroxyvitamin D₃: an essential vitamin D₃ metabolite for both normal bone integrity and healing of tibial fracture in chicks. *Endocrinol* 1997;138:3864-72
47. Seo EG, Norman AW. Three-fold induction of renal 25-hydroxyvitamin D₃-24-hydroxylase activity and increased serum 24,25-dihydroxyvitamin D₃ levels are correlated with the healing process after chick tibial fracture. *J Bone Miner Res* 1997;12:598-606
48. Matsumoto T, Ezawa I, Morita K, Kawanobe Y, Ogata E. Effect of vitamin D metabolites on bone metabolism in a rat model of postmenopausal osteoporosis. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 1985; 31 (Suppl):S61-5
49. Kato A, Seo EG, Einhorn TA, Bishop JE, Norman AW. Studies on 24R,25-dihydroxyvitamin D₃: evidence for a nonnuclear membrane receptor in the chick tibial fracture-healing callus. *Bone* 1998;23:141-6
50. Reddi HA. Bone and cartilage differentiation. *Curr Opin Genetics Develop* 1994;4:737-44
51. Sela J, Schwartz Z, Weinberg H. Changes in the distribution of extracellular matrix vesicles during healing of rat tibial bone (computerized morphometry and electron microscopy). *Bone* 1987;8:245-50
52. Dean DD, Schwartz Z, Muniz OS, Gomez R, Swain LD, Howell DS, Boyan BD. Matrix vesicles are enriched in metalloproteinases that degrade proteoglycans. *Calcif Tissue Int* 1992;50:342-9

53. Wulthier Re, Gore ST. Partition of inorganic ions and phospholipids in isolated cell, membrane and matrix vesicle fractions: Evidence for Ca-Pi-acidic phospholipid complexes. *calcif Tissue Res* 1977;24:163-71
54. Boyan BD, Dean DD, Sylvia VL, Schwartz Z. Cartilage and Vitamin D: Genomic and nongenomic regulation by 1,25-(OH)₂D₃ and 24,25-(OH)₂D₃. In: Feldman D, Glorieux FH, Pike JW, editors. *Vitamin D* San Diego, CA: Academic Press, 1977. pp.395-421
55. Boyan BD, Sylvia VL, Dean DD, Schwartz Z. 24,25-(OH)₂D₃ regulates cartilage and bone via autocrine and endocrine mechanisms. *Steroids* 2001;66:363-74
56. Dean DD, Boyan BD, Schwartz Z, Muniz OE, Carreno MR, Maeda S, Howell DS. Effect of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ and 24R,25-dihydroxyvitamin D₃ on Metalloproteinase activity and cell maturation in growth plate cartilage in vivo. *Endocrine* 2001;14:311-23
57. Howell DS, Pita JC, Alvarez J. Possible role of extracellular matrix vesicles in initial healing of rachitic cartilage. *Fed Proc* 1976;35:122-6
58. Norman AW, Okamura WH, Bishop JE, Henry HL. Update on biological actions of 1,25(OH)₂-vitamin D₃ (rapid effects) and 24R,25(OH)₂-vitamin D₃. *Moll Cell Endocrinol*, 2002; 197(1-2) 1-13
59. Sylvia VL, Schwartz Z, Schuman L, Morgan RT, Mackey S, Gomez R, Boyan BD. Maturation-dependent regulation of protein kinase C activity by vitamin D₃ metabolites in chondrocyte cultures. *J Cell Physiol* 1993;157:271-8
60. Schwartz Z, Sylvia VL, Del Toro F, Hardin RR, Dean DD, boyan BD. 24R,25-(OH)₂D₃ mediates its membrane receptor-dependent effects on protein kinase C and alkaline phosphatase via phospholipase A₂ and cyclooxygenase-1 (cox-1) but not cox-2 in growth plate chondrocytes. *J Cell Physiol* 2000;182:390-401
61. Schwartz Z, Swain LD, Kelly DW, Brooks BP, Boyan BD. Regulation of prostaglandin E₂ production by vitamin D metabolites in growth zone chondrocyte cultures is dependent on cell maturation. *Bone* 1992;13:395-401
62. Exton JH, Taylor SJ, Augert G, Bocckino SB. Cell signalling through phospholipid breakdown. *Molec Cell Biochem* 1991;104:81-6
63. Schwartz Z, Langston GG, Swain LD, Boyan BD. Inhibition of 1,25-(OH)₂D₃- and 24,25-(OH)₂D₃-dependent stimulation of alkaline phosphatase activity by A23187 suggests a role for calcium in the mechanism of vitamin D regulation of chondrocyte cultures. *J Bone Miner Res* 1991;6:709-18
64. Uiterlinden AG. *Genetics and Genomics of Osteoporosis*. European Calcified Tissues Society. 1999
65. Eriksen EF. *Osteoporosis Pathogenesis*. European Calcified Tissue Society. 2001
66. Deppert W, Haug M, Steinmeyer T, Modulation of p53 Protein Expression during Cellular Transformation with Simian Virus 40. *Mol Cell Biology* 1987;7:4453-63
67. Harris SA, Enger RJ, Riggs BL, Spelsberg TC. Development and Characterization of a conditionally Immortalized Human Fetal Osteoblastic Cell Line. 1995;10:178-86
68. Robbins JR, Thomas B, Tan L, Choy B, Arbiser JL, Berenbaum F, Goldring MB. Immortalized Human Adult Articular Chondrocytes Maintain Cartilage-specific Phenotype and responses to Interleukin-1 β . 2000;43:2189-2201
69. Awumey EM, Mitra DA, Hollis BW, Kumar R, Bell NH. Vitamin D metabolism is altered in Asian Indians in the southern United States: a clinical research center study. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998;83:169-73.

70. Schuit SC, Van der Klift M, Weel AE, De Laet CE, Burger H, Seeman E, Hofman A, Uitterlinden AG, van Leeuwen JP, Pols HA Fracture incidence and association with bone mineral density in elderly men and women: the Rotterdam Study. *Bone* 2004;34:195–202

Bedanken möchte ich mich bei PD Dr. rer. nat. Norbert Schütze für seine kompetente, zuverlässige und geduldige Begleitung. Ich Danke Jutta Müller und Jutta Schneiderei die gerade in der Anfangsphase, als die Pipette noch nicht so gut in der Hand lag, ein offenes Ohr und Zeit für meine Probleme hatten. Vielen Dank auch an Holger Staab für das gute Miteinander im Labor und auf der Strasse.

Herzlichen Dank an alle die mich bei dieser Arbeit unterstützt haben!

Lebenslauf

Olaf Pöppelmeier

Geburtsdatum: 01. 11. 1975

Geburtsort: Oldenburg (Oldb.), Deutschland

Familienstand: ledig

Schulbildung:

1981 – 1985: Grundschule auf der Wunderburg in Oldenburg

1986 – 1990: Vincent Massey Public School in Ottawa, Kanada

1990 – 1992: Hillcrest Highschool in Ottawa, Kanada

1992 – 1995: Cäcilienschule in Oldenburg

Zivildienst:

September 1995 – Dezember 1996 im Rettungsdienst bei der Johanniter
Unfallhilfe Oldenburg mit Ausbildung zum Rettungssanitäter

Studium:

1997-2004: Studium der Humanmedizin an der Bayerischen Julius-
Maximilians-Universität Würzburg

2003 – 2004: Praktisches Jahr

Innere Medizin: Medizinische Universitätsklinik Würzburg,

Urologie: Urologische Klinik der Universität Würzburg,

Chirurgie: King Edward Hospital, Nelson Mandela School of Medicine,
Durban, Südafrika

Oktober 2004: Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Ärztliche Tätigkeiten:

Seit dem 01.01.2005 Tätigkeit als Assistenzarzt in der Klinik für
Orthopädische Chirurgie und Unfallchirurgie im Klinikum Bamberg

Bamberg, den 20.12.2006

Olaf Pöppelmeier